

外泌体介导心室重构的研究进展

郑宇昕 王英杰 王肖龙

【摘要】 外泌体是由多种细胞通过胞吐作用分泌的纳米级膜性囊泡小体,其携带的蛋白质、RNA 等生物活性物质可以通过多种途径在细胞间进行输送,从而实现细胞间信息交流与传递。该文介绍外泌体介导的蛋白质、炎症因子和微小 RNA(miRNA)等对不同病理状态下心室重构作用的研究进展。

【关键词】 外泌体;微小 RNA;心室重构

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.02.008

心室重构是由于持续心肌损伤、机械负荷过重等原因导致炎症细胞因子过度表达及神经内分泌过度激活,从而使心肌结构和功能发生变化的动态过程。其主要病理过程是心肌细胞增粗增长、心肌质量增加、间质成分增多和毛细血管相对减少,使心壁增厚、心腔容积扩大和心腔形状改变,心功能由代偿转向失代偿,最终导致心力衰竭(心衰)和猝死。外泌体在心室重构的细胞间生物信号及功能物质传递中发挥重要作用。

1 外泌体概述

1.1 外泌体的发现

20 世纪 80 年代 Pan 等^[1]在电子显微镜下发现成熟网织红细胞中有许多大小几乎相同的胞内囊结构,通过胞吐的方式被分泌到细胞外基质中。Johnstone 等^[2]认为这种分泌过程类似于反向内吞作用,1987 年他们首次将这种从细胞内分泌出来的结构命名为外泌体。除网织红细胞外,T 细胞、B 细胞、血小板、树突细胞、上皮细胞和肿瘤细胞等均可分泌外泌体。

1.2 外泌体的生物学特性

外泌体是多囊泡体(MVBs)与细胞膜融合后向胞外分泌的脂质双分子层结构的囊性小泡,直径为 40~100 nm,包膜富含胆固醇、鞘磷脂、糖脂和神经酰胺。

细胞膜通过网格蛋白或非网格蛋白介导内吞

作用,在细胞内形成早期内涵体。早期内涵体与高尔基复合体相互作用形成晚期内涵体。晚期内涵体内陷形成 MVBs,MVBs 与质膜融合释放其中的外泌体^[3]。不同细胞来源的外泌体有相似的生物学特性,如大小、密度、高胆固醇/磷脂比、脂质双分子层及蛋白质成分。其蛋白质成分包括结构蛋白与活性蛋白,其中结构蛋白可作为外泌体的检测标志,如 CD9、CD63、热休克蛋白(HSP)70 等,而小 G 蛋白 Rab、蛋白激酶和肌钙蛋白等活性蛋白则可通过外泌体的介导实现信号转导及生物学效应^[4-5]。

1.3 外泌体介导的信号转导方式

外泌体通过所含信号分子、mRNA 和微小 RNA(miRNA)等参与细胞旁分泌和自分泌,完成细胞间信号转导并发挥生物学效应。主要通过以下 3 种途径:(1)受体与配体蛋白结合产生相互作用;(2)直接与质膜融合进入细胞内,释放所携带物质;(3)受体通过胞饮作用直接摄入^[6]。miRNA 具有调控基因表达及细胞分化、增殖和凋亡等多种功能。细胞外(如血液、细胞间质等)miRNA 大多存在于外泌体中,并通过外泌体进行细胞间信号转导。

2 外泌体介导的心肌缺氧缺血所致心室重构

在心肌细胞缺氧、缺血或坏死后,神经内分泌及炎症因子等激活,引起细胞及细胞间结构改变,使心室腔扩大,收缩功能逐渐降低。

2.1 心肌缺氧引起的心室重构

缺氧条件下,心肌组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达增加,一方面通过诱导基质金属蛋白酶(MMPs)表达,降解细胞外基质中的胶原蛋白,导致心肌间质重构^[7];另一方面促进心肌细胞凋亡,引起心肌重构。

正常的心肌细胞不产生 TNF- α 。Yu 等^[8]在新

基金项目:国家自然科学基金(81573647);上海市科委课题(14401972202);上海市中医临床重点实验室建设项目(14DZ2273200)

作者单位:201203 上海中医药大学附属曙光医院心内科

通信作者:王肖龙,Email: wxlqy0214@163.com

生大鼠心肌细胞中发现,低氧诱导细胞内 TNF- α mRNA 及蛋白表达明显增加,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)参与调控缺氧条件下心肌细胞 TNF- α 的分泌。在这些缺氧心肌细胞的上清液中提取到了由其分泌的外泌体,其中包含了 TNF- α 。当正常心肌细胞置于这些外泌体中时,细胞凋亡明显增加。该研究提示缺氧心肌高表达的 TNF- α 由外泌体介导以自分泌的方式引起邻近心肌细胞凋亡,最终引起心室重构,外泌体参与了炎症因子细胞间的传递。

2.2 心肌缺血坏死引起的心室重构

急性心肌梗死(AMI)后存活的心肌产生适应性肥厚,即心室重构。心室重构受到不同的信号物质如化学因子、生长因子和 miRNA 等调节,其中许多生物活性物质由心肌细胞分泌的外泌体携带。

研究发现,AMI 时心肌细胞分泌包含 HSP20、HSP60 以及 TNF- α 的外泌体,这些物质可以促进心肌细胞凋亡和间质纤维化,引起心室重构,而外泌体以自分泌的方式在心肌细胞间进行物质传递^[9]。

Kuwabara 等^[10]发现急性冠脉综合征(ACS)患者血浆中存在 miR-1 和 miR-133a 高表达,进一步在大鼠模型中发现,这些 miRNA 来源于梗死区或梗死边缘区释放的外泌体。Izarra 等^[11]发现在 AMI 小鼠模型中,心脏祖细胞源性外泌体携带的 miR-133a 可以减轻心肌纤维化及心肌细胞肥大,预防心室重构,改善心功能,其机制与 miR-133a 抑制胱天蛋白酶-9(caspase-9)活性有关。血管新生是心脏重构的重要环节,外泌体参与调节重构过程中血管新生。研究显示心脏缺血时,miR-214 表达增加并通过内皮细胞来源的外泌体分泌,miR-214 被证实可刺激内皮细胞迁移,诱导血管新生,从而增加缺血梗死区域血供,抑制心室重构^[9]。此外,Yang 等^[12]在 AMI 大鼠模型中发现 miR-214 还能够通过抑制人第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源等位基因(PTEN),减少心肌细胞凋亡,提高心脏收缩舒张功能,改善心室重构。

2.3 缺血再灌注损伤引起的心室重构

快速血运重建是 AMI 最重要的临床处理措施。缺血再灌注损伤是 AMI 早期梗死相关动脉再通后出现心室重构和心衰的主要原因。外泌体对心肌缺血再灌注损伤的干预已成为目前研究热点。

HSP70 是外泌体膜上的标志性结构蛋白,也是

Toll 样受体 4(TLR4)的配体。Vicencio 等^[13]将远端缺血预适应大鼠血浆中提取的外泌体输注到缺血再灌注离体大鼠心脏,可以减少大鼠心肌梗死面积;在体外缺氧/复氧心肌细胞模型中,使用上述外泌体干预可以减少心肌细胞死亡,其主要机制为外泌体表面 HSP70 与 TLR4 结合,激活细胞外信号调节激酶(ERK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号通路,最终促使 HSP27 磷酸化,起到心肌细胞保护作用,防止心室重构发生。

不同种类的干细胞源性外泌体可对心脏损伤起保护作用。Arslan 等^[14]以小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)来源外泌体对缺血再灌注小鼠模型的在体及离体心脏进行干预,发现与生理盐水对照组相比,小鼠心肌梗死面积减少,左心室结构和收缩功能较好,其主要机制与三磷酸腺苷(ATP)水平增加、氧化应激降低和磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶(PI3K/Akt)通路激活有关。研究发现,诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, IPS)来源的外泌体富含促细胞生存的 miR-21 和 miR-210,且能够将这些 miRNA 转送至心肌细胞;在缺血再灌注小鼠模型缺血部位肌内注射 IPS 来源的外泌体,能够抑制促凋亡蛋白 caspase-3,显著提高再灌注损伤后心肌细胞存活率,改善左室重构,其机制可能与外泌体来源的 miRNA 介导的细胞保护和抗细胞凋亡作用有关^[15]。

3 外泌体介导的压力负荷心室重构

心脏压力负荷增加可以导致心肌细胞肥大、成纤维细胞增生及细胞外基质蛋白和炎症细胞因子的分泌。成纤维细胞和心肌细胞又可通过自分泌与旁分泌方式进一步促进心室重构。

3.1 压力负荷小鼠模型的心室重构

在主动脉弓缩窄(TAC)所致心肌肥大小鼠模型中,对 miRNA(miR-27、miR-21 及 miR-15 等)进行基因敲除或拮抗,可以影响心肌肥大和心肌纤维化^[16]。Wang 等^[17]在 TAC 小鼠模型中发现心肌细胞内 miR-27 过表达,敲除 miR-27 可使心脏过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)表达增加,明显减轻压力超负荷引起的心肌肥大,防止心室重构发生。Thum 等^[18]在 TAC 小鼠模型中发现,左心室心肌细胞中 miR-21 呈现高表达,并可通过抑制 SPRY1(sprouty homologue 1)增加 ERK/MAPK 信号通路活性,引起心肌间质纤维化及心室重构。许多

miRNA 包含于外泌体中,并通过外泌体介导引起左室重构。Bang 等^[19]发现血管紧张素Ⅱ诱导的心脏成纤维细胞中存在高表达的 miR-21,miR-21 通过心脏成纤维细胞来源外泌体转送至心肌细胞,通过调控其靶标 SORBS2 (sorbin and SH3 domain-containing protein 2) 和 PDLIM5 (PDZ and LIM domain 5) 的表达,引起心肌细胞肥大,提示 miR-21 可作为旁分泌的介质促进心肌细胞肥大,而外泌体介导了心脏成纤维细胞与心肌细胞间生物信号的转导。

3.2 原发性高血压引起的心室重构

与健康人群相比,高血压患者可以出现循环 miRNA 差异性改变。miR-9 是左心室肥厚的负性调节剂,Kontaraki 等^[20]发现高血压患者血液中单核细胞内 miR-9 表达明显降低,且 miR-9 的表达水平与左心室质量指数呈正相关,提示高血压左心室肥厚时 miR-9 反馈性高表达可以抑制心室重构。单核细胞内 miR-9 表达对心肌细胞肥大的影响可能与外泌体介导的细胞间生物信号转导有关。肾素-血管紧张素系统(RAS)在高血压的病理生理学中发挥重要作用,研究表明外泌体参与了 RAS 对心室重构的影响^[21]。Karolina 等^[22]发现在高血压患者血液中提取的外泌体内 miR-92a 表达增加,而 miR-92a 可以调控血管紧张素Ⅱ受体 1(AT1R)靶标基因。原发性高血压患者较高水平的血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)是引起左心室肥厚等靶器官损伤的重要原因。Lyu 等^[5]研究发现,AngⅡ干预心脏成纤维细胞,可通过激活 AT1R 刺激外泌体释放,这些外泌体能够促进心肌细胞 AT1R、AT2R、肾素和血管紧张素原的表达,减少血管紧张素转化酶 2(ACE2)的水平,进而引起心肌细胞肥大,该研究首次揭示了心脏成纤维细胞来源外泌体介导的 RAS 激活引起病理性心肌肥厚的旁分泌机制。

3.3 盐敏感性高血压引起的心室重构

盐敏感性(salt sensitivity, SS)高血压是指相对高盐摄入可引起血压升高。逆盐敏感性(inverse salt sensitivity, ISS)高血压是指相对高盐摄入反而引起血压降低,但如无充足的食盐摄入,也会增加心血管疾病的发生及死亡。Gildea 等^[23]在从人尿液提取的外泌体中发现与 SS 和 ISS 相关的 45 种 miRNA,其中部分被认为是 SS 和 ISS 高血压的潜在标志物,参与调控 PPAR γ 、表皮生长因子受体(EGFR)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和 PTEN/PI3K 等与高血压相关的信号通路,而上述某些通路与心肌间质纤维化及重构有关。鉴于疾病早期可

能出现 miRNA 改变,推测尿液来源外泌体中的 miRNA 可作为识别钠调节通路异常的标志物。

4 外泌体介导的非缺血性心肌病心室重构和心衰

心衰时交感神经系统的激活和神经内分泌系统的紊乱促进病理性心室重构,最终导致失代偿性心衰。心衰时外泌体来源的 miRNA 可以出现表达改变,并可能通过旁分泌或自分泌方式参与心肌的病理性重构。Goren 等^[24]发现稳定性慢性心衰患者循环中外泌体来源的 miR-423-5p、miR-320a、miR-22 和 miR-92b 与正常对照组相比明显增加,且与血浆脑钠肽(BNP)和左心室扩张存在明显相关性。外泌体除了对前述缺血性心肌重构产生影响,也在非缺血性心肌病的心室重构和心衰进展中发挥重要作用。

4.1 扩张性心肌病(DCM)的心室重构

心肌细胞凋亡和心肌组织纤维化是 DCM 的常见病理变化。心脏干细胞来源的外泌体(CSC-XOs)携带 miR-22、miR-24、miR-146、miR-210,能够通过抑制 TGF- β 信号通路及心肌细胞凋亡,改善心室重构^[25]。Vandergriff 等^[26]以静脉注射 CSC-XOs 干预阿霉素诱导的 DCM 小鼠模型,与对照组相比,治疗组小鼠心肌细胞凋亡明显减少,心脏射血分数(EF)和左室短轴缩短率(FS)明显增加,提示 CSC-XOs 具有改善心肌病理性重构及心功能作用,且无明显排异反应,在 DCM 的防治中具有较大潜力。

4.2 围产期心肌病(PPCM)的心室重构

PPCM 是于妊娠晚期或产后数月出现、以心衰为主要表现的心肌病变,催乳素片段(相对分子质量 16 000)被认为是潜在的致病因子^[27]。Halkein 等^[28]研究表明催乳素片段可以促进 miR-146a 加载到内皮细胞的外泌体内,包含 miR-146a 的外泌体经内皮细胞释放后,可以被心肌细胞吸收,从而实现 miR-146a 在内皮细胞和心肌细胞间的转移。miR-146a 通过作用于靶基因,抑制血管新生,降低心肌细胞葡萄糖摄入,影响心肌血供和能量代谢,进而导致心室重构和心衰。循环或外泌体中 miR-146a 有望成为 PPCM 诊断或药物疗效判断的指标。

5 结语

外泌体是细胞经过“内吞-融合-外排”等一系列调控过程而形成的纳米级小囊泡,通过其携带的蛋白质、RNA 和炎性因子等生物活性物质在细胞间传递,达到细胞间信息交流的作用。外泌体作为生物

信息传递的载体或生物标志物已成为心室重构乃至心血管相关领域的研究热点,其对心室重构的作用值得深入探索。

参 考 文 献

- [1] Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor[J]. *Cell*, 1983, 33(3): 967-978.
- [2] 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(19):9412-9420.
- [3] 黄楷森, 刘 微, 黄德嘉. 外泌体在心血管疾病领域的研究现状[J]. *国际心血管病杂志*, 2014, 41(4):223-226.
- [4] Waldenström A, Ronquist G. Role of exosomes in myocardial remodeling[J]. *Circ Res*, 2014, 114(2):315-324.
- [5] Lyu L, Wang H, Li B, et al. A critical role of cardiac fibroblast-derived exosomes in activating renninangiotensin system in cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89(Pt B):268-279.
- [6] Zhang X, Yuan X, Shi H, et al. Exosomes in cancer: small particle, big player[J]. *Hematol Oncol*, 2014, 8(1):1-13.
- [7] 谢 萍, 祝善俊, 王 江, 等. 肿瘤坏死因子 α 在大鼠心肌梗死后心肌间质重塑和心力衰竭中的作用[J]. *中国循环杂志*, 2004, 19(3):229-233.
- [8] Yu X, Deng L, Wang D, et al. Mechanism of TNF- α autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: Initiated by hypoxia inducible factor 1 α , presented by exosomes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(6):848-857.
- [9] Zhao W, Zheng XL, Zhao SP. Exosome and its roles in cardiovascular diseases[J]. *Heart Fail Rev*, 2015, 20(3): 337-348.
- [10] Kuwabara Y, Ono K, Horie T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011, 4(4):446-454.
- [11] Izarra A, Moscoso I, Levent E, et al. miR-133a enhances the protective capacity of cardiac progenitors cells after myocardial infarction[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(6): 1029-1042.
- [12] Yang X, Qin Y, Shao S, et al. MicroRNA-214 inhibits left ventricular remodeling in an acute myocardial infarction rat model by suppressing cellular apoptosis via the phosphatase and tensin homolog (PTEN)[J]. *Int Heart J*, 2016, 57(2): 247-250.
- [13] Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(15):1525-1536.
- [14] Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3):301-312.
- [15] 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.
- [16] Creemers EE, van Rooij E. Function and therapeutic potential of noncoding RNAs in cardiac fibrosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(1):108-118.
- [17] Wang J, Song Y, Zhang Y, et al. Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice[J]. *Cell Res*, 2012, 22(3):516-527.
- [18] Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts[J]. *Nature*, 2008, 456(18): 980-984.
- [19] Bang C, Batkai S, Dangwal S, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(5):2136-2146.
- [20] Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, et al. MicroRNA-9 and microRNA-126 expression levels in patients with essential hypertension: potential markers of target-organ damage[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2014, 8(6): 368-375.
- [21] Romaine SP, Charchar FJ, Samani NJ, et al. Circulating microRNAs and hypertension—from new insights into blood pressure regulation to biomarkers of cardiovascular risk[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 27:1-7.
- [22] Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(12):2271-2276.
- [23] Gildea JJ, Carlson JM, Schoeffel CD, et al. Urinary exosome miRNome analysis and its applications to salt sensitivity of blood pressure[J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(12):1131-1134.
- [24] Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, et al. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure[J]. *Eur J Heart Fail*, 2012, 14(2):147-154.
- [25] Ibrahim AG, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(5):606-619.
- [26] Vandergriff AC, de Andrade JB, Tang J, et al. Intravenous cardiac stem cell-derived exosomes ameliorate cardiac dysfunction in doxorubicin induced dilated cardiomyopathy[J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015:960926.
- [27] Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, et al. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy[J]. *Cell*, 2007, 128(3): 589-600.
- [28] Halken J, Tabruyn SP, Ricke-Hoch M, et al. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 2143-2154.

(收稿:2016-08-24 修回:2017-01-11)

(本文编辑:胡晓静)