

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.12.037

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.12.037>

## 外泌体在糖尿病肾病中的研究进展

王秀芬<sup>1</sup> 综述 肖湘成<sup>1</sup>, 唐文彬<sup>1,2</sup> 审校

(1. 中南大学湘雅医院肾内科, 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医院健康管理中心, 长沙 410008)

**[摘要]** 糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是一项全球的公共健康问题, 具有高发病率, 增加患者死亡风险的特点。目前DN发病机制尚未被阐明, 也无有效的治疗方式阻止疾病向终末期肾病进展。外泌体既往被认为是一种生物“废料”, 但近年来研究表明: 外泌体介导细胞之间的信息交流及物质传递, 在正常状态及疾病病理生理过程中发挥重要作用。在DN相关研究中, 肾固有细胞来源外泌体主要参与炎症反应、纤维化的发生和发展; 间充质干细胞来源外泌体可通过调节细胞凋亡、增殖、免疫应答发挥肾保护作用; 尿液外泌体非编码RNA及蛋白质有望成为DN诊断及预测疾病进展的新型生物标志物。全面理解外泌体在DN中的生物学作用, 有利于推动相关临床转化实验发展, 开发新的治疗策略。

**[关键词]** 糖尿病肾病; 外泌体; 肾固有细胞; 干细胞; 巨噬细胞; 生物标志物

## Research progress of exosome in diabetic nephropathy

WANG Xiufen<sup>1</sup>, XIAO Xiangcheng<sup>1</sup>, TANG Wenbin<sup>1,2</sup>

(1. Department of Nephrology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Health Management Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract** Diabetic nephropathy (DN) is a global public health problem with high morbidity and increased risk of death. Its specific pathogenesis has not been clarified at present, and there is no effective treatment to prevent the disease from progressing to end-stage renal disease. Exosomes were previously considered as a kind of biological “waste”, but in recent years, studies have shown that exosomes mediate information exchange and material transfer between cells, and play an important role in normal state and disease pathophysiology. In DN-related research, renal intrinsic cell-derived exosomes are mainly involved in the occurrence and development of inflammatory response and fibrosis; mesenchymal stem cell-derived exosomes could play a renal protective role by regulating cell apoptosis, proliferation and immune response; urinary exosomal non-coding RNAs and proteins are expected to become novel biomarkers for the diagnosis and prediction of disease progression in DN. A comprehensive understanding of the biological role of exosomes in DN is conducive to promoting the development of relevant clinical translational experiments and developing new therapeutic strategies.

**Keywords** diabetic nephropathy; exosomes; renal intrinsic cells; stem cells; macrophages; biomarkers

收稿日期 (Date of reception): 2022-06-13

通信作者 (Corresponding author): 唐文彬, Email: twb-candy@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家重点研发计划 (2020YFC2005000); 湖南省自然科学基金 (2020JJ5921)。This work was supported by the National Key R&D Program (2020YFC2005000), and the Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ5921), China.

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)的一种严重的微血管并发症,是终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的主要原因之一。最新流行病学调查<sup>[1]</sup>发现:DN在中国住院的非透析慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)患者中的百分比已超过了由肾小球肾炎引起的CKD患者百分比。DN复杂的病理生理是由肾血流动力学改变、葡萄糖代谢紊乱导致的氧化应激增加、炎症反应以及肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性增强引起的<sup>[2]</sup>。但是,目前DN发病机制尚未被阐明,治疗上无有效控制疾病进展的药物, DN最终的病理结局是肾纤维化,患者进入透析治疗或肾移植,严重影响患者生活质量,同时也增加了死亡的风险,带来了沉重的社会经济负担。

外泌体是细胞内多囊泡胞内体与细胞膜相互融合后脱落而形成的小型双层微囊泡结构,直径30~150 nm,其内包含生物活性脂质、蛋白质、核酸,如长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)、环状RNA(circular RNA, circRNA)和信使RNA(messenger RNA, mRNA)及片断化DNA,能够参与细胞间的物质交换和信息交流,在各种病理生理进程中发挥重要作用,可以作为疾病的生物标志物、干预靶点、治疗载体应用于临床<sup>[3]</sup>。近年来,已广泛开展外泌体在DN发病机制、疾病进展、生物标志物等方面研究,试图进一步揭示疾病的分子机制,达到早期诊断、分子靶向治疗、改善预后的目标。本文围绕外泌体提取与鉴定,不同细胞来源外泌体在DN中的作用、生物标志物等方面综述外泌体在DN中的最新研究进展。

## 1 外泌体提取与鉴定

外泌体研究的广泛开展促进了外泌体分离的技术不断开发,用以获得更高质量的外泌体,用于进一步分析和应用。但是,目前还没有一套通用的标准方法。主要应用的外泌体分离提取方法包括差异超速离心法、密度梯度法、试剂盒法、沉淀法、超滤法、尺寸排阻色谱法和免疫亲和层析法等(表1),另有切向流过滤法、场流分馏、不对称流场分流等多种创新技术<sup>[11]</sup>。各类分离方法对于不同标本类型、不同细胞来源外泌体的分离和浓缩效能存在差异。差异超速离心法可分离相对纯净的外泌体,是一种最常用的外泌体分离技术,但是有提取物中易出现密度

相似的脂蛋白颗粒、操作耗时长缺点<sup>[4]</sup>。Kim等<sup>[12]</sup>研究发现与差异超速离心法相比,基于切向流过滤系统分离法对人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)的分离产率可提高92.5倍。Dash等<sup>[13]</sup>比较了总外泌体分离试剂盒法、蛋白质有机溶剂沉淀法、差异超速离心法提取的COLO 205和MCF-7肿瘤细胞培养基的外泌体在物理和分子特征上的差异,发现总外泌体分离试剂盒法具有更好的外泌体产量、纯度,回收后可直接用于药物递送和靶向治疗;而差异超速离心法分离的外泌体具有良好的颗粒形态,蛋白质有机溶剂沉淀法主要分离出的是细胞外囊泡的混合物。目前已发表的大多数DN外泌体相关研究中,主要采用的是差异超速离心法分离细胞培养液、肾组织、血浆、尿液来源的外泌体<sup>[14-17]</sup>。常用的外泌体鉴定方法有透射电镜观察外泌体典型的双层膜状的囊泡状结构;纳米颗粒跟踪分析外泌体粒径范围;蛋白质印迹鉴定外泌体标志物CD63、CD9、CD81、Alix、Tsg101<sup>[14,16-17]</sup>。

## 2 糖尿病肾病状态下外泌体的分泌

局部微环境是调节外泌体释放的重要因素。体外研究<sup>[18]</sup>指出细胞外酸度是诱导肿瘤细胞增加外泌体释放的主要决定因素。在DM和DN疾病状态下,高糖刺激不同肾固有细胞对外泌体分泌量的影响存在差异。研究<sup>[19-20]</sup>表明DN状态时肾小管上皮细胞外泌体分泌减少。RAS癌基因家族成员RAB27B是调节外泌体分泌的关键鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP)酶,Zeng等<sup>[20]</sup>通过体内外实验发现DN状态时高糖可诱导RAB27B基因启动子叉头框蛋白O1(forkhead box protein 1, FOXO1)的磷酸化,使RAB27B表达减少,从而导致外泌体分泌减少。然而,与对照组相比,经高糖刺激的系膜细胞和肾小球内皮细胞分泌的外泌体数量增多<sup>[21-22]</sup>。在高糖处理的巨噬细胞中同样发现了外泌体的分泌增加<sup>[23]</sup>。同时,在DM与DN不同疾病阶段,外泌体内容物的差异反映外泌体在DM至DN疾病进程中发挥重要生物学作用,成为潜在的控制疾病进展的治疗靶点。而在不同的慢性肾病中,由于基础病因的不同,外泌体的分泌量、内容及生物学作用也存在差异。Lv等<sup>[24]</sup>研究发现:与对照组相比,5/6肾切除的慢性肾病大鼠的肾和尿液中含有更多包含炎症细胞因子mRNA的外泌体。同样,在IgA肾病患者尿液中也证实蛋白尿的增加与富含CCL2 mRNA的尿液外泌体分泌增加有关<sup>[24]</sup>。

表1 常见外泌体分离方法比较

Table 1 Comparison of common exosome isolation methods

分离方法	优点	缺点	参考文献
差异超速离心法	易操作, 产物相对纯净	易出现密度相似的脂蛋白颗粒、操作耗时长	[4]
密度梯度法	通常与超速离心结合使用, 纯度高	耗时长	[5]
试剂盒法	耗时短, 操作简便, 完整性好	价格昂贵, 回收率和纯度较低	[6]
沉淀法	易操作, 耗时短, 适合大体积样本提取	纯度和回收率较低	[7]
尺寸排阻色谱法	易操作, 成本低, 提取物结构完整, 尺寸均匀	纯度低	[8]
超滤法	成本低, 富集效率高	纯度和回收率较低	[9]
免疫亲和层析法	特异度强, 灵敏度高	提取的外泌体储存条件严苛, 不适合大体积样本	[10]

### 3 不同细胞来源外泌体在 DN 中的作用

#### 3.1 肾固有细胞来源外泌体

肾固有细胞(包括足细胞、系膜细胞、肾小球内皮细胞、肾小管上皮细胞)可分泌外泌体携带母体细胞的遗传信息, 反映肾的疾病状态; 外泌体可以通过旁分泌作用于其他肾固有细胞及间质细胞, 引起生物学功能的改变。在DN相关研究中, 肾固有细胞来源外泌体主要参与炎症反应、纤维化的发生和发展。

##### 3.1.1 肾小管上皮细胞来源外泌体

肾小管是肾的主要组成部分, 容易受蛋白尿、毒素、缺氧、代谢紊乱和衰老等刺激而损伤。在DN疾病进程中, 肾小管上皮细胞不仅是有害刺激的受害者, 其本身可分泌各种炎症趋化因子和促纤维化细胞因子, 加重肾炎症和纤维化程度<sup>[25]</sup>。同时, 有害刺激下的肾小管上皮细胞分泌的外泌体可以作用于其他肾小管上皮细胞以及间质细胞, 加重肾损伤。Borges等<sup>[26]</sup>在慢性纤维化小鼠模型中观察到肾小管基底膜的皱缩和断裂, 使外泌体从肾小管细胞更易传递到肾间质。高糖刺激肾小管上皮细胞产生的外泌体能促进成纤维细胞增殖, 产生大量的纤维连接蛋白、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)和I型胶原<sup>[19]</sup>。同时, 缺氧损伤的肾小管上皮细胞分泌含转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) mRNA的外泌体能激活成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 加速肾间质纤维化<sup>[26]</sup>。

Zhou等<sup>[14]</sup>研究发现与对照组相比, 高糖刺激的人近端肾小管上皮细胞外泌体差异分泌lncRNA 69个、miRNA 152个、mRNA 885个和circRNA

3个, 生物信息学显示这些外泌体RNA参与了DN的发展, 可能是DN的生物标志物和治疗靶标。Sonoda等<sup>[27]</sup>提出外泌体中miRNA表达的变化很大程度上取决于外泌体在细胞内的运输和分选。已报道的有害刺激下肾小管上皮细胞外泌体对于miRNA的分选和转运涉及两种模式。第1种是肾小管上皮细胞分泌的外泌体促炎、促纤维化miRNA向间质细胞传递: Lv等<sup>[16]</sup>发现在急性和慢性肾损伤模型中, 肾小管上皮细胞来源外泌体miR-19b-3p通过促进M1型巨噬细胞活化加重肾损伤, 且肾组织和尿液外泌体miR-19b-3p都较正常对照组升高。第2种是肾小管上皮细胞分泌的外泌体促进抗炎、抗纤维化miRNA从母体细胞排出: Liu等<sup>[15]</sup>研究表明在DN小鼠模型和高糖诱导的肾小管上皮细胞模型中, 转运蛋白HNRNPA1介导外泌体分选肾小管上皮细胞 miR-483-5p, 尿液外泌体miR-483-5p明显上调, 肾组织和肾小管上皮细胞中miR-483-5p表达下调, 促进了细胞凋亡和细胞外基质的沉积, 引起肾间质纤维化。Li等<sup>[28]</sup>发现牛血清白蛋白处理的人近端肾小管上皮细胞中炎症介质表达上调, 细胞中抗炎miR-26a-5p表达下调, 而分泌的外泌体中miR-26a-5p表达显著上调, 敲除肾小管上皮细胞RAB27B基因后抑制外泌体的分泌, 可改善肾小管上皮细胞的炎症反应。以上研究表明外泌体分泌机制及内容物成分的复杂性, 其中的具体机制有待进一步研究。

##### 3.1.2 肾小球内皮细胞来源外泌体

DN的早期特征是肾小球超滤与肥大, 研究<sup>[29]</sup>表明: 高血糖状态刺激肾活性氧的过量产生, 导致肾小球内皮细胞功能障碍, 而受损的内皮细胞通过细胞间的串扰引起肾小球结构和功能

的改变, 在DN病理过程中发挥重要作用。外泌体作为一种重要的细胞间交流的介质, 参与了肾小球内皮细胞与系膜细胞、足细胞之间的串扰。与正常糖处理的肾小球内皮细胞相比, 高糖处理的肾小球内皮细胞来源外泌体TGF- $\beta$ 1 mRNA上调, 且通过TGF- $\beta$ 1/Smad3信号通路促进系膜细胞中 $\alpha$ -SMA的表达, 加速肾纤维化进程<sup>[30]</sup>。Wu等<sup>[21]</sup>研究发现: 高糖处理的肾小球内皮细胞来源外泌体富含TGF- $\beta$ 1 mRNA, 由Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路介导足细胞上皮-间充质转化和功能障碍。可见高糖刺激下的肾小球内皮细胞通过外泌体在肾小球硬化的进程中发挥重要作用, 进一步阐述其具体机制有利于寻找治疗干预的靶点。

### 3.1.3 系膜细胞来源外泌体

肾小球系膜细胞扩张是早期DN病理的主要体现, 随着疾病的发展, TGF- $\beta$ 1介导的系膜细胞活力丧失促成肾小球系膜的瘢痕形成和纤维化<sup>[31]</sup>。肾小球系膜细胞是肾素-血管紧张素系统成分的重要肾内来源, 经高糖刺激的系膜细胞外泌体中肾素和血管紧张素原蛋白增加, 但都无血管紧张素转化酶。利用高糖刺激的系膜细胞外泌体处理的正常系膜细胞后出现纤连蛋白、血管紧张素原、肾素、血管紧张素受体水平升高, 表明系膜细胞之间可以通过外泌体进行信息交流<sup>[22]</sup>。同时, Bai等<sup>[17]</sup>研究发现: 与正常对照组相比, 高糖处理的系膜细胞外泌体中Circ\_DLGAP4水平升高, 且外泌体Circ\_DLGAP4通过海绵吸附miR-143靶向ERBB3/NF- $\kappa$ B/MMP-2轴促进系膜细胞增殖和肾纤维化。

## 3.2 间充质干细胞来源外泌体

近年来干细胞在疾病中的治疗潜力备受关注, 根据干细胞的发育阶段, 将其分为胚胎干细胞与成体干细胞。成体干细胞是指分化的组织中未分化的细胞, 存在于人体的各种组织和器官中。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为一种自我更新的多能成体干细胞, 可以从骨髓/皮肤, 血液和尿液分离得到, 例如骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)、脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs)、hUCMSCs及尿源性干细胞(human urine-derived stem cells, hUSCs)<sup>[32]</sup>。但是, 目前MSCs治疗存在移植后细胞存活率低、供应有限、不易储存等问题, 促使研究其有效的替代方法<sup>[33]</sup>。已有的临床实验表明: 在肾病中除干细胞本身发挥作用外, 其培养基同样具有有益的临床作用, MSCs主要通过分泌包括

外泌体miRNA在内的因子发挥作用, 调节细胞凋亡、增殖、免疫应答等方面<sup>[34]</sup>。

### 3.2.1 骨髓间充质干细胞来源外泌体

BMSCs是骨髓中的非造血干细胞, 可分化增殖和自我更新为其他细胞, 是第1个被表征且使用最广泛的MSCs类型<sup>[35]</sup>。Sun等<sup>[36]</sup>通过实验证实BMSCs能抑制DN中细胞凋亡, 缓解肾损伤, 可作为一种重要的肾替代治疗方式。而DM大鼠模型中来源的BMSCs的形态学及增殖能力出现异常, 不能缓解链脲佐菌素诱导的DN小鼠的肾损伤<sup>[37]</sup>。外泌体介导BMSCs在DN的肾脏保护作用已得到证实。Ebrahim等<sup>[38]</sup>研究表明: BMSCs来源的外泌体通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路诱导自噬减轻DN大鼠纤维化, 改善肾功能。Mao等<sup>[39]</sup>发现BMSCs来源的外泌体miR-let-7a通过下调泛素特异性蛋白酶22(ubiquitin specific peptidase 22, USP22)抑制DN大鼠肾细胞凋亡, 发挥肾保护作用。

### 3.2.2 人脐带间充质干细胞来源外泌体

hUCMSCs是一组来自新生儿脐带组织的多能干细胞, hUCMSCs有易于收集, 免疫原性低和增殖能力强的优点, 被认为是MSCs被应用于临床的更好选择<sup>[40]</sup>。hUCMSCs已在糖尿病足<sup>[41]</sup>、膝关节炎<sup>[42]</sup>和卵巢早衰<sup>[43]</sup>等疾病中开展了广泛研究。在高脂饮食和链脲佐菌素建立的2型DM大鼠模型中, 静脉注射hUCMSCs来源的外泌体能降低血糖水平, 改善胰岛素抵抗<sup>[44]</sup>。在糖尿病视网膜病变相关研究中, hUCMSCs来源外泌体miR-126、miR-17-3p分别通过靶向高迁移率族蛋白B1(high-mobility group box B1, HMGB1)、信号转导子及转录激活子1(signal transduction and activator of transcription 1, STAT1)改善视网膜炎症反应和氧化损伤<sup>[45-46]</sup>。Xiang等<sup>[47]</sup>予以DN动物模型和细胞模型hUCMSCs处理后发现, hUCMSCs可明显改善DN炎症反应, 缓解肾纤维化。然而, hUCMSCs来源外泌体在DN的作用的具体机制有待进一步阐述。

### 3.2.3 脂肪间充质干细胞来源外泌体

ADMSCs广泛存在于脂肪组织中, 是一种容易获得且对供体影响小的MSCs类型。研究<sup>[33]</sup>表明: 在反复传代后, ADMSCs在体外显示出比BMSCs更高的增殖速率, 并显示出更大的能力来维持其干细胞特性, 包括自我更新、增殖和分化潜能。Jin等<sup>[48]</sup>通过体内外实验证实ADMSCs来源的外泌体通过增强自噬缓解足细胞凋亡, 降低DN

小鼠的尿蛋白和肌酐水平。ADMSCs来源的外泌体miR-215-5p通过抑制E盒结合锌指蛋白2(zinc finger E-box-binding homeobox, ZEB2)减轻足细胞的上皮-间充质转化, 具有肾保护作用<sup>[49]</sup>。另外, Hao等<sup>[50]</sup>发现: ADMSCs来源的外泌体miR-125a降低了DN大鼠的血糖水平和肾功能, 并通过靶向组蛋白脱乙酰酶1(histone deacetylase 1, HDAC1)/内皮素1(endothelin-1, ET-1)抑制系膜增生和肾纤维化。ADMSCs来源外泌体miRNA介导的肾保护作用有望成为DN治疗干预靶点。

### 3.2.4 人尿源性干细胞来源外泌体

hUSCs是一种泌尿系统高度同源的干细胞, 具有与MSCs相似的表型, 可以重新编程为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 在膀胱组织再生、尿道重建以及抗炎、抗纤维化等方面具有重要作用<sup>[51]</sup>。Zhang等<sup>[52]</sup>研究发现: hUSCs来源外泌体对暴露于缺氧/复氧的人近端肾小管上皮细胞和肾缺血/再灌注损伤的大鼠起到保护作用, 其关键在于hUSCs来源外泌体富含miR-216a-5p, 可靶向磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphate and tensin homologue deleted on chromosome ten, PTEN), 并通过Akt途径抑制细胞凋亡。Jiang等<sup>[51]</sup>研究表明: hUSCs外泌体含有生长因子、TGF- $\beta$ 1、血管生成素和骨形态发生蛋白7, 可能与血管再生和细胞存活有关, 静脉注射hUSCs外泌体能降低DM大鼠尿微量白蛋白排泄, 防止足细胞和肾小管上皮细胞凋亡。尿液不是一种简单的生物排泄物, hUSCs来源外泌体可能成为重要治疗成分, 及有效的肾病预后的预测工具。

### 3.3 巨噬细胞来源外泌体

巨噬细胞是先天性免疫细胞, 包括促炎型M1型巨噬细胞与抗炎型M2型巨噬细胞, 在慢性肾损伤反应中具有重要作用<sup>[53]</sup>。既往研究<sup>[21,54-55]</sup>表明: 高糖环境对巨噬细胞有活化作用, 导致大量的炎症介质的产生, 例如白细胞介素(interleukin, IL)-1, IL-6和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )。同时, Khalilpour等<sup>[56]</sup>研究发现巨噬细胞迁移抑制因子拮抗剂能够改善DN肾损伤, 表明巨噬细胞介导的炎症机制在DN中起重要作用。已有研究<sup>[57]</sup>表明: 巨噬细胞来源的外泌体是炎症反应的重要调节介质, 可能通过诱导募集的单核细胞分化, 活化骨髓造血细胞产生更多的外泌体, 形成激活免疫系统的级联反应。在动脉粥样硬化中已证实单核/

巨噬细胞通过释放外泌体调节免疫功能参与疾病的发生和发展<sup>[58]</sup>。DN相关研究<sup>[59]</sup>显示: 与正常糖组比较, 高糖处理的巨噬细胞来源的外泌体含有更高浓度的IL-1 $\beta$ 和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS), 且能激活其他巨噬细胞分泌炎症介质。体内实验<sup>[59]</sup>证实小鼠尾静脉注射高糖诱导的巨噬细胞外泌体后通过促进NF- $\kappa$ B/p65信号通路加速肾损伤。巨噬细胞也通过外泌体与肾系膜细胞形成串扰。Zhu等<sup>[23]</sup>通过体内外实验证实高糖诱导的巨噬细胞来源外泌体通过TGF- $\beta$ 1/Smad3途径激活肾小球系膜细胞, 导致系膜细胞活化和增殖, 细胞外基质和炎症因子分泌增加。M2型巨噬细胞通过分泌抗炎性细胞因子, 例如IL-10和精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)来抑制DN的发展, 同样也可以由外泌体介导在DN中发挥保护作用。Huang等<sup>[53]</sup>研究表明M2巨噬细胞通过分泌外泌体miR-25-3p激活自噬来缓解高糖诱导的足细胞损伤。

### 3.4 尿液外泌体可作为DN诊断及预后的生物标志物

蛋白尿和肾小球滤过率是目前临床DN诊断和预后判断的标志物, 但这两者存在一定的局限性, 部分DN患者为正常蛋白尿, 而肾小球滤过率的变化可能由其他DM的合并症所引起<sup>[60]</sup>。肾穿刺作为DN诊断的金标准, 属于有创操作, 存在一定风险, 临床上并不对所有考虑DN的患者进行肾穿刺, 只有高度怀疑非糖尿病性肾病时才推荐予以肾穿刺。同时, DN患者微量蛋白尿不仅可以发展为大量蛋白尿, 随着疾病发展也可以转变为正常蛋白尿, 而肾小球滤过率也不能准确反映肾损伤的严重程度<sup>[60]</sup>。因此, 寻找DN的新型诊断/预后的生物标志物, 更好地指导临床的诊治是十分有必要的。

尿液外泌体具有以非侵入性方式获得且可大量分离提取的优点, 近年来在肾病中已开展广泛研究, 尿液外泌体的数量、来源或内容物可在一定程度上反映肾细胞的病理生理状态及功能改变, 为肾病的诊断带来了丰富的生物学信息<sup>[61]</sup>。尿液外泌体miRNA、mRNA、蛋白质分析可以用作液体活检工具, 以改善分类和风险预测性能, 从而确定肾病的严重程度<sup>[62]</sup>。

已有大量研究发现尿液外泌体作为DN的诊断和预后的生物学标志物(表2)。Xie等<sup>[63]</sup>提出2型DN患者尿液外泌体miRNA发生变化, miR-362-3p, miR-877-3p, miR-150-5p和miR-15a-5p可能是早期2

型DN的诊断标志物。另有研究<sup>[64]</sup>发现尿液外泌体miR-15b、miR-34a和miR-636是2型DN的新型诊断标志物。Zhao等<sup>[66]</sup>研究表明: 2型DN患者尿液外泌体miRNA-4534表达与健康人组、DM组存在差异, 且与尿微量白蛋白水平相关, 其有望成为2型DN进展的生物标志物。在不同的研究中发现作为2型DN诊断标志物的尿液外泌体miRNA存在差异, 可能与患者的基线特征、疾病的复杂性相关, 是否可以结合多个miRNA提高诊断DN的特异性, 有待进一步的实验证实。另外, 也有研究者提出尿液外泌体富含的蛋白质标志物比全尿样品能更好地反映肾中潜在的蛋白质变化<sup>[73]</sup>。晚期

糖基化终末产物(advanced glycation end product, AGE)处理的足细胞分泌含有Elf3蛋白的外泌体, 且尿液外泌体Elf3只能在DN患者中测定, 尿液外泌体Elf3蛋白的产生表明足细胞存在不可逆转的损伤, 是DN早期足细胞损伤的非侵入性标志物<sup>[69]</sup>。Zubiri等<sup>[70]</sup>研究发现: 与对照组相比, DN患者尿液外泌体蛋白质AMBP, MLL3和VDAC1存在差异, 有望成为诊断DN的新研究领域。外泌体差异miRNA、蛋白质相互作用分析及更广泛的DN患者验证队列有利于将基础的研究发现早日应用于临床, 提高DN诊断的敏感度和特异性及判断疾病预后的能力。

表2 尿液外泌体作为生物学标志物在DN中的研究进展

Table 2 Research progress of urinary exosomes as biomarkers in DN

类别	外泌体内容物	作用	参考文献
miRNA	miR-362-3p, miR-877-3p, miR-150-5p, miR-15a-5p, miR-15b, miR-34a, miR-636, miR-133b-3p, miR-342-3p, miR-30a-5p, miR-21-5p, let-7e-5p, miR-23b-3p, miR-30b-5p, miR-125b-5p	诊断	[63-65]
	miRNA-4534, let-7c-5p, miR-29c-5p, miR-15b-5p, miR-320c	预测疾病进展	[66-68]
蛋白质	Elf3蛋白	反映足细胞损伤	[69]
	AMBP, MLL3和VDAC1蛋白, 钙调素	诊断	[70-71]
mRNA	WT1 mRNA	诊断和预后预测	[72]

## 4 结语

外泌体参与DN肾固有细胞之间的信息交流及物质传递, 涉及细胞凋亡、增殖、炎症反应、氧化应激等方面, 在DN肾纤维化发生和发展中发挥关键作用。同时, 巨噬细胞及MSCs来源外泌体作为血液外泌体的重要组成部分, 从整体内环境下参与DN疾病的进展。目前DN中外泌体的相关研究主要集中在miRNA, 而外泌体lncRNA、circRNA相关研究存在空缺, 阐述外泌体lncRNA、circRNA及非编码RNA之间相互作用有利于进一步明确DN的发病机制, 寻找生物学标志物及治疗干预的靶点。外泌体的生物学性质使它们有望成为天然纳米级载体, 并具有较强的体内安全性和较低的免疫原性, 而干细胞来源外泌体治疗DN是一种充满希望的方法, 但是, 大多数实验结论都是在临床前进行的, 因此将这些结果应用于临床还需要付出更多的努力。而尿液外泌体非编码RNA及蛋白质作为生物标志物, 有待更

大样本量的研究来验证。

## 参考文献

1. Yang C, Wang H, Zhao X, et al. CKD in China: evolving spectrum and public health implications[J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76(2): 258-264.
2. Sakuma H, Hagiwara S, Kantharidis P, et al. Potential targeting of renal fibrosis in diabetic kidney disease using microRNAs[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 587689.
3. Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232.
4. Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option?[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6466.
5. Cantin R, Diou J, Bélanger D, et al. Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants[J]. *J Immunol Methods*, 2008, 338(1/2): 21-30.
6. Tang YT, Huang YY, Zheng L, et al. Comparison of isolation methods

- of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(3): 834-844.
7. Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DG Jr. ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23978.
  8. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography[J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3(1): 23430.
  9. Vergauwen G, Dhondt B, Van Deun J, et al. Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2704.
  10. Li P, Kaslan M, Lee SH, et al. Progress in exosome isolation techniques[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 789-804.
  11. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines[J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750.
  12. Kim JY, Rhim WK, Yoo YI, et al. Defined MSC exosome with high yield and purity to improve regenerative activity[J]. *J Tissue Eng*, 2021, 12: 20417314211008626.
  13. Dash M, Palaniyandi K, Ramalingam S, et al. Exosomes isolated from two different cell lines using three different isolation techniques show variation in physical and molecular characteristics[J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2021, 1863(2): 183490.
  14. Zhou S, Fang J, Hu M, et al. Determining the influence of high glucose on exosomal lncRNAs, mRNAs, circRNAs and miRNAs derived from human renal tubular epithelial cells[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(6): 8467-8480.
  15. Liu D, Liu F, Li Z, et al. HNRNPA1-mediated exosomal sorting of miR-483-5p out of renal tubular epithelial cells promotes the progression of diabetic nephropathy-induced renal interstitial fibrosis[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(3): 255.
  16. Lv LL, Feng Y, Wu M, et al. Exosomal miRNA-19b-3p of tubular epithelial cells promotes M1 macrophage activation in kidney injury[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(1): 210-226.
  17. Bai S, Xiong X, Tang B, et al. Exosomal circ\_DLGAP4 promotes diabetic kidney disease progression by sponging miR-143 and targeting ERBB3/NF-κB/MMP-2 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 1008.
  18. Logozzi M, Spugnini E, Mizzoni D, et al. Extracellular acidity and increased exosome release as key phenotypes of malignant tumors[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38(1-2): 93-101.
  19. Wen J, Ma Z, Livingston MJ, et al. Decreased secretion and profibrotic activity of tubular exosomes in diabetic kidney disease[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 319(4): F664-F673.
  20. Zeng M, Wen J, Ma Z, et al. FOXO1-mediated downregulation of RAB27B leads to decreased exosome secretion in diabetic kidneys[J]. *Diabetes*, 2021, 70(7): 1536-1548.
  21. Wu X, Gao Y, Xu L, et al. Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells trigger the epithelial-mesenchymal transition and dysfunction of podocytes[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9371.
  22. da Silva Novaes A, Borges FT, Maquigussa E, et al. Influence of high glucose on mesangial cell-derived exosome composition, secretion and cell communication[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6270.
  23. Zhu QJ, Zhu M, Xu XX, et al. Exosomes from high glucose-treated macrophages activate glomerular mesangial cells via TGF-β1/Smad3 pathway in vivo and in vitro[J]. *FASEB J*, 2019, 33(8): 9279-9290.
  24. Lv LL, Feng Y, Wen Y, et al. Exosomal CCL2 from tubular epithelial cells is critical for albumin-induced tubulointerstitial inflammation[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(3): 919-935.
  25. Liu BC, Tang TT, Lv LL, et al. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2018, 93(3): 568-579.
  26. Borges FT, Melo SA, Özdemir BC, et al. TGF-β1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(3): 385-392.
  27. Sonoda H, Lee BR, Park KH, et al. miRNA profiling of urinary exosomes to assess the progression of acute kidney injury[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 4692.
  28. Li S, Jia Y, Xue M, et al. Inhibiting Rab27a in renal tubular epithelial cells attenuates the inflammation of diabetic kidney disease through the miR-26a-5p/CHAC1/NF-κB pathway[J]. *Life Sci*, 2020, 261: 118347.
  29. Lassén E, Daehn IS. Molecular mechanisms in early diabetic kidney disease: glomerular endothelial cell dysfunction[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9456.
  30. Wu XM, Gao YB, Cui FQ, et al. Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells activate mesangial cells to promote renal fibrosis[J]. *Biol Open*, 2016, 5(4): 484-491.
  31. Tung CW, Hsu YC, Shih YH, et al. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2018, 23 Suppl 4: 32-37.
  32. Huang Y, Yang L. Mesenchymal stem cells and extracellular vesicles in therapy against kidney diseases[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 219.
  33. Liu Y, Holmes C. Tissue regeneration capacity of extracellular vesicles isolated from bone marrow-derived and adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 648098.
  34. Bochon B, Kozubska M, Surygała G, et al. Mesenchymal stem cells-potential applications in kidney diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(10): 2462.
  35. Wang Y, Zhang J, Li J, et al. CircRNA\_014511 affects the radiosensitivity of bone marrow mesenchymal stem cells by binding to miR-29b-2-5p[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2019, 19(2): 155-163.

36. Sun J, Zhao F, Zhang W, et al. BMSCs and miR-124a ameliorated diabetic nephropathy via inhibiting notch signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(10): 4840-4855.
37. Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, et al. Umbilical cord extracts improve diabetic abnormalities in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and increase their therapeutic effects on diabetic nephropathy[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8484.
38. Ebrahim N, Ahmed IA, Hussien NI, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorated diabetic nephropathy by autophagy induction through the mTOR signaling pathway[J]. *Cells*, 2018, 7(12): 226.
39. Mao R, Shen J, Hu X. BMSCs-derived exosomal microRNA-let-7a plays a protective role in diabetic nephropathy via inhibition of USP22 expression[J]. *Life Sci*, 2021, 268: 118937.
40. Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 3057624.
41. Çil N, Oğuz EO, Mete E, et al. Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries[J]. *Biotech Histochem*, 2017, 92(1): 15-28.
42. Dilogio IH, Canintika AF, Hanitya AL, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for treating osteoarthritis of the knee: a single-arm, open-label study[J]. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2020, 30(5): 799-807.
43. Lu X, Cui J, Cui L, et al. The effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation on endometrial receptivity are associated with Th1/Th2 balance change and uNK cell expression of uterine in autoimmune premature ovarian failure mice[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 214.
44. Sun Y, Shi H, Yin S, et al. Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving  $\beta$ -cell destruction[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 7613-7628.
45. Zhang W, Wang Y, Kong Y. Exosomes derived from mesenchymal stem cells modulate miR-126 to ameliorate hyperglycemia-induced retinal inflammation via targeting HMGB1[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(1): 294-303.
46. Li W, Jin LY, Cui YB, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-17-3p ameliorates inflammatory reaction and antioxidant injury of mice with diabetic retinopathy via targeting STAT1[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107010.
47. Xiang E, Han B, Zhang Q, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells prevent the progression of early diabetic nephropathy through inhibiting inflammation and fibrosis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 336.
48. Jin J, Shi Y, Gong J, et al. Exosome secreted from adipose-derived stem cells attenuates diabetic nephropathy by promoting autophagy flux and inhibiting apoptosis in podocyte[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 95.
49. Jin J, Wang Y, 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 Res Int*, 2020, 2020: 2685305.
50. Hao Y, Miao J, Liu W, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes carry microRNA-125a to protect against diabetic nephropathy by targeting histone deacetylase 1 and downregulating endothelin-1[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14: 1405-1418.
51. Jiang ZZ, Liu YM, Niu X, et al. Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 24.
52. Zhang Y, Wang J, Yang B, et al. Transfer of microRNA-216a-5p from exosomes secreted by human urine-derived stem cells reduces renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 610587.
53. Huang H, Liu H, Tang J, et al. M2 macrophage-derived exosomal miR-25-3p improves high glucose-induced podocytes injury through activation autophagy via inhibiting DUSP1 expression[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(12): 2651-2662.
54. Xu X, Qi X, Shao Y, et al. High glucose induced-macrophage activation through TGF- $\beta$ -activated kinase 1 signaling pathway[J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(8): 655-664.
55. Sun L, Kanwar YS. Relevance of TNF- $\alpha$  in the context of other inflammatory cytokines in the progression of diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2015, 88(4): 662-665.
56. Khalilpour J, Roshan-Milani S, Gharalari FH, et al. Macrophage migration inhibitory factor antagonist (p425) ameliorates kidney histopathological and functional changes in diabetic rats[J]. *J Bras Nefrol*, 2019, 41(3): 315-322.
57. Ismail N, Wang Y, Dakhlallah D, et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer[J]. *Blood*, 2013, 121(6): 984-995.
58. Rautou PE, Vion AC, Amabile N, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis[J]. *Circ Res*, 2011, 109(5): 593-606.
59. Zhu M, Sun X, Qi X, et al. Exosomes from high glucose-treated macrophages activate macrophages and induce inflammatory responses via NF- $\kappa$ B signaling pathway in vitro and in vivo[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106551.
60. Barutta F, Bellini S, Canepa S, et al. Novel biomarkers of diabetic kidney disease: current status and potential clinical application[J]. *Acta Diabetol*, 2021, 58(7): 819-830.
61. Gudehithlu KP, Hart P, Joshi A, et al. Urine exosomal ceruloplasmin: a potential early biomarker of underlying kidney disease[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2019, 23(8): 1013-1021.

62. Fujitaka K, Murakami T, Takeuchi M, et al. mRNAs in urinary nano-extracellular vesicles as potential biomarkers for non-invasive kidney biopsy[J]. *Biomed Rep*, 2021, 14(1): 11.
63. Xie Y, Jia Y, Cuihua X, et al. Urinary exosomal microRNA profiling in incipient type 2 diabetic kidney disease[J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 6978984.
64. Eissa S, Matboli M, Aboushahba R, et al. Urinary exosomal microRNA panel unravels novel biomarkers for diagnosis of type 2 diabetic kidney disease[J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(8): 1585-1592.
65. Eissa S, Matboli M, Bekhet MM. Clinical verification of a novel urinary microRNA panel: 133b, -342 and -30 as biomarkers for diabetic nephropathy identified by bioinformatics analysis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 92-99.
66. Zhao Y, Shen A, Guo F, et al. Urinary exosomal miRNA-4534 as a novel diagnostic biomarker for diabetic kidney disease[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 590.
67. Li W, Yang S, Qiao R, et al. Potential value of urinary exosome-derived let-7c-5p in the diagnosis and progression of type II diabetic nephropathy[J]. *Clin Lab*, 2018, 64(5): 709-718.
68. Delić D, Eisele C, Schmid R, et al. Urinary exosomal miRNA signature in type II diabetic nephropathy patients[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150154 (2022-10-15) [2016-03-01]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0150154>.
69. Sakurai A, Ono H, Ochi A, et al. Involvement of Elf3 on Smad3 activation-dependent injuries in podocytes and excretion of urinary exosome in diabetic nephropathy[J/OL]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216788 (2022-10-15) [2019-05-31]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0216788>.
70. Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis[J]. *J Proteomics*, 2014, 96: 92-102.
71. Zubiri I, Posada-Ayala M, Benito-Martin A, et al. Kidney tissue proteomics reveals regucalcin downregulation in response to diabetic nephropathy with reflection in urinary exosomes[J]. *Transl Res*, 2015, 166(5): 474-484.e4 (2022-10-15) [2015-05-23]. <http://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.05.007>.
72. Abe H, Sakurai A, Ono H, et al. Urinary exosomal mRNA of WT1 as diagnostic and prognostic biomarker for diabetic nephropathy[J]. *J Med Invest*, 2018, 65(3.4): 208-215.
73. Gudehithlu KP, Garcia-Gomez I, Vernik J, et al. In diabetic kidney disease urinary exosomes better represent kidney specific protein alterations than whole urine[J]. *Am J Nephrol*, 2015, 42(6): 418-424.

本文引用: 王秀芬, 肖湘成, 唐文彬. 外泌体在糖尿病肾病中的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2022, 42(12): 3117-3125. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.12.037

**Cite this article as:** WANG Xiufen, XIAO Xiangcheng, TANG Wenbin. Research progress of exosome in diabetic nephropathy[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2022, 42(12): 3117-3125. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.12.037