

# 细胞外囊泡在慢性阻塞性肺疾病中的作用\*

陈 圳 苏薇薇 王永刚 李沛波<sup>△</sup>

(中山大学生命科学学院 广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心/  
广东省热带亚热带植物资源重点实验室, 广州 510275)

**摘要** 慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以不完全可逆性气流受限为特征的慢性呼吸系统疾病,其高发病率和高致死率严重威胁着人类的健康。细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一种包裹着生物活性分子的膜性囊泡,作为一种细胞间的新型通讯工具, EVs 通过其携带的活性分子参与并调控 COPD 的发生发展。本文对 EVs 在 COPD 病理进程方面的作用作一综述,以期对 COPD 的深入研究提供参考。

**关键词** 细胞外囊泡;慢性阻塞性肺疾病;病理机制

**中图分类号** R563

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种严重危害人体健康的多因素疾病,特征表现为不完全可逆性气流受限和持续性呼吸道症状,其核心发病机制为气道和肺实质的持续性炎症,进而引发肺泡结构性破坏和小气道的重塑与变窄。随着吸烟人数的增加和大气污染的加重,其高致残率和高致死率严重威胁着人类的健康与生命。虽然关于 COPD 的研究非常深入,但其确切的发病机制仍未被完全阐明。COPD 全球倡议组织(GOLD)的国际治疗指南提出, COPD 将在 2020 年成为全球第三大致死疾病<sup>[1]</sup>。我国 20 岁以上人群 COPD 患病率为 8.6%, 40 岁以上的人群患病率则超过 13.7%, 总患病人数接近一亿<sup>[2]</sup>。由于 COPD 发病机制的复杂性,目前尚缺乏安全、有效的治疗方法。

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一类内含蛋白质、脂质、核酸等生物活性分子的膜囊泡,能够携带内容物并从供体细胞转运至受体细胞,目前被广泛认为是机体内一种新型的细胞间通讯工具,在多种疾病的发生发展中扮演着重要角色<sup>[3]</sup>。随着生物信息学的发展,各类组学研究逐渐成为生命科学研究领域的重要工具,通过组学分析 EVs 中的组分(尤其是 RNA)在不同微环境下的差异性表达已成为研究热点之一。因此,考察 EVs 参与 COPD 的调控,为阐明 COPD 的发病机制及提供防治手段带来新的思路。

## 一、慢性阻塞性肺疾病

COPD 的第一大病理特征表现为气道和肺实质

的慢性炎症,持续性的炎症进而导致气道的重塑及变窄,尤其是以小气道的纤维化增厚及肺气肿的发生为主,这直接导致了患者气流受限甚至呼吸困难<sup>[4]</sup>。呼吸道气流受限会增加有毒颗粒物或病原微生物滞留于气道的风险,进而不断激活呼吸系统内多种细胞的模式识别受体(PRRs),如在肺泡巨噬细胞、树突状细胞和上皮细胞中均存在 Toll 样受体,这些 PRRs 作为非特异性免疫和特异性免疫的桥梁,可以识别突破机体屏障的病原体或异物并产生免疫应答。此外,被吸入的有毒颗粒物还会诱导结构性细胞的凋亡并激活高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)等损伤相关分子模式,进而激活 PRRs 并诱发炎症反应。PRRs 的持续性激活会导致中性粒细胞和巨噬细胞的数量激增并聚集在损伤部位,进而诱发氧化应激反应并产生多种炎症介质(如趋化因子、蛋白酶、炎性小体等),加剧呼吸道和肺实质的炎症反应<sup>[5]</sup>。

COPD 的第二大病理特征表现为氧化应激反应激活。氧化应激是指机体的氧化/抗氧化平衡失调的一种状态,机体产生大量活性氧(ROS),进而导致中性粒细胞炎性浸润、DNA 分子的损伤、蛋白质变性、脂质过氧化、细胞周期的阻滞等。炎症反应和氧化应激相互影响、相互促进,一方面,炎症细胞在损伤部位的聚集会持续性释放 ROS,参与氧化应

\* 国家自然科学基金(81374041);广东省应用型科技研发专项(2016B020239003)资助课题

<sup>△</sup>通信作者 lipb73@126.com

激;另一方面,氧化应激反应可以活化核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B),使得炎症细胞因子相关基因表达增强,加速炎症反应的发展<sup>[6]</sup>。因此,慢性炎症和氧化应激不仅仅是 COPD 的核心发病机制,也是防治 COPD 的关键性环节。近年来,尽管多种针对 COPD 的治疗方法均显示出一定的疗效,但由于 COPD 患者的异质性和发病机制的复杂性,目前临床上仍缺乏有效根治 COPD 的药物或方法。因此,迫切需要阐明 COPD 的发病机制,并探索新的防治策略。

## 二、细胞外囊泡

EVs 是指从细胞膜上脱落的双层膜纳米级囊泡,直径从 30 nm 到 1000 nm 不等,内含多种生物活性大分子,能够通过靶细胞受体识别或者与细胞膜融合的形式介导细胞间的信号传递过程。当外界条件介质发生变化时,EVs 的组分往往出现差异性表达以完成应激反应,因此 EVs 在细胞应对各种刺激和病理反应中可发挥重要作用。

根据 EVs 的生物来源、性质及功能通常将其分为三大类:外泌体、微囊泡和凋亡小体。外泌体是目前报道最多的一类囊泡,2013 年诺贝尔生理学或医学奖授予了发现细胞囊泡运输调控机制的三位科学家,将外泌体的关注度推向了新的高峰。外泌体的直径在 30nm~200nm 之间,细胞膜将目标物内吞后形成早期内吞体,后者逐渐成熟并向胞内出芽形成多泡体,多泡体与细胞质膜融合后向外释放形成外泌体<sup>[7]</sup>。微囊泡和凋亡小体的生物发生过程相对简单,主要是由细胞质膜直接出芽形成。

高纯度的 EVs 是对其进行蛋白质组学、基因组学、脂质组学分析及应用于临床诊疗的前提。目前已有多种 EVs 分离方法,包括超速离心(UC)法、超滤法、凝胶过滤层析(SEC)法、聚合物沉降法、免疫亲和捕获法和微流体法等。An 等(2018)比较了 3 种分离人类血清 EVs 的方法,结果表明优化后的 UC 法更适用于 EVs 的蛋白质组学研究,SEC 法则更适用于 EVs 的 RNA 组学研究。Tian 等(2020)使用了 6 种方法分离人血浆中的 EVs 并对分离结果进行了评估,结果表明 UC 法分离得到的 EVs 的纯度和质量都显著优于其他方法。国际细胞外囊泡协会也曾表明,目前尚缺乏统一的 EVs 分离方法“金标准”,并提示研究者们应该根据所提出的科学问题以及 EVs 的下游实验目的选取最适的分离方法。

## 三、细胞外囊泡在 COPD 病理进展中的作用

### (一)上皮细胞来源的 EVs 吸烟是导致 COPD

的主要危险因素。当机体暴露于香烟烟雾等有害刺激时,支气管上皮细胞最先受损,损伤的上皮细胞将进一步影响其周围的其他类型细胞。成纤维细胞作为支气管上皮细胞的“近邻”,在 COPD 气道重塑中会出现偏向肌成纤维细胞定向分化的表型,因此研究两种细胞之间的互作成为探索 COPD 气道重塑发病机制的策略之一。Fujita 等<sup>[8]</sup>发现,香烟烟雾提取物(CSE)可上调人支气管上皮细胞来源的外泌体中 miR-210 水平,上调的 miR-210 与肺成纤维细胞(LFs)中的自噬相关蛋白 7(ATG7)水平呈负相关性,ATG7 的下调导致了 LFs 自噬能力的缺失,并诱导 LFs 向肌成纤维细胞分化,因此促进了 COPD 气道重塑的发展。此外,Xu 等<sup>[9]</sup>的研究表明,CSE 可上调人支气管上皮细胞来源的外泌体中 miR-21 表达水平,上调的 miR-21 通过 pVHL/HIF-1 $\alpha$  信号通路诱导  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和 II 型胶原蛋白(collagen II)的表达,进而促进人肺成纤维细胞向肌成纤维细胞定向分化,加速气道重塑的发展。这些研究结果提示,CSE 能通过修饰外泌体的组分并导致支气管上皮细胞与成纤维细胞间的异常互作,使得成纤维细胞大量定向分化,进而产生气道重塑等病理特征。

CCN 蛋白家族 1(CCN1)是一种分泌性基质蛋白,广泛表达于多种组织细胞和胞外基质中。Moon 等<sup>[10]</sup>的研究表明,CSE 刺激会导致支气管上皮细胞来源的外泌体中全长 CCN1(hCCN1)表达增加,并诱导白细胞介素 8(IL-8)的释放及中性粒细胞的募集进而促进慢性炎症的发展。进一步研究发现,fl-CCN1 的裂解形式 cCCN1 与整合素- $\alpha$ 7 互作并使肺上皮细胞中基质金属蛋白酶-1(MMP-1)表达增加,高水平的 MMP-1 可加速细胞外基质的降解进而破坏肺泡结构以促进肺气肿的发展。此外,Du 等<sup>[11]</sup>的临床研究表明,与从未吸烟的健康人相比,COPD 患者支气管上皮细胞来源的外泌体中 miR-181c 水平显著降低,而 miR-181c 的直接靶标物 CCN1 的水平显著增加。而在 COPD 的细胞和小鼠模型中,过表达 miR-181c 能够使 CCN1 水平降低并抑制中性粒细胞浸润和 ROS 的生成,延缓 COPD 的发展。可见,CCN1 在气道上皮经外泌体介导 COPD 炎症反应中扮演着重要角色,可能成为防治 COPD 的重要靶点之一。

上皮细胞间质转化(EMT)是细胞塑形的一种过程,表现为上皮细胞失去极性,细胞骨架重建,细胞变成纺锤体形态,获得间质细胞标记物,并且细胞

的黏附能力减弱、增殖和迁移能力增强。EMT 的过度激活可导致气道壁的纤维化和增厚,在 COPD 气道重塑中发挥重要作用。He 等<sup>[12]</sup>发现 CSE 刺激会下调支气管上皮细胞来源的 EVs 中的 miR-21 水平,进而抑制巨噬细胞向 M2 型极化,最终延缓支气管上皮细胞自身的 EMT 过程以减慢 COPD 的发展,揭示了在 COPD 病理进程中一种新的代偿机制。

(二)炎症细胞来源的 EVs 炎症细胞包括淋巴细胞、浆细胞、粒细胞(嗜酸、嗜碱性、中性)和单核细胞。巨噬细胞源自单核细胞,是 COPD 炎症反应中的主要效应细胞,具有趋化性运动、吞噬、分泌和抗原呈递等作用<sup>[13]</sup>。Li 等<sup>[14]</sup>发现,CSE 处理可增强巨噬细胞来源的 EVs 的明胶和胶原水解活性,并上调巨噬细胞中基质金属蛋白酶-14(MMP-14)水平,促进肺气肿的发展。此外,CSE 还可通过细胞内钙动员活化单核细胞,并促进巨噬细胞来源的携带 IL-8、细胞间粘附分子-1(CAM-1)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的 EVs 的释放<sup>[15]</sup>。这些研究结果提示巨噬细胞可能通过释放 EVs 参与并调控 COPD 的炎症及组织损伤过程。

中性粒细胞(PMN)大约占白细胞的 60%,当机体被感染时,PMN 同巨噬细胞一样发挥防御、吞噬病原体的作用。Genschmer 等<sup>[16]</sup>的研究表明,来自 COPD 患者的活化的 PMN 分泌的外泌体可以作为一种新的致病实体,其表面覆盖着细胞弹性蛋白酶(NE)和可以识别胶原蛋白的整合素 Mac-1,可以有效结合并降解细胞外基质的主要组分,将其灌注到小鼠肺部后会导致肺部损伤(肺泡结构破坏)并引发肺气肿。该研究提示,通过干扰活化的 PMN 分泌外泌体或阻断外泌体与细胞外基质组分的结合或许可以延缓 COPD 的发展。

(三)内皮细胞来源的 EVs 内皮细胞主要分布在血管的内表面,形成了血管和血液的交界面,具有维持血管内环境稳态的作用。内皮细胞在激活或凋亡时,细胞膜会以出芽的形式释放内皮细胞微颗粒(EMPs)进入血液循环,EMPs 具有内皮细胞表面膜蛋白和细胞浆成分,在炎症反应和血管生成等方面发挥重要作用,因此 EMPs 被认为是评判内皮功能障碍性疾病(血栓性疾病、炎症性疾病)的新型标志物<sup>[17]</sup>。Takahashi 等(2012)的临床研究结果表明,与健康人相比,COPD 患者的 EMPs CD144<sup>+</sup>、CD31<sup>+</sup>和 CD62E<sup>+</sup>表达会显著升高。此外,Tökés-Füzesi 等(2018)发现,与不吸烟的健康人相比,

COPD 患者的循环 EMPs 数量显著增加,并与该疾病的炎症水平和急性加重相关。Strulovici 等<sup>[18]</sup>的研究也表明,吸烟会升高机体的循环 EMPs 水平,这一变化在戒烟的健康吸烟者中是可逆的,但 COPD 患者即使是戒烟后,循环 EMPs 水平仍未明显下降,可见,肺毛细血管内皮细胞可能通过 EVs 的介导在 COPD 病理进展中发挥了重要作用。

$\alpha$ 1-抗胰蛋白酶( $\alpha$ 1-AT)是一种蛋白酶抑制剂,主要由肝细胞分泌进入血液循环并抑制中性粒细胞弹性蛋白酶、胰蛋白酶的水解活性,可保护细胞不受蛋白酶的破坏,进而抑制炎症反应的发生。COPD 患者常表现有肺部细胞外基质降解、肺部结构破坏甚至是肺气肿,因此  $\alpha$ 1-AT 的缺乏可能是 COPD 进展的重要因素之一。Lockett 等<sup>[19]</sup>的研究发现,在生理状态下,肺微血管内皮细胞会通过释放 EVs 将  $\alpha$ 1-AT 转运至肺泡上皮细胞,然而,CSE 刺激可显著减少肺微血管内皮细胞分泌携带  $\alpha$ 1-AT 的 EVs 数量,有效阻断内皮细胞向上皮细胞运输  $\alpha$ 1-AT,提示 CSE 可通过调控肺微血管内皮细胞来源的 EVs 并导致上皮细胞中  $\alpha$ 1-AT 水平的降低,进而激活蛋白酶的水解活性并促进 COPD 的发展。

(四)其他来源的 EVs 血浆/血清是动物模型及人体样本的 EVs 最主要来源之一。Sundar 等<sup>[20]</sup>通过 miRNA 组学分析发现,与不吸烟者或吸烟但不患 COPD 者相比,COPD 患者血浆来源的 EVs 中 miR-22-3p、miR-99a-5p、miR-151a-5p、miR-320b 和 miR-320d 水平显著上升,而 miR-335-5p、miR-628-3p、miR-887-5p 和 miR-937-3p 水平显著下降,提示 EVs 中 miRNAs 的差异性表达可能有助于 COPD 的临床诊断。此外,Feller 等<sup>[21]</sup>发现,COPD 患者血清来源的 EVs 的 Wnt5a 配体、白细胞介素 6(IL-6)和 IL-8 表达增加,这些物质由 EVs 包裹并运输至 COPD 患者的各个器官,可能引发患者产生系统性炎症反应。

准确评估 COPD 的病程分级对于选择合适的治疗手段十分重要。COPD 急性加重(AECOPD)是指与 COPD 稳定期相比,患者呼吸困难、咳嗽超过日常状态,需要调整治疗策略。Jung 等<sup>[22]</sup>发现,血浆来源的 EVs 中 CD45 和 CD28 蛋白水平在社区获得性肺炎和 AECOPD 患者中有显著性差异的表达,这为 COPD 的鉴别提供了参考。Tan 等<sup>[23]</sup>比较了 AECOPD 患者和健康人血浆来源的外泌体中炎症标志物的表达情况,结果表明,AECOPD 患者中的外泌体数量、C-反应蛋白(CRP)、可溶性肿瘤坏死

因子受体 1(sTNFR1)和 IL-6 水平都明显高于健康人。此外,GOLD 的国际治疗指南将 COPD 病情严重程度分为 A、B、C、D 四个等级,其中 A 级患者病情最轻,D 级患者病情最严重,但尚无有效的方法以评估并区分 B 级和 C 级的患者。Carpi 等<sup>[24]</sup>分析了 COPD 患者血浆来源 EVs 中横纹肌特异性 miRNAs 的表达差异性,结果表明 miR-206、miR-133a-5p 和 miR-133a-3p 在 B 级患者中显著上调,并可应用于区分 B 级和其他 COPD 患者的诊断中。这些研究结果提示,EVs 可能成为 COPD 病程评估的重要标志物。

支气管肺泡灌洗(BAL)是一种采用生理盐水注入支气管肺部,然后吸出得到支气管肺泡灌洗液(BALF)的方法。BALF 中含有大量的肺内免疫效应细胞,因此,BAL 是研究动物或人体肺部病理变化的常用方法之一。Hélio 等<sup>[25]</sup>发现,与不吸烟者相比,吸烟者 BALF 来源的 EVs 的 let-7e、let-7g、miR-26b 表达显著降低,EVs 可进一步导致支气管上皮细胞的 miRNAs 差异性表达,并诱导其释放 IL-6 和 IL-8,该研究提示 BALF 来源的 EVs 在 COPD 患者的呼吸系统中也发挥着信息传递作用。此外,还有研究表明室内扬尘中细菌来源的 EVs 与肺部疾病相关。Kim 等<sup>[26,27]</sup>发现,被机体吸入的金黄色葡萄球菌会释放 EVs 并激活 Toll 样受体 2 (TLR2)信号,诱导机体产生干扰素和白细胞介素 17(IL-17),进而引发中性粒细胞浸润及肺部炎症。另外,被吸入的大肠杆菌也会通过释放 EVs 并激活 Toll 样受体 4(TLR4)信号,进而引发肺部中性粒细胞浸润甚至是肺气肿,这些研究结果提示细菌源性的 EVs 可能参与并调控 COPD 等肺部疾病的发生发展。

#### 四、结语与展望

COPD 是一种复杂慢性疾病,其发病机制涉及多种生物分子和信号通路,EVs 是重要的参与者之一。近年来,随着第三代高通量测序技术的发展,EVs 在 COPD 发病机制中的作用也逐渐被阐明,将其应用于 COPD 的诊断及治疗将会成为研究热点。EVs 不仅是细胞间通讯的天然工具,而且它与细胞较好的生物相容性也使其可以用于克服药物转运屏障。Agrawal 等(2017)发现,口服载有紫杉醇的牛奶来源的 EVs 可显著抑制肺癌小鼠的肿瘤生长,抑制率达到 60%,而口服相同剂量的紫杉醇则无显著抑制作用。此外,Haney 等(2019)的研究也表明,将巨噬细胞来源的 EVs 构建化疗药物(紫杉醇或阿

霉素)的递送载体导入肺癌小鼠模型中可发挥显著抗癌活性。这些研究结果提示 EVs 具有作为药物运输载体以治疗 COPD 的潜力。

Tsukasa 等<sup>[28]</sup>和 O'Farrell 等<sup>[29]</sup>的研究指出,EVs 用于 COPD 的治疗至少可以有两种策略:(1)抑制 EVs 在 COPD 病理进程中发挥细胞间通讯作用,可通过抑制 EVs 的释放、定向捕获循环中的 EVs 及干扰受体细胞摄取 EVs 等方法实现;(2)将 EVs 应用于肺再生和免疫调节剂。Broekman 等(2018)、Mohammadipoor 等(2018)和 Bari 等(2020)的研究表明,间充质干细胞(MSCs)来源的 EVs 具有抗炎和促进组织再生等作用,且已应用于防治 COPD 的临床前研究。然而,EVs 应用于 COPD 的临床诊疗中仍有许多问题亟待解决,如,由于 EVs 的尺寸和种群异质性以及体液或细胞培养基中存在大量的干扰性非囊泡成分(可溶性蛋白、细胞碎片颗粒等),目前仍缺乏快速有效地获取高纯度 EVs 的分离技术<sup>[30]</sup>。随着基础研究与临床应用的不断深入及紧密结合,将 EVs 应用于 COPD 的诊断和治疗将具有广阔的前景。

#### 参 考 文 献

- 1 Sing D, Agusti A, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention for chronic obstructive lung disease; the GOLD science committee report 2019. *Eur Respir J*, 2019, 53 : 1900164.
- 2 Wang C, Xu J, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study. *Lancet*, 2018, 391 : 1706~1717.
- 3 Mohan A, Agarwal S, Clauss M, et al. Extracellular vesicles: novel communicators in lung diseases. *Respir Res*, 2020, 21 : 175~196.
- 4 Peter J, Barnes. Small airway fibrosis in COPD. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 116 : 105598.
- 5 Brandsma CA, van den Berge M, Hackett TL, et al. Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: from disease mechanisms to precision medicine. *J Pathol*, 2019, 250 : 624~635.
- 6 Barnes PJ. Oxidative stress-based therapeutics in COPD. *Redox Biol*, 2020, 33 : 101544.
- 7 Fernandes M, Lopes I, Teixeira J, et al. Exosome-like nanoparticles: a new type of nanocarrier. *Curr Med Chem*, 2020, 27 : 3888~3905.
- 8 Fujita Y, Araya J, Ito S, et al. Suppression of autoph-

- agy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4 : 28388.
- 9 Xu H, Ling M, Xue J, et al. Exosomal microRNA-21 derived from bronchial epithelial cells is involved in aberrant epithelium-fibroblast cross-talk in COPD induced by cigarette smoking. *Theranostics*, 2018, 8 : 5419~5433.
  - 10 Moon HG, Kim SH, Gao J, et al. CCN1 secretion and cleavage regulate the lung epithelial cell functions after cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307 : 326~337.
  - 11 Du Y, Ding Y, Chen X, et al. MicroRNA-181c inhibits cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease by regulating CCN1 expression. *Resp Res*, 2017, 18 : 155~163.
  - 12 He SY, Chen DN, Hu MY, et al. Bronchial epithelial cell extracellular vesicles ameliorate epithelial-mesenchymal transition in COPD pathogenesis by alleviating M2 macrophage polarization. *Nanomed-Nanotechnol*, 2019, 18 : 259~271.
  - 13 Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clin Sci*, 2017, 131 : 1541~1558.
  - 14 Li CJ, Liu Y, Chen Y, et al. Novel proteolytic microvesicles released from human macrophages after exposure to tobacco smoke. *Am J Pathol*, 2013, 182 : 1552~1562.
  - 15 Cordazzo C, Petrini S, Neri T, et al. Rapid shedding of proinflammatory microparticles by human mononuclear cells exposed to cigarette smoke is dependent on Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Inflamm Res*, 2014, 63 : 539~547.
  - 16 Genschmer KR, Russell DW, Lal C, et al. Activated PMN exosomes: pathogenic entities causing matrix destruction and disease in the lung. *Cell*, 2019, 176 : 113~122.
  - 17 Krajewska-Włodarczyk M, Owczarczyk-Saczonek A, Zuber Z, et al. Role of microparticles in the pathogenesis of inflammatory joint diseases. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 : 5453~5468.
  - 18 Strulovici BY, Staudt MR, Krause A, et al. Persistence of circulating endothelial microparticles in COPD despite smoking cessation. *Thorax*, 2016, 71 : 1137~1144.
  - 19 Lockett AD, Brown MB, Santos-Falcon N, et al. Active trafficking of alpha 1 antitrypsin across the lung endothelium. *Plos One*, 2014, 9 : e93979.
  - 20 Sundar IK, Li D, Rahman I. Small RNA-sequence analysis of plasma-derived extracellular vesicle miRNAs in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease as circulating biomarkers. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8 : 1684816.
  - 21 Feller D, Kun J, Ruzsics I, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation becomes systemic by circulating extracellular vesicles containing Wnt5a and inflammatory cytokines. *Front Immunol*, 2018, 9 : 1724~1733.
  - 22 Jung AL, Moller Jorgensen M, Bæk R, et al. Surface proteome of plasma extracellular vesicles as biomarkers for pneumonia and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis*, 2020, 221 : 325~335.
  - 23 Tan DBA, Armitage J, Teo TH, et al. Elevated levels of circulating exosome in COPD patients are associated with systemic inflammation. *Respir Med*, 2017, 132 : 261~264.
  - 24 Carpi S, Polini B, Nieri D, et al. Expression analysis of muscle-specific mirnas in plasma-derived extracellular vesicles from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10 : 502~513.
  - 25 Héliot A, Landkocz Y, Roy Saint-Georges F, et al. Smoker extracellular vesicles influence status of human bronchial epithelial cells. *Int J Hyg Envir Heal*, 2017, 220 : 445~454.
  - 26 Kim YS, Choi EJ, Lee WH, et al. Extracellular vesicles, especially derived from Gram-negative bacteria, in indoor dust induce neutrophilic pulmonary inflammation associated with both Th1 and Th17 cell responses. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43 : 443~454.
  - 27 Kim YS, Lee WH, Choi EJ, et al. Extracellular vesicles derived from Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, induce emphysema mainly via IL-17A-mediated neutrophilic inflammation. *J Immunol*, 2015, 194 : 3361~3368.
  - 28 Tsukasa K, Yu F, Yusuke Y, et al. Extracellular vesicles in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 : 1801~1810.
  - 29 OFarrell HE, Yang IA. Extracellular vesicles in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Thorac Dis*, 2019, 11 : S2141~S2154.
  - 30 Gandham S, Su X, Wood J, et al. Technologies and standardization in research on extracellular vesicles. *Trends Biotechnol*, 2020, PMID : 32564882.