

外泌体的生物学特性及其微小 RNA 在脑梗死诊治中的应用

黄牡丹 肖崇珺 郑海清

中山大学附属第三医院康复医学科, 广州 510630

通信作者: 郑海清, Email: zhenghaiqing0909@aliyun.com

【摘要】 外泌体是由细胞主动分泌的胞外囊泡, 内含多种细胞特异的蛋白质、脂质、核酸等。外泌体作为细胞间通讯的载体, 参与了调节脑梗死后中枢神经系统修复及功能重塑的过程。随着研究深入, 越来越多研究表明, 外泌体来源的微小 RNA (miRNA) 在脑梗死诊断和治疗中扮演重要角色, 现就外泌体的生物学特性及其 miRNA 的研究应用做一综述。

【关键词】 外泌体; microRNAs; 脑梗死

基金项目: 国家自然科学基金 (81972151); 广东省自然科学基金 (2019A1515011106)

Funding: National Natural Science Foundation of China (81972151); Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2019A1515011106)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2020.08.024

外泌体 (exosome) 是细胞通过“内吞-融合-外排”等一系列生物学机制产生并主动向细胞外释放的直径为 30~150 nm 的小囊泡, 其内含有丰富的蛋白质、脂质、DNA、RNA 等生物活性物质^[1], 可通过与靶细胞受体结合, 水平转移内容物而在细胞间信号传递与信息交流中发挥重要的作用。近年来, 外泌体因具有来源广泛、低免疫源性、可作为载体荷载药物靶向治疗以及可穿过血脑屏障等特点, 在脑梗死的诊断和治疗中备受广泛关注。越来越多的研究表明, 外泌体分泌的微小核糖核酸 (micro ribonucleic acid, miRNA) 在促进脑梗死后神经血管单元结构重建和神经功能恢复中具有重要的作用^[2-3]。本文对外泌体的生物学特性及外泌体 miRNA 在脑梗死的诊断和治疗中的研究应用现状进行综述。

外泌体生物学特性

根据外泌体 ExoCarta 数据库 (<http://www.exocarta.org/>) 统计, 至今为止不同来源的外泌体内已经检测出 9769 种蛋白质、3408 种信使 RNA (messenger RNA, mRNA)、2838 种 miRNA 及 1116 种脂质。外泌体作为一种运输载体可以把其含有的蛋白质、核酸等输送到受体细胞, 在细胞间信号传递过程中发挥着重要的作用^[4]。

一、外泌体来源、形成与释放

多种细胞均可分泌外泌体, 如神经元、神经胶质细胞、内皮细胞、干细胞、肿瘤细胞等。外泌体是由细胞产生并主动向胞外释放的囊泡样小体, 本质是脂质双分子层^[5]。外泌体在核内体系统中形成, 主要经历以下过程: 细胞质膜初次内陷形成内吞小体, 多个内吞小体相互融合形成早期核内体。早期核内体再次内陷包裹细胞内液, 形成多个腔内小囊泡, 即转变为晚期核内体, 又称多泡核内体。大部分的多泡核内体将与溶酶体、自噬体相融合并最终被降解, 而小部分的多泡核内体在 Rab 蛋白家族协助下运送至细胞膜并与其结合, 最终将腔内小囊泡释放出细胞外, 被释放到细胞外环境的腔内小囊泡即为外泌体。外泌体可以包裹蛋白质、DNA、RNA 等信号分子, 但信号分子进

入囊泡的机制尚不清楚。外泌体存在于所有体液中, 如血液、乳液、脑脊液、唾液、尿液等, 也存在于细胞培养基上清液^[6]。

二、外泌体提取、鉴定与储存

目前用于提取外泌体的技术有超速离心、密度梯度离心、超滤、聚乙二醇沉淀、免疫亲和捕获、微控流等。每种提取方法各有优缺点, 如聚乙二醇沉淀法提取的外泌体产量较高但纯度较低; 而密度梯度离心、免疫沉淀亲和及超滤法提取的外泌体纯度较高但产量较低^[7]。当前广泛应用于鉴定外泌体方法主要有纳米粒子跟踪分析、流式细胞仪分析、透射电镜、蛋白免疫印记等。其中, 纳米粒子跟踪分析具有对单分散和多分散的粒子都具有较高的鉴定准确度, 但要求粒径直径大于 70 nm; 流式细胞仪在较低的粒子浓度下也可以检测到外泌体, 但要求外泌体直径大于 100 nm; 电镜分析可以直接可视化观察, 对外泌体大小没有要求, 但是透射电子显微镜会引起外泌体形态收缩改变^[7]。目前, 外泌体的鉴定主要是采用纳米粒子跟踪分析、透射电镜及蛋白免疫印记等实验方法相互印证。外泌体的贮存方式会直接影响外泌体的稳定性和生物学作用。外泌体在 4℃ 条件下, 一般可储存 7 d; 在 -80℃ 环境, 最长可储存 3 个月^[8]。目前研究显示 -70℃ 以下可能是长期保存外泌体的最适温度^[9]。

三、外泌体介导细胞间信号转导

细胞之间正常的信息交流对维持各种生物内环境的稳态具有极其重要的作用, 而细胞分泌的外泌体, 既可直接与周围环境的细胞相互作用, 也可进入体循环甚至穿过血脑屏障^[10], 发挥细胞间信息传递及免疫调节等生物学效应。外泌体与受体细胞相互作用的具体机制尚不清楚。目前认为, 外泌体作用于靶细胞的方式主要有 3 种: ①外泌体膜蛋白可以与其靶细胞上的受体相互作用, 从而激活靶细胞内信号传导; ②外泌体膜蛋白可被蛋白酶裂解, 可溶性片段可作为可溶性配体与细胞表面受体结合; ③外泌体可被靶细胞内化, 释放其内容物, 激活受体细胞的下游分子^[11]。有研究发现, 外泌体中的 mRNA 和 miRNA 可从一个细胞转移到另一个细胞, 并在受体细胞中发挥

生物学功能^[12]。因此,外泌体被认为是细胞间传递蛋白质、mRNA、miRNA 等分子物质的载体,其可通过转移生物蛋白、核酸等分子物质调节局部及整体细胞间的信息交流,进而诱导受体细胞发生相应的生理改变。

外泌体与脑梗死的诊断

目前对脑梗死的诊断仍主要是通过神经影像学检查手段(CT 或 MRI)进行诊断,尚缺乏有效的生物学标志物。近年来有研究表明,外泌体分泌的 miRNA 在脑梗死的早期诊断中具有重要的作用^[13-14]。miRNA 是一组内源性高度保守的小分子单链非编码 RNA,大约由 18~24 个核糖核苷酸组成,主要抑制靶基因转录后翻译进而调节细胞和生物体内重要的生命活动。miRNA 是细胞增殖、分化和迁移的关键调控因子^[15]。人类许多疾病都与 miRNA 的异常表达密切相关^[16-17]。与外周血液中的 miRNA 相比,外泌体内的 miRNA 具有不易被降解的特点,这使得外泌体 miRNA 有可能成为诊断脑梗死的生物学标志物。

Zhang 等^[18]对健康人神经干细胞和缺氧缺血(oxygen-glucose deprivation, OGD)预处理神经干细胞来源的外泌体进行高通量测序发现,与健康人神经干细胞来源的外泌体相比,OGD 预处理神经干细胞来源的外泌体中有 53 个 miRNA 上调、26 个 miRNA 下调。进一步分析发现,这些 miRNA 大部分靶基因与磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B(PI3K-Akt)信号通路、Hippo 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路等相关。Li 等^[19]建立大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,分别进行 5 min、10 min 和 120 min 的脑缺血再灌注处理,随后取大鼠脑脊液和血液进行 miRNA 测序和实时定量聚合酶链反应,结果显示缺血 10 min 大鼠的血浆外泌体 miR-122-5p 明显低于健康大鼠和缺血 5 min 大鼠;而缺血 5 min 大鼠的血浆外泌体 miR-300-3p 又显著高于对照组、缺血 10 min 组、缺血 120 min 组大鼠;且脑脊液中这些 miRNA 变化与血浆是一致的;经 ROC 曲线分析显示,miR-122-5p 和 miR-300-3p 具有较高的曲线下面积(area under curve, AUC)值(0.960;0.910),故认为血清外泌体 miR-122-5p 和 miR-300-3p 有望成为早期短暂性脑缺血发作的生物学标志物。

miR-9 和 miR-124 是脑组织特异性 miRNA,在年幼和成年的脊椎动物的大脑中均高表达^[20]。Ji 等^[13]研究发现,血清外泌体中 miR-9 和 miR-124 的变化与脑梗死具有相关性,纳入 65 例急性脑梗死患者和 66 例非脑梗死的志愿者,并检测 2 组人群中血清外泌体 miR-9 和 miR-124 的表达水平,结果发现急性脑梗死的患者血清中 miR-9 和 miR-124 较对照组有显著升高($P < 0.01$),进一步分析发现 miR-9 和 miR-124 与美国国立卫生研究院卒中量表 NIHSS 评分($r = 0.7126$; $r = 0.6825$)、梗死体积($r = 0.6768$; $r = 0.6312$)和血清炎症因子白介素(interleukin, IL)-6 浓度($r = 0.6980$; $r = 0.6550$)呈正相关,故认为血清外泌体 miR-9 和 miR-124 不仅可以作为诊断急性脑梗死的生物标志物,还可以评估脑梗死的损伤程度。Zhou 等^[21]的研究也报道了急性脑梗死患者 24 h 内血清外泌体 miR-134 较对照组升高($P < 0.0001$),ROC 曲线分析显示 miR-134 的 AUC 值是 0.834,敏感度为 75.3%,特异度为 72.8%;且 miR-134 与 NIHSS 评分($r = 0.6079$)、梗死体积($r = 0.7841$)、IL-6($r = 0.6936$)、高敏感性 C 反

应蛋白($r = 0.6207$)亦呈正相关。

此外,Chen 等^[14]还发现,急性脑梗死患者血清外泌体 miR-223 表达水平不仅较对照组显著升高($P < 0.001$),且血清高表达 miR-223 的脑梗死患者预后较低表达 miR-223 的预后更差($P < 0.05$);ROC 曲线分析显示 miR-223 的 AUC 值是 0.859,敏感度为 84.0%,特异度为 78.8%。

由于脑梗死不同病理时期其脑组织的细胞分子生物水平的变化也不尽相同^[22],因此,有研究推测,外泌体来源的 miRNA 可能有助于辨别脑梗死的具体分期^[23-24]。Li 等^[23]研究发现,血浆外泌体的 miR-422a 和 miR-125b-2-3p 在诊断脑梗死的具体分期具有重要的作用。该研究纳入了脑梗死的急性期(卒中后 1~3 d)患者 27 例和亚急性期(卒中后 4~14 d)患者 28 例,分别检测 2 组患者血浆外泌体 miR-422a 和 miR-125b-2-3p 水平,结果显示,急性期患者血浆外泌体的 miR-422a 表达水平明显升高,而亚急性期患者血浆外泌体的 miR-422a 和 miR-125b-2-3p 表达水平则下降。Wang 等^[24]研究也发现,miR-21-5p 和 miR-30a-5p 联合应用不仅可以作为诊断脑梗死的生物学标志物,还可以区分超急性期、亚急性期和恢复期等不同时期的脑梗死。

外泌体与脑梗死的治疗

自从 2013 年 Xin 等^[25]首次报道了间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源的外泌体可以通过促进血管新生和神经再生从而改善脑梗死大鼠受损的神经功能以来,外泌体及其分泌的 miRNA 在脑梗死治疗方面的研究已成为热点。

一、外泌体 miRNA 与脑血管新生

血管新生是涉及内皮细胞的活化、增殖、迁移、发芽,基底膜形成,新生血管形成与成熟的高度调控的复杂过程,是脑梗死后神经功能恢复的重要因素。血管新生需要大量的生长因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和成纤维细胞生长因子。Yang 等^[26]研究发现,补阳还五汤预处理的 MSCs 分泌的外泌体可以上调 MCAO 大鼠脑组织中 VEGF 和细胞增殖因子 Ki-67 的表达水平从而促进脑部血管再生。其机制可能与外泌体中 miR-126 表达水平升高和 miR-221 及 miR-222 的表达水平下降有关;当体外用补阳还五汤预处理的 MSCs 来源外泌体与内皮细胞共培养后,结果显示内皮细胞培养基中的 VEGF 表达量也增多,而采用转染小干扰 RNA 的干扰技术处理 MSCs 后,却发现与这些 MSCs 来源的外泌体共培养的内皮细胞培养基中 VEGF 表达量明显减少,故认为补阳还五汤预处理的 MSCs 分泌的外泌体可明显促进缺血性脑卒中大鼠的脑部血管再生,这可能是与外泌体分泌的与血管生成相关的 miRNA 有关。

也有研究^[27]表明,胶质母细胞瘤细胞来源的外泌体可以将促血管生成蛋白、mRNA 和 miRNA 传递到大脑内皮细胞中从而诱导血管生成。Sun 等^[28]也报道了胶质瘤干细胞来源的外泌体可以通过 miR-21 和 VEGF 信号通路来提高内皮细胞血管再生的能力。采用未做处理的胶质瘤干细胞来源的外泌体和过表达 miR-21 的胶质瘤干细胞来源的外泌体与人类大脑内皮细胞体外共培养 24 h 后发现,与高表达 miR-21 的外泌体共培养的内皮细胞的 VEGF 表达水平和 VEGF 受体 2 的比率(VEGF/VEGFR2)较对照组明显增加。

Yang 等^[29]为阐明外泌体 miR-181b-5p 在促进脑梗死后大脑血管再生的作用机制,采取 OGD 模型的脑微血管内皮细胞与脂肪干细胞(adipose-derived stem cells)来源的高表达 miR-181b-5p 的外泌体体外共培养 36 h,结果显示,与对照组相比,与过表达 miR-181b-5p 的外泌体共培养的微血管内皮细胞有更高的迁移率和成管能力,且 miR-181b-5p 还能上调缺氧诱导因子 1- α 和血管内皮生长因子的表达;结果还显示,miR-181b-5p 的靶基因转化受体电位阳离子通道亚家族 M 成员 7(transient receptor potential melastatin 7, TRPM7)的 mRNA 和蛋白质表达水平下降,而过表达 TRPM7 能减弱 miR-181b-5p 促进微血管内皮细胞迁移和成管的作用,故认为脂肪干细胞来源的外泌体可通过 miRNA-181b/TRPM7 轴提高 OGD 微血管内皮细胞的血管新生能力。

脑梗死发生后,神经血管单元的重建对脑卒中后神经功能恢复尤为重要。传统的康复运动训练可以部分促进中枢神经系统结构重塑和改善卒中后患者的神经功能障碍^[30,31],但具体机制仍未明确。Ma 等^[32]2018 年研究发现,适度的运动训练可促进内皮前体细胞外泌体 miR-126 表达水平增加,并可通过出芽相关蛋白-1 和血管内皮生长因子(SPRED1/VEGF)信号通路促进内皮细胞的迁移和血管生成从而发挥保护血管内皮细胞的作用。

二、外泌体 miRNA 与神经可塑性

中枢神经系统中,神经元的胞体、树突、轴突保持完整对于神经冲动的正常传导是必不可少的,因此,脑梗死发生后神经突起的重塑和神经再生对神经功能的恢复起着关键作用。Xin 等^[33]研究发现,MSCs 与脑梗死发生后 72h 的脑组织提取物体外共培养 24 h, MSCs 分泌的外泌体 miR-133b 表达水平升高。过表达 miR-133b 的 MSCs 外泌体能传递 miR-133b 到神经元从而促进神经突分支数增多和神经突长度增加,机制可能与抑制 Ras 同源基因家族成员 A(RhoA)的蛋白表达有关。Xin 等^[34]研究者还通过转染 miR-17-92 簇的质粒到 MSCs,使 MSCs 分泌的外泌体高表达 miR-17-92 簇,结果显示,与未处理的 MSCs 来源的外泌体相比,高表达 miR-17-92 簇的外泌体更加明显地促进少突胶质细胞形成髓鞘、树突增生等神经突重塑,从而明显改善脑梗死后神经功能恢复,故认为其机制可能与抑制 miR-17-92 簇的靶基因磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)从而激活下游的磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白/糖原合酶激酶(PI3K/Akt/mTOR/GSK-3 β)信号通路有关。

脑组织特异性 miRNA 中,miRNA-124 在大脑皮质和小脑中表达量最为丰富^[35]。miR-124 可通过靶向作用于多种蛋白质从而在脑梗死发生后的神经元分化、神经再生及神经功能修复的过程发挥重要的调节作用^[36]。Yang 等^[37]为阐明 miR-124 是如何靶向传递给脑梗死区域从而发挥治疗作用的机制,采用狂犬病毒糖蛋白与外泌体蛋白溶酶体相关膜糖蛋白 2b 融合的方法,给 MCAO 小鼠静脉注射狂犬病毒糖蛋白修饰的高表达 miR-124 的外泌体,结果显示,修饰后的外泌体有效地把 miR-124 递送到脑梗死区域,且可促进皮质神经祖细胞向神经元转化,促进神经发生。

三、外泌体 miRNA 与炎症反应

越来越多的研究证据表明脑组织微环境炎症反应的减轻与脑梗死后神经功能的恢复密切相关^[38,39]。M1 型小胶质细胞

或巨噬细胞极化在脑梗死后神经炎症中起着重要的作用^[40]。Geng 等^[41]曾报道外泌体 miR-126 可促进神经发生和改善脑梗死后的炎症微环境,过表达 miR-126 的脂肪干细胞来源的外泌体可以通过促进血管假性血友病因子(von Willebrand factor)和双皮质素(doublecortin)的上调表达,从而减少神经元凋亡和促进神经细胞增殖;外泌体 miR-126 可以抑制小胶质细胞活化,下调肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和 IL-1 β 的表达水平,从而改善脑梗死后的炎症微环境。

近年来有研究表明,自噬在改善脑梗死炎症反应中具有重要作用^[42-43],然而也有些研究发现自噬可以通过抑制 M2 型小胶质细胞或巨噬细胞活化从而促进炎症反应^[44]。Jiang 等^[45]通过采用脂肪干细胞来源的外泌体和过表达 miR-30d-5p 的外泌体与 OGD 小胶质细胞共培养,发现过表达 miR-30d-5p 的外泌体可明显抑制小胶质细胞自噬斑的形成;且过表达 miR-30d-5p 的外泌体可以显著抑制血清 TNF- α , IL-6, 一氧化氮合酶等炎症因子表达,促进抗炎因子 IL-4、IL-10 的上调表达,故认为外泌体 miR-30d-5p 可以通过抑制炎症因子表达从而减轻急性脑梗死自噬介导的脑损伤。

前景与挑战

外泌体可通过释放其内容物而发挥细胞间信息交流的作用,并能靶向调节多种细胞间的信号通路。目前,有关外泌体 miRNA 在脑梗死的研究仍有许多问题需要进一步去解决。①首先,外泌体主要分布于体液中,但体液本身也存在与外泌体内容物相同的生物分子,因此,外泌体的分离和提纯是重要的前提条件;②其次,外泌体 miRNA 作为脑梗死的生物学标志物,仍缺乏大样本、多中心临床研究数据的支持;③目前大多数研究仍主要是探索外泌体中 miRNA 与脑梗死后神经功能恢复的影响,对于其分泌的蛋白质和其他种类的 RNA 仍较少进行相关研究;④在临床试验中,外泌体 miRNA 在脑梗死的治疗方面仍需进行有效性和安全性研究。

参考文献

- [1] Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, et al. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(10): 1171-1182. DOI:10.1016/j.bcp.2011.02.011.
- [2] Xin H, Li Y, Liu Z, et al. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(12): 2737-2746. DOI:10.1002/stem.1409.
- [3] Song Y, Li Z, He T, et al. M2 microglia-derived exosomes protect the mouse brain from ischemia-reperfusion injury via exosomal miR-124[J]. *Theranostics*, 2019, 9(10): 2910-2923. DOI: 10.7150/thno.30879.
- [4] Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4): 575-581. DOI:10.1016/j.ceb.2009.03.007.
- [5] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 255-289. DOI:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

- [6] Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Nagaeva O, et al. Isolation and characterization of exosomes from cultures of tissue explants and cell lines [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2016, 115: 14.42.1-14.42.21. DOI: 10.1002/cpim.17.
- [7] Xu R, Greening DW, Zhu HJ, et al. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1152-1162. DOI: 10.1172/JCI81129.
- [8] Kalra H, Adda CG, Liem M, et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma [J]. *Proteomics*, 2013, 13(22): 3354-3364. DOI: 10.1002/pmic.201300282.
- [9] Lee M, Ban JJ, Im W, et al. Influence of storage condition on exosome recovery [J]. *Biotechnol Bioproc Engin*, 2016, 21(2): 299-304. DOI: 10.1007/s12257-015-0781-x.
- [10] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 341-345. DOI: 10.1038/nbt.1807.
- [11] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication [J]. *J Proteomics*, 2010, 73(10): 1907-1920. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.06.006.
- [12] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-659. DOI: 10.1038/ncb1596.
- [13] Ji Q, Ji Y, Peng J, et al. Increased brain-specific MiR-9 and MiR-124 in the serum exosomes of acute ischemic stroke patients [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163645. DOI: 10.1371/journal.pone.0163645.
- [14] Chen Y, Song Y, Huang J, et al. Increased circulating exosomal miRNA-223 is associated with acute ischemic stroke [J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 57. DOI: 10.3389/fneur.2017.00057.
- [15] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- [16] Kanwal R, Plaga AR, Liu X, et al. MicroRNAs in prostate cancer: Functional role as biomarkers [J]. *Cancer Lett*, 2017, 407(1): 9-20. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.08.011.
- [17] Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, et al. MiRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(7): 1073-1084. DOI: 10.1038/aps.2018.30.
- [18] Zhang G, Chen L, Guo X, et al. Comparative analysis of microRNA expression profiles of exosomes derived from normal and hypoxic preconditioning human neural stem cells by next generation sequencing [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(6): 1075-1089. DOI: 10.1166/jbn.2018.2567.
- [19] Li DB, Liu JL, Wang W, et al. Plasma exosomal miRNA-122-5p and miR-300-3p as potential markers for transient ischaemic attack in rats [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 24. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00024.
- [20] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse [J]. *Curr Biol*, 2002, 12(9): 735-739. DOI: 10.1016/s0960-9822(02)00809-6.
- [21] Zhou J, Chen L, Chen B, et al. Increased serum exosomal miR-134 expression in the acute ischemic stroke patients [J]. *BMC Neurol*, 2018, 18(1): 198. DOI: 10.1186/s12883-018-1196-z.
- [22] 张婷婷, 谢谦, 邵家骧, 等. MicroRNAs 与脑卒中的研究进展 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2012, 4(1): 1-10. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2012.01.001.
- [23] Li DB, Liu JL, Wang W, et al. Plasma exosomal miR-422a and miR-125b-2-3p serve as biomarkers for ischemic stroke [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2017, 14(4): 330-337. DOI: 10.2174/1567202614666171005153434.
- [24] Wang W, Li DB, Li RY, et al. Diagnosis of hyperacute and acute ischaemic stroke: the potential utility of exosomal microRNA-21-5p and microRNA-30a-5p [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2018, 45(5-6): 204-212. DOI: 10.1159/000488365.
- [25] Xin H, Li Y, Cui Y, et al. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(11): 1711-1715. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.152.
- [26] Yang J, Gao F, Zhang Y, et al. Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) enhances angiogenic effect of mesenchymal stem cell by upregulating VEGF expression after focal cerebral ischemia [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(4): 898-906. DOI: 10.1007/s12031-015-0539-0.
- [27] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12): 1470-1476. DOI: 10.1038/ncb1800.
- [28] Sun X, Ma X, Wang J, et al. Glioma stem cells-derived exosomes promote the angiogenic ability of endothelial cells through miR-21/VEGF signal [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22): 36137-36148. DOI: 10.18632/oncotarget.16661.
- [29] Yang Y, Cai Y, Zhang Y, et al. Exosomes secreted by adipose-derived stem cells contribute to angiogenesis of brain microvascular endothelial cells following oxygen-glucose deprivation in vitro through microRNA-181b/TRPM7 axis [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 65(1): 74-83. DOI: 10.1007/s12031-018-1071-9.
- [30] 吴华, 李岩, 顾旭东, 等. 功率自行车运动训练对脑卒中偏瘫患者下肢运动功能及步行能力的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2011, 33(8): 599-601. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.08.010.
- [31] 徐伟, 范金涛, 张琳瑛, 等. 水中运动训练与减重步行训练对脑卒中偏瘫患者步行能力的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2011, 33(6): 469-470. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.06.021.
- [32] Ma C, Wang J, Liu H, et al. Moderate exercise enhances endothelial progenitor cell exosomes release and function [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2018, 50(10): 2024-2032. DOI: 10.1249/MSS.0000000000001672.
- [33] Xin H, Li Y, Buller B, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(7): 1556-1564. DOI: 10.1002/stem.1129.
- [34] Xin H, Katakowski M, Wang F, et al. MicroRNA cluster miR-17-92 cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats [J]. *Stroke*, 2017, 48(3): 747-753. DOI: 10.1161/strokeaha.116.015204.
- [35] Mishima T, Mizuguchi Y, Kawahigashi Y, et al. RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS [J]. *Brain Res*, 2007, 1131(1): 37-43. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.

11.035.

- [36] Doeppner TR, Doehring M, Bretschneider E, et al. MicroRNA-124 protects against focal cerebral ischemia via mechanisms involving Usp14-dependent REST degradation [J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 126(2): 251-265. DOI:10.1007/s00401-013-1142-5.
- [37] Yang J, Zhang X, Chen X, et al. Exosome mediated delivery of miR-124 promotes neurogenesis after ischemia [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 7: 278-287. DOI:10.1016/j.omtn.2017.04.010.
- [38] Nih LR, Sideris E, Carmichael ST, et al. Injection of microporous annealing particle (MAP) hydrogels in the stroke cavity reduces gliosis and inflammation and promotes NPC migration to the lesion [J]. *Adv Mater*, 2017, 29(32): 1-27. DOI:10.1002/adma.201606471.
- [39] Moxon-Emre I, Schlichter LC. Evolution of inflammation and white matter injury in a model of transient focal ischemia [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69(1): 1-15. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3181e3ce6c.
- [40] Zhou S, Zhu W, Zhang Y, et al. S100B promotes microglia M1 polarization and migration to aggravate cerebral ischemia [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(11-12): 937-949. DOI: 10.1007/s00011-018-1187-y.
- [41] Geng W, Tang H, Luo S, et al. Exosomes from miRNA-126-modified ADSCs promotes functional recovery after stroke in rats by improving neurogenesis and suppressing microglia activation [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 780-792.
- [42] Ko JH, Yoon SO, Lee HJ, et al. Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NFκB pathways in autophagy- and p62-dependent manners [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 40817-40831. DOI:10.18632/oncotarget.17256.
- [43] Su P, Zhang J, Wang D, et al. The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia [J]. *Neuroscience*, 2016, 319: 155-167. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.035.
- [44] Shan M, Qin J, Jin F, et al. Autophagy suppresses isoprenaline-induced M2 macrophage polarization via the ROS/ERK and mTOR signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 110:432-443. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.021.
- [45] Jiang M, Wang H, Jin M, et al. Exosomes from MiR-30d-5p-ADSCs reverse acute ischemic stroke-induced, autophagy-mediated brain injury by promoting M2 microglial/macrophage polarization [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2): 864-878. DOI: 10.1159/000490078.

(修回日期:2020-07-30)

(本文编辑:汪 玲)

· 外刊撷英 ·

Respiratory rehabilitation in elderly patients with COVID-19: a randomized controlled study

BACKGROUND Different degrees of disorders are reported in respiratory function, physical function and psychological function in patients with corona virus disease 2019 (COVID-19), especially in elderly patients. With the experience of improved and discharged COVID-19 patients, timely respiratory rehabilitation intervention may improve prognosis, maximize functional preservation and improve quality of life (QoL), but there lacks of studies worldwide exploring the outcome of this intervention.

OBJECTIVE To investigate the effects of 6-week respiratory rehabilitation training on respiratory function, QoL, mobility and psychological function in elderly patients with COVID-19.

METHODS This paper reported the findings of an observational, prospective, quasi-experimental study, which totally recruited 72 participants, of which 36 patients underwent respiratory rehabilitation and the rest without any rehabilitation intervention. The following outcomes were measured; pulmonary function tests including plethysmography and diffusing lung capacity for carbon monoxide (DLCO), functional tests (6-min walk distance test), Quality of life (QoL) assessments (SF-36 scores), activities of daily living (Functional Independence Measure, FIM scores), and mental status tests (SAS anxiety and SDS depression scores).

RESULTS After 6 weeks of respiratory rehabilitation in the intervention group, there disclosed significant differences in FEV1(L), FVC(L), FEV1/FVC%, DLCO% and 6-min walk test. The SF-36 scores, in 8 dimensions, were statistically significant within the intervention group and between the two groups. SAS and SDS scores in the intervention group decreased after the intervention, but only anxiety had significant statistical significance within and between the two groups.

CONCLUSIONS Six-week respiratory rehabilitation can improve respiratory function, QoL and anxiety of elderly patients with COVID-19, but it has little significant improvement on depression in the elderly.

【摘自:Liu K,Zhang W,Yang Y, et al. Respiratory rehabilitation in elderly patients with COVID-19: A randomized controlled study. *Complement Ther Clin Pract*,2020,May.DOI:10.1016/j.ctcp.2020.101166】