

生物信息分析

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002473

TNF- α 刺激的 IEC-6 细胞源性外泌体 miRNAs 表达谱差异

肖婷婷, 罗敏, 王银晓, 曾星, 张娴

(广州中医药大学第二临床医学院 I 期临床研究室, 广州 510120)

【摘要】目的:分析肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)刺激的 IEC-6 小肠上皮细胞源性外泌体 miRNAs 的表达差异。**方法:**以 TNF- α (终浓度 50 ng/mL)刺激 IEC-6 细胞 4 h(TNF- α -exosome 组)后收集上清液,外泌体提取试剂盒结合超速离心法分离提取上清液中的外泌体;使用透射电镜、纳米微粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)技术和 Western blot 鉴定外泌体;提取外泌体 miRNAs 进行高通量测序,比较 control-exosome 组(IEC-6 细胞以不含 TNF- α 的无外泌体血清培养基正常孵育)和 TNF- α -exosome 组外泌体 miRNAs 表达谱差异;采用 TargetScan、miRDB 和 miRWalk 3 个软件对有显著差异表达的 miRNAs 进行潜在靶基因预测;Cytoscape 软件绘制显著差异表达 miRNAs 靶基因调控网络图;DAVID 网站注释工具对潜在靶基因进行功能注释,以此进一步分析潜在靶基因的生物学功能。**结果:**在透射电镜下可以观察到大量外泌体结构,其分布不均匀,直径 50~200 nm,呈圆形或椭圆形的脂质双层杯状囊泡;NTA 检测显示其粒径主峰为 141.9 nm,浓度为 3.41×10^9 particle/mL;Western blot 结果显示外泌体表面标志蛋白 CD63 表达阳性;高通量测序筛选出 6 个显著差异表达(差异倍数>2, $P<0.05$)的外泌体 miRNAs。与 control-exosome 组比较, TNF- α -exosome 组 mo-miR-125a-5p(差异倍数=3.689 0)、mo-miR-351-5p(差异倍数=3.803 1)、mo-miR-125b-5p(差异倍数=2.933 0)、mo-miR-542-3p(差异倍数=2.995 6)、mo-miR-30c-5p(差异倍数=3.065 0)和 miR-20a-5p(差异倍数=2.890 8)均明显下调($P=0.001$, $P=0.002$, $P=0.025$, $P=0.019$, $P=0.022$, $P=0.032$);运用靶基因预测网站对 6 个差异表达 miRNAs 靶基因预测,共得到潜在靶基因 158 个,并绘制 miRNAs 靶基因网络调控图;DAVID 功能注释结果显示这些下调 miRNAs 主要参与了 1 个京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路 and 12 个基因本体论(gene ontology, GO)生物学过程(biological process, BP)、15 个 GO 细胞组分(cell component, CC)、3 个 GO 分子功能(molecular function, MF)。**结论:**TNF- α 诱导的 IEC-6 细胞来源外泌体中包含丰富的 miRNAs,其表达谱有明显差异,高通量测序和相关数据库的联合运用对小肠上皮细胞外泌体 miRNA 的功能作用有了更深的了解,为小肠黏膜损伤相关疾病的发病机制研究提供了新视角。

【关键词】外泌体;外泌体 miRNA;小肠上皮细胞;高通量测序**【中图分类号】**R364.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-11-03Different expression profiles of TNF- α stimulated IEC-6 cells-derived exosomal miRNAs

Xiao Tingting, Luo Min, Wang Yinxiao, Zeng Xing, Zhang Xian

(Phase I Clinical Research Center Analytical and Testing Laboratory, The Second Hospital Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To analyze the differential expression of IEC-6 small intestinal epithelial-derived exosomal miRNAs stimulated by TNF- α . **Methods:** IEC-6 cells were stimulated with TNF- α (final concentration of 50 ng/mL) for 4h(the TNF- α -exosome group), and the supernatant was collected. The exosomes in the supernatant were extracted by the total exosome isolation kit combined with ultracentrifugation. Transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis(NTA) and Western blot were performed to identify exosomes. High throughput sequencing was used to compare the differential expression of exosome miRNAs between the control-exosome group(IEC-6 normally incubated with TNF- α -free medium) and the TNF- α -exosome group. Target Scan, miRDB and miRWalk were used to predict target genes of differential miRNAs, cytoscape was applied for the construction of miRNAs-target

作者介绍: 肖婷婷, Email: 1394614377@qq.com,

研究方向: 肠黏膜损伤与修复。

通信作者: 张娴, Email: zhangx07@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81473440)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200507.1618.014.html>

(2020-05-08)

genes network and DAVID annotation tools were applied on target genes to analyze the biological functions of genes.

Results: The transmission microscopy showed that there were a large number of exosomes, which were round or elliptical lipid bilayer vesicles, heterogeneously distributed, with a diameter about 50 nm to 200 nm. NTA showed that the main peak of the

particle size was 141.9 nm, the concentration was 3.41×10^9 particle/mL. Western blot results showed that the exosome marker protein CD63 was positive. High-throughput sequencing screened six differentially expressed exosomal miRNAs ($|\log_2(\text{fold change})| > 2, P < 0.05$). Compared with the control-exosome group, rno-miR-125a-5p ($|\log_2(\text{fold change})| = 3.689$) and rno-miR-351-5p ($|\log_2(\text{fold change})| = 3.803$) in the TNF- α -exosome group were significantly down-regulated, and rno-miR-125b-5p ($|\log_2(\text{fold change})| = 2.933$), rno-miR-542-3p ($|\log_2(\text{fold change})| = 2.995$), rno-miR-30c-5p ($|\log_2(\text{fold change})| = 3.065$) and rno-miR-20a-5p ($|\log_2(\text{fold change})| = 2.890$) in the TNF- α -exosome group were obvious down-regulated. Six differentially expressed miRNAs target genes were predicted by using the miRNA target gene prediction website and 158 genes were obtained and the network of six miRNAs were constructed. DAVID annotation showed that the target genes of down-regulated miRNAs were mainly involved in 1 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway and 12 gene ontology_biological process (GO_BP), 15 gene ontology_cell component (GO_CC), 3 gene ontology_molecular function (GO_MF). **Conclusion:** Exosomes derived from TNF- α -induced small intestinal epithelial cells contain rich miRNAs, and their expression profiles are significantly different. With the help of high throughput sequencing and related database, more information about the exosomal miRNAs derived from small intestinal epithelial cells and its function are revealed, and a new perspective for the pathogenesis of small intestinal mucosal injury-related diseases are provided.

[Key words] exosome; exosomal miRNA; small intestinal epithelial cells; high throughput sequencing

小肠不仅有消化吸收功能, 同时还有免疫、屏障和内分泌功能^[1]。多种因素所致的肠黏膜缺血、应激损伤、细菌易位及内毒素损伤等均可导致肠黏膜损伤及其屏障功能缺失^[2]。小肠上皮细胞作为肠道的一种功能性细胞, 在发挥免疫屏障功能、促进肠黏膜损伤修复及维持正常肠道功能中起着非常重要的作用^[3]。现有研究表明, 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导肠黏膜损伤主要是通过增加肠上皮细胞屏障的通透性, 但其具体作用机制有待进一步阐明^[4]。外泌体存在于几乎所有体液中, 其中细胞上清中的外泌体中也富含蛋白质、脂质、核酸等多种生物活性成分。而外泌体中的 miRNAs 不仅作为一种调控基因, 能靶向 mRNA 而最终导致其降解或翻译抑制, 还能与 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 结合并激活免疫细胞的配体能力^[5]。外泌体具有双层脂质结构, 能保护其 miRNAs 免受降解, 故能在细胞间安全递送 miRNAs, 且能特异性识别受体细胞, 介导细胞间的信号通讯, 从而调控靶细胞。但是, 目前关于外泌体 miRNAs 在小肠中的表达情况鲜有文献报道。本研究在肠黏膜损伤修复研究领域提出外泌体 miRNAs 可能作为 IEC-6 肠上皮细胞间通讯的介质, 并通过高通量测序来分析 TNF- α 诱导的 IEC-6 细胞来源外泌体中 miRNAs 的表达谱差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 大鼠小肠隐窝上皮细胞 IEC-6 细胞株, 购于

美国 ATCC 公司。

1.1.2 实验试剂 无外泌体血清 (exosome-depleted FBS) 购于美国 SBI 公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (FBS)、牛胰岛素、0.25% 胰酶和无菌 PBS 缓冲液购于美国 Gibco 公司; TNF- α 购于美国 Sigma 公司; 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂购于美国 Roche 公司; RIPA 裂解液购于美国 CST 公司; BCA 试剂盒购于美国 Thermo 公司; 抗 CD63 抗体购于美国 Proteintech 公司; 脱脂奶粉和山羊抗兔-HRP 二抗购于美国 Bio-Rad 公司; Total exosome isolation (cell culture media) 试剂盒和 Total exosome RNA and protein isolation 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养方法

IEC-6 细胞用含 10% FBS、0.1 U 牛胰岛素配制的 DMEM 完全培养基, 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱培养, 0.25% 胰酶消化。细胞接种后常规培养, 在细胞融合度达 80%~90% 时更换为无外泌体血清培养基。实验分 2 组, 收获上清前以含 50 ng/mL TNF- α 的无外泌体血清培养基继续孵育 4 h 后收获的上清 (TNF- α -exosome 组), 不含 TNF- α 的无外泌体血清培养基孵育收获的上清 (control-exosome 组), 用试剂盒结合超速离心进行后续的外泌体提取。

1.3 外泌体的提取方法

按照说明书提取外泌体, 细胞处理后收集上清液, 4 °C、500g 离心 5 min; 弃沉淀, 收集上清液, 4 °C、2 000g 离心 1 h; 弃沉淀, 收集上清液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 与 0.5 倍体积外泌体提取液颠倒混匀, 4 °C 过夜备用; 次日, 4 °C、10 000g 离心 1 h; 弃上清, 用 5 mL 无菌 PBS 重悬沉淀, 使用超速离心机 (Beckman 公司, 美国) 于 4 °C、100 000g 离心 70 min, 以消除小分子蛋白质; 弃上清, 用 200 μ L 无菌 PBS 重悬, 即可得外泌体。

1.4 外泌体的鉴定方法

1.4.1 透射电镜观察 将新鲜提取的外泌体用无菌 PBS 重悬后,吸取 5~10 μL 滴加于铜网上,沉淀 3 min 后用滤纸从边缘处吸去浮液,再用无菌 PBS 漂洗后使用磷钨酸负染,常温干燥 2 min 后,使用透射电镜(电子株式会社,日本)上机成像(操作电压 80~120 kV)观察。

1.4.2 NTA 鉴定 使用 Nanosight LM 10(Malvern 公司,英国)进行 NTA 检测。先用注射器吸取 1 mL 外泌体悬液样品,再缓慢注入样品池,后将光模块放回底座上,OMEGA 温度计的探头放入激光模块面板的铜孔内,点击 Start Camera,调整焦距,选择合适的 Screen Gain 和 Camera Level 进行检测。

1.4.3 Western blot 检测 加入含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液于提取出的外泌体样品中,冰上裂解 10 min 后用 BCA 法测定外泌体蛋白浓度。取 5 μL 样品加上样缓冲液及还原剂 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后上样,电泳后转至 PVDF 膜,室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h,加入抗 CD63 的一抗(1:1 000)室温摇床孵育 30 min 后,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜,次日 1 $\times$ TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入用新鲜 5% 脱脂奶粉配置的二抗(1:3 000)孵育 1 h,1 $\times$ TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。ECL 反应后,自动成像系统采集图片。

1.5 外泌体 RNA 的提取方法

提取外泌体后,用预冷的无菌 PBS 重悬外泌体沉淀,再加入等体积 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 2 $\times$ Denaturing Solution 混匀,冰上裂解 5 min 后加入等体积酚酸:氯仿,涡旋 30~60 s 充分混匀,室温下 12 000g 离心 10 min,吸取 300 μL 上层水相至新的无酶 EP 管中,再加入 1.25 倍体积的无水乙醇混匀。然后吸取 700 μL 混合液至已装入 2 mL 收集管的滤筒中,室温下 10 000g 离心 15 s 后倒掉收集管中的废液,重复此步骤 1 次。再向滤筒中加入 700 μL miRNA Wash Solution 1,室温下 10 000g 离心 15 s 后倒掉收集管中的废液,将滤筒回收至旧收集管中,向滤筒中加入 500 μL Wash Solution 2/3,室温下 10 000g 离心 15 s 后倒掉收集管中的废液,重复此步骤 1 次,室温下 10 000g 离心 1 min 后滤干残余的废液,将滤筒移入新的 2 mL 收集管中,加入 50 μL 95 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 Elution Solution 至滤筒中,室温下 10 000g 离心 30 s,回收 RNA,洗脱液中即为 RNA 溶解液。再用 50 μL Elution Solution 重新洗脱 1 次,离心后收集的即为 Total RNA,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.6 高通量测序方法

1.6.1 小 RNA 文库构建及测序 使用 Agilent 2200(芯片类型:HS RNA Reagent)对提取的总 RNA 进行质量检测。经纯化、分别连接 5' 接头和 3' 接头、第一链 cDNA 合成、PCR 扩增;用凝胶电泳法获取插入片段在 18~40 nt 的 cDNA 文库,后进行测序,由广州锐博生物技术公司完成。

1.6.2 miRNA 数据处理和信息分析 Illumina HiSeqTM 2500 测序所得 50 nt 原始序列集,通过去掉序列两端的接头、去除低质量序列和除去污染等过程,基本完成初步过滤后得到干

净序列(clean reads)。将所得的测序数据通过与 miRNA 的生物信息数据库进行比较,可以获得数据库中已有的 miRNA 表达信息,包括结构、长度和表达水平等。将测序获得的干净序列数据与 miRBase 21 数据库中该物种所有 miRNA 成熟体序列比对,计算其表达量。miRNA 的表达量校正方法:计算每百万 clean reads 中比对到特定 miRNA 的 reads 数目(the number of reads per million clean tags)。

1.6.3 共有及特有序列分析 通过对 2 组样品的 clean reads 数据进行比较,分析 2 组样品共有的 reads 序列及特有序列,2 组样品共有的序列及特有序列的比例分析用表格显示,两样品间 unique reads 用韦恩图显示。

1.6.4 miRNA 表达差异分析 通过对标本中 miRNA 表达量进行标准化,统计样品间表达的已知 miRNAs,从而判断这些 miRNAs 在样本间的表达量是否存在统计学差异,分别用 $\log_2\text{Ratio}$ 、散点图比较共同表达的 miRNAs 表达量差异,其中, $\log_2(\text{fold change})$ 为 $\log_2(\text{样品 TNF-}\alpha\text{-exosome RPM 值/样品 control-exosome RPM 值})$ 的绝对值。采用 RStudio 1.2.1335 软件中 heatmap 软件包对组间外泌体 miRNAs 表达量差异进行聚类分析,选取 $|\log_2(\text{fold change})| > 2$ 的 miRNAs 绘制热图。

1.7 靶基因预测方法

利用 TargetScan(http://www.targetscan.org/vert_72/)、miRDB(<http://mirdb.org/>) 和 miRWalk(<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) 对有统计学差异表达的 miRNA 进行靶基因预测,以增加靶基因的预测准确性。通过对这 3 个在线生物信息学网站预测的靶基因分别按照 3 个网站的评分标准进行筛选,并取其 3 个网站共同预测到的交集作为差异 miRNAs 的潜在靶基因。采用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制更为直观的差异表达 miRNAs 及其潜在靶基因的调控网络图。

1.8 潜在靶基因功能注释方法

运用网站 DAVID 生物信息学资源 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>) 的注释工具对 6 个差异表达明显下调的 miRNAs 潜在靶基因进行功能注释,输入基因列表,物种选择和背景均为大鼠,选择功能注释工具,选择 KEGG 通路、GO_BP、GO_CC 和 GO_MF 进行基因富集分析。

1.9 统计学处理

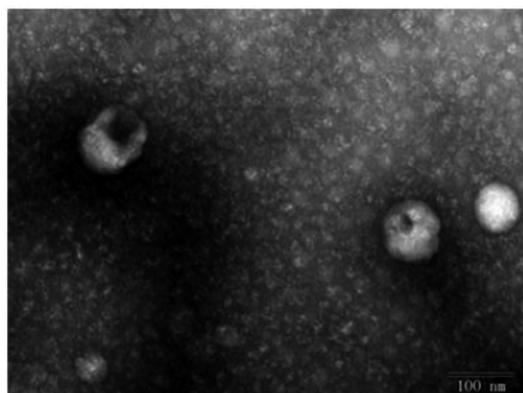
使用 R 3.6.1 软件 edgeR 分析 2 组间 miRNAs 表达差异的显著性;采用 DAVID 生物信息学资源 6.8 对 KEGG 通路、GO_BP、GO_CC 和 GO_MF 进行基因富集分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

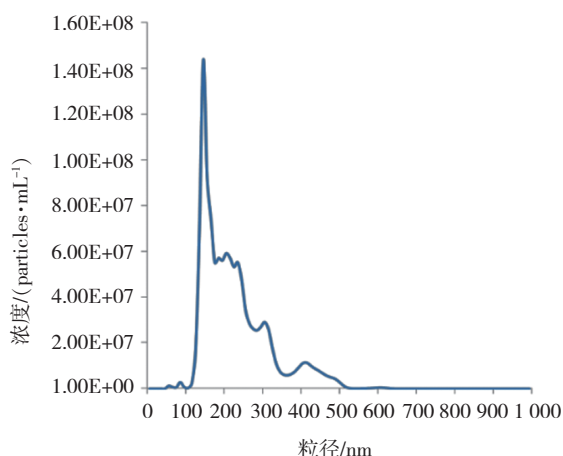
2.1 外泌体鉴定结果

透射电镜鉴定结果显示,背景清晰、杂质少、大小不一、直径 50~200 nm 的外泌体结构,有双层脂质膜包裹,呈圆形或椭圆形囊泡;NTA 检测结果显示,外泌体分布粒径主峰为

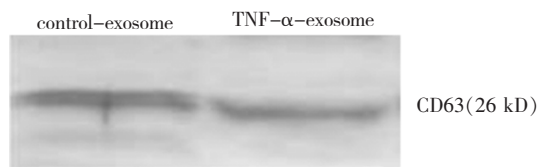
141.9 nm, 浓度为 3.41×10^9 particles/mL; Western blot 检测结果显示, 外泌体表面标志蛋白 CD63 表达均为阳性(图 1)。



A. 外泌体的形态



B. 外泌体的粒径体积分布



C. 外泌体的标志蛋白 CD63 检测

图 1 透射电镜、NTA 和 Western blot 鉴定外泌体

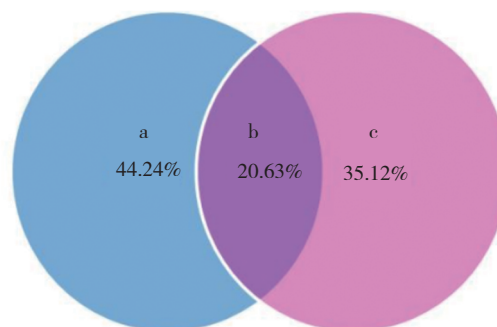
2.2 高通量测序结果

2.2.1 共有及特有序列分析 Illumina HiSeq™ 2500 测序所得原始数据显示, clean reads 总计 577 565 条, 其中 control-

exosome 组样品中特有序列 255 557 条, 占总序列的 44.24%, TNF- α -exosome 组样品中特有序列 202 866 条, 占总序列的 35.12%, control-exosome 和 TNF- α -exosome 两组 RNA 样品共有序列 119 142 条, 占总序列的 20.63%(表 1, 图 2)。

表 1 共有序列与特有序列比例分析

序列类型	干净序列计数	百分比/%
总共序列	577 565	100.00
2组样品共有序列	119 142	20.63
control-exosome特有序列	255 557	44.24
TNF- α -exosome 特有序列	202 866	35.12



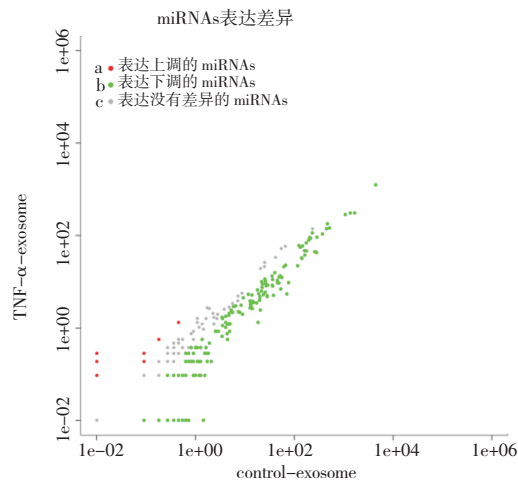
注: a, control-exosome 特有序列; b: 2 组样品共有序列;
c: TNF- α -exosome 特有序列

图 2 共有序列及特有序列韦恩图

2.2.2 miRNA 表达差异分析 通过 $\log_2$ Ratio、热图和散点图对 TNF- α -exosome 组和 control-exosome 组样品进行差异表达 miRNAs 分析和筛选。结果显示, 两样本外泌体中共检测出 156 个差异表达的 miRNAs(差异倍数>1), 其中 7 个 miRNAs 表达上调, 149 个 miRNAs 表达下调。表达差异最显著(差异倍数>2, $P < 0.05$)的前 6 个 miRNAs 为 rno-miR-125a-5p(差异倍数=3.689 0)、rno-miR-351-5p(差异倍数=3.803 1)、rno-miR-125b-5p(差异倍数=2.933 0)、rno-miR-542-3p(差异倍数=2.995 6)、rno-miR-30c-5p(差异倍数=3.065 0)和 miR-20a-5p(差异倍数=2.890 8), 均明显下调($P=0.001$, $P=0.002$, $P=0.025$, $P=0.019$, $P=0.022$, $P=0.032$)。散点图能展示 TNF- α 刺激的和正常的 IEC-6 细胞分泌的外泌体 miRNAs 总体表达情况, 对显著差异 miRNAs 进行双聚类分析(表 2, 图 3, 图 4)。

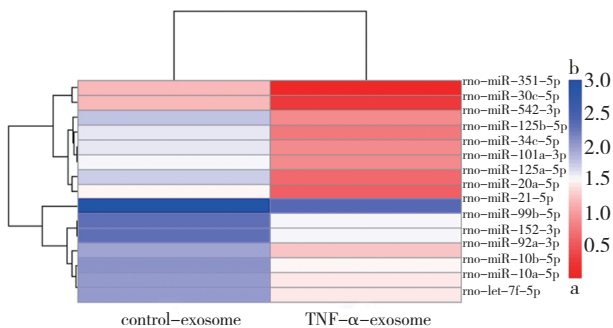
表 2 组间外泌体 miRNAs 差异表达统计

miRNA 名称	control-exosome	TNF- α -exosome	调节	差异倍数= $ \log_2(\text{fold change}) $	P 值
rno-miR-125a-5p	69.8333	5.414 6	下调	3.689 0	0.001
rno-miR-351-5p	18.2447	1.307 0	下调	3.803 1	0.002
rno-miR-542-3p	75.9449	9.522 1	下调	2.995 6	0.019
rno-miR-30c-5p	20.3119	2.427 2	下调	3.065 0	0.022
rno-miR-125b-5p	52.7570	6.908 2	下调	2.933 0	0.025
rno-miR-20a-5p	37.3882	5.041 1	下调	2.890 8	0.032



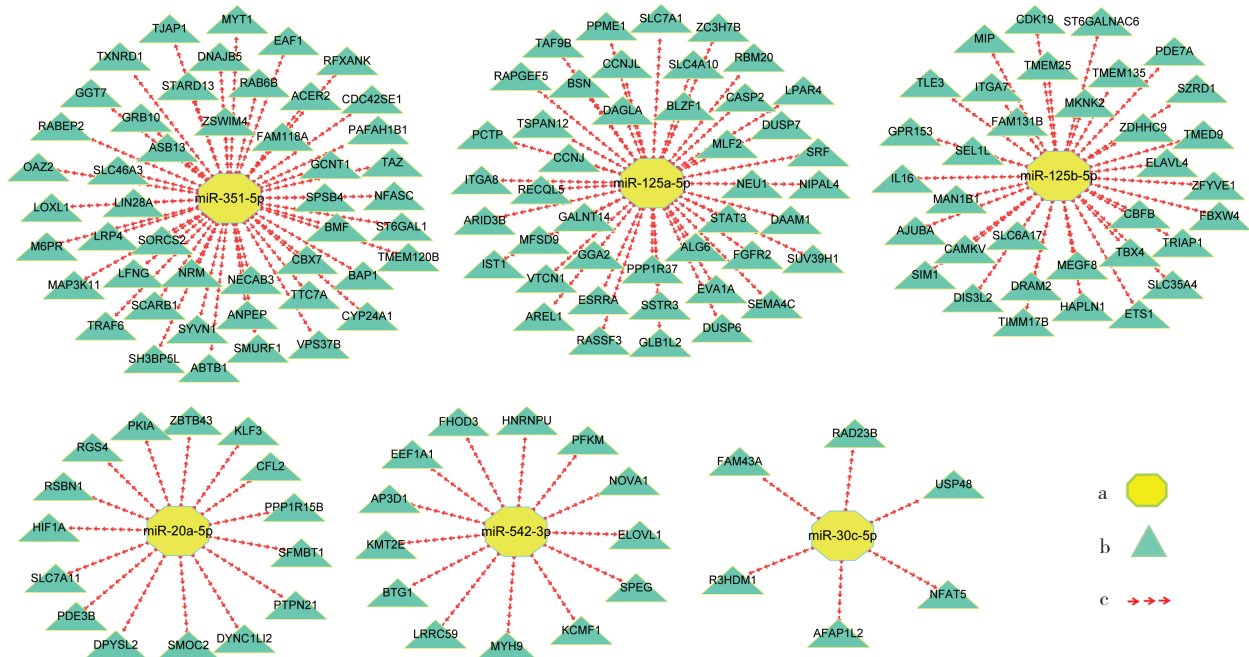
注:a,表达上调的 miRNAs;b:表达下调的 miRNAs;c:表达没有差异的 miRNAs

图3 组间外泌体 miRNAs 表达差异的散点图



注:a,表达量低的 miRNAs;b:表达量高的 miRNAs;0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 为表达量转化后的对数值

图4 组间外泌体差异表达 miRNAs 的热图



注:a,显著差异表达的 miRNAs;b:显著差异表达 miRNAs 的潜在靶基因;c:miRNAs 靶基因的调控关系

图5 组间外泌体中显著差异表达 miRNAs 靶基因调控网络图

2.3 靶基因预测结果

通过 TargetScan、miRDB、miRWalk 三个软件对差异表达的 miRNAs 进行靶基因预测并取其交集,得到 6 个差异表达明显下调 miRNAs 的潜在靶基因 158 个。rno-miR-351-5p、rno-miR-125a-5p、rno-miR-125b-5p、rno-miR-20a-5p、rno-miR-542-3p 和 rno-miR-30c-5p 的潜在靶基因分别为 47、43、34、15、13 和 6 个,并按 miRNAs 靶基因关联程度筛选出每个 miRNAs 最可能的潜在靶基因。利用 Cytoscape 软件绘制更加直观的 miRNAs 靶基因调控网络图(表 3,图 5)。

表3 显著差异 miRNAs 的靶基因预测

miRNA名称	潜在靶基因	关联程度
rno-miR-351-5p	ZSWIM4	47
rno-miR-125a-5p	ZC3H7B	43
rno-miR-125b-5p	SZRD1	34
rno-miR-20a-5p	HIF1A	15
rno-miR-542-3p	SPEG	13
rno-miR-30c-5p	USP48	6

2.4 潜在靶基因的功能注释结果

采用 DAVID 网站注释工具对显著差异表达 miRNAs 的 158 个潜在靶基因进行功能注释,结果显示 TNF- α 刺激的 IEC-6 细胞分泌外泌体中显著差异表达的 6 个 miRNAs 潜在靶基因共同涉及 3 条 KEGG 通路和 35 个 GO_BP、20 个 GO_CC、7 个 GO_MF,而具有明显差异的则为 1 条 KEGG 通路(MAPK 信号通路, $P=0.020$)和 12 个 GO_BP(肌肉细胞稳态, $P=0.003$;血管生成, $P=0.004$;细胞死亡的正向调节, $P=0.009$;RNA 聚合酶 II 启动子对 pri-miRNA 转录的正向调节, $P=0.010$;骨化的负向调节, $P=0.013$;磷脂转运, $P=0.014$;通过

天冬酰胺的蛋白 N-联糖基化, $P=0.021$; 肌节组织, $P=0.025$; miRNA 分解代谢过程, $P=0.032$; 缺氧反应的调节, $P=0.032$; RNA 聚合酶 II 启动子的转录, $P=0.041$; 对药物的反应, $P=0.043$ 、15 个 GO_CC (轴突细胞质, $P=0.003$; 细胞间桥, $P=0.005$; 细胞膜, $P=0.007$; 细胞核, $P=0.007$; 细胞质, $P=0.008$; 整联蛋白复合物, $P=0.011$; 胞质, $P=0.013$; 核质, $P=0.018$; Hrd1p 泛素连接酶 ERAD-L 复合物, $P=0.023$; 溶酶体膜, $P=$

0.029; 核包膜, $P=0.029$; 内质网, $P=0.029$; 反高尔基网络, $P=0.034$; 细胞内膜结合细胞器, $P=0.046$; 内质网质量控制室, $P=0.046$ 、3 个 GO_MF (转录激活子活性, RNA 聚合酶 II 转录调控区序列特异性结合, $P=0.011$; 蛋白质结合, $P=0.022$; 转录激活子活性, RNA 聚合酶 II 核心启动子近端区域序列特异性结合, $P=0.049$)。本研究归纳了这些明显差异的 KEGG 通路和 GO_BP、GO_CC、GO_MF 注释条目 (表 4)。

表 4 显著差异表达 miRNAs 潜在靶基因的 DAVID 功能注释列表

注释条目	基因功能	P 值	基因名称 (数目)
KEGG	MAPK 信号通路	0.020	FGFR2、MKNK2、TRAF6、SRF、DUSP7、DUSP6、MAP3K11 (7)
GO_BP	肌肉细胞稳态	0.003	HIF1A、CFL2、PFKM、SRF (4)
	血管生成	0.004	FGFR2、TSPAN12、HIF1A、TBX4、PDE3B、ANPEP、MYH9 (7)
	细胞死亡的正向调节	0.009	EEF1A1、ACER2、TXNRD1、DUSP6 (4)
	RNA 聚合酶 II 启动子对 pri-miRNA 转录的正向调节	0.010	HIF1A、SRF、STAT3 (3)
	骨化的负向调节	0.013	HIF1A、SMURF1、LRP4 (3)
	磷脂转运	0.014	TRIAP1、PCTP、SCARB1 (3)
	通过天冬酰胺的蛋白 N-联糖基化	0.021	ST6GALNAC6、ST6GAL1、SYVN1 (3)
	肌节组织	0.025	CFL2、FHOD3、SRF (3)
	miRNA 分解代谢过程	0.032	DIS3L2、LIN28A (2)
	缺氧反应的调节	0.032	AJUBA、HIF1A (2)
	RNA 聚合酶 II 启动子的转录	0.041	ESRRA、HIF1A、ETS1、TAF9B、NFAT5、ARID3B、SRF、STAT3 (8)
	对药物的反应	0.043	EEF1A1、HIF1A、RECQL5、ACER2 (4)
GO_CC	轴突细胞质	0.003	DYNC1L2、HIF1A、AP3D1、PAFAH1B1 (4)
	细胞间桥	0.005	KMT2E、ESRRA、EAF1、RFXANK (4)
	细胞膜	0.007	MEGF8、DYNC1L2、SYVN1、MAN1B1、PDE3B、ALG6、DAAM1、CBFB、MLF2、ELOVL1、MIP... (27)
	细胞核	0.007	CDK19、CYP24A1、IL16、BAP1、CBX7、RFXANK、CBFB、BLZF1、RAPGEF5、CASP2、CCNJ... (53)
	细胞质	0.008	IL16、BAP1、VPS37B、PTPN21、ANPEP、RFXANK、CBX7、ST6GALNAC6、CASP2、LOXL1、NIPAL4... (56)
	整联蛋白复合物	0.011	ITGA8、ITGA7、MYH9 (3)
	胞质	0.013	CDK19、EEF1A1、TAZ、PCTP、DPYSL2、PFKM、MYH9、ELAVL4、STAT3、AJUBA、OAZ2... (22)
	核质	0.018	FGFR2、KMT2E、CYP24A1、RAD23B、SYVN1、MKNK2、BAP1、ARID3B、MYT1、SFMBT1、RFXANK... (23)
	Hrd1p 泛素连接酶 ERAD-L 复合物	0.023	SYVN1、SEL1L (2)
	溶酶体膜	0.029	DRAM2、AP3D1、SCARB1、NEU1、ANPEP、M6PR (6)
	核包膜	0.029	NRM、IST1、LRRRC59、PAFAH1B1、ELAVL4 (5)
	内质网	0.029	ST6GAL1、SYVN1、MAN1B1、PDE3B、TMED9、NECAB3、MIP、ELOVL1、ITGA8、LRRRC59、ZDHHC9... (13)
	反高尔基网络	0.034	BSN、GGA2、M6PR、GCNT1、TJAPI (5)
	细胞内膜结合细胞器	0.046	KMT2E、MIP、FGFR2、EVA1A、DRAM2、RABEP2、EAF1、SCARB1、NEU1、NOVA1、SLC7A11 (11)
	内质网质量控制室	0.046	SYVN1、MAN1B1 (2)
GO_MF	转录激活子活性, RNA 聚合酶 II 转录调控区序列特异性结合	0.011	HIF1A、ARID3B、MYT1、SRF、STAT3 (5)
	蛋白质结合	0.022	TLE3、BSN、DPYSL2、MYH9、ELAVL4、TMED9、SRF、STAT3、SLC4A10、BLZF1、HIF1A、BTG1... (21)
	转录激活子活性, RNA 聚合酶 II 核心启动子近端区域序列特异性结合	0.049	ESRRA、HIF1A、NFAT5、ARID3B、SRF、STAT3 (6)

3 讨论

肠黏膜上皮由单层柱状上皮细胞组成,分为隐窝和绒毛两部分,具有吸收营养物质、物理屏障、调节免疫系统等多种生物学功能^[6]。肠道上皮细胞作为哺乳动物中自我更新最快的细胞,在维持正常肠道功能中发挥重要作用^[7]。肠黏膜屏障由肠道上皮细胞、表面黏液、正常菌群及免疫系统等组成,并可分为四大屏障功能,即生物屏障、机械屏障、免疫屏障和化学屏障^[8]。生理状态下,肠道凭借其特有的屏障功能可以阻止肠内有害物质移位至其他部位,但在各种因素应激等病理状态下,肠黏膜的结构和功能可能受到不同程度损伤,严重者可导致肠内细菌和内毒素移位,最终造成全身炎症反应和多器官功能障碍。研究表明,TNF- α 、白细胞介素、核转录因子和 TLR 等各类细胞因子、炎症介质、氧自由基和内毒素,均与肠黏膜屏障损伤机制有关^[9],其中 TNF- α 是由单核-巨噬细胞分泌的生物活性因子。研究发现,TNF- α 可直接杀伤肿瘤细胞,诱导肠上皮细胞间紧密连接蛋白分解和功能改变,并最终导致肠上皮通透性增加是造成肠黏膜损伤的机制之一^[10-11]。

IEC-6 细胞株自 Quaroni A 等^[12]从大鼠小肠隐窝细胞分离并经体外培养传代建立以来,被国内外学者广泛应用于小肠黏膜损伤修复的各种机制研究^[2]。外泌体几乎存在于所有体液(血液、唾液、尿液、细胞上清液等)中,呈类圆形或圆形,是由双层脂质膜包裹的一种细胞外微小囊泡,其内富含蛋白质(四跨膜蛋白家族 CD63、热休克蛋白 HSP70 等)、脂质(胆固醇、神经酰胺等)、核酸(mRNA、miRNA、LncRNA 等)等多种生物信号分子,这些内容物均可参与细胞间通讯并发挥重要功能^[13]。MiRNA 是一种长度为 17~24 个核苷酸的非编码微小 RNA,可与靶标 mRNA 的 3'-非翻译区或开放阅读框以不完全互补结合的方式调控转录后基因表达。外泌体内的 miRNA 除此经典作用外,还具备激活免疫细胞配体的能力。细胞分泌的外泌体 miRNA 可随其他介质一起进入循环以达到邻近及远处细胞,被安全递送至靶细胞后发挥功能性作用^[5]。因此,本研究认为 TNF- α 刺激的 IEC-6 细胞来源外泌体内的 miRNAs 可能在小肠黏膜损伤相关疾病的发生发展过程中有重要调控作用。

以终浓度为 50 ng/mL TNF- α 处理 IEC-6 细胞 4 h,分别收集 TNF- α 处理组和对照组的上清,使用试剂盒结合超速离心提取其外泌体,并分离外泌体 RNA 后进行高通量测序。测序结果显示,与对照组比较,TNF- α 处理组的外泌体中 miR-351-5p、miR-125a-5p、miR-125b-5p、miR-20a-5p、miR-542-3p、miR-30c-5p 等 6 个 miRNAs 均明显下调,2 组外泌体 miRNAs 表达谱差异明显。研究发现,miR-351-5p 通过靶向 MAPK13 和 sirtuin-6 促进肠黏膜氧化应激、炎症和细胞凋亡而加重肠缺血再灌注损伤,甚至可致组织坏死和全身性炎症反应^[14]。薯蓣皂素通过抑制 miR-351-5p/MAPK13 介导的炎症和细胞凋亡对缺血再灌注损伤起保护作用^[15]。本研究团队推测,外泌体 miR-351-5p 在 TNF- α 诱导的小肠黏膜损伤修复机制中起着不可忽视的作用。miR-125a-5p、miR-125b-5p 和 miR-542-3p 被认为是多种恶性肿瘤抑癌基因 miRNAs,并可调控癌细胞的迁移、增殖和侵袭等过程^[16-20]。由此推测 IEC-6 来源外泌体中 miR-125a-5p、miR-125b-5p 和 miR-542-3p 可能在 IEC-6 肠上皮细胞的增殖、迁移过程中发挥作用,进而探究其参与肠黏膜损伤的可能机制。MiR-30c-5p 除了作为一种抑癌 miRNA 外,还能抑制诱导型一氧化氮合酶、TNF- α 等促炎因子表达,因而降低肾脏缺血再灌注^[21]。由此推测外泌体中 miR-30c-5p 调节炎症因子而在肠黏膜损伤疾病中发挥作用。miR-20a-5p 被认为是一种致癌因子,在多种癌症的组织或细胞中高表达,可以靶向 mRNA 调控癌细胞的生长、凋亡、迁移和侵袭^[22-24]。此外,研究表明它能减轻内皮细胞损伤和抑制肾小管上皮细胞增殖^[25-26]。本研究团队推测外泌体 miR-20a-5p 可能在调节小肠上皮细胞增殖、迁移和分化方面发挥作用。

通过 DAVID 网站将 6 个显著差异 miRNAs 的 158 个潜在靶基因进行功能注释,从而对外泌体 miRNA 及其靶基因在肠黏膜损伤相关疾病机制中所起的作用做进一步探究。KEGG 通路分析结果表明,6 个显著差异 miRNAs 可能主要通过调控其潜在靶基因,从而参与 MAPK 信号通路的调节。GO 分析结果显示,这些潜在靶基因共同调节的生物学过程主要包括肌肉细胞稳态、血管生成、细胞死亡的正向调节、RNA 聚合酶 II 启动子对 pri-miRNA 转录的正向调节、骨化的负向调节、磷脂转运、通过天冬酰胺的蛋白 N-联糖基化、肌节组织、miRNA 分解代

谢过程、缺氧反应的调节、RNA 聚合酶 II 启动子的转录和对药物的反应等,细胞组分主要包含轴突细胞质、细胞间桥、细胞膜、细胞核、细胞质、整合蛋白复合物、胞质、核质、Hrd1p 泛素连接酶 ERAD-L 复合物、溶酶体膜、核包膜、内质网、反高尔基网络等,分子功能主要涉及转录激活子活性, RNA 聚合酶 II 转录调控区序列特异性结合、蛋白质结合等。

细胞间通讯在小肠黏膜损伤疾病发生发展中发挥重要作用。本研究在小肠黏膜损伤研究领域提出外泌体中的 miRNA 可能作为细胞间通讯的媒介。研究表明,经 TNF- α 刺激的小肠上皮细胞上清中的外泌体包含丰富的 miRNAs,且其表达谱差异明显,通过预测其潜在靶基因及其涉及的相关信号通路、生物学过程、细胞组分和分子功能等,对 TNF- α 处理的 IEC-6 肠上皮细胞分泌外泌体有了更深入的认识,为进一步探索肠黏膜损伤相关分子机制提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism[J]. J Nutr, 1998, 128(8):1249-1252.
- [2] 张子理. 益气健脾中药小肠隐窝干细胞分子药理研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2002.
- [3] 邹立军,熊 霞,王小城,等. 肠道隐窝-绒毛轴上皮细胞更新及调控机制研究进展[J]. 中国科学:生命科学, 2017, 47(2):190-200.
- [4] 王国丽. 肿瘤坏死因子- α 对肠上皮细胞通透性的影响及机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2010.
- [5] Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function[J]. Genom Proteom Bioinf, 2015, 13(1):17-24.
- [6] Kozuka K, He Y, Koo-McCoy S, et al. Development and characterization of a human and mouse intestinal epithelial cell monolayer platform[J]. Stem Cell Rep, 2017, 9(6):1976-1990.
- [7] 郝从芳,谢亚栋,马世鑫,等. 锌指蛋白 CXXC5 通过调节肠上皮细胞的增殖修复以控制肠炎的发生[J]. 免疫学杂志, 2018, 34(8):674-682.
- [8] 陈贤玉,王昆华. 肠黏膜生物屏障的研究现状和进展[J]. 结直肠肛门外科, 2012, 18(4):268-272.
- [9] 徐 胜,黄顺荣. 肠黏膜屏障损伤与保护分子机制研究进展[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2018, 7(3):276-280.
- [10] 冯馨锐,崔雨舒,何志涛,等. 肿瘤坏死因子- α 的生物学功能研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2019, 40(1):66-68.
- [11] 宋红丽. 肿瘤坏死因子- α 在暴发性肝衰竭时引起肠黏膜损伤机制的研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2005.
- [12] Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, et al. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria[J]. J Cell Biol, 1979, 80(2):248-265.
- [13] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication[J]. J Proteomics, 2010, 73(10):1907-1920.
- [14] Hu YP, Tao XF, Han X, et al. MicroRNA-351-5p aggravates intestinal ischemia/reperfusion injury via targeting MAPK13 and Sirtuin-6[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(17):3594-3609.
- [15] Zheng L, Han X, Hu Y, et al. Dioscin ameliorates intestinal ischemia/reperfusion injury via adjusting miR-351-5p/MAPK13-mediated inflammation and apoptosis[J]. Pharmacol Res, 2019, 139(1):431-439.
- [16] Vo DT, Karanam NK, Ding L, et al. MiR-125a-5p functions as tumor suppressor microRNA and is a marker of locoregional recurrence and poor prognosis in head and neck cancer[J]. Neoplasia, 2019, 21(9):849-862.
- [17] Tang L, Zhou L, Wu S, et al. MiR-125a-5p inhibits colorectal cancer cell epithelial-mesenchymal transition, invasion and migration by targeting TAZ[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12(5):3481-3489.
- [18] Li YZ, Wang YX, Fan HZ, et al. MiR-125b-5p inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting KIAA1522[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 504(1):277-282.
- [19] Hua S, Quan Y, Zhan M, et al. MiR-125b-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma via targeting TXNRD1[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19(1):203-213.
- [20] Li J, Shao W, Feng H. MiR-542-3p, a microRNA targeting CDK14, suppresses cell proliferation, invasiveness, and tumorigenesis of epithelial ovarian cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 110(1):850-856.
- [21] Zhang C, Yu S, Zheng B, et al. MiR-30c-5p reduces renal ischemia-reperfusion involving macrophage[J]. Med Sci Monit, 2019, 25(6):4362-4369.
- [22] Guo L, Zhu Y, Li L, et al. Breast cancer cell-derived exosomal miR-20a-5p promotes the proliferation and differentiation of osteoclasts by targeting SRCIN1[J]. Cancer Med, 2019, 8(12):5687-5701.
- [23] Cheng D, Zhao S, Tang H, et al. MicroRNA-20a-5p promotes colorectal cancer invasion and metastasis by downregulating Smad4[J]. Oncotarget, 2016, 7(29):45199-45213.
- [24] 李海龙,宋耀辉,陈兆峰,等. MiR-20a-5p/miR-20b-5p 在胃癌细胞和组织中的表达及调控靶基因信号通路富集分析[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(11):822-827.
- [25] 王晓景,张明星,陈小亮. MiR-20a-5p 通过靶向 MRTFA 缓解 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(9):743-750.
- [26] 公方晓,孙仁华,徐云祥,等. MiR-20a-5p 通过调控细胞周期蛋白 D1 抑制肾小管上皮细胞增殖[J]. 中国现代医生, 2016, 54(20):1-5.

(责任编辑:唐秋姗)