

· 综述 ·

尿外泌体与糖尿病肾脏疾病

申奥 赵艳艳

郑州大学第一附属医院内分泌科 450052

通信作者:赵艳艳, Email: fcczhaoyy1@zzu.edu.cn

【摘要】 糖尿病肾脏疾病(DKD)已经成为导致终末期肾病的主要原因之一。尿外泌体内含有来自肾单位所有细胞的蛋白质以及成千上万种 RNA、miRNA, 这些物质随着尿外泌体在肾脏细胞之间转移, 改变细胞的蛋白质组成和功能, 并且影响肾脏细胞间的信号转导, 参与 DKD 的发病机制。因此, 尿外泌体及其所含的丰富的生物信息可能是 DKD 非侵入性生物标志物的理想来源。

【关键词】 尿外泌体; 糖尿病肾脏疾病; 生物标志物

基金项目: 国家自然科学基金(81800734)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2019.06.007

Urinary exosomes and diabetic kidney disease Shen Ao, Zhao Yanyan. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Zhao Yanyan, Email: fcczhaoyy1@zzu.edu.cn

【Abstract】 Diabetic kidney disease(DKD) has become one of the leading causes of end-stage renal disease. The urinary exosomes contain proteins from all cells of the nephron and thousands of RNAs and miRNAs. These substances are transferred between kidney cells, which in turn alter the protein composition and function of the cells, and affect the signal transduction between kidney cells, and participate in the pathogenesis of diabetic kidney disease with the transfer of urinary exosomes. Therefore, urinary exosomes and the abundant biological information contained therein may be an ideal source of non-invasive biomarkers for DKD.

【Key words】 Urine exosomes; Diabetic kidney disease; Biomarker

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81800734)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2019.06.007

糖尿病肾脏疾病(DKD)已成为我国慢性肾脏疾病发病的首要原因^[1]。然而将估算的肾小球滤过率和尿白蛋白/肌酐比值(UACR)用于DKD的诊断存在一定的局限性, 剧烈运动、高蛋白饮食、感染、发热等均会引起无肾脏损害的UACR增高, 并且正常情况下, 一旦出现UACR增高, 则提示肾小球滤过膜滤孔已发生改变, 预示着肾脏进入不可逆损害阶段。研究表明, 尿外泌体是DKD早期诊断和治疗的非侵入性生物标志物, 可以帮助了解导致肾损伤的病理生理机制。

1 尿外泌体的基本生物学特性

外泌体是直径30~100 nm, 具有磷脂双分子层的囊性小泡, 主要由脂质、蛋白质和核酸构成^[2]。细胞膜内吞作用形成胞内体, 胞内体内陷形成多囊泡体, 一部分多囊泡体被运送至溶酶体, 另一部分在P53的调节下与细胞膜融合, 向细胞外释放的小囊

泡就是外泌体^[3]。

一般情况下, 血外泌体不能通过肾小球滤过孔到达尿液^[4]。因此可以认为尿液中的外泌体来源于肾脏和泌尿系细胞, 并且可以表达来源细胞的表面受体、特异性蛋白质、mRNA以及miRNA^[5]。目前, 肿瘤易感基因101蛋白(TSG101)和凋亡诱导因子6相互作用蛋白(ALIX)已被用作尿外泌体标志蛋白^[6]。随着蛋白质组学的进一步发展, 已经证明尿外泌体表达podocin和podocalyxin标志着肾小球足细胞来源, 表达二肽基肽酶(DPP)4和水通道蛋白-1标志着近端肾小管细胞来源, 表达水通道蛋白-2标志着集合管上皮细胞来源^[7-9]。除此之外, 尿外泌体可以通过表面的信号蛋白或脂质刺激靶细胞, 也可以将其携带的特异性蛋白质、mRNAs、miRNAs或者DNA转移至靶细胞, 甚至可以直接进入体循环发挥相应作用^[10]。肾脏细胞分泌的外泌体沿着肾单

位释放到尿液中,或者进入其他肾脏细胞,通过释放蛋白质或miRNA,参与指导转录、翻译等一系列病理生理过程,从而影响受体肾脏细胞的表型及生物功能^[11]。因此,尿外泌体的数量、来源或者含量的变化可能反映肾脏的病理生理状态。

2 尿外泌体在 DKD 中的研究进展

2.1 尿外泌体来源蛋白与 DKD Gudehithlu 等^[12]在研究 DKD 时发现,尿外泌体中肾病标志蛋白明胶酶和血浆铜蓝蛋白的变化与肾组织中的保持一致,进一步通过实验验证了尿外泌体蛋白能更准确的反映肾组织的变化。并且随着蛋白质组学在分离、纯化和表征分子组成方面的进展,已发现超过 40% 的蛋白质与疾病相关^[13]。DPP4 便是其中之一。Sun 等^[8]研究发现,来自糖尿病患者尿外泌体中的 DPP4 水平随尿白蛋白的增加而增加,并与 DKD 严重程度呈正相关,结合之前的研究结果,他们提出,尿外泌体中的 DPP4 可能来源于肾小管上皮细胞并与早期肾小管损伤有关,由此认为尿外泌体来源 DPP4 是微量白蛋白尿出现前的肾损伤标志物。虽然尿 DPP4 在 DKD 患者中排泄增加的机制尚不清楚,但是 DPP4 抑制剂已广泛应用于 2 型糖尿病患者中,对于改善血糖具有明显作用。最新研究表明,尿外泌体蛋白 E1f3 只存在于 DKD 患者中,并且它的出现表明足细胞开始出现不可逆的损伤,在晚期糖基化终末产物诱导培养的足细胞中证实,其机制依赖转化生长因子 β -Smad3 蛋白信号转导途径的激活。因此,Sakurai 等^[14]提出,E1f3 可能是 DKD 中足细胞损伤的早期非侵入性标志物;还有许多研究同样证明了尿外泌体中存在多种与 DKD 发展相关的蛋白质,这些蛋白质可能是早期诊断 DKD 的潜在标志物,如 Zubiri 等^[15]在 DKD 小鼠的尿外泌体中发现,与正常小鼠相比衰老标志蛋白-30 显著下降,胞吐作用介导的尿外泌体 C-megalin 蛋白参与 DKD 的进展等^[16]。

2.2 尿外泌体来源 miRNA 与 DKD 尿外泌体的双层膜结构将 miRNA 与尿液中的 RNA 酶隔离,可减少其降解,保护了来源细胞的相关信息,以反映来源细胞的生理病理状态,为 DKD 的诊断提供了丰富的生物信息来源^[17]。Mohan 等^[18]实验发现,来自糖尿病大鼠尿外泌体中的 miRNA-451-5p、miRNA-16 显著升高,而且与肾脏病理指标(肾小管间质纤维化指数和肾小球硬化指数)呈负相关,提示糖尿病肾脏中尿外泌体 miRNA-451-5p 和 miRNA-16 的升高对糖尿病所致的肾纤维化具有保护作用。同年 Deli 等^[19]首次发现了尿外泌体 miRNA-320c 在 DKD 患者中显著上调,而在正常白蛋白尿的糖尿病患者中表达不

受影响,并进一步证明 miRNA-320c 通过靶向调节血小板反应素-1 间接参与转化生长因子- β 信号转导,影响 DKD 的进展,因此提出可以将 miRNA-320c 作为 DKD 早期进展或早期治疗效果的新候选标志物。随后,利用 miRNA 的表达差异性来预测 DKD 已经成为研究热点,Xie 等^[20]利用尿外泌体 miRNA 表达谱发现,496 种 miRNA 在 DKD 患者与糖尿病患者中存在差异,证实 miRNA-362-3p、miRNA-877-3p、miRNA-150-5p 上调,miRNA-15a-5p 下调。同样,在 1 型糖尿病所致肾病中,尿外泌体 miRNA 表达具有差异性,生物信息学分析显示,miRNA 可能参与 DKD 的纤维化过程^[21]。由此推测,在 1 型和 2 型糖尿病中可能存在表达差异的尿外泌体 miRNA,将来或许可以找到诊断 1 型糖尿病的非侵入生物标志物,提高 1 型糖尿病的诊断速度和准确性。

2.3 尿外泌体来源 mRNA 和基因与 DKD 尿外泌体内 mRNA 和基因所携带的生物信息具有完整性和稳定性,更能反映疾病的病理状态及来源细胞间的信息传递状况。骨保护素是 DKD 中高表达的细胞凋亡相关基因^[22]。Benito-Martin 等^[23]发现,肾小管上皮细胞外泌体中包含骨保护素,并且在 DKD 中高表达,提示尿外泌体骨保护素可作为 DKD 的诊断指标。Wu 等^[24]在研究 DKD 中外泌体的潜在作用时,发现高糖处理的肾小球内皮细胞分泌的外泌体比正常情况下分泌的外泌体多,并且富含更高的转化生长因子- β 1 mRNA,通过转化生长因子- β 1/Smad3 信号通路促进肾小球细胞增殖,引起 α -平滑肌肌动蛋白和细胞外基质蛋白的过度表达,促进肾纤维化,进而导致 DKD。近期,有日本学者提出将尿外泌体 mRNA-Wilms 肿瘤基因(WT1)作为 DKD 诊断和预后的生物标志物,但是仍缺乏大量的临床数据验证^[25]。相信在科学技术持续发展的未来,一定可以找到更加快捷、准确的诊断 DKD 的新标准。

3 尿外泌体对 DKD 的治疗作用

尿外泌体作为机体分泌的一种囊性小泡,具有免疫原性低、在血液中稳定性高、向细胞运输药物效率高、有一定的靶向性等独特优势。高血糖导致的对肾小球足细胞以及肾小管上皮细胞的损伤是 DKD 中的早期关键事件。静脉注射尿液来源干细胞外泌体(USCs-Exo)不但可以减少尿量和尿微量白蛋白排泄,而且可以阻止足细胞损伤和肾小管上皮细胞的凋亡,同时抑制 caspase-3 的过度表达,促进肾小球内皮细胞的增殖^[26]。Jiang 等^[27]在 1 型糖尿病肾病小鼠体内也得出类似结论,提示 USCs-Exo 可

能通过抑制足细胞凋亡、促进血管再生来预防 DKD, 具有潜在的临床应用价值。另有研究表明, 尿外泌体还可以作为评价 DKD 治疗效果的标志物^[28]。由此看来, 尿外泌体可能成为新型诊断和治疗 DKD 的靶点和突破点。

综上, 尿外泌体来源的生物学标志物在 DKD 中的研究日益成熟, 一定条件下能够代替组织活检, 减轻患者痛苦, 提高疾病早期诊断的准确率, 在不久的将来可以作为无创或微创的非侵入性疾病诊断手段。同时, 尿外泌体作为治疗剂的载体预示着一个重要的方向, 即针对外泌体的靶向治疗可能为 DKD 患者带来一种新的治疗选择。

参 考 文 献

- [1] Zhang L, Long J, Jiang W, et al. Trends in chronic kidney disease in China[J]. N Engl J Med, 2016, 375 (9): 905-906. DOI: 10.1056/NEJMc1602469.
- [2] Stahl PD, Raposo G. Exosomes and extracellular vesicles: the path forward[J]. Essays Biochem, 2018, 62 (2): 119-124. DOI: 10.1042/EBC20170088.
- [3] Ha D, Yang N, Nadihe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges[J]. Acta Pharm Sin B, 2016, 6 (4): 287-296. DOI: 10.1016/j.apsb.2016.02.001.
- [4] Ranghino A, Dimuccio V, Papadimitriou E, et al. Extracellular vesicles in the urine: markers and mediators of tissue damage and regeneration[J]. Clin Kidney J, 2015, 8 (1): 23-30. DOI: 10.1093/ckj/sfu136.
- [5] Salih M, Zietse R, Hoorn EJ. Urinary extracellular vesicles and the kidney: biomarkers and beyond[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306 (11): F1251-F1259. DOI: 10.1152/ajprenal.00128.2014.
- [6] Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential[J]. Cell Biosci, 2019, 9: 19. DOI: 10.1186/s13578-019-0282-2.
- [7] Hogan MC, Johnson KL, Zenka RM, et al. Subfractionation, characterization, and in-depth proteomic analysis of glomerular membrane vesicles in human urine[J]. Kidney Int, 2014, 85 (5): 1225-1237. DOI: 10.1038/ki.2013.422.
- [8] Sun AL, Deng JT, Guan GJ, et al. Dipeptidyl peptidase-IV is a potential molecular biomarker in diabetic kidney disease[J]. Diab Vasc Dis Res, 2012, 9 (4): 301-308. DOI: 10.1177/1479164111434318.
- [9] Oosthuyzen W, Scullion KM, Ivy JR, et al. Vasopressin regulates extracellular vesicle uptake by kidney collecting duct cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27 (11): 3345-3355. DOI: 10.1681/ASN.2015050568.
- [10] Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83 (11): 1484-1494. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.12.037.
- [11] Saleem SN, Abdel-Mageed AB. Tumor-derived exosomes in oncogenic reprogramming and cancer progression[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72 (1): 1-10. DOI: 10.1007/s00018-014-1710-4.
- [12] Gudechithlu 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. DOI: 10.1159/000443539.
- [13] Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (36): 13368-13373. DOI: 10.1073/pnas.0403453101.
- [14] Sakurai A, Ono H, Ochi A, et al. Involvement of E1B on Smad3 activation-dependent injuries in podocytes and excretion of urinary exosome in diabetic nephropathy[J]. PLoS One, 2019, 14 (5): e0216788. DOI: 10.1371/journal.pone.0216788.
- [15] 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. DOI: 10.1016/j.trsl.2015.05.007.
- [16] De S, Kuwahara S, Hosojima M, et al. Exocytosis-mediated urinary full-length megalin excretion is linked with the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2017, 66 (5): 1391-1404. DOI: 10.2337/db16-1031.
- [17] Prabu P, Rome S, Sathishkumar C, et al. MicroRNAs from urinary extracellular vesicles are non-invasive early biomarkers of diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients with the 'Asian Indian phenotype'[J]. Diabetes Metab, 2019, 45 (3): 276-285. DOI: 10.1016/j.diabet.2018.08.004.
- [18] Mohan A, Singh RS, Kumari M, et al. Urinary exosomal microRNA-451-5p is a potential early biomarker of diabetic nephropathy in rats[J]. PLoS One, 2016, 11 (4): e0154055. DOI: 10.1371/journal.pone.0154055.
- [19] Deli D, Eisele C, Schmid R, et al. Urinary exosomal miRNA signature in type II diabetic nephropathy patients[J]. PLoS One, 2016, 11 (3): e0150154. DOI: 10.1371/journal.pone.0150154.
- [20] Xie Y, Jia Y, Xie C, et al. Corrigendum to "urinary exosomal microRNA profiling in incipient type 2 diabetic kidney disease"[J]. J Diabetes Res, 2018, 2018: 5969714. DOI: 10.1155/2018/5969714.
- [21] Ghai V, Wu X, Bheda-Malge A, et al. Genome-wide profiling of urinary extracellular vesicle microRNAs associated with diabetic nephropathy in type 1 diabetes[J]. Kidney Int Rep, 2017, 3 (3): 555-572. DOI: 10.1016/j.ekir.2017.11.019.
- [22] Lorz C, Benito-Martín A, Boucherot A, et al. The death ligand TRAIL in diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19 (5): 904-914. DOI: 10.1681/ASN.2007050581.
- [23] Benito-Martin A, Ucero AC, Zubiri I, et al. Osteoprotegerin in exosome-like vesicles from human cultured tubular cells and urine[J]. PLoS One, 2013, 8 (8): e72387. DOI: 10.1371/journal.pone.0072387.
- [24] 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. DOI: 10.1242/bio.015990.
- [25] 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. DOI: 10.2152/jmi.65.208.
- [26] Li D, Wang N, Zhang L, et al. Mesenchymal stem cells protect podocytes from apoptosis induced by high glucose via secretion of epithelial growth factor[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4 (5): 103. DOI: 10.1186/s13287-016-0287-2.
- [27] 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. DOI: 10.1186/s13287-016-0287-2.
- [28] Sun H, Yao W, Tang Y, et al. Urinary exosomes as a novel biomarker for evaluation of α -lipoic acid's protective effect in early diabetic nephropathy[J]. J Clin Lab Anal, 2017, 31 (6): 22129. DOI: 10.1002/jcla.22129.

(收稿日期: 2018-12-20)

(本文编辑: 饶颖)