

论著·基础研究

球形金纳米颗粒对骨髓间充质干细胞自噬流和外泌体分泌的影响

颜 春¹, 马玉洁², 谢玮岳¹, 杨庆源³, 孙奋勇³, 杨 志², 薛 松¹, 连 锋¹

1. 上海交通大学 医学院附属仁济医院心外科, 上海 200127; 2. 上海交通大学 电子信息与电气工程学院薄膜与微细技术教育部重点实验室, 上海 200240; 3. 同济大学 医学院附属第十人民医院检验科, 上海 200072

[摘要] **目的**·探讨球形金纳米颗粒 (AuNPs) 阻断大鼠骨髓间充质干细胞 (MSCs) 的自噬流对外泌体分泌的影响。**方法**·体外培养大鼠 MSCs, 分别以不同浓度 AuNPs (0、15、30、90、150 $\mu\text{g/mL}$) 处理细胞, CCK-8 法检测细胞活力, 以评估 AuNPs 细胞毒性。细胞分 3 组: 正常对照组、AuNPs 组 (20 $\mu\text{g/mL}$ AuNPs 作用 72 h) 和阳性对照组 (5 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹作用 4 h)。透射电镜下观察超微结构, 超速离心提取细胞上清液外泌体, 行纳米颗粒分析仪和电镜检测。共聚焦显微镜观察细胞自噬, Western blotting 验证。**结果**·0 ~ 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 AuNPs 对细胞增殖的影响小。AuNPs 组的 MSCs 外泌体分泌增多, 体积减小, LC3 和 p62 表达增高 (均 $P < 0.05$), 自噬小体增多, 溶酶体和自噬小体融合受阻。**结论**·AuNPs 阻断 MSCs 自噬流, 调节外泌体分泌。

[关键词] 金纳米颗粒; 间充质干细胞; 外泌体; 自噬

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.01.008 **[中图分类号]** R318.08; R329.2 **[文献标志码]** A

Effect of gold nanoparticle on autophagy flux and exosome secretion of mesenchymal stem cells

YAN Chun¹, MA Yu-jie², XIE Wei-yue¹, YANG Qing-yuan³, SUN Feng-yong³, YANG Zhi², XUE Song¹, LIAN Feng¹

1. Department of Cardiovascular Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127; 2. Ministry of Education Key Laboratory of Thin Film and Microfabrication Technology, School of Electronic Information and Electrical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; 3. Department of Clinical Laboratory Medicine, Shanghai Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072

[Abstract] **Objective**·To investigate the effect of gold nanoparticles (AuNPs) on exosome secretion of mesenchymal stem cells (MSCs) via blocking autophagy flux. **Methods**·Rat derived MSCs were treated with AuNPs (0, 15, 30, 90, 150 $\mu\text{g/mL}$), and the cell proliferation was detected with CCK-8 assay to evaluate the cytotoxicity of AuNPs. Then, MSCs were divided into normal control group, AuNPs group (20 $\mu\text{g/mL}$ AuNPs for 72 h) and positive control group (5 $\mu\text{mol/L}$ chloroquine for 4 h). Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of MSCs, and exosomes were extracted by ultracentrifugation and tested with nanoparticle analyzer and scan electron microscopy. The autophagy was observed by confocal microscopy and verified by Western blotting. **Results**·Low concentrations of AuNPs (0 to 30 $\mu\text{g/mL}$) slightly affected the cell proliferation. MSCs of AuNPs group secreted more abundant and smaller exosomes than those of control group, and expressed significantly more LC3 and p62 (both $P < 0.05$). Autophagosomes in AuNPs group were increased and fusion of lysosomes and autophagosomes was blocked. **Conclusion**·AuNPs block the autophagy flux and regulates the secretion of exosomes.

[Key words] gold nanoparticle; mesenchymal stem cell; exosome; autophagy

随着纳米科技的发展, 金纳米颗粒 (gold nanoparticles, AuNPs) 以其良好的生物相容性被广泛应用于骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 的成像示踪、疾病治疗和诱导分化等临床及基础研究^[1-4]。作为外来异物, AuNPs 被吞噬后会对细胞内膜系统产生何种生物作用, 目前还知之甚少。自噬 (autophagy) 是细胞在自噬相关基因调控下的自我降解过程, 不仅在生理状态

下, 也在应激情况下对自我功能进行调节。自噬的发生过程伴随着细胞内膜的生成、转移和融合。AuNPs 被细胞吞噬后会改变细胞自噬水平的改变, 细胞自噬被认为与内膜系统的另一重要生理现象——外泌体 (exosomes) 的分泌有关^[5]。

本研究通过体外分离培养大鼠 BMMSCs, 观察直径为 20 nm 的球形 AuNPs 对 MSCs 的自噬以及外泌体的影响。

[基金项目] 上海交通大学医工交叉研究基金 (YG2015MS51) (Shanghai Jiao Tong University Medicine-Engineering Foundation, YG2015MS51)。

[作者简介] 颜 春 (1990—), 男, 硕士生; 电子信箱: 1146911579@qq.com。

[通信作者] 连 锋, 电子信箱: dr.lianfeng@hotmail.com。



1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

MSCs 从清洁级的 4 ~ 6 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠骨髓中提取。SD 大鼠由上海市第十人民医院实验动物中心提供 [实验动物使用许可证号: SYXK (沪) 2011-0111]; AuNPs 合成于上海交通大学薄膜与微细技术实验室; 微管相关蛋白 LC3、自噬相关蛋白 beclin1 和 mTOR 抗体 (Cell Signaling Technology); p62、TSG101 抗体 (Abcam); GAPDH 抗体 (三箭生物); Western blotting 二抗 (Licor); GFP-RFP-LC3 慢病毒 (吉满生物); RIPA 裂解液 (康为世纪); 蛋白酶抑制剂 (普利莱); DMEM (Gibco)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 原代细胞培养 10 d 后按 1:3 传代, 第 3 ~ 7 代细胞用于实验。无外泌体血清是由胎牛血清经 120 000 × g 超速离心 18 h 制备而来。

1.2.2 AuNPs 的合成与检测 用晶体生长法合成 20 nm 的球形金纳米颗粒。100 mL 的 HAuCl₄ 溶液 (10 mg/mL) 合成的 AuNPs 用 1.2 mL 的 PBS 重悬, 扫描电子显微镜下观察 AuNPs 的形态和大小, 并检测 AuNPs 的紫外可见光谱吸收波长。

1.2.3 细胞处理 实验分 3 组: 空白对照组、氯喹组 (阳性对照组)、AuNPs 组 (实验组)。将 MSCs 接种于 10 cm 的培养皿中, 待其生长密度至 60% 左右, 换含 10% 无外泌体胎牛血清的培养液培养。实验组在培养液中加入 AuNPs (20 μg/mL) 培养 72 h; 阳性对照组则加入氯喹 (5 μmol/L) 培养 4 h; 空白对照组不加其他试剂培养 72 h。

1.2.4 外泌体的提取及检测 收集细胞上清, 在 4 °C 下分别以 300 × g 离心 10 min, 弃沉淀; 再以 2 000 × g 离心 20 min, 弃沉淀后以 10 000 × g 离心 30 min; 收集上清液, 经 0.22 μm 的滤器过滤后, 120 000 × g 离心 90 min; 弃上清后用 200 μL 的 PBS 重悬沉淀。送纳米颗粒分析仪 (ZetaView, NanoSight) 和电镜 (Tecnai G2 spirit Biotwin, 赛默飞) 检测。

1.2.5 细胞毒性检测 细胞分组处理后以 5 000 个 /mL 的密度将细胞接种在 96 孔板中, 每孔 100 μL。培养 72 h 后, 向每孔细胞加入 CCK-8 溶液 10 μL, 37 °C 培养 1 h。用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值 [*D* (450 nm)]。每组设 3 个复孔。

1.2.6 细胞的超微结构观察 细胞用 AuNPs 处理后, 2% 戊二醛固定液 4 °C 固定 2 h, 收集细胞, 经漂洗、固定、置换、浸透、包埋、切片及枸橼酸铅电子染色后, 透射电

镜 (Tecnai G2 spirit Biotwin, 赛默飞) 下观察。

1.2.7 病毒的转染及细胞自噬流的检测 P2 代 MSCs 在 6 孔板中生长密度至 70% 左右时, 培养液更换为含 GFP-RFP-LC3 慢病毒 (MOI=50, polybrene 终浓度为 5 μg/mL) 的 ENi.S. 溶液 100 μL, 37 °C 孵育 12 h; 再更换为含嘌呤霉素 (5 μg/mL) 的正常培养液培养, 获得稳定表达 GFP-RFP-LC3 的细胞。将稳定表达 GFP-RFP-LC3 的细胞株分组处理后按 10 000 个 /mL 的密度接种于 24 孔板, 每孔 500 μL, 37 °C 培养 72 h 后用 4% 多聚甲醛固定, 穿膜打孔后用 DAPI 染色 1 min, 共聚焦显微镜 (LSM710, Zeiss) 下观察。

1.2.8 Western blotting 分组处理后的细胞用 PBS 洗 2 遍, 用细胞刮刮下细胞, 13 400 × g 瞬时离心后向细胞沉淀中加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 冰上裂解 10 min。BCA 法进行蛋白定量。加入蛋白电泳缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min 后进行蛋白电泳。电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入 LC3、p62、GAPDH、TSG101 抗体, 均按 1:1 000 稀释, 4 °C 孵育过夜; PBST 洗 3 次, 每次 10 min; 加荧光二抗, 37 °C 孵育 30 min, Odyssey 成像系统检测结果。上述实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

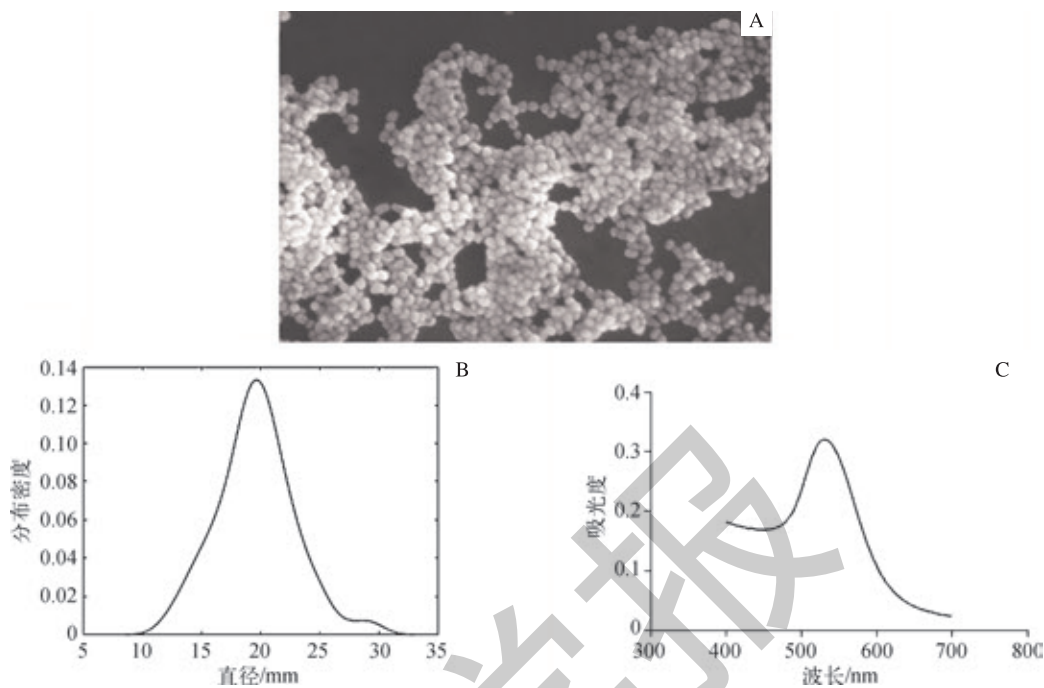
2 结果

2.1 AuNPs 的合成与检测

扫描电镜结果显示 (图 1A), 合成的 AuNPs 大小较均一, 直径在 20 nm 左右, 呈球形。随机测量了其中 100 个 AuNPs 的直径, 结果显示合成的 AuNPs 平均直径为 (19.58 ± 3.27) nm (图 1B)。20 nm 的 AuNPs 紫外可见光谱吸收波长在 540 nm 左右 (图 1C)。

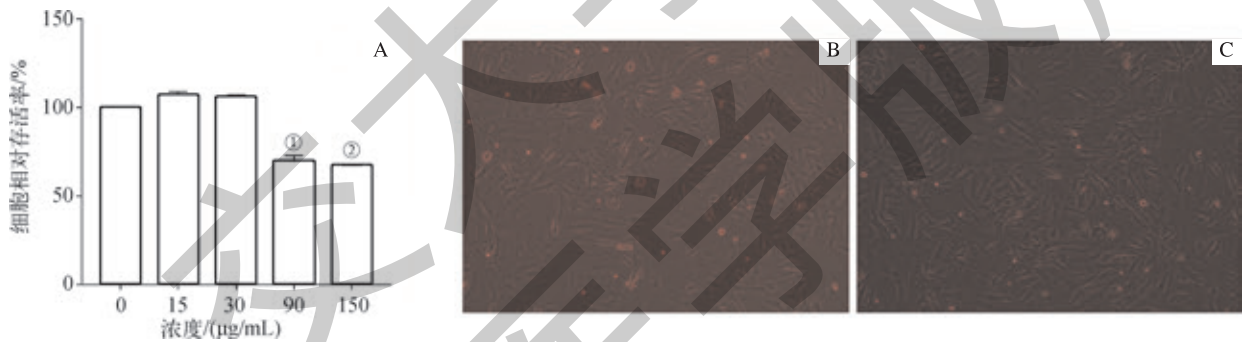
2.2 细胞形态观察和细胞毒性检测

不同浓度的 AuNPs (15、30、90 和 150 μg/mL) 处理细胞 3 d 后, 15 μg/mL 和 30 μg/mL 的 AuNPs 对 MSCs 增殖的影响与对照组相比无统计学差异, 90 μg/mL 和 150 μg/mL 组具有显著的细胞毒性 (均 $P < 0.05$, 图 2A)。光学显微镜下见 MSCs 贴壁生长, 呈长梭形, AuNPs 处理后的细胞与对照组在形态和数量上无明显差异 (图 2B、C)。在透射电子显微镜下可见大量的 AuNPs 被吞噬至细胞内体中, 部分内体已经与溶酶体融合, 细胞的多囊泡体 (multivesicular bodies, MVBs) 内蓄留着大量 AuNPs (图 3)。



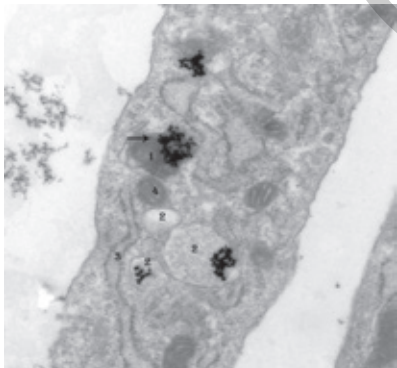
注: A. 扫描电子显微镜下的 AuNPs (×200 000); B. 20 nm AuNPs 的粒径分布图; C. 20 nm AuNPs 的紫外可见光吸收波长。

图 1 合成的 20 nm AuNPs 的检测
Fig 1 Detection of synthesized 20 nm AuNPs



注: A. 不同浓度 AuNPs 处理 MSCs 72 h 后的细胞相对存活率; B. 正常对照组 MSCs (×200); C. 20 μg/mL AuNPs 处理的 MSCs (×200)。[Ⓐ]*P*=0.003, [Ⓑ]*P*=0.001, 与正常对照组比较。

图 2 AuNPs 对 MSCs 生长的影响
Fig 2 Influence of AuNPs on the growth of MSCs

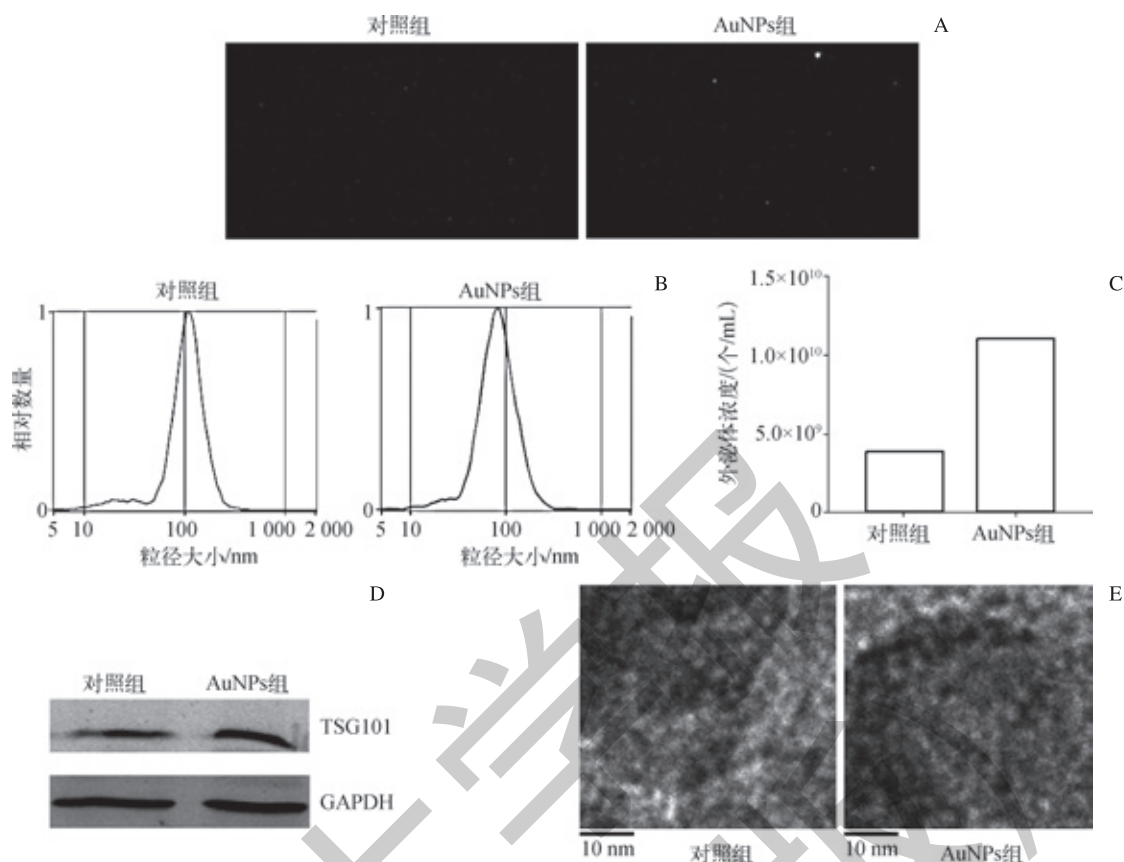


注: 一示含有 AuNPs 的自噬小体和溶酶体融合。1. 溶酶体; 2. 多囊泡体; 3. 内质网; 4. 溶酶体。

图 3 透射电子显微镜下吞噬 AuNPs 的 MSCs 超微结构 ×4 000
Fig 3 Ultrastructure of MSCs swallowing AuNPs observed by transmission electron microscope ×4 000

2.3 外泌体的检测

在纳米颗粒分析仪中可见大量均一的、球形灰色亮点, 为溶液中的外泌体。20 nm AuNPs 处理组的外泌体, 在灰白色亮点中偶可见不规则的亮点, 亮度明显高于外泌体, 为散在的 AuNPs (图 4A)。实验组的外泌体分泌量 (1.1×10^{10} 个/mL) 明显高于对照组 (4.0×10^9 个/mL) (*P*=0.014) (图 4C), 同时实验组外泌体的平均直径明显小于对照组 (88.7 nm vs 112.5 nm, *P*=0.042, 图 4B)。采用等体积上样 (每孔 30 μL), Western blotting 结果显示 (图 4D), 实验组 TSG101 表达高于对照组。电镜下可见典型的双凹圆饼状外泌体结构, 中央较暗, 周边较亮 (图 4E)。



注: A. 外泌体纳米颗粒分析仪检测; B. 外泌体粒径大小分布图; C. 外泌体浓度; D. Western blotting 检测 TSG101, 每孔等体积加样 30 µL; E. 外泌体电泳图。

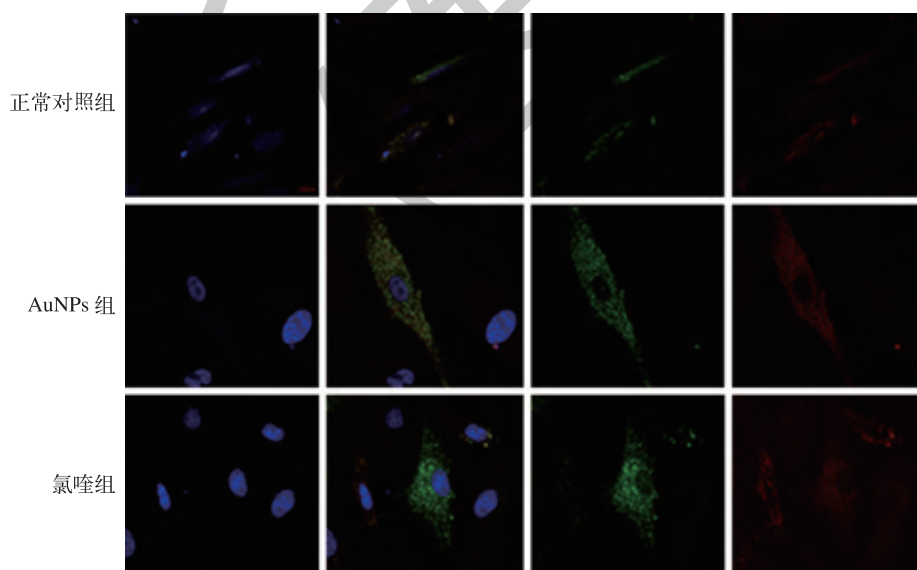
图 4 20 µg/mL AuNPs 对 MSCs 外泌体分泌的影响

Fig 4 Influence of 20 µg/mL AuNPs on exosome secretion of MSCs

2.5 自噬流的检测

20 µg/mL 的 AuNPs 处理细胞 72 h 后, 细胞的自噬小体明显增多, 红色荧光和绿色荧光同时增多, 在共聚焦显

微镜下呈黄色 (图 5)。5 µmol/L 氯喹处理 4h 后, 红色荧光和绿色荧光较对照组同时增强 (图 5), 见大量自噬小体聚集。



注: 绿色荧光斑点为未与溶酶体融合的自噬体, 红色荧光斑点为自噬体, 黄色荧光斑点为自噬流受阻时的自噬体。

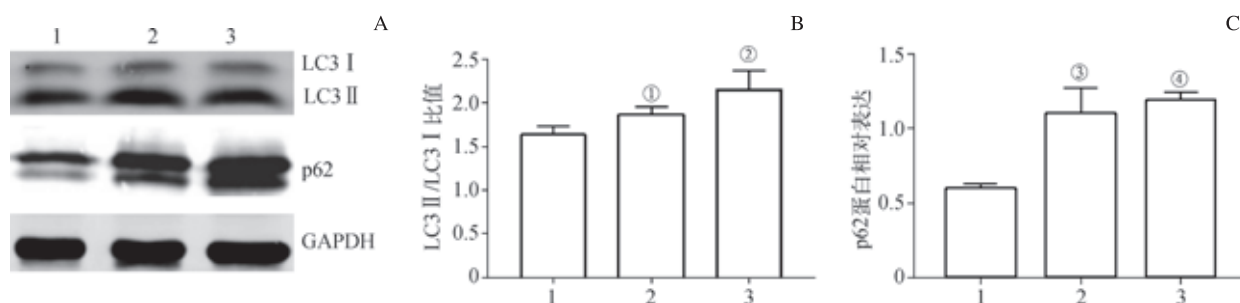
图 5 共聚焦显微镜检测 MSCs 细胞自噬

Fig 5 Autophagy of MSCs detected by confocal microscopy

2.6 自噬相关蛋白 LC3 和 p62 的表达

Western blotting 分析结果显示, AuNPs 和氯喹处理组

细胞的 LC3 II / LC3 I 比值高于对照组 (图 6B), p62 蛋白的相对表达量亦高于对照组 ($P=0.023$, 图 6C)。



注: A. Western blotting 蛋白条带; B. LC3 II / LC3 I 比值; C. p62 蛋白相对表达量。1. 正常对照组; 2. AuNPs 处理组; 3. 氯喹处理组。^① $P=0.043$, ^② $P=0.023$, ^③ $P=0.012$, ^④ $P=0.001$, 与正常对照组比较。

图 6 20 µg/mL 的 AuNPs 对 MSCs 的 LC3 和 p62 蛋白表达的影响
Fig 6 Effect of 20 µg/mL AuNPs on expression of LC3 and p62 in MSCs

3 讨论

不同的纳米材料对细胞生理功能的影响不一样。相关研究认为, 纳米颗粒进入细胞后通过激活 ROS 系统、损害线粒体等途径产生细胞毒性^[6-7]。相较于其他纳米材料, AuNPs 具有良好的生物相容性^[8]。本研究用浓度梯度 0 ~ 150 µg/mL 的 AuNPs 与 MSCs 共培养, 在 0 ~ 30 µg/mL 的浓度下, MSCs 的增殖能力无明显变化, 浓度达到 90 µg/mL 时, AuNPs 出现较为明显的细胞毒性。

外泌体是细胞经过“内吞-融合-外排”等一系列过程形成并分泌的直径为 30 ~ 150 nm 的亚细胞双层膜囊泡^[9]。外泌体在内体系统中形成, 主要过程包括位于细胞膜周围早期内体 (early endosomes, EEs) 的形成以及位于细胞核周围晚期内体 (late endosomes, LEs) 的成熟, 后者也称为 MVBs; 外泌体储存于 MVBs 内, MVBs 与细胞膜融合后, 释放外泌体到细胞外^[10]。外泌体内含有蛋白质、RNA、DNA 等多种物质, 在与靶细胞融合后, 这些物质能释放至靶细胞内, 调控靶细胞的代谢活动, 具有细胞间的信号交流作用^[11]。细胞分泌的外泌体被认为在缺血性疾病, 肿瘤发生、发展和炎症反应等疾病中都有重要作用^[12-14]。

纳米颗粒被细胞吞噬后对细胞外泌体分泌的影响尚无定论。Zhu 等^[15]发现, 磁性氧化铁颗粒能够诱导小鼠支气管上皮细胞分泌外泌体, 并通过抗原提呈细胞诱导 T 淋巴细胞分化。而 Andersson-Willman 等^[16]研究表明, 二氧化钛和氧化锌纳米颗粒对单个核细胞和树突状细胞的外泌体形态、大小无明显影响。本研究用 20 µg/mL 的 AuNPs 与 MSCs 共培养, NanoSight 检测发现 MSCs 分泌的外泌体明显多于阴性对照组, 并且体积小于对照组; 电镜下

可见少量散在分布的 AuNPs。鉴于 AuNPs 处理组的外泌体数量是对照组的近 10 倍, 且在体积分布上处理组只在 88.7 nm 出现单峰, 20 nm 处是平滑曲线, 未见双峰, 基本排除 AuNPs 对外泌体浓度和大小的影响。

细胞自噬的过程伴随自噬体 (autophagosome) 的形成和成熟, 自噬体同溶酶体融合形成自噬溶酶体 (autolysosome) 并降解。LC3 参与自噬体的形成, 自噬体形成时, 胞浆型 LC3 (即 LC3 I) 会酶解掉一小段多肽, 转变为膜型 LC3 (即 LC3 II), LC3 II 升高代表自噬的启动^[17]。p62 可以通过自噬溶酶体来降解, 因此 p62 可以反映自噬的强弱。当自噬体与溶酶体的融合发生障碍时, LC3 II 升高, 同时 p62 因为无法在溶酶体内降解也增高。本实验 Western blotting 结果显示, AuNPs 共培养的实验组细胞 LC3 II 升高, p62 增加, 提示自噬体和溶酶体融合发生障碍。转染了 GFP-RFP-LC3 后, 共聚焦显微镜下可见实验组 MSCs 细胞绿色荧光增多, 进一步验证了 AuNPs 阻碍了溶酶体和自噬体的融合。在自噬流畅通时, 绿色荧光会在自噬溶酶体的酸性条件下降解, 呈现红色荧光斑点; 自噬流受阻时, 绿色荧光不被降解, 和红色荧光融合形成黄色荧光斑点, 荧光显微镜下绿色荧光斑点和黄色荧光斑点增多。Ma 等^[18]研究发现, AuNPs 通过碱化溶酶体的 pH 值, 破坏溶酶体降解功能, 阻碍溶酶体和自噬小体融合。

本实验发现, AuNPs 可促进 MSCs 外泌体分泌, 同时抑制 MSCs 的自噬流。既往研究认为, 细胞外泌体的分泌与细胞自噬是一种协作的关系^[5, 19-20]。Dias 等^[21]通过抑制星形胶质细胞的自噬, 促进了其外泌体的分泌。MVBs 除了直接分泌出细胞外, 还会与自噬小体融合, 继而被溶酶体降解。通过抑制自噬或阻断自噬流, 可使自噬小体与溶

酶体融合受阻, 自噬溶酶体累积, MVBs 被溶酶体降解减少并在细胞内累积, 继而 MVBs 向细胞外分泌增多, 外泌体分泌增加。本实验采用 AuNPs 阻断 MSCs 的自噬流, 促

进外泌体的分泌。MSCs 分泌的外泌体在缺血性疾病、炎症反应中均有重要作用^[13]。促进外泌体的分泌对 MSCs 治疗心肌梗死、下肢缺血和脑梗等疾病均有重要意义^[13, 22]。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Li XX, Li KA, Qin JB, et al. *In vivo* MRI tracking of iron oxide nanoparticle-labeled human mesenchymal stem cells in limb ischemia[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 1063-1073.
- [2] Talekar M, Tran TH, Amiji M. Translational nano-medicines: targeted therapeutic delivery for cancer and inflammatory diseases[J]. *AAPS J*, 2015, 17(4): 813-827.
- [3] Duan J, Yu Y, Yu Y, et al. Silica nanoparticles induce autophagy and endothelial dysfunction via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 5131-5141.
- [4] Kinoh H, Miura Y, Chida T, et al. Nanomedicines eradicating cancer stem-like cells *in vivo* by pH-triggered intracellular cooperative action of loaded drugs[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(6): 5643-5655.
- [5] Baixauli F, Lopez-Otin C, Mittelbrunn M. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 403.
- [6] Li JJ, Hartono D, Ong CN, et al. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(23): 5996-6003.
- [7] Peynshaert K, Manshian BB, Joris F, et al. Exploiting intrinsic nanoparticle toxicity: the pros and cons of nanoparticle-induced autophagy in biomedical research[J]. *Chem Rev*, 2014, 114(15): 7581-7609.
- [8] Tsai DH, Lu YF, DelRio FW, et al. Orthogonal analysis of functional gold nanoparticles for biomedical applications[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(28): 8411-8422.
- [9] Fonseca P, Vardaki I, Occhionero A, et al. Metabolic and signaling functions of cancer cell-derived extracellular vesicles[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016, 326: 175-199.
- [10] Alenquer M, Amorim MJ. Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection[J]. *Viruses*, 2015, 7(9): 5066-5083.
- [11] Cervio E, Barile L, Moccetti T, et al. Exosomes for intramyocardial intercellular communication[J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 482171.
- [12] Ailawadi S, Wang X, Gu H, et al. Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(1): 1-11.
- [13] Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3): 301-312.
- [14] Kumar D, Gupta D, Shankar S, et al. Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: possible implications for biomarker and treatment of cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(5): 3280-3291.
- [15] Zhu M, Tian X, Song X, et al. Nanoparticle-induced exosomes target antigen-presenting cells to initiate Th1-type immune activation[J]. *Small*, 2012, 8(18): 2841-2848.
- [16] Andersson-Willman B, Gehrman U, Cansu Z, et al. Effects of subtoxic concentrations of TiO₂ and ZnO nanoparticles on human lymphocytes, dendritic cells and exosome production[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(1): 94-103.
- [17] Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions[J]. *FASEB J*, 2016, 30(12): 3961-3978.
- [18] Ma X, Wu Y, Jin S, et al. Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(11): 8629-8639.
- [19] Hessvik NP, Overbye A, Brech A, et al. PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(24): 4717-4737.
- [20] Murrow L, Debnath J. ATG12-ATG3 connects basal autophagy and late endosome function[J]. *Autophagy*, 2015, 11(6): 961-962.
- [21] Dias MV, Teixeira BL, Rodrigues BR, et al. PRNP/prion protein regulates the secretion of exosomes modulating CAV1/caveolin-1-suppressed autophagy[J]. *Autophagy*, 2016, 12(11): 2113-2128.
- [22] Chen F, Du Y, Esposito E, et al. Effects of focal cerebral ischemia on exosomal versus serum miR126[J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(6): 478-484.

[收稿日期] 2017-08-28

[本文编辑] 邵碧云

