

基础研究

论著

HGF-MSCs 外泌体通过 miR-221-5p/NLRP1 轴调控自噬对
闭塞性细支气管炎气道上皮细胞 EMT 和炎症的影响

韩冬梅, 丁丽, 郑晓丽, 李晟, 刘静, 闫洪敏, 王恒湘*

空军军医大学空军特色医学中心血液病科, 北京 100142

[中图分类号] R562 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1685.2026.0107

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 韩冬梅, 丁丽, 郑晓丽, 等. HGF-MSCs 外泌体通过 miR-221-5p/NLRP1 轴调控自噬对闭塞性细支气管炎气道上皮细胞 EMT 和炎症的影响[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(4): 586-598.

[收稿日期] 2024-10-26 [录用日期] 2025-08-12 [上线日期] 2026-01-07

[摘要] **目的** 探讨肝细胞生长因子修饰间充质干细胞(HGF-MSCs)的外泌体诱导 miR-221-5p/NLRP1 调控自噬对闭塞性细支气管炎(BO)气道上皮细胞上皮-间充质转化(EMT)和炎症的影响。**方法** 对脐带 MSCs 进行 HGF 过表达后, 分离外泌体(HGF-MSCs-EXO)。通过电子显微镜观察外泌体形态, 粒径分析仪测定粒径分布, Western blotting 检测标志蛋白 CD63 和肿瘤易感基因 101(TSG101)的表达, qRT-PCR 检测 HGF mRNA 的表达, 以验证 HGF-MSCs-EXO 是否构建成功。构建 BO 小鼠模型和脂多糖(LPS)诱导的 TC-1 细胞 BO 体外模型, 并给予 HGF-MSCs-EXO 处理, 采用组织学检查评估气管组织的损伤情况, Western blotting 检测自噬相关蛋白[Beclin1、自噬相关基因 5(ATG5)、p62]和 EMT 标志蛋白[α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、波形蛋白、E-钙黏蛋白(E-cadherin)]的表达, ELISA 法检测炎症因子[白细胞介素(IL)-6、IL-1β、γ 干扰素(IFN-γ)]的浓度, 以探究 HGF-MSCs-EXO 对 BO 的影响。此外, 通过转染 miR-221-5p 抑制剂或激动剂, 以及敲低 NLRP1 等实验, 结合双荧光素酶报告基因实验和 CHIP-qPCR 实验, 明确 miR-221-5p 与 NLRP1 的靶向关系, 以及二者在 HGF-MSCs-EXO 调控 BO 过程中的作用。**结果** 成功构建并鉴定 HGF-MSCs-EXO: 透射电镜下呈杯状或囊状, 直径 30~150 nm, 表达 CD63、TSG101 标志蛋白且 HGF mRNA 呈高表达。体内实验中, 与对照组相比, 模型组小鼠气管损伤严重, 自噬(Beclin1、ATG5 升高, p62 降低)、炎症(IL-6、IL-1β、IFN-γ 升高)及 EMT(E-cadherin 降低, α-SMA、波形蛋白升高)指标呈现异常($P<0.05$), HGF-MSCs-EXO 组上述指标及病理损伤明显改善($P<0.05$)。体外实验中, PKH26 荧光证实细胞可摄取 HGF-MSCs-EXO; 与空白对照组相比, LPS 模型组自噬、炎症、EMT 变化同体内实验一致, 且 miR-221-5p 降低、NLRP1 升高($P<0.05$), 而 HGF-MSCs-EXO 可逆转该变化($P<0.05$)。HGF 修饰可提高 MSCs 及外泌体中 miR-221-5p 的表达, 转染其抑制剂可逆转 HGF-MSCs-EXO 对自噬的抑制($P<0.05$); 体内外给予 miR-221-5p 激动剂可上调其表达, 缓解病理损伤, 抑制自噬、炎症及 EMT($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因及 CHIP-qPCR 实验证实 miR-221-5p 可与 NLRP1 靶向结合; miR-221-5p 模拟物可降低 NLRP1 mRNA 及蛋白表达水平, 抑制剂则升高其表达水平($P<0.05$); 敲低 NLRP1 可模拟 miR-221-5p 的调控效应, 且 miR-221-5p 抑制剂可逆转敲低 NLRP1 的作用($P<0.05$)。体内验证显示, 模型组气管组织 NLRP1 mRNA 及蛋白表达水平明显高于对照组, miR-221-5p 激动剂组明显低于模型组, 而 HGF-MSCs-EXO 组明显高于 miR-221-5p 激动剂组($P<0.05$)。与 HGF-MSCs-EXO+敲低对照组相比, HGF-MSCs-EXO+NLRP1 敲低组气管组织 NLRP1 表达水平降低, 病理损伤改善更显著, 自噬、炎症及 EMT 指标调控效应更强($P<0.05$)。**结论** HGF-MSCs-EXO 可通过递送 miR-221-5p, 靶向抑制 NLRP1 的表达, 进而调控自噬过程, 最终减轻 BO 气道上皮细胞的 EMT 和炎症反应, 为 BO 的治疗提供了新的潜在靶点。

[关键词] 肝细胞生长因子修饰间充质干细胞; 外泌体; 自噬; 闭塞性细支气管炎

Exosomes from HGF-MSCs regulate EMT and inflammation in airway epithelial cells of obliterative bronchiolitis by modulating autophagy via the miR-221-5p/NLRP1 axis

Han Dong-Mei, Ding Li, Zheng Xiao-Li, Li Sheng, Liu Jing, Yan Hong-Min, Wang Heng-Xiang*

Department of Hematology, Air Force Medical Center, Air Force Military Medical University, Beijing 100142, China

[基金项目] 北京市自然科学基金(7232171)

[作者简介] 韩冬梅, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事血液病方面的研究

[通信作者] 王恒湘, E-mail: Junzhang32984@126.com

*Corresponding author, E-mail: Junzhang32984@126.com

This work was supported by the Beijing Natural Science Foundation (7232171)

[Abstract] Objective To investigate the role of exosomes derived from hepatocyte growth factor-overexpressing mesenchymal stem cells (HGF-MSCs, HGF-MSCs-EXO) in regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) and inflammation in airway epithelial cells of obliterative bronchiolitis (OB) by modulating autophagy *via* the miR-221-5p/NLRP1 axis. **Methods** Umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) were transfected to overexpress HGF, and HGF-MSCs-EXO were isolated from the transfected cells. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the morphology of HGF-MSCs-EXO, and nanoparticle tracking analysis (NTA) was performed to assess their particle size distribution. Western blotting was used to detect the expression of exosome marker proteins CD63 and tumor susceptibility gene 101 (TSG101). qRT-PCR was employed to detect the expression of *HGF* mRNA to verify the successful construction of HGF-MSCs-EXO. An *in vivo* OB mouse model and an *in vitro* OB model of TC-1 cells induced by lipopolysaccharide (LPS) were established. HGF-MSCs-EXO were administered to intervene in both models. Histopathological examination was performed to evaluate tracheal tissue damage. Western blotting was used to detect the expression of autophagy-related proteins [such as Beclin1, autophagy-related gene 5 (ATG5), p62], and EMT marker proteins [such as α -smooth muscle actin (α -SMA), Vimentin, and E-cadherin]. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure the concentrations of pro-inflammatory cytokines [interleukin (IL)-6, IL-1 β , and interferon- γ (IFN- γ)]. Additionally, to clarify the regulatory mechanism, miR-221-5p inhibitor or agomir was transfected, and *NLRP1* was knocked down in cells/mice. Dual-luciferase reporter gene assay and chromatin immunoprecipitation-qPCR (CHIP-qPCR) were conducted to confirm the targeting relationship between miR-221-5p and *NLRP1*. **Results** HGF-MSCs-EXO were successfully constructed and identified: TEM showed cup-shaped or vesicular structures, with a diameter range of 30-150 nm, the exosomal marker proteins CD63 and TSG101 were expressed, and *HGF* mRNA was highly expressed in HGF-MSCs-EXO. *In vivo* experiments, compared with control group, model group showed severe tracheal tissue damage, abnormal activation of autophagy (increased Beclin1 and ATG5, decreased p62), enhanced inflammation (elevated IL-6, IL-1 β , IFN- γ), and obvious abnormal EMT (decreased E-cadherin, increased α -SMA and Vimentin) ($P<0.05$). These indicators and pathological damage were significantly improved in the HGF-MSCs-EXO group ($P<0.05$). *In vitro* experiments, PKH26 fluorescence confirmed that TC-1 cells could internalize HGF-MSCs-EXO. Consistent with *in vivo* results, the LPS-induced model group exhibited abnormal autophagy, inflammation, and EMT, accompanied by downregulated miR-221-5p and upregulated *NLRP1* ($P<0.05$), which were reversed by HGF-MSCs-EXO treatment ($P<0.05$). HGF modification significantly increased the expression of miR-221-5p in MSCs and their exosomes, while transfection of miR-221-5p inhibitor abrogated the autophagy-inhibitory effect of HGF-MSCs-EXO ($P<0.05$). Administration of miR-221-5p agomir *in vivo* and *in vitro* upregulated miR-221-5p expression, remarkably alleviated pathological damage, and inhibited autophagy, inflammation, and EMT ($P<0.05$). Dual-luciferase reporter gene assay and CHIP-qPCR confirmed that miR-221-5p directly targeted *NLRP1*. miR-221-5p mimics decreased *NLRP1* mRNA and protein expression, while miR-221-5p inhibitor increased them ($P<0.05$). *NLRP1* knockdown mimicked the regulatory effect of miR-221-5p, and this effect was reversed by miR-221-5p inhibitor ($P<0.05$). *In vivo* verification showed that *NLRP1* mRNA and protein expression in tracheal tissues of the model group was significantly higher than that of the control group, lower in the miR-221-5p agomir group than in the model group, and higher in the HGF-MSCs-EXO group than in the miR-221-5p agomir group ($P<0.05$). Furthermore, compared with the HGF-MSCs-EXO+negative control knockdown group, the HGF-MSCs-EXO+NLRP1 knockdown group showed lower *NLRP1* expression, more significant improvement in pathological damage, and stronger regulatory effects on autophagy, inflammation, and EMT indicators ($P<0.05$). **Conclusion** HGF-MSCs-EXO can target and inhibit *NLRP1* expression by delivering miR-221-5p, thereby modulating autophagy and ultimately alleviating EMT and inflammatory responses in airway epithelial cells of OB. This provides a novel potential target for OB.

[Key words] hepatocyte growth factor-overexpressing mesenchymal stem cells; exosomes; autophagy; bronchiolitis obliterans

闭塞性细支气管炎(bronchiolitis obliterans, BO)是肺移植的常见并发症^[1],也是导致进行性呼吸困难及气流受阻的小气道疾病。BO具有临床表现不典型、发病机制不明确、诊断方法不敏感、治疗效果不确定等特点,导致患者预后差、病死率高^[2]。目前,全身性皮质类固醇依然是BO的支柱性治疗方案,然而,由于其存在不良反应,故不适宜长期应用^[3]。早期治疗可阻断疾病进展,然而由于支气管发生不可逆的纤维化改变和气道阻塞,BO晚期的治

疗效果不佳^[4]。因此,深入探讨BO的发生机制并找到有效的干预措施具有重要意义。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多能细胞,具有优异的自我更新和免疫调节特性^[5-6]。MSCs广泛应用于一系列临床前研究,已在多个领域显示出应用前景,如组织再生、免疫调节、抗炎特性和伤口愈合等^[7-8]。Keller等^[9]发现,静脉输注同种异体MSCs治疗BO具有可行性、耐受性和安全性,并证实BO患者中输注MSCs是可行的、安全的,且耐

受性良好。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是包括MSCs在内的多种细胞类型分泌的生长因子^[10]。MSCs可通过升高HGF水平和降低转化生长因子(TGF)- β_1 水平来阻止上皮-间质转化(EMT)进展,其中HGF是MSCs抗纤维化的关键因素之一^[11]。HGF基因修饰的MSCs可减轻BO模型气管的局部炎症,通过下调调节性T细胞(Treg)、辅助性T细胞(Th)1、Th2和Th17,降低炎症细胞因子如干扰素 γ (IFN- γ)的表达和分泌,增加抗炎细胞因子如白细胞介素(IL)-4和IL-10的表达,降低促纤维化因子TGF- β 的表达来促进移植气管组织病理学的恢复^[12]。MSCs释放的外泌体被认为是旁分泌效应的执行者^[13-15]。外泌体治疗具有无免疫原性、易于储存等特性,同时该治疗可装载其他药物以提高其作为给药系统的效率,还可以作为即用型药物应用^[16-17]。因此,开发治疗BO的外泌体疗法具有重要意义。

MSCs衍生外泌体的再生功能取决于其携带的蛋白质、脂质、DNA、RNA和miRNA^[14,18]。而miRNA的异常表达可能在炎症性肺病的发生中发挥重要作用。Duecker等^[19]在感染性BO中发现多种异常的miRNA,它们参与炎症和纤维化过程,并证实这些miRNA在炎症过程中具有调节作用。研究发现,miR-221-5p在急性肺损伤^[20]及哮喘患者肺组织中^[21]呈现差异性表达,然而其在BO中的作用机制尚不清楚。NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白(NLRP)是NLR家族的成员,包含14种蛋白,可促进炎症发生和组织重塑过程^[22-23]。NLRP1作为主要的炎症小体,与慢性阻塞性肺疾病患者的肺功能相关^[24],被确定为屏障细胞(包括支气管上皮细胞)中潜在的主要炎症小体^[25]。然而,NLRP1在BO中的作用鲜少报道。本研究拟在BO小鼠中探讨经HGF修饰的MSCs衍生外泌体(HGF-MSCs-EXO)对移植气管的治疗作用及其作用机制,分析HGF-MSCs-EXO、miR-221-5p、NLRP1三者BO中的调控关系,以期BO的治疗提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 HGF修饰的MSCs培养和外泌体纯化 人脐带MSCs购自美国模式培养物集存库(ATCC),并在 α 修饰的Eagle培养基(MEM:武汉Life Technologies公司)中生长。所有培养基均补充10%胎牛血清(FBS:武汉Life Technologies公司)和1%链霉素-青霉素双抗,然后将细胞维持在含5%CO₂、37℃的湿润培养箱中。利用pcDNA3.1载体(美国Thermo Fisher Scientific公司)构建HGF过表达载体(pc-HGF)。以空载体pcDNA3.1作为对照(pc-NC)。将人脐带MSCs接种在6孔板(3×10⁵个细胞/ml)中,并在37℃、5%

CO₂下培养24 h。然后,使用Lipofectamine[®] 3000(美国Invitrogen公司)转染细胞,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测转染效率。

将转染成功的MSCs在Dulbecco的改良MEM(美国Gibco公司)中培养,培养基中含有10%不含外泌体的FBS,当融合至90%时,将细胞洗净,用PBS重悬,收集上清培养基进行外泌体纯化。分别在200×g、2000×g和15 000×g下顺序离心10、20、30 min,去除死细胞、细胞碎片和大囊泡后,上清液在100 000×g下离心80 min。用PBS一次性洗涤后收集颗粒,获得外泌体。

HGF-MSCs-EXO的鉴定:(1)使用透射电子显微镜(HT7700, 80 kV, 日本Hitachi公司)观察HGF-MSCs-EXO的形态并拍摄图像;(2)使用Nanosight LM10(中国Malvern PANalytical公司)纳米粒子跟踪分析仪(NTA)检测HGF-MSCs-EXO的粒径,并使用纳米粒子跟踪分析2.3软件(中国Malvern PANalytical公司)对数据进行分析;(3)采用Western blotting检测HGF-MSCs-EXO表面标志物CD63和肿瘤易感基因101(TSG101)的表达;(4)采用qRT-PCR检测HGF-MSCs-EXO中HGF mRNA的表达。

1.2 实验动物 42只雌性C57BL/6小鼠和50只雌性BALB/c小鼠(6~8周龄,18~20 g)购自上海杰克森实验室,并在室温22~25℃和12 h/12 h光/暗循环的SPF级设施中饲养和护理,整个实验过程中,所有小鼠均可自由饮水和食用标准饲料。所有动物实验均按照《实验动物护理原则》(美国国立卫生研究院)和空军特色医学中心研究所委员会批准的实验动物护理和使用指南进行。本研究获空军特色医学中心伦理委员会批准[空特(科研)第2025-S3-PJ01]。

1.3 BO小鼠模型构建及分组 BALB/c和C57BL/6小鼠分别作为供体和受体。将供体BALB/c小鼠用乙醚麻醉后,于颈前正中线切开皮肤,分离皮下组织和颈前肌群,充分暴露气管,离断气管取出置于4℃生理盐水中备用;将受体C57BL/6雌性小鼠用乙醚麻醉后,后颈部切开皮肤,稍许游离皮下组织,将供体气管置于受体的皮下,丝线固定移植气管,缝合皮肤。移植后7 d,除对照组外,其余各组小鼠均按首次处理方式再次接受相同剂量对应的注射。移植后28 d,经过CO₂窒息法处死小鼠,经尾静脉抽取外周血,离心分离血清,保存于-80℃用于ELISA检测。取移植气管组织,一部分采用4%多聚甲醛溶液固定用于HE染色,另一部分保存于-80℃,用于其他检测。将C57BL/6小鼠分为:(1)对照组、模型组及HGF-MSCs-EXO组,每组6只。对照组仅在受体C57BL/6小鼠体内进行相同的手术,而不进行气管移植。气管植入4 h后,模型组小鼠注

射等量的 PBS; HGF-MSCs-EXO 组注射 100 μ g HGF-MSCs-EXO。采用 ELISA 法检测 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平; HE 染色观察组织病理学改变; Western blotting 检测自噬相关蛋白(Beclin1、ATG5、p62)及 EMT 标志物(α -SMA、波形蛋白、E-cadherin)的表达水平。(2)激动剂对照组及 miR-221-5p 激动剂组, 每组 6 只。气管植入 4 h 后, 激动剂对照组尾静脉注射 20 μ l NC agomir(8 μ mol/L); miR-221-5p 激动剂组尾静脉注射 20 μ l miR-221-5p agomir(8 μ mol/L)。采用 qRT-PCR 检测 miR-221-5p 表达水平; HE 染色观察组织病理学改变; Western blotting 检测自噬相关蛋白(Beclin1、ATG5、p62)及 EMT 标志物(α -SMA、波形蛋白、E-cadherin)的表达水平; ELISA 法检测血清 IFN- γ 、IL-6、IL-1 β 浓度。(3)HGF-MSCs-EXO+敲低对照组及 HGF-MSCs-EXO+敲低 NLRP1 组, 每组 6 只。气管植入 4 h 后, HGF-MSCs-EXO+敲低对照组注射 100 μ g HGF-MSCs-EXO 及对照慢病毒 sh-NC(5×10^7 个病毒基因组颗粒/只小鼠); HGF-MSCs-EXO+敲低 NLRP1 组注射 100 μ g HGF-MSCs-EXO 及 NLRP1 敲低慢病毒 sh-NLRP1(5×10^7 个病毒基因组颗粒/只小鼠)。采用 qRT-PCR 检测 NLRP1 mRNA 表达水平, Western blotting 检测 NLRP1 蛋白表达水平; HE 染色观察组织病理学改变; Western blotting 检测自噬相关蛋白(Beclin1、ATG5、p62)及 EMT 标志物(α -SMA、波形蛋白、E-cadherin)的表达水平; ELISA 法检测血清 IFN- γ 、IL-6、IL-1 β 浓度。miR-221-5p agomir、sh-NLRP1 及相应对照购自上海 Genepharma 公司。

1.4 细胞培养 小鼠气道上皮细胞 TC-1 系购自 ATCC。将细胞系在含 10% FBS(美国 Thermo Fisher 公司)和 100 μ l/ml 青霉素-链霉素(上海碧云天生物技术股份有限公司)的 DMEM(美国 Thermo-Life 公司)中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 下培养。采用 10 ng/ml 脂多糖(LPS: 美国 Sigma 公司)处理细胞 24 h 以在体外诱导细胞产生炎症反应, 模拟 BO 中的气道炎症状态。将细胞分为空白对照组(正常 TC-1 细胞)、LPS 模型组(LPS 处理 24 h)、HGF-MSCs-EXO 组(LPS 处理 24 h 后, 使用 100 μ g/ml HGF-MSCs-EXO 处理 24 h)。采用 PKH26 外泌体摄取实验观察细胞对 HGF-MSCs-EXO 的摄取情况; Western blotting 检测自噬相关蛋白(Beclin1、ATG5、p62)、EMT 相关蛋白(α -SMA、波形蛋白、E-cadherin)、NLRP1 蛋白的表达水平; ELISA 法检测细胞上清液炎症因子(IL-6、IL-1 β 、IFN- γ)的浓度; qRT-PCR 检测细胞中 miR-221-5p 的表达水平。

1.5 细胞转染 si-NLRP1 和阴性对照 siRNA(si-NC)、miR-221-5p 模拟物、miR-221-5p 抑制剂和相应的阴性对照购自广州 RiboBio 公司。使用 Lipofectamine[®] 3000

(美国 Invitrogen 公司)在 TC-1 细胞中进行转染, 采用 qRT-PCR 评估转染效率, 并用于后续实验。转染后的细胞分组如下: (1)抑制剂对照组(转染抑制剂阴性对照)、miR-221-5p 抑制剂组(转染 miR-221-5p 抑制剂)、模拟物对照组(转染模拟物阴性对照)、miR-221-5p 模拟物组(转染 miR-221-5p 模拟物)。采用 qRT-PCR 检测 miR-221-5p、NLRP1 mRNA 表达水平以验证转染效率; Western blotting 检测自噬相关蛋白(Beclin1、ATG5、p62)及 NLRP1 蛋白表达水平; ELISA 法检测细胞上清炎症因子 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度; 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-221-5p 与 NLRP1 的靶向结合关系; CHIP-qPCR 实验验证 NLRP1 与 miR-221-5p 的结合情况。(2)HGF-MSCs-Exo+抑制剂对照组(转染抑制剂阴性对照 24 h 后给予 HGF-MSCs-Exo 治疗)、HGF-MSC-Exo+miR-221-5p 抑制剂组(转染 miR-221-5p 抑制剂 24 h 后给予 HGF-MSCs-Exo 治疗)。采用 qRT-PCR 检测 miR-221-5p 表达水平; Western blotting 检测自噬相关蛋白(Beclin1、ATG5、p62)表达水平。(3)敲低对照组(转染对照 si-NC)、敲低 NLRP1 组(转染 si-NLRP1)、敲低 NLRP1+抑制剂对照组(共转染 si-NLRP1 与抑制剂阴性对照)、敲低 NLRP1+miR-221-5p 抑制剂组(共转染 si-NLRP1 与 miR-221-5p 抑制剂)。采用 qRT-PCR 检测 miR-221-5p、NLRP1 mRNA 表达水平; Western blotting 检测 NLRP1、自噬相关蛋白(Beclin1、ATG5、p62)、EMT 相关蛋白(α -SMA、波形蛋白、E-cadherin)表达水平; ELISA 法检测细胞上清炎症因子(IL-6、IL-1 β)浓度。

1.6 外泌体内化观察实验 将从 MSCs 中提取的外泌体根据试剂盒说明书采用 PKH26 染料(美国 Sigma 公司)进行标记。即使用无血清培养基将外泌体重悬, 并用 PKH26 染料在室温下孵育 5 min, 加入等体积的 PBS 终止反应。4 $^{\circ}$ C 下 110 000 $\times$ g 超速离心 60 min 去除未结合的染料, 并将清洗后的外泌体重悬于 PBS 中。然后将 TC-1 细胞培养至生长密度 70%~80%, 用无血清培养基清洗 2 次后, 将 PKH26 标记的外泌体加入细胞培养基中培养 24 h, 细胞用 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min 后, 使用 DAPI 染色固定 10 min, 于共聚焦显微镜下观察外泌体在细胞中的分布和摄取情况。

1.7 HE 染色 将移植气管组织采用石蜡进行包埋后切片(厚度 4 μ m)。根据 HE 染色试剂盒说明书(美国 Sigma-Aldrich 公司), 将切片依次进行二甲苯脱蜡、苏木精染液染色 5 min、流水冲洗至返蓝、伊红染液染色 3 min, 流水洗去染液后梯度乙醇脱水、二甲苯透明后, 中性树胶封存, 于光学显微镜(日本 Nikon 公司)下观察组织病理学变化。

1.8 qRT-PCR 检测 用 Trizol(美国 Life Technologies 公司)提取纯化细胞或组织的总 RNA。分别采用 miRNA

反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)、Superscript III 第一链合成系统(美国 Life Technologies 公司)将 miR-150-5p、mRNA 反转录合成 cDNA。然后,使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)和 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 系统(美国 Agilent Technologies 公司)进行 qRT-PCR 检测。反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。U6、GAPDH 分别作为 miRNA、mRNA 的内源性对照。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量,引物序列见附表 1。

1.9 ELISA 法检测小鼠血清和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 IFN- γ 浓度 收集小鼠血液样本,以 1000 $\times$ g 离心 10 min,分离和收集上层血清;收集各组细胞上清液,使用酶标仪(Multiskan FC,美国 ThermoFisher 公司)测量 450 nm 波长处的光密度值,计算 IL-6、IL-1 β 和 IFN- γ 浓度。IL-6、IL-1 β 和 IFN- γ ELISA 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.10 双荧光素酶报告基因测定荧光素酶活性 利用 TargetScan(<http://www.targetscan.org>)生物信息学网站分析预测具有野生型 miR-221-5p 结合位点的 NLRP1 序列。突变型(MUT)NLRP1 结合位点的序列由上海 Genema 公司提供。将结合位点扩增并克隆到 pmirGLO 报告荧光素酶载体(美国 Promega 公司)中。然后,将报告质粒与 miR-221-5p 模拟物或模拟物对照共同瞬时转染到支气管上皮细胞(来自本课题组的细胞库)中。转染 48 h 后利用荧光素酶报告分析系统(美国 Promega 公司)测定荧光素酶活性。

1.11 染色质免疫沉淀(ChIP)-qPCR 使用 EZ-Magna ChIP 试剂盒(美国 EMD Millipore 公司)进行 ChIP 测定。将转染模拟物对照、miR-221-5p 模拟物 24 h 的 TC-1 细胞用 4% 甲醛交联,用 0.125 mol/L 甘氨酸孵育,使 DNA 与蛋白质交联。然后将细胞裂解并进行超声处理,得到 100~500 bp 的染色质片段。将裂解液与一抗兔 IgG(1:100, #ab171870, 英国 Abcam 公司,阴性对照)、抗 NLRP1 抗体(1:100, #ab36852, 英国 Abcam 公司)(IgG 作为阴性对照, NLRP1 作为检测目标)共同孵育。采用 qRT-PCR 对沉淀的 DNA 进行分析。根据预测的 NLRP1 结合位点,设计 ChIP 引物:正向 5'-TGGTTTGCCTTCCAGCACTAA-3',反向 5'-TGAGGTCTGCAGGGTCTTG-3'。

1.12 Western blotting 检测相关蛋白的表达 使用 RIPA 裂解缓冲液(江苏 Keygen Biotech 公司)提取移植气管组织或细胞中总蛋白,并使用 BCA 试剂盒(上海 Beyotime 公司)定量蛋白浓度。将等量(20 μ g)的蛋白质上样到 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳上进行分离,然后转移到聚偏氟乙烯膜(美国 Millipore 公司)上。用 5% 脱脂牛奶封闭非特异性结合

后,将膜与一抗 NLRP1(#ab36852, 1:1000)、CD63(#ab134045, 1:10 000)、TSG101(#ab125011, 1:5000)、Beclin1(#ab207612, 1:2000)、自噬相关基因 5(ATG5; ab108327, 1:1000)、p62(#ab109012, 1:1000)、 α -SMA(#ab5694, 1:500)、波形蛋白(#ab92547, 1:5000)、E-cadherin(#ab40772, 1:1000)、GAPDH(#ab9485, 1:1000)于 4 °C 孵育过夜,然后与山羊抗兔 IgG H&L (HRP)(#ab205718)孵育 1 h。通过使用增强的化学发光使信号检测可视化。一抗和二抗购自英国 Abcam 公司。

1.13 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用非配对双尾 Student *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。实验至少重复 3 次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HGF-MSCs-EXO 的鉴定 透射电镜下观察纯化的外泌体呈杯状或囊状(附图 1A)。NTA 检测结果显示, HGF-MSCs-EXO 的直径范围为 30~150 nm(附图 1B)。Western blotting 检测结果显示,外泌体能够表达标志蛋白 CD63 和 TSG101(附图 1C)。此外, qRT-PCR 检测结果显示, HGF 在该外泌体中大量表达($P < 0.05$, 附图 1D),表明在 MSCs 中成功构建并分离出了被 HGF 修饰的 MSCs 外泌体 HGF-MSCs-EXO。

2.2 HGF-MSCs-EXO 对 BO 小鼠气管组织及气道上皮细胞自噬、炎症及 EMT 的影响 HE 染色结果显示,对照组小鼠气管上皮层细胞排列整齐、形态正常,黏膜下层无明显炎症浸润,软骨层结构完整、细胞分布规则,各层组织界限清晰,未见充血、水肿等病理改变;与对照组相比,模型组小鼠移植气管组织损伤严重,气管同种异体移植植物管腔的变化范围从最小的侵犯到纤维血管结缔组织几乎完全闭塞,伴随着上皮细胞的变化、坏死伴上皮细胞脱落、基底膜破坏、肉芽组织形成和炎性细胞的散在积聚;与模型组相比, HGF-MSCs-EXO 组移植气管组织损伤明显减轻(图 1A)。Western blotting、ELISA 法检测结果显示,与对照组相比,模型组 BO 小鼠移植气管组织中 Beclin1、ATG5 蛋白表达水平升高, p62 蛋白表达降低($P < 0.05$),血清 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度升高($P < 0.05$),移植气管组织中间充质标志物 α -SMA、波形蛋白表达水平升高,上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达水平降低($P < 0.05$);与模型组相比, HGF-MSCs-EXO 组小鼠移植气管组织中 Beclin1、ATG5 蛋白表达水平降低, p62 蛋白表达水平升高($P < 0.05$),血清 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平降低($P < 0.05$),移植气管组织中 α -SMA、波形蛋白表达水平降低,

E-cadherin表达水平升高($P<0.05$, 图1B—D)。

2.3 HGF-MSCs-EXO 对体外 BO 模型细胞自噬、炎症和 EMT 的影响 PKH26 外泌体摄取实验结果显示, HGF-MSCs-EXO 组红色荧光信号强烈且分布于细胞内, PBS 组未观察到红色荧光信号(图 2A)。Western blotting、ELISA 法、qRT-PCR 检测结果显示, 与空白对照组相比, LPS 模型组细胞中 Beclin1、ATG5 蛋白表达水平升高, p62 蛋白表达水平降低($P<0.05$), 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度升高($P<0.05$), 气道上皮细胞中间充质标志物 α -SMA、波形蛋白蛋白表达水平升高, 上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达水平降低($P<0.05$), miR-221-5p 表达水平降低($P<0.05$), NLRP1 蛋白表达水平升高($P<0.05$); 与

LPS 模型组相比, HGF-MSCs-EXO 组细胞中 Beclin1、ATG5 蛋白表达水平降低, p62 蛋白表达水平升高($P<0.05$), 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度降低($P<0.05$), 细胞中 α -SMA、波形蛋白蛋白表达水平降低, E-cadherin 蛋白表达水平升高($P<0.05$), miR-221-5p 表达水平升高($P<0.05$), NLRP1 蛋白表达水平降低($P<0.05$)(图 2B—F)。

2.4 HGF-MSCs-EXO 对 BO 中 miR-221-5p 的恢复作用 qRT-PCR 检测结果显示, 与 MSCs 相比, HGF 修饰的 MSCs 中 miR-221-5p 表达水平明显升高($P<0.05$, 图 3A); 与 MSCs-EXO 组相比, HGF-MSCs-EXO 组中 miR-221-5p 表达水平也明显升高($P<0.05$)(图 3B)。

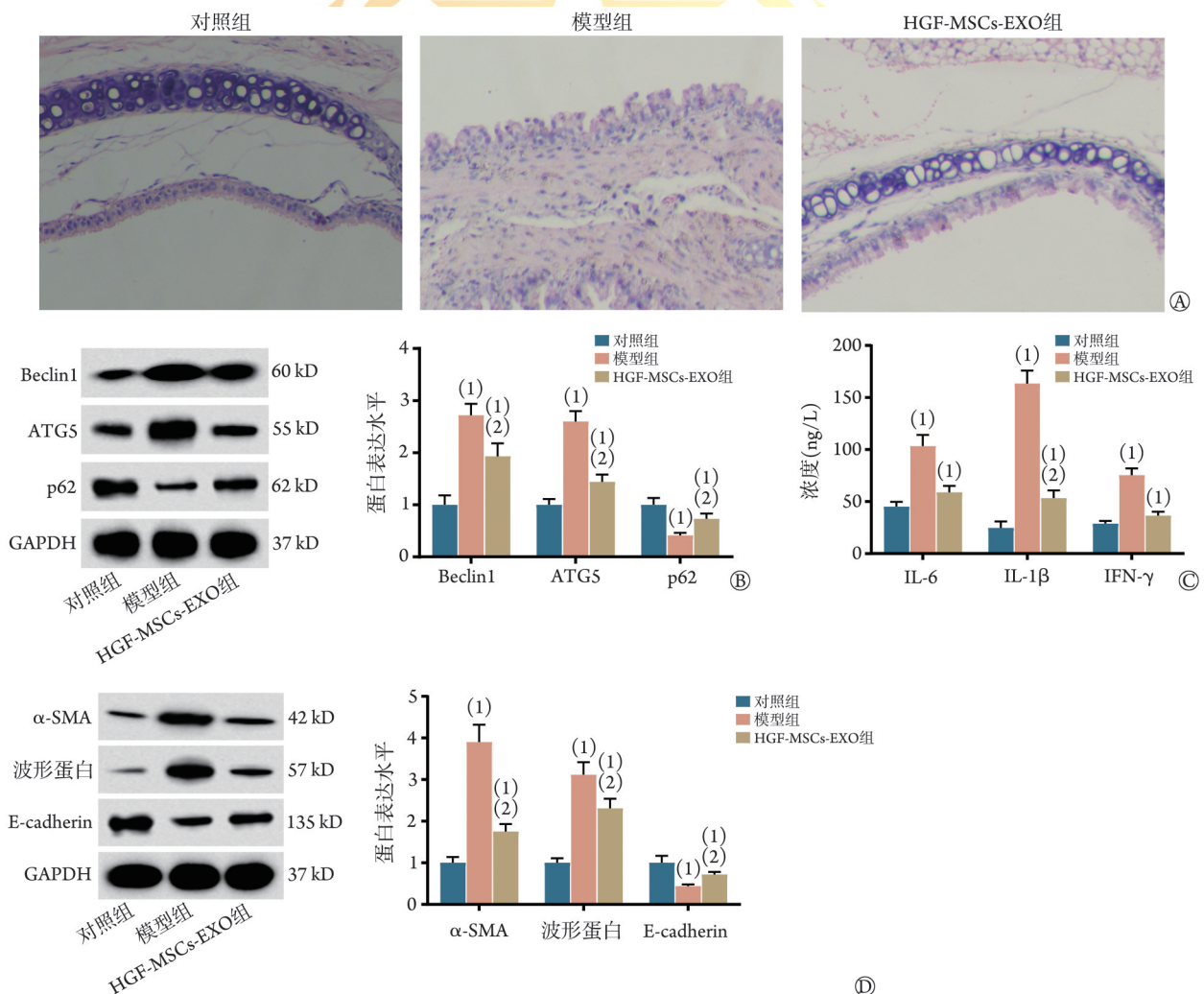


图1 HGF-MSCs-EXO对BO小鼠气管组织损伤及气道上皮细胞自噬、炎症和EMT的治疗作用($n=6$)

Fig. 1 The therapeutic effects of HGF-MSCs-EXO on tracheal tissue injury and autophagy, inflammation and EMT of airway epithelial cells in BO mice ($n=6$)

A. HE染色观察小鼠移植气管组织病理变化($\times 200$); B. Western blotting检测小鼠移植气管组织中自噬蛋白Beclin1、ATG5、p62的表达情况; C. ELISA法检测小鼠外周血清IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度; D. Western blotting检测小鼠移植气管组织中上皮-间质转化(EMT)标志蛋白 α -SMA、波形蛋白、E-cadherin的表达。与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与模型组比较, (2) $P<0.05$ 。HGF-MSCs-EXO. 肝细胞生长因子修饰间充质干细胞外泌体; BO. 闭塞性细支气管炎; ATG5. 自噬相关基因5; p62. 泛素结合蛋白p62; IL-6. 白细胞介素-6; IL-1 β . 白细胞介素-1 β ; IFN- γ . γ 干扰素; α -SMA. α -平滑肌肌动蛋白; E-cadherin. E-钙黏蛋白

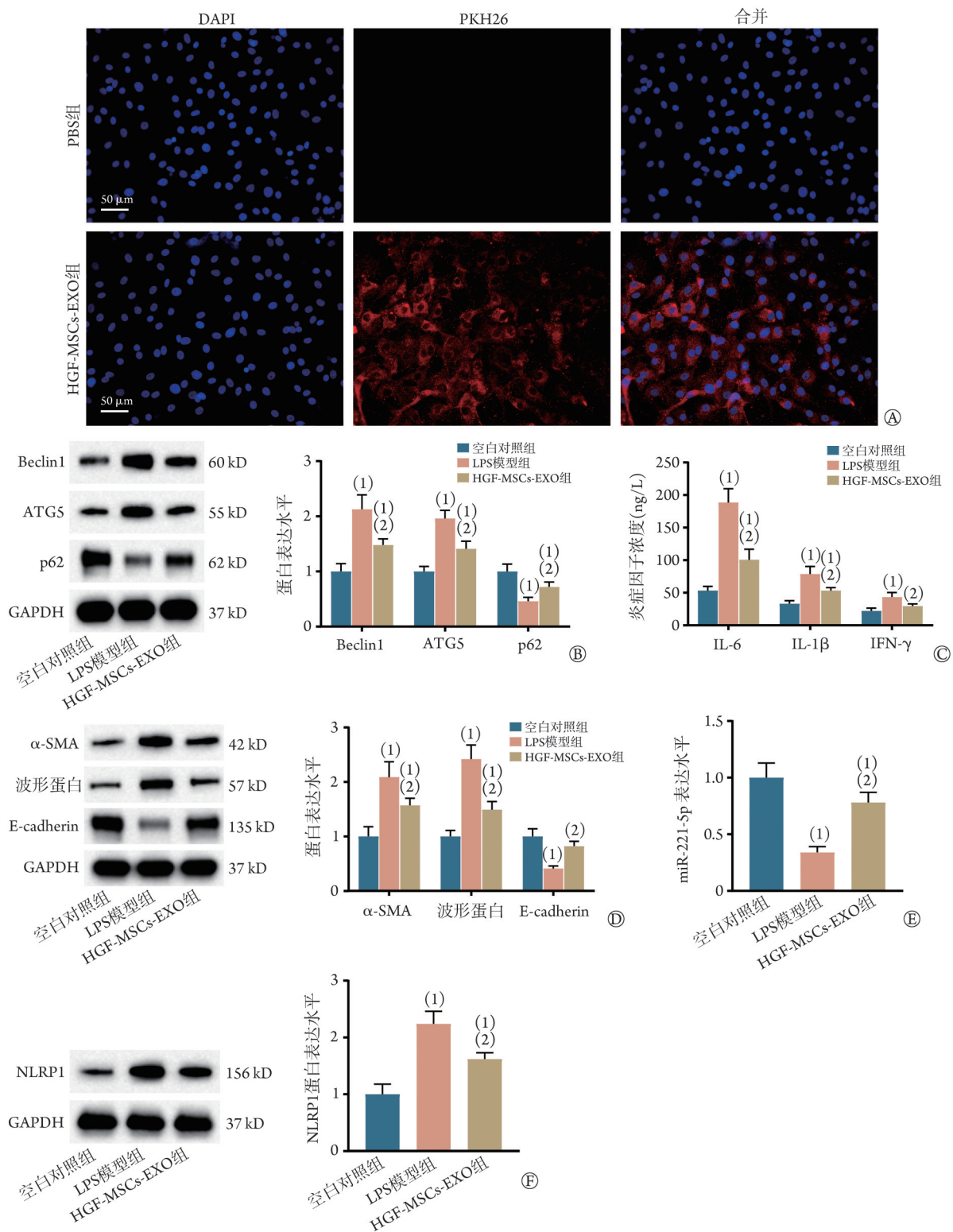


图2 HGF-MSCs-EXO减轻体外BO细胞模型的细胞自噬、改善炎症和EMT($n=3$)

Fig.2 HGF-MSCs-EXO alleviates autophagy in the *in vitro* BO cell model and improves inflammation and EMT ($n=3$)

A. 荧光追踪 TC-1 对 HGF-MSCs-EXO 的摄取; B. Western blotting 检测 TC-1 细胞中自噬蛋白 Beclin1、ATG5、p62 的表达; C. ELISA 法检测 TC-1 细胞培养上清液中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度; D. Western blotting 检测 TC-1 细胞中上皮-间质转化(EMT)标志蛋白 α -SMA、波形蛋白、E-cadherin 的表达; E. qRT-PCR 检测细胞中 miR-221-5p 的表达; F. Western blotting 检测细胞中 NLRP1 的表达。与空白对照组比较, (1) $P<0.05$; 与 LPS 模型组比较, (2) $P<0.05$ 。HGF-MSCs-EXO. 肝细胞生长因子修饰间充质干细胞外泌体; BO. 闭塞性细支气管炎; DAPI. 4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐染色; PKH26. 外泌体示踪染料染色; ATG5. 自噬相关基因 5; p62. 泛素结合蛋白 p62; IL-6. 白细胞介素-6; IL-1 β . 白细胞介素-1 β ; IFN- γ . γ 干扰素; α -SMA. α -平滑肌肌动蛋白; E-cadherin. E-钙黏蛋白; NLRP1. NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 1

在HGF-MSCs、HGF-MSCs-Exo中转染miR-221-5p抑制剂后，HGF-MSCs及HGF-MSCs-Exo中miR-221-5p表达水平均明显降低，与各自阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$ ，图3C)。与HGF-MSCs-Exo+抑制剂对照组相比，TC-1细胞暴露于HGF-MSCs-Exo+miR-221-5p抑制剂后，Beclin1、ATG5蛋白表达水平升高，p62蛋白表达水平降低($P<0.05$ ，图3D)。qRT-PCR检测结果显示，与对照组相比，模型组BO小鼠移植气管组织中miR-221-5p表达水平明显降低($P<0.05$)；与模型组相比，HGF-MSCs-EXO组移植气管组织中miR-221-5p表达水平明显升高($P<0.05$ ，图3E)。

2.5 miR-221-5p对BO小鼠支气管细胞自噬、炎症、EMT的改善作用 qRT-PCR检测结果显示，与激动剂对照组相比，miR-221-5p激动剂组BO小鼠气管组织中miR-221-5p表达增加($P<0.05$ ，图4A)。HE染色结果显示，激动剂对照组小鼠移植气管组织损伤与模型组类似，气管上皮层细胞排列紊乱、部分结构破坏，基底膜破坏，局部可见肉芽组织增生及散在

炎性细胞浸润；与激动剂对照组相比，miR-221-5p激动剂组小鼠移植气管组织病理损伤得到缓解(图4B)。ELISA法、Western blotting检测结果显示，与激动剂对照组相比，miR-221-5p激动剂组BO小鼠血清中炎症因子IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度明显降低($P<0.05$)移植气管组织中Beclin1、ATG5蛋白表达水平降低，p62蛋白表达水平升高($P<0.05$)，移植气管组织中气道上皮细胞中间充质标志物 α -SMA、波形蛋白表达水平降低，上皮标志物E-cadherin蛋白表达水平升高($P<0.05$)(图4C—E)。

2.6 miR-221-5p靶向NLRP1对气道上皮细胞自噬、炎症及EMT的抑制作用 生物信息网站TargetScan(<https://www.targetscan.org>)预测结果显示，miR-221-5p与NLRP1存在结合位(图5A)。双荧光素酶报告基因实验结果显示，在WT-NLRP1 TC-1细胞中，与模拟物对照组比较，miR-221-5p模拟物组细胞中相对荧光素酶活性明显降低($P<0.05$)，而在MuT-NLRP1 TC-1细胞中，与模拟物对照组比较，miR-221-5p模拟物组细胞中相对荧光素酶活性差异无统计学意义

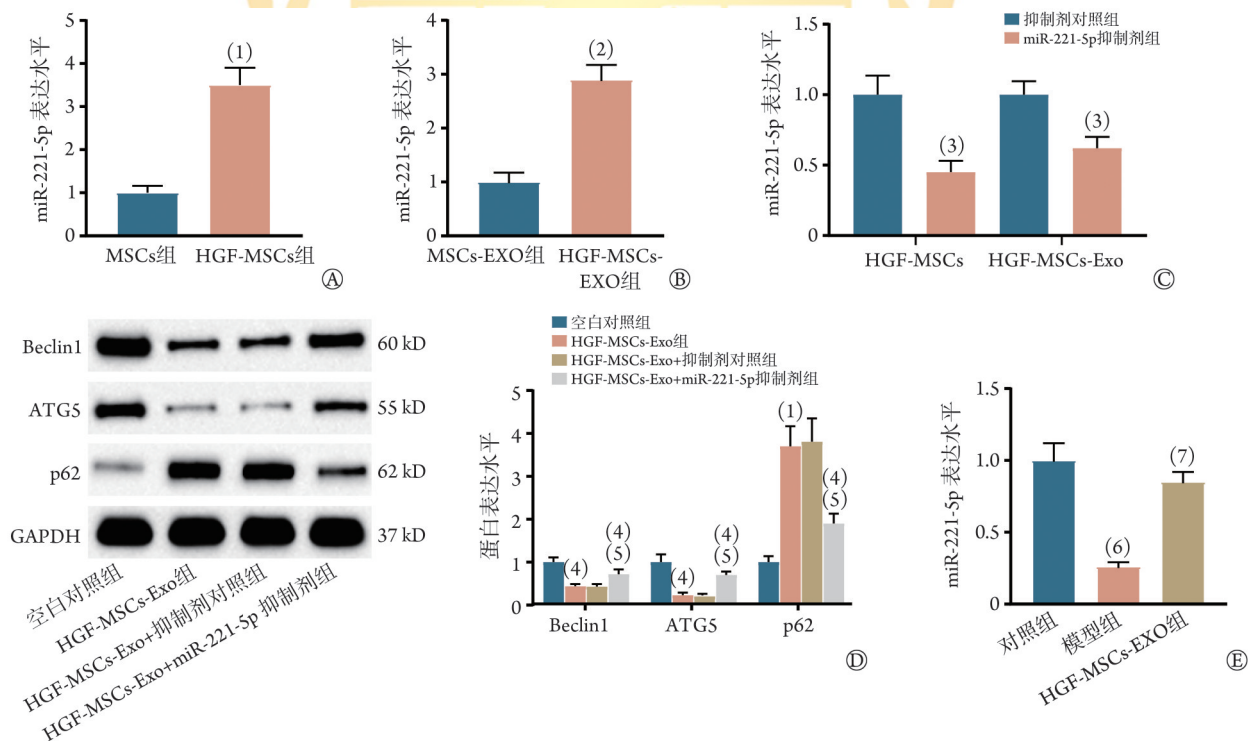


图3 HGF-MSCs-EXO补充BO中下调的miR-221-5p

Fig.3 HGF-MSCs-EXO supplements the down-regulated miR-221-5p in BO

A. qRT-PCR检测MSCs、HGF-MSCs中miR-221-5p的表达，与MSCs组比较，(1) $P<0.05$ ；B. qRT-PCR检测MSCs-EXO、HGF-MSCs-EXO中miR-221-5p的表达，与MSCs-EXO组比较，(2) $P<0.05$ ；C. qRT-PCR检测转染miR-221-5pp抑制剂阴性对照或miR-221-5p抑制剂处理的HGF-MSCs及其对应外泌体(HGF-MSCs-Exo)中miR-221-5pp的表达，与抑制剂对照组比较，(3) $P<0.05$ ；D. Western blotting检测PBS、HGF-MSCs-Exo、HGF-MSCs-Exo+miR-221-5pp抑制剂阴性对照及HGF-MSCs-Exo+miR-221-5p抑制剂处理的TC-1细胞中自噬蛋白Beclin1、ATG5、p62的表达，与空白对照组比较，(4) $P<0.05$ ；与HGF-MSCs-Exo+miR-221-5p抑制剂组比较，(5) $P<0.05$ ；E. qRT-PCR检测HGF-MSCs-EXO治疗前后BO小鼠移植气管组织中miR-221-5p的表达，与对照组比较，(6) $P<0.05$ ；与模型组比较，(7) $P<0.05$ 。细胞实验独立重复3次，小鼠 $n=6$ 。MSCs. 间充质干细胞；HGF-MSCs. 肝细胞生长因子(HGF)修饰的间充质干细胞；MSCs-EXO. 间充质干细胞外泌体；HGF-MSCs-EXO. 肝细胞生长因子修饰的间充质干细胞外泌体；BO. 闭塞性细支气管炎；ATG5. 自噬相关基因5；p62. 泛素结合蛋白p62

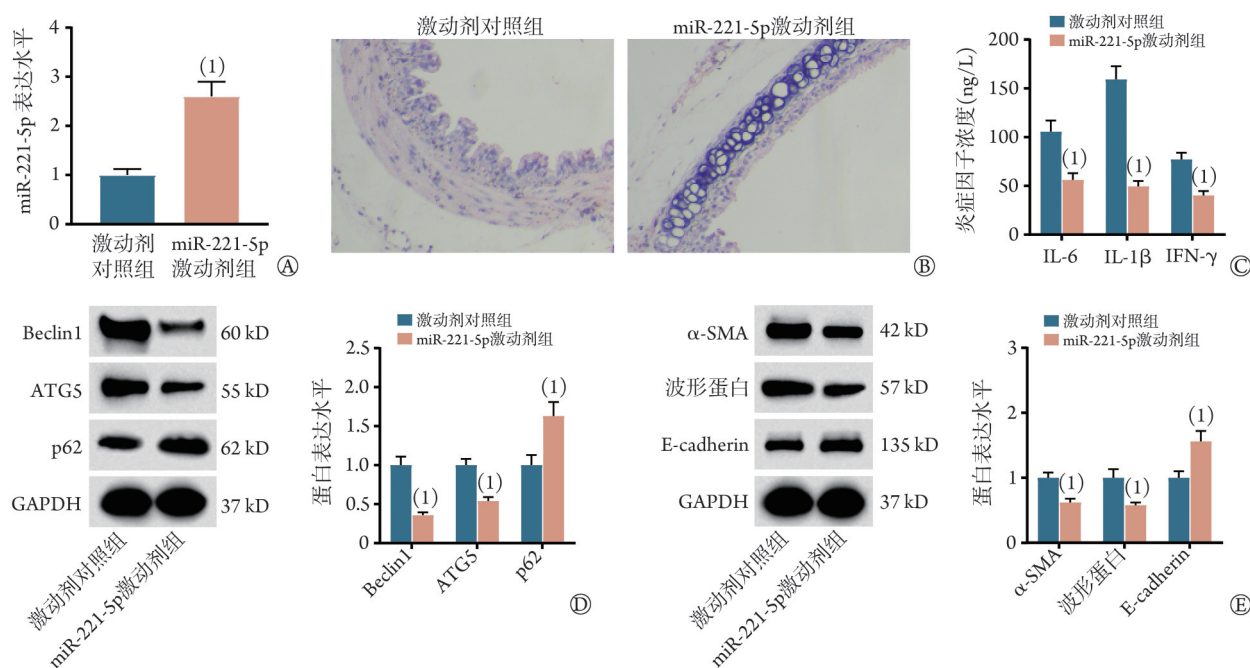


图4 miR-221-5p缓解BO小鼠支气管细胞的自噬、炎症、EMT($n=6$)

Fig.4 miR-221-5p alleviates autophagy, EMT and inflammation of bronchial cells in mice with BO ($n=6$)

A. qRT-PCR检测BO小鼠注射miR-221-5p激动剂后移植气管组织中miR-221-5p的表达; B. HE染色观察注射miR-221-5p激动剂对BO小鼠移植气管组织病理损伤的影响($\times 200$); C. ELISA法检测注射miR-221-5p激动剂对BO小鼠外周血清中IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度的影响; D. Western blotting检测miR-221-5p激动剂注射后BO小鼠移植气管组织中自噬蛋白Beclin1、ATG5、p62的表达; E. Western blotting检测miR-221-5p激动剂注射后BO小鼠移植气管组织中上皮-间质转化(EMT)标志蛋白 α -SMA、波形蛋白、E-cadherin的表达。与激动剂对照组比较, (1) $P<0.05$ 。BO. 闭塞性细支气管炎; ATG5. 自噬相关基因5; p62. 泛素结合蛋白p62; IL-6. 白细胞介素-6; IL-1 β . 白细胞介素-1 β ; IFN- γ . γ 干扰素; α -SMA. α -平滑肌肌动蛋白; E-cadherin. E-钙黏蛋白

($P>0.05$, 图5B)。CHIP-qPCR实验结果显示, miR-221-5p模拟物可明显促进NLRP1蛋白与其自身启动子区的结合($P<0.05$, 图5C)。随后, 用Lipofectamine[®] 3000转染miR-221-5p模拟物或抑制剂及其相应的阴性对照, 并采用qRT-PCR检测转染效率, 结果显示, 与模拟物对照组相比, miR-221-5p模拟物组细胞中miR-221-5p表达水平明显升高($P<0.05$); 与抑制剂对照组相比, miR-221-5p抑制剂组细胞中miR-221-5p表达明显降低($P<0.05$)(图5D)。qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, 与模拟物对照组相比, miR-221-5p模拟物组细胞中NLRP1 mRNA和蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); 与抑制剂对照组相比, miR-221-5p抑制剂组细胞中NLRP1 mRNA和蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)(图5E)。与敲低对照组相比, 敲低NLRP1组细胞上清液中炎症因子IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度降低($P<0.05$), 细胞中Beclin1、ATG5蛋白表达水平降低, p62蛋白表达水平升高($P<0.05$), 间充质标志物 α -SMA、波形蛋白表达降低, 上皮标志物E-cadherin蛋白表达增加($P<0.05$); 与敲低NLRP1+抑制剂对照组相比, 敲低NLRP1+miR-221-5p抑制剂组细胞上清液中炎症因子IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度增加($P<0.05$), 细胞中Beclin1、ATG5蛋白表达水平升

高, p62蛋白表达水平降低($P<0.05$), α -SMA、波形蛋白表达水平升高, E-cadherin蛋白表达水平降低($P<0.05$, 图5F—H)。

此外, 在小鼠体外模型对上述机制进行简要验证, qRT-PCR、Western blotting检测结果显示, 与对照组相比, 模型组BO小鼠移植气管中NLRP1 mRNA和蛋白表达水平升高($P<0.05$, 图5I)。此外, 与模型组相比, miR-221-5p激动剂组BO小鼠移植气管组织中NLRP1 mRNA和蛋白表达水平降低($P<0.05$); 与miR-221-5p激动剂组相比, HGF-MSCs-EXO组BO小鼠移植气管组织中NLRP1 mRNA和蛋白表达水平升高($P<0.05$, 图5J)。

2.7 HGF-MSCs-EXO与NLRP1对BO小鼠气管自噬、炎症及EMT的调控 qRT-PCR、Western blotting检测结果显示, 与HGF-MSCs-EXO+敲低对照组相比, HGF-MSCs-EXO+敲低NLRP1组BO小鼠NLRP1 mRNA和蛋白表达水平降低($P<0.05$, 图6A)。HE染色结果显示, HGF-MSCs-EXO+敲低对照组小鼠移植气管腔形态相对规整, 狭窄程度较轻, 组织各层的病理损伤轻微; 与HGF-MSCs-EXO+敲低对照组相比, 敲低NLRP1进一步增强了HGF-MSCs-EXO缓解移植气管损伤的作用(图6B)。Western blotting和

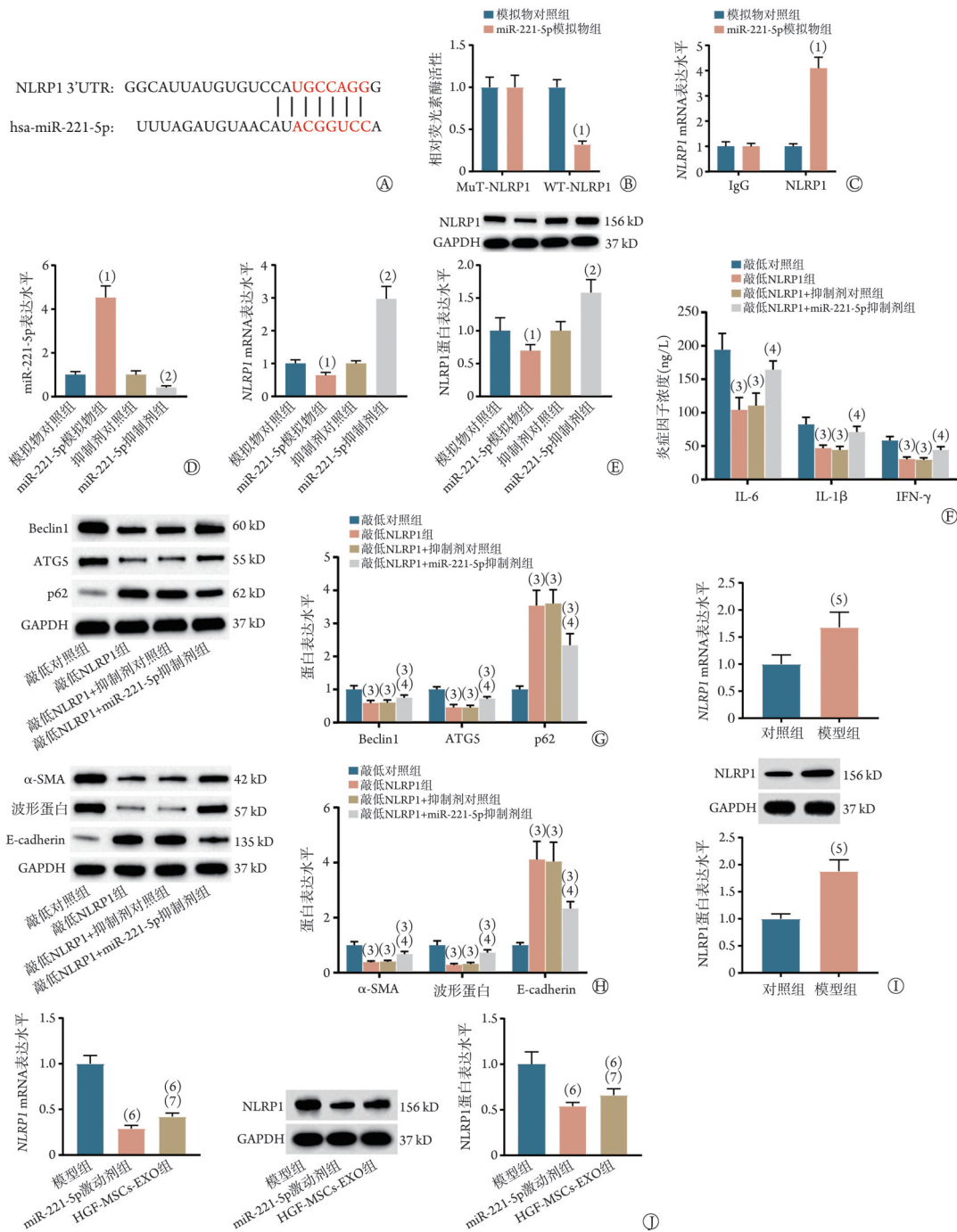


图5 miR-221-5p直接靶向NLRP1抑制气道上皮细胞的自噬、炎症及EMT(细胞n=3,小鼠n=6)

Fig.5 miR-221-5p directly targets NLRP1 to inhibit autophagy, inflammation and EMT in airway epithelial cells (cell n=3, mouse n=6)

A. TargetScan 预测 miR-221-5p 与 NLRP1 的结合位点; B. 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-221-5p 与 NLRP1 的结合; C. CHIP-qPCR 实验验证 NLRP1 与 miR-221-5p 的靶向结合; D. 利用 miR-221-5p 模拟物、miR-221-5p 抑制剂及其相应阴性对照转染 TC-1 细胞后, 采用 qRT-PCR 检测细胞中 miR-221-5p 的表达; E. qRT-PCR 和 Western blotting 检测转染 miR-221-5p 抑制剂、miR-221-5p 模拟物及相应阴性对照的 TC-1 细胞中 NLRP1 的表达情况; 与模拟物对照组比较, (1) $P<0.05$; 与抑制剂对照组比较, (2) $P<0.05$; F. ELISA 法检测敲低 NLRP1 的同时转染 miR-221-5p 抑制剂对 TC-1 细胞中炎症因子 IFN- γ 、IL-6、IL-1 β 浓度的影响; G. Western blotting 检测敲低 NLRP1 的同时转染 miR-221-5p 抑制剂对 TC-1 细胞中自噬蛋白 Beclin1、ATG5、p62 表达的影响; H. Western blotting 检测敲低 NLRP1 的同时转染 miR-221-5p 抑制剂对 TC-1 细胞中上皮-间质转化(EMT)标志蛋白 α -SMA、波形蛋白、E-cadherin 表达的影响; 与敲低对照组比较, (3) $P<0.05$; 与敲低 NLRP1+抑制剂对照组比较, (4) $P<0.05$; I. qRT-PCR、Western blotting 检测 NLRP1 mRNA 和蛋白在 BO 小鼠移植气管中的表达; 与对照组比较, (5) $P<0.05$; J. qRT-PCR 及 Western blotting 检测 miR-221-5p 激动剂、HGF-MSCs-EXO 对 BO 小鼠移植气管组织中 NLRP1 mRNA 和蛋白表达的影响; 与模型组比较, (6) $P<0.05$; 与 miR-221-5p 激动剂组比较, (7) $P<0.05$ 。WT.野生型; MuT.突变型; NLRP1.NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 1; ATG5.自噬相关基因 5; p62.泛素结合蛋白 p62; IL-6.白细胞介素-6; IL-1 β .白细胞介素-1 β ; IFN- γ . γ 干扰素; α -SMA. α -平滑肌肌动蛋白; E-cadherin.E-钙黏蛋白

ELISA法检测结果显示,与HGF-MSCs-EXO+敲低对照组相比,HGF-MSCs-EXO+敲低NLRP1组BO小鼠移植气管组织中自噬蛋白Beclin1、ATG5表达水平降低,p62表达水平升高($P<0.05$),血清中IL-6、IL-1 β 、

IFN- γ 浓度降低($P<0.05$),移植气管组织中气道上皮细胞中间充质标志物 α -SMA、波形蛋白表达水平明显降低,上皮标志物E-cadherin蛋白表达水平明显升高($P<0.05$,图6C-E)。

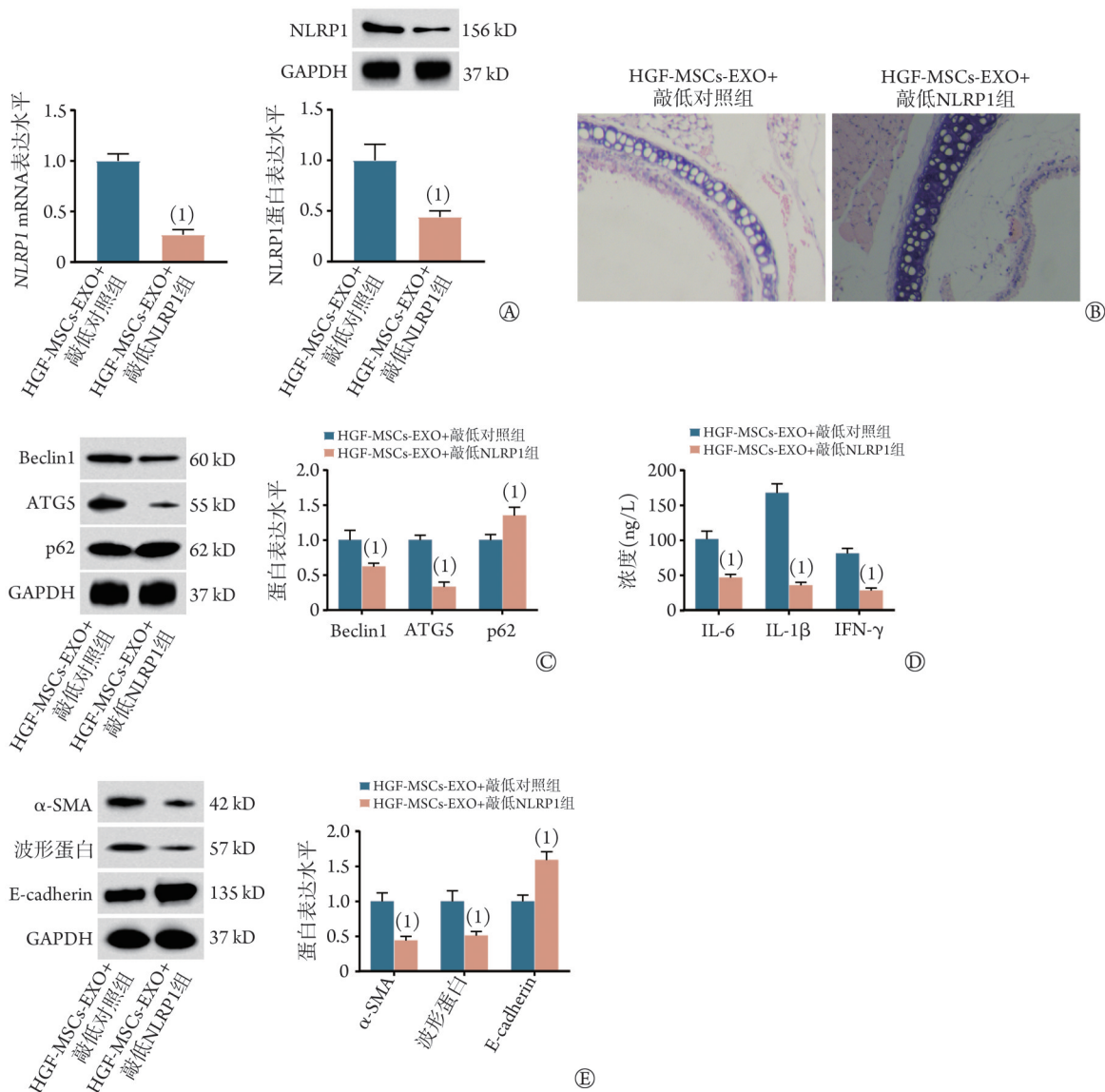


图6 HGF-MSCs-EXO通过沉默NLRP1介导BO小鼠的气管细胞自噬缓解细胞炎症与EMT($n=6$)

Fig.6 HGF-MSCs-EXO improves cellular inflammation and EMT in BO mice by silencing NLRP1 and mediating autophagy in tracheal cells ($n=6$)

A. qRT-PCR、Western blotting检测NLRP1 mRNA和蛋白在BO小鼠移植气管中表达情况; B. HE染色观察BO小鼠移植气管组织病理变化($\times 200$); C. Western blotting检测BO小鼠移植气管组织中自噬蛋白Beclin1、ATG5、p62的表达; D. ELISA法检测BO小鼠外周血清炎症因子IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 浓度; E. Western blotting检测BO小鼠移植气管组织中上皮-间质转化(EMT)标志蛋白 α -SMA、波形蛋白、E-cadherin的表达。与HGF-MSCs-EXO+敲低对照组比较, (1) $P<0.05$ 。HGF-MSCs-EXO. 肝细胞生长因子修饰的间充质干细胞外泌体; NLRP1. NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白1; BO. 闭塞性细支气管炎; ATG5. 自噬相关基因5; p62. 泛素结合蛋白p62; IL-6. 白细胞介素-6; IL-1 β . 白细胞介素-1 β ; IFN- γ . γ 干扰素; α -SMA. α -平滑肌肌动蛋白; E-cadherin. E-钙黏蛋白

3 讨论

BO是一种以不可逆的小气道狭窄和闭塞为特征的肺纤维增生性疾病^[26]。自噬失调、呼吸道上皮细胞损伤、支气管周围炎症和纤维血管结缔组织增生

是BO中气道阻塞的原因。然而,BO的治疗和预防仍是一个难题,其机制仍不完全清楚,且缺乏有效的治疗策略^[4]。本研究发现,HGF-MSCs-EXO在治疗BO中具有一定作用,并揭示了HGF-MSCs-EXO递送的miR-221-5p通过沉默NLRP1来减轻BO中自噬

失调、EMT形成、炎症反应的潜在机制。

近年来,随着研究的不断深入,发现MSCs可通过短暂旁分泌生长因子、趋化因子和细胞因子等,减少细胞凋亡和纤维化,促进血管生成和组织修复,发挥更甚于干细胞本身的治疗作用^[27-28]。而HGF基因修饰的MSCs治疗BO可减轻局部炎症反应,促进移植气管组织病理学的恢复^[12]。因此,本研究成功构建HGF修饰的MSCs,并从中成功分离出外泌体HGF-MSCs-EXO。在HGF-MSCs-EXO治疗BO小鼠的实验中,发现HGF-MSCs-EXO能够减轻BO小鼠移植气管的病理损伤,恢复自噬失调,抑制细胞EMT,并缓解炎症。

在BO中差异性表达的miRNA可有效对该疾病进行诊断和治疗^[19]。基于miRNA分子水平机制的治疗策略在预防和治疗器官移植后并发症及提高移植后的长期生存率方面具有重要意义^[29]。本研究在BO小鼠移植气管组织中发现miR-221-5p呈下调趋势,HGF-MSCs-EXO能够将miR-221-5p递送到移植气管组织细胞中弥补BO导致的miR-221-5p表达水平降低。此外,miR-221-5p能够与NLRP1靶向结合。研究发现,NLRP1炎症小体可参与肺上皮细胞炎症反应^[30]及病毒性呼吸疾病的发生^[31]。此外,有研究指出,在造血干细胞移植诱导的非感染性肺损伤中存在炎症小体的活化,而敲除NLRP1基因可有效缓解炎症性损伤^[32],提示NLRP1炎症小体活化也可能是导致BO发生的主要原因之一,抑制NLRP1炎症小体活化可能是HGF-MSCs-EXO缓解BO的途径之一。本研究在BO小鼠移植气管组织中检测到NLRP1高表达。通过对BO小鼠给予HGF-MSCs-EXO治疗的同时敲低NLRP1的表达,发现敲低NLRP1可促进HGF-MSCs-EXO对自噬、EMT的抑制及对炎症因子的下调作用,提示HGF-MSCs-EXO可能通过沉默NLRP1介导BO小鼠的气管细胞自噬缓解细胞炎症与EMT。同样在气道上皮细胞中发现,HGF-MSCs-EXO可能通过miR-221-5p/NLRP1轴减轻体外BO模型细胞的自噬,缓解炎症和EMT。

综上所述,本研究在一定程度上提供了一种基于HGF修饰MSCs外泌体HGF-MSCs-EXO释放miR-221-5p调控NLRP1的潜在策略。具体而言,HGF修饰MSCs外泌体通过上调miR-221-5p来抑制NLRP1的激活来减少移植气管组织中的细胞自噬、炎症及EMT,从而缓解气管的损伤。然而,目前关于这些影响的具体机制和程度仍需要更多深入的研究来明确。在将外泌体与miR-221-5p用于临床治疗之前,充分评估其对全身各组织器官的安全性和潜在影响是必不可少的,这将有助于制定更加合理、安全有效的治疗策略。本研究结果为理解BO的分子机制提

供了新的思路,为BO的治疗提供了潜在的途径和药物靶点。本研究尚属于初步研究,而BO的发病机制复杂,未来尚需通过动物实验和大样本临床试验来证实HGF-MSCs-EXO、miR-221-5p、NLRP1在BO中的详细机制。

【附加材料】

附表1和附图1见<https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.2026.0107FJ>。

请扫描右方二维码获取。



【参考文献】

- [1] Bansal S, Itabashi Y, Perincheri S, *et al*. The role of miRNA-155 in the immunopathogenesis of obliterative airway disease in mice induced by circulating exosomes from human lung transplant recipients with chronic lung allograft dysfunction[J]. *Cell Immunol*, 2020, 355: 104172.
- [2] Walther S, Rettinger E, Maurer HM, *et al*. Long-term pulmonary function testing in pediatric bronchiolitis obliterans syndrome after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 55(7): 1725-1735.
- [3] Glanville AR, Benden C, Bergeron A, *et al*. Bronchiolitis obliterans syndrome after lung or haematopoietic stem cell transplantation: current management and future directions[J]. *ERJ Open Res*, 2022, 8(3): 00185-2022.
- [4] Arjuna A, Olson MT, Walia R, *et al*. An update on current treatment strategies for managing bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2021, 15(3): 339-350.
- [5] Wuttisarnwattana P, Eid S, Wilson DL, *et al*. Assessment of therapeutic role of mesenchymal stromal cells in mouse models of graft-versus-host disease using cryo-imaging[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 1698.
- [6] 高洋, 秦合伟, 刘丹丹. 间充质干细胞调控免疫反应治疗创伤性脑损伤的作用机制研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(11): 1327-1335.
- [7] Zhidu S, Ying T, Rui J, *et al*. Translational potential of mesenchymal stem cells in regenerative therapies for human diseases: challenges and opportunities[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 266.
- [8] 李梦洋, 胡大海. 间充质干细胞外泌体成分在创面感染愈合中的应用新见解[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2025, 41(5): 500.
- [9] Keller CA, Gonwa TA, Hodge DO, *et al*. Feasibility, safety, and tolerance of mesenchymal stem cell therapy for obstructive chronic lung allograft dysfunction[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(2): 161-167.
- [10] Huang C, Zheng Y, Bai J, *et al*. Hepatocyte growth factor overexpression promotes osteoclastogenesis and exacerbates bone loss in CIA mice[J]. *J Orthop Translat*, 2021, 27: 9-16.
- [11] Li QY, Feng T, Zheng PC, *et al*. Research progress on the correlation between hepatocyte growth factor and the development of pulmonary fibrosis[J]. *J Clin Pulm Med*, 2022, 27(10): 1569-1573.
- [12] Cao XP, Han DM, Zhao L, *et al*. Hepatocyte growth factor enhances the inflammation-alleviating effect of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in a bronchiolitis obliterans model[J].

- Cytherapy, 2016, 18(3): 402-412.
- [13] Hade MD, Suire CN, Suo Z. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: applications in regenerative medicine[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1959.
- [14] Liu R, Wu S, Liu W, *et al.* microRNAs delivered by small extracellular vesicles in MSCs as an emerging tool for bone regeneration[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1249860.
- [15] Huang J, U KP, Yang F, *et al.* Human pluripotent stem cell-derived ectomesenchymal stromal cells promote more robust functional recovery than umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells after hypoxic-ischaemic brain damage[J]. *Theranostics*, 2022, 12(1): 143-166.
- [16] Koh HB, Kim HJ, Kang SW, *et al.* Exosome-based drug delivery: translation from bench to clinic[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(8): 2042.
- [17] Zeng H, Guo S, Ren X, *et al.* Current strategies for exosome cargo loading and targeting delivery[J]. *Cells*, 2023, 12(10): 1416.
- [18] Dong J, Wu B, Tian W. Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells (hypoMSCs-Exo): advantages in disease treatment[J]. *Cell Tissue Res*, 2023, 392(3): 621-629.
- [19] Duecker RP, de Mir Messa I, Jerkic SP, *et al.* Epigenetic regulation of inflammation by microRNAs in post-infectious bronchiolitis obliterans[J]. *Clin Transl Immunol*, 2022, 11(2): e1376.
- [20] Yang J, Do-Umehara HC, Zhang Q, *et al.* miR-221-5p-mediated downregulation of JNK2 aggravates acute lung injury[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 700933.
- [21] Gil-Martinez M, Lorente-Sorolla C, Rodrigo-Munoz JM, *et al.* Analysis of differentially expressed microRNAs in serum and lung tissues from individuals with severe asthma treated with oral glucocorticoids[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1611.
- [22] Zhou X, Tao Y, Shi Y. Unraveling the NLRP family: structure, function, activation, critical influence on tumor progression, and potential as targets for cancer therapy[J]. *Cancer Lett*, 2024, 605: 217283.
- [23] Xu Z, Kombe Kombe AJ, Deng S, *et al.* NLRP inflammasomes in health and disease[J]. *Mol Biomed*, 2024, 5(1): 14.
- [24] Ozretic P, da Silva Filho MI, Catalano C, *et al.* Association of NLRP1 coding polymorphism with lung function and serum IL-1 β concentration in patients diagnosed with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(10): 783.
- [25] Barry K, Murphy C, Mansell A. NLRP1-a cinderella story: a perspective of recent advances in NLRP1 and the questions they raise[J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 1274.
- [26] Deng K, Lu G. Immune dysregulation as a driver of bronchiolitis obliterans[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1455009.
- [27] Lai RC, Yeo RW, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 82-88.
- [28] Zhang S, Mulder C, Riddle S, *et al.* Mesenchymal stromal/stem cells and bronchopulmonary dysplasia[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1247339.
- [29] Sun J, Zhang Q, Huang F, *et al.* Mechanisms of miRNA-mediated cell death in renal ischemia reperfusion injury[J]. *Gene*, 2025, 964: 149635.
- [30] Liu H, Qin J, Deng L, *et al.* LncRNA SNHG16 promotes LPS-induced human bronchial epithelial cell pyroptosis through miR-339-5p/NLRP1 axis mediation[J]. *Cent Eur J Immunol*, 2024, 49(4): 345-365.
- [31] Laanesoo A, Mäe M, Remm A, *et al.* NLRP1 is a prominent inflammasome sensor found in bronchial epithelial cells in asthma and can be activated by rhinovirus A16[J]. *Clin Exp Allergy*, 2025, 55(3): 239-246.
- [32] Li MF, Li W, Ding L, *et al.* The function of NLRP1 in noninfectious pulmonary injury following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Chin J Hematol*, 2017, 38(7): 607-611.

(责任编辑: 纪方方)

解放军医学杂志®