

外泌体 microRNA 在脑出血中的研究进展

黄四妹 储照虎 胡文杰 赵守财 金凡夫 周莹莹 徐阳

【中图分类号】 R743.34 【文献标识码】 A

【文章编号】 1007-0478(2020)06-0844-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.06.034

脑出血(Intracerebral hemorrhage, ICH)是神经内科常见的脑血管疾病,具有较高发病和病死率的特点,但是目前仍缺乏改善 ICH 预后的好的治疗方法。外泌体装载不同的蛋白质、脂质以及核酸等物质,并将其传递到靶细胞,从而介导细胞与细胞之间的信息交流。microRNA(miRNA)是外泌体所装载内容物中的一种,被外泌体包裹的 miRNA 可以稳定地存在于体液中以及实现其精准靶向输送,调节靶细胞功能。有研究发现外泌体 miRNA 参与 ICH 的病理生理过程,并且在 ICH 的生物标志物和靶向治疗的应用中具有明显优势。本综述主要就外泌体 miRNA 在 ICH 中的相关研究进展进行归纳与总结。

ICH 是脑卒中的第二大类型。造成 ICH 的直接原因有动脉粥样硬化、高血压病、脑血管畸形、凝血功能障碍、脑瘤、血管炎、全身性感染和溶栓治疗等,ICH 的危险因素包括高血压病、不健康的饮食习惯、缺乏运动、饮酒过多、心脏原因和社会心理因素,其中高血压病是 ICH 最重要的危险因素^[1]。据统计,在 2016 年我国出血性脑卒中的患病率已达到了 406.16/10 万,并且这个数值在逐年上升,与此同时 ICH 的发病率也在不断增长,至 2016 年达 126.34/10 万^[2]。ICH 后形成的血肿块对脑组织的机械压迫属于原发性脑损伤,可造成脑内的血流障碍,严重的甚至会造成脑疝,继发性脑损伤主要是因为血肿及其降解产物诱发一系列炎症反应、氧化应激和凝血酶的形成,最终造成血脑屏障损伤、脑组织水肿或脑细胞死亡^[3]。目前 ICH 的治疗包括内科治疗和外科治疗,但是很多治疗方法对 ICH 的预后并无明显改善^[4]。阐明 ICH 的病理机制,探索 ICH 损伤的特异性生物标志物以及有效的治疗方法对改善 ICH 的预后至关重要。最新的研究显示,外泌体携带的 miRNA 有可能涉及 ICH 的病理生理机制;同时外泌体 miRNA 有望成为 ICH 损伤的特异性生物标志物,用于预测 ICH 的预后;外泌体作为载体携带 miRNA 在脑出血的靶向治疗中具有优势。本研究主要概括了外泌体 miRNA 在 ICH 中的相关研究,为深入揭示外泌体 miRNA 与 ICH 的关系及临床应用提供思路。

1 外泌体及 miRNA 的概念

外泌体是直径为 30~100 nm 的细胞外囊泡^[5]。人体所

有细胞均可产生外泌体^[6]。在血浆、血清、脑脊液等人体体液也都可以检测出外泌体的存在^[7]。外泌体含有源自其亲代细胞的蛋白质、脂质和遗传物质,并将这些生物活性物质传递至靶细胞,促进细胞间通讯^[8]。其中 miRNA 是研究最多的外泌体介导的活性物质。

miRNA 为 20~24 个核苷酸长度的单链非编码 RNA,本身不会被翻译成蛋白质,但是可通过靶向 mRNA 参与蛋白质翻译的调控,在表观遗传水平上改变和调节基因的表达^[9]。miRNA 的形成包括初级 miRNA 的转录、前体 miRNA 的加工以及前体 miRNA 由细胞核向细胞质的运输,最终剪切为成熟 miRNA^[10]。miRNA 装载入外泌体主要依赖于运输必需的内体分选复合物以及 miRNA 的特异性结合基序^[11]。但是关于 miRNA 如何被选择性地装载入外泌体的具体机制有待进一步阐明。外泌体的双层脂质膜结构可以保护内部的 miRNA 免受核糖核酸酶的降解,维持 miRNA 的稳定性^[12];同时 miRNA 以外泌体为载体可以实现其精确输送至靶细胞,参与细胞间通讯。

2 外泌体 miRNA 与 ICH 的病理生理变化

miRNA 在哺乳动物中枢神经系统中大量表达^[9]。大量动物实验以及体外实验揭示 miRNA 调节与 ICH 相关的血肿大小、细胞凋亡、血脑屏障、水肿体积以及炎症反应等病理生理过程^[13-15]。miRNA 也可通过加载入外泌体参与细胞之间的沟通。

2.1 外泌体 miRNA 调节血脑屏障中内皮细胞间的连接

中枢神经系统中血管内皮细胞通过彼此间的紧密连接以及与周细胞、星形胶质细胞、中间神经元和细胞外基质接触以构建和维持血脑屏障,血脑屏障存在多种主动运输机制,可以为神经系统提供营养物质,同时将废物从神经系统中运输出去^[16]。人类和动物发生 ICH 后均有可能导致血脑屏障的损伤,而血脑屏障损伤会促进脑水肿的形成,从而将潜在的有害物质带入脑实质以及通过促进白细胞的迁移造成神经炎症的发生^[17]。对于血脑屏障的保护有助于促进 ICH 后的恢复。杜久林等^[18]发现神经元来源的 miR-132 可以减轻斑马鱼幼虫 ICH,并进一步揭示 miR-132 可能通过靶向脑血管内皮细胞的真核生物延伸因子 2 激酶,继而增加了脑血管内皮钙粘蛋白的表达,增强了脑血管内皮细胞之间的连接,有助于维持脑血管的完整性;相反,miR-132 的敲低或突变导致斑马鱼幼虫严重的 ICH 和血管内皮钙粘蛋白的减少,并利用大鼠的神经元进行体外研究发现神经元可通过分泌外泌体作为载体并将 miR-132 运送至脑血管内皮细胞来

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81701161)

作者单位:241000 安徽省芜湖市皖南医学院[黄四妹(研究生)

胡文杰(研究生) 金凡夫(研究生) 周莹莹(研究生);皖南医学院第一附属医院神经内科[储照虎 赵守财 徐阳(通信作者)]

发挥对脑血管的保护作用。通过此项研究可以得出,神经元可分泌携带 miR-132 的外泌体以及借助外泌体的靶向作用将 miR-132 输送至脑血管内皮细胞,有助于维持脑血管内皮细胞之间连接的完整性,减轻 ICH 诱发的血脑屏障破坏。

2.2 外泌体 miRNA 调节神经元凋亡

细胞凋亡是 ICH 后继发性神经元死亡的重要途径之一^[19]。何志义等^[20]将转染了 miR-21 模拟物的间充质干细胞(Mesenchymal stem cell, MSC)进行脑内注射发现,与对照组比较这种富含 miR-21 的 MSC 有助于减轻 ICH 大鼠神经元凋亡,改善了神经功能,ICH 后的血肿大小和水肿含量也明显减少;进一步研究发现 miR-21 由源自 MSC 的外泌体转运至神经元,并通过靶向瞬时受体电位 M7 以及减少核因子 κ B 通路的激活来减轻 ICH 后的神经元损伤。这揭示了 miR-21 修饰的 MSC 分泌的外泌体通过 miR-21 有助于减轻 ICH 后的神经元凋亡,对 ICH 后的神经元具有保护作用。

3 外泌体 miRNA 作为 ICH 的生物标志物以及预测 ICH 病情变化

ICH 患者病情严重程度的评估和预后判断的方法包括神经系统体格检查、脑卒中评分量表或脑出血评分量表以及影像学检查^[4]。有证据表明量表评分对 ICH 预测预后的准确度不高,在很大程度上受主观因素的影响^[21],而连续的影像学检查是不现实的,因此需要探索简便的方法以监测 ICH 的病情变化以及预测 ICH 的预后。研究者们测定 ICH 患者和健康者血清 miRNA 水平发现,ICH 患者与健康对照者血清中有 55 种差异表达的 miRNA^[22]。在 ICH 的不同阶段 miRNA 也有特异性的表达谱^[23],这提示体液中 miRNA 能够反映 ICH 患者的病情变化。相较于游离 miRNA,外泌体的脂质膜可以维持 miRNA 的稳定性,并且外泌体是 miRNA 的富集体,可以提高体液中 miRNA 扩增的敏感性以及减小低丰度 miRNA 出现假阴性结果的可能性^[24]。通过检测体液中外泌体 miRNA 水平可作为研究 miRNA 的一种可靠方法。

李武英等^[25]通过分析循环血浆中外泌体 miRNA 水平发现 ICH 患者与急性脑梗死患者血浆外泌体中存在 8 个相关的 miRNA,其中在 ICH 患者中相对高表达的有 miR-6857-5p, miR-6847-5p, miR-3120-3p, miR-151a-5p, miR-6752-5p。由此推断,脑卒中后异常表达的外泌体 miRNA 可穿过血脑屏障进入血液循环,并且脑梗死与 ICH 患者间差异表达的外泌体 miRNA 可能是造成这两种脑卒中亚型生物学特性不同的内在分子机制。循环外泌体 miRNA 有望成为 ICH 的生物标志物,通过对 ICH 患者循环中外泌体来源的 miRNA 的分析有助于 ICH 患者病情的判断。Spaull 等^[26]检测 3 例妊娠不足 32 周出生的早产儿的脑脊液,且这 3 例早产儿均患有脑出血后脑积水(Post-haemorrhagic hydrocephalus, PHH),发现所收集的脑脊液中存在外泌体及外泌体 miRNA,随着对早产儿 PHH 的治疗,外泌体 miRNA 的水平也在发生改变,且不同的 miRNA 有其各自独特的变化规律,预示着脑脊液中外泌体 miRNA 水平可作为早产儿 PHH 的生物标志物,在早产儿 PHH 的病情监测和预

后评估中具有潜在价值。这项研究提示脑脊液中外泌体 miRNA 水平有可能作为 ICH 患者的生物标志物,用于预测 ICH 的预后,未来需要更多实验深入研究外泌体 miRNA 与 ICH 预后的关系。

4 外泌体 miRNA 与 ICH 的靶向治疗

miRNA 参与 ICH 的病理生理过程,通过对 miRNA 的精细调控有望成为 ICH 的一种有效治疗方法,改善 ICH 的预后^[27]。目前 miRNA 的递送系统包括脂质体、聚合物纳米颗粒和外泌体,通过使用递送系统可增加 miRNA 物理稳定性并防止核糖核酸酶降解^[28]。但是脂质体作为载体仍存在免疫原性和细胞毒性问题^[29]。聚合物纳米颗粒的生物相容性和长期潜在的安全性仍然需要关注^[30]。外泌体作为天然载体具有较低的免疫原性、更高的生物相容性、较长的半衰期、天然的靶向能力以及较高的组织亲和性^[31],并且外泌体由于含有脂质膜成分有助于其穿过血脑屏障,是治疗中枢神经系统疾病理想的药物载体^[32]。通过使用外泌体作为载体加载 miRNA 治疗 ICH 具有较大的潜力。

姚溪洋等^[33]将 miR-133b 模拟物转染骨髓来源的 MSC,随后收集含有 miR-133b 的外泌体,并将此外泌体通过尾静脉注入 ICH 大鼠体内,利用实时荧光聚合酶链反应检测发现,注入外泌体后的脑组织中 miR-133b 的水平增加,表明外泌体可以成功将 miR-133b 运送至脑组织。与对照组比较,注入携带 miR-133b 的外泌体后可明显减少由 ICH 诱发的神经元凋亡和神经退行性变,这些结果说明外泌体可作为载体携带 miR-133b 进入脑组织而减轻 ICH 诱发的神经元凋亡和神经退行性变。综上所述,以外泌体为载体加载 miRNA 有望作为 ICH 的一种新型治疗方法。

5 结束语

外泌体装载 miRNA 介导细胞间的信息交流,其在 ICH 的病理生理机制中扮演重要角色。外泌体内 miRNA 在 ICH 的不同阶段有其特异性的表达谱,有望成为 ICH 的潜在生物标志物,以监测 ICH 患者的病情变化,有助于对 ICH 患者作出及时的临床诊疗。外泌体作为一种细胞产物,具备免疫原性低以及靶向性好等优势,可携带 miRNA 穿过血脑屏障而减轻 ICH 后的脑损伤,在 ICH 的靶向治疗上具有一定优势。但是目前外泌体 miRNA 与 ICH 的相关研究有限,绝大部分实验处于动物实验阶段。未来外泌体 miRNA 参与 ICH 的病理生理机制将得到进一步明确,其在作为 ICH 的新型生物标志物以及靶向治疗中具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Weimar C, Kleine-Borgmann J. Epidemiology, prognosis and prevention of Non-Traumatic intracerebral hemorrhage [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(15): 2193-2196.
- [2] 王隆德, 刘建民, 杨弋, 等. 我国脑卒中防治仍面临巨大挑战—《中国脑卒中防治报告 2018》概要 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(2): 105-119.
- [3] Shao Z, Tu S, Shao A. Pathophysiological mechanisms and po-

- tential therapeutic targets in intracerebral hemorrhage[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1079.
- [4] 中华医学会神经病学分会. 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国脑出血诊治指南(2019)[J]. *中华神经科杂志*, 2019, 52(12): 994-1005.
 - [5] Jadli AS, Ballasy N, Edalat P, et al. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 467(1/2): 77-94.
 - [6] Chung IM, Rajakumar G, Venkidasamy B, et al. Exosomes: current use and future applications[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 500: 226-232.
 - [7] Skryabin GO, Komelkov AV, Savelyeva EE, et al. Lipid rafts in exosome biogenesis[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2020, 85(2): 177-191.
 - [8] Ghoreishy A, Khosravi A, Ghaemmaghami A. Exosomal microRNA and stroke: A review[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 16352-16361.
 - [9] Abdul-Muneer PM. MicroRNA in the pathophysiology of CNS injury: implication in neuroregenerative medicine [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2016, 22(7): 543-545.
 - [10] Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 132.
 - [11] Yu X, Odenthal M, Fries JW. Exosomes as miRNA carriers: Formation-Function-Future[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 2028.
 - [12] Kalluri R, Lebleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
 - [13] Kong F, Zhou J, Zhou W, et al. Protective role of microRNA-126 in intracerebral hemorrhage[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(3): 1419-1425.
 - [14] Xi T, Jin F, Zhu Y, et al. MicroRNA-126-3p attenuates blood-brain barrier disruption, cerebral edema and neuronal injury following intracerebral hemorrhage by regulating PIK3R2 and Akt[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 494(1/2): 144-151.
 - [15] Yang Z, Zhong L, Xian R, et al. MicroRNA-223 regulates inflammation and brain injury via feedback to NLRP3 inflammasome after intracerebral hemorrhage[J]. *Mol Immunol*, 2015, 65(2): 267-276.
 - [16] Zhang X, Gu Y, Li PT, et al. Matrix Metalloproteases-Mediated cleavage on β -Dystroglycan May play a key role in the Blood-Brain barrier after intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 794-800.
 - [17] Xu F, Shen G, Su Z, et al. Glibenclamide ameliorates the disrupted blood-brain barrier in experimental intracerebral hemorrhage by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome[J]. *Brain Behav*, 2019, 9(4): e01254.
 - [18] Xu B, Zhang Y, Du XF, et al. Neurons secrete miR-132-containing exosomes to regulate brain vascular integrity[J]. *Cell Res*, 2017, 27(7): 882-897.
 - [19] Salihu AT, Muthuraju S, Idris Z, et al. Functional outcome after intracerebral haemorrhage-a review of the potential role of antiapoptotic agents[J]. *Rev Neurosci*, 2016, 27(3): 317-327.
 - [20] Zhang H, Wang YZ, Lv Q, et al. MicroRNA-21 overexpression promotes the neuroprotective efficacy of mesenchymal stem cells for treatment of intracerebral hemorrhage[J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 931.
 - [21] 赵晓晶, 李群喜, 刘英, 等. 美国国立卫生院脑卒中量表评分与脑出血患者预后的相关性探讨[J]. *中国临床医生杂志*, 2019, 6(6): 712-714.
 - [22] Zhu Y, Wang JL, He ZY, et al. Association of altered serum MicroRNAs with perihematomal edema after acute intracerebral hemorrhage[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133783.
 - [23] Wang Z, Lu G, Sze J, et al. Plasma miR-124 is a promising candidate biomarker for human intracerebral hemorrhage stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(7): 5879-5888.
 - [24] Gallo A, Tandon M, Alevizos I, et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e30679.
 - [25] 李武英, 金俊, 陈健, 等. 脑梗死和脑出血患者外周血中循环 microRNA 表达谱差异的初步分析[J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(11): 1750-1753.
 - [26] Spaul R, Mcpherson B, Gialeli A, et al. Exosomes populate the cerebrospinal fluid of preterm infants with post-haemorrhagic hydrocephalus[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2019, 73(1): 59-65.
 - [27] Li L, Wang PP, Zhao HP, et al. Noncoding RNAs and intracerebral hemorrhage [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2019, 18(3): 205-211.
 - [28] Desantis V, Saltarella I, Lamanuzzi A, et al. MicroRNAs-Based Nano-Strategies as new therapeutic approach in multiple myeloma to overcome disease progression and drug resistance[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3084.
 - [29] Scheidele M, Vidakovic I, Prassl R. Lipid nanocarriers for microRNA delivery[J]. *Chem Phys Lipids*, 2020, 226: 104837.
 - [30] Ha D, Yang NN, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(4): 287-296.
 - [31] Samanta S, Rajasingh S, Drosos N, et al. Exosomes: new molecular targets of diseases[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(4): 501-513.
 - [32] Rufino-Ramos D, Albuquerque PR, Carmona V, et al. Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases[J]. *J Control Release*, 2017, 262: 247-258.
 - [33] Shen H, Yao XY, Li HY, et al. Role of exosomes derived from miR-133b modified MSCs in an experimental rat model of intracerebral hemorrhage[J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64(3): 421-430.

(2020-07-10 收稿)