

外泌体介导血管平滑肌细胞钙化的研究进展

丁耀东, 裴昱强, 王 瑞, 葛海龙

(首都医科大学附属北京安贞医院, 北京市 100029)

[关键词] 外泌体; 细胞外囊泡; 血管平滑肌细胞; 钙化

[摘要] 外泌体(exosome)是由细胞内分泌到细胞外的纳米级别的基质囊泡,具有磷脂双分子层结构,内含多种细胞特异的脂质、核酸及蛋白质等,主要参与细胞间通讯、免疫调节以及细胞信号通路调节等过程。近年来,研究发现外泌体在血管平滑肌细胞钙化的发生、发展过程中发挥着重要作用。了解外泌体调节血管平滑肌细胞钙化的机制,对未来临床预防血管平滑肌细胞钙化及降低心血管疾病发生风险有重要作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Advances in the study of exosomal mediated calcification of vascular smooth muscle cells

DING Yaodong, PEI Yuqiang, WANG Rui, GE Hailong

(Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] exosomes; extracellular vesicles; vascular smooth muscle cell; calcification

[ABSTRACT] Exosomes are nano-level matrix vesicles from cellular endocrine to extracellular level. They have a bi-layer structure of phospholipids and contain a variety of cell-specific lipids, nucleic acids and proteins. They are mainly involved in the processes of cellular communication, immune regulation and cellular signal pathway regulation. In recent years, studies have found that exosomes play an important role in the occurrence and development of vascular smooth muscle cells in vascular calcification. Understanding the mechanism by which exosomes regulate vascular smooth muscle cell calcification plays an important role in preventing vascular calcification and reducing the risk of cardiovascular disease in the future.

血管平滑肌细胞钙化是动脉粥样硬化、高血压、糖尿病血管疾病、血管损伤和慢性肾脏疾病发展过程中常见的病理生理现象^[1]。血管平滑肌细胞钙化会导致血管壁硬化,血管顺应性下降,心肌灌注受损,因此血管平滑肌细胞钙化不仅是心血管疾病重要危险因素,同时显著增加心血管疾病的死亡率^[2]。血管平滑肌细胞钙化过去被认为是一个被动的过程,但现在被证实是各种基因、信号通路、细胞因子以及钙磷平衡失调等参与的主动、可控过程,然而其具体调控机制仍然未知。外泌体(exosome)是纳米级别的基质囊泡,主要参与细胞间通讯、免疫调节以及细胞信号通路调节等过程,在多种病理生理过程中起重要作用。近来认为外泌

体可能参与了血管平滑肌细胞钙化发生发展的调控过程。

1 外泌体的生物学特性

外泌体是直径为 40 ~ 100 nm 的细胞外囊泡(EV),富含丰富蛋白质如特征性的高表达膜蛋白四分子交联家族成员如 CD81、CD82、CD63、CD9 等,及其他类型的蛋白如细胞内源性蛋白质 Alix、细胞质蛋白 Annexins、肿瘤易感基因 TSG101、热休克蛋白等^[3]。外泌体还富含脂质(胆固醇、鞘磷脂及神经酰胺)及核酸(DNA、mRNA、miRNA 以及 LncRNA)^[4]。

[收稿日期] 2019-07-26

[修回日期] 2019-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金(81573744)

[作者简介] 丁耀东,硕士研究生,研究方向为心血管疾病的基础研究,E-mail 为 dingyaodong1@163.com。通信作者葛海龙,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为心血管疾病基础研究,E-mail 为 gehailong@126.com。

外泌体广泛存于体液中,在特定情况下外泌体还通过以下机制刺激靶细胞传递信号:①通过表面结合配体诱导受体介导的信号转导;②将表面受体转移到靶细胞;③向靶细胞传递功能蛋白、脂质和RNA。外泌体被认为是细胞间集成及转运信号理想的载体有以下的原因:①外泌体的双层膜封闭内环境保护信号分子不被酶降解;②外泌体可以富集信号分子,使其具有较高的局部浓度;③外泌体可以转移疏水功能分子,如生物活性脂类和膜蛋白;④外泌体具有传递复杂的多分子生物信息的能力。外泌体上述特性可能参与了血管平滑肌细胞钙化的发生发展。

近年来,对外泌体介导血管平滑肌细胞钙化的研究表明,外泌体可以传递细胞内蛋白质和 miRNA 等物质,作为信息转运体来调节血管平滑肌细胞钙化的发生发展。最近发现从钙化的 VSMC 中提取的外泌体被证实通过激活丝裂原-活化蛋白激酶途径来促进 VSMC 的钙化^[5]。据报道,内皮细胞分泌的富含 miR-143/145 外泌体可以控制 VSMC 的表型转化^[6]。这种通过外泌体转运的 mRNA 调节去分化研究还表明,VSMC 分泌的外泌体可通过促进矿物质沉积促进血管平滑肌细胞钙化的发生^[7]。外泌体的分泌、富集和摄取过程可以从不同方面调节血管平滑肌细胞钙化。因此推测外泌体通过促进细胞表型的转化、矿物质沉积位点的形成和运输 miRNA 作为细胞之间的信息来促进血管的钙化。

2 外泌体介导血管平滑肌细胞钙化的机制

2.1 外泌体促进矿物质沉积参与钙化

研究表明,血管平滑肌细胞钙化与骨矿化相似且受严格调控,矿物质沉积是血管平滑肌细胞钙化的特征。发生表型转化的平滑肌细胞可在生理或病理信号作用下分泌外泌体,形成以磷酸钙晶体为核的羟基磷灰石。不溶性磷酸钙晶体沉积可以降低血管顺应性,促进炎症,刺激血管平滑肌细胞死亡,导致斑块生物力学不稳定。在血管壁上,血管平滑肌细胞(VSMC)对炎症细胞因子或矿物质失衡等病理信号发生骨或软骨表型转化^[8],特征是骨相关蛋白的表达和 MVBs 的释放,然而这些颗粒释放的来源和机制尚不清楚。电子显微镜研究表明,外泌体形成第一个钙化灶,定位在靠近胶原纤维和弹性蛋白的地方,它们在大小和矿物含量上有所不同,似乎起源于矿化部位中凋亡或活的 VSMC,以及动脉

粥样硬化斑块中的 VSMC、巨噬细胞、内皮细胞和血小板^[9]。在生理状态下,健康的 VSMC 通过表达钙化抑制剂有效地防止血管平滑肌细胞钙化,其中一些钙化抑制剂被装载到外泌体中,例如内源性表达的基质糖蛋白(MGP)和胎蛋白 a (fetuin-a) 蛋白,这是一种主要由肝脏分泌的糖蛋白,在外泌体中它可以结合矿物并稳定并抑制其生长^[10]。但是钙化患者循环胎蛋白 a 水平明显降低^[11],长期矿物质失衡或炎症会导致外泌体中基质糖蛋白和胎蛋白 a 的耗尽,并通过磷脂酰丝氨酸(PS)和 annexin A6 组成的蛋白脂质复合物富集,通过提供矿物成核位点,将外泌体转化为原发灶进行钙化^[12]。在 Kapustin 等^[13] 研究中指出外泌体介导钙化的机制:①外泌体的释放引发 VSMC 钙化,使用外泌体化学抑制剂螺环氧化物和 3-O-甲基鞘磷脂抑制外泌体的释放,结果表明两种外泌体抑制剂都减少了 VSMC 外泌体的产生,从而与对照组(未使用抑制剂组)相比,实验组血管平滑肌细胞钙化明显增加。相反,在 VSMC 添加外泌体显著促进血管平滑肌细胞钙化。②研究指出细胞外泌体是在 SMPD3 上调反应中分泌的,使用小干扰 RNA 敲除 SMPD3 可以降低外泌体的分泌。③外泌体的释放受成骨刺激以及细胞因子和生长因子的动态调节。研究发现在钙化的环境下,血小板衍生生长因子 BB 可增加 VSMC 的钙化。细胞因子也影响了外来体分泌,包括肿瘤坏死因子 α 上调外来体分泌,而 IL-6 和白细胞介素 10 都下调外泌体的分泌。④研究还指出通过动脉标本免疫组化染色显示在正常血管壁上未见外泌体的标记物 CD63,然而在钙化动脉中观察到广泛的 CD63 染色。

2.2 外泌体细胞间通讯调节钙化

细胞间通讯是血管平滑肌细胞钙化发生的关键机制。最近的研究结果表明,外泌体在细胞间传递信息方面起着重要作用^[14]。研究表明外泌体介导细胞间的信息传递依赖于硫酸肝素蛋白多糖(HSPG),HSPG 保护 VSMC 免受各种有毒物质和循环炎症细胞的侵袭,从而预防血管平滑肌细胞钙化。外泌体中 HSPG 表达降低使细胞表面 HSPG 暴露,从而进一步介导骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 内化,促进成肌细胞成骨表型转化^[15]。抑制 HSPG 细胞表面上的表达导致外泌体摄取效率降低。近年来,越来越多的证据表明 miRNA 在心血管平滑肌细胞钙化调控中发挥着不可或缺的作用。研究表明在血管平滑肌细胞中表达升高的 miRNA 通过靶向抗钙化蛋白或收缩标志物促进成骨,而另一些表达

降低的 miRNA 则通过靶向成骨转录因子抑制 VSMC 成骨^[16]。一些 miRNA, 包括 miR133b、miR204、miR211 在钙化过程中通过外泌体转运来调节各种受体细胞的生物学行为^[16]。Ulbing 等^[17]报道在慢性肾脏疾病患者循环中 miR223 下调, miR223 表达降低被认为是血管平滑肌细胞钙化发生的危险因素, 机制可能是 miR223 被包装在外泌体中。具有钙化潜能的外泌体也可能诱导 RUNX2、Smad1、OSTERIX、TNAP、伴侣蛋白、促炎因子等成骨标志物的基因表达来调节血管平滑肌细胞的钙化。这些因子调节转录辅助激活因子 myocardin 家族的表达和活性, 从而驱动收缩表型 VSMC 蛋白的表达。

2.3 潜在外泌体调节钙化的机制

已有一系列研究关注自噬与血管平滑肌细胞钙化之间的关系。在高磷诱导的情况下, 通过 AMP 活化蛋白激酶 (AMPK) 的活化来调节血管平滑肌细胞钙化的自噬过程^[18]。近年来, 自噬被认为是通过高磷刺激而增强, 抑制外泌体分泌形成矿物成核位点, 从而改善 VSMC 的钙化。自噬加速了外泌体的降解, 降低了外泌体的分泌, 这是由自噬体溶酶体融合介导的。此外, 在血管平滑肌细胞中, 自噬似乎会干扰 miRNA 加载到外泌体, 这可能会干扰矿物沉积和成骨表型转变^[19]。炎症可以介导血管平滑肌细胞钙化, 转化生长因子 β (TGF- β) 信号通路已被证明可以促进血管平滑肌细胞钙化。miR-29b 被证实通过靶向 Smad3 抑制 TGF- β /Smad3 轴激活, 从而抑制血管平滑肌细胞钙化。表明外泌体通过介导 miRNA 运输来调节炎症因子的表达, 进而调节血管平滑肌细胞钙化的进程^[20]。外泌体可能是免疫反应与血管平滑肌细胞钙化过程的一个新的相互作用点, 这种相互作用可能依赖于 miRNA 的转运。研究表明在血液透析患者中冠状动脉钙化评分与 Treg (调节 T 细胞) 细胞呈负相关; 调节性 T 细胞 (Treg) 在免疫应答中具有重要意义, 可能对炎症反应具有负调控作用^[21]。除了上述机理外, 机械牵拉被认为是外泌体调控血管平滑肌细胞钙化的一个潜在的新参与者。机械拉伸增强了心肌细胞外泌体的分泌, 并且由于机械环境, 外泌体内的内容物发生了改变。此外, 机械拉伸产生的剪切力促进 miR-143 加载到外泌体, 而不是内皮细胞中的其他 miRNA, 表明机械环境可影响外泌体分泌 miRNA^[22]。

3 外泌体介导血管平滑肌细胞钙化的最新进展

Guo 等^[23]研究表明, 骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC) 来源的外泌体通过修饰 microRNA 谱来减轻高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化。Kapustin 等^[24]研究发现凝血酶原 (prothrombin, PT) 是新型的循环血管平滑肌细胞钙化抑制剂。与 fetuin-A 钙化抑制剂所不同, fetuin-A 是通过直接结合新生生长的磷酸钙晶体来限制生长, PT 通过磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)/ 羧基谷氨酸 (carboxyglutamic acid, Gla) 相互作用抑制外泌体介导的钙化, 从而破坏钙化成核位点。脉冲追踪实验表明, PT 进入外泌体的机制有两种, 一种是直接与外泌体膜结合, 另一种是通过 LE/MVB/ 外泌体途径依赖钙的内吞和分泌。PT 与外泌体的结合也激活凝血途径, 而随着 PT 和 PT 活化产物的逐渐加载外泌体, Gla/PS 相互作用降低了钙化和促凝活性^[24]。

4 展望

血管平滑肌细胞钙化可以降低心血管病患者的生存率及远期预后, 有效治疗血管平滑肌细胞钙化的方法已被迫切需要。然而外泌体包含多种脂质、核酸及蛋白, 在细胞间通讯中扮演着重要的角色, 在血管平滑肌细胞钙化的病理生理过程中发挥着重要作用。外泌体在不同病理生理条件下, 外泌体的数量及内容物会发生改变, 稳定的脂质双分子层结构可以保护内容物免受破坏, 这些特点使其具有成为生物标志物的潜力, 可以更更早更准确地反应疾病的进程。虽然病理因素、表型 VSMC 转化与外泌体生物发生激活之间的机制关系尚不清楚, 而且外泌体的研究尚处于初级阶段, 但外泌体钙化途径的调控仍可能是一种新的治疗靶点, 而在此之前, 还需要做大量的基础研究及临床调查。

[参考文献]

- [1] Madhavan MV, Tarigopula M, Mintz GS, et al. Coronary artery calcification: pathogenesis and prognostic implications [J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(17): 1703-1714.
- [2] Shaw LJ, Giambrone AE, Blaha MJ, et al. Long-term prognosis after coronary artery calcification testing in asymptomatic patients: a cohort study [J]. Ann Intern Med, 2015, 163(1): 14-21.

- [3] Choi DS, Kim DK, Kim YK, et al. Proteomics of extracellular vesicles: exosomes and ectosomes[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2015, 34(4): 474-490.
- [4] Antonyak MA, Cerione RA. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1165: 147-173.
- [5] Chen NX, O'Neill KD, Moe SM. Matrix vesicles induce calcification of recipient vascular smooth muscle cells through multiple signaling pathways[J]. *Kidney Int*, 2018, 93(2): 343-354.
- [6] Tkach M, Thery C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232.
- [7] Hutcheson JD, Goettsch C, Bertazzo S, et al. Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques [J]. *Nat Mater*, 2016, 15(3): 335-343.
- [8] Pidkovka NA, Cherepanova OA, Yoshida T, et al. Oxidized phospholipids induce phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro[J]. *Circ Res*, 2007, 101(8): 792-801.
- [9] Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(7): 772-777.
- [10] Heiss A, Pipich V, Jahnhen-Dechent W, et al. Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition[J]. *Biophys J*, 2010, 99(12): 3986-3995.
- [11] Shroff RC, Shah V, Hiorns MP, et al. The circulating calcification inhibitors, fetuin-A and osteoprotegerin, but not matrix Gla protein, are associated with vascular stiffness and calcification in children on dialysis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(10): 3263-3271.
- [12] Bobryshev YV, Killingsworth MC, Huynh TG, et al. Are calcifying matrix vesicles in atherosclerotic lesions of cellular origin? [J]. *Basic Res Cardiol*, 2007, 102(2): 133-143.
- [13] Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion [J]. *Circ Res*, 2015, 116(8): 1312-1323.
- [14] Bardeesi ASA, Gao J, Zhang K, et al. A novel role of cellular interactions in vascular calcification[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 95.
- [15] Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH, et al. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(43): 17380-17385.
- [16] Ouyang L, Zhang K, Chen J, et al. Roles of platelet-derived growth factor in vascular calcification [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 2804-2814.
- [17] Ulbing M, Kirsch AH, Leber B, et al. MicroRNAs 223-3p and 93-5p in patients with chronic kidney disease before and after renal transplantation [J]. *Bone*, 2017, 95: 115-123.
- [18] Mattoscio D, Casadio C, Miccolo C, et al. Autophagy regulates UBC9 levels during viral-mediated tumorigenesis [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(3): e1006262.
- [19] Blanc L, Vidal M. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion [J]. *Small GTPases*, 2018, 9(1-2): 95-106.
- [20] Liang C, Bu S, Fan X. Suppressive effect of microRNA-29b on hepatic stellate cell activation and its crosstalk with TGF-beta1/Smad3 [J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(5): 326-333.
- [21] Li P, Liu C, Yu Z, et al. New insights into regulatory T cells: exosome and non-coding RNA-mediated regulation of homeostasis and resident Treg cells [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 574.
- [22] Pironti G, Strachan RT, Abraham D, et al. Circulating exosomes induced by cardiac pressure overload contain functional angiotensin II type 1 receptors [J]. *Circulation*, 2015, 131(24): 2120-2130.
- [23] Guo Y, Bao S, Guo W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes alleviate high phosphorus-induced vascular smooth muscle cells calcification by modifying microRNA profiles [J]. *Funct Integr Genomics*, 2019, 19(4): 633-643.
- [24] Kapustin AN, Schoppet M, Schurgers LJ, et al. Prothrombin loading of vascular smooth muscle cell-derived exosomes regulates coagulation and calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(3): e22-e32.

(此文编辑 朱雯霞)