

# 脂多糖刺激肺泡上皮细胞分泌的外泌体对肺泡巨噬细胞的致炎效应

丁成志 彭巍 李勇 杨云 邵强 赵宁 陈家泉 钱克俭 刘芬

**【摘要】目的** 探讨脂多糖(LPS)刺激肺泡上皮细胞(RLE-6TN)分泌的外泌体对肺泡巨噬细胞(NR8383)的致炎效应。**方法** 运用Transwell共培养体系,将经过不同处理的RLE-6TN细胞(正常组、LPS刺激组、外泌体抑制剂组、外泌体抑制剂预处理+LPS刺激组)分别与NR8383细胞共培养, NR8383细胞单培养作为空白对照组,共培养12 h后利用荧光定量PCR(qPCR)法检测各组NR8383细胞中IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的mRNA相对表达量。为进一步探讨肺泡上皮细胞分泌的外泌体对NR8383炎症反应的影响,采用差速超速离心法分别提取实验组外泌体(LPS刺激RLE-6TN细胞分泌的外泌体)和对照组外泌体(正常RLE-6TN细胞分泌的外泌体),运用透射电镜、蛋白免疫印迹鉴定外泌体,用qNano粒子直径分析仪检测外泌体粒子直径。将NR8383细胞分为实验组,对照组, PBS组,分别加入外泌体悬液(10  $\mu$ g/mL,实验组和对照组)和等体积的PBS,培养12 h后,用激光共聚焦显微镜观察NR8383细胞对外泌体的吞噬,用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测细胞上清液中炎症因子的IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6的表达水平。**结果** ① Transwell共培养实验中,与空白对照组相比,LPS组的炎症因子mRNA相对表达量显著升高( $P < 0.01$ ),而与LPS组相比,外泌体抑制剂预处理+LPS组的炎症因子mRNA相对表达量却明显降低( $P < 0.01$ );②提取的外泌体经过透射电镜观察为圆形或椭圆形囊泡,直径为40~100 nm,表达外泌体标志物CD63和CD9;③两组外泌体与NR8383细胞共培养5 h后,激光共聚焦显微镜下见胞内散在分布被吞噬的红色荧光外泌体。实验组、对照组外泌体分别作用于NR8383细胞后,与PBS组相比,实验组外泌体引起NR8383细胞炎症因子表达的显著升高( $P < 0.01$ ),对照组外泌体则差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** LPS刺激肺泡上皮细胞分泌的外泌体能够激活肺泡巨噬细胞产生致炎作用。

**【关键词】** 脂多糖;外泌体;肺泡上皮细胞;肺泡巨噬细胞;炎症

**The inflammatory effect of exosomes derived from alveolar epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide on the alveolar macrophages** Ding Chengzhi, Peng Wei, Li Yong, Yang Yun, Shao Qiang, Zhao Ning, Chen Jiaquan, Qian Kejian, Liu Fen

Department of Critical Care Medicine(Ding C, Peng W, Yang Y, Shao Q, Zhao N, Chen J, Qian K, Liu F), Department of Oncology(Li Y), The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: Liu Fen, Email:liufen9934@163.com

**【Abstract】Objective** To explore the inflammatory effect of exosomes derived from alveolar epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS) on the alveolar macrophages (NR8383).

**Methods** The alveolar epithelial cells disposed with different treatments were co-cultured with alveolar macrophages by using a Transwell system separately. Alveolar epithelial cells (RLE-6TN) were randomly divided into 4 groups: normal group, LPS-stimulated group, exosome inhibitor group, and exosome inhibitor pretreatment + LPS stimulation group. NR8383 cultured alone was considered as a

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.10.013

基金项目:国家自然科学基金(81671894, 81660315);江西省科技厅重点研发计划项目(20161BBG70157)

作者单位:330006 南昌,南昌大学第一附属医院重症医学科(丁成志、彭巍、杨云、邵强、赵宁、陈家泉、钱克俭、刘芬),肿瘤科(李勇)

通信作者:刘芬, Email:liufen9934@163.com

blank control. After the 12-h co-culture, the real-time PCR (qPCR) was performed to examine the mRNA relative expression of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  in NR8383 cells. To further explore the role of exosomes derived from RLE-6TN on alveolar macrophages mediated inflammatory response, the experimental exosomes (exosomes derived from LPS-induced RLE-6TN) and control exosomes derived from normal RLE-6TN were extracted by gradient ultracentrifugation. Transmission electron microscopy and Western blotting analyses was performed to identify the exosomes, and qNano particle diameter analyzer was conducted to measure the particle diameter of exosomes. In vitro, NR8383 cells were divided into 3 groups which were cultured with exosomes derived from LPS-stimulated RLE-6TN at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (experimental group), exosomes derived from untreated RLE-6TN at the same concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (control group), and the PBS at the same volume with experimental group (PBS group), respectively for 12 h. After the treatment, the phagocytosis of NR8383 cells was observed by laser confocal microscope and the release of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in supernatants of NR8383 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay ELISA

**Results** (1) In the co-culture experiment, the mRNA relative expression of pro-inflammatory cytokine in the LPS group was significantly increased compared with the blank control group ( $P < 0.01$ ), however comparing the exosome inhibitor pretreatment+LPS group with the LPS group, the expression of pro-inflammatory cytokine was decreased ( $P < 0.01$ ). (2) The extracted exosomes were observed as circular or elliptical vesicles with a diameter of 40-100 nm under the transmission electron microscopy. Western blotting analyses showed that the extracted exosomes express the protein marker, such as CD63 and CD9; After incubation with NR8383 cells for 5 h, laser scanning confocal microscope showed that the exosomes labeled with red fluorescent were uptaken by NR8383 cells. (3) After the exosomes derived from the LPS-disposed RLE-6TN and the normal RLE-6TN cells were incubated with NR8383 cells respectively. The ELISA test showed that treated the alveolar macrophages with LPS induced alveolar epithelial secreted exosomes led to a robustly increased release of pro-inflammatory cytokine ( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference between the control group and PBS group ( $P > 0.05$ ).

**Conclusions** Exosomes derived from LPS-disposed alveolar epithelial cells activate the alveolar macrophage-mediated inflammatory response.

**【 Key words 】** Lipopolysaccharide; Exosomes; Alveolar epithelial cells; Alveolar macrophages; Inflammation

脓毒症肺损伤在危重症患者中有着很高的发病率和病死率，主要特征表现为炎性细胞活化和弥漫性肺泡损伤<sup>[1-2]</sup>。革兰阴性细菌外膜释放的脂多糖 (LPS) 被认为是引起脓毒症肺损伤的重要因素<sup>[3]</sup>。当机体受到 LPS 刺激时，可导致肺泡上皮细胞、肺毛细血管内皮细胞和肺间质的急性弥漫性损害，巨噬细胞在肺内聚集、浸润、活化，释放大量炎症介质和细胞因子，引起急性肺损伤甚至急性呼吸窘迫综合征<sup>[4]</sup>。

外泌体是细胞分泌的一种囊泡状小体，直径为 30~100 nm，其携带了脂质、蛋白质、核酸等多种生物活性成分，可通过直接接触或膜融合的方式将囊内的活性成分转移至靶细胞，从而参与各种生理病理过程<sup>[5-6]</sup>。已有研究表明在受到细菌刺激时，来源于肺泡巨噬细胞的外泌体通过传递促炎因子 il-36  $\gamma$  可诱发肺损伤<sup>[7]</sup>。但在脓毒症肺损伤中，来源于肺泡上皮细胞的外泌体所发挥的作用尚不清

楚。本研究旨在探讨在脓毒症肺损伤中，肺泡上皮细胞分泌的外泌体是否对肺泡巨噬细胞产生致炎作用，为进一步了解脓毒症肺损伤的发生发展机制开辟新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383、大鼠肺泡 II 型上皮细胞株 RLE-6TN 均购自上海中国科学院细胞库；胎牛血清 (Gibco 公司，美国)；青霉素、链霉素 (山东鲁抗医药股份有限公司，中国)；DMEM/F-12、Ham F-12K 培养液、GW4869、PKH-26 荧光染料、CSFE 荧光染料、DAPI 染料和 LPS (E.coli, O111 : B4) (Sigma 公司，美国)；兔抗大鼠 CD9 单克隆抗体 (Abcam 公司，英国)；兔抗大鼠 CD63 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司，美国)；辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗 (北京中杉金桥生

物技术有限公司, 中国); 逆转录试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa 公司, 日本); TRIzol 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒和 SuperSignal West Femto 化学发光底物 (Thermo Fisher 公司, 美国); 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL-1 $\beta$ 、IL-6) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒 (上海依科赛生物制品有限公司, 中国); Transwell 培养板 (0.4  $\mu\text{m}$  孔径, Corning 公司, 美国); 微量蛋白核酸定量分析仪、ABI Step One Plus 实时荧光定量 PCR 仪和超速离心机 (Thermo Fisher 公司, 美国); H-7650 透射电子显微镜 (Hitachi 公司, 日本); 高分辨率可调电阻脉冲生物颗粒检测仪 (Izon 公司, 美国); FV3000 激光共聚焦显微镜 (Olympus 公司, 日本); 凝胶成像分析仪 (Bio-Rad 公司, 美国)

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 肺泡巨噬细胞株 NR8383 培养于含 15% 胎牛血清、1.5 g/L 碳酸氢钠的 Ham F-12K 完全培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱内培养, 2~3 d 更换 1 次培养基, 当细胞生长融合至 80% 时传代 1 次。肺泡 II 型上皮细胞株 RLE-6TN 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM / F12 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养, 每 2~3 d 传代 1 次, 传代时用含质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 细胞消化液消化。

**1.2.2 Transwell 共培养及实验分组** 分别取对数生长期的 NR8383 和 RLE-6TN, 利用 Transwell 小室和 6 孔板构建共培养体系: 将 RLE-6TN 随机分为 4 组, 各组处理如下: 正常组: 正常的 RLE-6TN; LPS 组: RLE-6TN 经过 LPS (终浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激 24 h; GW4869 组: RLE-6TN 经过外泌体抑制剂 (GW4869, 终浓度为 10  $\mu\text{mol}$ ) 预处理 8 h; GW4869+LPS 组: RLE-6TN 先经过外泌体抑制剂 (GW4869, 终浓度为 10  $\mu\text{mol}$ ) 预处理 8 h, 再加入 LPS (终浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激 24 h。RLE-6TN 细胞经过各组处理后以  $5 \times 10^5$ /孔接种于 Transwell 小室中 (即上室), NR8383 细胞以  $1 \times 10^6$ /孔接种于 6 孔板中 (即下室), 待细胞贴壁后将 Transwell 小室插入 6 孔板中共培养。NR8383 单培养作为空白对照组。12 h 后收集各组 NR8383 细胞, 进行后续实验。

**1.2.3 外泌体的提取** RLE-6TN 用完全培养基 (DMEM/F-12+10% 的 FBS+ 双抗) 培养, 当细

胞增殖达到 80% 时, 用 PBS 冲洗细胞表面, 换 DMEM/F-12 基础培养基培养并加入 LPS (终浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中静置培养 24 h。收集细胞上清液, 4 $^{\circ}\text{C}$  300  $\times$  g 离心 10 min, 取上清液弃残余细胞, 2 000  $\times$  g 离心 10 min 除去细胞碎片, 取上清液经 10 000  $\times$  g 离心 30 min, 进一步除去细胞碎片, 取上述上清液, 用 0.22  $\mu\text{m}$  的过滤器处理进行过滤, 除去外泌体以外的微泡, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、100 000  $\times$  g 超高速离心 70 min, 去除上清液而留下的沉渣及外泌体, 用 PBS 溶液重悬外泌体, 再次 4 $^{\circ}\text{C}$ 、100 000  $\times$  g 超高速离心 70 min, 即获得纯度较高的实验组外泌体 (实验组 Exo), 自未加 LPS 刺激的 RLE-6TN 细胞提取的外泌体悬液作为对照组外泌体 (对照组 Exo), 将外泌体转移至 1.5 mL 的 EP 管中, -80 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.4 外泌体形态的观察** 取 20  $\mu\text{L}$  外泌体悬液, 滴于孔径为 2 nm 的载样铜网上, 室温静置 2 min, 用滤纸从滤网侧边吸去多余的液体, 滴加 3% 磷钨酸溶液 30  $\mu\text{L}$ , 室温负染 5 min, 用滤纸吸干负染液, 晾干, 将铜网置于透射电镜的样品室内, 观察外泌体形态并拍摄透射电镜照片。

**1.2.5 外泌体直径的检测** 使用 Izon 颗粒分析仪检测外泌体的直径。用标准品标准化设备后, 将样品用 PBS 缓冲液稀释 100 倍, 混匀, 按操作要求将 100  $\mu\text{L}$  稀释液注入加样板中, 随后检测样品颗粒的直径。

**1.2.6 蛋白印迹法 (Western Blot) 检测外泌体表面蛋白标记** 采用 RIPA 裂解液提取外泌体内的蛋白质, 通过 BCA 法测定外泌体蛋白的浓度。制胶 (12% 分离胶, 5% 浓缩胶), 取外泌体蛋白 40  $\mu\text{g}$  经电泳分离后转移至硝酸纤维素膜, 封闭后分别加稀释后兔抗 CD9 (1:1 000 稀释)、CD63 (1:1 000 稀释) 单克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育, TBST 洗膜 3 次, 分别滴加 HRP 标记的二抗 (1:4 000 稀释), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 化学发光底物检测杂交信号, 凝胶成像系统下观察条带显影并拍照。

**1.2.7 外泌体的标记和摄取** 按照 PKH-26 红色荧光标记试剂盒说明书步骤, 对外泌体进行标记。将荧光染料 PKH-26 (400  $\mu\text{L}$ ) 加入到外泌体悬液中, 室温孵育 5 min 后用等体积的无外泌体血清进行封闭, 用 PBS 洗涤 2 次, 去除未结合的染料。将 PKH-26 标记的外泌体与 NR8383 细胞 ( $1 \times 10^5$  个) 共培养 5 h, 并用 CFSE (羧基荧光素琥珀酰亚胺

基氨基酯)和 DAPI 标记细胞,于共聚焦显微镜下观察拍照。

1.2.8 外泌体与 NR8383 细胞共培养及实验分组 选取生长状态良好的 NR8383 细胞,随机分为 PBS 组、对照组和实验组,以  $1 \times 10^6$ /孔的密度接种于 6 孔板,分别加入实验组外泌体和对照组外泌体(终浓度都为  $10 \mu\text{g/mL}$ ),空白组加入等体积的 PBS,各组以去除外泌体血清 NR8383 细胞,12 h 后收集各组细胞上清液,进行后续实验。

1.2.9 炎症因子表达的检测 (1) qPCR 技术检测 mRNA 表达水平 细胞总 RNA 提取按照 TRIzol 试剂盒操作说明书操作,将细胞总 RNA 逆转录获得 cDNA。应用 SYBR Green 荧光染料试剂盒进行 qPCR。通过 Ct 值进行数据分析,目的基因的相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示,引物序列见表 1。

(2) ELISA 技术检测细胞上清液细胞因子的水平 按照 ELISA 说明书步骤,检测各组细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的蛋白水平。

### 1.3 统计学方法

所有数据均使用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,应用 GraphPad Prism 5 软件作图。数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 The primer sequences for qPCR

名称	引物序列
IL-6	Forward: 5'-GCTCTGGTCTTCTGGAGTTCC-3'
	Reverse: 5'-GAGTTGGATGGTCTTGGTCCT-3'
IL-1 $\beta$	Forward: 5'-ACAAGGAGAGACAAGCAACGA-3'
	Reverse: 5'-TCTGCTTGAGAGGTGCTGATG-3'
TNF- $\alpha$	Forward: 5'-GGCAGCCTTGTCCTTGAAGAG-3'
	Reverse: 5'-GTAGCCACGTCGTAGCAAACC-3'
$\beta$ -actin	Forward: 5'-TACTGCCCTGGCTCCTAGCA-3'
	Reverse: 5'-TGGACAGTGAGGCCAGGATAG-3'

## 2 结果

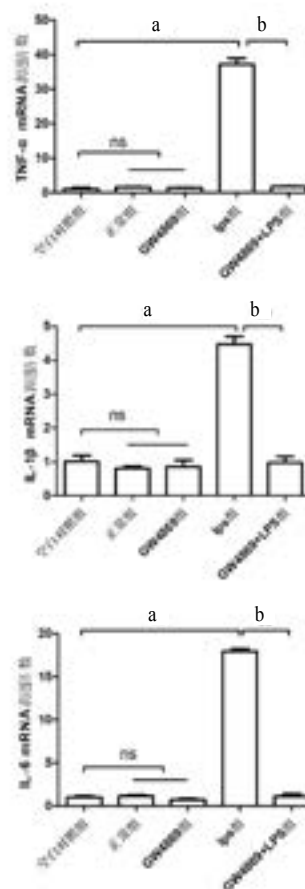
### 2.1 Transwell 共培养条件下 RLE-6TN 细胞对 NR8383 细胞炎症因子 mRNA 水平的影响

经过不同处理的 RLE-6TN 细胞与 NR8383 共培养 12 h 后,利用 qPCR 检测 NR8383 细胞中炎症因子的 mRNA 表达水平,结果显示:与空白对照组相比,脂多糖刺激的 RLE-6TN 引起 NR8383 细胞 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的 mRNA 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ),差异有统计学意义,而 GW4869 组的

IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的 mRNA 水平却无明显变化 ( $P > 0.05$ ),差异无统计学意义;GW4869+LPS 组与 LPS 组相比,IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的 mRNA 水平都显著降低 ( $P < 0.01$ ),这说明外泌体抑制剂(GW4869)能够削弱经 LPS 刺激的 RLE-6TN 细胞对 NR8383 细胞炎症因子表达的影响,同时值得注意的是,正常的 RLE-6TN 对 NR8383 细胞炎症因子的 mRNA 水平无影响。由此表明,LPS 刺激 RLE-6TN 细胞分泌的外泌体能够对 NR8383 细胞炎症因子的表达水平产生影响,见图 1。

### 2.2 外泌体的收集与鉴定

透射电镜下,实验组外泌体(实验组 Exo)为圆形或椭圆形的膜性小囊泡,直径为 40~100 nm,

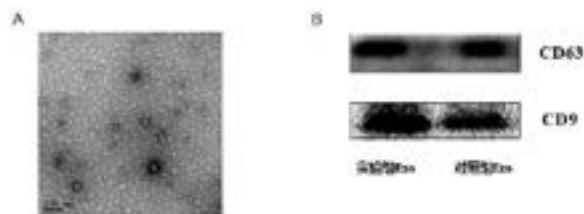


空白对照组:以 NR8383 细胞单培养;正常组:正常的 RLE-6TN 细胞;GW4869 组:RLE-6TN 经过外泌体抑制剂(GW4869,终浓度为  $10 \mu\text{mol}$ )预处理 8 h;GW4869+LPS 组:RLE-6TN 先经过外泌体抑制剂(GW4869)预处理 8 h,再加入 LPS(终浓度为  $1 \mu\text{g/mL}$ )刺激 24 h。与空白对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ,<sup>ns</sup> $> 0.05$ ;与 LPS 组相比,<sup>b</sup> $P < 0.01$ , $n = 3$

图 1 NR8383 细胞中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的 mRNA 相对表达量

Fig 1 The mRNA relative expression of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in NR8383 cells

可见特征性杯状囊泡。蛋白免疫印迹实验结果显示实验组和对照组外泌体均表达膜蛋白分子 (CD 63、CD 9), 两者的相对相对分子质量分别为 43 kd、25 kd。高分辨率可调电阻脉冲检测样品颗粒直径, TRPS 结果显示: 粒子直径的众数为 107 nm, 平均直径为 126 nm, 见图 2。

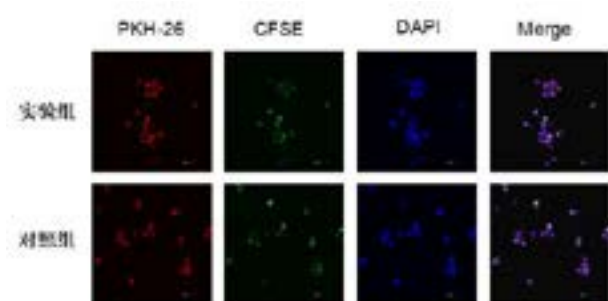


A: 透射电镜观察外泌体形态; B: 外泌体表面标记物的表达, 实验组 Exo: LPS 刺激 RLE-6TN 细胞 24 h 分泌的外泌体, 对照组 Exo: 正常的 RLE-6TN 分泌的外泌体

图 2 外泌体的鉴定  
Fig 2 Identification of exosomes

### 2.3 NR8383 细胞吞噬外泌体

用 PKH-26 红色荧光标记的实验组和对照组外泌体分别与 NR8383 细胞共培养 5 h 后, 用 CFSE 绿色荧光染料标记 NR8383 细胞的胞质, 用 DAPI 染料标记 NR8383 细胞的胞核, 于共聚焦显微镜下观察, 结果显示: 两组 NR8383 细胞形态皆正常, 胞质内散在的红色荧光颗粒即为染色后的被 NR8383 细胞吞噬的外泌体, 见图 3。



红色荧光颗粒为染色后的外泌体, 绿色荧光为染色后的 NR8383 胞质, 蓝色荧光为染色后的 NR8383 细胞胞核 (共聚焦显微镜  $\times 400$ )

图 3 外泌体的内吞现象  
Fig 3 The internalization of exosomes

### 2.4 外泌体对 NR8383 细胞炎症因子表达的影响

将实验组、对照组外泌体 (终浓度都为  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 与等体积的 PBS 分别加入 NR8383 细胞中, 12 h 后用 ELISA 法测定细胞上清液中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的含量, 结果显示: 实验组 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的蛋白含量均显著高于 PBS 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 而对照组与 PBS 组差异无统

计学意义 ( $P > 0.05$ ) 见表 2。

表 2 各组肺泡巨噬细胞上清液中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的含量 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 2 Concentrations of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in the supernatant of alveolar macrophages in each group (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-6
PBS 组	36.17 $\pm$ 12.11	34.83 $\pm$ 5.01	42.45 $\pm$ 11.01
对照组 Exo	46.11 $\pm$ 5.29	40.07 $\pm$ 6.10	54.55 $\pm$ 8.05
实验组 Exo	251.81 $\pm$ 38.11 <sup>a</sup>	385.51 $\pm$ 30.44 <sup>a</sup>	306.10 $\pm$ 51.61 <sup>a</sup>

注: IL-1 $\beta$ , 白细胞介素-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ , 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; IL-6: 白介素-6; 空白组在 NR8383 细胞中加入与实验组 Exo 等体积的 PBS; 对照组 Exo 正常的 RLE-6TN 细胞分泌的外泌体; 实验组 Exo: LPS 刺激 RLE-6TN 细胞 24 h 分泌的外泌体; 与 PBS 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$

## 3 讨论

外泌体是由双层脂质膜构成的微泡颗粒, 可由不同类型的细胞脱落释放, 存在于多种体液中<sup>[8]</sup>。外泌体通过传递特定的信息 (如: miRNA、DNA、蛋白质等) 到受体细胞, 介导细胞通讯及信息传递, 在各种病理生理学进展中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。本研究利用差速超速离心法成功提取肺泡上皮细胞分泌的外泌体, 经透射电镜观察、Western Blot 检测和粒子直径检测结果均符合外泌体的特征。

长期以来, 一直有研究证实, 外泌体介导了应激条件下肺泡上皮细胞与免疫细胞之间的联系, Lee 等发现酸诱导肺泡上皮产生的微囊泡可以介导巨噬细胞的迁移, 以及在高氧条件下, 肺上皮细胞衍生的细胞微囊泡可通过 microRNA 激活巨噬细胞介导炎症反应<sup>[10-11]</sup>。另外, Moon 等发现高氧诱导肺泡上皮细胞衍生的外泌体, 可以通过传递促凋亡因子天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 而激活巨噬细胞, 从而导致肺部炎症反应<sup>[12]</sup>。但是在脓毒症肺损伤中, 肺泡上皮产生的外泌体对肺泡巨噬细胞的影响尚未见报道。

本研究利用 LPS 刺激肺泡上皮细胞建立脓毒症肺损伤模型, 在 Transwell 共培养体系中, 我们发现, 经 LPS 刺激的肺泡上皮细胞能够使肺泡巨噬细胞炎症因子的 mRNA 水平显著提高, 然而当对 LPS 刺激的肺泡上皮细胞用外泌体抑制剂 (GW4869) 进行预处理 8 h 后, 这种致炎作用却遭到明显削弱。当把提取的外泌体与肺泡巨噬细胞共培养后发现, LPS 刺激肺泡上皮产生的外泌体能够激活肺泡巨噬细胞释放大量炎症因子, 而正常的肺泡上皮细胞分泌的外泌体对肺泡巨噬细胞炎症因子的表达却无任何影响。众所周知, 外泌体的功能受

生理和病理的影响,会随着细胞外环境的改变而发生动态的变化<sup>[13-15]</sup>。因此,笔者推测,LPS的刺激会导致肺泡上皮细胞分泌的外泌体内的成分发生改变,当这些外泌体被肺泡巨噬细胞摄取之后,改变了肺泡巨噬细胞的信号通路,激活肺泡巨噬细胞产生炎症反应,这需要后续的实验进一步证实。

综上所述,可以初步判断,在脓毒症肺损伤中,肺泡上皮细胞分泌的外泌体能够激活肺泡巨噬细胞产生致炎作用。这种由外泌体介导的细胞间信息交流方式可能在脓毒症肺损伤的发病机制中发挥重要作用,这将为临床治疗和诊断提供新的靶点。然而在脓毒症肺损伤中,肺泡上皮细胞分泌的外泌体是介导何种分子来发挥作用,又是以何种方式扮演关键角色,至今仍不清楚,这些将是后续研究有待解决的科学问题。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Rubenfeld G D, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury[J]. *N Engl J Med*,2005,353(16):1685-1693. DOI:10.1056/NEJMoa050333.
- [ 2 ] Li X, Shu R, Filippatos G, et al. Apoptosis in lung injury and remodeling[J]. *J Appl Physiol* (5),2004,97(4):1535-1542.DOI:10.1152/japplphysiol.00519.2004.
- [ 3 ] Brigham K L, Meyrick B. Endotoxin and lung injury[J]. *Am Rev Respir Dis*,1986,133(5):913-927.
- [ 4 ] 曾皋, 郭树彬. 急性肺损伤 / 急性呼吸窘迫综合征的生物标志物 [J]. *中华急诊医学杂志*,2015(4):450-454.DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.04.029.
- [ 5 ] Schneider A, Simons M. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders[J]. *Cell Tissue Res*,2013,352(1):33-47.DOI:10.1007/s00441-012-1428-2.
- [ 6 ] Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication[J]. *Curr Opin Cell Biol*,2009,21(4):575-581. DOI:10.1016/j.ceb.2009.03.007.
- [ 7 ] Kovach MA, Singer BH, Newstead MW, et al. IL-36gamma is secreted in microparticles and exosomes by lung macrophages in response to bacteria and bacterial components[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 100(2):413-421.DOI:10.1189/jlb.4A0315-087R.
- [ 8 ] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends[J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4):373-383. DOI:10.1083/jcb.201211138.
- [ 9 ] Record M, Carayon K, Poirot M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological[J]. *Biochim Biophys Acta*,2014,1841(1):108-120. DOI:10.1016/j.bbali.2013.10.004.
- [ 10 ] Lee H, Zhang D, Wu J, et al. Lung Epithelial cell-derived microvesicles regulate macrophage migration via microRNA-17/221-induced integrin beta1 recycling[J]. *J Immunol*,2017,199(4):1453-1464.DOI:10.4049/jimmunol.1700165.
- [ 11 ] Lee H, Zhang D, Zhu Z, et al. Epithelial cell-derived microvesicles activate macrophages and promote inflammation via microvesicle-containing microRNAs[J].*Sci Rep*,2016,6:35250.DOI:10.1038/srep35250.
- [ 12 ] Moon H G, Cao Y, Yang J, et al. Lung epithelial cell-derived extracellular vesicles activate macrophage-mediated inflammatory responses via ROCK1 pathway[J]. *Cell Death Dis*,2015,6:e2016. DOI:10.1038/cddis.2015.282.
- [ 13 ] Osada-Oka M, Shiota M, Izumi Y, et al. Macrophage-derived exosomes induce inflammatory factors in endothelial cells under hypertensive conditions[J]. *Hypertens Res*, 2017,40(4):353-360. DOI:10.1038/hr.2016.163.
- [ 14 ] 张玮, 彭澎, 沈铿. 外泌体来源 RNA 在细胞通讯中的作用 [J]. *中国医学科学院学报*, 2016(4):480-483.DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.2016.04.020.
- [ 15 ] Liu Y, Gu Y, Han Y, et al. Tumor exosomal RNAs promote lung pre-metastatic niche formation by activating alveolar epithelial TLR3 to recruit neutrophils[J]. *Cancer Cell*, DOI:10.1016/j.ccell.2016.06.021.

(收稿日期: 2018-04-21)

(本文编辑: 何小军)