

间充质干细胞来源外泌体在脊髓损伤治疗中的研究进展

石强 徐建广

摘要 脊髓损伤是严重创伤事件,可对患者的感觉、运动或自主神经功能产生严重影响。由于脊髓损伤的病理过程复杂,目前尚无成功的临床治疗策略。外泌体被认为是细胞与组织之间通过转运蛋白质、脂质和核酸进行交流的关键载体,间充质干细胞来源外泌体在脊髓损伤治疗的研究中已成为热点。该文对间充质干细胞来源外泌体在脊髓损伤治疗中的潜在作用机制以及微 RNA 在其中的作用进行综述。

关键词 脊髓损伤;间充质干细胞;外泌体;微 RNA

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2021.05.007

脊髓损伤常导致损伤节段以下肢体出现严重运动和感觉功能障碍。由于缺乏有效治疗方法,脊髓损伤患者的预防、治疗和康复成为亟待解决的问题。近年来,间充质干细胞(MSC)在脊髓损伤治疗中受到较多关注。MSC 的疗效主要来自旁分泌效应,而非 MSC 的分化和植入,因此含有各种旁分泌介质的 MSC 来源外泌体可能成为脊髓损伤的治疗策略之一。

1 MSC 来源外泌体治疗脊髓损伤的机制

外泌体广泛存在于体液中,它是细胞外囊泡的主要亚类之一,几乎所有类型细胞均会分泌外泌体^[1]。MSC 来源外泌体含有大量不同种类的蛋白质、脂质、核酸等活性物质,与 MSC 相比,外泌体更容易获得和储存,并且其应用几乎不受伦理限制。外泌体的体积明显小于 MSC,因此不会被肺组织和肝组织捕获,并且可穿过血脊髓屏障^[2]。MSC 来源外泌体治疗脊髓损伤的机制涉及以下一些方面。

1.1 抗炎作用

促炎因子[如白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α]与抗炎因子的相对水平与脊髓损伤患者的功能恢复相关。Romanelli 等^[3]使用人脐带间充质干细胞(hUCMSC)来源外泌体在体外直接与活化的小胶质细胞相互作用,发现其可在继发性损伤过程中抑制促炎因子表达。他们对脊髓损伤

大鼠模型静脉注射该外泌体,发现其可抑制 IL-1 β 和 IL-6 的表达,抑制瘢痕形成,从而有助于运动功能恢复。

神经炎症的特征是由各种外部刺激激活体内的常驻免疫细胞。这种激活由核苷酸结合结构域样受体蛋白(NLRP)3 炎症小体介导,在继发性脊髓损伤中起关键作用^[4-5]。研究发现,NLRP3 炎症小体可在脊髓损伤后被触发和上调^[5-6],而抑制 NLRP3 炎症小体激活可以促进大鼠脊髓损伤后的功能恢复^[5-7]。Huang 等^[8]的研究发现,硬膜外脂肪间充质干细胞来源外泌体可促进神经功能恢复,减少损伤体积。在脊髓损伤动物模型中静脉给予该外泌体,可显著抑制 NLRP3 炎症小体活化并降低炎症因子表达。该外泌体在脊髓损伤后可上调抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤(Bcl)-2 的表达,降低促凋亡蛋白 Bcl-2 关联蛋白 X(Bax)的表达。Sun 等^[9]的研究发现,hUCMSC 来源外泌体可降低促炎因子 TNF- α 、IL-6、干扰素- γ 和粒细胞集落刺激因子的水平,同时升高抗炎因子 IL-4 和 IL-10 的水平。

1.2 促进巨噬细胞极化

MSC 来源外泌体的治疗效果与其促进巨噬细胞极化有关。巨噬细胞是具有广泛功能可塑性的异质细胞,分为 M1 和 M2 两种表型^[10]。M1 型巨噬细胞可产生促炎因子、活性氧(ROS)和一氧化氮,促进组织的炎症和损伤。M2 型巨噬细胞通常产生抗炎因子,并减少受伤部位促炎因子产生,从而导致组织重塑。

巨噬细胞可以从一种表型转换到另一种表型,

这是由损伤或感染后产生的炎症因子诱导的^[10-11]。M1型巨噬细胞对受损脊髓有加重损伤的作用,而M2型巨噬细胞在有抑制性底物时可以促进轴突再生^[12-13]。脊髓损伤后,M1型巨噬细胞数量增加而M2型巨噬细胞数量减少,两者共同作用加重了损伤^[13-14]。研究显示,hUCMSC来源外泌体可触发巨噬细胞从M1型向M2型分化^[10]。Lankford等^[15]的研究显示,静脉注射MSC来源外泌体可使其迅速到达受损脊髓,并可特异性结合M2型巨噬细胞,表明M2型巨噬细胞可以减轻脊髓损伤。

1.3 减少A1型星形胶质细胞

星形胶质细胞在脊髓损伤过程中的作用非常重要,它们可以阻碍或促进中枢神经系统的恢复^[16]。Liddelow等^[17]研究发现,A1型和A2型星形胶质细胞分别由神经炎症和缺血诱导产生。A2型星形胶质细胞通过上调某些神经营养因子的表达发挥保护作用;而A1型星形胶质细胞在脊髓损伤后可迅速产生,并对髓鞘、突触和神经元有神经毒性作用。因此,抑制A1型星形胶质细胞可能是治疗脊髓损伤的方法之一。

有学者研究发现,骨髓间充质干细胞(BMSC)来源外泌体能有效促进脊髓损伤后的功能恢复,其可能机制是抑制A1型星形胶质细胞的激活^[18]。A1星形胶质细胞标记物(C3补体)将以核因子- κ B(NF- κ B)依赖的方式上调^[19]。NF- κ B信号转导通路可被多种炎症因子激活,如TNF- α 、IL-1、ROS。脊髓损伤的继发性炎症反应受NF- κ B信号转导通路调节,抑制该通路可促进脊髓损伤后的功能恢复^[20]。Wang等^[20]的研究显示,BMSC来源外泌体通过抑制NF- κ B p65的核移位,有效减少了脊髓损伤诱导产生的A1型星形胶质细胞。

1.4 保护血脊髓屏障

血脊髓屏障由基底膜、周细胞、毛细血管内皮细胞和星形胶质细胞足突共同形成^[21],负责维持神经系统的正常功能。周细胞作为神经血管单位的一部分,对维持血管完整性和屏障特性非常重要。Jo等^[22]的研究显示,周细胞维持微血管稳定性的主要机制可能为以下3种:①促进内皮紧密连接蛋白的表达;②调节跨细胞的囊泡转运;③调节紧密连接的排列。

脊髓损伤后保持血脊髓屏障的完整性可能成为治疗方法之一。研究表明,BMSC来源外泌体可通过NF- κ B p65途径抑制周细胞迁移,从而在脊髓损

伤后保持血脊髓屏障完整性,减少神经元细胞凋亡,促进轴突再生和运动功能恢复^[23]。Yuan等^[24]直接使用周细胞来源外泌体治疗脊髓损伤。他们发现,治疗后可减少细胞凋亡,改善损伤脊髓的微循环,预防损伤和水肿的发生。

2 MSC来源外泌体的微RNA

微RNA(miRNA)是一种内源性非编码核糖核酸,长度为20~24个核苷酸。成熟miRNA用Dicer酶处理后,通常与目的信使RNA(mRNA)相互作用,并结合到3'端,抑制目的mRNA的翻译,促进降解。越来越多的证据表明,具有双层膜结构的外泌体可作为miRNA的载体靶向脊髓损伤部位,外泌体可以穿透血脑屏障或血脊髓屏障,从而增强miRNA的治疗效果^[25]。MSC可通过预先转染特定miRNA质粒来分泌含高水平特定miRNA的外泌体^[26]。目前在脊髓损伤治疗研究中,主要涉及的外泌体miRNA为miRNA-21、miRNA-133b和miRNA-126。

2.1 miRNA-21

miRNA-21在脊髓损伤治疗中得到最多研究。Zhou等^[27]确定,miRNA-21修饰的BMSC来源外泌体可显著促进功能恢复,减少病变体积和细胞凋亡,其主要通过下调促凋亡基因*FasL*的表达实现。miRNA靶基因分析表明,miRNA-21含有与*FasL*基因3'非翻译区互补的结合位点,这表明*FasL*基因是其直接靶基因。Xu等^[28]报道,MSC来源外泌体的miRNA-21通过下调*PTEN*基因表达调节脊髓损伤患者神经元的凋亡和分化,*PTEN*基因是miRNA-21的靶基因。进一步的研究显示,肿瘤抑制基因程序性细胞死亡因子4也是MSC来源外泌体分泌的miRNA-21的靶基因^[29]。Ji等^[30]的研究表明,MSC来源外泌体对肥胖大鼠脊髓损伤的保护作用减弱是由于存在胰岛素抵抗,胰岛素抵抗降低了外泌体分泌的miRNA-21水平。

2.2 miRNA-133b

miRNA-133b在神经元的分化、生长和凋亡中起重要作用^[31],一些分子[如信号转导及转录激活因子(STAT)3、RhoA和cAMP反应元件结合蛋白(CREB)]介导了miRNA-133b对脊髓损伤的保护作用。

STAT3分布在星形胶质细胞和神经元中,负责神经元增殖分化及轴突再生^[32],活化的STAT3介导由脊髓损伤引起的炎症反应^[33]。RhoA在大鼠

脊髓损伤后上调,作用于 Rho 相关激酶,RhoA 与神经元的死亡相关^[34]。转录因子 CREB 在轴突再生中也起重要作用,激活 CREB 能够对抗髓鞘抑制剂的作用,并促进体内的轴突再生^[35]。

Qiu 等^[36]证明,外源性 miRNA-133b 可显著增加 STAT3 的磷酸化水平,参与脊髓损伤大鼠脊髓轴突再生。有研究显示,RhoA 是 miRNA-133b 的直接靶基因,MSC 来源外泌体释放的 miRNA-133b 可促进轴突生长^[37]。Li 等^[38]进一步证实,静脉注射 miRNA-133b 修饰的 MSC 来源外泌体对脊髓损伤后的神经元有保护作用,并能促进运动功能恢复,其作用一部分来自于细胞外信号调控激酶(ERK) 1/2、STAT3 和 CREB 的激活以及 RhoA 表达的抑制。Ren 等^[35]的研究表明,含 miRNA-133b 的外泌体通过影响与脊髓损伤动物轴突再生和促进神经元功能恢复相关的信号转导通路,显著促进神经丝蛋白、生长相关蛋白(GAP)-43、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)和髓鞘碱性蛋白的表达。

2.3 miRNA-126

近期研究发现,miRNA-126 能促进脊髓损伤后的功能恢复。Hu 等^[39]的文献报道,脊髓损伤后 miRNA-126 表达降低。该过程可能与 Sprouty 相关 EVH1 结构域抑制蛋白(SPRED)-1、磷酸肌醇-3 激酶(PI3K)调节亚单位 2 和血管细胞黏附分子 1 的靶基因表达下调有关。一些研究使用 miRNA-126 修饰的 MSC 来源外泌体治疗脊髓损伤。Huang 等^[40]证明,含 miRNA-126 的外泌体能促进脊髓损伤后的血管生成和神经发生,减轻细胞凋亡,从而促进脊髓损伤模型大鼠的功能恢复。Yuan 等^[41]采用静脉注射 miRNA-126 修饰的 MSC 来源外泌体,发现其可促进功能恢复和轴突再生。与 miRNA-21 相似,miRNA-126 可能激活 ERK1/2、STAT3 和 CREB,同时抑制 RhoA 表达。

2.4 其他 miRNA

Yu 等^[42]将 miRNA-29b 修饰的 BMSC 来源外泌体注射到大鼠模型,发现可促进脊髓损伤大鼠的运动功能恢复,减少脊髓组织的病理损伤,促进神经元再生。其机制可能与调节神经再生相关蛋白(如神经丝蛋白 200、GAP-43 和 GFAP)的表达有关。

Zhao 等^[43]发现,BMSC 来源外泌体在缺血脊髓中具有神经保护作用。该效应可能与 BMSC 预转染后分泌高表达 miRNA-25 的外泌体相关,这表明 miRNA-25 有增强神经保护的作用。

miRNA-544 也是具有神经保护作用的外泌体 miRNA。Li 等^[44]使用 miRNA-544 类似物转染大鼠 BMSC 以获得高表达 miRNA-544 的外泌体,并在脊髓损伤大鼠模型中静脉注射这种外泌体。研究结果表明,miRNA-544 可促进脊髓损伤后神经元的功能恢复。此外,miRNA-544 在 BMSC 中的过表达减轻了脊髓损伤引起的组织学缺陷和神经元缺失。

Liu 等^[45]的研究发现,外泌体 miRNA-216a-5p 通过抑制 Toll 样受体 4 /NF- κ B 和 PI3K/Akt 信号转导通路将小胶质细胞从 M1 促炎表型转变为 M2 抗炎表型,从而增强治疗作用。

3 结语

脊髓损伤治疗是一个巨大挑战,目前尚缺乏有效治疗方法。来源于 MSC 的外泌体可以穿过血脊髓屏障,其作为良好的药物载体在脊髓损伤治疗中有较大潜力。未来需要开展更多研究来阐明外泌体在脊髓损伤中的具体作用,为临床应用提供依据。

参考文献

- [1] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie GA. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(1): 9-17.
- [2] Wang X, Botchway B, Zhang Y, et al. Combinational treatment of bioscaffolds and extracellular vesicles in spinal cord injury[J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12: 81.
- [3] Romanelli P, Bieler L, Scharler C, et al. Extracellular vesicles can deliver anti-inflammatory and anti-scarring activities of mesenchymal stromal cells after spinal cord injury[J]. Front Neurol, 2019, 10: 1225.
- [4] Irrera N, Russo M, Pallio G, et al. The role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of traumatic brain injury[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17): 6204.
- [5] Jiang W, Li M, He F, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome to attenuate spinal cord injury in mice[J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 207.
- [6] Zhang M, Wang L, Huang S, et al. MicroRNA-223 targets NLRP3 to relieve inflammation and alleviate spinal cord injury[J]. Life Sci, 2020, 254: 117796.
- [7] Na L, Wang S, Liu T, et al. Ultrashort wave combined with human umbilical cord mesenchymal stem cell (HUC-MSC) transplantation inhibits NLRP3 inflammasome and improves spinal cord injury via Mk2/TTP signalling pathway[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 3021750.
- [8] Huang JH, Fu CH, Xu Y, et al. Extracellular vesicles derived from epidural fat-mesenchymal stem cells attenuate NLRP3 inflammasome activation and improve functional

- recovery after spinal cord injury[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(4): 760-771.
- [9] Sun G, Li G, Li D, et al. hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 89: 194-204.
- [10] Wang LX, Zhang SX, Wu HJ, et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases[J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 106(2): 345-358.
- [11] Fang H, Li HF, Pan Q, et al. MiR-132-3p modulates MEKK3-dependent NF- κ B and p38/JNK signaling pathways to alleviate spinal cord ischemia-reperfusion injury by hindering M1 polarization of macrophages[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 570451.
- [12] 徐保平, 姚敏, 王晓涛, 等. 巨噬细胞极化在脊髓损伤中的作用机制[J]. *中国骨伤*, 2018, 31(1): 88-92.
- [13] Orr MB, Gensel JC. Spinal cord injury scarring and inflammation: therapies targeting glial and inflammatory responses[J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(3): 541-553.
- [14] Wang X, Cao K, Sun X, et al. Macrophages in spinal cord injury: phenotypic and functional change from exposure to myelin debris[J]. *Glia*, 2015, 63(4): 635-651.
- [15] Lankford KL, Arroyo EJ, Nazimek KA, et al. Intravenously delivered mesenchymal stem cell-derived exosomes target M2-type macrophages in the injured spinal cord[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190358.
- [16] Anderson MA, Burda JE, Ren Y, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration[J]. *Nature*, 2016, 532(7598): 195-200.
- [17] Liddelow SA, Guttenplan KA, Larke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487.
- [18] Liu W, Wang Y, Gong F, et al. Exosomes derived from bone mesenchymal stem cells repair traumatic spinal cord injury by suppressing the activation of A1 neurotoxic reactive astrocytes[J]. *J Neurotrauma*, 2019, 36(3): 469-484.
- [19] Lian H, Yang L, Cole A, et al. NF κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 2015, 85(1): 101-115.
- [20] Wang L, Pei S, Han L, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes reduce A1 astrocytes via downregulation of phosphorylated NF κ B P65 subunit in spinal cord injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(4): 1535-1559.
- [21] Bartanusz V, Jezova D, Alajajian B, et al. The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications[J]. *Ann Neurol*, 2011, 70(2): 194-206.
- [22] Jo DH, Kim JH, Heo JI, et al. Interaction between pericytes and endothelial cells leads to formation of tight junction in hyaloid vessels[J]. *Mol Cells*, 2013, 36(5): 465-471.
- [23] Lu Y, Zhou Y, Zhang R, et al. Bone mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote recovery following spinal cord injury via improvement of the integrity of the blood-spinal cord barrier [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 209.
- [24] Yuan X, Wu Q, Wang P, et al. Exosomes derived from pericytes improve microcirculation and protect blood-spinal cord barrier after spinal cord injury in mice [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 319.
- [25] Ding SQ, Chen J, Wang SN, et al. Identification of serum exosomal microRNAs in acute spinal cord injured rats[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2019, 244(14): 1149-1161.
- [26] Chen L, Lu FB, Chen DZ, et al. BMSCs-derived miR-223-containing exosomes contribute to liver protection in experimental autoimmune hepatitis[J]. *Mol Immunol*, 2018, 93: 38-46.
- [27] Zhou X, Chu X, Yuan H, et al. Mesenchymal stem cell derived EVs mediate neuroprotection after spinal cord injury in rats via the microRNA-21-5p/FasL gene axis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108818.
- [28] Xu G, Ao R, Zhi Z, et al. miR-21 and miR-19b delivered by hMSC-derived EVs regulate the apoptosis and differentiation of neurons in patients with spinal cord injury [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10205-10217.
- [29] Kang J, Li Z, Zhi Z, et al. MiR-21 derived from the exosomes of MSCs regulates the death and differentiation of neurons in patients with spinal cord injury[J]. *Gene Ther*, 2019, 26(12): 491-503.
- [30] Ji W, Jiang W, Li M, et al. miR-21 deficiency contributes to the impaired protective effects of obese rat mesenchymal stem cell-derived exosomes against spinal cord injury [J]. *Biochimie*, 2019, 167: 171-178.
- [31] Xia C, Cai Y, Lin Y, et al. MiR-133b-5p regulates the expression of the heat shock protein 70 during rat neuronal cell apoptosis induced by the gp120 V3 loop peptide[J]. *J Med Virol*, 2016, 88(3): 437-447.
- [32] Madaro L, Passafaro M, Sala D, et al. Denervation-activated STAT3-IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(8): 917-927.
- [33] Zheng XQ, Huang JF, Lin JL, et al. Controlled release of baricitinib from a thermos-responsive hydrogel system inhibits inflammation by suppressing JAK2/STAT3 pathway in acute spinal cord injury[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, 199: 111532.
- [34] Wu X, Walker CL, Lu Q, et al. RhoA/Rho kinase mediates neuronal death through regulating cPLA(2) activation[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(9): 6885-6895.
- [35] Ren ZW, Zhou JG, Xiong ZK, et al. Effect of exosomes derived from miR-133b-modified ADSCs on the recovery of neurological function after SCI[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(1): 52-60.

- [36] Qiu J, Cafferty WB, McMahon SB, et al. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation[J]. J Neurosci, 2005, 25(7): 1645-1653.
- [37] Lu XC, Jy Z, Tang LJ, et al. MiR-133b promotes neurite outgrowth by targeting RhoA expression[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(1): 246-258.
- [38] Li D, Zhang P, Yao XY, et al. Exosomes derived from miR-133b-modified mesenchymal stem cells promote recovery after spinal cord injury[J]. Front Neurosci, 2018, 12: 845.
- [39] Hu JZ, Zeng L, Huang JH, et al. miR-126 promotes angiogenesis and attenuates inflammation after contusion spinal cord injury in rats[J]. Brain Res, 2015, 1608: 191-202.
- [40] Huang JH, Xu Y, Yin XM, et al. Exosomes derived from miR-126-modified MSCs promote angiogenesis and neurogenesis and attenuate apoptosis after spinal cord injury in rats[J]. Neuroscience, 2020, 424: 133-145.
- [41] Yuan B, Pan S, Dong YQ, et al. Effect of exosomes derived from mir-126-modified mesenchymal stem cells on the repair process of spinal cord injury in rats[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(2): 483-490.
- [42] Yu T, Zhao C, Hou S, et al. Exosomes secreted from miRNA-29b-modified mesenchymal stem cells repaired spinal cord injury in rats[J]. Braz J Med Biol Res, 2019, 52(12): e8735.
- [43] Zhao L, Jiang X, Shi J, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells overexpressing microRNA-25 protect spinal cords against transient ischemia[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2019, 157(2): 508-517.
- [44] Li C, Li X, Zhao B, et al. Exosomes derived from miR-544-modified mesenchymal stem cells promote recovery after spinal cord injury[J]. Arch Physiol Biochem, 2020, 126(4): 369-375.
- [45] Liu W, Rong Y, Wang J, et al. Exosome-shuttled miR-216a-5p from hypoxic preconditioned mesenchymal stem cells repair traumatic spinal cord injury by shifting microglial M1/M2 polarization[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 47.

(收稿日期:2021-03-03)

(本文编辑:杨晓娟)