

被 α -synuclein 激活的小胶质细胞通过外泌体转运 miR-19a-3p 抑制神经细胞自噬

林 辉¹, 刘思齐², 黄云苑², 周天恩³

(1. 华南农业大学医院内科, 广东 广州 510640; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院急诊科, 广东 广州 510120; 3. 中山大学附属佛山医院急诊科, 广东 佛山, 528000)

摘要:【目的】研究被过表达 α -synuclein 的 SH-SY5Y 细胞外泌体刺激后的小胶质细胞重新分泌的外泌体 (SNCA-HM Exo) 的 miRNAs 成分变化, 及其对神经细胞自噬的影响。【方法】收集小胶质细胞外泌体进行 miRNAs 芯片分析和 PCR 检测, 筛选出差异表达的 miRNAs, 对其靶基因进行 KEGG 及 GO 分析, 筛选出与 PI3K/Akt/信号通路相关的 miRNAs。将 SH-SY5Y 细胞分为四组, 分别为 Con-HM Exo 组, Con-HM Exo+miR-19a mimic 组, SNCA-HM Exo 组以及 SNCA-HM Exo+miR-19a-3p inhibitor 组, 采用 Western Blot 进行验证试验。【结果】芯片分析和 PCR 共筛选出 15 个差异表达的 miRNAs。KEGG 及 GO 分析发现, 其靶基因富集分值最高的是 PI3K/Akt 信号通路, 其中 miR-19a-3p 调控 PI3K/Akt 信号通路的靶基因包括 PTEN 等。验证试验发现, miR-19a 模拟物组及 SNCA-HM Exo 组与对照组比较 PTEN、LC3 II/I 下降, p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、P62 升高 ($P < 0.05$), 而 miR-19a 抑制剂可逆转这一作用 ($P < 0.05$)。【结论】SNCA-HM Exo 可通过 miR-19a-3p 调控 PTEN, 激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 进而抑制神经细胞自噬。

关键词: α -突触核蛋白; 外泌体; miR-19a-3p; 自噬; 小胶质细胞; SH-SY5Y 细胞

中图分类号: R742.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2021)01-0057-09

Microglia Activated by α -Synuclein Inhibits Autophagy in SH-SY5Y Cells by Transporting miR-19a-3p Via Exosomes

LIN Hui¹, LIU Si-qi², HUANG Yun-yuan², ZHOU Tian-en³

(1. Department of Internal Medicine, South China Agricultural University Hospital, Guangzhou 510640, China; 2. Department of Emergency, SunYat-sen Memorial Hospital, SunYat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Department of Emergency, The Affiliated Foshan Hospital of Sun Yat-sen University, Foshan 528000, China)

Correspondence to: ZHOU Tian-en; E-mail: zhoutianen55@163.com

Abstract: 【Objective】To study the changes of miRNAs in exosomes secreted from microglia after being activated by exosomes of SH-SY5Y cells overexpressing α -synuclein (SNCA-HM Exo) and their effects on autophagy of SH-SY5Y cells. 【Methods】Microglia exosomes were collected for miRNAs microarray analysis and PCR detection, and the differentially expressed miRNAs were screened out. Their target genes were analyzed by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO). MiRNAs and their target genes related to PI3K/Akt/signaling pathway were screened out and verified by Western blot. The SH-SY5Y cells were divided into four groups: Con-HM Exo, Con-HM Exo+miR-19a mimic, SNCA-HM Exo and SNCA-HM Exo+miR-19a-3p inhibitor. 【Results】Fifteen differentially expressed miRNAs were screened out by microarray analysis and PCR. KEGG and GO analysis showed that PI3K/Akt signaling

收稿日期: 2020-11-01

基金项目: 广东省自然科学基金(2018A0303130205, 2017A030313840)

作者简介: 林辉, 主治医师, 研究方向: 脑神经退行性疾病, E-mail: 190107038@qq.com; 周天恩, 通信作者, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 帕金森病, E-mail: zhoutianen55@163.com

pathway had the highest enrichment score of target genes, and PTEN was one of the target genes regulated by mir-19a-3p. We found that, compared with the control group, the expression of PTEN and LC3 II/I were decreased, while the expression of p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR and p62 were increased in the miR-19a-3p mimic group and the SNCA-HM Exo group ($P < 0.05$). However, miR-19a-3p inhibitor could reverse this effect ($P < 0.05$).【Conclusion】SNCA-HM Exo regulates PTEN through miR-19a-3p, activates PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, and then inhibits autophagy in SH-SY5Y cells.

Key words: α -synuclein; exosome; miR-19a-3p; autophagy; microglia; SH-SY5Y cells

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(1):57-65]

过表达的 α -突触蛋白(α -synuclein, SNCA)及其在多巴胺能神经元中的聚集、沉积是帕金森病(Parkinson's disease, PD)发病机制中的重要因素。我们之前研究发现^[1],过表达SNCA的神经细胞外泌体可被小胶质细胞摄取,并通过miRNA-19a-3p调控PTEN通路,进而抑制受体小胶质细胞自噬。然而小胶质细胞自噬被抑制后重新分泌的外泌体的miRNAs成分及功能变化尚不清楚。我们研究发现,小胶质细胞自噬被抑制后重新分泌的外泌体也可以再次被神经细胞摄取,然而这部分外泌体对神经元自噬功能的影响亦不清楚。本文主要研究了被过表达SNCA的SH-SY5Y细胞外泌体刺激后的小胶质细胞重新分泌的外泌体(SNCA-HM Exo)的miRNAs成分变化,以及其对受体神经细胞自噬的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y细胞,武汉普诺赛生命科技有限公司),人小胶质细胞(Human microglia, HM, 上海斯信生物科技有限公司),LC3抗体(美国CST公司),P62抗体(日本mbl公司),GAPDH抗体(美国Abcam公司),HRP标记羊抗兔二抗(美国Abcam公司),HRP标记羊抗鼠二抗(美国Abcam公司),M-MLV逆转录酶(美国Promega公司),GoTaq[®] qPCR Master Mix(美国Promega公司),miRCURYTM Array microarray kit(丹麦Exiqon公司),Hybridization Chamber II(美国Corning公司),BioarrayLifterSlip coverslip(美国Ambion公司),miRCURYTM Array Labelling kit(丹麦Exiqon公司),RNeasy Mini Kit(德国Qiagen公司),PTEN抗体(美国Abcam公司),Akt抗体(美国CST公司),

p-Akt抗体(美国Santa Cruz公司),mTOR抗体(美国Abcam公司),p-mTOR抗体(美国Santa Cruz公司),hsa-miR-19a-3p mimic(广州市锐博生物科技有限公司),hsa-miR-19a-3p inhibitor(广州市锐博生物科技有限公司)。

1.2 小胶质细胞培养及外泌体分离

复苏并培养小胶质细胞(human microglia, HM),以 1×10^6 细胞数接种于10 cm培养皿中,先培养24 h。分为两组,Con-Exo HM组:在HM中加入过表达GFP-con的SH-SY5Y细胞外泌体(约 1×10^8 微粒数);SNCA-Exo HM组:在HM中加入过表达GFP-SNCA的SH-SY5Y细胞外泌体(约 1×10^8 微粒数),培养24 h后换培养液,继续培养24 h后收集上清液,采用超速梯度离心的方法分离外泌体,具体离心方法详见我们既往发表的文章^[2]。Con-Exo HM分泌的外泌体简称为Con-HM Exo,SNCA-Exo HM分泌的外泌体简称为SNCA-HM Exo。收集分离的外泌体送NTA分析,结果显示Con-HM Exo粒子浓度为 0.923×10^8 (particles/mL),SNCA-HM Exo粒子浓度为 0.873×10^8 (particles/mL)。

1.3 小胶质细胞外泌体负染色后电镜鉴定

滴加20 μ L外泌体悬液于载样铜网上,在室温条件下静置1 min,用滤纸从背面吸干液体,滴加2%磷钨酸溶液(pH 6.8)20 μ L于铜网上,室温下负染色1 min。用滤纸吸干负染液,在白炽灯下烘干10 min,置于于200 kv透射电镜下观察。

1.4 外泌体miRNAs芯片分析

外泌体超速离心收集后,加0.25 mL TRIZOL充分裂解,加入氯仿两相分离,收集水相,加入异丙醇沉淀RNA,乙醇清洗。RNA质量检测后应用NanoDrop[®] ND-1000进行RNA浓度和纯度检测。应用miRCURYTM Array Labelling kit进行miRNAs标记。采用RNeasy Mini Kit浓缩RNA,之后应用

miRCURYTM Array microarray kit 进行 miRNAs 芯片杂交。最后使用 Genepix 4000B 扫描芯片图像, 并采用 Genepix Pro 6.0 软件分析。

1.5 miR-19a-3p 模拟物 (miR-19a-3p mimic) 及抑制剂 (miR-19a-3p inhibitor) 转染 SH-SY5Y 细胞

在每个6孔板中接种 1×10^5 SH-SY5Y 细胞, 培养 24 h。转染前换液, 每孔加入培养液 2 mL, miR-19a-3p 模拟物及抑制剂的转染浓度均为 100 nmol/L。分别用 120 μ L 1 \times Buffer 稀释 10 μ L 20 μ mol/L 的 miR-19a-3p 模拟物及抑制剂, 摇匀后分别加入 12 μ L Reagent 混匀, 在室温条件下孵育 10 min 后分别加入每孔含 2 mL 培养液的 6 孔板中。共同培养 48 h 后收集细胞, 采用 PCR 方法验证转染的效率。

1.6 实验分组

每个6孔板中接种 1×10^5 SH-SY5Y 细胞, 分为 4 组, 具体如下:

Con-HM Exo 组: Con-HM Exo (约 1×10^8 微粒数) 与 SH-SY5Y 细胞共培养 48 h。

Con-HM Exo+miR-19a mimic 组: miR-19a-3p 模拟物转染 SH-SY5Y 细胞后, 加入 Con-HM Exo (约 1×10^8 微粒数) 共培养 48 h。

SNCA-HM Exo 组: SNCA-HM Exo (约 1×10^8 微粒数) 与 SH-SY5Y 细胞共培养 48 h。

SNCA-HM Exo+miR-19a-3p inhibitor 组: miR-19a-3p inhibitor 转染 SH-SY5Y 细胞后, 加入 SNCA-HM Exo (约 1×10^8 微粒数) 共培养 48 h。

1.7 Western Blot 检测蛋白的表达水平

收集 SH-SY5Y 细胞, 提取蛋白后采用凝胶电泳方法检测目的蛋白表达。蛋白电泳结束后将蛋白转至 PVDF 膜上, 然后封闭非特异性抗原, 之后加入相应的一抗 P62 (MBL, PM045, 1:1 000), LC3 (CST, CST3862, 1:1 000), PTEN (Abcam, ab32199, 1:1 000), p-Akt (Santa Cruz, sc-81433, 1:1 000), Akt (CST, #9272, 1:1 000), p-mTOR (Santa Cruz, sc-101738, 1:1 000), mTOR (Abcam, ab2732, 1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 条件下震荡孵育, 第 2 天采用 TBST 洗涤后分别加入羊抗鼠二抗 (Abcam, ab6808, 1:5 000) 或羊抗兔二抗 (CST, #7054, 1:5 000), 继续在室温条件下震荡孵育 50 min 后 TBST 洗涤三次, 最后加入显影剂曝光显影。采用 Image J 软件分析蛋白条带的光密度值。以 GAPDH (Ab-

cam, ab70699, 1:5 000) 作为内参, 比较各组细胞蛋白表达的差异。

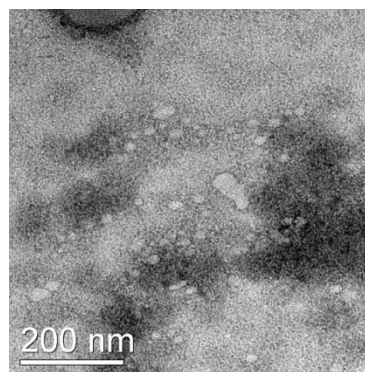
1.8 统计学方法

所有数据均采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的定量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两个独立样本定量数据的比较采用 *t* 检验, 多组间定量数据的比较采用单因素方差分析, 方差分析有统计学意义时多重比较采用 LSD-*t* 检验, 当方差不齐时, 采用 Kruskal Wallis *H* 检验。差异有统计学意义时采用 Bonferroni 法进行两两比较。当 $P < 0.05$ 时, 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小胶质细胞外泌体透射电镜鉴定

小胶质细胞外泌体负染色后, 透射电镜下可见直径大约 40~100 nm 的囊泡, 其大小及形状特征与外泌体相符 (图 1)。



morphological characteristics of microglia exosomes observed by electron microscope after negative staining.

图1 小胶质细胞外泌体透射电镜鉴定

Fig.1 Identification of microglia exosomes by electron microscope

2.2 不同组别之间外泌体存在差异表达的 miRNAs

为研究被过表达 α -synuclein 的 SH-SY5Y 细胞外泌体刺激的 HM 再次分泌的外泌体 (SNCA-HM Exo) 是否能通过 miRNAs 调控受体神经细胞的自噬功能, 我们对这些 HM 外泌体内含的 miRNAs 进行芯片分析。结果显示, 被过表达 α -synuclein 的 SH-SY5Y 细胞外泌体以及对照组外泌体分别刺激的 HM 分泌的外泌体中存在表达差异 2 倍以上的 miRNAs, 我们筛选出差异表达最显著的 20 个 miRNAs, 其中表达上调与表达下调的 miRNAs 各 10 个

(表1),因为本实验芯片分析仅作为初筛,所以实验组与对照组的样本量均为1。为了验证芯片分析数据的可靠性,我们接着应用PCR对芯片分析初步筛选出的这20个miRNAs进行验证,并进行统计学分析,最后确认其中15个miRNAs存在表达差异,其中7个miRNAs表达上调,8个miRNAs表达下调,差异有统计学意义($P < 0.05$;图2)。我们应用TargetscanHuman 7.1及miRDBV5两个数据库同时对这15个miRNAs进行靶基因预测,结果显示差异表达的15个miRNAs的靶基因共有1457个。

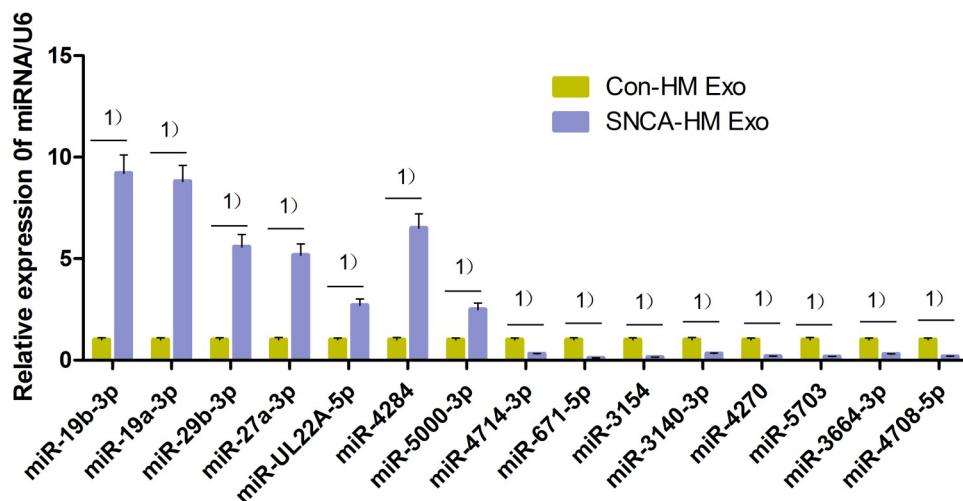
2.3 差异表达的miRNAs的靶基因KEGG和GO分析

我们应用KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库对差异表达的miRNAs的靶基因进行生物信息学分析,靶基因富集分值最高的十条信号通路见图3A所示,其中富集于PI3K-Akt信号通路的靶基因共有46个(图3A)。富集于PI3K-Akt信号通路的46个靶基因及其对应的miRNAs详见表2,其中hsa-miR-19a-3p调控PI3K/Akt信号通路相关的靶基因包括*PTEN*、*ITGB8*、*PIK3CB*、*PPP2R5E*、*SGK1*、*THBS1*、*TSC1*、*CCND2*(表2)。PI3K/Akt/mTOR信号通路是调控自噬的重要通路。我们

进一步应用GO(Gene Ontology)数据库对差异表达的miRNAs的靶基因进行生物信息学分析,靶基因富集分值高的包括自噬等十条通路(图3B)。KEGG与GO分析均提示靶基因与自噬密切相关,因此我们进一步研究了小胶质细胞外泌体通过miRNAs对SH-SY5Y细胞自噬的影响。

2.4 SNCA-HM Exo 激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,抑制 SH-SY5Y 细胞自噬

为研究被过表达 α -synuclein的SH-SY5Y细胞外泌体激活的HM分泌的外泌体(SNCA-HM Exo)是否能通过miR-19a-3p调控PTEN,进而激活PI3K/Akt/mTOR信号通路,最终抑制神经细胞自噬,我们将miR-19a mimic以及miR-19a inhibitor分别转染SH-SY5Y细胞,观察它们对PTEN以及PI3K/Akt/mTOR信号通路蛋白表达的影响。Western blot检测结果显示,Con-HM Exo+miR-19a mimic组与SNCA-HM Exo组PTEN($F = 47.429$, $P < 0.001$)、LC3 II/I($F = 64.295$, $P < 0.001$)表达量与Con-HM Exo对照组相比均出现下调,差异有统计学意义($P < 0.01$;图4),而SNCA-HM Exo同时加用miR-19a inhibitor后PTEN($F = 47.429$, $P < 0.001$)、LC3 II/I($F = 64.295$, $P < 0.001$)表达量与单纯SNCA-



After further detection by PCR, we confirmed that 7 miRNAs were up-regulated and 8 miRNAs were down-regulated among the 20 differentially expressed miRNAs. miR-19b-3p ($t = 12.759$, $P < 0.001$); miR-19a-3p ($t = 10.805$, $P < 0.001$); miR-29b-3p ($t = 9.335$, $P = 0.001$); miR-27a-3p ($t = 9.703$, $P = 0.001$); miR-UL22A-5p ($t = 4.885$, $P = 0.008$); miR-4284 ($t = 8.179$, $P = 0.001$); miR-5000-3p ($t = 5.108$, $P = 0.007$); miR-4714-3p ($t = 16.077$, $P < 0.001$); miR-671-5p ($t = 27.884$, $P < 0.001$); miR-3154 ($t = 17.344$, $P < 0.001$); miR-3140-3p ($t = 14.500$, $P < 0.001$); miR-4270 ($t = 23.383$, $P < 0.001$); miR-5703 ($t = 23.754$, $P < 0.001$); miR-3664-3p ($t = 15.372$, $P < 0.001$); miR-4708-5p ($t = 20.29$, $P < 0.001$). Compared with the Con-HM Exo, 1) $P < 0.01$, $n = 3$.

图2 PCR验证小胶质细胞外泌体中差异表达的miRNAs

Fig.2 Identification of differentially expressed miRNAs in microglia exosomes by PCR

表1 两组小胶质细胞外泌体中差异表达的miRNAs
Table 1 Differentially expressed miRNAs between GFP-con HM Exo and GFP-SNCA HM Exo

Names	Fold change	Foreground-Background	
		A	B
hsa-miR-5000-3p	8.517829702	65.5	555.5
hcmv-miR-UL22A-5p	8.304144048	89.5	740
hsa-miR-4301	5.565520539	314	1 740
hsa-miR-29b-3p	4.856814373	274	1 325
hsa-miR-19b-3p	4.403458243	160	701.5
hsa-miR-4284	4.363122088	505.5	2 196
hsa-miR-19a-3p	4.321759488	313.5	1 349
hsa-miR-668-3p	3.932885508	101	395.5
hsa-miR-27a-3p	3.876340862	327.5	1 264
hsa-miR-4638-5p	3.863482282	460	1 769.5
hsa-miR-3140-3p	0.040570794	557	22.5
hsa-miR-4714-3p	0.071935585	914.5	65.5
hsa-miR-4708-5p	0.082719497	728.5	60
hsa-miR-4270	0.089496763	252.5	22.5
hsa-miR-5703	0.101479902	336.5	34
hsa-miR-3908	0.128281791	321	41
hsa-miR-4278	0.146087645	247.5	36
hsa-miR-671-5p	0.175256151	447	78
hsa-miR-3664-3p	0.186234838	1221.5	226.5
hsa-miR-3154	0.186304859	593	110

Twenty miRNAs with the most significant differential expression were selected, of which 10 were up-regulated and 10 were down-regulated. Fold change: the ratio of normalized intensities between two conditions (using normalized data, ratio scale). Foreground-Background: the signal of the probe after background correction. A: Con-HM Exo; B: SNCA-HM Exo. $n=1$.

HM Exo组相比较,蛋白表达明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$;图4);Con-HM Exo+miR-19a mimic组与SNCA-HM Exo组 p-Akt/Akt ($F = 57.852$, $P<0.001$)、p-mTOR/mTOR ($F = 40.435$, $P<0.001$)、P62 ($F = 42.105$, $P<0.001$)表达量与Con-HM Exo对照组相比,均出现表达上调,差异有统计学意义($P<0.01$;图4),而SNCA-HM Exo同时加用 miR-19a inhibitor后 p-Akt/Akt ($F = 57.852$,

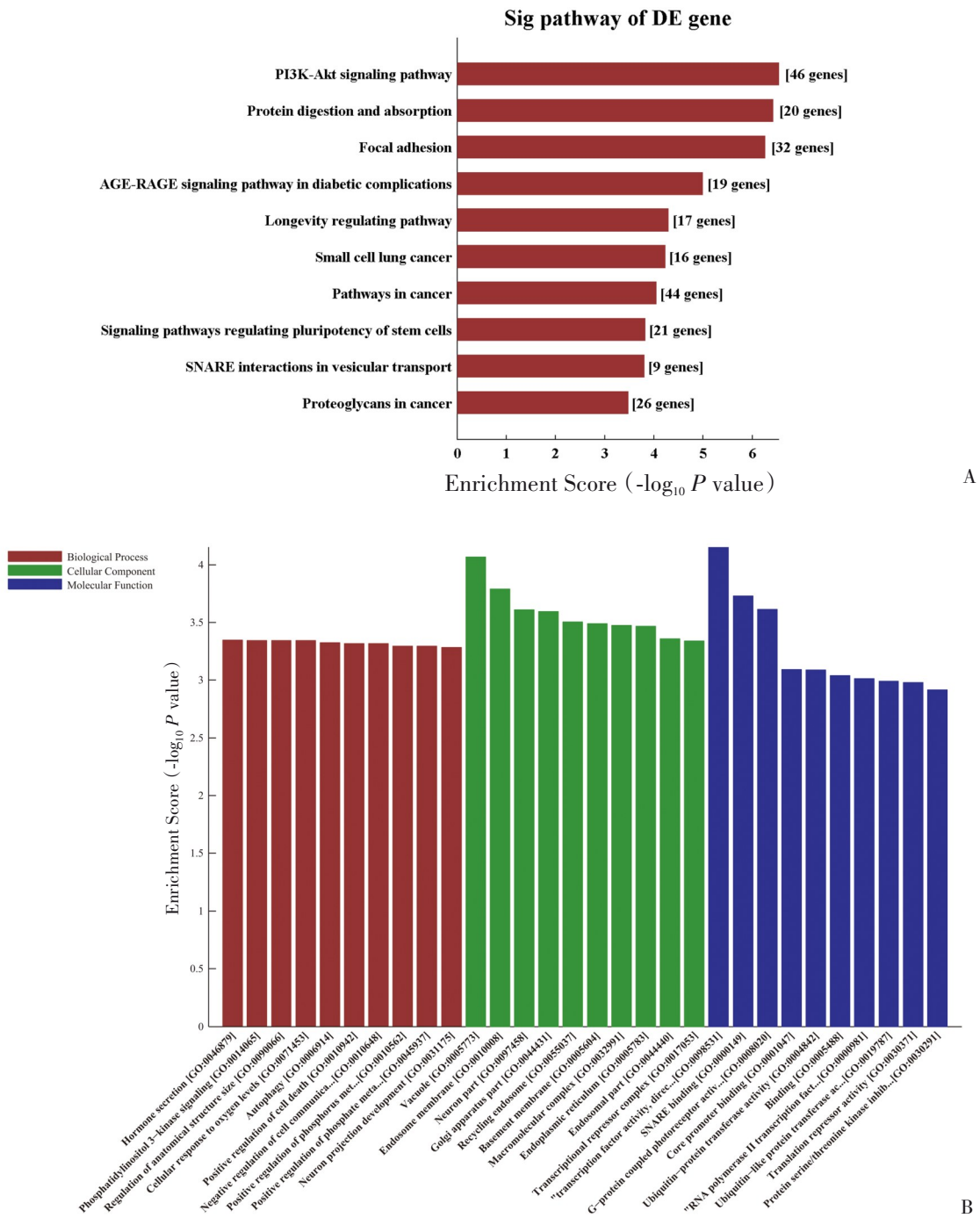
$P<0.001$)、p-mTOR/mTOR ($F = 40.435$, $P<0.001$)、P62 ($F = 42.105$, $P<0.001$)蛋白表达与单纯SNCA-HM Exo相比较,均出现明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$;图4)。

3 讨论

帕金森病是一种神经退行性疾病,它的主要病理特点为Lewy小体在多巴胺能神经元中的形成和沉积以及这些多巴胺能神经元的变性和死亡。Lewy小体的主要由 α -synuclein蛋白组成。 α -synuclein蛋白还可以激活小胶质细胞,引发小胶质细胞的炎症反应^[2]。异常活化的小胶质细胞可导致神经元自噬功能障碍,这是其导致神经元损伤的机制之一。自噬障碍都可导致异常细胞器的降解出现障碍,进而引发细胞变性死亡。研究发现,在帕金森疾病过程中增强自噬可以起到保护多巴胺能神经元的作用,这与自噬促进异常蛋白质和细胞因子的降解有关^[3]。研究还发现^[4],自噬障碍可通过激活PI3K/Akt/mTOR信号通路,激活炎症反应,加重帕金森病的进展和恶化。目前很多研究均表明,自噬障碍是帕金森病病理生理机制中的重要环节^[5-6],调控自噬有可能成为治疗帕金森病的新的的重要手段之一^[7]。

外泌体是一种细胞分泌的微小囊泡,其可通过在细胞间转移蛋白质、mRNA和miRNAs等物质发挥生物学功能。很多细胞,包括神经和小胶质细胞等均可分泌外泌体,外泌体可携带 α -synuclein蛋白在神经细胞与小胶质细胞之间传递^[8-9]。我们既往研究发现^[1],过表达 α -synuclein的SH-SY5Y细胞外泌体通过miRNA-19a-3p调控PTEN通路,进而抑制受体小胶质细胞自噬,从而上调 α -synuclein对MAPK通路的激活效应,促进小胶质细胞的异常激活。本文重点研究了小胶质细胞被过表达 α -synuclein的SH-SY5Y细胞外泌体异常活化后对神经细胞自噬的影响及其机制,同时研究了小胶质细胞外泌体在其中的介导作用。

MicroRNAs(miRNAs)是一类小分子的RNA,通过与靶基因的3'端非编码区的碱基互补配对结合,抑制靶基因的翻译表达,发挥生物学功能。miRNAs调控靶基因表达广泛参与了帕金森病等神经退行性疾病的发病过程^[10-11],然而其调控机制并未明确。本文对被过表达 α -synuclein的SH-SY5Y



A: KEGG analysis of the differentially expressed miRNAs showing the 10 signal pathways with higher enrichment score of target genes. There are 46 target genes enriching in the PI3K Akt signaling pathway. B: GO analysis of the differentially expressed miRNAs showing the 10 signal pathways with higher enrichment score of target genes.

图3 小胶质细胞外泌体中差异表达的miRNAs的靶基因KEGG分析

Fig.3 KEGG and GO analysis of differentially expressed miRNAs in microglia exosomes.

细胞外泌体异常激活的小胶质细胞分泌的外泌体中的miRNAs进行芯片分析,研究了小胶质细胞外泌体中的miRNAs对神经细胞自噬功能的影响。

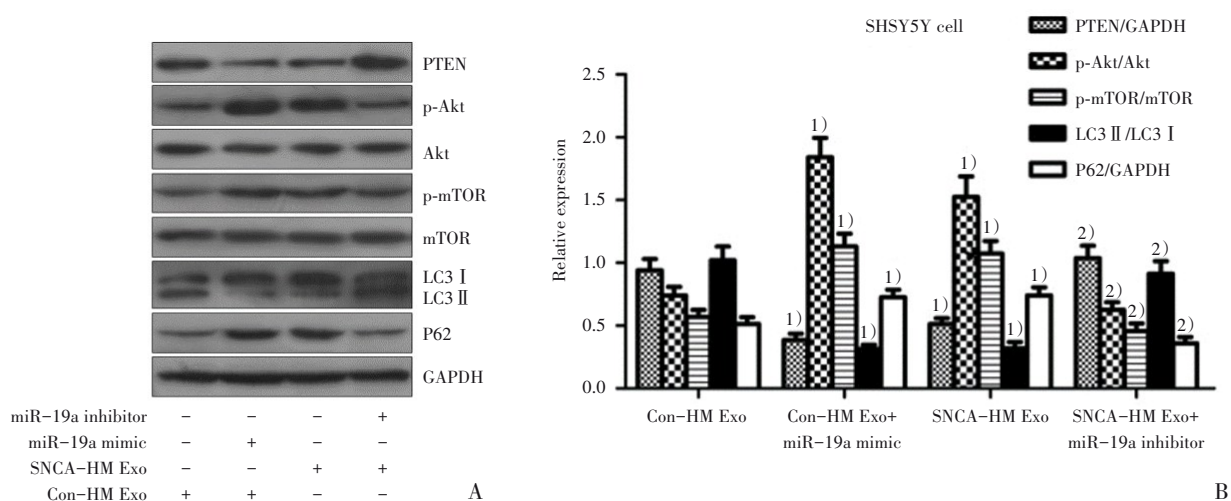
我们通过miRNA基因芯片技术检测发现,被

过表达α-synuclein的SH-SY5Y细胞外泌体刺激的小胶质细胞分泌的外泌体(SNCA-HM Exo)与对照组外泌体之间存在表达差异的miRNAs,包括hsa-miR-19a-3p等。通过TargetsCanHuman 7.1及

表2 小胶质细胞外泌体中差异表达的miRNAs及其相应的富集于PI3K-Akt信号通路的靶基因
Table2 Differentially expressed miRNAs in microglia exosomes and their corresponding target genes enriching in PI3K Akt signaling pathway

miRNAs	Target genes enriching in PI3K Akt signaling pathway
hsa-miR-19a-3p	<i>PTEN, ITGB8, PIK3CB, PPP2R5E, SGK1, THBS1, TSC1, CCND2</i>
hsa-miR-19b-3p	<i>PTEN, ITGB8, PIK3CB, PPP2R5E, SGK1, THBS1, TSC1, CCND2</i>
hsa-miR-29b-3p	<i>ITGB1, EIF4E2, MCL1, AKT3, PIK3R1, COL2A1, COL4A1, COL4A2, COL4A4, COL4A5, COL6A3, COL9A1, PTEN, SGK1, VEGFA</i>
hsa-miR-27a-3p	<i>LPAR6, CREB1, RELN, VEGFC, YWHAB, YWHAQ</i>
hsa-miR-3154	<i>LAMC1, CSF1</i>
hsa-miR-4708-5p	<i>MAPK1, BCL2</i>
hsa-miR-4270	<i>MAPK3, BCL2L1, VEGFB</i>
hsa-miR-5703	<i>CDKN1A</i>
hsa-miR-4714-3p	<i>F2R, EIF4EBP1</i>
hsa-miR-4284	<i>GNG13, TP53</i>
hsa-miR-5000-3p	<i>LPAR5</i>
hsa-miR-3664-3p	<i>PPP2R5E, CHAD</i>
hsa-miR-671-5p	<i>FGFR2, CREB3L2, KIT, NFKB1, SGK2, THBS1</i>

After bioinformatics analysis, we found that the target genes of miR-19a-3p regulating the PI3K/Akt signaling pathway included the following: *PTEN, ITGB8, PIK3CB, PP2R5E, SGK1, THBS1, TSC1*, and *CCND2*.



Expression of PTEN/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway-related proteins detected by western blot was analyzed. PTEN/GAPDH ($F = 47.429, P < 0.001$); p-Akt/Akt ($F = 57.852, P < 0.001$); p-mTOR/mTOR ($F = 40.435, P < 0.001$); LC3 II/I ($F = 64.295, P < 0.001$); P62/GAPDH ($F = 42.105, P < 0.001$). Compared with Con-HM Exo, 1) $P < 0.01$; Compared with SNCA-HM Exo, 2) $P < 0.01, n=3$, by western blot in SH-SY5Y cell.

图4 Western blot 检测SH-SY5Y细胞PTEN及PI3K/Akt/mTOR自噬信号通路蛋白表达
Fig.4 Expression of PTEN/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway-related proteins detected

miRDBV5 两个数据库同时对差异表达最显著的miRNAs的靶基因进行预测,并对靶基因进行KEGG以及GO分析,发现PI3K-Akt信号通路是靶基因富集分值最高的信号通路,富集于PI3K-Akt

信号通路的靶基因共有46个。PI3K/Akt/mTOR信号通路是自噬调控的重要通路之一^[12]。mTOR受到PI3K/Akt信号通路的调控^[13]。PI3K被激活后可通过PIP3磷酸化AKT,使其活化,进而磷酸化TSC-

2,抑制 TSC-1 和 TSC-2 复合物的形成,减少其对 Rheb 的抑制作用,最终磷酸化并激活 mTOR,产生自噬抑制。雷帕霉素(Rapamycin)可通过抑制 mTORC1 诱导自噬。我们进一步对差异表达的 miRNAs 的靶基因进行 GO 分析发现,靶基因富集分值高的包括自噬等十条通路。KEGG 与 GO 分析均提示靶基因与自噬密切相关,因此我们进一步研究了 SNCA-HM Exo 通过 miRNAs 对 SH-SY5Y 自噬的影响。

外泌体 miRNAs 芯片分析发现,miR-19a-3p 等 15 个 miRNAs 在 SNCA-HM Exo 中高表达。研究发现 miR-19a-3p 可负向调控自噬^[13]。miR-19a-3p 可靶向 NBR2,调控 AMPK/PPAR α 信号通路,进而抑制肝细胞的自噬^[14],同时可通过自噬抑制缓解缺血缺氧引发的心肌细胞损伤,或者通过靶向 TGF- β RII,进而抑制心肌细胞的自噬功能,由此减轻 TGF- β 1 诱导的心肌细胞纤维化^[15]。研究还发现,miR-19a-3p 可通过靶向 PTEN,调控 PTEN/PI3K/Akt 信号通路,进而调控细胞凋亡、自噬等病理生理过程^[16]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路受到上游因子 PTEN 的调控^[17],PTEN 是 PIP3 磷酸酶,通过去磷酸化 PIP3,抑制 Akt 的磷酸化,促进自噬。研究发现,目前有很多细胞因子可通过 PTEN 调控自噬,进而影响细胞的生物学功能^[18]。PTEN 是很多 miRNAs 的靶基因,也是众多 miRNAs 在基因层面上发挥生物学效应的重要调控靶点之一^[19-20]。我们通过 Targetscan 数据库对 miR-19a-3p 的靶基因进行预测发现,miR-19a-3p 与靶基因 *PTEN* 3'-UTR 区域共有 3 个结合位点,而且此 3 个位点在不同种属中高度保守。故我们重点研究了 SNCA-

HM Exo 能否通过 miR-19a-3p 调控受体神经细胞 PTEN/PI3K/Akt/mTOR 自噬信号通路,进而抑制神经细胞自噬。

我们通过 Western blot 检测各组 SH-SY5Y 细胞的 PTEN 及 PI3K/Akt/mTOR 自噬信号通路相关蛋白表达,结果显示,Con-HM Exo+miR-19a mimic 组与 SNCA-HM Exo 组 PTEN、LC3 II/I 表达量与 Con-HM Exo 对照组相比均出现下调,而 SNCA-HM Exo 同时加用 miR-19a inhibitor 后 PTEN、LC3 II/I 表达量与单纯 SNCA-HM Exo 组相比较,蛋白表达明显增加;Con-HM Exo+miR-19a mimic 组与 SNCA-HM Exo 组 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、P62 表达量与 Con-HM Exo 对照组相比,均出现表达上调,而 SNCA-HM Exo 同时加用 miR-19a inhibitor 后 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、P62 蛋白表达与单纯 SNCA-HM Exo 相比较,均出现明显降低,这说明 miR-19a-3p 模拟物和 SNCA-HM Exo 均可下调受体神经细胞 PTEN 的表达,由此激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,最终抑制神经细胞自噬。miR-19a-3p 抑制剂可阻断 SNCA-HM Exo 对 PTEN、PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白表达以及自噬的影响,说明 SNCA-HM Exo 可通过 miR-19a-3p 靶向调控 PTEN,进而调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白表达,最终抑制小胶质细胞的自噬功能。

综上所述,被过表达 α -synuclein 的 SH-SY5Y 细胞外泌体激活的小胶质细胞重新分泌的外泌体可通过 miR-19a-3p 靶向抑制 PTEN,从而激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,最终抑制神经细胞自噬。

参考文献

- [1] Zhou T, Lin D, Chen Y, et al. α -synuclein accumulation in SH-SY5Y cell impairs autophagy in microglia by exosomes overloading miR-19a-3p [J]. *Epigenomics*, 2019, 11(15): 1661-1677.
- [2] Zhang J, Dongwei Zhou, Zhang Z, et al. miR-let-7a suppresses α -Synuclein-induced microglia inflammation through targeting STAT3 in Parkinson's disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(4): 740-746.
- [3] Karabiyik C, Lee MJ, Rubinsztein DC. Autophagy impairment in Parkinson's disease [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 711-720.
- [4] Giacoppo S, Bramanti P, Mazzon E. Triggering of inflammasome by impaired autophagy in response to acute experimental Parkinson's disease: involvement of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Neuroreport*,

- 2017, 28(15): 996–1007.
- [5] Mishra AK, Mishra S, Rajput C, et al. Cypermethrin activates autophagosome formation albeit inhibits autophagy owing to poor lysosome quality: relevance to Parkinson's disease [J]. *Neurotox Res*, 2018, 33(2): 377–387.
- [6] Wang ZY, Liu JY, Yang CB, et al. Neuroprotective natural products for the treatment of Parkinson's disease by targeting the autophagy-lysosome pathway: a systematic review [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(8): 1119–1127.
- [7] Moors TE, Hoozemans JJ, Ingrassia A, et al. Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(1): 11.
- [8] Guo M, Wang J, Zhao Y, et al. Microglial exosomes facilitate α -synuclein transmission in Parkinson's disease [J]. *Brain*, 2020, 143(5): 1476–1497.
- [9] Meng Y, Ding J, Li C, et al. Transfer of pathological α -synuclein from neurons to astrocytes via exosomes causes inflammatory responses after METH exposure [J]. *Toxicol Lett*, 2020, 331: 188–199.
- [10] Arshad AR, Sulaiman SA, Saperi AA, et al. MicroRNAs and target genes as biomarkers for the diagnosis of early onset of Parkinson disease [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 352.
- [11] Leggio L, Vivarelli S, L'Episcopo F, et al. microRNAs in Parkinson's disease: from pathogenesis to novel diagnostic and therapeutic approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2698.
- [12] Li H, He C, Wang X, et al. MicroRNA-183 affects the development of gastric cancer by regulating autophagy via MALAT1-miR-183-SIRT1 axis and PI3K/AKT/mTOR signals [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3163–3171.
- [13] Kayabasi C, Okcanoglu TB, Yelken BO, et al. Comparative effect of imatinib and ponatinib on autophagy and miRNome in chronic myeloid leukemia [J]. *Gene*, 2017, 637: 173–180.
- [14] Liu YM, Ma JH, Zeng QL, et al. MiR-19a Affects Hepatocyte autophagy via regulating lncRNA NBR2 and AMPK/PPAR α in D-GalN/Lipopolysaccharide-stimulated hepatocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 358–365.
- [15] Zou M, Wang F, Gao R, et al. Autophagy inhibition of hsa-miR-19a-3p/19b-3p by targeting TGF- β R II during TGF- β 1-induced fibrogenesis in human cardiac fibroblasts [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24747.
- [16] Dou L, Wang S, Huang X, et al. MiR-19a mediates gluconeogenesis by targeting PTEN in hepatocytes [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 3967–3971.
- [17] Wang Y, Chen B, Wang Z, et al. Marsdeniatisin extraction (MTE) inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human acute T cell leukemia cells through inactivating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway via PTEN enhancement [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 82851–82863.
- [18] Yu W, Ni Y, Saji M, et al. Cowden syndrome-associated germline succinate dehydrogenase complex subunit D (SDHD) variants cause PTEN-mediated down-regulation of autophagy in thyroid cancer cells [J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(7): 1365–1375.
- [19] Li L, Xu J, Wu M, Hu JM. Protective role of microRNA-221 in Parkinson's disease [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2018, 119(1): 22–27.
- [20] Li R, Jin Y, Li Q, et al. MiR-93-5p targeting PTEN regulates the NMDA-induced autophagy of retinal ganglion cells via AKT/mTOR pathway in glaucoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100: 1–7.

(编辑 余菁)