

外泌体治疗脊髓损伤的研究进展

史冬玲*, 何冰倩, 戴灵豪

(浙江中医药大学 中医药科学院, 浙江 杭州 311400)

摘要:外泌体是细胞分泌到胞外环境的膜囊泡,是治疗脊髓损伤的一种新策略。间充质干细胞分泌的外泌体在脊髓损伤的治疗中具有抗凋亡、抗炎和促血管生成的作用,同时能促进神经细胞间的交流,并可作为外源性遗传物质的载体。与其亲代细胞相比,外泌体可穿越血脑屏障,更加稳定,降低了施用活细胞所固有的安全风险。

关键词:脊髓损伤;外泌体;间充质干细胞

中图分类号:R34 文献标志码:A

Research progress of exosomes in treating spinal cord injury

SHI Dong-ling*, HE Bing-qian, DAI Ling-hao

(Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China)

Abstract: Exosomes are membrane vesicles secreted by cells into the extracellular environment. Exosomes are a new cell component in the treatment of spinal cord injury. Exosomes are secreted by mesenchymal stem cells have anti-apoptotic, anti-inflammatory and pro-angiogenic effects in the treatment of spinal cord injury, which play a key role in nerve cell-cell communication and can delivery exogenous genetic material. Exosomes can penetrate blood-brain barrier and are more stable than their parent cells, reducing the safety risks in the administration of viable cells.

Key words: spinal cord injury; exosomes; mesenchymal stem cells

1 脊髓损伤研究的现状

脊髓损伤是脊柱损伤严重的并发症之一。WHO 数据显示,每年世界各国约有 25 万~50 万的人遭受脊髓损伤。引起脊髓损伤的主要原因是交通事故、高空坠落和暴力损伤。脊髓损伤常伴随瘫痪、大小便失禁等并发症,给患者及其家庭带来巨大的经济负担。调查显示,脊髓损伤越来越年轻化,给社会造成巨大压力。但是,目前临幊上缺乏有效的治疗措施。虽然科研工作者在脊髓损伤的治疗上已经做

了很多的探索,但是所有的方法都显示出了有限的疗效,尤其是损伤后功能的恢复。因此,脊髓损伤治疗新策略的研究是很有必要的。

2 细胞治疗潜在的机制

脊髓损伤治疗最大的挑战就是轴突的再生和重新连接。干细胞具有的强壮的增殖和分化潜能使得干细胞移植技术在脊髓损伤的治疗中开辟了新天地。多潜能间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是由间充质干细胞和祖细胞组成的非造血细

胞亚群,具有多能性特征,可以从骨髓、外周血、脐带血、脂肪组织和皮肤等样本中获得。MSCs 作为细胞治疗的来源,对于大鼠脊髓损伤的治疗具有较好的疗效^[1-2]。但是,干细胞的自体移植存在几个问题,一是存活率低。移植的细胞只有小部分能够存活^[3]。二是具有产生肿瘤的风险。长时间培养的 MSCs 由于染色体不稳定性增强可能会向永生化和自主化转变,当注射到多器官的生物体中,可能会导致肿瘤的生成^[4]。三是靶向性差,静脉内移植不能定向到达损伤部位^[5]。如何能够扬长避短,既能使用 MSCs 治疗脊髓损伤的优势又能避免它带来的弊端呢?

间充质干细胞移植促进功能恢复不是因为分化成损伤的组织,而是通过分泌营养因子和细胞因子改善损伤微环境来间接地促进轴突的再生^[6-7]。MSCs 通过旁分泌的方式分泌的小分子物质,如生长因子、趋化因子、细胞因子和胞外微囊泡等,可以促进细胞再生和血管生成^[8]。

3 MSCs 来源的外泌体 (MSCs-exosomes) 的形成与功能特点

MSCs 的治疗效果可能归因于其强大分泌可溶性分子和外泌体的能力^[7,9]。外泌体是由许多细胞类型分泌到细胞外环境中的直径为 40~100 nm 的膜囊泡。它们对应于内体隔室的内部囊泡、多泡体,并在该细胞器与质膜胞外融合时释放。在细胞内,它们是在隔离特定蛋白质和脂质的过程中,通过内体膜向内萌芽而形成的。外泌体内包裹有蛋白质、脂质和不同的核酸 (mRNAs, miRNAs, lncRNAs)^[10]。这些外泌体 RNAs 可以被不同的细胞摄取并可在靶细胞内表达,同时外泌体作为信号分子的天然载体,在细胞间交流中起着关键性的作用^[11]。和移植 MSCs 相比, MSCs-exosomes 可以通过血脑屏障,更容易储存和移植。多潜能间充质干细胞来源的外泌体在多种疾病中都展现出治疗潜能。在糖尿病小鼠的模型中, MSCs-exosomes 可以逆转海马中神经元和星形胶质细胞的降解以及轴突的丧失^[12]。在中枢神经系统损伤模型中, MSCs-exosomes 可促进皮质神经元轴突的生长^[13]。在大鼠的脑卒中模型中,全身给予 MSCs-exosomes 促进神经血管重塑和脑卒中后功能恢复^[14]。三维立体培养的人骨髓来源的 MSCs

显示出更多的外泌体分泌,并能促进创伤性脑损伤大鼠的功能恢复^[15-16]。这些结果均提示 MSCs-exosomes 可能是脊髓损伤的有希望的治疗工具。

4 外泌体对于脊髓损伤的治疗

4.1 MSCs-exosomes 对于脊髓损伤的治疗作用

4.1.1 MSCs-exosomes 抗细胞凋亡作用: 脊髓损伤的病理生理学机制是很复杂的,包括细胞凋亡炎性反应、血管损伤、兴奋毒性、流体-解质紊乱、线粒体功能障碍、钙和其他一些过程。其中凋亡和炎性反应是脊髓损伤继发性损伤的主要事件。细胞凋亡主要受上游 Bcl-2 家族和下游 caspase 家族的调控,其中抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 是细胞凋亡最常见的凋亡标志物。采用尾静脉注射的方式将 100 μg 外泌体总蛋白植入到 T10 打击模型的脊髓损伤大鼠内,发现 MSCs-exosomes 处理减少了脊髓损伤后大鼠脊髓中 TUNEL 阳性细胞的数量。同时,显著抑制促凋亡 Bax 水平,而抗凋亡 Bcl-2 水平上调。结果表明, MSCs-exosomes 在脊髓损伤中起着抗细胞凋亡的作用^[17]。

4.1.2 MSCs-exosomes 抗炎作用: 脊髓损伤后,血脑屏障受到损坏,受伤的脊髓可以迅速被来自血液的嗜中性粒细胞渗透。TNF-α 阳性和 IL-1β 阳性细胞在脊髓损伤后脊髓周围区域强烈上调^[18]。TNF-α 和 IL-1β 是重要的炎性介质,可加强脊髓中的神经细胞死亡。尾静脉注射 MSCs-exosomes 可显著下调促炎性细胞因子 (TNF-α 和 IL-1β) 蛋白质水平和上调抗炎细胞因子 (IL-10) 蛋白质水平,在脊髓损伤后发挥抗炎作用^[17]。

4.1.3 MSCs-exosomes 促进血管生成作用: 脊髓损伤后脊髓血供迅速中断。研究表明促进脊髓微血管网络的血管生成和重建可以增强脊髓损伤后的功能恢复。在肢体、脑卒中等缺血性疾病模型中, MSCs-exosomes 显示出促进血管生成的能力。在小鼠后肢缺血模型中 MSCs-exosomes 显著增强小鼠缺血肢体的微血管密度^[19]。在大鼠脑卒中缺血模型中, MSCs-exosomes 静脉注射增强了血管生成并改善了功能恢复^[14]。在大鼠脊髓损伤缺血模型中,尾静脉注射 MSCs-exosomes, 脊髓灰质的前角有大量 PCNA/RECA-1 阳性细胞增殖,暗示血管的生成。但是,通过外泌体在损伤后 3 d 的血管生成的提高

是否有助于功能恢复,还需要进一步的探索^[17]。

4.2 外泌体作为胞间通讯分子促进脊髓损伤后修复

大脑的功能依赖于神经细胞之间的细胞间通讯。现在的体外证据表明,外泌体是由神经元以一种取决于突触活性的方式释放的。这些外泌体可以被其他神经元重新摄取。神经元分泌的外泌体中所含的脂质、蛋白质和 RNA 可直接改变摄取细胞中的信号传导和蛋白质表达。因此外泌体可以代表一个理想的神经元间信号转移的机制^[20]。除神经元外,在中枢神经系统中,星形胶质细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞均可分泌外泌体,外泌体可以被其他神经系统中的细胞摄取,进行细胞间交流^[20-22]。脊髓损伤后,中枢神经系统损伤再生困难,主要原因是胶质疤痕的抑制。磷酸酶和张力蛋白同系物(phosphatase and tensin homologues, PTEN)是一种抑癌基因,是神经元再生的主要负调节因子,抑制其活性一直被认为是脊髓损伤的治疗靶点。Goncalves MB 等^[23]利用神经元和胶质细胞间外泌体交流的特性,使用视黄酸受体 β (retinoic acid receptor beta, RAR β) 拮抗剂处理神经元,神经元中 PTEN 活性由于胞质磷酸化作用而降低,同时外泌体的分泌增加。外泌体被星形胶质细胞摄取,导致增殖受阻,从而减少胶质疤痕的形成,促进脊髓损伤后运动和感觉功能的恢复。

4.3 外泌体作为 siRNA 载体促进脊髓损伤后修复

外泌体不仅可以作为体内物质的载体,同样可作为外来物质的载体,比如载送外源性遗传物质。外泌体介导的 siRNA 可以有效和特异地到达中枢神经系统,并产生效应^[24]。中枢神经系统损伤后,来源于创伤性脑损伤和脊髓损伤受试者的脑脊液的外泌体中的炎性蛋白质表达增加。炎性反应小体相关蛋白会通过外泌体的方式被释放到脑脊液

中,包括凋亡相关点样蛋白 (apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain, ASC)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 1 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 1, NLRP1) 和半胱天冬氨酸酶 (caspase-1)。研究者将神经元来源的装载有抑制 ASC 表达的 siRNA 的外泌体经股动脉注射到脊髓损伤的大鼠体内,实验数据显示来自神经元的外泌体可以通过血脑屏障,有效的在体内递送货物,显著降低脊髓损伤后炎性反应小体激活,并且降低了 caspase-1 激活和 IL-1 β 的加工^[25]。因此,外泌体提供了一种新的治疗方法,即基于 RNA 的药物来阻断中枢神经系统损伤后的炎性反应。

5 结论和展望

外泌体作为一种新的治疗策略,对于脊髓损伤的治疗展现出了一定的疗效。与移植 MSCs 相比, MSCs-exosomes 具有体内存活期更长、低致癌性、高传递效率的优势。外泌体不仅可以通过血脑屏障进入中枢神经系统,还可以通过基因修饰,提高治疗效率。虽然目前外泌体对于脊髓损伤治疗的直接报道还比较少,但是种种特征显示外泌体对于脊髓损伤的治疗研究前景很大。在以后的研究中可关注以下问题:第一,注意外泌体细胞来源和培养条件。实验已经表明外泌体的功能特性会受到细胞来源和培养条件的影响,例如三维培养。第二,外泌体是细胞间的通讯分子,但是外泌体诱导的治疗效应所依赖的营养活性机制尚不明确。第三,外泌体以何种机制透过血脑屏障,含有 siRNA 的外泌体如何特异性到达靶细胞,以及哪些因素在脊髓损伤的治疗中起主要作用等等。总之,外泌体提供了脊髓损伤治疗研究的新方向。

参考文献:

- [1] Neirinckx V, Agirman G, Coste C, et al. Adult bone marrow mesenchymal and neural crest stem cells are chemoattractive and accelerate motor recovery in a mouse model of spinal cord injury [J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6: 211-225.
- [2] Matyas JJ, Stewart AN, Goldsmith A, et al. Effects of

bone-marrow-derived MSC transplantation on functional recovery in a rat model of spinal cord injury: comparisons of transplant locations and cell concentrations [J]. Cell Transplant, 2017, 26: 1472-1482.

- [3] Wang C, Shi D, Song X, et al. Calpain inhibitor attenuates ER stress-induced apoptosis in injured spinal cord af-

- ter bone mesenchymal stem cells transplantation [J]. *Neurochem Int*, 2016, 97: 15-25.
- [4] Rodriguez R, Rubio R, Menendez P. Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells [J]. *Cell Res*, 2012, 22: 62-77.
- [5] Matsushita T, Lankford KL, Arroyo EJ, et al. Diffuse and persistent blood-spinal cord barrier disruption after contusive spinal cord injury rapidly recovers following intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Exp Neurol*, 2015, 267: 152-164.
- [6] Chung HJ, Chung WH, Lee JH, et al. Expression of neurotrophic factors in injured spinal cord after transplantation of human-umbilical cord blood stem cells in rats [J]. *J Vet Sci*, 2016, 17: 97-102.
- [7] Yeng CH, Chen PJ, Chang HK, et al. Attenuating spinal cord injury by conditioned medium from human umbilical cord blood-derived CD34 (+) cells in rats [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2016, 55: 85-93.
- [8] Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, et al. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis *in vitro* [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24: 1635-1647.
- [9] Kim Y, Jo SH, Kim WH, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 229-238.
- [10] 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.
- [11] Qu J, Zhang H. Roles of mesenchymal stem cells in spinal cord injury [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 5251313. doi: 10.1155/2017/5251313.
- [12] Nakano M, Nagaishi K, Konari N, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24805. doi: 10.1038/srep24805.
- [13] Zhang Y, Chopp M, Meng Y, et al. Effect of exosomes derived from multipluripotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury [J]. *J Neurosurg*, 2015, 122: 856-867.
- [14] Xin H, Li Y, Cui Y, 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: 1711-1715.
- [15] Zhang Y, Chopp M, Zhang ZG, et al. Systemic administration of cell-free exosomes generated by human bone marrow derived mesenchymal stem cells cultured under 2D and 3D conditions improves functional recovery in rats after traumatic brain injury [J]. *Neurochem Int*, 2017, 111: 69-81.
- [16] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging potential of exosomes for treatment of traumatic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12: 19-22.
- [17] Huang JH, Yin XM, Xu Y, et al. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells attenuates apoptosis, inflammation, and promotes angiogenesis after spinal cord injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34: 3388-3396.
- [18] Han D, Wu C, Xiong Q, et al. Anti-inflammatory mechanism of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in rat model of spinal cord injury [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71: 1341-1347.
- [19] Hu GW, Li Q, Niu X, et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 10-24.
- [20] Chivet M, Hemming F, Pernet-Gallay K, et al. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system [J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 145. doi: 10.3389/fphys.2012.00145.
- [21] Fruhbeis C, Frohlich D, Kuo WP, et al. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 182. doi: 10.3389/fncel.2013.00182.
- [22] Fruhbeis C, Frohlich D, Kuo WP, et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication [J]. *PLoS Biol*, 2013, 11: e1001604. doi: 10.1371/journal.pbio.1001604.
- [23] Goncalves MB, Malmqvist T, Clarke E, et al. Neuronal RARbeta signaling modulates PTEN activity directly in neurons and via exosome transfer in astrocytes to prevent glial scar formation and induce spinal cord regeneration [J]. *J Neurosci*, 2015, 35: 15731-15745.
- [24] Liu Y, Li D, Liu Z, et al. Targeted exosome-mediated delivery of opioid receptor Mu siRNA for the treatment of morphine relapse [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17543. doi: 10.1038/srep17543.
- [25] de Rivero Vaccari JP, Brand F, 3rd, Adamczak S, et al. Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury [J]. *J Neurochem*, 2016, 136 Suppl 1: 39-48.