・论著・

人脐带间充质干细胞外泌体的鉴定及其作用于肺动脉高压的生物信息 学分析

吴璐瑶^{1,2},黎伟文^{1,2},肖梦媛¹,邓少东^{2,3*},陈建英^{1*}(1.广东医科大学附属医院,广东 湛江 524001;2.广东医科大学第 二临床医学院,广东 东莞 523808;3.广东医科大学附属东莞第一医院,广东 东莞 523710)

摘要:目的 探讨人脐带间充质干细胞外泌体(human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes, hUCMSC-Exo)缓解 肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)的潜在分子作用机制。方法 对 hUCMSC-Exo 进行提取、鉴定及高通量测序。 利用 GeneCards 搜索 PH 作用靶点,在 GEO 数据库下载 PH 相关芯片(GSE53408、GSE113439),经过批次校正后筛选出 差异基因。GeneCards 和 GEO 数据库以及 hUCMSC-Exo 所含 miRNAs 预测的靶向调控的 mRNAs 取交集,构建蛋白互作 网络筛选出 hUCMSC-Exo 作用于 PH 的关键靶点,并进行 GO 和 KEGG 富集分析。结果 测序得到 hUCMSC-Exo 中 43 个高表达的 miRNAs,其中 17 个 miRNAs 可作用于 PH,发现其作用机制可能与前列腺癌、HIF-1 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、癌症的蛋白多糖和癌症通路等相关。结论 本研究可为 hUCMSC-Exo 防治 PH 的临床研究提供新思路。

关键词:肺动脉高压;人脐带间充质干细胞外泌体;外泌体测序;生物信息学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)04-0433-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.04.001

引用本文:吴璐瑶,黎伟文,肖梦媛,等.人脐带间充质干细胞外泌体的鉴定及其作用于肺动脉高压的生物信息学分析[J]. 中国现代应用药学,2023,40(4):433-442.

Identification of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Exosomes and Bioinformatics Analysis of Their Effects on Pulmonary Hypertension

WU Luyao^{1,2}, LI Weiwen^{1,2}, XIAO Mengyuan¹, DENG Shaodong^{2,3*}, CHEN Jianying^{1*}(1. The Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China; 2. The Second Clinical Medical College, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 3. The First Dongguan Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Dongguan 523710, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the potential molecular mechanism of human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes(hUCMSC-Exo) in alleviating pulmonary hypertension(PH). **METHODS** The hUCMSC-Exo were high-throughput sequenced after extracted and identified. PH target was searched in GeneCards. PH-related chip GSE53408 and GSE113439 were downloaded from GEO databases and screened for the differential genes after batch correction. The target genes in GeneCards and GEO databases and the target regulated genes predicted by miRNAs contained in hUCMSC-Exo were used for intersection. The protein-protein interaction network was constructed to screen out the key targets of hUCMSC-Exo acting on PH, then went for GO and KEGG analysis. **RESULTS** Forty-three high expression miRNAs were collected after hUCMSC-Exo sequenced. A total of 17 miRNAs might affect PH through prostate cancer, HIF-1 signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, proteoglycans in cancer and pathways in cancer. **CONCLUSION** This study provides a new idea for exploring the role of hUCMSC-Exo in alleviating PH.

KEYWORDS: pulmonary hypertension(PH); human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes(hUCMSC-Exo); exosome sequencing; bioinformatics

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是由 多种病因及不同的发病机制导致的肺血管结构或 功能改变,常引起肺血管阻力和肺动脉压力升高,继而发展成为右心功能衰竭,预后极差^[1]。目前,

中国现代应用药学 2023 年 2 月第 40 卷第 4 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2023 February, Vol.40 No.4 .433.

基金项目:国家自然科学基金项目(81370242);广东医科大学学科建设项目(4SG21229GDGFY01,4SG21008G);广东医科大学校级大学生 创新创业训练计划项目(GDMU2021117,GDMU2021156);广东医科大学附属医院干细胞临床前研究项目(2018PSSC006);湛江市科技计划项目 (2021B01145);广东医科大学青年科研培育基金项目(GDMUQ202101)

作者简介:吴璐瑶,女,硕士生 E-mail: 289992322@qq.com ***通信作者:**陈建英,男,硕士,主任医师 E-mail: jychen271@126.com 邓少东,男,博士,讲师 E-mail: dengshaodong@gdmu.edu.cn

PH 的发病机制尚未完全明确,涉及组织、细胞、 分子介质及遗传基因等多个层次,与血管内皮细 胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞和循环内皮祖 细胞等多种细胞相关联。PH 引起肺血管平滑肌的 增殖、重构,内皮炎症及向间质转化。在分子层 面,涉及 miRNA、趋化因子、低氧诱导因子、GTP 结合蛋白等多种基因产物的调控,目前 PH 仍然缺 乏有效的生物标志物^[2]。治疗 PH 的药物主要包括 钙离子通道阻滞剂、前列腺素、内皮素受体拮抗 剂、磷酸二酯酶抑制剂和可溶性鸟苷酸环化酶激 动剂,这些药物可以提高患者运动能力、生活质 量和改善肺血液循环,但是无法治愈 PH 且预后依 然很差。

间充质干细胞是一类具有自我复制能力和多 向分化潜能的非造血祖细胞,可以从组织中分离 出来,间充质干细胞具有修复损伤和参与免疫调 节的作用,已有相关研究将间充质干细胞运用到 疾病治疗中。同时,间充质干细胞具有多向分化 的潜能,间充质干细胞注入 PH 大鼠后,在肺组织 中可发现类软骨细胞及类肾小囊细胞等,存在极 大的安全隐患。同时,干细胞移植治疗还存在存 活率低、分化率低等不足,极大地限制了间充质 干细胞等干细胞的临床应用,因此研究者们将目 光投向外泌体。外泌体是通过多泡体与质膜融合 进入细胞外环境而释放的一种微粒,可作为细胞 与细胞之间沟通的桥梁,传递各种具有其来源细 胞的成分,如 mRNA、miRNA、营养因子及功能 蛋白等。外泌体中携带的 miRNAs 可能会引起受体 细胞中一系列信号通路的启动,基因的调控及相关 蛋白的表达。笔者所在课题组前期研究显示外泌体 可以通过调节肾素-血管紧张素系统预防大鼠急性 心肌梗死[3]。

miRNA 是一类由 19~25 个核苷酸组成的小型 非编码 RNA, 在转录后通过靶向 mRNA 调控基因 的表达, 成熟的 miRNA 在细胞核内经过转录和处 理, 通过与 mRNA 的非翻译区相互作用, 下调特 定靶向 mRNA 的表达, 最终通过降解靶向 mRNA 或抑制其翻译调控转录后基因的表达。有研究表 明, miRNA 参与调控 PH 过程中的肺动脉内皮细 胞和肺动脉平滑肌细胞的功能从而影响肺血管重 构。在调控肺动脉内皮细胞功能中, miR-98 可以 被过氧化物酶体增殖物激活的受体-γ 调节, 并减 弱内皮素-1 的表达和肺血管重塑^[4]。在调控肺动脉 平滑肌细胞的代谢中,过表达的 miR-let-7b 通过 靶向血管紧张素转换酶-2 来刺激肺动脉平滑肌细 胞的增殖和迁移^[5]。

为此,本研究采用人脐带间充质干细胞外泌体(human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes, hUCMSC-Exo),对提取的外泌体进行鉴定和高通量测序,分析其含有的高表达的miRNAs,并结合 PH 靶基因进行分析,探讨hUCMSC-Exo改善PH的潜在分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器

NovoCyte 260R 流式细胞仪(艾森生物杭州有 限公司); Optima XPN-100 超高速离心机 (BECKMAN); 1658033型电泳仪(美国Bio-Rad); JEM1230 透射电子显微镜(日本电子株式会社);铜 网(TED pella); ZetaView 纳米粒径仪(德国 Particle Metrix); Hiseq 2 000/2 500 高通量测序仪 (Illumina)。

1.2 试剂

α-MEM 培养基(Gibco, 批号: C12571500BT); 人脐带间充质干细胞成脂诱导分化试剂盒(货号: HUXUC-90031)、人脐带间充质干细胞成骨诱导分 化试剂盒(货号: HUXUC-90021)均购自美国 Cyagen; HLA-DR FITC(货号: 327005)、CD105 APC(货号: 323207)、CD90 FITC (货号: 328107)、 CD73 FITC(货号: 344015)、CD45 PerCP(货号: 304025)、CD34 PE(货号: 343505)均购自 Biolegend; 2%磷钨酸溶液(北京索莱宝科技有限公 司,货号: G1871); CD9 抗体(货号: ab263019)、 CD63 抗体(货号: ab134045)、calnexin 抗体(货号: ab133615)、HSP70 抗体(货号: ab181606)、TSG101 抗体(货号: ab125011)均购自 Abcam; TruSeq Small RNA Sample Prep Kits(Illumina, San Diego, 货号: RS-200-0024)。

1.3 外泌体的提取、鉴定与分析

1.3.1 人脐带间充质干细胞的培养与鉴定 脐带 来源于广东医科大学附属医院的产妇,本实验研 究通过医院伦理委员会批准后进行(批准号: YJYS2021062),每个产妇及其家属均签署知情同 意书。取新鲜的人脐带,用 PBS 清洗 2~3 次,去 除血管后将组织剪碎约1 mm³种板,用含10% FBS 和1%双抗的 α-MEM 培养基在 37 ℃、5% CO₂条 件下培养。待细胞满 80%时进行传代,传至第 3 代。取第3代人脐带间充质干细胞以2×10⁴·cm⁻²的细胞密度接种于6孔板,用成脂和成骨分化培养基诱导分化,分别用油红O和茜素红染色显像观察,鉴定人脐带间充质干细胞成骨成脂的分化能力。运用流式细胞术检测人脐带间充质干细胞表面标志物HLA-DR、CD105、CD90、CD73、CD45、CD34^[6]。

1.3.2 外泌体的提取 将人脐带间充质干细胞培养至密度达 80%后,以无血清培养基培养 48 h 并 收集培养液上清。采用差速离心法提取外泌体,以 1 000×g、4 ℃离心 10 min,然后以 2 000×g、4 ℃ 离心 10 min,去除细胞碎片及死细胞。取上清液 以 10 000×g、4 ℃离心 20 min,去除亚细胞成分。取上清液以 100 000×g、4 ℃超高速离心 70 min,离心后弃掉上清液,加入 PBS 重悬沉淀后,再以 100 000×g、4 ℃超高速离心 70 min,弃上清,每 管加入 PBS 重悬沉淀,即得 hUCMSC-Exo^[7]。

1.3.3 透射电子显微镜及纳米颗粒跟踪分析 (nanopartide tracking analysis, NTA)鉴定 取外泌 体悬液 20 μL,呈水滴状滴至电镜铜网状栅中, 使滴液在铜网上保留片刻(>1 min),2%磷钨酸溶 液负染固定 1~10 min,滤纸吸干后室温自然晾干, 在生物透射电子显微镜下观察并拍照。用 NTA 检 测外泌体颗粒的大小,步骤如下:①以去离子水 清洗样本池;②仪器以聚苯乙烯微球(100 nm)校 准;③以 1×PBS 缓冲液清洗样本池;④样本用 1×PBS 缓冲液稀释 1 000 倍后,上样检测。

1.3.4 蛋白印迹检测 外泌体蛋白样品通过 12% 和 15% SDS-PAGE 胶分离,转印至 PVDF 膜上, 用 5%脱脂牛奶封闭,4℃孵育一抗过夜,所用到 的抗体如下,CD9(1:1000)、CD63(1:1000)、Calnexin(1:1000)、HSP70(1:1000)、TSG101(1:1000),孵育二抗1h,用 ECL 曝光显影。

1.3.5 高通量测序 本研究选取 3 批次 hUCMSC-Exo 进行测序分析,实验流程按照 Illumina 公司提 供的标准步骤执行,包括制备文库和测序实验。 miRNA 测序文库制备采用 TruSeq Small RNA Sample Prep Kits。文库制备工作完成后,对构建 好的文库使用 Illumina Hiseq 2 000/2 500 进行测 序,测序读长为单端 1×50 bp。

1.3.6 hUCMSC-Exo miRNAs 的筛选及其靶基因 预测 以 miRNA 测序表达谱归一化法确定 hUCMSC-Exo miRNA 的表达谱信息^[8],选择表达

量较高的 miRNAs(指在一个样本中拷贝数大于平 均值的 miRNA)。采用 miRDB (http://mirdb.org/), miRTarBase(http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/php/ index. php) 和 TargetScan(http://www.targetscan.org/vert_ 72/)数据库对得到的 miRNAs 进行靶基因预测。3 个数据库同时预测到才被认为是潜在的靶基因。 1.4 PH 的生物信息学分析

在 GeneCards (https://www. genecards. org/)搜 索 PH 相关基因,关键词为 "pulmonary arterial hypertension"。从 GEO 数据库(Gene Expression Omnibus database)下载 PH 中与肺组织相关的数据 集,关键词为 "pulmonary arterial hypertension"和 "homo sapiens",下载 GSE53408 及 GSE113439 2 个数据集,以及基因注释平台文件 GPL6244。利 用 R 软件的 Limma 和 Sva 软件包对差异表达的 mRNAs 进行批次矫正。筛选 GSE53408 及 GSE113439 2 个数据集的共同差异基因。

1.5 hUCMSC-Exo 作用于 PH 的靶基因筛选

利用 Draw VennDiagram 软件 (http:// bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/),将 "1.4"项下获取 PH 的相关基因与 hUCMSC-Exo miRNAs 预测的靶基因进行交集,获得 hUCMSC-Exo 作用于 PH 的靶基因。

1.6 GO 和 KEGG 富集分析

运用 DAVID(https://david.ncifcrf.gov/)在线注 释工具,以 P<0.05 为筛选条件,分析 hUCMSC-Exo 作用于 PH 的相关生物功能和信号通路。

1.7 蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络的构建

将筛选出的靶基因输入 STRING 数据库 (https://www.string-db.org/),设置综合交互得分 0.400 为显著性阈值,得出 PPI 网络,并用 R 包进 行分析,分析 PPI 网络的拓扑学特征,筛选出 hUCMSC-Exo 作用于 PH 的关键靶点。

2 结果

2.1 人脐带间充质干细胞的鉴别

光学显微镜下观察第 3 代(passage3, P3)人脐 带间充质干细胞的生长情况,见图 1。在光学显微 镜下可观察到人脐带间充质干细胞成脂分化可被 油红 O 染色,成骨分化可被茜素红染色,图 2~3。 流式细胞术检测结果显示,CD105、CD90、CD73 表达呈阳性,而 HLA-DR、CD45、CD34 表达呈 阴性,结果见图 4。

Chin J Mod Appl Pharm, 2023 February, Vol.40 No.4 \cdot 435 \cdot



图1 人脐带间充质干细胞 P3 显微图

Fig. 1 Morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells(P3)



图2 人脐带间充质干细胞成脂分化图

Fig. 2 Adipocytes differentiation diagram of human umbilical cord mesenchymal stem cells



图 3 人脐带间充质干细胞成骨分化图 Fig. 3 Osteogenic differentiation diagram of human umbilical cord mesenchymal stem cells

2.2 hUCMSC-Exo 的鉴定与相关检测结果

2.2.1 hUCMSC-Exo 的鉴定 扫描电镜下可观 察到外泌体成圆盘状,见图 5。NTA 检测外泌体 浓度为每毫升 4.4×10⁶个微粒,见图 6。蛋白印迹

试验结果显示 hUCMSC-Exo 表达 CD9、CD63、 Hsp70、TSG101,不表达 Calnexin,见图 7。

2.2.2 高通量测序与靶基因预测结果 根据 miRNA 测序表达谱归一化法,共获取表达量较高的 miRNAs 43个,见表1。利用 miRDB、miRTarBase 和 TargetScan 数据库对得到的 43个 miRNAs 进行 靶基因预测,并进行交集处理,得到 hUCMSC-Exo miRNA 的靶基因 808个。

2.3 PH 的生物信息学分析结果

GeneCards 数据库搜索得到 5 347 个 PH 相关 基因。GSE53408 和 GSE113439 联合分析并进行 批次矫正,获得 601 个差异表达的 mRNAs,其中 上调 503 个,下调 98 个,差异的 mRNAs 用热图 表示,见图 8。

2.4 hUCMSC-Exo 作用于 PH 的靶基因

将 PH 的生物信息学分析结果与外泌体 miRNA 预测结果取交集,得到 17 个靶基因,包括 MDM2、VCAN、UBR5、HIF1A、DDX3X、IGF1、 SLC7A11、ATP13A3、TWF1、ADAMTS9、BZW1、 MYO5A、FBN1、ANGPT2、CALU、HSPA5、 HSP90B1,结果见图 9。

2.5 GO 和 KEGG 富集分析

将 17个 hUCMSC-Exo 作用于 PH 的靶基因列 表输入基因功能注释数据库 DAVID,可获得 23 条生物过程(biological process, BP),11条细胞组 分(cellular component, CC)和 8条分子功能 (molecular function, MF),结果见图 10。其中前 10个 BP 分别是细胞蛋白质代谢过程,翻译后蛋



图4 人脐带间充质干细胞表面标志物流式细胞术分析

Fig. 4 Flow cytometry analysis of the surface markers of human umbilical cord mesenchymal stem cells



图 5 人脐带间充质干细胞外泌体的透射电子显微镜图 (30 000×)

Fig. 5 Transmission electron microscope diagram of hUCMSC-Exo(30 000×)



图 6 人脐带间充质干细胞外泌体纳米颗粒跟踪分析检 测图

纳米颗粒跟踪分析检测外泌体浓度为每毫升 4.4×10⁶ 个微粒。

Fig. 6 Nanoparticle tracking analysis diagram of hUCMSC-Exo Concentration of exosomes detected by nanoparticle tracking analysis was 4.4×10^{6} particle per mL.



图 7 人脐带间充质干细胞外泌体蛋白印迹 CD9、CD63、Hsp90、TSG101表达, Calnexin 不表达。 Fig. 7 Western blotting of hUCMSC-Exo

Positive expression: CD9, CD63, Hsp90 and TSG101; nagetive expression: Calnexin.

白质修饰,基因表达的正调控,凋亡过程的负调 控,骨骼系统发育,细胞对抗菌药物的反应,ATF6 介导的未折叠蛋白应答,内质网中的蛋白质折叠, 对缺氧的应答,对铁离子的应答。前 10 个 CC 分

表1 人脐带间充质干细胞外泌体的 miRNAs Tab.1 miRNAs in the hUCMSC-Exo

		キャナシュ
miRNAs	Genome ID	表达水平
hsa-let-7f-5p	chr9	高
hsa-let-7i-5p	chr12	高
hsa-let-7g-5p	chr3	百
hsa-let-7f-5p	Х	高
hsa-miR-10a-5p_R-1	chr17	高
hsa-miR-21-5p_R+1	chr17	高
hsa-miR-21-3p	chr17	吉同
hsa-miR-22-3p	chr17	高
hsa-miR-23a-3p_R+1	chr19	首同
hsa-miR-26a-5p	chr3	高
hsa-miR-26a-5p	chr12	首同
hsa-miR-27a-3p_R-1	chr19	高
hsa-miR-27b-3p	chr9	高
hsa-miR-29a-3p	chr7	高
hsa-miR-31-5p_R+1	chr9	音同
hsa-miR-99b-5p	chr19	高
hsa-miR-100-5p	chr11	高
hsa-miR-103a-3p	chr20	高
hsa-miR-103a-3p	chr5	高
hsa-miR-125b-5p	chr21	高
hsa-miR-125a-5p_R-1	chr19	高
hsa-miR-125b-5p	chr11	高
hsa-miR-127-3p	chr14	高
hsa-miR-143-3p	chr5	甫
hsa-miR-145-5p	chr5	高
hsa-miR-146a-5p	chr5	高
hsa-miR-181a-5p	chr9	音同
hsa-miR-181a-5p	chrl	高
hsa-miR-186-5p_R+1	chr1	高
hsa-miR-191-5p	chr3	吉同
hsa-miR-199a-5p	chr1	吉同
hsa-miR-199b-3p	chr1	音同
hsa-miR-199b-3p	chr9	吉同
hsa-miR-199a-5p	chr19	音同
hsa-miR-199b-3p	chr19	音同
hsa-miR-221-3p	Х	音同
hsa-miR-222-3p_R+3	Х	音同
hsa-miR-320a-3p	chr8	高
hsa-miR-370-3p	chr14	青
hsa-miR-423-5p	chr17	高
hsa-miR-423-3p	chr17	高
hsa-miR-4448_R-2_1ss6CG	chr3	高
hsa-miR-4488 L+1R–1	chr11	吉同

注: Genome ID 表示 miRNA 成熟体对应的 miRNA 前体序列所在基因 组的染色体名称。

Note: Genome ID referred to the chromosome name of the genome where the miRNA precursor sequence corresponding to the miRNA mature body was located.

Chin J Mod Appl Pharm, 2023 February, Vol.40 No.4 \cdot 437 \cdot

中国现代应用药学 2023 年 2 月第 40 卷第 4 期



SE 113439 SE 53408

图 8 GEO 数据集联合分析差异表达基因热图 蓝色代表对照组,紫色代表疾病组,GSE113439 用浅绿色表示, GSE53408 用粉红色表示。右侧纵轴展示的是差异的基因名,横轴表 示样品名。

Fig. 8 Heatmap of combined analysis of differentially expressed genes in GEO databases

Blue represented control groups; purple represents disease groups; light green represented GSE113439; pink represents GSE53408. Right Y-axis: differentially expressed genes. X-axis: samples names.



图9 靶基因韦恩图

GeneCards、GEO数据集和外泌体测序所得的 miRNAs 靶基因取交集, 得到 17 个重叠的靶基因。

Fig. 9 Venn diagram of target genes

Intersection of GeneCards, GEO databases and target genes of miRNAs obtained from exocrine sequencing come to 17 targets.

· 438 · Chin J Mod Appl Pharm, 2023 February, Vol.40 No.4



图 10 靶基因 GO 途径富集分析

纵轴展示 GO 条目的名称,绿色表示分子功能,橙色表示细胞组分,紫色表示生物过程。圆圈内的数目表示基因数。

Fig. 10 GO pathways enrichment analysis of target genes Y-axis showed the GO terms. Green: molecular function. Orange: cellular component. Purple: biological process. The number of target genes were in the circles.

别是黑色素、内质网腔、胞外区、高分子复合物、 细胞膜、肌浆网腔、内质网伴侣复合体、内质网、 细胞外基质、黏着斑。8 个 MF 分别是钙黏蛋白结 合、钙离子结合、ATP 酶活性、ATP 结合、蛋白 质结构域特异性结合、泛素蛋白连接酶结合、RNA 结合、酶结合。KEGG 富集分析结果主要包括前 列腺癌、HIF-1 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、癌 症的蛋白多糖和癌症通路,见图 11。



图 11 KEGG 信号通路气泡图

左侧纵轴表示 KEGG 富集的条目,圆圈的颜色表示 P 值,圆圈的大 小代表基因数目。

Fig. 11 Bubble plot of KEGG pathways

Y-axis on the left represented names of KEGG pathways. The color and the size of the plot represented P value and the number of genes.

2.6 PPI 网络的构建及 PH 关键靶点的筛选

运用 STRING 数据库对 hUCMSC-Exo 中所含 miRNAs 可能靶向调控 PH 的 17 个作用靶点进行 PPI 分析,以 R 软件进行关键节点分析,构成 PPI

中国现代应用药学 2023 年 2 月第 40 卷第 4 期

网络的 11 个基因按照度值从高到低排序分别是 HIF1A、HSP90B1、IGF1、HSPA5、ADAMTS9、 ANGPT2、CALU、MDM2、VCAN、FBN1、UBR5, 见图 12。



图 12 PPI 网络图 Fig. 12 PPI network diagram

3 讨论

本研究通过高通量测序分析 hUCMSC-Exo 中 的 miRNAs, 可得出提取的外泌体样本中存在 43 个高表达的 miRNAs。miRNAs 能通过调控其靶基 因及其下游通路参与病理生理过程。 Hsa-miR-127-3p 下调可以导致狼疮性肾炎肾脏 I 型干扰素信号通路的过度激活^[9]。Hsa-miR-10a-5p 可以通过调节 BDNF/SEMA4C 通路促进胰腺癌的 发生和发展^[10]。在川崎病的研究中, hsa-miR-27b-3p 通过调节 SMAD7 抑制内皮细胞的增殖和迁移^[11]。 Hsa-miR-186-5p 通过抑制 SMAD6 和 SMAD7 调节 TGFβ 信号通路, 过表达的 hsa-miR-186-5p 可以抑 制结肠癌细胞的增殖、迁移和细胞活性,促进凋 亡^[12]。Hsa-miR-199a-5p 通过靶向调控 HIF1A 保护 缺氧诱导的心肌细胞损伤[13]。在糖尿病肾病中, hsa-miR-199b-3p 通过靶点 KDM6A 调节 E-钙黏蛋 白,从而防止上皮-间质转化和肾小管功能障碍[14]。 Hsa-miR-23a-3p 在 PH 患者的肺动脉和缺氧诱导的 肺动脉平滑肌细胞中明显上调^[15]。Hsa-miR-423-3p 可以影响肝癌细胞的增殖和细胞周期[16]。对比伴有 支气管肺发育不良和无支气管肺发育不良的早产 儿的脐带血外泌体,发现伴有支气管肺发育不良的 早产儿脐带血外泌体损害血管形成,其差异的 hsa-miR-103a-3p 促进内皮细胞的增殖、迁移和小管 的形成,与内皮细胞功能及血管生成相关[17]。脐带 血外泌体hsa-miR-125a-5p 通过调节 VEGFA 在子痫 前期的表达,抑制滋养层细胞的迁移和增殖[18]。长 非编码 RNA LINC00968 通过降低 hsa-miR-423-5p 上调 PROX1,从而减少乳腺癌细胞增殖、迁移和 血管生成^[19]。

miRNAs 可以成为疾病诊断和预后的潜在靶 点。Poursaei 等^[20]研究显示, hsa-let-7g-5p 可能可 以作为诊断阿尔茨海默病的血液生物标志物。HsamiR-21-3p 和 hsa-miR-21-5p 可以作为鼻咽癌的潜 在靶点^[21]。与人正常肺上皮细胞对比, hsa-miR-22-3p 在肺腺癌细胞中明显下调^[22]。Hsa-miR-181a-5p 和 hsa-miR-26a-5p 有可能作为成年慢性髓 系白血病患者分子水平上应用酪氨酸激酶抑制剂 治疗的新生物标志物^[23]。Hsa-miR-27a-3p 可能可 以作为原发的多形性胶质母细胞瘤的标志物[24]。 Hsa-miR-99b-5p 在类风湿性关节炎患者中明显上 调^[25]。Hsa-miR-320a-3p 作为簇集蛋白的潜在调节 性 miRNA,可以作为诊断异常侵袭性胎盘的潜在 标志物^[26]。呼吸道合胞病毒感染会引起 hsamiR-4448 的显著表达[27]。Hsa-miR-191-5p 可以作 为筛选高质量精子的潜在标志物,其高表达与早 期人类胚胎质量有关[28]。生物信息学分析显示, hsa-miR-221-3p 和 hsa-miR-222-3p 及其靶基因可 能是肝细胞癌的预后预测标志物[29]。

血浆外泌体 miRNAs 也具有成为诊断生物标 志物的潜能。1 项吸烟者血浆外泌体的研究显示, hsa-let-7f-5p 和 hsa-let-7i-5p 在吸电子烟者和不吸 烟者血浆外泌体表达存在差异;而比较吸普通香 烟和不吸烟者的血浆外泌体时,发现 hsamiR-29a-3p 的差异表达^[30]。通过对血清外泌体的 检测,发现 hsa-miR-370-3p 与银屑病关节炎、寻常 型银屑病、类风湿性关节炎和痛风性关节炎的发病 机制相关^[31]。血浆外泌体 hsa-miR-4488 可能作为抗 黑色素瘤分化相关蛋白 5 抗体阳性亚群皮肌炎相关 间质性肺病的新生物标志物^[32]。乳腺癌患者血浆外 泌体中的 hsa-miR-21-5p 较对照组明显上调^[33]。HsamiR-125b-5p 在晚期非小细胞肺癌血清外泌体中明 显上调,免疫治疗能抑制其上调表达^[34]。

随着再生医疗研究的不断发展,干细胞外泌体治疗可以减少干细胞分化带来的不良反应,干细胞来源的外泌体可能起到干预疾病机制的作用。人间充质干细胞分泌的 hsa-miR-145-5p 和 hsa-miR-31-5p 可以抑制神经胶质瘤细胞的侵袭^[35]。人脐带间充质干细胞通过外泌体携带的 hsa-miR-145-5p 抑制胰腺导管腺癌的发展^[6],而人脐带间充质干细胞通过外泌体携带的 hsa-miR-100-5p 起到

中国现代应用药学 2023 年 2 月第 40 卷第 4 期

促进胰腺导管腺癌进展的作用^[36]。人间充质干细胞外泌体来源的hsa-miR-143-3p通过调控靶基因可以促进胰腺癌细胞凋亡和抑制细胞生长^[37]。Hsa-miR-146a-5p来源于hUCMSC-Exo,有促进骨形成的潜能^[38]。

KEGG 富集分析发现,差异显著的通路分别 为前列腺癌,HIF-1 信号通路,PI3K-Akt 信号通路, 癌症的蛋白多糖和癌症通路。hUCMSC-Exo 含有 的 miRNAs 可能可以通过信号通路上的潜在靶点 影响 PH。有研究显示,通过影响 PI3K-Akt 通路可 以影响肺动脉平滑肌细胞的增殖、迁移和凋亡,影 响 PH 的血管重构。调节 PI3K-Akt 通路还可以影响 肺动脉内皮细胞的增殖和生存^[39-41]。促进肌动蛋白 细胞骨架调节可以引起肺动脉内皮细胞的内皮间 质化改变^[42]。在缺氧的刺激下,能引起肺血管的收 缩和肺动脉的重构,HIF-1 信号通路在这个过程中 起到重要的作用^[43]。

PPI 网络分析显示,构成这个 PPI 网络的 11 个基因按照度值从高到低排序分别是 HIF1A、 HSP90B1、IGF1、HSPA5、ADAMTS9、ANGPT2、 CALU、MDM2、VCAN、FBN1、UBR5。HIF1A 在缺氧条件下可以通过激活其他基因的转录而维 持细胞和系统的稳态,是 PH 的关键基因,尤其是 缺氧诱导的 PH, HIF1A 在肺动脉平滑肌细胞和肺 动脉内皮细胞中均表达上调[44-45]。IGF1 是和新 生血管生成相关的基因,促进 PH 中新生血管的形 成^[46]。在肺动脉平滑肌细胞中, IGF1 可以通过 S473 活化 AKT 而激活下游通路^[47]。HSP90B1 和 HSPA5 同属于热休克蛋白家族,是一种保守的蛋 白质。抑制 HSP90 可以防止 PDGF-BB 引起的肺 动脉平滑肌细胞的增殖和迁移^[48]。HSP90B1 和 HSPA5 与 PH 的关系还有待进一步的研究。有生 物信息学分析指出, ANGPT2 可能作为鲁索利替 尼治疗 PH 的潜在靶点^[49]。MDM2 在原发性 PH 患 者的肺组织中表达上调,抑制 MDM2 的表达可以 缓解肺动脉血管重构^[50]。在低表达 BMPR2 的原发 性 PH 和遗传性 PH 患者的肺动脉中能发现高表达 的 FBN1^[51]。在 PH 患者的肺动脉内皮细胞中可以 观察到 PPARγ-UBR5 的相互作用被破坏,与 DNA 修复还有内皮稳态相关^[52]。ADAMTS9、CALU、 VCAN 在 PH 中的作用目前还缺乏实验验证。

人脐带间充质干细胞是一种成体干细胞,是 存在于新生儿脐带组织中的一种多功能干细胞。

已有研究证明人脐带间充质干细胞可以对大鼠放 射性肺炎有治疗作用[53]。在新冠肺炎的治疗中, 人脐带干细胞能有效地降低一系列炎症因子,如 GM-CSF $\$ IFN-g $\$ IL-5 $\$ IL-6 $\$ IL-7 $\$ TNF- α $\$ TNF- β $\$ PDGF-BB 和 RANTES(P<0.05), 提高患者的生存 率^[54]。在 PH 中, 人脐带间充质干细胞能有效降低 右心室收缩压从而缓解 PH^[55]。近年来,随着亚细 胞治疗和细胞外囊泡领域大量、深入的研究,了 解到间充质干细胞外泌体具有携带源细胞生物信 息、低免疫原性与无分化风险等特点,具有较好 的临床应用前景。PH 的发病机制未明,治疗手段 以缓解临床症状为主,已有研究表明外泌体对 PH 有缓解效果, Aliotta 等[56]研究证明, 间充质干细胞 外泌体可以减低野百合碱诱导的大鼠 PH 模型的右 室壁与左室壁+室间隔(RV/LV+S)的比值,还有肺动 脉管壁厚度与内径(WT/D)的比值。笔者所在课题组 前期研究中也发现间充质干细胞外泌体可以缓解 平均肺动脉压和平均右心室压力[57],间充质干细胞 外泌体还对血管生成有良好的促进作用。Zhang 等^[7] 研究表明,用TNF-α预处理的hUCMSC-Exo可以 通过抑制 NLRP3 的活化从而缓解急性肝损伤。此 前本课题组有相关研究证明在同样处理条件下, 人脐带间充质干细胞外囊泡比其来源的人脐带间 充质干细胞所含的血管生成素、血管内皮生长因 子、单核细胞趋化蛋白-1 和血管内皮生长因子受 体-2 表达量要高[58]。

本研究发现 hUCMSC-Exo 可能存在通过其高 表达的 miRNAs 调控 PH 的靶基因的潜能,参与 PH 的病理生理过程,但具体的作用机制还需要进 一步实验证明。

REFERENCES

- OLSCHEWSKI A, BERGHAUSEN E M, EICHSTAEDT C A, et al. Pathobiology, pathology and genetics of pulmonary hypertension: Update from the Cologne Consensus Conference 2018[J]. Int J Cardiol, 2018(272S): 4-10.
- [2] ZOLTY R. Pulmonary arterial hypertension specific therapy: The old and the new[J]. Pharmacol Ther, 2020(214): 107576.
- [3] XIAO M Y, ZENG W K, WANG J X, et al. Exosomes protect against acute myocardial infarction in rats by regulating the renin-angiotensin system[J]. Stem Cells Dev, 2021, 30(12): 622-631.
- [4] KANG B Y, PARK K K, KLEINHENZ J M, et al. Peroxisome proliferator–activated receptor γ and microRNA 98 in hypoxia-induced endothelin-1 signaling[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016, 54(1): 136-146.
- [5] ZHAO H Y, WANG Y, ZHANG X L, et al. miR-181b-5p

inhibits endothelial-mesenchymal transition in monocrotalineinduced pulmonary arterial hypertension by targeting endocan and TGFBR1[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020(386): 114827.

- [6] DING Y X, CAO F, SUN H C, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cells deliver exogenous miR-145-5p to inhibit pancreatic ductal adenocarcinoma progression[J]. Cancer Lett, 2019(442): 351-361.
- [7] ZHANG S Q, JIANG L R, HU H Z, et al. Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF-α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage[J]. Life Sci, 2020(246): 117401.
- [8] LI X, SHAHID M Q, WU J W, et al. Comparative small RNA analysis of pollen development in autotetraploid and diploid rice[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 499.
- [9] WU L L, HAN X, JIANG X Y, et al. Downregulation of renal hsa-miR-127-3p contributes to the overactivation of type I interferon signaling pathway in the kidney of lupus nephritis[J]. Front Immunol, 2021(12): 747616.
- [10] FEI X, JIN H Y, GAO Y, et al. Hsa-miR-10a-5p promotes pancreatic cancer growth by BDNF/SEMA4C pathway[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2020, 34(3): 927-934.
- [11] RONG X, GE D H, SHEN D P, et al. miR-27b suppresses endothelial cell proliferation and migration by targeting Smad7 in Kawasaki disease[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(4): 1804-1814.
- [12] BAYAT Z, GHAEMI Z, BEHMANESH M, et al. Hsa-miR-186-5p regulates TGFβ signaling pathway through expression suppression of SMAD6 and SMAD7 genes in colorectal cancer[J]. Biol Chem, 2021, 402(4): 469-480.
- [13] CHEN H Y, LU J, WANG Z K, et al. Hsa-miR-199a-5p protect cell injury in hypoxia induces myocardial cells via targeting HIF1a[J]. Mol Biotechnol, 2022, 64(5): 482-492.
- [14] BAI S J, XIONG X Y, TANG B, et al. Hsa-miR-199b-3p prevents the epithelial-mesenchymal transition and dysfunction of the renal tubule by regulating E-cadherin through targeting KDM6A in diabetic nephropathy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021(2021): 8814163.
- [15] LIU Y, HU R, ZHU J Q, et al. The lncRNA PAHRF functions as a competing endogenous RNA to regulate MST1 expression by sponging miR-23a-3p in pulmonary arterial hypertension[J]. Vascul Pharmacol, 2021(139): 106886.
- [16] DE OLIVEIRA A R C P, CASTANHOLE-NUNES M M U, BISELLI-CHICOTE P M, et al. Differential expression of angiogenesis-related miRNAs and VEGFA in cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Arch Med Sci, 2020, 16(5): 1150-1157.
- [17] ZHONG X Q, YAN Q, CHEN Z G, et al. Umbilical cord blood-derived exosomes from very preterm infants with bronchopulmonary dysplasia impaired endothelial angiogenesis: Roles of exosomal microRNAs[J]. Front Cell Dev Biol, 2021(9): 637248.
- [18] ZHAO X Y, LI Y M, CHEN S, et al. Exosomal encapsulation of miR-125a-5p inhibited trophoblast cell migration and proliferation by regulating the expression of VEGFA in preeclampsia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 525(3): 646-653.
- [19] SUN X F, HUANG T, ZHANG C J, et al. Long non-coding RNA LINC00968 reduces cell proliferation and migration and angiogenesis in breast cancer through up-regulation of PROX1

中国现代应用药学 2023 年 2 月第 40 卷第 4 期

by reducing hsa-miR-423-5p[J]. Cell Cycle, 2019, 18(16): 1908-1924.

- [20] POURSAEI E, ABOLGHASEMI M, BORNEHDELI S, et al. Evaluation of hsa-let-7d-5p, hsa-let-7g-5p and hsa-miR-15b-5p plasma levels in patients with Alzheimer's disease[J]. Psychiatr Genet, 2022, 32(1): 25-29.
- [21] LAO T D, QUANG M T, LE T A H. The role of hsa-miR-21 and its target genes involved in nasopharyngeal carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2021, 22(12): 4075-4083.
- [22] DONG H X, WANG R, JIN X Y, et al. LncRNA DGCR5 promotes lung adenocarcinoma(LUAD) progression via inhibiting hsa-miR-22-3p[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(5): 4126-4136.
- [23] MOHD YACOB A, MUHAMAD N A, CHANG K M, et al. Hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-182-5p, and hsa-miR-26a-5p as potential biomarkers for BCR-ABL1 among adult chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors at the molecular response[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 332.
- [24] SALMANI T, GHADERIAN S M H, HAJIESMAEILI M, et al. Hsa-miR-27a-3p and epidermal growth factor receptor expression analysis in glioblastoma FFPE samples[J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2021, 17(5): e185-e190.
- [25] JIANG X, WEI Z J, WANG C, et al. A four-miRNA-based diagnostic signature for rheumatoid arthritis[J]. Dis Markers, 2022(2022): 6693589.
- [26] TIMOFEEVA A V, FEDOROV I S, PIROGOVA M M, et al. Clusterin and its potential regulatory microRNAs as a part of secretome for the diagnosis of abnormally invasive placenta: Accreta, increta, and percreta cases[J]. Life (Basel), 2021, 11(4): 270.
- [27] BAÑOS-LARA M, ZABALETA J, GARAI J, et al. Comparative analysis of miRNA profile in human dendritic cells infected with respiratory syncytial virus and human *Metapneumovirus*[J]. BMC Res Notes, 2018, 11(1): 432.
- [28] XU H, WANG X, WANG Z K, et al. microRNA expression profile analysis in sperm reveals hsa-miR-191 as an auspicious omen of *in vitro* fertilization[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 165.
- [29] WANG X K, LIAO X W, HUANG K T, et al. Clustered microRNAs hsa-miR-221-3p/hsa-miR-222-3p and their targeted genes might be prognostic predictors for hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer, 2019, 10(11): 2520-2533.
- [30] SINGH K P, MAREMANDA K P, LI D M, et al. Exosomal microRNAs are novel circulating biomarkers in cigarette, waterpipe smokers, E-cigarette users and dual smokers[J]. BMC Med Genomics, 2020, 13(1): 128.
- [31] CHEN X M, ZHAO Y, WU X D, et al. Novel findings from determination of common expressed plasma exosomal microRNAs in patients with psoriatic arthritis, psoriasis vulgaris, rheumatoid arthritis, and gouty arthritis[J]. Discov Med, 2019, 28(151): 47-68.
- [32] ZHONG D L, WU C Y, XU D, et al. Plasma-derived exosomal hsa-miR-4488 and hsa-miR-1228-5p: Novel biomarkers for dermatomyositis-associated interstitial lung disease with anti-melanoma differentiation-associated protein 5 antibody-positive subset[J]. Biomed Res Int, 2021(2021): 6676107.
- [33] LIU M, MO F, SONG X H, et al. Exosomal hsa-miR-21-5p is a biomarker for breast cancer diagnosis[J]. PeerJ, 2021(9):

Chin J Mod Appl Pharm, 2023 February, Vol.40 No.4 \cdot 441 \cdot

e12147.

- [34] PENG X X, YU R Y, WU X, et al. Correlation of plasma exosomal microRNAs with the efficacy of immunotherapy in EGFR/ALK wild-type advanced non-small cell lung cancer[J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(1): e000376.
- [35] KUROGI R, NAKAMIZO A, SUZUKI S O, et al. Inhibition of glioblastoma cell invasion by hsa-miR-145-5p and hsa-miR-31-5p co-overexpression in human mesenchymal stem cells[J]. J Neurosurg, 2018, 130(1): 44-55.
- [36] DING Y X, MEI W T, ZHENG Z, et al. Exosomes secreted from human umbilical cord mesenchymal stem cells promote pancreatic ductal adenocarcinoma growth by transferring miR-100-5p[J]. Tissue Cell, 2021(73): 101623.
- [37] WANG B Y, XU Y, WEI Y H, et al. Human mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-143 promotes apoptosis and suppresses cell growth in pancreatic cancer via target gene regulation[J]. Front Genet, 2021(12): 581694.
- [38] ZHAI M M, ZHU Y, YANG M Y, et al. Human mesenchymal stem cell derived exosomes enhance cell-free bone regeneration by altering their miRNAs profiles[J]. Adv Sci (Weinh), 2020, 7(19): 2001334.
- [39] YANG Y Y, YIN L H, ZHU M N, et al. Protective effects of dioscin on vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension via adjusting GRB2/ERK/PI3K-AKT signal[J]. Biomed Pharmacother, 2021(133): 111056.
- [40] ZHANG S, WANG J, QI X M, et al. Plasminogen activator Inhibitor-2 inhibits pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension via PI3K/Akt and ERK signaling[J]. Exp Cell Res, 2021, 398(1): 112392.
- [41] WANG Y Y, CHENG X D, JIANG H. Effect of atorvastatin on pulmonary arterial hypertension in rats through PI3K/AKT signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(23): 10549-10556.
- [42] GOOD R B, GILBANE A J, TRINDER S L, et al. Endothelial to mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Pathol, 2015, 185(7): 1850-1858.
- [43] ABE H, SEMBA H, TAKEDA N. The roles of hypoxia signaling in the pathogenesis of cardiovascular diseases[J]. J Atheroscler Thromb, 2017, 24(9): 884-894.
- [44] ZHANG B, NIU W, DONG H Y, et al. Hypoxia induces endothelial mesenchymal transition in pulmonary vascular remodeling[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(1): 270-278.
- [45] SHIMODA L A, SEMENZA G L. Functional analysis of the role of hypoxia-inducible factor 1 in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension[J]. Methods Enzymol, 2004(381): 121-129.
- [46] FU J, BAI P Y, CHEN Y W, et al. Inhibition of miR-495 improves both vascular remodeling and angiogenesis in pulmonary hypertension[J]. J Vasc Res, 2019, 56(2): 97-106.

- [47] YANG Q W, SUN M, RAMCHANDRAN R, et al. IGF-1 signaling in neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension: Role of epigenetic regulation[J]. Vascul Pharmacol, 2015(73): 20-31.
- [48] WANG G K, LI S H, ZHAO Z M, et al. Inhibition of heat shock protein 90 improves pulmonary arteriole remodeling in pulmonary arterial hypertension[J]. Oncotarget, 2016, 7(34): 54263-54273.
- [49] DONG H R, LI X C, CAI M S, et al. Integrated bioinformatic analysis reveals the underlying molecular mechanism of and potential drugs for pulmonary arterial hypertension[J]. Aging, 2021, 13(10): 14234-14257.
- [50] SUN Z X, NIE X W, SUN S Y, et al. Long non-coding RNA MEG3 downregulation triggers human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration via the p53 signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6): 2569-2581.
- [51] HIEPEN C, JATZLAU J, HILDEBRANDT S, et al. BMPR2 acts as a gatekeeper to protect endothelial cells from increased TGF β responses and altered cell mechanics[J]. PLoS Biol, 2019, 17(12): e3000557.
- [52] LI C G, MAHON C, SWEENEY N M, et al. PPARγ interaction with UBR5/ATMIN promotes DNA repair to maintain endothelial homeostasis[J]. Cell Rep, 2019, 26(5): 1333-1343.e7.
- [53] WANG R, ZHU C Z, QIAO P, et al. Experimental treatment of radiation pneumonitis with human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(4): 262-266.
- [54] ALANAZI A. COVID-19 and the role of stem cells[J]. Regen Ther, 2021(18): 334-338.
- [55] FUKUMITSU M, SUZUKI K. Mesenchymal stem/stromal cell therapy for pulmonary arterial hypertension: Comprehensive review of preclinical studies[J]. J Cardiol, 2019, 74(4): 304-312.
- [56] ALIOTTA J M, PEREIRA M, WEN S C, et al. Exosomes induce and reverse monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice[J]. Cardiovasc Res, 2016, 110(3): 319-330.
- [57] CHEN J Y, AN R, LIU Z J, et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived microvesicles on pulmonary arterial hypertension in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(9): 1121-1128.
- [58] CHEN J Y, LIU Z J, HONG M M, et al. Proangiogenic compositions of microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115316.

收稿日期: 2022-02-06 (本文责编:沈倩)