

# 缺氧环境下肾小管上皮细胞外泌体中自噬相关 microRNA 表达量的研究

晏子友<sup>1</sup>, 万鸣宏<sup>2</sup>, 杨林<sup>3</sup>, 杨芸琪<sup>2</sup>, 黄伟<sup>2</sup>, 沈金峰<sup>2</sup>, 罗富里<sup>1</sup>, 皮持衡<sup>4</sup>

**摘要** 目的 观察缺氧环境下肾小管上皮细胞(RTEC)外泌体中自噬相关的微小核糖核酸(miRNA)表达量的变化。方法 体外培养 RTEC,常氧及缺氧分别处理 RTEC,采用 Exo-Quick-TC 提取外泌体,采用透射电镜、蛋白浓度定量鉴定并比较外泌体的特性,采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 RTEC 外泌体中自噬相关 miRNA-30b、miRNA-30c、miRNA-214、miRNA-183、miRNA-200a 表达量。结果 缺氧状态下肾小管细胞分泌的外泌体外观无明显变化,缺氧 48 h 外泌体/细胞蛋白比值明显上升,明显高于常氧组,随着缺氧时间延长外泌体自噬相关 miRNA 表达逐渐上升,缺氧组各时

间段自噬相关 miRNA-30b、miRNA-30c、miRNA-214、miRNA-183、miRNA-200a 含量均高于常氧组,且随着缺氧时间延长含量逐渐上升。结论 缺氧可改变肾小管细胞分泌外泌体的生物学功能,表现为自噬相关 miRNA 表达上调,这可能是慢性肾脏病患者重要脏器出现自噬行为的原因之一。

**关键词** 缺氧; 外泌体; 肾小管上皮细胞; miRNA

**中图分类号** R 332

**文献标志码** A **文章编号** 1000 - 1492(2020)01 - 0056 - 04

**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2020.01.012

2019 - 08 - 26 接收

基金项目: 江西省自然科学基金(编号: 20171BAB205079); 江西省青年自然科学基金(编号: 20192BAB215051)

作者单位: <sup>1</sup>江西中医药大学附属医院,南昌 330000

<sup>2</sup>江西中医药大学,南昌 330000

<sup>3</sup>江西省人民医院,南昌 330000

<sup>4</sup>皮持衡全国名中医工作室,南昌 330000

作者简介: 晏子友,男,主任医师;

罗富里,男,主治医师,责任作者, E-mail: 372861629@qq.com

慢性缺氧是慢性肾脏病病理改变的主要原因之一,在慢性缺氧过程中肾小管上皮细胞(renal tubular epithelial cell, RTEC)凋亡会诱发肾小管坏死,加速慢性肾脏病进展<sup>[1-2]</sup>。自噬最初描绘成吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解内容物以获取能量的过程,可能与多种疾病的发生有关<sup>[3-5]</sup>。在肾脏病早期机体远端组织和器官可出现生物学行为改变,在肾脏病患者中肺、心脏均可出现自噬,但机制尚不明确<sup>[6]</sup>。目

Newcastle Disease Virus (NDV) and the mechanism related. **Methods** Morphological observation revealed the changes in cell surface structure and ultrastructure after virus infection; CCK-8 assay was employed to evaluate the inhibitory effect of NDV infection on human NCI-H1299 cancer cells. The apoptosis rate of infected NCI-H1299 cells was detected by flow cytometry; The expression levels of RhoA, ROCK2, F-actin and P-MYPT1 proteins, which were closely related to the microfilament skeleton, were evaluated by western blot analysis after NDV infection for 0, 24, 36, 48 h; Scratch assay and cell migration assay were used to observe the effects of virus infection on migration ability. **Results** Common inverted phase contrast microscope and scanning electron microscope images showed that the cells changed their normal morphology and structure to fusion and dead shapes after NDV F3 treatment. The microvilli on the cell surface became short, swollen or even shedded. CCK-8 assay results showed that NDV inhibited the proliferation of NCI-H1299 cells in a time- and dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Flow cytometry results demonstrated that apoptosis rate increased with NDV F3 infection time within 24 h ( $P < 0.01$ ). Western blot results showed that the expression levels of RhoA, ROCK2, F-actin and p-MYPT1 proteins have decreased with NDV infection time ( $P < 0.05$ ). Scratch assay and cell migration assay showed the healing rate of NDV-infected group was slower than that of control group and the infected cell' migration ability was inhibited significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** NDV infection inhibits the proliferation and invasion of NCI-H1299 cells via apoptotic mode. The apoptosis mechanism may be related to RhoA/ROCK pathway which is closely involved in the destruction of microfilament skeleton.

**Key words** NCI-H1299; NDV; apoptosis; RhoA/ROCK signaling pathway

前已证实在慢性肾脏病早期即可出现微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 的差异性表达, miRNA 与细胞自噬等多种生物学行为密切相关<sup>[7]</sup>。外泌体是细胞和脏器传递生物学信息的重要媒介, 外泌体中含有的 miRNA 是外泌体干预细胞功能的主要机制, 也可能是肾脏细胞沟通远端脏器的枢纽, 可能是肾脏病患者远端脏器组织自噬的主要原因<sup>[8]</sup>。该研究采用体外缺氧模型培养 RTEC, 探讨缺氧状态下 RTEC 外泌体中自噬相关 miRNA 分泌情况。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料与试剂** 大鼠 RTEC 株 (NRK-52E) 购自中国典型培养物保藏中心 (武汉 CCTC 公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 DMEM 培养基购自上海赛默飞世尔科技有限公司; miRNA 反转录试剂盒/PCR 试剂盒、cel-miR 39 购自北京天根生化科技有限公司; BCA 蛋白浓度试剂盒购自北京碧云天生态园林科技有限公司; ExoQuick-TC 外泌体提取试剂盒购自美国 SBI 公司。

**1.2 miRNA 的生物信息学预测** 利用 mi-croRNA.org、Target Scan、miRanda 及 PicTar 等生物信息学软件查阅文献确定将 miRNA-30b、miRNA-30c、miRNA-214、miRNA-183、miRNA-200a 作为自噬相关 miRNA 研究对象。

**1.3 RTEC 干预和外泌体提取** 缺氧干预与分离外泌体: 采用无外泌体的 10% FBS 培养基分皿接种培养 NRK-52E 细胞, 待细胞融合达 60% 后换用无血清培养基培养 12 h 同步化, 后换含无外泌体 1% FBS 培养基并分别放入常氧 (37 °C、21% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>)、缺氧 (37 °C、1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) 培养箱培 48 h, 收集两 2 组细胞培养上清, 加入 2 ml 的 ExoQuick-TC 沉淀液, 反复颠倒 3 次使其混匀; 冷藏 (4 °C) 过夜 (12 h); 10 000 r/min 离心 ExoQuick-TC 混合液 30 min。离心后外泌体沉淀位于试管底部, 呈浅褐色或白色。

**1.4 外泌体和细胞蛋白浓度** 取 2 组重悬液, 据 BCA 试剂盒说明书操作, 最后在 562 nm 波长处测量各样品孔吸光度值, 根据标准曲线计算外泌体蛋白浓度; 同时测定常氧及缺氧 RTEC 的蛋白浓度, 计算外泌体蛋白浓度与细胞蛋白浓度比值。

**1.5 RT-PCR 检测肾脏细胞外泌体中 miRNA 表达量** 取等蛋白量的常氧及缺氧外泌体各加入 5 pmol 的 cel-miR 39 作为外参, 根据北京天根试剂盒说明书提取外泌体总 RNA, 反转录并使用实时荧光

定量 PCR 测定 miRNA-30b、miRNA-30c、miRNA-214、miRNA-183、miRNA-200a 的表达量, 以上 miRNA 引物由北京天根公司设计合成。

**1.6 外泌体的鉴定** 采用细胞裂解液处理细胞后离心去上清液为总蛋白, 变性后每孔加入 30 μg 总蛋白行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿转移至 PVDF 膜, 5% 牛血清白蛋白 BSA 室封闭 60 min, 孵育一抗过夜, 加入二抗室温孵育 60 min, 扫描成像。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 进行统计分析。两样本比较, 使用独立样本 *t* 检验; 方差齐的多样本均数的比较使用单因素方差分析, 多重比较使用 LSD 法; 方差不齐的多样本均数的比较使用 Welch 法, 多重比较使用 Dunnett's T3 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 缺氧对外泌体基本特征的影响** 以细胞蛋白为阳性参照, 2 组重悬后 Western blot 结果均提示表达外泌体标志性蛋白 CD63, 见图 1; 取离心后沉淀重悬后电镜下观察, 镜下常氧和缺氧组囊泡均可见圆形或椭圆形的环状结构, 有完整的薄膜, 直径在 60 ~ 150 nm, 多个视野对比, 均未见明显异常, 见图 2。



图 1 Western blot 检测细胞外泌体标志物 CD63 的表达

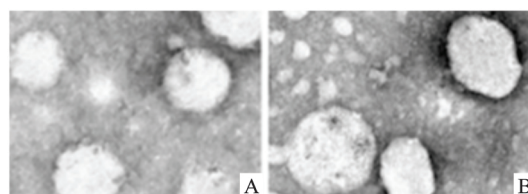


图 2 2 组大鼠外泌体形态的比较

A: 常氧组; B: 缺氧组

**2.2 缺氧对外泌体分泌量的影响** 随着时间进展, 12、24、48 h 常氧组和缺氧组外泌体总蛋白均增加, 差异有统计意义, 但 2 组细胞对应时间点分泌的外泌体总蛋白差异无统计学意义; 12、24、48 h 外泌体总蛋白用对应的细胞蛋白标化, 结果显示 12、24 h 时缺氧组外泌体/细胞蛋白比值较常氧组无明显变化, 48 h 时缺氧组外泌体/细胞蛋白比值相较常氧组高, 且差异有统计学意义, 见表 1。

表1 缺氧对外泌体分泌量的影响

组别	常氧组			F 值	P 值	缺氧组			F 值	P 值
	12 h	24 h	48 h			12 h	24 h	48 h		
外泌体蛋白	1.2 ± 0.2	3.2 ± 1.1	5.2 ± 1.3	28.5	0.03	1.3 ± 0.3	3.8 ± 1.4	5.8 ± 1.9	25.4	0.04
外泌体蛋白/细胞蛋白	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.4*	6.3	0.20	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.7 ± 0.8	31.4	0.02

与对应时间点缺氧组比较: \* P < 0.05

表2 缺氧对外泌体中自噬相关 miRNA 表达谱的影响

组别	常氧组			F 值	P 值	缺氧组			F 值	P 值
	12 h	24 h	48 h			12 h	24 h	48 h		
miRNA-30b	13.5 ± 2.8*	14.6 ± 2.9*	14.9 ± 3.1*	6.2	0.3	18.5 ± 2.8	21.5 ± 3.2	32.5 ± 3.4	31.4	0.02
miRNA-30c	8.3 ± 1.5*	9.2 ± 1.7*	10.6 ± 1.8*	8.3	0.2	8.3 ± 1.5	13.8 ± 1.2	28.4 ± 2.5	27.5	0.03
miRNA-214	5.3 ± 1.2*	6.2 ± 1.8*	6.4 ± 1.9*	6.5	0.3	9.6 ± 1.4	18.5 ± 1.6	26.4 ± 3.2	29.5	0.03
miRNA-183	6.5 ± 1.8*	7.1 ± 1.6*	7.3 ± 1.7*	8.5	0.2	12.3 ± 1.5	19.3 ± 1.9	27.7 ± 3.2	31.5	0.02
miRNA-200a	7.5 ± 1.6*	8.4 ± 1.8*	8.9 ± 1.9*	8.7	0.2	13.8 ± 1.4	23.4 ± 1.3	27.3 ± 2.6	32.8	0.02

与对应时间点缺氧组比较: \* P < 0.05

**2.3 缺氧对外泌体中自噬相关 miRNA 表达量的影响** 缺氧组患者血清中 miRNA-30b、miRNA-30c、miRNA-214、miRNA-183、miRNA-200a 水平明显增高,而且高于常氧组,差异有统计学意义,而常氧组 miRNA-30b、miRNA-30c、miRNA-214、miRNA-183、miRNA-200a 含量无明显变化,见表2。

### 3 讨论

缺氧是急慢性肾脏病患者的主要病理生理机制之一。越来越多的研究<sup>[9-11]</sup>证实急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)甚少单独发生,并且肾损伤与远端脏器(肺、肝、心、脑、消化道、骨髓)等之间存在复杂的交互作用。本研究在缺氧环境下培养肾小管上皮模拟 AKI 过程中肾脏细胞缺血缺氧的过程,通过标准化检测后发现缺氧环境下肾脏细胞分泌外泌体的量明显增多,并且随着缺氧时间的延长,外泌体的含量逐渐上升。这可能是细胞对外环境改变释放的一种信号。

自噬是广泛存在于真核细胞中的生命现象,是生物在发育、衰老的过程中存在的一个消除自身多余或者受损细胞器以及维持细胞稳态的共同机制<sup>[12]</sup>。在急慢性肾脏病疾病模型中心脏、肺、肌肉多数远端脏器和组织均存在自噬的现象<sup>[13]</sup>。目前肾脏病患者远端脏器功能改变的具体机制尚不完全明确,可能与细胞炎症因子浸润、尿毒症毒素侵袭有关,此外遗传信息的传递可能在远端脏器行为改变中存在重要的临床意义<sup>[14-15]</sup>。外泌体是细胞分泌的囊泡,携带多种生物学信息,是沟通远端细胞的主要媒介,可能参与急慢性肾损伤中远端脏器功能损伤。当 AKI 发生时肾脏细胞分泌大量 miRNA,这些

miRNA 由外泌体包裹并被释放入血,可能对远端脏器、细胞生物学行为造成影响。本研究建立体外培养肾小管上皮细胞模型,定量检测自噬相关 miRNA 表达量的影响,结果证实随着缺氧时间的延长外泌体中 miRNA-30b、miRNA-30c、miRNA-214、miRNA-183、miRNA-200a 发现了显著变化,这意味着细胞外环境改变可能导致细胞外泌体中 miRNA 表达谱改变,进而可能影响细胞的生物学行为,通过进一步分析不同缺氧时间段患者 miRNA 表达谱的关系,结果提示随着缺氧时间的延长,miRNA 表达量明显上升。提示外泌体中 miRNA 表达与肾脏病变的程度密切相关,而此类 miRNA 在外泌体的包裹下可能导致影响远端脏器的行为,干预机体重要脏器的生物学行为,这可能是肾脏病早期远端脏器发生适应性变化的重要原因。

本研究关注的是外泌体中 miRNA 表达谱在缺氧时量的上升与肾脏疾病重要脏器的自噬行为有一定程度关联,但是否还有血液中其他因素的影响,还有待于进一步研究。

综上所述,缺氧可以影响肾脏细胞外泌体的分泌,影响外泌体的量和外泌体中包裹的 miRNA 的表达,缺氧环境下证实外泌体中自噬相关 miRNA 表达均明显上调,缺氧环境下 RTEC 外泌体中自噬相关 miRNA 表达上调可能参与重要脏器的生物学行为,这为进一步研究慢性肾脏病患者重要脏器自噬行为奠定了坚实的基础。

### 参考文献

[1] Kang H M, Ahn S H, Choi P, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis de-

- velopment [J]. *Nat Med*, 2015, 21(1): 37–46.
- [2] Zhao X, Liu G, Shen H, et al. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(3): 684–92.
- [3] Jain S, Keys D, Nydam T, et al. Inhibition of autophagy increases apoptosis during re-warming after cold storage in renal tubular epithelial cells [J]. *Transplant International*, 2015, 28(2): 214–23.
- [4] Gou R, Chen J, Sheng S, et al. KIM-1 mediates high glucose-induced autophagy and apoptosis in renal tubular epithelial cells [J]. *Cell Physiology Biochem*, 2016, 38(6): 2479–88.
- [5] 朱永俊, 夏云峰, 钟良宝, 等. 自噬对肾大部切除大鼠肾小管上皮细胞程序性坏死的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(7): 1266–72.
- [6] Ryter S W, Koo M K, Choi A M. Molecular regulation of autophagy and its implications for metabolic diseases [J]. *Curr Opin Clin Nutrition Metab Care*, 2014, 17(4): 329–37.
- [7] Fesler A, Liu H, Wu N, et al. Autophagy regulated by miRNAs in colorectal cancer progression and resistance [J]. *Cancer Transm Med*, 2017, 3(3): 96–100.
- [8] Dusso A, Colombo M I, Shanahan C M. Not all vascular smooth muscle cell exosomes calcify equally in chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(2): 298–301.
- [9] Dang V D, Jella K K, Montgomery D S, et al. Molecular analysis of exosomes from mouse kidney collecting duct cells [J]. *FASEB J*, 2017, 31(12): 5399–408.
- [10] Crookenden M A, Walker C G, Peiris H, et al. Effect of circulating exosomes from transition cows on Madin-Darby bovine kidney cell function [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(7): 5687–700.
- [11] Faubel S, Edelstein C L. Mechanisms and mediators of lung injury after acute kidney injury [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(1): 48–60.
- [12] Hoste E A, Bagshaw S M, Bellomo R, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study [J]. *Intensive Care Med*, 2015, 41(8): 1411–23.
- [13] Kaushal G P, Shah S V. Autophagy in acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2016, 89(4): 779–91.
- [14] Baixauli F, López-Otín C, Mittelbrunn M. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 403.
- [15] Xu J, Camfield R, Gorski SM. The interplay between exosomes and autophagy – partners in crime [J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(15): jes215210.

## Expression of autophagy related microRNA in human renal tubular epithelial exudate under hypoxia

Yan Ziyou<sup>1</sup>, Wan Minghong<sup>2</sup>, Yang Lin<sup>3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000,

<sup>2</sup>Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000,

<sup>3</sup>Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330000)

**Abstract Objective** To observe the expression of autophagy-related microRNAs in renal tubular epithelial exosomes under hypoxia. **Methods** Tubular epithelial cells were cultured in vitro and treated with normoxia and hypoxia respectively. ExoQuick-TC was used to extract the exosomes. The characteristics of the exosomes were quantitatively identified by transmission electron microscopy and protein concentration. RT-PCR was used to detect autophagy-related microRNA30b, microRNA30c, microRNA214 and miRNA-183, miRNA-200a expression in the exosomes of tubular epithelial cells. **Results** Under hypoxic condition, the secretion of renal tubular cells in vitro did not change significantly, and the secretion of exosome/cell protein content significantly increased after 48 hours of hypoxia than that in normoxia group. With the prolongation of hypoxia time, the expression of autophagy-related exosome gradually increased. The levels of autophagy-related miRNA-30b, miRNA-30c, miRNA-214, miRNA-183 and miRNA-200a in the hypoxia group were higher than those in the normoxic group, and gradually increased with the prolongation of hypoxia. **Conclusion** Hypoxia can alter the biological function of renal tubular cell secretory exosome, which is manifested by up-regulation of autophagy-related microRNA expression. This may be one of the reasons for the important organ autophagy in patients with chronic kidney disease.

**Key words** hypoxia; exocrine body; renal tubular epithelial cells; miRNA