·论著·

单核巨噬细胞膜修饰 iPSC-CM 来源外泌体靶向修复损伤心脏的实验研究

钟剑锋,王杰鑫,李上海,郑重洲,莫少门

(广东医科大学附属医院心内科,广东 湛江 524001)

摘要:目的 利用单核巨噬细胞膜修饰人多潜能干细胞诱导心肌细胞(iPSC-CMs)来源的外泌体并探讨其心肌修复作用。**方法** 使用高速离心法提取 iPSC-CMs 来源的外泌体,试剂盒提取单核巨噬细胞膜。采用脂质体挤出器融合外泌体和细胞膜,Western blot、透射电镜和纳米颗粒分析仪评价膜融合效果。采用 CCK-8 试验检测细胞活力,建立小鼠心肌梗死模型,隔天静脉注射 M-iCM-EXs (1011 个 EXs/kg)3 次;6 h 后采用小动物活体光学成像系统评价 M-iCM-EXs 对损伤心脏的靶向性;28 d 后采用 Masson 三色染色评估 M-iCM-EXs 治疗对心肌梗死后心室重构的作用和心动超声图评价 M-iCM-EXs 治疗后对的心功能变化。**结果** CCK-8 试验证实 M-iCM-EXs 可提高 OGD 后细胞活力;小动物活体光学成像系统证实 M-iCM-EXs 对损伤心脏具有靶向性;Masson 染色和心动超声图证实 M-iCM-EXs 治疗后能抑制小鼠心肌梗死后的心室重塑。**结论** 单核巨噬细胞膜修饰 iPSC-CM 来源的外泌体具有靶向损伤心肌的能力,能更有效修复损伤心脏。

关键词:心肌梗死;iPSC-CMs;外泌体;靶向治疗

中图分类号:R541.4;R459.9 **文献标识码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.1006-1959.2023.17.014

文章编号:11006-1959(2023)17-0076-07

Experimental Study on Targeted Repair of Injured Heart by iPSC-CM-derived Exosomes Modified by Monocyte-macrophage Membrane

ZHONG Jian-feng,WANG Jie-xin,LI Shang-hai,ZHENG Chong-zhou,MO Shao-men

(Department of Cardiology,Affiliated Hospital of Guangdong Medical University,Zhanjiang 524001,Guangdong,China)

Abstract:Objective To study and explore its myocardial repair effect.**Methods** The exosomes derived from iPSC-CMs were extracted by high-speed centrifugation, and the mononuclear macrophage membrane was extracted by the kit. The exosomes and cell membranes were fused by liposome extruder, and the membrane fusion effect was evaluated by Western blot, transmission electron microscopy and nanoparticle analyzer. CCK-8 assay was used to detect cell viability, and a mouse model of myocardial infarction was established. M-iCM-EXs (1011 EXs/kg) was intravenously injected every other day for 3 times. After 6 h, the targeting of M-iCM-EXs to injured heart was evaluated by small animal in vivo optical imaging system. After 28 days, Masson trichrome staining was used to evaluate the effect of M-iCM-EXs treatment on ventricular remodeling after myocardial infarction and echocardiography was used to evaluate the changes of cardiac function after M-iCM-EXs treatment.**Results** CCK-8 assay confirmed that M-iCM-EXs could improve cell viability after OGD. Small animal imaging technology confirmed the targeting of M-iCM-EXs to ischemic myocardial tissue. Masson trichrome staining test and echocardiography confirmed that M-iCM-EXs treatment could inhibit ventricular remodeling and improve cardiac function after MI in mice.**Conclusion** The iPSC-CMs-derived exosomes modified by monocyte-macrophage membrane have the ability to target damaged myocardium and can repair damaged heart more effectively.

Key words: Myocardial infarction;iPSC-CMs;Exosomes;Targeted therapy

心肌梗死(myocardial infarction,MI)是全世界范围内主要死亡原因之一[1]。目前,诱导多功能干细胞分化的心肌细胞 (induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes,iPSC-CMs) 衍生的外泌体(exosomes,EXs)已被证实在梗死后的心脏修复和心肌再生中有效[2,3]。然而,iPSC-CM EXs(iCM-EXs)静

基金项目:1.广东省医学科研基金项目(编号:A2021347);2.广东省中医药局科研项目(编号:20201184)

作者简介:钟剑锋(1986.2-),男,广东湛江人,硕士,主治医师,主要从事心脏电生理及射频消融研究

通讯作者:莫少门(1992.12-),男,广东揭阳人,硕士,主治医师,主要从事心脏电生理及射频消融研究

脉注射后的归巢效率低和治疗量低是限制它们进一步临床应用的主要障碍[4]。近年来研究发现[5],利用单核巨噬细胞膜修饰外泌体逃逸单核巨噬细胞系统(mononuclear phagocyte system,MPS)是一种提高 iCM-EXs 对缺血损伤心肌的传递效率的高效靶向治疗心肌损伤策略。MI 虽然作为无菌性炎症,但同样会刺激骨髓储备池募集大量炎症单核细胞[6]。在 MI 后 30 min,炎症单核细胞会大量招募至损伤的心肌区域,24~72 h 达到峰值,被招募到损伤区域的单核细胞继而分化为心脏巨噬细胞,并在吞噬细胞碎片以及心肌修复中发挥重要的作用[7,8]。本研究旨在验证单核巨噬细胞膜修饰的 iCM-EXs(M-iCM-EXs)通过单核巨噬细胞膜与缺血损伤的内皮细胞和心肌细胞之间的相互作用,增强其在损伤心脏中的归巢和滞留能力,旨在提高心肌修复作用,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 30 只雄性 C57BL/6 小鼠,购自广东省医学实验动物中[SYXK(Y 粤)2019-0215]。所有动物实验均已获得广东医科大学动物实验伦理委员会批准(批准编号:GDY2102321)。

1.1.2 主要试剂和仪器 PSCeasy® Ⅱ人多潜能干细胞培养基、CardioEasy® 人心肌分化试剂盒以及 CardioEasy®人心肌细胞维持培养基购自北京赛贝生物技术有限公司;细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Cell Counting Kit-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;RiboTM Exosome Isolation Reagent 购自广州锐博生物科技有限公司;Masson 三色染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 iPSC-CMs 的诱导及鉴定 iPSC-CMs 诱导步骤参考于北京赛贝生物有限公司 CardioEasy®人心肌分化试剂盒说明书。待纯化后纯度≥90%的 iPSC-CMs 后,利用免疫荧光的方法检测 iPSC-CMs 的特异性基因 α-横纹肌肌动蛋白(α-Sarcomeric Alpha Actinin)和肌钙蛋白 T(cTnT)的表达。

1.2.2 iCM-EXs 的提取及鉴定 将收集得到的 iPSC-CMs 上清液以 300 g 离心 10 min 和 3000 g 离心 20 min 以去除细胞细胞碎片,然后通过 0.22 μm 过滤器进行过滤以进一步清除细胞碎片。接着,100 000 g 超离 1 h 以纯化 iCM-EXs,PBS 洗涤沉淀后再次超离。得到的外泌体用 PBS 重悬,-80 ℃保存。iCM-EXs 经 Western blot、透射电镜(TEM)和纳米颗粒分析仪(NTA)鉴定。

1.2.3 单核巨噬细胞膜融合 iCM-EXs 单核巨噬细胞膜蛋白从 RAW264.7 细胞提取得到,具体步骤如下:用含有 EDTA(不含胰酶)的消化液处理细胞,收集细胞并离心,离心后弃上清取细胞沉淀;在细胞沉淀中加入 PMSF 的膜蛋白抽提试剂 A,混合后冰浴 15 min;把混合液转移到预冷的玻璃匀浆器中,匀浆约 50 下;接着,4 ℃,14 000 g 离心 10 s,取上清;后加入膜蛋白抽提试剂 B,混合后冰浴 10 min;随后,4 ℃,14 000 g 离心 5 min,收集上清即为细胞膜蛋白溶液。将得到细胞膜蛋白溶液与外泌体以 1∶1 等比例进行混合,应用脂质体挤出器分别通过 0.2 μm 和 0.1 μm 聚碳酸酯膜,继而形成 M-iCM-EXs。

1.2.4 细胞活力检测 将原代心肌细胞种到 96 孔板中,细胞分为 3 组:OGD 组、OGD+iCM-EXs 组、OGD+M-iCM-EXs 组。首先将 iCM-EXs 和 M-iCM-EXs 分别与心肌细胞共孵育 48 h,接着构建 OGD 模型(0%FBS、1%O_2)6 h。待模型结束后,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μl。37 ℃避光孵育 1 h 后,在酶标仪 450 nm 处测定吸光度。

1.2.5 小鼠心梗模型构建 将 1%的戊巴比妥钠以 50 mg/kg 的剂量进行小鼠腹腔注射诱导麻醉,动物随机分为 3 组:心梗组、心梗+iCM-EXs 治疗组、心梗+M-iCM-EXs 治疗组。小鼠采取左侧第四肋间依次切开皮肤和肌肉暴露心脏,用 8-0 的丝线永久结扎冠脉的左前降支,可见心尖处变白,即心梗模型构建成功。

1.2.6 小动物活体光学成像系统体内示踪 iCMs-EXs 为了追踪体内外泌体的分布,利用 PKH-26(Sigma)标记了 iCM-EXs 和 M-iCM-EXs。然后,将心肌梗死小鼠随机分为两组,通过静脉注射标记好的 iCM-EXs 和 M-iCM-EXs(1011 EXs/kg)。注射 3 d 后,用小动物活体光学成像系统(IVIS Specturm)摄取体外图像。

医学信息

1.2.7 Masson 三色染色 在 iCM-EXs 和 M-iCM-EXs 治疗后 4 周,将小鼠处死,取出心脏制作石蜡切片。Masson 染色的详细步骤参考于北京索莱宝科技有限公司的 Masson 三色染色试剂盒的说明书。

1.2.8 心脏超声 在 iCM-EXs 和 M-iCM-EXs 治疗后 4 周,通过经胸超声心动图(FUJIFILM Visual Sonics,加拿大)评估心功能。计算射血分数(ejection fraction,EF)、缩短分数(fractional shortening,FS)、左室舒张末期内径(left ventricular internal diastolic dimension,LVIDd)和左室收缩末期内径(left ventricular internal systolic dimension,LVISd)。

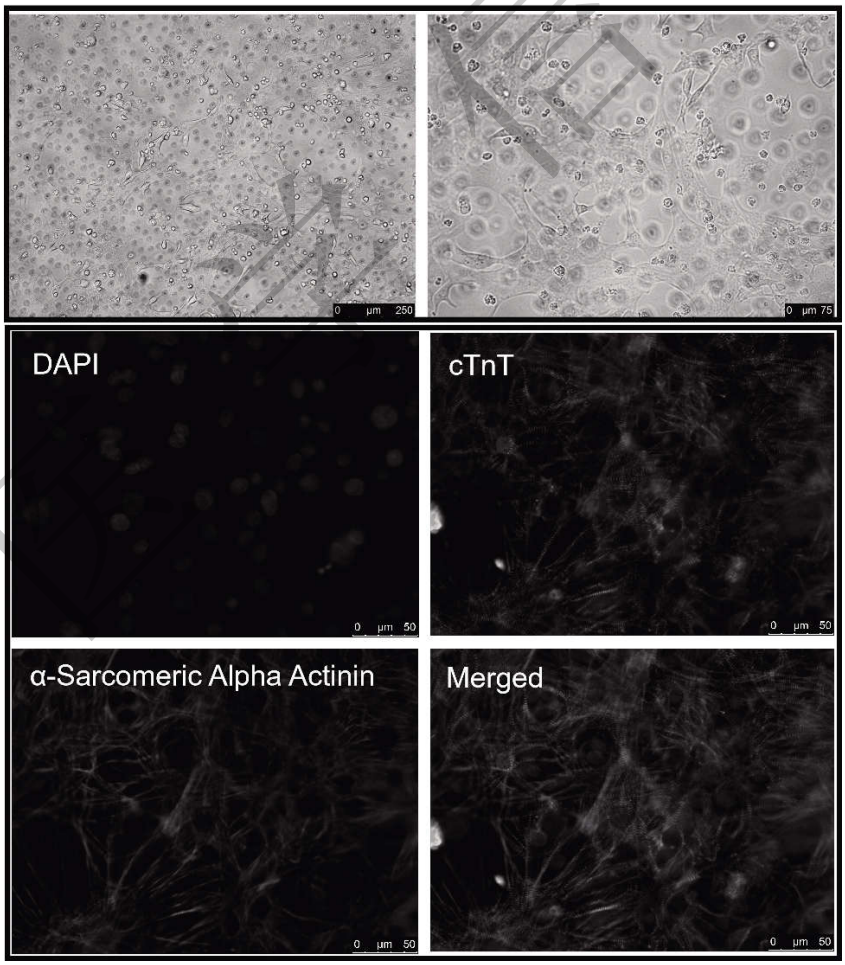
1.3 统计学方法 使用 GraphPad Prism 9.4.0 软件(GraphPad-Software Inc,美国)进行数统计分析。两组间使用 t 检验分析,三组或三组以上使用单因素方差分析(ANOVA)分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 诱导和纯化后 iPSC-CMs 的鉴定 光镜下 iPSCs 诱导纯化后的心肌细胞,见图 1A;免疫荧光鉴定 iPSC-CMs 特异性基因:α-横纹肌肌动蛋白和肌钙蛋白 T,见图 1B。

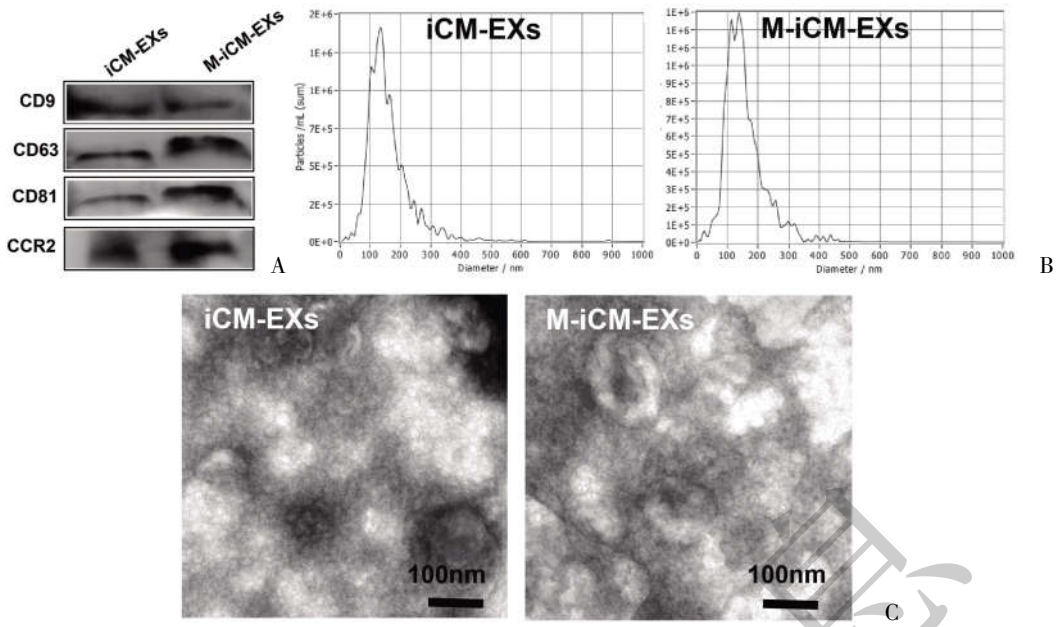
2.2 iCM-EXs 和 M-iCM-EXs 的鉴定 Western blot 验证外泌体特异性标记蛋白(CD9、CD63 和 CD81)和单核细胞膜上典型的标记蛋白 CCR2,见图 2A。NTA 检测 M-iCM-EXs 粒径在 100~200 nm,见图 2B。TEM 观察 M-iCM-EXs 囊泡形态,见图 2C。

2.3 M-iCM-EXs 可增加氧糖剥夺后心肌细胞活力 与 OGD 组和 iCM-EXs 组比较,iCM-EXs 处理组能增加细胞活力,表现出更佳的心肌保护作用,见图 3。



注:A:光镜下跳动的 iPSC-CMs(Bar=250 μm/75 μm);B:纯化后的 iPSC-CMs 的 α-Sarcomeric Alpha Actinin 和 cTnT 的免疫荧光图(Bar=50 μm)

图 1 iPSC-CMs 的鉴定



注:A:Western blot 验证 iCM-EXs 和 M-iCM-EXs 标记蛋白;B:NTA 检测 iCM-EXs 和 M-iCM-EXs 的粒径大小;C:TEM 观察 iCM-EXs 和 M-iCM-EXs 的形态

图 2 M-iCM-EXs 的鉴定

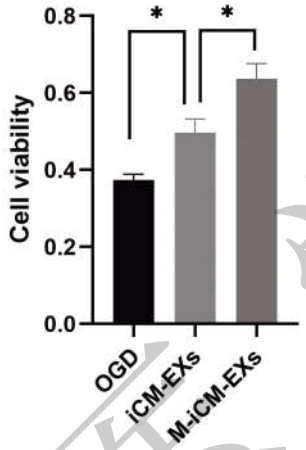


图 3 各组细胞活力的比较($^*P$<0.05)

2.4 小动物活体光学成像系统体内示踪 iCM-EXs 心梗小鼠静脉注射 iCM-EXs 和 M-iCM-EXs 6 h 后进行体内成像(IVIS)结果显示,与 iCM-EXs 比较,M-iCM-EXs 在损伤心脏中积累较多,具有靶向梗死心脏的能力,见图 4。

2.5 M-iCM-EXs 治疗对心梗后心室重构的影响 与 MI 组比较,单独 iCM-EXs 治疗可有效减少左室梗死面积(P<0.05),但相对瘢痕厚度比较,差异无统计学意义(P>0.05)。与 iCM-EXs 治疗的小鼠比较,静脉注射 M-iCM-EXs 治疗的小鼠梗死面积和瘢痕厚度更小,差异有统计学意义(P<0.05),见图 5。

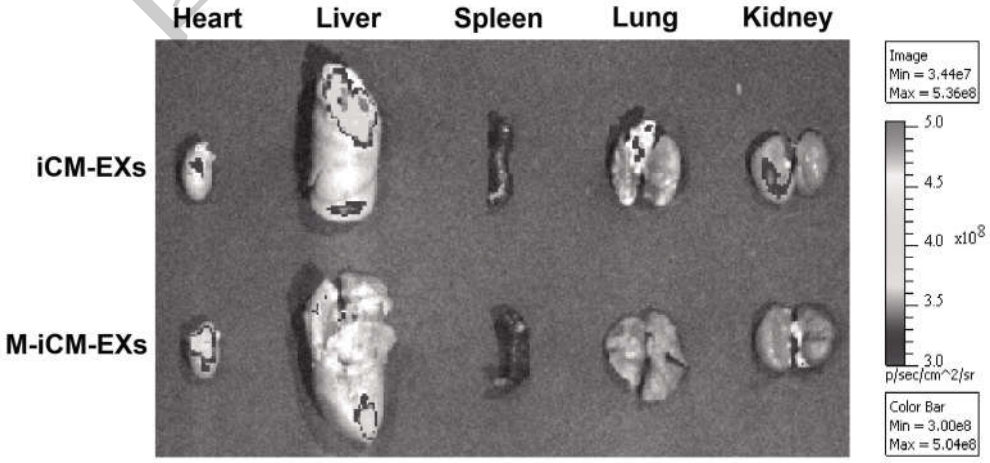
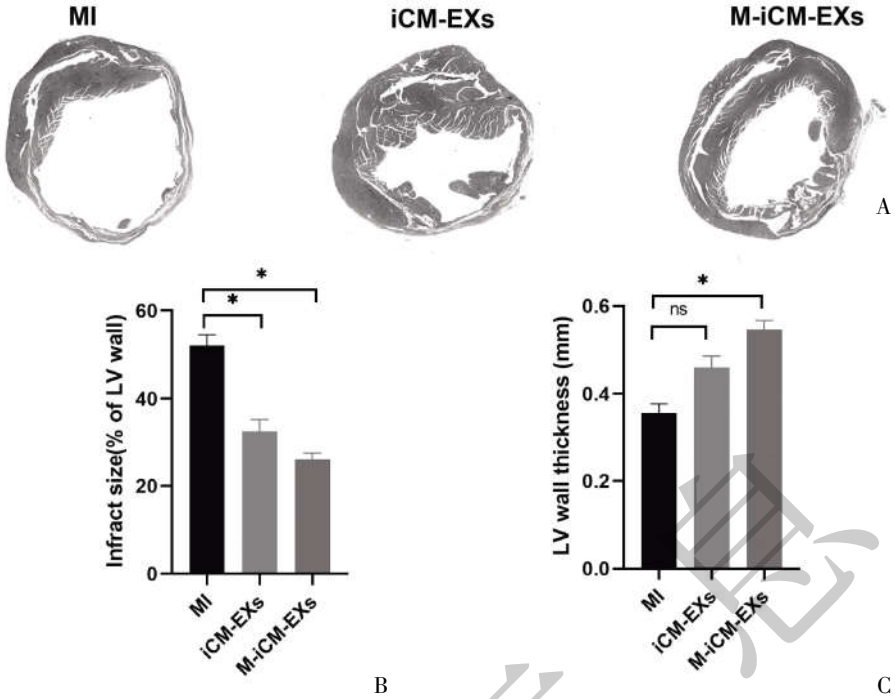


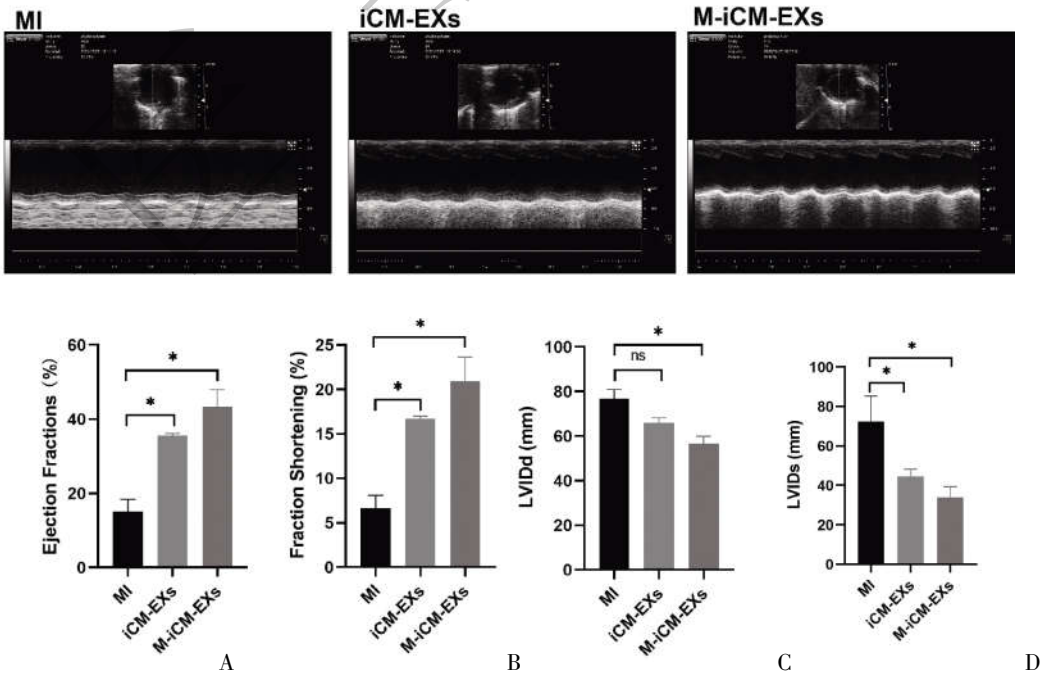
图 4 小动物活体光学成像系统示踪 EXs 在体内各器官的分布



注:A:各组 Masson 三色染色图;B:各组左室梗死面积;C:各组左室室壁厚度;*P<0.05

图 5 Masson 三色染色评估各组心梗后心室重构

2.6 M-iCM-EXs 治疗对心梗后心功能的影响 心肌梗死后 28 d 的超声心动图结果显示,与 MI 组比较,iCM-EXs 和 M-iCM-EXs 治疗均能提高小鼠梗死后 EF%和 FS%,而 M-iCM-EXs 治疗组的提高更明显(P<0.05),见图 6A~图 6C。同时,M-iCM-EXs 治疗能够降低小鼠梗死后 LVIDd 和 LVIDs,显著改善心梗后心功能(P<0.05),见图 6D~图 6E。



注:A:各组代表性 M 型超声心动图图像;B:各组 EF;C:各组 FS%;D:各组 LVIDd;E:各组 LVIDs;*P<0.05

图 6 超声心动图评估各组心梗后心功能

3 讨论

iPSC-CMs 是治疗心肌再生中最有前景的细胞来源之一[9,10]。但由于移植后 iPSC-CMs 的保留率和存活率低以及潜在移植后致瘤和诱发室性心律失常的可能性，因此限制了该技术进一步推向临床应用[11]。近年来不少研究指出 iPSC-CMs 衍生的外泌体(iCMs-EXs)同样能表现出一样的心脏保护作用，因为 iCMs-EXs 含有丰富的生物活性蛋白、RNAs 和 microRNAs(miRNAs)能传递至靶细胞[12,13]。但是，大量研究表明静脉注射的 EXs 会被单核吞噬细胞系统(MPS)的巨噬细胞快速清除，并抢先积累在 MPS 器官中，如肝脏、脾脏和肺脏[14,15]。因此，EXs 静脉注射后出现的归巢效率低和治疗量低也是限制它们进一步临床应用的主要障碍。Liu B 等[16]制备了一种封装 iCMs- EXs 的水凝胶心脏贴片，使得 iCMs- EXs 中有效分子能够持续、长效释放至心脏梗死周边区，并明显减少 MI 后梗死面积和改善心功能等。然而这种递送方式需要传统开胸手术，存在费用多、操作难度大等缺点。

本研究中设计出一种靶向、长效 iCMs-EXs 递送心脏损伤部位的方法。首先，分离出作为单核/巨噬细胞细胞膜，并通过脂质体挤出器将膜修饰在 iCMs-EXs 上，来模拟外周血单核细胞在应激状态下的炎症细胞靶向损伤区域的特点。Western blot、NTA 和 TEM 实验结果显示，膜融合后的外泌体仍然保持圆形的膜结构微小囊泡且直径在 100~200 nm。单核巨噬细胞膜具有特异性免疫调节蛋白（如 CD47），能减少体内单核吞噬细胞系统清除 iCMs-EXs[17-19]。此外，心脏的内皮和心肌细胞上具有白细胞整合素受体(ICAM-1)。在心脏损伤后 ICAM-1 表达上调并对外周血的单核巨噬细胞的迁移具有强烈的招募作用，而且主要聚集在心脏梗死区域，并在 2~3 d 达到峰值。因此，受组织受损炎症细胞募集的生理学特点，单核细胞膜能够通过粘附机制和胞吞作用能帮助 iCMs-EXs 精准运送至损伤内皮或心肌损伤部位，再被受损的内皮和心肌所内化[20,21]。因此，作为一种新的治疗方法，单核巨噬细胞膜修饰的外泌体归巢后显著提高了对损伤心脏的治疗效果，并改善了治疗结果。心梗的小鼠静脉注射 iCM-EXs 或 M-iCM-EXs 6 h 后，体内成像系统(IVIS)图像显示，iCM-EXs 被单核吞噬细胞系统缓慢清除，与 iCM-EXs 相比，M-iCM-EXs 在损伤心脏中积累较多，而 iCM-EXs 更容易在肝脏和肺部中积累。同时，与 MI 组比较，iCM-EXs 和 M-iCM-EXs 治疗能够提高小鼠梗死后 EF 和 FS，而 M-iCM-EXs 治疗组的改善更显著。此外，心脏切片 Masson 染色结果显示，与 iCM-EXs 治疗的小鼠相比，静脉注射 M-iCM-EXs 治疗的小鼠梗死面积和瘢痕厚度更小。这些结果表明 M-iCMs-EXs 治疗后在心脏功能和重塑方面能显示出更大的获益。

目前，外泌体基因工程还可以通过对 EXs 的表面修饰归巢肽以提高其靶向心脏的能力和治疗效率[22,23]。这种方式确实能缩短了 EXs 达到治疗靶点所需的时间，同时显著降低脱靶效应，从而提高了治疗效果。然而，这些新型的人工合成多肽却潜在未知的毒性或免疫原性问题[24,25]。当然，本研究中仍存在不足的问题，很难保证融合后外泌体的完整性、内容物含量的不变，因为外泌体内容物中的 RNA、DNA、脂质和蛋白质都是对治疗有积极的作用[26]，膜挤压法可能对外泌体的生物功能内容物潜在损害，因此需要寻找更好的技术来解决外泌体膜融合的问题，尽量能够达到最小的内容物泄漏和最大的载药量的能力。

综上所述，本研究通过仿生的策略，利用 M-iCM-EXs 可以通过单核细胞膜与缺血损伤的内皮细胞和心肌细胞之间的相互作用，增强其在损伤心脏中的归巢和滞留能力，实现外泌体靶向心脏的修复治疗。

参考文献：

[1]急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南(2019)[J].中华心血管病杂志,2019(10):766-783.

[2]Gao L,Wang L,Wei Y,et al.Exosomes secreted by hiPSC-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine[J].Sci Transl Med,2020,12(561):eaay1318.

[3]Heallen TR,Martin JF.Heart repair via cardiomyocyte -secreted vesicles[J].Nat Biomed Eng,2018,2(5):271-272.

[4]Zhao H,Chen X,Hu G,et al.Small Extracellular Vesicles From Brown Adipose Tissue Mediate Exercise Cardioprotection [J]. Circ Res,2022,130(10):1490-1506.

[5]Zhang N,Song Y,Huang Z,et al.Monocyte mimics improve mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle homing in a

mouse MI/RI model[J].Biomaterials,2020,255:120168.

[6]刘马超,杭莺,刘云,等.白细胞计数、中性粒细胞与淋巴细胞比值对急性心肌梗死患者短期预后的影响分析[J].中国心血管杂志,2018,23(5):384-388.

[7]路阳,赵宁,杜以梅.单核巨噬细胞在心肌炎中的作用[J].中国心血管杂志,2021,26(4):402-405.

[8]Huang CK,Dai D,Xie H,et al.Lgr4 Governs a Pro-Inflammatory Program in Macrophages to Antagonize Post-Infarction Cardiac Repair[J].Circ Res,2020,127(8):953-973.

[9]Ye L,Chang YH,Xiong Q,et al.Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells [J].Cell Stem Cell,2014,15(6):750-761.

[10]Tan SH,Loo SJ,Gao Y,et al.Thymosin β4 increases cardiac cell proliferation, cell engraftment, and the reparative potency of human induced-pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a porcine model of acute myocardial infarction[J].Theranostics,2021,11(16):7879-7895.

[11]Paik DT,Tian L,Lee J,et al.Large-Scale Single-Cell RNA-Seq Reveals Molecular Signatures of Heterogeneous Populations of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells[J].Circ Res,2018,123(4):443-450.

[12]Adamiak M,Cheng G,Bobis-Wozowicz S,et al.Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Extracellular Vesicles Are Safer and More Effective for Cardiac Repair Than iPSCs[J].Circ Res,2018,122(2):296-309.

[13]El Harane N,Kervadec A,Bellamy V,et al.Acellular therapeutic approach for heart failure: in vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors[J].Eur Heart J,2018,39(20):1835-1847.

[14]Smyth T,Kullberg M,Malik N,et al.Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes [J].J Control Release,2015,199:145-155.

[15]Elkhoury K,Chen M,Koçak P,et al.Hybrid extracellular vesicles-liposome incorporated advanced bioink to deliver microRNA[J].Biofabrication,2022,14(4):10.1088/1758-5090/ac8621.

[16]Liu B,Lee BW,Nakanishi K,et al.Cardiac recovery via extended cell-free delivery of extracellular vesicles secreted by cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells[J]. Nat Biomed Eng,2018,2(5):293-303.

[17]Belhadj Z,He B,Deng H,et al.A combined "eat me/don´t eat me" strategy based on extracellular vesicles for anticancer nanomedicine[J].J Extracell Vesicles,2020,9(1):1806444.

[18]Advani R,Flinn I,Popplewell L,et al.CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin´s Lymphoma[J].N Engl J Med,2018,379(18):1711-1721.

[19]Morrissey MA,Kern N,Vale RD.CD47 Ligation Repositions the Inhibitory Receptor SIRPA to Suppress Integrin Activation and Phagocytosis[J].Immunity,2020,53(2):290-302.e6.

[20]Niessen HW,Lagrand WK,Visser CA,et al.Upregulation of ICAM-1 on cardiomyocytes in jeopardized human myocardium during infarction[J].Cardiovasc Res,1999,41(3):603-610.

[21]Xie L,Galettis A,Morris J,et al.Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression is necessary for monocyte adhesion to the placental bed endothelium and is increased in type 1 diabetic human pregnancy [J].Diabetes Metab Res Rev, 2008,24(4):294-300.

[22]Vandergriff A,Huang K,Shen D,et al.Targeting regenerative exosomes to myocardial infarction using cardiac homing peptide [J].Theranostics,2018,8(7):1869-1878.

[23]Wang X,Chen Y,Zhao Z,et al.Engineered Exosomes With Ischemic Myocardium-Targeting Peptide for Targeted Therapy in Myocardial Infarction [J].J Am Heart Assoc,2018,7 (15): e008737.

[24]De La Peña H,Madrigal JA,Rusakiewicz S,et al.Artificial exosomes as tools for basic and clinical immunology [J].J Immunol Methods,2009,344(2):121-132.

[25]Gao X,Ran N,Dong X,et al.Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy[J].Sci Transl Med,2018,10(444):eaat0195.

[26]Hu S,Wang X,Li Z,et al.Platelet membrane and stem cell exosome hybrid enhances cellular uptake and targeting to heart injury[J].Nano Today,2021,39:101210.

收稿日期:2022-03-22;修回日期:2022-03-29
编辑/肖婷婷

医学信息