

人脐带间充质干细胞的外泌体对肺癌细胞生物学活性的影响及其作用机制

李玉朋^{1,2}, 马征来³, 陈娟³, 马春玲³, 石建华², 于壮^{1*}

¹青岛大学附属医院肿瘤内科, 山东 青岛

²临沂市肿瘤医院内二科, 山东 临沂

³临沂市妇幼保健院出生缺陷防治重点实验室, 山东 临沂

收稿日期: 2023年5月21日; 录用日期: 2023年6月14日; 发布日期: 2023年6月25日

摘要

目的: 初步探究人脐带间充质干细胞来源的外泌体(Exosomes of human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSC-EXO)对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的影响及其作用机制。方法: 以A549细胞为研究模型构建荷瘤鼠, 给予脐带间充质干细胞来源的hUCMSC-EXO治疗, 并分别分为模型对照组、外泌体低剂量组、外泌体中剂量组、外泌体高剂量组和化疗组。分别从组织水平以肿瘤组织块的大小、组织形态、CD9的表达评价和细胞水平以细胞形态、增殖、分化进行评价, 综合分析脐带间充质干细胞外泌体(hUCMSC-EXO)对NSCLC影响。结果: 荷瘤鼠第8周用脊椎脱臼法处死, 去掉皮肤剥离取出肿瘤组织测量其大小, 统计分析各实验组的差异, 结果显示模型对照组与外泌体低剂量组、中剂量组、高剂量组的差异具有统计学意义($P < 0.05$), 对照组与化疗组的差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而外泌体低剂量组、中剂量组、高剂量组之间的差异没有统计学意义($P > 0.05$)。结论: 通过本研究证实: 非小细胞肺癌A549细胞对hUCMSC-EXO反应具有剂量依赖性, 高浓度的hUCMSC-EXO明显抑制肿瘤组织的生长和细胞迁移。

关键词

人脐带间充质干细胞, 非小细胞肺癌, 外泌体

Effect of Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Biological Activity of Lung Cancer Cells and Its Mechanism

Yupeng Li^{1,2}, Zhenglai Ma³, Juan Chen³, Chunling Ma³, Jianhua Shi², Zhuang Yu^{1*}

*通讯作者 E-mail: yuzhuang2002@163.com

文章引用: 李玉朋, 马征来, 陈娟, 马春玲, 石建华, 于壮. 人脐带间充质干细胞的外泌体对肺癌细胞生物学活性的影响及其作用机制[J]. 临床医学进展, 2023, 13(6): 9913-9922. DOI: 10.12677/acm.2023.1361386

¹Department of Oncology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Second Internal Medicine, Linyi Cancer Hospital, Linyi Shandong

³Key Laboratory of Birth Defect Prevention and Treatment in Linyi MCH Hospital, Linyi Shandong

Received: May 21st, 2023; accepted: Jun. 14th, 2023; published: Jun. 25th, 2023

Abstract

Objective: To investigate the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes (hUCMSC-EXO) on non-small cell lung cancer (NSCLC) and its mechanism. **Methods:** A549 cells were used as the study model to construct tumor-bearing mice, which were treated with mesenchymal stem cell hUCMSC-EXO from umbilical cord, they were divided into model control group, low-dose exosome group, middle-dose exosome group, high-dose exosome group and chemotherapy group. The size, histomorphology, CD9 expression of tumor tissue and cell morphology, proliferation and differentiation of tumor tissue were evaluated at the tissue level, the effect of umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes (hUCMSC-EXO) on NSCLC was analyzed. **Results:** At the 8th week, the tumor-bearing mice were killed with the method of spinal dislocation, the size of the tumor tissue was measured after the skin was removed, and the difference among the experimental groups was statistically analyzed, the results showed that there were significant differences between model control group and exosome low-dose group, middle-dose group and high-dose group ($P < 0.05$), and control group and chemotherapy group ($P < 0.05$), there was no significant difference among low-dose, middle-dose and high-dose exosome groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** This study confirmed that: The non-small-cell lung cancer A549 cells responded to hUCMSC-EXO in a dose-dependent manner, with high concentrations of hUCMSC-EXO significantly inhibiting tumor growth and cell migration.

Keywords

Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell, Non-Small Cell Lung Cancer, Exosomes

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺癌是我国乃至全世界发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一。根据最近的统计,全世界每年诊断出大约 200 万例恶性肿瘤,超过 75% 的患者死于这种疾病[1]。根据癌细胞的特征,肺癌通常分为两种亚型:非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(Small cell lung cancer, SCLC),其中 NSCLC 比 SCLC 更广泛,约占诊断肺癌病例的 85% [2] [3]。吸烟与肺癌之间的关系早已建立并得到证实 [4]; 然而,全世界大约 25% 的病例发生在非吸烟者身上,这一比例在亚洲甚至更高[5] [6]。最近的研究表明,除了吸烟,空气污染,包括接触厨房油烟,是一个不可忽视的危险因素,其他因素,如遗传易感性、不良饮食、职业暴露和空气污染,可能独立或与吸烟共同作用[7]。

NSCLC 是临床中最为多见的肺癌类型之一,是起源于支气管黏膜、支气管腺体和肺泡上皮的一类肺恶性肿瘤性疾病,可分为腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌、大细胞癌及肉瘤样癌等亚型[7]。早期肺癌患者一般无明显典型症状,中晚期患者则根据原发病灶位置的不同、是否有胸内播散、远处转移灶等情况,可

出现咳嗽、咳痰或咯血、呼吸困难或喘鸣、发热、体重明显下降、声音异常、胸腔积水等不同症状[2]。由于大部分患者在发现 NSCLC 时已进入晚期，错过了最佳的手术时机，只能采取化疗手段来控制病情发展[2]。

许多实验积极评估 MSC 衍生的胞外囊泡(EV)，包括外泌体(exosomes)和微泡(MV)，在基于 MSC 的细胞治疗中的作用，MSC 衍生的外泌体中包含细胞因子和生长因子、信号脂质、mRNA 和调节 miRNA 的内容物。MSC 外泌体可用于无细胞再生医学，这一过程很大程度上将取决于它们生产的质量、重复性和效力，这些参数决定了基于细胞治疗的 MSC 发展。然而，MSC 外泌体的组成成分不是静态的，而是受 MSC 组织来源、其活性和和临近细胞类型的影响而改变，因此，当 MSC 与肿瘤细胞一起培养或在体内肿瘤微环境中培养时，由 MSC 产生的外泌体内的成分会发生改变。基于此，MSC 外泌体可以为降低基于 MSC 的细胞治疗的风险[8]。脐带间充质干细胞外泌体将开启“无细胞”的干细胞治疗的新方法。

2. 材料与方法

2.1. 材料

A549 非小细胞肺癌细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司购买；CD9 一抗本购自美国 abcam 公司(ab236630)；DAB 显色试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司；研究利用的脐带由临沂市妇幼保健院产科提供(已取得临沂市妇幼保健院伦理委员会的许可：KYL-YXLL-2021025) BALB/c 雄性裸鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，共 20 只，荷瘤鼠分为模型对照组、低剂量外泌体组、中剂量外泌体组、高剂量外泌体组、化疗组，每组各 4 只裸鼠。利用脐带分离培养获取脐带间充质干细胞，进一步从培养液中分离获取外泌体。

2.2. CCK8 检测方法

将对数生长期的 A549 细胞，以 1×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板内，细胞贴壁后移除培养液，分别加入 100 μ L 含不同体积的外泌体(原液浓度： 1×10^{11} particle·mL⁻¹) (模型对照组：0 μ L、外泌体低剂量组：10 μ L、外泌体中剂量组：20 μ L、外泌体高剂量组：40 μ L、化疗组：顺铂 1 μ L)的培养基，置于 5% CO₂、37℃ 的恒温培养箱中培养 24 h。均设 5 个复孔，继续培养 24 h、48 h、72 h、96 h 后，将 10 μ L CCK-8 溶液依次加入所有孔中，置于体积分数为 5% CO₂、37℃ 的恒温培养箱中继续孵 2 h。使用酶标检测仪依次测定所有孔在 450 nm 处的吸光度值(A)，每组实验重复 3 次。

2.3. 肺癌模型造模与制片

两人配合在小鼠后背部左右两侧分布注射 1×10^6 的细胞量，并给予低、中、高浓度外泌体及化疗药腹腔内注射，每周一次，共 4 次。裸鼠共分 5 组，每组 4 只：

- ① 模型对照组： 1×10^6 细胞(不打外泌体)
- ② 低浓度组： 1×10^6 细胞 + 低浓度外泌体(250 μ L)
- ③ 中浓度组： 1×10^6 细胞 + 中浓度外泌体(500 μ L)
- ④ 高浓度组： 1×10^6 细胞 + 高浓度外泌体(750 μ L)
- ⑤ 化疗组： 1×10^6 细胞 + 顺铂 25 mg/kg

观察 6~8 周后，肿瘤细胞注射部位有包块样肿瘤形成。脱颈法处死小鼠，将包块取出后置于 10 倍体积于组织大小的 4%多聚甲醛中固定，4℃ 冰箱过夜，病理石蜡切片后进行 H&E 染色。

2.4. 外泌体提取方法

- 1) 上清液预处理：在去除杂质的离心上清液中加入 Exosome Concentration Solution (ECS 试剂)，具

体的加入剂量如下：细胞培养上清液 20 mL 加入 ECS 剂量 5 mL；

2) 溶液混合：加入 ECS 试剂后将离心管盖紧，通过涡旋振荡器混匀 1 min，再放置于 4℃ 静置 2 h；

3) 沉淀外泌体：取出装有混合液的离心管于 4℃ 以 10,000 q 离心 60 min，弃上清，沉淀中富含外泌体颗粒；(注：尽可能吸净上清液)

4) 外泌体重悬：取 1 × PBS 均匀吹打离心沉淀物，待其溶解后，将重悬液转移至新的 1.5 mL 离心管中；细胞上清 20 mL 样品体积加入 0.2 mL PBS 剂量；

5) 收获外泌体颗粒：将含有重悬液的 1.5 mL 离心管于 4℃ 以 12,000 q 离心 2 min，保留上清液，该上清液中富含外泌体颗粒。(注：若沉淀较多，可 12,000 g/2 min 离心多次至无明显沉淀，每次取离心上清液)

6) 纯化外泌体：将收获的外泌体颗粒粗品转入 Exosome Purification Filter (EPF 柱) 上室中，于 4℃ 以 3000 q 离心 10 min，离心后收集 EPF 柱管底的液体，此液体即为纯化后的外泌体颗粒；

7) 外泌体的保存：纯化后的外泌体以 50~100 μl 进行分装保存于 -80℃ 低温冰箱中，以备后继实验使用。

2.5. 划痕实验检测细胞迁移

1) 标记 6 孔板：使用 marker 笔在 6 孔板的底面画平行线。每个实验组三个复孔。

2) 铺 6 孔板：细胞计数后铺板，密度控制在第二天长满。

3) 制造划痕：用直尺比着，使用 10 μl 枪制造细胞划痕，划痕方向与标记线垂直。

4) 洗：PBS 洗 3 次，充分洗去漂浮细胞。

5) 换液：换无血清培养基或低血清培养基(FBS ≤ 2%)。

6) 定时拍照：每次拍照前都用 PBS 洗 3 次，充分洗去漂浮细胞。

2.6. 统计学处理

将实验所得数据进行归纳整理，统计学分析采用 Graphpad prism 7 破解版软件进行数据处理，采用单因素方差分析 CD9、肿瘤大小。P < 0.05 为具有统计学差异。

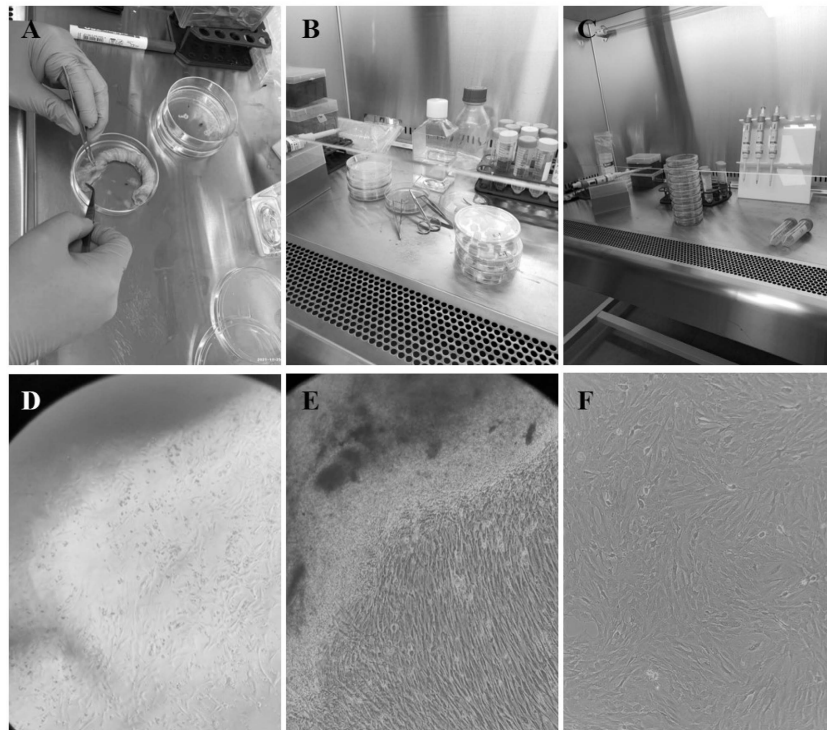
3. 结果

3.1. 脐带间充质干细胞分离培养

剖宫产后获取脐带，使用装有 DMEM-F12 基础培养基的灭菌瓶从产房运输到临沂市出生缺陷重点实验室，75%酒精快速冲洗 3 遍，PBS 冲洗 3 遍，使用眼科剪、眼科镊去掉脐动脉和静脉血管以及冲洗掉内部血液，剪成 1.0 cm × 1.0 cm 的组织块，先放入提前备好(0.5 明胶铺皿)的 10 cm 培养皿中 1 h 促贴壁，随后加入完全培养基(DMEM-F12 + 10% FBS) 10 ml，隔天换液，第 7~8 d 组织周围开始爬出细胞，P3 后可以冻存储备用(图 1)。

3.2. 脐带间充质干细胞外泌体提取及注射

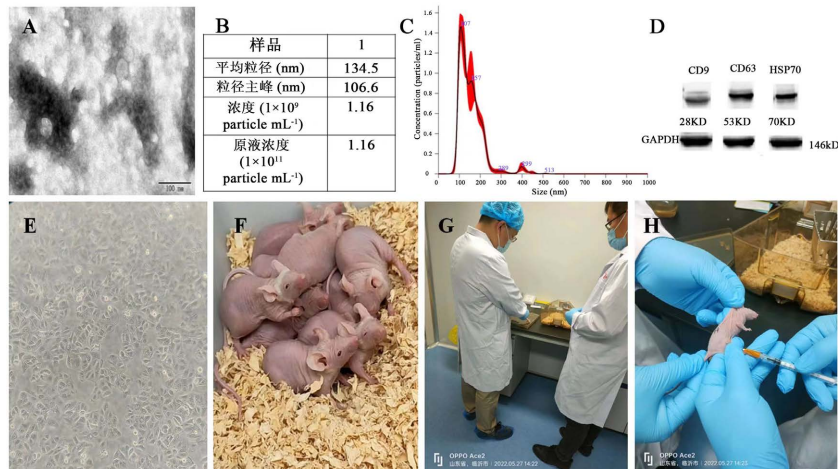
根据外泌体提取试剂盒高速离心提取的溶液送暨南大学生科院进行检测，其形态、平均直径、分布主峰、浓度都符合实验要求，同时检测其特异标记物 CD9、CD63、HSP70 的表达(图 2(A)~(D))。准备 A549 细胞及购买裸鼠，在裸鼠两后腿背侧分别注射 1 × 10⁶ 的细胞量，与此同时给予外泌体低剂量组、中剂量组、高剂量组分别腹腔注射 250 μL、500 μL、750 μL 的外泌体(1 × 10⁹ 个/mL)，在肿瘤形成的 4 周内每周注射外泌体一次，化疗组每周注射化疗药物(顺铂 25 mg/kg)一次(图 2(E)~(H))。



(A): 脐带去除动脉和静脉血管; (B): 剪切好的脐带组织块放入备好的培养皿; (C): 脐带组织块 37℃ 培养箱静止促贴壁 1 h 后加完全培养基; (D): 培养第 7 d 时可以观察到组织块周围有细胞爬出(200×); (E): 培养第 18 d 时可以观察到组织块周围大量的细胞(200×); (F): P3 冻存前脐带间充质干细胞的状态(200×)。

Figure 1. Isolation and culture of umbilical cord mesenchymal stem cells

图 1. 脐带间充质干细胞分离培养



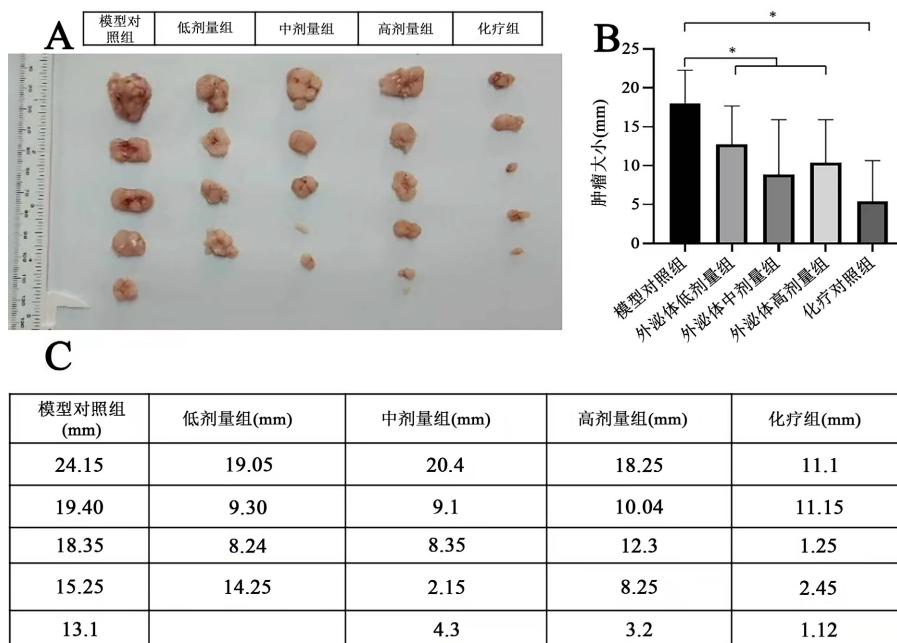
(A): 电镜下的外泌体囊泡的形态(20 万倍); (B): 外泌体的主要特征; (C): 外泌体流式分析其直径大小的平均分布; (D): WB 检测外泌体所具有特异标记物的表达(200×); (E): A549 细胞消化前的细胞状态(200×); (F): 购买的裸鼠; (G): 检查裸鼠; (H): 给裸鼠注射外泌体。

Figure 2. Isolation of exosomes from umbilical cord mesenchymal stem cells and injection of A549 cells

图 2. 脐带间充质干细胞外泌体分离及 A549 细胞注射

3.3. A549 肺癌模型肿瘤组织的取材及统计

荷瘤鼠第 8 周脱臼处死, 去掉皮肤剥离取出肿瘤组织测量其大小(图 3(A)、图 3(C)), 统计分析各实验组的差异, 结果显示模型对照组与外泌体低剂量组、中剂量组、高剂量组的差异具有统计学意义($P < 0.05$), 对照组与化疗组的差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而外泌体低剂量组、外泌体中剂量组、外泌体高剂量组之间的差异没有统计学意义($P > 0.05$) (图 3(B))。



(A): 荷瘤鼠(裸鼠)形成肿瘤的大小; (B): 各实验组肿瘤大小的统计分析, 外泌体低中高剂量组肿瘤组织的大小与模型对照组之间的差异具有统计学意义, 化疗组肿瘤组织大小与模型对照组之间的差异具有统计学意义; (C): 各实验组肿瘤组织测量的平均直径大小。

Figure 3. Statistical analysis of tumor size after injection of A549 cells

图 3. A549 细胞注射后形成的肿瘤规格测量统计分析

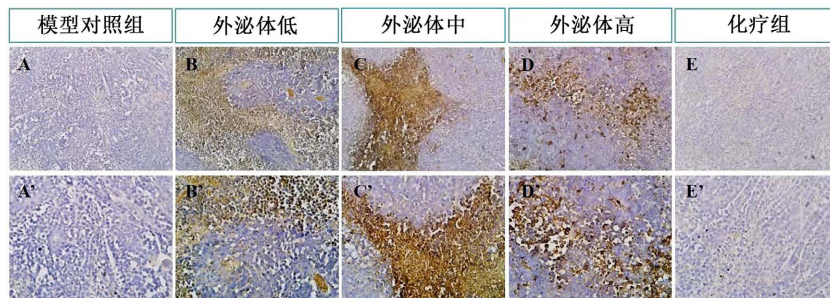
3.4. A549 肺癌模型肿瘤组织免疫组化检测 CD9 的表达

肿瘤组织经过 PFA 固定后, 常规石蜡切片进行 CD9 的免疫组织检测。结果显示模型对照组、化疗组没有 CD9 的表达, 外泌体低剂量组、中剂量组、高剂量组表达 CD9, 而三组之间没有明显的差异(图 4)。CD9 表达的结果表明脐带间充质干细胞来源的外泌体吸收入血后, 通过血流进入肿瘤组织作用于肿瘤细胞, 抑制其增殖、迁移(图 5)。

模型对照组的细胞迁移速度明显快于外泌体低剂量组、中剂量组、高剂量组三组, 且三组之间有随着外泌体浓度的增高出现迁移能力逐渐减弱的现象, 细胞状态显示细胞增殖速度也受到影响。化疗组显示细胞无法贴壁生长。

3.5. 外泌体对 A549 肺癌细胞增殖能力的影响

利用 CCK8 试剂盒检测外泌体对肿瘤细胞 A549 细胞增殖能力的影响(图 6), 模型对照组的细胞增殖能力高于外泌体低剂量组、中剂量组、高剂量组、化疗组, 且外泌体低剂量组、中剂量组、高剂量组表现出细胞增殖能力逐渐减弱的现象, 其中化疗组显示顺铂对细胞增殖能力具有明显的抑制作用。



模型对照组(A, A')与化疗组(E, E')没有 CD9 的表达, 外泌体低剂量组(B, B')、中剂量组(C, C')、高剂量组(D, D')三组之间 CD9 的表达没有明显的差异。

Figure 4. Expression of CD9 in tumor tissues of each experimental group after injection of umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes

图 4. 注射脐带间充质干细胞外泌体后各实验组瘤组织 CD9 的表达情况

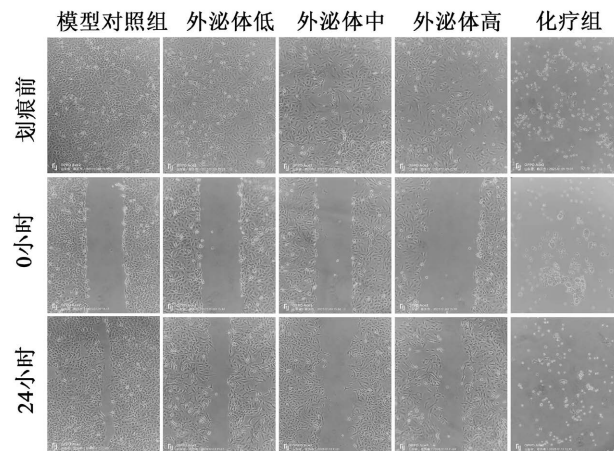


Figure 5. The effect of exosomes on cell migration was detected by A549 cell scratch assay

图 5. A549 细胞划痕实验检测外泌体对细胞迁移的影响

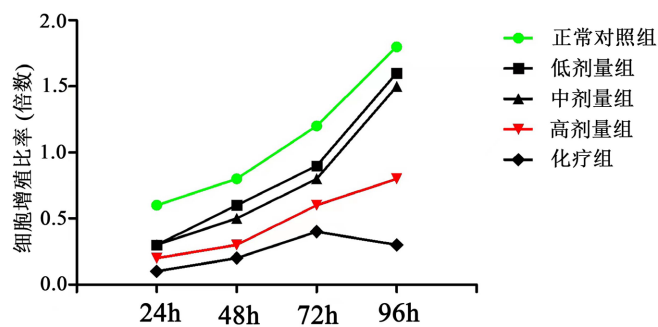


Figure 6. The effect of exosomes on A549 cell proliferation was detected by CCK8

图 6. CCK8 检测外泌体对 A549 细胞增殖的影响

模型对照组的细胞增殖能力高于外泌体低剂量组、中剂量组、高剂量组、化疗组, 且外泌体低剂量组、中剂量组、高剂量组表现出细胞增殖能力逐渐减弱的现象。与化疗组相比其抑制细胞增殖的能力弱于顺铂对细胞增殖增殖能力的抑制。

4. 讨论

肺癌是一种高度流行的疾病,肺癌有着高发病率,且较低的5年生存率,具有重要的死亡率,现有治疗方法的有限疗效是导致该疾病存活率低的原因。常规化疗联合放疗可以改善预后,但相当一部分NSCLC患者对这些治疗没有反应[9][10][11][12][13]。临床治疗现状推促新的治疗手段的探索。

由于无创分离方法,没有伦理问题,免疫原性较低,自我更新能力更快,倍增时间更稳定,增殖能力更高,与其他来源相比,人脐带MSC(hUCMSC)是基于细胞的治疗和再生医学的首选候选者[14][15]。然而,hUCMSC在维持生物活性、定量生物活性物质和临床治疗物流方面存在相对的局限性[16]。因此,寻找一种无细胞的方法具有相同的输出和功效似乎是必要的。

外泌体是一种平均大小在40~100 nm的纳米囊泡,由不同类型的细胞释放,含有蛋白质,mRNA,miRNA和DNA。外泌体通过生物分子传递改变受体细胞的生物化学特性,并在细胞通讯中发挥作用,是液体活组织检查中不为人知的成分之一。由于它们的膜起源,它们很容易与细胞融合,作为一个自然的传递系统,维持细胞的生物活性和免疫耐受性。有证据表明,间充质干细胞来源的外泌体(MSC-EXO)表现出与MSC相似的功能,具有低免疫原性和无肿瘤化。骨髓间充质干细胞也可以从包括人脐带(HUC)在内的各种来源分离出来。由于hUCMSC-EXO是一种非侵入性的采集方法,具有较高的增殖能力和较低的免疫原性,因此与其他MSC-EXO资源相比,hUCMSC-EXO经常被用于再生医学和各种疾病的治疗[17][18],由于它们的许多生物活性和细胞通讯,它们已经吸引了研究人员的注意力,作为基于细胞的无细胞疗法的新策略[19][20]。

hUCMSC-EXO具有调节脓毒症诱导的急性呼吸窘迫症候群(ARDS)相关的各种生物事件的能力,包括细胞免疫代谢,促炎症细胞因子的产生,使其能够发挥治疗作用[21]。含有微小RNA(microRNA)的人脐带间充质干细胞的外泌体(Exosomes of human umbilical cord mesenchymal stem cells)已被强调为可能的癌症治疗选择[22]。外泌体中的miRNA促进细胞间高效传递的重要载体[23][24]。MiR-598已被认为是不同类型癌症的肿瘤抑制剂,包括骨肉瘤[25],大肠癌肿瘤和胃癌[26]。硬皮病是一种多系统疾病,其中组织纤维化是由炎症和血管损伤引起的。由于缺乏有效的治疗手段,硬皮病的死亡率一直居高不下。(hUCMSC-EXO)对小鼠急性肝衰竭(ALF)的治疗作用及其机制,在APAP诱导的ALF小鼠模型中,单尾静脉注射hMSC-EXO有效地提高了ALF小鼠的存活率,抑制了肝细胞的凋亡,改善了肝功能[27]。hUCMSC-EXO已被认为是各种自身免疫性疾病的潜在治疗方法,并且也可以作为治疗硬皮病的制剂[28]。

由于脐带间充质干细胞具有很好的抑制肿瘤发生发展的作用,但是截至目前开展对于NSCLC的作用研究较少。因此,本课题选用NSCLC细胞株A549为研究对象。研究来自hUCMSCs来源的hMSC-Exo与非小细胞肺癌发展发展的相关性。本课题同时开展SNPR1细胞株的研究,数据正在整理收集中。

本课题检测了荷瘤鼠肿瘤组织的大小以及A549细胞的形态、增殖、迁移证实hMSC-EXO对NSCLC的作用机制。所取得结果显示外泌体组间的没有明显的差异,可能与外泌体的剂量大小的分组有关,需在后续的实验中进一步求证。为了更好的证实hMSC-EXO对NSCLC的作用,本课题设计使用制外泌体抑制剂gw4869,再次求证抑制作用是否消失。hMSC-EXO对NSCLC的作用机制需要从转录水平进行深入的研究,本课题所获取的结果仅仅为后续研究奠定基础。hUCMSC-EXO对于A549细胞作用的具体机制需要从基因水平进一步探究。hUCMSC-EXO可能成为NSCLC临床诊治过程的新的治疗药物:它们已经吸引了研究人员的注意力,作为基于细胞的无细胞疗法影响NSCLC临床诊治的新策略。

基金项目

临沂市妇幼保健院院级科研项目(人脐带间充质干细胞的外泌体对肺癌细胞生物学活性的影响及其机制,编号:Y202212)。

参考文献

- [1] Li, X. and Wu, F. (2023) Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Transfer miR-598 to Inhibit the Growth and Metastasis of Non-Small-Cell Lung Cancer by Targeting THBS2. *Cell Death Discovery*, **9**, Article No. 3. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01283-z>
- [2] Romaszko, A.M. and Doboszynska, A. (2018) Multiple Primary Lung Cancer: A Literature Review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, **27**, 725-730. <https://doi.org/10.17219/acem/68631>
- [3] Li, X., Zhang, Z.R., Fu, Y.L., Miao, J.B. and Hu, B. (2017) Synchronous Multiple Primary Lung Cancer Dignosed by Different Phenotype-Genotype: A Case Report and Literature Review. *Chinese Journal of Lung Cancer*, **20**, 857-860. (In Chinese)
- [4] Rivera, G.A. and Wakelee, H. (2016) Lung Cancer in Never Smokers. In: Ahmad, A. and Gadgeel, S., Eds., *Lung Cancer and Personalized Medicine*, Springer, Cham, 43-57. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_3
- [5] Torres-Duran, M., et al. (2016) Small Cell Lung Cancer in Never-Smokers. *European Respiratory Journal*, **47**, 947-953. <https://doi.org/10.1183/13993003.01524-2015>
- [6] Wu, X., Denise, B.B., Zhan, B. and Zhang, J.T. (2022) Determining Association between Lung Cancer Mortality Worldwide and Risk Factors Using Fuzzy Inference Modeling and Random Forest Modeling. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **19**, Article 14161. <https://doi.org/10.3390/ijerph192114161>
- [7] Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C. and Boffetta, P. (2016) Risk Factors for Lung Cancer Worldwide. *European Respiratory Journal*, **48**, 889-902. <https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>
- [8] Phinney, D.G. and Pittenger, M.F. (2017) Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*, **35**, 851-858. <https://doi.org/10.1002/stem.2575>
- [9] Rolfo, C., Giallombardo, M., Reclusa, P., Sirera, R. and Peeters, M. (2017) Exosomes in Lung Cancer Liquid Biopsies: Two Sides of the Same Coin? *Lung Cancer*, **104**, 134-135. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.11.014>
- [10] Abu-Rmeileh, N.M.E., Hussein, A., Capewell, S. and O'Flaherty, M. (2013) Preventing Type 2 Diabetes among Palestinians: Comparing Five Future Policy Scenarios. *BMJ Open*, **3**, e003558. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003558>
- [11] Dominici, M., et al. (2006) Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*, **8**, 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- [12] Castro-Manrreza, M.E. and Montesinos, J.J. (2015) Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *Journal of Immunology Research*, **2015**, Article ID: 394917. <https://doi.org/10.1155/2015/394917>
- [13] Wang, J., Liao, L. and Tan, J. (2011) Mesenchymal-Stem-Cell-Based Experimental and Clinical Trials: Current Status and Open Questions. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **11**, 893-909. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.574119>
- [14] Kestendjieva, S., et al. (2008) Characterization of Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Human Umbilical Cord. *Cell Biology International*, **32**, 724-732. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.02.002>
- [15] Qiao, C., et al. (2008) Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Umbilical Cord. *Cell Biology International*, **32**, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.08.002>
- [16] Ding, M., et al. (2018) Exosomes Isolated from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Neuroinflammation and Reduce Amyloid- β Deposition by Modulating Microglial Activation in Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, **43**, 2165-2177. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2641-5>
- [17] Ruzycka-Ayoush, M., et al. (2023) Exosomes Derived from Lung Cancer Cells: Isolation, Characterization, and Stability Studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **181**, Article ID: 106369. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106369>
- [18] Yaghoubi, Y., et al. (2019) Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Derived-Exosomes in Diseases Treatment. *Life Sciences*, **233**, Article ID: 116733. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116733>
- [19] Schorey, J.S. and Bhatnagar, S. (2008) Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. *Traffic*, **9**, 871-881. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x>
- [20] Zhang, W., et al. (2017) Therapeutic Efficacy of Neural Stem Cells Originating from Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Diabetic Retinopathy. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 408. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00298-2>
- [21] Deng, H., et al. (2022) Differential Lung Protective Capacity of Exosomes Derived from Human Adipose Tissue, Bone

- Marrow, and Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Sepsis-Induced Acute Lung Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2022**, Article ID: 7837837. <https://doi.org/10.1155/2022/7837837>
- [22] Xie, H. and Wang, J. (2022) MicroRNA-320a-Containing Exosomes from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Curtail Proliferation and Metastasis in Lung Cancer by Binding to SOX4. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, **42**, 268-278. <https://doi.org/10.1080/10799893.2021.1918166>
- [23] Davis-Dusenbery, B.N. and Hata, A. (2010) MicroRNA in Cancer: The Involvement of Aberrant MicroRNA Biogenesis Regulatory Pathways. *Genes Cancer*, **1**, 1100-1114. <https://doi.org/10.1177/1947601910396213>
- [24] Lin, S. and Gregory, R.I. (2015) MicroRNA Biogenesis Pathways in Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **15**, 321-333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
- [25] Liu, K., Sun, X.L., Zhang, Y.G., Liu, L. and Yuan, Q.L. (2017) MiR-598: A Tumor Suppressor with Biomarker Significance in Osteosarcoma. *Life Sciences*, **188**, 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.09.003>
- [26] Chen, J., *et al.* (2017) MiR-598 Inhibits Metastasis in Colorectal Cancer by Suppressing JAG1/Notch2 Pathway Stimulating EMT. *Experimental Cell Research*, **352**, 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.01.022>
- [27] Wu, H.Y., *et al.* (2021) Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure through Activating ERK and IGF-1R/PI3K/AKT Signaling Pathway. *Journal of Pharmacological Sciences*, **147**, 143-155. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2021.06.008>
- [28] Yu, Y., Shen, L.L., Xie, X.Y., Zhao, J.J. and Jiang, M. (2022) The Therapeutic Effects of Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Scleroderma. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **19**, 141-150. <https://doi.org/10.1007/s13770-021-00405-5>