

• 基础研究 •

# 不同性别来源人胚胎干细胞与羊膜间充质干细胞外泌体蛋白质组学与 miRNA 谱分析

黄蓓蓓<sup>1</sup>, 宁松<sup>2</sup>, 吴慧敏<sup>2</sup>, 覃莲菊<sup>2</sup>, 刁飞扬<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室, 江苏 南京 211103; <sup>2</sup>南京医科大学第一附属医院生殖医学中心, 江苏 南京 210036

**[摘要]** 目的: 探讨不同性别来源人胚胎干细胞外泌体(human embryonic stem cell-derived exosome, hESC-exo)和人羊膜间充质干细胞外泌体(human amniotic mesenchymal stem cell-derived exosome, hAMSC-exo)在蛋白质组学和转录组学层面的差异。方法: 构建符合外泌体研究的培养体系, 通过超速离心分别从男女株人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)和人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cell, hAMSC)中获得质量符合研究要求的外泌体(exosome, exo), 采用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析来定义蛋白质组学表征, 进行高通量测序以确定微小RNA(microRNA, miRNA)谱。通过生物信息学分析确定外泌体调控的主要生物学过程和通路。结果: 在蛋白质组学和转录组学层面, hAMSC-exo 男株与女株表征类似, 而 hESC-exo 男株与女株间存在较大差异。miRNA 图谱和蛋白质组分析揭示了 hESC-exo 主要与发育、代谢相关, hAMSC-exo 主要与免疫、代谢相关。结论: 通过蛋白质组学和 miRNA 测序对不同性别来源的 hAMSC-exo 和 hESC-exo 进行了系统分析, 预测它们的生物学功能, 揭示其在不同领域的应用潜力, 为临床前和临床试验中选择更优来源细胞提供新的视角。

**[关键词]** 外泌体; 人羊膜间充质干细胞; 人胚胎干细胞; miRNA; 蛋白质组**[中图分类号]** R329; Q7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2026)02-188-14**doi:** 10.7655/NYDXBNSN250918

## Comparative analysis of sex-specific exosomal proteomes and miRNA profiles: human embryonic stem cells versus human amniotic mesenchymal stem cells

HUANG Beibei<sup>1</sup>, NING Song<sup>2</sup>, WU Huimin<sup>2</sup>, QIN Lianju<sup>2</sup>, DIAO Feiyang<sup>1,2</sup><sup>1</sup>State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211103;<sup>2</sup>Clinical Center of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210036, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate proteomic and transcriptomic differences between exosomes derived from sex-specific human embryonic stem cells (hESC-exo) and human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSC-exo) at the molecular level. **Methods:** A defined cell culture system optimized for exosome research was established. High-quality exosomes were isolated *via* ultracentrifugation from male and female lines of hESCs and hAMSCs. Proteomic characterization was performed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), while microRNA (miRNA) profiles were determined by high-throughput sequencing. Bioinformatics analysis subsequently identified key biological processes and pathways regulated by the exosomes. **Results:** At both proteomic and transcriptomic levels, exosomes derived from male and female hAMSCs exhibited similar molecular profiles, whereas those originating from male and female hESCs showed significant sex-based differences. Integrated miRNA profiling and proteomic analysis revealed that hESC-exo were primarily associated with developmental and metabolic processes, while hAMSC-exo predominantly participated in immune and metabolic functions. **Conclusion:** Through systematic proteomic and miRNA sequencing analyses of sex-specific exosomes derived from hAMSCs and hESCs, this study predicted their biological functions and revealed their

**[基金项目]** 国家重点研发计划(2022YFC2702505)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: phenix\_y@163.com (ORCID: 0000-0003-0118-3382)

potential applications across multiple domains. These findings provide novel perspectives for selecting optimal cell sources in preclinical and clinical trials.

**[Key words]** exosomes; human amniotic mesenchymal stem cells; human embryonic stem cells; miRNA; proteome

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(02): 188-201]

过去几年,以再生子宫内膜、改善卵巢功能为目的的干细胞治疗被认为是治疗女性生殖系统疾病最有前途的策略。然而,在临床条件下,无论是采取静脉注射或子宫内注射干细胞,亦或是通过生物材料封装干细胞,干细胞疗法都存在免疫排斥、致瘤风险等局限性<sup>[1]</sup>。

外泌体是细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)的一种<sup>[2-3]</sup>,直径在30~200 nm之间,在电子显微镜下呈杯状外观。存在于细胞培养物的上清液或血液、精液、尿液等多种体液中<sup>[4]</sup>,可通过旁分泌活动介导复杂的生理和病理过程,包括器官与生殖发育、抗原提呈、神经元通讯、免疫应答、衰老调控以及细胞增殖<sup>[5-6]</sup>。

外泌体因其生物安全性、稳定性、无非整倍性和低免疫原性而受到广泛关注,成为干细胞治疗的有效替代品<sup>[7-8]</sup>。已有报道经血干细胞(menstrual blood-derived stromal cell, MenSC)、人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)、人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cell, hAMSC)、人脂肪间充质干细胞(human adipose mesenchymal stem cell, hADSC)等来源的外泌体在创伤、生殖、眼科疾病中发挥改善内皮衰老、促进血管生成、加速细胞迁移、改善纤维化、促进伤口愈合等作用<sup>[9-14]</sup>。

目前研究人员主要根据可及性选择不同来源干细胞进行外泌体研究。外泌体富含蛋白质、核酸和脂质等多种生物活性物质,具有与亲代细胞相似的治疗效果<sup>[8]</sup>,因此不同细胞来源的外泌体可能带有亲代细胞功能特征。既往个别研究对人多能干细胞、胚胎干细胞和脐带间充质干细胞进行过蛋白质组或 miRNA 表达谱的描述<sup>[15-16]</sup>。然而,来源于 hAMSC 的外泌体组学相关研究尚未见报道,更未关注男性株系与女性株系来源的外泌体是否存在生物学差异。2016年本实验室曾对脐带间充质干细胞、羊膜间充质干细胞、胚胎干细胞男女株培养上清中的细胞因子进行比较,发现女性脐带间充质干细胞可能具有更好地促进细胞生长、改善血供的能力,而男性脐带间充质干细胞和女性胚胎干细胞可

能具有更强的降解结缔组织的能力<sup>[17]</sup>。据此推测不同性别来源和干细胞来源的外泌体可能在功能上也存在一定的差异。

本研究选择男性和女性 hESC 及 hAMSC 来源的外泌体进行蛋白质组和 miRNA 谱系研究,旨在为外泌体的临床应用提供新的见解,以指导临床根据需要选择更具有针对性的干细胞,实现精准治疗。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验细胞株

经南京医科大学第一附属医院地方机构审查委员会批准(批准日期:2008-07-16),女株 AMSC13 及男株 AMSC15 构建自正常足月分娩妇女自愿捐献新鲜胎盘组织<sup>[18]</sup>。经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准(批准号:2012-SR-128),女株 CCRM28 及男株 CCRM22 构建自辅助生殖技术中不孕症受试者自愿提供的囊胚,通过矫正多倍体受精卵获得二倍体囊胚成功建系<sup>[19-20]</sup>。以上均获得患者签署的书面知情同意书。

#### 1.1.2 试剂与耗材

mTeSR1 Basal Medium、mTeSR1 Supplement (Stem Cell 公司,加拿大); ncEpic Supplement (125x)、ncEpic Basal Medium(安徽首宁生物科技有限公司); Matrigel (Corning 公司,美国); UltraGRO (AventaCell 公司,美国); L-谷氨酰胺溶液(北京索莱宝科技有限公司);  $\alpha$ -MEM(北京兰杰柯科技有限公司); 肝素钠(常州千红生化制药有限公司); MSC NutriStem XF supplement(以色列生物技术公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); NANOG 抗体、TRA-1-60 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国); OCT4 抗体、SSEA4 抗体、CD9 抗体、CD63 抗体、TSG101 抗体、Calnexin 抗体(Abcam 公司,美国); CD73 抗体、CD90 抗体、CD105 抗体、CD44 抗体、CD11b 抗体、CD19 抗体、CD34 抗体、CD45 抗体、HLA-DR 抗体(BD 公司,美国)。

### 1.1.3 仪器与设备

超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);流式细胞仪、超速离心机(Beckman公司,美国);透射电子显微镜(FEI公司,美国);超低温冰箱(三洋公司,日本);二氧化碳培养箱、高速冷冻离心机(Thermo Fisher公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 hESC和hAMSC的体外培养

hESC由原先的mTeSR培养体系更换为成分明确且无血清和无饲养层的ncEpic培养系统,并在涂有基质胶(Matrigel)的培养皿中生长,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。每天更换培养基,当细胞汇合约85%时,收集培养上清液,使用解离缓冲液消化细胞,并在基质胶包被板上的ncEpic培养基中作为团块传代。

hAMSC使用含有93.87%α-MEM、5%UltraGRO、1%L-谷氨酰胺溶液和0.03%肝素钠的完全培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,细胞汇合度为70%~80%时,更换为含有98.3%α-MEM、1.1%L-谷氨酰胺溶液和0.59%MSC NutriStem XF supplement的无外泌体培养基,继续培养24h后,收集培养上清液。

### 1.2.2 hESC和hAMSC的鉴定

hESC的鉴定主要通过形态学鉴定:显微镜下观察细胞形态变化;免疫学鉴定:免疫荧光染色检测hESC表面标志物的表达;流式细胞术:评估hESC的多能性标志物NANOG、OCT4、SSEA4、TRA-1-60的表达,采用FlowJo软件进行实验数据分析。

hAMSC的鉴定主要通过形态学鉴定:显微镜下观察细胞形态变化;功能鉴定:在成骨、成脂和成软骨分化培养基中培养诱导hAMSC分化,通过茜素红、油红O和阿利辛蓝染色证实;流式细胞术:进行hAMSC表型分析,并测定表达间充质标志物CD73、CD90、CD105、CD44、CD11b、CD19、CD34、CD45和HLA-DR的细胞的百分比。

### 1.2.3 外泌体的分离和鉴定

当细胞约85%融合时收集300mL细胞上清液用于外泌体纯化。所有离心步骤都在4℃下进行。将上清液进行梯度离心(300g离心10min,2000g离心20min,12000g离心30min)以分离细胞碎片。使用0.22μm过滤器进行过滤。使用Ti70转子将滤液以120000g离心3h,然后将它们重悬于PBS中,再次以120000g进行超速离心3h。将最终的外泌体颗粒重悬在PBS中,并在-80℃下储存直至

使用。

使用透射电子显微镜(transmission electron microscopy,TEM)观察外泌体的形态特征。通过纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis,NTA)测量外泌体的粒径和浓度。通过蛋白质印迹分析外泌体上表面标志物CD9、CD63、TSG101和Calnexin的表达。

### 1.2.4 RNA提取及测序

外泌体RNA纯化试剂盒从hESC和hAMSC男性及女性细胞株系的外泌体中提取和纯化总RNA。使用Agilent Bioanalyzer 2100系统和RNA Nano 6000检测试剂盒对RNA浓度和纯度进行评估。遵循制造商的建议,使用SMARTer全链RNA序列试剂盒V2高效制备文库,并使用QIAseq miRNA文库试剂盒生成文库。最后,通过Agilent Bioanalyzer 2100和qPCR评估文库质量。使用TruSeq PE Cluster Kitv3-cBot-HS在acBot集群生成系统上对索引编码样品进行聚类,然后,在Illumina NovaSeq 6000平台上对文库制备物进行测序,并生成配对末端读数<sup>[21-22]</sup>。

### 1.2.5 RNA差异表达分析

miRNA的测序读数使用指定的基因组GRCH38作为参考进行序列比对及后续分析<sup>[23]</sup>。miRNA注释文件来自miRBase,利用miRDeep2软件进行已知及新的miRNA鉴定,Bowtie用于miRNA文库测序数据的比对。本研究中,采用edgeR软件进行差异筛选,将差异倍数(fold change,FC)≥1.5且P<0.05作为筛选标准。

### 1.2.6 液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry,LC-MS/MS)分析

从外泌体提取总蛋白,并使用Bradford方法对样品进行蛋白浓度测定。提取好的外泌体采用质谱检测适配的外泌体裂解液裂解,胰蛋白酶消化蛋白质过夜,之后使用脱盐柱进行脱盐。将肽段样本用0.1%甲酸复溶,使用纳升流速Easy-nLC 1200色谱系统进行色谱分离。肽段分离后用QE HF-X质谱仪进行DIA质谱分析。

质谱检测得到的数据采用Spectronaut18软件进行搜索检索。通过蛋白质负载对数据进行归一化并校正差异P值错误发现率(false discovery rate,FDR)后,差异表达蛋白(differentially expressed protein,DEP)被认为是有效的。本研究中,显著差异蛋白筛选阈值为FC≥1.5或FC≤1/1.5,且P<0.05。

### 1.2.7 生物信息学分析

采用R包clusterProfiler对原始数据进行生物信

息学分析。基因本体论(gene ontology, GO)分析用来评估差异表达基因在特定生物过程中的潜在富集。京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)是系统分析基因功能、基因组信息数据库,有助于将基因及表达信息作为一个整体网络进行研究。富集分析采用超几何分布的算法进行显著性检验计算 $P$ 值,并通过基于多重假设检验的FDR进行 $P$ 值校正,计算 $Q$ 值,以确定统计显著性。

### 1.3 统计学方法

本研究中的相关实验均进行了3次独立生物学重复。GraphPad Prism 9软件用于分析实验数据和绘制统计图,计量资料以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )的形式表示。数据比较采用双尾 $t$ 检验分析, $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hESC和hAMSC的鉴定

无饲养层系统培养的hESC从mTeSR培养体系转换至ncEpic培养体系,通过流式细胞术对hESC的多能性进行跟踪鉴定。经过几次传代培养,hESC状态稳定,如图1A所示,hESC克隆团内部细胞排列紧密,分布均匀,边缘完整。免疫荧光表明hESC在细胞膜表达TRA-1-60和SSEA4,细胞核中表达NANOG和OCT4(图1B)。进一步的流式细胞术显示这些多能性相关标志物(NANOG、OCT4、SSEA4、TRA-1-60)的阳性率均高于95%(图1D)。男性细胞株和女性细胞株表征一致,符合多能性干细胞的标准,可用于后续实验。

hAMSC生长呈梭形,并显示成纤维细胞样形态(图1A)。体外能够诱导分化为脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞(图1C)。通过流式细胞术鉴定hAMSC特异性表面标志物(图1E),结果显示细胞高表达CD73、CD90、CD105和CD44,而不表达或极低表达CD19、CD34、CD45、CD11b和主要组织相容性蛋白HLA-DR。男性细胞株和女性细胞株表征一致,这些结果证实了制备的hAMSC可以用于下游实验。

### 2.2 hESC-exo和hAMSC-exo的分离与鉴定

为探讨不同性别干细胞外泌体是否存在功能差异,分别从hESC和hAMSC的男性细胞株和女性细胞株的条件培养基中分离出外泌体,并根据形态、粒径、浓度和表面标记进行鉴定。透射电镜显示这些外泌体呈“茶托状”形态,不同于细胞来源的外泌体之间没有形状差异(图2A)。NTA显示它们

的尺寸分布在50~200 nm, hESC-exo女株平均粒径( $130.63 \pm 36.32$ )nm,男株平均粒径( $192.0 \pm 8.57$ )nm, hESC-exo平均男株粒径比女株粒径大; hAMSC-exo女株粒径( $147.07 \pm 3.29$ )nm,男株粒径( $148.50 \pm 2.33$ )nm(图2B)。蛋白印迹表明,分离的外泌体携带阳性标记CD9、CD63和TSG101,但不携带阴性标记Calnexin(图2C)。尽管hESC女株的外泌体产量高于男株,但总体而言,hAMSC的外泌体产量比hESC的外泌体产量高(图2D)。

### 2.3 hESC-exo和hAMSC-exo蛋白质和miRNA的质检

从男性和女性hESC-exo和hAMSC-exo提取蛋白质和RNA进行蛋白质组学和miRNA测序。皮尔逊图证明了相同细胞来源的外泌体之间的高度相关性(图3A)。PCA用于定量评估蛋白质和miRNA的可重复性(图3B、C)。蛋白质定量分析显示,hAMSC-exo的蛋白质浓度高于hESC-exo(图3D)。RNA浓度的测定显示,hAMSC-exo与hESC-exo之间差异无统计学意义(图3E)。

### 2.4 男女株hESC-exo和hAMSC-exo蛋白质组特征

#### 2.4.1 hESC-exo男株与女株的比较

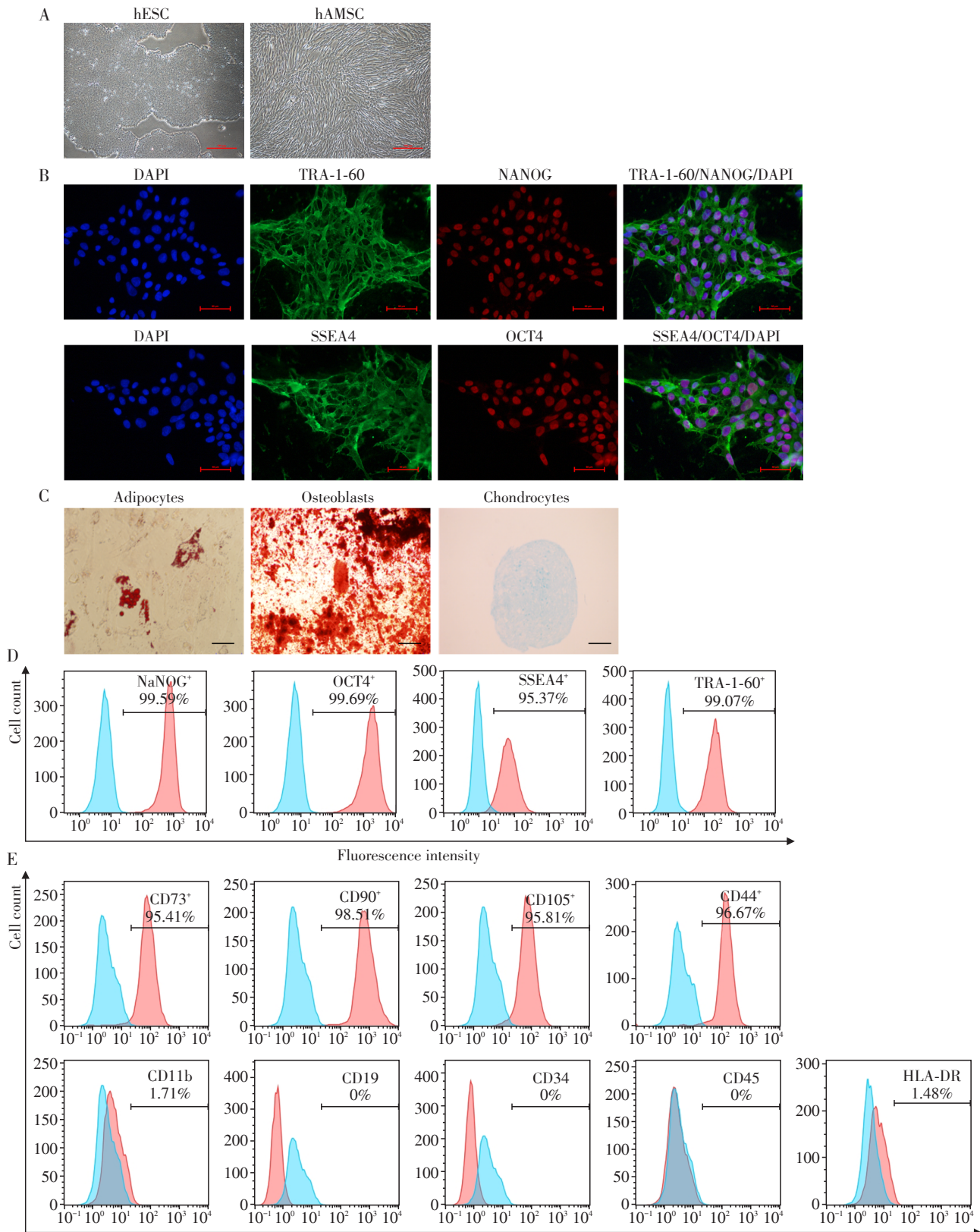
男女株hESC-exo蛋白质组分析发现330个差异表达蛋白质(图4A)。热图分析显示男株hESC-exo(簇1)中上调蛋白主要富集于新冠、系统性红斑狼疮、酒精依赖症;女株hESC-exo(簇2)中上调蛋白主要参与补体和凝血级联反应、金黄色葡萄球菌感染、蛋白质消化与吸收、胆固醇代谢、类风湿性关节炎(图4B)。

构建维恩图识别男株和女株之间独特和重叠的蛋白质编码基因簇。女株hESC-exo和男株hESC-exo分别有44个和950个特异表达蛋白,同时存在2678个共享蛋白(图4C)。

对男女株hESC-exo特异表达蛋白进行KEGG富集分析。结果表明,女株hESC-exo特异表达蛋白显著富集于疟疾、非洲锥虫病、PI3K-Akt信号通路、黏着斑形成等通路(图4D)。男株hESC-exo特异表达蛋白显著富集于剪接体、mRNA监测途径、核质转运、DNA复制等通路(图4E)。男女株hESC-exo共享蛋白显著富集于蛋白酶体、核质运输、内质网蛋白质加工、肌肉细胞骨架、黏着斑、内吞作用、溶酶体、核糖体等通路(图4F)。上述通路主要与细胞周期及代谢调控相关。

#### 2.4.2 hAMSC-exo男株与女株的比较

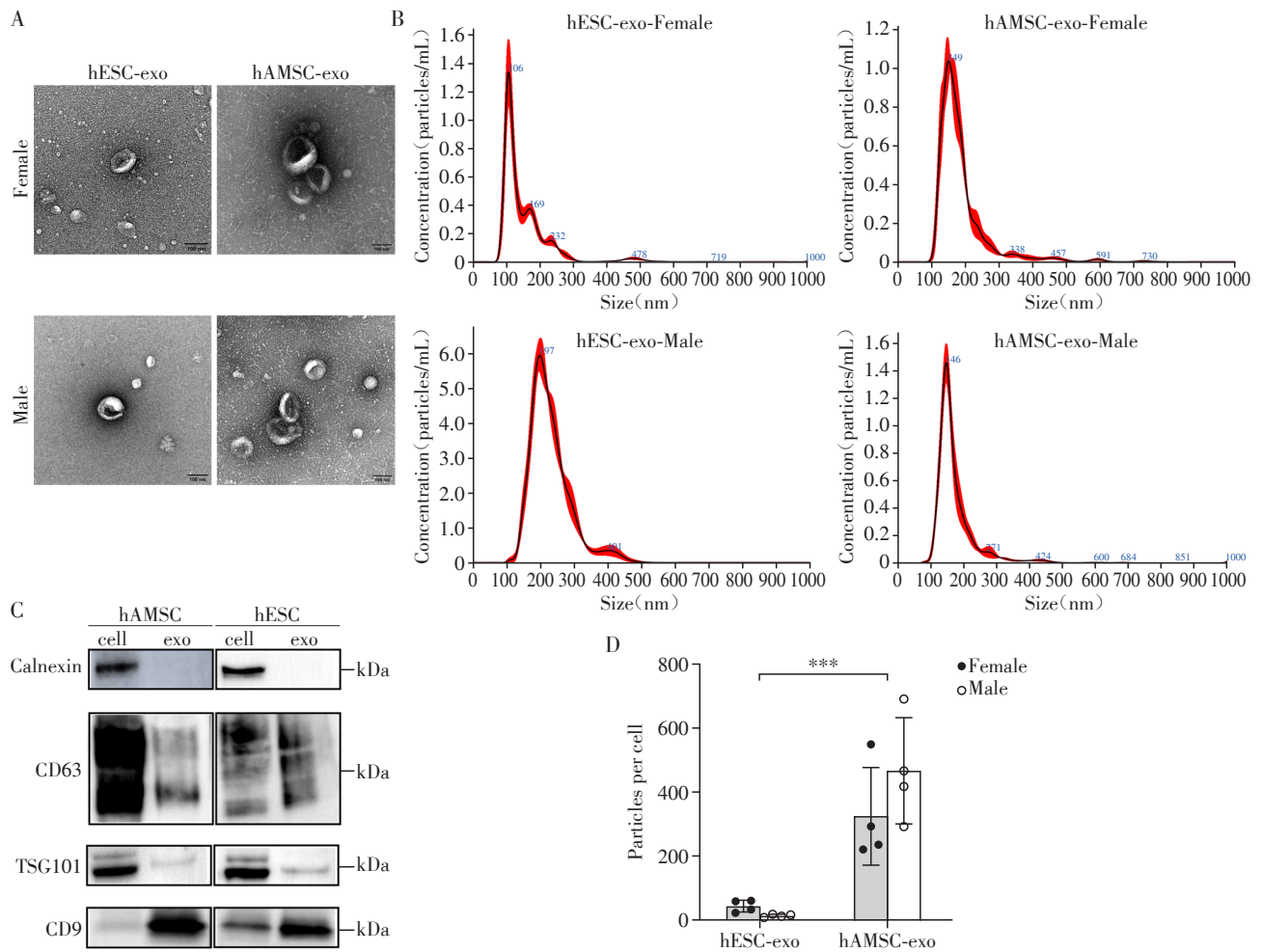
男女株hAMSC-exo蛋白质组测序发现81个差异表达蛋白质(图5A)。相比hESC-exo, hAMSC-exo



**A:** Microscopic images represent the morphology of hESCs and hAMSCs. Scale bar: 500  $\mu$ m. **B:** Immunofluorescence staining confirming the expression of hESC-specific markers. Scale bar: 50  $\mu$ m. **C:** Cultured hAMSCs could differentiate into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes. Scale bar: 100  $\mu$ m. **D:** Flow cytometry analysis of pluripotency markers in hESCs. **E:** Flow cytometry analysis of cell-surface markers in the hAMSCs. Cells exhibited high expression (>95%) of CD73, CD90, CD105, and CD44, but were negative or expressed very low levels (<2%) of CD11b, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR ( $n=3$ ).

图1 hESC和hAMSC的鉴定

Figure 1 Identification of hESC and hAMSC



A: Representative TEM images of exosomes derived from hESCs and hAMSCs. Scale bar: 100 nm. B: Size distribution of exosomes measured by NTA. C: Western blot analysis of Calnexin, CD63, CD9, and TSG101 expression levels in cells and exosomes. D: Evaluation of mean exosomes yield per cell. All data are presented as mean±standard deviation (SD) and analyzed by *t*-test. \*\*\**P* < 0.001.

图2 hESC-exo和hAMSC-exo的分离和鉴定

Figure 2 Isolation and Characterization of hESC-exo and hAMSC-exo

男株与女株间差异性较小。热图分析显示, 女性hAMSC-exo(簇1)中上调蛋白主要富集于人乳头瘤病毒感染、细胞凋亡相关通路; 男株hAMSC-exo(簇2)中蛋白主要富集于蛋白酶体、抗叶酸耐药性、叶酸转运与代谢相关通路(图5B)。

维恩图分析提示女株hAMSC-exo和男株hAMSC-exo分别具有156个及152个特异表达蛋白, 同时存在1263个共享蛋白(图5C)。

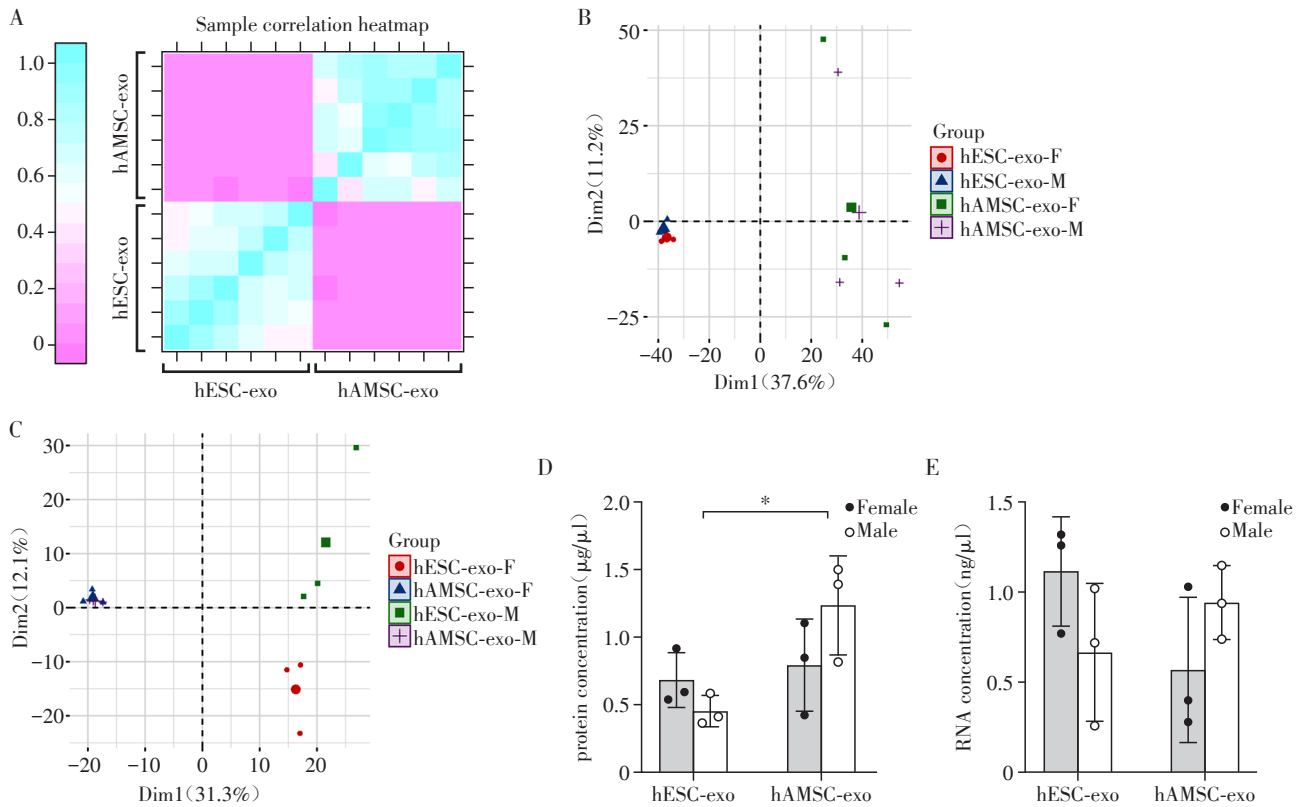
KEGG富集分析表明, 女株hAMSC-exo特异表达蛋白显著富集于免疫调节相关的信号通路, 如核糖体、冠状病毒疾病、蛋白酶体、脊髓小脑性共济失调、致病性大肠杆菌感染、朊病毒病等(图5D)。男株hAMSC-exo特异表达蛋白显著富集于代谢调控及免疫相关信号通路, 如甲状腺激素信号通路、Apelin信号通路、动物线粒体自噬、癌症中的中枢碳

代谢、血清素能突触传递等(图5E)。男女株hAMSC-exo共享蛋白显著富集于补体和凝血级联反应、黏着斑形成、肌肉细胞中的细胞骨架、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)与受体间相互作用、上皮细胞的细菌入侵、肌动蛋白细胞骨架调节、内吞作用、内质网蛋白加工、沙门氏菌感染、溶酶体等通路(图5F)。上述信号通路均与重塑代谢和免疫微环境相关。

## 2.5 男女株hESC-exo和hAMSC-exo miRNA谱特征

### 2.5.1 hESC-exo男株与女株的比较

对男女株hESC-exo进行miRNA差异表达分析, 检测到80个差异表达miRNA(图6A)。热图分析显示, 女株hESC-exo(簇1)中上调的miRNA主要参与胆碱能突触、黏着斑形成、催产素信号通路、MAPK信号通路、轴突引导等通路。男株hESC-exo(簇2)



A: Pearson correlation analysis between exosome samples. B: PCA map of proteins in four exosome groups. C: PCA map of miRNAs in four exosome groups. D: The quantification of protein concentration in four exosome groups ( $n=3$ ). E: The quantification of RNA concentration in four exosome groups ( $n=3$ ). \* $P < 0.05$ .

图3 蛋白质和miRNA的质量检验  
Figure 3 Quality inspection of protein and miRNA

中上调的miRNA主要参与II型糖尿病、黏着斑、谷氨酸能突触、TRP炎症介质调节、血小板活化等通路(图6B)。

维恩图分析提示女株hESC-exo和男株hESC-exo分别具有35个及179个特异表达miRNA,同时存在377个共享的miRNA(图6C)。

KEGG分析表明,女株hESC-exo中35个特异表达miRNA富集于cAMP、MAPK、Rap1、Ras、Notch、PI3K-Akt、轴突引导、胆碱能突触传递等通路(图6D)。男株hESC-exo中179个特异表达miRNA富集于cAMP、MAPK、Rap1、Ras、Wnt、ErbB、FoxO信号通路(图6E)。这些通路在发育和代谢调节过程中发挥着积极作用。

男女株hESC-exo共享的377个miRNA富集于黏着斑形成、癌症相关通路、ECM与受体间的相互作用、调节干细胞多能性的信号通路、AMPK信号通路、Rap1信号通路、胆碱能突触传递等(图6F)。这些通路主要与细胞的黏附能力、迁移特性、增殖活性以及代谢调控密切相关。

### 2.5.2 hAMSC-exo男株与女株的比较

对男女株hAMSC-exo进行miRNA差异表达分析,检测到26个差异表达miRNA(如图7A所示)。相比hESC-exo,男女株hAMSC-exo之间差异性较小,与蛋白质组分析结果一致。热图分析显示,男株hAMSC-exo(簇1)中上调的miRNA主要参与甘油磷脂代谢、糖胺聚糖生物合成、花生四烯酸代谢。相比之下,女株hAMSC-exo(簇2)中上调miRNA主要参与ECM与受体间的相互作用、黏着斑、谷氨酸能突触、癌症通路、TRP通路的炎症介质调节(图7B)。

维恩图分析提示女株hAMSC-exo和男株hAMSC-exo分别具有71个及50个特异表达miRNA,同时存在337个共享miRNA(图7C)。

KEGG分析提示女株hAMSC-exo特异表达miRNA主要参与调节MAPK信号通路、胰岛素分泌过程、cGMP-PKG信号通路、Wnt信号通路、PI3K-Akt信号通路以及cAMP信号通路(图7D)。而男株hAMSC-exo特异表达miRNA则参与了cAMP信号通路、内吞作用、胰岛素分泌过程、胆碱能突触传递、甘油磷脂

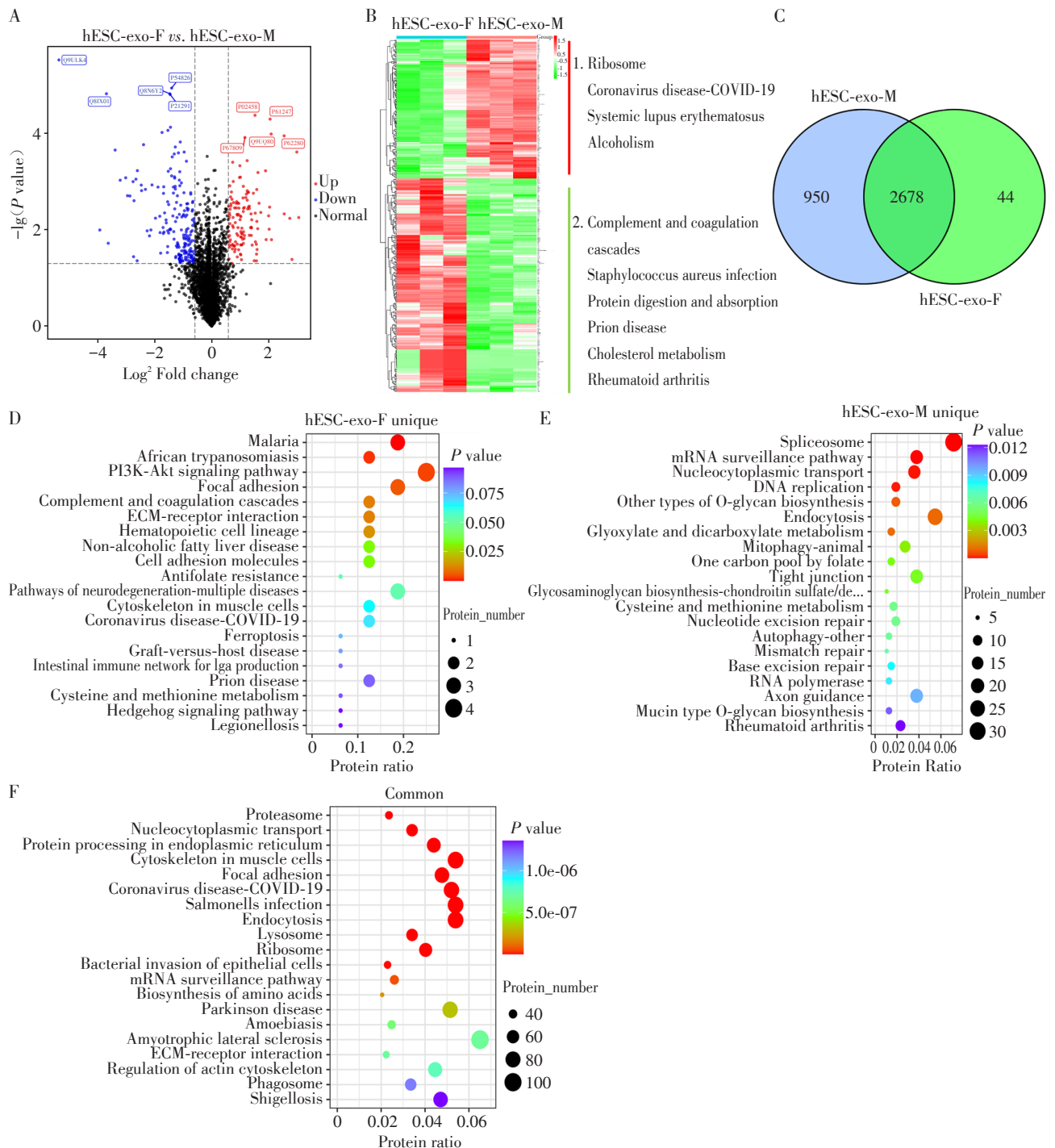


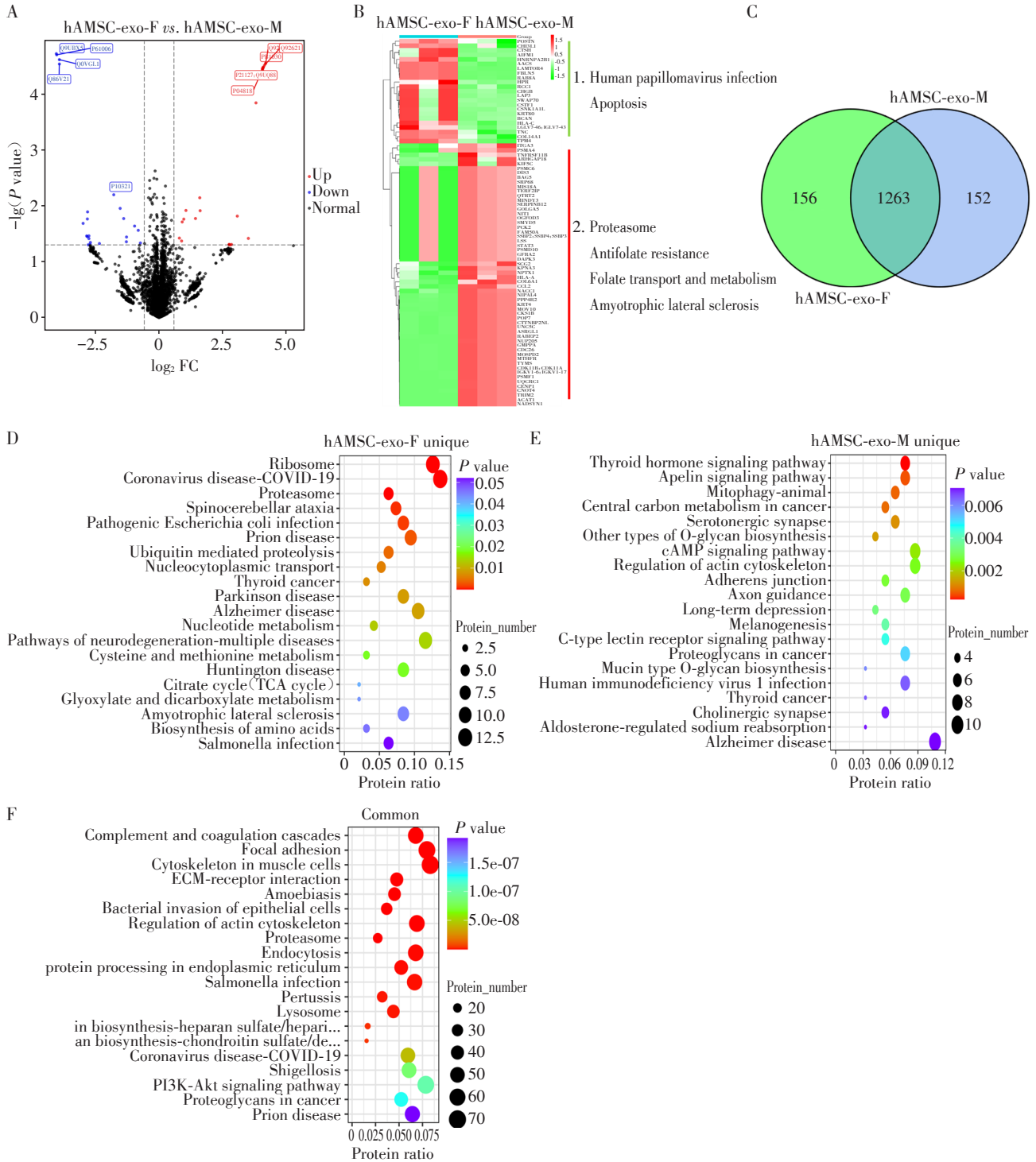
图4 男女株 hESC-exo 蛋白质组比较分析  
**Figure 4** Pairwise bioinformatics analysis of the proteomes in male and female hESC-exo

A: Volcano diagrams of differentially expressed proteins in hESC-exo-F vs. hESC-exo-M. B: Heatmap of the levels of differentially expressed proteins in hESC-exo-F and hESC-exo-M. The significantly enriched pathways are shown on the right. C: Venn diagram of pairwise analysis of hESC-exo-F vs. hESC-exo-M. D, E: KEGG analysis of unique proteins of hESC-exo-F (D) and hESC-exo-M (E) when performed their pairwise analysis. F: KEGG analysis of common proteins in hESC-exo-F and hESC-exo-M.

代谢、HIF-1 信号通路、MAPK 信号通路以及 Wnt 信号通路的调节(图 7E)。以上通路在代谢平衡和免疫调节过程中发挥着积极作用。

男女株 hAMSC-exo 共享 miRNA 富集于癌症相关

通路、黏着斑形成、内吞作用、血小板活化、ECM 与受体间的相互作用、Rap1 信号通路、甲状腺激素信号传导以及黑素生成等通路(图 7F), 与细胞的黏附能力、迁移特性、增殖活性以及代谢和免疫功能密切相关。



A: Volcano diagrams of differentially expressed proteins in hAMSC-exo-F vs. hAMSC-exo-M. B: Heatmap of the levels of differentially expressed proteins in hAMSC-exo-F and hAMSC-exo-M. The significantly enriched pathways are shown on the right. C: Venn diagram of pairwise analysis of hAMSC-exo-F vs. hAMSC-exo-M. D, E: KEGG analysis of unique proteins of hAMSC-exo-F (D) and hAMSC-exo-M (E) when performing their pairwise analysis. F: KEGG analysis of common proteins in hAMSC-exo-F and hAMSC-exo-M.

图5 男女株hAMSC-exo蛋白质组比较分析

Figure 5 Pairwise bioinformatics analysis of the proteomes in male and female hAMSC-exo

### 3 讨论

外泌体是细胞主动分泌的一种天然纳米级微

小囊泡,既往研究数据揭示不同亚组细胞外囊泡其成分不一样,外泌体显著富集细胞外基质成分、黏附连接复合体及囊泡介导的转运相关蛋白质<sup>[24-26]</sup>。

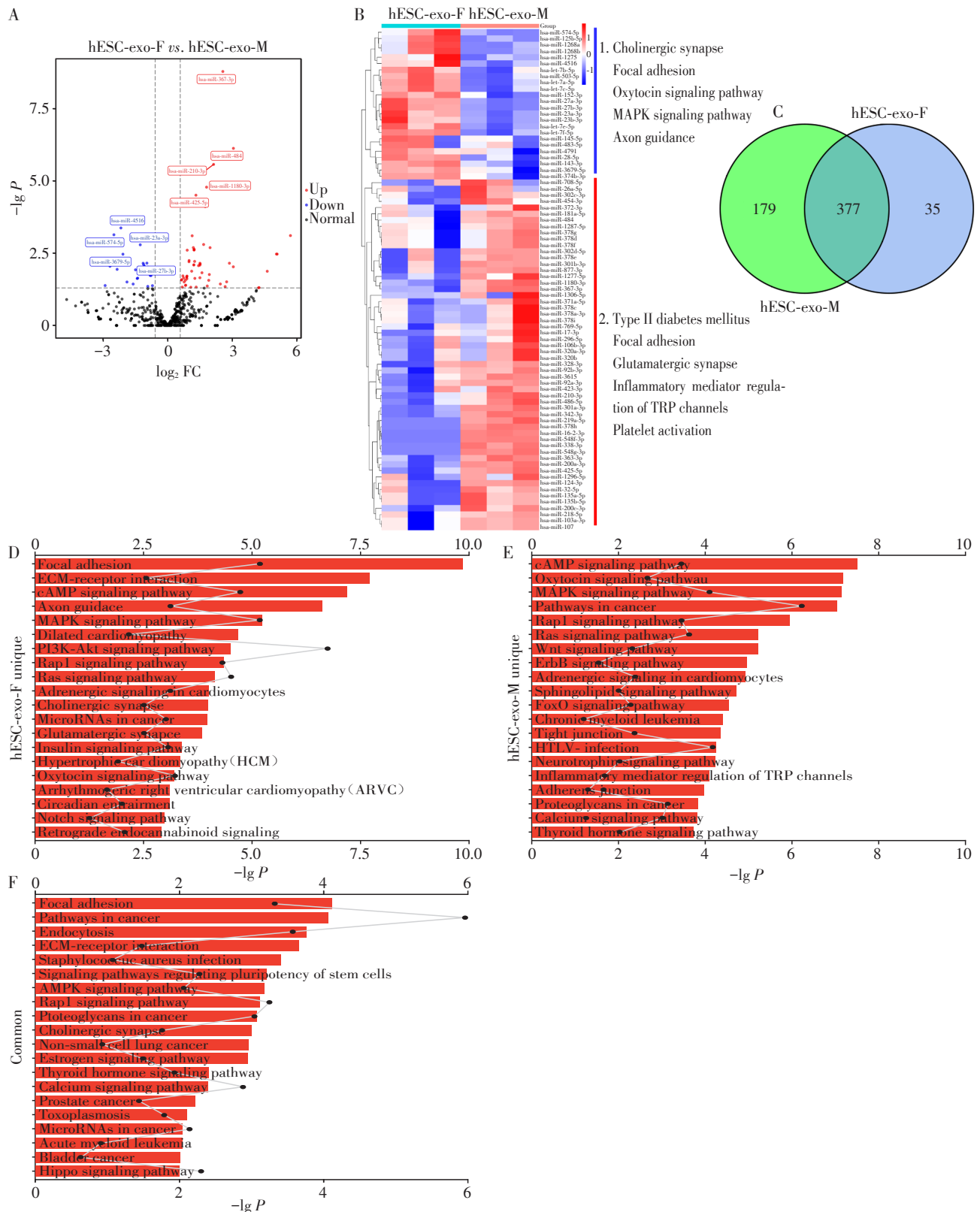
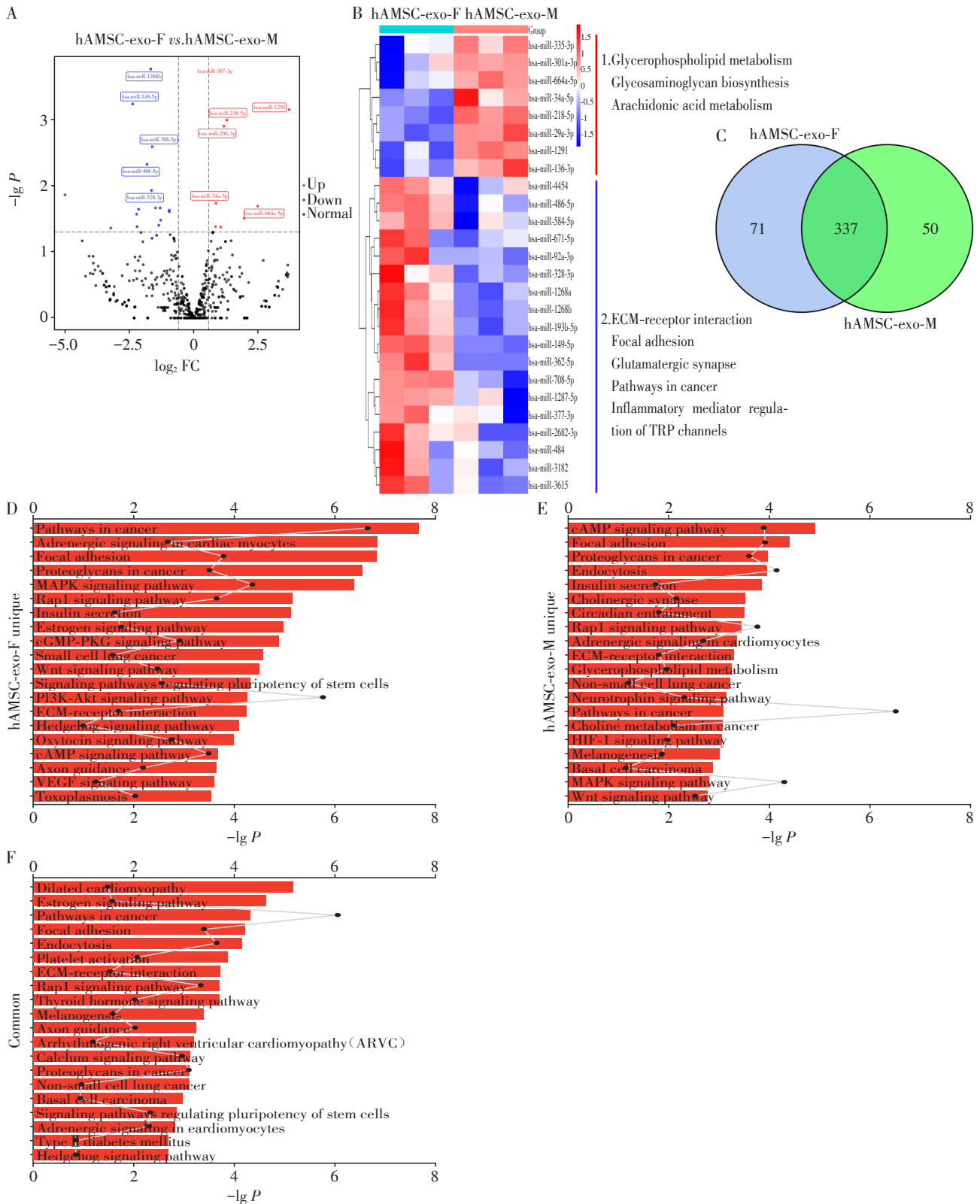


Figure 6 Pairwise bioinformatics analysis of miRNA profiles in male and female hESC-exo

图6 男女株hESC-exo miRNA表达谱比较分析

Figure 6 Pairwise bioinformatics analysis of miRNA profiles in male and female hESC-exo



A: Volcano diagrams of differentially expressed miRNAs in hAMSC-exo-F vs. hAMSC-exo-M. B: Heatmap of the levels of differentially expressed miRNAs in hAMSC-exo-F and hAMSC-exo-M. The significantly enriched pathways are shown on the right. C: Venn diagram of pairwise analysis of hAMSC-exo-F vs. hAMSC-exo-M. D, E: KEGG analysis of unique miRNAs of hAMSC-exo-F (D) and hAMSC-exo-M (E) when performed their pairwise analysis. F: KEGG analysis of common miRNAs in hAMSC-exo-F and hAMSC-exo-M. The red bar represents the  $-\lg P$  and the black dot represents gene ratio (defined as the proportion of genes annotated in this specific pathway term relative to the total number of genes in the pathway database).

图7 男女株 hAMSC-exo miRNA 表达谱比较分析

Figure 7 Pairwise bioinformatics analysis of miRNA profiles in male and female hAMSC-exo

与干细胞相比,外泌体作为囊泡载体,展现出更高的生物相容性与储存稳定性,其低免疫原性特征显著降低治疗相关不良反应发生率<sup>[27]</sup>。外泌体携带蛋白质、mRNA 和 miRNA 等生物活性分子,当外泌体被靶细胞高效摄取,这些分子被转移到受体细胞并影响其生理功能,从而完成信号分子递送,实现跨细胞通讯网络重构<sup>[28-29]</sup>。

既往研究揭示,外泌体来源细胞的自身状态和功能会影响外泌体的生成和分泌。细胞应激反应与外泌体分泌存在显著正相关性<sup>[30-34]</sup>。细胞辐照可诱导衰老并同步促进外泌体分泌量提升<sup>[30-31]</sup>。化疗药物顺铂治疗后<sup>[32]</sup>以及低氧微环境<sup>[33]</sup>会增加外泌体的释放。衣霉素诱导的内质网应激增加了细胞多囊泡体的数量并增强了外泌体分泌<sup>[34]</sup>。此外,干细胞的干性和多能性也可以影响外泌体成分。

本研究通过 PCA 以及差异表达的 miRNA 和蛋白质分析,发现 hESC-exo 和 hAMSC-exo 男女株均存在一定的差异,且以 hESC-exo 男株与女株之间差异为甚。在蛋白质组层面,女株 hESC-exo 富集于疟疾锥虫感染、PI3K-Akt 等通路;男株 hESC-exo 富集于 DNA 复制、剪接等信号通路;女株 hAMSC-exo 富集于细菌、病毒感染相关信号通路;男株 hAMSC-exo 富集于自噬、癌症代谢等通路。在 miRNA 表达谱层面,女株 hESC-exo 富集于 Notch、PI3K-Akt、轴突引导、胆碱能突触传递等通路;男株 hESC-exo 富集于 Wnt、ErbB、FoxO 等信号通路;女株 hAMSC-exo 富集于 PI3K-Akt 信号通路;男株 hAMSC-exo 富集于甘油磷脂代谢、HIF-1 信号通路。

本研究同时发现无论在蛋白质还是 miRNA 层面, hESC-exo 功能主要在细胞周期及代谢调控等相关通路中富集, hAMSC-exo 功能主要在免疫调节相关通路中富集。

hESC-exo 独特的 miRNA 谱与 cAMP 信号通路、Notch 信号通路、Hedgehog 信号通路、Ras 信号通路、FoxO 信号通路、ErbB 信号通路的调节有关,这些 miRNA 簇可能调节发育和代谢。cAMP 信号通路激活促进颗粒细胞的增殖分化,是卵母细胞第一次减数分裂及卵泡发生的重要调控因子<sup>[35-36]</sup>。Notch 通路与卵母细胞储备维持与成熟、颗粒细胞-卵母细胞互作、肥胖相关代谢调节、子宫内膜蜕膜化等生殖功能相关<sup>[37-38]</sup>。FoxO 通路与卵母细胞减数分裂、精子发生、胰岛素信号通路调控有关<sup>[39-40]</sup>。Hedgehog、Ras 通路 与 卵 巢 细 胞 发 育、卵 母 细 胞 成 熟 有 关<sup>[41]</sup>。ErbB/ERK1/2 通路影响卵丘细胞和卵母细胞成熟。

hAMSC-exo 独特的 miRNA 调节卵巢类固醇生成、cGMP-PKG 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、磷脂酰肌醇信号系统、黑素生成、cAMP 信号通路,这可能有助于重塑代谢和免疫微环境。卵巢类固醇生成通过动态整合激素合成、代谢调控、信号转导及环境响应,主导卵泡发育、生殖周期和妊娠维持等关键过程<sup>[42]</sup>。其异常与多囊卵巢综合征、不孕症等疾病密切相关,而靶向调控信号通路(如 cAMP-PKA)为生殖医学提供了潜在治疗策略<sup>[43-44]</sup>。cGMP-PKG 通路调控 T 细胞、巨噬细胞 M2 极化<sup>[45]</sup>; PI3K-Akt 与活性氧、始基卵泡激活和卵母细胞成熟有关<sup>[46]</sup>。磷脂酰肌醇信号系统与 IL-1、TNF、NF- $\kappa$ B 等炎症因子与自身免疫性疾病有关;黑素生成涉及 CD8<sup>+</sup> T 细胞、IFN- $\gamma$  等炎症因子及 Th17/Treg 平衡参与的免疫耐受。

综上所述,本研究提示在蛋白质和 miRNA 层面, hESC-exo 的功能主要富集于发育、代谢相关通路,而 hAMSC-exo 功能主要富集于免疫、代谢相关通路。同时发现 hESC-exo 和 hAMSC-exo 男女株均存在一定的差异,且以 hESC-exo 男株与女株之间差异为甚。后续将结合验证和功能实验对不同细胞来源的外泌体,特别是男女株的不同特性开展进一步研究,为基于临床问题进行不同来源干细胞外泌体的选择提供参考依据。

#### 利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

#### Conflict of Interests:

All authors declared no conflict of interests.

#### 作者贡献声明:

黄蓓蓓负责干细胞实验操作、数据分析和撰写论文初稿,宁松和吴慧敏参与部分实验操作,覃莲菊负责实验指导,刁飞扬负责研究设计、论文审阅修改及研究经费支出。

#### Author's Contributions:

HUANG Beibei was responsible for experimental operations, data analysis, and drafting the initial manuscript; NING Song and WU Huimin participated in some experimental operations; QIN Lianju was responsible for experimental guidance; DIAO Feiyang was responsible for research design, reviewing and revising the manuscript, and securing funding.

#### [参考文献]

- [1] HESLOP J A, HAMMOND T G, SANTERAMO I, et al. Concise review: workshop review: understanding and assessing the risks of stem cell-based therapies[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(4): 389-400
- [2] SALOMON C, DAS S, ERDBRÜGGER U, et al. Extracellular vesicles and their emerging roles as cellular messen-

- gers in endocrinology: an endocrine society scientific statement[J]. *Endocr Rev*, 2022, 43(3): 441-468
- [3] VAN NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213-228
- [4] YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER P R, ANDREU Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27066
- [5] COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 255-289
- [6] DAI J, SU Y Z, ZHONG S Y, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 145
- [7] TANG Y Y, ZHOU Y, LI H J. Advances in mesenchymal stem cell exosomes: a review [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 71
- [8] REN K. Exosomes in perspective: a potential surrogate for stem cell therapy[J]. *Odontology*, 2019, 107(3): 271-284
- [9] ZHANG S W, CHANG Q Y, LI P P, et al. Concentrated small extracellular vesicles from menstrual blood-derived stromal cells improve intrauterine adhesion, a pre-clinical study in a rat model[J]. *Nanoscale*, 2021, 13(15): 7334-7347
- [10] CHEN B, SUN Y J, ZHANG J T, et al. Human embryonic stem cell-derived exosomes promote pressure ulcer healing in aged mice by rejuvenating senescent endothelial cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 142
- [11] GAO S Y, CHEN T, HAO Y, et al. Exosomal miR-135a derived from human amnion mesenchymal stem cells promotes cutaneous wound healing in rats and fibroblast migration by directly inhibiting LATS2 expression [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 56
- [12] XIAO S E, XIAO C F, MIAO Y, et al. Human acellular amniotic membrane incorporating exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells promotes diabetic wound healing[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 255
- [13] ZHANG Z L, SHANG J, YANG Q Y, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells ameliorate hepatic fibrosis by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway and remodeling choline metabolism[J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 29
- [14] PENG Z Q, GUAN X H, YU Z P, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells-derived conditioned medium and exosomes alleviate oxidative stress-induced retinal degeneration by activating PI3K/Akt/FoxO3 pathway [J]. *Exp Eye Res*, 2024, 244: 109919
- [15] WANG Z G, HE Z Y, LIANG S, et al. Comprehensive proteomic analysis of exosomes derived from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 511
- [16] BI Y K, QIAO X L, LIU Q, et al. Systemic proteomics and miRNA profile analysis of exosomes derived from human pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 449
- [17] 张琴静, 陈爱琴, 宁松, 等. 建立不同类型干细胞并比较其分泌细胞因子的水平[J]. *生殖医学杂志*, 2016, 25(6): 528-539
- ZHANG Q J, CHEN A Q, NING S, et al. Establish different types of stem cells and compare their cytokine secretion levels[J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2016, 25(6): 528-539
- [18] QIN L J, ZHANG J, XIAO Y J, et al. A novel long-term intravenous combined with local treatment with human amnion-derived mesenchymal stem cells for a multidisciplinary rescued uremic calciphylaxis patient and the underlying mechanism[J]. *J Mol Cell Biol*, 2022, 14(2): mjac010
- [19] JIANG C Y, CAI L B, HUANG B X, et al. Normal human embryonic stem cell lines were derived from microsurgical enucleated tripronuclear zygotes[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(9): 2016-2023
- [20] HUANG B X, JIANG C Y, CHEN A Q, et al. Establishment of human-embryonic-stem-cell line from mosaic trisomy 9 embryo[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2015, 54(5): 505-511
- [21] LIU Y, TANG H J, LI C, et al. Long non-coding RNA and circular RNA and coding RNA profiling of plasma exosomes of osteosarcoma by RNA seq [J]. *Sci Data*, 2023, 10(1): 395
- [22] MA L, LIU Y H, LIU C, et al. lncRNA, miRNA, and mRNA of plasma and tumor-derived exosomes of cardiac myxoma-related ischaemic stroke[J]. *Sci Data*, 2025, 12(1): 91
- [23] YANG F, ZHOU L Y, SHEN Y, et al. Multi-omics approaches for drug-response characterization in primary biliary cholangitis and autoimmune hepatitis variant syndrome[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 214
- [24] HARASZTI R A, DIDIOT M C, SAPP E, et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources [J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 32570
- [25] DOZIO V, SANCHEZ J C. Characterisation of extracellular vesicle - subsets derived from brain endothelial cells and analysis of their protein cargo modulation after TNF exposure[J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1302705

- [26] KIMIZ-GEBOLOGLU I, ONCEL S S. Exosomes: Large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake[J]. *J Control Release*, 2022, 347: 533-543
- [27] LUKOMSKA B, STANASZEK L, ZUBA-SURMA E, et al. Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 9628536
- [28] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 9-17
- [29] SIMPSON R J, LIM J W, MORITZ R L, et al. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2009, 6(3): 267-283
- [30] LEHMANN B D, PAINE M S, BROOKS A M, et al. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7864-7871
- [31] BEER L, ZIMMERMANN M, MITTERBAUER A, et al. Analysis of the secretome of apoptotic peripheral blood mononuclear cells: impact of released proteins and exosomes for tissue regeneration[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16662
- [32] XIAO X, YU S R, LI S C, et al. Exosomes: decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89534
- [33] KING H W, MICHAEL M Z, GLEADLE J M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 421
- [34] KANEMOTO S, NITANI R, MURAKAMI T, et al. Multi-vesicular body formation enhancement and exosome release during endoplasmic reticulum stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(2): 166-172
- [35] 郑文影, 王超. 环磷酸腺苷参与哺乳动物卵泡发育的研究进展[J]. *生理学报*, 2021, 73(3): 518-526
- ZHENG W Y, WANG C. Research progress on cyclic AMP signaling in mammalian follicular development [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2021, 73(3): 518-526
- [36] HERNÁNDEZ-RAMÍREZ L C, TRIVELLIN G, STRATAKIS C A. Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate (cAMP) signaling in the anterior pituitary gland in health and disease[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 463: 72-86
- [37] ZHANG Y Y, YAN Z Q, QIN Q Y, et al. Transcriptome landscape of human folliculogenesis reveals oocyte and granulosa cell interactions [J]. *Mol Cell*, 2018, 72(6): 1021-1034.e4
- [38] 谢娟, 康劲文, 刘晓征, 等. 敲除 Rbpj 降低小鼠子宫蜕膜对孕酮的敏感性[J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(3): 518-525
- XIE J, KANG J W, LIU X Z, et al. Knockout of Rbpj reduces uterine decidual sensitivity to progesterone in mice[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(03): 518 - 525
- [39] SHEN Z, CHEN M, GAO Y, et al. The function of Foxo1 in spermatogonia development is independent of PI3K/PTEN signaling[J]. *Faseb j*, 2022, 36(10): e22522
- [40] YILDIRIM S, MHAMANE A, LÖSCH S, et al. TSC22D1 is a newly identified inhibitor of insulin secretion in pancreatic beta cells[J]. *FEBS J*, 2025, 292(23): 6307-6329
- [41] 灭列·马达尼牙提, 孙萌, 褚瑰燕. Hedgehog 信号通路在动物卵巢卵泡发育和类固醇生成中的调控作用[J]. *畜牧兽医学报*, 2025, 56(3): 969-978
- MIELIE · M, SUN M, CHU G Y. Regulatory roles of the hedgehog signaling pathway in ovarian follicular development and steroidogenesis [J]. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 2025, 56(3): 969-978
- [42] 张静, 张姬越, 岳永起, 等. LKB1 基因对卵巢颗粒细胞类固醇激素生成相关基因的调控作用[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(10): 2057-2066
- ZHANG J, ZHANG J Y, YUE Y Q, et al. Regulatory role of LKB1 gene on steroidogenesis-associated Genes in ovarian granulosa cells [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(10): 2057-2066
- [43] HUANG J C, DUAN C C, JIN S, et al. HB-EGF induces mitochondrial dysfunction via estrogen hypersecretion in granulosa cells dependent on cAMP-PKA-JNK/ERK-Ca(2+)-FOXO1 pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(5): 2047-2059
- [44] WANG Y S, WU J Y, ZHANG G C, et al. Androgens drive SLC1A5-dependent metabolic reprogramming in polycystic ovary syndrome [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 7611
- [45] TIAN L, LIU L Y, WANG C L, et al. PTTG1 promotes M2 macrophage polarization via the cGMP-PKG signaling pathway and facilitates EMT progression in human epithelial ovarian cancer cells [J]. *Discov Oncol*, 2025, 16(1): 730
- [46] 李娇娇, 焦亚飞, 石德顺. PI3K/Akt 信号通路对卵泡发育和卵母细胞成熟作用的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(8): 33-37
- LI J J, JIAO Y F, SHI D S. Advances in understanding the PI3K/Akt signaling pathway in ovarian Follicular development and oocyte maturation [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2021, 57(8): 33-37

(收稿: 2025-08-18; 修回: 2025-09-04; 录用: 2025-10-20)

(本文编辑: 戴玉娟)