DOI:10.3969/j.issn.2097-7948.2026.01.024

·论著·

经鼻吸入间充质干细胞来源的细胞外囊泡治疗急性肺损伤的作用与机制研究

刘浩正,孙宜宣,刘鑫楷,刘思成,李瑞,傅恩泽,李宗金*
南开大学医学院,天津 300350

摘要:目的 探索一种具有高疗效与良好临床转化潜力的急性肺损伤(ALI)治疗新策略:经鼻吸入途径递送间充质干细胞来源的细胞外囊泡(MSC-EVs),系统评估其对脂多糖(LPS)诱导的 ALI 的治疗效果,并初步揭示其治疗机制。**方法** 从人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)的培养基上清中提取并鉴定 MSC-EVs。通过气管滴注 LPS 建立小鼠 ALI 模型后,采用经鼻吸入方式进行干预。24 h 后,综合运用肺组织苏木素-伊红(HE)染色、免疫荧光染色、肺泡灌洗液(BALF)细胞学与生化分析以及实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测炎症因子白细胞介素-6(IL-6)等多项指标,全面评估疗效。进一步通过生物信息学方法,预测 MSC-EVs 中关键微小 RNAs(miRNAs)的靶基因,并进行京都基因与基因组数据库(KEGG)通路富集分析,从分子网络层面探究其潜在作用机制。**结果** 经鼻吸入 MSC-EVs 能显著改善 ALI 小鼠的肺组织病理损伤。与损伤组相比,损伤后MSC-EVs治疗组的肺组织病理情况及免疫细胞浸润程度均得到明显改善。生物信息学分析揭示,MSC-EVs 中富含的miRNAs可能通过调控丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)-蛋白激酶 B(PKB/Akt)等关键信号通路,参与炎症抑制、细胞凋亡调控及组织修复过程。**结论** 经鼻吸入能有效将MSC-EVs递送至肺部,其作用机制与直接缓解肺部病理损伤、调节局部免疫反应及影响多条修复相关信号通路密切相关。该研究为开发基于MSC-EVs的吸入式生物制剂、推动 ALI 的临床治疗提供了重要的实验依据与新颖思路。

关键词:急性肺损伤;间充质干细胞;细胞外囊泡;经鼻吸入;生物信息学
中图分类号:R563

Study on the efficacy and mechanism of intranasal inhalation of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in treating acute lung injury

LIU Haozheng, SUN Yixuan, LIU Xinkai, LIU Sicheng, LI Rui, FU Enze, LI Zongjin*
Nankai University School of Medicine, Tianjin 300350, China

Abstract: Objective To explore a novel therapeutic strategy for acute lung injury (ALI) with high efficacy and favorable clinical translational potential by delivering mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles (MSC-EVs) via the intranasal route and to systematically evaluate the therapeutic effects of MSC-EVs in a lipopolysaccharide (LPS) induced ALI model and further provided initial insights into the underlying mechanisms.

基金项目:国家自然科学基金项目(82472169);国家资助博士后研究人员计划(GZC20251727)
*通信作者
利益冲突:作者均声明无利益冲突
伦理批件:20230027
知情同意:不需要
引用本文:刘浩正,孙宜宣,刘鑫楷,等.经鼻吸入间充质干细胞来源的细胞外囊泡治疗急性肺损伤的作用与机制研究[J].再生医学研究,2026,1(1):1-13.doi:10.3969/j.issn.2097-7948.2026.01.024.

Fund program: The National Natural Science Foundation of China (82472169); The Postdoctoral Fellowship Program of China Postdoctoral Science Foundation (GZC20251727)
*Corresponding author
Conflicts of interest: Authors all declare no conflicts of interest.
Ethical approval: 20230027.
Informed consent: Not required.
Cite this article: Liu HZ, Sun YX, LIU XK, *et al*. Study on the efficacy and mechanism of intranasal inhalation of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in treating acute lung injury[J]. Zaisheng Yixue Yanjiu, 2026, 1(1): 1-13.. doi: 10.3969/j.issn.2097-7948.2026.01.024.

Methods MSC-EVs were isolated and characterized from the conditioned medium of human umbilical cord MSCs (hUC-MSCs). Following the establishment of a mouse ALI model via intratracheal instillation of LPS, the intervention was administered through intranasal inhalation. Twenty-four hours post-intervention, a comprehensive assessment of therapeutic efficacy was conducted. This included histological evaluation of lung tissues via hematoxylin-eosin (HE) staining, immunofluorescence staining, cytological and biochemical analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and quantification of the inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) using real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). Furthermore, bioinformatics approaches were employed to predict the target genes of key microRNAs (miRNAs) contained within the MSC-EVs. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was subsequently performed to explore the potential molecular network mechanisms underlying their therapeutic effects. **Results** Intranasal inhalation of MSC-EVs significantly ameliorated pulmonary histopathological damage in ALI mice. Compared to the injury group, the MSC-EVs treatment group showed marked improvements in lung histopathology and the extent of immune cell infiltration following injury. Bioinformatics analysis revealed that the miRNAs enriched in MSC-EVs may participate in processes such as inflammation suppression, apoptosis regulation, and tissue repair, potentially by modulating key signaling pathways including mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-protein kenase B (PKB/Akt). **Conclusion** This study systematically demonstrates that intranasal inhalation effectively delivers MSC-EVs to the lungs. The therapeutic effects are closely associated with direct attenuation of pulmonary pathological damage, modulation of local immune responses, and regulation of multiple repair-related signaling pathways. Collectively, these findings provide important experimental evidence and novel insights for the development of MSC-EV-based inhalable biologics and for advancing the clinical treatment of ALI.

Key words: Acute lung injury; Mesenchymal stem cells; Extracellular vesicles; Intranasal administration; Bioinformatics

急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是一类由于内外致病因素损伤肺泡和毛细血管,进而导致肺通、换气功能异常和机体缺氧的肺部疾病。该病致死率较高,尚无特效治疗手段。患者病情进展迅速,数日内即可发展为重症急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS),出现大面积的肺间质、肺泡水肿或出血等,临床症状为胸闷、咳嗽和咳痰等,可进一步恶化导致低氧血症甚至呼吸衰竭[1]。在 ALI 过程中,细胞中的核因子-κB(nuclear factor-κB,NF-κB)等多条炎症通路被激活并引发下游级联反应,释放出多种炎性介质,招募炎症细胞聚集,引发炎症反应,造成微环境破坏,血管通透性增大,水和低分子量物质渗出到组织间隙内等病理表现[2]。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)是人体内的成体干细胞,具有多向分化潜能,能够增殖并分化为多种细胞类型[3]。MSCs 来源的细胞外囊泡(mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles,MSC-EVs)是 MSCs 分泌的细胞外囊泡(extracellular vesicles,EVs),根据国际细胞外囊泡学会 2023 年发布的指南,EVs 可根据分离方式、物理特性等操作特征进行分类,其中直径小于 200 nm 的亚群通常被定义为小细胞外囊泡(small EVs,sEVs)[4],本研究关注的 MSC-EVs 主要富集于该尺寸范围(常见直径为 30 ~ 150 nm)。MSC-EVs 携带多种生物活性成分,包括目前已鉴定出的多种微小 RNAs(microRNAs,miRNAs)[5]和蛋白质[6],还包括 mRNA[7]、各类脂质等[8]。MSC-EVs 可以将这些活性物质传递给组织细胞,引起细胞基因表达和代谢活动的改变,在 MSCs 的免疫调节和机体修复过程中起到关键作用。有研究证据表明 MSC-EVs 在 ALI 的修复和 ARDS 治疗方面起到积极作用,例如,Wei 等[9]在脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的 ALI 小鼠模型中发现,MSC-EVs 所携带的 miR-377-3p 可抑制 RPTOR,诱导肺泡上皮细胞发生自噬,从而有效缓解病理损伤。

MSC-EVs 作为细胞疗法的无细胞替代方案,继承了 MSCs 的免疫调节、抗炎和组织修复功能,同时规避了活细胞移植的致瘤、栓塞等风险,在 ALI/ARDS 治疗中展现出巨大潜力。迄今为止,已有多项针对 MSC-EVs 治疗 ARDS 的临床试验。已有研

究[10]证实,通过静脉途径给予不同剂量的 MSCs 及 MSC-EVs 在 ARDS 患者中可表现出良好的耐受性,接受治疗的患者氧合指数有所改善,血管内皮损伤程度也有下降。然而,对于应用 MSC-EVs 进入 ALI 和 ARDS 的临床治疗仍然存在争议,其作用效果仍不明确,此外诸如给药方式、剂量、不良反应等均需进一步探究[11]。目前的实验中,MSC-EVs 主要采取静脉给药的方式[12],然而,传统静脉注射给药方式存在明显局限:大部分 EVs 被肝脾等单核-巨噬系统快速清除,肺部递送效率低;全身分布可能引起非预期效应,存在潜在的微栓塞风险[13-14]。

吸入给药是针对呼吸系统最直接的给药途径。大部分 MSC-EVs 直径在 30 ~ 150 nm,能有效到达肺组织并被靶细胞内化。因此,从气道吸入 EVs 可能是起效更快、作用更加持久的给药方法。相较于全身给药,吸入方式能使药物高浓度、快速富集于肺部病灶,大幅提高局部生物利用度,显著减少全身暴露及副作用[15]。近年来,尽管有少数研究尝试通过气管滴注给予 MSC-EVs,但更符合临床用药习惯、患者依从性更佳的经鼻吸入递送方式[16],其在 ALI 治疗中的系统性疗效评价、肺内分布特性及专属作用机制研究较少。

因此,本研究基于经鼻吸入给药途径,系统评估了 MSC-EVs 对 LPS 诱导的 ALI 小鼠模型的治疗效果,并初步探讨其潜在作用机制。具体而言,本研究旨在:(1)建立 MSC-EVs 经鼻吸入给药方案并验证其可行性;(2)从多维度系统评价 ALI 的疗效;(3)利用生物信息学手段预测并解析其潜在的作用分子网络,以期为 ALI 的临床吸入治疗提供全新思路和坚实实验基础。

1　材料与方法

1.1　实验动物与分组

BALB/c 小鼠,雄性,鼠龄 8 ~ 10 周,体质量 18 ~ 20 g,饲养于南开大学实验动物中心,自由进食水。将小鼠随机分为正常组(sham)、损伤组(LPS)、EVs 组(EVs)、损伤治疗组(LPS+EVs)。动物实验操作均按照南开大学实验动物饲养及使用规范进行(批准号 20230027)。

1.2　主要试剂

LPS、BCA 蛋白定量试剂盒、HRP-兔二抗(碧云天公司);DMEM/F12 细胞培养基(Corning 公司);胎牛血清(BI 公司);F4/80 抗体、DAPI(Proteintech 公司);DiI 荧光染料(索莱宝公司);Alexa Fluor 488 荧光二抗、Alexa Fluor 594 荧光二抗(Invitrogen 公司);E-cadherin 抗体、CD9 抗体、GM130 抗体、CD63 抗体(Abcam 公司);Alix 抗体(万类生物公司)。

1.3　方法

1.3.1　EVs 提取　实验前,将普通胎牛血清在 4 ℃下经 100 000×*g* 超速离心 18 h,并使用 0.22 μm 针式滤器过滤,以去除内源性 EVs,再使用该处理后的血清配制不含 EVs 的培养基。选择第 3 至 9 代的人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells,hUC-MSCs)培养 24 h 后,用不含 EVs 的培养基继续培养 48 h,收集培养基上清液。4 ℃,500×*g* 离心 10 min,收集上清液;4 ℃,2000×*g* 离心 30 min,再次收集上清液。100 000×*g* 超速离心 120 min,弃上清液,每管加入 100 μL PBS 重悬,并使用 BCA 试剂盒测定 EVs 的具体制备浓度约为 2.121 μg/μL。

1.3.2　EVs 鉴定　通过透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)观察 EVs 形态:取超速离心富集的 EVs 样品滴加至碳支持膜铜网,室温吸附后用 2% 磷钨酸负染,晾干后于 TEM 下观察 EVs 的杯状或球形形态。采用 Western blot 检测 EVs 标志蛋白:使用 RIPA 裂解液提取 EVs 总蛋白,经 BCA 法定量后,进行 SDS-PAGE 电泳并转印至 PVDF 膜,分别用 CD9、CD63、Alix 作为阳性标志物,GM130 作为阴性标志物进行抗体孵育,通过电化学发光(electrochemiluminescence,ECL)法检测目的蛋白表达。利用纳米粒径追踪分析测定 EVs 粒径分布:将 EVs 样品稀释过滤后上机检测,获取粒径分布图谱。以上 3 种方法联合用于 EVs 的形态、标志蛋白及粒径分布的综合鉴定。

1.3.3　EVs 标记　向提取的 EVs 中加入 5 μmol/L 的亲脂性荧光示踪剂 DiI,于 37 ℃避光条件下孵育 30 min;随后将样品转移至超速离心管,100 000×*g* 离心 120 min,弃上清以去除游离 DiI 染料,PBS 重悬沉

淀,得到 DiI 标记的 EVs(DiI-labeled extracellular vesicles,DiI-EVs),置于 4 ℃避光保存。

1.3.4 ALI 模型建立 小鼠经腹腔注射阿佛丁麻醉,固定于操作台,脱去毛发,碘伏消毒。颈部作纵行切口,钝性分离胸腺、结缔组织及肌肉组织,暴露气管。使用胰岛素注射器经气管注射 LPS 溶液(5 mg/kg)。注射完成后将小鼠直立数秒使 LPS 溶液充分进入呼吸道,回纳组织并缝合创口,在注射 LPS 溶液进行 ALI 造模 2 h 后可进行 MSC-EVs 给药。

1.3.5 经鼻吸入给药方案的建立 本研究的关键创新在于给药途径,小鼠经鼻吸入的单次给药剂量为 100 μg/只。在 LPS 诱导 ALI 模型建立 2 h 后进行 MSC-EVs 给药,具体操作如下:将提取的 MSC-EVs用无菌 PBS 重悬至所需浓度。使用阿佛丁麻醉,将小鼠置于仰卧位。使用微量移液器吸取 10 μL MSC-EVs 悬液(或 PBS 对照),缓慢、逐滴(约 2 μL/次)滴加于小鼠一侧鼻孔边缘。利用小鼠自主的吸气动作,将液滴自然吸入鼻腔及下呼吸道。间隔 30 s 后,于另一侧鼻孔重复操作,直至给完总剂量。整个过程确保动物呼吸平稳,无呛咳。术后护理:给药后保持小鼠仰卧位约 1 min,待其完全吸入药液后放回笼中正常饲养,在 MSC-EVs 给药24 h 后进行取材。

1.3.6 小鼠肺组织取材 在 MSC-EVs 给药治疗 24 h 后,小鼠经腹腔注射三溴乙醇(0.1 mL/10 g)麻醉,固定在操作台上,于肋缘下作腹部横向切口,切开皮肤及腹膜后沿胸廓内缘作弧形切口分离肋与膈肌。将皮肤及腹膜切口向双侧腋下延长,沿腋前线剪断胸廓肋骨并用血管钳夹持剑突向上翻折,暴露心脏及肺。使用20 mL 注射器沿心脏长轴方向刺入右心室,并用眼科剪剪破左心耳。推动注射器灌注 PBS 溶液,可见血液自心房破口流出。灌注至左房流出液无色透明及肺部颜色明显减退后,颈部作纵行正中切口,暴露气管,离断两侧锁骨并沿冠状面剖开胸廓,完全暴露胸腔器官。用 1 mL 注射器自气管处向肺内灌注 4% 多聚甲醛 0.4 mL,并使用手术缝线在注射器破口下方结扎气管。离断结扎部位上端气管,清除覆盖于肺表面的心脏及结缔组织,PBS 冲洗表面杂质后部分装入 4% 多聚甲醛离心管中储存,部分装入 30% 蔗糖溶液,储存至组织充分下沉。

1.3.7 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色 肺组织用 4% 多聚甲醛固定24 h,梯度乙醇脱水、二甲苯透明,65℃浸蜡 4 h 后包埋,制作 5 μm 石蜡切片。切片脱蜡复水后,苏木素染核 2 min,1% 盐酸-乙醇分化 3 s,反蓝后伊红染色 2 min,再次梯度脱水、透明,中性树胶封片,显微镜下观察。

1.3.8 肺泡腔面积计算 本研究采用 ImageJ 软件对小鼠 HE 染色切片中的肺泡腔面积进行定量分析。具体方法为:选取每只小鼠肺组织的石蜡切片,于光学显微镜下拍摄图像;将图像导入 ImageJ 后转换为灰度图像,通过手动设定阈值进行二值化处理,使肺泡腔区域与肺组织形成明显对比;在每张图像中选取代表性视野作为感兴趣区域,计算肺泡腔区域的像素面积,并计算其占感兴趣区域总像素面积的百分比作为肺泡腔面积占比。最终进行统计分析。

1.3.9 免疫荧光染色 肺组织经蔗糖充分脱水,使用 OCT 包埋剂包埋,液氮冷冻后制作 5 μm 切片。切片室温复温,PBS 冲洗,山羊血清封闭液室温封闭 2 h,滴加一抗(E-cadherin 或 F4/80),在 4℃下孵育 12 h 以上,PBS 冲洗后根据所需滴加相应荧光二抗(Alexa Fluor 488 或 Alexa Fluor 594),室温避光孵育 2 h,DAPI 染核 10 min,封片后荧光显微镜下观察,定量分析 F4/80 阳性区域面积。

1.3.10 小鼠肺泡灌洗 处死待检小鼠,暴露气管并结扎。将 pp 材质注射器针头插入结扎部位下端气管,用缝线绕气管固定。使用 1 mL 注射器连接 pp 注射器针头并注入 PBS 溶液 0.5 mL,轻轻按摩小鼠胸廓后缓慢回抽,重复灌洗 3 次并收集肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。4 ℃、2000 r/min 离心 15 min,弃上清液。沉淀加入等体积 PBS 重悬。

1.3.11 吉姆萨染色 使用 ddH_2O 将改良吉姆萨染色液稀释 20 倍,制成工作液。取 BALF 重悬后所得细胞溶液滴于载玻片一端。用另一载玻片行推片操作。自然风干后,滴加适量吉姆萨工作液使其与载玻片充分接触,染色 2.5 min,用 ddH_2O 自载玻片一端冲洗,自然风干后置于显微镜下观察。

1.3.12 RNA 提取 小鼠肺组织取材后浸泡于

500 μL 的 Trizol 溶液中，剪碎并反复吹打，室温静置 10 min。每管加入 200 μL 氯仿，用力摇晃 30 s 使样品充分乳化，再次静置 10 min。4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min。取上清液，加入等体积异丙醇，混匀后静置 10 min 使沉淀析出，随后在 12 000 r/min 条件下离心 10 min。弃上清液，75% 乙醇清洗后晾干即得到 RNA 沉淀。随后用 DEPC 水重悬，使用 Nanodrop 定量后反转为 cDNA 存放至-20 ℃冰箱中。

1.3.13　实时荧光定量聚合酶链式反应（real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）　PCR 八连管每小格内依次加入 SYBR 酶、引物和模板，加 DEPC 水至总体积为 20 μL；启动 RT-qPCR 仪，按以下参数设置程序并运行：94 ℃预变性 5 min；随后进行 35 个循环，循环条件为 94 ℃变性 30 s、55 ℃退火 25 s、72 ℃延伸 25 s；循环结束后执行溶解曲线分析。以每个样品的结果与每组的内参 GAPDH Ct 值进行比较计算，计算基因的表达水平。PCR 引物序列见表 1。

表 1　PCR 引物序列

Table 1　PCR primer sequence

基因名称	引物方向	引物序列	产物长度(bp)
IL-6	正向	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC	76
	反向	TTGGTCCTTTAGCCACTCCTTTC	
GAPDH	正向	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	123
	反向	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

IL-6：白细胞介素-6。

IL-6：interleukin-6.

1.3.14　MSC-EVs 中 miRNAs 的生物信息学分析　基于基因表达数据库（Gene Expression Omnibus，GEO）数据集 GSE211008 中 4 个样本的表达谱，本研究首先筛选出 hUC-MSC 来源的 EVs 中丰度最高的 30 个 miRNAs，继而通过联合 miRDB、TargetScan 和 mirDIP 3 个数据库预测其靶基因，取三者预测结果的交集，获得高置信度的靶基因集合，并对该集合开展京都基因与基因组数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析。

1.3.15　统计学处理　图像使用 ImageJ 进行处理和分析，数据统计分析使用 GraphPad。所有数据均以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间均数比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）。若总体差异具有统计学意义，进一步使用 Tukey 多重比较检验进行组间比较。统计分析结果中，当 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　MSC-EVs 的鉴定

应用 TEM 拍摄 MSC-EVs 照片，可见收集到的 EVs 呈典型的圆盘状（图 1A）；Western blot 检测结果可见 MSC-EVs 表达 Alix、CD63 和 CD9 等阳性标志物蛋白（图 1B），而无阴性高尔基体标志物 GM130 蛋白；对 MSC-EVs 的粒径大小进行统计，结果显示 MSC-EVs 粒径在 30～150 nm，峰值出现在 100 nm（图 1C）。

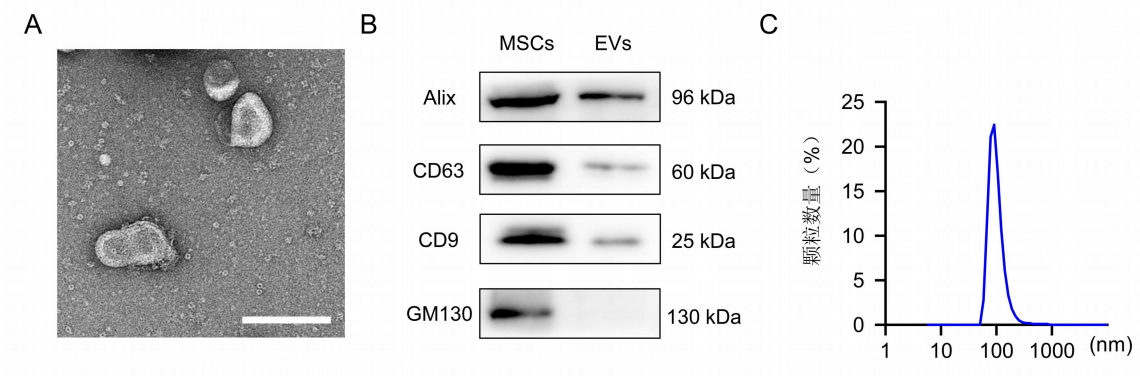


图 1　MSC-EVs 的鉴定。A：MSC-EVs 的透射电子显微镜图像，标尺为 200 nm；B：MSC-EVs 标志蛋白 Western blot 检测结果；C：MSC-EVs 的粒径检测。MSC-EVs：间充质干细胞来源的细胞外囊泡。

Figure 1　Characterization of MSC-EVs. A: Transmission electron microscopy image of MSC-EVs, scale bar: 200 nm; B: Western blot analysis of MSC-EVs marker proteins; C: Particle size analysis of MSC-EVs. MSC-EVs: mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles.

2.2 经鼻吸入途径实现药物在肺内的有效分布

为验证吸入给药的有效性，利用染料标记 EVs 后进行示踪，通过经鼻吸入途径使其进入呼吸道，并观察肺组织的着色情况。小鼠麻醉后用移液器将等量混合物缓慢多次滴加于鼻孔周围，使其随自然呼吸进入体内。10 min后灌流血管并取下小鼠肺脏，观察到滴鼻操作后小鼠鼻尖周围及口腔均有染色情况出现，气管受染料着色，肺门及支气管周围区域呈现明显染色（图 2），表明经鼻吸入方式能成功将含有 EVs 的液滴递送至气道，并实现有效分布，为该途径的治疗应用提供了直接证据。

为进一步验证该给药途径的可行性及其在组织水平的分布特征，通过经鼻吸入途径将与治疗剂量相等的 DiI-EVs 递送至小鼠呼吸道。给药 2 h 后收集肺组织，制备冰冻切片，并进行 E-cadherin 免疫荧光染色及 DAPI 核染色。其中，E-cadherin 呈绿色荧光，DiI-EVs 呈红色荧光，细胞核呈蓝色荧光，得到各组免疫荧光成像结果（图 3）。结果显示，小鼠经鼻吸入 EVs 可以有效进入呼吸区；DiI-EVs 均匀附着于肺泡壁表面，提示 EVs 可有效到达肺泡上皮区域。

2.3 经鼻吸入 EVs 显著改善 ALI 肺组织病理损伤

EVs 组与正常组 HE 染色结果未见明显差异，两组肺泡结构完整，未见明显炎性细胞浸润或组织水肿，表明单纯经鼻吸入 EVs 对正常肺组织无不良影响。损伤组表现为弥散性肺间质损伤，肺泡隔增厚，伴有炎症细胞浸润及毛细血管扩张充血，组织出现水肿，部分肺泡结构破坏。经鼻吸入 EVs 治疗后，上述病理改变得到明显缓解，表现为肺泡间隔厚度大幅下降，充血水肿现象相对减轻，炎细胞浸润减少（图 4A）。定量分析显示，正常组肺泡腔面积为（66.02±0.92）%，损伤组为（26.79±1.47）%，EVs 组为（66.64±0.73）%，损伤治疗组为（53.91±1.28）%。与损伤组相比，损伤治疗组肺泡面积显著增加（图 4B），表明 EVs 治疗使肺泡腔面积得以恢复，显著改善肺组织病理损伤。

2.4 经鼻吸入 EVs 有效抑制肺部炎症细胞募集

将 BALF 样本进行涂片处理，吉姆萨染色后置于显微镜下观察并进行计数统计（图 5A）。正常组白细胞计数为（1.50±0.34）个，EVs 组为（1.67±0.33）个，损伤组为（18.17±1.92）个，损伤治疗组为（3.83±0.48）个。正常组、EVs 组、损伤治疗组三组间无显著差异，而损伤组显著高于上述三组（$P<0.05$，图 5B）。结果表明，损伤组白细胞数量显著升高，而在损伤后通过经鼻吸入 EVs 进行干预，炎症细胞的募集得到有效抑制，白细胞计数显著降低，提示其具有明显的抗炎作用。同时，EVs 组与正常组白细胞计数无显著差异，表明 EVs 单独应用不会诱导肺部炎症细胞浸润，具有良好的安全性。



图 2 染料经鼻吸入后在肺内的分布情况

Figure 2 Distribution of the dye in the lungs after intranasal inhalation

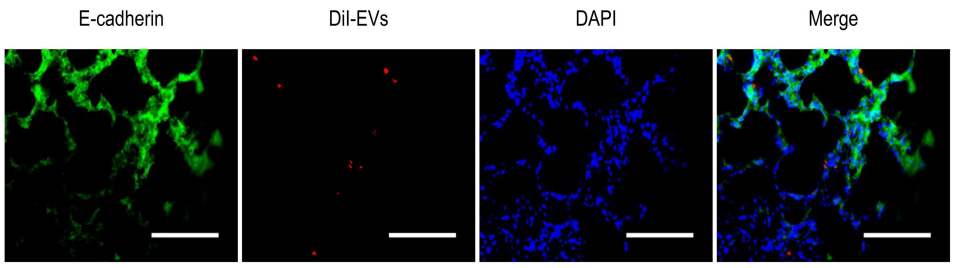


图 3 DiI-EVs 在肺内的分布情况。标尺为 200 μm。DiI-EVs：DiI 标记的 EVs。

Figure 3 Distribution of DiI-EVs in the lungs. Scale bar: 200 μm. DiI-EVs: DiI-labeled extracellular vesicles.

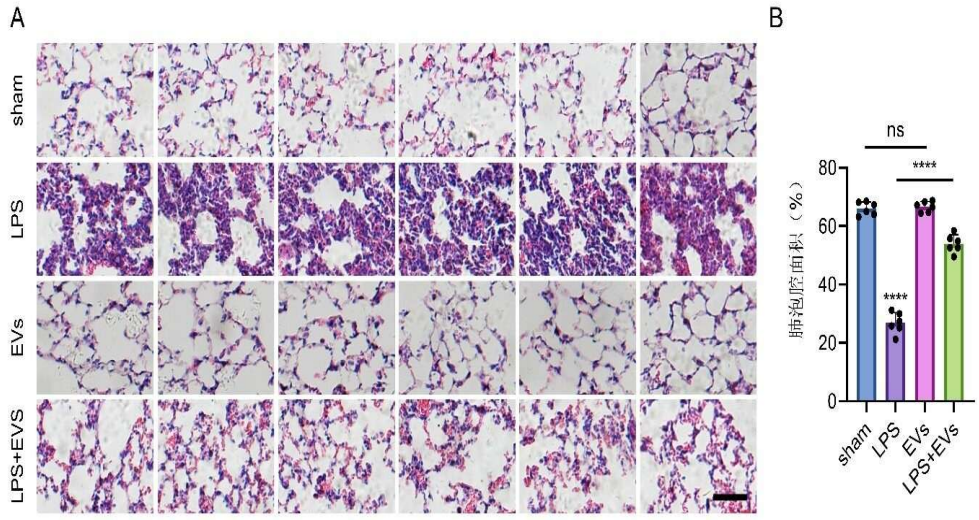


图 4　MSC-EVs 改善肺内病理变化作用。A：不同组别小鼠肺组织经 HE 染色的显微图像，标尺为 50 μm；B：不同组别小鼠肺组织 HE 染色肺泡腔面积统计（$n=6$）。****：$P<0.0001$；ns：无显著性差异；HE：苏木素-伊红。

Figure 4　Effect of MSC-EVs on ameliorating pulmonary pathological changes. A: HE staining images of lung tissue from mice in different groups, scale bar: 50 μm; B: Statistical analysis of alveolar lumen area in lung tissue from mice in different groups ($n=6$). ****: $P<0.0001$; ns: no significant difference; HE: hematoxylin-eosin.

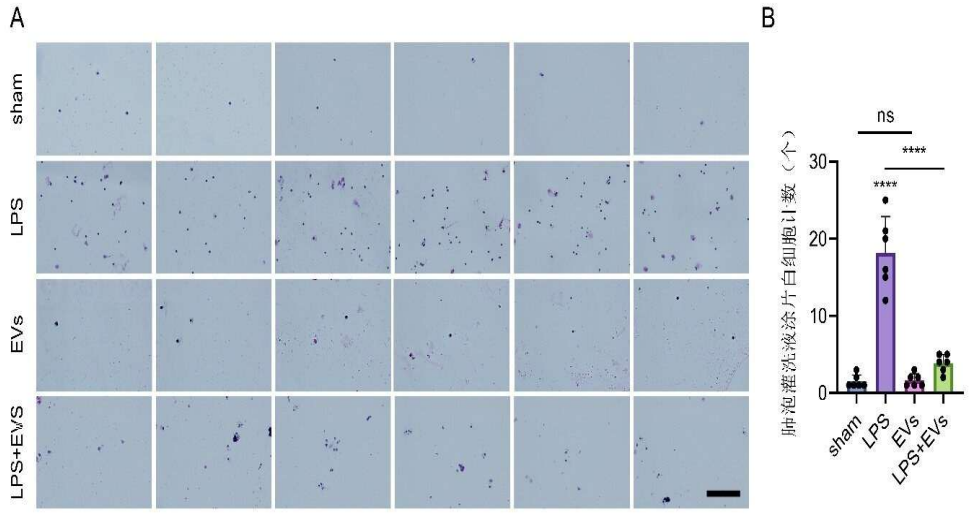


图 5　MSC-EVs 对炎症细胞浸润的影响。A：不同组别小鼠 BALF 中白细胞的吉姆萨染色图片，标尺为 200 μm；B：不同组别小鼠 BALF 白细胞计数统计（$n=6$）。****：$P<0.0001$；ns：无显著性差异；BALF：肺泡灌洗液。

Figure 5　Effect of MSC-EVs on inflammatory cell infiltration. A: Giemsa staining images of leukocytes in BALF from mice in different groups, scale bar: 200 μm; B: Statistical analysis of leukocyte count in BALF from mice in different groups ($n=6$). ****: $P<0.0001$; ns: no significant difference; BALF: bronchoalveolar lavage fluid.

冰冻切片后对 F4/80 靶点进行免疫荧光染色，细胞核使用 DAPI 染色，其中 F4/80 免疫荧光信号呈红色，细胞核 DAPI 着色为蓝色，得到各组免疫荧光成像结果（图 6A）。正常组红色荧光面积为（0.48±0.05）%，损伤组为（7.74±0.64）%，EVs 组为（0.72±0.03）%，损伤治疗组为（3.91±0.41）%（图 6B）。正常组与 EVs 组之间无显著差异，表明单纯 EVs 吸入不会引起巨噬细胞在肺组织中的异常聚集。

与损伤组相比，损伤治疗组中 F4/80 的表达水平显著降低，提示损伤组肺组织中巨噬细胞浸润程度显著提高，而经鼻吸入 EVs 治疗后该浸润程度明显减轻，表明 EVs 可有效抑制巨噬细胞向损伤肺组织趋化浸润。

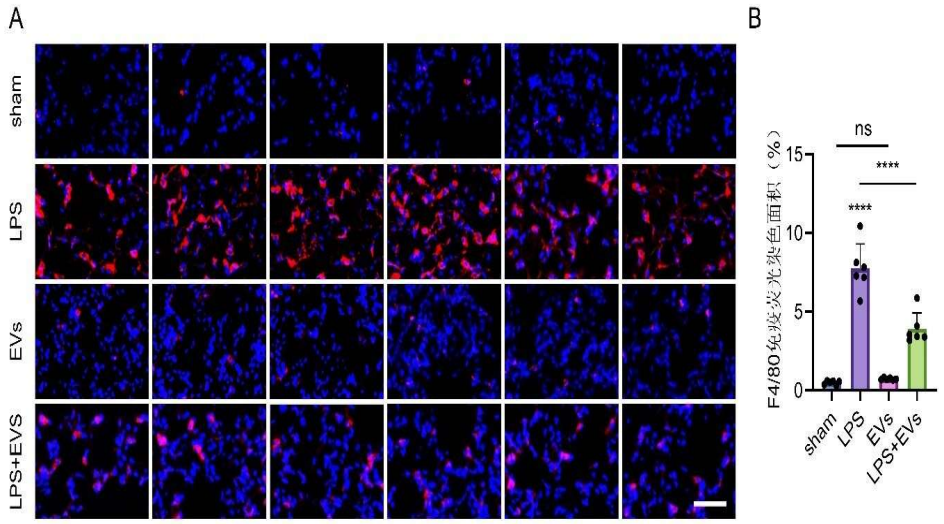


图 6 MSC-EVs 对巨噬细胞浸润的影响。A：不同组别小鼠肺组织的 F4/80 免疫荧光染色，标尺为 50 μm；B：不同组别小鼠肺组织 F4/80 免疫荧光染色面积统计（$n=6$）。****：$P<0.0001$；ns：无显著性差异。

Figure 6 Effect of MSC-EVs on macrophage infiltration. A: F4/80 immunofluorescence staining of lung tissue from mice in different groups, scale bar: 50 μm; B: Statistical analysis of F4/80 immunofluorescence staining area in lung tissue from mice in different groups ($n=6$). ****: $P<0.0001$; ns: no significant difference.

2.5 经鼻吸入 EVs 改善肺血管通透性与局部炎症反应

各组 BALF 上清总蛋白浓度采用 BCA 法测定。正常组 BALF 总蛋白含量为（1.65±0.08）μg/μL，损伤组为（3.44±0.13）μg/μL，EVs 组为（1.70±0.11）μg/μL，损伤治疗组为（2.12±0.04）μg/μL（图 7A）。正常组与 EVs 组之间无显著性差异，提示 EVs 单独应用不影响肺血管屏障完整性。与正常组相比，损伤组 BALF 蛋白含量显著升高，提示肺血管屏障功能受损、血浆蛋白大量渗出；经 MSC-EVs 治疗后，BALF 蛋白浓度明显下降，表明 EVs 治疗有助于改善肺血管屏障功能并减轻肺水肿。

进一步提取组织 RNA 进行 RT-qPCR。正常组IL-6 表达水平为（1.00±0.00），损伤组为（24.78±1.94），EVs 组为（1.30±0.23），损伤治疗组为（2.40±0.11）（图 7B）。统计分析表明，正常组、EVs 组与损伤治疗组之间 IL-6 表达水平差异无统计学意义，而损伤组 IL-6 表达水平显著高于其余三组（$P<0.05$）。上述结果提示，EVs 治疗可显著抑制损伤诱导的 IL-6 高表达，发挥良好的局部抗炎作用，且 EVs 单独应用不会引起肺部炎症因子的异常升高。

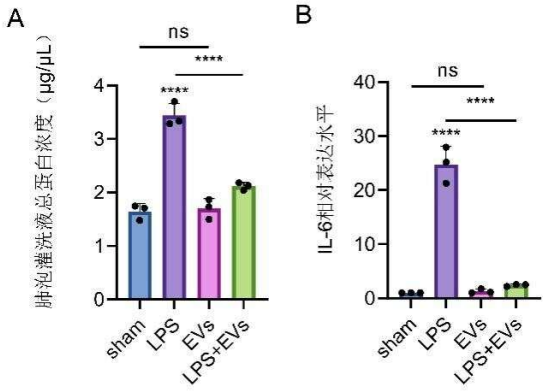


图 7 MSC-EVs 对肺血管通透性与局部炎症反应的调节作用。A：不同组别小鼠 BALF 总蛋白含量统计（$n=3$）；B：不同组别小鼠肺组织 IL-6 含量统计（$n=3$）。****：$P<0.0001$，ns：无显著性差异。

Figure 7 Regulatory effect of MSC-EVs on pulmonary vascular permeability and local inflammatory response. A: Statistical analysis of total protein content in BALF from mice in different groups ($n=3$); B: Statistical analysis of IL-6 levels in lung tissue from mice in different groups ($n=3$). ****: $P<0.0001$; ns: no significant difference.

2.6　MSC-EVs 中 miRNAs 治疗作用的潜在作用机制网络预测

EVs 已被证实在多种疾病中具有显著的治疗潜力，其作用主要依赖于其可以递送所携带的蛋白质、核酸等生物活性成分[17]。在这些成分中，miRNAs 作为重要的调控分子，可通过调节靶细胞基因表达来介导 EVs 的治疗作用。因此，为阐明 MSC-EVs 发挥治疗作用的分子机制，本研究聚焦于其 miRNAs 组成，基于 GEO 数据集 GSE211008 中 4 个 hUC-MSC-EVs 样本的 miRNAs 表达谱，筛选出其中表达量最高的 30 种 miRNAs（包括 hsa-miR-21-5p、hsa-miR-221-3p、hsa-miR-92a-3p 等），并通过热图展示这些 miRNAs 的种类及丰度（图 8A）。

为深入解析上述关键 miRNAs 的潜在功能，进一步预测其下游靶基因，并提高预测结果的可靠性，本研究整合了 mirDIP、miRDB 和 TargetScan 3 个权威数据库进行联合分析，取三者交集以降低假阳性，最终获得 2539 个高置信度靶基因（图 8B）。对这些靶基因群进行进一步的 KEGG 通路富集分析，结果显示这些靶基因显著富集于丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）、磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）-蛋白激酶 B（protein kenase B，PKB/Akt）等关键信号通路（图 8C）。以上结果提示，经鼻吸入的 MSC-EVs 可能通过其携带的 miRNAs 货物调控上述信号网络，从而协同发挥抗炎、抗凋亡及促进组织修复的作用。

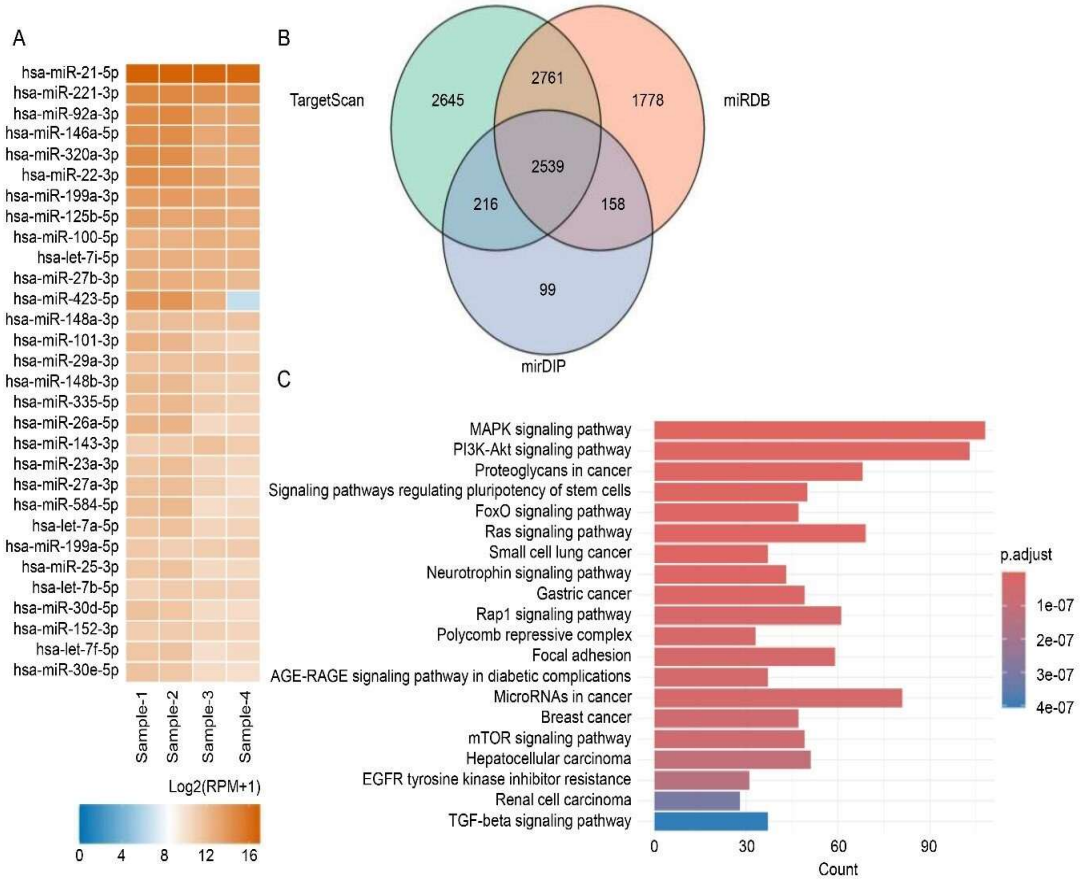


图 8　基于生物信息学的 MSC-EVs 所含 miRNAs 作用机制综合分析。A：MSC-EVs 中平均表达量位于前 30 位的 miRNAs；B：MSC-EVs 中富含的 miRNAs 的高置信度靶基因预测；C：2539 种高置信度靶基因的 KEGG 通路富集分析。miRNAs：微小 RNAs；KEGG：京都基因与基因组数据库。

Figure 8　Comprehensive analysis of the mechanism of action of miRNAs contained in MSC-EVs based on bioinformatics. A: Top 30 miRNAs ranked by average expression in MSC-EVs; B: Prediction of high-confidence target genes of enriched miRNAs in MSC-EVs; C: KEGG pathway enrichment analysis of the 2539 high-confidence target genes. miRNAs: microRNAs; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

值得注意的是，在这些高表达的 miRNAs 中，hsa-miR-21-5p 已被证实可通过靶向 PI3K-Akt 等信号通路发挥抗凋亡作用，从而减轻肺组织损伤[18]；hsa-miR-199a-3p 在 ALI 中亦显著下调，并通过靶向 NLRP1 参与炎症调控[19]；而 hsa-miR-146a-5p 在呼吸系统疾病中同样被证实可通过调控 PI3K-Akt 等信号通路参与疾病进程[20]，这些发现与本研究的生物信息学预测结果相吻合。进一步通过生物信息学分析发现，MSC-EVs 中高表达的 miRNAs 显著富集于 MAPK 和 PI3K-Akt 信号通路，这一结果与多项研究相互印证。例如，Tautuiaki 等[21]在探究天然产物抗炎作用时发现，hsa-miR-21-5p、hsa-miR-146a-5p 等可通过调控 MAPK 和 PI3K-Akt 信号通路介导抗炎效应；Yu 等[22]在运动干预衰老骨骼肌的研究中也证实，hsa-miR-21-5p 等可通过靶向 *SMAD4*、*TRAF6* 等基因调控 MAPK 通路。上述跨研究、跨疾病模型的一致性结果表明，这些 miRNAs 可能作为调控炎症与组织修复的保守性核心因子，进一步支持了本研究在 MSC-EVs 治疗 ALI 中聚焦于这些 miRNAs 的合理性。

3 讨论

ALI 作为一种重症肺部疾病，其发病率与死亡率居高不下，是全球公共卫生领域面临的重大挑战之一。得益于自身特殊的生物学属性，EVs 已成为一种极具潜力的治疗策略[23]。本研究的创新之处在于，将经鼻吸入给药方式与 MSC-EVs 疗法相结合，为 ALI 的治疗提供了新思路。

传统静脉注射给药途径存在肺部递送效率低的问题。相比之下，经呼吸道吸入作为一种无创伤性的肺部递送途径，能够显著提高 EVs 在肺部的生物利用度与治疗效果，具有突出的临床转化潜力[15]。因此，本研究采用经鼻吸入方式，系统评价了 MSC-EVs对 LPS 诱导的 ALI 小鼠模型的治疗作用，并初步探讨其作用机制，从而为 ALI 治疗提供新的实验依据。通过染料分布实验直观证实，经鼻吸入可实现药物在肺内广泛而均匀的分布，确保 EVs 能够直接、大量地抵达损伤部位。这种局部高浓度药物暴露是静脉给药难以实现的优势，也是其发挥优异疗效的物理基础。

在病理损伤方面，既往研究[24-25]显示 ALI 肺组织 HE 染色呈现肺泡间隔增厚、炎性细胞浸润及肺泡结构破坏等典型病变。与之相符，本研究在 LPS 诱导的损伤组中也观察到类似组织学改变。经鼻吸入 MSC-EVs 治疗后，肺泡间隔厚度明显减小，炎细胞浸润减轻，肺泡腔面积显著恢复，提示 MSC-EVs 能有效缓解肺组织结构损伤。在炎症调控方面，ALI 常伴随大量免疫细胞在肺内募集及促炎因子水平升高[26]。与之相符，本研究通过 BALF 细胞学分析及 IL-6 的 RT-qPCR 检测发现，损伤组白细胞计数与 IL-6 表达水平均显著上升，而 MSC-EVs 治疗后两者均明显降低，说明 MSC-EVs 可有效抑制肺部炎症细胞浸润及局部炎症反应。此外，免疫荧光染色显示 $F4/80^+$ 巨噬细胞在损伤肺组织中大量聚集，而治疗组其浸润程度显著减轻，进一步证实在调控免疫细胞募集的过程中，MSC-EVs 可发挥重要作用。在血管通透性方面，既往研究[27]报道 ALI 常伴随 BALF 中蛋白含量升高，反映血管屏障功能受损，本研究结果与此基本一致。损伤组 BALF 总蛋白浓度显著升高，而 MSC-EVs 治疗后该指标明显下降，提示 MSC-EVs 有助于恢复肺血管屏障完整性，减轻肺水肿。

本研究进一步采用生物信息学方法探讨了 MSC-EVs中富集的miRNAs在 ALI 治疗中的潜在作用机制。通过对高置信度靶基因进行 KEGG 通路富集分析，发现这些基因显著富集于 MAPK 与 PI3K-Akt 等关键信号通路，这些通路可调控细胞周期、炎症反应及肺损伤修复。近年来，许多研究证实 miRNAs 可通过调控上述通路参与 ALI/ARDS 的发生与发展。例如，Wang 等[28]系统总结指出，多种 miRNAs 通过靶向 PI3K/AKT 及 MAPK 通路中的关键分子，调控肺泡上皮细胞、血管内皮细胞及巨噬细胞的功能，进而影响 ALI/ARDS 的病理进程。在 PI3K-Akt 通路方面，已有研究[29]证实 miR-21 可通过抑制 PTEN 表达激活该通路，从而在 ALI 中发挥抗炎与抗凋亡作用；另一项研究[30]亦表明，miR-23a 调控 CXCR4/PTEN/PI3K/AKT 通路，从而缓解脓毒症诱导的肺损伤。值

得注意的是,在本研究筛选出的 hUC-MSC-EVs 高表达 miRNAs 中,miR-21-5p 与 miR-23a-3p 均位列其中,且丰度较高,提示这些 EVs 可能通过递送上述 miRNAs,协同调控 PI3K-Akt 及 MAPK 信号通路,从而抑制肺部炎症反应、减轻组织损伤。上述发现从分子层面为本研究的治疗效应提供了机制解释,与既往报道相一致。

近年来,经呼吸道吸入 MSC-EVs 在 ALI 的临床前研究中已展现出良好前景。多项研究表明,吸入 MSC-EVs 可显著减轻肺部炎症和水肿,改善肺功能。例如,Wang 等[31]发现经呼吸道递送 MSC-EVs 能有效减少肺缺血再灌注损伤模型中的肺泡壁增厚和炎性细胞浸润,改善肺顺应性和氧合功能,且疗效优于静脉注射;Zhao 等[32]亦证实吸入 MSC-EVs 可减轻 LPS 诱导的 ALI,降低支气管肺泡灌洗液中炎性因子水平。这些研究为经鼻吸入 EVs 治疗 ALI 的临床转化提供了重要实验依据。

在此基础上,经鼻吸入 MSC-EVs 的临床转化仍需系统解决吸入制剂特有的药学与工艺学问题。经鼻吸入更贴近无创、便携的临床用药场景,但其制剂学要求亦有自身特点。首先,MSC-EVs 的规模化生产与批次一致性是临床开发的基础。当前研究中,EVs 多通过超速离心或切向流过滤等方法制备,产量与纯度波动较大,难以满足工业化生产要求[33-34]。建立符合良好生产规范(good manufacturing practice,GMP)的封闭式、可放大的生产工艺,并明确关键质量属性(如粒径分布、标志蛋白表达、功能性 RNA 含量),是实现制剂标准化的前提。其次,经鼻吸入制剂需解决 EVs 在溶液状态下的长期稳定性问题。现有研究[35-36]表明,MSC-EVs 在液体制剂中易发生聚集或活性下降,冻干或低温保存虽能部分维持其功能,但冻干工艺对 EVs 膜结构与生物活性的影响尚需系统评估。第三,制剂与递送装置的适配性也不容忽视:不同给药装置在递送效率、粒径分布以及对 EVs 完整性的影响方面存在差异,这些因素直接决定了 EVs 在肺部的沉积分布与治疗效果。尽管筛网雾化器在研究中被广泛采用,但不同装置对 EVs 产生的剪切应力差异及其对生物活性的影响仍需建立标准化的评价方法[34,36]。最后,临床前药效评价应更贴近临床使用场景,如考虑多次给药方案、联合用药以及与现有呼吸支持设备的兼容性,并建立与人体生理状态更为接近的疾病模型,以提升转化预测的可靠性[33,35]。因此,未来研究应聚焦于构建“制剂-装置-评价”一体化的研发体系,系统解决经鼻吸入 MSC-EVs 的关键转化瓶颈。

尽管本研究证实经鼻吸入 MSC-EVs 对 LPS 诱导的 ALI 具有显著治疗作用,但仍存在一定局限性。首先,该策略虽能明显减轻肺部炎症与组织损伤,但未能完全逆转 LPS 所致病理改变,提示未来需进一步优化给药方案,如调整剂量、增加频次或联合其他疗法以提升疗效。其次,模式动物与人体在生理及免疫应答上存在差异,且 EVs 在体内的生物分布、代谢动力学及递送效率尚未完全明确,这些因素均制约其临床转化。第三,EVs 的长期安全性仍需通过系统临床前及临床研究进行评估。同时,不同来源与制备条件下 EVs 在组成、功能及疗效上存在异质性[37],其标准化制备与质控体系尚待完善。此外,生物信息学分析结果仍需后续实验验证以增强可靠性。未来研究应聚焦于 EVs 制备工艺的标准化、体内作用机制的确证、系统临床前评价以及临床转化与联合治疗策略的探索。

综上所述,本研究通过构建并系统评估经鼻吸入 MSC-EVs 治疗 ALI 的新策略,证实该治疗策略能高效实现 EVs 在肺组织的富集,显著减轻肺组织损伤、抑制炎症细胞浸润、降低血管通透性,并下调关键炎症因子 IL-6 表达,从而有效缓解 ALI 病程进展。其作用机制可能与 EVs 中富集的 miRNAs 通过调控 MAPK、PI3K-Akt 等多条信号通路,进而抑制炎症反应、调节细胞凋亡及促进组织修复密切相关。该创新策略为 ALI/ARDS 的治疗提供了具有高转化潜力的新途径,也为更广泛的呼吸系统疾病的干预提供了新思路。展望未来,进一步的研究应聚焦于递送系统的优化,例如通过生物材料封装或表面工程修饰以增强肺内滞留与靶向能力,并积极推进其临床转化进程,包括建立 MSC-EVs 经鼻吸入制剂的标准化制备工艺,开展大动物实验验证其安全性与有效性,从而为该策略的临床应用奠定基础。

参考文献

1 Meyer NJ, Gattinoni L, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome[J]. Lancet, 2021, 398(10300): 622-637. doi: 10.1016/s0140-6736(21)00439-6.

2 Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(5): 383-396. doi: 10.1038/nri3209.

3 Lopes-Pacheco M, Robba C, Rocco PRM, *et al.* Current understanding of the therapeutic benefits of mesenchymal stem cells in acute respiratory distress syndrome[J]. Cell Biol Toxicol, 2019, 36(1): 83-102. doi: 10.1007/s10565-019-09493-5.

4 Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches[J]. J Extracell Vesicles, 2024, 13(2): e12404. doi: 10.1002/jev2.12404.

5 Chen TS, Lai RC, Lee MM, *et al.* Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(1): 215-224. doi: 10.1093/nar/gkp857.

6 Lai RC, Tan SS, Teh BJ, *et al.* Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome[J]. Int J Proteomics, 2012, 2012: 1-14. doi: 10.1155/2012/971907.

7 Yao T, Dong X, Wang X, *et al.* Engineering exosomes for mRNA delivery: a review[J]. Int J Biol Macromol, 2025, 316(Pt 1): 144662. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.144662.

8 Zhao S, Di Y, Fan H, *et al.* Targeted delivery of extracellular vesicles: the mechanisms, techniques and therapeutic applications[J]. Mol Biomed, 2024, 5(1): 60. doi: 10.1186/s43556-024-00230-x.

9 Wei X, Yi X, Lv H, *et al.* MicroRNA-377-3p released by mesenchymal stem cell exosomes ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting RPTOR to induce autophagy[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(8): 657. doi: 10.1038/s41419-020-02857-4.

10 Wilson JG, Liu KD, Zhuo H, *et al.* Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial[J]. Lancet Respir Med, 2015, 3(1): 24-32. doi: 10.1016/s2213-2600(14)70291-7.

11 Lightner AL, Sengupta V, Qian S, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle infusion for the treatment of respiratory failure from COVID-19[J]. Chest, 2023, 164(6): 1444-1453. doi: 10.1016/j.chest.2023.06.024.

12 Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, *et al.* Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(5): 683-692. doi: 10.1089/scd.2008.0253.

13 Poinsot V, Pizzinat N, Ong-Meang V. Engineered and mimicked extracellular nanovesicles for therapeutic delivery[J]. Nanomaterials (Basel), 2024, 14(7): 639. doi: 10.3390/nano14070639.

14 Kimiz-Gebologlu I, Oncel SS. Exosomes: large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake[J]. J Control Release, 2022, 347: 533-543. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.05.027.

15 Zhao R, Wang L, Wang T, *et al.* Inhalation of MSC-EVs is a noninvasive strategy for ameliorating acute lung injury[J]. J Control Release, 2022, 345: 214-230. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.03.025.

16 Popowski KD, López de Juan Abad B, George A, *et al.* Inhalable exosomes outperform liposomes as mRNA and protein drug carriers to the lung[J]. Extracell Vesicle, 2022, 1: 100002.. doi: 10.1016/j.vesic.2022.100002.

17 Kibria G, Ramos EK, Wan Y, *et al.* Exosomes as a drug delivery system in cancer therapy: potential and challenges[J]. Mol Pharm, 2018, 15(9): 3625-3633. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00277.

18 Ren Y, Qin S, Yuan P, *et al.* Gata3 drives miR-21-5p transcription to mitigate hyperoxia-induced lung injury, independent of CpG island methylation[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 23966. doi: 10.1038/s41598-025-09039-2.

19 Chen Z, Dong WH, Chen Q, *et al.* Downregulation of miR-199a-3p mediated by the CtBP2-HDAC1-FOXP3 transcriptional complex contributes to acute lung injury by targeting NLRP1[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(12): 2627-2640. doi: 10.7150/ijbs.37133.

20 Zhang Y, Sheng Y, Gao Y, *et al.* Exploration of the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease caused by smoking-based on bioinformatics analysis and *in vitro* experimental evidence[J]. Toxics, 2023, 11(12): 995. doi: 10.3390/toxics11120995.

21 Tautuiaki S, Gojer J, Jayaprakash R, *et al.* Anti-inflammatory effects of kawakawa (Piper excelsum): an integrative mRNA-miRNA approach[J]. Food Sci Nutr, 2024, 12(11): 8858-8869. doi: 10.1002/fsn3.4450.

22 Yu Z, Ni PS, Wang ZZ, *et al.* Deciphering the miRNA-mRNA interaction network regulating aging skeletal muscle in various exercise regimens through comprehensive bioinformatics analysis[J]. Cell Biochem Biophys, 2025, 83(4): 4275-4286. doi: 10.1007/s12013-025-01848-6.

23 Taghavi-Farahabadi M, Mahmoudi M, Soudi S, *et al.* Hypothesis for the management and treatment of the COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome and lung injury using mesenchymal stem cell-derived exosomes[J]. Med Hypotheses, 2020, 144: 109865. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109865.

24 Wang Y, Xu T, Li D. Exosomal RNF144A derived from mesenchymal stem cells ameliorates lps-induced pneumonia in experimental models by inducing TSHR ubiquitination[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2025, 197(12): 7960-7980. doi: 10.1007/s12010-025-05405-y.

25 Thompson BT, Drazen JM, Chambers RC, *et al.* Acute respiratory distress syndrome[J]. N Engl J Med, 2017, 377(6): 562-572. doi: 10.1056/NEJMra1608077.

26 Yang L, Cao Z, Xing Y, *et al.* Inhalation & intravenous: umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes therapy strategy for acute respiratory distress syndrome in a murine model[J]. J Thorac Dis, 2025, 17(12): 11100-11117. doi: 10.21037/jtd-2025-250.

27 Xiao J, Hou F, Wang H, *et al.* Monocyte-derived macrophages induce alveolar macrophages death via TNF-α in acute lung injury[J]. Immun Inflamm Dis, 2024, 12(12): e70081. doi: 10.1002/iid3.70081.

28 Wang P, Lai D, Jin L, *et al.* Roles of microRNAs in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical potential[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1570128. doi: 10.3389/fimmu.2025.1570128.

29 Ding Y, Hou Y, Liu Y, *et al.* Prospects for miR-21 as a target in the treatment of lung diseases[J]. Curr Pharm Des, 2021, 27(3): 415-422. doi: 10.2174/1381612826999200820160608.

30 Zhang P, Huang Q, Liao P, *et al.* Molecular mechanism of miRNA-23a in sepsis-induced lung injury[J]. Am J Transl Res, 2023, 15(6): 3900-3911. PMID: 37434814.

31 Wang T, Wu G, Gao P, *et al.* Inhalation of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles activates macrophage polarization through the miR-22-3p/NLRP3/IL-1β pathway, ameliorating lung ischemia-reperfusion injury[J]. Stem Cell Res Ther, 2026, 17(1): 107. doi: 10.1186/s13287-026-04921-w.

32 Zhao R, Wang L, Wang T, *et al.* Inhalation of MSC-EVs is a noninvasive strategy for ameliorating acute lung injury[J]. J Control Release, 2022, 345: 214-230. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.03.025.

33 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.

34 Gonzalez H, McCarthy S, Masterson C, *et al.* Nebulised mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles ameliorate *E. coli* induced pneumonia in a rodent model[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 151. doi: 10.1186/s13287-023-03385-6.

35 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.

36 Couto SCF, Lopes-Pacheco M, Rocha V, *et al.* Extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells as a promising therapy for ARDS: a systematic review of preclinical studies[J]. Front Med (Lausanne), 2025, 12: 1665948. doi: 10.3389/fmed.2025.1665948.

37 Abbasi R, Alamdari-Mahd G, Maleki-Kakelar H, *et al.* Recent advances in the application of engineered exosomes from mesenchymal stem cells for regenerative medicine[J]. Eur J Pharmacol, 2025, 989: 177236. doi: 10.1016/j.ejphar.2024.177236.

(责任编辑:张跃)