

肠源性外泌体通过 miR-146a 调控 NF- κ B 通路介导肾小管上皮细胞 HK-2 炎症反应

江 茜¹, 徐 娟², 王 宏¹, 康 利¹, 王璐瑶¹, 王 蕾^{1*}, 刘琳娜^{2*}

1. 天津市医药科学研究所 心脑血管药物研究室, 天津 300020

2. 中山市中医院 肾病科·风湿科, 广东 中山 528400

摘要: 目的 探讨肠源性外泌体通过 miR-146a 调控 NF- κ B 通路介导肾小管上皮细胞 HK-2 的炎症反应。方法 Caco-2 细胞分为对照组、模型[10 ng·mL⁻¹ 的脂多糖 (LPS) 刺激构建肠上皮细胞炎症模型]组、NC mimic 组和 miR-146a mimic 组, 提取各组外泌体 (30 μ g·mL⁻¹) 孵育 HK-2 细胞, 记为对照-Exos、LPS-Exos、NC-Exos、miR-146a-Exos 组。转录组学测序对对照组与模型组差异基因进行检测; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 miR-146a 表达; 酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测细胞培养基白细胞介素 (IL)-1 β 、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平; Western blotting 法检测细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和核因子- κ B (NF- κ B)、磷酸化-NF- κ B (p-NF- κ B)、Toll 样受体 4 (TLR4) 炎症信号通路蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组 Caco-2 细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 TLR4、NF- κ B、p-NF- κ B 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01), 培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著增加 ($P < 0.05$), 细胞及外泌体中 miR-146a 表达显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01); miR-146a mimic 组细胞及外泌体中 miR-146a 表达显著增加 ($P < 0.01$)。外泌体与 HK-2 细胞共孵育后, 与对照-Exos 组比较, LPS-Exos、miR-146a mimic 组培养基中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平明显增加 ($P < 0.05$), 细胞中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 NF- κ B 炎症通路相关 TLR4、NF- κ B、p-NF- κ B 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01)。结论 肠源性外泌体通过 miR-146a 调控 NF- κ B 通路介导 HK-2 细胞炎症反应。

关键词: 肠源性外泌体; 微小 RNA-146a; NF- κ B 信号通路; HK-2 细胞; 炎症反应

中图分类号: R363.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 10-2326-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.10.012

Intestine-derived exosomes regulates inflammatory response of HK-2 cells through miR-146a-regulated NF- κ B pathway

JIANG Qian¹, XU Juan², WANG Hong¹, KANG Li¹, WANG Luyao¹, WANG Lei¹, LIU Linna²

1. Cardiovascular and Cerebrovascular Drug Research Laboratory, Tianjin Institute of Medical & Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

2. Department Nephrology·Rheumatology, Zhongshan Hospital of TCM, Zhongshan 528401, China

Abstract: Objective To investigate the role of intestine-derived exosomes in regulating the inflammatory response of HK-2 cells through the NF- κ B pathway regulated by miR-146a. **Methods** Caco-2 cells were divided into control group, model group (constructed intestinal epithelial cell inflammation model by stimulating with 10 ng·mL⁻¹ LPS), NC mimic group, and miR-146a mimic group. The exosomes (30 μ g·mL⁻¹) from each group were extracted and incubated with HK-2 cells, respectively, and named as control-Exos, LPS-Exos, NC-Exos, and miR-146a-Exos group. Transcriptome sequencing was used to detect differential genes between the control group and the model group; real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect miR-146a expression; ELISA was used to detect the levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the cell culture supernatant; Western blotting was used to detect the expressions of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NF- κ B, p-NF- κ B, and Toll-like receptor 4

收稿日期: 2024-05-13

基金项目: 中山市社会公益与基础研究项目 (2020B3005); 中山市第三批社会公益与基础研究项目 (2021B3006); 天津市中医处课题 (2021163); 天津市医药科学研究所课题 (S202304)

第一作者: 江 茜 (1990—), 女, 助理研究员, 研究方向为药理学。E-mail: jiangduoxi@163.com

*共同通信作者: 刘琳娜 (1980—), 女, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为肾病。E-mail: 40047682@qq.com

王 蕾 (1979—), 女, 研究员, 研究方向为药理学。E-mail: zws9905@sina.com

(TLR4) inflammatory signaling pathway proteins in the cells. **Results** Compared with the control group, the expressions of inflammatory factors IL-1 β , IL-6, and TNF- α and TLR4, NF- κ B, and p-NF- κ B proteins in the model group were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), the levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the cell culture supernatant were significantly increased ($P < 0.05$), and the expressions of miR-146a in the cells and exosomes were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01); the expressions of miR-146a in the cells and exosomes of the miR-146a mimic group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the control-Exos group, the levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the culture supernatant of the LPS-Exos and miR-146a mimic groups were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Intestine-derived exosomes regulate the inflammatory response of HK-2 cells through miR-146a-regulated NF- κ B pathway.

Key words: intestine-derived exosomes; microRNA-146a; NF- κ B pathway; HK-2 cells; inflammatory reaction

慢性肾脏病(CKD)是指各种原因引起的肾脏结构或功能异常 ≥ 3 个月,伴或不伴肾小球滤过率下降3个月以上^[1]。患者体内普遍存在白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 炎症细胞因子释放的全身炎症的慢性微炎症状态^[2]。CKD的全身微炎症状态是由于肾功能受损、体内毒素通过肠壁血管渗入到肠腔内并在肠道内蓄积,进而引起肠道微生态系统紊乱、肠道菌群失衡导致肠道上皮屏障功能受损、肠源性尿毒素进入血液循环,导致肾脏微炎症状态,加剧肾损伤^[3]。研究发现,尿毒症大鼠结肠-结肠上皮连接处破裂,维持透析的终末期肾病(ESRD)患者出现慢性小肠结肠炎的组织学表现^[4]。此外,肠道炎症可以导致肾小球肾炎肾实质疾病,最常见的是影响肾小球和小管间质,进而演变为ESRD^[5-6],以肠道为靶点可以治疗CKD^[4]。

外泌体是一种直径为40~200 nm的膜囊泡,由细胞分泌到周围环境中。外泌体能够携带运输蛋白质、脂质、mRNA、miRNA、lncRNA和DNA,以自分泌、旁分泌和内分泌的方式传递分子信息^[7]。课题组发现CKD大鼠分泌释放肠源性外泌体增加,并且外泌体携带miR-146a的表达特性^[8]。因此,本研究通过体外实验进一步探讨肠源性外泌体miR-146a调控肾损伤的机制。

1 材料

1.1 细胞

人结肠癌细胞系Caco-2(SCSP-5027)、人肾小管上皮细胞HK-2(SCSP-511)购于中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂

jetPRIME®Transfection Reagent Ref(货号114-15,美国polyplus公司);RIPA(强)裂解液(货号abs9229),苯甲磺酰氟(PMSF,货号abs812852),BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(货号OS28),细胞表面抗原63(CD63)(货号abs132700)、肿瘤易

感基因101(TSG101,货号abs145552)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,货号abs137959)、IL-1 β (货号abs120224)、IL-6(货号abs135607)、TNF- α (货号abs149748),Toll样受体(TLR)(货号abs132000)、Goat Anti-Mouse IgG-HRP(货号abs514810)抗体,均购自中国absin公司;5 $\times$ 蛋白上样缓冲液(货号P1040,中国Solarbio公司);培养基上清使用外泌体提取试剂盒(超纯,细胞培养上清用)(货号BB-8902,上海贝博生物科技有限公司);IL-1 β ELISA试剂盒(货号ml037361-J)、IL-6 ELISA试剂盒(货号ml102828-J)、TNF- α ELISA试剂盒(货号ml102859-J),均购自上海酶联生物科技有限公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(货号10600023,美国GE公司);热休克蛋白70抗体(HSP70)、核因子- κ B抗体(NF- κ B,货号8242)、NF- κ B p-p65(Ser536)抗体(93H1)(货号3033)、Anti-Rabbit IgG HRP-Linked Antibody(货号7074),美国CST公司;Immobion Western chemILuminescent HRP Substrate(货号WBKLS0100,德国MILLipore公司);miRNA Purification Kit(货号CW2141S)、miRNA cDNA Synthesis Kit(货号CW2141S)、miRNA qPCR Assay Kit(货号CW2142S),中国康为世纪公司。

1.3 主要仪器

AU5800全自动生化分析仪(美国Beckman公司);CP100MX超速离心机、HT-7700透射电镜(日本Hitachi公司);纳米颗粒跟踪分析仪(德国Particle Metrix公司);Bio-Rad电泳系统(美国伯乐公司);ImageQuant LAS 500型一体化成像仪(美国GE公司);ABI7500型荧光定量PCR仪(美国ABI公司);ASP200S全自动组织脱水机、EG1150H组织包埋机、RM2255全自动切片机(德国Leica公司);Ci-L图像采集显微镜、NIS-BRML图像分析系统(日本Nikon公司);台式冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

Caco-2、HK-2 细胞用含 10% FBS, 100 U·mL⁻¹ 青、链霉素的 DMEM 培养基, 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中常规培养, 平均 2 d 换 1 次培养基, 待生长至融合度为 80% 后按 1:2 比例传代。

2.2 Caco-2 细胞分组、处理方法

取对数生长期 Caco-2 细胞, 每孔 5×10⁴ 个接种于 6 孔板中, 完全培养基培养 24 h 后, 更换无血清培养基并进行分组。对照组: 更换无血清培养基后继续培养 24 h; 模型组: 在无血清培养基中加入 10 ng·mL⁻¹ 脂多糖(LPS)^[9-11] 刺激 Caco-2 细胞, 继续培养 24 h; NC mimic 组: Caco-2 细胞用 jetPRIME[®] Transfection Reagent 转染 NC mimic, 转染浓度为 100 nmol·L⁻¹, 培养 24 h; miR-146a mimic 组: 100 nmol·L⁻¹ miR-146a mimic 转染于 Caco-2 细胞, 继续培养 24 h。收集上述细胞及细胞培养基, -80 °C 冻存备用。

Western blotting 检测对照组和模型组细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α 炎症因子和 NF-κB 炎症通路相关蛋白 TLR4、NF-κB、p-NF-κB 的表达(方法学见“2.6”项); ELISA 法检测培养基中 IL-1β、IL-6、TNF-α 炎症因子的表达, 验证模型是否成功。

2.3 转录组测序及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 验证

采用标准提取方法从对照组和模型组细胞中提取 RNA。随后在 NEB Fragmentation Buffer 中用二价阳离子将得到的 mRNA 随机打断, 按照 NEB 普通建库方式或链特异性建库方式进行建库。库检合格后, 把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina 测序。测序的基本原理是边合成边测序(sequencing by synthesis)。在测序的 flow cell 中加入 4 种荧光标记的 dNTP、DNA 聚合酶以及接头引物进行扩增, 在每 1 个测序簇延伸互补链时, 每加入 1 个被荧光标记的 dNTP 就能释放出相对应的荧光, 测序仪通过捕获荧光信号, 并通过计算机软件将光信号转化为测序峰, 从而获得待测片段的序列信息。

qRT-PCR 实验验证测序筛选的靶基因。参照 miRNA Purification Kit 说明书提取 miRNA, 鉴定 miRNA 浓度及纯度。采用加尾法进行逆转为 cDNA, 体系为 miRNA 5 μL、10×Poly(A) Polymerase Buffer 2.5 μL、ATP 1 μL、*E. coli* Poly(A) Polymerase 5 U·μL⁻¹ 0.5 μL、RNase-Free Water 16 μL,

miRNA 加 Poly(A) 尾的过程: 37 °C、15 min。修饰后的 miRNA cDNA 第一链合成的过程: 42 °C、50 min, 85 °C、5 min。

qRT-PCR 反应: 2×miRNA qPCR Mixture (ROX) 10 μL; 引物 (10 μmol·L⁻¹) 1 μL; miRNA 第一链 cDNA 2 μL; ddH₂O 7 μL。反应程序: 预变性 95 °C、10 min, 变性 95 °C、15 s, 退火/延伸 60 °C、1 min, 45 个循环; 溶解曲线分析: 95 °C、15 s, 60 °C、1 min, 95 °C、15 s, 60 °C、15 s。以内参 U6 进行标准化, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称	序列(5'→3')
miR-146a	CGCTGAGAACTGAATTCATGGGTT
U6	AGAGAAGATTAGCATGGCCCCTG

同时检测 NC mimic 组、miR-146a mimic 组 miR-146a 的表达水平。

2.4 外泌体的提取与鉴定

外泌体试剂盒提取“2.2”项各组细胞培养基中的外泌体。取 4 mL 培养基 4 °C、3 000×g 离心 5 min, 取上清至于另一干净离心管中, 4 °C、10 000×g 离心 20 min, 取上清至于另一干净离心管中, 加入 1 mL 试剂 A, 上下颠倒混匀, 4 °C 过夜, 4 °C、10 000×g 离心 1 h。弃上清, 加入 100 μL 外泌体保存液, 混匀, -80 °C 冻存备用。

采用透射电镜观察外泌体形态, 纳米颗粒跟踪分析评估分离的外泌体直径分布, Western blotting 检测外泌体标志蛋白 CD63、HSP70、TSG101 的表达(方法学见“2.6”项), 鉴定外泌体。qRT-PCR 实验检测对照组、模型组、NC mimic 组 miR-146a mimic 组外泌体中 miR-146a 表达水平。

2.5 外泌体孵育 HK-2 细胞分组、处理方法

将“2.4”项中提取的外泌体用 0.2 μm 滤膜滤过, 4 °C 备用。取对数生长期 HK-2 细胞, 按每孔 1×10⁵ 个接种于 6 孔板中, 完全培养基培养 24 h 后, 更换无血清培养基后, 分别给予 30 μg·mL⁻¹^[12-13] 各组(对照组、模型组、NC mimic 组、miR-146a mimic 组)外泌体处理 HK-2 细胞 24 h, 分别记对照-Exos、LPS-Exos、NC-Exos、miR-146a-Exos 组, 收集细胞及细胞培养基, -80 °C 冻存备用。

2.6 Western blotting 实验

RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法进行蛋

白定量,蛋白变性后,SDS-PAGE电泳200 mA、2 h,将蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。5%脱脂奶粉室温封闭1 h,TBST洗3次、每次5 min,CD63(1:1 000)、HSP70(1:1 000)、TSG101(1:1 000)、IL-1 β (1:1 000)、IL-6(1:1 000)、TNF- α (1:1 000)、NF- κ B(1:1 000)、TLR4(1:1 000)、p-NF- κ B(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)一抗4℃过夜。室温复温30 min,TBST洗3次,每次5 min,二抗兔(1:2 000)、二抗鼠(1:2 000)室温孵育2 h。TBST洗3次,每次5 min,ECL发光,显像,Image J进行灰度分析。

2.7 ELISA法检测细胞培养基上清液中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平

细胞培养上清1 000 $\times$ g离心20 min,取50 μ L加入孔板中,加入100 μ L HRP标记的IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的抗体,37℃孵育60 min,弃去液体,洗涤液洗5次,每孔加入底物A、B各50 μ L,37℃避光孵育15 min,每孔加入终止液50 μ L,450 nm测定吸光度(A)值。

2.8 统计学处理

采用Graph Pad 6.0进行数据分析和绘图,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间比较采用独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 LPS诱导Caco-2构建肠上皮损伤模型

通过Western blotting检测IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子的表达,结果见图1、表2,与对照组比

较,模型组炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达显著增加($P < 0.01$)。随后检测了NF- κ B炎症通路相关蛋白的表达,与对照组比较,模型组TLR4、NF- κ B、p-NF- κ B表达明显增加($P < 0.05$ 、 0.01)。

ELISA检测培养基中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子的表达(表3),与对照组相比,模型组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著增加($P < 0.05$)。

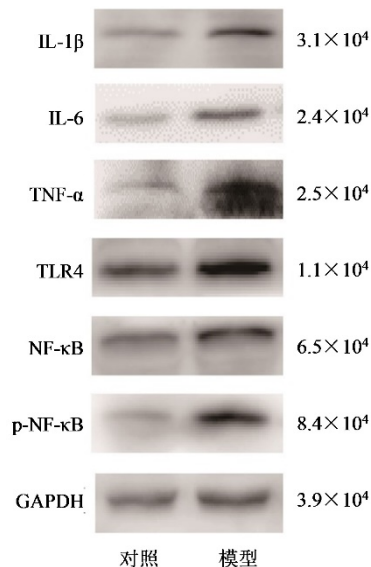


图1 Western blotting检测炎症因子及NF- κ B通路蛋白表达
Fig. 1 Expression of inflammatory factors and NF- κ B pathway protein detected by Western blotting

表2 炎症蛋白表达灰度值统计结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Statistical results of gray value of inflammatory protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	IL-1 β /GAPDH	IL-6/GAPDH	TNF- α /GAPDH	TLR4/GAPDH	NF- κ B/GAPDH	p-NF- κ B/GAPDH
对照	3.32 $\pm$ 0.09	1.08 $\pm$ 0.03	2.33 $\pm$ 0.03	1.95 $\pm$ 0.13	1.37 $\pm$ 0.18	4.85 $\pm$ 0.02
模型	10.61 $\pm$ 0.09**	12.66 $\pm$ 0.13**	8.38 $\pm$ 0.03**	3.80 $\pm$ 0.30*	2.45 $\pm$ 0.14*	10.34 $\pm$ 0.07**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

表3 ELISA检测培养基炎症因子含量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Content of inflammatory factors in culture medium was detected by ELISA ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	IL-1 β (pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α (pg·mL ⁻¹)
对照	56.79 $\pm$ 5.02	59.62 $\pm$ 0.01	59.35 $\pm$ 0.35
模型	82.34 $\pm$ 4.77*	85.65 $\pm$ 2.85*	80.28 $\pm$ 0.94*

与对照组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group.

3.2 肠上皮损伤模型miR-146a表达增加

如图2-A为CKD肠上皮损伤模型的差异基因,图2-B为差异microRNA的表达热图,发现miR-146a在模型组表达较对照组增加。qRT-PCR进一

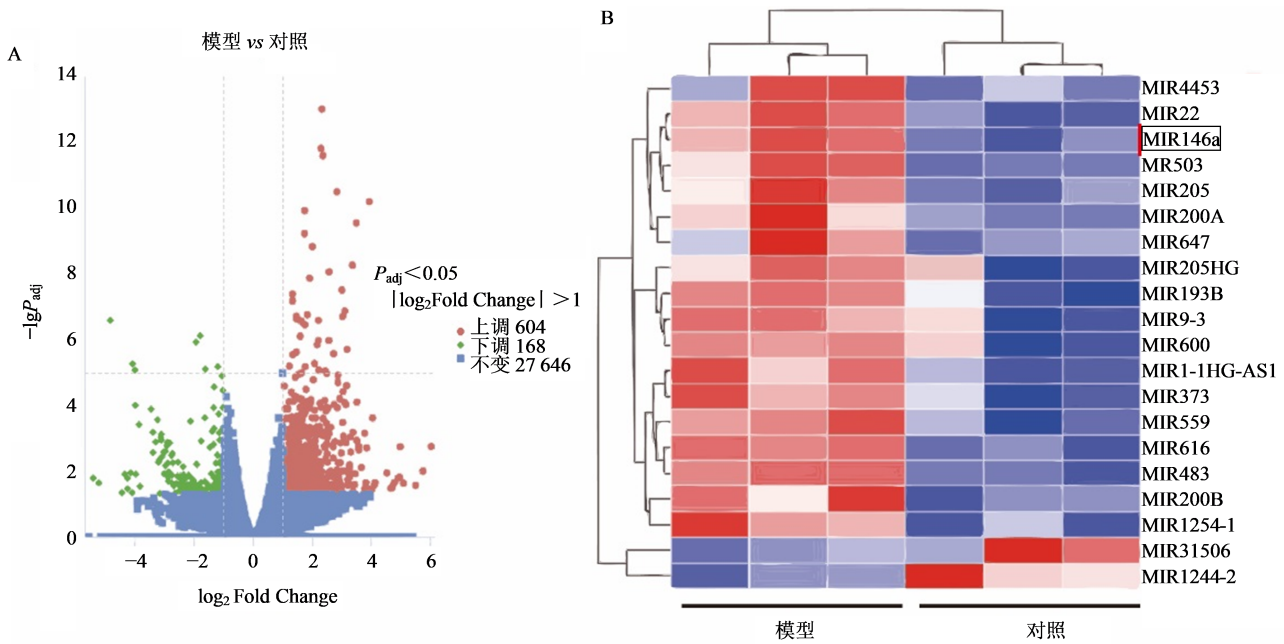
步验证,与对照组比较,miR-146a在模型组和miR-146a mimic组表达显著增加($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表4。

3.3 肠上皮细胞源性外泌体的鉴定

通过试剂盒法提取Caco-2细胞培养基中的外泌体,透射电镜可见“茶托状”颗粒(图3-A箭头所示)。外泌体平均粒径为161 nm(图3-B)。外泌体表面蛋白标记物TSG101、HSP70、CD63表达明显高于Caco-2细胞组(图3-C)。

3.4 肠上皮损伤模型外泌体miR-146a表达增加

qRT-PCR分别检测了培养基外泌体中miR-146a的表达,结果如表4所示,与对照组比较,模型



A-基因差异表达火山图;B-miRNA 差异表达热图。

A-Volcanic map of gene differential expression;B-miRNA differential expression heatmap.

图2 转录组测序结果图

Fig. 2 Transcriptome sequencing results

表4 Caco-2细胞及外泌体中miR-146a的表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Expression of miR-146a in cells and exosomes ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Caco-2细胞 miR-146a/U6	外泌体 miR-146a/U6
对照	1.00±0.02	1.00±0.01
模型	29.31±2.98*	53.02±2.81**
NC mimic	1.01±0.03	0.99±0.01
miR-146a mimic	241.45±9.51**	218.15±0.32**

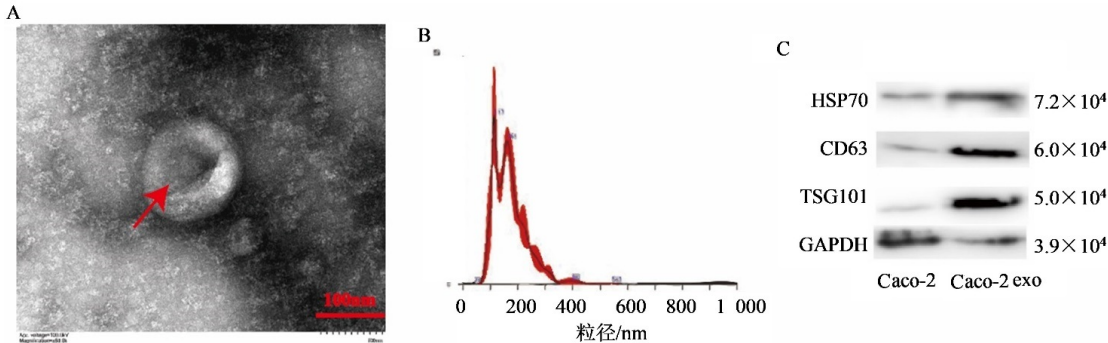
与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

组、miR-146a mimic 组外泌体携带 miR-146a 显著上调($P<0.01$)。

3.5 肠上皮细胞释放外泌体 miR-146a 激活 HK-2 细胞炎症反应

与对照 -Exos 组比较, LPS-Exos、miR-146a mimic 组外泌体孵育 HK-2 细胞后, 培养基中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平明显增加($P<0.05$, 表 5), 炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 NF- κ B 炎症通路相关 TLR4、NF- κ B、p-NF- κ B 蛋白表达显著增加($P<0.05$ 、0.01)(图 4、表 6)。



A-外泌体透射电镜图($\times 20\,000$);B-粒径分析;C-Western blotting 检测外泌体标志 TSG101、HSP70、CD63。

A-Transmission electron microscopy image of extracellular vesicles ($\times 20\,000$); B-exosome Nano particle tracking analyzer particle size analysis;

C-Western blotting was used to detect extracellular vesicle markers TSG101, HSP70, and CD63.

图3 肠上皮细胞源性外泌体的鉴定

Fig. 3 Identification of intestinal epithelial cell-derived exosomes

表5 ELISA法检测培养基中炎症因子水平 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Content of inflammatory factors in culture medium was detected by ELISA method ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照-Exos	58.37 $\pm$ 3.96	58.03 $\pm$ 2.01	59.77 $\pm$ 3.35
LPS-Exos	84.25 $\pm$ 4.77*	92.16 $\pm$ 2.85*	89.12 $\pm$ 0.94*
NC-Exos	56.97 $\pm$ 1.22	59.41 $\pm$ 1.78	58.93 $\pm$ 0.81
miR-146a-Exos	100.43 $\pm$ 3.92*	89.14 $\pm$ 1.47*	81.43 $\pm$ 0.81*

与对照-Exos组比较: * $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control-Exos group.

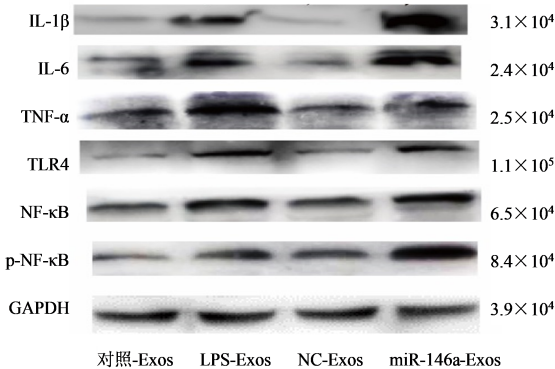


图4 Western blotting检测炎症因子及NF- κ B通路蛋白表达

Fig. 4 Expression of inflammatory factors and NF- κ B pathway protein by Western blotting

表6 炎症因子及NF- κ B通路蛋白表达灰度值统计 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Statistical results of gray value of inflammatory factors and NF- κ B pathway protein ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	IL-1 β /GAPDH	IL-6/GAPDH	TNF- α /GAPDH	TLR4/GAPDH	NF- κ B/GAPDH	p-NF- κ B/GAPDH
对照-Exos	0.82 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.01	0.75 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.00	1.11 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.03
LPS-Exos	3.48 $\pm$ 0.17**	4.34 $\pm$ 0.22**	1.28 $\pm$ 0.06*	1.92 $\pm$ 0.08**	2.02 $\pm$ 0.10*	1.55 $\pm$ 0.07*
NC-Exos	0.84 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.00	1.05 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.04
miR-146a-Exos	3.01 $\pm$ 0.09**	2.25 $\pm$ 0.13**	1.45 $\pm$ 0.03**	0.47 $\pm$ 0.01**	2.81 $\pm$ 0.07*	1.67 $\pm$ 0.04*

与对照-Exos组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control-Exos group.

到细胞通讯作用,受体细胞则接受信息、发挥相关生物功能^[7, 17]。研究发现,外泌体和外泌体 miRNA 的递送已被证明可以改善全身微炎症状态^[18-19]。糖尿病肾病患者尿液外泌体 miR-146a 表达增加^[20]。在糖尿病肾病/肾小球内皮损伤的肾脏和尿液样本中观察到 miR-146a 的上调表达。尿液外泌体 miR-146a 可能作为糖尿病肾病的诊断指标^[21]。

本实验用 LPS 刺激 Caco-2 细胞来模拟 CKD 肠上皮炎症损伤模型^[10],发现 LPS 刺激后 Caco-2 细胞释放外泌体 miR-146a 表达增加。将这些外泌体与肾小管上皮细胞 HK-2 共孵育后发现 HK-2 细胞分泌的炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 增加, NF- κ B 信

4 讨论

全身炎症是 CKD 发展的重要因素,微炎症的程度是临床用来预测患者预后的有效指标。改善 CKD 患者的微炎症状态可有效延缓、停止甚至逆转疾病的恶性进展,保护肾功能,预防尿毒症的发生^[1-2]。微小 RNA 是内源性小的非编码 RNA,通过转录后修饰调节基因表达^[14]。研究发现, miR-146a 作为重要的促炎症因子在免疫调节方面起着重要作用^[15-16]。

课题组前期发现 CKD 大鼠微炎症状态及肠源性外泌体携带 miR-146a 的表达特性^[8]。外泌体是核内体来源的直径为 40~200 nm 的细胞外囊泡,可以携带核酸(miRNA、mRNA)、脂质、蛋白质等,起

号通路激活。推测在 CKD 中由于肠道炎症损伤,肠上皮细胞分泌释放的外泌体表达 miR-146a 进而加剧肾小管上皮炎症损伤。为了进一步探讨肠源性外泌体 miR-146a 影响肾损伤的机制,通过 Caco-2 细胞转染 miR-146a mimic 构建 miR-146a 过表达的肠上皮细胞模型, qRT-PCR 检测发现 Caco-2 细胞和释放的外泌体中 miR-146a 表达明显升高。过表达 miR-146a 的外泌体与 HK-2 细胞共孵育后,分泌的炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 增加, NF- κ B 信号通路激活。进一步说明肠源性外泌体 miR-146a 激活 NF- κ B 信号通路,促进 HK-2 细胞炎症损伤。

MiR-146a 通过 NF- κ B 通路调节炎症,其失调与

肾纤维化有关。在促炎条件下,miR-146a通过Toll样受体激活NF- κ B通路^[22]。体外糖尿病肾病模型中miR-146a过度表达,进而增加TNF- α 、TGF- β 1和NF- κ B的表达^[23]。但是,也研究发现人脐带间充质干细胞外泌体中的miR-146a-5p靶向TRAF6/STAT1通路,从而促进巨噬细胞向M2表型极化,并改善糖尿病肾病大鼠的肾损伤^[24],这与本实验的结果矛盾。因此,课题组推测miR-146a形成一个改变NF- κ B活性的负调控和正调控的交叉调节的复杂网络,以调节炎症反应^[16]。所以,还需要进一步的体内外实验探讨肠源性外泌体通过miR-146a调控NF- κ B通路调控HK-2细胞炎症反应的具体机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄玉红,王洁.慢性肾脏病所致微炎症状态的研究进展[J].右江民族医学院学报,2021,43(1):128-133.
Huang Y H, Wang J. Research progress of micro-inflammatory state caused by chronic kidney disease [J]. J Youjiang Med Univ Natl, 2021, 43(1): 128-133.
- [2] Kadamane S P, Satariano M, Massey M, et al. The role of inflammation in CKD [J]. Cells, 2023, 12(12): 1581.
- [3] Bartochowski P, Gayraud N, Bornes S, et al. Gut-kidney axis investigations in animal models of chronic kidney disease [J]. Toxins, 2022, 14(9): 626.
- [4] Pei T T, Hu R, Wang F J, et al. *Akkermansia muciniphila* ameliorates chronic kidney disease interstitial fibrosis via the gut-renal axis [J]. Microb Pathog, 2023, 174: 105891.
- [5] Dumas S A, Tsironis C, Bolaji A A, et al. Glomerulonephritis and inflammatory bowel disease: A tale of gut-kidney axis dysfunction [J]. Autoimmun Rev, 2023, 22(6): 103327.
- [6] Ambruzs J M, Larsen C P. Renal manifestations of inflammatory bowel disease [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2018, 44(4): 699-714.
- [7] Sadeghi S, Tehrani F R, Tahmasebi S, et al. Exosome engineering in cell therapy and drug delivery [J]. Inflammopharmacology, 2023, 31(1): 145-169.
- [8] 刘琳娜,王宏,江茜,等.慢性肾病微炎症大鼠肠源性外泌体携带miR-146a表达特性研究[J].中国比较医学杂志,2023,33(4):83-89,108.
Liu L N, Wang H, Jiang Q, et al. Characterization of intestine-derived exosomes carrying miR-146a in rats with chronic kidney disease microinflammation [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 83-89, 108.
- [9] Liu L N, Wang L, Wang H, et al. Niaodukang mixture inhibits micro-inflammation in CKD rats by enhancing miR-146a levels in enterogenous exosomes [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 332: 118318.
- [10] Stephens M, von der Weid P Y. Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner [J]. Gut Microbes, 2020, 11(3): 421-432.
- [11] Tungsanga S, Panpetch W, Bhunyakarnjanarat T, et al. Uremia-induced gut barrier defect in 5/6 nephrectomized mice is worsened by *Candida* administration through a synergy of uremic toxin, lipopolysaccharide, and (1 $\rightarrow$ 3) - β -D-glucan, but is attenuated by *Lactocaseibacillus rhamnosus* L34 [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(5): 2511.
- [12] Xu H, Ma H D, Zha L F, et al. Engineered exosomes transporting the lncRNA, SVIL-AS1, inhibit the progression of lung cancer via targeting miR-21-5p [J]. Am J Cancer Res, 2024, 14(7): 3335-3347.
- [13] Liu X, Liu Z, Wang C, et al. Kidney tubular epithelial cells control interstitial fibroblast fate by releasing TNFAIP8-encapsulated exosomes [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(10): 672.
- [14] Bartel D P. Metazoan microRNAs [J]. Cell, 2018, 173(1): 20-51.
- [15] Asa'ad F, Garaicoa-Pazmiño C, Dahlin C, et al. Expression of microRNAs in periodontal and peri-implant diseases: A systematic review and meta-analysis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4147.
- [16] Taganov K D, Boldin M P, Chang K J, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33): 12481-12486.
- [17] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [18] Krylova S V, Feng D R. The machinery of exosomes: Biogenesis, release, and uptake [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1337.
- [19] Shen Q C, Huang Z Z, Yao J C, et al. Extracellular vesicles-mediated interaction within intestinal microenvironment in inflammatory bowel disease [J]. J Adv Res, 2021, 37: 221-233.
- [20] González-Palomo A K, Pérez-Vázquez F J, Méndez-Rodríguez K B, et al. Profile of urinary exosomal microRNAs and their contribution to diabetic kidney disease through a predictive classification model [J]. Nephrology (Carlton), 2022, 27(6): 484-493.
- [21] Earle A, Bessonny M, Benito J, et al. Urinary exosomal

- microRNAs as biomarkers for obesity-associated chronic kidney disease [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(18): 5271.
- [22] Mann M, Mehta A, Zhao J L, et al. Author Correction: An NF- κ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 3338.
- [23] Huang Y Q, Liu Y, Li L, et al. Involvement of inflammation-related miR-155 and miR-146a in diabetic nephropathy: Implications for glomerular endothelial injury [J]. *BMC Nephrol*, 2014, 15: 142.
- [24] Zhang Y Q, Le X, Zheng S, et al. MicroRNA-146a-5p-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance protection against diabetic nephropathy in rats through facilitating M2 macrophage polarization [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 171.

【责任编辑 兰新新】