

外泌体在急性中枢神经系统损伤中的研究进展

龚之涛 综述 江荣才 审校

天津医科大学总医院神经外科,天津市 300052

摘要:外泌体是由各种类型的细胞经过一系列调控形成并可分泌到细胞外,分子直径为 30 ~ 120 nm 的小囊泡。它广泛分布于各种生物流体中,具有在细胞间转运蛋白质、脂类和核酸等活性物质,介导细胞间的信息交流和激活信号通路等作用。外泌体含有疾病指纹,可用于临床诊断。并在神经损伤的修复过程中,通过促进神经血管再生和减少神经性炎症等促进了神经功能的恢复。本文就其研究现状,尤其是在急性中枢神经系统损伤中的作用做简要综述。

关键词:外泌体;MicroRNAs(miRNAs);神经修复;诊断;治疗

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2016.06.027

急性中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤包括创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)和非创伤性脑损伤,非创伤性损伤范围较广,本文专指血管病导致的损伤如出血性卒中、缺血性卒中和蛛网膜下腔出血等。急性 CNS 损伤是造成机体死亡和长期残疾的主要原因,给社会带来了巨大负担^[1]。尽管已有海量研究,并开展了大量治疗实验,但目前还没有公认安全有效的疗法^[2]。因此,寻找促进修复急性 CNS 损伤的新疗法,是临床神经科学领域的主要任务。越来越多的研究显示,外泌体有望成为诊疗 CNS 损伤的有效疗法。

1 外泌体简介

1983 年,外泌体在绵羊网织红细胞中被首次发现。Johnstone 首先分离出这些囊泡并发现它们含有多种活性酶,将其命名为外泌体。它是直径为 30 ~ 120 nm 的小囊泡,可被所有类型的细胞(正常或病理状态)分泌,并且在血液、唾液、尿液和乳汁等生物流体中的含量都很丰富^[3],每微升血清中大约有 3×10^6 外泌体^[4]。它是在体内不同位置之间运送货物的载体^[3],非常适合小功能分子的传送,在细胞间的信息交流中起到主要作用^[5]。并且参与了机体的免疫应答、抗原提呈、炎症反应、细胞迁移及分化、肿瘤侵袭、细胞凋亡和血管生成等过程^[6]。它不仅含有蛋白质、脂类和 mRNA,还带有非编码 RNA,包括 miRNAs、Piwi 相互作用 RNAs(Piwi-interacting RNAs, piRNAs)、长链非编码 RNAs

(long non-coding RNAs, lncRNAs)和环状 RNAs(circular RNAs, circRNAs)等^[7,8]。而含有 22 ~ 25 个核苷酸的 miRNAs,可以调节基因表达并在中介生物学功能方面发挥重要作用。研究者已经认识到,通过改变外泌体内调节基因表达的通信指令,有望达到治疗癌症与神经系统疾病的目的^[4]。

外泌体及其所携带的物质反映了它们来源细胞的生理状况及其所处的环境条件^[4],它的组成和功能取决于其母细胞^[9],具有高度的细胞起源依赖性^[10]。当外泌体被宿主细胞分泌到受体细胞中时,不仅其携带的蛋白质和脂类可直接发挥生物活性,mRNA 可被翻译成蛋白质,随其转移的 miRNAs 也同样具有活性,可靶向调节受体细胞中 mRNA 的水平。传统认识是,由于体积很小或特异受体介导的内化,细胞分泌的信号分子是通过被动扩散进入受体细胞的。而新证据发现,外泌体可以主动向受体细胞发送更加复杂的“信息”。这些纳米级的囊泡(外泌体)就像病毒一样,能够轻松地从一个细胞转移到另一个细胞并且穿过细胞膜卸载其内容物^[3]。

分离外泌体的传统方法是超速离心法和蔗糖密度梯度离心法,但这些方法步骤繁琐且浪费时间,难以应用于大规模工业生产^[11,12]。Kim 等^[13]使用可扩大生产且高效的色谱法分离外泌体,他们发现多能间充质干细胞(multipotent mesenchymal stromal cells, MSCs)来源外泌体的表面抗原决定簇

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81271359,81671221);天津市科技计划项目(合同编号:14ZCZDSY00179)。

收稿日期:2016-10-09;**修回日期:**2016-12-08

作者简介:龚之涛(1993-),男,硕士在读,主要从事脑创伤的研究。

通讯作者:江荣才(1969-),男,教授,主任医师,博士生导师,医学博士,主要从事脑损伤及血管生成方面研究。

CD63 和 CD81 阳性率高于 80%, 并表达了高水平的肿瘤坏死因子诱导蛋白 6 (tumor necrosis factor-stimulated gene 6 protein, TSG-6)。TSG-6 被证明与抑制 TBI 小鼠模型的神经性炎症高度相关。接下来需要进一步确定促进神经损伤修复的外泌体所表达的特异抗原, 利用这些抗原, 可以通过免疫亲和层析法提取高度特异性的目标外泌体。

2 外泌体用于急性 CNS 损伤的诊断

CNS 损伤患者会出现各种各样的症状及影像学特点, 临床上很难准确鉴定其损伤程度和监测治疗反应, 神经组织活检又有多种条件限制, 因此特别需要神经损伤相关的特异生物标记物来反映其病理生理机制和预测神经功能恶化的风险^[7]。Chen 等^[16]确定了肺癌、结直肠癌和糖尿病患者血清 miRNAs 的特异表达形式, 证明血清 miRNAs 包含了各种疾病指纹。脑肿瘤患者外周血中共同存在脑源性外泌体、tau 蛋白和 β -淀粉样蛋白等物质。然而, 游离蛋白质和核酸标志物在循环血中极不稳定, 且通常在重度神经损伤时才能检测到。而外泌体具有许多优于其它标记物的特性, 如可以稳定存在于循环中、能在早期阶段检测到、存在于容易获得的生物流体(血液和脑脊液等)、来源于特定细胞并且容易准确量化^[6,7]。

外泌体携带的非编码 RNA (包括 miRNAs) 在维持健康与疾病进展方面起到调节作用^[14]。Yuan 等^[15]证实, 干细胞通过外泌体转移了 miRNAs 给靶细胞, 并改变了它的基因表达。特定的 miRNAs 与神经障碍的发展有关, 导致了 TBI 并发症的发生和进展^[17]。Taylor 等^[7]证明 IL-1 β 等促炎性细胞因子是由损伤相关单核细胞来源的特定外泌体诱导产生的, 神经损伤后的 24 小时内循环和脑脊液中明显增加。另外, 脑脊液 IL-1 β 已被证明在高压和预后不佳的严重 CNS 损伤中水平最高, 所以这些外泌体携带的物质可能具有预测价值^[18]。随着科技进步, 受伤脑组织来源外泌体携带的特异 miRNAs 及其它物质, 或许可作为稳定且非侵入性的生物标志物用于临床诊断、监测疗效和评估预后。

3 外泌体用于急性 CNS 损伤的治疗

最近十年多项研究表明, MSCs 治疗神经损伤实验模型非常有效, 具有潜在的临床应用价值^[12,19]。虽然它具有很好的治疗前景, 但是也存在一些问题: 只有一小部分移植的骨髓 MSCs 能够存活, 且最终只有更少数在损伤脑组织处分化成神经细

胞; 只可以将少量的 MSCs 直接注入颅内; 动脉注射可引起脑缺血; 而静脉注射又会导致体内广泛分布^[20]。并且 Chopp 等^[21]证明, 骨髓 MSCs 参与大脑重塑和功能恢复的主要机制是其旁分泌效应而不是细胞替代作用。在用骨髓 MSCs 治疗脑卒中大鼠的实验中证实, 干细胞通过分泌外泌体转移了 miRNAs 到脑实质细胞中, 而后这些 miRNAs 调节了受体细胞多种基因的表达^[22]。与移植外源性 MSCs 不同, MSCs 来源的外泌体不会增殖、低免疫原性(异体来源的外泌体可能也是安全的^[4])、更容易传递和存储(存储在 -80°C 的外泌体超过两年都不会失去生物活性^[3])并且可以通过药物途径(静脉注射或吸入给药等)穿过血脑屏障^[23]。所以, 使用 MSCs 来源的外泌体比直接移植 MSCs 治疗神经损伤更加安全有效且方便易行。Zhang 等^[10]证明了: 将来源于 MSCs 的外泌体以尾静脉注射的方式治疗 TBI 大鼠, 显著增加了病变边界区和齿状回新生内皮细胞的数量、提高了齿状回新生未成熟及成熟神经元的数量、促进了基质重塑, 还减少了神经性炎症。经过治疗, TBI 大鼠的空间学习和记忆能力及感觉运动功能均得到了恢复, 展示了该疗法对神经血管重塑和神经功能恢复的促进作用^[10,12]。另有研究显示, 外泌体还促进了轴突生长和突触形成^[24]。因此, 外泌体或许可能成为一种临床治疗急性 CNS 损伤的有效方式。

研究表明, 神经损伤会同时影响整个机体的不同分子途径^[25]。这种身体器官间的多靶向通信是通过释放微泡来实现的。脑损伤会刺激实质细胞和血管细胞释放外泌体, 而外泌体所包含的 miRNAs 信息等内在成分则可被损伤刺激和分子微环境的变化所修改。随着这些外泌体通过血管系统被传送到身体的各个部位, 体液的流动促进了活跃的信息交流。miRNAs 的存在就像打开了分子开关, 引起了对于疾病和损伤的各种生物反应^[4]。而 miRNAs 相互之间以及对转录因子会产生影响, 从而形成一个生物网络, 通过级联放大作用一个事件便会唤起众多反应。通过转染来改变骨髓 MSCs 的特异性 miRNAs, 产生的含有特异 miRNAs 的外泌体也就相应的有了特殊功能^[26]。由于进入到血液中的 miRNAs 如果没有外泌体包裹, 将被核糖核酸酶迅速(几个小时)降解, 而包含在外泌体中的 miRNAs 即使在室温下也非常稳定(几天)不会被降解^[27]。因此, 外泌体在神经损伤修复中发挥了关

键作用。外泌体促进 TBI 后功能恢复的作用机制尚不完全清楚。需要进一步的研究来确定外泌体中促进神经损伤后血管和神经再生的分子成分,包括特定的 miRNAs 和生长因子。一旦知道治疗中所必需的特定分子,就可以选择性促进这些分子的表达来提高治疗效果^[10]。另外,迄今为止进行的实验都使用的是来源于同一病人的外泌体^[3],还不能确定同种异型个体亦或者异种生物的外泌体用于治疗患者是否安全,以及能否人工合成符合特定需要的外泌体?现在大多数关于外泌体小分子 RNA 的研究都局限于 miRNAs,然而随着测序技术的进步,我们认识到还有许多其它的小 RNA 存在于外泌体中,包括 piRNAs、lncRNAs 和 circRNAs 等^[7]。现已证明胃癌组织中有 piRNA-651 和 piRNA-823 异常表达^[28],所以这些小 RNA 的功能值得关注。另外,多数研究只关注外泌体本身,而忽视了其它体液成分,还有必要弄清楚,除了 MSCs 来源的外泌体外,其它细胞(如胚胎干细胞)来源的外泌体以及其它细胞有机成分,是否也具有促进急性 CNS 损伤修复的作用^[10]?骨髓 MSCs 是否可能通过刺激肺巨噬细胞和脾 T 细胞对中枢神经系统产生远程系统效应^[29]?而如今需要回答的最基本问题是:是否高剂量的外泌体能够更好的促进急性 CNS 损伤后功能的恢复^[10]?

4 总结

外泌体广泛存在于血液和尿液等生物流体中,并且非常稳定。它含有各种疾病指纹,在急性 CNS 损伤后促进了神经血管重塑和神经功能恢复,展现出了应用于临床诊疗的极大潜力。但是,其具体作用机制和效应分子,以及特异外泌体的提取和制备等问题尚需进一步研究。随着对外泌体更加深入的认识,急性中枢神经损伤领域可能诞生革命性的新疗法。

参 考 文 献

- [1] Lei J, Gao G, Jiang J. Acute traumatic brain injury: is current management evidence based? An empirical analysis of systematic reviews. *J Neurotrauma*, 2013, 30(7): 529-537.
- [2] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(2): 128-142.
- [3] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(7): 940-948.
- [4] Chopp M, Zhang ZG. Emerging potential of exosomes and non-coding microRNAs for the treatment of neurological injury/diseases. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2015, 20(4): 523-526.
- [5] Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(11): 1484-1494.
- [6] Taylor DD, Gercel-Taylor C. The origin, function and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet*, 2013, 4: 142.
- [7] Taylor DD, Gercel-Taylor C. Exosome platform for diagnosis and monitoring of traumatic brain injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369(1652).
- [8] Barteneva NS, Maltsev N, Vorobjev IA. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Front Cell Infect Microbiol*, 2013, 3: 49.
- [9] Katsuda T, Kosaka N, Takeshita F, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*, 2013, 13(10-11): 1637-1653.
- [10] Zhang Y, Chopp M, Meng Y, et al. Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 2015, 122(4): 856-867.
- [11] Muller L, Hong CS, Stolz DB, et al. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods*, 2014, 411: 55-65.
- [12] György B, Hung ME, Breakefield XO, et al. Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2015, 55: 439-464.
- [13] Kim DK, Nishida H, An SY, et al. Chromatographically isolated CD63 + CD81 + extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(1): 170-175.
- [14] Weng R, Cohen SM. Drosophila miR-124 regulates neuroblast proliferation through its target anachronism. *Development*, 2012, 139(8): 1427-1434.
- [15] Yuan XL, Chen L, Li MX, et al. Elevated expression of Foxp3 in tumor-infiltrating Treg cells suppresses T-cell proliferation and contributes to gastric cancer progression in a COX-2-dependent manner. *Clin Immunol*, 2010, 134(3): 277-288.
- [16] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer

- and other diseases. *Cell Res*, 2008, 18 (10) : 997-1006.
- [17] Redell JB, Moore AN, Ward NH, et al. Human traumatic brain injury alters plasma microRNA levels. *J Neurotrauma*, 2010, 27 (12) : 2147-2156.
- [18] Kochanek PM, Berger RP, Bayir H, et al. Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury : diagnosis , prognosis , probing mechanisms , and therapeutic decision making. *Curr Opin Crit Care*, 2008, 14 (2) : 135-141.
- [19] Cox CS Jr, Baumgartner JE, Harting MT, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for severe traumatic brain injury in children. *Neurosurgery*, 2011, 68 (3) : 588-600.
- [20] Lu D, Mahmood A, Qu C, et al. Collagen scaffolds populated with human marrow stromal cells reduce lesion volume and improve functional outcome after traumatic brain injury. *Neurosurgery*, 2007, 61 (3) : 596-602.
- [21] Chopp M, Li Y, Zhang J. Plasticity and remodeling of brain. *J Neurol Sci*, 2008, 265 (1-2) : 97-101.
- [22] Xin H, Li Y, Liu Z, et al. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. *Stem Cells*, 2013, 31 (12) : 2737-2746.
- [23] Braccioli L, van Velthoven C, Heijnen CJ. Exosomes : a new weapon to treat the central nervous system. *Mol Neurobiol*, 2014, 49 (1) : 113-119.
- [24] Xin H, Li Y, Cui Y, et al. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33 (11) : 1711-1715.
- [25] Pennypacker KR, Offner H. The role of the spleen in ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35 (2) : 186-187.
- [26] Katakowski M, Buller B, Zheng X, et al. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Lett*, 2013, 335 (1) : 201-204.
- [27] Hu G, Drescher KM, Chen XM. Exosomal miRNAs : Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front Genet*, 2012, 3 : 56.
- [28] Cheng J, Deng H, Xiao B, et al. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. *Cancer Lett*, 2012, 315 (1) : 12-17.
- [29] Walker PA, Shah SK, Jimenez F, et al. Bone marrow-derived stromal cell therapy for traumatic brain injury is neuroprotective via stimulation of non-neurologic organ systems. *Surgery*, 2012, 152 (5) : 790-793.