

间充质干细胞及其衍生物雾化吸入治疗肺部疾病研究进展

王玉松 马琪敏 朱峰 夏照帆

海军军医大学第一附属医院烧伤外科,上海 200433

通信作者:夏照帆, Email: xiazhaofan@163.com

【摘要】 在急性和慢性肺部疾病中,不适当的免疫反应和异常修复过程可导致肺组织的不可逆损伤,进而导致肺功能下降甚至衰竭,从而导致患者死亡。间充质干细胞(MSCs)及其衍生物因其独特的生理功能和特性,在肺部疾病的细胞和无细胞疗法中显示出广阔的应用前景,并正进入临床转化阶段,但其安全性和有效性仍存在争议。MSCs及其衍生物的雾化给药为肺部疾病的治疗提供了新的机遇和挑战。在一些临床前研究和临床试验中,有证据表明雾化MSCs及其衍生物的给药方式是安全且有效的,这种方法可能是治疗各种复杂肺部疾病的最佳解决方案。然而在将该方法应用于临床之前,应进一步研究各种给药策略及其与不同雾化装置的兼容性。本文就MSCs及其衍生物雾化治疗肺部疾病的研究进展进行综述。

【关键词】 间充质干细胞; 外泌体; 细胞外囊泡; 雾化治疗; 肺部疾病

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2019YFA0110601)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220706-00636

Research progress of mesenchymal stem cells and their derivatives nebulization in the treatment of pulmonary diseases

Wang Yusong, Ma Qimin, Zhu Feng, Xia Zhaofan

Department of Burns, the First Affiliated Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Xia Zhaofan, Email: xiazhaofan@163.com

【Abstract】 In acute or chronic lung diseases, inappropriate immune response and abnormal repair process can lead to irreversible damage to lung tissue, which in turn leads to decreased lung function and even respiratory failure or death. Mesenchymal stem cells (MSCs) and their derivatives have shown wide application prospects in cell therapy and acellular therapy of lung diseases and are entering the clinical transformation stage because of their unique physiological functions and characteristics, but the safety and efficacy of MSCs and their derivatives are still controversial. Nebulization therapy provides new opportunities and challenges for the innovative treatment of MSCs and their derivatives in lung diseases. In a number of preclinical studies and clinical trials, there have been evidence that atomization therapy of MSCs and their derivatives is safe and effective. This method could be an optimal solution for the treatment of various complex lung diseases. However, extensive research should be carried out on various strategies and their compatibility with different nebulizers before this method can be used in clinical setting. In this paper, we review the research progress of MSCs and their derivatives by nebulization in the treatment of pulmonary diseases.

【Key words】 Mesenchymal stem cell; Exosome; Extracellular vesicle; Nebulization; Pulmonary disease

Fund program: National Key Research and Design Program of China (2019YFA0110601)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220706-00636

很多研究已经证实了间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)及其衍生物治疗急性慢性肺部疾病,尤其是炎症性肺疾病的安全性和有效性^[1-5]。MSCs衍生物是指MSCs在培养过程中产生的培养基、旁分泌因子、分泌蛋白质组、细胞外囊泡等产物^[2],广义的概念还包括经过预处理的MSCs。较MSCs本身而言,MSCs衍生物的治疗应用虽然存在剂量、产量及纯度等问题,但因其具有更低的免疫原性、性质稳定、疗效相当、无成瘤及血栓风险等优势,目前也是干细胞应用领域内研究较多的方向之一^[6]。

临床给药方式是MSCs及其衍生物治疗肺部疾病的重要影响因素之一。近年来,雾化吸入MSCs及其衍生物的临床前研究及临床研究结果均显示出良好的可操作性以及可能比其他给药方式更佳的安全性和有效性^[7-8]。本文就相关问题的研究进行综述。

1 MSCs及其衍生物治疗急性慢性肺部疾病的可能作用机制

1.1 MSCs治疗肺部疾病的确切机制: 众多研究初步揭示了MSCs治疗肺部疾病的可能机制,但仍然尚不明确,主要包括:①“归巢”:MSCs能通过特异性受体结合受损肺组织释放的一系列信号因子,逆浓度梯度“归巢”至肺损伤和炎症区域^[9]。②分化:多种来源的MSCs在体内体外可分化为I型、II型肺泡上皮细胞,并表达肺表面活性物质相关蛋白C^[10-11]。③抗炎:研究证实, MSCs表面表达大量受体分子,直接或者间接吸附和中和机体释放的大量炎症因子,从而抗纤维化、降低或者改善炎症反应;释放某些活性分子阻断炎症信号的瀑布效应,为肺内功能细胞的修复和再生创造环境^[3-4, 12-15]。④免疫调节:MSCs通过产生可溶性的细胞因子和诱导辅助性T细胞2(helper T cell 2, Th2)对内毒素的促炎反应和抗炎反应,以及抑制T淋巴细胞、

B淋巴细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK细胞)等免疫细胞的增殖、活化、分泌和凋亡等方式发挥免疫调节作用^[3, 16-18]。⑤旁分泌/自分泌:MSCs通过旁分泌/自分泌某些生长因子、细胞因子、趋化因子、调节肽以及其他一些相关特异性活性因子/分子(包括干细胞因子、干细胞衍生因子、钠尿肽、降钙素基因相关肽等),在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(acute lung injury/acute respiratory distress syndrome, ALI/ARDS)的治疗中发挥抗炎-免疫调节、肺泡液体清除、修复和改善受损的肺泡毛细血管屏障结构和功能、趋化、抗菌、促进血管生成、抗凋亡、防御反应和组织分化等作用^[18-20]。

1.2 MSCs 衍生物在治疗肺部疾病中具有与其母细胞相似的功能:①预处理作用:低氧预处理的MSCs不仅表现出治疗功能增强且提高其耐受有害环境影响的能力,还可以提高归巢能力及分化效率,从而增强疗效^[21-24]。②MSCs培养基:富含MSCs分泌产物的培养基可抑制细胞凋亡、诱导细胞增殖,从而修复受损肺血管,并在炎症性肺疾病中减少促炎细胞因子产生,具有促进受损细胞修复和抗炎-免疫调节功能^[25-27]。③MSCs分泌组:MSCs分泌组是指分泌到细胞外的一组蛋白质,具有促进组织再生、组织修复、细胞保护、血管生成、对抗细胞凋亡及促炎细胞因子的能力^[28-29]。④细胞外囊泡:MSCs分泌细胞外囊泡可根据其来源、大小和发生机制分为外泌体、微泡、凋亡小体3种类型,其具有无自我复制能力和生物活性稳定等优点,可通过改善肺泡张力、纠正肺动脉高压、降低活化的巨噬细胞和促炎细胞因子水平而显示出其独特的益处^[30-32]。⑤线粒体转移:健康MSCs来源的线粒体可通过胞间(纳米管、微管等结构)连接、囊泡等方式转移到肺部受损细胞中,重建这些细胞的有氧呼吸功能,使之继续存活并发挥作用^[33-35]。

2 MSCs 及其衍生物雾化吸入治疗肺部疾病

合理的给药途径是影响MSCs及其衍生物疗效的重要因素之一。目前国内外研究中, MSCs及其衍生物的给药途径大致分为肠内、肠外以及局部给药,包括口服、舌下含服、直肠给药、静脉输注、动脉注射、皮下注射、肌内注射、气管滴注、雾化吸入等^[36]。截至2022年6月30日,以“Mesenchymal stem cells”和“Pulmonary disease”作为主题词搜索,在美国国立卫生研究院(National Institute of Health, NIH)临床试验网站中共有167项临床试验注册, MSCs及其衍生物治疗肺部疾病临床研究中常见的给药方式主要为静脉输注(138项)、未明确(10项)、气管滴注(9项)、雾化吸入(6项)、气管灌注(3项)、肌内注射(1项)。在传统的静脉或局部给药方式研究中, MSCs及其衍生物表现出体内存活率低、潜在致瘤和血栓风险、MSCs衍生物产量及纯度不定、治疗机制复杂、调控难度大、储存运输条件严格等缺陷^[37-38];而雾化吸入给药方式具有能够直达呼吸道、更大剂量输入、精确给予剂量、操作简单、风险低等特点,在治疗肺部疾病中可能更具安全性和有效性^[7, 39]。因此,研究人员对于MSCs及其衍生物的雾化给药方式也越来越感兴趣。

2.1 MSCs 及其衍生物雾化吸入治疗肺部疾病的研究进展

2.1.1 国内外临床前研究进展:研究表明,与各种肠胃外途径相比,雾化吸入不仅有助于提高治疗有效率,还可以保证MSCs在肺中的高水平浓度及活力分布^[40],同时细胞丢失和形态变化的风险也最小^[41]。McCarthy等^[42]证实了骨髓来源和脐带血来源的MSCs培养基与雾化器可以适配并且安全有效, MSCs培养基作为一种含有MSCs分泌活性多肽的有效抗菌剂,如LL-37、铁调素和脂质运载蛋白2(lipocalin-2, LCN2)等,可以通过雾化吸入方式对多种病原体分离株发挥抑菌作用,且浓缩和重组的培养基不影响其抑菌性能。

Dinh等^[43]将不同原因所致肺纤维化小鼠放入雾化系统内,连续7d(每日30min)分别雾化吸入肺球状细胞分泌组(lung spheroid cell-secretome, LSC-Sec)和外泌体(lung spheroid cell-exosomes, LSC-Exo)以及骨髓MSCs分泌组和外泌体[LSC和MSCs分泌蛋白剂量以10mg/kg分泌组蛋白浓度为标准;LSC和MSCs外泌体剂量按外泌体颗粒数(10×10^9 个颗粒/kg)为标准],结果显示,雾化吸入肺球状细胞、骨髓MSCs的分泌组和外泌体可以通过重建正常肺泡及血管结构、减轻细胞凋亡以及局部/全身炎症反应、减少胶原[基质金属蛋白-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)]沉积及肌成纤维细胞增殖等作用来减轻博来霉素和二氧化硅诱导的肺纤维化,而且对肝肾功能无毒性作用,证实了细胞分泌蛋白组和外泌体雾化吸入治疗肺纤维化是安全有效的;同时作者还认为, LSC-Sec和LSC-Exo在某些方面可能优于骨髓MSCs的疗效。

通过腹腔注射和吸入卵清蛋白致敏,可以激发模型家兔哮喘发作。Halim等^[41]研究了MSCs和表达血管生成素1(angiotensin-1, ANGPT1)的MSCs(MSCs-pANGPT1)雾化吸入对哮喘相关气道炎症的影响,作者使用雾化器将MSCs和MSCs-pANGPT1细胞雾化吸入,治疗后评估肺组织病理学并对炎症反应进行定量评分,结果显示,雾化吸入MSCs和MSCs-pANGPT1后气道炎症明显减轻,基底膜、上皮、黏膜和黏膜下层厚度等结构明显改善,细支气管区及血管周围区的炎症反应和粒细胞浸润明显减少,两组气道炎症评分均较治疗前明显降低,同时也减少了支气管肺泡灌洗液中气道炎症细胞的数量,抑制了杯状细胞的增殖;该研究同时也分析了雾化吸入治疗的主要作用机制,可能是降低促炎因子[白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、转化生长因子- β 、肿瘤坏死因子、MMP-9等]水平。证实了雾化吸入MSCs和MSCs-pANGPT1治疗哮喘的安全性和有效性。

国内瞿介明团队^[44]通过DiR标记MSCs外泌体,观察使用网状振动雾化器雾化吸入后的外泌体在体内的生物分布,发现雾化吸入后的MSCs外泌体在24h时肺部聚集达到峰值,然后逐渐降低,持续时间约28d。在铜绿假单胞菌造成的小鼠肺损伤模型中,雾化吸入MSCs外泌体可以显著降低小鼠肺部炎症水平、减轻肺损伤、提高小鼠生存率。此外,在

剂量-效应研究中作者还发现,外泌体在 $(0.2 \sim 2.0) \times 10^6$ 个颗粒范围内,随着剂量的增加,治疗效果会更好,呈现剂量-效应关系,而超过 2.0×10^6 个颗粒后剂量与效应则呈负相关,这一结果提示适当剂量 MSCs 外泌体是雾化吸入发挥治疗效果的重要前提^[44]。

2.1.2 国内外临床研究进展:据 Brave 和 MacLoughlin^[2]报道,有超过 75 项针对 ARDS、脓毒症和新冠肺炎的 MSCs 及其衍生物临床试验显示出安全有效的结果。截至 2022 年 6 月 30 日,以“间充质干细胞”和“肺部疾病”作为主题词搜索,在美国临床试验数据库中有 167 项注册的临床试验,其中 138 项静脉输注 MSCs 及其衍生物治疗肺部疾病试验中已有多项发布结果,验证了 MSCs 及其衍生物静脉输注治疗肺部疾病的安全性和有效性。

在 167 项注册临床试验中,以雾化吸入为给药方式的试验共有 6 项。前述的瞿介明团队^[44]在临床前研究中同时还开展了 MSCs 外泌体雾化吸入治疗 ARDS 的临床研究(NCT 04313647),研究招募了 24 名健康志愿者雾化吸入 MSCs 外泌体,主要目的是评估临床安全性,结果表明,所有志愿者均表现出对雾化吸入外泌体良好的耐受性,生命体征、血常规、凝血功能、免疫球蛋白 E (immunoglobulins E, IgE) 等指标未见显著异常。这一结果为进一步推进雾化吸入 MSCs 外泌体在肺部疾病临床应用的安全性提供了有力证据。

此外,另一项在重症新冠肺炎患者中开展的评估异体脂肪 MSCs 外泌体雾化吸入治疗安全性(主要结局:不良反应和严重不良反应、临床改善的时间)和有效性[次要结局:脱机患者数量、机械通气时间、重症监护病房(intensive care unit, ICU)住院时间、血管活性药物使用时间、预后以及血炎症指标、乳酸、影像学改变等]的小型、单臂、开放、联合介入临床研究(NCT 04276987)^[45],连续 5 d 每日给予患者 6 mL (含 2.0×10^8 个颗粒)剂量的外泌体气溶胶雾化吸入,其中 7 例新冠肺炎患者(男性 4 例,女性 3 例)均接受异体脂肪 MSCs 外泌体雾化吸入治疗。入组患者年龄 43 ~ 70 岁,从出现症状到入院和雾化吸入异体脂肪 MSCs 外泌体的中位时间分别为 30(15, 40)d 和 54(34, 69)d。所有新冠肺炎患者都能很好地耐受异体脂肪 MSCs 外泌体雾化吸入,在连续 5 d 的雾化治疗期间或雾化后即刻,所有患者生命体征稳定,没有发生预先指定的不良事件或剂量相关毒性事件,且作为新冠肺炎的关键预后指标,雾化吸入异体脂肪 MSCs 外泌体后,淋巴细胞减少趋势有所改善,7 例患者均表现为淋巴细胞计数增加;同时雾化吸入异体脂肪 MSCs 外泌体后,所有患者的胸部 CT 结果均显示有不同程度的消退,其中 4 例消退更为明显。这一结果为雾化吸入 MSCs 外泌体治疗肺部疾病的安全性和有效性提供了支持。

至此,国内外开始进一步积极探索 MSCs 外泌体雾化治疗肺部疾病的临床应用。国内于 2020 年 7 月 1 日开展了一项评估同种异体脂肪 MSCs 外泌体雾化治疗耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌所致肺部感染的多重、随机、双盲临床研究临床试验(NCT 04544215)^[46],预计入组人数 60 人。该研究设

置了低剂量组(给予 8×10^8 个外泌体颗粒)、高剂量组(给予 16×10^8 个外泌体颗粒)和空白对照组,连续雾化吸入治疗 7 d,评价指标包括主要结局(8 d 临床治愈率)和次要结局(不良反应率、8 d 感染清除率、28 d 内复发率和二次感染率、机械通气时间、ICU 住院时间及 28 d 和 90 d 病死率),该研究进一步大规模分析了同种异体脂肪 MSCs 外泌体雾化治疗肺部感染性疾病的安全性和有效性。同年 11 月 30 日,另一项评估同种异体脂肪 MSCs 外泌体雾化治疗 ARDS 的多重、随机、双盲、对照临床试验(NCT 04602104, I ~ II 期)^[47],预计入组人数 169 人。I 期分别给予 2×10^8 、 8×10^8 、 16×10^8 个颗粒剂量连续雾化吸入治疗 7 d; II 期分为两个治疗组和一个安慰剂组,分别给予 1/4 最大剂量、最大剂量、生理盐水连续雾化吸入治疗 7 d,评价指标包括主要结局(不良反应发生率、临床改善时间、28 d 病死率)和次要结局[Murray 肺损伤评分、氧合指数、序贯器官衰竭评分(sepsis-related organ failure assessment, SOFA)、急性生理学及慢性健康状况评分 II (acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)、幸存者 ICU 住院时间],该研究进一步大规模地分析了同种异体脂肪 MSCs 外泌体治疗 ARDS 的安全性和有效性。同时,国外分别在 2020 年 7 月和 10 月开展了两项关于重症新冠肺炎患者 MSCs 外泌体雾化治疗的安全性和有效性临床研究(COVID-19Exo 和 COVID-19Exo2)。COVID-19Exo 研究(NCT 04491240, I ~ II 期)^[48]将符合条件的 30 例研究对象随机、双盲分为两个治疗组或安慰剂组。治疗 1 组在 10 d 内每日 2 次吸入 3 mL 含 $(0.5 \sim 2.0) \times 10^{10}$ 个第 1 类纳米颗粒(外泌体)特殊溶液(未具体说明);治疗 2 组在 10 d 内每日 2 次吸入 3 mL 含 $(0.5 \sim 2.0) \times 10^{10}$ 个第 1 类纳米颗粒(外泌体)特殊溶液(未具体说明),目前已完成患者招募工作。COVID-19Exo2 研究(NCT 04602442, II 期)^[49] 10 月 1 日开始招募 90 例患者进行随机、平行分配试验,该试验分组、治疗剂量与 COVID-19Exo 研究一致。这两项研究都将从不良事件、临床恢复时间、生理生化指标及影像学变化等方面进一步分析不同组型外泌体雾化治疗重症新冠肺炎患者的安全性和有效性。

综上, MSCs 及其衍生物雾化吸入治疗肺部疾病的结果均显示出良好的安全性和一定的有效性,国内外前沿研究大规模探索了其临床应用的可能。MSCs 及其衍生物雾化治疗肺部疾病创新疗法的应用,也正需要进一步的实验及临床数据用于验证其作用机制并解决吸入剂量、频次及雾化吸入装置的类型等临床应用的关键问题。

2.2 MSCs 及其衍生物雾化吸入装置的研究进展:在 MSCs 及其衍生物雾化吸入治疗肺部疾病过程中,雾化吸入装置是重要的影响因素,影响着 MSCs 及其衍生物的活性、给药效率以及疗效,上述临床前研究及临床研究中各研究团队选择的雾化吸入装置也不尽相同。传统雾化吸入装置类型主要分为超声波、压缩喷射和网状振动雾化装置 3 类。在 MSCs 及其衍生物雾化吸入装置适配方面的研究虽然有限,但也取得了一些进展,一定程度上促进了近年来相关临床前研究及临

表 1 国内干细胞及其衍生物的雾化吸入治疗技术相关专利

授权公告号	专利名称	发明专利和实用新型专利简介
CN 109078244 A CN 209122883 U	一种干细胞雾化呼吸治疗装置	一种干细胞雾化呼吸治疗装置,包括弧形盘及安装在弧形盘内部的放置盘,侧板的内壁设置有挡环,放置盘的一侧设置有出口环,出口环的两端均设置有凸块,底盘的内部设置有内盘,内盘的表面设置有挡片,该干细胞雾化呼吸治疗装置,干细胞冻干粉胶囊沿着挡片围成的放置槽路径转动,直到干细胞冻干粉胶囊从出口环的开口槽推出,进而方便对干细胞冻干粉胶囊进行拿取,提高了使用效果,卡板卡在凸块两侧,并对出口环进行限位固定,此时出口环位于弧形盘内,在便于对干细胞冻干粉胶囊存放的同时,避免干细胞冻干粉胶囊受到污染
CN 112657022 A CN 213252161 U	一种新型便携干细胞雾化器	一种干细胞雾化呼吸治疗装置,具体涉及雾化呼吸治疗技术领域,包括雾化桶,雾化桶的顶部设置有密封盖,密封盖的顶端固定连接把手筒,把手筒内部设置有电机,电机的输出端转子部连接有转轴,转轴的两侧均固定连接 3 个均匀分布的搅拌杆,转轴的底端连接有滚动轴承,滚动轴承镶嵌在雾化桶的内壁中,搅拌杆的两侧均设置有清洗机构。本实用新型专利拥有自清洁的功能,清洗效率高,节省了人力,操作方便,可以对雾化的液体进行温度调节,提高了装置的实用性,还可以对液体进行保温,节约了能源,保护了环境,可以对面罩进行消毒处理,以保证下次使用时更加干净卫生,非常方便实用

床研究的发展。

有研究已证明, MSCs 在表面声波的激发下能够保持活性和功能,但在该研究中细胞受到的振动强度远远低于雾化所需的临界水平^[50]。而传统雾化装置中由于强烈力学作用产生气溶胶,容易造成 MSCs 大量失活,难以保证雾化过程中 MSCs 及其衍生物存活或保持其功能^[51]。2016 年 Alhasan 团队^[8]的研究被认为是 MSCs 及其衍生物雾化吸入的开创性研究,他们展示了一种新的高频雾化平台用于 MSCs 雾化治疗肺部疾病,这些表面声波在足够高的频率下工作,与传统雾化装置相比使雾化的治疗分子或细胞受到的振动激发的时间极大缩短,从而消除了大分子变性或细胞裂解的风险,最大限度地保存了 MSCs 及其衍生物的活性。在 2018 年, Aveyanov 团队^[52]比较了在超声波、压缩喷射和网状振动雾化装置中 10 min 后 MSCs 的存活率,其中压缩喷射雾化装置中细胞活力保存最好(为 72%);超声波雾化后细胞存活率降低至 20%;网状振动雾化后未见活细胞。该研究提示压缩喷射雾化可能是 MSCs 输送到肺部的最好方法。

国内干细胞及其衍生物的雾化吸入装置研发也已取得突破,截至 2021 年 11 月 28 日,以“干细胞”和“雾化”为关键词检索国内相关专利,已有 13 项公布或在审,多项专利的批准为临床应用提供了安全、有效、方便的使用策略(表 1)。

3 小结

本文主要探讨了 MSCs 及其衍生物雾化吸入治疗肺部疾病的研究进展,总结了目前临床前研究及临床研究结果, MSCs 及其衍生物雾化吸入治疗肺部疾病的临床前研究证明该方案安全有效,临床研究中安全性已有充分验证,有效性也已得到初步验证,尚待进一步研究结果的公布。因此,雾化吸入 MSCs 及其衍生物是治疗肺部疾病极具潜力的临床应用方式,然而目前该方式的临床转化仍有部分关键问题尚未明确,包括给药剂量、频次、雾化装置类型等,此外还包括 MSCs 及其衍生物储存、运输、分离纯化、调控、制备成本、完整规范的临床质控等诸多问题,需要进一步实验和更大规模的临床数据来验证和支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Al-Khawaga S, Abdelalim EM. Potential application of mesenchymal stem cells and their exosomes in lung injury: an emerging therapeutic option for COVID-19 patients [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11 (1): 437. DOI: 10.1186/s13287-020-01963-6.
- [2] Brave H, MacLoughlin R. State of the art review of cell therapy in the treatment of lung disease, and the potential for aerosol delivery [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (17): 6435. DOI: 10.3390/ijms21176435.
- [3] Yen BL, Yen ML, Wang LT, et al. Current status of mesenchymal stem cell therapy for immune/inflammatory lung disorders: gleaning insights for possible use in COVID-19 [J]. Stem Cells Transl Med, 2020, 9 (10): 1163-1173. DOI: 10.1002/sctm.20-0186.
- [4] Wu GS, Chang F, Fang H, et al. Non-muscle myosin II knockdown improves survival and therapeutic effects of implanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Ann Transl Med, 2021, 9 (3): 262. DOI: 10.21037/atm-20-4851.
- [5] Harrell CR, Jovicic BP, Djonov V, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells and their secretome in the treatment of SARS-CoV-2-induced acute respiratory distress syndrome [J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2020, 2020: 1939768. DOI: 10.1155/2020/1939768.
- [6] 钟玉兰, 涂鑫. 间充质干细胞源外泌体在肺部疾病中的应用与作用 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23 (13): 2121-2126. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.1687.
- [7] Kardia E, Halim NSSA, Yahaya BH. Aerosol-based cell therapy for treatment of lung diseases [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1516: 243-255. DOI: 10.1007/978-1-4939-9921-8_50.
- [8] Alhasan L, Qi AS, Rezk AR, et al. Assessment of the potential of a high frequency acoustofluidic nebulisation platform for inhaled stem cell therapy [J]. Integr Biol (Camb), 2016, 8 (1): 12-20. DOI: 10.1039/c5ib00206k.
- [9] Kähler CM, Wechselberger J, Hilbe W, et al. Peripheral infusion of rat bone marrow derived endothelial progenitor cells leads to homing in acute lung injury [J]. Respir Res, 2007, 8 (1): 50. DOI: 10.1186/1465-9921-8-50.
- [10] Neuringer IP, Randell SH. Stem cells and repair of lung injuries [J]. Respir Res, 2004, 5 (1): 6. DOI: 10.1186/1465-9921-5-6.
- [11] Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium [J]. Development, 2001, 128 (24): 5181-5188. DOI: 10.1242/dev.128.24.5181.
- [12] Pedrazza L, Cunha AA, Luft C, et al. Mesenchymal stem cells improves survival in LPS-induced acute lung injury acting through inhibition of NETs formation [J]. J Cell Physiol, 2017, 232 (12): 3552-3564. DOI: 10.1002/jcp.25816.
- [13] Jafarinia M, Alsahebhosoul F, Salehi H, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a novel cell-free therapy [J]. Immunol Invest, 2020, 49 (7): 758-780. DOI: 10.1080/08820139.2020.1712416.
- [14] Jiang YS, Li F, Li YN, et al. CD69 mediates the protective role of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against

- Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection [J]. Clin Transl Med, 2021, 11 (11): e563. DOI: 10.1002/ctm2.563.
- [15] 阎岩, 姜秀峰, 丁添非, 等. 免疫疗法及间充质干细胞移植在危重型新型冠状病毒肺炎患者治疗中的效果评价 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (2): 139-144. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201113-00714.
- [16] Eleuteri S, Fierabracci A. Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (18): 4597. DOI: 10.3390/ijms20184597.
- [17] 牛志芳, 丁子玲, 郭小芹, 等. 骨髓间充质干细胞对烟雾吸入伤大鼠 Th17/Treg 免疫平衡的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2022, 29 (2): 172-176. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2022.02.010.
- [18] 郑莉, 王盛, 杨浩, 等. 间充质干细胞调控巨噬细胞 M1/M2 平衡减轻急性呼吸窘迫综合征的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (4): 509-512. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200426-00334.
- [19] Zhu F, Xia ZF. Paracrine activity of stem cells in therapy for acute lung injury and adult respiratory distress syndrome [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2013, 74 (5): 1351-1356. DOI: 10.1097/TA.0b013e318283d942.
- [20] 朱峰, 文辉才, 郭光华. 干细胞旁分泌效应在 ALI/ARDS 治疗中的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28 (4): 755-759. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2012.04.033.
- [21] Lee JH, Han YS, Lee SH. Potentiation of biological effects of mesenchymal stem cells in ischemic conditions by melatonin via upregulation of cellular prion protein expression [J]. J Pineal Res, 2017, 62 (2): e12385. DOI: 10.1111/jpi.12385.
- [22] Hu CX, Li LJ. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties *in vitro* and *in vivo* [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22 (3): 1428-1442. DOI: 10.1111/jcmm.13492.
- [23] Jiang CM, Liu J, Zhao JY, et al. Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells [J]. J Dent Res, 2015, 94 (1): 69-77. DOI: 10.1177/0022034514557671.
- [24] Liu YY, Chiang CH, Hung SC, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells ameliorate ischemia/reperfusion-induced lung injury [J]. PLoS One, 2017, 12 (11): e0187637. DOI: 10.1371/journal.pone.0187637.
- [25] Hwang B, Liles WC, Waworuntu R, et al. Pretreatment with bone marrow-derived mesenchymal stromal cell-conditioned media confers pulmonary ischemic tolerance [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2016, 151 (3): 841-849. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2015.11.043.
- [26] Kim SY, Lee JH, Kim HJ, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302 (9): L891-L908. DOI: 10.1152/ajplung.00288.2011.
- [27] Shologu N, Scully M, Laffey JG, et al. Human mesenchymal stem cell secretome from bone marrow or adipose-derived tissue sources for treatment of hypoxia-induced pulmonary epithelial injury [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (10): 2996. DOI: 10.3390/ijms19102996.
- [28] Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, et al. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10 (3): 244-258. DOI: 10.1016/j.stem.2012.02.005.
- [29] Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (9): 1852. DOI: 10.3390/ijms18091852.
- [30] Akers JC, Gonda D, Kim R, et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies [J]. J Neurooncol, 2013, 113 (1): 1-11. DOI: 10.1007/s11060-013-1084-8.
- [31] Gangadaran P, Ahn BC. Extracellular vesicle- and extracellular vesicle mimetics-based drug delivery systems: new perspectives, challenges, and clinical developments [J]. Pharmaceutics, 2020, 12 (5): 442. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050442.
- [32] Bari E, Ferrarotti I, Torre ML, et al. Mesenchymal stem/stromal cell secretome for lung regeneration: the long way through "pharmaceuticalization" for the best formulation [J]. J Control Release, 2019, 309: 11-24. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.07.022.
- [33] Dutra Silva J, Su Y, Calfee CS, et al. Mesenchymal stromal cell extracellular vesicles rescue mitochondrial dysfunction and improve barrier integrity in clinically relevant models of ARDS [J]. Eur Respir J, 2021, 58 (1): 2002978. DOI: 10.1183/13993003.202978-2020.
- [34] Velarde F, Ezquerro S, Delbruyere X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated transfer of mitochondria: mechanisms and functional impact [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79 (3): 177. DOI: 10.1007/s00018-022-04207-3.
- [35] 韩进旺, 宋艳玲, 朱峰. 干细胞治疗肺损伤的线粒体转移机制 [J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30 (1): 88-90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.01.017.
- [36] Jin JF, Zhu LL, Chen M, et al. The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection [J]. Patient Prefer Adherence, 2015, 9: 923-942. DOI: 10.2147/PPA.S87271.
- [37] Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion [J]. Front Immunol, 2012, 3: 297. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00297.
- [38] Maumus M, Rozier P, Boulestreau J, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: opportunities and challenges for clinical translation [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 997. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00997.
- [39] Xisto DG, Abreu SC, Antunes MA, et al. Intratracheal versus intravenous bone marrow mononuclear cell therapy in experimental chronic allergic asthma: which is the best administration route? [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183: A3588.
- [40] Swart GT, Merskey HS. Family background and physical health of adolescents admitted to an inpatient psychiatric unit. II: physical health [J]. Can J Psychiatry, 1989, 34 (2): 84-88. DOI: 10.1177/070674378903400202.
- [41] Halim NSS, Ch'ng ES, Kardia E, et al. Aerosolised mesenchymal stem cells expressing angiopoietin-1 enhances airway repair [J]. Stem Cell Rev Rep, 2019, 15 (1): 112-125. DOI: 10.1007/s12015-018-9844-7.
- [42] McCarthy SD, Horgan E, Ali A, et al. Nebulized mesenchymal stem cell derived conditioned medium retains antibacterial properties against clinical pathogen isolates [J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2020, 33 (3): 140-152. DOI: 10.1089/jamp.2019.1542.
- [43] Dinh PC, Paudel D, Brochu H, et al. Inhalation of lung spheroid cell secretome and exosomes promotes lung repair in pulmonary fibrosis [J]. Nat Commun, 2020, 11 (1): 1064. DOI: 10.1038/s41467-020-14344-7.
- [44] Shi MM, Yang QY, Monsel A, et al. Preclinical efficacy and clinical safety of clinical-grade nebulized allogenic adipose mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles [J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10 (10): e12134. DOI: 10.1002/jev2.12134.
- [45] Zhu YG, Shi MM, Monsel A, et al. Nebulized exosomes derived from allogenic adipose tissue mesenchymal stromal cells in patients with severe COVID-19: a pilot study [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13 (1): 220. DOI: 10.1186/s13287-022-02900-5.
- [46] ClinicalTrials.gov. A clinical study of mesenchymal progenitor cell exosomes nebulizer for the treatment of pulmonary infection [EB/OL]. (2020-09-10) [2022-06-30]. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT04544215>.
- [47] ClinicalTrials.gov. A clinical study of mesenchymal stem cell exosomes nebulizer for the treatment of ARDS [EB/OL]. (2020-10-26) [2022-06-30]. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT04602104>.
- [48] ClinicalTrials.gov. Evaluation of safety and efficiency of method of exosome inhalation in SARS-CoV-2 associated pneumonia (COVID-19EXO) [EB/OL]. (2020-07-29) [2022-06-30]. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT04491240>.
- [49] ClinicalTrials.gov. Safety and efficiency of method of exosome inhalation in COVID-19 associated pneumonia (COVID-19EXO2) [EB/OL]. (2020-10-26) [2022-06-30]. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT04602442>.
- [50] Li HY, Friend J, Yeo L, et al. Effect of surface acoustic waves on the viability, proliferation and differentiation of primary osteoblast-like cells [J]. Biomicrofluidics, 2009, 3 (3): 34102. DOI: 10.1063/1.3194282.
- [51] Masterson CH, McCarthy SD, O'Toole D, et al. The role of cells and their products in respiratory drug delivery: the past, present, and future [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2020, 17 (12): 1689-1702. DOI: 10.1080/17425247.2020.1814732.
- [52] Aver'yanov AV, Konoplyannikov AG, Antonov NS, et al. Survival of mesenchymal stem cells in different methods of nebulization [J]. Bull Exp Biol Med, 2018, 164 (4): 576-578. DOI: 10.1007/s10517-018-4034-9.