

外泌体在糖尿病心肌损伤中的作用研究进展

熊永红, 夏中元

(武汉大学人民医院麻醉科, 武汉 430060)

摘要: 外泌体是细胞膜向内凹陷释放的细胞外囊泡, 直径为 50~150 nm, 能够携带蛋白质、脂质、核酸、糖等生物活性分子, 具有重要的细胞间信息传递功能。心肌损伤是糖尿病心血管疾病的严重并发症之一, 早期诊断及预防糖尿病心肌损伤是目前临床亟需解决的问题。外泌体在糖尿病心肌损伤的防治方面起重要作用。本文就外泌体在糖尿病心肌损伤中的作用研究进展作一综述。

关键词: 糖尿病心肌损伤; 外泌体; 小细胞外囊泡

Role of exosomes in diabetic myocardial injury

XIONG Yonghong, XIA Zhongyuan

(Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University,
Wuhan 430060, China)

Abstract: Exosomes are small extracellular vesicles released after cell membrane depression, with 50 to 150 nm in diameter, carrying biological active molecules such as proteins, lipids, nucleic acids and sugars to transmit information among cells. Myocardial injury is one of the serious complications of diabetes. Early diagnosis and prevention of diabetic myocardial injury is a clinical problem to be solved urgently. Exosomes have a great potential for the prevention and treatment of diabetic myocardial injury. This paper reviews the research progress of exosomes in diabetic myocardial injury.

Key words: diabetic myocardial injury; exosomes; extracellular vesicles

糖尿病是一种由生活方式改变或遗传因素导致的胰岛素分泌不足、功能缺陷和胰岛素抵抗引起的慢性内分泌紊乱和代谢障碍性疾病。心血管疾病是糖尿病的严重并发症之一, 占糖尿病相关死亡的 60%~80%^[1]。动脉粥样硬化是糖尿病患者心力衰竭的主要原因, 其次是心肌细胞自身的收缩功能障碍, 称为糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)^[2]。DCM 最早出现的是心肌纤维化, 心肌细胞功能失调和重塑, 之后可出现心脏舒张功能和收缩功能障碍, 最终导致心力衰竭。DCM 病理生理变化的因素包括: AMP-活化蛋白激酶降低^[3], 过氧化物酶激活受体异常^[4], O-连接 N-乙酰葡萄糖胺改变^[5], 自噬及磷脂酰肌醇 3 激酶通路异常^[6], 小分子 RNA(microRNA, miRNA)^[7] 和外泌体通路异常^[8]。血糖水平是由机体器官相互调节的结果, 已知不同的循环因子包括激素、细胞因子、趋化

因子和生长因子等在器官间有重要信息传递作用。研究发现, 外泌体作为一种新的细胞间通讯传导方式, 可在体内大量分布, 具有重要的细胞间信息传递功能。以往认为外泌体仅是一种细胞排泄的废物, 但近年研究证明外泌体在疾病诊治、细胞间通讯、药物靶向给药等方面发挥重要作用。研究证明干细胞释放的外泌体可改善心脏功能, 减轻心脏纤维化, 刺激血管生成和调节 miRNA 表达^[9]。本文对外泌体在糖尿病心肌损伤中的研究进展综述如下。

1 外泌体概述

外泌体自被发现以来, 研究人员开始不断研究其临床价值和在细胞间通讯中的重要作用。外泌体是直径 50~150 nm 的小细胞外囊泡, 其包含细胞因子和趋化因子、细胞质蛋白、质膜蛋白和脂质、非编码 RNA 如 miRNA, 长链非编码 RNA, 环状 RNA 和信使 RNA。其中, 核酸能够通过外泌体与靶细胞膜的融合被受体细胞吸收, 控制受体细胞蛋白表达或激活受体信号通路^[10]。外泌体广泛存在于体液(血清、脑脊液等)、分泌物(唾液、乳汁、精液等)及排泄物(尿液等)

中^[11]。细胞膜向外萌芽形成微泡,直径一般为200~1 000 nm;多囊体形成并释放外泌体,直径为50~150 nm;细胞凋亡晚期产生凋亡小体,直径为1~5 nm。外泌体可通过直径大小或者分泌来源与凋亡小体或微泡区分开来。

从各种样品中分离并鉴定外泌体对后期实验研究有重要意义。目前外泌体的分离常用方法包括差速、超速离心法、沉淀法、超滤法、亲和层析法、微流控技术等;扫描电镜或透射电镜等电子显微镜可用于外泌体形态鉴定,Western blot法可用于测定外泌体表面特异性分子标志物,流式细胞仪检测外泌体的生物标志物等^[12]。但由于外泌体的提取及鉴定国际上尚无统一标准,国际细胞囊泡协会2017指出外泌体实验鉴定的基本要求,包含电子显微镜或原子力显微镜、单粒子跟踪、蛋白免疫印记法^[13]。

2 外泌体对心肌的保护作用

氧化应激条件下,外泌体递送至细胞可刺激血管生成和保护细胞以及调节炎症和细胞凋亡。从各种干细胞分离的外泌体进行的研究表明了其在减轻心肌纤维化和改善心肌梗死后心脏功能方面的潜在作用。如在正常条件下培养的胚胎干细胞产生治疗性干细胞,Khan等^[14]研究中所观察到的其中利用小鼠胚胎干细胞衍生的外泌体在急性心肌梗死小鼠模型中治疗梗死后的心脏。Barile等^[15]从人类骨髓间充质干细胞中分离出来的外泌体,注入急性心肌梗死大鼠模型心脏,与对照组相比,外泌体治疗组血管密度增加,心功能改善。

2.1 外泌体与 miRNAs 目前心脏源性外泌体对心肌的保护作用主要是其富含 miRNA,其他心源性外泌体内容物对心肌细胞保护作用未见报道。在缺血心肌中,心脏祖细胞来源的外泌体可抑制心肌细胞凋亡并促进血管生成^[16],心肌源性干细胞分泌的外泌体促进心肌细胞再生^[17]。其中,心肌源性干细胞分泌的外泌体含有大量 miRNA,尤其是 miR-21、miR-22、miR-24 和 miR-146a,均显示出对受损的心肌有益。miR-21 通过调节程序性细胞死亡蛋白4、FasL 和 AKT 途径的表达或激活蛋白激酶途径来减少心肌细胞凋亡;miR-22 对心脏应激有重要作用;miR-24 通过靶向作用于促纤维化转化生长因子- β 信号传导途径的弗林蛋白酶调节心脏纤维化,并且在心肌梗死模型中 miR-24 的过表达减少了心肌瘢痕形成;miR-146a 抑制白细胞介素-1 受体相关激酶1 和肿瘤坏死因子受体相关因子6,减少核因子- κ B 的活化,改善心肌细胞损伤。

miR-21 和 miR-146a 共同导致 p38 丝裂原相关激酶磷酸化的明显降低^[18]。

Namazi 等^[19]研究了缺氧和常氧心肌源性干细胞培养基中获得外泌体对血管生成的作用,结果显示低氧条件下(1%氧气持续2 d)心肌源性干细胞分泌的外泌体有促进血管生成的作用。随后,其对促血管生成 miRNA 进行分析鉴定,发现 miR-210、miR-130a 和 miR-126 在缺氧环境表达均上调。Hu 等^[20]研究发现,在外泌体 miRNA 的调节下,心肌源性干细胞分泌的外泌体通过减少瘢痕大小,增加心肌细胞增殖和血管生成而促进心肌修复。由此可见,miRNAs 的作用并非任何单一 miRNA 的结果,其作用依赖多个 miRNA 协同工作。由于 miRNA 不需与靶 miRNA 完全匹配,因此,miRNA 可抑制多种不同的蛋白质。当共表达或抑制时,随着途径的重叠,可能导致多重相互作用和改变。

2.2 外泌体与干细胞 研究证实干细胞释放的外泌体可作为心脏修复潜在的无细胞治疗剂。以往认为外泌体在短距离和长距离细胞间通讯的生理功能中起重要作用。纳米粒子可通过 miRNA 直接调控基因表达,将信息传递给靶细胞。在急性心肌梗死后应用于小鼠来源的间充质干细胞、心脏祖细胞、胚胎干细胞和心肌源性干细胞的外泌体可增强心脏功能、血管生成、减弱细胞凋亡和纤维化^[21]。虽然干细胞释放的外泌体可作为心肌修复潜在的无细胞治疗剂,是一种具有修复损伤心脏组织并使其再生的辅助方法;但由于缺血心脏中细胞移植的存活不佳,一般仅能观察到心脏功能的适度改善。远端缺血预处理诱导的血浆外泌体通过转运调节 miR-24 参与心肌缺血再灌注的保护作用^[22]。因此,外泌体在参与心肌保护作用方面发挥一定作用,但具体机制及途径仍需进一步研究。

3 外泌体与糖尿病心肌损伤

外泌体随体内葡萄糖浓度的高低产生相应的变化。在高血糖水平下,miR-9、miR-15a、miR-30d 和 miR-133a 的表达水平上调,而 miR-375 表达水平下调^[23-24]。外泌体的生物效应可通过将编码信息从原来的细胞传递至受体细胞,同时可将编码信息释放到细胞间液或血液循环中,从而引起受体细胞的变化^[2]。高糖培养下外泌体的产生速率和形态不受影响,但高糖可能影响外泌体的心脏保护能力。为确定来自健康个体的外泌体是否可用于保护糖尿病个体的心肌细胞。Davidson 等^[25]采用非糖尿病大鼠心肌细胞分泌的外泌体干预缺氧复氧下糖尿病大鼠的心肌细胞,细

胞缺氧复氧后死亡率从 $(24 \pm 1)\%$ 明显增加至 $(63 \pm 4)\%$ 。用非糖尿病的对照大鼠分离的外泌体进行预处理细胞死亡率明显降低至 $(29 \pm 3)\%$ 。另一项研究发现,来自人尿源干细胞释放的外泌体携带 DMBT1 通过促进血管生成、促进糖尿病性创伤修复^[26]。

3.1 外泌体与心肌损伤 外泌体可通过介导细胞间的通讯调节包括细胞生存在内的多个细胞过程。干细胞疗法可对受损心肌组织进行修复和再生,但干细胞移植至受损心肌组织后其存活率较低。Hu 等^[20]研究发现,移植后的干细胞存活率低是因为心肌梗死细胞来源的外泌体促进移植的骨髓间充质干细胞损伤。为模拟心肌细胞或移植的骨髓间充质干细胞在体内遇到的微环境状态,将心肌细胞条件培养基和从过氧化氢处理的心肌细胞培养基中收集心脏外泌体,与氧化应激条件下的骨髓间充质干细胞在体外进行培养。过氧化氢诱导的心肌细胞条件培养基和心肌外泌体明显加速骨髓间充质干细胞损伤;并降低细胞中凋亡分子 Bcl-2 和抗凋亡分子 Bax 比率和细胞活力。通过转录激活样效应因子核酸酶基因组编辑技术构建 Rab27a 基因敲除的小鼠模型,Rab27a 属于 GTP 酶家族,在外泌体分泌中起关键作用。将雄性小鼠 GFP 修饰的骨髓间充质干细胞植入 Rab27a 基因敲除野生型雌性小鼠中梗死相邻的存活心肌中。结果显示在 Rab27a 基因敲除小鼠中,Y 染色体 Sry DNA、GFP mRNA 和 GFP 荧光信号强度均较高,移植的骨髓间充质干细胞在梗死心脏中存活增加。提示受损心肌细胞来源的外泌体促进了梗死心脏中移植的骨髓间充质干细胞损伤,从而揭示了心肌梗死后移植细胞存活的新机制。

3.2 外泌体与糖尿病心肌损伤 多数糖尿病患者伴有不同程度心肌损伤,且糖尿病引起的心肌梗死和细胞死亡是导致糖尿病患者死亡的主要原因,血糖升高可加重心肌肥大、细胞凋亡和纤维化,当肥大的心肌失代偿时,可发生心力衰竭。受损的心肌细胞胰岛素代谢异常,线粒体功能障碍,氧化应激增加,一氧化氮生物利用度降低。炎症介质释放,肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活,自主神经病变,内质网应激,微血管功能障碍以及其他各种心脏代谢异常均与糖尿病心肌损伤的发生、发展有关。因此,减少局部缺血和减少细胞死亡从而减少糖尿病心肌损伤有重要意义。糖尿病初期,高血糖可导致内皮细胞和微血管功能障碍,心血管生成障碍是糖尿病心血管疾病的关键原因。

3.3 外泌体与 I 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)心肌损伤 T1DM 是一种自身反应性 T 细胞

引起的胰岛 β 细胞破坏导致胰岛素分泌不足的自身免疫性疾病。在全球 4.22 亿糖尿病患者中,T1DM 占 10%。T1DM 好发于儿童和青少年,且 T1DM 是儿童时期常见慢性疾病之一,其发病率不断增加^[27]。研究表明,在 T1DM 模型中,间充质干细胞分泌的外泌体具有免疫调节作用。通过外泌体传递特定的 miRNA 也可成为一种治疗方法。例如,来自糖尿病大鼠的骨髓基质细胞的外泌体通过转移 miR-14582 在大鼠中风模型中具有神经修复作用。在其他研究中,间充质干细胞衍生的外泌体已被用作 T1DM83 中的小 RNA 载体。除了核酸之外,外泌体已成功用于递送药物,如姜黄素可改善 T1DM 卒中后小鼠的神经血管功能^[28]。但外泌体在 T1DM 心肌损伤的研究是一个全新的治疗或研究方向,有可能为临床治疗提供新的思路和方法。

3.4 外泌体与 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)心肌损伤 T2DM 是一种代谢性疾病,患病率呈上升趋势。胰岛素抵抗和 β 细胞功能下降是 T2DM 发生、发展的重要原因。其中,肥胖是导致胰岛素抵抗的主要致病因素。当 β 细胞不能分泌足够胰岛素以补偿胰岛素敏感性降低时,可导致 T2DM^[29]。研究表明心肌细胞衍生的外泌体含有 miRNA、蛋白质和脂质,这些均可转移到邻近的心脏内皮细胞并调节其功能^[3]。有研究报道,外泌体可保护 T2DM 大鼠心肌缺血、缺氧再灌注损伤,说明外泌体在糖尿病心肌损伤中产生有利作用^[3,29]。

4 结 语

目前,外泌体在糖尿病心肌损伤中的作用机制尚未完全明确。高糖环境对外泌体分泌的影响机制尚不清晰。目前技术不能提取到完全纯化的外泌体。明确外泌体的生物学成分,对外泌体进行基因组和蛋白组学分析将为临床提供诊断和监测糖尿病心肌损伤的新途径。外泌体内容物的组成和数量与疾病严重程度相关,了解外泌体靶向传递和清除机制,有可能通过检测外泌体内容物的表达情况为糖尿病心肌损伤提供治疗方法。

参考文献

- [1] ISOMAA B, ALMGREN P, TUOMI T, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome [J]. Diabetes Care, 2001, 24(4): 683-689.
- [2] SALEM E, FAN G C. Pathological effects of exosomes in mediating diabetic cardiomyopathy [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 998: 113-138.
- [3] CHANG W, ZHANG M, LI J, et al. Berberine improves

- insulin resistance in cardiomyocytes via activation of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase[J]. *Metabolism*, 2013, 62(8):1159-1167.
- [4] DEROSA G, SAHEBKAR A, MAFFIOLI P. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1):153-161.
- [5] OLIVIER-VAN S S, HANOVER J A. You are what you eat: O-linked N-acetylglucosamine in disease, development and epigenetics[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2015, 18(4):339-345.
- [6] 孙超, 杨桂珍, 薛富善, 等. 自噬和 PI3K-Akt-mTOR 信号转导通路参与缺血预处理对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2017, 31(11):1046-1050.
- [7] RIBEIRO A O, SCHOOF C R, IZZOTTI A, et al. MicroRNAs: modulators of cell identity, and their applications in tissue engineering[J]. *Microna*, 2014, 3(1):45-53.
- [8] WALDENSTROM A, RONQUIST G. Role of exosomes in myocardial remodeling[J]. *Circ Res*, 2014, 114(2):315-324.
- [9] GUAY C, REGAZZI R. Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2017, 19 Suppl 1:137-146.
- [10] 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(6):654-659.
- [11] IBRAHIM A, MARBAN E. Exosomes: fundamental biology and roles in cardiovascular physiology[J]. *Annu Rev Physiol*, 2016, 78:67-83.
- [12] 龚春梅, 徐远飞, 周继昌. 外泌体分离与鉴定方法研究进展[J]. *生命科学*, 2018, 30(3):319-324.
- [13] WITWER K W, SOEKMAJJI C, HILL A F, et al. Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility[J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1):1396823.
- [14] KHAN M, NICKOLOFF E, ABRAMOVA T, et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2015, 117(1):52-64.
- [15] BARILE L, LIONETTI V, CERVIO E, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103(4):530-541.
- [16] IBRAHIM A G, CHENG K, MARBAN E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(5):606-619.
- [17] GURHA P, ABREU-GOODGER C, WANG T, et al. Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction[J]. *Circulation*, 2012, 125(22):2751-2761.
- [18] 麻兴华, 王宪沛, 高传玉. 核因子- κ B 介导心肌缺血再灌注损伤机制的研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2017, 31(1):88-91.
- [19] NAMAZI H, MOHIT E, NAMAZI I, et al. Exosomes secreted by hypoxic cardiosphere-derived cells enhance tube formation and increase pro-angiogenic miRNA [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5):4150-4160.
- [20] HU M, GUO G, HUANG Q, et al. The harsh microenvironment in infarcted heart accelerates transplanted bone marrow mesenchymal stem cells injury: the role of injured cardiomyocytes-derived exosomes[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):357.
- [21] DOUGHERTY J A, MERGAYE M, KUMAR N, et al. Potential role of exosomes in mending a broken heart: nanoshuttles propelling future clinical therapeutics forward[J]. *Stem Cells Int*, 2017:5785436.
- [22] MINGHUA W, ZHIJIAN G, CHAHUA H, et al. Plasma exosomes induced by remote ischaemic preconditioning attenuate myocardial ischaemia/reperfusion injury by transferring miR-24[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):320.
- [23] DEHWAH M A, XU A, HUANG Q. MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity[J]. *J Genet Genomics*, 2012, 39(1):11-18.
- [24] WILLIAMS M D, MITCHELL G M. MicroRNAs in insulin resistance and obesity[J]. *Exp Diabetes Res*, 2012:484696.
- [25] DAVIDSON S M, RIQUELME J A, TAKOV K, et al. Cardioprotection mediated by exosomes is impaired in the setting of type 2 diabetes but can be rescued by the use of non-diabetic exosomes *in vitro* [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1):141-151.
- [26] CHEN C Y, RAO S S, REN L, et al. Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis[J]. *Theranostics*, 2018, 8(6):1607-1623.
- [27] ATKINSON M A, EISENBARTH G S, MICHELS A W. Type 1 diabetes[J]. *Lancet*, 2014, 383(9911):69-82.
- [28] ALKHALIDY H, WANG Y, LIU D. Dietary flavonoids in the prevention of T2D: an overview[J]. *Nutrients*, 2018, 10(4):438.
- [29] NAMAZI H, MOHIT E, NAMAZI I, et al. Exosomes secreted by hypoxic cardiosphere-derived cells enhance tube formation and increase pro-angiogenic miRNA [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5):4150-4160.

收稿日期:2018-04-11 修回日期:2018-08-22 本文编辑:徐小红