

内分泌腺疾病及代谢病文献综述

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002037

间充质干细胞外泌体在糖尿病肾病治疗中的研究进展

李少斌, 汤 蜜, 杨亦彬

(遵义医学院附属医院肾病风湿科, 遵义 563100)

【摘要】糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)已成为影响人类健康的重大问题,防治其发生发展备受业界关注。近年来,干细胞移植治疗策略在防治 DN 进展中已彰显潜力,尤其是间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)移植治疗。越来越多的证据表明, MSCs 主要以旁分泌方式发挥治疗功能,而其释放一系列纳米级囊泡(外泌体)则作为细胞间通讯的重要介质。MSCs 可将干细胞表型传递给受体细胞,促进干细胞维持、分化、自我更新与修复,并且可能介导基质元件之间相互作用,促进受体细胞的组织修复再生。新近干细胞外泌体介导治疗慢性肾脏病已成为研究热点,在 DN 研究中已取得一定结果。本文主要就干细胞外泌体治疗 DN 的国内外研究最新进展进行综述并讨论。

【关键词】糖尿病肾病;干细胞外泌体**【中图分类号】**R692;R587.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-11-01

Research advances in the role of mesenchymal stem cell exosomes in treatment of diabetic nephropathy

Li Shaobin, Tang Mi, Yang Yibin

(Department of Nephrology & Rheumatology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College)

【Abstract】Diabetic nephropathy(DN) has become a major problem affecting human health, and the prevention and treatment of its development and progression has attracted more and more attention in the industry. In recent years, stem cell transplantation has shown great potential in the prevention and treatment of DN, especially mesenchymal stem cells(MSCs) transplantation. More and more studies have shown that MSCs mainly exert a therapeutic effect in a paracrine mode, and a series of nanoscale vesicles(exosomes) released by MSCs act as an important mediator for intercellular communication. These exosomes can transfer stem cell phenotype to recipient cells, promote stem cell maintenance, differentiation, self-renewal, and repair, mediate interactions between matrix elements, and promote tissue repair and regeneration of recipient cells. Stem cell exosome-mediated treatment of chronic kidney disease has become a research hotspot in recent years, and some achievements have been made in the treatment of DN. This article reviews the recent advances in stem cell exosomes in the treatment of DN in China and foreign countries.

【Key words】diabetic nephropathy; stem cell exosome

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最重要的慢性微血管并发症,并已成为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)最主要的病因之一。由于 DN 发病机制复杂多样,现有的临床治疗手段仅能有限延缓 DN 进展,亟待寻求更有效的防治措施。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)以其多能性的特点被作为新兴的再生疗法,其低免疫

源性及增殖分化的治疗潜在在慢性肾脏病中的作用备受关注。研究表明, MSCs 主要是经由旁分泌途径对损伤进行修复^[1]。干细胞衍生的外泌体是重要的旁分泌介导因子,具有转移特定的蛋白质、mRNA 及 microRNA,以及不引起免疫排斥反应、致癌性低等特性而被认为是一种安全可靠的治疗策略,并成为慢性肾脏病干预治疗研究的热点^[2]。MSCs 近年在 DN 领域已取得某些进展。

作者简介:李少斌, Email:550842326@qq.com,

研究方向:糖尿病肾病与干细胞治疗。

通信作者:杨亦彬, Email:yyb1011@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81260118)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190325.1454.008.html>

(2019-03-26)

1 MSCs 的旁分泌作用

MSCs 是具有强大自我更新及多系分化潜能的多能细胞。肾脏损伤后, MSCs 促进肾脏恢复机制尚不十分清楚,涉

及 MSCs 迁移和分化为宿主组织或器官;与宿主细胞治疗性地融合;自分泌和(或)旁分泌效应;患者固有的干细胞再生刺激其内源性修复等^[3]。新近研究更多认为 MSCs 主要治疗作用在于旁分泌效应^[4]。MSCs 可通过合成及分泌生长因子、趋化因子和细胞因子而对周围细胞产生影响,或增强抗炎和器官保护介质的表达,特别是 MSCs 可分泌释放大量细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)而备受关注,尤其是外泌体(exosome)以此干预性治疗各类疾病的研究成为热点。

2 MSCs 分泌外泌体的形成与释放

外泌体是细胞外囊泡常见类型之一,直径 30~100 nm,其内选择性地充满蛋白质、mRNA 和 microRNAs。大多数外泌体具有相类似的蛋白质结构,包括四分子交联体家族成员-9(TM4SF9)、Alix 及 Tsg101,以及反映其来源的特异性蛋白质^[5-6]。外泌体由多泡体(bulovesicular bodies, MVBs)形成, MVBs 中的囊泡可分为早期内体、晚期内体和回收内体。早期内体与内吞囊泡融合,使其内容蛋白易于回收、降解,此时称为回收内体。早期内体经过一系列转化成为晚期内体,回收内体中的内容物则被优先分解为 30~100 nm 的囊泡进入晚期内体。晚期内体被具有靶向溶解作用的溶酶体融合,导致晚期内体膜破坏,将囊泡分泌到细胞外空间,这些囊泡即为外泌体^[7]。有研究证明,经由生长因子受体的信号传导可使早期内体和 MVBs 的形成增加,这表明干细胞根据其需要来调整外泌体的生成与分泌^[8]。外泌体的起源表明其产生主要是由微环境的改变而导致的。

3 MSCs 外泌体在 DN 治疗中的应用

DN 的治疗目前仅限于改善血压或血糖的药物。一旦肾脏疾病进展到不可逆转的阶段,血液透析等替代治疗就不可避免。MSCs 虽可分化与促进实质细胞增殖、修复肾脏损伤,但高血糖可导致内环境稳态异常,可能导致 MSCs 移植后在糖尿病患者中达不到满意的治疗效果^[9]。许多学者意识到,如果直接运用干细胞外泌体对 DN 进行干预,有可能避免这种情况。在体内研究中, Nagaishi 等^[10]通过运用骨髓 MSCs 衍生外泌体干预 DN 大鼠模型,发现其抑制肾小管间质纤维化与肾小球系膜基质扩张,通过抑制 p38-MAPK 和 TGF- β 的表达从而逆转 TGF- β 的增强与异位表达,阻止肾小管上皮细胞中的 ZO-1 降解,最主要的是减少了尿蛋白的排泄。Jiang 等^[11]则通过分离尿源干细胞的外泌体(urine-derived stem cells exosome, USC-exo),分别通过体外及体内研究发现 USC-exo 除了可以减少尿量和尿微量白蛋白排泄外,还可以防止足细胞和肾小管上皮细胞凋亡,抑制 caspase-3 过度表达并增加糖尿病大鼠肾小球内皮细胞增殖。这些数据表明干细胞衍生的外泌体可能具有治疗 DN 损伤的潜力。

DN 常伴随肾小球滤过率下降,高血压导致肾小球硬化

和纤维化^[12]。MSCs 分泌的外泌体富有抗炎与抗纤维化的能力。He 等^[13]发现 BM-MSC 衍生的外泌体干预治疗输尿管阻塞诱导的肾纤维化模型。在体外肾小管细胞中,外泌体可抑制 TGF- β 刺激诱导的形态学变化和减轻 α -SMA 导致的肾脏纤维化。MSCs 衍生的外泌体可能通过调节炎症有关的蛋白质(TNF- α 、NF- κ B、IL-1 β 等)抑制氧化应激的表达来保护大鼠免受缺血再灌注的侵害,同时也对 NADPH 氧化酶(NOX-1、NOX-2)、细胞凋亡相关蛋白(Bax、caspase-3)、纤维化蛋白(SMAD3、TGF- β)和血管生成蛋白(CD31、vWF、血管生成素)有所影响^[14]。由此可以推论, MSCs 外泌体有可能通过胞吞作用进入肾脏细胞,通过一系列连锁反应激活肾脏再生机制。

4 MSCs 外泌体对 DN 的可能作用途径

国内外 MSCs 分泌外泌体于 DN 治疗的研究仍处于起步状态,大多数仅局限于作为诊断标志物的研发^[15]。目前的一些研究结果发现, MSCs 外泌体具有改善 DN 肾脏病理损伤及延缓 DN 进程的潜在作用。本课题组也发现, MSCs 可能通过旁分泌作用改善 DN 肾脏损伤与促血管生成等多种潜质^[16]。外泌体对 DN 治疗的潜在作用方式还有待商榷。

4.1 MSCs 外泌体对血糖的作用

高血糖是导致 DN 的最根本原因之一。糖尿病最佳的治疗选择是胰腺移植,但供体的不足及自身免疫排斥使其存在局限性。因此,干细胞向产生胰岛素细胞的转分化成为众多学者的研究方向。通过相关转录因子(PDX1、MafA、Ngn3 及 NeuroD 等)的诱导,可实现干细胞分化为胰岛素分泌细胞(insulin-producing cells, IPCs),但仍存在各种障碍,包括向 IPCs 分化的低比例、限制性增殖等^[17]。干细胞外泌体用于诱导细胞引起人们的关注,干细胞外泌体具有可以改变细胞表型的功能^[18]。Figliolini 等^[19]发现人胰岛释放生物活性的细胞外泌体可以内化到人胰岛内皮细胞,诱导胰岛素 mRNA 表达,保护胰岛细胞免于凋亡,并通过特异性 mRNA 和 microRNA 增强血管生成。有学者使用离心和微孔尺寸的过滤器装置来产生大量细胞外泌体(称为模拟纳米囊泡),并运用这种方法制备大量胰岛 β 细胞。外泌体在体内将骨髓干细胞成功诱导成为 IPCs,成功减轻 STZ 诱导糖尿病大鼠模型的血糖,并建立完善的气血供应环境^[20]。外泌体介导的干细胞分化产生 IPCs 为胰岛 β 细胞替代治疗提供了新的思路。

4.2 MSCs 外泌体对微血管病变的作用

微量蛋白尿的存在和(或)肾小球滤过率的降低是 DN 的主要临床表现,组织学上主要是肾小球的改变,包括早期肾小球基底膜增厚或肾小球系膜基质积聚和 Kimmelstiel-Wilson 结节性病变,有或没有微动脉瘤和肾小球膜溶解,最终导致晚期肾小球硬化。糖尿病微血管病变与 DN 的形态学和病理生理学密切相关^[21]。Hedhli 等^[22]将肌源性 MSCs 运用于糖尿病微血管病模型,发现其可以上调促血管生成基因如 HIF-1 α

等的表达。干细胞可通过自分泌及旁分泌相关血管生成因子治疗微血管病变,这些效应很大程度可能是依靠外泌体来实现的。有学者发现人 CD34⁺外周血衍生的造血干细胞外泌体可在体外和体内促进小鼠角膜的血管生成。这些外泌体被发现携带富含促血管生成的 miRNA,如 miR-126、miR-130a 等^[23]。Lopatina 等^[24]发现,脂肪 MSCs 外泌体有助于促进血管生成,并表明 PDGF 可能诱导具有增强血管生成潜力的 EV 的释放。VEGF 是有效的促血管生成因子之一,但过度表达 VEGF 可导致异常的病理血管生成,因此抗 VEGF 一度被视为治疗 DN 的有效策略。有学者发现,用 MSCs 衍生的外泌体可刺激 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞产生 miR-100,拮抗 VEGF 的表达^[25]。来自缺氧诱导的胎盘间充质干细胞的外泌体是促进胎盘微血管内皮细胞迁移和血管形成的主要参与者^[26]。由此可以推断出内环境处于缺氧状态可能是外泌体的主要调节因素。这一点推测与 Ohyashiki 等^[27]的研究相契合。Ohyashiki 等^[27]发现,多发性骨髓瘤细胞分泌的外泌体通过 miR-135b 靶向因子抑制缺氧诱导因子-1 来增强血管生成。因此,干细胞外泌体可能通过促血管生成或抗血管重塑的作用参与 DN 的治疗。

4.3 MSCs 外泌体的抗凋亡作用

肾小球足细胞与内皮细胞是维持肾小球滤过屏障功能的关键。细胞的凋亡和缺失是导致 DN 患者蛋白尿的主要原因^[28]。如何避免足细胞过度凋亡损伤一直是治疗 DN 的关键。在肾缺血再灌注损伤模型中,干细胞外泌体通过诱导抗凋亡基因 *Bcl-xl*、*Bcl2* 和 *BIRC8* 的表达和下调促凋亡基因 *Casp1*、*Casp8* 和 *LTA* 的表达而对肾细胞发挥促存活作用^[29]。干细胞外泌体用于治疗缺血心脏病中发现,其抗凋亡机制可能是含有高水平的促存活 microRNA,包括 miR-21 和 miR-210。这些 miRNA 的高表达水平与 Nanog(一种胚胎干细胞特异性转录因子)和关键的缺氧相关转录因子 HIF-1 α 直接相关^[30]。在顺铂诱导的急性肾损伤中,干细胞外泌体可通过减少促凋亡蛋白 Bax 及上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,并逆氧化应激来修复肾脏损伤^[31]。上述干细胞外泌体的运用虽表现出其抗凋亡能力,但所涉及的机制尚不清楚。

4.4 MSCs 外泌体的免疫调节作用

1 型糖尿病是一种自身免疫性疾病,其特征为胰岛 β 细胞的免疫相关性破坏,导致胰岛素分泌下降和高血糖症。在 DN 的早期阶段,由于黏附分子和趋化因子的局部释放,T 细胞和巨噬细胞在肾小球和间质中迁移和积聚^[32]。慢性高血糖诱导促炎细胞因子 (IFN- γ 、TNF- α 和 IL-1 β) 和活性氧生成,并激活蛋白激酶、p38 MAPK 和 JNK 信号通路^[33]。肾脏细胞随后通过释放趋化因子 MCP-1、CSF-1 和促纤维化因子 TGF- β 等建立炎症环,导致细胞外基质沉积向纤维化发展。自研究干细胞特性以来,有学者发现 MSCs 具有低免疫原性或“免疫特权”。该特性被认为能够跨越主要组织相容性障碍进行 MSCs 移植。随后发现其免疫豁免作用可能来自其产生的囊泡,包括抑制 B 细胞和 T 细胞的增殖和单核细胞的成熟,

通过促进产生外泌体以调节 T 细胞和巨噬细胞的 M2 型抑制性免疫应答,并产生大量的细胞因子和生长因子^[34]。MSCs 外泌体具有免疫活性,具有诱导抗炎细胞因子和 Tregs 细胞来减弱活化的免疫系统的潜力^[35]。由于 IFN- γ 对免疫介导的炎症性疾病保护至关重要,人脂肪间充质干细胞衍生外泌体可以显著降低 IFN- γ 的产生^[36]。Nojehdehi 等^[37]也发现,hAMSCs 衍生的外泌体具有免疫抑制和抗炎潜力,其通过 miRNA 调节巨噬细胞极化从而获得将巨噬细胞从 M1 转移到 M2 表型的能力。因此,干细胞所分泌的外泌体可以考虑用作局部免疫抑制的理想载体治疗 DN 所引起的局部炎症细胞浸润。

5 展 望

从众多研究可以看出,MSCs 衍生的外泌体的可能作用途径是由选择性的 3 种组分(mRNA、microRNA 和蛋白质)介导的。mRNA、microRNA 可以转录或抑制靶基因的表达,包含在外泌体中的蛋白质可以直接在受体细胞中发挥作用。3 种组分相互作用参与受体细胞中的转录调控。但 MSCs 衍生的外泌体如何发挥组织营养及修复作用需要进一步研究。此外,干细胞外泌体的制备及质量调控将成为外泌体临床治疗面临的主要问题。随着研究的深入,MSCs 衍生的外泌体有望成为 DN 治疗的前景方法之一。

参 考 文 献

- [1] Eirin A,Zhu XY,Puranik AS,et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation[J]. *Kidney Int*,2017,92(1):114-124.
- [2] Sun X,Meng H,Wan W,et al. Application potential of stem/progenitor cell-derived extracellular vesicles in renal diseases[J]. *Stem Cell Res Ther*,2019,10(1):8.
- [3] Aghajani NA,Lerman LO,Eirin A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair:current status and looming challenges[J]. *Stem Cell Res Ther*,2017,8(1):273.
- [4] Koniusz S,Andrzejewska A,Muraca M,et al. Extracellular vesicles in physiology,pathology,and therapy of the immune and central nervous system,with focus on extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells as therapeutic tools[J]. *Front Cell Neurosci*,2016,10:109.
- [5] Carpintero-Fernández P,Fafián-Labora J,O'Loughlin A. Technical advances to study extracellular vesicles[J]. *Front Mol Biosci*,2017,4:79.
- [6] Lai RC,Yeo RW,Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes[J]. *Semin Cell Dev Biol*,2015,40:82-88.
- [7] Borges FT,Reis LA,Schor N. Extracellular vesicles:structure,function,and potential clinical uses in renal diseases[J]. *Braz J Med Biol Res*,2013,46(10):824-830.
- [8] Borges FT,Melo SA,Özdemir BC,et al. TGF- β 1-containing exo-

- somes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(3): 385–392.
- [9] Liu Y, Tang SC. Recent progress in stem cell therapy for diabetic nephropathy[J]. Kidney Dis (Basel), 2016, 2(1): 20–27.
- [10] Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes[J]. Sci Rep, 2016, 6: 34842.
- [11] Jiang ZZ, Liu YM, Niu X, et al. Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7: 24.
- [12] Heuer JG, Harlan SM, Yang DD, et al. Role of TGF- α in the progression of diabetic kidney disease[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 312(6): F951–962.
- [13] He J, Wang Y, Lu X, et al. Micro-vesicles derived from bone marrow stem cells protect the kidney both in vivo and in vitro by microRNA-dependent repairing[J]. Nephrology (Carlton), 2015, 20(9): 591–600.
- [14] Lin KC, Yip HK, Shao PL, et al. Combination of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes for protecting kidney from acute ischemia-reperfusion injury[J]. Int J Cardiol, 2016, 216: 173–185.
- [15] 纪成, 费书琴, 陈鸣, 等. 间充质干细胞来源外泌体在肾脏疾病中的研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2018, 39(7): 722–725.
- [16] 陈玉琴. 人羊膜间充质干细胞对糖尿病大鼠肾脏血管生成相关因子的影响[D]. 遵义: 遵义医学院, 2018.
- [17] Jacobson EF, Tzanakakis ES. Human pluripotent stem cell differentiation to functional pancreatic cells for diabetes therapies: innovations, challenges and future directions[J]. J Biol Eng, 2017, 11: 21.
- [18] Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, et al. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 306(7): C621–633.
- [19] Figliolini F, Cantaluppi V, De Lena M, et al. Isolation, characterization and potential role in beta cell-endothelium cross-talk of extracellular vesicles released from human pancreatic islets[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102521.
- [20] Oh K, Kim SR, Kim DK, et al. In vivo differentiation of therapeutic insulin-producing cells from bone marrow cells via extracellular vesicle-mimetic nanovesicles[J]. ACS Nano, 2015, 9(12): 11718–11727.
- [21] Tanabe K, Maeshima Y, Sato Y, et al. Antiangiogenic therapy for diabetic nephropathy[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 5724069.
- [22] Hedhli J, Konopka CJ, Schuh S, et al. Multimodal assessment of mesenchymal stem cell therapy for diabetic vascular complications[J]. Theranostics, 2017, 7(16): 3876–3888.
- [23] Mocharla P, Briand S, Giannotti G, et al. AngiomiR-126 expression and secretion from circulating CD34⁺ and CD14⁺ PBMCs: role for proangiogenic effects and alterations in type 2 diabetics[J]. Blood, 2013, 121(1): 226–236.
- [24] Lopatina T, Bruno S, Tetta C, et al. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential[J]. Cell Commun Signal, 2014, 12: 26.
- [25] Pakravan K, Babashah S, Sadeghizadeh M, et al. MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells[J]. Cell Oncol (Dordr), 2017, 40(5): 457–470.
- [26] Mathew SA, Chandravanshi B, Bhone R. Hypoxia primed placental mesenchymal stem cells for wound healing[J]. Life Sci, 2017, 182: 85–92.
- [27] Ohyashiki JH, Umez T, Ohyashiki K. Exosomes promote bone marrow angiogenesis in hematologic neoplasia: the role of hypoxia[J]. Curr Opin Hematol, 2016, 23(3): 268–273.
- [28] Saurus P, Kuusela S, Lehtonen E, et al. Podocyte apoptosis is prevented by blocking the Toll-like receptor pathway[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1752.
- [29] 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.
- [30] Wang Y, Zhang L, Li Y, et al. Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium[J]. Int J Cardiol, 2015, 192: 61–69.
- [31] Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis *in vivo* and *in vitro*[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(2): 34.
- [32] Fernández-Real JM, Vendrell J, García I, et al. Structural damage in diabetic nephropathy is associated with TNF- α system activity[J]. Acta Diabetol, 2012, 49(4): 301–305.
- [33] Fakhrudin S, Alanazi W, Jackson KE. Diabetes-induced reactive oxygen species: mechanism of their generation and role in renal injury[J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 8379327.
- [34] Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(3): 252–260.
- [35] Zhang B, Yin Y, Lai RC, et al. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(11): 1233–1244.
- [36] Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, et al. Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on *in vitro* stimulated T cells[J]. Front Immunol, 2014, 5: 556.
- [37] Domenis R, Cifù A, Quaglia S, et al. Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 13325.

(责任编辑: 张辉洁)