

不同细胞来源的外泌体在 COPD 中的研究进展

杨 玥, 卞 涛*

(南京医科大学附属无锡人民医院 呼吸与危重症科, 江苏 无锡 214000)

摘要: 外泌体(exosomes)是一种几乎被所有类型的细胞分泌的脂质双分子层囊泡, 其包裹各类蛋白质、DNA、mRNA、miRNA 及 LncRNA, 是细胞之间沟通的重要媒介, 参与机体各种生理、病理过程。在慢性阻塞性肺疾病(COPD)中, 支气管上皮细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等多种细胞均可通过分泌外泌体参与 COPD 气道重构与气肿的发生和发展, 间充质干细胞和脂肪干细胞源外泌体则在 COPD 治疗中起到重要作用。

关键词: 外泌体; 慢性阻塞性肺疾病; 支气管上皮细胞; 巨噬细胞; 中性粒细胞

中图分类号: R56 文献标志码: A

Research progress of different cells derived exosomes in COPD

YANG Yue, BIAN Tao*

(Department of Respiratory and Critical Illness, Wuxi People's Hospital, Nanjing Medical University, Wuxi 214000, China)

Abstract: Exosomes are lipid bilayer vesicles secreted by almost all types of cells, which consist of various proteins, DNA, mRNA, miRNA and LncRNA. They are an important medium for communication between cells and participate in various physiological and pathological processes. In chronic obstructive pulmonary disease (COPD), bronchial epithelial cells, macrophages, neutrophils and other cells can participate in COPD airway remodeling and emphysema by secreting exosomes. Moreover, mesenchymal stem cells and adipose stem cell-derived exosomes play an important role in the treatment of COPD.

Key words: exosomes; COPD; bronchial epithelial cell; macrophages; neutrophil

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种与增龄相关的慢性气道炎性疾病, 以持续存在的呼吸道症状和气流受限为特征, 与长期的香烟烟雾或其他有害气体吸入有关^[1]。目前研究发现, 香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)刺激可以诱发多种类型细胞如支气管上皮细胞、中性粒细胞和巨噬细胞向外界分泌细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)。根据直径大小, EVs 分为外泌体、微粒、凋亡小体及癌小体, 其中外泌体是占据比重最大的细胞外囊泡^[2], 上述类型细

胞通过释放外泌体与邻近各种细胞, 如支气管上皮细胞、成纤维细胞和肺泡上皮细胞相互作用, 导致黏液高分泌, 成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 肺泡上皮细胞凋亡等, 最终发生气道重构与肺气肿, 是 COPD 发病机制研究的新热点。

1 外泌体概述

1.1 外泌体的发现

外泌体是一种直径 40~100 nm 的盘状囊泡, 在 1983 年, 首次于绵羊网织红细胞中发现, 1987 年命

名为“exosome”^[3]。2007 年首次发现外泌体可以携带 mRNA 及 miRNA，并且可以进入受体细胞进行翻译表达相关蛋白^[4]。之后，外泌体可以作为遗传物质载体这一观点被广泛接受。

1.2 外泌体的成分

外泌体的脂质双分子结构包裹大量内容物，主要包括蛋白质、脂质、mRNA、miRNA、lncRNA 和 DNA。

蛋白质是外泌体中最早研究的物质，蛋白质组学分析发现不同类型细胞所分泌的外泌体不仅有同样的蛋白质成分，而且包含分泌细胞所特有的蛋白。前者包括外泌体膜与受体细胞融合相关的 Rabs 蛋白，具有外泌体膜交换以及融合作用的膜联蛋白，参与外泌体运输的 4 跨膜蛋白家族 (CD63、CD81 和 CD9)、热休克蛋白家族、各种代谢酶类、核糖体蛋白 (RPS3)、信号传导因子、黏附因子、细胞骨架蛋白以及泛素，等等，后者如结肠上皮细胞来源的外泌体含有 A33 蛋白，抗原提呈细胞来源外泌体特有 MHC-II、CD86，T 淋巴细胞来源外泌体特有的颗粒酶与穿孔素，肿瘤细胞来源外泌体特有的肿瘤相关抗原以及中性粒细胞来源外泌体表面带有中性粒细胞特异性酯酶，等等^[5]。

脂质的相关研究相对较少，其组成因来源细胞不同而有所区别，外泌体富含鞘磷脂、磷脂酰丝氨酸和胆固醇，此外还包含神经节苷脂，饱和脂肪酸和神经酰胺，对维持外泌体内核酸在细胞外液中的稳定起到重要作用^[6]。

外泌体中核酸物质包括 DNA，各种编码及非编码 RNA，自 2007 年以来一直是研究的重点和热点。外泌体中的 RNA 可以运输至相邻细胞或随着体液远程运输，进入到受体细胞内仍然保持其生物活性，可以通过转录、翻译或直接作用于蛋白质水平影响受体细胞蛋白表达，是外泌体的重要生物学特征^[7]。

2 在 COPD 中各种类型细胞来源外泌体的作用

2.1 支气管上皮细胞来源的外泌体

支气管上皮细胞是与空气中有毒害物质接触的主要细胞之一，在香烟烟雾刺激下能分泌多种细胞因子及趋化因子，作用于周围的平滑肌细胞和间充质成纤维细胞，并且有募集炎性细胞的作用，在 COPD 的发生发展中扮演重要角色^[8]。支气管上皮

细胞是肺内外泌体的主要生产者。香烟烟雾刺激通过耗竭支气管上皮细胞表面巯基，增加细胞内活性氧，导致更多的病理性外泌体的释放^[9]，通过旁分泌方式作用于周围支气管上皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞，这是导致 COPD 小气道重构及肺气肿的重要机制之一。

气道上皮之间可以通过外泌体进行信息交流。原代支气管上皮细胞 HTBE 分泌的主要是基本的先天保护性蛋白，包括黏蛋白 5B，而培养的气道上皮细胞系 Calu-3 分泌的主要是病理相关蛋白，包括黏蛋白 5AC。交换两种细胞上清内的外泌体之后，HTBE 的外泌体中 miRNA 普遍升高，细胞的黏蛋白分泌显著增加，反之，Calu-3 的分泌则没有明显改变^[10]。

除了气道上皮之间能够通过外泌体进行沟通交流，气道上皮与巨噬细胞、成纤维细胞和肺泡上皮细胞之间也可以通过外泌体进行信息传递，参与 COPD 多种病理过程。

气道上皮细胞通过释放外泌体参与 COPD 气道重构。CSE 刺激下人支气管上皮细胞 (BEAS-2B) 分泌出的外泌体中检测出更高水平的 miR-21，外泌体进入人髓系白血病单核细胞 THP-1 细胞后，进一步提高 THP-1 细胞内的 miR-21 的水平，使 THP-1 细胞向 M2 型巨噬细胞分化的同时伸出伪足，分泌更多的巨噬细胞特征性细胞因子如转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 和白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 等，反向促进 BEAS-2B 发生上皮间质转化过程^[2] (图 1A)。但是在 CSE 刺激早期支气管上皮细胞保护性地减少外泌体内 miR-21 的分泌，这是一种早期的代偿机制。同样的，人支气管上皮细胞 HBE 在 CSE 刺激之后，外泌体中 miR-21 含量增加，与 HBE 共培养的成纤维细胞内吞外泌体后，细胞内的 miR-21 水平随之增加，靶向降低 pVHL 水平，进而使缺氧诱导因子 1α 水平升高，成纤维细胞向肌成纤维细胞分化，I 型胶原增加，引起气道重塑^[11] (图 1B)。CSE 刺激下 BEAS-2B 细胞外泌体中 miR-210 含量增加通过引起共培养的人成纤维细胞内自噬相关蛋白表达降低，自噬减少，人成纤维细胞向肌成纤维细胞分化。提示支气管上皮细胞通过外泌体与周围细胞交联，是长期香烟烟雾刺激致 COPD 气道重塑的

重要原因^[12](图 1B)。

气道上皮细胞释放外泌体参与 COPD 肺气肿的形成。BEAS-2B 在 CSE 刺激下产生的外泌体中含有半胱氨酸富集蛋白 61 (cysteine-rich protein 61, CYR61/CCN1) 的阳性胞体从 29% 升高至 45%, 在纤维蛋白酶的作用下外泌体中的全长型 CCN1 裂解形成剪切型 CCN1, 随之引起基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1, MMP1) 水平提升, 而 MMP1 是与肺气肿发生高度相关的经典蛋白酶, 其引起肺泡细胞凋亡增加, 肺泡间隔破坏^[13]。支气管上皮细胞在香烟烟雾刺激下分泌出含有更多 CCN1 的外泌体, 可能通过 MMP1 导致肺气肿的产生(图 1C)。

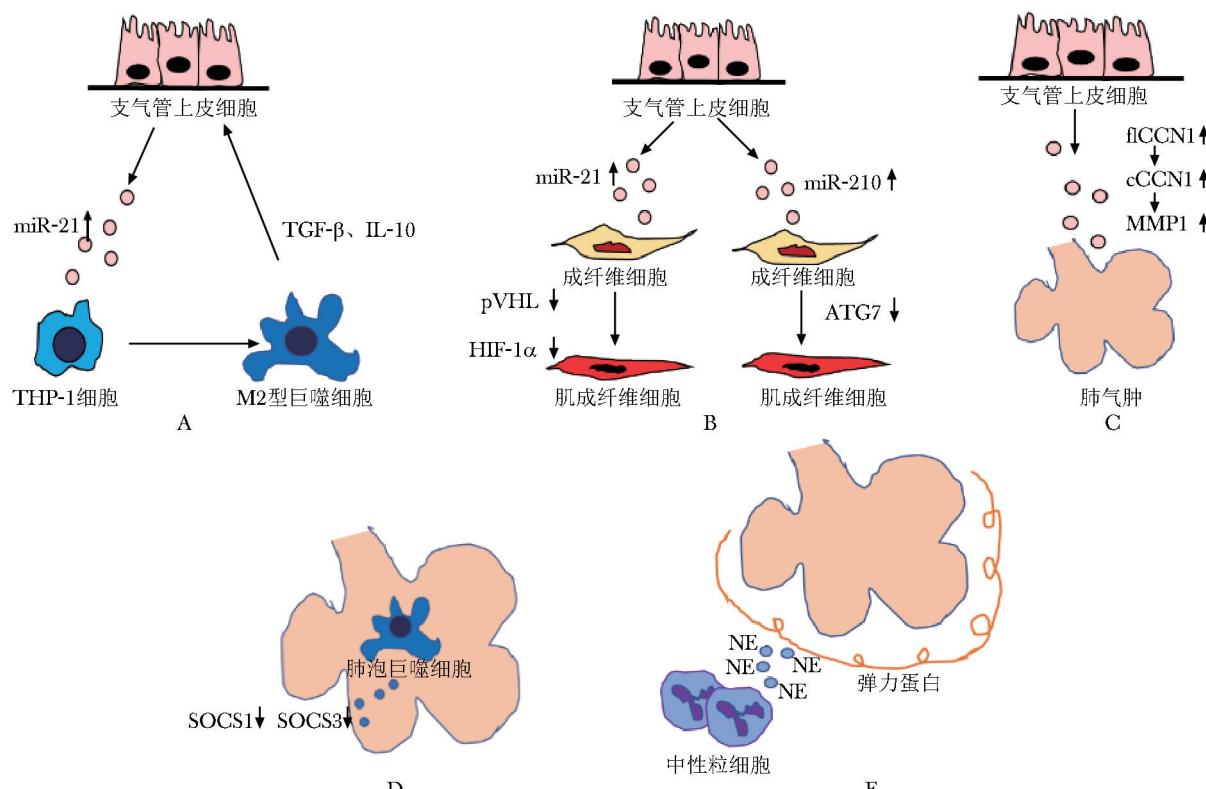
2.2 炎性细胞来源的外泌体

巨噬细胞和中性粒细胞是构成 COPD 慢性炎性反应的重要细胞, 在 COPD 小鼠模型和 COPD 患者

的肺泡灌洗液、肺组织中均发现巨噬细胞和中性粒细胞数量显著增多^[14]。

2.2.1 巨噬细胞来源的外泌体: 巨噬细胞是肺泡常驻免疫细胞。正常情况下, 肺泡内仅含少量的巨噬细胞, 香烟烟雾等有毒有害颗粒和气体可诱导巨噬细胞浸润和活化, 活化的巨噬细胞分泌白细胞介素 8 (interleukin 8, IL-8)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和白三烯 B4 等炎性因子, 破坏周围的肺实质。因此, 巨噬细胞活化是 COPD 气肿发生发展的重要原因^[15]。

肺泡上皮和邻近的肺泡巨噬细胞在生理和病理状态下均有密切交流。肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AM) 的形成与肺泡上皮细胞分泌的表面活性蛋白 A、TNF- α 、IL-10 和前列腺素 E2 有关^[16]。生理状态下, 肺泡巨噬细胞可以向邻近的肺泡上皮



- A. exosomal miR-21 derived from bronchial epithelial cells promotes the differentiation of THP-1 into M2 macrophages;
- B. exosomal miR-21 and miR-210 in exosomes from bronchial epithelial cells promote the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts;
- C. CCN1 in exosomes derived from bronchial epithelial cells induces alveolar apoptosis via MMP1;
- D. the reduce of SOCS1 and SOCS3 in exosomes derived from macrophages makes the protective and anti-inflammatory effects disappear;
- E. elastase bounded on the surface of exosomes derived from neutrophils promotes the occurrence of emphysema

图 1 不同细胞来源外泌体参与 COPD 气道重构和肺气肿发生

Fig 1 Different cells derived exosomes in COPD airway remodelling and emphysema

细胞释放含有细胞因子信号抑制分子 1(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1)的外泌体和富含细胞因子信号抑制分子 3(suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3)的微囊泡。炎性因子激活 JAK/STAT 通路, STATs 磷酸化后形成二聚体, 进入细胞核, 诱导下游信号传导蛋白表达, 而细胞因子信号传导抑制因子 SOCS 蛋白家族可通过使 JAKs 的细胞因子受体磷酸化, 阻断细胞因子对 JAK 的激活, 切断 JAK/STAT 信号传导通路^[17]。AM 来源的微粒进入肺泡上皮细胞后, SOCS1 和 SOCS3 可以抑制胞内由炎性因子刺激导致的 JAK/STAT 通路的激活, 阻止炎性反应的放大, 从而维持肺泡周围微环境的稳态^[18]。香烟烟雾刺激下, AM 数量显著增加, 相反的, 通过 AM 分泌外泌体和微囊中包含的 SOCS1 和 SOCS3 蛋白水平减少, 使肺泡巨噬细胞的保护抗感染作用消失(图 1D)。这一现象为探讨香烟烟雾等有毒有害颗粒和气体导致肺气肿的机制提供了新思路。

2.2.2 中性粒细胞来源的外泌体: 中性粒细胞是 COPD 主要炎性细胞之一, 吸入有毒有害颗粒和气体后, 肺内中性粒细胞募集活化, 向周围释放弹力蛋白酶、多种细胞因子及氧自由基, 同时中性粒细胞胞外杀菌网络形成增加^[19-20]。中性粒细胞释放蛋白酶过量或肺内抗蛋白酶活性降低, 蛋白酶/抗蛋白酶失衡会使肺泡外的弹性蛋白和 I 型胶原被结合降解, 导致肺气肿发生^[21-22]。

与不吸烟正常人相比, 在 COPD 患者肺泡灌洗液中发现, 中性粒细胞来源外泌体表面结合有大量中性粒细胞弹力蛋白酶。进一步将 COPD 患者的肺泡灌洗液通过气管滴注处理小鼠后, 发现小鼠出现明显的肺气肿。在细胞水平上, 活化的中性粒细胞会分泌更多的外泌体, 中性粒细胞弹力蛋白酶以膜结合蛋白的形式黏附在外泌体表面, 不仅有经典途径分泌的中性粒细胞弹力蛋白酶一样的活性, 而且可以准确定位于 I 型胶原^[23]。中性粒细胞来源外泌体调节可以作为治疗 COPD 肺气肿的新靶点(图 1E)。

2.2.3 干细胞来源的外泌体: 外泌体具有免疫排斥少, 内含物稳定, 半衰期长和靶向传递的优势, 其中, 人间充质干细胞和脂肪干细胞衍生的外泌

体是无细胞再生医学的有前途的治疗剂, 在肿瘤疾病、神经系统疾病、呼吸系统疾病和心血管系统疾病等中均有应用^[24]。干细胞来源外泌体在 COPD 治疗方面也已经有了初步的研究。间充质干细胞释放出的外泌体可以缓解 CSE 诱导的支气管上皮细胞线粒体功能障碍, 同时, 间充质干细胞联合其外泌体腹腔注射可以减轻香烟烟雾刺激引起的小鼠气道炎性反应^[25]; 人胎盘提取的间充质细胞来源的外泌体与免疫调节因子混合, 在小鼠和临床实验中均证实其具有促进抗炎因子释放、减少炎性细胞浸润、改善肺功能等作用^[26]; 脂肪干细胞衍生的人工外泌体同样具有生物活性, 可在较低剂量促进 II 型肺泡上皮增殖, 经气管内滴注后, 其可通过增加小鼠肺部成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2, FGF2) 蛋白水平而有效地缓解弹力蛋白酶构建的小鼠肺气肿, 为未来在治疗 COPD 肺气肿提供了新的思路^[27]。

3 问题与展望

综上所述, 外泌体是近年来受到广泛关注的细胞间通讯工具和靶向治疗药物载体, 可能是肺内各类细胞交流的关键因素。有毒有害颗粒及气体刺激下, 肺内多种细胞通过外泌体相互沟通, 参与 COPD 病理特征形成, 同时, 干细胞来源外泌体可应用于 COPD 的治疗。虽然对外泌体与 COPD 的关系的研究越来越多, 但是外泌体在 COPD 临床应用方面的价值仍待进一步探索。

外泌体一定程度上可以反应细胞状态, 是细胞向周围甚至远隔细胞传递信息的桥梁。理论上, 根据这些信息的组合及分析可以判断疾病的发生、严重程度和预后等。但是由于在体液中尤其是肺泡灌洗液中, 提取外泌体往往较为困难, 因此, 外泌体在 COPD 中的应用还较少。近年来外泌体分离和检测技术日渐成熟, 高通量检测数据库的逐渐完善, 其他疾病中外泌体在诊断、治疗和预后方面的应用不断增多, 为外泌体在 COPD 方面应用打下基础, 在不久的将来, 外泌体用以作为监测 COPD 疾病进程和风险预估的标志物也将成为可能。

参考文献:

- [1] Singh D, Agusti A, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease: the GOLD science committee report 2019 [J]. Eur Respir J, 2019, 53: 1900164. doi: 10.1183/13993003.00164-2019.
- [2] He S, Chen D, Hu M, et al. Bronchial epithelial cell extracellular vesicles ameliorate epithelial-mesenchymal transition in COPD pathogenesis by alleviating M2 macrophage polarization [J]. Nanomedicine, 2019, 18: 259-271.
- [3] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. J Biol Chem, 1987, 262: 9412-9420.
- [4] Valadi H, Ekstrom 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: 654-659.
- [5] Kalluri R, Lebleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367:eaa6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
- [6] Miranda AM, Lasiecka ZM, Xu Y, et al. Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures [J]. Nat Commun, 2018, 9:291. doi: 10.1038/s41467-017-02533-w.
- [7] Park JE, Dutta B, Tse SW, et al. Hypoxia-induced tumor exosomes promote M2-like macrophage polarization of infiltrating myeloid cells and microRNA-mediated metabolic shift [J]. Oncogene, 2019, 38: 5158-5173.
- [8] Hou W, Hu S, Li C, et al. Cigarette smoke induced lung barrier dysfunction, EMT, and tissue remodeling: a possible link between COPD and lung cancer [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 2025636. doi: 10.1155/2019/2025636.
- [9] Benedikter BJ, Volgers C, van Eijck PH, et al. Cigarette smoke extract induced exosome release is mediated by depletion of exofacial thiols and can be inhibited by thiol-antioxidants [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 108: 334-344.
- [10] Gupta R, Radicioni G, Abdelwahab S, et al. Intercellular communication between airway epithelial cells is mediated by exosome-like vesicles [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 60: 209-220.
- [11] Xu H, Ling M, Xue J, et al. Exosomal microRNA-21 derived from bronchial epithelial cells is involved in aberrant epithelium-fibroblast cross-talk in COPD induced by cigarette smoking [J]. Theranostics, 2018, 8: 5419-5433.
- [12] Fujita Y, Araya J, Ito S, et al. Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis [J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4:28388. doi: 10.3402/jev.v4.28388.
- [13] Moon HG, Kim SH, Gao J, et al. CCN1 secretion and cleavage regulate the lung epithelial cell functions after cigarette smoke [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 307: L326-L337.
- [14] Kojima K, Asai K, Kubo H, et al. Isoflavone aglycones attenuate cigarette smoke-induced emphysema via suppression of neutrophilic inflammation in a COPD murine model [J]. Nutrients, 2019, 11:2023. doi:10.3390/nu11092023.
- [15] Li N, Liu Y, Cai J. lncRNA MIR155HG regulates M1/M2 macrophage polarization in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109015. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109015.
- [16] Tanno A, Fujino N, Yamada M, et al. Decreased expression of a phagocytic receptor Siglec-1 on alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respir Res, 2020, 21: 30. doi: 10.1186/s12931-020-1297-2.
- [17] Durham GA, Williams J, Nasim MT, et al. Targeting SOCS proteins to control JAK-STAT signalling in disease [J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40: 298-308.
- [18] Mizuno S, Soma S, Inada H, et al. SOCS1 antagonist-expressing recombinant bacillus calmette-guerin enhances antituberculosis protection in a mouse model [J]. J Immunol, 2019, 203: 188-197.
- [19] Dicker AJ, Crichton ML, Pumphrey EG, et al. Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141: 117-127.
- [20] Murphy MP, Mcenery T, McQuillan K, et al. Alpha1 antitrypsin therapy modulates the neutrophil membrane pro-

- teome and secretome [J]. Eur Respir J, 2020, 55: 1901678. doi: 10.1183/13993003.01678-2019.
- [21] Fysikopoulos A, Seimetz M, Hadzic S, et al. Amelioration of elastase-induced lung emphysema and reversal of pulmonary hypertension by pharmacological iNOS inhibition in mice [J]. Br J Pharmacol, 2020. doi: 10.1111/bph.15057.
- [22] Ortega VE, Li X, O'Neal WK, et al. The effects of rare SERPINA1 variants on lung function and emphysema in SPIROMICS [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2020, 201: 540-554.
- [23] Genschmer KR, Russell DW, Lal C, et al. Activated PMN exosomes: pathogenic entities causing matrix destruction and disease in the lung [J]. Cell, 2019, 176: 113-126.
- [24] Liu H, Sun X, Gong X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived exosomes exert antiapoptotic effect via activating PI3K/Akt/mTOR pathway on H9C2 cells [J]. J Cell Biochem, 2019, 120: 14455-14464.
- [25] Maremunda KP, Sundar IK, Rahman I. Protective role of mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cell-derived exosomes in cigarette smoke-induced mitochondrial dysfunction in mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 385: 114788. doi: 10.1016/j.taap.2019.114788.
- [26] Harrell CR, Miloradovic D, Sadikot R, et al. Molecular and cellular mechanisms responsible for beneficial effects of mesenchymal stem cell-Derived product “Exo-d-MAPPS” in attenuation of chronic airway inflammation [J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2020, 2020: 3153891. doi: 10.1155/2020/3153891.
- [27] Kim YS, Kim JY, Cho R, et al. Adipose stem cell-derived nanovesicles inhibit emphysema primarily via an FGF2-dependent pathway [J]. Exp Mol Med, 2017, 49: e284. doi: 10.1038/emm.2016.127.

新闻点击

乳房植入物成分可能导致人体细胞死亡

据美国今日医学新闻(*Medical News Today*)报道,来自荷兰的研究指出,乳房植入物中的“有机硅(Silicone)”分子可能导致人类细胞死亡。

硅胶乳房植入物可能产生的不良反应已争辩了数十年,在某些情况下,植入物可能导致严重的疲劳、发烧、肌肉和关节疼痛以及注意力不集中等,但是一直都没有科学研究证明有机硅分子可能产生这些不良反应。

众所周知,乳房植入物可能会“渗出”,也就是植入物的有机硅分子穿过外壳进入人体。荷兰奈梅亨大学医学中心研究人员在2016年就发现,有机硅分子可以经由血液或淋巴系统在人体内移动。为了弄清楚有机硅分子对人体细胞有什么影响,研究人员在3种不同类型的人体培养细胞中添加了小的有机硅分子,这种分子也存在于硅胶乳房植入物中。结果发现其中一种细胞对有机硅分子的反应比其他两种细胞更敏感,这表明人类细胞对有机硅的敏感性各不相同。

实验表明,有机硅似乎可能引发细胞死亡的过程。研究人员认为,观察到类似于细胞程序性死亡的过程,这是一种称为凋亡(apoptosis)的自然过程,对清除人体细胞具有重要功用。而有机硅对细胞的影响似乎取决于剂量和分子质量的大小,分子质量越小,效果更强。

因为在研究中使用的是培养细胞,而不是特定的人类细胞,例如脑细胞或肌肉细胞,所以还需要进一步的研究来厘清更多疑问。

刘晓荻 译
薛惠文 编