



外泌体在缺血性卒中诊断及治疗中的研究与应用

尹文婧, 曲 瑒, 任佳欣, 马虹印综述, 郭珍妮, 杨 弋审校

摘要: 缺血性卒中是最常见的脑卒中类型,可导致严重的神经功能障碍,但目前缺乏有效的诊断方法和治疗手段。外泌体是一种天然的囊泡,可以通过递送蛋白质、脂质、核酸发挥细胞间通讯的作用。缺血性卒中发生后,外泌体分泌量增加且内容物发生变化,因此可以作为潜在的生物标志物,用以辅助缺血性卒中的诊断和治疗。本文旨在综述外泌体在缺血性卒中中潜在的诊断价值,并探讨外泌体在卒中后的修复作用以及作为药物载体的应用前景,最后我们简要介绍了基于外泌体的临床研究现状。

关键词: 缺血性卒中; 外泌体; 诊断; 治疗; 药物输送

中图分类号: R743 **文献标识码:** A

Research and application of exosomes in the diagnosis and treatment of ischemic stroke YIN Wenjing, QU Yang, REN Jiaxin, et al. (Stroke Center, The Neurology Hospital, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Ischemic stroke (IS) is the most common type of stroke that can lead to severe neurological dysfunction while effective diagnostic and therapeutic methods are currently limited. Exosomes are natural vesicles that can play a key role in intercellular communication by delivering proteins, lipids, and nucleic acids. Notably, IS could cause changes in the level and content of exosome, which can serve as a potential biomarker to assist the diagnosis and treatment of IS. This article reviews the potential diagnostic value of exosomes, discusses their repair effects, and explores the potential application as drug carriers in IS. We also provide a concise summary of the current clinical research status based on exosomes.

Key words: Ischemic stroke; Exosome; Diagnosis; Treatment; Drug delivery

脑卒中是全球公共健康的高危疾病之一,其中缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)占卒中的87%,可造成严重的残疾并带来沉重的经济负担^[1]。目前各种指南推荐静脉溶栓和血管内治疗作为首选的治疗方法,但其应用受到狭窄治疗时间窗的限制,并且随着发病时间的延长,治疗效果也会相应下降。因此寻找一种快速、简单的诊断方式和有效的治疗手段十分重要。外泌体(exosomes)是一类直径为40~160 nm的天然脂质双层囊泡。1983年研究人员首次在绵羊网织红细胞中发现了它并在1987年将其命名为“外泌体”。最初,外泌体被简单地认为是细胞排出的废物,但随着生物技术的快速发展,人们对外泌体的认识和理解变得更加全面深刻。外泌体作为一种天然的纳米材料,可以运载蛋白质、胆固醇、核酸等物质,并通过脂膜融合和受体-配体识别等机制完成细胞间的信息传递^[2]。最近的研究表明,IS后脑细胞释放的外泌体数量增加,并且外泌体积极参与了IS后脑损伤的恢复过程,成为IS后潜在的生物标志物和治疗靶点。此外,由于外泌体低免疫原性、高生物相容性以及可穿过血脑屏障等特性被视为极具潜能的药物递送载体。本文主要介绍外泌体对IS的诊断价值、治疗价值以及作为药物载体的价值,为IS

的治疗和科学研究提供参考。

1 外泌体的生物发生

外泌体是由各种细胞分泌的脂质囊泡,并且可以在血液、尿液、脑脊液等体液中广泛检测到^[3, 4]。外泌体的生物发生机制已被大多数研究报道,但仍有很多细节需要进一步探索。一般来说,外泌体的生物发生过程涉及4个关键步骤,包括货物分选、多囊泡体(multivesicular bodies, MVBs)的形成和成熟、MVBs的运输以及MVB与质膜的融合^[2],并且这些过程都是在各种机制的严密调节下完成的^[5]。MVBs是外泌体生物发生的中心。细胞质膜的内陷形成了早期内体。随后,早期内体将各种货物整合到腔内囊泡中以形成MVBs,并且可以与各种细胞器(例如反式高尔基体、内质网、线粒体或吞噬体)进行

收稿日期:2023-11-20;修订日期:2023-12-25

基金项目:吉林大学白求恩医学部(2022JBGS03);吉林省科技厅(YDZJ202302CXJD061、20220303002SF);吉林省重点实验室(YDZJ202302CXJD017)

作者单位:(吉林大学第一医院神经专科医院卒中中心,吉林 长春 130021)

通信作者:郭珍妮, E-mail: zhen1ni2@163.com; 杨 弋, E-mail: doc-toryangyi@163.com

信息交流与传递。待 MVBs 成熟后,会经历两条生物学途径,其一就是与溶酶体融合进而被降解;另外一条途径就是与质膜融合,被释放到细胞外并形成外泌体^[6,7]。

2 外泌体在 IS 的诊断作用

IS 由于具有高致残率和高死亡率的特点,并且治疗效果会随着时间的延长而降低^[8]。因此,早期识别或者诊断是急性脑卒中的关键。对于 IS 患者来说,时间就是大脑,寻找一种快速、敏感和准确的诊断方法是控制病情进展和改善预后的关键一环。

在 IS 发生后,不仅外周血细胞和内皮细胞可以释放外泌体^[9],各种脑细胞也可以释放外泌体^[10,11]。这些外泌体可以穿过血脑屏障并在脑脊液和外周血中检测到。因此,有望成为良好的早期诊断和判断 IS 预后的生物标志物^[12]。最近的研究评估了 IS 后外泌体中微小核糖核酸(miRNA)水平的变化,发现 IS 患者的外泌体 miR-134、miR-223 水平明显高于非缺血性卒中患者。这些研究还发现 miR-134、miR-223 的表达水平与美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health Stroke Scale, NIHSS)评分以及脑梗死体积呈现正相关关系。因此,miR-134、miR-223 与 IS 的发生、严重程度和预后紧密相关,是早期诊断和预后的潜在的新型标志物^[13,14]。大脑动脉粥样硬化性卒中(large artery atherosclerotic, LAA)是所有卒中亚型中预后最差、负担最重的一种亚型,该亚型的早期诊断显得更加的重要。2021 年,Zhang 等^[15]发现外泌体中 lnc_000048, lnc_001350 和 lnc_016442 在 LAA 患者中显著增加,并且其水平随着卒中严重程度的增加而升高。此外,研究人员还发现外泌体 lncRNAs 比 NIHSS 评分具有更高的判断预后的能力。Xiao 等^[16]发现外泌体所含有的 circ_0043837 和 circ_0001801 是 LAA 的独立预测因子,其诊断价值优于血浆中的 circRNAs,有助于更好地预防和管理 LAA。这些发现表明,外泌体在 IS 的早期诊断中具有极大的潜力。

IS 包括超早期(<6 h)、急性期(1~7 d)、亚急性期(8~14 d)和恢复期(>14 d),外泌体在鉴别不同时期的 IS 方面也有重要价值。Wang 等^[17]发现与对照组(非卒中患者)相比,亚急性期和恢复期卒中患者血浆外泌体中 miRNA-21-5p 的水平明显增高;超早期卒中患者血浆中外泌体 miR-30a-5p 明显升高,而在急性期中的含量却低于对照组;与超早期患者相比,急性期患者的 miRNA-21-5p 和 miRNA-30a-5p 均较低。因此,外泌体有助于准确地判断 IS 所处时期,并且根据分期及时制定针对性的治疗方案。

基于上述研究发现,外泌体有望作为 IS 早期诊断的重要指标,同时也是评估缺血损伤程度和阶段

的有希望的生物标志物。总之,外泌体对卒中具有重要的诊断价值,需要进一步研究其作为生物标志物的潜力。

3 外泌体在 IS 的治疗作用

3.1 外泌体的潜在治疗作用 IS 后的脑组织修复涉及多个复杂过程,如抗炎、抗凋亡、促进血管生成和神经发生等。众所周知,外泌体可以通过释放各种生物活性物质,如蛋白质、核酸和脂质等与周围细胞进行通信。IS 发生后,外泌体的含量发生了明显变化,这预示着外泌体可能在 IS 中发挥着重要作用。

IS 后会发生一系列炎症级联反应。多种细胞和细胞因子与卒中后的神经炎症有关。尽管炎症在某种程度上有助于卒中的修复^[18],长期不受控制的炎症会导致继发性脑损伤,如神经元损伤、血管老化等。因此,控制炎症是 IS 治疗的关键目标。小胶质细胞在 IS 的炎症反应中发挥重要的作用^[19]。外泌体调节小胶质细胞的表型转化是一种有前景的治疗策略。例如,Zhao 等^[20]发现来源于骨髓间充质干细胞的外泌体可以通过 miR-223-3p 调节 CysLT2R-ERK1/2 介导的小胶质细胞极化发挥抗炎作用。星形胶质细胞和外周免疫细胞也是加剧 IS 炎症反应的重要免疫细胞。研究人员发现,皮质神经元来源的外泌体通过 miR-18c-3p 下调星形胶质细胞中 CXCL1 和炎症因子的表达,并且可以进一步减少浸润脑组织的外周免疫细胞数量,从而改善 IS 后的炎症^[21]。

细胞凋亡广泛地参与到 IS 的发生发展中。来源于骨髓间充质干细胞的外泌体通过 miR-134 下调 caspase-8 的表达进而抑制少突胶质细胞的凋亡,这可能是 IS 的潜在治疗靶点^[22]。Deng 等^[23]发现来源于骨髓间充质干细胞的外泌体通过 miR-138-5p 下调 LCN2、Bax 和 caspase-3 水平达到抑制星形胶质细胞凋亡的作用。由此可见,具有活性成分的外泌体可能通过抑制细胞凋亡,促进 IS 后的神经功能恢复。

在 IS 所致的血管损伤中,促进受损内皮细胞的修复和受损区域血管生成是至关重要的。血管生成是一个复杂的过程,涉及一系列关键因子的相互作用,如 VEGF、VEGFR2、Ang-1 和 Tie-2。Hu 等^[24]发现,来源于骨髓间充质干细胞的外泌体可以通过 miR-21-5p 增加微血管密度。由于脑组织对缺血缺氧极其敏感且耐受性差,当脑血管相应供血动脉被阻塞后,脑部神经元会快速地发生不可逆的损伤,甚至出现坏死。最近的研究发现,外泌体中活性物质能够在神经元中起到很重要的调控作用,通过调节神经轴突的增殖和分化,有助于促进神经元的再生和突触的重塑。例如,Jin 等^[25]发现星形胶质细胞外泌体中的表面蛋白 HepaCAM 通过独特的表面接触

机制促进轴突生长。综上,外泌体在促进血管生成和神经发生方面具有潜力,并促进IS后的神经功能恢复。

3.2 外泌体作为药物载体的作用 1996年,美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准了唯一治疗IS的药物阿替普酶,但其应用受到狭窄治疗窗口的限制。近年来研究人员一直在寻找新的药物(例如,依达拉奉、姜黄素等)来延缓病情进展,然而大多数药物很难通过血脑屏障(blood-brain barrier),该屏障一直是限制IS治疗药物发展的瓶颈^[26]。外泌体具有免疫原性低、稳定性好、递送效率高等特点。更重要的是,外泌体可以穿过血脑屏障,有望成为IS后的药物递送载体。

大量证据表明,活性氧类(ROS)在IS后立即积聚,通过激活线粒体介导的细胞凋亡和破坏血脑屏障的完整性,导致进一步的缺血性损伤。因此,清除ROS可以促进IS的功能恢复。依达拉奉(edaravone, Edv)是一种临床上常用的神经保护药物,可以清除ROS,抑制细胞过氧化物,减少细胞损伤^[27]。然而其应用受到半衰期短、难以通过血脑屏障以及生物利用度低等潜在的限制。为了解决这一问题, Li等^[28]将依达拉奉加载到巨噬细胞衍生的外泌体(Exo+Edv)中,随后发现Exo+Edv提高了依达拉奉的生物利用度,减少了神经元损伤和梗死面积,提供了良好的神经保护作用。Guo等^[29]将依达拉奉加载到血浆来源的外泌体中,与游离依达拉奉相比,负载依达拉奉的外泌体可改善脑靶向性,提高安全性和生物利用度,并减少脑卒中急性期的梗死面积。

与其他抗氧化剂相比,姜黄素是一种从姜科植物姜黄中分离得到的天然抗氧化剂,具有来源简单、抗氧化活性强、无毒等优点。此外,它在治疗IS表现出清除ROS,抗凋亡和神经保护的特性^[30,31]。然而,姜黄素稳定性差且难以通过血脑屏障限制了其临床发展^[32,33]。一些报道已经证实,姜黄素可以被装载到干细胞衍生的外泌体上,并且在IS中产生神经保护作用并减轻缺血再灌注损伤^[34]。近期, He等^[35]将姜黄素装载到巨噬细胞衍生的外泌体(Exo-cur)中,随后发现Exo-cur不仅具有良好的稳定性,而且具有减少缺血脑组织中ROS的作用。

这些结果表明相比传统的药物直接摄入体内的方法,外泌体作为药物载体可以使药物具有更好的稳定性和更高的靶向性,为IS治疗提供了新方向。

4 外泌体的临床试验

近年来,越来越多的研究证实外泌体可以促进IS的神经血管再生和功能恢复。然而基于外泌体治疗IS的临床研究仍处于初步阶段,需要设计良好的临床试验来促进外泌体的临床转化。截至目前,已

经有两个关于外泌体在治疗IS的临床研究注册(NCT03384433、NCT06138210)。前一项临床研究的目的是评估富含mir-124的同种异体间充质干细胞来源的外泌体对改善急性缺血性卒中患者残疾的作用;后一项临床研究的目的是探索人多功能干细胞外泌体对急性缺血性卒中的治疗作用。此外,还有一些是有关外泌体在脑卒中的预测、诊断和预后作用的研究(NCT05035134、NCT05370105),目前仍在招募中。

5 展望

IS是世界范围内高发病率和高死亡率的疾病之一。越来越多的研究人员关注外泌体在IS的作用,并将外泌体看作是一种潜在的IS治疗策略。外泌体作为一种通讯物质和运输载体,在IS中发挥重要作用,例如抗炎、抗凋亡、血管生成、神经发生等。最近的报道集中在外泌体作为一种潜在的药物递送途径在IS的应用。然而,外泌体给药的剂量、频率和途径尚未达成一致,需要进一步研究,以促进外泌体治疗从实验室走向临床。迄今为止,外泌体研究仍处于初始阶段,没有足够的信息可用于将外泌体治疗转化为临床实践。因此,基于外泌体的治疗在减轻IS造成的功能障碍方面具有巨大的潜力,值得进一步研究。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 尹文婧、曲瑒负责设计论文框架、查阅文献并起草论文;任佳欣、马虹印负责查阅文献;郭珍妮负责论文修改;杨弋负责拟定写作思路、指导撰写文章并最后定稿。

[参考文献]

- [1] Tsao CW, Aday AW, Almarazooq ZI, et al. Heart disease and stroke statistics-2023 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2023, 147(8): e93-e621.
- [2] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [3] Huang M, Xiao C, Zhang L, et al. Bioinformatic analysis of exosomal microRNAs of cerebrospinal fluid in ischemic stroke rats after physical exercise [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(6): 1540-1553.
- [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] He C, Zheng S, Luo Y, et al. Exosome theranostics: biology and translational medicine [J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 237-255.
- [6] Liang Y, Duan L, Lu J, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3183-3195.
- [7] Dai J, Su Y, Zhong S, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 145.
- [8] Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 up-

- date to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American heart association/american stroke association [J]. *Stroke*, 2019, 50(12): e344-e418.
- [9] Kanninen KM, Bister N, Koistinaho J, et al. Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(3): 403-410.
- [10] Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, et al. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 182.
- [11] Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(10): 1769-1779.
- [12] Otero-Ortega L, Laso-García F, Frutos MGD, et al. Role of exosomes as a treatment and potential biomarker for stroke [J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(3): 241-249.
- [13] Zhou J, Chen L, Chen B, et al. Increased serum exosomal miR-134 expression in the acute ischemic stroke patients [J]. *BMC Neurol*, 2018, 18(1): 198.
- [14] Chen Y, Song Y, Huang J, et al. Increased circulating exosomal miRNA-223 is associated with acute ischemic stroke [J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 57.
- [15] Zhang S, Wang X, Yin R, et al. Circulating exosomal lncRNAs as predictors of risk and unfavorable prognosis for large artery atherosclerotic stroke [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(12): e555.
- [16] Xiao Q, Hou R, Li H, et al. Circulating exosomal circRNAs contribute to potential diagnostic value of large artery atherosclerotic stroke [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 830018.
- [17] Wang W, Li DB, Li RY, et al. Diagnosis of hyperacute and acute ischaemic stroke: the potential utility of exosomal microRNA-21-5p and microRNA-30a-5p [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2018, 45(5-6): 204-212.
- [18] Lambertsens KL, Finsen B, Clausen BH. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? [J]. *Acta Neuropathol*, 2019, 137(5): 693-714.
- [19] Dixon MA, Greferath U, Fletcher EL, et al. The contribution of microglia to the development and maturation of the visual system [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 659843.
- [20] Zhao Y, Gan Y, Xu G, et al. MSCs-derived exosomes attenuate acute brain injury and inhibit microglial inflammation by reversing CysLT2R-ERK1/2 mediated microglia M1 polarization [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(5): 1180-1190.
- [21] Song H, Zhang X, Chen R, et al. Cortical neuron-derived exosomal microRNA-181c-3p inhibits neuroinflammation by downregulating CXCL1 in astrocytes of a rat model with ischemic brain injury [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2019, 26(5): 217-233.
- [22] Xiao Y, Geng F, Wang G, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes prevent oligodendrocyte apoptosis through exosomal miR-134 by targeting caspase-8 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(2): 2109-2118.
- [23] Deng Y, Chen D, Gao F, et al. Exosomes derived from microRNA-138-5p-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells confer neuroprotection to astrocytes following ischemic stroke via inhibition of LCN2 [J]. *J Biol Eng*, 2019, 13: 71.
- [24] Hu H, Hu X, Li L, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in ischemic stroke mice via upregulation of miR-21-5p [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 883.
- [25] Jin S, Chen X, Tian Y, et al. Astroglial exosome HepaCAM signaling and ApoE antagonization coordinates early postnatal cortical pyramidal neuronal axon growth and dendritic spine formation [J]. *bioRxiv*, 2023, 14(1): 5150.
- [26] Elsharkasy OM, Nordin JZ, Hagey DW, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: why and how? [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 159: 332-343.
- [27] Enomoto M, Endo A, Yatsushige H, et al. Clinical effects of early edaravone use in acute ischemic stroke patients treated by endovascular reperfusion therapy [J]. *Stroke*, 2019, 50(3): 652-658.
- [28] Li F, Zhao L, Shi Y, et al. Edaravone-loaded macrophage-derived exosomes enhance neuroprotection in the rat permanent middle cerebral artery occlusion model of stroke [J]. *Mol Pharm*, 2020, 17(9): 3192-3201.
- [29] Guo L, Pan J, Li F, et al. A novel brain targeted plasma exosomes enhance the neuroprotective efficacy of edaravone in ischemic stroke [J]. *IET Nanobiotechnol*, 2021, 15(1): 107-116.
- [30] Xie CJ, Gu AP, Cai J, et al. Curcumin protects neural cells against ischemic injury in N2a cells and mouse brain with ischemic stroke [J]. *Brain Behav*, 2018, 8(2): e00921.
- [31] Li W, Suwanwela NC, Patumraj S. Curcumin prevents reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of NF- κ B, ICAM-1, MMP-9 and caspase-3 expression [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 4710-4720.
- [32] Kharat M, Du Z, Zhang G, et al. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: impact of pH, temperature, and molecular environment [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(8): 1525-1532.
- [33] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(6): 807-818.
- [34] Kalani A, Chaturvedi P, Kamat PK, et al. Curcumin-loaded embryonic stem cell exosomes restored neurovascular unit following ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 79: 360-369.
- [35] He R, Jiang Y, Shi Y, et al. Curcumin-laden exosomes target ischemic brain tissue and alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ROS-mediated mitochondrial apoptosis [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 117: 111314.

引证本文:尹文婧,曲 瑒,任佳欣,等. 外泌体在缺血性卒中诊断及治疗中的研究与应用[J]. 中风与神经疾病杂志,2024,41(1):3-6.