

·基础研究·

RVG修饰的间充质干细胞外泌体通过转变小胶质细胞极性治疗强迫症

韦淳仁, 罗宇翀, 王伟洁, 岳计辉, 温盛霖
(中山大学附属第五医院精神心理科, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】为了探究狂犬病毒糖蛋白(RVG)修饰的间充质干细胞外泌体对强迫症小鼠模型的治疗效果,明确外泌体治疗强迫症的疗效以及探究其发挥作用的机制。【方法】提取原代小鼠脂肪来源的间充质干细胞,使用病毒感染获得过表达RVG的间充质干细胞外泌体,并通过粒径分析、Western blot、透射电镜表征外泌体。利用喹吡罗构建强迫症小鼠模型,将小鼠分为5组:对照组、模型组、氯米帕明(CMI)组、间充质干细胞外泌体(MSC-EXO)组、RVG修饰的间充质干细胞外泌体(RVG-MSC-EXO)组,并通过行为学实验如强迫检查、旷场、埋珠、水迷宫测试小鼠强迫、认知等行为。通过qPCR、ELISA检测小鼠前额叶皮质炎症因子水平,并通过免疫荧光检测小鼠前额叶皮质小胶质细胞极性。通过小动物活体成像(IVIS)验证RVG-MSC-EXO在小鼠体内靶向性。【结果】过表达RVG的间充质干细胞外泌体对小鼠脑部具有靶向性。喹吡罗小鼠模型经过外泌体治疗后,强迫检查和埋珠行为改善,促炎因子减少、抗炎因子增加。外泌体治疗后喹吡罗模型小鼠前额叶皮质小胶质细胞极性由M1型转变为M2型。【结论】过表达RVG的间充质干细胞外泌体可靶向小鼠大脑,通过转变小胶质细胞极性以改善强迫症小鼠颅内炎症水平,最终减少强迫症小鼠的强迫样行为。

关键词:狂犬病毒糖蛋白;小胶质细胞;强迫症;外泌体;间充质干细胞

中图分类号:R749 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2026)03-0468-14

DOI:10.11714/jssysu.med.YX20260012

RVG-modified Mesenchymal Stem Cell Exosomes Treat Obsessive-compulsive Disorder by Shifting Microglia Polarity

WEI Chunren, LUO Yuchong, WANG Weijie, YUE Jihui, WEN Shenglin

(Department of Psychiatry, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

Correspondence to: WEN Shenglin, E-mail: wenshl@mail.sysu.edu.cn; YUE Jihui, E-mail: yuejh@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】This study aimed to investigate the therapeutic effects of rabies virus glycoprotein (RVG)-modified mesenchymal stem cell-derived exosomes (MSC-EXO) in a mouse model of obsessive-compulsive disorder (OCD), and to explore the underlying mechanisms.【Methods】Primary mouse adipose-derived MSCs were isolated and characterized by adipogenic and osteogenic differentiation assays and flow cytometry. RVG-overexpressing MSCs were generated, and the derived exosomes were characterized by nanoparticle size analysis, Western blotting, and transmission electron microscopy. An OCD mouse model was established using quinpirole, and the mice were divided into five groups: control, model, clomipramine (CMI), MSC-EXO, and RVG-MSC-EXO. Compulsive-like behaviors and cognitive function were evaluated using the compulsive checking test, open field test, marble-burying test, and Morris water maze. The levels of inflammatory cytokines in the mouse prefrontal cortex were measured by qPCR and ELISA. Microglial

收稿日期:2026-01-14

录用日期:2026-04-24

基金项目:广东省自然科学基金(2019A1515011308);广东省医学科学技术研究基金(A2024168)

作者简介:韦淳仁,第一作者,研究方向:强迫症的发病机制,E-mail:weichr@mail2.sysu.edu.cn;温盛霖,通信作者,博士生导师,主任医师,E-mail:wenshl@mail.sysu.edu.cn;岳计辉,通信作者,副主任医师,E-mail:yuejh@mail.sysu.edu.cn

polarization in the prefrontal cortex was assessed by immunofluorescence staining. The brain-targeting ability of RVG-MSC-EXO was verified using an in vivo imaging system (IVIS).【Results】RVG-modified MSC-derived exosomes exhibited significant brain-targeting ability in mice. Exosome treatment significantly reduced compulsive checking and marble-burying behaviors in mice. Exosome treatment decreased pro-inflammatory cytokines and increased anti-inflammatory cytokines. Exosome treatment promoted a shift in microglial polarization from the M1 phenotype to M2 phenotype.【Conclusion】RVG-modified mesenchymal stem cell-derived exosomes can target the mouse brain, alleviate neuroinflammation by promoting microglial polarization towards the M2 phenotype, and ultimately reduce compulsive-like behaviors in OCD mice.

Key words: rabies virus glycoprotein; microglia; obsessive-compulsive disorder; exosomes; mesenchymal stem cell

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2026, 47(3): 468-481]

强迫症 (obsessive-compulsive disorder, OCD) 是一种慢性精神障碍,其特征为反复出现的强迫思维和/或强迫行为^[1-3]。这些症状往往耗费患者大量时间精力,导致其显著痛苦,并对个体的社会功能包括日常生活、职业表现、学习能力及人际关系造成实质性损害,最终严重影响患者的生活质量^[4]。目前针对强迫症的治疗主要有以选择性五羟色胺 (serotonin, 5-HT) 再摄取抑制剂 (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs) 为主的一线药物治疗;若一线药物治疗效果不佳,可考虑使用氯米帕明 (clomipramine, CMI) 等二线药物;部分患者联用小剂量抗精神病药物可有增效^[5],另外可配合认知行为疗法,如暴露与反应阻止疗法^[6]等,但其中最为有效的 SSRI 药物治疗联用 CBT 治疗也仅对 40%~60% 的患者有效,且通常不能完全缓解,另外 SSRI 因为非特异地作用于全身 5-HT 受体,部分患者可能出现胃肠道症状等副作用^[5],导致患者依从性较差。强迫症的神经炎症机制是当前研究的热点之一,大量证据表明,大脑中持续的、低度的炎症反应可能在 OCD 的病理生理中扮演着重要角色^[7-9]。

小胶质细胞作为中枢神经系统中主要的固有免疫效应细胞,在 OCD 的神经免疫机制中扮演着关键角色^[10-11]。小胶质细胞相当于中枢神经系统的“巨噬细胞”,占胶质细胞的 20%^[12-13],其不仅能够协调炎症反应,还在维持神经系统的稳态中发挥着重要的作用^[14]。最早提示小胶质细胞与 OCD 有关的研究来源于对强迫症动物模型的探索。同源盒 B8 (homeobox, Hoxb8) 基因是在脑内仅表达于小胶质细胞的转录因子,参与调控小胶质细胞的增殖和分化。Hoxb8 基因敲除小鼠表现出了明显的强

迫行为,提示强迫行为可能与小胶质细胞的异常相关^[15]。

外泌体 (exosomes, Exo) 是一类直径约 30~150 nm 的细胞外囊泡,由细胞内多泡体与细胞膜融合后释放到细胞外环境^[16-17]。外泌体结构主要包括膜蛋白、腔内蛋白、核酸、脂质。间充质干细胞外泌体 (mesenchymal stem cell exosomes, MSC-EXO) 因其独特的生物学特性和临床应用潜力,在再生医学、免疫调节和疾病治疗领域备受关注^[18-19]。间充质干细胞外泌体在神经精神疾病治疗中也展现出突破性潜力,目前已有研究发现包括:可穿透血脑屏障、神经保护与抗凋亡、促进神经再生、免疫调节等^[20]。神经炎症可能是精神障碍的重要发病机制,间充质干细胞外泌体主要通过以下途径参与神经炎症反应:调控小胶质细胞表型转化、抑制神经炎症及炎症因子表达和促进吞噬清除病理蛋白。目前已有大量针对间充质干细胞改善神经炎症的基础研究,例如:从人脐带间充质干细胞中提取的外泌体能够通过调节阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 小鼠小胶质细胞的活化来减轻脑神经炎症^[21-22]。在自闭症小鼠模型以及 SH3 和多结构域蛋白 3b 基因敲除孤独症模型中使用间充质干细胞外泌体也可改善其重复性行为 and 社交障碍^[23-24]。一项研究表明,给予抑郁大鼠模型骨髓来源间充质干细胞外泌体,可改善其抑郁症状、同时抑制神经元凋亡、抑制氧化应激与神经炎症^[25]。

外泌体静脉注射或雾化吸入后经血液循环,主要分布于肝、脾等脏器,虽然可穿透血脑屏障,但脑内分布比例仍然较少,这促使研究者通过工程化手段增强其针对大脑的靶向性,其中过表达靶向蛋白的外泌体被发现具有良好的脑部靶向效果。狂犬

病毒糖蛋白(rabies virus glycoprotein, RVG)靶向肽是一种源自狂犬病病毒糖蛋白的生物活性短肽,因其能特异性地靶向中枢神经系统,尤其是神经元,并有效穿越血脑屏障而备受关注。它在神经疾病治疗、诊断显像剂递送和基础神经科学研究中具有巨大的应用潜力。Alvarez-Erviti等^[26]用乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, AChR)特异性狂犬病病毒糖蛋白多肽修饰树突状细胞的细胞外囊泡,从而使细胞外囊泡能够有效地携带药物穿过血脑屏障治疗脑部疾病。在AD小鼠模型中,来自间充质干细胞的RVG修饰的外泌体通过调节炎症反应来挽救记忆缺陷^[27]。RVG修饰的细胞外囊泡通过介导的circDYM传递减轻了慢性不可知应激诱导的抑郁样行为^[28]。通过转染RVG并且负载miR124调节可卡因诱导的小胶质细胞活化^[29]。结合既往针对外泌体工程化修饰的研究,我们希望通过慢病毒转染在间充质干细胞上过表达RVG靶向肽,从而赋予间充质干细胞外泌体靶向大脑的能力,提高其可能的治疗效果。

总的来说,强迫症是一种致残性较高的慢性精神疾病,尽管现有研究已部分阐明其潜在的发病机制,具有一定的治疗手段,但临床治疗效果仍有限,亟需探索更有效的干预策略以改善治疗现状。本研究证明了RVG修饰的间充质干细胞外泌体可靶向小鼠脑部并通过转变小胶质细胞极性,抑制强迫症相关脑区内侧前额叶皮层(medial prefrontal cortex, mPFC)神经炎症,进而减轻强迫症小鼠强迫样行为。

1 材料与方法

1.1 实验动物

所有实验均严格遵守国家颁布的《医学实验动物管理实施细则》《实验动物管理条例》以及国际医学期刊要求,并已获得中山大学附属第五医院动物关爱与使用委员会的批准,伦理批准编号:00633。为避免雌性小鼠雌激素变化对行为结果的影响,本研究只选用8~10周龄雄性C57BL/6小鼠。所有实验小鼠购买自广东省医学动物实验中心,均为无特定病原体级(SPF),并在标准实验室条件下饲养,包括人为控制的12 h光暗周期,24 h可自由取用食物和水,温度22℃,湿度60%,笼子里覆盖着玉米

芯碎屑。所有实验开始前,小鼠均饲养至少1周以适应环境。为避免声音、光照强度及操作者气味等环境因素对行为学结果产生干扰,实验前1周操作者每日通过抚摸方式让小鼠熟悉其气味;实验过程中,各组小鼠均在相同光照强度及相对安静的环境中进行测试,以确保实验条件的一致性。

1.2 原代脂肪间充质干细胞提取及表征

无菌条件下从C57BL/6小鼠中获取脂肪组织,用含有1%双抗的PBS溶液清洗脂肪组织3~5次,充分去除血液成分;脂肪组织放入细菌培养皿中,使用无菌剪刀、镊子将脂肪组织剪碎呈糊状,加入预热的I型胶原酶,于温箱(37℃)消化1 h,每10 min震荡混匀1次,消化完毕,消化液呈浑浊液体状,无明显脂肪组织存在;加入1倍体积完全培养基终止消化,再加上适量PBS稀释消化液,40 μm滤网过滤,去除未消化成分,得到消化稀释液;300×g,离心10 min,去除油脂和上清,得到细胞沉淀;培养基重悬,再次300×g,离心10 min,弃上清,培养基重悬;镜下计数,按10⁴/mL种板,37℃,5%CO₂培养,24 h后第1次换液,以后2~3 d换液1次,80%融合后0.25%Trypsin,0.02%EDTA消化传代;细胞镜下作形态学观察。最后通过流式细胞术检测干细胞阳性细胞标志物:CD44、CD106,以及阴性细胞标志物:CD45、CD34、CD14、CD105以明确干细胞纯度,再通过成脂诱导、油红O染色,以及成骨诱导、茜素红染色明确干细胞分化能力。

1.3 RVG慢病毒包装及感染

RVG基因全序列通过NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查询,RVG质粒由华大基因公司合成,将质粒转化并抽提后,包装RVG慢病毒:取4×10⁶个HEK293T细胞铺于10 cm的细胞培养皿中,培养液为含有10%FBS的DMEM(不含有青霉素/链霉素),然后将其置于37℃,5%CO₂的培养箱中培养;培养大约20 h以后,细胞在培养皿的融合度大概为70~80%时,即可配置转染试剂用于质粒的转染;取两个ep管,①管加入80 μL PEI(1 μg/μL)+500 μL Opti-MEM,②管加入质粒(psPAX 2: PMD2. G/4: 3: 1/10 μg: 7.5 μg: 2.5 μg)+500 μL Opti-MEM,①管加入②管,充分混匀,静置10~20 min。PEI:质粒组=3:1。轻柔均匀加入70%~80%汇合率的293T细胞中,边晃动摇瓶,边将PEI-质粒混合液一滴滴地加入皿中,确保PEI-

质粒复合物均匀分布。12 h换液,24 h通过观察荧光确定包病毒是否成功。48 h取细胞上清,1 000×g,10 min离心去细胞碎片和杂质,吸取上清。使用0.45 μm滤器过滤上清液。加入1/4体积的5×PEG,并立即颠倒混匀,4℃冰箱中沉淀12 h;离心、取上清后重悬可得到浓缩的RVG慢病毒。病毒感染干细胞:铺板、在细胞汇合度50%~60%左右加入慢病毒浓缩液,8~12 h换液,感染细胞48~72 h后收集细胞在荧光显微镜下观察,加入嘌呤霉素,使每个孔的嘌呤霉素终浓度在1 μg/mL到10 μg/mL以筛选出稳转株。

1.4 外泌体提取及表征

使用去外泌体血清+干细胞专用培养基培养脂肪干细胞至100%密度,收集细胞上清,先2 000×g,4℃,离心10 min,以去除死亡细胞;后1 0000×g,4℃,离心30 min,去除细胞碎片和凋亡小体;使用0.22 μm滤器过滤;加入超速离心管中,配平,置于超速离心机,100 000×g,4℃,离心60 min;弃上清,加入PBS洗涤、重悬;再次置于超速离心机,100 000×g,4℃,离心60 min;弃上清,加入100 μL PBS重悬,所得外泌体置于-80℃保存。

CD9、CD63以及CD81属于4次跨膜蛋白家族,是外泌体膜上高表达的经典标志物,TSG101属于细胞内源性分选复合物的组分,参与外泌体的形成,也是外泌体的经典标志物。Calnexin主要定位于内质网,而外泌体不起源于内质网,通常是外泌体的阴性标志物。通过Western blot检测上述标志物、NTA粒径分析、透射电镜观察对外泌体进行表征。透射电镜操作步骤:将囊泡使用双蒸水进行重悬,然后取10 μL纳米囊泡水溶液悬滴于Formvar碳涂层的网格上;沉降5 min后,用滤纸吸掉多余的纳米囊泡,然后悬滴10 μL醋酸铀染色20 s,用滤纸尖端吸走多余醋酸铀;常温晾干后,使用透射电子显微镜在120 kV下拍摄电子显微照片。

1.5 免疫荧光实验

小鼠12.5 g/L阿佛丁麻醉,打开胸腔从右心耳注入PBS后注入多聚甲醛。取下小鼠大脑,将大脑用OCT包埋后,使用冰冻切片机进行冰冻切片并贴片;将贴片渗透(3 ml/L Triton X-100)并封闭(30 ml/L BSA),室温封闭1 h;染上dapi并使用防淬灭封片剂;使用共聚焦显微镜观察。

1.6 RVG-MSC-EXO靶向性测试

使用小动物活体成像系统对外泌体内分布进行检测;使用DIR染料工作液对外泌体进行染色;在37℃下孵育30 min;对染色后的外泌体再次超速离心以浓缩;分别将MSC-EXO和RVG修饰的间充质干细胞外泌体(RVG-modified mesenchymal stem cell exosomes, RVG-MSC-EXO)尾静脉注射入小鼠血液中,注射浓度2 mg/mL,每20 g体质量给药0.1 mL;给小鼠背部脱毛,以便获得更好的荧光效果;分别于注射后6 h、12 h、18 h、24 h对小鼠进行成像;24 h成像完成后解剖获取小鼠脑、心、肺、肝、脾、肾,并且再次排列好以成像。使用共聚焦观察强迫症相关脑区外泌体分布。注射dil染色后的外泌体,浓度为2 mg/mL,每20 g体质量给药0.1 mL。免疫荧光实验部分同上。

1.7 强迫症模型构建

分组:①对照组:生理盐水;②模型组:喹吡罗+生理盐水组;③CMI组:喹吡罗+CMI组;④MSC-EXO组:喹吡罗+间充质干细胞外泌体;⑤RVG-MSC-EXO组:喹吡罗+RVG-MSC-EXO。

造模:行为训练前1 h予2组小鼠皮下注射100 μL喹吡罗(0.75 mg/kg体质量),予对照组小鼠皮下注射100 μL生理盐水后,进行行为训练。模型构建完毕后,予对照组、模型组腹腔注射生理盐水,予CMI组腹腔注射250 μLCMI(10 mg/kg体质量),分别予MSC-EXO组和RVG-MSC-EXO组尾静脉注射相应外泌体(尾静脉注射,浓度2 mg/mL,每20 g体质量给药0.1 mL)。

行为训练:训练方法参照既往喹吡罗诱导的强迫症大鼠研究^[30]以及改良后的小鼠造模方式^[31]。具体过程如下:训练前5 d(每天1 h)将小鼠放置于训练装置内以熟悉训练装置,接着以2天1次的频率进行19次的训练。训练前准备好水瓶,其中1个水瓶装清水,1个水瓶装100 g/L的蔗糖水,并分别称量两个水瓶的重量。训练开始前将小鼠随机分成实验组和对照组,分别接受颈后皮下注射100 μL生理盐水和等量的喹吡罗溶液。注射后将小鼠放入实验装置中训练2.5 h。结束后再次称量水瓶的重量以计算训练过程中糖水和清水的消耗量。分析训练过程中的第2个60 min小鼠往返栖息处与饮水点的次数。

1.8 行为学实验

1.8.1 旷场实验 常用来评价小鼠的活动状态以及焦虑水平,该实验的原理是:小鼠天生会对陌生的开阔场所有所恐惧,这会导致其发生在场地周边活动的行为,而小鼠对陌生区域的好奇特性又促使其发生在中央区域探索的行为。使用实验室自制50 cm×50 cm×25 cm旷场箱(黑边白底)进行测试。将实验动物放置在开阔场地的中心,让其自由在实验装置中探索10 min,记录视频后使用visutrack软件记录小鼠行为,实验结束后,将其放回饲养笼内。实验结束后通过visutrack软件测定10 min内小鼠进入中心区域的次数、在中心区域停留的总时间以及在实验装置中运动的总距离。其中,实验装置的中心区域即以实验装置正中心,边长为25 cm,面积为实验装置面积25%的正方形区域。

1.8.2 埋珠试验 埋珠实验在方形箱子(31 cm×23 cm×16 cm)中进行,在该箱子的底部铺上一层厚度约为5 cm的玉米芯垫料,铺平并稍稍压实。将12个(3×4)黑色玻璃弹珠均匀地分布在玉米芯垫料的表面上。在实验时,将小鼠轻轻放入盒子中,30 min后迅速将其移出。计算被埋入玉米芯垫料的弹珠的数量(超过2/3的体积被埋入了玉米芯中,即认为被埋)

1.8.3 Morris水迷宫 使用Morris水迷宫测定记忆和学习功能。实验操作者对所有处理组的身份不知情。该装置由一个圆形钢池(直径:120 cm;高度:60 cm)组成,其中充满水,水面比平台(直径:6 cm;深度:30 cm)顶部高1 cm。使用蓝色幕布环绕水迷宫以避免室内提示,并放置在一个隔离的房间(20℃,60%湿度)。将水温保持在21℃,并通过添加二氧化钛使其呈白色不透明。测试进行了6 d。前5 d为平台隐藏期,测试小鼠找到平台的时间以及游泳速度;第6天为无平台期,测试1 min内小鼠在平台象限内停留时间。在每次试验开始时,小鼠被放置在水中,面对墙壁,从不同的起始位置(南、北、西、东),给予小鼠1 min寻找隐藏平台,并允许小鼠停留在隐藏平台15 s。如果小鼠在1 min内不能定位平台,将其引导到平台上并允许其在平台上停留15 s。我们使用视频跟踪系统来跟踪每只小鼠的游泳活动。使用visutrack软件分析平台隐藏期游泳速度、游泳轨迹图、平台隐藏期找到平台时间和无平台期平台象限停留时间。

1.9 实时定量荧光PCR

将小鼠mPFC脑区组织在液氮中磨碎,每50~100 mg组织加入1 mL TRIZOL,用匀浆仪进行匀浆处理。根据诺唯赞RNA提取试剂盒步骤提取组织总RNA。利用NanoDrop 2000分光光度计测定RNA浓度及纯度。RNA转录合成cDNA后进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR),反应体系为2 μL cDNA、上下游引物各0.4 μL、2×Mix 10 μL、DEPC水7.2 μL。引物序列请扫文末附表阅读。

1.10 酶联接免疫吸附剂测定

取各组小鼠mPFC脑区脑组织研磨并匀浆后取上清作为样本做ELISA。根据武汉三鹰ELISA试剂盒说明书在各孔中加入标准品或样品各100 μL,37℃孵育90 min,倒去孔内液体,加入100 μL生物素化抗体工作液,37℃孵育60 min,洗涤3次,加入100 μL酶结合物工作液,37℃孵育30 min,洗涤5次,加入90 μL底物溶液,37℃孵育15 min左右,加入50 μL终止液,立即在450 nm波长处测量OD值。

1.11 统计分析

实验数据采用Graphpad进行统计学分析,统计结果以平均值±标准误表示。两组间比较采用两独立样本*t*检验,单因素多组间比较采用one-way ANOVA,两两比较采用bonferroni法,双因素多组间比较采用two-way ANOVA,两两间使用Tukey's多重比较检验(Tukey's HSD test)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 间充质干细胞及外泌体的表征

培养至第三代的脂肪来源间充质干细胞呈均一的成纤维样梭形形态,汇合度达90%以上(图1A)。流式细胞术分析显示,细胞高表达间充质干细胞阳性标志物CD44和CD106,而几乎不表达造血/内皮细胞标志物CD45、CD34、CD14和CD105(图1B-G),证实了细胞的高纯度。经成脂与成骨诱导分化后,细胞分别可被油红O染色(显示脂滴,图1H)和茜素红染色(显示钙结节,图1I),证明了其多向分化潜能。

Western blot分析表明,从RVG转染的MSCs(RVG-modified mesenchymal stem cell, RVG-MSC)

中提取的外泌体(RVG-MS-EXO)高表达外泌体标志蛋白CD9、CD63、CD81和TSG101,而阴性标志蛋白Calnexin表达降低(图1J)。Flag标签蛋白在RVG-MS-及其外泌体中均成功检出,证实了RVG的稳定表达。纳米颗粒跟踪分析显示,RVG-MS-EXO与未修饰的MS-EXO均具有均一的粒径分布,峰值直径分别为133.5 nm和135.5 nm,颗粒浓度分别为 $4.7 \times 10^6/\text{mL}$ 和 $3.2 \times 10^6/\text{mL}$ (图1K)。透射电镜观察进一步证实,两者均呈现典型的杯状双层膜结构,直径100~200 nm,符合外泌体的形态特征(图1L)。

2.2 RVG-MS-EXO有良好的脑部靶向能力

为验证RVG过表达能否增强外泌体的靶向性,我们经尾静脉向小鼠分别注射DiR标记的RVG-MS-Exo与MS-Exo,采用小动物活体成像系统(in vivo imaging system, IVIS)动态监测注射后6 h、12 h、18 h及24 h的体内荧光分布。

经小动物活体成像从小鼠背部拍摄可见,外泌体主要分布于肝、脾以及脑部(附图1A)。分别对脑部以及体部进行圈定ROI,并分析其平均荧光强度,如附图1B所示,体外观察4个时间点(6 h、12 h、18 h、24 h),2种外泌体在体部平均荧光强度均无统计学差异,而在注射后18 h和24 h,脑部荧光强度出现统计学差异($P=0.0415$, $P=0.0321$),提示外泌体在脑部的分布可能于注射后18 h达到高峰。以上结果表明,从体外观察,RVG-MS-EXO相对于MS-EXO具有更强的靶向脑部能力。

体外拍摄结束后(注射后24 h)处死小鼠,取脑、心、肝、脾、肺、肾进行离体成像,以明确外泌体在各脏器的分布特征。如图2A-B所示,在注射后24 h,RVG-MS-EXO与MS-EXO在心脏、肝脏、肺部、脾脏、肾脏的分布无统计学差异($P>0.05$),而RVG-MS-EXO相对于MS-EXO在小鼠脑部分布明显增多($P=0.0132$)。这一结果表明RVG-MS-EXO具有更强的靶向大脑能力,可使外泌体治疗效果更有针对性,且减少其他部位副反应。

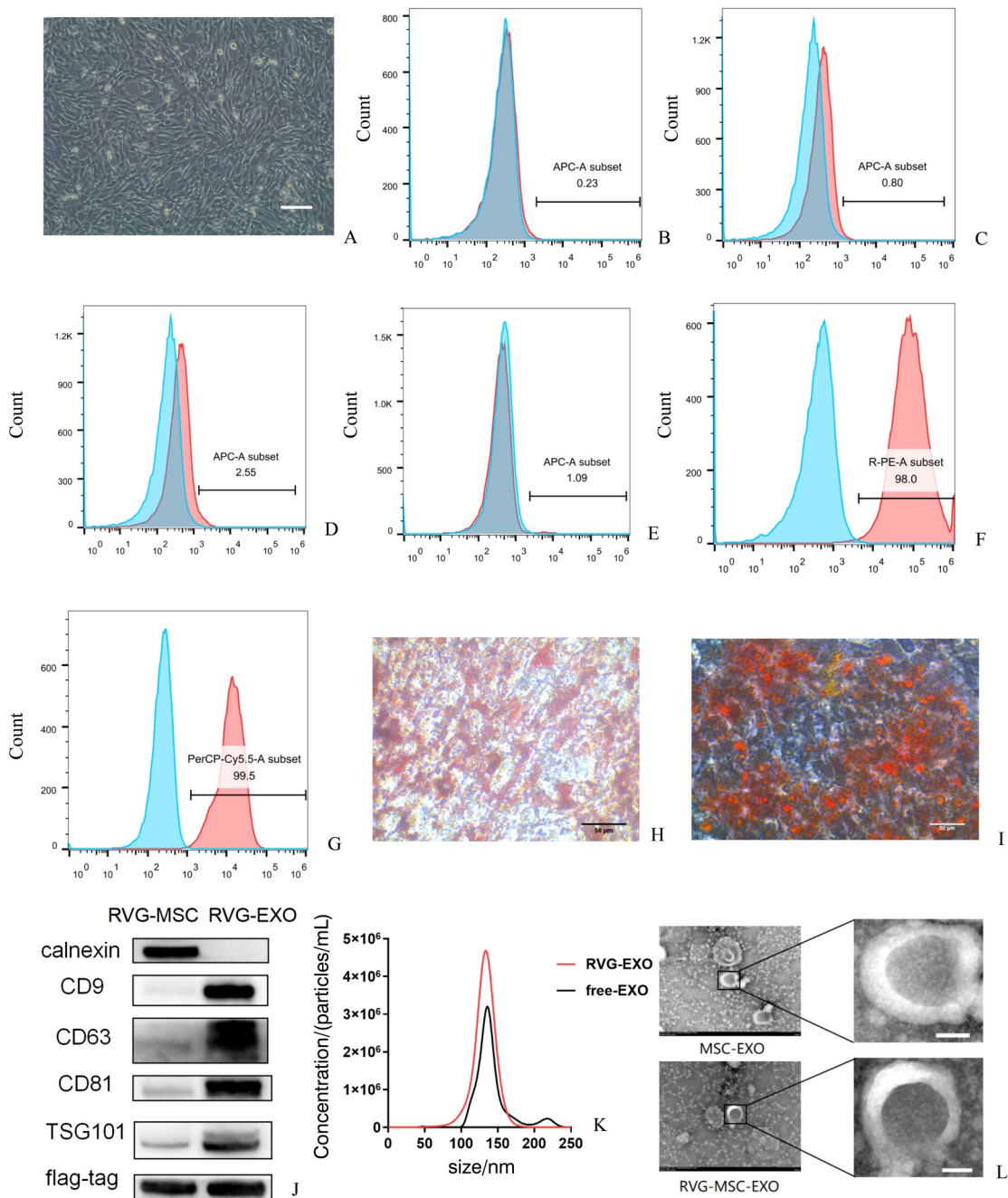
为了更直观地观察外泌体在强迫症相关脑区(皮质、丘脑和纹状体)的分布,注射后24 h,处死RVG-MS-EXO组和MS-EXO组小鼠,并取脑、包埋、冰冻切片、染色观察。如图2C-D所示,2种外泌体在皮质、丘脑、纹状体中均有分布,且相较于MS-EXO,RVG-MS-EXO分布量明显增多($P=$

0.0343 , $P=0.0008$, $P=0.0086$)。这提示RVG可使外泌体更好地靶向强迫症相关脑区。

2.3 RVG-MS-EXO治疗可逐渐减少啮齿罗模型小鼠强迫检查次数及掩埋行为

如图3A所示,我们对小鼠在行为学装置中第2小时的行为表现进行了分析。如图3B,在造模完成后对各组小鼠进行埋珠实验($F=6.714$, $P=0.0004$),啮齿罗造模后强迫症小鼠埋珠行为相对对照组小鼠增多($P=0.0032$),证明啮齿罗构建的强迫检查模型小鼠同时具有强迫掩埋行为。而在CMI($P=0.0283$)、RVG-MS-EXO($P=0.0002$)、MS-EXO($P=0.0364$)后掩埋行为均有显著减少。如图3C,通过双因素方差分析($F=3.181$, $P<0.0001$),并通过Tukey's多重比较检验(Tukey's HSD test)发现,4组啮齿罗诱导后的强迫症小鼠,从第2次训练起(第3天)至干预治疗时(第38天),其往返于homebase与糖水点的次数就显著大于对照组小鼠($P<0.01$)。这证明啮齿罗诱导的强迫症小鼠模型产生了显著强迫检查行为。第38天后,予盐水注射作为阴性对照的强迫症小鼠仍可维持至少10 d强迫检查症状,而尾静脉注射MS-EXO、RVG-MS-EXO以及CMI组小鼠均在注射后有不同程度强迫检查减少。相对于MS-EXO组小鼠,RVG-MS-EXO组与CMI组效果明显更加显著。RVG-MS-EXO组从第39天即开始产生显著治疗效果($P=0.0011$),且后续强迫检查次数仍以较大幅度下降,约47 d下降至对照组(control sucrose)水平。MS-EXO组在注射后也出现强迫检查下降趋势,但相较RVG-MS-EXO组更平缓,直至第49天(注射后10 d)才与模型组小鼠有统计学差异($P=0.0026$)。CMI组作为阳性对照组,也显示了良好的治疗效果:第43天开始(注射后)即与模型组小鼠产生统计学差异($P=0.0171$),后续差异逐渐增大,约47 d下降至对照组(control sucrose)水平。上述结果提示外泌体及CMI治疗可逐渐减少啮齿罗模型小鼠强迫检查次数,且RVG-MS-EXO治疗效果优于MS-EXO组。

此外,为了排除生理需求(饥饿/饥渴)所致小鼠往返次数差异,我们对训练过程中各组小鼠所消耗的糖水以及水的量进行分析。结果显示,各组小鼠在所有时间点的糖水消耗量($F=2.471$, $P=0.0625$)和清水消耗量均无明显差异($F=1.644$, $P=0.185$)。



A: Microscopic image of third-generation adipose-derived mesenchymal stem cells (20 \times), scale bar=100 μm . B-G: Flow cytometry results of adipose-derived mesenchymal stem cells: CD45 (B) CD34 (C) CD14 (D) CD105 (E) CD106 (F) CD44 (G). H: Oil red O staining after mesenchymal stem cells were induced to differentiate into adipocytes (200 \times), scale bar =50 μm . I: Alizarin red staining after osteogenic induction of mesenchymal stem cells (200 \times), scale bar=50 μm . J: Western blot results for stem cells and stem cell exosomes. K: Particle size analysis results for RVG-EXO and MSC-EXO. L: Transmission electron microscopy results of RVG-EXO and MSC-EXO, scale bar=50 nm.

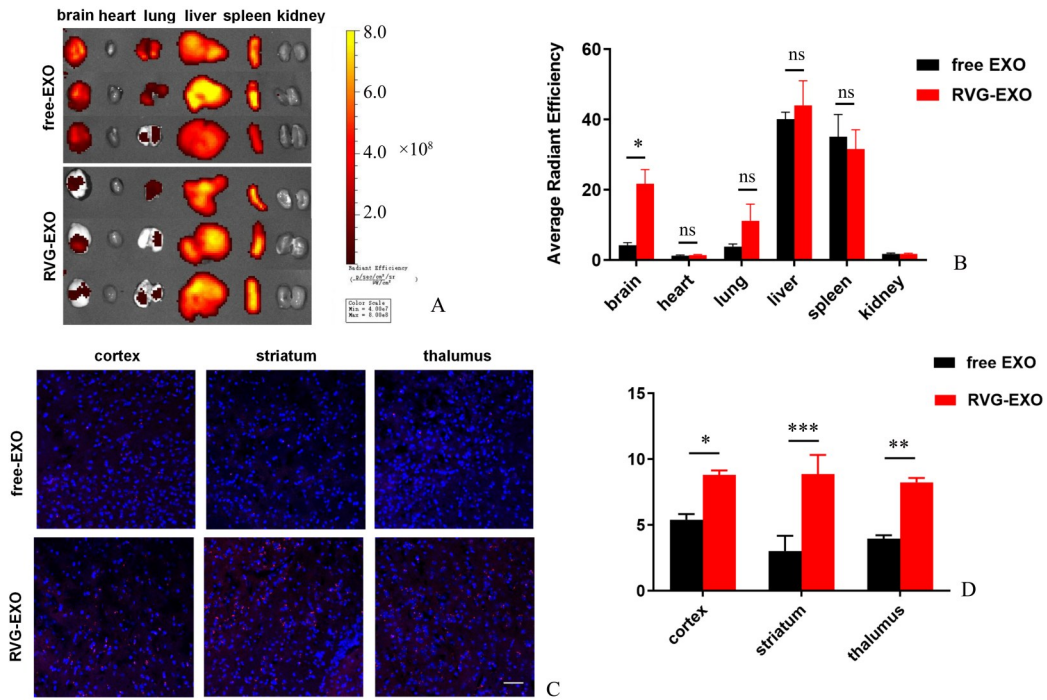
图1 干细胞及外泌体表征

Fig. 1 Characterization of mesenchymal stem cells and exosomes

2; 图3D)。这可排除生理需求对各组小鼠往返次数 homebase 及糖水点的影响。

为排除运动与认知功能对行为学结果的干扰,

我们进一步进行了旷场实验与 Morris 水迷宫测试。旷场实验结果显示, 各组小鼠在旷场中的运动总距离、进入中心区域的次数、停留时间以及在中心区



A: IVIS imaging of exosome distribution in heart, liver, spleen, lung, and kidney at 24 h, $n=3$. B: Quantification of exosome distribution in heart, liver, spleen, lung, and kidney at 24 h, $n=3$. C: Exosome distribution in cortex, striatum, and thalamus by confocal microscopy, $n=3$, scale bar=50 μm . Blue: DAPI, Red: DIL. D: Quantification of average exosome fluorescence intensity. Data are presented as means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, ns: no significant.

图2 RVG-MSC-EXO有良好的脑部靶向能力

Fig. 2 RVG-MSC-EXO exhibits excellent brain targeting capability

域内的运动距离均无统计学差异(附图2A-D)。这表明造模及治疗过程未影响小鼠的基础运动能力,排除了运动水平差异对强迫检查行为的潜在干扰。同时,中心区域活动的各项指标亦无差异,提示小鼠的焦虑样行为未发生明显改变。

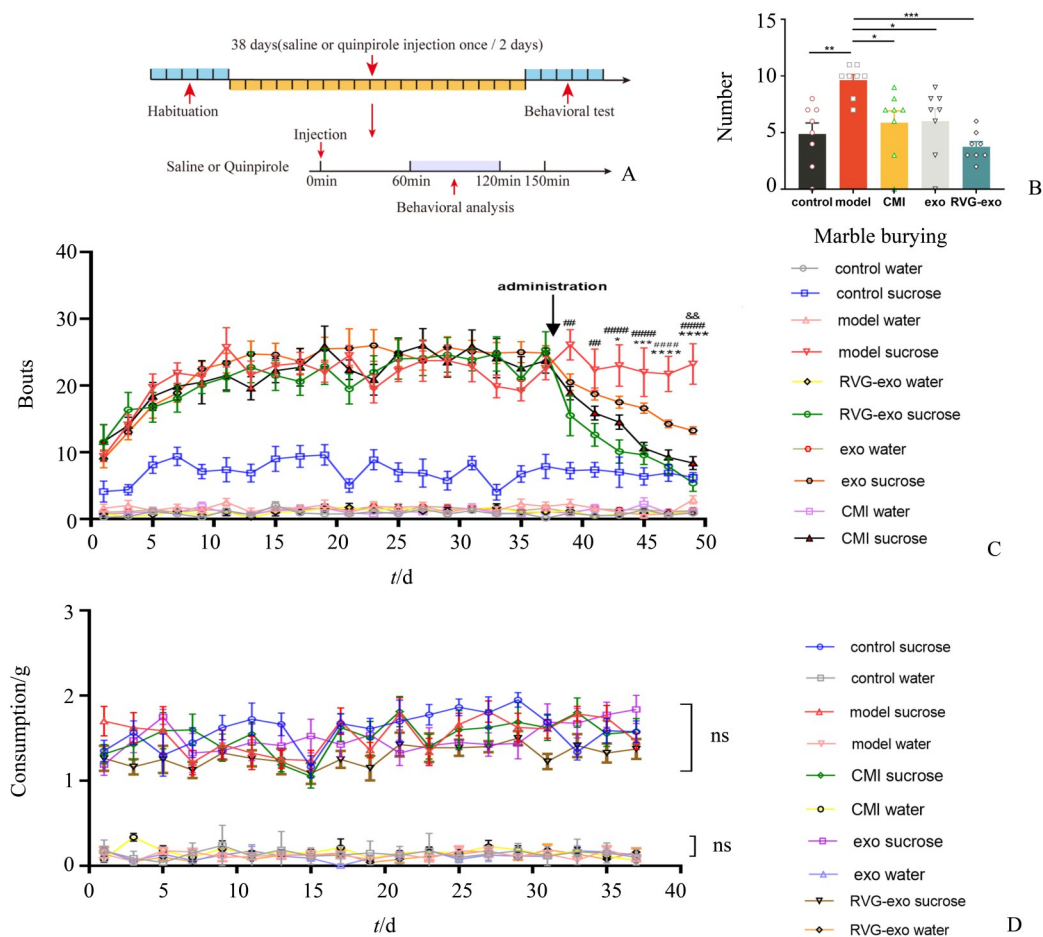
在Morris水迷宫测试中,各组小鼠在5 d平台隐藏期的平均游泳速度无差异(附图2E),表明后续空间学习能力的比较不受运动能力影响。在平台隐藏期,各组小鼠每日找到隐藏平台的潜伏期(附图2F)及在无平台期的目标象限停留时间(附图2G)均无统计学差异。以上结果说明,造模及治疗未损害小鼠的空间学习与记忆能力,从而确保观察到的强迫样行为为差异不受认知功能障碍的混杂影响。

2.4 RVG-MSC-EXO促进强迫症小鼠小胶质细胞极性转变

为了在mRNA水平确定强迫症造模及外泌体治疗对小胶质细胞表型及炎症因子的影响,我们进行qPCR检测小鼠强迫症相关脑区——mPFC的诱

导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, *iNOS*)、分化簇206(cluster of differentiation 206, *CD206*)和精氨酸酶-1(arginase-1, *Arg-1*)。

如图4A,小胶质细胞M1型标志物*iNOS*的mRNA表达水平($F=25.17, P < 0.0001$),在啮齿罗造模后显著升高($P < 0.0001$),而经过CMI、MSC-EXO、RVG-MSC-EXO治疗后小鼠*iNOS*表达水平均显著下降(3者 $P < 0.0001$),3种治疗效果之间无明显差异。如图4B,小胶质细胞M2型标志物*Arg-1*的表达水平($F=6.121, P=0.0040$),在啮齿罗造模后出现显著下降($P=0.0086$),RVG-MSC-EXO治疗后小鼠*Arg-1*表达水平显著上升($P=0.0038$),但CMI及MSC-EXO治疗后虽有上升趋势,但未产生统计学差异,不排除标准误差过大所致。另外3种治疗方案两两之间Tukey's HSD test无统计学差异。如图4C,小胶质细胞M2型标志物*CD206*($F=20.58, P < 0.0001$),在造模后表达显著下降($P < 0.0001$),而RVG-MSC-EXO治疗后小鼠*CD206*水平显著提高($P < 0.0001$)。此外,RVG-MSC-EXO处理组



A: Behavioral test timeline. B-C: Results of compulsive checking test in mice, number of trips between home base and sugar water/water points (B), $n=8$, sugar water and water consumption (C), $n=8$. Data analyzed by two-way ANOVA, [#]RVG-exo sucrose vs model sucrose, *CMI sucrose vs model sucrose, [&]exo sucrose vs. model sucrose. D: Marble burying experiment, $n=8$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; # $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$; ^{&&} $P < 0.01$.

图3 RVG-MS-EXO 治疗可减少喹吡罗模型小鼠强迫检查次数及掩埋行为

Fig. 3 RVG-MS-EXO treatment reduces the compulsive checking and burying behaviors in the quinpirole model mice

CD206 的 mRNA 水平相较 CMI 组 ($P=0.0139$) 及 MSC-EXO 组 ($P=0.0006$) 均有显著差异。上述结果表明造模后小鼠小胶质细胞 M1 型标志物的 mRNA 水平增加, 小胶质细胞 M2 型标志物的 mRNA 水平下降, 而 RVG-MS-EXO 可改变这一现象。

如图 4D-E, 对各组小鼠 mPFC 脑区进行免疫荧光观察 ($F=50.21, P < 0.0001$)。喹吡罗造模后小鼠 mPFC 脑区 iNOS⁺ 细胞 (即 M1 型小胶质细胞) 比例显著增加, 而 CMI ($P < 0.0001$) 及 RVG-MS-EXO ($P < 0.0001$) 均可使其减少。这一结果提示强迫症的发生及治疗可能与小胶质细胞极性转变相关。

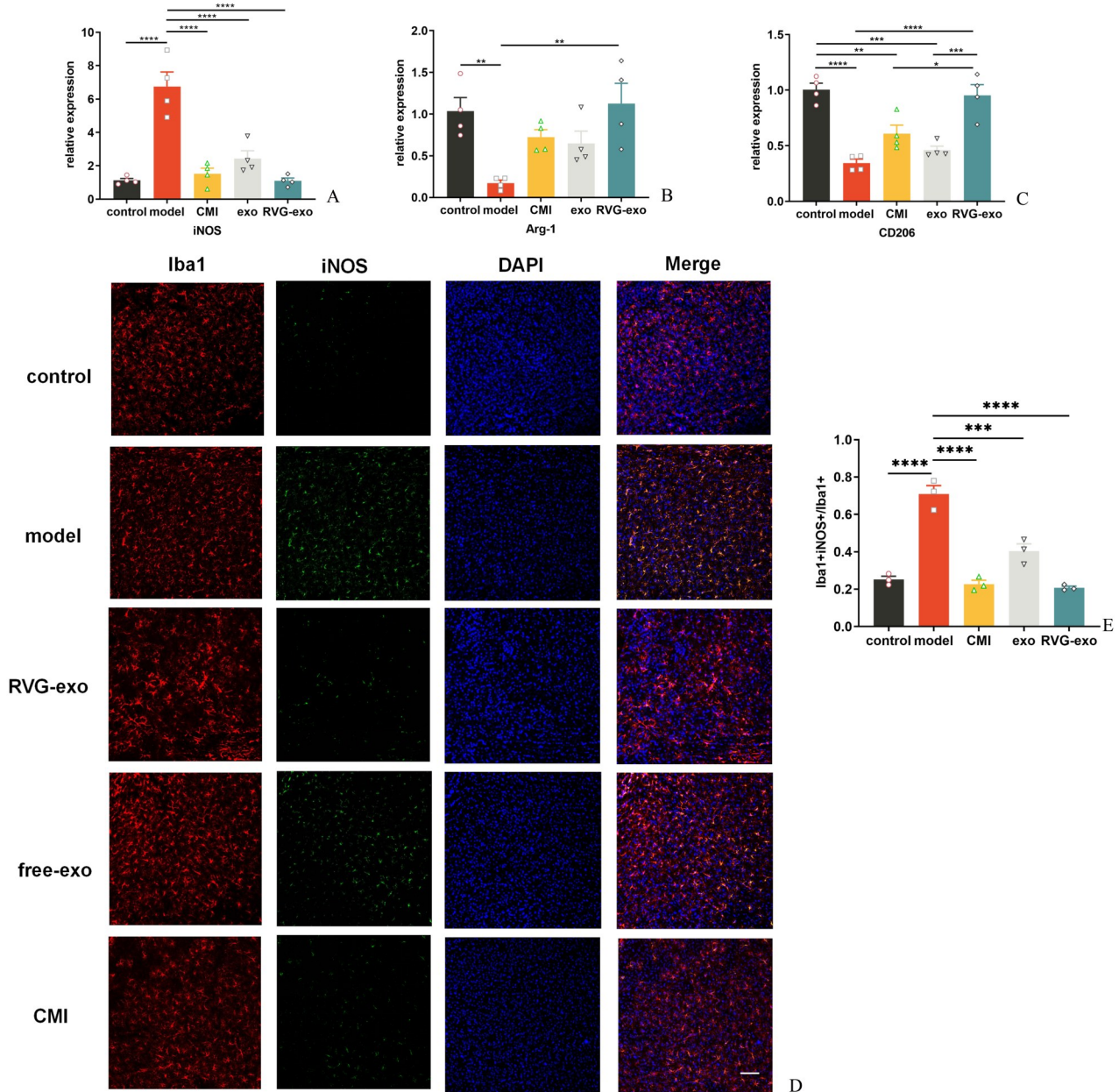
以上结果提示, 强迫症造模后小鼠 mPFC 脑区

M1 型小胶质细胞增多, M2 型小胶质细胞减少, 而 CMI 及 RVG-MS-EXO 均可减弱这一改变。

2.5 RVG-MS-EXO 对强迫症小鼠产生抗炎效果

为了在 mRNA 水平确定强迫症造模及外泌体治疗对炎症因子的影响, 我们通过 qPCR 检测小鼠强迫症相关脑区——mPFC 的白细胞介素 (interleukin, *IL*)-6、*IL*-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF*- α)、*IL*-4、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , *TGF*- β) 和 *IL*-10。

如图 5A-C, 喹吡罗造模后强迫症小鼠模型 mPFC 脑区促炎因子 *IL*-6 ($P=0.0006$)、*IL*-1 β ($P=0.0022$)、*TNF*- α ($P=0.0006$) 的 mRNA 水平均有显著上升。在 RVG-MS-EXO ($P=0.0003$)、CMI ($P=$



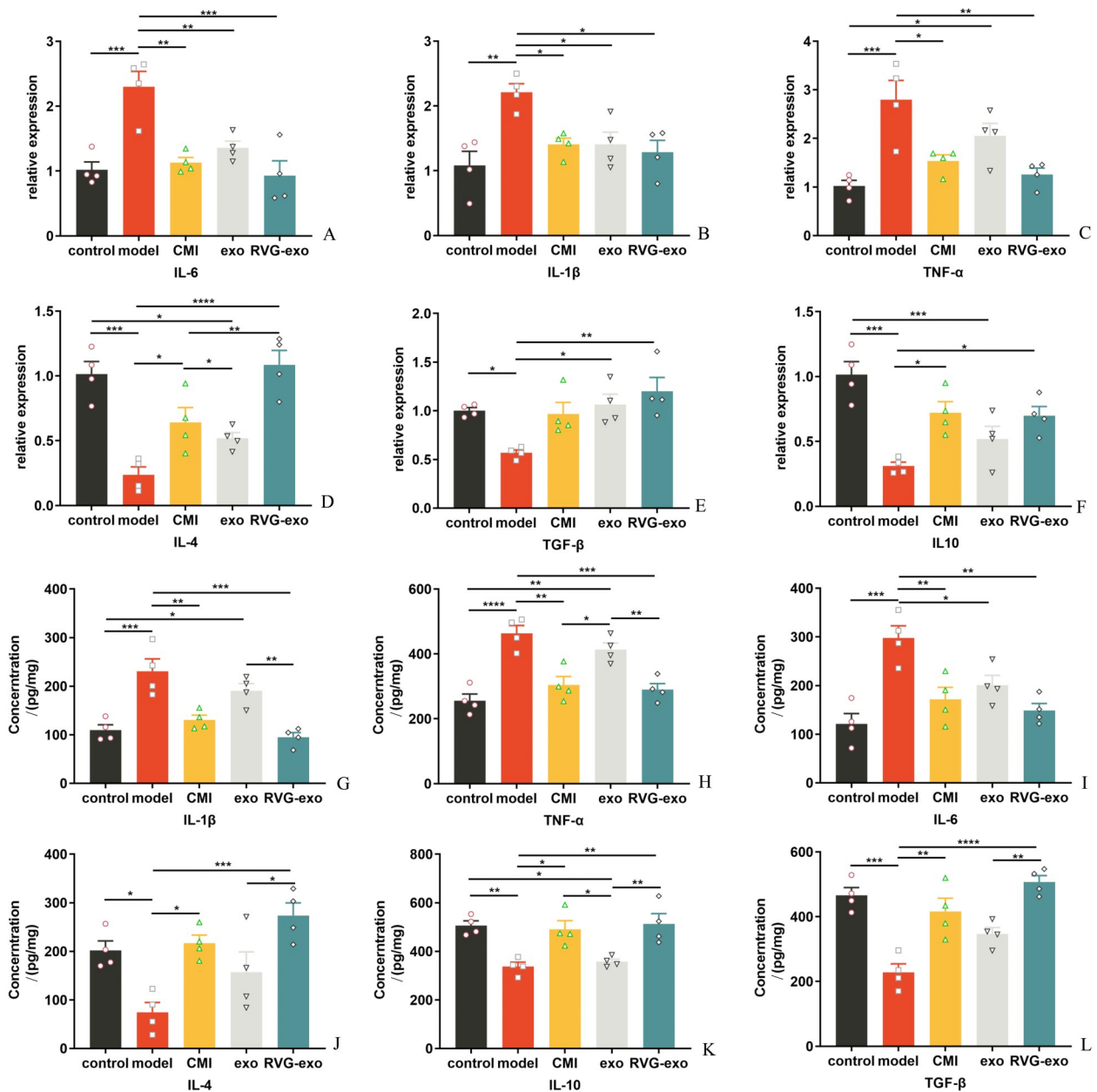
A-C: qPCR results of microglia markers, *iNOS* (A), *Arg-1* (B), *CD206* (C), $n=4$. D: Representative images of M1-type microglia immunofluorescence, scale bar=100 μm , $n=3$. E: Quantification of *iNOS*⁺ cells/microglia. Data are presented as means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

图4 RVG-MSC-EXO促进啉吡罗模型小鼠小胶质细胞极性转变

Fig. 4 RVG-MSC-EXO shifts microglia polarity in the quinpirole model mice

0.0014)、MSC-EXO ($P=0.0087$)处理后 *IL-6* 的 mRNA 水平均有显著下降。在 RVG-MSC-EXO ($P=0.0114$)、CMI ($P=0.0301$)、MSC-EXO ($P=0.0299$) 处理后 *IL-1 β* 的 mRNA 水平均有显著下降。在 RVG-MSC-EXO ($P=0.0023$) 及 CMI ($P=0.0120$) 处理后 *TNF- α* 的 mRNA 水平均有显著下降。如图 5G-I, 啉吡罗造模后强迫症小鼠模型 mPFC 脑区促

炎因子 *IL-1 β* ($P=0.0004$)、*TNF- α* ($P < 0.0001$)、*IL-6* ($P=0.0003$) 的蛋白水平均有显著上升。在 RVG-MSC-EXO ($P=0.0001$)、CMI ($P=0.0026$) 处理后 *IL-1 β* 的蛋白水平均有显著下降。在 RVG-MSC-EXO ($P=0.0004$)、CMI ($P=0.0010$) 处理后 *TNF- α* 的蛋白水平均有显著下降。在 RVG-MSC-EXO ($P=0.0015$)、CMI ($P=0.0063$) 及 MSC-EXO (P



A-F: qPCR results of inflammatory factor, *IL-6* (A), *IL-1β* (B), *TNF-α* (C), *IL-4* (D), *TGF-β* (E), *IL-10* (F), $n=4$. G-L: ELISA results of inflammatory factor, *IL-1β* (G), *TNF-α* (H), *IL-6* (I), *IL-4* (J), *IL-10* (K), *TGF-β* (L), $n=4$. Data are presented as means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

图5 RVG-MS-C-EXO对喹吡罗模型小鼠产生抗炎效果

Fig. 5 RVG-MS-C-EXO exhibits anti-inflammatory effects in the quinpirole model mice

=0.040 7)处理后 *IL-6* 的蛋白水平均有显著下降。以上结果提示造模后小鼠促炎因子的 mRNA 水平及蛋白水平增加,而 CMI 及 RVG-MS-C-EXO 均可减弱这一改变。

如图 5D-F, 喹吡罗造模后强迫症小鼠模型 mPFC 脑区抗炎因子 *IL-4* ($P=0.0002$)、*TGF-β* ($P=0.0446$)、*IL-10* ($P=0.0002$) 的 mRNA 水平均有显著

下降。在 RVG-MS-C-EXO ($P < 0.0001$) 及 CMI ($P=0.0435$) 处理后 *IL-4* 的 mRNA 水平均有显著上升。在 RVG-MS-C-EXO ($P=0.0028$)、MS-C-EXO ($P=0.0186$) 处理后 *TGF-β* 的 mRNA 水平均有显著上升。在 RVG-MS-C-EXO ($P=0.0299$) 及 CMI ($P=0.0202$) 处理后 *IL-10* 的 mRNA 水平均有显著上升。如图 5J-L, 喹吡罗造模后强迫症小鼠模型

mPFC脑区抗炎因子IL-4($P=0.0272$)、IL-10($P=0.0051$)和TGF- β ($P=0.0002$)的蛋白水平均有显著下降。在RVG-MSC-EXO($P=0.0007$)、CMI($P=0.0127$)处理后IL-4的蛋白水平均有显著增高。在RVG-MSC-EXO($P=0.0037$)、CMI($P=0.0110$)处理后IL-10的蛋白水平均有显著提高。在RVG-MSC-EXO($P<0.0001$)及CMI($P=0.0016$)处理后TGF- β 的蛋白水平均有显著上升。以上结果提示造模后小鼠抗炎因子的mRNA水平及蛋白水平下降,而CMI及RVG-MSC-EXO均可减弱这一改变。

3 讨论

在本研究中我们证明了RVG修饰的间充质干细胞外泌体可改善强迫症小鼠模型的强迫检查行为,并发现其机制可能在于转变小胶质细胞极性,抑制强迫症相关脑区mPFC神经炎症,产生抗强迫症作用。

喹吡罗是一种多巴胺受体激动剂,能够诱导大鼠进行有规律的运动,并与正常大鼠相比,更倾向于进入固定的盒子中,这样的行为与人类的强迫检查症状相似,因此喹吡罗大鼠模型作为一种经典的药理模型出现在强迫症的相关研究中^[30]。喹吡罗诱导的小鼠强迫检查模型的构建是一个很大的进步。在本课题组前期研究中,我们成功通过喹吡罗药理诱导并结合行为训练获得稳定的强迫检查小鼠,且明确在强迫症相关脑区神经元激活(c-fos表达)明显增多^[31]。至此我们获得了饲养成本较低、所需行为学空间较小的强迫检查小鼠模型。本研究继续沿用这一造模方式,并且进一步加入阳性对照组(CMI组),结果表明CMI能显著减少喹吡罗模型小鼠的重复检查行为,这一结果更进一步支持该模型能较好的模拟强迫症的病理过程,是一种稳定的强迫症小鼠模型。

需要指出的是,现有的强迫症动物模型,(包括基因敲除模型、药理诱导模型、光遗传/化学遗传模型)都只能模拟部分强迫样症状^[32],而无法全面复现人类强迫症的复杂的强迫思维、强迫行为及其伴随症状。例如在本研究中强迫症模型小鼠未表现出明显的焦虑样表现,而临床上强迫症患者常伴有严重焦虑症状^[33]。这一局限性必然影响动物实验成果向临床研究转化,因此后续的进一步验证至关

重要。假如间充质干细胞外泌体被证明在灵长类动物的强迫行为中有显著性治疗效果,可以进一步联合SSRI类药物、二线药物、认知行为疗法,明确联用后效果是否强于单用。在此同时,注意一期及二期临床试验中患者出现的不良反应。即便在本研究中的治疗剂量下未发现各器官损害及肝肾毒性,也要关注强迫症患者与强迫症动物模型的种群差异,警惕不良反应的发生,避免出现“弊大于利”的问题。

在本研究中,我们发现喹吡罗诱导的模型小鼠的mPFC脑区小胶质细胞M1型增加、M2型减少,而治疗后M1型明显下降,M2型明显增加。这提示我们强迫症的发生可能伴随神经炎症的发生。值得注意的一点是,外泌体属于细胞外囊泡的一种,但不同来源的细胞外囊泡作用于不同疾病的动物模型,可能对小胶质细胞/巨噬细胞极性转变产生刚好相反的作用效果,而不是简单得出“外泌体/细胞外囊泡可将小胶质细胞/巨噬细胞由M1型转变为M2型”这一结论。在既往研究中,针对肝癌的小鼠模型,运用细菌来源的细胞外膜囊泡,经过工程化修饰——过表达GPC3及CD47,可将外周巨噬细胞由M2型(CD206⁺)逐渐转化为M1型(CD86⁺),从而促进免疫系统抗肿瘤效果^[34]。这一结果的具体机制仍待继续研究。需要指出的是,本研究中测定的细胞因子并不直接反应小胶质细胞极性的改变,因为细胞因子来源多样,如星形胶质细胞、神经元、浸润的外周免疫细胞也参与细胞因子的调节^[35-37]。小胶质细胞极性改变还需要形态学层面进一步观察,如测量胞体面积、突起总长度、分支节点数等参数。

在以往研究中,间充质干细胞外泌体主要用于免疫调节、组织修复再生、重塑肿瘤微环境、神经调控等。针对神经损伤及神经退行性病变如脊髓损伤、AD、帕金森病等的研究相对较多,但针对强迫症的研究寥寥无几,这也促使我们不断探索其可能的治疗作用。干细胞外泌体相比干细胞疗法的优势在于可以穿越血脑屏障且致癌风险、免疫排斥风险更低。在本次研究中,我们首次探索通过间充质干细胞外泌体发挥抗强迫症状的作用。这为后续间充质干细胞外泌体用于临床强迫症治疗做铺垫。而在外泌体膜表面过表达RVG蛋白,可以更加高效的靶向脑部,弥补了间充质干细胞及其外泌体本

身产量较少的问题且提高了治疗的针对性、有望减少其他部位可能的不良反应,这一优势相对传统的SSRI类药物是值得期待的。

RVG靶向肽是神经靶向递送领域的一个重要工具。它巧妙利用了狂犬病病毒天然的神经营袭机制,为跨越血脑屏障和靶向神经元提供了一把“钥匙”。RVG靶向肽的作用机制主要在于其与烟碱型乙酰胆碱受体高亲和力结合。通过偶联或装载各种治疗性分子(核酸、蛋白、小分子)或显像剂到RVG肽或其修饰的纳米载体上,研究者们正在开发针对多种难治性神经系统疾病的新疗法和诊断工具。尽管在递送效率、特异性、稳定性和临床转化方面仍面临挑战,但RVG肽展现出的巨大潜力使其持续成为研究热点。随着肽工程、纳米技术和基础机制的不断进步,RVG靶向递送系统有望在未来为脑部疾病的精准诊断和治疗带来重要变化。

本研究创新点在于探索了通过间充质干细胞外泌体发挥抗强迫症状的作用,探索强迫症发病机

制与小胶质细胞极性转变之间的关系。当然,本研究还存在几点明显不足之处,表现在未对间充质干细胞外泌体发挥作用的具体分子机制、相关通路进行研究。其次我们的研究局限在小胶质细胞上,并没有展开对其与神经元间的相互作用,未探索星形胶质细胞、神经元上是否也对强迫症调节发挥作用。另外本实验仅使用CMI作为阳性对照,而临床上更多使用如氟伏沙明等SSRI类药物作为抗强迫一线药物,主要源于目前针对喹吡罗诱导的强迫症鼠类模型的实验多选用CMI作为阳性对照、并给予本文用法用量参考,我们将在后续实验中尝试使用氟伏沙明作为相应阳性对照。最后,RVG-MSc-EXO的潜在风险仍需后续大量生物安全性实验以及临床试验进一步证明。在后续的研究中,我们将针对干细胞外泌体针对小胶质细胞具体作用通路进行更细致的研究。



附表和附图
Appendix table
and figure

参考文献

- [1] Robbins TW, Vaghi MM, Banca P. Obsessive-compulsive disorder: puzzles and prospects[J]. *Neuron*, 2019, 102(1): 27-47.
- [2] Veale D, Roberts A. Obsessive-compulsive disorder[J]. *BMJ*, 2014, 348: g2183.
- [3] Stein DJ, Costa D, Lochner C, et al. Obsessive-compulsive disorder[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 52.
- [4] Torres AR, Prince MJ, Bebbington PE, et al. Obsessive-compulsive disorder: prevalence, comorbidity, impact, and help-seeking in the British National Psychiatric Morbidity Survey of 2000[J]. *Am J Psychiatry*, 2006, 163(11): 1978-1985.
- [5] Fineberg NA, Gale TM. Evidence-based pharmacotherapy of obsessive-compulsive disorder[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2005, 8(1): 107-129.
- [6] Goodman WK, Storch EA, Sheth SA. Harmonizing the neurobiology and treatment of obsessive-compulsive disorder[J]. *Am J Psychiatry*, 2021, 178(1): 17-29.
- [7] Marazziti D, Mucci F, Fontenelle LF. Immune system and obsessive-compulsive disorder[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, 93: 39-44.
- [8] Jiang NM, Cowan M, Moonah SN, et al. The impact of systemic inflammation on neurodevelopment[J]. *Trends Mol Med*, 2018, 24(9): 794-804.
- [9] Pape K, Tamouza R, Leboyer M, et al. Immunoneuropsychiatry—novel perspectives on brain disorders[J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(6): 317-328.
- [10] Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in physiology and disease[J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79(1): 619-643.
- [11] Block ML, Hong JS. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity[J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(Pt 5): 1127-1132.
- [12] Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices[J]. *Glia*, 2001, 33(3): 256-266.
- [13] Tremblay M, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience[J]. *PLoS Biology*, 2010, 8(11): e1000527.
- [14] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration[J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35(1): 441-468.
- [15] Chen S, Tvrdik P, Peden E, et al. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice[J]. *Cell*, 2010, 141(5): 775-785.
- [16] Samanta S, Rajasingh S, Drosos N, et al. Exosomes: new

- molecular targets of diseases [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2018, 39(4): 501-513.
- [17] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88(1): 487-514.
- [18] Ma CY, Zhai Y, Li CT, et al. Translating mesenchymal stem cell and their exosome research into GMP compliant advanced therapy products: promises, problems and prospects [J]. *Med Res Rev*, 2024, 44(3): 919-938.
- [19] Zhang S, Chuah SJ, Lai RC, et al. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity [J]. *Biomaterials*, 2018, 156: 16-27.
- [20] 郭玲玲,韩晓,陈哲远,等.脂肪间充质干细胞外泌体对脑创伤记忆障碍作用及机制研究[J].*临床军医杂志*,2024,52(1):66-69; +73.
Guo LL, Han X, Chen ZY, et al. Study on the effect and mechanism of adipose derived mesenchymal stem cell extracellular vesicles on memory impairment after traumatic brain injury[J]. *Clin J Med Officers*,2024,52(1):66-69; +73.
- [21] Guo M, Yin Z, Chen F, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome: a promising alternative in the therapy of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2020, 12(1): 109.
- [22] Ding M, Shen Y, Wang P, et al. Exosomes isolated from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate neuroinflammation and reduce amyloid-beta deposition by modulating microglial activation in Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(11): 2165-2177.
- [23] Perets N, Hertz S, London M, et al. Intranasal administration of exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorates autistic-like behaviors of BTBR mice [J]. *Mol Autism*, 2018, 9: 57.
- [24] Perets N, Oron O, Herman S, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells improved core symptoms of genetically modified mouse model of autism Shank3B [J]. *Mol Autism*, 2020, 11(1): 65.
- [25] Guo H, Huang B, Wang Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes improve injury of hippocampal neurons in rats with depression by upregulating microRNA-26a expression [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 82: 106285.
- [26] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 341-345.
- [27] Cui G, Guo H, Li H, et al. RVG-modified exosomes derived from mesenchymal stem cells rescue memory deficits by regulating inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Immun Ageing*, 2019, 16(1): 10.
- [28] Yu X, Bai Y, Han B, et al. Extracellular vesicle-mediated delivery of circDYM alleviates CUS-induced depressive-like behaviours [J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(1): e12185.
- [29] Chivero E T, Liao K, Niu F, et al. Engineered extracellular vesicles loaded with miR-124 attenuate cocaine-mediated activation of microglia [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 573.
- [30] Sun T, Song Z, Tian Y, et al. Basolateral amygdala input to the medial prefrontal cortex controls obsessive-compulsive disorder-like checking behavior [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(9): 3799-3804.
- [31] 罗宇翀,韦淳仁,陈晓,等.喹吡罗诱导的慢性强迫症小鼠模型的改进[J].*中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(3): 412-421.
Luo YC, Wei CR, Chen X, et al. Improvement of the mouse model of chronic obsessive-compulsive disorder induced by quinpirole [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(3): 412-421.
- [32] Camilla DL, Eagle DM, Grant JE, et al. Animal models of obsessive-compulsive spectrum disorders [J]. *CNS Spectr*, 2014, 19(1): 28-49.
- [33] Krebs G, Heyman I. Obsessive-compulsive disorder in children and adolescents [J]. *Arch Dis Child*, 2015, 100(5): 495-499.
- [34] Li Y, Zhu T, Chen J, et al. Dual-targeted engineered bacterial outer membrane vesicles for hepatocellular carcinoma immunotherapy [J]. *Adv Funct Mater*, 2024, 34(41): 2401355.
- [35] Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, et al. Control of synaptic strength by glial TNFalpha [J]. *Science*, 2002, 295(5563): 2282-2285.
- [36] Ross FM, Allan SM, Rothwell NJ, et al. A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices [J]. *J Neuroimmunol*, 2003, 144(1): 61-67.
- [37] Stellwagen D, Malenka RC. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha [J]. *Nature*, 2006, 440(7087): 1054-1059.

(编辑 黄子芸)