doi:10.11659/jjssx.03E021092

·综 述·

外泌体诱导干细胞分化的研究进展

张水勤[1],肖雁冰[2] (1.遵义医科大学研究生学院,贵州 遵义 563000;2.遵义医科大学附属妇幼保健院妇产科,贵州 遵义 563000)

[摘 要] 体外干细胞定向诱导分化方法中,共培养及转化因子诱导均可使干细胞定向分化,但在干细胞定向分化微环境中真正起到诱导分化的关键物质尚未明确。越来越多的研究表明,细胞来源的外泌体在细胞间通讯中表现出独特的功能,其在加快组织的修复,促进细胞的增殖、迁移及调控细胞生理功能等方面都具有显著作用。本文结合国内外研究现状,就外泌体诱导干细胞定向分化进行综述,从宏观上进一步探索诱导干细胞定向分化物质的基础,为体外细胞的定向诱导提供新的思路。

[关键词] 干细胞;外泌体;间充质干细胞;细胞分化;诱导分化;器官移植;无细胞疗法

[中图分类号] Q813.5 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-03-23

Research progress of exosome mediated stem cell differentiation

ZHANG Shui-qin[1],XIAO Yan-bing[2] (1.Graduate School,Zunyi Medical University,Zunyi Guizhou 563000,China;2.Department of Obstetrics and Gynecology,Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to Zunyi Medical University,Zunyi Guizhou 563000,China)

Objective: Among the in vitro stem cell directional differentiation method,co-culture and transforming factor induction both can make stem cells directional differentiation. While the key substances that can actually induce differentiation in the microenvironment of the directional differentiation of stem cells have not been clarified. More and more studies have shown that cell-derived exosomes have unique function in intercellular communication,which plays a significant role in accelerating tissue repair,promoting cell proliferation and migration,and regulating cell physiological functions and so on. This paper reviewed the research status of the exosome induced directional differentiation of stem cells at home and abroad,in order to further explore the basis of the substances that induced the directional differentiation of stem cells on the macro level,and provide new ideas for directional induction of cells in vitro.

Keywords: stem cells; exosomes; mesenchymal stem cells; cell differentiation; induced differentiation; organ transplantation; cell-free therapy

除转基因诱导及外源性诱导因子诱导干细胞分化外,与成熟体细胞共培养同样可以诱导干细胞定向分化为目的细胞[1],但诱导分化的机制尚未完全明确。有研究显示,干细胞显著的再生能力是由于其外泌体是组织修复过程中活跃的参与者[2]。目前,临床上器官功能损伤的患者可以通过药物、手术及器官移植等手段治疗,但都无法彻底根治,并且常伴随一系列相关并发症。鉴于传统疗法的局限性,生物再生替代疗法已成为目前器官功能损伤治疗的研究热点。已有研究证明,外泌体可以在不需要任何生长因子或刺激物的情况下诱导细胞定向分化[3]。以干细胞分化为目的细胞的替代疗法可为退变及损伤组织或器官的修复再生提供足量且稳定的细胞来源,使维持原有的生物力学功能、逆转组织损伤、功能退化成为了可能。

1 外泌体的来源、结构、种类及作用

细胞在特定外环境下产生的一些以膜为基础结构的细胞外囊泡,又被称为细胞外小泡。细胞外囊泡分为三类:第一类是凋亡小体,直径 5 ~ 50 nm;第二类为微泡、外小体、微粒或质膜衍生小泡,直径 50 ~ 1 000 nm;第三类也是最重要的一种,分泌型细胞外小泡,直径 50 ~ 150 nm,又被称作外泌体,是细胞间通讯传递物质的新发现[4]。细胞内特异性的核酸、蛋白质及其他生物活性分子根据细胞内外环境选择性地加载到外泌体中,并在全身循环。研究表明,外泌体在多种生物过程中发挥着通讯作用,例如细胞通讯、干细胞分化、器官再生等,是细胞间相互作用的一种新方式[5-6]。外泌体通过特定配体锚定在不同类型的细胞表面改变细胞间通讯,包括生物的发生、负载物的选择、细胞的特异性摄取、抗原呈递、免疫调节和药物有效载荷传递[6],提示外泌体是细胞间信号传导的重要参与者,其功能及特征与起源细胞的生理功能及胞内含有的特异性物质有关[7-8]。

[基金项目] 国家自然科学资金项目(81660293);遵义市创新人才团队培养项目(遵市科人才【2018】10 号)

[通信作者] 肖雁冰,E-mail:273140954@qq.com

2 外泌体在生物医学及组织修复中的作用

2.1 外泌体诱导干细胞在神经再生与修复中的作用

Takeda 等[9]发现,神经细胞分泌的外泌体可诱导间充质干细胞(mesenchyma stem cell,MSC)分化为神经细胞,且分化后的 MSC 高表达神经标志物微管相关蛋白,这个复杂的过程由外部和固有信号共同驱动,这些信号最终决定了神经细胞的类型和数量,而外泌体中的 miRNA 可能是 MSC 向神经元分化的机制。外泌体可能通过膜融合或内吞的方式将能够重新编码多种细胞机制的 miRNA 导入受体细胞中,从而有助于向星形细胞谱系的诱导[10]。事实上,外泌体运输的许多蛋白和 miRNA 都反映了其起源细胞的性质。此外,Ma 等[11]揭示了外泌体中部分 miRNA 的特征,证明 miR-21a在神经元生成和介导外泌体神经源性潜力中有关键作用。

2.2 外泌体诱导干细胞在髓核再生与修复中的作用

2006 年,Richardson 等[12]将髓核细胞与骨髓间充质干细胞直接共培养后,骨髓间充质干细胞可表现出髓核细胞表型。近年来有研究发现,用荧光染料标记的髓核细胞外泌体与骨髓间充质干细胞直接共培养,可观察到髓核细胞外泌体以内吞的方式被骨髓间充质干细胞摄取,骨髓间充质干细胞向髓核细胞分化,并且分化能力强于细胞间接共培养[13]。蓝蔚仁[3]的研究发现,敲减部分 Rab27a 蛋白的髓核细胞,其外泌体的释放明显减少,骨髓间充质干细胞向髓核细胞分化明显受到抑制,证明外泌体是诱导骨髓间充质干细胞向髓核细胞分化的重要物质之一。此外,髓核细胞经骨髓间充质干细胞分泌的外泌体处理后出现明显增殖,通过定量检测骨髓间充质干细胞外泌体刺激后的髓核细胞发现,髓核细胞内与椎间盘细胞外基质丢失、退变密切相关的基质金属蛋白酶-1、基质金属蛋白酶-3 表达均下降,而其抑制物蛋白表达呈升高趋势,从而促进髓核细胞的增殖,延缓椎间盘组织的退化[14]。此外,在动物实验中也发现,骨髓间充质干细胞来源的外泌体可通过抑制炎性介质及 NLRP3 等炎性小体的活性从而在髓核细胞中发挥抗炎作用,还可阻止椎间盘的退行性变[15]。以上研究为体外获取更多的髓核细胞提供了更为简单的方法,同时也为椎间盘病变的治疗提供了全新的方向。

2.3 外泌体诱导干细胞在骨再生与修复中的作用

Chen 等[16]将脂肪干细胞和软骨细胞共培养后发现,脂肪干细胞具有新生软骨形成的能力,可降低X 型胶原蛋白和肿瘤坏死因子-α 的表达,并且还能改善新生软骨的凋亡和纤维化等问题。进一步研究发现,附载于聚乙烯亚胺支架上的外泌体改善了骨整合过程中的矿化作用,且诱导人牙周膜干细胞向骨分化[3]。一项动物实验研究发现,与用 PBS 处理的软骨病灶相比,胚胎干细胞衍生的外泌体治疗骨缺损具有独特的作用,其可使软骨病灶完全恢复为类似于天然组织的软骨和软骨下骨[17],证明外泌体在软骨修复中有重要的作用。此外,在探索含 MSC 外泌体的丝素蛋白 3D 支架促进大鼠颅骨缺损区的骨再生实验中,骨髓间充质干细胞在附有外泌体的 3D 支架上培养 14 d 后,其相关促成骨基因 ALP、RUNX2 及 OCN 的表达均上调,说明骨髓间充质干细胞的成骨分化受到支架上的外泌体的调控,并且主要发生在成骨分化后期[18-19]。外泌体显示出其通过转移生物成分改变细胞间通讯的能力,也进一步证明外泌体功能与外泌体来源细胞密切相关。

2.4 外泌体诱导干细胞在牙再生与修复中的作用

目前,牙周疾病的治疗主要是修复和重建牙及牙周组织的结构和功能完整性。有研究发现,在病变牙周围移植骨髓间充质干细胞后,肿瘤坏死因子-α 和白细胞介素-1β 明显下调,破骨细胞数量减少,牙槽骨病变明显逆转,说明骨髓间充质干细胞除可抑制牙周炎症反应外,还可以促进牙周组织的再生[20]。Wang 等[21]的研究发现,人乳牙脱落细胞的外泌体可促进牙周膜干细胞的成骨分化,原因可能是外泌体携带的 Wnt3a 和 BMP2 抑制了 BMP/Smad 和 Wnt/β-catenin信号通路,显著增强成骨分化。Mohammed 等[22]发现,脂肪间充质干细胞的外泌体在大鼠实验性牙周炎的辅助治疗中,可促进新牙周组织的生成,说明 BMC 分泌的外泌体确实具有促进牙周组织再生的潜力。将人牙周干细胞与骨髓间充质干细胞外泌体在体外共培养可发现,牙周组织再生和成骨分化可能是由于骨髓间充质干细胞外泌体通过 OPG-RANKL-RANK 信号通路调节破骨细胞的功能,并影响巨噬细胞极化和白细胞介素-1β 表达,从而调节炎症性免疫反应,抑制牙周炎的发展和牙周组织的免疫损伤[23]。还有实验发现,脂多糖预处理牙囊细胞的外泌体后能促进牙囊细胞的增殖、迁移,形成完整的牙周组织,伴随外泌体浓度的增加,牙囊细胞增殖、迁移速度加快,最终达到饱和状态[24]。这为未来以新型材料为支架、以外泌体为载体诱导细胞定向分化提供了思路。

3 外泌体诱导干细胞在肿瘤发生、发展中的作用

与健康个体相比,癌症患者中可以检测到更多、更频繁的外泌体指导细胞的分子通讯[9,25]。这种由外泌体指导的相互作用在肿瘤形成、进展、免疫逃逸、转移

及血管生成和耐药性中具有促进作用[26]。CD99 有助于抑制肿瘤的发生和分化,沉默 CD99 的尤文氏肉瘤细胞的外泌体通过 miR-34a 抑制 Notch-NF-κB 诱导促进尤文氏肉瘤细胞的神经分化,减少细胞的增殖和迁移,进而诱导分化程度更高的恶性表型[27-28]。人肝癌 HepG2 细胞源性外泌体与脂肪间充质干细胞共培养,其可诱导脂肪间充质干细胞向癌相关肌成纤维细胞分化,同时也能显著促进细胞增殖[26],进一步提高肿瘤的侵袭力。也有研究发现,胶质瘤细胞与星形胶质细胞共孵育时,两种细胞相互促进生长,甚至部分星形胶质细胞表达致瘤表型[29],原因可能在于外泌体起源于 C6 胶质瘤细胞,外泌体的功能与细胞来源密切相关。

4 外泌体在机体代谢中的作用

人体心血管疾病、糖尿病、脂肪肝、骨质疏松症、气道疾病、退行性疾病(包括痴呆症)和某些癌症,被认为在很大程度上是由肥胖引起的胰岛素抵抗导致。脂肪组织外泌体在能量平衡和代谢中有重要作用。脂联素是一种多效性器官保护蛋白,其通过与 T-钙黏蛋白结合被内吞入细胞,从而刺激外泌体的生物合成和释放[30-31],导致细胞神经酰胺(一种与胰岛素抵抗、细胞死亡、炎症和动脉粥样硬化有关的鞘脂)的减少,过量的神经酰胺可引起胰岛素抵抗和心血管疾病相关临床表现[32]。一项动物实验研究发现,脂肪组织巨噬细胞衍生的外泌体可影响小鼠的胰岛素敏感性,当给予瘦小鼠肥胖小鼠脂肪组织巨噬细胞的外泌体时,可引起其葡萄糖不耐受和胰岛素抵抗;而瘦小鼠脂肪组织巨噬细胞的外泌体则改善了肥胖小鼠的葡萄糖不耐受和胰岛素抵抗,其可能是外泌体内 microRNAs(如 miR-155)的变化对调节胰岛素敏感性和葡萄糖稳态有重要作用[33]。脂联素如何通过外泌体提高胰岛素敏感性和心脏功能,以及进一步应用于临床治疗还有待进一步研究。

5 展望

目前,临床上目的细胞及特定器官在体内外的构建是现代再生医学及替代医疗的崭新方案。其中干细胞是一种具有强大自我更新和多向分化潜能的细胞,但由于免疫排斥、诱导效率低、稳定性较差及相关并发症问题限制了干细胞在临床上的广泛运用[34]。为了避免这些风险,体外目的细胞培养或无细胞诱导替代疗法有望成为一种有前途的策略。相关研究发现,干细胞疗法用于细胞及组织的再生修复,不仅是因为干细胞在损伤部位的增殖和分化,也可能是由旁分泌释放的外泌体发挥作用[2]。越来越多的研究表明,外泌体在各种生理系统中对伤口愈合和组织修复具有积极作用[35],且外泌体的生物学效应在很大程度上取决于供体细胞的来源和生理状态,与共培养相比,无细胞方法具有免疫原性低、靶向性强、效率高及易于使用等优势[5]。这引起了人们对在组织工程及再生医学中利用外泌体的兴趣,其中定型细胞分泌的外泌体可以诱导或触发增殖细胞的分化,为构建替代疗法打开了一条崭新的通路。考虑到磷脂双分子层外泌体的良好生物相容性和免疫亲和力等相关特性,可经过特定修饰并将有效载荷传递至靶细胞,因此外泌体经过改造后可以提供各种具有巨大治疗潜力的有效载荷,如小干扰 RNA、微小 RNA(miRNA/miR)和小分子干扰 RNA[36]。此外,外泌体作为“无细胞”疗法的介质,能够避免干细胞直接移植疗法的不良问题。但是,干细胞进入体内的方式也是需要解决的问题,经血循环注射干细胞后,其在体内的迁移路径和在各个器官中的分布难以追踪,虽然干细胞经血循环注入后表现出对创伤组织的“归巢现象”,但其归巢率往往较低,而未“归巢”的干细胞在人体内代谢的形式和归宿尚不清楚[37]。外泌体作为细胞分泌介质,其功能在很大程度上取决于亲代细胞的功能,且目前任何干细胞和成体细胞都能够实现外泌体的大规模生产,因此对干细胞的定向诱导可能会改变目前传统的细胞治疗的模式,推进组织或器官替代治疗的新进程,其代表了“无细胞”医学领域中的一种有前途的新方向,并可能为当下所面临的许多医学难题提供解决思路。

[参考文献]

[1] 王珊青,徐剑炜. 干细胞共培养的方法及其分化诱导[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(11):2122 - 2125. doi:10.3321/j.issn:1673 - 8225.2007.11.039.

[2] Abdik H,Avsar Abdik E,Hizli Deniz AA,et al. A novel virtue in stem cell research:exosomes and their role in differentiation[J]. Adv Exp Med Biol,2019,1144:133 - 146. doi:10.1007/5584_2019_339.

[3] 蓝蔚仁. 髓核细胞外泌体诱导骨髓间充质干细胞向髓核细胞分化的机制研究[D]. 重庆:陆军军医大学,2019.

[4] Trubiani O,Marconi GD,Pierdomenico SD,et al. Human oral stem cells,biomaterials and extracellular vesicles:a promising tool in bone tissue repair[J]. Int J Mol Sci,2019,20(20):4987. doi:10.3390/ijms20204987.

[5] Liu J,Wu F,Zhou H. Macrophage-derived exosomes in cancers:biogenesis,functions and therapeutic applications[J]. Immunol Lett,2020,227:102 - 108. doi:10.1016/j.imlet.2020.08.003.

[6] Kalluri R,LeBleu VS. The biology,function,and biomedical applications of exosomes[J]. Science,2020,367(6478):eaau6977. doi:10.1126/science.aau6977.

[7] Jadli AS,Ballasy N,Edalat P,et al. Inside (sight) of tiny communicator:exosome biogenesis,secretion,and uptake[J]. Mol Cell Biochem,2020,467(1 - 2):77 - 94. doi:10.1007/s11010 - 020 - 03703 - z.

[8] de Souza W,Barrias ES. Membrane-bound extracellular vesicles secreted by parasitic protozoa:cellular structures involved in the communication

between cells[J]. Parasitol Res,2020,119(7):2005 - 2023. doi:10.1007/s00436 - 020 - 06691 - 7.

[9] Takeda YS,Xu Q. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells using exosomes derived from differentiating neuronal cells[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135111. doi: 10. 1371/journal. pone. 0135111.

[10] Stronati E,Conti R,Cacci E,et al. Extracellular vesicle-induced differentiation of neural stem progenitor cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(15):3691. doi:10.3390/ijms20153691.

[11] Ma Y,Li C,Huang Y,et al. Exosomes released from neural progenitor cells and induced neural progenitor cells regulate neurogenesis through miR-21a[J]. Cell Commun Signal,2019,17(1):96. doi:10.1186/s12964 - 019 - 0418 - 3.

[12] Richardson SM,Walker RV,Parker S,et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation[J]. Stem Cells,2006,24(3):707 - 716. doi:10.1634/stemcells.2005 - 0205.

[13] Lan WR,Pan S,Li HY,et al. Inhibition of the Notch1 pathway promotes the effects of nucleus pulposus cell-derived exosomes on the differentiation of mesenchymal stem cells into nucleus pulposus-like cells in rats[J]. Stem Cells Int,2019:8404168. doi:10.1155/2019/8404168.

[14] 刘国科,林远方,郑晓斌,等.骨髓间充质干细胞通过其分泌的外泌体促进髓核细胞增殖的实验研究[J].湖南中医杂志,2019,35(4):146 - 148. doi:10.16808/j.cnki.issn1003 - 7705.2019.04.064.

[15] Xia C,Zeng Z,Fang B,et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration via anti-oxidant and anti-inflammatory effects[J]. Free Radic Biol Med,2019,143:1 - 15. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.026.

[16] Chen CH,Kuo CY,Chen JP. Effect of cyclic dynamic compressive loading on chondrocytes and adipose-derived stem cells co-cultured in highly elastic cryogel scaffolds[J]. Int J Mol Sci,2018,19(2):370. doi:10.3390/ijms19020370.

[17] Zhang S,Chu WC,Lai RC,et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration[J]. Osteoarthritis Cartilage,2016,24(12):2135 - 2140. doi:10.1016/j.joca.2016.06.022.

[18] Kim DK,Lee S,Kim M,et al. Exosome-coated silk fibroin 3D-scaffold for inducing osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. Chem Eng J,2021,406:127080. doi:10.1016/j.cej.2020.127080.

[19] Wang X,Omar O,Vazirisani F,et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes have altered microRNA profiles and induce osteogenic differentiation depending on the stage of differentiation[J]. PLoS One, 2018,13(2):e0193059. doi:10.1371/journal.pone.0193059.

[20] Lu L,Liu Y,Zhang X,et al. The therapeutic role of bone marrow stem cell local injection in rat experimental periodontitis[J]. J Oral Rehabil,2020,47(Suppl 1):73 - 82. doi:10.1111/joor.12843.

[21] Wang M,Li J,Ye Y,et al. SHED-derived conditioned exosomes enhance the osteogenic differentiation of PDLSCs via Wnt and BMP signaling in vitro[J]. Differentiation,2020,111:1 - 11. doi:10.1016/j.diff.2019.10.003.

[22] Mohammed E,Khalil E,Sabry D. Effect of adipose-derived stem cells and their EXO as adjunctive therapy to nonsurgical periodontal treatment:a histologic and histomorphometric study in rats[J]. Biomolecules,2018,8(4):167. doi:10.3390/biom8040167.

[23] Liu L,Guo S,Shi W,et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles promote periodontal regeneration[J]. Tissue Eng Part A,2020. doi:10.1089/ten.TEA.2020.0141.

[24] Shi W,Guo S,Liu L,et al. Small extracellular vesicles from lipopolysaccharide-preconditioned dental follicle cells promote periodontal regeneration in an inflammatory microenvironment[J]. ACS Biomater Sci Eng,2020,6(10):5797 - 5810. doi:10.1021/acsbiomaterials.0c00882.

[25] Melo SA,Luecke LB,Kahlert C,et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. Nature, 2015, 523(7559):177 - 182. doi:10.1038/nature14581.

[26] Meng W,Hao Y,He C,et al. Exosome-orchestrated hypoxic tumor microenvironment[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1):57. doi:10.1186/s12943 - 019 - 0982 - 6.

[27] De Feo A,Sciandra M,Ferracin M,et al. Exosomes from CD99-deprived Ewing sarcoma cells reverse tumor malignancy by inhibiting cell migration and promoting neural differentiation[J]. Cell Death Dis, 2019,10(7):471. doi:10.1038/s41419 - 019 - 1675 - 1.

[28] Ventura S,Aryee DN,Felicetti F,et al. CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-Notch-mediated control of NF-κB signaling[J]. Oncogene,2016,35(30):3944 - 3954. doi:10.1038/onc.2015.463.

[29] Oushy S,Hellwinkel JE,Wang M,et al. Glioblastoma multiforme-derived extracellular vesicles drive normal astrocytes towards a tumour-enhancing phenotype[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,2018,373(1737):20160477. doi:10.1098/rstb.2016.0477.

[30] Fang H,Judd RL. Adiponectin regulation and function[J]. Compr Physiol,2018,8(3):1031 - 1063. doi:10.1002/cphy.c170046.

[31] Obata Y,Kita S,Koyama Y,et al. Adiponectin/T-cadherin system enhances exosome biogenesis and decreases cellular ceramides by exosomal release[J]. JCI Insight,2018,3(8):e99680. doi:10.1172/jci.insight.99680.

[32] Kita S,Maeda N,Shimomura I. Interorgan communication by exosomes,adipose tissue,and adiponectin in metabolic syndrome[J]. J Clin Invest,2019,129(10):4041 - 4049. doi:10.1172/JCI129193.

[33] Ying W,Riopel M,Bandyopadhyay G,et al. Adipose tissue macrophage-derived exosomal miRNAs can modulate in vivo and in vitro insulin sensitivity[J]. Cell,2017,171(2):372 - 384. e12. doi:10.1016/j.cell.2017.08.035.

[34] Ortuño-Costela MDC,Cerrada V,García-López M,et al. The challenge of bringing iPSCs to the patient[J]. Int J Mol Sci,2019,20(24):6305. doi:10.3390/ijms20246305.

[35] Yin S,Ji C,Wu P,et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and exosomes:bioactive ways of tissue injury repair[J]. Am J Transl Res,2019,11(3):1230 - 1240.

[36] Barile L,Vassalli G. Exosomes:therapy delivery tools and biomarkers of diseases[J]. Pharmacol Ther,2017,174:63 - 78. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.020.

[37] 胡啸天,邓志钦,段 莉,等.间充质干细胞归巢效应的研究进展[J].生物骨科材料与临床研究,2020,17(5):53 - 57. doi:10.3969/j.issn.1672 - 5972.2020.05.012.

(编辑:龙小芬)