

间充质干细胞来源的外泌体与眼免疫性疾病

梁春兰 师 齐 刘 莲 钟敬祥

摘 要 外泌体(exosomes, EXOs),直径 30~150nm,指从细胞膜上脱落或由细胞分泌的脂质双分子层结构的囊泡状小体。EXOs 包含复杂的 RNAs 和蛋白质,且具有生物学功能。绝大多数细胞都能分泌 EXOs,而间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源的 EXOs 具有产量多、稳定性好和无免疫原性等优势。间充质干细胞来源的外泌体(MSC-EXOs)可以修复组织损伤、抑制炎症反应、调节免疫系统,已被广泛探索作为一种基于再生细胞治疗眼科疾病的药物。本文重点综述了来自骨髓、脂肪组织和脐带 MSC-EXOs 在眼免疫性疾病中的研究进展,包括干燥综合征干眼、同种移植角膜移植排斥反应和自身免疫性葡萄膜炎,以期眼免疫性疾病的治疗提供新的研究方向。

关键词 眼免疫性疾病 间充质干细胞 外泌体 先天性免疫 适应性免疫

中图分类号 R770.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.09.037

眼睛是一个典型的免疫赦免区,外来移植组织或其他抗原无法被眼部免疫系统识别和清除^[1]。眼睛有 3 层连续的防御机制以维持免疫赦免状态,包括有效的血-眼屏障(包括血-房水屏障及血-视网膜屏障)、调节性 T 细胞(regulatory cell, Treg)诱导的眼部微环境,以及前房相关性免疫偏离^[2]。然而一旦眼睛的免疫系统被破坏,眼部一些免疫性疾病可能会导致灾难性后果。临床上常见的眼免疫性疾病,如眼超敏反应、角膜移植排斥反应、自身免疫性眼病等,可严重地威胁人们的视力。然而目前临床上治疗眼免疫性疾病的药物或手术疗效仍有一定的局限性。

近年来,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其免疫调节潜力而被广泛应用于免疫相关疾病的实验与临床研究^[3]。MSCs 是具有自我更新和多向分化能力的多能干细胞,可以从许多组织中分离出来,如骨、脂肪组织、脐带、肝脏、羊水、胎盘以及骨髓等^[4]。MSCs 主要通过旁分泌细胞外囊泡的机制介导细胞间通讯,例如释放外泌体^[5]。几乎所有的细胞都能分泌外泌体。MSCs 像所有其他细胞一样产生外泌体,但也有一些差异。MSCs 是已知产生外泌体的细胞类型中最多产的。这些外泌体不仅表达共同的表面蛋白 CD9、CD81,而且还特异地表达一些黏附分子,如 CD29、CD44 和 CD73^[6]。外泌体是一种无细胞的治疗方法,具有显著的治疗效益:它们易于

分离、管理和存储,并且不会触发免疫排斥和成瘤的风险^[6]。与 MSCs 比较,间充质干细胞来源的外泌体(mesenchymal stem cell-derived exosomes, MSC-EXOs)具有与 MSCs 相似的功能。由于纳米大小和脂质双分子层的结构,外泌体可以很容易地通过生物屏障,进入靶器官,从而发挥作用^[7]。MSC-EXOs 也因此凭借自身优势发挥着细胞间通讯、物质传递和免疫调节作用,推动着纳米载药技术、基因工程等技术的发展。

一、MSC-EXOs 的免疫调节作用

研究表明,不同来源的 MSCs-EXOs 可以有效地激活或抑制免疫反应,调控炎症反应、自身免疫,并参与肿瘤、感染性疾病和自身免疫性疾病的发展^[8]。MSC-EXOs 可以通过调控多种免疫细胞从而调节先天性和适应性免疫反应^[9]。例如促进 Treg 分化、抑制树突细胞的分化和成熟、抑制 T 淋巴细胞的增殖与活性、抑制 NK 细胞的细胞毒性作用等^[10]。

1. MSC-EXOs 调节先天性免疫反应:先天性免疫在作为人体防御的第一道防线,在早期炎症反应中发挥重要作用。MSCs 可以调节多种类型的先天免疫细胞,如巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞、NK 细胞等^[11]。MSC-EXOs 可以影响巨噬细胞的极化,即 M1 向 M2 表型的转化。巨噬细胞是先天免疫中的重要细胞,它们至少有两种分化形式,即 M1 型和 M2 型。促进炎症的 M1 型巨噬细胞在宿主抵御细菌和病毒感染中起着核心作用,而抗炎的 M2 型巨噬细胞与寄生虫感染、组织重塑、纤维化和肿瘤疾病相关^[12]。Sun 等^[13]结果表明,脐带间充质干细胞来源

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81970806)

作者单位:510630 广州,暨南大学附属第一医院眼科

通信作者:刘莲,主任医师,硕士生导师,电子信箱:liulianbb@

163.com

的外泌体 (umbilical cord mesenchymal stem cell - derived exosomes, UCMSC - EXOs) 可诱导巨噬细胞表型极化, 抑制炎症, 促进脊髓损伤修复。类似地, Zhao 等^[14] 研究发现, 脂肪间充质干细胞来源的外泌体 (adipose stem cell - derived exosomes, ADSC - EXOs) 可以通过携带的活性 STAT3 来减少巨噬细胞极化为 M2 型。NK 细胞是先天免疫的主要效应细胞, 可有效介导在炎症反应中杀死肿瘤细胞, 调节免疫。目前关于 MSC - EXOs 与 NK 细胞相互作用的研究较少。Spaggiari 等^[15] 研究表明, MSCs 在 IL - 2 诱导下的可以抑制静息状态时 NK 细胞的增殖, 而对激活状态时的 NK 细胞无效。然而, 活化的 NK 细胞可以有效降解 MSCs, 这在应用 MSCs 治疗移植物抗宿主病时应予以考虑^[15]。MSCs/MSC - EXOs 可以调控先天性免疫细胞, 同样地免疫细胞也可能影响前者的功能, 两者相互作用。可见, MSCs/MSC - EXOs 与先天免疫细胞之间的免疫调控机制相当复杂。

2. MSC - EXOs 调节适应性免疫反应: 适应性免疫指后天获得的, 是淋巴细胞在特定抗原刺激下做出的特异性反应, 主要包括细胞免疫和体液免疫。T 淋巴细胞是参与细胞免疫的淋巴细胞, 受抗原刺激并转化为淋巴细胞。T 淋巴细胞中有许多亚群, 包括细胞毒性 T 细胞 (CTL)、抑制 T 细胞 (Ts)、Treg 和辅助 T 细胞 (Th) 等。研究数据表明, T 淋巴细胞在许多自身免疫性疾病和炎症性疾病的发生、发展中起着重要作用^[16]。MSCs - EXOs 可影响 T 淋巴细胞的分化和功能调控。ADSC - EXOs 可以抑制 T 淋巴细胞的分化、激活、增殖, 以及促炎性细胞因子 IFN - γ 的产生^[17]。骨髓间充质干细胞来源的外泌体 (bone marrow mesenchymal stem cell - derived exosomes, BMSC - EXOs) 可诱导 Th1 转化为 Th2, 显著降低促炎性细胞因子 TNF - α 、IL - 1 β 的水平, 提高抗炎性细胞因子 TGF - β 的水平^[18]。B 淋巴细胞也是重要的适应性免疫细胞, 它介导体液免疫和分泌抗体。MSCs - EXOs 可影响 B 淋巴细胞的状态和功能。Khare 等^[19] 将 BMSC - EXOs 和外周血单核细胞共培养, 发现 BMSC - EXOs 通过调控活化 B 淋巴细胞 mRNA 可显著抑制 B 淋巴细胞的增殖、成熟, 从而影响 B 淋巴细胞的功能。

二、眼免疫学疾病与 MSC - EXOs 的关系

鉴于目前来源于骨髓、脂肪及脐带组织的 MSC - EXOs 被广泛地研究, 本文重点总结了 BMSC - EXOs、ADSC - EXOs、UCMSC - EXOs 在眼免疫性疾病的研究进展, 包括干燥综合征角膜结膜炎、自身免疫性葡

萄炎和同种异体角膜移植排斥反应。此外, 一些可能与免疫相关的疾病也引起了越来越多的关注。年龄相关性黄斑变性 (age - related macular degeneration, AMD)、青光眼、糖尿病性视网膜病变和其他与年龄相关的退行性眼病, 被认为有很强的免疫学基础^[20]。

1. 免疫相关性泪腺疾病: 泪腺是眼部分泌免疫系统的主要组织。干燥综合征是一种慢性系统性自身免疫性疾病, 具有外分泌腺和黏膜上皮淋巴细胞浸润和特异性自身抗体的特征, 可引起眼干和口干^[21]。干燥综合征的发病机制是由 Th1/Th17 细胞和异常的 Treg 引起的免疫失衡, 包括大量的 B 淋巴细胞和巨噬细胞聚集^[22]。巨噬细胞表型 M1/M2 极化在慢性炎症的过程中起着关键作用^[12]。Lu 等^[23] 研究表明, UCMSC 可有效抑制兔模型中干燥综合征角膜结膜炎的炎症, 从而恢复泪腺功能。这种效应可能部分归因于蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 通路的激活, 诱导巨噬细胞极化为抗炎 M2 表型, 抑制巨噬细胞相关炎性细胞因子 TNF - α 、IL - 6 的分泌, 增加抗炎性细胞因子 IL - 10、TGF - β 的表达^[23]。

MSCs - EXOs 可以通过 Treg 来发挥免疫调节能力^[24]。另有研究分别使用 BMSC 和 BMSC - EXOs 治疗干燥综合征的模型小鼠。研究表明, BMSC 和 BMSC - EXOs 治疗: ①成功地保留了小鼠唾液腺和泪腺的功能; ②通过诱导病变周围更多的 T 淋巴细胞、下调 TNF - α 、IL - 1 β 和上调 IL - 10 来调节免疫; ③与 BMSC 治疗比较, BMSC - EXOs 具有安全性、生物利用度高、使用方便等优势^[25]。

2. 同种异体角膜移植排斥: 角膜移植是全球常见的移植形式, 由于角膜无血管和淋巴管的特性, 角膜作为移植组织具有相对的免疫特权^[26]。有研究报道, 角膜移植失败的主要原因是同种异体移植排斥反应, 其中抗炎 Treg 在识别同种异体抗原和促进移植耐受性方面发挥重要作用^[27]。目前对角膜移植排斥反应的药物治疗并不理想。Lu 等^[28] 把 BMSC 注射到大鼠的结膜下, 发现角膜移植的存活率和透明度提高, 水肿以及新生血管减少, 这可能是由于 CD4⁺ 细胞和 CD68⁺ 巨噬细胞减少, 抗炎 Treg 的增加有关。有证据表明同种异体的移植物释放的外泌体可以用于延长异体移植的存活率^[29]。然而, MSC - EXOs 在角膜移植模型中疗效仍然缺乏直接证据。

3. 免疫相关的葡萄膜疾病: 葡萄膜炎是可能导致失明眼科疾病。虽然葡萄膜炎早期阶段的病因可能存在差异 (特别是感染性和非感染性葡萄膜炎之间

的区别),但这是由一种快速、常见的炎症途径引起的,导致多种常见的临床表现^[30]。对于非感染性葡萄膜炎,如自身免疫性葡萄膜炎,是一种由 T 淋巴细胞介导的不适当的免疫反应^[31]。Xie 等^[32]在实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis,EAU)的小鼠模型中探究了 BMSC-EXO 的作用,表明 BMSC-EXO 通过下调 TH1、TH17、Treg、抑制 T 淋巴细胞增殖,从而减轻 EAU 的临床及病理表现。但是 Bai 等^[33]通过在 EAU 的小鼠眼周注射 UC-MSC-EXO,结果显示 UCMSC-EXO 通过抑制白细胞迁移发挥治疗作用。然而,他们没有观察到 UC-MSC-EXO 对 T 淋巴细胞增殖的抑制作用,并表明 UCMSC-EXO 抑制自身免疫反应炎症的机制并不依赖于 T 淋巴细胞抑制和凋亡诱导。如上所述,BMSC-EXO 和 UCMSC-EXO 在 EAU 的小鼠模型中的分子机制似乎有很大的差别^[32,33]。笔者推测这种差异可能归因于 MSC-EXO 组织来源上的差异造成不同的微环境。从不同来源 MSC-EXO 的治疗潜力,特别是其抗炎和免疫调节机制,仍有待于进一步研究。

4. 其他潜在的免疫相关眼病:青光眼是一种常见的与年龄相关的视神经疾病,是世界范围内失明的主要原因。一种自身免疫成分参与了青光眼的发病机制,而最直接的证据是在患者青光眼视网膜中检测到 IgG 抗体沉积^[34]。T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、浆细胞和小胶质细胞在青光眼的进展中相互作用^[35]。研究表明,MSCs 可能是视网膜神经节细胞保护的潜在治疗方法。Pan 等^[36]研究表明,UCMSC-EXO 通过促进视网膜神经节细胞的存活和胶质细胞的活化而不是轴突再生,在神经保护中至关重要。值得注意的是,自身免疫与青光眼之间的关系仍存在争议。能否将青光眼亚型归类为自身免疫性青光眼,仍有待于进一步研究。

老年性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)是一种进行性致盲疾病,是 50 岁以上不可逆转失明的主要原因。AMD 的病理损伤积累视网膜色素上皮和 Bruch 膜,可导致晚期光感受器变性、玻璃膜疣样变性,地图样萎缩(干性/萎缩性)和脉络膜新生血管(湿性/新生血管性)。临床上针对湿性 AMD 患者主要采用玻璃体腔注射抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的药物,费用较高且需患者较好的依从性进行多次药物注射。研究发现,MSC-EXO 显著抑制 VEGF 表达和分泌,

且呈剂量依赖性^[37]。以上证据可以使笔者进一步了解 AMD 的病理情况,也可以为治疗 AMD 提供新的思路。

三、展 望

MSCs 与 MSC-EXO 比较,两种方式各有优缺点,例如 MSCs 可以直接运用于研究中,无需额外的分离和纯化步骤。但 MSC-EXO 是一种无细胞的治疗方法,仍然具有一定的优势。目前 MSCs 常见的组织来源有骨髓、脂肪和脐带等,因此本文重点综述了 BMSC-EXO、ADSC-EXO、UCMSC-EXO 在干燥综合征角膜结膜炎、同种移植角膜移植排斥反应和自身免疫性葡萄膜炎的研究进展。有趣的是,使用不同来源的 MSCs 或 MSC-EXO 的不同研究在相似疾病模型中具有不同的分子机制,但均表明 MSCs 或 MSC-EXO 具有一定的疗效。然而,MSCs 或 MSC-EXO 的免疫机制尚不完全清楚。不同组织来源 MSC-EXO 的含量、免疫调节能力、分泌细胞因子谱等方面的差异是否对实验结果或结论产生影响,在今后的研究中仍需保持谨慎的态度。此外,除了不同的组织来源,实验中外泌体不同的分离方法、培养基和培养环境、建模引起的不同微环境、患者与动物疾病模型之间的区别等因素也同样值得注意。MSC-EXO 治疗不同疾病的基础方法尚不明确,最佳的 MSCs 来源、给药方式、剂量、临床的有效性、安全性等仍有待于进一步探索。否则,可能无法在临床上发挥 MSC-EXO 的真正治疗潜力。

参考文献

- 1 孟宁,李志杰,彭广华. 眼免疫赦免与免疫偏离[J]. 眼科新进展, 2000, 20(2): 161-163
- 2 Perez VL, Caspi RR. Immune mechanisms in inflammatory and degenerative eye disease [J]. Trends Immunol, 2015, 36(6): 354-363
- 3 Lai P, Weng J, Guo L, et al. Novel insights into MSC-EVs therapy for immune diseases [J]. Biomark Res, 2019, 7(1): 6
- 4 Brown C, McKee C, Bakshi S, et al. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2019, 13(9): 1738-1755
- 5 Yu B, Li XR, Zhang XM. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as a new therapeutic strategy for ocular diseases [J]. World J Stem Cells, 2020, 12(3): 178-187
- 6 Nuzzi R, Caselgrandi P, Vercelli A. Effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on retinal injury: a review of current findings [J]. Stem Cells Int, 2020, 2020(4): 8883616
- 7 He GH, Zhang W, Ma YX, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes ameliorate blue light stimulation in retinal pigment epithelium cells and retinal laser injury by VEGF-dependent mechanism

- [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(4): 559 – 566
- 8 Ha DH, Kim HK, Lee J, *et al.* Mesenchymal stem/stromal cell – derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration[J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1157
 - 9 Ren K. Exosomes in perspective: a potential surrogate for stem cell therapy[J]. *Odontology*, 2019, 107(3): 271 – 284
 - 10 韩睿, 李琳, 王润清, 等. 间充质干细胞来源外泌体对免疫功能调控的作用与应用前景[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(17): 2762 – 2769
 - 11 Shi Y, Wang Y, Li Q, *et al.* Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(8): 493 – 507
 - 12 Sica A, Erreni M, Allavena P, *et al.* Macrophage polarization in pathology[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(21): 4111 – 4126
 - 13 Sun G, Li G, Li D, *et al.* HUCMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 89(4): 194 – 204
 - 14 Zhao H, Shang Q, Pan Z, *et al.* Exosomes from adipose – derived stem cells attenuate adipose inflammation and obesity through polarizing M2 macrophages and beiging in white adipose tissue[J]. *Diabetes*, 2018, 67(2): 235 – 247
 - 15 Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, *et al.* Mesenchymal stem cell – natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL – 2 – induced NK – cell proliferation[J]. *Blood*, 2006, 107(4): 1484 – 1490
 - 16 Scheinecker C, Göschl L, Bonelli M. Treg cells in health and autoimmune diseases: New insights from single cell analysis[J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102376
 - 17 Blazquez R, Sanchez – Margallo FM, de la Rosa O, *et al.* Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 556
 - 18 Chen W, Huang Y, Han J, *et al.* Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells – derived exosome[J]. *Immunol Res*, 2016, 64(4): 831 – 840
 - 19 Khare D, Or R, Resnick I, *et al.* Mesenchymal stromal cell – derived exosomes affect mRNA expression and function of B – lymphocytes[J]. *Front Immunol*, 2018, 9(3): 3053
 - 20 Perez VL, Caspi RR. Immune mechanisms in inflammatory and degenerative eye disease [J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(4): 354 – 363
 - 21 Lopez – Miguel A, Teson M, Martin – Montanez V, *et al.* Clinical and molecular inflammatory response in Sjogren Syndrome – associated dry eye patients under desiccating stress[J]. *Am J Ophthalmol*, 2016, 161: 133 – 141
 - 22 Gao S, Wang Y, Li Y, *et al.* Tetrahedral framework nucleic acids re-establish immune tolerance and restore saliva secretion in a Sjögren’s Syndrome mouse model[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(36): 42543 – 42553
 - 23 Lu X, Li N, Zhao L, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate ongoing autoimmune dacryoadenitis in rabbits via polarizing macrophages into an anti – inflammatory phenotype[J]. *Exp Eye Res*, 2020, 191: 107905
 - 24 Riazifar M, Mohammadi MR, Pone EJ, *et al.* Stem cell – derived exosomes as nanotherapeutics for autoimmune and neurodegenerative disorders[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(6): 6670 – 6688
 - 25 Abughanam G, Elkashy OA, Liu Y, *et al.* Mesenchymal stem cells extract (MSCsE) – based therapy alleviates xerostomia and keratoconjunctivitis sicca in Sjogren’s Syndrome – like disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4750
 - 26 Mahabadi N, Czyz CN, Tariq M, *et al.* Corneal graft rejection[M]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2021, PMID: 30085585
 - 27 Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T lymphocytes and allograft rejection[J]. *Front Immunol*, 2016, 7(12): 582
 - 28 Lu X, Chu C, Liu X, *et al.* High – throughput RNA – sequencing identifies mesenchymal stem cell – induced immunological signature in a rat model of corneal allograft rejection[J]. *PLoS One*, 2019, 14(9): e0222515
 - 29 Gonzalez – Nolasco B, Wang M, Prunevillie A, *et al.* Emerging role of exosomes in allorecognition and allograft rejection[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2018, 23(1): 22 – 27
 - 30 Krishna U, Ajanaku D, Denniston AK, *et al.* Uveitis: a sight – threatening disease which can impact all systems[J]. *Postgrad Med J*, 2017, 93(1106): 766 – 773
 - 31 Barry RJ, Nguyen QD, Lee RW, *et al.* Pharmacotherapy for uveitis: current management and emerging therapy[J]. *Clin Ophthalmol*, 2014, 8(1): 1891 – 1911
 - 32 谢若天, 白伶伶, 杨静, 等. 大鼠来源的间充质干细胞外泌体对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠模型的治疗作用[J]. *中华眼底病杂志*, 2018, 34(6): 562 – 567
 - 33 Bai L, Shao H, Wang H, *et al.* Effects of mesenchymal stem cell – derived exosomes on experimental autoimmune uveitis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4323
 - 34 Parisi V, Oddone F, Ziccardi L, *et al.* Citicoline and retinal ganglion cells: effects on morphology and function[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16(7): 919 – 932
 - 35 Gramlich OW, Beck S, von Thun Und Hohenstein – Blaul N, *et al.* Enhanced insight into the autoimmune component of glaucoma: IgG autoantibody accumulation and pro – inflammatory conditions in human glaucomatous retina[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57557
 - 36 Pan D, Chang X, Xu M, *et al.* UMSC – derived exosomes promote retinal ganglion cells survival in a rat model of optic nerve crush[J]. *J Chem Neuroanat*, 2019, 96(1): 134 – 139
 - 37 Pakravan K, Babashah S, Sadeghizadeh M, *et al.* MicroRNA – 100 shuttled by mesenchymal stem cell – derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF – 1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2017, 40(5): 457 – 470

(收稿日期: 2022 – 04 – 21)

(修回日期: 2022 – 05 – 02)