

Exosome—Potential Target for Clinical Application

Debin Guo^{1,2}, Xiangqing Zhu¹, Xinghua Pan¹

¹Stem Cell and Immune Cells Biomedical Techniques Integrated Engineering Laboratory of State and Regions, Kunming Yunnan

²The Third Military Medical University, Chongqing

Email: 993834021@qq.com, qing1021zhu@163.com, xinghuapan@aliyun.com

Received: Jan. 19th, 2017; accepted: Feb. 7th, 2017; published: Feb. 10th, 2017

Abstract

Exosome, a kind of utricle bubble, is present in virtually all cells, which has potential clinical application value in the communication between cells, disease biology marks and drug delivery. In this paper, we made a review of recent progress of exosome using for diagnosis and treatments of cancer, ischemia/reperfusion injury, hematopoietic injury, osteal diseases.

Keywords

Extracellular Vesicles, Exosome, Clinical Application of Progress, The Liquid Biopsy

外泌体——临床运用的潜在靶点

郭德斌^{1,2}, 朱向情¹, 潘兴华¹

¹干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室, 云南 昆明

²第三军医大学, 重庆

Email: 993834021@qq.com, qing1021zhu@163.com, xinghuapan@aliyun.com

收稿日期: 2017年1月19日; 录用日期: 2017年2月7日; 发布日期: 2017年2月10日

摘要

外泌体(Exosome)是一种普遍存在细胞中, 在细胞间通讯、疾病生物学标志和药物传递上具有潜在临床运用价值的小囊泡。本文就其在癌症、缺血-再灌注损伤、造血损伤、骨骼疾病等诊疗方面的研究进展进行简要综述。

关键词

胞外囊泡, 外泌体, 临床应用进展, 液态活检

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

1. 引言

胞外囊泡(extracellular vesicles)是指从细胞膜上脱落或者由细胞分泌的双层膜结构囊泡状小体, 其富含磷脂酰丝氨酸、胞质蛋白、mRNA、imRNA、DNA [1] [2]。根据胞外囊泡大小、来源及分离方式大致可分为三类[3] [4] [5]: (1) 微泡(Microvesicles): 源于细胞质膜, 直径在 50~1500 nm, 离心率为 1000~10,000 g 可被分离, 富含 CD40; (2) 凋亡小体: 源于死亡细胞碎片, 直径在 800~5000 nm, 离心率为 1500~100,000 g 可被分离, 富含组蛋白和 DNA; (3) 外泌体(Exosome): 是细胞早期内涵体向内出芽形成的小囊泡, 通过胞吐作用释放, 直径 50~120 nm, 富含细胞内膜标记 Tsg101, CD63, CD9, CD81。另外还有血源性的小囊泡(blood-derived vesicles)直径 130~500 nm, 由活化的血小板分泌[6]。

外泌体(Exosome)是一种几乎可以被所有类型细胞分泌的纳米级囊泡, 也是胞外囊泡中功能最全的一类[7], 在免疫中的抗原呈递、肿瘤的生长与迁移、组织损伤修复, 感染与炎症反应等方面起着重要作用。不同细胞分泌的外泌体内含不同组成成分与功能分子, 直接反应其来源细胞的生理、病理及功能状态, 这就提供了丰富潜在的生物标志物分子源[8]。外泌体具有脂质双层膜结构, 能较好保护其包被的物质, 是靶向细胞或器官潜在药物传递系统(DDS)的有效工具[9]。近年来外泌体的研究进展迅速, 尤其是其携带的 RNA 功能受到高度重视, 本文就外泌体在癌症、缺血-再灌注损伤、造血损伤、骨骼疾病等诊疗方面的研究进展进行简要综述, 为将来外泌体的临床运用提供理论基础。

外泌体影响靶细胞的生物学效应机制复杂, 很多机制尚不清楚, 就目前研究而言, 可能通过以下几种方式发挥效应: (1) 做为新的信号模式体直接刺激靶细胞[10], 靶细胞应激反应从而改变生物学活性; (2) 与靶细胞特异性的受体相互作用, 通过细胞内化转移外泌体所包含的生物活性分子改变靶细胞的功能状态[3]; (3) 作为细胞通讯中枢介质, 传递活性蛋白、功能性的 mRNA、miRNA 和转录因子, 介导细胞与细胞间的交流, 协同生物学效应。

2. 外泌体与肿瘤的诊疗

2.1. 肿瘤的诊断

无论是肿瘤的早期筛查, 诊断, 治疗还是动态监测, 液态活检都发挥了重要作用, 让肿瘤无创诊断得以实现。液态活检通过非侵入性取样进行检测, 方便快捷、微创无痛, 大大降低肿瘤活检的危险, 延长患者生存期。而外泌体作为液态活检的靶标正逐渐成为液态活检的新生主力军。

Belov, L.等[11]将已知的肿瘤表面标志物固定于芯片上, 通过抗体芯片分别检测细胞与血浆中外泌体标志物, 约 40%的癌细胞表面标志物在囊泡表面体现, 说明抗体芯片检测外泌体表面蛋白有望应用于肿瘤诊断。Exosome Diagnostics 公司开发的 ExoDxLung (ALK)产品可以检测基于 EML4 和 ALK 两基因间的融合突变, 突变具有 ALK 抑制剂敏感性, 如 Xalkori 与 Zykadia 突变, 每一种突变可导致一种类型的非小细胞肺癌(NSCLC), 从而指导癌症治疗方案的制定。ExoDxLung (ALK)可同时检测外泌体 RNA 与

ctDNA, 可将罕见癌基因突变检测灵敏度提高近三倍以上[12] (对比循环肿瘤细胞或 ctDNA 等液态活检检测不到的情况)。外泌体可以通过转移 miRNA 与血管生成相关蛋白促肿瘤生长, 这便提供了基于血液诊断的信息[13]。kalluri 等发现细胞表面蛋白多糖磷脂酰肌醇聚糖-1(GPC1)在胰腺癌个体血液外泌体中含量丰富, GPC1 能以 100%的准确率和敏感性诊断出早期与晚期胰腺癌[14]。宫颈癌患者的阴道灌洗液中外泌体的 miRNA-21 和 miRNA-146 的水平明显升高, 水平高低与宫颈癌的分级密切相关[15]。另外通过检测一些已知的前列腺癌基因(例如 BIRC5, ERG, PCA3 和 TMPRSS2)对比发现, 检测外泌体可作为一种非侵入性的手段来判断高分级或恶性的肿瘤[16]。外泌体 miRNAs 可介导肿瘤细胞与基质细胞相互通信。Ying,X.等发现上皮性卵巢癌(EOC)来源外泌体 MIR-222-3P 促进巨噬细胞 M2 型的极化, 该过程激活 SOCS3/STAT3 信号通路, 且血清中检测到外泌体 MIR-222-3P 的水平与 EOC 相关[17]。

外泌体连接整合素介导肿瘤器官靶向性转移, 外泌体能包裹双链大 DNA 片段(甚至 10 kb 以上), 且外泌体包含大量功能性 RNA、DNA 易通过二代测序进行分析, 而肿瘤来源的外泌体可显著富集在生物体液中, 以上都提示外泌体 RNA、DNA 作为肿瘤诊断的可靠测序材料, 说明用遗传物质测序有望成为癌症诊断的重要手段之一[18]。

2.2. 肿瘤的治疗

间充质干细胞(MSCs)是肿瘤微环境的重要组成部分, 大量研究显示肿瘤来源的间充质干细胞不像其他组织中正常的间充质干细胞, 他们表现出强大促进肿瘤发生发展的能力。但正常间充质干细胞转化为肿瘤相关间充质干细胞的机制是未知的。中科院研究人员发现肿瘤发生过程中分泌大量囊泡, 这些囊泡被组织间正常间充质干细胞摄取后, 既不影响生长因子的生成和间充质干细胞的免疫抑制特性, 相反, 通过调控间充质干细胞中趋化因子 CCL-2, CCL-7, CCL-12 的表达, 募集更多的巨噬细胞迁徙、浸润 b16-f0 黑色素瘤与 EL-4 淋巴瘤, 促进肿瘤生长。这一发现对揭示肿瘤间充质干细胞的来源具有重要意义, 同时也揭示了肿瘤细胞、间充质干细胞及免疫细胞之间可能存在交互调控作用[19]。Besse B. [20]团队对无法进行手术的进展期非小细胞肺癌患者进行 IFN- γ -Dex(树突状细胞来源外泌体)II 期临床试验。发现 NKp30 依赖的 NK 细胞功能的增加, IFN- γ -Dex 产物的 II 类 MSC 的表达水平与 Dex 的 NKp30 配体 BAG6 的表达水平具有相关性, 并与 NKp30 依赖的 NK 细胞的功能呈相关性, 后者与较长的无进展生存期有关, 证实了在晚期非小细胞肺癌患者中树突状细胞来源外泌体能提高 NK 细胞抗肿瘤的免疫应答能力。Pucci F 等人[21]发现肿瘤细胞分泌的外泌体会随淋巴循环进入肿瘤邻近淋巴结, 而淋巴结被膜下巨噬细胞会结合这些外泌体, 从而阻止其与淋巴结髓质区 B 细胞的相互作用, 降低 B 细胞自身抗体的分泌, 从而抑制 B 细胞自身抗体对肿瘤细胞的抑制作用。有研究证实通过给予巨噬细胞靶向药物并同时阻断肿瘤细胞外泌体的释放, 有效抑制了肿瘤的增长。

另外, 外泌体虽然具有惰性, 但它们能通过细胞膜融合后将携带的物质与信号传递到受体细胞以改变受体的生物学功能(例如如抗原递呈细胞来源外泌体不仅包含了完整的主要组织相容性复合物, 还能递呈抗原), 所以外泌体是纳米药物递送或基因治疗的潜在载体, 这也提示利用外泌体研发癌症疫苗成为可能[22]。

3. 外泌体与其他疾病的诊疗

3.1. 外泌体改善缺血-再灌注损伤

有学者将来间充质干细胞来源的外泌体通过尾静脉输注到心梗模型大鼠体内, 发现梗死面积明显减少, 细胞凋亡率下降, 血液中的外泌体浓度升高, 并检测到心肌细胞不能摄取外泌体, 而外泌体通过与心肌细胞表面接触来发挥作用。间充质干细胞来源的外泌体可能通过以下方式发挥作用: ① 携带丰富的

可溶性生长因子如 VEGF, TGF β 1, IL-8, MFGE-8, ANGPTL1、促血小板生成素,促进血管活性生成[23]; ② 携带丰富的转录因子,如 HGF 激活血管生成通路,刺激内皮及血管平滑肌细胞的增殖与迁移[24]; ③ 携带丰富的信号分子 miRNAs,调节细胞周期的进展及增殖(miR-222, miR-191, miR-21, let-7a) [25],促进血管生成(miR-222, miR-21, let-7f) [26],促进内皮细胞分化(miR-6087) [27]; ④ 通过作用于 Notch1 受体及其下游信号分子 HES1 激活 Notch 信号通路调节血管重塑及维持血管寿命[28]。

简而言之,外泌体能作用于心肌细胞和血管,并通过血管生成和抗血管重塑介导心脏组织再生;减轻心肌缺血、再灌注损伤,减小心肌梗死面积;减少氧化应激反应,增加 ATP 及 NADH 含量,控制炎症活动,从而保护缺血再灌注损伤的心肌细胞,改善心室的功能[29] [30] [31]。说明外泌体为缺血及再灌注损伤疾病的诊疗提供了新思路。

3.2. 外泌体保护造血系统

外泌体作为细胞间通讯连接的媒介,对造血干细胞(HSC)的自我更新,迁移,分化,衰老及干性的维持都有重要作用[32]。Luciana De Luca 等[33]将骨髓间充质干细胞来源的外泌体与脐血造血干细胞(UCB-CD34+)共同培养,通过下一代测序骨髓间充质干细胞来源的外泌体的 miRNA 和 piRNA 发现外泌体所包含的 RNAs 可以影响 UCB-CD34+基因表达模式。其中有 103 个基因上调表达,它们中大部分可编纂趋化因子及其受体,趋化各类型骨髓细胞(比如 CXCR4 超表达促进 UCB-CD34+从外周血向骨髓的迁移)。同时 MLP、ZFP36 等基因下调表达,导致所有造血家系成熟细胞相关的 RNAs 合成减少。研究还发现骨髓间充质干细胞来源的外泌体的 miRNA 和 piRNA 对 UCB-CD34+细胞有相同的功能调控,增强 UCB-CD34+细胞活性,抑制细胞凋亡或坏死,减少细胞分化。所以,外泌体与造血干细胞的共移植为造血重建提供了新思路。

Khalyfa A.等[34]发现相比健康儿童,严重镰刀形细胞贫血(SCA)患者的外泌体会扰乱内皮屏障,影响粘附分子的诱导表达与单核细胞粘附。基因芯片分析确定,不同分级的 SCA 到健康儿童,外泌体 miRNA 表达谱差异巨大,说明外泌体的 miRNA 有助于预测 SCA 的临床进展期。

3.3. 外泌体调节骨稳态

microRNA 在调节骨稳态中起到了重要作用,但机制仍不清楚。W. Sun 等[35]发现破骨细胞分泌的外泌体富含 miRNA,其中 miR-214 会被外泌体转移至成骨细胞,从而抑制成骨细胞功能。骨质疏松症患者和小鼠的血清来源的外泌体 miR-214 大幅上调,这些外泌体可以显著抑制成骨细胞活性。说明在外泌体中循环的 miR-214 不仅可作为骨质流失的生物标志物,也可以选择性地调节成骨细胞的功能。Qin Y 等[36]发现间充质干细胞来源外泌体可在体内有效刺激骨再生,具有骨特异性且不会致瘤与栓塞,不造成毒副及免疫原性的并发症。有研究人员从怀孕的母鼠羊水中提取干细胞并成功分离外泌体,然后注射到患有脆骨病的模型鼠后,发现骨折发生率比未注射组降低 78%,说明外泌体注射能大幅度降低因老化与疾病导致的骨折风险。说明外泌体治疗可能是优于生物材料与细胞治疗骨骼疾病的又一种新方法。

Zhu H.等[37]通过 Nanosight 检测评估 85 例激素性股骨头坏死和 115 健康献血者血清中的外泌体水平。然后,通过分析受试者工作特征曲线评估血清外泌体的诊断准确率,结果显示股骨头坏死组循环外泌体水平较对照组显著降低,曲线下面积为 0.72,提示血清细胞水平对激素性股骨头坏死的诊断准确度中等。说明循环外泌体水平在激素性股骨头坏死诊断上具有重要价值。

4. 外泌体的分离、提纯与标记

外泌体作为信息传递载体,就其细胞来源及携带遗传物质不同,靶向目标功能各异而言,只有提纯外泌体才能更大发挥其作用,减轻临床应用的副作用[38]。

现在提取外泌体方法较多,如直流,密度梯度离心(DGC),蔗糖垫层离心,凝胶渗透色谱(GPC)亲和捕获(AC),微流控装置,基于沉淀的聚合法,膜过滤,但仍没有一种方法被当作金标准[39]。目前量化提纯外泌体更多的是基于其蛋白的表达[40]。通过蛋白质组学分析发现 KIF23, RACGAP1, 染色体分离样蛋白-1,输出蛋白-2(CSE1L/CAS)TSg101, Alix/PDCD6IP 和 CD63 仅见于外泌体,而 TSPAN6 和 TSPAN3 存在各类型胞外囊泡[41] [42]。

另外,不同细胞来源外泌体同样具有起源细胞的生物学标志,据此可分选和标记外泌体。值得一提的是 P. Marzola 等[43]使用了超微超顺磁性纳米铁颗粒标记细胞再通过细胞进入外泌体。利用体内体外 MR 成像效果及外泌体中含铁量来衡量标记效率,利用透射电子显微镜图像和组织学分析验证所获得的结果。该条件可以标记 100%的细胞,而对细胞活性几乎无影响;而 MR 成像检测到细胞信号的下限在体外是 100 个细胞而体内是 2500 个细胞。该方法提高 MR 的诊断准确率,也为体内研究外泌体的转归提供了可能性。

5. 展望

随着精准医学概念的提出,疾病的精确诊断和治疗越来越受到关注。而胞外囊泡,尤其是外泌体作为一个新兴的研究热点,由于其在体内的广泛分布和获取便捷性,已趋向成为临床研究的潜在靶点。同时外泌体内容物的丰富性,及对起源细胞的复制性反应,也为疾病发病机制的研究提供了新思路。随着外泌体研究的深入也伴随更多愈加复杂和亟待解决的问题,比如:同种细胞外泌体是否存在不同亚型,其生理功能及携带的内容物是否相同?不同细胞外泌体之间是否会有协同作用,就像细胞与细胞间的通讯连接?随着外泌体研究技术的不断完善与发展,我们期待外泌体这个潜在治疗靶点在精准医学的发展道路上越走越远。

基金项目

国家科技支撑计划项目(2014BI01B0);昆明市重点项目(2015-1-S-00973);云南省战略性新兴产业专项(2013DA004);全军实验动物专项(SYDW[2014]003)。

参考文献 (References)

- [1] Minciocchi, V.R., Freeman, M.R. and Di Vizio, D. (2015) Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **4**, 155-164. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.010>
- [2] Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa Silva, B., et al. (2014) Double-Stranded DNA in Exosomes: A Novel Biomarker in Cancer Detection. *Cell Research*, **24**, 766-769. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.44>
- [3] Colombo, M., Raposo, G. and Théry, C. (2014) Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **30**, 255-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- [4] Dean, W.L., Lee, M.J., Cummins, T.D., Schultz, D.J. and Powell, D.W. (2009) Proteomic and Functional Characterisation of Platelet Microparticle Size Classes. *Thrombosis and Haemostasis*, **102**, 711-718.
- [5] Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J. and Sixma, J.J. (1999) Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived from Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. *Blood*, **94**, 3791-3799.
- [6] Aatonen, M.T., Ohman, T., Nyman, T.A., Laitinen, S., Grönholm, M. and Siljander, P.R. (2014) Isolation and Characterization of Platelet-Derived Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, **3**, 1108-1120.
- [7] Ela, S., Mager, I., Breakefield, X.O. and Wood, M.J. (2013) Extracellular Vesicles: Biology and Emerging Therapeutic Opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, **12**, 347-357. <https://doi.org/10.1038/nrd3978>
- [8] Lv, L.L., Cao, Y.H., Pan, M.M., Liu, H., Tang, R.N., Ma, K.L., et al. (2014) CD2AP mRNA in Urinary Exosome as Biomarker of Kidney Disease. *Clinica Chimica Acta*, **428**, 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.10.003>

- [9] Tetta, C., Bruno, S., Fonsato, V., Deregibus, M.C. and Camussi, G. (2011) The Role of Microvesicles in Tissue Repair. *Organogenesis*, **7**, 105-115. <https://doi.org/10.4161/org.7.2.15782>
- [10] Kastelowitz, N. and Yin, H. (2014) Exosomes and Microvesicles: Identification and Targeting by Particle Size and Lipid Chemical Probes. *ChemBioChem*, **15**, 923-928. <https://doi.org/10.1002/cbic.201400043>
- [11] Belov, L., Matic, K.J., *et al.* (2014) Extensive Surface Protein Profiles of Extracellular Vesicles from Cancer Cells May Provide Diagnostic Signatures from Blood Samples. *Journal of Extracellular Vesicles*, **15**, 525-535.
- [12] Sheridan, C. (2016) Exosome Cancer Diagnostic Reaches Market. *Nature Biotechnology*, **34**, 359-360. <https://doi.org/10.1038/nbt0416-359>
- [13] Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., *et al.* (2008) Glioblastoma Microvesicles Transport RNA and Proteins That Promote Tumour Growth and Provide Diagnostic Biomarkers. *Nature Cell Biology*, **10**, 1470-1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>
- [14] Melo, S.A., Luecke, L.B., Kahlert, C., *et al.* (2015) Glypican-1 Identifies Cancer Exosomes and Detects Early Pancreatic Cancer. *Nature*, **523**, 177-182. <https://doi.org/10.1038/nature14581>
- [15] Liu, J., Sun, H., Wang, X., *et al.* (2014) Increased Exosomal MicroRNA-21 and MicroRNA-146a Levels in the Cervicovaginal Lavage Specimens of Patients with Cervical Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 758-773. <https://doi.org/10.3390/ijms15010758>
- [16] Motamedinia, P., Scott, A.N., Bate, K.L., Sadeghi, N., Salazar, G., Shapiro, E., *et al.* (2016) Urine Exosomes for Non-Invasive Assessment of Gene Expression and Mutations of Prostate Cancer. *PLoS ONE*, **11**, 137-142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154507>
- [17] Ying, X., *et al.* (2016) Epithelial Ovarian Cancer-Secreted Exosomal miR-222-3p Induces Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Oncotarget*, **10**, 632-636.
- [18] Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.L., *et al.* (2015) Tumour Exosome Integrins Determine Organotropic Metastasis. *Nature*, **527**, 329-335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>
- [19] Lin, L.Y., Du, L.M., Cao, K., Huang, Y., Yu, P.F., *et al.* (2016) Tumour Cell-Derived Exosomes Endow Mesenchymal Stromal Cells with Tumour-Promotion Capabilities. *Oncogene*, 131-138. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.131>
- [20] Besse, B., *et al.* (2015) Dendritic Cell-Derived Exosomes as Maintenance Immunotherapy after First Line Chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology*, **5**, 1070-1080.
- [21] Pucci, F., Garris, C., Lai, C.P., Newton, A., *et al.* (2016) SCS Macrophages Suppress Melanoma by Restricting Tumor-Derived Vesicle-B Cell Interactions. *Science*, **352**, 242-246. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1328>
- [22] Pitt, J.M., Charrier, M., Viaud, S., André, F., Besse, B., Chaput, N. and Zitvogel, L. (2014) Dendritic Cell-Derived Exosomes as Immunotherapies in the Fight against Cancer. *The Journal of Immunology*, **193**, 1006-1011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400703>
- [23] Coultas, L., Chawengsaksophak, K. and Rossant, J. (2005) Endothelial Cells and VEGF in Vascular Development. *Nature*, **438**, 937-945.
- [24] Chade, A.R. and Stewart, N. (2013) Angiogenic Cytokines in Renovascular Disease: Do They Have Potential for Therapeutic Use? *Journal of the American Society of Hypertension*, **7**, 180-190.
- [25] Lu, R., Qu, Y., Ge, J., Zhang, L., Su, Z., Pflugfelder, S.C., *et al.* (2012) Transcription Factor TCF4 Maintains the Properties of Human Corneal Epithelial Stem Cells. *Stem Cells*, **30**, 753-761.
- [26] Yoo, J.K., Kim, J., Choi, S.J., Noh, H.M., Kwon, Y.D., Yoo, H., *et al.* (2011) Discovery and Characterization of Novel MicroRNAs during Endothelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, **21**, 2049-2057.
- [27] Nagpal, N. and Kulshreshtha, R. (2014) MiR-191: An Emerging Player in Disease Biology. *Frontiers in Genetics*, **5**, 99.
- [28] Maruotti, N., Corrado, A., Neve, A. and Cantatore, F.P. (2013) Systemic Effects of Wnt Signaling. *Journal of Cellular Physiology*, **228**, 1428-1432.
- [29] Nakamura, Y., Miyaki, S., Ishitobi, H., Matsuyama, S., Nakasa, T., Kamei, N., *et al.* (2015) Mesenchymal-Stem-Cell-Derived Exosomes Accelerate Skeletal Muscle Regeneration. *FEBS Letters*, **589**, 1257-1265.
- [30] Khan, M., Ali, F., Mohsin, S., Akhtar, S., Mehmood, A., Choudhery, M.S., *et al.* (2013) Preconditioning Diabetic Mesenchymal Stem Cells with Myogenic Medium Increases Their Ability to Repair Diabetic Heart. *Stem Cell Research & Therapy*, **4**, 58-71.
- [31] Huang, L., Ma, W., Ma, Y., Feng, D., Chen, H. and Cai, B. (2015) Exosomes in Mesenchymal Stem Cells, a New Therapeutic Strategy for Cardiovascular Diseases? *International Journal of Biological Sciences*, **11**, 238-245.
- [32] Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G. and Geraci, F. (2014) Extracellular Membrane Vesicles as a Mechanism of

Cell-to-Cell Communication: Advantages and Disadvantages. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, **306**, 621-633.

- [33] De Luca, L., Trino, S., Laurenzana, I., *et al.* (2015) MiRNAs and piRNAs from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Extracellular Vesicles Induce Cell Survival and Inhibit Cell Differentiation of Cord Blood Hematopoietic Stem Cells: A New Insight in Transplantation. *Oncotarget*, **6**, 6676-6692.
- [34] Khalyfa, A., Khalyfa, A.A., Akbarpour, M., Connes, P., Romana, M., Lapping-Carr, G., Zhang, C., Andrade, J. and Gozal, D. (2016) Extracellular Microvesicle MicroRNAs in Children with Sickle Cell Anaemia with Divergent Clinical Phenotypes. *British Journal of Haematology*, **7**, 246-253. <https://doi.org/10.1111/bjh.14104>
- [35] Sun, W., Zhao, C., Li, Y., Wang, L., Nie, G., *et al.* (2016) Osteoclast-Derived MicroRNA-Containing Exosomes Selectively Inhibit Osteoblast Activity. *Cell Discovery*, **2**, Article No. 16015.
- [36] Qin, Y., Sun, R., Wu, C., Wang, L. and Zhang, C. (2016) Exosome: A Novel Approach to Stimulate Bone Regeneration through Regulation of Osteogenesis and Angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, 1124-1132. <https://doi.org/10.3390/ijms17050712>
- [37] Zhu, H.Y., *et al.* (2016) Circulating Exosome Levels in the Diagnosis of Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. *Bone & Joint Research*, **5**, 276-279. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.56.BJR-2015-0014.R1>
- [38] Lobb, R.J., *et al.* (2015) Optimized Exosome Isolation Protocol for Cell Culture Supernatant and Human Plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, **4**, Article No. 27031. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031>
- [39] Webber, J. and Clayton, A. (2013) How Pure Are Your Vesicles? *Journal of Extracellular Vesicles*, **2**, 151-159. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19861>
- [40] Xu, R., Greening, D.W., Zhu, H.-J., *et al.* (2016) Extracellular Vesicle Isolation and Characterization: Toward Clinical Application. *Journal of Clinical Investigation*, **126**, 1152-1163. <https://doi.org/10.1172/JCI81129>
- [41] Charrin, S., le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P.E., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2009) Lateral Organization of Membrane Proteins: Tetraspanins Spin Their Web. *Biochemical Journal*, **420**, 133-154. <https://doi.org/10.1042/BJ20082422>
- [42] Janas, T., Janas, M.M., Sapoń, K. and Janas, T. (2015) Mechanisms of RNA Loading into Exosomes. *FEBS Letters*, **589**, 1391-1398. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.036>
- [43] Marzola, P., Busato, A., Bonafede, R., Bontempi, P., Scambi, I., *et al.* (2016) Magnetic Resonance Imaging of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide-Labeled Exosomes from Stem Cells: A New Method to Obtain Labeled Exosomes. *International Journal of Nanomedicine*, **11**, 2481-2490. <https://doi.org/10.2147/ijn.s104152>

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ojs@hanspub.org