

外泌体药物递送载体构建及治疗心血管疾病的研究进展

李旻俊, 彭泽琳, 张良清

广东医科大学附属第一医院麻醉科, 广东 湛江 524000

摘要: 外泌体是活细胞分泌的直径为 30~100 nm 的囊泡, 是细胞间信息交流的重要媒介。外泌体具有独特的低免疫原性、高稳定性及器官靶向性, 不仅可作为诊断心血管疾病的生物标志物, 还可作为治疗心血管疾病药物的天然递送载体, 在心血管疾病的诊断、治疗中有较大应用潜力。本文就外泌体药物递送载体构建及其在心血管疾病治疗中应用的研究进展作一综述。

关键词: 心血管疾病; 外泌体; 药物传递系统

Construction of exosomes targeted delivery vectors and its role in the treatment of cardiovascular diseases

LI Min-jun, PENG Ze-lin, ZHANG Liang-qing

Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524000, China

Corresponding author: ZHANG Liang-qing, E-mail: zhanglq1970@163.com

Abstract: Exosomes are vesicles with a diameter of 30 to 100 nm secreted by living cells, and they are an important medium for information exchange between cells. In recent years, studies have found that exosomes can be used not only as biomarkers for the diagnosis of cardiovascular diseases, but also as natural drug delivery carriers for the treatment of cardiovascular diseases. The unique low immunogenicity, high stability, and organ targeting of exosomes bring a great potential in the treatment of cardiovascular diseases in the future. This paper reviews the construction strategies of exosomes targeted delivery vectors and the research progress of their applications in the treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: cardiovascular disease; exosomes; drug delivery system

心血管疾病是全球主要的疾病死亡原因, 由多种病理因素共同导致, 发病机制尚未完全阐明^[1-2]。外泌体广泛存在于体液如血液、尿液中, 参与血管生成、血压调节等生理过程, 细胞凋亡和心肌肥大、纤维化等病理过程, 是诊断心血管疾病的潜在生物标志物^[3]。研究^[4]发现, 外泌体可向某些组织器官靶向运送蛋白质、mRNA、miRNA 及药物, 为心血管疾病的治疗带来希望。但天然外泌体靶向能力有限, 一定程度上限制了其在心血管疾病治疗中的应用^[5]。通过特定方式将外泌体构建为药物递送载体, 可提高心脏靶向性, 改善外泌体在循环中的稳定性^[4]。本文就外泌体药物递送载体构建及其在心血管疾病治疗中应用的研究进展综述如下。

1 外泌体的功能与特性

外泌体是细胞在生理、病理状态下均可分泌的一类细胞外囊泡, 主要作用是通过传递膜表面或腔内的生物分子进行细胞间信号传递, 调节细胞的生理功能^[6]。外泌体表面标志物可识别外泌体细胞来源, 不同细胞来源的外泌体携带的内容物不同。外泌体可作为药物递送载体, 负载包括小分子化合物、蛋白质、寡核苷酸等治疗药物。外泌体具有独特的低免疫原性、高稳定性及器官靶向性, 在心血管疾病治疗中有较大的应用潜力^[3]。

2 外泌体药物递送载体构建

2.1 外泌体靶向修饰方法 外泌体作为药物递送载体在心血管疾病治疗中发挥重要作用。但静脉注射外泌体易产生脱靶效应。目前采用 2 种方法对外泌体进行修饰以靶向心肌细胞。

2.1.1 基因修饰 对外泌体供体细胞进行基因修饰

以表达靶向肽,被修饰的供体细胞分泌的外泌体表面可表达靶向肽^[5]。Kim等^[7]采用溶酶体相关膜糖蛋白2b和缺血心肌靶向肽融合的慢病毒载体对骨髓干细胞进行基因修饰以表达缺血心肌靶向肽,荧光显微镜成像显示表达缺血心肌靶向肽的外泌体进入心肌细胞的数量多于天然外泌体。外泌体供体细胞基因修饰可较大程度提高功能化外泌体的稳定性,但需在供体细胞中进行基因操作,昂贵、耗时。

2.1.2 化学修饰 对外泌体表面直接进行化学修饰主要有2种方式^[8-9]:一是将疏水配体或脂类配体通过疏水相互作用自发地插入外泌体脂质双分子层^[9];二是先通过碳二亚胺偶联化学方法将4-戊酸的羧基与外泌体膜脂质上的胺基交联,随后通过点击化学反应(铜催化的叠氮-炔基 Huisgen 环加成反应)与靶向肽发生耦合。这些反应可在水溶液中进行,与传统生物缀合技术相比,具有选择性、相容性和专一性高的特点^[10]。化学修饰选择的靶向肽均是对整合蛋白 $\alpha v\beta 3$ 具有高亲和力的含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列的环状多肽,即缺血心肌靶向肽^[5,7,9]和心肌细胞特异性肽^[11]。有研究^[5,9]并未量化靶向肽修饰的外泌体进入心肌细胞的绝对数量,但靶向肽修饰可增加外泌体对心肌缺血区域的靶向性,增强治疗效果。文献^[5]报道,对心肌梗死小鼠注射缺血心肌靶向肽修饰的外泌体,左室射血分数增加46%;注射 Scramble 肽修饰的外泌体,左室射血分数增加38%。外泌体化学修饰可在体外进行,可使靶向肽或其他靶向配体与外泌体膜结合,但可能改变外泌体膜的某些固有特征,产生一些潜在影响。

2.2 外泌体药物装载方法

2.2.1 被动装载 将目标药物与外泌体共孵育。装载效率主要取决于药物的浓度梯度及疏水性。与亲水性药物相比,高浓度的疏水性药物载药效率较高^[12]。Sun等^[13]自 EL-4 小鼠淋巴瘤细胞系中纯化出外泌体,室温下与姜黄素(一种疏水性多酚)共孵育,载有姜黄素的外泌体在脑炎、自身免疫性疾病等多种疾病模型中发挥明显的抗炎作用。被动装载的优点是不会破坏外泌体膜的完整性,缺点是药物负载量较其他装载方法低。

2.2.2 主动装载 通过电穿孔、超声、脂质体冻融、机械挤压及皂苷处理等技术,直接将药物装载到外泌体中,有利于将各种类型的 RNA 输送至靶组织,调节靶细胞中的基因表达^[12,14]。外泌体药物的主动装载方

法丰富了外泌体内容物,已应用于心血管疾病的相关研究中,发现其可减轻心脏纤维化,抑制炎症反应,促进血管生成。有学者^[15]从心源性球样细胞中收集外泌体,采用电穿孔技术装载 miR-322,对心肌梗死小鼠模型进行注射,发现与注射未装载 miR-322 外泌体的小鼠相比,其心肌梗死面积缩小,纤维化程度减轻,血管生成增加。但电穿孔可引起外泌体不稳定,使 RNA 聚集,形成不溶性 siRNA 沉淀,药物装载量较低^[16]。

2.2.3 其他装载方法 主要通过生物工程技术修饰供体细胞来实现。Li等^[17]报道一种工程化外泌体,将对 RNA 具有极高亲和力的人抗原 R(human antigen R, HuR)与外泌体跨膜蛋白 CD9 序列融合后修饰供体细胞,修饰后的供体细胞表达融合蛋白 HuR-CD9,产生的外泌体可主动增加 RNA 装载量。因此,针对外泌体种类和被装载药物性质来制定优化的装载方案,是提高外泌体药物装载效率的关键。

2.3 改善外泌体循环稳定性的方法 外泌体经靶向修饰及药物装载后具有治疗特性和器官靶向的能力,但其在循环中易被快速清除,造成在靶组织和细胞中低积累^[18]。因此,应增加外泌体在循环系统中的稳定性,并提高外泌体与靶细胞间的相互结合能力^[3]。有研究^[19]将与抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)纳米抗体结合的脂质体-聚乙二醇插入外泌体膜,聚乙二醇是亲水性聚合物,聚乙二醇化增加了外泌体的循环时间、减少了与非靶向细胞的相互作用;囊泡表面的抗 EGFR 纳米抗体增强了外泌体与表达 EGFR 细胞的靶向结合,增加了其向靶组织的递送。巨噬细胞清道夫受体 A(scavenger receptor A, SR-A)是一种跨膜糖蛋白,在清除包括外泌体在内的纳米颗粒中发挥重要作用,SR-A 抑制剂硫酸右旋糖酐可抑制肝脏摄取外泌体^[20]。Balb/c 小鼠预注射硫酸右旋糖酐,然后静脉内注射 1,1'-双十八烷基-3,3',3'-四甲基吡啶三碳菁碘标记的外泌体,肝脏摄入的外泌体减少约 50%,血浆外泌体水平增加^[20]。因此,外泌体的聚乙二醇化或使用肝脏摄取抑制剂是增加外泌体循环稳定性的理想方法。

3 外泌体靶向递送载体在心血管疾病中的应用

3.1 外泌体治疗心肌梗死 在心肌梗死急性期,外泌体可减少细胞凋亡、减轻炎症反应、缩小心肌梗死面积;在心肌梗死恢复期,外泌体可促进血管生成、减轻心肌梗死部位纤维化及心肌重构、改善心肌梗死后心

功能^[21]。Huang 等^[22]过表达沉默信息调节因子 1 的脂肪干细胞来源外泌体,并作用于急性心肌梗死患者外周血内皮祖细胞,发现其可促进细胞内 CXC 趋化因子配体 12、核因子 E2 相关因子 2 表达,促进内皮祖细胞迁移和血管形成,缩小梗死面积,减轻急性心肌梗死后左心室重塑及心肌炎症。Gan 等^[23]发现,糖尿病可加重心肌缺血再灌注损伤,糖尿病小鼠血清外泌体 miR-130b-3p 表达异常升高,心肌内注射 miR-130b-3p 模拟物可明显加重非糖尿病小鼠缺血再灌注损伤,而应用 miR-130b-3p 抑制剂可明显减轻心肌缺血再灌注损伤,为糖尿病并发心肌梗死的治疗提供新思路。

3.2 外泌体治疗心肌病 扩张型心肌病的特征是心室腔扩张和心肌收缩力受损,易发展为急性充血性心力衰竭,增加死亡风险,而目前缺乏有效的治疗方法。Wu 等^[24]发现,与健康人相比,扩张型心肌病急性充血性心力衰竭患者血清外泌体 miR-92b-5p 表达增加,提示血清外泌体中的 miR-92b-5p 是诊断扩张型心肌病所致急性充血性心力衰竭的潜在生物标志物。肥胖状态下,过量的脂质摄入易导致肥胖性心肌病。Wang 等^[25]发现,高脂饮食诱导小鼠肝脏和血清外泌体 miR-122 表达增加,靶向抑制二磷酸腺苷-核糖基化因子 2 表达,可破坏心脏结构,降低心功能指数,减少线粒体三磷酸腺苷产生,增加耗氧量,而应用 miR-122 抑制剂可抑制上述作用,减少心肌重塑,为肥胖性心肌病的治疗提供新思路。

3.3 外泌体治疗动脉粥样硬化 动脉粥样硬化是心血管疾病的主要诱因,炎症是动脉粥样硬化的特征,抗炎被认为是治疗动脉粥样硬化的一种有效方法^[26]。Wu 等^[26]发现, M2 巨噬细胞分泌的外泌体 (M2-Exos) 具有炎症靶向性,在电穿孔作用下将 5-氨基乙酰丙酸己酯盐酸盐 (HAL) 装载入 M2 巨噬细胞衍生的外泌体形成 HAL-M2-Exos,对急性腹膜炎小鼠全身性给药,发现 HAL-M2-Exos 可通过 M2 外泌体表面的趋化因子受体与动脉粥样硬化部位的炎症性血管内皮细胞结合,引起内源性抗炎细胞因子和外源性 HAL 释放,HAL 促进血红素合成和代谢,产生一氧化碳和胆红素,抗炎细胞因子与一氧化碳和胆红素可显著减轻体内炎症引起的动脉粥样硬化。白细胞介素-4 诱导 M2 巨噬细胞产生的外泌体含有 miR-99a/146b/378a,其靶向下调核因子- κ B 和肿瘤坏死因子- α 信号传导从而抑制炎症,促进 M2 巨噬细胞极化,减轻动脉粥样硬化^[27]。

3.4 外泌体治疗肺动脉高压 肺动脉高压的特征是远端肺动脉循环的血管重塑,包括肺血管内皮细胞凋亡、增殖,远端肺小动脉粥样硬化,细胞外基质蛋白沉积和血管周围炎症^[28]。Aliotta 等^[29]从单芥子碱诱导的肺动脉高压小鼠血清或肺组织中分离外泌体 (MCT-PH-Exos) 并注入健康小鼠,发现其可引起右心室肥大和肺血管重构,机制可能是 MCT-PH-Exos 递送 miR-20a 至肺血管内皮细胞诱发肺血管重构,导致右心室肥大。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 来源外泌体可抑制小鼠低氧肺动脉高压的发展,可能是 MSCs 来源外泌体向肺血管内皮细胞递送 miR-124,抑制成纤维细胞增殖、迁移和单核细胞趋化蛋白-1 表达,改善肺血管重构,表明携带 miR-124 的 MSCs 来源外泌体可能在治疗肺动脉高压中有一定潜力。文献^[30]报道,过表达 Krüppel 样因子 2 的人肺动脉内皮细胞来源外泌体高表达 miR-181a-5p 和 miR-324-5p,二者分别通过抑制 Notch4 和重组人 c-Ets-1 蛋白表达减轻肺动脉高压小鼠肺血管重构,抑制右心室肥大。因此,外泌体未来可能成为肺动脉高压治疗的新靶点。

4 结 语

外泌体作为药物递送载体具有低免疫原性、高稳定性及器官靶向性等优势,但其应用于心血管疾病治疗的研究尚处于起步阶段,有关外泌体供体细胞的选择及外泌体靶向性修饰、提高药物装载效率、改善外泌体生物分布的方法等问题尚待解决。外泌体在心血管疾病的治疗中有重要价值,但尚需进一步研究外泌体的体内运输机制,制定外泌体药物生产质量控制标准。

参考文献

- [1] 高传玉. 防治心血管疾病的新策略[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(5): 417-422.
- [2] 王烁珊, 吴敬国, 荆小莉, 等. 甘油三酯葡萄糖指数与冠状动脉粥样硬化性心脏病关系的研究进展[J]. 中华全科医学, 2021, 19(6): 1008-1012.
- [3] DE ABREU R C, FERNANDES H, DA COSTA MARTINS P A, et al. Native and bioengineered extracellular vesicles for cardiovascular therapeutics[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(11): 685-697.
- [4] TOMINAGA N, YOSHIOKA Y, OCHIYA T, et al. A novel platform for cancer therapy using extracellular vesicles[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 95: 50-55.
- [5] WANG X, CHEN Y H, ZHAO Z A, et al. Engineered exosomes with ischemic myocardium-targeting peptide for targeted therapy in myocardial infarction[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(15): e008737.

- [6] 贺娇,许泼实. 外泌体提取方法及鉴定分析研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2018,32(7):718-721.
- [7] KIM H, YUN N, MUN D, et al. Cardiac-specific delivery by cardiac tissue-targeting peptide-expressing exosomes [J]. Biochem Biophys Res Commun,2018,499(4):803-808.
- [8] TIAN T, ZHANG H X, HE C P, et al. Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy[J]. Biomaterials,2018,150:137-149.
- [9] VANDERGRIFF A, HUANG K, SHEN D L, et al. Targeting regenerative exosomes to myocardial infarction using cardiac homing peptide[J]. Theranostics,2018,8(7):1869-1878.
- [10] XU L, FARUQU F N, LIAM-OR R, et al. Design of experiment (DoE)-driven *in vitro* and *in vivo* uptake studies of exosomes for pancreatic cancer delivery enabled by copper-free click chemistry-based labelling[J]. J Extracell Vesicles,2020,9(1):1779458.
- [11] MENTKOWSKI K I, LANG J K. Exosomes engineered to express a cardiomyocyte binding peptide demonstrate improved cardiac retention *in vivo* [J]. Sci Rep,2019,9(1):10041.
- [12] RAIMONDO S, GIAVARESI G, LORICO A, et al. Extracellular vesicles as biological shuttles for targeted therapies[J]. Int J Mol Sci,2019,20(8):1848.
- [13] SUN D M, ZHUANG X Y, XIANG X Y, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes [J]. Mol Ther,2010,18(9):1606-1614.
- [14] SHAHABIPOUR F, BANACH M, SAHEBKAR A. Exosomes as nanocarriers for siRNA delivery: paradigms and challenges[J]. Arch Med Sci,2016,12(6):1324-1326.
- [15] YOUN S W, LI Y, KIM Y M, et al. Modification of cardiac progenitor cell-derived exosomes by miR-322 provides protection against myocardial infarction through Nox2-dependent angiogenesis[J]. Antioxidants (Basel),2019,8(1):18.
- [16] ZHANG Y F, SHI J B, LI C. Small extracellular vesicle loading systems in cancer therapy: current status and the way forward[J]. Cytotherapy,2019,21(11):1122-1136.
- [17] LI Z L, ZHOU X Y, WEI M Y, et al. *In vitro* and *in vivo* RNA inhibition by CD9-HuR functionalized exosomes encapsulated with miRNA or CRISPR/dCas9[J]. Nano Lett, 2019,19(1):19-28.
- [18] WIKLANDER O P, NORDIN J Z, O'LOUGHLIN A, et al. Extracellular vesicle *in vivo* biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting[J]. J Extracell Vesicles,2015,4:26316.
- [19] KOOIJMANS S A A, FLIERVOET L A L, VAN DER MEEL R, et al. PEGylated and targeted extracellular vesicles display enhanced cell specificity and circulation time[J]. J Control Release,2016,224:77-85.
- [20] WATSON D C, BAYIK D, SRIVATSAN A, et al. Efficient production and enhanced tumor delivery of engineered extracellular vesicles[J]. Biomaterials,2016,105:195-205.
- [21] 朱耀斌,张燕搏,范祥明. 外泌体在心肌梗死治疗中研究进展 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2017,31(12):1236-1238.
- [22] HUANG H, XU Z X, QI Y, et al. Exosomes from SIRT1-overexpressing ADSCs restore cardiac function by improving angiogenic function of EPCs [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020,21:737-750.
- [23] GAN L, XIE D N, LIU J, et al. Small extracellular microvesicles mediated pathological communications between dysfunctional adipocytes and cardiomyocytes as a novel mechanisms exacerbating ischemia/reperfusion injury in diabetic mice[J]. Circulation,2020,141(12):968-983.
- [24] WU T, CHEN Y C, DU Y T, et al. Serum exosomal miR-92b-5p as a potential biomarker for acute heart failure caused by dilated cardiomyopathy[J]. Cell Physiol Biochem,2018,46(5):1939-1950.
- [25] WANG Y S, JIN P P, LIU J J, et al. Exosomal microRNA-122 mediates obesity-related cardiomyopathy through suppressing mitochondrial ADP-ribosylation factor-like 2 [J]. Clin Sci (Lond),2019,133(17):1871-1881.
- [26] WU G H, ZHANG J F, ZHAO Q R, et al. Molecularly engineered macrophage-derived exosomes with inflammation tropism and intrinsic heme biosynthesis for atherosclerosis treatment[J]. Angew Chem Int Ed Engl,2020,59(10):4068-4074.
- [27] BOUCHAREYCHAS L, DUONG P, COVARRUBIAS S, et al. Macrophage exosomes resolve atherosclerosis by regulating hematopoiesis and inflammation via microRNA Cargo[J]. Cell Rep,2020,32(2):107881.
- [28] DELANEY C, DAVIZON-CASTILLO P, ALLAWZI A, et al. Platelet activation contributes to hypoxia-induced inflammation [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2021,320(3):L413-L421.
- [29] ALIOTTA J M, PEREIRA M, WEN S C, et al. Exosomes induce and reverse monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice[J]. Cardiovasc Res,2016,110(3):319-330.
- [30] SINDI H A, RUSSOMANNO G, SATTI S, et al. Therapeutic potential of KLF2-induced exosomal microRNAs in pulmonary hypertension[J]. Nat Commun,2020,11(1):1185.

收稿日期:2021-01-26 修回日期:2021-05-20 本文编辑:李立华