

间充质干细胞来源的细胞外囊泡与肾损伤修复*

王琪¹ 姜大朋^{1△}

[摘要] 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)具有修复、再生和免疫调节功能,其在器官损伤修复过程中发挥重要作用。MSC 的治疗机制与其旁分泌形成的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)有关。EVs 主要包括外泌体(exosome)和微囊泡(microvesicles),其内含多种遗传物质和蛋白信号分子,这些成分在调控细胞间信号传递中起重要作用,可影响受体细胞的增殖、分化、凋亡。肾脏疾病的治疗效果并不理想,因此迫切需要寻找新的有效治疗手段,目前的研究已提示 EVs 与肾脏损伤与修复密切相关。本文将对 MSC 来源 EVs 对肾脏损伤修复的作用及其机制进行综述。

[关键词] 间充质干细胞;细胞外囊泡;外泌体;急性肾损伤;慢性肾病

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2020.03.016

[中图分类号] R692 **[文献标志码]** A

Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair

WANG Qi JIANG Dapeng

(¹Department of Pediatric Urology, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200120, China)

Corresponding author: JIANG Dapeng, E-mail: jdp509@163.com

Abstract Mesenchymal stem cell(MSC) have the function of repair, regeneration and immunomodulation, which play an important role in the repair of organ injury. The therapeutic effects of MSC are primarily mediated by the paracrine release of factors, including extracellular vesicles(EVs), composed of microvesicles and exosomes. MSC-derived EVs contain a variety of genetic and protein material that play a key role in the intercellular-communication, and can affect the proliferation, differentiation and apoptosis of receptor cells. Treatment of kidney diseases is not satisfactory, so it is urgent to find new and effective treatments. Current researches have revealed that EVs are closely related to renal injury and repair. In this review, we summarized the application and mechanism of MSC-derived EVs in the repair of kidney injury.

Key words mesenchymal stem cell; extracellular vesicles; exosomes; acute kidney injury; chronic kidney disease

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)具有修复、再生和免疫调节功能,其在器官损伤修复中发挥重要作用^[1]。MSC 的治疗机制与其来源的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)有关。EVs 是 MSC 旁分泌的生物活性物质之一,在细胞间信息传递过程中扮演着极为重要的角色,其在肾脏修复再生中发挥着独特的功能。急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是指多种病因引起的肾功能快速下降而出现的临床综合征,其发病率和病死率一直居高不下。此外,慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的发病率与病死率呈逐年增加趋势^[2]。因此, EVs 在肾脏修复中的作用已成为目前肾脏损伤研究领域的热点。本文将对 MSC 来源 EVs 对肾脏损伤修复的作用及其机制进行综述,希望为未来研究提供参考价值。

1 EVs 生物学特性

EVs 主要包括外泌体(exosome)、微囊泡(microvesicles),其内含有的蛋白质、mRNA、miRNA、脂质等成分可调控细胞间信号的传递,从而影响受体细胞的增殖、分化和凋亡^[3]。EVs 可以诱导经由受体配体相互作用的信号,或者通过内吞作用或吞噬作用与靶细胞膜内化或融合将其内容物递送到其细胞质中,由此改变受体细胞的生理状态^[3]。越来越多的证据显示 EVs 中发挥作用的物质主要为 exosome(30~100 nm),其由多囊泡小体内部产生,与质膜融合分泌而形成;而 microvesicles(100~1 000 nm)由细胞膜出芽形成^[4-5]。起初 exosome 被认为是细胞排出的废物,随着不断的研究发现,它不仅可以维持细胞稳态,还可以用于细胞间交流,并与许多生理与病理过程相关^[5]。

2 EVs 与肾损伤修复

2.1 骨髓间充质干细胞来源的 EVs(bone marrow derived mesenchymal stem cell-EVs, BMSC-EVs)

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No:81472085)

¹ 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心小儿泌尿外科(上海, 200120)

[△] 审校者

通信作者:姜大朋, E-mail: jdp509@163.com

BMSC 是最早被定义的间充质干细胞,现已广泛应用于再生医学领域。关于其分泌的 EVs/exosome 与肾脏保护作用的关系也被广泛研究^[6]。Wang 等^[7]在肾 IRI(ischemia reperfusion injury, IRI)诱导的 AKI 模型中,证实 BMSC-EVs 可降低血清肌酐及尿素氮水平,使肾功能明显好转,并降低促炎因子 TNF- α 和凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达。另有研究人员 BMSC 源 exosome 对肾 IRI 影响的时间依赖性以及潜在机制进行了探索。研究发现 BMSC 通过分泌包含有靶向 BIP 的 miR-199a-5p 的 exosome 来保护肾脏 IRI,并在再灌注的早期阶段抑制内质网应激。该研究提供了在肾脏 IRI 的早期再灌注阶段的新治疗策略^[8]。在药物诱导的 AKI 大鼠模型中,研究人员发现 EVs 可通过调节炎症因子的表达来减轻肾脏炎症反应^[9-10]。关于 EVs 在药物性 AKI 的保护机制也有深入探索,Tomasoni 等^[11]证实 BMSC 源 exosome 通过转移胰岛素样生长因子(IGF)-1 蛋白质和 IGF-1RmRNA 促进肾小管上皮细胞增殖。Bruno 等^[12]发现 exosome 可将调节纤维化和上皮向间质转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的 miRNA 转移至受体细胞。

在小鼠肾 5/6 大部切除模型中也研究了 BMSC-EVs 的肾脏保护作用。与对照组相比,EVs 可使淋巴细胞浸润减少,肾小管萎缩和纤维化减轻,提示 BMSC-EVs 在保留残余肾功能方面具有潜在作用^[13]。Gregorini 等^[14]发现在肾移植前把离体肾脏用含 MSC-EVs 的 Belzer 溶液(BS)灌注,可通过改变某些基因的表达来改善细胞代谢与物质转运,使离体肾的缺血损伤减小。结论还指出可溶性 EVs 与移植 MSC 分泌 EVs 相比,前者保护作用更明显。该实验证明 BMSC-EVs 对循环衰竭后的肾脏有保护作用,可保护肾移植前的肾功能。

2.2 人脐带血间充质干细胞来源 EVs(human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-EVs, HucMSC-EVs)

HucMSC 是从人脐带华尔通胶(Wharton Jelly)中分离出的细胞,其具有来源丰富、易于采集和运输,增殖能力强、移植后无异物排斥反应、不涉及伦理问题等诸多优点。

Zhang 等^[15]通过对 IRI 缺血期后的大鼠静脉注射 HucMSC-EVs,证实了 EVs 通过抑制 NOX2/gp91(phox)的表达使肾的氧化应激损伤减弱。此小组还发现 EVs 可通过增强 Nrf2/ARE 的激活来降低氧化应激水平,EVs 治疗后反应氧化应激水平的 MDA 和 8-OHdg 表达降低^[16]。Zou 等^[17]发现注射 EVs 可使肾血管内皮生长因子(VEGF)表达上调,HIF-1 α 表达下调,并可增加毛细血管密度,

减少肾纤维化。体外实验进一步证实 EVs 可直接将 VEGF 传递至肾小管上皮细胞。Chen 等^[18]发现 HucMSC-EVs 能诱导肾小管细胞(NRK-52E)阻滞在 G2/M 细胞周期,降低胶原沉积相关蛋白的表达,改善肾缺血诱导的肾纤维化。U0126(ERK1/2 阻滞剂)可逆转此作用,从而明确 HucMSCs-EVs 通过 ERK1/2 信号通路诱导 G2/M 细胞周期阻滞。

HucMSC-exosome 在药物性 AKI 中的作用也有研究。Zhou 等^[19]用顺铂诱导的 AKI 大鼠模型,向大鼠肾包膜内注射 exosome,观察到肾细胞的氧化应激损伤明显减小。该研究小组发现部分机制是通过激活 ERK1/2 通路来促进细胞增殖,增加抗氧化剂谷胱甘肽的表达,并抑制 p38MAPK 通路的激活。HucMSC-exosome 还能抑制肾小管上皮细胞中线粒体凋亡和炎症因子的分泌,并可通过抑制 mTOR 磷酸化来激活自噬,增加自噬标记蛋白(LC3B)和自噬相关基因(ATG5、ATG7)的表达。自噬现已被证明是一种自我保护的机制^[20]。该研究小组通过进一步研究发现,HucMSC-exosome 转运的 14-3-3 ζ 可诱导细胞自噬,防止顺铂对肾小管上皮细胞的损伤,指出 HucMSC-exosome 转运的 14-3-3 ζ 是其发挥肾保护作用的主要原因^[21]。

目前,只有一项临床试验测试了 HucMSC-EVs 对进展期 CKD 的肾保护作用^[22]。在此 II/III 期临床试验中,估计肾小球滤过率(eGFR)在 15~60 mL/min 的 40 例患者被随机分为安慰剂组或 HucMSC-EVs 组,并随访 12 个月。EVs 组患者的肾功能指标和炎症因子水平都有明显改善。更重要的是,患者在整个研究期间均未发生明显的不良反应。本研究提示 MSC-EVs 治疗对 CKD 患者是安全的,可以改善肾脏炎症和功能。

2.3 脂肪间充质干细胞来源的 EVs(adipose mesenchymal stem cell-EVs, ADMSC-EVs)

ADMSC 在 2001 年被首次报道,其从脂肪组织分离获得,ADMSC-EVs 的器官保护作用已在肝纤维化、肝细胞癌、缺血心肌模型中得到了证实^[23]。Lin 等^[24]向 IRI 大鼠静脉注射 MSCs 或其 EVs,发现 TNF- α 和 IL-1 β 等促炎因子表达降低。Eirin 等^[25]利用一种同时存在代谢综合征和肾血管疾病的猪模型来检测输注自体 ADMSC-EVs 是否会改善肾的结构和功能。该研究小组发现单次肾内给药可减轻肾脏炎症。ADMSC-EVs 治疗后,巨噬细胞还发生了从促炎型向修复型的转变,进一步增强了 EVs 的免疫调节能力。目前已有研究发现,ADMSC-exosome 可使 Sox9 基因表达上调,促进 IRI 小鼠肾小管上皮细胞增生和修复,改善缺血缺氧,减少间质炎症浸润,其可通过抑制纤维化特

异性通路 TGF- β 1/Smad 3 减轻肾纤维化,减缓 AKI 向 CKD 的转变^[26]。此实验证实 exosome 组与 ADMSC 组有相似的作用,并通过加入抑制 exosome 释放的物质 GW4869 进一步证实 Exosome 为抗纤维化作用的关键分子。

2.4 肾源性间充质干细胞来源的 EVs(kidney derived mesenchymal stem cell-EVs,KMSC-EVs)

KMSC 是从肾脏中分离得到的干细胞有研究发现,从 KMSC 中分离出的微分子(microparticles,MPs)含有 VEGF、成纤维细胞生长因子和 IGF-1 等多种促血管生成基因^[27]。将异基因供体来源的 KMSC-MPs 应用于肾 IRI 小鼠后,缺血肾功能得到改善,提示与血管生成有关的转录因子传递可能有助于 MPs 诱导的肾修复作用。在体外实验中,将促纤维细胞 TGF- β 1 作用于小管上皮细胞,然后与 KMSC-MPs 共同培养,结果发现 MPs 可逆转 EMT 和 TGF- β 1 诱导的内皮细胞形态学改变,显示了其抗纤维化和肾保护作用^[28]。两项实验 MPs 的分离均使用了超速离心法,但根据其具体操作,只能称之为“microparticles”,与 EVs 不完全等同,但也可提示 KMSC-EVs 的作用。

2.5 人尿源干细胞来源的 EVs(human urine-derived stem cells-EVs,USCs-EVs)

USC 可由人体排出的尿液中分离得到,其具有祖细胞的特征,表现出干细胞的许多生物学特性。有研究显示,USCs-exosome 能改善糖尿病大鼠尿微量白蛋白/肌酐比值,减少肾小球系膜增生,减少组织细胞的凋亡,从而改善肾脏功能,并延缓糖尿病的发生、发展。USCs 及 USCs-exosome 对 1 型糖尿病大鼠的肾脏和体外高糖损伤的人足细胞具有保护作用^[29]。这提示在肾损伤修复方面,USCs-EVs 有尚待挖掘的潜力。

3 不足与展望

理论上,EVs 等无细胞疗法在安全性方面可能比其来源的 MSC 有更大优势。EVs 是没有增殖能力的小颗粒,避免了移植后可能出现病理性分化和形成肿瘤,因此 EVs 应该有更少的不良反应。不可否认,EVs 缺乏细胞机制而无法在受体组织中增殖,因此其需要反复使用。基于有限的实验数据,我们还需对 EVs/exosome 治疗模型或患者进行长期随访研究,以进一步确定其安全性。

在疾病条件下,体内 MSC 释放 EVs 的性质可能与体外培养不同。受损的小管上皮细胞释放的 EVs 能转运 mRNA 到成纤维细胞,促进纤维化,并引发组织修复和再生机制,说明细胞外环境能影响 EVs 的形成与作用^[30]。但在实际条件中,体外培养的 EVs 在分泌前无法完全模拟体内的应激条件。因此我们推测用相关化学介质预处理 MSC 来

模拟体内微环境,可能会导致干细胞分泌的 EVs 有更显著的疗效。由于细胞微环境对 MSC 释放 EVs 的影响具体机制仍不清楚,因此预处理 MSC 后其治疗效果的改变值得深究。

4 结论

目前,关于 MSC-EVs 的基础研究主要聚焦于其通过靶向递送生物活性物质至受损的细胞缓解肾损伤及其中涉及的具体分子及通路,以寻找新型治疗方案。随着对 EVs 的深入探索,MSC-EVs 对肾损伤修复作用及其机制不断被阐明,其在肾脏疾病方面有广阔的应用前景。

[参考文献]

- 1 Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(9):726-736.
- 2 汪年松,陈玉强. 2014 年版中国糖尿病肾病防治专家共识解读[J]. 老年医学与保健, 2015, 21(4):207-209.
- 3 Tkach M, Thery C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go [J]. Cell, 2016, 164(6):1226-1232.
- 4 Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(2):193-208.
- 5 Shao H, Im H, Castro CM, et al. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles[J]. Chem Rev, 2018, 118(4):1917-1950.
- 6 Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9):1852-1876.
- 7 Wang R, Lin M, Li L, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome protects kidney against ischemia reperfusion injury in rats[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2014, 94(42):3298-3303.
- 8 Wang C, Zhu G, He W, et al. BMSCs protect against renal ischemia-reperfusion injury by secreting exosomes loaded with miR-199a-5p that target BIP to inhibit endoplasmic reticulum stress at the very early reperfusion stages[J]. Faseb J, 2019, 33(4):5440-5456.
- 9 Reis LA, Borges FT, Simoes MJ, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats[J]. PLoS One, 2012, 7(9):e44092.
- 10 Collino F, Bruno S, Incarnato D, et al. AKI Recovery Induced by Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Carrying MicroRNAs [J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(10):2349-2360.
- 11 Tomasoni S, Longaretti L, Rota C, et al. Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(5):772-780.

- 12 Bruno S, Tapparo M, Collino F, et al. Renal Regenerative Potential of Different Extracellular Vesicle Populations Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(21–22):1262–1273.
- 13 He J, Wang Y, Sun S, et al. Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2012, 17(5):493–500.
- 14 Gregorini M, Corradetti V, Pattonieri EF, et al. Perfusion of isolated rat kidney with Mesenchymal Stromal Cells/Extracellular Vesicles prevents ischaemic injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(12):3381–3393.
- 15 Zhang G, Zou X, Miao S, et al. The anti-oxidative role of micro-vesicles derived from human Wharton-Jelly mesenchymal stromal cells through NOX2/gp91 (phox) suppression in alleviating renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e92129.
- 16 Zhang G, Zou X, Huang Y, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Protect Against Acute Kidney Injury Through Anti-Oxidation by Enhancing Nrf2/ARE Activation in Rats[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2016, 41(2):119–128.
- 17 Zou X, Gu D, Xing X, et al. Human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles alleviate renal ischemic reperfusion injury and enhance angiogenesis in rats[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(10):4289–4299.
- 18 Chen W, Yan Y, Song C, et al. Microvesicles derived from human Wharton's Jelly mesenchymal stem cells ameliorate ischemia-reperfusion-induced renal fibrosis by releasing from G2/M cell cycle arrest[J]. *Biochem J*, 2017, 474(24):4207–4218.
- 19 Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(2):34.
- 20 Wang B, Jia H, Zhang B, et al. Pre-incubation with hucMSC-exosomes prevents cisplatin-induced nephrotoxicity by activating autophagy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1):75.
- 21 Wang J, Jia H, Zhang B, et al. HucMSC exosome-transferred 14–3-3zeta prevents the injury of cisplatin to HK-2 cells by inducing autophagy in vitro[J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(1):29–44.
- 22 Nassar W, El-Ansary M, Sabry D, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases[J]. *Biomater Res*, 2016, 20:21.
- 23 Prat M, Oltolina F, Antonini S, et al. Isolation of Stromal Stem Cells from Adipose Tissue[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1553:169–182.
- 24 Lin KC, Yip HK, Shao PL, et al. Combination of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes for protecting kidney from acute ischemia-reperfusion injury[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 216:173–185.
- 25 Eirin A, Zhu XY, Puranik AS, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(1):114–124.
- 26 Zhu F, Chong Lee Shin OLS, Pei G, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells employed exosomes to attenuate AKI-CKD transition through tubular epithelial cell dependent Sox9 activation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41):70707–70726.
- 27 Choi HY, Moon SJ, Ratliff BB, et al. Microparticles from kidney-derived mesenchymal stem cells act as carriers of proangiogenic signals and contribute to recovery from acute kidney injury[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e87853.
- 28 Choi HY, Lee HG, Kim BS, et al. Mesenchymal stem cell-derived microparticles ameliorate peritubular capillary rarefaction via inhibition of endothelial-mesenchymal transition and decrease tubulointerstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6:18.
- 29 Jiang ZZ, Liu YM, Niu X, et al. Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1):24.
- 30 Borges FT, Melo SA, Ozdemir BC, et al. TGF-beta1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(3):385–392.

(收稿日期:2019-03-23)