

外泌体在急性肺损伤中的作用研究进展

张涛¹, 岳渊¹, 肖漓²

1. 佳木斯大学基础医学院, 佳木斯 154007; 2. 中国人民解放军总医院第八医学中心呼吸与危重症医学部研究所, 北京市器官移植与免疫调节重点实验室

[摘要] 急性肺损伤是一种常见且棘手的危重疾病, 其病因及发病机制错综复杂, 如今已成为临床研究的热点之一。急性肺损伤是由肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤, 肺毛细血管通透性增强而导致的急性缺氧性呼吸衰竭。干细胞来源的外泌体具有减低肺部炎症反应、改善肺微血管内皮屏障通透性以及促进肺组织结构修复等作用, 这为急性肺损伤的治疗提供了一种新策略。该文就外泌体在急性肺损伤中的作用机制研究进展进行综述。

[关键词] 急性肺损伤; 外泌体; 免疫调节; 综述

DOI:10.3969/J. issn. 1672-6790. 2022. 04. 028

Research progress of exosomes in acute lung injury

Zhang Tao^{*}, Yue Yuan, Xiao Li

^{*} Jiamusi University Basic Medical College, Jiamusi 154007, China

Corresponding author: Xiao Li, Email: xiaolilab309@163.com

[Abstract] Acute lung injury is a common and intractable critical disease, and its etiology and pathogenesis are complicated, which has become one of the hotspots in clinical research. Acute lung injury is caused by the injury of alveolar epithelial cells and capillary endothelial cells, and the enhanced permeability of pulmonary capillary leads to acute hypoxic respiratory failure. It was found that exosomes derived from stem cells can reduce lung inflammation, improve lung microvascular endothelial barrier permeability and promote lung tissue structural repair, which provides a new strategy for the treatment of acute lung injury. This article reviews the research progress of exosome in acute lung injury.

[Keywords] Acute lung injury; Exosomes; Immunomodulation; Review

急性肺损伤(ALI)是指由心源性以外的各种肺内外致病因素导致的急性、进行性缺氧性呼吸衰竭, 是呼吸科常见的危重疾病之一^[1]。据报道, ALI 患者的病死率达 35% ~ 40%^[2]。其临床症状为发热、咳嗽、痰中带血, 部分患者可伴有呼吸困难或胸痛, ALI 发展至严重阶段被称为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[3]。导致 ALI 患者的原因有很多, 如感染、休克、严重非胸部创伤、重度烧伤、大量输血、急性胰腺炎及药物中毒, 或吸入烟尘、氧中毒及放射性损伤等^[4]。由于 ALI 患者病死率居高不下, 故早期快速诊断以及探索有效的治疗方法意义重大。

近年来, 越来越多的研究证明间充质干细胞(MSC)及其分泌的外泌体可以治疗 ALI, MSC 可以分泌多种细胞因子, MSC 来源的外泌体(MSC-exo)则可

以通过所携带的 miRNA 和蛋白质作用于靶细胞, 通过不同的机制来干预和调控 ALI 的发展^[5-6]。MSC 释放的外泌体不仅有类似于干细胞的趋化作用, 而且其免疫原性较弱, 具有非常好的发展前景^[7]。最近的研究发现其他细胞如肺泡上皮细胞、内皮祖细胞等分泌的外泌体也对 ALI 的修复发挥一定作用。

1 外泌体的概念与生物学特性

外泌体是直径 30 ~ 100 nm 的囊泡样小体, 属于一种细胞外囊泡(EV), 由多种细胞主动向胞外分泌, 包含复杂 RNA 和蛋白质。其首次发现于 20 世纪 80 年代, Trams 等^[8]观察到网织红细胞在成熟期间会分泌一种含有转铁蛋白受体的小囊泡, 介导转铁蛋白受体的清除。在此后的十余年间, 外泌体仅被看作是细胞清除代谢废物的工具^[9]。直到 20 世

基金项目: 军队医学科技青年培育计划项目(18QNP035)

作者简介: 张涛, 教授, Email: ztlzy1971@163.com

通信作者: 肖漓, 主任技师, Email: xiaolilab309@163.com

纪90年代末,Zitvogel等^[10]研究表明,外泌体可能是细胞间通讯的重要媒介,这才重新激起了人们对外泌体研究的兴趣。人体中几乎所有类型的细胞都能产生外泌体,它可以从多种体液中被分离出来,包括血液、尿液、肺泡灌洗液(BALF)、唾液和脑脊液等。外泌体通过内体和质膜2种途径产生,其中研究最多的是内体途径(即先由质膜出芽形成早期内体,然后早期内体萌发腔内囊泡形成囊泡小体,最终囊泡小体与质膜融合释放外泌体),也可以从质膜直接出芽形成(即质膜途径)。

外泌体参与多种生理和病理过程,具有促凝和抗凝作用、促炎和抗炎作用、促血管生成等多种生物学活性。外泌体具有以下特点:①结构特殊,特性稳定,可以长时间低温保存且不改变其活性;②体积小,可避免微循环阻塞;③外泌体表面有磷脂膜,可保证多种生物活性成分不易被酶降解。相比于细胞,外泌体在治疗方面更具优势和应用潜力。因此,外泌体的研究在医学领域日益受到瞩目。

目前研究证实,外泌体是细胞间的通讯方式之一,可以完成细胞间遗传物质、脂质和蛋白质的交换^[11]。外泌体通过不同的途径将信息传递给靶细胞,主要包括:①外泌体膜上的蛋白直接与靶细胞膜上的蛋白接触,触发胞内信号级联;②外泌体胞膜与靶细胞胞膜融合,释放其内容物进入靶细胞;③靶细胞直接吞噬外泌体并将其内化为组成部分。

2 外泌体的生物学功能

细胞凋亡的调控异常会导致多种疾病,ALI是由于细胞凋亡和肺部炎症反应过度而导致组织损伤加重。其中脂多糖(LPS)诱导肺损伤后的细胞凋亡是导致ALI的主要途径之一。Liu等^[1]研究表明,骨髓间充质干细胞(BMSC)来源的外泌体(BMSC-exo)可有效抑制LPS诱导肺损伤后肺泡巨噬细胞(AMs)中的自噬体和自溶酶体斑点的形成,进而阻止LPS诱导的AMs凋亡。Mao等^[12]研究表明,BMSC-exo在硫芥(SM)导致的ALI中具有抗细胞凋亡的作用。SM是一种可导致ALI的剧毒化学试剂。结果显示,注射BMSC-exo 24 h后,凋亡细胞数量显著减少。

外泌体不仅可以抑制细胞凋亡,同时具有促炎或抗炎作用。ALI时出现肺内炎症反应不可控,大量炎症细胞和炎症因子释放。AMs是驻留在肺组织中的主要免疫细胞,它通过释放过量的炎症细胞因子,促进中性粒细胞浸润和肺组织损伤,这在ALI发病机制中起核心作用。肺泡上皮细胞(AEC)是

一种具有较大表面积的肺部结构细胞,在肺损伤过程中AEC通常最先被破坏。而外泌体在AMs和AEC之间的信息传递中发挥重要作用。Sui等^[13]研究表明,巨噬细胞培养液用LPS处理后,分离纯化出外泌体,检测到外泌体中肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 和IL-6的水平显著升高,说明用LPS诱导巨噬细胞后,该细胞分泌的外泌体具有促炎作用。Liu等^[14]研究证实,AECs来源的外泌体(AECs-exo)可能是造成脓毒症急性肺损伤炎症加重的原因之一。实验发现AECs分泌的外泌体中的miRNAs可以将炎症信号传递给活化的巨噬细胞,进而引发肺内炎症,这表明AEC-exo在脓毒症急性肺损伤中具有促炎作用。

Li等^[15]使用LPS和MSC-exo处理Ⅱ型肺泡上皮细胞(MLE-12),观察炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-10)的表达。结果显示,与LPS处理组相比,经MSC-exo处理的细胞中炎症因子表达显著下调,提示MSC-exo具有抗炎作用。Liu等^[1]的实验发现LPS刺激后的血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平显著升高,随后在静脉或气管内注射BMSC-exo,TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的水平可显著受到抑制。上述表明BMSC-exo可以有效减轻LPS引起的炎症反应。

3 外泌体治疗ALI可能的作用机制

3.1 外泌体通过调控信号传导通路发挥作用

PI3K/Akt信号通路调控多种生理过程,包括细胞凋亡、增殖和分化。Mizuta等^[16]研究证实,在组蛋白导致的ALI中,使用脂肪间充质干细胞(ADSCs)外泌体的抑制剂GW4869后,Akt磷酸化水平下调,这说明Akt磷酸化是由ADSCs来源的外泌体(ADSCs-exo)诱导的。ADSCs-exo在上调Akt磷酸化水平的同时,也激活了PI3K/Akt信号通路,从而减轻组蛋白导致的ALI。上述结果证明了ADSCs-exo通过PI3K/Akt信号通路减轻肺损伤程度。已知机体在受到感染后,炎症反应需要启动NF- κ B信号通路。Li等^[15]选取了HO-1、GPX-1、Nrf-2、NF- κ B和GR等5个与NF- κ B信号通路相关的基因,探讨MSC-exo能否通过NF- κ B信号通路改善LPS诱导的ALI。结果显示,输注MSC-exo后,上述5个基因的表达受到显著调控,并且炎症反应程度减轻,证明了MSC-exo可通过NF- κ B信号通路改善LPS诱导的ALI。

3.2 外泌体通过miRNA发挥作用

近几年的研究表明,外泌体中的miRNA在细胞间微通讯中发挥关键作用,外泌体通过促进miRNA从一个细胞转移到

靶细胞而成为细胞间通讯的重要使者^[17-18]。

内皮祖细胞(EPC)可参与损伤血管的修复,减轻血管渗漏和炎症反应,并增强细菌清除^[19-20]。Zhou 等^[21]研究指出 EPC 来源的外泌体(EPC-exo)在脓毒症中可以预防内皮功能障碍和肺损伤,原因之一是它们携带了 miRNA-126。miRNA-126 是一种重要的血管生成信号调节因子,可以维持血管内皮细胞和血管壁的完整性。实验表明 EPC-exo 能够将 miRNA-126 转移到内皮细胞中,从而降低与 ARDS 发展相关的基因表达。此外,静脉注射 EPC-exo 可减轻小鼠脓毒症急性肺损伤,其原因也是依赖于 miRNA-126 的存在。

Yi 等^[22]为了证明 MSC-exo 分泌 miRNA-30b-3p 对 LPS 处理的 MLE-12 细胞的影响,将过表达 miRNA-30b-3p 的 MSC-exo 注射入 ALI 小鼠中,检测 MLE-12 细胞的增殖、凋亡情况。结果显示,携带 miRNA-30b-3p 的 MSC-exo 可通过促进 MLE-12 增殖和抑制其凋亡对 LPS 导致的 ALI 发挥治疗作用,缓解 ALI 小鼠肺损伤。

Xu 等^[23]使用光气诱导大鼠 ALI 后,从大鼠 BALF 中分离出外泌体,发现外泌体促进了 MSC 增殖和 IL-10 释放。通过 miRNA 谱分析,发现 miRNA-28-5p 在促进 MSC 增殖中发挥作用,且 miRNA-28-5p 可以激活 PI3K/Akt 信号通路。

Li 等^[18]从大鼠的 MSC 中提纯出外泌体,发现 miRNA-124-3p 在 MSC-exo 中大量表达。将 MSC-exo 注射入 ALI 大鼠中,发现 MSC-exo miRNA-124-3p 可提高 ALI 大鼠存活率,并增强其肺组织中谷胱甘肽/超氧化物歧化酶活性。经 miRNA-124-3p 处理的大鼠 BALF 中巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的数量显著减少。上述结果表明, MSC-exo 携带的 miRNA-124-3p 可改善 ALI 应激损伤。

3.3 外泌体通过调控自噬发挥作用 自噬是指细胞吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡,与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其包裹内容物,借此实现细胞代谢和某些细胞器更新。自噬在生理和病理过程中都可发生,其在 ALI 中所起的作用尚未完全阐明。Liu 等^[1]研究表明 BMSC-exo 在 LPS 刺激后的肺泡巨噬细胞中显著降低了 Beclin-1 表达。Beclin-1 基因是一种自噬相关基因,与 Bcl-2 基因相互拮抗而调控自噬。BMSC-exo 通过抑制肺泡巨噬细胞自噬而减轻 LPS 导致的 ALI。而 Wei 等^[2]研究表明,人脐带间充质干细胞(hucMSCs)释

放的外泌体通过增强自噬和抑制炎症因子表达而缓解 LPS 诱导的 ALI。

4 间充质干细胞来源的外泌体在新冠肺炎治疗中发挥作用

2020 年,由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的肺炎在全球爆发。新冠肺炎患者死亡的主要原因是低氧性呼吸衰竭,最终导致 ARDS^[24]。新冠肺炎的大流行给全球公共卫生和国际经济带来巨大的负面影响^[25]。外泌体含有与其来源细胞相似的成分,如 MSC-exo 与 MSC 在功能上一致,而 MSC-exo 有更多的优势,如穿透血液屏障、有较低的免疫原性、无肿瘤发生风险、可以大规模制造等,而且 MSC-exo 成本更加低廉,因此 MSC-exo 成为治疗新冠肺炎潜在治疗方案之一^[26-27]。

Sengupta 等^[28]对 24 例新冠肺炎患者进行了临床试验研究以评估 BMSC-exo 的安全性和有效性。BMSC-exo 经静脉注射后,细胞因子风暴显著减轻,患者缺氧情况显著改善,且 72 h 内无不良反应。Zhang 等^[29]表明表达 hACE2 的外泌体可以与细胞上的 hACE2 竞争性结合 SARS-CoV-2 的刺突蛋白,从而阻断病毒侵入宿主细胞。Khalaj 等^[30]认为外泌体作为一种新冠肺炎的新型治疗方法具有巨大的潜力,外泌体可降低肺炎症反应,使受损肺泡上皮和内皮细胞再生修复,防止肺纤维化。

在新冠肺炎大流行期间,我们一直在探寻关于外泌体治疗新冠肺炎合理有效的方法,并在临床试验方案中评估其安全性和有效性,这些研究成果对于 SARS-CoV-2 来说是非常有价值的。

5 总结与展望

不同细胞来源的外泌体作用差别很大。如 MSC-exo 可以预防早期缺氧引起的肺部炎症,修复内皮屏障,减轻肺水肿,恢复肺泡清除率,改善急性肺损伤患者的呼吸功能;而 BALF 中巨噬细胞的外泌体则会分泌促炎因子,促进肺部发生炎症反应;肺泡上皮细胞释放的外泌体可将炎症信号传递给活化的巨噬细胞而引发肺内炎症;EPC-exo 则可以通过 miR-126 减轻 ALI。

与药物治疗相比,外泌体治疗方法有很大的优势:①外泌体免疫原性较低,可以避免免疫应答激活;②外泌体作为一种新型疗法,其尺寸小可深入到大多数组织内部;③外泌体有良好的生物稳定性,可装载药物;④外泌体可保持良好的生物相容性,能携带多种类型的生物分子;⑤外泌体可对其表面特异

性受体进行加工,以实现将治疗性分子作用于靶细胞等。这都使得其在治疗 ALI 中存在良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] LIU X, GAO C, WANG Y, et al. BMSC-Derived exosomes ameliorate LPS-Induced acute lung injury by miR-384-5p-Controlled alveolar macrophage autophagy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 9973457.
- [2] WEI X, YI X, LV H, et al. MicroRNA-377-3p released by mesenchymal stem cell exosomes ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting RPTOR to induce autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8):657.
- [3] BELLANI G, LAFFEY J G, PHAM T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries [J]. *JAMA*, 2016, 315(8):788-800.
- [4] 叶晓燕, 刘涛. 急性肺损伤体内外实验模型研究进展 [J]. 职业与健康, 2020, 36(2):269-274.
- [5] 苏晓磊, 汪坤, 刘月, 等. 牙髓干细胞来源外泌体对急性肺损伤的作用及机制研究 [J]. 军事医学, 2018, 42(2):130-137.
- [6] 陈文涛, 曾庆铨, 林庆斌, 等. 肺毒症患者血清外泌体对肺毒症大鼠急性肺损伤的影响 [J]. 西部医学, 2020, 32(6):818-822.
- [7] 程婷婷, 宋元林. 干细胞胞外囊泡在急性呼吸窘迫综合征中的治疗作用 [J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2018, 11(5): 615-618. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2018.05.025.
- [8] TRAMS E G, LAUTER C J, SALEM N JR, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 645(1):63-70.
- [9] JOHNSTONE R M, ADAM M, HAMMOND J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(19):9412-9420.
- [10] ZITVOGEL L, REGNAULT A, LOZIER A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine; dendritic cell-derived exosomes [J]. *Nat Med*, 1998, 4(5):594-600.
- [11] 张莉珊, 曾勉. 间充质干细胞来源外泌体治疗急性肺损伤的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(29):4714-4721.
- [12] MAO G C, GONG C C, WANG Z, et al. BMSC-derived exosomes ameliorate sulfur mustard-induced acute lung injury by regulating the GPRC5A-YAP axis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(12): 2082-2093.
- [13] SUI X, LIU W, LIU Z. Exosomes derived from LPS-induced MHs cells prompted an inflammatory response in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2021, 292:103711.
- [14] LIU F, PENG W, CHEN J, et al. Exosomes derived from alveolar epithelial cells promote alveolar macrophage activation mediated by mir-92a-3p in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:646546.
- [15] LI J, DENG X, JI X, et al. Mesenchymal stem cell exosomes reverse acute lung injury through Nrf-2/ARE and NF-κB signaling pathways [J]. *PeerJ*, 2020, 8:e9928. DOI:10.7717/peerj.9928.
- [16] MIZUTA Y, AKAHOSHI T, GUO J, et al. Exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate histone-induced acute lung injury by activating the PI3K/Akt pathway in endothelial cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):508.
- [17] LUO Q, GUO D, LIU G, et al. Exosomes from MiR-126-Overexpressing adscs are therapeutic in relieving acute myocardial ischaemic injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(6):2105-2116.
- [18] LIQ C, LIANG Y, SU Z B. Prophylactic treatment with MSC-derived exosomes attenuates traumatic acute lung injury in rats [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(6):L1107-L1117.
- [19] LEE J W, ZHU Y, MATTHAY M A. Cell-based therapy for acute lung injury: are we there yet? [J]. *Anesthesiology*, 2012, 116(6):1189-1191.
- [20] KAWASAKI T, NISHIWAKI T, SEKINE A, et al. Vascular repair by tissue-resident endothelial progenitor cells in endotoxin-induced lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(4):500-512.
- [21] ZHOU Y, LI P F, GOODWIN A J, et al. Exosomes from endothelial progenitor cells improve outcomes of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Crit Care*, 2019, 23(1):44.
- [22] YI X, WEI X, LV H, et al. Corrigendum to "Exosomes derived from microRNA-30b-3p-overexpressing mesenchymal stem cells protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting SAA3" [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 394(1):112160.
- [23] XU N, HE D, SHAO Y, et al. Lung-derived exosomes in phosgene-induced acute lung injury regulate the functions of mesenchymal stem cells partially via miR-28-5p [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121:109603.
- [24] DESHPANDE C. Thromboembolic findings in COVID-19 autopsies: pulmonary thrombosis or embolism? [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 173(5):394-395.
- [25] FERNÁNDEZ-FRANCOS S, EIRO N, GONZÁLEZ-GALIANO N, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy as an alternative to the treatment of acute respiratory distress syndrome: current evidence and future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15):7850.
- [26] VAKHSHITEH F, ATYABI F, OSTAD S N. Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14:2847-2859.
- [27] POCSFALVI G, MAMMADOVA R, RAMOS JUAREZ A P, et al. COVID-19 and extracellular vesicles: an intriguing interplay [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2020, 45(5):661-670.
- [28] SENGUPTA V, SENGUPTA S, LAZO A, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells as treatment for severe COVID-19 [J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29(12):747-754.
- [29] ZHANG J, HUANG F, XIA B, et al. The interferon-stimulated exosomal hACE2 potently inhibits SARS-CoV-2 replication through competitively blocking the virus entry [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):189.
- [30] KHALAJ K, FIGUEIRA R L, ANTOUNIANS L, et al. Systematic review of extracellular vesicle-based treatments for lung injury: are EVs a potential therapy for COVID-19? [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1):1795365.