



厦门大学学报(自然科学版)  
*Journal of Xiamen University(Natural Science)*  
ISSN 0438-0479,CN 35-1070/N

## 《厦门大学学报(自然科学版)》网络首发论文

题目: 细胞外囊泡参与调控外源因素诱导的肝毒性损伤的研究进展  
作者: 江珊, 吕鹏, 林忠宁, 刘刚  
收稿日期: 2019-07-13  
网络首发日期: 2019-10-23  
引用格式: 江珊, 吕鹏, 林忠宁, 刘刚. 细胞外囊泡参与调控外源因素诱导的肝毒性损伤的研究进展. 厦门大学学报(自然科学版).  
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.n.20191023.1650.002.html>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

特约综述

# 细胞外囊泡参与调控外源因素诱导的肝毒性损伤的研究进展

江珊, 吕鹏, 林忠宁, 刘刚<sup>✉</sup>

(厦门大学公共卫生学院, 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 福建 厦门 361102)

<sup>✉</sup>通信作者 gangliu.cmitm@xmu.edu.cn

**摘要** 肝脏是机体代谢外源因素的主要功能性器官, 其具有独特的血窦结构和丰富的细胞组成, 而细胞的功能改变是造成肝毒性损伤的主要原因。细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是由脂质双分子层所形成的纳米级球形囊泡, 源自于各细胞亚群, 用于负载特定的内容物, 并可作为载体介导相邻或远处细胞间的信息交流。该文综述了外源因素暴露下 EVs 介导肝毒性损伤进程中各细胞的信息传递, 并探讨靶向干预 EVs 的具体途径, 为预防和控制肝毒性损伤提供线索以及潜在的应用价值。

**关键词** 细胞外囊泡; 细胞间通信; 肝毒性损伤; 外源因素; 靶向干预

中图分类号 R543 文献标志码 A DOI: 10.6043/j.issn.0438-0479.201907016

## The roles of extracellular vesicles in regulating of hepatotoxic damage induced by exogenous factors

JIANG Shan, LÜ Peng, LIN Zhongning, LIU Gang<sup>✉</sup>

(State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract** Liver is the mainly metabolic organ with unique sinusoid structure and abundant cell types, which plays an important functional role in metabolizing exogenous factors. Importantly, the functional impairment of hepatocytes is leading cause of hepatotoxic damage. Extracellular vesicles (EVs), with nano size and lipid bilayer membrane, are produced by almost all types of cells. EVs serve as potential carriers by loading and transporting specific molecules, mediating information communication between cells. This review mainly discusses the cellular cross-talk and specific approaches of targeted intervention in the process of EVs-mediated hepatotoxic damage, which provides further guidance and application for preventing hepatotoxic damage.

**Key words** extracellular vesicles; intercellular communication; hepatotoxic damage; exogenous factors; targeted intervention

肝脏是人体最大的实质性器官, 承载着物质的合成及分解、生物代谢及转化等多种功能, 外源因素暴露所致的毒性损伤是大多数肝脏疾病的起始, 可发展成为肝硬化、肝癌等, 严重危害公众健康; 其中肝实质细胞对外源因素的代谢是肝脏毒性损伤始动因素, 而后通过细胞间通讯机制将信息传递到非实质细胞, 进一步加剧肝毒性损伤。细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 早期仅被当作细胞运输代谢废物出胞的载体。但近年来, 它们在细胞间组分交换以达成细胞间信息交流的功能, 引起了研究者的广泛关注, 并已成为一种新兴的参与细胞间通讯的新媒介, 尤其是其在肝脏的病理进程中发挥着重要的作用<sup>[1-3]</sup>。本文系统阐述了在药物、酒精、肝炎病毒及脂毒性物质等外源因素暴露下, 诱导产生肝脏毒性损伤相关 EVs 的机制以及潜在的干预靶点, 为外源因素诱导肝毒性损伤的干预提供

收稿日期: 2019-07-13

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFA0205201); 国家自然科学基金(81422023, 51273165, U1705281, U1505221); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (ncet-13-0502)

网络首发时间: 2019-10-23 17:35:39 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.n.20191023.1650.002.html>

理论依据。

## 1 EVs 的分类、形成和功能

### 1.1 EVs 的分类

EVs 是一组脂质双分子层包绕形成的纳米级球状膜性囊泡, 无功能性细胞核, 是细胞自发或在一定条件下释放出的一种亚细胞成分, 实质上是一组纳米级颗粒, 主要包括源于内体系统的外泌体 (exosome)、膜出芽的微囊泡 (microvesicle) 及细胞凋亡产生的膜囊泡-凋亡小体 (apoptotic body) 3 类<sup>[3-7]</sup>; 近年来研究发现一个新的 EVs 亚群, 即癌小体 (large oncosomes; LOs)<sup>[8]</sup>, LOs 由肿瘤细胞膜出芽形成, 依赖于细胞内 AKT1 和 EGFR 信号通路的激活<sup>[9-10]</sup>, 并与肿瘤的侵袭性直接相关<sup>[9, 11]</sup>。其中, 每种亚群根据其产生途径的差异, 有其独特的标志物分子, 用于区分不同的亚群 (表 1)。目前以外泌体及微囊泡的功能研究居多, 本文亦着重关注这两个亚群。

表1 EVs分类及标志物  
Tab. 1 Classification and the markers of EVs

来源	尺寸/nm	密度/(g·mL <sup>-1</sup> )	标志物	
外泌体	内体途径	30~150	1.13~1.18	四跨膜蛋白 Alix
微囊泡	膜出芽	150~1000	1.16~1.19	整合素、CD40
凋亡小体	凋亡细胞膜出芽	>1000	1.16~1.28	磷脂酰丝氨酸、基因组 DNA
癌小体	癌细胞膜出芽	1000~10 000	1.10~1.15	角蛋白 CK18

### 1.2 EVs 的形成

几乎所有细胞都能够分泌负载丰富内容物的 EVs, 该过程在从细菌到人类和植物的整个进化过程中均保守<sup>[12-14]</sup>。其中, 微囊泡由细胞膜直接出芽形成, 是磷脂再分布和细胞骨架蛋白收缩之间动态互作的结果, 该过程受到胞内钙离子浓度的调控<sup>[7]</sup>; 而外泌体发生需通过内体途径, 形成过程相对繁杂, 需要借助一系列蛋白质的相互作用以调节 EVs 内容物的装载, 最后经由多囊泡晚期内吞体即多泡体 (multivesicular body, MVB) 与质膜融合, 释放外泌体<sup>[15-17]</sup> (图 1)。

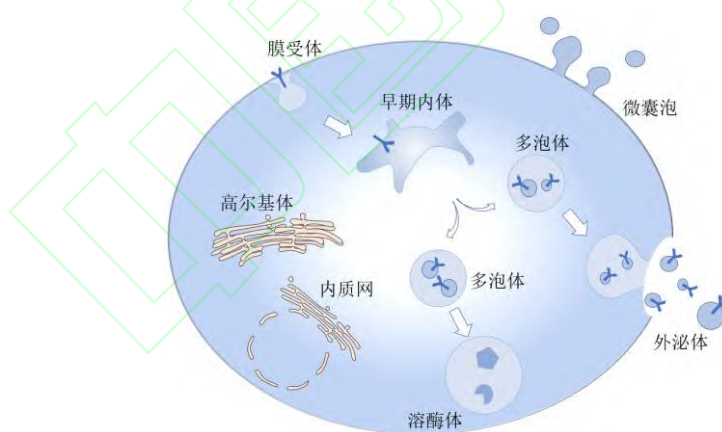


图 1 EVs 的形成及释放  
Fig.1 Biogenesis and secretion of extracellular vesicles

### 1.3 EVs 的内容物组成及功能

细胞产生的 EVs 可携带大量的生物信息物质, 包括 mRNA、非编码 RNA、DNA、脂质和蛋白质等成分。目前 Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org/>) 中记录了来自于 41 个物种, 共计 1254 份研究数据 (2018 年 8 月前收录), 共统计分析出细胞外囊泡中含有 349988 种蛋白、27646 种 mRNAs、10520 种 miRNAs 和 639 种脂质。EVs 主要存在于细胞生存的微环境以及生物体液 (血液、淋巴液、唾液、尿液、精液及乳汁) 等, 参与多种病理进程<sup>[3]</sup>; 研究表明, 肝细胞通过释放 EVs 调节肝脏与其他组织间的信息传递, 同时血液循环中大量存在的其他细胞来源的 EVs 也能够将信息运载

到肝组织内<sup>[18]</sup>。EVs 通过将其携带的生物信息运输到周边靶细胞或经血液循环及体液运输至远处<sup>[19]</sup>；一旦附着至靶细胞，EVs 可触发受体配体结合反应诱导下游信号通路的激活，或通过胞吞或膜融合作用等方式将内容物转移至靶细胞中，由此改变受体细胞的生理状态及功能，或对受体细胞遗传组进行重新编排，使靶细胞获得新的功能或失去某功能甚至死亡，进而影响疾病的发生及发展<sup>[20-21]</sup>。

## 2 外源因素经由 EVs 诱导肝毒性损伤

肝脏血液供应丰富，细胞组成亦丰富。几乎所有的肝脏细胞，包括肝上皮细胞（即肝细胞和胆管细胞）、天然杀伤 T (NKT) 细胞、肝星状细胞、巨噬细胞、成体肝干细胞和肝窦内皮细胞，均可以释放 EVs，同时也均可作为 EVs 的靶细胞<sup>[22-26]</sup>。不同细胞类型的共存产生了对细胞间通信网络的需求，以维持肝脏稳态<sup>[27]</sup>。大量的研究表明，EVs 与肝脏疾病的发生及发展相关，在药物、病毒、酒精及脂毒性物质等外源因素刺激下，肝脏内各细胞响应刺激，分泌负载非编码 RNA、脂质和蛋白质等内容物的 EVs，通过细胞间的通讯，调控靶细胞的信号通路，共同导致肝脏毒性损伤的形成；EVs 可作为肝脏疾病诊断及预后判断潜在的新型生物标志物<sup>[28]</sup>。

### 2.1 药物

肝脏作为药物代谢的核心器官，药物代谢产生异生物质诱导的损伤即为药物性肝损伤（drug-induced liver injury, DILI）。DILI 是一种严重的全球性健康问题，占急性肝功能衰竭的 50% 以上<sup>[29]</sup>。例如，含有对乙酰氨基酚（acetaminophen, APAP）的化合物是最常用的处方药，APAP 蛋白质加合物的形成是 APAP 肝毒性的关键特征<sup>[30]</sup>，也是引起 DILI 最常见的原因<sup>[31]</sup>。在 APAP 所致的药物性肝损伤中，已有研究显示肝脏血清 EVs 的数量增加，并且这些 EVs 中的 miR-122 和白蛋白 mRNA 含量显著增加<sup>[32]</sup>；APAP 以 300 mg / kg 暴露剂量腹腔注射入小鼠，24 h 后观察发现 BABL/c 小鼠肝脏小叶中心坏死，并且同步检测到循环 EVs 数量的增加，其中肝脏特异性标志物 miR-122、miR-192 和 miR-155 明显增加<sup>[33]</sup>。双氯芬酸（diclofenac, DCF）400 μmol/L 暴露于肝细胞 36 h，可改变 EVs 的释放量以及内容物组成，经组学筛选发现存在 25 种特异差异蛋白，该差异性分子可作为 DCF 诱导肝损伤的关键原因<sup>[30]</sup>。在 D 氨基半乳糖胺（galactosamine, GalN）诱导肝损伤模型中，18 h 后观察到 EVs 中 Alb、Gnb2l 和 Rbp4 等的 mRNA 水平上调<sup>[30, 34]</sup>。同时，研究发现源自小鼠肝细胞的 EVs 含有带活性的异生素代谢酶如细胞色素 P450、UDP 葡萄糖醛酸基转移酶和谷胱甘肽 S-转移酶药物代谢蛋白家族的几个成员，提示 EVs 可能参与靶细胞中药物和内源性有毒物质的解毒过程<sup>[24]</sup>并与 DILI 密切相关<sup>[30]</sup>。

### 2.2 酒精

长期过量摄入酒精会导致酒精性肝损伤即酒精性肝病（ALD），并可能发展为酒精性肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌等<sup>[35]</sup>。ALD 最显著的特征是炎性单核细胞和巨噬细胞群的募集以及库普夫细胞（KCs）的激活<sup>[36]</sup>。多项研究表明，酒精性肝炎患者和慢性酒精喂养或急性酒精暴露小鼠的循环血液中 EVs 数量均显著增加<sup>[37-40]</sup>。Vikas 等的研究表明，酒精通过 TRAIL receptor-caspase 3 依赖性途径诱导肝细胞释放携带 CD40L 的 EVs，诱导巨噬细胞的浸润及激活，促炎细胞因子的释放进一步促进 ALD 的发生<sup>[41]</sup>；酒精也可以通过诱导源细胞释放携带 miRNA 的外泌体介导与其他肝脏细胞的交叉互话，诱导 Huh7.5 细胞释放携带 miR-122 的外泌体，通过抑制 HO-1 途径并促进单核巨噬细胞对 LPS 刺激敏感，增加促炎细胞因子 TNF-α、IL-1β 和 NOX2 的水平<sup>[38]</sup>，进而介导 ALD 的发展。提取 ALD 小鼠血清 EVs 经静脉滴注至未经酒精暴露的小鼠体内，显示肝细胞中单核细胞趋化蛋白 1 表达增强，体内 KCs（CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>）数量增加，其中 M1 型 KCs（TNF-α<sup>+</sup>, IL-12/23<sup>+</sup>）百分比增加，M2 型 KCs（CD163<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>）百分比降低；同时，通过酒精暴露小鼠中循环 EVs 的蛋白质组分析，发现 EVs 携带热休克蛋白 90（HSP90）也可作为酒精暴露小鼠活化巨噬细胞群的介质<sup>[36, 42]</sup>。

### 2.3 肝炎病毒

在病毒性肝炎的病理过程中，EVs 参与病毒的播散、宿主免疫抑制以及局部免疫微环境的劫持，维持持续感染。分离慢性乙型肝炎（CHB）患者血清 EVs，发现其负载乙型肝炎病毒（HBV）核酸和蛋白，同时分离患者 NK 细胞，也发现了 HBV 核酸和 HBV 蛋白的存在，表明 EVs 被 NK 细胞



摄取, HBV 病毒的核酸可抑制 NK 细胞表面的模式识别受体表达, 特别是视黄酸诱导基因 I (RIG-I) 的表达, 导致核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶途径的抑制, 最终导致 NK 细胞免疫功能障碍<sup>[43]</sup>。HBV 感染状态下, 肝细胞释放包裹具有免疫调节功能 microRNA 的 EVs, 传递至肝脏巨噬细胞中, 抑制巨噬细胞中 IL-12 和 p35 mRNA 表达, 介导病毒免疫逃逸的发生。Devhare 等研究表明, HCV 感染肝细胞释放的外泌体携带 miR-19a, 靶向肝星状细胞(HSC)经由 SOCS3-STAT3 信号轴激活转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )信号传导, 诱导肝脏纤维化<sup>[44]</sup>。Cobb 等发现 HCV 感染肝细胞释放含有 TGF- $\beta$  的外泌体, 通过扩增生发中心 T 滤泡调节 (Tfr) 细胞, 抑制 T 滤泡辅助 (Tfh) 细胞, 最终导致 HCV 患者中 CD4<sup>+</sup> T 细胞功能失调, 同时抑制 B 细胞产生高亲和力抗体, 导致抗病毒免疫失调<sup>[45]</sup>; 慢性 HCV 感染者血清中分离的 EVs 中包含了 HCV RNA, 同时可以调节 HCV 通过非受体依赖的方式转运到人原代正常肝细胞中<sup>[46]</sup>。

## 2.4 高脂

研究表明, 脂毒性诱导肝实质细胞释放 EVs 作用于肝非实质细胞如 Kupffer 细胞和肝星状细胞等, 促进非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 进程。Hirsova 等研究证实, 在饱和脂肪酸刺激下, 肝实质细胞死亡受体 (DR5) 被激活, 进而介导 caspase8、caspase3 以及 ROCK1 (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1) 的依次激活, 释放携带 TRAIL 的 EVs, 随后被骨髓来源巨噬细胞内吞, 进一步通过激活 RIP1 (receptor interacting protein kinase-1)、FADD (receptor interacting protein kinase-1)、TRADD (receptor interacting protein kinase-1) 和 NF- $\kappa$ B 信号通路, 上调促炎因子 IL-6 和 IL-1 $\beta$  的表达, 介导巨噬细胞炎症反应的发生<sup>[47]</sup>。Ibrahim 等<sup>[48]</sup>和 Tomita 等<sup>[49]</sup>的研究显示, 棕榈酸酯或溶血磷脂酰胆碱通过混合谱系激酶 3(MLK3)诱导肝细胞释放携带趋化因子 CXCL10 的 EVs, 诱导单核细胞/巨噬细胞对肝脏的趋化性, 促进 Kupffer 细胞的激活以及对外周血淋巴细胞招募的反应, 促进非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的发生发展<sup>[48-50]</sup>。Kakazu 等发现, 棕榈酸酯激活 ER 应激, 通过 IRE1 $\alpha$ -XBP1 信号轴介导携带神经酰胺的 EVs 释放, 神经酰胺形成鞘氨醇-1-磷酸(S1P)激活巨噬细胞趋化性, 是脂毒性条件下肝脏募集巨噬细胞的潜在机制<sup>[51]</sup>。Povero 等研究证明, 脂质过载诱导肝细胞释放包含 miR-128-3p 的 EVs, HSC 内化后通过靶向调控过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ ) 信号通路, 促使 HSC 细胞中 collagen、 $\alpha$ -SMA 和 TIMP-2 等促纤维化基因的 mRNA 水平表达显著上调, 并分泌细胞外基质及多种细胞因子, 在肝纤维化进程中起重要作用<sup>[34, 52-53]</sup>。高脂饮食喂养的小鼠血清中存在高水平的 EVs, 可被 KCs 吞噬介导细胞间通讯, 其中内容物 mtDNA 可经由 IFN 调节因子、核转录因子激活蛋白 1 和 NF- $\kappa$ B 等信号通路激活 KCs, 促进肝脏炎症。而富含 TRAIL 的 EVs 有助于巨噬细胞活化, 导致在营养过剩的 NASH 小鼠模型中观察到无菌性炎症反应, 共同参与肝细胞炎症反应的发生。

综上, 肝实质细胞在药物、病毒、酒精及脂毒性物质等多种外源因素的刺激下, 经细胞内相应通路诱导负载 miRNA、蛋白、病毒核酸等内容物的 EVs 释放, 通过受体配体反应或直接与靶细胞膜融合方式释放内容物, 作用于巨噬细胞、肝星状细胞、NK 细胞等非实质细胞, 诱导非实质细胞内促炎促纤维化相关信号通路的激活, 并上调促炎因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ , 纤维化相关因子  $\alpha$ SMA、TGF $\beta$  的表达, 从而介导巨噬细胞炎症反应以及纤维化的发生, 诱发 NK 细胞免疫功能障碍, 最终导致肝脏毒性损伤 (图 2)。

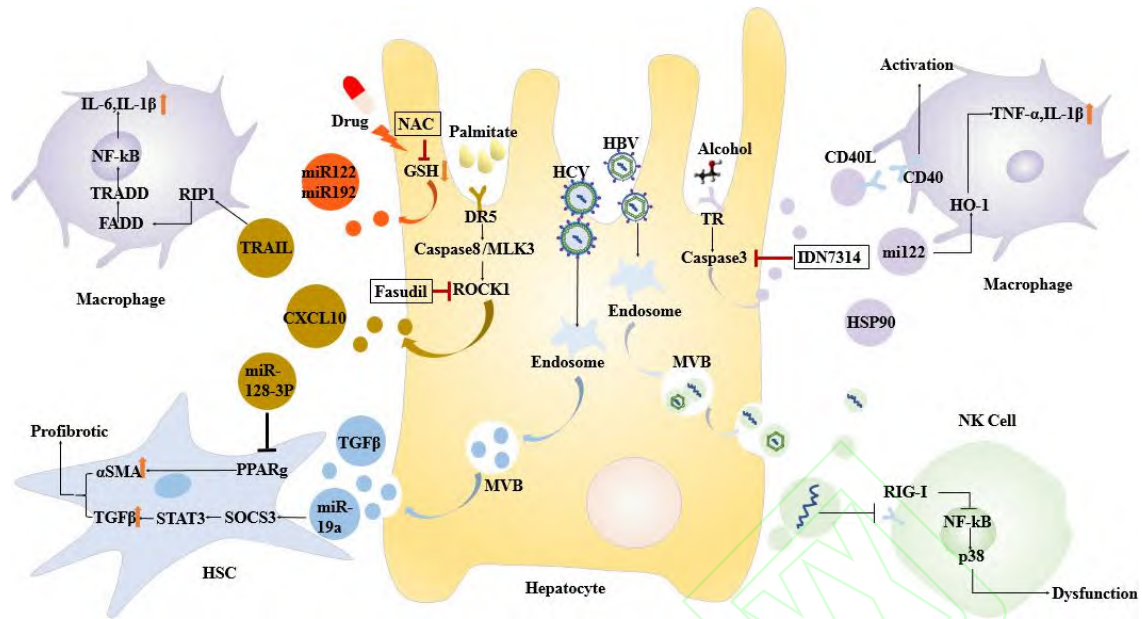


图2 外源因素经由EVs相关机制诱导肝毒性损伤  
Fig.2 EVs-related mechanisms of exogenous factors inducing hepatotoxic damage

### 3EVs的靶向干预及功能化改造策略

细胞间通讯是机体实现生理功能的方式，也是诸多病理生理进程的发生机制<sup>[54]</sup>。近年来，EVs作为参与细胞间通讯的新型介质，极大引起了科研界的探索热潮；随着肝脏毒理学机制越来越受到关注，更深入地了解EVs参与的细胞间互话对减轻或逆转肝损伤具有重要意义；同时，基于EVs的高生物相容性、低免疫原性及高效递送等生物学特性，所建立起来的另一套功能化膜囊泡体体系，用于小分子多肽及药物的靶向递送，也为新的治疗策略提供了新的方向。

#### 3.1 干预EVs的内容物组成、释放及摄取

APAP诱导细胞氧化损伤释放EVs介药物性肝损伤，通过使用抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)或谷胱甘肽联合APAP处理小鼠，可使EV中蛋白质水平及miR 122等恢复至正常水平，一定程度上预防了肝毒性的发展<sup>[37]</sup>。酒精通过TRAIL receptor-caspase3依赖性途径诱导肝细胞释放携带CD40L的EVs，诱导巨噬细胞的浸润及激活，caspase 3抑制剂IDN-7314可降低EVs的释放，减轻酒精诱导的炎症反应<sup>[41]</sup>。HBV感染的肝细胞释放负载病毒核酸的EVs，经过游走，被正常肝细胞摄取，加剧病毒的感染，提示阻断EVs的释放可以阻止病毒的播散<sup>[43, 55]</sup>。饱和脂肪酸刺激诱导携带TRAIL的EVs释放，募集巨噬细胞并激活其向促炎性转化，导致NASH的发生及发展；使用盐酸法舒地尔(Fasudil)抑制ROCK1依赖性EVs释放，可减轻饱和脂肪酸诱导的肝脏炎症反应(图2)；NASH小鼠模型施用ROCK1依赖性EVs释放抑制剂可有效降低循环EVs的数量，这与谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)等肝脏损伤血清学指标，以及IL-1 $\beta$ 等炎症因子水平的降低呈现明显的相关，减轻了纤维化的发展，可据此开发治疗NASH患者的策略<sup>[47]</sup>。

EVs的释放也依赖于胞内一系列蛋白的作用，RAB(Ras-related GTP-binding protein)GTPase家族蛋白是EVs中常见的胞质成分，也是介导MVB与质膜融合的关键分子，通过敲除RAB的表达，抑制RAB GTPase家族蛋白的活性能有效抑制EVs释放<sup>[56]</sup>。此外，棕榈酸酯通过MLK3诱导脂毒性肝细胞释放携带趋化因子CXCL10的EVs，诱导单核细胞/巨噬细胞对肝脏的趋化性促进炎症的发展，抑制MLK3活性可以有效降低EVs中CXCL10蛋白含量，从而减少巨噬细胞的活化，降低炎症因子的表达<sup>[50]</sup>；脂质过载诱导包含miR-128-3p的EVs，靶向HSCs细胞中PPAR- $\gamma$ 的调控，促进肝纤维化进程；而靶向肝星状细胞miR-128-3p的功能化抑制可逆转脂质诱导的肝纤维化进程<sup>[53]</sup>。CD40-/-小鼠酒精暴露后炎症反应大大减弱，提示阻断EVs与靶细胞的受体配体结合，可降低EVs介导的损伤。

将组装有 EGFRvIII mRNA 的胶质瘤衍生 EVs 与肝素一起温育,可以减少受体细胞对 EVs 的摄取,抑制促瘤信息向受体细胞的转移。因而,肝素对 EV 摄取的影响可能为研究 EV 功能提供了独特的工具并作为靶向 EVs 发挥治疗作用的治疗药物<sup>[57]</sup>。新近的一项研究显示,富含 Vanin1 的 EVs 在 NASH 小鼠模型中介导内皮细胞迁移和体外血管形成以及新血管形成,用针对 Vanin-1 的中和抗体处理会大大受体细胞对 EVs 的摄取<sup>[58]</sup>。综上,通过抑制 EVs 释放,调控 EVs 内容物组成,以及阻断受体细胞对 EVs 的摄取,是基于外源因素暴露下,靶向干预 EVs 介导的细胞间通讯疗法的机会。

### 3.2 EVs 衍生的功能化囊泡用于靶向递送治疗

EVs 的磷脂双分子层稳定结构及纳米级的微小尺寸能够保护其携带的活性物质免遭巨噬细胞或相关补体的清除及破坏,进而延长循环半衰期、增强自身的生物活性,由此已经成为具有高生物相容性、低免疫原性及高效递送的非常有前景的药物递送载体<sup>[59]</sup>。采用纳米工程学方法将 EVs 作为靶向治疗的天然载体,装载化疗药物如紫杉醇<sup>[60]</sup>以及 Dox<sup>[61]</sup>等,可提高药物的靶向性,同时也能减少药物在靶点以外部位的聚集,从而降低了脏器毒性。Zhang 等研发出一种新型病毒模拟纳米囊泡(virus-mimetic nanovesicles, VMV),由源自哺乳动物细胞质膜的磷脂,通过信号肽分选途径锚定至细胞膜的重组蛋白和能够控制 VMV 大小和强度的表面活性剂组成,VMV 能够有效地诱导针对活包膜病毒的抗体产生,VMV 接种的小鼠在 H1N1 病毒(H)暴露于致死剂量后仍能够存活<sup>[62]</sup>。该研究团队进而设计了具有靶向配体的生物工程细胞膜纳米囊泡包封溶瘤病毒(OA@BCMNs),结果显示 OA@BCMNs 显著抑制了针对 OA 的先天性和适应性免疫应答,且其表面的 preS1 修饰增强了多种异种移植肿瘤模型中的靶向递送,实现了有效的抗病毒免疫屏蔽,并增强了溶瘤病毒疗法的靶向能力<sup>[63]</sup>。此外,HBV 特异性受体,人类牛磺胆酸钠共转运多肽(hNTCP)定向锚定表达至膜囊泡(hNTCP-MVs)进而实现了迅速阻断细胞模型中的 HBV 感染,可有效预防 HBV 感染的人肝嵌合小鼠模型中的病毒感染,传播和复制<sup>[64]</sup>。采用上述定向表达技术,Liu 等人设计了可以展示全长单克隆抗体(mAb)的新型细胞膜衍生的纳米囊泡(NV),可选择性地将细胞毒性剂递送至肿瘤细胞并发挥有效的抑制作用,并可调节肿瘤免疫微环境<sup>[65]</sup>。上述研究为推动囊泡的功能化设计研发做出了积极探索,对于解决目前棘手的公共卫生学问题具有理论意义和潜在应用价值。

与此同时,尽管目前已有大量的研究表明 EVs 在药物装载及靶向递送领域具有广阔的应用前景,但现今仍然面临诸多挑战,例如 EVs 生物制品的规模化生产、质控指标及安全性评价,对于向临床转化而言,仍需要走较长一段路<sup>[66]</sup>。

## 4 总结及展望

EVs 所介导的细胞间通讯,在外源因素诱导的肝脏病理生理过程中有着举足轻重的作用。但如何精确的靶向调控 EVs 的内容物组成和释放并阻断外源因素暴露诱导的肝毒性损伤仍需进一步探索。已知特定细胞来源的 EVs 可具有特异性修复作用,如胎盘来源的细胞外囊泡携带有自然杀伤淋巴细胞和其他免疫系统组分的抑制性配体,从而对胎儿起免疫保护作用<sup>[67]</sup>;纤维化动物模型中使用人脐带间充质干细胞源性外泌体,减少肝脏组织 I 型、III 型胶原蛋白沉积,并通过抑制 TGF $\beta$ /Smad 信号通路,最终实现纤维化的逆转<sup>[68]</sup>。鉴于此,更多特异性来源的 EVs 值得进一步的探究,特别是 EVs 的修饰及药物装载用于靶向递送治疗的深入系统研究。在 EVs 的功能化改造过程中,供体细胞和 EVs 的变化可能影响其内容物或蛋白质组成,因此还需要进一步探索能够提高 EVs 稳定性的操作方式,并开展更多的临床医学转化实践。动物模型及临床试验已证明 EVs 及其携带的内容物可被用作鉴定肝脏疾病和监测宿主对各种治疗的反应的潜在生物标志物,广泛探索各种疾病模型下 EVs 特异性标志物,有望推动 EVs 作肝脏疾病的非侵入性检测手段,也可为外源因素诱导的肝损伤提供有效的干预靶点。

### 参考文献:

- [1] COLOMBO M, RAPOSO G, THERY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 255-289.
- [2] YANEZ-MO M, SILJANDER P R, ANDREU Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. *J*



- Extracell Vesicles, 2015, 4(1): 270-276.
- [3] 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.
- [4] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *J Neurooncol*, 2019, 21(1): 9-17.
- [5] BORRELLI D A, YANKSON K, SHUKLA N, et al. Extracellular vesicle therapeutics for liver disease[J]. *J Control Release*, 2018, 273: 86-98.
- [6] SHAO H, IM H. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles[J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(4): 1917-1950.
- [7] AKERS J C, GONDA D, KIM R, et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies[J]. *J Neurooncol*, 2013, 113(1): 1-11.
- [8] MEEHAN B, RAK J, DI VIZIO D. Oncosomes - large and small: what are they, where they came from?[J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 33-109.
- [9] MINCIACCHI V R, YOU S, SPINELLI C, et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13): 11327-11341.
- [10] DI VIZIO D, MORELLO M, DUDLEY A C, et al. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(5): 1573-1584.
- [11] MORELLO M, MINCIACCHI V R, DE CANDIA P, et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(22): 3526-3536.
- [12] SCHOREY J S, CHENG Y, SINGH P P, et al. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions[J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(1): 24-43.
- [13] DEATHERAGE B L, COOKSON B T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(6): 1948-1957.
- [14] ROBINSON D G, DING Y, JIANG L. Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment[J]. *Protoplasma*, 2016, 253(1): 31-43.
- [15] CHOUDHURI K, LLODRA J, ROTH E W, et al. Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse[J]. *Nature*, 2014, 507(7490): 118-123.
- [16] NABHAN J F, HU R, OH R S, et al. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(11): 4146-4151.
- [17] COLOMBO M, MOITA C, VAN NIEL G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 24): 5553-5565.
- [18] MOHANKUMAR S, PATEL T. Extracellular vesicle long noncoding RNA as potential biomarkers of liver cancer[J]. *Brief Funct Genomics*, 2016, 15(3): 249-256.
- [19] LI L, PIONTEK K, ISHIDA M, et al. Extracellular vesicles carry microRNA-195 to intrahepatic cholangiocarcinoma and improve survival in a rat model[J]. *Hepatology*, 2017, 65(2): 501-514.
- [20] ARRAUD N, LINARES R, TAN S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration[J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(5): 614-627.
- [21] SATO K, MENG F, GLASER S, et al. Exosomes in liver pathology[J]. *J Hepatol*, 2016, 65(1): 213-221.
- [22] MASYUK A I, HUANG B Q, WARD C J, et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 299(4): G990-G999.
- [23] DENG Z B, ZHUANG X, JU S, et al. Intestinal mucus-derived nanoparticle-mediated activation of Wnt/beta-catenin signaling plays a role in induction of liver natural killer T cell anergy in mice[J]. *Hepatology*, 2013, 57(3): 1250-1261.
- [24] CONDE-VANCELLS J, RODRIGUEZ-SUAREZ E, EMBADE N, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(12): 5157-5166.
- [25] WITEK R P, YANG L, LIU R, et al. Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 320-330.
- [26] PAN Q, RAMAKRISHNAIAH V, HENRY S, et al. Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi)[J]. *Gut*, 2012, 61(9): 1330-1339.
- [27] CAI S, CHENG X, PAN X, et al. Emerging role of exosomes in liver physiology and pathology[J]. *Hepatol Res*, 2017, 47(2): 194-203.
- [28] SZABO G, MOMEN-HERAVI F. Extracellular vesicles in liver disease and potential as biomarkers and therapeutic targets[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(8): 455-466.
- [29] PALOMO L, MLECZKO J E, AZKARGORTA M, et al. Abundance of Cytochromes in Hepatic Extracellular Vesicles Is Altered by Drugs Related With Drug-Induced Liver Injury[J]. *Hepatol Commun*, 2018, 2(9): 1064-1079.
- [30] DUAN L, RAMACHANDRAN A, AKAKPO J Y, et al. Role of extracellular vesicles in release of protein adducts after acetaminophen-induced liver injury in mice and humans[J]. *Toxicol Lett*, 2019, 301: 125-132.
- [31] PATEL S J, MILWID J M, KING K R, et al. Gap junction inhibition prevents drug-induced liver toxicity and fulminant hepatic failure[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(2): 179-183.
- [32] HOLMAN N S, MOSEDALE M, WOLF K K, et al. Subtoxic Alterations in Hepatocyte-Derived Exosomes: An Early Step in Drug-Induced Liver Injury?[J]. *Toxicol Sci*, 2016, 151(2): 365-375.
- [33] CHO Y E, KIM S H, LEE B H, et al. Circulating Plasma and Exosomal microRNAs as Indicators of Drug-Induced Organ Injury in Rodent Models[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2017, 25(4): 367-373.
- [34] ROYO F, SCHLANGEN K, PALOMO L, et al. Transcriptome of extracellular vesicles released by hepatocytes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e686-e693.
- [35] STICKEL F, DATZ C, HAMPE J, et al. Pathophysiology and Management of Alcoholic Liver Disease: Update 2016[J]. *Gut Liver*, 2017, 11(2): 173-188.
- [36] SAHA B, MOMEN-HERAVI F, FURI I, et al. Extracellular vesicles from mice with alcoholic liver disease carry a distinct protein cargo and induce macrophage activation through heat shock protein 90[J]. *Hepatology*, 2018, 67(5): 1986-2000.
- [37] CHO Y E, IM E J, MOON P G, et al. Increased liver-specific proteins in circulating extracellular vesicles as potential biomarkers for drug- and alcohol-induced liver injury[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172-463.
- [38] MOMEN-HERAVI F, BALA S, KODYS K, et al. Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific miRNA-122 and sensitize monocytes to LPS[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9991.
- [39] SAHA M, ALLON M. Diagnosis, Treatment, and Prevention of Hemodialysis Emergencies[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12(2): 357-369.



- [40] SAHA B, MOMEN-HERAVI F, KODYS K, et al. MicroRNA Cargo of Extracellular Vesicles from Alcohol-exposed Monocytes Signals Naive Monocytes to Differentiate into M2 Macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(1): 149-159.
- [41] VERMA V K, LI H, WANG R, et al. Alcohol stimulates macrophage activation through caspase-dependent hepatocyte derived release of CD40L containing extracellular vesicles[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(3): 651-660.
- [42] EGUCHI A, LAZARO R G, WANG J, et al. Extracellular vesicles released by hepatocytes from gastric infusion model of alcoholic liver disease contain a MicroRNA barcode that can be detected in blood[J]. *Hepatology*, 2017, 65(2): 475-490.
- [43] YANG Y, HAN Q, HOU Z, et al. Exosomes mediate hepatitis B virus (HBV) transmission and NK-cell dysfunction[J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(5): 465-475.
- [44] DEVHARE P B, SASAKI R, SHRIVASTAVA S, et al. Exosome-mediated intercellular communication between hepatitis C virus-infected hepatocytes and hepatic stellate cells[J]. *J Virol*, 2017, 91(6): JVI.02555-16.
- [45] COBB D A, KIM O K, GOLDEN-MASON L, et al. Hepatocyte-derived exosomes promote T follicular regulatory cell expansion during hepatitis C virus infection[J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 71-85.
- [46] BUKONG T N, MOMEN-HERAVI F, KODYS K, et al. Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(10): e1004-424.
- [47] HIRSOVA P, IBRAHIM S H, KRISHNAN A, et al. Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles From Hepatocytes[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(4): 956-967.
- [48] Correction: Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2016, 64(2): 70-72.
- [49] TOMITA K, KABASHIMA A, FREEMAN B L, et al. Mixed Lineage Kinase 3 Mediates the Induction of CXCL10 by a STAT1-Dependent Mechanism During Hepatocyte Lipotoxicity[J]. *Hepatology*, 2017, 66(10): 3249-3259.
- [50] IBRAHIM S H, HIRSOVA P, TOMITA K, et al. Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2016, 63(3): 731-744.
- [51] KAKAZU E, MAUER A S, YIN M, et al. Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1alpha-dependent manner[J]. *J Lipid Res*, 2016, 57(2): 233-245.
- [52] BAN L A, SHACKEL N A, MCLENNAN S V. Extracellular vesicles: a new frontier in biomarker discovery for non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 376.
- [53] POVERO D, PANERA N, EGUCHI A, et al. Lipid-induced hepatocyte-derived extracellular vesicles regulate hepatic stellate cell via microRNAs targeting PPAR-gamma[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2015, 1(6): 646-663.
- [54] PERUMPAIL B J, KHAN M A, YOO E R, et al. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(47): 8263-8276.
- [55] LI J, LIU K, LIU Y, et al. Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN-alpha-induced antiviral activity[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(8): 793-803.
- [56] TURTURICI G, TINNIRELLO R, SCONZO G, et al. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 306(7): C621-C633.
- [57] ATAI N A, BALAJ L, VAN VEEN H, et al. Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells[J]. *J Neurooncol*, 2013, 115(3): 343-351.
- [58] POVERO D, EGUCHI A, NIESMAN I R, et al. Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require Vanin-1 for uptake by endothelial cells[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(296): 8.
- [59] ZHANG P, LIU G, CHEN X. Nanobiotechnology: Cell Membrane-Based Delivery Systems[J]. *Nano Today*, 2017, 13: 7-9.
- [60] PASCUCCI L, COCCE V, BONOMI A, et al. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery[J]. *J Control Release*, 2014, 192: 262-270.
- [61] HADLA M, PALAZZOLO S, CORONA G, et al. Exosomes increase the therapeutic index of doxorubicin in breast and ovarian cancer mouse models[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2016, 11(18): 2431-41.
- [62] ZHANG P, CHEN Y, ZENG Y, et al. Virus-mimetic nanovesicles as a versatile antigen-delivery system[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(45): E6129-E6138.
- [63] LV P, LIU X, CHEN X, et al. Genetically engineered cell membrane nanovesicles for oncolytic adenovirus delivery: a versatile platform for cancer virotherapy[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e209330.
- [64] LIU X, YUAN L, ZHANG L, et al. Bioinspired artificial nanodecoys for hepatitis B virus[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(38): 12499-12503.
- [65] LIU X, LIU C, ZHENG Z, et al. Vesicular antibodies: a bioactive multifunctional combination platform for targeted therapeutic delivery and cancer immunotherapy[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(17): e1808-294.
- [66] GUDBERGSSON J M, JONSSON K, SIMONSEN J B, et al. Systematic review of targeted extracellular vesicles for drug delivery - Considerations on methodological and biological heterogeneity[J]. *J Control Release*, 2019, 306: 108-120.
- [67] TOMINAGA N, KOSAKA N, ONO M, et al. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 67-16.
- [68] LI T, YAN Y, WANG B, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(6): 845-854.