

## 综述

## 外泌体在急性肾损伤中作用的研究进展

廖伟棠<sup>1</sup>, 张 文<sup>2</sup>

1. 上海交通大学 医学院, 上海 200025; 2. 上海交通大学 医学院附属瑞金医院肾内科, 上海 200025

**[摘要]** 外泌体是一种产生于细胞内并分泌到胞外的膜性囊泡小体, 人体中几乎所有类型的细胞均能产生和分泌外泌体。外泌体内可携带多种蛋白信号分子、mRNA、miRNA、lncRNA 及其降解片段。这些成分因为有外泌体脂质膜的保护而具有充分的生物学活性, 参与细胞迁移、凋亡、增殖的过程, 从而有效发挥对受体细胞的调节作用。外泌体作为细胞与细胞间信号传递的重要信息载体, 参与多种肾脏疾病的发生、发展。该文针对外泌体的生物学特性及其在急性肾损伤中的作用进行简要综述。

**[关键词]** 外泌体; 急性肾损伤; 生物学标志物

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.07.018 **[中图分类号]** R692 **[文献标志码]** A

## Research progress on role of exosomes in acute kidney injury

LIAO Wei-tang<sup>1</sup>, ZHANG Wen<sup>2</sup>

1. Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Department of Nephrology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** Exosomes are extracellular vesicles with plasma membrane. They are produced intracellularly and then secreted out of the cells. Almost all types of cells in human bodies can produce and excrete exosomes. Exosomes carry a variety of signal proteins, mRNA, miRNA, lncRNA and their degradation fragments. Due to the protection of lipid membrane, these components have biological activity and get involved in the process of cell migration, apoptosis and proliferation, and can modulate the function of the recipient cells. As an important cell-cell signal carrier, exosomes are involved in the development of many kidney diseases. This article reviewed the biological characteristics of exosomes and their roles in acute kidney injury.

**[Key words]** exosome; acute kidney injury; biological marker

外泌体最早是在体外培养的绵羊红细胞上清培养液中发现的, 是红细胞主动分泌的直径为 40 ~ 100 nm、密度为 1.10 ~ 1.18 g/mL、大小均一的单层膜结构囊泡样小体<sup>[1]</sup>。外泌体内部往往包含母细胞所特有的各种小分子遗传物质, 包括 mRNA、miRNA 及各种蛋白信号分子, 并由完整的单层膜性结构包裹从而减少了外部微环境的干扰<sup>[2]</sup>。外泌体广泛参与细胞信号转导、细胞分化、免疫调节、物质代谢、基因调控、损伤与修复<sup>[3]</sup>, 在细胞间通信和物质信息转运中发挥着重要的作用<sup>[4]</sup>。

## 1 外泌体的来源

外泌体是各种细胞在不同应激状态下向外周释放的单层膜状囊泡小体, 起初被认为是细胞排泄产物。然而, 不断有研究发现, 多种类型细胞在生理或病理情况下均可以释放外泌体, 且外泌体中含有多种遗传物质和蛋白信号

分子。这些生物学活性物质在调控细胞间信号传递中起重要的作用<sup>[5]</sup>。外泌体的来源十分广泛, 已有报道树突状细胞、淋巴细胞、肥大细胞及尿液、血液和精液<sup>[6-8]</sup>中均分离提取出外泌体; 此外, 不同类型的干细胞亦可分泌外泌体。虽然外泌体来源于不同的细胞, 但是其形成过程基本相似。首先, 细胞膜发生内陷, 形成早期核内体; 随后在溶酶体融合作用下, 细胞内容物进入早期核内体, 形成腔内多囊泡小体; 最后这些多囊泡小体被母细胞以胞吐的形式分泌到细胞外微环境中, 即为外泌体<sup>[9-10]</sup>。外泌体中携带的母细胞的多种遗传物质和信息分子被运输到周围细胞或远处组织中, 进行细胞间的物质运输和信息交流, 从而参与多种生理及病理学过程。

## 2 外泌体的主要组分

截止到目前, 在外泌体中发现了超过 4 000 种蛋白质,

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81470967, 81670613) (National Natural Science Foundation of China, 81470967, 81670613)。

**[作者简介]** 廖伟棠 (1984—), 男, 博士生; 电子信箱: liaoweitang183@163.com。

**[通信作者]** 张 文, 电子信箱: zhangwen255@163.com。

这些蛋白参与包括物质内吞、跨膜信号转导、抗原提呈等多种生物学过程<sup>[11-12]</sup>。外泌体中富含具有交换和融合功能作用的膜联蛋白(包括膜联蛋白1~6等),还含有参与外泌体运输的四跨膜蛋白家族(CD9、CD63和CD81)以及热休克蛋白(HSP60、HSP70、HSP90)、整合素、磷脂酶D2、细胞骨架蛋白和一些生物酶类<sup>[13]</sup>。此外,多种细胞信号蛋白如 $\beta$ -联蛋白( $\beta$ -catenin)、Wnt4、Notch配体、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )也在外泌体中进行传递,影响受体细胞的生物学行为<sup>[14-16]</sup>。而在一些特殊情况下,外泌体也能运载主要组织相容性复合体I、II,共刺激因子和黏附分子参与免疫调节过程<sup>[17-18]</sup>。总之,外泌体含有多种蛋白质成分,这些蛋白质成分根据来源细胞及组织的不同而存在差异,而这些差异的蛋白质最终导致外泌体行使不同的生物学功能<sup>[19-20]</sup>。

外泌体中除了含有蛋白质外,还含有大量具有生物学活性的遗传物质,如miRNA、mRNA、lncRNA和DNA,这些组分与外泌体在各种生物活动中扮演的角色息息相关<sup>[21]</sup>。细胞之间可以通过外泌体中的RNA来交换遗传物质。当受体细胞摄取这些含有RNA的外泌体后,mRNA可以在受体细胞内被翻译出相应的蛋白质,miRNA可以靶向调节受体细胞中mRNA水平,而siRNA可以通过干扰受体细胞内目标基因翻译使其沉默<sup>[22]</sup>。

### 3 外泌体与急性肾损伤

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)在临床的发病率有增高趋势,且死亡率高、预后差,给社会和家庭带来沉重的经济和疾病负担。外泌体不仅可作为AKI诊断及预后评估的新型标志物,而且肾小管上皮细胞分泌的外泌体可启动并调控细胞增殖和修复,在肾脏疾病的发展中发挥重要的作用<sup>[23]</sup>。

#### 3.1 外泌体在AKI诊断中的应用

改善AKI预后的关键是早期诊断、早期干预。传统的诊断指标血清肌酐和尿素受到的影响因素多,且不能在早期反映肾小球滤过率的下降。近年来尿外泌体相关研究已筛选出了大量的AKI相关候选生物学标志物,如水通道蛋白-1(aquaporin-1, AQP-1)、胎球蛋白A(fetuin-A)和转录激活因子3(activating transcription factor 3, ATF3)。由于外泌体具有完整的膜性结构包绕,微环境对内容物的干扰小,比如尿外泌体内的蛋白可以避免尿液其他蛋白分子的污染;此外,外泌体的膜结构还可以减少RNA酶的降解作用,这使得尿外泌体RNA相比尿

液RNA的稳定性更高。因此,尿外泌体生物学标志物在AKI诊断方面具有独特的优越性<sup>[24]</sup>。

**3.1.1 AQP-1** AQP-1是选择性允许水通过质膜的跨膜蛋白家族,在AKI的病理生理学机制中发挥着重要作用。Sonoda等<sup>[25]</sup>研究者发现缺血再灌注损伤大鼠和肾衰竭IV期患者的尿外泌体中,AQP-1含量显著下降。同时在肾再灌注损伤模型研究中发现,尿外泌体中AQP-1的含量在缺血再灌注后6h即可观察到下降,并且这种低水平可持续至恢复再灌注后96h。研究者还通过对患者肾功能进行分析,发现肾脏AQP-1表达量下降与AKI早期肾功能受损程度相关,这提示了AQP-1可能存在肾脏保护作用。

**3.1.2 胎球蛋白A** 胎球蛋白A为肝脏分泌的一种多功能蛋白。在顺铂诱导的大鼠AKI模型中,Zhou等<sup>[26]</sup>研究人员发现外泌体中胎球蛋白A在AKI发生后的第2日便开始升高,持续至第5日;而大鼠血肌酐的升高发生在AKI发生后的第4日。随后在肾缺血再灌注损伤大鼠模型中同样发现胎球蛋白A在肾脏损伤早期(2~6h)即出现明显改变,这表明外泌体中胎球蛋白A可能是一个反映肾功能变化的较好指标。在临床研究发现AKI患者尿外泌体胎球蛋白A相比于对照组明显上升。这使得胎球蛋白A可作为反映AKI患者肾功能的潜在的早期标志物。

**3.1.3 ATF3** Zhou等<sup>[27]</sup>研究人员发现,在药物所致的大鼠AKI模型中,尿外泌体中ATF3在AKI早期就开始升高,而且时间早于血清肌酐的增加,并持续存在于大鼠尿外泌体中。在临床研究发现,AKI患者尿外泌体中ATF3显著增加,而在AKI患者的尿外泌体全尿以及慢性肾脏病患者和健康人群的全尿和外泌体中均未检测到ATF3。由此可推断ATF3仅表达在AKI患者尿外泌体中,这使ATF3有望成为特异性的AKI标志物。

**3.1.4 钠氢交换体** 钠氢交换体(sodium hydrogen exchanger, NHE)是细胞膜上离子转运蛋白家族,它能够调控细胞内pH值的动态平衡,从而影响细胞的分化、凋亡以及生长增殖等复杂的生理和病理过程。在一项临床研究<sup>[28]</sup>中发现AKI患者的尿外泌体中NHE的浓度与肾小管损伤显著相关,与 $\text{Na}^+$ 排泄分数及尿视黄醇结合蛋白这些传统的反映肾损伤的指标相比,NHE具有更高的特异度。

#### 3.2 外泌体在AKI中的保护修复作用

外泌体作为一个重要的细胞间信息交换的媒介,除可以作为诊断AKI的生物学标志物,还在肾小管上皮细胞损伤及修复中发挥重要作用。有研究<sup>[29]</sup>发现各种干细胞来源的外泌体,比如间充质干细胞来源的外泌体可通过向损伤中存活的分化细胞传递关键信号,从而减轻损伤、促

进修复。随着对干细胞来源的外泌体研究越来越多,发现其主要通过以下3种机制发挥肾脏保护作用。

**3.2.1 促进血管生成** ATF3是一个转录因子家族,通过识别和结合环腺苷酸应答元件而激活基因表达。有研究<sup>[30]</sup>发现,在缺血再灌注性AKI模型中,肾小管内皮细胞可释放大量的ATF3外泌体;这些外泌体被邻近的受体细胞内吞后,ATF3可转录翻译成蛋白上调促血管因子的表达,从而促进肾小管上皮细胞增殖,减少细胞凋亡,达到对缺血再灌注性AKI的肾脏的保护作用。Zhang等<sup>[31]</sup>还发现在缺血再灌注模型中,肾脏经间质干细胞来源的外泌体预处理后,肾脏的血流量明显高于对照组。此外,将外泌体注入细胞培养基中,也发现外泌体可使血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达上调,促进血管生成,从而使肾小管上皮细胞发挥损伤修复作用。

**3.2.2 抗氧化损伤** 目前普遍认为,氧化应激是AKI的重要发病机制之一。自由基可直接作用于肾小管上皮细胞,引起生物膜脂质过氧化、细胞蛋白及酶变性、DNA损伤,最后导致肾小管上皮细胞的坏死或凋亡<sup>[32]</sup>。越来越多的研究<sup>[33]</sup>发现,外泌体能够通过减弱缺血再灌注时氧自由基的产生,减少氧化应激损伤,起到肾保护作用。在顺铂诱导的大鼠AKI模型中,经输注干细胞来源的外泌体预处理后,发现其DNA氧化损伤产物8-羟基脱氧鸟苷、脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的水平明显比对照组低,caspase 3、Bax等凋亡相关基因表达水平下降;表明外泌体能够通过抗氧化应激、抗细胞凋亡发挥肾脏保护作用<sup>[34]</sup>。

**3.2.3 促进细胞增殖和抑制凋亡** 肾小管上皮细胞缺血缺氧损伤是导致AKI的重要原因,其主要病变是肾小管上皮细胞的坏死和凋亡,而损伤后的修复主要依靠残存肾小管上皮细胞的增殖及再分化来重建肾小管结构及功能的

完整性。在缺血性心肌细胞的研究方面,有研究<sup>[35]</sup>证实,间充质干细胞来源的外泌体可以促进心肌细胞增殖,提升心肌细胞的生存能力,改善心脏功能。外泌体的心脏保护机制可能与外泌体中的miRNA相关,但是具体机制仍需进一步研究。在外泌体的肾保护方面,Bi等<sup>[36]</sup>将间质干细胞来源的外泌体培养基注入顺铂诱导的大鼠AKI模型中,肾小管上皮细胞凋亡明显减少,增殖水平升高,肾损伤减少;该研究表明外泌体可能通过促进细胞增殖和抑制凋亡,从而起到肾保护作用。

## 4 展望

外泌体作为细胞间信息传递和物质转运的载体,发挥了广泛的生物学活性功能。在AKI领域,外泌体作为在AKI诊断的新型分子生物学标志物具有巨大的潜力。虽然外泌体在AKI的研究中进展较快,但是仍有如下问题需要解决:①AKI早期诊断并规范化治疗非常重要,但是目前检测早期AKI的外泌体标志物多为现象的描述,仍处于起步阶段;就临床应用而言,仍需要开发AKI早期特异性外泌体作为疾病诊断和预后判断的生物学标志物。②尽管已经发现外泌体在肾小管上皮细胞增殖和修复中起重要的作用,但是大部分工作尚停留在科研阶段,并未进入多中心、大样本验证和临床实施阶段。③目前已知的外泌体分离提取方法中,尚无一种策略能够提取高浓度、高纯度的外泌体,较难满足临床体液样品的高通量检测需求,难以开展外泌体在AKI发病过程的后续功能研究。以上问题的解决,不仅对AKI,对其他疾病和学科也都有重要意义;相信通过越来越多的研究,外泌体在AKI的修复中将具有广阔的应用前景。

## 参·考·文·献

- [1] Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions[J]. *Blood*, 1989, 74(5): 1844-1851.
- [2] Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, et al. The biogenesis and functions of exosomes[J]. *Traffic*, 2002, 3(5): 321-330.
- [3] Dreyer F, Baur A. Biogenesis and functions of exosomes and extracellular vesicles[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1448: 201-216.
- [4] Staals RHJ, Pruijn GJM. The human exosome and disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010: 132-142.
- [5] Bang C, Thum T. Exosomes: new players in cell-cell communication[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(11): 2060-2064.
- [6] Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(36): 13368-13373.
- [7] Cappello F, Logozzi M, Campanella C, et al. Exosome levels in human body fluids: a tumor marker by themselves[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 96: 93-98.
- [8] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2): 193-208.
- [9] Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 87(1): 146-150.
- [10] 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.
- [11] Théry C, Regnault A, Garin J, et al. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73[J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(3): 599-610.
- [12] Taylor DD, Zacharias W, Gercel-Taylor C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling[J]. *Methods Mol Biol*, 2011: 235-246.
- [13] Schey KL, Luther JM, Rose KL. Proteomics characterization of exosome cargo[J]. *Methods*, 2015, 87: 75-82.
- [14] Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, et al. Exosome release of  $\beta$ -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling[J]. *J Cell Biol*, 2010, 190(6): 1079-1091.
- [15] Zhang B, Wang M, Gong A, et al. HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling



- is required for cutaneous wound healing[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(7): 2158-2168.
- [16] Sheldon H, Heikamp E, Turley H, et al. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by delta-like 4 incorporation into exosomes[J]. *Blood*, 2010, 116(13): 2385-2394.
- [17] McLellan AD. Exosome release by primary B cells[J]. *Crit Rev Immunol*, 2009, 29(3): 203-217.
- [18] Bobrie A, Colombo M, Raposo G, et al. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses[J]. *Traffic*, 2011, 12(12): 1659-1668.
- [19] Schaeffer D, Clark A, Klauer AA, et al. Functions of the cytoplasmic exosome[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 702: 79-90.
- [20] Zakharova L, Svetlova M, Fomina AF. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes *via* phosphatidylserine receptor[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212(1): 174-181.
- [21] Hannafon BN, Ding WQ. Cancer stem cells and exosome signaling[J]. *Stem Cell Investig*, 2015, 2: 11.
- [22] Allmang C, Kufel J, Chanfreau G, et al. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis[J]. *EMBO J*, 1999, 18(19): 5399-5410.
- [23] van Balkom BWM, Pisitkun T, Verhaar MC, et al. Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases[J]. *Kidney Int*, 2011, 80(11): 1138-1145.
- [24] Lin SY, Chang CH, Wu HC, et al. Proteome profiling of urinary exosomes identifies alpha 1-antitrypsin and H2B1K as diagnostic and prognostic biomarkers for urothelial carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 34446.
- [25] Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, et al. Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297(4): F1006-F1016.
- [26] Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, et al. Exosomal fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2006, 70(10): 1847-1857.
- [27] Zhou H, Cheruvanky A, Hu X, et al. Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease[J]. *Kidney Int*, 2008, 74(5): 613-621.
- [28] du Cheyron D, Daubin C, Poggioli J, et al. Urinary measurement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 (NHE3) protein as new marker of tubule injury in critically ill patients with ARF[J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 42(3): 497-506.
- [29] Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4(3): 214-222.
- [30] Chen HH, Lai PF, Lan YF, et al. Exosomal *ATF3* RNA attenuates pro-inflammatory gene *MCP-1* transcription in renal ischemia-reperfusion[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(9): 1202-1211.
- [31] Zhang HC, Liu XB, Huang S, et al. Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both *in vitro* and *in vivo*[J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(18): 3289-3297.
- [32] Deuel JW, Schaer CA, Boretta FS, et al. Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2064.
- [33] 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.
- [34] Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis *in vivo* and *in vitro*[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(2): 34.
- [35] Zhang Z, Yang J, Yan W, et al. Pretreatment of cardiac stem cells with exosomes derived from mesenchymal stem cells enhances myocardial repair[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(1): e002856.
- [36] Bi B, Schmitt R, Israilova M, et al. Stromal cells protect against acute tubular injury *via* an endocrine effect[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(9): 2486-2496.

[ 收稿日期 ] 2018-01-12

[ 本文编辑 ] 瞿麟平

## 学术快讯

## 上海交通大学医学院附属第九人民医院红十字眼库顺利完成第 1 例角膜独立捐献

2018 年 6 月 27 日, 上海交通大学医学院附属第九人民医院红十字眼库独立接受的第 1 例角膜捐献工作顺利完成。第九人民医院红十字眼库、红十字会办公室向角膜捐献者颁发遗体(角膜)捐献证书。

第九人民医院红十字眼库于 2017 年 7 月正式成立, 成为上海市红十字会下属 4 所眼库之一。经第九人民医院眼库与上海市、区两级红十字会下属各遗体接受站及各大医院的器官获取组织通力合作, 已经实现接受角膜捐献 19 例(角膜 38 枚)。