

综述

外泌体miRNA与心血管疾病

刘方玥¹, 杨杰², 蒋建利², 边惠洁², 南刚^{2*}

(¹空军军医大学基础医学院学员一大队, 西安 710032; ²空军军医大学国家分子医学转化中心, 基础医学院细胞生物学教研室, 西安 710032)

摘要: 心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)是循环系统疾病, 主要表现为心脏或血管功能异常。CVD的病因多样, 包括血流动力学改变、基因突变、全身性疾病导致心脏损伤等, 其发病机制与治疗方式仍需探究。外泌体是具有内吞起源的异质性的纳米级膜囊泡, 可以携带各种“货物”, 如蛋白质、微小RNA(microRNA, miRNA)等。这些物质可以反映外泌体的细胞来源, 并且可以实现细胞间信息交流从而改变靶向细胞的表型。源自不同细胞的外泌体miRNA参与CVD的发生发展, 并产生不同的生物学效应。本文从外泌体miRNA参与CVD的发病机制出发, 梳理了不同细胞来源的外泌体miRNA在CVD中的潜在作用及研究进展。

关键词: 外泌体; 心血管疾病; 微小RNA

Exosomal microRNA and cardiovascular disease

LIU Fangyue¹, YANG Jie², JIANG Jianli², BIAN Huijie², NAN Gang^{2*}

(¹No.1 Cadet Regiment, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China;

²National Translational Science Center for Molecular Medicine, Department of Cell Biology, School of Basic Medicine, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Cardiovascular diseases (CVD) are diseases of the circulatory system, primarily manifested as abnormalities in heart or vascular function. The causes of CVD are diverse, including changes in hemodynamics, gene mutations, and heart damage caused by systemic diseases. The pathogenesis and treatment methods of CVD still need to be explored. Exosomes are heterogenous nanoscale membrane vesicles with endocytic origin that can carry various “cargos”, such as proteins, microRNA (miRNA), etc. These substances can reflect the cellular origin of exosomes and facilitate intercellular communication, thereby altering the phenotype of target cells. Exosomal miRNAs derived from different cells are involved in the occurrence and development of CVD and can produce different biological effects. This paper starts from the pathogenic mechanism of exosomal miRNAs in CVD, and summarizes the potential roles and research progress of exosomal miRNAs from different cell sources in CVD.

Key Words: exosome; cardiovascular diseases; microRNA

《世界心脏报告》显示, 2021年, 2 050万人死于心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD), 占全球死亡总人数的三分之一。目前, CVD的具体发病机制仍待探究, 治疗策略仍需改进, 患者亟

收稿日期: 2024-12-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82372787); 陕西省自然科学基金重点研发计划(2023-YBSF-174)

第一作者: E-mail: liufangyueer@163.com

*通信作者: E-mail: nanren3033@163.com

需更有效的方式对受损的心肌功能进行改善。近年来, 基因疗法已成为疾病治疗的重要方向。其中, 微小RNA(microRNA, miRNA)因其独特的转录后调控功能备受关注^[1], 为CVD的诊疗提供了新的思路。但是选择合适的递送系统是miRNA疗法面临的问题之一^[2]。有研究发现, 外泌体可以作为miRNA的有效递送载体, 并且外泌体miRNA是介导细胞通讯和调控表观遗传的关键因子, 参与CVD的多种生理和病理过程, 包括血管重塑、免疫、病毒感染、炎症等^[3]。因此, 外泌体miRNA可能参与CVD的发生, 并且可能在诊断治疗方面发挥作用。本文旨在阐述不同细胞来源的外泌体miRNA在CVD发病与进展中的作用。

1 外泌体及外泌体miRNA概述

外泌体是含有蛋白质、脂质、RNA、DNA特定组成的细胞外囊泡, 直径在40~160 nm之间。从结构上来说, 外泌体具有脂质双分子层, 内含多种生物成分, 并且外泌体具有异质性, 不同细胞产生的外泌体的内容物具有差异^[4]。

外泌体的发现需要追溯到1983年。研究者在观察绵羊网织红细胞时发现的囊泡样结构^[5]。研究者起初认为, 外泌体只是负责排出被细胞废弃的物质。但是随着科研工作的不断推进, 外泌体的生物学功能逐渐被解析。研究人员发现, 细胞能够通过外泌体途径对远端细胞实施调控作用^[6], 甚至可能实现自身的遗传物质向目标细胞的横向转移。

在CVD的研究中, 外泌体miRNA受到广泛关注, 它可以在转录后层面调控基因表达。MiRNA是一类17~24 nt的小型非编码RNA。它通过两种方式发挥调控作用, 第一种是miRNA与开放阅读框不完全结合, 从而抑制蛋白质的翻译过程; 另一种则是与mRNA完全结合导致mRNA降解。因此, miRNA调控蛋白质翻译过程并且在细胞通讯间发挥作用^[7]。外泌体miRNA则是一类由外泌体介导分泌的非编码单链RNA, 其优势在于外泌体可将miRNA包裹并通过血液循环进行运输, 从而保护miRNA免受RNA酶的降解。并且miRNA进入外泌体可能具有“偏好性”, 亲代细胞有自己独特的分选“规则”, 根据“规则”引导miRNA进入外泌体中, 最终递送至受体细胞发挥相应作用。

MiRNA被分选进入外泌体可能与miRNA的特定序列基序、细胞内的RNA结合蛋白以及外泌体形成过程中的膜泡运输机制有关。除此之外, 在生理或病理条件下, 外泌体miRNA的表达水平可能发生变化。例如, 急性心肌梗死的患者血浆中外泌体miRNA-1、miRNA-133a和miRNA-499的水平显著提高^[8]; 稳定型冠状动脉疾病的患者血清外泌体中miR-942-5p、miR-149-5p和miR-32-5p的表达水平较高^[9]。

由于外泌体的来源细胞不同, 其携带的miRNA种类和功能也可能不同。这些差异可能导致外泌体miRNA在CVD的发生中产生不同的生物学效应。例如, 来自内脏脂肪细胞的外泌体miR-27b-3p能够抑制PPAR α 的表达, 加速动脉粥样硬化的进展^[10], 而来源于间充质干细胞的外泌体含有miR-342-5p, 可以保护内皮细胞^[11]。除此之外, 外泌体具有靶向特性, 并且其免疫原性低、理化稳定性高, 所以可能作为递送miRNA的载体, 提供新的治疗方法^[12](图1)。

2 外泌体miRNA与心血管疾病

据统计, 中国CVD患病人数已高达3.3亿, 且患病率持续上升^[13]。随着人口老龄化的不断加剧, CVD的发病风险也随之升高, 因此我国亟需采取更为精确且高效的手段来实现CVD的早期筛查与治疗, 从而切实改善患者预后以及降低CVD的致死率。而外泌体miRNA可能达到这一目的, 在CVD中, 外泌体miRNA发挥着重要作用, 参与了CVD的多种生理和病理过程, 包括血管重塑、调控巨噬细胞功能、参与细胞增殖和迁移以及促进纤维化等^[14]。特定的miRNA, 如miR-155, 参与造血谱系分化、免疫以及血管重塑等。这些过程都与CVD有关, 包括心肌梗死、急性缺血性中风和腹主动脉瘤等。因此, 外泌体miRNA有望作为治疗手段或非侵入性生物标志物, 在CVD中具有良好的应用前景。目前, 已经有多项外泌体miRNA帮助诊断或治疗CVD的研究进入临床试验(表1)。

3 血清外泌体miRNA

与传统的组织活检相比, 血清外泌体的非侵入性获取方式显著提高了检测的便捷性与安全性, 并且其携带的miRNA能够动态、实时地反映体内

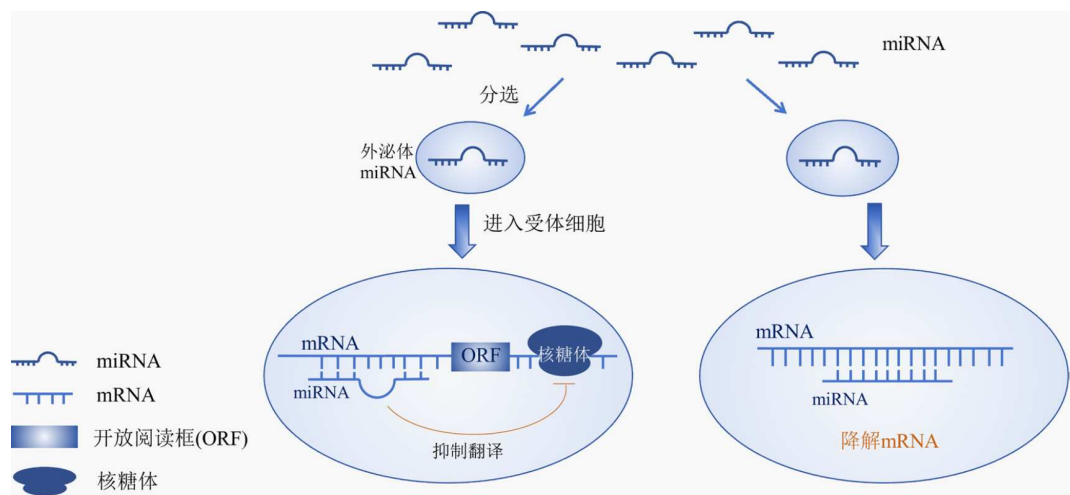


图1 外泌体miRNA作用机制

表 1 外泌体miRNA诊疗心血管疾病的临床试验

注册时间	注册编号	MiRNA来源	疾病类型	应用价值
2023	ChiCTR2300074699	白细胞	不稳定心绞痛	治疗
2022	NCT04921774	血液	心脏移植术后急性排斥反应	早期和无创检测
2020	NCT04266639	血浆	急性缺血性中风	拓宽诊断的标志物
2019	NCT04127591	血浆	心肌梗死	诊断
2017	NCT03264976	血清	糖尿病视网膜病变	预测高危和预后不良人群
2017	NCT03202212	血浆	血管功能障碍	生物标志物
2017	NCT03227055	尿液	慢性肾病儿童的心血管合并症	系统评估患病率、临床症状和进展

生理病理状态的变化，为临床决策提供更为精准、及时的参考依据。因此，血清外泌体miRNA已成为疾病监测、治疗效果评估及预后预测等领域中极具潜力的研究对象^[15]，深入探索血清外泌体miRNA在CVD中的作用，对于提升CVD的诊疗水平具有重要意义。

3.1 心力衰竭

心力衰竭(heart failure, HF)是复杂的多因素综合征，通常由心肾功能受损引发，占据CVD死亡原因的首位，是各种CVD的终末期表现，其5年生存率与恶性肿瘤相当^[16]。HF患者可能出现多种症状，包括呼吸困难、胸闷、乏力以及肺淤血等。目前，医务工作者主要依据临床症状、超声心动图等作出诊断，但其特异性不高，在肾功能衰竭的患者中同样可能检测到相似指标。因此，寻找特异性的疾病标志物对于心力衰竭的诊断具有重要意义。

杨丽等^[17]通过微阵列等方式进行检测，发现血清外泌体miR-125a-5p和miR-99b-5p的含量在心力

衰竭患者中显著降低，并且miR-125a-5p和miR-99b-5p可以进行联合检测，其诊断效能更高，曲线下面积(area under curve, AUC)达到0.80。Lu等^[18]发现，miR-22-3p在HF模型组的外泌体中高表达，并且随外泌体浓度升高，心肌细胞活力降低。MiR-22-3p可以作为心力衰竭的标志物，负调控FURIN，使HF损伤的风险上升。除此之外，对于由扩张型心肌病导致的急性心力衰竭(dilated cardiomyopathy-acute heart failure, DCM-AHF)，其诊断的特异性也尚显不足，需要探寻新的生物学标志物。Wu等^[19]采集了43例DCM-AHF和34例年龄性别匹配的正常志愿者的血清，发现血清外泌体miR-92b-5p的含量与年龄和心超指标呈正相关。利用ROC(receiver operating characteristic curve)曲线分析发现，当miR-92b-5p≥0.0023时，病人可能患有DCM-AHF，也就是说，血清外泌体中的miR-92b-5p可能为诊断提供客观的生物学指标。血清外泌体中的特殊miRNA还可作为评估患者预后的指标。Xie等^[20]发现，如果患者的血清外泌体中miR-

27a的表达水平较高, 那么患者的生存率较高。

3.2 心肌炎

心肌炎指心脏中体液免疫或细胞免疫反应升高, 临床表现为胸痛、轻度呼吸困难、急性心源性休克等。多达20%的心肌炎患者随后可能发展为慢性炎症性扩张型心肌病^[21]。病毒感染是心肌炎的常见诱因。除此之外, 系统性自身免疫性疾病、药物使用等亦可诱发心肌炎。

实验性自身免疫性心肌炎(experimental autoimmune myocarditis, EAM)是急性心肌炎动物模型, 与CD4⁺ T细胞有关^[22], 其可发展为心肌病、心肌纤维化和收缩功能障碍。T细胞的免疫和代谢状态与EAM进展过程相关, 而外泌体在自身免疫反应中是介导多种T细胞功能的信使。Sun等^[23]证明了来自EAM小鼠的血清外泌体可以被CD4⁺ T细胞内化, 并诱导免疫代谢重编程。此外, 这些外泌体可以促进EAM在体内的进展, 并且EAM血清外泌体中miR-142的表达显著增加。MiR-142是一种免疫和代谢相关的miRNA, 与一系列自身免疫性疾病相关。甲基CpG结合域蛋白2(methyl CpG binding domain protein 2, MBD2)和细胞信号传导抑制因子1(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1)是miR-142的直接靶基因。外泌体miR-142可以通过抑制MBD2和SOCS1来影响细胞间交流, 从而影响CD4⁺ T细胞的糖酵解和炎症反应。这种细胞间通信机制有助于理解心肌炎发展的自身免疫致病机制。

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是心肌被病毒感染后出现的炎症性病变, 它可能使心脏出现不同程度的功能损伤。统计数据发现, 约21%的患者会进展成扩张型心肌病或心衰等致死性心脏病。全球VMC发病率为0.1%~15%并呈上升趋势, 4%~20%的青少年、运动员的心源性猝死与之相关^[24]。此外, VMC发病机制复杂, 寻找有效的诊断与治疗方法具有挑战性。柯萨奇病毒B3(coxsackievirus B3, CVB3)被认为是VMC的关键病原体, CVB3感染后心肌炎患者的血清外泌体miRNA可能发生变化, 为研究VMC的发生机制和治疗方法提供了新的思路。Fan等^[25]在23例VMC患者和12例对照组中检测了血清外泌体中10个miRNA的表达, 发现miR-30a和miR-181d在患者的

血清外泌体中上调, 并且过表达的miR-30a和miR-181d通过抑制SOCS3来调节对CVB3的免疫应答。该研究提示, 抑制miR-30a和miR-181d表达可能成为VMC的治疗方式之一。此外, VMC患者血清外泌体中的miR-320可以靶向磷酸肌醇-3-激酶调节亚基1(phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, *Pik3r1*), 使Akt/mTOR通路被抑制, 增加小鼠心肌细胞的凋亡数量^[26]。

除治疗潜力外, 血清外泌体miRNA在疾病诊断中亦展现出独特优势。到目前为止, 心内膜活检仍然是确诊VMC和暴发性心肌炎(fulminant myocarditis, FM)的金标准^[27]。然而, 由于心肌活检难度大、存在创伤风险等阻碍了其在临床实践中的广泛应用。血清外泌体是潜在的生物标志物, 可能成为VMC和FM的检测手段之一。王宏茂等^[28]发现, 血清外泌体miR-135-5p能够抑制Akt/mTOR信号通路, 降低免疫炎症活性, 通过miR-135-5p诊断VMC患儿的预后不良的效能较好。Zhang等^[29]发现, hsa-miR-146a-5p、hsa-miR-23a-3p和hsa-miR-27a-3p在儿童FM患者的外泌体中表达水平较高, 其中hsa-miR-146a-5p的诊断效能较高。以上研究结果可能为心肌炎临床诊疗提供新的特异性生物学指标。

4 干细胞来源的外泌体miRNA

干细胞疗法在心血管系统中展现出多方面的治疗潜力, 包括心肌保护、组织再生与修复、纤维化与凋亡抑制、心肌收缩功能增强以及心功能改善等。深入研究揭示, 旁分泌作用在干细胞治疗心肌损伤中起着重要作用, 外泌体目前被认为是实现这一目标的主要途径。当心肌出现纤维化时, 使用源自不同干细胞的外泌体治疗具有显著效果, 其能够显著减轻甚至遏制心肌纤维化的进程。此外, 外泌体本身具有高度的可塑性, 可以进行工程修饰, 从而发挥更好的治疗效果。因此, 干细胞来源的外泌体在CVD的治疗领域展现出巨大的应用潜力, 为心脏修复提供了新的策略。

4.1 扩张型心肌病

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)指左心室或双心室出现扩张或收缩功能障碍的情况, 并且该功能障碍不是由异常负荷条件或严重

冠状动脉疾病导致的。导致DCM的原因包括基因突变、感染、毒素等。数据显示,约250人中就有一人患DCM^[30]。

阿霉素(doxorubicin, DOX)是可以治疗多种肿瘤的蒽环类药物,但其长期使用会对心脏造成毒性,患者可能出现DCM。目前虽然有右雷佐生等心脏保护剂来减轻心脏毒性,但是由于心脏保护剂可能与其他药物相互作用,会影响药效或者引起其他不良反应。因此,DOX使用者的心脏功能亟需进行改善。Ni等^[31]发现,滋养层干细胞(trophoblast stem cell, TSC)衍生的外泌体可以预防DOX诱导的DCM。TSC是从分娩后“废弃的”羊膜组织中获得,具有收集方便、免疫原性低和多分化潜能等诸多优点,并且TSC可以分泌大量外泌体。他们的研究发现,let-7i-5p在DOX诱导的DCM和DOX暴露的AC16细胞中均显著下调,而利用TSC来源的外泌体let-7i可以通过下调YAP信号传导抑制心肌凋亡并减轻心脏纤维化,从而改善心肌功能。除此之外,DOX的施用导致心肌细胞凋亡,存活素被认为是DOX诱导的心肌病患者的治疗靶点。然而,由于其半衰期短,长期提供外源性存活素难以实现。而来源于间充质干细胞的外泌体中miR-199a-3p含量较高,可以调节Akt-Sp1/p53信号通路,上调存活素和Bcl-2的表达。因此,外泌体递送miR-199a-3p有望成为DOX诱导心肌病的新疗法^[32]。

儿童扩张型心肌病是儿童心肌病的最常见形式。尽管儿童期原发性DCM的年发病率较低,但死亡或心脏移植的5年无事件生存率估计为50%~60%,并且目前降低晚期心力衰竭儿童死亡率的药物治疗和非药物干预方式较少。外泌体miRNA为治疗提供了新的可能。心脏球样干细胞(cardiosphere-derived cells, CDCs)能够分化成心脏组织,在儿童DCM治疗中展现出治疗潜力。Hirai等^[33]发现,CDCs来源的外泌体(CDC-Exo)可以改善心脏功能并减少心肌纤维化。CDC-Exo富含促血管生成和心脏保护性miRNA, CDC-Exo中的miR-146a-5p含量较高,能抑制促炎细胞因子和转录物的产生,从而减少心肌纤维化。

4.2 心肌梗死

心肌梗死的发病是由于冠状动脉的急性闭塞,

进而诱发心肌组织的血液供给急剧减少乃至坏死。临床症状方面,心肌梗死常表现为急性发作的、剧烈且持续时间较长的胸骨后疼痛,患者还可能伴有呼吸困难、恶心感、异常出汗以及强烈的濒死恐惧。此外,心肌梗死还可能诱发严重并发症,如心力衰竭、休克等。急性心肌梗死后的炎症反应对于梗死区域的扩展及左心室的重构过程具有显著影响。近期一些研究发现了各种外泌体miRNA,它们调节心肌梗死后的心肌炎症,包括miR-302d-3p、miR-126、miR-139-3p、miR-24-3p、miR-200b-3p、miR-671、miR-129-5p^[34]。这些相关的外泌体miRNA也在疾病治疗中起到关键作用。

来自间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)的外泌体已成为重要的旁分泌信使,为显著改善缺血性损伤的预后提供了有效的途径。研究发现,miR-21-5p水平在缺血后心脏中趋于上调,miR-21-5p是心脏对缺血性损伤反应的关键介质^[35]。而MSC来源的外泌体介导的miR-21-5p递送可以增强对缺血心肌的靶向递送,同时最大限度地减少全身毒性,从而最大限度地提高治疗效果。然而,单独的MSC-Exo治疗效果有限,因此研究提高MSC-Exo有效性的方法至关重要。研究发现,使用中药同心螺处理后, MSC-Exo中miR-146a-5p的表达显著上调。MiR-146a-5p能够下调IRAK1的表达,减少梗死后心肌细胞的炎症和凋亡,促进心肌修复^[36]。

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)来源的外泌体在治疗中同样有重要意义。用过表达miR-30e的BMSC来源的外泌体治疗能够改善大鼠心肌组织的病理损伤和纤维化。外泌体miR-30e可以负调控LOX1表达,并且抑制了心肌梗塞的大鼠心肌组织中的NF- κ Bp65/Caspase-9信号传导,从而减少了心肌细胞的凋亡和纤维化^[37]。此外, Du等^[38]发现, BMSC-Exo-25-3p能够使JAK2/STAT3信号通路失去活性,并且抑制M1样巨噬细胞极化,从而减小心肌梗死面积。Wang等^[39]发现,富含miR-129-5p的BMSC外泌体可以抑制HMGB1和炎症因子的表达,改善小鼠心脏功能。以上研究为心肌梗死的治疗提供了新的途径。

4.3 心肌炎

人脐带间充质干细胞(human umbilical cord

mesenchymal stem cell, hUCMSC)来源的外泌体为心肌炎的治疗开辟了新途径。Gu等^[40]发现, hUCMSC衍生的外泌体使AMPK/mTOR信号通路被激活, 促进自噬, 进而减少心肌细胞的凋亡。具体而言, 这些外泌体提升了pAMPK与AMPK的比例, 降低了pmTOR与mTOR的比例, 由此共同促进了AMPK/mTOR通路的活化, 有效抑制了CVB3对人心肌细胞的感染诱导凋亡, 从而缓解了CVB3引发的心肌炎症状。除了CVB3, 免疫检查点抑制剂的使用同样可能导致心肌炎。而MSC具有免疫调节能力, 使用hBMSC-Exos能够减轻PD-1/PD-L1抑制剂诱导的心肌损伤^[41]。此外, 缺血再灌注时细胞会迁移到损伤部位以执行修复功能, 然而这些细胞的过度聚集可能会加剧对心脏结构和功能的损害, 导致急性心肌炎^[42]。富含miR-455-3p的BMSC外泌体能够抑制缺血再灌注诱导的心肌损伤从而保护心脏^[43]。这些研究成果为心肌炎的治疗策略提供了新的潜在方向。

5 巨噬细胞来源的外泌体miRNA

CVD的发展与免疫反应密切相关, 心血管系统受损后, 机体可能激活炎症信号通路并触发一系列免疫反应。巨噬细胞作为免疫系统中的关键效应细胞, 参与心脏保护阶段、炎症阶段和组织修复阶段。而源自巨噬细胞的外泌体能够传递关键的信号分子, 调节心肌细胞的凋亡, 并且参与心肌重塑。这些作用机制的研究可能为深入理解CVD提供新视角, 为治疗策略的制定带来新思路。

5.1 心肌梗死

心肌梗死后的早期炎症期, 大量炎症细胞在梗死部位积累, 其中巨噬细胞扮演着核心的调节角色。M1型巨噬细胞通过释放促炎因子抑制组织修复; 而M2型巨噬细胞则通过促进瘢痕成熟和血管生成发挥保护作用。

M1型巨噬细胞衍生的外泌体(M1-exosome, M1-Exo)抑制内皮细胞再生, 加速心肌梗死损伤, 并阻止心脏修复。M1-Exo含有丰富的miR-155, 可递送至心肌细胞, 使IL-6R/JAK/STAT3信号通路被抑制, 从而抑制心肌细胞增殖^[44]。因此, 抑制miR-155可能促进心肌再生和心脏修复, 可能成为

治疗心肌梗死的重要靶点。此外, 抑制miR-155可促进巨噬细胞向M2巨噬细胞的极化, 这为研究心肌梗死的发病机制提供了新的思路, 提示可以通过调节巨噬细胞亚型平衡来改善心肌梗死患者的预后。Long等^[45]发现, 心肌梗死后静脉注射M2-Exo可将miR-1271-5p传递给心肌细胞, 降低SOX6表达水平, 减少心肌细胞凋亡, 达到保护心脏的效果。除此之外, 来源于M2巨噬细胞的外泌体miR-148a含量较高, 可以抑制TXNIP-NLRP3-Caspase-1的激活, 减少缺血/再灌注的损伤, 从而保护心脏^[46]。

5.2 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是一种与炎症有关的CVD^[47], 其特征为粥样斑块聚集并在大中型动脉内膜上沉积, 导致管腔的严重狭窄, 血液运输受阻, 进而出现组织器官缺血缺氧的状况。

在动脉粥样硬化研究中, 巨噬细胞占据重要地位, 其早期被募集至动脉内膜并转化为泡沫细胞, 通过分泌多种生物活性物质影响邻近细胞的功能, 从而影响疾病进展^[48]。研究者使用氧化的低密度脂蛋白刺激巨噬细胞后, 发现其分泌的外泌体中miR-186-5p水平升高, miR-186-5p可以使SHIP2介导的PI3K/Akt/mTOR通路失活, 从而加速血管平滑肌细胞的侵袭, 最终加速动脉粥样硬化的进展^[49]。此外, 巨噬细胞来源的外泌体miR-16-5p可以下调SMAD7, 促进炎症反应和氧化应激, 最终使疾病恶化^[50]。吸烟是内皮功能障碍和血管钙化的重要原因, 与动脉粥样硬化密切相关。尼古丁是烟草中主要的有害物质, 可以加速动脉粥样硬化的进展。尼古丁处理巨噬细胞后, 巨噬细胞的外泌体miR-21-3p富集, 其靶向PTEN增加了血管平滑肌细胞迁移和增殖, 从而加速动脉粥样硬化的发展^[51]。除此之外, M2巨噬细胞的抗炎特性可通过外泌体miRNA传达。Bouchareychas等^[52]发现, M2巨噬细胞外泌体可降低动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞的造血和炎症状态。骨髓源性巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM)的外泌体包含减轻炎症反应的miRNA-99a/146b/378a, 其可以在IL-4极化的作用下进一步增加。这些外泌体miRNA通过靶向NF- κ B和TNF- α 信号传导抑制炎症, 并促进受体巨噬细胞中的M2极化。

6 外泌体miRNA应用面临的挑战及改进方案

虽然外泌体miRNA具有多种生物学功能,应用前景广阔,但是外泌体miRNA在CVD方面的研究仍不完善,将其应用仍然存在一定的风险,目前存在如下问题。首先,外泌体生产效率较低。数据显示,外泌体有效的剂量效应是10~100 μg 。然而,1 mL培养基的产量通常小于1 μg ^[53]。除此之外,外泌体难以批量提纯,技术上难以快速鉴别外泌体与其他胞外囊泡。虽然超速离心法是外泌体分离的“金标准”^[54],具有高处理能力,但是该方法常受到蛋白质污染的影响。并且外泌体的质量和功能会受到细胞来源和纯化条件的显著影响,用于治疗目的的外泌体检测的主要技术挑战之一是区分来自正常细胞的外泌体和从受损细胞中分离的外泌体。其次,外泌体需要进行伦理审查,供体细胞的选择需要遵守相关规定。目前外泌体miRNA治疗缺乏大量临床试验,目前在ClinicalTrials.gov上注册的关于外泌体与CVD的临床试验仅46项。此外,外泌体miRNA疗法无法完全确定给药的最佳剂量,治疗CVD后的不良反应也尚不完全清楚。

针对上述问题,外泌体miRNA应用的改进方案正被积极探索。在生产方面,多种三维培养技术已被证实有效,其中包括微阵列孔板、旋转瓶培养以及中空纤维生物反应器等。这些方式不仅提高了外泌体的产量,还实现了特定基因表达水平的上调,从而为外泌体的基础研究和临床应用提供了更为可靠的实验模型^[55]。此外,人工外泌体正在开发中。简单来说,人工外泌体就是将脂质体与肽结合形成复合物,具有较低的免疫原性效应、更高的胶体稳定性和更好的生物半衰期。目前已有人工外泌体进入临床应用^[56]。在分离外泌体方面,工作人员可以根据样本的性质和研究目的考虑使用多种分离技术,从而扬长避短。例如,先应用聚合物沉淀^[57]进行预处理,再使用免疫亲和捕获方法处理大体积样品。这种方式既可提高其分离的效率,又可避免使用过量的昂贵抗体,从而做到经济 and 高效。此外,多种检测分离技术也正在发展,电阻脉冲传感技术可以根据外泌体通过小孔时的电阻来测量外泌体的大小,该

技术可检测直径为50~1 000 nm的囊泡。而超快隔离系统可以利用负压振荡和双耦合谐振器激活膜振动,从各种生物体液中超高效纯化外泌体^[58]。在靶向性方面,研究者可以通过化学修饰的方式对外泌体进行改造^[59],包括点击化学反应、两亲性分子的插入、生物分子的缀合等,这些修饰就像给外泌体贴上了“标识码”,机体根据“标识码”上的信息将外泌体运输到相应位置,从而提高外泌体递送的准确性。此外,外泌体miRNA的临床试验在不断推进,药物的装载与释放方式不断优化,设计适合患者的个性化治疗方案在未来有望实现。

以上研究提示,应用外泌体miRNA时需要注意多技术联用。例如,将工程技术与纳米技术联合使用,在实现精准治疗的同时增强其穿透血脑屏障等生物屏障的能力,从而拓宽其应用范围;在分离外泌体方面,将超速离心、免疫亲和超顺磁性纳米粒子分离、尺寸排阻色谱法等方式相结合,能够显著提高外泌体的提取效率和纯度,为后续研究提供高质量的样本。研究者需要将不同方法进行整合,最终提高外泌体的提纯效率与纯度,优化药物装载与释放,降低生产成本,加速临床转化的进程。

综上,虽然外泌体miRNA的调控途径以及病理作用机制尚未完全明确,但对该领域的研究正在不断深入,并已成为生物医学研究的热点。众多科研人员正在努力剖析外泌体miRNA的复杂调控网络,以期阐明其在细胞通讯、基因表达调节及疾病发展过程中的具体角色。当前,外泌体miRNA在CVD的应用前景愈发广阔,在诊断、治疗策略制定及预后判断等多个方面展现出发展潜力。

7 结语

外泌体miRNA可以影响CVD的发病与进展,并且不同细胞来源的外泌体miRNA由于其含量与种类的差异而参与不同的生物学过程,从而产生不同的生物学效应,其在早期诊断、疾病机理探究及预后评估方面展现出重要价值,成为医学基础研究及临床工作中不可或缺的工具。然而,目前外泌体miRNA治疗方式仍然面临外泌体分离效

率较低、相关分子机制尚未完全阐明等问题。希望未来随着研究的不断深入, 外泌体的分离方式可以得到改进, 能够分离不同的囊泡亚群, 从而为每个亚群分配特定的功能和起源^[60]。克服分离技术等方面的限制将为外泌体miRNA的应用铺平道路, 未来的医务工作者有望依据患者特异性的外泌体miRNA表达特征, 设计个性化的治疗方案, 从而增强治疗的针对性和安全性。总之, 外泌体miRNA在CVD中展现出广阔的应用前景, 有望为医学领域带来更多创新和突破, 为患者提供更加精准有效的治疗方案。

作者贡献声明:

刘方玥儿: 数据收集, 分析/解释数据, 绘制图表, 设计论文框架, 起草论文;

杨 杰: 负责设计论文框架, 起草论文;

边惠洁、蒋建利: 论文修改;

南 刚: 拟定写作思路, 指导撰写文章并定稿。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] Burki T. 2024 Nobel Prize awarded for work on microRNAs. *Lancet*, 2024, 404(10462): 1507-1508
- [2] 井汇源, 曹素芳, 刘影, 等. 基于RNA病毒的microRNA递送载体研究进展. *生命的化学*, 2021, 41(3): 519-525
- [3] Zhang X, Sun S, Ren G, et al. Advances in intercellular communication mediated by exosomal ncRNAs in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16197
- [4] Sengupta R, Topiwala IS, Shakthi A M, et al. Immune cell-derived exosomes: a cell-free cutting-edge tumor immunotherapy. *ACS Appl Bio Mater*, 2024, 7(11): 7076-7087
- [5] Tang Z, Li D, Hou S, et al. The cancer exosomes: clinical implications, applications and challenges. *Intl J Cancer*, 2020, 146(11): 2946-2959
- [6] Yue B, Yang H, Wang J, et al. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Prolif*, 2020, 53(7): e12857
- [7] Diener C, Keller A, Meese E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends Genet*, 2022, 38(6): 613-626
- [8] Kim SJ, Mesquita FCP, Hochman-Mendez C. New biomarkers for cardiovascular disease. *Tex Heart Inst J*, 2023, 50(5): e238178
- [9] Zhang P, Liang T, Chen Y, et al. Circulating exosomal miRNAs as novel biomarkers for stable coronary artery disease. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 3593962
- [10] Tang Y, Yang LJ, Liu H, et al. Exosomal miR-27b-3p secreted by visceral adipocytes contributes to endothelial inflammation and atherogenesis. *Cell Rep*, 2023, 42(1): 111948
- [11] Xing X, Li Z, Yang X, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosome-mediated microRNA-342-5p protects endothelial cells against atherosclerosis. *Aging*, 2020, 12(4): 3880-3898
- [12] Li B, Cao Y, Sun M, et al. Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNAs in cancer progression and therapy. *FASEB J*, 2021, 35(10): e21916
- [13] 国家心血管病中心, 中国心血管健康与疾病报告编写组, 胡盛寿. 中国心血管健康与疾病报告2023概要. *中国循环杂志*, 2024, 39(7): 625-660
- [14] Zheng D, Huo M, Li B, et al. The role of exosomes and exosomal microRNA in cardiovascular disease. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 616161
- [15] Fattahi F, Asadi MR, Abed S, et al. Blood-based microRNAs as the potential biomarkers for Alzheimer's disease: evidence from a systematic review. *Metab Brain Dis*, 2024, 40(1): 44
- [16] Emmons-Bell S, Johnson C, Roth G. Prevalence, incidence and survival of heart failure: a systematic review. *Heart*, 2022, 108(17): 1351-1360
- [17] 杨丽, 戴婷婷, 刘丹, 等. 血清外泌体miR-125a-5p和miR-99b-5p在心衰诊断中的价值. *全科医学临床与教育*, 2024, 22(5): 392-395, 420
- [18] Lu W, Liu X, Zhao L, et al. MiR-22-3p in exosomes increases the risk of heart failure after down-regulation of *FURIN*. *Chem Biol Drug Des*, 2023, 101(3): 550-567
- [19] Wu T, Chen Y, Du Y, et al. Serum exosomal miR-92b-5p as a potential biomarker for acute heart failure caused by dilated cardiomyopathy. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(5): 1939-1950
- [20] Xie Y, Hang JZ, Zhang N, et al. Clinical significance of miR-27a expression in serum exosomes in patients with heart failure. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2022, 67(5): 324-331
- [21] Lasrado N, Reddy J. An overview of the immune mechanisms of viral myocarditis. *Rev Med Virol*, 2020, 30(6): 1-14
- [22] Jia X, Li L, Wang T, et al. Puerarin inhibits macrophage M1 polarization by combining STAT1 to reduce myocardial damage in EAM model mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 733: 150702
- [23] Sun P, Wang N, Zhao P, et al. Circulating exosomes control $cd4^+$ T cell immunometabolic functions via the transfer of miR-142 as a novel mediator in myocarditis. *Mol Ther*, 2020, 28(12): 2605-2620

- [24] Yang J, Zhang H, Wang X, et al. Kruppel-like factor 10 protects against acute viral myocarditis by negatively regulating cardiac MCP-1 expression. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2236-2248
- [25] Fan KL, Li MF, Cui F, et al. Altered exosomal miR-181d and miR-30a related to the pathogenesis of CVB3 induced myocarditis by targeting SOCS3. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(5): 2208-2215
- [26] 张欣, 李雪琴, 朱良宇, 等. 病毒性心肌炎血清外泌体来源的miR-320通过靶向Pik3r1抑制AKT/mTOR通路促进小鼠心肌细胞凋亡. *细胞与分子免疫学杂志*, 2023, 39(6): 516-525
- [27] Waseem M, Wang BD. Organoids: an emerging precision medicine model for prostate cancer research. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 1093
- [28] 王宏茂, 张明明, 林瑶, 等. 外泌体miRNA-135-5p通过AKT-mTOR信号通路对心肌炎患儿心肌损伤程度及预后预测价值. *现代生物医学进展*, 2024, 24(7): 1216-1220
- [29] Zhang X, Yang R, Ma M, et al. Altered plasma exosome miRNAs and novel potential biomarkers in pediatric fulminant myocarditis. *Genomics*, 2023, 115(3): 110622
- [30] Fatkin D, Calkins H, Elliott P, et al. Contemporary and future approaches to precision medicine in inherited cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 77(20): 2551-2572
- [31] Ni J, Liu Y, Wang K, et al. Trophoblast stem-cell-derived exosomes improve doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy by modulating the let-7i/YAP pathway. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 948-956
- [32] Lee JY, Chung J, Byun Y, et al. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced cardiomyopathy by upregulating survivin expression via the miR-199a-3p-Akt-Sp1/p53 signaling pathway. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 7102
- [33] Hirai K, Ousaka D, Fukushima Y, et al. Cardiosphere-derived exosomal microRNAs for myocardial repair in pediatric dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med*, 2020, 12(573): eabb3336
- [34] Lai Z, Ye T, Zhang M, et al. Exosomes as vehicles for noncoding rna in modulating inflammation: a promising regulatory approach for ischemic stroke and myocardial infarction. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 7485-7501
- [35] Ji Z, Wang C. Mesenchymal stem cell-derived exosomal mir-21-5p inhibits YAP1 expression and improves outcomes in myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord*, 2024, 24(1): 547
- [36] Xiong Y, Tang R, Xu J, et al. Tongxinluo-pretreated mesenchymal stem cells facilitate cardiac repair via exosomal transfer of miR-146a-5p targeting IRAK1/NF- κ B p65 pathway. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 289
- [37] Pu L, Kong X, Li H, et al. Exosomes released from mesenchymal stem cells overexpressing microRNA-30e ameliorate heart failure in rats with myocardial infarction. *Am J Transl Res*, 2021, 13(5): 4007-4025
- [38] Du J, Dong Y, Song J, et al. BMSC-derived exosome-mediated miR-25-3p delivery protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by constraining M1-like macrophage polarization. *Mol Med Rep*, 2024, 30(2): 142
- [39] Wang S, Dong J, Li L, et al. Exosomes derived from miR-129-5p modified bone marrow mesenchymal stem cells represses ventricular remodeling of mice with myocardial infarction. *J Tissue Eng Regen Med*, 2022, 16(2): 177-187
- [40] Gu X, Li Y, Chen K, et al. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate viral myocarditis through activating AMPK/mTOR-mediated autophagy flux pathway. *J Cell Mol Medi*, 2020, 24(13): 7515-7530
- [41] Zhou B, Qin Q, Fang Y, et al. Exosomes from human bone marrow MSCs alleviate PD-1/PD-L1 inhibitor-induced myocardial injury in melanoma mice by regulating macrophage polarization and pyroptosis. *Life Sci*, 2024, 358: 123108
- [42] Liu Y, Chen J, Xiong J, et al. Potential cardiac-derived exosomal miRNAs involved in cardiac healing and remodeling after myocardial ischemia-reperfusion injury. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 24275
- [43] Wang Y, Shen Y. Exosomal miR-455-3p from BMMSCs prevents cardiac ischemia-reperfusion injury. *Hum Exp Toxicol*, 2022, 41: 9603271221102508
- [44] He X, Liu S, Zhang Z, et al. M1 macrophage-derived exosomes inhibit cardiomyocyte proliferation through delivering miR-155. *BMC Cardiovasc Disord*, 2024, 24(1): 365
- [45] Long R, Gao L, Li Y, et al. M2 macrophage-derived exosomes carry miR-1271-5p to alleviate cardiac injury in acute myocardial infarction through down-regulating SOX6. *Mol Immunol*, 2021, 136: 26-35
- [46] Wu X, Iroegbu CD, Peng J, et al. Cell death and exosomes regulation after myocardial infarction and ischemia-reperfusion. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 673677
- [47] Yang X, Hu J, Gao Q, et al. Advances in nano-delivery systems based on diagnosis and theranostics strategy for atherosclerosis. *J Drug Targeting*, 2025, 33(4): 492-507
- [48] Wang C, Li Z, Liu Y, et al. Exosomes in atherosclerosis: performers, bystanders, biomarkers, and therapeutic targets. *Theranostics*, 2021, 11(8): 3996-4010
- [49] Ren L, Chen S, Yao D, et al. OxLDL-stimulated macrophage exosomes promote proatherogenic vascular smooth muscle cell viability and invasion via delivering

- miR-186-5p then inactivating SHIP2 mediated PI3K/AKT/mTOR pathway. *Mol Immunol*, 2022, 146: 27-37
- [50] Chen F, Li J, She J, et al. Exosomal microRNA-16-5p from macrophage exacerbates atherosclerosis via modulating mothers against decapentaplegic homolog 7. *Microvascular Res*, 2022, 142: 104368
- [51] Zhu J, Liu B, Wang Z, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6901-6919
- [52] Bouchareychas L, Duong P, Covarrubias S, et al. Macrophage exosomes resolve atherosclerosis by regulating hematopoiesis and inflammation via microRNA cargo. *Cell Rep*, 2020, 32(2): 107881
- [53] Lai JJ, Chau ZL, Chen S, et al. Exosome processing and characterization approaches for research and technology development. *Adv Sci*, 2022, 9(15): e2103222
- [54] Liu W, Ma Z, Kang X. Current status and outlook of advances in exosome isolation. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414(24): 7123-7141
- [55] Lee DH, Yun DW, Kim YH, et al. Various three-dimensional culture methods and cell types for exosome production. *Tissue Eng Regen Med*, 2023, 20(4): 621-635
- [56] Liang L, Peng W, Qin A, et al. Intracellularly synthesized artificial exosome treats acute lung injury. *ACS Nano*, 2024, 18(32): 21009-21023
- [57] Park SH, Lee EK, Yim J, et al. Exosomes: nomenclature, isolation, and biological roles in liver diseases. *Biomol Ther (Seoul)*, 2023, 31(3): 253-263
- [58] Chen Y, Zhu Q, Cheng L, et al. Exosome detection via the ultrafast-isolation system: EXODUS. *Nat Methods*, 2021, 18(2): 212-218
- [59] Zhao S, Di Y, Fan H, et al. Targeted delivery of extracellular vesicles: the mechanisms, techniques and therapeutic applications. *Mol Biomed*, 2024, 5(1): 60
- [60] Sani F, Shafiei F, Dehghani F, et al. Unveiling exosomes: cutting-edge isolation techniques and their therapeutic potential. *J Cell Mol Medi*, 2024, 28(20): e70139