

人脐带间充质干细胞来源的外泌体治疗过敏性哮喘小鼠模型的实验研究

殷勇^{1,2*}, 张艳丽^{3*}, 丁勇³, 曹琦³, 马征来³, 马春玲^{1,3,4#}

¹滨州医学院免疫学教研室, 山东 烟台

²山东药品食品职业学院医学检验教研室, 山东 威海

³临沂市妇幼保健院出生缺陷防治重点实验室, 山东 临沂

⁴山东医学高等专科学校分子生物学实验中心, 山东 临沂

收稿日期: 2023年7月26日; 录用日期: 2023年8月18日; 发布日期: 2023年8月25日

摘要

目的: 构建过敏性哮喘小鼠模型, 研究人脐带干细胞来源的外泌体治疗过敏性哮喘模型小鼠的有效性, 并探讨外泌体发挥作用的分子机制。方法: 本研究中BALB/c小鼠随机分为人脐带间充质干细胞外泌体(hUCMSCs-exos)治疗组、激素治疗对照组、哮喘小鼠模型对照组和正常小鼠对照组。① 模型构建方法: 在第1天和第14天给予15只小鼠腹腔内注射0.2 ml含有卵清蛋白(OVA)和AL(OH)₃的混合液构建小鼠模型; ② 治疗方法: 在第21到27天, OVA组每天将致敏小鼠放入有机玻璃箱内给予5% OVA雾化30 min; 正常对照组(CON)采用PBS雾化吸入30 min; 激素治疗对照组采用布地奈德雾化吸入治疗30 min, 每只鼠平均吸入0.02 mg; hUCMSCs-exos治疗组采用人脐带间充质干细胞培养上清制备的浓度为0.7 mg/ml的外泌体每天雾化治疗30 min。③ 标本采取和检测方法: 造模和治疗结束后, 采用眼周静脉丛采血法采静脉血; 取肺组织和肺灌洗液。利用ELISA方法检测静脉血中的IgE及IL-4的浓度; 肺组织切片做HE染色; 肺灌洗液进行白细胞总数和嗜酸性粒细胞计数。结果: hUCMSCs-exos干预治疗组的小鼠与模型对照组的小鼠相比炎症明显改善, 可明显降低IL-4 ($p < 0.05$)和IgE ($p < 0.01$)的水平, BALF中的白细胞总数及嗜酸性粒细胞的指标也明显降低($p < 0.01$), 小鼠的肺组织炎症也有明显的改善; 布地奈德治疗组的干预效果与hUCMSCs-exos治疗组的效果相似, 但是从小鼠肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞数量的组间比较, 可见hUCMSCs-exos治疗组的降低更加明显($p < 0.01$)。结论: 本研究结果证明, 人脐带间充质干细胞来源的外泌体治疗过敏性哮喘模型小鼠是有效的。

关键词

人脐带间充质干细胞, 外泌体, 过敏性哮喘, 小鼠模型

*共同第一作者。

#通讯作者。

Experimental Study on Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes in the Treatment of Allergic Asthma Mouse Models

Yong Yin^{1,2*}, Yanli Zhang^{3*}, Yong Ding³, Qi Cao³, Zhenglai Ma³, Chunling Ma^{1,3,4#}

¹Department of Immunology, Binzhou Medical University, Yantai Shandong

²Department of Medical Laboratory, Shandong Pharmaceutical and Food Vocational College, Weihai Shandong

³Key Laboratory of Birth Defect Prevention and Control, Linyi Maternal and Child Health Hospital, Linyi Shandong

⁴Laboratory Center of Molecular Biology, Shandong Medical College, Linyi Shandong

Received: Jul. 26th, 2023; accepted: Aug. 18th, 2023; published: Aug. 25th, 2023

Abstract

Objective: To study the effectiveness of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of allergic asthma mouse models constructed with OVA, and explore the molecular mechanism of exosomes. **Methods:** In this study, BALB/c mice were randomly divided into human umbilical cord mesenchymal stem cell exosome (hUCMSCs-exos) treatment group, hormone therapy control group, asthma mouse model control group, normal mouse control group. ① **Model construction Methods:** On day 1 and day 14, 15 mice were injected intraperitoneally with 0.2 ml mixture containing OVA and AL(OH)₃ to establish mouse models. ② **Treatment methods:** On days 21 to 27, the sensitized mice in the OVA group were put into a plexiglass box and given 5% OVA atomization for 30 min every day; normal control group (CON) was atomized by PBS for 30 min; the control group was treated with budesonide atomized inhalation for 30 min, with an average inhalation of 0.02 mg per rat. In the hUCMSCs-exos treatment group, exosomes with a concentration of 0.7 mg/ml prepared by human umbilical cord mesenchymal stem cell culture supernatant were atomized for 30 min every day. ③ **The methods of specimen taking and testing** were as follows: After modeling and treatment, venous blood was collected by periorbital venous plexus; taking lung tissue and lung lavage fluid. IgE and IL-4 concentrations in venous blood were detected by ELISA. Lung tissue sections were stained with HE. Total white blood cells and eosinophils were counted in lung lavage fluid. **Results:** Compared with mice in the model control group, the inflammation of mice in hUCMSCs-exos intervention group was significantly improved, the levels of IL-4 ($p < 0.05$) and IgE ($p < 0.01$) were significantly decreased, and the total number of white blood cells and eosinophils in BALF was also significantly decreased ($p < 0.01$). The mice also showed significant improvement in lung tissue inflammation. The intervention effect of the budesonide treatment group was similar to that of the hUCMSCs-exos treatment group, but the intergroup comparison of the percentage of eosinophils in the alveolar lavage fluid of mice showed a more significant reduction in the hUCMSCs-exos treatment group ($p < 0.01$). **Conclusion:** The results of this study prove that human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes is effective in the treatment of allergic asthma model mice.

Keywords

Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells, Exosomes, Allergic Asthma, Mouse Model



1. 引言

哮喘是一种影响所有年龄段的气道慢性炎症性疾病[1], 主要症状是发作性的喘息、气急、胸闷以及咳嗽。根据联合国世界卫生组织的报道, 世界范围内哮喘患者约达三亿之多, 我国约有哮喘患者 3 千万, 近年来我国哮喘发病率呈明显上升的趋势, 并波及到不同年龄或不同经济状况的人群中[2] [3] [4]。支气管哮喘是由嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞等细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病。尽管涉及哮喘的病理生理机制仍有待阐明, 但最常见的哮喘表型以 Th2 分泌的细胞因子(例如 IL-4、IL-5 和 IL-13)的增加以及血清免疫球蛋白 E (IgE)和嗜酸性粒细胞增多为主要特征[5] [6]。

目前, 针对过敏性哮喘的有效的特异性治疗手段却相对甚少, 例如以布地奈德为代表的激素治疗虽然有一定效果, 但长期应用副作用比较大。大量的临床前研究证明, 利用间充质干细胞治疗急性肺损伤和肺部感染性炎症疗效显著。然而, 干细胞不仅有保存和运输方面的限制, 还有致癌风险的存在。

成体干细胞如 MSCs 由于扩增能力有限, 其成瘤性风险也较低。但有注射胎儿神经干细胞形成脑瘤的报道[7]。CAR-T 细胞产品由于引入外源基因以及病毒载体插入位点突变, 使其可能具有致癌性风险[8]。研究证据表明, 干细胞来源的外泌体已经成为新型的无细胞治疗最有力的替代方法[9] [10]。

本研究将采用人脐带干细胞来源的外泌体治疗过敏性哮喘的小鼠模型, 证明外泌体治疗过敏性哮喘小鼠模型的安全性和有效性及其使用剂量, 并进一步探讨外泌体发挥作用的分子机制, 为外泌体进一步应用于临床提供理论和实验依据。

2. 材料与方法

2.1. 人的脐带间充质干细胞的培养

人脐带组织标本由临沂市妇幼保健院(滨河院区)提供, 且本研究经临沂市妇幼保健院伦理委员会批准, 捐赠者知情同意。利用组织贴壁法分离培养脐带组织来源的干细胞, 营养液成份由 5% UltraGRO 和含有 0.032% 医用肝素钠的 α -MEM 基础培养液组成。用消化传代培养法进行扩增培养并进行细胞纯度的鉴定, 收集第 3 代至第 4 代的细胞培养上清。

2.2. 人脐带间充质干细胞外泌体的分离纯化

将人脐带间充质干细胞培养上清于 4℃ 300×, 离心 10 min 去除悬浮细胞和死细胞; 4℃ 2000×g, 离心 10 min 去除细胞碎片等杂质; 使用 0.22 μ m 无菌滤器过滤上清液进一步去除细菌等杂质; 4℃ 100,000×g, 120 min 超速离心得到外泌体沉淀, 去除上清液后加入 200 μ l PBS 洗涤一遍; 再次 4℃ 100,000×g, 120 min 超速离心, 弃去上清液, 加入 100 μ l PBS 得到高纯度的间充质干细胞来源的外泌体; 分装后于 -80℃ 冰箱保存备用。

2.3. 人脐带间充质干细胞衍生外泌体的鉴定

2.3.1. 透射电子显微镜

外泌体透射电镜(TEM)检测采用阴性染色法。阴性染色时, 取约 10 μ l 外泌体重悬液于铜网板上, 4℃ 下静置 3 min; 洗净网格并用滤纸吸干, 然后于 1% 磷钨酸中负染色 2 min, 随即用蒸馏水洗涤, 避光干燥。

用透射电子显微镜(JEM-1200EX, JEOL)在 120 kV 下观察网格。图像由数码相机(软成像解决方案, Olumpus)拍摄。

2.3.2. 人脐带间充质干细胞衍生外泌体粒径和浓度的测定

使用 NanoSight NS 300 系统(NanoSight Technology, Malvern, UK)进行检测, 将外泌体颗粒重悬于 500 μL 无菌 PBS 中, 用 0.22 μm 注射器过滤器(Millipore)过滤。样品被稀释(1:4000), 直到单个纳米颗粒可以被追踪。通过外泌体的布朗运动速率直接跟踪外泌体数量和大小, 进行快速视频捕获和数据分析, 检测外泌体的粒径的大小和浓度(粒子/ml)。

2.3.3. Western Blot 鉴定

利用外泌体专用的裂解液对纯化的外泌体进行裂解用于 western blot 鉴定。所检测的蛋白分子分别是: CD63、CD9、HSP70; 所使用的兔抗人的一抗如下: CD63 单克隆抗体(1:500)、CD9 单克隆抗体(1:500)和 HSP70 单克隆抗体(1:500); 使用羊抗兔的二抗(1:10,000)鉴定外泌体的标志性蛋白分子的表达情况。

2.4. 小鼠过敏性哮喘模型的构建和干预治疗的方法

本研究使用雄性 BALB/c 鼠, 6~8 周龄, 体重为 20 g 左右, 分 hUCMSCs-exos 治疗组、模型组对照组、正常对照组和布地奈德治疗组对照组, 每组 5 只; 造模方法: 第 1 天和第 14 天给予小鼠腹腔内注射 0.2 ml 含有 OVA 和 $\text{AL}(\text{OH})_3$ 的混合液致敏, 然后在第 21 天到第 27 天期间每天将致敏小鼠放入有机玻璃箱内给予雾化吸入 5% OVA 30 min (见图 1); 正常对照组(CON)采用 PBS 雾化吸入 30 min; 布地奈德治疗组采用布地奈德(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)每天雾化治疗 10 min; hUCMSCs-exos 治疗组使用 0.75 mg/ml 的 hUCMSCs-exos 进行雾化治疗(10 min/天)。

造模或治疗结束后, 眼周静脉丛采血法采静脉血; CO 法处死小鼠, 取肺组织和肺灌洗液。利用 ELISA 方法检测静脉血中的 IgE 及 IL-4 的水平; 肺组织切片做 HE 染色; 肺灌洗液进行白细胞总数和嗜酸性粒细胞计数。

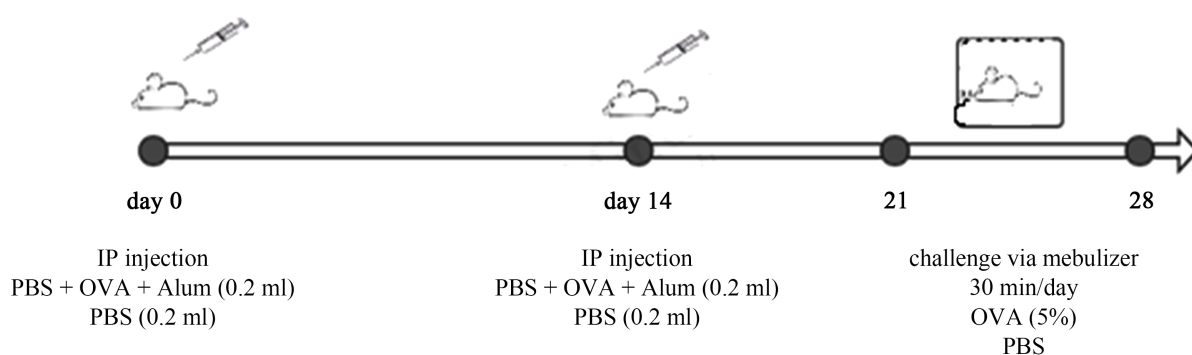


Figure 1. Flow chart of constructing a mouse model of allergic airway inflammation

图 1. 过敏性气道炎症小鼠模型构建的流程图

2.5. 支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar Lavage Fluid, BALF)的收集和细胞计数

最后 1 次激发 24 h 内(第 28 天)将各组小鼠处死, 无菌条件下分离气管, 结扎左主支气管后, 剪开右主支气管插入气管导管并固定, 无菌生理盐水灌洗 3 次, 1 mL/次, 收集的 BALF 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 1200 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, PBS 重悬细胞沉淀, 利用半导体激光流式细胞联合核酸荧光染色技术对小鼠 BALF 中白细胞总数进行计数, 制备涂片并用瑞士染色计数 BALF 中嗜酸性粒细胞百分比。

2.6. 小鼠血液的采集和 IgE 及 IL-4 浓度的检测

将小鼠进行眼眶取血, 直接抗凝收集血液, 2500 r/min 离心 3 min, 取上层血浆, 参照 ELISA 试剂盒 (Elabscience) 说明书检测各组小鼠血浆中 IgE 及 IL-4 浓度。

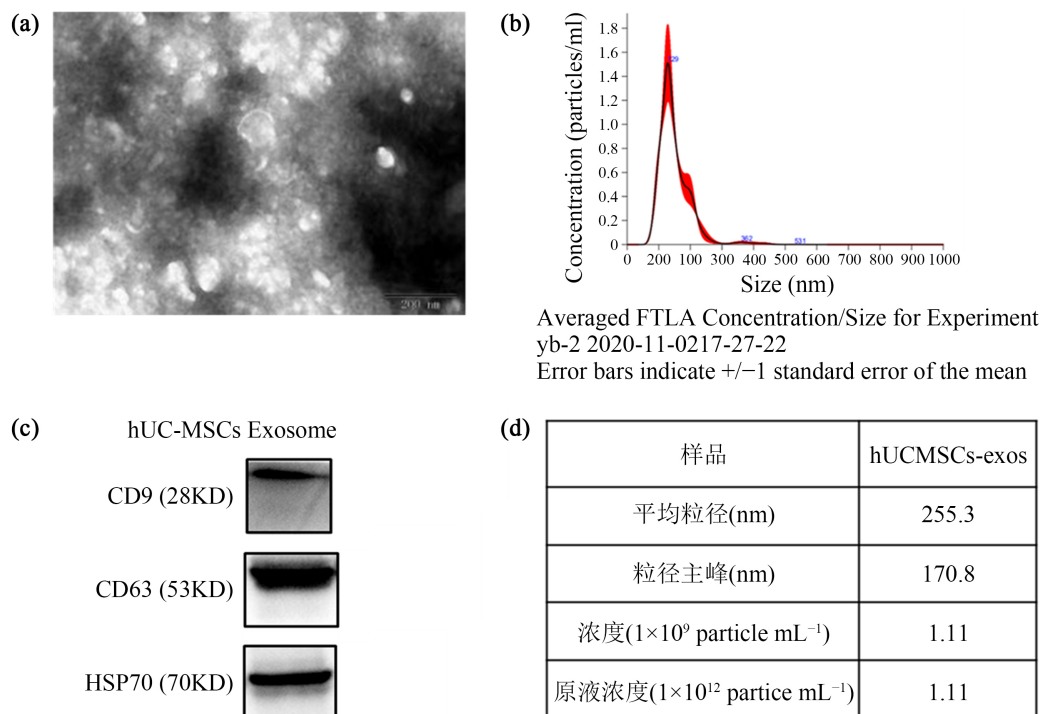
2.7. 统计分析

使用 SPSS Statistics 26.0 进行统计分析。采用 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验。采用 Levene 检验进行方差齐性检验。符合正态分布且具有方差齐性的计量资料采用单因素方差分析进行组间比较, 采用 LSD 法进行两两比较; 不符合正态分布或不具有方差齐性的计量资料采用 Kruskal-Wallis H 检验进行组间比较。检验的显著性水平为 0.05 (双侧), 统计图绘制在 prism 9.0 软件完成。

3. 结果

3.1. hUCMSCs-exos 的鉴定

通过透射电子显微镜和 Nanosight300 检测从 hUC-MSCs 中分离的外泌体, 成像表明从 hUCMSCs 分离的颗粒呈圆形或椭圆形, 具有完整的半膜, 具有典型的外泌体形态(图 2(a))。使用 Nanosight300 分析脐带间充质干细胞外泌体, 浓度为 1.32×10^{11} particle mL⁻¹ (图 2(b))。粒径范围为 50~200 nm 之间, 与报道的外泌体直径基本一致。通过 Western Blot 检测外泌体的标志性蛋白的表达, 外泌体的裂解物显示出 CD9、CD63 和 HSP70 的强阳性条带(图 2(c))。用作对照的 hUC-MSCs 细胞裂解物对外泌体标记蛋白产生的信号很弱甚至没有。



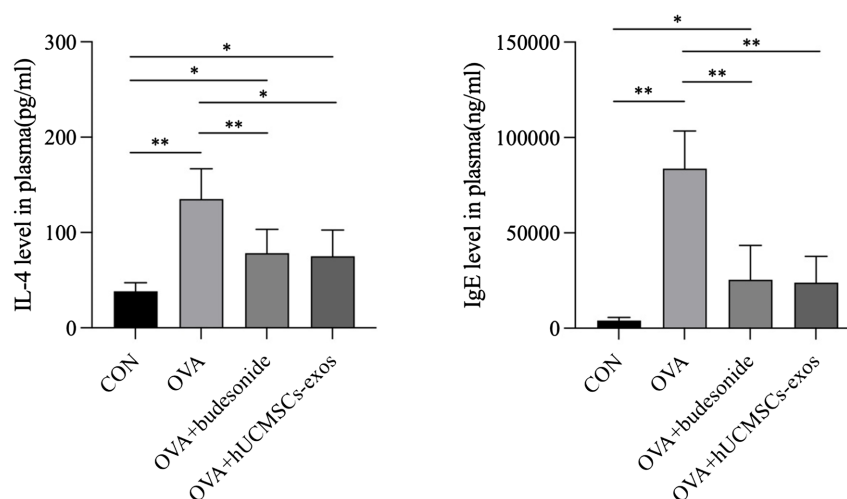
(a) 通过透射电子显微镜观察 hUCMSCs-exos 的形态学(比例尺 = 100 nm)。(b) 通过纳米颗粒追踪分析评估外泌体直径分布。(c) 通过蛋白质印迹分析特定外泌体表面标志物的表达。(d) Nanosight300 检测从 hUC-MSCs 中分离的外泌体的浓度。

Figure 2. Identification of hUCMSCs-exos by transmission electron microscopy and Nanosight 300

图 2. 透射电子显微镜和 Nanosight 300 等方法鉴定 hUCMSCs-exos

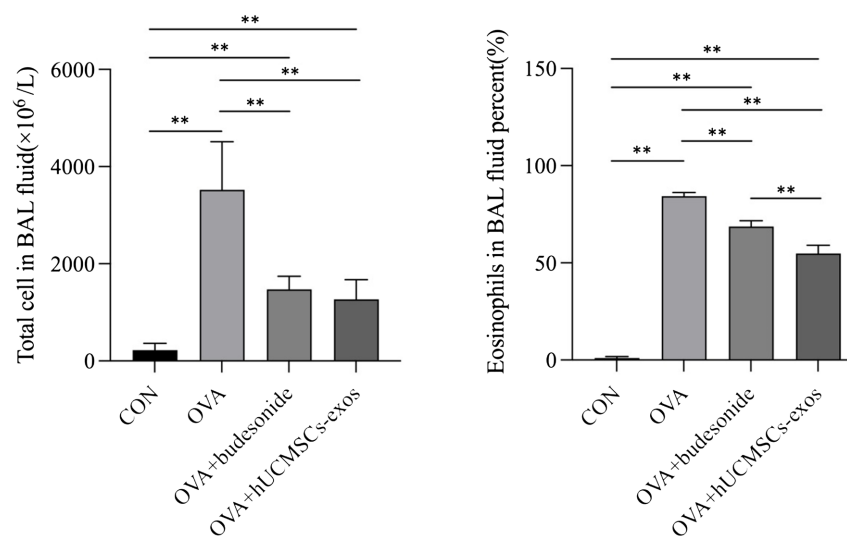
3.2. 各组小鼠 IgE 和 IL-4 浓度的检测

与正常对照组(CON)相比,哮喘组(OVA)的 IgE 及 IL-4 均有显著升高(图 3, $p < 0.01$); 与哮喘组(OVA)相比,布地奈德治疗组的 IgE 及 IL-4 均有降低(图 3, $p < 0.01$),但 hUCMSCs-exos 治疗组的 IgE (图 3, $p < 0.01$)及 IL-4 (图 3, $p < 0.05$)呈现了不同程度的显著性降低; 外泌体组与布地奈德治疗组的对比无差异基本相似。



hUCMSC-exosomes 吸入治疗后,利用 ELISA 法检测各组小鼠血浆中 IL-4 和 IgE 表达水平。CON (空白对照组); OVA (哮喘组); OVA + budesonide (布地奈德治疗组); OVA + hHUMSCs-exos (人脐带间充质干细胞外泌体治疗组)。*表示两两比较差异显著 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$ 。

Figure 3. The influence of hUCMSC-exosomes on the expression of IL-4 and immunoglobulin IgE in mouse plasma
图 3. hUCMSC-exosomes 对小鼠血浆中 IL-4 和免疫球蛋白 IgE 表达产生的影响



通过半导体激光流式细胞核酸荧光染色技术计数小鼠的支气管细胞灌洗液(BALF)中,制备涂片并用瑞士染色计数 BALF 中嗜酸性粒细胞百分比。CON (空白对照组); OVA (哮喘组); OVA + budesonide (布地奈德治疗组); OVA + hHUMSCs-exos (人脐带间充质干细胞外泌体治疗组)。*表示两两比较差异显著 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$ 。

Figure 4. The influence of UCMSC-exosomes treatment on the total number of leukocytes and eosinophils in mouse bronchoalveolar lavage fluid (BALF)
图 4. 检测 UCMSC-exosomes 治疗对小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞总数和嗜酸性粒细胞数量的影响

3.3. hUCMSCs-Exos 干预治疗后细胞反应

肺泡灌洗液能够反应肺部的感染状态、炎症反应、免疫反应、肿瘤微环境等。嗜酸性粒细胞 Eosinophil (ESO) 倾向于积聚在过敏性炎症部位, 有助于支气管哮喘的发生和发展, 肺部的 ESO 能够直接影响肺部的 T 细胞活性, 调节 TH1 与 TH2 反应之间因子的表达。与正常对照组(CON)相比, 哮喘组(OVA)肺泡灌洗液中白细胞总数及嗜酸性粒细胞百分比均显著升高(图 4, $p < 0.01$); 布地奈德治疗组和 hUCMSCs-exos 治疗组肺泡灌洗液中白细胞总数及嗜酸性粒细胞百分比均明显升高(图 4, $p < 0.01$)。与哮喘组(OVA)相比, hUCMSCs-exos 治疗组和布地奈德治疗组肺泡灌洗液中白细胞总数及嗜酸性粒细胞百分比均显著降低(如图 4, $p < 0.01$); 而与布地奈德治疗组相比, hUCMSCs-exos 治疗组肺泡灌洗液中的嗜酸性粒细胞百分比的降低最为显著(如图 4, $p < 0.05$), 白细胞总数的差异无统计学意义。

4. 讨论

过敏性哮喘严重影响人类的健康, 且其发病率每年以 5% 的速度增长。过敏性哮喘是由于免疫系统先天和适应性分支之间复杂的相互作用, 主要以 2 型 T 辅助淋巴细胞(Th2)驱动而引起的免疫炎症反应[11]。OVA 诱导的过敏性气道炎症模型已广泛地用于研究过敏原诱导的 Th2 细胞细胞因子分泌, 其触发嗜酸性粒细胞募集、IgE 产生和杯状细胞增生[12]。在目前的研究中, hUCMSCs-exos 对过敏性哮喘小鼠模型进行治疗, 能够减少免疫细胞积累和粘液分泌, 有效降低了炎症细胞, 尤其是嗜酸性粒细胞的浸润和细胞因子的释放, 显示了 hUCMSCs-exos 治疗对过敏反应具有抑制作用。

1983 年, 外泌体首次于绵羊网织红细胞中被发现, 1987 年 Johns-tone 将其命名为外泌体(exosome)。多种细胞在正常及病理状态下均可分泌外泌体, 其主要来源于细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体, 经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中。随着外泌体的研究进展, 更准确的分子机制参与细胞间交流的过程已经被揭示; 特别是 microRNAs (miRNAs) 和长链非编码 RNA (lncRNAs) 都由外泌体穿梭。此外, 外泌体可能在多种呼吸道疾病的发病机制中发挥重要作用, 如慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺癌和哮喘。因此, 外泌体在多种肺部疾病中显示出作为诊断生物标志物和治疗靶点的前景[13]。

由于外泌体广泛参与细胞之间的交流, 外泌体的临床研究在治疗不同疾病中都显示了明显疗效。据报道 MSCs 来源的外泌体(MSCs-derived exosomes, MEX)所含生物活性物质促进组织损伤修复[12]。Bruno 等[14]研究表明, MEX 中的 mRNA 主要与促增殖、转录调控以及免疫调节有关, 对肾损伤发挥修复作用。Zhu 等[15]研究了 MEX 中 mRNA 与急性肺损伤修复间的关系, 研究发现外泌体包含角质细胞生长因子, 它从 BMSCs 转运至肺泡二型上皮细胞, 并翻译 KGF 蛋白, 可以抑制免疫反应, 减少肺组织损伤。

肺部具有巨大的肺泡表面积、肺泡细胞膜较薄、丰富的毛细血管网、狭小的气血通路、低酶活性、肺深处较慢的清除速率等生理解剖特点。与其他给药途径相比, 雾化吸入给药具有药物用量小、吸收表面积大、起效迅速、避免肝首过效应、全身副作用小、使用方便等优点。布地奈德作为吸入性糖皮质激素药物是目前过敏性哮喘的首选局部抗炎药物, 能增强内皮细胞、平滑肌细胞和溶酶体膜的稳定性, 抑制免疫反应和降低抗体合成, 从而使组胺等过敏活性介质的释放减少和活性降低, 抑制支气管收缩物质的合成和释放从而减轻平滑肌的收缩反应, 但是其不良反应也很明显。本研究以布地奈德雾化治疗组作为对照组, 研究结果显示 hUCMSCs-exos 组达到了相似的治疗效果。

Interleukin 4 (IL-4) 是 CD4+T 细胞亚群、B 细胞、肥大细胞等分泌的多效性细胞因子, 可促进 B 细胞合成的抗体向 IgE 转换。Immunoglobulin E (IgE) 是介导 I 型变态反应的主要抗体。IgE 和 IL-4 的浓度的高低与过敏原的致敏效果呈正相关。人类 IL-4 属于 Th2 细胞因子家族, 介导 I 型过敏反应的肥大细胞等其它细胞也可以产生 IL-4。IL-4 对于 B 细胞、T 细胞、肥大细胞、巨噬细胞和造血细胞都有免疫调节作

用。小鼠的 IL-4 也主要由 Th2 亚群产生[16] [17] [18]。

免疫球蛋白 IgE 存在于外周血中, 是正常人血清中含量最少的免疫球蛋白, 其主要功能是介导 I 型超敏反应。IgE 有能够与肥大细胞和嗜碱性粒细胞结合的免疫功能[19] [20]。有研究证明, 在小鼠体内适宜条件下 IL-4 可以诱导 IgE 的分泌, IgE 产生的量与小鼠过敏哮喘的严重程度成正比[21]。

本研究证明应用 hUCMSCs-exos 治疗过敏性哮喘可以减轻哮喘的炎症反应, 降低哮喘小鼠内炎症细胞因子分泌。同时发现外泌体对于哮喘小鼠的治疗效果要比布地奈德的治疗效果更好, 这一研究发现将会带来巨大的社会效益; 随着临床研究的和外泌体产品完善, 外泌体产品的应用临床指日可待。

5. 结论

从实验结果来看, hUCMSCs-exos 与抗哮喘药布地奈德的作用效果相似, 甚至优于布地奈德治疗效果。这为哮喘的治疗提供了新的方法, 并拓宽了这种基于外泌体的无细胞疗法的前景。

基金项目

临沂市医药科技计划项目(202120074); 临沂市妇幼保健院院内资助项目(Y2021MS05)。

参考文献

- [1] Stern, J., Pier, J. and Litonjua, A.A. (2020) Asthma Epidemiology and Risk Factors. *Seminars in Immunopathology*, **42**, 5-15. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00785-1>
- [2] 吕婷, 刘东璞, 盛延良, 薛超, 彭玲, 卢凤美. 外泌体在过敏性疾病中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(20): 5152-5156. <https://med.wanfangdata.com.cn>
- [3] 胡倩, 李国荣, 侯晨辉, 王建英, 寇应琳. 间充质干细胞来源外泌体对 HDM 刺激的气道上皮细胞炎症及 EMT 的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(3): 560-565.
- [4] 章安东, 王翎. 外泌体在慢性气道炎症性疾病诊疗中的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2022, 42(20): 1587-1591.
- [5] Álvaro, M., Sancha, J., Larramona, H., Lucas, J.M., Mesa, M., Tabar, A.I. and Martínez-Cañavate, A. (2013) Allergen-Specific Immunotherapy: Update on Immunological Mechanisms. *Allergologia et Immunopathologia*, **41**, 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2012.07.018>
- [6] El-housseiny, L., Ibrahim, M.K. and Sellinger, R. (2017) Th2 Related Markers in Milk Allergic Inflammatory Mice Model, versus OVA. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **15**, 453-461. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.07.001>
- [7] Abbot, S., Agbanyo, F., Ahlfors, J.E., et al. (2018) Report of the International Conference on Manufacturing and Testing of Pluripotent Stem Cells. *Biologicals*, **56**, 67-83. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2018.08.004>
- [8] Li, Y.H., Huo, Y. and Yu, L. (2019) Quality Control and Nonclinical Research on CAR-T Cell Products: General Principles and Key Issues. *Engineering*, **5**, 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.12.003>
- [9] Antoine, M., Zhu, Y.G., Gudapati, V., Lim, H. and Lee, J.W. (2016) Mesenchymal Stem Cell Derived Secretome and Extracellular Vesicles for Acute Lung Injury and Other Inflammatory Lung Diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **16**, 859-871. <https://doi.org/10.1517/14712598.2016.1170804>
- [10] 姜达琳, 刘国旺, 孙琢玉, 王心. 骨髓间充质干细胞胰系方向诱导分化的成瘤性及致瘤性[J]. 中华实验外科杂志, 2023, 40(1): 40-42.
- [11] Schuijs, M.J., Willart, M.A., Hammad, H. and Lambrecht, B.N. (2013) Cytokine Targets in Airway Inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*, **13**, 351-361. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.03.013>
- [12] Seo, Y.S., Kim, H.S., Lee, A.Y., Chun, J.M., Kim, S.B., Moon, B.C. and Kwon, B.I. (2019) *Codonopsis lanceolata* Attenuates Allergic Lung Inflammation by Inhibiting Th2 Cell Activation and Augmenting Mitochondrial ROS Dismutase (SOD2) Expression. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 2312. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38782-6>
- [13] Hosseini, H.M., Fooladi, A.A., Nourani, M.R. and Ghanezadeh, F. (2013) The Role of Exosomes in Infectious Diseases. *Inflammation & Allergy—Drug Targets*, **12**, 29-37. <https://doi.org/10.2174/1871528111312010005>
- [14] van den Berge, M. and Tasena, H. (2019) Role of MicroRNAs and Exosomes in Asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, **25**, 87-93. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000532>
- [15] Cañas, J.A., Sastre, B., Rodrigo-Muñoz, J.M. and Del Pozo, V. (2019) Exosomes: A New Approach to Asthma Pathology.

-
- Clinica Chimica Acta*, **495**, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.04.055>
- [16] Iwaszko, M., Bialy, S. and Bogunia-Kubik, K. (2021) Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells*, **10**, 3000-3019. <https://doi.org/10.3390/cells10113000>
- [17] Ho, I.C. and Miaw, S.C. (2016) Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases. In: Ma, X., Eds., *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases*, Springer, Dordrecht, 31-77. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_3
- [18] Gadani, S.P., Cronk, J.C., Norris, G.T. and Kipnis, J. (2012) IL-4 in the Brain: A Cytokine to Remember. *The Journal of Immunology*, **189**, 4213-4219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202246>
- [19] Eckl-Dorna, J., Villazala-Merino, S., Campion, N.J., Byazrova, M., Filatov, A., Kudlay, D., Karsonova, A., Riabova, K., Khaitov, M., Karaulov, A., Niederberger-Leppin, V. and Valenta, R. (2019) Tracing IgE-Producing Cells in Allergic Patients. *Cells*, **8**, Article 994. <https://doi.org/10.3390/cells8090994>
- [20] Finkelman, F.D., Katona, I.M., Urban Jr, J.F. and Paul, W.E. (1989) Control of *in vivo* IgE Production in the Mouse by Interleukin 4. In: Chadwick, D.J., Evered, D. and Whelan, J., Eds., *Ciba Foundation Symposium 147—IgE, Mast Cells and the Allergic Response: IgE, Mast Cells and the Allergic Response: Ciba Foundation Symposium 147*, Wiley, New York, 3-17. <https://doi.org/10.1002/9780470513866.ch2>
- [21] Platts-Mills, T.A., Satinover, S.M., Naccara, L., Litonjua, A.A., Phipatanakul, W., Carter, M.C., Heymann, P.W., Woodfolk, J.A., Peters, E.J. and Gold, D.R. (2007) Prevalence and Titer of IgE Antibodies to Mouse Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **120**, 1058-1064. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.06.032>