

·综述·

本文引用:马荣丽,李勇敏,谭小宁,罗吉,吕元,罗燕.肾细胞外泌体的研究进展[J].湖南中医药大学学报,2017,37(11):1291-1294.

## 肾细胞外泌体的研究进展

马荣丽<sup>2</sup>,李勇敏<sup>2\*</sup>,谭小宁<sup>2</sup>,罗吉<sup>2</sup>,吕元<sup>2</sup>,罗燕<sup>2</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙410006)

**[摘要]** 外泌体(Exosomes)是一种细胞分泌的,携带大量活性物质,传递细胞间通信的纳米囊泡。肾细胞外泌体参与肾脏再生、修复及肾小管细胞间交流,调控骨细胞生长,在肾病的进展、控制及肾肿瘤中扮演重要角色,有作为肾脏疾病靶向治疗剂的潜力。尿液外泌体含有慢性肾病、糖尿病肾病、肾纤维化及肾肿瘤等潜在的标志物。肾脏作为机体重要器官,其外泌体(包括尿外泌体)的研究方兴未艾,现对其研究进展做一总结。

**[关键词]** 肾细胞外泌体;生物学功能;标志物;分子学诊断;靶向治疗

**[中图分类号]**R223;R446 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.11.030

### Research Progress of the Renal Cell Exosomes

MA Rongli<sup>2</sup>, LI Yongmin<sup>2\*</sup>, TAN Xiaoning<sup>2</sup>, LUO Ji<sup>2</sup>, LV Yuan<sup>2</sup>, LUO Yan<sup>2</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

**[Abstract]** Exosomes are small-sized nanovesicles secreted by cells, which carries a large number of active substances and transfers intercellular communication. Renal cell exosomes has the potential as a therapeutic agent for kidney disease, which are involved in kidney regeneration, repair and communication between renal tubule cells, regulating the growth of bone cells, plays an important role in the progression and control of kidney disease. Urinary exosomes contain potential markers such as chronic kidney disease, diabetic nephropathy, renal fibrosis, and kidney tumors. The research progress of exosomes (including urinary exosomes) of kidney, as an important organ, is summarized in this paper.

**[Keywords]** renal cell exosomes; biological functions; biomarker; molecular diagnostics; targeted therapy

几乎所有细胞会释放膜结合的囊泡(extracellular vesicles, ECVs), 这些囊泡被分为:微泡、凋亡小体、外泌体(exosomes)<sup>[1]</sup>。细胞内吞泡膜向内凹陷形成多泡内涵体,内涵体与细胞膜融合后释放其中的小囊泡,直径30~100 nm为外泌体<sup>[2]</sup>。最初,这些囊泡被认为是细胞的“垃圾”,后来证明它们在生物体内的细胞间和系统(体液)水平通讯中起重要作用<sup>[3]</sup>。各种生物细胞,包括真核生物和原核生物细胞释放各自不同的外泌体,在血液、精液、唾液和尿液等中

可检测到部分外泌体<sup>[2]</sup>。外泌体从特定的膜区域被释放,选择性的携带母细胞蛋白质, mRNA, miRNA, DNA 及其他的细胞成分,具有母细胞特征、靶向性与强大生物功能三大特点<sup>[4-6]</sup>。与自分泌或者旁分泌信号相比,它是一种更高阶的细胞间交流信号,能全面参与机体细胞新陈代谢,影响特定受体细胞的结构和功能<sup>[7]</sup>。

肾脏组织细胞有肾小管上皮细胞、肾小球内皮细胞、足细胞、肾实质细胞等,所有肾单位的细胞都

**[收稿日期]**2016-07-27

**[基金项目]**国家自然科学基金面上项目(81774163);湖南省研究生科研创新项目(CX2016B374)。

**[作者简介]**马荣丽,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药治疗肿瘤转移的机制。

**[通讯作者]**\*李勇敏,男,研究员,硕士研究生导师, E-mail:lym0937@126。

可以分泌外泌体<sup>[8]</sup>,包括肾癌细胞。目前研究多集中在尿外泌体,其它并未多见。鉴于肾脏对机体的重要性,本文探讨肾脏细胞外泌体的研究进展,现总结如下。

## 1 肾细胞外泌体的功能

### 1.1 肾细胞外泌体的生理作用

外泌体参与肾小管细胞之间的信息交流,外泌体从近端到远端肾单位的转移可能是先前未被认知的经肾通信系统。John J等<sup>[9]</sup>用外泌体特定的荧光蛋白标记5个肾近端小管上皮细胞,从细胞上清中分离得到荧光标记的外泌体,再与远端小管和集合管细胞共培养,发现它们都摄取了荧光标记的外泌体。Kishore Kumar Jella等<sup>[10]</sup>认为其交流的机制可能是近端小管分泌的外泌体调控远端小管和集合管细胞的上皮钠通道(ENaC)。在这种交流的过程中,外泌体释放功能性的蛋白和基因,调控临近或者远端细胞的功能影响疾病的发生发展<sup>[11]</sup>。

肾上皮细胞外泌体参与肾脏再生,可能调控骨细胞生长。上皮衍生的胞外体活化转录因子3(ATF3)mRNA通过抑制单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)诱导的巨噬细胞浸润从而减轻肾缺血再灌注损伤<sup>[12]</sup>。为了探索中医“肾主骨”理论的现代分子学机制,本课题组从人近曲小管上皮细胞HK-2中分离外泌体与人成骨细胞共培养,发现外泌体在体外能靶向成骨细胞,调控骨细胞生长,具体机制正在进一步研究<sup>[4]</sup>。

### 1.2 肾细胞外泌体与肾脏疾病

来源于肾脏的外泌体在肾病的进展、控制及肾肿瘤发展方面扮演了重要的角色。张伟等<sup>[13]</sup>研究发现在缺氧条件下,肾小管细胞分泌外泌体增加,缺氧诱导因子(HIF-1)介导分泌的外泌体对肾小管细胞具有保护作用,而来自HIF-1 $\alpha$ 敲低细胞的外泌体对细胞的保护作用丧失。Zhou XJ等<sup>[14]</sup>研究提示肾近端小管上皮细胞外泌体在上皮细胞伤口愈合中起对抗作用,肾小管细胞刮伤后,外泌体的产量增加,表皮生长因子(EGF)及其受体(EGFR)的激活可以促进伤口愈合,减少外泌体的释放。Gildea JJ等<sup>[9]</sup>在多巴胺的受体激动剂非诺多泮降压机制的研究中发现,肾小管上皮细胞经非诺多泮刺激后产生外泌体增加,外泌体从近端小管转移到远端小管和集合管,降低受体细胞活性氧的产率,从而使血压保持稳定。除了有益作用外,外泌体还被发现有负面作用。Wu

XM等<sup>[15]</sup>研究糖尿病肾病(DN)中外泌体的潜在作用,发现高糖处理的肾小球内皮细胞(GECs)分泌的外泌体相比正常情况下分泌的外泌体更多,外泌体中富含更高的TGF- $\beta$ 1mRNA,再通过TGF- $\beta$ 1/Smads3信号通路促进肾小球细胞(GMCs)增殖,及 $\alpha$ -SMA蛋白和细胞外基质蛋白的过度表达,促进肾纤维化。因此,外泌体可作为预防和治疗DN的新靶点。某些损伤的近端肾小管上皮细胞外泌体在缺氧性肾纤维化模型小鼠单侧输尿管梗阻后产生可以启动组织修复/再生反应,激活成纤维细胞,导致纤维化<sup>[16]</sup>。在之前有研究证明肾小管刷状缘衍生的100 nm的外膜囊泡能诱导草酸钙结晶导致肾结石<sup>[17]</sup>。

肾癌细胞衍生的外泌体操控周围微环境,促进血管形成、侵袭和转移以及逃避免疫监视。张龙等<sup>[18]</sup>用786-0肾癌细胞外泌体处理人脐静脉内皮细胞(HUVECs),检测肝细胞粘附分子(hepaCAM)与血管内皮生长因子(VEGF)的mRNA和蛋白表达,发现肾癌细胞外泌体通过下调hepaCAM和上调VEGF的表达促进肿瘤血管生成。Kengo Horie等<sup>[19]</sup>发现HIF-1诱导碳酸酐酶9(CA9)在多种类型的癌症包括肾细胞癌(RCC)中过度表达,继而从转染了CA9的细胞中分离外泌体发现这些CA9外泌体有促进血管生成的作用。NK细胞是一个重要的抗肿瘤效应细胞,能直接杀伤靶细胞。Xia Y等<sup>[20]</sup>发现肾透明细胞癌(ccRCCs)外泌体通过调控TGF- $\beta$ /SMAD信号通路诱导肿瘤浸润性NK细胞功能障碍,从而逃避宿主的免疫监视,表明外泌体有ccRCC免疫靶向治疗的潜力。杨林等<sup>[21]</sup>发现肾癌ACHN细胞来源的外泌体能促进自身细胞增殖,抑制其凋亡,筛除肾癌微环境中的exosomes或抑制其功能,可能成为肾癌治疗的新方法。张尧等<sup>[22]</sup>研究发现来自白细胞介素-12锚定修饰肾癌细胞的外泌体带有增强免疫和抗肿瘤作用的肿瘤排斥抗原,如肾癌细胞相关的抗原G250G和PI-IL-12,exosomes-GPI-IL-12明显促进T细胞的增殖,增加IFN- $\gamma$ 释放。EXOs/IL-12刺激可诱导抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTLs),在体外有更显著的细胞毒作用,开创了一种基于外泌体疫苗治疗肾细胞癌的新策略。

### 1.3 肾细胞外泌体的分子研究

肾细胞外泌体内容物在正常和疾病状态下有差异。Wang X等<sup>[23]</sup>研究了人原代肾小管上皮细胞(PTEC)外泌体在正常和炎症及缺氧(与慢性肾病相关)状态下

外泌体 miRNA 和蛋白种类表达水平的差异,发现在疾病状态下,外泌体标志性蛋白 CD9,CD63,CD81 的表达量增加,炎症状态下 has-miR-200a,has-miR-222,has-miR-204 表达明显升高,缺氧条件下 has-miR-3182,has-miR-4448 表达升高,has-miR-7641 表达下调。蛋白质组学分析了外泌体 536 种蛋白,其中 212 种在这三种状态下均存在,72 种只有在炎症状态下被发现,53 种在缺氧条件下独有。Dang VD 等<sup>[24]</sup>对外泌体的亚型进行了分子比较,用脂质组学和蛋白质组学对小鼠皮质集合管顶端质膜和基底质膜衍生的外泌体进行了分析,发现它们在蛋白和脂质方面都存在着差异,这将有助于理解外泌体的生物起源,反应其特定的生物通路。以上结果为肾细胞外泌体的研究起到了抛砖引玉的作用。

## 2 肾细胞外泌体与肾病诊断和治疗

### 2.1 肾细胞外泌体的分子学诊断

泌尿系统外泌体可视为一个潜在的诊断工具,其标志物与功能是目前研究的热点。Alberto Benito-Martin 等<sup>[25]</sup>发现肾小管上皮细胞和尿液外泌体中包含 TNF 受体超家族糖蛋白 osteoprotegerin (OPG),一种与凋亡相关的基因,在糖尿病肾病中高表达。提示肾小管上皮细胞和尿液外泌体 OPG 可作为慢性肾病的诊断指标。Anne E.Turco 等<sup>[26]</sup>在尿液中检测到肾实质细胞分泌的外泌体,女性尿液外泌体多于男性。随着年龄增加肾小球旁细胞和足细胞外泌体的标志物减少;肾肥大患者肾小球系膜细胞、集合管细胞和单核细胞的外泌体标志物减少;肾硬化患者上述细胞及近端小管、远端小管上皮细胞外泌体的标志物更少,但是肾盂上皮细胞外泌体的标志物与肾肥大和硬化没有关联。因此肾实质特定细胞外泌体标志物能诊断早期肾脏疾病。Lv LL 等<sup>[27]</sup>发现尿液外泌体 miR-29c 的表达与肾功能和肾组织纤维化密切相关,可以作为肾纤维化的诊断指标。E. E. Morrison 等<sup>[28]</sup>对不同肾脏疾病发生过程中尿液外泌体标志物进行了总结,比如尿外泌体胎球蛋白-A、活化转录因子-3 是急性肾损伤的标志物;肾母细胞瘤 WT-1 基因的表达增高与肾小球硬化有关;Podocalyxin 在尿外泌体中表达升高是糖尿病肾病和 IgA 肾病的标志物等。尿液外泌体不仅能够检测异常细胞、蛋白质、核酸和母细胞来源的相关特异信息,且取样安全简

单、样本量大;更能避免组织活检的创伤性及潜在的并发症风险,是肾病诊断的有力工具。

### 2.2 肾细胞外泌体靶向治疗肾脏疾病

Wilna Oosthuyzen 等<sup>[29]</sup>研究发现血管加压素能够刺激荧光标记的自身外泌体进入到肾集合管 mC-CDc11 细胞株和原代细胞中,转运 miRNA,改变受体细胞的基因表达谱,在中枢性尿崩症病人中,去氨加压素减少了肾小球和近端小管细胞外泌体的排泄,提示外泌体可作为 RNA 治疗载体,能靶向肾脏特定细胞。Jesus H. Dominguez 等<sup>[30]</sup>发现肾小管细胞外膜囊泡能加速大鼠肾缺血再灌注损伤模型的恢复,通过静脉注射外膜囊泡 24 h 和 48 h 后,能明显改善肾功能、肾小管损伤、4-羟基萘酮加合物形成、中性粒细胞浸润、纤维化等,具有潜在的临床应用价值。

## 3 展望

外泌体是生物医学界近年研究的热点之一,作为机体细胞与系统间的通信工具,调控机体的生理病理过程。中医肾被称为“先天之本”,可见肾细胞外泌体对机体生老病死调控的重要性。肾细胞外泌体的分泌、靶向、调控等研究缺乏系统理论指导,能否借鉴中医脏腑理论是一个有趣的挑战。

可以认为尿外泌体归为肾细胞外泌体的一种,它不仅是各种疾病的生物标志物,更能作为疾病的非侵入式诊断工具,为疾病特别是肿瘤的发生、发展、治疗全过程提供监测,估计疾病的严重程度、病情发展、治疗效果、术后并发症等等。

外泌体作为药物和疫苗是药物学家最关心的问题。外泌体的靶向性,低免疫性和细胞毒性,将特定功能性物质加载到外泌体中,有望达到真正的精准医疗。且外泌体带有母细胞特征,作为疫苗具有得天独厚的优势。总体来说,肾细胞外泌体的研究难度大,落后其它细胞外泌体的研究。根据中医脏腑理论,本文提出是否肾细胞外泌体对远端骨组织细胞有特定的靶向调控作用,将为探索肾细胞外泌体的靶向功能研究打开另一扇窗户。

### 参考文献:

- [1] Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, et al. Extracellular Vesicles in Angiogenesis[J]. *Circ Res*, 2017, 120(10): 1658-1673.
- [2] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles, exosomes, microvesicles, and friends[J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-383.



- [3] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-659.
- [4] 李勇敏,谭小宁,马荣丽,等.中医脏腑相关理论新释——外泌体与脏腑相关理论之联系探微[J].*湖南中医杂志*,2017,33(2):1-4.
- [5] Wen H, Frokiaer J, Kwon TH, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 in rat is mediated by a vasopressin-dependent apical pathway[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(7): 1416-1429.
- [6] Rani S, O'Brien K, Kelleher FC, et al. Isolation of exosomes for subsequent mRNA, MicroRNA, and protein profiling [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 784: 181-195.
- [7] Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(18): 7312-7317.
- [8] Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(36): 13368-13373.
- [9] Gildea JJ, Seaton JE, Victor KG, et al. Exosomal transfer from human renal proximal tubule cells to distal tubule and collecting duct cells[J]. *Clin Biochem*, 2014,47(15): 89-94.
- [10] Jella KK, Yu L, Yue Q, et al. Exosomal GAPDH from Proximal Tubule Cells Regulate ENaC Activity[J]. *PLoS One*,2016,11(11): e0165763.
- [11] Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(14): 6328-6333.
- [12] Chen HH, Lai PF, Lan YF, et al. Exosomal ATF3 RNA attenuates pro-inflammatory gene MCP-1 transcription in renal ischemia-reperfusion[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(9): 1202-1211.
- [13] Zhang W, Zhou X, Yao Q, et al. HIF-1-mediated production of exosomes during hypoxia is protective in renal tubular cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017,313(4):906-913.
- [14] Zhou X, Zhang W, Yao Q, et al. Exosome production and its regulation of EGFR during wound healing in renal tubular cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2017,312(6): F963-F970.
- [15] Wu XM, Gao YB, Cui FQ, et al. Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells activate mesangial cells to promote renal fibrosis[J]. *Biol Open*,2016,5(4): 484-491.
- [16] Borges FT, Melo SA, Özdemir BC, et al. TGF- $\beta$ 1-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.
- [17] Nagasawa M, Koide H, Ohsawa K, et al. Purification of brush border membrane vesicles from rat renal cortex by size-exclusion chromatography[J]. *Anal Biochem*, 1992, 201(2): 301-305.
- [18] Zhang L, Wu X, Luo C, et al. The 786-0 renal cancer cell-derived exosomes promote angiogenesis by downregulating the expression of hepatocyte cell adhesion molecule [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(1): 272-276.
- [19] Horie K, Kawakami K, Fujita Y, et al. Exosomes expressing carbonic anhydrase 9 promote angiogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 492(3): 356-361.
- [20] Xia Y, Zhang Q, Zhen Q, et al. Negative regulation of tumor-infiltrating NK cell in clear cell renal cell carcinoma patients through the exosomal pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37783-37795.
- [21] 杨林,吴小候,罗春丽,等.肾病 ACHN 细胞 exosome 对自身细胞增殖和凋亡的影响[J].*南方医科大学学报*,2012,32(10):1498-1502.
- [22] Zhang Y, Luo CL, He BC, et al. Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response in vitro: a novel vaccine for renal cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(1): 133-140.
- [23] Wang X, Wilkinson R, Kildley K, et al. Unique molecular profile of exosomes derived from primary human proximal tubular epithelial cells under diseased conditions[J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1314073.
- [24] Dang VD, Jella KK, RRT R, et al. Lipidomic and proteomic analysis of exosomes from mouse cortical collecting duct cells [J]. *The FASEB Journal*, 2017,16:417.
- [25] Benito-Martin A, Uccero AC, Zubiri I, et al. Osteoprotegerin in exosome-like vesicles from human cultured tubular cells and urine[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72387.
- [26] Turco AE, Lam W, Rule AD, et al. Specific renal parenchymal-derived urinary extracellular vesicles identify age-associated structural changes in living donor kidneys[J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 29642.
- [27] Lv LL, Cao YH, Ni HF, et al. MicroRNA-29e in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(8): 1220-1227.
- [28] Morrison EE, Bailey MA, Dear JW. Renal extracellular vesicles: from physiology to clinical application[J]. *J Physiol*, 2016, 594(20): 5735-5748.
- [29] Oosthuyzen W, Scullion KM, Ivy JR, et al. Vasopressin Regulates Extracellular Vesicle Uptake by Kidney Collecting Duct Cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(11): 3345-3355.
- [30] Dominguez JH, Liu Y, Gao H, et al. Renal Tubular Cell-Derived Extracellular Vesicles Accelerate the Recovery of Established Renal Ischemia Reperfusion Injury [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2017: ASN.2016121278.