

# NO 诱导富含 miR-126 的胎盘间充质干细胞外泌体治疗大鼠脓毒症

张国虎<sup>1</sup>, 李友军<sup>2</sup>, 夏金明<sup>2</sup>, 吕世进<sup>2</sup>, 王锦权<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探索 NO 诱导的胎盘间充质干细胞(PMSCs)外泌体对脓毒症大鼠的治疗效果及药理机制。方法 分别利用 NO、miR-126 抑制剂、无效对照抑制剂对 PMSCs 进行诱导培养,超速离心获取 3 种外泌体(N-Exo、I-Exo 和 Exo)。利用透射电镜观察外泌体形态,qPCR 检测 miR-126 含量。取清洁级 SD 大鼠 160 只,等分成 4 组。对照组(假手术+PBS)、脓毒症组(CLP+PBS)、N-Exo 组(CLP+N-Exo)、I-Exo 组(CLP+I-Exo)。利用盲肠结扎穿孔术(CLP)构建大鼠脓毒症模型。检测各组大鼠术后 48 h 血生化指标(血清 ALT、AST、BUN、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  含量);取肺和肾,HE 染色进行病理评分、测量血管微渗漏指数和干/湿重之比;Western blot 检测肾脏内高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、晚期糖基化终产物受体(RAGE)、Toll 样受体 2(TRL-2)、TRL-4、p-p65 蛋白含量,qPCR 测量 miR-126-3p 和 miR-126-5p 的含量;最终观察各组大鼠 7 d 存活率。结果 ① miR-126 含量: N-Exo > Exo > I-Exo ( $P < 0.05$ ); ② 7 d 存活率: 脓毒症组和 I-Exo 组显著低于 N-Exo 组和对照组 ( $P < 0.05$ ); ③ 肝肾功能及炎症因子含量、肺和肾病理评分、血管微渗漏及干/湿重之比: 脓毒症组和 I-Exo 组显著高于 N-Exo 组和对照组 ( $P < 0.05$ ); ④ 肾脏内 miR-126-3p、miR-126-5p 及 HMGB1、RAGE、TRL-2、TRL-4、p-p65 蛋白含量: 脓毒症组和 I-Exo 组显著低于 N-Exo 组和对照组 ( $P < 0.05$ )。结论 N-Exo 可能是通过 miR-126-HMGB1-NF- $\kappa$ B 来抑制炎症反应,保护血管内皮细胞,最终提高脓毒症大鼠的生存率。

**关键词** 脓毒症;微小核糖核酸-126;外泌体;高迁移率族蛋白 B1

中图分类号 R 459.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)06-0918-08  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.017

脓毒症是由感染引起,因患者全身反应失调而导致的危及生命的多脏器功能障碍。其中,微血管损伤及功能障碍是最终导致多器官功能障碍的重要

原因之一,但目前临床对此还缺乏有效的治疗手段。有研究<sup>[1]</sup>表明,一氧化氮(nitric oxide,NO)可有效诱导胎盘间充质干细胞(placental mesenchymal stem cells,PMSCs)分泌富含 miR-126 的外泌体,该外泌体可有效促进损伤血管的再生。该实验试图利用该类型外泌体尝试治疗脓毒症大鼠,观察其治疗效果以及可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及设备试剂

**1.1.1 人足月龄胎盘** 经安徽医科大学伦理委员会审议并批准本次实验。在征得产妇及其家属知情同意后,于 2018 年 1 月 1 日从安徽医科大学第一附属医院妇产科无菌条件下获取一枚健康、完整胎盘。产妇无各类遗传病、传染病、妊娠并发症,且健康足月生产。

**1.1.2 大鼠** 由安徽医科大学实验动物中心提供并饲养雄性 SD 大鼠 160 只(清洁级,7~8 周龄,许可证号: scxk(皖)2018-03),体质量(240 $\pm$ 20)g,正常饮食和水,12 h/12 h 昼夜交替,饲养 1 周。

### 1.1.3 主要设备和试剂

**1.1.3.1 主要设备** 细胞培养箱购于日本 SANYO 公司;差速离心机购于德国 EPPENDORF 公司;HT7700 透射电镜购于日本 Hitachi 公司;全自动生化分析仪购于深圳迈瑞生物公司;CFX96 实时 PCR 系统购于美国 Bio-Rad 公司。

**1.1.3.2 主要试剂** 10% 胎牛血清购于澳大利亚 FBS 公司;复合消化酶、DAEM/F12 培养基购于美国 Gibco 公司;CS-NO<sup>[2]</sup> 购于上海生工生物工程公司; $\beta$ -半乳糖苷酶购于上海吉至生化公司;Opti-MEM 减血清培养基购于美国 Invitrogen 公司;miR-126 抑制剂及 qPCR 引物购于广州锐博生物有限公司;水合氯醛、异氟烷购于山东鲁南贝特公司;ELISA 检测试剂盒购于武汉贝茵莱公司;QIAGEN miRNA Reverse Transcription Kit 反转录试剂盒、SYBR Green master mix、miR Neasy 试剂盒购于美国 QIAGEN 公司;BCA 蛋白质测定试剂盒购于美国 Promega 公司;聚偏二

2019-04-02 接收

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(编号:2015KYB300)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学附属省立医院重症医学科,合肥 230001

<sup>2</sup>杭州师范大学附属医院急诊重症监护室,杭州 310011

作者简介:张国虎,男,硕士研究生;

王锦权,男,主任医师,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:jqwang604@163.com

氟乙烯膜、兔抗大鼠一抗、过氧化物酶标记的二抗购于美国 GE Healthcare 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 人胎盘间充质干细胞的培养** 无菌条件下,取胎儿蜕膜侧胎盘组织,剪成  $1 \sim 3 \text{ mm}^3$  组织块。利用复合消化酶(0.2% 胶原酶 + 0.35% 透明质酸酶 + 100 U/ml DNA 酶)消化 50 min。离心获取细胞接种于 DAEM/F12 培养基,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。贴壁克隆样生长的细胞经 0.25% 胰酶消化传代,取第 4 代 PMSCs 用于实验。

**1.2.2 NO 和 miR-126 抑制剂诱导培养** 取第 4 代 PMSCs 等分为 3 组,分别为 A1、A2 和 A3。首先,向 A1、A2 的培养基中分别加入 0.25 mg/ml 的 NO 缓释剂(CS-NO),向 A3 培养基中加入等量的蒸馏水,培养 24 h。然后,按照转染试剂盒使用说明书,利用 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 转染试剂和 Opti-MEM 减血清培养基进行转染。其中 A2 中加入 miR-126-3p 和 miR-126-5p 抑制剂各 50 nmol/L,向 A1 和 A3 中则加入等量的无效对照抑制剂,转染 5 h。最终分别获得 A1(经 NO 诱导的 PMSCs、NO-PMSCs)、A2(miR-126 抑制剂诱导的 PMSCs、I-NO-PMSCs)、A3(无诱导的 PMSCs)。

**1.2.3 外泌体的提取** 分别收集 3 种诱导培养干细胞(NO-PMSCs、I-NO-PMSCs 和 PMSCs)的条件培养基各 200 ml,先 2 307 r/min 离心 10 min;然后,11 304 r/min 离心 20 min;最后 32 630 r/min 离心 70 min。从而分别获得两种对应的外泌体(N-Exo、I-Exo 和 Exo)。

**1.2.4 透射电镜观察外泌体** 取一滴外泌体悬液放置于栽样铜网上,室温下静置孵育 5 min,用 2% 乙酸铀酰对样品进行染色 30 s,然后放置晾干 60 min,最后使用透射电镜进行观察。

**1.2.5 脓毒症大鼠模型(CLP)的建立及分组治疗** 术前大鼠称重,首先使用 4% 的混合气体(异氟烷 + 纯氧)对大鼠进行吸入麻醉,后改用 2% 的混合气体进行维持麻醉。大鼠仰卧位备皮并消毒。腹正中切口,钝性分离腹肌,进入腹膜,于右下腹寻找并分离盲肠,找到回盲口,使用 4-0 丝线在回盲部和盲肠末端中点位置避开肠系膜血管进行结扎,不中断肠连续性。在盲肠末端上约 0.5 cm 处,使用 18 号针头贯通穿刺盲肠 2 次,挤出约黄豆粒大小的粪便,然后将盲肠还纳腹腔。丝线逐层缝合腹膜、腹壁及皮肤。术后使用预热( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ )的生理盐水输液( $30 \text{ ml/kg}$ )复苏,并于术后 6 h、24 h 和 48 h,给每只大

鼠分别皮下注射  $25 \text{ mg/kg}$  的亚胺培南。

所有 160 只大鼠随机等分为 4 组,即对照组(假手术 + PBS)、脓毒症组(CLP + PBS)、Exo 组(CLP + N-Exo)、I-Exo 组(CLP + I-Exo),每组 40 只大鼠。然后,在每组大鼠中,再次随机抽取 20 只,用于存活率观察实验;剩余的 20 只则用于病理学分析及分子生物学实验。所有干预治疗均为术后 4 h,通过尾静脉注射,剂量为  $2 \text{ mg/kg}$ ,外泌体浓度为  $1 \text{ g/L}$ 。

**1.2.6 大鼠存活率** CLP 术后开始监测所有大鼠的活动,每日 2 pm 记录 1 次大鼠状态,连续监测 7 d,统计各组大鼠 7 d 存活率。

**1.2.7 肝肾功能、炎症因子监测及主要脏器病理检验** 术后 48 h,使用水合氯醛( $10\%$ 、 $300 \text{ mg/kg}$ )腹腔注射麻醉,开腹,夹闭腹主动脉近心端,采血针缓慢抽取全血。静置(室温、30 min)、离心( $3\ 000 \text{ r/min}$ 、10 min)取上清液, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存。

使用全自动生化分析仪检测血清 ALT、AST 和 BUN 的含量。按照 ELISA 检测试剂盒的操作规范,首先试剂盒复温(室温、30 min)。然后,取所测指标(IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ )的标准品,各加入 1 ml 稀释液,静置( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 、15 min),然后慢慢搅匀,然后根据需要进行稀释。在样板条的每个孔中加入  $100 \text{ }\mu\text{l}$  标准品或是血清,恒温孵育( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、90 min),然后洗板(4~5 次、 $350 \text{ }\mu\text{l/孔}$ )。接着,加入生物素化的抗体( $100 \text{ }\mu\text{l/孔}$ ),再次封板孵育( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、60 min),然后再次洗板。最后,加入显色底物(TMB、 $100 \text{ }\mu\text{l/孔}$ ),再次避光孵育( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、15 min)。然后加入终止液( $100 \text{ }\mu\text{l/孔}$ ),并于 3 min 内使用多功能酶标仪测 OD 值,通过每种检测指标的标准曲线算的对应浓度。

打开大鼠胸、腹腔,快速分离肺脏和肾脏,10% 福尔马林固定,石蜡包埋,制作 5 mm 切片,HE 染色,显微镜下观察。调节相同的光圈及放大倍数,每张切片随机选取 10 个视野,由两名病理专业医师,根据肺<sup>[3]</sup>、肾<sup>[4]</sup>损伤评分标准进行盲法评分,并对评分进行统计。肺脏病理评分标准:1 分:正常;2 分:肺间质炎性细胞浸润  $< 50\%$ ;3 分:肺间质炎性细胞浸润  $> 50\%$ ;4 分:肺实变及免疫细胞浸润  $< 50\%$ ;5 分:肺实变及免疫细胞浸润  $> 50\%$ 。每组所得分数进行统计分析。肾脏病理评分标准:1 分:单细胞或点状坏死;2 分:肾小管受损面积  $< 25\%$ ;3 分:肾小管受损面积为  $25\% \sim 50\%$ ;4 分:肾小管受损免疫为  $50\% \sim 75\%$ ;5 分:肾小管受损免疫  $> 75\%$ 。

**1.2.8 肺和肾血管微渗漏和干/湿重之比** 术后 48 h,通过尾静脉给所有大鼠注射伊文思蓝(2%、4 ml/kg) 40 min 后处死大鼠,打开胸腔,使用生理盐水从左心室进行灌注,直至右心耳流出无色液体为止。完整摘取双侧肺脏和肾脏。将左侧肺脏和肾脏分别浸入甲酰胺溶液(3 ml)中,在恒温箱中孵育 48 h 后,离心(3 000 r/min、8 min),取上清液,以甲酰胺溶液为空白对照,在 620 nm 波长处测定 OD 值。将右侧肺脏和肾脏表面水分用滤纸拭干,称取湿重。然后将组织放入烤箱中干燥(60 °C、48 h),再称取干重,并计算干/湿重比。

**1.2.9 实时荧光 PCR** 取各组大鼠肾脏组织和两种外泌体,利用 miR Neasy 试剂盒从细胞或肾脏组织中分离总 RNA。然后,按照 QIAGEN miRNA Reverse Transcription Kit 反转录试剂盒的使用说明,对 RNA 进行逆转录。cDNA 合成完毕后,利用 SYBR Green master mix 的实时检测方法,通过 CFX96 实时 PCR 系统测定 miR-126-3p 或 miR-126-5p 的水平,引物序列如表 1。使用细胞内 snRNA U6 作为内参,使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  值进行定量计算。

表 1 引物序列

目的基因	引物序列(5' -3')
miR-126-3p	F: 5'-GCATCGTCGTACCCGTGAGTAAT-3' R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTTC-3'
miR-126-5p	F: 5'-GGCGGCATTATTACTTTTGG-3' R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3' R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

**1.2.10 蛋白质印迹分析** 取各组大鼠肾脏组织,在 RIPA 裂解缓冲液中收获细胞,利用 BCA 蛋白质测定试剂盒进行蛋白定量,通过 10% SDS-PAGE 进行分离,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜在 5% 脱脂乳中封闭 1 h,并在 4 °C 条件下,一抗中孵育过夜,然后在室温条件下,与辣根过氧化物酶偶联的第二抗孵育 1 h。用荧光显色剂显色。使用  $\beta$ -肌动蛋白用作内部对照。一抗: HMGB1(1 : 1 000; 兔 IgG)、RAGE(1 : 1 000; 兔 IgG)、TRL-2(1 : 1 000; 兔 IgG)、TRL-4(1 : 1 000; 兔 IgG)、p-p65(1 : 1 000; 兔 IgG)、t-p65(1 : 1 000; 兔 IgG)和  $\beta$ -肌动蛋白(1 : 1 000; 兔 IgG); 二抗: 经过氧化物酶标记的羊抗兔抗体。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,计量资料实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 ANOVA 方差分析,组内比较采用采用 Bonferroni

法。生存分析采用 Kaplan-Meier 法,组间比较采用 Log-rank 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 外泌体的获得和鉴定分析** 电镜检测结果显示,N-Exo 和 I-Exo 两种外泌体均为直径约为 70 nm 的圆形膜囊泡,两者在形态上无显著差异,如图 1。但 3 种外泌体 miR-126 的含量,I-Exo 显著低于 Exo,而 Exo 则显著低于 N-Exo,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。提示本实验成功提取了外泌体,且 NO 诱导培养显著增加了 N-Exo 中 miR-126 的含量,而 miR-126 抑制剂的培养则显著降低了 I-Exo 中 miR-126 的含量。

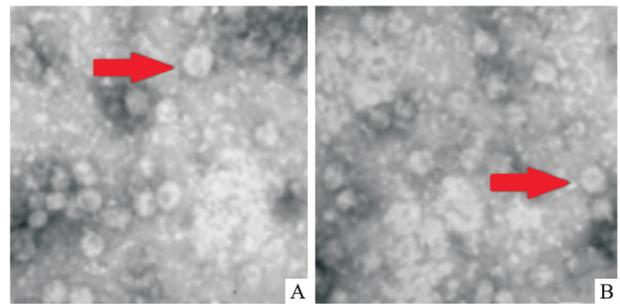


图 1 外泌体透射电镜照片  $\times 100\ 000$   
A: N-Exo 组; B: I-Exo 组

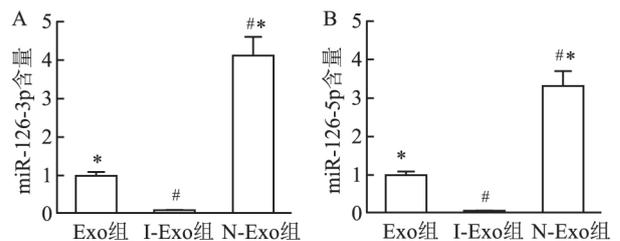


图 2 不同外泌体内 miR-126-3p 和 miR-126-5p 的含量

A: miR-126-3p; B: miR-126-5p; 与 Exo 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 I-Exo 组比较: \*  $P < 0.05$

## 2.2 外泌体对于脓毒症大鼠的治疗效果

**2.2.1 生存分析** 各组大鼠进行 7 d 存活率统计并绘制生存曲线图(图 3)。其中脓毒症组和 I-Exo 组间差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.38, P > 0.05$ ),但 N-Exo 组大鼠生存率显著高于脓毒症组和 I-Exo 组,差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.02, 6.89, P < 0.05$ )。提示 N-Exo 可以显著提高脓毒症大鼠的 7 d 生存率。

**2.2.2 血生化分析** N-Exo 组显著降低了各项血生化指标及炎症因子的含量,与对照组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); I-Exo 组则未降低各项生化指标及炎症因子的含量,与脓毒症组间差异无统计学

意义( $P > 0.05$ )。N-Exo 组和对照组各项生化指标及炎症因子均显著低于脓毒症组和 I-Exo 组, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。见表 2。

**2.2.3 肺肾病理分析** 术后 2 天, N-Exo 显著降低了肺脏和肾脏的损伤, 损伤评分与对照组间差异无统计学意义; I-Exo 组和脓毒症组则出现肺泡壁增厚、肺间质间隙增大、肺泡内炎症细胞浸润增多; 肾脏出现毛细血管充血, 肾小管损伤和刷状缘丧失, 见图 4。I-Exo 组和脓毒症组病理损伤评分显著高于对照组和 N-Exo 组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 5。

**2.2.4 肺脏和肾脏的血管微渗漏及干/湿重比** N-Exo 组有效缓解了脓毒症造成的微血管损伤, 血管微渗漏和器官干/湿重比均显著降低, 与对照组间差异无统计学意义; 而 I-Exo 组则无显著的治疗作用, 与脓毒症组间差异无统计学意义, 且均显著高于 N-Exo 组和对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 6。

**2.3 肾脏中 miR-126、HMGB1 及其下游关键靶点蛋白含量的变化** 对照组和 N-Exo 组、脓毒症组和 I-Exo 组大鼠肾脏内 miR-126-3p 和 miR-126-5p 含量

差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 但对照组和 N-Exo 组大鼠肾脏内 miR-126-3p 和 miR-126-5p 含量显著高于脓毒症组和 I-Exo 组, 且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 7。提示脓毒症导致大鼠肾脏内 miR-126 表达降低, 而富含 miR-126 的 N-Exo 提高了肾脏内 miR-126 的含量, 而缺乏 miR-126 的 I-Exo 则无此功能。

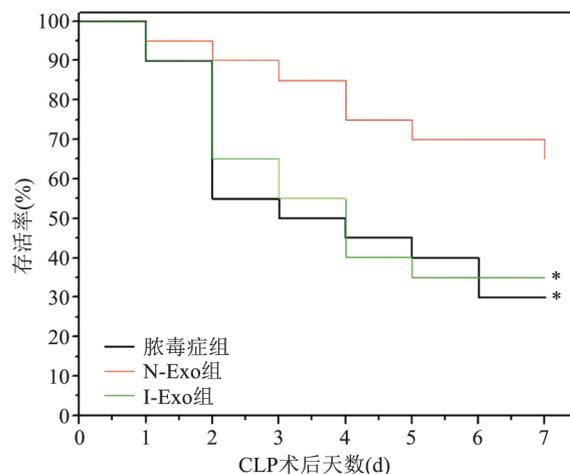


图3 各组大鼠生存分析曲线图  
与 N-Exo 组比较: \*  $P < 0.05$

表 2 各组大鼠血清多项生化指标统计表( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

指标	对照组	脓毒症组	I-Exo 组	N-Exo 组	F 值	P 值
AST(U/L)	25.2 ± 0.9	98.4 ± 4.1	95.2 ± 3.8	24.3 ± 1.9	3 885.0	<0.001
ALT(U/L)	17.2 ± 0.8	70.1 ± 4.3	67.5 ± 3.9	18.1 ± 1.2	1 925.8	<0.001
BUN(mg/dl)	48.1 ± 2.5	120.7 ± 5.6	117.3 ± 6.4	46.7 ± 2.4	1 623.2	<0.001
IL-1β(pg/ml)	152.4 ± 5.3	816.7 ± 57.2	845.1 ± 60.3	157.7 ± 20.2	1 660.1	<0.001
IL-6(mg/ml)	0.5 ± 0.1	6.8 ± 1.0	6.5 ± 1.3	0.6 ± 0.2	362.6	<0.001
IL-10(pg/ml)	10.0 ± 0.2	421.4 ± 37.6	385.7 ± 40.5	10.9 ± 1.5	1 353.8	<0.001
TNF-α(pg/ml)	11.7 ± 0.5	82.4 ± 5.6	76.5 ± 7.9	10.8 ± 1.3	1 300.9	<0.001
IFN-γ(pg/ml)	20.1 ± 2.1	47.8 ± 5.5	43.2 ± 6.1	22.2 ± 2.5	206.8	<0.001

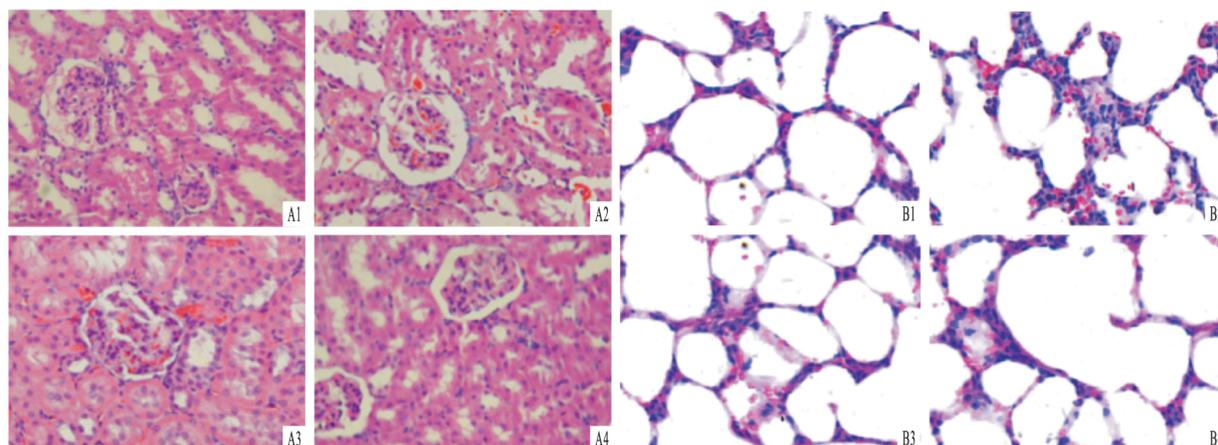


图 4 各组大鼠肺脏和肾脏病理切片 HE 染色 × 100

A: 肺脏病理切片; B: 肾脏病理切片; 1: 对照组; 2: 脓毒症组; 3: I-Exo 组; 4: N-Exo 组

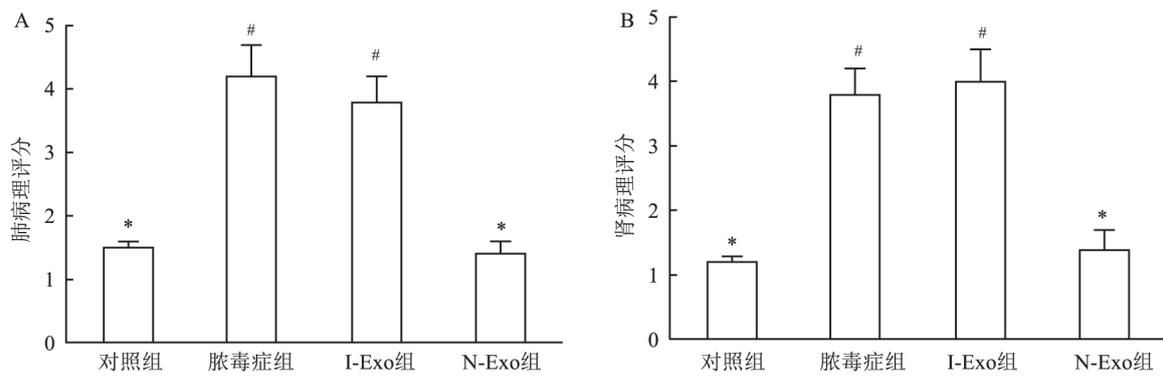


图5 各组大鼠肺脏和肾脏病理损伤评分统计图

A: 肺病理评分; B: 肾病理评分; 与对照组比较: #  $P < 0.05$ ; 与脓毒症组比较: \*  $P < 0.05$

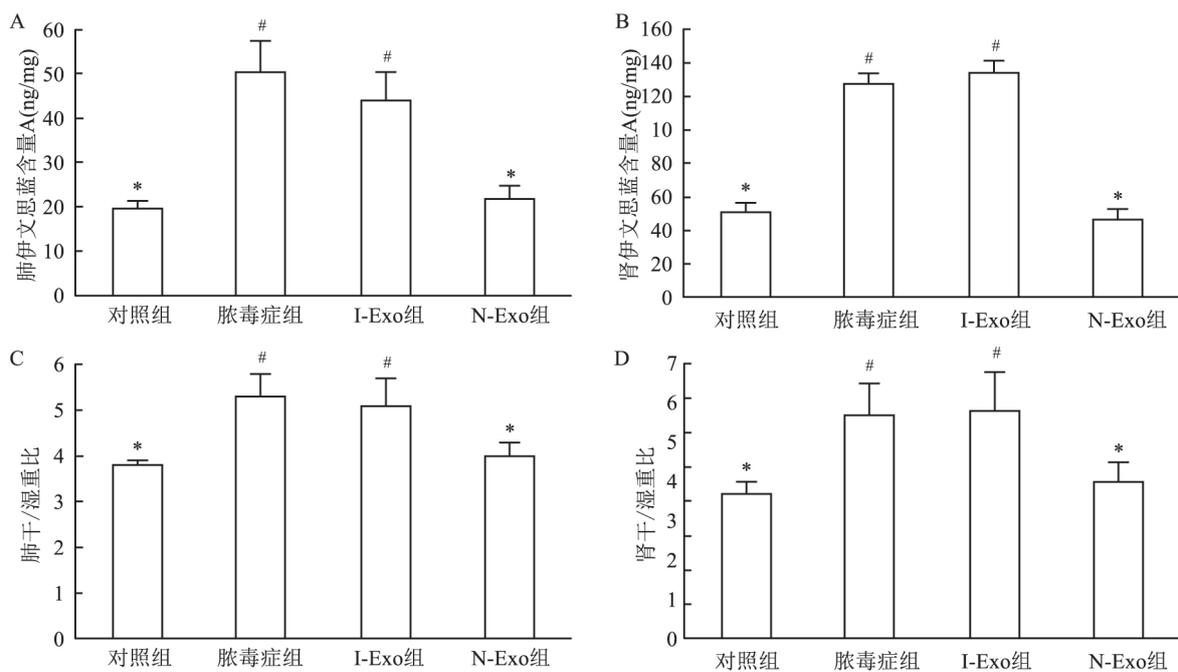


图6 各组大鼠肺脏和肾脏血管微渗漏及肾脏干/湿重比统计图

A: 肺伊文思蓝含量; B: 肾伊文思蓝含量; C: 肺干/湿重比; D: 肾干/湿重比; 与对照组比较: #  $P < 0.05$ ; 与脓毒症组比较: \*  $P < 0.05$

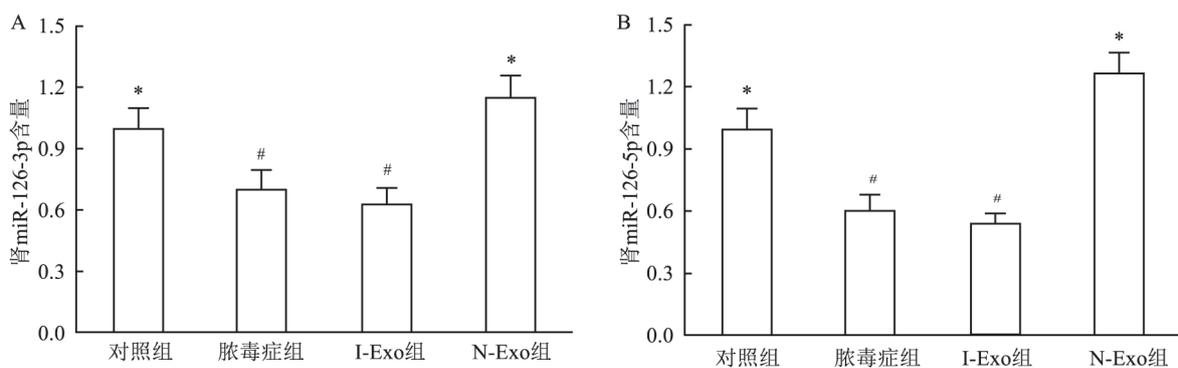


图7 各组大鼠肾脏内 miR-126-3p 和 miR-126-5p 含量统计图

A: 肾 miR-126-3p 含量; B: 肾 miR-126-5p 含量; 与对照组比较: #  $P < 0.05$ ; 与脓毒症组比较: \*  $P < 0.05$

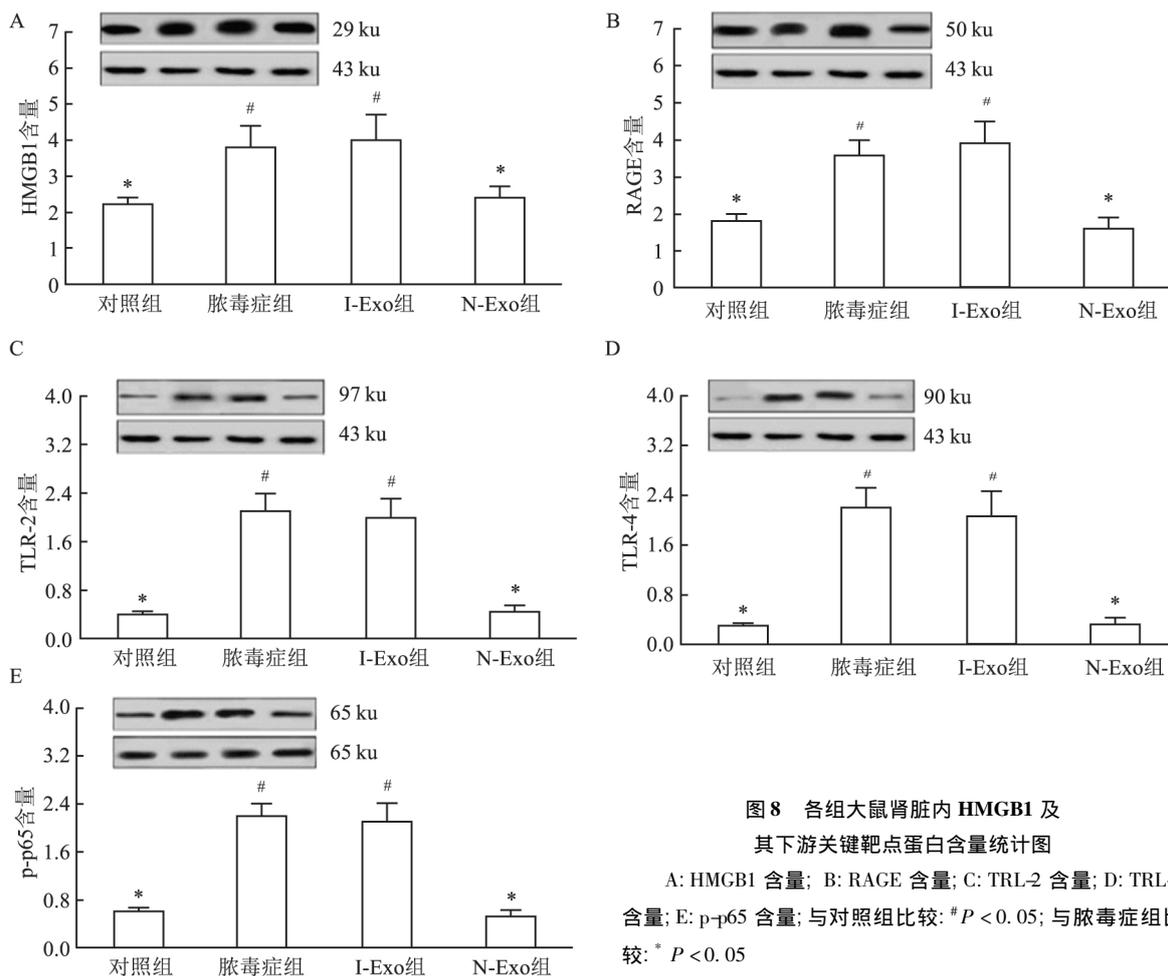


图8 各组大鼠肾脏内 HMGB1 及其下游关键靶点蛋白含量统计图

A: HMGB1 含量; B: RAGE 含量; C: TRL-2 含量; D: TRL-4 含量; E: p-p65 含量; 与对照组比较: #  $P < 0.05$ ; 与脓毒症组比较: \*  $P < 0.05$

对照组和 N-Exo 组、脓毒症组和 I-Exo 组大鼠肾脏内 HMGB1、RAGE、TRL-2、TRL-4 和 p-p65 含量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 但对照组和 N-Exo 组大鼠肾脏内 HMGB1、RAGE、TRL-2、TRL-4 和 p-p65 的含量显著高于脓毒症组和 I-Exo 组, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 8。提示脓毒症导致大鼠肾脏内 HMGB1 表达升高, 同时导致 HMGB1 下游靶点受体 RAGE、TRL-2、TRL-4 的表达升高, 最终引起核心炎症因子 NF- $\kappa$ B 的 p-p65 的含量升高。N-Exo 对该病理过程具有逆转作用, 这可能就是 N-Exo 的药理机制。

### 3 讨论

miR-126 主要表达在富含血管的组织内, 例如心脏、肺和肾脏之中<sup>[5]</sup>, 因此本研究主要集中于大鼠富含血管的肾脏组织中。miR-126 的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶的加工, 其大小臂分别形成一条具有功能的成熟 miRNA, 即 miR-126-3p 和 miR-126-5p。既往的研究主要集中于 miR-126-3p, 发现了众

多的作用靶点。然而, 对于 miR-126-5p 的研究则相对较少, 发现的作用靶点也较少, HMGB1 就是其中之一。Tang et al<sup>[6]</sup> 通过 miR-126 的类似物和抑制剂人为增高或降低高糖培养条件下的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 中 miR-126 的水平, 通过荧光素酶报告基因测定, 证实了 HMGB1 基因的 3'-UTR 是 miR-126 的直接靶点; 同时, 过表达 miR-126 可通过降低 HMGB1 的表达水平, 进而抑制 TNF- $\alpha$  表达以及 ROS 含量和 NADPH 氧化酶的活性, 可能是通过激活 Akt-NOS 信号通路来发挥抗炎保护作用; 抑制 miR-126 的表达, 则获得相反的实验结果。

HMGB1 几乎存在于人体所有的细胞内, 主要位于细胞核和细胞质内; 生理条件下, 细胞外无 HMGB1。脓毒症中, 由于激烈的炎症反应和大量的细胞坏死, 活化的单核/巨噬细胞以及损伤坏死细胞, 均可释放大量的 HMGB1 至细胞外, 它们通过介导早期和晚期炎症反应以及适应性免疫应答, 在脓毒症的发生、发展中起到重要的作用, 同时也是脓毒症的候选治疗靶点之一<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[8-9]</sup> 表明,

HMGB1 在脓毒症小鼠体内是重要的内源性致死因子。另一方面, HMGB1 的水平也可反映脓毒症中机体炎症及损伤程度, 甚至直接关系到脓毒症的预后。HMGB1 的主要受体分子有 TLRs<sup>[10]</sup>、RAGE<sup>[11]</sup>、T 细胞免疫球蛋白黏液素 3 (TIM3)<sup>[12]</sup> 以及 CXCR4<sup>[13]</sup> 等。其中, TLRs 主要通过调节髓样分化因子 (MyD88) 或 p38MAPK 途径, 促使 NF-κB 活化, 从而导致多种炎症因子的释放; RAGE 则通过激活 p38MAPK 和细胞外调节蛋白激酶 (ERK1/2), 进而导致 IκB 的磷酸化和降解, 最终也是通过激活 NF-κB, 促进其核转移, 以正反馈的形式进一步增强 RAGE 表达。TIM3 则主要抑制单核/巨噬细胞的活化, 同时介导 T 细胞的凋亡, 且与 TLRs 途径相互抑制。CXCR4 则主要通过对多种免疫细胞的趋化作用, 从而促进炎症反应的发生发展。本实验结果显示富含 miR-126 的 N-Exo 不光显著降低了脓毒症大鼠肾脏组织内的 HMGB1 水平, 也降低了 TLR-2、TLR-4 以及 RAGE 的水平, 同时还降低了这些受体信号通路的交汇点—NF-κB 的 p65 的磷酸化水平。因此, 提示 N-Exo 可能是通过 miR-126 的输注, 降低了脓毒症大鼠 HMGB1 的水平, 进而通过 TLR-2、TLR-4 以及 RAGE 受体的信号转导, 抑制 NF-κB 的激活, 进而抑制多种炎症因子的释放并缓解炎症反应, 从而降低血管内皮细胞的损伤和血管微渗漏, 保护多种器官的功能, 最终提高脓毒症大鼠的生存率。本实验结果提示, 利用 NO 诱导的富含 miR-126 的 PMSCs 外泌体有望成为治疗脓毒症的新型生物制剂。下一步的研究主要集中于如何通过调节 NO 浓度调节外泌体内 miR-126 含量以及探索治疗脓毒症最适外泌体浓度。

参考文献

[1] Du W, Zhang K, Zhang S, et al. Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer [J]. *Biomaterials*, 2017, 133: 70 -

81.  
 [2] Zhao Q, Zhang J, Song L, et al. Polysaccharide-based biomaterials with on-demand nitric oxide releasing property regulated by enzyme catalysis [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(33): 8450 - 8.  
 [3] Nauta A J, Westerhuis G, Kruisselbrink A B, et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. [J]. *Blood*, 2006, 108(6): 2114 - 20.  
 [4] Langenberg C, Bagshaw S M, May C N, et al. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review [J]. *Critical Care*, 2008, 12(2): R38.  
 [5] Pablo L, Mirabela R, Robert S, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1401 - 14.  
 [6] Tang S T, Wang F, Shao M, et al. MicroRNA-126 suppresses inflammation in endothelial cells under hyperglycemic condition by targeting HMGB1 [J]. *Vascul Pharmacol* 2017, 88: 48 - 55.  
 [7] Lee W, Ku S, Kim T H, et al. Emodin-6-O-β-d-glucoside inhibits HMGB1-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food Chem Toxicol* 2013, 52: 97 - 104.  
 [8] Wang H, Ward M F, Sama A E, et al. Targeting HMGB1 in the treatment of sepsis [J]. *Expert Opin Ther Tar* 2014, 18(3): 257 - 68.  
 [9] Zhang T, Xia M, Zhan Q, et al. Sodium butyrate reduces organ injuries in mice with severe acute pancreatitis through inhibiting HMGB1 expression. [J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(7): 1991 - 9.  
 [10] Lee C H, Yoon S J, Lee S M, et al. Chlorogenic acid attenuates high mobility group box 1 (HMGB1) and enhances host defense mechanisms in murine sepsis [J]. *Mol Med*, 2012, 18(1): 1437 - 48.  
 [11] Li K, Yang J, Han X. Ketamine attenuates sepsis-induced acute lung injury via regulation of HMGB1-RAGE pathways [J]. *Int Immunopharmacol* 2016, 34: 114 - 28.  
 [12] Kadowaki T, Morishita A, Niki T, et al. Galectin-9 prolongs the survival of septic mice by expanding tim-3-expressing natural killer T cells and PDCA-1 + CD11c + macrophages [J]. *Crit Care*, 2013, 17(6): R284.  
 [13] 杨璐璐, 孙自敏, 刘欣, 等. 胞外 HMGB1 调控 SDF-1/CXCR-4 轴介导脐血 CD34 + 细胞的迁移作用研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(5): 1415 - 21.

**NO - induced miR - 126 - rich placental mesenchymal stem cell exosomes to treat sepsis in rats**

Zhang Guohu<sup>1</sup>, Li Youjun<sup>2</sup>, Xia Jinming<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Intensive Care Unit, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

<sup>2</sup>Emergency Intensive Care Unit, The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310011)

**Abstract Objective** To investigate the therapeutic effect of NO-induced placental mesenchymal stem cell (PM-SC) exosomes in septic rats and its pharmacological mechanism. **Methods** PMSCs were induced by NO, miR-126

网络出版时间: 2019-5-30 10:50 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190527.1648.012.html>

## N-乙酰半胱氨酸对脂多糖诱导的人牙周膜成纤维细胞表达相关蛋白和基因的影响

郑睿, 谭裕洁, 古萌琴, 康婷, 郭玲

**摘要** 目的 研究 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 对脂多糖 (LPS) 诱导的人牙周膜成纤维细胞 (hPDLFs) 中关于人类肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 合成的影响。方法 hPDLFs 通过原代培养获得。以不同浓度的 NAC 或 LPS 刺激细胞, 使用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 在不同时间点 (24、48、72 h) 测量细胞增殖情况, 以此得到药物的最适浓度。通过实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 分析测定 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和核转录因子 (NF- $\kappa$ B) 的 mRNA 水平。通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测量 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 的蛋白质水平。结果 随着 NAC 药物浓度的升高, 细胞的增殖

率上升, 并且在 NAC 处于 1 mmol/L 时到达顶峰, 此后细胞增殖率随 NAC 浓度增高而下降。LPS 可诱导 hPDLFs 中的 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B mRNA 及蛋白表达的增加。然而 NAC 预处理抑制了这些效应。结论 NAC 通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性, 从而抑制 LPS 诱导的 hPDLFs 中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的合成。

**关键词** N-乙酰半胱氨酸; 脂多糖; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; 人牙周膜成纤维细胞

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)06-0925-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.018

2019-01-30 接收

基金项目: 四川省科技厅面上项目 (编号: 2017JY0111); 泸州市-校联合 (编号 2016LZXNYD-J20); 西南医科大学重点项目 (编号: 2016013); 西南医科学青年基金 (编号: 23)

作者单位: 西南医科大学附属医院修复科, 泸州 646000

作者简介: 郑睿, 男, 硕士研究生;

郭玲, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 372083745@qq.com

牙周炎 (periodontitis, PD) 是由特定微生物引起的一种常见的口腔疾病, 可导致牙周支持组织的破坏<sup>[1-2]</sup>。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 通过诱导炎症细胞因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 等的释放, 并使口腔微生物群从共生状

inhibitor and null control inhibitor, and three exosomes (N-Exo, I-Exo and Exo) were obtained by ultracentrifugation. The morphology of exosomes was observed by transmission electron microscope, and the content of miR-126 was detected by qPCR. 160 clean grade SD rats were taken and divided into 4 groups. Control group (sham operation + PBS), sepsis group (CLP + PBS), N-Exo group (CLP + N-Exo), I-Exo group (CLP + I-Exo). A rat sepsis model was constructed using cecal ligation and puncture (CLP). Blood biochemical parameters (serum ALT, AST, BUN, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  content) were measured at 48 h after operation in each group. Taking lung and kidney, HE staining for pathological score, measuring the ratio of vascular microleakage index and dry/wet weight; Western blot was used to analyze high mobility group box-1 protein (HMGB1), advanced glycation end product receptor (RAGE), Toll-like receptor 2 (TRL-2), TRL-4, p-p65 protein content, qPCR measurement the content of miR-126-3p and miR-126-5p; Finally, the survival rate of rats in each group was observed at 7 days. **Results** ① miR-126 content: N-Exo > Exo > I-Exo ( $P < 0.05$ ); ② 7 d survival rate: the sepsis group and the I-Exo group were significantly lower than the N-Exo group and the control group ( $P < 0.05$ ); ③ The ratio of liver and kidney function and inflammatory factors, lung and renal pathological score, vascular microleakage and dry/wet weight: the sepsis group and the I-Exo group were significantly higher than the N-Exo group and the control group ( $P < 0.05$ ); ④ Contents of miR-126-3p, miR-126-5p and HMGB1, RAGE, TRL-2, TRL-4, and p-p65 in the kidney: the sepsis group and the I-Exo group were significantly lower than the N-Exo group and the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** N-Exo may inhibit inflammatory response through miR-126-HMGB1-NF- $\kappa$ B, protect vascular endothelial cells, and ultimately improve the survival rate of septic rats.

**Key words** sepsis; micro RNA-126; exosomes; high mobility group box-1 protein