

外泌体的研究进展及其对神经系统疾病的免疫调节

聂昊,胡洋,唐洲平

作者单位
华中科技大学同济
医学院附属同济医
院神经内科
武汉 4300309
基金项目
国家自然科学基金
(No.81471201,
81171089)
收稿日期
2018-05-26
通讯作者
唐洲平
ddjtzp@163.com

摘要 外泌体是来源于细胞自身分泌的一种脂质双分子层包裹形成的膜性小体,参与调解机体免疫反应,作为运输载体参与炎症反应,在肿瘤的发生发展和治疗过程中也起到一定作用。外泌体在多发性硬化、视神经脊髓炎、重症肌无力等神经系统免疫疾病中发挥重要作用,同时也参与阿尔茨海默病、帕金森病等中枢神经系统疾病的发生发展。本文就外泌体的性质、作用、获得、鉴别及其在中枢神经系统疾病中的研究进展作一综述。

关键词 外泌体;中枢神经系统疾病;免疫疾病;多发性硬化;视神经脊髓炎;重症肌无力;阿尔茨海默病;帕金森病

中图分类号 R741;R741.02;R743 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgnj.2018.10.010

外泌体(exosomes)是由脂质双分子层包裹形成的类圆形膜性小体,是胞外囊泡的一种类型,内含多种蛋白质、RNA、miRNA、生长因子及其受体等。外泌体在多种细胞中广泛存在,其与来源细胞有相同的标记物,可据此鉴定外泌体的来源和性质。

1 胞外囊泡的分类

根据分子大小和释放方式的不同,胞外囊泡分为外泌体、微囊泡、凋亡小体。外泌体是其中直径最小者,约为40~100 nm,产生方式为胞吞胞吐,可通过其表面表达的CD81、CD63、Alix等分子进行鉴定。

2 外泌体的作用机制

曾经外泌体被认为是细胞排出的碎片等无用物质,但近年来,研究发现外泌体中包含多种重要分子,参与多种生理病理过程,具有广阔的研究前景。

2.1 参与免疫反应

包括树突状细胞等在内的免疫细胞来源的外泌体具有调节免疫反应的作用包括调控抗原呈递、介导免疫活化和免疫抑制、免疫监视和调控细胞间通讯^[1-4]。参与免疫调节的外泌体内小分子包括CD73、乳凝素、FasL、膜上转化生长因子等^[5,6]。外泌体上细胞表面和部分膜、黏附蛋白对于其调节相关细胞的识别、黏附、抗原提呈和受体细胞功能至关重要。外泌体可被临近受体细胞捕捉,作用机制包括细胞内黏附分子1和淋巴细胞功能相关抗原1、磷脂丝胺酸、T细胞免疫球蛋白域和黏蛋白域蛋白4之间的相互作用等^[4,7]。

这些膜结构的微粒是潜在的免疫治疗药物。外泌体来源的抗原肽-MHC复合物可协助抗原提呈细胞向反应性T细胞的转化^[8]。Thery等^[9]发现,DC细胞来源的外泌体除了可介导体内外幼稚T细胞的

分泌,也可协助MHC-II类分子缺如的DC细胞激活T细胞。

2.2 作为运输载体

外泌体具有天然磷脂双分子层结构,且携带特异的表面标志,易被靶细胞识别并摄取,因此具有内在的跨越生物屏障的能力。外泌体为细胞的自身产物,比外源性药物的毒性小,可避免被机体免疫系统识别、吞噬,故药物运转效率高。外泌体表达的多种物质均与母细胞相同,包括脂质、各种生长因子和核糖核酸等^[10,11]。

2.2.1 外泌体作为肿瘤相关载体 不同来源及处理方式的外泌体具有抗肿瘤和致肿瘤的作用。体外实验中,CD105阳性的肾脏来源癌细胞分泌的外泌体,可激活内皮细胞在基底膜的毛细血管生发,增强肿瘤细胞的抗药性^[12,13]。在小鼠乳腺癌动物模型中,茶素没食子酸可发挥抑制肿瘤增长的效果。机理可能与茶素没食子酸酯可上调miRNA-16在肿瘤细胞中的表达,其通过外泌体进入肿瘤相关巨噬细胞,抑制其浸润和M2型巨噬细胞的极化有关^[14]。

外泌体可能通过调节不同免疫细胞的种类,形成一个促肿瘤发生的环境。在同源免疫交互作用过程中,存在抗原驱动从T细胞向APC的单向miRNA转移,这一过程由CD63阳性的外泌体介导。通过靶向作用于神经鞘磷脂酶2抑制外泌体及其产物后,减少了miRNA从T细胞向APC细胞的转移^[15,16]。

人工修饰的外泌体也在临床研究中起到一定作用。外泌体可有效地传送miRNA到表达生长因子受体的乳腺癌细胞中。通过编辑产生外泌体的供体细胞,使其表达融合了GE11多肽的血小板生长因子受体跨膜域。携带有let-7a miRNA核酸药物的外泌体可通过静脉注射,靶向到达表达EGFR的异体RAG2(-/-)小鼠乳腺癌组织中,达到治疗目的^[17]。

2.2.2 外泌体作为炎症相关载体 外泌体作为炎症载体,内含多种蛋白、细胞因子,通过这些内含物

的释放,可以发挥促炎或抑炎的作用。

外泌体可携带错构和病原蛋白,造成疾病在临近细胞间的传播。感染型的羊瘙痒病朊蛋白可被外泌体携带,外泌体在相邻细胞间交换,把朊病毒扩散到机体的多个器官或多个不同机体^[18,19]。P2X7受体激活可促使成熟及未成熟DC细胞膜上外泌体的分泌,鉴于成熟DC细胞前期受到激活刺激,母细胞为成熟DC细胞来源的外泌体内含IL-1 β 、凋亡小体1、凋亡小体3、组织蛋白酶D等炎症因子和分子,P2X7受体的激活可促进外泌体内IL-1 β 的释放^[20]。

外泌体也可作为携带抗炎药物的工具。如将外泌体作为递送姜黄素等抗炎介质的载体,姜黄素在体内更稳定,血药浓度更高,在很大程度上克服脱靶效应,提高生物利用率^[21]。

3 外泌体的分离和纯化

目前外泌体的分离和纯化主要有差速离心法和试剂盒法。差速离心法是从体液或上清中分离外泌体的主要方法之一。离心的层次越多,得到外泌体的纯度越高。密度梯度离心的方式有助于得到纯度更高的外泌体。试剂盒提取外泌体目前广为应用。包括美国System Biosciences的一系列生物公司已推出了成熟的外泌体试剂盒产品。其主要优势是提取过程简便、快速,大大降低人力成本。但此法提取的外泌体纯度相对较低,价格高昂,且混杂不同种类的胞外囊泡,是其研究应用中的短板。除此之外,过滤、超滤、凝胶色谱、磁珠免疫亲和性捕获、微流体等方式也可用于提取外泌体^[22-25]。

4 外泌体的评价方法

外泌体的鉴定,目前应用最多的技术为流式细胞术,但其分辨率较低。电镜可以观察外泌体的形态和大小。电镜结合流式细胞术,是高质量的外泌体鉴定手段^[26]。通过外泌体膜上特异性表达的分子标记物(CD63、CD81、Alix等),也可对外泌体的性质进行相关探究。此外,共聚焦显微镜、荧光显微镜等技术也可用于外泌体的鉴定。

5 外泌体对神经系统疾病的免疫调节

5.1 多发性硬化

多发性硬化是中枢神经系统的慢性免疫性炎症脱髓鞘疾病,发病机制与遗传、自身免疫和环境等因素有关^[27]。在多发性硬化的发病过程中,TNF α 、IL-1 β 、IFN- β 等促炎因子释放;白细胞、单核细胞、血小板等炎症细胞和各种免疫细胞增殖、趋化和聚集;血脑屏障内皮细胞功能紊乱,血脑屏障通透性增加;细胞因子和趋化因子的释放反之加重炎症细胞和免疫细胞的聚集活化,共同导致多发性硬化的慢性疾病状态。目前多发性硬化的诊断多依赖于影像学磁共振和脑脊液的鉴定^[26,28]。

外泌体在多发性硬化的发生发展过程中起到重要作用。其在体内外均可促进免疫炎症因子的趋化和聚集。多发性硬化的特效药物可降低脑脊液中外泌体的数量,提示外泌体可以作为多发性硬化的标志物之一。炎症状态下,外泌体的表达增加,

增强细胞内、外炎症介质(IL-1 β 、IL-6、COX2、iNOS等)的交换,炎症因子的释放,也促进免疫细胞的趋化,免疫细胞反过来增加含炎症因子的外泌体的释放,从正反两相促进疾病进程^[29]。

5.2 视神经脊髓炎

视神经脊髓炎是视神经与脊髓同时或相继受累的急性或亚急性脱髓鞘病变。视神经脊髓炎与多发性硬化在疾病初期难以鉴别,水通道蛋白4(aquaporin4, AQP4)抗体被认为是区别两者的重要病原学依据。具有高度特异性的血清自身抗体NMO-IgG特异性攻击星形胶质细胞上的AQP4, AQP4抗体诱导的补体活化是视神经脊髓炎的始动因素^[30]。通过对NMO患者的脑脊液分离出的外泌体的蛋白组学分析发现,外泌体内含的NMO标志性蛋白(例如胶质细胞纤维酸性蛋白GFAP)的表达有特异性的增加,结果与流式细胞术相一致。与此同时,MS、特发性纵横肌炎(I-LETM)的特异性标志物也有相应表达。提示我们可以将脑脊液外泌体分析作为神经系统免疫疾病鉴别诊断的手段之一^[31]。

5.3 重症肌无力

重症肌无力是由神经-肌肉接头处传递功能障碍所引起的自身免疫性疾病^[32]。其发病机理与辅助性T细胞TH1和TH2细胞的活化有关,它们作用于AChR特异性B细胞,激活体液免疫,产生特异性AChR抗体。有报道指出,抗原特异性不成熟DC来源外泌体可有效减轻实验性自身免疫性重症肌无力的肌无力程度及病理性自身抗体水平,其治疗效果呈抗原特异性和部分剂量依赖性。其机制与外泌体减轻CD4+T淋巴细胞增殖反应、调整Th细胞由Th17、Th1向Treg极化有关^[33]。免疫性树突状细胞来源的外泌体在免疫性疾病中表现出一定的免疫抑制活性,其通过减少AChR反应性淋巴细胞增殖、降低AChR抗体水平和促炎因子水平,改善实验性自身免疫性重症肌无力的进展^[34]。

5.4 阿尔茨海默病

外泌体还参与了中枢系统其他疾病的发生发展,包括阿尔茨海默病和帕金森病。阿尔茨海默病的发病、进展与 β 淀粉样蛋白与tau蛋白参与的淀粉样斑块形成和神经功能退行性病变息息相关,外泌体则参与了 β 淀粉样蛋白和tau蛋白在机体内的代谢、转运等的过程^[34-36]。Vingtdeux等^[36]研究显示,神经退行性疾病的病理生理学机制与蛋白质错构的朊病毒增殖有关,外泌体可能参与阿尔茨海默病中毒性物质的寡聚体和多聚体的转运和传播,阻断这一病理过程也可能成为治疗阿尔茨海默病的潜在方法。

5.5 帕金森病

在帕金森病的病理学改变是中脑黑质的多巴胺能神经元变性、缺失,剩余的多巴胺能神经元内形成嗜酸性包涵体(即路易氏小体),该包涵体的主要成分为 α -突触核蛋白。 α -突触核蛋白广泛存在于多种体液中,在过表达 α -突触核蛋白的SH-SY5Y细胞分泌的外泌体中发现了 α -突触核蛋白,这些外泌体可将 α -突触核蛋白传递至正常SH-SY5Y细胞中,在 α -突触核蛋白传递过程中发挥重要作用^[37]。另外,小胶质细胞可分泌MHC-II类分

子和TNF- α ,而 α -突触核蛋白可促进其分泌。活化的外泌体加速细胞凋亡。活化的小胶质细胞分泌的外泌体或参与了 α -突触核蛋白相关性帕金森病中的发病过程^[38]。

6 小结

目前关于神经系统免疫疾病与外泌体之间关联的研究仍相对较少,本综述对外泌体在神经系统免疫疾病中的作用进行总结,探索神经系统免疫疾病发病机制的新突破口。在临床研究中,外泌体自身在靶向性、免疫原性和携带生物活性分子等方面的巨大优势,使之成为基础研究和临床实践中极具潜力的“新兴明星”。

参考文献

- [1] Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis[J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 3792-3801.
- [2] El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, et al. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics[J]. *Clin Chem*, 2004, 50: 564-573.
- [3] Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, et al. The biogenesis and functions of exosomes[J]. *Traffic*, 2002, 3: 321-330.
- [4] Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9: 581-593.
- [5] Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, et al. Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 177: 531-543.
- [6] Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 35: 169-173.
- [7] Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 34211-34222.
- [8] Montecalvo A, Shufesky WJ, Stolz DB, et al. Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition[J]. *J Immunol*, 2008, 180: 3081-3090.
- [9] Thery C, Duban L, Segura E, et al. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3: 1156-1162.
- [10] O'Loughlin AJ, Woffindale CA, Wood MJ. Exosomes and the emerging field of exosome-based gene therapy[J]. *Curr Gene Ther*, 2012, 12: 262-274.
- [11] Fais S, Logozzi M, Lugini L, et al. Exosomes: the ideal nanovectors for biodelivery[J]. *Biol Chem*, 2013, 394: 1-15.
- [12] Zeelenberg IS, Ostrowski M, Krumeich S, et al. Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 1228-1235.
- [13] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91: 431-437.
- [14] Jang JY, Lee JK, Jeon YK, et al. Exosome derived from epigallocatechingallate treated breast cancer cells suppresses tumor growth by inhibiting tumor-associated macrophage infiltration and M2 polarization[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 421.
- [15] Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells[J]. *Nat Commun*, 2011, 2: 282.
- [16] Greening DW, Gopal SK, Mathias RA, et al. Emerging roles of exosomes during epithelial-mesenchymal transition and cancer progression[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 60-71.

- [17] Ohno S, Takanashi M, Sudo K, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells[J]. *Mol Ther*, 2013, 21: 185-191.
- [18] Fevrier B, Vilette D, Archer F, et al. Cells release prions in association with exosomes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 9683-9688.
- [19] Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, et al. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing[J]. *J Pathol*, 2007, 211: 582-590.
- [20] Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, et al. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 β -loaded microvesicles from human dendritic cells[J]. *Blood*, 2007, 109: 3856-3864.
- [21] Sun D, Zhuang X, Xiang X, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes[J]. *Mol Ther*, 2010, 18: 1606-1614.
- [22] Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes[J]. *Methods*, 2012, 56: 293-304.
- [23] Bobrie A, Colombo M, Raposo G, et al. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses[J]. *Traffic*, 2011, 12: 1659-1668.
- [24] Chaput N, Thery C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations[J]. *Semin Immunopathol*, 2011, 33: 419-440.
- [25] van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8: 2596-2607.
- [26] Saenz-Cuesta M, Osorio-Quejeda I, Otaegui D. Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis: What are They Telling Us[J]? *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 100.
- [27] Bernard CC, Kerlero DRN. Multiple sclerosis: an autoimmune disease of multifactorial etiology[J]. *Curr Opin Immunol*, 1992, 4: 760-765.
- [28] Minagar A, Maghzi AH, McGeer JC, et al. Emerging roles of endothelial cells in multiple sclerosis pathophysiology and therapy[J]. *Neurol Res*, 2012, 34: 738-745.
- [29] Verderio C, Muzio L, Turola E, et al. Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation[J]. *Ann Neurol*, 2012, 72: 610-624.
- [30] Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, et al. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis[J]. *Brain*, 2007, 130: 1194-1205.
- [31] Lee J, McKinney KQ, Pavlopoulos AJ, et al. Exosomal proteome analysis of cerebrospinal fluid detects biosignatures of neuromyelitis optica and multiple sclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 462: 118-126.
- [32] 操亚云, 刘潺潺, 桂梦翠, 等. 晚发型重症肌无力的临床特点及预后研究[J]. *神经损伤与功能重建*, 2017, 12: 514-517.
- [33] Yin W, Ouyang S, Luo Z, et al. Immature Exosomes Derived from MicroRNA-146a Overexpressing Dendritic Cells Act as Antigen-Specific Therapy for Myasthenia Gravis[J]. *Inflammation*, 2017, 40: 1460-1473.
- [34] Bu N, Wu HQ, Zhang GL, et al. Immature dendritic cell exosomes suppress experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. *J Neuroimmunol*, 2015, 285: 71-75.
- [35] Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, et al. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 10977-10989.
- [36] Vingtdeux V, Sergeant N, Buee L. Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease[J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 229.
- [37] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, et al. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 42: 360-367.
- [38] Winer JR, Maass A, Pressman P, et al. Associations Between Tau, beta-Amyloid, and Cognition in Parkinson Disease[J]. *JAMA Neurol*, 2018, 75: 227-235.

(本文编辑:唐颖馨)