

外泌体应用于创伤性脑损伤诊断及治疗的研究进展

张国禄¹, 王健², 陈凌²

1. 中国人民解放军总医院第三医学中心急诊医学科, 北京市 100010

2. 中国人民解放军总医院第一医学中心神经外科医学部, 北京市 100010

摘要: 创伤性脑损伤 (TBI) 是常见的致残和死亡原因, 已经成为世界性的公共卫生问题。当前对于 TBI 的诊断主要依赖于完整的病史、体格检查和影像学检查, 传统的实验室检测很少发挥作用。外泌体作为细胞分泌的囊泡, 含有大量亲代细胞的信息物质, 是细胞间通讯的重要组成部分。得益于其穿过血脑屏障 (BBB) 的能力, 外泌体用于 TBI 的诊断具有非常大的潜力。当前用于 TBI 的主要治疗方式包括外科手术、康复训练和有限的自发功能恢复, 尚无明确有效药物治疗方案。越来越多的研究证明, 外泌体能够调节 TBI 后炎症, 促进神经、血管再生和维持血脑屏障完整性, 从而改善 TBI 预后。该文旨在对外泌体应用于 TBI 诊断及治疗的最新研究进展进行综述。

关键词: TBI; 外泌体; 诊断; 治疗

中图分类号: R651.15

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.05.011

Research progress in application of exosomes in diagnosis and treatment of traumatic brain injury

ZHANG Guo-Lu¹, WANG Jian², CHEN Ling². 1. Department of Emergency Medicine, Third Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100010, China; 2. Department of Neurosurgical Medicine, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100010, China

Corresponding author: CHEN Ling, male, Chief Physician, professor, PhD Tutor. Mainly engaged in Comprehensive treatment of brain tumor and Traumatic brain injury rehabilitation. Email: chen_ling301@163.com

Abstract: Traumatic brain injury (TBI), a common cause of disability and death, has been a worldwide public health problem. Currently, the diagnosis of TBI mainly depends on complete medical history, physical examination, and radiological examination, and conventional laboratory tests rarely play a role. Exosomes, acting as important components of intercellular communication, are cell-derived vesicles containing information of parental cells. With the capacity of crossing the blood-brain barrier, exosomes hold substantial promise for diagnosing TBI. At present, the main treatment modalities for TBI include surgical operation, rehabilitation training, and limited spontaneous functional recovery, but there is no clear and effective medication. More and more studies have shown that exosomes can regulate inflammation after TBI, promote neurovascular regeneration, and maintain the integrity of the blood-brain barrier, thus improving the prognosis of TBI. This article reviews the latest research progress in the application of exosomes in the diagnosis and treatment of TBI.

Key words: traumatic brain injury; exosomes; diagnosis; treatment

据估计每年全球创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 发病率约为 939 例/10 万, 其中轻度 81.02%, 中度 11.04%, 重度 7.95% (这是被引用文献的原始数据), 最常见的原因因为交通事故所

基金项目: 国家自然科学基金 (81870986)

收稿日期: 2020-08-05; 修回日期: 2020-09-23

作者简介: 张国禄 (1990-) 男, 主治医师, 硕士学位, 主要从事神经创伤相关课题的研究。E-mail: zhangguolu.wjxy@163.com。

通信作者: 陈凌, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师。主要从事颅脑肿瘤的综合救治及脑外伤修复。E-mail: chen_ling301@163.com。

造成的头部损伤^[1]。美国 TBI 患者多为男性,儿童、青少年和 65 岁以上的成年人最有可能受到脑外伤。特别是年龄在 75 岁以上的老年人,因跌倒造成 TBI 住院和死亡的比率最高。此外,外伤死亡的病例中,有大约三分之一是 TBI 造成的,另有 250 万~650 万人生活在 TBI 相关的残疾中^[2]。损伤急性期内,病情可能得到有限的好转,之后恢复速度会逐渐减缓,其恢复情况主要受损伤严重程度的影响^[3]。因 TBI 住院的患者中最终有 43% 致残^[4],他们常常终生伴随着认知缺陷、记忆受损、运动障碍、听力和视力丧失、癫痫以及心理问题。与其他常见的神经系统疾病(如中风和阿尔茨海默氏病)相比,TBI 在年轻人群中更为普遍,导致劳动力大量丧失。外泌体是细胞产生的 30~100 nm 之间的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs),可以双向穿过血脑屏障,并在人体内维持其内信号分子的稳定,从而在中枢神经系统和血液中建立有效的物质交换。对血液中神经源性外泌体的检测、分析有助于了解 TBI 后中枢神经系统的病理生理情况,进而做出诊断甚至分型、分级。而对外泌体成分进行改造后,通过静脉给药的方式即可有效进入到中枢神经系统中,发挥对 TBI 的治疗作用。

1 外泌体

1.1 外泌体的生成

EVs 起源于细胞内体或质膜,几乎所有细胞都能够产生,并释放到胞外,在细胞间的生理和病理过程中起着重要的作用。最初外泌体被认为是细胞代谢废物。而最新的研究指出,外泌体在细胞间通讯过程中发挥重要作用,参与到多种生理、病理进程,包括促进血管生成,免疫调节,组织重塑中。

外泌体来源于内体系统,早期内体成熟过程中包膜不断向内凹陷,在内体内形成腔内囊泡(intraluminal vesicles, ILVs)。在这个过程中,蛋白质、核酸和脂质经过筛选后进入到 ILVs 中^[5]。含有大量 ILVs 的晚期内体也被称为多囊体(multivesicular bodies, MVBs),MVBs 可以与溶酶体结合而被降解,也可以与细胞膜融合后将 ILVs 释放到细胞外,形成外泌体。外泌体生成暨 MVBs 的成熟过程十分的复杂,内体分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)在其中发挥了最主要的作用^[6]。ESCRT 机制涉及 ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III 和囊泡蛋白分选相关蛋白(vacuolar protein sorting 4, VPS4) 5 个核心复合体,

促进 ILVs 的出芽和释放到 MVBs 腔内。ESCRTs 能够识别包括表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在内的被泛素化修饰的细胞成分,并对其进行筛选,这一功能依赖于 ESCRTs 的泛素结合结构域。ESCRT-0 含有 Hrs 和 STAM 2 个子单元,每个子单元中都含有 2 个泛素结合结构域(ubiquitin binding domains, UBD);ESCRT-1 的 Tsg101 亚基和 UBAP1 亚基和 ESCRT-II 中的 Vps36 亚基也含有泛素结合结构域。ESCRT-III 不含类似结构,而是作为核心于上述复合体组装成为与膜结合的丝状结构,并与 Vps4 结合共同对膜结构进行重塑^[7],使 MVBs 膜向内凹陷并最终于其脱离。ESCRT 途径能够与 Syntenin 和 ALG-2 相互作用蛋白 X(ALG-2 interacting protein X, ALIX)相互作用,ALIX 能够连接内容物和 ESCRT-III 空泡蛋白分类相关蛋白 32(vacuolar protein sorting associated protein 32, Vps32)^[6]。哺乳动物细胞培养的研究表明,ESCRT 功能的完全破坏并不能消除 ILVs 的形成,而是影响特定 ILVs 的形成^[8]。这说明在 ESCRT 之外,还有其他的机制存在。如当前已知的有四跨膜蛋白超家族(Tetraspanins)成员包括 CD9 和 CD82、Tspan8、CD63, Rab 蛋白包括 RAB11、Rab27a、Rab27b 等,以及溶酶体/晚期内体的小整合膜蛋白(small integral membrane protein of the lysosome/late endosome, SIMPLE)等。作为外泌体的外膜,脂质对外泌体的形成也非常的重要^[9]。外泌体中的胆固醇、鞘磷脂的含量高于母细胞,因而可以认为酯筏、胆固醇亚膜结构域也在外泌体的形成过程中发挥了重要的作用。离体实验中,小鼠少突胶质细胞外泌体的释放取决于产生神经酰胺的中性鞘磷脂酶(Sphingomyelinase, nSMase)的活性,而不依赖于 ESCRT 的功能,产生的神经酰胺可以通过其特有的锥形结构促进 MVBs 膜出芽形成 ILVs。其代谢产物鞘氨醇磷脂(S1P)能够与 MVBs 膜上的受体结合,促进外泌体分泌。被细胞释放后,脂质膜保护外泌体内容物不被酶消化,并促进受体细胞的摄取。

1.2 大脑中的外泌体

大脑中的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞等多种细胞都能够分泌外泌体。外泌体是中枢神经系统神经元和胶质细胞之间重要的通讯方式,通过参与和调节神经元的成熟和修复以及突触的活性和可塑性,对神经元的生理功能起着至关重要的作用。

大脑中的外泌体携带有大量 miRNA 和蛋白质,是细胞间信息交流中发挥的重要方式,在生理和病理条件下都发挥着重要的作用,能够反映亲代细胞的状态。并且能够通过血脑屏障,在脑脊液、血液、尿液、唾液或者乳汁等多种体液中得到提纯^[10]。脑脊液与蛛网膜下腔和脑室系统直接联通,其中的外泌体能够较好的反映大脑的生理、病理变化,是最理想的神经源性外泌体来源。但是脑脊液作为获取大脑源性外泌体的来源存在以下几个不足:①样本收集困难,而且具有一定的风险;②样本量受限;③受人群、年龄、生活习惯等影响较大。在临床工作中,血液是最常用的体液样本,如果以血液作为大脑源性外泌体来源,则能避免上述问题。

在实验室条件下,对血浆外泌体中的特异性蛋白和核酸进行检测,有望作为多种神经系统疾病的早期诊断方案,包括脑肿瘤鉴别和分级,以及脑卒中、癫痫、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化和朊病毒相关疾病等多种神经退行性疾病。

2 外泌体与 TBI 诊断

严重的 TBI 具有显著的临床和影像学表现,通过格拉斯哥昏迷评分量表 (Glasgow coma scale, GCS) 评分和影像学检查能够及时、明确的做出诊断。但对于慢性创伤性脑病 (chronic traumatic encephalopathy, CTE),特别是军人^[11]和运动员^[12]等容易在训练、比赛和军事行动中反复受到轻中度的 TBI 的特殊人群,往往由于无明显症状和影像学表现而很难做出诊断。临床中急需可靠的生物标志物作为 TBI 诊断标准,相关研究也成为了 TBI 研究的热点。近些年的研究中发现了多种有潜力作为标志物的蛋白和 RNA,但是很少被批准应用于临床诊断。究其原因,包括以下 2 点:一是血脑屏障的存在,使得蛋白质、核酸等生物大分子很难进入到外周血液;其次,这些生物标志物很可能被内源性酶类快速降解。导致外周血液中 TBI 生物标志物的浓度非常低,给提纯和检测造成了较大的困难。而外泌体能够有效的通过血脑屏障,并保持自身内分子稳定性,同时对外泌体提纯后,从中分离得到的生物大分子能够保持在相对较高的浓度。刚好弥补了以上不足,具有非常高的临床应用价值。

2.1 血浆中神经源性外泌体蛋白质作为 TBI 的诊断指标

在发生 TBI 后,患者血浆中神经源性外泌体及

其标志物水平出现改变。与对照组相比,急性 mTBI 组血浆神经源性外泌体浓度降低了 45%,同时,外泌体中一系列功能性脑蛋白如小 G 蛋白 10 (ras-related small GTPase 10, RAB10)、泛素羧基末端水解酶 L1 (UCHL1)、annexin VII、钠钾氯共转运体 1 (sodium-potassium-chloride cotransporter 1, NKCC-1)、片段化的 A II 和 claudin-5 的水平也发生了变化^[13]。另外一项研究中也发现类似的现象,在 TBI 后的 3~12 个月内细胞型朊蛋白 (cellular prion protein, PrPc)、突触蛋白 3 (synaptogyrin-3)、P-T181-tau (tau phosphorylated at threonine 181)、P-S396-tau、 β 样淀粉蛋白 42 (A β 42) 和白介素-6 (Interleukin-6, IL6) 等神经源性外泌体标志物水平升高,部分蛋白水平甚至可以维持十余年^[14]。这些蛋白的功能包括调节突触形成和活性、神经元囊泡的生成、促进清除受损细胞蛋白、构成和调节神经元细胞镁离子转运和功能、以及维持神经结构和血脑屏障 (blood-brain-barrier, BBB) 的紧密性,能够反映 TBI 后中枢神经系统功能和修复情况。血浆中的星形细胞源性外泌体 (astrocyte derived exosomes, ADEs) 水平在 TBI 后首先降低,并逐渐回复中正常水平。其内的各种神经毒性补体蛋白水平随疾病进展在不同时期交替升高和降低,即使是在数十年后依然能够检测到异常^[15]。这说明外泌体蛋白水平的变化不仅能够对 TBI 进行诊断,甚至可以对 TBI 患者进行分期。TBI 后小鼠外泌体中的 Tau 及磷酸化 Tau 水平上升。这些外泌体能够诱导神经元凋亡和兴奋性突触后电位 (miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSC) 损害,加剧 TBI 导致的慢性进展性损伤,进而加重运动和认知功能障碍,往往预示着较差的预后^[16]。有研究人员将 TBI 患者按照 GCS 评分进行分组,并对其血浆外泌体进行分离和研究,共筛选出了 186 种 TBI 相关蛋白。在 GCS 评分为 15 分、9~12 分和 3~8 分的患者中分别发现了 6、16 和 14 种特异性的蛋白^[17]。GCS 是临床中最常用的量表,能够对 TBI 患者损伤程度进行分级,并对预后进行估计。因此,这些蛋白应用于临床后能够在一定程度上达到相同的作用,并有效避免主观因素对结果造成影响。

2.2 血液中神经源性外泌体 RNA 作为 TBI 的诊断指标

miRNA 能够以碱基配对的形式与 mRNA 非编码结构结合,进而在基因转录后水平对蛋白质合成

过程进行调控。反过来也可以反映细胞的生理、病理改变,作为 TBI 的生物标志。在小鼠 mTBI 模型中,不同程度的脑损伤能够造成脑组织中钙离子信号、突触、轴突引导调节通路的 miRNA 表达不同程度的改变^[18]。当前针对血浆和血清 miRNA 作为 TBI 的诊断指标研究中确认了 10 个能够对轻度、中度和重度 TBI 进行诊断的 miRNA 序列。包括 miR-151-5p、miR-195、miR-20a、miR-328、miR-362-3p、miR-30d、miR-451、miR-486、miR-505 以及 miR-92a^[19]。TBI 患者血清中 miR-93、miR-191 和 miR-499 水平均高于对照组,重度 TBI 患者高于中、轻度 TBI 患者。而较高水平的 miR-93、miR-191 和 miR-499 也预示预后较差。这 3 个 miRNA 能够作为 TBI 诊断、严重程度和预后判断的指标^[20]。

但是神经源性 miRNA 在血浆中易降解且在浓度低,限制了其在 TBI 诊断中的应用,神经源性外泌体能够携带 miRNA 通过 BBB,并维持内部 miRNA 的稳定存在,且具有相对高的浓度,具有非常大的潜力。Wang 等在 TBI 大鼠血清外泌体中发现了 31 个上调的 miRNA 和 19 个下调的 miRNA,涉及到 MAPK 信号通路、肌动蛋白骨架调控、Rap1 信号通路和 Ras 信号通路^[21]。

Hemphill 等开发了通过一种纳米流体免疫磁性技术提纯外泌体并结合芯片和机器学习的方法对其中的 miRNA 进行分析,将一组而不是单个生物标记作为 TBI 分级和诊断的指标。在实验中,对外伤组与假手术组小鼠正确识别率达到 99%。甚至能够有效分析损伤程度、损伤时间、既往损伤病史等信息^[22]。这无疑将外泌体对 TBI 的诊断和分级向临床应用推进了一大步。

3 外泌体与 TBI 的治疗

对外泌体的研究起源于间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 治疗脑外伤的研究,研究人员发现只有小部分 MSC 能够存活,而能够转化为神经元细胞的数量更少,其促进脑损伤后修复的作用有赖于分泌的活性因子,并在分离旁分泌因子时发现了外泌体的治疗效应^[23]。研究表面,在脑损伤后给予 MSC 源性的外泌体与给予 MSC 几乎具有相同的治疗效果^[24]。与细胞治疗方案相比,外泌体不会在宿主组织中增殖,免疫原性较低,更容易储存和被受体细胞摄取,能够更好的通过各种生理屏障。与人工合成的载体系统相比,外泌体内源性的表面成分使其在血液循环中更加稳定,同时能够

躲过细胞吞噬和免疫系统,作为内源性的天然载体系统,能够避免内体和溶酶体的降解,更有效的运输各种有效成分特别是容易降解的各种 RNA,是一种非常理想的给药方式。

3.1 外泌体对 TBI 治疗效果

对于中枢神经系统治疗中,一个非常重要的限制因素就是 BBB 的选择性通过。外泌体主要通过跨细胞途径穿过脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs),然后依次经过胞吞、MVB 形成和胞吐,进入到中枢神经系统^[25]。荧光追踪显示:外泌体在静脉给药后 1h 主要分布于腹部,并以脾脏信号强度最高,在数小时后开始进入大脑,在第 3 天达到较高的水平并持续增长到第 7 天^[26]。

外泌体能够上调紧密连接蛋白水平,修复 BBB,保持其完整性,进而减轻外伤后脑水肿^[27]。同时促进血管生成、提高血管密度,促进齿状回神经再生和成熟并有效抑制神经炎症,有效改善 TBI 大鼠的空间学习能力和感觉、运动功能恢复^[28]。在 TBI 和出血性卒中猪模型早期给予外泌体治疗能够减轻脑肿胀,减小损伤面积,降低蛋白渗出,降低颅内压并增加脑灌注压^[29]。与对照组 TBI 猪模型相比,早期接受外泌体治疗组能够减轻损伤、缩小损伤灶体积,抑制炎症和细胞凋亡^[30],神经功能恢复的时间缩短,更早通过神经认知能测试^[31]。对成年恒河猴皮质损伤的研究中,外泌体治疗能够减少灵长类动物皮质损伤后炎症,增强皮层的可塑性。接受外泌体治疗的猴子与接受药物治疗的猴子相比,在第 3~5 周的恢复期中,其精细运动功能恢复增强^[32]。

TBI 的早期即可出现局部和全身的炎症反应,在神经元死亡、继发性损伤和功能恢复中发挥十分重要的作用。在 LI 等对脱落的乳牙中干细胞所分泌的外泌体的研究中发现,外泌体能够改变小胶质细胞 M1 极化来改善 TBI 后神经功能恢复。外泌体能够降低脑组织中小胶质细胞的密度,抑制 M1 型小胶质细胞极化并促进 M2 型小胶质细胞极化,进而对促炎刺激产生强烈的反应,降低肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、CD68 和一氧化氮 (NO) 代谢所生成的具有神经毒性的亚硝酸盐水平^[33]。骨髓间充质干细胞对小胶质细胞极化的调整依赖于对诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、CD206 和精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg1) 表达的调节,实验中同样观察

到 TNF- α 和 IL6 β 表达水平发生变化^[34]。

3.2 外泌体 RNA 治疗 TBI 的分子机制

外泌体中含有大量的 miRNA, 能够与目标 mRNA 上的互补序列结合, 在转录后水平调节基因表达。当前研究结果, 外泌体的治疗效应主要来自于其中含有的大量 miRNA, 在神经元与胶质细胞的细胞通讯过程中发挥了十分重要的作用。

小胶质细胞是中枢神经系统中最主要的免疫细胞, 在 TBI 后呈现 M1 和 M2 两种极化状态, 在神经炎症中起到关键作用, M1 产生促进炎和细胞毒性介质, 阻碍 CNS 修复甚至加重损伤, M2 产生神经保护因子, 促进神经再生、血管生成、和髓鞘再生^[35], 是对 TBI 进行干预的重要靶点。小胶质细胞源性外泌体 miR-124-3P 水平升高, 增加损伤神经元内 miR-124-3P 水平, 进而抑制由 FIP200 介导的损伤神经元自噬, 进而发挥脑保护作用^[36]。升高的 miR124-3p 能够促进具有抗炎效应的 M2 细胞极化, 或者直接作用于磷酸二酯酶 4B, 通过抑制 mTOR 信号通路而抑制神经炎症^[37]。小胶质细胞外泌体中的 miR124-3p 进入神经元后能够促进轴突生长^[37]。特别是在重复轻度损伤模型中, 能够靶向作用于 RelA/ApoE 信号通路, 促进 β -淀粉样蛋白水解, 降低继发性神经功能减退的发生^[38]。在另一项研究中, 含有 miR-124 的外泌体能够抑制 TBI 后海马区 TLR4 信号通路, 促进小胶质细胞向 M2 细胞分化, 促进海马区神经再生, 从而改善神经功能预后^[39]。M2 细胞源性外泌体中的 miR-124 能通过调节神经元 UPS14 表达而发挥脑保护作用^[40]。

神经元损伤后借助外泌体向小胶质细胞内传递 miR-21-5p, 促进小胶质细胞极化为 M1 细胞表型, 并使其中 miR-21-5p 水平上升, 同时释放出多种炎症因子, 从而加重神经炎症、抑制突触增长、诱导神经元细胞凋亡^[41]。但是当这些外泌体被神经元细胞摄取后能够靶向作用于 RAB11a, 从而抑制神经元自噬, 减少 TBI 所造成的神经损伤^[42]。

TBI 激活的星形胶质细胞所产生的外泌体中所富含的 miR873a-5p 能够促进 M1 型小胶质细胞向 M2 表型转化, 同时能够通过抑制 Myd88 表达和 ERK 和 NF- κ B p65 的磷酸化促进小胶质细胞向 M2 表型转化, 减少 TBI 小鼠脑实质破坏、脑水肿及神经功能缺陷^[43]。

神经元源性的外泌体能够通过向内皮细胞传递 miR132 改善 BBB 的完整性, 进一步研究认为

miR-132 能够解除 eEF2K、eEF2 对血管内皮细胞钙黏蛋白 (VE-cadherin) 的抑制作用, VE-cadherin 是黏连蛋白的一种, 对于维持脑血管的完整性有非常重要的作用^[44]。

神经元和神经胶质细胞来源的外泌体对 TBI 的治疗具有非常可观的价值。但是受到其亲代细胞的限制很难在体外进行大量的生产。而 MSC 具有来源广、易获取、易培养、增殖能力强的特点, 同时具有强大的免疫调节能力^[45], 更重要的是该细胞具有很强的可塑性^[46], 是更加理想的外泌体来源, 也是外泌体治疗的热点生物材料。

小鼠脑组织提取物能够导致 MSC 中的 miR133-b 水平上升, 并在外泌体的介导下进入到星形胶质细胞和神经元中, 促进轴突的生长^[47]。脊髓损伤后, 脊髓内 miR133-b 水平出现下降, 给予 MSC 源性的含有 miR133-b 的外泌体能够改善脊髓功能恢复, 减少损伤体积并保护神经元, 同时能够促进轴突生长。进一步的研究显示, 其神经保护作用依赖于 CRBE 和 STAT3 的磷酸化信号通路^[48]。在出血性脑卒中大鼠模型中, 升高的 miR-133b 能够抑制同源基因家族成员 A (homolog gene family member A, RhoA) 表达, 并且促进 ERK1/2-CREB 磷酸化, 发挥抗凋亡作用, 减轻脑损伤^[49]。而在缺血性脑卒中大鼠模型体内, miR-133b 在抑制 RhoA 的同时调节星形胶质细胞中结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 表达^[50]。

MSC 源性外泌体对早期脑损伤 (early brain injury, EBI) 治疗的研究中, 外泌体中的 miR129-5p 能够抑制蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 后高迁移率族蛋白 1 (high-mobility group box 1 protein, HMGB1) 和 Toll 样受体-4 (Toll-like receptor-4, TLR4) 表达水平的上升, 发挥抗炎、抗凋亡作用, 进而提高 SAH 小鼠存活率^[51]。MSC 在脑源性神经生长因子的作用下能够分泌 miR-216a-5p, 能够抑制 HMGB1/NF κ B 信号通路, 减少 H₂O₂ 对细胞的氧化应激。同时增强神经元迁移, 抑制细胞凋亡促进神经再生, 改善 TBI 大鼠感觉运动功能和空间学习能力^[52]。含有 miR193b-3p 的外泌体应用于小鼠 SAH 模型时, 能够抑制 HDAC3 的表达及活性, 进而提高 NF- κ B p65 磷酸化, 降低 IL-1 β 、IL-6, 和 TNF- α 等促炎细胞因子水平。从而减轻 SAH 诱导的脑水肿血脑屏障损伤和神经退行性改变, 改善预后^[53]。

在 miRNA 之外, MSC 源性外泌体中的长链非编码 RNA MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) 能够调控包括 snoRNA 在内的其他非编码 RNA 的表达, 并通过调节炎症相关信号通路、细胞周期、细胞死亡和再生等分子信号通路促进运动功能恢复, 并减少损伤体积^[26]。

外泌体中的各种 RNA 特别是 miRNA 在调节炎症、抗凋亡、促进神经细胞再生、维持血脑屏障稳定性及对于 TBI 后神经损伤的控制具有关键性的作用, 几乎涉及到神经损伤和修复的方方面面。因此, 外泌体 RNA 是针对 TBI 非常理想的治疗手段。

3.3 外泌体治疗 TBI 的研究方向

外泌体是一种非常有潜力的 TBI 治疗手段, 但是其中含有的 miRNA 种类繁多, 其效应可能远超我们的认识, 有研究发现 MSC 源性的外泌体在其他系统包括循环系统、泌尿系统、消化系统、呼吸系统等多个系统, 产生不同的效应, 并影响到造血、创伤修复、骨骼愈合等生理、病理过程。甚至同一种 miRNA 分子在不同的靶器官中也发挥着不同的作用, 有研究发现啮齿类动物大脑缺血时所产生的内皮细胞源性外泌体能够加重心力衰竭^[54], 外泌体中的 miR-215-p 在影响神经损伤预后的同时对心肌收缩功能^[55]和再生潜能^[56]产生影响。因此, 在应用于临床治疗中必须增强外泌体的特异性, 能够有效提高其在中枢神经系统中的浓度, 同时避免对其他系统和生理过程产生不利的影响。

离体和在体实验中, 血液中含有大量的外泌体能够在转铁蛋白及其受体的作用下对大脑具有天然的靶向性^[57], 部分外泌体携带亲代细胞膜上的细胞特异性蛋白质, 例如少突胶质细胞源性外泌体中髓鞘蛋白, 具有独特的归巢选择性^[58], 幼稚巨噬细胞源性的外泌体借助淋巴细胞功能相关抗原-1 (lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1) 和细胞间黏附分子 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) 穿过血脑屏障向脑细胞输送脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)^[59]。

这说明我们可以对外泌体亲代细胞或者外泌体自身进行改造, 在外泌体表面加载特异性标签使其具有组织特异性。狂犬病病毒对于神经系统具有非常强的特异性, 其特异性主要来源于其表面的糖蛋白 RVG 与神经元、小胶质细胞和少突胶质细胞表面的烟酰乙酰胆碱受体的特异性结合。表达有 RVG 多肽融合的外泌体能够特异性的与大脑中

的神经元、小胶质细胞和少突胶质细胞融合, 并将 siRNA 和 miRNA 导入到靶细胞中, 发挥基因调节作用^[60], 或者抑制神经炎症等作用^[53]。携带有 RVG 标签的外泌体对小鼠的皮层和海马区表现出更强的靶向性, 在减少促炎因子的同时, 有效的提高抗炎因子水平, 在动物实验中能够更有效的抑制星形胶质细胞活化, 改善小鼠认知功能^[61]。但是, 病毒衍生蛋白具有免疫原性而存在一定的潜在风险, 而人工合成的多肽则更加安全并且更为简便易行, 研究人员采用生物正交无铜叠氮炔环加成反应 (bio-orthogonal copper-free azide alkyne cyclo-addition) 方法将与 $\alpha v \beta 3$ 整合蛋白具有高度亲和力的环形短肽 (Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) c (RGDyK) 加载到外泌体表面, 使其对小鼠缺血脑组织具有非常强的特异性, 能够被神经元和星形胶质细胞摄取^[62]。经过选择或者改造的外泌体, 不仅能够对脑组织具有靶向性, 甚至能够应用于缺血、炎症等特殊条件^[59], 是非常有前景的 TBI 治疗方案。

4 展望

综上所述, 外泌体所具有的内源性、稳定性等特点, 对完整的血脑屏障具有双向的通过性, 使其能够作为载体在中枢神经系统和血液循环中进行双向物质传递。因此既可以作为窥探中枢神经系统的窗口, 又能够将各种有效成分, 特别是各种 miRNA 和药物导入到神经系统中, 发挥治疗效果。改造后的外泌体具有较强的特异性, 能够减少对其他组织、器官和系统产生不良反应。对于 TBI 的诊断、进展、治疗和神经功能恢复具有难以替代的作用, 是一种非常有潜力的诊断和治疗方案。但是, 外泌体在应用过程中还受到限制。诊断方面: ①虽然血液是理想的外泌体来源, 但是其中混杂的大量其他组织来源胞外囊泡会对诊断产生干扰, 这就要求在今后能够进一步完善外泌体的分离和筛选技术。②神经源性外泌体中含有大量 RNA、蛋白质, 需要后续大量的数据筛选工作才能建立其与 TBI 诊断和分级的对应关系, 人工智能、机器学习的加入则有助于解决这一问题。治疗方面: ① MSCs 是外泌体的理想获得方式, 但是其 RNA、蛋白质成分复杂, 效应难以预测。②达到理想治疗效果还需要外泌体对中枢神经系统具有更好的特异性。而对外泌体进行改造, 要求我们对外泌体形成过程中 RNA、蛋白质的分选、装载过程进行更深一步的研究。通过人工合成的方式合成外泌体或者代替物,

实现成分、结构完全可控则是获得外泌体最理想的方式。

参 考 文 献

- [1] Dewan MC, Rattani A, Gupta S, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury [J]. *J Neurosurg*, 2019, 130(4): 1080-1097.
- [2] Taylor CA, Bell JM, Breiding MJ, et al. Traumatic brain injury-related emergency department visits, hospitalizations, and deaths - United States, 2007 and 2013 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2017, 66(9): 1-16.
- [3] Corrigan JD, Zheng T, Pinto SM, et al. Effect of preexisting and co-occurring comorbid conditions on recovery in the 5 years after rehabilitation for traumatic brain injury [J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2020, 35(3): E288-E298.
- [4] Ma VY, Chan L, Carruthers KJ. Incidence, prevalence, costs, and impact on disability of common conditions requiring rehabilitation in the United States: stroke, spinal cord injury, traumatic brain injury, multiple sclerosis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, limb loss, and back pain [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2014, 95(5): 986-995. e1.
- [5] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [6] Larios J, Mercier V, Roux A, et al. ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes [J]. *J Cell Biol*, 2020, 219(3): e201904113.
- [7] McCullough J, Frost A, Sundquist WI. Structures, functions, and dynamics of ESCRT-III/Vps4 membrane remodeling and fission complexes [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2018, 34: 85-109.
- [8] Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, et al. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs [J]. *Traffic*, 2009, 10(7): 925-937.
- [9] Skotland T, Hessvik NP, Sandvig K, et al. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(1): 9-18.
- [10] Wu XQ, Zheng TT, Zhang BR. Exosomes in parkinson's disease [J]. *Neurosci Bull*, 2017, 33(3): 331-338.
- [11] Swanson TM, Isaacson BM, Cyborski CM, et al. Traumatic brain injury incidence, clinical overview, and policies in the US military health system since 2000 [J]. *Public Health Rep*, 2017, 132(2): 251-259.
- [12] Vanitallie TB. Traumatic brain injury (TBI) in collision sports: Possible mechanisms of transformation into chronic traumatic encephalopathy (CTE) [J]. *Metabolism*, 2019, 100S: 153943.
- [13] Goetzl EJ, Elahi FM, Mustapic M, et al. Altered levels of plasma neuron-derived exosomes and their cargo proteins characterize acute and chronic mild traumatic brain injury [J]. *FASEB J*, 2019, 33(4): 5082-5088.
- [14] Goetzl EJ, Peltz CB, Mustapic M, et al. Neuron-derived plasma exosome proteins after remote traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2020, 37(2): 382-388.
- [15] Goetzl EJ, Yaffe K, Peltz CB, et al. Traumatic brain injury increases plasma astrocyte-derived exosome levels of neurotoxic complement proteins [J]. *FASEB J*, 2020, 34(2): 3359-3366.
- [16] Wang B, Han S. Exosome-associated tau exacerbates brain functional impairments induced by traumatic brain injury in mice [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2018, 88: 158-166.
- [17] Moyron RB, Gonda A, Selleck MJ, et al. Differential protein expression in exosomal samples taken from trauma patients [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2017, 11(9-10): 1700061.
- [18] Chandran R, Sharma A, Bhomia M, et al. Differential expression of microRNAs in the brains of mice subjected to increasing grade of mild traumatic brain injury [J]. *Brain Inj*, 2017, 31(1): 106-119.
- [19] Bhomia M, Balakathiresan NS, Wang KK, et al. A panel of serum miRNA biomarkers for the diagnosis of severe to mild traumatic brain injury in humans [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28148.
- [20] Yang T, Song JX, Bu XM, et al. Elevated serum miR-93, miR-191, and miR-499 are noninvasive biomarkers for the presence and progression of traumatic brain injury [J]. *J Neurochem*, 2016, 137(1): 122-129.
- [21] Wang PC, Ma HL, Zhang YX, et al. Plasma exosome-derived MicroRNAs as novel biomarkers of traumatic brain injury in rats [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(4): 437-448.
- [22] Ko J, Hemphill M, Yang Z, et al. Diagnosis of traumatic brain injury using miRNA signatures in nanomagnetically isolated brain-derived extracellular vesicles [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(23): 3617-3630.
- [23] Das M, Mayilsamy K, Mohapatra SS, et al. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of traumatic brain injury: progress and prospects [J]. *Rev Neurosci*, 2019, 30(8): 839-855.
- [24] Zhang Y, Chopp M, Zhang ZG, et al. Systemic administration of cell-free exosomes generated by human bone marrow derived mesenchymal stem cells cultured under 2D and 3D conditions improves functional recovery in rats after traumatic brain injury [J]. *Neurochem Int*, 2017, 111: 69-81.
- [25] 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.

- [26] Patel NA, Moss LD, Lee JY, et al. Long noncoding RNA MALAT1 in exosomes drives regenerative function and modulates inflammation-linked networks following traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 204.
- [27] Gao WW, Li F, Liu L, et al. Endothelial colony-forming cell-derived exosomes restore blood-brain barrier continuity in mice subjected to traumatic brain injury [J]. *Exp Neurol*, 2018, 307: 99-108.
- [28] Zhang YL, Chopp M, Meng YL, et al. Effect of exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury [J]. *J Neurosurg*, 2015, 122(4): 856-867.
- [29] Williams AM, Bhatti UF, Brown JF, et al. Early single-dose treatment with exosomes provides neuroprotection and improves blood-brain barrier integrity in swine model of traumatic brain injury and hemorrhagic shock [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2020, 88(2): 207-218.
- [30] Williams AM, Wu Z, Bhatti UF, et al. Early single-dose exosome treatment improves neurologic outcomes in a 7-day swine model of traumatic brain injury and hemorrhagic shock [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2020, 89(2): 388-396.
- [31] Williams AM, Denny IS, Bhatti UF, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes provide neuroprotection and improve long-term neurologic outcomes in a swine model of traumatic brain injury and hemorrhagic shock [J]. *J Neurotrauma*, 2019, 36(1): 54-60.
- [32] Moore TL, Bowley BGE, Pessina MA, et al. Mesenchymal derived exosomes enhance recovery of motor function in a monkey model of cortical injury [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2019, 37(4): 347-362.
- [33] Li Y, Yang YY, Ren JL, et al. Exosomes secreted by stem cells from human exfoliated deciduous teeth contribute to functional recovery after traumatic brain injury by shifting microglia M1/M2 polarization in rats [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 198.
- [34] Ni HQ, Yang S, Siaw-Debrah F, et al. Exosomes derived from bone mesenchymal stem cells ameliorate early inflammatory responses following traumatic brain injury [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 14.
- [35] Devanney NA, Stewart AN, Gensel JC. Microglia and macrophage metabolism in CNS injury and disease: the role of immunometabolism in neurodegeneration and neurotrauma [J]. *Exp Neurol*, 2020, 329: 113310.
- [36] Li D, Huang S, Yin ZY, et al. Increases in miR-124-3p in microglial exosomes confer neuroprotective effects by targeting FIP200-Mediated neuronal autophagy following traumatic brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(8): 1903-1923.
- [37] Huang S, Ge XT, Yu JW, et al. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons [J]. *FASEB J*, 2018, 32(1): 512-528.
- [38] Ge XT, Guo MT, Hu TP, et al. Increased microglial exosomal miR-124-3p alleviates neurodegeneration and improves cognitive outcome after repetitive mild traumatic brain injury [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(2): 503-522.
- [39] Yang YX, Ye YQ, Kong CG, et al. MiR-124 enriched exosomes promoted the M2 polarization of microglia and enhanced hippocampus neurogenesis after traumatic brain injury by inhibiting TLR4 pathway [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(4): 811-828.
- [40] Song YY, Li ZW, He TT, et al. M2 microglia-derived exosomes protect the mouse brain from ischemia-reperfusion injury via exosomal miR-124 [J]. *Theranostics*, 2019, 9(10): 2910-2923.
- [41] Yin ZY, Han ZL, Hu TP, et al. Neuron-derived exosomes with high miR-21-5p expression promoted polarization of M1 microglia in culture [J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 83: 270-282.
- [42] Li D, Huang S, Zhu JL, et al. Exosomes from MiR-21-5p-increased neurons play a role in neuroprotection by suppressing Rab11a-mediated neuronal autophagy in vitro after traumatic brain injury [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1871-1885.
- [43] Long XB, Yao XL, Jiang Q, et al. Astrocyte-derived exosomes enriched with miR-873a-5p inhibit neuroinflammation via microglia phenotype modulation after traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 89.
- [44] 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.
- [45] Joo HS, Suh JH, Lee HJ, et al. Current knowledge and future perspectives on mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic agent [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 727.
- [46] Mastrolia I, Foppiani EM, Murgia A, et al. Challenges in clinical development of mesenchymal stromal/stem cells: concise review [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(11): 1135-1148.
- [47] Xin HQ, Li Y, Buller B, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(7): 1556-1564.
- [48] Li D, Zhang P, Yao XY, et al. Exosomes derived from

- miR-133b-modified mesenchymal stem cells promote recovery after spinal cord injury [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 845.
- [49] Shen HT, 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.
- [50] Xin HQ, Li Y, Liu ZW, et al. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(12): 2737-2746.
- [51] Xiong LL, Sun LL, Zhang YX, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells can alleviate early brain injury after subarachnoid hemorrhage through miRNA129-5p-HMGB1 pathway [J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29(4): 212-221.
- [52] Xu H, Jia Z, Ma K, et al. Protective effect of BMSCs-derived exosomes mediated by BDNF on TBI via miR-216a-5p [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e920855.
- [53] Lai NS, Wu DG, Liang TY, et al. Systemic exosomal miR-193b-3p delivery attenuates neuroinflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 74.
- [54] Chen JL, Cui CC, Yang XP, et al. MiR-126 affects brain-heart interaction after cerebral ischemic stroke [J]. *Transl Stroke Res*, 2017, 8(4): 374-385.
- [55] Mayourian J, Ceholski DK, Gorski PA, et al. Exosomal microRNA-21-5p mediates mesenchymal stem cell paracrine effects on human cardiac tissue contractility [J]. *Circ Res*, 2018, 122(7): 933-944.
- [56] Qiao L, Hu SQ, Liu SY, et al. microRNA-21-5p dysregulation in exosomes derived from heart failure patients impairs regenerative potential [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(6): 2237-2250.
- [57] Qu MK, Lin Q, Huang LY, et al. Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson's disease [J]. *J Control Release*, 2018, 287: 156-166.
- [58] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 341-345.
- [59] Yuan DF, Zhao YL, Banks WA, et al. Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain [J]. *Biomaterials*, 2017, 142: 1-12.
- [60] Liu YC, Li DM, Liu ZY, et al. Targeted exosome-mediated delivery of opioid receptor Mu siRNA for the treatment of morphine relapse [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17543.
- [61] Cui GH, Guo HD, Li H, et al. RVG-modified exosomes derived from mesenchymal stem cells rescue memory deficits by regulating inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Immun Ageing*, 2019, 16: 10.
- [62] Tian T, Zhang HX, He CP, et al. Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy [J]. *Biomaterials*, 2018, 150: 137-149.