

DOI: 10.13376/j.cbls/2024027

文章编号: 1004-0374(2024)02-0245-13

运动调控胞外囊泡生物发生的研究进展

邢正¹, 郭兰兰², 张靓^{1*}

(1 北京师范大学体育与运动学院, 北京 100875; 2 对外经济贸易大学体育部, 北京 100105)

摘要: 胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是一类由细胞释放的各种具有膜性结构的囊泡的统称, 其能被大多数细胞所分泌, 通过携带核酸、蛋白质、脂质等特定的生物活性分子到达靶细胞实现细胞间信息交流。目前 EV 的生物发生调节已成为疾病防治的关键靶点, 受到广泛关注。运动能够促进 EV 的释放, 调节其内容物构成, 上述作用甚至被认为是机体对运动产生适应的标志。运动时信号通路 (如 Ca^{2+} 、mTOR、STAT3 等) 的激活, 细胞微环境 (如 pH 和氧浓度等) 乃至 EV 生物发生相关蛋白质翻译后修饰的变化都会影响 EV 的形成、内容物分选及囊泡运输等过程。该综述总结了 EV 的生物发生过程、运动对 EV 生物发生的影响, 并根据现有研究, 从信号通路、细胞微环境及蛋白质翻译后修饰的角度分析运动调节 EV 生物发生的可能机制。

关键词: 运动; 胞外囊泡; 生物发生

中图分类号: G804.7; Q74 **文献标志码:** A

Progress in the study of exercise-regulated extracellular vesicle biogenesis

XING Zheng¹, GUO Lan-Lan², ZHANG Jing^{1*}

(1 College of P.E. and Sports, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 2 Physical Education Department, University of International Business and Economics, Beijing 100105, China)

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are a type of vesicles with membranous structures released by cells, which can be secreted by most cells and carry specific bioactive molecules such as nucleic acids, proteins, and lipids to target cells for intercellular information exchange. At present, the biogenic regulation of EV has become a key target for disease prevention and control, receiving widespread attention. Exercise can promote the release of EV and regulate its content composition, which is even considered a sign of the body's adaptation to exercise. The activation of signaling pathways (such as Ca^{2+} , mTOR, STAT3, etc.) during exercise, changes in cellular microenvironment (such as pH and oxygen concentration), and even in posttranslational modifications of EV-related proteins can affect the formation of EV, content sorting, and vesicular transport processes. In this review we summarize the biogenic process of EV and the impact of exercise on EV biogenesis. Based on existing research, we analyze the possible mechanisms by which exercise regulates EV biogenesis from the perspectives of signaling pathways, cellular microenvironment, and protein post-translational modifications.

Key words: exercise; extracellular vesicles; biogenesis

胞外囊泡 (extracellular vesicles, EV) 是一种具有脂质双层的囊泡, 能够被大多数细胞所分泌, 并广泛分布于血液、尿液、唾液、乳汁等多种体液中, 包含蛋白质、脂质、核酸等多种生物活性物质^[1]。这些生物活性物质到达受体细胞后, 能够调节受体细胞的生物学效应, 在细胞通讯中发挥重要作用, 同时 EV 特有的脂质双分子层结构可避免其携带的

内容物被胞外酶降解。EV 可作为生物标记物来发挥诊断价值, 同时因 EV 携带体内的生理病理学信息, 也可用来研究相关疾病的发病机制、治疗方

收稿日期: 2023-07-31; 修回日期: 2023-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871207)

*通信作者: E-mail: zhangjing@bnu.edu.cn

法^[2]。随着EV提纯技术的发展与进步, EV正成为生物学和医学领域的研究热点。2018年, 国际胞外囊泡学会发表了胞外囊泡研究最低要求 (Minimal Information for Studies of EVs 2018, MISEV2018), 文中建议根据EV的粒径大小、密度、来源组织/细胞或特定生化成分对EV进行命名和分类, 如根据EV粒径大小, 可分为小EVs (sEVs, 50~100 nm)、中/大型EVs (m/IEVs, 100~200 nm) 及大型EV (LEV, 200~500 nm)^[3]。因此根据不同的标准, EV可分为多种类型。

现有的研究已经充分证实, 不论是长期运动还是急性运动, 不论是有氧运动亦或是抗阻运动, 均能够显著提高各种体液 (如汗液、血液、尿液等) 中EV的含量, 还能够改变EV内容物的种类和含量。EV通过在细胞间进行信号转导和物质交换, 介导了诸多运动产生的全身效应, 因此EV被认为是一种运动因子 (exerkine), 其释放增加是机体运动适应的结果^[4]。但目前关于运动如何促进EV分泌及内容物改变, 知之甚少。因此本研究着眼于运动时细胞微环境的变化、EV信号通路的变化以及EV生物发生相关蛋白表达及翻译后修饰的变化等方面, 探寻运动调节EV分泌和内容物分选的可能内在机制, 为运动促进健康的理论研究提供新的视角。

1 EV的生物发生

EV的生物发生主要有质膜途径和内体途径^[1]。目前的研究主要集中在内体途径, 该过程包括内容

物分选、多囊体 (multivesicular body, MVB) 形成、MVB运输和MVB-质膜融合四个过程, 其中MVB的形成是EV生物发生的中心环节^[5]。

1.1 MVB的形成

MVB的形成起始于细胞膜的内吞作用, 细胞膜向内出芽形成早期内体, 早期内体含有多种内容物, 其通过向内出芽的方式形成多个腔内囊泡 (intraluminal vesicle, ILV), 发展成为晚期内体, 因在电镜下看到其内部含有多个腔内囊泡, 又被称为多囊体。初级多囊体形成后, 多囊体之间能够相互融合; 此外, 多囊体还会和其他膜性细胞器, 如反式高尔基体、内质网和线粒体等形成接触位点, 并进行物质交换, 最终形成成熟的多囊体^[6-9]。

在多囊体形成过程中, 腔内囊泡的形成是关键步骤, 依据是否需要内体分拣转运复合体 (endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT) 的参与, 可将腔内囊泡的形成分为ESCRT依赖性途径^[10]和ESCRT非依赖性途径^[11] (图1)。

1.1.1 ESCRT依赖途径

ESCRT系统包括4种核心复合体, 分别为ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II和ESCRT-III, 每个复合体又含有多个亚基, 并有着不同的功能。此外, 还需要液泡蛋白分选因子4 (vacuolar protein sorting 4, VPS4)-VPS20 关联蛋白1 (VPS20 associated 1, Vta1) 复合体和凋亡连接基因-2-相互作用蛋白X (Alix) 等辅助分子的参与^[12] (表1)。最终完成以下三个功能: 识别泛素化的蛋白质并防止其降解; 使内体膜

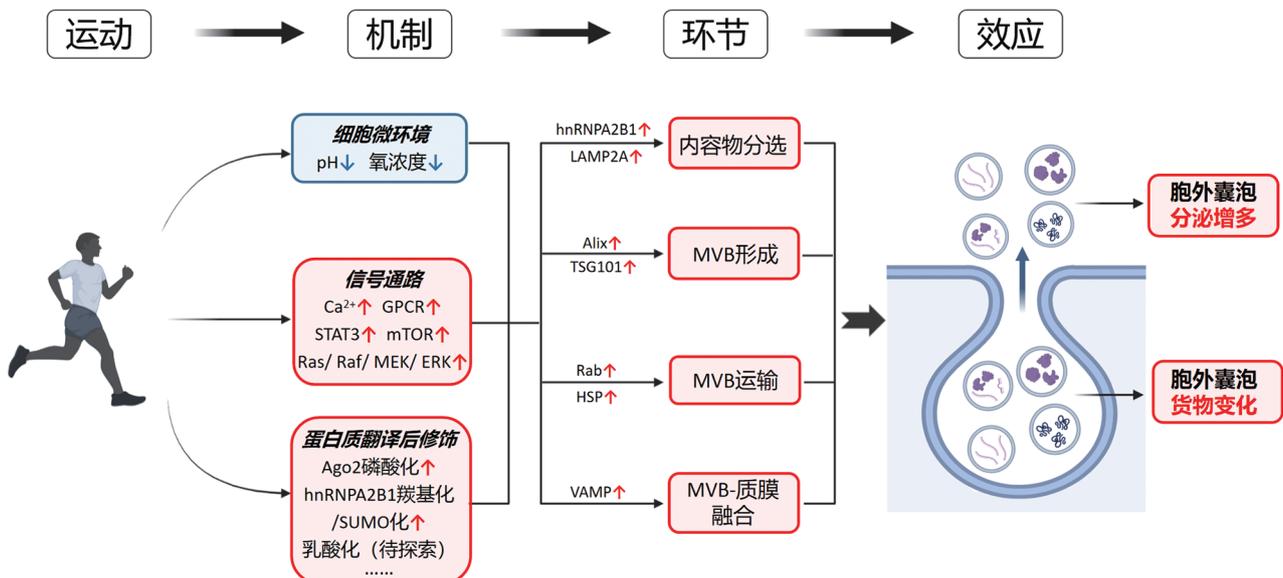


图1 运动调控细胞外囊泡的生物发生

表1 ESCRT系统的功能及亚基构成

ESCRT复合体	构成亚基	复合体功能
ESCRT-0	肝细胞生长因子调节酪氨酸激酶底物(hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate, HRS)、信号转导适配分子1 (signal transducing adapter molecule 1, STAM1)	作为内体分拣转运复合体最上游的启动因子, 首先被招募到内体膜上, 识别泛素化的蛋白质, 并通过与网格蛋白相互作用, 将泛素化的蛋白质募集到内体微结构域中, 而后招募TSG101
ESCRT-I	肿瘤易感基因101 (tumor susceptibility gene 101, TSG101)、VPS28、VPS37A/B/C/D、多囊体蛋白12 (multivesicular body, MVB12)A/B	通过TSG101亚基与ESCRT-0形成复合体, 将泛素化的蛋白质和含有PT/SAP基序的蛋白质定位至芽颈部, 而后招募ESCRT-II
ESCRT-II	VPS22、VPS25、VPS36	通过与内体膜的瞬间接触来启动ESCRT-III复合体的形成, 诱导内体膜的内陷和内容物封存
ESCRT-III	带电多泡体蛋白(charged multivesicular body proteins, CHMP) 1/2/3/4/5/6/7、IST1 (increased salt tolerance-1)	剪切芽体的颈部, 将小泡释放到内体的腔内, 完成出芽过程, 形成ILV
VPS4-Vta1	VPS4、Vta1	通过水解ATP提供能量, 将内体膜上的ESCRT-III复合物解聚下来, 从而完成循环利用
Alix		促进ESCRT-III复合体的形成, 并将ESCRT-III复合物募集到MVB的限制膜上

内陷出芽并吞入某些生物分子; 生成带有内容物的ILVs^[13]。

1.1.2 ESCRT非依赖途径

ESCRT系统并非ILV形成的唯一途径, 当敲除ESCRT的某些关键亚基后, 虽然EV的分泌明显减少, 但并没有完全阻止EV的产生^[14]。证据表明, EV的生物发生还存在不依赖于ESCRT的途径, 其中脂筏组分和四跨膜蛋白在其中起到了关键作用。

脂筏组分, 如中性鞘磷脂酶2 (neutral sphingomyelinase 2, nSMase2)-神经酰胺途径^[15-16]、小窝蛋白1 (caveolin-1)^[17-18]和浮舰蛋白 (flotillins)^[19]等介导了内体运输和ILV形成。除了脂筏组分外, 四跨膜蛋白 (tetraspanin, 包括CD和TSPN家族) 也在多种细胞的ILV形成过程中发挥重要作用^[5]。

可见, ILV的形成有多种机制参与, 在同一细胞甚至是单个MVB中, 会同时存在多种途径共同介导ILV形成; 根据细胞类型和环境的不同, 多种ILV形成机制可以动态调节、相互补充和协调, 以维持正常的生物学功能^[20]。

1.2 EV的内容物及分选

EV携带的内容物是其发挥生物学功能的关键组分, 主要包括蛋白质、核酸、脂质和代谢物四大类^[21]。内容物进入到EV的过程受到严格调控, 根据源细胞的状态可进行动态调节并表现出高度的组织特异性^[22-23]。在癌症、免疫系统疾病、神经系统疾病、心血管疾病和肥胖发生时, EV所携带的内容物会发生特异性的变化, 常被作为疾病的生物

标记物^[24]。

1.2.1 EV蛋白内容物及分选

EV携带的蛋白质位于EV膜上或腔内, 有的作为EV标记蛋白, 如TSG101、CD63和Alix等, 它们参与了ILV的形成, 并被EV携带共同分泌到胞外; 有的作为EV功能蛋白, 如膜转运蛋白、信号转导蛋白和酶等, 介导源细胞对靶细胞的调节^[21]。

EV蛋白质的分选与MVB的形成过程同步进行。ESCRT复合体亚基能够识别和结合某些包含泛素结合域的蛋白质, 将它们招募到内体表面, 并随着内体膜的内陷进入到ILV中, 从而完成蛋白质内容物的EV分选^[25]。此外, 内体表面存在的类似于脂筏的结构域, 能够特异性结合胞浆中的脂筏形成相关蛋白并将其运输到ILV中^[26]。脂筏组分之一神经酰胺被证明参与了某些胞质蛋白和RNA结合蛋白等内容物的分选^[27]。四跨膜蛋白也能够结合某些靶蛋白和一些细胞核内容物并将其分选到ILV中^[28-31]。热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 在EV蛋白质分选过程中也发挥重要作用^[32], 如HSP70能够与含有特定序列的靶蛋白结合, 并将其分选到ILV中^[33]。溶酶体关联膜蛋白2A (recombinant lysosomal associated membrane protein 2A, LAMP2A) 是溶酶体膜上一种高度糖基化的跨膜蛋白, 能够调节自噬的发生, 同时也参与了胞质蛋白向MVB中的分选^[33]。

综上, 目前已经发现ESCRT复合体、脂筏、热休克蛋白、LAMP2A等均参与了EV的蛋白质分

选, 一些蛋白质已被证实通过特殊的结构域或蛋白序列与内体/MVB上的膜蛋白和脂筏等结合并最终转运到内体中, 但仍有部分蛋白质的分选机制尚不清楚。

1.2.2 EV核酸内容及分选

EV携带的核酸包括DNA、RNA及非编码RNA(如miRNA、circRNA、lncRNA等)^[34]。EV通过所携带的RNA影响靶细胞的基因表达、信号转导及生物学功能。

核酸的EV分选具有高度的选择性, 目前关注较多的是miRNA的分选过程。RNA结合蛋白被证实miRNA的分选中发挥重要作用。含有某些特定motif的miRNA会被相应的RNA结合蛋白识别, 在其介导下被分选到EV中。例如, RNA结合蛋白异质核糖核蛋白A2B1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1, hnRNPA2B1)主要位于膜性细胞器或胞内囊泡表面, 能特异性识别胞浆中含有GGAG基序的miRNA(如miRNA-198), 并将其运输到ILV中, 最终通过EV分泌^[35]。参与构成RISC复合物的Argonaute 2(Ago2)蛋白也参与了miRNA的分选调节, 其能够与miRNA结合形成Ago2-miRNA复合物, 保护miRNA免受RNase的降解^[36], 且Ago2与MVB被证明存在较多的共定位, 可通过EV分泌^[37], 因此推测其介导了miRNA向ILV中的运输。

总之, RNA结合蛋白(包括hnRNP、Ago2等)主要介导了RNA进入EV的过程, 现有的研究提示RNA结合蛋白通常以序列特异性的方式识别并结合靶RNA, 形成RNA-蛋白质复合物, 从而携带RNA进入到内体/MVB中, 完成RNA的EV分选过程。但RNA结合蛋白如何靶向运输至内体, 尚未见研究报道。

1.3 MVB的运输与膜融合

1.3.1 MVB的运输

MVB在胞内的运输需要细胞骨架(肌动蛋白和微管)、相关分子马达(动力蛋白、驱动蛋白和肌球蛋白)和分子开关(Rab-GTPase/targeting GTPase)的协同作用。MVB的运输是受到高度调控的过程, 在分子马达的驱动下, MVB在胞内沿微管骨架进行运输, 并由Rab决定其去向, 或前往溶酶体降解或与质膜融合向外分泌^[38-40]。Rab27b及其效应因子EXPH5(exophilin5)协同介导了MVB沿微管骨架定向迁移, 从核周区域转移到细胞边缘, 然后在Rab27a及其效应因子突触结合蛋白样4(synaptotagmin-like 4, SYTL4)的共同作用下, 使MVB与质膜发生对接, 最终完成MVB在囊泡内的运输过程^[41]。

1.3.2 MVB与质膜融合

EV分泌的最后一步是MVB与质膜融合释放ILV, 这一过程由可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感性因子附着蛋白受体(soluble NSF attachment protein receptors, SNARE)蛋白家族介导。SNARE蛋白家族主要包括两种亚型: v-SNARE和t-SNARE, 分别定位于囊泡膜和质膜, 当囊泡运输至细胞膜附近后, v-SNAREs与t-SNAREs相互作用形成trans-SNARE复合物, 在此复合物的组装过程中产生足够的能量催化膜融合, 使ILV释放至胞外形成EV^[42-43]。此外, SNARE蛋白家族的Ykt6被认为在EV分泌过程中发挥关键作用^[44-45]。

综上, EV生物发生包括多个过程, 涉及多种途径, 且每个过程和途径都受到了高度精细的调控。当机体处于疾病或应激状态下, EV生物发生的各个过程均会出现相应的变化, 作为一种细胞向内环境输送生物活性分子的策略, 能够维持机体的稳态, 或是导致疾病的加速发展^[21]。运动作为一种生理应激, 是否会影响EV的生物发生呢, 其又是如何发挥调节作用的呢, 下文将对运动对EV生物发生的影响及机制进行阐述。

2 运动对EV生物发生的影响

多种运动方式均能够显著上调血液、汗液及组织中EV的水平, 还能够显著影响EV内容物的种类和含量。运动引起的EV变化被认为是机体对运动的适应, 目前国内外的研究均围绕运动诱导EV的有益作用而展开, 暂未见研究报道其副作用, 但不排除EV会产生其他副作用的可能。促进EV分泌和货物变化是运动改善疾病、促进健康的重要机制之一, 如运动诱导的EV通过促进肌纤维再生^[46]、增加肌细胞线粒体数量^[47]等途径以缓解肌肉萎缩症状, 并保持肌肉质量; 再如, 运动诱导的EV通过促进心脏血管新生^[48]、抑制心肌细胞凋亡^[49]及心肌纤维化^[50], 从而防治心血管疾病。因此, 运动诱导的EV对于维持机体健康、防治疾病至关重要, 对其内在机制进行探究也显得十分必要且紧迫。本文从EV生物发生的角度, 分析运动作用的靶点, 发现运动不仅参与调节MVB的形成, 改变EV内容物(如miRNA和蛋白质)的含量, 还通过干预Rab及SNARE蛋白来影响MVB的运输和质膜融合(表2)。

2.1 运动对体液EV含量的影响

目前关于运动调节体液EV含量的研究, 多采

表2 运动调节EV生物发生的作用靶点

作用环节	作用靶点	靶点变化	最终效应
ILV形成	TSG101	mRNA的表达升高	参与ESCRT-I复合体组装, 促进ILV形成; 促进某些泛素化蛋白分选至ILV中
	Alix	mRNA的表达升高	促进ESCRT-III复合体形成; 促进ILV出芽和脱落
内容物分选	hnRNPA2B1	mRNA的表达升高	促进含有特定motif的miRNA分选到ILV中
	LAMP2A	蛋白质的表达升高	促进含有特定motif的蛋白质分选到ILV中
MVB运输	Rab	mRNA的表达及蛋白质活性升高	促进MVB向质膜附近转移
	HSP70/90	mRNA的表达升高	作为分子伴侣协助MVB向质膜的运输
MVB-质膜融合	VAMP2/5/7	mRNA的表达升高; 蛋白质从胞浆转位到质膜	促进MVB与质膜融合, 导致EV的释放

用以下几种运动方式进行干预: 根据运动时长的不同可分为急性运动(一次性运动)和长期运动; 根据运动时机体供能方式的不同可分为有氧运动和无氧运动(抗阻运动)。

人群研究的结果表明多种运动方式均可显著改变各种体液中EV的含量。Brahmer等^[51]对受试者进行一次递增强度自行车有氧运动干预(从40 W开始, 每3 min增加40 W, 直到力竭)后采集静脉血, 通过粒径排阻色谱法分离血浆EV, 发现受试者血浆EV标记物(包括CD9、CD63、CD81、Flot-1、Alix、Tsg101等)的表达明显增加, 表明循环中EV数量增多。在另一项研究中, 13名中青年受试者进行一次20 min匀速有氧慢跑(1.66 m/s, 共2 km)后即刻收集8 mL汗液, 检测到汗液中EV标记蛋白Alix、CD63和HSP70的表达显著增加, 经过差速离心法提取汗液中的EV并使用BCA(bicinchoninic acid)检测试剂盒测定EV蛋白总浓度, 发现运动后汗液中EV蛋白质总浓度显著升高^[52]。抗阻运动对EV分泌的影响也不容忽视。有研究对青年男性受试者于飞轮训练器上进行5组10次的抗阻深蹲训练干预, 运动后2 h采集静脉血并提取血浆EV, 经纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)检测发现运动后其浓度增加了2倍^[53]。但也有研究得出了不同的结果: Hou等^[54]对青年男性赛艇运动员和无训练史男性学员进行1年有氧赛艇训练干预, 并于末次运动结束后24 h采集受试者血样, 发现循环EV粒径、浓度不存在差异; 此外, 在老年受试者接受8周的抗阻运动干预后5~6天采集到的血浆EV样本中也未发现EV标记蛋白有显著改变^[55]。由此可见, 尽管一些研究表明运动能够显著提高体液中EV的含量, 但运动后EV的采样时间、受试者的年龄、运动干预方式及干预时长的不同均可能对EV的检测造成影响, 从而带来完全

不同的实验结果。

相较而言, 动物实验的研究结果较为一致, 均表明运动能够促进EV的释放。例如, 5周跑台高强度间歇训练后小鼠血浆EV浓度显著升高^[56]。类似地, 进行3周游泳运动干预后的小鼠, 其血清中EV数量增加1.85倍^[48]。此外, Wistar大鼠经低强度(14~16 m/min)、中强度(20~22 m/min)及高强度(24~26 m/min)有氧运动后, 与对照组相比, 血清EV标记蛋白CD63表达显著增加, 且增加的幅度与运动强度呈正相关^[57], 提示循环EV的数量可能与运动强度相关。

综上, 不论是一次运动还是长期运动, 有氧运动还是抗阻运动, 均能够引起多种体液中EV水平的升高, 这些EV的组织来源一直颇受关注, 但由于目前尚未发现EV的组织特异性标记物, 因此在体研究对EV进行标记和追踪较为困难。但仍有研究通过细胞计量分析显示, 超过5%的循环EV中富含骨骼肌特异性miR-206, 提示骨骼肌是循环EV的重要来源之一^[58]。运动时骨骼肌广泛动员并处于高负荷状态, 因此推测肌源性EV分泌增多可能是运动时循环EV含量升高的原因之一。此外, 还有研究对小鼠进行8周跑台运动干预(10 m/min, 每天300 m)后, 发现在血浆EV浓度升高的同时, 心肌组织EV释放显著增强。离体实验也证明, 使用胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)激活剂处理大鼠心肌细胞H9C2模拟运动的效应, 心肌细胞EV释放明显增加^[49], 提示运动也能够显著促进心肌的EV分泌, 可能是运动时循环EV的来源。

2.2 运动调节MVB的形成

Alix能够激活ESCRT-III复合体的形成, 介导ESCRT-III向MVB限制膜上的定位, 参与ILV的出芽和脱落过程, 对EV的形成十分重要^[10]。Xhuti

等^[59]对老年受试者进行了为期12周的抗阻训练干预后,肌肉活检结果表明Alix的蛋白表达在训练后显著升高。类似地,健康男性受试者在进行了有氧+抗阻运动的急性干预后,股外侧肌肉活检同样发现Alix mRNA的表达显著升高^[60]。

TSG101作为ESCRT-I复合体的组成亚基之一,在ESCRT依赖性途径的ILV发生和泛素化蛋白分选过程中发挥重要作用^[61]。一项研究对15名处于糖尿病前期阶段的患者进行了一次急性有氧运动干预,发现骨骼肌中TSG101的mRNA表达显著上调^[62]。

Hsp90作为溶酶体相关蛋白跨膜4B(LAPTM4B)的分子伴侣,能够促进MVB向质膜转运,增强EV分泌^[63-64]。有研究对小鼠进行中等强度跑台训练12周后,检测到心肌Hsp70和Hsp90的mRNA表达显著升高^[65]。此外,大鼠进行一次力竭跑台运动干预后,心肌中Hsp70呈现出高表达趋势,且在运动后24h达到最高峰^[66],提示急性运动也能够对热休克蛋白的表达产生调节作用。

以上研究结果提示,多种运动方式均可调节参与MVB形成的多种蛋白分子,如Alix、TSG101和Hsp90等,鉴于它们在EV生物发生中的作用,可以推测运动促进的EV分泌与其表达变化有关,但还需要更多的直接证据来支撑。

2.3 运动对EV内容物的影响

2.3.1 运动对EV中miRNA表达的影响

多种运动方式均能显著调节EV中miRNA的表达。在人体实验中,青年男性进行1年有氧赛艇训练干预后,循环EV中的miR-342-5p显著升高^[54];青年男性进行一次抗阻飞轮训练干预2h后,血浆EV中miR-206和miR-146a的水平显著升高^[53]。在动物实验中,5周跑台高强度间歇训练后小鼠血浆EV中三种肌源性miRNA(miR-133a、miR-133b、miR-206)的含量显著增加^[56],与人体研究的结果类似。此外,EV中miRNA的含量与运动强度有关,如Oliveira等^[57]对大鼠进行不同强度的有氧运动干预后,检测到血浆EV中有12种miRNA的表达在运动后显著升高,且EV中miRNA的表达水平与运动强度呈正相关。

运动对RNA结合蛋白表达的调节可能是其影响EV中miRNA丰度的原因之一。hnRNPA2B1是miRNA分选进入EV的关键参与者^[35]。大鼠经10周的中等强度跑台运动干预后,其大脑hnRNPA2B1 mRNA的表达显著升高^[67],提示运动可能通过上调hnRNPA2B1的表达以促进特定miRNA向EV中

的分选。

2.3.2 运动对EV中蛋白质表达的影响

目前的研究多关注于运动对EV膜标记蛋白含量的影响,而对EV运输蛋白的相关研究较为匮乏。Chi等^[68]认为,长期有氧运动能够显著促进肌源性EV中纤维连接蛋白III型域包含蛋白5(fibronectin type III domain-containing protein 5, FNDC5)鸢尾素的表达,随血液循环到达内皮细胞,并通过Dnajb3和HSP70分子伴侣系统增加SIRT6稳定性以保护血管免受老化。该研究提示运动对EV货物蛋白的表达具有显著的调节作用,且受到调节的蛋白能够对下游的生物学过程产生影响,可能是运动改善心血管疾病的机制之一。还有研究使用纳米超高效液相色谱(UHPLC)串联质谱(MS/MS)技术对血浆EV进行蛋白质组学检测,在EV中共检测到5359种蛋白质,经过递增强度功率自行车运动干预(55% VO₂max 30 min; 70% VO₂max 20 min; 80% VO₂max 10 min)后,有322种蛋白质出现了差异表达,除去囊泡相关蛋白如Alix、Rab和膜联蛋白(Annexin)、热休克蛋白、细胞骨架蛋白以及Flotilin1和Flotilin2之外,EV内容物蛋白的表达也出现了显著差异,其中G蛋白、GTP酶和糖酵解关键酶如己糖激酶、6-磷酸果糖激酶-1和丙酮酸激酶的增加最为显著^[69]。有研究提示,通过EV传递的糖酵解酶可显著影响受体细胞中的糖酵解速率,可能是运动调节相关细胞糖酵解速率的策略之一^[70-71]。

LAMP2A已被证明能够识别特定的蛋白基序并将其分选到MVB中。同时,运动能够对LAMP2A的表达产生影响,如9周的跑台运动显著提高了大鼠血管基质组分中LAMP2A蛋白的表达^[72]。综上,推测运动可能通过调节LAMP2A的表达,进而参与EV蛋白内容物的分选。

2.4 运动对MVB运输及质膜融合的影响

2.4.1 运动调节Rab蛋白的表达

运动对MVB运输的影响主要是通过调节Rab实现的。在经1周游泳运动干预的小鼠心脏及IGF-1处理(模拟运动效应)的H9C2细胞中,均发现Rab27B和Rab35的mRNA表达及蛋白表达水平显著上调,且使用siRNA干扰H9C2细胞中的Rab35表达后,明显抑制了EV的释放^[49]。

除了促进Rab的表达,运动还能激活Rab-GTP调节MVB的运输。Rab是胰岛素和运动激活的信号级联通路中蛋白激酶作用的关键靶蛋白,蛋白激酶B(Akt)底物(小鼠糖代谢调节蛋白AS160)和

Human TBC1 域家族成员 1 (Homo sapiens TBC1 domain family member 1, TBC1D1) 磷酸化水平的增加能够激活 Rab。具体而言,运动激活 Akt,诱导 AS160 的磷酸化,抑制了 Rab-GTP 向 Rab-GDP 转化,保持了 Rab 的活性,促进胞内囊泡向质膜的转运^[73-74]。类似地,肥胖 2 型糖尿病患者进行短期有氧运动训练干预后,磷酸化 Akt 的底物 AS160 的磷酸化水平显著升高,且胰岛素刺激下的 Rab GTP 表达显著增多^[75]。

2.4.2 运动调节 SNARE 的表达和转位

SNARE 转位到质膜是 MVB 与质膜融合的前提条件。早在 1996 年, Kristiansen 等^[76]就发现 100% 最大摄氧量的力竭运动导致男性受试者肌肉 SNARE 家族蛋白成员突触小泡缔合性膜蛋白 2 (synaptic vesicle-associated membrane protein 2, VAMP2) 的表达增加 1.4 倍,并促进了胞内囊泡向细胞膜的转运。除了主动运动干预外,被动运动也有类似的效果。被动运动是指受试者处于放松状态,动作的整个过程都由外力完成,常用于临床治疗关节性疾病及肌肉萎缩等^[77]。Wistar 大鼠骨骼肌经被动收缩干预后,骨骼肌中的 VAMP2、VAMP5 和 VAMP7 从细胞内隔室转位到细胞膜表面,并可能参与胞内囊泡与细胞膜的接触和融合^[78]。

总之,多种运动方式能够调节 Rab 的表达及激活、SNARE 的表达及转位,并可能参与调节 MVB 的运输和质膜融合。

3 运动调节 EV 生物发生的机制

以往的研究多从现象层面观察运动对 EV 的分泌及内容物的影响,而运动是通过何种机制产生上述现象,尚未完全阐明。根据 EV 生物发生的过程及已有的调节机制,结合运动的作用,从 EV 微环境(如酸碱度、氧含量)、信号通路(如 Ca^{2+} 、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR 等)及蛋白质的翻译后修饰(如泛素化、乳酸化等)角度,阐述运动作用的可能机制。

3.1 运动调节 EV 生物发生的微环境

3.1.1 酸碱度

酸性环境对 EV 的分泌具有显著的促进作用,可能通过促进 EV 生物发生蛋白的表达来实现。一项研究使用 10 mmol/L 的 L-乳酸处理巨噬细胞,发现细胞 EV 的释放明显增多^[79]。此外,还有一些研究证实肿瘤细胞的酸性环境有利于 EV 的分泌。Parolini 等^[80]发现,与对照培养基(pH = 7.4)相比,

酸性培养基(pH = 6.0)能够显著促进人黑色素瘤细胞 EV 的分泌,并且观察到酸性 pH 下 EV 含有更多的 caveolin-1 蛋白;类似地,HEK293 细胞分别在酸性(pH = 4)、中性(pH = 7)和碱性(pH = 11)条件培养基培养后,与中性培养基相比,酸性培养基 EV 标记蛋白(包括 CD9、CD63 和 HSP70)的表达显著升高,而细胞在碱性条件下几乎不分泌 EV^[81]。有研究对酸性环境促进 EV 分泌的机制进行了探讨,在头颈部鳞状癌细胞中鉴定出了名为侵袭伪足的特殊侵入性肌动蛋白结构,它能够协助癌细胞在体内进行扩散,并且是 CD63 和 Rab27a 阳性囊泡的特异性和关键对接和分泌位点,而酸性环境能够促进侵袭伪足的生成,导致了细胞 EV 分泌的增加^[82]。

众所周知,运动能够显著影响内环境及骨骼肌细胞的酸碱度。人运动到力竭时血液 pH 可低至 6.27。大强度运动后,每千克湿肌乳酸浓度可从运动前的 1 mmol/L 升高至 30 mmol/L,其他酸性产物如丙酮酸等也在骨骼肌细胞中大量堆积,使得骨骼肌内的 pH 下降至 6.3~6.6^[83]。因此,运动诱导的 pH 向酸性偏移,可能是其促进 EV 分泌的重要机制之一,但目前仍缺少直接证据。期待未来有研究能够以运动诱导的酸碱度变化为切入点,探究运动促进 EV 释放的机制。

3.1.2 缺氧

缺氧会影响多种癌细胞的 EV 释放,并改变其内容物的表达水平。如在暴露于缺氧环境(1% O_2)的卵巢癌细胞中,Rab27a 表达显著上调,Rab7、LAMP1/2、神经氨酸酶 1 (neuraminidases-1, NA-1) 的表达显著下调,EV 的释放明显增加^[84]。与此现象不同的是,人前列腺癌细胞暴露于低氧(1% O_2)条件后,通过纳米颗粒跟踪分析观察到培养基 EV 的平均直径显著降低,Western Blot 结果表明低氧导致 EV 标记蛋白 CD63、CD81、HSP90、HSP70 和 Annexin II 的水平也显著降低。此外,低氧处理还导致 EV 中多种信号分子,如转化生长因子- β 2 (transforming growth factor- β 2, TGF- β 2)、肿瘤坏死因子 1 α (tumor necrosis factor 1 α , TNF1 α)、白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、TSG101、Akt、整合素连接激酶 1 (integrin-linked kinase 1, ILK1) 和 β -连环蛋白 (β -catenin) 等水平的升高^[85]。因此,缺氧对 EV 释放的影响可能因细胞类型而异。

缺氧也会影响正常细胞 EV 的分泌,且缺氧处理的时间与 EV 的分泌量成正比。Zhang 等^[86]收集了缺氧干预 0、12、24 h 的巨噬细胞源性的 EV,结

果发现与缺氧干预 0 h 及 12 h 相比, 缺氧干预 24 h 导致巨噬细胞源性 EV 标记蛋白表达显著升高。大鼠肾近端肾小管细胞 (RPTCs) 的研究也表明缺氧 (1% O₂) 不改变 EV 的大小, 但以时间依赖性的方式显著增加了 EV 的生成^[87]。主动脉瓣狭窄、缺血性心脏病患者的心脏能够比正常心脏分泌更多的胞外囊泡, 同时从人多能干细胞分化而来的心肌细胞, 经缺氧处理后, 其胞外囊泡的分泌也显著增加^[88]。

在动物研究中, 裸鼯鼠暴露于缺氧环境中 4 h 后, 与常氧环境组相比, 其血浆小型 EV 和中型 EV 的数量均显著减少, 大型 EV 虽未出现统计学差异, 但也出现了减少的趋势; 此外, 血浆 EV 中瓜氨酸的含量也出现了显著降低, 表明缺氧对 EV 的分泌和蛋白质的分选都能产生显著影响^[89]。

一些研究对缺氧导致 EV 释放的机制进行了探索, 发现在常氧条件下使用 HIF-1 稳定剂能促进 EV 分泌, 缺氧条件下如果抑制或敲除 HIF-1, EV 分泌不会增加, 提示 HIF-1 介导缺氧期间的 EV 产生^[90]。HIF 可以增加一些细胞表面受体的表达和激活, 诱导内吞作用, 增加内体形成和 EV 释放。HIF 还可以通过与启动子区结合, 促进 Rab22A、Rab27a 基因表达, 增强胞内囊泡的运输过程, 促进 EV 的分泌^[91]。此外, HIF-1 α 作为质子泵 ATP6V1A 的转录负调节因子, 抑制 H⁺ 向溶酶体内的运输, 使溶酶体功能受损, 减少 MVB 的降解, 促进了 EV 的分泌^[90]。因此, HIF 在缺氧诱导 EV 释放的过程中发挥着至关重要的作用。

剧烈运动会造成机体的短暂缺氧, 还会诱导骨骼肌等组织中 HIF-1 的表达显著升高。大鼠在进行了一次大强度力竭运动干预后, 通过 HE 染色和 HBFP 染色综合评价发现心肌组织的缺血缺氧程度相比对照组显著增强^[92]。此外, 对大鼠进行不同形式的运动干预后, 其心肌组织出现了不同程度的缺血缺氧改变^[93]。缺氧还会导致骨骼肌 HIF-1 的表达显著升高, 被证明是骨骼肌对缺氧环境适应性的反应^[94]。因此可以合理推测, 运动通过缺氧以及调节 HIF 的表达可以影响胞外囊泡的分泌以及货物构成。但目前尚未将运动导致的缺氧与 EV 的生物发生过程联系起来, 该方向的研究成果值得期待。

3.2 运动调节EV相关信号通路

3.2.1 Ca²⁺信号

Ca²⁺ 作为胞内第二信使, 其对 EV 的分泌具有促进作用。在莫能菌素 (monensin, MON) 处理 K562 细胞导致胞内 Ca²⁺ 增加的同时, 培养基中 EV 的含

量也显著升高。而使用 Ca²⁺ 螯合剂则完全消除了上述作用, 意味着该过程需要 Ca²⁺ 的参与。在 MON 处理后产生的 MVB 中还出现了 Ca²⁺ 的累积, 表明囊泡内的 Ca²⁺ 可能在 EV 分泌过程中起关键作用^[95]。另一项研究证实细胞内 Ca²⁺ 浓度的增加促进了高迁移率蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 分选到肝细胞 EV 中, 并且诱导了肝细胞 EV 分泌的增加^[96]。其作用机制可能为: Ca²⁺ 通过钙通道内流, 在离子通道附近形成一个 Ca²⁺ 微区, 引起局部 Ca²⁺ 浓度瞬间升高从而激活 Ca²⁺ 感受器突触结合蛋白 (synaptotagmin), 后者通过与磷脂以及 syntaxin 的相互作用触发 MVB 与质膜的融合过程^[97]。此外, Ca²⁺ 对 ESCRT、Alix 和 nSMase2 等^[98-102] 多种 EV 生物发生相关蛋白的活性和功能产生影响, 参与调节 ILV 形成、MVB 质膜融合过程。

Ca²⁺ 是骨骼肌兴奋-收缩耦联因子, 细胞内 Ca²⁺ 浓度的改变是细胞生理功能的重要物质基础, 直接影响着骨骼肌的运动功能。科学运动可调控细胞膜内外 Ca²⁺ 稳态, 改善肌肉功能^[103], 并促进心肌 Ca²⁺ 通道损伤修复, 恢复肌浆网中 Ca²⁺ 释放及胞浆内的 Ca²⁺ 浓度^[104]。Matsunaga 等^[105] 对接受一次急性跑台运动 (50 m/min, 10% 坡度, 2.5 min) 的大鼠的股外侧肌进行组织匀浆后检查了肌浆网的功能, 如 Ca²⁺-ATP 酶活性和 Ca²⁺ 吸收率和释放率, 发现运动可引起肌肉内肌浆网 Ca²⁺ 摄取率增加 12.4%。但目前尚缺乏直接证据证实骨骼肌细胞内 Ca²⁺ 浓度的变化会影响 EV 的释放。根据现有的研究, 心肌和肝细胞内 Ca²⁺ 浓度对 EV 的分泌发挥着重要的调节作用, 能够为骨骼肌内 Ca²⁺ 与 EV 的研究提供一定的参考和指导。

3.2.2 mTOR信号

对细胞生长和增殖过程具有重要调控作用的 mTOR 信号被证实也参与了 EV 的生物发生。抑制人前列腺癌 PC3 细胞和结肠癌 HT29 细胞中的 mTORC1 信号能够促进溶酶体相关基因 Lamp1 和 V-ATP 酶 d2 亚基的转录, 使得大量 MVB 进入到溶酶体中降解, 最终抑制了 PC3 细胞和 HT29 细胞的 EV 释放^[106]。mTORC1 信号的激活还能够促进肝癌细胞中程序性细胞死亡配体 1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 的表达, 并增加后者在 EV 中的分泌, 表明 mTOR 对 EV 的内容物分选也具有一定的调控作用^[107]。然而, 在另一项研究中用雷帕霉素阻断 mTORC1 信号会加速小鼠胚胎成纤维细胞的 EV 释放^[108]。可见, 在不同类型的细胞

中, mTOR 信号对 EV 的生物发生可能产生不同的作用。运动是导致 mTOR 信号激活的重要生理刺激之一^[109-110], 证实 mTOR 激活对运动调节 EV 生物发生十分必要。

此外, Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路^[111-113]、信号转导和转录激活因子 3 (signal transduction and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路^[114] 及 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCR) 信号通路^[115-116] 的激活均参与了 EV 生物发生的调节, 而运动对上述信号通路均有显著的激活作用^[117-119], 但它们是否参与了运动对 EV 生物发生的调节还未见报道。

3.3 运动通过翻译后修饰调节EV的生物发生

蛋白质翻译后修饰 (post-translational modification, PTMs) 在蛋白质功能调节中的作用被越来越多地关注, 特定蛋白的磷酸化、糖基化、拟素化、SUMO 化及泛素化修饰在 EV 的生物发生过程中发挥着关键的调节作用^[2], 也为 EV 生物发生的调节途径增加了更多的维度。运动能够显著改变某些 EV 蛋白的翻译后修饰水平, 如大鼠进行 10 周的中等强度跑台运动干预后, 其大脑 hnRNPA2B1 蛋白的羧基化降低, 且蛋白质结构和功能更加稳定^[67], 可能有利于其参与 miRNA 的 EV 分选。前文提及了乳酸对 EV 释放的促进作用, 而乳酸作为运动时糖无氧酵解的产物之一, 可以诱导多种蛋白质中的赖氨酸发生乳酸化修饰, 其在运动调节 EV 生物发生中的作用值得期待。

4 展望

EV 及其携带的内容物是组织细胞间重要的通讯方式, 参与了多种疾病的发生和发展。众多学者日益关注 EV 生物发生过程及其调节机制, 意图寻找疾病防治的新靶点。EV 的生物发生主要包括内容物分选、MVB 形成、MVB 运输和 MVB- 质膜融合四个过程, 每个过程都受到了高度精细的调控。

许多研究已经证实了运动对 EV 分泌的促进作用, 并将 EV 认为是“运动因子 (exerkines)”, 作为机体运动适应的产物之一^[3]。不论是长期运动还是急性运动, 是抗阻运动还是耐力运动, 均能明显促进 EV 的分泌, 并使 EV 携带的核酸、蛋白质的种类和含量发生显著改变。尽管目前尚未见研究探讨运动影响 EV 生物发生的直接机制, 但通过总结前人的研究, 不难发现运动能够显著调节参与 EV 生物发生的多种功能蛋白质的表达及活性, 并能够显

著影响 EV 生物发生的微环境、相关信号通路及某些蛋白质的翻译后修饰水平。通过对以上途径进行深入探究, 或许能够揭开运动调节 EV 生物发生的内在机制。

总之, EV 在体内的物质运输和信号转导中发挥着举足轻重的作用。运动对 EV 的分泌和内容物含量可产生显著的影响, 充分研究 EV 的生物发生过程和调节机制, 可为运动防治某些疾病提供新的线索和靶点, 对运动促进健康的研究具有重大意义。

[参 考 文 献]

- [1] Jadli A S, Ballasy N, Edalat P, et al. Inside (sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. *Mol Cell Biochem*, 2020, 467: 77-94
- [2] 郝慧强, 李姝赟, 郭松佳, 等. 外泌体生物学发生机制的研究进展. *山东医药*, 2021, 61: 109-12
- [3] 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 Extracell Vesicles*, 2018, 7: 1535750
- [4] Nederveen JP, Warnier G, Di Carlo A, et al. Extracellular vesicles and exosomes: insights from exercise science. *Front Physiol*, 2021, 11: 604274
- [5] Han QF, Li WJ, Hu KS, et al. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer*, 2022, 21: 207
- [6] Di Mattia T, Tomasetto C, Alpy F. Faraway, so close! Functions of endoplasmic reticulum-endosome contacts. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865: 158490
- [7] Kwon SH, Oh S, Nacke M, et al. Adaptor protein CD2AP and L-type lectin LMAN2 regulate exosome cargo protein trafficking through the Golgi complex. *J Biol Chem*, 2016, 291: 25462-75
- [8] Rabas N, Palmer S, Mitchell L, et al. PINK1 drives production of mtDNA-containing extracellular vesicles to promote invasiveness. *Cell Biol*, 2021, 220: e202006049
- [9] Zhao YG, Codogno P, Zhang H. Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 733-50
- [10] Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 677-85
- [11] Grassart A, Cheng AT, Hong SH, et al. Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis. *Cell Biol*, 2014, 205: 721-35
- [12] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest*, 2016, 126: 1208-15
- [13] Frankel EB, Audhya A. ESCRT-dependent cargo sorting at multivesicular endosomes. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 74: 4-10
- [14] Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, et al. Multivesicular

- endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, 2009, 10: 925-37
- [15] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 2008, 319: 1244-7
- [16] Guo BB, Bellingham SA, Hill AF. The neutral sphingomyelinase pathway regulates packaging of the prion protein into exosomes. *J Biol Chem*, 2015, 290: 3455-67
- [17] Parton RG, McMahon KA, Wu Y. Caveolae: formation, dynamics, and function. *Curr Opin Cell Biol*, 2020, 65: 8-16
- [18] Hayer A, Stoeber M, Ritz D, et al. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol*, 2010, 191: 615-29
- [19] Kwiatkowska K, Matveichuk OV, Fronk J, et al. Flotillins: at the intersection of protein S-palmitoylation and lipid-mediated signaling. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 2283
- [20] Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, et al. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun*, 2014, 5: 3477
- [21] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, 367: 6977
- [22] Haraszi RA, Didiot MC, Sapp E, et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 32570
- [23] Jia S, Zhang Q, Wang Y, et al. PIWI-interacting RNA sequencing profiles in maternal plasma-derived exosomes reveal novel non-invasive prenatal biomarkers for the early diagnosis of nonsyndromic cleft lip and palate. *EBioMedicine*, 2021, 65: 103253
- [24] Dixon AC, Dawson TR, Di Vizio D, et al. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 454-76
- [25] 黄欢, 李万杰, 杨冬. ESCRT系统: 一个多功能的蛋白转运及膜剪切机器. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29: 11
- [26] de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, et al. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*, 2003, 102: 4336-44
- [27] Singh R, Pochampally R, Watabe K, et al. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Mol Cancer*, 2014, 13: 256
- [28] van Niel G, Charrin S, Simoes S, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell*, 2011, 21: 708-21
- [29] Ma S, Mangala LS, Hu W, et al. CD63-mediated cloaking of VEGF in small extracellular vesicles contributes to anti-VEGF therapy resistance. *Cell Rep*, 2021, 36: 109549
- [30] Yokoi A, Villar-Prados A, Oliphant PA, et al. Mechanisms of nuclear content loading to exosomes. *Sci Adv*, 2019, 5: 8849
- [31] Yanatori I, Richardson DR, Dhekne HS, et al. CD63 is regulated by iron via the IRE-IRP system and is important for ferritin secretion by extracellular vesicles. *Blood*, 2021, 138: 1490-503
- [32] Gémardin C, De Gassart A, Blanc L, et al. Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic*, 2004, 5: 181-93
- [33] Ferreira JV, da Rosa Soares A, Ramalho J, et al. LAMP2A regulates the loading of proteins into exosomes. *Sci Adv*, 2022, 8: eabm1140
- [34] Wei H, Chen Q, Lin L, et al. Regulation of exosome production and cargo sorting. *Int J Biol Sci*, 2021, 17: 163-77
- [35] Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, et al. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*, 2013, 4: 2980
- [36] Li L, Zhu D, Huang L, et al. Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PLoS One*, 2012, 7: e0046957
- [37] McKenzie AJ, Hoshino D, Hong NH, et al. KRAS-MEK signaling controls Ago2 sorting into exosomes. *Cell Rep*, 2016, 15: 978-87
- [38] Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell*, 2007, 12: 671-82
- [39] Rocha N, Kuijl C, van der Kant R, et al. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol*, 2009, 185: 1209-25
- [40] Song P, Trajkovic K, Tsunemi T, et al. Parkin modulates endosomal organization and function of the endolysosomal pathway. *Neurosci*, 2016, 36: 2425-37
- [41] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 19-30
- [42] Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, et al. A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 1993, 75: 409-18
- [43] Nichols BJ, Ungermann C, Pelham HR, et al. Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature*, 1997, 387: 199-202
- [44] Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, et al. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 1036-45
- [45] Ruiz-Martinez M, Navarro A, Marrades RM, et al. YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 2016, 7: 51515-24
- [46] Wang B, Zhang C, Zhang A, et al. MicroRNA-23a and MicroRNA-27a mimic exercise by ameliorating CKD-induced muscle atrophy. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28: 2631-40
- [47] Barone R, Macaluso F, Sangiorgi C, et al. Skeletal muscle Heat shock protein 60 increases after endurance training

- and induces peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α 1 expression. *Sci Rep*, 2016, 6: 92-104
- [48] Bertoldi K, Cechinel LR, Schallenger B, et al. Circulating extracellular vesicles in the aging process: impact of aerobic exercise. *Mol Cell Biochem*, 2018, 440: 115-25
- [49] Bei Y, Xu T, Lv D, et al. Exercise-induced circulating extracellular vesicles protect against cardiac ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, 2017, 112: 38
- [50] Chaturvedi P, Kalani A, Medina I, et al. Cardiosome mediated regulation of MMP9 in diabetic heart: role of mir29b and mir455 in exercise. *J Cell Mol Med*, 2015, 19: 2153-61
- [51] Brahmer A, Neuberger E, Esch-Heisser L, et al. Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8: 1615820
- [52] Wu CX, Liu ZF. Proteomic profiling of sweat exosome suggests its involvement in skin immunity. *J Invest Dermatol*, 2018, 138: 89-97
- [53] Annibaldi G, Contarelli S, Lucertini F, et al. Muscle and systemic molecular responses to a single flywheel based iso-inertial training session in resistance-trained men. *Front Physiol*, 2019, 10: 554
- [54] Hou Z, Qin X, Hu Y, et al. Longterm exercise-derived exosomal miR-342-5p: a novel exerkine for cardioprotection. *Circ Res*, 2019, 124: 1386-400
- [55] Estebanez B, Visavadiya NP, De Paz JA, et al. Resistance training diminishes the expression of exosome CD63 protein without modification of plasma miR-146a-5p and cfDNA in the elderly. *Nutrients*, 2021, 13: 665
- [56] Castano C, Mirasierra M, Vallejo M, et al. Delivery of muscle-derived exosomal miRNAs induced by HIIT improves insulin sensitivity through down-regulation of hepatic FoxO1 in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 30335-43
- [57] Oliveira GP Jr, Porto WF, Palu CC, et al. Effects of acute aerobic exercise on rats serum extracellular vesicles diameter, concentration and small RNAs content. *Front Physiol*, 2018, 9: 532
- [58] Guescini M, Canonico B, Lucertini F, et al. Muscle releases α -sarcoglycan positive extracellular vesicles carrying miRNAs in the bloodstream. *PLoS One*, 2015, 10: e0125094
- [59] Xhuti D, Nilsson MI, Manta K, et al. Circulating exosome-like vesicle and skeletal muscle microRNAs are altered with age and resistance training. *J Physiol*, 2023, 601: 5051-73
- [60] Garner RT, Solfest JS, Nie YH, et al. Multivesicular body and exosome pathway responses to acute exercise. *Exp Physiol*, 2020, 105: 511-21
- [61] Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. The ESCRT pathway. *Dev Cell*, 2011, 21: 77-91
- [62] Warnier G, De Groote E, Britto FA, et al. Effects of an acute exercise bout in hypoxia on extracellular vesicle release in healthy and prediabetic subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2022, 322: R112-22
- [63] Yuyama K, Sun H, Mikami D, et al. Lysosomal-associated transmembrane protein 4B regulates ceramide-induced exosome release. *FASEB J*, 2020, 34: 16022-33
- [64] Lauwers E, Wang YC, Gallardo R, et al. Hsp90 mediates membrane deformation and exosome release. *Mol Cell*, 2018, 71: 689-702
- [65] 蔡颖, 徐玉生, 郑璠等. 有氧运动对小鼠心功能及热休克蛋白的影响. *中国医学工程*, 2016, 24: 1-5
- [66] 李爱萍, 崔书强, 徐金成等. 高温环境下急性力竭运动对大鼠心肌HSP70及血浆心钠素的影响. *中国运动医学杂志*, 2010, 29: 188-91
- [67] Liu W, Li L, Kuang H, et al. Proteomic profile of carbonylated proteins screen regulation of apoptosis via CaMK signaling in response to regular aerobic exercise. *Biomed Res Int*, 2018: 2828143
- [68] Chi C, Fu H, Li YH, et al. Exerkine fibronectin type-III domain-containing protein 5/irisin-enriched extracellular vesicles delay vascular ageing by increasing SIRT6 stability. *Eur Heart J*, 2022, 43: 4579-95
- [69] Whitham M, Parker BL, Friedrichsen M, et al. Extracellular vesicles provide a means for tissue crosstalk during exercise. *Cell Metab*, 2018, 27: 237-51
- [70] Garcia NA, Moncayo-Arlandi J, Sepulveda P, et al. Cardiomyocyte exosomes regulate glycolytic flux in endothelium by direct transfer of GLUT transporters and glycolytic enzymes. *Cardiovasc Res*, 2016, 109: 397-408
- [71] Zhao H, Yang L, Baddour J, et al. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *Elife*, 2016, 5: e10250
- [72] Tanaka G, Kato H, Izawa T. Endurance exercise training induces fat depot-specific differences in basal autophagic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466: 512-7
- [73] Trebak JT, Pehmøller C, Kristensen JM, et al. Acute exercise and physiological insulin induce distinct phosphorylation signatures on TBC1D1 and TBC1D4 proteins in human skeletal muscle. *J Physiol*, 2014, 592: 351-75
- [74] Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev*. 2013, 93: 993-1017
- [75] O'Gorman DJ, Karlsson HK, McQuaid S, et al. Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2006, 49: 2983-92
- [76] Kristiansen S, Hargreaves M, Richter EA. Exercise-induced increase in glucose transport, GLUT-4, and VAMP-2 in plasma membrane from human muscle. *Am J Physiol*, 1996, 270: E197-201
- [77] 何袁婕. 持续被动运动对膝关节置换术后老年患者的影响. *中国城乡企业卫生*, 2023, 38: 168-70
- [78] Rose AJ, Jeppesen J, Kiens B, et al. Effects of contraction on localization of GLUT4 and v-SNARE isoforms in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 297: R1228-37
- [79] Yang K, Fan M, Wang X, et al. Lactate promotes macrophage HMGB1 lactylation, acetylation, and exosomal release in polymicrobial sepsis. *Cell Death*

- Differ, 2022, 29: 133-46
- [80] Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*, 2009, 284: 34211-22
- [81] Ban JJ, Lee M, Im W, et al. Low pH increases the yield of exosome isolation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461: 76-9
- [82] Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, et al. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep*, 2013, 5: 1159-68
- [83] 陶胜国. PH值变化对运动能力的影响. *吉林体育学院学报*, 2005: 86-158
- [84] Dorayappan KDP, Wanner R, Wallbillich JJ, et al. Hypoxia-induced exosomes contribute to a more aggressive and chemoresistant ovarian cancer phenotype: a novel mechanism linking STAT3/Rab proteins. *Oncogene*, 2018, 37: 3806-21
- [85] Ramteke A, Ting H, Agarwal C, et al. Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Mol Carcinog*, 2015, 54: 554-65
- [86] Zhang Z, Xu Y, Cao C, et al. Exosomes as a messenger to regulate the crosstalk between macrophages and cardiomyocytes under hypoxia conditions. *J Cell Mol Med*, 2022, 26: 1486-500
- [87] Zhang W, Zhou X, Yao Q, et al. HIF-1-mediated production of exosomes during hypoxia is protective in renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313: F906-13
- [88] Achille A, Derk F, Laura P, et al. Myocardial hypoxic stress mediates functional cardiac extracellular vesicle release. *Eur Heart J*, 2021, 42: 2780-92
- [89] D'Alessio S, Cheng H, Eaton L, et al. Acute hypoxia alters extracellular vesicle signatures and the brain citrullinome of naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 4683
- [90] Wang X, Wu R, Zhai P, et al. Hypoxia promotes EV secretion by impairing lysosomal homeostasis in HNSCC through negative regulation of ATP6V1A by HIF-1 α . *J Extracell Vesicles*, 2023, 12: e12310
- [91] Bister N, Pistono C, Huremagic B, et al. Hypoxia and extracellular vesicles: a review on methods, vesicular cargo and functions. *J Extracell Vesicles*, 2020, 10: e12002
- [92] Liu HT, Pan SS. Late exercise preconditioning promotes autophagy against exhaustive exercise-induced myocardial injury through the activation of the AMPK-mTOR-ULK1 pathway. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5697380
- [93] Yuan JQ, Yuan Y, Pan SS, et al. Altered expression levels of autophagy-associated proteins during exercise preconditioning indicate the involvement of autophagy in cardioprotection against exercise-induced myocardial injury. *J Physiol Sci*, 2020, 70: 10
- [94] Favier FB, Britto FA, Freyssen DG, et al. HIF-1-driven skeletal muscle adaptations to chronic hypoxia: molecular insights into muscle physiology. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 4681-96
- [95] Savina A, Furlán M, Vidal M, et al. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*, 2003, 278: 20083-90
- [96] Li W, Deng M, Loughran PA, et al. LPS induces active HMGB1 release from hepatocytes into exosomes through the coordinated activities of TLR4 and Caspase-11/GSDMD signaling. *Front Immunol*, 2020, 11: 229
- [97] 朱丹. Ca²⁺依赖和Ca²⁺不依赖的囊泡分泌研究进展. *现代生物医学进展*, 2008, 8: 548-50
- [98] Messenger SW, Woo SS, Sun Z, et al. A Ca²⁺-stimulated exosome release pathway in cancer cells is regulated by Munc13-4. *J Cell Biol*, 2018, 217: 2877-90
- [99] Woo SS, James DJ, Martin TF. Munc13-4 functions as a Ca²⁺ sensor for homotypic secretory granule fusion to generate endosomal exocytic vacuoles. *Mol Biol Cell*, 2017, 28: 792-808
- [100] Kim OK, Nam DE, Hahn YS. The pannexin 1/purinergic receptor P2X4 pathway controls the secretion of microRNA-containing exosomes by HCV-infected hepatocytes. *Hepatology*, 2021, 74: 3409-26
- [101] Tawfik B, Martins JS, Houy S, et al. Synaptotagmin-7 places dense-core vesicles at the cell membrane to promote Munc13-2- and Ca²⁺-dependent priming. *Elife*, 2021, 10: e64527
- [102] Skowrya ML, Schlesinger PH, Naismith TV, et al. Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science*, 2018, 360: eaar5078
- [103] Kuo IY, Ehrlich BE. Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7: a006023
- [104] Stølen TO, Høydal MA, Ahmed MS, et al. Exercise training reveals micro-RNAs associated with improved cardiac function and electrophysiology in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 148: 106-19
- [105] Matsunaga S, Yamada T, Mishima T, et al. Effect of high intensity training and acute exercise on *in vitro* function of rat sarcoplasmic reticulum. *Eur J Appl Physiol* 2007, 99: 641-9
- [106] Mitani F, Lin J, Sakamoto T, et al. Asteltxin inhibits extracellular vesicle production through AMPK/mTOR-mediated activation of lysosome function. *Sci Rep*, 2022, 12: 6674
- [107] Wei Y, Tang X, Ren Y, et al. An RNA-RNA crosstalk network involving HMGB1 and RICTOR facilitates hepatocellular carcinoma tumorigenesis by promoting glutamine metabolism and impedes immunotherapy by PD-L1⁺ exosomes activity. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 421
- [108] Zou W, Lai M, Zhang Y, et al. Exosome release is regulated by mTORC1. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6: 1801313
- [109] Watson K, Baar K. mTOR and the health benefits of exercise. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 130-9
- [110] Levitt DE, Luk HY, Vingren JL. Alcohol, resistance exercise, and mTOR pathway signaling: an evidence-based narrative review. *Biomolecules*, 2022, 13: 2
- [111] Cha DJ, Franklin JL, Dou Y, et al. KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *Elife*, 2015, 4: e07197

- [112] Datta A, Kim H, Lal M, et al. Manumycin A suppresses exosome biogenesis and secretion via targeted inhibition of Ras/Raf/ERK1/2 signaling and hnRNP H1 in castration-resistant prostate cancer cells. *Cancer Lett*, 2017, 408: 73-81
- [113] Demory Beckler M, Higginbotham JN, Franklin JL, et al. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12: 343-55
- [114] Fan M, Sun W, Gu X, et al. The critical role of STAT3 in biogenesis of tumor-derived exosomes with potency of inducing cancer cachexia *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*, 2022, 41: 1050-62
- [115] Verweij FJ, Bebelman MP, Jimenez CR, et al. Quantifying exosome secretion from single cells reveals a modulatory role for GPCR signaling. *J Cell Biol*, 2018, 217: 1129-42
- [116] Im EJ, Lee CH, Moon PG, et al. Sulfisoxazole inhibits the secretion of small extracellular vesicles by targeting the endothelin receptor A. *Nat Commun*, 2019, 10: 1387
- [117] 李博文, 田蕾, 冯丽丽, 等. 全身振动训练和高强度间歇运动上调MGF/MEK/ERK对心梗大鼠心功能和骨骼肌的保护作用. *中国体育科技*, 2023, 59: 58-66
- [118] Sun XJ, Feng WL, Hou N. The role of JAK2/STAT3 signaling pathway in exercise preconditioning against myocardial apoptosis. *Chi J Appl Physiol*, 2017, 33: 393-97
- [119] Morland C, Lauritzen KH, Puchades M, et al. The lactate receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: expression and action in brain. *J Neurosci Res*, 2015, 93: 1045-55