

外泌体中 miRNA 介导动脉粥样硬化及中药干预作用的研究进展

赵立凤，俞琦，于红红^{*}，田维毅^{*}

(贵州中医药大学，贵州贵阳 550002)

摘要：动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种多因素导致的慢性炎症性疾病，发病率呈逐年上升趋势，是心血管疾病人群中高死亡率的主要原因，有效调控其发生发展进程可对相关疾病进行早期防治。外泌体作为一种新发现的天然纳米载体和细胞间信使，在调节细胞间通讯中发挥着关键作用，通过细胞间通讯将所携带的内容物运输至邻近或远距离的靶细胞，并通过多种方式影响靶细胞的生物学功能从而干预AS。中药能通过多靶点、多途径整合起效防治AS，其机制可能与调控相关外泌体中的miRNA有关。本文旨在探讨外泌体衍生的miRNA在AS中的调控作用及中药干预的影响。

关键词：动脉粥样硬化(AS)；外泌体；miRNA；中药

中图分类号：R289

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2020)10-2695-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.030

动脉粥样硬化(AS)是一种常见的慢性炎症性疾病，其基本病变是在动脉内膜面形成斑块，有脂质条纹、纤维斑块和粥样斑块，继续加重可出现钙化、粥样溃疡形成、血栓形成和斑块内出血等继发性病变，尤其后2种都是心脑血管事件的常见因素^[1]。外泌体(exosome)广泛存在于人体体液中，可通过细胞间通讯将信息传递给邻近或远距离的靶细胞，miRNA是外泌体中的一种内容物，在调控细胞生物学行为反应以及基因靶标的表达方面发挥重要作用，可作为关键的信号传导和分子调控途径参与AS的发生发展。近年来，外泌体对AS的影响方面的研究日益增多，它可通过调节炎症反应、内皮细胞凋亡、巨噬细胞极化、血管平滑肌细胞表型转化及血小板活性等多个方面参与AS的发生发展过程，本文对此进行综述。

1 外泌体的命名及功能

1986年，Trams和Johnstone在绵羊网织红细胞上清液中发现的物质命名为外泌体^[2]，是由活细胞衍生的直径为30~100 nm的膜性囊泡^[3]，不同来源的细胞类型在正常或病理状态下均可分泌^[4]。外泌体内含有微小RNA(miRNA)、rRNA和蛋白质等物质，能够在细胞间进行信息传递，是肿瘤、心血管疾病的标志物。外泌体作为细胞外囊泡、细胞的重要信息载体，参与调控细胞的生理活动。

2 外泌体中的miRNA

miRNA是外泌体中的一种内容物，是一组广泛的非编码单链小RNA分子，截至目前，在动物、植物和病毒中已

经发现有2万多个。miRNA可减少mRNA的转录，并在转录后的基因表达过程中及调控细胞分化、发育、增殖以及凋亡等多个细胞生物学行为反应方面发挥着重要作用^[5]。miRNA可调节基因靶标(例如癌基因和肿瘤抑制基因)的表达，并充当具有mRNA结合和切割的基因抑制因子。在病理情况下，不同细胞来源的外泌体中miRNA的表达水平有所差异^[6]，因此，miRNA是近年来探究AS发病机制及治疗靶点的一个研究热点。

3 外泌体中miRNA对动脉粥样硬化的调节

大量研究表明，AS是由多种内在因素相互作用所致的慢性炎症性疾病，当前也有越来越多的研究认为其还与外泌体通过外来途径的影响密切相关^[7]。但在AS发生发展进程中，不同来源细胞分泌的外泌体中miRNA具有不同甚至相反的作用，其中一部分促进，一部分抑制。在后续的研究中探索清楚是哪些外泌体在AS发生发展过程中起作用，这对诊断和治疗具有重要意义。

3.1 外泌体中miRNA对炎症反应的影响 慢性炎症贯穿AS发生发展的整个过程，是一个关键因素，但是其具体机制尚未明确，有研究发现外泌体中miRNA可能是炎症反应过程中重要的一环。Wang等^[8]发现，THP-1衍生的巨噬细胞中miR-9的靶基因为JAK1和MMP-13，miR-9可通过JAK1/STAT1信号通路抑制NLRP3炎性体的激活并减轻AS炎症。因此，miR-9可以作为AS的潜在治疗靶标。另有研究表明，MiR-188-3p可减少ApoE^{-/-}小鼠的血管内脂质积

收稿日期：2019-09-12

基金项目：国家自然科学基金资助项目(81760790, 81860776, 81860779)；贵州省国内一流建设学科项目(中药学)(GNYL[2017]008)；贵州省普通高等学校工程研究中心项目(黔教合KY字[2015]337)

作者简介：赵立凤(1994—)，女，硕士生，从事动脉粥样硬化基础研究。E-mail：1662977510@qq.com

*通信作者：于红红(1987—)，女，实验师，从事动脉粥样硬化基础研究。Tel：085188308923

田维毅(1972—)，男，博士，教授，博士生导师，从事动脉粥样硬化基础研究。Tel：085188233015，E-mail：tianweiyi1972@sina.com

聚，减轻巨噬细胞的炎症反应，减少促炎因子的表达，同时增加 ABCA1 和 KLF2 水平，此实验通过研究 miR-188-3p 对巨噬细胞炎症反应和氧化的抑制作用，发现了一种新的 AS 潜在疗法^[9]。

另一方面，有研究发现外泌体也具有促炎作用。THP-1 源性巨噬细胞中 miR-134 通过 ANGPTL4/LPL 途径促进脂质积聚和促炎性细胞因子的分泌，从而加剧 AS 的发生发展。因此，靶向 miR-134 可能为预防和治疗 AS 性心血管疾病提供了新的策略^[10]。

综上所述，外泌体中的 miRNA 部分能够抑制炎症反应的发生，部分能够诱导炎症反应的发生，通过增强或抑制炎症反应，从而相应的加剧或延缓 AS 的发生发展。

3.2 外泌体中 miRNA 调节血管内皮细胞凋亡 miRNA 作为一种小分子调节物质，可表达于血管内皮细胞，在调节血管的生理病理过程中发挥重要作用。Burger 等^[11]研究发现，内皮集落形成细胞衍生的外泌体中富含 miR-486-5p，能够靶向抑制肾脏组织在 L/R 条件下张力蛋白同源物的表达水平，阻止其通过 AKT 通路诱导内皮细胞的凋亡。另有研究发现，平滑肌细胞衍生的外泌体可以通过介导 miR-150 转移来控制内皮细胞的迁移^[12]，从而保护血管内皮细胞。此外，在 ApoE^{-/-} 小鼠的 As 模型中还发现血管内皮细胞中的 miR-126 可以减少斑块面积^[13]。

与之相反，也有研究表明外泌体中的 miRNA 可导致血管内皮细胞凋亡，引起内皮功能障碍。Goodwin 等^[14]对外泌体中脓毒血症相关 miRNA 进行分析，结果显示脓毒血症患者的 miR-34a 表达较健康人显著升高，而 miR-15a 和 miR-27a 有所下降，说明外泌体诱导了内皮细胞的衰老与凋亡。

综上所述，外泌体对内皮细胞凋亡具有双向调节作用，其功能的体现可能与所来源的细胞种类、细胞内部携带的具体成分和不同类型及强度的外界刺激有密切关系。

3.3 外泌体中 miRNA 调节巨噬细胞极化 巨噬细胞在不同刺激因素的作用下，为满足机体的不同需求可转化成具有不同功能表型的巨噬细胞，这个过程称为极化。Yang 等^[15]研究表明，miR-216a 通过激活端粒酶 Smad3/NF-κB 促进 M1 型巨噬细胞极化和 AS 进展。Zhuang 等^[16]发现，巨噬细胞中 miR-223 能够促进小鼠巨噬细胞炎症因子的表达，通过抑制 Pknex1 促进 M1 型巨噬细胞极化，是关键调节剂。研究发现，巨噬细胞中 miR-378a 通过直接或间接方式调节信号调节蛋白 α (SIRPα) 介导巨噬细胞的吞噬和极化作用，这可能为促进巨噬细胞的胆固醇逆向转运和抑制 AS 的进展提供了新的途径^[17]。

3.4 外泌体中 miRNA 调节血管平滑肌细胞表型转化 血管平滑肌细胞 (VSMC) 在生理情况下的表型为收缩型，在一定的内外因素刺激下，VSMC 表型由收缩型转化为合成型，是 AS 发生发展的一个重要因素。miRNA 是 VSMC 转化的分子开关，可以通过影响转录因子调节 VSMC 表型转化。Cheng 等^[18]通过研究体外培养的大鼠 VSMC 和体内

球囊损伤的大鼠颈动脉，证实 miR-145 可上调钙调蛋白及平滑肌肌动蛋白等 VSMC 分化标志物基因的表达，是一种新的表型标记和 VSMC 的新的表型调节剂。Torella^[19]等发现，miR-133 在体外和体内 VSMC 实验中均表达增强，是 VSMC 表型转化的一个重要调节因子，能有效抑制 VSMC 表型转化。

3.5 外泌体中 miRNA 调节血小板活性 血小板活化、黏附和聚集亦是 AS 发病机制的重要环节。通过对 As 患者服用抗血小板药物阿司匹林的研究中发现，血小板外泌体中的 miR-126 和 miR-223 的表达水平降低^[20-21]。有研究选取了血小板中 miR-200b、miR-495、miR-107 这 3 种 miRNA 与其相应的靶基因相结合，发现三者均可通过调节相关蛋白的表达影响血小板活性^[22]。这些研究表明，部分 miRNA 能够调节血小板活性，有望成为 AS 治疗的潜在标志物。

4 外泌体负载中药对动脉粥样硬化的防治及其他疾病的影响

中药可通过多途径、多位点对靶器官进行调控，从而达到预防、治疗疾病的目的。外泌体有膜包裹，所运载的物质不会轻易被蛋白降解，这对中药发挥更好的疗效具有重大意义。

4.1 姜黄素 姜黄素是来自植物姜黄（姜科）的根茎中的一种天然多酚，长期以来被用于治疗炎症相关的疾病。研究发现，负载有姜黄素的外泌体能够通过载脂蛋白 A1 与 ATP 结合盒蛋白 A1 介导途径使细胞内的低密度脂蛋白流出量增加，可降低细胞内胆固醇水平，并且还发现由外泌体搭载的姜黄素的药物疗效增加^[23]。Ma 等^[24]发现，姜黄素不仅能有效抑制 LPS 诱导的细胞因子 TNF-α、IL-6 的表达，还可抑制 RAW264.7 巨噬细胞与 THP-1 源性巨噬细胞中 miR-155 的表达；通过阻断 PI3K/AKT 信号通路，可导致 miR-155 水平降低，说明姜黄素抑制 LPS 诱导的炎症反应的作用可能与抑制 miR-155 的表达有关。

4.2 补阳还五汤 补阳还五汤在临幊上用于治疗偏瘫和中风，最近研究发现，该方干预骨髓间充质干细胞 (MSCs) 衍生的外泌体时，能激活血管内皮生长因子的表达，诱导 miR-126 的表达，抑制 miR-221 和 miR-222 的表达。另外，在大鼠双侧颈动脉结扎后，补阳还五汤干预的 MSCs 的外泌体可以促进大鼠 Ki-67 和脑内血管内皮生长因子的表达，使血管密度增加，可促进缺血区脑血管的生成，改善缺血症状^[25]。

4.3 丹皮酚 丹皮酚是一种从中药牡丹皮中分离出来的活性化合物，可调节血细胞功能和保护血管细胞的损伤，已被证明具有抗 AS 的作用^[26]。Liu 等^[27]在体内实验中证实，丹皮酚抑制了 ApoE^{-/-} 小鼠 AS 的发展，增加了 miR-223 的表达，抑制了 STAT3 通路；在体外实验中，丹皮酚抑制了 HUVECs 中的炎症分泌、黏附和 STAT3 的表达，可在 miR-223 抑制剂转染入 THP-1 细胞后逆转，说明丹皮酚可以通过增加 HUVECs 中 miR-223 的表达，降低 HUVECs 中 IL-1β、IL-6、ICAM-1、VCAM-1 的表达，并减轻 THP-1 细胞

与HUVEC的黏附，从而抑制AS的发生发展。

4.4 紫草素 紫草素是从中药紫草中分离出的萘醌，可通过减弱氧化应激抑制炎症反应、抑制DNA拓扑异构酶的活性等机制抑制肿瘤细胞生长^[28]。Wei等^[29]分析了乳腺癌细胞MCF-7衍生的外泌体中的miRNA谱，发现一些miRNA在外泌体中被特异性分选和丰富。通过敲除外泌体中最丰富的miRNA和MCF-7增殖试验发现，外泌体中miR-128负调节MCF-7受体细胞Bax水平，并抑制细胞增殖。这些结果表明，紫草素通过减少肿瘤细胞来源的外泌体miR-128的表达抑制MCF-7的增殖。

4.5 三七总皂苷 三七是属于五加科的一种中药，临幊上常用于心脑血管疾病方面的治疗，三七总皂苷（PNS）已被证实是药材发挥心脏保护作用的主要有效成分。PNS可显著减弱异丙肾上腺素（ISO）诱导的心肌损伤和纤维化，在ISO处理的小鼠心脏中miR-29c表达显著降低，而PNS处理后其表达增加，表明PNS的心脏保护作用可能是由于升高miR-29c表达所致，这可有助于加强对PNS治疗心血管疾病活性的理解^[30]。

4.6 甘草 Xiang等^[31]从甘草煎剂中提取miRNA和合成的miRNA模拟物，用于干预从健康志愿者分离的外周血单核细胞，通过RT-PCR分析Toll样受体、转录因子、信号分子和细胞因子的基因表达，结果显示甘草miRNA通过抑制参与T淋巴细胞分化、炎症和凋亡基因的表达，可以显著调节外周血单核细胞。

5 总结与展望

外泌体可通过调节炎症反应、内皮细胞凋亡、巨噬细胞极化、血管平滑肌细胞表型转化及血小板活性等多个方面参与AS发生发展过程，其中miRNA在AS病理过程中扮演着重要角色，已引起越来越多研究者的关注。研究表明，外泌体中的miRNA的表达水平既可以调控AS发生发展进程，也可以反映其疗效。中医药以整体观念及辨证论治为指导，通过多位点、多途径整合起效，对于复杂性疾病的治疗具有独特优势。然而，目前国内外对外泌体负载中药治疗AS的研究几乎处于空白状态，故更深入地研究外泌体中miRNA在AS过程中的作用机制，并将其作为中药有效成分的载体，可能是相关诊断和治疗的新型生物标记物，以及相关研究新的着力点和新靶标，还可能使miRNA成为药靶，或模拟miRNA进行新药开发，具有很大的探索潜力和应用价值。

参考文献：

- [1] Stefanadis C, Antoniou C, Tsiachris D, et al. Coronary atherosclerotic vulnerable plaque: current perspectives [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(3): 43-55.
- [2] Johnstone R M, Adam M, Hammond J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 9412-9420.
- [3] Khatun Z, Bhat A, Sharma S, et al. Elucidating diversity of exosomes: biophysical and molecular characterization methods [J]. *Nanomedicine*, 2016, 11(17): 359-377.
- [4] Isola AL, Chen S. Exosomes: the messengers of health and disease [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15(1): 157-165.
- [5] Mohr A M, Mott J L. Overview of microRNA biology [J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(1): 3-11.
- [6] Caivano A, Laurenzana I, De Luca L, et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12): 9739-9752.
- [7] Huber H J, Holvoet P. Exosomes: emerging roles in communication between blood cells and vascular tissues during atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2015, 26(5): 412-419.
- [8] Wang Y, Han Z, Fan Y, et al. MicroRNA-9 inhibits NLRP3 inflammasome activation in human atherosclerosis inflammation cell models through the JAK1/STAT signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41: 1555-1571.
- [9] Zhang X F, Yang Y, Yang X Y, et al. MiR-188-3p upregulation results in the inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in ApoE-deficient mice [J]. *Thromb Res*, 2018, 171: 55-61.
- [10] Ye Q, Tian G P, Cheng H P, et al. MicroRNA-134 promotes the development of atherosclerosis via the ANGPTL4/LPL pathway in apolipoprotein e knockout mice [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2018, 25(3): 244-253.
- [11] Burger D, Vias J L, Zimpelmann J, et al. Transfer of microRNA-486-5p from human endothelial colony forming cell-derived exosomes reduces ischemic kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2016, 90(6): 1238-1250.
- [12] Zhao Y, Li Y, Luo P, et al. XBP1 splicing triggers miR-150 transfer from smooth muscle cells to endothelial cells via extracellular vesicles [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(12): 28627.
- [13] Chistiakov D A, Orekhov A N, Bobryshev Y V, et al. Cardiac extracellular vesicles in normal and infarcted heart [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(1): 63.
- [14] Goodwin A J, Guo C, Cook J A, et al. Plasma levels of microRNA are altered with the development of shock in human sepsis: an observational study [J]. *Crit Care*, 2015, 19: 440.
- [15] Yang S, Li J, Chen Y, et al. MicroRNA-216a promotes M1 macrophages polarization and atherosclerosis progression by activating telomerase via the Smad3/NF-κB pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1865 (7): 1772-1781.
- [16] Zhuang G Q, Meng C, Guo X, et al. miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation [J]. *Circulation*, 2012, 125: 2892-2903.
- [17] Chen W, Li X, Wang J, et al. miR-378a modulates macrophage phagocytosis and differentiation through targeting CD47-SIRPα axis in atherosclerosis [J]. *Scand J Immunol*, 2019, 90(1): e12766.
- [18] Cheng Y, Liu X, Yang J, et al. MicroRNA-145, a novel

- smooth muscle cell phenotypic marker and modulator controls vascular neointimal lesion formation [J]. *Circ Res*, 2009, 105(2): 158-166.
- [19] Torella D, Iaconetti C. MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch *in vitro* and vascular remodeling *in vivo* [J]. *Circ Res*, 2011, 109: 880-893.
- [20] Willeit P, Zampetaki A, Dudek K, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation [J]. *Circ Res*, 2013, 112(4): 595-600.
- [21] Chyrczel B, Totoń-Zurafńska J, Kruszelnicka O, et al. Association of plasma miR-223 and platelet reactivity in patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy: A preliminary report [J]. *Platelets*, 2015, 26(6): 593-597.
- [22] Srikanthan S, Li W, Silverstein R L, et al. Exosome polyubiquitin inhibits platelet activation, downregulates CD36 and inhibits pro-atherothrombotic cellular functions [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(11): 1906-1917.
- [23] Canfrán-Duque A, Pastor O, Quintana-Portillo R, et al. Curcumin promotes exosomes/microvesicles secretion that attenuates lysosomal cholesterol traffic impairment [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(4): 687-697.
- [24] Ma F, Liu F, Ding L, et al. Anti-inflammatory effects of curcumin are associated with down regulating microRNA-155 in LPS-treated macrophages and mice [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 1263-1273.
- [25] Yang J, Gao F, Zhang Y, et al. Buyanghuanwu decoction (BYHWD) enhances angiogenic effect of mesenchymal stem cell by upregulating VEGF expression after focal cerebral ischemia [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56: 898-906.
- [26] Yuan X, Chen J, Dai M, et al. Paeonol promotes microRNA-126 expression to inhibit monocyte adhesion to ox-LDL-injured vascular endothelial cells and block the activation of the PI3K/Akt/NF-κB pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38: 1871-1878.
- [27] Liu Y R, Li C, Wu H F, et al. Paeonol attenuated inflammatory response of endothelial cells via stimulating monocytes-derived exosomal MicroRNA-223 [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1105.
- [28] Yoshida L S, Kakegawa T, Yuda Y, et al. Shikonin changes the lipopolysaccharide-induced expression of inflammation-related genes in macrophages [J]. *J Nat Med*, 2017, 71(4): 723-734.
- [29] Wei Y, Li M Z, Gui S F, et al. Shikonin inhibits the proliferation of human breast cancer cells by reducing tumor-derived exosomes [J]. *Molecules*, 2016, 21(6): 777.
- [30] Liu L, Ning B B, Cui J G, et al. miR-29c is implicated in the cardioprotective activity of Panax notoginseng saponins against isoproterenol-induced myocardial fibrogenesis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 1-4.
- [31] Xiang J, Huang J C, Xu C, et al. Effect of miRNA from Glycyrrhiza uralensis decoction on gene expression of human immune cells [J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(9): 1752-1756.