

水凝胶负载干细胞外泌体在组织再生领域的应用研究进展

佟莹莹^{1,2,3}, 金威洋^{1,2,3}, 杨光华^{1,2,3*}

1 上海海洋大学 科技部生物科学国际研究中心, 上海 201306

2 上海海洋大学 国家水生动物病原体收集中心, 上海 201306

3 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心, 上海 201306

佟莹莹, 金威洋, 杨光华. 水凝胶负载干细胞外泌体在组织再生领域的应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1351-1362.
TONG Yingying, JIN Weiyang, YANG Guanghua. Application of hydrogel-loaded stem cell exosomes in the field of tissue regeneration[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1351-1362.

摘 要: 近年来, 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)衍生的外泌体在组织再生领域引发许多关注。MSCs 衍生外泌体作为细胞间通讯的信号分子, 具有天然靶向性强、免疫原性低等特点, 其通过 MSCs 旁分泌途径被细胞吸收, 参与调控发挥促进细胞或组织再生功能。水凝胶作为再生医学领域的支架材料, 具有良好的生物相容性、降解性等特点。将二者制成复合物联合使用后不仅可以提高外泌体在病变位置的滞留时间, 且可通过原位注射等方法提高外泌体到达病变位置的剂量, 在病变区域治疗效果显著且持续性改善。文中总结了现阶段外泌体与水凝胶复合物材料共同作用促进组织修复、再生的研究结果, 以期对未来组织再生领域中的相关研究工作提供借鉴。

关键词: 水凝胶; 外泌体; 组织再生; 干细胞

Application of hydrogel-loaded stem cell exosomes in the field of tissue regeneration

TONG Yingying^{1,2,3}, JIN Weiyang^{1,2,3}, YANG Guanghua^{1,2,3*}

1 International Research Center for Biological Sciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 National Aquatic Animal Pathogen Collection Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 Aquatic Animal Genetics and Breeding Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In recent years, mesenchymal stem cell (MSCs)-derived exosomes have attracted much attention in the field of tissue regeneration. Mesenchymal stem cell-derived exosomes are

*Corresponding author. E-mail: ghyang119@163.com

Received: 2022-07-18; Accepted: 2022-10-28

signaling molecules for communication among cells. They are characterized by natural targeting and low immunogenicity, and are mostly absorbed by cells through the paracrine pathway of mesenchymal stem cells. Moreover, they participate in the regulation and promotion of cell or tissue regeneration. As a scaffold material in regenerative medicine, hydrogel has good biocompatibility and degradability. Combining the two compounds can not only improve the retention time of exosomes at the lesion site, but also improve the dose of exosomes reaching the lesion site by *in situ* injection, and the therapeutic effect in the lesion area is significant and continuous. This paper summarizes the research results of the interaction of exocrine and hydrogel composite materials to promote tissue repair and regeneration, in order to facilitate research in the field of tissue regeneration in the future.

Keywords: hydrogel; exosomes; tissue regeneration; stem cells

外泌体(exosomes)是一种具有双层生物膜结构的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs), 直径 30–150 nm, 具有高度动态异质性, 参与调节细胞内复杂的信号通路^[1-2]。外泌体中的细胞特异性蛋白质和遗传物质能够反映其细胞起源和生理状态, 不同细胞衍生的外泌体特性及作用亦不相同^[3]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有独特的自我再生能力和多向分化潜能^[4], 其衍生的外泌体与免疫反应、心血管疾病、神经系统疾病等有关^[1,5-7]。通过对 MSCs 衍生外泌体以骨关节炎修复为目标进行临床研究, 我们发现 MSCs 衍生外泌体显著减轻了患者关节炎症, 磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)检测到膝盖软骨体积出现不同程度的增大, 可见, MSCs 外泌体在促进组织再生领域起到关键作用^[8]。随着分子生物学技术的发展及应用, 再生医学治疗选择已逐步由传统干细胞治疗过渡到外泌体介导无细胞治疗^[9]。然而, 外泌体的稳定性、传递效率和弱靶向性限制了其临床应用, 尤其是免疫系统对外泌体的快速清除能力大大降低了外泌体在体内的存留时间, 严重影响治疗效果。基于这些问题, 现代临床实践应用需要探索一种支架材料用于负载干细胞外泌体提高外泌体的利用度、促进外泌体的功能研究。水凝胶(hydrogel)作为亲水性三维网络

结构凝胶, 可以吸收大于自身几倍的水, 且不破坏自身结构^[10], 在生物相容性, 可降解性, 溶胀性上都有很大优势, 既可用作组织修复再生过程的细胞支撑材料, 也可用作传递药物的高效载体, 在各个领域有着广泛的应用前景^[11-12]。组织工程研究表明水凝胶与外泌体形成的生物复合物, 能够保护外泌体免于体内免疫作用的清除, 同时减缓了水凝胶上外泌体的释放, 其协同作用改善了外泌体的组织维持时间和治愈效果^[13]。因此, 将 MSCs 外泌体负载到水凝胶中有望成为临床治疗新方法之一。但是由于疏水性及细胞黏附性限制了其在组织工程技术中的进一步发展, 如何提高水凝胶的性能以适应不同条件下的实验要求是一个亟待解决的问题。本文对目前水凝胶负载干细胞外泌体应用于组织工程领域的进展作了概述, 为水凝胶外泌体复合物对各种疾病的治疗潜力提供信息。

1 外泌体的来源和分离

外泌体作为纳米级细胞外载体, 起源于多囊泡内体途径, 广泛应用于纳米医学、再生医学、药理学和癌症生物学等领域^[2,14]。外泌体的生物发生涉及细胞质膜的双重内陷过程, 在此过程中细胞内的腔内小泡会形成多泡小体并与细胞质膜融合通过胞吐作用将外泌体分泌到胞质环境

中(图 1)。外泌体的标志物和形态与它们的大小无关,许多蛋白质如 CD63、CD9、CD81、CD82、Alix 以及 TSG101 均可作为外泌体的标志物^[15],此外,间充质干细胞外泌体还可以将 CD44、CD90、CD73、CD29 作为标志物用于检测^[16]。由于外泌体的异质性较高,如何分离外泌体将是一件至关重要的事情。目前,常见的外泌体分离技术有超速离心技术、基于尺寸的分选技术、免疫亲和和层析技术、基于电荷中和的聚合物沉淀等。本团队主要通过超速离心及免疫亲和层析对外泌体进行分离,同时也在不断地开发更优化的外泌体分离方法,以配合临床研究,达到更好的治疗效果。随着研究的深入,外泌体分离效率和纯度也在不断提升,将为临床医学提供多层次的治疗手段。

2 外泌体的组织修复与再生功能

干细胞(stem cell, SC)作为机体非特化细胞,具有自我更新和多向分化的能力^[17],可以通过复制和分化替换受损或丢失的细胞从而维持组

织稳态^[18-19],但仍有许多障碍需要克服,如致瘤性、免疫原性和异质性等^[20]。研究发现 SC 除了利用自己的分化能力,更多的是通过旁分泌的途径间接参与调控,促进组织再生。基于这种现状,新兴的无细胞疗法排除了细胞的参与,仅以功能化的无细胞生物作为支架平台参与治疗,外泌体在再生医学中的优势逐渐显现出来。最近的研究结果表明,外泌体不仅能够参与细胞增殖、迁移、血管生成和组织再生等过程^[21-22],其所含生物分子与来源细胞之间存在一致性,这对促进多细胞组织再生尤为重要^[23]。干细胞外泌体对组织损伤进行修复的过程中对细胞微环境也有调控作用,例如通过调控基质金属蛋白酶^[24]或抑制胶原生物合成调节细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的含量^[25],从而影响细胞状态。有证据表明,外泌体能够携带细胞因子、miRNA 和其他参与促炎和抗炎调节的活性分子参与免疫调控,例如会引起 NF- κ B、TLR4、WNT、JAK-STAT、MAPK 等信号通路变化,调控细胞微环境中炎症因子的释放。同时也发现 MSC 外泌体能够通

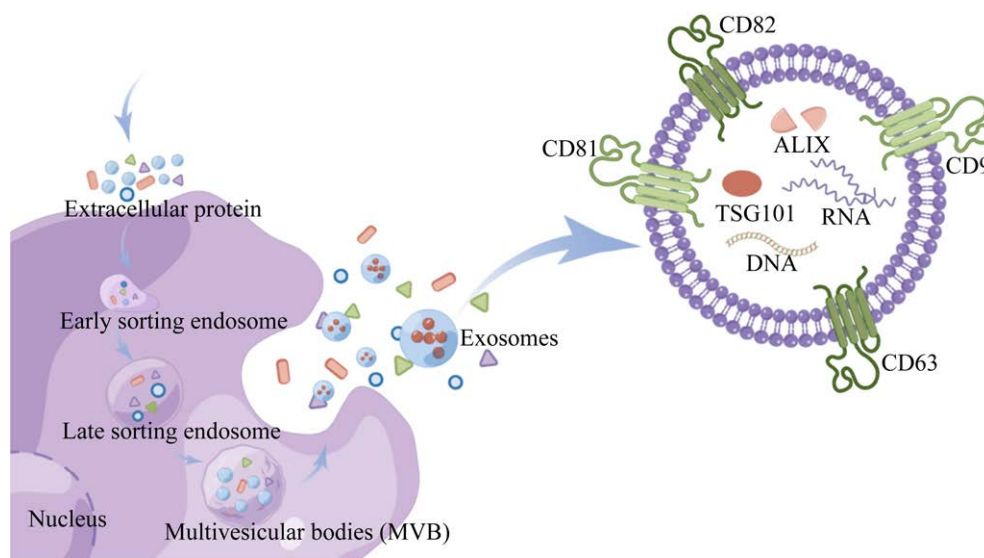


图 1 外泌体的来源^[2]

Figure 1 Source of exosomes^[2].

过减少损伤部位微环境中中性粒细胞和巨噬细胞的募集,将巨噬细胞从促炎 M1 表型转化为对修复伤口至关重要的抗炎 M2 表型实现炎症调节并表现出免疫抑制作用^[26]。

目前,通过生物工程等手段,不仅可以设计外泌体表面的受体蛋白,增强其对作用部位的靶向性,同时可以灵活控制其囊泡内携带的生物分子从而对特定的药物、蛋白质等进行递送。这也为我们接下来的研究打开了广阔的思路。此外,外泌体疗法大大降低了传统 SC 疗法中存在的安全风险和操作限制。

3 水凝胶负载外泌体疗法

3.1 水凝胶

水凝胶作为物理或化学交联的三维亲水聚合物网络^[27-29],因良好的溶胀能力使其成为药物输送系统、再生和生物学等应用中不可或缺的材料^[30-31]。目前,本课题组研制的树形聚赖氨酸水凝胶的应用正处于国内临床试验阶段(临床注册号: NCT03255343),利用水凝胶的生物相容性和可降解性等特性,我们开发出树状聚赖氨酸包埋核素的纳米缓释技术并将 188 铼(Re)递送至

肿瘤部位,用来治疗癌症^[32]。2019 年 9 月 16 日,水凝胶缓释 188Re 治疗实体肿瘤技术(ImDendrim)经欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)批准,并正式获得欧盟及罗马尼亚国家药品管理局(Agentia Nationala a Medicamentului si a Dispozitivelor Medicale din Romania, ANMMDMR)三类医疗器械临床许可批文(批文号: ImDendrim/CT/02/11/27)。2019 年凭借 ImDendrim 治疗肺癌的临床结果获得美国临床肿瘤学会(American Society of Clinical Oncology, ASCO)奖,该成果在美国放射治疗及肿瘤学会(American Society for Therapeutic Radiology and Oncology, ASTRO)被公布^[33]。因此,本课题组将在此基础上结合干细胞研究基础进一步开发水凝胶的应用。在组织再生学研究中,将水凝胶负载 SC 外泌体后,对促进组织再生可以同时发挥两者的功能^[34],如图 2 所示。最近几年,随着对水凝胶研究持续加深,未来其应用领域将会不断扩大。大部分用于封装外泌体的水凝胶都是基于天然衍生的聚合物^[35]。常用的天然聚合物材料可分为多糖(壳聚糖、海藻酸盐、透明质酸、琼脂糖和纤维素)和蛋白质(胶原蛋白、明胶和纤维蛋白)^[36]。

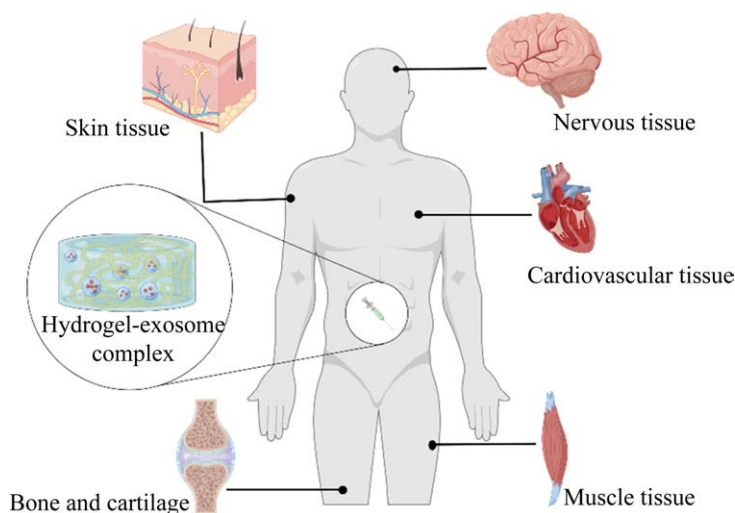


图 2 水凝胶负载外泌体在组织再生领域的应用

Figure 2 Application of hydrogel-loaded exosomes in the field of tissue regeneration.

对比于普通的药物递送系统,凝胶药物递送系统维持细胞或者生物活性分子结构与功能的时间更长^[37],但是由于细胞的特殊性,用水凝胶对细胞进行封装仍然具有许多挑战。随着纳米技术的不断发展,具有特殊性能的纳米材料或聚合物等可以被添加到水凝胶中,合成新型纳米复合水凝胶,以提高水凝胶的理化性质。此外,外泌体是细胞外分泌物质,可被机体吸收并维持体内稳态。因此将外泌体植入水凝胶组织片,为组织缺损局部外泌体高效保存提供了一种解决方法^[38]。

3.2 水凝胶负载外泌体给药系统

近年来,探寻新的方法将外泌体运送到损伤部位已成为组织再生领域新的热点^[39-40]。外泌体在临床应用过程中稳定性差、滞留困难,因为它们被注射进入机体后就会立即被免疫系统消除^[41],且半衰期较短。研究证明小鼠经静脉注射后从 B16-BL6 黑色素瘤细胞中分离的外泌体迅速从体循环中消失,半衰期仅为 2 min^[41]。而使用水凝胶负载外泌体后其半衰期明显提高,如 Yu 等^[42]制备纤维蛋白水凝胶控制外泌体的释放,结果显示纤维蛋白水凝胶有效提高骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC)外泌体在体内的保留和稳定性,大鼠皮下植入模型中 DiR 荧光标记的外泌体追踪结果表明,该系统能够将外泌体稳定地保留损伤部位长达 2 周。这些结果给了我们更大的信心以优化水凝胶负载外泌体的给药系统,提高外泌体的递送效率及给药量,对组织损伤产生更高疗效和更强的特异性。

目前,水凝胶基质负载外泌体主要表现为以下 3 种形式:(1) 水凝胶的物理结合,基于水凝胶在水中的溶胀原理,即水凝胶和聚合物先被交联剂凝胶化后再以不同物理方式与外泌体结合,例如 Shi 等^[43]运用冷冻干燥的方法制备壳聚糖/

丝基水凝胶包裹牙龈 MSCs 来源的外泌体。水凝胶因其超强吸水性及溶胀性使外泌体吸附在多孔结构上^[44],由于外泌体的物理结合较弱,孔径大小十分重要,外泌体有可能容易漏出大孔或者不易穿过小孔。(2) 基于活性前体的共价交联,即先将游离外泌体包裹于天然或合成的聚合物中,然后再添加交联剂制备形成水凝胶,如 Lv 等^[45]以氯化钙为交联剂对海藻酸盐水凝胶的制备; Qin 等^[46]以聚(乙二醇)二丙烯酸酯为交联剂,利用硫酸化透明质酸、肝素和明胶的复合基质封装 BMSC 衍生的外泌体。(3) 原位凝胶化法,即将外泌体同时与交联剂和溶液中的聚合物混合产生原位凝胶化,完成外泌体的靶向递送。如 Wang 等^[47]构建可注射性、自愈性、抗菌活性、刺激响应性外泌体释放的多肽型 F127/氧化透明质酸/聚 ϵ -L-赖氨酸(F127/OHA-EPL, FHE)水凝胶并利用原位凝胶化治疗糖尿病皮肤损伤。原位凝胶化能达到不规则空腔准确构象的目的,同时实现注射部位优异的整合与保留率^[48]。结合临床研究的应用,开发出合适的水凝胶负载外泌体给药系统,将为我们接下来的研究工作提供巨大的便利。

3.3 水凝胶负载干细胞外泌体作用机制

干细胞外泌体具有促进损伤处成纤维细胞增殖生长、血管生成和抗炎等作用。而在众多用于组织再生领域的生物材料中,水凝胶被誉为支持多数细胞行为及营养运输最为理想的给药载体之一。结合其保护作用,干细胞外泌体能够维持生物活性并在病理环境中进行可控释放,以增强自身的功能。Guo 等^[49]在研究中发现,富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)的外泌体可通过激活下游 RHO/YAP 信号转导途径促进成纤维细胞的增殖和迁移,进而导致胶原蛋白的合成和沉积、增强上皮再形成和更快速的慢性伤口闭合。同时,PRP 外泌体通过激活 PI3K/AKT 和

ERK 通路有助于改善血管生成。在 Wang 等^[47]的研究中再次证实了这一结果,多肽型水凝胶实现了脂肪间充质干细胞外泌体持续释放,显著增加了I型和III型胶原蛋白沉积并促进伤口愈合和无瘢痕皮肤形成。

在皮肤创伤治疗中,水凝胶能与外泌体联合使用,亦已有相关研究验证了水凝胶在功能发挥上拥有更多优势。如 Li 等^[50]运用基因工程技术制备复合水凝胶治疗大鼠皮肤创伤,其中壳聚糖和羟基磷灰石(hydroxyapatite, HAP)包裹的滑膜间充质干细胞外泌体递送 miR-126-3p (SMSCs-126-Exos)。结果表明, HAP 置入后能促进血管的生成,释放出的 Ca^{2+} 离子能调节哺乳动物皮肤稳态,对角质细胞增殖与分化具有调节作用, SMSCs-126-Exos 则可以通过活化 MAPK/EAK、PI3K/AKT 信号等刺激成纤维细胞的增殖,人微血管内皮细胞增殖、迁移及毛细血管网形成而有利于创面的愈合;类似地, Hu 等^[51]使用甲基丙烯酸明胶/纳米粘土凝胶包裹人脐带间充质干细胞外泌体时发现, miR-23a-3p 可以激活 PTEN/AKT 信号实现外泌体的可持续释放并促进软骨再生通路。

3.4 水凝胶负载干细胞外泌体在组织再生领域的应用

3.4.1 皮肤组织再生

皮肤伤口愈合是一个动态的过程,涉及许多生物分子^[52],愈合不彻底或发生坏死均会破坏皮肤屏障功能,目前促进皮肤组织再生的方法大多是通过防止伤口感染、维持伤口局部水分实现的^[53]。Wang 等^[47]运用多肽基 FHE 水凝胶进行糖尿病伤口愈合实验时发现 FHE@exosomes (FHE@exo)水凝胶在第 21 天具有最有效的愈合率,其中 FHE@exo 水凝胶组第 14 天的闭合率高达为 $88.67\% \pm 6.9\%$,而其他组的最终愈合率分别为 $76.3\% \pm 3.2\%$ (外泌体)、 $64.3\% \pm 9.8\%$ (FHE 水

凝胶)和 $36.3\% \pm 10.4\%$ (对照)。此外,随着外泌体加载到 FHE 水凝胶中,与纯外泌体相比, FHE@exo 水凝胶的愈合性能明显提高。同时 Li 等^[50]证明凝胶递送外泌体时外泌体的控释时间高达 1 周。对于糖尿病患者的慢性皮肤伤口,应用水凝胶与 SC 外泌体组合材料也可以有效改善伤口愈合情况^[54-56]。这些研究都证明了凝胶递送外泌体疗法比单次直接使用外泌体更有益。

3.4.2 心血管组织再生

心血管疾病以高死亡率、高发病率为主要特点,近年来,随着该领域组织工程的发展,水凝胶负载 SC 外泌体逐渐成为该疾病的安全治疗手段。如 Han 等^[57]开发的新型可注射自组装聚乙烯醇/甘油/氯化钠(PVA/Glycerol/NaCl, PGN)水凝胶应用于大鼠的心肌梗塞治疗后,自组装肽水凝胶显著提高了外泌体稳定性,水凝胶降解时平稳释放 GHRP6 可激活 PI3K-AKT1 及其他途径靶向 TGF- β 1 抑制心脏纤维化,并通过抑制 NF- κ B 途径缓解炎症、降低巨噬细胞募集及血清中 TNF- α 含量、抑制细胞凋亡实现心脏功能的改善。Lv 等^[45]针对心肌梗塞的治疗,利用藻酸盐水凝胶包裹 BMSC 外泌体,得到了同样卓越的心脏功能。最近的研究发现将诱导多能干细胞的心肌细胞封装于水凝胶贴片中应用于大鼠心肌后,水凝胶贴片实现了心肌细胞外泌体的缓慢释放,保护了急性受伤的心脏免受病理性肥大^[58]。我们也注意到在研究衰老引起的血管功能障碍时, Han 等^[59]发现,丝素蛋白水凝胶封装 miR-675 外泌体能够促进小鼠缺血后肢的血液灌注、并通过抑制 TGF- β 1/P21 通路来预防衰老,从而达到血管功能障碍的良好治疗效果。另外,在缺血性组织损伤的治疗探究过程中, Zhang 等^[60]发现,热敏壳聚糖水凝胶可模拟天然细胞外基质生态位,进而促进细胞粘附、迁移和增殖,使用该凝胶包被外泌体时,组织再生作用更强。研究证明

海藻酸盐、透明质酸和纤维蛋白类水凝胶在心脏修复再生中有显著作用,胶原蛋白类水凝胶则在血管重建中应用广泛,尽管外泌体水凝胶复合物的对心血管组织初步研究取得了良好的效果,但在其应用临床之前,仍有许多问题需要回答。

3.4.3 神经组织再生

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中枢神经系统的致命创伤,由于中枢神经系统的内在修复能力非常有限,目前临床上有效治疗 SCI 的主要方法是改善抑制性微环境,如 Li 等^[61]建立的创新局部植入策略,对比于全身给药方案,该策略使用多肽修饰的黏附性透明质酸水凝胶(PPFLMLLKSTR-hydrogel, pGel)包裹人 MSCs 外泌体(Exosomes-pGel, Exo-pGel), pGel 不仅提高了 hMSC 衍生的外泌体的 3D 粘附和保留,且植入 Exo-pGel 在微环境中具有抗氧化与抗炎作用,进而有效调控星形胶质细胞及胆碱乙酰转移酶含量,促进重度 SCI 术后神经修复。植入疗法有效促进了大鼠脊髓再生和后肢运动功能的恢复,进一步保护了 SCI 后泌尿组织免受神经源性损伤。卢亮^[62]在治疗创伤性颅脑损伤大鼠时也发现,将 BMSC 外泌体与脑膜胶等水凝胶材料结合,可以显著改善颅脑损伤大鼠的神经功能恢复,外泌体在一定程度上能减轻神经炎症的发生。有研究表明,生物支架材料(如水凝胶)还可通过模仿周围神经损伤后不同的修复微环境,并与外泌体产生协同作用,促进神经突起生长和神经缺损修复。Yang 等^[63]在治疗大鼠坐骨神经缺损时,将神经营养素 3 (neurotrophin-3, NT-3)的 mRNA 包裹在脂肪干细胞衍生的外泌体(Exo^{NT-3})中,并用海藻酸盐水凝胶将其包裹以构建神经引导导管,该递送系统可以实现至少 2 周的外泌体稳定释放,显著改善了神经再生情况。在其他应用中,壳聚糖、琼脂糖、纤维蛋白等材料也常被制作成水凝胶用于修复神经损伤。

3.4.4 骨与软骨再生

修复由创伤、肿瘤和畸形引起的大骨缺损一直是骨治疗的挑战之一,运用支架材料和其他生物分子组合治疗的骨组织工程成为极有前途的治疗方案。在骨组织再生的治疗中, MSC-Exos 以递送内源性货物的方式激发成骨细胞增殖及血管生成,抑制破骨细胞的成熟。目前临床中应用于骨修复水凝胶种类较多,如壳聚糖、透明质酸、纤维蛋白等天然聚合物水凝胶,合成水凝胶经制作后可形成具有特定分子量、嵌段结构、可降解键及交联模式的材料,并在可控的大小范围内调整结构及降解速率,使其更适合应用于临床骨再生治疗。为了探究外泌体对骨损伤的修复作用, Yang 等^[64]开发了一种可注射的羟基磷灰石嵌入原位交联透明质酸-海藻酸盐水凝胶系统,对大鼠颅骨损伤进行治疗时取得了良好的愈合效果。随后, Zhang 等^[65]开发了结合合成支架材料,将脐带 MSCs 衍生外泌体与透明质酸水凝胶和纳米羟基磷灰石/聚-ε-己内酯支架配合使用,同时增强了外泌体体内留存时间和水凝胶支架硬度,在对大鼠颅骨缺损进行治疗时,该复合材料能通过促进内皮祖细胞的增殖、迁移和血管生成分化促进体内的骨再生,满足临床对骨重建的要求,为骨缺损提供了一种新的治疗方法。对于这一方面的研究,我们利用多聚赖氨酸水凝胶在临床上也正在探究如何以它为支架,将外泌体送到骨关节损伤部位,发挥其最大的潜在修复功能。临床研究结果已表明,多聚赖氨酸水凝胶负载外泌体治疗骨关节炎效果良好。水凝胶作为外泌体原位凝胶支架,其组织粘附性也有助于软骨缺损修复和软骨融合。

3.4.5 肌肉组织再生

在肌肉组织的缺损修复领域,采取的方法主要是利用生物相容性良好的生物支架,如纤维蛋白水凝胶等向肌肉损伤处传递具有形成肌纤维

潜力的细胞,结合对微环境的诱导达到肌肉修复的目的。张浩^[66]构建了一种具有组织特异性的脱细胞猪骨骼肌组织水凝胶和具有肌向分化潜能的 MSCs 外泌体构成的修复体,用于修复大鼠胫骨前肌大体积缺损,实验表明,该三位培养系统中的外泌体可以有效支持大鼠脉静脉内皮细胞的生长、增殖,及体外成血管能力,在体内促进了新生血管生成,对胫骨前肌大体积缺损取得了很好的治疗效果。

近年来,肌腱修复技术有所改进,但修复部位灾难性断裂和粘连却频繁发生,针对屈肌腱修复这一问题,Shi 等^[67]开发了一种新型组织工程纯化外泌体产品贴片,在治疗犬的趾深屈肌腱损伤时发现,该贴片能够增加屈肌腱的愈合强度、细胞性和肌腱细胞迁移,同时能够对离体修复间隙的形成和肌腱细胞炎症产生负向影响,提供了一套全新的治疗人体肌腱损伤方案。继发现来源于 BMSC 的外泌体能促进肌腱干/祖细胞体外增殖、迁移及肌腱分化之后,Yu 等^[42]验证了基于外泌体的治疗应用结合局部纤维蛋白凝胶递送策略修复肌腱的潜力,并研究确认嵌入纤维蛋白的外泌体可以从纤维蛋白中受控释放并保留在缺损区域,具有激活肌腱损伤区域内源性腱干/祖细胞的再生潜力,是一种非常有效的肌腱局部修复方法,对于肌腱修复具有重要意义。

4 讨论与展望

以材料学和聚合物物理学等学科为理论基础的水凝胶包裹技术得到了持续进步,但是其在生物医学临床应用方面仍然面临着诸多挑战与临床需求。基于对 SC 外泌体治疗研究的基础,本课题组结合 SC 外泌体在临床研究中所展现的优势和不足,提出了通过水凝胶负载外泌体治疗病人的研究方案。团队拥有丰富的干细胞培养和外泌体提取经验,证明从亲代细胞提取的外泌体

可以成为 ECM 的组成部分。在联合相关医院开展的 SC 外泌体骨关节炎和鼻炎治疗的临床研究中,治疗有效率分别达到 71.33%和 65.54%,表现出良好的治疗效果,但是同时发现干细胞外泌体易被机体去除,缺乏稳定性等严重影响治疗效果的因素。近年来,为了解决该问题,外泌体-水凝胶复合物作为再生医学领域的新兴工具,为多种疾病的治疗提供了新的策略。我们在与水凝胶相关研究团队合作讨论中获得的实验数据进一步证明,水凝胶作为维持外泌体生物活性的加载和释放系统,通过模拟基质可将 SC 外泌体递送到修复部位,具有巨大的研究意义。大量研究表明,同时将 SC 外泌体负载在水凝胶上,能够更好发挥各自优势,既有利于保护外泌体不被人体快速清除,又能利用水凝胶的三维网格结构和降解过程调控外泌体的缓释,目前 3D 打印技术被广泛用于提高水凝胶支架功能孔隙率、孔形状及几何形状等,也可通过在合成水凝胶中引入整合素等物质来调节外泌体的释放和递送时间,实现短时间内治疗效果的最大化。

目前二者的联合应用在细胞和组织再生方面已取得了显著成果,增加了我们在该领域进一步研究的信心,在不断改善外泌体获取方式的同时,我们将继续探索水凝胶负载外泌体方法,以便充分地发挥出两者的优势。但在生物学领域,外泌体-水凝胶复合物的基本知识还处于初期阶段,其在再生医学领域中的具体作用机制还未完全阐明。近年来,许多研究者评估了各种情况下外泌体-水凝胶给药系统在损伤修复中的再生潜力,如皮肤组织损伤、心血管损伤及骨损伤等,但是向临床应用转化过程中仍有诸多问题亟需解决,例如我们对骨关节炎,鼻炎等疾病进行临床研究时,如何简化外泌体提取步骤、同时提高外泌体分离效率,是治疗的关键步骤,也是今后本课题组研究的重要方向。对水凝胶材料进行优

化,提高其生物相容性、可降解性等特点,开发出更完善的水凝胶材料和 SC 外泌体递送系统,利用水凝胶的天然优势,克服干细胞外泌体在临床治疗中的不足,才能最大程度地发挥出治疗效果。相比于强化生物材料特性而言,外泌体如何递送到靶细胞中更具有挑战性,这是因为要考虑到各类生物材料和细胞行为之间在有关时间尺度内的相互影响。延长半衰期,增加外泌体纯度等最新研究进展可用于克服该问题。目前水凝胶-外泌体的临床应用仍需深入探索,本团队将继续研究开发可行的水凝胶-外泌体递送系统,为干细胞外泌体临床研究提供实验基础,未来有望成为组织再生领域的有力修复工具。

REFERENCES

- [1] TKACH M, THÉRY C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232.
- [2] KALLURI R, LEBLEU VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [3] LI MY, LI SS, DU CY, ZHANG YN, LI Y, CHU LQ, HAN X, GALONS H, ZHANG YM, SUN H, YU P. Exosomes from different cells: characteristics, modifications, and therapeutic applications[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 207: 112784.
- [4] HAN Y, LI XZ, ZHANG YB, HAN YP, CHANG F, DING JX. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 886.
- [5] ANTIMISIARIS SG, MOURTAS S, MARAZIOTI A. Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(4): 218.
- [6] ZHANG S, CHU WC, LAI RC, LIM SK, HUI JHP, TOH WS. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2016, 24(12): 2135-2140.
- [7] FATIMA F, NAWAZ M. Stem cell-derived exosomes: roles in stromal remodeling, tumor progression, and cancer immunotherapy[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2015, 34(12): 541-553.
- [8] YU B, ZHANG XM, LI XR. Exosomes derived from mesenchymal stem cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(3): 4142-4157.
- [9] KIM S, LEE SK, KIM H, KIM TM. Exosomes secreted from induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells accelerate skin cell proliferation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3119.
- [10] ANNABI N, TAMAYOL A, UQUILLAS JA, AKBARI M, BERTASSONI LE, CHA C, CAMCI-UNAL G, DOKMECI MR, PEPPAS NA, KHADEMHOSEINI A. 25th anniversary article: rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine[J]. *Advanced Materials: Deerfield Beach, Fla*, 2014, 26(1): 85-123.
- [11] BROWN TE, ANSETH KS. Spatiotemporal hydrogel biomaterials for regenerative medicine[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(21): 6532-6552.
- [12] REN PG, ZHANG H, DAI Z, REN F, WU YD, HOU RX, ZHU YB, FU J. Stiff micelle-crosslinked hyaluronate hydrogels with low swelling for potential cartilage repair[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, 7(36): 5490-5501.
- [13] BRENNAN MÁ, LAYROLLE P, MOONEY DJ. Biomaterials functionalized with MSC secreted extracellular vesicles and soluble factors for tissue regeneration[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(37): 1909125.
- [14] PLUCHINO S, SMITH JA. Explicating exosomes: reclassifying the rising stars of intercellular communication[J]. *Cell*, 2019, 177(2): 225-227.
- [15] THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, CLAYTON A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. *Current Protocols in Cell Biology*, 2006, Chapter 3: Unit 3.22.
- [16] BIAN SY, ZHANG LP, DUAN LF, WANG X, MIN Y, YU HP. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model[J]. *Journal of Molecular Medicine: Berlin, Germany*, 2014, 92(4): 387-397.
- [17] ZAKRZEWSKI W, DOBRZYŃSKI M, SZYMONOWICZ M, RYBAK Z. Stem cells: past, present, and future[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10(1): 68.
- [18] ZHANG HJ, WANG ZZ. Mechanisms that mediate stem cell self-renewal and differentiation[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008, 103(3): 709-718.
- [19] HWANG I, UCHIDA H, DAI ZW, LI F, SANCHEZ T, LOCASALE JW, CANTLEY LC, ZHENG HW, PAIK J. Cellular stress signaling activates type-I IFN response through FOXO₃⁻ regulated lamin posttranslational

- modification[J]. Nature Communications, 2021, 12: 640.
- [20] YAMANAKA S. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges[J]. Cell Stem Cell, 2020, 27(4): 523-531.
- [21] FAFIÁN-LABORA JA, RODRÍGUEZ-NAVARRO JA, O'LOGHLEN A. Small extracellular vesicles have GST activity and ameliorate senescence-related tissue damage[J]. Cell Metabolism, 2020, 32(1): 71-86.e5.
- [22] MERINO-GONZÁLEZ C, ZUÑIGA FA, ESCUDERO C, ORMAZABAL V, REYES C, NOVA-LAMPERTI E, SALOMÓN C, AGUAYO C. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: potential clinical application[J]. Frontiers in Physiology, 2016, 7: 24.
- [23] SHABBIR A, COX A, RODRIGUEZ-MENOCAL L, SALGADO M, van BADIAVAS E. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis *in vitro*[J]. Stem Cells and Development, 2015, 24(14): 1635-1647.
- [24] XING HY, ZHANG ZJ, MAO QJ, WANG CG, ZHOU YL, ZHOU XP, YING LW, XU HB, HU SJ, ZHANG N. Injectable exosome-functionalized extracellular matrix hydrogel for metabolism balance and pyroptosis regulation in intervertebral disc degeneration[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 264.
- [25] TANG QM, LU B, HE J, CHEN X, FU QL, HAN HJ, LUO CQ, YIN HF, QIN ZW, LYU DN, ZHANG LF, ZHOU M, YAO K. Exosomes-loaded thermosensitive hydrogels for corneal epithelium and stroma regeneration[J]. Biomaterials, 2022, 280: 121320.
- [26] SILVA AM, TEIXEIRA JH, ALMEIDA MI, GONÇALVES RM, BARBOSA MA, SANTOS SG. Extracellular vesicles: immunomodulatory messengers in the context of tissue repair/regeneration[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 98: 86-95.
- [27] WANG DN, YANG XW, LIU Q, YU L, DING JD. Enzymatically cross-linked hydrogels based on a linear poly(ethylene glycol) analogue for controlled protein release and 3D cell culture[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2018, 6(38): 6067-6079.
- [28] LEIJTEN J, SEO J, YUE K, TRUJILLO-DE SANTIAGO G, TAMAYOL A, RUIZ-ESPARZA GU, SHIN SR, SHARIFI R, NOSHADI I, ÁLVAREZ MM, ZHANG YS, KHADEMOSSEINI A. Spatially and temporally controlled hydrogels for tissue engineering[J]. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2017, 119: 1-35.
- [29] MAHDAVINIA GR, MOUSANEZHAD S, HOSSEINZADEH H, DARVISHI F, SABZI M. Magnetic hydrogel beads based on PVA/sodium alginate/laponite RD and studying their BSA adsorption[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 147: 379-391.
- [30] ZHU JM, MARCHANT RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds[J]. Expert Review of Medical Devices, 2011, 8(5): 607-626.
- [31] JUNG S, ABEL JH, STARGER JL, YI H. Porosity-tuned chitosan-polyacrylamide hydrogel microspheres for improved protein conjugation[J]. Biomacromolecules, 2016, 17(7): 2427-2436.
- [32] YANG GH, SADEG N, TAHAR HB. New potential *in situ* anticancer agent derived from [188Re] rhenium nitro-imidazole ligand loaded 5th generation poly-L-lysine dendrimer for treatment of transplanted human liver carcinoma in nude mice[J]. Drug Designing: Open Access, 2017, 6(1): 1-7.
- [33] HAFID BT, SADEG N, YANG G. Intra-tumoral hepatic administration under CT stereotactic and ultrasound guidance of *in situ* anti-cancer agent derived from [188re] rhenium nitro-imidazole ligand loaded 5th generation poly-L-lysine dendrimer[J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2019, 105(1): E642.
- [34] PACELLI S, PAOLICELLI P, DREESEN I, KOBAYASHI S, VITALONE A, CASADEI MA. Injectable and photocross-linkable gels based on gellan gum methacrylate: a new tool for biomedical application[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 1335-1342.
- [35] ZHAO XH, CHEN XY, YUK H, LIN ST, LIU XY, PARADA G. Soft materials by design: unconventional polymer networks give extreme properties[J]. Chemical Reviews, 2021, 121(8): 4309-4372.
- [36] BOATENG J, CATANZANO O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing—a review[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 104(11): 3653-3680.
- [37] RICE JJ, MARTINO MM, DE LAPORTE L, TORTELLI F, BRIQUEZ PS, HUBBELL JA. Engineering the regenerative microenvironment with biomaterials[J]. Advanced Healthcare Materials, 2013, 2(1): 57-71.
- [38] PEÑA B, LAUGHTER M, JETT S, ROWLAND TJ, TAYLOR MRG, MESTRONI L, PARK D. Injectable hydrogels for cardiac tissue engineering[J]. Macromolecular Bioscience, 2018, 18(6): e1800079.
- [39] BRUNO S, TAPPARO M, COLLINO F, CHIABOTTO

- G, DEREGIBUS MC, SOARES LINDOSO R, NERI F, KHOLIA S, GIUNTI S, WEN SC, QUESENBERRY P, CAMUSSI G. Renal regenerative potential of different extracellular vesicle populations derived from bone marrow mesenchymal stromal cells[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2017, 23(21/22): 1262-1273.
- [40] LAI RC, ARSLAN F, LEE MM, SZE NSK, CHOO A, CHEN TS, SALTO-TELLEZ M, TIMMERS L, LEE CN, EL OAKLEY RM, PASTERKAMP G, de KLEIJN DPV, LIM SK. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Research*, 2010, 4(3): 214-222.
- [41] IMAI T, TAKAHASHI Y, NISHIKAWA M, KATO K, MORISHITA M, YAMASHITA T, MATSUMOTO A, CHAROENVIRIYAKUL C, TAKAKURA Y. Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2015, 4: 26238.
- [42] YU HL, CHENG J, SHI WL, REN B, ZHAO FY, SHI YY, YANG P, DUAN XN, ZHANG JY, FU X, HU XQ, AO YF. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes promote tendon regeneration by facilitating the proliferation and migration of endogenous tendon stem/progenitor cells[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 106: 328-341.
- [43] SHI Q, QIAN ZY, LIU DH, SUN J, WANG X, LIU HC, XU J, GUO XM. GMSC-derived exosomes combined with a chitosan/silk hydrogel sponge accelerates wound healing in a diabetic rat skin defect model[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 904.
- [44] THOMAS V, YALLAPU MM, SREEDHAR B, BAJPAI SK. Breathing-in/breathing-out approach to preparing nanosilver-loaded hydrogels: highly efficient antibacterial nanocomposites[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2008: NA.
- [45] LV KQ, LI QJ, ZHANG L, WANG YC, ZHONG ZW, ZHAO J, LIN XX, WANG JY, ZHU KY, XIAO CC, KE CL, ZHONG SH, WU XP, CHEN JH, YU H, ZHU W, LI X, WANG B, TANG RK, WANG JA, HUANG JY, HU XY. Incorporation of small extracellular vesicles in sodium alginate hydrogel as a novel therapeutic strategy for myocardial infarction[J]. *Theranostics*, 2019, 9(24): 7403-7416.
- [46] QIN YH, WANG L, GAO ZL, CHEN GY, ZHANG CQ. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation *in vitro* and promote bone regeneration *in vivo*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21961.
- [47] WANG CG, WANG M, XU TZ, ZHANG XX, LIN C, GAO WY, XU HZ, LEI B, MAO C. Engineering bioactive self-healing antibacterial exosomes hydrogel for promoting chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration[J]. *Theranostics*, 2019, 9(1): 65-76.
- [48] MATHEW AP, UTHAMAN S, CHO KH, CHO CS, PARK IK. Injectable hydrogels for delivering biotherapeutic molecules[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 110: 17-29.
- [49] GUO SC, TAO SC, YIN WJ, QI X, YUAN T, ZHANG CQ. 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.
- [50] LI M, KE QF, TAO SC, GUO SC, RUI BY, GUO YP. Fabrication of hydroxyapatite/chitosan composite hydrogels loaded with exosomes derived from miR-126-3p overexpressed synovial mesenchymal stem cells for diabetic chronic wound healing[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 4(42): 6830-6841.
- [51] HU HX, DONG LL, BU ZH, SHEN YF, LUO J, ZHANG H, ZHAO SC, LV F, LIU ZT. MiR-23a-3p-abundant small extracellular vesicles released from Gelma/nanoclay hydrogel for cartilage regeneration[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2020, 9(1): 1778883.
- [52] SINNO H, PRAKASH S. Complements and the wound healing cascade: an updated review[J]. *Plastic Surgery International*, 2013, 2013: 146764.
- [53] TOTTOLI EM, DORATI R, GENTA I, CHIESA E, PISANI S, CONTI B. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(8): 735.
- [54] YANG JY, CHEN ZY, PAN DY, LI HZ, SHEN J. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes combined pluronic F127 hydrogel promote chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 5911-5926.
- [55] WANG Y, CAO Z, WEI Q, MA K, HU W, HUANG Q, SU J, LI H, ZHANG C, FU X. VH298-loaded extracellular vesicles released from gelatin methacryloyl hydrogel facilitate diabetic wound healing by HIF-1 α -mediated enhancement of angiogenesis[J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 147: 342-355.
- [56] SHIEKH PA, SINGH A, KUMAR A. Exosome laden oxygen releasing antioxidant and antibacterial cryogel wound dressing O_xOBand alleviate diabetic and infectious wound healing[J]. *Biomaterials*, 2020, 249:

120020.

- [57] HAN CS, ZHOU J, LIANG C, LIU B, PAN XB, ZHANG Y, WANG YL, YAN B, XIE WP, LIU F, YU XY, LI YX. Human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes encapsulated in functional peptide hydrogels promote cardiac repair[J]. *Biomaterials Science*, 2019, 7(7): 2920-2933.
- [58] LIU BH, LEE BW, NAKANISHI K, VILLASANTE A, WILLIAMSON R, METZ J, KIM J, KANAI M, BI L, BROWN K, DI PAOLO G, HOMMA S, SIMS PA, TOPKARA VK, VUNJAK-NOVAKOVIC G. Cardiac recovery via extended cell-free delivery of extracellular vesicles secreted by cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, 2(5): 293-303.
- [59] HAN CS, ZHOU J, LIU B, LIANG C, PAN XB, ZHANG Y, ZHANG YQ, WANG YL, SHAO LB, ZHU B, WANG JJ, YIN Q, YU XY, LI YX. Delivery of miR-675 by stem cell-derived exosomes encapsulated in silk fibroin hydrogel prevents aging-induced vascular dysfunction in mouse hindlimb[J]. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*, 2019, 99: 322-332.
- [60] ZHANG KY, ZHAO XN, CHEN XN, WEI YZ, DU W, WANG YB, LIU LN, ZHAO WA, HAN ZB, KONG DL, ZHAO Q, GUO ZK, HAN ZC, LIU N, MA FX, LI ZJ. Enhanced therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes with an injectable hydrogel for hindlimb ischemia treatment[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(36): 30081-30091.
- [61] LI LM, ZHANG Y, MU JF, CHEN JC, ZHANG CY, CAO HC, GAO JQ. Transplantation of human mesenchymal stem-cell-derived exosomes immobilized in an adhesive hydrogel for effective treatment of spinal cord injury[J]. *Nano Letters*, 2020, 20(6): 4298-4305.
- [62] 卢亮. 外泌体结合水凝胶在创伤性颅脑损伤后神经修复疗效研究[D]. 汕头: 汕头大学硕士学位论文, 2021.
LU L. The experimental study on the efficacy of exosomes combining hydrogel on neural repair after traumatic brain injury[D]. Shantou: Master's Thesis of Shantou University, 2021 (in Chinese).
- [63] YANG Z, YANG Y, XU YC, JIANG WQ, SHAO Y, XING JH, CHEN YB, HAN Y. Biomimetic nerve guidance conduit containing engineered exosomes of adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, 12(1): 442.
- [64] YANG S, ZHU B, YIN P, ZHAO LS, WANG YZ, FU ZG, DANG RJ, XU J, ZHANG JJ, WEN N. Integration of human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomes with hydroxyapatite-embedded hyaluronic acid-alginate hydrogel for bone regeneration[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020, 6(3): 1590-1602.
- [65] ZHANG YT, XIE Y, HAO ZC, ZHOU PY, WANG PF, FANG S, LI L, XU SG, XIA Y. Umbilical mesenchymal stem cell-derived exosome-encapsulated hydrogels accelerate bone repair by enhancing angiogenesis[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(16): 18472-18487.
- [66] 张浩. 构建含有间充质干细胞和外泌体的脱细胞组织水凝胶用于修复大体积肌肉缺损的实验研究[D]. 西安: 第四军医大学博士学位论文, 2016.
ZHANG H. The study of constructing the bio-hydrogel derived from decellularized tissue containing mesenchymal stem cells and exosomes for the treatment of volumetric muscle loss[D]. Xi'an: Doctoral Dissertation of The Fourth Military Medical University, 2016 (in Chinese).
- [67] SHI GD, WANG YC, WANG ZW, THORESON AR, JACOBSON DS, AMADIO PC, BEHFAR A, MORAN SL, ZHAO CF. A novel engineered purified exosome product patch for tendon healing: an explant in an *ex vivo* model[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2021, 39(8): 1825-1837.

(本文责编 郝丽芳)