

文献综述

DOI: 10.13406/j.cnki.cxyb.003266

外泌体及其携带的 microRNAs 对脑缺血-再灌注损伤影响的研究进展

周桂林,白文娅,邵建林

(昆明医科大学第一附属医院麻醉科,昆明 650500)

【摘要】脑缺血-再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)是继发于缺血性脑卒中血流再通后的脑组织损伤,有很高的致死率及致残率。外泌体是从细胞释放到细胞外空间的双层脂质膜结构微小囊泡,通过其携带的膜蛋白、细胞质蛋白和遗传物质,在细胞间起着传递信息、靶向运输及调节多种病理生理功能的作用。体内大多数细胞都可以分泌外泌体,外泌体及其携带的微小RNAs(microRNAs)在减轻CIRI后的神经功能损伤及促进脑血管再生中有着积极的作用。深入研究外泌体及其携带的microRNAs对CIRI的保护作用及其机制,可为外泌体的临床转化及CIRI治疗提供新思路。

【关键词】脑缺血-再灌注损伤;缺血性脑卒中;外泌体;微小RNAs;脑保护

【中图分类号】R743.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-05-26

Research advances in the effect of exosomes and their microRNAs on cerebral ischemia-reperfusion injury

Zhou Guilin, Bai Wenya, Shao Jianlin

(Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University)

【Abstract】Cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) is brain tissue damage secondary to ischemic stroke after blood flow recanalization and has extremely high fatality and disability rates. Exosomes are microvesicles with a double-layer lipid membrane structure released from cells into the extracellular space and play the roles of information transmission, targeted transportation, and regulation of various pathological and physiological functions through the membrane proteins, cytoplasmic proteins, and genetic materials they carry. Most cells inside the body can secrete exosomes, and exosomes and the microRNAs they carry play a positive role in alleviating neurological deficits and promoting cerebral angiogenesis after CIRI. Further studies on the protective effect of exosomes and their microRNAs on CIRI and its mechanism can provide new ideas for the bench-to-bedside translation of exosomes and the treatment of CIRI.

【Key words】cerebral ischemia-reperfusion injury; ischemic stroke; exosome; microRNAs; cerebral protection

脑卒中属于常见的心脑血管疾病,是我国成人致死致残的主要原因^[1]。2019年我国40岁及以上人群现患和曾患卒中人数约为1704万,给社会、家庭及医疗卫生体系带来了巨大的负担。脑卒中包括出血性脑卒中和缺血性脑卒中,其中缺血性脑卒中的发病率较高,约占85%^[2]。针对缺血性脑卒中,治疗方法主要有溶栓、抗凝、血管内介入取栓等,各种治

作者介绍:周桂林,Email:529296040@qq.com,

研究方向:脑缺血-再灌注损伤的研究和治疗。

通信作者:邵建林,Email:cmushaojl@aliyun.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81960250)昆医联合专项-重点资助项目(编号:202201AY070001-037);昆医联合专项-面上资助项目(编号:202301AY070001-193)。

优先出版:<https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1046.R.20230717.1538.004.html>
(2023-07-18)

疗方法的目的是为脑部建立侧支循环,让缺血缺氧的脑组织重新恢复血氧供应,尽可能地恢复受损神经元^[3]。但缺血区脑血流再通后,反而出现脑组织损伤或神经功能恶化加重的情况,这种现象被称为脑缺血-再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)。目前,不同治疗结果的差异很大,尚无单一的治疗方法可以提供最佳的效果^[4]。

外泌体是细胞在应激状态下分泌的具有双层脂质膜结构的小囊泡,携带大量信号分子,能够介导细胞间的物质交换和信息传递^[5]。不同细胞衍生的外泌体可通过减轻炎症反应,抑制细胞焦亡、神经元及线粒体凋亡和血脑屏障损伤等作用机制来减轻CIRI^[6-8]。

微小RNAs(microRNAs)是一种短链非编码小RNA,在各器官、组织和细胞中均有表达,也存在于中枢神经系统中^[9]。外泌体可通过其携带的microRNAs改变运动皮质的

可塑性、抑制神经元及小胶质细胞凋亡、减轻神经炎症等在 CIRI 中发挥保护作用^[10-14]。因此,外泌体及其携带的 microRNAs 可能成为 CIRI 治疗的新靶点。现就外泌体及其携带的 microRNAs 在 CIRI 中的研究进展作一综述。

1 外泌体

1.1 外泌体的起源

外泌体最早是由 Pan 和 Johnstone 于 1983 年发现的,他们在研究绵羊网织红细胞成熟过程中,发现转铁蛋白受体释放到细胞外间隙与一种小囊泡有关。1989 年,Johnstone 将这种功能性囊泡定义为外泌体^[15-16]。近年研究表明,外泌体的产生与质膜的双重内陷和含有腔内小泡的多囊泡体 (multivesicular bodies, MVBs) 形成有关。MVBs 形成后有 2 个结局:一个是与溶酶体或自噬小体融合被降解并回收其内容物;另一个是与细胞质膜融合,并以外泌体的形式释放入细胞外空间,这一过程被称为外泌体的生物发生^[17](图 1)。在间充质干细胞、神经元、内皮细胞和上皮细胞中都观察到外泌体的生物发生^[17]。

1.2 外泌体的组成及功能

外泌体由脂质、蛋白质及核酸组成,根据外泌体的生物发生过程,不难得知外泌体所携带的脂质、蛋白质及核酸来

源于其供体细胞。由于 MVBs 可以与细胞内的其他小泡和细胞器相交,从而导致外泌体成分的多样性^[18]。外泌体脂质组成包括胆固醇、鞘磷脂、己糖神经酰胺、磷脂酰丝氨酸和饱和脂肪酸,这些脂质成分参与外泌体膜的组成^[19]。

外泌体膜具有脂质双层结构,表达多种蛋白质^[20]。这种脂质双层膜结构使外泌体 RNA 可以被血液来源的核糖核酸酶保护而不被降解,使外泌体可以在远端部位发挥其功能^[21]。外泌体的蛋白质成分非常丰富,主要分为两类:一类是参与外泌体囊泡形成和分泌的蛋白,包括与膜转运和融合相关的蛋白质(如 Rab GTP 酶)、热休克蛋白(如 HSP70、HSP9)、四次跨膜蛋白超家族(如 CD63、CD81)、ESCRT 复合体相关蛋白(如 Tsg101、Alix)、整合素等;另一类是与供体细胞相关的特异性成分(如 CD45 和来源于抗原提呈细胞的 MHC-II)^[22]。

外泌体含有 RNA,并能将其携带的 RNA 以功能形式转移到其他细胞和组织。microRNAs 和 mRNA 是在外泌体中发现的第一类核酸,随后在外泌体中又发现了多种类型的 RNA(如 snRNAs、miRNAs、tRNAs 等)^[23]。不同类型的 RNA,包括 mRNA 和非编码 RNA,如 microRNAs,在外泌体中发挥功能,并可以影响受体细胞的转录组^[24]。

血脑屏障位于脑微血管中,被认为是主要的脑屏障,其作用在于维持大脑的动态平衡,保护大脑免受外源性和循环

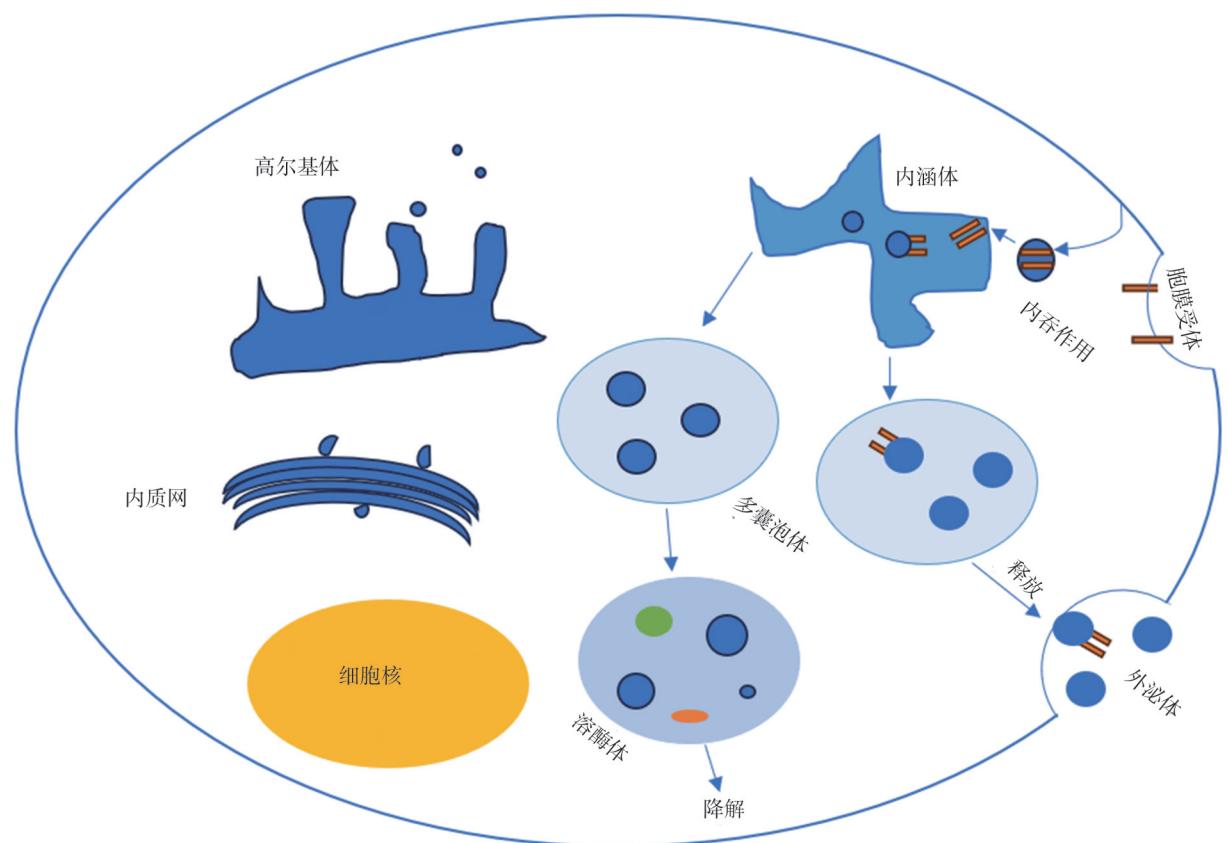


图 1 外泌体的生物发生

系统的威胁^[25]。血脑屏障的存在,生理情况下极大地保护了大脑,避免脑组织受到外来物质的损害,但在合并病理性脑损伤的情况下也阻止了很多治疗药物进入大脑,成为脑损伤治疗的障碍。由于外泌体具有低免疫原性、生物相容性、低毒性以及能自由穿过血脑屏障的特点^[26-27],使它成为病理性脑损伤治疗中一种很有希望及前景的方法。研究证实,外泌体可通过其携带的 microRNAs 调节神经炎症、增加脑血管完整性^[28]、抑制凋亡^[13]及免疫反应^[28]、改变运动皮层可塑性^[10]等改善脑内微环境、增加神经元存活并改善运动功能,从而发挥脑保护作用。

1.3 外泌体的摄取、分布及代谢

外泌体从供体细胞释放到细胞外环境中,经历一个自由漂浮期,在此期间它们在体液中循环^[29]。外泌体被受体细胞以不同的方式摄取,以实现细胞间的通讯。细胞对外泌体的摄取大致可以分为以下 3 种类型:①外泌体直接与质膜融合,将其携带的货物运送到受体细胞^[30]。②外泌体表面有可溶信号,配体和受体并列在外泌体和受体细胞上,膜结合的蛋白被金属蛋白酶裂解形成可溶性细胞因子,介导外泌体和靶细胞的信号传导^[31]。③靶细胞通过不同形式的内吞作用摄取外泌体。这些内吞作用过程包括网织蛋白和小窝蛋白介导的内吞作用、受体和 RAFT 介导的内吞作用、巨噬细胞吞噬作用^[32-33]。被细胞摄取的外泌体,则通过将其携带的生物活性物质(如蛋白质、脂类、mRNA 和 microRNAs 等)转移到受体细胞来改变其生理状态^[34]。动物实验表明,静脉内施用的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)首先经历快速分布阶段,主要定位于脾脏,然后是肝脏。之后在 6 h 内通过肝和肾途径进行消除^[35]。作为 EVs 的主要成分,外泌体在人体内的分布及代谢情况仍不明确,相信随着实验技术的发展以及后续临床实验的展开,这个谜底也很快会解开。Kalra H 等^[36]的研究表明,在-20 °C 下储存 90 d 的样品 TEM 图像显示,外泌体在血浆中确实可以稳定长达 3 个月。该研究还进行了 1 项细胞实验,使用 PKH67 染色实验证了在-20 °C 保存 30 d 的外泌体可被 LIM 1215 结直肠癌细胞摄取,表明低温保存(-20 °C)的外泌体既稳定还能发挥生物学功能。另外 1 项研究表明,冷冻和解冻对储存在-20 °C 和-80 °C 的外泌体的生物物理特性没有影响^[37]。后续研究还需要确定低温保存是否影响外泌体的生物学功能,即与正常外泌体相比,低温保存的外泌体在生物学功能(如免疫原性、载体转运功能、抗炎、抗凋亡特性等)方面是否存在统计学差异。

2 不同细胞来源外泌体对 CIRI 的影响

几乎所有细胞都能分泌外泌体,根据它们的大小、内容物(货物)、对受体细胞的功能影响和来源细胞,表现出一定的异质性^[38],而不同细胞分泌的外泌体在 CIRI 的治疗中也发挥着不同的作用。目前已有很多种细胞(如间充质干细胞、

内皮细胞和胶质细胞等)来源的外泌体被证实在 CIRI 中发挥着积极作用。随着研究的不断深入,相信会有更多类型细胞来源的外泌体在 CIRI 中发挥作用,也为将来个体化选择外泌体进行 CIRI 治疗成为可能。

2.1 间充质干细胞来源外泌体(mesenchymal stem cell derived exosomes, MSC-Exos)对 CIRI 的影响

间充质干细胞是一类来源于机体成熟组织的多能成体干细胞,脐带、骨髓和脂肪组织中均存在间充质干细胞。在各种细胞来源的外泌体中, MSC-Exos 因其具有免疫调节和再生功能而备受关注^[39]。MSC-Exos 主要从间充质干细胞亚型中提取,包括脂肪来源间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs)和骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)。

ADMSCs 是一种具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞,具有促进人表皮细胞增殖和抗凋亡的作用^[40],在治疗缺血性脑卒中方面有很好的前景。研究发现,在常氧(氧浓度 21%)及低氧(氧浓度 1%)条件下培养的第三代脂肪来源间充质干细胞外泌体(exosomes derived from adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSC-Exos)均能改善 CIRI 后大鼠神经功能缺损评分、减轻脑梗死体积和脑组织病理损伤、抑制神经元凋亡及减少 CytC 和 IL-1 β 表达,且低氧处理组的外泌体作用更加显著^[41],表明 ADMSC-Exos 可通过抑制神经元凋亡及炎症反应来减轻 CIRI,从而发挥神经保护作用。相较于常氧处理组,低氧处理组的外泌体产生更显著的脑保护机制还需要深入研究。Huang X 等^[42]研究了色素上皮源性因子修饰的 ADMSC-Exos 在 CIRI 中的作用,发现色素上皮源性因子修饰的 ADMSC-Exos 可通过调节自噬和凋亡来减轻 CIRI。El Bassit G 等^[43]进行的 1 项细胞实验表明,人源性 ADMSC-Exos 可促进脑损伤后永生化的 HT-22 海马神经细胞的存活和增殖。

小胶质细胞是大脑中的主要免疫细胞,小胶质细胞经缺血、感染、损伤等刺激后可被激活,并分为 M1 型和 M2 型极化状态,根据其活化的不同表型,小胶质细胞可表现出细胞毒性或细胞保护作用^[44]。CIRI 可使小胶质细胞向促炎型的 M1 型极化,M1 型小胶质细胞随后释放促炎因子,放大炎症反应,并加重神经损伤。静脉注射骨髓间充质干细胞来源的外泌体(bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes, BMSC-Exos)可通过调节小胶质细胞从促炎型的 M1 型向抗炎型的 M2 型极化,从而抑制 NLRP3 炎性小体介导的神经炎症和焦亡,发挥脑保护作用^[45]。另 1 项研究表明,尾静脉注射 MSC-exos 可通过逆转 CysLT2R-ERK1/2 介导的小胶质细胞 M1 极化和促进 M2 极化,显著抑制小胶质细胞炎症,从而改善急性缺血性脑损伤后的神经炎症反应和神经症状^[46]。Zeng Q 等^[47]进行的 1 项细胞实验表明, BMSC-Exos 可通过促进 AMPK 依赖的自噬,减轻 NLRP3 炎性小体介导的细胞焦亡,从而保护 PC12 细胞免受缺氧/复氧(oxygen-

glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 损伤。推测其可能是 BMSC-Exos 发挥脑保护的机制之一。另 1 项研究也发现, MSC-Exos 可通过调节抗炎 (IL-4 和 IL-10) 和促炎细胞因子 (IL-6、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和 IL-1 β), 抑制小胶质细胞来改善急性缺血或缺血-再灌注损伤引起的炎症, 从而减轻神经损伤^[48]。在脑缺血性动物模型中还观察到 BMSC-Exos 可促进脑内皮细胞及神经元的增殖^[49-50]。

上述研究结果提示间充质干细胞来源的外泌体可通过调节小胶质细胞表型, 减轻神经炎症引起的神经损伤, 并通过促进自噬及脑内皮细胞和神经元的增殖, 抑制神经元凋亡、焦亡等途径, 减轻神经损伤并改善 CIRI 后的神经症状, 以发挥脑保护作用。

2.2 内皮细胞来源外泌体 (endothelial cells-derived exosomes, EC-Exos) 对 CIRI 的影响

在中枢神经系统中, 微血管主要由内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 组成。在缺血性脑卒中, 受损区域的 ECs 可释放细胞因子和趋化因子, 促进内源性神经祖细胞 (neural progenitor cells, NPCs) 迁移和分化, 同时形成新的微血管^[51]。内皮祖细胞来源的外泌体 (endothelial progenitor cells derived exosomes, EPCs-Exos) 通过抑制 Caspase 介导的细胞凋亡和上调血管内皮生长因子受体-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2), 促进神经再生和血管生成, 从而促进神经功能恢复^[52]。另 1 项实验表明, EPCs-Exos 通过改善血管生成功能、减少细胞凋亡和活性氧的产生, 促进缺血区新生血管的形成来保护内皮细胞免受缺血缺氧的损害^[53]。

Yue KY 等^[54]研究了人脐静脉内皮细胞来源的外泌体 (human umbilical endothelial cells-derived exosomes, HUVECs-Exos) 对遭受 OGD 的神经元的影响, 发现 HUVECs-Exos 减少了 OGD 条件下神经元的凋亡, 这一作用可被外泌体释放阻断剂 GW4869 所拮抗, 表明 HUVECs-Exos 可通过减轻 OGD 诱导的神经细胞凋亡来发挥脑保护作用。Zhang YZ 等^[55]用 HUVECs-Exos 来培养小鼠离体神经干细胞, 发现 HUVECs-Exos 不仅可以增加小鼠神经干细胞的增殖并减少其凋亡, 还可保持其干性。HUVECs-Exos 还通过促进细胞增殖、迁移和侵袭, 同时抑制细胞凋亡, 从而使神经细胞抵抗缺血-再灌注损伤, 发挥神经保护的作用。

研究表明, 远程缺血后处理 (remote ischemic preconditioning, RIPC) 可减轻 CIRI^[56]。基于此, Xiao B 等^[60]假设 RIPC 对神经损伤的保护作用是通过股动脉内皮细胞释放的外泌体介导的, 并进行了体内及体外实验来验证, 实验结果表明股动脉 EC-Exos 通过抑制缺血诱导的 SH-SY5Y 神经细胞凋亡和生长周期停滞, 直接保护神经元免受缺血-再灌注损伤, 并介导 RIPC 中的神经保护作用。bEnd.3 是一种小鼠脑微血管内皮细胞, Zhou ST 等^[51]的研究表明, 注射 bEnd.3 细胞来源的外泌体 (bEnd.3 cells-derived exosomes, bEnd.3-Exo) 可缩小 MCAO/R 大鼠脑梗死体积并改善神经行为结局, 促进

MCAO/R 大鼠的神经再生, 证明 bEnd.3-Exo 可以克服物种障碍并被 NPCs 摄取, 通过促进神经干细胞的存活和神经修复, 减轻缺血区神经细胞的损伤。

上述研究结果提示, 内皮细胞来源的外泌体可通过促进神经细胞增殖、迁移和侵袭, 并抑制神经细胞凋亡、减少活性氧的生成、上调血管内皮生长因子等, 促进神经再生和缺血区新生血管形成, 促进神经功能的恢复, 减轻 CIRI。

2.3 胶质细胞来源的外泌体对 CIRI 的影响

神经胶质细胞是神经组织中除神经元以外的另一大类细胞, 也有突起, 但无树突和轴突之分, 广泛分布于中枢和周围神经系统。在中枢神经系统的神经胶质细胞主要有星形胶质细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞等。目前对于神经胶质细胞来源外泌体在 CIRI 中作用的研究主要集中在星形胶质细胞和小胶质细胞, 并且取得了令人欣喜的结果。对于少突胶质细胞来源外泌体的研究较少, 已有的研究表明少突胶质细胞来源的外泌体通过促进轴突运输来维持轴突稳态和功能, 维持神经元的能量供应以提高神经元的活力^[57]。

2.3.1 星形胶质细胞来源外泌体 (astrocyte-derived exosomes, ASC-Exos) 对 CIRI 的影响

星形胶质细胞是人类中枢神经系统中最丰富的胶质细胞, 它们为神经元提供代谢和营养支持, 并在正常生理条件下调节突触活动^[58]。Wu 等^[59]研究了 ASCs-Exos 对缺血性脑卒中的保护作用, 发现 ASCs-Exos 通过调节自噬抑制 OGD/R 诱导的神经元凋亡并减轻神经元损伤, 从而发挥神经保护作用。ASCs-Exos 治疗在 OGD/R 的 N2a 细胞中抑制细胞凋亡并促进细胞增殖以减轻神经元损伤, 并通过靶向 TLR7 下调 NF- κ B/MAPK 轴以缓解 CIRI。缝隙连接 α 1 (gap junction alpha 1, GJA1) 蛋白又被称为连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43), 是哺乳动物中枢神经系统中表达最广泛和最重要的间隙连接蛋白, GJA1-20k 是来源于 GJA1 的 mRNA。Chen W 等^[5]推测外泌体和 GJA1-20k 可能参与了星形胶质细胞对神经元的保护和修复, 星形胶质细胞可能通过分泌外泌体被神经元摄取而转移 GJA1-20k 来介导神经元的损伤修复, 并使用星形胶质细胞和脑外伤样损伤神经元的 Transwell 共培养模型来进行验证。提示脑外伤后, 外泌体被神经元摄取并释放 GJA1-20k 蛋白, 这些星形胶质细胞来源的 GJA1-20k 蛋白通过降低 Cx43 磷酸化, 保护和恢复受损线粒体功能, 抑制细胞凋亡, 从而促进神经元恢复, 发挥脑保护作用。朊蛋白是一种主要在神经元表达的蛋白质, 可通过调节细胞凋亡和氧化应激增加神经元对缺血、缺氧性损害的耐受性^[60]。Guitart K 等^[61]的研究表明, 在缺血缺氧时, 星形胶质细胞可释放含有朊蛋白的外泌体, 被神经元摄取后, 可促进 37/67kDa 层粘连蛋白受体、载脂蛋白 E 和核糖体蛋白 S3 表达, 而簇蛋白/载脂蛋白 J 的表达降低, 最终促进神经元存活, 表明缺血缺氧后星形胶质细胞来源外泌体的神经保护作用与星形胶质细胞分泌的外泌体中的朊蛋白相关, 而与神经元中的朊蛋白无关。

综上所述,ASCs-Exo 可通过调节细胞自噬、抑制凋亡及促进神经元增殖减轻神经元损伤,同时还通过其携带的蛋白分子作用于神经元,维持线粒体功能的稳定及提高神经元对缺血缺氧性损害的耐受性,间接地发挥对神经细胞的保护作用,从而减轻 CIRI。

2.3.2 小胶质细胞来源外泌体(microglia-derived exosomes, Mi-Exos)对 CIRI 的影响 小胶质细胞被认为是大脑中的常驻免疫细胞。它不断地监视大脑环境以维持正常的大脑功能和体内平衡。一旦发生 CIRI,静息的小胶质细胞就会进入活化状态,激活的小胶质细胞有 M1 型和 M2 型,根据激活表型的不同,小胶质细胞可以对细胞发挥不同的作用^[62-63]。

小胶质细胞分泌的外泌体可将炎症信号传递给受体小胶质细胞,然后上调共刺激分子 CD86 并表达促炎基因,如 IL-1 β 、IL-6、诱导型一氧化氮合酶和环氧合酶-2^[64]。Song YY 等^[65]进行了 1 项研究,以 IL-4 激活以获得 M2 型小胶质细胞,并提取 M2 型小胶质细胞分泌的外泌体(M2 microglia-derived exosomes, M2-Mi-Exo),经过体内及体外实验证实,M2-Mi-Exo 通过下调 USP14 减轻中风后小鼠的神经功能缺陷及神经元凋亡,增加细胞活力,发挥神经保护作用。Tian Y 等^[66]研究了小胶质细胞对缺血性脑卒中的保护作用和促血管生成作用。发现用 IL-4 激活的小胶质细胞可通过诱导缺血性脑中血管生成素的表达,增加缺血区新生血管的形成,从而改善缺血-再灌注损伤。Xie LJ 等^[67]发现 OGD 处理后的 Mi-Exos 对细胞产生了不利作用,研究人员在小胶质细胞和脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cell, BMEC)中构建了 OGD 模型并分离 OGD 处理后小胶质细胞分泌的外泌体,发现 OGD 刺激可抑制 BMEC 新生血管形成,增强了细胞凋亡并降低细胞的活力,而给予 OGD 激活的 Mi-Exos 可通过调节 FGF2/STAT3 通路,加重这种损伤。由于该实验并未对 OGD 处理后的小胶质细胞极化类型进行鉴别,无法确认本实验中的 Mi-Exos 对细胞作用的差异是否与小胶质细胞的不同极化类型有关。

根据外泌体的生物发生过程可知,外泌体所携带的生物活性物质由其供体细胞产生。小胶质细胞来源的外泌体可能会由于供体细胞所受干预措施不同而产生差异,从而在对受体细胞的作用上产生截然不同的结果,后续研究需要重点关注产生这种差异的根本原因,是否与不同极化类型的小胶质细胞所分泌的外泌体含有不同的生物活性物质有关。

3 外泌体携带的 MicroRNAs 对 CIRI 的影响

microRNAs 是一种小的非编码单链 RNA, 调节基因表达。它们由大约 22 个核苷酸组成,在细胞内功能中发挥重要作用。研究发现,microRNAs 通过外泌体主动分泌至受体细胞,以保护它们免受 RNA 酶的降解,这表明它们在产生 microRNAs 的细胞之外发挥作用^[24]。外泌体携带许多类型的

生物活性分子,而 microRNAs 因其改变受体细胞中蛋白质水平的能力而脱颖而出^[68]。细胞释放的外泌体中的 microRNAs 可以与相关的载体一起循环,到达邻近和远处的细胞。外泌体携带的 microRNAs 进入受体细胞后发挥功能作用。虽然很难完全排除外泌体携带的其他物质的影响,但 microRNAs 被认为是关键的功能元件^[69]。目前,关于外泌体携带的 microRNAs 在 CIRI 中的作用是一个研究热点,明确对 CIRI 有利的 microRNAs 种类,提高外泌体治疗的有效性,为将来工程化外泌体在 CIRI 中的应用提供理论基础。

缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)是由短暂和重复(或长期但中度)缺血和再灌注诱导的,这增加了靶组织对长期缺血和缺血-再灌注损伤的耐受性^[70-71]。Li H 等^[72]使用从接受脑 IPC 小鼠血浆中分离的外泌体处理 OGD/R 的 N2a 细胞,发现脑 IPC 可增加血浆中外泌体的含量,而且脑 IPC 后分离的外泌体可通过其携带的 microRNA-451a 抑制 Rac1 及其下游的信号通路,减轻炎症反应、抗氧化及凋亡,促进 OGD/R 处理的 N2a 细胞存活。microRNA-132-3p 可通过促进内皮细胞的增殖和迁移促进新生血管的形成,是公认的促血管生成的 microRNA^[73]。另 1 项研究比较了 MSCs-Exos 与过表达 microRNA132-3p 的 MSCs-Exos 对缺血-再灌注损伤的保护作用。发现 MSCs-Exos 可抑制内皮细胞的凋亡及氧化应激,并通过激活 PI3K/AKT/eNOS 通路和直接抑制 RASA1 表达,以及增加脑血管完整性来减轻小鼠 CIRI,而过表达 microRNA132-3p 可增强 MSCs-Exos 的保护作用^[11]。研究发现,过表达 microRNA-26a-5p 的 MSCs-Exos 可通过靶向 CDK6 有效减轻 CIRI,并在体外抑制小胶质细胞凋亡^[13]。Bu XC 等^[74]的实验表明,ATC-Exos-microRNA-361 可通过靶向 CTSB 和下调 AMPK/mTOR 通路来减轻 CIRI 大鼠的神经损伤,在体外可增加细胞活性并抑制细胞凋亡。另 1 项经 MCAO/R 大鼠侧脑室注射 EC-Exos 的研究发现,EC-Exos 通过转移其携带的 microRNA-1263p,改变运动皮层的神经可塑性,从而改善 CIRI 模型大鼠的运动功能^[10]。Song YY 等^[65]通过给予 IL-4 刺激得到 M2 型 BV2 细胞,培养后分离得到 M2 型 BV2 细胞来源的外泌体(M2 BV2 cells derived exosomes, M2-BV2-Exos),经尾静脉注射 MCAO/R 模型小鼠,发现 M2-BV2-Exos 通过调节 microRNA-124 和 USP14,抑制炎症及免疫反应,发挥神经保护作用。

综上发现,外泌体可通过将其携带的 microRNAs 转移至靶细胞,调节神经炎症、神经元焦亡和凋亡,促进髓鞘形成、轴突生长和神经元存活及神经血管再生等,改善脑缺血后的神经血管单元重建和功能恢复,从而发挥脑保护作用。

4 小结与展望

由于外泌体具有低免疫原性、可自由通过血脑屏障以及可作为药物载体的特性,为 CIRI 的治疗带来了新思路。近

年来,针对外泌体在CIRI中的影响进行了大量的研究。外泌体在神经保护和神经恢复方面的有益作用得到了广泛的论证,然而,有些外泌体也具有涉及神经变性和神经炎症的不利影响^[75-76]。一种观点是外泌体可能携带供体细胞的致病物质,通过细胞间的沟通进行传递并引起疾病表型,对外泌体的负面作用需要更深入的探究^[77]。外泌体因其携带多种生物活性物质,对靶细胞的影响很可能不是单一物质的作用,需要分别明确其携带的各生物活性成分的具体作用,为将来个体化选择外泌体进行治疗提供理论基础。同时,细胞微环境的变化可能会影响其分泌的外泌体所携带的生物活性物质,即使是同一种细胞,在不同状态下所分泌的外泌体也会产生不同的生物学效应,供体细胞状态改变对外泌体功能的影响还需要进一步研究。而且,目前大部分研究还处于细胞和动物模型阶段,从临床试验层面来探讨外泌体在缺血性脑血管病的疗效研究也亟待开展。

参 考 文 献

- [1] 王陇德,彭斌,张鸿祺,等.《中国脑卒中防治报告2020》概要[J].中国脑血管病杂志,2022,19(2):136-144.
Wang LD, Peng B, Zhang HQ, et al. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2020[J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2022, 19(2): 136-144.
- [2] Lu C, Ha TZ, Wang XH, et al. The TLR9 ligand, CpG-ODN, induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of PI3K/Akt signaling[J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3(2):e000629.
- [3] 吴林.缺血性脑卒中临床治疗研究现状与进展[J].医学理论与实践,2019,32(19):3065-3066,3047.
Wu L. Present situation and progress of clinical treatment of ischemic stroke[J]. J Med Theory Pract, 2019, 32(19):3065-3066,3047.
- [4] Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients[J]. BMJ, 2002, 324(7329):71-86.
- [5] Chen W, Zheng P, Hong T, et al. Astrocytes-derived exosomes induce neuronal recovery after traumatic brain injury via delivering gap junction alpha 1-20 K[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2020, 14 (3) : 412-423.
- [6] Xiao B, Chai Y, Lv SG, et al. Endothelial cell-derived exosomes protect SH-SY5Y nerve cells against ischemia/reperfusion injury[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(4):1201-1209.
- [7] Wang KK, Ru JN, Zhang HL, et al. Melatonin enhances the therapeutic effect of plasma exosomes against cerebral ischemia-induced pyroptosis through the TLR4/NF-κB pathway[J]. Front Neurosci, 2020, 14:848.
- [8] Jiang YB, He RY, Shi YJ, et al. Plasma exosomes protect against cerebral ischemia/reperfusion injury via exosomal HSP70 mediated suppression of ROS[J]. Life Sci, 2020, 256:117987.
- [9] 李俊杰,彭丽佳,罗靖,等.miR-27a-3p在氧糖缺失-复氧损伤PC12细胞中的表达及其对PC12细胞增殖、凋亡的影响[J].山东医药,2021,61(22):1-5.
Li JJ, Peng LJ, Luo J, et al. Expression of miR-27a-3p in PC12 cells damaged by oxygen-glucose deprivation and reoxygenation and its effects on proliferation and apoptosis of PC12 cells[J]. Shandong Med J, 2021, 61(22):1-5.
- [10] Gao BY, Zhou ST, Sun CC, et al. Brain endothelial cell-derived exosomes induce neuroplasticity in rats with ischemia/reperfusion injury [J]. ACS Chem Neurosci, 2020, 11(15):2201-2213.
- [11] Pan QW, Kuang XL, Cai SY, et al. miR-132-3p priming enhances the effects of mesenchymal stromal cell-derived exosomes on ameliorating brain ischemic injury[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11 (1):260.
- [12] Li XT, Zhang Y, Wang Y, et al. Exosomes derived from CXCR4-overexpressing BMSC promoted activation of microvascular endothelial cells in cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Neural Plast, 2020, 2020:8814239.
- [13] Cheng C, Chen XY, Wang YH, et al. MSCs-derived exosomes attenuate ischemia-reperfusion brain injury and inhibit microglia apoptosis might via exosomal miR-26a-5p mediated suppression of CDK6[J]. Mol Med, 2021, 27(1):67.
- [14] Zhao YM, Gan YX, Xu GW, et al. Exosomes from MSCs overexpressing microRNA-223-3p attenuate cerebral ischemia through inhibiting microglial M1 polarization mediated inflammation[J]. Life Sci, 2020, 260:118403.
- [15] Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor[J]. Cell, 1983, 33(3):967-978.
- [16] Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions[J]. Blood, 1989, 74(5):1844-1851.
- [17] Dang XTT, Kavishka JM, Zhang DX, et al. Extracellular vesicles as an efficient and versatile system for drug delivery[J]. Cells, 2020, 9 (10):2191-2226.
- [18] Kalluri R, Lebleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478):6977-6991.
- [19] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30:255-289.
- [20] Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis[J]. Cells, 2019, 8(7):727.
- [21] Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, et al. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood[J]. J Extracell Vesicles, 2014, 3:23743-23756.
- [22] Zhang Y, Bi JY, Huang JY, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications[J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15:6917-6934.

- [23] Warburg O. Annual review of biochemistry. prefatory chapter[J]. *Annu Rev Biochem*, 1964, 33: 1-14.
- [24] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-659.
- [25] Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweert S, et al. Targeting and crossing the blood-brain barrier with extracellular vesicles[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 851.
- [26] Guo L, Huang ZX, Huang LJ, et al. Surface-modified engineered exosomes attenuated cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting the delivery of quercetin towards impaired neurons[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 141.
- [27] 赵培源, 王 蕾. 外泌体在中枢神经细胞间通讯中的作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2017, 42(10): 1219-1222.
- Zhao PY, Wang L. Roles of exosomes in the communication of central nervous system cells[J]. *J Chongqing Med Univ*, 2017, 42(10): 1219-1222.
- [28] Pei XX, Li YC, Zhu LF, et al. Astrocyte-derived exosomes suppress autophagy and ameliorate neuronal damage in experimental ischemic stroke[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 382(2): 111474.
- [29] McKelvey KJ, Powell KL, Ashton AW, et al. Exosomes: mechanisms of uptake[J]. *J Circ Biomark*, 2015, 4: 7.
- [30] He CJ, Zheng S, Luo Y, et al. Exosome theranostics: biology and translational medicine[J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 237-255.
- [31] Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 328-334.
- [32] Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake[J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 24641-24654.
- [33] Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(3): 301-312.
- [34] Edgar JR. Q&A: what are exosomes, exactly?[J]. *BMC Biol*, 2016, 14: 46.
- [35] Lai CP, Mardini O, Ericsson M, et al. Dynamic biodistribution of extracellular vesicles *in vivo* using a multimodal imaging reporter[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(1): 483-494.
- [36] Kalra H, Adda CG, Liem M, et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma[J]. *Proteomics*, 2013, 13(22): 3354-3364.
- [37] Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 87(1): 146-150.
- [38] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 9-17.
- [39] Ha DH, Kim HK, Lee J, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration[J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1157.
- [40] Ma T, Fu BC, Yang X, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes promote cell proliferation, migration, and inhibit cell apoptosis via Wnt/β-catenin signaling in cutaneous wound healing[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10847-10854.
- [41] 郝海珍, 郭 铁, 余 丹. 脂肪间充质干细胞来源外泌体对脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡及炎症因子影响[J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(17): 1656-1665.
- Hao HZ, Guo T, Yu D. Effect of exosomes derived from adipose-derived mesenchymal stem cells on neuron apoptosis and inflammatory cytokines in a rat model of cerebral ischemia reperfusion[J]. *J Third Mil Med Univ*, 2019, 41(17): 1656-1665.
- [42] Huang X, Ding J, Li YF, et al. Exosomes derived from PEDF modified adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate cerebral ischemia-reperfusion injury by regulation of autophagy and apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 371(1): 269-277.
- [43] El Bassit G, Patel RS, Carter G, et al. MALAT1 in human adipose stem cells modulates survival and alternative splicing of PKCδII in HT22 cells[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(1): 183-195.
- [44] Chen HZ, Deng CJ, Meng ZY, et al. Research progress of targeting neuro-immune inflammation in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Front Biosci*, 2022, 27(11): 312.
- [45] Liu XL, Zhang MM, Liu HN, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury-induced neuroinflammation and pyroptosis by modulating microglia M1/M2 phenotypes[J]. *Exp Neurol*, 2021, 341: 113700.
- [46] Zhao YM, Gan YX, Xu GW, et al. MSCs-derived exosomes attenuate acute brain injury and inhibit microglial inflammation by reversing CysLT2R-ERK1/2 mediated microglia M1 polarization[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(5): 1180-1190.
- [47] Zeng Q, Zhou YQ, Liang DH, et al. Exosomes secreted from bone marrow mesenchymal stem cells attenuate oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced pyroptosis in PC12 cells by promoting AMPK-dependent autophagic flux[J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 182.
- [48] Jiang M, Wang HR, Jin MM, et al. Exosomes from miR-30d-5p-ADSCs reverse acute ischemic stroke-induced, autophagy-mediated brain injury by promoting M2 microglial/macrophage polarization[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2): 864-878.
- [49] Xin HQ, Li Y, Cui YS, et al. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(11): 1711-1715.
- [50] Moon GJ, Sung JH, Kim DH, et al. Application of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for stroke: biodistribution and microRNA study[J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(5): 509-521.
- [51] Zhou ST, Gao BY, Sun CC, et al. Vascular endothelial cell-derived exosomes protect neural stem cells against ischemia/reperfusion injury[J]. *Neuroscience*, 2020, 441: 184-196.

- [52] Wang JJ, Chen SZ, Zhang WF, et al. Exosomes from miRNA-126-modified endothelial progenitor cells alleviate brain injury and promote functional recovery after stroke[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26(12):1255-1265.
- [53] Ma XT, Wang JJ, Li J, et al. Loading miR-210 in endothelial progenitor cells derived exosomes boosts their beneficial effects on hypoxia/reoxygenation-injured human endothelial cells via protecting mitochondrial function[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(2):664-675.
- [54] Yue KY, Zhang PR, Zheng MH, et al. Neurons can upregulate Cav-1 to increase intake of endothelial cells-derived extracellular vesicles that attenuate apoptosis via miR-1290[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12):869.
- [55] Zhang YZ, Liu F, Song CG, et al. Exosomes derived from human umbilical vein endothelial cells promote neural stem cell expansion while maintain their stemness in culture[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1):892-898.
- [56] Sharma D, Maslov LN, Singh N, et al. Remote ischemic preconditioning-induced neuroprotection in cerebral ischemia-reperfusion injury: Preclinical evidence and mechanisms[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 883:173380.
- [57] Frühbeis C, Kuo-Elsner WP, Müller C, et al. Oligodendrocytes support axonal transport and maintenance via exosome secretion[J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(12):e3000621.
- [58] 裴美娟,李娅丽,涂 悅,等. 星形胶质细胞分泌的外泌体在中枢神经系统疾病中的作用机制研究进展[J]. 武警医学, 2021, 32(9): 817-820.
- Pei MJ, Li YL, Tu Y, et al. Research progress on the mechanism of exosomes secreted by astrocytes in central nervous system diseases[J]. *Med J Chin People's Armed Police Force*, 2021, 32(9):817-820.
- [59] Wu WC, Liu JQ, Yang CB, et al. Astrocyte-derived exosome-transported microRNA-34c is neuroprotective against cerebral ischemia-reperfusion injury via TLR7 and the NF- κ B/MAPK pathways[J]. *Brain Res Bull*, 2020, 163:84-94.
- [60] Onodera T, Sakudo A, Tsubone H, et al. Review of studies that have used knockout mice to assess normal function of prion protein under immunological or pathophysiological stress[J]. *Microbiol Immunol*, 2014, 58(7):361-374.
- [61] Guitart K, Loers G, Buck F, et al. Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein[J]. *Glia*, 2016, 64(6):896-910.
- [62] Tang Y, Le WD. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2):1181-1194.
- [63] Takeda H, Yamaguchi T, Yano H, et al. Microglial metabolic disturbances and neuroinflammation in cerebral infarction[J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 145(1):130-139.
- [64] Verderio C, Muzio L, Turola E, et al. Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation[J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(4):610-624.
- [65] Song YY, Li ZW, He TT, et al. M2 microglia-derived exosomes protect the mouse brain from ischemia-reperfusion injury via exosomal miR-124[J]. *Theranostics*, 2019, 9(10):2910-2923.
- [66] Tian Y, Zhu P, Liu SS, et al. IL-4-polarized BV2 microglia cells promote angiogenesis by secreting exosomes[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2019, 28(4):421-430.
- [67] Xie LJ, Zhao H, Wang YY, et al. Exosomal shuttled miR-424-5p from ischemic preconditioned microglia mediates cerebral endothelial cell injury through negatively regulation of FGF2/STAT3 pathway[J]. *Exp Neurol*, 2020, 333:113411.
- [68] Lafourcade C, Ramírez JP, Luarte A, et al. MiRNAs in astrocyte-derived exosomes as possible mediators of neuronal plasticity[J]. *J Exp Neurosci*, 2016, 10(Suppl 1):1-9.
- [69] Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13(1):17-24.
- [70] Sprick JD, Mallet RT, Przyklenk K, et al. Ischaemic and hypoxic conditioning: potential for protection of vital organs[J]. *Exp Physiol*, 2019, 104(3):278-294.
- [71] Bhuiyan MIH, Kim YJ. Mechanisms and prospects of ischemic tolerance induced by cerebral preconditioning[J]. *Int Neurotol J*, 2010, 14(4):203-212.
- [72] Li H, Luo Y, Liu P, et al. Exosomes containing miR-451a is involved in the protective effect of cerebral ischemic preconditioning against cerebral ischemia and reperfusion injury[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(5):564-576.
- [73] Anand S, Majeti BK, Acevedo LM, et al. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis[J]. *Nat Med*, 2010, 16(8):909-914.
- [74] Bu XC, Li D, Wang F, et al. Protective role of astrocyte-derived exosomal microRNA-361 in cerebral ischemic-reperfusion injury by regulating the AMPK/mTOR signaling pathway and targeting CTSB[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16:1863-1877.
- [75] Li JJ, Wang B, Kodali MC, et al. *In vivo* evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1):8.
- [76] Perez-Gonzalez R, Gauthier SA, Kumar A, et al. The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(51):43108-43115.
- [77] Elliot S, Catanuto P, Pereira-Simon S, et al. Urine-derived exosomes from individuals with IPF carry pro-fibrotic cargo[J]. *Elife*, 2022, 11:e79543.

(责任编辑:唐秋姗)