

引用:黄鸿宇,郭子莘,陈甲尧,胡清睿,钟星星,危洋,李勤霞,黄子歆,熊武,张熙.托里消毒散对内皮祖细胞外泌体中表达与炎症相关miRNAs的影响[J].中医药导报,2025,31(5):45-50.

托里消毒散对内皮祖细胞外泌体中表达与炎症相关miRNAs的影响*

黄鸿宇¹,郭子莘¹,陈甲尧¹,胡清睿¹,钟星星¹,危洋¹,李勤霞¹,黄子歆²,熊武³,张熙¹

(1.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南长沙 410208;

2.湖南中医药大学中医学系,湖南长沙 410208;

3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] 目的:探讨托里消毒散浸提液促进内皮祖细胞(EPCs)增殖的最佳质量浓度,进一步分析托里消毒散浸提液对EPCs分泌外泌体(EPC-Exos)及外泌体中与炎症相关微小RNA(miRNAs)表达的影响。方法:无菌条件下取足月健康新生儿脐带血,分离得到单个核细胞,进一步分离并鉴定得到EPCs,将鉴定成功的EPCs用不同质量浓度梯度(0.00、0.01、0.05、0.10、0.20、0.50、0.80、1.00、2.00、3.00、4.00、8.00、16.00、32.00、48.00、64.00、100.00及128.00 mg/mL)的托里消毒散浸提液干预24 h,筛选出促进EPCs增殖的最佳质量浓度。另将鉴定成功的EPCs分为托里消毒散浸提液组(实验组)和磷酸盐缓冲液(PBS)组(对照组),实验组用最佳质量浓度的托里消毒散浸提液干预,对照组用等体积的PBS液处理,培养24 h,分别收集两组细胞外泌体。Western blotting法检测两组外泌体的生物学标记物(CD81、CD63、CD9、Calnexin);采用透射电子显微镜观察外泌体的形态;利用纳米粒子追踪分析技术检测外泌体的粒径;BCA检测两组外泌体质量浓度;qPCR法检测各组外泌体中与炎症相关miRNAs分子的表达。结果:托里消毒散浸提液促进EPCs增殖的最佳质量浓度为0.50 mg/mL;各组外泌体的生物学标记物(CD81、CD63、CD9)的表达均呈阳性,Calnexin的表达呈阴性。两组外泌体均形态完整、呈球形、大小均一,对照组中97.3%的EPC-Exos粒径为41.1~109.0 nm;实验组中99.5%的EPC-Exos粒径为120.3~284.5 nm。对照组与实验组EPC-Exos总蛋白质量浓度分别为(1.16±0.01) μg/μL和(1.04±0.02) μg/μL,差异均有统计学意义($P<0.01$)。实验组中部分与炎症相关miRNAs表达较对照组增多,即miR-92a-3p和miR-92a-5p表达增多,miR-92a-3p差异无统计学意义($P>0.05$),miR-92a-5p差异有统计学意义($P<0.05$),而miR-30d-3p、miR-30d-5p、miR-144-3p和miR-144-5p的表达较对照组明显减少,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:托里消毒散浸提液在促进内皮祖细胞增殖的同时能促进其分泌外泌体,且所分泌的外泌体负载调控炎症反应的miRNAs。托里消毒散浸提液能介导EPC-Exos发挥炎症调控的作用。

[关键词] 托里消毒散;内皮祖细胞;外泌体;微小RNA;炎症

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)05-0045-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.05.008

Effect of Tuoli Xiaodu Powder (托里消毒散) on Expression of Inflammation-Related miRNAs in Exosomes of Endothelial Progenitor Cells

HUANG Hongyu¹, GUO Zishen¹, CHEN Jiayao¹, HU Qingrui¹, ZHONG Xingxing¹, WEI Yang¹, LI Qinxia¹, HUANG Zixin², XIONG Wu³, ZHANG Xi¹

(1. College of Integrative Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China; 2. College of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410007, China)

[Abstract] Objective: To investigate the optimal concentration of Tuoli Xiaodu powder extracts for endothelial progenitor cells (EPCs) proliferation activity, to further analyze the effect of Tuoli Xiaodu powder extracts on the secretion of EPCs exosomes (EPC-Exos) and the expression of inflammation-related Micro RNAs (miRNAs)

*基金项目:湖南省卫生健康委科研计划项目(202204034510);湖南省科技厅临床医疗技术创新引导项目(2021SK50802)

通信作者:张熙,女,教授,研究方向为血管再生/慢性创面修复基础研究

in the exosomes. Methods: Term healthy newborn umbilical cord blood was extracted under aseptic conditions. Mononuclear cells were isolated, and EPCs were further isolated and identified. The successful EPCs were treated with different concentration gradients (0.00, 0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 0.80, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 8.00, 16.00, 32.00, 48.00, 64.00, 100.00, 128.00 mg/mL) of Tuoli Xiaodu powder extracts was treated for 24 h, and the optimal concentration of promoting EPCs proliferation was screened. In addition, EPCs successfully identified were divided into Tuoli Xiaodu powder extracts group (experimental group) and phosphate buffer (PBS) group (control group). The experimental group was treated with the optimal concentration of Tuoli Xiaodu powder extracts, and the control group was treated with equal volume of PBS solution for 24 h. The exosomes of the two groups were collected respectively. The biological markers (CD81, CD63, CD9, Calnexin) of the two groups of exosomes were detected by Western blotting. The morphology of exosomes was observed by transmission electron microscope. The particle size of exosomes was detected by nanoparticle tracking analysis. The concentrations of exosomes in the two groups were detected by BCA. The expression of inflammation-related miRNAs in exosomes of each group was detected by qPCR. Results: The optimal concentration of Tuoli Xiaodu powder to promote EPCs proliferation was 0.50 mg/mL. The expression of biological markers of exosomes (CD81, CD63, CD9) was positive in two groups, while the expression of Calnexin was negative. The exosomes in two groups were intact, spherical and uniform in size, and 97.3% of EPC-Exos in the control group had a particle size of (41.1–109.0) nm. The particle size of 99.5% EPC-Exos in the experimental group was (120.3–284.5) nm. The total protein concentration of EPC-Exos was (1.16±0.01) μg/μL and (1.04±0.02) μg/μL in control group and experimental group, respectively, with significant differences ($P<0.01$). The expression of some inflammation-related miRNAs increased in experimental group compared with that in the control group. The expression of miR-92a-3p and miR-92a-5p was increased. There was no statistical significance for miR-92a-3p ($P>0.05$), while there was statistical significance for miR-92a-5p ($P<0.05$). However, the expressions of miR-30d-3p, miR-30d-5p, miR-144-3p and miR-144-5p were significantly decreased in experimental group, compared with the control group, with significant differences ($P<0.05$). Conclusion: Tuoli Xiaodu powder extracts can promote the proliferation of endothelial progenitor cells and promote their secretion of exosomes, and the secretory exosomes are loaded with miRNAs that regulate inflammatory response. It indicates that Tuoli Xiaodu powder extracts can mediate EPC-Exos to play a role in inflammation regulation.

[Keywords] Tuoli Xiaodu powder; endothelial progenitor cells; exosome; miRNAs; inflammation

血管内皮受损和血管新生障碍与炎症反应密切相关。新形成的血管使炎症细胞持续募集,从而释放多种促血管生成细胞因子、趋化因子、促炎因子和生长因子,并进一步促血管生成^[1]。这一系列正反馈循环得不到有效调控会产生恶性循环,加剧炎症反应,最终形成慢性炎症^[2]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)的前体细胞,主要源自骨髓。当血管内皮细胞发生炎症时,它们会从骨髓经由血液循环迁移到受损的内皮部位,参与血管内皮炎症损伤的修复过程^[3]。外泌体(exosomes, Exos)是细胞旁分泌的重要组成部分,包含微小RNA(micro RNAs, miRNAs)、长链非编码RNA及蛋白质等诸多活性物质,能够对靶细胞产生作用,发挥其生物活性^[4]。托里消毒散出自明代外科学家陈实功的著作《外科正宗》,包涵中医“透”和“托”的治疗思想。“透法”中的白芷、皂角刺可使脓液排出,“托法”中黄芪、当归则能通畅气血,避免毒素内陷。相关研究^[5]显示,当归、黄芪、白芷和皂角刺提取物均能明显促进内皮细胞增殖,具有调节炎症反应、促进血管生成的作用。目前有研究^[6]表明EPC-Exos有调控血管内皮细胞炎症的作用,miRNAs可减轻或抑制内皮细胞炎症,恢复其功能。还有研究表明,EPC分泌外

泌体(EPC-Exos)包裹的内含物中miRNA 30d^[7]、miRNA 92a^[8]、miRNA 144^[9]与炎症密切相关。本团队前期研究发现浸提液在提取效率、成分纯度、细胞实验的稳定性和可控性等方面具有优势,故本实验收集托里消毒散浸提液干预后的EPCs分泌的外泌体,并检测EPC-Exos中与炎症相关miRNAs的表达,旨在为进一步阐释托里消毒散通过介导EPC-Exos发挥炎症调控的作用机制奠定基础。

1 材 料

1.1 药品与试剂 托里消毒散浸提液(人参、川芎、白芍、黄芪、当归、白术、茯苓、金银花各3 g,白芷、甘草、皂角刺、桔梗各1.5 g,蒸馏水400 mL,煎至320 mL),中药饮片购自湖南省中医药研究院附属医院,经湖南中医药大学药学院中药鉴定教研室龚力民副教授鉴定,以上12味药材饮片符合2020版《中国药典》一部各味药材项下规定;胰酶(批号:AWC0232)、磷酸盐缓冲液(PBS)(批号:AWC0409)及胎牛血清(批号:10099141)均购自美国Gibco公司;BCA蛋白定量试剂盒(美国Abiowell公司,批号:02A220621);外泌体提取纯化试剂盒(细胞上清)(批号:UR52121)、外泌体提取纯化试剂盒(血液)(批号:UR52136)、外泌体提取纯化试剂盒(其他液体)

(批号:UR52141)、外泌体蛋白专用裂解液(批号:UR33101)、外泌体红色荧光标记染料(PKH26)(批号:UR52302)和外泌体绿色荧光标记染料(PKH67)(批号:UR52303)均购自上海宇政生物科技有限公司;Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司,批号:15596-026);RT试剂盒(批号:RR047A)、TB Green qPCR试剂盒(批号:RR420A)均购自TAKARA公司;PBS液(HyClone公司,批号:SH30256.01);CD63抗体(批号:FITC557288)、CD9抗体(批号:FITC555371)及CD81抗体(批号:FITC551108)均购自美国BD公司。

1.2 主要仪器 倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器有限公司,型号:DSZ2000X);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R);纳米颗粒追踪分析仪(德国Particle Metrix公司,型号:ZetaView PMX 110);纳米流式分析仪(美国NanoFCM公司,型号:SNA-D1);透射电子显微镜(日本JEOL公司,型号:1230);多功能酶标仪(美国PerkinElmer公司,型号:VICTORX);蛋白凝胶电泳仪(美国ThermoFisher公司,型号:EI0001);实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司,型号:Stepone plus);分光光度计(美国Thermo公司,型号:NanoDrop2000)。

2 方 法

2.1 EPCs的培养与鉴定 无菌条件下取足月健康新生儿脐带血。脐带血的获取已得到孕妇及其家属同意并签署知情同意书,获湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准,批准文号:HN-LL-GZR-201902。本团队前期已从人脐血中分离和鉴定过EPCs^[10]。

2.2 托里消毒散浸提液促EPCs增殖的最佳浓度质量确定 将鉴定成功的EPCs分别用0.00、0.01、0.05、0.10、0.20、0.50、0.80、1.00、2.00、3.00、4.00、8.00、16.00、32.00、48.00、64.00、100.00及128.00 mg/mL的托里消毒散浸提液进行干预。细胞贴壁后消化计数,以 5×10^3 个细胞/孔密度接种于96孔板内,每孔100 μ L,各组均设6个复孔,去除含药培养基每孔加入100 μ L含有CCK-8的培养基。37 °C,5% CO₂继续孵育24 h后于Bio-Tek酶标仪分析450 nm处吸光度(OD)值,取均值绘制柱状图。

2.3 实验分组 将鉴定成功的EPCs随机分为实验组和对照组,实验组用最佳质量浓度的托里消毒散浸提液干预,对照组用等体积的PBS液干预。

2.4 EPC-Exos的提取 用无外泌体血清配置培养基,收集500 μ L培养上清;500 $\times g$ 离心10 min,弃去细胞和细胞碎片,上清液转移到新的离心管;将外泌体提取试剂加入到收集的细胞上清中,外泌体提取试剂与细胞培养上清按1:5混匀,4 °C过夜;10 000 $\times g$ 离心30 min后弃上清,10 000 $\times g$ 离心5 min,用移液枪小心吸去残留的上清液;最后用200 μ L PBS液重悬沉淀并转移到1.5 mL的离心管中,将该上清液中外泌体颗粒转入EP管中于4 °C以3 000 $\times g$ 离心10 min,去除上清,而后收集管底纯化后的外泌体,置于-80 °C冷藏备用。

2.5 EPC-Exos的鉴定 将培养获得的EPC-Exos用超速离心法与超滤法提取,贮存在-80 °C温度下无菌EP管内。采用蛋白免疫印迹法检测EPC-Exos表面CD81、CD63、CD9及Calnexin特征性标志物。

2.6 EPC-Exos的形态观察 将通过超速离心法结合超滤法分离得到的外泌体取5 μ L加到Formvar-carbon载样铜网上,将100 μ L PBS加到封口膜上,用镊子将铜网(Formvar膜面朝下)放在PBS液滴上清洗。将铜网放在50 μ L 1%戊二醛液滴上5 min;再将铜网放在100 μ L ddH₂O中5 min(洗8次)。室温下负染EPC-Exos,将50 μ L草酸双氧铀液滴于铜网上沉淀75 min,滤纸吸去浮液。将50 μ L甲基纤维素液滴于铜网上沉淀10 min,滤纸吸去浮液。常温干燥数分钟后将铜网置于透射电子显微镜样品室内,于80 kV进行电镜检测成像,观察外泌体形态并拍摄电子照片。

2.7 EPC-Exos粒径分析 采用纳米颗粒跟踪分析技术检测两组EPC-Exos的粒径,取两组各1 μ L EPC-Exos悬液,用PBS液稀释1 000倍,采用纳米颗粒跟踪分析仪对每个EPC-Exos颗粒的布朗运动进行追踪和分析,利用Stockes-Einstein方程式根据仪器捕捉的EPC-Exos布朗运动,计算其粒径。

2.8 EPC-Exos总蛋白质量浓度检测 用BCA蛋白定量试剂盒检测两组EPC-Exos中总蛋白含量,用与待测蛋白样品一致的稀释液将BSA标准品稀释为2.000 0、1.000 0、0.500 0、0.250 0、0.120 0、0.062 5、0.000 0 μ g/ μ L,标准品用RIPA裂解液按照50%梯度稀释,根据计算出的BCA工作液需要总量,将BCA-A和BCA-B按照50:1的体积比,配制BCA工作液,充分混匀。将稀释好的BSA标准品和待测蛋白样品各25 μ L分别加到作好标记的96孔板微孔中,再各孔加入200 μ L BCA工作液,37 °C放置30 min。用酶标仪在562 nm范围内,测定每个样品及BSA标准品的吸光值,绘制标准曲线,计算样品中的蛋白浓度。

2.9 EPC-Exos中与炎症相关miRNAs表达的检测 采用RT-qPCR法进行检测。RT-qPCR检测目的基因引物均在北京擎科公司合成。采用TRizol试剂分别提取两组1 mL样本总RNA,用紫外吸收法测定浓度和纯度。用SYBR法进行引物设计,再实时定量PCR,按以下程序进行:95 °C,10 min;40个PCR循环(95 °C,15 s;60 °C,30 s),实施定量PCR扩增,并从60 °C缓慢加热到95 °C。以U6为内参照,每个样本设3个复孔。用ImageJ 1.8.0软件(美国国立卫生研究院)分析2组外泌体总RNA电泳条带,采用△循环阈值(ΔC_t)法处理结果,计算目的基因与内参基因的相对表达量,即 $2^{-\Delta \Delta C_t}$ 法。重复3次。

表1 RT-qPCR法检测EPC-Exos中与炎症相关miRNAs表达的引物序列表

基因名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')	产物长度/bp
hsa-miR-30d-5p	TGTAAACATCCCCGACTGGAAAG	GCTGTCAACGATACGGCTACGTA	78
hsa-miR-30d-3p	CTTCAGTCAGATGTTGCTGC	GCTGTCAACGATACGGCTACCTA	78
hsa-miR-144-3p	TACAGTATACTGATGTACT	GCTGTCAACGATACGGCTACGTA	75
hsa-miR-144-5p	GCGGGATATCATCATATACTGTAAG	GCTGTCAACGATACGGCTACGTA	79
hsa-miR-92a-5p	AGGTTGGATCGCTTCAATGCT	GCTGTCAACGATACGGCTACCTA	78
hsa-miR-92a-3p	TATTGCCACTGTCCGGCCCTGT	GCTGTCAACGATACGGCTACGTA	77
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTGGCT	94

2.10 统计学方法 采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析。计量资料用“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较若满足正态性和方差齐性选用独立样本t检验,满足正态分布但是方差不

齐选用成组t检验,不满足正态性选用秩和检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 EPCs形态特征与表面标志物鉴定^[10] 据团队前期培养结果显示,第7天培养细胞呈现典型集落形态,集落中间为圆形细胞,周边为呈放射状排列的梭形细胞。(见图1)早期EPCs的特征是CD34、KDR的高水平表达以及可检测到CD14单核细胞标志物的表达。对EPCs表面标志物(CD34、KDR、CD14)的表达水平进行表征,流式细胞术分析显示EPCs表面标志物CD34、KDR的表达率高于90%,CD14的表达率低于10%。(见图2)

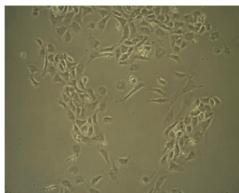


图1 EPCs培养第7 d的光镜图 ($\times 100$)

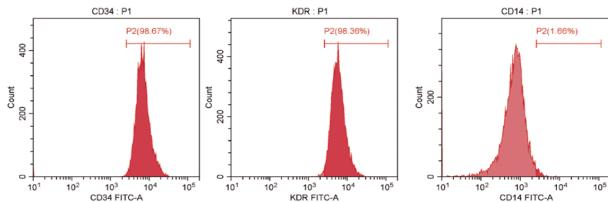


图2 EPCs 表面标志物鉴定

3.2 不同质量浓度托里消毒散浸提液对EPCs细胞活性的影响 通过不同质量浓度梯度的托里消毒散浸提液干预EPCs,发现0.50 mg/mL质量浓度下的细胞活性最强。(见图3)

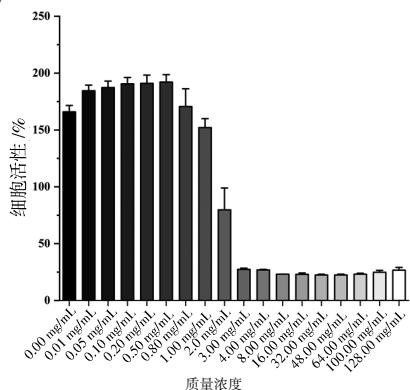


图3 不同质量浓度梯度的托里消毒散浸提液干预下EPCs 的活性 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.3 EPC-Exos的形态鉴定 在透射电子显微镜下观察两组EPC-Exos,两组均形态完整、呈球形或杯状且大小不一。(见图4)

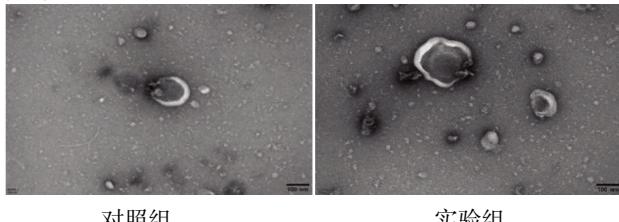


图4 透射电子显微镜下观察到的EPC-Exos ($\times 100000$)

3.4 EPC-Exos的表面标志物鉴定 各组EPC-Exos特征性表面标志物CD81、CD63和CD9的表达呈阳性,Calnexin表达呈阴

性。(见图5)

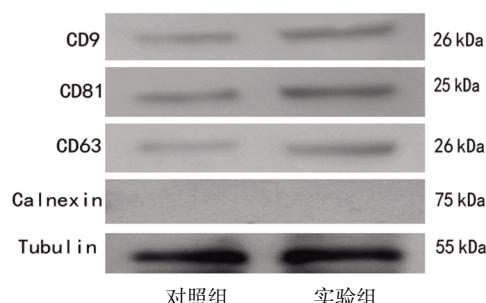


图5 EPC-Exos 特征性表面标志物 CD9、CD81、CD63 和 Calnexin 的表达

3.5 EPC-Exos粒径 对照组中97.3%的EPC-Exos粒径为41.1~109.0 nm,实验组中99.5%的EPC-Exos粒径为120.3~284.5 nm。(见图6)

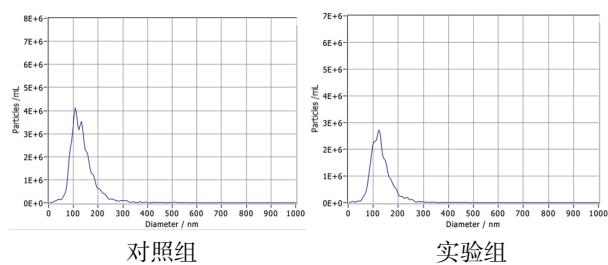
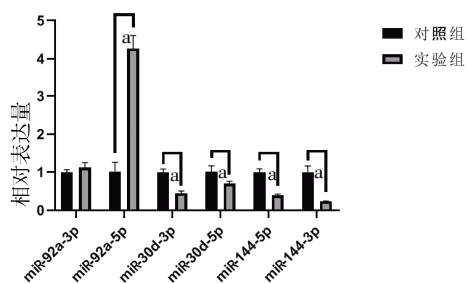


图6 EPC-Exos 粒径图

3.6 EPC-Exos质量浓度 对照组EPC-Exos的质量浓度为(1.04 ± 0.02) $\mu\text{g}/\text{mL}$,明显低于实验组的(1.16 ± 0.01) $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($t=-10.930, P=0.000$)。

3.7 托里消毒散浸提液对EPC-Exos中与炎症相关miRNAs表达的影响 培养24 h后,与对照组比较,实验组miR-92a-5p表达明显增多($P<0.05$),而miR-92a-3p差异无统计学意义($P>0.05$);实验组miR-30d-3p、miR-30d-5p、miR-144-5p、miR-144-3p表达明显减少,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(见图7)



注:与对照组比较,^a $P<0.05$ 。

图7 托里消毒散浸提液对 EPC-Exos 中与炎症相关 miRNAs 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨 论

血管炎症是导致血管再生困难或血管病变的原因。有研究表明,当血管局部出现病变时,无论是渗透性的改变、炎症反应还是止血过程,都发生在血管壁上,且这些过程均由ECs进行调控^[11]。EPCs作为ECs的前体细胞,不仅能够分化成血管内皮细胞,有助于预防内皮功能紊乱和组织缺血现象,还能降低血管增生的概率^[12]。血管生成是多种病理过程(如创伤愈合、慢性炎症和肿瘤等)中的基本事件^[13]。炎症反应与血管新

生是两个相互联系、彼此影响的病理过程。

EPCs是一种骨髓源性细胞,又称血管母细胞,在一定条件下可迁移到外周循环,分化为成熟的血管内皮细胞,并分泌多种细胞因子和血管生长因子,从而促进血管生成、增强组织修复、改善整体伤口愈合^[14]。Exos是由细胞分泌的包含RNAs和蛋白质的小囊泡(30~150 nm),在唾液、血液、尿液及乳汁等体液中大量存在。其被认为具有细胞间信使的功能,在特定细胞之间传递它们的效应物或信号分子。Exos在免疫应答^[15]、炎症反应^[16]、血管生成^[17]、凋亡^[18]、凝血和废物处理等生理过程中具有重要作用。源于不同细胞的Exos所含RNAs及蛋白成分存在差异,既可充当多种疾病早期诊断的标志物,也能作为靶向药物的载体用于疾病治疗。炎症是众多心血管疾病病理生理过程的核心因素,不仅能促使血管内皮生长因子等物质的生成^[19],还能激发骨髓中的EPCs释放到循环外周血中^[20],进而参与组织修复过程。有研究发现外泌体可通过调节损伤局部的炎症反应来促进皮肤的修复。袁佳沁等^[21]指出外泌体调节炎症反应可能是通过激活核因子-κB(NF-κB)/p65、let-7b/Toll样受体4(TLR4)通路,降低炎症因子肿瘤坏死因子(TNF-α)、白介素-1β(IL-1β)等的表达和诱导巨噬细胞活化来实现的。亦有研究显示,Exos作为一种旁分泌的功能性产物,可降低血管内皮细胞的损伤程度,缓解炎症反应^[22]。从EPC-Exos中寻找出含有与炎症相关的高表达miRNAs,进而深入研究其调控炎症反应的机制,可以为炎症反应及创面愈合的研究、治疗及相关新药研发提供新靶点和新思路。

托里消毒散为外科疮疡补托法代表方^[23]。研究^[24]表明,托里消毒散可促进炎症消退,缩小病灶范围,它能经由多种方式降低病变部位的炎症反应,比如通过各种信号通路调控细胞因子的表达,抑制炎性小体的激活以及助力炎症创面的愈合。郝福明等^[25]采用金黄色葡萄球菌局部注射制备大鼠疮疡模型,用托里消毒散进行灌胃治疗。结果显示,该方剂可提升脓肿愈合率,增加溶菌酶含量,减少IL-2含量,其作用机制与促进组织修复(透托法)、加速脓肿愈合、调节免疫功能、发挥抗炎杀菌作用密切相关。目前尚无托里消毒散浸提液与EPCs及其外泌体的相关研究。

本实验检测与炎症相关miRNAs的表达,发现实验组EPC-Exos表达量增多,说明托里消毒散组方中有中药成分可促进EPCs分泌外泌体。进一步对EPC-Exos中与炎症相关miRNAs定量检测,结果显示实验组中miR-92a-3p、miR-92a-5p质量浓度高于对照组,实验组中miR-30d-3p、miR-30d-5p、miR-144-5p、miR-144-3p质量浓度明显低于对照组,据实验结果分析miR-92a多分泌抑炎因子以降低炎症反应,而miR-30d、miR-144多分泌促炎因子。抑制miR-30d、miR-144分泌促炎因子,可降低炎症反应。

miR-92a多分泌抑炎因子起抗炎作用,如ECs衍生的外泌体能激活肺泡巨噬细胞(AMs)并诱导急性肺损伤中miR-92a-3p介导的肺部炎症。LIU F等^[26]研究发现肺泡上皮细胞(AECs)中miR-92a-3p质量的抑制降低了AECs衍生外泌体(LPS-Exos)的促炎作用。CHEN H等^[27]研究发现miR-92a-3p可被mmu_circ_0000037靶向,miR-92a-3p过表达能抵消mmu_circ_0000037

对蓝蛋白诱导的MPC-83细胞损伤所产生的影响。而Pias1被确认为miR-92a-3p的靶标,mmu_circ_0000037可通过海绵化miR-92a-3p来调控Pias1的表达。故mmu_circ_0000037可通过靶向miR-92a-3p/Pias1轴缓解蓝蛋白诱导的MPC-83细胞炎症损伤。还有研究表明miR-30d多分泌促炎因子,如在全身炎症反应综合征中,miR-30d-5p被鉴定为潜在炎症调节因子,介导并调控炎症反应^[28]。重症脑炎中上调表达的RAB11B-AS1可通过吸附miR-30d-5p以调控小神经胶质细胞的激活及炎症反应^[29]。YE X H等^[30]研究发现lncRNA Malat1升高或miR-30d-5p的敲低能消除sh-STIM2所诱导的细胞损伤抑制现象。在小胶质细胞中,基质相互作用分子2(STIM2)的敲低可通过抑制小胶质细胞的活化、炎症反应、细胞凋亡及焦亡,从而减轻脑缺血/再灌注所造成的损伤。此外,有研究表明miR-144亦分泌促炎因子,如KIM H J等^[31]研究发现在感染脓肿分枝杆菌脓肿亚种(Mabc)和脓肿分枝杆菌亚种(Mmass)后,小鼠的巨噬细胞和肺中miR-144-3p和促炎细胞因子/趋化因子的表达上调,同时miR-144-3p的过表达还会导致促炎细胞因子/趋化因子显著增加。MO M L等^[32]研究表明,miR-144-3p能靶向BMP2以负调节其表达,磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号传导的激活损害了IL-1β刺激诱导的BMP2加重的N1511细胞损伤的抑制。抑制miR-144-3p可减轻类风湿性关节炎大鼠的软骨损伤和炎症。

综上所述,托里消毒散浸提液能通过介导EPC-Exos中的上述miRNAs调控内皮祖细胞炎症反应,但本研究未能筛选出托里消毒散方中具体起效药物单体,存在一定的缺陷,需在后续实验中进一步研究阐明。

参考文献

- NAITO H, IBA T, TAKAKURA N. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells[J]. Int Immunol, 2020, 32(5):295-305.
- SAHA S, MÜLLER D, CLARK A G. Mechanosensory feedback loops during chronic inflammation[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11:1225677.
- YANG K, LIU X, LIN W W, et al. Upregulation of microRNA-125b leads to the resistance to inflammatory injury in endothelial progenitor cells [J]. Cardiol Res Pract, 2020, 2020:6210847.
- 熊武,谭梅鑫,邹晓玲,等.人参皂苷Rg1调控内皮祖细胞分泌外泌体及表达血管新生相关miRNAs的影响[J].时珍国医国药,2022,33(2):277-280.
- 谭梅鑫.托里消毒散调控创面炎症反应对糖尿病皮肤溃疡愈合的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2023.
- PAN X Y, YANG L, WANG S Q, et al. Semaglutide alleviates inflammation-induced endothelial progenitor cells injury by inhibiting miR-155 expression in macrophage exosomes[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 119: 110196.
- HUANG J M, LI Y, ZHU S Y, et al. miR-30 family:

- A novel avenue for treating bone and joint diseases? [J]. Int J Med Sci, 2023, 20(4): 493–504.
- [8] ZHUANG C Y, PIAO C X, CHOI M, et al. Delivery of miRNA-92a inhibitor using RP1-linked peptide elicits anti-inflammatory effects in an acute lung injury model [J]. J Biomed Nanotechnol, 2021, 17(7): 1273–1283.
- [9] YU A Y, ZHANG T X, ZHONG W Y, et al. miRNA-144 induces microglial autophagy and inflammation following intracerebral hemorrhage [J]. Immunol Lett, 2017, 182: 18–23.
- [10] 肖慧,白雪,余亦程,等.黄芪甲苷对高糖受损人内皮祖细胞分泌SDF-1 α 和CXCR4的影响[J].中医药导报,2020,26(12):1-4.
- [11] RANDI A M, SMITH K E, CASTAMAN G. Von Willebrand factor regulation of blood vessel formation [J]. Blood, 2018, 132(2): 132–140.
- [12] YAN F C, LI J, ZHANG W. Transplantation of endothelial progenitor cells: Summary and prospect [J]. Acta Histochem, 2023, 125(1): 151990.
- [13] 夏如意,唐棣,吴娟娟,等.糖尿病患者创面难愈合的机制及治疗新进展[J].中国美容整形外科杂志,2024,35(3): 161–164.
- [14] 尹千璐,周小莉,王森,等.活血通络汤对抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎患者内皮祖细胞功能及血管内皮损伤因子的影响[J].中国中医药信息杂志,2023,30(4): 100–105.
- [15] 李言蹊,林树梅,任艳娥,等.乳源外泌体在营养调控及免疫功能调节方面的研究进展[J].动物营养学报,2023,35(5):2808–2814.
- [16] 樊逸菲,程锦,徐雁,等.ATDC5来源外泌体包载小分子药物5Z-7-Oxozeanol治疗骨关节炎[J].中国生物化学与分子生物学报,2023,39(5):706–714.
- [17] 陶苏皖,钟晓,黎钗,等.干细胞外泌体对内皮细胞增殖迁移和血管生成的影响[J].生物技术,2023,33(1):81–87,94.
- [18] 雷艳,詹世淮,杨兰,等.脐带间充质干细胞源外泌体通过自噬对肾小管上皮细胞凋亡的抑制作用研究[J].重庆医学,2023,52(15):2255–2260,2266.
- [19] GLINTON K E, MA W S, LANTZ C, et al. Macrophage-produced VEGFC is induced by efferocytosis to ameliorate cardiac injury and inflammation [J]. J Clin Invest, 2022, 132(9):e140685.
- [20] YUAN F F, PENG W, YANG Y Y, et al. Endothelial progenitor cell-derived exosomes promote anti-inflammatory macrophages via SOCS3/JAK2/STAT3 axis and improve the outcome of spinal cord injury [J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 156.
- [21] 袁佳沁,宋福晨,朱美冬,等.外泌体在糖尿病性溃疡中作用机制及应用的研究进展[J].实用临床医药杂志,2019, 23(20):1–5.
- [22] 刘司麒,吴明芮,乔铃然,等.负载人脐带间充质干细胞的水凝胶对糖尿病小鼠皮肤创面愈合的疗效[J].中国组织工程研究,2023,27(1):21–27.
- [23] 郝福明,李元奎.外科托法源流考[J].中华中医药杂志, 2011, 26(10):2208–2210.
- [24] 杜楠楠,冯佳梅,吴雪卿.简述托里消毒散的现代研究进展[J].内蒙古中医药,2023,42(2):108–111.
- [25] 郝福明,赵清树,任秀玲,等.托法扶正托毒机理的动物实验研究[J].中华中医药学刊,2010,28(7):1418–1420.
- [26] LIU F, PENG W, CHEN J Q, et al. Exosomes derived from alveolar epithelial cells promote alveolar macrophage activation mediated by miR-92a-3p in sepsis-induced acute lung injury [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:646546.
- [27] CHEN H, TU J, HE L, et al. Mmu_circ_0000037 inhibits the progression of acute pancreatitis by miR-92a-3p/Pias1 axis [J]. Immun Inflamm Dis, 2023, 11(4):e819.
- [28] CASERTA S, MENGOTTA M, KERN F, et al. Severity of systemic inflammatory response syndrome affects the blood levels of circulating inflammatory-relevant microRNAs [J]. Front Immunol, 2017, 8:1977.
- [29] 潘建英,陈仲华,黄建东.重症脑炎中上调表达的lncRNA RAB11B-AS1通过靶向miR-30d-5p调控小神经胶质细胞激活及炎症反应的作用及机制[J].中国妇幼保健, 2023, 38(6):1121–1124.
- [30] YE X H, CHEN Q Y, GONG X R, et al. STIM2 suppression blocks glial activation to alleviate brain ischemia reperfusion injury via inhibition of inflammation and pyroptosis [J]. Mol Biotechnol, 2024, 66(8): 2046–2063.
- [31] KIM H J, KIM I S, LEE S G, et al. miR-144-3p is associated with pathological inflammation in patients infected with Mycobacteroides abscessus [J]. Exp Mol Med, 2021, 53(1):136–149.
- [32] MO M L, JIANG J M, LONG X P, et al. miR-144-3p aggravated cartilage injury in rheumatoid arthritis by regulating BMP2/PI3K/Akt axis [J]. Mod Rheumatol, 2022, 32(6):1064–1076.

(收稿日期:2024-10-22 编辑:罗英姣)