

外泌体 miRNA 及其在肺纤维化中的作用研究进展

王泽华, 张丽昀, 张浩澜, 胡成博, 马春燕*

(宁夏大学 生命科学学院 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 中国宁夏 银川 750021)

摘要: 外泌体是由细胞膜与多囊泡体融合并通过胞吐作用释放到胞外的纳米尺寸的脂双层囊泡, 在细胞间通信作为媒介发挥重要作用。微RNA (microRNA, miRNA) 是一类由 18~24 个核苷酸组成的内源性非编码RNA, 在转录后基因表达中充当重要的调节因子。肺纤维化是一种不可逆、进行性的慢性肺部疾病, 多项研究表明外泌体 miRNA 异常表达与肺纤维化发生发展息息相关。本文主要对外泌体及 miRNA 的生物学特性进行概述, 讨论外泌体 miRNA 在肺纤维化疾病中展现出的重要作用以及其作为新型生物标志物在肺纤维化疾病中的巨大潜力。

关键词: 外泌体; 微RNA (miRNA); 肺纤维化; 生物标志物

中图分类号: Q25, R563

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)01-0009-07

Research Progress of Exosomal miRNAs and Their Roles in Pulmonary Fibrosis

WANG Zehua, ZHANG Liyun, ZHANG Haolan, HU Chengbo, MA Chunyan*

(Conservation and Utilization of Special Biological Resources in Western China, College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China)

Abstract: Exosomes are nano-sized lipid bilayer vesicles that are fused by the cell membrane and multivesicles and released into the extracellular space by exocytosis. Exosomes play an important role in intercellular communication. MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous non-coding RNAs consisting of 18~24 nucleotides. miRNAs play an important role in the regulation of post-transcriptional gene expression. Pulmonary fibrosis is an irreversible and progressive chronic lung disease. Many studies have shown that abnormal expression of exosomal miRNAs is closely related to the development of pulmonary fibrosis. This review focuses on the biological characteristics of exosomes and miRNAs, and discusses the important roles of exosomal miRNAs in pulmonary fibrosis and their potential as a novel biomarker in this disease.

Key words: exosome; microRNA (miRNA); pulmonary fibrosis; biomarker

(*Life Science Research*, 2023, 27(1): 009-015)

外泌体(exosomes)是由多种细胞(上皮细胞、巨噬细胞、间充质干细胞、免疫细胞等)主动向胞外分泌的一种纳米级别的胞外囊泡, 在血液、尿液、羊水、脑脊液、淋巴液、母乳、唾液、胃酸等生物液中广泛分布^[1]。其最初被认知为细胞释放的代谢物, 但后续的研究发现外泌体是细胞通信的重要介质^[2], 其携带的蛋白质、核酸、脂质等多种生物活性成分在细胞增殖、细胞凋亡、血管新生、免疫反应及细胞通信等众多生物学过程发挥重要作用^[3]。

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是一种慢性、间质性的肺组织间质损伤疾病, 也是多种肺部疾病的最终表现^[4]。其发病机制复杂, 患者生存周期短、难治愈、病死率高, 目前该疾病尚缺乏确切有效的治疗方法。遗传异常、自身免疫、机体损伤等自身条件因素以及病原微生物感染、放射性元素、职业条件等外部环境因素都会引起复杂肺间质损伤, 根据发病原因的不同, 肺纤维化可分为特发性肺纤维化、继发性肺纤维化、遗传性肺纤维化以

收稿日期: 2022-04-02; 修回日期: 2022-08-03; 网络首发日期: 2022-09-30

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(NZ1633); 国家自然科学基金资助项目(31660255)

作者简介: 王泽华(1997—), 男, 陕西渭南人, 硕士研究生; *通信作者: 马春燕(1975—), 女, 宁夏银川人, 博士, 教授, 主要从事外泌体及动物病原微生物研究, E-mail: machnyan0411@163.com。

及其他肺纤维化^[5]。无论是哪种肺间质损伤,其共同点是纤维化,主要病理特征都包括早期出现弥漫性肺炎,后期出现成纤维细胞过度增殖和细胞外基质沉积^[6]。因此,研究肺纤维化的发病和调控机制以及精准治疗靶点对探究肺纤维化疾病具有重要作用。近年来,外泌体在细胞通信方面成为研究热点。外泌体可由供体细胞转移到受体细胞,其携带的多种活性物质可以在受体细胞内激活或调节相应的信号通路,从而在各种疾病病理形成途径中发挥重要作用。本文对外泌体及其微RNA (microRNA, miRNA)在肺纤维化疾病中的作用研究进展进行综述,以期对肺纤维化的临床诊断和治疗等方面的研究提供新方向。

1 外泌体概述

1983年, Pan等^[7]在研究绵羊网织红细胞成熟过程中首次发现转铁蛋白受体释放到胞外与一种小囊泡有关。1989年, Johnstone等^[8]将这种小囊泡命名为“exosome”。2013年,美国 James E. Rothman等3位科学家荣获诺贝尔生理学或医学奖,以表彰他们发现包括外泌体在内的细胞囊泡的运输调控机制,随后外泌体研究成为生物医学领域的热点^[9]。

外泌体是由活细胞主动分泌的细胞外囊泡之

一,直径为30~150 nm,密度为1.13~1.19 g/mL^[10]。电子显微镜下观察到的外泌体形态为球体、杯型或双凹碟型。外泌体主要来源于细胞膜内陷形成的早期内吞体(early endosomes),早期内吞体经一系列步骤形成晚期内吞体(late endosomes),晚期内吞体形成多个管腔囊泡,即多胞体(multivesicular body, MVB)(图1)。其中,绝大多数多胞体被溶酶体分解,只有少部分与细胞膜融合释放到胞外基质中^[11]。几乎所有类型细胞分泌的外泌体都包含一些共有的蛋白质,如四跨膜蛋白、膜转运和膜融合蛋白、热休克蛋白,但来自胞内细胞器(如线粒体、高尔基体和内质网)的蛋白质却很少^[12]。除蛋白质外,外泌体也富含多种脂质和核酸,所含脂质包括胆固醇、鞘磷脂、神经酰胺和磷脂酰丝氨酸,但不富含溶血磷脂酸^[13]。目前,外泌体与受体细胞之间的相互作用存在3种机制^[14](图1): 1) 外泌体的跨膜蛋白与靶细胞的信号受体直接相互作用; 2) 外泌体与受体细胞质膜融合将其内容物传递到细胞质中; 3) 受体细胞通过胞吞作用直接吞噬外泌体。外泌体内在于受体细胞存在两种去向。其一,被吞噬的外泌体融入靶细胞并继续进行胞吞作用,这种途径将使得外泌体穿过受体细胞并释放到邻近的细胞中; 其二,外泌体与多胞体融合后经胞内溶酶体作用降解。

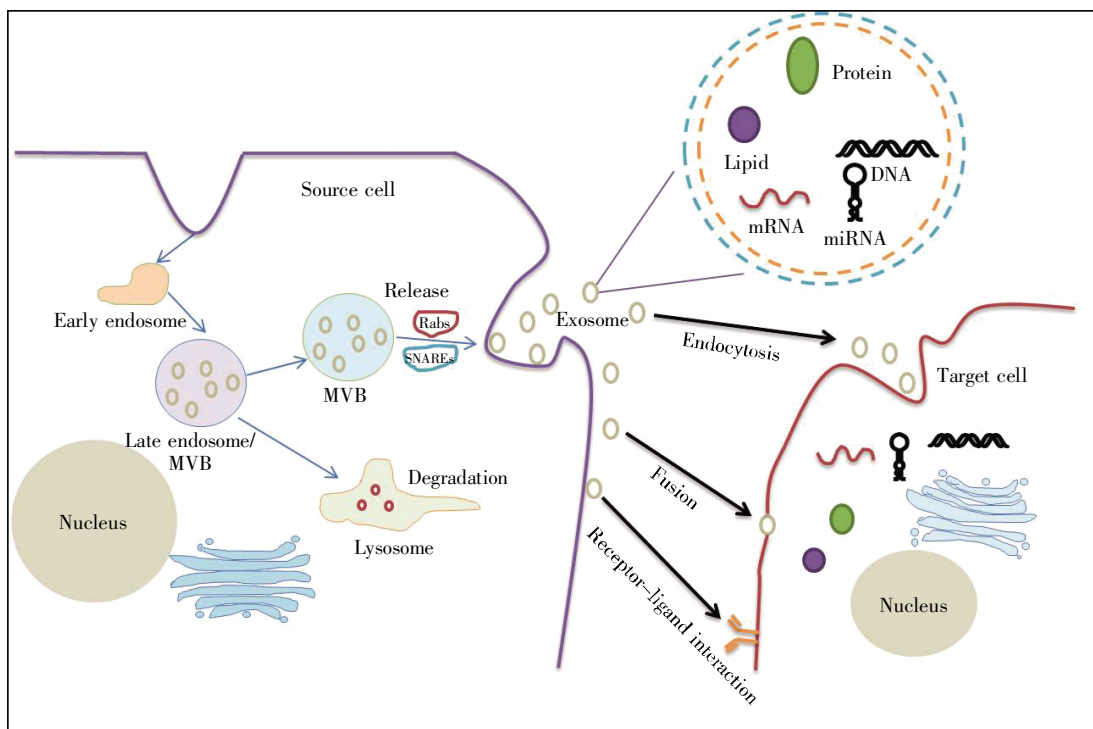


图1 外泌体的生物发生和作用机制(参照文献[13-16],使用 Microsoft PowerPoint 绘制)

Fig.1 Biogenesis and mechanism of action of exosomes (drawn with Microsoft PowerPoint, according to References [13-16])

2 外泌体 miRNA

到目前为止,外泌体中已有 9 769 种蛋白质和 2 838 种 miRNA 被发现(<http://www.exocarta.org/>; 2022-01-10)。miRNA 是一类内源性基因编码的长度为 18~24 个核苷酸的小 RNA,通过与靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合,抑制靶基因及其下游分子的表达,也可以调控靶基因的降解,从而发挥生理调节作用^[15]。外泌体所含 RNA 种类中 miRNA 所占比率最高^[16]。随着组织环境的改变以及外界的刺激作用,外泌体所包含 miRNA 的种类和数量会有所不同。通常,外泌体所含 miRNA 比例高于亲本细胞,这可能与细胞内 miRNA 分选到外泌体的机制有关。可能的途径包括: 1) 中性鞘磷脂酶 2 依赖途径^[17]; 2) 异质性核糖核蛋白依赖途径^[18]; 3) miRNA 的 3'-末端序列依赖途径^[19]。在外泌体 miRNA 的来源中,30% 的 miRNA 产生于编码蛋白质基因的内含子,剩下绝大部分 miRNA 来自特定的 miRNA 基因。miRNA 可随外泌体循环传递到较近或远处的相应靶细胞中,并通过两种方式在受体细胞发挥生物学功能。一种为常规负向调控特定基因的表达,另一种仅存在于少部分外泌体源性 miRNA 中,通过发挥配体功能与 Toll 样受体结合激活免疫细胞^[20]。

3 外泌体 miRNA 可作为疾病生物标志物

生物标志物是标记生物体发生功能变化的生化指标,常用于疾病检测或预后,新型生物标志物的发现、验证和改进对提高疾病诊断与治疗水平十分重要^[21-22]。外泌体作为疾病的新型生物标志物,具有易获取、来源广泛、在各种体液中高度稳定、内容物可以良好反映其亲代细胞的生理状态等优点^[23]。

外泌体中的 miRNA 不仅仅只是遗传信息的调控者,也可以作为疾病的生物标志物。早在 2009 年 Rabinowits 等^[24]就证明,非小细胞肺癌患者的外泌体 miRNA 与非小细胞肺癌组织中的 miRNA 相似,表明外泌体 miRNA 可以作为非小细胞肺癌液体活检材料的标志物。特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种病因不明的肺纤维化,Lacedonia 等^[25]发现 IPF 患者血清来源外泌体 let-7d 和 miR-16 明显下调,通过确定 let-7d 和 miR-16 表达水平可以快速确定

IPF 患者。Njock 等^[26]通过比较 IPF 患者和正常人痰中提取出的外泌体,确定了 miR-142-3p、miR-33a-5p 和 let-7d-5p 这 3 种具有巨大潜力的 miRNA,其中 miR-142-3p 与一氧化碳弥散量和肺泡容积的扩散能力呈负性相关。此研究是 IPF 患者痰来源外泌体 miRNA 含量的首次表征,也表明痰来源外泌体 miRNA 与肺纤维化的严重程度相关。Stachowiak 等^[27]发现,miR-223、miR-451a、miR-27b-3p、miR-486-5p 这 4 种 miRNA 在囊性纤维化患者痰液外泌体中存在明显变化,但在血液无明显差异,推测其可能是判断儿童囊性纤维化发生的潜在生物标志物。有研究报道,从血清来源外泌体中分离的 miR-375 和 miR-1307 可作为卵巢癌诊断的潜在生物标志物,其与传统的生物标志物 CA125 和 HE4 结合可提高癌症诊断的特异性和准确性^[28]。另有研究报道,血浆来源的外泌体 miR-15a-5p 作为新型生物标志物在子宫内膜癌的早期检测中具有重大意义^[29]。Parzibut 等^[30]研究发现,急性呼吸窘迫综合征患者血清来源外泌体中的 miR-130a-3p、miR-221-3p、miR-24-3p、miR-98-3p、let-7d-3p、miR-1273a 和 miR-193a-5p 的表达水平,能以较高准确度区分急性呼吸窘迫综合征患者和健康对照。此外,尿液外泌体 miR-2909 可用作前列腺癌诊断的生物标志物^[31]。

4 外泌体 miRNA 与肺纤维化

肺纤维化是一种进行性呼吸系统疾病,其特征是肌成纤维细胞增生和胶原蛋白沉积。虽然吡非尼酮和尼达尼布已被批准为治疗肺纤维化的药物,但它们无法使受损组织再生,肺纤维化的发病率和死亡率仍居高不下。近期研究表明,外泌体作为信使通过运送 miRNA 在肺组织的修复和纤维化过程中发挥重要作用。

4.1 外泌体 miRNA 对上皮间质转化的调控

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指在特定的生理条件下上皮细胞转化为具有间质表型细胞的生物学过程。在此过程中,上皮细胞特征逐渐丧失,而间质标志物表达上调,细胞失去极性和黏附性而获得迁移和侵袭等特性。EMT 的发生导致大量细胞外基质沉积,大量促纤维化因子被释放,从而促进肺纤维化的病理进程^[32]。在肺纤维化发病过程中,外泌体携带多种与 EMT 相关的 miRNA、蛋白质作用于 EMT 相关的信号通路参与肺纤维化的进程。本课题组

之前的研究发现,巨噬细胞来源外泌体可通过调控 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路,影响相关下游因子的表达,促进转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)诱导的 EMT,且加入脂多糖刺激后巨噬细胞外泌体对 EMT 的作用更强^[33]。

近年来,外泌体 miRNA 作为明星调节分子在 EMT 过程中发挥重要作用。与正常成纤维细胞相比,癌症相关成纤维细胞分泌的外泌体含有较高的 miR-210,其可以靶向 *UPF1* (*up-frameshift 1*) 基因,从而激活 PTEN/PI3K/Akt 信号通路,诱导非小细胞肺癌细胞的 EMT^[34]。已有研究报道,TGF- β 1 诱导的 A549 细胞来源外泌体富含 miR-23b,其可以促进正常 A549 细胞发生 EMT,而该外泌体中的 miR-23a 则可促进 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞的 EMT^[35-36]。巨噬细胞作为肺纤维疾病的关键细胞,其所分泌的外泌体可以将高表达的 miR-21-5 运送至支气管上皮细胞,从而靶向 Smad7 并通过 TGF- β 1/Smad 信号通路促进 EMT,加重纤维化的发生^[37]。除对 EMT 有促进作用之外,外泌体还可以传递一些关键 miRNA 抑制 EMT 的发生。支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)是支气管肺泡灌洗期间通过柔性支气管镜收集的液体。在使用聚六亚甲基胍磷酸盐处理建立的肺纤维化小鼠模型中,BALF 来源外泌体 miR-451a 的表达水平显著降低,导致靶基因 *OSR1* (*odd-skipped related transcription factor 1*) 的表达水平在肺纤维化组织增加,而转染 miR-451a 可以下调 *OSR1* 的表达,抑制 EMT,从而减缓肺纤维化^[38]。总的来讲,现有研究^[39-46]提示,肿瘤细胞等多种细胞来源外泌体在肺脏上皮细胞的 EMT 中发

挥重要调控作用(表 1),且 EMT 的抑制大多是由外泌体内的 miRNA 引起的,而外泌体中的蛋白质、脂质甚至长链非编码 RNA 能否抑制 EMT 仍不清楚,有待继续探究。

4.2 外泌体 miRNA 对成纤维细胞的调控

在正常情况下,肺部成纤维细胞的数量相对较少且处于精确调控状态,胶原的合成和降解也处于动态平衡。在伤口愈合反应过程中,机体成纤维细胞增殖并分化为可收缩的、产生基质的肌成纤维细胞,进而构建新的细胞外基质以支持新细胞并收缩伤口,然后细胞凋亡以解决伤口愈合反应。但在病理性纤维化中,修复反应并未消退,胶原合成和降解的动态平衡被打破,肌成纤维细胞持续存在并导致肺间质内基质蛋白沉积和致纤维因子 TGF- β 大量增加。近几年,有关外泌体 miRNA 与肺部疾病的研究已有大量报道,但详细的调控机制尚未完全阐明。

成纤维细胞在肺纤维化的发生和进展中起关键作用,多项研究表明外泌体 miRNA 能通过调控成纤维细胞的生长和发育影响肺纤维化的进程。成纤维细胞活化为肌成纤维细胞是导致肺纤维化的主要因素之一。Xu 等^[47]发现人脐带间充质干细胞来源外泌体通过转移 let-7i-5p 抑制成纤维细胞活化,从而通过 TGF- β /Smad3 信号通路缓解二氧化硅诱导的肺纤维化。与对照小鼠相比,在博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠中,血清来源外泌体 miR-16 表达上调 8 倍;体内实验证明,miR-16 可抑制雷帕霉素不敏感的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)伴侣的表达,以及 TGF- β 1 诱导的人肺成纤维细胞

表 1 外泌体 miRNA 促进或抑制肺脏上皮细胞的 EMT
Table 1 Exosomal miRNAs promote or inhibit the EMT of lung epithelial cells

Parental cell	Recipient cell	miRNA	Function
Cancer-related fibroblasts	Non-small cell lung cancer cells (H1975 and A549)	miR-210 ^[34]	Promotion
Cancer-related fibroblasts	A549, SPC-A-1-BM	miR-499a-5p ^[39]	Promotion
Mesenchymal phenotype A549 cells	A549	miR-200c, miR-205 ^[40]	Promotion
TGF- β 1-induced A549 cells	A549	miR-23a ^[35]	Promotion
Hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells	Lung epithelial cancer cells H358, A549, and H460	miR-193a-3p, miR-210-3p, miR-5100 ^[41]	Promotion
Bronchial epithelial cells (BEAS-2B)	Bronchial epithelial cells (BEAS-2B)	miR-21 ^[42]	Promotion
Human colorectal cancer (CRC) cell lines SW480, HCT116, LOVO, HT29,	HCT116 cells	miR-1255b-5p ^[43]	Inhibition
Mesenchymal stem cells (MSCs)	Nasopharyngeal carcinoma cell lines CME-2, 5-8F and 6-10B	miR-34c ^[44]	Inhibition
MSCs	Human CRC cell lines	miR-3940-5p ^[45]	Inhibition
Adipose-derived stem cells	Podocytes	miR-215-5p ^[46]	Inhibition

分泌的酸性和富含半胱氨酸蛋白的表达,从而降低肺组织中的肺纤维化^[48]。Kuse 等^[49]研究发现,博来霉素处理 7 d 后,小鼠血清来源外泌体 miR-22 表达上调 2 倍。体外实验发现,miR-22 通过调控细胞外信号调控的激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)途径抑制 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达;体内实验发现,博来霉素诱导 10 d 后,给肺纤维化小鼠转染 miR-22 可降低 α -SMA 表达并减轻肺纤维化。上述研究表明,外泌体 miR-22 可调节成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化,是肺纤维化有潜力的新型治疗靶标。Kadota 等^[50]发现,支气管上皮细胞来源的细胞外囊泡可以有效抑制 TGF- β 诱导的肌成纤维细胞分化和肺上皮细胞衰老,并且这种效果比间充质干细胞细胞外囊泡的作用更明显。这种抑制作用主要与上皮细胞细胞外囊泡传递 miR-16、miR-26a、miR-26b、miR-141、miR-148a、miR-200a 并参与抑制经典和非经典 Wnt 信号通路有关。巨噬细胞与成纤维细胞的信号传递在肺纤维化的病理性进展中也起到重要作用。Wang 等^[51]用测序技术发现,与对照巨噬细胞外泌体相比,经二氧化硅刺激的巨噬细胞外泌体有 298 个 miRNA 差异表达,其中 miR-125a-5p 可靶向调控 *Smurf1* (*Smad specific E3 ubiquitin protein ligase 1*)。进一步的体外实验证明,miR-125a-5p 靶向 *Smurf1* 影响了 TGF- β /Smad1 信号通路,促进了成纤维细胞向肌成纤维细胞分化和肺纤维化的发展。这些研究表明,外泌体通过传递一些特殊的 miRNA 调控成纤维细胞的增殖和活化,对肺纤维化的发生发展具有重要作用。

4.3 外泌体 miRNA 对巨噬细胞的调控

巨噬细胞是一类广泛分布的具有抗菌和吞噬性的先天免疫细胞,在器官发育、机体防御、急性和慢性炎症、组织稳态和重塑以及肺间质纤维化疾病的发病机制中发挥着不可或缺的作用^[52]。巨噬细胞极化是指巨噬细胞受到周围环境以及多种转录因子的刺激出现表型和功能的分化,该极化过程在多种疾病的免疫病理中发挥重要作用。在组织损伤和炎症反应的发展过程中,在局部环境不同因素刺激下巨噬细胞分别极化为 M1 和 M2 两种不同的表型^[53]。

在肺纤维化的生物学过程中,巨噬细胞作为核心的调控细胞在炎症和创口修复方面起到重要作用。脂多糖处理的间充质干细胞通过外泌体传

送 let-7b 调控巨噬细胞极化和慢性炎症消退,达到促进伤口愈合的目的^[54]。相关研究报道,肺泡上皮 I 型细胞来源外泌体含有的一些 miRNA 进入肺泡巨噬细胞,促进炎症小体的激活、中性粒细胞募集和 M1 巨噬细胞的极化,从而支持细菌性肺部感染,达到促炎症反应的目的^[55]。近些年来,巨噬细胞等多种细胞来源的外泌体 miRNA 在肺纤维化中的作用引起人们的广泛关注。Zhou 等^[56]报道,用诱导多能干细胞来源外泌体处理肺纤维化小鼠可传递 miR-302a-3p 靶向 *TET1* 基因,引起 M2 型巨噬细胞减少,从而减轻博来霉素诱导的肺纤维化。Yao 等^[57]研究发现,在肺纤维化大鼠模型中 miR-328 的表达显著上调,而靶基因 *FAM13A* 的表达显著下调。体内和体外实验表明, M2 巨噬细胞来源外泌体 miR-328 的增加和靶基因 *FAM13A* 的沉默都促进了肺成纤维细胞的增殖和细胞外基质沉积,进而加重肺纤维化。Guiot 等^[58]研究发现,和健康对照者相比,IPF 患者痰液和血浆中的外泌体 miR-142-3p 水平均显著升高,且外泌体 miR-142-3p 表达水平与 IPF 患者痰中巨噬细胞百分比呈正相关。该研究还得出,巨噬细胞来源的外泌体通过携带 miR-142-3p 抑制 TGF- β 1 受体和促纤维化基因的表达,从而减轻气道上皮细胞的纤维化。综上可知,在疾病的发生过程中,上皮细胞、间充质干细胞、多种肿瘤细胞等不同细胞来源外泌体 miRNA 都会对巨噬细胞以及巨噬细胞的极化产生调节作用,这可能为肺纤维化疾病的治疗提供新的策略。

5 总结和展望

尽管肺纤维化疾病的研究一直不断深入,但疾病的快速诊断及准确治疗仍然是一个巨大的挑战。外泌体作为一种纳米级细胞外囊泡,其携带的多种物质不仅仅反映了来源组织或细胞的生理状态,也在人体复杂的组织和生理网络环境发挥着重要的通信作用。外泌体所包含的 miRNA 不但可以作为肺脏纤维化疾病诊断的新型分子生物标志物,也可作为重要的调控分子干预肺组织纤维化的发生及进程,但详细的调控机制尚不清楚,有待继续深入研究。

虽然外泌体具有很多优点,但外泌体的临床使用也面临着诸多问题。1) 在外泌体提取方面,现有的外泌体分离和纯化技术确实众多,但这些技术多少都存在一定的局限性,很难找出一种省

时省力并且能大量制备、纯度高的技术。2) 在外泌体制备过程中既要保证其生物活性,也要尽量防止其他条件(培养基条件、细胞活力、微生物污染等)对外泌体所含成分的影响。3) 外泌体具有很大的异质性,其组成因产生它们的细胞类型而异,因此在临床研究中必须对外泌体供体细胞的生理状态进行统一。4) 科研工作者尚未建立将外泌体中具有潜在治疗性 miRNA 精准递送至单个细胞或器官的具体方法。因此,加深外泌体作为递送工具的研究,推动 miRNA 的精准靶向递送,可能为肺纤维化的治疗提供新的治疗策略。5) 外泌体携带多种 miRNA,一种 miRNA 可以调控多个靶基因,不同种 miRNA 也可以调控同一个靶基因。因此,这种复杂的调控网络需要进一步探索。6) 外泌体供体细胞的选择、药物载装方式、载体安全性以及外泌体表面靶向肽的选择等也是有待解决的问题。7) 绝大多数外泌体 miRNA 的作用是从体外实验获得的,而且现有研究仅仅鉴定出少部分 miRNA 标志物。未来应该进一步加深体内研究,探索特定外泌体来源 miRNA 对疾病的调控机制,为临床应用提供理论基础。总的来讲,在肺纤维化的生物治疗中外泌体已经显示出潜在的应用前景,虽然外泌体研究仍存在一些困难,但随着相关研究的不断深入,这些困难将会被逐渐攻破。在未来,外泌体来源 miRNA 在肺纤维化早期诊断、治疗靶点及临床药物开发等方面均有前瞻性指导意义。

参考文献(References):

- [1] LI M Y, LI S S, DU C Y, *et al.* Exosomes from different cells: characteristics, modifications, and therapeutic applications[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 207: 112784.
- [2] MELDOLESI J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication[J]. *Current Biology*, 2018, 28(8): R435–R444.
- [3] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [4] LEDERER D J, MARTINEZ F J. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2018, 378(19): 1811–1823.
- [5] MEYER K C. Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis[J]. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2017, 11(5): 343–359.
- [6] KINOSHITA T, GOTO T. Molecular mechanisms of pulmonary fibrogenesis and its progression to lung cancer: a review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1461.
- [7] PAN B T, JOHNSTONE R M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor[J]. *Cell*, 1983, 33(3): 967–978.
- [8] JOHNSTONE R M, BIANCHINI A, TENG K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions[J]. *Blood*, 1989, 74(5): 1844–1851.
- [9] 洪鹏, 冯娟, 王宪. 细胞囊泡运输调节机制——2013 年诺贝尔生理学或医学奖工作介绍[J]. *生理科学进展(HONG Peng, FENG Juan, WANG Xian. Mechanism of vesicle transport regulation——Nobel Prize in physiology or medicine 2013)*[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2014, 45(3): 235–241.
- [10] PLUCHINO S, SMITH J A. Explicating exosomes: reclassifying the rising stars of intercellular communication[J]. *Cell*, 2019, 177(2): 225–227.
- [11] HESSVIK N P, LLORENTE A. Current knowledge on exosome biogenesis and release[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75(2): 193–208.
- [12] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2019, 88: 487–514.
- [13] SKOTLAND T, HESSVIK N P, SANDVIG K, *et al.* Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology[J]. *Journal of Lipid Research*, 2019, 60(1): 9–18.
- [14] WU P P, ZHANG B, OCANSEY D K W, *et al.* Extracellular vesicles: a bright star of nanomedicine[J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120467.
- [15] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(4): 1202–1207.
- [16] GOLDIE B J, DUN M D, LIN M J, *et al.* Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(14): 9195–9208.
- [17] KOSAKA N, IGUCHI H, HAGIWARA K, *et al.* Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(15): 10849–10859.
- [18] VILLARROYA-BELTRI C, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C, SÁNCHEZ-CABO F, *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2980.
- [19] KOPPERS-LALIC D, HACKENBERG M, BIJNSDORP I V, *et al.* Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes[J]. *Cell Reports*, 2014, 8(6): 1649–1658.
- [20] ZHANG J, LI S, LI L, *et al.* Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2015, 13(1): 17–24.
- [21] POLLER W, DIMMELER S, HEYMANS S, *et al.* Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives[J]. *European Heart Journal*, 2018, 39(29): 2704–2716.
- [22] HE C J, ZHENG S, LUO Y, *et al.* Exosome theranostics: biology and translational medicine[J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 237–255.
- [23] MORI M A, LUDWIG R G, GARCIA-MARTIN R, *et al.* Extracellular miRNAs: from biomarkers to mediators of physiology and disease[J]. *Cell Metabolism*, 2019, 30(4): 656–673.
- [24] RABINOWITS G, GERÇEL-TAYLOR C, DAY J M, *et al.* Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer[J]. *Clinical Lung Cancer*, 2009, 10(1): 42–46.
- [25] LACEDONIA D, SCIOSCIA G, SOCCIO P, *et al.* Downregulation of exosomal let-7d and miR-16 in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *BMC Pulmonary Medicine*, 2021, 21: 188.
- [26] NJOCK M S, GUIOT J, HENKET M A, *et al.* Sputum exosomes: promising biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Thorax*, 2019, 74(3): 309–312.

- [27] STACHOWIAK Z, WOJSZYK-BANASZAK I, JOŃCZYK-PO-TOCZNA K, *et al.* miRNA expression profile in the airways is altered during pulmonary exacerbation in children with cystic fibrosis: a preliminary report[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9(6): 1887.
- [28] SU Y Y, SUN L, GUO Z R, *et al.* Upregulated expression of serum exosomal miR-375 and miR-1307 enhance the diagnostic power of CA125 for ovarian cancer[J]. *Journal of Ovarian Research*, 2019, 12: 6.
- [29] ZHOU L Y, WANG W, WANG F F, *et al.* Plasma-derived exosomal miR-15a-5p as a promising diagnostic biomarker for early detection of endometrial carcinoma[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20: 57.
- [30] PARZIBUT G, HENKET M, MOERMANS C, *et al.* A blood exosomal miRNA signature in acute respiratory distress syndrome[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 640042.
- [31] WANI S, KAUL D, MAVUDURU R S, *et al.* Urinary-exosomal miR-2909: a novel pathognomonic trait of prostate cancer severity[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 259: 135-139.
- [32] XIE L S, ZENG Y. Therapeutic potential of exosomes in pulmonary fibrosis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 590972.
- [33] 尤学红, 郭媛媛, 刘晓明, 等. 脂多糖刺激巨噬细胞获得的外泌体促进 TGF- β 1 诱导的人 A549 细胞上皮间质转化[J]. *细胞与分子免疫学杂志* (YOU Xuehong, GUO Yuanyuan, LIU Xiaoming, *et al.* Exosomes derived from LPS-stimulated macrophages promote TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of human type II alveolar epithelial A549 cells[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*), 2019, 35(8): 673-681.
- [34] YANG F, YAN Y B, YANG Y, *et al.* MiR-210 in exosomes derived from CAFs promotes non-small cell lung cancer migration and invasion through PTEN/PI3K/Akt pathway[J]. *Cellular Signalling*, 2020, 73: 109675.
- [35] KIM J, KIM T Y, LEE M S, *et al.* Exosome cargo reflects TGF- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) status in A549 human lung adenocarcinoma cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 478(2): 643-648.
- [36] CAO M R, SEIKE M, SOENO C, *et al.* miR-23a regulates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition by targeting E-cadherin in lung cancer cells[J]. *International Journal of Oncology*, 2012, 41(3): 869-875.
- [37] LI X, YANG N, CHENG Q, *et al.* miR-21-5p in macrophage-derived exosomes targets Smad7 to promote epithelial mesenchymal transition of airway epithelial cells[J]. *Journal of Asthma and Allergy*, 2021, 14: 513-524.
- [38] JEONG M H, KIM H R, PARK Y J, *et al.* Reprogrammed lung epithelial cells by decrease of miR-451a in extracellular vesicles contribute to aggravation of pulmonary fibrosis[J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2022, 38(5): 725-740.
- [39] HE S, LI Z M, YU Y F, *et al.* Exosomal miR-499a-5p promotes cell proliferation, migration and EMT via mTOR signaling pathway in lung adenocarcinoma[J]. *Experimental Cell Research*, 2019, 379(2): 203-213.
- [40] TANG Y T, HUANG Y Y, LI J H, *et al.* Alterations in exosomal miRNA profile upon epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cell lines[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19: 802.
- [41] ZHANG X N, SAI B Q, WANG F, *et al.* Hypoxic BMSC-derived exosomal miRNAs promote metastasis of lung cancer cells via STAT3-induced EMT[J]. *Molecular Cancer*, 2019, 18: 40.
- [42] HE S Y, CHEN D N, HU M Y, *et al.* Bronchial epithelial cell extracellular vesicles ameliorate epithelial-mesenchymal transition in COPD pathogenesis by alleviating M2 macrophage polarization[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2019, 18: 259-271.
- [43] ZHANG X, BAI J, YIN H, *et al.* Exosomal miR-1255b-5p targets human telomerase reverse transcriptase in colorectal cancer cells to suppress epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Molecular Oncology*, 2020, 14(10): 2589-2608.
- [44] WAN F Z, CHEN K H, SUN Y C, *et al.* Exosomes overexpressing miR-34c inhibit malignant behavior and reverse the radioresistance of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2020, 18: 12.
- [45] LI T, WAN Y C, SU Z Y, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-3940-5p inhibits colorectal cancer metastasis by targeting integrin α 6[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2021, 66(6): 1916-1927.
- [46] JIN J, WANG Y G, ZHAO L, *et al.* Exosomal miRNA-215-5p derived from adipose-derived stem cells attenuates epithelial-mesenchymal transition of podocytes by inhibiting ZEB2[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 2685305.
- [47] XU C J, HOU L, ZHAO J, *et al.* Exosomal let-7i-5p from three-dimensional cultured human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibits fibroblast activation in silicosis through targeting TGFBR1[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 233: 113302.
- [48] INOMATA M, KAMIO K, AZUMA A, *et al.* Rictor-targeting exosomal microRNA-16 ameliorates lung fibrosis by inhibiting the mTORC2-SPARC axis[J]. *Experimental Cell Research*, 2021, 398(2): 112416.
- [49] KUSE N, KAMIO K, AZUMA A, *et al.* Exosome-derived microRNA-22 ameliorates pulmonary fibrosis by regulating fibroblast-to-myofibroblast differentiation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Nippon Medical School*, 2020, 87(3): 118-128.
- [50] KADOTA T, FUJITA Y, ARAYA J, *et al.* Human bronchial epithelial cell-derived extracellular vesicle therapy for pulmonary fibrosis via inhibition of TGF- β -Wnt crosstalk[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2021, 10(10): e12124.
- [51] WANG D, HAO C F, ZHANG L, *et al.* Exosomal miR-125a-5p derived from silica-exposed macrophages induces fibroblast transdifferentiation[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 192: 110253.
- [52] WANG L X, ZHANG S X, WU H J, *et al.* M2b macrophage polarization and its roles in diseases[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2019, 106(2): 345-358.
- [53] LIU G X, ZHAI H Q, ZHANG T, *et al.* New therapeutic strategies for IPF: based on the "phagocytosis-secretion-immunization" network regulation mechanism of pulmonary macrophages[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 118: 109230.
- [54] TI D D, HAO H J, TONG C, *et al.* LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2015, 13: 308.
- [55] LEE H, GROOT M, PINILLA-VERA M, *et al.* Identification of miRNA-rich vesicles in bronchoalveolar lavage fluid: insights into the function and heterogeneity of extracellular vesicles[J]. *Journal of Controlled Release*, 2019, 294: 43-52.
- [56] ZHOU Y, GAO Y, ZHANG W, *et al.* Exosomes derived from induced pluripotent stem cells suppresses M2-type macrophages during pulmonary fibrosis via miR-302a-3p/TET1 axis[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 99: 108075.
- [57] YAO M Y, ZHANG W H, MA W T, *et al.* MicroRNA-328 in exosomes derived from M2 macrophages exerts a promotive effect on the progression of pulmonary fibrosis via FAM13A in a rat model[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2019, 51(6): 1-16.
- [58] GUIOT J, CAMBIER M, BOECKX A, *et al.* Macrophage-derived exosomes attenuate fibrosis in airway epithelial cells through delivery of antifibrotic miR-142-3p[J]. *Thorax*, 2020, 75(10): 870-881.