



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2024.01.013

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2024.01.013>

· 临床研究 ·

M1 型巨噬细胞来源的外泌体微小 RNA-16-5p 对心房肌细胞电生理的影响

程燕妮 王学文 曹真 付韞韬 柯元甲 郭珂欣 李雅佳 龙晓建 赵庆彦

[摘要] **目的** 探讨 M1 型巨噬细胞来源的外泌体微小 RNA(miR)-16-5p 对心房肌细胞电生理的影响及可能机制。**方法** 将小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7 细胞)分为脂多糖(LPS)组(LPS 诱导刺激 RAW264.7 细胞 24 h 使其分化为 M1 型巨噬细胞)、miR-16-5p 阴性对照(NC)组(将 miR-16-5p NC 转染 RAW264.7 细胞后诱导分化)、miR-16-5p 模拟物(mimics)组(将 miR-16-5p mimics 转染 RAW264.7 细胞后诱导分化)、miR-16-5p 抑制物(inhibitor)组(将 miR-16-5p inhibitor 转染 RAW264.7 细胞后诱导分化)及 LPS + 中性鞘磷脂酶抑制剂(GW4869)组(RAW264.7 细胞经 LPS 诱导完成后加入 10 μ M GW4869 继续培养)。5 组巨噬细胞培养 48~72 h 后收集上清液,采用超速离心法提取外泌体。采用实时荧光 PCR(qRT-PCR)检测转染后巨噬细胞 miR-16-5p 相对表达水平。将心房肌细胞(HL-1 细胞)暴露于快速电刺激(1.0 V/cm, 10 Hz)48 h 构建快速起搏诱导的房颤细胞模型,与各组外泌体共培养,心房肌细胞分为 A 组(起搏 HL-1 细胞 + LPS 组外泌体)、B 组(起搏 HL-1 细胞 + miR-16-5p NC 组外泌体)、C 组(起搏 HL-1 细胞 + miR-16-5p mimics 组外泌体)、D 组(起搏 HL-1 细胞 + miR-16-5p inhibitor 组外泌体)、E 组(起搏 HL-1 细胞 + LPS + GW4869 组外泌体)。采用膜片钳检测各组心房肌细胞动作电位时限[复极化达 50% 和 90% 的动作电位时限(APD₅₀、APD₉₀)],采用蛋白质免疫印记法检测 5 组细胞中磷脂酰肌醇激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化 AKT(p-AKT)表达水平。**结果** miR-16-5p mimics 组巨噬细胞 miR-16-5p 相对表达水平高于 miR-16-5p NC 组($P < 0.001$),而 miR-16-5p inhibitor 组低于 miR-16-5p NC 组($P < 0.05$)。A 组和 B 组 HL-1 细胞 APD₅₀ 和 APD₉₀ 比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);C 组 HL-1 细胞 APD₅₀ 和 APD₉₀ 均短于 A 组($P < 0.05$);D 组及 E 组 HL-1 细胞 APD₅₀ 和 APD₉₀ 均长于 A 组($P < 0.01$)。A 组和 B 组 HL-1 细胞 PI3K 表达水平、p-AKT/AKT 比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);C 组 HL-1 细胞 PI3K 表达水平、p-AKT/AKT 均低于 A 组($P < 0.001$);D 组及 E 组 HL-1 细胞 PI3K 表达水平、p-AKT/AKT 均高于 A 组($P < 0.001$)。**结论** M1 型巨噬细胞来源的外泌体 miR-16-5p 可缩短心房肌细胞动作电位时限,可能与抑制 PI3K/AKT 通路有关。

[关键词] 心房颤动; 巨噬细胞; 外泌体; 动作电位; 电重构**[中图分类号]** R541.7 **[文献标识码]** A

Effects of M1 macrophage-derived exosome microRNA-16-5p on electrophysiology of atrial myocytes

Cheng Yanni, Wang Xuwen, Cao Zhen, Fu Yuntao, Ke Yuanjia, Guo Kexin, Li Yajia, Long Xiaojian, Zhao Qingyan. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of M1 macrophage-derived exosome microRNA(miR)-16-5p on electrophysiology of atrial myocytes and explore the potential mechanisms. **Methods** Mononuclear macrophages(RAW264.7 cells) were divided into lipopolysaccharide(LPS) group(RAW264.7 cells were induced and stimulated by LPS for 24 h to differentiate into M1 macrophages), miR-16-5p negative control(NC) group(miR-16-5p NC was transfected into RAW264.7 cells and induced differentiation), miR-16-5p mimics group(miR-16-5p mimics were transfected into RAW264.7 cells and induced differentiation), miR-16-5p inhibitor group(miR-16-5p inhibitor was transfected into RAW264.7 cells and induced differentiation) and LPS + neutral sphingomyelin inhibitor(GW4869) group(RAW264.7 cells were induced by LPS and then cultured with 10 μ M GW4869). Supernatant was collected after culture of macrophages for 48-72 h in 5 groups, and exosomes were obtained by ultracentrifugation.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(82170312)

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院心血管内科 武汉大学心血管病研究所 心血管病湖北省重点实验室

通讯作者:赵庆彦, E-mail: ruyan71@163.com

Real-time fluorescent PCR (qRT-PCR) was used to detect relative expression level of miR-16-5p in transfected macrophages. Atrial myocytes (HL-1 cells) were exposed to rapid electrical stimulation (1.0 V/cm, 10 Hz) for 48 h to construct rapid pacing-induced atrial fibrillation cell model, then co-cultured with exosomes from each group. Atrial myocytes were divided into A group (pacing HL-1 cells + exosomes from LPS group), B group (pacing HL-1 cells + exosomes from miR-16-5p NC group), C group (pacing HL-1 cells + exosomes from miR-16-5p mimics group), D group (pacing HL-1 cells + exosomes from miR-16-5p inhibitor group) and E group (pacing HL-1 cells + exosomes from LPS + GW4869 group). Patch clamp was used to detect action potential duration at 50% and 90% repolarization (APD_{50} and APD_{90}). Western blotting was used to detect expression levels of phosphatidylinositol kinase (PI3K), protein kinase B (AKT), phosphorylated AKT (p-AKT) in cells of 5 groups. **Results** Relative expression level of miR-16-5p in macrophages of miR-16-5p mimics group was higher than that of miR-16-5p NC group ($P < 0.001$), while miR-16-5p inhibitor group was lower than that of miR-16-5p NC group ($P < 0.05$). There were no significant difference of APD_{50} and APD_{90} in HL-1 cells between A group and B group ($P > 0.05$). APD_{50} and APD_{90} in HL-1 cells of C group were all shorter than those in A group ($P < 0.05$). APD_{50} and APD_{90} in HL-1 cells of D group and E group were longer than those in A group ($P < 0.01$). There were no significant difference in expression levels of PI3K and P-Akt/AKT in HL-1 cells between A group and B group ($P > 0.05$). Expression levels of PI3K and P-Akt/AKT in HL-1 cells of C group were lower than those in A group ($P < 0.001$). Expression levels of PI3K and P-Akt/AKT in HL-1 cells of D group and E group were higher than those in A group ($P < 0.001$). **Conclusion** M1 macrophage-derived exosome miRNA-16-5p can shorten action potential duration of atrial myocytes, possibly associated with the inhibition of the PI3K/AKT pathway.

[Key words] Atrial fibrillation; Macrophage; Exosome; Action potential; Electrical remodeling

近年来研究表明外泌体在心房颤动(简称房颤)的发生发展中起重要作用^[1]。外泌体可通过调节细胞间的信息交流从而调控基因表达,影响心房重构和房颤的发生^[2]。有研究结果显示巨噬细胞来源的富含微小 RNA(miRNA, miR)的外泌体可调控心肌细胞炎症反应和电重构等病理过程^[3]。miRNA 是外泌体介导细胞间信号通讯的重要功能分子。研究发现, miR-16-5p 可促进心肌细胞的内质网应激和氧化应激,抑制 miR-16-5p 表达可减少细胞凋亡及炎症,减轻心肌损伤^[4]。既往研究已证实炎症和房颤的关系密切,临床和基础研究均发现房颤发生时心房 M1 型巨噬细胞浸润明显增多^[5-6]。但 M1 型巨噬细胞分泌的外泌体 miR-16-5p 对心肌细胞电重构是否有作用尚不明确。本研究旨在探讨 M1 型巨噬细胞来源的外泌体 miR-16-5p 对心房肌细胞电生理的影响及潜在机制。

材料与方法

1. 材料:RAW264.7 细胞(小鼠单核巨噬细胞系)、HL-1 细胞(小鼠心房肌细胞系)均购于武汉 Procell 实验室。脂多糖(LPS)购于 Sigma 公司,中性鞘磷脂酶抑制剂(GW4869,一种外泌体抑制剂)购于 MCE 公司,转染试剂 Lipofectamine 6000(Lipo6000)、蛋白定量试剂盒(BCA 试剂盒)均购于碧云天公司, RNA 提取试剂(Trizol)购于 TakaRa 公司,细胞快速裂解液(RIPA 裂解液)、第一链 cDNA 合成试剂盒、蛋白激酶 B(AKT)抗体、肿瘤易感基因 101 蛋白(TSG101)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体均购于赛维尔生物科技有限公司,磷脂酰肌醇激酶(PI3K)抗体、磷酸化 AKT

(p-AKT)抗体均购于爱博泰克生物科技有限公司, CD81 购于三鹰公司, miR-16-5p 阴性对照(miR-16-5p NC)、miR-16-5p 模拟物(miR-16-5p mimics)及 miR-16-5p 抑制物(miR-16-5p inhibitor)均由武汉勤达创新生物科技有限公司合成。

2. 方法

(1)巨噬细胞的培养及分组:首先将 RAW264.7 细胞接种在含有 10% 胎牛血清的高糖培养基的大皿中并置于 37 °C、5% CO₂ 环境中培养,当细胞增殖至密度达到 80% ~ 90% 时进行传代,将细胞分为 5 组:①LPS 组:LPS 诱导刺激 RAW264.7 细胞 24 h 使其分化为 M1 型巨噬细胞后不施加任何干预;②miR-16-5p NC 组:将 miR-16-5p NC 转染 RAW264.7 细胞后诱导分化;③miR-16-5p mimics 组:将 miR-16-5p mimics 转染 RAW264.7 细胞使 miR-16-5p 过表达,再诱导分化;④miR-16-5p inhibitor 组:将 miR-16-5p inhibitor 转染 RAW264.7 细胞抑制 miR-16-5p 表达,再诱导分化;⑤LPS + GW4869 组:RAW264.7 细胞经 LPS 诱导完成后,更换新鲜培养基并加入 10 μM GW4869 继续培养 48 ~ 72 h。

(2)巨噬细胞的诱导:将巨噬细胞以 1×10^6 个细胞/孔接种于六孔板中,每孔添加 LPS(500 ng/ml)刺激 24 h 分化为 M1 型巨噬细胞,诱导结束后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 1 ~ 2 次,加入含 10% 胎牛血清的高糖培养基中继续培养,采用光学显微镜观察巨噬细胞形态变化,采用免疫荧光观察未分化组及分化组巨噬细胞标志物小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体(F4/80)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达水

平,采用实时荧光 PCR (qRT-PCR)检测 M1 型巨噬细胞特定表面受体标记物肿瘤坏死因子 (TNF)- α 和 iNOS 表达情况。

(3)巨噬细胞转染 miR-16-5p:首先向 250 μ l 的高糖培养基中加入 5 μ l 的 lipo6000 转染试剂,轻轻吹打使之混匀,室温静置 5 min,另向 250 μ l 的高糖培养基中分别加入 5 μ l miR-16-5p NC/mimics/inhibitor,轻轻吹打混匀,将含有 lipo6000 的高糖培养基分别与含有 miR-16-5p NC/mimics/inhibitor 的高糖培养基混合配置成转染复合物并充分混匀,室温静置 20 min。将六孔板接种好的细胞更换为无血清培养基,分别将转染复合物加入对应六孔板的各个孔中,培养 4~6 h 后更换为完全培养基,加入 LPS 诱导为 M1 型巨噬细胞,继续培养细胞 48 h。

(4)qRT-PCR 检测:巨噬细胞分别转染 miR-16-5p NC、miR-16-5p mimics、miR-16-5p inhibitor 48 h 后,trizol 提取总 RNA 并测定浓度及纯度,按照第一链 cDNA 合成试剂盒说明书操作将其逆转录为 cDNA,进行定量 PCR 扩增,以 U6 为内参基因,各引物序列如表 1 所示。每个样品均设 3 个复孔,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-16-5p 相对表达水平。

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5' -3')
TNF- α	F:GCAACTGCTGCACGAAATC R:CTGCTGTCTCTGCCAC
iNOS	F:GCTTGGGCTCTTGTCACTCC R:GGCCTTGTCTGAAGAGTGT
miR-16-5p	F:ACACTCCAGCTGGGTAGCAGCACGTAAATA R:CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGCGCCAATA
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCACA R:AACGCTTCACGAATTTGCCGT
GAPDH	F:CCTCGTCCCCTAGACAAAATG R:TGAGGTCAATGAAGGGTCTGT

(5)外泌体的提取及鉴定:收取各组细胞上清液,采用超速离心法收集外泌体,4 $^{\circ}$ C 低温冷冻离心机中以 300 g 离心 10 min,去除沉淀;2 000 g 离心 10 min,去除沉淀;10 000 g 离心 30 min,收集上清液,用滤过膜过滤后,以 100 000 g 离心 2 h,收集沉淀,加入适量 PBS 重悬。采用透射电镜法鉴定外泌体,将外泌体重悬液用 2.5% 戊二醛在 4 $^{\circ}$ C 冰箱固定过夜,将样本滴置在碳支持膜铜网上 3~5 min,滤纸吸掉多余的液体,滴加 2% 磷钨酸在碳支持膜铜网上静置 2~3 min,用滤纸吸去多余液体,室温干燥,透射电子显微镜下观察外泌体形态,并采集图像。采用蛋白质免疫印记法 (Western blot) 检测外泌体标志蛋白 CD81 和 TSG101。

(6)HL-1 细胞快速起搏及分组:采用快速电刺激构建房颤细胞模型,用电烙铁在培养皿盖两侧打孔,将灭菌的碳电极 (直径 0.5 mm) 分别置入两侧孔中,电极一侧与培养皿中的培养基接触,另一端连接刺激系 (Master 8 以色列),以 1.0 V/cm 的电压、10 Hz 频率刺激 HL-1 细胞 48 h 建立房颤细胞模型。起搏 HL-1 细胞分为 5 组:A 组 (起搏 HL-1 细胞 + LPS 组外泌体)、B 组 (起搏 HL-1 细胞 + miR-16-5p NC 组外泌体)、C 组 (起搏 HL-1 细胞 + miR-16-5p mimics 组外泌体)、D 组 (起搏 HL-1 细胞 + miR-16-5p inhibitor 组外泌体)、E 组 (起搏 HL-1 细胞 + LPS + GW4869 组外泌体)。将提取的各组分外泌体与对应分组的 HL-1 细胞共培养 48 h。

(7)全细胞膜片钳检测 HL-1 细胞动作电位:首先用水平电极拉制仪 (PB-7,日本 Narishige 公司)拉伸玻璃电极,从尾部灌充电极内液,入水电阻约为 4~10 M Ω 。在显微镜下选取合适细胞后,通过微操纵器将微电极推向细胞并紧贴细胞表面,同时观测微电极电阻变化,待细胞与微电极形成巨阻封接,破膜后可形成全细胞记录方式。将膜片钳设定为电流钳模式,记录 HL-1 细胞动作电位时限,测量复极化达 50% 和 90% 的动作电位时限 (APD₅₀、APD₉₀)。

(8)Western blot 检测各组心房肌细胞 PI3K、p-AKT、AKT 蛋白表达水平:将各组心房肌细胞用 PBS 清洗 1~2 次,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。各组等样上量,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白条带分离后电转至硝酸纤维素膜上,室温下用无血清快速封闭液封闭 30 min,洗膜 3 次,孵育对应一抗过夜,再次洗膜 3 次,孵育对应二抗,洗膜后使用化学发光试剂盒进行显影拍照,采用 Image J 软件进行条带灰度值分析。

3. 统计学处理:应用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *LSD* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. M1 型巨噬细胞的鉴定:未分化 RAW264.7 细胞在倒置显微镜下为圆形,经过 LPS 诱导为 M1 型巨噬细胞后,细胞生出伪足,形态发生变化。免疫荧光检测 M1 型巨噬细胞标记物结果显示,相对于未分化巨噬细胞,LPS 诱导后 M1 型巨噬细胞特异性标志物荧光强度明显增高。见图 1。PCR 检测 LPS 诱导后 M1 型巨噬细胞表面特异性受体 TNF- α 和 iNOS 的 mRNA 表达水平均高于未分化巨噬细胞 (4.79 \pm 0.93 比 1.13 \pm 0.07;3.80 \pm 0.37 比 0.98 \pm 0.04,*P* 均 < 0.01)。

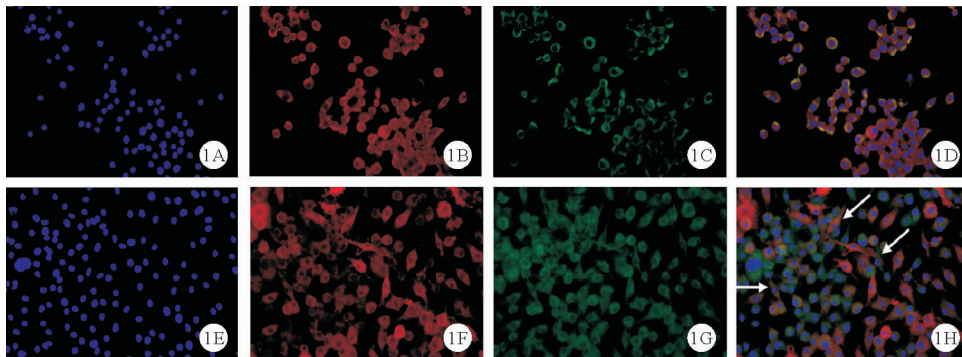


图 1 巨噬细胞免疫荧光检测结果 [A ~ D 依次为未分化巨噬细胞的细胞核 (DAPI)、F4/80、iNOS、Merge, ×400; E ~ H 依次为 LPS 诱导后 M1 型巨噬细胞的 DAPI、F4/80、iNOS、Merge, ×400, 图 H 中箭头所示为 M1 型巨噬细胞生出伪足]

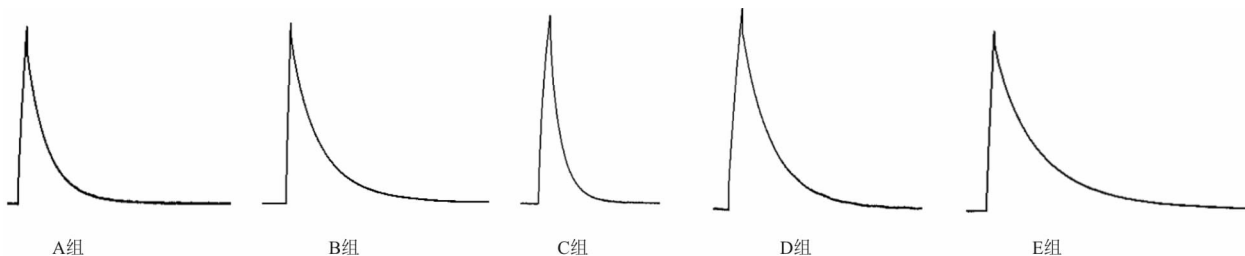


图 3 A 组、B 组、C 组、D 组及 E 组 HL-1 细胞典型动作电位

2. miR-16-5p NC 组、miR-16-5p mimics 组及 miR-16-5p inhibitor 组巨噬细胞 miR-16-5p 相对表达水平比较:miR-16-5p NC 组、miR-16-5p mimics 组及 miR-16-5p inhibitor 组巨噬细胞 miR-16-5p 相对表达水平分别为 1.03 ± 0.04 、 13.92 ± 3.34 、 0.42 ± 0.05 , 其中 miR-16-5p mimics 组高于 miR-16-5p NC 组 ($P < 0.001$), 而 miR-16-5p inhibitor 组低于 miR-16-5p NC 组 ($P < 0.05$)。

3. 外泌体的鉴定:各组外泌体呈球状囊泡样结构, 大小为 20 ~ 200 nm, 见图 2, 符合外泌体的形态特征。各组外泌体采用 Western blot 检测其标志蛋白 CD81 和 TSG101 表达水平, 二者均明显表达, 提取的外泌体可供后续实验使用。

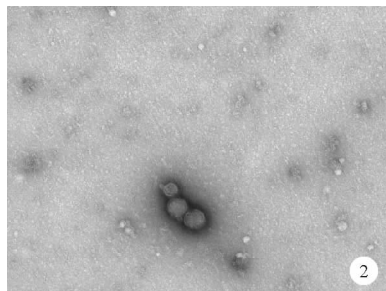


图 2 外泌体电镜图 (×10 000)

4. A 组、B 组、C 组、D 组及 E 组 HL-1 细胞动作电位比较:A 组和 B 组 HL-1 细胞 APD_{50} 和 APD_{90} 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); C 组 HL-1 细胞 APD_{50} 和 APD_{90} 均短于 A 组 ($P < 0.05$); D 组及 E 组 HL-1 细胞

APD_{50} 和 APD_{90} 均长于 A 组 ($P < 0.01$)。见图 3 和表 2。

表 2 A 组、B 组、C 组、D 组及 E 组 HL-1 细胞动作电位比较 ($n = 3, ms, \bar{x} \pm s$)

组别	APD_{50}	APD_{90}
A 组	23.2 ± 2.2	47.9 ± 3.6
B 组	25.8 ± 1.3	52.4 ± 2.0
C 组	17.1 ± 1.9^a	38.3 ± 2.4^a
D 组	38.4 ± 1.8^b	82.0 ± 3.2^b
E 组	51.9 ± 3.0^b	112.1 ± 4.3^b

注:与 A 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

5. A 组、B 组、C 组、D 组及 E 组 HL-1 细胞相关蛋白表达水平比较:A 组和 B 组 HL-1 细胞 PI3K 表达水平、p-AKT/AKT 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); C 组 HL-1 细胞 PI3K 表达水平、p-AKT/AKT 均低于 A 组 ($P < 0.001$); D 组及 E 组 HL-1 细胞 PI3K 表达水平、p-AKT/AKT 均高于 A 组 ($P < 0.001$); 5 组 HL-1 细胞 AKT 表达水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 A 组、B 组、C 组、D 组及 E 组 HL-1 细胞相关蛋白表达水平比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	PI3K	AKT	p-AKT/AKT
A 组	0.76 ± 0.17	0.91 ± 0.04	0.51 ± 0.06
B 组	0.77 ± 0.05	0.89 ± 0.03	0.50 ± 0.07
C 组	0.33 ± 0.02^a	0.87 ± 0.08	0.16 ± 0.01^a
D 组	0.98 ± 0.13^a	0.90 ± 0.02	0.79 ± 0.10^a
E 组	0.89 ± 0.09^a	0.88 ± 0.05	0.91 ± 0.08^a

注:与 A 组比较, ^a $P < 0.001$

讨 论

心脏不同类型细胞分泌的外泌体通过介导各种信号转导参与心房重构及炎症反应,形成房颤发生的重要病理基质。Li 等^[7]发现成纤维细胞来源的外泌体通过降低 L 型钙通道 Cav1.2 蛋白的表达来增加房颤的易感性。Shahov 等^[8]发现心外膜脂肪源性外泌体可缩短多能干细胞源性心肌细胞的动作电位持续时间,使其发生电重构。我们前期研究发现,快速心房起搏犬心外膜脂肪组织存在大量促炎型巨噬细胞浸润,向心外膜脂肪组织注射氯膦酸二钠脂质体后,心房周围巨噬细胞浸润明显减少,房颤不易诱发,且维持时间缩短^[6]。快速心房起搏犬心房组织和静脉血中外泌体含量升高,静脉注射外泌体抑制剂可减轻心房纤维化及炎症反应,降低房颤的易感性^[9]。为探讨 M1 型巨噬细胞来源的外泌体对心房肌细胞电生理的影响及具体机制,我们将各组巨噬细胞外泌体与快速起搏心房肌细胞共培养并使用全膜片钳记录动作电位,结果发现 M1 型巨噬细胞来源的外泌体使心房肌细胞动作电位时限明显缩短,而加入 GW4869 抑制外泌体分泌使心房肌细胞动作电位时限相对延长。miRNA 是外泌体介导细胞间信号通讯的重要功能分子。已有研究表明,M1 巨噬细胞来源的外泌体 miR-29a 介导心肌细胞 NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3 (NLRP3) 的激活^[10],而心肌细胞 NLRP3 的激活可上调 Ryanodine 受体 2 (RyR2) 的表达,促进肌浆网异常的钙释放。Toro 等^[4]证实 miR-16-5p 的过表达促进心肌细胞的氧化应激,靶向 miR-16-5p 可能在内质网应激介导的心脏损伤中发挥心脏保护作用。为进一步研究 M1 型巨噬细胞外泌体中 miR-16-5p 对心房肌动作电位的影响,我们通过向巨噬细胞转染 miR-16-5p,发现 miR-16-5p 过表达使起搏心房肌细胞动作电位时限缩短,而沉默 miR-16-5p 基因则使起搏心房肌细胞动作电位时限相对延长,以上结果表明 M1 型巨噬细胞来源的外泌体 miR-16-5p 可缩短心房肌细胞动作电位时限。

已有研究证实 PI3K 是 miR-16-5p 的直接靶点,miR-16-5p 可负向调控 PI3K 的表达,进而影响其下游蛋白表达,促进细胞自噬和凋亡^[11-12]。张飞龙等^[13]研究发现下调 PI3K/AKT/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)通路可增加糖尿病大鼠房颤的易感性。Ko 等^[14]研究发现快速起搏 HL-1 细胞中 PI3K/Akt 信号转导降低,通过影响心房肌细胞的晚钠电流参与心肌电重构。本研究分别检测 5 组起搏 HL-1 细胞 PI3K 及其下游蛋白

AKT、p-AKT 表达情况,结果显示 miR-16-5p 过表达下调 PI3K 和 p-Akt 的表达水平,而对细胞中总 Akt 的影响可忽略不计,使用 miR-16-5p 抑制物可上调 PI3K 和 p-Akt 的表达水平。

综上所述,M1 型巨噬细胞外泌体 miR-16-5p 可缩短心房肌细胞动作电位时限,可能与抑制 PI3K/AKT 通路有关。抑制 M1 型巨噬细胞外泌体分泌或抑制 miR-16-5p 表达可减缓快速起搏心房肌细胞电重构的发生,但对电重构相关离子通道是否有影响及具体机制需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Procyk G, Bilicki D, Balsam P, et al. Extracellular Vesicles in Atrial Fibrillation-State of the Art [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14): 7591.
- [2] Xiang K, Akram M, Elbossaty WF, et al. Exosomes in atrial fibrillation: therapeutic potential and role as clinical biomarkers [J]. *Heart Fail Rev*, 2022, 27(4): 1211-1221.
- [3] Wang C, Zhang C, Liu L, et al. Macrophage-Derived mir-155-Containing Exosomes Suppress Fibroblast Proliferation and Promote Fibroblast Inflammation during Cardiac Injury [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(1): 192-204.
- [4] Toro R, Pérez-Serra A, Mangas A, et al. miR-16-5p Suppression Protects Human Cardiomyocytes against Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress-Induced Injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1036.
- [5] Hulsmans M, Schloss MJ, Lee IH, et al. Recruited macrophages elicit atrial fibrillation [J]. *Science*, 2023, 381(6654): 231-239.
- [6] 曹真, 刘弟世闻, 付韬韬, 等. 心外膜脂肪中巨噬细胞对快速心房起搏犬心房 KCa3.1 及心房颤动易感性的影响 [J]. *临床内科杂志*, 2022, 39(3): 196-200.
- [7] Li S, Gao Y, Liu Y, et al. Myofibroblast-Derived Exosomes Contribute to Development of a Susceptible Substrate for Atrial Fibrillation [J]. *Cardiology*, 2020, 145(5): 324-332.
- [8] Shahov-Teper O, Ram E, Ballan N, et al. Extracellular Vesicles From Epicardial Fat Facilitate Atrial Fibrillation [J]. *Circulation*, 2021, 143(25): 2475-2493.
- [9] Yao Y, He S, Wang Y, et al. Blockade of Exosome Release Suppresses Atrial Fibrillation by Alleviating Atrial Fibrosis in Canines With Prolonged Atrial Pacing [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 699175.
- [10] Wang Y, Qiu Z, Yuan J, et al. Hypoxia-reoxygenation induces macrophage polarization and causes the release of exosomal miR-29a to mediate cardiomyocyte pyroptosis [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2021, 57(1): 30-41.
- [11] Yin K, Cui Y, Sun T, et al. Antagonistic effect of selenium on lead-induced neutrophil apoptosis in chickens via miR-16-5p targeting of PI3K1 and IGF1R [J]. *Chemosphere*, 2020, 246: 125794.
- [12] Zhang K, Han Y, Zhao Y, et al. Upregulated gga-miR-16-5p Inhibits the Proliferation Cycle and Promotes the Apoptosis of MG-Infected DF-1 Cells by Repressing PI3K1-Mediated the PI3K/Akt/NF-κB Pathway to Exert Anti-Inflammatory Effect [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1036.
- [13] 张飞龙, 褚淑蕾, 王伟伟, 等. 糖尿病大鼠因 PI3k-Akt-eNOS 信号通路受损而易发心房颤动 [J]. *中华心血管病杂志*, 2018, 46(5): 376-381.
- [14] Ko TH, Jeong D, Yu B, et al. Inhibition of late sodium current via PI3K/Akt signaling prevents cellular remodeling in tachypacing-induced HL-1 atrial myocytes [J]. *Pflugers Arch*, 2023, 475(2): 217-231.

(收稿日期: 2023-12-25)

(本文编辑: 周三凤)