

## 胞外小泡可能成為過度訓練症候群的生物指標

鄭愛奇<sup>1</sup>、方世華<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 福興武術國民中小學

<sup>2</sup> 國立臺灣體育運動大學競技運動學系

### 摘要

運動員因長期高強度訓練及競賽求勝的壓力而出現過度訓練症候群，不僅危及健康，也會直接影響訓練及競技表現。目前對於過度訓練症候群的評估方法，須同時檢測許多生理生化項目後再做統整分析，耗時、費力且花費高，又因運動員個別差異，出現的症狀不盡相同，常造成判斷上的困難。已有許多研究顯示由細胞分泌至胞外的胞外小泡，其內所含之成分會隨著生理的變化有所不同，因此，可能可做為發炎相關症狀或是疾病惡化程度的臨床診斷指標。本文藉由瞭解近年來對胞外小泡及其在體內對骨骼肌細胞再生、分化調控之影響及機轉的研究，未來可分析運動員進行最大運動後體液中出現的胞外小泡其內容物變化較明顯者，作為評估過度訓練症候群之生物指標，這可提供教練及選手即時的資訊，兼具學術創新性及實務應用性。

**關鍵詞：**胞外小泡；過度訓練症候群；生物指標

通訊作者：方世華

E-mail：：shfang@ntupes.edu.tw

DOI：10.3966/2226535X2019060802004

## 壹、前言

運動員容易因長期高強度訓練及競賽造成的身心壓力而出現過度訓練症候群，不同系統呈現出多種傷害，均會直接或間接影響恢復、訓練及競技表現，然而，對於過度訓練症候群的判定，除了主觀的疲勞感受之外，需配合客觀指標的評估，過去往往需要同時檢測許多生理、生化項目後再做統整分析，不僅耗時、費力、花費高，甚至有時因為在不同選手出現的症狀不盡相同，造成判斷過度訓練症候群時的困擾。本文提出以胞外小泡 (extracellular vesicles) 的變化作為快速且正確評估運動員過度訓練指標之可行性。

## 貳、胞外小泡的種類與組成

2013 年 Randy Schekman, James Rothman, Thomas C. Südhof 學者因提出細胞內的訊息傳遞系統與細胞的外泌系統而獲得諾貝爾生理醫學獎，進而啟發更多研究學者發現不同種類的胞外小泡與其功能，以及在許多生理及病理過程扮演的重要角色 (Wang et al., 2017)。胞外小泡為細胞分泌至胞外的微小囊泡 (vesicles)，外層由雙層脂膜 (lipid bilayer) 所組成，內含許多複雜生物分子。胞外小泡依產生方式與粒子大小分為三類：直徑 30-130 nm 者稱為胞外泌體 (exosomes)；直徑 100-1000 nm 者稱為微小泡 (microvesicles)；直徑 500-5000 nm 者稱為凋亡小體 (apoptotic bodies) (Wang et al., 2017)。其中的胞外泌體及微小泡都被證實可以經由其內所含的蛋白質與核苷酸進行細胞與細胞之間的訊號傳遞 (Gyorgy et al., 2011; Mathivanan, Ji, & Simpson, 2010)。過去研究發現胞外小泡表面富含許多 (a) 穿越細胞膜的蛋白質 (transmembrane proteins) 如：CD9、CD37、CD63、CD82 (Lener et al., 2015)；(b) 與不同細胞的內質體 (endosome) 成分相關的蛋白如：GTPase；(c) 與胞外小泡形成過程有關的蛋白 (van Niel, Porto-Carreiro, Simoes, & Raposo, 2006)。除了蛋白質之外，胞外小泡內容物包含訊息 RNA (messenger RNA, mRNA) 和微小 RNA (microRNA, miRNA)，這些都可被其他細胞接受後，miRNA 透過與細胞內 mRNA 的

結合而抑制其蛋白質轉譯 (Valadi et al., 2007)，進而影響該細胞的反應。

## 參、胞外小泡的生理角色

雖然幾乎所有細胞都會分泌胞外小泡，但這些胞外小泡內所含的成份相當複雜，隨著分泌來源的細胞種類與其狀態分別表現出不同生物活性的內容物。胞外小泡不僅出現在組織內，也可釋放到體液如：血液、唾液、尿液、淚液、脊髓液中，再進行長距離的穩定運輸，到達其他細胞組織間，透過胞外小泡表面蛋白與目標細胞的細胞膜上接受器結合，或是整個胞外小泡被內吞入細胞內，將所攜帶的蛋白質及 RNA 傳送入細胞內，達到系統性溝通和訊息轉移的功能 (Mulcahy, Pink, & Carter, 2014)。相對於一般細胞激素等生物分子直接溶於血液中，胞外小泡提供了具保護性 (protective) 的運輸。有研究顯示不管在血液或是唾液中所分離的胞外小泡都可以被吞噬細胞所吞噬，藉此進行細胞與細胞之間訊息的傳遞 (Alikhani et al., 2011)，這些胞外小泡可能主要是由內皮細胞及免疫細胞所分泌的。此外，胞外小泡在癌症發展、免疫調節、組織再生、胎兒發育等過程中，均扮演著不可或缺的角色，已有一些研究發表顯示胞外小泡內不同的 miRNA 及蛋白質大量表現在特定腫瘤的病人血液中，因此，可以做為偵測不同腫瘤表現的特定生物指標 (Revenfeld et al., 2014)。在血液循環中的胞外小泡數目會隨著急性或慢性發炎疾病如：敗血症、中風、代謝症候群等疾病的嚴重程度而增加 (Yamamoto et al., 2016; Yamamoto et al., 2015)，然而，這些胞外小泡在生理及病理所扮演的角色與機轉仍不完全清楚 (Javeed & Mukhopadhyay, 2017; Record, Carayon, Poirot, & Silvente-Poirot, 2014)。

## 肆、胞外小泡與骨骼肌之相關研究

骨骼肌是身體最大的器官，佔了將近 40% 的身體質量，除了負責動作與維持姿勢之外，這幾年的研究顯示骨骼肌是一個具分泌能力的器官，

除了已知可產生介白素 6 (Interleukin 6, IL-6) (Pedersen et al., 2003) 之外，還會產生其他細胞激素及上百種蛋白及 miRNA (Baggish et al., 2011; Henningsen, Pedersen, & Kratchmarova, 2011)，不同種類的運動後在血漿中可偵測到的 miRNA 變化也不相同，進而影響其他系統的功能 (Turchinovich, Weiz, & Burwinkel, 2012)。過去研究顯示 miR-1 及 miR-133 在離心運動後增加，而 miR-181b 及 miR-214 在向心運動後增加 (Aoi, 2014; Polakovičová, Musil, Laczó, Hamar, & Kyselovič, 2016)。長時間耐力運動後 miR-20a 及 miR-221 顯著增加，而短時間爆發性的最大運動後會發現 miR-21, miR-146a 及 miR-222 顯著增加，並在休息後 1 小時顯著下降 (Baggish et al., 2011; Wardle et al., 2015)，許多以馬拉松運動後 miRNA 的變化為主題的研究發現 miR-1, miR-30, miR-133a, miR-146a, miR-208 及 miR-206 等指標在馬拉松運動後立即顯著增加，運動後 24 小時後下降 (Baggish et al., 2014; Clauss et al., 2016; Viereck, Kruger, & Thum, 2014)。此外，不同細胞受到環境的壓力如：熱、缺氧、氧化壓力及放射線等影響時，產生的胞外小泡內容物會不同 (Ratajczak et al., 2006)。有一研究以運動引起的熱壓力使吞噬細胞釋放胞外小泡，其中所含的熱休克蛋白 72 (heat shock protein 72, HSP 72) 會造成骨骼肌內粒線體數目增加，進而增加運動耐力 (Henstridge et al., 2014)。有研究顯示胞外泌體中的 miR-1, miR-21, miR-133 及 miR-206 會作用到肌細胞的基因表現及生理功能 (He et al., 2014; Matsuzaka & Hashido, 2015)；miR-181 在肌細胞分化時會大量表現 (Naguibneva et al., 2006)；miR-30b 及 miR-206 會調控肌肉細胞的再生與發炎 (Chen et al., 2009)。因此，可藉由研究血液中胞外小泡了解肌肉增生及分化的狀況，也可進一步了解影響骨骼肌的能量代謝與發炎的程 (Aoi & Sakuma, 2014)。

## 伍、過度訓練症候群

運動員為了達到最好的表現奪得金牌奉行「一分耕耘一分收穫」(no pain, no gain) 的精神，將自己推到一個超過負荷的壓力之下，當過度訓練之後可能出現不同系統的多種傷害包括(a)生理的傷害如：自主神經失調、

肌肉痠痛、慢性疲勞等；(b) 生化的傷害如：氧化傷害、內分泌失衡、免疫系統功能不佳、肌肉肝醣量下降、易受細菌病毒感染等；(c) 精神情緒的傷害如：憂鬱、注意力降低、焦慮等 (Maffetone & Laursen, 2016)。如果沒有適當的休息與恢復可能導致運動表現低下，伴隨情緒障礙長達 2-3 個月之久，尤其是因免疫功能受到抑制後引起上呼吸道及其他感染的疾病，將使運動員需要更久的時間才能恢復體能。過去有一些作為評估過度訓練症候群的指標 (Kreher, 2016) 包括 (a) 內分泌系統指標如：C 反應蛋白 (C-reactive protein)、肌酸激酶 (creatinase)、血清中睪固酮與皮質醇的比值 (testosterone/cortisol ratio)、肌紅蛋白 (myoglobin)、乳酸等；(b) 免疫系統指標如：唾液中免疫球蛋白 A (immunoglobulin A)、血清中發炎細胞激素 (inflammatory cytokines) 等；(c) 血液系統指標如：血漿的黏稠度、紅血球沉降速度等；(d) 氧化壓力系統指標如：還原與氧化的穀胱甘肽比值 (reduced/oxidized glutathione ratio) 等；(e) 心臟功能指標如：安靜心跳數、最大心跳數及心跳變異率 (heart rate variabilities, HRV) 等及 (f) 疲勞自覺量表 (rating of perceived exertion, RPE)。這麼多的項目往往需要同時檢測後再做統整與判斷，然而引起過度訓練症候群的原因除了訓練過度之外，還有人際關係、情緒、攝取營養的質與量、睡眠品質、冷熱環境等許多可能的因素需要一併列入考量 (Kreher & Schwartz, 2012)，而且因個體差異，在不同選手出現的症狀也不盡相同，因此，配合疲勞的主觀感受與客觀指標才能準確判定過度訓練症候群。

## 陸、胞外小泡做為臨床診斷的生物指標

不論細胞在正常或是病態的狀況下，都會分泌胞外小泡，以其不同的內含物代表著不同的生理狀態，因此，許多的研究都將胞外小泡的內容物當作臨床的檢驗生物指標，有些以其內含蛋白質作為指標，例如：黑色素癌的病人產生比正常人較多 CD63+的胞外泌體 (Logozzi et al., 2009)；慢性 C 型肝炎的人嚴重時會產生較多 CD81+的胞外泌體 (Welker et al., 2012)。胞外小泡也可能造成免疫的抑制現象如：癌細胞所產生的胞外小泡其內容物使活化的 T 細胞凋亡及抑制細胞毒殺作用，有些則是增強免疫

如：正常細胞所產生的胞外小泡其內容物使抗原呈現細胞活化抗原專一性 T 細胞的功能 (Valenti et al., 2007)；即使是心血管疾病或是腎臟相關疾病，也有研究顯示特定的胞外小泡內容物可以做為臨床診斷的生物指標 (Lv et al., 2014)。當選手經過適度運動、高強度運動或是出現過度訓練症候群時，在生理、生化、內分泌、免疫系統、精神心理上產生不同的負面反應，此時體內的胞外小泡的數目及內含物也會隨之改變，因此，可將胞外小泡變化當作檢測的生物指標，同時也可以將選手個人胞外小泡蛋白質及 miRNA 的變化納入運動員生物護照 (athlete biological passport, ABP) 資料中，藉此了解個別選手的變化以準確掌握其健康狀況。

## 柒、結語

有關胞外小泡的研究與醫學診斷的應用正飛快的進步，然而在運動科學領域尚未有深入的探討與應用，雖然選手處於正常或是疲憊的狀況下都會分泌胞外小泡，但其不同的內含物就代表著不同選手各自不同生理的狀態，因此，將胞外小泡內容物質與量的變化，當作判定個別選手過度訓練症候群的臨床檢驗生物指標，將可即時提供客觀數據，加上主觀的疲勞感受，協助運動員調整訓練課表或是適當的營養補充以避免造成進一步生理傷害，這將是運動科學上兼具學術創新及實務應用的發展方向。

## 參考文獻

- Alikhani, V. S., Eldh, M., Paredes, P. T., Bossios, A., Gabriellson, S., & Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of translational medicine*, *9*, 9. doi:10.1186/1479-5876-9-9.
- Aoi, W. (2014). Frontier impact of microRNAs in skeletal muscle research: a future perspective. *Frontiers Physiology*, *5*, 495. doi:10.3389/fphys.2014.00495
- Aoi, W., & Sakuma, K. (2014). Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs? *Frontiers Physiology*, *5*, 39. doi:10.3389/fphys.2014.00039
- Baggish, A. L., Hale, A., Weiner, R. B., Lewis, G. D., Systrom, D., Wang, F., . . . Chan, S. Y. (2011). Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *Journal of Physiology*, *589*(Pt 16), 3983-3994. doi:10.1113/jphysiol.2011.213363
- Baggish, A. L., Hale, A., Weiner, R. B., Lewis, G. D., Systrom, D., Wang, F., . . . Chan, S. Y. (2011). Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *Journal of Applied Physiology*, *116*(5), 522-531. doi:10.1152/jappphysiol.01141.2013
- Chen, J. F., Callis, T. E., & Wang, D. Z. (2009). MicroRNAs and muscle disorders. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 1), 13-20. doi:10.1242/jcs.041723
- Clauss, S., Wakili, R., Hildebrand, B., Kääh, S., Hoster, E., Klier, I., ...Nickel, T. (2016). MicroRNAs as Biomarkers for Acute Atrial Remodeling in Marathon Runners (The miRathon Study—A Sub-Study of the Munich Marathon Study). *PLoS ONE*, *11*(2), e0148599. doi: 10.1371/journal.pone.0148599
- Gyorgy, B., Szabo, T. G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., . . . Buzas, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(16), 2667-2688. doi:10.1007/s00018-011-0689-3
- He, W. A., Calore, F., Londhe, P., Canella, A., Guttridge, D. C., & Croce, C. M. (2014). Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia

- via TLR7. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(12), 4525-4529. doi:10.1073/pnas.1402714111
- Henningsen, J., Pedersen, B. K., & Kratchmarova, I. (2011). Quantitative analysis of the secretion of the MCP family of chemokines by muscle cells. *Molecular BioSystems*, 7(2), 311-321. doi:10.1039/c0mb00209g
- Henstridge, D. C., Bruce, C. R., Drew, B. G., Tory, K., Kolonics, A., Estevez, E., . . . Febbraio, M. A. (2014). Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. *Diabetes*, 63(6), 1881-1894. doi:10.2337/db13-0967
- Javeed, N., & Mukhopadhyay, D. (2017). Exosomes and their role in the micro-/macro-environment: a comprehensive review. *Journal of Biomedical Research*, 31(5), 386-394. doi:10.7555/JBR.30.20150162
- Kreher, J. B. (2016). Diagnosis and prevention of overtraining syndrome: an opinion on education strategies. *Open Access Journal of Sports Medicine*, 7, 115-122. doi:10.2147/OAJSM.S91657
- Kreher, J. B., & Schwartz, J. B. (2012). Overtraining syndrome: a practical guide. *Sports Health*, 4(2), 128-138. doi:10.1177/1941738111434406
- Lener, T., Gimona, M., Aigner, L., Borger, V., Buzas, E., Camussi, G., . . . Giebel, B. (2015). Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 30-087. doi:10.3402/jev.v4.30087
- Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., . . . Fais, S. (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One*, 4(4), e5219. doi:10.1371/journal.pone.0005219
- Lv, L. L., Cao, Y. H., Pan, M. M., Liu, H., Tang, R. N., Ma, K. L., . . . Liu, B. C. (2014). CD2AP mRNA in urinary exosome as biomarker of kidney disease. *Clinica Chimica Acta*, 428, 26-31. doi:10.1016/j.cca.2013.10.003
- Maffetone, P. B., & Laursen, P. B. (2016). Athletes: Fit but unhealthy? *Sports Medicine-Open*, 2(1), 24. doi:10.1186/s40798-016-0048-x
- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907-

1920. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006
- Matsuzaka, Y., & Hashido, K. (2015). Roles of miR-1, miR-133a, and miR-206 in calcium, oxidative stress, and NO signaling involved in muscle diseases. *RNA & Disease*, 2(2).
- Mooren, F. C., Viereck, J., Kruger, K., & Thum, T. (2014). Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 306(4), H557-563. doi:10.1152/ajpheart.00711.2013
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3. doi:10.3402/jev.v3.24641
- Naguibneva, I., Ameyar-Zazoua, M., Polesskaya, A., Ait-Si-Ali, S., Groisman, R., Souidi, M., . . . Harel-Bellan, A. (2006). The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nature Cell Biology*, 8(3), 278-284. doi:10.1038/ncb1373
- Pedersen, B. K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., . . . Saltin, B. (2003). Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 24(2-3), 113-119.
- Polakovičová, M., Musil, P., Laczo, E., Hamar, D., & Kyselovič, J. (2016). Circulating microRNAs as potential biomarkers of exercise response. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1553.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., & Ratajczak, M. Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 20(9), 1487-1495. doi:10.1038/sj.leu.2404296
- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., & Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(1), 108-120. doi:10.1016/j.bbailip.2013.10.004
- Revenfeld, A. L., Baek, R., Nielsen, M. H., Stensballe, A., Varming, K., & Jorgensen, M. (2014). Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. *Clinical Therapeutics*, 36(6), 830-846. doi:10.1016/j.clinthera.

2014.05.008

- Turchinovich, A., Weiz, L., & Burwinkel, B. (2012). Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(11), 460-465. doi:10.1016/j.tibs.2012.08.003
- Valenti, R., Huber, V., Iero, M., Filipazzi, P., Parmiani, G., & Rivoltini, L. (2007). Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Research*, 67(7), 2912-2915. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0520
- van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., & Raposo, G. (2006). Exosomes: a common pathway for a specialized function. *Journal of Biochemistry*, 140(1), 13-21. doi:10.1093/jb/mvj128
- Wang, J., Sun, X., Zhao, J., Yang, Y., Cai, X., Xu, J., & Cao, P. (2017). Exosomes: A Novel Strategy for Treatment and Prevention of Diseases. *Frontiers of Pharmacology*, 8, 300. doi:10.3389/fphar.2017.00300
- Wardle, S. L., Bailey, M. E. S., Kilikevicious, A., Malkova, D., Wilson, R. H., Venckunas, T., & Moran, C. N. (2015). Plasma microRNA levels differ between endurance and strength athletes. *PLoS ONE*, 10(4), e0122107. doi:10.1371/journal.pone.0122107
- Welker, M. W., Reichert, D., Susser, S., Sarrazin, C., Martinez, Y., Herrmann, E., . . . Kronenberger, B. (2012). Soluble serum CD81 is elevated in patients with chronic hepatitis C and correlates with alanine aminotransferase serum activity. *PLoS One*, 7(2), e30796. doi:10.1371/journal.pone.0030796
- Yamamoto, S., Azuma, E., Muramatsu, M., Hamashima, T., Ishii, Y., & Sasahara, M. (2016). Significance of Extracellular Vesicles: Pathobiological Roles in Disease. *Cell Structure and Function*, 41(2), 137-143. doi:10.1247/csf.16014
- Yamamoto, S., Niida, S., Azuma, E., Yanagibashi, T., Muramatsu, M., Huang, T. T., . . . Sasahara, M. (2015). Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. *Scientific Reports*, 5, 8505. doi:10.1038/srep08505

## Extracellular vesicles may become the biomarkers for overtraining syndrome

Ai-Chi Zheng<sup>1</sup>, Shih-Hua Fang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fushing Martial Art Elementary and Junior High School

<sup>2</sup> Department of Sport Performance, National Taiwan University of Sport

### *Abstract*

Athletes have high risk for overtraining syndromes due to long-term high-intensity training and competition stress. Overtraining syndrome is harmful to health and also negatively affects training and athletic performance. Currently, diagnosis for overtraining syndromes integrates many physiological and biochemical items, which is time consuming, laborious and costly. Moreover, different players may show variable symptoms that made the diagnosis difficult. Many studies have shown that extracellular vesicles are secreted by cells to the extracellular environments and their specific contents are variable depending on the physiological changes. Therefore, the contents of extracellular vesicles may be used as clinical diagnostic indicators of cancer, inflammation-related symptoms or the severity of disease. This article introduced recent studies regarding the effects and mechanisms of extracellular vesicles on the regeneration and differentiation of skeletal muscle cells. In the future, the significantly changed contents of extracellular vesicles from athletes immediately after the maximal exercise may become the biomarkers of overtraining syndromes. Meanwhile, the information will be immediately available to coaches and athletes. Also, this idea is novel academically and has the potential to be applied in training.

**Keywords: Extracellular vesicles; Overtraining syndrome; Biomarkers**