



杨黄恬, 中国科学院上海生命科学研究院分子心脏学研究组组长, 研究员。研究兴趣为解析心肌细胞形成、保护与再生的细胞分子机理, 探寻防治缺血性心脏病、心力衰竭的有效靶点和干预手段。研究组主要研究方向为多能干细胞心肌谱系细胞分化调控及心肌修复, 间歇性低氧训练、化合物及内源性物质在心肌缺血/再灌注损伤保护、抗心力衰竭中的作用、调控机制和应用转化。

http://www.sinh.cas.cn/rcdw/qtyjzz/201803/t20180327_4986739.html

干细胞及其衍生细胞外泌体在心肌梗死损伤修复中的作用

吴强^{1,2} 杨黄恬^{1,2*}

(¹中国科学院肿瘤与微环境重点实验室, 中国科学院上海营养与健康研究所, 中国科学院上海生命科学研究院, 中国科学院大学, 上海 200031; ²中国科学院干细胞与再生医学创新研究院, 北京 100101)

摘要 移植干细胞及其衍生细胞为心肌梗死后心肌修复带来希望。其中, 旁分泌效应被认为是移植细胞心肌保护作用的新型机制。越来越多的实验证据表明, 各种干细胞分泌的外泌体通过向靶细胞递送特定物质(如某些蛋白质和小RNA)而成为心脏细胞间重要的物质和信息传播者, 发挥对缺血损伤心肌的保护作用。因此, 干细胞来源的外泌体有可能成为促进心肌修复的生物制剂。该文简要总结了干细胞及其衍生细胞外泌体对心肌梗死后心脏损伤修复的研究进展, 聚焦于外泌体的形成、特征和功能, 各类成体干细胞和多能干细胞及其衍生细胞外泌体成分及作用机制, 并探讨了外泌体作为促进缺血性心脏病损伤修复制剂的可能性和亟需解决的问题。

关键词 干细胞; 外泌体; 心肌梗死; 心肌修复

Roles of Exosomes Secreted from Stem Cells and Their Derived Cells in Cardiac Repair Following Myocardial Infarction

Wu Qiang^{1,2}, Yang Huangtian^{1,2*}

(¹CAS Key Laboratory of Tissue Microenvironment and Tumor, Shanghai Institute of Nutrition and Health, Shanghai Institutes for Biological Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

²Institute for Stem Cell and Regenerative, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Transplantation of stem cells and their derived cells brings hopes for cardiac repair following myocardial infarction. Mechanically, these protective effects are mainly mediated by the paracrine effect. Accumulated evidences show that various stem cell-derived exosomes are important vehicles for delivering specific

国家自然科学基金(批准号: 81520108004、81470422)、中国科学院“器官重建与制造”战略性先导科技专项项目(批准号: XDA16010201)和国家重点研发计划专项项目(批准号: 2017YFA 0103700、2016YFC1301204)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54923281, E-mail: htyang@sibs.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81520108004, 81470422), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDA16010201) and National Key Research and Development Program of China (Grant No.2017YFA 0103700)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54923281, E-mail: htyang@sibs.ac.cn

网络出版时间: 2019-01-17 16:41:03

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190117.1640.010.html>

substances and messages to target cells in the heart. These exosomes and their contents, such as certain proteins and small RNAs, can improve cardiac function of ischemic hearts and promote healing processes of infarcted hearts. Therefore, stem cell-derived exosomes might become a promising therapeutic agent for ischemic heart disease. In this review, we summarized current research progress in the exosomes secreted by stem cells and their derived cells on the repair of infarcted hearts, with a focus on the formation, characteristics, compositions, functions and mechanisms of exosomes secreted from adult stem cells and pluripotent stem cells as well as their derived cells, and discussed the potential and challenges for the translational applications of the exosomes in myocardial repair.

Keywords stem cells; exosomes; myocardial infarction; myocardial repair

心血管疾病是当今威胁人类健康最严重的疾病之一。据世界卫生组织预测,到2030年将有2 360万人死于心血管疾病,该病高居致死病因的首位。据《中国心血管病报告2016》的统计数据,我国心血管病患病率处于持续上升阶段,其中冠心病1 100万,心力衰竭(心衰)450万,从2005年开始,急性心肌梗死(心梗)死亡率呈现快速上升态势,成为严重危害国人健康的难治性疾病之一,给家庭和社会发展带来了沉重的负担^[1]。心肌细胞死亡和心肌纤维化是心肌梗死后导致心衰和死亡的关键因素。现有的治疗方法难以逆转心肌梗死后心衰进程。因此,如何减少心肌梗死后心肌细胞丢失、促进功能重建是制约心衰发生发展、降低心肌梗死死亡率的重要环节,也是生命医学领域亟需解决的重大科学问题。

随着干细胞生物学研究的突破和技术的发展,通过移植干细胞/前体细胞及其衍生心血管细胞改善缺血心脏心肌细胞的存活、血供与心肌重构,恢复病变心脏功能的尝试显示,其有可能成为促进人类心肌梗死后心肌修复的有效方法^[2-3],但动物心肌梗死模型和临床试验显示,移植细胞的存活非常少,难以支撑起补充心脏丢失细胞发挥保护功能的假设^[4]。新近的研究揭示,移植的干细胞主要通过旁分泌作用发挥心脏保护作用^[5]。其中,外泌体由于其独特的脂质双分子结构及其内含的各类生物大分子成分,在旁分泌保护功能中占具重要地位^[6]。本文总结了干细胞及其衍生细胞外泌体对心肌梗死后损伤修复的研究进展,阐述了外泌体的形成、特征和功能,着重讨论了成体干细胞和多能干细胞及其衍生细胞外泌体成分、特征和心肌修复的作用及作用机制,并探讨了外泌体应用于缺血性心脏病损伤修复的可能性和亟需解决的问题。

1 干细胞

干细胞是一类具有高度自我更新和多向分化潜能的细胞。在一定条件下,它可以分化成各种组织细胞,具有形成组织器官和个体的潜在功能。根据干细胞所处的发育阶段分为多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)和成体干细胞(somatic stem cells)。用于心肌梗死修复研究的成体干细胞包括间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)、心脏祖细胞(cardiac progenitor cells, CPCs)、心肌球源细胞(cardiosphere-derived cells, CDCs)等。近年采用遗传谱系示踪的研究手段对原认为的CPCs有了新的认识,例如,发现小鼠心脏c-kit⁺细胞在心脏原位难以分化为心肌细胞,因此其不是CPCs^[7-9]。PSCs包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),这些细胞可在体外无限增殖,并可分化为三胚层衍生细胞,包括心血管前体细胞(cardiovascular progenitor cells, CVPCs)^[10-12]、心肌细胞^[13]、血管平滑肌细胞和内皮细胞^[14-15]等,成为心肌梗死细胞治疗的重要供源之一^[2,16-19]。

2 干细胞对缺血性心肌损伤修复的作用

干细胞由于其具有潜在的分化为各类功能细胞的潜力,已有多篇文献报道在心肌梗死后移植干细胞及其衍生的细胞对心脏修复具有显著保护作用,包括小动物实验、临床前大动物研究和临床试验。

2.1 成体干细胞

研究发现,成体来源的CPCs/CDCs/MSCs移植心肌梗死小鼠缩小梗死面积、改善心功能^[20-22],有明显的促血管新生和抗细胞凋亡作用,但难以分化为心肌细胞。大动物移植研究进一步证明,成体CPCs/CDCs/MSCs可促进心肌梗死疤痕区心肌和

血管修复^[23-25]。临床I期试验显示,移植成体CPCs/CDCs/MSCs明显改善心肌梗死后心功能和心肌梗死面积,提高缺血性心肌患者的左心室射血分数^[3,26-27]。但移植成体干细胞对心功能的改善作用较弱,且持续时间有限。

2.2 多能干细胞

PSCs可在体外无限增殖,并具有分化为三个胚层各种衍生细胞包括CVPCs/CPCs、心肌细胞等的的能力,因此有可能成为心肌梗死等细胞治疗的重要供源。

2.2.1 PSC源心血管前体细胞 近年的研究证明,移植PSCs定向诱导分化获得的Flk-1⁺^[28]、Isl1⁺^[29]或SSEA1⁺^[10]的CVPCs,明显缩小动物心肌梗死面积、改善心肌梗死后心功能。

新近,王建安、胡新央团队与我们的临床前大动物非人灵长类的合作研究揭示,食蟹猴心肌梗死后移植人类(h)ESC分化的CVPCs可抑制心肌细胞凋亡和改善心功能,但移植细胞难以长期存活^[4],提示旁分泌效应在hPSC-CVPCs心肌保护作用中可能发挥着重要作用。法国巴黎心血管疾病研究中心Menasché带领的研究团队^[19]于2015年开展了国际上首例心肌梗死后晚期心衰患者移植hESC-CVPCs的临床试验。2018年,他们进一步报道了6例心肌梗死后晚期心衰患者移植hESC-CVPCs的临床试验,细胞移植后观察18个月,未见成瘤和心律失常,从而使短期和中期安全性得到了有效验证,为进一步的临床有效性和安全性评价试验奠定基础。但因与搭桥手术同步进行,且例数有限,无法评价有效性^[18]。

2.2.2 PSC源心肌细胞/内皮细胞/平滑肌细胞 在小动物心肌梗死模型中,移植hPSC分化的心肌细胞具有一定的缩小心肌梗死面积、改善心功能的作用^[3,30]。在豚鼠心肌梗死模型中,移植hESC源心肌细胞可与宿主心肌细胞产生电偶联、抑制心率失常^[31]。大网膜制成的hiPSC源心肌细胞补片移植到猪心脏可通过促进血管新生促进移植心肌细胞的存活^[32]。此外,hiPSC衍生的心肌细胞、内皮细胞和平滑肌细胞构成的心肌补片植入猪或小鼠心肌梗死模型可以改善心脏功能和新陈代谢而未引起室性心律失常^[2,33]。新近的两项使用少量猴的大动物心肌缺血性模型研究发现,hESC还是hiPSC衍生的心肌细胞被注射到心肌梗死的心肌内能够在宿主心脏驻留并与宿主心肌细胞整合,促进心肌梗死后心功能

的恢复,但会引发一过性心率失常^[34-36]。

2.3 旁分泌效应

在作用机制方面,新近的研究提示,干细胞源心血管细胞移植的心脏保护功能或主要/部分归因于其旁分泌作用,包括分泌的蛋白因子和外泌体等^[37-38]。其中,外泌体由于其独特的脂质双分子结构及其内含的各类生物大分子成分,在旁分泌保护功能中占有重要地位^[39]。除了介导移植干细胞的损伤修复作用外,外泌体由于其安全性高、免疫原性低、穿透性好、便于工程化改造等优点,作为无细胞治疗制剂,具有诱人的应用前景,但其走向转化应用还有一系列问题有待阐明。

3 外泌体

细胞分泌到细胞外空间的由脂质双分子层包裹的膜泡称为细胞外膜泡(extracellular vesicles, EVs),主要包括细胞质膜直接出芽形成的微泡(microvesicles, 50~1 000 nm)、胞内体(endosome)来源的外泌体(exosomes, 30~150 nm)等^[40]。这些不同的EVs可在局部或远程传递物质和信息,在机体的生理病理过程中起着重要的作用^[41]。鉴于外泌体与其他类型EVs的生物化学性质的相似性和大小的部分重叠,难以通过实验来区分外泌体和小的微泡^[42]。故本综述除外泌体外,也介绍了干细胞及其衍生细胞分泌的其他EVs在心肌梗死损伤修复中的作用。

3.1 外泌体的生物形成、分泌

外泌体是由细胞内多泡小体(multivesicular bodies, MVBs)与细胞质膜融合后释放到细胞外基质中的微小膜泡,具有脂质双层膜结构,碟状,直径为30~150 nm^[43]。尽管外泌体早在1987年被发现^[44],但人们一直认为,这种膜泡只是一种细胞丢弃的垃圾,直到2007年人们发现,这种微小膜泡中含有多种具有重要功能的蛋白、脂质、核酸(mRNAs和microRNAs等),研究人员才开始重视外泌体^[45]。PubMed中以“exosome”为关键词的检索数据显示,到2007年12月31日发表的外泌体方面的论文累计仅600余篇,到2018年10月1日已激增至约9 000篇。

对外泌体的蛋白组成成分分析发现,其中来自核、线粒体、内质网或高尔基体中的蛋白较少。已被鉴定的外泌体蛋白大多数来源于胞质、内吞泡和质膜。很多在外泌体中发现的胞质蛋白属于内吞途径中的蛋白,如annexin II、Ras相关蛋白5(RAS-

related protein, RAB5)、RAB7、肿瘤易感基因101 (tumor susceptibility gene101, TSG101)^[46]。这些结果进一步证明了外泌体为胞内体(endosome)来源的假说^[44]。对于MVBs内的膜泡蛋白分选的机制研究有限^[47], 新近的研究发现, 泛素样蛋白3(ubiquitin-like 3, UBL3)修饰影响细胞内蛋白质被分选进外泌体^[48]。

外泌体的形成过程涉及转运必需内吞体分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)的参与。ESCRT-0招募来所需的蛋白[如TSG101、CD63(cluster of differentiation 63)等], ESCRTI和ESCRTII驱动膜的出芽, ESCRTIII参与出芽的完成。胞内体膜向内出芽, 最终释放膜泡到胞内体中。通过这种反向出芽(reverse-budding)的方式形成包含很多小膜泡的胞内体, 故称为多泡小体(MVBs)^[41,49]。

晚期胞内体有三种命运: 一是与溶酶体结合, 最终将其中的蛋白降解, 例如表皮生长因子受体在活化后移入MVBs内, 并与溶酶体融合而降解; 另一种是MVBs中的小囊泡与细胞膜融合从而将其内容物表达于细胞膜表面, 如B细胞和非成熟DC细胞内的MHCII类区室(MHC class II compartment, MIIC), 当与细胞膜融合后, 将使MHCII分子表达于细胞膜表面; 第三种即为外泌体的形成过程, MVBs与质膜融合将向内出芽形成的小膜泡释放到细胞外, 从而形成外泌体^[46], 形成过程如图1所示。

外泌体是一种很小的EVs, 直径只有30~150 nm, 在电镜下呈现出一种碟状形态。常规地, 从细胞上清中提取外泌体的方法是多步离心法, 先后去除死细胞和大的细胞碎片, 最后通过超速离心将外泌体沉淀下来, 也可通过0.22 μm滤膜过滤后直接超速离心。但是这种方法分离的外泌体中会混有其他膜泡和大的蛋白聚合物, 这个问题可采用蔗糖密度梯度离心法解决。外泌体的密度为1.13~1.19 g/mL, 利用

密度梯度离心方法能够很好地将外泌体与大蛋白聚合物及其他膜泡分离出来^[50]。

普通超速离心法和基于蔗糖垫/密度梯度的超速离心法是目前最为公认的外泌体提取方法^[51-52]。但由于操作较为复杂、耗时较长, 人们也开发了一些其他的分离方法, 如基于PEG的沉淀法^[53]、基于大小的排阻色谱法^[54]、磁珠免疫法^[55]等。这些方法各有优缺点(表1)。

分离得到的外泌体主要通过电子显微镜检测(TEM)、纳米颗粒追踪分析(NTA)和标志性蛋白检测三种方法进行鉴定。TEM观察外泌体的形态、大小; NTA检测外泌体的浓度和大小分布; 标志性蛋白检测确定所得到的样品是否含有外泌体的标志性蛋白, 如Alix、TSG101、CD63等^[50]。

3.2 外泌体的组成成分

外泌体是一种脂质双层膜包被的膜泡, 膜成分与质膜相似, 相关研究较少。其组成成分较为复杂, 有广泛存在的蛋白和具有细胞特异的蛋白, 此外, 还有各种mRNAs、microRNAs, 甚至DNA(图1)。

外泌体中广泛存在的蛋白可能主要参与其生物形成或其他一些未知功能。它们主要包括胞质蛋白(如tubulin蛋白、actin蛋白和actin结合蛋白等)、ANNEXINS蛋白、RAB蛋白、信号转导蛋白(如蛋白激酶、G蛋白等)、代谢相关的酶(如过氧化物酶、丙酮酸激酶等)、热休克蛋白[如HSP70(heat shock protein 70)和HSP90]、MHC蛋白和最常见四次跨膜蛋白(如CD9、CD63、CD81等)^[56]。

不同细胞分泌的外泌体中也包含一些细胞特异的蛋白。研究较透彻的抗原呈递细胞分泌的外泌体中含有与抗原呈递相关的MHCII和CD86; T细胞来源的外泌体富含T细胞受体; 血红细胞和树突状细胞(dendritic cells, DCs)分泌的外泌体含有整合素的α

表1 外泌体分离方法比较
Table 1 Comparison of isolation methods for exosomes

分离纯化方法 Isolation methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
Ultracentrifugation	Current gold standard, high purity	Complicated process, time-consuming,
Gradient centrifugation	Very high purity	Complicated process
Coprecipitation	User-friendly	Low purity
Size-exclusion chromatography	High purity	Complicated process
Immunomagnetic bead separation	High purity	Complicated process, low Recovery

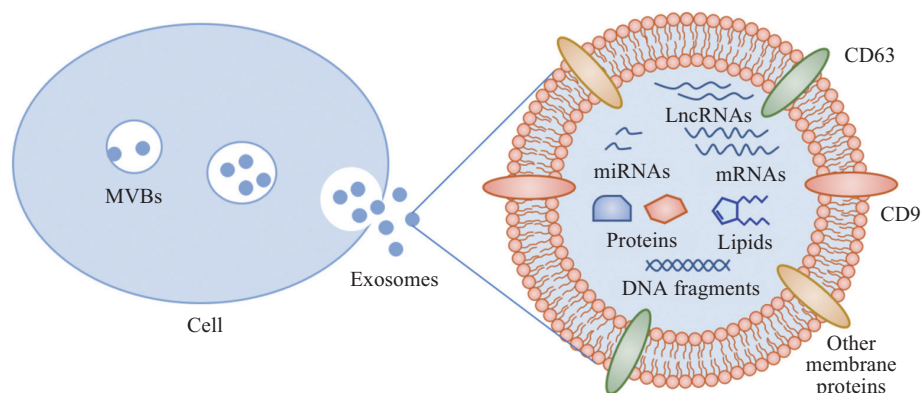


图1 外泌体的形成及其组成成分

Fig.1 The biogenesis and composition of exosomes

和 β 链; B细胞分泌的外泌体含有CD54; 肥大细胞分泌的外泌体含有CD13等。这些蛋白可能促使外泌体靶向特定的细胞^[47]。但对不同来源干细胞的特异蛋白的了解甚少, 有待进行系统比较以确定。

自从2007年人们发现这种微小膜泡中含有多种具有重要功能核酸成分(mRNAs和microRNAs等)后, 各类细胞的外泌体中的多种核酸成分被鉴定出来, 其中被研究最多的就是miRNAs, 如间充质干细胞外泌体含有的miR-21、miR-125b、miR-223等^[57-59]。但对不同细胞或同种细胞不同状态、不同微环境下分泌的外泌体的组成成分缺乏系统比较。

3.3 外泌体的生物学功能

不同细胞或同种细胞在不同状态下分泌的外泌体具有特异性的成分, 作为信号分子传递给临近和远方的细胞, 从而改变其他细胞的功能。因此, 外泌体在机体的生理病理调控中起着重要的作用, 如炎症和免疫反应、肿瘤的生长与迁移、组织损伤修复包括心肌修复等, 在疾病的诊断和治疗中展现出了巨大的应用前景, 成为一个新的研究前沿热点^[43,45]。

外泌体携带各类蛋白质、核酸等成分到达靶细胞后的主要作用方式包括: (1)外泌体携带不同的配体与不同的细胞表面受体结合, 激活受体细胞中的受体和下游信号传导途径; (2)外泌体也可靶向特异的细胞并与其细胞膜融合, 将外泌体膜上的蛋白质等成分整合到靶细胞膜上; (3)外泌体直接被靶细胞吸收, 外泌体中的蛋白质、核酸等进入靶细胞发挥作用^[60-61]。外泌体是一种很好的物质和信息传递媒介, 而不需要细胞之间的直接接触。外泌体富含多种膜蛋白, 如MHCI、MHCII、整合素、T细胞共受体CD4和CD8等, 这些蛋白能够参与抗原呈递、T细胞

激活、细胞运动和黏附, 与其他蛋白形成复合物^[46]。对于这些作用的详细机制目前仍不清楚, 并且这种作用方式是否同样参与了心肌修复作用有待更多的研究。

外泌体的功能主要取决于其分泌细胞的类型, 不同细胞分泌的外泌体的组成成分不尽相同, 因而能够发挥不同的生物功能。外泌体主要的生物学功能有: 抗原呈递、病原体免疫监督、转运蛋白质和RNA、转运传染性物质等^[62]。此外, 同种细胞的不同状态或所处的微环境不同时, 其外泌体的功能也有所不同^[63]。

在早期的研究中, 网织红细胞通过分泌外泌体用来“丢弃”一些在成熟红细胞中无作用的膜蛋白, 如转铁蛋白受体。这种方式对于在溶酶体中难以降解的蛋白是一种有效的剔除方式^[44]。人们推测, 这可能是外泌体最原始的一种功能。早期大多数外泌体的研究是关于抗原呈递细胞的, 在最初的开创性研究中, Raposo等^[64]证明, EBV转染的B细胞分泌的外泌体能够以一种抗原特异的方式刺激CD4⁺T细胞的形成。随后研究较多的是肿瘤微环境中的外泌体参与肿瘤的发生、发展、侵袭、转移等^[65]。最近, 干细胞外泌体由于继承了干细胞的诸多特性, 如促进细胞迁移、血管新生、抑制凋亡与炎症等, 在组织损伤修复, 尤其是心肌梗死修复中的研究报道不断涌现^[66-69]。

4 干细胞及其衍生细胞外泌体对心肌梗死后心肌的修复作用

新近的研究显示, hPSCs及hPSCs来源的CVPCs、心肌细胞、内皮细胞等分泌的外泌体对心肌梗死心

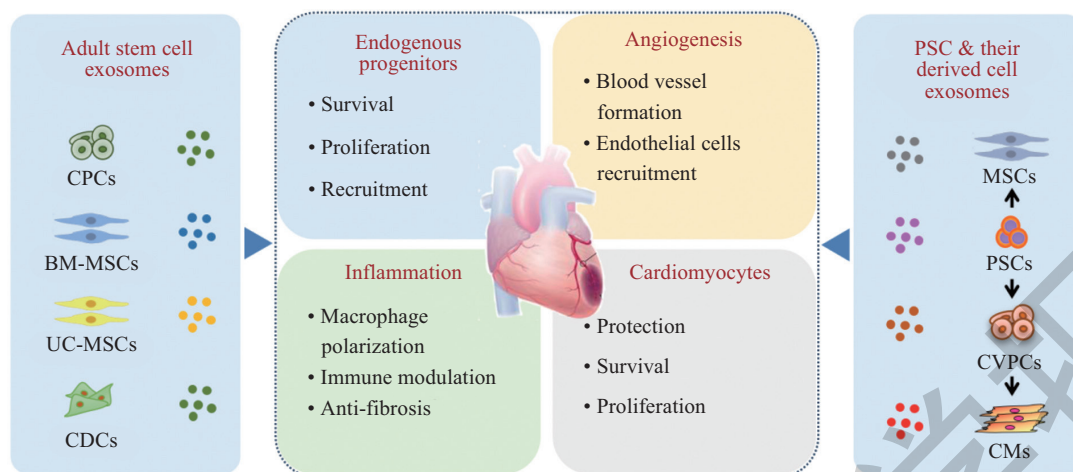


图2 各类干细胞外泌体对心肌梗死修复作用模式图

Fig.2 Schematic diagram of various stem cell exosomes repairing myocardial infarction

脏具有心功能保护作用^[66-69]。与干细胞移植治疗相比,外泌体可避免细胞移植引起的异常分化,减少免疫排斥^[70],且外泌体具有易于储存运输的优点。因此,干细胞分泌的外泌体用于组织损伤修复的可能性引起了人们的关注,通过干细胞来源的外泌体促进损伤细胞修复有望成为组织损伤修复的新策略。

无论成体干细胞还是PSCs及其衍生细胞外泌体的作用机制的研究,大多主要关注外泌体的RNA成分,尤其是miRNAs,而对外泌体蛋白方面关注较少,有待进一步探索阐明。各类干细胞外泌体的心脏保护作用机制如图2所示。

4.1 成体干细胞外泌体

成体干细胞的外泌体研究主要聚焦在间充质干细胞、心脏干细胞等方面。2011年, Sahoo等^[6]发现,人外周血来源的CD34⁺干细胞分泌的外泌体在体外和体内均具有促血管生成的活性。外泌体可能是此类细胞移植用于治疗性血管生成的旁分泌效应的重要组成部分。2014年, Wang等^[71]报道了通过阻止p53介导的凋亡信号传导和抑制肿瘤坏死因子受体相关因子6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)介导的核因子- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)激活来保护心肌免受缺血/复灌损伤(I/R)的miR-125存在于骨髓MSC分泌的外泌体中。类似地,过表达GATA-4的骨髓MSCs通过分泌的外泌体中的多种miRNAs抑制细胞凋亡,从而发挥心脏保护作用^[72]。过表达CXCR4的骨髓MSCs外泌体通过Akt途径保护梗死的心脏^[73]。脐带MSCs外泌体同样具有心脏保护作用^[74-76]。其心

脏保护作用机制报道最多的是外泌体中的miRNAs,如miR-223^[77]、miR-21^[57,78-79]、miR-210^[80]。

CPCs通过其分泌的EVs中的miR-210、miR-132、miR-146a-3p抑制心肌细胞凋亡,改善心肌梗死后心功能^[81]。2014年, Gray等^[63]进一步对低氧处理的CPCs分泌的外泌体进行了miRNAs的高通量分析,发现了一系列参与促进血管新生、抑制胶原形成的miRNAs。Xiao等^[82]发现, CPCs通过miR-21靶向PDCD-4抑制心肌细胞凋亡。与大龄儿童的CPCs外泌体相比,来自新生儿的CPCs外泌体具有更强的改善心脏功能与促进血管新生、减少纤维化的作用^[83]。心脏组织来源的心肌前体细胞通过外泌体EMMPRIN蛋白促进血管新生^[84]。2013年, Feng等^[85]发现,热休克可改善Sca-1⁺干细胞的存活,并通过外泌体介导的HSF1/miR-34a/HSP70途径促进缺血性心肌细胞存活。通过高通量分析, Barile等^[86]发现, CPC外泌体中PAPP-A蛋白介导IGF-1释放发挥心脏保护功能。

2014年, Ibrahim等^[87]发现, CDCs分泌的外泌体主要通过miR-146a在鼠的急性和慢性心肌梗死模型中保护心脏。该团队后续研究发现, CDCs外泌体预处理的成纤维细胞可抑制纤维化、细胞凋亡并促进血管新生^[88]。CDCs外泌体中含有Y RNA片段,可调节白细胞介素-10(interleukin 10, IL-10)表达,在大鼠缺血/再灌模型中发挥心脏保护功能^[89]。CDCs外泌体转移miR-181b到巨噬细胞中,降低PKC δ 转录水平,是CDCs保护再灌注后心肌的作用基础^[90]。此外,有报道称, CDCs外泌体具有抗衰

老的功能^[91]。

美国西奈山医学院的Marban研究组^[53]在大动物猪心肌梗死模型中,开展了CDCs外泌体的研究,发现心肌内注射CDCs外泌体可减少猪心肌梗死疤痕,抑制病理性重塑并改善心肌梗死后心功能。

4.2 多能干细胞外泌体

2015年, Khan等^[66]发现,小鼠胚胎干细胞衍生的外泌体具有改善梗死心脏功能的能力,并促进血管新生、心肌细胞存活和减少梗死后纤维化。此外,在注射外泌体后8周增加c-kit⁺ CPCs存活、增殖。miR290-295簇可能是心脏保护功能的物质基础。Adamiak等^[67]比较了小鼠iPSCs及其分泌的膜泡,发现iPSC-EVs具有更好的心脏保护功能,且安全性更高。但有关PSCs分泌的外泌体的研究报道相对较少,其作用和机制及安全性有待进一步明确。

4.3 多能干细胞衍生细胞外泌体

2010年, Lai等^[54]利用hESCs分化的MSCs分泌的外泌体发现了其心脏缺血/复灌后的保护功能。其作用机制涉及改善靶细胞的ATP水平,降低氧化应激,激活PI3K/Akt途径^[92]。hESCs分化的心脏前体细胞分泌的EVs在心肌梗死后心衰模型中起到保护心脏的作用^[68,93]。Lee等^[94]系统比较了hESCs和hiPSCs来源的心肌细胞分泌的外泌体的RNA成分,并首次报道了hPSC-心肌细胞外泌体的心脏保护作用。Liu等^[69]将hiPSCs来源的EVs和hiPSCs分化的心肌细胞分泌的EVs包装进水凝胶贴片中移植到大鼠心肌梗死模型,与hiPSCs来源的EVs相比,hiPSCs分化的心肌细胞分泌的EVs发挥更好的心脏功能改善作用。对外泌体所含的miRNAs分析证实,与hiPSCs来源的EVs相比,hiPSCs分化的心肌细胞分泌的EVs中富含的miRNAs更多地去参与抑制心脏损伤和肥大。

4.4 干细胞及其衍生细胞外泌体心肌梗死修复作用的优化

虽然常规培养条件下,多数干细胞及其衍生细胞外泌体已具有心肌梗死修复作用,但其修复作用有待提升,并期望能增加其所含的有益成分而减少有害成分,因此,研究者通过改变培养条件、基因工程操作等方法调控干细胞选择性分泌有益外泌体,从而增强其心肌梗死修复作用。例如, Feng等^[85]发现,热休克可改善Sca-1⁺干细胞的存活,并通过外泌体介导的HSF1/miR-34a/HSP70途径促进缺血性心

肌细胞存活。Gray等^[63]对低氧处理的CPCs分泌的外泌体进行了miRNAs的高通量分析,发现一系列参与促进血管新生、抑制胶原形成的miRNAs成分增多。过表达GATA-4^[72]或CXCR4^[73]的骨髓MSCs增强其外泌体心脏保护功能。如何调控干细胞产生具有修复作用的外泌体的研究尚处于初步探索阶段,这一研究领域的进展将对临床转化应用具有重要意义。

5 干细胞外泌体的转化应用

外泌体领域的主要应用前景目前主要集中在两大方面,即疾病的诊断和治疗。1987年,外泌体首先在哺乳动物网织红细胞中被鉴定出来,直到2007年,外泌体介导的mRNAs和miRNAs的转移才被确定为“细胞间遗传交换的新机制”。从那时起,一系列的商业活动开始出现,形成了一个支持外泌体相关产品、技术和服务的整个行业。诊断的应用走在前面,美国外泌体诊断公司推出了多款基于外泌体技术的液体活检产品,如前列腺癌早期诊断和肺癌筛查。治疗的转化应用的探索也紧随其后,如正在开展包括心肌梗死在内的大动物疾病模型和小规模临床试验的探索^[53]。

外泌体应用开发主要面临大规模分离提取操作繁杂、质量难以控制、运输储存和治疗靶向性欠佳等问题。针对这些问题,研究人员正在进行探索。外泌体的治疗转化应用,首先要解决的是如何生产临床级GMP外泌体。这又涉及三方面的内容:(1)细胞的大规模培养;(2)外泌体的大规模提取;(3)质量控制。

大规模分离提取方面主要为以下内容。Andriolo等^[95]尝试开发了CPC的无异源性大规模培养方法用于外泌体生产。工业界正在尝试低成本生产无限量的临床级MSCs,这将为外泌体生产所需的大规模细胞培养提供基础。针对细胞培养过程中天然分泌的外泌体数量少、大规模生产困难的问题,韩国MDimune公司使用建立的专有技术直接从细胞进行挤出生产比天然分泌的外泌体多出100倍的人造外泌体^[96]。

质量控制涉及两方面:(1)源头细胞的质量控制;(2)外泌体提取的质量控制。首先,源头细胞需保证有明确可操作的质量控制标准。尤其是干细胞的明确界定,如MSCs的定义并不明确,不同实验室使用

不同的分子标记表征MSCs^[97], 这给外泌体的生产质量控制带来问题。此外, 不同状态或不同条件下细胞分泌的外泌体的特性不同, 如低氧条件下, 成体干细胞外泌体具有更好的促血管新生、抗纤维化等作用^[63,98]。因此, 建立针对不同干细胞及不同培养条件的外泌体的质量控制标准是外泌体生产质量控制的基础。

建立标准的操作流程是质量控制的关键。今年, Kalluri等^[99]在*JCI Insight*期刊上发表文章, 阐述了临床级外泌体的生产和质检流程。该研究报告了采用GMP标准的基于生物反应器的大规模临床级外泌体生产方法。建立了标准操作流程以生产具有功能的工程化外泌体。在多个体外和体内研究中验证了临床级GMP外泌体的功能。该工作还探究了这种临床级外泌体的保存期限、体内分布、毒理学特征以及与化学疗法结合的功效。(1)心血管方面。Andriolo等^[95]尝试开发了生产用于治疗应用的GMP级人心脏祖细胞外泌体。这些初步探索为GMP外泌体的临床试验建立了基础。(2)运输储存方面。Kalluri等^[99]建立了可将生产的GMP级外泌体在-80 °C保存6个月, 4 °C或室温条件下保存2天而功能活性不受影响的方法。(3)治疗靶向性方面。Vandergriff等^[100]使用心脏归巢肽将CDCs外泌体靶向到梗死的的心脏, 可明显改善心功能、抑制纤维化和瘢痕、促进细胞增殖和血管新生。此外, 外泌体驻留率也需要进一步提高。Liu等^[69]将iCM-EVs封装在基于胶原的水凝胶贴片中可以使分子持续长期释放到周围环境中。该方法通过减少输送分子的冲刷和延长保护作用来改善直接注射的缺点。(4)临床研发方面。CDCs外泌体正处于临床应用开发阶段。Capricor公司是一家面向临床应用的生物技术公司, 为心脏病和其他严重疾病开发生物治疗方法。2016年, 该公司获得来自美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)高达420万美元的研究经费, 用于开发治疗左室发育不全综合征的CAP-2003产品(CDCs外泌体的一种)。

基于干细胞及其衍生细胞心肌损伤修复的研究揭示了旁分泌机制的心肌保护和修复作用, 而外泌体在很大程度上模拟了干细胞心肌保护和修复的旁分泌作用。通过对外泌体深入的基础研究的探索 and 关键应用开发瓶颈问题的突破, 外泌体有可能发展为心肌修复的新制剂。

参考文献 (References)

- 1 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 朱曼璐, 王文, 王拥军, 等.《中国心血管病报告2016》概要. 中国循环杂志[Chen Weiwei, Gao Runlin, Liu Lisheng, Zhu Manlu, Wang Wen, Wang Yongjun, *et al.* Report on cardiovascular diseases in China (2016)]. Chinese Circ J. 2017; 32(6): 521-30.
- 2 Ye L, Chang YH, Xiong Q, Zhang P, Zhang L, Somasundaram P, *et al.* Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells. *Cell Stem Cell* 2014; 15(6): 750-61.
- 3 Matsa E, Sallam K, Wu JC. Cardiac stem cell biology: glimpse of the past, present, and future. *Circ Res* 2014; 114 (1): 21-7.
- 4 Zhu K, Wu Q, Ni C, Zhang P, Zhong Z, Wu Y, *et al.* Lack of remuscularization following transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitor cells in infarcted nonhuman primates. *Circ Res* 2018; 122(7): 958-69.
- 5 Gneccchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, *et al.* Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005; 11(4): 367-8.
- 6 Sahoo S, Klychko E, Thorne T, Misener S, Schultz KM, Millay M, *et al.* Exosomes from human CD34⁺ stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ Res* 2011; 109(7): 724-8.
- 7 Sultana N, Zhang L, Yan J, Chen J, Cai W, Razzaque S, *et al.* Resident c-kit⁺ cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat Commun* 2015; 6: 8701.
- 8 Li Y, He L, Huang X, Issa Bhaloo S, Zhao H, Zhang S, *et al.* Genetic lineage tracing of non-myocyte population by dual recombinases. *Circulation* 2018; 138(8): 793-805.
- 9 Maliken BD, Molkenstein JD. Undeniable evidence That the adult mammalian heart lacks an endogenous regenerative stem cell. *Circulation* 2018; 138(8): 806-8.
- 10 Blin G, Nury D, Stefanovic S, Neri T, Guillevic O, Brinon B, *et al.* A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest* 2010; 120(4): 1125-39.
- 11 Cao N, Liang H, Huang J, Wang J, Chen Y, Chen Z, *et al.* Highly efficient induction and long-term maintenance of multipotent cardiovascular progenitors from human pluripotent stem cells under defined conditions. *Cell Res* 2013; 23(9): 1119-32.
- 12 Birket MJ, Mummery CL. Pluripotent stem cell derived cardiovascular progenitors—A developmental perspective. *Dev Biol* 2015; 400(2):169-79.
- 13 Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res* 2012; 111(3): 344-58.
- 14 Patsch C, Challet-Meylan L, Thoma EC, Urich E, Heckel T, O'Sullivan JF, *et al.* Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol* 2015; 17(8): 994-1003.
- 15 Zhang J, Chu LF, Hou Z, Schwartz MP, Hacker T, Vickerman V, *et al.* Functional characterization of human pluripotent stem cell-derived arterial endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(30): E6072-E8.
- 16 Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*

- 2008; 451(7181): 937-42.
- 17 Miller LW. Trial of embryonic stem cell-derived cardiac progenitor cells. *J Am Coll Cardiol* 2018; 71(4): 439-42.
 - 18 Menasché P, Vanneaux V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, *et al.* Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitors for severe ischemic left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2018; 71(4): 429-38.
 - 19 Menasche P, Vanneaux V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J* 2015; 36(30): 2011-7.
 - 20 Liu ML, Nagai T, Tokunaga M, Iwanaga K, Matsuura K, Takahashi T, *et al.* Anti-inflammatory peptides from cardiac progenitors ameliorate dysfunction after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc* 2014; 3(6): e001101.
 - 21 Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res* 2015; 116(8): 1413-30.
 - 22 Zwetsloot PP, Vegh AM, Jansen of Lorkeers SJ, van Hout GP, Currie GL, Sena ES, *et al.* Cardiac stem cell treatment in myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Circ Res* 2016; 118(8): 1223-32.
 - 23 Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, *et al.* Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2013; 128(2): 122-31.
 - 24 Lee ST, White AJ, Matsushita S, Malliaras K, Steenbergen C, Zhang Y, *et al.* Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57(4): 455-65.
 - 25 Hu X, Xu Y, Zhong Z, Wu Y, Zhao J, Wang Y, *et al.* A large-scale investigation of hypoxia-preconditioned allogeneic mesenchymal stem cells for myocardial repair in nonhuman primates: paracrine activity without remuscularization. *Circ Res* 2016; 118(6): 970-83.
 - 26 Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, *et al.* Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012; 379(9819): 895-904.
 - 27 Kanelidis AJ, Premer C, Lopez J, Balkan W, Hare JM. Route of delivery modulates the efficacy of mesenchymal stem cell therapy for myocardial infarction: a meta-analysis of preclinical studies and clinical trials. *Circ Res* 2017; 120(7): 1139-50.
 - 28 Mauritz C, Martens A, Rojas SV, Schnick T, Rathert C, Schecker N, *et al.* Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived Flk-1 progenitor cells engraft, differentiate, and improve heart function in a mouse model of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2011; 32(21): 2634-41.
 - 29 Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, *et al.* Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature* 2009; 460(7251): 113-7.
 - 30 Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheili V, Fugate JA, Dupras SK, *et al.* Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007; 25(9): 1015-24.
 - 31 Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheili V, Kim J, *et al.* Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 2012; 489(7415): 322-5.
 - 32 Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Miki K, Ito E, *et al.* Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart. *Circulation* 2013; 128(11 Suppl 1): S87-94.
 - 33 Gao L, Kupfer ME, Jung JP, Yang L, Zhang P, Da Sie Y, *et al.* Myocardial tissue engineering with cells derived from human-induced pluripotent stem cells and a native-like, high-resolution, 3-dimensionally printed scaffold. *Circ Res* 2017; 120(8): 1318-25.
 - 34 Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, *et al.* Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 2014; 510(7504): 273-7.
 - 35 Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, *et al.* Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 2016; 538(7625): 388-91.
 - 36 Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol* 2018; 36(7): 597-605.
 - 37 Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell* 2012; 10(3): 244-58.
 - 38 Sharma S, Mishra R, Bigham GE, Wehman B, Khan MM, Xu H, *et al.* A deep proteome analysis identifies the complete secretome as the functional unit of human cardiac progenitor cells. *Circ Res* 2016; 120(5): 816-34.
 - 39 Barile L, Moccetti T, Marban E, Vassalli G. Roles of exosomes in cardioprotection. *Eur Heart J* 2016; 38(18): 1372-9.
 - 40 van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(4): 213-28.
 - 41 Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255-89.
 - 42 Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200(4): 373-83.
 - 43 Sahoo S, Losordo DW. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ Res* 2014; 114(2): 333-44.
 - 44 Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 1987; 262(19): 9412-20.
 - 45 Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6): 654-9.
 - 46 Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 2002; 3(5): 321-30.
 - 47 Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(8): 569-79.

- 48 Ageta H, Ageta-Ishihara N, Hitachi K, Karayel O, Onouchi T, Yamaguchi H, *et al.* UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. *Nat Commun* 2018; 9(1): 3936.
- 49 Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 2013; 113(1): 1-11.
- 50 Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3: Unit 3 22.
- 51 Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov AV. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc* 2015; 2015(4): 319-23.
- 52 Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chem Rev* 2018; 118(4): 1917-50.
- 53 Gallet R, Dawkins J, Valle J, Simsolo E, de Couto G, Middleton R, *et al.* Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur Heart J* 2017; 38(3): 201-11.
- 54 Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010; 4(3): 214-22.
- 55 Yoo CE, Kim G, Kim M, Park D, Kang HJ, Lee M, *et al.* A direct extraction method for microRNAs from exosomes captured by immunoaffinity beads. *Anal Biochem* 2012; 431(2): 96-8.
- 56 Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 2008; 8(19): 4083-99.
- 57 Mayourian J, Ceholski DK, Gorski P, Mathiyalagan P, Murphy JF, Salazar SI, *et al.* Exosomal microRNA-21-5p mediates mesenchymal stem cell paracrine effects on human cardiac tissue contractility. *Circ Res* 2018; 122(7): 933-44.
- 58 Xiao C, Wang K, Xu Y, Hu H, Zhang N, Wang Y, *et al.* Transplanted mesenchymal stem cells reduce autophagic flux in infarcted hearts via the exosomal transfer of mir-125b. *Circ Res* 2018; 123(5):564-578.
- 59 Sukma Dewi I, Celik S, Karlsson A, Hollander Z, Lam K, McManus JW, *et al.* Exosomal miR-142-3p is increased during cardiac allograft rejection and augments vascular permeability through down-regulation of endothelial RAB11FIP2 expression. *Cardiovasc Res* 2017; 113(5): 440-52.
- 60 Yellon DM, Davidson SM. Exosomes: nanoparticles involved in cardioprotection? *Circ Res* 2014; 114(2): 325-32.
- 61 Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, Das D, Boi-Doku C, Arjun S, *et al.* Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65(15): 1525-36.
- 62 Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* 2008; 9(6): 871-81.
- 63 Gray WD, French KM, Ghosh-Choudhary SK, Maxwell JT, Brown ME, Platt MO, *et al.* Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circ Res* 2014; 116(2): 255-63.
- 64 Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996; 183(3): 1161-72.
- 65 O'Driscoll L. Expanding on exosomes and ectosomes in cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(24): 2359-62.
- 66 Khan M, Nickoloff E, Abramova T, Johnson J, Verma SK, Krishnamurthy P, *et al.* Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ Res* 2015; 117(1): 52-64.
- 67 Adamiak M, Cheng G, Bobis-Wozowicz S, Zhao L, Kedracka-Krok S, Samanta A, *et al.* Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived extracellular vesicles are safer and more effective for cardiac repair than iPSCs. *Circ Res* 2017; 122(2): 296-309.
- 68 El Harane N, Kervadec A, Bellamy V, Pidial L, Neametalla HJ, Perier MC, *et al.* Acellular therapeutic approach for heart failure: *in vitro* production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. *Eur Heart J* 2018; 39(20): 1835-47.
- 69 Liu B, Lee BW, Nakanishi K, Villasante A, Williamson R, Metz J, *et al.* Cardiac recovery via extended cell-free delivery of extracellular vesicles secreted by cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells. *Nat Biomed Eng* 2018; 2(5): 293-303.
- 70 Jung JH, Fu X, Yang PC. Exosomes generated from iPSC-derivatives: new direction for stem cell therapy in human heart diseases. *Circ Res* 2017; 120(2): 407-17.
- 71 Wang X, Ha T, Zou J, Ren D, Liu L, Zhang X, *et al.* MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6. *Cardiovasc Res* 2014; 102(3): 385-95.
- 72 Yu B, Kim HW, Gong M, Wang J, Millard RW, Wang Y, *et al.* Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection. *Int J Cardiol* 2014; 182C: 349-60.
- 73 Kang K, Ma R, Cai W, Huang W, Paul C, Liang J, *et al.* Exosomes secreted from CXCR4 overexpressing mesenchymal stem cells promote cardioprotection via Akt signaling pathway following myocardial infarction. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 659890.
- 74 Zhao Y, Sun X, Cao W, Ma J, Sun L, Qian H, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells relieve acute myocardial ischemic injury. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 761643.
- 75 Ma J, Zhao Y, Sun L, Sun X, Zhao X, Sun X, *et al.* Exosomes derived from Akt-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells improve cardiac regeneration and promote angiogenesis via activating platelet-derived growth factor D. *Stem Cells Transl Med* 2016; 6(1): 51-9.
- 76 Wang XL, Zhao YY, Sun L, Shi Y, Li ZQ, Zhao XD, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improve myocardial repair via upregulation of Smad7. *Int J Mol Med* 2018; 41(5): 3063-72.
- 77 Wang X, Gu H, Qin D, Yang L, Huang W, Essandoh K, *et al.* Exosomal miR-223 contributes to mesenchymal stem cell-elicited cardioprotection in polymicrobial sepsis. *Sci Rep* 2015; 5: 13721.
- 78 Wang K, Jiang Z, Webster KA, Chen J, Hu H, Zhou Y, *et al.*

- Enhanced cardioprotection by human endometrium mesenchymal stem cells driven by exosomal miR-21. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(1): 209-22.
- 79 Shi B, Wang Y, Zhao R, Long X, Deng W, Wang Z. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-21 protects C-kit⁺ cardiac stem cells from oxidative injury through the PTEN/PI3K/Akt axis. *PLoS One* 2018; 13(2): e0191616.
 - 80 Wang N, Chen C, Yang D, Liao Q, Luo H, Wang X, *et al.* Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles, via miR-210, improve infarcted cardiac function by promotion of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; 1863(8): 2085-92.
 - 81 Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, *et al.* Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2014; 103(4): 530-41.
 - 82 Xiao J, Pan Y, Li XH, Yang XY, Feng YL, Tan HH, *et al.* Cardiac progenitor cell-derived exosomes prevent cardiomyocytes apoptosis through exosomal miR-21 by targeting PDCD4. *Cell Death Dis* 2016; 7(6): e2277.
 - 83 Agarwal U, George A, Bhutani S, Ghosh-Choudhary S, Maxwell JT, Brown ME, *et al.* Experimental, systems and computational approaches to understanding the microRNA-mediated reparative potential of cardiac progenitor cell-derived exosomes from pediatric patients. *Circ Res* 2016; 120(4): 701-12.
 - 84 Vrijisen KR, Maring JA, Chamuleau SA, Verhage V, Mol EA, Deddens JC, *et al.* Exosomes from cardiomyocyte progenitor cells and mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis via EMMPRIN. *Adv Healthc Mater* 2016; 5(19): 2555-65.
 - 85 Feng Y, Huang W, Meng W, Jegga AG, Wang Y, Cai W, *et al.* Heat shock improves Sca-1⁺ stem cell survival and directs ischemic cardiomyocytes toward a prosurvival phenotype via exosomal transfer: a critical role for HSF1/miR-34a/HSP70 pathway. *Stem Cells* 2014; 32(2): 462-72.
 - 86 Barile L, Cervio E, Lionetti V, Milano G, Ciullo A, Biemmi V, *et al.* Cardioprotection by cardiac progenitor cell-secreted exosomes: role of pregnancy-associated plasma protein-A. *Cardiovasc Res* 2018; 114(7): 992-1005.
 - 87 Ibrahim AG-E, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports* 2014; 2(5): 606-19.
 - 88 Tseliou E, Fouad J, Reich H, Slipczuk L, de Couto G, Aminzadeh M, *et al.* Fibroblasts rendered antifibrotic, antiapoptotic, and angiogenic by priming with cardiosphere-derived extracellular membrane vesicles. *J Am Coll Cardiol* 2015; 66(6): 599-611.
 - 89 Cambier L, de Couto G, Ibrahim A, Echavez AK, Valle J, Liu W, *et al.* Y RNA fragment in extracellular vesicles confers cardioprotection via modulation of IL-10 expression and secretion. *EMBO Mol Med* 2017; 9(3): 337-52.
 - 90 de Couto G, Gallet R, Cambier L, Jaghatspanyan E, Makkar N, Dawkins JF, *et al.* Exosomal microRNA transfer into macrophages mediates cellular postconditioning. *Circulation* 2017; 136(2): 200-14.
 - 91 Grigorian-Shamagian L, Liu W, Fereydooni S, Middleton RC, Valle J, Cho JH, *et al.* Cardiac and systemic rejuvenation after cardiosphere-derived cell therapy in senescent rats. *Eur Heart J* 2017; 38(39): 2957-67.
 - 92 Arslan F, Lai RC, Smeets MB, Akeroyd L, Choo A, Agnor EN, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2013; 10(3): 301-12.
 - 93 Kervadec A, Bellamy V, El Harane N, Arakelian L, Vanneaux V, Cacciapuotì I, *et al.* Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2016; 35(6): 795-807.
 - 94 Lee WH, Chen W, Shao NY, Xiao D, Qin X, Baker N, *et al.* Comparison of non-coding RNAs in exosomes and functional efficacy of human embryonic stem cell- versus induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells* 2017; 35(10): 2138-49.
 - 95 Andriolo G, Provati E, Lo Cicero V, Brambilla A, Soncin S, Torre T, *et al.* Exosomes from human cardiac progenitor cells for therapeutic applications: development of a GMP-grade manufacturing method. *Front Physiol* 2018; 9: 1169.
 - 96 Jang SC, Kim OY, Yoon CM, Choi DS, Roh TY, Park J, *et al.* Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. *ACS Nano* 2013; 7(9): 7698-710.
 - 97 Sipp D, Robey PG, Turner L. Clear up this stem-cell mess. *Nature* 2018; 561(7724): 455-7.
 - 98 Namazi H, Mohit E, Namazi I, Rajabi S, Samadian A, Hajizadeh-Saffar E, *et al.* Exosomes secreted by hypoxic cardiosphere-derived cells enhance tube formation and increase pro-angiogenic miRNA. *J Cell Biochem* 2017; 119(5): 4150-60.
 - 99 Mendt M, Kamerkar S, Sugimoto H, McAndrews KM, Wu CC, Gagea M, *et al.* Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight* 2018; 3(8): e99263.
 - 100 Vandergriff A, Huang K, Shen D, Hu S, Hensley MT, Caranasos TG, *et al.* Targeting regenerative exosomes to myocardial infarction using cardiac homing peptide. *Theranostics* 2018; 8(7): 1869-78.