

间充质干细胞来源的胞外囊泡的研究进展

杨 佳 范 恒

摘 要 胞外囊泡(EVs),曾经被误认为是细胞垃圾碎片,近年来越来越多的研究发现它在细胞间信号传递中起着至关重要的作用,它通过介导配体-受体反应或传递胞质成分(蛋白、mRNA 和 microRNA)等方式与靶细胞发生联系而引起越来越多的关注。近年来研究发现间充质干细胞(MSCs)来源的 EVs 在多种疾病中发挥着重要的生物学作用,有可能成为替代干细胞治疗的新型物质。随着对 EVs 研究的深入,将来有望利用其特有的作用方式阐述疾病的发生、发展并研发新型的药物载体,达到诊断和治疗更多疾病的目的。现就 EVs 的生物学特性、与靶细胞的作用方式及 MSCs 来源的 EVs 在多种疾病中的治疗作用的研究进展做一综述。

关键词 胞外囊泡 间充质干细胞 治疗作用。

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.046

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种最初在骨髓中发现的来源于中胚层和外胚层的多能干细胞,因其具有多向分化潜能,向受损组织定向迁徙,免疫调控,自我更新等特点而日益受到人们的关注。由于其在多种器官(心、肾、肺、肝等)及组织损伤中的强大修复作用,MSCs 正被应用于越来越多的科研实验探索和临床观察研究中。但是,在干细胞局部或全身移植实验中,只有很少一部分 MSCs 会最终定植于受损组织,这意味着对于受损组织的保护作用可能并不是因为它的有限的再分化作用,而是旁分泌作用^[1]。这个设想为替代细胞治疗策略的发展提供了新的治疗视角。虽然已经证实 MSCs 可以分泌多种细胞因子和生长因子,但是这些因子似乎不足以解释 MSCs 强大的修复能力^[2]。胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一种曾经被误认为是细胞垃圾碎片的物质,近年来因其强大的生物学作用重新进入了科学家的视线。研究发现它可以介导细胞之间的信息传递,是细胞与细胞交流的重要物质。

一、EVs 的生物学特点

EVs 是大多数细胞在自然条件下都可以产生的一种膜性囊泡,根据大小和来源的不同,可以大致分为 3 类^[3]: ①凋亡小体(apoptotic bodies) $\phi 800 \sim 5000\text{nm}$,在细胞产生程序凋亡时产生;②微囊泡或脱落囊泡(microvesicles or shedding vesicles, MVs) $\phi 50 \sim$

1000nm,从细胞质膜上脱落而释放产生, MVs 产生过程与胞质内钙离子浓度的增加和细胞膜骨架的重构有关;③外泌体(exosomes, EXOs) $\phi 40 \sim 100\text{nm}$,其来源被认为是与内吞作用相关,由多囊体分泌,与细胞骨架的激活和钙离子浓度相关。由于这 3 种不同的囊泡在物理特性和生化组成上存在许多的相似之处,这也导致很难将它们完全精确的分离开来。在实验条件下,一般采用不同的离心力将它们分离,200 ~ 1500g 用来沉淀细胞和细胞碎片,10000 ~ 20000g 用来沉淀大小在 100 ~ 800nm 的囊泡(MVs),100000 ~ 2000000g 用来沉淀直径 < 100nm 的囊泡(EXOs)。

二、EVs 影响其靶细胞的机制

1. 其表面的配体与靶细胞的受体结合继而激活或抑制靶细胞内的转导通路:实际上, EVs 表达多种受体和表面分子,包括组织因子(TF),肿瘤坏死因子(TNF), MHC I 类/II 类分子和 CCR5 趋化因子受体^[4-6]等。通过其表面携带的配体与靶细胞的受体结合并使其激活。比如 MVs 表面表达细胞间黏附分子 ICAM1,可以与表达在 CD8⁺ 的树突状细胞膜上的淋巴细胞功能相关分子 LFA1 (ICAM1 的一个配体)相互作用,从而激活 T 细胞^[7]。 MVs 表达跨膜 Notch 配体 Dll4,通过与表达在内皮细胞和神经细胞上的 Notch 受体相互作用而分别刺激血管再生和轴突生长^[8]。此外, MVs 与靶细胞融合的过程中,还可以在细胞间传递受体或具有生物活性的脂质。比如趋化因子受体 CCR5 或 CXCR4 可以从 T 细胞传递至非淋巴系统细胞,使其更容易被 HIV 感染^[9,10]。

2. 通过传递胞内蛋白来调节靶细胞功能: EVs 在

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院
中西医结合科

通讯作者:范恒,教授,主任医师,电子信箱:fanheng009@aliyun.

com

形成过程中可以将母细胞胞质中的成分包裹进去,然后传递到靶细胞中,使其具有新的生物学功能或遗传特征。内皮细胞来源的 MVs 可以通过传递促血管生成因子^[11](例如 VEGF、bFGF、PDGF、aFGF、TNF- α 和 TGF- β 等)和基质金属蛋白酶(MMP9、MMP2)^[12]来促进血管生长。此外,由脂多糖刺激的单核细胞产生的 MVs,可以通过传递 caspase-1 诱导靶细胞凋亡^[13]。所以, EVs 介导的生长因子,受体,促或抗凋亡分子的传递,使不同种类细胞间的对话成为了可能。

3. 介导 mRNA 信息的水平传递: Bruno 等^[14]证明人 MSCs 来源的 MVs 在体外实验中可以刺激肾小管上皮细胞(TECs)的增殖和抗凋亡,在体内实验中可以促进由丙三醇导致的重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠模型急性肾损伤的恢复。经核糖核酸酶(RNase)处理过的 MVs 无论在体内还是体外实验中都失去了作用。Ratajczak 等^[15]证明小鼠胚胎干细胞来源的 MVs 可以通过向靶细胞传递多能 mRNA 转录因子重新编程造血祖细胞。同样的,用 RNase 预先处理 MVs,明显抑制了其生物活性,表明 MVs 来源的 mRNA 的重要作用。

4. 传递母细胞的 miRNAs 到靶细胞,发挥生物学作用: Jansen 等^[16]证明 MicroRNA-126 可以通过 MVs 传递至人冠状动脉内皮细胞,通过靶蛋白 SPRED1(sprouty-related EVH1 domain-containing protein 1)促进血管内皮细胞的修复。而 MicroRNA-126 基因敲除的 MVs 则失去了这种促进细胞迁徙和增殖的作用。EXOs 携带的 microRNA 可以通过细胞对 EXOs 的直接摄取而在不同细胞系间传递。与非转移性乳腺癌细胞或良性乳腺癌细胞相比, MiR-10b 在转移性乳腺癌细胞(MDA-MB-231)中高表达。非转移性乳腺癌细胞经过摄入来源于 MDA-MB-231 细胞的含有 MiR-10b 的 EXOs 后,其 HOXD10 和 KLF4 等靶基因被明显抑制并出现侵袭能力^[17]。Collino 等^[18]研究发现,通过基因芯片对人 MSCs 筛查 365 种已知的成熟的 microRNA 发现有 105 种 microRNA 表达于 MSCs 及其 MVs 中,7 种 microRNA 只出现于细胞中,3 种 microRNA 仅在 MVs 中被检测到,说明 EVs 内的 miRNA 不是随机聚集的,其特定物质的聚集可能受一种特殊机制调控。

三、间充质干细胞来源的 EVs 应用

EVs 可以通过传递生物活性物质而影响受体细胞,这种作用在组织再生和修复中显现的尤为明显。

EVs 是一种非常有潜力的治疗工具,用 EVs 取代干细胞将成为一种新的治疗策略。

1. 肾损伤: Bruno 等^[14]证明 MSCs 干预后的急性肾损伤(AKI)修复可能是通过 MVs 实施的,并发现 MSC-MVs 可以激活肾小管上皮细胞的增殖。与 MSCs 相比, MVs 可以模拟其母细胞的治疗作用来调节细胞再生,但是这个作用是 RNA 依赖的,因为 RNase 预处理后的 MVs 失去了其治疗作用。在小鼠 5/6 肾切除模型中, MSCs 来源的 MVs 可以修复肾损伤,接受 MVs 治疗的小鼠展示了更少的肾纤维化,间质淋巴细胞浸润和肾小管萎缩^[19]。MSC-MVs 还可以提高铂类化合物导致的致命性急性肾损伤 SCID 小鼠的存活率,在这个实验中,单次注射 MVs 缓解肾脏功能并且提高了存活率,但是不能阻止肾脏的慢性损伤以及尿素氮和血肌酐的持续增加,但是当多次注射 MVs 后,死亡率进一步下降,在 21 天时,存活小鼠的肾功能恢复正常,肾组织呈现正常形态学表现。这种保护机制主要是与 MVs 介导肾小管上皮细胞的抗坏死基因如 Bcl-2 的上调以及执行细胞凋亡的基因如 caspase-1 和 caspase-8 的下调有关^[20]。

2. 循环系统疾病: Lee 等^[21]研究发现在小鼠模型中, MSCs 来源的 EXOs 可以明显缓解由缺氧诱导的肺动脉高压。不仅如此,他们还发现静脉注射 MSC-EXOs 可以抑制血管重构和缺氧性肺动脉高压,其机制与抑制低氧诱导的 STAT3 信号通路的活化有关,而成纤维细胞来源的 EXOs 却没有这个功效。Lai 等^[22]发现胚胎干细胞来源的间充质干细胞(hESC-MSCs)产生的 EXOs 在心力衰竭缺血再灌注小鼠模型中可以显著减小心肌梗死面积。他们认为保护性 EXOs 的分泌是 MSCs 的一般属性也是主要功能。考虑到使用干细胞的伦理限制和巨大花费,以及生产 MVs 所需要的母细胞数量之大,其课题组用携带有原癌基因(MYC)的慢病毒转染 hESC-MSCs,产生了一种原癌基因永生化的 ESC-MSCs,并且证明这种细胞产生的 MVs 依然具有心血管保护作用^[23]。

3. 脑损伤: 静脉注射的 MSCs 通过分泌神经营养因子和血管生成因子展示出了对脑卒中脑损伤的治疗作用^[24]。有研究报道在大鼠脑卒中模型中 MSC-MVs 有促进组织修复的作用^[25]。除了这些营养因子之外, Xin 等发现在其保护作用中 EVs 介导的 miRNA 传递具有重要作用。之前研究已经证明, miR-133b 在中脑多巴胺能的神经元高表达,并调节着酪氨酸羟化酶和多巴胺的运输。Xin 等发现, MSCs 在治疗中

脑动脉闭塞模型的大鼠时,可以使同侧半球的 miR - 133b 水平升高。对轴突感应的影 响则与 EVs 介导的 miR - 133b 在 MSCs 与神经元细胞及星形细胞之间的传递密切相关。Xin 等还发现, MSCs 与中脑动脉闭塞的脑组织的接触可以提高其分泌的 EVs 中 miR - 133b 的水平,这个结果显示, MSCs 在损伤组织的刺激下可以提高具有治疗作用的 EVs 的分泌水平。

4. 免疫系统疾病: MSCs 来源的 MVs 与自身免疫性脊髓炎模型大鼠的脾单核细胞共培养,发现 MVs 抑制了自身免疫性淋巴细胞的增殖并且促进 IL - 10、TGF - β 等抗炎因子的分泌,此外,流式细胞学检测发现 MSC - MVs 还是 MSCs 特异性耐受分子 (PD - L1、Gal - 1 和 TGF - β) 的载体。这些结果显示 MSC - EVs 是引起外周免疫耐受,调节免疫反应的强大介质。在移植物抗宿主病 (GVDH) 中也对 MSC - EXOs 的作用进行了研究,在同种异体皮肤移植模型中,皮下注射 MSC - EXOs,不仅延迟 GVDH 的发作时间 2 天,而且伴随 Tregs 细胞的增高,体外实验显示 EXOs 激活单核细胞 MYD88 依赖的信号,诱导 M2 - like 表型,促进活化的 CD4⁺T 细胞向 Tregs 细胞转变。Ti 等发现脂多糖 (LPS) 预处理的 MSCs 可以通过其 EXOs 释放的 let - 7b 调节慢性炎症中巨噬细胞的增殖。

5. 椎间盘损伤:在椎间盘退化的动物模型中, MSCs 被证明可以修复正常的椎间盘结构。椎间盘退化取决于髓核细胞的改变, Strassburg 等发现了 MSCs 与退化的髓核细胞之间的相互联系,并发现这两种细胞的信息对话是通过广泛而直接的膜物质 MVs 的传递而实现的。

6. 糖尿病: Favaro 等通过共聚焦显微镜和流式细胞学检测发现被 GAD65 刺激的外周血单核细胞 (1 型糖尿病患者来源) 可以内化异种的人类骨髓间充质干细胞来源的 MVs。MVs 可以显著降低外周血单核细胞中 IFN - γ 的表达水平,并且增加 TGF - β 、IL - 10、IL - 6 和 PGE₂ 的表达。此外 MVs 还降低 Th17 细胞的数量和 IL - 17 的表达水平,并且增加 FoxP3 (+) 调节性 T 细胞在外周血单核细胞中的数量。这些结果提供的证据表明, MSCs 来源的 MVs 可以在 1 型糖尿病胰岛抗原刺激中抑制体外促炎反应。

7. 肿瘤: MSCs 应用于临床的安全性始终存在争议,最主要担心的问题就是其恶性转化性。在实际应用中为了得到足够数量的干细胞,往往需要一个长期的体外扩增过程。有研究发现,对间充质干细胞进行

长期的体外扩增培养,可能使其突破寿命调控,而出现永生化倾向并显示出恶性特征。此外,在不同疾病中针对 MSCs 的基因学改造,往往又增加了细胞的致癌潜力。MSCs 已经在多种恶性肿瘤中被发现,比如胃癌、脂肪瘤、骨肉瘤等,为证明其参与肿瘤的发展提供了有力的证据,不仅如此,许多研究表明这些细胞还可能是肿瘤相关成纤维细胞的潜在来源。所以 MSC - EVs 在肿瘤研究方面显得尤为重要。有研究发现在大鼠模型中脂肪间充质干细胞来源的 EXOs 可以抑制肝细胞性肝癌的生长,在 EXOs 治疗后的第 20 天,治疗组肿瘤明显变小,表观扩散系数增高,在循环血和瘤内的 NKT 细胞数量明显增加。此外, EXOs 还可以作为药物或核酸释放的载体,成功地传递 microRNA 至靶细胞。Shin - ichiro Ohno al 成功改造 EXOs 使其表面表达 GE11 肽, GE11 肽可以与乳腺癌细胞表面 EGFR 结合,通过这种 EXOs 将抑癌 microRNA let - 7a 转运至 RAG2^{-/-} 小鼠表达 EGFR 的异种移植乳腺癌细胞中,从而达到抑制肿瘤生长的作用。这为癌症的 microRNA 替代疗法提供了一个良好的平台。但需要强调的是,在抗癌治疗中关于评估使用基因改造的 MSCs 或 MSCs 来源的 EVs 的风险时仍然需要十分谨慎。

四、展 望

尽管 EVs 的体积远远小于其母细胞,但由于其含有丰富的生物活性物质,而很有可能成为替代干细胞修复损伤治疗的新型物质。作为细胞之间信息传递的新途径,人们对 EVs 的作用机制还认识得不够全面。对于其用于组织再生的有效性和安全性有待于更多的实验研究来评估。为了避免干细胞移植后异常分化而发生恶性肿瘤的风险,单独植入干细胞来源的 EVs 是否可以达到损伤修复的目的等诸多问题需要进一步探索及证实。随着对 EVs 的作用基础和临床研究的深入,将来有望利用 EVs 特有的作用方式来阐释疾病的发生、发展并研发新型的药物载体,从而达到诊断和治疗更多疾病的目的。

参考文献

- 1 Li TS, Takahashi M, Ohshima M, *et al.* Myocardial repair achieved by the intramyocardial implantation of adult cardiomyocytes in combination with bone marrow cells[J]. *Cell Transpl*, 2008, 17(6): 695 - 703
- 2 Roche S, D'Ippolito G, Gomez LA, *et al.* Comparative analysis of protein expression of three stem cell populations: models of cytokine delivery system in vivo[J]. *Int J Pharma*, 2013, 440(1): 72 - 82
- 3 Crescitelli R, Lasser C, Szabo TG, *et al.* Distinct RNA profiles in

- subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes[J]. J Extracel Vesicle, 2013,2
- 4 Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, *et al.* Membrane vesicles, current state – of – the – art; emerging role of extracellular vesicles[J]. Cell Mole Life Sci, 2011,68(16):2667 – 2688
- 5 Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. Na Rev Immunol, 2009,9(8):581 – 593
- 6 Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, *et al.* Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane – derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection[J]. Nat Med, 2000,6(7):769 – 775
- 7 Nolte – ’t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, *et al.* Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA – 1 [J]. Blood, 2009,113(9):1977 – 1981
- 8 Sheldon H, Heikamp E, Turley H, *et al.* New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta – like 4 incorporation into exosomes[J]. Blood, 2010,116(13):2385 – 2394
- 9 Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange[J]. Circ Res, 2010,107(9):1047 – 1057
- 10 Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, *et al.* Platelet – and megakaryocyte – derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4 – null cells and make them susceptible to infection by X4 – HIV[J]. AIDS, 2003,17(1):33 – 42
- 11 Taraboletti G, D’Ascenzo S, Giusti I, *et al.* Bioavailability of VEGF in tumor – shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH[J]. Neoplasia, 2006,8(2):96 – 103
- 12 Taraboletti G, D’Ascenzo S, Borsotti P, *et al.* Shedding of the matrix metalloproteinases MMP – 2, MMP – 9, and MT1 – MMP as membrane vesicle – associated components by endothelial cells[J]. Am J Pathol, 2002,160(2):673 – 680
- 13 Sarkar A, Mitra S, Mehta S, *et al.* Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase – 1 [J]. PLoS One, 2009,4(9):e7140
- 14 Bruno S, Grange C, Deregibus MC, *et al.* Mesenchymal stem cell – derived microvesicles protect against acute tubular injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2009,20(5):1053 – 1067
- 15 Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, *et al.* Embryonic stem cell – derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery [J]. Leukemia, 2006,20(5):847 – 856
- 16 Jansen F, Yang X, Hoelscher M, *et al.* Endothelial microparticle – mediated transfer of MicroRNA – 126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose – damaged endothelial microparticles[J]. Circulation, 2013,128(18):2026 – 2038
- 17 Singh R, Pochampally R, Watabe K, *et al.* Exosome – mediated transfer of miR – 10b promotes cell invasion in breast cancer[J]. Mo Cancer, 2014,13:256
- 18 Collino F, Deregibus MC, Bruno S, *et al.* Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs [J]. PLoS One, 2010,5(7):e11803
- 19 He J, Wang Y, Sun S, *et al.* Bone marrow stem cells – derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model[J]. Nephrology, 2012,17(5):493 – 500
- 20 Bruno S, Grange C, Collino F, *et al.* Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury[J]. PLoS One, 2012,7(3):e33115
- 21 Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, *et al.* Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia – induced pulmonary hypertension[J]. Circulation, 2012,126(22):2601 – 2611
- 22 Lai RC, Arslan F, Lee MM, *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Stem Cell Res, 2010,4(3):214 – 222
- 23 Chen TS, Arslan F, Yin Y, *et al.* Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC – derived MSCs[J]. J Transl Med, 2011,9:47
- 24 Honmou O, Onodera R, Sasaki M, *et al.* Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke[J]. Trends Mol Medi, 2012,18(5):292 – 297
- 25 Xin H, Li Y, Buller B, *et al.* Exosome – mediated transfer of miR – 133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth [J]. Stem Cell, 2012,30(7):1556 – 1564

(收稿日期:2015 – 10 – 12)

(修回日期:2015 – 10 – 20)

(上接第 170 页)

- 19 Hackam DG, Mrkobrada M. Selective serotonin reuptake inhibitors and brain hemorrhage: a meta – analysis [J]. Neurology, 2012, 79(18):1862 – 1865
- 20 Lai SM, Studenski S, Richards L, *et al.* Therapeutic exercise and depressive symptoms after stroke [J]. J Am Geriatr Soc, 2006, 54(2):240 – 247
- 21 Kootker JA, Rasquin SM, Smits P, *et al.* An augmented cognitive behavioural therapy for treating post – stroke depression: description of a treatment protocol [J]. Clin Rehabil, 2015, 29(9):833 – 843
- 22 Eum Y, Yim J. Literature and art therapy in post – stroke psychological disorders [J]. Tohoku J Exp Med, 2015, 235(1):17 – 23
- 23 Kijowski S. Difficulties in post – stroke gait improvement caused by post – stroke depression [J]. Chin Med J, 2014, 127(11):2085 – 2090
- 24 Huijben – Schoenmakers M, Rademaker A, van Rooden P, *et al.* The effects of increased therapy time on cognition and mood in frail patients with a stroke who rehabilitate on rehabilitation units of nursing homes in the Netherlands: a protocol of a comparative study [J]. BMC Geriatr, 2014, 14:68
- 25 Writing Group Members, Lloyd – Jones D, Adams RJ, *et al.* Heart disease and stroke statistics – 2010 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2010, 121(7):e46 – e215

(收稿日期:2015 – 10 – 07)

(修回日期:2015 – 10 – 26)