

外泌体 miR-125a-5p 对 NIH/3T3 细胞增殖和凋亡的影响

张建会, 王永星, 郝长付, 于兴浩, 黄婧旋, 魏静静, 杨果, 姚武

郑州大学公共卫生学院尘肺病教研室, 河南 郑州 450000

摘要:

[背景] 矽肺发生涉及多细胞、多因子的变化和相互作用, 其中成纤维细胞是肺纤维化过程中关键的效应细胞。近年来研究发现, 成纤维细胞的增殖除了受转化生长因子- β 等细胞因子的调节之外, 外泌体作为细胞间信号的载体也在其中发挥重要的作用。外泌体 miRNAs 介导的细胞间信号可能在 SiO₂ 诱导的成纤维细胞转分化和增殖中发挥作用。前期研究发现 miR-125a-5p 是一条差异表达的 miRNAs。

[目的] 探讨外泌体 miR-125a-5p 对小鼠胚胎成纤维细胞 NIH/3T3 增殖和凋亡的影响。

[方法] 培养 RAW264.7 细胞, 收取上清提取外泌体, 并采用透射电镜、纳米颗粒跟踪分析和 Western blot 对其进行鉴定。设立对照组和 SiO₂ 组 (100 μ g/mL SiO₂), 观察 SiO₂ 粉尘对 RAW264.7 细胞外泌体及其中 miR-125a-5p 表达的影响。建立 RAW264.7 与 NIH/3T3 的共培养模型, 分为对照组、SiO₂ 组 (100 μ g/mL) 和外泌体组 (10 μ g/mL 外泌体作用于 NIH/3T3, 并且该组无 RAW264.7), 24、48 h 时采用 Western blot 和 CCK-8 检测 NIH/3T3 细胞 I 型胶原 (collagen I) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达和增殖活性。培养 NIH/3T3 细胞, 分为模拟剂组、抑制剂组和对照组, 于转染 24、48 h 后收集细胞, 采用荧光定量 PCR、CCK-8 和流式细胞术分别检测 NIH/3T3 细胞中 miR-125a-5p 的表达、细胞的增殖活性、细胞周期和凋亡的情况。

[结果] 透射电镜下观察到外泌体具有圆形或茶托样的膜结构。纳米颗粒跟踪分析结果显示外泌体呈聚团或散在分布, 粒径大多在 30~150 nm。Western blot 可检测到外泌体膜标志蛋白 TSG101、Alix, 未检测到内质网蛋白 calnexin。与对照组相比, SiO₂ 粉尘刺激后 RAW264.7 细胞外泌体含量增多; 外泌体膜标志蛋白 TSG101 和 Alix 相对表达量升高; miR-125a-5p 的相对表达量上升 ($P < 0.05$)。共培养 24、48 h 检测结果显示, 与对照相比, SiO₂ 组和外泌体组 collagen I、 α -SMA 相对表达量均上升; 细胞增殖活性升高 ($P < 0.05$)。NIH/3T3 细胞转染 24 h 和 48 h 后, 与对照组比较, 模拟剂组 miR-125a-5p 相对表达量上升至 82.969 \pm 5.570 和 64.934 \pm 19.972 (对照组为 1.000) ($P < 0.01$), 细胞增殖活性上升了 18.66% 和 25.92%, G2/M 期细胞数目下降至 (2.15 \pm 0.35) % 和 (2.99 \pm 0.61) % [对照组分别为 (6.30 \pm 0.87) % 和 (6.67 \pm 0.59) %], 凋亡率下降至 (23.15 \pm 4.21) % 和 (19.20 \pm 4.75) % [对照组为 (35.15 \pm 3.65) % 和 (37.09 \pm 3.52) %] ($P < 0.05$); 抑制剂组 miR-125a-5p 相对表达量下降至 0.008 \pm 0.001 和 0.038 \pm 0.003 ($P < 0.01$), 细胞增殖活性下降了 17.33% 和 25.13%, G2/M 期细胞数目上升至 (10.72 \pm 2.06) % 和 (15.67 \pm 2.12) %, 凋亡率上升至 (50.23 \pm 4.06) % 和 (57.38 \pm 3.72) % ($P < 0.05$)。

[结论] SiO₂ 粉尘引起 RAW264.7 细胞外泌体中 miR-125a-5p 升高, 且 miR-125a-5p 可以促进 NIH/3T3 细胞增殖并抑制凋亡。

关键词: miR-125a-5p; 外泌体; 增殖; 凋亡; RAW264.7; NIH/3T3

Effect of exosomal miR-125a-5p on proliferation and apoptosis of NIH/3T3 cells ZHANG Jian-hui, WANG Yong-xing, HAO Chang-fu, YU Xing-hao, HUANG Ruo-xuan, WEI Jing-jing, YANG Guo, YAO Wu (Department of Pneumoconiosis, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract:

[Background] Silicosis occurrence involves multicellular and multifactorial changes and interactions, in which fibroblasts are the key effector cells in the progression of pulmonary fibrosis. Recent studies have found that, in addition to cytokines such as transforming growth factor-beta, the proliferation of fibroblasts is also regulated by exosomes as carriers of

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19096

基金项目

国家自然科学基金 (81773404)

作者简介

张建会 (1989—), 女, 硕士生;
E-mail: 1520379960@qq.com

通信作者

姚武, E-mail: yaowu@zzu.edu.cn

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-02-27

录用日期 2019-05-21

文章编号 2095-9982(2019)07-0669-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

► 引用

张建会, 王永星, 郝长付, 等. 外泌体 miR-125a-5p 对 NIH/3T3 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (7): 669-675.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19096

Funding

This study was funded.

Correspondence to

YAO Wu, E-mail: yaowu@zzu.edu.cn

Competing interests None declared

Received 2019-02-27

Accepted 2019-05-21

► To cite

ZHANG Jian-hui, WANG Yong-xing, HAO Chang-fu, et al. Effect of exosomal miR-125a-5p on proliferation and apoptosis of NIH/3T3 cells [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(7): 669-675.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19096

intercellular signals. The intercellular signals mediated by exosomal microRNAs may play a role in the transdifferentiation and proliferation of fibroblasts induced by SiO₂. A previous study has proved miR-125a-5p one of the differentially expressed miRNAs.

[Objective] This study is designed to explore the effect of exosomal miR-125a-5p on proliferation and apoptosis of mouse embryonic fibroblasts NIH/3T3 cells.

[Methods] Exosomes were extracted from the supernatant of RAW264.7 cell culture and identified by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, and Western blot. RAW264.7 cells were divided into a control group and a SiO₂ group (100 μg/mL SiO₂) to observe the effect of SiO₂ dust on exosomes and exosomal miR-125a-5p of RAW264.7 cells. Co-cultured RAW264.7 and NIH/3T3 cells were divided into a control group, a SiO₂ group (100 μg/mL SiO₂), and an exosome group (10 μg/mL exosomes were administered directly to NIH/3T3 cells, without RAW264.7 cells) to detect the expressions of collagen I and α-smooth muscle actin (α-SMA) by Western blot and cell proliferation by CCK-8 after 24 h and 48 h. NIH/3T3 cells were divided into mimic, inhibitor, and control groups, and after 24 h and 48 h of transfection, the expression of miR-125a-5p, cell proliferation activity, cell cycle, and apoptosis of NIH/3T3 cells were detected by fluorescence quantitative PCR, CCK8, and flow cytometry, respectively.

[Results] The exosomes exhibited round or saucer-like membrane structure under transmission electron microscopy. They were clustered or scattered with a particle size mainly at 30-150 nm by nanoparticle tracking analysis. The membrane marker proteins TSG101 and Alix were detected and the endoplasmic reticulum protein calnexin was not detected by Western blot. Compared with the control group, the concentration of exosomes, the relative expression levels of membrane marker proteins TSG101 and Alix, and the relative expression level of miR-125a-5p increased after the designed SiO₂ dust exposure ($P < 0.05$). After 24 h and 48 h of co-culture, compared with the control group, the relative expression levels of collagen I and α-SMA and the cell proliferation activity increased in the SiO₂ group and the exosome group ($P < 0.05$). After 24 h and 48 h of transfecting into NIH/3T3 cells, compared with the control group, the relative expression levels of miR-125a-5p increased to 82.969 ± 5.570 and 64.934 ± 19.972 (control: 1.000) ($P < 0.01$), the cell proliferation activities increased by 18.66% and 25.92%, the numbers of cells in G2/M decreased to $(2.15 \pm 0.35)\%$ and $(2.99 \pm 0.61)\%$ [control: $(6.30 \pm 0.87)\%$ and $(6.67 \pm 0.59)\%$], and the apoptosis rates decreased to $(23.15 \pm 4.21)\%$ and $(19.20 \pm 4.75)\%$ in the mimic group [control: $(35.15 \pm 3.65)\%$ and $(37.09 \pm 3.52)\%$], respectively ($P < 0.05$); the relative expression levels of miR-125a-5p declined to 0.008 ± 0.001 and 0.038 ± 0.003 ($P < 0.01$), the proliferation activities decreased by 17.33% and 25.13%, the numbers of cells in G2/M increased to $(10.72 \pm 2.06)\%$ and $(15.67 \pm 2.12)\%$, and the apoptosis rates increased to $(50.23 \pm 4.06)\%$ and $(57.38 \pm 3.72)\%$ in the inhibitor group, respectively ($P < 0.05$).

[Conclusion] SiO₂ dust induces the increase of exosomal miR-125a-5p in RAW264.7 cells, and miR-125a-5p promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of NIH/3T3 cells.

Keywords: miR-125a-5p; exosome; proliferation; apoptosis; RAW264.7; NIH3T3

矽肺是因长期吸入大量游离SiO₂粉尘而引起的以肺部弥漫性纤维化为主的全身性疾病。我国矽肺的新发病例数在职业病中常年位居第一^[1]。巨噬细胞吞噬SiO₂后会过度分泌转化生长因子(transforming growth factor, TGF)-β、血小板衍生因子(platelet derived growth factor, PDGF)等细胞因子,从而促进成纤维细胞活化和增殖,加重肺纤维化进程。虽然人们对尘肺病做了大量的研究,但是仍然缺乏早期的诊断指标和有效的治疗手段。因此,寻找有效的治疗靶点对延缓纤维化进展、延长患者生命、提高生活质量具有重要意义。

近年来研究发现外泌体在细胞和组织纤维化过程中可以触发炎症,激活成纤维细胞,导致组织纤维化^[2],这为尘肺病的研究提供了新的思路和策略。外泌体是直径在30~150 nm具有膜结构的细胞外囊泡,含有大量的核酸,包括miRNAs、mRNAs、DNA和非编码的RNAs。miRNAs是一种小的非编码RNA,通过靶向降解mRNAs或抑制其翻译来调节基因转录后的表达^[3]。miRNAs可参与多种生理过程,在细胞分化和发育中起关键作用^[4]。此外,外泌体miRNAs作为细胞间

通信信号可以进入到各种组织细胞,调节受体细胞的表达^[5]。Zhou等^[6]研究发现肝细胞癌来源的外泌体miRNA-21促进成纤维细胞向肿瘤相关成纤维细胞转化。本课题组前期对尘肺患者和健康人群血清及染尘前后小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7细胞)株外泌体miRNAs进行测序,发现SiO₂粉尘暴露后人群血清及RAW264.7细胞的外泌体miR-125a-5p表达均升高;进一步通过生物信息分析发现,miR-125a-5p借由TGF-β信号通路影响细胞的增殖和凋亡^[7]。miR-125a-5p参与许多疾病的发生发展,已有研究表明其在肝纤维化中能够促进肝星状细胞的活化和增殖^[8]及在脂肪生成中促进前脂肪细胞的增殖,但是在肺纤维化中的研究较少。肺纤维过程中成纤维细胞是关键效应细胞。NIH/3T3细胞是小鼠胚胎成纤维细胞,常用于矽肺和肺纤维化的研究。因此,本研究拟采用透射电镜、纳米颗粒跟踪分析(nanosight tracking analysis, NTA)、荧光定量PCR、Western bolt等技术,观察SiO₂粉尘对RAW264.7细胞外泌体及其miR-125a-5p对NIH/3T3细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要仪器与试剂

RAW264.7细胞和NIH/3T3细胞(中国科学院上海细胞库,中国)。流式细胞仪(BD,美国),自动酶标仪(SUNRISE,美国),荧光定量PCR(ABI,美国),透射电镜(日立,日本),纳米颗粒跟踪分析仪Zate View(Particle Metrix,德国)。Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究,中国),CCK-8细胞增殖毒性检测试剂盒(同仁,日本),miR-125a-5p的模拟剂、抑制剂(生工生物工程股份有限公司,中国),miRNA提取分离试剂盒、miRNA反转录试剂盒、miR-125a-5p引物(天根生化科技有限公司,中国),兔抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)(CST,美国),兔抗鼠I型胶原(collagen I)、ALG-2相互作用蛋白X(ALG-2-interacting protein X, Alix)、钙连蛋白(calnexin)和肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)(武汉三鹰生物技术有限公司,中国),胎牛血清(Hyclone,美国),DMEM培养基(索莱宝,美国),胰酶、SiO₂(Sigma,美国),脂质体(Invitrogen,美国),二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(博士德,中国)。

1.2 RAW264.7细胞外泌体

1.2.1 细胞培养及外泌体提取 将RAW264.7细胞以 1×10^6 /mL接种于直径100 mm的平皿中,用含10%胎牛血清的DMEM于37°C、5%CO₂条件培养24 h后,更换成DMEM。24 h后收集上清,0.22 μ m过滤器过滤,滤液110000 \times g离心2 h,弃上清,用PBS重悬,110000 \times g离心70 min,沉淀即外泌体,用100 μ L PBS重悬。

1.2.2 外泌体鉴定 电镜检测:取10 μ L的外泌体悬液滴到铜网上沉淀1 min,滤纸吸干,10 μ L 2%醋酸双氧铀滴到铜网静置1 min,滤纸吸干后在80 kV透射电镜下观察外泌体形态及粒径大小。NTA:取10 μ L外泌体悬液稀释10000倍,电阻率以15000 μ S/cm传感上纳米颗粒跟踪分析仪Zate View检测外泌体的粒径分布和浓度。Western blot检测:取外泌体悬液和RAW264.7细胞裂解液,BCA试剂盒检测蛋白浓度,调蛋白浓度,95°C煮5 min。配制分离胶和浓缩胶电泳,聚偏二氟乙烯膜转膜。5%脱脂剂奶粉37°C封闭1 h,一抗室温2 h, TBST洗3遍。二抗孵育1 h, TBST洗3遍,化学发光法使条带显影,保存图片,采用Image J图像

分析软件测定灰度值。实验重复3次。

1.2.3 细胞分组及SiO₂粉尘染毒 RAW264.7细胞分为SiO₂组和对照组, SiO₂组以100 μ g/mL SiO₂粉尘刺激,对照组加入等量的PBS,分别收取上清提取外泌体,检测外泌体粒径、浓度和蛋白的变化。

1.2.4 miR-125a-5p表达 取两组外泌体100 μ L,按照试剂盒说明书提取miRNA,然后用反转录试剂盒将miRNA反转录,以cDNA为模板进行荧光定量PCR,每组设置3个复孔,U6作为内参。SYBR Green反应体系:2 \times miRcute Plus miRNA PreMix 10 μ L,正向引物0.4 μ L,反向引物0.4 μ L,无酶水7.2 μ L。反应条件:95°C预变性15 min,94°C变性20 s,60°C退火延伸34 s,共40个循环。所得数值采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算miR-125a-5p的相对表达量,实验重复3次。

1.3 miR-125a-5p转染

1.3.1 细胞共培养 NIH/3T3细胞以 7.5×10^4 /mL分别接种于transwell下室,分为对照组、SiO₂组和外泌体组(该组无RAW264.7细胞)。RAW264.7以 1×10^5 /mL接种于上室,待细胞稳定培养24 h后,将有RAW264.7的小室分别放入对照组、SiO₂组, SiO₂组加入100 μ g/mL SiO₂,外泌体组加入10 μ g/mL的外泌体。24、48 h后,收取下室细胞,采用Western blot和CCK-8检测细胞collagen I和 α -SMA的表达及增殖活性。

1.3.2 miR-125a-5p模拟剂和抑制剂对NIH/3T3细胞的转染 NIH/3T3细胞以 7.5×10^4 /mL接种于6孔板,分为模拟剂组、抑制剂组和对照组。待细胞稳定后取3个1.5 mL EP管,每管加入5 μ L的脂质体和125 μ L无双抗的DMEM,孵育5 min;另取3个EP管,每管加入125 μ L无双抗的DMEM,再分别加入模拟剂、抑制剂和无酶水,孵育5 min。将装有脂质体的混合液分别加入装有模拟剂、抑制剂和无酶水的管中孵育15 min制备成转染复合物,细胞弃去原培养基用PBS洗3遍后,加入1.75 mL无双抗的DMEM。将制备好的转染复合物加入细胞中。培养6 h后更换成完全培养基,24、48 h后分别收集细胞。

1.3.3 荧光定量PCR检测转染后NIH/3T3细胞中miR-125-5p表达 取转染后收集的NIH/3T3细胞提取miRNAs,并采用荧光定量PCR检测miR-125a-5p的表达。

1.3.4 CCK-8法检测转染后NIH/3T3细胞增殖活性 细胞接种于96孔板,分为模拟剂、抑制剂和对照3组,每组8个复孔。转染24、48 h,加入CCK-8试剂60 min后,在酶标仪上测定450 nm处的光密度(D)。通过下式计

算细胞增殖活性：细胞增殖活性 = $[(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.3.5 流式细胞术检测转染后 NIH/3T3 细胞周期和凋亡 细胞接种于 6 孔板，分为模拟剂、抑制剂和对照 3 组。转染 24、48 h 后，细胞用胰酶消化后 $500 \times g$ 离心 5 min，弃上清用 PBS 重悬，细胞计数并取 1×10^4 个细胞进行细胞周期检测，其余用预冷 70% 乙醇固定，加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液检测细胞周期。 $500 \times g$ 离心 5 min，弃上清，加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC，轻轻混匀，再加入 10 μL 碘化丙啶染色液，室温避光孵育 20 min，随后置于冰浴中。孵育过程中可以重悬细胞 2~3 次以改善染色效果。流式细胞仪检测细胞的凋亡率。

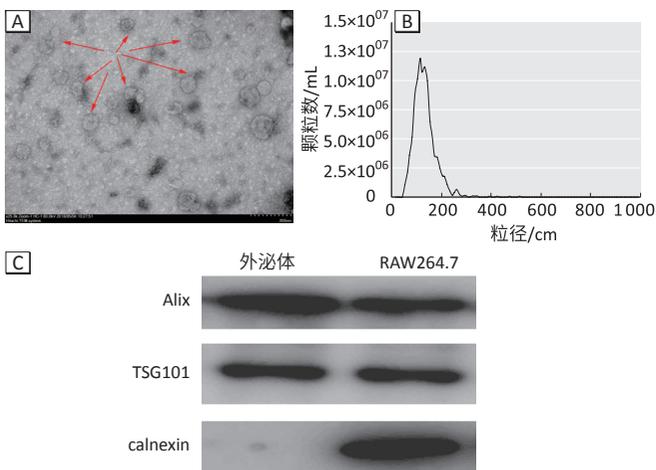
1.4 统计学分析

服从正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析，两组样本间差异的比较采用 *t* 检验（正态资料），3 组及以上样本间差异的比较采用单因素方差分析，涉及两两比较的采用 LSD-*t* 检验分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 RAW264.7 细胞外泌体鉴定

经透射电镜可见 RAW264.7 细胞株来源的外泌体为茶托状圆形囊泡，呈聚团或散在分布，见图 1A 箭头所指。NTA 检测外泌体的布朗运动，得到粒径分布图，可见大部分在 30~150 nm，见图 1B。Western blot 检测外泌体表面标志蛋白，结果显示 TSG101、Alix 在外泌体和细胞中均表达，calnexin 只在细胞中表达，见图 1C。

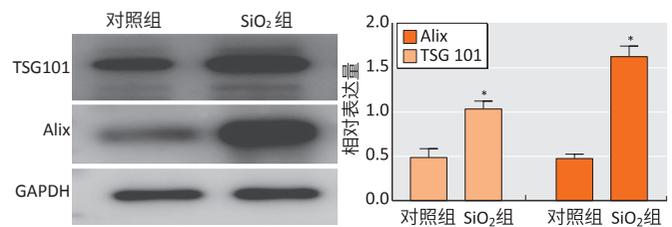


[注] A：透射电镜，箭头所指为外泌体；B：NTA；C：Western blot。

图 1 巨噬细胞 RAW264.7 外泌体的鉴定

2.2 RAW264.7 细胞外泌体浓度和蛋白

取 SiO_2 组和对照组 RAW264.7 细胞外泌体，经 NTA 检测： SiO_2 组平均粒径为 (137.0 ± 44.2) nm，外泌体数为 $1 \times 10^{12}/\text{mL}$ ；对照组平均粒径为 (132.0 ± 46.6) nm，外泌体数为 $5.4 \times 10^{11}/\text{mL}$ 。 SiO_2 刺激 RAW264.7 细胞后，外泌体粒径变化差异没有统计学意义，但释放量增加 ($P < 0.05$)。Western blot 检测结果表明， SiO_2 组外泌体中的 TSG101 和 Alix 表达量增加 ($P < 0.01$)，见图 2。



[注] *：与对照相比， $P < 0.05$ 。

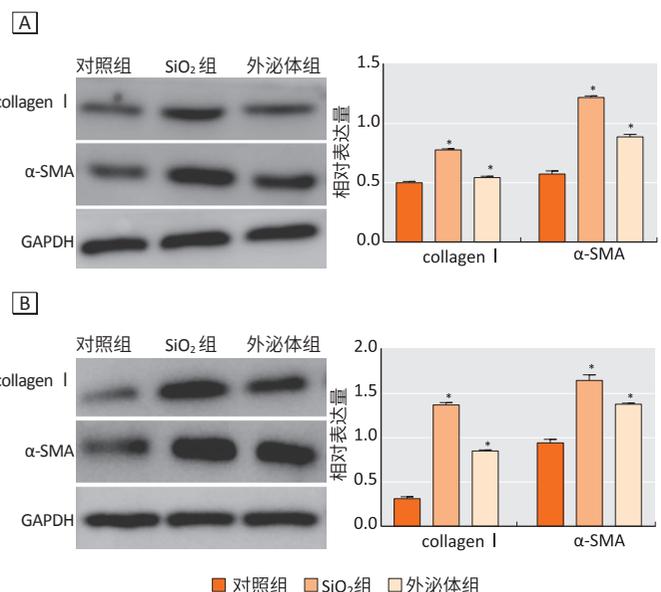
图 2 SiO_2 对 RAW264.7 细胞外泌体表面标志蛋白的影响

2.3 RAW264.7 细胞外泌体 miR-125a-5p 的表达

与对照组 (0.92 ± 0.08) 相比， SiO_2 组外泌体中 miR-125a-5p 相对表达量 (3.05 ± 0.25) 上升 ($P < 0.05$)。

2.4 NIH/3T3 细胞转分化和细胞增殖活性

Western blot 结果显示，共培养 24、48 h 后，与对照相比， SiO_2 组和外泌体组 collagen I 和 α -SMA 的相对表达量均升高 ($P < 0.05$)，见图 3。CCK-8 检测结果显示，共培养 24、48 h 后，与对照相比， SiO_2 组和外泌体组细胞增殖活性上升 ($P < 0.05$)，见表 1。



[注] A：24 h；B：48 h。*：与对照相比， $P < 0.05$ 。

图 3 共培养 24 h 和 48 h 后 NIH/3T3 细胞中 collagen I 和 α -SMA 蛋白表达

表1 外泌体对NIH/3T3细胞增殖活性(%)的影响

| 分组 | 24h | 48h |
|--------------------|--------------|---------------|
| SiO ₂ 组 | 130.63±5.50* | 147.28±13.05* |
| 外泌体组 | 114.61±0.50* | 122.88±9.95* |
| 对照组 | 100.00±2.89 | 100.00±1.90 |
| F | 25.42 | 18.43 |
| P | 0.01 | 0.03 |

[注]*: 与同时时间点的对照组相比, P<0.05。

2.5 miR-125a-5p 转染后在NIH/3T3细胞中的表达

与对照组相比, 转染24、48h后模拟剂组miR-125a-5p表达量上升(P<0.01); 抑制剂组的miR-125a-5p表达量下降(P<0.01), 见表2, 表明转染成功。

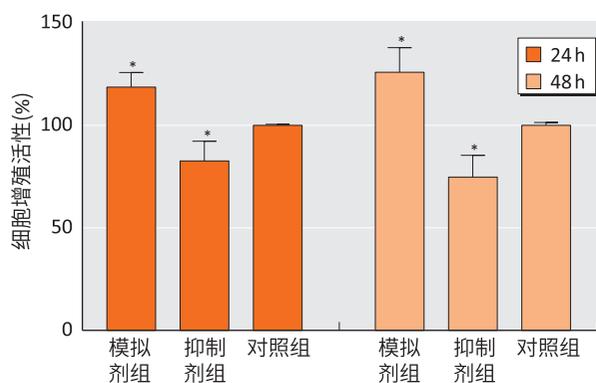
表2 miR-125a-5p 转染后NIH/3T3细胞中miR-125a-5p的表达

| 分组 | 24h | 48h |
|------|---------------|----------------|
| 模拟剂组 | 82.969±5.570* | 64.934±19.972* |
| 抑制剂组 | 0.008±0.001* | 0.038±0.003* |
| 对照组 | 1.000 | 1.000 |
| P | <0.001 | <0.001 |

[注]*: 与同时时间点的对照组相比, P<0.01。

2.6 miR-125a-5p 转染后NIH/3T3细胞的增殖活性

与对照组相比, 转染24h后, 模拟剂组细胞增殖活性上升了18.66%, 抑制剂组的细胞增殖活性下降了17.33%(P<0.05); 转染48h后, 模拟剂组细胞增殖活性上升了25.92%, 抑制剂组的细胞增殖活性下降了25.13%(P<0.05)。见图4。



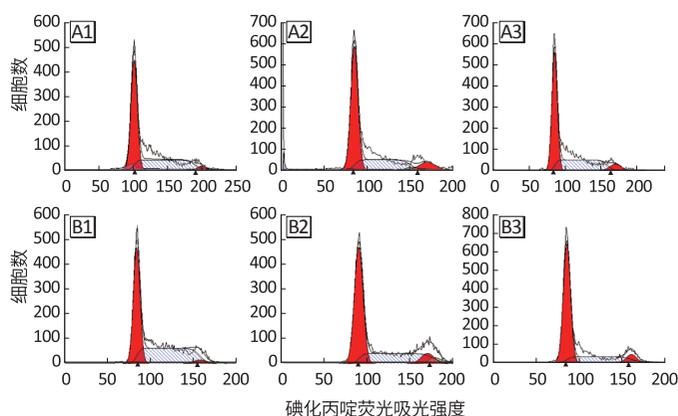
[注]*: 与对照相比, P<0.05。

图4 miR-125a-5p 转染后NIH/3T3细胞增殖活性

2.7 miR125a-5p 转染后NIH/3T3的细胞周期

细胞转染24h后, 模拟剂组细胞G2/M期[(2.15±0.35)%]低于对照组[(6.30±0.87)%], 而抑制剂组细胞G2/M期[(10.72±2.06)%]高于对照组(P<0.05)。细胞转染48h后, 模拟剂组细胞G2/M期[(2.99±0.61)%]低于对照组[(6.67±0.59)%], 而抑制

剂组细胞G2/M期[(15.67±2.12)%]高于对照组(P<0.05)。见图5。

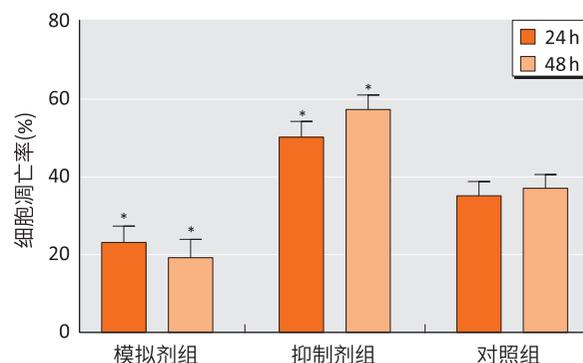


[注] A: 24h; B: 48h。1: 模拟物组; 2: 抑制剂组; 3: 对照组。

图5 miR-125a-5p 转染后NIH/3T3细胞周期分布

2.8 miR-125a-5p 转染后NIH/3T3细胞凋亡率

细胞转染24、48h后, 模拟剂组细胞凋亡率分别为[(23.15±4.21)%]、[(19.20±4.75)%], 低于对照组[(35.15±3.65)%]、[(37.09±3.52)%](P<0.05), 而抑制剂组细胞凋亡率分别为[(50.23±4.06)%]、[(57.38±3.72)%], 明显高于对照组(P<0.05), 见图6。



[注]*: 与同时时间点的对照组相比, P<0.05。

图6 miR-125a-5p 转染后NIH/3T3细胞凋亡率

3 讨论

本研究的关键步骤是外泌体的提取, 对RAW264.7细胞培养上清的外泌体进行鉴定, 透射电镜下可见经典的茶托样结构; NTA显示外泌体粒径大多数分布在30~150nm之间; Western blot检测到膜标志蛋白TSG101、Alix, 未检测到calnexin。这些结果提示RAW264.7细胞上清中可成功提取外泌体。外泌体的形成受内吞分选转运复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)依赖途径调节, TSG101和Alix是ESCRT的组成部分, 常作为外泌体的标志蛋白, calnexin是内质网的标志蛋白, 常作为区别

细胞和外泌体的标志蛋白。本研究结果显示, SiO₂ 刺激后外泌体表面标志蛋白相对量表达升高, 外泌体的释放量增加, miR-125a-p 相对表达量上升。研究发现, 在肿瘤中肌肉丙酮酸激酶同工酶 2 磷酸化突触小体相关蛋白 23 和热休克蛋白 90 促进外泌体的释放^[9]。特发性纤维化病人和小鼠灌洗液中囊泡含量增加, 特别是外泌体的含量, 囊泡蛋白含量上升^[10]。目前外泌体释放增加的机制尚不明确。miR-125a-5p 在乙型肝炎病毒转染的肝细胞中^[11] 及在四氯化碳诱导肝纤维化小鼠模型中^[8] 上调。以上研究均表明, miR-125a-5p 在纤维化中上调。

为了探索外泌体对 NIH/3T3 细胞的影响, 本实验建立共培养模型。Western blot 和 CCK-8 结果显示, 与对照组相比, SiO₂ 组和外泌体组中 collagen I、 α -SMA 蛋白的相对表达量及细胞增殖活性上升, 表明外泌体可以影响 NIH/3T3 细胞的转分化和增殖活性。为了进一步探索外泌体中 miR-125a-5p 的作用, 本研究采用人工合成 miR-125a-5p 的模拟剂和抑制剂干扰 NIH/3T3 细胞, 观察其对细胞增殖和凋亡的影响。结果表明, 过表达 miR-125a-5p 后, NIH/3T3 细胞的存活率上升, G2/M 期细胞数减少, 凋亡率下降; 而抑制时存活率下降, G2/M 期细胞数增多, 凋亡率上升, 说明 miR-125a-5p 可以促进 NIH/3T3 细胞增殖, 抑制细胞的凋亡, 进而加重纤维化的程度。这与课题组前期研究中预测 miR-125a-5p 调控细胞增殖和凋亡的情况相符^[6]。近年来大量的研究表明外泌体 miRNAs 在疾病的发生发展中发挥着重要作用, 外泌体可以选择性地包裹 miRNAs, 稳定地将 miRNAs 转移到受体细胞并发挥作用^[12]。在肺癌、肺部炎症和肺纤维化等疾病中, miRNAs 调节许多关键基因的表达^[13-14]。心脏干细胞来源的外泌体 miR-21 可以通过靶向结合程序性细胞死亡因子 4 抑制心肌细胞的凋亡^[15]。miR-125a-5p 在肺癌组织和细胞系中通过直接靶向结合信号转导和转录激活子 3, 从而抑制细胞的增殖、迁移、侵袭并促进细胞凋亡^[16], 在膀胱癌中靶向结合岩藻糖基转移酶 4 抑制细胞的增殖促进凋亡^[17], 在肝纤维化中通过下调缺氧诱导因子 1 来抑制肝星状细胞的增殖^[8], 在脂肪生成中直接靶向结合信号转导和转录激活子 3 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖^[18]。

本实验的不足之处在于选取外泌体浓度时没有设置浓度梯度, 直接选取了 10 μ g/mL。后期将通过设置外泌体的浓度梯度, 检测其对 NIH/3T3 的作用,

进而确定一个最佳浓度。在外泌体 miR-125a-5p 对 NIH/3T3 细胞增殖和凋亡的影响方面, 本实验只是初步的探索, 后续将对其作用机制进行研究。

综上所述, SiO₂ 引起 RAW264.7 细胞外泌体中 miR-125a-5p 升高, 外泌体中 miR-125a-5p 可以促进 NIH/3T3 细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 进而加重纤维化的程度。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 2017 年我国卫生健康事业发展统计公报 [R]. 北京: 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 2018.
- [2] BORGES FT, MELO SA, ÖZDEMİR BC, et al. TGF- β 1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24 (3): 385-392.
- [3] AMBROS V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431 (7006): 350-355.
- [4] LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. Cell, 1993, 75 (5): 843-854.
- [5] 施冰, 李俊峡. 外泌体源性 miRNA: 心血管疾病新的生物标志物 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2017, 9 (11): 1396-1397, 1408.
- [6] ZHOU Y, REN H, DAI B, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37 (1): 324.
- [7] 张林. SiO₂ 诱导的尘肺相关巨噬细胞外泌体 miRNAs 在肺成纤维细胞转分化中的作用与机制 [D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
- [8] LI G, LI J, LI C, et al. MicroRNA-125a-5p contributes to hepatic stellate cell activation through targeting FIH1 [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38 (4): 1544-1552.
- [9] LAUWERS E, WANG YC, GALLARDO R, et al. Hsp90 mediates membrane deformation and exosome release [J]. Mol Cell, 2018, 71 (5): 689-702.e9.
- [10] MARTIN-MEDINA A, LEHMANN M, BURG Y, et al. Increased extracellular vesicles mediate WNT-5A signaling in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 198 (12), doi: 10.1164/rccm.201708-

- 15800C.
- [11] COPPOLA N, ONORATO L, PANELLA M, et al. Correlation between the hepatic expression of human microRNA hsa-miR-125a-5p and the progression of fibrosis in patients with overt and occult HBV infection [J]. *Front Immunol*, 2018, 9 : 1334.
- [12] YUAN T, HUANG X, WOODCOCK M, et al. Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients [J]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 19413.
- [13] LI B, DING CM, LI YX, et al. MicroRNA-145 inhibits migration and induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cells through regulation of the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40 (5) : 2944-2954.
- [14] JU MJ, LIU BF, HE HY, et al. MicroRNA-27a alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis through modulating TLR4/MyD88/NF-κB pathway [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17 (16) : 2001-2018.
- [15] XIAO J, PAN Y, LI X H, et al. Cardiac progenitor cell-derived exosomes prevent cardiomyocytes apoptosis through exosomal miR-21 by targeting PDCD4 [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7 (6) : e2277.
- [16] ZHONG L, SUN S, SHI J, et al. MicroRNA-125a-5p plays a role as a tumor suppressor in lung carcinoma cells by directly targeting STAT3 [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39 (6) : 1010428317697579.
- [17] ZHANG Y, ZHANG D, LV J, et al. MiR-125a-5p suppresses bladder cancer progression through targeting FUT4 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108 : 1039-1047.
- [18] XU Y, DU JJ, ZHANG PW, et al. MicroRNA-125a-5p mediates 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation [J]. *Molecules*, 2018, 23 (2) : 317.

(英文编辑：汪源；编辑：汪源；校对：丁瑾瑜)

· 告知栏 ·

《环境与健康展望 (中文版)》停刊启事

由于美国 *Environmental Health Perspectives* 杂志自 2019 年起改变《环境与健康展望 (中文版)》(CEHP) 的出版模式, 由原来的整期出版改为连续出版, 新的出版模式不再适合 CEHP 纸质版的印刷出版。因此, 上海市疾病预防控制中心已于 2019 年起终止与美国国家环境卫生科学研究院合作出版 CEHP。所致不便, 深表歉意。如有需要, 可以登录 EHP 杂志官方网站 (ehp.niehs.nih.gov) 获取相关信息。

推进环境与人群健康的改善, 是上海市疾病预防控制中心始终如一的工作重点。欢迎各位读者继续关注我中心主办的中文核心期刊《环境与健康》。《环境与健康》为本领域内的优秀学术期刊, 除了纸质期刊之外, 我们还通过相关网站 (<http://www.jeom.org>)、微信公众号 (环境与职业医学, JEOM) 不遗余力地为广大读者提供国内、国际公共卫生, 尤其是环境与健康领域的相关前沿资讯。

欢迎扫码关注, 希望“环境与职业医学”微信公众号能成为各位读者了解公共卫生、环境与健康研究动态的贴心小助手。

官方公众号 欢迎关注



上海市疾病预防控制中心
《环境与健康》编辑部