

糖络宁对高血糖大鼠血清外泌体中 miR-322 和 IRE1 α -RIDD 表达的影响

姚伟洁¹, 杨鑫伟², 李 潇², 朱笏悦², 韩 朔², 冯 欣^{1*}, 许利平^{2*}

1. 首都医科大学附属北京妇产医院北京妇幼保健院, 北京 100006

2. 首都医科大学中医药学院 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069

摘要: **目的** 探讨糖络宁通过高血糖大鼠血清外泌体抑制细胞凋亡的机制。**方法** SD大鼠分为对照组、模型组和糖络宁(10.9 g/kg)组。除对照组外,其余组大鼠ip链脲佐菌素诱导高血糖大鼠模型。给药组大鼠ig药物,对照组和模型组大鼠ig等体积蒸馏水,1次/d,连续12周。给药结束后,收集大鼠血清,采用差异离心法提取血清外泌体,使用大鼠雪旺细胞RSC96内化外泌体,将RSC96细胞分别与对照组、模型组、糖络宁组的大鼠血清外泌体共培养24 h。采用CCK-8法测定RSC96细胞活力;采用Western blotting法测定RSC96细胞中肌醇酶1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α)、磷酸化IRE1 α (p-IRE1 α)和蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase A6, PDIA6)蛋白表达;采用qRT-PCR法测定外泌体中miR-322 mRNA表达,RSC96细胞中miR-322、IRE1 α 及IRE1依赖性降解(IRE1-dependent decay, RIDD)底物CD59、蛋白激酶D2(protein kinase D2, PKD2)、A类清道夫受体(scavenger receptor class A, SCARA)、蛋白水解酶D(peptidase D, PEPD)mRNA表达。**结果** 与对照组比较,模型组血清外泌体数量显著增加($P<0.01$),外泌体及RSC96细胞中miR-322 mRNA水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01),RSC96细胞活力显著降低($P<0.01$),RSC96细胞IRE1 α 蛋白和mRNA表达水平显著升高($P<0.01$),PDIA6蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),RIDD底物CD59、PKD2、SCARA和PEPD mRNA表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,糖络宁组血清外泌体数量明显降低($P<0.05$),外泌体及RSC96细胞中miR-322 mRNA水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01),RSC96细胞活力显著增加($P<0.05$),RSC96细胞IRE1 α 蛋白和mRNA表达水平显著降低($P<0.05$),PDIA6蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),RIDD底物CD59、PKD2、SCARA和PEPD mRNA表达水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 糖络宁通过增加高血糖大鼠血清外泌体中miR-322 mRNA水平,从而抑制IRE1 α -RIDD诱导的细胞凋亡。

关键词: 糖络宁; 内质网应激; 外泌体; RSC96细胞; 肌醇酶1 α ; miR-322

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)06-1654-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.06.013

Effect of Tangluoning on expression of miR-322 and IRE1 α -RIDD in serum exosomes of hyperglycemic rats

YAO Wei-jie¹, YANG Xin-wei², LI Xiao², ZHU Jia-yue², HAN Shuo², FENG Xin¹, XU Li-ping²

1. Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Beijing Maternal and Child Health Care Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China

2. Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of Tangluoning (糖络宁) on inhibiting cell apoptosis through serum exosomes in hyperglycemic rats. **Methods** SD rats were divided into control group, model group, and Tangluoning (10.9 g/kg) group. Except for the control group, rats in the other groups were ip streptozotocin to induce hyperglycemia rat model. Rats in administration group were ig drugs, rats in control group and model group were ig equal volumes of distilled water, once a day for 12 weeks. After administration, serum of rats was collected, the serum exosomes were extracted by differential centrifugation, and RSC96 cells were used to internalize the exosomes. RSC96 cells were co-cultured with serum exosomes of control group, model group, and Tangluoning group for 24 h. CCK-8 method was used to determine the viability of RSC96 cells. Western blotting was used to determine the expressions

收稿日期: 2020-10-22

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(7194268)

作者简介: 姚伟洁(1990—),男,初级药师,博士,主要从事中药药理学研究。Tel: 13910432840 E-mail: yaowjyaoyao@163.com

*通信作者: 冯 欣,主任药师,研究方向为药理学和医院药学。Tel: (010)52273030 E-mail: fengxin1115@126.com

许利平,教授,研究方向为中药药理学。Tel: (010)83911639 E-mail: xulp@ccmu.edu.cn

of inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), phosphorylated IRE1 α (p-IRE1 α), and protein disulfide isomerase (PDIA6) in RSC96 cells. qRT-PCR was used to measure the expression of *miR-322* mRNA in exosomes, *miR-322*, *IRE1 α* and IRE1-dependent decay (RIDD) substrate such as *CD59*, protein kinase D2 (*PKD2*), scavenger receptor class A (*SCARA*), protein hydrolase D (*PEPD*) mRNA expressions in RSC96 cells. **Results** Compared with control group, the number of serum exosomes in model group was significantly increased ($P < 0.01$); The level of *miR-322* mRNA in exosomes and RSC96 cells was significantly reduced ($P < 0.05$, 0.01); The viability of RSC96 cells was significantly reduced ($P < 0.01$); IRE1 α protein and mRNA expressions in RSC96 cells were significantly increased ($P < 0.01$); PDIA6 expression was significantly reduced ($P < 0.01$); RIDD substrates such as *CD59*, *PKD2*, *SCARA* and *PEPD* mRNA levels were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with model group, the number of serum exosomes in Tangluoning group was significantly reduced ($P < 0.05$); The mRNA level of *miR-322* in exosomes and RSC96 cells was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01); The viability of RSC96 cells was significantly increased ($P < 0.05$); IRE1 α protein and mRNA levels in RSC96 cells were significantly reduced ($P < 0.05$); PDIA6 expression was significantly increased ($P < 0.01$); RIDD substrates such as *CD59*, *PKD2*, *SCARA* and *PEPD* mRNA levels were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Tangluoning can inhibit the apoptosis induced by IRE1 α -RIDD through increasing *miR-322* mRNA level in serum exosomes of hyperglycemic rats.

Key words: Tangluoning; endoplasmic reticulum stress; exosomes; RSC96 cells; inositol-requiring enzyme 1 α ; *miR-322*

中药复方糖络宁是首都医科大学中医药学院高彦彬教授根据多年临床经验总结的经验方，在糖尿病周围神经病变（diabetic peripheral neuropathy, DPN）的临床和实验治疗中均具有良好的疗效^[1-4]。课题组前期实验研究表明，糖络宁可以通过抑制雪旺细胞 SCs 中肌醇酶 1 α （inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α ）蛋白表达，进而抑制内质网应激诱导的细胞凋亡^[3-4]。但糖络宁调控 IRE1 α 途径的机制尚不明确。外泌体是能够被不同类型的细胞释放到细胞外的纳米囊泡。外泌体内部包含蛋白质、信使 RNA（messenger RNA, mRNA）和微小 RNA（microRNAs, miRNA），能够通过将功能性分子转移到靶细胞，在生理病理状态下作为细胞之间的交流工具^[5-6]。高糖环境可以增加外泌体数量，并改变细胞外泌体中蛋白质和 RNA 组成，表明外泌体可能与糖尿病的发病机制有关^[6]。氧化应激和内质网应激可以改变外泌体分泌程度与组成^[7-8]，糖络宁可通过抗氧化应激和抗内质网应激途径改善 DPN^[2-4,9]，表明糖络宁可能影响外泌体分泌，从而调节 SCs 细胞中的 IRE1 α 途径。

内质网应激时，大鼠心肌细胞 H9C2 和人胚胎肾细胞 HEK293T 中 *miR-424(322)*-503（人类表现为 *miR-424*，啮齿类动物表现为 *miR-322*）表达水平显著降低^[10]。*miR-424(322)* 可以激活 IRE1 依赖性衰解（IRE1-dependent decay, RIDD）^[10]，RIDD 能够诱导细胞凋亡，提示糖络宁对 IRE1 α 信号通路的调控作用与 *miR-322* 及 RIDD 有关。本研究通过分离大鼠血清中的外泌体，使用大鼠雪旺细胞 RSC96 将外泌体内化，考察 RSC96 细胞中 *miR-322* mRNA 水平及

IRE1、RIDD 底物的变化，探究糖络宁能否通过调节外泌体中 *miR-322* mRNA 水平来调控 RSC96 细胞中的 IRE1 α 途径，进而调节 RIDD 来抑制细胞凋亡。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，6~8 周龄，体质量（200 $\pm$ 20）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2012-0001。动物饲养于 SPF 级饲养室，12 h/12 h 昼夜交替、温度（23 $\pm$ 2） $^{\circ}\text{C}$ 、湿度（55 $\pm$ 10）%，自由进食饮水。动物实验经首都医科大学伦理委员会批准（批准号 AEEI-2015-118）。

1.2 细胞

RSC96 细胞购自美国 ATCC。

1.3 药材

糖络宁由黄芪 15 g、丹参 15 g、狗脊 15 g、川牛膝 12 g、延胡索 10 g、木瓜 15 g、赤芍 12 g 和鸡血藤 15 g 组成，黄芪（批号 150826003）、丹参（批号 151002005）、狗脊（批号 1511016）、川牛膝（批号 150519001）、延胡索（批号 150524001）、木瓜（批号 1504063）、赤芍（批号 150701004）、鸡血藤（批号 150906003）购自河北安国药材批发市场，经首都医科大学中医药学院金世元教授鉴定分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎、蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. 的干燥根茎、苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的干燥根、罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang

的干燥块茎、蔷薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟果实、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎, 中药标本保存于首都医科大学中医药学院的植物标本室中。

1.4 药品与试剂

链脲佐菌素 (批号 SLCC4199)、PKH26 染料购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 澳洲胎牛血清 (批号 2167759CP) 购自美国 Gibco 公司; Trizol 试剂 (批号 223306) 购自美国 Invitrogen 公司; TransStart Tip Green qPCR SuperMix (批号 20200105)、TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (批号 20200105) 购自北京全式金生物技术有限公司; 高效 RIPA 组织/细胞裂解液 (批号 20200305) 购自北京索莱宝科技有限公司; 蛋白 Marker 购自北京康润诚业生物科技有限公司; 超敏发光液 (批号 1907701) 购自美国 Millipore 公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 20190805) 购自北京博奥森生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒 (批号 20200111) 购自无锡尚宝生物科技有限公司; EXOCET 外泌体定量试剂盒购自美国 System Biosciences 公司; 兔多克隆 β -tubulin 抗体、兔单克隆 CD9 抗体、小鼠单克隆肿瘤易感基因 101 (tumor susceptibility gene 101, TSG101) 抗体、兔多克隆浮肌蛋白-1 (Flotillin 1) 抗体、兔单克隆蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase A6, PDIA6) 抗体、兔多克隆磷酸化 IRE1 α (p-IRE1 α) 抗体、小鼠单克隆 β -actin 抗体均购自英国 Abcam 公司; 小鼠单克隆 IRE1 α 抗体购自德国 Santa Cruz 公司; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) 抗体 (批号 200060126)、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 抗体 (批号 206790121) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.5 仪器

3K15 型低温离心机 (美国 Sigma 公司); Mini-PROTEAN® Tetra 电泳槽、小型 Trans-Blot® 转印槽、CFX96™ 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 371 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); MLS-3020 型高压灭菌器 (日本 SANYO 公司); AC2-4E1 型生物安全柜 (美国 ESCO 公司)。

2 方法

2.1 糖络宁复方的制备

黄芪、丹参、狗脊、川牛膝、延胡索、木瓜、赤芍和鸡血藤饮片加入 10 倍量蒸馏水, 于室温浸泡

1 h, 沸水煎煮 1 h, 经 6 层纱布滤过; 重复以上步骤 1 次, 合并 2 次滤液, 加热浓缩至膏状, 于真空干燥箱中干燥成粉末, 于干燥器中存储, 临用前加入蒸馏水溶解。采用高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 对粉末进行分析, 得到绿原酸、芍药内酯苷、芍药苷、迷迭香酸和丹酚酸 B 的质量分数分别为 5.368、9.779、76.786、8.116、99.013 mg/g^[9]。

2.2 高血糖大鼠模型的制备、分组与给药

根据课题组前期研究^[4,9], 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组和糖络宁 (10.9 g/kg) 组, 每组 8 只。除对照组外, 其余组大鼠 ip 链脲佐菌素 (10 mg/mL), 1 周后大鼠空腹血糖浓度 ≥ 16.7 mmol/L 表明高血糖大鼠模型制备成功。糖络宁粉末溶于蒸馏水配制成质量浓度为 1.09 g/mL 的溶液, 糖络宁组大鼠 ig 药物, 对照组和模型组大鼠 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 12 周。

2.3 高血糖大鼠血清外泌体的提取

给药结束后, 大鼠脱颈椎处死, 腹主动脉取血, 4 °C、3000 r/min 离心 10 min, 吸取血清, 血清依次 300×g 离心 10 min、2000×g 离心 15 min、10 000×g 离心 30 min; 吸取上清液, 70 000×g 离心 70 min, 离心 2 次, 沉淀物即为外泌体。使用 PBS 溶解外泌体, 用于后续实验。

2.4 外泌体的超微结构观察

外泌体用 2.5% 戊二醛固定 3 h, 于 PB 中存储, 用透射电镜观察外泌体的结构。

2.5 高血糖大鼠血清外泌体数量检测

按照 EXOCET 外泌体定量试剂盒说明书检测大鼠血清外泌体数量。

2.6 RSC96 细胞培养

RSC96 细胞用含 10% FBS、4 mmol/L 谷氨酰胺、25 mmol/L 葡萄糖、1 mmol/L 丙酮酸钠、1.5 g/L 碳酸氢钠、1% 青链霉素混合液的 DMEM 完全培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.7 RSC96 细胞对外泌体的内化作用

外泌体用绿色荧光染料 PKH26 标记, 将 RSC96 细胞与 PKH26 标记的外泌体共同培养 24 h, RSC96 细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 加入 3% BSA 于室温封闭 30 min。将 β -tubulin 用作 RSC96 细胞的标记蛋白, 进行免疫荧光染色, 于激光共聚焦显微镜下观察。

2.8 糖络宁血清外泌体对 RSC96 细胞活力的影响

RSC96 细胞以 4×10^3 /孔接种于 96 孔板中, 培

养 12 h。设置对照组、模型组、糖络宁组，按 1：40 000 将 RSC96 细胞分别与对照组、模型组、糖络宁组大鼠血清外泌体共培养 24 h，加入 CCK-8 溶液，于 37 °C 孵育 3 h，采用酶标仪于 490 nm 测定吸光度 (A) 值。

2.9 糖络宁血清外泌体对 RSC96 细胞 CD9、TSG101、Flotillin 1、PDIA6、IRE1 α 和 p-IRE1 α 蛋白表达的影响

RSC96 细胞以 4×10^5 /孔接种于 6 孔板中，培养 12 h。设置对照组、模型组、糖络宁组，按 1：40 000 将 RSC96 细胞分别与对照组、模型组、糖络宁组大鼠血清外泌体共培养 24 h，提取 RSC96 细胞蛋白，采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5% 脱脂牛奶于室温封闭 2 h，分别加入 CD9、TSG101、Flotillin 1、PDIA6、IRE1 α 和 p-IRE1 α 抗体，4 °C 孵育过夜，分别加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 抗体，室温孵育 1 h，采用凝胶成像分析系统曝光条带，使用 Image J 软件对条带进行定量分析。

2.10 糖络宁血清外泌体对 RSC96 细胞 miR-322、CD9、蛋白激酶 D2 (protein kinase D2, PKD2)、A 类清道夫受体 (scavenger receptor class A, SCARA)、蛋白水解酶 D (peptidase D, PEPD) 和 IRE1 α mRNA 表达的影响

RSC96 细胞以 4×10^5 /孔接种于 6 孔板中，培养 12 h。设置对照组、模型组、糖络宁组，按 1：40 000 将 RSC96 细胞分别与对照组、模型组、糖络宁组大鼠血清外泌体共培养 24 h，按照试剂盒说明书提取 RSC96 细胞及外泌体中总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1，将 U6 作为 miR-322 内参，将 β -actin 作为 CD9、PKD2、SCARA、PEPD 和 IRE1 α 内参。

2.11 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析，以单因素方差分析 (ANOVA) 评估两组之间的差异。

3 结果

3.1 糖络宁对高血糖大鼠血清外泌体结构、分泌量及 miR-322 水平的影响

如图 1-A 所示，从大鼠血清分离的外泌体为圆形或椭圆形，具有膜结合的囊泡，直径为 50~60 nm。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

名称	序列
U6	RT: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGT-3' F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3' R: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGT-3'
miR-322	RT: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAAT-TCAGTTGAGTCCAAA-3' F: 5'-GTCGCAGCAGCAATTCATGT-3' R: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTC-3'
β -actin	F: 5'-GAAGTGTGACGTTGACATCCG-3' R: 5'-GCCTAGAAGCATTTGCGGTG-3'
CD59	F: 5'-GTTGCTGGTACCTCGGTTCTG-3' R: 5'-ACGGTGCTCTTCGGTGCTCTT-3'
PKD2	F: 5'-AGGAAGGCTGCTGGATGGAGTG-3' R: 5'-CCTAGACCGTGACCTGACTGTGAA-3'
SCARA	F: 5'-GCCTCAACCACAGCCTATCCTATG-3' R: 5'-CCTTCAGACGCAGGTCCTCAGT-3'
PEPD	F: 5'-GGCAAGTTCACAGACAGCAGAAAG-3' R: 5'-CCAATGCGTGTCAGTTCTCCAG-3'
IRE1 α	F: 5'-GCATCCGAATGTGATCCGCTACTT-3' R: 5'-TGAGGTGGTCTGATGAAGCAAGGT-3'

如图 1-B 所示，从大鼠血清分离的外泌体中特异性标志物 CD9、TSG101 和 Flotillin 1 蛋白均为阳性表达，表明外泌体分离成功。如图 1-C 所示，与对照组比较，模型组大鼠血清外泌体数量显著增加 ($P < 0.01$)；与模型组比较，糖络宁组大鼠血清外泌体数量明显减少 ($P < 0.05$)，表明糖络宁能够抑制高血糖导致的外泌体过度分泌。如图 1-D 所示，与对照组比较，模型组大鼠血清外泌体中 miR-322 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，糖络宁组大鼠血清外泌体中 miR-322 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.01$)，表明糖络宁可以上调高血糖大鼠血清外泌体中 miR-322 mRNA 水平。

3.2 RSC96 细胞对外泌体的内化作用

以 PKH26 标记血清中外泌体，以 β -tubulin 标记 RSC96 细胞，以 DAPI 标记细胞核，如图 2 所示，外泌体位于 RSC96 细胞核周围，表明外泌体已被 RSC96 细胞内化。

3.3 糖络宁血清外泌体对 RSC96 细胞活力及 miR-322 mRNA 水平的影响

如图 3-A 所示，与对照组比较，模型组 RSC96 细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，糖络宁组 RSC96 细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$)，表明糖络宁血清外泌体可以降低高血糖引起的 RSC96 细胞毒性。如图 3-B 所示，与对照组比较，模型组 RSC96 细胞 miR-322 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，糖络宁组 RSC96 细胞 miR-322 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。以上结

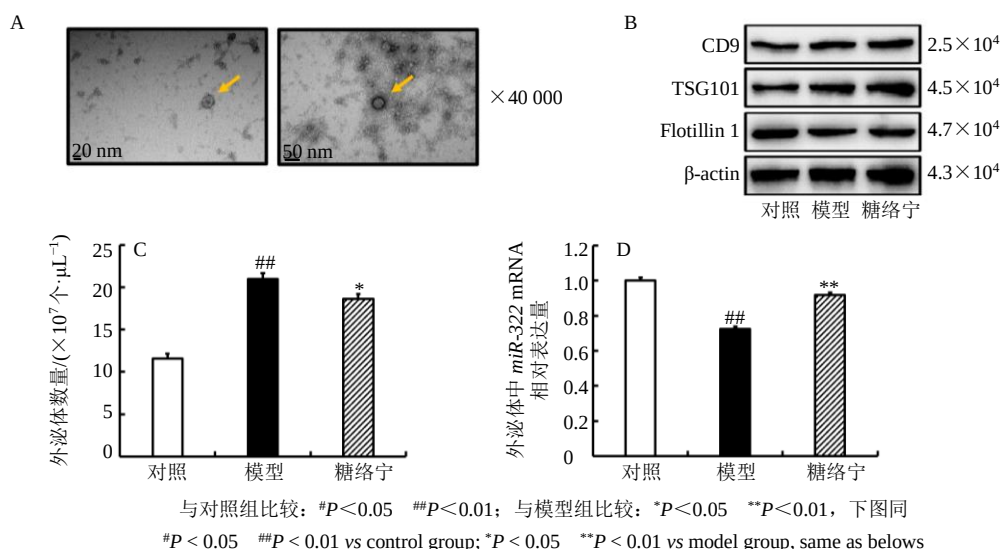


图 1 糖络宁对高血糖大鼠血清外泌体结构 (A), CD9、TSG101、Flotillin 1 蛋白表达 (B), 外泌体数量 (C) 和外泌体中 *miR-322* mRNA 表达 (D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effects of Tangluoning on serum exosomes structure (A), CD9, TSG101, Flotillin 1 protein expression (B), number of exosomes (C), and *miR-322* mRNA level (D) in hyperglycemic rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

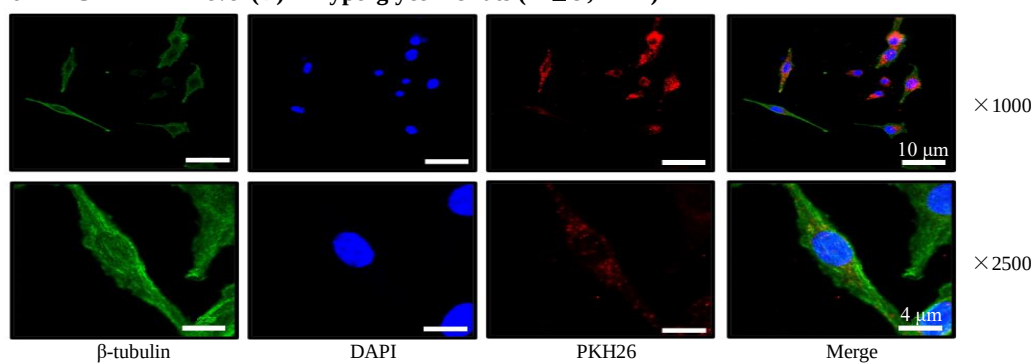


图 2 RSC96 细胞对外泌体的内化作用

Fig. 2 Internalization of RSC96 cells to exosomes

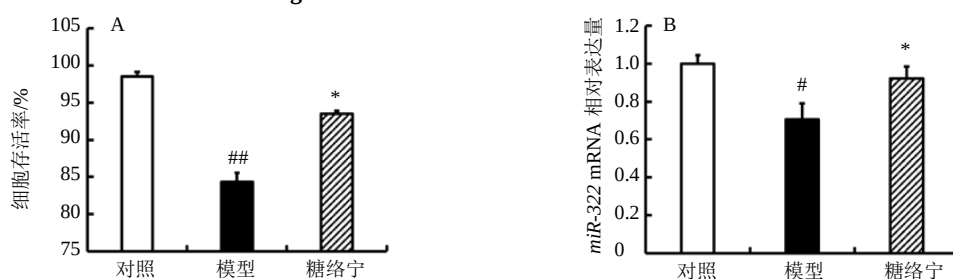


图 3 糖络宁血清外泌体对 RSC96 细胞活力 (A) 及 *miR-322* mRNA 水平 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effect of Tangluoning serum exosomes on RSC96 cell viability (A) and *miR-322* mRNA level (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

果表明外泌体被 RSC96 细胞内化后, *miR-322* 通过外泌体进入 RSC96 细胞。

3.4 糖络宁血清外泌体对 RSC96 细胞 PDIA6、p-IRE1 α 、IRE1 α 蛋白表达及 *IRE1 α* mRNA 表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组 RSC96 细胞 PDIA6 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$),

p-IRE1 α /IRE1 α 蛋白及 *IRE1 α* mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 糖络宁组 RSC96 细胞 PDIA6 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), p-IRE1 α /IRE1 α 蛋白及 *IRE1 α* mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), 表明糖络宁血清外泌体可以上调 PDIA6 蛋白表达水平, 降低 IRE1 α 蛋白及 mRNA 表达水平。

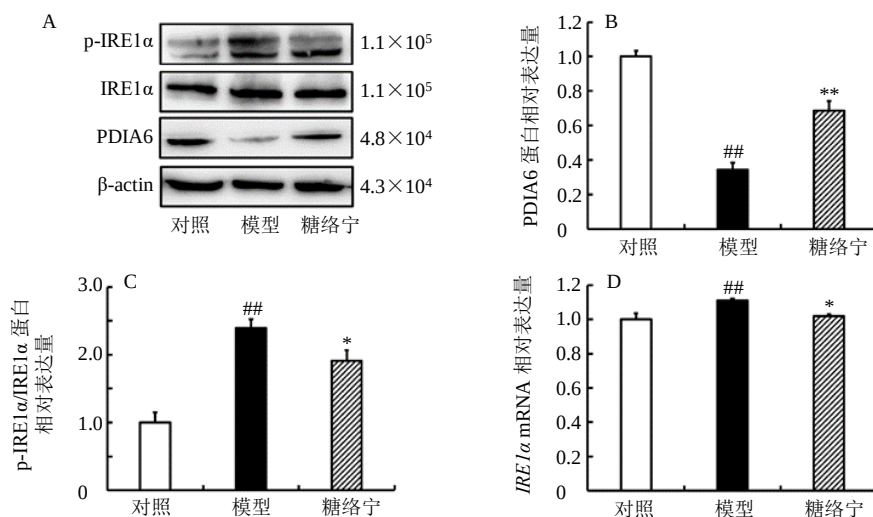


图 4 糖络宁血清外泌体对 RSC96 细胞 PDIA6、p-IRE1α、IRE1α 蛋白表达 (A~C) 及 IRE1α mRNA 表达 (D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 4 Effects of Tangluoning serum exosomes on PDIA6, p-IRE1α, IRE1α protein expression (A—C) and IRE1α mRNA expression (D) in RSC96 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.5 糖络宁血清外泌体对 RSC96 细胞 CD59、PKD2、SCARA 和 PEPD mRNA 表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组 RSC96 细胞 CD59、PKD2、SCARA 和 PEPD mRNA 表达

水平均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,糖络宁组 RSC96 细胞 CD59、PKD2、SCARA 和 PEPD mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$),表明糖络宁血清外泌体降低了 RIDD 活性。

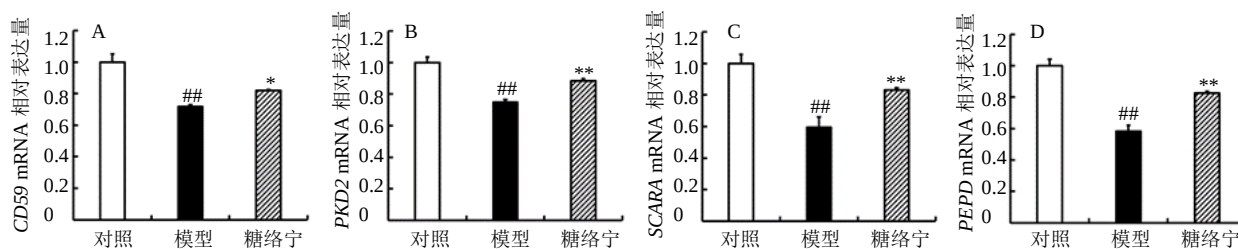


图 5 糖络宁血清外泌体对 RSC96 细胞 CD59 (A)、PKD2 (B)、SCARA (C) 和 PEPD (D) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 5 Effect of Tangluoning serum exosomes on CD59 (A), PKD2 (B), SCARA (C), and PEPD (D) mRNA expression in RSC96 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

外泌体直径为 40~100 nm,形状为双盘或杯状^[5-6]。膜转运和融合相关蛋白 Flotillin 1、多囊泡胞内体产生相关蛋白 TSG101、四跨膜蛋白超家族 CD9 可以作为鉴定外泌体的特异性蛋白^[11]。本研究结果显示,从大鼠血清中分离的外泌体外观为圆形或椭圆形,直径为 50~60 nm,具膜结合的囊泡,外泌体特异性标记蛋白如 CD9、TSG101 和 Flotillin 1 呈阳性表达,表明血清中的外泌体分离成功。此外,本研究结果显示,高糖可促进血清外泌体分泌并降低外泌体中 miR-322 mRNA 水平,糖络宁可以减少高糖导致的外泌体过度分泌并升高外泌体中 miR-322 mRNA 水平,提示糖络宁可能通过增加血

清外泌体中 miR-322 mRNA 水平来调控 RSC96 细胞中的 IRE1α 途径。外泌体包含蛋白质、mRNA 和 miRNA 等多种信号分子,可被多种细胞分泌到胞外,并通过血清、血浆、尿液和脑脊液进入靶细胞,从而调节一系列生物学过程^[5-6]。本研究发现,RSC96 细胞与外泌体共同培养 24 h 后,外泌体位于 RSC96 细胞核周围,表明外泌体被 RSC96 细胞内化;糖络宁血清外泌体显著升高 RSC96 细胞中 miR-322 mRNA 水平,表明糖络宁可以通过外泌体调节 RSC96 细胞中 miR-322 表达。

PDIA6 是 miR-322 的靶点,miR-322 水平的降低可能会下调 PDIA6 表达,PDIA6 可抑制 IRE1 活性^[10-12]。敲除 IRE1α 后,小鼠胚胎成纤维细胞中

miR-322 表达水平增加了 2.5 倍, 表明 miR-322 与 IRE1 α 密切相关^[13]。本研究结果显示, 高血糖大鼠血清中的外泌体显著降低 PDIA6 蛋白表达水平并显著升高 IRE1 α 蛋白表达水平, 糖络宁血清中的外泌体显著升高 PDIA6 蛋白表达水平并显著降低 IRE1 α 蛋白表达水平, 表明糖络宁血清外泌体可以通过上调 miR-322 mRNA 表达水平来升高 PDIA6 蛋白表达水平, 从而降低 IRE1 α 蛋白表达水平。

miR-322 可以通过调控 PDIA6 表达来调节 IRE1 α 的 RIDD 活性^[10], 进一步特异性调节内质网应激的信号传导^[10]。研究发现, IRE1 α 酶活性与 RIDD 活性有关^[14]。IRE1 可通过假激酶的激活和 X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1) mRNA 的剪接, 增加细胞适应内质网应激的能力, 提高细胞存活率; IRE1 也可通过 RIDD 降解编码存活蛋白的 mRNA, 诱导细胞凋亡, 从而抑制细胞生长^[14-19]。XBP1 mRNA 的剪接仅在内质网应激的适

应性阶段被短暂激活, RIDD 活性随着内质网应激强度增加而增强^[20-21]。起初 XBP1 和 RIDD 均具有细胞保护作用, 但如果不能缓解内质网应激, 则 XBP1 mRNA 剪接减少, RIDD 的机制将从细胞保护转变为细胞毒性, RIDD 活性持续增加, 最终通过降解编码存活蛋白的 mRNA 诱导细胞凋亡^[20-21]。研究发现, miR-424 对 XBP-1 mRNA 表达没有影响^[10]。CD59、PKD2、SCARA 和 PEPD 作为 RIDD 的底物, 可反映 RIDD 的活性^[10,22-24]。本研究发现, 糖络宁血清中的外泌体可以通过增加 RSC96 细胞中 CD59、PKD2、SCARA 和 PEPD mRNA 表达水平来降低 RIDD 活性, 从而抑制细胞凋亡。

综上, 如图 6 所示, 糖络宁通过增加高血糖大鼠血清外泌体中 miR-322 mRNA 水平, 进一步增加 RSC96 细胞中 miR-322 mRNA 水平, 进而增加 RSC96 细胞中 PDIA6 蛋白表达并降低 IRE1 α 蛋白表达, 降低 RIDD 活性, 从而抑制细胞凋亡。

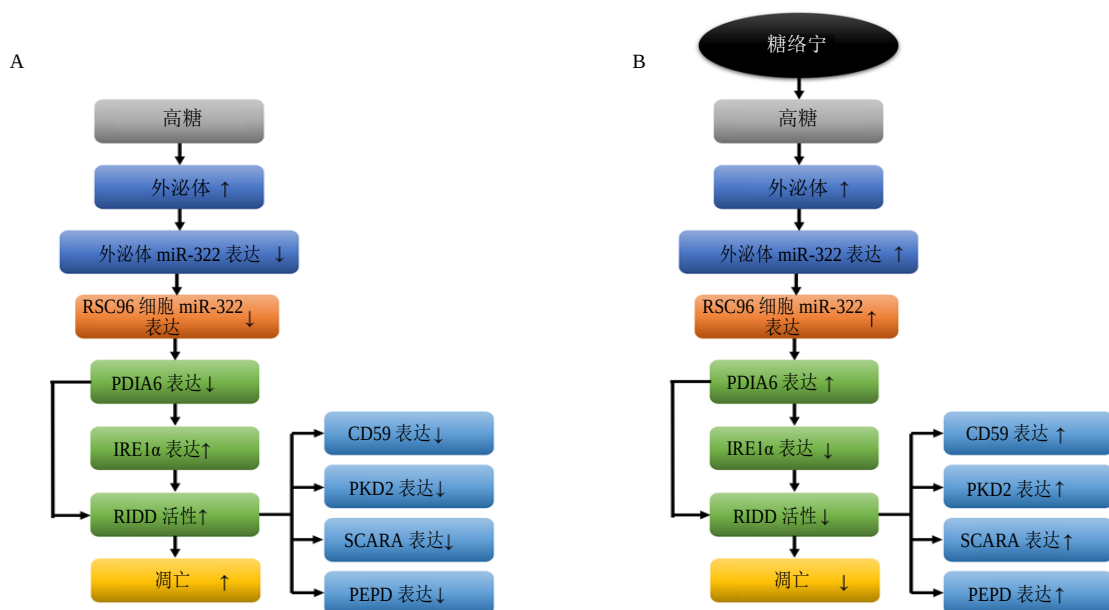


图 6 高血糖大鼠血清外泌体 (A) 及糖络宁血清外泌体 (B) miR-322 表达对 RSC96 细胞中 IRE1 α -RIDD 途径及细胞凋亡的影响

Fig. 6 Effect of miR-322 expression in serum exosomes of hyperglycemic rats (A) and Tangluoning serum exosomes (B) on IRE1 α -RIDD pathway and apoptosis in RSC96 cells

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李步满, 高彦彬, 夏晶, 等. 糖络宁治疗糖尿病周围神经病变临床疗效及其对氧化应激反应的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(8): 8-10.
- [2] Yang X W, Yao W J, Liu H L, et al. Tangluoning, a traditional Chinese medicine, attenuates *in vivo* and *in vitro* diabetic peripheral neuropathy through modulation

of PERK/Nrf2 pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1014.

- [3] Yao W J, Yang X W, Zhu J Y, et al. IRE1 α siRNA relieves endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and alleviates diabetic peripheral neuropathy *in vivo* and *in vitro* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2579.
- [4] Yao W J, Yang X W, Zhu J Y, et al. Tang-Luo-ning, a traditional Chinese medicine, inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of schwann cells under high glucose environment [J]. *Evid Based Compl Alter*

- Med*, 2017, 2017: 5193548.
- [5] de Jong O G, Verhaar M C, Chen Y, *et al.* Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes [J]. *J Extracell Vesicles*, 2012, 1(1): 18396.
 - [6] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-383.
 - [7] Shiau J Y, Chang Y Q, Nakagawa-Goto K, *et al.* Phytoagent deoxyelephantopin and its derivative inhibit triple negative breast cancer cell activity through ROS-mediated exosomal activity and protein functions [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 398.
 - [8] Kanemoto S, Nitani R, Murakami T, *et al.* Multivesicular body formation enhancement and exosome release during endoplasmic reticulum stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(2): 166-172.
 - [9] Yang X W, Yao W J, Li Q Q, *et al.* Mechanism of Tang Luo Ning effect on attenuating of oxidative stress in sciatic nerve of STZ-induced diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174: 1-10.
 - [10] Gupta A, Hossain M M, Read D E, *et al.* PERK regulated miR-424(322)-503 cluster fine-tunes activation of IRE1 and ATF6 during Unfolded Protein Response [J]. *Sci Rep*, 2016, 5: 18304.
 - [11] Kalra H, Drummen G P C, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 170.
 - [12] de Eletto D, Eletto D, Dersh D, *et al.* Protein disulfide isomerase A6 controls the decay of IRE1 α signaling via disulfide-dependent association [J]. *Mol Cell*, 2014, 53(4): 562-576.
 - [13] Groenendyk J, Peng Z, Dudek E, *et al.* Interplay between the oxidoreductase PDIA6 and microRNA-322 controls the response to disrupted endoplasmic reticulum calcium homeostasis [J]. *Sci Signal*, 2014, 7(329): ra54.
 - [14] Hollien J, Weissman J S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response [J]. *Science*, 2006, 313(5783): 104-107.
 - [15] Hetz C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2): 89-102.
 - [16] Han D, Lerner A G, Vande Walle L, *et al.* IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates [J]. *Cell*, 2009, 138(3): 562-575.
 - [17] Moenner M, Pluquet O, Bouchecareilh M, *et al.* Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22): 10631-10634.
 - [18] Dejeans N, Pluquet O, Lhomond S, *et al.* Autocrine control of glioma cells adhesion and migration through IRE1-mediated cleavage of SPARC mRNA [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(18): 4278-4287.
 - [19] Pluquet O, Dejeans N, Bouchecareilh M, *et al.* Posttranscriptional regulation of PER1 underlies the oncogenic function of IRE α [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(15): 4732-4743.
 - [20] Upton J P, Wang L K, Han D, *et al.* IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2 [J]. *Science*, 2012, 338(6108): 818-822.
 - [21] Lerner A G, Upton J P, Praveen P V K, *et al.* IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress [J]. *Cell Metab*, 2012, 16(2): 250-264.
 - [22] Hollien J, Lin J H, Li H, *et al.* Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells [J]. *J Cell Biol*, 2009, 186(3): 323-331.
 - [23] Oikawa D, Tokuda M, Hosoda A, *et al.* Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 α [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(18): 6265-6273.
 - [24] Oikawa D, Tokuda M, Iwawaki T. Site-specific cleavage of CD59 mRNA by endoplasmic reticulum-localized ribonuclease, IRE1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(1): 122-127.

[责任编辑 李亚楠]