基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003884

miR-22-3p通过靶向AIFM1调控低氧诱导的肺动脉平滑肌细胞线粒体稳态和凋亡

向渝静，唐胡婷，安　永
（重庆医科大学附属儿童医院胸心外科/国家儿童健康与疾病临床医学研究中心/儿童发育疾病研究教育部重点实验室/结构性出生缺陷与器官修复重建重庆市重点实验室，重庆　400010）

【摘　要】目的：通过建立体外肺动脉高压（pulmonary arterial hypertension，PAH）模型，探讨miR-22-3p与线粒体凋亡诱导因子1（apoptosis-inducing factor，mitochondrion-associated 1，AIFM1）对低氧诱导下肺动脉平滑肌细胞（pulmonary artery smooth muscle cells，PASMCs）的线粒体稳态和凋亡的影响。**方法：**通过低氧培养构建体外的PAH模型，并调控AIFM1和miR-22-3p的表达使其升高或降低。实时荧光定量聚合酶链反应（reverse transcription quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）和免疫印迹技术检测AIFM1、miR-22-3p和活化半胱氨酸蛋白酶-3（cleaved cysteine-aspartic protease-3，Cleaved Caspase-3）的表达水平。细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）检测细胞增殖活性。流式细胞术检测细胞凋亡情况。通过线粒体超氧化物指示剂（mitochondrial superoxide indicator，mitoSOX）、腺嘌呤核苷三磷酸（adenosine triphosphate，ATP）试剂盒检测线粒体功能。线粒体动力学使用线粒体红色荧光探针（mito-tracker red cmxros，MitoTracker）测量线粒体周长变化。并且通过双荧光素酶报告基因实验分析验证AIFM1和miR-22-3p之间的相互作用。**结果：**低氧诱导下，PASMCs的线粒体活性氧（reactive oxygen species，ROS）含量升高，ATP水平下降，线粒体裂变增加，细胞凋亡减少。AIFM1过表达能够改善线粒体稳态，并增加细胞凋亡。miR-22-3p负调控AIFM1，并逆转其过表达效应。**结论：**miR-22-3p通过靶向AIFM1改善低氧诱导的PASMCs线粒体稳态、增殖活性和凋亡，旨在为肺动脉高压的预防和治疗提供潜在理论依据。

【关键词】肺动脉高压；线粒体稳态；凋亡
【中图分类号】R473.72　　**【文献标志码】**A

MiR-22-3p regulates hypoxia-induced mitochondrial homeostasis and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells by targeting apoptosis-inducing factor，mitochondrion-associated 1

Xiang Yujing，Tang Huting，An Yong
（*Department of Cardiothoracic Surgery，Children's Hospital of Chongqing Medical University，National Clinical Research Center for Child Health and Disorders，Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders，Chongqing Key Laboratory of Structural Birth Defect and Reconstruction*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the effect of miR-22-3p and apoptosis-inducing factor，mitochondrion-associated 1（AIFM1）on mitochondrial homeostasis and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells（PASMCs）under hypoxic conditions by establishing an *in vitro* model of pulmonary hypertension（PAH）. ***Methods*：**PASMCs were cultured under hypoxic conditions to establish an *in vitro* model of PAH，and the expression levels of AIFM1 and miR-22-3p were upregulated or downregulated. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction（RT-qPCR）and Western blotting were used to measure the expression levels of AIFM1，miR-22-3p，and cleaved cysteine-aspartic protease-3（Cleaved Caspase-3）. cell counting kit-8（CCK-8）assay was used to measure the proliferative activity of cells，and flow cytometry was used to measure cell apoptosis. Mitochondrial superoxide indicator（mitoSOX）and adenosine triphosphate（ATP）assay kits were used to observe mitochondrial function and dynamics，and Mito-Tracker Red CMXRos（MitoTracker）was used to measure the change in mitochondrial circumference. Dual-luciferase reporter assay was used to validate the interaction between AIFM1 and miR-22-3p. ***Results*：**Hypoxia increased the content of mitochondrial ROS，reduced the level of ATP，promoted mitochondrial fission，and reduced cell apoptosis in PASMCs. AIFM1 overexpression improved mitochondrial homeostasis and increased cell apoptosis，while miR-22-3p negatively regulated AIFM1 and reversed the effect of AIFM1 overexpression. ***Conclusion*：**This study shows that miR-22-3p enhances mitochondrial homeostasis，proliferation，and apoptosis in hypoxia-induced

作者介绍：向渝静，Email：xiangyj@163.com，研究方向：儿童肺动脉高压的研究与治疗。
通信作者：安　永，Email：incavnate@126.com。
基金项目：重庆市自然科学基金面上资助项目（编号：CSTB2023NSCQ-MSX0579）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250620.1059.002（2025-06-20）

PASMCs by targeting AIFM1, which provides a potential theoretical basis for the prevention and treatment of PAH.
【Key words】pulmonary arterial hypertension; mitochondrial homeostasis; apoptosis

体外肺动脉高压（pulmonary arterial hypertension，PAH）是以肺血管明显重构和肺血管负荷逐渐增加，进而导致右心室肥厚和重构为特征的疾病[1]。每100万人中有5~50例患病。目前尚不清楚PAH的具体发病机制，缺氧诱导的血管重塑被认为是PAH疾病进展的重要原因，肺动脉血管平滑肌细胞增殖和凋亡的失衡在此过程中发挥了主要作用[2-3]。因此积极探索影响PAH中肺血管平滑肌凋亡的途径对PAH的预防和治疗具有重要意义。

线粒体是真核生物特有的双膜细胞器，线粒体之间形成1个动态的，相互连接的网络，通过调节细胞和组织之间的信号传导来影响生物体的生理机能[4]。在肺血管平滑肌细胞中，线粒体参与调节细胞凋亡、氧化应激、细胞周期等一系列生理功能[5]。目前研究表明线粒体与细胞凋亡存在密切联系，病理条件下，大量不同的刺激如低氧、脱氧核糖核酸（deoxyribo nucleic acid，DNA）损伤，有丝分裂停滞等，导致了线粒体外膜透化并激活半胱天冬酶的线粒体膜间隙蛋白的释放，影响了细胞凋亡的调控[6]，在PAH肺血管细胞中，线粒体功能表现为氧化磷酸化水平降低和糖酵解活性增强[7]。PAH中的线粒体功能不良导致广泛的肺血管重塑，减少了平滑肌细胞凋亡，增加了其增殖活性，提示在PAH中线粒体功能紊乱对肺动脉平滑肌抗凋亡表型的调节具有重要作用[8]。

线粒体凋亡诱导因子1（apoptosis-inducing factor，mitochondrion-associated 1，AIFM1）是1种线粒体氧化还原酶，可以从线粒体膜间隙释放到细胞核和胞质[9]。在凋亡相关刺激下，AIFM1可以作为半胱天冬酶非依赖途径中的促凋亡因子，介导染色质浓缩和大规模DNA降解[10]。研究证明AIFM1在缺氧性心肌损伤中起重要作用，其能促进心肌细胞损伤而加重心肌缺血[11]。研究表明，AIFM1通过穿透线粒体膜并释放到细胞质中，促进细胞凋亡[12]。在心肌保护策略中，调控AIFM1的细胞内表达可减缓心肌细胞凋亡，从而减少心肌损伤[13]。AIFM1在维持线粒体形态和能量代谢中的具有重要作用，其通过调节线粒体的融合与裂变动态，维持其形态稳定，从而保证线粒体功能的正常运行[14]。同时，AIFM1参与调控线粒体的能量代谢过程，包括氧化磷酸化和ATP合成，其功能缺失可能导致线粒体能量生成不足，进而影响细胞的能量平衡和整体功能[15]。因此，AIFM1是1个潜在的PAH治疗和干预靶点。

微小RNA（microRNA，miRNA）是1类内源性的具有调控功能的小分子非编码RNA，主要通过参与基因的转录后调控，来实现对靶基因的表达调节[16]。越来越多的证据表明，miRNA在PAH中的作用具有双重性[17]。一方面，某些miRNA能够延缓PAH的发生与发展。例如，研究表明，PAH患者中miR-150的表达明显降低，而miR-150的过表达能够减轻缺氧诱导的血管壁增厚，抑制胶原纤维的形成，并下调缺氧条件下肺组织和PASMCs中α平滑肌肌动蛋白（alpha smooth muscle actin，α-SMA）、转化生长因子β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）和胶原Ⅰ的表达[18]。另一方面，miRNA也可能促进PAH的发展。体外研究发现，miR-211的过表达有助于血管壁的增厚和扩张[19]。提示miRNA在PAH中的作用具有特异性，因此深入探讨不同miRNA在PAH中的功能对理解其发病机制和治疗干预具有重要意义。编码miR-22的基因位于17号染色体的短臂上，在包括心血管等各种组织中广泛表达，在许多脊椎动物物种中高度保守[17]。miR-22最初在许多癌症中被发现具有调控线粒体功能、抑制细胞生长，诱导细胞周期停滞、凋亡和衰老的作用[19-21]。有研究显在急性肾损伤中miR-22-3p可以通过靶向AIFM1促进脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的肾细胞凋亡[21]。然而，尚不清楚在PAH发病机制中miR-22-3p对AIFM1的调控作用及其相应生物学效应。

本研究通过缺氧刺激PAMSCs在体外构建了PAH模型，发现miR-22-3p可以通过靶向AIFM1改善低氧诱导的PAMSCs线粒体稳态、增殖活性及凋亡。旨在为PAH的预防和治疗理论基础提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 原代人肺动脉平滑肌细胞（human pulmo-

nary artery smooth muscle cells，HPASMC）从中乔新舟（上海，中国）获取。将细胞培养在10%胎牛血清（Sigma，MD，美国）和100 U/mL 青霉素-链霉素（碧云天，上海，中国）的高糖培养基（Gibco，MD，美国）中。细胞孵育在37 ℃的5% CO_2的细胞孵箱（Thermo，NE，美国）中。根据细胞状态进行消化、传代，所有实验均在3~6代完成。为了建立体外PAH低氧模型，将肺动脉平滑肌细胞（pulmonary artery smooth muscle cells，PASMCs）在92% N_2，5% CO_2和3% O_2的低氧孵箱（Thermo，NE，美国）培养48 h。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 AIFM1小干扰RNA（AIFM1 siRNA）、AIFM1过表达载体（pcDNA3.1-AIFM1）、miR-22-3p模拟物（miR-22-3p mimics）、miR-22-3p抑制剂（miR-22-3p inhibitor）及其相应的阴性对照（mimics NC、inhibitor NC、pcDNA3.1-NC、si-NC）均购自吉玛基因（上海，中国）。将PAMSCs种植在6孔板或96孔板中，观测细胞密度约为60%时，使用 lipofectamine™ 3000（Invitrogen，CA，美国）和Opti-MEM™ Medium（Invitrogen，CA，美国）进行转染。48 h后，用实时荧光定量聚合酶链反应（reverse transcription quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）测定转染的效率。

1.2.2 RT-qPCR 使用RNAex Pro RNA（艾可瑞，湖南，中国）从细胞中分离总RNA。根据制造商的说明，用Evo M-MLV反转录试剂盒Ⅱ（艾可瑞，湖南，中国）合成cDNA。然后，使用SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒（艾可瑞，湖南，中国）将cDNA用于在CFX96 Real-time PCR仪（Bio-Rad，CA，美国）上进行的RT-qPCR测定。分别用U6和GAPDH标准化mRNA和miRNA的相对表达，然后用$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算。研究中使用的引物见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

引物名称	序列（5′→3′）
hsa-miR-22-3p-F	GCGAAGCTGCCAGTTGAAG
hsa-miR-22-3p-R	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
H-AIFM1-F	ACGCTGTTGTGAGTGGAAGA
H-AIFM1-R	ACTGTGGGCAAACTACTGTCC
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6-R	AACGCTTACGAATTTGCGT
GAPDH-F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
GAPDH-R	TGGTGAAGACGCCAGTGGA

1.2.3 细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8） PASMCs以每孔3×10³个细胞的密度接种于96孔板中，每孔加入100 μL培养基。按照试剂说明书，将CCK-8试剂以10 μL CCK-8试剂与90 μL新鲜培养基的比例混合。吸弃每孔中的旧培养基后，每孔加入100 μL新配制的CCK-8混合液，置于37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育1 h。使用微板读数器（Bio-Rad Laboratories，CA，USA）在450 nm波长下测定各孔的吸光度（absorbance，A）值。

1.2.4 细胞凋亡 使用Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit（碧云天，上海，中国）检测细胞凋亡。按照说明，每个样本收集3×10^5个细胞，用PBS洗涤2次，分别加入Annexin V-FITC和碘化丙啶，轻轻混匀，避光孵育15 min对细胞进行染色。随即用BD flow cytometer（BD Bioscience，NJ，USA）进行检测。数据通过Flowjo V10软件（BD Biosciences，NJ，USA）进行分析。

1.2.5 线粒体活性氧 使用MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicators（Thermo，CA，USA）测定PASMCs中的线粒体活性氧（reactive oxygen species，ROS）。按照说明书准备MitoSOX™ Red储存液和工作液。每组收集3×10^5个细胞，将细胞用工作液染色，避光孵育15 min。之后用HBSS洗涤3次。随即用流式细胞仪进行分析。

1.2.6 腺嘌呤核苷三磷酸（adenosine triphosphate，ATP） 使用Enhanced ATP Assay Kit（碧云天，上海，中国）检测PASMCs中的ATP含量。按照说明书配置工作液。每样用ATP检测裂解液处理后，转移至已加入工作液的不透光96孔板中。随后使用luminometer（Bio-Rad Laboratories，CA，USA）进行分析。

1.2.7 线粒体红色荧光探针（mito-tracker red cmxros，Mito-Tracker） 使用Mito-Tracker Red CMXRos（懋康，上海，中国）评估线粒体周长。向共聚焦皿加入Mito-Tracker Red CMXRos使其终浓度为400 nm。避光孵育20 min后，用PBS清洗2次。使用激光扫描共聚焦显微镜（Nikon，Japan）获得图像。数据采用Image J分析。

1.2.8 免疫印迹 PASMCs的蛋白质使用含有蛋白酶抑制剂的强效裂解液（碧云天，上海，中国）提取。然后使用二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）试剂盒（碧云天，上海，中国）测定蛋白质浓度。裂解样品用成十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）分离，然后转移到至聚偏二氟乙烯（polyvinylidenefluoride，PVDF）膜上。然后，将膜与包括AIFM1（1∶1 000，ab32516，abcam）、活化半胱氨酸蛋白酶-3（cleaved cysteine-aspartic protease-3，Cleaved Caspase-3）（1∶1 000，Asp175，CST）。β-actin一抗（1∶5 000，R23613，正能）作为上样对照。用洗涤缓冲液（tris-buffered saline，TBST）（Servicebio，武汉，中国）洗涤后，将膜与相应二抗（正能，成都，中国）一起温育60 min。最后，用增强型化学发光试剂（enhanced chemiluminescence，ECL），（正能，成都，中国）覆盖薄膜，并用明胶滤光器（gelatin light filter，GEL）影像系统（Bio-Rad，CA，USA）进行图像处理。利用Image J软件对蛋白质定量分析。

1.2.9 双萤光素酶报告基因检测 将AIFM1 3′-UTR序列的野生型（wt）和突变型（mut）报告基因序列克隆到萤光素酶报告基因载体（luciferase reporter vectors，PGL3），（吉玛，上海，中国）中。然后，将细胞铺在24孔板上，使用Lipofectamine™ 3000（Invitrogen，CA，USA）将AIFM1-wt或AIFM1-mut质粒和miR-22-3p inhibitor、mimics、NC共转染。转染48 h后，使用双萤光素酶报告基因测定系统（Promega，WI，USA）检测相对萤光素酶活性。

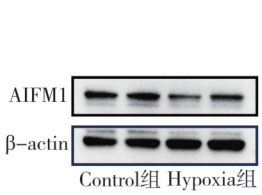
1.3 统计学方法

使用GraphPad Prism软件（版本8.3.0）进行。对于符合正态分布的计量资料数据，以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用Student's t检验；多组间比较采用Kruskal-Wallis检验。检验水准设为α=0.05。

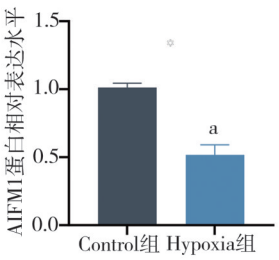
2　结　果

2.1　PAH低氧体外模型的建立

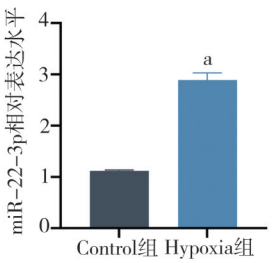
建立了缺氧诱导的体外PAH模型，课题组发现低氧诱导后，PASMCs中AIFM1蛋白表达降低（图1A、B），miR-22-3p表达升高（图1C）。与对照组相比，低氧诱导的PAMSCs的细胞活性明显增加（图1D），同时细胞凋亡减少（图1E、F）。随后，本课题组发现低氧处理改变了线粒体功能，表现为低氧组ROS水平升高（图1G、H），ATP产生水平降低（图1I）。同时，线粒体形态学方面，Mitotracker数据显示缺氧刺激导致PAMSCs线粒体周长减小（图1J、K），表明线粒体分裂增加。上述结果表明，缺氧处理介导了体外培养的PAMSCs的线粒体稳态失调和增殖活性及凋亡失衡。



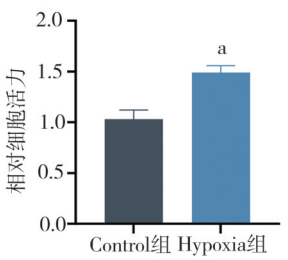
A. 免疫印记检测AIFM1蛋白表达



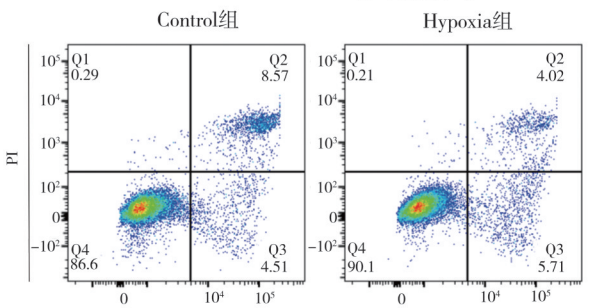
B. 各组细胞AIFM1蛋白的相对表达水平



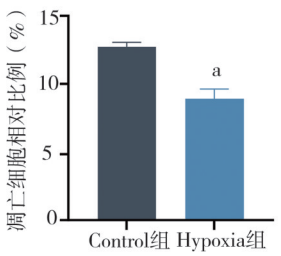
C. RT-qPCR检测miR-22-3p的表达



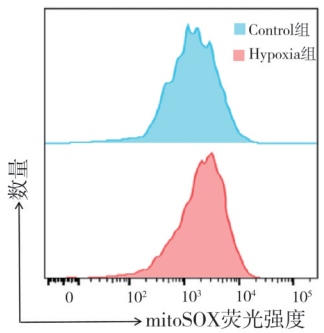
D. CCK-8法测定细胞增殖活性



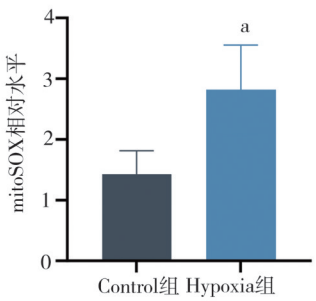
E. 流式细胞术检测细胞凋亡水平



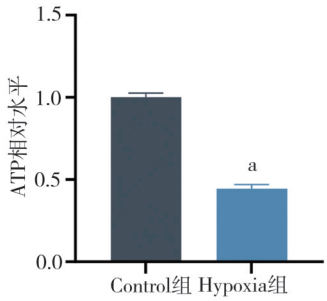
F. 各组细胞凋亡相对水平



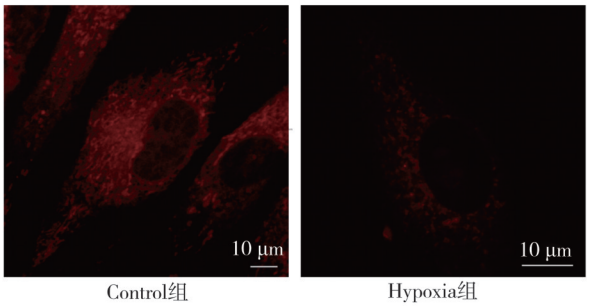
G. 流式细胞术检测细胞线粒体活性氧物质水平



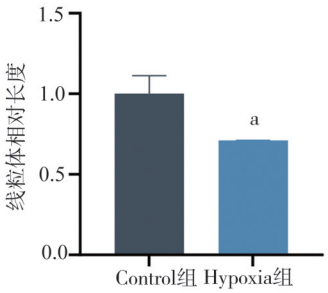
H. 各组细胞活性氧物质相对水平



I. ATP试剂盒检测线粒体ATP含量



J. Mitotracker Red CMXRos染色检测细胞线粒体形态



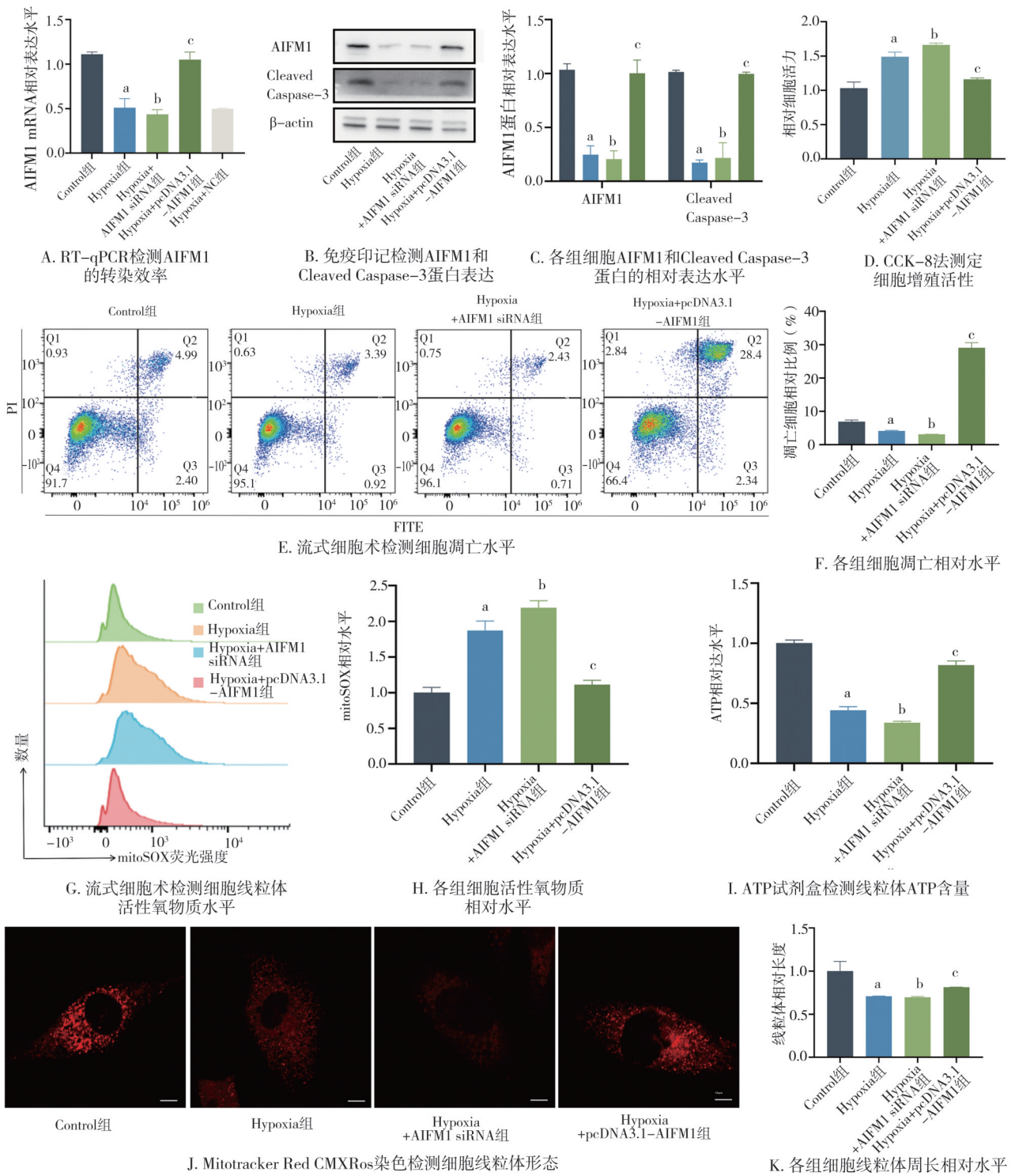
K. 各组细胞线粒体周长相对水平

注：a，与Control组比较，$P<0.05$

图1　低氧诱导PASMCs凋亡减少和线粒体稳态失衡

2.2 AIFM1介导PASMCs线粒体稳态及凋亡

为研究AIFM1在PASMCs中的作用，本课题组转染了AIFM1 siRNA和pcDNA3.1-AIFM1以实现AIFM1的敲低和过表达（图2A~C）。AIFM1过表达进一步降低了低氧诱导下PASMCs的细胞活性（图2D），并促进了细胞凋亡（图2E、F），同时增强了Cleaved Caspase-3的蛋白表达。相反，AIFM1敲低则减弱了这些效应（图2B、C）。此外，AIFM1过表达减少了低氧条件下PASMCs的ROS释放（图2G、H）和ATP水平（图2I），并增加了线粒体周长（图2J、K），敲低AIFM1则可以观察到相反的结果。这些数据表明，AIFM1在低氧诱导的PASMCs中促进了细胞凋亡和线粒体紊乱。



A. RT-qPCR检测AIFM1的转染效率

B. 免疫印记检测AIFM1和Cleaved Caspase-3蛋白表达

C. 各组细胞AIFM1和Cleaved Caspase-3蛋白的相对表达水平

D. CCK-8法测定细胞增殖活性

E. 流式细胞术检测细胞凋亡水平

F. 各组细胞凋亡相对水平

G. 流式细胞术检测细胞线粒体活性氧物质水平

H. 各组细胞活性氧物质相对水平

I. ATP试剂盒检测线粒体ATP含量

J. Mitotracker Red CMXRos染色检测细胞线粒体形态

K. 各组细胞线粒体周长相对水平

注：a，与Control组比较，$P<0.05$；b，与Hypoxia组比较，$P<0.05$；c，与Hypoxia组比较，$P<0.05$

图2 AIFM1介导低氧诱导的PASMCs凋亡和线粒体稳态

2.3 miR-22-3p靶向负调控AIFM1的表达

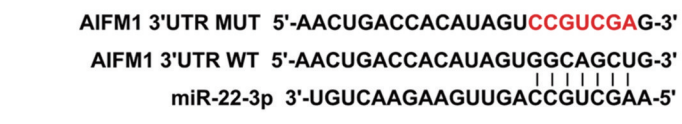
为了探究miR-22-3p对AIFM1的调控作用，本课题组通过检索TargetScan数据库发现，AIFM1是miR-22-3p的潜在靶标之一（图3A）。并通过双荧光素酶报告基因实验进一步证实了miR-22-3p直接作用于AIFM13′ UTR（图3B）。同时，本课题组发现低氧诱导下miR-22-3p表达升高，AIFM1 mRNA和蛋白水平均下降，进一步研究中，本课题组利用miR-22-3p mimics和inhibitor分别提高和抑制miR-22-3p的表达水平，并观察AIFM1的相应改变。结果表明miR-22-3p mimics可以抑制缺氧的PASMCs中AIFM1 mRNA（图3C）和蛋白质（图3D、E）的表达，而miR-22-3p inhibitor则引起相反的改变。这些数据表明，在低氧处理的PASMCs中miR-22-3p靶向负调控AIFM1的表达。

2.4 miR-22-3p介导低氧诱导PAMSCs的线粒体功能稳态和凋亡

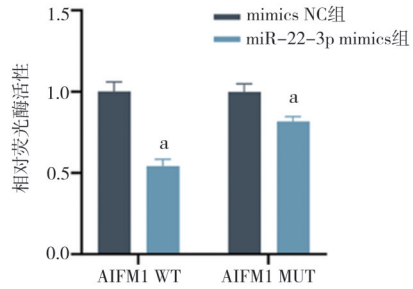
为了验证miR-22-3p对低氧处理下PASMCs的影响，本课题组检测了miR-22-3p在低氧情况下的表达，并使用miR-22-3p mimics和inhibitor成功建立了具有miR-22-3p过表达和抑制的低氧PASMCs细胞模型。本研究发现低氧处理促进了miR-22-3p的表达（图4A），同时miR-22-3p mimics的转染提高了低氧诱导后PASMCs的细胞活性（图4B），减少了Cleaved Caspase-3的表达（图4C、D），抑制了细胞凋亡（图4E、F）；而miR-22-3p inhibitor干预效果则相反。同时本课题组在线粒体相关检测中发现，miR-22-3p mimics的转染可降低ROS释放（图4G、H），和ATP含量（图4I）；并进一步导致线粒体周长下降，miR-22-3p inhibitor转染导致相反的效果（图4J、K）。综上所述，在低氧诱导的PAH细胞模型中，miR-22-3升高并改善了PASMCs的凋亡抵抗和线粒体稳态失衡。

2.5 miR-22-3p逆转AIFM1的功能

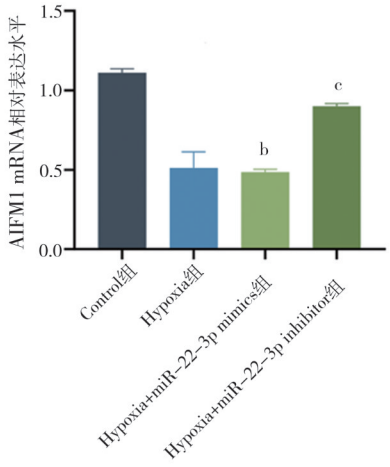
为验证miR-22-3p靶向负调控AIFM1的生物学功能，本课题组在低氧条件下的PASMCs中同时过表达了AIFM1和miR-22-3p。结果显示，pcDNA3.1-AIFM1明显提高了低氧诱导的PASMCs中AIFM1的mRNA和蛋白水平（图5A~C），促进了细胞增殖活性，降低了Cleaved Caspase-3水平，改善了凋亡抵抗（图5D~F）。同时，AIFM1过表达还改善了线粒体稳态，包括减少ROS，增加ATP生成，增加线粒体周长，减少线粒体分裂（图5G~K）。同时过表达miR-22-3p和AIFM1可逆转上述变化。综上所述，在低氧诱导的PAH细胞模型中，miR-22-3p的升高改善了PASMCs的凋亡抵抗和线粒体稳态失衡。



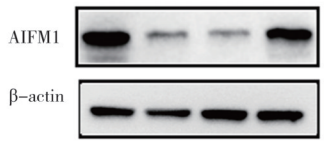
A. 在TargetScan上预测miR-22-3p与AIFM1结合位点



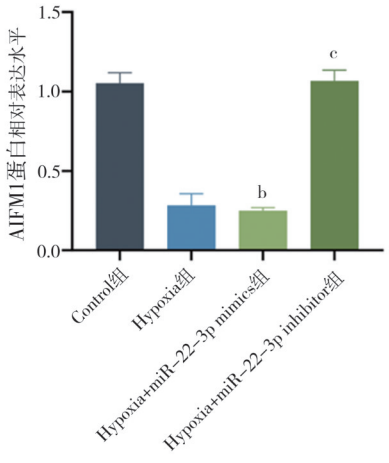
B. 双荧光素酶基因报告实验



C. RT-qPCR检测AIFM1 mRNA的表达



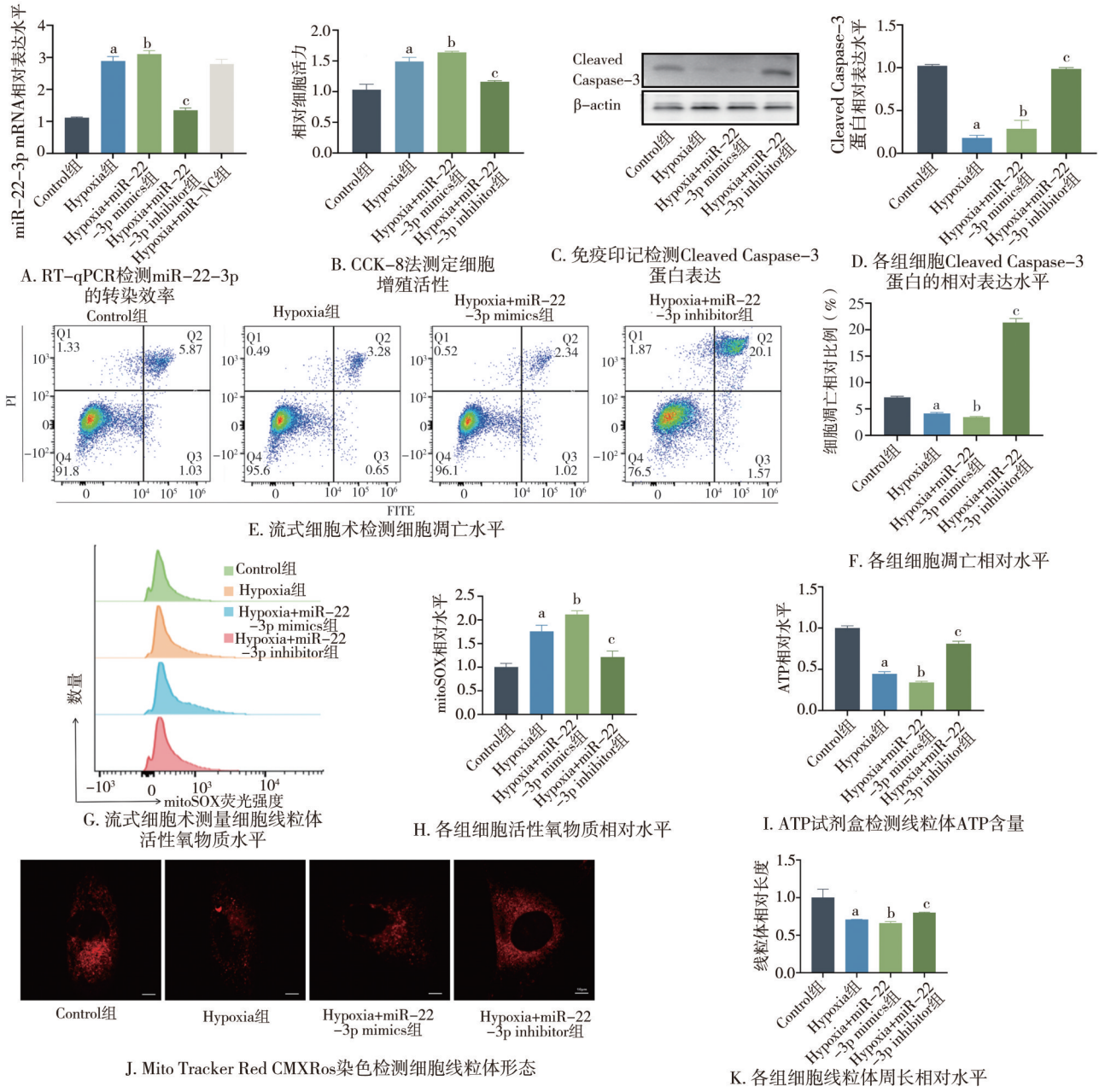
D. 免疫印记检测AIFM1蛋白表达



E. 各组细胞AIFM1蛋白的相对表达水平

注：a，与mimics NC组比较，$P<0.05$；b，与Control组比较，$P<0.05$；c，与Hypoxia组比较，$P<0.05$

图3 miR-22-3p靶向AIFM1



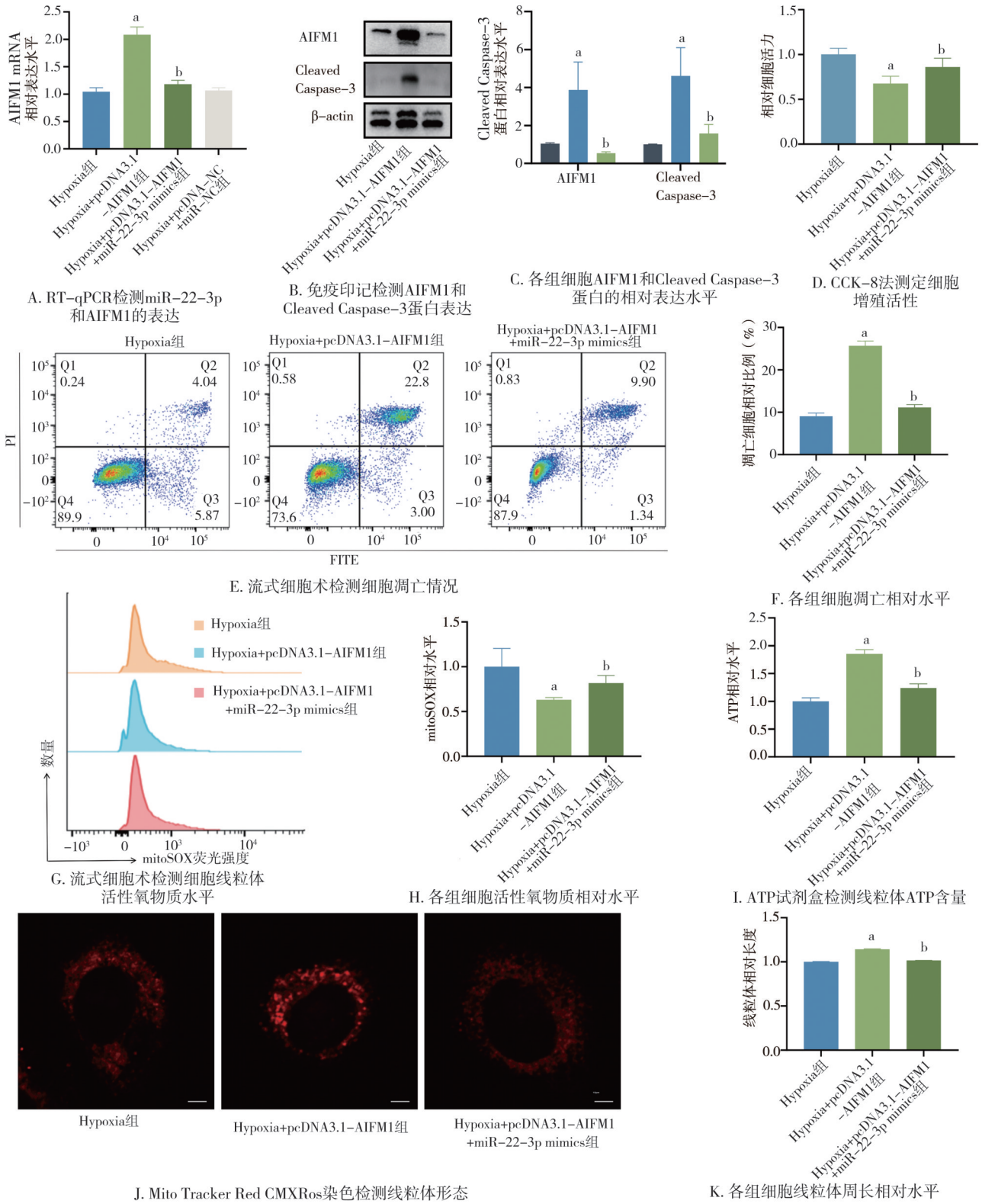
注：a，与Control组比较，$P<0.05$；b，与Hypoxia组比较，$P<0.05$；c，与Hypoxia组比较，$P<0.05$；d，与Control组比较，$P>0.05$

图4　miR-22-3p介导低氧诱导的PASMCs凋亡和线粒体稳态

3　讨　论

本研究通过低氧诱导PASMCs构建了体外PAH模型，以探讨miR-22-3p和AIFM1在调节PAMSCs线粒体稳态和凋亡过程中的作用机制。本课题组验证了缺氧条件下PAMSCs出现线粒体功能障碍和抗凋亡表型。同时本研究发现了低氧干预提高了miR-22-3p表达水平，抑制了AIFM1的表达；进一步研究发现了miR-22-3p通过负调控AIFM1生物学功能，改善了细胞的线粒体功能稳态，并抑制了细胞的凋亡。以上结果提示了抑制miR-22-3p改善低氧诱导PASMCs抗凋亡表型。

肺动脉高压的特征以肺动脉血管壁内增殖与凋亡失衡导致的血管重构为主[22-23]。Pu XY等[24]研究者已证实，临床患者的PASMCs具有抗凋亡和过度增殖的特性，而平滑肌过度增殖和肥大，则导致血管狭窄肺动脉压力增大[25]。临床研究提示，增加平滑肌细胞对凋亡的敏感性可能对治疗PAH有益[26]。本研究观察到体外模型中PASMCs的Cleaved Caspase-3的表达降低，提示凋亡通路被抑制，流式细胞实验进一步证实了低氧诱导PAH模型中



A. RT-qPCR检测miR-22-3p和AIFM1的表达

B. 免疫印记检测AIFM1和Cleaved Caspase-3蛋白表达

C. 各组细胞AIFM1和Cleaved Caspase-3蛋白的相对表达水平

D. CCK-8法测定细胞增殖活性

E. 流式细胞术检测细胞凋亡情况

F. 各组细胞凋亡相对水平

G. 流式细胞术检测细胞线粒体活性氧物质水平

H. 各组细胞活性氧物质相对水平

I. ATP试剂盒检测线粒体ATP含量

J. Mito Tracker Red CMXRos染色检测线粒体形态

K. 各组细胞线粒体周长相对水平

注：a，与Hypoxia组比较，$P<0.05$；b，与Hypoxia+pcDNA3.1-AIFM1组比较，$P<0.05$

图5　miR-22-3p逆转AIFM1的功能

PASMCs的抗凋亡表型。

在PAH患者的PASMCs中，线粒体异常作为氧传感器起重要作用，并参与细胞凋亡、Ca^{2+}信号传导、葡萄糖代谢等病理生理过程调控[27-28]。PAH线粒体代谢发生障碍，特别是能量产生从氧化磷酸化（Oxidative phosphorylation，OXPHOS）转移到糖酵解

和乳酸发酵以维持ATP产生和细胞存活，以支持肿瘤细胞不受控制的生长[29]。目前的研究表明，低氧诱导的PASMCs中表现为线粒体功能障碍并促使细胞出现过度增殖和凋亡抵抗的表型[30]。线粒体ROS，ATP含量是评价线粒体功能的常见指标。PASMCs中的线粒体是ROS产生的主要源头，在电子传递链合成ATP的过程中，线粒体内膜两侧的质子梯度不平衡导致ROS释放[31]。线粒体膜电位的降低和通透性转变孔（permeability transition pore，PTP）的开放导致电子传递链功能损伤，从而减少ATP的合成并增加ROS的生成[32]。本研究发现ATP，ROS，提示低氧诱导下PAMSMc线粒体功能障碍。此外，线粒体形态改变，即融合和裂变，也是线粒体稳态的重要评价指标[33]。本研究发现线粒体裂解增加。以上结果提示着低氧条件下PASMCs中的线粒体稳态失衡，可能进一步促进了其抗凋亡特性。

AIFM1是1种位于染色体Xq26.1上的蛋白质，参与包括细胞凋亡在内的多个关键生物过程[34]，其与氧化还原酶复合体I（nicotinamide adenine dinucleotide，NADH）有密切的相互作用，参与调节线粒体呼吸链中的电子传递过程[35]。目前研究表明，在不同疾病中，AIFM1的异常表达与促进细胞凋亡密切相关[9]。例如，通过上调AIFM1的表达，可以降低子宫颈癌细胞的活力并诱导细胞凋亡[36]，而AIFM1的过表达可以促进肝癌细胞凋亡[37]。而在PAH中，AIFM1表达水平下降，过表达AIFM1可以保护肺血管重塑，避免出现抗凋亡表型[39]。在本研究中发现低氧诱导下AIFM1表达降低，同时本课题组观察到，AIFM1的过表达改善了线粒体的代谢和动力学特性，表现为降低ROS生成、增加ATP产量，并减少线粒体的分裂，增加线粒体周长。这些变化进一步降低了PASMCs的增殖活性，并促进了凋亡。进一步证实了AIFM1与PAH相关PASMCs的凋亡抗性表型的相关性。因此，本研究结果表明，AIFM1可能通过调控线粒体功能和凋亡过程，成为PAH预防和干预的潜在靶点。。

miRNA对细胞增殖、分化、凋亡、迁移和代谢等关键生物学过程具有调控功能[38]，值得注意的是，miRNA主要通过与mRNA的3’非翻译区（3’untranslated region，3’UTR）区域较为松散的结合，从而抑制靶基因mRNA的转录后翻译，调节靶基因功能。在miRNA家族中，miR-22与细胞凋亡密切相关。miR-22-3p能够通过靶向性别决定区Y框蛋白9（SRY-box 9，Sox 9）来减轻阿尔茨海默病模型小鼠的细胞凋亡[39]。环状丝裂原活化蛋白激酶5通过调节miR-22-3p/DAPK2轴促进高糖诱导的心肌细胞凋亡[40]。长非编码RNA DSCR8通过miR-22-3p/ARPC5轴促进肝癌细胞增殖并抑制凋亡[41]。本研究中发现miR-22-3p在PAH细胞低氧模型中表达升高，利用双荧光素酶报告基因实验发现miR-22-3p与AIFM1 mRNA 3’UTR直接结合，AIFM1 mRNA和蛋白水平下降，佐证了miR-22-3p介导AIFM1的表达。AIFM1主要定位于线粒体内膜间隙，当细胞受到严重应激（如氧化应激、DNA损伤等）时，AIFM1从线粒体释放到细胞质，并进一步转移至细胞核。一方面在细胞核中，AIFM1可以与DNA结合，导致DNA片段化和染色质凝聚，从而非胱天蛋白酶依赖的凋亡途径；另一方面全长AIFM1也可以促进半胱氨酸蛋白酶-3（Cysteine-aspartic protease-3，Caspase-3）转录，从而促进经典凋亡途径[36]，因此miR-22-3p可能通过介导AIFM1的表达水平，从而在调控细胞凋亡中发挥重要作用。本课题组在进一步验证发现，PAMSCs中过表达AIFM1的促凋亡功能可以被miR-22-3p模拟物（miR-22-3p mimics）逆转，表现为miR-22-3p和AIFM1 mRNA水平同时升高，AIFM1蛋白水平进一步下降，线粒体稳态失衡，如ROS水平升高、线粒体膜电位下降、ATP含量下降、线粒体分裂增加，凋亡减少。这些观察结果进一步佐证了miR-22-3p可以负调控AIFM1，导致细胞凋亡减少，这种改变可能是通过线粒体稳态来介导的。提示miR-22-3p/AIFM1轴可能是PAH的潜在干预靶点，为未来的治疗提供了新的研究靶点。

本研究存在一定的局限性，主要体现在实验模型的选择上。尽管本课题组基于体外低氧模型进行了实验，获得了初步的直接数据，但该模型可能无法全面反映PAH的复杂性。例如，体外模型无法完全模拟细胞间的相互作用，以及全身性反应对平滑肌细胞凋亡的影响。因此，未来的研究应考虑结合体内模型，以更全面地理解PAH的机制和相关生物过程。

综上所述，本研究通过缺氧诱导PASMCs建立了体外PAH模型，并验证了miR-22-3p可以通过负调节AIFM1来调控缺氧刺激下PAMSCs的线粒体稳态，进而改善凋亡抵抗。因此，miR-22-3p/AIFM1轴可能成为临床预防和治疗PAH的潜在治疗靶点。但是本研究仍有不足，需要进一步通过动物实验进行验证，以及对AIFM1的下游机制进行探索。

参 考 文 献

[1] Hassoun PM. Pulmonary arterial hypertension[J]. N Engl J Med，2021，385(25)：2361-2376.

[2] Ma BH，Cao YY，Qin J，et al. Pulmonary artery smooth muscle cell phenotypic switching：a key event in the early stage of pulmonary artery hypertension[J]. Drug Discov Today，2023，28(5)：103559.

[3] Mocumbi A，Humbert M，Saxena A，et al. Pulmonary hypertension [J]. Nat Rev Dis Primers，2024，10：1.

[4] Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in health and disease[J]. Cells, 2019, 8(7): 680.

[5] Ryan J, Dasgupta A, Huston J, et al. Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension[J]. J Mol Med(Berl), 2015, 93(3): 229-242.

[6] Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 85-100.

[7] Culley MK, Chan SY. Mitochondrial metabolism in pulmonary hypertension: beyond mountains there are mountains[J]. J Clin Invest, 2018, 128(9): 3704-3715.

[8] Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, et al. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1alpha-Kv1.5 O_2^- sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(2): 570-578.

[9] Wischhof L, Scifo E, Ehninger D, et al. AIFM1 beyond cell death: an overview of this OXPHOS-inducing factor in mitochondrial diseases [J]. EBioMedicine, 2022, 83: 104231.

[10] Holze C, Michaudel C, Mackowiak C, et al. Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway[J]. Nat Immunol, 2018, 19(2): 130-140.

[11] Zhou WG, Ji L, Liu XQ, et al. AIFM1, negatively regulated by miR-145-5p, aggravates hypoxia-induced cardiomyocyte injury[J]. Biomed J, 2022, 45(6): 870-882.

[12] Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, et al. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(6): 516-524.

[13] Herrmann JM, Riemer J. Apoptosis inducing factor and mitochondrial NADH dehydrogenases: redox-controlled gear boxes to switch between mitochondrial biogenesis and cell death[J]. Biol Chem, 2020, 402 (3): 289-297.

[14] Novo N, Ferreira P, Medina M. The apoptosis-inducing factor family: Moonlighting proteins in the crosstalk between mitochondria and nuclei[J]. IUBMB Life, 2021, 73(3): 568-581.

[15] Baechler BL, Bloemberg D, Quadrilatero J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation[J]. Autophagy, 2019, 15(9): 1606-1619.

[16] Lu TX, Rothenberg ME. microRNA[J] Allergy Clin Immunol. 2018, 141(4): 1202-1212

[17] Huang ZP, Wang DZ. miR-22 in cardiac remodeling and disease [J]. Trends Cardiovasc Med, 2014, 24(7): 267-272.

[18] Nejati K, Alivand M, Arabzadeh A. MicroRNA-22 in female malignancies: focusing on breast, cervical, and ovarian cancers[J]. Pathol Res Pract, 2021, 223: 153452.

[19] Li Y, Ren WD, Wang X, et al. MicroRNA-150 relieves vascular remodeling and fibrosis in hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1740-1749.

[20] Wang JY, Li Y, Ding MM, et al. Molecular mechanisms and clinical applications of miR-22 in regulating malignant progression in human cancer (Review)[J]. Int J Oncol, 2017, 50(2): 345-355.

[21] Xiong J, Du Q, Liang Z. Tumor-suppressive microRNA-22 inhibits the transcription of E-box-containing c-Myc target genes by silencing c-Myc binding protein[J]. Oncogene, 2010, 29(35): 4980-4988.

[22] Zhong L, Leng S, Alabed S, et al. Pulmonary artery strain predicts prognosis in pulmonary arterial hypertension[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2023, 16(8): 1022-1034.

[23] Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297 (6): L1013-L1032.

[24] Pu XY, Du LP, Hu YH, et al. Stem/progenitor cells and pulmonary arterial hypertension[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41 (1): 167-178.

[25] Hoeper MM, Badesch DB, Ardeschir Ghofrani H, et al. Phase 3 trial of sotatercept for treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. N Engl J Med, 2023, 388(16): 1478-1490.

[26] Yang Z, Song TY, Truong L, et al. Important role of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release *via* ryanodine receptor-2 channel in hypoxia-induced rieske iron-sulfur protein-mediated mitochondrial reactive oxygen species generation in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. Antioxid Redox Signal, 2020, 32(7): 447-462.

[27] Aravamudan B, Thompson MA, Pabelick CM, et al. Mitochondria in lung diseases[J]. Expert Rev Respir Med, 2013, 7(6): 631-646.

[28] Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 102.

[29] Dasgupta A, Wu DC, Tian L, et al. Mitochondria in the pulmonary vasculature in health and disease: oxygen-sensing, metabolism, and dynamics[J]. Compr Physiol, 2020, 10(2): 713-765.

[30] Breitenbach M, Rinnerthaler M, Hartl J, et al. Mitochondria in ageing: there is metabolism beyond the ROS[J]. FEMS Yeast Res, 2014, 14(1): 198-212.

[31] Santos JH. Mitochondria signaling to the epigenome: a novel role for an old organelle[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 170: 59-69.

[32] Chan DC. Dissecting mitochondrial fusion[J]. Dev Cell, 2006, 11 (5): 592-594.

[33] Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling[J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(5): 259-264.

[34] Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death[J]. Oncogene, 2004, 23 (16): 2785-2796.

[35] Zhang Y, Yang YX, Liu RX, et al. Downregulation of microRNA-425-5p suppresses cervical cancer tumorigenesis by targeting AIFM1 [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(5): 4032-4038.

[36] Kasai SY, Shimizu S, Tatara Y, et al. Regulation of Nrf2 by mitochondrial reactive oxygen species in physiology and pathology[J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 320.

[37] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23: 175-205.

[38] Gurha P. MicroRNAs in cardiovascular disease[J]. Curr Opin Cardiol, 2016, 31(3): 249-254.

[39] Xia PC, Chen J, Liu YC, et al. MicroRNA-22-3p ameliorates Alzheimer's disease by targeting SOX9 through the NF-κB signaling pathway in the hippocampus[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 180.

[40] Shen M, Wu YB, Li LB, et al. CircMAP3K5 promotes cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy by regulating miR-22-3p/DAPK2 Axis[J]. J Diabetes, 2024, 16(1): e13471.

[41] Huang JN, Zhang HM, Cai JD, et al. Long noncoding RNA DSCR8 promotes the proliferation of liver cancer cells and inhibits apoptosis *via* the miR-22-3p/ARPC5 Axis[J]. J Cancer, 2023, 14(1): 35-49.

（收稿：2024-08-07；修回：2024-12-06；录用：2024-12-12）

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：

向渝静，唐胡婷，安 永. miR-22-3p通过靶向AIFM1调控低氧诱导的肺动脉平滑肌细胞线粒体稳态和凋亡[J]. 重庆医科大学学报，2025, 50(11): 1531-1540.