

## . 综 述 .

## 内皮祖细胞分泌的外泌体在颅脑损伤中作用的研究进展

马小鹏 综述 张华楸 审校

【关键词】 颅脑损伤;内皮祖细胞;外泌体

【文章编号】 1009-153X(2021)09-0724-03

【文献标志码】 A

【中国图书资料分类号】 R 651.1+5

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)具有较高的发病率和病死率,是青壮年最常见的死亡和残疾原因。全球每年约有 5 000 万例 TBI,年经济损失约 4 000 亿美元,占世界生产总值的 0.5%<sup>[1]</sup>。TBI 后神经组织的损伤和修复是一个复杂的病理生理过程,多种细胞参与其中,其中外泌体介导的细胞间信号传导和相互调控具有重要意义。

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)来源于骨髓和外周血管壁,是血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)的前体细胞<sup>[2]</sup>。当组织缺血或血管内皮损伤时,EPCs 被组织释放的损伤信号动员后进行迁移,前往内皮损伤部位参与修复<sup>[3]</sup>。EPCs 分为早期和晚期 EPCs,活化的早期 EPCs 表达丰富的炎性细胞因子和旁分泌血管生成因子,以旁分泌外泌体的方式招募更多的 EPCs 和 ECs 形成微血管<sup>[4]</sup>,是损伤后的快速反应结果。早期 EPCs 的来源是外周血管壁,外周血 EPCs 含量极少,只占外周细胞的 0.01%。晚期 EPCs 通过增殖、迁移、定位到受损内皮处,分化成血管 ECs 并整合到血管网络中<sup>[5,6]</sup>。晚期 EPCs 的来源是骨髓中的 EPCs。早期 EPCs 和晚期 EPCs 的作用方式具有差异,提示 EPCs 可能具有不同的治疗作用。已有研究发现 TBI 后 EPCs 分泌的外泌体对脑微血管修复和改善预后具有有益影响<sup>[7]</sup>。

外泌体是介导细胞间通讯的小囊泡,有类似细胞膜的磷脂双分子层,为内部的小分子物质提供了较稳定的环境。外泌体是一种理想的载体,可将 mRNA、miRNA 或蛋白质运送到受体细胞中,而不会在循环中被酶消化。透射电镜观察发现,EPCs 外泌

体的外观结构呈椭圆形膜性囊泡,较多的 EPCs 外泌体聚集在一起呈葡萄状排列,大小不等,纳米颗粒跟踪分析显示平均直径为 120 nm。近期的研究发现囊泡因内容物不同呈现出不同透亮度,其主要成分为 mRNA 和蛋白分子<sup>[6]</sup>。对早期 EPCs 外泌体进行免疫印迹试验分析,发现其能高强度表达 CD9、CD63 和热休克蛋白 70<sup>[7]</sup>。

EPCs 作为 TBI 后外泌体来源的主要途径之一,其作用和意义逐步为人们所认识。本文就 EPCs 外泌体在 TBI 中的作用研究进展进行综述。

## 1 EPCs 分泌的外泌体在 TBI 中的作用

1.1 修复损伤的血脑屏障 TBI 常伴随血脑屏障的破坏。血脑屏障由多种细胞和神经元构成,其中毛细血管壁的 ECs 具有细胞间紧密连接蛋白,构成血脑屏障的主要结构基础。在生理条件下,血脑屏障为脑组织选择性通透营养物质,同时保护脑组织不受有毒物质侵害,确保中枢神经系统功能正常执行。

内皮集落形成细胞(endothelial colony forming cell, ECFC)是从人脐带静脉血中分离得到的早期特异性 EPCs。Gao 等<sup>[7]</sup>从 ECFC 条件培养基中分离出 ECFC 外泌体并用细胞膜染料 PKH67 标记后,静脉输入 TBI 小鼠体内,12 h 后观察到 ECFC 外泌体被大鼠微血管 ECs 高效摄取;伤后 24 h,ECs 向创面的迁移量显著升高;不同含量 ECFC 外泌体预处理 ECs 后,显著增加紧密连接蛋白的表达。这说明 ECFC 可能通过旁分泌的方式刺激 ECs 的增殖和迁移。有研究报道等<sup>[8,9]</sup>从人脐血中分离单核细胞培养扩增为 ECFC,静脉注射到 TBI 小鼠体内 24 h 后,荧光原位杂交发现在受伤的大脑中检测到标记的 ECFC,明显减轻脑水肿程度,增加紧密连接蛋白的表达;小鼠运动能力、空间获取和参考记忆能力显著改善。这表明 ECFC 在 TBI 后可以直接定位到损伤部位,参与新

血管形成并改善神经功能。因此,TBI后ECFC兼有早期EPCs和晚期EPCs的特征。ECFC既通过外泌体的方式促进受损血管内皮的修复,其本身又可定位至受损部位,分化成ECs整合到血管网络中。

1.2 促进血管内皮的修复 TBI导致ECs损伤,使血管平滑肌细胞增殖,常会导致微血管狭窄。Kong等<sup>[10]</sup>发现在大鼠颈动脉球囊损伤模型中,EPCs外泌体能抑制新生内膜的过度增生,对ECs修复起到保护作用。Li等<sup>[11]</sup>在大鼠颈动脉内皮损伤模型中用荧光染料标记EPCs并收获其释放的外泌体,标记的外泌体与ECs共培养后,外泌体被捕获并转移到ECs的核周区域,显著增强ECs的增殖。Hu等<sup>[12]</sup>进行RNA测序发现miR-21-5p在EPCs外泌体中高度富集,并特异性抑制受体ECs中血管生成抑制因子血栓反应蛋白-1的表达。

1.3 抵抗缺氧 李罗成等<sup>[6]</sup>发现低氧可引起ECs损伤,体外缺氧环境处理的人脐静脉ECs增殖、迁移能力下降,凋亡细胞比例上升;EPCs外泌体显著改善缺氧条件下ECs增殖、迁移能力。Wang等<sup>[13]</sup>用小鼠骨髓中分离的单核细胞,在体外饥饿应激培养基中培养EPCs并提取饥饿应激EPCs外泌体明显提高血管ECs一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和NO水平,保护血管ECs免受缺氧诱导的活性氧族的影响;同时,PI3K抑制剂可以消除饥饿应激EPCs外泌体的这些保护作用。这提示饥饿应激EPCs外泌体通过PI3K/eNOS/NO通路发挥作用。

2 调控EPCs外泌体分泌的因素

2.1 血糖水平 研究发现高血糖抑制EPCs外泌体的释放和相关基因的表达<sup>[14,15]</sup>,使TBI病人血液中EPCs数量减少。当暴露于高葡萄糖时,人脐带ECs的活力和成管能力显著降低,而衰老细胞的比例则明显增高。Hassanpour等<sup>[14]</sup>将人骨髓来源的EPCs分别与糖尿病和健康人的血清共培养后,糖尿病组EPCs外泌体数量较对照组显著减少,与外泌体分泌和运输的相关基因表达下调。这提示糖尿病对EPCs分泌外泌体的效率产生不利影响。

2.2 孕激素 Li等<sup>[16]</sup>制备小鼠TBI模型后腹膜内给予孕激素,发现循环EPCs水平增加,受伤脑组织CD34和CD31阳性细胞的数量和血管密度增加。这表明TBI后孕激素可显著改善神经功能并促进血管重塑。

2.3 运动锻炼 Ma等<sup>[17]</sup>分别从久坐和低、中度运动组小鼠中分离血浆EPCs外泌体,用高糖和缺氧诱导的ECs损伤模型与三组EPCs外泌体共培养研究ECs的

保护因素,结果发现EPCs水平和EPCs外泌体在中度运动小鼠体内的释放率明显增高;运动组EPCs含量及其释放的外泌体miR-126的表达明显增高。这提示运动可能通过增加EPCs外泌体的释放和外泌体中miR-126的含量增强对ECs的保护作用。

综上所述,TBI后脑血管内皮组织损伤、缺血释放多种细胞因子,活化的早期EPCs通过旁分泌外泌体作用于ECs,并招募更多的EPCs促进组织修复。当骨髓中的EPCs受各种因素的刺激后开始动员向外周血迁移形成晚期EPCs,增加外周血中EPCs的数量并分化成血管ECs修复损伤。EPCs外泌体的保护作用表现为修复损伤的脑屏障、促进血管内皮的修复和帮助ECs抵抗缺氧损伤。EPCs作为干细胞移植的替代治疗方案,具有促进血管再生作用<sup>[18]</sup>。由于免疫排异等问题,EPCs的临床应用十分有限<sup>[19]</sup>。EPCs外泌体具有与EPCs相似的作用,但其主要成分是不具有免疫原性的小分子核酸,因此,EPCs外泌体有望成为改善TBI预后的治疗手段<sup>[20]</sup>。近年来,EPCs被发现对神经修复和脑血管再生具有重要意义<sup>[21-23]</sup>,但EPCs外泌体是否具有其父本EPCs的这一重要作用尚待更多研究证实。

【参考文献】

[1] Khellaf A, Khan DZ, Helmy A. Recent advances in traumatic brain injury [J]. J Neurol, 2019, 266(11): 2878-2889.

[2] 潘天岳,刘浩,符伟国,等. 血管内皮祖细胞鉴定及其促血管新生机制的研究进展[J]. 中国临床医学, 2019, 26(4):635-640.

[3] 龚如,江基尧. 内皮祖细胞在缺血性脑血管疾病治疗中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2014, 41(2):130-133.

[4] Cheng CC, Chang SJ, Chueh YN, et al. Distinct angiogenesis roles and surface markers of early and late endothelial progenitor cells revealed by functional group analyses [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 182.

[5] Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, et al. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay [J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(6): 660-668.

[6] 李罗成,王志维,吴红兵,等. 内皮祖细胞来源的外泌体减轻血管内皮细胞缺氧性损伤[J]. 微循环学杂志, 2019, 29(4):1-6.

[7] Gao W, Li F, Liu L, et al. Endothelial colony-forming cell-

- derived exosomes restore blood-brain barrier continuity in mice subjected to traumatic brain injury [J]. *Exp Neurol*, 2018, 307: 99-108.
- [8] Zhang Y, Li Y, Wang S, *et al*. Transplantation of expanded endothelial colony-forming cells improved outcomes of traumatic brain injury in a mouse model [J]. *J Surg Res*, 2013, 185(1): 441-449.
- [9] Huang XT, Zhang YQ, Li SJ, *et al*. Intracerebroventricular transplantation of ex vivo expanded endothelial colony-forming cells restores blood-brain barrier integrity and promotes angiogenesis of mice with traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2013, 30(24): 2080-2088.
- [10] Kong J, Wang F, Zhang J, *et al*. Exosomes of endothelial progenitor cells inhibit neointima formation after carotid artery injury [J]. *J Surg Res*, 2018, 232: 398-407.
- [11] Li X, Chen C, Wei L, *et al*. Exosomes derived from endothelial progenitor cells attenuate vascular repair and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(2): 253-262.
- [12] Hu H, Wang B, Jiang C, *et al*. Endothelial progenitor cell-derived exosomes facilitate vascular endothelial cell repair through shuttling miR-21-5p to modulate thrombospondin-1 expression [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(14): 1629-1644.
- [13] Wang J, Chen S, Ma X, *et al*. Effects of endothelial progenitor cell-derived microvesicles on hypoxia/reoxygenation-induced endothelial dysfunction and apoptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 572729.
- [14] Hassanpour M, Cheraghi O, Brazvan B, *et al*. Chronic exposure of human endothelial progenitor cells to diabetic condition abolished the regulated kinetics activity of exosomes [J]. *Iran J Pharm Res*, 2018, 17(3): 1068-1080.
- [15] Wei HJ, Liu L, Chen FL, *et al*. Decreased numbers of circulating endothelial progenitor cells are associated with hyperglycemia in patients with traumatic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(6): 984-990.
- [16] Li Z, Wang B, Kan Z, *et al*. Progesterone increases circulating endothelial progenitor cells and induces neural regeneration after traumatic brain injury in aged rats [J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(2): 343-353.
- [17] Ma C, Wang J, Liu H, *et al*. Moderate exercise enhances endothelial progenitor cell exosomes release and function [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2018, 50(10): 2024-2032.
- [18] 张小媚, 钱莉玲. 内皮祖细胞来源的胞外囊泡研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(11): 1211-1216.
- [19] Duscher D, Barrera J, Wong VW, *et al*. Stem cells in wound healing: the future of regenerative medicine: a mini-review [J]. *Gerontology*, 2016, 62(2): 216-225.
- [20] Huang L, Ma W, Ma Y, *et al*. Exosomes in mesenchymal stem cells, a new therapeutic strategy for cardiovascular diseases [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(2): 238-245.
- [21] Liu L, Wei H, Chen F, *et al*. Endothelial progenitor cells correlate with clinical outcome of traumatic brain injury [J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(7): 1760-1765.
- [22] Guo XB, Deng X, Wei Y. Homing of cultured endothelial progenitor cells and their effect on traumatic brain injury in rat model [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4164.
- [23] Malinovskaya NA, Komleva YK, Salmin VV, *et al*. Endothelial progenitor cells physiology and metabolic plasticity in brain angiogenesis and blood-brain barrier modeling [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 599.

(2020-03-28 收稿, 2020-05-06 修回)