

孙理华,王娟,张岳,等. 间充质干细胞来源的外泌体通过 microRNA-21-5p 调节心脏自噬并影响心肌缺血大鼠的心脏功能 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 88-96.

Sun LH, Wang J, Zhang Y, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes regulate cardiomyocyte autophagy and cardiac function via microRNA-21-5p in rats with myocardial ischemia [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 88-96.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.05.014

间充质干细胞来源的外泌体通过 microRNA-21-5p 调节心脏自噬并影响心肌缺血大鼠的心脏功能

孙理华,王娟,张岳,张颖,幸世峰*

(新疆医科大学第五附属医院心血管内科,乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 探讨间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分泌的外泌体(exosome, Exos)是否通过 miR-21-5p 调节心脏自噬并影响心肌缺血大鼠的心脏功能。方法 在体外,观察 MSCs-Exos 对 H_2O_2 刺激 H9C2s 的影响;通过 CCK-8 测定法检测细胞活力;流式细胞术检测细胞凋亡;荧光显微镜检测细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生;免疫印迹分析自噬相关蛋白和荧光 GFP-LC3 测定自噬体形成。在大鼠 MI/RI 模型中,通过 TUNEL 测定、免疫组织化学染色及超声心动图分别检查了 MSCs-Exos 对细胞凋亡、心肌 LC3B 表达和心脏功能影响。结果 在体外实验中, MSCs-Exos 显著提高了 H_2O_2 刺激的 H9C2 细胞活力($P<0.05$),降低了 ROS 的产生和细胞凋亡率($P<0.05$)。而与 H_2O_2 +MSCs-Exos 组相比, H_2O_2 +MSC-Exos+miR^{-21-5p} 组细胞活力显著降低($P<0.01$), ROS 的产生和细胞凋亡率显著增加($P<0.01$)。Western blot 检测显示:与 H_2O_2 组相比, H_2O_2 +MSCs-Exos 组 LC3B-II/LC3B-I 和 LC3B-II 的表达显著增强($P<0.01$), p62 的表达显著降低($P<0.01$);与 H_2O_2 +MSCs-Exos 组相比, H_2O_2 +MSC-Exos+miR^{-21-5p} 组的 LC3B-II/LC3B-I 和 LC3B-II 的表达显著降低($P<0.05$), p62 的表达显著增强($P<0.05$)。自噬通量结果:与 H_2O_2 组比较, H_2O_2 +MSCs-Exos 组细胞中存在的 GFP-LC3 点数增加;而与 H_2O_2 +MSCs-Exos 组相比, H_2O_2 +MSC-Exos+miR^{-21-5p} 组细胞中存在的 GFP-LC3 点数显著降低($P<0.05$)。在体内, RT-qPCR 分析结果显示:在 MSCs-Exos 中和 MI/RI 后心肌组织中 miR-21-5p 的表达均呈正相关性。与其他各组相比, MI/RI + MSCs-Exos 组的 LC3B 表达显著增强($P<0.01$);心肌细胞凋亡显著减少($P<0.01$);分数缩短率(FS%)和左心室射血分数(LVEF)均显著提高($P<0.05$)。结论 MSCs-Exos 可通过调节心肌自噬改善 MI/RI 大鼠的心脏功能,其作用机制可能与 miR-21-5p 转移有关。

【关键词】 间充质干细胞;外泌体;microRNA-21-5p;心脏自噬;心肌缺血/再灌注损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 05-0088-09

Mesenchymal stem cell-derived exosomes regulate cardiomyocyte autophagy and cardiac function via microRNA-21-5p in rats with myocardial ischemia

SUN Lihua, WANG Juan, ZHANG Yu, ZHANG Ying, XING Shifeng*

(Department of Cardiovascular Medicine, Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

【Abstract】 Objective To investigate whether exosomes (Exos) secreted by mesenchymal stem cells (MSCs) regulate cardiac autophagy and cardiac function in rats with myocardial ischemia through miR-21-5p. **Methods** *In vitro*,

[基金项目]新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2018D01C308)。

[作者简介]孙理华(1979—),男,硕士,研究方向:心血管疾病临床及基础研究。E-mail:sunxxlan@sohu.com

[通信作者]幸世峰(1973—),男,硕士,研究方向:心血管疾病临床及基础研究工作。E-mail:yhfeng99@126.com

the effect of MSC exos on H_2O_2 stimulated H9C2 cells was observed. Cell viability was detected by the CCK-8 assay, apoptosis was detected by flow cytometry, reactive oxygen species (ROS) production was analyzed by fluorescence microscopy, and autophagy-related proteins and autophagy formation were detected by immunoblotting and fluorescent GFP-LC3. In rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury (MI/IR), the effects of MSC exos on cell apoptosis, myocardial LC3b expression, and cardiac function were examined by TUNEL assay, immunohistochemistry, and echocardiography. **Results** *In vitro*, MSC-Exos significantly increased the activity of H9C2s stimulated by H_2O_2 ($P < 0.05$) and decreased the production of ROS and the rate of apoptosis ($P < 0.05$). Compared with the H_2O_2 +MSCs-Exos group, the cell viability in the H_2O_2 +MSC-ExosmiR^{-21-5p} group was significantly decreased ($P < 0.01$), whereas ROS production and apoptosis were significantly increased ($P < 0.01$). Western blot analysis showed that compared with the H_2O_2 group, the expression of LC3B-II/LC3B-I and LC3B-II in the H_2O_2 +MSC-ExosmiR^{-21-5p} group was significantly lower than that in the H_2O_2 +MSCs-Exos group ($P < 0.05$), while the expression of p62 was significantly increased ($P < 0.05$). Autophagy flux result: Compared with the H_2O_2 group, GFP-LC3 was increased in the H_2O_2 +MSCs-Exos group. Furthermore, Compared with the H_2O_2 +MSCs-Exos group, the number of GFP-LC3 points in the cells of the H_2O_2 +MSC-ExosmiR-21-5p group was significantly reduced ($P < 0.05$). *In vivo*, RT-qPCR analysis showed that there was a positive correlation between the expression of miR-21-5p in MSCs-Exos and MI/RI. Compared with other groups, the expression of LC3B in the MI/RI+MSCs-Exos group was significantly increased ($P < 0.01$), myocardial apoptosis was significantly reduced ($P < 0.01$), and the fraction shortening rate (%FS) and left ventricular ejection fraction (LVEF) were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** MSCs-Exos can improve cardiac function in MI/RI rats by regulating myocardial autophagy, and its mechanism may be related to miR-21-5p transfer.

【 Keywords 】 mesenchymal stem cells; exosomes; microRNA-21-5p; autophagy; myocardial ischemia/reperfusion injury

缺血性心脏病 (ischaemic heart disease, IHD) 是世界上死亡的主要原因之一^[1]。及时再灌注是 IHD 的主要治疗手段,不仅可以减少梗死面积,而且可以提高 IHD 患者的生存率^[2]。再灌注也可能导致梗塞扩展,这是心肌缺血/再灌注损伤 (myocardial ischemia/reperfusion injury, MI/RI) 的主要组成部分之一^[3]。MSCs 是一种多能祖细胞,它可以通过多种机制改善动物 IHD 模型和 IHD 患者的心脏功能,然而,移植的 MSCs 在宿主组织中的存活率很低,并且在目标组织中仅能检测一小部分移植的 MSCs^[4-5]。多项研究表明, MSCs-Exos 在心肌梗死和 MI/RI 后具有心肌保护作用^[6-8],而 MSCs-Exos 中的 miRNA 可能为参与心脏保护中的关键因素,因此,Exos miRNA 具有为 MI/RI 治疗提供强有力的治疗靶标的潜力。文献检索显示, MSCs-Exos 中存在几种高度表达的 miRNA,其中, miR-21-5p 是众所周知的抗凋亡 miRNA,它在 MSCs-Exos 中高度表达^[9]。研究表明,自噬可能保护缺血性心脏病心肌缺血再灌注损伤^[10-11],但尚不清楚 MSCs-Exos 是否通过 miR-21-5p 调节 MI/RI 模型中的自噬,从而达到保护心肌的作用。因此,我们假设 miR-21-5p 可能具有下调与细胞死亡/存活相关的特定靶基因的能力,本研究旨在观察 MSCs-Exos 在 H_2O_2 诱导的

缺氧 H9C2 细胞 (H9C2s) 中及在大鼠 MI/RI 模型体内是如何调节心肌的自噬。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年健康雄性 SPF 级别 SD 大鼠 40 只 (4~10 周龄, 250~300 g), 购自上海 Slac 实验室动物有限公司 [SCXK(沪)2018-117]; 动物饲养在新疆医科大学 [SYXK(沪)2016-073], 经过新疆医科大学第五附属医院伦理委员会审查 (2018049907), 对于实验动物实行 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

H9C2 细胞系购自上海生物科学研究所; 含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM/Hi 培养基 (北京沃比森科技有限公司, 批号: C0662-857); PKH26 (美国 Sigma 公司, 批号: 031224); H_2O_2 (美国 Sigma 公司, 批号: 7722-84-1); CCK-8 溶液 (日本 DOJINDO 公司, 批号: EJ744); V-PE/7-AAD (美国 eBioscience 公司, 批号: XY-1944); GFP-LC3 (美国 Addgene 公司, 批号: KL-ZI-2078); TUNEL 试剂 (瑞士 Roche 公司); TRIzol 试剂盒 (日本 TOYOBO 公司, 批号: FSQ-201); SeraMirTM EVs RNA 提取试剂盒 (美国 System Biosciences 公司, 批号: 15596-

026); SYBR Green Master Mix 试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,批号:75762500RX); Exoquick exosome 快速提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司,型号:EXOQ5A-1); 透射电子显微镜(TEM,日本 Hitachi 公司,型号:HT7700); qNano 平台(新西兰 Izon Science 公司); DAPI 试剂盒(美国 Sigma 公司,批号:28718-90-3); FlowJo 软件(美国 Tree Star 公司); Olympus FV1000 激光扫描共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司); PCR 系统(美国 Thermo Scientific 公司); 胎牛血清 FBS、PBS、0.25%胰蛋白酶-EDTA(美国 Gibco 公司); 流式细胞仪(FCM,美国 BD Biosciences 公司,批号:0796-2007)等。

1.3 实验方法

1.3.1 MSCs 的分离和培养

采用戊巴比妥(50 mg/kg,腹膜内注射)麻醉大鼠,颈脱位处死大鼠。然后在无菌条件下去除胫骨和股骨。切开骨头末端,并用含有 1%~2% FBS 的 PBS 冲洗骨髓。然后将细胞悬液通过 40 μm 滤网(美国 BD Falcon 公司,批号:352340)过滤。将过滤后的悬浮液以 1000 r/min 的速度离心 5 min 后,将骨髓细胞放在含有 10% FBS 和 1%青霉素-链霉的 DMEM/F12 培养基中培养。在第 5 天更换培养基以除去非贴壁细胞,并在两天后进行细胞传代。使用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 传代 MSCs,并通过流式细胞仪(FCM)进行鉴定,后续实验使用第三代 MSC 细胞。

1.3.2 MSCs-Exos 提取、鉴定及进入 H9C2 细胞的内在化

将 MSCs 接种在 10 cm 的培养皿中过夜,待细胞融合度达到 80%,使用 Exoquick exosome 快速提取试剂盒从细胞中提取 MSCs-Exos,提取操作严格按照试剂盒说明书执行。使用透射电子显微镜评估 MSCs-Exos 的形态。使用 qNano 平台分析 MSCs-Exos 的大小和浓度。采用 Western blot 检测了 MSCs-Exos 的 LAMP-1、CD9 和 TSG101 蛋白质标记物的表达水平。

将 MSCs-Exos 在 37℃ 的黑暗环境中用 PKH26 标记 15 min,随后用 PBS 中洗涤 3 次,并于 4℃ 下,以 30000 r/min 离心 2 h。然后,将标记的 Exos (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 置于含 H9C2 细胞的培养皿中分别共孵育 12 h、24 h。用 PBS 洗涤 H9C2 细胞一次,用含有 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)的 PBS 进行细胞核染色 5 min。使用荧光显微镜观察 H9C2 细胞摄

取 MSCs-Exos 情况。

1.3.3 MSCs 转染

为了下调 MSCs-Exos 中 miR-21-5p 表达,用 miR-21-5p 抑制剂(MSC/simiR-21-5p)及加干扰对照(MSC/scramble)(终浓度为 100 nmol/L)处理 MSCs。使用 Lipofectamine 2000 提高干扰效率。转染 24 h 后弃去培养基,更换为含 10% FBS 的新鲜培养基继续培养。如上述方法纯化源自 MSC/simiR-21-5p 及 MSC/scramble 的 Exos。

1.3.4 H9C2 细胞活力测定

检测 MSCs-Exos 及 miR-21-5p 对 H9C2 细胞活力的影响,首先将 H9C2 细胞分别与含 MSCs-Exos (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、MSC-Exos simiR-21-5p (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及 MSC/scramble-Exos (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 共培养 12 h,对照组采用普通培养基,然后暴露于 H_2O_2 (500 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 12 h;然后,将 10 μL CCK-8 溶液加入到细胞中,再孵育 4 h 后,使用酶标仪(美国 BioTek 公司,批号:EL-800)于 450 nm 下测定光密度(OD)值,计算与对照组的相对值作为细胞存活率或处理细胞的增殖速率。

1.3.5 H9C2 细胞凋亡率测定

通过 FCM 检测膜联蛋白 V-PE/7-AAD 评估 MSCs-Exos 及 miR-21-5p 介导的 H9C2 细胞凋亡的情况,按照评估 Exos 对细胞生存力影响的实验所述,实施了类似的实验组。在预定的时间点,收集细胞,用冰冷的 PBS 洗涤两次,将细胞置于 7-AAD-Percp 和 Annexin V-PE 的 1 $\times$ Annexin V 结合缓冲液中孵育 15 min。最后,采用 FCM 检测凋亡并通过 FlowJo 软件进行分析。

1.3.6 自噬体形成的测定

使用 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司,批号:13778-075)将 GFP-LC3 质粒(1 $\mu\text{L}/\text{mL}$)转染到 H9C2s 中,然后用 10%福尔马林固定细胞。采用 Western blot 检测 H9C2s 自噬相关蛋白的表达,在 Olympus FV1000 激光扫描共聚焦显微镜下观察到 GFP-LC3 荧光,使用活细胞成像监测自噬通量。

1.3.7 动物实验

(1) 动物分组与 MI/RI 模型建立

将 SD 大鼠($n=30$)随机分成五组($n=6$),建立大鼠的 MI/RI 模型^[12]: (1)假手术组,对未结扎的大鼠左冠状动脉前降支(LAD)进行缝合; (2) MI/RI 组,将 LAD 结扎 30 min,然后再灌注 2 h; (3) MI/RI + MSCs-Exos 组,在再灌注前 5 min,使用 30 号针头

的汉密尔顿注射器将溶解于 10 μ LPBS 中的 MSCs-Exos(5 μ g)注入可见损伤区域的前部和外侧;(4) MI/RI + MSC-ExosimiR^{-21-5p}组,在再灌注前 5 min,使用 30 号针头的汉密尔顿注射器将溶解于 10 μ LPBS 中的 MSC-ExosimiR^{-21-5p}(5 μ g)注入可见损伤区域的前部和外侧;(5) MI/RI + MSC/scramble-Exos 组,在再灌注前 5 min,使用 30 号针头的汉密尔顿注射器将溶解于 10 μ LPBS 中的 MSC/scramble-Exos(5 μ g)注入可见损伤区域的前部和外侧。

(2) 心肌组织学分析

取心尖附近的心肌组织,用 4%多聚甲醛固定 48 h,固定后将心肌组织石蜡包埋,切成横截面(6 μ m),用于 TUNEL 和免疫组织化学染色。采用 DAPI 标记所有细胞核,将 TUNEL 标记的细胞核的细胞视为 TUNEL 阳性细胞,每个切片中阳性细胞的数目是 6 个视野中阳性细胞的平均值,计算结果表示为相对于假手术组获得的阳性细胞的百分比。按照免疫组织化学染色方法处理,然后将载玻片干燥,盖上盖玻片并在显微镜下检查,分析心肌组织中 LC3B 表达情况,相对光密度(ROD)通过 Image pro plus 软件计算为积分光密度(IOD)与测量面积之比。

(3) RT-qPCR 分析

按说明使用 TRIzol 试剂提取心肌组织中的总 RNA,使用 SeraMir™ EVs RNA 提取试剂盒进行 MSCs-Exos 总 RNA 提取。使用 ReverTra Ace Qpcr RT 试剂盒将每个样品的总 RNA 反转录为 cDNA。使用 SYBR Green Master Mix 试剂盒在 Applied Biosystems 7500 实时 PCR 系统中进行 RT-qPCR 反应。使用 U6 小核仁 RNA 基因的表达用作内部对照,并使用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}方法进行基因表达分析。miR-21-5p 和 U6 的引物是由日本 Takara 公司设计并合成。引物序列如下:miR-21-5p,正向:5'-GGCGGTGTA AACATCCTT-3',反向:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGG TCCGAGGTGTCG-3'; U6,正向:5'-CTCGCTTCG GCAGCACA-3',反向:5'-AACGCTTCACGAATTTGC GT-3'。

(4) 心脏功能分析

通过超声心动图检查(GE Vivid E9)以确定心脏结构和功能。在两个乳头肌之间的短轴上观察心脏,并且通过对三个连续心跳的结果求平均值,以 M 模式获得每个测量值。测量 LVID 和 LVIDd 以

确定心脏形态的结构变化。分数缩短率(%FS)的计算公式如下:%FS=(LVIDd-LVIDs)/LVIDd $\times$ 100,其中 LVIDd 为舒张期 LV 内径,LVIDs 为收缩期 LV 内径。超声心动图软件根据 Teicholz 公式自动计算左心室射血分数(LVEF)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件对本研究数据进行分析。计量资料所均表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析和 LSD 检验对数据进行分析。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs-Exos 的特征

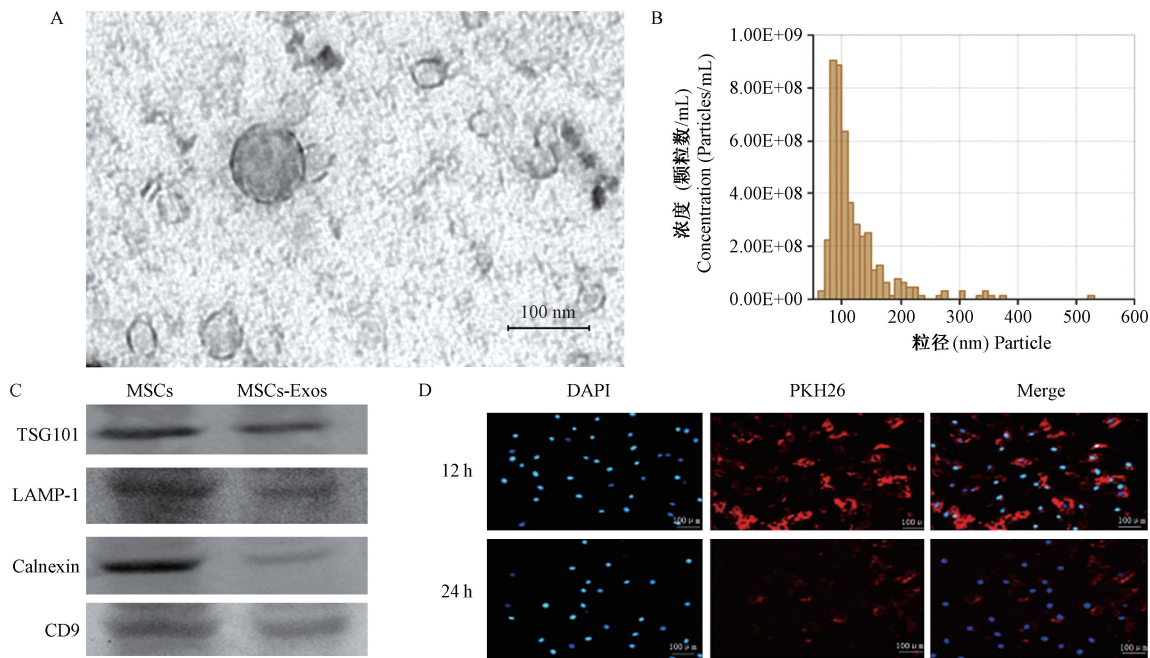
MSCs-Exos 在 TEM 下观察显示球形囊泡,呈圆形或典型的杯形(图 1A)。使用 qNano 对 MSCs-Exos 大小进行了分析,结果显示其总体分布为 40~160 nm(图 1B)。Western blot 证实了 Exos 标记物 TSG101、LAMP-1 和 CD9 高表达,而钙内毒素蛋白是内质网中的一种特殊的钙结合蛋白,在 Exos 中很少出现(图 1C)。H₂O₂ 刺激后 12 h,大多数 PKH26 标记的 Exos 位于 H9C2s 的细胞质中(图 1D)。上述结果表明,H₂O₂ 刺激后,MSCs-Exos 可被内化到 H9C2s 中。

2.2 MSCs-Exos 增强 H₂O₂ 刺激后的 H9C2 细胞的活力并减少细胞凋亡和 ROS 的产生

H₂O₂ 刺激的 H9C2s 制备体外细胞缺氧模型^[13],从而模拟 MI/RI 动物模型。与 H₂O₂ 组相比,H₂O₂ + MSCs-Exos 组细胞活力显著提高($P < 0.05$),ROS 产生和细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$);与 H₂O₂ + MSCs-Exos 组相比,H₂O₂ + MSC-ExosimiR^{-21-5p}组细胞活力显著降低($P < 0.01$),ROS 产生和细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$);H₂O₂ + MSC/scramble-Exos 组的治疗效果与 H₂O₂ + MSCs-Exos 组相似(图 2)。

2.3 MSCs-Exos 增加了 H9C2 细胞自噬的水平

Western blot 检测显示:与 H₂O₂ 组相比,H₂O₂ + MSCs-Exos 组 LC3B-II/LC3B-I 和 LC3B-II 的表达显著增强($P < 0.01$),p62 的表达显著降低($P < 0.01$);与 H₂O₂ + MSCs-Exos 组相比,H₂O₂ + MSC-ExosimiR^{-21-5p}组的 LC3B-II/LC3B-I 和 LC3B-II 的表达显著降低($P < 0.05$),p62 的表达显著增强($P < 0.05$);H₂O₂ + MSC/scramble-Exos 组的治疗效果与 H₂O₂ + MSCs-Exos 组相似(图 3A)。



注:A:通过 TEM 分析获得的 MSCs-Exos 的代表性图像;B:对 MSCs-Exos 进行了 qNano 分析;C:Western blot 分析 MSCs-Exos 中 TSG101、LAMP-1、CD9 和钙粘蛋白表达;D:将 H9C2 与 PKH26 标记的 MSCs-Exos 共培养 12 h 和 24 h 后,通过荧光显微镜检测 MSCs-Exos 可被内化到 H9C2s 中。

图 1 MSCs-Exos 的鉴定和表征

Note. A, Representative images of MSC-Exos obtained by TEM analysis. B, qNano analysis was performed on MSC-Exos. C, Western blot analysis of TSG101, LAMP-1, CD9, and cadherin expression in SCS-Exos. D, After the co-culture of H9C2s and pkh26-labeled SCS-Exos for 12 and 24 h, fluorescence microscopy was used to detect the internalization of SCS-Exos into H9C2 cell.

Figure 1 Identification and characterization of MSC-Exos

自噬通量结果显示:与 H_2O_2 组比较, H_2O_2 + MSCs-Exos 组细胞中存在的 GFP-LC3 点数增加;而与 H_2O_2 + MSCs-Exos 组相比, H_2O_2 + MSC-Exos+miR-21-5p 组细胞中存在的 GFP-LC3 点数显著降低($P<0.05$),如图 3B。

2.4 在 MSCs-Exos 中和 MI/RI 后心肌组织中 miR-21-5p 的表达

RT-qPCR 分析结果显示:miR-21-5p 抑制剂转染可显著降低 MSCs-Exos 中 miR-21-5p 的表达($P<0.01$,图 4A)。在 miR-21-5p 抑制剂及其阴性对照治疗 MI/RI 后,结果显示 miR-21-5p 抑制剂在心肌组织中显著降低了 miR-21-5p 表达($P<0.01$,图 4B)。

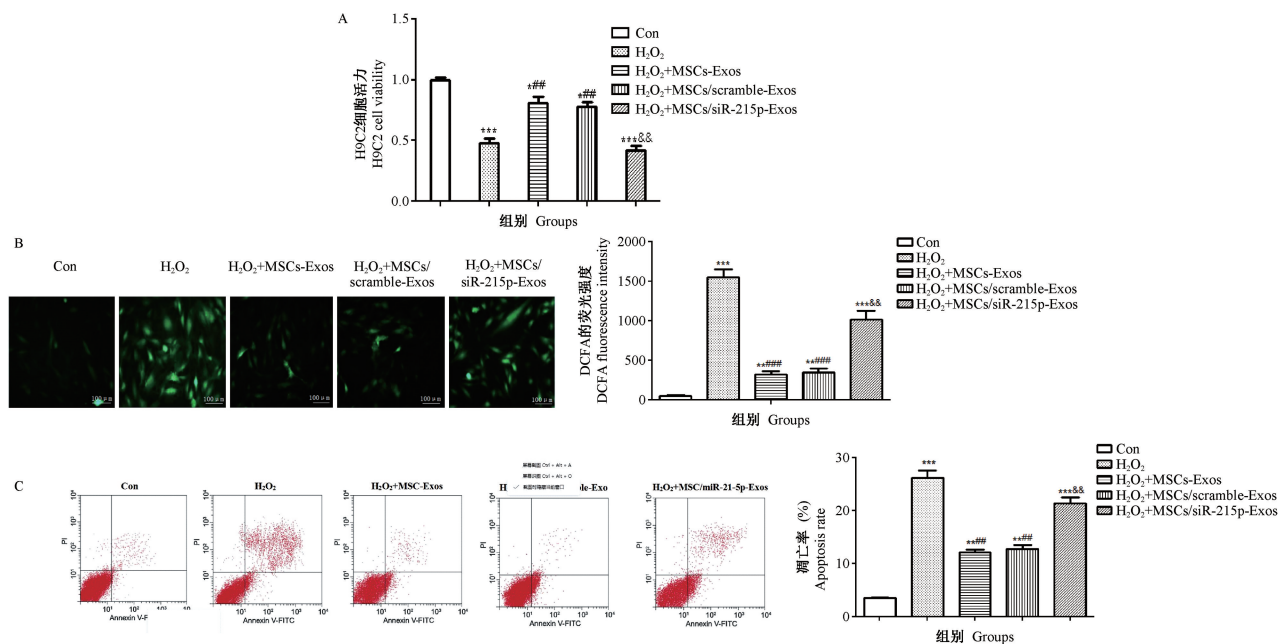
2.5 MSCs-Exos 诱导的自噬减少了大鼠心肌细胞的凋亡并改善了心脏功能

与其他各组相比,MI/RI + MSCs-Exos 组的 LC3B 表达显著增强($P<0.01$)(图 5A);心肌细胞凋亡显著减少($P<0.01$)(图 5B);分数缩短率(%FS)和左心室射血分数(LVEF)均显著提高($P<$

0.05)(图 5C)。

3 讨论

由于忙碌的生活和工作,越来越多的人不注重自己的饮食习惯,摄入各种高脂肪食物后,其高胆固醇血症发生的概率显著增加,甚至会演变为动脉粥样硬化,进而引起冠状动脉狭窄。当冠脉内斑块脱落时,则易发生心肌梗死、急性心梗等疾病,用药物干预、冠状动脉支架、冠状动脉搭桥等方法可以挽救患者的生命。而当发生心肌缺血时,有数亿的心肌细胞发生急性坏死,以上治疗方法并不能促使心肌的修复和再生。近年来,干细胞移植成为治疗缺血性心脏病的研究热点之一,间充质干细胞具有分化为心肌细胞的能力,具有补偿缺血坏死的心肌细胞的作用。大量研究表明,干细胞分泌的 Exos 有多种生物活性,包括修复心肌、促进血管新生、促进神经再生^[14-15]。外泌体中含有 mRNA、miRNA 以及各种抗凋亡和促血管生成因子,能诱导成纤维细胞迁移、增殖及胶原合成^[16]。且外泌体能传递 miRNA

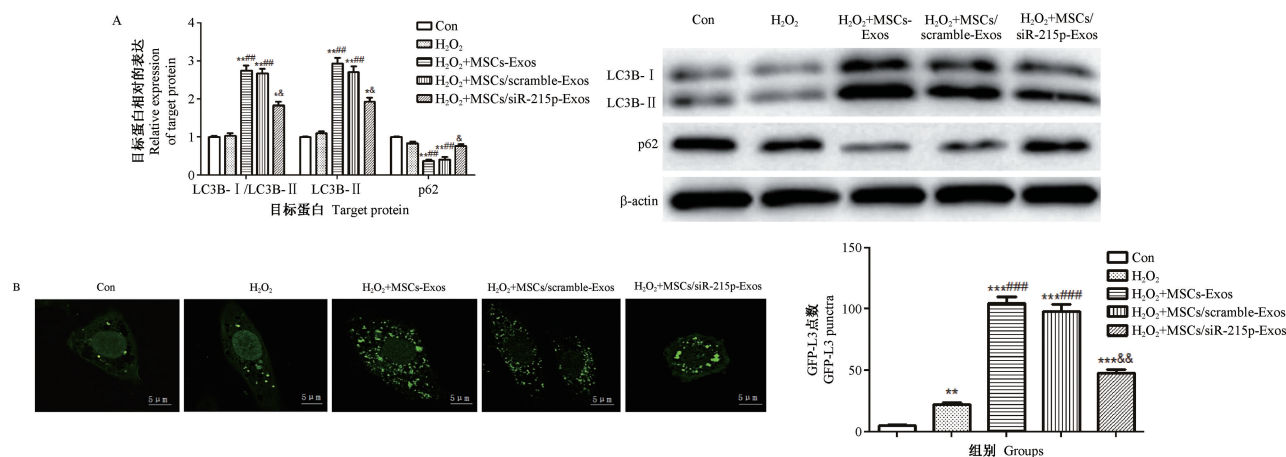


注:A:通过 CCK-8 评估细胞活力;B:通过荧光显微镜评估 ROS 的产生情况;C:通过 FCM 检测 H9C2 细胞凋亡情况;与对照组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与 H₂O₂ 组相比, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$;与 H₂O₂+MSCs-Exos 组相比, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$ 。下图同。

图 2 MSCs-Exos 对 H9C2 细胞的活力, H₂O₂ 诱导的细胞凋亡和 ROS 产生的影响

Note. A, Cell viability was assessed by the CCK-8 assay. B, Evaluation of ROS production by fluorescence microscopy. C, The apoptosis of H9C2 cells was detected by FCM. Compared with the control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with the H₂O₂ group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. Compared with the H₂O₂+MSCs-Exos group, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$. The same as below.

Figure 2 Effect of SCS-Exos on H9C2 cell viability, H₂O₂-induced apoptosis, and ROS production

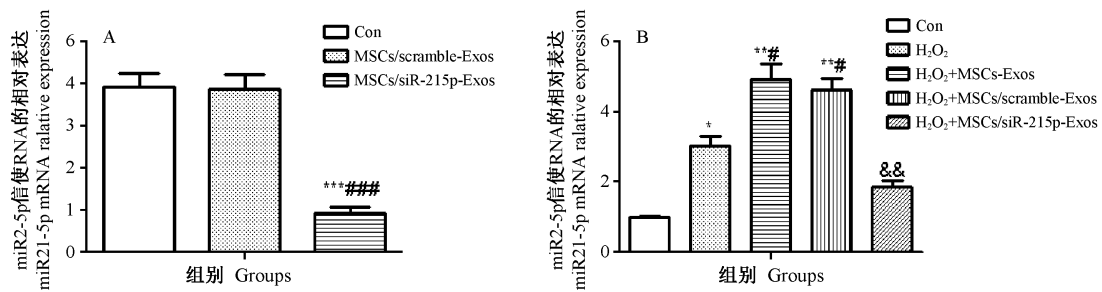


注:A:MSCs-Exos 对 H9C2 细胞自噬标记物 p62 和 LC3 蛋白表达的影响;B:用 GFP-LC3 质粒转染 H9C2 细胞,然后在共聚焦荧光显微镜下观察 LC3 点。条形图显示每个细胞的 GFP 点数。

图 3 MSCs-Exos 对 H9C2 细胞自噬水平的影响

Note. A, The effect of SCS-Exos on the expression of autophagy markers p62 and LC3 in H9C2 cells. B, H9C2 cells were transfected with a GFP-LC3 plasmid, and LC3 puncta were observed under a confocal fluorescence microscope. The bar graph shows the number of GFP points per cell.

Figure 3 Effect of SCS-Exos on the autophagy level in H9C2 cells

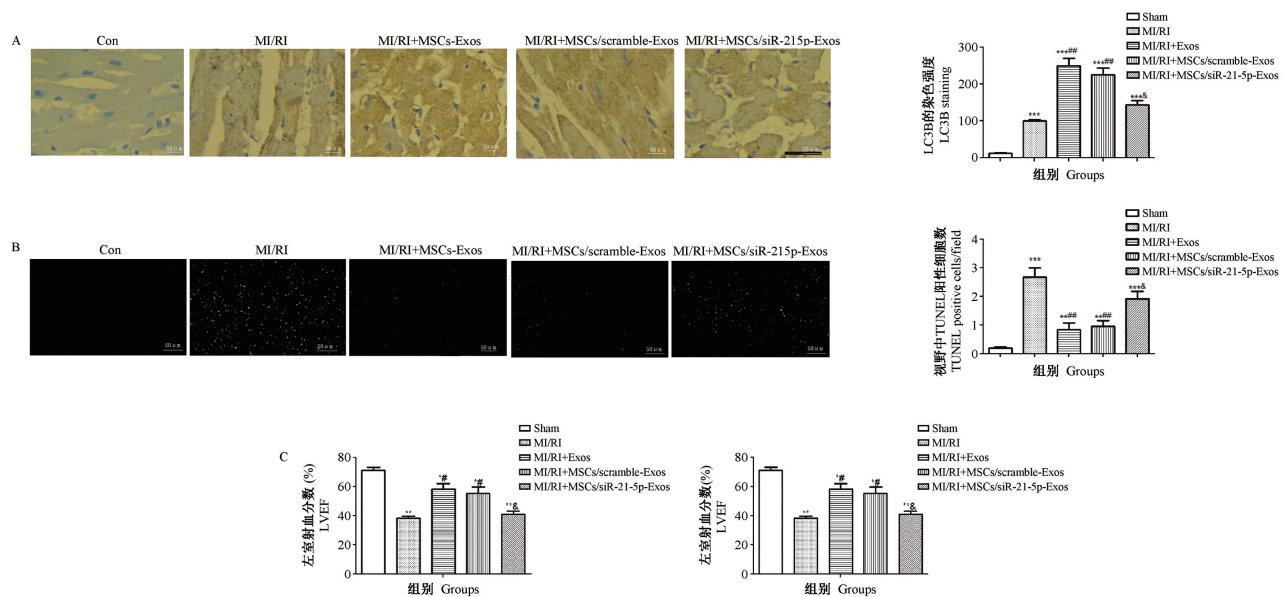


注:A:用 miR-21-5p 抑制剂及其阴性对照转染后 MSCs-Exos 中的 miR-21-5p 表达;B:MSCs-Exos 和 miR-21-5p 抑制剂处理后在心肌组织中的 miR-21-5p 表达($n=4$)。与对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与 MSC/scramble-Exos 组或 MI/RI 组相比, # $P<0.05$, ### $P<0.001$;与 MI/RI+MSCs-Exos 组相比, && $P<0.01$ 。

图 4 在 MSCs-Exos 中和 MI/RI 后心肌组织中 miR-21-5p 的表达

Note. A, miR-21-5p was expressed in MSC exos after transfection with miR-21-5p inhibitor and its negative control. B, Expression of miR-21-5p in the myocardium after MSC exos and miR-21-5p inhibitor treatment ($n=4$). Compared with the control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, # $P<0.05$, ### $P<0.001$. Compared with the MI/RI + MSCs-Exos group, ** $P<0.01$, && $P<0.01$.

Figure 4 Expression of miR-21-5p in the myocardium after MSCs-exos and MI/RI



注:A:每组心肌组织中 LC3B 的免疫组织化学染色;B:TUNEL 染色用于分析 MSCs-Exos 和 MSC-Exos/miR-21-5p 对 MI/RI 后凋亡细胞(凋亡细胞染成绿色)的影响;C:通过超声心动图测量各组大鼠的心脏功能。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 MI/RI 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与 MI/RI+MSCs-Exos 组相比, & $P<0.05$ 。

图 5 miR-21-5p 诱导的自噬对 MI/RI 大鼠细胞凋亡和心脏功能。

Note. A, Immunohistochemical staining of LC3b in the myocardium of each group. B, TUNEL staining was used to analyze the effect of MSCs-Exos and MSC-Exos/miR-21-5p on the apoptosis of cells after MI/RI. C, Cardiac function was measured by echocardiography. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with the MI/RI group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the MI/RI + MSCs-Exos group, & $P<0.05$.

Figure 5 Autophagy induced by miR-21-5p can enhance apoptosis and cardiac function in MI/RI rats

至靶细胞,发挥促进组织再生作用^[17]。而 miR-21-5p 具有促进细胞增值和迁移的功能^[18]。心肌 I/R 损伤病理机制研究的不断完善,有助于对相关治疗靶点更加深入探索。I/R 损伤涉及炎症因子的释放、氧化应激、自由基损伤、自噬及细胞凋亡等病理生理过程^[19-20]。miR-21-5p 可作为糖尿病性心肌病的候选治疗靶标,也是治疗脑外伤炎症的重要探索方向^[21-22]。在 MI/RI 期间,主要是从线粒体运输链中产生了过量的 ROS,过量的 ROS 通过各种机制导致细胞死亡^[23]。

本研究显示了 H₂O₂ 诱导的 ROS 降低 H9C2 细胞活力并增加细胞凋亡。暴露于 H₂O₂ 12 h 后, H9C2s 中的自噬通量被阻滞,这与细胞凋亡率显著增加是一致的,说明缺氧或缺血性损伤后自噬的增强对心肌有保护作用,心肌自噬减少了心肌细胞的凋亡并改善了心肌细胞的存活,心肌细胞自噬的上调减弱了 MI/RI^[24-27]。本研究通过抑制 MSCs-Exos 中的 miR-21-5p 表达,发现其可显著逆转 MSCs-Exos 对自噬、细胞凋亡和心脏功能的作用。上述结果表明 MSCs-Exos 可能通过 miR-21-5p 调节自噬保护免受 H₂O₂ 诱导的 H9C2 细胞损伤,同时介导大鼠 MI/RI 后的心脏自噬作用,当 MSCs-Exos 注射入 MI/RI 大鼠模型时,自噬增加,凋亡减小,心脏功能得到改善。

综上所述, MSCs-Exos 可保护 H₂O₂ 诱导的 H9C2 细胞凋亡,其可能作用机制为 miR-21-5p 参与 MSCs-Exos 诱导的心肌自噬来实现保护 MI/RI 损伤^[28-32]。这些发现可能为利用 miR-21-5p 在优化未来基于干细胞的心脏病治疗中的作用开辟新的研究方向。

参考文献:

- [1] Sezaki A, Imai T, Miyamoto K, et al. Mediterranean diet score and incidence of IHD: a global comparative study [J]. Public Health Nutr, 2019, 22(8): 1444-1450.
- [2] Cao B, Wang H, Zhang C, et al. Remote ischemic postconditioning (RIPC) of the upper arm results in protection from cardiac ischemia-reperfusion injury following primary percutaneous coronary intervention (PCI) for acute ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 1017-1026.
- [3] Yu Z, Wang S, Zhang X, et al. Pterostilbene protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via suppressing oxidative/nitrative stress and inflammatory response [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 43: 7-15.
- [4] Tarasov MV, Kotova PD, Bystrova MF, et al. Arachidonic acid

- hyperpolarizes mesenchymal cells from the human adipose tissue by stimulating TREK1 K⁺ channels [J]. Channels (Austin), 2019, 13(1): 36-47.
- [5] Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Stem Cell Res, 2010, 4(3): 214-222.
- [6] Akyurekli C, Le Y, Richardson RB, et al. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles [J]. Stem Cell Rev Rep, 2015, 11(1): 150-160.
- [7] 李汉成, 周玉婷, 李婵, 等. 外泌体源性微小 RNA 在疾病诊治中的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(24): 2646-2648, 2652.
- [8] Ong SB, Katwadi K, Kwek XY, et al. Non-coding RNAs as therapeutic targets for preventing myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22(3): 247-261.
- [9] Mayourian J, Ceholski DK, Gorski PA, et al. Exosomal microRNA-21-5p mediates mesenchymal stem cell paracrine effects on human cardiac tissue contractility [J]. Circ Res, 122(7): 933-944.
- [10] 肖杨, 吴青青, 昌薇, 等. 自噬在结构性心脏疾病中的作用及机制 [J]. 中华医学杂志, 2017, 97(33): 2635-2637.
- [11] 刘中, 产进中, 潘永露, 等. 吗啡预处理诱导的大鼠血清外泌体对 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(11): 1600-1605.
- [12] 刘丹, 张永慧, 金良友, 等. 柚皮苷对大鼠心肌缺血/再灌注损伤细胞凋亡的影响及作用机制 [J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(8): 846-848, 852.
- [13] Zhang HS, Liu MF, Ji XY, et al. Gastrodin combined with rhynchophylline inhibits cerebral ischaemia-induced inflammasome activation via upregulating miR-21-5p and miR-331-5p [J]. Life Sci, 2019, 239: 116935.
- [14] Zhang B, Wu X, Zhang X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ β -catenin pathway [J]. Stem Cells Transl Med, 2015, 4(5): 513-522.
- [15] Ma J, Zhao Y, Sun L, et al. Exosomes derived from akt-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells improve cardiac regeneration and promote angiogenesis via activating platelet-derived growth factor D [J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(1): 51-59.
- [16] Roxsca AM, Tuțuianu R, Titorencu ID. Mesenchymal stromal cells derived exosomes as tools for chronic wound healing therapy [J]. Rom J Morphol Embryol, 2018, 59(3): 655-662.
- [17] Shao L, Zhang Y, Lan B, et al. MiRNA-sequence indicates that mesenchymal stem cells and exosomes have similar mechanism to enhance cardiac repair [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 4150705.
- [18] Joanne MD, William LJ, Alexander VU, et al. Transcriptional profiling and metabolomic analysis of Staphylococcus aureus grown on autoclaved chicken breast [J]. Food microbiology, 2019, 82: 46-52.

- [19] 潘艳艳, 史斌浩, 马梦晴, 等. GSK3 β 在 HGF 信号通路中对改善心肌缺血再灌注损伤的作用研究 [J]. 重庆医学, 2019, 48(13): 2184–2188.
- [20] Datta A, Akatsu H, Heese K, et al. Quantitative clinical proteomic study of autopsied human in farcted brain specimens to elucidatethe deregulated pathways in ischemic stroke pathology [J]. J Proteomics, 2013, 91: 556–568.
- [21] Zhao J, Liu B, Li C. Knockdown of long noncoding RNA GAS5 protects human cardiomyocyte-like AC16 cells against high glucose-induced inflammation by inhibiting miR-21-5p-mediated TLR4/NF- κ B signaling [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2019.
- [22] Yin Z, Han Z, Hu T, et al. Neuron-derived exosomes with high miR-21-5p expression promoted polarization of M1 microglia in culture [J]. Brain Behav Immun, 2020 83: 270–282.
- [23] Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM, et al. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases; important role of Rac/NADPH oxidase [J]. J Pathol, 2013, 231(3): 290–300.
- [24] 陈华, 莫新玲, 何学恕, 等. 缺血/再灌注大鼠心肌 PPAR- γ 表达变化对再灌注心律失常的影响 [J]. 重庆医学, 2017, 46(17): 2313–2315.
- [25] Dai S, Xu Q, Liu S, et al. Role of autophagy and its signaling pathways in ischemia/reperfusion injury [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(10): 4470–4480.
- [26] Lin XL, Xiao WJ, Xiao LL, et al. Molecular mechanisms of autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury (Review) [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(1): 675–683.
- [27] 赵伟, 王永伟, 韦冠山, 等. PARP-1 介导的自噬流受阻在大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(8): 975–980.
- [28] Ling Y, Chen G, Deng Y, et al. Polydatin post-treatment alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by promoting autophagic flux [J]. Clin Sci, 2016, 130(18): 1641–1653.
- [29] Huang NF, Lam A, Fang Q, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin augment angiogenesis in the chronically infarcted myocardium [J]. Regen Med, 4(4): 527–538.
- [30] Yu B, Kim HW, Gong M, et al. Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection [J]. Int J Cardiol, 2015, 182: 349–360.
- [31] Yang Y, Li Y, Chen X, et al. Exosomal transfer of miR-30a between cardiomyocytes regulates autophagy after hypoxia [J]. J Mol Med (Berl), 94(6): 711–724.
- [32] Wang C, Tang Y, Wang Y, et al. Label-free quantitative proteomics identifies Smarca4 is involved in vascular calcification [J]. Ren Fail, 2019, 41(1): 220–228.

[收稿日期]2019-11-11