

亚精胺抑制外泌体 miRNA-451-5p 的机制研究

杨明¹ 刘晓峰² 范文娟¹ 明芳¹ 程波¹ 谌赞¹ 刘敏^{1*}

1. 江汉大学附属医院 湖北 武汉 430014

2. 汉口医院 湖北 武汉 430014

摘要: 亚精胺 (Spermidine) 作为一种内源性多胺, 在多种生理和病理过程中发挥重要作用, 尤其在调控细胞增殖、凋亡及衰老方面具有显著功能。近年来, 外泌体中 miRNA 在细胞间通信中的作用日益受到关注。miRNA-451-5p 是一种与炎症反应、肿瘤发生及细胞代谢密切相关的小分子 RNA。本研究旨在探讨亚精胺通过调控外泌体 miRNA-451-5p 表达的分子机制。通过采用 qRT-PCR、Western blot 及纳米颗粒跟踪分析等手段, 发现亚精胺处理后细胞外泌体中 miRNA-451-5p 表达水平显著下降, 伴随炎症相关信号通路活性减弱。进一步机制研究表明, 亚精胺可能通过调节 miRNA 加工酶 Dicer 或影响外泌体分泌通路实现该效应。本研究揭示了亚精胺调控外泌体 miRNA 的新机制, 为在炎症性疾病或癌症治疗中的应用提供了理论依据。

关键词: 外泌体; miRNA-451-5p

1 亚精胺抑制外泌体 miRNA-451-5p 相关概念

1.1 miRNA-451-5p 的功能与疾病相关性

miRNA-451-5p 是一种保守性较高的微小 RNA (microRNA), 广泛表达于多种哺乳动物组织中, 尤其在红细胞、肝脏、心脏及肿瘤组织中表现活跃。miRNA-451-5p 可通过与其 3' UTR 非翻译区 (3' UTR) 相结合, 调控细胞增殖、凋亡、迁移和分化等多种生物学功能。miRNA-451-5p 参与了许多重大疾病的发病过程。在肿瘤研究中, miRNA-451-5p 作为一个负调控分子, 在多种恶性肿瘤中发挥着重要的作用, 如: 胃癌、肺癌、黑色素瘤等, 其表达水平显著下调, 可以抑制肿瘤细胞的生长与浸润。此外, 在一些其它肿瘤 (例如: 胰腺癌等) 中, miRNA-451-5p 可以通过多个靶向基因的调节来发挥促癌效应。

1.2 亚精胺的生物活性与研究进展

亚精胺 (Spermidine) 是一种广泛分布于各种动物体内的多胺物质, 广泛分布于人体组织、食品 (如大豆、奶酪和全谷类) 中。其名称源于最初在精液中被发现。亚精胺在维持 DNA 稳定性, RNA 合成, 蛋白翻译, 细胞增殖和细胞凋亡等方面发挥着非常关键的作用。近年来, 亚精胺因其在延缓衰老、促进自噬、防治代谢性疾病等方面的潜力而受到广泛关注。

亚精胺作为一种新型的抗老化药物, 在延缓细胞老化方面发挥着重要作用。已有研究表明, 亚精胺可通过活化自噬通路, 消除损伤的蛋白及线粒体, 达到保护

机体正常功能, 延缓衰老的作用。物实验证明, 补充亚精胺可显著延长小鼠、果蝇和线虫等模型生物的生命, 并改善与年龄相关的心脏功能下降。此外, 亚精胺还表现出良好的抗炎作用, 可通过抑制 NF- κ B 信号通路减轻慢性低度炎症, 间接对抗衰老引发的系统性疾病。

2 材料与方法

2.1 细胞培养与处理

本研究选用人类肝癌细胞系 HepG2 和非小细胞肺癌细胞系 A549 进行实验。在 37°C, 5%CO₂ 浓度下, 在含有 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素的 DMEM 全培养液中进行了传代实验。处理组加入不同浓度的亚精胺 (0、10、50、100 μ M), 分别孵育 24、48、72 小时, 考察其对细胞增殖的影响。为避免外来外泌体干扰, 本研究采用高速离心法去除外泌体的 FBS 作为介质。用 CCK-8 方法测定了细胞活性, 并剔除了有毒物质, 以保证随后试验的生物关联性。

2.2 外泌体的分离及特性研究

收集细胞培养上清液, 采用超速离心法提取外泌体。具体步骤包括 300 \times g 离心去除细胞残骸, 2000 \times g 去除大颗粒物, 10,000 \times g 去除微囊泡, 最后通过 100,000 \times g 离心 2 小时沉淀外泌体。用 PBS 将沉积物重新悬浮, 然后通过透射电镜 (TEM) 观测, 显示典型的杯状结构; 纳米粒度分析 (NTA) 显示外泌体平均粒径为 100nm 左右; Western blot 检测外泌体标志蛋白 CD63、TSG101 和 Alix 阳性, Calnexin 阴性, 验证其纯

度和特异性。

2.3 miRNA 检测技术 (qRT-PCR)

外泌体 RNA 提取使用 miRNeasyMicroKit, RNA 浓度和纯度通过 Nanodrop2000 检测。cDNA 合成采用 miRNA 特异性反转录引物, 利用 TaqManmiRNAAssay 进行 qRT-PCR, U6 小核 RNA 作为内参。研究发现, 在亚精胺孵育 48h 后, miRNA-451-5p 的表达水平明显降低, 且在 50 μ M 条件下下调了 60% ($P < 0.01$)。

2.4 蛋白表达分析 (Westernblot)

采用 RIPA 酶切后, 以 BCA 为对照, 采用 SDS-PAGE、TSG101、Rab27a、Alix 等单抗与 Dicer, CD63, TSG101, Rab27a, Alix 等) 共孵育, HRP 标记二抗显色。结果表明, 亚精胺处理组 Dicer 表达降低 30%, 外泌体分泌相关蛋白 Rab27a 及 Alix 表达同步下降, 提示其可能影响 miRNA 加工及外泌体释放过程。

2.5 数据统计与分析方法

所有实验均重复至少三次, 数据以均值 \pm 标准差表示。统计分析采用 GraphPadPrism9 软件进行, 以多变量变异数进行组间对比, 以 $P < 0.05$ 为检验指标。利用 Pearson 相关性进行相关性研究, 并对 miRNA 与蛋白质水平的相关性进行验证。同时, 通过 GO 和 KEGG 途径的差异表达, 结合 miRNA 的下游靶标, 解析其调控的分子机制。

3 结果

3.1 亚精胺对 miRNA-451-5p 表达的影响

qRT-PCR 结果显示, 亚精胺处理可显著下调 miRNA-451-5p 在外泌体中的表达, 与对照组相比, 50 μ M 亚精胺处理 48 小时后, miRNA-451-5p 表达下降约 58.3% ($P < 0.01$), 且呈现剂量依赖性趋势。时间梯度实验进一步证实, 24 小时后表达开始下降, 48 小时达到谷值, 72 小时后趋于稳定。该结果提示亚精胺可能通过影响 miRNA 加工或外泌体选择性装载机制抑制 miRNA-451-5p 的表达与转运。

3.2 外泌体特征变化的观察

TEM 观察显示, 亚精胺处理并未改变外泌体的典型形态, 但 NTA 分析发现其粒径分布略有变化, 平均粒径由对照组的 103.4 \pm 4.2nm 增至 108.7 \pm 3.9nm ($P < 0.05$)。进一步研究发现, 高剂量的亚精胺干预后,

外泌体中 CD63、TSG101 的含量明显降低 (12%, $P < 0.05$), Westernblot 检测 CD63 和 TSG101 表达亦有所下降, 提示亚精胺可能在一定程度上抑制外泌体的生成或释放。

3.3 信号传导途径初探

通过对 miRNA-451-5p 靶基因的 KEGG 富集分析发现, 其主要参与 AMPK、PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路的调控。进一步检测上述通路关键蛋白表达, 亚精胺干预后, 心肌细胞中 p-AMPK 上调, p-AKT 及 p-ERK1/2 均显著下降, 推测其通过活化自噬途径, 进而调控细胞的增殖, 进而调控 miRNAs 的表达及功能。本研究将为揭示亚精胺对 miRNA 的作用机理奠定基础。

3.4 Dicer 及外泌体分泌相关蛋白的表达变化

Westernblot 发现, 在 50 μ M 作用 48h 后, Dicer 的表达明显降低 ($P < 0.01$), 提示 miRNA 的前体剪切存在明显的抑制作用。同时, Rab27a 和 Alix 表达亦呈现显著下调 (分别下降约 25% 和 30%, $P < 0.05$), 提示亚精胺可能通过干预外泌体分泌通路影响 miRNA 的胞外运输。这一发现揭示了亚精胺对 miRNA 表达调控的多层次作用机制。

4 论述

4.1 结果的生物学意义

本研究首次揭示亚精胺可通过降低 Dicer 表达和影响外泌体分泌通路, 从而下调 miRNA-451-5p 在外泌体中的表达。该研究既有重要的生物科学价值, 又可为阐明亚精胺的抗癌、延缓老化机理奠定理论基础。鉴于 miRNA-451-5p 参与了许多重大疾病的发生发展, 其表达水平的改变会对细胞命运选择、信号传导通路以及细胞之间的交流等产生重大的影响, 提示其对许多疾病的发生发展有着潜在的干预功能。

4.2 可能的调控机制分析

综合实验结果推测, 亚精胺通过多个机制协同下调 miRNA-451-5p。首先, 它对 Dicer 的调控作用会对 miRNA 的成熟进程产生影响。其次, 在细胞水平上, 亚精胺可以抑制 Rab27a/Alix 诱导的外泌体的分泌, 从而抑制 miRNA 的分泌。第三, 活化的 AMPK 通路可以负向调控 miRNA 的表达, 从而促进 miRNA 的表达。我们前期研究发现, 上述多种因素综合影响了 miR-451-5p 在细胞和动物模型中的表达, 从而使其在体内和体外均明显

降低。

4.3 与前人研究的比较

既往研究表明，亚精胺可以通过调节细胞自噬来延缓衰老和改善代谢平衡，但其在 miRNAs 中的作用尚不清楚。该项目的完成将揭示 miR-451-5p 和外泌体的作用机制，丰富了对其生物学功能的认识。我们前期研究表明，miR-451-5p 具有促进癌细胞侵袭转移的功能，而我们前期的实验结果显示，亚精胺抑制 miR-451-5p 的表达，这一现象在一定程度上可以解释 miR-451-5p 的抑癌功能。相对于已有的单途径研究，我们将获得更

为全面的基因表达调控网络。

4.4 研究的局限性及未来展望

但目前该领域的研究还存在一些不足，如只能通过体外的细胞试验加以证实，还缺少大鼠的体内及临床标本的支撑。同时，我们也不清楚亚精胺对 Dicer 的转录和翻译的影响。本项目拟采用 CRISPR/Cas9 基因编辑、RNA pull-down 及 RIP 等方法，阐明该基因的作用机制。本项目将为亚精胺靶向抗肿瘤药物的临床转化提供理论依据。

| 组别 | miRNA-451-5p | Rab27a 表达水平 | Alix 表达水平 | 外泌体粒径 | 备注 |
|-----|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| 实验组 | 32.5 ± 9.26 | 39.6 ± 8.1 | 39.8 ± 9.4 | 108.7 ± 3.9 | 亚精胺通过抑制 miRNA 加工和外泌体分泌调控信号。 |
| 对照组 | 84.8 ± 13.4 | 61.2 ± 12.8 | 69.6 ± 13.6 | 103.4 ± 4.2 | |
| P 值 | P < 0.01 | P < 0.05 | P < 0.05 | P < 0.05 | |

参考文献：

[1] Arginase 1 is a key driver of immune suppression in pancreatic cancer. [J]. Menjivar Rosa Elena; Nwosu Zeribe C; Du Wenting; Donahue Katelyn L; Hong Hanna S; Espinoza Carlos; Brown Kristee; Velez Delgado Ashley; Yan Wei; Lima Fatima; Bischoff Allison; Kadiyala Padma; Salas Escabillas Daniel; Crawford Howard C; Bednar Filip; Carpenter Eileen; Zhang Yaqing; Halbrook Christopher J; Lyssiotis Costas A; Pasca di Magliano Marina. eLife. 2023

[2] Fueling HCC dynamics: interplay between tumor microenvironment and tumor initiating cells. [J]. Huang Hongyang; Tsui YuMan; OiLin Ng Irene. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology. 2023

[3] Hypoxia signaling in hepatocellular carcinoma: Challenges and therapeutic opportunities. [J]. Sin Shant Qinxiang; Mohan Chakrabhavi Dhananjaya; Goh Robby Miguel WenJing; You Mingliang; Nayak Siddaiah Chandra; Chen Lu; Sethi Gautam; Rangappa Kanchugarakoppal Subbegowda; Wang Lingzhi. Cancer metastasis reviews. 2022

[4] One-Carbon and Polyamine Metabolism as Cancer Therapy Targets [J]. Islam Anowarul; Shaukat Zeeshan; Hussain Rashid; Gregory Stephen L. Biomolecules. 2022

[5] Liver tumour immune microenvironment subtypes and neutrophil heterogeneity. [J]. Xue Ruidong; Zhang Qiming; Cao Qi; Kong Ruirui; Xiang Xiao; Liu Hengkang; Feng Mei; Wang Fangyanni; Cheng Jinghui; Li Zhao; Zhan Qimin; Deng Mi; Zhu Jiye; Zhang Zemin; Zhang Ning. Nature. 2022

基金项目：湖北省教育厅 -- 指导项目；项目编号：B2019236

作者简介：

第一作者：杨明
* 通讯作者：刘敏