

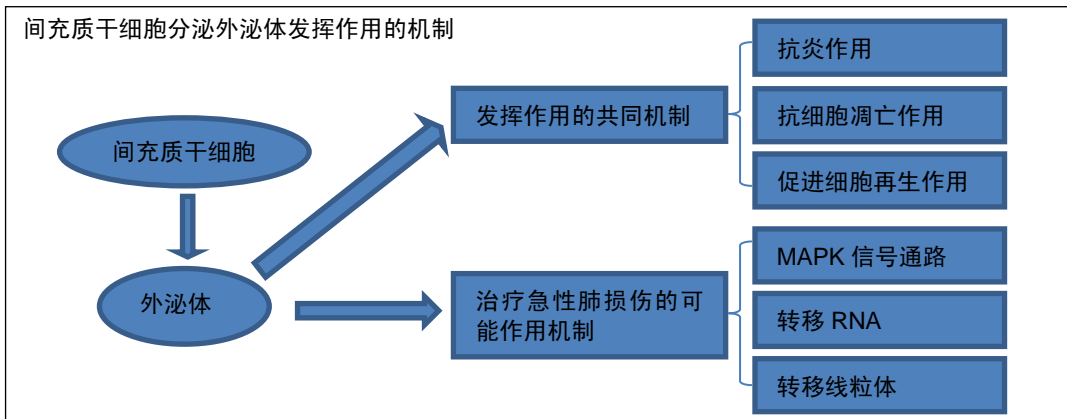
间充质干细胞来源外泌体治疗急性肺损伤的作用机制

张莉珊, 曾勉(中山大学附属第一医院MICU, 广东省广州市 510080)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1815

ORCID: 0000-0002-1841-6595(张莉珊)

文章快速阅读:



张莉珊, 女, 1993年生, 广东省人, 汉族, 中山大学附属第一医院在读硕士, 主要从事间充质干细胞治疗急性肺损伤相关研究。

通讯作者: 曾勉, 硕士, 教授, 主任医师, 中山大学附属第一医院 MICU, 广东省广州市 510080

文献标识码:A

稿件接受: 2019-05-30



文题释义:

外泌体: 是一类大小介于 30–100 nm 的含有 DNA、RNA、蛋白质和脂类的微囊泡, 几乎所有类型的细胞都能分泌外泌体, 广泛存在于血清、血浆、尿液等各种体液中。外泌体最初被认为是细胞清除代谢废物的手段, 近年来发现外泌体作为细胞间通讯的重要介质, 参与调控许多重要的细胞生理活动, 在免疫应答、凋亡、血管生成、炎症反应等过程中发挥作用, 成为多种疾病治疗的潜在靶点。

间充质干细胞来源外泌体: 具有选择性组装、靶向性投递、高效修复受损组织、安全性高、化学性质稳定、易于保存等优点, 可作为运载间充质干细胞多种分泌产物的载体参与间充质干细胞与损伤细胞之间的细胞通讯, 起到关键信使的作用, 是急性肺损伤相关干细胞领域的一个具有重要研究价值的新热点。

摘要

背景: 外泌体是一种可以由多种类型细胞分泌的膜性囊泡结构, 富含蛋白质、脂类和 RNA, 可通过介导细胞间的信息交流和信号转导而参与调控多种重要的细胞生理或病理活动。研究发现, 间充质干细胞分泌的外泌体具有减少肺部炎症反应、改善肺微血管内皮屏障通透性以及促进肺组织结构修复等作用, 有望为急性肺损伤提供一种创新的治疗方式。

目的: 对间充质干细胞来源外泌体治疗急性肺损伤作用机制的最新研究进展作一综述。

方法: 以“间充质干细胞, 外泌体, 急性肺损伤, mesenchymal stem cells, exosomes, acute lung injury”为检索词, 检索 1981 至 2018 年 PubMed、CNKI 中国期刊全文数据库, 纳入间充质干细胞来源外泌体治疗急性肺损伤的相关文献, 共纳入文献 58 篇进行分析总结。

结果与结论: ①外泌体通过转移蛋白质、脂质及核酸来影响靶细胞的生理活动, 介导细胞间信号转导及免疫调节等生物学效应; ②间充质干细胞来源外泌体携带来自间充质干细胞的某些蛋白质、脂质、DNA 及 RNA 等生物活性物质, 可能通过抗炎、抗细胞凋亡、促进细胞再生等共同机制发挥作用; ③通过对现有的研究总结了间充质干细胞来源外泌体发挥治疗急性肺损伤的主要作用机制, 为日后应用间充质干细胞来源外泌体治疗急性肺损伤提供相关参考。

关键词:

外泌体; 间充质干细胞; 急性肺损伤; 免疫调节; 细胞凋亡; 细胞再生; 无细胞治疗; 细胞间通讯; 国家自然科学基金

中图分类号: R459.9; R394.2; R563

基金资助:

国家自然科学基金(81670066), 项目负责人: 曾勉; 广东省省级科技计划项目(2016A020216009, 2014A020212151), 项目负责人: 曾勉

Zhang Lishan, Master candidate, Medical Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zeng Mian, Master, Professor, Chief physician, Medical Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Therapeutic mechanisms of mesenchymal stem cell derived exosomes in acute lung injury

Zhang Lishan, Zeng Mian (Medical Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Exosomes are vesicles with phospholipid bilayers containing lots of proteins, lipid and RNA

secreted by various types of cells, which might play important roles in cell-to-cell communication and signal transduction and participate in the regulation of important physiology or pathological processes. Recent studies have discovered that exosomes derived from mesenchymal stem cells, a promising treatment for acute lung injury, exert an anti-inflammation effect and improve the microvascular endothelial barrier permeability and enhance lung epithelial tissue repair.

OBJECTIVE: To review the recent advances in mesenchymal stem cells derived exosomes as a novel approach to the treatment of acute lung injury.

METHODS: Databases of PubMed and CNKI were searched for the articles related to the mechanism of mesenchymal stem cells-derived exosomes in the treatment of acute lung injury between 1981 and 2018. The keywords were “mesenchymal stem cells, exosomes, acute lung injury” in English and Chinese, respectively. Fifty-eight articles were enrolled for analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Exosomes plays an important role in mediating intercellular communication and regulating immune system by transferring bioactive proteins, lipids and nucleic acids to target cells. (2) Mesenchymal stem cells-derived exosomes carry certain proteins, lipids, nucleic acids from mesenchymal stem cells. They might contribute to attenuating the inflammatory response and apoptosis, and promoting cell regeneration. (3) The existing researches summarize the main mechanism of treatment of acute lung injury by mesenchymal stem cell-derived exosomes, and provide reference for the future application of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of acute lung injury.

Key words: exosomes; mesenchymal stem cells; acute lung injury; immunomodulation; apoptosis; cell regeneration; cell-free therapy; intercellular communication; National Natural Science Foundation of China

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81670066 (to ZM); the Guangdong Provincial Scientific Research Project, No. 2016A020216009 and 2014A020212151 (both to ZM)

0 引言 Introduction

急性肺损伤是指由非心脏疾病导致的急性、进行性加重的呼吸衰竭,据估计在全世界范围内约占重症监护室住院人数的10%,死亡率可达40%以上^[1]。急性肺损伤的病理特点为炎症导致的肺泡上皮细胞和肺泡毛细血管损伤,其中肺泡的病理改变可以分为3个连续且重叠的阶段。首先,渗出期是由中性粒细胞介导的炎症损害肺泡毛细血管屏障,呼吸膜通透性增加并引起肺泡内出血和水肿;在发病1周左右进入增殖期,此期主要为II型肺泡上皮细胞的修复和肌成纤维细胞的增殖;最后进入纤维化期,肺泡腔和间质中的胶原纤维化^[2]。大量研究表明,炎症反应、凝血纤溶系统异常、氧化应激失衡和内皮功能破坏等多种机制参与了急性肺损伤的发生发展^[3],但目前急性肺损伤的主要治疗手段仍以支持治疗为主,包括限制性液体管理、最佳呼气末正压通气、肺保护性通气策略和体外膜肺氧合等,治疗效果多不明显,导致其病死率仍居高不下,故探索急性肺损伤的新治疗手段意义重大。基于间充质干细胞的治疗方法已在许多急性肺损伤相关研究中显示出了诱人的应用前景。间充质干细胞是一种具有自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞,不仅能促进损伤组织的再生修复,还展示出一定的免疫调节作用。已有多项研究证实了间充质干细胞治疗急性肺损伤动物模型具有肯定的效果^[4],但其具体机制仍有待明确。早期研究认为间充质干细胞是通过移行归巢至受损肺组织并分化为肺泡上皮细胞来修复肺损伤,但是许多研究发现间充质干细胞移植后存活数量有限,大部分均会在48 h内被迅速清除^[5]。亦有研究显示,注射间充质干细胞培养基上清比注射间充质干细胞在抑制肺部炎症反应和肺泡损伤方面具有更显著的效果^[6]。因此,间充质干细胞定向分化为肺细胞并对肺组织起到直接修复的作用可能是非常有限的,而其旁分泌作用可能才是主要机制,即间充质干细胞可能通过释放一些物质(包括血管内皮生长因子、成纤维细胞

生长因子、转化生长因子 β 和白细胞介素1受体拮抗剂)来发挥其抑制炎症、促进损伤组织修复以及促血管生成等作用^[7]。近年来,关于外泌体的研究如火如荼,为进一步阐明间充质干细胞治疗急性肺损伤具体机制提供了新的方向。相关研究显示,间充质干细胞来源的外泌体具有选择性组装、靶向性投递、高效修复受损组织、安全性高、化学性质稳定、易于保存等优点,可作为运载间充质干细胞多种分泌产物的载体参与了间充质干细胞与损伤细胞之间的细胞通讯,起到关键信使的作用,是急性肺损伤相关干细胞领域的一个具有重要研究价值的新热点。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 检索数据库 PubMed数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)、CNKI中国期刊全文数据库(<http://www.cnki.net/>)。

1.2 检索途径、检索词及各检索词的逻辑关系 为全面、准确地检索出撰写该综述的相关文献,文章写作过程中综合考虑了检索途径的选择、检索词的选择和各检索词间逻辑关系的配置,制定了科学的检索策略。

1.2.1 检索途径 主要以主题词和摘要检索。

1.2.2 检索词 以“间充质干细胞,外泌体,急性肺损伤”为中文检索词,以“mesenchymal stem cells, exosomes, acute lung injury”为英文检索词,共检索到410篇文献。

1.2.3 检索词的逻辑组配 #1(“Exosomes”[Mesh]) AND “Mesenchymal Stem Cells”[Mesh]; #2 (“Mesenchymal Stem Cells”[Mesh]) AND “Exosomes”[Mesh] AND “lung”; #3 (“Mesenchymal Stem Cells”[Mesh]) AND (“acute lung injury”[Mesh]); #4((外泌体 OR 肺损伤) AND 间充质干细胞)。

1.2.4 检索的时间范围 1981至2018年,重点检索近5年内的文献。

1.3 文献筛选流程和筛选标准

1.3.1 文献筛选流程 见图1。

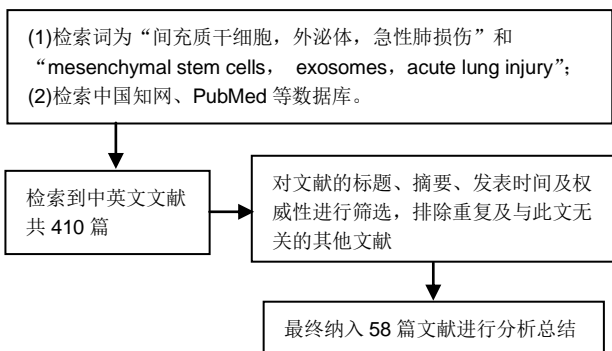


图1 文献筛选流程

1.3.2 文献的筛选标准 ①间充质干细胞治疗急性肺损伤的相关文献; ②外泌体生物学特性的相关文献; ③间充质干细胞来源外泌体治疗肺部疾病的相关文献; ④同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

1.3.3 文献的排除标准 ①与研究内容不相符的文献; ②研究时间过早、陈旧性的文献; ③重复性研究文献。

2 结果 Results

2.1 外泌体的概念与生物学特性 外泌体首次被发现于20世纪80年代, Tram等^[8-9]观察到网织红细胞在其成熟期间会分泌一种含有转铁蛋白受体的小囊泡, 介导转铁蛋白受体的清除。然而在此后的十余年间外泌体并未受到研究人员的关注, 仅被看作是细胞清除代谢废物的手段。直到20世纪90年代末, Zitvogel等^[10]研究表明外泌体可能是细胞间通讯的重要介质, 才重新激起了人们对外泌体研究的兴趣。研究证实了人体中几乎所有类型的细胞均能产生外泌体, 且已经从多种体液中分离出外泌体, 包括血液、尿液、唾液、精液、乳汁、胆汁、羊水、腹水和脑脊液等^[11]。随后, 一系列的研究发现许多细胞(包括免疫细胞、肠上皮细胞和间充质干细胞等)能通过释放外泌体来参与炎症反应、免疫反应和受损细胞增殖修复的调节^[12-14]。

外泌体是一种能被大多数细胞分泌的微小膜泡, 具有脂质双层膜结构, 见图2。根据国际细胞外囊泡学会的定义^[15], 外泌体是细胞外囊泡(Extracellular vesicles)最小的亚组(细胞外囊泡3个亚组分别为: 外泌体、微泡以及凋亡小体), 直径30-100 nm。细胞通过内吞作用形成早期内体(early endosome), 再与高尔基复合体相互作用以形成晚期内体, 进而融合形成多泡体(MVBs, multivesicle bodies), 多泡体与质膜融合通过胞吐作用释放外泌体^[16], 这个过程依赖于转运必需内体分选复合物(ESCRT)的作用。外泌体携带与细胞来源相关的多种蛋白质、脂质和核酸, 能作为信号分子传递给其他细胞参与细胞活动的重要调控。虽然外泌体的形成过程大致

相同, 但不同细胞来源的外泌体在不同状态下所包含的内容物各不相同。目前已经被识别存在于外泌体的蛋白包括: 膜联蛋白和flotillin(与外泌体的转运和融合有关)、四跨膜蛋白(参与细胞靶向)、Alix和TSG101(参与外泌体从多泡体的生物发生)、热休克蛋白(热休克蛋白60、热休克蛋白70和热休克蛋白90)、细胞外基质和细胞表面蛋白质(例如胶原蛋白、整合蛋白和半乳糖凝集素)、细胞表面受体(EGFR)等^[17-18]。与其起源细胞相比, 外泌体富含胆固醇、神经酰胺、磷酸甘油酯以及不饱和的脂肪酰基链, 参与维持外泌体结构的稳定性^[19]。此外, 外泌体中的核酸是来源细胞核酸的一个子集, 包括DNA、lncRNA、tRNA、mRNA、microRNA等。

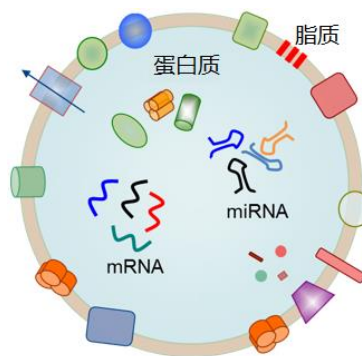


图2 外泌体结构模式图

最初用于提取外泌体的方法是差速离心法^[20]。首先通过递增的速度连续离心消除较大的囊泡, 然后以1 000 000xg超速离心沉淀得到外泌体。由于大小相似的不同囊泡以及蛋白质聚集体均可以在1 000 000xg条件下沉淀, 故超速离心法并不能得到纯化的外泌体。对此, 研究者随后提出了几种提取外泌体的方法, 包括超速离心联合蔗糖密度梯度法、超速离心法、免疫磁珠分离法和试剂盒提取法^[21]。然而, 目前外泌体的纯化仍相当困难, 需要更多的新方法来纯化外泌体以满足外泌体实验的需求。对于分离所得的外泌体可通过电子显微镜观察进行初步鉴定, 其直径为30-100 nm, 呈一侧凹陷的半球形。此外, 还可以应用Western blot法和流式细胞术来检测外泌体表面蛋白标志物和特异性蛋白标志物从而鉴定外泌体。随着科技的发展, 鉴定方法不断推陈出新, 最近新兴的纳米颗粒跟踪分析技术, 不但可以实现外泌体的可视化, 同时还可以用摄像头捕捉每个颗粒的布朗运动并进行追踪和分析, 从而计算出外泌体的半径和浓度。

外泌体一旦从细胞中分泌出来, 可以通过旁分泌或内分泌的方式改变邻近细胞或远处细胞的细胞活动。循环中的外泌体通过其特定的表面分子组合(包括MHC I和II类分子、膜联蛋白、整合素和四跨膜蛋白等)直接靶向特定的细胞, 随后靶细胞通过胞吞作用、膜融合或受体介导的内化作用来摄取外泌体^[18]。最后, 外泌体通过转移蛋白质、脂质及核酸来影响靶细胞的生理活动, 介

导细胞间信号转导及免疫调节等生物学效应。

2.2 间充质干细胞来源外泌体的生物学功能 间充质干细胞来源外泌体作为间充质干细胞分泌的囊泡,携带有来自间充质干细胞的某些蛋白质、脂质、DNA及RNA等生物活性物质,可能是间充质干细胞发挥治疗作用的物质基础。由于间充质干细胞来源的不同(如来源于骨髓、脂肪、脐带等),可将间充质干细胞来源外泌体进一步分为更多的亚类,但是它们所分泌的外泌体具有一些共同的特性,可能通过抗炎、抗细胞凋亡、促进细胞再生等共同机制发挥作用。

2.2.1 抗炎作用 炎症反应是多种疾病发生发展的重要机制之一,在炎症过程中损伤因子的释放造成组织和细胞的破坏。失控的炎症反应在急性呼吸窘迫综合征和败血症的发病机制中起着重要的作用^[2]。研究表明,间充质干细胞可以通过分泌含有抗炎相关细胞因子的外泌体调节免疫细胞的功能,发挥其抗炎效应,从而改善心肌梗死、急性肺损伤等疾病的预后。Arslan等^[22]为了验证间充质干细胞来源外泌体的抗炎作用,在小鼠心肌梗死模型行再灌注治疗前注入外泌体,结果发现其可显著降低再灌注24 h后的局部和全身炎症反应。在急性肺损伤的发生发展中,炎症反应占据核心地位,其发生由多种炎性递质共同参与。Lee等^[23]研究使用间充质干细胞来源外泌体预处理缺氧暴露小鼠,发现其可通过抑制炎症细胞因子如单核细胞趋化蛋白1和抑制巨噬细胞的募集来预防早期肺部炎症。间充质干细胞来源外泌体的这种抗炎作用在Chen等^[24]急性肺损伤小鼠模型实验中进一步得到证实,实验结果显示加有外泌体的实验组肺泡灌洗液中中性粒细胞数量、肺组织髓过氧化物酶的活性以及血浆中促炎因子水平均明显降低,而抗炎因子水平则明显增高。

2.2.2 抗细胞凋亡作用 细胞凋亡不足或细胞凋亡过度等细胞凋亡调控异常可能导致多种疾病发生。许多研究表明间充质干细胞来源外泌体可通过调节凋亡过程,对与凋亡过度密切相关的疾病发挥抗凋亡作用。Bruno等^[25]研究表明注射间充质干细胞来源外泌体对肾脏的保护机制主要归因于其抗凋亡作用,可降低顺铂诱导的急性肾损伤模型小鼠的死亡率,而且存活小鼠表现出正常的组织学和肾功能;细胞水平研究表明间充质干细胞来源外泌体可通过上调抗凋亡基因Bcl-xL、Bcl-2和BIRC8,以及下调促凋亡基因CASP1、CASP8和LTA来抑制肾小管上皮细胞凋亡。Chen等^[26]研究发现间充质干细胞来源外泌体可抑制D-氨基半乳糖/脂多糖诱导的急性肝衰竭小鼠肝细胞的凋亡,抗体芯片检测结果显示间充质干细胞来源外泌体含有较高含量的ICAM-1、血管生成素、Axl、IGFBP-6等与细胞凋亡相关的蛋白。神经细胞凋亡在阿尔茨海默病等神经退行性疾病发病机制占重要地位,其中 β -淀粉样蛋白在脑中的沉积被认为是阿

尔茨海默病的特征性表现,已有许多研究证实了 β -淀粉样蛋白在体内或体外均能诱导神经元凋亡。间充质干细胞来源外泌体被发现含有脑啡肽酶(脑中最重要的 β -淀粉样蛋白降解酶),有实验证明其与高表达 β -淀粉样蛋白的神经细胞共培养时,可以降低细胞内外的 β -淀粉样蛋白^[27],提示间充质干细胞来源外泌体能够抑制神经元凋亡,可能具有治疗阿尔茨海默病的作用。由于细菌性肺炎和脓毒症是急性肺损伤的2个常见病因,故免疫细胞的凋亡减少对于大多数急性肺损伤具有保护作用^[28-29]。Lee等^[30]研究发现间充质干细胞分泌的FGF7被认为能够抑制单核细胞凋亡,增加免疫细胞杀灭细菌的能力。而在大多数情况下,这些细胞因子包装在外泌体中。关于间充质干细胞来源外泌体在急性肺损伤中的抗细胞凋亡作用研究不多,仍需要更多的实验研究来阐明这一机制。

2.2.3 促进细胞再生作用 再生是指为修复组织缺损而发生的同种细胞的增生,对维持组织、器官的完整和稳定,恢复组织、器官原有的结构和功能具有重要意义。间充质干细胞来源外泌体促进细胞再生的作用在多种疾病或损伤模型中已被证实。在四氯化碳诱导的急性肝损伤小鼠模型中,间充质干细胞来源外泌体治疗组小鼠肝细胞损伤减少,肝细胞增殖增加,与细胞增殖有关的增殖细胞核抗原和细胞周期蛋白D1表达水平增加^[31],提示间充质干细胞来源外泌体可通过促进肝细胞再生发挥肝保护作用。

多项研究也证实了间充质干细胞来源外泌体在促进软骨再生中的作用。Zhang等^[32]首次证明了间充质干细胞来源外泌体在软骨修复中的功效,其可通过促进软骨再生和细胞外基质的沉淀来修复软骨缺损。Qin等^[33]进一步观察发现间充质干细胞来源外泌体介导的软骨缺损修复的特征表现为细胞增殖增多、基质合成增强和再生免疫表型增多,该过程的激活可能与CD73介导的AKT和ERK信号传导通路有关。此外,间充质干细胞来源外泌体在脑损伤中亦有促进细胞再生的功能,Zhang等^[34]证实了间充质干细胞来源外泌体可以通过促进脑血管生成和神经发生显著改善大鼠创伤性脑损伤程度。Zhu等^[35]实验证实了间充质干细胞来源外泌体能够保护内毒素诱导的肺损伤,其中还提到了将间充质干细胞提前与干扰表达角质形成细胞因子的siRNA共培养后,间充质干细胞来源外泌体的保护作用被部分消除。因此,推测间充质干细胞来源外泌体对肺损伤的保护作用机制,部分源于其转运角质形成细胞因子,而角质形成细胞因子具有促进II型肺泡上皮增生等生物学功能。II型肺泡上皮细胞作为肺泡上皮干细胞,其有强大的免疫功能、肺水转运功能、合成和分泌肺泡表面活性物质等功能,因而II型肺泡上皮细胞的再生修复在急性肺损伤的病程进展和转归中起着重要作用。

目前为止,已有许多临床试验证实了间充质干细胞

来源外泌体在急性肺损伤中的保护作用。Ionescu等^[36]报道在急性肺损伤小鼠模型中, 给予间充质干细胞条件培养基可抑制中性粒细胞的滚动、黏附和迁移, 研究还显示间充质干细胞条件培养基在体外和体内促进肺泡巨噬细胞分化为M2抗炎表型从而起到减少肺部炎症反应的作用。有研究表明内皮细胞和间充质干细胞共培养可以降低内皮细胞的通透性, 并通过动员连接蛋白向细胞膜黏附来防御细胞屏障的损坏以改善急性呼吸窘迫综合征时肺微血管内皮屏障的通透性^[19]。同时, 间充质干细胞来源外泌体还可以通过旁分泌多种细胞因子和生长因子(包括角质形成细胞因子、血管生成素1、白细胞介素1等)来促进受损肺组织的修复。间充质干细胞来源外泌体对于急性肺损伤的保护作用, 可能部分通过上述提到的抗炎、抗细胞凋亡和促细胞再生3种机制来发挥作用。

2.3 间充质干细胞来源外泌体治疗急性肺损伤的可能作用机制

2.3.1 间充质干细胞来源外泌体通过调控MAPK信号传导通路对急性肺损伤发挥保护作用 众所周知, 在急性肺损伤的发展进程中, MAPK是决定促炎细胞因子表达的关键信号通路, 因此, 抑制MAPK通路可能作为治疗急性肺损伤的潜在机制之一。MAPK包括JNK、P38和ERK, 是重要的细胞信号传导通路, 其中JNK具有促细胞凋亡的作用; P38磷酸化可促进炎性细胞因子释放, 引起过度炎症反应; ERK在调节细胞分化增殖中发挥重要作用。杨尧等^[37]实验显示在使用内毒素建模后3 d, 添加有间充质干细胞来源外泌体稀释液的实验组肺组织p-JNK、p-P38、p-ERK蛋白水平较模型组降低, 表明了人脐带间充质干细胞来源外泌体可能通过抑制内毒素诱导急性肺损伤大鼠肺组织MAPK通路中的p-JNK、p-P38、p-ERK蛋白表达, 起到抑制细胞凋亡、抑制促炎因子的表达和促进肺组织细胞增殖修复等效应, 从而发挥对肺组织的保护作用。Chen等^[24]借助盲肠结扎穿孔法建立急性肺损伤小鼠模型, 发现输注间充质干细胞来源外泌体的实验组肺组织MAPK、NF- κ B表达明显降低, 而HO-1、Nrf-2明显增高。外泌体是否还通过其他的信号通路来发挥对急性肺损伤的保护作用尚未有报道。近年研究表明, NOTCH、STAT3、PI3K/AKT等信号通路在急性肺损伤发生发展中发挥重要作用, 且这些信号通路受多种细胞因子的调控, 如白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 等。间充质干细胞来源外泌体作为包含有这些细胞因子的囊泡, 可能通过这些信号通路发挥调控作用, 需要进一步的实验来证明。

2.3.2 间充质干细胞来源外泌体通过转移RNA对急性肺损伤发挥保护作用 研究者发现功能性RNA可以通过外泌体进行转移这一具有里程碑意义的发现之后^[38], 许多研究显示外泌体在细胞间通讯中发挥着传递RNA的

生物学作用。特定RNA(包括mRNA、siRNA、miRNA等)选择性装载到外泌体中, 可以保护它免受细胞外核酸酶的影响, 从而延长其半衰期并增强生物活性, 即外泌体作为其载体可实现细胞间遗传信息的交换和细胞间的通讯。

mRNA是由DNA一条链作为模板转录而来的, 其携带的遗传信息可以指导蛋白质的合成, 而siRNA则通过干扰RNA的方式调节基因的表达, 间充质干细胞来源外泌体将mRNA转移到受体细胞以翻译成蛋白质发挥相应的作用。Zhu等^[35]研究发现间充质干细胞来源外泌体通过转移表达角质形成细胞因子和血管生成素1蛋白的mRNA, 可以减少大肠埃希菌诱导的小鼠急性肺损伤的炎症反应(包括总白细胞、中性粒细胞、人巨噬细胞炎症蛋白2)。

miRNA是一类独特的小单链非编码RNA, 通过与靶mRNA中的互补序列结合, 抑制转录或降解特定mRNA的表达, 在调节细胞基因表达中发挥关键作用^[39]。外泌体作为转运miRNA的载体, 可通过转移miRNA来实现细胞间的通讯, 即将其递送至受体细胞(包括肺组织细胞或免疫细胞)来改变其生理状态, 从而参与肺部疾病的病理发生过程^[40]。Park等^[41]发现间充质干细胞处理急性肺损伤大鼠模型后肺组织表达不同的miRNA, 其中5种miRNA显著上调(miR-1843-3p, miR-323-3p, miR-183-5p, miR-182和miR-196b-3p), 4种miRNA显著下调(miR-547-3p, miR-301b-5p, miR-503-3p和miR-142-3p), 这些miRNA与炎症反应、细胞凋亡、细胞增殖和免疫应答有关, 它们的改变参与了间充质干细胞对急性肺损伤的免疫调节。miRNA-196b通过抑制粒细胞集落刺激因子对粒细胞的生成和分化起到负调节作用^[42], 而miRNA-503和miRNA-142则起到诱导细胞凋亡的作用^[43], 至于其他miRNA表达谱的改变对急性肺损伤的免疫调节机制尚未有研究报道。目前研究最多的参与急性肺损伤发生机制的miRNA是miR-146a, 其通过抑制IRAK-1和TRAF-6的表达来抑制NF- κ B信号通路(IRAK-1和TRAF-6的表达可以活化NF- κ B信号通路), 而NF- κ B信号通路在急性肺损伤的病理生理中发挥重要作用, 有研究表明NF- κ B信号通路的减弱可抑制炎性细胞因子的产生^[44-45], 从而减轻急性肺损伤模型中的炎症反应。Song等^[46]研究显示人脐血间充质干细胞来源外泌体通过转移miR-146a在治疗小鼠脓毒症肺损伤中发挥免疫调节作用, 并且证明了使用促炎因子预处理间充质干细胞, 能使miR-146a选择性装载至间充质干细胞来源外泌体中。此外, 有研究显示miR-21也参与了肺炎、肺动脉高压等肺部疾病的发生发展^[47], 上调miR-21在参与肺组织再生修复的同时具有抗炎特性, 并且miR-21存在于间充质干细胞来源外泌体, 因此利用间充质干细胞来源外泌体转运miR-21可在急性肺损伤中发挥修复作用,

但其中一些具体机制仍不清楚,尚需要后续的实验进一步验证。同样地,如前述Park等^[41]研究中提到的间充质干细胞处理急性肺损伤大鼠模型后肺组织miRNA表达谱的改变,是否也由间充质干细胞来源外泌体介导转移至肺组织来发挥相应的保护作用,目前尚未有实验证明。

然而,间充质干细胞来源外泌体中含有的功能性RNA并非随机装载,而是间充质干细胞通过某些调节机制选择性包装特定的RNA分泌至受体细胞。Basu等^[48]认为募集到外泌体中的RNA的选择是高度精确的,并且由蛋白质调节。目前,关于间充质干细胞来源外泌体中装载的功能性RNA种类选择的精确机制尚不明确,需要更多的研究来了解间充质干细胞来源外泌体是如何选择性地募集和包装不同种类的RNA。

2.3.3 间充质干细胞来源外泌体可能通过转移线粒体DNA对急性肺损伤发挥保护作用 Spees等^[49]研究将人间充质干细胞与具有缺陷或缺失线粒体DNA的A549细胞共培养后,发现一些A549细胞获得了功能性线粒体,恢复了细胞的有氧呼吸,该实验首次证明了线粒体的转移可能使受损靶细胞获益。在急性肺损伤发生发展中,由线粒体产生的活性氧会导致线粒体DNA转录缺陷和线粒体功能障碍,而线粒体的异常会影响细胞产能功能障碍,加重急性肺损伤的严重程度^[50],因此,改善线粒体功能可能是急性肺损伤治疗的重要手段。间充质干细胞被认为是参与转移线粒体的供体细胞之一,大量的实验证实了线粒体转移在干细胞治疗中的重要性^[51],尤其在靶细胞受损的情况下,这种转移作用特别明显。Morrison等^[52]和Islam等^[53]许多实验研究证实了从间充质干细胞到肺泡上皮细胞和内皮细胞的线粒体转移是间充质干细胞在急性肺损伤动物模型中发挥保护作用的重要机制。介导细胞间线粒体转移的途径除了最常提到的隧道纳米管道,还可以通过细胞外囊泡来进行转运,细胞外囊泡可含有线粒体片段、线粒体蛋白质和线粒体DNA,较大的细胞外囊泡甚至可以装载整个线粒体^[54],一般认为较大的细胞外囊泡具有转移线粒体的作用。但是,一些研究在大小为30-100 nm的外泌体中也检测到了线粒体DNA^[55-56]。除此之外,来自Hough等^[57]最新研究证实了气道髓源调节细胞来源外泌体能够将线粒体转移至T细胞,改变慢性炎症性疾病如哮喘中的T细胞分化和功能。因此,间充质干细胞来源外泌体可能也作为转移线粒体DNA在急性肺损伤治疗中发挥作用。Islam等^[53]通过体内实验证实了骨髓来源间充质干细胞对急性肺损伤的保护是通过线粒体由间充质干细胞转移至肺泡上皮细胞而发挥作用的,这一过程是由细胞外囊泡介导的。由间充质干细胞转移来的线粒体可以增加肺泡内ATP的浓度和肺泡清除率,修复细胞活力,从而对肺组织起到保护作用。但文中未对细胞外囊泡作进一

步的鉴定,还需要进一步的实验证明间充质干细胞来源外泌体具有转移线粒体的能力。

3 间充质干细胞来源外泌体治疗急性肺损伤的应用前景与挑战 Application prospects and challenges of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of acute lung injury

如上所述,越来越多的实验研究发现间充质干细胞来源外泌体可以预防早期缺氧引起的肺部炎症,修复内皮屏障,减轻肺水肿,恢复肺泡清除率,改善急性肺损伤患者的呼吸功能。与直接输注间充质干细胞或单分子药物治疗相比,直接输注间充质干细胞来源外泌体优越性主要表现在^[58]:①间充质干细胞来源外泌体来自细胞并且可以被设计为非免疫原性,可以避免肿瘤转化和免疫应答激活;②间充质干细胞来源外泌体作为一种新型的无细胞疗法,其尺寸小可避免夹带在过滤器官中,因而能深入到大多数组织内部;③有良好的生物稳定性,可被修饰并装载感兴趣的药物;④保持良好的生物相容性,可携带多种类型的生物分子;⑤可对其表面特异性受体或抗体进行加工,以实现将治疗性的分子靶向送至目的细胞等。显然,间充质干细胞来源外泌体的这些特性使得其在治疗急性肺损伤中存在良好的应用前景。

然而,要使间充质干细胞来源外泌体能够真正走进临床应用,仍然有不少挑战。首先,关于间充质干细胞来源外泌体治疗急性肺损伤的研究证据几乎全部来自临床前期研究,而且多数是以细胞或基因水平研究为主,其应用于人体后是否仍有类似的治疗作用,尚不得而知;其次,关于间充质干细胞来源外泌体治疗急性肺损伤的作用机制研究仍然相当有限,仍存在许多不明确的地方,文中根据现有的研究总结了3个间充质干细胞来源外泌体发挥治疗急性肺损伤作用的3个主要作用机制,然而,间充质干细胞来源外泌体是通过单一机制还是联合机制发挥作用仍不清楚,且是否存在更多的作用机制还需要更多的研究予以解答;最后,如何大规模地生产出适用于治疗急性肺损伤的同质化的间充质干细胞来源外泌体是另一挑战,考虑到不同组织来源、培养条件或基因修饰条件下间充质干细胞所产生的外泌体具有不同特点,如何确定用于治疗急性肺损伤的最佳条件,同样是其应用于临床前需要解决的问题。

总之,较多相关研究显示了间充质干细胞来源外泌体治疗急性肺损伤的巨大前景,有望成为急性肺损伤的有效治疗手段,但距离其真正应用于临床仍有不少困难,需要更多研究进行更多探索。

致谢: 该实验主要在中山大学附属第一医院转化医学实验室完成,在此表示感谢。

作者贡献: 通讯作者负责文章的写作校对与项目指导,第一作者负责综述构思设计、文献收集和分析总结。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81670066)”“广东省省级科技计划项目(2016A020216009, 2014A020212151)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA*. 2016;315(8):788-800.
- [2] Sweeney RM, McAuley DF. Acute respiratory distress syndrome. *Lancet*. 2016;388(10058):2416-2430.
- [3] 凌亚豪,魏金锋,王爱平,等.急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征发病机制的研究进展[J].*癌变·畸变·突变*,2017,29(2): 151-154.
- [4] Chang YS, Oh W, Choi SJ, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transplant*. 2009; 18(8):869-886.
- [5] Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annu Rev Physiol*. 2015;77:13-27.
- [6] Aslam M, Baveja R, Liang OD, et al. Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180(11):1122-1130.
- [7] Lavoie JR, Rosu-Myles M. Uncovering the secreted of mesenchymal stem cells. *Biochimie*. 2013;95(12):2212-2221.
- [8] Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1981;645(1):63-70.
- [9] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412-9420.
- [10] Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*. 1998;4(5): 594-600.
- [11] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200(4):373-383.
- [12] Clayton A, Turkes A, Navabi H, et al. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 16): 3631-3638.
- [13] Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 2010;4(3):214-222.
- [14] van Niel G, Raposo G, Candalh C, et al. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*. 2001; 121(2):337-349.
- [15] Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.
- [16] Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J*. 2011;30(17):3481-3500.
- [17] Kim HS, Choi DY, Yun SJ, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res*. 2012;11(2):839-849.
- [18] Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annu Rev Physiol*. 2015;77:13-27.
- [19] Choi DS, Kim DK, Kim YK, et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*. 2013;13(10-11):1554-1571.
- [20] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;Chapter 3:Unit 3.22.
- [21] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27031.
- [22] 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. *Stem Cell Res*. 2013;10(3):301-312.
- [23] Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2012; 126(22):2601-2611.
- [24] Chen J, Chen LA. LATE-BREAKING ABSTRACT: Human mesenchymal stem cell exosomes attenuates sepsis-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK-NF-κB pathway. *Eur Respir J*. 2015; 46:OA4471.
- [25] Bruno S, Grange C, Collino F, et al. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS One*. 2012;7(3): e33115.
- [26] Chen W, Lin YJ, Zhou XY, et al. Rosiglitazone protects rat liver against acute liver injury associated with the NF-κB signaling pathway. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94(1): 28-34.
- [27] Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci Rep*. 2013;3:1197.
- [28] Herold S, Gabrielli NM, Vadasz I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305(10):L665-681.
- [29] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(21):2063.

- [30] Lee JW, Krasnodembskaya A, McKenna DH, et al. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells in ex vivo human lungs injured with live bacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(7):751-760.
- [31] Tan CY, Lai RC, Wong W, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Res Ther*. 2014; 5(3):76.
- [32] Zhang S, Chu WC, Lai RC, et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016; 24(12):2135-2140.
- [33] Qin Y, Wang L, Gao Z, et al. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo. *Sci Rep*. 2016;6:21961.
- [34] Zhang Y, Chopp M, Zhang ZG, et al. Systemic administration of cell-free exosomes generated by human bone marrow derived mesenchymal stem cells cultured under 2D and 3D conditions improves functional recovery in rats after traumatic brain injury. *Neurochem Int*. 2017;111:69-81.
- [35] Zhu YG, Feng XM, Abbott J, et al. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem Cells*. 2014;32(1):116-125.
- [36] Ionescu L, Byrne RN, van Haaften T, et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(11):L967-977.
- [37] 杨尧,朱耀斌,李志强,等.间充质干细胞外泌体对大鼠急性肺损伤的保护作用[J].中华实用诊断与治疗杂志,2017,31(7): 628-631.
- [38] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6): 654-659.
- [39] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-524.
- [40] Kubo H. Extracellular Vesicles in Lung Disease. *Chest*. 2018;153(1):210-216.
- [41] Park J, Jeong S, Park K, et al. Expression profile of microRNAs following bone marrow-derived mesenchymal stem cell treatment in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Exp Ther Med*. 2018;15(6):5495-5502.
- [42] Velu CS, Baktula AM, Grimes HL. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. *Blood*. 2009;113(19): 4720-4728.
- [43] Chang SW, Yue J, Wang BC, et al. miR-503 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells by targeting E2F3. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10): 12853-12860.
- [44] Zeng Z, Gong H, Li Y, et al. Upregulation of miR-146a contributes to the suppression of inflammatory responses in LPS-induced acute lung injury. *Exp Lung Res*. 2013;39(7): 275-282.
- [45] Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(11):837-848.
- [46] Song Y, Dou H, Li X, et al. Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of Interleukin-1 β -Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis. *Stem Cells*. 2017; 35(5):1208-1221.
- [47] Tan KS, Choi H, Jiang X, et al. Micro-RNAs in regenerating lungs: an integrative systems biology analysis of murine influenza pneumonia. *BMC Genomics*. 2014;15:587.
- [48] Basu J, Ludlow JW. Exosomes for repair, regeneration and rejuvenation. *Expert Opin Biol Ther*. 2016;16(4):489-506.
- [49] Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, et al. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(5):1283-1288.
- [50] Schumacker PT, Gillespie MN, Nakahira K, et al. Mitochondria in lung biology and pathology: more than just a powerhouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014; 306(11):L962-L974.
- [51] Yamada M, Emmanuele V, Sanchez-Quintero MJ, et al. Genetic Drift Can Compromise Mitochondrial Replacement by Nuclear Transfer in Human Oocytes. *Cell Stem Cell*. 2016; 18(6):749-754.
- [52] Morrison TJ, Jackson MV, Cunningham EK, et al. Mesenchymal Stromal Cells Modulate Macrophages in Clinically Relevant Lung Injury Models by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(10):1275-1286.
- [53] Islam MN, Das SR, Emin MT, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med*. 2012;18(5): 759-765.
- [54] Torralba D, Baixauli F, Sánchez-Madrid F. Mitochondria Know No Boundaries: Mechanisms and Functions of Intercellular Mitochondrial Transfer. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:107.
- [55] Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, et al. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res*. 2010;316(12): 1977-1984.
- [56] Guescini M, Genedani S, Stocchi V, et al. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)*. 2010;117(1):1-4.
- [57] Hough KP, Trevor JL, Strenkowski JG, et al. Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox Biol*. 2018;18:54-64.
- [58] Riazifar M, Pone EJ, Lötvall J, et al. Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2017;57:125-154.