DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250408.003
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250408.1359.006

外泌体miR-885-5p靶向Hmgb1调控急性胰腺炎细胞凋亡的实验研究

黄桂香[1],甘慧芳[1],潘路娟[1,2,3,4],张彩灵[1,2,3,4],徐 键[1],张芷若[1],谷登凯[1],覃月秋[1,2,3,4]✉
(1.右江民族医学院研究生院,广西 百色 533000;2.右江民族医学院附属医院消化内科,广西 百色 533000;3.广西医疗卫生重点培育学科,广西 百色 533000;4.百色市临床重点专科,广西 百色 533000)

[摘要] **目的**:探讨外泌体miR-885-5p靶向高迁移率族蛋白b1(Hmgb1)对急性胰腺炎细胞凋亡的作用及机制。**方法**:以未经处理的兔胰腺永生化腺泡细胞作为Control组,用浓度为1×10^{-7} mol/L的雨蛙素联合10 μg/mL的脂多糖处理兔胰腺腺泡永生化细胞24 h建立严重急性胰腺炎(acute pancreatitis,AP)体外模型,分离Control组和模型组细胞上清液的外泌体,用透射电镜观察外泌体形态,纳米颗粒追踪分析仪对外泌体进行粒径分析,Western blot检测外泌体蛋白标志物,RT-qPCR检测外泌体中miR-885-5p的表达。构建miR-885-5p过表达慢病毒及空病毒载体、miR-885-5p低表达慢病毒及空病毒载体分别转染模型细胞建立miR-885-5p mimics组及mimics NC组、miR-885-5p inhibitor组及inhibitor NC组,RT-qPCR检测各组细胞miR-885-5p、Hmgb1、Bax、Bcl-2、Caspase-3的mRNA表达量。Western blot检测各组细胞Hmgb1、Bax、Bcl-2和Caspase-3蛋白表达量。流式细胞术检测各组细胞凋亡率,Hoechst染色观察细胞凋亡情况。双荧光素酶报告试验验证miR-885-5p和Hmgb1的靶向关系。**结果**:Control组和严重AP组细胞外泌体直径约为50~200 nm,呈茶托状的外囊泡,双层膜结构。Western blot结果显示CD63、HSP70和TSG101有表达;严重AP组外泌体miR-885-5p的表达上调($P<0.01$)。与Control组相比,严重AP组的miR-885-5p表达上调($P<0.01$),Hmgb1、Bax、Caspase-3的mRNA和蛋白表达上调($P<0.01$),Bcl-2的mRNA和蛋白表达下降($P<0.01$),细胞凋亡率升高($P<0.01$)。与mimics NC组相比,miR-885-5p mimics组的miR-885-5p表达上调($P<0.01$),Hmgb1、Caspase-3的mRNA和蛋白表达上调($P<0.01$),Bax的mRNA表达上调($P<0.01$)以及蛋白表达上调($P<0.05$),Bcl-2的mRNA和蛋白表达下降($P<0.05$),细胞凋亡率升高($P<0.01$)。与inhibitor NC组相比,miR-885-5p inhibitor组的miR-885-5p表达下调($P<0.05$),Hmgb1、Bax的mRNA和蛋白表达下调($P<0.01$),Caspase-3的mRNA表达下调($P<0.05$)以及蛋白表达下调($P<0.01$),Bcl-2的mRNA和蛋白表达升高($P<0.01$),细胞凋亡率下降($P<0.01$)。双荧光素酶基因检测报告试验显示*Hmbg1*为miR-885-5p的靶基因。**结论**:外泌体miR-885-5p在严重AP模型细胞中高表达,上调miR-885-5p的表达促进细胞凋亡,抑制miR-885-5p的表达可逆转这一结果,其机制可能与靶向Hmgb1促进Bax、Caspase-3表达及抑制Bcl-2表达有关。

[关键词] 外泌体;miR-885-5p;高迁移率族蛋白b1(Hmgb1);急性胰腺炎(CAP);凋亡
[中图分类号] R576 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)03-0188-11

Experimental study of exosomal miR-885-5p targeting Hmgb1 to regulate apoptosis in acute pancreatitis cells

HUANG Guixiang[1], GAN Huifang[1], PAN Lujuan[1,2,3,4], ZHANG Cailing[1,2,3,4], XU Jian[1], ZHANG Zhiruo[1], GU Dengkai[1], QIN Yueqiu[1,2,3,4]✉
(1. *Graduate School, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise* 533000, *China*; 2. *Department of Gastroenterology, Youjiang Medical College for Nationalities Affiliated Hospital, Baise* 533000, *China*; 3. *Guangxi Healthcare Key Cultivation Disciplines, Baise*

[基金项目] 国家自然科学基金(82260134);广西自然科学基金(2023GXNSFAA026118);右江民族医学院附属医院高层次人才科研项目(R202011702)
[作者简介] 黄桂香,E-mail:983879003@qq.com。
[通讯作者] 覃月秋,博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:gxbsqyq@126.com。
[收稿日期] 2025-01-08 [修回日期] 2025-03-25 网络出版时间:2025-04-08 18:54:17

533000, *China*; 4. *Baise City Clinical Key Specialties*, *Baise* 533000, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the National Natural Science Foundation of China* (82260134); *Guangxi Natural Science Foundation* (2023*GXNSFAA*026118); *High Level Talent Research Project of Affiliated Hospital of Youjiang University of Ethnic Medicine* (*R*202011702)

[*Author*]: *HUANG Guixiang*, *E-mail*: 983879003@*qq.com*.

[*Correspondence to*]: *QIN Yueqiu*, *Ph.D.*, *Professor*, *Chief Physician*, *Master's Supervisor*, *E-mail*: *gxbsqyq*@126.*com*.

Received: 2025-01-08 *Revised*: 2025-03-25 *JHMU*, 2026; 32(3): 188-198

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To investigate the role and mechanism of exosomal miR-885-5p targeting High mobility group protein b1(Hmgb1) on acute pancreatitis cell apoptosis. **Methods**: The untreated rabbit pancreatic immortalized follicular cells were used as the Control group, and rabbit pancreatic follicular immortalized cells were treated with sainfoin at a concentration of 1×10^{-7} mol/L combined with 10 μg/mL lipopolysaccharide for 24 h to establish an *in vitro* model of acute pancreatitis (AP), and the supernatants of the cells in the Control group and the model group were separated from the exosomes, and the morphology of exosomes was observed by transmission electron microscopy. Exosomes were isolated from the supernatants of Control and model group cells, the morphology of exosomes was observed by transmission electron microscopy, the particle size analysis of exosomes was performed by nanoparticle tracking analyzer, the exosomal protein markers were detected by Western blot, The expression of miR-885-5p in exosomes was detected by RT-qPCR. Construct miR-885-5p overexpression lentiviral and empty viral vectors, miR-885-5p low-expression lentiviral and empty viral vectors were transfected with model cells to establish miR-885-5p mimics group and mimics NC group, miR-885-5p inhibitor group and inhibitor NC group. RT-qPCR detected the mRNA expression of miR-885-5p, Hmgb1, Caspase-3, Bax and Bcl-2. Western blot detected the protein expression of Hmgb1, Caspase-3, Bax, and Bcl-2 in the cells of each group. Flow cytometry detected the apoptosis rate of cells in each group. Hoechst staining was used to observe the apoptosis of cells. Dual luciferase reporter assay verified the targeting relationship between miR-885-5p and Hmgb1. **Results**: The diameters of cellular exosomes in both Control and severe AP groups were about 50-200 nm, with tea-to-shaped outer vesicles and double-membrane structure. Western blot results showed that CD63, HSP70, and TSG101 were expressed; and the expression of exosomal miR-885-5p was up-regulated in the severe AP group ($P<0.01$). Compared to the Control group, miR-885-5p expression was up-regulated in the severe AP group ($P<0.01$), mRNA and protein expression of Hmgb1, Caspase-3, and Bax was up-regulated ($P<0.01$), mRNA and protein expression of Bcl-2 was decreased ($P<0.01$), and apoptosis rate was increased ($P<0.01$). Compared with the mimics NC group, miR-885-5p miR-885-5p expression was up-regulated in the miR-885-5p mimics group ($P<0.01$), the mRNA and protein expression of Hmgb1 and Caspase-3 ($P<0.01$), the mRNA expression of Bax ($P<0.01$) as well as the protein expression of Bax ($P<0.05$). The mRNA and protein expression of Bcl-2 was decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate was increased ($P<0.01$). Compared with the inhibitor NC group, miR-885-5p expression was down-regulated in the miR-885-5p inhibitor group ($P<0.05$), mRNA and protein expression of Hmgb1 and Bax ($P<0.01$), mRNA expression of Caspase-3 ($P<0.05$) and protein expression ($P<0.01$), elevated mRNA and protein expression of Bcl-2 ($P<0.01$), and decreased apoptosis ($P<0.01$). Dual luciferase gene detection reporter assay showed *Hmbg1* as the target gene of miR-885-5p. **Conclusion**: Exosomal miR-885-5p was highly expressed in severe acute pancreatitis model cells. The up-regulation of miR-885-5p expression promoted apoptosis, while inhibition of miR-885-5p expression reversed this effect. The mechanism may be related to targeting HMGB1, which promotes the expression of Bax and Caspase-3, and inhibits the expression of Bcl-2.

[Key words] Exosomes; MiR-885-5p; High mobility group protein b1(Hmgb1); Acute pancreatitis; Apoptosis

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床上常见的急腹症,大多数患者症状较轻,表现为胰腺水肿和炎症。大约有20%的患者病情严重,出现胰腺出血、坏死,最终发展为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)[1],研究表明,AP发病严重程度与腺泡细胞的凋亡密切相关[2]。高迁移率族蛋白b1(high mobility group protein b1, Hmgb1)是一种炎症因子,可介导炎症反应,调节多种疾病的细胞凋亡[3],有研究证实,Hmgb1在胰腺炎中呈现高表达,SAP患者血清Hmgb1水平明显升高,且升高程度与疾病严重程度相关[4]。外泌体是直接为50～200 nm的细胞外微囊泡,广泛存在于各种体液中,其内含多种大量蛋白质、核酸、脂质等物质,是细胞间通讯的重要介质。外泌体miRNA异常表达可能与胰腺炎的发生、发展有密切关系[5]。MicroRNA(miRNAs)是一类内源性非编码单链小分子,在细胞内具有多种重要的调节作用。有研究表明,在SAP中,受损的胰腺释放大量差异表达的外泌体miRNAs[5,6],这些miRNAs参与了AP细胞凋亡过程[7,8]。miR-885-5p是非保守miRNAs家族的一员,

可靶向多种因子促进或抑制疾病的发展，Hussein等[9]研究发现，miR-885-5p在胰腺癌患者外周血中显示高表达。另有研究指出，在卵巢癌中miR-885-5p和Hmgb1关系密切，miR-885-5p可靶向Hmgb1促进卵巢癌细胞凋亡[10]。在AP中，miR-885-5p是否能通过Hmgb1调控细胞凋亡尚不明确。因此，本研究采用兔胰腺永生化腺泡细胞株建立严重AP模型，探究外泌体中miR-885-5p靶向Hmbg1调控AP腺泡细胞凋亡的作用及具体分子机制。

1　材料与方法

1.1　细胞系和主要试剂

兔胰腺永生化腺泡细胞系及专用完全培养基购自上海澳睿赛生物科技有限公司；Hoechst33258凋亡染色试剂盒、10×Tris-Glycine转膜缓冲液、PBS、10×SDS-PAGE电泳缓冲液购自武汉赛维尔生物科技有限公司；胰蛋白酶、miRNA和mRNA逆转录试剂盒、RT-qPCR引物（miR-885-5p、Hmgb1、Bcl-2、U6、β-actin）、SYBR Green Master Mix、彩虹Maker、SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司；Caspase-3、Bax RT-qPCR引物购自生工生物工程（上海）股份有限公司；雨蛙素（Cerulein）购自上海源叶生物科技有限公司；脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）、10×TBST、PMSF、蛋白磷酸化酶抑制剂购自北京索莱宝科技有限公司；ELISA试剂盒、α-淀粉酶试剂盒购自厦门仑昌硕生物科技有限公司；慢病毒购自汉恒生物科技（上海）有限公司；快速封闭液、一抗稀释液、二抗稀释液购自上海碧云天生物科技有限公司；Trizol购自上海赛默飞生物科技有限公司；RIPA裂解液购自北京英文特生物技术有限公司；PVDF膜购自Millpore公司；Hmgb1、Caspase-3、Bax、Bcl-2、β-actin抗体均购自abmart生物医药（上海）有限公司；CD63（52090）、HSP70（46477）、TSG101（72312）购自美国CST公司；山羊抗兔IgG（H+L）HRP、山羊抗小鼠IgG（H+L）HRP购自江苏亲科生物研究中心有限公司；超敏ECL化学发光试剂盒购自苏州莫纳生物科技有限公司；凋亡检测试剂盒购自苏州四正柏生物有限公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　兔胰腺永生化腺泡细胞用专用完全培养基培养，放置于37 ℃、5%CO_2恒温培养箱中，每1～2天换1次液，待细胞长到融合度90%左右，用胰蛋白酶消化约30 s后将胰酶吸出，尽量吸干净，待细胞间隙增宽时加入6 mL完全培养基终止消化，以1∶2～1∶4的比例传代。细胞贴壁不牢时可用0.1 m/mL多聚赖氨酸提前2～4 h包被细胞培养瓶。

1.2.2　不同浓度的雨蛙素联合脂多糖处理兔胰腺腺泡细胞后淀粉酶的表达　取对数生长期、生长良好的兔胰腺永生化腺泡细胞以1×10^5个/mL的浓度接种在6孔板内24 h，用雨蛙素浓度1×10^{-8} mol/L与不同浓度的脂多糖（0、1、10、100 μg/mL）联合培养24 h后收集细胞上清液，检测淀粉酶水平，选择淀粉酶分泌明显增高时的脂多糖浓度，再分别与不同浓度的雨蛙素（0、1×10^{-9}、1×10^{-8}、1×10^{-7}、1×10^{-6} mol/L）联合培养，筛选出淀粉酶分泌水平最高时雨蛙素及脂多糖的浓度[11-13]。具体步骤按照淀粉酶试剂盒说明书进行操作。

1.2.3　严重AP体外模型的构建　取处于对数生长期的兔胰永生化腺腺泡细胞以1×10^5个/孔的浓度接种于6孔板，培养24 h，待细胞贴壁后加入终浓度为10^{-7} mol/L的雨蛙素及10 μg/mL脂多糖的完全培养基2 mL刺激细胞，分别在0、12、24、48 h时收集细胞上清液进行ELISA实验检测炎症因子TNF-α、IL-6水平，确认造模时间[14]。

1.2.4　细胞慢病毒转染及分组　（1）慢病毒转染：选常规培养的细胞5×10^4个/孔的密度接种于6孔板，培养24 h后细胞融合度约50%，进行慢病毒转染，转染24～48 h，期间于倒置显微镜下观察细胞形态。（2）细胞分组：将处于对数生长期的细胞以5×10^4个/孔的浓度接种于6孔板，培养24 h。提前配置含10%胎牛血清及5 μg/mL病毒促感染试剂polybrene的病毒感染专用培养基。实验共分为6组，Control组：兔胰腺永生化腺泡细胞常规培养；严重AP组：含10^{-7} mol/L雨蛙素及10 μg/mL脂多糖的完全培养基培养细胞；构建miR-885-5p过表达慢病毒及空病毒载体、miR-885-5p低表达慢病毒及空病毒载体转染严重AP模型细胞分别建立miR-885-5p mimics NC组及mimics NC组、miR-885-5p inhibitor组及inhibitor NC组，各组细胞于转染16 h后更换新鲜完全培养基，继续培养24～48 h，期间观察细胞形态[15]。

1.2.5　外泌体提取实验　采用超速离心法提取外泌体，收集Control组和严重AP组的细胞上清液，在4 ℃，500×g离心5 min，吸取上清液至50 mL离心管，去除死细胞，将得到的上清液在4 ℃、2 000×g离心15 min，吸取上清液转移至超速离心管中，去除细胞碎片。将得到的上清液在4 ℃、10 000×g离心1 h，离心完成后吸取上清液转移至超速离心管继续于4 ℃、100 000×g离心90 min，沉淀外泌体，小心去除

上清液。PBS重悬沉淀,转移至小型超速离心管,继续在4 ℃、100 000×*g*离心1 h,小心弃去上清液,适量PBS重悬外泌体,放在−80 ℃冰箱保存。

1.2.6 透射电镜术 取重悬的外泌体滴加于载样铜网上,吸附10 min,用滤纸从边缘处吸去浮液,再吸取一滴负染液滴铜网上,放置3 min,用滤纸吸去浮液,自然干燥后用透射电子镜观察外泌体形态。

1.2.7 纳米颗粒跟踪分析 将重悬的外泌体适当比例稀释到1 mL,以1 mL注射器吸取外泌体稀释液,以匀速、缓慢推注入纳米颗粒跟踪分析仪,测定外泌体的粒径及颗粒数。

1.2.8 RT-qPCR实验 提取RNA,紫外分光光度计检测RNA浓度及纯度,分别使用miRNA逆转录试剂盒(茎环法)、mRNA逆转录试剂盒逆转录成cDNA,其中以*U6*作为*miR-885-5p*的内参,*β-actin*作为*Hmgb1*、*Bax*、*Bcl-2*、*Caspase-3 mRNA*的内参,结果采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法分析计算相对表达量,RT-qPCR反应条件:预变性95 ℃ 300 s;变性95 ℃ 10 s,退火60 ℃ 20 s,延伸72 ℃ 20 s,40个循环。各个基因引物序列见表1。

表1 RT-qPCR基因引物序列

Tab 1 Primer sequences of RT-qPCR

gene	上游(5′→3′)	下游(5′→3′)
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
miR-885-5p-RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAGAGGCAG	
ocu-miR-885-5p	ACACTCCAGCTGGGTCCATTACACTACCCT	TGGTGTCGTGGAGTCG
HMGB1	AGGCGGACAAGGCTCGTTA	CCAATGGACAGGCCAGGAT
Bax	TTTGCTTCAGGGTTTCATCCAG	GTCCAGTTCGTCGCCAATG
Bcl-2	TGCTTCAGGGTTTCATCCA	TGTCCAGTTCGTCGCCAAT
Caspase-3	CGGAAGGTAGCGACAGAGTT	GAGCATGGACACAATACATGGAATC
β-actin	GCTCTTCCAGCCCTCCTTC	ATGTCCACGTCGCACTTCA

1.2.9 Western blot实验 加入含蛋白酶抑制剂的裂解液提取蛋白,置于冰上摇晃裂解1 h,离心后收集上清液,用BCA法测定蛋白浓度。SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离蛋白,常规湿法转至PDVF膜,快速封闭液封闭1 h,TBST洗膜5 min,共3次。加入鼠一抗:β-actin(1∶750),兔一抗Hmgb1(1∶1 250)、Bax(1∶1 000)、Bcl-2(1∶1 000)、Caspase-3(1∶750)、CD63(52 090,1∶500)、HSP70(46 477,1∶500)、TSG101(72 312,1∶500),常温摇床孵育2 h;洗涤,加入IgG-HRP标记的山羊抗鼠IgG-HRP(1∶10 000)、山羊抗兔IgG-HRP(1∶10 000),室温摇床孵育1 h;洗膜;ECL显影;用ImageJ软件进行灰度值分析。

1.2.10 Hoechst染色实验 各组细胞以2×10^5个/孔接种于6孔板内,放入37 ℃、5%CO_2细胞培养箱内培养,待细胞融合度细胞融合度约50%时吸去完全培养基,用PBS洗涤,加入1 mL固定液常温固定10 min。弃去固定液后用PBS浸洗3 min,加入Hoechst 33258染色液0.5 mL,放在细胞培养箱中培养10~20 min。弃去染色液,PBS洗涤。荧光显微镜观察细胞。

1.2.11 流式细胞术 造模及转染后收集各组细胞,根据annexinV-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作,各组细胞用PBS洗涤离心3次,制备成浓度为1×10^6个/mL的细胞悬液,每组取100 μL细胞悬液加入10 μL annexinV-FITC+10 μL PI,混匀,避光孵育30 min,流式细胞仪上机检测各组细胞凋亡率。

1.2.12 双荧光素酶报告实验 通过Target Scan Human数据库(http://www.targetscan.org)进行miR-885-5p与Hmgb1的结合位点预测。构建Hmgb1 3′UTR-WT(野生型)和Hmgb1 3′UTR-MUT(突变型)荧光素酶报告载体,在促转染试剂Lipofectamine 3000的作用下,分别与miR-885-5p模拟物和miR-885-5p模拟物NC共转染,转染48 h后收集细胞,检测各组的荧光素酶活性。按照试剂盒技术手册进行操作。

1.3 统计学处理

所有实验重复3次,统计学处理采用SPSS 27.0软件分析数据,用GraphPad Prism 8.4软件作图。计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,多组计量资料间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验,所有数据服从正态分布及方差齐性检验,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

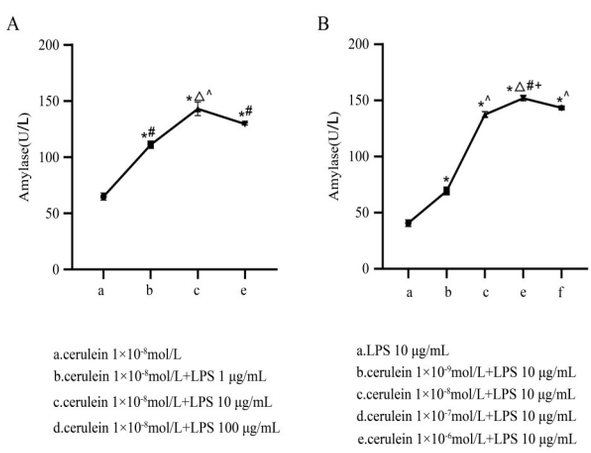
2.1 不同浓度的雨蛙素联合脂多糖处理兔胰腺永

生化腺泡细胞后淀粉酶的表达

淀粉酶实验结果显示，使用雨蛙素浓度为1×10^{-8} mol/L与不同浓度的脂多糖(0、1、10、100 μg/mL)联合干预细胞24 h，相对于单独使用雨蛙素造模，淀粉酶分泌水平随着脂多糖浓度的加大而升高，当脂多糖浓度为10 μg/mL时，淀粉酶分泌水平最高，明显高于单独刺激组(图1 A)。相对于单独使用脂多糖造模，分别用不同浓度的雨蛙素(0、1×10^{-9}、1×10^{-8}、1×10^{-7}、1×10^{-6} mol/L)联合干预细胞，当雨蛙素浓度为1×10^{-7} mol/L，淀粉酶分泌水平最高($P<0.05$)，明显高于单独刺激组(图1 B)。

2.2　各时间点细胞上清液TNF-α、IL-6水平

结果显示，与0 h相比，雨蛙素(1×10^{-7} mol/L)及脂多糖(10 μg/mL)刺激细胞中TNF-α、IL-6水平在造模后12 h明显升高，在24 h达到最高，在48 h时有所下降，见表2。结合细胞形态结果，设定干预细胞的最佳时间为24 h，成功构建严重AP模型。



A：使用雨蛙素(cerulein)浓度(10^{-8} mol/L)联合不同浓度的脂多糖(LPS)干预细胞24 h；B：使用脂多糖(10 μg/mL)联合不同浓度的雨蛙素干预细胞24 h；与a相比，$^{*}P<0.05$；与b相比，$^{\#}P<0.05$；与c相比，$^{\triangle}P<0.05$；与d相比，$^{\star}P<0.05$；与e相比，$^{\blacktriangle}P<0.05$

图1 不同浓度的雨蛙素及脂多糖干预细胞的淀粉酶分泌量

Fig 1 Intervention of amylase secretion by cells with different concentrations of cerulein and lipopolysaccharide

表2　不同时间点细胞上清液的TNF-α、IL-6表达(pg/mL，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expression of TNF-α and IL-6 in cell supernatant at different time points(pg/mL，$\bar{x}\pm s$)

时间(h)	TNF-α	IL-6
0	99.49±6.88	25.54±0.82
12	126.46±10.8^{ac}	60.52±1.03^{ac}
24	146.66±10.99^{abd}	81.13±1.99^{abd}
48	117.77±9.24^{ac}	48.01±1.26^{ac}

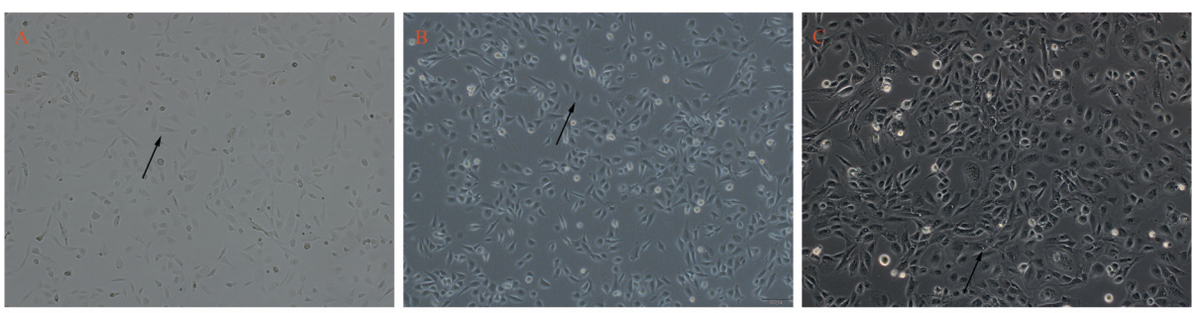
注：与0 h相比，$^{a}P<0.05$；与12 h相比，$^{b}P<0.05$；与24 h相比，$^{c}P<0.05$；与48 h相比，$^{d}P<0.05$。

2.3　慢病毒转染效果

常规培养的兔胰腺永生化腺泡永生化细胞呈上皮细胞样，片状贴壁生长，向外延伸增殖。雨蛙素(1×10^{-7} mol/L)联合脂多糖(10 μg/mL)干预24 h时细胞回缩，形态变圆，部分细胞脱落、死亡。转染48 h后细胞胞质内出现大量空泡(图2A～C)。

2.4　外泌体形态和表型特征

透射电子镜观察兔胰腺永生化腺泡细胞上清液外泌体形状，严重AP组和Control组外泌体形态相差不大，呈茶托状的外囊泡，双层膜结构(图3)。纳米颗粒跟踪分析仪检测外泌体的粒径和颗粒数，结果显示，两组外泌体颗粒粒径均分布在50～200 nm间，呈高度富集峰；Control组外泌体平均粒径大小为122.2 nm，浓度约为2.35e+11 particles/mL；严重AP组外泌体平均粒径大小为100.8 nm，浓度约为8.47e+11 particles/mL(图4)。Wester blot结果显示，Control组和严重AP组外泌体标志蛋白TSG101、CD63、HSP70有表达(图5)。



A：兔胰腺腺泡细胞正常培养；B：造模24 h后细胞回缩，形态变圆，部分细胞脱落、死亡；C：转染48 h后细胞胞质内出现大量空泡(黑色箭头)

图2　兔胰腺腺泡永生化细胞造模、转染后形态对比(10×，标尺=100 μm)

Fig 2　Modeling and morphological comparison of rabbit pancreatic acinar immortalized cells after transfection(10×, scale bar =100 μm)

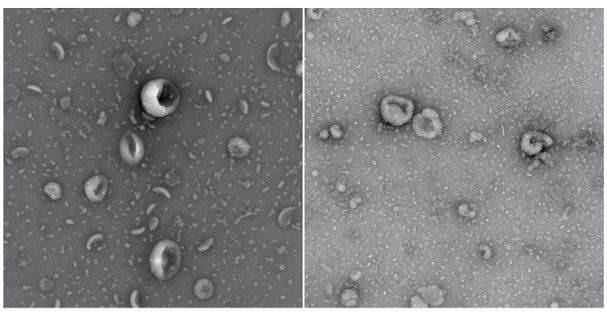
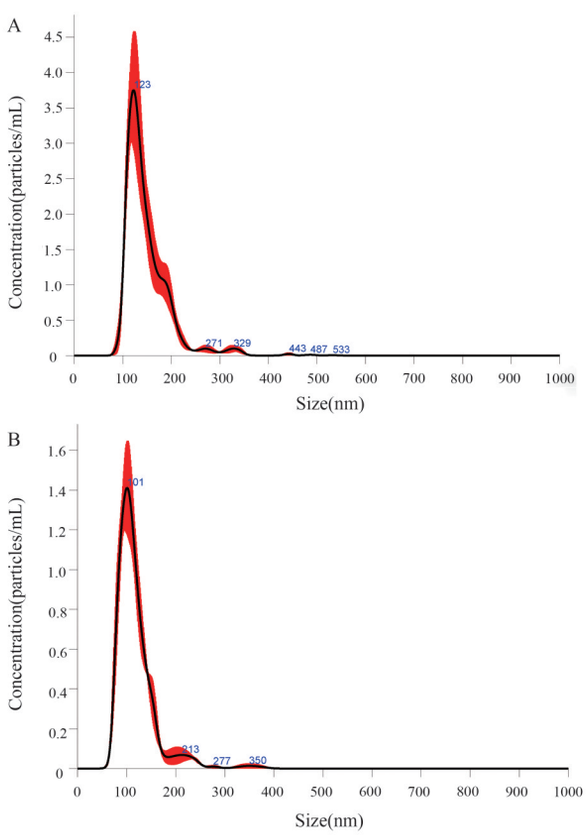


图3 外泌体电镜下的形态(20 000×,标尺=200 nm)

Fig 3 The morphology of exosomes under electron microscope (20 000×, scale bar = 200 nm)



A:Control组;B:严重AP组

图4 各组外泌体的粒径和浓度

Fig 4 Particle size and concentration of exosomes in each group

RT-qPCR结果显示,与Control组外泌体相比,严重AP组外泌体miR-885-5p表达明显上调($P<0.01$)(图6)。

2.5 RT-qPCR检测miR-885-5p和*Hmgb1*、*Bax*、*Bcl-2*、*Caspase-3* mRNA在各组细胞中的相对表达量

RT-qPCR研究结果表明,与Control组相比,严重AP组的*miR-885-5p*和*Hmgb1*、*Bax*、*Caspase-3*的mRNA表达上调($P<0.01$),*Bcl-2*的mRNA表达下调($P<0.01$);与mimics NC组相比,miR-885-5p mimics组的*miR-885-5p*和*Hmgb1*、*Bax*、*Caspase-3*的mRNA表达上调($P<0.01$),*Bcl-2*的mRNA表达下调($P<0.05$)。与inhibitor NC组相比,miR-885-5p inhibitor组的*miR-885-5p*和*Caspase-3*的mRNA表达下调($P<0.05$),*Hmgb1*、*Bax*的mRNA表达下调($P<0.01$),*Bcl-2*的mRNA表达上调($P<0.01$)(图7A~E)。

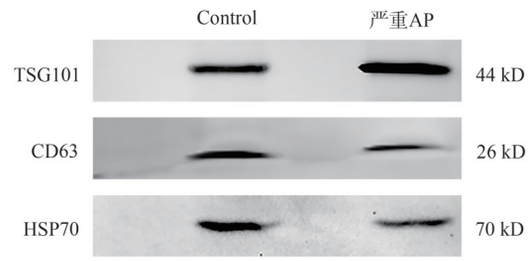
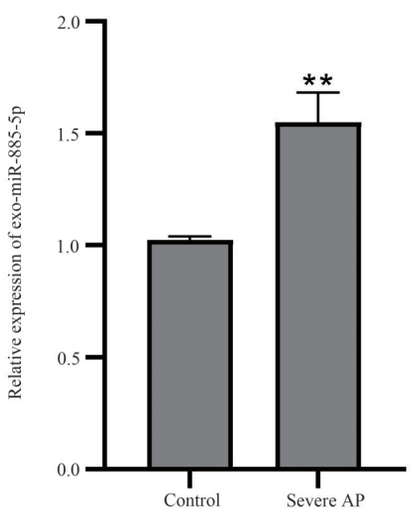


图5 各组外泌体标志蛋白TSG101、CD63、HSP70的表达

Fig 5 Expression of exosome marker proteins TSG101, CD63 and HSP70 in each group



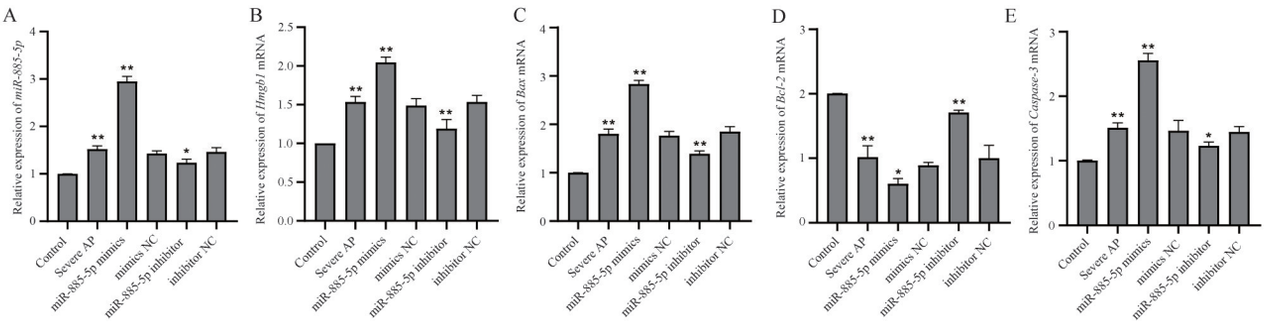
$^{**}P<0.01$

图6 外泌体miR-885-5p的表达变化

Fig 6 Changes in the expression of exosome miR-885-5p

2.6 Wester blot检测Hmgb1、Bax、Bcl-2、Caspase-3在各组细胞中的蛋白相对表达量

Wester blot研究结果显示,与Control组相比,严重AP组的Hmgb1、Bax和Caspase-3的蛋白表达量升高($P<0.01$),Bcl-2的蛋白表达量降低($P<0.01$)。



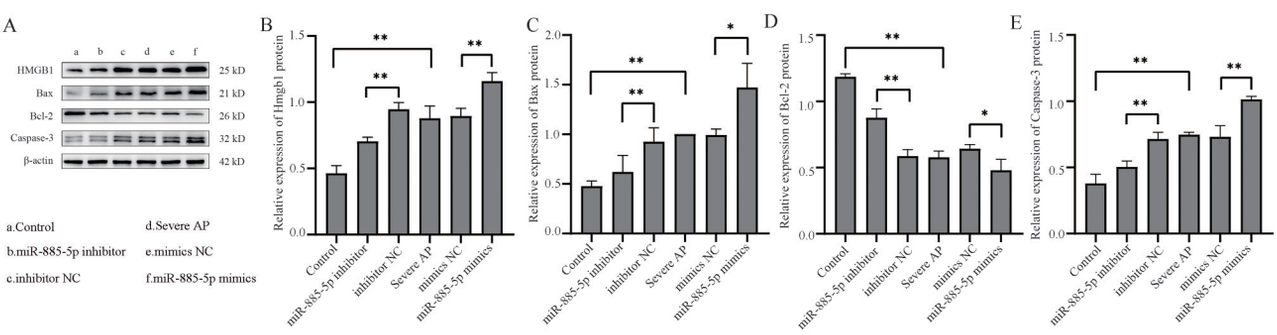
$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

A：各组细胞miR-885-5p的表达量；B：各组细胞Hmgb1的mRNA表达量；C：各组细胞的Bax mRNA表达量；D：各组细胞Bcl-2的mRNA表达量；E：各组细胞Caspase-3 mRNA表达量

图7　各组细胞*miR-885-5p*及*HMGB1*、*Bax*、*Bcl-2*、*Caspase-3*的mRNA相对表达量

Fig 7　Relative expression of *miR-885-5p*, *HMGB1*, *Bax*, *Bcl-2* and *Caspase-3* in each group

与mimics NC组相比，miR-885-5p mimics组的Hmgb1、Caspase-3的蛋白表达量升高（$P<0.01$），Bax的蛋白表达量升高（$P<0.05$），Bcl-2的蛋白表达量降低（$P<0.05$）。与inhibitor NC组相比，miR-885-5p inhibitor组的Hmgb1、Bax和Caspase-3的蛋白表达量降低（$P<0.01$），Bcl-2的蛋白表达量升高（$P<0.01$）（图8A～E）。



$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

A：各组细胞Hmgb1、Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白表达情况；B：Hmgb1的蛋白表达量；C：Bax的蛋白表达量；D：Bcl-2的蛋白表达量；E：Caspase-3的蛋白表达量

图8　各组细胞HMGB1、Bax、Bcl-2、Caspase-3等凋亡相关蛋白的影响

Fig 8　The effects of Hmgb1, Bax, Bcl-2, Caspase-3 apoptosis-related proteins in each group

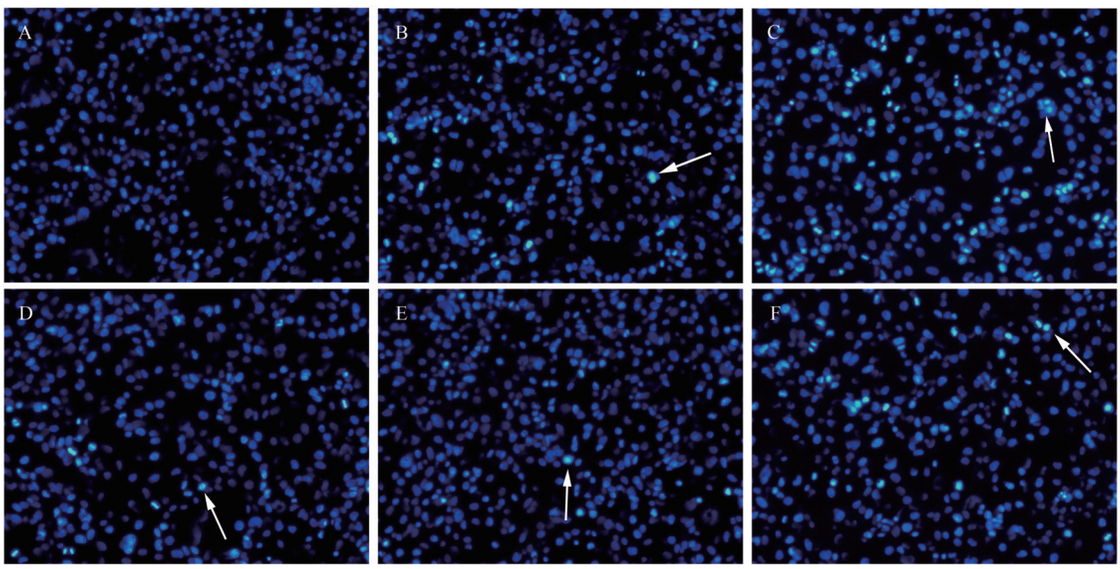
2.7　Hoechst染色、流式细胞术检测各组细胞凋亡情况

Hoechst 33258凋亡染色结果显示，正常细胞核呈低蓝色，染色均匀，细胞核完整；相比于Control组，严重AP组部分细胞核致密浓缩，呈亮蓝色；与mimics NC组相比，miR-885-5p mimics组的细胞减少，致密浓缩、亮蓝色的细胞核增多，促进细胞凋亡；与inhibitor NC组相比，miR-885-5p inhibitor组的亮蓝色、致密细胞核减少，细胞密度增加，抑制细胞凋亡（图9A～F）。

流式细胞术以散点图显示，以annexin V-FITC为横坐标，PE为纵坐标，左下象限（Q3-3）为正常活细胞，右上象限（Q3-2）为晚期凋亡细胞及坏死细胞，右下象限（Q3-4）为早期凋亡细胞，计算公式：各组细胞凋亡率＝早期凋亡率＋晚期凋亡率。结果显示，与Control组相比，严重AP组细胞总凋亡率明显增高（$P<0.01$）；与mimics NC相比，miR-885-5p mimics组总凋亡率明显增高（$P<0.01$）；反之，与inhibitor NC组相比，miR-885-5p inhibitor组总凋亡率明显下降（$P<0.01$）（图10A、B）。

2.8　双荧光素酶实验验证miR-885-5p和Hmgb1的靶向关系

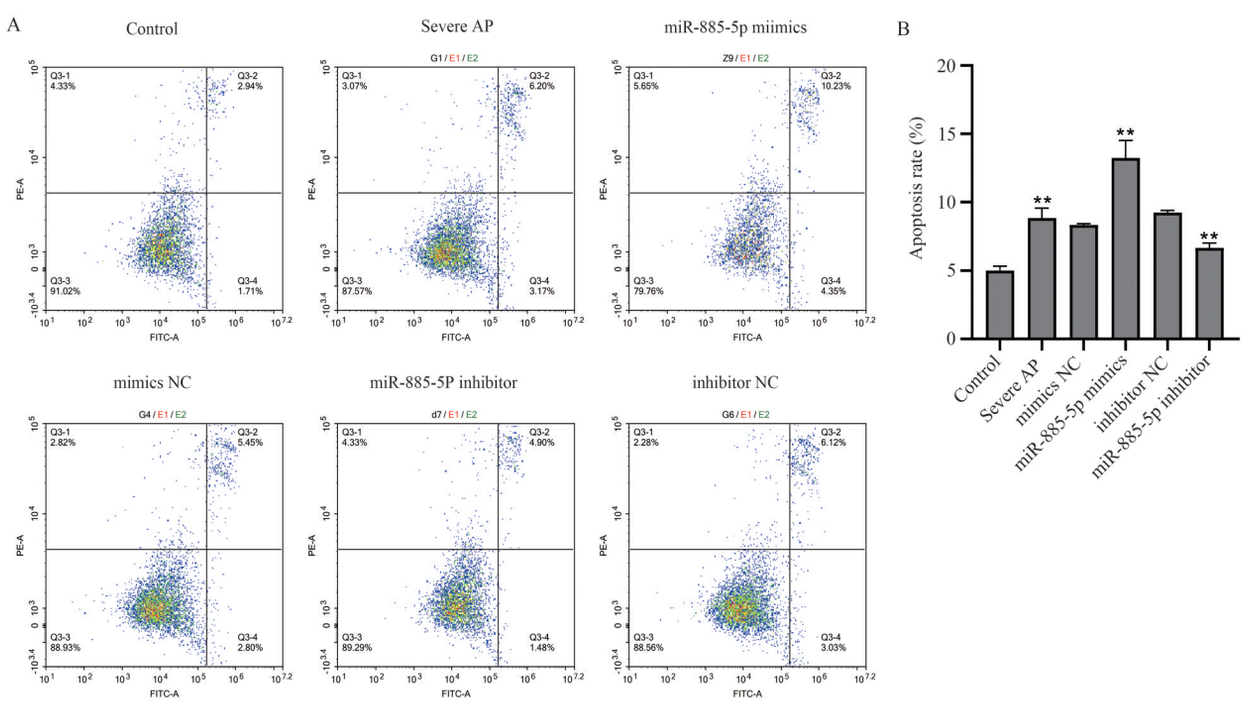
Target Scan Human数据库显示HMGB1与miR-885-5p的互作靶点（图11）。双荧光素酶实验研究结果显示Hmgb1与miR-885-5p含有互补的核苷酸序列（图12），miR-885-5p mimics与Hmgb1



A：Control组；B：严重AP组；C：miR-885-5p mimics组；D：mimics NC组；E：miR-885-5p inhibitor组；F：inhibitor NC组（白色箭头）

图9　各组细胞Hoechst凋亡染色比较（20×，标尺=200 μm）

Fig 9　Comparison of Hoechst apoptosis staining in each group（20×，scale bar=200 μm）



$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

图10　流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Fig 10　The apoptosis rate of cells in each group was detected by flow cytometry

3′UTR-WT共转的荧光素酶活力比miR-885-5p mimics NC与Hmgb1 3′UTR-WT共转的荧光素酶活力低（$P<0.01$），miR-885-5p mimics与Hmgb1 3′UTR-MUT共转的荧光素酶活力与miR-885-5p mimics NC与Hmgb1 3′UTR-MUT共转的荧光素酶活力无明显差异，可得出miR-885-5p靶向调控Hmgb1（图13）。

3　讨论

AP是常见的消化系疾病，由胆囊结石、过度饮酒、高脂血症、内镜逆行胰胆管造影术（ERCP）和各

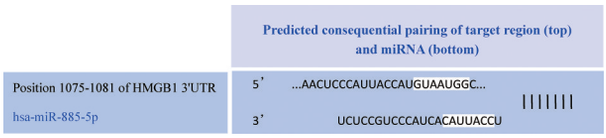


图 11　Target Scan Human 数据库显示 HMGB1 与 miR-885-5p 的互作靶点

Fig 11　Target Scan Human date base shows the in teraction target of HMGB1 and miR-885-5p

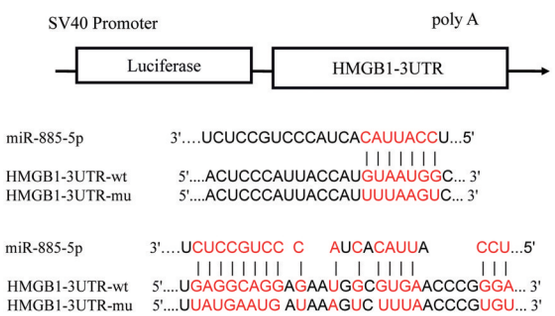
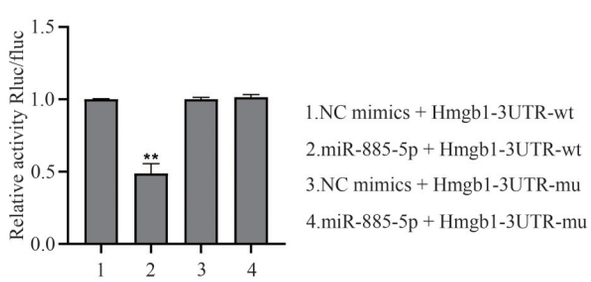


图 12　miR-885-5p 与 h-Hmgb1-3′UTR 靶位点示意图

Fig 12　The binding diagram of miR-885-5p and h-Hmgb1-3′UTR target site



与 NC mimics＋HMGB1-3UTR-wt 比较，$^{**}P<0.01$

图 13　双荧光素酶报告基因实验检测 miR-885-5p 与 h-Hmgb1-3′UTR 相互作用

Fig 13　The interaction between miR-885-5p and h-Hmgb1-3′UTR was detected by dual luciferase reporter gene assay

种药物等多种病因导致胰酶大量激活，胰腺自消化所致的胰腺水肿、出血及坏死等炎症损伤[16]，多数患者病情轻，预后好，少数病人可发展为重症急性胰腺炎，最终导致全身炎症反应综合征（SIRS）和多器官衰竭（MOF），病死率高[17]。目前 AP 的发病机制尚不明确，有研究证实细胞凋亡在 AP 发病过程扮演着重要角色[18]。还有研究发现，miRNA 表达的改变与 AP 的发生、发展有关，miRNA 通过外泌体运输作用于靶基因调节 AP 细胞凋亡，从而影响 AP 的发生、发展[19]。

外泌体作为细胞外分泌的微小囊泡，携带核酸、蛋白质、脂质等大量信息分子，参与细胞之间信息交流，影响细胞的增殖、迁移、凋亡等生物学过程，在 AP 发生、发展过程中发挥重要作用，是近年来国内外研究的一个热点。有研究表明，在 AP 患者体内，外泌体的水平明显升高，这一现象与胰腺损伤密切相关[20]。研究发现，外泌体 miR125b-5p 通过靶向 PI3K/AKT 信号通路促进腺泡细胞凋亡，加重急性胰腺炎炎症[21]。而 miR-885-5p 能否通过外泌体形式参与 AP 细胞凋亡的调控尚不清楚。

本研究采用雨蛙素联合脂多糖处理兔胰腺永生化腺泡细胞建立严重 AP 体外模型，结果显示，严重 AP 组细胞上清液淀粉酶、TNF-α、IL-6 等炎症因子水平升高，说明严重 AP 体外模型建立成功。CD63、HSP70 和 TSG101 是外泌体常见的表面分子标志物，本研究鉴定兔胰腺腺泡永生化腺泡细胞外泌体表型特征，结果显示，经雨蛙素及脂多糖处理后，Control 组及严重 AP 组细胞上清液电镜下能够观察到外泌体，严重 AP 组外泌体浓度较 Control 组增多，这表明炎症状态下细胞外泌体生成增多。将上述两组采用 WB 实验检测外泌体标志蛋白，结果显示 CD63、HSP70 和 TSG101 有表达，说明兔胰腺永生化腺泡细胞培养上清液中能成功分离出外泌体。而对上述两组的 RT-qPCR 检测发现，与 Control 组比较，严重 AP 组外泌体 miR-885-5p 表达上调，这提示 miR-885-5p 可能以外泌体的形式影响着 AP 的进程，但具体机制尚不明确。

微小 RNA（microRNAs）是外泌体内载的重要成分，是一类 17～24 个核苷酸组成的内源性非编码单链 RNA，参与基因的分化、转录、翻译，其性质在很大程度上决定了外泌体对靶基因的作用。miRNA 在炎症、细胞凋亡、增殖、坏死中的作用已得到充分证实。miR-885-5p 是一个非保守 microRNA，可以调节细胞的生长、衰老和凋亡，已被证明是多种疾病的重要标志物[22]。*Bax* 属于促凋亡基因，*Caspase-3* 是细胞凋亡的重要执行者，*Bcl-2* 属于抗凋亡基因，这些基因在细胞凋亡过程中起着促进或抑制的作用。研究发现，miR-885-5p 靶向 AEG1 抑制细胞增殖和细胞周期进展并促进细胞凋亡，抑制肝癌细胞迁移[23]。Alural 等[24]研究发现，过表达 miR-885-5p 可以降低 *Bcl-2* 的表达，促进神经元样细胞凋亡，加重神经元氧化、损伤。在前列腺癌中，下调 miR-885-5p 的表达可抑制 Caspase-3 活性，减少细胞凋亡，促进细胞增殖、迁移，加重前列腺癌的恶性程度[25]。以上这些研究表明，miR-885-5p 通过各种信号通路促进细胞凋亡，参与多种疾病的发生、发展，但是否参与调控 AP 细胞凋亡尚不明确。

本研究发现，严重AP组细胞中Bax、Caspase-3表达升高，Bcl-2表达下降，细胞凋亡增多；上调miR-885-5p的表达后，Bax、Caspase-3表达升高，Bcl-2表达下降，细胞凋亡增多；下调miR-885-5p的表达后，Bax、Caspase-3表达下降，Bcl-2表达升高，细胞凋亡减少，提示miR-885-5p促进AP腺泡细胞凋亡。

miR-885-5p通过何种途径调控AP细胞凋亡尚不明确。有研究发现，miR-885-5p靶向Hmgb1促进卵巢癌细胞凋亡[10]。Hmgb1是广泛存在于哺乳动物中的一种高度保守的核蛋白，属于Hmgb蛋白家族的一种，其在细胞核中高度表达，参与调控细胞凋亡、增殖及炎性损伤[26]，在多种炎症疾病中表达上调[27]。研究发现，在大鼠AP模型中，胰腺组织的Hmgb1表达升高，抑制Hmgb1的表达可有效减轻AP炎症[28]。在小鼠AP模型中，Hmgb1表达升高，可促进Caspase-3的表达，从而促进腺泡细胞凋亡[29]。本研究结果显示，严重AP组细胞的Hmgb1表达较Control组明显升高，细胞凋亡增多；上调Hmgb1的表达后，Bax、Caspase-3表达升高，Bcl-2表达下降，细胞凋亡增多；下调Hmgb1的表达后，Bax、Caspase-3表达下降，Bcl-2表达升高，细胞凋亡减少，提示Hmgb1表达水平与AP细胞凋亡密切相关。

目前miR-885-5p能否通过Hmgb1调控AP细胞凋亡尚不明确。前人研究发现，miR-885-5p靶向Hmgb1促进卵巢癌细胞凋亡[10]，通过生物信息学分析发现miR-885-5p和Hmgb1具有互补结合位点。为验证miR-885-5p和Hmgb1的关系，进一步进行了双荧光素酶报告基因检测实验，结果显示miR-885-5p与Hmgb1存在靶向基因序列。因此推测外泌体miR-885-5p可能靶向Hmgb1促进AP腺泡细胞凋亡。为验证这一推测，本研究分别上调及下调miR-885-5p的表达，结果显示，上调miR-885-5p后，Hmgb1、Bax、Caspase-3表达量随之上升，Bcl-2表达量随之下降，细胞凋亡增多；而下调miR-885-5p的表达可逆转。

综上所述，外泌体miR-885-5p在严重AP模型细胞中高表达，miR-885-5p通过靶向Hmgb1促进Bax、Caspase-3表达及抑制Bcl-2表达诱导胰腺细胞凋亡。因此，外泌体miR-885-5p是AP细胞凋亡的重要调控因子，miR-885-5p/Hmgb1信号轴可能是治疗AP的潜在靶标，为临床治疗AP提供了新思路。

作者贡献度说明：

黄桂香：负责实验构思、设计与操作，撰写论文；甘慧芳、潘路娟：负责整理数据与统计分析；张彩灵、徐键、张芷若、谷登凯：实验操作助手；覃月秋：指导实验设计，修改论文以及经费支持。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Gliem N, Ammer-Herrmenau C, Ellenrieder V, et al. Management of severe acute pancreatitis: An update[J]. Digestion, 2021,102(4):503-507.

2 Tan JH, Cao RC, Zhou L, et al. ATF6 aggravates acinar cell apoptosis and injury by regulating p53/AIFM2 transcription in severe acute pancreatitis[J]. Theranostics, 2020,10(18):8298-8314.

3 Chen R, Kang R, Tang D. The mechanism of HMGB1 secretion and release[J]. Exp Mol Med, 2022,54(2):91-102.

4 Liu J, Niu Z, Zhang R, et al. MALAT1 shuttled by extracellular vesicles promotes M1 polarization of macrophages to induce acute pancreatitis *via* miR-181a-5p/HMGB1 axis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(19):9241-9254.

5 Qu Y, Ding Y, Lu J, et al. Identification of key microRNAs in exosomes derived from patients with the severe acute pancreatitis[J]. Asian J Surg, 2023, 46(1):337-347.

6 梁华益.重症急性胰腺炎患者血浆外泌体microRNA表达谱的初步研究[D].百色：右江民族医学院，2022.
Liang HY. Preliminary study on microRNA expression profile of plasma exosomes in patients with severe acute pancreatitis[D]. Baise: Youjiang Medical University Nationalities,2022.

7 杨琦.大黄素通过调节外泌体microRNA表达谱改善大鼠重症急性胰腺炎肺损伤的机制研究[D].大连：大连医科大学，2024.
Yang Q. Emodin improves severe acute pancreatitis-lung injury in rats by regulating exosomal microRNA expression profile [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2024.

8 Shao Y, Li Y, Jiang Y, et al. Circulating exosomal miR-155-5p contributes to severe acute pancreatitis -associated intestinal barrier injury by targeting SOCS1 to activate NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. FASEB J, 2023,37(6):e23003.

9 Hussein NA, Kholy ZA, Anwar MM, et al. Plasma miR-22-3p, miR-642b-3p and miR-885-5p as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017,143(1):83-93.

10 Yan R, Zeng S, Gao F, et al. CircUBE2D2 regulates

HMGB1 through miR-885-5p to promote ovarian cancer malignancy[J]. Clinics (Sao Paulo), 2024,79:100391.

11 Tang G, Yu C, Xiang K, et al. Inhibition of ANXA2 regulated by SRF attenuates the development of severe acute pancreatitis by inhibiting the NF-κB signaling pathway[J]. Inflamm Res, 2022,71(9):1067-1078.

12 Liu Y, Yang L, Chen KL, et al. Knockdown of GRP78 promotes apoptosis in pancreatic acinar cells and attenuates the severity of cerulein and LPS induced pancreatic inflammation[J]. PLoS One, 2014,9(3):e92389.

13 刘超. 青蒿琥酯对大鼠重症急性胰腺炎模型的治疗作用及机制研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2017.
Liu C. Therapeutic effect of artesunate on severe acute pancreatitis rat models and its mechanisms [D]. Chongqing:Army Medical University, 2017.

14 周杰, 李敬东, 权刚, 等. miR-539靶向GPD1L对雨蛙素诱导的急性胰腺炎细胞模型凋亡和自噬的影响[J]. 中国老年学杂志, 2022,42(16):4067-4072.
Zhou J,Li JD,Quan G,et al. Effect of miR-539 targeting GPD1 L on apoptosis and autophagy in caerulein-induced acute pancreatitis cell model[J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(16):4067-4072.

15 刘东菊, 潘路娟, 梁华益, 等. miR-let-7b-5p对急性胰腺炎AR42J细胞凋亡及自噬的作用研究[J]. 右江民族医学院学报, 2022,44(1):6-10.
Liu DJ,Pan LJ,Liang HY,et al. Effect of miR-let-7b-5p on apoptosis and autophagy of AR42J cells in acute pancreatitis[J]. J Youjiang Med Univ Nationalit, 2022, 44(1):6-10.

16 Lee PJ, Papachristou GI. New insights into acute pancreatitis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019,16(8): 479-496.

17 Liu Y, Li M, Mei C, et al. Thioredoxin-interacting protein deficiency protects against severe acute pancreatitis by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1[J]. Cell Death Dis, 2022,13(10):914.

18 He J, Hou X, Wu J, et al. Hspb1 protects against severe acute pancreatitis by attenuating apoptosis and ferroptosis via interacting with Anxa2 to restore the antioxidative activity of Prdx1[J]. Int J Biol Sci, 2024,20(5): 1707-1728.

19 Su XJ, Chen Y, Zhang QC, et al. Exosomes derived from cerulein-stimulated pancreatic acinar cells mediate peritoneal macrophage M1 polarization and pyroptosis *via* an miR-24-3p/MARCH3/NLRP3 Axis in acute pancreatitis[J]. Pancreas, 2024,53(8):e641-e651.

20 Carrascal M, Areny-Balaguero A, De-Madaria E, et al. Inflammatory capacity of exosomes released in the early stages of acute pancreatitis predicts the severity of the disease[J]. J Pathol, 2022,256(1):83-92.

21 Zheng Z, Cao F, Ding YX, et al. Acinous cell AR42J-derived exosome miR125b-5p promotes acute pancreatitis exacerbation by inhibiting M2 macrophage polarization *via* PI3K/AKT signaling pathway [J]. World J Gastrointest Surg, 2023,15(4):600-620.

22 Gui J, Tian Y, Wen X, et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 120(5):183-193.

23 Li C, Wang X, Song Q. MicroRNA 885-5p inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by repressing AEG1 [J]. Onco Targets Ther, 2020,13:981-988.

24 Alural B, Duran GA, Tufekci KU, et al. EPO mediates neurotrophic, neuroprotective, anti-oxidant, and anti-apoptotic effects *via* downregulation of miR-451 and miR-885-5p in SH-SY5Y neuron-like cells[J]. Front Immunol, 2014,5:475.

25 Yang Z, Zhang F, Cai K, et al. Long noncoding RNA HOXA-AS2 facilitates prostate cancer progression by inhibiting miR-885-5p to upregulate KDM5B[J]. Kidney Blood Press Res, 2023,48(1):45-55.

26 Tang D, Kang R, Zeh HJ, et al. The multifunctional protein HMGB1: 50 years of discovery[J]. Nat Rev Immunol, 2023,23(12):824-841.

27 Niu F, Pan S. MicroRNA-488 inhibits neural inflammation and apoptosis in spinal cord injury through restraint on the HMGB1/TLR4/NF-kappaB signaling pathway [J]. Neuroreport, 2021,32(12):1017-1026.

28 Wu X, Yang Z, Wang H, et al. High-mobility group box protein-1 induces acute pancreatitis through activation of neutrophil extracellular trap and subsequent production of IL-1beta[J]. Life Sci, 2021,286:119231.

29 Gao Y, Wang L, Niu Z, et al. miR-340-5p inhibits pancreatic acinar cell inflammation and apoptosis *via* targeted inhibition of HMGB1[J]. Exp Ther Med, 2022, 23 (2):140.

[本文编辑] 朱 昊