

微小 RNA-21-5p 拮抗 II 型肺泡上皮细胞凋亡的分子机制

覃松 陈淼 戢慧 刘国跃 陈涛 李康 梅鸿

【摘要】目的 通过腺病毒过表达微小 RNA-21-5p (miR-21-5p) 后转染 II 型肺泡上皮细胞 (AEC II), 观察其对过氧化氢 (H₂O₂) 诱导的 AEC II 细胞凋亡的影响, 并探索其抗凋亡的分子机制。**方法** 将传代培养的大鼠 AEC II 随机均分为 4 组: 正常对照组 (生理盐水)、H₂O₂ 损伤组 (0.5 mmol/L H₂O₂)、miR-21-5p 过表达组 (miR-21-5p 腺病毒 + 0.5 mmol/L H₂O₂)、miR-21-5p 阴性转染组 (空腺病毒 + 0.5 mmol/L H₂O₂)。采用透射电镜及流式细胞仪分别检测细胞凋亡形态及早期凋亡率; 取转染效率最高的时间点 (6、12、24、48 h), 采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 AEC II 内 miR-21-5p 表达水平, 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测细胞内 Bcl-2、Bax、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 的蛋白表达。**结果** ① AEC II 鉴定: 荧光显微镜下可见 AEC II 的特征性结构 (微绒毛及嗜碱性板层小体)。② 细胞凋亡形态: 透射电镜下可见 AEC II 胞质回缩, 染色质凝聚、边聚, 细胞表面微绒毛稀少, 嗜碱性板层小体排空。③ AEC II 内 miR-21-5p 表达: 48 h miR-21-5p 腺病毒转染效率最高。miR-21-5p 过表达组 AEC II 细胞中 miR-21-5p 表达量明显高于 H₂O₂ 损伤组和 miR-21-5p 阴性转染组 (A 值: 1.54 ± 0.02 比 1.02 ± 0.02、0.56 ± 0.03、0.58 ± 0.02, 均 P < 0.05)。④ 细胞凋亡率: 与正常对照组比较, H₂O₂ 损伤组、miR-21-5p 阴性转染组和 miR-21-5p 过表达组细胞凋亡率均随损伤时间的延长逐渐升高。除损伤 6 h 外, miR-21-5p 过表达组细胞凋亡率明显低于 H₂O₂ 损伤组和 miR-21-5p 阴性转染组 [12 h: (10.73 ± 2.80)% 比 (16.26 ± 0.59)%、(16.04 ± 0.70)%, 24 h: (16.00 ± 3.44)% 比 (23.29 ± 2.78)%、(23.58 ± 2.31)%, 48 h: (31.30 ± 3.55)% 比 (50.53 ± 2.17)%、(49.41 ± 1.97)%, 均 P < 0.05]; miR-21-5p 阴性转染组与 H₂O₂ 损伤组各时间点比较差异均无统计学意义。⑤ 蛋白表达: miR-21-5p 过表达组 AEC II 细胞 Bax、caspase-3 蛋白表达明显低于 H₂O₂ 损伤组和 miR-21-5p 阴性转染组 [Bax (A 值): 0.07 ± 0.01 比 0.18 ± 0.01、0.13 ± 0.01, caspase-3 (A 值): 0.07 ± 0.01 比 0.23 ± 0.01、0.12 ± 0.01, 均 P < 0.05], Bcl-2 蛋白表达水平明显高于 H₂O₂ 损伤组和 miR-21-5p 阴性转染组 (A 值: 0.26 ± 0.01 比 0.06 ± 0.01、0.10 ± 0.01, 均 P < 0.05)。**结论** ① miR-21-5p 具有抗 AEC II 凋亡的作用。② 腺病毒载体是转染 AEC II 的一种比较成功的基因转导载体。③ miR-21-5p 抗 AEC II 凋亡可能与下调 Bax、caspase-3 蛋白表达水平及上调 Bcl-2 蛋白表达水平有关。

【关键词】 肺泡上皮细胞, II 型; 凋亡; 微小 RNA; miR-21-5p; 分子机制

The molecular mechanism of antiapoptosis of type II alveolar epithelial cell by microRNA-21-5p Qin Song, Chen Miao, Ji Hui, Liu Guoyue, Chen Tao, Li Kang, Mei Hong. Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China
Corresponding author: Chen Miao, Email: Chenmiao64@163.com

【Abstract】Objective To study the effect of hydrogen peroxide (H₂O₂) in inducing apoptosis of type II alveolar epithelial cell (AEC II) after overexpression by adenoviral transfection of micro RNA-21-5p (miR-21-5p), and to explore the mechanism of its anti-apoptosis. **Methods** Subculture AEC II were randomly divided into four groups: normal control group (normal saline), H₂O₂ challenge group (0.5 mmol/L H₂O₂), miR-21-5p overexpression group (miR-21-5p adenovirus + 0.5 mmol/L H₂O₂), miR-21-5p negative transfection group (adenovirus void + 0.5 mmol/L H₂O₂). Transmission electron microscopy and flow cytometry were used to detect apoptotic morphology and early apoptotic rate. Real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of miR-21-5p in AEC II, and Western Blot was used to detect the protein expressions of Bcl-2, Bax, and caspase-3 at the highest transfection efficiency at different time points (6, 12, 24, 48 hours). **Results**

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2015.07.007

基金项目: 贵州省科技计划项目 [黔科合 SY 字 (2012) 3152 号]; 贵州省科学技术基金项目 (黔科合 J 字 [2012] 48 号)

作者单位: 563003 贵州遵义, 遵义医学院附属医院重症医学科

通讯作者: 陈淼, Email: Chenmiao64@163.com

① AEC II identification: fluorescence microscopy showed the presence of characteristic structure of AEC II, i.e. microvilli and osmiophilic lamellar bodies. ② Apoptotic morphology: transmission electron microscopy showed cytoplasmic retraction, chromatin condensation, margination, lack of cell surface microvilli, and emptying of osmiophilic lamellar bodies in AEC II. ③ The expression of miR-21-5p in AEC II: the highest transfection efficiency was found at 48 hours. The expression of miR-21-5p in miR-21-5p overexpression group was significantly higher than that of the normal control group, H₂O₂ challenge group and miR-21-5p negative transfection group (*A* value: 1.54 ± 0.02 vs. 1.02 ± 0.02 , 0.56 ± 0.03 , 0.58 ± 0.02 , all $P < 0.05$). ④ The rate of early apoptosis: compared with normal control group, the early apoptotic rates in H₂O₂ challenge group, miR-21-5p negative transfection group and miR-21-5p overexpression group were gradually elevated with the prolongation of injury time. The early apoptotic rate in miR-21-5p overexpression group was significantly lower than that of the H₂O₂ challenge group and miR-21-5p negative transfection group at all time points except 6 hours [12 hours: (10.73 ± 2.80)% vs. (16.26 ± 0.59)%, (16.04 ± 0.70)%; 24 hours: (16.00 ± 3.44)% vs. (23.29 ± 2.78)%, (23.58 ± 2.31)%; 48 hours: (31.30 ± 3.55)% vs. (50.53 ± 2.17)%, (49.41 ± 1.97)%, all $P < 0.05$]. There was no significant difference in early apoptotic rate between miR-21-5p negative transfection group and H₂O₂ challenge group at each time point. ⑤ Protein expression: the expressions of Bax and caspase-3 in miR-21-5p overexpression group were significantly lower than those of the H₂O₂ challenge group and miR-21-5p negative transfection group [Bax (*A* value): 0.07 ± 0.01 vs. 0.18 ± 0.01 , 0.13 ± 0.01 ; caspase-3 (*A* value): 0.07 ± 0.01 vs. 0.23 ± 0.01 , 0.12 ± 0.01 , all $P < 0.05$], and Bcl-2 protein expression was significantly higher than that of the H₂O₂ challenge group and miR-21-5p negative transfection group (*A* value: 0.26 ± 0.01 vs. 0.06 ± 0.01 , 0.10 ± 0.01 , both $P < 0.05$). **Conclusions** ① miR-21-5p has the function of anti-apoptosis of AEC II. ② Adenoviral vector is a successful gene transfer vector when transfected with AEC II. ③ The anti-apoptosis of AEC II by miR-21-5p may be associated with reduced Bax and caspase-3 protein levels and raised expression levels of Bcl-2 protein.

【Key words】 Type II alveolar epithelial cell; Apoptosis; MicroRNA; miR-21-5p; Molecule mechanism

高氧性急性肺损伤 (HALI)^[1]、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)^[2]、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)^[3]、肺纤维化^[4]等多种肺部疾病的共同发病机制之一是氧化应激导致的 II 型肺泡上皮细胞 (AEC II) 凋亡。AEC II 的存活和凋亡直接影响肺损伤程度及修复结局^[5]。氧化应激导致的细胞凋亡主要由活性氧自由基 (ROS) 介导, 如超氧阴离子 O⁻ 和过氧化氢 (H₂O₂) 等释放入肺泡, 参与此类疾病的病理生理改变, 引发 AEC II 凋亡^[6]。H₂O₂ 是 ROS 中最适合作为信号分子的一种物质, 被广泛用于诱导细胞氧化损伤及凋亡模型建立^[7]。

ARDS 病程中常伴有顽固性低氧血症, 临床上通过氧疗纠正顽固性低氧, 但机体长时间接触高浓度氧容易引起 HALI, 导致病情加重^[8-10]; 动物实验证实, 机体长时间接触高氧容易引起 HALI^[11-12]。高氧主要攻击 AEC II^[1,13], AEC II 凋亡被认为是 HALI 基本的发病机制^[14-16]。本课题组前期研究通过基因芯片筛选出微小 RNA-21-5p (miR-21-5p) 很可能参与了 AEC II 凋亡的调控^[17]。本实验拟在前期研究基础上, 用 miR-21-5p 腺病毒过表达载体转染 AEC II, 检测 miR-21-5p 是否过表达成功; 用 H₂O₂ 诱导 AEC II 凋亡模型, 观察细胞凋亡率的变化, 明确 miR-21-5p 是否具有抗 AEC II 凋亡作用, 验证及确定靶位点, 其次通过检测 miR-21-5p 对

Bcl-2、Bax 及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 表达的影响, 明确 miR-21-5p 对 AEC II 凋亡的拮抗作用是否与线粒体凋亡通路有关, 从而进一步明确 miR-21-5p 能否抗 AEC II 凋亡, 探索 miR-21-5p 拮抗 AEC II 凋亡可能的分子机制及其途径, 也为 miRNA 干预 AEC II 凋亡进而防治肺部疾病提供重要资料, 为治疗如 ARDS 等凋亡相关疾病提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 细胞传代培养与分组: 大鼠 AEC II 由湘雅医学院中心实验室提供。将细胞复苏后置于 CO₂ 孵箱中培养, 待细胞单层汇合后用 0.125% 胰酶消化贴壁细胞, 按 1:3 传代培养。再将传代培养成功的 AEC II 随机等量均分为正常对照组 (生理盐水)、H₂O₂ 损伤组 (0.5 mmol/L H₂O₂)、miR-21-5p 过表达组 (miR-21-5p 腺病毒 + 0.5 mmol/L H₂O₂)、miR-21-5p 阴性转染组 (空腺病毒 + 0.5 mmol/L H₂O₂) 4 组。各组分别于 H₂O₂ 损伤后 6、12、24、48 h 进行指标检测。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞转染: 取对数生长期细胞接种于六孔板, 待细胞长满后, 用 0.125% 胰蛋白酶 / 乙二胺四乙酸 (EDTA) 消化细胞并计数。10 μL 病毒原液加入 10 mL 无血清 RPMI 1640 培养基稀释后, 以 10、20、

30、40、50、60、70、80 为感染复数转染细胞,摸索最佳感染复数,并设复孔。转染成功后根据发出的绿色荧光情况确定转染效率最高的时间点。

1.2.2 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 miR-21-5p 表达:取转染效率最高时间点各组 AEC II 进行反转录,将反转录产物进行 RT-PCR,分析 miR-21-5p 的表达。miR-21-5p 引物由北京博恒科创生物科技有限公司设计。miR-21-5p 基因序列为 UAGCUUAUCAGACUGAU GUUGA,引物序列:上游 5'-GGTCAATAGCTTATCA GACTGA-3',下游 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTC CGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAACTCAACA-3';内参 U6 引物序列:上游 5'-TTCCTCCGCAAGGATGA CACGC-3',下游 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAAAAATAT-3',反转录引物为 GTGCAGGGTCCGAGGT。腺病毒转染成功 48 h,用荧光定量 PCR 仪检测细胞 miR-21-5p 与内参基因 β -肌动蛋白 (β -actin) 的吸光度 (A) 值比值作为相对表达量。

1.2.3 凋亡细胞形态观察:透射电镜下观察到 AEC II 细胞中微绒毛及嗜碱性板层小体是鉴定细胞凋亡的“金标准”。用 0.5 mmol/L H_2O_2 损伤 24 h 后收集细胞悬液,离心弃上清液,加入 4% 戊二醛固定 24 h,标本由遵义医学院电镜中心进行电镜观察,透射电镜下观察染色质变化情况并寻找凋亡小体。

1.2.4 细胞早期凋亡的检测:以 miR-21-5p 腺病毒过表达载体及 miR-21-5p 腺病毒阴性载体分别转染 AEC II,转染成功后用 0.5 mmol/L H_2O_2 损伤细胞,于 6、12、24、48 h 制备各组单细胞悬液,离心弃上清,磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 1 次。按照膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 双标记;用流式细胞仪检测细胞早期凋亡率。

1.2.5 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 AEC II 中 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的表达:取转染 48 h 的 AEC II 于小离心管 (EP) 中,PBS 洗涤细胞 2 次,加入细胞裂解液,超声使细胞破碎,离心沉淀提取全蛋白,100 °C 煮沸 5 min。各泳道的上样量为 50 μ g,80 ~ 120 V,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),半干法转移凝胶至硝酸纤维素膜 (PVDF 膜),5% BSA 慢摇 4 h 封闭 PVDF 膜,洗膜后分别加入 Bcl-2 抗体、Bax 抗体和 caspase-3 抗体,4 °C 过夜;加入二抗,慢摇 2 h 后进行电学发光 (ECL) 显色,X 线胶片显影定影,将胶片进行

扫描,用图像分析软件 Image proplus 6.0 对图像进行 A 值分析。

1.3 统计学分析:采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,符合正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析;不符合正态分布的计量资料以中位数 (四分位数) [$M(Q_L, Q_U)$] 表示,采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞转染 (图 1):miR-21-5p 腺病毒过表达载体及 miR-21-5p 腺病毒阴性载体转染 AEC II 成功后发绿色荧光,以 30 为最佳感染复数,48 h 时转染效率最高。

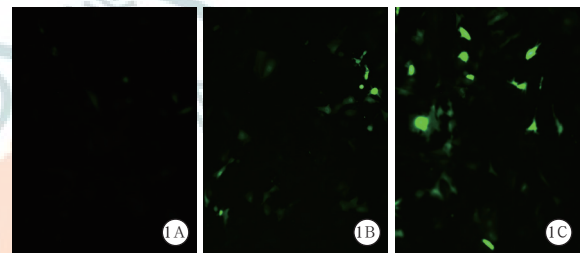
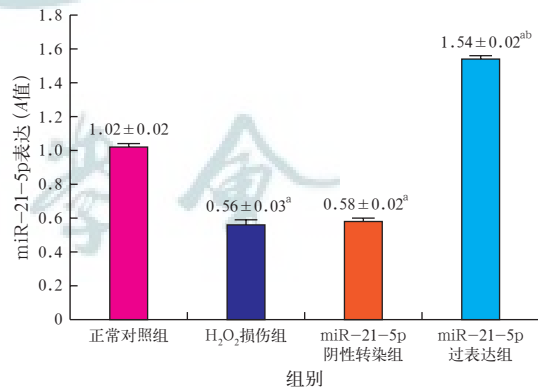


图 1 荧光显微镜下观察腺病毒载体转染后 II 型肺泡上皮细胞 (AEC II) 形态 腺病毒转染成功呈绿色荧光;转染 12 h (A)、24 h (B) 时绿色荧光较少,48 h 时 (C) 转染成功

2.2 miR-21-5p 表达 (图 2):miR-21-5p 过表达组 miR-21-5p 表达量明显高于其他 3 组 (均 $P < 0.05$),说明腺病毒过表达载体构建及转染成功。



注: AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, miR-21-5p 为微小 RNA-21-5p, H_2O_2 为过氧化氢;与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$;与 H_2O_2 损伤组和 miR-21-5p 阴性转染组比较, ^b $P < 0.05$

图 2 腺病毒转染成功 48 h 各组大鼠 AEC II 细胞 miR-21-5p 的表达量

2.3 AEC II 凋亡 (图 3):透射电镜下可见细胞凋亡早期改变为胞质回缩,染色质边聚、凝聚,细胞表面微绒毛稀少,甚至消失,嗜碱性板层小体排空。

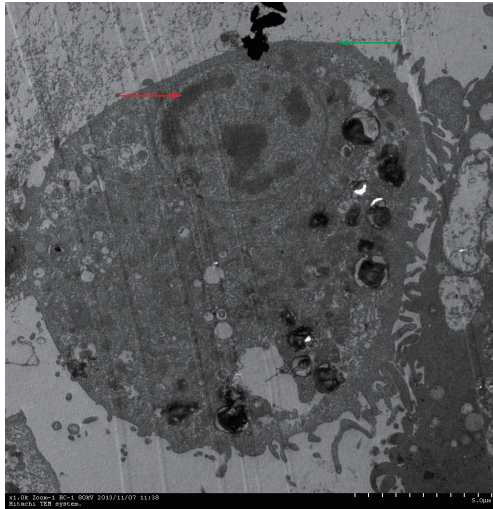


图 3 透射电镜下观察 II 型肺泡上皮细胞 (AEC II) 凋亡形态 红色箭头示染色质凝聚、凝聚;绿色箭头示微绒毛减少 ×8 000

2.4 细胞早期凋亡率 (表 1): 与正常对照组比较, H₂O₂ 损伤组、miR-21-5p 阴性转染组及 miR-21-5p 过表达组细胞凋亡率均随损伤时间的延长逐渐上升 (均 $P < 0.05$)。miR-21-5p 过表达组细胞凋亡率较同一时间点 H₂O₂ 损伤组、miR-21-5p 阴性转染组明显降低 (均 $P < 0.05$)。miR-21-5p 阴性转染组与 H₂O₂ 损伤组同时时间点细胞凋亡率比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

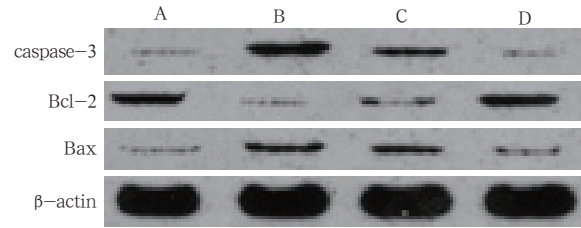
表 1 miR-21-5p 过表达对 H₂O₂ 损伤后不同时间点大鼠 AEC II 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	凋亡率 (%)			
		6 h	12 h	24 h	48 h
正常对照组	5	2.47 ± 0.10	3.01 ± 0.32	6.05 ± 0.38	7.04 ± 0.43
H ₂ O ₂ 损伤组	5	7.82 ± 0.15 ^a	16.26 ± 0.59 ^a	23.29 ± 2.78 ^a	50.53 ± 2.17 ^a
miR-21-5p 阴性转染组	5	7.66 ± 0.17 ^a	16.04 ± 0.70 ^a	23.58 ± 2.31 ^a	49.41 ± 1.97 ^a
miR-21-5p 过表达组	5	7.68 ± 0.20 ^a	10.73 ± 2.80 ^{ab}	16.00 ± 3.44 ^{ab}	31.30 ± 3.55 ^{ab}

注: miR-21-5p 为微小 RNA-21-5p, H₂O₂ 为过氧化氢, AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞;与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$;与 H₂O₂ 损伤组和 miR-21-5p 阴性转染组比较, ^b $P < 0.05$

2.6 AEC II 中 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 表达 (图 4; 表 2): 腺病毒转染 48 h 时细胞转染效率最高, 故选择转染 48 h 的细胞进行 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 3 种蛋白的 Western Blot 检测。结果显示, 与正常对照组比较, H₂O₂ 损伤组 Bcl-2 蛋白表达明显下降, Bax、caspase-3 蛋白表达明显升高 (均 $P < 0.05$)。miR-21-5p 过表达组 Bcl-2 蛋白表达明显高于 H₂O₂ 损伤组和 miR-21-5p 阴性转染组, Bax 与 caspase-3 蛋白表达明显低于 H₂O₂ 损伤组和 miR-21-5p 阴性

转染组 (均 $P < 0.05$)。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, β -actin 为 β -肌动蛋白; A 为正常对照组, B 为过氧化氢 (H₂O₂) 损伤组, C 为微小 RNA-21-5p (miR-21-5p) 阴性转染组, D 为 miR-21-5p 过表达组

图 4 Western Blot 检测腺病毒转染成功 48 h 各组大鼠 AEC II 细胞 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的表达

表 2 腺病毒转染成功 48 h 各组大鼠 AEC II 细胞 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Bcl-2 (A 值)	Bax (A 值)	caspase-3 (A 值)
正常对照组	5	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
H ₂ O ₂ 损伤组	5	0.06 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^a
miR-21-5p 阴性转染组	5	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01
miR-21-5p 过表达组	5	0.26 ± 0.01 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^{ab}

注: AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, H₂O₂ 为过氧化氢, miR-21-5p 为微小 RNA-21-5p; 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 H₂O₂ 损伤组和 miR-21-5p 阴性转染组比较, ^b $P < 0.05$

3 讨论

本研究通过构建 miR-21-5p 重组腺病毒过表达载体, 以病毒转染方式上调 AEC II 内 miR-21-5p 的表达水平, 观察其对 H₂O₂ 所致 AEC II 凋亡的影响, 结果显示, 上调 AEC II 内 miR-21-5p 表达水平能明显降低 AEC II 的凋亡率, 表明 miR-21-5p 具有抗 AEC II 凋亡的作用。

通过腺病毒过表达 miR-21-5p, 使腺病毒携带目的基因 miR-21-5p 对 AEC II 进行转染, 从而使 AEC II 内 miR-21-5p 高表达。病毒带有绿色荧光, 转染成功后通过荧光显微镜下可以观察到带绿色荧光的细胞达到 75% 以上, 通过 RT-PCR 检测到 miR-21-5p 表达较正常对照组增多, 上调 AEC II 内 miR-21-5p 表达水平可明显降低 AEC II 凋亡率, 而相同时间点 miR-21-5p 阴性转染组与 H₂O₂ 损伤组比较细胞凋亡率无明显差异, 说明在最佳感染复数时腺病毒对细胞无损伤作用或损伤作用极小, 也反向证明了是 miR-21-5p 对 AEC II 凋亡率有影响而不是腺病毒的作用, 说明腺病毒过表达载体构建成

功,同时也表明腺病毒是转染 AEC II 的一种成功载体。miR-21-5p 过表达组 6 h 细胞凋亡率与 H₂O₂ 损伤组和 miR-21-5p 阴性转染组相比差异均无统计学意义,可能是因为转染时间较短,miR-21-5p 未转染成功或转染极少进入 AEC II 内,6 h 时几乎观察不到绿光荧光,也说明了这一点。本实验采用 0.5 mmol/L H₂O₂ 损伤 AEC II 后,细胞凋亡率随时间延长而逐渐增加,表明 H₂O₂ 是一种非常适合用于诱导细胞氧化损伤及建立凋亡模型的物质,国内外也均有大量研究报道^[18-19]。

Bcl-2 家族蛋白与细胞凋亡密切相关,Bcl-2 与 Bax 是调控细胞凋亡的关键基因组,其中 Bcl-2 是抑制凋亡的重要基因,而 Bax 是促凋亡的重要基因,Bcl-2/Bax 比值可以确定细胞是否发生了凋亡^[20]。Bcl-2 家族控制着线粒体外膜和内膜的通透性,因此是线粒体凋亡途径的主要调控者,它们通过激活一系列下游基因发挥调节凋亡的作用^[21]。Caspase 又称凋亡蛋白酶,是细胞凋亡的执行人,在细胞凋亡过程中发挥了多种功能^[22]。本课题组前期在对 H₂O₂ 氧化损伤所致 AEC II 凋亡过程中线粒体跨膜电位、caspase-3 及细胞色素 C 表达的研究中,均显示其对凋亡的调控可能是通过线粒体通路实现的。本研究通过检测各组 AEC II 中 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的表达,从而明确各组细胞的抗凋亡蛋白 Bcl-2 及促凋亡蛋白 Bax 和 caspase-3 的表达,结果显示,miR-21-5p 过表达组 Bax、caspase-3 表达较其他 3 组明显降低,Bcl-2 表达较其他 3 组明显增加,表明 miR-21-5p 在抗 AEC II 细胞凋亡过程中发挥了关键作用,其机制可能是 miR-21-5p 通过对线粒体通路调控从而抑制 AEC II 凋亡。

综上所述,本研究结果证明了 miR-21-5p 拮抗 AEC II 凋亡可能的分子机制及其途径,也为 miRNA 干预 AEC II 凋亡进而防治肺部疾病提供了重要的资料,为治疗如 HALI 等凋亡相关疾病提供了新的策略。

参考文献

[1] Lee HS, Kim CK. Effect of recombinant IL-10 on cultured fetal rat alveolar type II cells exposed to 65%-hyperoxia [J]. *Respir Res*, 2011, 12: 68.
[2] Ma X, Xu D, Ai Y, et al. Fas inhibition attenuates lipopolysaccharide-induced apoptosis and cytokine release of rat type II alveolar epithelial cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37 (7): 3051-3056.

[3] Liu H, Ma L, Wu J, et al. Apoptosis of alveolar wall cells in chronic obstructive pulmonary disease patients with pulmonary emphysema is involved in emphysematous changes [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29 (4): 466-469.
[4] Kamp DW, Liu G, Cheres P, et al. Asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. The role of endoplasmic reticulum stress response [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49 (6): 892-901.
[5] Perl M, Chung CS, Perl U, et al. Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176 (6): 591-601.
[6] Geiser T, Ishigaki M, van Leer C, et al. H₂O₂ inhibits alveolar epithelial wound repair in vitro by induction of apoptosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287 (2): L448-453.
[7] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signalling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5 (5): 388-395.
[8] Hodgson C, Carteaux G, Tuxen DV, et al. Hypoxaemic rescue therapies in acute respiratory distress syndrome: Why, when, what and which one? [J]. *Injury*, 2013, 44 (12): 1700-1709.
[9] Altemeier WA, Sinclair SE. Hyperoxia in the intensive care unit: why more is not always better [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2007, 13 (1): 73-78.
[10] Nowak-Machen M, Schmelzle M, Hanidziar D, et al. Pulmonary natural killer T cells play an essential role in mediating hyperoxic acute lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48 (5): 601-609.
[11] 付红敏,许峰,刘成军,等.高氧对早产鼠肺泡 II 型上皮细胞的影响及降钙素基因相关肽的保护作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2008, 20 (10): 578-581.
[12] 张向峰,丁少芳,高元明,等.多种基质金属蛋白酶在高氧所致急性肺损伤中的表达 [J]. *中华危重病急救医学*, 2006, 18 (8): 449-451.
[13] Lee HS, Kim CK. Cathepsin B is activated as an executive protease in fetal rat alveolar type II cells exposed to hyperoxia [J]. *Exp Mol Med*, 2011, 43 (4): 223-229.
[14] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*, 2000, 407 (6805): 770-776.
[15] Liang X, Wei SQ, Lee SJ, et al. p62 sequestosome 1/light chain 3b complex confers cytoprotection on lung epithelial cells after hyperoxia [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48 (4): 489-496.
[16] Li L, Wu W, Huang W, et al. NF-kappaB RNAi decreases the Bax/Bcl-2 ratio and inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in human alveolar epithelial cells [J]. *Inflamm Res*, 2013, 62 (4): 387-397.
[17] 戢慧,陈森,钱明江,等. II 型肺泡上皮细胞凋亡相关微小 RNA 的筛选 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (9): 546-549.
[18] Kim SJ, Cheres P, Williams D, et al. Mitochondria-targeted Ogg1 and aconitase-2 prevent oxidant-induced mitochondrial DNA damage in alveolar epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (9): 6165-6176.
[19] Wang Y, Feinstein SI, Fisher AB. Peroxiredoxin 6 as an antioxidant enzyme: protection of lung alveolar epithelial type II cells from H₂O₂-induced oxidative stress [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104 (4): 1274-1285.
[20] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points [J]. *Cell*, 2004, 116 (2): 205-219.
[21] Tsukahara S, Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shwe, et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2006, 13 (2): 63-68.
[22] 金惠铭. *病理生理学* [M]. 北京:人民卫生出版社, 2013: 141-151.

(收稿日期: 2015-02-25)

(本文编辑:李银平)