基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003590

miR-370-3p/SESN2 调控脂多糖诱导的小鼠肺泡上皮细胞凋亡的机制研究

武周游，李　婷，张腾伟，房巧燕，杨　刘，黎　巧
（湖南省妇幼保健院新生儿一科，长沙　410008）

【摘　要】**目的：**探讨 miR-370-3p/Sestrin2（SESN2）调控脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的小鼠肺泡上皮细胞（alveolar epithelial cells，AECs）凋亡的机制。**方法：**将 C57BL/6J 小鼠随机分为 LPS+anti-NC 组和 LPS + miR-370-3p 抑制剂（anti-miR-370-3p）组，每组 12 只。通过气管内注射 LPS（5 mg/kg）来诱导急性肺损伤（acute lung injury，ALI）。分别通过小鼠尾静脉注射 anti-miR-370-3p 或 anti-NC。MLE12 细胞随机分为对照组（Con+anti-NC）、Con+anti-miR-370-3p 组、LPS+anti-NC 组、LPS+anti-miR-370-3p 组、LPS+si-SESN2+anti-miR-370-3p 组。使用定量实时 PCR 分析肺组织或细胞中 miR-370-3p。通过测量线粒体形态学和线粒体膜电位考察 miR-370-3p 敲低对 LPS 诱导的线粒体功能障碍的保护作用。双荧光素酶报告分析证实了 miR-370-3p 和 SESN2 之间的靶向关系。**结果：**与 LPS+anti-NC 组相比，LPS+anti-miR-370-3p 组肺组织中 miR-370-3p 表达、丝氨酸苏氨酸激酶 3（receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3，RIPK3）、混合系列蛋白激酶样结构域（mixed lineage kinase domain-Like，MLKL）蛋白水平、肺部炎症评分明显降低（$P<0.05$），和肺组织中肺表面活性蛋白 C（surfactant protein C，SPC）蛋白水平明显增加（$P<0.001$）。与 LPS+anti-NC 组相比，LPS+anti-miR-370-3p 组 MLE12 细胞中 RIPK3、MLKL 蛋白表达、PI 阳性细胞百分比明显降低（$P<0.05$），并且线粒体片段化和线粒体膜电位明显增加（$P<0.05$）。miR-370-3p 对 SESN2-WT 报道基因的荧光素酶活性具有抑制作用。与 LPS+anti-miR-370-3p 组相比，LPS+si-SESN2+anti-miR-370-3p 组线粒体片段化和线粒体膜电位均明显降低（$P<0.05$）。**结论：**miR-370-3p/SESN2 轴通过介导线粒体断裂和损害线粒体功能促进 LPS 诱导的 ALI 期间 AECs 坏死性凋亡。

【关键词】miR-370-3p；Sestrin2；脂多糖；肺泡上皮细胞；坏死性凋亡
【中图分类号】R563　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2023-07-27

Mechanism of miR-370-3p/SESN2 regulating lipopolysaccharide-induced apoptosis of mouse alveolar epithelial cells

Wu Zhouyou，Li Ting，Zhang Tengwei，Fang Qiaoyan，Yang Liu，Li Qiao
（*First Department of Neonatology，Hunan Provincial Maternal and Child Health Care Hospital*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the mechanism of miR-370-3p/Sestrin2（SESN2）regulating the apoptosis of mouse alveolar epithelial cells（AECs）induced by lipopolysaccharide（LPS）. ***Methods***：C57BL/6J mice were randomly divided into LPS+anti-NC group and LPS+miR-370-3p inhibitor（anti-miR-370-3p）group，with 12 mice in each group. LPS（5 mg/kg）was given by intratracheal injection to induce acute lung injury（ALI），and anti-miR-370-3p or anti-NC was injected via the caudal vein of mice. MLE12 cells were randomly divided into control group（Con+anti-NC），Con+anti-miR-370-3p group，LPS+anti-NC group，LPS+anti-miR-370-3p group，and LPS+si-SESN2+anti-miR-370-3p group. Quantitative real-time PCR was used to analyze miR-370-3p in lung tissue or cells. Mitochondrial morphology and mitochondrial membrane potential were measured to investigate the protective effect of miR-370-3p knockdown against LPS-induced mitochondrial dysfunction. Dual-luciferase reporter assay confirmed the targeting relationship between miR-370-3p and SESN2. ***Results***：Compared with the LPS+anti-NC group，the LPS+anti-miR-370-3p group had significant reductions in the expression of miR-370-3p and the protein expression levels of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3（RIPK3）and mixed lineage kinase domain-like（MLKL）in lung tissue，as well as a significant reduction in lung inflammation score（$P<0.05$）and a significant increase in the protein expression level of surfactant protein C（SPC）in lung tissue（$P<0.001$）. Compared with the LPS+anti-NC group，the LPS+anti-miR-370-3p group had significant reductions in the protein expression levels of RIPK3 and MLKL in MLE12 cells and the percentage of PI-positive cells（$P<0.05$），as well as significant increases in mitochondrial fragmentation and mitochondrial membrane potential（$P<0.05$）. MiR-370-3p could inhibit the luciferase activity of SESN2-WT reporter gene. Compared with the LPS+anti-miR-370-3p group，the LPS+Si-SEN2+anti-miR-370-3p group had significant reductions in mitochondrial fragmentation and mitochondrial membrane potential（$P<0.05$）. ***Conclusion***：The miR-370-3p/SESN2 axis promotes the necrotizing apoptosis of AECs during ALI induced by LPS by mediating mitochondrial breakage and damaging mitochondrial function.

【**Key words**】miR-370-3p；Sestrin2；lipopolysaccharide；alveolar epithelial cells；necrotizing apoptosis

作者介绍：武周游，Email：spelling789@163.com，
研究方向：新生儿感染性疾病。

基金项目：湖南省卫生健康委员会科研资助项目（编号：202102168412）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240926.1043.024
（2024-09-27）

急性肺损伤（acute lung injury，ALI）/急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS）是一种威胁生命的临床疾病，其特征是弥漫性肺泡损伤、肺水肿和不受控制的炎症[1]。新冠肺炎导致的 ARDS 死亡人数前所未有，这突出表明 ARDS 的治疗仍然是一个挑战[2]。因此，迫切需要开发 ALI/ARDS 新的治疗靶点。肺泡-毛细血管屏障的破坏是 ALI 病理生理学的一个重要方面，其导致弥漫性肺泡上皮细胞（alveolar epithelial cells，AECs）损伤[3]。随后，受损的 AECs 释放损伤相关的分子模式来激活肺泡巨噬细胞，放大炎症反应，并加剧 ALI/ARDS[3]。因此，阐明 AECs 损伤的分子机制可能为 ALI 的治疗提供潜在策略。在 ALI 中已报道了几种形式的细胞死亡，如凋亡、焦亡、铁死亡、坏死和程序性坏死[4]。最近 1 项研究表明，在脂多糖（LPS）诱导的 ALI 小鼠中，程序性坏死是 AECs 死亡的主要原因[5]。然而，在 ALI 过程中引发 AECs 程序性坏死的机制尚不清楚。微小核糖核酸（MicroRNAs，miRNAs）是小的非编码核糖核酸分子，被认为是基因表达的内源性生理调节因子[6]。鉴于单个 miRNA 可能会改变复杂的细胞过程，包括细胞生长、凋亡、炎症免疫反应和细胞间相互作用，因此它们的异常表达可能与 ARDS 的发病机制有关。miR-370-3p 作为一种重要的 miRNA，它可能会改变复杂的细胞过程，如细胞生长、细胞周期、凋亡和入侵[7]。最近研究发现，脓毒症小鼠肺中 miR370-3p 过表达，并被提议作为脓毒症状态的生物标志物，其作用机制可能与细胞线粒体功能障碍相关[8]。此外，miR-370-3p 还与 LPS 诱导的儿童肺炎肺损伤有关[9]。值得注意的是，线粒体功能障碍与 AECs 的程序性坏死密切相关[10]。因此，在目前的研究中，旨在通过使用 ALI 动物模型来鉴定 miR-370-3p 是否参与 ALI 的程序性坏死，并试图了解 miR-370-3p 与线粒体功能之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

本研究中使用的成年雄性 C57BL/6J 小鼠（6 周龄，22~24 g）购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。所有小鼠饲养在湿度为 50%~60%、温度为 24 ~ 26 ℃且光照/黑暗周期为 12 h 的受控环境中。

将小鼠随机分成对照组和 LPS 组，每组 6 只。LPS 组小鼠用 1% 戊巴比妥钠（40 mg/kg，美国 Sigma 公司）进行麻醉，通过气管内注射 LPS（5 mg/kg，溶解在生理盐水中，来自大肠杆菌 O111：B4，美国 Sigma-Aldrich 公司）来诱导 ALI[11]。对照组小鼠气管内注射相同剂量的生理盐水。此外，为了考察 miR-370-3p 抑制对 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺的病理损伤影响，将小鼠随机分为 LPS+anti-NC 组和 LPS+miR-370-3p 抑制剂（anti-miR-370-3p）组，每组 12 只。LPS+anti-miR-370-3p 组小鼠尾静脉注射 anti-miR-370-3p（2 mg/kg，上海捷瑞生物工程有限公司），和 LPS+anti-NC 组小鼠给予相同量的 anti-NC。2 d 后，小鼠气管内注射 LPS（5 mg/kg），12 h 后处死小鼠。

1.2 组织病理学分析

小鼠右上肺固定在 4% 多聚甲醛中，然后包埋在石蜡中。将肺组织切成 3 μm 切片，苏木精-伊红（H&E）染色，在光学显微镜下观察形态学变化。肺损伤由 2 名经验丰富的研究者进行测量，按照损伤严重程度（有无出血、中性粒细胞浸润、透明膜、肺泡内碎片和中隔增厚）进行盲法评分，评分等级为 0~4 级[12]：0 分表示没有受伤；1 分<25% 损伤；2 分 25%~50% 损伤；3 分 50%~75% 损伤和 4 分>75% 损伤。将 2 个分数平均，得到最终的炎症分数。

1.3 细胞培养和处理

小鼠 AECs 系 MLE12 购自美国 ATCC，并在 37 ℃下在含有 2% 新生小牛血清的 DMEM/F12 培养基（美国 Gibco 公司）中培养。用 LPS 处理（5 μg/mL）刺激不同时间（0 h、6 h、12 h、24 h）诱导 AECs 损伤。为了抑制 miR-370-3p，用 miR-370-3p 抑制剂（10 nmol/L）处理 MLE12 细胞 24 h。

为了考察 si-SESN2 转染对 MLE12 细胞中 SESN2 蛋白表达的影响，将 MLE12 细胞分为：Con 组、si-NC 组和 si-SESN2 组。si-NC 组和 si-SESN2 组分别用对照 siRNA（si-NC）或 SESN2 siRNA（si-SESN2；均购自上海 GenePharma 有限公司）转染 MLE12 细胞 24 h。

为了探讨 miR-370-3p/SESN2 通路在 LPS 诱导线粒体损伤中的作用，将 MLE12 细胞随机分为对照组（Con+anti-NC）、Con+anti-miR-370-3p 组、LPS+anti-NC 组、LPS+anti-miR-370-3p 组、LPS+si-SESN2+anti-miR-370-3p 组。在 LPS 刺激前，各组用 Lipofectamine 2000 TM 试剂（美国 Invitrogen 公司）将 anti-NC、anti-miR-370-3p 或 si-SESN2 转染 MLE12 细胞 24 h，然后 LPS+anti-NC 组、LPS+anti-miR-370-3p 组、LPS+si-SESN2+anti-miR-370-3p 组加入 LPS 处理（5 μg/mL）处理 24 h，而 Con+anti-NC 组、Con+anti-miR-370-3p 组加入等量培养基处理 24 h。

1.4 免疫荧光染色

将肺组织切片脱蜡，用 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液透化，加热以回收抗原。在 37 ℃下用 3% H_2O_2 封闭内源过氧化物酶 10 min 后，用 5% 牛血清白蛋白（BSA，美国 Biofroxx 公司）封闭切片 1 h，然后在 4 ℃下与小鼠抗 MLKL 单克隆抗体（1∶100，美国 Proteintech 公司）和兔抗表面活性剂蛋白 C（SPC）多克隆抗体（1∶100，美国 ABclonal 公司）在 PBS 中孵育过夜。用 PBS 洗涤切片 3 次，并与绿色荧光 FITC 山羊抗兔 IgG（1∶400）在 PBS 中孵育 2 h，细胞核用 4’，6’-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI，北京 Solarbio 公司）染色，观察载玻片，并用荧光显微镜（日本 Nikon 公司）捕捉图像。

1.5 定量实时 PCR 分析

使用 RNeasy Mini 试剂盒（美国 QIAGEN 公司）从右肺组

织或细胞中提取总RNA样品。应用cDNA逆转录试剂盒（美国Invitrogen公司）合成cDNA。使用TB Green PCR Master Mix（日本Takara公司）在CFX96 Touch实时PCR检测系统（美国Bio-Rad公司）上检测基因的相对表达。反应条件如下：95 ℃预变性10 min，94 ℃变性15 s，60 ℃退火30 s，40个循环。使用标准的$2^{-\Delta\Delta CT}$方法计算相对mRNA表达，以U6作为内标。本研究中使用的引物序列如下：miR-370-3p（F）：5'-CAGGCAGGCAGTATCACTCA-3'；miR-370-3p（RT）：5'-AGCTCATATGGGTCCGACAG-3'，U6（F）：5'-TTCCAGCCTTCCTTCTTG-3'，U6(R)：5'-GGAGCCAGAGCAGTAATC-3'。

1.6 蛋白质印迹分析

通过蛋白质印迹分析从肺组织或MLE12细胞提取的蛋白质表达。将左上肺匀浆并在含有蛋白酶抑制剂苯基甲烷磺酰氟的RIPA缓冲液（北京Solarbio公司）中溶解。用BCA蛋白检测试剂盒（美国Thermo Fisher Scientific公司）测量蛋白浓度。将5倍样品缓冲液与蛋白质样品（1:4）混合，通过10%SDS-PAGE凝胶分离。转移到聚偏二氟乙烯膜（美国Millipore公司）后，室温下用5%脱脂牛奶封闭膜1 h，然后与针对丝氨酸苏氨酸激酶3（Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3，RIPK3）（1∶2 000，英国Abcam公司）、混合系列蛋白激酶样结构域（Mixed Lineage Kinase Domain-Like，MLKL）（1∶2 000，美国abclonal公司）、SESN2（1∶1 500，英国Abcam公司）、肺表面活性蛋白C（surfactant protein C，SPC）（1∶2 000，美国Protentech公司）、α微管蛋白（α-Tubulin）（1∶10 000，美国Santa Cruz公司）一抗在4 ℃孵育过夜。在室温下与过氧化物酶偶联的第二抗体（1:5 000，英国Abcam公司）孵育1 h后，通过ECL化学发光系统（美国Thermo Fisher公司）观察条带。

1.7 Hoechst 33342和PI染色

将MLE12细胞（1×10^{5}细胞/孔）铺在6孔培养板的盖玻片上，并进行指定的处理。将细胞与Hoechst 33342（1 μg/mL）和PI（5 μg/mL）（上海Beyotime公司）在37 ℃下孵育15 min。使用Eclipse Ni-U荧光显微镜（日本Nikon公司）捕捉荧光图像。

1.8 线粒体形态学

Mito-Tracker免疫染色观察线粒体形态。将24孔板中的MLE12细胞在室温下用4%多聚甲醛中固定15 min，用PBS洗涤3次，用100 nmol/L Mito-Tracker红CMXRos（上海Beyotime公司）孵育30 min。在荧光显微镜下获取图像。

1.9 线粒体膜电位的测量

使用JC-1分析试剂盒（上海Beyotime公司）测定线粒体膜电位变化。收获在48孔板中培养的MLE12细胞（1 × 10^{4}细胞/孔）。用PBS洗涤细胞，然后重悬于100 μL DMEM/F12培养基中，并与JC-1工作溶液（培养基与JC-1工作溶液的比例为1:1）一起在37 ℃黑暗中孵育20 min。使用荧光显微镜获得图像。用红-绿荧光比值评价线粒体膜电位的变化。将红/绿免疫信号转换成平均灰度强度，然后通过Image J软件分析以确定免疫荧光。

1.10 双荧光素酶报告基因分析

采用Targetscan搜索miR-370-3p的下游基因，并预测了miR-370-3p和SESN2结合位点。通过将含有miR-370-3p结合位点的SESN2-WT或MUT片段插入到pmirGLO载体（美国Promega公司）中，构建SESN2-野生型（WT）或SESN2-突变体（MUT）载体。使用Lipofectamine 2000试剂将SESN2-WT、SESN2-MUT、载体和miR-370-3p质粒共转染到MLE12中。24 h后，通过Nano-Glo双荧光素酶报告方法（美国Promega公司）测定荧光素酶活性。

1.11 统计学方法

采用SPSS 22.0进行统计分析。所有数据均呈正态分布，并采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）形式表达。2组之间的统计比较采用t检验；多组间比较采用方差分析，随后通过Bonferroni校正进行组间两两比较。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 LPS诱导肺和AECs中miR-370-3p表达上调

为了确定miR-370-3p在ALI期间是否发生变化，本课题组首先通过气管内注射LPS建立了一个广泛使用的ALI小鼠模型，并发现小鼠肺部炎症细胞浸润增加、肺泡隔增厚、出血和透明膜形成（图1A）。与对照组相比，LPS组ALI小鼠肺组织中miR-370-3p表达上调（t=15.840，P<0.001）（图1B）。此外，检测了LPS刺激下AECs中miR-370-3p表达。与体内结果一致，与对照组相比，LPS组AECs中miR-370-3p表达显著上调（t=18.020，P<0.001）（图1C）。

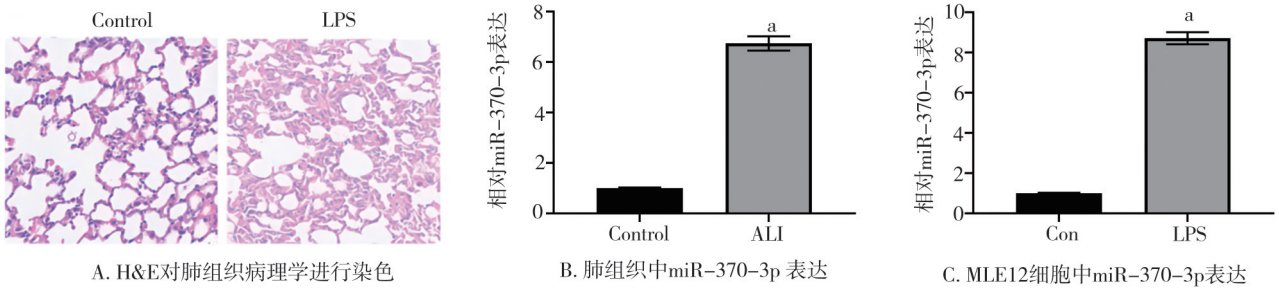
2.2 miR-370-3p的抑制减轻了LPS诱导的ALI小鼠肺的病理损伤和坏死性凋亡

为了进一步阐明抑制miR-370-3p对ALI的减轻作用，在LPS给药（2.5 mg/kg，i.t.）前1 d，C57BL/6J小鼠尾静脉注射miR-370-3p抑制剂（2 mg/kg）。与LPS+anti-NC组相比，LPS+anti-miR-370-3p组肺组织中miR-370-3p表达显著降低（t=22.430，P<0.001），并且肺部炎症评分显著降低（t=3.320，P=0.026），表现在肺中浸润的炎性细胞、肺泡萎陷和肺泡壁厚度减少（图2A~C）。

坏死性凋亡是一种程序性细胞死亡，是ALI中AECs死亡的主要方式。与LPS+anti-NC组相比，LPS+anti-miR-370-3p组肺组织中RIPK3、MLKL蛋白水平显著减少（t=8.460、t=9.520，均P<0.001），而SPC蛋白水平显著增加（t=3.950，P=0.012）（图2D）。为了进一步阐明miR-370-3p的抑制是否主要减轻ALI小鼠AECs的坏死性凋亡，使用免疫荧光检测SPC和MLKL的共定位。结果显示，在LPS+anti-miR-370-3p组中，SPC和MLKL蛋白在ALI小鼠的肺组织中共表达减少（图2E）。总之，这些数据表明miR-370-3p的抑制减轻了LPS诱导的ALI小鼠中AECs的坏死性凋亡。

2.3 miR-370-3p的抑制减轻体外LPS刺激下AECs的坏死性凋亡

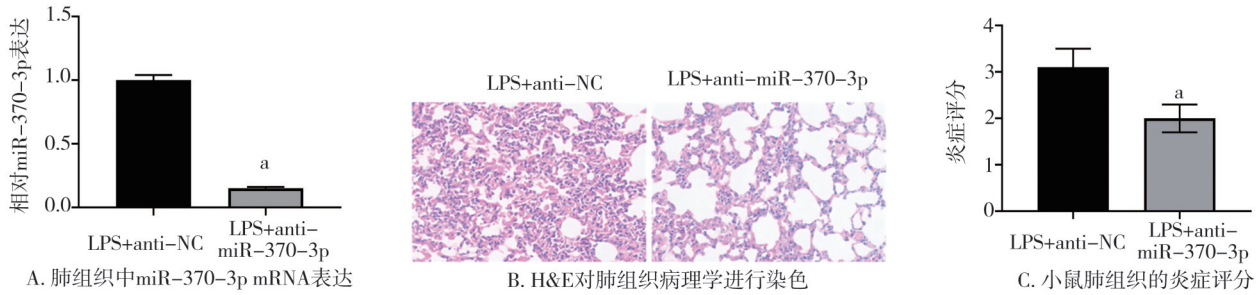
在MLE12细胞中LPS处理后，观察到RIPK3、MLKL以时间依赖性表达上调（F=135.260、F=150.840，均P<0.001）（图3A）。为了进一步研究LPS诱导的AECs死亡的性质，使用Hoechst 33342/PI染色来阐明细胞膜的完整性。本研究发现LPS刺激以时间依赖的方式诱导PI摄取（质膜完整性的丧失）（F=93.820，P<0.001）（图3B）。结果表明LPS诱导AECs坏死性凋亡。



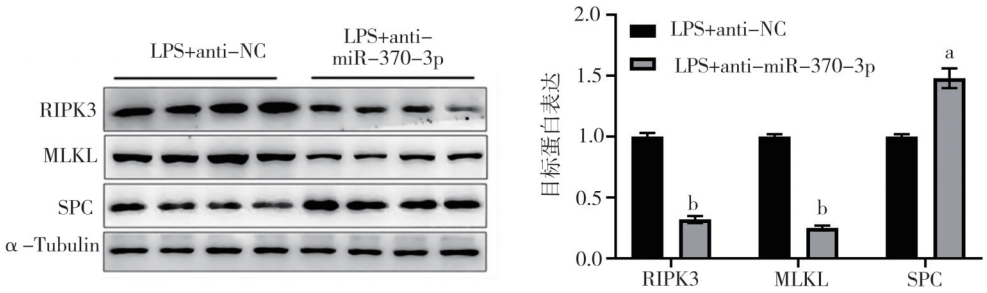
A. H&E对肺组织病理学进行染色　B. 肺组织中miR-370-3p 表达　C. MLE12细胞中miR-370-3p表达

注：a，与Control组或Con组相比，$P<0.001$

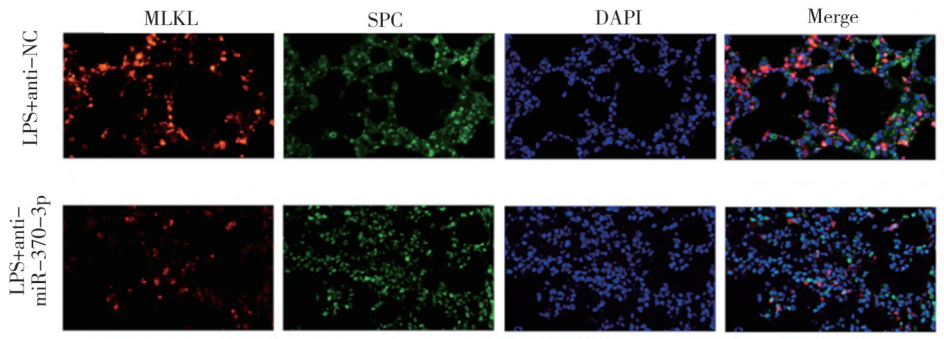
图1　LPS诱导肺和AECs中miR-370-3p表达上调



A. 肺组织中miR-370-3p mRNA表达　B. H&E对肺组织病理学进行染色　C. 小鼠肺组织的炎症评分



D. 蛋白质印迹法测定肺组织中RIPK3、MLKL和SPC蛋白水平



E. 免疫荧光检测SPC和MLKL的荧光强度（绿色：SPC，红色：MLKL）

注：a，与LPS+anti-NC组相比，$P<0.05$；b，与LPS+anti-NC组相比，$P<0.001$

图2　miR-370-3p的抑制减轻了LPS诱导的ALI小鼠肺的病理损伤和坏死性凋亡

为了进一步阐明抑制miR-370-3p是否会减轻AECs和ALI的坏死性凋亡，本课题组评估了在LPS刺激下miR-370-3p抑制剂对MLE12细胞的影响。用miR-370-3p抑制剂（10 nmol/L）预处理24 h后，MLE12细胞接受LPS（5 μg/mL）处理24 h。结果显示，与Con+anti-NC组相比，LPS+anti-NC组MLE12细胞中RIPK3、MLKL蛋白表达显著增加（$P<0.001$），并且PI阳性细胞百分比显著增加（$P<0.001$）。与LPS+anti-NC组相比，LPS+anti-miR-370-3p组中RIPK3、MLKL蛋白表达显著降低（$P=0.005$、$P<0.001$），并且PI阳性细胞百分比显著降低（$P=0.004$）（图4A~B）。总之，这些数据表明，在体外LPS刺激下，miR-370-3p的抑制减轻了AECs的坏死性凋亡。

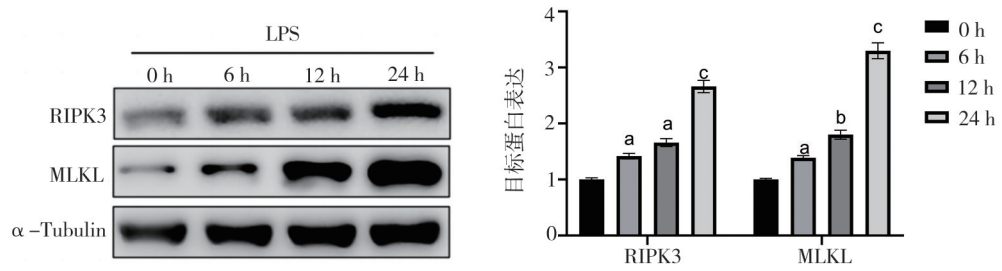
2.4　抑制miR-370-3p减轻线粒体断裂和线粒体膜电位降低

CMXRos染色的免疫荧光染色显示Con+anti-NC组和Con+anti-miR-370-3p组MLE12细胞中存在完整的线粒体网络，而在LPS+anti-NC组和LPS+anti-miR-370-3p组MLE12

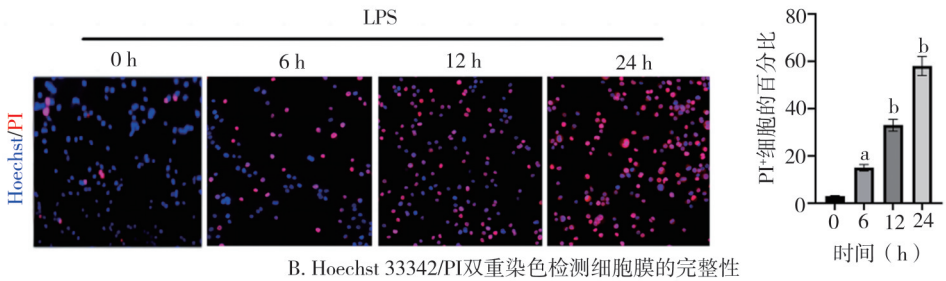
细胞中发现了显著的片段化。与LPS+anti-NC组相比，LPS+anti-miR-370-3p组线粒体片段化显著增加（P=0.018）（图5A）。进行JC-1分析以评估细胞中的δψm。如图5B所示，与Con+anti-NC组相比，LPS+anti-NC组MLE12细胞显示出更大的绿色荧光和更低的红色荧光强度（P<0.001），表明δψm被耗散。相比之下，LPS+anti-miR-370-3p组中绿色和红色荧光强度分别降低和增加（P=0.022），表明抑制miR-370-3p部分逆转了LPS诱导的δψm耗散。

2.5 Sestrin2（SESN2）是miR-370-3p的直接下游mRNA靶标 根据4种不同的miRNA靶预测工具miRanda、TargetScan、RNAhybrid和PITA的结果，SESN2是AECs中miR-370-3p的重叠靶。图6A显示了使用TargetScan匹配miR-370-3p的种子序列的SESN2的3'UTR中的片段。荧光素酶报道基因测定显示miR-370-3p对SESN2-WT报道基因的荧光素酶活性具有抑制作用（P=0.017），而当结合位点突变时，荧光素酶活性保持不受影响（图6B）。在MLE12细胞经LPS处理后，观察到SESN2表达下调。此外，在用不同浓度的miR-370-3p抑制剂转染的MLE12细胞中，观察到SESN2表达以浓度依赖性上调（图6C）。

为了研究miR-370-3p是否通过调节SESN2的表达在



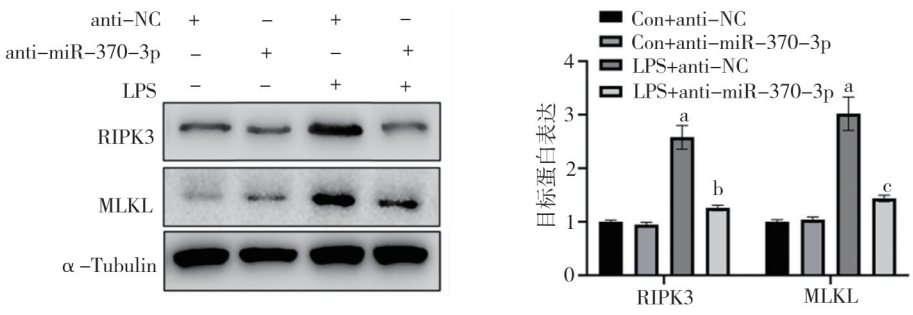
A. 蛋白质印迹法测定细胞中RIPK3、MLKL表达



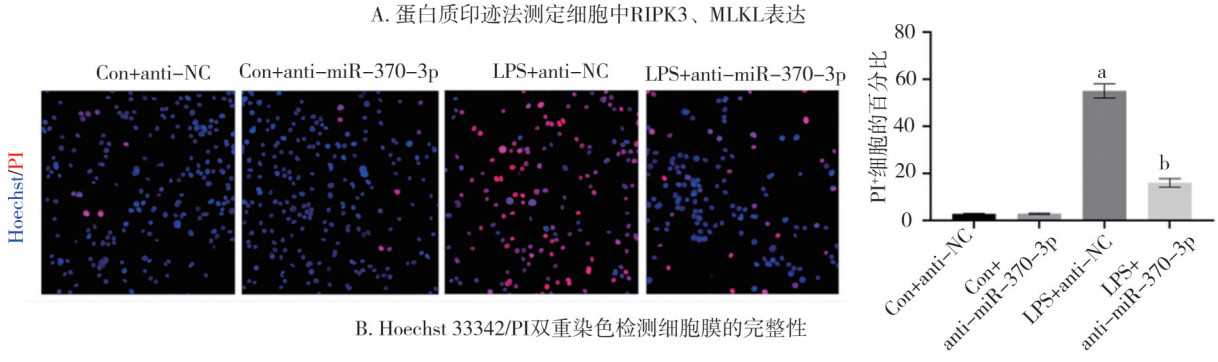
B. Hoechst 33342/PI双重染色检测细胞膜的完整性

注：a，与0 h组相比，P<0.05；b，与0 h组相比，P<0.010；c，与0 h组相比，P<0.001

图3 LPS诱导AECs坏死性凋亡



A. 蛋白质印迹法测定细胞中RIPK3、MLKL表达

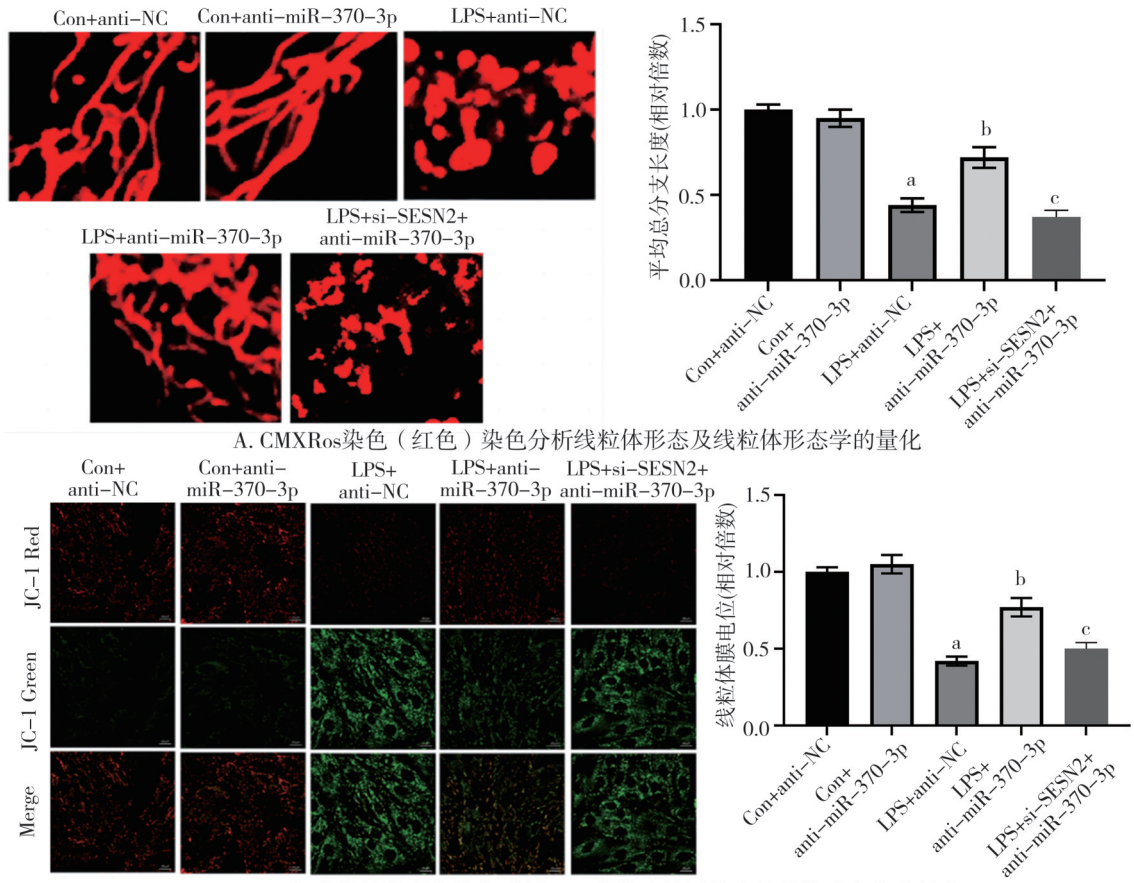


B. Hoechst 33342/PI双重染色检测细胞膜的完整性

注：a，与Con+anti-NC组相比，P<0.001；b，与LPS+anti-NC组相比，P<0.010；c，与LPS+anti-NC组相比，P<0.001

图4 miR-370-3p的抑制减轻体外LPS刺激下AECs的坏死性凋亡

LPS诱导的AECs线粒体功能障碍中起作用，本课题组敲低了MLE12细胞中SESN2蛋白表达（图7），并设置了挽救实验，包括LPS+si-SESN2+anti-miR-370-3p组。结果显示，与LPS+anti-miR-370-3p组相比，LPS+si-SESN2+anti-miR-370-3p组线粒体片段化和线粒体膜电位均显著降低（P=0.015、P=0.011）（图5）。

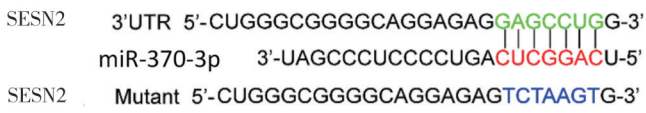


A. CMXRos染色（红色）染色分析线粒体形态及线粒体形态学的量化

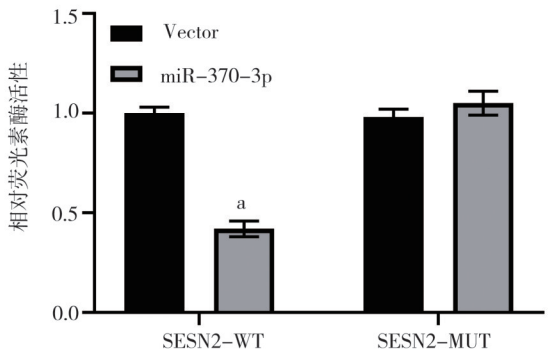
B. MLE12细胞线粒体膜电位指示剂JC-1的代表性图像和线粒体膜电位的量化

注：a，与Con+anti-NC组相比，P<0.001；b，与LPS+anti-NC组相比，P<0.05；c，与LPS+anti-miR-370-3p组相比，P<0.05

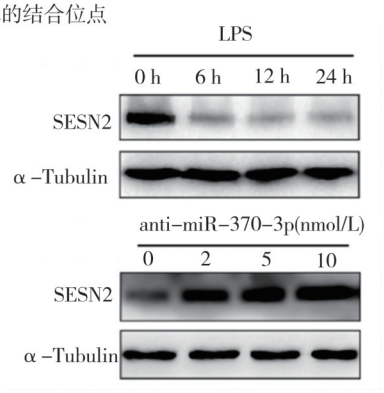
图5　抑制miR-370-3p减轻了线粒体断裂并恢复了AECs的线粒体膜电位



A. Targetscan预测了miR-370-3p和SESN2的结合位点



B. 双荧光素酶报告分析证实了miR-370-3p和SESN2之间的靶向关系



C. Western blot检测LPS（5 μg/mL）刺激或miR-370-3p抑制剂对SESN2表达的影响

注：a，与Vector组相比，P<0.001

图6　SESN2是miR-370-3p的直接下游mRNA靶标

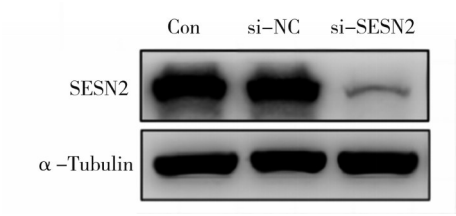


图7 通过Western blot检测si-NC或si-SESN2转染对MLE12细胞中SESN2蛋白表达的影响

3 讨 论

目前，ALI仍然是临床上主要的呼吸系统疾病之一，治疗效果有限，病死率高。线粒体动力学参与了ALI的发展。哺乳动物细胞的线粒体是高度动态的细胞器网络，通过相反的融合和分裂途径维持线粒体生物能功能和体内平衡[13]。近年来，线粒体动力学在ALI中的作用备受关注[14]。越来越多的证据表明，线粒体融合受到抑制导致ALI中的线粒体断裂[15]。目前，对ALI线粒体动力学的研究主要集中在肺泡巨噬细胞。据报道，在LPS诱导的Sprague-Daw ley大鼠和RAW264.7细胞的ALI肺组织中，MFN2和OPA1的表达下调，DRP1上调，导致线粒体动态失衡[16]。在LPS应激的NR8383细胞中，逆转线粒体的形态损伤，上调线粒体融合蛋白的表达，下调分裂蛋白的表达，从而改善ALI[15]。在这里发现miR-370-3p上调与LPS刺激下AECs的线粒体功能障碍密切相关。

本研究表明，miR-370-3p上调是ALI的重要内源性致病机制。miR-370-3p位于DLK1-DIO3结构域内，该结构域已被鉴定为人类14号染色体上的癌症相关基因组区域[17]。几项研究报道，miR-370-3p与各种类型的癌症的致瘤性有关[18-19]。值得注意的是，最近研究发现脓毒症脑病中miR370-3p的上调是脓毒症分子（LPS和TNF-α）激活的结果，这种激活通过抑制线粒体融合过程，导致线粒体断裂并参与器官损伤[20]。因此，本研究探讨了miR-370-3p是否参与了ALI的发生和发展。本研究发现，在LPS刺激下，肺组织和AECs中miR-370-3p表达上调。为了探索miR-370-3p在ALI病理过程中的作用，体内使用了miR-370-3p抑制剂敲低肺组织中miR-370-3p表达，并发现miR-370-3p的抑制减轻了ALI小鼠的病理损伤和炎症反应，并上调了SPC蛋白的表达。AECs是肺中的结构细胞，AECs的损伤影响气体交换，这是ALI患者发生难治性低氧血症的关键原因。各种损伤因素刺激AECs，破坏肺泡屏障的完整性，然后激活巨噬细胞，释放炎症因子，加重ALI[4]。SPC是AECs的特异性标志物之一，其降低可增加肺泡表面张力，加重AECs损伤[5]。因此，这些研究表明miR-370-3p抑制可能保护肺组织内皮细胞。

本研究发现，在体外和体内，miR-370-3p上调引起的AECs损伤激活了坏死性凋亡。坏死性凋亡被认为是ALI过程的驱动力[21]。最近的1项研究表明，在LPS诱导的ALI中，坏死性凋亡是AECs的主要死亡方式，但ALI期间AECs坏死性凋亡的分子机制尚未完全阐明[5]。本研究的发现表明抑制miR-370-3p减少了RIPK3和MLKL的水平，证明miR-370-3p缺乏减轻了ALI小鼠的坏死性凋亡。为了进一步阐明AECs是否是参与坏死性凋亡的关键细胞，课题组检测了SPC和MLKL的共定位表达，并发现抑制miR-370-3p减少了二者在ALI小鼠肺组织中共定位表达。与体内的发现一致，在体外AECs损伤前给予miR-370-3p抑制剂减轻了LPS刺激下AECs的坏死性凋亡。

线粒体是AECs的重要细胞器，不仅因为其产生ATP的功能，还因为其在AECs暴露于环境压力或损伤时传递细胞外和细胞内信号的作用[10]。持续的线粒体功能障碍可导致氧化应激诱导的AECs损伤，进而导致凋亡增加、增殖减少、生物功能受损[13]。越来越多的证据表明，线粒体功能障碍是坏死性凋亡的主要机制之一[22-23]。本研究发现抑制miR-370-3p减轻了LPS诱导的线粒体断裂，和增加了线粒体膜电位。此外，miR-370-3p负调控SESN2表达。SESN2是Sestrins蛋白家族的一员，在内质网应激、缺氧、氧化应激和DNA损伤等许多病理生理过程中起主要作用[24]。研究发现，细胞ROS积累上调SESN2，激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，促进片段化线粒体中的选择性自噬[24]。此外，SESN2还介导AMPK-PGC1α激活，以促进线粒体生物合成，从而减少氧葡萄糖耗竭导致的细胞损伤[25]。因此，SESN2作为一种高度保守的多功能蛋白，在线粒体相关的损伤中具有保护作用。本研究中，敲低SESN2逆转了miR-370-3p敲低对LPS诱导的线粒体功能障碍的保护作用。同时，miR-370-3p与SESN2有调节关系，表明它们在LPS刺激下AECs的坏死性凋亡中起重要作用。

总之，本研究表明miR-370-3p/SESN2轴通过

介导线粒体断裂和损害线粒体功能促进LPS诱导的ALI期间AECs坏死性凋亡。这些发现为未来研究miR-370-3p、线粒体动力学和ALI中AECs丢失之间的关系奠定了基础。然而，这项研究并不是全面的，需要进一步研究以揭示miR-370-3p的深层调控机制，如miR-370-3p的其他靶基因作为进一步研究的目标。

参 考 文 献

[1] Shah D, Das P, Acharya S, et al. Small immunomodulatory molecules as potential therapeutics in experimental murine models of acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS)[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2573.

[2] Metkus TS, Sokoll LJ, Barth AS, et al. Myocardial injury in severe COVID-19 compared with non-COVID-19 acute respiratory distress syndrome[J]. Circulation, 2021, 143(6): 553-565.

[3] Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes[J]. Lancet, 2022, 400(10358): 1145-1156.

[4] Yang HH, Jiang HL, Tao JH, et al. Mitochondrial citrate accumulation drives alveolar epithelial cell necroptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. Exp Mol Med, 2022, 54(11): 2077-2091.

[5] Tamada N, Tojo K, Yazawa T, et al. Necrosis Rather Than Apoptosis is the Dominant form of Alveolar Epithelial Cell Death in Lipopolysaccharide-Induced Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome Model[J]. Shock, 2020, 54(1): 128-139.

[6] Luo S, Ding XF, Zhao SQ, et al. Long non-coding RNA CHRF accelerates LPS-induced acute lung injury through microRNA-146a/Notch1 axis[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(16): 1299.

[7] Zhang J, Mao FX, Zhao G, et al. Long non-coding RNA SNHG16 promotes lipopolysaccharides-induced acute pneumonia in A549 cells via targeting miR-370-3p/IGF2 axis[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78: 106065.

[8] Zhou YY, Qing MY, Xu M. Circ-BNIP3L knockdown alleviates LPS-induced renal tubular epithelial cell injury during sepsis-associated acute kidney injury by miR-370-3p/MYD88 axis[J]. J Bioenerg Biomembr, 2021, 53(6): 665-677.

[9] Wang P, Zhang HT, Zhao WQ, et al. Silencing of long non-coding RNA KCNQ1OT1 alleviates LPS-induced lung injury by regulating the miR-370-3p/FOXM1 axis in childhood pneumonia[J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 247.

[10] Cao C, Chen SF, Song ZM, et al. Inflammatory stimulation mediates nucleus pulposus cell necroptosis through mitochondrial function disfunction and oxidative stress pathway[J]. Front Biosci, 2022, 27(4): 111.

[11] Kong M, Zhu DR, Dong JY, et al. *Iso*-seco-tanapartholide from *Artemisia argyi* inhibits the $PFKFB_3$-mediated glycolytic pathway to attenuate airway inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 301: 115781.

[12] Yuan YF, Wang W, Zhang Y, et al. Apelin-13 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and acute lung injury by regulating $PFKFB_3$-driven glycolysis induced by NOX4-dependent ROS[J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 2121-2139.

[13] Uchikado Y, Ikeda Y, Ohishi M. Current understanding of the pivotal role of mitochondrial dynamics in cardiovascular diseases and senescence[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 905072.

[14] Sharma A, Ahmad S, Ahmad T, et al. Mitochondrial dynamics and mitophagy in lung disorders[J]. Life Sci, 2021, 284: 119876.

[15] Shi J, Yu TX, Song K, et al. Dexmedetomidine ameliorates endotoxin-induced acute lung injury *in vivo* and *in vitro* by preserving mitochondrial dynamic equilibrium through the HIF-1a/HO-1 signaling pathway[J]. Redox Biol, 2021, 41: 101954.

[16] Deng SY, Zhang LN, Mo YN, et al. Mdivi-1 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting MAPKs, oxidative stress and apoptosis[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2020, 62: 101918.

[17] Lulli V, Buccarelli M, Ilari R, et al. miR-370-3p impairs glioblastoma stem-like cell malignancy regulating a complex interplay between HMGA2/HIF1A and the oncogenic long non-coding RNA (lncRNA) NEAT1[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(10): 3610.

[18] Chen JB, Sun Y, Ou ZY, et al. Androgen receptor-regulated circFNTA activates KRAS signaling to promote bladder cancer invasion[J]. EMBO Rep, 2020, 21(4): e48467.

[19] Jia B, Wang ZP, Sun X, et al. Long noncoding RNA LINC00707 sponges miR-370-3p to promote osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells through upregulating WNT2B[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 67.

[20] Hiengrach P, Visitchanakun P, Tongchairawewat P, et al. Sepsis encephalopathy is partly mediated by miR370-3p-induced mitochondrial injury but attenuated by BAM15 in cecal ligation and puncture sepsis male mice[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5445.

[21] Lee SH, Shin JH, Park MW, et al. Impairment of mitochondrial ATP synthesis induces RIPK3-dependent necroptosis in lung epithelial cells during lung injury by lung inflammation[J]. Immune Netw, 2022, 22(2): e18.

[22] Bazard P, Pineros J, Frisina RD, et al. Cochlear inflammaging in relation to ion channels and mitochondrial functions[J]. Cells, 2021, 10(10): 2761.

[23] Islam T, Afonso MB, Rodrigues CMP. The role of RIPK3 in liver mitochondria bioenergetics and function[J]. Eur J Clin Invest, 2022, 52(3): e13648.

[24] Li JY, Ren C, Wang LX, et al. Sestrin2 protects dendrite cells against ferroptosis induced by sepsis[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(9): 834.

[25] Wang B J, Wang SD, Xiao MJ, et al. Regulatory mechanisms of Sesn2 and its role in multi-organ diseases[J]. Pharmacol Res, 2021, 164: 105331.

（责任编辑：周一青）