

## 外泌体参与糖尿病心肌病发病的研究进展

姚杰春, 郭润民, 梁伟钧

广东医科大学附属第一医院心血管内科, 广东 湛江 524001

**【摘要】** 糖尿病心肌病(DbCM)是一种独立于冠状动脉疾病、瓣膜病、先天性心脏病、高血压心脏病以代谢障碍及心肌功能障碍为特征的心血管并发症,其临床表现为早期心脏舒张功能受损,晚期收缩功能受损,最终发展为心力衰竭。DbCM病理过程较为复杂,而外泌体中的某些生物成分可能在DbCM的病理过程中起重要作用。本研究主要从糖尿病心肌病的发病机制、外泌体在DbCM中的作用等方面综述外泌体与糖尿病心肌病的最新进展,有可能为DbCM的早期识别及治疗提供新的方向。

**【关键词】** 糖尿病心肌病;冠状动脉疾病;发病机制;外泌体;治疗

**【中图分类号】** R587.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2019)11—1451—04

**Advances in research on the involvement of exosomes in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy.** YAO Jie-chun, GUO Run-min, LIANG Wei-jun. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, Guangdong, CHINA

**【Abstract】** Diabetic cardiomyopathy (DbCM) is a cardiovascular complication independent of coronary artery disease, valvular disease, congenital heart disease, and hypertensive heart disease, characterized by metabolic disorders and myocardial dysfunction. Its clinical manifestations are early impaired diastolic function, impaired late systolic function, and eventually heart failure. The pathological process of DbCM is complicated, and some biological components in exosomes may play an important role in the pathological process of DbCM. Therefore, this study reviews the recent advances in exocytosis and diabetic cardiomyopathy from the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy and the role of exosomes in DbCM, which may provide a new direction for the early identification and treatment of DbCM.

**【Key words】** Diabetic cardiomyopathy; Coronary artery disease; Pathogenesis; Exosomes; Treatment

糖尿病是一种由多种病因引起的一慢性高血糖为特征的代谢性疾病,主要由于胰岛素分泌作用缺陷或胰岛素抵抗所致<sup>[1]</sup>。随着人民生活水平的提高,全球糖尿病患病率明显较前升高,预计2030年将达4.39亿例<sup>[2]</sup>,糖尿病会导致心、脑、微血管、肾脏、眼、神经等器官或组织的损害,而心血管及脑血管疾病是2型糖尿病的主要死亡原因。另外,糖尿病引起的微血管病变导致的心力衰竭也是死亡原因之一<sup>[3]</sup>,这种并发症称为糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DbCM)。

DbCM的作用机制尚未明确,较为复杂,主要与心脏氧化应激增强、线粒体功能障碍、钙离子通道障碍、炎症、内质网应激、心肌细胞凋亡和纤维化、微血管病变有关<sup>[4]</sup>,据报道,外泌体(exosomes)在DbCM的发病机制中扮演重要的角色<sup>[5]</sup>,本文在后面重要阐述。

### 1 DbCM发病机制的概述

DbCM早期表现为舒张功能障碍,可能与心室肥大和僵硬、高舒张末期容积和压力、和心脏细胞间基质重塑有关<sup>[6]</sup>。在糖尿病心脏的心室僵硬的机制中,主要是通过胶原蛋白和晚期糖基化终产物(AGEs)相

互结合或作用所致的心肌沉积增加僵硬,从而降低心肌顺应性,最终导致心室舒张障碍;另一方面,在持续的高血糖状态,由于能量代谢异常,会加剧心肌肥大、细胞凋亡和纤维化,当心肌肥大到不能代偿细胞凋亡和纤维化时,就会出现收缩功能障碍,提示DbCM最终会发生充血性心力衰竭<sup>[7]</sup>。DbCM的发病机制较为复杂,涉及的机理或反应较多,主要从以下方面去阐述。

1.1 心脏胰岛素抵抗参与DbCM发病 心脏胰岛素信号通过控制蛋白质合成,底物使用和细胞存活来介导细胞稳态。心脏组织的糖代谢主要是通过胰岛素激活胰岛素信号传导/对接分子胰岛素受体底物(IRS)-1/2和下游PI3K/蛋白激酶B(Akt),刺激葡萄糖转运蛋白4(glucose transport4 GLUT4)易位至细胞膜并随后摄取葡萄糖进而代谢的<sup>[8]</sup>。在2型糖尿病患者中发现MG53(mitsugumin 53)含量增加,且2型糖尿病小鼠模型中心脏MG53蛋白水平升高导致lin受体和IRS-1蛋白酶体的退化,此外,心肌细胞特异性的MG53过表达抑制胰岛素信号传导并且心肌纤维化增加<sup>[9]</sup>。所以,心脏胰岛素信号的受体和相关蛋白激酶

基金项目:广东省科技计划项目(编号:20110316)

通讯作者:梁伟钧,主任医师,教授, E-mail:liangwj1962@sina.com

的缺乏或功能障碍均导致胰岛素信号传导减弱或灭活,进一步加重葡萄糖代谢异常,致使心肌纤维化,向糖尿病性心肌病进展。

1.2 线粒体功能障碍参与DbCM发病 正常情况下,心肌细胞中90%的ATP由胞内产生,但在2型糖尿病中,线粒体从葡萄糖转变为游离脂肪酸(Free Fatty Acid FFA)氧化以产生ATP,这与线粒体氧化应激(Mitochondrial Oxidative Stress ROS)生成增加和氧化磷酸化受损有关<sup>[10]</sup>。线粒体Ca<sup>2+</sup>功能异常进一步促进线粒体呼吸功能紊乱,导致细胞死亡。

1.3 线粒体氧化应激参与DbCM发病 线粒体ROS是电子传递链中复合物I和III的氧代谢的天然副产物。在正常情况下,电化学质子用于合成ATP。然而,当存在高血糖和胰岛素抵抗时,会使烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和黄素腺嘌呤二核苷酸向线粒体呼吸链转移,导致线粒体内膜超极化,抑制复合物III中的电子传递,和过量的ROS产生<sup>[10]</sup>。在饮食诱导的肥胖和存在胰岛素抵抗的患者中,根据Teshima的报道提示心肌细胞烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶活性增加<sup>[11]</sup>。因此,氧化应激促进心脏胰岛素抵抗,最终导致心肌纤维化,向心力衰竭进一步发展。

1.4 内质网应激与细胞死亡参与DbCM发病 心脏氧化应激、炎症、脂毒性和错误折叠蛋白的积累会加重心脏内质网功能的损害,促进内质网应激,诱导未折叠蛋白反应,最终内质网应激与未折叠蛋白反应共同抑制细胞蛋白质的合成和减少错误折叠或损坏蛋白质的降解,并增加细胞凋亡和自噬<sup>[10]</sup>。据研究表明,心脏细胞凋亡的增加是DbCM发展的主要危险因素<sup>[12]</sup>,活检糖尿病心脏组织表达的心肌细胞凋亡与非糖尿病心脏相比高出85倍<sup>[13]</sup>。内质网应激也通过Ca<sup>2+</sup>依赖性途径诱导自噬,与肌醇酶1和蛋白激酶RNA样内质网激酶等有关,自噬通过mTOR、AMPK和沉默信息调节途径进行调节。自噬反应的激活通常被认为是一种代偿反馈机制,可以防止细胞凋亡。然而,在DbCM中噬的失调会导致心肌细胞的自噬体与溶酶体融合,致使心肌细胞凋亡,加重DbCM的进展。

1.5 微血管功能障碍参与DbCM发病 由DILLMANN等<sup>[14]</sup>报道可知,DbCM通常没有明显的冠状动脉疾病。据报道,血管功能障碍会影响冠状动脉血流量和心肌灌注,所以糖尿病性心肌病可能与冠状动脉血管功能障碍有关。在一项2 783例患者的临床研究中,冠状动脉血流储备(CFR)受损程度与糖尿病和非糖尿病患者的心脏病死亡率分别增加4.9倍和3.2倍<sup>[14]</sup>。这表明冠状动脉微循环功能障碍是心脏病死亡率一个重要又独立的因素。盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptors MR)除了表达于上皮组织促进保钠排钾外,还表达于心血管组织而发挥重要作用<sup>[15]</sup>。

糖尿病和非糖尿病患者使用MR拮抗剂治疗可改善冠状动脉微血管功能并预防2型糖尿病患者的心血管疾病,这表明心脏MR激活在糖尿病患者冠状动脉微血管功能障碍中起重要作用。

1.6 钙离子调节异常参与DbCM发病 在高糖环境下,心肌存在多种离子转运异常,如:Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>抑制,Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交换抑制,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性受抑,其中钙离子调节异常在DbCM的发展中起不可缺的角色,因为心肌的舒缩功能依赖于细胞内游离钙离子的浓度<sup>[16]</sup>。多项研究均表明,DbCM心肌细胞内的钙离子水平增高,心肌细胞动作电位周期明显延长,主要是由于高血糖使心肌细胞钙清除减慢造成心肌细胞内钙超载,使肌浆网钙泵ATP酶活性下降、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交换减少,而钙超载的发生,使心脏顺应性降低,引发心肌细胞形态和功能的改变,引起心肌病变。

综上所述,不难发现,糖尿病心肌病的发病机制主要为能量代谢异常和微血管病变。其中,胰岛素抵抗所致葡萄糖摄取障碍,而线粒体功能障碍及氧化应激所致能量来源和产生障碍;当然,在能量代谢紊乱情况下,会进一步诱发内质网应激,致使心肌细胞凋亡;钙离子调节功能的正常运转,依赖于能量的供给,能量代谢的异常,该功能由于供能障碍明显受损。另一方面,心肌细胞的存活及其功能的维持离不开血液的灌注,而微血管为血液供应的重要渠道;当出现微血管功能障碍时,血液不能为心肌细胞提供营养及能量,致使心肌细胞凋亡、坏死、纤维化,加重心肌损伤。能量代谢异常和微血管病变的作用并不是相互独立,而是相互促进,共同作用。DbCM的发病机制并不仅仅为以上所述,还有炎症、肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活,心脏自主神经病变等都参与其中,而外泌体为近年来的研究热点,以下继续阐述外泌体在DbCM的作用。

## 2 外泌体参与DbCM发病的分子机制

在DbCM中存在着糖代谢异常,由于心肌细胞纤维化及坏死,致使外泌体分泌异常。外泌体是一种直径为30~90nm的细胞外囊泡,作为细胞间通讯的重要介质,它们含有多种生物成分,包括miRNA、脂类、蛋白质、和调节两种正常生理学的转录因子<sup>[17]</sup>。外泌体对糖尿病心肌病的作用取决于其所含的物质,下面进一步阐述外泌体中所含的物质对DbCM的影响。

依据WANG等<sup>[18]</sup>的一项研究表明,在糖尿病心肌细胞中可检测出携带有害成分的外泌体且其可引起一系列心血管并发症,主要表现为心肌纤维化,心肌细胞凋亡和心室功能障碍。所以,外泌体对心肌产生有害或有益的影响,具体取决于所含的物质<sup>[19]</sup>。其中,起重要作用的物质是miRNA和蛋白质,而miRNA是一种微小的(约22个核苷酸)和单链非编码RNA家族

的调节因子,主要通过对相应 mRNA 的降解或翻译的抑制、靶基因的调控等起作用。

2.1 心肌细胞来源外泌体 miR-320 的上调 在 T2DM 小鼠模型中,WANG 等<sup>[20]</sup>观察到心肌细胞释放的外泌体可抑制 EC 增殖,迁移和管状的形成,最终使新生血管受损。提取同源的外泌体转移至 EC,发现 miR-320 的上调和 IGF-1, HSP20 和 Ets2 的下调。该外泌体中的 miR-320 在 MCEC(小鼠心脏内皮细胞)中可以功能性地下调其靶基因受体(IGF-1, Hsp20 和 Ets2),并且 miR-320 的过表达能抑制 MCEC 迁移和管形成。通过敲除 miR-320 基因可消除外泌体介导的血管损伤作用<sup>[20]</sup>。所以,miR-320 的上调会进一步抑制新生血管的形成,这可能为 DbCM 中微血管形成障碍的机制之一。

2.2 内皮细胞来源外泌体 Mst1 含量增多 Mst1 (Mammalian sterile 20-like kinase 1)是一种参与调节器官大小、细胞凋亡和自噬 Hippo 途径中的关键蛋白质,外泌体 Mst1 从心肌微血管内皮细胞向心肌细胞的转移可加重糖尿病性心肌病。从 HU 等<sup>[21]</sup>的研究可以知道,他们使用内皮细胞特异性 Mst1 转基因的小鼠(用链脲佐菌素(STZ)构建了糖尿病模型)与非转基因(NTg)糖尿病小鼠相比,Tg-Mst1EC 小鼠的心脏功能更差,胰岛素抵抗加重<sup>[21]</sup>。Mst1 可能是通过减少 Daxx 和 GLUT4 之间的相互作用以及增强 Mst1 和 Daxx 的结合来破坏葡萄糖转运蛋白 4 型(GLUT4)膜易位,从而抑制糖尿病状态下的葡萄糖摄取,加重胰岛素抵抗。Mst1 蛋白含量的增多,可抑制心肌细胞的自噬,增强细胞凋亡,促进 DbCM 的形成。

2.3 心肌细胞来源外泌体 Hsp20 水平降低 根据 WANG 等<sup>[18]</sup>的研究发现,糖尿病心肌细胞可以分泌有害的外泌体,其中 Hsp20 水平明显降低,提示低水平 Hsp20 可能参与 DbCM 的进展。Hsp20 作为一种重要的伴侣蛋白,参与细胞对病理刺激的防御机制,通过与 Tsg101 的相互作用,促进心肌细胞外泌体的产生<sup>[22]</sup>。最近 TAN 等<sup>[23]</sup>阐明外泌体的内容物可以直接通过基因转染介导或在亲代细胞中间接修饰,实现细胞间的转移,从而可以将患病的外泌体转化为有益的外泌体。在特异性过表达 Hsp20 的转基因糖尿病小鼠模型里,可以观察到 Hsp20 的过表达能显着减弱了 DbCM 小鼠的心功能不全,减少心肌肥大、细胞凋亡、纤维化和微血管稀疏等情况<sup>[18]</sup>。同样,这项研究还观察到糖尿病心肌细胞释放外泌体的有害作用可以通过改变其内容物和分泌物转化为有益作用,由 Hsp20 过表达的心肌细胞产生的外泌体作用于在高血糖条件下的心肌细胞,可以有效恢复其心脏功能。所以,基因修饰 Hsp20 的外泌体可能是糖尿病心肌病的新型治疗剂。

在外泌体的研究中,其参与 DbCM 的发病机制其实也离不开能量代谢异常和微血管病变,是深一步的解释及补充。糖尿病中的心肌内皮细胞的外泌体 Mst1 主要通过抑制葡萄糖的摄取,致使能量代谢异常;而外泌体中的 miR-320 上调及 Hsp20 减少则通过使新生血管形成障碍,加重心肌坏死。

### 3 展望

在 KHAN 等<sup>[24]</sup>的研究中可以发现,胚胎干细胞来源的外泌体可以将其内容物(如 miR-294)转移至相邻的靶细胞,与单独使用 miR-294 作用于该细胞相比发挥同样的效果,这就为外泌体形成靶向药物提供基础证据;另一方面,富含 miR-294 的外泌体可以明显改善缺血性心肌病的心肌坏死,增加新的微血管形成、肌细胞增殖和改善心肌梗死后的存活,且该效果持续的时间约为 6~8 周,提示外泌体的作用半衰期较长<sup>[4]</sup>;由于 DbCM 的发病过程存在的不同程度的微血管病变及心肌缺血,外泌体的新生血管功能可能起到重要的作用,也促使外泌体形成新的治疗方法之一。

由于近几年外泌体的研究快速发展,尽管其在细胞通讯间的联系尚未完全研究透彻,但其在 DbCM 的形成机制中有进一步的补充,在既往的研究上提供新的研究方向和新的诊疗方法。据了解,在临床实践中,抗氧化剂缓冲剂的使用未能有效保护糖尿病心脏病<sup>[25]</sup>;同样,严格控制高血糖也未能延缓糖尿病患者向心力衰竭的发作或进展。所以,外泌体的出现及作用特点为 DbCM 的治疗及诊断方法提供另一条可行的道路,但还需更多的实验及临床论证。

尽管外泌体在 DbCM 的形成机制中有以上的作用,但部分只局限于动物实验,在临床上还欠缺相应的临床实验。笔者认为,外泌体要作为一种新的诊疗方法或者诊断手段,还有待解决以下的几方面问题:第一:安全性问题,由于外泌体的持续作用时间较长,半衰期较长且作用的受体为广泛性,系统性,非局部性,对于疗效上是未知的,另外最重要的是它的降解方式和排泄方式也是未知的。第二:特异性问题,外泌体的受体较为广泛或存在相似受体,具有治疗效应的外泌体具有明显的副作用,或许通过改变外泌体的给药方式尽可能减少副作用的发生,如口服、静脉、靶向用药、定位注射等。第三,检测困难性问题。miRNA、热休克蛋白为家族性,并非特异表达于外泌体,存在多种细胞因子,且临床上提取外泌体较为困难或难以与凋亡小体、微囊泡等相鉴别,或许可通过改变检测方式或改进检测手段(如不一定为血液,尿液<sup>[26]</sup>中也含有相应的外泌体),使外泌体提取更容易或提高敏感性。

#### 参考文献

- [1] SHEPHERD PR, KAHN BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus [J].

- Med N Engl J, 1999, 341(4): 248-257.
- [2] EGEDE LE, ELLIS C. Diabetes and depression: global perspectives [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2010, 87(3): 302-312.
- [3] MIKI T, YUDA S, KOUZU H, et al. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features [J]. *Heart Failure Reviews*, 2013, 18(2): 149-166.
- [4] DILLMANN WH. Diabetic Cardiomyopathy [J]. *Circulation Research*, 2018, 122(4): 624-638.
- [5] SALEM ESB, FAN GC. Pathological Effects of exosomes in mediating diabetic cardiomyopathy [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 998: 113-138.
- [6] AN HEEREBEEK L, HAMDANI N, HANDOKO ML, et al. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension [J]. *Circulation*, 2008, 117(1): 43-51.
- [7] MACDONALD MR, PETRIE MC, HAWKINS NM, et al. Diabetes, left ventricular systolic dysfunction, and chronic heart failure [J]. *European Heart Journal*, 2008, 29(10): 1224-1240.
- [8] FRAGOSO A, MENDES F, SILVA AP, et al. Insulin resistance as a predictor of cardiovascular morbidity and end-stage renal disease [J]. *J Diabetes Complicat*, 2015, 29(8): 1098-1104.
- [9] LIU F, SONG R, FENG Y, et al. Upregulation of MG53 induces diabetic cardiomyopathy through transcriptional activation of peroxisome proliferation-activated receptor  $\alpha$  [J]. *Circulation*, 2015, 131(9): 795-804.
- [10] JIA G, DEMARCO VG, SOWERS JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2016, 12(3): 144-153.
- [11] TESHIMA Y, TAKAHASHI N, NISHIO S, et al. Production of reactive oxygen species in the diabetic heart. Roles of mitochondria and NADPH oxidase [J]. *Circulation Journal*, 2014, 78(2): 300-306.
- [12] XIAO TIAN L, QINAN W, XIAGUANG G, et al. Exenatide Activates the APPL1-AMPK-PPAR $\alpha$  axis to prevent diabetic cardiomyocyte apoptosis [J]. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 2016: 4219735.
- [13] YANG L, ZHAO D, REN J, et al. Endoplasmic reticulum stress and protein quality control in diabetic cardiomyopathy [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1852(2): 209-218.
- [14] MURTHY VL, NAYA M, FOSTER CR, et al. Association between coronary vascular dysfunction and cardiac mortality in patients with and without diabetes mellitus [J]. *Circulation*, 2012, 126(15): 1858-1868.
- [15] GARG R, RAO AD, BAIMAS-GEORGE M, et al. Mineralocorticoid receptor blockade improves coronary microvascular function in individuals with type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2015, 64(1): 236-242.
- [16] HATTORI Y, MATSUDA N, KIMURA J, et al. Diminished function and expression of the cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in diabetic rats: implication in Ca<sup>2+</sup> overload [J]. *The Journal of Physiology*, 2000, 527(1): 85-94.
- [17] JOHNSEN KB, GUDBERGSSON JM, SKOV MN, et al. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1846(1): 75-87.
- [18] WANG X, GU H, HUANG W, et al. Hsp20-mediated activation of exosome biogenesis in cardiomyocytes improves cardiac function and angiogenesis in diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2016, 65(10): 3111-3128.
- [19] HUANG-DORAN I, ZHANG CY, VIDAL-PUIG A. Extracellular vesicles: novel mediators of cell communication in metabolic disease [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2017, 28(1): 3-18.
- [20] WANG X, HUANG W, LIU G, et al. Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2014, 74: 139-150.
- [21] HU J, WANG S, XIONG Z, et al. Exosomal Mst1 transfer from cardiac microvascular endothelial cells to cardiomyocytes deteriorates diabetic cardiomyopathy [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2018, 1864(11): 3639-3649.
- [22] RIBEIRO MF, ZHU H, MILLARD RW, et al. Exosomes function in pro- and anti-angiogenesis [J]. *Current Angiogenesis*, 2013, 2(1): 54-59.
- [23] TAN A, RAJADAS J, SEIFALIAN AM. Exosomes as nano-therapeutic delivery platforms for gene therapy [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(3): 357-367.
- [24] KHAN M, NICKOLOFF E, ABRAMOVA T, et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction [J]. *Circulation Research*, 2015, 117(1): 52-64.
- [25] VASSORT G, TURAN B. Protective role of antioxidants in diabetes-induced cardiac dysfunction [J]. *Cardiovascular Toxicology*, 2010, 10(2): 73-86.
- [26] STREET JM, KORITZINSKY EH, GLISPIE DM, et al. Urine exosomes: an emerging trove of biomarkers [J]. *Advances in Clinical Chemistry*, 2017, 78: 103-122.

(收稿日期:2019-03-28)