

## · 前沿进展 ·

## 外来体对心脏保护作用的研究进展

张文潇, 项慧玲

**【摘要】** 外来体多数是指心血管系统细胞释放的微小脂质双分子囊泡结构, 尽管目前外来体的纯化方法仍存在一定技术挑战, 但外来体已被证实具有心脏保护作用, 如从血浆中纯化的外来体可激活心脏保护途径, 而干细胞释放的外来体有利于改善心血管功能。本文主要综述了心血管系统细胞和干细胞释放的外来体对心脏保护作用的研究进展, 以期对心血管疾病的治疗提供新方向。

**【关键词】** 外来体; 心血管系统; 心脏保护; 综述

**【中图分类号】** R 977.6 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2017.07.001

张文潇, 项慧玲. 外来体对心脏保护作用的研究进展 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25 (7): 1-6. [www.syxnf.net]

ZHANG W X, XIANG H L. Progress on cardiac protective effect of exosomes [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2017, 25 (7): 1-6.

**Progress on Cardiac Protective Effect of Exosomes** ZHANG Wen-xiao, XIANG Hui-ling

Department of Cardiovascular Medicine, the Central Hospital of Edong Medical Group, Huangshi 435000, China

Corresponding author: XIANG Hui-ling, E-mail: paper66@163.com

**【Abstract】** Exosomes are minute lipid bi-molecular vesicle structures, mostly came from cardiovascular system, in spite of purified method of exosomes is still exist some technological challenges, many studies proved that exosomes had certain cardiac protective effect; exosomes purified from plasma can activate the cardiac protection pathway, stem cells-induced exosomes can improve the cardiovascular function. This paper reviewed cardiac protective effect of exosomes purified from plasma and stem cells, to provide new direction for cardiovascular disease.

**【Key words】** Exosomes; Cardiovascular system; Cardioprotection; Review

目前, 临床上将直径为 50 ~ 100 nm 的颗粒称为外来体, 而将直径为 100 nm ~ 1 μm 的颗粒称为微粒, 不同颗粒的释放机制不同, 外来体主要通过内体途径释放。外来体表面可携带细胞表面标志物, 与邻近细胞表面受体相结合, 也可与远处细胞相互作用。此外, 外来体的水泡性质意味着其能携带蛋白质信使 RNA (mRNA) 和微小 RNA (miRNA), 并将 mRNA 和 miRNA 转移到受体细胞, 从而实现单元到单元的通信。临床研究表明, 多数心血管系统细胞可释放外来体, 且释放的外来体均被证实具有心脏保护作用。本文主要综述心血管系统细胞和干细胞释放的外来体对心脏保护作用的研究进展, 为心血管疾病的治疗提供新的方向。

## 1 外来体

**1.1 概述** 外来体一词是于 1981 年首次提出并用来描述由细胞释放的亚微小脂质囊泡结构<sup>[1]</sup>, 随后外来体被具体指含有转铁蛋白受体的直径约 50 nm 的囊泡 (见图 1a)<sup>[2-3]</sup>, 几年后外来体被认为是细胞脱落的多余蛋白质, 直到 2007 年才有研究发现, 外来体中含有可以在细胞间转移的 miRNA<sup>[4]</sup>, 故其

作为生物标志物和潜在的治疗靶点开始受到临床极大关注。大多数由细胞释放的外来体直径为 50 ~ 100 nm, 该部分外来体最初通过细胞内多泡体与细胞膜融合产生, 并从细胞内释放, 故外来体与通过质膜脱落释放的直径为 100 nm ~ 1 μm 的微粒不同。但目前的分离技术尚难获得纯外来体, 临床提供的外来体多为微粒和细胞外囊泡的混合物, 如凋亡小体等<sup>[5-6]</sup>。因此, 实验过程中使用的细胞囊泡分离物应称为细胞外囊泡 (EVs)。

**1.2 分离方法** 将 EVs 与血液或组织培养基分离的常用方法包括超速离心法、沉淀、亲和分离技术和分子排阻色谱法<sup>[7]</sup>, 但上述方法均可能导致分离的 EVs 中含有少量微粒<sup>[5-6]</sup>。密度梯度纯化离心法从大分子蛋白质中分离囊泡的纯度较高, 但耗时且产量低; 此外, 由于其他血液成分 (如脂蛋白、蛋白质大分子复合物和血浆蛋白质) 与外来体体积甚至密度相似, 故可在一定程度上污染分离的囊泡。因此, 从培养的细胞中分离 EVs 时需使用无血清培养基或预先清除了血清的培养细胞, 以减少其他血清成分的污染, 但需要注意的是使用无血清培养基时细胞健康是关键因素, 因经历细胞凋亡的细胞可分裂、释放污染囊泡的凋亡小体, 从而影响 EVs 纯度<sup>[8]</sup>。

既往研究显示, 分离的 EVs 纯度较高时产量一定不足,

435000 湖北省黄石市, 鄂东医疗集团中心院区心血管内科

通信作者: 项慧玲, E-mail: paper66@163.com

理论上直径为 100 nm 的单个外来体含有约 1 500 个蛋白质, 故 1 ml 血液中可以完全纯化约 1 010 个外来体, 预计最多产出 1  $\mu$ g 蛋白质<sup>[9-10]</sup>, 具体见表 1。临床研究表明, 与运输有关的内吞体分选转运复合物 (ESCRT) 与外来体释放有关, 但抑制 ESCRT 蛋白质的关键酶不能完全消除外来体。由于神经酰胺富含外来体且参与其腔内形成, 故可采用中性鞘磷脂酶抑制剂抑制外来体释放<sup>[11]</sup>, 但该抑制剂是否对外来体释放具有特异性尚不能明确<sup>[12]</sup>。

采用流式细胞术检测微泡是具有挑战性的<sup>[13]</sup>。由于微泡比光的波长小, 故需要专门技术来量化和可视化外来体, 特别是小体积外来体, 必须使用动态光散射或原子力显微镜确定外来体大小和浓度<sup>[7]</sup>, 透射电子显微镜或低温电子显微镜可观察颗粒泡状本质 (见图 1b ~ d)<sup>[14]</sup>, 跨膜蛋白 (CD9, CD63, CD81) 和热休克蛋白 (Hsp70) 可作为外来体的分子标志物。临床常通过膜标记蛋白质判断外来体来源, 但许多外来体具有相似的膜标记蛋白质, 故外来体的来源较难确定<sup>[13]</sup>。由于外来体内容通常反映原始细胞内容, 故外来体成分可能有助于识别生物标志物。

## 2 心血管系统细胞释放的外来体的心脏保护作用

微泡和外来体均可在糖尿病、心血管疾病、内皮细胞功能障碍、凝血功能障碍和多囊卵巢综合征发生发展中扮演重要角色<sup>[7]</sup>, 如急性冠脉综合征患者血液中内皮细胞起源和具有凝血作用的循环微泡浓度升高<sup>[15]</sup>, 以微泡作为内皮细胞功能障碍标志物有助于识别冠心病高风险患者<sup>[16]</sup>。健康个体血液中含有大量 EVs, 血浆中约含有 1 010 个/ml 囊泡<sup>[9-10]</sup>, EVs 和囊泡主要来自血小板和红细胞, 少量来自淋巴细胞、内皮细胞和实质细胞。ARRAUD 等<sup>[13]</sup>使用冷冻电子显微镜观察到血液中 EVs 的结构, 并证实大多数 EVs 是直径约 200 nm 的球形结构, 同时他们还观察到较大的未知来源的管状结构 (见图 1b、c), 并估计在无血小板血浆中 EVs 数量达到  $5 \times 10^7$  个/ml; 通过检查外来体表面膜标记蛋白质认为相似数量的囊泡来自血小板和红细胞。鉴于健康人血浆中 EVs 数量较多, 故探究外来体的功能具有重要的临床意义。笔者检索、分析大量文献总结出心血管系统细胞释放的 EVs 的作用 (见表 2), 并进一步分析外来体的心脏保护作用。

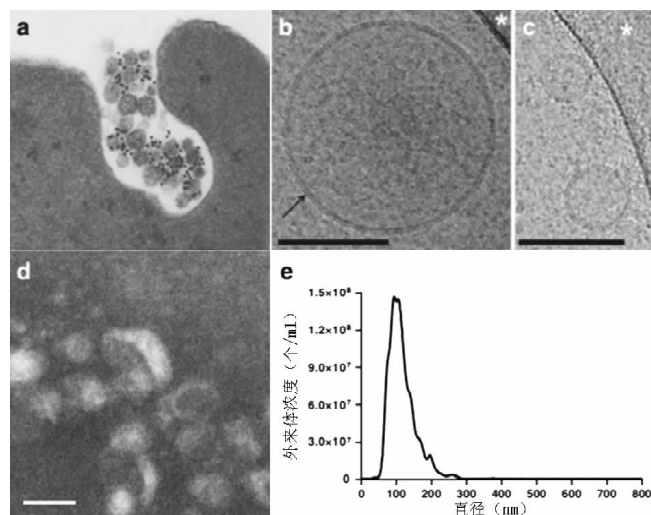
### 2.1 血小板释放的外来体的心脏保护作用

血小板释放的外来体的作用机制尚未完全明确, 其可能同时有害和有益<sup>[17]</sup>。血小板释放的外来体通常是前血栓形成的, 其可以在体外和体内刺激血管生成<sup>[18-19]</sup>。将血小板释放的微泡注入慢性心肌缺血大鼠的缺血心肌可增加功能性毛细血管数量; 血管损伤后血小板局部活化、脱颗粒, 进而释放包含外来体和微泡的 EVs<sup>[20]</sup>。目前有研究已证实, 血小板释放的 EVs 与血管生成早期生长细胞相互作用改变了基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) /趋化因子受体 4 (CXCR4) 信号传导, 并刺激其成熟和再内皮化<sup>[21]</sup>。因此, 测量血浆微泡浓度具有重要诊断价值, 如非冠状动脉疾病患者血小板和其他细胞释放的微泡数量在压力超声心动图后立即增加, 而冠状动脉疾病患者血小板和其他细胞释放的微泡数量在压力超声心动图后无变化<sup>[22]</sup>。

### 2.2 心肌细胞释放的外来体的心脏保护作用

心肌细胞在体

外释放外来体已得到临床证实 (见图 1e)<sup>[23-24]</sup>, 该外来体的蛋白质和 mRNA 含量在不同培养条件和刺激 (如氧化应激) 下均会发生改变<sup>[23,25]</sup>。临床研究表明, 在氧化应激或葡萄糖剥夺条件下, 新生儿心肌细胞和心脏样 H9c2 细胞会释放大量外来体; 外来体与内皮细胞共培养过程中可诱导内皮细胞增殖、血管生成及增加受体细胞中葡萄糖摄取量和糖酵解活性<sup>[26-27]</sup>。但还有研究显示, 糖尿病大鼠心肌细胞释放的外来体不仅抑制促血管生成能力, 还抑制血管生成, 分析其原因可能与 miRNA-320 转移及其受体——心脏内皮细胞中靶基因 (IGF-1, Hsp20 和 Ets2) 下调有关<sup>[28]</sup>。此外, 糖尿病大鼠的循环微泡由于改变了 miRNA-126 的表达而对内皮祖细胞功能产生负面影响<sup>[29]</sup>。因此, 外来体功能丧失可能有助于心血管疾病的治疗。



注: a 为细胞内体与绵羊网织红细胞质膜融合后通过胞吐释放外来体 (图片来源于文献 [3]); b、c 为纯血浆冷冻电子显微镜图, 球形 EVs 嵌入无血小板血浆的薄膜中, b 中 EVs 直径为 185 nm, c 中 EVs 直径分别为 45 nm、60 nm, EVs 外围的脂质双层是两条相距 4 nm 的暗线 (箭头指向处), 背景颗粒状部分与血浆蛋白质含量高有关, 比例尺为 100 nm (图片来源于文献 [14]); d 是采用差速超速离心法从大鼠血浆中分离外源体的透射电子显微镜图, 比例尺为 100 nm; e 为采用纳米颗粒跟踪分析技术确定的原代成年大鼠心肌细胞释放外来体情况

图 1 外来体基本情况

Figure 1 General information of alien body

### 2.3 血管平滑肌细胞释放的外来体的心脏保护作用

血管钙化与主要心脏不良事件有关。在矿化最早阶段, 血管平滑肌细胞释放形成核心磷酸钙晶体和促进血管钙化的外来体<sup>[30]</sup>, 表明调节血管平滑肌细胞释放外来体的途径可能是预防钙化的新靶点。

### 2.4 内皮细胞释放的外来体的心脏保护作用

心脏细胞类型间的沟通机制及其是否可以用于治疗越来越受到临床关注, 如一些药物可以通过刺激内皮细胞和心肌细胞间的心脏保护途径而起作用<sup>[31]</sup>。外来体和微泡是细胞间的重要通信手段, 特别

是需要通过专门通信途径,如免疫突触<sup>[32-33]</sup>。目前,临床正在积累外来体在心血管系统中的沟通作用<sup>[7,34]</sup>,如原始内皮细胞与激活的周细胞共同培养,外来体通常包围在体内并与其连通,以外显子依赖性方式刺激血管生成<sup>[35]</sup>;内皮细胞通过转移富含miRNA-143/145的EVs来控制共培养平滑肌细胞中的靶基因表达及应对剪切应力<sup>[36]</sup>;对载脂蛋白E(ApoE)(-/-)的动脉粥样硬化小鼠注射EVs后发现其主动脉粥样硬化病变缓解<sup>[37]</sup>。内皮细胞释放的外来体的另一作用是能刺激受体细胞的迁移和血管生成<sup>[7]</sup>,该作用与miRNA-214表达有关<sup>[36]</sup>。

### 3 干细胞释放的外来体的心脏保护作用

目前,大量临床研究显示干细胞释放的外来体均具有心脏保护作用(见表3),如脂肪间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、造血干细胞、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、心脏祖细胞(cardiac progenitor cells, CPCs)、心肌球样细胞(cardiosphere-derived cells, CDCs)及心脏侧群干细胞(cardiac side population cells, CSPCs)等。

**3.1 MSCs 释放的外来体** MSCs 释放的外来体在体外可抑制血管平滑肌增殖、迁移,且给小鼠注射外来体 20 d 后可抑制静脉移植内膜增生程度,炎症细胞因子如白介素 6 (IL-6) 和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 水平也随之降低<sup>[38]</sup>。静脉输送 MSCs 释放的外来体还可通过抑制肺动脉内皮细胞 STAT3 信号传导而抑制低氧诱导的肺动脉高压小鼠血管重塑和高血压<sup>[39]</sup>。近期发表的一项研究结果显示, MSCs 释放的外来体在逆转小鼠肺动脉高压时潜力巨大,而源自野百合碱诱导的肺动脉高压小鼠外来体在注射到非患病动物后可诱导其产生肺动脉高压<sup>[40]</sup>,分析各研究间产生的差异可能与外来体不同 miRNA 表达谱有关。

**3.2 造血干细胞释放的外来体** 将干细胞注入心肌能保护心脏免受局部缺血和再灌注损伤,且通过修复和再生功能而改善损伤后心脏功能。人类 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>造血干细胞移植到缺血组织中可诱导新生血管形成,且与减少心绞痛和改善运动时间有关<sup>[41]</sup>。EVs 特别是外来体被认为对旁分泌功能具有调节作用<sup>[42]</sup>。实际上, CD<sub>34</sub><sup>+</sup>造血干细胞释放的外来体在体外和体内均具有促血管生成作用<sup>[43]</sup>,但 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>造血干细胞释放的外来体对急性心肌梗死患者不具有心脏保护作用<sup>[44]</sup>。

**3.3 ESCs 释放的外来体** 将 ESCs 释放的外来体注射到心肌梗死小鼠心脏中可增加血管重建和心肌细胞存活并减少心肌纤

维化,分析其作用机制可能与心肌中 miRNA-294 和 C-kik 心脏祖细胞递送有关,且与 ESCs 相比,外来体的优势是无致癌的潜在威胁<sup>[45]</sup>。

**3.4 CPCs 释放的外来体** CPCs 释放的外来体可从接受心脏瓣膜手术患者的心房外植体中获得。临床研究表明,心肌梗死大鼠植入 CPCs 释放的外来体后可减少心肌细胞凋亡、增加新生血管形成、提高左心室射血分数<sup>[46]</sup>,但大多数细胞植入后不久因缺氧会发生凋亡或丢失。为了提高外来体抗缺氧能力, CPCs 应与携带 HIF1 的非病毒小环质粒共同递送,使内皮细胞过度表达 HIF1,产生含有高含量 miRNA-126 和 miRNA-210 的外来体,从而激活促蛋白激酶并诱导糖酵解转换<sup>[47]</sup>。同时, CPCs 释放的外来体也被证实能刺激内皮细胞迁移<sup>[48]</sup>。

**3.5 CDCs 释放的外来体** 临床研究表明, CDCs 释放的外来体能改善心肌梗死大鼠心脏功能、抑制细胞凋亡、促进心肌细胞增殖及血管生成<sup>[49]</sup>。此外, CDCs 释放的外来体还能减少多柔比星诱导的扩张型心肌病小鼠细胞凋亡和纤维化<sup>[50]</sup>。

**3.6 CSPCs 释放的外来体** 目前, CSPCs 释放的外来体已被用于体外建立成纤维细胞。临床研究表明, CSPCs 释放的外来体可导致促血管生成因子、基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) 和血管内皮生长因子分泌增加<sup>[51-52]</sup>。当 CSPCs 释放的外来体注射到慢性心肌梗死大鼠心脏时,发现成纤维细胞可刺激重要血管生成并具有保护心脏作用<sup>[51]</sup>。

基于上述证据表明,干细胞释放的外来体具有心脏保护作用, MSC 释放的外来体能缩小心肌缺血/再灌注损伤小鼠的梗死面积并促进其恢复,该机制似乎涉及 AKT 和 GSK-3 $\beta$  信号通路<sup>[53-55]</sup>。从血液中纯化的富含外来体的 EVs 在体内或体外均可保护大鼠心脏和心肌细胞免受急性缺血和再灌注损伤,该机制与外源性 Hsp70 通过 TLR4 激活 MAPK/ERK1/2 信号通路有关<sup>[10]</sup>。

## 4 展望

目前,外来体的研究仍存在很多困难,尤其是缺乏获得纯外来体的分离技术。在生物医学方面,循环外来体的作用机制尚未完全明确;在治疗方面,了解外来体药动学和药效学至关重要。尽管存在诸多困难,但外来体在心血管疾病治疗中的潜力已受到越来越多的关注,且已有临床试验将外来体作为治疗剂进行研究<sup>[56]</sup>。未来,还需要更多的研究进一步明确外来体的心脏保护作用及其作用机制。

表 1 典型外来体一般情况

Table 1 General information of typical exosome

外来体类型	直径/长度	体积 ( $\mu\text{m}^3$ )	密度 (g/ml)	质量 (体积 $\times$ 密度, ng)	蛋白质质量 <sup>a</sup> (ng)	蛋白质数量 <sup>ab</sup> (个)	蛋白质所需的外来体/细胞数(个/ $\mu\text{g}$ )
球形外来体	100 nm	0.000 5	1.15	$6.0 \times 10^{-7}$	$1.2 \times 10^{-7}$	1 390	$8.3 \times 10^9$
立方体细胞	15 $\mu\text{m}$	3 375	1.03	3.48	0.70	$8.0 \times 10^9$	1 430

注:<sup>a</sup>为真核细胞内假定蛋白质占外来体总质量 20%,平均蛋白质质量为 52 kDa 时;<sup>b</sup>为蛋白质数量计算公式,蛋白质数量 = 蛋白质质量/52 000  $\times$  阿伏伽德罗常量

表 2 心血管系统细胞释放的 EVs 的作用

Table 2 Effects of cardiovascular system - induced extracellular vesicles

细胞/器官	来源	EVs 类型	中介物	作用	文献
血浆/未知细胞	大鼠,人类	外来体	Hsp70	保护心肌缺血再灌注损伤(分离心肌细胞),激活体外(Langendorff)离体心脏灌注模型和体内大鼠 Hsp70/TLR-4 介导的心肌细胞 ERK/p38 信号通路	[10]
血浆,内皮细胞	人类	微泡	N/A	有助于识别冠心病高风险患者	[16]
血小板	人类	微粒	脂质生长因子	可以在体外和体内刺激血管生成	[19]
血小板	人类	微粒	VEGF, bFGF, PDGF, 乙酰肝素酶	增加功能性毛细血管数量	[20]
血小板	人类	微粒	CXCR4	通过增加 CXCR4 而增加成熟内皮细胞标志物的表达,增强血管内皮细胞的黏附和迁移	[22]
血小板,红细胞,内皮细胞	人类	微泡	N/A	非血管疾病患者血小板、红细胞及内皮细胞微粒浓度升高,且具有促凝血作用	[23]
心肌细胞	HL-1 细胞系	外来体	未确定	外来体与内皮细胞共培养过程中可诱导内皮细胞增殖、血管生成	[26]
心肌细胞	大鼠	外来体	GLUT1, GLUT4	葡萄糖剥夺新生大鼠心肌细胞,增加携带 GLUT1 和 GLUT4 的转运蛋白分泌外来体,进而转运到大鼠心脏微血管内皮细胞中以增加葡萄糖摄取量和糖酵解活性	[27]
心肌细胞	H9C2 细胞系	外来体	未确定	糖尿病大鼠心肌细胞释放的外来体不仅抑制促血管生成能力,还抑制血管生成	[28]
心肌细胞	大鼠	外来体	miRNA-320	糖尿病大鼠的循环微泡由于改变了 miRNA-126 的表达而对内皮祖细胞功能产生负面影响	[29]
血浆,内皮祖细胞	人类	微泡	miRNA-126/VEGFR-2	调节血管平滑肌细胞释放外来体的途径可能是预防钙化的新靶点	[30]
血管平滑肌细胞	人类	外来体/基质囊泡	钙/磷酸盐沉积物	携带矿物沉积物的血管平滑肌细胞衍生的基质囊泡鉴定为外来体,而钙化条件可导致血管平滑肌细胞衍生外来体增多,慢性肾脏病和动脉粥样硬化患者动脉中高钙化的外来体水平较高	[31]
周细胞,内皮细胞	人类	外来体	未确定	周边细胞利用内皮细胞中的 CoCl <sub>2</sub> 刺激受体细胞的迁移和血管生成	[36]
内皮细胞	HUVECs,小鼠 HSV 细胞系	微泡,外来体	miRNA-143, miRNA-145	经受剪切应力或过表达 Kruppel-like 因子 2 (由剪切应力激活)的内皮细胞的 miRNA-143 和 miRNA-145 的表达增加	[37]

注: TLR-4 = Toll 样受体 -4, VEGF = 血管内皮生长因子, bFGF = 碱性成纤维细胞生长因子, PDGF = 血小板衍化生长因子, CXCR4 = 趋化因子受体 4, GLUT1 = 葡萄糖转运蛋白 1, GLUT4 = 葡萄糖转运蛋白 4, miRNA = 微小 RNA, VEGFR-2 = 血管内皮生长因子受体 2, HUVECs = 人脐静脉血内皮细胞

表 3 干细胞释放的外来体的心脏保护作用

Table 3 Cardiac protective effect of exosomes purified from stem cells

外来体来源	心脏保护作用	机制	文献
CD <sub>34</sub> <sup>+</sup> 造血干细胞	提高体外和体内血管生成活性	未确定	[43]
ESCs	增加血管重建和心肌细胞存活并减少心肌纤维化	将 miRNA-294 递送至 C-kit 心脏祖细胞	[45]
CPCs	减少心肌细胞凋亡,增加新生血管形成,提高 LVEF	可能递送 miRNA-210、miRNA-132 和 miRNA-146a - 3p	[46]
CPCs	改善 MI 小鼠 LVEF	将 miRNA-126 和 miRNA-210 递送至 CPCs,激活促蛋白激酶并诱导糖酵解转换	[47]
CPCs	刺激内皮细胞迁移	未确定	[48]
CDCs	抑制 MI 小鼠心肌细胞凋亡和促进心肌细胞增殖,同时增加血管生成	潜在递送 miRNA-146a	[49]
CDCs	抑制细胞凋亡和纤维化,改善多柔比星诱导的心肌损伤	未确定	[50]
CSPCs	刺激血管生成及发挥心脏保护作用	增加 SDF-1 $\alpha$ 和 VEGF 的分泌	[51]
MSCs	缩小梗死面积	可能与 AKT 和 GSK-3 $\beta$ 信号通路有关	[53 - 55]

注: ESCs = 胚胎干细胞, CPCs = 心脏祖细胞, MI = 心肌梗死, LVEF = 左心室射血分数, CSPCs = 心脏侧群干细胞, SDF-1 $\alpha$  = 基质细胞衍生因子 1 $\alpha$ , MSCs = 间充质干细胞

参考文献

[1] TRAMS E G, LAUTER C J, SALEM N Jr, et al. Exfoliation of membrane ecto - enzymes in the form of micro - vesicles [J]. Biochim Biophys Acta, 1981, 645 (1): 63 - 70.

[2] HARDING C, HEUSER J, STAHL P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold - transferrin in rat reticulocytes; demonstration of a pathway for receptor shedding [J]. Eur J Cell Biol, 1984, 35 (2): 256 - 263.

[3] PAN B T, TENG K, WU C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes [J]. J Cell Biol, 1985, 101 (3): 942 - 948.

[4] VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, et al. Exosome - mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. Nat Cell Biol, 2007, 9 (6): 654 - 659.

[5] KOWAL J, ARRAS G, COLOMBO M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2016, 113 (8): E968 - E977. DOI: 10. 1073/pnas. 1521230113.

[6] SÓDAR B W, ÁGNES K, KRISZTINA P, et al. Low - density

- lipoprotein mimics blood plasma – derived exosomes and microvesicles during isolation and detection [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24316. DOI: 10. 1038/srep24316.
- [7] LAWSON C, VICENCIO J M, YELLON D M, et al. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease [J]. *J Endocrinol*, 2016, 228 (2): R57 – R71. DOI: 10. 1530/JOE – 15 – 0201.
- [8] SHELKE G V, LÄSSER C, GHO Y S, et al. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA – containing extracellular vesicles from fetal bovine serum [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014. DOI: 10. 3402/jev. v3. 24783.
- [9] DRAGOVIC R A, GARDINER C, BROOKS A S, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis [J]. *Nanomedicine*, 2011, 7 (6): 780 – 788. DOI: 10. 1016/j. nano. 2011. 04. 003.
- [10] VICENCIO J M, YELLON D M, SIVARAMAN V, et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia – reperfusion injury [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65 (15): 1525 – 1536. DOI: 10. 1016/j. jacc. 2015. 02. 026.
- [11] TRAJKOVIC K, HSU C, CHIANTIA S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes [J]. *Science*, 2008, 319 (5867): 1244 – 1247. DOI: 10. 1126/science. 1153124.
- [12] KOWAL J, TKACH M, THÉRY C. Biogenesis and secretion of exosomes [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 29 (1): 116 – 125. DOI: 10. 1016/j. ceb. 2014. 05. 004.
- [13] ARRAUD N, LINARES R, TAN S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12 (5): 614 – 627. DOI: 10. 1111/jth. 12554.
- [14] THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids [J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, Chapter 3: Unit 3. 22. DOI: 10. 1002/0471143030. cb0322s30.
- [15] MALLAT Z, BENAMER H, HUGEL B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes [J]. *Circulation*, 2000, 101 (8): 841 – 843.
- [16] NOZAKI T, SUGIYAMA S, KOGA H, et al. Significance of a Multiple Biomarkers Strategy Including Endothelial Dysfunction to Improve Risk Stratification for Cardiovascular Events in Patients at High Risk for Coronary Heart Disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54 (7): 601 – 608. DOI: 10. 1016/j. jacc. 2009. 05. 022.
- [17] MARTINEZ M C, ANDRIANTSITOHAINA R. Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential [J]. *Circ Res*, 2011, 109 (1): 110 – 119. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 110. 233049.
- [18] KIM H K, SONG K S, CHUNG J H, et al. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro [J]. *Br J Haematol*, 2004, 124 (3): 376 – 384.
- [19] BRILL A, DASHEVSKY O, RIVO J, et al. Platelet – derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post – ischemic revascularization [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 67 (1): 30 – 38.
- [20] HEIJNEN H F, SCHIEL A E, FIJNHEER R, et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and  $\alpha$  – granules [J]. *Blood*, 1999, 94 (11): 3791 – 3799.
- [21] MAUSE S F, RITZEL E, LIEHN E A, et al. Platelet Microparticles Enhance the Vasoregenerative Potential of Angiogenic Early Outgrowth Cells After Vascular Injury [J]. *Circulation*, 2010, 122 (5): 495 – 506. DOI: 10. 1161/CIRCULATIONAHA. 109. 909473.
- [22] AUGUSTINE D, AYERS L V, LIMA E, et al. Dynamic release and clearance of circulating microparticles during cardiac stress [J]. *Circ Res*, 2014, 114 (1): 109 – 113. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 114. 301904.
- [23] MALIK Z A, KOTT K S, POE A J, et al. Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304 (7): H954 – H965. DOI: 10. 1152/ajpheart. 00835.
- [24] GUPTAS, KNOWLTON A A. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292 (6): H3052 – H3056.
- [25] GENNEBÄCK N, HELLMAN U, MALM L, et al. Garrison. Growth factor stimulation of cardiomyocytes induces changes in the transcriptional contents of secreted exosomes [J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, 2 (2): 1 – 8. DOI: 10. 3402/jev. v2i0. 20167.
- [26] GARCIA N A, MONCAYO – ARLANDI J, SEPULVEDA P, et al. Cardiomyocyte exosomes regulate glycolytic flux in endothelium by direct transfer of GLUT transporters and glycolytic enzymes [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 109 (3): 397 – 408. DOI: 10. 1093/cvr/cvv260.
- [27] GARCIA N A, ONTORIAOVIEDO I, GONZÁLEZKING H, et al. Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (9): e0138849. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0138849.
- [28] WANG X, HUANG W, LIU G, et al. Cardiomyocytes mediate anti – angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR – 320 into endothelial cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 74 (9): 139 – 150. DOI: 10. 1016/j. yjmcc. 2014. 05. 001.
- [29] WU K, YANG Y, ZHONG Y, et al. The effects of microvesicles on endothelial progenitor cells are compromised in type 2 diabetic patients via downregulation of miR – 126/VEGFR2 pathway [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 310 (10): E828 – 837. DOI: 10. 1152/ajpendo. 00056. 2016.
- [30] KAPUSTIN A N, CHATROU M L, DROZDOV I, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion [J]. *Circ Res*, 2015, 116 (8): 1312 – 1323. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 116. 305012.
- [31] RIQUELME J A, WESTERMEIER F, HALL A R, et al. Dexmedetomidine protects the heart against ischemia – reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 103: 318 – 327. DOI: 10. 1016/j. phrs. 2015. 11. 004.
- [32] MITTELBRUNN M, VICENTE – MANZANARES M, SÁNCHEZ – MADRID F. Organizing Polarized Delivery of Exosomes at Synapses

- [J]. *Traffic*, 2015, 16 (4): 327 – 337. DOI: 10. 1111/tra. 12258.
- [33] ZHANG L, WRANA J L. The emerging role of exosomes in Wnt secretion and transport [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 27 (2): 14 – 19. DOI: 10. 1016/j. gde. 2014. 03. 006.
- [34] YELLON D M, DAVIDSON S M. Exosomes: nanoparticles involved in cardioprotection? [J]. *Circ Res*, 2014, 114 (2): 325 – 332. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 113. 300636.
- [35] MAYO J N, BEARDEN S E. Driving the Hypoxia Inducible Pathway in Human Pericytes Promotes Vascular Density in an Exosome Dependent Manner [J]. *Microcirculation*, 2016, 22 (8): 711 – 723. DOI: 10. 1111/micc. 12227.
- [36] VAN BALKOM B W, DE JONG O G, SMITS M, et al. Endothelial cells require miR – 214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells [J]. *Blood*, 2013, 121 (19): 3997 – 4006, S1 – 15. DOI: 10. 1182/blood – 2013 – 02 – 478925.
- [37] HERGENREIDER E, HEYDT S, TRÉGUER K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs [J]. *Nature Cell Biology*, 2012, 14 (3): 249 – 256. DOI: 10. 1038/ncb2441.
- [38] RONG L, HONG S, JIAN M, et al. Extracellular Vesicles Derived from Adipose Mesenchymal Stem Cells Regulate the Phenotype of Smooth Muscle Cells to Limit Intimal Hyperplasia [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2016, 30 (2): 111 – 118. DOI: 10. 1007/s10557 – 015 – 6630 – 5.
- [39] LEE C, MITSIALIS S A, ASLAM M, et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia – induced pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2012, 126 (22): 2601 – 2611. DOI: 10. 1161/CIRCULATIONAHA. 112. 114173.
- [40] ALIOTTA J M, PEREIRA M, WEN S, et al. Exosomes induce and reverse monocrotaline – induced pulmonary hypertension in mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 110 (3): 319 – 330.
- [41] MADONNA R, VAN LAAKE L W, DAVIDSON S M, et al. Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: cell – based therapies for myocardial repair and regeneration in ischemic heart disease and heart failure [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37 (23): 1789 – 1798. DOI: 10. 1093/eurheartj/ehw113.
- [42] KISHORE R, KHAN M. More Than Tiny Sacks; Stem Cell Exosomes as Cell – Free Modality for Cardiac Repair [J]. *Circ Res*, 2016, 118 (2): 330 – 343. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 115. 307654.
- [43] SAHOO S, KLYCHKO E, THORNE T, et al. Exosomes from Human CD<sub>34</sub><sup>+</sup> Stem Cells Mediate their Pro – angiogenic Paracrine Activity [J]. *Circ Res*, 2011, 109 (7): 724 – 728. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 111. 253286.
- [44] MACKIE A R, KLYACHKO E, THORNE T, et al. Sonic hedgehog – modified human CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells preserve cardiac function after acute myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2012, 111 (3): 312 – 321.
- [45] KHAN M, NICKOLOFF E, ABRAMOVA T, et al. Embryonic stem cell – derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2015, 117 (1): 52 – 64. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 117. 305990.
- [46] BARILE L, LIONETTI V, CERVIO E, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103 (4): 530 – 541. DOI: 10. 1093/cvr/cvu167.
- [47] ONG S G, LEE W H, HUANG M, et al. Cross talk of combined gene and cell therapy in ischemic heart disease role of exosomal microrna transfer [J]. *Circulation*, 2014, 130 (11 Suppl 1): S60 – 69. DOI: 10. 1161/CIRCULATIONAHA. 113. 007917.
- [48] VRIJSEN K R, SLUIJTER J P, SCHUCHARDT M W V, et al. Cardiomyocyte progenitor cell – derived exosomes stimulate migration of endothelial cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14 (5): 1064 – 1070. DOI: 10. 1111/j. 1582 – 4934. 2010. 01081. x.
- [49] IBRAHIM A G, CHENG K, MARBÀN E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2 (5): 606 – 619. DOI: 10. 1016/j. stemcr. 2014. 04. 006.
- [50] VANDERGRIF A C, DE ANDRADE J B, TANG J, et al. Intravenous Cardiac Stem Cell – Derived Exosomes Ameliorate Cardiac Dysfunction in Doxorubicin Induced Dilated Cardiomyopathy [J]. *Stem Cell International*, 2015: 960926. DOI: 10. 1155/2015/960926.
- [51] TSELIU E, FOUAD J, REICH H, et al. Fibroblasts Rendered Antifibrotic, Antiapoptotic, and Angiogenic by Priming With Cardiosphere – Derived Extracellular Membrane Vesicles [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66 (6): 599 – 611. DOI: 10. 1016/j. jacc. 2015. 05. 068.
- [52] BROMAGE D I, DAVIDSON S M, YELLON D M. Stromal derived factor 1 $\alpha$ : a chemokine that delivers a two – pronged defence of the myocardium [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 143 (3): 305 – 315. DOI: 10. 1016/j. pharmthera. 2014. 03. 009.
- [53] LAI R C, ARSLAN F, LEE M M, et al. Exosomes secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4 (3): 214 – 222.
- [54] ARSLAN F, LAI R C, SMEETS M B, 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 [J]. *Stem Cell Research*, 2013, 10 (3): 301 – 312. DOI: 10. 1016/j. scr. 2013. 01. 002.
- [55] LAI R C, ARSLAN F, TAN S S, et al. Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large – scale production of cardioprotective microparticles [J]. *J Cell Cardiol*, 2010, 48 (6): 1215 – 1224. DOI: 10. 1016/j. yjmcc. 2009. 12. 021.
- [56] LODISH H, BERK A, ZIPURSKY S L, et al. *Molecular cell biology* [M]. 4th edition. New York: W. H. Freeman, 2000.

(收稿日期: 2017 – 04 – 12; 修回日期: 2017 – 07 – 18)

(本文编辑: 谢武英)