

信号转导和转录激活蛋白 STAT1/3/5 在高氧性急性肺损伤中的作用及机制研究

梅鸿¹ 冯帮海² 刘君亚¹ 陈淼¹ 覃松¹

¹遵义医科大学附属医院重症医学科, 贵州遵义 563000; ²遵义市中医院重症医学科, 贵州遵义 563000

通信作者: 覃松, Email: 120647053@qq.com

【摘要】 目的 探讨信号转导和转录激活蛋白 (STAT1/3/5) 是否对高氧性急性肺损伤 (HALI) 具有保护作用及其机制。**方法** 将 70 只 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法分为常氧对照组、HALI 组、STAT1/3/5 抑制剂组共 5 组, 每组 14 只。在 90% 以上高氧中暴露 48 h 建立 HALI 模型; 3 个 STAT 抑制剂组分别于制模前 1 周腹腔注射 STAT1 抑制剂 40 mg/kg、STAT3 抑制剂 5 mg/kg、STAT5 抑制剂 10 mg/kg, 连续预处理 1 周。每组随机取 6 只采血, 采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测微小 RNA-21 (miR-21) 表达。随后处死小鼠取肺组织, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL-6、IL-1 β)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 含量, 计算肺组织含水量, 在光镜下观察肺组织病理学变化并进行肺损伤病理评分, 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测肺组织磷酸化 STAT (p-STAT1、p-STAT3、p-STAT5) 表达。采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析每组剩余 8 只小鼠 7 d 累积生存率。**结果** 光镜下可见 HALI 组及 STAT1 抑制剂组肺泡结构破坏, 肺泡和肺间质大量中性粒细胞 (NEU) 浸润, 肺间质增厚, 肺损伤病理评分及肺组织含水量明显升高; STAT3 抑制剂组和 STAT5 抑制剂组肺泡腔清晰, NEU 浸润程度和肺间质厚度不及 HALI 组, 肺损伤病理评分和肺组织含水量明显降低, STAT3 抑制剂组更为明显。与常氧对照组比较, HALI 组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MDA 和 MMP9 含量及 p-STAT3、p-STAT5 表达水平均明显升高, 而 SOD 和 miR-21 表达则明显下降。与 HALI 组比较, STAT3 抑制剂组及 STAT5 抑制剂组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MDA 和 MMP9 含量均明显下降, 而 SOD 及 miR-21 表达明显升高, 以 STAT3 抑制剂组更为明显 [TNF- α (μ g/L): 42.53 ± 3.25 比 86.36 ± 5.48 , IL-6 (ng/L): 68.46 ± 4.28 比 145.00 ± 6.89 , IL-1 β (μ g/L): 28.74 ± 3.53 比 68.00 ± 5.64 , MDA (μ mol/g): 20.33 ± 2.74 比 42.58 ± 3.45 , MMP9 (ng/L): 128.55 ± 6.35 比 325.13 ± 6.65 , SOD (kU/g): 50.53 ± 4.19 比 22.53 ± 3.27 , miR-21 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.550 ± 0.018 比 0.316 ± 0.037 , 均 $P < 0.05$]。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示, STAT3 抑制剂组和 STAT5 抑制剂组 7 d 累积生存率均明显高于 HALI 组 [62.5% (5/8)、37.5% (3/8) 比 12.5% (1/8), 均 $P < 0.05$]。**结论** 抑制 STAT3 过度活化可能通过 miR-21 的表达抑制炎症反应, 调控氧化应激并改善肺通透性, 在 HALI 中发挥肺保护作用。

【关键词】 信号转导和转录激活蛋白 1/3/5; 高氧性急性肺损伤; 急性呼吸窘迫综合征; 微小 RNA; 凋亡

基金项目: 国家自然科学基金 (81960362, 81960024)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220223-00170

Role and mechanism of signal transducer and activator of transcription protein STAT1/3/5 in hyperoxia-induced acute lung injury

Mei Hong¹, Feng Banghai², Liu Junya¹, Chen Miao¹, Qin Song¹

¹The Second Ward, Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China; ²Department of Critical Care Medicine, Zunyi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zunyi 563000, Guizhou, China

Corresponding author: Qin Song, Email: 120647053@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate whether signal transducer and activator of transcription (STAT1/3/5) have a protective effect on hyperoxia-induced acute lung injury (HALI) and its mechanism. **Methods** Seventy C57BL/6J mice were randomly divided into five groups: normoxia control group, HALI group, and STAT1/3/5 inhibitor groups, with 14 mice in each group. The HALI model was established by exposure to more than 90% hyperoxia for 48 hours; three STAT inhibitor groups were pretreated by intraperitoneal injection of STAT1 inhibitor 40 mg/kg and STAT3 inhibitor 5 mg/kg, and STAT5 inhibitor 10 mg/kg for 1 week. Six blood samples were randomly collected from each group, and microRNA-21 (miR-21) expression was measured by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Lung tissue of the sacrificed mice was obtained, and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins (IL-6, IL-1 β), superoxide dismutase (SOD), malonic dialdehyde (MDA), and matrix metalloproteinase 9 (MMP9). The water content of lung tissue was calculated. The pathological changes in lung tissue were observed under the light microscope, and the pathological score

of lung injury was performed. Western blotting was used to detect the expression of phosphorylated STAT (p-STAT1, p-STAT3, p-STAT5) in lung tissue. The 7-day cumulative survival rates of the remaining 8 mice in each group were analyzed using Kaplan-Meier survival curves. **Results** Under the light microscope, the alveolar structures in the HALI group and the STAT1 inhibitor group were destroyed, a large number of neutrophils (NEU) infiltrated in the alveoli and lung interstitium, which were thickened. The pathological score of lung injury and the water content of the lung tissue was significantly increased. In STAT3 inhibitor and STAT5 inhibitor groups, the alveolar cavity was clear, the degree of NEU infiltration and the thickness of lung interstitium were lower than those in HALI group, the pathological score of lung injury and the water content of lung tissue were significantly decreased, especially in STAT3 inhibitor group. Compared with the normoxia control group, the contents of TNF- α , IL-6, IL-1 β , MDA, and MMP9, and the expression levels of p-STAT3 and p-STAT5 in the HALI group were significantly increased. In contrast, the content of SOD and the expression of miR-21 were significantly decreased. Compared with the HALI group, the contents of TNF- α , IL-6, IL-1 β , MDA, and MMP9 in the STAT3 inhibitor group and STAT5 inhibitor group were significantly decreased. At the same time, the content of SOD and the expression of miR-21 were significantly increased, especially in STAT3 inhibitor group [TNF- α ($\mu\text{g/L}$): 42.53 ± 3.25 vs. 86.36 ± 5.48 , IL-6 (ng/L): 68.46 ± 4.28 vs. 145.00 ± 6.89 , IL-1 β ($\mu\text{g/L}$): 28.74 ± 3.53 vs. 68.00 ± 5.64 , MDA ($\mu\text{mol/g}$): 20.33 ± 2.74 vs. 42.58 ± 3.45 , and MMP9 (ng/L): 128.55 ± 6.35 vs. 325.13 ± 6.65 , SOD (kU/g): 50.53 ± 4.19 vs. 22.53 ± 3.27 , miR-21 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$): 0.550 ± 0.018 vs. 0.316 ± 0.037 , all $P < 0.05$]. Kaplan-Meier survival curve analysis showed that the 7-day cumulative survival rates of the STAT3 inhibitor group and STAT5 inhibitor group were significantly higher than those of the HALI group [62.5% (5/8), 37.5% (3/8) vs. 12.5% (1/8), both $P < 0.05$]. **Conclusion** Inhibition of STAT3 hyperactivation may suppress the inflammatory response, regulate oxidative stress, improve lung permeability through regulating the expression of miR-21, which exert lung protection in HALI.

【Key words】 Transcriptional activator protein 1/3/5; Hyperoxia-induced acute lung injury; Acute respiratory distress syndrome; microRNA; Apoptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81960362, 81960024)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220223-00170

高氧性急性肺损伤(hyperoxia-induced acute lung injury, HALI)是导致患者死亡及新生儿残疾的主要原因之一^[1],其发病机制错综复杂,研究表明,活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)是介导 HALI 的核心因素^[2]。高氧暴露可以导致体内 ROS 超负荷聚集,其机制不仅是通过脂质过氧化、DNA 损伤等直接破坏氧化还原稳态,而且还可以作为第二信使诱导肺组织细胞分泌趋化因子,诱导中性粒细胞(neutrophils, NEU)大量释放肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukins, IL-1 β 、IL-6)等炎症介质,导致肺内皮细胞和肺泡上皮损伤坏死,肺通透性增加,最终进展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[3-4]。信号转导和转录激活蛋白(signal transducer and activator of transcription, STAT)家族成员 STAT1/3/5 在调节氧化应激、凋亡及炎症反应等生物过程中发挥着重要作用。目前研究显示,ROS 促进 STAT1/3/5 的活化,同时活化的 STAT3/5 可正向或负向调控 ROS 的动态平衡,从而发挥细胞保护作用^[5]。同时,活化的 STAT3/5 可促进微小 RNA-21-5p (microRNA-21-5p, miRNA-21-5p) 表达从而调控促存活基因的表达^[6-7]。然而,亦有报道指出抑制 miR-21 可促进 STAT3 活化并抑制 STAT5 活化^[8]。有研究表明,抑制 STAT3 的过度活化可通过调控血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial

growth factor, VEGF)途径改善血管内皮通透性,减轻脂多糖诱导的肺损伤^[9-10]。本课题组前期研究表明,过表达 miR-21 可通过抑制 II 型肺泡上皮细胞凋亡减轻 HALI^[11],且 miR-21 可同时靶向调控 STAT1/3/5。然而 STAT1/3/5 在 HALI 中的作用机制未见报道,且 ROS、miR-21 及 STAT1/3/5 之间的分子相互作用错综复杂,目前尚无定论。因此,本研究拟探讨 STAT1/3/5 在 HALI 中的作用及与 miR-21 的关系,以期对 HALI 的机制研究和治疗策略提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组、模型制备和处理:70 只 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法分为常氧对照组、HALI 组、STAT1 抑制剂组、STAT3 抑制剂组和 STAT5 抑制剂组,每组 14 只。STAT1 抑制剂 Fludarabine、STAT3 抑制剂 S3I-201、STAT5 抑制剂 STAT5-IN-1 分别按 40 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg 经腹腔注射给药,预处理 1 周。除常氧对照组外,其余各组均参照刘国跃等^[12]的方法构建 HALI 动物模型,维持其二氧化碳(CO₂)浓度<0.005、氧浓度>0.90。HALI 制模 48 h 后,将所有小鼠置于室内空气中饲养 1 周,观察小鼠存活率。从各组中随机选取 6 只小鼠,七氟烷吸入麻醉,采用眼球摘除法取血 1.5 mL, -20℃冻存备用;随后处死小鼠取肺组织, -80℃冻存备用,检测相关指标。本实验相关操作均符合《实验动物饲养管理和试用手册》相关要求,并经过遵义医科大学

伦理委员会批准(审批号:ZMU21-2107-074)。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量:取小鼠右上肺叶称重,剪碎后研磨成匀浆,离心,吸取上清液。采用 ELISA 法检测肺组织中 SOD、MDA、MMP9、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量,操作严格按试剂盒说明书进行。

1.2.2 肺组织含水量测定:取小鼠左上肺叶,用滤纸吸干水分称湿重质量(wet weight, W),60℃烤箱内烘烤 48 h 后称干重质量(dry weight, D),计算肺组织含水量=(W-D)/W $\times$ 100%。

1.2.3 肺组织病理学观察及肺损伤病理评分:取小鼠左下肺叶,染色后用倒置显微镜观察肺组织病理改变,随机选取镜下至少 20 个高倍视野($\times$ 400),采用 Matute-Bello 等^[13]的方法进行肺损伤病理评分。

1.2.4 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 miR-21 表达:取小鼠血标本,按照试剂盒说明书操作步骤提取总 RNA,测定纯度和 RNA 浓度,采用相对定量法检测 RNA 扩增,以 U6 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-21 表达量。

1.2.5 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting) 检测肺组织磷酸化 STAT(p-STAT1、p-STAT3、p-STAT5) 表达:取小鼠右肺中叶和下叶称重,裂解组织后行蛋白定量,经电泳、转膜、封闭后,分别加入 p-STAT1、p-STAT3、p-STAT5 一抗后 4℃摇床孵育 16 h;加入二抗室温避光孵育 2 h,化学发光法显影,使用 Image Lab 软件曝光,拍照。以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参,使用 Image J 软件分析各条带灰度值,以靶蛋白与 β -actin 的灰度值比值作为靶

蛋白表达量。

1.2.6 生存情况:观察每组剩余 8 只小鼠的 7 d 累积生存率。

1.3 统计学分析:使用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析;使用 Kaplan-Meier 生存曲线分析小鼠 7 d 累积生存率。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学观察及肺损伤病理评分(图 1;表 1):常氧对照组肺组织间质偶见 NEU;HALI 组及 STAT1 抑制剂组肺泡结构破坏,肺泡和肺间质大量 NEU 浸润,肺间质及肺泡间隔明显增厚,部分肺泡腔可见蛋白质碎片及透明膜;STAT3 抑制剂组肺泡腔清晰,虽有 NEU 浸润,但肺泡未见明显破坏;STAT5 抑制剂组可见 NEU 浸润及肺间质增厚,损伤程度较 HALI 组轻,但好转程度不及 STAT3 抑制剂组。HALI 组肺损伤病理评分较常氧对照组明显升高,STAT5 抑制剂组肺损伤病理评分较 HALI 组明显降低,但明显高于 STAT3 抑制剂组(均 $P<0.05$)。

表 1 各组小鼠肺组织 W/D 比值及肺损伤病理评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	肺 W/D 比值	肺损伤病理评分(分)
常氧对照组	6	3.440 $\pm$ 0.258	0.080 $\pm$ 0.015
HALI 组	6	5.850 $\pm$ 0.274 ^a	0.780 $\pm$ 0.022 ^a
STAT1 抑制剂组	6	5.550 $\pm$ 0.187 ^a	0.750 $\pm$ 0.018 ^a
STAT3 抑制剂组	6	3.930 $\pm$ 0.216 ^{abc}	0.420 $\pm$ 0.016 ^{abc}
STAT5 抑制剂组	6	4.460 $\pm$ 0.193 ^{abcd}	0.520 $\pm$ 0.025 ^{abcd}

注:W/D 比值为肺湿/干质量比值,HALI 为高氧性急性肺损伤,STAT 为信号转导和转录激活蛋白;与常氧对照组比较,^a $P<0.05$;与 HALI 组比较,^b $P<0.05$;与 STAT1 抑制剂组比较,^c $P<0.05$;与 STAT3 抑制剂组比较,^d $P<0.05$

2.2 肺组织含水量(表 1):与常氧对照组相比,各组肺组织 W/D 比值均明显升高(均 $P<0.05$);与 HALI 组相比,STAT3 抑制剂组和 STAT5 抑制剂组 W/D 比

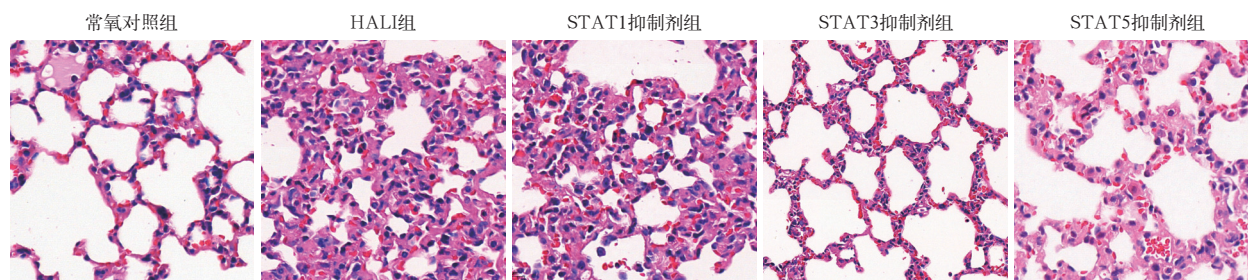


图 1 光镜下观察各组小鼠肺组织病理学改变 常氧对照组可见肺泡结构清晰,肺泡壁光滑,偶有中性粒细胞(NEU)浸润;高氧性急性肺损伤(HALI)组及信号转导和转录激活蛋白 1(STAT1)抑制剂组可见肺泡结构破坏,肺泡和肺间质可见大量 NEU 浸润,肺间质及肺泡间隔明显增厚,部分肺泡腔可见蛋白质碎片及透明膜;STAT3 抑制剂组肺泡腔清晰,虽有部分 NEU 浸润,但肺泡未见明显破坏;STAT5 抑制剂组可见部分 NEU 浸润及肺间质增厚 苏木素-伊红(HE)染色 高倍放大

表 2 各组小鼠肺组织氧化应激指标及炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

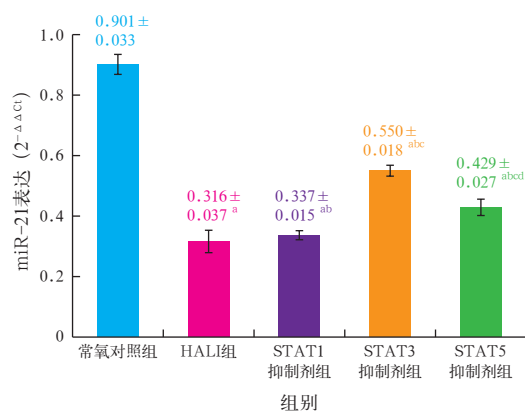
组别	动物数(只)	SOD(kU/g)	MDA($\mu\text{mol/g}$)	MMP9(ng/L)	TNF- α ($\mu\text{g/L}$)	IL-6(ng/L)	IL-1 β ($\mu\text{g/L}$)
常氧对照组	6	65.32 $\pm$ 5.48	8.35 $\pm$ 2.79	50.26 $\pm$ 5.67	5.64 $\pm$ 1.45	15.23 $\pm$ 2.36	12.46 $\pm$ 2.72
HALI 组	6	22.53 $\pm$ 3.27 ^a	42.58 $\pm$ 3.45 ^a	325.13 $\pm$ 6.65 ^a	86.36 $\pm$ 5.48 ^a	145.00 $\pm$ 6.89 ^a	68.00 $\pm$ 5.64 ^a
STAT1 抑制剂组	6	24.36 $\pm$ 2.59 ^a	40.52 $\pm$ 3.98 ^a	616.37 $\pm$ 7.48 ^a	84.27 $\pm$ 4.95 ^a	142.55 $\pm$ 5.95 ^a	65.37 $\pm$ 4.86 ^a
STAT3 抑制剂组	6	50.53 $\pm$ 4.19 ^{abc}	20.33 $\pm$ 2.74 ^{abc}	128.55 $\pm$ 6.35 ^{abc}	42.53 $\pm$ 3.25 ^{abc}	68.46 $\pm$ 4.28 ^{abc}	28.74 $\pm$ 3.53 ^{abc}
STAT5 抑制剂组	6	38.64 $\pm$ 3.95 ^{abcd}	30.29 $\pm$ 3.55 ^{abcd}	225.74 $\pm$ 6.85 ^{abcd}	63.37 $\pm$ 4.88 ^{abcd}	86.74 $\pm$ 5.73 ^{abcd}	43.75 $\pm$ 4.15 ^{abcd}

注:SOD 为超氧化物歧化酶,MDA 为丙二醛,MMP9 为基质金属蛋白酶 9,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL 为白细胞介素,HALI 为高氧性急性肺损伤,STAT 为信号转导和转录激活蛋白;与常氧对照组比较,^a $P<0.05$;与 HALI 组比较,^b $P<0.05$;与 STAT1 抑制剂组比较,^c $P<0.05$;与 STAT3 抑制剂组比较,^d $P<0.05$

值均明显降低(均 $P<0.05$);与 STAT3 抑制剂组比,STAT5 抑制剂组 W/D 比值明显升高($P<0.05$)。

2.3 肺组织氧化应激指标(SOD、MDA 及 MMP9)及炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)水平(表 2):与常氧对照组相比,HALI 组、STAT1 抑制剂组、STAT3 抑制剂组和 STAT5 抑制剂组 SOD 水平均明显降低,MDA、MMP9、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平均明显升高(均 $P<0.05$);与 HALI 组相比,STAT3 抑制剂组和 STAT5 抑制剂组 SOD 水平均明显升高,MDA、MMP9、TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 水平均明显降低(均 $P<0.05$);与 STAT3 抑制剂组相比,STAT5 抑制剂组 SOD 水平明显降低,MDA、MMP9、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平均明显升高(均 $P<0.05$)。

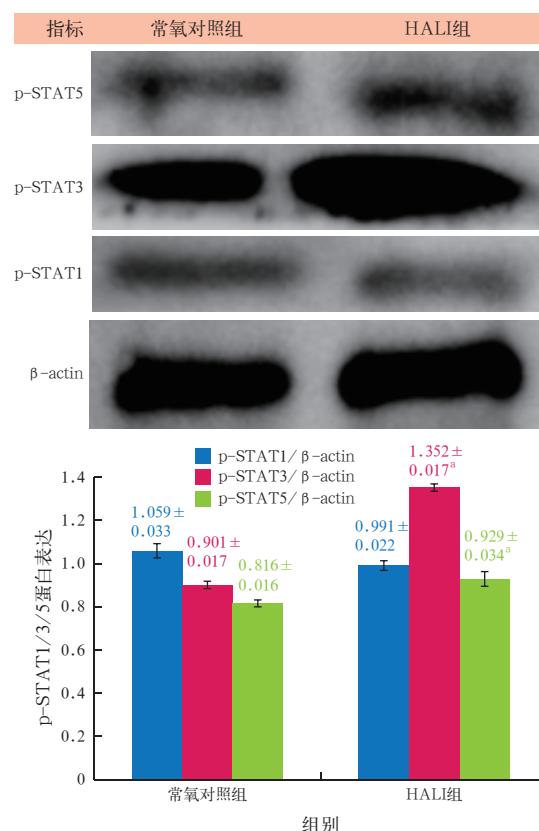
2.4 miR-21 表达(图 2):与常氧对照组比较,HALI 组、STAT1 抑制剂组、STAT3 抑制剂组和 STAT5 抑制剂组 miR-21 表达水平均明显降低(均 $P<0.05$);与 HALI 组比较,STAT3 抑制剂组和 STAT5 抑制剂组 miR-21 表达水平均明显升高(均 $P<0.05$);与 STAT3 抑制剂组比较,STAT5 抑制剂组 miR-21 表达水平明显降低($P<0.05$)。



注:miR-21 为微小 RNA-21,HALI 为高氧性急性肺损伤,STAT 为信号转导和转录激活蛋白;与常氧对照组比较,^a $P<0.05$;与 HALI 组比较,^b $P<0.05$;与 STAT1 抑制剂组比较,^c $P<0.05$;与 STAT3 抑制剂组比较,^d $P<0.05$

图 2 各组小鼠肺组织 miR-21 表达水平比较

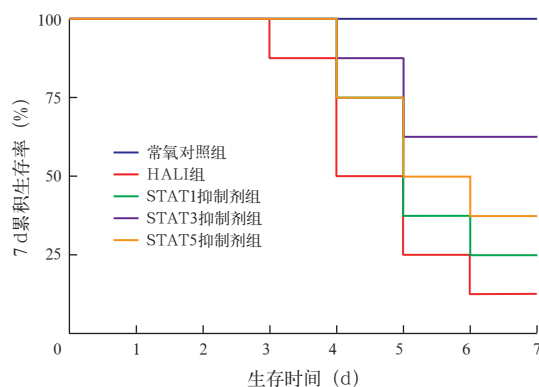
2.5 p-STAT1/3/5 蛋白表达(图 3):与常氧对照组比较,HALI 组 p-STAT3/5 蛋白表达水平升高,以 p-STAT3 升高最为明显($P<0.05$)。



注:HALI 为高氧性急性肺损伤,STAT 为信号转导和转录激活蛋白,p-STAT 为磷酸化 STAT,β-actin 为 β-肌动蛋白;与常氧对照组比较,^a $P<0.05$

图 3 各组小鼠肺组织 p-STAT1/3/5 蛋白表达水平比较

2.6 小鼠 7 d 累积生存率(图 4):HALI 组 7 d 累积生存率较常氧对照组明显下降[12.5%(1/8)比 100.0%(8/8), $P<0.05$];STAT1 抑制剂组 7 d 累积生存率与 HALI 组比较差异无统计学意义[25.0%(2/8)比 12.5%(1/8), $P>0.05$];STAT3 抑制剂组和 STAT5 抑制剂组 7 d 累积生存率较 HALI 组明显升高[62.5%(5/8)、37.5%(3/8)比 12.5%(1/8),均 $P<0.05$];各组小鼠死亡时间主要分布在制模后 4~6 d。



注: HALI 为高氧性急性肺损伤, STAT 为信号转导和转录激活蛋白

图 4 各组小鼠 7 d Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨论

氧疗在挽救患者生命、争取抢救时机中发挥着极其重要的作用,然而,长时间暴露于高氧环境下,可促使体内 ROS 大量蓄积,诱导肺组织释放大炎症细胞介质,破坏氧化还原平衡稳态,损伤肺泡上皮细胞,导致肺泡毛细血管通透性增加,加重 ARDS 的进展^[3, 14]。有研究报道, STAT3 的过度活化可加重小鼠内皮细胞的炎症反应和凋亡^[15]。STAT3 及其家族成员 STAT1/5 在 HALI 中的作用未见报道。本课题组长期进行 HALI 机制的研究,发现在 90% 以上的高氧中暴露 48 h 可成功构建 HALI 动物模型^[16-17]。本研究探讨 STAT1/3/5 在 HALI 中的作用。

基础和临床研究表明,抑制炎症风暴,可显著改善氧合、抑制氧化应激水平、减少生理死腔并改善毛细血管通透性,这对 ARDS 的治疗至关重要^[18]。本研究显示,抑制 HALI 模型小鼠的 STAT1,小鼠的 7 d 生存率、肺损伤病理评分、肺 W/D 比值及病理学观察无明显改变;而抑制 STAT3 和 STAT5, HALI 小鼠的 7 d 生存率均有所改善,且肺损伤病理评分、肺 W/D 比值均明显降低,其中以抑制 STAT3 最为明显。通过检测炎症因子水平发现, STAT1 抑制剂组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平无明显变化,而 STAT3 抑制剂组及 STAT5 抑制剂组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平均明显降低,以 STAT3 抑制剂组尤为显著。上述实验结果说明,抑制 STAT3 可显著减少小鼠肺组织炎症细胞浸润及炎症介质的释放,减轻肺水肿,改善肺通透性,从而减轻 HALI,这与 Wang 等^[10]和 Li 等^[15]的研究结果一致。

氧化应激是导致肺血管内皮细胞及肺泡上皮细胞功能障碍的核心环节。ROS 不仅损伤肺血管内皮

细胞及上皮细胞,增加肺血管通透性,促进肺水肿的形成;还与多种细胞因子相互作用,促进炎症因子如 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 的释放,加重炎症级联反应^[19]。氧化还原平衡对维持肺气液屏障,改善毛细血管通透性至关重要。SOD 作为肺组织氧自由基清除因子,在对抗肺损伤中发挥重要作用;而作为脂质过氧化最终代谢产物的 MDA,可反映肺损伤严重程度^[19]。在本实验中,高氧暴露后, SOD 活力明显降低, MDA 明显升高,此结果说明在 HALI 中存在严重的氧化应激反应,氧化还原平衡稳态被破坏。而抑制 STAT3 的过度活化,可明显提高 SOD 活力,抑制 MDA 的表达。有研究表明, TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 的大量释放可促进 MMP9 活化,通过降解肺泡基底膜胶原蛋白,破坏肺泡上皮细胞与肺血管内皮细胞间的结构与功能,加重肺血管通透性^[20]。本实验中,高氧暴露后 MMP9 表达明显增强,而 STAT3 抑制剂显著抑制 MMP9 的活力,结合炎症介质、肺 W/D 比值等结果,在 HALI 组中, p-STAT3 明显升高,说明抑制 STAT3 的过度活化,可通过降低氧化应激水平,减轻肺组织炎症细胞浸润并改善肺通透性,从而在 HALI 中发挥肺保护作用。

miRNA 是一类进化上保守的小分子非编码 RNA,能在转录水平抑制靶基因的表达,在细胞增殖分化、氧化应激、凋亡以及炎症反应等方面发挥重要作用^[21]。本课题组前期研究结果表明,在 HALI 中 miR-21 低表达,而过表达 miR-21 可减轻 HALI^[22]。在本实验中,与 HALI 组和 STAT1 抑制剂组相比,抑制 STAT3 和 STAT5 组 miR-21 表达水平升高。有研究报道, miR-21 可抑制 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 的表达^[23],并调控 STAT3 的活化^[6]及 MMP9 的表达^[24]。结合本实验中炎症因子及 MMP9 表达水平,说明 miR-21 可能通过调控 STAT3 的活化减轻 HALI。关于其具体机制,本课题组将进一步研究。

综上所述,抑制 STAT3 的过度活化,可能通过 miR-21 的表达抑制炎症反应,调控氧化应激并改善肺通透性,从而在 HALI 中发挥肺保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Syed M, Das P, Pawar A, et al. Hyperoxia causes miR-34a-mediated injury via angiotensin-1 in neonatal lungs [J]. Nat Commun, 2017, 8 (1): 1173. DOI: 10.1038/s41467-017-01349-y.
- [2] Amarelle L, Quintela L, Hurtado J, et al. Hyperoxia and lungs: what we have learned from animal models [J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 606678. DOI: 10.3389/fmed.2021.606678.
- [3] Dias-Freitas F, Metelo-Coimbra C, Roncon-Albuquerque R Jr.

- Molecular mechanisms underlying hyperoxia acute lung injury [J]. *Respir Med*, 2016, 119: 23–28. DOI: 10.1016/j.rmed.2016.08.010.
- [4] Kellner M, Noonepalle S, Lu Q, et al. ROS signaling in the pathogenesis of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 967: 105–137. DOI: 10.1007/978-3-319-63245-2_8.
- [5] Linher-Melville K, Singh G. The complex roles of STAT3 and STAT5 in maintaining redox balance: lessons from STAT-mediated xCT expression in cancer cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 451: 40–52. DOI: 10.1016/j.mce.2017.02.014.
- [6] Chen LY, Wang X, Qu XL, et al. Activation of the STAT3/microRNA-21 pathway participates in angiotensin II-induced angiogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (11): 19640–19654. DOI: 10.1002/jcp.28564.
- [7] Espadinha AS, Prouzet-Mauléon V, Claverol S, et al. A tyrosine kinase-STAT5-miR21-PDCD4 regulatory axis in chronic and acute myeloid leukemia cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (44): 76174–76188. DOI: 10.18632/oncotarget.19192.
- [8] Dong LY, Wang XF, Tan J, et al. Decreased expression of microRNA-21 correlates with the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18 (11): 2213–2224. DOI: 10.1111/jcmm.12353.
- [9] Chen IC, Wang SC, Qu YT, et al. Corylin ameliorates LPS-induced acute lung injury via suppressing the MAPKs and IL-6/STAT3 signaling pathways [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14 (10): 1046. DOI: 10.3390/ph14101046.
- [10] Wang L, Astone M, Alam SK, et al. Suppressing STAT3 activity protects the endothelial barrier from VEGF-mediated vascular permeability [J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14 (11): dmm049029. DOI: 10.1242/dmm.049029.
- [11] 石磊, 何英, 白冰, 等. 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 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29 (3): 244–248. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.010.
- [12] 刘国跃, 牟胜旭, 陈森, 等. 一种简便可控的高氧急性肺损伤模型的建立方法 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (1): 27–32. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.01.006.
- [13] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44 (5): 725–738. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0210ST.
- [14] Singer M, Young PJ, Laffey JG, et al. Dangers of hyperoxia [J]. *Crit Care*, 2021, 25 (1): 440. DOI: 10.1186/s13054-021-03815-y.
- [15] Li J, Xue L, Wu YF, et al. STAT3-activated lncRNA XIST accelerates the inflammatory response and apoptosis of LPS-induced acute lung injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (14): 6550–6557. DOI: 10.1111/jcmm.16653.
- [16] 刘国跃, 王勇, 陈森. 胍丁胺对大鼠高氧性急性肺损伤的影响 [J]. *中国急救医学*, 2019, 39 (9): 882–886. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2019.09.016.
- [17] 张伟, 徐乐, 陈森, 等. miR-21-5p 过表达对高氧性急性肺损伤大鼠 AEC II 早期凋亡的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (8): 978–982. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.013.
- [18] Amin Z, Rahmawati FN. Recent insight into potential acute respiratory distress syndrome [J]. *Saudi Med J*, 2017, 38 (4): 344–349. DOI: 10.15537/smj.2017.4.15843.
- [19] Liu Y, Zhou SJ, Xiang D, et al. Friend or foe? The roles of antioxidants in acute lung injury [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10 (12): 1956. DOI: 10.3390/antiox10121956.
- [20] 易梦秋, 余旻, 王鹏. 多器官功能障碍综合征大鼠肺组织 MMP-9、TIMP-1 和 IV 型胶原的表达 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34 (1): 123–129. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2018.01.021.
- [21] 任颖聪, 陈森, 刘鑫鑫, 等. 胞外囊泡微小 RNA 在急性肺损伤中的相关研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (5): 633–637. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200727-00544.
- [22] 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.
- [23] Zhu WD, Xu J, Zhang M, et al. MicroRNA-21 inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting nuclear factor- κ B [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16 (6): 4616–4622. DOI: 10.3892/etm.2018.6789.
- [24] 陈翔, 黄莹, 龙春艺, 等. miR-21 调控 TIMP-3 影响 LPS 诱导下 RAW264.7 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 表达 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35 (11): 1295–1299. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2019.11.003.

(收稿日期: 2022-02-23)

• 科研新闻速递 •

维生素 C 治疗脓毒性休克：一项多中心临床试验

维生素 C 具有抗氧化作用。在脓毒性休克中, 维生素 C 可能减轻氧化应激引起的组织损伤。先前已有多个团队进行过研究, 但其数据结果存在许多相互矛盾的地方。为此, 有学者进行了一项多中心、随机、安慰剂对照试验。在该试验中, 研究人员将符合以下条件的成人患者随机分配至静脉输注 (静注) 维生素 C (剂量为 50 mg/kg) 或配对照安慰剂组, 给药方案为每 6 h 1 次, 至 96 h, 入组条件: 入住重症监护病房 (intensive care unit, ICU) 不超过 24 h, 经证实或疑似感染为主要诊断, 正接受血管升压药治疗。主要评价指标为 28 d 内死亡或持续器官功能不全 (定义为使用血管升压药、有创机械通气、新使用肾脏替代治疗) 组成的复合指标。结果显示, 总共有 872 例患者被随机分组 (维生素 C 组 435 例, 安慰剂组 437 例)。维生素 C 组和安慰剂组分别有 44.5% (191/429) 和 38.5% (167/434) 患者发生主要结局事件 [风险比 (hazard ratio, *HR*) = 1.21, 95% 可信区间 (95% confidence interval, 95% *CI*) 为 1.04 ~ 1.40; *P* = 0.01]。28 d 时, 维生素 C 组和安慰剂组分别有 35.4% (152/429) 和 31.6% (137/434) 患者死亡 (*HR* = 1.17, 95% *CI* 为 0.98 ~ 1.40), 分别有 9.1% (39/429) 和 6.9% (30/434) 患者存在持续器官功能不全 (*HR* = 1.30, 95% *CI* 为 0.83 ~ 2.05)。在器官功能不全评分、生物标志物、6 个月生存率、健康相关生活质量、3 级急性肾损伤、低血糖发作等指标方面, 两组间结果相似。维生素 C 组有 1 例患者发生严重低血糖发作, 1 例发生严重过敏事件。研究人员据此得出结论: ICU 中正接受血管升压药治疗的脓毒症成人患者中, 与使用安慰剂相比, 接受静注维生素 C 治疗的患者 28 d 内死亡或持续器官功能不全风险较高。

罗红敏, 编译自《N Engl J Med》, 2022, 386: 2387–2398