

微小 RNA-21 抑制剂对高氧性急性肺损伤大鼠 II 型肺泡上皮细胞凋亡的影响

石磊 何英 白冰 陈淼

563000 贵州遵义,遵义医学院附属医院重症医学科二病区(石磊、何英、陈淼),泌尿内科(白冰)

通讯作者:陈淼, Email: chenmiao64@163.com

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2017.03.010

【摘要】 目的 观察微小 RNA-21 (miR-21) 抑制剂对高氧性急性肺损伤 (HALI) 大鼠 II 型肺泡上皮细胞 (AEC II) 凋亡的影响。方法 将 80 只 SD 大鼠按随机数字表法分为空气对照组、高氧损伤组、空病毒对照组 (经鼻腔滴入 200 μ L 慢病毒液) 及 miR-21 抑制剂预处理组 (经鼻腔滴入 200 μ L 含 miR-21 抑制剂的慢病毒液), 每组 20 只; 各组大鼠给予相应处理后立即置于氧浓度 >90% 的高氧箱中饲养以建立 HALI 模型; 空气对照组正常饲养且不予任何处理。各组分别于高氧暴露 0、24、48、72 h 随机取 10 只大鼠, 观察双肺组织大体变化, 光镜下观察病理学改变。另于 48 h 取 10 只大鼠肺组织, 采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测 miR-21 表达, 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western Bolt) 检测天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 蛋白表达, 采用原位末端刻录标记试验 (TUNEL) 检测 AEC II 凋亡情况。结果 ① 空气对照组各时间点肺组织无异常表现。随高氧暴露时间延长, 高氧损伤组肺组织损伤逐渐加重, 72 h 肺组织呈暗红色, 多处斑片状出血, 肺组织结构紊乱, 出现肺泡壁断裂, 肺泡间隔明显水肿、增宽, 大量炎性细胞浸润, 肺泡腔内出现水肿液。miR-21 抑制剂预处理组肺组织损伤程度较高氧损伤组进一步加重; 而空病毒对照组无明显变化。② 与空气对照组比较, 高氧损伤组肺组织 miR-21 表达明显下调 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.021 ± 0.005 比 0.037 ± 0.006), caspase-3 蛋白表达明显上调 (A 值: 0.423 ± 0.081 比 0.123 ± 0.023 , 均 $P < 0.05$)。给予 miR-21 抑制剂预处理后, miR-21 表达进一步下调 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.014 ± 0.003 比 0.021 ± 0.005), caspase-3 蛋白表达进一步上调 (A 值: 0.691 ± 0.085 比 0.423 ± 0.081 , 均 $P < 0.05$); 空病毒对照组 miR-21 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.025 ± 0.007 比 0.021 ± 0.005) 和 caspase-3 表达 (A 值: 0.475 ± 0.062 比 0.423 ± 0.081) 与高氧损伤组差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。③ 与空气对照组比较, 高氧损伤组凋亡细胞增多。给予 miR-21 抑制剂预处理后, 凋亡细胞较高氧损伤组进一步增多; 而空病毒对照组则无明显变化。结论 抑制体内 miR-21 表达可以加重 HALI 大鼠肺组织损伤, 增加 AEC II 凋亡。

【关键词】 微小 RNA-21; 急性肺损伤, 高氧性; 肺泡上皮细胞, II 型; 凋亡

基金项目: 国家自然科学基金 (81560019)

Effects of microRNA-21 inhibitor on apoptosis of type II alveolar epithelial cells in rats with hyperoxia-induced acute lung injury Shi Lei, He Ying, Bai Bing, Chen Miao

Second Ward of Department Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou, China (Shi L, He Y, Chen M); Department of Urinary Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou, China (Bai B)

Corresponding author: Chen Miao, Email: chenmiao64@163.com

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of microRNA-21 (miR-21) inhibitor on apoptosis of type II alveolar epithelial cells (AEC II) in rats with hyperoxia-induced acute lung injury (HALI). **Methods** Eighty Sprague-Dawley (SD) rats were divided into air-control group, hyperoxia injury group, empty-virus control group (200 μ L solution with lentivirus was dropped into the nasal) and miR-21 inhibitor pretreatment group (200 μ L solution with lentivirus contained miR-21 inhibitor was dropped through the nasal) by random number table. After treatment, the rats in all groups were fed in the hyperoxia incubator with oxygen concentration exceeding 90% for production of HALI model, and the rats in air-control group were fed normally without any treatment. Ten rats were selected at 0, 24, 48 and 72 hours after exposure in hyperoxia environment respectively, and the general changes of lung tissues were observed in light microscope. The right lung tissues were harvested to observe the pathological changes under light microscopy. The left lung tissues of other 10 rats in each group were harvested at 48 hours after execution, the miR-21 expression was determined by real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR), the protein expression of cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (caspase-3) was determined by Western Bolt, and apoptosis of AEC II was detected by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). **Results** ① No abnormal appearance in lung tissues was observed at all time points in the air-control group. In hyperoxia injury group, the lung injury would be more severe if the exposure time was longer, and lung tissues turned dark red after exposure for 72 hours, with patchy hemorrhage in several places; the structure of lung tissues was disordered, the alveolar wall was broken, the alveolar septum was significantly edematous and broadened, and there was plenty of inflammatory cell infiltration and edema fluid appeared inside the alveolar space. In miR-21 inhibitor pretreatment group, the degree of lung tissue

injury was more severe than that of the hyperoxia injury group, and there was no significant change in empty-virus control group. ② Compared with air-control group, miR-21 expression of the hyperoxia injury group was significantly decreased ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.021 ± 0.005 vs. 0.037 ± 0.006), and the protein expression of caspase-3 was significantly increased (A value: 0.423 ± 0.081 vs. 0.123 ± 0.023 , both $P < 0.05$). After pretreatment with miR-21 inhibitor, the expression of miR-21 was further decreased ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.014 ± 0.003 vs. 0.021 ± 0.005), while the protein expression of caspase-3 was further increased (A value: 0.691 ± 0.085 vs. 0.423 ± 0.081 , both $P < 0.05$). There were no statistically significant differences in the expression of miR-21 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.025 ± 0.007 vs. 0.021 ± 0.005) and caspase-3 (A value: 0.475 ± 0.062 vs. 0.423 ± 0.081) between empty-virus control group and hyperoxia injury group (both $P > 0.05$). ③ Compared with air-control group, the apoptosis cells in hyperoxia injury group were increased, which was further increased after pretreatment of miR-21 inhibitor, but no changes were found in empty-virus control group. **Conclusion** Inhibition of miR-21 expression *in vivo* could aggravate the injury of lung tissue in HALI rats, and increase the apoptosis of AEC II.

【Key words】 microRNA-21; Hyperoxia-induced acute lung injury; Type II alveolar epithelial cell; Apoptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81560019)

高氧性急性肺损伤(HALI)是典型的氧疗并发症,可发展为成人急性呼吸窘迫综合征(ARDS)或新生儿支气管肺发育不良,导致肺通气及换气功能障碍,表现为以进行性呼吸困难和顽固性低氧血症为特征的呼吸衰竭综合征,是导致患者死亡及新生儿残疾的主要原因^[1-3],阐明其发病机制、寻找更好的肺保护措施有重要意义。本课题组前期研究表明,凋亡相关微小RNA-21(miR-21)在II型肺泡上皮细胞(AEC II)内高表达,且在细胞凋亡过程中明显下调^[4];进一步研究发现,上调细胞内miR-21-5p表达水平可减轻肺损伤,减少AEC II凋亡,上调抗凋亡蛋白Bcl表达,下调促凋亡蛋白天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)和Bax表达,从而减轻HALI^[5-6]。本实验首先给大鼠滴鼻导入以慢病毒为载体的miR-21抑制剂,下调肺组织内miR-21表达水平,然后建立大鼠HALI模型,观察肺组织病理学改变及miR-21、caspase-3表达变化和AEC II凋亡情况,从另一角度验证前期实验结果。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型制备:SD大鼠80只,体重180~220 g,雌雄不拘,第三军医大学大坪医院实验中心提供,动物许可证号:SCXK(渝)2012-0005。按随机数字表法将大鼠分为空气对照组、高氧损伤组、空病毒对照组及miR-21抑制剂预处理组,每组20只。空病毒对照组大鼠经鼻腔滴入200 μ L慢病毒液,miR-21抑制剂预处理组经鼻腔滴入200 μ L含miR-21抑制剂的慢病毒液,两组大鼠于相应处理后立即置于氧浓度>90%的高氧箱中饲养,以建立HALI模型;高氧损伤组仅建立HALI模型;空气对照组正常饲养,不予任何处理。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 慢病毒转染最佳转染滴度的确定:本课题组前

期研究已确定 6×10^6 TU/mL为最佳转染滴度、48 h为最佳转染时间^[4],故本实验拟取 6×10^6 TU/mL为最终转染滴度、48 h为观察时间点。

1.3 检测指标及方法:各组分别于高氧暴露0、24、48、72 h取10只大鼠,经颈动脉放血处死后取双肺组织,观察大体变化,并进行病理学观察。于高氧暴露48 h另取10只大鼠处死后,取左肺组织于RNA固定液保存,以备基因和蛋白表达检测;取右肺组织,4%多聚甲醛常温固定,以备细胞凋亡检测。

1.3.1 肺组织病理学观察:取右肺组织,经10%甲醛溶液固定、脱水、石蜡包埋切片、二甲苯脱蜡后行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。

1.3.2 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测miR-21表达水平:提取左肺组织总RNA,进行纯度鉴定并测定总RNA浓度。反转录为cDNA,以cDNA为模板进行PCR。引物设计合成由重庆威斯腾生物技术中心完成。反转录条件:25 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 50 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min;扩增条件:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30 s,循环35次。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达量。

1.3.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Bolt)检测肺组织caspase-3蛋白表达水平:制备肺组织匀浆,测定总蛋白含量。取20 μ g蛋白样品,经电泳、转膜、封闭后加入一抗过夜,加入辣根过氧化物酶(HRP)耦联的二抗室温孵育1 h,洗膜后加入增强化学发光(ECL)试剂,以caspase-3与内参照3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)条带吸光度(A)值比值作为caspase-3蛋白表达量。

1.3.4 原位末端缺刻标记试验(TUNEL)检测AEC II凋亡情况:取右肺组织固定后石蜡包埋、脱蜡、抗原修复、染色、封片后通过镜检AEC II特异性标志物表面活性蛋白C(SP-C)以鉴定AEC II。采用

TUNEL 试验检测 AEC II 凋亡情况。细胞质有棕黄色 SP-C 颗粒沉着为正常 AEC II 细胞, TUNEL 染色见细胞核呈褐色即为 AEC II 凋亡细胞。

1.4 统计学方法:应用 SPSS 17.0 统计软件处理数据,先采用 Kolmogorov-Smirnov 法对计量资料进行正态性检验,正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法检验;不符合正态分布则采用秩和检验,检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变

2.1.1 大体改变(图 1):随高氧暴露时间延长,肺组织损伤逐渐加重,72 h 肺组织充血水肿明显,部分大鼠出现淡黄色胸腔积液。

2.1.2 光镜下组织改变(图 2):空气对照组肺泡组织结构无异常改变。高氧损伤组和空病毒对照组随高氧暴露时间延长,肺泡壁断裂,肺泡融合,伴炎性细胞浸润;且两组无明显差异。miR-21 抑制剂预处理组各时间点肺组织病理损伤较高氧损伤组进一步加重。

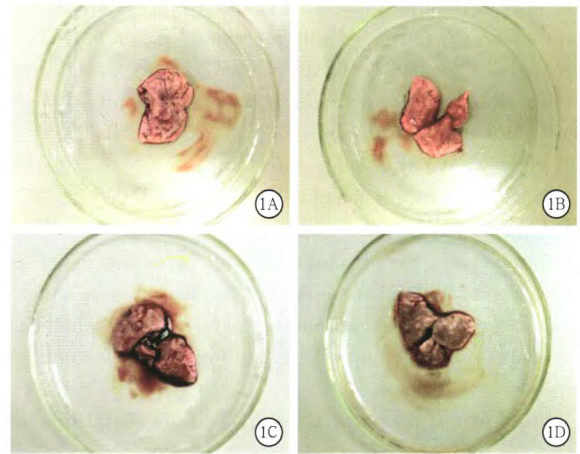


图 1 高氧性急性肺损伤(HALI)大鼠高氧暴露各时间点肺组织大体改变 高氧暴露 0 h(A)肺组织红润,呈浅粉红色;24 h(B)肺组织呈淡红色,稍肿胀,无明显渗出及出血;48 h(C)肺组织呈红色,明显肿胀,表面可见散在出血点;72 h(D)肺组织呈暗红色,充血水肿明显,表面苍白,可见散在斑片状出血

2.2 各组肺组织 miR-21 表达比较(表 1):与空气对照组比较,高氧损伤组肺组织 miR-21 表达明显下调($P < 0.05$);经 miR-21 抑制剂预处理后,miR-21 表达较高氧损伤组进一步下调($P < 0.05$);而空病毒对照组则无明显变化。

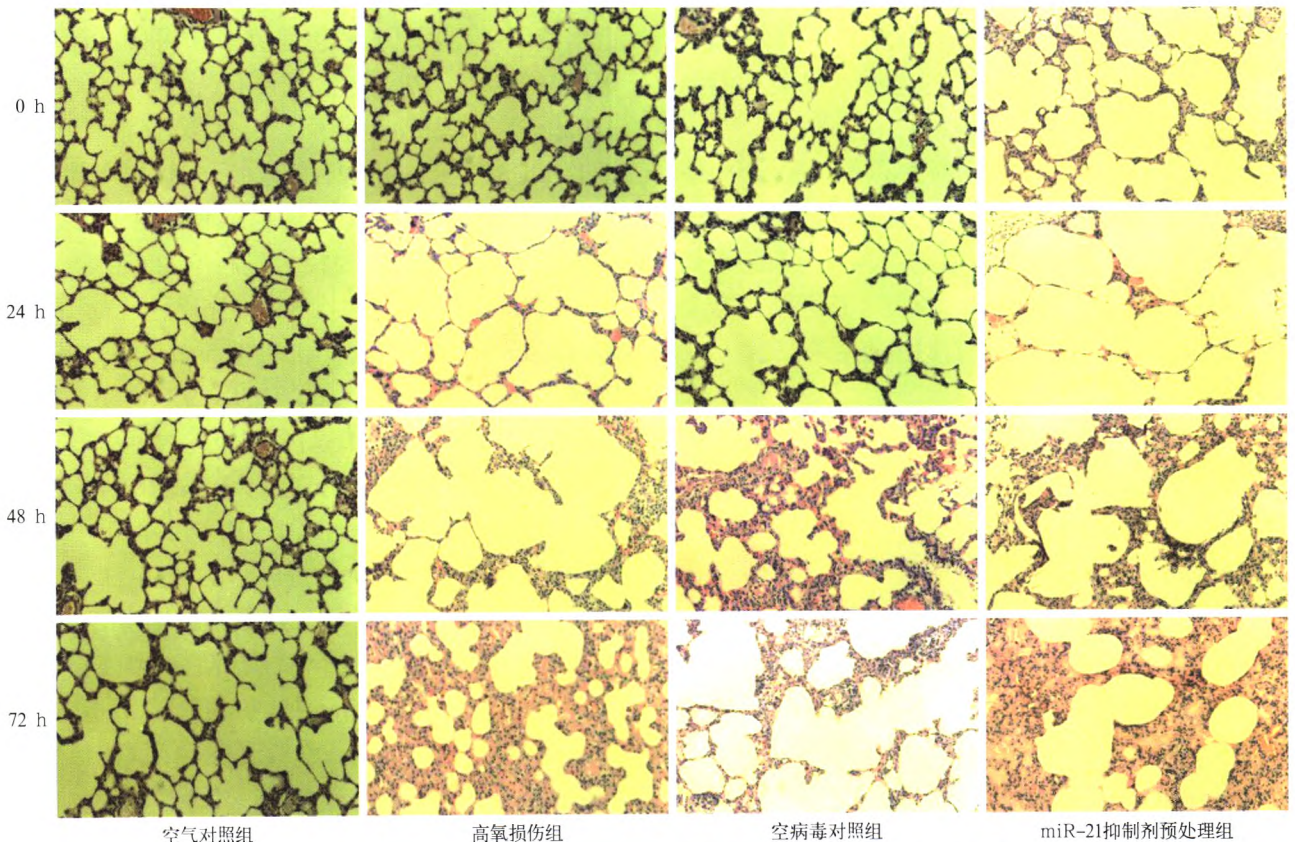


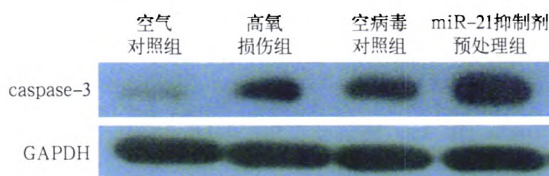
图 2 光镜下观察高氧性急性肺损伤(HALI)大鼠高氧暴露各时间点肺组织病理学改变 空气对照组各时间点肺泡腔清晰、结构完整、壁光滑,肺泡腔内无渗液,肺泡间隔均匀一致。高氧损伤组 0 h 肺泡结构清晰,肺泡腔内无渗液;24 h 肺泡间隔稍有增宽、水肿及少量炎性细胞渗出;48 h 及 72 h 肺组织结构紊乱,出现肺泡壁断裂,肺泡间隔明显水肿、增宽,大量炎性细胞浸润,肺泡腔内出现水肿液。空病毒对照组各时间点肺组织病理学改变与高氧损伤组无明显差异;微小 RNA-21(miR-21)抑制剂预处理组随高氧暴露时间延长,肺泡间隔断裂融合,水肿明显,伴大量炎性细胞浸润及大量红细胞渗出,肺组织损伤进一步加重 HE 高倍放大

表 1 miR-21 抑制剂预处理对高氧性急性肺损伤 (HALI) 大鼠肺组织 miR-21 和 caspase-3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	miR-21 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	caspase-3 表达 (A 值)
空气对照组	10	0.037 ± 0.006	0.123 ± 0.023
高氧损伤组	10	0.021 ± 0.005 ^a	0.423 ± 0.081 ^a
空病毒对照组	10	0.025 ± 0.007 ^a	0.475 ± 0.062 ^a
miR-21 抑制剂组	10	0.014 ± 0.003 ^{abc}	0.691 ± 0.085 ^{abc}

注: miR-21 为微小 RNA-21, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3; 与空气对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与高氧损伤组比较, ^b $P < 0.05$; 与空病毒对照组比较, ^c $P < 0.05$

2.3 各组肺组织 caspase-3 蛋白表达比较(表 1; 图 3): 与空气对照组比较, 高氧损伤组肺组织 caspase-3 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$); 经 miR-21 抑制剂预处理后 caspase-3 蛋白表达较高氧损伤组进一步上调 ($P < 0.05$); 空病毒对照组无明显变化。



miR-21 为微小 RNA-21, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 miR-21 抑制剂预处理对高氧性急性肺损伤 (HALI) 大鼠肺组织 caspase-3 蛋白表达的影响

2.4 各组 AEC II 凋亡比较(图 4): 与空气对照组比较, 高氧损伤组呈褐色染色的 AEC II 凋亡细胞增多; 经 miR-21 抑制剂预处理后, AEC II 凋亡细胞较高氧损伤组进一步增多; 而空病毒对照组则无明显变化。

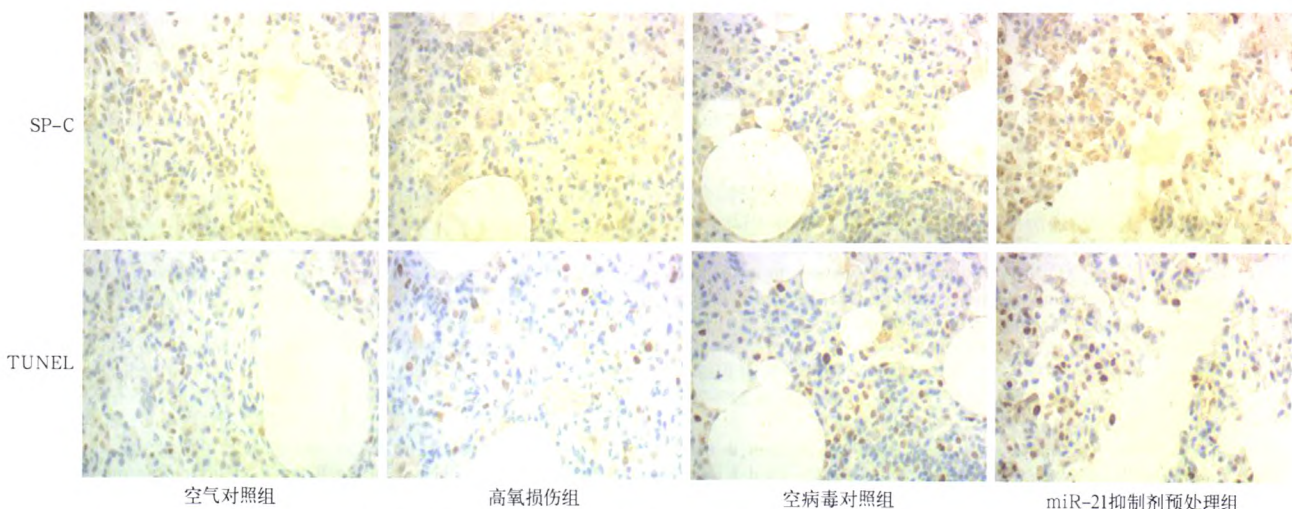


图 4 光镜下观察高氧性急性肺损伤 (HALI) 大鼠 48 h 肺组织 II 型肺泡上皮细胞 (AEC II) 凋亡情况 观察 AEC II 细胞特异性标志物表面活性蛋白 C (SP-C) 阳性表达, 以细胞质有棕黄色颗粒沉着为 AEC II 阳性细胞; TUNEL 染色部位为细胞核, 褐色细胞即为 AEC II 凋亡细胞。各组均可见细胞质内棕黄色颗粒沉着的 AEC II。空气对照组未见细胞核为褐色染色的 AEC II 凋亡细胞; 高氧损伤组 (B) 偶见细胞核为褐色染色的 AEC II 凋亡细胞; 空病毒对照组 (C) AEC II 凋亡细胞数量与高氧损伤组无明显差异; 微小 RNA-21 (miR-21) 抑制剂预处理组 (D) 可见褐色染色的 AEC II 凋亡细胞较高氧损伤组明显增多 TUNEL 染色 高倍放大

3 讨论

研究表明, 高氧会引起 AEC 凋亡和坏死, 细胞凋亡是调节高氧毒性的核心环节, 其机制为机体长期吸入高浓度氧气后, 在肺内产生大量活性氧自由基及相关衍生物, 破坏氧化 / 抗氧化系统, 最终影响大鼠的存活率和其他相关肺损伤指标^[7]。凋亡是使 AEC II 保持正常生理功能和动态平衡的一种形式, 在正常肺组织发生、成熟以及急性肺损伤 (ALI) 病理过程中都伴随着 AEC II 凋亡^[8]。AEC II 是 AEC 的干细胞, 也是高氧攻击的主要细胞, 有研究显示抑制其凋亡可有效减轻大鼠 HALI 程度^[9]。

miR 是一类含约 22 个核苷酸的小分子非编码 RNA, 经 RNA 干扰机制在转录后水平负性调控约 1/3 人类基因^[10]。miR 是众多基因的关键调节者, 涉及从细胞生长发育到细胞凋亡等生物过程^[11-12]。作为细胞内重要的调控分子, miR 在多种细胞凋亡信号转导通路中发挥关键作用, 抗凋亡因子 miR-21 在大多数肿瘤组织高表达^[13-14]; miR-21 还可通过下调 Bax/Bcl-2 比例、caspase-3 活性、人第 10 号染色体上缺失磷酸酶和张力蛋白同源基因 (PTEN) 及程序性细胞死亡蛋白 4 (PDCD4) 表达, 抑制人脑胶质瘤 U87MG 细胞^[15]、胃癌细胞^[16]、神经细胞^[17]、卵巢癌^[18]等多种细胞凋亡。

miR 抑制剂是一类经化学修饰后特定针对细胞中靶 miR 的抑制剂, 转入细胞后可特异性、高效结合细胞内成熟的靶 miR, 敲低内源性 miR 表达水平, 降低内源性 miR 的基因沉默效应, 形成稳定的复合

物,使蛋白表达量增加,阻止 miR 对靶 miR 的降解或者翻译抑制,上调靶 miR 表达,这一技术有望成为临床治疗和研究的策略^[19]。

本课题组前期研究表明,miR-21-5p 可抑制 AEC II 凋亡,可能与下调 Bax、caspase-3 蛋白表达及上调 Bcl-2 蛋白表达有关^[4],证实 miR-21-5p 过表达对肺组织具有重要保护作用。本实验结果显示,随着高氧暴露时间延长,肺组织损伤逐渐加重;通过慢病毒为载体转染 miR-21 抑制剂后发现,肺组织 miR-21 表达水平较其他 3 组明显降低,证明转染成功,抑制了 miR-21 表达。本研究 Western Bolt 检测结果显示,miR-21 抑制剂预处理组 caspase-3 蛋白表达较其他 3 组明显增高,说明抑制 miR-21 表达可诱导促凋亡蛋白 caspase-3 高表达。

AEC II 鉴定主要依靠自身形态及特异性表达标志物,如 SP-A、SP-B、SP-C、脂联素(APN)等^[20],完全分化的 AEC II 特征表型是表达表面活性蛋白。SP-C 是唯一仅在 AEC II 表达的活性蛋白,故用来鉴定 AEC II^[21]。本研究表明,miR-21 抑制剂预处理组 AEC II 凋亡明显,提示 miR-21-5p 可能成为临床调控 AEC II 凋亡及防治 HALI 的有效靶点。鉴于 miR 调控网络复杂性及 miR-21 在多种癌细胞高表达,本课题组将对其肺保护作用机制及其安全性等进行研究,为将 miR-21-5p 这一调控靶点用于临床提供理论依据。

综上,通过抑制体内 miR-21 表达可进一步加重 HALI 大鼠肺组织损伤,增加 AEC II 凋亡,其机制可能与上调 caspase-3 表达有关。

参考文献

[1] Bhandari V, Choo-Wing R, Harijith A, et al. Increased hyperoxia-induced lung injury in nitric oxide synthase 2 null mice is mediated via angiopoietin 2 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46 (5): 668-676. DOI: 10.1165/rcmb.2011-00740C.

[2] 姜凯丽,张锡刚.活性氧在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中的作用[J].*中华损伤与修复杂志(电子版)*,2010,5(2):249-253. DOI: 10.3969/cma.j.issn.1673-9450.2010.02.019.

Jiang KL, Zhang XG. Application of active oxygen to acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Chin J Inj Repair Wound Healing (Electron Ed)*, 2010, 5 (2): 249-253. DOI: 10.3969/cma.j.issn.1673-9450.2010.02.019.

[3] 贺宏丽,陈秋华,刘玲,等.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征基因治疗进展[J].*中华急诊医学杂志*,2013,22(3):229-233. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2013.03.001.

He HL, Chen QH, Liu L, et al. Gene treatment progress in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Chin J Emerg Med*, 2013, 22 (3): 229-233. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2013.03.001.

[4] 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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.09.010.

Ji H, Chen M, Qian MJ, et al. Screening type II alveolar epithelial cell apoptosis related microRNA [J]. *Chin Crit Care Med*, 2013, 25 (9): 546-549. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.09.010.

[5] 刘国跃,陈森,戢慧,等.微小 RNA-21-5p 对大鼠高氧性急性肺损伤的影响[J].*中国中西医结合急救杂志*,2015,22(1):23-27. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.01.11.

Liu GY, Chen M, Ji H, et al. Effect of microRNA-21-5p on hyperoxic acute lung injury in rats [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2015, 22 (1): 23-27. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.01.11.

[6] 覃松,陈森,戢慧,等.微小 RNA-21-5p 拮抗 II 型肺泡上皮细胞凋亡的分子机制[J].*中华危重病急救医学*,2015,(7):574-578. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.007.

Qin S, Chen M, Ji H, et al. The molecular mechanism of antiapoptosis of type II alveolar epithelial cell by microRNA-21-5p [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, (7): 574-578. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.007.

[7] Budinger GR, Mutlu GM, Urich D, et al. Epithelial cell death is an important contributor to oxidant-mediated acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183 (8): 1043-1054. DOI: 10.1164/rccm.201002-0181OC.

[8] 黎檀实,尹明,冯丽洁,等.急性肺损伤中肺泡 II 型细胞凋亡机制的研究现状[J].*中华危重病急救医学*,2002,14(3):185-187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2002.03.026.

Li TS, Yin M, Feng LJ, et al. Research status of apoptosis mechanism of alveolar epithelial cells type II of acute lung injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2002, 14 (3): 185-187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2002.03.026.

[9] 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. DOI: 10.3858/emmm.2011.43.4.027.

[10] Hu HY, Li KP, Wang XJ, et al. Set9, NF-κB, and microRNA-21 mediate berberine-induced apoptosis of human multiple myeloma cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34 (1): 157-166. DOI: 10.1038/aps.2012.161.

[11] Shi L, Chen J, Yang J, et al. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity [J]. *Brain Res*, 2010, 1352: 255-264. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.07.009.

[12] 谢丽莉. MicroRNA 在糖尿病并发症中的研究进展[J].*实用检验医师杂志*,2015,7(1):44-46. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.013.

Xie LL. Research progress of microRNA in diabetic complications [J]. *Chin J Clin Pathol*, 2015, 7 (1): 44-46. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.013.

[13] 熊欣,郑长黎. miRNA-214 对胃癌细胞 BGC823, MKN45 的细胞周期和凋亡的影响[J].*中国普通外科杂志*,2010,19(12):1311-1315.

Xiong X, Zheng CL. The effect of miRNA-214 on cell cycle and apoptosis of gastric cancer cell lines BGC823 and MKN45 [J]. *Chin J Gen Surg*, 2010, 19 (12): 1311-1315.

[14] 王秀宏.微小 RNA 与肿瘤发生发展的关系[J].*实用检验医师杂志*,2010,2(3):181-184. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2010.03.015.

Wang XH. The relationship between micro-RNA and tumorigenesis [J]. *Chin J Clin Pathol*, 2010, 2 (3): 181-184. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2010.03.015.

[15] Bailey SG, Sanchez-Elsner T, Stephanou A, et al. Regulating the genome surveillance system: miRNAs and the p53 super family [J]. *Apoptosis*, 2010, 15 (5): 541-552. DOI: 10.1007/s10495-010-0456-1.

[16] Garofalo M, Condorelli GL, Croce CM, et al. MicroRNAs as regulators of death receptors signaling [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17 (2): 200-208. DOI: 10.1038/cdd.2009.105.

[17] Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13 (1): 12-23. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00510.x.

[18] Xu P, Guo M, Hay BA. MicroRNAs and the regulation of cell death [J]. *Trends Genet*, 2004, 20 (12): 617-624. DOI: 10.1016/j.tig.2004.09.010.

[19] 龙卫国,郑芳,丁伟,等. miR-21 抑制剂在 5-FU 抑制肠癌细胞增殖中的作用[J].*临床与实验病理学杂志*,2014,30(2):131-134. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2014.02.004.

Long WG, Zheng F, Ding W, et al. Study on the role of miR-21 inhibitor in 5-FU inhibiting the proliferation of intestinal carcinoma cells [J]. *Chin J Clin Exp Pathol*, 2014, 30 (2): 131-134. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2014.02.004.

[20] Ballard PL. Hormonal regulation of pulmonary surfactant [J]. *Endocr Rev*, 1989, 10 (2): 165-181. DOI: 10.1210/edrv-10-2-165.

[21] Hamvas A, Cole FS, Noguee LM. Genetic disorders of surfactant proteins [J]. *Neonatology*, 2007, 91 (4): 311-317. DOI: 10.1159/000101347.

(收稿日期:2016-10-10)