

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.24.003

二甲基乙二酰基甘氨酸对间充质干细胞外泌体生物学特性的影响*

王香云,张东伟
(浙江省湖州市第一人民医院神经内科 313000)

[摘要] **目的** 探讨二甲基乙二酰基甘氨酸(DMOG)预处理对骨髓间充质干细胞(MSC)来源的外泌体(exosome)在心肌保护机制方面生物学特性的影响。**方法** 分离及鉴定间充质干细胞来源的 exosome,比较 DMOG 预处理后 MSCs 分泌的 exosome(Exo^{DMOG})与常规处理来源的 exosome(Exo)对小鼠心肌梗死后心肌保护、体外内皮细胞血管形成能力及心肌细胞抗凋亡能力的影响。**结果** DMOG 预处理后 MSCs 分泌的 exosome 明显改善小鼠心肌梗死后心功能并延长生存期,在体外实验中拥有更佳的促血管新生能力及心肌细胞保护能力。DMOG 预处理的 exosome 中 miR-210 表达水平明显上升,在体外实验中 miR-210 mimic 转染到受体细胞中拥有与 Exo^{DMOG} 相似的生物学作用;体内实验发现,加入 miR-210 的抑制剂(antogomiR-210)后明显削弱了 Exo^{DMOG} 对促血管新生、心肌细胞保护的作用。**结论** DMOG 预处理后 MSCs 来源的 exosome 拥有更佳的促血管生成能力及心肌细胞保护作用,可能通过 miR-210 来发挥生物学作用。

[关键词] 二甲基乙二酰基甘氨酸;间充质基质细胞;外泌体;内皮细胞;肌细胞,心脏

[中图法分类号] R542.2+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)24-4151-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effects of dimethyloxalyglycine on the biological characteristics of exosome from mesenchymal stem cells*

WANG Xiangyun,ZHANG Dongwei

(Department of Neurology,the First People's Hospital of Huzhou,Huzhou,Zhejiang 313000,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of dimethyloxalyglycine (DMOG) pretreatment on biological characteristics of myocardial protection by exosome (MSC-Exo) derived from MSCs (mesenchymal stem cells). **Methods** Exosome derived from MSCs was isolated and identified,and the capacity of improving cardiac function after myocardial infarction (MI),pro-angiogenesis and anti-apoptosis were compared between exosome (Exo^{DMOG}) secreted by MSCs after DMOG treatment and exosome (Exo) after conventional treatment. **Results** DMOG preconditioned MSCs-Exo significantly improved cardiac function and prolonged survival after MI in mice,and exerted better pro-angiogenesis and cardioprotection ability in vitro. The expression level of miR-210 in DMOG preconditioned exosome was significantly increased,and miR-210 mimic exerted in-to recipient cells had similar biological function as Exo^{DMOG} in vitro. However,the pro-angiogenesis and cardio-protection ability of Exo^{DMOG} was significantly weakened by adding miR-210 inhibitor,antogomiR-210,in vivo. **Conclusion** DMOG preconditioned MSC-Exo has superior ability of cardio-protection and pro-angiogenesis, which might due to the biological effects of miR-210.

[Key words] dimethyloxalyglycine;mesenchymal stromal cells;exosomes;endothelial cells;myocytes,cardiac

目前心肌梗死的发病率和病死率仍很高^[1],用干细胞治疗心肌梗死是当下的一种新理念,其通过多重不确定的机制来修复心脏^[2]。其中骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)易获得、免疫排斥低,已被广泛研究^[3]。但由于干细胞移植后的低归巢率、高凋亡率等缺陷,使得干细胞治疗效果大打折扣。而干细胞通过缺氧、药物预处理及基因改造等方法可以增加疗效,其中药物预处理具有操作较容易、细胞耐受性较好等优势,被广泛研究。二甲基乙二酰基甘氨酸(DMOG)是一种缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)的稳

定剂,可以使细胞在常氧状态下高表达 HIF-1α。外泌体(exosome)是一种由细胞分泌的纳米囊泡,研究发现其可以起到与 MSCs 本身几乎一致的生物学作用^[4]。本研究采用不同浓度的 DMOG 对 MSCs 进行预处理,以探讨 DMOG 的最佳处理浓度,并分析 DMOG 预处理后 exosome 在体内外试验中的生物学作用及其可能的机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞 清洁级 6~8 周龄 C57BL/

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81570251);浙江省医药卫生科技计划项目(2017KY639)。 作者简介:王香云(1988—),住院医师,硕士,主要从事心脑血管疾病的防治研究。

6 小鼠,由上海斯莱克实验动物公司提供;H9C2 心肌细胞冻存细胞株购于南京科佰生物科技有限公司;人脐静脉内皮细胞(HUVECs)冻存细胞株购于赛业(广州)生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器与试剂 倒置相差显微镜(德国 Leica 公司);低温离心机(德国 Eppendorf);低温高速离心机(美国 Thermo 公司);低温超速离心机(美国 Becman 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);DMEM/F12 培养基(美国 Corning 公司);胎牛血清(FBS,上海普飞生物技术有限公司);Matrigel(美国 BD 公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen Life Technologies 公司);DMOG 试剂(美国 Sigma-Aldrich 公司);miR-210 mimic、antagomiR-210 及对照(广州市锐博生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 MSC 的培养及鉴定 骨髓取自 6 周龄 C57BL/6 小鼠下肢长骨骨髓,并采用全骨髓培养,传代至第 3~4 代的小鼠 MSCs 采用流式细胞术鉴定细胞表型,具体检测包括 CD31、CD29、CD34、CD44。

1.2.2 MSC 预处理 以第 3~4 代小鼠 MSCs 作为 DMOG 预处理对象,分为空白对照组和实验组,每组计数并接种细胞 1×10^7 个/培养皿,首先用含有 10% FBS 的完全培养基培养 12 h,观察细胞状态良好后准备后续实验。DMOG 用 DMEM/F12 培养基稀释为 250、500、1 000、1 500 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度。之后细胞按照 DMOG 浓度 0、250、500、1 000、1 500 $\mu\text{mol/L}$ 共 5 组预处理 24 h。

1.2.3 MSC 来源的外泌体提取与鉴定 同时收集实验组和空白对照组细胞培养 24 h 后的条件培养基(细胞上清液),通过超速离心法获得 exosomes。具体步骤:(1)细胞上清液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下多步骤离心,300 $\times g$ 离心 10 min、2 000 $\times g$ 离心 10 min、12 000 $\times g$ 离心 30 min,分别去除死细胞、细胞碎片及细胞微泡(microvesicles),获得的细胞上清液再使用 100×10^3 超滤管浓缩,4 000 $\times g$ 离心 15 min,之后超速离心机下 4 $^{\circ}\text{C}$ 100 000 $\times g$ 离心 1 h,轻弃上清液,观察沉淀物,并用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,重悬后继续 4 $^{\circ}\text{C}$ 100 000 $\times g$ 离心 1 h。最终获得沉淀用 50~100 μL PBS 重悬,冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 待用。通过蛋白质印迹法(Western blot)检测 exosome 表面标记如 CD63、CD9 等,通过电镜观察 exosome 的典型形态和粒径大小。

1.2.4 miR-210 mimic 转染试验 分别在 H9C2 心肌细胞和 HUVECs 中转染 miR-210 mimic。具体步骤:HUVECs 或 H9C2 细胞分别接种到 24 孔板,约 1×10^5 个/孔,细胞密度 70%~90%,更换培养基。分别稀释 lipofectamine 2000 和 miR-210 mimic 在 25 μL 无血清培养基中,等比例混匀,待室温孵育后,每孔加入 50 μL 混合液,常温下培养 3 d。

1.2.5 体内试验后小鼠心肌梗死模型和小鼠心功能测定 采用 8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠,开胸后结扎

冠脉左前降支,实验分为 4 组:对照组(Sham 组),DMOG 预处理来源 exosome(Exo^{DMOG})组,对照 exosome(Exo)组,PBS 组,采用双盲法进行,分 5 点注射。小鼠心功能检测:按心肌梗死后术后当天(0 d)、术后 3、7、14、28 d,通过二维 M 型心脏超声分别对各组小鼠进行心功能评价。

1.2.6 组织学分析 实验按双盲进行,收集心肌梗死后 28 d 各实验组小鼠心脏,甲醛固定,石蜡包埋,用于后续病理切片。梗死面积的评估是以结扎线以下 500 μm ,对后续的组织切片用 Masson's trichrome 染色评估心肌梗死面积,并用 Image-pro Plus 软件分析每个心脏切面的梗死区域及整个左心室面积,心肌梗死百分比=梗死区域面积/整个左心室面积 $\times 100\%$ 。

1.2.7 免疫荧光染色 用于观察梗死周边区小动脉密度及心肌细胞凋亡情况。(1)小动脉密度观察:收集心肌梗死后 28 d 各实验组小鼠的心脏,完成组织冰冻切片后用甲醛固定,TritonX-100 破膜 10 min,10%牛血清蛋白(10%BSA)室温封闭 1 h,羊抗鼠 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、兔抗鼠肌钙蛋白 I(Troponin I)抗体共同 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,之后孵育二抗、细胞核 DAPI 染色,在荧光显微镜下观察、拍照,每个心脏随机选取 5 个切面,统计高倍镜下小动脉密度。(2)心脏组织 TUNEL 染色:标本制作方法同前,组织冰冻切片采用 TUNEL 染色,细胞核 4',6'-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色,每个心脏随机选取 5 个切面,在荧光显微镜下观察、计数 TUNEL+细胞数及 DAPI+细胞数。细胞凋亡率=(TUNEL+细胞总数)/(DAPI+细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.2.8 HUVECs 管腔形成实验 HUVECs 管腔形成实验在铺有 BD matrigel 的 96 孔板上进行。在相差显微镜下观察 HUVECs 形成管腔的情况,并每隔 1~2 h 拍照,最后统计管腔长度。

1.2.9 H9C2 心肌细胞凋亡实验 H9C2 凋亡实验(TUNEL 试验)在 6 孔板上进行,将 H9C2 细胞以 1×10^5 个/孔接种,根据实验分组处理 24 h,根据 TUNEL 试剂盒染色,在荧光显微镜下观察凋亡细胞数,最后计算凋亡率。

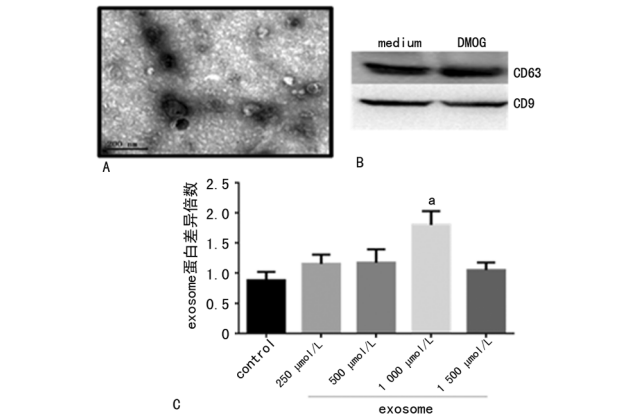
1.2.10 miR-210 抑制试验 采用特异性抑制 miR-210 表达的抑制剂 antagomiR-210,在 DMOG 预处理的同时加入 antagomiR-210,收集上述处理来源的 exosome(Exo^{DMOG+ATM})。进一步比较体内实验的差异,小鼠心肌梗死模型方法同前,实验分为 Sham 组、PBS 组、Exo^{DMOG} 组、Exo^{DMOG+ATM} 组,评估心肌梗死后 3、7、14、28 d 小鼠心功能,收集 28 d 小鼠心脏组织行免疫荧光染色。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6.02 软件作图并统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用两独立样本 t 检验;进行方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)或双因素方差分析(Two-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

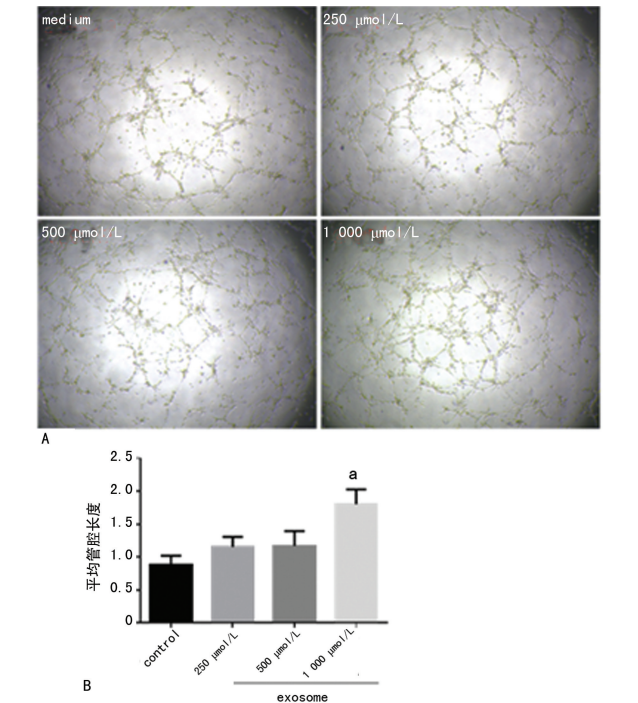
2 结 果

2.1 MSC 来源的 exosome 鉴定 通过电镜观察 exosome 的形态及大小,符合典型杯状结构,直径约 100 nm(图 1A)。通过 Western blot 检测 exosome 表面相关标记物 CD63、CD9 均阳性(图 1B)。对收集的 exosome 采用二喹啉甲酸(BCA)进行蛋白定量,随着 DMOG 的浓度增加,exosome 的分泌水平有增加的趋势,其中 DMOG 浓度在 1 000 μmol/L 时增加最明显,但进一步提高 DMOG 浓度 exosome 的分泌减少,可能是 DMOG 过量带来的副作用(图 1C),由此未进一步增加 DMOG 浓度进行实验。



A:电镜下 exosome 鉴定;B:Western blot 对 exosome 的鉴定;C: BCA 蛋白定量分析比较不同浓度 DMOG 处理后 exosome 分泌水平;^a: $P<0.05$,与 control 组比较

图 1 MSCs-Exo 的鉴定及不同浓度 DMOG 对 exosome 分泌的影响

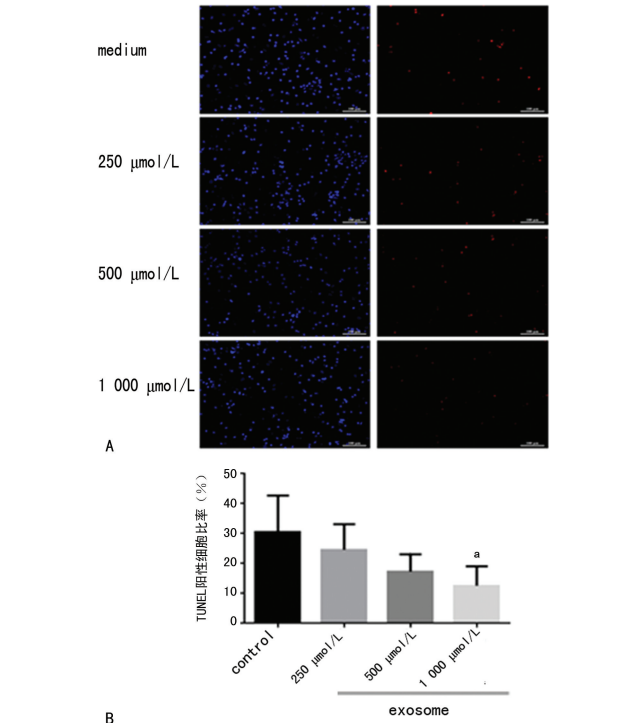


A:HUVECS 管腔形成实验;B: HUVECS 管腔形成实验分析图;^a: $P<0.05$,与 control 组比较

图 2 不同浓度 DMOG 预处理 MSCs 来源的 exosome 对促血管新生的作用

2.2 不同浓度 DMOG 预处理 MSCs 来源的 exosome 对促血管新生的作用 收集不同浓度 DMOG 预处理 MSC 分泌的 exosome,进行 HUVECS 管腔形成实验,根据浓度不同,试验分为 control、250 μmol/L、500 μmol/L、1 000 μmol/L 组,结果发现随着 DMOG 浓度的增加,Exo 促血管新生能力亦明显提高,其中在 1 000 μmol/L 浓度下最明显,表现为管腔形成长度增加(图 2A、B)。

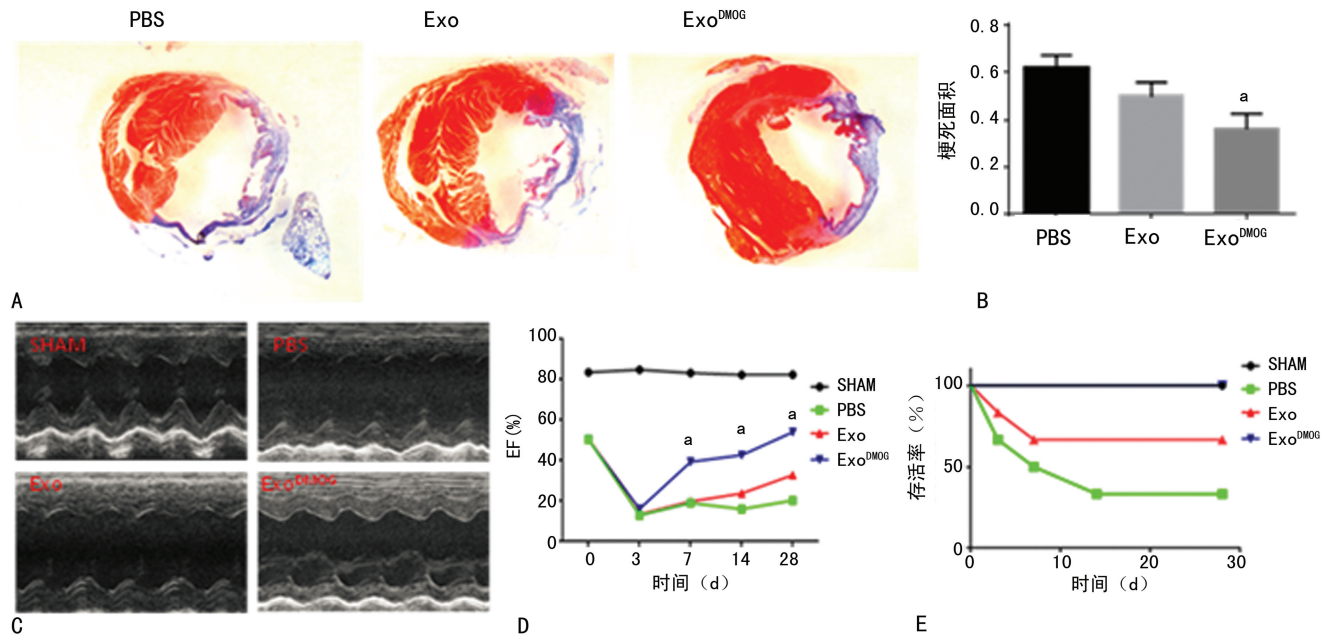
2.3 不同浓度 DMOG 预处理 MSCs 来源的 exosome 对心肌细胞的保护作用 比较不同浓度 DMOG 预处理后 MSCs 来源的 exosome 对心肌细胞的保护作用的差异,在体外进行 H9C2 细胞过氧化氢(H₂O₂)诱导的凋亡实验。根据浓度不同,分为 control、250 μmol/L、500 μmol/L、1 000 μmol/L 组,结果发现 1 000 μmol/L 组 exosome 对心肌细胞的保护作用最明显,表现为 TUNEL 阳性的细胞比率最低(图 3A、B)。



A:TUNNEL 实验;B:TUNNEL 实验分析图;^a: $P<0.05$,与 control 组比较

图 3 不同浓度 DMOG 预处理 MSCs 来源的 exosome 对心肌细胞抗凋亡的作用

2.4 DMOG 处理 MSC 来源的 exosome 可以改善小鼠心肌梗死后心功能 为了明确 DMOG 预处理来源 exosome(Exo^{DMOG})在体内实验中是否拥有优异的心肌保护作用,本研究通过左冠状动脉前降支永久结扎,建立小鼠急性心肌梗死模型,实验分为 Sham 组、Exo 组、Exo^{DMOG} 组、PBS 组,由于 1 000 μmol/L 浓度 DMOG 预处理来源的 exosome 在体外实验中生物学特性明显,故 Exo^{DMOG} 组的 exosome 来源于 1 000μmol/L 浓度 DMOG 预处理的 MSCs 来源的 exosome。体内实验采用双盲法进行,在左前降支顺



A:小鼠心肌 Masson's trichrome 染色;B:Masson's trichrome 染色分析图;C:小鼠心脏超声;D:小鼠心脏超声 EF 结果分析图;E:生存分析图;^a: $P<0.05$

图 4 DMOG 处理 MSC 来源的 exosome 可以改善小鼠心肌梗死后心功能

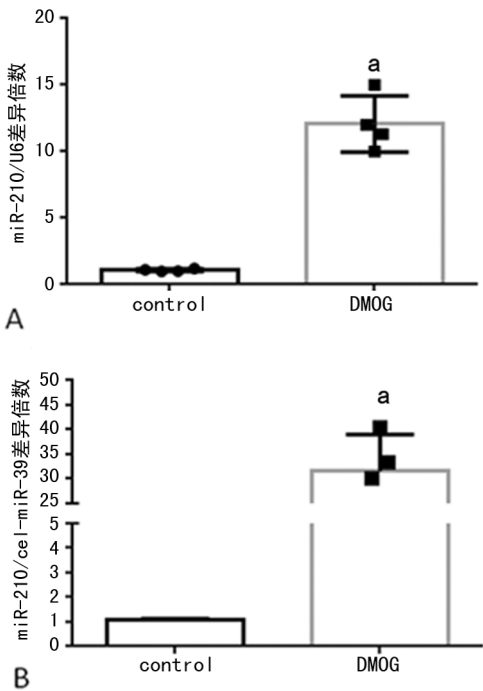
利结扎后,在结扎线周围心肌组织中立即注射 exosome (约收集自 2×10^7 个 MSCs)或同等剂量的 PBS 液,分 5 点注射,每点约 $10\ \mu\text{L}$ 。术后当天(0 d),心肌梗死后 3、7、14、28 d,利用小动物心脏超声仪系统检测各组小鼠的心功能改变并记录结果,收集 28 d 的小鼠心脏标本进行组织学分析。心肌梗死后 28 d,Exo^{DMOG} 组小鼠心功能均较对照 Exo 组有明显改善,具体表现在减少心肌梗死后瘢痕形成(图 4A、B),射血分数(EF)增加 $[(48.54\pm 7.6)\% \text{ vs. } (20.53\pm 8.1)\%, P<0.05]$ (图 4C、D),并且存活率明显增加(图 4E)。

2.5 DMOG 预处理对 miR-210 在 MSC 内和其分泌的 exosome 表达的影响 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 DMOG 预处理后干细胞中及 exosome 中 miR-210 均大量增加,尤以 exosome 中升高为主(图 5A、B)。本研究选取 miR-210 作为 DMOG 预处理后对 MSC 分泌的 exosome 生物学效益的重要研究对象。

2.6 miR-210 与 Exo^{DMOG} 拥有类似的生物学作用 miR-210 在 DMOG 预处理 MSC 分泌的 exosome 中的表达明显增加,促使猜测 miR-210 可能是其中最主要的生物学作用表现者。为此,在体外实验中进一步证实,分别在 HUVECs 和 H9C2 中转染 miR-210 mimic,结果表明,实验组相比对照组促血管新生能力明显增加,表现为管腔形成长度增加(图 6A、B),另外实验组 H9C2 在 H_2O_2 诱导下的凋亡率明显降低(图 6C、D)。这与 Exo^{DMOG} 的生物学作用相一致。

2.7 antagomiR-210 削弱 Exo^{DMOG} 的生物学作用 为进一步明确 miR-210 在 Exo^{DMOG} 的作用,采用特异

性抑制 miR-210 表达的抑制剂 antagomiR-210。结果显示,Exo^{DMOG+ATM} 组的小鼠心功能(EF 值)较 Exo^{DMOG} 组明显降低,与 PBS 组相仿(图 7A、B);同时,免疫荧光染色证实 Exo^{DMOG+ATM} 组在心肌细胞保护和血管新生方面的作用也明显降低,具体表现在 TUNEL 阳性细胞较 Exo^{DMOG} 组增加(图 7C、D), α -SMA 染色的小动脉密度较 Exo^{DMOG} 组减少(图 7E、F)。



A:MSCs 细胞水平 miR-210 PCR 分析图;B:exosome 水平 miR-210 PCR 分析图;^a: $P<0.05$,与 control 组比较

图 5 DMOG 预处理对 miR-210 在 MSC 细胞水平和 exosome 水平的影响

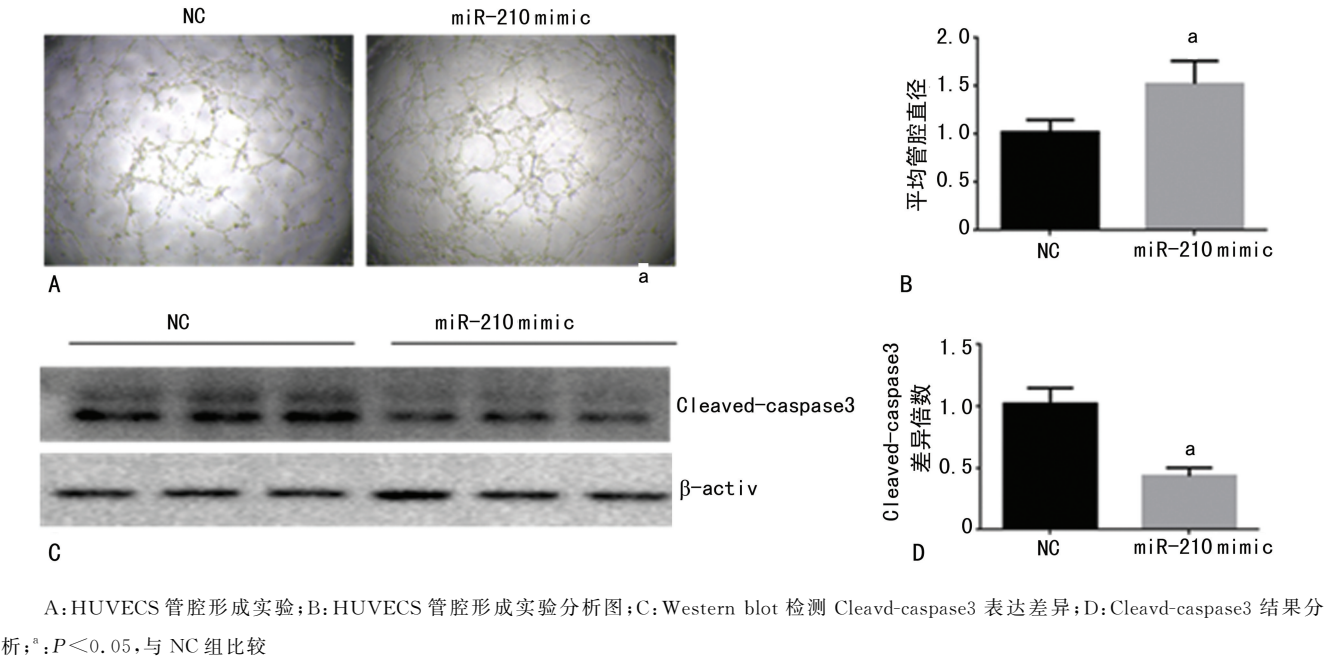


图 6 miR-210 的生物学作用分析

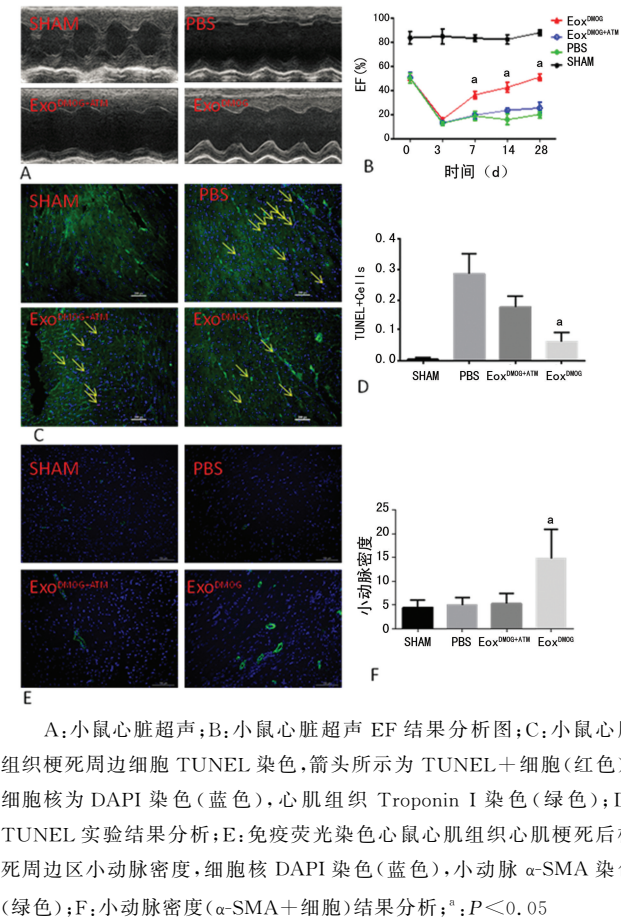


图 7 antagomiR-210 削弱 Exo^{DMOG} 的生物学作用

3 讨 论

干细胞移植疗法可改善心肌梗死后心功能,其可能通过旁分泌等多种机制发挥作用^[2]。但由于移植后干细胞归巢率低、凋亡率高等缺陷,使其治疗效果并不明确。研究发现,预处理干细胞可以增强干细胞

移植后的功效,预处理的方法有很多,包括药物、条件、基因修饰等,如缺氧条件预处理能提高干细胞修复心肌的能力^[5-6]。由于药物预处理操作简单,使其被广泛研究。DMOG 是一种 HIF-1 α 的稳定剂,在常氧条件下加入适当浓度的 DMOG 可以使细胞中的 HIF-1 α 处于稳定状态,类似于缺氧状态。既往研究发现,DMOG 预处理可以增强 MSCs 的促血管新生^[7],提高存活率^[8],促进分化^[9]等。

最新的研究发现,干细胞可以分泌大量被称为 exosome 的纳米颗粒。而 exosome 可能在 MSC 的旁分泌作用中扮演相当重要的角色。研究发现,exosome 发挥多种生物学作用,包括促血管新生^[10]、神经再生^[11]和修复心脏^[12]等。如果 exosome 能被研发成为生物制剂用于治疗疾病,可以成为干细胞治疗的替代方法,可能成为未来医学的研究方向。本研究通过不同浓度的 DMOG 预处理 MSCs 并收集 exosome,发现在 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下 exosome 的分泌水平最高,但增加浓度未见进一步升高,可能与药物副作用相关。同时还发现,1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度预处理来源的 exosome 在体内外心肌保护、血管新生作用上优势明显。

进一步研究发现,相较于对照组,干细胞 DMOG 预处理分泌的 exosome 表达谱差异明显,可以肯定的是 DMOG 处理后干细胞分泌的 exosome 中包含 HIF-1 α 诱导的 miRNA^[13],如 miR-210,其由 HIF-1 α 特异性调控^[14]。miR-210 被认为可以改善血管新生^[15-17]、保护细胞存活、抗凋亡^[18-19]。与其他文献报道一致,本研究发现 DMOG 预处理 MSCs 分泌的 exosome 中 miR-210 显著表达。同时作者也发现通过体外转染 miR-210 mimic 到受体细胞中,其结果与

Exo^{DMOG} 的生物学作用相类似。然而加入 miR-210 的抑制剂 antogomiR-210 后, DMOG 预处理收集的 exosome(Exo^{DMOG+ATM}), 在心肌梗死模型中改善梗死后心功能、心肌细胞保护、血管新生方面较 Exo^{DMOG} 明显减弱。由此认为, DMOG 预处理 MSCs 分泌的 exosome 在血管新生、心肌保护作用方面表现更加优异, 其可能是通过 miR-210 来发挥生物学作用。

综上所述, DMOG 预处理 MSCs 来源的 exosome 拥有更佳的心脏保护能力, 表现在体外实验中更好地促管腔形成、心肌细胞凋亡, 以及体内实验中改善心肌梗死后小鼠心功能、小鼠存活率等。其可能的原因是在 DMOG 预处理条件下, HIF-1 α 得以稳定, 其下游的靶基因得以激活, DMOG 预处理来源的 exosome 中 miR-210 的表达水平明显上升。通过 miR-210 mimic 转染受体细胞后发现, 其在血管新生、心肌细胞抗凋亡等方面与 DMOG 预处理来源的 exosome 具有相同的生物学作用。由此推测 Exo^{DMOG} 的生物学作用可能主要通过 miR-210 实现。本研究也证实 DMOG 预处理是一种有效、安全的方式来提升干细胞来源的 exosome 对心肌梗死动物模型的生物疗效, 可作为今后用于优化 exosome 替代治疗疗效的一种方法。

参考文献

- [1] TOWBIN J A, BOWLES N E. The failing heart[J]. *Nature*, 2002, 415(6868): 227-233.
- [2] WEN Z, ZHENG S, ZHOU C, et al. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(5): 1032-1043.
- [3] WILLIAMS A R, HARE J M. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease [J]. *Circ Res*, 2011, 109(8): 923-940.
- [4] LAI R C, ARSLAN F, LEE M M, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4(3): 214-222.
- [5] TANG Y L, ZHU W, CHENG M, et al. Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression [J]. *Circ Res*, 2009, 104(10): 1209-1216.
- [6] HU X, YU S P, FRASER J L, et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 135(4): 799-808.
- [7] ZHANG J, GUAN J, QI X, et al. Dimethylxaloylglycine promotes the angiogenic activity of mesenchymal stem cells derived from iPSCs via activation of the PI3K/Akt pathway for bone regeneration [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(6): 639-652.
- [8] LIU X B, WANG J A, OGLE M E, et al. Prolyl hydroxylase inhibitor dimethylxaloylglycine enhances mesenchymal stem cell survival [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(5): 903-911.
- [9] TAHEEM D K, FOYT D A, LOAIZA S, et al. Differential regulation of human bone marrow mesenchymal stromal cell chondrogenesis by hypoxia inducible factor-1 α hydroxylase inhibitors [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(9): 1380-1392.
- [10] LOPATINA T, BRUNO S, TETTA C, et al. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential [J]. *Cell Commun Signal*, 2014, 12: 26.
- [11] XIN H, LI Y, CUI Y, et al. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(11): 1711-1715.
- [12] 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 Cells Int*, 2015(2015): 960926.
- [13] GRAY W D, FRENCH K M, GHOSH-CHOUDHARY S K, et al. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology [J]. *Circ Res*, 2014, 116(2): 255-263.
- [14] HUANG X, DING L, BENNEWITH K L, et al. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation [J]. *Mol Cell*, 2009, 35(6): 856-867.
- [15] FASANARO P, D'ALESSANDRA Y, DI STEFANO V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23): 15878-15883.
- [16] HU S J, HUANG M, LI Z J, et al. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease [J]. *Circulation*, 2010, 122(Suppl 11): S124-131.
- [17] KOSAKA N, IGUCHI H, HAGIWARA K, et al. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(15): 10849-10859.
- [18] 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.
- [19] HU S, HUANG M, LI Z, et al. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease [J]. *Circulation*, 2010, 122(Suppl 11): S124-131.