

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.21.003

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20231008.1134.016\(2023-10-08\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20231008.1134.016(2023-10-08))

miR-24-3p/S1PR2 信号轴对大鼠 RMECs 损伤的作用与机制研究*

贺蛟龙¹,徐云玲^{2△}

(1.吉首大学第一附属医院/湘西土家族苗族自治州人民医院重症医学科,湖南吉首 416000;2.浙江省
立同德医院/浙江省中医药研究院/浙江省中药新药研发重点实验室,杭州 310007)

[摘要] **目的** 研究 miR-24-3p/1-磷酸鞘氨醇受体 2(S1PR2)信号轴对肾小球内皮细胞(RMECs)损伤的作用及影响机制。**方法** 原代分离获得大鼠 RMECs,制备急性肾损伤(AKI)模型。采用 CCK8 检测细胞增殖能力,流式细胞术检测细胞凋亡情况、活性氧(ROS)水平,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)-1 β 的表达;生化试剂盒检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平;实时荧光定量 PCR 检测细胞中 S1PR2(NM_017192.2)的 mRNA 表达水平,Western blot 检测 S1PR2 和凋亡相关基因 caspase-3 和 caspase-9、血管内皮细胞损伤相关因子细胞分裂周期蛋白 20(CDC20)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达水平。**结果** LPS 组 TNF- α 、IL-1 β 水平高于 control 组,miR-24-3p inhibitor+LPS 组 TNF- α 、IL-1 β 水平高于 inhibitor NC+LPS 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。LPS 组 MDA、SOD 水平高于 control 组,miR-24-3p inhibitor+LPS 组 MDA 水平高于 inhibitor NC+LPS 组,但 SOD 水平低于 inhibitor NC+LPS 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。LPS 组 S1PR2 mRNA 表达水平高于 control 组,miR-24-3p inhibitor+LPS 组 S1PR2 mRNA 表达水平低于 inhibitor NC+LPS 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。LPS 组 S1PR2、caspase-9、caspase-3 蛋白表达水平高于 control 组,CDC20、VEGF 蛋白表达水平低于 control 组,差异有统计学意义($P<0.05$);miR-24-3p inhibitor+LPS 组 S1PR2、caspase-3、caspase-9 蛋白表达水平低于 inhibitor NC+LPS 组,CDC20、VEGF 蛋白表达水平高于 inhibitor NC+LPS 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** miR-24-3p inhibitor 通过联动抑制 S1PR2 表达,下调 caspase-3、caspase-9 表达,上调 CDC20、VEGF 表达,实现抑制 TNF- α 、IL-1 β 与 MDA 表达、降低 AKI 模型对细胞造成损伤的作用。

[关键词] 肾脏微血管内皮细胞;miR-24-3p inhibitor;1-磷酸鞘氨醇受体 2;急性肾损伤模型

[中图法分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)21-3214-06

Role and mechanism of MIR-24-3P/S1PR2 signaling axis for rat renal microvascular endothelial cell injury*

HE Jiaolong¹,XU Yunling^{2△}

(1. Department of Intensive Care Medicine, First Affiliated Hospital of Jishou University/
Xiangxi Tujia Miao Autonomous Prefecture People's Hospital, Jishou, Hunan 416000, China;
2. Zhejiang Provincial Tongde Hospital/Zhejiang Provincial Academy of Traditional Chinese
Medicine/Zhejiang Provincial Key Laboratory of Research and Development of
Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310007, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of miR-24-3p/S1PR2 signal axis on the renal microvascular endothelial cell (RMECs) injury and its influencing mechanism. **Methods** The rat RMECs were obtained by primary isolation and the acute renal injury model was established. The cell proliferation ability was detected by CCK8;the cellular apoptosis and reactive oxygen species (ROS) level were detected by flow cytometry;the TNF- α and IL-1 β expressions were detected by ELISA;the SOD and MDA levels were detected by the biochemical reagent kit;the mRNA expression level of S1PR2 (NM_017192.2) in cells was detected by real time qPCR,and the expression level of S1PR2 and apoptosis related genes caspase-3,caspase-9,CDC20 and

* 基金项目:湖南省卫生健康委员会课题计划项目(202217014301);浙江省中医药科技计划项目(2023ZR006)。 作者简介:贺蛟龙(1986—),副主任医师,硕士,主要从事急危重症医学基础研究与临床诊治。 △ 通信作者,E-mail: xu335629515@163.com。

VEGF were detected by Western blot. **Results** The levels of TNF- α and IL-1 β in the LPS group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), while which in the miR-24-3p inhibitor+LP group were higher than those in the inhibitor NC+LPS group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The MDA and SOD levels in the LPS group were higher than those in the control group, the MDA level in the miR-24-3p inhibitor+LPS group was higher than that in the inhibitor NC+LPS group, but the SOD level was lower than that in the inhibitor NC+LPS group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The SIPR2 mRNA expression level in the LPS group was higher than that in the control group, the SIPR2 mRNA level in the miR-24-3p inhibitor+LPS group was lower than that in the inhibitor NC+LPS group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The SIPR2, caspase-3 and caspase-9 protein expression levels in the LPS group were higher than those in the control group, the CDC20 and VEGF protein expression levels were lower than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). the SIPR2, caspase-3 and caspase-9 protein levels in the miR-24-3p inhibitor+LPS group were lower than those in the inhibitor NC+LPS group, the CDC20 and VEGF protein expression levels were higher than those in the inhibitor NC+LPS group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-24-3p inhibitor inhibitsthe expression of SIPR2 by linkage, down-regulates the caspase-3 and caspase-9 expressions, up-regulates the CDC20 and VEGF expressions, and realizes to inhibit the TNF- α , IL-1 β and MDA expressions and reduce the injury effect of the AKI model on the cells.

[Key words] retinal microvascular endothelial cells; miR-24-3p inhibitor; sphingosine-1-phosphate receptors 2; acute kidney injury model

普遍研究认为,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)引起脓毒症的发生机制与炎症细胞因子“瀑布样释放”、血管氧化应激水平升高和内皮细胞中多糖-蛋白质复合物降解有关^[1]。肾脏是脓毒症的易损器官,严重脓毒症患者中合并急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)发生率高达 50% 以上^[2]。作为一类特殊微血管类型的细胞,肾小球内皮细胞(retinal microvascular endothelial cells, RMECs)损伤已被证实与 AKI 密切相关^[3]。1-磷酸鞘氨醇受体 2 (sphingosine-1-phosphate receptors 2, SIPR2)在成年鼠肾脏和人血管细胞、血管内皮细胞中广泛表达^[4],不仅具有调节多种细胞增殖、生存及迁移等功能,还可以调节血管内皮细胞屏障的通透性^[5-6],参与血管炎症反应^[7-8],介导血管平滑肌细胞的迁移和增殖^[9],被认为在 LPS 血症期间血管内皮的通透性和炎症反应中起关键作用。随着分子微生物学研究的不断进展,越来越多的研究发现,微 RNA(microRNA, miRNA)是参与肾脏各个结构与功能维持的重要稳态调节因子,可通过不完全互补结合到目的基因 mRNA 3' UTR,抑制蛋白翻译进而抑制蛋白合成,从而调节多种生物学过程^[10-11]。miRNA 在 AKI 中多出现异常表达,可能参与 AKI 的发病机制,调节视网膜微血管内皮细胞凋亡、炎症等过程^[12]。在众多 miRNA 中,miR-24-3p 是研究较为广泛的一组^[13-14]。miR-24-3p 在肿瘤组织中高度表达,并促进细胞增殖、迁移和癌细胞的侵袭,在缺血/再灌注中发挥心脏保护作用。基于以上研究背景和预测,本研究拟验证在 LPS 诱导的 RMECs 中,miR-24-3p 靶向调控 SIPR2 表达继而影响细胞损伤

和凋亡过程,以期为 AKI 的临床治疗提供新的思路 and 实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与 RMECs 的分离培养鉴定

SPF 级 3~8 d 龄 SD 大鼠 6 只购于北京阜华康生物科技股份有限公司[许可证号 SYXK(赣)2020-0001]。动物适应环境:温度(23±2)℃,湿度 50%~75%,普通饲料喂养。参照 GREEN 等^[15]的三步梯度筛网法分离肾小球。无菌条件下摘取 4~6 周大鼠肾脏,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗后取肾皮质,剪碎后于 70 μ m 细胞筛网研磨、过滤、离心得到肾小球。再取 0.125%胰蛋白酶消化后的肾小球离心,弃上清液后加入配置好的内皮细胞培养基(20%胎牛血清,DMEM/F12,20 mg/L 内皮生长因子),于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,3 d 后第 1 次换液,随后隔日换液。待细胞融合成单层时进行传代,经鉴定后取第 4~10 代细胞用于后续实验。

采用倒置显微镜观察分离培养的细胞。0.125%胰酶消化细胞后,按 4×10^4 /cm² 将细胞接种于 24 孔板中,待细胞铺满单层后用 PBS 清洗,4%多聚甲醛固定,PBS 再次清洗,加 5%牛血清白蛋白(BSA),37℃封闭 30 min,分别加入一抗 vWF(1:200)孵育 4 h、二抗 Cy3 标记的(1:200)孵育 30 min,PBS 洗 3 次加 DAPI 避光孵育 5 min,50%甘油封闭,荧光显微镜观察。

1.1.2 仪器与试剂

倒置荧光显微镜(CKX53)购于奥林巴斯(上海)有限公司;全自动酶标仪(WD-2102B)、电泳仪(DYY-

8C)和蛋白垂直电泳仪(DYY-6C)均购于北京六一仪器厂;超高灵敏度化学发光成像系统(Chemi Doc™ XRS⁺)、荧光 PCR 仪(CFX Connect™ 实时)均购于伯乐生命医学产品(上海)有限公司;化学发光图像分析系统(Tanon-5200,上海天能科技有限公司);多功能酶标仪(SuPerMax 3100)购于上海闪谱生物科技有限公司。胎牛血清(FBS,10099-141)、营养混合液 F-12(DMEM/F-12)、OPTI-MEM 培养基(31985-062)、GlutaMAX™ 添加剂(10565018)、超敏发光液(RJ239676)购于美国 Gibco 公司;胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液(T1300)、牛血清白蛋白(BSA,A8020)购于北京索莱宝科技有限公司;大鼠肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α ELISA 试剂盒(MM-0180R2)、大鼠白细胞介素(interleukin, IL)-1β ELISA 试剂盒(MM-0047R2)购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;Trizon Reagent(CW0580S)、miRNA 提取试剂盒(CW0627S)、超纯 RNA 提取试剂盒(CW0581M)、BCA 蛋白定量试剂盒(CW0014S)购于北京康为世纪生物科技有限公司;cDNA 第一链合成试剂盒(MR101-02)、实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒(MQ101-02)、逆转录(RT)-qPCR 专用预混液(+gDNA wiper,R223-01)、通用型高敏感度染料法定量 PCR 检测试剂盒(Q711-02)购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;小鼠抗 β-actin 单克隆抗体(TA-09,1:2 000)、辣根化酶标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG,H+L,ZB-2305,1:2 000)、辣根化酶标记的山羊抗兔 IgG(H+L,ZB-2301,1:2 000)购于北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗 S1PR2 抗体(21180-1-ap,1:1 000)购于美国 Proteintech 公司;兔抗 caspase-3(af6311,1:500)、兔抗 caspase-9(AC062,1:500)、兔抗细胞分裂周期蛋白 20(cell division cycle 20, CDC20, af4759, 1:1 000)、兔抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF, af5131, 1:1 000)、vWF(AF3000,1:200)均购于美国 Affinity 公司;Cy3 标记的山羊抗兔 IgG(H+L,As007,ABclonal,1:200)购于武汉爱博泰克生物科技有限公司。miR-24-3p inhibitor、miR-24-3p inhibitor NC、Lipofectamine™2000 转染试剂购于美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞实验分组

当细胞密度达 70% 时进行转染;按照 Lipofectamine™2000 转染试剂说明书进行转染操作。实验根据加入转染物的不同分为 4 组:对照组(control 组),LPS 模型组(LPS 组),inhibitor NC+LPS 组(转染 miR-24-3p inhibitor NC 试剂 100 nmol/L),LPS+miR-24-3p inhibitor 组(转染 miR-24-3p inhibitor 试剂 100 nmol/L)。各组各设 6 个复孔,加药前 24 h 内换无血清培养液。

1.2.2 总 RNA 提取及 RT-qPCR 检测

收集各组细胞,按试剂盒说明书操作提取细胞中总 RNA,按 miRNA 逆转录试剂盒说明书操作逆转录合成 cDNA,测定合成的 cDNA 水平和纯度,采用 RT-qPCR 检测 miR-24-3p 的 mRNA 水平。引物如下:miR-24-3p 上游引物 5'-GCGTGGCTCAGT-TCAGCAG-3',下游引物 5'-AGTGCAGGGTC-CGAGGTATT-3';按照 PCR 试剂盒说明书要求建立反应体系,PCR 循环条件如下:95 ℃ 10 min;95 ℃ 10 s,58 ℃ 30 s,40 个循环;72 ℃ 30 s。以 U6 和 β-actin 作为内参,基因的相对表达水平用 2^{-ΔΔCt} 法进行数据分析。

1.2.3 CCK8 检测与细胞活力计算

细胞生长至 70%~80% 融合时采用胰酶消化、重悬,细胞计数,调整细胞密度为 1×10⁴/孔;24 h 后进行 CCK8 检测,在 96 孔板中配置 100 μL 的细胞悬液,每孔加入 10 μL CCK8 试剂,置于恒温培养箱中避光孵育 2 h;在酶标仪 450 nm 波长处检测各孔的吸光度(A)值。细胞活力 V_{细胞} 计算公式为:

$$V_{\text{细胞}} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡及活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平

转染 miR-24-3p inhibitor 成功后的 RMECs 细胞加入 LPS(1 μg/mL)诱导处理 24 h。收集并洗涤细胞 3 次,胰酶消化细胞、离心,按试剂盒方法加入染料,采用流式细胞仪检测。另取转染 miR-24-3p inhibitor 成功后的 RMECs 细胞加入 LPS(1 μg/mL)诱导处理 24 h。完成造模后,采用无血清培养基按照 1:1 000 稀释 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA),终浓度为 10 μmol/L;弃去细胞培养液,向细胞中加入稀释好的 DCFH-DA,37 ℃ 培养箱孵育 20 min;采用无血清培养液洗涤 3 次,充分去除多余的、未进入细胞的 DCFH-DA;加 1 mL PBS 洗涤,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液;加 500 μL PBS 重悬细胞后采用流式细胞仪检测。

1.2.5 细胞上清液 TNF-α、IL-1β 表达及 SOD、MDA 水平检测

转染 miR-24-3p inhibitor 成功后的 RMECs 细胞加入 LPS(1 μg/mL)诱导处理 24 h。完成造模后,收集上清液;上清液离心,分装,-80 ℃ 冻存。根据 ELISA 法测定培养液中 TNF-α、IL-β。另取转染 miR-24-3p inhibitor 成功后的 RMECs 细胞加入 LPS(1 μg/mL)诱导处理 24 h。采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD,硫代巴比妥酸比色分析法测定 MDA,操作步骤按试剂盒说明书。SOD 活力 V_{SOD} 计算公式为:

$$V_{\text{SOD}} = K / 50\% \times i \times (0.24 \text{ mL} / 0.02 \text{ mL}) / S \quad (2)$$

其中,K 代表 SOD 抑制率,i 代表反应体系稀释倍数,S 代表待测样本蛋白水平。

1.2.6 qPCR 检测

收集细胞,采用 miRNA 提取试剂盒提取总 miRNA,测定其水平和纯度,通过 HiScript II Q RT Super-Mix for qPCR 逆转录试剂盒合成产物,利用 PCR 仪进行 qPCR 检测。引物如下:SlPR2 上游引物 5'-CGC-CAAGGTCAAGCTCTA-3',下游引物 5'-GCAAGC-CTCCAGATGGT-3'; GAPDH 上游引物 5'-GA-CAACTTTGGCATCGTGGA-3',下游引物 5'-ATG-CAGGGATGATGTTCTGG -3'。反应体系如下:2× ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL, cDNA 1 μL,上下游引物各 0.4 μL, RNase Free dd H₂O 补足体积到 20 μL。反应过程:95℃、10 min;95℃、10 s, 57℃、30 s,40 个循环;72℃、30 s。

1.2.7 蛋白免疫印迹(Western blot)检测

收集转染后的 RMECs 细胞,提取细胞总蛋白,BCA 法检测蛋白水平后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转聚偏二氟乙烯膜孵育一抗,4℃过夜,洗膜 3 次后室温下孵育辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或

兔 IgG 二抗 2 h,洗膜后采用增强化学发光液显影拍照,Image J 软件对蛋白条带进行半定量分析,半定量结果以目标条带与 β-actin 条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

1.3 统计学处理

以上各实验独立重复 3 次。采用 Graphpad 8.0 统计软件进行统计分析及作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据两两比较采用独立样本 *t* 检验,多组间数据比较采用 ANOVA 单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RMECs 鉴定结果

RMECs 原代分离培养 3~4 d 后,在倒置显微镜下可观察到贴壁生长的散在集落,细胞以梭形和多角形为主,6 d 后逐渐整合成单层。免疫荧光检测可见 RMECs 呈多角形,细胞质Ⅷ因子相关抗原表达呈强阳性,说明分离培养的细胞为 RMECs,见图 1。

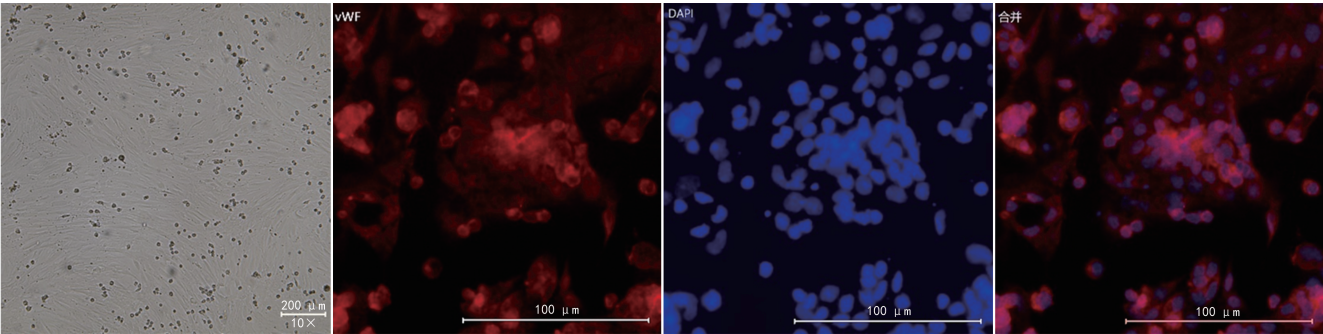
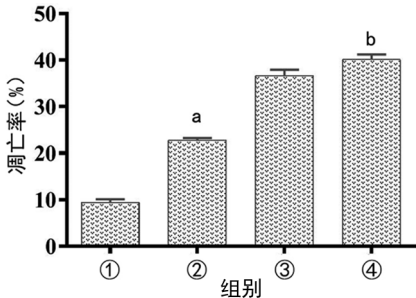


图 1 RMECs 的免疫荧光检测结果

2.2 4 组 RMECs 增殖与凋亡情况比较

与 control 组比较,LPS 组的凋亡率上升(*P* < 0.05);与 inhibitor NC+LPS 组比较,miR-24-3p inhibitor+LPS 组凋亡率上升(*P* < 0.05),见图 2。

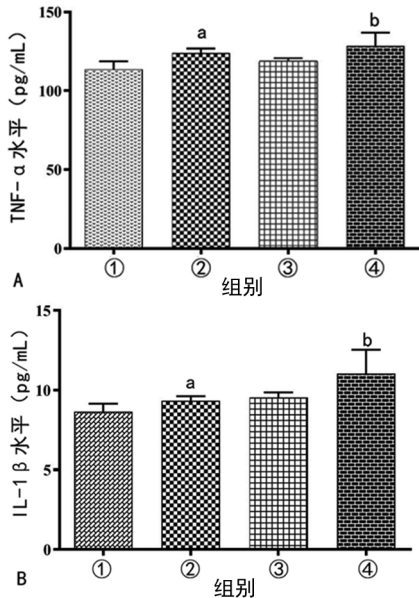


①: control 组;②: LPS 组;③: inhibitor NC + LPS 组;④: LPS + miR-24-3p inhibitor 组;^a: *P* < 0.05,与 control 组比较;^b: *P* < 0.05,与 inhibitor NC+LPS 组比较。

图 2 4 组 RMECs 增殖与凋亡情况比较

2.3 4 组 RMECs 细胞炎症细胞因子表达水平比较

与 control 组比较,LPS 组的 TNF-α、IL-1β 水平上升(*P* < 0.05);与 inhibitor NC+LPS 组比较,miR-24-3p inhibitor + LPS 组的 TNF-α、IL-1β 水平上升(*P* < 0.05),见图 3。

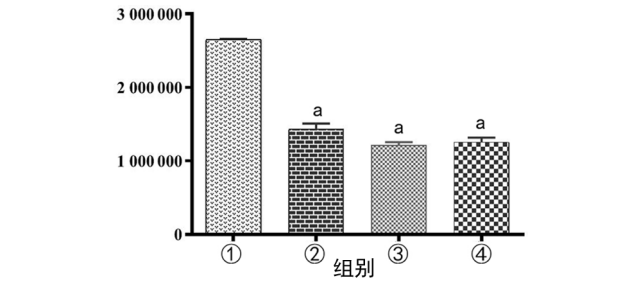


A:4 组 TNF-α 水平比较;B:4 组 IL-1β 水平比较;①: control 组;②: LPS 组;③: inhibitor NC + LPS 组;④: LPS + miR-24-3p inhibitor 组;^a: *P* < 0.05,与 control 组比较;^b: *P* < 0.05,与 inhibitor NC+LPS 组比较。

图 3 4 组 RMECs 炎症细胞因子表达水平比较

2.4 4 组 RMECs 内 ROS 水平比较

与 control 组比较,其他 3 组的 ROS 表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

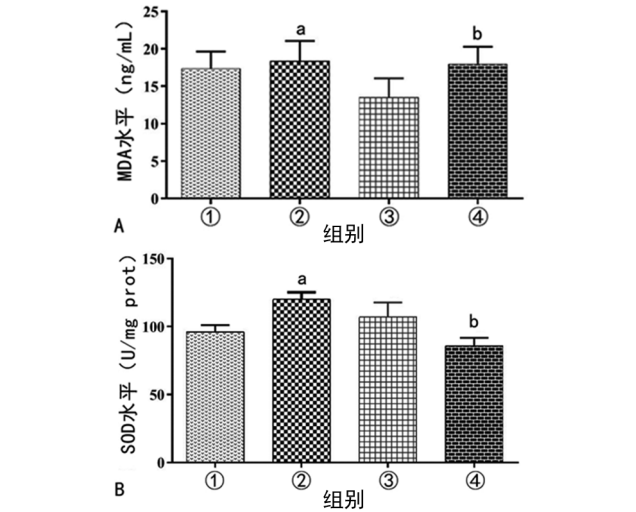


①: control 组; ②: LPS 组; ③: inhibitor NC+LPS 组; ④: LPS+miR-24-3p inhibitor 组; ^a: $P<0.05$, 与 control 组比较。

图 4 4 组 RMECs 内 ROS 水平比较

2.5 4 组 RMECs 氧化应激损伤相关因子表达水平比较

与 control 组比较,LPS 组的 MDA、SOD 表达水平上升($P<0.05$);与 inhibitor NC+LPS 组比较,miR-24-3p inhibitor+LPS 组的 MDA 表达水平上升($P<0.05$),SOD 表达水平下降($P<0.05$),见图 5。



A:4 组 MDA 水平比较;B:4 组 SOD 水平比较;①: control 组; ②: LPS 组; ③: inhibitor NC+LPS 组; ④: LPS+miR-24-3p inhibitor 组; ^a: $P<0.05$, 与 control 组比较; ^b: $P<0.05$, 与 inhibitor NC+LPS 组比较。

图 5 4 组 RMECs 氧化应激损伤相关因子表达水平比较

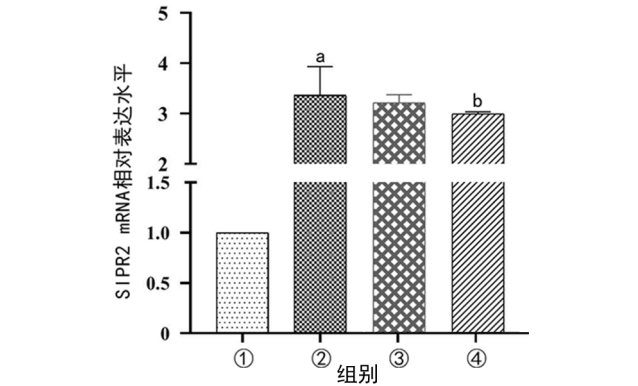
2.6 4 组 RMECs S1PR2 表达水平比较

与 control 组比较,LPS 组的 S1PR2 表达上升($P<0.05$);与 inhibitor NC+LPS 组比较,miR-24-3p inhibitor+LPS 组的 S1PR2 表达下降($P<0.05$),见图 6。

2.7 4 组 RMECs 相关蛋白表达水平比较

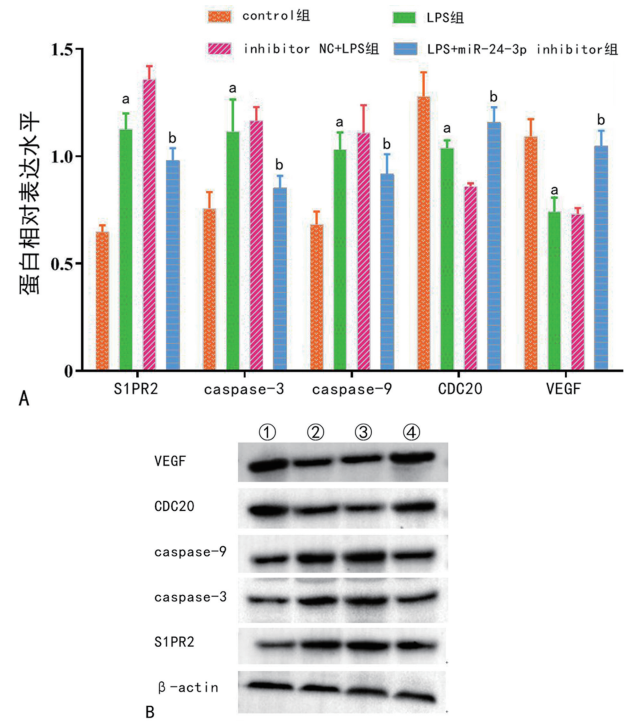
与 control 组比较,LPS 组的 S1PR2、caspase-3、caspase-9 蛋白表达水平上升,CDC20、VEGF 蛋白表达水平下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与 inhibitor NC+LPS 组比较,miR-24-3p inhibitor+LPS 组的 S1PR2、caspase-9、caspase-3 蛋白表达水平下降,

CDC20、VEGF 蛋白表达水平上升,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 7。



①: control 组; ②: LPS 组; ③: inhibitor NC+LPS 组; ④: LPS+miR-24-3p inhibitor 组; ^a: $P<0.05$, 与 control 组比较; ^b: $P<0.05$, 与 inhibitor NC+LPS 组比较。

图 6 miR-24-3p inhibitor 调控 AKI 模型下 RMECs S1PR2 表达水平的影响



A:5 种蛋白表达水平比较;B:5 种蛋白 Western blot 图;①: control 组; ②: LPS 组; ③: inhibitor NC+LPS 组; ④: LPS+miR-24-3p inhibitor 组; ^a: $P<0.05$, 与 control 组比较; ^b: $P<0.05$, 与 inhibitor NC+LPS 组比较。

图 7 4 组 RMECs 相关蛋白表达水平比较

3 讨 论

AKI 是临床上常见的危重症。研究表明,肾脏微血管内皮细胞损伤与大部分肾脏疾病密切相关,是加重肾脏病进展的重要因素^[16]。近年来,临床虽然对肾脏微血管内皮细胞损伤的具体因素及相关机制尚不清楚,而探寻上下游基因水平、调控机制对于治疗甚至干预 AKI 都有重要临床价值。

miRNA 可以调节靶基因的表达,目前已有动物

实验结果显示,某些 miRNA 可作为 AKI 早期诊断的标志物^[17-18]。本研究结果表明 miR-24-3p inhibitor 通过联动抑制 S1PR2 的表达,进而下调 caspase-3、caspase-9 的表达水平,激活 CDC20、VEGF 的表达,降低细胞炎症细胞因子 TNF- α 与促进胞氧化应激损伤因子 MDA 的水平,保护细胞,减少 LPS 对细胞造成损伤。

脓毒症中大量 LPS 存在于循环血液,其可直接损伤内皮细胞或通过间接方式引起内皮细胞的激活和损伤^[19]。有研究表明,LPS 可以呈剂量依赖性引起 RMECs 的形态损伤,浓度为 10 mg/L 时即可使损伤标志物 LPS 明显增加^[20],同时上调组织因子的合成及其在细胞表面的表达水平,促进凝血系统启动。本研究中,LPS 所致的内皮细胞损伤在镜下表现为细胞器发生明显空泡性变性。

miR-24-3p inhibitor 缓解 LPS 诱导 RMECs 凋亡的作用机制还有待于进一步研究,后续实验可围绕临床药物通过 miR-24-3p 介导靶向调控 S1PR2 分子轴来开展更深入的探索。

参考文献

- [1] MARECHAL X, FAVORY R, JOULIN O, et al. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress [J]. Shock, 2008, 29(5): 572-576.
- [2] MA S, EVANS R G, IGUCHI N, et al. Sepsis-induced acute kidney injury: a disease of the microcirculation [J]. Microcirculation, 2019, 26(2): e12483.
- [3] VERMA S K, MOLITORIS B A. Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury [J]. Semin Nephrol, 2015, 35(1): 96-107.
- [4] ZHANG G, YANG L, KIM G S, et al. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation [J]. Blood, 2013, 122(3): 443-455.
- [5] LORENZ J N, ARENDL J, ROBITZ R, et al. Vascular dysfunction in S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor knockout mice [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 292: R440-R446.
- [6] TAKUWA Y, OKAMOTO Y, YOSHIOKA K, et al. Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases [J]. Biofactors, 2012, 38(5): 329-337.
- [7] WANG F, OKAMOTO Y, INOKI I, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in apoE-deficient mice [J]. J Clin Invest, 2010, 120(11): 3979-3995.
- [8] SKOURA A, MICHAUD J, IM D S, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(1): 81-85.
- [9] TAKASHIMA S, SUGIMOTO N, TAKUWA N, et al. G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(4): 689-697.
- [10] LIN Y, CAO H, TIAN Y, et al. miR-24-3p stimulates migration, invasion and proliferation of prostate cancer cells by targeting suppressor of cytokine signaling 6 [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(3): 1803-1810.
- [11] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [12] MAHTAL N, LENOIR O, TINEL C, et al. MicroRNAs in kidney injury and disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2022, 18(10): 643-662.
- [13] TINGLE S J, SEWPAUL A, BATES L, et al. Dual microRNA blockade increases expression of antioxidant protective proteins: implications for ischemia-reperfusion injury [J]. Transplantation, 2020, 104(9): 1853-1861.
- [14] FAN P C, CHEN C C, PENG C C, et al. A circulating miRNA signature for early diagnosis of acute kidney injury following acute myocardial infarction [J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 139.
- [15] GREEN D F, HWANG K H, RYAN U S, et al. Culture of endothelial cells from baboon and human glomeruli [J]. Kidney Int, 1992, 41(6): 1506-1516.
- [16] 雷俊峰, 周芸. 慢性肾脏病微血管内皮细胞损伤机制研究进展 [J]. 国际移植与血液净化杂志, 2016, 14(4): 3.
- [17] 赵阳, 崔丽艳. microRNA 作为急性肾损伤早期诊断生物标志物的研究进展 [J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(8): 4. (下转第 3226 页)