

· 综述 ·

干细胞源外泌体——心肌细胞损伤修复的新工具

于芃¹, 曹丰^{1,2*}

(¹空军军医大学第一附属医院心血管内科, 西安 710032; ²解放军总医院国家老年疾病临床医学研究中心, 北京 100853)

【摘要】 外泌体是胞内来源的胞外小泡, 作为细胞间通讯的关键介质, 通过富含的多种蛋白质及 miRNA 等遗传物质调控细胞凋亡、免疫应答、炎症反应等过程发挥生物学作用。干细胞(SC)疗法在功能性心肌细胞损伤修复中表现了独特的优势。研究发现间充质干细胞(MSC)源外泌体可以提高心肌细胞在缺血/再灌注损伤后的生存能力, 这表明 MSC 在心肌细胞损伤恢复中发挥的有益作用可能与其分泌的外泌体有关。因此, 外泌体疗法可能是心肌细胞损伤修复的一个无细胞治疗策略的新方向。本文主要对 SC 源外泌体在心肌细胞损伤修复治疗中发挥的作用进行综述。

【关键词】 急性心肌梗死; 干细胞源外泌体; 心血管疾病

【中图分类号】 R541.4

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.03.045

Stem cell-derived exosomes — a new tool for repairing myocardial injury

YU Peng¹, CAO Feng^{1,2*}

(¹Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; ²National Clinical Research Center for Geriatric Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Exosomes, as the key mediators of intercellular communication, are extracellular vesicles derived from intracellular sources. They play various physiological roles in apoptosis regulation, immune responses, inflammation and other processes *via* their containing proteins and genetic materials, such as microRNAs. Stem cell therapy shows unique advantages in the repairing of myocardial cell injury. Evidence indicates that mesenchymal stem cell (MSC)-derived exosomes improve the viability of myocardial cells after ischemia/reperfusion injury, which suggests that the beneficial effects of the stem cells in the recovery may be associated with their secretion of exosomes. Therefore, exosome therapy might be a new direction for cell-free therapy strategy in myocardial repair. In this review, we summarized the roles of stem cell-derived exosomes in the repair of myocardial injury.

【Key words】 myocardial infarction; stem cells-derived exosomes; cardiovascular diseases

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81630058).

Corresponding author: CAO Feng, E-mail: fengcao8828@163.com

美国心脏协会(American Heart Association, AHA)《心脏病与卒中统计数据(2018版)》报道^[1], 全球每年因心血管疾病(cardiovascular diseases, CVDs)死亡的人数比所有癌症和慢性下呼吸道疾病的总和还要多。CVDs最严重的形式是急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI), 死亡率高达12%^[2]。AMI后生存患者中, 缺血性损伤使大量功能心肌细胞死亡, 造成心力衰竭。近年来, 许多研究尝试寻找再生功能性心肌细胞的新方法。主要是通过各种刺激, 使梗死心肌细胞再生或提供能够产生新的心肌组织来替代受损组织的细胞, 达到恢复心脏功能的最终目标。

干细胞(stem cell, SC)疗法在功能性心肌细胞再生中表现出独特的优势。研究发现缺血预处理间的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)分泌的外泌体中富含微小核糖核酸22(micro ribonucleic acid 22, mi-RNA22), 通过旁分泌的形式作用于缺血/再灌注损伤后的心肌细胞, 与甲基 CpG 结合蛋白2(methyl CpG binding protein 2, Mecp2)结合, 发挥抗细胞凋亡、减轻心肌纤维化的作用。这表明 MSC 在心肌细胞损伤恢复中发挥的有益作用可能与其分泌外泌体有关^[3]。近年来, 许多科学研究确定了外泌体在分子水平诊断疾病、药物递送和疾病治疗的作用。并证实外泌体在 CVDs 治疗中可以通

收稿日期: 2018-10-28; 接受日期: 2018-11-20

基金项目: 国家自然科学基金(81630058)

通信作者: 曹丰, E-mail: fengcao8828@163.com

过信号传递途径激活内源性修复^[4]。因此,外泌体疗法可能是修复受损心肌、再生功能性心肌细胞的一个新方向。主要通过携带功能性 miRNAs 来调控细胞间的信息传递,达到再生功能性心肌细胞的目的^[5]。本文主要对外泌体在心肌细胞损伤修复治疗中的作用进行综述。

1 外泌体的生物学特性

1.1 外泌体的生物发生

活细胞能够分泌多种膜状囊泡,主要包括外泌体(40~100 nm)、微泡(200~1 000 nm)及凋亡小体(500~5 000 nm)^[6]。膜状囊泡不仅依据直径分类,其生成机制也不同。其中,外泌体的生物发生过程如下:在外界刺激下细胞通过内吞作用形成早期核内体的过程中,可以将细胞质中小蛋白质、DNA、miRNA 包裹在内,形成晚期核内体,此时也称为多囊泡体;随后,晚期核内体与细胞膜融合,通过胞吐过程释放出携带各种分子、蛋白质、基因、miRNAs 和酶的外泌体^[7]。

1.2 外泌体:细胞间通讯信使

外泌体在释放到体液循环后,可以向靶细胞迁移,一旦被靶细胞吸收,外泌体就可以将从源细胞携带的各种分子和 miRNA 等转移到靶细胞。细胞分泌的所有膜状囊泡中,外泌体中 miRNA 最丰富,因此,外泌体可以作为将 miRNA 转移到靶细胞的一种转运体。

外泌体可以通过转移 miRNAs 等细胞活性因子至受体细胞调控细胞通路^[8]。Li 等^[9]研究发现,在动脉粥样硬化进程中,凝血酶激活的血小板源外泌体中,miRNA-223、miRNA-21 水平明显升高,通过抑制细胞间黏附因子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达,发挥内皮保护作用,减少血栓形成。Wang 等^[10]研究发现,心肌梗死后小鼠巨噬细胞源外泌体中 miRNA-155 水平明显上调,通过抑制 miRNA-155 的表达,可以减少心肌损伤期间成纤维细胞增殖并抑制炎症。因此,外泌体具有转移非编码 RNA(包括 miRNA 和 lncRNA)从源细胞到受体细胞的能力,进而调节受体细胞表型及蛋白质的表达,在心血管事件的发生发展中发挥重要作用。

1.3 外泌体:CVDs 的一种新型生物标志物

在各种病理生理条件下,细胞分泌的外泌体包含不同种类的 miRNAs、RNAs、蛋白质及脂质成分,使其具有成为潜在的疾病诊断生物标志物的能力。目前,应用生物信息学的方法可以鉴定外泌体中含有的大量 miRNAs。许多研究表明急性心肌梗死和

动脉粥样硬化患者血液中提取的外泌体中存在特异性的 miRNAs。

Boulanger 等^[11]指出,在冠心病患者中,循环外泌体含量明显增多,特别是富含 miRNA-199a 和 miRNA-126 的亚群体,这说明外泌体具有成为冠心病生物标志物的潜力。同时,Shalaby 等^[12]通过对不稳定型心绞痛、非 ST 段抬高型心肌梗死及非心脏源性胸痛患者进行血清 miRNA 分析发现,与非心脏源性胸痛患者相比,不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高型心肌梗死患者的血清中 miRNA-499 和 miRNA-210 表达水平显著增加,且与疾病 3 h 内的发展速度呈正相关,说明 miRNA-499 和 miRNA-210 可以作为潜在的急诊诊断急性冠脉综合征并预测风险程度的可靠生物标志物。

Bi 等^[13]研究发现,在急性冠脉综合征患者血清外泌体中,miRNA-208a 的表达水平明显增加,其表达量与患者 Killip 分级、肌酸激酶同工酶 MB(creatinine kinase isoenzymes MB, CK-MB)峰值、心肌肌钙蛋白(cardiac troponin, cTn)峰值呈正相关。Kaplan-Meier 生存分析显示,miRNA-208a 高表达患者的 1 年生存率显著降低。同时,在 AMI 患者血清外泌体中多种 miRNAs 与梗死后心力衰竭的发生密切相关。Matsumoto 等^[14]在研究中指出,在已经发生心力衰竭和心室重构的 AMI 患者中,血清外泌体源 miRNA-192、miRNA-194 和 miRNA-34a 均明显增高。

2 SC 源外泌体在心肌损伤修复中的作用

不同种类的 SC 源外泌体可以传递不同的生物学信息,有心脏保护功能的外泌体可以来自骨髓 MSC、胚胎干细胞、造血干细胞等。目前已经尝试了移植 SC 或基于 SC 的细胞移植疗法来治疗心血管疾病的各种策略^[15]。研究发现在修复或再生受损组织的过程中,起主要作用的并不是移植细胞本身,而是移植细胞的旁分泌因子。最近,许多研究证实了关于外泌体及其内 miRNAs 在心血管系统中的细胞间通讯中的重要作用^[16]。

骨髓 MSC 具有免疫抑制特性,而单独应用 MSC 源外泌体可以避免发生免疫排斥反应,增强对受损心肌细胞的保护作用。Arslan 等^[17]发现对 AMI 小鼠心肌内注射 MSC 源外泌体后,梗死面积减少 45%,并减轻全身炎症。同时,Ju 等^[18]研究表明,心肌内注射 MSC 源外泌体可促进小鼠心肌梗死模型中心肌细胞增殖,促进血管生成,缩小梗死范围。这都说明在心肌梗死早期应用 MSC 源外泌体治疗可以起到心肌保护作用。人脐带 MSC 源外泌体通过保

护心肌细胞免于凋亡,同时促进细胞增殖和血管生成来对缺血性损伤后的心脏进行修复,而没有外泌体的人脐带 MSC 对心脏功能恢复几乎没有促进作用,提示人脐带 MSC 对心肌的修复是由外泌体介导的^[19]。

Khan 等^[20]在胚胎 SC 源外泌体对梗死后心肌的保护作用的研究中发现,胚胎 SC 源外泌体具有促进血管生成、提高心肌细胞存活、恢复心脏功能的作用。进一步研究发现,胚胎 SC 源外泌体中富含 miRNA-294,其主要作用靶点为心脏祖细胞,促进心脏祖细胞的增殖与存活。

3 SC 源外泌体在 CVDs 诊疗中的新作用

在急性、慢性缺血模型和急性缺血再灌注损伤模型中,外泌体在大幅度缩小梗死面积、减少纤维化和相关的病理重塑、刺激血管生成和改变免疫功能等保护受损心肌方面发挥明显作用^[21]。

3.1 SC 源外泌体:CVDs 的一种新型治疗方法

MSC 源外泌体在免疫调节和心脏保护方面有着与 MSC 相同的特性^[22]。在心脏再生研究中,使用 SC 源外泌体替代 SC 治疗有以下几个优点:(1)这种新疗法可以为靶细胞提供活性分子,如 mRNA,miRNA 和蛋白质等,同时,这些分子可以通过对源细胞操纵等外部手段进行修饰;(2)相比输注 SC,单独输注 SC 源外泌体可以降低免疫排斥反应。美中不足的是,由于外泌体分离提纯过程比较复杂且效率较低,同时缺乏再生能力,半衰期短,外泌体可能仅具有短期益处。Takahashi 等^[23]研究表明,小鼠黑色素瘤 B16-BL6 细胞外泌体很快从血液循环中消失,半衰期约为 2 min,这也限制了其治疗疾病的能力。

3.2 SC 源外泌体:CVDs 治疗的一种新型药物载体

外泌体是细胞自然分泌的膜性囊泡,具有稳定性、生物相容性、生物屏障渗透性、低毒性和低免疫原性。越来越多的证据表明,外泌体含有的蛋白质、脂质、DNA、miRNA 等可以作为信号分子的天然载体,通过旁分泌方式介导细胞间信息传递,因此,可以通过修饰将特定的生物活性分子转移到靶细胞,在心血管疾病的治疗中发挥重要作用^[24]。通过对 SC 源外泌体的个性化修饰,可以使其在疾病治疗中发挥作用,成为一种具有广阔应用前景的新型药物载体。

基于外泌体的治疗方法是新兴的一种纳米治疗手段。其生物学基础是将特定 miRNAs 整合到外泌体中,传递给靶向细胞,促进血管生成和心肌再生,发挥保护心脏、减少炎症和抑制动脉粥样斑块形成

的作用。同时,外泌体可以递送一些蛋白调节剂(如 Shh 蛋白调节剂、形态发生蛋白等),促进心肌梗死后心脏血管再生,发挥抗凋亡和血管保护作用^[25]。

在目前研究中,使用外泌体作为纳米载体的主要途径包括 3 种。(1)直接对源细胞外泌体加载治疗性药物;(2)通过对源细胞进行药物处理,使外泌体中含有治疗性药物;(3)利用活性化合物转染源细胞,上调其分泌外泌体中某种目标分子的含量^[26]。然而,到目前为止,这些方法都没有在疾病治疗的临床转化中得到验证。

4 总结与展望

SC 源外泌体的研究为心肌修复提供了一种新的无细胞治疗手段,同时为心血管疾病治疗开拓了新的领域。外泌体对生理和病理过程的影响,以及对心脏再生的作用机制还需要进一步的研究,以证实它们既是疾病诊断的生物标志物,也是治疗心血管疾病的不错选择。大量实验表明 SC 源外泌体对心血管疾病具有极大的治疗潜力,可以克服单纯 SC 治疗的不足,为心脏再生领域提供了一把利器。但是 SC 源外泌体治疗心血管疾病的临床转化仍处于起步阶段,还需进一步探索。

【参考文献】

- [1] Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2018, 137(12): e67–e492. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000558.
- [2] Kristensen SD, Laut KG, Fajadet J, *et al.* Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction 2010/2011: current status in 37 ESC countries [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(29): 1957–1970. DOI: 10.1093/eurheartj/ehf529.
- [3] Feng Y, Huang W, Wani M, *et al.* Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Meeep2 via miR-22[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88685. DOI: 10.1371/journal.pone.0088685.
- [4] Yellon DM, Davidson SM. Exosomes: nanoparticles involved in cardioprotection? [J]. *Circ Res*, 2014, 114(2): 325–332. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300636.
- [5] Shao L, Zhang Y, Lan B, *et al.* miRNA-sequence indicates that mesenchymal stem cells and exosomes have similar mechanism to enhance cardiac repair[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 4150705. DOI: 10.1155/2017/4150705.
- [6] Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles[J]. *Traffic*, 2018, 19(5): 319–327. DOI: 10.1111/tra.12558.
- [7] Alenquer M, Amorim MJ. Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection[J]. *Viruses*, 2015, 7(9): 5066–5083. DOI: 10.3390/v7092862.

- [8] Pan JH, Zhou H, Zhao XX, *et al.* Role of exosomes and exosomal microRNAs in hepatocellular carcinoma: potential in diagnosis and antitumor treatments (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1809–1816. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3383.
- [9] Li J, Tan M, Xiang Q, *et al.* Thrombin-activated platelet-derived exosomes regulate endothelial cell expression of ICAM-1 *via* microRNA-223 during the thrombosis-inflammation response [J]. *Thromb Res*, 2017, 154: 96–105. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.04.016.
- [10] Wang C, Zhang C, Liu L, *et al.* Macrophage-derived mir-155-containing exosomes suppress fibroblast proliferation and promote fibroblast inflammation during cardiac injury [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(1): 192–204. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.09.001.
- [11] Boulanger CM, Loyer X, Rautou PE, *et al.* Extracellular vesicles in coronary artery disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(5): 259–272. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.7.
- [12] Shalaby SM, El-Shal AS, Shoukry A, *et al.* Serum miRNA-499 and miRNA-210: a potential role in early diagnosis of acute coronary syndrome [J]. *IUBMB Life*, 2016, 68(8): 673–682. DOI: 10.1002/iub.1529.
- [13] Bi S, Wang C, Jin Y, *et al.* Correlation between serum exosome derived miR-208a and acute coronary syndrome [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(3): 4275–4280.
- [14] Matsumoto S, Sakata Y, Suna S, *et al.* Circulating p53-responsive microRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2013, 113(3): 322–326. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301209.
- [15] Sanina C, Hare JM. Mesenchymal stem cells as a biological drug for heart disease; where are we with cardiac cell-based therapy? [J]. *Circ Res*, 2015, 117(3): 229–233. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.306306.
- [16] Bang C, Batkai S, Dangwal S, *et al.* Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(5): 2136–2146. DOI: 10.1172/JCI70577.
- [17] 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 [J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3): 301–312. DOI: 10.1016/j.scr.2013.01.002.
- [18] Ju C, Shen Y, Ma G, *et al.* Transplantation of cardiac mesenchymal stem cell-derived exosomes promotes repair in ischemic myocardium [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2018, 11(5): 420–428. DOI: 10.1007/s12265-018-9822-0.
- [19] Zhao Y, Sun X, Cao W, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells relieve acute myocardial ischemic injury [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 761643. DOI: 10.1155/2015/761643.
- [20] Khan M, Nickoloff E, Abramova T, *et al.* Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2015, 117(1): 52–64. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305990.
- [21] Davidson SM, Yellon DM. Exosomes and cardioprotection — a critical analysis [J]. *Mol Aspects Med*, 2018, 60: 104–114. DOI: 10.1016/j.mam.2017.11.004.
- [22] Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy [J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 359. DOI: 10.3389/fphys.2012.00359.
- [23] Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H, *et al.* Visualization and *in vivo* tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection [J]. *J Biotechnol*, 2013, 165(2): 77–84. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.03.013.
- [24] Loyer X, Vion AC, Tedgui A, *et al.* Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases [J]. *Circ Res*, 2014, 114(2): 345–353. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300858.
- [25] Soleti R, Martinez MC. Sonic hedgehog on microparticles and neovascularization [J]. *Vitam Horm*, 2012, 88: 395–438. DOI: 10.1016/B978-0-12-394622-5.00018-3.
- [26] Batrakova EV, Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery [J]. *J Control Release*, 2015, 219: 396–405. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.07.030.

(编辑: 门可)