

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.03.036

· 专论与综述 ·

外泌体在皮肤修复与再生中作用的研究进展*

时 权¹ 徐 娟¹ 郭希民² 刘洪臣^{1Δ}

(1 中国人民解放军总医院 口腔医学研究所 北京 100853; 2 军事医学科学院 基础医学研究所 北京 100850)

摘要: 外泌体是直径在 30-100 nm 左右的囊泡结构。作为一种活细胞分泌的亚细胞成分,外泌体广泛参与细胞之间的交流,并可以作为干细胞的旁分泌因子来发挥生物学效应。研究发现外泌体可以参与皮肤组织修复与再生的各个过程,通过促进皮肤细胞的增殖迁移,促进血管新生,调节免疫反应来促进创伤愈合与皮肤组织再生,为进一步实现无细胞治疗提供了新的实现途径。对于某些慢性创面,例如糖尿病性皮肤病等也有较好的治疗效果。本文就外泌体在皮肤修复与再生中作用的研究进展做一综述。

关键词: 外泌体; 皮肤再生; 创面修复

中图分类号: R62; Q593 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)03-561-04

Research Progress of the Role of Exosomes in Skin Repair and Regeneration*

SHI Quan¹, XU Juan¹, GUO Xi-min², LIU Hong-chen^{1Δ}

(1 Department of Stomatology, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China;

2 Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850, China)

ABSTRACT: Exosomes are one kind of the extracellular vesicles which ranged in size from 30 to 100 nm. As the subcellular components secreted by the living cells, exosomes widely are involved in the cell to cell communication and they are one of the key secretory products of stem cells to play to the biological effects of stem cells. It has been found that exosomes can enhance the wound healing and facilitate the skin regeneration by promoting proliferation and migration of fibroblasts, enhancing angiogenesis and regulating immune responses, which lay a foundation to achieve the cell-free therapy. Besides, exosomes also had excellent effect in treating chronic wounds, such as the diabetic ulcers. This article reviewed the advances on the role of exosomes in skin repair and regeneration.

Key words: Exosomes; Skin regeneration; Wound healing

Chinese Library Classification(CLC): R62; Q593 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)03-561-04

前言

皮肤是人体的最外面的一层结构,是人体最大的一个器官。其主要功能是保护机体免受外界病原体的入侵,同时还具有排汗、感觉等功能。然而皮肤组织经常发生急性或者慢性损伤,例如烧烫伤、糖尿病性足部溃疡等。这些急慢性的皮肤创伤不但会影响病人的生理功能心理健康,同时也带来了巨大的社会经济负担^[1]。因此越来越多的研究致力于如何加速皮肤创面的愈合,促进皮肤组织的修复与再生。尤其是对于糖尿病皮肤溃疡这类慢性创面,血管、神经及相关细胞的功能受损导致创面迁延不愈,目前临床仍缺乏十分有效的治疗方法。

在皮肤修复与再生领域,以干细胞为中心的相关疗法取得了多种令人惊喜的治疗效果。最初的研究认为干细胞的治疗作用与其自身可以分化为多种组织细胞有关,例如干细胞可以分化为脂肪细胞,成骨细胞,软骨细胞,上皮细胞等^[2]。但目前越来越多的研究证明干细胞在创伤修复中主要依靠旁分泌的方式

来促进皮肤创伤的修复,而干细胞自身向受伤部位的移植、分化率很低,而且短暂^[3,4]。此外,干细胞的使用还存在着保存困难、伦理、突变致瘤、免疫排斥等限制。因此寻找一种同时具有干细胞治疗效果,又能克服干细胞缺点治疗方法是十分必要的。而外泌体作为一种细胞分泌的亚细胞成分,广泛参与细胞之间的交流,可以作为干细胞的旁分泌因子来发挥生物学效应,为进一步实现无细胞治疗(cell-free therapy)提供了新的实现途径^[5]。外泌体不但可以作为疾病的诊断、治疗工具,还参与多种病理生理过程,如组织修复、免疫反应与炎症、肿瘤的生长与转移等^[6,7]。本文就外泌体在皮肤修复与再生中作用的研究进展做一综述。

1 外泌体简介

1.1 外泌体的特点

外泌体是细胞分泌的胞外囊泡的一种,主要成分是磷脂双分子层和携带相关内容物。其最早是在 1980 年 Pan 等研究羊

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81271180)

作者简介:时权(1990-),博士研究生,主要研究方向:口腔修复基础与临床,E-mail: shiquan3333@sina.cn

Δ 通讯作者:刘洪臣(1957-),博士生导师,教授,主要研究方向:口腔临床医学,E-mail: liuhc301@hotmail.com,电话:010-66937949

(收稿日期:2017-04-28 接受日期:2017-05-23)

的网织红细胞时被发现,此后这些小囊泡被命名为 "exosomes"^[8]。外泌体的直径约 30-100 nm,其大小与病毒类似。外泌体中含有多种物质,且其内容物可随分泌细胞种类的不同而改变。其主要的成分有蛋白质,miRNA,mRNA,DNA 以及脂质。此外,还有其他种类的 RNA 分子,例如 piRNA, snRNA 等^[9]。据统计,截止到 2015 年 7 月,已有 27642 种 mRNA 和 4934 种 miRNA 被发现并报道^[9]。受体细胞可以通过膜融合、胞吞作用或者细胞特异性的吞噬作用摄入外泌体^[9,10]。外泌体可以将其所携带的内容物等传递给受体细胞,影响细胞的微环境并调节相关蛋白的表达^[11]。

1.2 外泌体的提取与鉴定

外泌体可以从多种体液中提取,包括血液、尿液、乳汁、羊水、滑膜液、胸腔液、腹水、精液、唾液^[3]。此外,外泌体也可以从多种细胞培养上清液中提取。已有的相关报道多集中于干细胞、肿瘤细胞以及免疫细胞。目前最常用的外泌体提取方法是超速离心法^[12]。为了提高提取外泌体的效率及纯度,越来越多的商品化的提取试剂盒也开始大量应用。

有多种方法应用于鉴定提取到的外泌体,其中最重要的是对外泌体的粒径以及蛋白标记物进行检测。对于外泌体的粒径,常用透射电子显微镜、扫描电镜、纳米粒子跟踪分析相关仪器检测^[13]。而对于蛋白标记物则常用 WB 法检测,例如检测跨膜蛋白分子 (CD 9,CD 63,CD 81), 热休克蛋白 (Hsp 70,Hsp 90), 多囊泡胞内体产生相关蛋白 (Alix,TSG 101)^[14]。此外,也可以根据研究本身需要对外泌体所含的 RNA 进行检测^[14]。

1.3 外泌体的优点

外泌体作为干细胞旁分泌途径中的重要成分,在促进皮肤创伤的修复与再生中具有较好的应用前景。相比于直接利用细胞进行组织修复,外泌体具有多种干细胞不可比拟的优点:1. 安全性好。利用外泌体来进行组织修复,可以避免产生免疫排斥反应、血管阻塞、突变成瘤的风险,将安全性大大提高^[3,9]。2. 易保存运输。分离得到的外泌体可以在 -80℃ 长期保存,外泌体的外膜可以保护其内容物。尤其对于 RNA 分子而言,避免了外部 RNA 酶对其的降解作用。3. 作用快效率高。外泌体可以直接被细胞摄入,影响靶细胞的功能,提高了作用效率。4. 无伦理限制。外泌体作为细胞分泌的一种亚细胞结构,其在应用时没有相关的伦理限制。5. 来源广泛。外泌体可以从多种细胞的培养上清、多种体液、血液中提取,来源广泛,便于利用。

2 外泌体对皮肤修复与再生作用

皮肤的创面愈合与再生是一个复杂的生理学过程,需要多种组织、细胞协同作用来替换、修复、重建缺失的细胞结构、组织层次。虽然大多数的皮肤创伤愈合不存在阻碍,但是对于创伤面积大、有慢性疾病影响、合并感染等情况,皮肤的修复再生便会受到影响,有些甚至终身不愈合。生理学中一般将创伤的愈合分为几个阶段:出血期、炎症期、增生期、组织改建期(瘢痕形成期)。目前已有的研究发现,外泌体可以影响其中多个过程、多种细胞促进皮肤的修复与再生。

2.1 促进成纤维细胞的增殖、迁移

皮肤的成纤维细胞在皮肤组织修复与再生中具有重要的作用:参与伤口收缩、胞外基质沉积、组织改建等^[15]。Zhang 等分

离纯化人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hucMSCs) 来源的外泌体,并将其应用于烧伤大鼠模型中^[16,17]。研究发现,该外泌体可以以剂量依赖的方式促进皮肤细胞(真皮成纤维细胞、表皮角质细胞)的增殖。此外,利用该外泌体还可以抑制由热应激引起的皮肤细胞的凋亡,激活 AKT 信号通路,降低前凋亡蛋白 Bax 的表达。在体内试验中,研究者采用局部多点注射的方法,将外泌体注入大鼠二度烧伤模型的伤口周围来评价外泌体的作用。结果显示,脐带间充质干细胞来源的外泌体加速了伤口愈合,促进了再上皮化,提高了 CK 19、PCNA、I 型胶原的表达。而进一步探讨其机制发现,该提取的外泌体中含有 wnt4 蛋白,可以促进 β -catenin 核转移,激活皮 wnt/ β -catenin 通路,促进 PCNA、细胞周期蛋白 D 3, N 钙黏素、I 型胶原等的表达,抑制 E 钙黏素的表达,促进皮肤的修复与再生。从诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[18]、脂肪间充质干细胞^[19]、滑膜间充质干细胞^[20]等提取的外泌体也有类似修复效果。例如 Zhang 等通过体内外研究发现 50 μ g/mL、100 μ g/mL 的 iPSCs 外泌体可以促进人成纤维细胞的增殖与迁移,促进 I、III 型胶原、纤连蛋白的转录与表达,促进皮肤创伤的修复与再生^[18]。

在糖尿病患者中,由于局部组织缺血、缺氧,高糖环境等可使皮肤成纤维细胞的增殖、迁移能力、分泌相关蛋白能力受损,创面愈合困难。Arsalan 等从人的骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 中提取外泌体,并用其处理从糖尿病慢性溃疡创面提取的成纤维细胞,结果显示外泌体可以以浓度剂量依赖的方式促进提取的成纤维细胞的增殖与迁移^[21]。BMMSCs 源性外泌体可以激活在皮肤创面愈合中起重要作用的通路,例如 AKT,ERK,STAT3 等,同时促进促进各种生长因子的表达,例如 HGF,IGF,NGF,SDF-1 等。除了干细胞源性的外泌体,也有学者对体细胞源性的外泌体进行了研究。Adolf 等提取人的循环纤维细胞 (human circulating fibrocytes),并用 PDGF-BB 和 TGF- β 1 刺激,收集细胞培养上清,提取外泌体。检测证实该外泌体无免疫原性,也可以促进糖尿病角质细胞、成纤维细胞的增殖与迁移。在动物模型中,该外泌体可以加速 II 型糖尿病小鼠皮肤创面的愈合^[22]。进一步的分析发现,该外泌体中含有多种的有效成分,如成血管相关的 miR-126、130a、132,抗炎相关的 miR124a、125b,以及调节胶原形成的 miR-21^[22]。

2.2 促进血管新生

对于创面修复而言,血管形成是具有极其重要的生理学作用,其可以运送氧气、营养物质、免疫细胞等到达损伤部位从而促进皮肤相关细胞增殖、胞外基质的沉积。血管形成包括血管内皮基质降解、内皮细胞移行与增殖、内皮细胞管道化分支形成血管环和形成新的基底膜等步骤^[23]。从多种细胞培养上清中提取的外泌体可以促进血管的新生,促进皮肤组织的修复、创面的愈合。Zhang 等提取 iPSCs 源性的外泌体,研究发现该外泌体可以在体外促进人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的增殖、迁移及小管形成能力。在大鼠皮肤全层缺损模型中,外泌体不但可以促进伤口处血管的新生,还可以促进血管的成熟。Liang 等提取人脂肪间充质干细胞源的外泌体,发现其可以被血管内皮细胞所摄取,并且在体内、

体外试验中发现其可以促进血管的形成^[19]。通过对外泌体成分的分析发现 miR-125a 在提取的外泌体中含量丰富并且在血管形成过程中具有重要作用,并且可以抑制 PLL4 的表达,促进血管形成及相关标记物的表达。将 miR-125a 敲低后,该外泌体成血管活性则被抑制^[19]。Yuan 等提取人尿液干细胞源性外泌体,同样发现其可以促进 HUVECs 的增殖、迁移与小管形成,并加速大鼠皮肤创伤的血管新生,促进修复与再生^[24]。

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞,其在生理或病理因素刺激下,可从骨髓动员到外周血参与损伤血管的修复。研究发现,从内皮祖细胞中提取的外泌体具有极大的成血管活性,不但可以促进一般情况下血管的再生、皮肤组织的修复,也可以加速糖尿病皮肤创面的愈合。Li 等的研究表明内皮祖细胞源性的外泌体可以促进血管内皮细胞的增殖、迁移能力,促进 VEGF、HIF-1 α 等成血管相关因子表达^[25]。该课题组进一步研究发现,EPCs 源性的外泌体也可以同时促进正常大鼠和糖尿病大鼠的皮肤创伤的血管新生,加速创伤愈合^[26]。Zhang 等通过微阵列相关分析发现内皮祖细胞源性的外泌体可以影响在成血管中有重要作用的 ERK1/2 通路,调节相关蛋白的表达促进糖尿病性皮肤创面的修复与再生^[27]。

2.3 调节炎症反应

皮肤组织受损之后,可以引起局部炎症反应的发生,同时也伴随着炎症因子分泌的改变。例如在烧伤、糖尿病患者中,局部的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) α 、白介素(interleukin, IL)1 β 等表达升高。过度的炎症反应可能导致多器官功能衰竭,甚至死亡^[28]。外泌体可以通过调节损伤局部的炎症反应来促进皮肤的修复。研究者从 hucMSCs 中提取外泌体,并研究了其在糖尿病大鼠烧伤模型中对炎症反应的作用。动物研究发现,外泌体可以抑制由热应激引起的炎症反应,降低 TNF- α 、IL1- β 的表达,促进抗炎因子 IL-10 的表达^[29]。其中外泌体所含的 miR-181c 在这个过程中起到了重要的作用。miR-181c 的过表达的外泌体可以有效的降低脂多糖刺激的巨噬细胞分泌的炎症因子,抑制 TLR-4 信号通路,减少 NF- κ B/p65 的通路激活,抑制烧伤引起的炎症反应^[29]。

2.4 抑制瘢痕形成

皮肤受损之后的瘢痕形成是创面愈合的难点之一。瘢痕超过一定的限度会引起多种并发症,例如外形的破坏及功能活动障碍等,给患者带来巨大的肉体痛苦和精神痛苦,尤其是烧烫伤、严重外伤后遗留的瘢痕^[30]。而目前的研究发现,外泌体在抑制瘢痕形成方面也有一定的作用。Hu 等提取人脂肪间充质干细胞的外泌体,并且将其应用于小鼠的皮肤缺损修复。通过将外泌体静脉注射入动物体内,对外泌体进行示踪发现其可以被招募至皮肤的伤口周围,发挥其功能,极大地提升伤口愈合的速度^[19]。而且通过组织学分析发现外泌体可以在伤口愈合的早期其可以促进胶原的合成来提高修复速度,晚期则抑制胶原的合成来抑制疤痕组织的形成^[19]。

3 总结与展望

外泌体对于需要组织修复与再生的疾病提供了十分有前景的无细胞治疗实现途径。通过总结外泌体在皮肤组织修复与

再生方面作用的文献,我们认为来自某些干细胞、体细胞的外泌体可以加速皮肤的创伤愈合、促进皮肤组织再生,即使是对于慢性难愈性创面仍有较好的修复效果。因此外泌体为皮肤组织的修复再生开辟了新的研究领域。但是,目前也存在着一些问题需要我们进一步的去探索。例如外泌体的提取纯化过程目前仍相对繁琐,尚不能快速分离出所需的、足量的具有积极作用的外泌体。此外,外泌体促进组织修复与再生的具体机制尚未完全清楚。因此将外泌体应用至临床还需要更多的研究进行探索。

参考文献(References)

- [1] Arya AK, Tripathi R, Kumar S, et al. Recent advances on the association of apoptosis in chronic non healing diabetic wound [J]. World journal of diabetes, 2014, 5(6): 756-762
- [2] Ullah I, Subbarao Raghavendra B, et al. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective [J]. Bioscience Reports, 2015, 35(2): e00191
- [3] Rani S, Ryan AE, Griffin MD, et al. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications[J]. Molecular Therapy, 2015, 23(5): 812-823
- [4] Katsha AM, Ohkouchi S, Xin H, et al. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model[J]. Molecular therapy, 2011, 19(1): 196-203
- [5] Katsuda T, Kosaka N, Takeshita F, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles [J]. Proteomics, 2013, 13(10-11): 1637-1653
- [6] Katsuda T, Kosaka N, Ochiya T. The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers [J]. Proteomics, 2014, 14(4-5): 412-425
- [7] Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy [J]. Annual review of physiology, 2015, 77: 13-27
- [8] Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor[J]. Cell, 1983, 33(3): 967-978
- [9] Rani S, Ritter T. The Exosome-A Naturally Secreted Nanoparticle and its Application to Wound Healing [J]. Advanced materials, 2016, 28(27): 5542-5552
- [10] Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells [J]. The Journal of biological chemistry, 2009, 284(49): 34211-34222
- [11] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [J]. Nature cell biology, 2008, 10(12): 1470-1476
- [12] Rani S. MicroRNA profiling of exosomes isolated from biofluids and conditioned media [J]. Methods in molecular biology, 2014, 1182: 131-144
- [13] Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy [J]. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2011, 87(1): 146-150
- [14] Rani S, O'Brien K, Kelleher FC, et al. Isolation of exosomes for sub-

- sequent mRNA, MicroRNA, and protein profiling [J]. *Methods in molecular biology*, 2011, 784: 181-195
- [15] Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing [J]. *Frontiers in bioscience*, 2004, 9: 283-289
- [16] Zhang B, Wang M, Gong A, et al. HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing [J]. *Stem cells*, 2015, 33(7): 2158-2168
- [17] Zhang B, Wu X, Zhang X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/beta-catenin pathway [J]. *Stem cells translational medicine*, 2015, 4(5): 513-522
- [18] Zhang J, Guan J, Niu X, et al. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis[J]. *Journal of translational medicine*, 2015, 13: 49
- [19] Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts [J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 32993
- [20] Tao S, Guo SC, Li M, et al. Chitosan Wound Dressings Incorporating Exosomes Derived From MicroRNA-126-Overexpressing Synovium Mesenchymal Stem Cells Provide Sustained Release of Exosomes and Heal Full-Thickness Skin Defects in a Diabetic Rat Model[J]. *Stem cells translational medicine*, 2016, 6(3): 736-747
- [21] Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, et al. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro[J]. *Stem cells and development*, 2015, 24(14): 1635-1647
- [22] Geiger A, Walker A, Nissen E. Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2015, 467(2): 303-309
- [23] Yoo SY, Kwon SM. Angiogenesis and its therapeutic opportunities [J]. *Mediators of inflammation*, 2013, 2013: 127170
- [24] Yuan H, Guan J, Zhang J, et al. Exosomes secreted by human urine-derived stem cells accelerate skin wound healing by promoting angiogenesis in rat[J]. *Cell biology international*, 2016
- [25] Li X, Chen C, Wei L, et al. Exosomes derived from endothelial progenitor cells attenuate vascular repair and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(2): 253-262
- [26] Li X, Jiang C, Zhao J. Human endothelial progenitor cells-derived exosomes accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats by promoting endothelial function [J]. *Journal of diabetes and its complications*, 2016, 30(6): 986-992
- [27] Zhang J, Chen C, Hu B, et al. Exosomes Derived from Human Endothelial Progenitor Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis Through Erk1/2 Signaling [J]. *International journal of biological sciences*, 2016, 12(12): 1472-1487
- [28] Leclerc T, Thepenier C, Jault P, et al. Cell therapy of burns [J]. *Cell proliferation*, 2011, 44(Suppl 1): 48-54
- [29] Li X, Liu L, Yang J, et al. Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation [J]. *EBioMedicine*, 2016, 8: 72-82
- [30] Heng MC. Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration[J]. *International journal of dermatology*, 2011, 50(9): 1058-1066

(上接第 544 页)

- [28] Jónsdóttir B, Jaworowski Å, San Miguel C, et al. IL-8 predicts early mortality in patients with acute hypercapnic respiratory failure treated with noninvasive positive pressure ventilation [J]. *BMC Pulm Med*, 2017, 17(1): 35
- [29] Mohan A, Arora S, Uniyal A, et al. Evaluation of plasma leptin, tumor necrosis factor- α , and prealbumin as prognostic biomarkers during clinical recovery from acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Lung India*, 2017, 34(1): 3-8
- [30] Kochetkova EA, Nevzorova VA, Ugai LG, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha and TNF Superfamily Members in Bone Damage in Patients with End-Stage Chronic Obstructive Lung Disease Prior to Lung Transplantation[J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 99(6): 578-587