

间充质干细胞外泌体对肺脏上皮钠离子转运的调控作用研究

毛珂君 刘妍宏 华宇 韩爱新 丁炎 聂宏光*

(中国医科大学基础医学院干细胞与再生医学研究室, 沈阳 110122)

摘要 该文讨论了小鼠骨髓间充质干细胞来源的外泌体(bone mesenchymal stem cell-exosome, BMSC-exo)对肺损伤引起的肺泡上皮钠离子转运障碍的调控。从BMSCs的条件培养基中分离外泌体, 利用透射电镜技术对其形态结构以及大小进行了鉴定; 对培养的经典肺上皮细胞系H441细胞分别给予脂多糖或外泌体处理, 应用qRT-PCR和Western blot技术检测了H441细胞中钠离子通道在mRNA和蛋白水平的表达情况。此外, 研究结果表明, LPS处理的H441细胞中miR-199a-3p的表达明显降低; 与单独应用LPS组相比, 浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 的外泌体处理组中miR-199a-3p的表达显著性升高; 和阴性对照组(NC)相比, 转染miR-199a-3p mimic的H441细胞中 α -、 γ -ENaC的表达明显升高, 而和inhibitor NC组相比, miR-199a-3p inhibitor组的 α -、 γ -ENaC的表达则明显降低。网站预测结果显示, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是miR-199a-3p的靶蛋白, miR-199a-3p mimic组的mTOR蛋白的表达明显低于NC组; miR-199a-3p inhibitor组和inhibitor NC组相比, mTOR的表达显著性升高。以上结果表明, BMSC-exo可能经miR-199a-3p参与mTOR通路调节肺泡上皮细胞中钠离子通道的表达来促进肺脏上皮离子转运, 进而可能促进病理条件下的肺脏液体清除, 参与临床急性肺损伤等相关水肿性肺疾病的治疗。

关键词 外泌体; 骨髓间充质干细胞; 肺损伤; 上皮钠离子通道

The Research about the Regulation of Mesenchymal Stem Cell Exosomes on Sodium Transport of Lung Epithelium

MAO Kejun, LIU Yanhong, HUA Yu, HAN Aixin, DING Yan, NIE Hongguang*

(Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, Basic Medical College, China Medical University, Shenyang 110122, China)

Abstract This study discussed the regulation of BMSC-exo (bone mesenchymal stem cell-exosome) derived from mouse on alveolar epithelial sodium transport disorders caused by lung injury. The exosomes from the conditioned medium of BMSCs were isolated and their morphology, structure and size were identified by transmission electron microscopy. The cultured H441 cells, the classical lung epithelial cell line, were treated with lipopolysaccharide or exosomes, respectively. The expression of sodium ion channels at mRNA and protein levels in H441 cells separately was detected by qRT-PCR and Western blot. The results of this study showed that the protein expression levels of α -、 γ -ENaC in the group combined exosomes and LPS were significantly increased compared

收稿日期: 2020-05-21

接受日期: 2020-11-16

国家自然科学基金(批准号: 81670010)和辽宁省重点研发计划指导计划项目(批准号: 2018225077)资助的课题

*通讯作者。Tel: 024-23535143, E-mail: hgnc@cmu.edu.cn

Received: May 21, 2020

Accepted: November 16, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81670010) and the Key Research and Development Program Guidance Project of Liaoning Province (Grant No.2018225077)

*Corresponding author. Tel: +86-24-23535143, E-mail: hgnc@cmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5462>

with the LPS-treated group. Besides, the mRNA expression levels of the α -, β -, and γ -subunits were also significantly increased. In addition, our results also showed that the expression of miR-199a-3p in LPS-treated H441 cells was significantly decreased. Compared with the LPS group, miR-199a-3p expression was significantly increased in the exosome treatment group at 20 $\mu\text{g/mL}$. Compared with negative control group, the expression levels of α - and γ -ENaC in H441 cells transfected with miR-199a-3p mimic were significantly increased, while those of miR-199a-3p inhibitor group were significantly decreased compared with inhibitor negative control group. The prediction of the website showed that mTOR (mammalian target of rapamycin) was the direct target of miR-199a-3p. mTOR protein expression of the group transfected with miR-199a-3p mimic was significantly lower than the negative control group, while mTOR expression of the group transfected with miR-199a-3p inhibitor was significantly increased compared with the inhibitor negative control group. The above results suggest that BMSC-exo may participate in the mTOR pathway through miR-199a-3p to regulate the expression of sodium ion channels in alveolar epithelial cells to promote the ion transport in pulmonary epithelium, which may further improve the clearance of pulmonary fluid under pathological conditions and participate in the treatment of clinical acute lung injury and other related edema lung diseases.

Keywords exosomes; bone mesenchymal stem cells; lung injury; epithelial sodium channel

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是肺泡上皮障碍导致的以肺水肿为特征的肺部疾病,也是许多疾病的并发症之一,主要表现在肺泡液体清除率的降低和跨上皮 Na^+ 和 Cl^- 离子的转运障碍等。肺泡上皮细胞中的上皮钠离子通道(epithelial sodium channel, ENaC)控制 Na^+ 的重吸收,在维持水盐转运平衡和水的重吸收等方面起着至关重要的作用^[1]。有研究表明,骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)以及BMSC条件培养基(BMSC-conditioned medium, BMSC-CM)可以通过其旁分泌和自分泌中的某些因子参与以炎症反应为特征的疾病[如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的ALI]的治疗,也可用于受损组织和细胞的修复等^[2]。

外泌体是细胞外囊泡的一种,可以由不同类型的细胞分泌,大小在30~120 nm。外泌体含有许多不同的生物分子包括蛋白质、脂质、mRNA和miRNA等,在细胞-细胞通信中具有重要意义^[3]。BMSC来源的外泌体(BMSC-exosome, BMSC-exo)作为干细胞旁分泌过程中的主要成分之一,很可能携带多种生物活性物质,可作为BMSCs发挥作用的主要媒介,具有与BMSCs相似的生物学功能和作用^[4]。我们推测其在肺损伤中也能发挥类似于BMSCs或者BMSC-CM的治疗作用,本实验探讨BMSC-exo是否能在细胞水平上对LPS诱导的肺损伤模型起保护作用,旨在为相关水肿性肺疾病提供新的研究方向和治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

H441细胞株购自美国模式培养物集存库; DMEM/F12培养基、RPMI-1640培养基和胎牛血清购自HyClone公司; 重组小鼠碱性成纤维细胞生长因子购自PeproTech公司; 逆转录和PCR试剂盒均购自TaKaRa公司; 小鼠抗 α -、 γ -ENaC单克隆抗体购自Abcam公司; 小鼠抗 β -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG和羊抗鼠IgG购自Santa Cruz公司; 转染试剂、miRNAs对照、miRNAs模拟物、miRNAs抑制剂对照、miRNAs抑制剂均购自Genepharma公司; 其余试剂均购自美国Sigma公司。

1.2 BMSCs的分离与培养

C57雄性小鼠由中国医科大学实验动物中心提供,动物合格证号为SCXK(辽)20180001。本实验遵循中国医科大学伦理委员会制定的相关规定(伦理审批号: 14026M)。鼠龄3周,体质量9~12 g。将C57小鼠处死并浸泡于75%的酒精中消毒杀菌后,移至超净台。解剖暴露出小鼠双下肢的股骨,剪断膝关节,分离出两根股骨; 在预冷的PBS中剔除其筋膜和肌肉,将2 mL含有10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素和重组小鼠碱性成纤维细胞生长因子的干细胞培养基通过5 mL的注射器冲刷股骨至6孔板中,直到骨髓被冲刷干净。于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,24~48 h后换液,此后隔天换液。

1.3 外泌体的分离和鉴定

将第二代长至80%的骨髓间充质干细胞用PBS洗2~3次, 加入无血清的培养液进行饥饿处理, 48 h后收取其培养液为条件培养基, 将收集的条件培养基于300 ×g下离心5 min, 弃去沉淀; 然后将上清于2 000 ×g下离心15 min, 除去沉淀; 再于12 000 ×g下离心35 min, 弃去沉淀后用0.22 μm的滤器过滤; 将滤液在150 000 ×g下离心3 h, 弃去上清, 即可得到外泌体。

制备外泌体电镜样本采用的是负染法, 将得到的外泌体均匀涂抹于炭吸附膜上, 干燥后用4%多聚甲醛固定20 min。PBS漂洗, 干燥后加入醋酸双氧铀负染5 min, 吸干液体后于37 °C干燥, 并于扫描电子显微镜下观察。

1.4 体内实验验证BMSC-exo可以改善LPS诱导的小鼠急性肺水肿

我们将动物实验分为3组, 分别是Control组、LPS组和EXO+LPS组; 造模如下: 腹腔注射5 mg/kg的LPS 4 h后, 麻醉小鼠, 气管滴注100 μL的外泌体, 作用20 h后处死小鼠取其左肺测湿重, 并于60 °C烘干48 h后测其干重, 计算出湿干重比, 并作图。

1.5 实验分组

用外泌体和LPS分别处理H441细胞后, 对ENaC亚基的蛋白和mRNA表达情况进行检测。将实验用H441细胞随机分为4组: 第1组为无血清DMEM/F12培养基对照组(Control组); 第2组用LPS(10 μg/mL)+无血清DMEM/F12培养基培养24 h(LPS组); 第3组用外泌体+无血清DMEM/F12培养基培养24 h(EXO组); 第4组先用LPS+无血清DMEM/F12培养基预处理4 h后, 再加入外泌体继续培养20 h(EXO+LPS组)。

将不同浓度的外泌体加入经LPS处理的H441细胞中, 其分组情况如下: 利用蛋白定量的方法测定外泌体的浓度之后将其加入适量细胞培养基中, 分别采取10、20、40 μg/mL 3个浓度, 研究将BMSC-exo加入经LPS处理的H441细胞中后miR-199a-3p的表达变化。实验随机分为5组: 第1组为无血清DMEM/F12培养基对照组(Control组); 第2组用LPS(10 μg/mL)+无血清DMEM/F12培养基培养24 h(LPS组); 第3~5组先用LPS+无血清DMEM/F12培养基预处理4 h, 再分别加入10、20、40 μg/mL的BMSC-exo后继续培养20 h(EXO+LPS组)。

1.6 qRT-PCR检测不同处理条件下 α -、 β -和 γ -ENaC的mRNA和miR-199a-3p的表达

将经以上处理的H441细胞用Trizol提取总RNA, 用紫外分光光度计对RNA的浓度及纯度进行检测分析, 选取 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 均在1.8~2.0的RNA样品, 终质量为1 μg, 然后按照Thermo Fisher试剂盒说明书中的方法进行PCR操作。 α -ENaC的引物序列: 5'-AGG GCT AGA GAGCCT AGA GA-3'(上游), 5'-TTC CTC CCG GAC TGT TTG AC-3'(下游); β -ENaC的引物序列: 5'-ACC ACC TTA GCT GCC ATC AC-3'(上游), 5'-TGC AGT ACC ACA CTA GCA GC-3'(下游); γ -ENaC的引物序列: 5'-GCA CCG TTC GCC ACC TTC TA-3'(上游), 5'-AGG TCA CCA GCA GCT CCT CA-3'(下游); GAPDH序列: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'(上游), 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'(下游)。应用SYBR Premix Ex Taq II kit试剂盒进行qRT-PCR反应。反应条件为: 95 °C预变性30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40个循环。以GAPDH表达作为内参标定 α -、 β -和 γ -ENaC的表达量, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相关分析。而miR-199a-3p表达的测定选取 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 均在1.8~2.0的RNA样品, 终质量为500 ng, 然后按照Thermo Fisher试剂盒说明书中的方法进行PCR操作。miR-199a-3p的引物序列为: 5'-ACA GUA GUC UGC ACA UUG GUU A-3'(上游), 5'-ACC AAU GUG CAG ACU UAC GUU U-3'(下游)。应用SYBR Premix Ex Taq II kit试剂盒进行qRT-PCR反应。反应条件为: 95 °C预变性30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40个循环。以U6表达作为内参标定miR-199a-3p的表达量, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 数值进行相关分析。

1.7 Western blot

将上述4组的H441细胞加入RAPI裂解液提取总蛋白, 于95 °C恒温金属浴加热10 min使蛋白变性, 获得蛋白样品并将其保存在-20 °C备用。进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳实验时, 在每个泳道中加入等量蛋白样品, 再将蛋白转至PVDF膜上, 用5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)于室温下封闭1 h后加入 α -或 γ -ENaC抗体(1:2 000), 4 °C摇晃孵育过夜, 然后用TBST洗3次后加入二抗(1:5 000), 室温下孵育1 h, 再次洗膜后, 用ECL显影, 得到条带后用Image J软件对条带进行分析。

1.8 miR-199a-3p转染的H441细胞中 α -、 γ -ENaC蛋白的表达

将H441细胞接种于6孔板中,待细胞密度达到50%~60%时,弃掉培养液,用PBS清洗细胞3次,换成无血清培养液进行培养。将实验分成4组:第1组为NC(negative control)组,第2组为mimic(miR-199a-3p mimic)组,第3组为inhibitor NC(miR-199a-3p inhibitor negative control)组,第4组为inhibitor(miR-130b inhibitor)组。进行转染复合物的配制,向无菌的EP管中加入200 μ L的无血清的RPMI-1640培养基,分别向其中加入4 μ L转染试剂siRNA-mate以及3 μ L上述分组物质,快速混匀,放置20 min,待形成转染复合物后,将各组混合物以散点式加到6孔板中,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养6 h后,换成含有血清的培养液培养48~72 h,提取蛋白,用Western blot技术检测miR-199a-3p对 α -、 γ -ENaC蛋白和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)蛋白表达的影响。

1.9 统计学处理

Western blot灰度值采用Image J软件处理,qRT-PCR和Western blot实验数据均采用SPSS软件处理。实验结果采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,实验结果用SPSS 22软件进行差异性分析,用Origin 8.0软件绘图, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体形态结构的鉴定

我们从BMSC-CM中分离得到外泌体,通过透

射电镜观察外泌体的形态和大小,发现在负染后,外泌体周围包裹着一圈黑色光圈,且其呈圆形或椭圆形,内部含有物质结构,外泌体的大小不一,直径一般为50~100 nm(图1)。

2.2 MSC-exo减轻LPS诱导的小鼠急性肺水肿

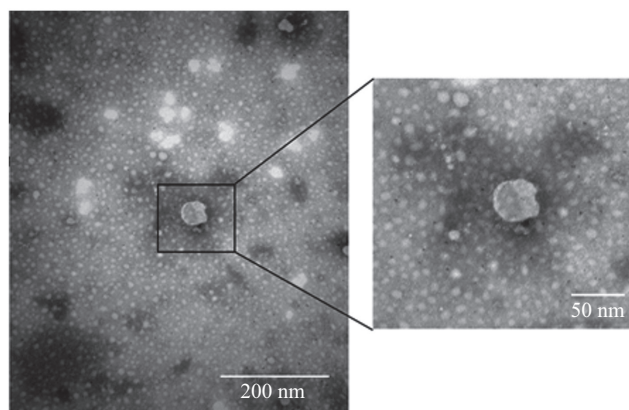
急性肺损伤的症状之一就是肺水清除率降低造成肺水肿,肺湿干重比可以反映肺脏液体清除能力,与ENaC通道蛋白的功能密切相关。如图2所示,LPS组和Control组相比肺的湿干重比明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$);EXO+LPS组和LPS组相比肺湿干重比又明显降低,差异具有显著性($P<0.05$)。因此,我们推测MSC-exo能改善LPS诱导的小鼠急性肺损伤。

2.3 BMSC-exo增加H441细胞中 α -和 γ -ENaC的蛋白表达水平

LPS诱导的肺损伤的蛋白水平特征为ENaC蛋白表达降低,因此我们将实验设置为4组,Control、LPS、EXO和EXO+LPS组,以验证外泌体在LPS调控ENaC中的作用。如图3所示,以阴性对照组H441细胞中蛋白表达水平为对照,LPS处理组的 α -、 γ -ENaC的蛋白表达均明显降低,与对照组相比差异具有非常显著的统计学意义(图3B和图3D, $P<0.01$ 或 $P<0.001$);而在LPS预处理条件下,外泌体能使 α -ENaC和 γ -ENaC蛋白表达显著升高,且与LPS对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$),上述结果表明,外泌体可以显著性增加ENaC蛋白水平的表达,进而可能改善肺损伤。

2.4 BMSC-exo增加H441细胞中 α -ENaC、 β -ENaC、 γ -ENaC mRNA水平的表达

BMSC-exo增加了H441细胞中蛋白表达水平,

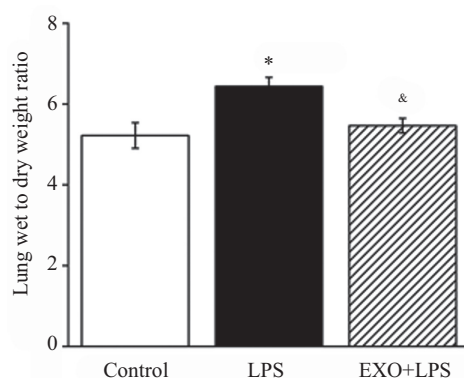


图中黑色方框内表示外泌体的放大图。

The enlarged image of exosomes is shown in the black box.

图1 外泌体透射电镜鉴定图

Fig.1 The identification of exosomes by transmission electron microscopy

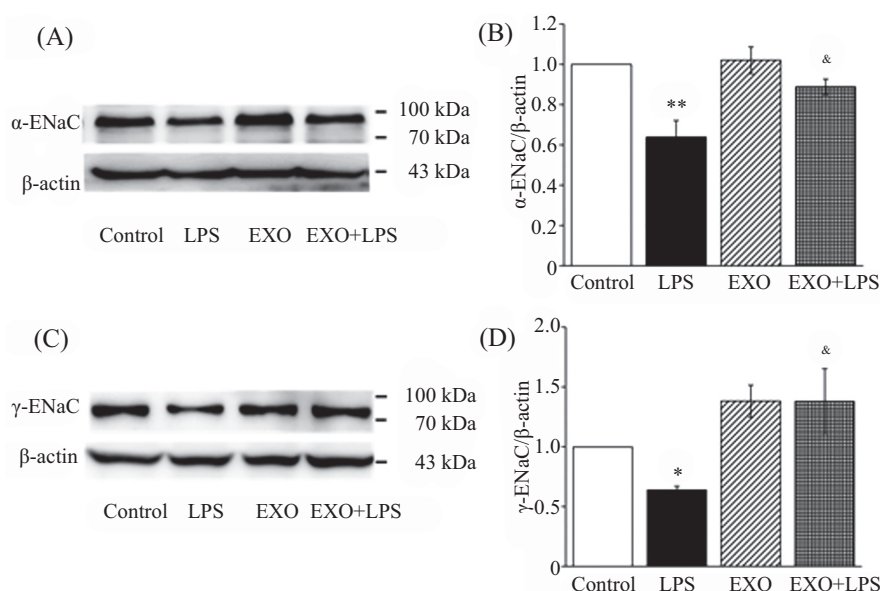


称量小鼠的湿肺和干肺的质量并计算其湿干重比的结果。* $P<0.05$, 与Control组比较; & $P<0.05$, 与LPS组比较。

The wet and dry lungs of mice were weighed and their wet to dry weight ratios were calculated. * $P<0.05$ compared with Control group; & $P<0.05$ compared with LPS group.

图2 BMSC-exo减轻了LPS诱导的小鼠的急性肺水肿

Fig.2 BMSC-exo improves LPS-induced acute pulmonary edema in mice



A: 利用Western blot技术检测BMSC-exo处理H441细胞后α-ENaC蛋白表达水平的条带图; B: α-ENaC条带的灰度统计图; C: 表示的是BMSC-exo处理H441细胞后γ-ENaC蛋白条带图; D: γ-ENaC蛋白条带相应的统计图。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与Control组比较; & $P<0.05$, 与LPS组比较。

A: the band diagram of Western blot to analyze the effect of BMSC-exo on the expression of α-ENaC protein in H441 cells; B: grayscale statistic of the α-ENaC strip; C: the band diagram of Western blot to analyze the effect of BMSC-exo on the expression of γ-ENaC protein in H441 cells; D: grayscale statistic of the γ-ENaC strip. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with Control group; & $P<0.05$ compared with LPS group.

图3 外泌体增加LPS处理的H441细胞中α-、γ-ENaC蛋白的表达

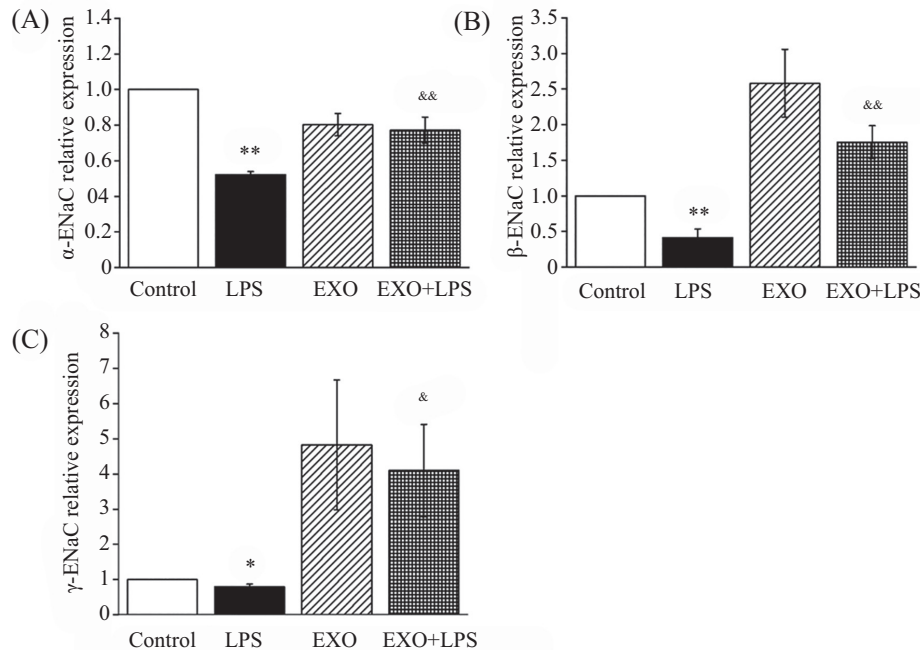
Fig.3 Exosomes increases the expression of the α-, γ-ENaC proteins in LPS-treated H441 cells

我们推测这是由转录水平的变化所导致的。因此, 我们进一步通过qRT-PCR实验研究了LPS诱导的α-ENaC、β-ENaC和γ-ENaC基因水平的变化。如图4所示, 我们应用qRT-PCR技术验证了在不同条件处理下ENaC的不同亚基mRNA水平的表达, 如结果所示, 与阴性对照组相比, LPS组的α-ENaC、β-ENaC和γ-ENaC的mRNA水平的表达都呈现降低的趋势($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 外泌体逆转了LPS处理组

α-ENaC、β-ENaC和γ-ENaC的mRNA表达降低的趋势, 且差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图4); 因此, 我们推测BMSC-exo可以通过增加α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC的基因水平进而提高其蛋白水平的表达, 以提高钠离子通道的转运能力。

2.5 不同浓度外泌体治疗组中miR-199a-3p的表达

由以上结果我们发现, BMSC-exo可能通过调节α-ENaC和γ-ENaC亚基的蛋白水平表达, 以及



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与Control组比较; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, 与LPS组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with Control group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ compared with LPS group.

图4 外泌体增加了LPS处理的H441细胞中 α -ENaC、 β -ENaC、 γ -ENaC mRNA水平的表达

Fig.4 Exosomes increases the mRNA expression levels of α -ENaC, β -ENaC, γ -ENaC in LPS-treated H441 cells

α -、 β -、 γ -ENaC在mRNA水平上的表达来对改善LPS诱导的ALI细胞模型,而外泌体这一囊泡中包含着mRNA、miRNA、蛋白等多种功能性物质,有研究提出外泌体中包含的miRNA可以参与调节钠离子通道^[5]。在本实验中,我们首先应用Miranda和TargetScan等多个预测软件对miRNA进行了预测,筛选出可能与ENaC相关的miRNA^[6],并且结合有关报道,我们选取了一种既存在于BMSC-exo中又可能对ENaC有调节作用的miRNA即miR-199a-3p进行了相关的研究^[7]。我们将不同浓度的外泌体分别给予LPS处理的H441细胞,检测其对miR-199a-3p表达的影响。结果发现,LPS处理的H441细胞中miR-199a-3p的表达显著降低($P < 0.05$);与单独LPS处理组相比,浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 的外泌体处理组中miR-199a-3p的表达显著性升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图5)。

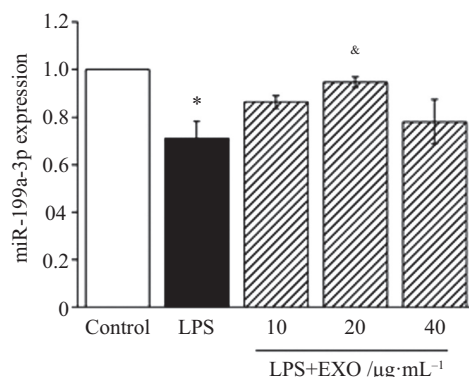
2.6 转染miR-199a-3p的H441细胞中 α -、 γ -ENaC和mTOR蛋白的表达

miR-199a-3p可能参与ENaC通道蛋白的调控,我们将miR-199a-3p的mimic和抑制剂分别转染到细胞中,检测其转染效率。通过Western blot技术检测miR-199a-3p对H441细胞 α -、 γ -ENaC蛋白表达的

影响。与阴性对照(NC)组相比,miR-199a-3p模拟物(mimic)组的H441细胞中 α -、 γ -ENaC蛋白表达显著升高($P < 0.05$);miR-199a-3p抑制剂组(inhibitor)与其对照(inhibitor NC)相比,H441细胞中 α -、 γ -ENaC蛋白表达降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果显示:miR-199a-3p能够上调 α -、 γ -ENaC蛋白表达水平(图6)。通过生信分析和网站预测发现,mTOR是miR-199a-3p的靶蛋白,如图7所示,转染miR-199a-3p mimick和miR-199a-3p inhibitor到H441细胞中后,通过Western blot实验检测了mTOR的蛋白表达,与阴性对照(NC)组相比,miR-199a-3p模拟物(mimic)组的H441细胞中mTOR蛋白表达显著降低,且差异具有统计学意义($P < 0.05$);miR-199a-3p抑制剂组(inhibitor)与其对照(inhibitor NC)相比,H441细胞中mTOR蛋白表达升高,且具有显著性差异($P < 0.001$)。

3 讨论

近年来,各种不同类型细胞分泌的外泌体由于富含旁分泌因子和许多不同的生物分子,如蛋白质、脂质、mRNA和miRNA等,而得到了众多研究者的关注^[8-9]。本实验用BMSC-exo处理LPS诱导的ALI

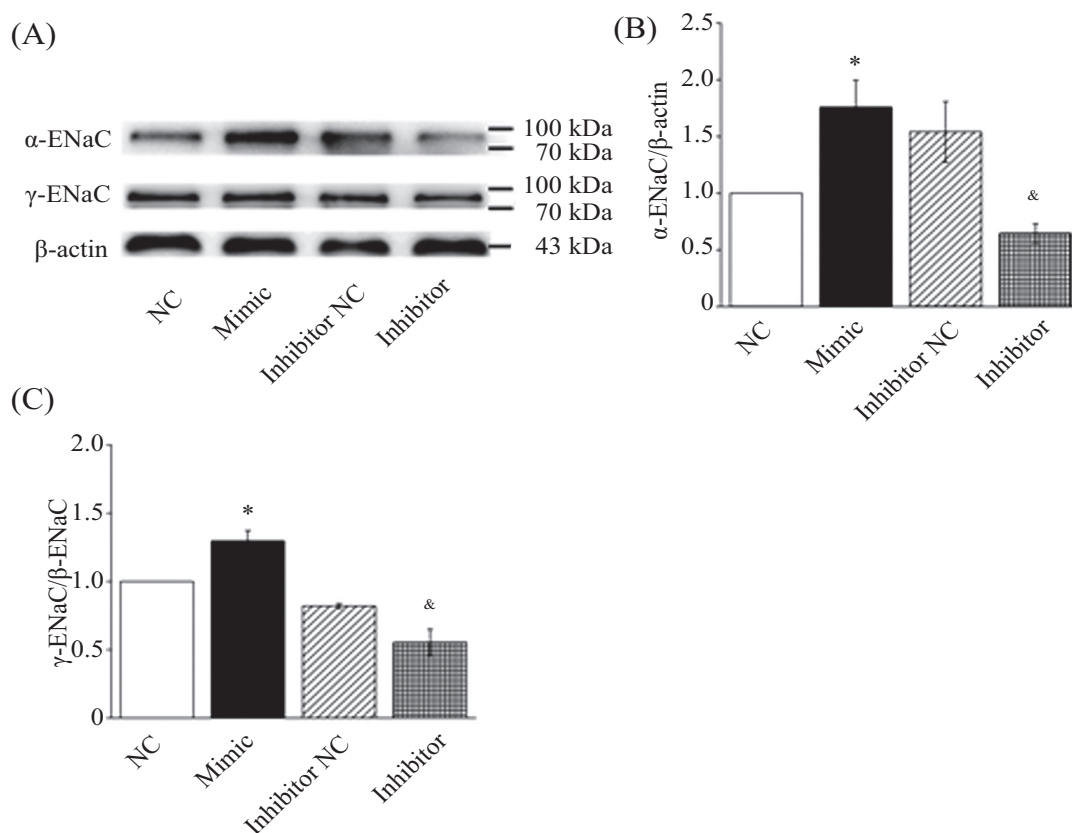


* $P < 0.05$, 与Control组比较; & $P < 0.05$, 与LPS组比较。

* $P < 0.05$ compared with Control group; & $P < 0.05$ compared with LPS group.

图5 不同浓度的外泌体对H441细胞中miR-199a-3p表达的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of exosomes on the expression of miR-199a-3p in H441 cells



A: Western blot技术分析miR-199a-3p对H441细胞中α-ENaC、γ-ENaC蛋白表达水平影响的条带图; B: α-ENaC蛋白表达的统计图; C: γ-ENaC蛋白表达的统计图。* $P < 0.05$, 与NC组比较; & $P < 0.05$, 与LPS组比较。

A: the band diagram of Western blot to analyze the effect of miR-199a-3p on the expression of γ-ENaC and α-ENaC proteins in H441 cells; B: statistical analysis of the expression of α-ENaC protein; C: statistical analysis of the expression of γ-ENaC protein. * $P < 0.05$ compared with NC group; & $P < 0.05$ compared with LPS group.

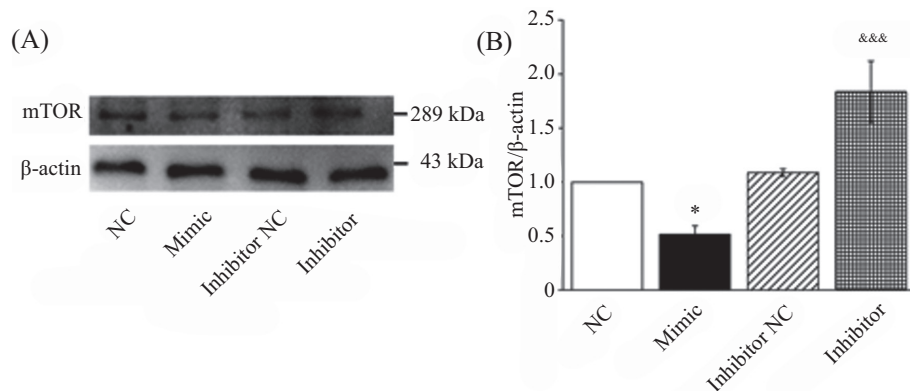
图6 转染miR-199a-3p的H441细胞中α-ENaC、γ-ENaC蛋白表达的改变

Fig.6 Changes of α-ENaC and γ-ENaC protein expression in H441 cells transfected with miR-199a-3p

模型, 观察其对肺泡上皮中ENaC亚基的蛋白水平和mRNA水平的影响。

ALI常见的临床表现为肺水肿, 后者的形成一般与肺泡液体清除率的降低密切相关, 有研究表明,

肺泡上皮细胞中的ENaC参与肺水清除和重吸收等过程, 并发挥着至关重要的作用^[10]。ENaC通道蛋白的亚基α、β和γ-ENaC分别参与不同类型的肺损伤过程, 并通过其对Na⁺的转运而控制着肺水清除的过



A: Western blot检测表明miR-199a-3p降低了H441细胞中mTOR蛋白表达水平; B: 相应的统计图; * $P<0.05$, 与NC组比较; &&& $P<0.001$, 与LPS组比较。

A: Western blot showed that miR-199a-3p decreased the expression level of mTOR protein in H441 cells; B: the corresponding statistical analysis; * $P<0.05$ compared with NC group; &&& $P<0.001$ compared with LPS group.

图7 转染miR-199a-3p的H441细胞中mTOR蛋白的表达情况

Fig.7 Expression of mTOR protein in H441 cells transfected with miR-199a-3p

程, 在水肿性疾病中起着重要作用^[11]。有研究将自体BMSCs移植到由LPS诱导的急性呼吸窘迫综合征模型体内的组织病理学的变化表明, BMSCs能够减少炎性细胞的浸润, 减轻肺水肿和肺出血等症状, 在肺损伤修复中起重要作用^[12-13]。而BMSCs对不同原因导致的肺损伤也具有一定的治疗作用^[14]。BMSCs主要是通过其旁分泌作用发挥治疗作用^[15-16], 研究表明, 给予BMSC-CM后, LPS诱导的ALI的组织病理学改变明显减弱, 白细胞介素-6和巨噬细胞炎症蛋白2的水平降低, 且无论是体外实验还是体内实验, 其结果都表明BMSC-CM治疗可增强肺泡灌洗液中中性粒细胞的凋亡, 降低抗凋亡分子BCL-XL和MCL-1的表达, 进而缓解ALI^[17]。而有研究发现, 从BMSC-CM中通过超速离心得到的外泌体对小鼠的ALI也有一定的治疗作用^[18]。BMSC-exo是BMSCs的旁分泌成分中的一种, 可以通过其内部携带的miRNA或者蛋白等起作用, miRNA可以通过与其目标mRNA分子的3'端非编码区域互补匹配, 导致该mRNA分子的翻译受到抑制或者降解该mRNA^[19]。此外miRNA的转录独立于其他基因, 且不翻译蛋白质, 参与生命过程中一系列的重要进程, 在体内代谢过程中起到多种调控作用^[19-20]。而miRNA也可以通过结合一些蛋白激酶类物质参与ENaC的调控, 同时miRNA的表达也预示着某些疾病的发生和发展^[21]。本实验则首先鉴定了所提取的物质是否为外泌体, 而后将BMSC-exo作用于LPS诱导的急性肺损伤小鼠, 发现其可以减轻肺损伤引起的肺水肿症状, 提高肺水清除率。接

着用BMSC-exo处理受损的细胞, 并在蛋白和分子水平上验证其对ENaC的修复作用, 并推测其可以改善肺损伤。我们同样研究了LPS处理下miR-199a-3p表达的变化, 应用不同浓度的外泌体后miR-199a-3p的表达有逐渐上升的趋势, 我们可以推测, LPS处理后H441细胞中miR-199a-3p表达的降低可能与肺损伤的发生有关, 通过外泌体的治疗, 可以改善急性肺损伤。网站预测和一些研究的结果表明, miR-199a-3p直接靶向作用mTOR, 且mTOR参与下游糖皮质激素调节激酶1的调控^[22-23]。研究表明, ENaC在细胞表面的表达增加与活性SGK-1的持续积累有关, 且这种联系是通过蛋白酶体途径等复杂机制产生的^[24-26]。我们的研究结果也表明, miR-199a-3p和mTOR是负调控的关系, miR-199a-3p的含量增多而mTOR蛋白的含量减少, 据此我们推测miR-199a-3p是通过调节mTOR通路来参与ENaC调控的, 从而达到对ALI的保护作用。

在ALI等肺水肿性疾病中, 患者多伴随有肺泡上皮细胞ENaC数量的减少或结构的破坏, 修复ENaC功能则可减缓此类疾病的发生和进展^[27]。本实验研究结果表明, BMSC-exo能增加ENaC亚基的表达, 因此, BMSC-exo可能成为此类疾病潜在的治疗方法, 为研究有关肺水肿性疾病提供参考价值。

参考文献 (References)

- [1] LIU Y, JIANG B J, ZHAO R Z, et al. Epithelial sodium channels in pulmonary epithelial progenitor and stem cells [J]. Int J Biol

- Sci, 2016, 12(9): 1150-4.
- [2] PHINNEY D G, PITTENGER M F, Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(9): 851-8.
- [3] KOUREMBANAS S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy [J]. *Annu Rev Physiol*, 2015, 77: 13-27.
- [4] VYAS N, DHAWAN J. Exosomes: mobile platforms for targeted and synergistic signaling across cell boundaries [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(9): 1567-76.
- [5] YI X M, WEI X X, LV H J, et al. Exosomes derived from microRNA-30b-3p-overexpressing mesenchymal stem cells protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting SAA3 [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 383(2): 111454.
- [6] DENG J, WANG D X, DENG W, et al. Regulation of alveolar fluid clearance and ENaC expression in lung by exogenous angiotensin II [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012, 181(1): 53-61.
- [7] FERGUSON S W, WANG J, LEE C J, et al. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1419.
- [8] SILVA A M, TEIXEIRA J H, ALMEIDA M I, et al. Extracellular vesicles: immunomodulatory messengers in the context of tissue repair/regeneration [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 98: 86-95.
- [9] MELDOLESI J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8): R435-44.
- [10] DENG W, LI C Y, TONG J, et al. Insulin ameliorates pulmonary edema through the upregulation of epithelial sodium channel via the PI3K/SGK1 pathway in mice with lipopolysaccharide-induced lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 1665-77.
- [11] DING Y, ZHAO R Z, ZHAO X L, et al. ENaCs as both effectors and regulators of miRNAs in lung epithelial development and regeneration [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(3): 1120-32.
- [12] MOKHBER D M R, JABBARI F M, SADEGHIAN C S, et al. Intrapulmonary autologous transplant of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improves lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in rabbit [J]. *Crit Care*, 2018, 22(1): 353.
- [13] WANG J C, QIN Y, MI X J. The protective effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMSC) on LPS-induced acute lung injury via TLR3-mediated IFNs, MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 79: 176-87.
- [14] FENG Y W, XU Q Q, YANG Y Y, et al. The therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the acute lung injury induced by sulfur mustard [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 90.
- [15] MATTHAY M A. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells for acute respiratory distress syndrome [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2015, 12(suppl 1): S54-7.
- [16] SPADARO S, PARK M, TURRINI C, et al. Biomarkers for acute respiratory distress syndrome and prospects for personalised medicine [J]. *J Inflamm*, 2019, 16(11): 1353-60.
- [17] SU V Y F, LIN C S, HUNG S C, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium induces neutrophil apoptosis associated with inhibition of the NF- κ B pathway in endotoxin-induced acute lung injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2208.
- [18] LIU A, ZHANG X W, HE H L, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived secretome and vesicles for lung injury and disease [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2020, 20(2): 125-40.
- [19] LI W, MA K, ZHANG S, et al. Pulmonary microRNA expression profiling in an immature piglet model of cardiopulmonary bypass-induced acute lung injury [J]. *Artif Organs*, 2015, 39(4): 327-35.
- [20] LEE S M, CHOI H, YANG G, et al. MicroRNAs mediate oleic acid-induced acute lung injury in rats using an alternative injury mechanism [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 292-300.
- [21] QIN K, ZHON X, WANG D X. MicroRNA-7-5p regulates human alveolar epithelial sodium channels by targeting the mTORC2/SGK-1 signaling pathway [J]. *Exp Lung Res*, 2016, 42(5): 237-44.
- [22] LI Q, XIA X F, JI J, et al. MiR-199a-3p enhances cisplatin sensitivity of cholangiocarcinoma cells by inhibiting mTOR signaling pathway and expression of MDR1 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 33621-30.
- [23] CALLEGARI E, DABUNDO L, GUERRIERO P, et al. MiR-199a-3p modulates MTOR and PAK4 pathways and inhibits tumor growth in a hepatocellular carcinoma transgenic mouse model [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 485-93.
- [24] LANG F, PEARCE D. Regulation of the epithelial Na⁺ channel by the mTORC2/SGK1 pathway [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 31(2): 200-5.
- [25] MAMSLEY M K, KORBMACHER C, BERTO G M. Inhibitors of the proteasome stimulate the epithelial sodium channel (ENaC) through SGK1 and mimic the effect of aldosterone [J]. *Pflugers Arch*, 2018, 470(2): 295-304.
- [26] LANG F, STOURNARAS C, ALESUTAN I. Regulation of transport across cell membranes by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 [J]. *Mol Membr Biol*, 2014, 31(1): 29-36.
- [27] SCHMIDT C, KLAMMT J, THOME U H, et al. The interaction of glucocorticoids and progesterone distinctively affects epithelial sodium transport [J]. *Lung*, 2014, 192(6): 935-46.