

外泌体在神经退行性疾病发病中的研究进展

路雁惠,张锐毅 综述 贾延劼 审校

郑州大学第一附属医院,河南省郑州市 450000

摘要:外泌体是一种纳米级双层脂质囊泡,它通过主动分选机制包裹特定细胞内容物,包括多种特异性蛋白质、脂质和核酸,靶向作用于受体细胞,参与细胞间信息交流。研究发现,神经元及神经胶质细胞均可释放外泌体,并参与阿尔兹海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化等神经系统疾病中细胞间物质传递及信息交流。

关键词:外泌体;神经退行性疾病;阿尔兹海默病;帕金森病;肌萎缩侧索硬化

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2019.01.021

神经退行性疾病是由神经元和(或)其髓鞘进行性减少,随着时间的推移逐渐出现功能障碍的一类疾病。这类疾病的脑组织病理改变主要有两种表现形式:一种是细胞凋亡导致大量神经元丢失;另一种则是细胞胞体数量并无明显减少,但神经细胞出现结构及功能的进行性、退行性变性。随着人口老龄化日益加重,神经退行性疾病发病率也逐年攀增,然而临床上缺乏明确诊断的金标准及有效的治疗方法。外泌体是纳米级双层磷脂膜囊泡小体,细胞通过外泌体主动分选机制将特定细胞内容物,如多种特异性蛋白质、脂质和核酸等物质包裹于其内,经自分泌、旁分泌及内分泌三种方式,靶向与受体细胞融合,从而参与细胞间物质转运及信息交流,在多种生理及病理过程中发挥重要作用。研究发现,中枢神经系统中神经元及神经胶质细胞均可释放外泌体,携带特定成分,运输至临近或远隔细胞,从而发挥保护、抗炎、修复、再生等作用。然而在病理状态下,亦可携带异常物质导致细胞结构异常及功能紊乱,甚至神经元进行性丢失,在中枢神经系统疾病的发病与恶化中占重要地位。本文就外泌体的生物学特性及在中枢神经系统退行性疾病发生及发展中作用作一简要综述。

1 外泌体生物学特性

外泌体是直径约 30~100 nm 的双层磷脂膜囊泡小体,其内含有丰富的蛋白质、脂质、mRNA 和 microRNA 等,以膜融合方式释放于细胞外液及体液中,例如尿液、血浆、支气管肺泡灌洗液、母乳和脑

脊液等^[1],并以自分泌、旁分泌方式作用于临近细胞,或进入血液系统流向远隔细胞,通过受体-配体结合、内吞作用和胞浆膜融合等方式直接作用于靶细胞,参与复杂的细胞间物质交换及信息交流^[2,3]。

外泌体形成大致分为 3 个步骤:①细胞膜向内凹陷形成胞内囊泡,即早期内涵体(early endosomes, EE);②EE 以内生芽方式形成腔内含有多个囊泡的多囊泡小体(multivesicular bodies, MVBs);③MVBs 与溶酶体结合,部分 MVBs 内小囊泡被溶酶体降解,余小囊泡与细胞膜融合,以外泌体的形式释放到细胞外,形成外泌体。

依照细胞种类及病理生理状态不同,外泌体主要有 3 种不同的分选机制:转运分选复合物(endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT)依赖途径、四分子交联体(tetraspanins)依赖途径及脂质依赖途径。目前研究较为广泛的是 ESCRT 依赖途径,其主要物质是由 20 余种蛋白构成 5 个蛋白复合物 ESCRT-0、-I、-II、-III 及 Vps4。ESCRT-0 与 EE 膜表面特异性泛素化蛋白结合,使早期内体膜向内凹陷,并分选包裹特定内容物,在 ESCRT-I、-II 作用下形成小囊泡,在 ESCRT-III 的剪切作用下与早期内体膜分离,形成成熟的晚期核内体,即 MVBs^[4,5]。

外泌体富含蛋白质及脂质,据外泌体数据库 Exocarta(www.exocarta.org)统计,已有 8000 余种外泌体相关蛋白及 184 种脂质,其中列出了超过 100

基金项目:国家自然科学基金(联合项目),编号:U1604170

收稿日期:2018-05-04;**修回日期:**2018-10-29

作者简介:路雁惠(1992-),女,研究生在读,主要从事神经退行性疾病及外泌体的基础研究。

通信作者:贾延劼(1971-),男,教授,博士生导师,科副主任,博士,博士后,主要神经系统变性疾病的研究。E-mail:jiayanjie1971@aliyun.com; jiayanjie1971@163.com。

种蛋白质可作为外泌体生物标志物^[6]。由于外泌体属于细胞内体的一种类型,其富含热休克蛋白(Hsp70 和 Hsp90)、膜转运及融合蛋白(GTPases Annexins and flotillin)及四分子交联体超家族(CD9、CD63、CD81 和 CD82),热休克蛋白、跨膜蛋白及 Rab 家族蛋白主要参与外泌体在细胞内组装及转运,整联蛋白主要调控外泌体与靶细胞的结合。外泌体双层脂质结构主要由胞浆蛋白-类脂、脂类、鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇组成,鞘氨醇和 GM3 调控外泌体柔韧性,磷脂酰丝氨酸可将蛋白整合于外泌体表面,参与外泌体与细胞膜的融合过程。外泌体还可装载多种 mRNA、miRNA,其含量及种类受供体细胞状态及细胞外微环境调控,且外泌体 miRNA 无法正常释放,供体细胞正常功能也会受影响。如经缺血预处理的肾脏外泌体中 microRNA-21 表达量增加,促炎因子的产生减少,使组织器官免受内毒素血症引起的损伤^[7]。

2 中枢神经细胞外泌体功能

中枢神经系统中大多数细胞类型均可释放出外泌体,例如神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞。其主要生理作用包括消除细胞废物、调节免疫反应及细胞间信息交流,具有调控神经元及神经胶质细胞发育、再生及调节突触的功能。在神经退行性疾病中,外泌体也可参与病变蛋白的沉积与扩散,例如阿尔兹海默病中 A β 蛋白沉积、帕金森病中 α 突触核蛋白寡聚体的扩散等^[8]。

2.1 外泌体与阿尔兹海默病

阿尔兹海默病(Alzheimer disease, AD)是以进行性记忆力减退和认知功能障碍为主要临床表现的神经系统退行性病变,其主要病理表现为 β 淀粉样蛋白(amyloid- β , A β)沉积形成神经炎性斑及 tau 蛋白异常磷酸化导致神经纤维缠结。A β 是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经 β -和 γ -分泌酶的蛋白水解作用而产生的含有 39 ~ 43 个氨基酸的多肽。A β 1 ~ 42 具有较强的毒性,且易聚集。早在 2002 年就有研究在 AD 患者脑组织斑块中发现外泌体特异蛋白 Alix 和 Flotillin 沉积^[8,9],且证实 flAPP 和 APP CTFs 被浓缩至外泌体内并转运至细胞外,导致神经炎性斑的形成^[10]。

Tau 蛋白是神经细胞微管相关蛋白,正常成熟脑组织中为低磷酸化 Tau 蛋白分子,AD 患者 Tau 蛋白过度磷酸化,致使神经纤维缠结。在正常神经

元外泌体 Tau 蛋白为低磷酸化,神经元去极化激发外泌体释放,经旁分泌途径直接作用于临近神经元,参与正常 Tau 蛋白在细胞间的传递。而 AD 患者中外泌体不仅可机械转运磷酸化 Tau 蛋白,还通过不同的机制招募与神经变性相关的线粒体蛋白和轴突发育蛋白进入外泌体内,促进 Tau 蛋白过磷酸化^[11,12]。

外泌体还通过胰岛素抵抗途径参与神经元凋亡,pSer312-IRS-1 是无效的胰岛素信号蛋白,其含量与脑萎缩成正相关,AD 患者外周血中外泌体 pSer312-IRS-1 含量更高而 p-panTyr-IRS-1 含量更低,导致 Tau 蛋白过磷酸化及 A β 沉积,神经元能量代谢异常、氧化应激、线粒体功能障碍等引起的神经元凋亡等^[13,14]。

外泌体对神经元的保护作用亦不可忽视,其表面蛋白 PrPC 可隔离中和 A β 来源的可扩散性配体(amyloid-beta derived diffusible ligands, ADDLs),减少 ADDLs 造成的长时程增强电位损伤,从而发挥神经保护作用^[14]。

2.2 外泌体与帕金森病

帕金森病(Parkinson disease, PD)是以静止性震颤、肌强直、运动迟缓等进行性运动障碍并伴有嗅觉障碍、自主神经功能紊乱、睡眠及认知障碍为主要临床表现的神经系统退行性病变,其病理特征为 α 突触核蛋白沉积导致路易小体形成以及黑质致密区多巴胺能神经元大量变性缺失。Stuendl 等^[15]发现 PD 患者脑脊液外泌体中含致病 α 突触核蛋白,将这些外泌体注射于正常大鼠脑脊液中,正常大鼠脑脊液中 α 突触核蛋白量呈剂量依赖的方式增长,最终导致 PD 发生。进一步研究发现, α 突触核蛋白细胞间传递必须依赖外泌体,供体细胞溶酶体功能异常时,胞内 α 突触核蛋白增多,外泌体运输 α 突触核蛋白数量也相应提高^[16,17]。含有 α 突触核蛋白的外泌体还促进小胶质细胞 BV-2 释放富含 MHC-II 和 mTNF- α 外泌体,导致神经元凋亡^[18]。

外泌体在金属 Mn 依赖的 α 突触核蛋白过表达及沉积中也发挥重要作用,金属 Mn 可导致 MN9D 多巴胺能细胞系中 Rab27a 蛋白过表达,促进外泌体的释放,上调 miR-210、miRNA-125、miR-450b 和 miR-669b 等,这些 miRNA 通过多种信号传导通路,导致线粒体功能障碍、免疫系统紊乱、炎症激活及蛋白质聚集,且钙离子含量越高,受体细胞摄

取外泌体量越大^[19, 20]。此外, Leucinerich repeat kinase 2 (LRRK2) 基因是家族型 PD 已知的最常见致病基因, 外泌体可将自身磷酸化 Ser (P)-1292 LRRK2 蛋白转运自尿液中, 因此可作为一种检测 PD 发病及病变程度的生物学标志物^[21]。

2.3 外泌体与肌萎缩侧索硬化

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一组选择性侵犯脊髓前角细胞、脑干后组运动神经元、皮质锥体细胞及锥体束, 从而导致肌无力、肌肉萎缩及病理征的神经变性疾病, 其可能的发病机制有: Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (SOD1) 基因突变、兴奋性氨基酸毒性作用、线粒体功能障碍、免疫炎症反应、星形胶质细胞功能异常、TAR DNA 结合蛋白 43 (TDP-43) 包涵体形成等。

有 10% 的 ALS 是由 SOD1 基因突变所致, 当基因突变时 SOD1 蛋白错误折叠形成不溶性寡聚体, 使微丝缠结影响轴突运输^[20]。早在 2007 年即发现运动神经元通过外泌体将多达 80% 突变体 SOD1 (mSOD1) 转移至周围正常细胞, 仅小部分 mSOD1 经大饮泡被临近细胞摄取, 或利用清道夫受体被胶质细胞摄取继而灭活^[22, 23]。此外, 星形胶质细胞也可通过外泌体将 mSOD1 转运至运动神经元导致细胞死亡^[24]。TDP-43 蛋白是第二个被发现的 ALS 相关异常蛋白, 正常 TDP-43 蛋白主要在核内, 与 TAR DNA 结合, 参与调节转录、修饰 mRNA 等, 胞浆中 TDP-43 含量甚微, 该蛋白在其发挥完生理功能后经蛋白酶体通路降解^[25]。当细胞内 TDP-43 含量过高时, 外泌体可将其转运至细胞外微环境中或邻近神经元中, bafilomycin A1 抑制自噬使 TDP-43 外泌体分泌量增加, 表明外泌体可能是细胞清除 TDP-43 寡聚体的补充机制, 而 GW4869 抑制外泌体分泌则诱导 TDP-43 在细胞内形成寡聚体, 导致神经元凋亡^[26]。

外泌体还可通过激活小胶质细胞在 ALS 疾病进展中发挥作用, mSOD1 运动神经元外泌体富含 miR-124, 它可将该 microRNA 转运至小胶质细胞使其活化, 并激活 NF- κ B 信号通路释放大量的 IL-1 β 、TNF- α 、MHC-II 和 iNOS, 到晚期小胶质细胞表面受体及 miR-155、miR-146a 和 miR-124 的表达增加, 进一步加重炎症反应, 导致细胞内环境紊乱、运动神经元变性坏死^[27]。

3 总结

外泌体在神经退行性病变中发挥许多重要作

用, 它不仅是细胞内代谢废物排出细胞外的转运载体, 还参与异常物质细胞间传递与播散, 从而发挥神经元保护、变性及死亡等多个过程。神经退行性疾病是中枢神经系统中的一大类疾病, 由于其具体发病机制不明, 造成该疾病“诊断晚、治疗难”的局面, 给社会、家庭及个人带来了沉重的负担。大量研究表明, 外泌体在神经退行性病变中扮演重要角色, 其主要参与异常蛋白的播散, 导致受损细胞逐渐增多, 病情进行性恶化。因此, 深入研究神经退行性病变中外泌体形成、分选包装内容物、转运及播散异常蛋白的具体分子机制, 探索潜在的高特异性诊断及预后生物标志物, 寻找药物作用新靶点, 开发治疗新途径极为重要, 其可为实现该疾病“早发现、精准治疗”带来希望。

参 考 文 献

- [1] Li S, Yao J, Xie M, et al. Exosomal miRNAs in hepatocellular carcinoma development and clinical responses [J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1): 54.
- [2] Saman S, Kim W, Raya M, et al. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease [J]. J Biol Chem, 2012, 287(6): 3842-3849.
- [3] Sarko DK, McKinney CE. Exosomes: Origins and Therapeutic Potential for Neurodegenerative Disease [J]. Front Neurosci, 2017, 11: 82.
- [4] Colombo M, Moita C, van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles [J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 24): 5553-5565.
- [5] Perez-Hernandez D, Gutierrez-Vazquez C, Jorge I, et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes [J]. J Biol Chem, 2013, 288(17): 11649-11661.
- [6] Keerthikumar S, Gangoda L, Liem M, et al. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes [J]. Oncotarget, 2015, 6(17): 15375-15396.
- [7] Jia P, Wu X, Dai Y, et al. MicroRNA-21 Is Required for Local and Remote Ischemic Preconditioning in Multiple Organ Protection Against Sepsis [J]. Crit Care Med, 2017, 45(7): e703-e710.
- [8] Dreyer F, Baur A. Biogenesis and Functions of Exosomes and Extracellular Vesicles [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1448: 201-216.
- [9] Takahashi RH, Milner TA, Li F, et al. Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is asso-

- ciated with synaptic pathology [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161 (5) : 1869-1879.
- [10] Yuyama K, Yamamoto N, Yanagisawa K. Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality : another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation [J]. *J Neurochem*, 2008, 105 (1) : 217-224.
- [11] Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, et al. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes [J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12 (1) : 5.
- [12] Saman S, Lee NC, Inoyo I, et al. Proteins recruited to exosomes by tau overexpression implicate novel cellular mechanisms linking tau secretion with Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 40 (Suppl 1) : S47-S70.
- [13] Mullins RJ, Mustapic M, Goetzl EJ, et al. Exosomal biomarkers of brain insulin resistance associated with regional atrophy in Alzheimer's disease [J]. *Hum Brain Mapp*, 2017, 38 (4) : 1933-1940.
- [14] An K, Klyubin I, Kim Y, et al. Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of Abeta assemblies in vivo [J]. *Mol Brain*, 2013, 6 : 47.
- [15] Delenclos M, Trendafilova T, Mahesh D, et al. Investigation of Endocytic Pathways for the Internalization of Exosome-Associated Oligomeric Alpha-Synuclein [J]. *Front Neurosci*, 2017, 11 : 172.
- [16] Stuenkel A, Kunadt M, Kruse N, et al. Induction of alpha-synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies [J]. *Brain*, 2016, 139 (Pt 2) : 481-494.
- [17] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, et al. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission [J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 42 (3) : 360-367.
- [18] Chang C, Lang H, Geng N, et al. Exosomes of BV-2 cells induced by alpha-synuclein : important mediator of neurodegeneration in PD [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 548 : 190-195.
- [19] Harischandra DS, Ghaisas S, Rokad D, et al. Environmental neurotoxicant manganese regulates exosome-mediated extracellular miRNAs in cell culture model of Parkinson's disease : Relevance to alpha-synuclein misfolding in metal neurotoxicity [J]. *Neurotoxicology*, 2018, 64 : 267-277.
- [20] Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, et al. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers [J]. *Mol Neurodegener*, 2012, 7 : 42.
- [21] Fraser KB, Rawlins AB, Clark RG, et al. Ser (P) -1292 LRRK2 in urinary exosomes is elevated in idiopathic Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2016, 31 (10) : 1543-1550.
- [22] Gomes C, Keller S, Altevogt P, et al. Evidence for secretion of Cu, Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 428 (1) : 43-46.
- [23] Roberts K, Zeineddine R, Corcoran L, et al. Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype [J]. *Glia*, 2013, 61 (3) : 409-419.
- [24] Basso M, Pozzi S, Tortarolo M, et al. Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes : implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (22) : 15699-15711.
- [25] Guo A, Tapia L, Bamji SX, et al. Progranulin deficiency leads to enhanced cell vulnerability and TDP-43 translocation in primary neuronal cultures [J]. *Brain Res*, 2010, 1366 : 1-8.
- [26] Iguchi Y, Eid L, Parent M, et al. Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43 [J]. *Brain*, 2016, 139 (Pt 12) : 3187-3201.
- [27] Pinto S, Cunha C, Barbosa M, et al. Exosomes from NSC-34 Cells Transfected with hSOD1-G93A Are Enriched in miR-124 and Drive Alterations in Microglia Phenotype [J]. *Front Neurosci*, 2017, 11 : 273.