

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2023.10.009

· 综述 ·

间充质干细胞的细胞治疗策略研究进展

段星祥¹, 张瑞¹, 贺燕², 彭友俭³, 叶青松^{1,3,4}

1. 武汉大学人民医院再生医学中心,湖北 武汉(430060); 2. 武汉科技大学附属天佑医院再生与转化医学研究所,湖北 武汉(430064); 3. 武汉大学人民医院口腔医学中心,湖北 武汉(430060); 4. 哈佛大学麻省总医院,哈佛大学牙学院口腔颌面外科,美国 波士顿(02114)

【摘要】 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的细胞治疗是近年研究热点,包括传统意义上的以活细胞为基础的细胞治疗策略和新出现的以细胞外囊泡和其他可溶性蛋白质或生物活性分子为基础的去细胞治疗策略。目前,MSCs诱导获得的细胞已具备成熟的功能和特异性的结构,结合生物材料或类器官技术的原位移植在定植率及功能性方面有了较大提升。另一方面,随着大规模培养技术和细胞外囊泡分离技术的成熟,大量获得高纯度的细胞外囊泡难度降低,细胞外囊泡的研究也逐渐成为当前研究的热点。越来越多的研究支持MSCs的治疗效果不仅是通过植入和分化效应进行修复,MSCs旁分泌也表现出良好效果。笔者对MSCs的细胞治疗策略和去细胞治疗策略的最新进展进行综述。

【关键词】 生物材料; 再生医学; 间充质干细胞; 牙髓干细胞; 细胞治疗策略; 去细胞治疗策略; 细胞外囊泡; 外泌体

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2023)10-0745-06

【引用著录格式】 段星祥,张瑞,贺燕,等.间充质干细胞的细胞治疗策略研究进展[J].口腔疾病防治,2023,31(10):745-750. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2023.10.009.

Progress on the cell therapy strategy of mesenchymal stem cells DUAN Xingxiang¹, ZHANG Rui¹, HE Yan², PENG Youjian³, YE Qingsong^{1,3,4}. 1. Department of Regenerative Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. Institute of Regenerative and Translational Medicine, Tianyou Hospital of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, China; 3. Department of Stomatology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; 4. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Massachusetts General Hospital and Harvard School of Dental Medicine, Boston 02114, USA

Corresponding author: YE Qingsong, Email: qingsongye@whu.edu.cn, Tel: 86-15858242516

【Abstract】 Cell therapy based on mesenchymal stem cells (MSCs) has been a hot research topic in recent years, including the traditional cell therapy strategy based on living cells and the new cell-free therapy strategy based on soluble proteins or bioactive molecules such as extracellular vesicles (EVs). At present, MSC-induced cells have mature functions and specific structures, and insitu transplantation combined with biomaterials or organic technology has greatly improved the settlement rate and function. On the other hand, as the large-scale culture technique and EVs separation technique evolve, it is possible to obtain a large number of pure EVs, and EVs are gradually becoming a hot spot of current research. An increasing number of studies have shown that the therapeutic effect of MSCs not only occurs by implantation and differentiation but also manifests as the paracrine effect of MSCs. In this review, we discuss the emerging outcomes of cell therapies and acellular therapies to alleviate these pathological conditions.

【Key words】 biomaterial; regenerative medicine; mesenchymal stem cells; dental pulp stem cells; cells therapies; acellular therapies; extracellular vesicle; exosomes

J Prev Treat Stomat Dis, 2023, 31(10): 745-750.

【收稿日期】 2022-11-13; **【修回日期】** 2023-01-23

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81871503);湖北省重点研发计划项目(2022BCA029)

【作者简介】 段星祥,医师,硕士,Email: xingxiangduan@foxmail.com

【通信作者】 叶青松,教授,博士,Email: Qingsongye@hotmail.com, Tel: 86-88041919-83122



微信公众号

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No. 81871503); Key Research and Development Project of Hubei Province (No. 2022BCA029).

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是干细胞家族中的重要一员,具有免疫调节能力和多项分化能力,在再生医学中有着重要地位。MSCs的细胞治疗是近年研究热点,包括传统意义上的以活细胞为基础的细胞治疗策略和新出现的以细胞外囊泡和其他可溶性蛋白质或生物活性分子为基础的去细胞治疗策略^[1]。细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)就是去细胞治疗策略的一个典型例子,这些微小的囊泡在被发现是细胞之间传递信号的信使分子之前很长一段时间都被当作细胞排出体外的废弃物^[2]。在去细胞治疗策略研究成为热点的同时,传统细胞治疗策略也在迅速发展,在创伤后应激障碍、缺血性心脏病、肺动脉高压等疾病治疗领域实现了突破^[3]。随着材料科学的兴起,性能各异的合成生物材料被研发出来。结合生物材料,MSCs可以进行原位移植并形成一个小整体,进而增强其抗炎和修复受损组织的能力^[4]。本文对基于MSCs的细胞治疗策略的现状以及由MSCs衍生的去细胞治疗策略进行综述。

1 MSCs 细胞治疗策略

MSCs属于多能干细胞,在增殖和分化能力上不具备完全的干性,因此在具备分化潜能的同时又不存在致癌的风险。此外MSCs细胞治疗对机体具有免疫调节能力,MSCs能够分泌多种免疫调节因子,包括吡啶胺2,3-双加氧酶、转化生长因子 β 、前列腺素E2、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)等,对T细胞、B细胞、NK细胞都有调节作用^[5]。随着MSCs研究的深入,不断有新的MSCs被发现并应用于新的疾病领域,多学科的交叉结合提升了MSCs细胞治疗策略的实用性,但目前临床中仍然存在着许多的瓶颈。

骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)是最早被发现的MSCs,也是临床研究和应用最为广泛的MSCs,但是因为其获取较为困难,且对捐献者有一定损伤,严重影响了它的应用。牙髓间充质干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)来源于牙齿,在口腔的治疗过程会产生许多废弃的

牙齿,有研究显示每名口腔患者平均拔牙次数为0.18次,接受口腔外科治疗的患者则高达1.29次,因此医疗废弃牙是DPSCs的绝佳来源,其来源广泛,既不存在伦理争议,又无侵入性操作^[4]。DPSCs具有比BMSCs更强的增殖能力,研究显示DPSCs在神经再生、血管生成、骨质形成方面明显优于BMSCs,同时成脂倾向弱于BMSCs,因此DPSCs在神经、骨疾病方面将比BMSCs更具优势^[6]。与牙周膜干细胞、乳牙干细胞等其他牙源性干细胞相比,DPSCs在增殖速率方面不如二者,但在成骨方面更具优势,乳牙干细胞体内形成完整的牙本质/髓样复合体时存在明显缺陷,而牙周膜干细胞对成骨刺激的响应性明显不如DPSCs^[7-8]。

1.1 MSCs 细胞治疗的适应证

MSCs在自身免疫性疾病、移植排斥、慢性炎症疾病方面的研究获得了更多的关注。在2016年BMSCs的免疫调节作用才正式被学者们所认可,但在2016之前NIH临床注册的MSCs相关临床试验项目中,接近一半项目的适应证都是免疫与炎症相关的疾病。第一例MSCs应用于免疫性疾病是2004年,BMSCs被移植到IV级急性移植物抗宿主病(graft-vs-host disease, GVHD)患者体内,患者于1年后痊愈^[9]。之后越来越多的基础研究和临床实验证明了MSCs对于GVHD的有效性,其机制包括抑制效应T细胞和旁分泌作用调节相关炎症细胞因子的水平,如IFN- γ 、TNF- α 和白细胞介素-1 β 等,MSCs还具有促进免疫细胞产生抗炎因子白细胞介素-10的作用^[10]。在其他传统治疗难以奏效的免疫疾病方面,MSCs也取得许多惊人的成果,在最近的一项临床研究中显示,静脉注射MSCs治疗银屑病是安全且部分有效的,Treg细胞水平可能是预测移植有效性的一个关键指标,且女性的有效性明显高于男性^[11]。在系统性红斑狼疮的治疗中,CD1c⁺树突状细胞被发现是系统性红斑狼疮患者免疫调节细胞的关键点,而MSCs能够通过IFN- γ -FLT3L-FLT3轴上调CD1c⁺树突状细胞来达到抑制炎症的作用^[12]。

诱导技术的进步也在一定程度上拓宽了MSCs细胞治疗策略的适应证,MSCs可以在体外条件下

发育为三个胚层的不同细胞。在向内胚层细胞分化方面,目前报道有多种有效的方法可将MSCs诱导分化为肝细胞^[13]。MSCs诱导得到的肝细胞样细胞不仅能够合成和分泌白蛋白,还通过CYP3A4酶代谢药物,在移植进入肝衰竭的小鼠模型之后,它们能够在损伤的肝脏中定植,成为小鼠肝脏的一部分,并帮助恢复其肝功能缓解肝衰竭症状^[14]。在外胚层细胞分化方面,MSCs具有很强的神经分化潜能。有研究报道将MSCs经过诱导后得到的胆碱能样神经元移植入小鼠脑内后能够改善阿尔茨海默病大鼠的空间学习和记忆能力^[15]。也有研究报道通过静脉注射MSCs同样能够减少阿尔茨海默病模型小鼠的Tau蛋白磷酸化和炎症反应,并且早期注射MSCs对阿尔茨海默病样神经病理改变有长期的有益影响^[16]。除此之外,MSCs的细胞治疗策略在抑郁症、创伤后应激障碍等疾病中也有应用。

1.2 MSCs与生物材料结合增强治疗的效果

常规的细胞治疗策略存在定植率低、存活率低、活性差等问题,通过与材料科学的交叉结合,不仅能够解决这些问题,甚至能够特异性提高细胞的某项能力,增强细胞治疗效果。这些材料往往具有良好力学和生物学性能,既满足细胞附着要求,又不引起过敏或免疫反应,具有很强的生物活性和生物相容性,以及可控的生物降解。脊髓损伤在外伤患者中较为常见,往往会给患者带来严重的后果,目前仍无有效治疗能够让患者完全恢复, MSCs与材料的结合有望解决这一问题。DPSCs联合水凝胶及活性氧清除剂,可以协同调节铁代谢,抑制铁死亡,促进脊髓铁稳态的恢复^[17]。同时联合水凝胶移植的DPSCs能够很好地定植分化并参与神经的重建,成为小鼠神经的一部分^[18]。龋齿是最常见的口腔疾病之一,是牙齿硬组织破坏和牙髓暴露的主要原因,如何保存深部病变的牙髓活力一直是棘手的问题,DPSCs能够分化成牙本质样细胞,产生牙本质/牙髓样复合体,因此是牙本质修复的理想选择^[19]。但传统的细胞治疗策略应用于牙齿时,细胞难以黏附,体内体外差异巨大。通过磁性纳米颗粒改性的水凝胶包裹的3D DPSCs微球能够很好解决细胞黏附的问题,并且在磁性纳米颗粒的机械刺激下还能够促进DPSCs的成牙性分化^[20]。

1.3 MSCs细胞治疗临床应用的瓶颈

MSCs的细胞治疗策略目前尚未在临床中广泛

应用,主要还是人们对其安全性的担忧。MSCs属于多能干细胞,相较于胚胎干细胞和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),不存在成瘤风险和病毒编程带来的潜在风险,目前临床实验已证实MSCs的安全性,未发生异位组织、肿瘤等严重不良事件^[21]。但是MSCs对于肿瘤的影响似乎是把双刃剑,这也是人们担忧其安全性的原因之一。研究报道MSCs可能是肿瘤启动子,因为这些细胞可以促进癌细胞的增殖、侵袭、转移和肿瘤血管生成^[22]。另一方面,也有报道又证实了MSCs的抑瘤作用。细胞的异质性也是带来安全性的问题之一,在经过大规模扩增培养后很可能表现出形态和功能的异质性,甚至可能造成血管栓塞导致严重后果^[23]。因此MSCs制备过程的安全性、分子机制、标准化以及运输和临床应用等方面的研究有待进一步深入。

2 MSCs去细胞治疗策略

去细胞治疗策略是通过细胞外囊泡和细胞分泌的其他可溶性蛋白质或生物活性分子进行治疗,是细胞治疗的一种衍生策略^[1,24],不具有致瘤性和栓塞风险,具有更好的安全性。

2.1 去细胞治疗制剂

常见的去细胞治疗制剂包括条件培养基、细胞外囊泡(EVs)、细胞裂解液三种。条件培养基是将MSCs在无血清的基础培养基中培养,再将培养基离心过滤去除细胞碎片等杂质后获得的培养基,是可溶性成分和泡状成分的复杂混合物,包含可溶性蛋白质(细胞因子、生长因子、趋化因子、细胞粘附分子、信号和信号转导蛋白和酶)、核酸(DNA、mRNA和microRNAs)、脂质和EVs^[25]。由于条件培养基的收集比较简单,因此衍生出了2种产品,即条件培养基浓缩液和EVs分离液(外泌体)。EVs包含大量miRNA、mRNA和蛋白质,在细胞-细胞通讯、组织稳态、细胞分化和器官发育和重塑中发挥重要作用。EVs根据其大小和来源主要分为5个亚群:纳米囊泡(8~12 nm);外泌体(30~150 nm);微囊泡(200~1 000 nm);凋亡小体(1 000~5 000 nm);癌小体(1~10 μm)^[26]。MSCs裂解液是将MSCs通过物理或者化学方法裂解,经离心过滤去除破碎细胞器的产物,包含多种细胞因子。MSCs裂解液同样具有炎症调节和促进组织再生的作用,有研究报道MSCs裂解液在结肠炎、神经源性阴茎勃起障碍、皮肤光老化小鼠模型中均

能够抑制炎症反应,抑制细胞凋亡,促进组织再生,改善临床症状^[27-28]。

2.2 去细胞治疗的有效性和安全性

MSCs 来源的外泌体的相关研究是最多的,本综述主要阐述 MSCs 来源的外泌体去细胞治疗的有效性和安全性。MSCs 来源的外泌体已用于多种疾病模型的治疗,在 MSCs 应用最为广泛的炎症和免疫疾病方面,局部应用 MSCs 来源外泌体可以抑制角质层补体的激活,从而减少中性粒细胞在角质层内和角质层分泌的 IL-17,缓解银屑病症状^[29]。MSCs 在神经血管疾病的治疗中也有很好的效果,DPSCs 来源的外泌体能够通过抑制 HMGB1/TLR4/MyD88/NF- κ B 多条通路,减轻脑梗小鼠模型的脑水肿、脑梗死和神经功能障碍等症状^[30]。外泌体联合生物材料也有诸多应用, MSCs 来源的外泌体结合导电水凝胶显著减少脊髓神经损伤小鼠模型中 CD68⁺ 小胶质细胞,增强局部神经干细胞聚集,诱导神经元和轴突再生,明显促进脊髓神经损伤小鼠模型的功能恢复^[31]。此外 MSCs 来源的外泌体还应用于癌症治疗,研究表明 MSCs 的外泌体具有固有的归巢特性,再现了它们在体内的生物学作用,使它们在用于癌症治疗时有效地移动到肿瘤细胞中^[32]。以上研究证明 MSCs 来源的外泌体表现出来的效果良好。外泌体主要由 miRNA、mRNA 和蛋白质构成,危险因素相对更少,从各方面都相较细胞治疗策略更为安全。正是因为去细胞治疗策略所展现出来良好的有效性和安全性,许多临床前成果已经迅速步入临床实验阶段,相信未来去细胞治疗策略的发展将会带来更多的惊喜。

2.3 外泌体临床应用的瓶颈和突破

外泌体临床应用的所面临的主要问题是产能不足。差速超离法用于外泌体分离的第一种方法,至今仍是外泌体分离的金标准,但是长时间的高速离心会造成外泌体的机械损伤,差速超离耗时长,提取率不高,使其难以在短时间内处理多个生物样品^[33]。聚合物沉淀法操作简单,所需时间短,适用于处理大量样品,但纯度不高且回收率较低,可能产生假阳性结果,产生的聚合物难以去除^[34]。超滤和排阻色谱法是根据外泌体与其他组分的尺寸差异进行分离,免疫亲和法是通过标记外泌体的特异性蛋白来分离,以上两种方法都存在提取效率较低的问题^[35]。基于以上原理也出现多个商业化的试剂盒,极大地简化了提取流程,但

不同厂商的试剂盒提取效果差异较大^[36]。新出现的微流控分离技术,能够进一步提高回收率、减少样品体积、缩短处理时间,具有良好的应用前景,Chen 等^[37]开发的 EXODUS 系统通过在两个耦合振荡器在膜上产生双频横波分离外泌体,使 EXODUS 系统在速度、纯度和收率方面优于其他分离技术。除了通过分离提取的改进增加产能外,干细胞的大规模培养也能够提高外泌体的产能。传统的二维培养所得到的细胞量十分有限,而新出现的大规模培养技术很好地解决了这一问题。应用较为普遍的多层培养托盘系统也被称为“细胞堆”或“细胞工厂”,多个培养托盘相互堆叠,给细胞更多附着面积,可以提供高达 25 440 cm² 的培养表面积,远大于 T-225 培养瓶。除此之外还有滚瓶和微载体的培养方式,也能通过增大附着面积的方式扩大培养规模^[38]。最新的研究报道自动化技术与微载体技术结合,实现全封闭自动化的 MSCs 大规模培养,能够最大程度减少污染可能,且节约人力成本,实现工业化生产临床级 MSCs,细胞质量与传统二维平面培养的细胞质量无显著差异^[39]。另外,外泌体成分复杂,具体作用机制还需要更多的临床前研究加以证实,仍需开展全方位、多领域的研究。

3 小结

细胞治疗策略能替换病变的细胞从根本上解决某些疾病,尤其在神经、心肌等再生能力弱的组织中所起作用更为关键。随着诱导技术、组织工程技术、类器官技术的发展等,一些限制已经实现突破, MSCs 诱导获得的细胞已经具备成熟的功能和特异性的结构,结合生物材料或类器官技术的原位移植在定植率及功能性方面都有极大的提升,但其中的许多有效机制仍不明确,移植规模仍然较小,离人工器官的目标仍相去甚远。虽然目前研究显示 MSCs 在移植后能够定植于体内,但似乎旁分泌所起到的作用更大,人们对细胞治疗策略安全性的担忧也是促进去细胞治疗策略发展的原因之一。MSCs 的旁分泌作用对于类器官的形成是有利的^[40],这其中的机制值得进一步探索。去细胞治疗策略和细胞治疗策略是一个相辅相成、有机结合的整体,相信这会加速人工器官的早日实现,实现真正意义上的再生。

【Author contributions】 Ye QS, Duan XX, Zhang R, He Y, Peng YJ collected the references and wrote the article. Ye QS conceptualized

and wrote the article, reviewed the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Watanabe Y, Tsuchiya A, Terai S. The development of mesenchymal stem cell therapy in the present, and the perspective of cell-free therapy in the future[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2021, 27(1): 70-80. doi: 10.3350/cmh.2020.0194.
- [2] Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, et al. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling[J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 1 - 19. doi: 10.1186/s12964-021-00730-1.
- [3] Pu X, Du L, Hu Y, et al. Stem/progenitor cells and pulmonary arterial hypertension[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(1): 167-178. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315052.
- [4] Zarepour A, Hooshmand S, Gökmen A, et al. Spinal cord injury management through the combination of stem cells and implantable 3D bioprinted platforms[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3189. doi: 10.3390/cells10113189.
- [5] Wang G, Zhang Y, Hu N, et al. Mesenchymal stem cells attenuate acute lung injury in mice partly by suppressing alveolar macrophage activation in a PGE2-dependent manner[J]. *Inflammation*, 2022, 45(5): 2000-2015. doi: 10.1007/s10753-022-01670-9.
- [6] Kumar A, Kumar V, Rattan V, et al. Secretome proteins regulate comparative osteogenic and adipogenic potential in bone marrow and dental stem cells[J]. *Biochimie*, 2018, 155: 129 - 139. doi: 10.1016/j.biochi.2018.10.014.
- [7] Kotova AV, Lobov AA, Dombrovskaya JA, et al. Comparative analysis of dental pulp and periodontal stem cells: differences in morphology, functionality, osteogenic differentiation and proteome[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(11): 1606. doi: 10.3390/biomedicines9111606.
- [8] Zhai Q, Dong Z, Wang W, et al. Dental stem cell and dental tissue regeneration[J]. *Front Med*, 2019, 13(2): 152 - 159. doi: 10.1007/s11684-018-0628-x.
- [9] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells[J]. *Lancet*, 2004, 363(9419): 1439-1441. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16104-7.
- [10] Zheng Q, Zhang S, Guo WZ, et al. The unique immunomodulatory properties of MSC-derived exosomes in organ transplantation[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 659621. doi: 10.3389/fimmu.2021.659621.
- [11] Cheng L, Wang S, Peng C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells for psoriasis: a phase 1/2a, single-arm study[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 263. doi: 10.1038/s41392-022-01059-y.
- [12] Yuan X, Qin X, Wang D, et al. Mesenchymal stem cell therapy induces FLT3L and CD1c+ dendritic cells in systemic lupus erythematosus patients[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2498. doi: 10.1038/s41467-019-10491-8.
- [13] Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(1): 70-77. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05496.x.
- [14] Choi J, Kang S, Kim B, et al. Efficient hepatic differentiation and regeneration potential under xeno-free conditions using mass-producible amnion-derived mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 569. doi: 10.1186/s13287-021-02470-y.
- [15] Zhao X, Li D, Zhang L, et al. Mesenchymal stem cell therapies for Alzheimer's disease: preclinical studies[J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(7): 1687-1695. doi: 10.1007/s11011-021-00777-6.
- [16] Neves AF, Camargo C, Premer C, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells reduces Tau phosphorylation and inflammation in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Exp Neurol*, 2021, 341: 113706. doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113706.
- [17] Ying Y, Huang Z, Tu Y, et al. A shear-thinning, ROS-scavenging hydrogel combined with dental pulp stem cells promotes spinal cord repair by inhibiting ferroptosis[J]. *Bioact Mater*, 2023, 22: 274-290. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.09.019.
- [18] Luo L, He Y, Jin L, et al. Application of bioactive hydrogels combined with dental pulp stem cells for the repair of large gap peripheral nerve injuries[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(3): 638 - 654. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.08.028.
- [19] Matsui M, Kobayashi T, Tsutsui TW. CD146 positive human dental pulp stem cells promote regeneration of dentin/pulp-like structures[J]. *Hum Cell*, 2018, 31(2): 127 - 138. doi: 10.1007/s13577-017-0198-2.
- [20] Han X, Tang S, Wang L, et al. Multicellular spheroids formation on hydrogel enhances osteogenic/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells under magnetic nanoparticles induction[J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 5101 - 5115. doi: 10.2147/IJN.S318991.
- [21] Tsuchiya A, Kojima Y, Ikarashi S, et al. Clinical trials using mesenchymal stem cells in liver diseases and inflammatory bowel diseases[J]. *Inflamm Regen*, 2017, 37(1): 16. doi: 10.1186/s41232-017-0045-6.
- [22] Jafari A, Rezaei-Tavirani M, Farhadhosseinabadi B, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells to promote/suppress cancer: two sides of the same coin[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 126. doi: 10.1186/s13287-021-02196-x.
- [23] Wang YH, Tao YC, Wu DB, et al. Cell heterogeneity, rather than the cell storage solution, affects the behavior of mesenchymal stem cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 391. doi: 10.1186/s13287-021-02450-2.
- [24] Driscoll J, Patel T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease[J]. *J Gastroenterol*, 2019, 54(9): 763-773. doi: 10.1007/s00535-019-01599-1.
- [25] Zhang B, Wu Y, Mori M, et al. Adipose-derived stem cell conditioned medium and wound healing: a systematic review[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2022, 28(4): 830 - 847. doi: 10.1089/ten.TEB.2021.0100.
- [26] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical ap-

- plications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478): eaa6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
- [27] Albersen M, Fandel TM, Lin G, et al. Injections of adipose tissue-derived stem cells and stem cell lysate improve recovery of erectile function in a rat model of cavernous nerve injury[J]. J Sex Med, 2010, 7(10): 3331 - 3340. doi: 10.1111/j.1743 - 6109.2010.01875.x.
- [28] Duan X, Luo Y, Zhang R, et al. ZIF-8 as a protein delivery system enhances the application of dental pulp stem cell lysate in anti-photoaging therapy[J]. Mater Today Adv, 2023, 17: 100336. doi: 10.1016/j.mtadv.2022.100336.
- [29] Zhang B, Lai RC, Sim WK, et al. Topical application of mesenchymal stem cell exosomes alleviates the imiquimod induced psoriasis-like inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 720. doi: 10.3390/ijms22020720.
- [30] Li S, Luo L, He Y, et al. Dental pulp stem cell-derived exosomes alleviate cerebral ischaemia-reperfusion injury through suppressing inflammatory response[J]. Cell Prolif, 2021, 54(8): e13093. doi: 10.1111/cpr.13093.
- [31] Fan L, Liu C, Chen X, et al. Exosomes-loaded electroconductive hydrogel synergistically promotes tissue repair after spinal cord injury via immunoregulation and enhancement of myelinated axon growth[J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9(13): e2105586. doi: 10.1002/advs.202105586.
- [32] Naseri Z, Oskuee RK, Jaafari MR, et al. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 7727-7747. doi: 10.2147/IJN.S182384.
- [33] Wei H, Qian X, Xie F, et al. Isolation of exosomes from serum of patients with lung cancer: a comparison of the ultra-high speed centrifugation and precipitation methods[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(10): 882. doi: 10.21037/atm-21-2075.
- [34] Zhang Y, Bi J, Huang J, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications[J]. Int J Nanomed, 2020, 15: 6917 - 6934. doi: 10.2147/IJN.S264498.
- [35] Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis[J]. Cells, 2019, 8(7): 727. doi: 10.3390/cells8070727.
- [36] Jiang Z, Liu G, Li J. Recent progress on the isolation and detection methods of exosomes[J]. Chem Asian J, 2020, 15(23): 3973-3982. doi: 10.1002/asia.202000873.
- [37] Chen Y, Zhu Q, Cheng L, et al. Exosome detection via the ultrafast-isolation system: exodus[J]. Nat Methods, 2021, 18(2): 212-218. doi: 10.1038/s41592-020-01034-x.
- [38] Tavassoli H, Alhosseini SN, Tay A, et al. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: a biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products [J]. Biomaterials, 2018, 181: 333 - 346. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.016.
- [39] Zhang Y, Na T, Zhang K, et al. GMP-grade microcarrier and automated closed industrial scale cell production platform for culture of MSCs[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2022, 16(10): 934-944. doi: 10.1002/term.3341.
- [40] Leeman KT, Pessina P, Lee JH, et al. Mesenchymal stem cells increase alveolar differentiation in lung progenitor organoid cultures [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6479. doi: 10.1038/s41598-019-42819-1.

(编辑 张琳)



官网