



神经心理专栏

外周血脑细胞来源细胞外囊泡作为中枢神经系统疾病生物标志物研究进展

张高嘉¹, 孔岩², 李玲¹, 焦娇¹, 徐丹丹¹, 曹育嘉¹, 刘梦雨¹综述, 张志珺^{1,3}审校

摘要: 脑细胞来源细胞外囊泡(brain cell-derived extracellular vesicles, BCDEVs)是由中枢神经系统(central nervous system, CNS)所有神经细胞共同释放的一组含有其来源细胞生物分子的异质性的双层膜结构纳米囊泡,在脑生理及病理状态下,它们正成为神经元、神经胶质细胞和结缔组织之间通信和废物管理的关键介质。基于不同BCDEVs表面特异性分子标记物,目前研究者已成功从外周血中富集不同BCDEVs亚型包括神经元细胞来源细胞外囊泡(neuron-derived extracellular vesicles, NDEVs)、星形胶质细胞来源细胞外囊泡(astrocytes-derived extracellular vesicles, ADEVs)、少突胶质细胞来源细胞外囊泡(oligodendrocyte-derived extracellular vesicles, ODEVs)、小胶质细胞来源细胞外囊泡(microglia-derived extracellular vesicles, MDEVs)、周细胞来源细胞外囊泡(pericyte-derived extracellular vesicles, PDEVs)和内皮细胞来源细胞外囊泡(endotheliocyte-derived extracellular vesicles, EDEVs)。本篇综述首先概述了细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs),同时对目前使用的用于富集外周血不同BCDEVs特异性分子标记物进行概述,最后重点介绍了外周血BCDEVs在CNS疾病中的应用,以阐明其作为生物标志物的潜力,以及它们在实现这一目标时所面临的挑战。

关键词: 脑细胞来源细胞外囊泡; 中枢神经系统疾病; 生物标志物

中图分类号: R741 **文献标识码:** A

Research advances in peripheral blood brain cell-derived extracellular vesicles as the biomarker for central nervous system diseases ZHANG Gaojia, KONG Yan, LI Ling, et al. (Department of Neurology, School of Medical Sciences, Southeast University, Nanjing, 210009, China)

Abstract: Brain cell-derived extracellular vesicles (BCDEVs) are a group of double-layer membrane-structured nanovesicles which are released by all neural cells in the central nervous system (CNS) and contain the heterogeneity of the biological molecules of their originating cells, and under the physiological and pathological conditions of the brain, they are becoming the key media for communication and waste management between neurons, glial cells, and connective tissue. Based on the different specific molecular markers on the surface of BCDEVs, researchers have successfully enriched different subtypes of BCDEVs from peripheral blood, including neuron-derived extracellular vesicles, astrocytes-derived extracellular vesicles, oligodendrocyte-derived extracellular vesicles, microglia-derived extracellular vesicles, pericyte-derived extracellular vesicles, and endotheliocyte-derived extracellular vesicles. This article reviews extracellular vesicles, summarizes the different specific molecular markers used to enrich different BCDEVs from peripheral blood, and introduces the application of peripheral blood BCDEVs in CNS diseases, so as to clarify their potential as a biomarker and the challenges they face in achieving this goal.

Key words: Brain cell-derived extracellular vesicles; Central nervous system diseases; Biomarker

本篇综述首先概述了细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs),同时对目前使用的用于富集外周血不同脑细胞来源细胞外囊泡(brain cell-derived extracellular vesicles, BCDEVs)特异性分子标记物进行概述,最后重点介绍了外周血BCDEVs在中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病中的应用,以阐明其作为生物标志物的潜力,以及它们在实现这一目标时所面临的挑战。

1 EVs概述

EVs是一组由各种类型的细胞经过多个不同阶段的演变释放到细胞外环境的纳米级异质性脂质双层膜囊泡^[1,2],存在于所有人体体液中,包括CSF、血液、尿液、母乳和唾液等^[3-8],其内包含几乎所有类别的生物分子,如核酸(细胞核及线粒体DNA、长链RNA和miRNA)、蛋白质(结构蛋白和/或酶蛋白)、代谢物和脂类^[9,10],其内容物的不同取决于它们的起源细胞和该细胞所处的生理及病理状态^[11,12],这些不同分子在调节一系列生物过程的细胞-细胞通信中发挥重要作用^[13-17]。在过去十年间,人们对EVs的类别和特征及其生理和病理作用的认识不断加深,根据其大小及生物起源不同主要分为3种类型:外

泌体、微囊泡(microvesicles, MVs)和凋亡小体^[18]。凋亡小体是由细胞程序性死亡形成的最大的膜性囊泡(500~4 000 nm),凋亡细胞经历多个阶段的演变,最终导致包裹在不同的膜结合囊泡中的细胞内容物的破坏形成凋亡小体^[19,20],常以腔内存在细胞器和/或核内容物为特征。虽然通常与EVs无关,但在各种条件下,溶酶体囊泡分泌或分泌性自噬等非常规分泌过程可能会将大量细胞质基质释放到细胞外环境中而形成与EVs相似的膜性囊泡结构^[21]。MVs,也称胞外体、微粒或脱落囊泡,大小为100~1 000 nm,直接由质膜向外出芽形成^[22],MVs与凋亡小体的区别不仅在于大小,还在于它们的形成、内容和膜特异性抗原。外泌体是一种由多泡体(multive bodies, MVB)与胞膜融合后分泌到细胞外环境的一组直径介于

收稿日期:2023-06-01;修订日期:2023-07-11

作者单位:(1. 东南大学医学院神经病学系,东南大学附属中大医院神经内科,东南大学神经精神医学研究所,江苏南京210009;2. 东南大学医学院生物化学与分子生物学系,江苏南京210009;3. 中国科学院深圳先进技术研究院脑认知与脑疾病研究所,广东深圳518005)

通信作者:张志珺, E-mail: janemengzhang@vip.163.com

30~150 nm的含有特殊标记物的膜性小囊泡^[23,24],其表面或腔内含有特殊标记物包括 Alix、TSG101、HSC70、HSP90、CD81、CD9、CD63等^[15,25]。外泌体起初被认为是一种细胞废弃物^[26],然而随着研究技术的进步,人们发现外泌体代表了一种新的细胞间通讯方式,并参与了广泛的生理和病理过程^[15]。MV_s和外泌体在大小上存在重叠,虽然根据他们的生物发生过程可以明确区别不同类型EV_s,但到目前为止,由于缺乏特定的标记和技术方法,还没有一种策略可以在复杂的生物流体样本中对这两种类型的EV_s进行无可争议的表征和/或物理分离^[27-30],因此本综述中,使用总体术语EV_s进行表述。

2 用于富集外周血不同BCDEV_s特异性分子标志物

BCDEV_s是由不同神经细胞分泌的含有来自其生成细胞生物分子的细胞外纳米囊泡,在外周血血浆或者血清中可通过不同EV_s特异性表面标记物富集不同亚型BCDEV_s,这为CNS疾病的诊断及疗效评估开辟了新的范式。来自华盛顿大学西雅图分校的Zhang团队^[31]和加州大学旧金山分校的Goetzl团队^[32]首先开创了这一领域,分别先后建立了外周血NDEV_s的富集方法。目前用于富集外周血NDEV_s特异性分子标志物有L1细胞黏附分子(L1-Cell adhesion Molecule, LICAM)^[33-35]、神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)^[36,37]和突触体相关蛋白-25(synaptosomal associated protein-25, SNAP25)^[38],其中LICAM分子是最常用的外周血NDEV_s特异性分子标志物。最近来自浙江大学的Zhang团队又新鉴定了一种分子标志物N-甲基-D-天冬氨酸受体2A(N-methyl-D-aspartate receptor 2A, NMDAR2A),发现NMDAR2A与LICAM共同存在于NDEV_s,可被用于富集外周血NDEV_s特异性分子标志物^[33]。随后Goetzl课题组又创建了外周血ADEV_s的富集方法^[39],目前用于富集外周血ADEV_s特异性分子标志物多采用谷氨酰胺天冬氨酸转运体[glutamine aspartate transporter, GLAST(又称作astrocyte cell surface antigen-1, ACSA-1^[39]或excitatory amino acid transporter 1, EAAT1^[38])],目前报道的仅有一项研究同时使用水通道蛋白4(aquaporin-4, AQP4)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)用于分离血浆ADEV_s^[40]。随后华盛顿大学西雅图分校的Zhang团队^[41]和日本京都医科大学Tokuda团队^[38]分别采用不同的特异性分子标志物[前者使用2,3-环核苷酸-3-磷酸二酯酶(2,3-cyclic nucleotide-3-phosphodiesterase, CNPase),后者使用少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(oligodendrocyte-myelin glycoprotein, OMG)]创建了外周血ODEV_s富集方法。由威克森林医学院Deep团队利用小胶质细胞特异性分子标志物I型跨膜蛋白119(Type-I transmembrane protein 119, TMEM119)成功建立了食蟹猴外周血MDEV_s富集方法^[42],随后东南大学神经精神研究所Zhang团队首次利用TMEM119在人血浆中分离MDEV_s^[43]。最近来自威克森林医学院Deep团队又分别利用PDGFR β 和CD31建立了外周血血浆PDEV_s和EDEV_s^[44]。虽然目前已经建立了利用特异性分子标志物富集外周血不同BCDEV_s方法,然而用于分离各种BCDEV_s特异性分子标志物并非各

自神经细胞所特有,在其他类型细胞中也都有表达。如LICAM蛋白不仅在神经元中表达,在肾脏和脂肪组织中也有表达^[38],同时最近的一项研究表明,存在于人血浆中的LICAM可能与NDEV_s无关^[45]。因此迫切需要寻找更加特异性的不同脑细胞分子标志物用于富集外周血不同亚型BCDEV_s。

3 外周血BCDEV_s作为CNS退行性疾病生物标志物研究

3.1 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)

3.1.1 外周血BCDEV_s作为AD诊断生物标志物 外周血BCDEV_s作为一种新兴的生物标志物已引起大家广泛关注,通过检测这些囊泡所包含的生物分子和数量变化,可为AD的早期诊断提供新途径。既往研究发现,与对照组相比,AD患者血浆NDEV_s内T-Tau、P-T181-Tau、P-S396-Tau、A β 1-42^[7]、P-Tau231、pSer312-IRS-1、pY-IRS-1^[46]、组织蛋白酶D(Cathepsin D)、溶酶体相关膜蛋白1(lysosome-associated membrane protein 1, LAMP-1)、泛素化蛋白、热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)^[47]、突触素、突触足蛋白、突触结合蛋白-2、神经粒蛋白(neurogranin, NRGN)、生长相关蛋白43(growth-associated protein 43, GAP-43)、突触蛋白酶1(synapsin 1)^[48]、TDP-43^[49]、miR-132-3p、miR-212^[50]、血清NDEV_s内SNAP-25^[51]、血浆ADEV_s内C1q、C4b、C3d、因子B、因子D、Bb、C3b、C5b-C9末端补体复合物、白介素-6、肿瘤坏死因子 α 和IL-1 β 水平发生显著改变^[52],其中P-S396-Tau、P-T181-Tau、A β 1-42、组织蛋白酶D、LAMP-1、泛素化蛋白、HSP70、神经素蛋白2 α (neurexin 2 α , NRXN2 α)、谷氨酸GluA4受体和磷酸化IRS-1等候选分子甚至可在AD临床发病1~10年前出现异常^[32,46,47,53,54],在一项起始认知功能正常平均随访3.5年后进展为AD的大样本研究中发现,与认知功能正常对照组相比,起始认知功能正常后进展为AD患者血浆NDEV_s直径增大,囊泡内P-Tau181、P-Tau231、pSer312-IRS-1和pY-IRS-1水平升高,对AD疾病预测准确度高达89.6%(敏感性=81.8%,特异性=85.8%)^[46]。并且突触结合蛋白、突触素和NRGN水平高低与简易智力状态检查(minimal state examination, MMSE)及AD评估量表-认知子量表(AD assessment scale-cognitive subscale, ADAS-cog)评分显著相关,具有较高的疾病诊断效能,其诊断准确度高达82.6%(敏感性=87.5%,特异性=70.6%)^[48,51],这些BCDEV_s内候选分子由于受到脂质双分子层的保护,具有较高的稳定性^[55],与脑组织^[50]或CSF^[36]中存在一致性差异性改变。除了囊泡内候选分子,研究者还发现AD患者血浆NMDAR2A阳性EV_s浓度较对照组明显下降^[33],血浆NDEV_s直径显著增大^[46]。以上结果表明,外周血NDEV_s或ADEV_s及其内分子具有代表中枢作为AD诊断生物标志物潜能,具有较高的诊断灵敏性和特异性。

3.1.2 外周血BCDEV_s作为AD鉴别诊断生物标志物 外周血BCDEV_s除了可作为AD潜在诊断生物标志物外,其内一些候选分子还可作为AD与其他认知功能障碍性疾病包括遗忘型轻度认知功能损害(amnesic mild cognitive impairment, aMCI)和FTD等鉴别诊断生物标志物。研究发现,与aMCI患者相

比,AD患者血浆NDEVs内A β 42、T-Tau和P-T181-Tau水平显著升高^[36],与FTD患者相比,AD患者血浆NDEVs内组织蛋白酶D、LAMP-1和泛素化蛋白水平显著升高^[47]。与对照组相比,AD患者血浆NDEVs内GAP-43和突触蛋白酶1水平下降,而在FTD患者中未发现上述分子异常^[48]。AD患者血浆ADEVs中 β -淀粉样前体蛋白裂解酶1(β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1, BACE-1)和可溶性淀粉样前体蛋白 β (soluble amyloid precursor protein β , sAPP β)水平明显高于正常对照组,胶质细胞源性神经营养因子(glial-derived neurotrophic factor, GDNF)水平明显低于正常对照组,但在FTD中未观察到血浆ADEVs中上述3种蛋白存在差异性表达^[39]。同时另一项研究发现,AD患者胰岛素抵抗水平(P-serine 312-IRS-1/P-pantyrine-IRS-1)显著高于FTD患者,且在临床发病前1~10年,AD患者胰岛素抵抗水平已明显高于FTD患者^[54]。

3.1.3 外周血BCDEVs作为AD进展及预后生物标志物 既往研究发现,在AD发病前6~11年的临床前期,血浆NDEVs中NRXN2 α 、谷氨酸GluA4受体和神经素1(Neurexin 1, NLGN1)水平较正常对照均显著降低,并且其水平高低随痴呆进展而显著下降^[53],而在另一项经过5~12年随访后确诊为AD的纵向队列研究中发现,AD患者血浆ADEVs中补体调节蛋白CD59、CD46、衰变加速因子和1型补体受体水平显著低于对照组,这些补体分子在AD起始认知功能正常阶段就已降低,随着认知功能损害的加重其水平进一步降低^[52]。以上结果提示上述血浆BCDEVs中候选分子可作为AD疾病进展及预后生物标志物。

3.1.4 外周血BCDEVs作为AD风险预测生物标志物 外周血BCDEVs还可作为疾病预测性诊断生物标志物,糖尿病患者轻度认知功能障碍(Mild cognitive impairment, MCI)发病风险增加,并可增加MCI向AD转化风险^[56-58],Zhang等人^[59]研究发现,与2-型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T₂DM)认知功能正常组相比,T₂DM合并AD或进展MCI患者血浆NDEVs内NADH泛醌氧化还原酶核心亚基S3(NADH ubiquinone oxidoreductase core subunit S3, NDUFS3)和琥珀酸脱氢酶复合亚基B(Succinate dehydrogenase complex subunit B, SDHB)水平显著降低,同时与T₂DM稳定MCI患者相比,T₂DM进展MCI患者血浆NDEVs内NDUFS3和SDHB水平下降,并且在随访期间,血浆NDEVs内低NDUFS3和SDHB水平与进展MCI患者海马和灰质萎缩率及AD特征性皮质厚度降低相关^[59]。在对MCI转化为AD的预测性生物标志物研究中发现,与3年内MCI稳定组相比,3年内MCI转化为AD患者组血浆ADEVs中C1q、C4b、因子D、Bb片段、C5b、C3b和C5b-C9水平显著升高,抑制性CPs衰变加速因子、CD46、CD59和1型补体受体水平显著降低^[60]。而在另一项研究中发现,与认知正常对照和稳定MCI患者相比,MCI转化为AD患者血浆NDEVs中P-S396-Tau、P-T181-Tau和A β 1-42水平显著升高,而NRGN和抑制因子1沉默转录因子水平显著降低,同时作者将MCI转化为AD患者血浆NDEVs注射到小鼠海马CA₁区后可明显增加该脑区P-Tau阳性细胞数比例^[61]。以上结果

表明,外周血BCDEVs有作为T₂DM或MCI向AD疾病转化风险预测性诊断生物标志物,同时将AD患者血浆NDEVs注射到小鼠海马CA₁区后P-Tau阳性细胞数比例增高,也进一步证明了囊泡内致病性蛋白的存在,为利用外周血BCDEVs作为介质研究AD潜在发病机制提供可能依据。

3.1.5 外周血BCDEVs作为探索AD潜在发病机制生物标志物 Goetzl等人通过对血浆ADEVs和NDEVs中A β 42肽生成系统系列蛋白成分定量分析后发现,AD患者血浆ADEVs中BACE-1、 γ -分泌酶、可溶性A β 42、sAPP β 、sAPP α 、GDNF、P-T181-Tau和P-S396-Tau水平均显著高于血浆NDEVs中各相应蛋白水平^[39],提示ADEVs中丰富的A β 42肽生成系统系列蛋白可能在维持神经元内A β 42肽生成系统蛋白动态平衡发挥关键作用,为AD关于神经细胞之间相互作用在疾病发病机制研究中提供了新思路^[39]。既往研究表明,AD患者脑内存在神经元自噬-溶酶体功能障碍^[62,63],研究者通过对AD患者血浆NDEVs内不同类型溶酶体蛋白进行定量分析后发现,在AD诊断前的数年里,血浆NDEVs中组织蛋白酶D、LAMP-1、泛素化蛋白和HSP70溶酶体蛋白水平存在显著性差异改变,以上结果进一步证明了AD患者在疾病早期阶段可能已出现神经细胞自噬-溶酶体通路功能障碍^[47]。在另一项研究中,Kapogiannis等人在发现来自AD患者外周血ADEVs中补体水平整体升高后^[52],随后在另一项研究中,将外周血免疫富集的ADEVs和NDEVs作用于大鼠元代皮质神经元和人诱导性多能干细胞(human-induced pluripotent stem cells, h-iPSCs),使用多种细胞和分子实验技术验证后发现,AD患者血浆ADEVs可通过激活补体诱导神经元上膜攻击复合物表达,引起神经元细胞膜破坏和神经突密度降低,从而引起大鼠元代皮质神经元和h-iPSCs细胞活力降低,并在另一组经尸检诊断的AD患者中得到进一步的验证^[64]。以上结果表明ADEVs可通过补体介导的途径对神经元细胞产生直接损伤作用,为深入了解AD病理生理机制提供了新思路,同时循环中ADEVs很容易被神经元内化吸收,这也促使改良ADEVs在AD脑靶向治疗中的应用,为将来药物研发提供一定的启示。既往研究表明,AD的疾病进展和严重程度与保护神经元抵抗不同应激转录因子缺乏有关^[65,66],Goetzl等人通过对AD患者血浆NDEVs内介导神经元抵抗不同应激的细胞存活因子定量分析后发现,AD患者血浆NDEVs内介导神经元抵抗不同应激的细胞存活因子包括低密度脂蛋白受体相关蛋白6、热休克因子-1和阻遏元件1沉默转录因子水平均显著降低^[67],该研究表明,AD患者脑内神经元病理性死亡可能与神经元存活所需细胞存活因子缺失有关,揭示了神经元细胞外囊泡中细胞存活因子水平降低与AD发病机制之间的潜在关系,为AD的治疗提供了新的思路和方向。

3.2 突触核蛋白病

突触核蛋白病是一组以错误折叠的 α -syn沉积在神经元及神经胶质细胞为主要病理特征的临床和病理学异质性疾病,主要包括帕金森病(parkinson disease, PD)和多系统萎缩(multisystem atrophy, MSA)等^[68]。目前关于外周血BCDEVs在突触核蛋白病中作为生物标志物研究主要围绕致病性蛋白

α -syn 展开,显示出较好的疾病诊断、预测及疗效评估效果。

3.2.1 帕金森病(Parkinson disease,PD)

3.2.1.1 外周血 BCDEVs 作为 PD 诊断生物标志物 既往研究表明,外周血 BCDEVs 中 α -syn、DJ-1 和 Lnc-POU3F3 水平异常可作为 PD 诊断生物标志物^[31,69]。Zhang 等人研究发现,与 HC 相比,PD 患者血浆 NDEVs 中 α -syn 水平显著升高,血浆 NDEVs 内 α -syn 与统一帕金森病评定量表(Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS)之间存在显著相关性($r=0.176, P=0.004$),并且血浆 NDEVs 中 α -syn 水平在区分 PD 患者与对照组敏感性和特异性接近 CSF α -syn^[31]。而在另一项研究中,Liu 等人发现,与 HC 相比,早期 PD 血浆 NDEVs 中 α -syn 水平显著升高,并且与 PD 患者 UPDRS III/(I+II+III)评分($r=0.29, P=0.04; r=0.36, P=0.01$)、非运动症状问卷评分($r=0.30, P=0.039$)和 Sniffin Sticks 16 项评分($r=-0.29, P=0.04$)相关^[69]。而在另一项联合多中心、大样本及多队列研究中发现,无论是发现队列还是验证队列,与对照组相比,PD 患者血清 NDEVs 中 α -syn 水平均显著升高,在区分 PD 和对照组方面两队列表现出一致的准确性,ROC 分析 AUC 均达到了 0.86(发现队列:敏感性=82%,特异性=71%;验证队列:敏感性=85%,特异性=74%)^[34]。除了 α -syn,研究者还对外周血 BCDEVs 中其他潜在候选分子包括 DJ-1 和 Lnc-POU3F3 进行定量分析,以评估其作为 PD 诊断生物标志物潜能。在一项横断面队列研究中,Wang 等人发现,与对照组相比,PD 患者血浆 NDEVs 中 DJ-1 和 α -syn 水平同步显著升高,同时 NDEVs 中 DJ-1 与 α -syn 显著正相关($r=0.902, P<0.001$)^[70]。而在另一项横断面研究中,Zou 等人发现,与对照组相比,PD 患者血浆 NDEVs 中 Lnc-POU3F3 和 α -syn 水平同步显著升高,并且与 α -syn 显著正相关($r=0.658, P=0.009$)^[71]。以上结果表明,血清或血浆 NDEVs 中 α -syn、DJ-1 与 Lnc-POU3F3 可作为 PD 潜在诊断生物标志物。

3.2.1.2 外周血 BCDEVs 作为 PD 鉴别诊断生物标志物 在一项联合多中心、大样本、横断面及纵向队列研究中,Tofaris 等人^[34]对多种神经变性谱系疾病包括路易体谱系疾病[包括快速眼睡眠行为障碍(rapid eye movement sleep behaviour disorder, RBD)、运动性 PD、PD 伴痴呆、DLB、MSA]和其他类型神经退行性病变[包括 FTD、进行性核上性麻痹(progressive supranuclear palsy, PSP)和皮质基底节变性(corticobasal syndrome, CBS)]血清 NDEVs 内 synenin-1、clusterin 和 α -syn 3 种蛋白水平进行定量分析后发现,RBD、PD 和 DLB 患者血清 NDEVs 中 α -syn 升高的水平约是 MSA 或其他蛋白病包括 FTD、PSP 和 CBS 的 2 倍,差异有显著性。而与 RBD、PD 和 MSA 相比,FTD、PSP 和 CBS 患者血清 NDEVs 中 clusterin 水平显著升高。血清 NDEVs 中 α -syn 在鉴别 PD 和其他非典型帕金森综合征具有较高的效能,ROC 分析 AUC 为 0.85(敏感性=0.80,特异性=0.74),联合 α -syn 和 clusterin 可显著提高 PD 与其他非典型帕金森综合征鉴别诊断效能,ROC 分析 AUC 为 0.98(敏感性=0.94,特异性=0.96),即使在 PD 发病前驱期也具有较高的鉴别诊断效能(RBD vs 其他非典型

帕金森综合征, AUC=0.98,敏感性=0.95,特异性=0.93)^[34]。而在另一项横断面研究中,Dutta 等人发现,联合血清/血浆 NDEVs 和 ODEVs 中 α -syn 可以更好的区分 PD 和 MSA 患者,与 MSA 患者相比,PD 患者血清/血浆 NDEVs 和 ODEVs 中 α -syn 水平均显著下降,与 NDEVs 中 α -syn 相比,ODEVs 中 α -syn 水平可以更好的区分 PD 和 MSA 患者,其 ROC 分析 AUC 为 0.87(敏感性=73.0%,特异性=82.7%)。而当联合 NDEVs 和 ODEVs 两种 BCDEVs 后,即 ODEVs 中 α -syn/NDEVs 中 α -syn,其鉴别 PD 和 MSA 两种疾病效能更高,其 ROC 分析 AUC 为 0.90(敏感性=89.8%,特异性=86.0%),具有较高的鉴别诊断敏感性和特异性^[72]。

3.2.1.3 外周血 BCDEVs 作为 PD 进展生物标志物 Tofaris 等人对 PD 患者进行平均(40.3±8.5)个月随访后发现,血清 NDEVs 中 α -syn 随着 PD 疾病进展而稳定升高^[34],而 Liu 等人进一步研究发现,在对早期 PD 患者进行平均 22 个月随访后发现,与基线血浆 NDEVs 内 α -syn 水平相比,Cox 回归分析显示血浆 NDEVs 内 α -syn 水平的纵向升高与 PD 运动症状进展相关(hazard ratio=8.92, 95% CI 1.10~71.4, $P=0.039$)^[69]。以上结果表明,血浆 NDEVs 中 α -syn 水平可作为 PD 疾病进展潜在生物标志物。

3.2.1.4 外周血 BCDEVs 作为探索 PD 药物治疗潜在作用机制生物标志物 在一项关于 PD 随机安慰剂对照研究中发现,艾塞那肽可通过调节胰岛素信号通路改善 PD 运动功能^[73],为了探索艾塞那肽改善 PD 运动功能潜在作用机制,MRCP 等人通过血清 NDEVs 评估艾塞那肽改善 PD 患者运动功能是否与接受艾塞那肽治疗后 PD 患者脑胰岛素和 Akt 信号通路活性增强有关^[35]。研究者富集接受艾塞那肽-PD 试验的 60 例受试者血清 NDEVs,并对其内脑胰岛素和 Akt 信号通路蛋白进行定量分析后发现,与接受安慰剂治疗 PD 患者相比,艾塞那肽治疗 48 周时 PD 患者血清 NDEVs 内酪氨酸磷酸化 IRS-1 及其下游底物包括总 Akt 和磷酸化雷帕霉素机制性靶点(mechanistic target of rapamycin, mTOR)表达升高,同时血清 NDEVs 中总 mTOR ($F_{4,50}=5.34, P=0.001$)和磷酸化 mTOR ($F_{4,50}=4.38, P=0.04$)与 UPDRS 中第三部分非药物治疗评分的改善显著相关。本研究结果表明,艾塞那肽改善 PD 患者运动功能可能通过使 PD 患者脑胰岛素信号传导正常化并与脑内 Akt 和 mTOR 级联的激活有关^[35]。这为以后使用靶向神经元通路的药物进行临床试验时,使用基于 NDEVs 生物标志物阐明药物靶点参与提供了一种简单实用的方法。

3.2.2 MSA 不同于 PD 病理特点为 α -syn 聚集在神经元细胞为主,MSA 患者脑内病理性 α -syn 主要聚集在少突胶质细胞,因此,Zhang 等人对 MSA 患者血浆 ODEVs 水平及其内 α -syn 进行定量分析,以评估其作为 MSA 诊断及鉴别诊断生物标志物潜力。与 PD 患者相比,MSA 患者血浆 ODEVs 浓度显著下降,且具有较好的疾病诊断能力(MSA vs. HC, AUC=0.85,敏感性=3.9%,特异性=71.9%)和鉴别诊断能力(MSA vs. PD, AUC=0.77,敏感性=61.8%,特异性=81.3%)。与 PD 患者相比,MSA 患者血浆 ODEVs 内 α -syn 水平显著降低,随后通过一系列细胞及动物实验证明导致 MSA 患者血浆 ODEVs 内 α -syn 水平降低

原因是由中枢分泌进入外周血浆中 ODEVs 数量减少引起,而与每个 ODEVs 中装载的 α -syn 数量无关。为了验证 MSA 患者中枢到达外周血浆 ODEVs 减少潜在机制,研究者在 MSA 转基因小鼠和原代少突胶质细胞中进一步验证了导致 MSA 患者血浆 ODEVs 数量减少可能与脑内 α -syn 过量表达聚集介导的干扰 syntaxin4 和 VAMP2 之间的相互作用,进而导致可溶性 N-乙酰马来酰肼敏感融合因子附着蛋白受体复合物的功能障碍,最终引起少突胶质细胞 MVB 释放过程障碍^[41]。以上结果表明,血浆 ODEVs 及其内 α -syn 水平具有作为 MSA 诊断及鉴别诊断生物标志物潜力,MSA 患者血浆中减少的 ODEVs 可能与少突胶质细胞病理性 α -syn 聚集增加有关,然而外周血 ODEVs 作为 MSA 生物标志物的潜力仍需要进一步的探索。

4 外周血 BCDEVs 作为多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 生物标志物研究

MS 是一种免疫介导的中枢神经系统脱髓鞘疾病,约 15% 患者表现为原发进展型 MS (primary progressive MS, PPMS)^[74,75],临床中对于 MS 分型诊断仍较困难,为了寻找 MS 不同亚型生物标志物,Agliardi 等人对 MS 患者不同亚型 [临床孤立综合征 (clinically isolated syndrome, CIS)、PPMS 和复发缓解型 MS (relapsing remitting MS, RRMS)] 及 HC 血清 ODEVs 中髓鞘碱基蛋白 (myelin basic protein, MBP) 进行定量分析,探讨其作为 MS 分型诊断和预后生物标志物潜力。结果显示,与 HC 相比, CIS ($P < 0.001$)、RRMS ($P < 0.001$) 和 PPMS ($P < 0.001$) 血清 ODEVs 中 MBP 浓度显著升高,此外,与 RRMS ($P = 0.004$) 和 CIS ($P = 0.03$) 相比, PPMS 患者血清 ODEVs 内 MBP 浓度显著增加。HC 与 MS 患者 (CIS、RRMS 和 PPMS) 血清 ODEVs 中 MBP 水平 ROC 分析 AUC 为 0.96 (敏感性 = 97.84%, 特异性 = 100.00%), PPMS 与 RRMS+CIS 血清 ODEVs 中 MBP 水平 ROC 分析 AUC 为 0.80 (敏感性 = 66.67%, 特异性 = 87.50%)。Pearson 相关性分析显示,血清 ODEVs 中 MBP 水平分别与扩展残疾状态量表 ($r = 0.32, P < 0.01$) 和多发性硬化严重程度评分 ($r = 0.32, P < 0.01$) 显著正相关。以上结果表明血清 ODEVs 中 MBP 水平可作为 MS 分型诊断和监测疾病进展潜在生物标志物。

5 外周血 BCDEVs 作为创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 生物标志物研究

TBI 是指大脑遭受外部机械力创伤后引起脑部功能紊乱的复杂性疾病,世界范围内,每年约 5 000 多万人罹患 TBI,约一半人口一生中会发生一次或多次 TBI^[76],目前已成为世界性公共卫生问题。TBI 后引起的慢性脑功能紊乱包括认知障碍 (cognitive impairment, CI)、慢性脑震荡及创伤后应激障碍 (post-traumatic stress disorder, PTSD),尤其是对于运动员或者军人等在训练或者参加军事行动过程中较易发生轻中度 TBI 的特殊人群,往往由于缺乏临床症状及影像学表现而诊断困难,因此临床中急需寻找一些可靠轻中度 TBI 诊断生物标志物,以便早期发现,早期干预。

Goetzl 等人分别纳入了年龄在 18~26 岁 1 周内发生运动相关的急性轻度 TBI (mild TBI, mTBI)、超过 3 个月发生 2~4 次运动相关慢性 mTBI 及 HC, 富集

上述受试者血浆 NDEVs。与 HC 相比,仅急性 mTBI 血浆 NDEVs 浓度显著降低,并且其内一系列神经功能性脑蛋白包括 ras 相关的小 GTPase10、annexin VII、泛素 C 末端水解酶 L1、AH 血影蛋白片段、claudin-5、氯化钠-钾协同转运蛋白-1 和 AQP4 水平相较于 HC 显著异常,表现为不同程度地升高或降低^[77]。随后 Goetzl 等人又探讨了慢性 TBI 对 CI 患者血浆 NDEVs 内蛋白水平的影响,结果发现,在 TBI 后 3~12 个月内,与 TBI 无 CI 患者相比,TBI 合并 CI 患者血浆 NDEVs 内细胞肌病毒蛋白、突触素-3、P-T181-Tau、P-S396-Tau 和 A β 42 水平显著升高,而 claudin-5、annexin VII 和 AQP4 在有无 TBI 合并 CI 两组患者中均未升高^[78]。而在随后的体外细胞实验中,Winston 等人^[79]发现 TBI 患者血浆 NDEVs 中存在高水平 A β 42,可对体外培养的神经元细胞产生细胞毒性作用,可损坏神经元细胞膜的完整性,进一步证明了 TBI 患者血浆 NDEVs 中神经退行性变生物标志物的存在^[79]。以上结果提示急慢性 TBI 可能引起大脑不同病理学改变,这为运动相关 mTBI 诱导的神经退行性病变寻找可供参考的病因学上的生物标志物提供新思路。同时血浆 NDEVs 中神经退行性变相关蛋白的异常,为 TBI 介导的 CI 潜在药物开发提供新的治疗靶点。

随后 Goetzl 等人通过对 TBI 患者血浆 ADEVs 内神经毒性补体蛋白水平定量分析,探讨补体介导的 TBI 潜在发病机制。发现急性 TBI 后血浆 ADEVs 水平下降,并在几个月内恢复正常。与 HC 相比,急性 TBI 血浆 ADEVs 内经典途径 C4b、替代途径因子 D 和因子 Bb、凝集素途径甘露糖结合凝集素、共享神经毒性效应物 C3b 和 C5b-9 末端 C 复合物水平显著升高,并且在随后长达数十年时间里一直维持在较高水平^[80]。以上结果表明补体系统的激活可能参与了 TBI 的病理,提示开发补体抑制剂可能对急性 TBI 有治疗作用。

为了寻找外周血中与 TBI 后慢性脑震荡和 PTSD 相关生物标志物,Gill 等人^[81]对军人 mTBI 血浆 NDEVs 内 Tau、A β 42、TNF α 、IL-6 和白介素-10 (IL-10) 水平进行定量分析后发现。与无 mTBI 组相比,mTBI 组血浆 NDEVs 内 Tau、A β 42 和 IL-10 水平显著升高,回归分析显示 mTBI 后脑震荡症状与 NDEVs 内 Tau 蛋白升高相关 ($B = 0.70, t = 2.95, P < 0.01$), PTSD 症状与 NDEVs 内 IL-10 水平升高相关 ($B = 0.8, t = 2.60, P < 0.01$)。这些发现表明 Tau 蛋白可能参与 mTBI 后慢性脑震荡症状病理,同时也提示 mTBI 后 PTSD 可能与中枢炎症活动增强有关,为炎症可能参与 TBI 后慢性 PTSD 提供新证据^[81]。

6 外周血 BCDEVs 作为 MDD 生物标志物研究

WHO 已将 MDD 列为全球残疾的最大单一因素^[82,83]。既往研究发现 MDD 患者血液中神经递质、色氨酸代谢物、内分泌激素、免疫细胞因子以及生长和神经营养因子的浓度与 HC 相比存在显著差异^[84-87],这些基于血液生物标志物研究增加了对 MDD 相关病理生理的理解,但这些变化通常缺乏疾病特异性和关于 MDD 严重程度或对治疗反应变化的预测能力。最近发表的一些文章评估了从 MDD 患者血浆或血清富集的 NDEVs 或 ADEVs 中潜在生物标志物,例如 IRS-1^[88]、线粒体蛋白^[89]、外泌体大小和 miRNA^[90]以及炎症分子^[91],为客观识别 MDD 及其

潜在发病机制提供了新思路。

Rong等人比较了MDD(70例)和HC(70例)血清ADEVs内多个炎症因子变化后发现,与HC相比,MDD患者血清ADEVs中干扰素- γ 、IL-12p70、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 和IL-17A均显著增加,单个炎症因子ROC分析AUC介于0.52~0.70之间,联合上述多个差异表达炎症因子ROC分析AUC为0.92(95%CI 0.860~0.974),然而,多重比较校正后,MDD患者上述差异表达炎症因子与发病年龄、病程、当前发作时间和抑郁严重程度等临床特征之间无相关性^[91]。

既往研究表明,外周血BCDEVs及其内容物可作为MDD抗抑郁治疗反应生物标志物。Goetzl等人^[89]在一项共纳入20例MDD患者小样本临床研究中,通过观察接受8周选择性血清素再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor,SSRI)治疗前后MDD患者血浆NDEVs中14种功能性线粒体蛋白包括线粒体动力和功能维持类蛋白、线粒体能量产生类蛋白、线粒体代谢和细胞存活类蛋白和线粒体生物发生类蛋白变化后发现,与HC相比,MDD患者SSRI治疗前基线期血浆NDEVs内控制线粒体生物发生和许多抗氧化基因反应的转录2型核呼吸因子(transcriptional type 2 nuclear respiratory factor,NRF2)、亲环素D、线粒体融合蛋白2、亮氨酸拉链EF-手含跨膜1蛋白的钙通道/钙通道增强剂成分、线粒体连接蛋白突触亲蛋白、肌球蛋白VI、内膜电子传递复合物I和III、烟酰胺单核苷酸腺苷酸转移酶2、神经元线粒体代谢调节和保护因子人蛋白和线粒体12S rRNA-C开放阅读框蛋白均显著降低,而促神经退行性NADase不育 α 和含有TIR基序的蛋白质1水平显著升高。在对SSRI治疗有反应的MDD患者中,除复合物I、NRF2和PPAR γ 辅激活剂-1 α 外,其他线粒体功能蛋白水平恢复正常,而在对SSRI治疗无反应MDD患者中,上述血浆NDEVs线粒体功能蛋白水平未见改变^[89]。而在另一项研究中,Saeedi等人分别从两个时间点(基线和随访8周后)对艾司西酞普兰治疗有反应($n=20$)和无反应($n=20$)MDD患者血浆NDEVs分析后发现,与HC相比,未经治疗MDD血浆NDEVs平均直径变小,蒙哥马利抑郁量表(montgomery-asberg depression rating scale,MADRS)评分变化与平均NDEVs大小随治疗的变化之间存在显著相关性($r=-0.196,P<0.01$),同时血浆NDEVs内miR-423-3p、miR-191-5p、miR-486-5p、miR-30d-5p、miR-425-5p、miR-25-3p、miR-21-5p、miR-335-5p和miR-126-5p水平随抗抑郁治疗反应发生显著性差异改变,miR-21-5p、miR-30d-5p和miR-486-5p三条miRNA组合预测MDD患者艾司西酞普兰抗抑郁治疗反应ROC分析AUC为0.83(敏感性=76%,特异性=84%)^[90]。以上结果表明,MDD患者血浆NDEVs大小和其内线粒体蛋白和miRNA水平的改变可作为评估抗抑郁药物反应生物标志物。

胰岛素信号转导对神经可塑性、大脑代谢及全身能量代谢都至关重要^[92-95],既往研究表明,胰岛素抵抗参与MDD病理生理过程^[96,97]。Nasca等人通过对MDD患者血浆NDEVs及其内IRS-1和丝氨酸-312磷酸化IRS-1(pSer-IRS-1)定量分析后发现,与HC相比,MDD患者血浆NDEVs浓度增加,NDEVs内IRS-1

水平升高,并且IRS-1水平的升高与MDD患者自杀和快感缺失相关^[88]。这些发现为建立脑胰岛素抵抗机制框架提供了新见解,也为进一步MDD药物治疗开发提供新的药物靶点依据。

7 外周血BCDEVs作为其他精神性疾病生物标志物研究

除了探索BCDEVs作为MDD潜在生物标志物外,研究者还探索BCDEVs作为其他精神性疾病包括首发精神病(first-episode psychotics,FP)、压力诱发疲劳障碍(stress-induced exhaustion disorder,SED)和双相情感障碍(bipolar disorder,BD)潜在生物标志物价值。

在一项小样本病例对照研究中,Goetzl等人^[98]对10名未经治疗FP患者血浆ADEVs和NDEVs内神经线粒体电子传递蛋白和补体蛋白进行定量分析后发现。与HC相比,FP患者血浆ADEVs和NDEVs中NADH-泛醌氧化还原酶(复合物I)的亚基1和6以及细胞色素b-c1氧化酶(复合物III)的亚基10水平显著降低。与HC相比,FP患者血浆ADEVs中胶质纤维酸性蛋白和C3b调节蛋白水平显著升高,神经保护蛋白白血病抑制因子水平显著降低^[98]。随后Goetzl等人又对FP患者血浆NDEVs和ADEVs内线粒体神经保护蛋白进行定量分析后发现。与HC相比,FP患者血浆ADEVs和NDEVs内线粒体融合蛋白2、亲环素D、线粒体短开放阅读框神经保护及代谢调节肽人蛋白和线粒体12S rRNA-C开放阅读框蛋白水平显著降低^[99]。而在另一项对FP患者血浆NDEVs中线粒体钙离子通道蛋白水平研究发现,与HC相比,FP患者血浆NDEVs中亮氨酸拉链EF-手含跨膜1蛋白、瞬时受体电位阳离子通道亚家族M成员4和溶质载体家族8成员B1或线粒体Na⁺/Ca²⁺交换物的水平显著降低,而电压依赖的1型钙通道亚基 α -1C水平显著升高^[100]。以上结果表明血浆BCDEVs内线粒体蛋白和补体蛋白水平可能有助于预测FP,有助于了解FP背后潜在发病机制,同时为探寻FP潜在药物治疗靶点提供新思路。

越来越多的证据表明,神经炎症与BD的发病有关,TNF- α 拮抗剂英夫利昔单抗可改善BD和儿童虐待史个体亚群抑郁症状^[101]。为了探索英夫利昔单抗抗抑郁作用机制介质,Mansur等人分别富集55例成人BD在基线和治疗第2周、6周、12周(终点)血浆NDEVs,对其内的细胞炎症因子进行定量分析后发现,英夫利昔单抗可通过TNFR1、NF- κ B和NF- κ B抑制剂的时间相互作用来改善合并儿童虐待史BD患者抑郁样症状,在英夫利昔单抗治疗患者中,血浆NDEVs内TNFR1水平降低与MADRS评分降低相关,在第6周($r=0.672,P=0.005$)比第2周($r=0.849,P=0.985$)或第12周($r=0.801,P=0.128$)更明显,同时TNFR1水平降低与整体大脑皮质厚度增加相关($r=-0.581,P=0.029$)。以上结果提示,英夫利昔单抗可能以儿童期创伤依赖的方式参与BD患者TNFR/NF- κ B神经炎症通路^[102]。

综上所述,外周血BCDEVs包含的多种与疾病相关生物分子和数量变化在CNS疾病的早期诊断、鉴别诊断、疾病预测、预后评估以及疾病机制研究方面扮演着重要的角色,显示出较好的诊断、预后及疗效评估等潜力,然而,这些生物标志物的特异性和敏

感性仍需进一步研究和验证,尤其需要大规模多中心临床研究来验证其作为生物标志物的可靠性、准确性和临床应用价值。同时目前基于BCDEVs生物标志物研究尚处于实验室研究起步阶段,具体的BCDEVs在脑内如何包装致病性蛋白及EVs如何从中枢转运到外周的潜在机制尚不清楚。然而尽管如此,基于血液的中枢来源的生物标志物有可能彻底改变临床过程中识别和监测患者的方式,代替进行一系列冗长而繁琐的检测,开发一种分析血液中多种疾病相关蛋白质组合的单一方法,将提高外周血BCDEVs在临床试验中对患者试验和结果监测的诊断准确性。同时基于外周血BCDEVs研究,也可早期确定某些药物治疗的有益和/或有害结局,进而可以指导制药公司和其他研究人员在进行临床试验前期初步了解药物对疾病的影响,以提高药物研发效率。同时由于EVs可双向通过BBB,可以制造携带信号分子、药物或小干扰RNA的EVs,将这些化合物通过BBB运输到脑部,以靶向特定的细胞亚型,这将克服BBB本身对大脑运送的限制,并提供良好的生物相容性、高靶向特异性和低免疫原性^[103]。

8 基于外周血BCDEVs研究面临的挑战

虽然基于外周血BCDEVs是一个迅速发展和极具前景的研究领域,然而,要使这些分析成为测量CNS疾病生物标志物的标准方法,还需要克服诸多挑战。如上所述,为了富集外周血BCDEVs,需寻找更加特异性BCDEVs标记物,如由Zhang等人鉴定的L1CAM分子虽然显示出神经元细胞起源特异性^[31],并在多个研究中被证实^[90,104],然而,目前已知L1CAM也在某些肿瘤和其他一些细胞如肾细胞中表达^[105],虽然目前没有直接证据表明外周血中L1CAM阳性EVs是从肾脏和其他外周细胞类型中分泌,同时最近一篇研究甚至认为血液中L1CAM可能与NDEVs无关^[45]。同样,其他CNS不同脑细胞包括星形胶质细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞来源特异性EVs表面标记物,以及来自受不同CNS疾病影响的不同大脑区域的特异性分子标记物也应进一步探索,以确定对每种CNS疾病更加特异性的生物标志物候选分子。因此,识别更具有CNS特异性或特定于脑细胞亚群或特定脑区的EVs表面标记物是本领域目前面临的重要挑战之一。外周血BCDEVs研究另一个面临的挑战是EVs的分离和表征。虽然目前已建立多种EVs分离和表征方法,但这些分离和表征方法都有各自的局限性,并且大多数分离和表征方法还没有建立标准化流程,使得该领域无法具体定义不同研究人员所研究的EVs亚群,这也解释了为何不同课题组实验结果的不一致性^[32,36,106]。因此,未来可进一步开发用于单个EVs分离和表征的新技术,使用多个标记分子准确可靠地分析单个EVs具有许多优势,如减少污染信号/噪声,减少对样品材料的要求,以及更容易定位EVs亚群,以便更快速、敏感和准确地对EVs进行分析。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 张高嘉负责设计论文框架、收集文献、起草论文和论文修改;孔岩、李玲、焦娇、徐丹丹、曹育嘉和刘梦雨论文修改;张志珺负责对文章的知识性内容作批评性审阅及论文修改。

[参考文献]

- [1] Mathieu M, Martin-Jaular L, Laviue G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1):9-17.
- [2] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4):213-228.
- [3] Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk[J]. *J Immunol*, 2007, 179(3):1969-1978.
- [4] Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages[J]. *J Transl Med*, 2011, 9:9.
- [5] Muraoka S, Jedrychowski MP, Tatebe H, et al. Proteomic profiling of extracellular vesicles isolated from cerebrospinal fluid of former national football league players at risk for chronic traumatic encephalopathy[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13:1059.
- [6] Wu M, Ouyang Y, Wang Z, et al. Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(40):10584-10589.
- [7] Street JM, Koritzinsky EH, Glispie DM, et al. Urine exosomes: an emerging trove of biomarkers[J]. *Adv Clin Chem*, 2017, 78:103-122.
- [8] Han Y, Jia L, Zheng Y, et al. Salivary exosomes: emerging roles in systemic disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(6):633-643.
- [9] Lazo S, Noren Hooten N, Green J, et al. Mitochondrial DNA in extracellular vesicles declines with age[J]. *Aging Cell*, 2021, 20(1):e13283.
- [10] Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, et al. Reassessment of exosome composition[J]. *Cell*, 2019, 177(2):428-445. e18.
- [11] Lobb RJ, Hastie ML, Norris EL, et al. Oncogenic transformation of lung cells results in distinct exosome protein profile similar to the cell of origin[J]. *Proteomics*, 2017, 17(23-24):10.1002/pmic.201600432.
- [12] Li Y, He X, Li Q, et al. EV-origin: Enumerating the tissue-cellular origin of circulating extracellular vesicles using exLR profile[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18:2851-2859.
- [13] 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.
- [14] Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12):1470-1476.
- [15] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478):eaau6977.
- [16] Meldolesi J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8):R435-R444.
- [17] Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, et al. Extracellular miRNAs: from biomarkers to mediators of physiology and disease[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(4):656-673.
- [18] Andaloussi SE, Mäger I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5):347-357.
- [19] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4):239-257.
- [20] Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(1):56-65.
- [21] Spaulding HR, Kelly EM, Quindry JC, et al. Autophagic dysfunction and autophagosome escape in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Acta Physiol*, 2018, 222(2):10.1111/apha.12944.
- [22] Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more[J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(2):43-51.
- [23] Xu R, Greening DW, Zhu HJ, et al. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4):1152-1162.
- [24] Simons M, Raposo G. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4):575-581.
- [25] Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis[J]. *Cells*, 2019, 8(7):727.

- [26] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(19):9412-9420.
- [27] Roudi S, Rädler JA, El Andaloussi S. Therapeutic potential of extracellular vesicles in neurodegenerative disorders[J]. *Handb Clin Neurol*, 2023, 193:243-266.
- [28] Colombo E, Borgiani B, Verderio C, et al. Microvesicles; novel biomarkers for neurological disorders[J]. *Front Physiol*, 2012, 3:63.
- [29] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends[J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4):373-383.
- [30] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines[J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1):1535750.
- [31] Shi M, Liu C, Cook TJ, et al. Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 128(5):639-650.
- [32] Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: a case-control study[J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11(6):600-607. e1.
- [33] Tian C, Stewart T, Hong Z, et al. Blood extracellular vesicles carrying synaptic function- and brain-related proteins as potential biomarkers for Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19(3):909-923.
- [34] Jiang C, Hopfner F, Katsikoudi A, et al. Serum neuronal exosomes predict and differentiate Parkinson's disease from atypical Parkinsonism[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020, 91(7):720-729.
- [35] Athauda D, Gulyani S, Karnati HK, et al. Utility of neuronal-derived exosomes to examine molecular mechanisms that affect motor function in patients with parkinson disease: a secondary analysis of the exenatide-PD trial[J]. *JAMA Neurol*, 2019, 76(4):420-429.
- [36] Jia L, Qiu Q, Zhang H, et al. Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid[J]. *Alzheimers Dement*, 2019, 15(8):1071-1080.
- [37] Kluge A, Bunk J, Schaeffer E, et al. Detection of neuron-derived pathological α -synuclein in blood[J]. *Brain*, 2022, 145(9):3058-3071.
- [38] Ohmichi T, Mitsuhashi M, Tatebe H, et al. Quantification of brain-derived extracellular vesicles in plasma as a biomarker to diagnose Parkinson's and related diseases[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2019, 61:82-87.
- [39] Goetzl EJ, Mustapic M, Kapogiannis D, et al. Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease[J]. *FASEB J*, 2016, 30(11):3853-3859.
- [40] Wallensten J, Mobarrez F, Asberg M, et al. Isoforms of soluble vascular endothelial growth factor in stress-related mental disorders: a cross-sectional study[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):16693.
- [41] Yu Z, Shi M, Stewart T, et al. Reduced oligodendrocyte exosome secretion in multiple system atrophy involves SNARE dysfunction[J]. *Brain*, 2020, 143(6):1780-1797.
- [42] Kumar A, Kim S, Su Y, et al. Brain cell-derived exosomes in plasma serve as neurodegeneration biomarkers in male cynomolgus monkeys self-administering oxycodone[J]. *EBioMedicine*, 2021, 63:103192.
- [43] Zhang G, Li L, Kong Y, et al. Vitamin D-binding protein in plasma microglia-derived extracellular vesicles as a potential biomarker for major depressive disorder[J]. *Genes Dis*, 2023, 11(2):1009-1021.
- [44] Kumar A, Su Y, Sharma M, et al. microRNA expression in extracellular vesicles as a novel blood-based biomarker for Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 4:18.
- [45] Norman M, Ter-Ovanesyan D, Trieu W, et al. L1CAM is not associated with extracellular vesicles in human cerebrospinal fluid or plasma[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(6):631-634.
- [46] Kapogiannis D, Mustapic M, Shardell MD, et al. Association of extracellular vesicle biomarkers with alzheimer disease in the Baltimore longitudinal study of aging[J]. *JAMA Neurol*, 2019, 76(11):1340-1351.
- [47] Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, et al. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease[J]. *Neurology*, 2015, 85(1):40-47.
- [48] Goetzl EJ, Kapogiannis D, Schwartz JB, et al. Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease[J]. *FASEB J*, 2016, 30(12):4141-4148.
- [49] Zhang N, Gu D, Meng M, et al. TDP-43 is elevated in plasma neuronal-derived exosomes of patients with Alzheimer's disease[J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12:166.
- [50] Cha DJ, Mengel D, Mustapic M, et al. miR-212 and miR-132 are downregulated in neurally derived plasma exosomes of Alzheimer's patients[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13:1208.
- [51] Agliardi C, Guerini FR, Zanzottera M, et al. SNAP-25 in serum is carried by exosomes of neuronal origin and is a potential biomarker of Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(8):5792-5798.
- [52] Goetzl EJ, Schwartz JB, Abner EL, et al. High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease[J]. *Ann Neurol*, 2018, 83(3):544-552.
- [53] Goetzl EJ, Abner EL, Jicha GA, et al. Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease[J]. *FASEB J*, 2018, 32(2):888-893.
- [54] Kapogiannis D, Boxer A, Schwartz JB, et al. Dysfunctionally phosphorylated type 1 insulin receptor substrate in neural-derived blood exosomes of preclinical Alzheimer's disease[J]. *FASEB J*, 2015, 29(2):589-596.
- [55] Winston CN, Goetzl EJ, Baker LD, et al. Growth hormone-releasing hormone modulation of neuronal exosome biomarkers in mild cognitive impairment[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 66(3):971-981.
- [56] Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, et al. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review[J]. *Lancet Neurol*, 2006, 5(1):64-74.
- [57] Kopf D, Frölich L. Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials[J]. *J Alzheimers Dis*, 2009, 16(4):677-685.
- [58] Pal K, Mukadam N, Petersen I, et al. Mild cognitive impairment and progression to dementia in people with diabetes, prediabetes and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 2018, 53(11):1149-1160.
- [59] Chi H, Yao R, Sun C, et al. Blood neuroexosomal mitochondrial proteins predict alzheimer disease in diabetes[J]. *Diabetes*, 2022, 71(6):1313-1323.
- [60] Winston CN, Goetzl EJ, Schwartz JB, et al. Complement protein levels in plasma astrocyte-derived exosomes are abnormal in conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease dementia[J]. *Alzheimers Dement*, 2019, 11:61-66.
- [61] Winston CN, Goetzl EJ, Akers JC, et al. Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile[J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 3:63-72.
- [62] Ihara Y, Morishima-Kawashima M, Nixon R. The ubiquitin-proteasome system and the autophagic-lysosomal system in Alzheimer disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(8):a006361.
- [63] Urbanelli L, Magini A, Buratta S, et al. Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate[J]. *Genes*, 2013, 4(2):152-170.
- [64] Noguera-Ortiz CJ, Mahairaki V, Delgado-Peraza F, et al. Astrocyte- and neuron-derived extracellular vesicles from Alzheimer's disease patients effect complement-mediated neurotoxicity[J]. *Cells*, 2020, 9(7):1618.
- [65] Lu T, Aron L, Zullo J, et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2014, 507(7493):448-454.
- [66] Liu CC, Tsai CW, Deak F, et al. Deficiency in LRP6-mediated Wnt signaling contributes to synaptic abnormalities and amyloid pathology in Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 2014, 84(1):63-77.
- [67] Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, et al. Low neural exosomal levels of cellular survival factors in Alzheimer's disease[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2015, 2(7):769-773.
- [68] Koga S, Sekiya H, Kondru N, et al. Neuropathology and molecular diagnosis of Synucleinopathies[J]. *Mol Neurodegener*, 2021,

- 16(1):83.
- [69] Niu M, Li Y, Li G, et al. A longitudinal study on α -synuclein in plasma neuronal exosomes as a biomarker for Parkinson's disease development and progression[J]. *Eur J Neurol*, 2020, 27(6): 967-974.
- [70] Zhao ZH, Chen ZT, Zhou RL, et al. Increased DJ-1 and α -synuclein in plasma neural-derived exosomes as potential markers for Parkinson's disease[J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 10:438.
- [71] Zou J, Guo Y, Wei L, et al. Long noncoding RNA POU3F3 and α -synuclein in plasma L1CAM exosomes combined with β -glucocerebrosidase activity: potential predictors of Parkinson's disease[J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(3):1104-1119.
- [72] Dutta S, Hornung S, Krueyatidee A, et al. α -Synuclein in blood exosomes immunoprecipitated using neuronal and oligodendroglial markers distinguishes Parkinson's disease from multiple system atrophy[J]. *Acta Neuropathol*, 2021, 142(3):495-511.
- [73] Athauda D, Maclagan K, Skene SS, et al. Exenatide once weekly versus placebo in Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2017, 390(10103): 1664-1675.
- [74] Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, et al. Multiple sclerosis[J]. *Lancet*, 2018, 391(10130): 1622-1636.
- [75] Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis[J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(10):903-912.
- [76] Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research[J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(12):987-1048.
- [77] 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.
- [78] 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.
- [79] Winston CN, Romero HK, Ellisman M, et al. Assessing neuronal and astrocyte derived exosomes from individuals with mild traumatic brain injury for markers of neurodegeneration and cytotoxic activity[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13:1005.
- [80] 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.
- [81] Gill J, Mustapic M, Diaz-Arrastia R, et al. Higher exosomal tau, amyloid-beta 42 and IL-10 are associated with mild TBIs and chronic symptoms in military personnel[J]. *Brain Inj*, 2018, 32(11):1359-1366.
- [82] Ferrari AJ, Somerville AJ, Baxter AJ, et al. Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature[J]. *Psychol Med*, 2013, 43(3):471-481.
- [83] Ferrari AJ, Charlson FJ, Norman RE, et al. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010[J]. *PLoS Med*, 2013, 10(11):e1001547.
- [84] Sigitova E, Fišar Z, Hroudová J, et al. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder[J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2017, 71(2):77-103.
- [85] Strawbridge R, Young AH, Cleare AJ. Biomarkers for depression: recent insights, current challenges and future prospects[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2017, 13:1245-1262.
- [86] Kennis M, Gerritsen L, van Dalen M, et al. Prospective biomarkers of major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(2):321-338.
- [87] Sakurai M, Yamamoto Y, Kanayama N, et al. Serum metabolic profiles of the tryptophan-kynurenine pathway in the high risk subjects of major depressive disorder[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):1961.
- [88] Nasca C, Dobbin J, Bigio B, et al. Insulin receptor substrate in brain-enriched exosomes in subjects with major depression: on the path of creation of biosignatures of central insulin resistance[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(9):5140-5149.
- [89] Goetzl EJ, Wolkowitz OM, Srihari VH, et al. Abnormal levels of mitochondrial proteins in plasma neuronal extracellular vesicles in major depressive disorder[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(12): 7355-7362.
- [90] Saeedi S, Nagy C, Ibrahim P, et al. Neuron-derived extracellular vesicles enriched from plasma show altered size and miRNA cargo as a function of antidepressant drug response[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(12):7417-7424.
- [91] Xie XH, Lai WT, Xu SX, et al. Hyper-inflammation of astrocytes in patients of major depressive disorder: evidence from serum astrocyte-derived extracellular vesicles[J]. *Brain Behav Immun*, 2023, 109:51-62.
- [92] Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(3):168-181.
- [93] Biessels GJ, Reagan LP. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015, 16(11):660-671.
- [94] Grillo CA, Piroli GG, Lawrence RC, et al. Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity[J]. *Diabetes*, 2015, 64(11):3927-3936.
- [95] Ferrario CR, Reagan LP. Insulin-mediated synaptic plasticity in the CNS: anatomical, functional and temporal contexts[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 136:182-191.
- [96] Nasca C, Rasgon N, McEwen B. An emerging epigenetic framework of systemic and central mechanisms underlying stress-related disorders[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2019, 44(1):235-236.
- [97] Watson K, Nasca C, Aasly L, et al. Insulin resistance, an unmasked culprit in depressive disorders: promises for interventions[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 136(Pt B):327-334.
- [98] Goetzl EJ, Srihari VH, Guloksuz S, et al. Decreased mitochondrial electron transport proteins and increased complement mediators in plasma neural-derived exosomes of early psychosis[J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1):361.
- [99] Goetzl EJ, Srihari VH, Guloksuz S, et al. Neural cell-derived plasma exosome protein abnormalities implicate mitochondrial impairment in first episodes of psychosis[J]. *FASEB J*, 2021, 35(2): e21339.
- [100] Goetzl EJ, Srihari VH, Mustapic M, et al. Abnormal levels of mitochondrial Ca^{2+} channel proteins in plasma neuron-derived extracellular vesicles of early schizophrenia[J]. *FASEB J*, 2022, 36(8):e22466.
- [101] McIntyre RS, Subramaniapillai M, Lee Y, et al. Efficacy of adjunctive infliximab vs placebo in the treatment of adults with bipolar I/II depression: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Psychiatry*, 2019, 76(8):783-790.
- [102] Mansur RB, Delgado-Peraza F, Subramaniapillai M, et al. Extracellular vesicle biomarkers reveal inhibition of neuroinflammation by infliximab in association with antidepressant response in adults with bipolar depression[J]. *Cells*, 2020, 9(4):895.
- [103] Agliardi C, Clerici M. Blood extracellular vesicles (EVs) of central nervous system origin: a window into the brain[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(1):55-56.
- [104] Mustapic M, Eitan E, Werner JK Jr, et al. Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: a potential window into brain pathologic processes[J]. *Front Neurosci*, 2017, 11:278.
- [105] Kenwright S, Watkins A, De Angelis E. Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(6):879-886.
- [106] Shi M, Kovac A, Korff A, et al. CNS tau efflux via exosomes is likely increased in Parkinson's disease but not in Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(11):1125-1131.

引证本文:张高嘉,孔岩,李玲,等. 外周血脑细胞来源细胞外囊泡作为中枢神经系统疾病生物标志物研究进展[J]. 中馈与神经疾病杂志, 2023, 40(9):771-779.