

• 论著 •

微小 RNA-145-5p 在低氧诱导人肺泡上皮细胞焦亡中的作用及机制

袁润奇¹ 郭俊妙¹ 梁珍婷¹ 郑永信¹ 黄勇波¹ 徐永昊¹ 毛璞² 单靖岚²¹ 广州医科大学附属第一医院重症医学科, 广东广州 510000; ² 广州医科大学附属第一医院感染管理科, 广东广州 510000

通信作者: 单靖岚, Email: isabels@126.com

【摘要】 目的 阐明微小 RNA-145-5p (miR-145-5p) 在低氧诱导人肺泡上皮细胞焦亡中的作用及机制。**方法** 体外培养人肺泡上皮细胞株 BEAS-2B, 取对数生长期 BEAS-2B 细胞常规培养至 80% 融合度后用于实验。① 在 1% O₂ 的低氧条件下培养 BEAS-2B 细胞, 并设常氧对照组。采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测培养 24 h 细胞中焦亡标志蛋白 [NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3), Gasdermin D N 端结构域 (GSDMD-N) 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1)] 的表达; 采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测培养 6 h 和 12 h 细胞中 miR-145-5p 表达。② 在常氧条件下转染 30 nmol/L miR-145-5p 模拟物 (miR-145-5p mimic) 过表达 miR-145-5p, 在低氧条件转染 30 nmol/L miR-145-5p 抑制物 (miR-145-5p inhibitor) 抑制 miR-145-5p 表达, 并分别设对照组和阴性对照组。细胞培养 24 h 后, 采用 Western blotting 检测细胞中焦亡标志蛋白及核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 表达; 应用流式细胞仪检测细胞中活性氧 (ROS) 水平; 通过 miR 靶基因预测软件 miRWalk 预测 miR-145-5p 的靶基因, 并采用 Western blotting 进行验证。③ 分别在低氧条件下转染 6.94 ng/μL 沉默信息调节因子 5 (Sirt5) 过表达质粒或加入 12.5 mmol/L ROS 抑制剂 N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) 进行预处理, 并分别设立空载体质粒组和 (或) 对照组。细胞培养 24 h 后, 采用 Western blotting 检测细胞中 Sirt5、Nrf2 和焦亡标志蛋白表达; 应用流式细胞仪检测细胞中 ROS 水平。**结果** ① 与常氧对照组相比, 低氧 24 h 组细胞中焦亡标志蛋白表达水平显著升高, 证明低氧可诱导 BEAS-2B 细胞焦亡。随低氧诱导时间延长, 细胞中 miR-145-5p 表达水平逐渐升高, 表明低氧可引起 miR-145-5p 表达水平升高。② 常氧条件下, 与对照组和阴性对照组相比, miR-145-5p mimic 组细胞中焦亡标志蛋白表达水平显著升高 [NLRP3 蛋白 (NLRP3/β-actin): 1.58 ± 0.07 比 1.00 ± 0.01、0.98 ± 0.07, GSDMD-N 蛋白 (GSDMD-N/β-actin): 1.71 ± 0.03 比 1.01 ± 0.01、0.85 ± 0.03, caspase-1 蛋白 (caspase-1/β-actin): 2.33 ± 0.04 比 1.01 ± 0.01、1.05 ± 0.04, 均 $P < 0.05$], Nrf2 蛋白表达水平显著降低 (Nrf2/β-actin: 0.79 ± 0.03 比 1.00 ± 0.01、1.03 ± 0.04, 均 $P < 0.05$), ROS 水平显著升高 (荧光强度: 1.74 ± 0.03 比 1.00 ± 0.01、0.92 ± 0.03, 均 $P < 0.05$); 低氧条件下, 与对照组和阴性对照组相比, miR-145-5p inhibitor 组细胞中焦亡标志蛋白表达水平显著降低 [NLRP3 蛋白 (NLRP3/β-actin): 0.21 ± 0.04 比 1.70 ± 0.02、1.63 ± 0.04, GSDMD-N 蛋白 (GSDMD-N/β-actin): 1.32 ± 0.02 比 2.51 ± 0.02、2.72 ± 0.03, caspase-1 蛋白 (caspase-1/β-actin): 0.56 ± 0.01 比 2.77 ± 0.02、3.12 ± 0.03, 均 $P < 0.05$], Nrf2 蛋白表达水平显著升高 (Nrf2/β-actin: 1.57 ± 0.04 比 1.22 ± 0.01、1.28 ± 0.04, 均 $P < 0.05$), ROS 水平显著下降 (荧光强度: 0.64 ± 0.05 比 1.87 ± 0.04、1.70 ± 0.07, 均 $P < 0.05$)。表明 miR-145-5p 可促进细胞焦亡。miRWalk 预测结果显示, Sirt5 的 3' 非翻译区 (3'UTR) 与 miR-145-5p 存在碱基互补结合点; 常氧条件下, miR-145-5p mimic 组细胞中 Sirt5 蛋白表达水平较对照组和阴性对照组显著降低 (Sirt5/β-actin: 0.59 ± 0.03 比 1.00 ± 0.01、1.01 ± 0.03, 均 $P < 0.05$), 验证了 Sirt5 是 miR-145-5p 的靶基因。③ 转染 Sirt5 过表达质粒或在细胞中加入 ROS 抑制剂 NAC 均可以部分逆转细胞焦亡的发生, 且 Sirt5 过表达还能够上调 Nrf2 表达, 消除细胞内 ROS。**结论** 在人肺泡上皮细胞中, miR-145-5p 可通过靶向 Sirt5 下调 Nrf2 表达, 使 ROS 表达上调, 诱发细胞焦亡。

【关键词】 急性呼吸窘迫综合征; 肺泡上皮细胞; 微小 RNA; 活性氧; 细胞焦亡**基金项目:** 国家自然科学基金 (81770077)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240217-00134

Role and mechanism of microRNA-145-5p in hypoxia-induced pyroptosis of human alveolar epithelial cells

Yuan Runqi¹, Guo Junmiao¹, Liang Zhenting¹, Zheng Yongxin¹, Huang Yongbo¹, Xu Yonghao¹, Mao Pu², Shan Jinglan²¹ Department of Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, Guangdong, China; ² Department of Infection Management, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, Guangdong, China

Corresponding author: Shan Jinglan, Email: isabels@126.com

【Abstract】 Objective To elucidate the role and mechanism of microRNA-145-5p (miR-145-5p) in hypoxia-induced pyroptosis of human alveolar epithelial cells. **Methods** *In vitro*, human alveolar epithelial cell line BEAS-2B was cultured. Cells in the logarithmic growth phase were cultured to 80% confluence and then used for the experiment. ① BEAS-2B cells were cultured under 1% O₂ hypoxic condition, with a normoxic control group. Western blotting was employed to detect the expressions of pyroptosis marker proteins [NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), Gasdermin D

N-terminal domain (GSDMD-N), and caspase-1] in cells cultured for 24 hours. Real-time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of miR-145-5p in cells cultured for 6 hours and 12 hours. ② Cells were transfected with 30 nmol/L miR-145-5p mimic to overexpress miR-145-5p expression under normoxic condition or 30 nmol/L miR-145-5p inhibitor to suppress miR-145-5p expression under hypoxic condition. Control group and negative control group were respectively set up. After 24 hours of cell culture, Western blotting was used to detect the expressions of pyroptosis marker proteins and nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) in cells. Flow cytometry was applied to detect the level of reactive oxygen species (ROS) in cells. The target genes of miR-145-5p were predicted by miR target gene prediction software miRWalk and verified by Western blotting. ③ Under hypoxic condition, cells were transfected with 6.94 ng/ μ L silent information regulator 5 (Sirt5) overexpression plasmid or pretreated with 12.5 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (NAC) as an ROS inhibitor. The empty plasmid group and control group were set up. After 24 hours of cell culture, Western blotting was used to detect the expressions of Sirt5, Nrf2, and pyroptosis marker proteins in cells. Flow cytometry was used to detect the level of ROS in cells. **Results** ① Compared with the normoxic control group, the expression levels of pyroptosis marker proteins in the 24-hour hypoxia group was significantly increased, indicating that hypoxia could induce pyroptosis in BEAS-2B cells. The expression level of miR-145-5p in cells gradually increased with the extension of hypoxia induction time, indicating that hypoxia could cause the increase of miR-145-5p expression level. ② The expression levels of pyroptosis marker proteins in cells of miR-145-5p mimic group significantly increased under normoxic condition as compared with the control and negative control groups [NLRP3 protein (NLRP3/ β -actin): 1.58 ± 0.07 vs. 1.00 ± 0.01 , 0.98 ± 0.07 , GSDMD-N protein (GSDMD-N/ β -actin): 1.71 ± 0.03 vs. 1.01 ± 0.01 , 0.85 ± 0.03 , caspase-1 protein (caspase-1/ β -actin): 2.33 ± 0.04 vs. 1.01 ± 0.01 , 1.05 ± 0.04 , all $P < 0.05$], Nrf2 protein expression level was significantly decreased (Nrf2/ β -actin: 0.79 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.01 , 1.03 ± 0.04 , both $P < 0.05$), ROS level was significantly up-regulated (fluorescence intensity: 1.74 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.01 , 0.92 ± 0.03 , both $P < 0.05$). Under hypoxia condition, compared with control group and negative control group, the expression levels of pyroptosis marker proteins in miR-145-5p inhibitor group were significantly decreased [NLRP3 protein (NLRP3/ β -actin): 0.21 ± 0.04 vs. 1.70 ± 0.02 , 1.63 ± 0.04 ; GSDMD-N protein (GSDMD-N/ β -actin): 1.32 ± 0.02 vs. 2.51 ± 0.02 , 2.72 ± 0.03 ; caspase-1 protein (caspase-1/ β -actin): 0.56 ± 0.01 vs. 2.77 ± 0.02 , 3.12 ± 0.03 ; all $P < 0.05$], Nrf2 protein expression level was significantly increased (Nrf2/ β -actin: 1.57 ± 0.04 vs. 1.22 ± 0.01 , 1.28 ± 0.04 , both $P < 0.05$), ROS level was significantly down-regulated (fluorescence intensity: 0.64 ± 0.05 vs. 1.87 ± 0.04 , 1.70 ± 0.07 , both $P < 0.05$). The results indicated that miR-145-5p could promote cell pyrodeath. The predictive result of miRWalk showed that the 3' untranslated region (3'UTR) of Sirt5 had complementary base binding sites with miR-145-5p. The expression level of Sirt5 protein in cells of miR-145-5p mimic group was significantly lower than that of control group and negative control group under normoxic condition (Sirt5/ β -actin: 0.59 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.01 , 1.01 ± 0.03 , both $P < 0.05$), which verified that Sirt5 was the target gene of miR-145-5p. ③ The occurrence of pyrodeath could be partially reversed by transfection with Sirt5 overexpression plasmid or adding ROS inhibitor NAC into cells, and Sirt5 overexpression could also up-regulate Nrf2 expression and eliminate intracellular ROS. **Conclusion** In human alveolar epithelial cells, miR-145-5p can down-regulate Nrf2 by targeting Sirt5, thereby increasing ROS expression and inducing pyrodeath.

【Key words】 Acute respiratory distress syndrome; Alveolar epithelial cell; MicroRNA; Reactive oxygen species; Pyroptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770077)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240217-00134

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是一种临床预后较差的急性弥漫性肺损伤, 常见于重症监护病房 (intensive care unit, ICU), 住院病死率高达 35% ~ 46%^[1-2]。在 ARDS 中, 局部氧供不足可导致肺泡内皮/上皮细胞功能障碍, 是疾病进展的重要标志, 能够引起细胞层面的氧化应激, 表现为活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 在细胞内蓄积。ROS 可造成多种细胞死亡, 如细胞凋亡、细胞焦亡、铁死亡等, 加重肺损伤^[3]。鉴于 ROS 在 ARDS 发生和进展中的作用, 目前有研究表明抗氧化治疗可部分逆转 ARDS 中的肺损伤^[4-6]。因此, 抗氧化在 ARDS 治疗中具有巨大前景。

沉默信息调节因子 (silent information regulator, Sirt) 家族是一类辅酶 I (NAD⁺) 依赖的去乙酰化酶,

已被证明在多种细胞功能中发挥关键作用, 如蛋白质的翻译后修饰、能量代谢、DNA 损伤修复及抗氧化功能等, 其中 Sirt5 的功能主要是参与调节抗氧化剂和氧化还原信号通路^[7-8]。Sirt5 主要定位在线粒体基质中, 其调控细胞氧化应激水平的主要方式是通过上调核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2) 并激活下游的抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 以维持细胞的氧化平衡, 清除细胞内 ROS^[9-10]。研究表明, Sirt5 可被多种微小 RNA (microRNA, miR) 调控, miR-145-5p 则是被广泛关注的 miR 之一^[11]。miR-145-5p 是 5 号染色体上 miR-145 基因编码的 miR, 在多种缺氧性疾病中, miR-145-5p 表达均上调并造成组织损伤, 但在 ARDS 中的作用机制尚不明确, 因此 miR-145-5p

在 ARDS 中发挥的作用值得探究^[12-13]。本研究旨在通过细胞实验探究低氧下 miR-145-5p 靶向 Sirt5 促进肺泡上皮细胞焦亡的作用及机制,并通过干预实验进行验证,以期更加深入全面地认识 miR-145-5p 在 ARDS 发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及伦理:人肺泡上皮细胞株 BEAS-2B 购自美国 ATCC 公司。经广州医科大学附属第一医院科研项目审查伦理委员会审查,本研究符合免除伦理审查要求(审批号: KYLL-MS-011-01-FJ02)。

1.2 细胞培养及细胞低氧模型的建立:将复苏后的 BEAS-2B 细胞培养于含 10% 胎牛血清和青-链霉素双抗的完全培养基中,并置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱内进行细胞传代。取对数生长期 BEAS-2B 细胞常规培养至 80% 融合度后,放入 37 °C 含 94% N₂、5% CO₂ 和 1% O₂ 的培养箱内低氧培养 24 h。

1.3 细胞转染:按照 Lipofectamine[®] 2000 转染试剂说明书,将 30 nmol/L miR-145-5p 的模拟物(miR-145-5p mimic)、抑制物(miR-145-5p inhibitor)及其阴性对照(normal control, NC)的模拟物(NC mimic)、抑制物(NC inhibitor)转染至 BEAS-2B 细胞;将 6.94 ng/μL Sirt5 过表达质粒及空载体质粒转染至 BEAS-2B 细胞。

1.4 细胞分组及处理:① 将 BEAS-2B 细胞分为常氧对照组和低氧组:低氧组细胞置于含 1% O₂、94% N₂ 和 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中低氧培养;常氧对照组置于含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中常氧培养。② 将 BEAS-2B 细胞分为常氧对照组、NC mimic+常氧组、miR-145-5p mimic+常氧组、低氧对照组、NC inhibitor+低氧组、miR-145-5p inhibitor+低氧组、NC mimic+常氧组和 miR-145-5p mimic+常氧组转染 30 nmol/L NC mimic 或 miR-145-5p mimic 后常氧培养 24 h;NC inhibitor+低氧组和 miR-145-5p inhibitor+低氧组转染 30 nmol/L NC inhibitor 或 miR-145-5p inhibitor 后低氧培养 24 h。③ 将 BEAS-2B 细胞分为低氧对照组、空载体质粒+低氧组、Sirt5 过表达质粒+低氧组:空载体质粒+低氧组和 Sirt5 过表达质粒+低氧组转染 6.94 ng/μL 空载体质粒或 Sirt5 过表达质粒后低氧培养 24 h。④ 将 BEAS-2B 细胞分为低氧对照组、N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-cysteine, NAC)+低氧组:NAC+低氧组用 12.5 mmol/L ROS 抑制剂 NAC 干预 12 h 后低氧培养 24 h。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 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-145-5p 表达:提取 BEAS-2B 细胞中总 miR,定量并稀释至 5 ng/μL;将总 miR 反转录成 cDNA 后稀释 30 倍,取 3 μL 进行 PCR,扩增反应条件:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 5 s,56 °C 退火/延伸 15 s,40 个循环。完成反应后在软件中生成循环曲线及循环阈值(cycle threshold, CT),以 U6 为内参,按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 miR-145-5p 的表达水平。

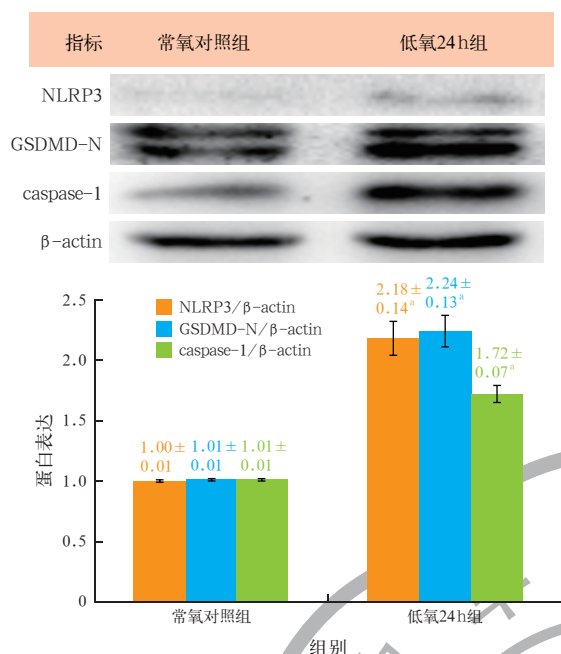
1.5.2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测蛋白表达:提取 BEAS-2B 细胞蛋白并定量;在聚丙烯酰胺凝胶中电泳后电转移至硝酸纤维素膜;将膜放入 5% 脱脂牛奶,室温封闭 1 h;洗膜后放入 NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、Gasdermin D N 端结构域(Gasdermin D N-terminal domain, GSDMD-N)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1(caspase-1)、Sirt5、Nrf2 抗体(均 1:1 000 稀释)或 β-肌动蛋白(β-actin)抗体(1:5 000 稀释),4 °C 孵育过夜;次日洗膜后,将膜放入辣根酶标记的二抗(1:5 000 稀释),室温振荡孵育 1 h。使用混合发光液曝光显色,放入凝胶成像仪成像,应用 Image J 软件计算蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参 β-actin 的灰度值比值代表目的蛋白表达量。

1.5.3 细胞 ROS 检测:用无血清培养液稀释 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)至终浓度为 10 μmol/L,并加入 BEAS-2B 细胞中,置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中孵育 30 min;待 DCFH-DA 与细胞充分接触后,用无血清细胞培养液洗涤细胞;立即于倒置荧光显微镜下观察并拍照记录,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)重悬后,应用流式细胞仪检测 ROS 荧光强度。

1.6 统计学分析:使用 GraphPad Prism 9.0 软件对实验数据进行统计分析。计量资料均符合正态分布,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;方差齐用最小显著差异法(LSD),方差不齐用 Tamhane 检验或秩和检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧对 BEAS-2B 细胞焦亡的影响(图 1):低氧 24 h 组细胞中焦亡标志蛋白 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 的表达水平均较常氧对照组显著升高(均 *P* < 0.05)。证明低氧刺激可以诱导 BEAS-2B 细胞发生焦亡。

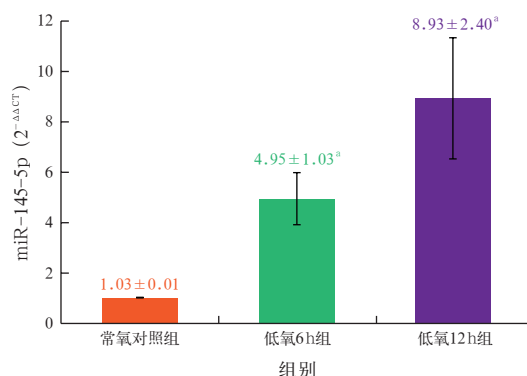


注: Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, BEAS-2B 细胞为人肺泡上皮细胞株, NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3, GSDMD-N 为 Gasdermin D N 端结构域, caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, β -actin 为 β -肌动蛋白; 与常氧对照组比较, ^a $P < 0.05$

图 1 Western blotting 检测两组 BEAS-2B 细胞中焦亡标志蛋白表达

2.2 低氧对 BEAS-2B 细胞中 miR-145-5p 表达的影响(图 2): 与常氧对照组相比, 低氧 6 h 和 12 h 组细胞中 miR-145-5p 表达水平显著升高(均 $P < 0.05$)。表明低氧可引起 miR-145-5p 表达上调。

2.3 miR-145-5p 对 BEAS-2B 细胞焦亡的影响(图 3): 常氧条件下, miR-145-5p mimic 组细胞中焦亡标志蛋白 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 表达水平均较对照组和 NC mimic 组显著升高(均 $P < 0.05$), 而对照组与 NC mimic 组差异无统计学意义; 低氧条件下,



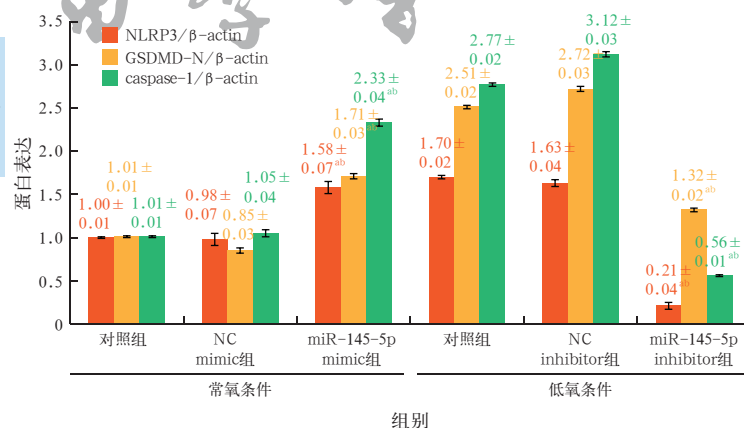
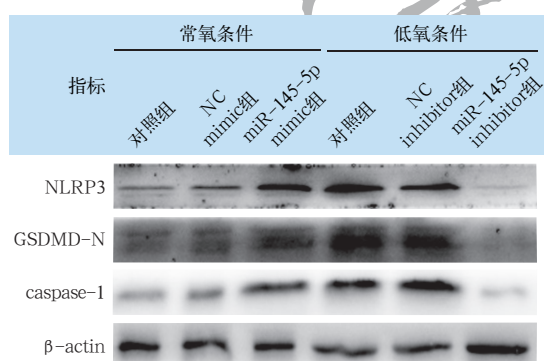
注: BEAS-2B 细胞为人肺泡上皮细胞株, miR-145-5p 为微小 RNA-145-5p; 与常氧对照组比较, ^a $P < 0.05$

图 2 各组 BEAS-2B 细胞中 miR-145-5p 表达比较

miR-145-5p inhibitor 组细胞中 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 蛋白表达水平较对照组和 NC inhibitor 组显著降低(均 $P < 0.05$), 而对照组与 NC inhibitor 组差异无统计学意义。表明 miR-145-5p 可促进细胞焦亡。

2.4 miR-145-5p 靶向调控 Sirt5: miRWalk 预测结果显示, Sirt5 的 3' 非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)与 miR-145-5p 存在碱基互补结合点位。常氧条件下, miR-145-5p mimic 组 Sirt5 蛋白表达水平较对照组和 NC mimic 组显著降低(均 $P < 0.05$), 而对照组与 NC mimic 组差异无统计学意义(图 4)。表明 miR-145-5p 可以靶向调控 Sirt5。

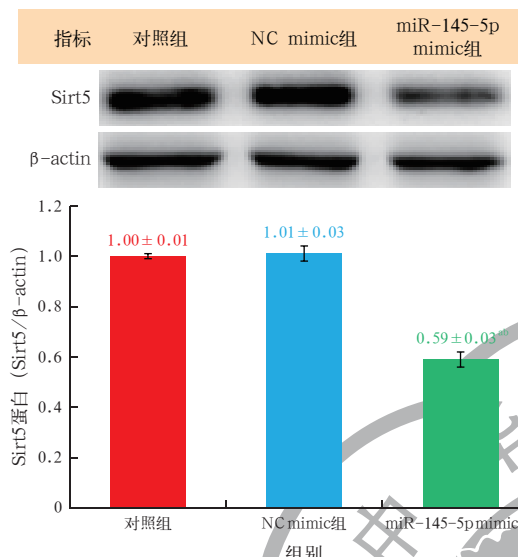
2.5 miR-145-5p 对 BEAS-2B 细胞中 Nrf2、ROS 表达的影响(图 5 ~ 7): 常氧条件下, miR-145-5p mimic 组细胞中 Nrf 蛋白表达水平均较对照组和 NC mimic 组显著降低, ROS 水平显著升高(均 $P < 0.05$), 而对照组与 NC mimic 组差异无统计学意义; 低氧条件下, miR-145-5p inhibitor 组细胞中 Nrf2 蛋白表达水平较



注: Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, BEAS-2B 细胞为人肺泡上皮细胞株, NC 为阴性对照, mimic 为模拟物, miR-145-5p 为微小 RNA-145-5p, inhibitor 为抑制物, NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3, GSDMD-N 为 Gasdermin D N 端结构域, caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, β -actin 为 β -肌动蛋白; 与相同条件下对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与相同条件下 NC 组比较, ^b $P < 0.05$

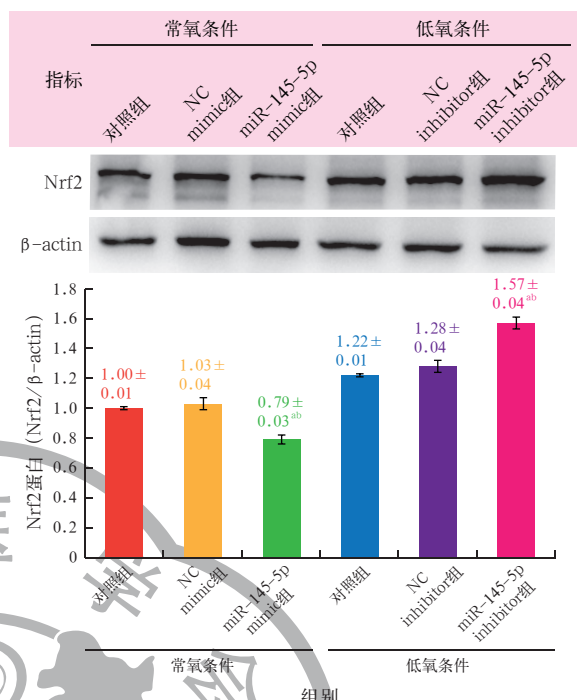
图 3 Western blotting 检测各组不同培养条件下 BEAS-2B 细胞中焦亡标志蛋白表达

对照组和 NC inhibitor 组显著升高,ROS 水平显著降低(均 $P < 0.05$),而对照组与 NC inhibitor 组差异无统计学意义。表明 miR-145-5p 可调控 Nrf2、ROS 表达。



注: Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, BEAS-2B 细胞为人肺泡上皮细胞株, Sirt5 为沉默信息调节因子 5, NC 为阴性对照, mimic 为模拟物, miR-145-5p 为微小 RNA-145-5p, β-actin 为 β-肌动蛋白; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 NC mimic 组比较, ^b $P < 0.05$

图 4 Western blotting 检测各组常氧条件下 BEAS-2B 细胞中 Sirt5 蛋白表达



注: Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, BEAS-2B 细胞为人肺泡上皮细胞株, Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, NC 为阴性对照, mimic 为模拟物, miR-145-5p 为微小 RNA-145-5p, inhibitor 为抑制物, β-actin 为 β-肌动蛋白; 与相同条件下对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与相同条件下 NC 组比较, ^b $P < 0.05$

图 5 Western blotting 检测各组不同培养条件下 BEAS-2B 细胞中 Nrf2 蛋白表达

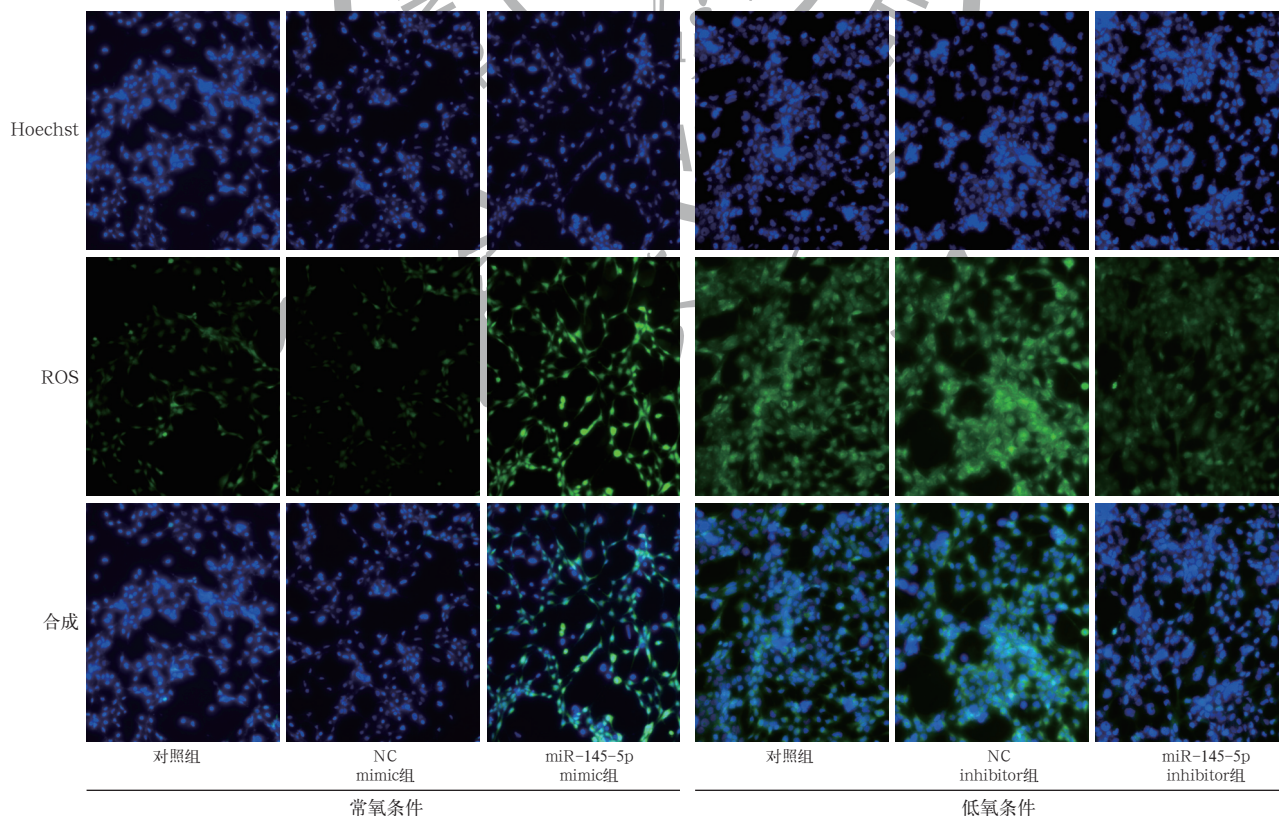
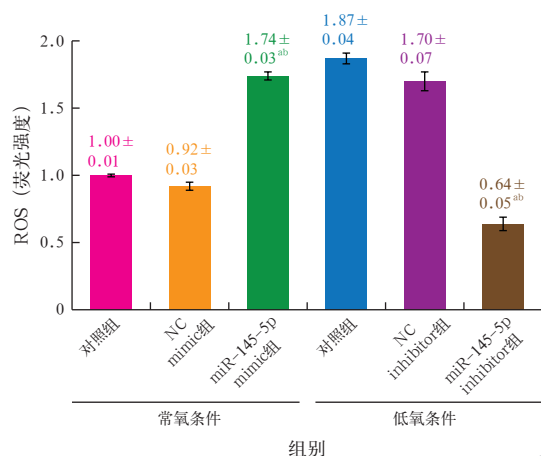


图 6 倒置荧光显微镜下观察各组不同培养条件下人肺泡上皮细胞株 (BEAS-2B 细胞) 中活性氧 (ROS) 的表达。在常氧条件下, 微小 RNA-145-5p (miR-145-5p) 模拟物 (mimic) 组 ROS 荧光强度较对照组和阴性对照 (NC) mimic 组显著增强; 在低氧条件下, miR-145-5p 抑制物 (inhibitor) 组 ROS 荧光强度较对照组和 NC inhibitor 组显著减弱。Hoechst 染色。低倍放大



注: BEAS-2B 细胞为人肺泡上皮细胞株, ROS 为活性氧, NC 为阴性对照, mimic 为模拟物, miR-145-5p 为微小 RNA-145-5p, inhibitor 为抑制物;与相同条件下对照组比较, ^a $P < 0.05$;与相同条件下 NC 组比较, ^b $P < 0.05$

图 7 各组不同培养条件下 BEAS-2B 细胞中 ROS 水平比较

2.6 过表达 Sirt5 预处理对低氧诱导 BEAS-2B 细胞中焦亡标志蛋白、Nrf2 及 ROS 表达的影响(表 1): Sirt5 过表达质粒+低氧组细胞中 Sirt5、Nrf2 蛋白表达水平较低氧对照组及空载体质粒+低氧组显著升高, 焦亡标志蛋白 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 表达及 ROS 水平均显著降低(均 $P < 0.05$)。表明过表达 Sirt5 可以上调 Nrf2 表达, 消除细胞内 ROS, 并部分逆转细胞焦亡的发生。

表 1 各组 BEAS-2B 细胞中 Sirt5、Nrf2、焦亡标志蛋白及 ROS 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (孔)	Sirt5 蛋白 (Sirt5/β-actin)	Nrf2 蛋白 (Nrf2/β-actin)	NLRP3 蛋白 (NLRP3/β-actin)
低氧对照组	3	1.00 ± 0.02	0.99 ± 0.02	1.00 ± 0.01
空载体质粒+ 低氧组	3	1.09 ± 0.01	1.07 ± 0.06	0.98 ± 0.04
Sirt5 过表达 质粒+低氧组	3	4.59 ± 0.03 ^{ab}	2.02 ± 0.06 ^{ab}	0.74 ± 0.04 ^{ab}

组别	孔数 (孔)	GSDMD-N 蛋白 (GSDMD-N/β-actin)	caspase-1 蛋白 (caspase-1/β-actin)	ROS (荧光强度)
低氧对照组	3	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01
空载体质粒+ 低氧组	3	0.85 ± 0.04	0.85 ± 0.03	1.01 ± 0.06
Sirt5 过表达 质粒+低氧组	3	0.50 ± 0.04 ^{ab}	0.43 ± 0.02 ^{ab}	0.57 ± 0.06 ^{ab}

注: BEAS-2B 细胞为人肺泡上皮细胞株, Sirt5 为沉默信息调节因子 5, Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, ROS 为活性氧, NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3, GSDMD-N 为 Gasdermin D N 端结构域, caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, β-actin 为 β-肌动蛋白;与低氧对照组比较, ^a $P < 0.05$;与空载体质粒+低氧组比较, ^b $P < 0.05$

2.7 NAC 预处理对低氧诱导 BEAS-2B 细胞中焦亡标志蛋白及 ROS 表达的影响(表 2): NAC+低氧组细胞中焦亡标志蛋白 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 表

达及 ROS 水平较低氧对照组显著降低(均 $P < 0.05$)。表明 ROS 抑制剂 NAC 可以部分逆转细胞焦亡的发生。

表 2 两组 BEAS-2B 细胞中焦亡标志蛋白及 ROS 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (孔)	NLRP3 蛋白 (NLRP3/β-actin)	GSDMD-N 蛋白 (GSDMD-N/β-actin)
低氧对照组	3	1.00 ± 0.01	1.01 ± 0.01
NAC+低氧组	3	0.72 ± 0.06 ^a	0.44 ± 0.03 ^a

组别	孔数 (孔)	caspase-1 蛋白 (caspase-1/β-actin)	ROS (荧光强度)
低氧对照组	3	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.01
NAC+低氧组	3	0.29 ± 0.04 ^a	0.68 ± 0.05 ^a

注: BEAS-2B 细胞为人肺泡上皮细胞株, ROS 为活性氧, NAC 为 N-乙酰-L-半胱氨酸, NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3, GSDMD-N 为 Gasdermin D N 端结构域, caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, β-actin 为 β-肌动蛋白;与低氧对照组比较, ^a $P < 0.05$

3 讨论

ARDS 的发生发展往往伴随炎症, 炎症是导致组织缺氧、产生 ROS 的主要原因之一。Beck-Schimmer 等^[14]报道, 在发生炎症的大鼠肺组织中, 中性粒细胞和巨噬细胞与肺上皮细胞的黏附增加, 这些白细胞浸润会消耗炎症组织的氧气, 使 ROS 大量蓄积; Fröhlich 等^[15]发现, 炎症会导致水肿和微血栓形成, 也促使组织缺氧。低氧会促使组织产生大量 ROS, ROS 主要来源于线粒体中的电子传递链, 其机制是膜 O_2 水平影响线粒体复合物结构, 增加从泛半醌到 O_2 的电子转移, 从而增加 ROS 向细胞质释放^[14, 16]。ROS 在细胞内的蓄积可诱导多种细胞死亡发生, 包括细胞焦亡、细胞凋亡、铁死亡等^[15, 17]。本研究观察到低氧培养肺泡上皮细胞 24 h 后, 细胞内 ROS 水平显著升高, 细胞焦亡现象也随之发生; 使用 ROS 抑制剂 NAC 预处理后, 细胞内 ROS 水平被抑制, 同时也缓解了细胞焦亡的发生。

低氧 miR 是一类细胞低氧期间表达量发生变化的 miR, 被证明与多种疾病的低氧和组织损伤相关, 包括心肌梗死、慢性心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病等^[18-20]。作为低氧 miR 之一, miR-145-5p 在低氧条件下的表达上调, 这是由低氧诱导因子-1α (hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α) 介导的^[21]。HIF-1α 是调节细胞缺氧反应的核心蛋白, 在低氧条件下表达上调^[22]。Blick 等^[16]在 miR-145 启动子区域中鉴定出两个 HIF 反应元件, 证明 HIF-1α 表达上调可使 miR-145 表达上调; 使用小干扰 RNA 敲低 HIF-1α 后, miR-145 在低氧条件下的表达也相应降低, 这也

印证了 miR-145 的低氧诱导依赖于 HIF-1 α 。在本研究中, miR-145-5p 在低氧条件下表达上调,有可能是通过 HIF-1 α 表达上调引起的。

Sirt5 具有抗氧化防御的功能,通过对其他蛋白的翻译后修饰实现,也可以通过调控 Nrf2 表达实现。Nrf2 是一种细胞保护性核转录因子,在细胞发生氧化应激时从细胞质移位到细胞核,与抗氧化反应基因启动子区域的抗氧化反应元件结合,启动一系列抗氧化剂的转录,从而降低细胞内 ROS 水平^[10, 23]。Sun 等^[24]发现, Sirt5 可正向调控 Nrf2 表达,且 Sirt5 过表达可促进 Nrf2 入核激活;使用 Nrf2 抑制剂后, Sirt5 对 ROS 的下调作用被逆转。在非小细胞肺癌中,敲除 Sirt5 可使 Nrf2 及其下游靶基因表达水平降低^[25]。本研究中 Sirt5 被 miR-145-5p 靶向表达水平降低时, Nrf2 蛋白表达水平也降低, ROS 水平随之增高;而 Sirt5 过表达上调了 Nrf2 蛋白表达水平, ROS 水平随之降低。表明 Sirt5 可通过调控 Nrf2 表达,影响细胞内 ROS 水平,与其他研究结果一致。然而,由于 Sirt5 位于线粒体基质,其在转录水平调控 Nrf2 的机制尚不明确。一种假说认为, Sirt5 可移位至细胞核,作用于 Sirt 家族另一个成员 Sirt3,促进 Sirt3 核移位后,调控 Nrf2 表达^[26],但仍有待进一步研究。

综上所述,本研究证实低氧诱导的 miR-145-5p 上调可促进人肺泡上皮细胞焦亡;应用靶基因预测软件预测了 miR-145-5p 的靶基因是 Sirt5,并得到了 Western blotting 的验证;通过 Sirt5 过表达及抑制 ROS 的方法证实了 miR-145-5p 可通过 Sirt5/Nrf2 通路促进低氧诱导的人肺泡上皮细胞焦亡。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 傅莹, 林锦乐, 张文武, 等. ARDS 生物标志物的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29 (7): 656-661. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.07.018.
- [2] Fan E, Brodie D, Slutsky AS. ARDS 的诊疗新进展[J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30 (3): 203.
- [3] 郑永信, 黄勇波, 刘晓青, 等. 氧化应激反应在流感病毒相关 ARDS 中作用的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (10): 1272-1276. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210609-00854.
- [4] de Vasconcelos NM, Lamkanfi M. Recent insights on inflammasomes, gasdermin pores, and pyroptosis[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020, 12 (5): a036392. DOI: 10.1101/cshperspect.a036392.
- [5] Tynl K, Li FY, Wilson JX. Septic impairment of capillary blood flow requires nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase but not nitric oxide synthase and is rapidly reversed by ascorbate through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism[J]. Crit Care Med, 2008, 36 (8): 2355-2362. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31818024f6.
- [6] Dong H, Xia YY, Jin SL, et al. Nrf2 attenuates ferroptosis-mediated IIR-ALI by modulating TERT and SLC7A11[J]. Cell Death Dis, 2021, 12 (11): 1027. DOI: 10.1038/s41419-021-04307-1.
- [7] Bae YS, Lee JH, Choi SH, et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2[J]. Circ Res, 2009, 104 (2): 210-218, 21p following 218. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181040.
- [8] Bae YS, Oh H, Rhee SG, et al. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling[J]. Mol Cells, 2011, 32 (6): 491-509. DOI: 10.1007/s10059-011-0276-3.
- [9] 李嘉柔, 王洪亮. Keap1/Nrf2/ARE 信号通路可通过调节氧化应激缓解脓毒症过程中的细胞铁死亡[J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (7): 881-884. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210130-00180.
- [10] Wu YT, Wu SB, Wei YH. Roles of sirtuins in the regulation of antioxidant defense and bioenergetic function of mitochondria under oxidative stress[J]. Free Radic Res, 2014, 48 (9): 1070-1084. DOI: 10.3109/10715762.2014.920956.
- [11] Li Y, Gao M, Yin LH, et al. Dioscin ameliorates methotrexate-induced liver and kidney damages via adjusting miRNA-145-5p-mediated oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 169: 99-109. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.035.
- [12] Liang FY, Wang X, Ow SH, et al. Sirtuin 5 is anti-apoptotic and anti-oxidative in cultured SH-EP neuroblastoma cells[J]. Neurotox Res, 2017, 31 (1): 63-76. DOI: 10.1007/s12640-016-9664-y.
- [13] Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018, 1865 (5): 721-733. DOI: 10.1016/j.bbamer.2018.02.010.
- [14] Beck-Schimmer B, Schimmer RC, Madjdpour C, et al. Hypoxia mediates increased neutrophil and macrophage adhesiveness to alveolar epithelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25 (6): 780-787. DOI: 10.1165/ajrcmb.25.6.4433.
- [15] Fröhlich S, Boylan J, McLoughlin P. Hypoxia-induced inflammation in the lung: a potential therapeutic target in acute lung injury? [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48 (3): 271-279. DOI: 10.1165/ajrcmb.2012-0137TR.
- [16] Blick G, Ramachandran A, McCormick R, et al. Identification of a hypoxia-regulated miRNA signature in bladder cancer and a role for miR-145 in hypoxia-dependent apoptosis[J]. Br J Cancer, 2015, 113 (4): 634-644. DOI: 10.1038/bjc.2015.203.
- [17] Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95 (20): 11715-11720. DOI: 10.1073/pnas.95.20.11715.
- [18] Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, et al. Nrf2/Keap1/ARE signaling: towards specific regulation[J]. Life Sci, 2022, 291: 120111. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120111.
- [19] Ross K. miR equal than others: microRNA enhancement for cutaneous wound healing[J]. J Cell Physiol, 2021, 236 (12): 8050-8059. DOI: 10.1002/jcp.30485.
- [20] Bibby G, Krasniqi B, Reddy I, et al. Capturing the RNA castle: exploiting microRNA inhibition for wound healing[J]. FEBS J, 2022, 289 (17): 5137-5151. DOI: 10.1111/febs.16160.
- [21] Kilikevicius A, Meister G, Corey DR. Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50 (2): 617-634. DOI: 10.1093/nar/gkab1256.
- [22] Nicolas FE, Lopez-Gomollon S, Lopez-Martinez AF, et al. RNA silencing: recent developments on miRNAs[J]. Recent Pat DNA Gene Seq, 2009, 3 (2): 77-87. DOI: 10.2174/187221509788654197.
- [23] Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, et al. The role of sirtuins in antioxidant and redox signaling[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 28 (8): 643-661. DOI: 10.1089/ars.2017.7290.
- [24] Sun XD, Wang SH, Gai JD, et al. SIRT5 promotes cisplatin resistance in ovarian cancer by suppressing DNA damage in a ROS-dependent manner via regulation of the Nrf2/HO-1 pathway[J]. Front Oncol, 2019, 9: 754. DOI: 10.3389/fonc.2019.00754.
- [25] Zhou LS, Wang F, Sun RQ, et al. SIRT5 promotes IDH2 desuccinylation and G6PD dephosphorylation to enhance cellular antioxidant defense[J]. EMBO Rep, 2016, 17 (6): 811-822. DOI: 10.15252/embr.201541643.
- [26] Lin ZF, Xu HB, Wang JY, et al. SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441 (1): 191-195. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.033.

(收稿日期: 2024-02-17)
(责任编辑: 孙茜 李银平)