分类号：R592　　单位代码：10312
密　级：公开　　学　　号：2020110242

南京医科大学

硕 士 学 位 论 文

题　　目：小肠上皮通过外泌体调控心脏成纤维细胞老化的机制研究

研 究 生：赫义君

指导教师：丁国宪

学科专业：老年医学

学院名称：第一临床医学院

答辩时间：二〇二三五月叁拾壹日

中国知网　https://www.cnki.net

目　录

前言.....8
材料及方法.....11
结果.....26
讨论.....38
结论.....42
参考文献.....43
综述 外泌体与心脏成纤维细胞功能的研究进展.....48
参考文献.....56

中国知网 https://www.cnki.net

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
PKH26	PKH26 Fluorescent Cell Linker Kitc	PKH26 外泌体染料
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
ACTA2	Actin Alpha 2	α-肌动蛋白
α-SMA	Alpha smooth muscle Actin	α-平滑肌肌动蛋白
COL1A1	Collagen I	I 型胶原
COL3A1	Collagen III	III 型胶原
β-GAL	Beta-galactosidase	β-半乳糖苷酶
MMP	Matrix Metalloproteinase	基质金属蛋白酶
IL-1β	Interleukin-1beta	白细胞介素 1β
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素 6
MCP1	Monocyte chemoattractant protein-1	单核细胞趋化蛋白-1
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha	肿瘤坏死因子 α
TSG101	Tumor susceptibility gene 101	肿瘤易感基因 101
RASA1	RAS p21 protein activator 1	RAS p21 激活蛋白 1
miRNA	mi Ribonucleic Acid	微小核糖核酸
DAPI	4’,6-Diamidino-2’-phenylindole	4',6 二脒基-2-苯基吲哚
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸缓冲生理盐水
CFs	Cardiac fibroblasts	心脏成纤维细胞
EXO	Exosome	外泌体

中国知网 https://www.cnki.net

小肠上皮通过外泌体调控心脏成纤维细胞老化的机制研究

中文摘要

目的：随着老龄化社会和慢病时代的来临，老年人群心衰发病率逐渐上升，其中老化引起的心脏纤维化在老年心衰中起着基石作用。心脏成纤维细胞是心脏细胞外基质的主要来源，起着维持心脏功能稳态的关键作用，也是心脏重构和心脏纤维化的主要参与者。因此，明确老化过程中心脏成纤维细胞功能变化，靶向干预心脏成纤维细胞老化，防止心脏纤维化的发生，可以有效预防老年心力衰竭的发生。小肠上皮不仅是营养感受与吸收的主要结构，在机体能量稳态的调节中发挥重要功能，更是衰老的信号传递中心，是调控机体衰老、延长寿命的重要靶组织。同时小肠上皮也是重要的内分泌器官，可以通过“肠-心轴”影响心脏功能。外泌体是细胞及组织间发挥重要通讯和调控作用的生物活性分子。近年来外泌体在调控衰老和衰老相关疾病中的作用也已受到越来越多的关注，尤其外泌体与心肌老化密切相关，是抗心肌老化，改善心功能的有效靶标。本研究旨在探究小肠上皮外泌体对心脏成纤维细胞老化的作用，为未来临床抗心脏老化提供新的思路。

方法：提取年轻（3 月龄）、老龄（18 月龄）小鼠小肠上皮组织外泌体，分别刺激年轻、年老小鼠原代心脏成纤维细胞。通过 PKH26 示踪观察外泌体被摄取情况，检测刺激后心脏成纤维细胞分化、ECM 合成、ECM 降解、炎症与老化等基因变化，通过 α-SMA，COL1A1，COL3A1 免疫荧光染色，β-半乳糖苷酶染色评估刺激后细胞外基质蛋白合成及老化变化，通过细胞划痕实验检测细胞增殖迁移能力。对年轻、老龄小鼠小肠上皮组织外泌体、血循环外泌体进行高通量测序，寻找共同变化显著的 miRNA，通过生信软件预测靶基因，利用 mimics 转染的方式在原代心脏成纤维细胞中高表达该 miRNA，检测其对心脏成纤维细胞功能基因的影响。

结果：

1. 与年轻小鼠相比，老龄小鼠原代心脏成纤维细胞中衰老的细胞占比更高，并

中国知网 https://www.cnki.net

且肌成纤维细胞分化基因 ACTA2、胶原合成基因 COL1A1、COL3A1 显著升高或有升高趋势，胶原降解基因 MMP16 基因显著降低，炎症基因 IL-1β、IL-6、TNF-α 显著升高，老化基因 P16 显著升高。

2. 小鼠原代心脏成纤维细胞能够摄取小肠上皮组织外泌体。
3. 老龄小鼠小肠上皮组织外泌体刺激的年轻小鼠心脏成纤维细胞 P16 基因、半乳糖苷酶染色等老化指标增加，纤维化、炎症相关基因较对照组显著升高，同时 ECM 成分蛋白（α-SMA、I 型、III 型胶原蛋白）合成增加。接受年轻小鼠小肠上皮组织外泌体刺激的老龄小鼠心脏成纤维细胞老化指标降低，纤维化、炎症基因均降低，ECM 成分蛋白合成减少。
4. 高通量测序分析发现与年轻小鼠相比，老龄小鼠血循环、小肠上皮组织外泌体共同变化的 miRNA 中有 5 个显著上调，另有 12 个显著下调。其中 miR-223-3p 上调了 4.72 倍，研究证实 miR-223-3p 能促进心脏成纤维细胞老化、炎症、纤维化水平升高，涉及的靶基因包括 RASA1、MMP16 等。
5. 对原代心脏成纤维细胞高表达 miR-223-3p 后，靶基因 RASA1、MMP16 表达被显著抑制，同时老化、炎症、纤维化等基因显著上调或有升高趋势。

结论：随着机体衰老，小鼠心脏成纤维细胞中衰老的细胞占比增加，功能发生改变，表现为 ECM 合成增加，降解减少，炎症水平升高。老龄小鼠的小肠上皮组织外泌体可以促进年轻鼠心脏成纤维细胞老化、炎症、纤维化水平升高，而年轻小鼠的外泌体可以部分程度改善老年小鼠心脏成纤维细胞老化、炎症、纤维化。高通量测序发现老年小鼠小肠上皮外泌体中 miR-223-3p 升高，可以通过抑制靶基因 RASA1、MMP16 促进心脏成纤维细胞老化、炎症、纤维化增加。

关键词：外泌体；小肠上皮；心脏成纤维细胞；老化

中国知网 https://www.cnki.net

Mechanism of intestinal epithelium regulating cardiac fibroblast senescence through exosome

Abstract

Objective:

With the advent of the aging society and the era of chronic disease, the incidence of heart failure in the elderly is gradually increasing, in which cardiac fibrosis caused by aging plays a cornerstone role in heart failure in the elderly. Cardiac fibroblasts are the main source of cardiac extracellular matrix, playing a key role in maintaining cardiac functional homeostasis, and are also the main participants in cardiac remodeling and cardiac fibrosis. Therefore, defining the functional changes of cardiac fibroblasts during aging, targeted intervention of cardiac fibroblasts aging and preventing the occurrence of cardiac fibrosis can effectively prevent the occurrence of heart failure in the elderly. Intestinal epithelium is not only the main structure of nutritional perception and absorption, but also plays an important role in the regulation of energy homeostasis, but also the signal transmission center of aging, and it is an important target tissue to regulate aging and prolong life. Not only does intestinal epithelium motivate the regulation of energy homeostasis since it is the main structure of nutritional perception and absorption, but conveys messages associated with being aging as it is an important target tissue to regulate aging and prolong life as well. At the same time, intestinal epithelium is also an important endocrine organ, which can affect cardiac function through the "intestinal-mandrel". Exosomes are bioactive molecules that play an important role in communication and regulation between cells and tissues. In recent years, with more and more attention paid to the role of exosomes in the regulation of aging and aging-related diseases, especially when exosomes are, closely related to myocardial aging and are effective

中国知网 https://www.cnki.net

targets for anti-myocardial aging and improving cardiac function. The purpose of this study is to explore the effect of intestinal epithelial exosome on cardiac fibroblast aging and to provide new ideas for clinical anti-cardiac aging in the future.

Methods:

The exosome bodies were extracted from the intestinal epithelium of young (3 months) and old (18 months) mice, and the young and old cardiac fibroblasts were stimulated in vitro by adding cell culture medium to observe the exosome uptake by PKH26 tracer, and the gene changes of ECM synthesis, ECM dissolution, transformation to myofibroblasts, inflammation and aging of cardiac fibroblasts were detected by PCR. α-SMA,COL1A1,COL3A1 immunofluorescence staining and β-galactosidase staining were used to evaluate the changes of extracellular matrix protein synthesis and aging-related proteins after stimulation. The ability of cell proliferation and migration was detected by scratch test. The small intestinal epithelium and blood circulation exosome bodies of young and old mice were sequenced with high throughput to find the common significant changes of miRNA. The corresponding target genes were predicted by Bioinformatics software. MiRNA was highly expressed in primary cardiac fibroblasts by mimics transfection, and its effect on the function of cardiac fibroblasts was detected by RT-qPCR.

Results:

1. Compared with the primary cardiac fibroblasts of young mice, the COL3A1, ACTA2, P16 genes of aged mice were significantly increased.COL1A1 gene was up-regulated. IL-1 β, IL-6, TNF- α were significantly up-regulated, and MMP16 gene was significantly down-regulated.

2.The exosome body of intestinal epithelial tissue was traced by PKH26, and it was found that cardiac fibroblasts could absorb the exosome body of small intestinal epithelial tissue under fluorescence microscope.

中国知网 https://www.cnki.net

3. In the young mice stimulated by exosome of old mice, the genes related to fibrosis and inflammation in the experimental group were significantly higher than those in the control group. At the same time, the synthesis of ECM components (α-SMA, type I, type III collagen) increased, and aging-related genes and proteins increased significantly. The fibrosis, inflammation and aging genes of cardiac fibroblasts, α-SMA, type III collagen and aging-related genes and proteins of cardiac fibroblasts decreased in the young exosome group.

4. Compared with young mice, 5 miRNA with common changes of blood circulation and intestinal epithelia exosome in aged mice were significantly up-regulated and 12 down-regulated. Among them, miR-223-3p is significantly up-regulated by 4.72 times. It has been confirmed that miR-223-3p can promote cardiac fibroblast differentiation, fibrosis phenotype and inflammatory phenotype, including RASA1, MMP16 and so on.

5. The target gene was verified by miRNAmimics transfection method: after overexpressing miR-223-3p in primary cardiac fibroblasts, the expression of RASA1 and MMP16 genes in cardiac fibroblasts was significantly inhibited, while fibrosis-related genes COL1A1, COL3A1, ACTA2, inflammation-related genes IL-1 β and TNF- α were significantly increased, and aging-related gene P16 tended to increase.

Conclusions:

With the aging of the body, the function of mouse cardiac fibroblasts changes, which is characterized by the increase of ECM synthesis and modification, the decrease of collagen degradation and the increase of inflammatory level. In the cell model, we found that the exosome of small intestinal epithelial tissue could promote the occurrence of aging-related phenotype of cardiac fibroblasts in young mice, while the exosome of young mice could delay the aging phenotype of aged mice. Using

中国知网 https://www.cnki.net

high-throughput sequencing, we found that miR-223-3p may promote the aging, fibrosis and inflammatory phenotype of cardiac fibroblasts by inhibiting target genes RASA1 and MMP16.

Key words: exosome；intestinal epithelium；cardiac fibroblasts；senescence

中国知网 https://www.cnki.net

前言

近年来随着中国人口老龄化的加剧，60 岁及以上人口占总人口比例即将超过 20%，老化相关疾病成为亟待人们攻克的卫生难题。预防老化相关疾病的发生，提高老年人群健康预期寿命是未来我国医疗的重要目标。

老年心衰是威胁老年人生命健康的严重疾病，其临床症状复杂，病情易反复，临床治疗通常只能改善症状，延长生命，无法彻底根治，最后往往预后不良[1]。老年心衰除了与高血压、冠心病等外在因素有关外，也和心肌自身的老化密不可分，例如心肌细胞肥大及心脏间质纤维化造成的心脏不良重构[2]。心脏不良重构是由心肌细胞、成纤维细胞功能异常导致的，研究发现，活化的成纤维细胞通过自分泌或旁分泌可促发心肌肥大，肥大的心肌细胞又可活化成纤维细胞，促进胶原合成，使心肌纤维化，形成恶性循环，导致心肌重构不断加重、心功能不断下降，直至难治性心衰。

与高血压心脏病不同，老年心衰患者心功能下降主要表现为左室肥厚和舒张期功能障碍，其收缩功能往往是正常的，说明其病因更多来自于心脏间质的纤维化相关[3]。心脏间质的主要成分是细胞外基质蛋白（Extracellular matrix，ECM），它由胶原蛋白和纤连蛋白两种主要的纤维构成，这些纤维结构连接单个肌细胞并维持肌细胞排列，因此基质组成的变化可以极大地影响舒张和舒张刚度，损害心脏舒张功能，引起射血分数保留的心衰[4]。

心脏成纤维细胞是细胞外基质的主要来源，它是心脏间质中数量占比最多的细胞，约占总数的 60-70%。在正常的心脏中，成纤维细胞通过产生与降解细胞外基质，维持心脏结构稳态和正常功能。当心脏发生损伤时，随着心肌细胞死亡，炎症细胞清除坏死区域并分泌促炎因子，使静息的成纤维细胞活化为肌成纤维细胞[5]。肌成纤维细胞具有一定的平滑肌细胞的特性，特异性表达 α-SMA，同时其产生 I 型和 III 型胶原能力显著增强[6]，填补细胞死亡后留下的空隙，有助于维持心脏结构的完整性[7]。然而，如果把心脏比作一件艺术品，成纤维细胞

中国知网 https://www.cnki.net

相当于是一个“平庸的修补匠”，它完成的修复虽然能在形态上维持结构完整，但却不能恢复正常的生理功能，导致收缩及舒张功能异常及电生理紊乱[8]。

在对衰老的心脏的研究中，人们发现成纤维细胞的数量没有明显的变化[9]。这说明其根本原因来自成纤维细胞本身功能的变化而不是数量差异。而通过对年轻和老年左心室基质的成分分析发现，老年小鼠心脏中除了胶原沉积明显增加[10]，脯氨酸羟化酶和赖氨酸氧化酶表达也显著升高。胶原蛋白是通过赖氨酸氧化酶的交联来稳定并形成结构蛋白网格[11]，异常的胶原交联会影响收缩及舒张的能力，降低心功能。除此之外，研究人员发现衰老心脏成纤维细胞表达骨膜蛋白的能力同样增加[12]，这些都可能是导致心脏老化纤维化的重要因素。因此，调控心脏成纤维细胞功能，防止过度的纤维化发生可能是未来临床治疗老化心脏疾病的潜在靶点。

小肠是食物消化和营养吸收的重要器官，具有特殊的结构和功能，通过对营养物质的吸收和储存调定机体能量的稳态。当小肠上皮结构功能改变，例如绒毛形成异常时，机体的能量调节失去平衡，进而造成代谢紊乱，可以引起机体衰老[13]。现代肠道健康理论先驱梅契尼可夫出：“肠道健康就是世界上最好的长寿秘诀”。Libina 等人在线虫上发现通过对小肠上皮高表达 DAF-16 可以抑制 insulin / IGF-1 信号通路，大大延长线虫的寿命[14]。此外，Rera 等的研究也发现在果蝇的小肠上皮特异性增强 PGC-1 同源物的表达不仅延缓了肠道的衰老，还明显延长了果蝇的寿命[15]。这说明小肠上皮是衰老信号传递中心，可能是整体水平调控机体衰老、延长寿命的重要靶组织。

小肠上皮也是重要的内分泌和代谢器官，对机体各个脏器都有着一定的调控作用，肠-脑轴、肠-心轴等等均有一定的研究基础。例如肠道内分泌细胞产生的胰高血糖素样肽-1（glucagon-like peptide-1，GLP-1）受体激动剂可以逆转高脂饮食和血管紧张素 II 诱导的心肌重构和心功能下降[16]，证明小肠上皮具有调控心血管疾病的能力，对于维护机体代谢健康具有重要意义。不仅是 GLP-1，近期研究更是发现作为发挥分泌功能的重要器官，小肠上皮还可以通过分泌包含

中国知网 https://www.cnki.net

多种 mRNA、microRNAs、功能性蛋白质的外泌体[17]，激活或进入受体细胞，发挥通讯及调控作用。

外泌体同样是目前研究老化疾病的热点，很多研究都提出外泌体与动脉粥样硬化、2 型糖尿病等衰老相关疾病的发生发展紧密相关[18, 19]。外泌体具有多种组织和器官来源，是细胞-细胞、组织-组织间信息传递的重要媒介[20]，研究发现，心内注射新生鼠心球衍生细胞来源的外泌体，不仅延长了老年鼠的端粒长度，还逆转了心肌重构，改善了心功能，增加了活动能力[21]。并且，老年人心脏祖细胞体外给予年轻人心球衍生细胞来源的外泌体后，心脏细胞的端粒长度延长，衰老的细胞减少[22]。说明外泌体与心肌老化密切相关，是抗心肌老化，改善心功能的有效靶标。

目前尚无研究证实小肠上皮组织外泌体参与心脏老化、纤维化的调控，因此我们从小肠上皮组织外泌体入手，通过研究其对心脏成纤维细胞功能的影响，探究内在机制，为干预心脏纤维化及老化相关心脏病的发生提供新的临床思路。

中国知网 https://www.cnki.net

材料及方法

1.主要材料与试剂

产品	来源
TRIzol Reagent	Invitrogen，USA
DEPC	Sigma，USA
RNase inhibitor	Promega, USA
M-MLV	Promega, USA
dNTP	Promega, USA
SYBR Premix Ex TaqTM	Takara，Japan
II 型胶原酶	Sigma，USA
胰蛋白酶	Gibco，USA
DMEM 培养基	Gibco，USA
胎牛血清	Gibco，USA
PBS 粉剂	Hyclone，USA
蛋白预染 Marker	Fermentas, Lietuvos
5x 蛋白上样缓冲液	上海碧云天公司
α-SMA 抗体	CST，USA
COL1A1 抗体	Protein，USA
COL3A1 抗体	Protein，USA
β-半乳糖苷酶试剂盒	Cell Signal，USA
抗荧光淬灭封片液、免疫染色封闭液、DAPI	上海碧云天公司
miRNA mimics	上海吉玛公司
转染试剂	常州百代生物公司
Opti-mem 培养基	Gibco，USA

中国知网 https://www.cnki.net

2.主要仪器设备

产品名称	生产厂家
细胞培养超净台	HERA CELL
生物安全柜	新加坡 Esco 公司
二氧化碳孵箱	Heras
温控水浴箱	上海精宏
低温离心机	Eppendorf
紫外分光光度仪	Amersham Biosciences
纯水仪	Millipore 公司
-20℃、-4℃冰箱	安徽美菱公司
恒温摇床	上海安亭
荧光倒置显微镜	Olympus 公司

3.动物实验方法

3.1 不同年龄小鼠饲养

SPF 级雄性 3 月龄、18 月龄 C57BL/6J 小鼠，购自南京医科大学实验动物中心。饲养条件：自由进食和饮水，恒温（20-25℃），恒湿（50%-60%），12h 明暗循环。

3.2 高脂饮食鼠动物模型构建

小鼠购自南京大学动物模式中心，并于南京大学动物模式中心饲养，SPF 级环境，分别设为正常饮食组(Normal Chow Diet，NCD)、高脂饮食组（High Fat Diet，HFD）。正常饲料 3.8Kcal/g，营养配比：碳水化合物 70%，脂肪 10%，蛋白质 20%。高脂饲料 5.2Kcal/g，营养成分配比：碳水化合物 20%，脂肪 60%，蛋白质 20%。共进行高脂饮食 12 周。

中国知网 https://www.cnki.net

4.小肠上皮组织外泌体提取

4.1 主要试剂

(1) 配置 PH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液，加入 0.05%的 Tween-20，加蒸馏水定容至 1000ml。

(2) 1.234 克二硫苏糖醇加入 8mPBS 后混匀，按 1：100 倍稀释后使用。

(3) EDTA 178 毫克加入 50PBS 混匀，配置为 EDTA 溶液，预冷后使用。

4.2 实验过程

(1) 小鼠脱颈处死，充分暴露腹腔并取出小肠，用 PBS 清除粪便及脂肪。

(2) 将处理后的小肠按不同区域分成 4-6cm 数段，翻转上皮层暴露在外。

(3) 生理盐水和二硫苏糖醇（DTT 溶液）分别洗涤三遍，去除粘液层。

(4) 预冷的 EDTA 溶液孵育肠管 30 分钟，将小肠上皮层和固有层分离获得含有小肠上皮外泌体的上清液。

(5) 4℃离心 300g，5min 以去除沉淀，再用 0.22μm 滤器过滤上清液

(6) 超速离心 100,000g，2.5h，去除上清液，用 1ml PBS 清洗沉淀

(7) 用适量的 PBS 重悬外泌体并置于-80℃冰箱保存。

4.3 外泌体鉴定

4.3.1 透射电镜观察

将小肠上皮组织外泌体于 PFA 溶液中固定半小时。置于碳涂覆的铜网上，用 MilliQ 水洗涤后用 2.5％乙酸铀酰进行染色。风干铜网 10 分钟，在透射电子显微镜上观察外泌体形态并拍照

4.3.2 纳米颗粒追踪分析

使用纳米颗粒跟踪分析仪 NanoSight NS300 进行外泌体追踪，结合 Stockes-Einstein 方程式计算出纳米颗粒的流体力学直径和浓度。使用 NanoSight NTA 软件进行外泌体数量和大小分布的分析。

4.3.3 Western blotting 实验

（一）准备工作：

中国知网 https://www.cnki.net

1) 清洗所使用玻璃容器，并进行高压灭菌处理。所有耗材室温密封保存。
2) 配制 RIPA 试剂：cTris-HCl (pH 7.4) 50 mM、Triton X-100 1%、去氧胆酸钠 0.2%、SDS 0.2%、EDTA 1mM。
3) 30%丙烯酰胺/0.8％双丙烯酰胺试剂（配制 100ml）：丙烯酰胺 29.2g、双丙烯酰胺 800mg，放入 100ml 烧杯中，加入约 80ml 的 DDH2O，充分搅拌溶解，定容至 100 ml 使其配置为 30%丙烯酰胺/0.8％双丙烯酰胺溶液。
4) 4×分离胶缓冲液配制（配制量 100ml）：首先配制 2M Tris-HCL (pH8.8)；配制 10%SDS；取 2M Tris-HCL（pH8.8）75ml 和 10%SDS 4ml，放入 100ml 的量杯，DDH2O 定容至 100 ml，配制为 4×分离胶缓冲液。
5) 4×浓缩胶缓冲液配制（配制量 100ml）：首先配制 1M Tris-HCL（pH6.8）；取 50ml 1M Tris-HCL (pH6.8)和 4ml 10％SDS，放入 100ml 的量杯，DDH2O 定容至 100 ml，配制成 4×浓缩胶缓冲液，
6) 10％过硫酸铵配制（配制量 5ml）：称取过硫酸铵 0.5g，置于 5ml 离心管，加入 5ml 去离子水，充分搅拌溶解，小份分装，4℃保存。
7) 10×电泳缓冲液配制（配制量 1000ml）：取三氨基甲烷 30g、甘氨酸 144g、SDS10g，加入 900ml DDH2O 水，磁力搅拌均匀，定容 1000 ml，配制成 10×电泳缓冲液。
8) 6×样品缓冲液配制（配制量 10ml）：配制 50%甘油；配制 4%溴酚蓝；取 0.6ml 1M Tris-HCL（pH6.8）、5ml 50%甘油、2ml 10％SDS、 0.5ml β-巯基乙醇、1ml 4%溴酚蓝和 0.9ml DDH2O，混匀配制成 6×样品缓冲液，分装放入-20℃冰箱保存。
9) 10×转移缓冲液配制（配制量 1000ml）：称取 Tris 19.3g 和甘氨酸 90g，置于 1000ml 量杯，加 900mlDDH2O，磁力搅拌溶解，定容 1000ml，配置成 10×转移缓冲液。
10) 10×TBS 缓冲液配制（配制量 1000ml）：称取 Tris 3g 和 90g NaCl 置于 1000ml 烧杯，加入 900ml DDH2O，充分搅拌溶解，将 PH 调定至 7.4，定容至 1000ml，

中国知网 https://www.cnki.net

配制成 10×TBS 缓冲液。最终浓度为 Tris 50mmol/L。使用时十倍稀释即为工作液。每 1000ml 工作液加入 1ml Tween-20，可得 TBST 工作液。

11) 考马斯亮蓝染液配制（配制量 1000ml）：称取考马斯亮蓝 R-250 1.0g，置于 1000ml 烧杯，加入 450ml 甲醇和 100ml 冰醋酸，去离子水定容至 1000ml。

12) 考马斯亮蓝洗脱液配制（配制量 1000ml）：取 100ml 甲醇和 100ml 冰醋酸，置于 1000ml 容量瓶，去离子水定容至 1000ml。

（二）蛋白定量：

1) 将标准品 BSA 和待测样本蛋白分别加入 96 孔酶标板中

2) 每孔加入混合的 BCA 工作液（A 液：B 液=50:1）

3) 37℃恒温箱中孵育 30 分钟

4) 酶标仪 562nm 检测吸光度

5) 绘制标准曲线，并计算待测蛋白浓度

（三）SDS-PAGE 凝胶蛋白电泳

1) 根据目的蛋白大小选择合适的凝胶密度。凝胶密度/分辨范围如下：15%/15～45kDa1、12.5%/15～60kDa、10%/18～75kDa、7.5%/30～120kDa、5%/60～212kDa。

2) 根据使用的电泳系统，配制凝胶

3) 制备样品：将蛋白样品与 5×样品缓冲液在一个离心管中混匀，100℃加热 5min，使蛋白变性，冷却到室温，上样前使样品离心 1 分钟。

4) 上样：每孔 60μg，避免样品溢出，空的泳道以相应体积样品缓冲液平衡。

5) 恒压电泳，浓缩胶 8V/cm，分离胶 12V/cm。

中国知网 https://www.cnki.net

（四）转膜：

1) 根据实验条件选择合适的膜：常用的膜有硝酸纤维素膜、尼龙膜和 PVDF 膜，本实验选用 PVDF 膜

2) 将适当大小的 PVDF 膜放入甲醇中浸泡处理 5－10min 左右

3) 将海绵、滤纸浸入预冷的 Transfer-Buffer，按照夹心法依次将海绵、1 层滤纸、 凝胶、PVDF 膜、1 层滤纸、海绵顺序放好，小心除去夹心内气泡，筛孔板 固定，凝胶面向阴极插入电泳槽中，放入冰盒，倒入转移缓冲液，100V 稳压电泳，转膜一小时

（五）封闭：

将 PVDF 膜放入 5%脱脂牛奶中，置于摇床上，室温低速摇匀 1 小时。

（六）洗涤：

1×TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次，每次 5 分钟。

（七）一抗孵育

按照抗体试剂说明，用抗体稀释液将一抗稀释至最佳工作浓度，（CD63 抗体、TSG101 抗体：1%BSA＝1:1000），4℃摇床低速摇匀孵育过夜。

（八）洗涤

1×TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次，每次 10 分钟。

（九）二抗孵育

二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠或羊抗兔 IgG（IgG-HRP：1%BSA=1:20000），室温摇床低速摇匀孵育 1 小时

（十）洗涤：

1×TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次，每次 10 分钟。

(十一)ECL 发光：

将 ECL 显色液 A 与 B 按照 1:1 混和均匀滴加至膜表面，用数字化多功能图像增强化学发光系统曝片保存，曝光时间根据目的条带强度与背景信号强弱而定，观察结果。

中国知网 https://www.cnki.net

5.小鼠循环血外泌体提取

(1) 使用 1%水合氯醛麻醉小鼠后，经胸骨下缘穿刺入左心室，获得纯净的循环血液。

(2) 室温静置小鼠血清，使凝血物质凝结，3000 转速离心 10min 获得血清。

(3) 取 1ml 血清，加入 9ml 无菌 PBS，300g，4℃离心 10min。

(4) 取上清转移至新的离心管中，2000g，4℃离心 10min。

(5) 将上清转移至新的离心管内，10000g，4℃离心 30min。

(6) 将上清放入灭菌过的超速离心管，PBS 定容至 10ml，超速离心 70min。

(7) 去除上清，加入 10ml PBS 重悬沉淀，再次超速离心 70min。

(8) 去除上清，底部沉淀为外泌体

鉴定方法同上述小肠上皮组织外泌体。

6.小鼠原代心脏成纤维细胞的分离培养

6.1 实验对象

3 月龄小鼠（年轻组），18 月龄小鼠（老年组），购自南京医科大学实验动物中心。

6.2 实验器械

眼科剪刀 2 个，眼科镊子 4 只，40μM 细胞过滤筛网 1 个，玻璃皿 2 个，50ml 离心管 4 个，高压蒸汽灭菌后放入细胞超净台中使用。

6.3 实验试剂

心脏组织消化液配方：10% 2 型胶原酶 sigma 公司；牛血清蛋白 20g/L Biosharp 公司；HEPES（4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液）biosharp 公司；使用不含钙镁的 HBSS 定容。用 0.22μm 滤器进行过滤除菌。

6.4 实验步骤

（1）小鼠颈椎脱臼处死在 75%乙醇中短暂浸泡消毒 1min 后用无菌眼科剪快速打开胸腔。

中国知网 https://www.cnki.net

（2）快速取出心脏置于预冷无钙 HBSS 中，用眼科剪及眼科镊剪除心耳、大血管及心房。

（3）将心室组织剪碎至 1mm3 后用 II 型胶原酶（0.1%浓度）消化（37℃，200r/分恒温摇床震荡消化 15-20min）。

（4）消化干净后将上清通过 40um 筛网过滤，1000 转/分离心 10 分钟，去掉上清液。

（5）用适量完全培养基重悬沉淀并铺板，放入恒温孵育培养箱（37℃，5%CO2）。

（6）90 分钟后弃去培养液，更换为新的完全培养基，此时贴壁的细胞为心脏成纤维细胞。

7.小肠上皮组织外泌体刺激原代心脏成纤维细胞方法

7.1 外泌体蛋白定量（BCA 法）：

(1) 将提取好的小肠上皮外泌体与一定量的 PBS 充分混匀。

(2) 根据实验样本数量计算所使用的 BCA 工作液用量。

(3) 根据计算所需的 BCA 工作液总量，将试剂盒的 A 液和 B 液按照 50:1 的比例混合。

(4) 将待测样本及标准品按顺序加入酶标板中，再将 200μl 工作液加入并混匀，37℃孵育 30min，在室温下冷却。

(5) 开启酶标仪并在 562nm 吸光度下测定并记录结果。

(6) 按照标准品的检测结果绘制标准曲线，计算待测外泌体蛋白溶液的浓度

7.2 刺激小鼠原代心脏成纤维细胞

（1）提取小鼠原代心脏成纤维细胞计数铺板，用含 10%的无外泌体血清的 DMEM 高糖培养基培养。

（2）将外泌体溶液按照 5μg/10^5 细胞数的浓度加入培液。

（3）共培养 24 小时后收取 RNA

（4）共培养 48 小时后进行免疫荧光染色

中国知网 https://www.cnki.net

7.3 小肠上皮外泌体刺激原代心脏成纤维细胞示踪

将提取的小肠上皮组织外泌体与亲脂性染料 PKH26 共同孵育，将用 PKH26 荧光染色标记的外泌体加入用无外泌体血清培养三天的小鼠心脏成纤维细胞培养液中，共培养 48 小时。采用 DAPI 进行细胞核染色。荧光显微镜下相同曝光时间拍照，采用 ImageJ 软件计算相对荧光强度，对结果进行定量分析，评估外泌体的心脏成纤维细胞摄取效率。

8、RNA 提取、RT-PCR 和实时荧光定量 PCR

8.1 细胞总 RNA 提取（Trizol 法）

(1) 细胞培养完成后，在每个培养皿中加入适量 Trizol 试剂，静置 5 分钟使细胞充分裂解。

(2)按照每 1ml Trizol 加入氯仿 0.2ml 的比例将氯仿加入 EP 管，盖上盖子后剧烈震荡混匀，室温放置 5 分钟。

(3) 12000rpm 4℃15 分钟离心，离心后管中分成水相、中间层、有机相。吸取上清并转入 1.5ml EP 管，应注意避免误吸中间层。加入等体积的异丙醇使 RNA 沉淀，颠倒混匀，在 4℃冰箱中放置 10 分钟。（如需获得 miRNA 则置于-80℃冰箱中过夜沉淀）

(4) 12000rpm 4℃ 10 分钟离心，倒掉上清，加入 1ml DEPC 配置的 75％乙醇，弹拨管底观察羽毛状 RNA 沉淀浮起。

(5) 10000rpm 4℃ 10 分钟离心，小心倒掉上清，用吸水纸吸干管口剩余水分，静置等待 RNA 干燥。

(6) 根据沉淀大小加入 10-30ul DEPC 水溶解沉淀。

8.2 RNA 浓度及纯度的测定

取 2ul 提取的细胞总 RNA 用 250x 的 DEPC 水定容至 500ul，置于紫外分光光度仪上测定 260nm 处吸光度值，同时测定 260/280 值，其比值在 1.8-2.0 之间说明 RNA 纯度好，记录 RNA 浓度。

中国知网 https://www.cnki.net

8.3 RNA 逆转录

(1) 吸取 2μg RNA，0.5μg OligoDT，用 RNase-freeH2O 稀释至 11μl，作为溶液 A，在 70℃水浴 5 分钟，去除 RNA 二级结构。时间到后立即取出，迅速放置于冰上。

(2) 溶液 B 为 M-MLV reaction buffer 5μl、M-MLV RT 1μl、dNTP mix 10mM 1.25μl、RNase inhibitor 0.7ul、RNase-free H2O 6.05μl，总体积为 14ul。

(3) 溶液 B 与 A 混合并快速离心，将 25ul 的混合液在 37℃水浴 1 小时，所得产物为逆转录后的 cDNA，每管加 DDH2O 各 75μl，放入-20℃冰箱保存。

(4) 实时荧光相对定量 PCR，采用非竞争内标法，将各组的分化标志基因以及内参照 β-actin 在同一反应体系和相同反应条件下进行荧光定量 PCR 测定。反应结束后通过分析 Ct 值，计算定量结果。Ct 值即每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数，Ct 值越小，代表了模板起始拷贝数越多。本文用各样品中目的基因与内参照的拷贝数之比表示目的基因的相对表达量。

反应体系：

2×Master Mix 12.5ul

Master Mix plus 4ul

1pmol/ul primer 5ul

cDNA 1ul

DDH2O 2.5 ul

总体积 25ul

中国知网 https://www.cnki.net

8.4 引物序列

表 1　PCR 引物序列

基因名	引物序列（5’→ 3’）	
B-ACTIN	F:TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	R:CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC
TGF-B	F:CAACAATTCCTGGCGTTACCT	R:GCCCTGTATTCCGTCTCCTT
ACTA2	F:AAAAGACAGCTACGTGGGTGA	R:GCCATGTTCTATCGGGTACTTC
COL1A1	F:GCAACATCTCCCCTTCGTT	R:TCCGATGTTTCTGCTTTGTCGT
COL3A1	F:TTGAAGGAGGATGTTCCCATCT	R:ACAGACACATATTTGGCATGGTT
FN1	F:CGTCATTGCCCTGAAGAACA	R:AAGGGTAACCAGTTGGGGAA
FGF2	F:AGAAGAGCGACCCTCACATCA	R:CGGTTAGCACACACTCCTTTG
POSTN	F:CCATTGGAGGCAAACAACTCC	R:TTGCTTCCTCTCACCATGCA
MMP-2	F:GCCATCAGCGTTCCCATACTT	R:GACCCTGAAACCGTGGATGAT
MMP-9	F:CCACCACCACAACTGAACCAC	R:ACCAACCGTCCTTGAAGAAATG
LOX	F:CGTCCACGTACGTGCAGAAG	R:CCTGTATGCTGTACTGGCCAGAC
TNF-α	F:CCCTCACACTCACAAACCACC	R:CTTTGAGATCCATGCCGTTG
IL-1B	F: GCATCCAGCTTCAAATCTCGC	R:TGTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG
IL-6	F:CCCCAATTTCCAATGCTCTCC	R:CGCACTAGGTTTGCCGAGTA
TGF-B	F:CAACAATTCCTGGCGTTACCT	R:GCCCTGTATTCCGTCTCCTT
F4/80	F:ATGGACAAACCAACTTTCAAGGC	R:GCAGACTGAGTTAGGACCACAA
MKI67	F:CCACATGGATTTCTGAAC	R:GCCATCACACAACAGTAG
CDK1	F:TAGCATCAGATGCACGC	R:GTGTCCAGCAGTCGCACTAT
CCNB1	F:CATGGTGCACTTTCCTCCTT	R:AGGTAATGTTGTAGAGTTGGTGTCC
IKKα	F:TGCACTTGGCAATCATCCAC	R:TTCCTCGAAAGTCTCGGAGCT
KLF-15	F:CCCAATGCCGCCAAACCTAT	R:GAGGTGGCTGCTCTTGGTGTACATC

中国知网　https://www.cnki.net

9.细胞免疫荧光染色

（1）在细胞培养皿中放入细胞爬片，将细胞铺板到含有爬片的培养皿中。

（2）培养结束后，PBS 轻柔清洗细胞爬片 3 次。

（3）用 4%多聚甲醛固定细胞爬片 15 分钟。

（4）用 PBS 轻柔洗涤爬片 3 次，每次 5min。

（5）用山羊血清封闭 30min。

（6）使用配置好的一抗工作液孵育细胞爬片，室温孵育 2h 或 4℃过夜。

（7）用 PBS 轻柔洗涤爬片 3 次，每次 5min。

（8）二抗室温湿盒孵育 1h。

（9）用 PBS 轻柔洗涤爬片 3 次，每次 5min。

（10）DAPI 染色：将 DAPI 按 1：1000 稀释到 PBST 中，加入各孔中染色 5min。

（11）用 PBS 轻柔洗涤爬片 3 次，每次 5min。

（12）将细胞爬片用展片镊取出并放在盖玻片上，滴加防淬灭剂。

（12）指甲油封片，避光保存风干。

（13）荧光显微镜下观察并拍照。

10.细胞划痕实验

（1）提前紫外线消毒超净台及笔和钢尺，在 12 孔板的每个孔底部均匀画好参考线。

（2）将提取的原代成纤维细胞接种于培养板上，待细胞接近贴满时换液，并用 20ul 枪头沿着参考线垂直画出一道划痕。

（3）加入含有小肠上皮组织外泌体的培养基培养。

（4）在给予外泌体刺激后的 0h、6h、12h、24h 给细胞拍照并观察划痕的距离变化。

中国知网 https://www.cnki.net

11. miRNA 高通量测序分析

11.1 RNA 提取

使用 miRNeasy Serum/Plasma Kit（QIAGEN）并根据试剂盒说明书进行外泌体总 RNA 提取，对所得的总 RNA 取样质检。

11.2 RNA 质检方法

（1）通过 Qubit 3.0 Fluorometer（Invitrogen, Carlsbad, California）检测 RNA 样品浓度。

（2）通过 Agilent 2100 Bioanalyzer （Applied Biosystems, Carlsbad, CA）检测 RNA 的完整性（RIN 值）

11.3 文库构建

样品质检合格后，总共准备 100ng 的总 RNA，使用 VAHTSTM Small RNA Library Prep Kit for Illumina（Vazyme Biotech）构建文库，利用 Small RNA3′端有胫基及 5′端有完整磷酸基团的特殊结构，在 Small RNA 两端加上特定的接头，然后反转录合成 cDNA。随后进行 PCR 扩增，纯化，PAGE 胶电泳分离目标 DNA 片段（140－160bp 片段）或磁珠分选目的片段，即为 small RNA 文库。

11.4 文库质控

文库构建完成后，先使用 Qubt3.0 进行初步定量，随后使用 Agilent2100 Bioanalyzer 对文库大小范围进行检测。插入的目的片段大小符合后，使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量（文库有效浓度>2nM），以保证文库质量。

11.5 上机测序

库检合格后，将不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling，采用 Hi Seq SE50 PE150 模式进行测序。

12.miRNA 靶基因预测及细胞转染

12.1 生物信息学预测靶基因

通过生物信息学网站：http://www.Targetscan.org，http://www.microrna.org，http://www.miRWalk.org 等网站，根据相关物种及筛选原则，筛选 miRNA 的预测

中国知网 https://www.cnki.net

靶基因。

12.2 miRNA 细胞转染

(1) 在细胞密度生长在 50%左右时，提前一天更换无血清无抗生素的 DMEM 培养液，使细胞饥饿。

(2) 根据生物公司合成 miRNA mimic／mimic NC 的说明配置为工作浓度。

(3) 配制转染工作液(以 12 孔板为例)：

a) A 液(转染试剂与无血清培养基 Opti-MEM 混合液)：转染试剂 3μl+Opti-MEM47μl，轻轻吹打混匀，在室温下放置 5 分钟。

b) B 液(miRNA mimics/NC mimics 与无血清培养液 Opti-MEM)分别放置于 2 个 EP 管中。吹打混匀后室温下放置 5 分钟。

c) 将配好的 A 液和 B 液混悬均匀，室温下放置孵育 15 分钟。

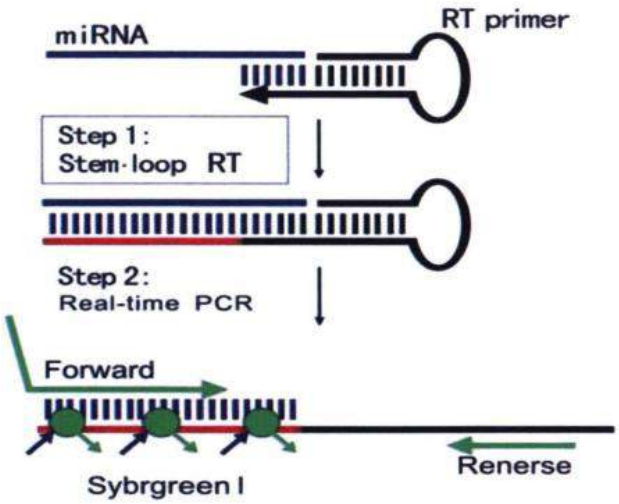
(4) 从培养箱中取出细胞并换液，用无菌预热的 PBS 清洗后，加入上述配制好的混合液，前后左右轻晃培养基，使转染液均匀分布于培养基中，所有培养的细胞尽可能充分转染。

(5) 在培养 48h 后提取 RNA 检测 miRNAs 或 mRNA 表达，72 小时后免疫荧光实验检测蛋白表达。

12.3 miRNA 引物设计及 RT-qPCR 验证

(1) 茎环法设计引物：利用 Target scan 查询到的 miRNA 序列，采用茎环法设计 miRNA 逆转录引物，茎环法示意图及设计的 miRNA 引物序列如下：

中国知网 https://www.cnki.net



mmu-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
逆转录引物序列	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGGGGT
qPCR-F	GCGCGTGTCAGTTTGTCAAAT
qPCR-R	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT

(2) miRNA 逆转录及 RT-qPCR：

a) 配置 A 液，取 1μg miRNA 用 DEPC 水配置到 9μl

b) 配置 B 液，按 M-MLV reaction buffer 4μl、M-MLV RT 1μl、dNTP mix 1μl、RNase inhibitor 0.5ul、miRNA 逆转录引物 1μl、U6 引物 1μl、DEPC 水 2.5μl，总体积为 11μl。

c) A 液与 B 液充分混匀，经过 25℃ 30 分钟，42℃ 30 分钟，85℃ 5 分钟后逆转录程序完成后，放入 4℃环境中保存

d) 以 U6 引物作为内参，比较 NC 组与 miRNA mimics 组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 得出 miRNA mimics 转染效率。

中国知网 https://www.cnki.net

结果

一、小肠上皮组织外泌体对心脏成纤维细胞老化及功能的影响

我们分别提取了年轻鼠与老龄鼠的原代心脏成纤维细胞（CFs）及小肠上皮组织外泌体（IEC-exo）。通过加入细胞培养基共培养的方式进行刺激，将细胞按接受相同年龄外泌体刺激为对照组；接受不同年龄外泌体刺激为实验组，持续刺激 24-48 小时后处理细胞。

1.不同年龄小鼠心脏成纤维细胞的培养及对比

为明确老年小鼠心脏成纤维细胞功能变化，我们分别提取年轻鼠及老龄鼠的原代心脏成纤维细胞，通过 β-半乳糖染色证实老年小鼠心脏成纤维细胞中衰老的细胞占比更高（图 1A）。通过 PCR 检测两组 ECM 合成（COL1A1、COL3A1、ACTA2）与降解（MMP16）、炎症（IL-1β、IL-6、TNF-α）、老化（P16）等指标。如图 1B 所示，老龄小鼠心脏成纤维细胞 ECM 合成与降解、炎症、老化指标均较年轻鼠升高。

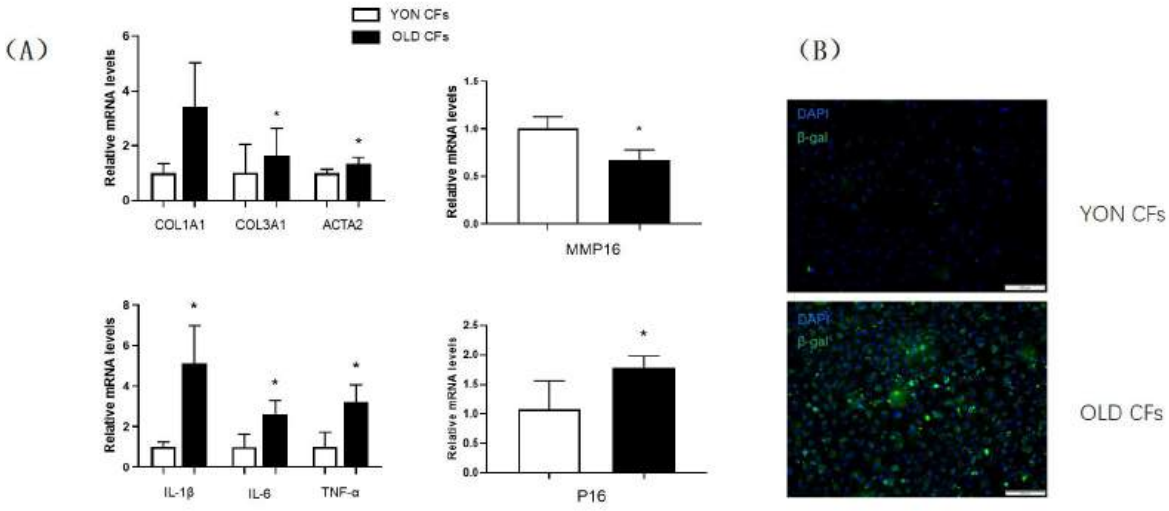


图 1 年轻、老龄小鼠心脏成纤维细胞老化及功能变化

A：年轻、老年小鼠心脏中细胞外基质合成与降解、炎症、老化等指标的变化。B：年轻、老年小鼠原代心脏成纤维细胞半乳糖苷酶染色。放大倍数 200×，绿色荧光：β-半乳糖苷酶，蓝色荧光：DAPI。

中国知网 https://www.cnki.net

2. 原代心脏成纤维细胞摄取小肠上皮外泌体

外泌体信号传递具有靶向性，不同来源的外泌体表面分子不同，其对应的受体细胞也具有特异性。为了证实心脏成纤维细胞能够摄取小肠上皮组织外泌体，我们提取了小鼠小肠上皮组织外泌体，将外泌体与 PKH26 染料共同孵育。PKH26 是一种亲脂性染料，经常被用于体内细胞的示踪研究，同样也可用于生物纳米颗粒，如外泌体的摄入。我们将 PKH26 染色的外泌体加入无外泌体血清培养基培养的原代心脏成纤维细胞中，在荧光倒置显微镜下观察细胞中 PKH26 显色，结果发现心脏成纤维细胞可以摄入小肠上皮组织分泌的外泌体（图 2）。由此我们证实小肠上皮分泌的外泌体能够作用于心脏成纤维细胞，细胞模型构建成功。

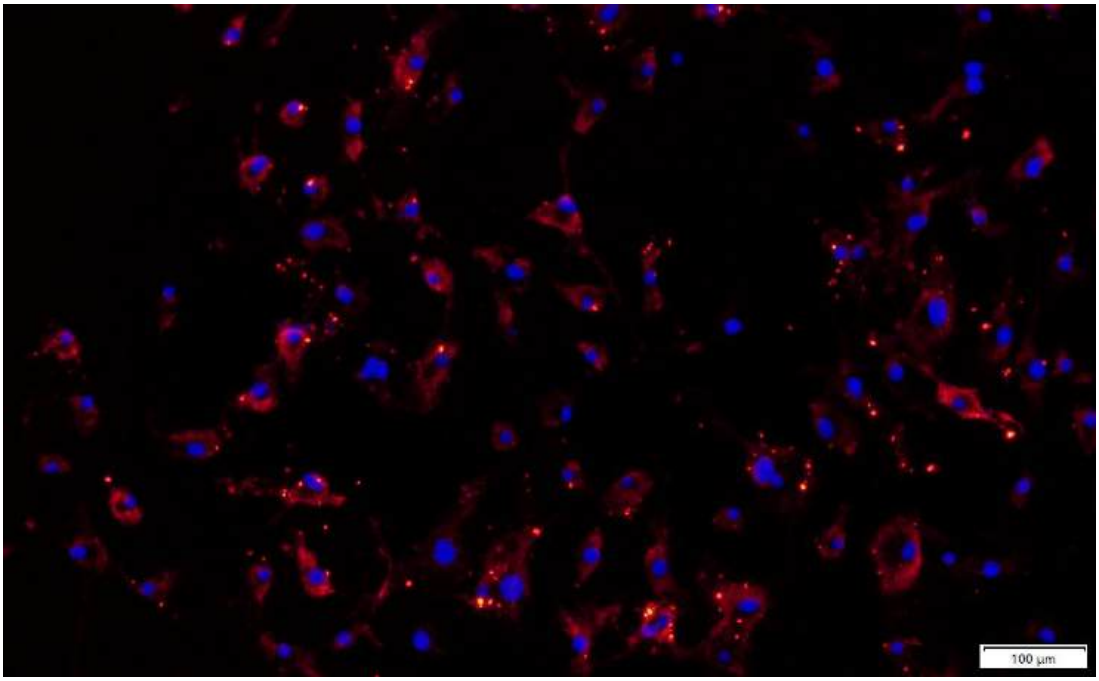


图 2 原代心脏成纤维细胞摄取小肠上皮组织外泌体

对提取的外泌体进行 PKH26 荧光染色，加入心脏成纤维细胞培养液中，荧光显微镜 200×视野下观察细胞中有荧光表达，证明外泌体被心脏成纤维细胞摄取。红色荧光：PKH26 标记的外泌体，蓝色荧光：DAPI。

中国知网 https://www.cnki.net

3.小肠上皮组织外泌体刺激心脏成纤维细胞的功能变化

我们采用 BCA 法检测外泌体的浓度，根据所得外泌体的浓度按 5ng/10^5 细胞数刺激原代心脏成纤维细胞。将与自身同年龄的小肠上皮组织外泌体刺激的成纤维细胞作为对照组，与相反年龄外泌体刺激的作为实验组。在共培养 24h 后检测基因变化情况（图 3），结果发现老龄鼠外泌体刺激的年轻小鼠心脏成纤维细胞 ECM 合成基因（ACTA2、COL1A1、COL3A1 等），炎症基因（IL1-β、IL-6、TNF-α）显著升高或有上升趋势，ECM 降解基因 MMP2、MMP9 升高，MMP16 下降，老化基因 P16 升高。而年轻小鼠外泌体刺激的老龄鼠心脏成纤维细胞部分 ECM 合成基因、炎症基因显著下降或有下降趋势，ECM 降解基因 MMP2、MMP9 下降，MMP16 升高，老化基因 P16 显著下降。

为进一步明确细胞老化及成纤维细胞基质蛋白合成功能变化，我们对两组细胞模型经外泌体刺激 48h 后进行 β-半乳糖苷酶染色及免疫荧光测定，年轻小鼠心脏成纤维细胞经老龄鼠小肠上皮组织外泌体刺激后 α-SMA、III 型胶原显著增加，I 型胶原存在上升趋势（1.5 倍），半乳糖苷酶染色显示老化增加；老龄小鼠心脏成纤维细胞经年轻鼠外泌体刺激后 α-SMA、III 型胶原均显著下降（图 4），半乳糖苷酶染色显示老化程度降低。

随着心脏成纤维细胞的老化，其增殖迁移的能力的改变也会对心脏不良重构产生影响，但通过细胞划痕实验计算统计外泌体刺激及对照组之间迁移率无显著差异，考虑在本实验中小肠上皮组织外泌体未引起心脏成纤维细胞增殖迁移能力变化。（图 5）

中国知网 https://www.cnki.net

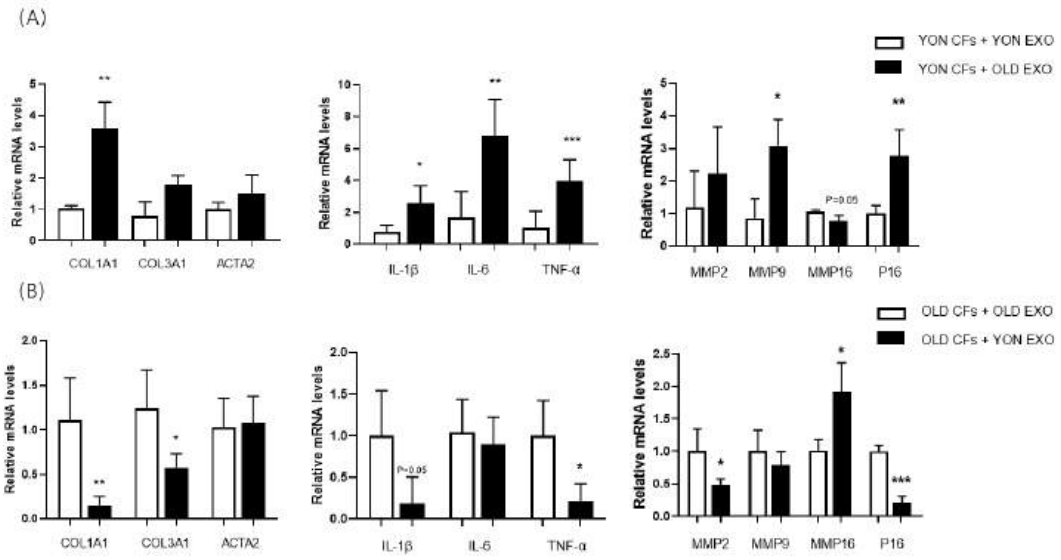
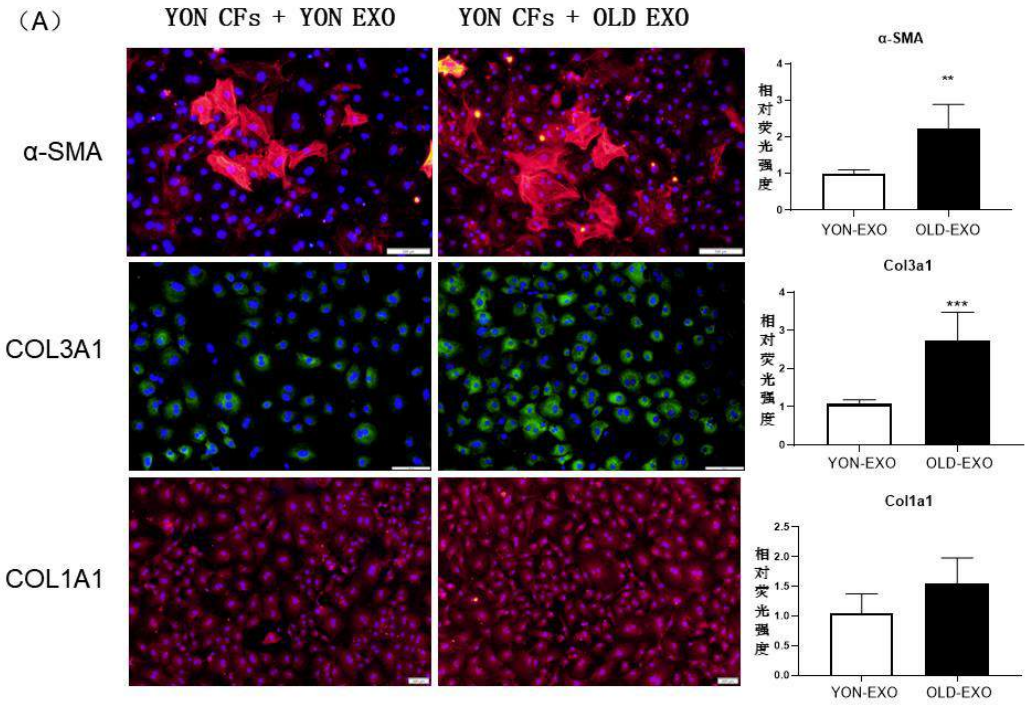
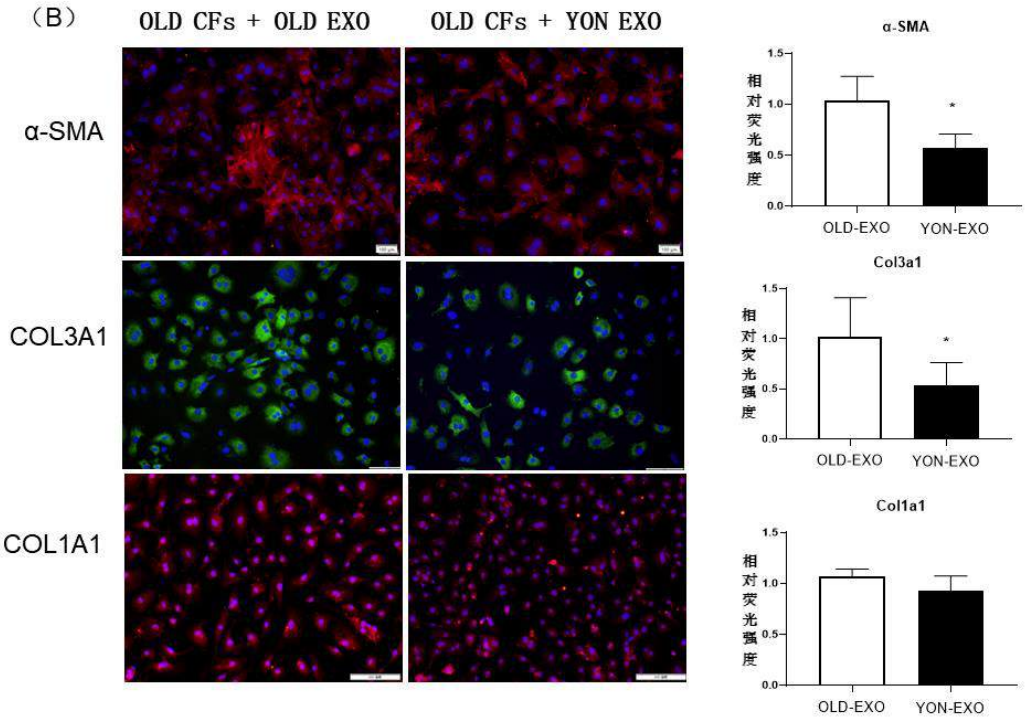


图 3 不同年龄小肠上皮组织外泌体刺激心脏成纤维细胞的基因表达改变

A：年轻小鼠心脏成纤维细胞接受同年龄小肠上皮组织外泌体刺激为对照组，老龄鼠外泌体刺激作为实验组，检测 ECM 合成、ECM 降解、炎症、老化等基因表达。B.老龄小鼠心脏成纤维细胞接受同年龄小肠上皮外泌体刺激为对照组，年轻鼠外泌体刺激为实验组，检测 ECM 合成、ECM 降解、炎症、老化等基因表达。***p＜0.001，**p＜0.01，*p＜0.05。所有实验数据均重复 3 次或 3 次以上。注：YON EXO 3 月龄小鼠小肠上皮组织外泌体；OLD EXO 18 月龄小鼠小肠上皮组织外泌体。

中国知网 https://www.cnki.net





中国知网 https://www.cnki.net

（C）

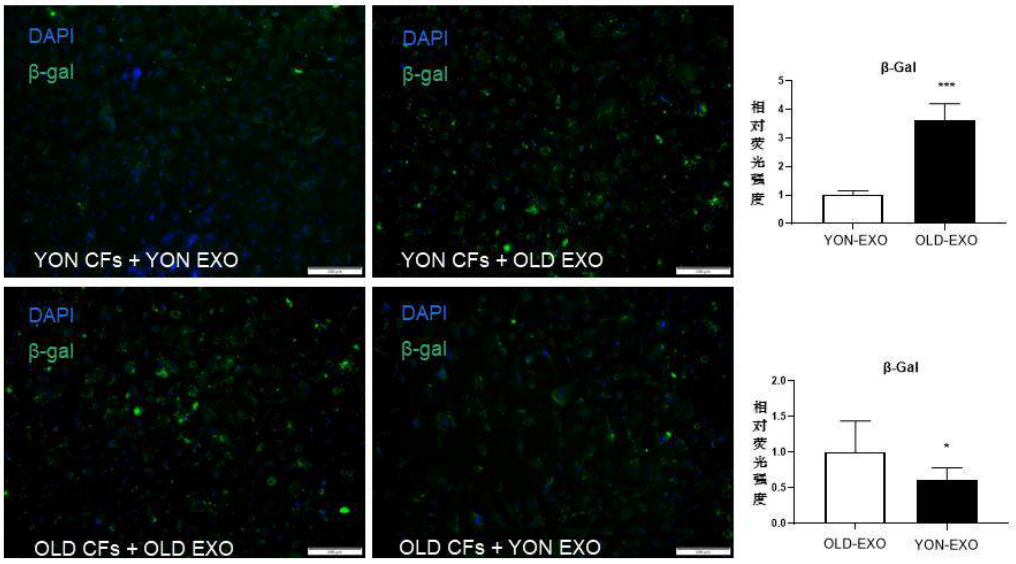


图 4 不同年龄小肠外泌体上皮组织外泌体刺激原代心脏成纤维细胞的免疫荧光变化

A：老龄鼠小肠上皮组织外泌体刺激年轻鼠心脏成纤维细胞 α-SMA、III 型胶原、I 型胶原表达及相对荧光强度定量对比。DAPI：蓝色；α-SMA：红色；COL3A1：绿色；COL1A1：红色。B：年轻小鼠小肠上皮组织外泌体刺激老龄鼠心脏成纤维细胞 α-SMA、III 型胶原、I 型胶原表达水平及相对荧光强度定量对比。C：不同年龄小鼠小肠上皮组织外泌体刺激原代心脏成纤维细胞半乳糖苷酶荧光染色及相对荧光强度定量对比。每组随机选择 5 个 200x 视野进行观察并拍照，采用 ImageJ 进行相对荧光强度定量分析

中国知网 https://www.cnki.net

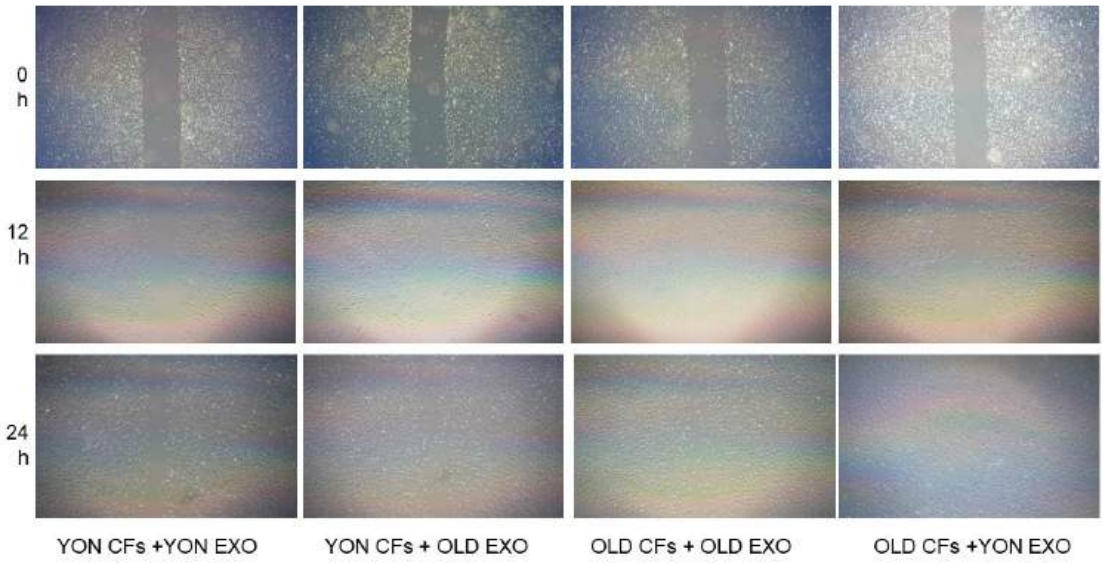


图 5 不同年龄小肠外泌体上皮组织外泌体刺激 CFs 细胞划痕实验

按照不同年龄小肠上皮组织外泌体刺激不同年龄成纤维细胞分组，观察 0、12、24h 细胞划痕面积，计算细胞迁移率。

4.高脂饮食小鼠小肠上皮组织外泌体调控心脏成纤维细胞

小肠上皮是重要的营养感受部位，是机体响应高脂饮食的第一器官。而高脂饮食是老化的加速器，为进一步研究小肠上皮组织外泌体对心脏老化的作用，我们从正常饮食和高脂饮食的小鼠分别提取小肠上皮外泌体，进行浓度测定后刺激原代心脏成纤维细胞。从图 6（A-E）可以看出高脂饮食鼠小肠上皮外泌体刺激下的心脏成纤维细胞增殖(MKI67、CDK1、CCNB1)，分化（TGF-β、ACTA2）、细胞外基质组分合成（Col1a1、Col3a1）、细胞外基质修饰（MMP2、MMP9、LOX）、炎症因子（IL-1β、IL-6、TNF-α）水平等基因水平高于正常饮食外泌体组。说明高脂饮食鼠小肠上皮组织外泌体可以作用于心脏成纤维细胞可以促进其纤维化相关基因表达。免疫荧光染色（图 7）显示高脂饮食小肠上皮组织外泌体实验组 α-SMA 蛋白、I、III 型胶原蛋白表达量均高于正常饮食外泌体对照组。

中国知网 https://www.cnki.net

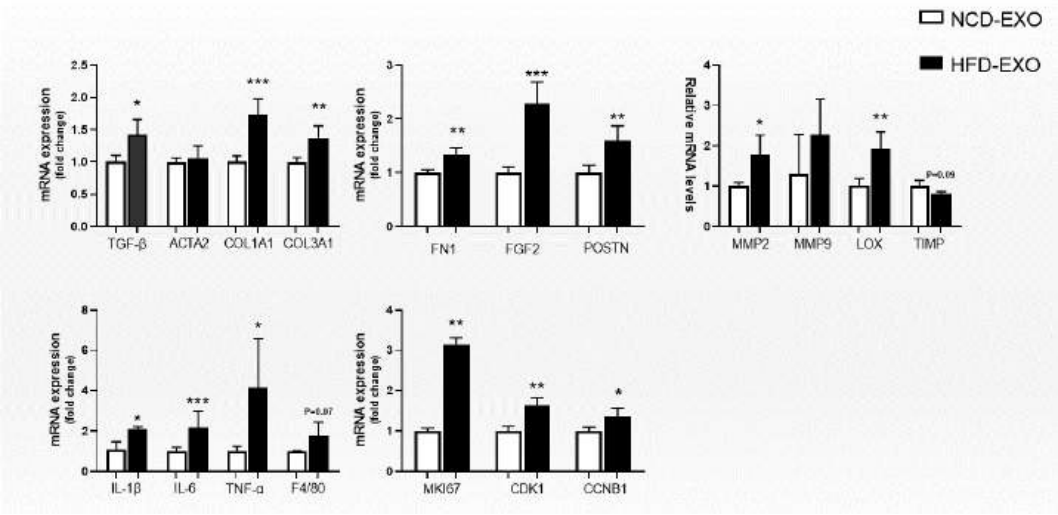


图 6 高脂饮食小鼠小肠上皮外泌体刺激心脏成纤维细胞基因变化

高脂饮食/正常饮食小鼠小肠上皮组织外泌体刺激心脏成纤维细胞后细胞分化、ECM 合成与降解、炎症、增殖迁移等基因表达对比。***p＜0.001，**p＜0.01，*p＜0.05。所有实验数据均重复 3 次或 3 次以上。

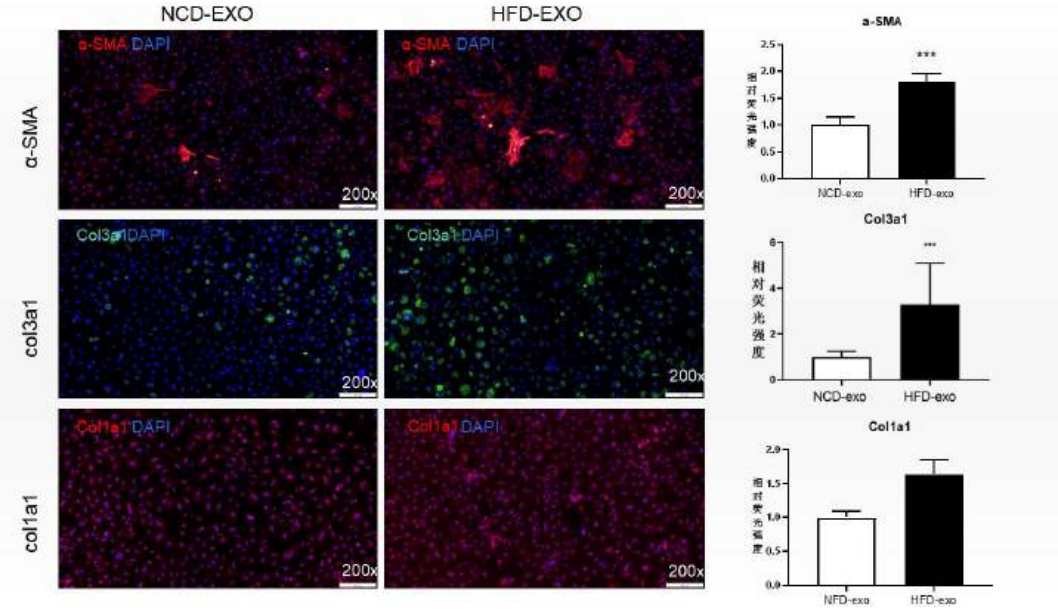


图 7. 高脂饮食小鼠小肠上皮组织外泌体刺激心脏成纤维细胞 ECM 蛋白表达变化

观察心脏成纤维细胞 α-SMA、III 型胶原、I 型胶原表达。DAPI：蓝色；α-SMA：红色；COL3A1：绿色；COL1A1：红色。每组随机选择 5 个 200×视野观察并拍照计算相对荧光强度。

注：NCD EXO 正常饮食小鼠小肠上皮外泌体；HFD EXO 高脂饮食小鼠小肠上皮外泌体。

中国知网 https://www.cnki.net

二、小肠上皮组织外泌体调控心脏成纤维细胞的机制研究

1.外泌体内容物高通量测序及分析

miRNA 高通量测序是目前研究外泌体内容物的重要手段，也是研究外泌体对受体器官作用机制的基础。小肠上皮组织外泌体自肠道产生，经血液循环传递至机体各个脏器发挥调控作用。因此找到循环血外泌体与小肠上皮组织外泌体共同变化的 miRNA 有助于我们更好的发现外泌体对受体器官作用的内在机理。我们分别提取了年轻鼠和老龄鼠循环血外泌体与小肠上皮组织外泌体，通过观察透射电镜、纳米颗粒追踪分析、Western Blotting 进行外泌体的鉴定（图 7）

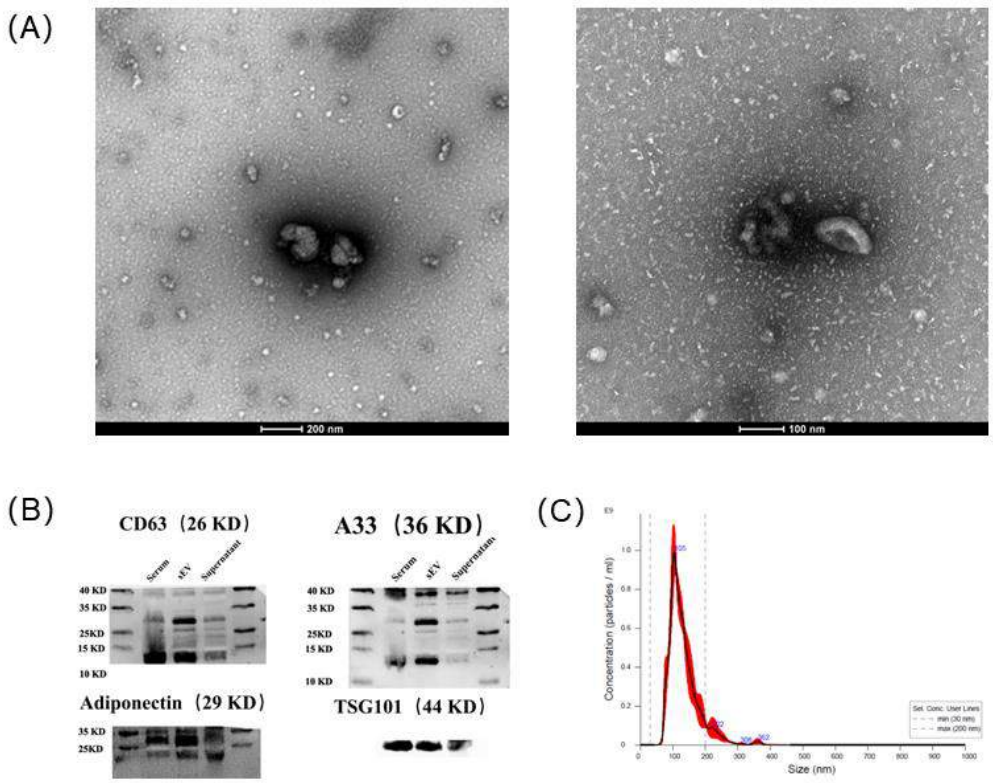


图 8.小鼠血循环外泌体的鉴定

A.透射电子显微镜下观察外泌体结构。B.免疫蛋白印迹 Western blotting 检测外泌体特异性标志 CD63、TSG101、肠道来源标志 A33，左为血清样本，中间为提取血清外泌体，右为去除外泌体后的血清上清液。C.纳米颗粒追踪分析，外泌体直径在 60-150nm 之间。

中国知网 https://www.cnki.net

我们将提取的青年、老年小鼠循环血外泌体与相对应的小肠上皮外泌体同时进行高通量测序（High Throughput Sequencing）。结果显示年轻鼠和老龄鼠小肠上皮外泌体和血清外泌体 miRNA 的表达上有显著差异。其中，年轻鼠小肠上皮外泌体共富集了 326 个 miRNAs，老龄鼠小肠上皮外泌体共富集了 258 个 miRNAs，两者有 211 个 miRNAs 是一致的，与年轻鼠相比，老龄鼠小肠上皮外泌体一共上调了 35 个 miRNAs，而下调了 59 个 miRNAs。在年轻鼠循环血外泌体共富集了 486 个 miRNAs，老龄鼠循环血外泌体共富集了 496 个 miRNAs，两者有 371 个是一致的，与年轻鼠相比，老龄鼠循环血外泌体上调了 37 个 miRNAs，而下调了 35 个 miRNAs。

将两组测序数据共同分析后我们得到小肠上皮外泌体与循环血外泌体共同上调的 5 个 miRNAs，共同下调的 12 个 miRNAs。miR-486a-5p 在老龄鼠中上升的最明显（18.49 倍），研究证实其可以通过靶向心脏成纤维细胞中的基质金属蛋白酶 19（MMP19）及抑制血管内皮生长因子 A（VEGFA）改善心肌梗死后的心功能。我们利用生物信息学软件预测 miR-486a-5p 可以靶向线粒体自噬基因 PINK1，自噬减少是衰老的重要标志，老龄小鼠小肠上皮外泌体 miR-486a-5p 造成心脏成纤维细胞自噬减少可能促进了其老化表型的发生。另外，老年小鼠外泌体中 miR-223-3p 上调了 4.72 倍，研究证实 miR-223-3p 与心脏纤维化密切相关，其靶基因 RASA1（RAS-GTP 酶激活蛋白 1）可以负向调控 RAS 信号通路，促进心脏成纤维细胞增殖分化，产生更多的 I 型、III 型胶原蛋白，促进心脏纤维化的发生。miR-223-3p 还可以通过抑制靶基因 IKKα 促进炎症因子 IL-1β、TNF-α 合成，增加炎症表型，以及通过抑制靶基因 KLF15 增加 ROS 促进老化表型等。利用生物信息学软件分析我们预测 miR-223-3p 可以靶向心脏成纤维细胞中的基质金属蛋白酶 16（MMP16），基质金属蛋白酶的减少增加细胞外基质沉积可以促进纤维化的发生。除此之外，老年鼠外泌体中上调的 miRNA 还包括 miR-214-3p 在调节心肌细胞肥大和纤维化方面起重要作用，与冠状动脉疾病相关，同样也与细胞自噬有关。miRNA 的高通量测序证实了我们提取外泌体包含

中国知网 https://www.cnki.net

丰富的内容物，为我们进一步明确小肠上皮组织外泌体调控心脏的机制提供了充分的基础。

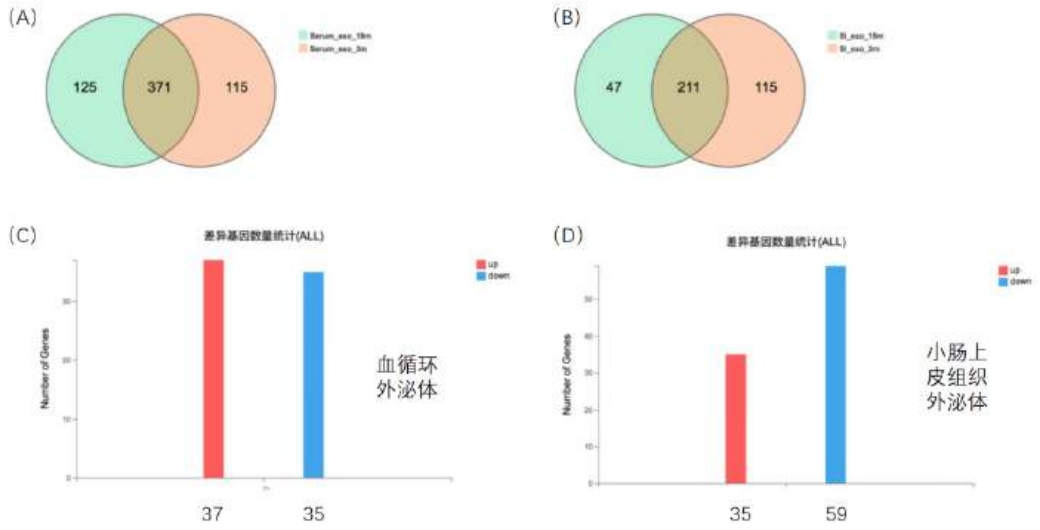


图 9 年轻小鼠与老年小鼠循环血、小肠上皮组织外泌体高通量测序

A：年轻、老龄小鼠血循环外泌体基因 Venn 图。B：年轻、老龄小鼠小肠上皮组织外泌体基因 Venn 图。C：血循环外泌体差异基因统计的柱状图。D：小肠上皮组织外泌体差异基因统计的柱状图。

2.外泌体内容物 miR-223-3p 对心脏成纤维细胞的影响

为验证高通量测序结果，我们对年轻、老年小鼠小肠上皮组织外泌体进行 miRNA 验证，通过 PCR 我们发现老年小鼠小肠上皮组织外泌体中 miR-223-3p 显著高于年轻小鼠外泌体（图 10）。因此，我们将 miR-223-3p 模拟物 mimics 转染进入心脏成纤维细胞，经 RT-qPCR 检测 miR-223-3p 表达量显著高于阴性对照转染组（Negative Control，NC），且结果具有统计学意义（图 11A），证明转染成功。通过 PCR 检测我们发现高表达 miRNA-223-3p 的心脏成纤维细胞中靶基因 RASA1、MMP16 均显著下调，调控纤维化相关基因 COL1A1、COL3A1、

中国知网 https://www.cnki.net

ACTA2 显著上调；IKKα基因显著下调，使炎症因子相关基因 IL-1β、TNF-α均显著上调，KLF15 基因显著下调使老化相关基因 P16、P53 显著上调。

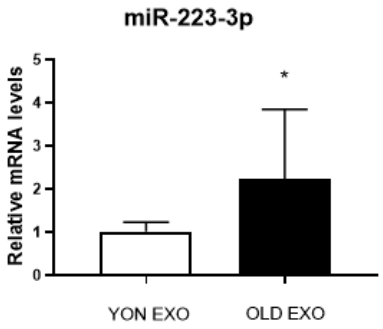


图 10 小肠上皮组织外泌体中 miR-223-3p 表达量的验证

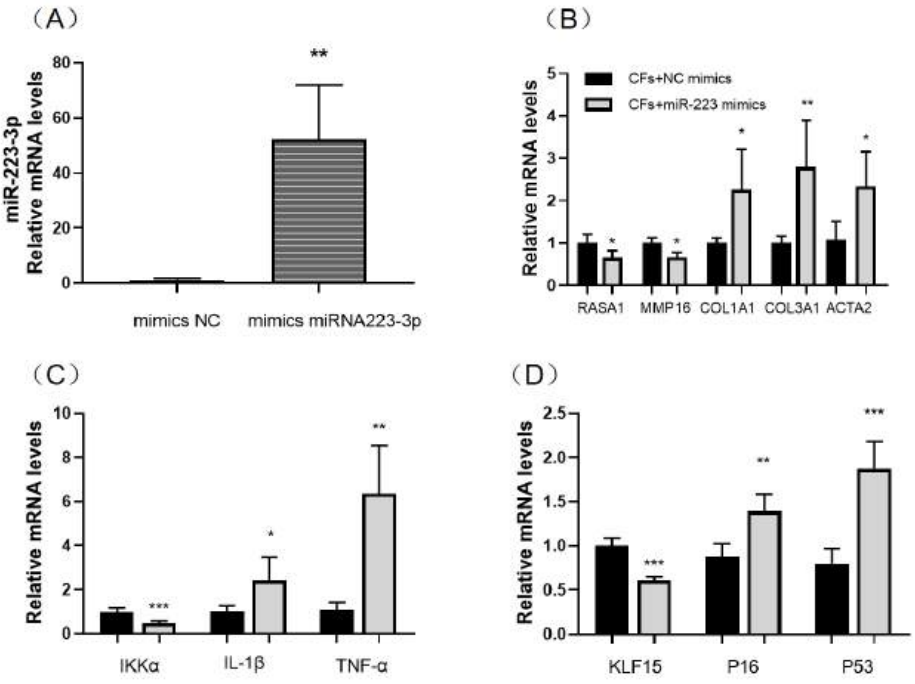


图 11 高表达 miR-223-3p 对心脏成纤维细胞功能的影响

A：心脏成纤维细胞高表达 miR-223-3p 与阴性对照（NC）相对表达量差异对比；B：高表达 miR-223-3p 实验组与 NC 对照组靶基因 RASA1、MMP16 变化及 ECM 合成基因变化情况；C：高表达 miR-223-3p 实验组与 NC 对照组靶基因 IKKα及炎症基因变化；D：高表达 miR-223-3p 实验组与 NC 对照组靶基因 KLF15 及老化基因改变。

中国知网 https://www.cnki.net

讨论

目前，我国有超过 1100 万名心衰患者，而在 70 岁以上的老人里，每十人就有一名心衰患者。老年人群的心衰问题对我国的卫生系统造成严重的挑战，防治老年心衰是目前亟待解决的临床问题[23]。

老年心衰的发生与心脏内在的老化有着密切的关系。老化的心脏中，心肌细胞凋亡和坏死，残存心肌细胞肥大、细胞外基质过度沉积、心肌纤维化等等，不仅促进了心衰的发生，也是心律失常的重要诱因[24]。心脏成纤维细胞在其中发挥着重要的角色，活化的成纤维细胞产生过度的细胞外基质，是造成心脏纤维化的重要因素。同时，活化的成纤维细胞可以促进心肌细胞肥大，而肥大的心肌细胞反过来继续促进心脏成纤维细胞激活，形成恶性循环，加剧心功能下降[25]。

心脏成纤维细胞是一组间充质来源细胞的统称，其转录具有异质性[26]，在不同年龄的小鼠中，其转录异质性也各不相同。研究证实，在衰老的心脏中，心脏成纤维细胞绝对数量没有发生明显的改变，更多的改变来自于细胞功能上的变化。衰老的心脏成纤维细胞功能改变一方面体现于其对急性损伤的修复能力减弱，表现为梗死后的不良纤维化[27]，另一方面则是在不发生急性损伤的自然老化心脏中细胞外基质合成增加造成慢性纤维化[28]。本研究通过体外培养老年小鼠原代心脏成纤维细胞，与年轻小鼠原代心脏成纤维细胞进行比较。证实老年小鼠心脏成纤维细胞中衰老的细胞占比更高。同时，老龄鼠心脏成纤维细胞分化、合成细胞外基质、炎症水平均升高。抑制心脏成纤维细胞老化，对防治心脏重构，延缓心脏纤维化具有重要意义。

为了寻找能调控心脏成纤维细胞老化的途径，我们着眼于可以在整体上调控机体老化的器官，即小肠上皮。小肠上皮是机体营养感受和吸收的部位，同样也是传递衰老信号的中心器官，可以通过激素、外泌体等多种方式对机体各个脏器发挥调控作用。研究证实来自循环血或其他细胞产生的外泌体均可调控心脏的衰老。通过实验，我们首先证实心脏成纤维细胞可以摄取小肠上皮外泌

中国知网 https://www.cnki.net

体。进一步分别进行年轻、老龄小鼠小肠上皮组织外泌体刺激对应的原代心脏成纤维细胞。结果发现老龄小鼠小肠上皮外泌体刺激的年轻小鼠心脏成纤维细胞 ECM 合成基因及胶原蛋白表达增加，ECM 降解基因 MMP2、MMP9 升高，MMP16 下降，炎症、老化基因升高，半乳糖苷酶染色增加。而年轻小鼠外泌体刺激的老龄鼠心脏成纤维细胞部分 ECM 合成基因及胶原蛋白表达降低、炎症、老化基因下降，半乳糖苷酶染色减少。说明小肠上皮外泌体具有调控心脏成纤维细胞发生老化、炎症、纤维化的作用。

高脂饮食是老化加速器，对线粒体功能异常、基因不稳定、表观基因变化、干细胞异常等老化标志都有影响[29]。我们课题组前期已构建高脂饮食小鼠动物模型，并开展高脂饮食鼠小肠上皮外泌体的研究。本实验发现，相比正常饮食组，高脂饮食小鼠小肠上皮组织外泌体可显著增加心脏成纤维细胞增殖分化、细胞外基质积聚、炎症等基因表达，合成 α-SMA 蛋白、I 型、III 型胶原蛋白能力增强。说明高脂饮食可以通过小肠上皮组织外泌体促进心脏成纤维细胞增殖、分化及胶原产生。

慢性炎症可引起细胞外基质的沉积，是促进纤维化表型发生的关键因素[30]。研究证实，衰老的成纤维细胞表达更高水平的 MCP-1 招募白细胞浸润[31]，促进心脏成纤维细胞的激活，诱导纤维化发生[32]。而同样表达升高的 IL-6 可以促进单核细胞成熟为表达胶原的巨噬细胞加剧心脏纤维化[33]。炎症除了对于免疫细胞的招募，Rieder 等人还发现小肠固有层单核细胞培养上清中包含的 TGF-β、IL-1β、TNF-α 等细胞因子都可以促进小肠血管内皮细胞 EndMT，促进纤维化的发生[34]。根据我们的实验结果，我们发现接受老龄鼠外泌体刺激的心脏成纤维细胞炎症相关基因 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达显著上升，而年轻鼠外泌体刺激也显著下调了 TNF-α，并对 IL-1β、IL-6 有下调趋势。我们推测小肠上皮外泌体对心脏成纤维细胞的炎症存在一定的影响，这种影响对心脏老化、纤维化发生有着促进作用。

已有研究表明，在心脏衰老过程中，纤维化的发生不仅由胶原的合成增加

中国知网 https://www.cnki.net

引起，基质的分解减少也是一个重要的因素。细胞外基质的主要成分是纤维蛋白、弹性蛋白和糖胺多聚糖[35]，这些组分在赖氨酸氧化酶等的作用下相互交织构成 ECM 结构，起到支撑心肌结构的作用。而他们的降解，有赖于基质金属蛋白酶（MMP matrix metalloproteinase）的作用，细胞外基质的水解增加与减少都会增加心脏纤维化的程度[36]。目前研究发现 TGF-β1-Smad2/3-MMP2/9 信号通路在心脏成纤维细胞中较为活跃，MMP2、MMP9 被证实具有促进纤维化的能力[37]。另一方面，MMP16 的减少也被证明会造成 I 型胶原沉积，促进纤维化。根据我们的研究，老年小鼠的小肠上皮组织外泌体可以显著增强年轻鼠心脏成纤维细胞 MMP9 表达、降低 MMP16 表达，而年轻小鼠小肠上皮组织外泌体可以显著降低老龄鼠心脏成纤维细胞 MMP2 的表达、升高 MMP16 的表达。这一现象证明了小肠上皮外泌体不仅可以影响心脏成纤维细胞分化及产生更多细胞外基质，同时也影响着细胞外基质的降解能力。

外泌体的分泌调节功能来源于其丰富的内容物，它是一种直径 40-150nm 的细胞外囊泡，携带功能性 siRNA、miRNA 以及蛋白质靶向调控受体组织或器官[38]。为了明确小肠上皮组织外泌体调控心脏成纤维细胞老化的内在机制，我们分别提取了年轻、老年小鼠循环血外泌体和年轻、年老小鼠小肠上皮外泌体同时进行高通量测序（High throughput Sequencing）。结果显示年轻鼠和老龄鼠外泌体 miRNA 的表达上有显著差异。将两组测序数据共同分析后我们得到小肠上皮外泌体与循环血外泌体共同上调的 5 个 miRNA，共同下调的 12 个 miRNA。其中 miR-486a-5p 在老龄鼠中上升得最明显（18.49 倍），miR-486a-5p 与细胞外基质降解及线粒体自噬均有相关性。其次是 miR-223-3p（4.72 倍），研究同样发现 miR-223-3p 与心脏纤维化相关[39]，其对应的靶基因 RASA1（RAS-GTP 酶激活蛋白 1）可以负向调控 RAS 信号通路，促进心脏成纤维细胞增殖分化，产生更多的 I 型、III 型胶原蛋白，促进心脏纤维化的发生。另外有文献报道，miR-223-3p 可以通过调控靶基因 IKKα 促进炎症因子 IL-1β、TNF-α 合成，增加心脏成纤维细胞炎症表型。此外我们还通过生信工具预测其下游的靶基因包含

中国知网 https://www.cnki.net

MMP16，基质水解酶的减少同样促进了心脏纤维化的发生。为了进一步验证，我们通过对成纤维细胞高表达 miR-223-3p，利用 RT-qPCR 证明了 miR-223-3p 能够负向调控靶基因 RASA1 及 MMP16。而在高表达 miR-223-3p 的实验组中，心脏成纤维细胞的胶原合成及分化基因 COL1A1、COL3A1、ACTA2 基因显著上调，炎症相关基因 IL-1β、TNF-α 显著上调，老化相关基因 P16 升高，说明了小肠上皮外泌体内容物 miR-223-3p 可以促进心脏成纤维细胞老化、炎症、纤维化等表型的发生。

综上所述，我们证实小肠上皮组织外泌体可以调控心脏成纤维细胞，并且老龄小鼠小肠上皮组织外泌体可以促进年轻小鼠心脏成纤维细胞老化、炎症、纤维化表型，而年轻小鼠的外泌体可以改善老龄小鼠心脏成纤维细胞老化、炎症纤维化表型。此外，高脂饮食也可以通过小肠上皮组织外泌体促进心脏纤维化。根据来自老龄鼠和高脂饮食鼠的外泌体均上调了心脏成纤维细胞的炎症基因，我们推测其老化、纤维化水平增加与炎症相关。通过外泌体-miRNA 高通量测序，我们找到老年鼠小肠上皮外泌体上调的 miR-223-3p，并初步推测其与老龄鼠外泌体促进心脏成纤维细胞老化、纤维化、炎症表型发生的相关机制。接下来，我们将从外泌体 miRNA 入手，进一步研究小肠上皮组织外泌体作用于心脏成纤维细胞的方式，找到通过干预肠道上皮外泌体从而达到延缓心脏老化的新依据。

中国知网 https://www.cnki.net

结论

随着机体衰老，小鼠心脏成纤维细胞中衰老的细胞占比增加，功能发生改变，表现为 ECM 合成增加，降解减少，炎症水平升高。老龄小鼠的小肠上皮组织外泌体可以促进年轻鼠心脏成纤维细胞老化、炎症、纤维化水平升高，而年轻小鼠的外泌体可以部分程度改善老年小鼠心脏成纤维细胞老化、炎症、纤维化。高通量测序发现老年小鼠小肠上皮外泌体中 miR-223-3p 升高，可以通过抑制靶基因 RASA1、MMP16 促进心脏成纤维细胞老化、炎症、纤维化增加。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] TORABI A, RIGBY A S, CLELAND J G. Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 55(1): 79-81; author reply

[2] BURCHFIELD J S, XIE M, HILL J A. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2 [J]. Circulation, 2013, 128(4): 388-400.

[3] TRIAL J, CIESLIK K A. Changes in cardiac resident fibroblast physiology and phenotype in aging [J]. American journal of physiology Heart and circulatory physiology, 2018, 315(4): H745-h55.

[4] GLUCHOWSKI A, HARRIS N, DULSON D, et al. Chronic Eccentric Exercise and the Older Adult [J]. Sports medicine (Auckland, NZ), 2015, 45(10): 1413-30.

[5] PLIKUS M V, WANG X, SINHA S, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease [J]. Cell, 2021, 184(15): 3852-72.

[6] CARLSON S, TRIAL J, SOELLER C, et al. Cardiac mesenchymal stem cells contribute to scar formation after myocardial infarction [J]. Cardiovascular research, 2011, 91(1): 99-107.

[7] LIU M, L PEZ DE JUAN ABAD B, CHENG K. Cardiac fibrosis: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies [J]. Advanced drug delivery reviews, 2021, 173: 504-19.

[8] TALLQUIST M D, MOLKENTIN J D. Redefining the identity of cardiac fibroblasts [J]. Nature reviews Cardiology, 2017, 14(8): 484-91.

[9] BANERJEE I, FUSELER J W, PRICE R L, et al. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse [J]. American journal of physiology Heart and circulatory physiology, 2007, 293(3): H1883-91.

中国知网 https://www.cnki.net

[10] DE CASTRO BR S L E, TOBA H, BAICU C F, et al. Age and SPARC change the extracellular matrix composition of the left ventricle [J]. BioMed research international, 2014, 2014: 810562.

[11] SMITH C L, BAEK S T, SUNG C Y, et al. Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling [J]. Circulation research, 2011, 108(12): e15-26.

[12] LI Q, LIU X, WEI J. Ageing related periostin expression increase from cardiac fibroblasts promotes cardiomyocytes senescent [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 452(3): 497-502.

[13] RERA M, AZIZI M J, WALKER D W. Organ-specific mediation of lifespan extension: more than a gut feeling? [J]. Ageing research reviews, 2013, 12(1): 436-44.

[14] LIBINA N, BERMAN J R, KENYON C. Tissue-specific activities of C. elegans DAF-16 in the regulation of lifespan [J]. Cell, 2003, 115(4): 489-502.

[15] RERA M, BAHADORANI S, CHO J, et al. Modulation of longevity and tissue homeostasis by the Drosophila PGC-1 homolog [J]. Cell metabolism, 2011, 14(5): 623-34.

[16] WITHAAR C, MEEMS L M G, MARKOUSIS-MAVROGENIS G, et al. The effects of liraglutide and dapagliflozin on cardiac function and structure in a multi-hit mouse model of heart failure with preserved ejection fraction [J]. Cardiovascular research, 2021, 117(9): 2108-24.

[17] DING Z, ZHANG C, ZHANG B, et al. Unraveling the Proteomic Landscape of Intestinal Epithelial Cell-Derived Exosomes in Mice [J]. Frontiers in physiology, 2022, 13: 773671.

[18] CAO Q, GUO Z, YAN Y, et al. Exosomal long noncoding RNAs in aging and age-related diseases [J]. IUBMB life, 2019, 71(12): 1846-56.

中国知网 https://www.cnki.net

[19] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes [J]. Annual review of biochemistry, 2019, 88: 487-514.

[20] XIA F, DING F, LV Y, et al. A High Efficient Method to Isolate Exosomes from Small Intestinal Epithelium [J]. Molecular biotechnology, 2019, 61(5): 325-31.

[21] ZHU B, ZHANG L, LIANG C, et al. Stem Cell-Derived Exosomes Prevent Aging-Induced Cardiac Dysfunction through a Novel Exosome/lncRNA MALAT1/NF-κB/TNF-α Signaling Pathway [J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2019, 2019: 9739258.

[22] GRIGORIAN-SHAMAGIAN L, LIU W, FEREYDOONI S, et al. Cardiac and systemic rejuvenation after cardiosphere-derived cell therapy in senescent rats [J]. European heart journal, 2017, 38(39): 2957-67.

[23] WANG H, CHAI K, DU M, et al. Prevalence and Incidence of Heart Failure Among Urban Patients in China: A National Population-Based Analysis [J]. Circulation Heart failure, 2021, 14(10): e008406.

[24] KELLER K M, HOWLETT S E. Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart [J]. The Canadian journal of cardiology, 2016, 32(9): 1065-73.

[25] FUJIU K, NAGAI R. Fibroblast-mediated pathways in cardiac hypertrophy [J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2014, 70: 64-73.

[26] VIDAL R, WAGNER J U G, BRAEUNING C, et al. Transcriptional heterogeneity of fibroblasts is a hallmark of the aging heart [J]. JCI insight, 2019, 4(22).

[27] CIESLIK K A, TRIAL J, ENTMAN M L. Defective myofibroblast formation from mesenchymal stem cells in the aging murine heart rescue by activation of the AMPK pathway [J]. The American journal of pathology, 2011, 179(4):

中国知网 https://www.cnki.net

1792-806.

[28] ANGELINI A, TRIAL J, ORTIZ-URBINA J, et al. Mechanosensing dysregulation in the fibroblast: A hallmark of the aging heart [J]. Ageing research reviews, 2020, 63: 101150.

[29] P REZ L M, PAREJA-GALEANO H, SANCHIS-GOMAR F, et al. 'Adipaging': ageing and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue [J]. The Journal of physiology, 2016, 594(12): 3187-207.

[30] FRANGOGIANNIS N G, DEWALD O, XIA Y, et al. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy [J]. Circulation, 2007, 115(5): 584-92.

[31] WANG X, WANG H X, LI Y L, et al. MicroRNA Let-7i negatively regulates cardiac inflammation and fibrosis [J]. Hypertension (Dallas, Tex : 1979), 2015, 66(4): 776-85.

[32] TRIAL J, HEREDIA C P, TAFFET G E, et al. Dissecting the role of myeloid and mesenchymal fibroblasts in age-dependent cardiac fibrosis [J]. Basic research in cardiology, 2017, 112(4): 34.

[33] CIESLIK K A, TRIAL J, ENTMAN M L. Mesenchymal stem cell-derived inflammatory fibroblasts promote monocyte transition into myeloid fibroblasts via an IL-6-dependent mechanism in the aging mouse heart [J]. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2015, 29(8): 3160-70.

[34] LAI Y, SHEN Y, LIU X H, et al. Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the activation of phosphoinositide 3-kinase-Rac1/RhoA pathway [J]. International journal of biological sciences, 2011, 7(6): 782-91.

中国知网 https://www.cnki.net

[35] STEPHENS E H, CHU C K, GRANDE-ALLEN K J. Valve proteoglycan content and glycosaminoglycan fine structure are unique to microstructure, mechanical load and age: Relevance to an age-specific tissue-engineered heart valve [J]. Acta biomaterialia, 2008, 4(5): 1148-60.

[36] PANWAR P, BUTLER G S, JAMROZ A, et al. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases [J]. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 2018, 65: 30-44.

[37] CHIAO Y A, RAMIREZ T A, ZAMILPA R, et al. Matrix metalloproteinase-9 deletion attenuates myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in ageing mice [J]. Cardiovascular research, 2012, 96(3): 444-55.

[38] ZHANG J, LI S, LI L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function [J]. Genomics, proteomics & bioinformatics, 2015, 13(1): 17-24.

[39] LIU X, XU Y, DENG Y, et al. MicroRNA-223 Regulates Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction by Targeting RASA1 [J]. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2018, 46(4): 1439-54.

中国知网 https://www.cnki.net

综　述

外泌体与心脏成纤维细胞功能的研究进展

摘要：

外泌体是一种携带生物活性物质的细胞外囊泡，其大小为 30-100nm，具有脂质双层结构，通过受体-配体作用，完成局部和远端细胞或组织间的生物信号的传递，具有调节受体细胞的表型及功能。外泌体对心脏疾病的作用是近年来研究的热点，越来越多的证据表明，心脏成纤维细胞可以摄取不同来源的外泌体并发生表型改变，为医学诊断及靶向治疗提供新的思路。

关键词：外泌体；心脏成纤维细胞

Abstract:

Exosome is a kind of extracellular vesicles carrying bioactive substances, which is 30-100nm in size and has a lipid bilayer structure. Through receptor-ligand interaction, exosomes complete the transmission of biological signals between local and distal cells or tissues, and can regulate the phenotype and function of receptor cells. The effect of exocrine on heart disease is a hot topic in recent years. More and more evidence shows that cardiac fibroblasts can absorb exosomes from different sources and produce phenotypic changes, which provides new ideas for diagnostic medicine and targeted therapy.

Key words: exosome; cardiac fibroblasts

1.外泌体概述

1.1 外泌体的定义

外泌体是一种细胞外囊泡，很长时间以来被认为是处理“细胞碎片”的一种机制。它通过内吞体系统产生，从质膜内陷开始形成早期的核内体，经过融合形成晚期核内体，再经内吞体膜内陷产生腔内小泡与质膜融合，将外泌体及其内容物释放到细胞外空间[1]。目前国际上定义的外泌体是大小为 30-100nm，具有

中国知网 https://www.cnki.net

脂质双层结构无法自我复制的细胞外囊泡。外泌体可以由多种细胞产生，并广泛分布于血液、尿液、脑脊液等体液中。近年来随着科学技术的不断进步，超速离心、梯度密度离心、尺寸排阻色谱等方法帮助人们有效地从体液中富集外泌体。而通过高通量测序，分析蛋白组学等方式使我们更清晰地了解其组分，得以深入研究其内在机理并发挥临床效用。

1.2 外泌体的功能

得益于特有的外膜结构，外泌体能够在体内长时间保存而不会降解，而其表面特有的蛋白分子使其具有靶向性，可以特异性调节对应细胞及组织[2]，因此外泌体可以有效地起到细胞间信号传递的工作，成为内分泌或旁分泌的重要媒介。外泌体的分泌功能源自于其丰富的内容物，包括核酸（如 miRNA、mRNA、lncRNA）、蛋白质和脂质等生物活性分子等[3]。当外泌体激活或进入受体细胞，它可以调控受体细胞的功能和生物学行为，在细胞-细胞，组织-组织间通讯和调节中发挥关键作用[4]。外泌体分泌的组分和速率有赖于细胞类型和细胞的病理生理状态，例如肿瘤细胞较非肿瘤细胞释放更多，内容物更丰富的外泌体[5]。除此之外例如各种类型的细胞应激：包括缺氧、氧化应激和药物刺激等，都可以调节外泌体分泌[6]。外泌体数量、内容物组分的变化，不仅可以反映着供体细胞状态，还与受体细胞的功能及整个机体的调节作用密切相关。大量研究表明体液中的外泌体不仅可以用作疾病的新型诊断标志物，也可以作为生物活性分子的载体起到治疗作用，在老化、代谢等疾病的预防和发展过程中都起着关键作用[7]。

1.3 外泌体内容物

（1）核酸 细胞间通过外泌体传递 RNA 早已被证实，Valadi 及其研究团队首先发现小鼠和人体内的肥大细胞的外泌体可携带 mRNAs 及 miRNAs[8]。Zhang 等人在 2010 年提出细胞可选择性将 miRNA 加入外泌体中分泌至胞外，并借助外泌体与受体细胞结合，将 miRNA 释放到受体细胞而调节其细胞功能[9]。miRNA 是一种进化上十分保守，长度为 18-25 个核苷酸的非编码 RNA，其通常可以阻遏翻译、降解含有互补靶序列的信使 RNA，对基因表达的调控起着重要

中国知网 https://www.cnki.net

的作用[10]。外泌体不仅是 miRNA 的中转站，同时也是 miRNA 的加工厂，通过人为干预外泌体 miRNA 的表达，例如基因编辑的方式，改变外泌体的靶向作用，具有潜在的临床价值[11]。

（2）蛋白质 通过对蛋白质组学的研究，人们发现外泌体不仅包含依赖于分泌细胞类型的蛋白质，还有部分参与基本的细胞过程，例如细胞粘附，细胞膜之间的融合，代谢和神经信号传导等[12]。外泌体中特征性的蛋白（例如 CD63，CD9，CD81 等）对于外泌体与受体细胞靶向结合至关重要的。除此以外，热休克蛋白 HSP70、HSP90，肿瘤易感基因 TSG101 等也与外泌体生物学行为密切相关[13]。

2.外泌体调控心脏成纤维细胞

2.1 心脏成纤维细胞的功能

心脏成纤维细胞是心脏间质中占比最多的细胞，约占细胞总数的 60-70%，是细胞外基质的重要来源，为心脏完整性和功能稳态发挥着重要作用[14]。传统观念对心脏成纤维细胞的认识局限于细胞外基质的合成和降解。而随着研究手段的不断创新，人们对心脏成纤维细胞的认识不断深入，逐渐发现成纤维细胞间具有很大的异质性[15, 16]，不同亚群的细胞具有不同的功能。例如成纤维可以产生细胞因子调控内皮细胞、心肌细胞[17]，部分成纤维细胞亚群具有类似巨噬细胞功能，促进炎症[18]，甚至经过重编程可以转化为心肌细胞等[19]。

2.2 不同外泌体对心脏成纤维细胞的影响

（1）心肌细胞来源外泌体 心肌细胞和心脏成纤维细胞间有着紧密的联系，外泌体在心肌-心脏成纤维细胞信号传递中起着关键的作用[20]。在对体外培养的心脏成纤维细胞进行心肌来源的外泌体刺激后的测序结果中，心脏成纤维细胞基因转录水平发生显著改变，其中 158 个基因下调另外有 175 个基因上调[21]。一些心肌细胞来源的外泌体 miRNAs 已被证明可以促进成纤维细胞的活化和纤维化。例如在急性心梗动物模型中，miR-208a 在心肌细胞中的表达升高。在血管紧张素 II 或缺氧处理后，体外从心肌细胞分离的外泌体中该 miRNA 的表达也

中国知网 https://www.cnki.net

增加。用富含 mir-208a 的外泌体孵育心脏成纤维细胞可促进成纤维细胞的增殖、活化和胶原蛋白的产生[22]。在心衰模型中，人们发现心肌细胞外泌体中高表达的 miRNA: miR-29b 和 miR-455 可以抑制心脏成纤维细胞基质金属蛋白酶 9 的表达进而促进纤维化[23]。除此之外，进行了 miRNA 编辑的心肌细胞来源外泌体，可以通过抑制心脏成纤维细胞活化起到防止梗死后心脏纤维化的作用[24]。

（2）心脏内皮细胞来源外泌体 心脏内皮细胞可以通过内皮-间质转化及旁分泌信号途径调控心脏基质的纤维化。内皮细胞与心脏成纤维细胞之间的信号传导依赖于细胞间的分子通讯和功能蛋白的交换，对于维持心脏功能并保护血管完整性中起着至关重要的作用。同样，内皮细胞外泌体还可以通过介导 miRNA 与蛋白在促血管生成、抗炎及抑制冠脉硬化中发挥重要作用，是调节机体炎症和免疫状态的重要介质。VAN BALKOM 等的研究发现内皮细胞外泌体内容物 miR-214 在外泌体介导的信号传导中起主导作用[25]。通过释放含有 miR-214 的外泌体，内皮细胞可以抑制临近靶细胞中毛细血管的扩张来调节细胞迁移，从而刺激血管的生成。Zhan 等的研究还发现了一种由高半胱氨酸和氧化低密度脂蛋白诱导的内皮细胞来源外泌体释放 HSP70 的机制，内皮细胞来源外泌体激活单核细胞与内皮细胞的黏附并诱导 HSP70 高表达，从而促进血管生成，这也为调节血管内皮功能完整性与血管新生提供一种新的旁分泌机制[26]。

（3）心脏前体细胞来源外泌体 心脏前体细胞，也被称为心脏祖细胞，是介于干细胞和成熟细胞之间，在彻底分化之前的中间细胞。心脏祖细胞来源外泌体通过调节 miRNA 及蛋白或靶基因的表达，可以修复受损心肌与抑制心肌细胞凋亡。现已发现心脏祖细胞中高表达的 miRNA 例如 miR-132、miR-210、miR-21、miR-17 等均在心脏疾病中发挥保护作用[27, 28]。而 Grigorian 等的研究更是发现，心内注射新生鼠心球衍生细胞来源的外泌体，不仅延长了老年鼠的端粒长度，还逆转了心肌重构，改善了心功能，增加了活动能力。并且，老年人心脏祖细胞体外给予年轻人心球衍生细胞来源的外泌体后，心脏细胞的端粒长度延长，衰老的细胞减少[29]。

中国知网 https://www.cnki.net

（4）血小板来源外泌体 血小板来源外泌体含有多种 miRNA、蛋白质、血小板生长因子、凝血因子及其他细胞因子，可以参与炎症、血栓形成、动脉硬化性心脏病等病理生理过程。研究发现，富含 miR-223 的血小板来源外泌体具有抑制炎症并保护心脏的作用，可以通过抑制细胞黏附分子-1、白介素-6、肿瘤坏死因子 α 等促炎因子的释放[30]，并对减少动脉粥样硬化斑块形成并预防缺血性心脏微血管内皮细胞迁移和增殖有一定的作用[31]。同时血小板来源的还可以通过激活转录共激活蛋白 YAP，促进成纤维细胞增殖和迁移，增加胶原合成，促进梗死后的愈合[32]。

（5）血清来源外泌体 血清中的外泌体 miRNAs 已被评估为多种疾病的潜在生物标志物，其中就包括纤维化。在一项研究中，血清来源的外泌体 miRNAs 能够区分慢性血吸虫感染导致的肝纤维化[33]。在患者与健康个体的对比中 miR-146a-5p 在不同程度的纤维化患者中变化最为显著。最近的研究评估了血清来源的外泌体 miRNAs 在成纤维细胞表型和基因表达的病理调节中的潜在功能作用。从充血性心力衰竭患者的血清中分离出的外泌体富含 miR-320a[22]，该 miRNA 的水平与心力衰竭进展的功能和分子生物标志物密切相关。用 miR-320a 模拟物转染 HEH2 心肌成纤维细胞系可增强成纤维细胞的增殖、激活 α-平滑肌肌动蛋白的表达和胶原蛋白的产生。

（6）间充质干细胞来源外泌体 间充质干细胞是一种具有长期自我更新能力的多能基质前体细胞，在多种组织中普遍存在，并且拥有向各种细胞类型分化的潜力[34]。间充质干细胞外泌体多次被证明在多种疾病治疗中拥有巨大潜力，尤其对于老化的研究中更是占有重要的角色。Lehmann 等早就发 DNA 损伤或端粒消耗导致的衰老能够影响外泌体的释放，来自年轻人的外泌体能通过抑制 miRNA34a 的表达逆转多柔比星诱导的心肌细胞衰老[35]。动物实验也证实，人脐带间充质干细胞来源的外泌体通过 lncRNA MALAT1/NF-κB/TNF-α 信号通路抗心肌老化，进而延缓老化引起的心功能下降[35]。通过对骨髓间充质干细胞高表达 miRNA-486-5p，富集外泌体刺激心脏成纤维细胞后，研究人员发现其具有

中国知网 https://www.cnki.net

抑制炎症，改善梗死后心功能。

（7）脂肪来源外泌体 脂肪细胞产生的外泌体可以被脂肪组织中的免疫细胞摄取，其内容物三酰甘油在巨噬细胞的分解下转化为脂肪酸并被释放，以被用来达到维持机体全身代谢稳态。当机体发生肥胖，特别是内脏脂肪增加时，代谢稳态被打破，过多的脂肪外泌体促使巨噬细胞活化、增加炎症因子释放进而引起全身胰岛素抵抗[36]，同时显著提升包括动脉粥样硬化在内的各种心血管疾病的发病率。最新的一项研究利用高通量测序展示了小鼠内脏脂肪外泌体的 miRNA 图谱，并验证了肥胖可以通过脂肪外泌体内容物 miR-27b-3p 抑制 PPARα 促进内皮炎症和促进动脉粥样硬化的形成[37]，揭示了肥胖症加重动脉粥样硬化的途径，提出了干预肥胖患者动脉粥样硬化的治疗策略。

3.心脏成纤维细胞产生的外泌体

心脏成纤维细胞在心脏中起重要的旁分泌作用，可以通过外泌体来完成和其他心脏细胞间的信息交流[38]。成纤维细胞分泌的外泌体对于心脏有着双刃剑的作用，既能保护缺血心肌细胞改善心功能，又能诱导心肌细胞肥大促进心脏重塑[39]。在缺氧条件下，心脏成纤维细胞外泌体可以通过内容物 miR-423-3p 调控 RAS 通路，减少心脏纤维化并抑制心肌细胞凋亡[40]。而 Bang 等人发现，成纤维细胞能够有选择性的分泌富含 miRNA-21-3p 的外泌体，这些外泌体可以作用于心肌细胞的 SORBS2 和 PDLIM5 靶点促进心肌细胞肥大[41]。此外，还有研究发现，心脏成纤维细胞分泌的外泌体可以促进自身心肌成纤维细胞向心肌细胞分化，这对于心肌的损伤修复和生理性再生可能具有重要意义[42]。心脏成纤维细胞来源的外泌体是近年来研究心血管疾病的热点方向，虽然许多研究成果都尚未进一步明确具体机制，但这是提示我们成纤维细胞外泌体对于心脏并不是单方面的正向作用或者负面效应，为我们研究外泌体与心衰发生发展机制的关联性提供了不同的思路。

中国知网 https://www.cnki.net

4. 外泌体的临床应用

外泌体疗法是一项前沿的临床治疗手段，指通过改装外泌体内容物，增加或丰富生物活性分子，起到临床治疗意义。外泌体具有脂质双分子层结构，有效的保护了内在成分并降低了免疫原性，使其能够拥有进入常规药物难以进入的区域并发挥治疗作用，例如血脑屏障等[43]。同时由于其表面分子的靶向性，外泌体可以直接对某一细胞或组织进行调控，这使外泌体拥有了成为新型治疗药物的潜力[4, 44]。目前改装外泌体主要分为两种方式：其一是通过对外泌体供体细胞进行处理，例如对目的核酸过表达或干涉来获得需要的外泌体[45]。另一种方法则是通过电穿孔等方式直接对外泌体进行编程重组[46]。两种方式都在不断探索和实践中，在未来临床应用中有着光明的前景。

通过处理外泌体供体细胞，产生装载特定的 miRNA 的外泌体来治疗相关疾病已有许多文献报导。例如 miRNA-124a 被认为对胶质母细胞瘤有潜在治疗作用，研究人员通过慢病毒转染的方式对间充质干细胞高表达这种 miRNA[47]。而这些间充质干细胞产生的外泌体有效的降低了体外胶质母细胞瘤细胞的活力，提高了胶质母细胞瘤小鼠的存活率。类似的研究还包括，通过对骨髓间充质干细胞通过脂质体转染高表达 miR-338[4]。用产生的外泌体处理 H9c2 心肌细胞可减少暴露于过氧化氢后的凋亡。此外，在大鼠心肌梗死模型中来自高表达了 miR-146 脂肪祖细胞来源的外泌体，显著减少了大鼠心肌梗死诱导的炎症和纤维化[48]。外泌体对药物传递的另一个优点是它们能够同时运输多种生物分子，在一项对化疗化合物 5-氟尿嘧啶耐药的癌细胞的研究中。通过电穿孔同时将 miR-21 和 5-FU 抑制剂装载于外泌体中给药，与单独药物治疗相比，小鼠模型中 5-FU 耐药性和抑制癌症生长显著降低[49]。

由于外泌体需要进入循环发挥作用，因此其通常在肝脏和脾脏大量富集，而在心脏或其他器官的积累较少。目前的研究希望能通过编辑外泌体膜分子结构来提高外泌体的细胞特异性和靶向性。这一研究进展将增强外泌体全身传递效率，同时减少脱靶效应，并有可能降低治疗所需的外泌体的有效剂量。与改

中国知网 https://www.cnki.net

造外泌体内容物类似，调节外泌体表面既可以借助细胞也可以通过直接编辑来完成。增强外泌体靶向的方法包括结合表面靶向肽、抗体、受体蛋白或信号分子等[50]。例如将一种叫做缺血心肌靶向肽的多肽植入外泌体膜，使 H9C2 心肌细胞对其摄取增强，增加心梗后梗死区域外泌体的富集，起到并减少炎症、凋亡和纤维化的作用[51]。此外还有使用磁性纳米颗粒将心肌梗死后的外泌体从血循环吸引到受损心肌，在磁场的作用下，纳米颗粒被招募到损伤的心肌中，外泌体被释放帮助导致梗死面积缩小，改善心室功能[45]。

5. 总结与展望

外泌体在心血管疾病的发生发展中发挥着重要的作用，其作为信号传递的工具参与调节细胞间的各种功能行为、疾病发生以及细胞间通讯。不同细胞来源外泌体可通过其 miRNA 调控心脏成纤维细胞进而影响心功能。例如心肌细胞、内皮细胞等来源外泌体通过在抑制心肌纤维化、抑制炎症因子表达方面的突出作用，起到心脏保护效应。此外，心脏成纤维细胞自身产生的外泌体与心肌细胞、内皮细胞等之间的通讯作用也为我们对心脏稳态运行的维持有了更全面的了解。目前的研究已经展示了外泌体在治疗心肌梗死、心力衰竭等疾病诊治中的前景，随着外泌体内容物研究及基因编辑技术的不断推进，其有望成为既经典的药物治疗之外，新的诊疗标志物及靶向治疗药物投入临床使用。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] LIVSHITS M A, KHOMYAKOVA E, EVTUSHENKO E G, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol [J]. Sci Rep, 2015, 5: 17319.

[2] CHAIROUNGDUA A, SMITH D L, POCHARD P, et al. Exosome release of β-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling [J]. The Journal of cell biology, 2010, 190(6): 1079-91.

[3] SANTANGELO L, GIURATO G, CICCHINI C, et al. The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting [J]. Cell reports, 2016, 17(3): 799-808.

[4] VAN NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. Nature reviews Molecular cell biology, 2018, 19(4): 213-28.

[5] TAYLOR D D, GERCEL-TAYLOR C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer [J]. Gynecologic oncology, 2008, 110(1): 13-21.

[6] HEDLUND M, NAGAEVA O, KARGL D, et al. Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16899.

[7] CAO Q, GUO Z, YAN Y, et al. Exosomal long noncoding RNAs in aging and age-related diseases [J]. IUBMB life, 2019, 71(12): 1846-56.

[8] VALADI H, EKSTR M K, BOSSIOS A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. Nature cell biology, 2007, 9(6): 654-9.

[9] ZHANG W, MURPHY C, SIEBURTH L E. Conserved RNaseII domain

中国知网 https://www.cnki.net

protein functions in cytoplasmic mRNA decay and suppresses Arabidopsis decapping mutant phenotypes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(36): 15981-5.

[10] SMITH-VIKOS T, SLACK F J. MicroRNAs and their roles in aging [J]. Journal of cell science, 2012, 125(Pt 1): 7-17.

[11] GARCIA-MARTIN R, WANG G, BRAND O B B, et al. MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention [J]. Nature, 2022, 601(7893): 446-51.

[12] FERGUSON S W, NGUYEN J. Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity [J]. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2016, 228: 179-90.

[13] SCHNEIDER A, SIMONS M. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders [J]. Cell and tissue research, 2013, 352(1): 33-47.

[14] FURTADO M B, NIM H T, BOYD S E, et al. View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration [J]. Development (Cambridge, England), 2016, 143(3): 387-97.

[15] VIDAL R, WAGNER J U G, BRAEUNING C, et al. Transcriptional heterogeneity of fibroblasts is a hallmark of the aging heart [J]. JCI insight, 2019, 4(22).

[16] TALLQUIST M D, MOLKENTIN J D. Redefining the identity of cardiac fibroblasts [J]. Nature reviews Cardiology, 2017, 14(8): 484-91.

[17] FLEENOR B S, MARSHALL K D, RIPPE C, et al. Replicative aging induces endothelial to mesenchymal transition in human aortic endothelial cells: potential role of inflammation [J]. Journal of vascular research, 2012, 49(1):

中国知网 https://www.cnki.net

59-64.

[18] CIESLIK K A, TRIAL J, ENTMAN M L. Mesenchymal stem cell-derived inflammatory fibroblasts promote monocyte transition into myeloid fibroblasts via an IL-6-dependent mechanism in the aging mouse heart [J]. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2015, 29(8): 3160-70.

[19] ZHOU Y, LIU Z, WELCH J D, et al. Single-Cell Transcriptomic Analyses of Cell Fate Transitions during Human Cardiac Reprogramming [J]. Cell stem cell, 2019, 25(1): 149-64.e9.

[20] FUJIU K, NAGAI R. Fibroblast-mediated pathways in cardiac hypertrophy [J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2014, 70: 64-73.

[21] CHATURVEDI P, KALANI A, MEDINA I, et al. Cardiosome mediated regulation of MMP9 in diabetic heart: role of mir29b and mir455 in exercise [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2015, 19(9): 2153-61.

[22] YANG J, YU X, XUE F, et al. Exosomes derived from cardiomyocytes promote cardiac fibrosis via myocyte-fibroblast cross-talk [J]. American journal of translational research, 2018, 10(12): 4350-66.

[23] CHEN L C, SHIBU M A, LIU C J, et al. ERK1/2 mediates the lipopolysaccharide-induced upregulation of FGF-2, uPA, MMP-2, MMP-9 and cellular migration in cardiac fibroblasts [J]. Chemico-biological interactions, 2019, 306: 62-9.

[24] WANG L, ZHANG J. Exosomal lncRNA AK139128 Derived from Hypoxic Cardiomyocytes Promotes Apoptosis and Inhibits Cell Proliferation in Cardiac Fibroblasts [J]. International journal of nanomedicine, 2020, 15: 3363-76.

[25] VAN BALKOM B W, DE JONG O G, SMITS M, et al. Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce

中国知网 https://www.cnki.net

angiogenesis in human and mouse endothelial cells [J]. Blood, 2013, 121(19): 3997-4006, s1-15.

[26] ZHAN R, LENG X, LIU X, et al. Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-classical pathway involving exosomes [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2009, 387(2): 229-33.

[27] WANG L, JIA Q, XINNONG C, et al. Role of cardiac progenitor cell-derived exosome-mediated microRNA-210 in cardiovascular disease [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2019, 23(11): 7124-31.

[28] 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]. Cardiovascular research, 2014, 103(4): 530-41.

[29] GRIGORIAN-SHAMAGIAN L, LIU W, FEREYDOONI S, et al. Cardiac and systemic rejuvenation after cardiosphere-derived cell therapy in senescent rats [J]. European heart journal, 2017, 38(39): 2957-67.

[30] LI J, TAN M, XIANG Q, et al. Thrombin-activated platelet-derived exosomes regulate endothelial cell expression of ICAM-1 via microRNA-223 during the thrombosis-inflammation response [J]. Thrombosis research, 2017, 154: 96-105.

[31] SUN Y, LIU X L, ZHANG D, et al. Platelet-Derived Exosomes Affect the Proliferation and Migration of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Via miR-126 [J]. Current vascular pharmacology, 2019, 17(4): 379-87.

[32] GUO S C, TAO S C, YIN W J, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma promote the re-epithelization of chronic cutaneous wounds via activation of YAP in a diabetic rat model [J]. Theranostics, 2017, 7(1): 81-96.

[33] CAI P, MU Y, OLVEDA R M, et al. Serum Exosomal miRNAs for Grading

中国知网 https://www.cnki.net

Hepatic Fibrosis Due to Schistosomiasis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(10).

[34] BEI Y, DAS S, RODOSTHENOUS R S, et al. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Theranostics [J]. Theranostics, 2017, 7(17): 4168-82.

[35] LIU Y, LIU Z, XIE Y, et al. Serum Extracellular Vesicles Retard H9C2 Cell Senescence by Suppressing miR-34a Expression [J]. Journal of cardiovascular translational research, 2019, 12(1): 45-50.

[36] FLAHERTY S E, 3RD, GRIJALVA A, XU X, et al. A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes [J]. Science (New York, NY), 2019, 363(6430): 989-93.

[37] TANG Y, YANG L J, LIU H, et al. Exosomal miR-27b-3p secreted by visceral adipocytes contributes to endothelial inflammation and atherogenesis [J]. Cell reports, 2023, 42(1): 111948.

[38] RANJAN P, KUMARI R, VERMA S K. Cardiac Fibroblasts and Cardiac Fibrosis: Precise Role of Exosomes [J]. Frontiers in cell and developmental biology, 2019, 7: 318.

[39] JIANG W, XIONG Y, LI X, et al. Cardiac Fibrosis: Cellular Effectors, Molecular Pathways, and Exosomal Roles [J]. Frontiers in cardiovascular medicine, 2021, 8: 715258.

[40] LUO H, LI X, LI T, et al. microRNA-423-3p exosomes derived from cardiac fibroblasts mediates the cardioprotective effects of ischaemic post-conditioning [J]. Cardiovascular research, 2019, 115(7): 1189-204.

[41] BANG C, BATKAI S, DANGWAL S, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy [J]. The Journal of clinical investigation, 2014, 124(5): 2136-46.

[42] YAPING X U, GUOTIAN Y, DANDAN J, et al. Fibroblast-derived exosomal miRNA-133 promotes cardiomyocyte-like differentiation [J]. Acta

中国知网 https://www.cnki.net

histochemica, 2022, 124(6): 151931.

[43] JANSEN F, LI Q, PFEIFER A, et al. Endothelial- and Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Regulation of Cardiovascular Health and Disease [J]. JACC Basic to translational science, 2017, 2(6): 790-807.

[44] BUNGGULAWA E J, WANG W, YIN T, et al. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems [J]. Journal of nanobiotechnology, 2018, 16(1): 81.

[45] LIU S, CHEN X, BAO L, et al. Treatment of infarcted heart tissue via the capture and local delivery of circulating exosomes through antibody-conjugated magnetic nanoparticles [J]. Nature biomedical engineering, 2020, 4(11): 1063-75.

[46] SHAO H, IM H, CASTRO C M, et al. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles [J]. Chemical reviews, 2018, 118(4): 1917-50.

[47] LANG F M, HOSSAIN A, GUMIN J, et al. Mesenchymal stem cells as natural biofactories for exosomes carrying miR-124a in the treatment of gliomas [J]. Neuro-oncology, 2018, 20(3): 380-90.

[48] PAN J, ALIMUJIANG M, CHEN Q, et al. Exosomes derived from miR-146a-modified adipose-derived stem cells attenuate acute myocardial infarction-induced myocardial damage via downregulation of early growth response factor 1 [J]. Journal of cellular biochemistry, 2019, 120(3): 4433-43.

[49] LIANG G, ZHU Y, ALI D J, et al. Engineered exosomes for targeted co-delivery of miR-21 inhibitor and chemotherapeutics to reverse drug resistance in colon cancer [J]. Journal of nanobiotechnology, 2020, 18(1): 10.

[50] WANG X, CHEN Y, ZHAO Z, et al. Engineered Exosomes With Ischemic Myocardium-Targeting Peptide for Targeted Therapy in Myocardial Infarction [J]. Journal of the American Heart Association, 2018, 7(15): e008737.

中国知网 https://www.cnki.net

[51] SUN X, CHEN H, GAO R, et al. Intravenous Transplantation of an Ischemic-specific Peptide-TPP-mitochondrial Compound Alleviates Myocardial Ischemic Reperfusion Injury [J]. ACS nano, 2023, 17(2): 896-909.

中国知网 https://www.cnki.net