

## 不同泌乳期人乳外泌体 miRNA 表达谱的研究

罗雨佳<sup>1</sup>, 黄子或<sup>1</sup>, 林莹莹<sup>2,3</sup>, 郭慧媛<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083

<sup>2</sup> 中国农业大学营养与健康系 北京 100193

<sup>3</sup> 国家乳业技术创新中心 北京 100193)

**摘要** 采用超高速离心法从人乳中提取出囊泡结构物质,从粒径、形态和外泌体特异性标记蛋白 3 个方面来确定提取的物质为外泌体。采用高通量测序得到不同泌乳期外泌体中 microRNA(miRNA)的表达谱。对表达谱进行分析,在人乳外泌体中共检出 852 种 miRNA,有 283 种 miRNA 在早、中、晚 3 个泌乳期中均有所表达。其中,表达量排名前 10 位的 miRNA 占到总量的 50%以上。在外泌体中高表达的 miRNA(占总外泌体 miRNA 表达量 2%以上的)并没有受到泌乳期的显著影响;而在外泌体中低表达的一些 miRNA(占总外泌体 miRNA 表达量 0.01%以下的)容易受到泌乳期的显著影响。此外,发现在人乳外泌体中有 88 种 miRNA 与炎症相关,其中有 65 种在不同泌乳期均稳定表达。综上,人乳外泌体可能具有调控炎症的功能,本研究为更好地研究不同泌乳期人乳外泌体生理功能提供基础数据。

**关键词** 人乳外泌体; miRNA; 高通量测序; 炎症

**文章编号** 1009-7848(2022)11-0335-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.11.035

母乳是新生儿最好的营养来源<sup>[1]</sup>,对婴儿的胃肠道健康、神经以及免疫系统的发育至关重要。母乳的功能与成分之间有密不可分的联系。它不仅提供基础的营养物质(如碳水化合物、脂肪、蛋白质等),还包含一些非营养性的生物活性因子,比如外泌体、乳铁蛋白等,这些活性物质在人体的生长发育中同样有着重要的作用。

外泌体是一类直径约 30~200 nm,具有脂质双层结构的微小囊泡<sup>[2]</sup>。外泌体能够携带一些信号分子,在细胞间的生物信息交流过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。它存在于大部分体液中,如血液、尿液以及唾液等<sup>[4]</sup>。乳汁是一种丰富的外泌体来源。目前对于乳源外泌体的研究主要集中在疾病诊断物和药物载体靶向治疗方面<sup>[5]</sup>。乳源外泌体的生理功能是近年来的研究热点,乳源外泌体在免疫调节<sup>[6]</sup>、炎症预防<sup>[7-8]</sup>以及肠道发育<sup>[9]</sup>的功能已被证实。然而,这些研究大都针对内源性外泌体,对于外源性外泌体(例如乳源外泌体)的生理功能研究还处于初级探索阶段。

外泌体主要的组成部分是蛋白质(膜连蛋白、

肌动蛋白等)、核酸(microRNA、lncRNA 等)和脂质。有研究表明,乳源外泌体有泌乳期特异性的特点,而乳源外泌体中的 miRNA 被认为是乳源外泌体发挥生理功能的主要贡献者<sup>[10-11]</sup>。每一种 miRNA 都有其特定的生物学功能,而发挥功能需要达到特定的表达量<sup>[12-13]</sup>。据报道,泌乳期会影响乳源外泌体中 miRNA 的种类与表达量<sup>[14]</sup>。了解不同泌乳期乳源外泌体中 miRNAs 的表达情况,对探究不同泌乳期乳源外泌体的功能有重要意义。部分研究表明泌乳期影响乳源外泌体中 miRNAs 的种类及表达量<sup>[15-16]</sup>。然而,这些研究大都集中在其它哺乳动物上(如牛乳、猪乳),目前关于泌乳期对人乳外泌体中 miRNAs 种类及表达量的影响还鲜有报道。此外,乳源外泌体中还有大量与炎症相关的 miRNA<sup>[17-18]</sup>,这些 miRNA 对婴幼儿预防及抵抗炎症疾病有着重要的意义,然而,目前未见有关泌乳期对乳源外泌体中炎症相关 miRNA 有影响的报道。

本研究采用超高速离心法获得囊泡结构物质,从形状、粒径和标记蛋白 3 个方面对外泌体进行鉴定。利用高通量测序分析比较不同泌乳期人乳外泌体中 miRNA 的种类与表达量,在此基础上筛选出表达量高和表达量变化有显著差异的 miRNA,以探究不同泌乳期间人乳外泌体中 miR-

收稿日期: 2021-11-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072219)

第一作者: 罗雨佳,女,博士生

通信作者: 郭慧媛 E-mail: guohuiyuan@cau.edu.cn

NA 的种类及表达水平的变化。将检出的 miRNA 与数据库比对,找到与炎症相关的 miRNA,探究人乳外泌体中与炎症相关的 miRNA 随泌乳期的变化情况,为更好地研究不同泌乳期人乳外泌体生理功能提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

母乳样品来自北京地区的 15 位健康母亲的母乳,采样时间涵盖产后泌乳期早期(3~14 d)、泌乳期中期(15 d~6 个月)与泌乳期晚期(7~9 个月)。当母亲喂养婴儿时,用灭菌的取乳器采集母乳后装入无菌、无酶的离心管内,每份样品的采集量为 30 mL(初乳为 20 mL)。母乳收集后立即放于-20℃保存,回到实验室保存在-80℃,每份样品的贮藏时间都在半年之内。

### 1.2 试剂

氯化钠、十二水合磷酸氢二钠、氯化钾、磷酸二氢钾、无水乙醇、无水甲醇、三氯甲烷、异丙醇、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵,购自北京化工厂; $\beta$ -巯基乙醇、苯甲基磺酰氟(PMSF)、丽春红,购自 Sigma 公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、细胞裂解液 Dnase/RNase-Free 去离子水、一抗稀释液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体,购自上海碧云天公司;BCA 试剂盒,购自美国 Thermo 公司;彩虹蛋白 Marker,购自索莱宝公司;脱脂乳,购自伊利股份有限公司;ECL 显影液,购自 Millipore 公司;CD63 抗体、Hsp-70 抗体、TSG-101 抗体、Calnexin 抗体,美国 CST 公司。

### 1.3 仪器与设备

Infinite M200 Pro 全波长酶标仪,瑞士 TECAN 公司;1 000,200,100,10  $\mu$ L 微量连续可调移液器,德国 Eppendorf 公司;DK-8B 电热恒温水槽,上海精宏实验设备有限公司;Revco Ultima II 低温冰箱,美国 Revco 公司;DK-98-II 2KW 超净工作台,天津泰斯特仪器厂;GL-206 低速离心机,上海安亭科学仪器厂;LDZM-40KCS 高压灭菌锅,上海申安医疗器械厂;Imager 600 凝胶成像仪,美国 Amersham 公司;165-8001 电泳仪、164-5050 电泳槽,美国 Bio-rad 公司;低温高速离心机,美国 Thermo 公司;低温超高速离心机,美国

Beckman 公司;JEM1200EX 电子透射电镜,日本 JEOL 公司;马尔文粒径仪,英国 Malvern Nano-ZS 公司;SCIENTZ-IIID 超声波破碎仪,中国宁波新芝生物科技公司。

### 1.4 方法

1.4.1 人乳外泌体的提取方法 样品解冻后,于 2 000 $\times$ g、4℃下离心 15 min 去除脂肪;接着在 12 000 $\times$ g、4℃下离心 1 h 去除细胞碎片;接着在 100 000 $\times$ g、4℃下超高速离心 1 h,重复 3 次,得到的沉淀物即为外泌体。结束后倒出清液,添加 PBS,于 100 000 $\times$ g、4℃下离心 1 h 洗涤,重复 2 次。最后将 PBS 倒出,离心管中加入无菌 PBS 反复吹吸至外泌体基本溶解于 PBS 缓冲液中,再分别转移至 EP 小管中,冻存于-80℃冰箱。

1.4.2 外泌体形态结构 从人乳外泌体原液中取 10  $\mu$ L 于 200  $\mu$ L 无菌无酶水中稀释混匀,再取 10  $\mu$ L 稀释液滴加到 300 目的镍网上。静置 10 min 后,用滤纸吸干镍网周围的水,干燥 30 min 后滴加超纯水。静置 10 min,用滤纸吸干后自然晾干 30 min。以上步骤重复 3 次。最后将镍网置于透射电子显微镜 80~120 kV 下观察所提取外泌体的形态结构。

1.4.3 粒径测定 将提取的人乳外泌体用超纯水稀释 1 000 倍然后从稀释液中取 1 mL 放入马尔文粒径仪中测定外泌体粒径大小分布。溶剂设定为水(折射率 1.33,分散相为脂肪,折射率 1.48)。根据 Stokes-Einstein 方程式测算出人乳外泌体的流体力学直径及分布。

1.4.4 蛋白质免疫印迹 将外泌体放入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液中裂解。蛋白浓度使用 BCA 试剂盒进行测定。接着在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳,然后转移到 PVDF 膜上。脱脂乳封闭 2 h 后,抗体 4℃孵育过夜。PBST(PBS 中补充吐温 20)洗膜,每次 5 分钟,重复 5 次。使用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体孵育 1 h,PBST 洗膜(方法同上)。最后滴加 ECL 显影液后显影。

1.4.5 文库构建、测序及数据分析 由联川生物科技有限公司对从外泌体提取出的 RNA 进行转录组测序。连接 3'adaptor 和 5'adaptor 后合成第一链 cDNA,再进行 PCR 扩增。选择大小合适的片段后在 Agilent 2200 TapeStation 进行文库质检。通

过质检的文库,上机进行样本制备。测序程序结束后,采用联川公司自主开发的 ACGT101-miR 软件对测序的结果进行分析。分析流程为:1)将 3' 端接头和垃圾序列去除,获取有效序列。2)按照序列的长度,保留碱基长度在 18~26 nt 的序列。3)将筛选后的序列与 mRNA、Rfam 和 Repbase 几个数据库里面的序列进行比对,将能比对的序列去掉。4)余下的序列在 miRBase 数据库中,比对前体与基因组,得到 miRNA 有效数据。5)进行 miRNA 差异性分析。miRNA 的聚类方法为层次聚类法 complete-linkage。使用 TargetScan 和 miRanda 两款软件对测序得出的 miRNA 分别进行靶基因预测,依据软件各自的筛选标准,将 TargetScan 的结果中 context score percentile 小于 50 的靶基因和 miRanda 的结果中 Max Energy>-10 的靶基因去除后,取两个软件结果中的交集。然后在 DAVID 网站上对 miRNA 靶基因的功能进行预测,把靶基因对应的功能及通路的基因数目统计出来,使用超几何检验,将所选 miRNA 对应的靶基因 mRNA 与数据库中功能及通路对应的基因数量相比,以  $P<0.05$  为阈值,查看该 miRNA 是否与炎症 NF- $\kappa$ B 通路相关。将可能作用于 NF- $\kappa$ B 通路的 miRNA 再放入 web of science 数据库中,若是能搜索出该 miRNA 与炎症的相关报道,则认为该 miRNA 与炎症相关。

1.4.6 数据统计分析 结果均表示为平均数 $\pm$ 标准误。统计分析均采用 SPSS 21.0 软件进行。当两

组数据进行显著性比较时,使用  $t$  检验进行分析;当多组数据间进行显著性比较时,使用单因素方差分析(one-way ANOVA)伴随邓肯(Duncan)多重比较,当  $P<0.05$  认为具有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 人乳外泌体的鉴定

如图 1a 所示,在透射电镜下观察到经过超高速离心法得到的人乳外泌体是呈椭圆形、有双层膜结构的囊泡,粒径大小在 100 nm 以内。图 1b 表明,人乳外泌体粒径的峰值为  $(68.18\pm 8.24)$  nm,该结果与在透射电镜下观察到的结果相符。从前人的结果可知,外泌体为 30~150 nm 的囊泡结构<sup>[3-4]</sup>,从粒径大小上,本研究中的提取物符合外泌体的标准。

由于乳中粒径在 100 nm 的成分可能为脂肪球、外泌体或者细胞碎片,因此本文对提取物进行标记蛋白的检测。由图 1c 可知,提取物能检测出外泌体表面标志蛋白 CD63、CD81、Alix 和 TSG-101 的表达,排除了脂肪球的可能性。此外,在提取的外泌体中未检测到 Calnexin 蛋白的表达,该蛋白是一种内质网来源蛋白,在提取的外泌体中检测不到它,说明样品没有或者很少存在其它细胞器(如内质网)产生的囊泡小体的污染。综合以上结果,可以证明采用超高速离心法能够成功提出人乳外泌体。

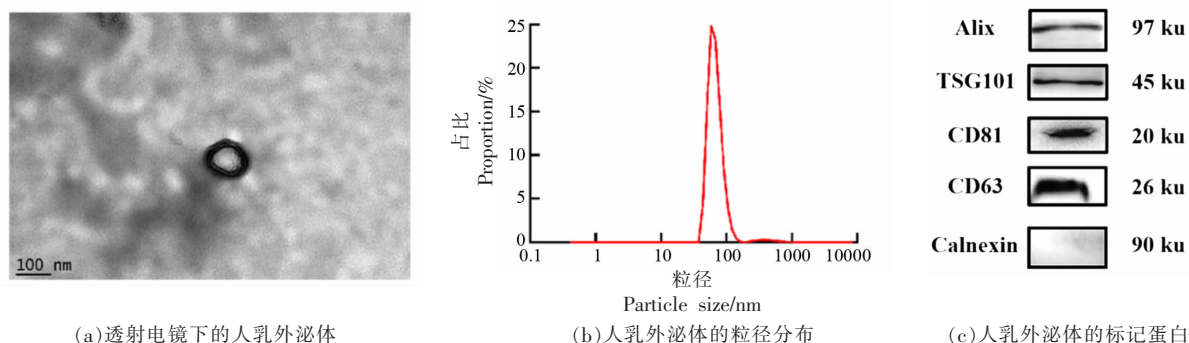


图 1 人乳外泌体的鉴定与表征

Fig.1 Identification and characterization of human milk exosomes

### 2.2 不同泌乳期外泌体 miRNA 的表达情况

2.2.1 不同泌乳期 miRNA 的种类表达情况 由图 2 可知,人乳外泌体中共检测出 852 种 miR-

NA,其中泌乳期早期检测出 390 种 miRNA,泌乳期中期检测出 656 种 miRNA,泌乳期晚期检测出 474 种 miRNA。有 283 种 miRNA 在整个泌乳期中

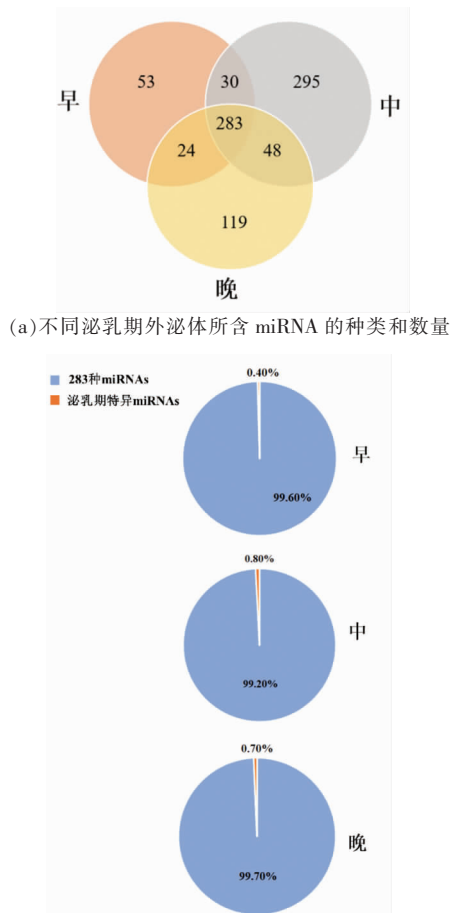


图2 早、中、晚泌乳期外泌体中共有及特异性表达的 miRNA

Fig.2 Mutual and different miRNA in early, middle and late lactation of human milk exosomes

均能检测出，它们的表达量占外泌体中总表达量的99%。此外，任何泌乳期都有自己独特的特异性miRNA。泌乳中期人乳外泌体中所含的特有miRNA最多，其次是泌乳末期人乳外泌体，特异性miRNA种类最少的为泌乳早期外泌体。然而，这些特异性miRNA在人乳外泌体中的表达量并不高，表达量处于每段泌乳期的末位，在外泌体中的总表达量小于1%。一般情况下，miRNA的表达情况与其功能息息相关，关于这些在整个泌乳期间都高表达的miRNA所行使的功能还尚未可知，需要进一步进行研究。泌乳期会影响人乳外泌体中低表达miRNA的种类变化，然而由于表达量过低，这些miRNA能否发挥生理调控作用有待研究。

2.2.2 不同泌乳期表达水平前10位的miRNA表达量的变化 为了探究泌乳期是否会影响人乳外泌体中高表达miRNA的表达，将每个miRNA的表达量以lg10取对数后再经过将数值中心化后以-2到3表示表达量的大小(图3)。乳外泌体中表达量最丰富的miRNA是miR-148a-3p，在任何泌乳期，该miRNA的含量都排在首位，远高于其它miRNA，超过总miRNA表达量的14%。表达量处于前10位的miRNA占整体外泌体中miRNA序列表达量的50%以上。

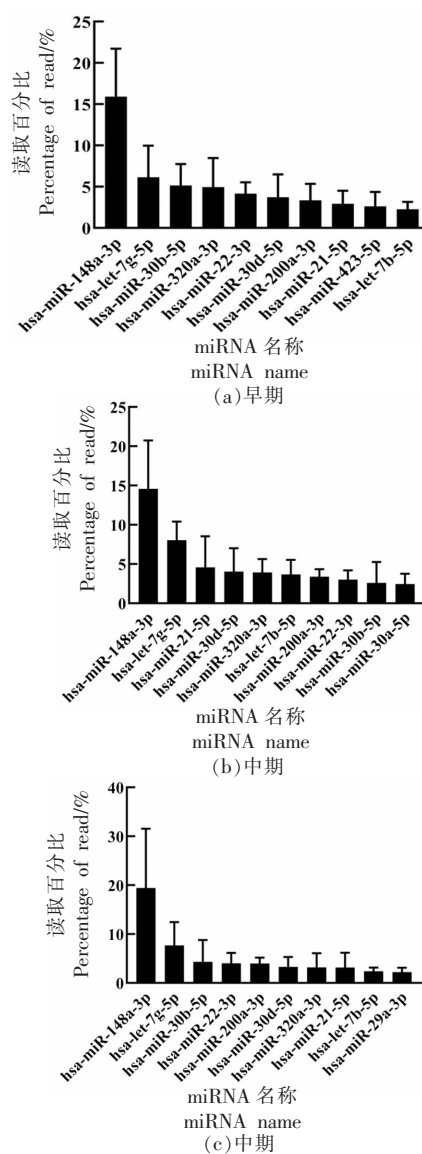


图3 不同泌乳期外泌体中表达水平最丰富的前10名miRNA

Fig.3 Top 10 miRNA in early, middle and late lactation of human milk exosomes

此外,不同的泌乳期中,表达量处于前 10 位 miRNA 的种类虽然会有一些变化,但变化不大。如在早期乳中出现的 miR-423、中期乳中 miR-30b-5p、晚期乳中出现的 miR-29a,虽然在其它时期内没有排在前 10 位之中,但是能在其它时期的第 10~15 位中找到。对不同时期乳外泌体中上述 miRNA 的含量进行分析,结果如图 4 所示。图中每个小方格表示一个基因,其颜色表示基因表达量的大小,颜色越红说明该 miRNA 的表达量越高,颜色越蓝说明该 miRNA 的表达量越低。miR-30b-5p 含量呈现先下降后上升的趋势;miR-320a-3p 的表达量呈现一直下降的趋势;let-7b-5p、miR-21-5p 和 miR-30a-5p 呈现先上升后平缓的趋势,而其它 miRNA,如 miR-148a-3p 和 let-7g-5p 的表达量基本不变。对这些数据进行显著性分析发现它们并无显著性变化。以上结果表明泌乳期对人乳外泌体中高表达 miRNA 的表达量变化无明显影响,它们在整个泌乳期都稳定表达,可能它们对机体的生长发育十分重要。研究表明,这些在整个泌乳期中都表达稳定的 miRNA 在机体器官发育、神经系统发育、能量代谢以及免疫调节中发挥重要的作用<sup>[15,19]</sup>。乳外泌体中含量最高的 miR-148a-3p 能够通过作用于靶基因赖氨酸特异性脱甲基酶 6B 来促进成骨细胞的分化<sup>[20]</sup>。let-7b 能够靶向神经生长因子促进周围神经的生长<sup>[21]</sup>。miR-22-3p 能够靶向 Wnt 通路中的转录因子 7,进而增加肝脏糖异生途径酶的表达,对碳水化合物的代谢有调节作用<sup>[22]</sup>。miR-30b-5p 对氨基半乳

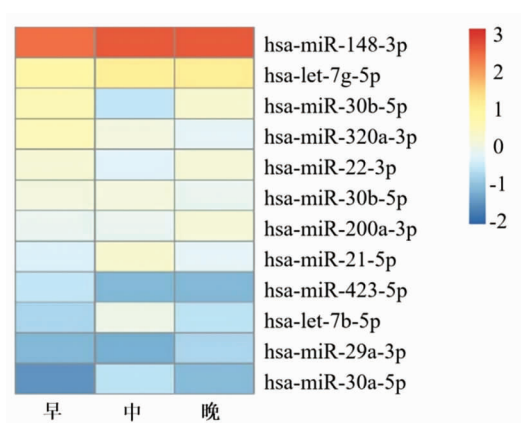


图 4 含量最高 miRNA 在早、中、晚期表达量的变化  
Fig.4 Changes of expression levels of miRNA with the highest content in early, middle and late lactation

糖胺转移酶(GALNT7)靶基因的表达有抑制作用,当其上调时能够增加细胞因子(IL-10)的分泌量,进而激活免疫细胞<sup>[23]</sup>。对于乳源外泌体中含量丰富且稳定表达的 miRNA 的功能,尤其是它们对于新生儿影响还有待进一步探索。

### 2.3 不同泌乳期人乳外泌体中表达量显著变化的 miRNA

不同泌乳期表达量显著变化的 miRNA 往往与该阶段婴幼儿的生理需求密切相关,可能对婴幼儿的生理行为有较大的调控作用,值得关注。通过比较早、中、晚泌乳期人乳外泌体中 miRNA 的表达谱,找到了表达量变化极显著( $P < 0.01$ )的 8 个 miRNA,如图 5 所示,它们分别是:hsa-let-7i-p3、hsa-miR-1271-5p、hsa-miR-103a-5p、hsa-

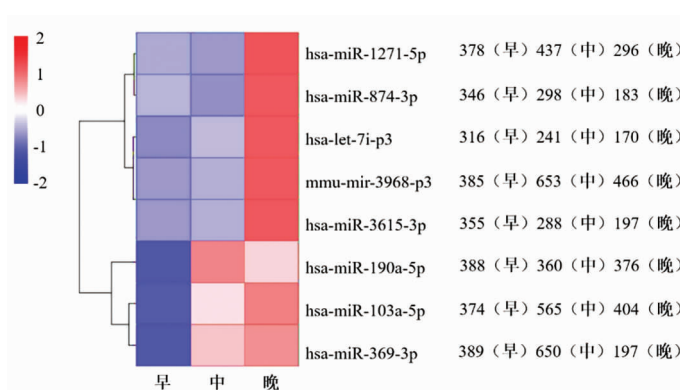


图 5 不同泌乳期之间表达量变化显著的 miRNA 及在各个泌乳期的排名

Fig.5 miRNA with significant expression changes between different lactation periods and their ranking in each lactation period

miR-874-3p、mmu-mir-3968-p3、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-190a-5p、hsa-miR-3615-3p。除 hsa-miR-190a-5p 的表达量在中期最高外,其它 miRNA 均是在早期与中期表达量不变,而在晚期表达量显著升高。将 3 个泌乳期间各个 miRNA 按表达量从大到小进行排序,可以看出这些 miRNA 的排名并不靠前,甚至位于末端,可见它们在乳外泌中的表达量不高。通过查阅文献,我发现这些 miRNA 大多具有抗癌功能。例如,当 miR-1271 过表达时,能够有效地抑制结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[24]</sup>。miR-874-3p 在肝癌细胞过表达时,在体外试验中能够抑制细胞生长和聚集形成,促进细胞凋亡<sup>[25]</sup>。miR-190a 能够抑制间充质-上皮细胞转化,并影响肝癌细胞的迁移和侵袭能力<sup>[26]</sup>。miR-369-3p 可以抑制乳头状甲状腺癌细胞的侵袭、迁移和上皮间质转化<sup>[27]</sup>。然而,这些 miRNA 为何在泌乳期末期表达量迅速增加,它们的功能与婴幼儿的生长发育需求有什么关联,还需要进一步探讨。此外,不少研究者认为当 miRNA 的表达量大于 1 000 拷贝数时<sup>[28]</sup>,它们才有调控机体生理活动的作用,而这 7 个 miRNA 的表达量在乳外泌体

中的表达量并不高,它们能否在饮用者的体内发挥作用还有待进一步研究。

## 2.4 不同泌乳期人乳外泌体中表达量显著变化的 miRNA

乳外泌体中含有丰富的与炎症相关的 miRNA,本研究测序结果显示与炎症相关的 miRNA 分布在不同泌乳时期,其中在早、中、晚期外泌体中均有表达的 miRNA 共有 65 个,占外泌体中 miRNA 总表达量的 54%,即乳外泌体含有大量且丰富的与炎症相关的 miRNA。如图 6 所示,与炎症相关且表达量高(排名处于前 10 位)的 miRNA 如 hsa-miR-148a-3p、hsa-miR-30b-5p、hsa-miR-22-3p 等,在不同泌乳期间的表达量没有显著改变。例如 has-miR-148a-3p,它在 3 个泌乳期均是人乳外泌体中表达量最高的 miRNA,在早、中、晚期的表达量分别为 15.8%、14.8%和 18.2%,并没有显著变化( $P>0.05$ )。以上结果表明,泌乳期对乳外泌中与炎症相关的 miRNA 的影响较小,这些 miRNA 在不同的泌乳期均能稳定表达,由此推测它们对机体炎症调节十分重要,哺乳动物能够通过饮用乳汁来调节体内炎症。

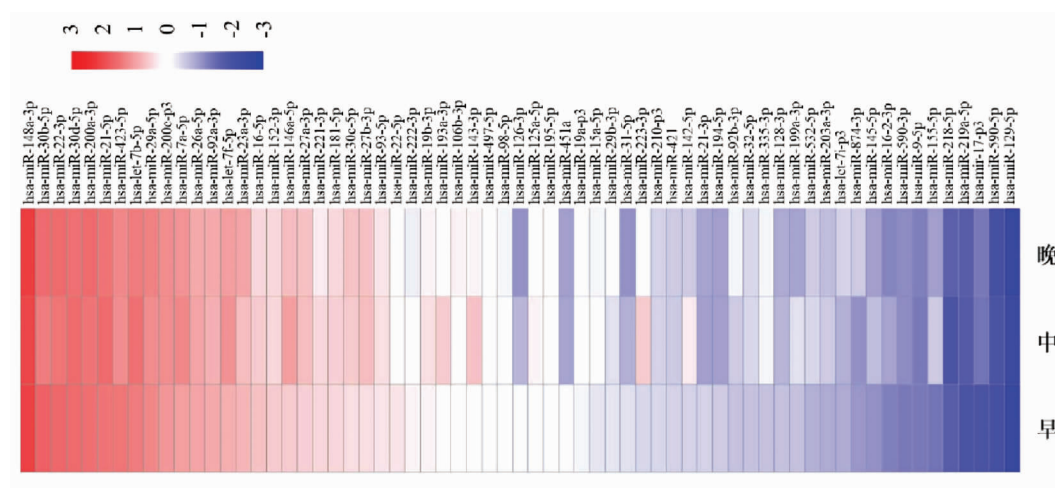


图 6 不同泌乳期外泌体中与炎症相关的 miRNA

Fig.6 Inflammation-related miRNA in the exosomes of different lactation stages

## 3 结论

通过形状、粒径和标记蛋白确定超高速离心法能有效分离提取人乳外泌体。通过高通量测序得到人乳外泌体中 miRNAs 在不同泌乳期(早、中、晚期)的表达谱。通过比较 3 个时期人乳外泌

体 miRNAs 表达谱发现,高表达 miRNAs 占总体表达量的 50%以上。这些高表达的 miRNAs 在泌乳期早期、中期和晚期中均能稳定表达,表达量无显著差异。相反,泌乳期对低表达的 miRNAs 影响显著,这些 miRNAs 的种类与表达量在不同泌乳

期中会有改变,他们的功能以及表达量变化原因值得进一步探究。此外,生物学分析表明人乳外泌体中含有丰富的与炎症相关的 miRNA,这些 miRNAs 的表达量不随泌乳期的变化而变化。人乳外泌体可能具有调控炎症的功能,这为更好地研究不同泌乳期人乳外泌体生理功能提供参考。

### 参 考 文 献

- [1] EIDELMAN A I, SCHANLER R J, JOHNSTON M, et al. Breastfeeding and the use of human milk[J]. *Pediatrics*, 2012, 129(3): E827-E841.
- [2] PEREIRA P C. Milk nutritional composition and its role in human health[J]. *Nutrition*, 2014, 30(6): 619-627.
- [3] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [4] JEPPESEN D K, FENIX A M, FRANKLIN J L, et al. Reassessment of exosome composition[J]. *Cell*, 2019, 177(2): 428-445.
- [5] 全令君,郝海宁,张兰威,等.乳源外泌体的组成及其生物功能研究进展[J].*食品科学*, 2020, 41(13): 310-317.  
TONG L J, HAO H J, ZHANG L W, et al. Advances in our understanding of the composition and biofunctional characteristics of milk-derived exosomes[J]. *Food Science*, 2020, 41(13): 310-317.
- [6] ADMYRE C, JOHANSSON S M, QAZI K R, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 179(3): 1969-1978.
- [7] ARNTZ O J, PIETERS B C H, OLIVEIRA M C, et al. Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015, 59(9): 1701-1712.
- [8] STREMMEL W, WEISKIRCHEN R, MELNIK B C. Milk exosomes prevent intestinal inflammation in a genetic mouse model of ulcerative colitis: A pilot experiment[J]. *Inflammatory Intestinal Diseases*, 2020, 5(3): 1-7.
- [9] HOCK A, MIYAKE H, LI B, et al. Breast milk-derived exosomes promote intestinal epithelial cell growth[J]. *Journal of Pediatric Surgery*, 2017, 52(5): 755-759.
- [10] KAHN S, LIAO Y, DU X, et al. Exosomal microRNAs in milk from mothers delivering preterm infants survive *in vitro* digestion and are taken up by human intestinal cells[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018, 62(11): e1701050.
- [11] WOLF T, BAIER S R, ZEMPLENI J. The intestinal transport of bovine milk exosomes is mediated by endocytosis in human colon carcinoma Caco-2 cells and rat small intestinal IEC-6 cells[J]. *Journal of Nutrition*, 2015, 145(10): 2201-2206.
- [12] DIEDERICH S, WINTER J, JUNG S, et al. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation[J]. *Nature Cell Biology*, 2009, 11(3): 228-234.
- [13] LIM L P, GLASNER M E, YEKTA S, et al. Vertebrate microRNA genes[J]. *Science*, 2003, 299(5612): 1540.
- [14] GUI Y R, LI M Z, WANG T, et al. Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43691.
- [15] WANG X, YAN X, ZHANG L, et al. Identification and peptidomic profiling of exosomes in preterm human milk: Insights into necrotizing enterocolitis prevention[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 63(13): e1801247.
- [16] ZHOU Q, LI M Z, WANG X Y, et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2012, 8(1): 118-123.
- [17] WU D, KITTANA H, SHU J, et al. Dietary depletion of milk exosomes and their microRNA cargos elicits a depletion of miR-200a-3p and elevated intestinal inflammation and chemokine (C-X-C Motif) ligand 9 expression in Mdr1a  $-/-$  Mice[J]. *Current Developments in Nutrition*, 2019, 3(12): 122-124.
- [18] WANG A P, DENG S, CHEN X, et al. MiR-29a-5p/STAT3 positive feedback loop regulates TETs in colitis-associated colorectal cancer[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2019, 26(4): 524-533.
- [19] KOSAKA N, IZUMI H, SEKINE K, et al. MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk[J]. *Silence*, 2010, 1(1): 7-14.
- [20] JIANG K F, YANG J, YANG C, et al. et al. MiR-148a suppresses inflammation in lipopolysaccharide-induced endometritis[J]. *Journal of Cellular*

- and Molecular Medicine, 2020, 24(1): 405–417.
- [21] LI S Y, WANG X H, GU Y, et al. Let-7 microRNAs regenerate peripheral nerve regeneration by targeting nerve growth factor[J]. Molecular Therapy, 2015, 23(3): 790.
- [22] KAUR K, VIG S, SRIVASTAVA R, et al. Elevated hepatic miR-22-3p expression impairs gluconeogenesis by silencing the Wnt-responsive transcription factor Tcf7[J]. Diabetes, 2015, 64(11): 3659–3669.
- [23] ALTMAE S, MARTINEZ-CONEJERO J A, ESTEBAN F J, et al. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity [J]. Reproductive Sciences, 2013, 20(3): 308–317.
- [24] LIU P, SHU Y, DING Y, et al. MiR-1271 regulates cisplatin resistance of human gastric cancer cell lines by targeting IGF1R, IRS1, mTOR, and BCL2[J]. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2014, 14(6): 884–891.
- [25] LEONG K W, CHENG C W, WONG C M, et al. MiR-874-3p is down-regulated in hepatocellular carcinoma and negatively regulates PIN1 expression [J]. Oncotarget, 2017, 8(7): 11343–11355.
- [26] WANG X Y, REN Y L, YANG X Y, et al. MiR-190a inhibits epithelial-mesenchymal transition of hepatoma cells via targeting the long non-coding RNA treRNA [J]. FEBS Letters, 2015, 589(24): 4079–4087.
- [27] 赵振伶, 邵焕军, 郝丽娜, 等. miR-369-3p 通过调控 *VEGFC* 基因表达对膀胱癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国医师杂, 2018, 20(1): 92–95, 99. ZHAO Z L, SHAO H J, HE L N, et al. Effects of miR-369-3p on the proliferation and apoptosis of bladder cancer cells by regulating the expression of *VEGFC* gene[J]. Journal of Chinese Physician, 2018, 20(1): 92–95, 99.
- [28] MURANO M, MAEMURA K, HIRATA I, et al. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis [J]. Clinical and Experimental Immunology, 2000, 120(1): 51–58.

### Exploration of Exosomal miRNA Expression Profiles in Human Milk during the Different Lactation Period

Luo Yujia<sup>1</sup>, Huang Ziyu<sup>1</sup>, Lin Yingying<sup>2,3</sup>, Guo Huiyuan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083

<sup>2</sup>Department of Nutrition and Health, China Agricultural University, Beijing 100193

<sup>3</sup>National Center of Technology Innovation for Dairy, Beijing 100193)

**Abstract** Human milk exosomes were obtained by the ultracentrifugation method and they were identified with particle size, morphology and biomarker proteins. The expression of microRNA (miRNA) in human milk exosomes of different lactation periods were obtained by high throughput sequencing technology. This study found that total 852 miRNA were detected in human milk exosomes and there were 283 miRNA expressed stably during the three periods after analyzing the profile of miRNAs. Among them, the top ten miRNA accounted for more than 50% of the total. The expression of high-expressed miRNA (accounted for more than 2% of the total) had no significantly changed during three lactation periods, while the expression of low-expressed miRNA (accounted for less than 0.01% of the total) were significantly changed in different lactation. In addition, there were 88 inflammation-related miRNA in human milk exosome, in which 65 miRNA were stable during different lactation periods. This study suggested that maybe human milk exosomes could regulate inflammation and provided a basis for better understanding the physiological functions of human milk exosomes in different lactation period.

**Keywords** human milk exosomes; microRNA; high throughput sequencing; inflammation