

本文引用:石卓林,杨晓花,袁晓梅.特发性肺纤维化患者血清外泌体 microRNA 表达谱的变化及临床意义[J].

新乡医学院学报, 2022, 39(5): 481-485. DOI: 10.7683/xxvxyxb.2022.05.016.

### 【临床研究】

## 特发性肺纤维化患者血清外泌体 microRNA 表达谱的变化及临床意义

石卓林<sup>1</sup>, 杨晓花<sup>2</sup>, 袁晓梅<sup>2</sup>

(1. 新乡医学院第一附属医院全科医学, 河南 卫辉 453100; 2. 新乡医学院第一附属医院呼吸内科, 河南 卫辉 453100)

**摘要:** **目的** 探讨特发性肺纤维化(IPF)患者血清外泌体 microRNA 表达谱的变化及其临床意义。**方法** 选择 2019 年 1 月至 2021 年 1 月就诊于新乡医学院第一附属医院的 24 例初诊 IPF 患者作为 IPF 组,另选择 24 名年龄、性别与 IPF 组匹配的健康体检者为对照组。应用肺功能检测仪检测 2 组受试者肺总量(TLC)、第 1 秒用力呼气容积占预计值百分比(FEV<sub>1</sub>% pred)、一氧化碳弥散量占预计值百分比(DLCO% pred)等肺功能指标。分离提取 2 组受试者血清外泌体进行 microRNA 高通量测序。分析 IPF 患者外泌体 microRNA 表达谱变化及其与肺功能的相关性。**结果** IPF 组患者的 TLC、FEV<sub>1</sub>% pred、DLCO% pred 均显著低于对照组( $P < 0.05$ )。2 组受试者间共有 168 种差异表达的 microRNA,其中 3 种 microRNA(miR-1-3p、miR-99a-5p、miR-411-5p)涉及磷脂酰肌醇激酶/丝氨酸/苏氨酸激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路且与 IPF 患者 DLCO% pred 呈正相关( $r = 0.575, 0.617, 0.825, P < 0.05$ )。**结论** IPF 患者血清外泌体 microRNA 表达谱与健康人群相比发生变化,异常表达的外泌体 microRNA 可能通过活化 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与 IPF 的发生。

**关键词:** 特发性肺纤维化;外泌体;微 RNA;高通量测序

中图分类号: R563 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2022)05-0481-05

## Changes and clinical significance of serum exosomal microRNA expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis

SHI Zhuolin<sup>1</sup>, YANG Xiaohua<sup>2</sup>, YUAN Xiaomei<sup>2</sup>

(1. Department of General Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China; 2. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China)

**Abstract: Objective** To investigate the changes of serum exosomes microRNAs expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and its clinical significance. **Methods** Twenty-four preliminary diagnosis of IPF patients admitted to the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University from January 2019 to January 2021 were selected as the IPF group, and 24 healthy physical examiners matched with the IPF group in the age and sexual were selected as the control group. The total lung capacity (TLC), the forced expiratory volume in one second/predict value ( $FEV_1\%$  pred) and the carbon monoxide diffusing capacity/predict value (DLCO% pred) of subjects in the two groups were measured by pulmonary function tester. Serum exosomes of subjects in the two groups were isolated and extracted for microRNAs high-throughput sequencing. The changes of microRNAs expression in exosomes of IPD patients and its correlation with lung function were analyzed. **Results** The TLC,  $FEV_1\%$  pred and DLCO% pred of patients in the IPF group were lower than those in the control group ( $P < 0.05$ ). There were 168 differentially expressed microRNAs in exosomes of subjects between the two groups. Among them, three microRNAs (miR-1-3p, miR-99a-5p, and miR-411-5p) involved in phosphatidylinositol-3-kinase/Akt / mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway, and the three microRNAs were positively correlated with DLCO% pred ( $r = 0.575, 0.617, 0.825; P < 0.05$ ). **Conclusion** Compared with the health people, the expression of microRNAs in serum exosomes of IPF patients is changed. The abnormally expressed microRNAs in exosomes may be involved in the occurrence of IPF by activating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

**Key words:** idiopathic pulmonary fibrosis; exosomes; microRNA; high-throughput sequencing

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)

是一种慢性、进行性呼吸系统疾病,临床表现以呼吸困难、肺功能逐渐恶化,病理变化以肺泡上皮细胞损伤、成纤维细胞过度增殖、肺泡结构破坏为主要特征<sup>[1-2]</sup>。IPF 的发病机制目前尚不明确,临床尚无理想的治疗手段,患者预后较差,多进展为呼吸衰竭<sup>[3]</sup>。对 IPF 发病机制的深入研究,有望实现早期

DOI:10.7683/xxvxxxb.2022.05.016

收稿日期:2021-04-26

**作者简介:**石卓林(1984-),女,河南卫辉人,学士,副主任医师,研究方向:慢性气道疾病的发病机制。

**通信作者:**袁晓梅(1973-),女,河南卫辉人,博士,主任医师,研究方向:慢性气道疾病的临床与基础研究;E-mail:y13653733617@sina.com。

干预,进而改善临床治疗效果。

外泌体是一类直径 80 ~ 100 nm 的磷脂膜包被囊泡,内含蛋白质、脂质、DNA、RNA 等多种物质,广泛存在于机体血液、唾液、尿液、脑脊液、羊水等体液中<sup>[4]</sup>。外泌体 microRNAs 表达谱受到外界环境刺激、疾病状态不同产生相应变化,外泌体 microRNA 被认为是细胞间信息传递的“信使”,参与机体功能调控。外泌体 microRNA 在肿瘤、代谢性疾病、自身免疫性疾病、神经系统疾病等发生发展中起到了明确的作用<sup>[5-7]</sup>。本研究应用高通量测序技术,对比了健康人群与 IPF 患者血清外泌体 microRNA 表达谱的差异,旨在探讨 IPF 发生的可能机制及 IPF 干预的新靶点。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2019 年 1 月至 2021 年 1 月就诊于新乡医学院第一附属医院呼吸内科的 24 例初诊 IPF 患者作为 IPF 组,其中男 13 例,女 11 例;年龄 47 ~ 69 (59.79 ± 5.99) 岁,有吸烟史者 9 例。病例纳入标准:(1)符合 2016 年《特发性肺纤维化诊断和治疗中国专家共识》中 IPF 诊断标准<sup>[8]</sup>;(2)首次确诊的 IPF 患者;(3)年龄 18 ~ 70 岁;(4)临床资料完整。另选择同期健康体检者 24 名为对照组,其中男 10 例,女 14 例;年龄 47 ~ 70 (57.83 ± 6.72) 岁,有吸烟史者 5 例。对照组纳入标准:(1)既往体健,入组时未合并临床明确诊断的急慢性疾病;(2)年龄 18 ~ 70 岁;(3)临床资料完整。IPF 组及对照组均排除患有严重心脏疾病、感染、肝肾疾病、血液系统疾病、自身免疫性疾病、糖尿病、肿瘤等疾病者。2 组研究对象性别、年龄、吸烟史比例比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。所有研究对象签署知情同意书,本研究经新乡医学院第一附属医院伦理委员会审核批准。

## 1.2 方法

**1.2.1 2 组受试者肺功能相关指标检测** 分别于 IPF 患者入院后第 2 天、对照组受试者体检日使用肺功能检测仪器(德国 Cortex Matamax 3B)进行肺功能相关指标检测。受试者戴上呼吸面罩后,先用嘴巴正常呼吸 3 ~ 5 次,待测试界面中呼吸曲线趋于稳定后,受试者深吸一口气,然后快速吐气,吐气时间根据设备界面提示,连续 2 次满足要求即为完成,记录受试者肺总量(total lung capacity, TLC)、第 1 秒用力呼气容积占预计值百分比(forced expiratory

volume in one second/predict value, FEV<sub>1</sub>% pred)、一氧化碳弥散量占预计值百分比(carbon mon-oxide diffusing capacity /predict value, DLCO% pred)。

**1.2.2 血清外泌体分离提取及鉴定** 于清晨空腹状态下采集 2 组受试者静脉血 15 mL,于 4 ℃ 下 3 000 × *g* 离心 10 min,分离血清;将上清液移入 50 mL 离心管,放入高速离心机中,12 000 × *g* 离心 45 min 去除细胞碎片及细胞器成分;取上清液,再次放入高速离心机,110 000 × *g* 离心 2 h,弃上清保留沉淀物;用 1 mL 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)将沉淀物重悬,经 0.22 μm 无菌滤器过滤后移入 50 mL 离心管中;110 000 × *g* 再次离心 70 min,弃上清,得到的沉淀即为提纯后的外泌体。用 200 μL PBS 将沉淀重悬后置于 -80 ℃ 冰箱保存。使用透射电镜鉴定分离出的外泌体形态。

**1.2.3 外泌体 microRNA 的提取及 cDNA 文库构建** 采用 TRIzol 法提取外泌体总 RNA。提取出的总 RNA 使用锐博公司 microRNA 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒进行反转录构建 cDNA 文库。

**1.2.4 microRNA 测序及生物信息学分析** 构建好的 cDNA 文库由广州锐博生物公司使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus RT-PCR 系统进行质控。通过质控后的样本借助公司 Illumina HiSeq™ 2500 高通量测序平台进行测序。应用 Target Scan 7.0、miRDB 及 miRanda 软件预测靶基因,对靶基因进行京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路注释。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 22.0 及 R 语言软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,2 组间比较采用 *t* 检验,不符合正态分布的计量资料以中位数和四分位数即 *M* (*Q*<sub>1</sub>, *Q*<sub>3</sub>)表示,2 组间比较采用 Mann-Whitney 检验;计数资料以百分率表示,2 组间比较采用  $\chi^2$  检验; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。采用 edgeR 对 2 组间 microRNAs 表达的差异进行分析, $P < 0.05$  且差异倍数(fold change) > 2 为差异有统计学意义,采用 log<sub>2</sub>(fold change)表示 2 组间某一 microRNA 表达的差异倍数。采用 Pearson 相关性分析评价 microRNA 表达水平与 IPF 患者肺功能指标相关性, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组受试者肺功能相关指标比较 结果见表 1。IPF 组患者的 TLC、FEV<sub>1</sub>% pred、DLCO% pred 均显著低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 1 2 组受试者肺功能相关指标比较

Tab.1 Comparison of lung function related indexes of subjects between the two groups				
( $\bar{x} \pm s$ )				
组别	n	TLC/L	FEV <sub>1</sub> % pred/%	DLCO% pred/%
对照组	24	4.37 ± 0.37	87.04 ± 4.30	91.92 ± 2.48
IPF 组	24	3.24 ± 0.32	71.17 ± 4.38	76.25 ± 7.61
t		11.161	12.658	9.586
P		0.000	0.000	0.000

2.2 2 组受试者血清外泌体 microRNA 表达谱比较 透射电镜下可见外泌体为直径 100 nm 左右的囊泡(图 1)。2 组受试者间共有 168 种差异表达的 microRNA。与对照组比较,IPF 组有 64 种 microRNA 表达上调,104 种 microRNA 表达下调(图 2)。

2 组受试者血清外泌体中 microRNA 按表达量由高到低排序,对照组中表达量最高的前 5 种 microRNA 分别为 miR-1-3p、miR-148a-3p、miR-99a-5p、miR-126a-3p 和 miR-1b,分别涉及磷脂酰肌醇激酶/丝氨酸/苏氨酸激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路(phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway,PI3K/Akt/mTOR)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogenactivated protein kinases,MAPK)信号通路、mTOR 信号通路及柠檬酸循环。IPF 组中表达量最高的前 5 种 microRNA 分别为 miR-148a-3p、miR-206-3p、miR-126a-3p、miR-3596a 和 let-7a-5p,分别涉及 MAPK 信号通路、醚类脂质代谢、柠檬酸循环、环磷腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路以及 Notch 信号通路。与对照组相比,IPF 组中有 3 种 microRNA(miR-1-3p、miR-99a-5p、miR-1b)的表达量发生了变化,该 3 种 microRNA 涉及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。IPF 组患者血清外泌体中 miR-1-3p、miR-99a-5p 的表达显著低于对照组,差异有统计学意义[log<sub>2</sub>(fold change)分别为 -3.98 和 -3.78,  $P<0.05$ ];2 组间 miR-1b 表达量比较差异无统计学意义[log<sub>2</sub>(fold change) = 1.36,  $P>0.05$ ]。

将 2 组受试者血清外泌体中 microRNA 按照表达差异倍数由高到低排序,差异最大的前 5 种 microRNA 分别为 miR-672-5p(涉及肿瘤坏死因子信号通路)、miR-466b-3p(涉及炎症介质对瞬时受体电位的调控)、miR-204-5p(涉及磷脂酰肌醇信号系统)、miR-215(涉及核黄素代谢)、miR-411-5p(涉及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路)。

2 组受试者血清外泌体中 microRNA 的表达模式相近,反映出样本质控良好(图 3)。

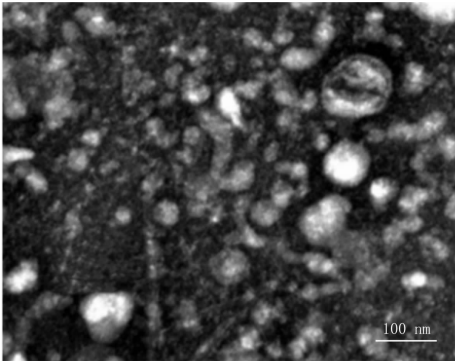


图 1 外泌体形态结构(透射电镜, × 20 000)  
Fig.1 Microscopy of exosomes (transmission electron microscope, × 20 000)

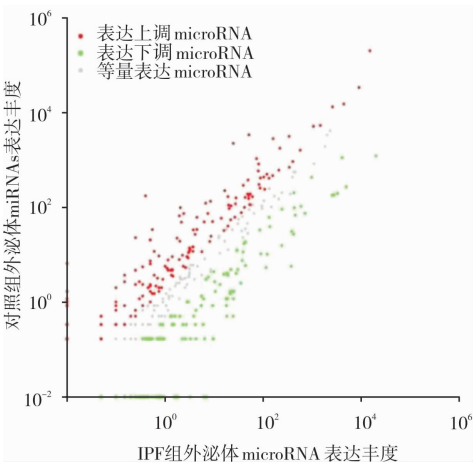


图 2 2 组受试者外泌体中 microRNA 的表达  
Fig.2 Expression of microRNA in exosomes of subjects in the two groups

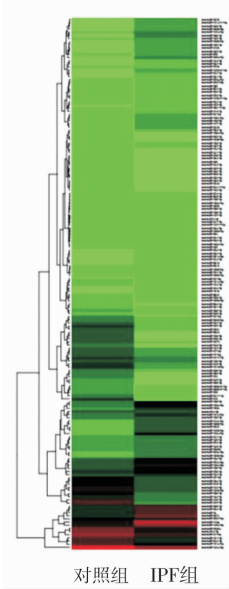


图 3 2 组受试者外泌体 microRNA 热图  
Fig.3 Heat map of microRNA in exosomes of subjects in the two groups

**2.3 差异表达的 microRNA 与 IPF 患者肺功能的关系** 结果见图 4。将按表达量由高到低排序筛选出的 2 种差异表达且涉及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的 microRNA (miR-1-3p、miR-99a-5p) 和按照表达差异倍数由高到低筛选出的 1 种差异表达且涉及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的 microRNA (miR-411-5p)

与 IPF 患者肺功能指标进行相关性分析,结果显示,miR-1-3p、miR-99a-5p、miR-411-5p 与 IPF 患者 DLCO% pred 呈正相关( $r = 0.575、0.617、0.825, P < 0.05$ ); 3 种 microRNAs 与 IPF 患者的 TLC、FEV1% pred 无相关性( $r_{TLC} = 0.324、0.24、0.396, r_{FEV1\% \text{ pred}} = 0.411、0.389、0.474; P > 0.05$ )。

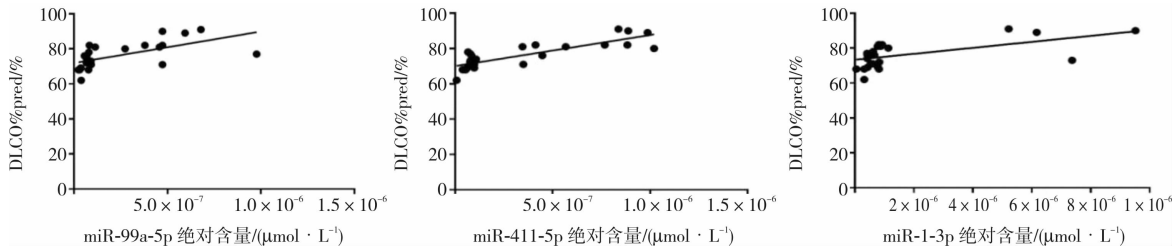


图 4 血清外泌体 miR-1-3p、miR-99a-5p、miR-411-5p 与 IPF 患者 DLCO%pred 的相关性

Fig. 4 Correlation between the miR-1-3p,miR-99a-5p,miR-411-5p in serum exosomes and the DLCO%pred in IPF patients

### 3 讨论

IPF 以肺组织成纤维细胞异常增殖、细胞外基质沉积及炎症细胞浸润为特点,最终引起肺功能进行性下降,目前尚无理想的治疗药物,确诊患者的平均生存周期仅 3 ~ 5 a,针对 IPF 发病机制及新治疗药物的探索一直是呼吸系统疾病研究领域的热点<sup>[2,9]</sup>。

近年来,外泌体在细胞间信息传递中的作用得到了广泛的证实,其中关于外泌体 microRNA 的作用研究最为成熟。供体细胞受机体疾病状态影响,产生的外泌体 microRNA 表达谱发生变化,被下游的接收细胞摄取后作用于 microRNA 的靶基因,调节下游细胞的生物学行为。研究发现,外泌体 microRNA 参与了代谢性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤转移等病理过程。外泌体 microRNA 在组织纤维化发展中起到了重要作用。WANG 等<sup>[10]</sup>研究发现,外泌体 miR-425 及 miR-744 参与了心肌纤维化的发展,且其表达量的下降程度与心力衰竭进展密切相关。LV 等<sup>[11]</sup>研究发现,外泌体 miR-29c 和 miR-21 的表达异常可能参与了肾脏纤维化,并且 miR-29c 和 miR-21 的表达量可用于预测肾脏纤维化程度。此外,还有研究表明,外泌体 microRNA 参与了腹膜及肝脏的纤维化<sup>[12-13]</sup>。

还有研究发现,外泌体 microRNA 有望成为纤维化病变的诊断标志物,可为疾病的分期、预后判断提供新的手段<sup>[14-15]</sup>。MAKIGUCHI 等<sup>[15]</sup>研究发现,血清外泌体 miR-21-5p 水平与 IPF 患者肺功能密切相关,高水平的 miR-21-5p 是 IPF 患者肺功能快速下降、高病死率的预测指标。GUIOT 等<sup>[16]</sup>研究发现,IPF 患者唾液外泌体 miR-142-3p 的表达量与肺功能呈负相关,异常表达的 microRNA 可通过 Wnt 信号通路促进间充质干细胞异常增殖,促进肺组织

纤维化。本研究发现,IPF 组患者血清外泌体 microRNA 表达谱与对照组比较有差异,2 组受试者外泌体 microRNA 种类及含量不同。对照组受试者血清外泌体中 microRNA 丰度最高的前 5 种 microRNA 中,包含 3 种与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关的 microRNA (miR-1-3p、miR-99a-5p、miR-1b),而这些 microRNA 在 IPF 组中表达下降。此外,比较 2 组受试者表达差异倍数最为明显的 5 种 microRNA,涉及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的 miR-411-5p 在 IPF 组中表达显著降低。这提示,与对照组比较,涉及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的 microRNA 表达量在 IPF 患者中显著降低。

mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,mTOR 可将其下游蛋白磷酸化,参与调控蛋白质及脂类合成、细胞生长、细胞自噬等过程。mTOR 信号通路的上游受多种信号通路调控,其中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路是调节细胞生长、增殖和存活的核心信号通路。异常的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与心肌、肾脏及肝脏等多种脏器和组织的纤维化过程<sup>[17-19]</sup>。动物实验表明,活化的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可促进成纤维细胞增殖及纤维化进程,抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可促进成纤维细胞凋亡,减少细胞外基质沉积,延缓肺组织纤维化<sup>[20-21]</sup>。此外有研究发现,PI3K/Akt/mTOR 信号通路是参与细胞自噬的重要通路,激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可抑制自噬发生<sup>[22]</sup>。肺泡上皮损伤导致的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)与 IPF 的发生密切相关,而自噬活性下降是导致 EMT 发生的重要分子机制<sup>[23-24]</sup>。由此推测,活化的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与了 IPF 的发生。本研究发现,血清外泌体 miR-1-3p、miR-99a-5p、miR-411-5p 表达量与患者肺功能呈正相关性,miR-1-3p、miR-99a-5p、miR-411-5p 表达量越低,患者肺功能越

差。microRNA 的经典作用机制为通过与信使 RNA 3'端非翻译区的 microRNA 调控元件结合,导致信使 RNA 降解,起到负向调控靶基因表达的作用。因此推测,IPF 患者血清中外泌体 microRNA 表达量降低可能使得 PI3K/Akt/mTOR 信号通路被异常活化,从而参与 IPF 的发生。

目前外泌体的治疗作用已在多个领域内得到证实,干细胞或正常个体来源的外泌体可通过传递功能性 microRNA 在肿瘤、神经系统疾病、慢性炎症等疾病领域发挥治疗作用。本研究的不足为仅对 3 种差异表达的外泌体 microRNA 表达趋势与 IPF 患者肺功能进行了相关分析。3 种差异表达的 microRNA 在 IPF 发生、发展中的确切作用以及外泌体 microRNA 对 IPF 的治疗作用还有待进一步的体内外实验验证。

**参考文献:**

[1] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Lancet*, 2017, 389(10082):1941-1952.

[2] WELLS A U, COSTABEL U, POLETTI V, et al. Challenges in IPF diagnosis, current management and future perspectives [J]. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2015, 32 Suppl 1:28-35.

[3] VANCHERI C, COTTIN V, KREUTER M, et al. IPF, comorbidities and management implications [J]. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2015, 32 Suppl 1:17-23.

[4] COLOMBO M, RAPOSO G, THERY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30:255-289.

[5] YANG P, CAO X, CAI H, et al. The exosomes derived from CAR-T cell efficiently target mesothelin and reduce triple-negative breast cancer growth [J]. *Cell Immunol*, 2021, 360:104262.

[6] BALBI C, VASSALLI G. Exosomes: beyond stem cells for cardiac protection and repair [J]. *Stem Cells*, 2020, 38(11):1387-1399.

[7] BARBERIS E, VANELLA V V, FALASCA M, et al. Circulating exosomes are strongly involved in SARS-CoV-2 infection [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8:632290.

[8] 中华医学会呼吸病学分会间质性肺疾病学组. 特发性肺纤维化诊断和治疗中国专家共识(2016年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(6):427-432.

INTERSTITIAL LUNG DISEASES GROUP OF THE CHINESE MEDICAL ASSOCIATION, RESPIRATORY DISEASES BRANCH. Chinese expert consensus on the diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (2016 revised edition) [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2016, 39(6):427-432.

[9] SUN B, LIU X, ZHENG X, et al. Novel pyrimidines as multitarget protein tyrosine kinase inhibitors for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. *Chem Med Chem*, 2020, 15(2):182-187.

[10] WANG L, LIU J, XU B, et al. Reduced exosome miR-425 and miR-744 in the plasma represents the progression of fibrosis and heart failure [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2018, 34(11):626-633.

[11] LV C Y, DING W J, WANG Y L, et al. A PEG-based method for the isolation of urinary exosomes and its application in renal fibro-

sis diagnostics using cargo miR-29c and miR-21 analysis [J]. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50(5):973-982.

[12] YU M, SHI J, SHENG M. Exosomes: the new mediator of peritoneal membrane function [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2018, 43(3):1010-1022.

[13] LI Z J, OU-YANG P H, HAN X P. Profibrotic effect of miR-33a with Akt activation in hepatic stellate cells [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(1):141-148.

[14] MANSOURI N, WILLIS G R, FERNANDEZ-GONZALEZ A, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes prevent and revert experimental pulmonary fibrosis through modulation of monocyte phenotypes [J]. *JCI Insight*, 2019, 4(21):e128060.

[15] MAKIGUCHI T, YAMADA M, YOSHIOKA Y, et al. Serum extracellular vesicular miR-21-5p is a predictor of the prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2016, 17(1):110.

[16] GUIOT J, CAMBIER M, BOECKX A, et al. Macrophage-derived exosomes attenuate fibrosis in airway epithelial cells through delivery of antifibrotic miR-142-3p [J]. *Thorax*, 2020, 75(10):870-881.

[17] CHEN G, CHEN H, WANG C, et al. Rapamycin ameliorates kidney fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling in interstitial macrophages and myofibroblasts [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e33626.

[18] LIAN H, MA Y, FENG J, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor induces heart interstitial fibrosis via an Akt/mTor/p70s6k pathway [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e4946.

[19] PATSENKER E, SCHNEIDER V, LEDERMANN M, et al. Potent antifibrotic activity of mTOR inhibitors sirolimus and everolimus but not of cyclosporine A and tacrolimus in experimental liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2011, 55(2):388-398.

[20] 杨文彬, 赵小青, 梁冉, 等. 小分子 RNA 干扰雷帕霉素靶蛋白基因表达对百草枯致大鼠肺纤维化的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(9):830-835.

YANG W B, ZHAO X Q, LIANG R, et al. Effects of small RNA interference targeting mammalian target of rapamycin on paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2017, 29(9):830-835.

[21] WOODCOCK H V, ELEY J D, GUILLOTIN D, et al. The mTORC1/4E-BP1 axis represents a critical signaling node during fibrogenesis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):6.

[22] ZHU J, DOU S, JIANG Y, et al. Apelin-36 exerts the cytoprotective effect against MPP<sup>+</sup>-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells through PI3K/Akt/mTOR autophagy pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 5(1):95-108.

[23] WANG Y H, XIONG H, LIU D, et al. Autophagy inhibition specifically promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion in RAS-mutated cancer cells [J]. *Autophagy*, 2019, 15(5):886-899.

[24] CHARLOTTE H, LI J J, LIU D, et al. Autophagy inhibition-mediated epithelial-mesenchymal transition augments local myofibroblast differentiation in pulmonary fibrosis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8):591-601.

[25] LAI R C, YEO R W, LIM S K. Mesenchymal stem cell exosomes [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40(3):82-88.