DOI:10.16016/j.2097-0927.202406020

VEGF 和 CD47 双修饰外泌体靶向递送治疗沙漠干热环境热射病急性肾损伤的作用及机制研究

韩小博[1],邓鑫凯[1],李 红[2],刘 超[3],高家威[1],李 啸[1],柴雅豪[1],韩小丽[4],韩红伟[5],赵胤杰[1],杨 曦[6],张 雷[1] 830000 乌鲁木齐,新疆军区总医院急诊医学科[1];400037 重庆,陆军军医大学第二附属医院生殖医学中心[2];100853 北京,解放军总医院肾内科[3];830000 乌鲁木齐,新疆军区总医院影像科[4];830000 乌鲁木齐,新疆军区总医院重症医学科[5];830000 乌鲁木齐,新疆军区总医院科研教学办公室[6]

[摘要] **目的** 设计一种基于外泌体高效递送的方式,将 VEGF 和 CD47 双修饰的外泌体递送到热射病引起的肾损伤,减轻并修复肾损伤。**方法** 构建靶向肾损伤的融合表达 VEGF 和 CD47 的质粒,转染至大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells,BMMSCs)后分离提取外泌体。通过透射电子显微镜及纳米颗粒跟踪分析、蛋白质印迹法等方法对外泌体进行鉴定。经大鼠尾静脉分别注射 200 μg DiD 标记的未修饰外泌体、VEGF 修饰的外泌体和 VEGF-CD47 双修饰的外泌体,采用小动物活体成像仪检测并分析外泌体对肾脏的靶向作用。60 只 SD 大鼠随机分 6 组每组 10 只,sham 组为空白对照组(A 组,$n=10$),其余各组均复制热射病肾损伤模型。模型复制成功后 12、24、36 h,B 组给予相同剂量生理盐水;C 组给予质粒空载体(Empty plasmids,Ep)组、D 组给予 Exos 组、E 组给予 $Exos^{VEGF}$ 组、F 组给予 $Exos^{VEGF\text{-}CD47}$ 组。于 3 次给药治疗后第 72 小时取肾脏组织和血:从组织水平观察肾组织病理变化并进行损伤评分;检测血清血尿素氮(BUN)、血清肌酐(Scr)评价治疗效果;WB 和 qRT-PCR 分析炎症介质 TNF-α、NF-κB 的表达水平;检测增殖调控信号分子 Ki67、FGF2、pAMPK、pERK 和纤维化调控分子 FGF23,综合分析对增殖和抑制纤维化的作用。**结果** 成功获取了 BMMSCs 和 $Exos^{VEGF\text{-}CD47}$ 并进行鉴定,急性肾损伤模型动物均复制成功。$Exos^{VEGF\text{-}CD47}$ 在活体肾组织中比 $Exos^{Ctrl}$ 组和 $Exos^{VEGF}$ 组的荧光强度高($P<0.05$)。治疗后 72 小时 $Exos^{VEGF\text{-}CD47}$ 组,肌酐、尿素氮下降($P<0.000\ 1$);$Exos^{VEGF\text{-}CD47}$ 组 Tubular casts score 评分显著低于 AKI+Exos 组、AKI+$Exos^{VEGF}$ 组($P<0.000\ 1$);促炎因子 TNF-α、NF-κB 蛋白水平明显下调($P<0.000\ 1$);而 Ki67、FGF2 显著上调($P<0.05$),FGF23 显著下调($P<0.000\ 1$)。**结论** VEGF 和 CD47 可以高效靶向热射病急性肾损伤,有效减轻损伤并促进修复,其机制可能与外泌体传递抑制肾组织炎症反应、促进增殖和抑制纤维化有关。

[关键词] 热射病;骨髓间充质干细胞;外泌体;VEGF;CD47;急性肾损伤

[中图法分类号] R594.11;R692.05;R977.6 [文献标志码] A

Effect and mechanism of targeted delivery of VEGF and CD47 dual-modifiedexosomes in treatment of acute kidney injury induced by heat stroke in rats in the desert dry hot environment.

HAN Xiaobo[1], DENG Xinkai[1], LI Hong[2], LIU Chao[3], GAO Jiawei[1], LI Xiao[1], CHAI Yahao, HAN Xiaoli[4], HAN Hongwei[5], ZHAO Yinjie[1], Yang Xi[6], ZHANG Lei[1] [1]Department of Emergency Medicine, [4]Department of Radiology, [5]Department of Critical Care Medicine, [6]Office of Scientific Research and Teaching Affairs, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 830000; [2]Center for Reproductive

[基金项目] 2020 年度新疆自治区面上项目(2020D01A139)

[通信作者] 张 雷, Email:zhanglei_xjjqzyy@163.com

杨 曦,yxx1984121@163.com.

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Medicine, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [3]Department of Nephrology, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China.

[**Abstract**] **Objective** To develop an effective method for delivering VEGF and CD47 double-modified exosomes to treat renal damage induced by heat stroke so as to reduce and repair renal damage. **Methods** A plasmid fusion-expressing VEGF and CD47 targeting renal injury was constructed, transfected into rat bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMMSCs), and then fusion-exosomes were isolated and extracted. Transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, and Western blotting were used to identify the obtained exosomes. Rats were intravenously injected with 200 μg of DiD-labeled unmodified exosomes, VEGF-modified exosomes and VEGF-CD47 double-modified exosomes, respectively, through the tail vein, and the effects of exosomes on the kidneys were detected and analyzed using a small animal *in vivo* imaging instrument. A total of 60 SD rats were randomly divided into 6 groups, with 10 rats in each group, that is, blank control group (group A), heat stroke-induced renal injury model receiving PBS in 12, 24 and 36 h after modelling (group B), empty plasmid group (group C), Exos group (group D), $Exos^{VEGF}$ group (group E) and $Exos^{VEGF\text{-}CD47}$. Kidney tissue and blood samples were collected in 72 h after 3 times of treatment. Pathological changes in kidney tissue were observed at the tissue level and the damage were scored. Changes in serum blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) levels were detected to evaluate the therapeutic effect. Western blotting and qRT-PCR were used to analyze the expression of the pro-inflammatory factors TNF-α and NF-κB, the proliferation regulatory signaling molecules Ki67, FGF2, pAMPK and pERK, and the fibrosis regulatory molecule FGF23, in order to comprehensively analyze the effects on proliferation and inhibition of fibrosis. **Results** BMMSCs and $Exos^{VEGF\text{-}CD47}$ were successfully isolated and characterized, and a rat model of acute kidney injury was effectively constructed. Higher fluorescence intensity was found in the kidney tissue of the $Exos^{VEGF\text{-}CD47}$ group than the Exos-Ctrl group and $Exos^{VEGF}$ group ($P<0.05$). In 72 h after treatment, the $Exos^{VEGF\text{-}CD47}$ group had significantly lower serum BUN and Scr levels ($P<0.0001$), and notably lower Tubular casts score ($P<0.0001$), decreased levels of pro-inflammatory factors TNF-α and NF-κB ($P<0.0001$), up-regulated Ki67 and FGF2 expression ($P<0.05$), and down-regulated FGF23 expression ($P<0.0001$) when compared with the AKI+Exos group and AKI+$Exos^{VEGF}$ group. **Conclusion** VEGF and CD47 show promise in targeting acute kidney injury induced by heat stroke, effectively mitigate damage and facilitate repair, which may be due to exosome-mediated inhibition of renal tissue inflammation, promotion of proliferation, and inhibition of fibrosis.

[**Key words**] heat stroke; bone marrow mesenchymal stem cells; exosme; VEGF; CD47; acute kidney injury

Supported by the General Project of Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2020D01A139). Corresponding author: ZHANG Lei, E-mail: zhanglei_xjjqzyy@163.com; Yang Xi, E-mail: yxx1984121@163.com

急性肾损伤(acute kidney injury,AKI)是常见的临床综合征,多种疾病可导致 AKI。其中热射病导致的 AKI 发病机制复杂,涉及多种因素,包括电解质紊乱与氧化应激损伤、高温直接毒性作用、凝血功能障碍、横纹肌溶解综合征,内毒素血症和全身炎症反应综合征等[1-2]。近些年来,随着全球气候变暖引起热射病相关的死亡人数逐年增高,往往与热射病识别延误有关。沙漠干热是导致热射病的特殊环境因素之一,其特征有别于热带湿热环境[3]。从 10 年临床病例分析发现热射病合并 AKI 明显增高死亡率,不仅是进展至慢性肾衰竭(chronic kidney disease, CKD)的独立危险因素,而且 AKI 是热射病治疗的“拐点”,早期识别和及时治疗对于改善患者的预后至关重要[4]。目前治疗主要以连续性肾脏替代治疗(continuous renal replacement therapy,CRRT)为主[5]。

近年来,研究显示间充质干细胞源性外泌体具有再生和修复特性,并可以作为药物载体治疗热相关损伤疾病是目前研究的热点,其携带 siRNA、miRNA、蛋白质等介导细胞间通信发挥重要作用[6-7],使它们能够同时参与各种治疗方法,这是传统小分子无法完成

的。但天然外泌体存在靶向性差的问题,利用靶向配体对外泌体进行表面修饰,可以帮助外泌体选择性递送到靶细胞,使外泌体在产量和靶向治疗方面达到标准,从而实现外泌体的精准治疗,加快外泌体的临床应用包括 AKI[8]。外泌体可以修饰为显示不同的抗体或表面受体,以将治疗有效分子或蛋白载荷转移到特定的器官、组织和细胞。热相关急性肾损伤主要是由近端小管上皮细胞对热损伤、缺血和炎症损伤非常敏感引起,但在轻度或中度损伤后依靠存活的近端小管上皮细胞去分化和再生可以实现一定程度的修复[9]。然而,持续或严重的热损伤、炎症瀑布样反应激活最终形成热射病特征性表现"类脓毒症"样反应,导致小管修复不完全,成为热射病急性肾损伤的病理基础。另一方面,微血管损伤、机体脱水、横纹肌溶解堵塞可引起小管周围毛细血管循环衰竭。小管损伤和微血管功能障碍造成的恶性循环进一步促进了形成 AKI,该恶性循环促进了 AKI 向 CKD 转化。有研究揭示 VEGF 在生理条件下分别是维持肾小球内皮和肾小管周围微血管完整性的重要促血管生成因子,尤其具有重塑脉管系统的潜在修复能力,为治疗 AKI 提供了可行的治疗策略[10]。既往研究 AKI 时,肾小管上皮细胞 VEGF 受体表达上调,可作为急性肾损伤评估病情的标志物[11],而且游离形式的 VEGF 往往不能够在损伤局部累积,外泌体等囊泡形式可以保证局部损伤修复所需要的浓度和信号通信。最新荟萃分析高质量研究也证实了 MSCs 来源的 Evs 经修饰后有治疗 AKI 的潜力[12-13]。KANELLIS 等[14]发现 VEGF 在肾小球细胞肾小管细胞的再分布,关系到急性肾损伤的转归,可能与 VEGF 受体配体结合引起的下游分子机制相关。ZHONG[15-16]通过外泌体载药外源补充 VEGF 逆转急性肾损伤是可行途径。因此,通过 VEGF 修饰外泌体靶向修复损伤阻断恶性循环可能是新的途径和思路。一直以来增加靶向性和沉积效率被认为是应用外泌体于临床治疗的瓶颈,多种靶点修饰成为趋势。CD47 是广泛表达于多种细胞表面的免疫球蛋白,其主要功能是通过与信号调节蛋白 α(SIRPα)结合来抑制巨噬细胞对细胞的吞噬作用,起到"不吃我"信号的作用,避免了靶向载药外泌体的消耗,从而进一步提高外泌体的稳定性和生物活性[17]。那么,在外泌体上表达 CD47 和 VEGF[18]是否可以提高肾脏靶向性和递送效率,并提供治疗性载药。在本研究中,我们建立了新疆干热环境热射病急性肾损伤大鼠模型[19],纯化表达 VEGF 和 CD47 的共修饰外泌体,达到治疗热射病损伤相关的 AKI,报道如下。

1 材料与方法

1.1 热射病肾损伤模型建立

所有动物研究均经中国人民解放军新疆军区总医院实验动物福利与伦理委员会批准,实验协议经过新疆医科大学的批准,遵守实验动物保护原则。雄性 Sprague-Dawley 大鼠 60 只(8~10 周龄;体质量 150~160 g),购自新疆医科大学实验动物中心[动物生产许可 SCXK(新)2023-0001]。将大鼠置于室温 22 ℃、湿度 35% 12 h/12 h 的光暗循环,自由取水和食物。

建立新疆干热环境热射病大鼠流程(参照已发表文章[4,20]和预实验):(1)根据随机数字表随机分为 6 组:sham 组(A 组,$n=10$)不进行处理、AKI 组(B 组,$n=10$)、AKI+质粒空载体组(C 组,$n=10$)、AKI+Exos 组(D 组,$n=10$)、AKI+$Exos^{VEGF}$ 组(E 组,$n=10$)、AKI+$Exos^{VEGF-CD47}$ 组(F 组,$n=10$)。(2)AKI 造模:进实验舱之前适应性训练大鼠跑步每天 10 min 20 m/min 运动量,持续训练 1 周,并给予 2 d 恢复期;进舱前收缩压测定:使用尾袖血压计测量每只大鼠 5 次取平均值,而后置于新疆特殊环境实验舱(42.63 ℃±1.00 ℃、湿度 10%±2%)下以 20 m/min 等速进行测试。每 10 分钟测量经直肠核心温度,大鼠不跑步时以 1 mA 电刺激,持续 2 h 为模型建立成功。

根据时间点从鼠尾取 600 μL 血用于检测,5 000 r/min 离心 5 min,小心丢弃上清,加入生理盐水 0.1 mL,摇匀。所有血样在 1 h 内分离,保存于-80 ℃。大鼠被解剖以获得肾脏。将一份肾皮质组织样本保存在-80 ℃的冰箱中,用于 RT-qPCR 和 Western blot 分析。另一个肾脏样本放置在 4%多聚甲醛中,用于 HE 染色、免疫组化。

1.2 大鼠骨髓间充质干细胞筛选和质粒的构建

大鼠骨髓间充质干细胞筛选:以颈椎脱臼法处死大鼠,用 75%乙醇浸泡。无菌状态下取出双侧股骨和胫骨,浸泡于无菌含双抗 PBS 溶液中。剔除股骨和胫骨周围的肌肉、结缔组织,用含双抗的 PBS 溶液清洗三遍。用眼科剪剪去股骨和胫骨的两端,暴露骨髓腔。用注射器以完全培养基反复冲洗骨髓腔直至骨头发白。收集骨髓液并离心,然后加入适当培养基(含 20%血清、双抗)接种于培养基皿中置于 37 ℃,5% CO_2,饱和湿度的细胞培养箱中培养。24~48 h 后去悬浮,接下来的每 3 天换液一次,传至 3 代用于转染质粒。流式细胞仪鉴定为 CD29、CD44、CD73、CD105 为阳性,CD34、CD45、CD11b 为阴性(<5%),诱导分化实验提示可以成骨、成软骨、成脂肪分化。

筛选纯化大鼠骨髓间充质干细胞并备用。质粒与

修饰外泌体由重庆康芮生物科技有限公司构建,将编码 VEGF、CD47 分别与 Lamp2b 的 cDNA 片段插入 pcDNA3.1 载体中人巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子的下游,同时在 Lamp2b 序列的末尾添加人流感血凝素(hemagglutinin, HA)标签,组装成 VEGF-Lamp2b-HA 质粒,CD47 质粒、融合表达 VEGF 和 CD47 的 VEGF-CD47-Lamp2b-HA 质粒。

1.3 $Exos^{VEGF-CD47}$ 外泌体的分离及鉴定

1.3.1 $Exos^{VEGF-CD47}$ 的收集与提取 将大鼠 BMSCs 细胞在 DMEM 完全培养基中培养至汇合度为 80%,用无血清 DMEM 培养基培养 48 h 后收集细胞上清。4 ℃ 2 000×*g* 离心 30 min 除去细胞及碎片; 0.22 μm 滤器过滤并收集过滤液;将过滤液 4 ℃ 100 000×*g* 离心 1 h 获得外泌体沉淀。将外泌体其重悬于 100 μL 的生理盐水-80 ℃中备用。经 BCA 法定量质粒后,分别取 200 μg 外泌体用生理盐水重悬并转移至 1.5 mL EP 管中。将质粒与 BMSCs 混匀后转移至预冷电转杯中,体系为 50 μL。使用日本 BEX 公司 CUY21 EDIT Ⅱ超级电转化仪设置电转参数(110 V,4 ms,循环次数 10,电阻 80 Ω 左右)并进行电穿孔,随后置于冰上 30 min 即可使用。收集细胞后提取 $Exos^{VEGF-CD47}$ 备用。

1.3.2 外泌体粒径分析和透射电子显微镜检测 送至新疆医科大学实验平台采用纳米颗粒跟踪分析(NTA, Particle-Metrix, GA)测量了纳米颗粒的大小和大小分布。透射电子显微镜观察外泌体形态分析(TEM, Hitachi, Japan)外泌体形态。首先吸取样品 10 μL 滴加于铜网上沉淀 1 min,用滤纸吸去浮液。取醋酸双氧铀 10 μL 滴加于铜网上沉淀 1 min,用滤纸吸去浮液。常温干燥数分钟,在 100 kV 下进行透射电子显微镜检测。

1.3.3 蛋白质印迹法检测外泌体标志物 采用蛋白质印迹法检测 大鼠骨髓间充质干细胞分泌的外泌体中 CD9、TSG101 及高尔基体标志物 GM130 的蛋白表达水平,以确定提取外泌体的纯度,同时检测外泌体表面 VEGF、CD47 和 Lamp2b 的蛋白表达水平。

1.4 外泌体体内靶向效率验证

将构建的新疆干热环境热射病大鼠随机分成 3 组(每组 10 只),分别将 200 μg 未修饰外泌体(Exos Ctrl 组)、VEGF 组和 VEGF-CD47 双修饰外泌体($Exos^{VEGF-CD47}$组)经 DiD 标记[DiD:外泌体-1∶300(体积比)]后,通过尾静脉注射进小鼠体内。在注射后 12、24、36 h 时使用美国 Perkin Elmer 公司 IVIS lumina Ⅱ小动物活体成像仪成像,并剥离小鼠肾脏进行成像,通过荧光强度分析外泌体在小鼠体内的分布情况及靶向情况。

1.5 外泌体治疗给药

sham 组为空白对照组(A 组,$n=10$),其余各组均复制热射病肾损伤模型,不做任何处理。模型复制成功后 12、24、36 h 以 10 μL/g 剂量尾静脉注射方式给药 1 次,B 组给予相同剂量生理盐水;C 组给予质粒空载体、D 组给予 Exos、E 组给予 $Exos^{VEGF}$、F 组给予 $Exos^{VEGF-CD47}$。

1.6 大鼠肾组织 HE 染色和免疫组织化分析及结果判定

实验组和对照组给予相应处理第 72 小时,取各组大鼠肾组织在 4%多聚甲醛的 PBS 中固定,包埋后连续切片(3 μm),随后进行 HE 染色、免疫组化染色。在双盲的条件下阅片,肾损伤病理评分(The injury score)评估如下:光镜下观察肾组织形态学改变,在 400 倍视野下连续观察,每只大鼠随机抽取 10 张切片评估,每张图像随机分为 100 个网格。每个网格的管状组织的半定量评估如下:0=正常组织;1=管状细胞肿胀、脱落或坏死、刷缘丢失、管型形成、管状细胞扩张、管状细胞萎缩、免疫细胞浸润。损伤评分是通过将每个图像的所有 100 个网格分数相加,然后取 10 个随机图像的平均值来计算的。

1.7 大鼠肾功能 ELISA 检测

在相应时间点 3%戊巴比妥麻醉大鼠,下腔静脉收集血液,3 000 r/min 离心 10 min,取血清后用酶联免疫吸附测定试剂盒(DY008, R&D Systems)测定血清 BUN、Cr、TNF-α 和 IL-6。

1.8 Western Blotting

利用 RIPA 缓冲液提取大鼠组织总蛋白质。测定蛋白质浓度后,用 12% SDS-PAGE 分离蛋白质,然后将其转移至 PVDF 膜。用 5%脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜,加一抗 NF-KB、Ki67、FGF2、FGF23、pAMPK、pERK、β-actin,室温孵育 1 h。洗膜后加二抗,室温孵育 1 h。洗膜后加入化学发光试剂。曝光显影后,读取蛋白质条带灰度值并统计学分析。

1.9 Real-Time PCR

用 Trizol(Sigma, USA)从肾脏匀浆组织中提取总 RNA。经 DNaseI 消化后,按照逆转录酶试剂盒(Applied Biosystems, USA)将 2 μg RNA 逆转录为 cDNA。采用 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Bioanalyzer, USA)在 260 nm 和 280 nm 处吸光度的比值来评价 cDNA 的质量,用 SYBR Green 特异性引物在 iCycler Thermal Cycler(Bio-Rad, USA)中进行 PCR 扩增。mRNA 的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算,内参基因为甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。

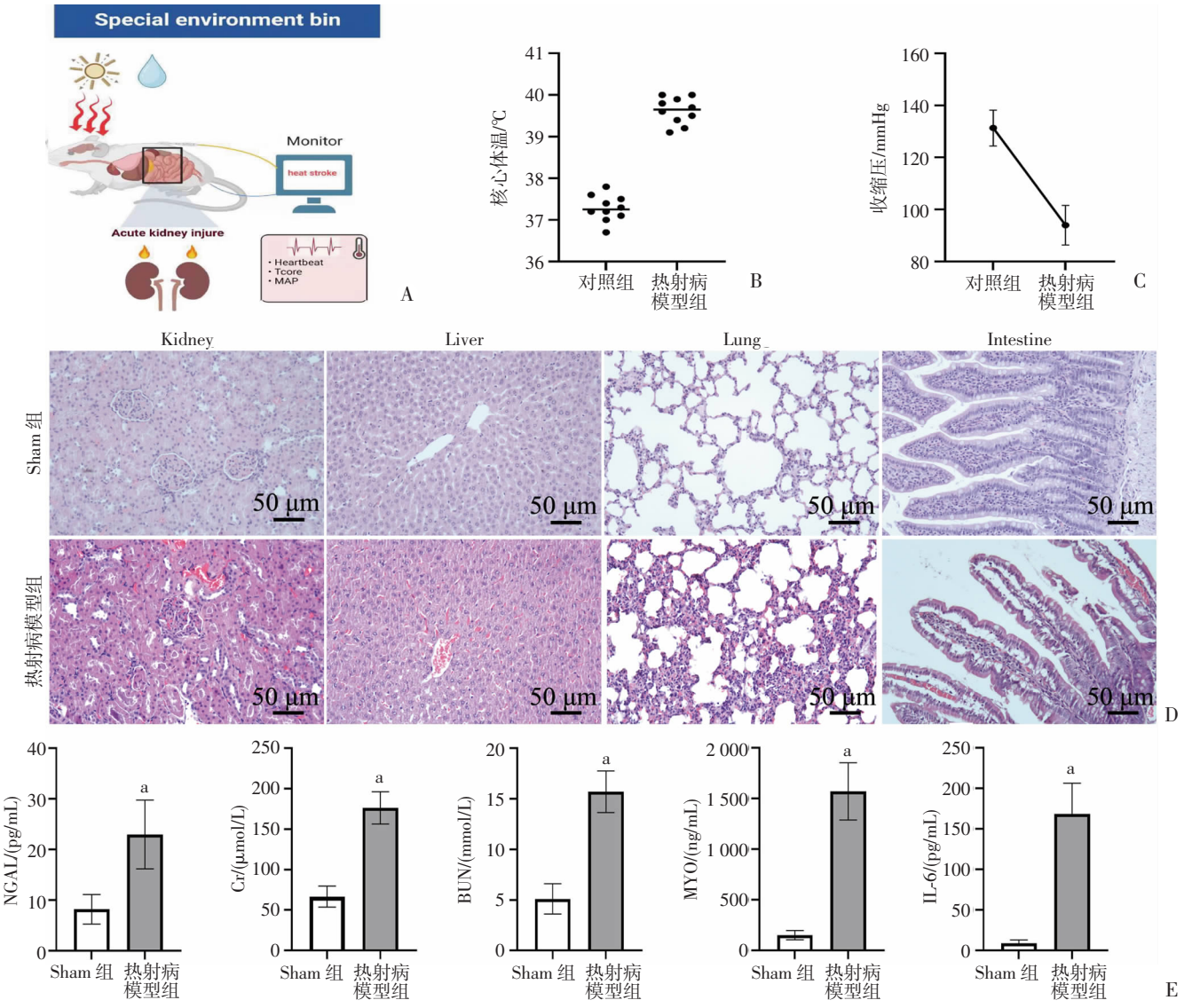
1.10 统计学处理

所有实验都使用 3 个生物重复。所有数据使用 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行统计分析和制图,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示。两组或多组间比较采用单因素方差分析和 Tukey 多组比较检验,对于两组正态分布的定量资料间比较采用 Student's t 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新疆干热环境热射病急性肾损伤模型建立

使用特殊环境舱模拟新疆干热环境(图 1A)构建的热射病大鼠核心体温均达到(40.38±0.25)℃(图 1B),表现出明显更快的心率,更低的收缩压 93.95±3.25) mmHg(图 1C)。此外,大鼠还出现了精神状态差、食欲不振、毛发凌乱、对外部刺激反应缓慢等临床症状。正常肾脏组织和热射病建模组比较,建模成功组肾小球和集合小管大量出血,小管上皮细胞肿胀,空泡变性,蛋白铸型;肝脏:肝细胞水肿、肝窦扩张充血;肺脏:肺充血、水肿,可见嗜酸性粒细胞浸润;肠道:固有层扩张充血,与上皮分离(图 1D)。根据肾脏疾病改善全球结局(KDIGO)标准,在 7 天内 Cr 升高比基线高 1.5 倍被诊断为 AKI[21-22]。大鼠血清生化检测显示(图 1E),热射病建模组中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、肌酸激酶(CK)、肌红蛋白(Myo)、IL-6 均超过正常上限,实验组与对照组有统计学意义($n=10$,$P<0.05$),提示模型建立成功。上述结果提示 EHS 致 AKI 大鼠模型成功建立。

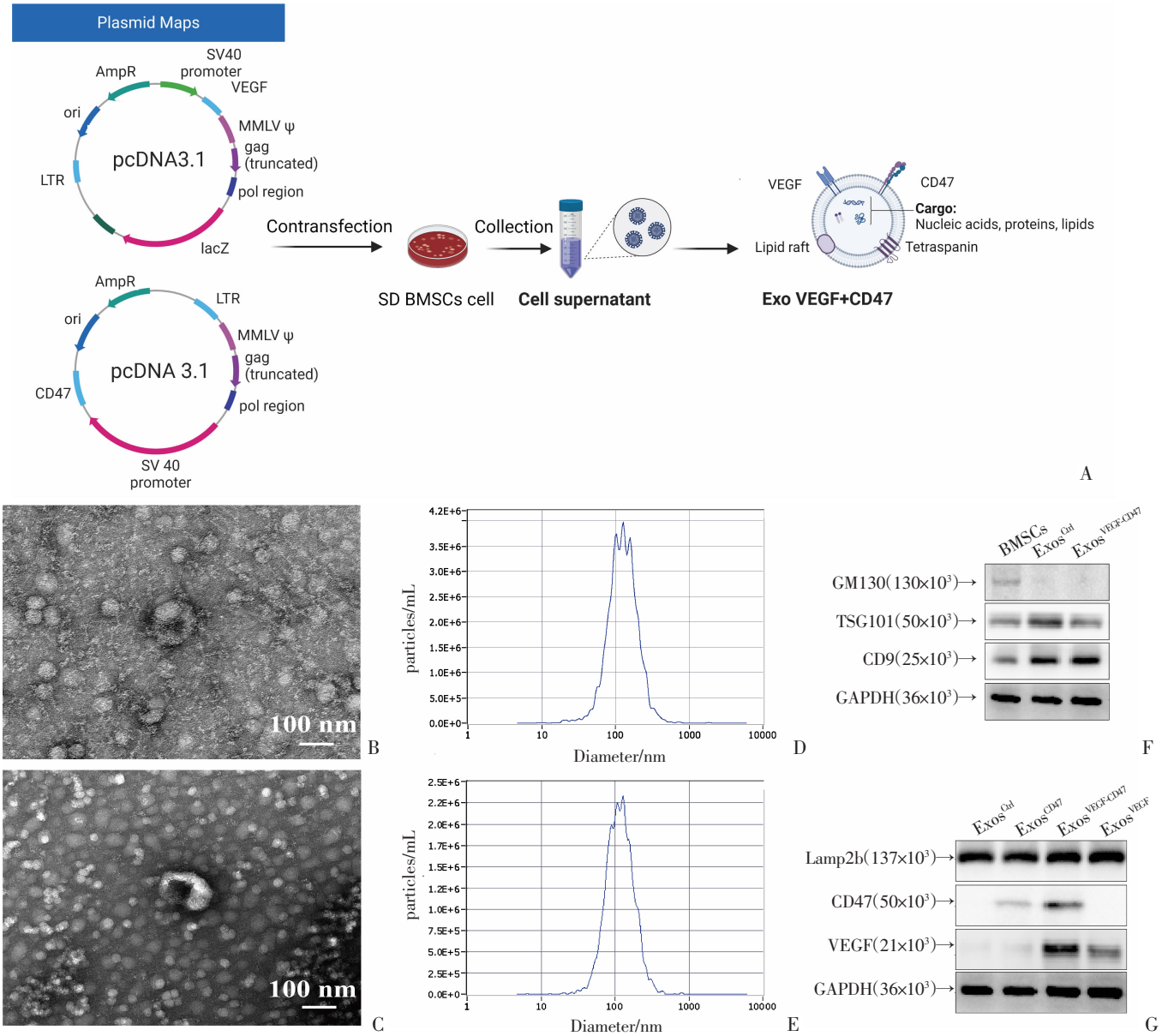


A:将实验动物置于新疆军区总医院特殊环境舱内,并定时经肛门监测核心体温(B)、收缩压(C);(D)对照组与实验组比较肾脏、肝脏、肺脏和小肠损伤 HE 染色情况;E:热射病模型大鼠 NGAL、Cr、BUN、MYO、IL-6 均较对照组升高,a:$P<0.05$,与 sham 组比较,$n=10$

图 1 热射病大鼠急性肾损伤模型的建立

2.2 VEGF 和 CD47 双修饰外泌体的鉴定

按照外泌体指南提取步骤提取外泌体[23]。将融合表达 VEGF 和 CD47 的质粒转染进大鼠骨髓间充质干细胞,48 h 后收集修饰外泌体(图 2A)。透射电子显微镜证实修饰不会影响外泌体的形态(图 2B,C),纳米粒径测量结果显示 VEGF 和 CD47 双修饰外泌体($Exos^{VEGF-CD47}$)与未修饰外泌体($Exos^{Ctrl}$)大小均匀,峰值在 120 nm 左右,大小没有显著差异(图 2D,E)。用蛋白质印迹法检测外泌体特征性标志物 TSG101、CD9 及高尔基体标志物 GM130 的表达水平,结果显示 VEGF 和 CD47 修饰未影响外泌体的标志物特征(图 2F)。通过蛋白质印迹法检测了外泌体表面 VEGF、CD47 和 Lamp2b 的表达水平,结果显示 $Exos^{Ctrl}$ 未明显表达 VEGF 和 CD47。修饰的外泌体($Exos^{CD47}$)、$Exos^{VEGF-CD47}$ 表面 CD47 表达增加,VEGF 修饰的外泌体($Exos^{VEGF}$)、$Exos^{VEGF-CD47}$ 表面 VEGF 的表达增加(图 2G)。



A:VEGF 和 CD47 双修饰外泌体的制备和分离示意图($Exos^{VEGF-CD47}$)。B/C:Tube 形态分析 ExosCtrl(B)和 $Exos^{VEGF-CD47}$(C)在透射电镜下的代表性图像。D/E:采用纳米颗粒跟踪分析方法测定未修饰外泌体($Exos^{Ctrl}$,D)和融合外泌体($Exos^{VEGF-CD47}$,E)的粒径。F:Western blotting 检测外泌体标记 CD9、TSG101 和高尔基体标记 GM130。G:Western blotting 检测 $Exos^{Ctrl}$、VEGF 修饰外泌体($Exos^{VEGF}$)、CD47 修饰外泌体($Exos^{CD47}$)和 $Exos^{VEGF-CD47}$ 上的 CD47、VEGF 和 Lamp2b 表达水平

图 2 $Exos^{VEGF-CD47}$ 分离、构建和鉴定

2.3 $Exos^{VEGF-CD47}$ 增强了外泌体对急性肾损伤组织的靶向作用

通过经尾静脉注射的方式给药注射 DiD 标记的 $Exos^{Ctrol}$、$Exos^{VEGF}$ 和 $Exos^{VEGF-CD47}$ 修饰的外泌体,通过小动物活体成像观察荧光强度。结果显示,相较于 $Exos^{Ctrl}$ 组和 $Exos^{VEGF}$ 组,$Exos^{VEGF-CD47}$ 在活体肾组织中的荧光强度最高(3.782±0.112 *vs* 0.641±0.071,3.782±0.112 *vs* 1.426±0.098,$P<0.05$,图 3A),在离体肾组织中富集度高(图 3B)。体内实验结果表明,VEGF-CD47 修饰增强了外泌体在肾组织的富集。

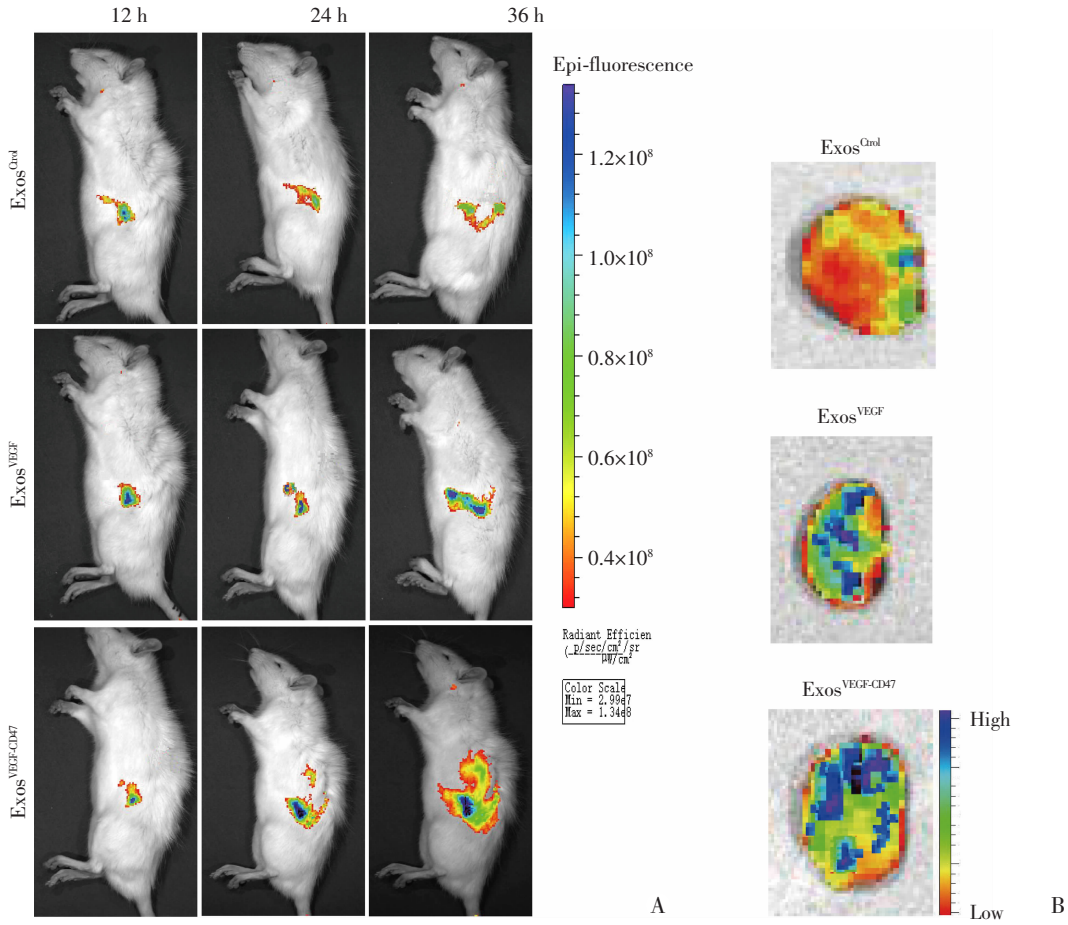
2.4 VEGF-CD47 双修外泌体改善新疆干热环境热射病相关急性肾损伤的肾功能

通过 ELISA 方法检测肌酐、尿素氮。血清尿素氮水平:AKI+盐水组与 AKI 组无统计学差异($P=0.469\ 1$);与 AKI 组相比,$Exos^{VEGF+CD47}$ 血清尿素氮明显下降($P<0.000\ 1$);$Exos^{VEGF}$ 组与 $Exos^{VEGF+CD47}$ 相比,$Exos^{VEGF+CD47}$ 降低更明显($P<0.000\ 1$)(图 4A)。血清肌酐水平:AKI+盐水组与 AKI 组无统计学差异($P=0.358\ 3$);与 AKI 组相比,$Exos^{VEGF+CD47}$ 组血清肌酐明显下降($P<0.000\ 1$);$Exos^{VEGF}$ 组与 $Exos^{VEGF+CD47}$ 相比,$Exos^{VEGF+CD47}$ 降低更明显($P=0.002\ 5$)(图 4B)。

2.5 ExosVEGF-CD47 抑制急性肾损伤肾小管炎症反应

免疫组化结果(图 5A)提示与 Sham 组相比较,AKI 未治疗组肾小管管型形成、周围血管扩张充血、炎性细胞浸润,并可见坏死;AKI+Ep 组与 AKI 组无明显变化;与 AKI + Exos 组、AKI + $Exos^{VEGF}$ 组相比,$Exos^{VEGF-CD47}$ 组管型减少,可见气球样变、肾小管周围扩张充血。

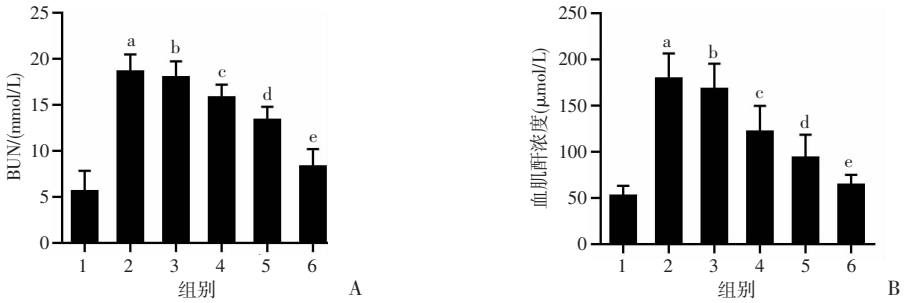
由于热射病类脓毒症样炎症反应是 AKI 引起组织损伤的主要机制之一,我们分析了 $Exos^{VEGF}$ 发挥抗炎作用的能力。与未处理的对照组相比,肾脏免疫组织化学染色显示,AKI 未治疗组的促炎细胞因子 TNF-α 及其下游效应因子 NF-κB 显著升高(图 5A)。图 5B Tubular casts score 提示 AKI+$Exos^{VEGF-CD47}$ 组评分显著低于 AKI+Exos 组、AKI+$Exos^{VEGF}$ 组,差异有统计学差异($P<0.000\ 1$)。



A:经颈动脉注射 DiD 标记的未修饰的 Exosmes(Exos Ctrl)、$Exos^{VEGF}$ 和 $Exos^{VEGF-CD47}$ 后 12 h、24 h 和 36 h 的 AKI 体内荧光图像;B:注射 DiD 标记的外泌体后离体肾脏的荧光图像

图 3 热射病大鼠急性肾损伤模型外泌体靶向能力

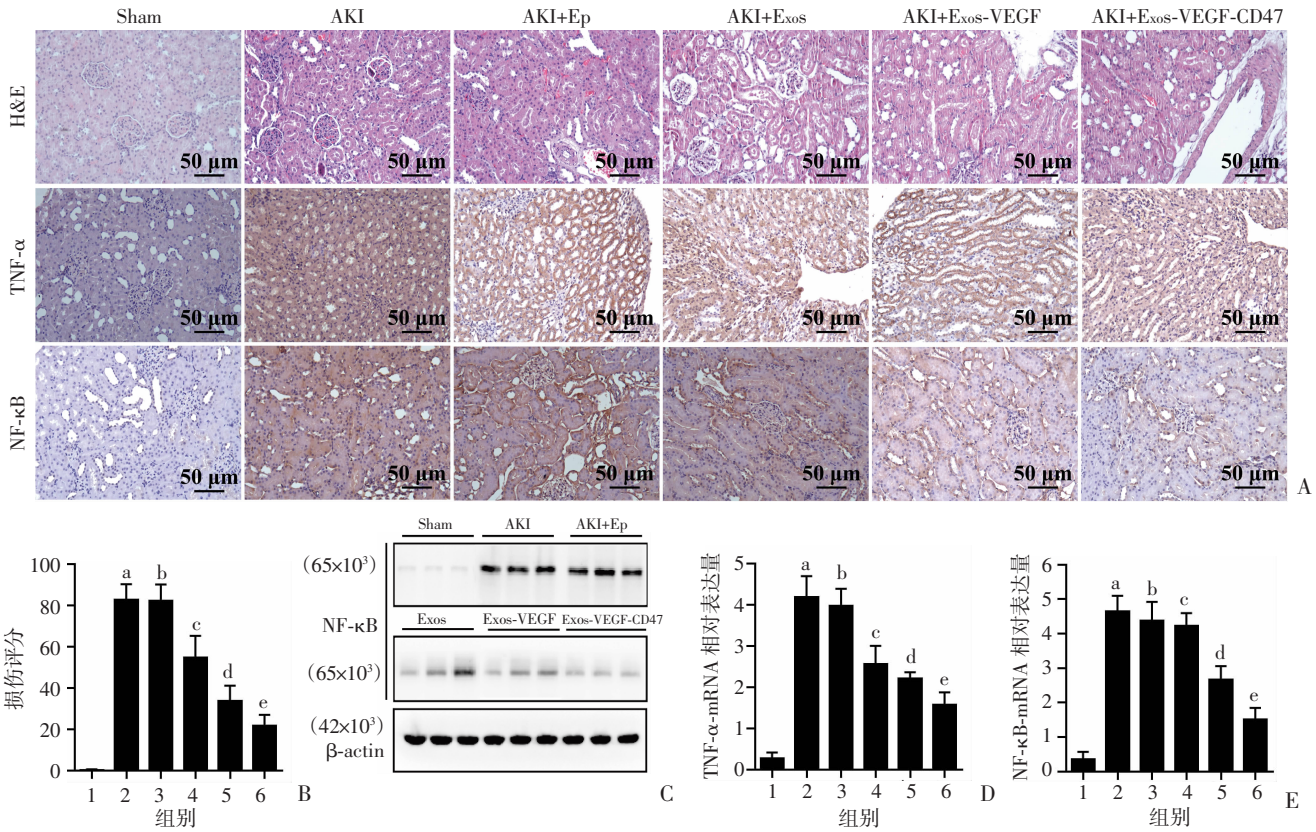
通过 Western blot 测定肾溶液中 NF-κB 的蛋白,与 AKI 组相比,AKI+Exos$^{VEGF-CD47}$ 组下游 NF-κB 蛋白相对表达下调(图 5C:1.48±0.38 *vs* 4.60±0.56,$P<0.000\ 1$)。qRT-PCR 检测发现 TNF-α 和 NF-κB mRNA 表达也出现了相似趋势:与 AKI 组相比,AKI+Exos$^{VEGF-CD47}$ 组血清促炎因子 TNF-α、NF-κB 水平显著下调($P<0.000\ 1$,图 5D 和 E)。



1:Sham;2:AKI;3:AKI+Ep;4:AKI+Exos;5:AKI+Exos^{VEGF};6:AKI+Exos$^{VEGF-CD47}$

A:a:$P=0.469\ 1$,$P>0.05$,与 AKI+Ep 组比较;b:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 相比;c:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 相比;d:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 组相比;e:$P<0.05$,与 AKI 组相比;B:a:$P=0.358\ 3$,$P>0.05$,与 AKI+Ep 组比较;b:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 相比;c:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 相比;d:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 组相比;e:$P<0.000\ 1$,与 AKI 组相比

图 4 ELISA 方法检测尿素氮水平(A),血肌酐水平(B)



1:Sham;2:AKI;3:AKI+Ep;4:AKI+Exos;5:AKI+Exos^{VEGF};6:AKI+Exos$^{VEGF-CD47}$

A:可见 Sham、AKI、AKI+Ep、AKI+Exos 组、AKI+Exos^{VEGF}、AKI+Exos$^{VEGF-CD47}$ 的 HE 染色,TNF-α 和 NF-κB 免疫组化染色;B:Tubular casts score 评估组织学差异,a:$P>0.05$,与 AKI+Ep 组比较;b:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 相比;c:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 相比;d:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 组相比;e:$P<0.000\ 1$,与 AKI 组相比;C:Western blot 分析 NF-κ 表达水平;D:PCR 分析 TNF-α 表达水平,a:$P>0.05$,与 AKI+Ep 组比较;b:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 相比;c:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 相比;d:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 组相比;e:$P<0.0001$,与 AKI 组相比;E:PCR 分析 NF-κ,a:$P>0.05$,与 AKI+Ep 组比较;b:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 相比;c:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 相比;d:$P<0.05$,与 Exos$^{VEGF-CD47}$ 组相比;e:$P<0.000\ 1$,与 AKI 组相比

图 5 Exos-VEGF-CD47 抑制急性肾损伤肾小管炎症反应

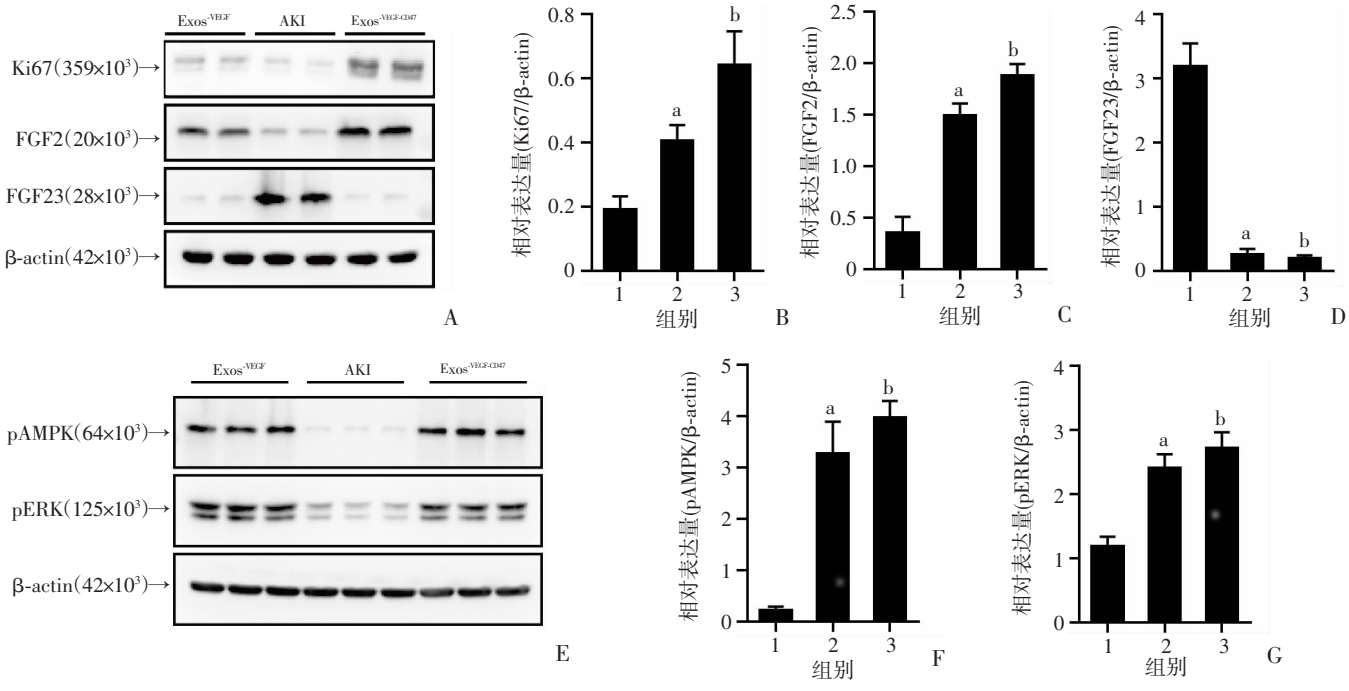
2.6 $Exos^{VEGF-CD47}$ 促进急性肾损伤后增殖修复

急性肾损伤主要因肾小管上皮细胞坏死、小管周围血管损伤,增加损伤修复是临床治疗好转的决定因素。为观察 $Exos^{VEGF}$ 促进热射病急性肾损伤后修复作用,从基因调控关键通路上证实损伤修复机制。WB 结果提示与 AKI 组相比 $Exos^{VEGF}$ 组和 $Exos^{VEGF-CD47}$ Ki67、FGF2 表达上调,而 FGF23 表达下调。从 Real-Time PCR 分析结果来看,与 AKI 组相比 $Exos^{VEGF-CD47}$ 上调了 Ki67(0.192±0.039 *vs* 0.641±0.104,$P<0.000\ 1$)和 FGF2(0.358±0.149 *vs* 1.880±0.110,$P<0.000\ 1$),下调了 FGF23(0.196±0.044 *vs* 3.189±0.353,$P<0.000\ 1$)。与 AKI+$Exos^{VEGF}$ 组相比,AKI+$Exos^{VEGF-CD47}$ 促进增殖相关信号更高,Ki67(0.406±0.047 *vs* 0.641±0.104,$P<0.000\ 1$);FGF2(1.493±0.113 *vs* 1.880±0.110,$P<0.000\ 1$),在激活纤维化信号方面,FGF23(0.196±0.044 *vs* 0.259±0.083,$P=0.050\ 8$)AKI+$Exos^{VEGF}$ 组与 AKI+$Exos^{VEGF-CD47}$ 组无统计学差异($P>0.05$),但较 AKI 明显升高有统计学差异($P<0.05$)(图 6A)。

为进一步明确关键调控增殖机制,使用 WB 证实在 AKI 组,对细胞再生和增殖关键信号通路调控因子 AMPK 和经典增殖途径 ERK 进行了 Western blot 分析和 PCR 分析。与 AKI 组相比,AKI+$Exos^{VEGF-CD47}$ 组 pAMPK 表达量均显著上调(3.972±0.323 *vs* 0.223±0.065,$P<0.000\ 1$)。与 AKI+$Exos^{VEGF}$ 组相比,AKI+$Exos^{VEGF-CD47}$ 组 pAMPK 相对表达量上调(3.972±0.323 *vs* 3.278±0.613,$P=0.0054$)。与 AKI 组相比,AKI+$Exos^{VEGF-CD47}$ 组 pERK 表达量均显著上调(2.715±0.247 *vs* 1.190±0.145,$P<0.000\ 1$)。与 AKI+$Exos^{VEGF}$ 组相比,$Exos^{VEGF-CD47}$ 组 pERK 相对表达量上调(2.715±0.214 *vs* 2.404±0.214,$P=0.007\ 6$)(图 6B)。

3 讨论

热射病可引起 AKI,并且使未来进展为慢性肾衰的风险增高。因此,建立贴近临床的动物模型用于热射病相关研究至关重要。LIU 等[24]用局部肌注甘油导致肌溶解和增加动物运动量的方法成功建立热射病大鼠模型。笔者认为热射病是系统性疾病,急性肾损伤在早期热损伤即出现。ZHOU 等[19-20]根据新疆特殊环境实验室成功建立新疆干热环境热射病肾损伤大鼠模型,本研究实验条件将舱内温度上升至 42.63 ℃±1.00 ℃维持 2 h,以 1 mA 电刺激在热环境下训练 65 min模拟劳力性热射病。该温度可以稳定复制热



1:AKI;2:AKI+$Exos^{VEGF}$;3:AKI+$Exos^{VEGF-CD47}$

A:Western blot 分析和 PCR 分析 Ki67、FGF2 和 FGF23 表达水平,(Ki67:a:$P<0.05$,与 AKI 组比较;b:$P<0.05$,与 $Exos^{VEGF}$ 相比;FGF2:a:$P<0.05$,与 AKI 组比较;b:$P<0.05$,与 $Exos^{VEGF}$ 相比;FGF23:a:$P<0.05$,与 AKI 组比较;b:$P=0.050\ 8$,与 $Exos^{VEGF}$ 相比);B:Western blot 分析和 PCR 分析 pAMPK、pERK 表达水平 pAMPK:a:$P<0.05$,与 AKI 组比较;b:$P<0.05$,与 $Exos^{VEGF}$ 相比;pERK:a:$P<0.05$,与 AKI 组比较;b:$P<0.05$,与 $Exos^{VEGF}$ 相比

图 6 Western blot 分析和 PCR 分析

射病急性肾损伤大鼠模型,该模型在本次实验中复制稳定,并且组织学评分均符合急性肾损伤模型,更贴近临床实践。

有研究认为新疆干热环境热射病休克、热损伤导致急性肾损伤更早[3,19]。热损伤加之热射病肌溶解损伤内皮细胞,而机体保护性措施是使损伤的内皮细胞增殖增加,肾血管与肾功能恢复重建密切相关,病理切片显示大部分器官内皮细胞损伤、炎症、广泛血栓形成和出血,血管内皮结构的破坏可导致各种肾脏疾病的发生和发展[25]。急性肾损伤往往是快速进展的转折点[20]。目前专家共识[26]提倡“十早一禁”即早做CRRT减轻肾脏损伤或延迟进展至急性肾损伤,但尚缺乏有效的药物治疗手段及递送方法。既往研究认为间充质干细胞作为修复组织损伤来源,通过归巢至受损部位和分泌调节分子。间充质干细胞损伤修复机制主要通过分泌外泌体进行损伤修复[23],囊泡包含的microRNA、蛋白质等有促分化、增殖、应激和免疫调节等功能[27],通过胞吐作用分泌来调节细胞功能或激活相关信号通路促进热射病急性肾损伤后修复。分离提纯干细胞和外泌体是本研究关键,分离的骨髓间充质干细胞 CD44、CD90、CD45 阳性,有向骨、软骨和脂肪等多向分化的潜能,与文献报道一致。

LIU 等[12]通过荟萃分析证实,外泌体治疗可以改善临床前啮齿动物 AKI 模型的肾功能和炎症反应状态、减少细胞凋亡,为人体临床试验提供了重要线索。目前发现外泌体中不仅含正向调节减轻肾损伤炎症、促修复的 microRNA-486-5p、miR-146a-5p、microRNA-21-5p 等,还有负向调节促进炎症和损伤的 microRNA-30a-5p、miRNA-19b-3p 等[28-29]。但随着外泌体研究的进展,其存在不均一性、靶器官沉积少、微血管首过效应、内容物多样性、容易被巨噬细胞吞噬等问题和技术瓶颈[23]。如何提高外泌体靶向性和沉积率以满足临床应用已成为研究的重要内容[30],通过外泌体表面修饰蛋白增加靶向性被证实成为新的方向。

急性肾损伤后足细胞和近端肾小管上皮细胞等实质细胞都会产生的 VEGF 减轻炎症、促进肾小球内皮和小管周围微血管增殖、减轻纤维化,但原位分泌量和质均存在不足,早期治疗不足可能导致后期慢性肾功能衰竭[15,31]。新的研究[15]也显示肾小管周围微血管内源性修复反应并不足。外源性补充大多以 VEGF 蛋白为主,由于其易降解、半衰期短、系统性毒性大、成本高等特点存在争议。外泌体携带[15] VEGF-A、VEGF-165[31]和 angiopoietin-1[32]可作为外泌体修饰蛋白增强靶向性。VEGF 是一种是血管生成重要的生长因子,肽段可以定位于外泌体膜表面增加受损肾组织器官沉积[33],通过受体和配体相结合启动下游信号转导。同时也可以通过激活 ERK 信号通路参与炎症反应。激活的 VEGFR 通过一系列的磷酸化事件,最终导致 MAPK/ERK1/2 的激活。这种激活不仅包括 ERK 蛋白的磷酸化,还涉及其核易位,即 ERK 进入细胞核并发挥其功能。进一步促进炎症因子的表达和释放,从而引发炎症反应。VEGF 在不同炎症反应中的具体作用机制是多方面的,既包括直接促进血管生成,也涉及通过调节免疫反应和细胞信号传导来间接影响炎症过程,例如炎症早期通过影响巨噬细胞的极化来调节免疫反应,减少与巨噬细胞的相互作用并可能减轻热射病早期的炎症反应[34]。而外泌体治疗的主要障碍是单核吞噬细胞系统(mononuclear phagocyte system,MPS),其吞噬作用限制了外泌体靶向治疗的临床应用。CD47 主要表达于循环造血干细胞、正常红细胞,也是一种跨膜分子,与巨噬细胞表面的 SIRPα 结合避免被吞噬。本实验通过 VEGF-CD47 双修饰外泌体作为骨髓间充质干细胞递送载体,活体动物成像显示肾脏沉积量增加,肾功能改善强于单独 VEGF 修饰外泌体,并且在降低炎症信号、促进增殖和降低纤维化信号方面优于其他组。提示二者相互协同既促进肾损伤修复,也降低早期炎症激活的作用,具体调节机制仍需要进一步证实。

KIM 等[35]用 pcdna-CTP-Lamp2b 共转染 HEK293 细胞,生成心脏靶向外泌体。Lamp-2b 最常用于与靶向细胞融合以实现肽修饰外泌体内吞,本实验构建质粒载体中应用 Lamp-2b[36],并通过电穿孔方式将构建质粒转染进入大鼠骨髓间充质干细胞,转染效率可达 80%~90%,完全满足实验要求。通过热射病急性肾损伤给药治疗发现,给药 3 次(建模后 12、24、36 h)72 h ExosVEGF-CD47 明显下调肾组织 TNF-α 和下游 NF-κB 水平。与 YUAN 等[37]阻断 ZBP1 降低 TNF-α 和下游 NF-κB 相符,从而减轻热损伤导致的细胞死亡。ExosVEGF-CD47 所携带调节相关分子是否与阻断 ZBP1 相关仍需进一步阐明。同样,ExosVEGF-CD47 组上调增殖相关信号通路蛋白 Ki67、FGF2,对肾毛细血管的结构和功能起着至关重要的作用。从肾脏病理 HE 染色、免疫组化染色以及肾功能来看有逆转作用。

但 $Exos^{VEGF-CD47}$ 下调了 FGF23,有学者研究证实 FGF23 主要通过与近端肾小管上皮细胞膜结合蛋白 Klotho 和成纤维细胞生长因子受体(FGFR)形成复合物来影响肾的钙磷平衡,从而促进慢性肾病相关的心肌肥厚和肾脏纤维化[38]。本研究发现 $Exos^{VEGF-CD47}$ 下调了 FGF23 可能抑制纤维化的作用,有效阻断了急性

肾损伤后的慢性进展。pAMPK 在 $Exos^{VEGF-CD47}$ 组较其他组明显上调,在热射病 AKI 中下调;pERK 也能看到同样的趋势,提示 $Exos^{VEGF-CD47}$ 在肾脏损伤修复中调节能量代谢和炎症,可能在肾损伤后组织再生有密切关系。目前仍然缺少大规模量产外泌体的技术,探索产生足够靶向外泌体的新技术和装载小分子药物将是我们未来的主要研究方向。

综上所述,通过构建质粒转染 BMMSCs 的 $Exos^{VEGF-CD47}$ 靶向急性肾损伤,精确靶向热射病急性肾损伤。成功逆转了热射病急性 AKI,减轻了热射病早期"脓毒症样"炎症反应,促进肾血管、肾小管等组织损伤后修复。本实验仅在小动物水平进行尝试,其大动物水平及临床研究是否相符需进一步证实。进一步对修饰外泌体内容物的活性分子、蛋白等进行研究或加载靶向治疗性活性分子,有望揭示具体损伤修复调控机制和提供新的治疗思路。

参考文献:

[1] 何嘉骐,倪军,张静. 热射病相关肾脏损伤的机制及研究进展[J]. 中华灾害救援医学,2021,9(1):754-757,767. DOI:10.13919/j.issn.2095-6274.2021.12.008.
HE J Q, NI J, ZHANG J. Review on the mechanism and research progress of renal injury related heat radiation disease [J]. Chin J Disaster Med,2021,9(1):754-757,767. DOI:10.13919/j.issn.2095-6274.2021.12.008.

[2] BOUCHAMA A, ABUYASSIN B, LEHE C, *et al*. Classic and exertional heatstroke[J]. Nat Rev Dis Primers, 2022, 8(1):8. DOI:10.1038/s41572-021-00334-6.

[3] SHEN C F, WEI D H, WANG G J, *et al*. Swine hemorrhagic shock model and pathophysiological changes in a desert dry-heat environment[J]. PLoS One, 2021, 16(1):e0244727. DOI:10.1371/journal.pone.0244727.

[4] WEN F L, XU Y J, XUE L E, *et al*. Proteomics analyses of acute kidney injury biomarkers in a rat exertional heat stroke model[J]. Front Physiol, 2023, 14:1176998. DOI:10.3389/fphys.2023.1176998.

[5] WU M, WANG C L, LIU Z Y, *et al*. Clinical characteristics and risk factors associated with acute kidney injury inpatient with exertional heatstroke: an over 10-year intensive care survey[J]. Front Med, 2021, 8:678434. DOI:10.3389/fmed.2021.678434.

[6] WITWER K W, THÉRY C. Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature[J]. J Extracell Vesicles, 2019, 8(1):1648167. DOI:10.1080/20013078.2019.1648167.

[7] BOST J P, SAHER O, HAGEY D, *et al*. Growth media conditions influence the secretion route and release levels of engineered extracellular vesicles[J]. Adv Healthc Mater, 2022, 11(5):e2101658. DOI:10.1002/adhm.202101658.

[8] OH S, KWON S H. Extracellular vesicles in acute kidney injury and clinical applications[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16):8913. DOI:10.3390/ijms22168913.

[9] KUSABA T, LALLI M, KRAMANN R, *et al*. Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(4):1527-1532. DOI:10.1073/pnas.1310653110.

[10] ZHA Y, LI Y W, LIN T Y, *et al*. Progenitor cell-derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects[J]. Theranostics, 2021, 11(1):397-409. DOI:10.7150/thno.50741.

[11] JOSUTTIS D, SCHWEDLER C, HEYMANN G, *et al*. Vascular endothelial growth factor as potential biomarker for COVID-19 severity[J]. J Intensive Care Med, 2023, 38(12):1165-1173. DOI:10.1177/08850666231186787.

[12] LIU C, WANG J, HU J, *et al*. Extracellular vesicles for acute kidney injury in preclinical rodent models: a meta-analysis[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1):11. DOI:10.1186/s13287-019-1530-4.

[13] WANG J, DONG Y, LI Y, *et al*. Designer Exosomes for active targeted chemo-photothermal synergistic tumor therapy [J]. Adv Funct Mater, 2018;28(18):1-14. DOI:10.1002/adfm.201707360.

[14] KANELLIS J, MUDGE S J, FRASER S, *et al*. Redistribution of cytoplasmic VEGF to the basolateral aspect of renal tubular cells in ischemia-reperfusion injury[J]. Kidney Int, 2000, 57(6):2445-2456. DOI:10.1046/j.1523-1755.2000.00103.x.

[15] ZHONG X, TANG T T, SHEN A R, *et al*. Tubular epithelial cells-derived small extracellular vesicle-VEGF-A promotes peritubular capillary repair in ischemic kidney injury[J]. NPJ Regen Med, 2022, 7(1):73. DOI:10.1038/s41536-022-00268-x.

[16] PICKERING J W, ENDRE Z H. Bench to bedside: the next steps for biomarkers in acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 311(4):F717-F721. DOI:10.1152/ajprenal.00268.2016.

[17] BELHADJ Z, HE B, DENG H L, *et al*. A combined "eat me/don't eat me" strategy based on extracellular vesicles for anticancer nanomedicine[J]. J Extracell Vesicles, 2020, 9(1):1806444. DOI:10.1080/20013078.2020.1806444.

[18] ZHAO H, SONG S S, MA J W, *et al*. CD47 as a promising therapeutic target in oncology[J]. Front Immunol, 2022, 13:757480. DOI:10.3389/fimmu.2022.757480.

[19] ZHOU R O, LIU J W, ZHANG D, *et al*. Heatstroke model

for desert dry-heat environment and observed organ damage [J]. Am J Emerg Med, 2014, 32(6): 573-579. DOI: 10.1016/j.ajem.2014.02.017.

[20] ZHAO Y H, SHEN C F, WANG G J, *et al*. Curcumin alleviates acute kidney injury in a dry-heat environment by reducing oxidative stress and inflammation in a rat model [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(1): e22630. DOI: 10.1002/jbt.22630.

[21] RICCI Z, ROMAGNOLI S. Acute kidney injury: diagnosis and classification in adults and children [J]. Contrib Nephrol, 2018, 193: 1-12. DOI: 10.1159/000484956.

[22] GOTO H, NAKASHIMA M, NAKASHIMA H, *et al*. Heat acclimation ameliorated heat stress-induced acute kidney injury and prevented changes in kidney macrophages and fibrosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2022, 323(3): F243-F254. DOI: 10.1152/ajprenal.00065.2022.

[23] HADE M D, SUIRE C N, SUO Z C. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: applications in regenerative medicine [J]. Cells, 2021, 10(8): 1959. DOI: 10.3390/cells10081959.

[24] LIU C, CHI K, GENG X D, *et al*. Exogenous biological renal support improves kidney function in mice with rhabdomyolysis-induced acute kidney injury[J]. Front Med, 2021, 8: 655787. DOI: 10.3389/fmed.2021.655787.

[25] XUE L, GUO W L, LI L, *et al*. Metabolomic profiling identifies a novel mechanism for heat stroke-related acute kidney injury [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(4): 241. DOI: 10.3892/mmr.2021.11880.

[26] 全军热射病防治专家组, 热射病急诊诊断与治疗专家共识组. 热射病急诊诊断与治疗专家共识(2021 版)[J]. 中华急诊医学杂志, 2021, 30(11): 1290-1299. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.11.002.
Army Expert Group on Prevention and Treatment of Heat Stroke Disease, the consensus group of experts on Emergency Diagnosis and Treatment of Heat Stroke. Expert consensus on emergency diagnosis and treatment of heat stroke (2021 edition)[J]. Chin J Emerg Med, 2021, 30(11): 1290-1299. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.11.002.

[27] LI Y, ZHU X T, ZHANG M, *et al*. Heatstroke-induced hepatocyte exosomes promote liver injury by activating the NOD-like receptor signaling pathway in mice [J]. PeerJ, 2019, 7: e8216. DOI: 10.7717/peerj.8216.

[28] HUN M, WEN H, HAN P, *et al*. Bibliometric analysis of scientific papers on extracellular vesicles in kidney disease published between 1999 and 2022[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 1070516. DOI: 10.3389/fcell.2022.1070516.

[29] CHEN Y M, ZHANG C Y, DU Y J, *et al*. Exosomal transfer of microRNA-590-3p between renal tubular epithelial cells after renal ischemia-reperfusion injury regulates autophagy by targeting TRAF6[J]. Chin Med J, 2022, 135(20): 2467-2477. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002377.

[30] SALUNKHE S, DHEERAJ, BASAK M, *et al*. Surface functionalization of exosomes for target-specific delivery and in vivo imaging & tracking: Strategies and significance[J]. J Control Release, 2020, 326: 599-614. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.042.

[31] KLABUKOV I, BALYASIN M, KRASILNIKOVA O, *et al*. Angiogenic modification of microfibrous polycaprolactone by pCMV-VEGF165 plasmid promotes local vascular growth after implantation in rats[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1399. DOI: 10.3390/ijms24021399.

[32] WYSOCZYNSKI M, PATHAN A, MOORE J B 4th, *et al*. Pro-angiogenic actions of CMC-derived extracellular vesicles rely on selective packaging of angiopoietin 1 and 2, but not FGF-2 and VEGF[J]. Stem Cell Rev Rep, 2019, 15(4): 530-542. DOI: 10.1007/s12015-019-09891-6.

[33] MAISTO R, OLTRA M, VIDAL-GIL L, *et al*. ARPE-19-derived VEGF-containing exosomes promote neovascularization in HUVEC: the role of the melanocortin receptor 5[J]. Cell Cycle, 2019, 18(4): 413-424. DOI: 10.1080/15384101.2019.1568745.

[34] SIMONS M, GORDON E, CLAESSON-WELSH L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(10): 611-625. DOI: 10.1038/nrm.2016.87.

[35] KIM H, YUN N R, MUN D, *et al*. Cardiac-specific delivery by cardiac tissue-targeting peptide-expressing exosomes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 499(4): 803-808. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.227.

[36] MURPHY D E, DE JONG O G, BROUWER M, *et al*. Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(3): 1-12. DOI: 10.1038/s12276-019-0223-5.

[37] YUAN F F, CAI J Z, WU J F, *et al*. Z-DNA binding protein 1 promotes heatstroke-induced cell death [J]. Science, 2022, 376(6593): 609-615. DOI: 10.1126/science.abg5251.

[38] FIGUREK A, RROJI M, SPASOVSKI G. FGF23 in chronic kidney disease: bridging the heart and Anemia[J]. Cells, 2023, 12(4): 609. DOI: 10.3390/cells12040609.

(**收稿**:2024-06-08;**修回**:2024-07-20)

(编辑 邓强庭)