DOI:10.16016/j.2097-0927.202212027

Ⅱ型肺泡上皮细胞来源外泌体 miR-21-5p 调控上皮钠离子通道减轻高氧性急性肺损伤

冯帮海[1],任颖聪[2],袁 平[3],刘君亚[2],王炜鑫[1],覃 松[2],陈 森[2] 563000 贵州 遵义,遵义市中医院重症医学科[1];563000 贵州 遵义,遵义医科大学附属医院:重症医学科[2],儿内二科[3]

[摘要] **目的** 探讨Ⅱ型肺泡上皮细胞(type Ⅱ alveolar epithelial cells,AEC-Ⅱ)来源外泌体(exosomes,Exos)-miR-21-5p(miR-21)调控上皮钠离子通道(epithelial sodium channel,ENaC)对高氧性急性肺损伤(hyperoxia-induced acute lung injury,HALI)的保护效应及可能机制。**方法** 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只,其中 20 只使用差速贴壁离心法提取原代 AEC-Ⅱ并培养,采用密度梯度离心法提取 AEC-Ⅱ来源外泌体,透射电镜鉴定外泌体形态。余 40 只小鼠按随机数字表法分为(n=10):常氧(Control)组、高氧(HALI)组、高氧+Exos-miR-21(HALI+miR-21)组和高氧+siPI3K+Exos-miR-21(HALI+siPI3K+miR-21)组。除 Control 组外,余 3 组小鼠暴露于 95%O_2 的自制高氧饲养箱中构建 HALI 模型。72 h 后 RT-qPCR 检测肺组织及外泌体 miR-21 表达;HE 染色观察肺组织形态学变化并行肺损伤病理评分,计算肺组织湿/干质量比及肺泡液体清除率(alveolar fluid clearance,AFC);可见分光光度法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)及总抗氧化能力(total antioxidant capacity,T-AOC)水平;荧光分光光度法测定活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)水平;Western blot 检测 PTEN、AKT、p-AKT、PI3K 及 α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 蛋白表达水平。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-21 与 PTEN 靶向关系。**结果** 原代 AEC-Ⅱ提取的囊泡状物质经鉴定为外泌体,外泌体中 miR-21 表达显著增高(P<0.05),PTEN 为 miR-21 靶基因。与 Control 组比较,HALI 组 HE 染色可见肺组织肺间隔增厚、大量炎症细胞浸润及肺泡萎陷,HALI 组、HALI+miR-21 组及 HALI+siPI3K+miR-21 组肺损伤病理评分、肺湿/干质量比、MDA 及 PTEN 蛋白表达升高(P<0.05);SOD、T-AOC、AFC、miR-21 及 p-Akt、α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 蛋白表达水平降低(P<0.05),以 HALI+siPI3K+miR-21 组最明显。与 HALI 组比较,HALI+miR-21 组 HE 染色可见肺间隔增厚、炎症细胞浸润明显减少,肺泡萎陷显著减轻;肺损伤病理评分、肺湿/干质量比、MDA 及 PTEN 蛋白表达显著降低(P<0.05);而 SOD、T-AOC、AFC、miR-21 及 p-Akt、α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 蛋白表达显著升高(P<0.05)。**结论** Ⅱ型肺泡上皮细胞来源外泌体 miR-21-5p 通过靶向 PTEN 激活 PI3K/AKT 信号通路调控上皮钠离子通道减轻高氧性急性肺损伤。

[关键词] Ⅱ型肺泡上皮细胞;外泌体;微小 RNA-21-5p;上皮钠离子通道;高氧性急性肺损伤;PI3K/Akt 信号通路

[中图法分类号] R363.22; R394.1; R563.9 [文献标志码] A

Exosomal miR-21-5p derived from type Ⅱ alveolar epithelial cells alleviates hyperoxia-induced acute lung injury by regulating epithelial sodium channels in mice

FENG Banghai[1], REN Yingcong[2], YUAN Ping[3], LIU Junya[2], WANG Wenxin[1], QIN Song[2], CHEN Miao[2]

[1]Department of Critical Care Medicine, Zunyi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zunyi, Guizhou Province, 563000; [2]Department of Critical Care Medicine, [3]Second Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect and possible mechanism of type Ⅱ alveolar epithelial cells (AEC-Ⅱ)-derived exosomal (Exos)-miR-21-5p (miR-21) on the regulation of epithelial

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金(81960024)

[通信作者] 陈 森,E-mail:chenmiao64@163.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

sodium channels (ENaC) in hyperoxia-induced acute lung injury (HALI). **Methods** Sixty male C57BL/6J mice (6-8 weeks old) were subjected, and 20 of them were used to isolate AEC-Ⅱ using differential wall centrifugation, which were further cultured extract derived exosomes with density gradient centrifugation. Transmission electron microscopy was employed to identify the morphology of obtained exosomes. The 40 remaining mice were randomly divided into ($n=10$): normoxia (Control), hyperoxia (HALI), hyperoxia+Exo-miR-21 (HALI+miR-21), and hyperoxia+siPI3K+miR-21 groups. Except for the Control group, the other 3 groups were exposed to self-made hyperoxia chamber containing 95% O_2 to establish rat model of HALI. In 72 h after exposure, RT-qPCR was performed to detect the miR-21 expression in lung tissue and in AEC-Ⅱ-derived exosomes. HE staining was performed to observe morphological changes in lung tissue and to score the pathology of lung injury, and the wet/dry mass ratio of lung tissue and alveolar fluid clearance (AFC) were calculated. Superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (T-AOC) were measured by visible spectrophotometry. The levels of reactive oxygen species (ROS) were measured by fluorescence spectrophotometry. The protein levels PTEN, AKT, p-AKT, PI3K and α-ENaC, β-ENaC, γ-ENaC were detected by Western blotting. Dual luciferase reporter gene assay was conducted to verify the relationship between miR-21 and PTEN targeting. **Results** The vesicular material extracted from primary cultured AEC-Ⅱ was identified as exosomes, the expression level of miR-21 was significantly increased in the exosomes ($P<0.05$), and PTEN was identified as the target gene of miR-21. Compared with the mice of the Control group, thickening pulmonary septum, massive infiltration of inflammatory cells and alveolar atrophy were observed, and pathological score of lung injury, lung wet/dry mass ratio, and protein levels of MDA and PTEN were elevated in the the HALI group, HALI+miR-21 group and HALI+siPI3K+miR-21 group ($P<0.05$). The protein expression levels of SOD, T-AOC, AFC, miR-21 and p-Akt, α-ENaC, β-ENaC, γ-ENaC were reduced in the above 3 groups ($P<0.05$), significantly in the HALI+siPI3K+miR-21 group. HE staining showed that no significant differences in thickening of pulmonary septum and inflammatory cell infiltration were observed between the HALI+miR-21 group and the HALI group, but milder alveolar atrophy was seen in the former group. What's more, the former group also got obviously reduced pathological score of lung injury, lower lung wet/dry mass ratio, and decreased MDA and PTEN expression ($P<0.05$), but increased protein levels of SOD, T-AOC, AFC, miR-21 and p-Akt, α-ENaC, β-ENaC, γ-ENaC ($P<0.05$) when compared with the latter group. **Conclusion** Exosomal miR-21 derived from AEC-Ⅱ targets PTEN to activate PI3K/AKT signaling pathway, and attenuates hyperoxic acute lung injury by regulating epithelial sodium channels.

[**Key words**] type Ⅱ alveolar epithelial cells; exosomes; microRNA-21-5p; epithelial sodium channels; hyperoxic acute lung injury; PI3K/Akt signaling pathway

Supported by the Regional Science Fund Project of National Natural Science Foundation of China (81960024). Corresponding author: CHEN Miao, E-mail: chenmiao64@163.com

高氧性机械通气作为治疗急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)的重要手段,对改善急危重患者低氧血症、维持其组织氧合具有重要意义。但长时间吸入超生理浓度的氧气(氧浓度>0.6)可导致高氧性急性肺损伤(hyperopia-induced acute lung injury, HALI)[1],与危重症患者不良结局呈正相关[2]。目前研究认为,活性氧(reactive oxygen species, ROS)是促使 HALI 进展的核心环节[3]。ROS 蓄积破坏氧化还原稳态并直接杀伤肺血管内皮细胞和肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AEC),导致肺泡屏障功能受损,不能有效清除聚集在肺泡腔内的渗出性液体,促进顽固性低氧血症的发生[4]。因此,基于及时有效清除肺泡蓄积液体的治疗策略对改善气体交换、提高氧合和改善预后至关重要[5]。AEC-Ⅱ可分化为肺泡Ⅰ型上皮细胞修复损伤肺组织,同时合成并分泌肺泡表面活性物质维持气液平衡,动态调节水盐代谢,在肺损伤中起核心作用[6]。AEC-Ⅱ中的上皮 Na^+通道(epithelial sodium channel, ENaC)作为 Na^+转运通道之一,是肺泡内液体清除(alveolar fluid clearance, AFC)率的核心调控因素[7],对维持水盐代谢动态平衡和肺泡液清除不可或缺[8-9]。外泌体(exosomes, Exos)作为胞外囊泡的一种,主要由干细胞

分泌,可携带多种生物活性物质如蛋白质、脂质及 miRNA 等,发挥着与干细胞相似的生物学功能和作用[10]。已有研究证明,AEC-Ⅱ是氧攻击的靶细胞,受损 AEC-Ⅱ分泌的胞外囊泡(extracellular vesicles,EVs)介导了肺上皮空气交换和屏障功能障碍[11]。课题组前期研究发现,微小 RNA-21-5p(miR-21-5p,后简称 miR-21)干预可拮抗 AEC-Ⅱ凋亡减轻 HALI[12]。而 PI3K/AKT 信号通路激活可调控 ENaC 蛋白表达促进水肿液消退发挥肺保护作用[13]。而故推测 AEC-Ⅱ来源 Exos-miR-21 可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进水肿液消除。本课题组拟在前期研究基础上探讨 AEC-Ⅱ来源 Exos-miR-21 对 HALI 保护效应及作用机制,旨在为 HALI 或 ARDS 提供新的研究方向和治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器

60 只 6~8 周龄实验用雄性 C57BL/6J 小鼠购自天勤生物科技公司(长沙),动物合格证号:SCXK(湘)2019-0014。β-actin、PTEN、PI3K、AKT、p-AKT、ENaC-α/β/γ 亚基(α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC)抗体及二抗购自美国 CST 公司;PI3K 小干扰 RNA(siPI3K)购自赛默飞世尔(中国)公司;伊文思蓝购自德国 Sigma 公司;胎牛血清(FBS)、DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity,T-AOC)测定试剂盒及 BCA 蛋白浓度定量试剂盒购自北京索莱宝公司;DCFH-DA 活性氧 ROS 荧光探针、HE 染色试剂盒和双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自碧云天生物公司;miR-21 PCR 引物由生工生物(上海)设计合成;酶标仪和电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 AEC-Ⅱ外泌体提纯和鉴定

C57BL/6J 小鼠 AEC-Ⅱ的分离培养参照文献[14]进行。收集 AEC-Ⅱ培养上清,密度梯度离心法从细胞培养上清中提取外泌体(4 ℃条件下:200×*g* 离心 10 min 取上清液,10 000×*g* 离心 30 min 吸取上清液,100 000×*g* 离心 100 min 取沉淀。1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤重悬后,再次以 100 000×g 离心 100 min 取沉淀,1 mL PBS 溶液重悬后 0.22 μm 滤器过滤除菌),测定浓度后置-80 ℃保存。透射电镜观察 AEC-Ⅱ外泌体形态,Western blot 分析外泌体标志物 CD63、CD81 以及内质网标记蛋白 HSP90B1 表达(AEC-Ⅱ设为对照)。

1.3 双荧光素酶基因报告实验

使用 TargetScan Human 8.0 (http://www.targetscan.org)在线工具对 miR-21 进行靶基因预测与结合位点分析。将含有 miR-21 结合位点的野生型(WT)与突变序列的突变型(MUT)的 3′UTR-PTEN 分别插入 PGL3 载体。以 PGL3 空载体为对照,利用 Lipofectamine 2000 试剂将 WT/MUT-PTEN 分别与 miR-21 mimics 或 miR-NC 转染到 HEK293T 细胞,转染 48 h 后收集细胞,使用双荧光素酶报告基因检测系统检测 HEK293T 细胞荧光素酶活性。

1.4 HALI 动物模型建立、实验分组和处理

本实验相关操作符合《实验动物饲养管理和试用手册》相关要求,并经过遵义医科大学伦理委员会批准(审批号:ZMU21-2107-074)。将 40 只 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法分为常氧(Control)组、高氧(HALI)组、高氧+外泌体 miR-21(HALI+miR-21)组、高氧+siPI3K+外泌体 miR-21 (HALI+siPI3K+miR-21)组。Control 组置于室内空气中饲养,siPI3K 按 15 nmol/20 g 剂量稀释于 80 μL 生理盐水中,通过移液管直接导入小鼠喉咙,立即闭合小鼠气道(每周 3 次)预处理 1 周,Exos-miR-21 经气管插管滴入 300 ng/50 mL 的 Exos-miR-21,参照刘国跃等[15]构建 HALI 动物模型的方法,将实验小鼠置于 40 cm×40 cm×50 cm 大小自制高氧动物饲养箱中,维持浓度 CO_2<0.5%,O_2≥95%,建立 HALI 损伤模型。高氧暴露 72 h 后,异氟醚吸入麻醉后处死小鼠,取肺组织行相应检查或-80 ℃冻存备用,每组随机选取 6 只小鼠检测相关指标。

1.5 HE 染色观察肺组织病理变化及肺损伤病理评分

取小鼠肺组织,4%多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,切片厚度 5 μm,HE 染色后光学显微镜下观察肺组织病理学改变,每张切片随机选取至少 20 个高倍视野(×400),采用 MATUTE-BELLO 等[16]肺损伤评分系统:按照肺泡中中性粒细胞个数、肺泡间质中性粒细胞个数、透明膜个数、被蛋白质碎片填充的肺泡个数及肺泡间隔厚度进行标准化评分。

1.6 肺水含量和 AFC 测定

肺水含量以肺组织湿/干质量比表示。取小鼠肺组织,用滤纸充分吸取肺组织表面水分和残留血液后,称取肺组织质量记为湿质量,放入 60 ℃烘箱持续烘干 60 h 后称取肺组织质量记为干质量;计算肺湿/干质量比。完整分离右肺组织并行气管插管,注入 100% N_2,将含 0.15 g/L 伊文思蓝标记的 5%白蛋白等渗生理盐水(4 mL/kg)经导管灌入小鼠肺组织,用保鲜膜包被后放入 37 ℃加湿培养箱中孵育。期间持续给予 100%氮气机械通气 1 h(气道压力维持在 650~700 Pa)。然后吸取右肺下叶内的肺泡液体 0.25 mL,通过分光光度仪,在 620 nm 处测定吸光度 *D*(620)值,再根据不同浓度伊文思蓝标记的白蛋白所测的 *D*(620)

值制成的标准曲线,换算为所测样本伊文思蓝标记的白蛋白浓度,按公式[(Vi-Vf)/Vi]×100%计算 AFC[17]。Vf=(Vi×Pi)/Pf。其中,V 表示肺泡内液体的起始容量(i)和作用后的最终容量(f),P 表示肺泡内液体中伊文思蓝的起始浓度(i)和作用后的最终浓度(f)。

1.7　肺组织 SOD、MDA、T-AOC 及 ROS 水平测定

取肺组织称量后剪碎研磨成匀浆,1 000×*g* 离心 10 min,吸取上清,操作严格按试剂盒说明书进行,采用可见分光光度法测定 SOD、MDA 及 T-AOC 水平,去肺组织剪碎胰酶消化后过滤制成单细胞悬液(细胞数≥10^6),加入 DCFH-DA 荧光探针,荧光分光光度法测定 ROS 水平。

1.8　实时荧光定量 PCR 检测各组肺组织及外泌体 miR-21 表达水平

取肺组织和外泌体,使用 TRIzol 试剂盒提取 RNA 并测定总 RNA 浓度及纯度。使用 miRNA 第 1 链 cDNA 合成试剂盒(加尾法)反转录合成 cDNA,进行定量 PCR 扩增。反应体系为 20 μL:2×miRNA qPCR master mix 10 μL;前后引物各 1 μL;Template DNA(miR-21)2 μL;ROX Referense Dye(L)/(H),1 μL;加入 RNase-free 水至 20 μL。PCR 反应条件为:预变性 95 ℃ 30 s;变性 95 ℃ 5 s;退火/延伸 60 ℃ 30 s;共 40 个循环。引物序列:miR-21 正向 5′-CCGGC-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3′,反向 5′-CTCAACT-GGTGTCGTGGA-3′;U6 正向 5′-CTCGCTTCGGCAGC-ACA-3′,反向 5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′。采用相对定量法检测 RNA 扩增,以 U6 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-21 表达量。

1.9　Western blot 检测各组小鼠肺组织 PTEN、PI3K、AKT、p-AKT、α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 蛋白表达水平

取小鼠肺组织称量 80 mg,裂解组织后,4 ℃、12 000×*g* 离心 30 min,取上清液使用 BCA 法进行蛋白定量并调整至一致浓度,样品经 10% 或 12% SDS-PAGE 电泳分离,转膜后于 5%脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入 PTEN、PI3K、AKT、p-AKT、α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 及 β-actin 抗体 4 ℃孵育 16 h,洗膜后加入 IgG-HRP 二抗后室温避光孵育 1 h,洗膜后加入 ECL 发光液,使用 Gel Doc™ EZ 全自动凝胶成像系统曝光、拍照。Image J 软件进行条带灰度值分析。以 β-actin 为内参照,计算目标蛋白相对表达量(目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参条带灰度值)。

1.10　统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两均数比较采用 LSD-*t* 法,以 $P<0.05$ 视为差异有统计意义。

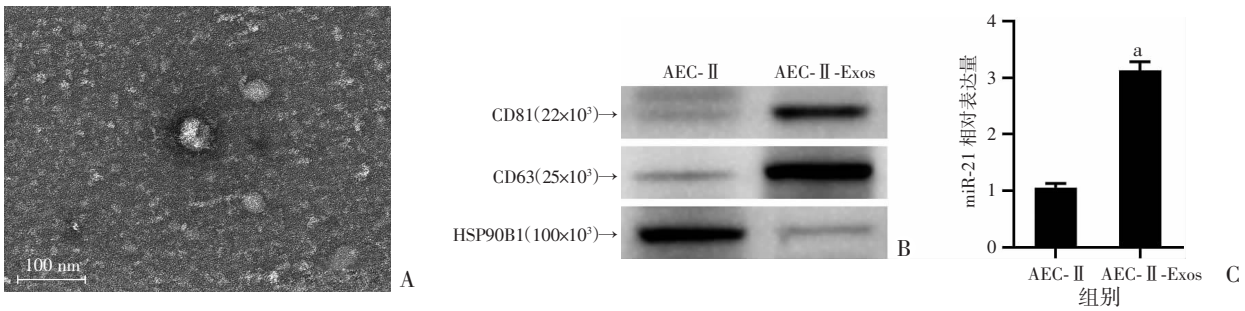
2　结果

2.1　外泌体鉴定结果

透射电镜下可见外泌体呈茶托状或椭圆形的膜性小囊泡,直径约 100 nm,囊泡外周包绕膜性结构(图 1A)。Western blot 检测显示:与对照组比较,外泌体标志性蛋白 CD81、CD63 表达在外泌体组显著升高。选用内质网标记蛋白 HSP90B1 作为阴性对照蛋白(图 1B)。RT-qPCR 检测结果显示,与 AEC-Ⅱ组比较,外泌体中 miR-21 表达显著上调($P<0.05$,图 1C)。

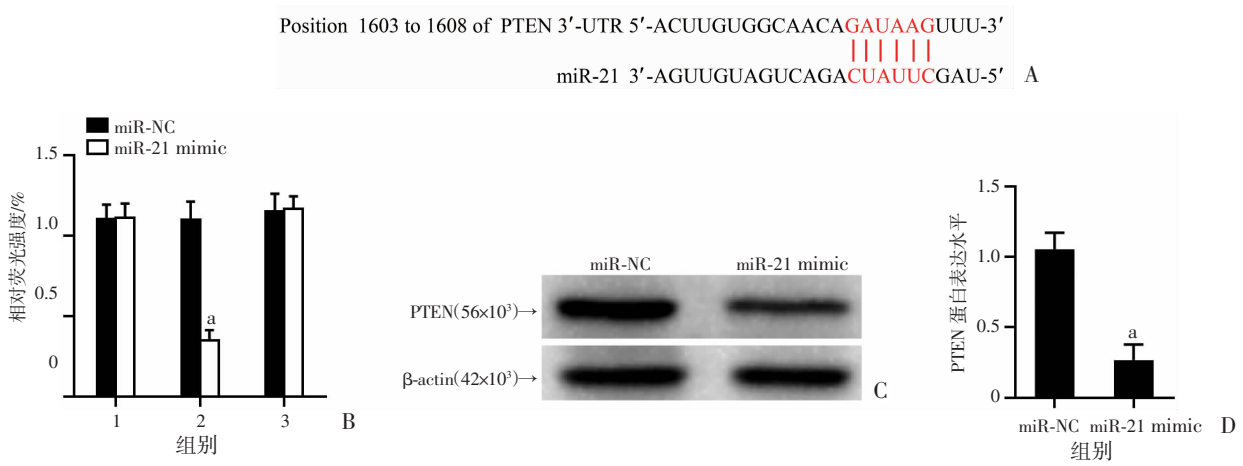
2.2　PTEN 为 miR-21 靶基因

使用 TargetScan 预测 miR-21 靶向结合 PTEN 基因(图 2A),双荧光素酶报告基因检测结果显示:pGL3-PTEN WT 组 293T 细胞转染 miR-21 mimic 后相对荧光强度低于转染 miR-NC 的细胞($P<0.05$,图 2B),而 pGL3-PTEN MUT 组 293T 细胞转染 miR-NC 和 miR-21 mimic 后相对荧光强度无明显变化。Western blot 检测结果显示 miR-21 组中 PTEN 基因表达下调($P<0.05$,图 2C、D)。



A:电镜观察外泌体形态;B:Western blot 检测 CD81、CD63 和 HSP90B1 在 AEC-Ⅱ和外泌体中的表达;C:RT-qPCR 检测 miR-21 在 AEC-Ⅱ和外泌体中的表达($n=6$,$\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与 AEC-Ⅱ组比较

图 1　AEC-Ⅱ外泌体鉴定及外泌体 miR-21 表达水平



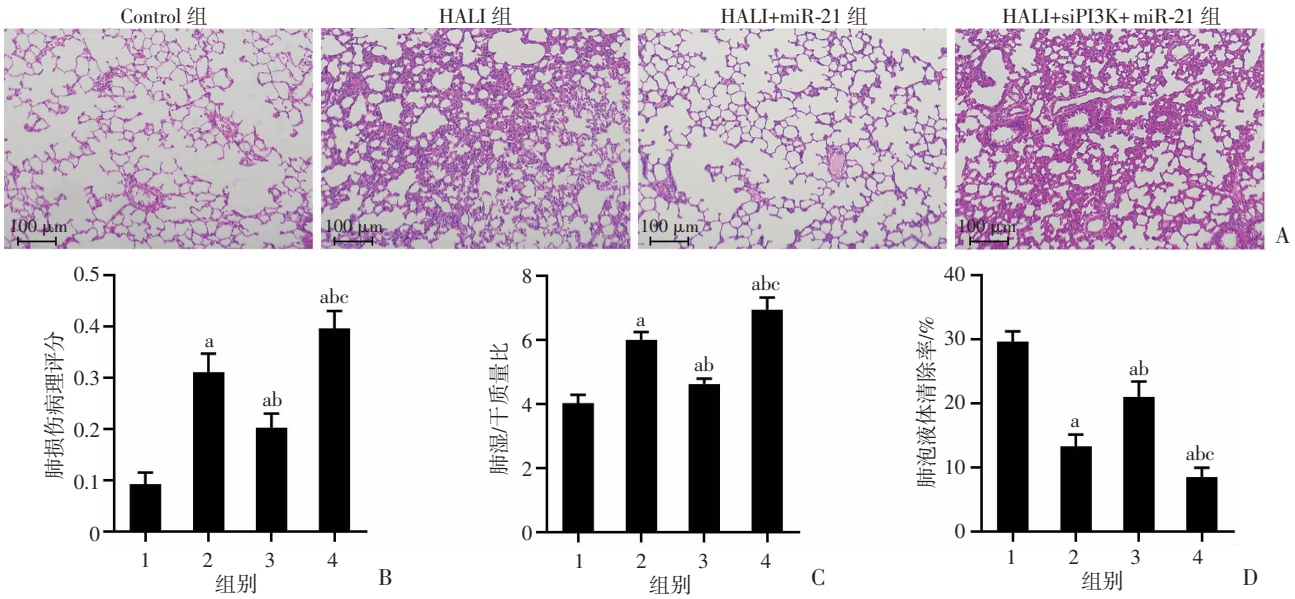
a:$P<0.05$,与 miR-NC 组比较

A:Targetscan 预测 miR-21 靶向结合 PTEN;B:双荧光素酶报告实验验证 miR-21 靶向结合 PTEN 1:pGL3-control;2:pGL3-PTEN WT;3:pGL3-PTEN WUT;C、D:Western blot 检测各组细胞中 PTEN 的蛋白表达

图 2 miR-21 靶向结合 PTEN($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.3 Ⅱ型肺泡上皮细胞来源外泌体 miR-21-5p 减轻高氧性急性肺损伤

HE 染色可见 Control 组肺泡结构清晰,偶有中性粒细胞浸润,高氧暴露后肺泡间隔增厚、大量炎性细胞浸润、透明膜形成及大量肺泡萎陷;AEC-Ⅱ-Exos-miR-21 干预可减轻 HALI,表现为炎症细胞浸润明显减少,肺间隔厚度及肺泡萎陷显著减少(图 3A)。沉默 PI3K 后,AEC-Ⅱ-Exos-miR-21 干预不能减轻 HALI。与 Control 组比较,HALI 组、HALI+miR-21 组及 HALI+siPI3K+miR-21 组肺损伤病理评分及肺湿/干质量比升高($P<0.05$,图 3B、C);AFC 下降($P<0.05$,图 3D);与 HALI 组比较,HALI+miR-21 组肺损伤病理评分及肺湿/干质量比降低($P<0.05$,图 3B、C),AFC 升高($P<0.05$,图 3D);HALI+siPI3K+miR-21 组肺损伤病理评分、肺湿/干质量比升高,AFC 降低($P<0.05$,图 3D),Exos-miR-21 干预不能逆转 PI3K/Akt 信号通路抑制对 HALI 的损伤作用。



1:Control 组;2:HALI 组;3:HALI+miR-21 组;4:HALI+siPI3K+miR-21 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HALI 组比较;c:$P<0.05$,与 HALI+miR-21 组比较

A:HE 染色观察肺组织病理改变;B:肺损伤病理评分;C:肺湿/干质量比;D:肺泡液体清除率(AFC)

图 3 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 对高氧性急性肺损伤与肺泡液体清除的影响($n=6,\bar{x}\pm s$)

2.4 miR-21 表达水平及 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 对氧化还原平衡的影响

高氧暴露后 miR-21 表达水平降低,与 Control 组比较,HALI 组 miR-21 表达水平降低($P<0.05$),与 HALI 组比较,HALI+miR-21 组与 HALI+siPI3K+miR-21 组 miR-21 表达水平升高($P<0.05$,图 4A),说明 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 干预成功。此外,高氧暴露可显著增加氧化应激水平,表现为:与 Control 组比较,HALI 组 ROS 及 MDA 水平升高,SOD 及 T-AOC 下降($P<0.05$);而 Exos-miR-21 干预后氧化应激水平得到抑制,与 HALI 组比较,HALI+miR-21 组 ROS 及 MDA 水平下降,SOD 及 T-AOC 升高($P<0.05$);沉默 PI3K 后,AEC-Ⅱ Exos-miR-21 干预不能改善 HALI,与 HALI 组比较,ROS、MDA 水平升高,SOD 及 T-AOC 水平降低($P<0.05$),与 HALI+miR-21 组比较,HALI+siPI3K+miR-21 组 ROS 及 MDA 表达水平升高,SOD 活力及 T-AOC 能力下降($P<0.05$),见图 4B~E。

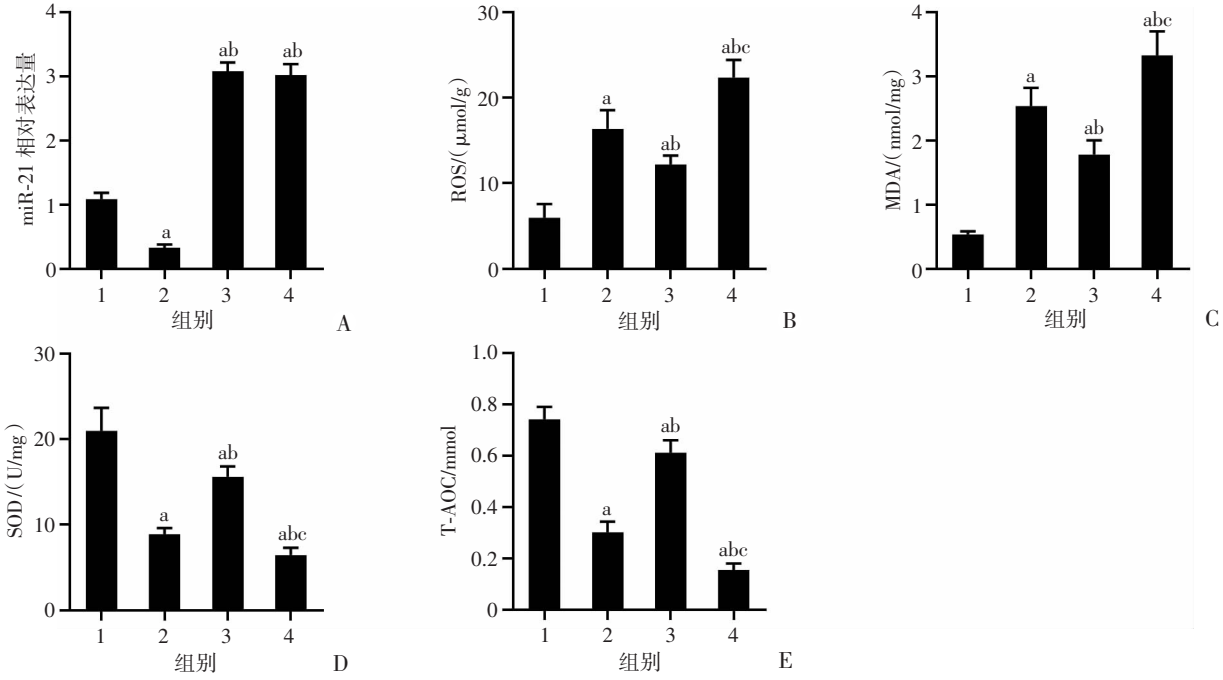
2.5 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 抑制 PTEN 激活 PI3K/Akt 信号通路促进 ENaC 蛋白表达

高氧暴露后,与 Control 组比较,HALI 组 PTEN 蛋白表达升高($P<0.05$),p-Akt、α-ENaC、β-ENaC 与 γ-ENaC 蛋白表达降低($P<0.05$),PI3K 蛋白无明显变化($P>0.05$);而 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 干预可显著降低 PTEN 表达水平,与 HALI 组比较,HALI+miR-21 组及 HALI+siPI3K+miR-21 组 PTEN 表达降低($P<0.05$),p-Akt 蛋白表达升高($P<0.05$),α-ENaC、β-ENaC 与 γ-ENaC 蛋白表达增高($P<0.05$);siPI3K 沉默 PI3K 蛋白后 PI3K 蛋白表达降低,Exos-miR-21 干预不能减轻 HALI,与 Control 组、HALI 组及 HALI+miR-21 组比较,HALI+siPI3K+miR-21 组 PI3K 表达降低($P<0.05$),与 HALI 组与 HALI+Exos-miR-21 组比较,p-Akt 蛋白表达降低($P<0.05$),α-ENaC、β-ENaC 与 γ-ENaC 蛋白表达降低($P<0.05$);各组 Akt 蛋白表达无明显变化($P>0.05$);见图 5。说明 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 抑制 PTEN 激活 PI3K/Akt 信号通路促进 ENaC 蛋白表达。

3 讨论

3.1 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 靶向结合 PTEN

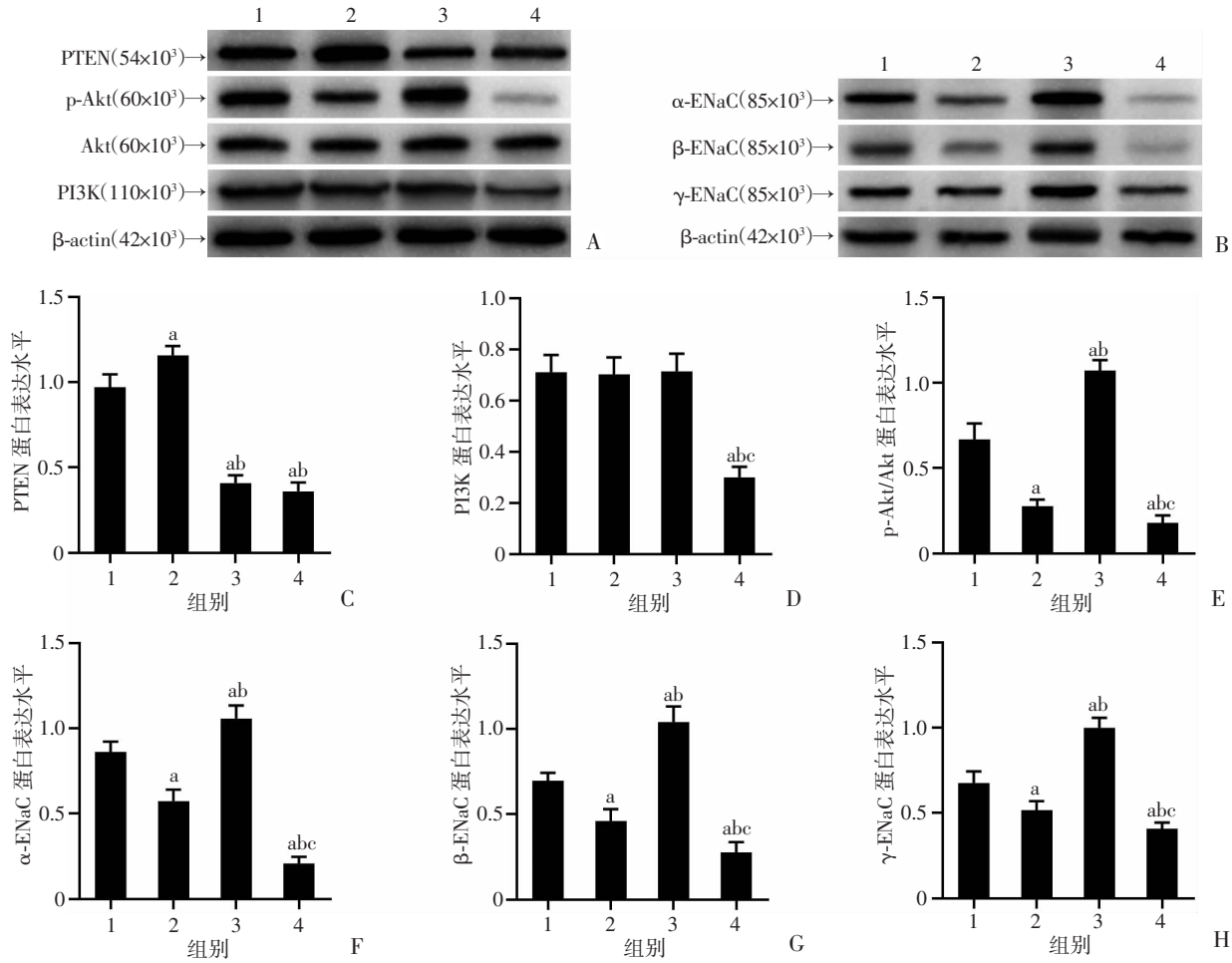
外泌体(Exos)是由细胞质膜通过胞吞作用形成多囊泡后再次与质膜结合通过旁分泌方式分泌直径为 50~120 nm 的囊泡,其内含丰富的蛋白质、脂质及各种 RNA(lncRNA、miRNA、mRNA)等大量生物活性分子以维持细胞正常生理功能。Exos 可通过其所含的 microRNA 参与细胞间通讯在 ARDS 疾病模型中发挥抗炎、抑制细胞凋亡、促进细胞再生及免疫调节等作用[18]。部分研究证实,肺泡上皮来源的 Exos-miR-21 可促进肺泡M2型巨噬细胞极化减轻呼吸机相关性肺



1:Control 组;2:HALI 组;3:HALI+miR-21 组;4:HALI+siPI3K+miR-21 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HALI 组比较;c:$P<0.05$,与 HALI+miR-21 组比较

A:miR-21 表达水平;B:ROS;C:MDA;D:SOD 活力;E:T-AOC

图 4 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 对 HALI 氧化应激指标 ROS、MDA、SOD 及 T-AOC 水平的影响($n=6$,$\bar{x}\pm s$)



1:Control 组;2:HALI 组;3:HALI+miR-21 组;4:HALI+siPI3K+miR-21 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HALI 组比较;c:$P<0.05$,与 HALI+miR-21 组比较

A:Western blot 检测肺组织 PI3K、Akt、p-AKT、PTEN 蛋白表达;B:Western blot 检测肺组织 ENaC 蛋白表达;C:PTEN 蛋白;D:PI3K 蛋白;E:p-Akt 蛋白;F:α-ENaC 蛋白;G:β-ENaC 蛋白;H:γ-ENaC 蛋白

图 5 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 对 PI3K/Akt 信号通路及 ENaC 蛋白表达的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

损伤[19]。由多能干细胞分化的肺泡Ⅱ型上皮细胞衍生的 Exos-miR-371b-5p 可激活 PI3K/AKT 信号通路促进 AEC-Ⅱ增殖,促进受损肺泡的再上皮化[20]。这些研究结果提示,AEC-Ⅱ来源的 Exos 对 ARDS 的治疗效应与其传递 miRNA 密切相关。本课题组前期研究发现,miR-21 在 HALI 中低表达,其过表达可拮抗 AEC-Ⅱ凋亡发挥肺保护作用[12]。本实验通过提取原代 AEC-Ⅱ细胞培养在提取外泌体发现,外泌体中 miR-21 较 AEC-Ⅱ明显升高。miR-21 可靶向人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)。

3.2 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 促进 ENaC 蛋白表达减轻 HALI

高氧性机械通气作为治疗 ARDS 的基石,常导致 HALI 的发生,其发病机制尚未阐明,无有效的靶向干预措施。目前研究认为,ROS 蓄积可破坏氧化还原稳态并直接杀伤肺血管内皮细胞导致毛细血管壁通透性增加,同时引起肺泡上皮细胞凋亡坏死,不能有效清除聚集在肺泡腔内的渗出性液体,严重损害肺换气功能,导致肺通气/血流比例(V/Q)失衡,促进顽固性低氧血症进展[3],且不能被高浓度氧疗纠正。及时有效清除泡腔内过多的液体可显著改善患者气体交换、提高氧合,降低 ARDS 患者死亡率[4-5]。而位于肺泡上皮细胞顶膜的钠离子(Na^+)通道(ENaC)是调控肺泡内液体清除(AFC)的关键因素。ENaC 由 α、β 和 γ 亚基组成异源三聚体结构,其调控 Na^+ 转运效率受 ENaC 在细胞膜上数量、ENaC 磷酸化与泛素化等诸多因素调节。部分研究表明,上调肺组织 ENaC 各亚基表达,可增强 AFC 从而减轻脂多糖诱导的 ARDS[17,21-22]。本实验中,高氧暴露后可见肺泡间隔增厚,大量炎症细胞浸润,大量肺泡萎陷,肺泡可见透明膜形成,同时肺

损伤病理评分及肺湿/干质量比升高,AFC 及 α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 蛋白表达显著下降,表明高氧暴露可抑制 α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 蛋白表达限制 AFC。而经 Exos-miR-21 干预后可见炎症细胞浸润减少,肺间隔变薄,肺泡萎陷及透明膜显著减少,同时肺损伤病理评分及肺湿/干质量比降低,AFC 及 α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 蛋白表达升高,表明 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 干预可促进 α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 蛋白表达调节 AFC 减轻 HALI。而 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 干预不能逆转 siPI3K 基因沉默对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用,与 HALI 组比较,肺组织病理损伤更为严重,肺损伤病理评分及肺湿/干质量比进一步升高,α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 蛋白表达下降更为严重。表明 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 可能经 PI3K/AKT 信号通路调控 α-ENaC、β-ENaC、γ-ENaC 蛋白表达。

3.3 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 激活 PI3K/AKT 信号通路调控氧化应激平衡

PTEN 作为 PI3K/AKT 信号通路的抑制因子,其可通过去磷酸化作用促使磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PIP3)向磷脂酰肌醇,4,5-二磷酸(PIP2)转化,下调 p-Akt 水平[23]。Western blot 结果显示,PTEN 表达降低后,p-Akt 表达增强,Exos-miR-21 干预不能消除 siPI3K 基因沉默对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用,p-Akt 表达显著下降,表明 AEC-Ⅱ Exos-miR-21 可通过靶向抑制 PTEN 表达激活 PI3K/Akt 信号通路。此外,有研究证实,激活 PI3K/AKT 信号通路可抑制氧化应激水平维持氧化还原平衡减轻与 HALI[24-25]。本实验中,高氧暴露后,ROS 及 MDA 活性显著增强,SOD 及 T-AOC 显著下降,表明高氧可破坏氧化还原平衡。而细胞内 ROS 蓄积会抑制 ENaC 活性导致 AFC 转运效率降低[26]。本实验中高氧暴露可显著抑制 ENaC 各亚基表达水平导致 AFC 降低。而 Exos-miR-21 干预可显著改善上述指标。同时沉默 siPI3K 基因后,Exos-miR-21 对 HALI 的保护作用明显减弱。以上结果说明,Exos-miR-21 可激活 PI3K/Akt 信号通路抑制氧化应激维持化还原平衡,促进 ENaC-α/β/γ 调节 AFC 转运。

综上,AEC-Ⅱ来源 Exos-miR-21 可靶向 PTEN 激活 PI3K/AKT 信号通路抑制氧化应激调控 ENaC 减轻 HALI。但本实验仅在动物层面证实 AEC-Ⅱ来源 Exos-miR-21 对 HALI 的保护作用,未在细胞分子水平进一步探讨其分子机制,为本实验的不足之处。本课题组下一步将通过沉默 PTEN 蛋白、沉默 Exos-miR-21 并抑制 PI3K/Akt 信号通路等方法,重点探讨 AEC-Ⅱ来源 Exos-miR-21 在 HALI 的分子机制。以期丰富临床干预 HALI 的小分子靶点,为外泌体治疗 HALI 提供科学依据。

参考文献:

[1] DIAS-FREITAS F, METELO-COIMBRA C, RONCON-ALBUQUERQUE R Jr. Molecular mechanisms underlying hyperoxia acute lung injury[J]. Respir Med, 2016, 119: 23-28. DOI: 10.1016/j.rmed.2016.08.010.

[2] SINGER M, YOUNG P J, LAFFEY J G, *et al*. Dangers of hyperoxia[J]. Crit Care, 2021, 25(1): 440. DOI: 10.1186/s13054-021-03815-y.

[3] BEYER A M, NORWOOD TORO L E, HUGHES W E, *et al*. Autophagy, TERT, and mitochondrial dysfunction in hyperoxia[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2021, 321(5): H985-H1003. DOI: 10.1152/ajpheart.00166.2021.

[4] MEYER N J, GATTINONI L, CALFEE C S. Acute respiratory distress syndrome[J]. Lancet, 2021, 398(10300): 622-637. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00439-6.

[5] NIU F F, XU X T, ZHANG R, *et al*. Ursodeoxycholic acid stimulates alveolar fluid clearance in LPS-induced pulmonary edema via ALX/cAMP/PI3K pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 20057-20065. DOI: 10.1002/jcp.28602.

[6] RUARO B, SALTON F, BRAGA L, *et al*. The history and mystery of alveolar epithelial type Ⅱ cells: focus on their physiologic and pathologic role in lung[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2566. DOI: 10.3390/ijms22052566.

[7] VADÁSZ I, SZNAJDER J I. Gas exchange disturbances regulate alveolar fluid clearance during acute lung injury[J]. Front Immunol, 2017, 8: 757. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00757.

[8] 张颖, 李敏, 高力扬. 上皮钠通道在相关呼吸系统疾病中的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(5):943-949. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2020.05.026
ZHANG Y, LI M, GAO L Y. Progress in relationship between epithelial sodium channel and related respiratory diseases[J]. Chin J Pathophysiol, 2020, 36(5):943-949. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2020.05.026

[9] 毛珂君, 刘妍宏, 华宇, 等. 间充质干细胞外泌体对肺脏上皮钠离子转运的调控作用研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(2): 369-377. DOI: 10.11844/cjcb.2021.02.0012.
MAO K J, LIU Y H, HUA Y, *et al*. The research about the regulation of mesenchymal stem cell exosomes on sodium transport of lung epithelium[J]. Chin J Cell Biol, 2021, 43(2): 369-377. DOI: 10.11844/cjcb.2021.02.0012.

[10] HOU A N, FU J H, YANG H P, *et al*. Hyperoxia stimulates the transdifferentiation of type Ⅱ alveolar epithelial cells in newborn rats[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(9): L861-L872. DOI: 10.1152/ajplung.00099.2014.

[11] VYAS N, DHAWAN J. Exosomes: mobile platforms for targeted and synergistic signaling across cell boundaries[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(9): 1567-1576. DOI: 10.1007/s00018-016-2413-9.

[12] 冯帮海, 梅鸿, 刘鑫鑫, 等. 微小 RNA-21-5p 通过激活 PI3K/Akt 信号通路调控Ⅱ型肺泡上皮细胞凋亡减轻大鼠高氧性急性肺损伤[J]. 中华危重病急救医学, 2023, 35(2): 140-145. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220317-00259.
FENG B H, MEI H, LIU X X, *et al*. MicroRNA21-5p alleviates hyperoxia-induced acute lung injury in rats through activating phosphatidylinositol 3 kinase/serine-threonine protein kinase signaling pathway by regulating type Ⅱ alveolar epithelial cell apoptosis[J]. Chin Crit Care Med, 2023, 35(2): 140-145. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220317-00259.

[13] 何婧, 王导新, 邓旺. FOXO1 对急性肺损伤小鼠肺泡上皮钠通道的调控作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(6): 1155-1161. I0003. DOI: 10.13481/j.1671-587x.20200608.
HE J, WANG D X, DENG W. Regulatory effect of FOXO1 on alveolar epithelial sodium channel in acute lung injury mice and its mechanism[J]. J Jilin Univ Med Ed, 2020, 46(6): 1155-1161, I0003. DOI: 10.13481/j.1671-587x.20200608.

[14] CHEN Q, LIU Y R. Isolation and culture of mouse alveolar type Ⅱ cells to study type Ⅱ to type I cell differentiation[J]. STAR Protoc, 2021, 2(1): 100241. DOI: 10.1016/j.xpro.2020.100241.

[15] 刘国跃, 牟胜旭, 陈淼, 等. 一种简便可控的高氧急性肺损伤模型的建立方法[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(1): 27-32. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.01.006.
LIU G Y, MOU S X, CHEN M, *et al*. A simple and controllable method for reproduction of a model of high oxygen tension induced acute lung injury[J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28(1): 27-32. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.01.006.

[16] MATUTE-BELLO G, DOWNEY G, MOORE B B, *et al*. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(5): 725-738. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0210ST.

[17] ZHOU Z Y, HUA Y, DING Y, *et al*. Conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells involved in acute lung injury by regulating epithelial sodium channels *via* miR-34c[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 640116. DOI: 10.3389/fbioe.2021.640116.

[18] LIU C, XIAO K, XIE L X. Advances in the use of exosomes for the treatment of ALI/ARDS[J]. Front Immunol, 2022, 13: 971189. DOI: 10.3389/fimmu.2022.971189.

[19] WANG Y T, XIE W L, FENG Y Q, *et al*. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage polarization *via* Notch2/$SOCS_1$ during mechanical ventilation[J]. Int J Mol Med, 2022, 50(1): 96. DOI: 10.3892/ijmm.2022.5152.

[20] QUAN Y, WANG Z H, GONG L, *et al*. Exosome miR-371b-5p promotes proliferation of lung alveolar progenitor type Ⅱ cells by using PTEN to orchestrate the PI3K/Akt signaling[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 138. DOI: 10.1186/s13287-017-0586-2.

[21] 马青, 李长毅, 王导新, 等. PI3K/SGK1 信号通路上调小鼠肺上皮钠通道表达的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(1): 50-55. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2022.01.007
MA Q, LI C Y, WANG D X, *et al*. PI3K/SGK1 signaling pathway up-regulates expression of sodium channel in mouse alveolar epithelium[J]. Chin J Pathophysiol, 2022, 38(1): 50-55. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2022.01.007

[22] 刘宏飞, 候亚鹏, 金睿, 等. 木犀草素通过调节上皮钠通道影响肺上皮离子转运[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(4): 402-408. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2020.04.006.
LIU H F, HOU Y P, JIN R, *et al*. Luteolin affects lung epithelial ion transport by regulating epithelial sodium channels[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(4): 402-408. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2020.04.006.

[23] SHI Y J, WANG J R, CHANDARLAPATY S, *et al*. PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1[J]. Nat Struct Mol Biol, 2014, 21(6): 522-527. DOI: 10.1038/nsmb.2828.

[24] CAO H F, FENG Y, NING Y Y, *et al*. Edaravone protects rats and human pulmonary alveolar epithelial cells against hyperoxia injury: heme oxygenase-1 and PI3K/Akt pathway may be involved[J]. Exp Lung Res, 2015, 41(7): 404-414. DOI: 10.3109/01902148.2015.1054053.

[25] CHEN Y, CHANG L W, LI W B, *et al*. Thioredoxin protects fetal type Ⅱ epithelial cells from hyperoxia-induced injury[J]. Pediatr Pulmonol, 2010, 45(12): 1192-1200. DOI: 10.1002/ppul.21307.

[26] SHLYONSKY V, BOOM A, MIES F. Hydrogen peroxide and sodium transport in the lung and kidney[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 9512807. DOI: 10.1155/2016/9512807.

(**收稿**:2022-12-04;**修回**:2023-01-28)

(编辑 栾 嘉)