

综述

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2022.07.002

外泌体在肾间质纤维化中作用的研究进展

宋晓红 郭兆安

【摘要】 慢性肾脏病（CKD）已成为全球性的公共卫生问题，CKD患者的最终结局往往会发展为终末期肾病（ESRD）。肾间质纤维化（RIF）是不同病因的CKD进展为ESRD的共同途径。因发病机制复杂，目前RIF尚无有效的治疗方法，近期研究表明外泌体在多种肾脏疾病的发生发展中发挥着重要作用。该文对外泌体在RIF发病机制中作用的最新研究进展进行综述，探讨外泌体在RIF诊断与治疗中的前景及挑战。

【关键词】 肾间质纤维化；外泌体；发病机制；人工外泌体

Research progress on the role of exosomes in renal interstitial fibrosis Song Xiaohong[△], Guo Zhaoan. [△]The First Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China

Corresponding author, Guo Zhaoan, E-mail: gza63@163.com

【Abstract】 Chronic kidney disease (CKD) has become a global public health event. CKD may eventually progress into end-stage renal disease (ESRD). Renal interstitial fibrosis (RIF) is the common pathway for the progression from CKD into ESRD. Due to the complex pathogenesis, there is currently no effective treatment for RIF. Recent studies have shown that exosomes play an important role in the occurrence and development of a variety of kidney diseases. In this article, the latest research progress on the role of exosomes in the pathogenesis of RIF was reviewed, and the application prospect of exosomes in the diagnosis and treatment of RIF was investigated.

【Key words】 Renal interstitial fibrosis; Exosome; Pathogenesis; Artificial exosome

近年来，慢性肾脏病（CKD）的发病率不断上升，流行病学研究表明，CKD全球流行率接近10%，已成为全球性的公共卫生问题^[1]。随着病情的进展，有490.2万~708.3万CKD患者最终进展为终末期肾病（ESRD），给家庭和社会造成严重负担^[2]。肾间质纤维化（RIF）是不同病因的CKD患者肾功能进行性丧失的共同途径，其主要病理特征为炎性细胞浸润、肾小管萎缩、毛细血管丢失、肌成纤维细胞增殖加速和细胞外基质（ECM）过度沉积^[3]。RIF因其发病机制复杂，相互作用的信号通路容易形成补偿机制，目前尚无有效方法可阻止其进展。近期研究显示，外泌体参与包括RIF等的多种肾脏疾病的发生发展，并已经在疾病诊断与治疗方面显示出独特优势。因此深入系统地研究外泌体在RIF中的作用机制对指导RIF早期诊断与治疗，改善患者预后意义重大。

一、外泌体概述

外泌体是一种直径为30~150 nm的细胞外囊

泡，外由脂质双分子层构成，内含脂质、蛋白质和核酸[包括mRNA、微RNA（miR）或长链非编码RNA]等多种成分^[4]。它通过母体细胞多囊体的外膜与顶端质膜的融合而被释放进入微环境，可以反映母体细胞的生理病理状态。人体内几乎所有类型细胞均可分泌外泌体，外泌体最初被认为是人体的“垃圾袋”，但随着研究的深入，人们逐渐认识到外泌体在病理生理过程中的重要作用^[5]。研究者发现，外泌体可以通过受体-配体结合，直接与质膜融合和通过内吞方式将脂质、蛋白质和核酸等成分由母体细胞转移至靶细胞，介导细胞间的信号传递，诱导靶细胞的遗传和表观遗传学变化，参与生物发生发展过程^[6]。在RIF中受损肾单位细胞分泌的外泌体携带不同蛋白质、核酸等效应器分子，将有害信号不断传播与扩大，不仅使肾脏固有细胞发生表型转变，还不断激活炎性细胞及肌成纤维细胞，使得损伤修复过程由间断性转为持续性，ECM不受控制地积聚，导致正常肾功能逐渐丧失。外泌体除在生物体的病理

生理过程中扮演重要角色外,还可以作为疾病诊断与治疗的工具,其中,人工外泌体(AE)作为一种新型纳米生物技术已经引起人们的关注。本文将主要从发病机制方面综述外泌体在RIF研究中的最新进展,并探讨外泌体在RIF诊断与治疗中的前景与挑战。

二、外泌体在RIF发病机制中的作用

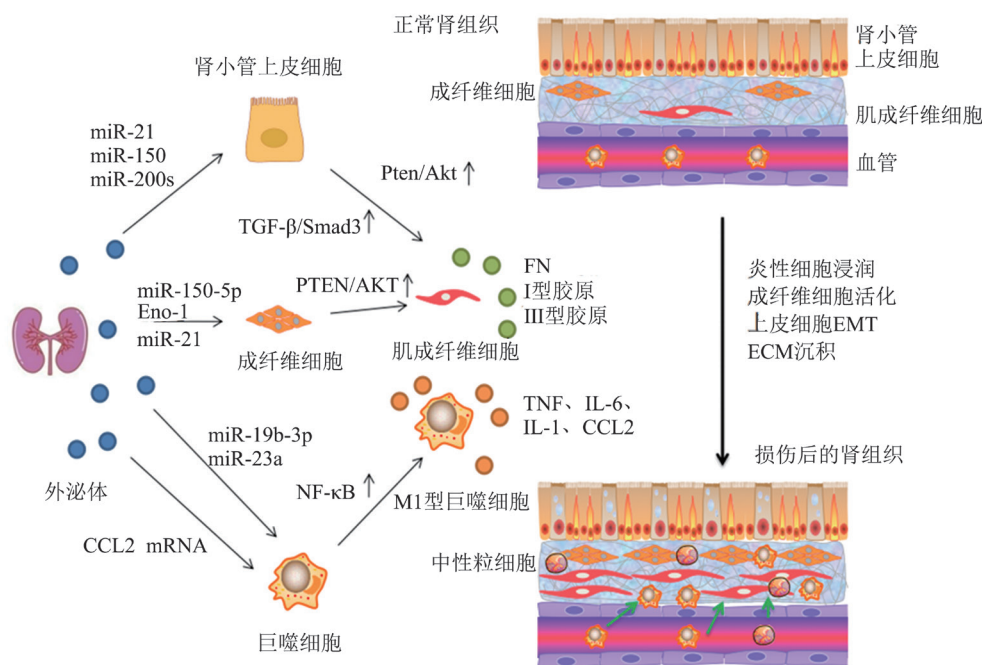
肾脏受到损伤后,来源于肾脏系膜细胞、肾小管上皮细胞(TEC)等固有细胞的外泌体通过多种细胞因子及通路募集炎性细胞,促使肾固有细胞发生表型转化,激活肌成纤维细胞,导致ECM过度沉积,从而促进RIF进展。外泌体的具体作用机制见图1。

1. 炎性细胞浸润

炎性细胞的迁移与浸润在RIF进程中发挥着重要作用。在受到高血糖、蛋白质超载、缺氧等损伤后,TEC出现包括细胞周期停滞、EMT等细胞及分子重排改变,从而分泌各种趋化因子(包括CCL2、CCL3等)触发中性粒细胞、巨噬细胞及树突状细胞等免疫细胞向损伤部位募集^[7]。损伤初期,被招募至损伤部位的中性粒细胞主要驱动早期炎症反应,随后活化的巨噬细胞释放多种炎性及纤维化因子,促使持续性炎症发生,ECM积

聚,正常肾单位被永久性纤维瘢痕代替,肾功能逐渐丧失^[7]。由TEC释放的炎性趋化因子或介质,除了通过可溶性细胞因子和介质传递经典信号外,外泌体因其传递信息的潜力在促进炎症细胞的激活与募集、加重炎症反应方面也受到学者们的极大关注。

巨噬细胞浸润是肾小管间质疾病最具特征的表现之一,来源于受损TEC的外泌体可通过上皮-巨噬细胞信号串扰介导巨噬细胞募集与活化。Lv等^[8]的研究显示,经牛血清白蛋白处理的TEC可通过外泌体将有害信号传递到间质巨噬细胞,促进肾小管间质炎症和纤维化。研究者发现,暴露于牛血清白蛋白环境中,不仅使TEC释放更多含有CCL2 mRNA的外泌体,还能增强巨噬细胞对CCL2 mRNA的摄取,从而促进巨噬细胞的迁移,诱导炎症反应的发生^[8]。据报道,在CKD患者的肾组织中,巨噬细胞可转化为具有促炎效应的M1型,分泌对系膜细胞和上皮细胞具有细胞毒作用的炎症因子,从而促进肾纤维化进程^[9]。巨噬细胞的表型转换可以由细胞因子或配体-受体的相互作用来触发,最近发现外泌体介导的细胞通信是启动M1型巨噬细胞活化的另一种途径。Lv等^[10]发现,糖尿病肾病患者尿液外泌体中存在高水平的miR-19b-3p且与肾小管间质炎症程度相关,随后其将牛血清白蛋



注: TGF- β 为转化生长因子- β , EMT 为上皮细胞-间质转化, CCL 为趋化因子配体, FN 为纤维连接蛋白。

图1 外泌体促进RIF发展的作用机制

白诱导的 TEC 外泌体与巨噬细胞共同孵育,结果显示外泌体中 miR-19b-3p 可靶向作用于细胞因子信号转导抑制因子 1 (SOCS-1) 激活 NF- κ B 通路,使受体巨噬细胞极化为促炎的 M1 表型,加重肾脏损伤。此外,经缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 处理的 TEC 释放的外泌体可通过转移 miR-23a 和抑制泛素编辑酶 A20 的活性,激活 NF- κ B 信号来触发巨噬细胞的促炎表型,接受外泌体注射的小鼠肾小管间质炎症程度明显增加也佐证了这一作用^[11]。

2. 肌成纤维细胞活化

肌成纤维细胞是具有平滑肌的某些功能和结构特征的成纤维细胞,完全发育的肌成纤维细胞具有与成纤维细胞相似的外观,可特异性表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)^[12]。研究表明,肾组织的肌成纤维细胞主要来源于成纤维细胞活化、骨髓分化及上皮细胞表型转化等,外泌体在其中扮演重要角色^[12]。

低氧应激导致 TEC 分泌外泌体,将外泌体与肾成纤维细胞(NRK-49F)共同孵育后, NRK-49F 表达大量 α -SMA、FN 以及 I 型胶原,研究进一步证明 miR-150-5p 在外泌体介导的 TEC-成纤维细胞通信中发挥重要作用^[13]。此外, Wen 等^[14]报道,来源于高糖处理近端 TEC 的外泌体可诱导成纤维细胞增殖和发生明显的形态学改变。笔者通过对外泌体进行蛋白组学结合 Nephroseq 数据库分析,认为内皮型一氧化氮合酶可能在外泌体诱导的成纤维细胞激活中有着不可替代的作用,但具体的作用机制有待进一步研究。还有研究表明, TGF- β 1 诱导 TEC 产生的外泌体可以加重正常 TEC 的表型改变,定量逆转录-PCR (RT-qPCR) 显示 miR-21 借助外泌体完成 TEC 间的信息传递,通过激活受体细胞 Pten/Akt 信号通路参与 RIF 的发生发展^[15]。虽然对于发生 EMT 的 TEC 是否通过转化为肌成纤维细胞的方式参与纤维化进程尚存在争议,但它仍可通过旁分泌等途径促进炎症细胞和肌纤维细胞的募集,促进 RIF 的发生^[16]。

3. ECM 沉积

ECM 沉积是 RIF 的一个标志性形态学表现,不仅与 I 型、III 型胶原、FN 等蛋白的过度合成有关,而且与其降解减少有关。外泌体中的 miR 等成分可通过多条途径参与 ECM 的沉积。

研究表明,成纤维细胞活化后可分泌大量胶原蛋白,是 ECM 的主要来源。Guan 等^[17]研究缺血再灌注(IR)模型小鼠时发现,与对照组相比,

外泌体敲除(腹腔注射外泌体抑制剂 GW4869)的小鼠 α -SMA、I 型胶原和 FN 表达明显降低,随后的体外实验表明,缺氧条件下 TEC 来源的外泌体 miR-150 可启动成纤维细胞的增殖与活化,这可能是 IR 肾脏外泌体促进 ECM 合成的机制之一。染色体显性遗传性多囊肾病(ADPKD)被认为是最常见的单基因遗传性肾病,主要由 PKD1 (占 85%) 或 PKD2 (占 15%) 突变引起,是 ESRD 的重要病因之一。一项有关 ADPKD 的研究显示,在体外 PKD1 缺失肾上皮细胞来源的外泌体可以激活成纤维细胞,促进 FN、 α -SMA 和 TGF- β mRNA 表达,导致 ECM 的异常沉积,并发现可能通过 miR-200s 和 miR-21 靶向下调受体细胞 PKD1 基因表达发挥作用。此外,用 PKD1 突变细胞外泌体处理小鼠肾髓质集合管细胞后, RT-qPCR 显示囊性细胞 miR 与外泌体 miR 以及邻近细胞 miR 之间可能存在一个正反馈环,促使 ADPKD 患者的囊肿生长及肾纤维化的不断进展,外泌体作为运输 miR 的“桥梁”,是环路中不可缺少的部分^[18]。

TGF- β 是肾纤维化进程中的关键因子,可通过 Smad 依赖及非 Smad 依赖信号通路介导 COL1A1、COL4A1、基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂等下游信号的表达,调节 ECM 的合成与降解,促进纤维化进程^[19]。最近越来越多的证据表明,转录因子 Sp1 对一些与纤维化相关的基因表达起着重要的调节作用,包括 TGF- β 以及 TGF- β 的下游靶标^[20]。一项研究应用 RT-qPCR 技术检测狼疮性肾炎(LN)患者尿外泌体中 miR 的表达情况,结果显示 miR-21 和 miR-150 过表达, miR-29c 表达降低,并且这种表达特点与 LN 患者 RIF 的发生发展有关。将 miR-150 和 miR-21 模拟物转染 TEC,在 TGF- β 刺激后,细胞中 Sp1 的产生被抑制,同时诱导 COL1A1、COL4A1、TGF- β 和 Smad3 等促纤维化分子表达增加,表明 miR-150 和 miR-21 通过 Smad3/TGF- β 途径发挥促纤维化作用,而不依赖于 Sp1。而用 miR-29c 抑制剂转染 PTC,不仅促使纤维化分子明显增加,亦促进了 Sp1 的产生,说明 miR-29c 可能通过 Sp1 依赖的 Smad3/TGF- β 通路抑制 TEC 合成胶原蛋白^[21]。

目前有关 RIF 的具体机制尚在研究中,人们已经发现细胞能量代谢失常在 RIF 发生发展中起重要作用。研究还显示,外泌体携带的环状 RNA (circRNA) TRPS1 可通过影响谷氨酰胺代谢促进膀胱癌免疫微环境中 CD8⁺T 淋巴细胞的耗竭从而

影响肿瘤进展。因此，外泌体通过影响能量代谢参与 RIF 或许是未来研究的新方向。

三、外泌体与 RIF 诊断

尿液中的外泌体携带着来自亲代细胞的不同分子物质，代表肾单位不同部分的病理生理状态^[22]。因此，尿液外泌体作为各种肾脏疾病诊断和预后评估的无创性潜在标志物引起了广泛关注。有研究比较了 38 例 CKD 患者和 12 名正常人的尿液外泌体，结果显示尿外泌体中 miR-200b 的含量与患者肾功能及 RIF 程度密切相关，提示它可能是一种新型无创的肾纤维化标志物^[23]。同时有研究表明，尿液外泌体 circ_0040507 结合血清 PSA 在诊断前列腺癌方面有良好的应用前景^[24]。虽然研究取得了一定的进展，但尿液外泌体应用于临床仍有诸多障碍，其中主要限制因素是缺乏一种标准化的、易于操作的且适用于大样本量常规筛查实验室技术。目前有几项研究正在寻求突破方法，尝试在不使用超速离心法的情况下冷冻尿液和分离外泌体，相信在不久的将来，这些难关会被逐一攻克。

四、外泌体与 RIF 治疗

在治疗方面，与细胞疗法相比，外泌体能在起到治疗效应的同时不会引发细胞的自我增殖，从而降低肿瘤的发生风险。目前的研究主要集中在以下几个方面：①通过阻断外泌体的产生或摄取，中断外泌体介导的细胞通信，延缓疾病发展进程^[25]。②直接从细胞中分离天然外泌体进行疾病治疗^[26]。但上述 2 种方式均存在着靶向性不足的问题，在发挥治疗作用的同时可能会干扰人体正常的生理过程，从而导致难以估量的后果。③对天然外泌体进行一定程度的改造，包括负载药物、对亲本细胞进行定向诱导、在外泌体表面涂覆靶向抗体等，增强外泌体作用的靶向性^[27]。但如何将改造方法标准化、提高载药效率以及实现规模化生产等问题仍未得到解决。

基于上述种种挑战，以纳米生物技术为基础的 AE 应运而生，并已经在一些领域取得突破。Aday 等^[28]运用微流控系统成功将 let-7b-5p 导入基于脂质纳米粒的 AE 中，并有效地将该 miR 传递给内皮细胞，从而促进血管生成，提高了内皮细胞在缺氧环境中的存活率。此外，Li 等^[29]用介孔二氧化硅修饰的转换纳米颗粒负载辛二酰苯胺异

羟肟酸 (SAHA)，然后包裹 M1 型巨噬细胞衍生的外泌体膜，不仅实现靶向给药，还克服了 SAHA 的不良药代动力学，从而发挥优异的抗肿瘤作用，研究表明细胞膜包裹的仿生纳米颗粒在药物输送系统中的独特优势。在另一项研究中，Zhang 等^[30]将红细胞和 MCF-7 肿瘤细胞来源的杂交膜蛋白整合到磷脂双分子层中构建了第一个具有抗吞噬和靶向癌症治疗的仿生人工嵌合外泌体，并通过动物实验证明，与普通脂质体相比，人工嵌合外泌体在体内具有更高的肿瘤蓄积率、更低的截留率和更好的抗肿瘤治疗效果，同时具有制备规模化、结构稳定、载药量高和功能定制化等特点。与其他载体系统相比，仿生外泌体的合成具有简便性，这种载药方式可能是未来纳米医学发展的关键。目前 AE 载药方式已经在抗肿瘤等领域取得一定进展，但在肾脏疾病方面的研究还没有完全展开，相信 AE 也可以在 RIF 的治疗中发挥独特优势。

五、总结与展望

RIF 作为肾脏疾病中广泛存在的病理机制，一直是医学工作者研究的重点，如何减缓 RIF 进程，改善预后是一项亟待解决的难题。在过去的十年里，广泛的研究集中在基于各种细胞的方法来修复受损的肾实质，包括多能祖细胞、间充质干细胞等，然而该方法存在着诸多限制。在各种被提出的肾纤维化潜在治疗方法中，外泌体作为一种无细胞治疗方法逐步走入人们视线。随着研究的深入，外泌体参与 RIF 发生发展的机制逐渐被揭示。同时外泌体的特殊性质，如生物相容性、选择靶向性和可修饰性，也让人们认识到它在 RIF 诊断与治疗方面的潜力。虽然外泌体的研究发展同样面临着许多挑战，但笔者相信随着科技的发展和研究的深入，外泌体将成为设计新一代 RIF 诊断与治疗方法的重要工具。

参 考 文 献

- [1] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 2020, 395 (10225) : 709-733.
- [2] Lv J C, Zhang L X. Prevalence and disease burden of chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165 : 3-15.
- [3] Ying W Z, Li X, Rangarajan S, et al. Immunoglobulin light

- chains generate proinflammatory and profibrotic kidney injury. *J Clin Invest*, 2019, 129 (7): 2792-2806.
- [4] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, 367 (6478): eaau6977.
- [5] Thankam F G, Agrawal D K. Infarct zone: a novel platform for exosome trade in cardiac tissue regeneration. *J Cardiovasc Transl Res*, 2020, 13 (5): 686-701.
- [6] Park S J, Kim J M, Kim J, et al. Molecular mechanisms of biogenesis of apoptotic exosome-like vesicles and their roles as damage-associated molecular patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115 (50): E11721-E11730.
- [7] Kundert F, Platen L, Iwakura T, et al. Immune mechanisms in the different phases of acute tubular necrosis. *Kidney Res Clin Pract*, 2018, 37 (3): 185-196.
- [8] Lv L L, Feng Y, Wen Y, et al. Exosomal CCL2 from tubular epithelial cells is critical for albumin-induced tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29 (3): 919-935.
- [9] Jia Y, Zheng Z, Xue M, et al. Extracellular vesicles from albumin-induced tubular epithelial cells promote the M1 macrophage phenotype by targeting klotho. *Mol Ther*, 2019, 27 (8): 1452-1466.
- [10] Lv L L, Feng Y, Wu M, et al. Exosomal miRNA-19b-3p of tubular epithelial cells promotes M1 macrophage activation in kidney injury. *Cell Death Differ*, 2020, 27 (1): 210-226.
- [11] Li Z L, Lv L L, Tang T T, et al. HIF-1 α inducing exosomal microRNA-23a expression mediates the cross-talk between tubular epithelial cells and macrophages in tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int*, 2019, 95 (2): 388-404.
- [12] Kuppe C, Ibrahim M M, Kranz J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature*, 2021, 589 (7841): 281-286.
- [13] Zhou X, Zhao S, Li W, et al. Tubular cell-derived exosomal miR-150-5p contributes to renal fibrosis following unilateral ischemia-reperfusion injury by activating fibroblast *in vitro* and *in vivo*. *Int J Biol Sci*, 2021, 17 (14): 4021-4033.
- [14] Wen J, Ma Z, Livingston M J, et al. Decreased secretion and profibrotic activity of tubular exosomes in diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 319 (4): F664-F673.
- [15] Zheng S B, Zheng Y, Jin L W, et al. Microvesicles containing microRNA-21 secreted by proximal tubular epithelial cells are involved in renal interstitial fibrosis by activating Akt pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22 (3): 707-714.
- [16] Yuan Q, Tan R J, Liu Y. Myofibroblast in kidney fibrosis: origin, activation, and regulation. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165 : 253-283.
- [17] Guan H, Peng R, Mao L, et al. Injured tubular epithelial cells activate fibroblasts to promote kidney fibrosis through miR-150-containing exosomes. *Exp Cell Res*, 2020, 392 (2): 112007.
- [18] Ding H, Li L X, Harris P C, et al. Extracellular vesicles and exosomes generated from cystic renal epithelial cells promote cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 4548.
- [19] Frangogiannis N. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med*, 2020, 217 (3): e20190103.
- [20] Ding A, Bian Y Y, Zhang Z H. SP1/TGF- β 1/Smad2 pathway is involved in angiogenesis during osteogenesis. *Mol Med Rep*, 2020, 21 (3): 1581-1589.
- [21] Solé C, Moliné T, Vidal M, et al. An exosomal urinary miRNA signature for early diagnosis of renal fibrosis in lupus nephritis. *Cells*, 2019, 8 (8): 773.
- [22] Sun I O, Lerman L O. Urinary extracellular vesicles as biomarkers of kidney disease: from diagnostics to therapeutics. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10 (5): 311.
- [23] Garcia-Vives E, Solé C, Moliné T, et al. The urinary exosomal miRNA expression profile is predictive of clinical response in lupus nephritis. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (4): 1372.
- [24] 陶文, 何涛, 何娅娣, 等. 尿液外泌体 circ_0040507 联合 PSA 对前列腺癌诊断价值的初步研究. *新医学*, 2020, 51 (6): 455-458.
- [25] Catalano M, O'Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *J Extracell Vesicles*, 2019, 9 (1): 1703244.
- [26] Liu B, Hu D, Zhou Y, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against renal interstitial fibrosis through ROS-mediated P38MAPK/ERK signaling pathway. *Am J Transl Res*, 2020, 12 (9): 4998-5014.
- [27] Tang T T, Lv L L, Wang B, et al. Employing macrophage-derived microvesicle for kidney-targeted delivery of dexamethasone: an efficient therapeutic strategy against renal inflammation and fibrosis. *Theranostics*, 2019, 9 (16): 4740-4755.
- [28] Aday S, Hazan-Halevy I, Chamorro-Jorganes A, et al. Bioinspired artificial exosomes based on lipid nanoparticles carrying let-7b-5p promote angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther*, 2021, 29 (7): 2239-2252.
- [29] Li H, Li S, Lin Y, et al. Artificial exosomes mediated spatiotemporal-resolved and targeted delivery of epigenetic inhibitors. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19 (1): 364.
- [30] Zhang K L, Wang Y J, Sun J, et al. Artificial chimeric exosomes for anti-phagocytosis and targeted cancer therapy. *Chem Sci*, 2018, 10 (5): 1555-1561.

(收稿日期: 2022-01-11)

(本文编辑: 林燕薇)