

# 外泌体 MicroRNA 在亨廷顿舞蹈病发生发展中的作用

王璐璐 董露露 王天俊

【中图分类号】 R742.2 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2022)04-0397-03  
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.04.021

亨廷顿舞蹈病(Huntington's disease, HD)是一种遗传性神经退行性疾病,其特征为运动障碍、进行性认知功能下降及精神障碍,可严重影响患者的生活质量。外泌体微小 RNA (MicroRNA)是一种由蛋白质生物合成的内源性非编码 RNA 分子。最新研究表明,外泌体 MicroRNA 广泛参与 HD 发生发展,不仅参与其发病机制,还在基因预测及机制调控等方面表现出潜在的研究价值。因此,探讨外泌体 MicroRNA 在 HD 发生发展中的作用可为 HD 的研究提供新方向。

亨廷顿舞蹈病(Huntington's disease, HD)是一种常染色体显性神经遗传性疾病,由亨廷顿基因(Huntingtingene, HTT)第 1 个外显子发生 CGA 突变导致其编码的亨廷顿蛋白(Mutant huntingtin, mHTT)的多聚谷氨酰胺异常扩增<sup>[1]</sup>。其发病原因目前尚不确切。外泌体是一种由膜衍生纳米级别的微泡,通过传递细胞内信号物质在细胞间通讯中发挥着关键作用。最新研究表明,外泌体能穿透血脑屏障,参与 HD 的发病过程,还可用来预测疾病进展和优化治疗。MicroRNA 是外泌体参与疾病进展最有潜能的标记分子,可成为诊断 HD 的重要生物学标记物。

## 1 外泌体概述

### 1.1 外泌体生物学特征

外泌体是一种由细胞分泌到细胞外的微小磷脂双层膜囊泡(Extracellular vesicles, EV),其特征为杯状形态、直径为 40~100nm<sup>[2]</sup>。几乎不同种类的细胞均可释放外泌体<sup>[3]</sup>。外泌体的产生过程包括(1)细胞膜向内凹陷形成细胞内囊泡,即早期核内体;(2)早期核内体通过内生芽在腔内形成多泡形成多囊泡体(Multivesicular bodies, MVBs);(3)MVBs 与溶酶体结合:MVBs 内的一些囊泡被溶酶体降解,其余囊泡与细胞膜融合,并以外泌体的形式释放到细胞外<sup>[4]</sup>。外泌体广泛存在于多种动物的组织和体液中,其作为载体可携带多种具有生物活性的内含物包括脂质、蛋白质、信使核糖核酸(Messenger ribonucleic acid, mRNA)、MicroRNA 以及小分子等多种生物活性物质<sup>[5]</sup>。外泌体通过各种形式将分子运送到靶细胞,被靶细胞摄取而完成细胞间通讯,可调控靶细胞生物学功能<sup>[6]</sup>。外泌体可参与机体神经发生、调节细胞微环境、炎症反应和诱导免疫等,在大脑细胞功能稳态中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。因此,外泌体作为生物标记物对 HD 等神经

系统疾病诊断具有巨大的潜力。

### 1.2 外泌体参与 HD 发病机制

近年来,外泌体参与 HD 发病机制的研究报道越来越多。mHTT 通过外泌体途径扩散的机制复杂且尚未明确。据研究发现,外泌体可以运输 HTT 蛋白质和 RNA 以及 mHTT 聚集物<sup>[8]</sup>。星形胶质细胞外泌体携带热休克蛋白,可降低错误折叠蛋白的细胞毒性并防止神经退行性变。 $\alpha$ B-晶状体蛋白(由外泌体分泌的胶质蛋白)的过表达可促进外泌体释放,同时可降低 HD140Q 敲定小鼠纹状体中 mHTT 聚集物的密度。Hong 等<sup>[9]</sup>研究发现 mHTT 在 HD 患者星形胶质细胞中可通过降低  $\alpha$ B-晶体蛋白的水平来减少外泌体的分泌。Jeon 等<sup>[10]</sup>通过研究野生型(Wild type, WT)小鼠神经元分化发现 mHTT 与 HD 成纤维细胞相互聚集,证实外泌体可运输 mHTT。来源于脂肪分泌的外泌体(Adipose-derived stem cells exosomes, ASC-exo)可释放神经营养因子,其在体外 HD 模型中可减少 HTT 聚集物、线粒体功能障碍和细胞凋亡<sup>[11]</sup>。此外,神经保护突触伴侣半胱氨酸链蛋白  $\alpha$  被观察到可由 mHTT 第 1 个外显子通过 EV 输出,参与突触蛋白稳态维持和细胞 mHTT 清除<sup>[12]</sup>。外泌体具有携带 HD 生物学标记物的能力,其介导 HD 疾病进展和病理生理学机制需要进行更深入的研究。

## 2 外泌体 MicroRNA 与 HD

### 2.1 外泌体 MicroRNA 参与 HD 发病机制

外泌体中研究最多的生物学因子为微小 RNA (MicroRNA, miR)。MicroRNA 是一类长度只有 18~22 个核苷酸的高度保守的非编码 RNA 分子。MicroRNA 主要参与基因转录后水平的调控,具有特异性强、分子稳定、高度表达等特点,参与细胞生长、分化及凋亡<sup>[13]</sup>。外泌体 MicroRNA 稳定表达,可将测序技术在 miR 表达谱上发展和应用<sup>[14]</sup>。

近年来国内外多项研究结果已经证明, MicroRNA 与 HD 的转录后表达失调有关,许多重要的神经特异性 MicroRNA 在 HD 发病过程中受到抑制<sup>[15]</sup>。James<sup>[16]</sup>通过 MicroRNA 测序技术对 HD 模型小鼠的纹状体和人类 HD 患者的大脑额叶皮质和尾状核进行研究,发现 50%~60% 的 MicroRNA 差异表达存在于外泌体中;他还建立 HD 猴子模型并在其额叶皮质中发现 11 个 MicroRNA 有 7 个在外泌体中被发现。相关报道显示外泌体 MicroRNA 表达失调或功能异常的原因还有可能涉及其他因素,还需进一步研究。综上所述, MicroRNA 异常表达参与 HD 的发病机制,可推断 MicroRNA 是 HD 生物学标志物研究重点之一。

2.2 外泌体 miR-125b, miR-150, miR-146a 和 miR-214 在

基金项目:国家自然科学基金(编号为 81241037)

作者单位:050001 石家庄,河北省人民医院神经内科[王璐璐(华北理工大学研究生学院) 董露露(河北北方学院研究生院) 王天俊(通信作者)]

## HD 中的表达

大量实验研究表明,与健康人群比较,外泌体 MicroRNA 在 HD 患者体液中存在异常表达。有研究发现,在 MicroRNA 中靶向 HTT 基因 miR-125b, miR-150, miR-146a (表达减少)和 miR-214(表达增加)均在外泌体中发现<sup>[17]</sup>。这些外泌体 MicroRNA 在 HD 模型小鼠 HTT 3'-非编码区(3'-Untranslated Regions, 3'-UTR)中存在 111 个 MicroRNAs 的识别位点,其中 miR-125b, miR-150 的表达水平在细胞中下降,miR-214 表达增加。

有研究证明,miR-125b, miR-150, miR-146a 和 miR-214 能够靶向小鼠的 HTT 3'-UTR 基因片段,但在 HD 患者身上是否可以靶向尚未可知,Mithun<sup>[18]</sup>克隆 HD 患者 HTT 3'-UTR 的 4 个片段预测了 miR-214, miR-146a 和 miR-125b 的位点。miR-214, miR-146a 和 miR-125b 与 HTT 3'-UTR 基因片段结合会降低该基因片段荧光素酶的平均活性。有研究发现 miR-214 和 miR-146a 与 HTT 3'-UTR 片段 1 结合后荧光素酶的活性为片段 1 正常活性的 35%和 50%,而在 miR-125b 中并未发现。miR-214, miR-150 和 miR-125b 与 HTT 3'-UTR 片段 2 结合后荧光素酶活性分别降低到片段 2 正常活性的 30、58 和 58%。在 HTT 3'-UTR 片段 3 具有 miR146a 和 miR-125b 预测位点,miR-146a 与片段 3 结合后该片段活性下降到 39%,而 miR-125b 未观察到该片段活性降低。在 HTT 3'-UTR 片段 4 具有 miR-125b 和 miR-214 预测位点的情况下荧光素酶活性的平均下降约为正常平均活性的 73%和 66%。这些数据表明这 3 个 MicroRNAs 即 miR-214, miR-146a 和 miR-125b 可以靶向 HD 不同片段中的多个位点。有研究表明外泌体 MicroRNA 可以靶向人类 HTT 3'-UTR,并有潜能成为识别 HTT 的生物标志物,提高预测 HD 疾病的精准度。

## 2.3 外泌体 miR-124, miR-22 在 HD 中的表达

miR-124 是 HD 病变中下调幅度最大的 MicroRNA 之一,可能在 HD 发病过程中具有重要作用。Lee 等<sup>[19]</sup>发现 HD 患者血清中的外泌体 miR-124 可以抑制 HD 靶细胞基因该片段活性 REST)蛋白(miR-124 的关键靶蛋白)表达,进而促进脑源性神经营养因子的释放。为此,进一步试验证实与未经处理的对照 WT 小鼠比较,被注射外泌体 MicroRNA-124 的亨廷顿转基因小鼠(HD R6/2)小鼠的 MicroRNA-124 表达增多,而外泌体 miR-124 处理的小鼠 REST 蛋白水平较对照组显著降低,提示表达失调的 miR-124 可作为参与 HD 发病的重要机制。此外,还有学者发现外泌体 miR-124 可增加旋转棒测试 R6/2 小鼠下落潜伏期,认为 miR-124 可以通过其在神经元分化和存活中的作用来减慢 HD 的病情进展,对 HD 患者治疗与预后具有重要意义<sup>[20]</sup>。

HD 存在预测调控的靶细胞有组蛋白去乙酰化酶 4(Histone deacetylase 4, HDAC4)、REST 辅抑制因子-1(Repressor element silencing transcription factor, REST-1)和 G 蛋白信号调节因子 2(Regulator of G protein signaling proteins, Rgs2)。miR-22 是一种具有潜在神经保护作用的 MicroRNA。外泌体 miR-22 在 HD 患者的脑中低表达,推测其具有抗神经退行性变的作用。外泌体 miR-22 可在 HD 体外模型中预测靶向 Rgs2 及 HDAC4。大脑纹状体神经元中

Rgs2 低表达可通过降低细胞外信号调节蛋白激酶 K 激活来起到保护作用<sup>[21]</sup>。HDAC4 的缺陷可以改善 HD 细胞和动物模型中的神经退行性变,最近研究表明,HDAC 抑制剂亚酰苯胺羟胺酸可通过抑制 HDAC4 转录后表达来发挥作用<sup>[22]</sup>。这些结果表明,外泌体可以作为一种无创的检测方法,不仅可以用于 HD 的早期筛查,还可以用于串联调控通路来治疗 HD 潜在的方法。

## 2.4 其他外泌体 MicroRNA 在 HD 中的表达

Reed 等<sup>[23]</sup>发现 HD 患者在出现症状前可检测到外泌体 miR-135b-3p, miR-140-5p, miR-520f-3p, miR-3928-5p, miR-4317 和 miR-8082 水平显著升高,故推测以上外泌体 MicroRNA 是 HD 早期诊断的潜在生物标志物。星形胶质细胞来源的外泌体 miR-26 参与神经突触传导的可塑性,并且在 HD 患者中也有差异表达<sup>[24]</sup>。外泌体 miR-26 具有免疫调节、促血管生成及神经营养等作用。Lee 等<sup>[25]</sup>在小鼠体外源性神经细胞中发现,来源于脂肪细胞分泌的外泌体可以通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活因子 1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ )通路来减少 HTT 聚集物积累,可用于 HD 治疗,也提供 1 个新的研究途径。

## 3 外泌体 MicroRNA 在 HD 中的治疗

MicroRNA 近年来在神经退行性疾病和其他许多疾病的治疗中具有巨大的潜力。来自脑脊液、血液的外泌体是 HD 最有诊断价值的生物标志物。目前,相关基因治疗策略主要有以下 3 种:反义寡核苷酸(Anti-sense oligonucleotide, ASO)、RNA 干扰以及调控 mRNA 剪接的小分子化合物<sup>[26]</sup>。外泌体作为药物的靶点为 HD 的治疗提供了一种新的方法。Li 等<sup>[27]</sup>发现 HD 患者 HTT 第 1 个外显子过表达时外泌体 miR-34b 的表达水平显著升高,因此抑制 miR-34b 的表达会减少 HTT 在细胞中的分布及减轻其体外毒性。此外,他还发现 R6/2 小鼠体内 miR-27a 过表达可增高多药耐药蛋白-1(Multidrug resistance protein-1, MRP-1)的表达水平。据报道,MRP-1 可以转运 HTT,从而减少 HTT 在细胞中的积累<sup>[28]</sup>。Lee 等<sup>[29]</sup>认为外泌体 miR-21, miR-222 和 miR-let7a 可抑制细胞凋亡和改善细胞周期进展和增殖。最近研究表明,ASC-exo 可以显著减少 R6/2 小鼠神经细胞中 HTT 的积累,改善异常凋亡蛋白水平,降低线粒体功能障碍,减少细胞凋亡,表明 ASC-exo 在 HD 治疗中的潜在作用<sup>[30]</sup>。此外,还有学者在一项动物模型(R6/2 转基因 HD 小鼠)中开发一种体外给药外泌体 miR-124,研究发现 R6/2 HD 小鼠运动症状方面并未明显改善,但他认为基于外泌体 MicroRNA 用于 HD 治疗的研究具有前瞻性价值。这些数据表明,外泌体 MicroRNA 不仅是 HD 早期诊断的潜在生物学标志物,还可为 HD 的基因筛查、病情进展及预后、治疗提供新的方向。

## 4 外泌体 MicroRNA 不足与展望

外泌体 MicroRNA 的相关研究在临床起步较晚,仍面临着重大的实际问题。如一些商业化试剂可以简化外泌体 MicroRNA 提取过程,但由于其价格昂贵,不能广泛应用于临床。其次,目前尚未开展有效且快速检测外泌体 MicroR-

NA 的技术方法。此外,不同疾病进展期患者的 MicroRNA 表达水平存在较大差异,需要大量样本标准化、可控的流行病学研究数据来提高诊断率。但外泌体 MicroRNA 要成为诊断 HD 可靠的生物学标志物,还需要明确 MicroRNA 与 HD 发生发展的关系;进一步阐明疾病的发病机制,还需开展更成熟可靠的检验技术,从各种体液中提取 MicroRNA,用于临床实践。

## 5 结束语

外泌体 MicroRNA 现已成为亨廷顿病所研究的重点和焦点。HD 患者病情进展缓慢,病死率高,其诊断主要依靠家族遗传史和基因检测。据研究显示,目前国内外尚缺乏诊断 HD 可靠的生物学证据,因此外泌体 MicroRNA 可能成为 HD 未来研究的新方向。大多数学者研究证实,外泌体 MicroRNA 可参与 HD 发病机制,在基因预测、机制调控及治疗等方面具有一定价值。外周血液中 MicroRNA 水平变化可能受多种因素影响,但外泌体 MicroRNA 却具有高稳定性及特异性的特点,能可靠应用于 HD 等神经系统退行性疾病中。为探索外泌体 MicroRNA 的基因学相关机制提供更客观全面的理论依据,未来也需结合血清学标志物及影像学等检查,为 HD 早期诊断、基因监测和改善预后奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] McColgan P, Tabrizi SJ. Huntington's disease: a clinical review[J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25(1): 24-34.
- [2] Chen BY, Sung C, Chen C, et al. Advances in exosomes technology[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 493(4): 14-19.
- [3] Pegtel DM, Gould S. Exosomes[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88(9): 487-514.
- [4] Kalluri R, LeBleu V. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [5] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends[J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-383.
- [6] Ragusa M, Barbagallo C, Ciriigliaro M, et al. Asymmetric RNA distribution among cells and their secreted exosomes: biomedical meaning and considerations on diagnostic applications[J]. *Front Mol Biosci*, 2017, 4(4): 66.
- [7] Qing L, Chen W, Tang J, et al. Exosomes and their MicroRNA cargo: new players in peripheral nerve regeneration[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2018, 32(9): 765-776.
- [8] Zhang X, Abels ER, Redzic JS, et al. Potential transfer of polyglutamine and CAG-repeat RNA in extracellular vesicles in Huntington's disease: background and evaluation in cell culture[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(3): 459-470.
- [9] Hong Y, Zhao T, Li XJ, et al. Mutant huntingtin inhibits alphaB-Crystallin expression and impairs exosome secretion from astrocytes[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(39): 9550-9563.
- [10] Jeon I, Cicchetti F, Cisbani G, et al. Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein[J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 132(4): 577-592.
- [11] Talaat RM, Adel S, Salem TA, et al. Correlation between angiogenic/inflammatory mediators in Wistar rat model of liver dysplasia[J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2016, 37(5): 472-484.
- [12] Rozas JL, Gómez L, Tomás C, et al. Increased neurotransmitter release at the neuromuscular junction in a mouse model of polyglutamine disease[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(3): 1106-1113.

- [13] Hu J, Song Y, Wang Q, et al. Incorporating historical sub-optimal deep neural networks for dose prediction in radiotherapy[J]. *Med Image Anal*, 2021, 67(5): 101886.
- [14] Cheng L, Quek C, Sun X, et al. The detection of microRNA associated with Alzheimer's disease in biological fluids using next-generation sequencing technologies[J]. *Front Genet*, 2013, 4(3): 150.
- [15] Johnson R, Zuccato C, Belyaev N, et al. A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 29(3): 438-445.
- [16] Wang J, Langfelder P, Horvath S, et al. Exosomes and homeostatic synaptic plasticity are linked to each other and to Huntington's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases by database-enabled analyses of comprehensively curated datasets[J]. *Front Neurosci*, 2017, 11(3): 149.
- [17] Das S, Bhattacharyya NP. Heat shock factor 1-Regulated miRNAs can target huntingtin and suppress aggregates of mutant huntingtin[J]. *Microna*, 2015, 4(3): 185-193.
- [18] Sinha M, Ghose J, Bhattacharyya NP. Micro RNA-214, -150, -146a and -125b target Huntingtin gene[J]. *RNA Biol*, 2011, 8(6): 1005-1021.
- [19] Lee ST, Im W, Ban JJ, et al. Exosome-based delivery of miR-124 in a Huntington's disease model[J]. *J Mov Disord*, 2017, 10(1): 45-52.
- [20] Liu T, Im W, Mook-Jung I, et al. MicroRNA-124 slows down the progression of Huntington's disease by promoting neurogenesis in the striatum[J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(5): 786-791.
- [21] Does MR, Trejo J. Endo-lysosomal sorting of G-protein-coupled receptors by ubiquitin: diverse pathways for G-protein-coupled receptor destruction and beyond[J]. *Traffic*, 2019, 20(2): 101-109.
- [22] Jovicic A, Jolissaint J, Moser R, et al. MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific Huntington's disease-related mechanisms[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54222.
- [23] Reed ER, Reed E, Latourelle J, et al. MicroRNAs in CSF as prodromal biomarkers for Huntington disease in the PRE-DICT-HD study[J]. *Neurology*, 2018, 90(4): e264-e272.
- [24] Trzyna A, Banas-Zabczyk A. Adipose-derived stem cells secrete and its potential application in "Stem Cell-Free Therapy"[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(6): 345-369.
- [25] Lee M, Liu T, Im W, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells ameliorate phenotype of Huntington's disease in vitro model[J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 44(4): 2114-2119.
- [26] Crooke ST, Wang S, Vickers T, et al. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(3): 230-237.
- [27] Li D, Li YP, Li YX, et al. Effect of regulatory network of exosomes and microRNAs on neurodegenerative diseases[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2018, 1(18): 2216-2225.
- [28] Im W, Ban JJ, Chung JY, et al. Multidrug resistance protein 1 reduces the aggregation of mutant huntingtin in neuronal cells derived from the Huntington's disease R6/2 model[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 16887.
- [29] Lee M, Ban JJ, Kim KY, et al. Adipose-derived stem cell exosomes alleviate pathology of amyotrophic lateral sclerosis in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(3): 434-439.
- [30] Yerrapragada SM, Bihl JC. Role of exosomes in mediating the cross-talk between adipose tissue and the brain[J]. *Neuromolecular Med*, 2021, 11(5): 2115-2120.