

. 综 述 .

间充质干细胞来源外泌体在脑缺血再灌注损伤中神经保护作用的研究进展

韩 硕 王君玉 卢成寅 侯立军

【摘要】 脑卒中是导致我国成年人残疾、死亡的首位原因,其中 80% 以上的脑卒中为缺血性脑卒中。缺血再灌注损伤是导致缺血性脑卒中病人残疾、死亡的常见原因。目前,针对缺血再灌注损伤的临床药物主要包括自由基清除剂、钙离子拮抗剂和兴奋性氨基酸拮抗剂等,疗效不理想。近年来,越来越多的研究者开始尝试应用干细胞治疗,但动物实验发现移植的干细胞在脑内存活率较低,很少有干细胞能分化为神经元。令人意外的是,研究发现干细胞可以通过旁分泌外泌体发挥神经保护作用。但天然外泌体靶向能力差,目前已经研发的工程性外泌体针对神经细胞具有主动靶向能力。本文对间充质干细胞来源外泌体在脑缺血再灌注损伤中的神经作用研究进展作一综述。

【关键词】 缺血性脑卒中;缺血再灌注损伤;间充质干细胞;外泌体

【文章编号】 1009-153X(2024)03-0177-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743

Research progress of neuroprotective effect of exosomes derived from mesenchymal stem cells on cerebral ischemia-reperfusion injury

HAN Shuo, WANG Jun-yu, LU Cheng-yin, HOU Li-jun. Department of Neurosurgery, Shanghai Changzheng Hoapital, Shanghai 200003, China

【Abstract】 Stroke is the leading cause of disability and death among adults in China, with more than 80% of strokes being ischemic strokes. Cerebral ischemia-reperfusion injury is a common cause of disability and death in patients with ischemic strokes. Currently, the clinical drugs targeting cerebral ischemia-reperfusion injury mainly include free radical scavengers, calcium ion antagonists, and excitatory amino acid antagonists, with unsatisfactory effects. In recent years, more and more researchers have begun to try using stem cells for treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury, but animal experiments have found that the survival rate of transplanted stem cells in the brain is low, and very few stem cells can differentiate into neurons. Surprisingly, studies have found that stem cells can exert neuroprotective effect through paracrine exosomes. However, natural exosomes have poor targeting ability, and engineered exosomes with active targeting ability to neural cells have been developed. This review summarizes the progress in the neuroprotective effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on cerebral ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 Ischemic stroke; Ischemia-reperfusion injury; Mesenchymal stem cells; Exosomes

脑卒中是导致我国成年人残疾、死亡的首位原因,其中缺血性脑卒中占 80% 以上^[1]。目前,针对缺血性脑卒中后再灌注损伤的临床药物主要包括自由基清除剂依达拉奉、钙离子拮抗剂尼莫地平和兴奋性氨基酸拮抗剂苦参碱等,疗效不理想。近年来,越来越多的研究者开始尝试应用干细胞治疗脑缺血再灌注损伤,但动物实验发现缺血再灌注损伤后移植

的干细胞在脑内存活率较低,很少有干细胞能分化为神经元^[2]。令人意外的是,动物运动功能却能在干细胞治疗后得到明显改善,后来发现干细胞可以通过旁分泌外泌体发挥神经保护作用^[3]。干细胞来源外泌体是干细胞内溶酶体微粒内陷形成的小囊泡,经囊泡外体膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中,直径在 30~150 nm。目前,研究发现外泌体内含物包括 41 860 种蛋白质,2 838 种 microRNA 和 3 408 种 mRNA,其中多种内含物已被证实作为信号分子传递给其他细胞,并在缺血再灌注损伤中发挥神经保护作用^[4]。本文就干细胞来源外泌体在脑缺血再灌注损伤治疗中神经保护作用的研究进展作一综述。

1 治疗缺血性脑卒中的干细胞种类

根据发育潜能,被用于治疗缺血性脑卒中的干

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2024.03.012

基金项目:国家自然科学基金(81671206),上海市科委国际科技合作项目(09410705100, 14430721300),军队“十二五”重点课题(BWS12J025)

作者单位:200003 上海,上海长征医院神经外科(韩 硕、王君玉、卢成寅、侯立军)

通信作者:侯立军,Email:lijunhousmmu@yahoo.com

细胞可分为三类:第一类为全能干细胞,培养难度较大,其中只有胚胎干细胞开展了少量外泌体研究^[5];第二类为多能干细胞,其中间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是目前研究最多的、用于治疗脑缺血再灌注损伤的干细胞,主要是骨髓 MSCs、脂肪 MSCs 和脐带血 MSCs^[6],其中骨髓 MSCs 于 2020 年被我国药监局药品审评中心许可作为缺血性脑卒中的一款干细胞新药开始进行临床试验(受理号 JXSL1900126)^[7, 8],脂肪 MSCs 和脐带血 MSCs 来源外泌体虽然取样困难,研究相对较少,也被证实可以促进神经再生及抑制炎症反应^[9-11];第三类为专能干细胞,研究最多的是神经干细胞,其分泌的外泌体注射入大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型后,证实可增加大鼠神经元树突分支数量及抑制脑组织炎症反应^[12],美国正在进行一项 1 期临床试验(NCT03629275),通过将神经干细胞来源外泌体注入脑卒中病人大脑受损区,观察缺血性脑卒中后持续残疾病人的手臂或腿部功能,随访 2 年未见免疫排斥相关的副作用^[13]。

2 干细胞来源外泌体对脑缺血再灌注损伤的保护作用

2.1 促进血管再生 干细胞来源外泌体可以通过调节血管内皮生长因子以及血管生成素的表达,促使缺血再灌注损伤后新生血管从原有血管上分支出来,增加损伤区域大脑血供。Xin 等^[14]将 MSCs 来源外泌体溶于磷酸盐缓冲生理盐水注射入 MCAO 大鼠体内,28 d 后检查发现新生血管内皮细胞数量相比仅注射生理盐水组明显增多,提示干细胞来源外泌体能够促进血管重塑。Yang 等^[15]向 MCAO 大鼠注射补阳还伍汤预处理 MSCs 来源外泌体,相比注射未经过预处理的 MSCs 来源外泌体,促血管生成分子 miRNA-126 表达水平明显升高,而抗血管生成分子 miRNA-221 和 miRNA-222 表达水平下降,脑内血管密度明显增加。这为干细胞治疗脑卒中提供了一个新思路,即可以通过药物预处理干细胞来源外泌体,提高治疗效果。

2.2 增加神经元可塑性 缺血再灌注损伤后神经元的可塑性代表大脑的修复能力,其强弱与脑内其他细胞(如星形胶质细胞和小胶质细胞等)的变化也有关。MSCs 来源外泌体可以通过脑源性神经营养因子增强缺血再灌注损伤后大脑可塑性,同时还可以提高神经元的可塑性,促进神经胶质细胞功能恢复^[16]。Rui 等^[17]通过骨髓 MSCs 来源外泌体运输 Axin2

基因激活 Wnt 通路,可以增加大鼠突触数量,并逆转缺血损伤引起的磷酸化神经丝和突触素丢失,从而减轻轴突损伤。因此,干细胞帮助大脑修复可能是通过促进突触再生和避免轴突损伤两方面发挥作用。Yang 等^[18]分别建立大鼠和猴 MCAO 模型,24 h 后注射干细胞来源外泌体运输 circSCMH1,从而与 MeCP2 结合增加下游基因(Mobp、Fxyd1 和 Prodh)表达,提高神经可塑性,并使动物运动功能明显改善。这提示外泌体可以在发病 24 h 后发挥作用,延长了现在的治疗时间窗。

2.3 抑制细胞凋亡 缺血半暗带中许多神经元在再灌注损伤后都会通过线粒体内部途径发生凋亡,而干细胞来源外泌体可以通过活化细胞外信号调节激酶,抑制缺血再灌注损伤的神经元凋亡。Tian 等^[19]利用精氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、D 型苯丙氨酸、赖氨酸组成的环肽(cRGD)修饰骨髓 MSCs 来源外泌体,从而靶向到达脑缺血再灌注损伤区,有效抑制炎症反应和细胞凋亡。Zhang 等^[12]利用促炎因子干扰素 γ 诱导神经干细胞产生的外泌体,在体外可促进细胞增殖,减少凋亡,较普通外泌体表现出更好的疗效。

2.4 减少氧化应激损伤 干细胞来源外泌体中超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶可分解四氯化碳和过氧化氢,并调节 PINK、DJ1 等线粒体相关基因表达,显著减少炎症因子(诱导型一氧化氮合酶、肿瘤坏死因子)、氧化应激标志物(非吞噬细胞氧化酶 1/2、氧化蛋白)和炎症细胞活化标志物(CD11、胶质纤维酸性蛋白)的表达水平,减少神经细胞受到的氧化应激损伤。有研究发现过表达 miR-30d-5p 的脂肪 MSCs 的外泌体能降低肿瘤坏死因子- α 和诱导型一氧化氮合成酶的表达水平,增加抗炎细胞因子(白细胞介素 4 和白细胞介素 10)的表达,通过抑制炎症反应减少脑损伤^[20]。

2.5 减少梗死面积 外泌体可以传递 mRNA、microRNA 和蛋白质到特定部位抑制缺血区细胞凋亡,比如膜联蛋白 42、肌动蛋白 β 和肌丝蛋白等;还可通过内吞和分裂重塑损伤细胞,减少梗死面积。Xin 等^[21]发现 MCAO 后注射富含 miR-17-92 簇的外泌体,大鼠梗死面积相对缩小,肢体运动功能明显改善。Nalamolu 等^[22]体外共培养正常 MSCs 和氧糖剥夺后复氧的 MSCs,提取其外泌体并注射入 MCAO 大鼠体内,与注射正常 MSCs 来源外泌体相比,梗死面积减少更明显。这提示将干细胞置于缺血再灌注环境下预处理,其释放的内容物治疗效果更佳。

3 工程化外泌体

虽然很多研究证实外泌体可以越过血脑屏障,但天然外泌体会被快速清除或聚集在网状内皮系统的器官,如肝脏,因此实现干细胞来源外泌体的靶向功能,需要基因工程和化学修饰对外泌体进行改造。最经典的工程化外泌体方案是在脂质双层结构基础上添加脑靶向肽,比如最常用的狂犬病病毒糖蛋白,从而选择性靶向神经元细胞和脑内皮细胞的烟碱乙酰胆碱受体^[23]。另一种常用的脑靶向肽是cRGD,通过整合素 $\alpha v\beta 3$ 与脑血管内皮细胞结合,随着脑缺血时整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达水平升高,更容易进入神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞^[24]。目前工程化干细胞来源外泌体主要有两种修饰策略:第一种最常用即将脑靶向肽与外泌体膜定位蛋白Lamp2b融合表达,瞬时转染Lamp2b-脑靶向肽质粒以构建稳转细胞株,分离获得脑靶向肽表面修饰的外泌体^[25];第二种是先分离干细胞来源外泌体,再合成硬脂酰-脑靶向肽插入外泌体磷脂双分子层^[26]。总之,工程化改造后的外泌体可以作为靶向缺血性脑损伤的递送载体,并且能够被快速和大规模生产。

4 总结和展望

与干细胞治疗相比,干细胞来源外泌体不仅作为脂质结合的纳米级囊泡更容易透过血脑屏障,而且膜结合蛋白较少不易被免疫细胞识别。但目前研究仍处于起步阶段,有许多问题需要解决,比如如何去除内含物中炎性因子等有害物和如何根据半衰期确定给药频次等。随着干细胞来源外泌体研究的不断深入,必将为脑缺血再灌注损伤带来新的希望。

【利益冲突声明】:本文不存在任何利益冲突。
【作者贡献声明】:韩硕负责论文写作和修改;王君玉、卢成寅查阅资料、修改论文;侯立军负责论文指导。

【参考文献】

[1] FESKE SK. Ischemic stroke [J]. Am J Med, 2021, 134(12): 1457-1464.
[2] YOON EJ, CHOI Y, KIM TM, *et al.* The Neuroprotective effects of exosomes derived from TSG101-overexpressing human neural stem cells in a stroke model [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9532.
[3] HUANG R, CHENG T, LAI X. Mechanism of ischemic brain injury

repair by endothelial progenitor cell-derived exosomes [J]. Mol Med Rep, 2022, 26(2): 157-164.
[4] TAO H, LI L, DONG L, *et al.* Growth differentiation factor 7 pretreatment enhances the therapeutic capacity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells against cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chem Biol Interact, 2023, 386(2): 110779-110785.
[5] XIA Y, HU G, CHEN Y, *et al.* Embryonic stem cell derived small extracellular vesicles modulate regulatory T cells to protect against ischemic stroke [J]. ACS Nano, 2021, 15(4): 7370-7385.
[6] YANG T, JIANG N, HAN H, *et al.* Bibliometric analysis of stem cells in ischemic stroke (2001-2022): trends, hotspots and prospects [J]. Int J Med Sci, 2024, 21(1): 151-168.
[7] MARKOWSKA A, KOZIOROWSKI D, SZLUFIK S. Microglia and stem cells for ischemic stroke treatment- mechanisms, current status, and therapeutic challenges [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2023, 28(10): 269-274.
[8] LIU X, ZHANG M, LIU H, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury-induced neuroinflammation and pyroptosis by modulating microglia M1/M2 phenotypes [J]. Exp Neurol, 2021, 341: 113700-113708.
[9] HUANG W, FAN Y, JIANG C, *et al.* Marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes upregulate astrocytic glutamate transporter-1 expression via mir-124/mTOR pathway against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury [J]. J Integr Neurosci, 2023, 22(6): 144-148.
[10] WASEEM A, SAUDAMIN I, HAQUE R, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes: shaping the next era of stroke treatment [J]. Neuroprotection, 2023, 1(2): 99-116.
[11] WU Q, WU JH, YE ZY, *et al.* Exosomes from hypoxia-treated mesenchymal stem cells: promoting neuroprotection in ischemic stroke through miR-214-3p/PTEN mechanism [J]. Mol Neurobiol, 2024, 1(2): 780-792.
[12] ZHANG G, ZHU Z, WANG H, *et al.* Exosomes derived from human neural stem cells stimulated by interferon gamma improve therapeutic ability in ischemic stroke model [J]. J Adv Res, 2020, 24: 435-445.
[13] KALLADKA D, SINDEN J, POLLOCK K, *et al.* Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study [J]. Lancet, 2016, 388(10046): 787-796.
[14] XIN H, LI Y, CUI Y, *et al.* Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats [J]. J Cereb Blood

Flow Metab, 2013, 33(11): 1711–1715.

[15] YANG J, GAO F, ZHANG Y, *et al.* Buyang huanwu decoction (BYHWD) enhances angiogenic effect of mesenchymal stem cell by upregulating VEGF expression after focal cerebral ischemia [J]. J Mol Neurosci, 2015, 56(4): 898–906.

[16] ZHOU X, DENG X, LIU M, *et al.* Intranasal delivery of BDNF-loaded small extracellular vesicles for cerebral ischemia therapy [J]. J Control Release, 2023, 357(5): 1–19.

[17] WEI R, ZHANG L, HU W, *et al.* Zeb2/Axin2-enriched BMSC-derived exosomes promote post-stroke functional recovery by enhancing neurogenesis and neural plasticity [J]. J Mol Neurosci, 2022, 72(1): 69–81.

[18] YANG L, HAN B, ZHANG Z, *et al.* Extracellular vesicle-mediated delivery of circular RNA SCMH1 promotes functional recovery in rodent and nonhuman primate ischemic stroke models [J]. Circulation, 2020, 142(6): 556–574.

[19] TIAN T, ZHANG HX, HE CP, *et al.* Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy [J]. Biomaterials, 2018, 150(8): 137–149.

[20] JIANG M, WANG H, JIN M, *et al.* Exosomes from MiR-30d-5p-ADSCs reverse acute ischemic stroke-induced, autophagy-mediated brain injury by promoting M2 microglial/macrophage polarization [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(2): 864–878.

[21] XIN H, KATAKOWSKI M, WANG F, *et al.* MicroRNA cluster miR-17-92 Cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats [J]. Stroke, 2017, 48(3): 747–753.

[22] NALAMOLU KR, VENKATESH I, MOHANDASS A, *et al.* Exosomes secreted by the cocultures of normal and oxygen-glucose-deprived stem cells improve post-stroke outcome [J]. Neuromolecular Med, 2019, 21(4): 529–539.

[23] AHMED W, KUNIYAN MS, JAWED AM, *et al.* Engineered extracellular vesicles for drug delivery in therapy of stroke [J]. Pharmaceutics, 2023, 15(9): 2173–2179.

[24] KHAN H, PAN JJ, LI Y, *et al.* Native and bioengineered exosomes for ischemic stroke therapy [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9(5): 619565–619570.

[25] ALEHOSSEIN P, TAHERI M, TAYEFEH GHahremani P, *et al.* Transplantation of exercise-induced extracellular vesicles as a promising therapeutic approach in ischemic stroke [J]. Transl Stroke Res, 2023, 14(2): 211–237.

[26] LI P, YIN R, CHEN Y, *et al.* Engineered extracellular vesicles for ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies [J]. J Nanobiotechnol, 2023, 21(1): 396–343.

(2022–10–18 收稿, 2024–03–03 修回)

(上接第 150 页)

【参考文献】

[1] KAWAMATA T, KATAYAMA Y. Cerebral contusion: a role model for lesion progression [J]. Prog Brain Res, 2007, 161: 235–241.

[2] MINO M, FUJIMURA M, YOSHIDA M, *et al.* Application of neuroendoscopic target aspiration of the necrotic core for cerebral contusion with delayed progression: technical note [J]. Acta Neurochir (Wien), 2019, 161(2): 225–230.

[3] OH HJ, HWANG SC. Supraorbital endoscopic evacuation for traumatic intracerebral hematomas in the frontal lobe [J]. J Korean Neurosurg Soc, 2022, 65(6): 846–852.

[4] REISCH R, PERNECZKY A. Ten-year experience with the supraorbital subfrontal approach through an eyebrow skin incision [J]. Neurosurgery, 2005, 57(4 Suppl): ONS 242–255.

[5] WILSON DA, DUONG H, TEO C, *et al.* The supraorbital endoscopic approach for tumors [J]. World Neurosurg, 2014, 82(6 Suppl): S72–80.

[6] QIU BH, XU SX, FANG LX, *et al.* Surgical strategies for neurological function preservation in severe brain contusion [J]. Turk Neurosurg, 2012, 22(3): 329–335.

[7] TURRENTINE FE, WANG HK, SIMPSON VB, *et al.* Surgical risk factors, morbidity, and mortality in elderly patients [J]. J Am Coll Surg, 2006, 203(6): 865–877.

[8] MONK TG, SAINI V, WELDON BC, *et al.* Anesthetic management and one-year mortality after noncardiac surgery [J]. Anesth Analg, 2005, 100(1): 4–10.

[9] STUSS DT. Traumatic brain injury: relation to executive dysfunction and the frontal lobes [J]. Curr Opin Neurol, 2011, 24(6): 584–589.

[10] LI YQ, YANG RX, LI ZH, *et al.* Surgical evacuation of spontaneous supratentorial lobar intracerebral hemorrhage: comparison of safety and efficacy of stereotactic aspiration, endoscopic surgery, and craniotomy [J]. World Neurosurg, 2017, 105: 332–340.

[11] ALAHMADI H, VACHHRAJANI S, CUSIMANO MD, *et al.* The natural history of brain contusion: an analysis of radiological and clinical progression [J]. J Neurosurg, 2010, 112(5): 1139–1145.

(2023–05–06 收稿, 2023–12–25 修回)