

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.06.005
文章编号: 1005-8982 (2025) 06-0024-08

实验研究·论著

MicroRNA-132-3p 靶向 Nrf2 加重脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的机制研究*

马寒玉, 赵宇浩, 张铭, 李真, 王飞, 陈书艳

(上海交通大学医学院附属新华医院 老年医学科, 上海 200092)

摘要: **目的** 探讨 microRNA-132-3p(miR-132-3p)靶向 Nrf2 加重脂多糖(LPS)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的机制。**方法** 用 LPS 刺激 HUVECs 建立体外脓毒症细胞模型,引起内皮细胞损伤。采用 CCK-8 法测定细胞活力,EdU 法检测细胞增殖能力。转染 miR-132-3p 模拟物/抑制剂后,检测细胞迁移能力、乳酸脱氢酶(LDH)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 、活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平。通过荧光素酶报告基因验证 miR-132-3p 与其靶基因的结合。**结果** 对照组细胞活力、细胞阳性比高于 LPS 组($P < 0.05$)。LPS 组 LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA 水平均较对照组升高($P < 0.05$),SOD 水平较对照组降低($P < 0.05$)。LPS 组 miR-132-3p mRNA 相对表达量较对照组升高($P < 0.05$),Nrf2 mRNA 相对表达量较对照组降低($P < 0.05$)。LPS 组 Nrf2 蛋白相对表达量较对照组降低($P < 0.05$)。LPS 组与 LPS+阴性对照组细胞活力比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),LPS + miR-132-3p 模拟物组细胞活力较 LPS 组降低($P < 0.05$),LPS+miR-132-3p 抑制剂组细胞活力较 LPS 组升高($P < 0.05$)。LPS 组与 LPS+阴性对照组迁移细胞数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),LPS + miR-132-3p 模拟物组迁移细胞数较 LPS 组减少($P < 0.05$),LPS + miR-132-3p 抑制剂组迁移细胞数较 LPS 组增多($P < 0.05$)。LPS 组与 LPS+阴性对照组细胞划痕愈合率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),LPS + miR-132-3p 模拟物组细胞划痕愈合率较 LPS 组降低($P < 0.05$),LPS + miR-132-3p 抑制剂组细胞划痕愈合率较 LPS 组升高($P < 0.05$)。LPS 组与 LPS + 阴性对照组 LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA 和 SOD 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);LPS + miR-132-3p 模拟物组 LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA 水平均较 LPS 组升高($P < 0.05$),SOD 水平较 LPS 组降低($P < 0.05$);LPS + miR-132-3p 抑制剂组 LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA 水平均较 LPS 组降低($P < 0.05$),SOD 水平较 LPS 组升高($P < 0.05$)。对照组与阴性对照组 Nrf2-WT 的荧光素酶活性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),miR-132-3p 模拟物抑制 Nrf2-WT 的荧光素酶活性($P < 0.05$),miR-132-3p 抑制剂增强 Nrf2-WT 的荧光素酶活性($P < 0.05$)。各组 Nrf2-MUT 的荧光素酶活性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。LPS 组与 LPS+阴性对照组 Nrf2 mRNA 相对表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),LPS + miR-132-3p 模拟物组 Nrf2 mRNA 相对表达量较 LPS 组降低($P < 0.05$),LPS+miR-132-3p 抑制剂组 Nrf2 mRNA 相对表达量较 LPS 组升高($P < 0.05$)。LPS 组与 LPS+阴性对照组 Nrf2 蛋白相对表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),LPS + miR-132-3p 模拟物组 Nrf2 蛋白相对表达量较 LPS 组降低($P < 0.05$),LPS+miR-132-3p 抑制剂组 Nrf2 蛋白相对表达量较 LPS 组升高($P < 0.05$)。**结论** miR-132-3p 通过下调 Nrf2 的表达加重了 LPS 诱导的内皮细胞损伤,miR-132-3p 可能是治疗脓毒症的潜在的新靶点。

关键词: 脓毒症; microRNA-132-3p; 内皮细胞; 脂多糖; 核因子红细胞2相关因子2

中图分类号: R631

文献标识码: A

MicroRNA-132-3p targets Nrf2 to exacerbate lipopolysaccharide-induced injury in human umbilical vein endothelial cells*

收稿日期: 2024-10-23

* 基金项目: 国家自然科学基金(No:81974219)

[通信作者] 陈书艳, E-mail: shuyanchencn@163.com; Tel: 13651622760

Ma Han-yu, Zhao Yu-hao, Zhang Ming, Li Zhen, Wang Fei, Chen Shu-yan
(Department of Geriatrics, Xinhua Hospital of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which microRNA-132-3p (miR-132-3p) targets Nrf2 to exacerbate lipopolysaccharide (LPS)-induced injury in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs were stimulated with LPS to establish an in vitro sepsis cell model, inducing endothelial cell injury. Cell viability was measured using the CCK-8 assay, and cell proliferation was assessed using the EdU assay. After transfection with miR-132-3p mimics/ inhibitors, cell migration ability and levels of lactate dehydrogenase (LDH), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) were measured. The binding of miR-132-3p to its target genes was confirmed by luciferase reporter assay. **Results** The cell viability and percentage of positive cells in the control group were higher than those in the LPS group ($P < 0.05$). The levels of LDH, TNF- α , IL-6, IL-1 β , ROS, and MDA were higher and the level of SOD was lower in the LPS group than in the control group ($P < 0.05$). The relative expression of miR-132-3p in the LPS group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), and relative mRNA expression of Nrf2 was lower in the LPS group than that in the control group ($P < 0.05$). The relative protein expression of Nrf2 was lower in the LPS group than that in the control group ($P < 0.05$). The difference in cell viability between the LPS group and the LPS + NC group was not statistically significant ($P > 0.05$). The cell viability of the LPS+miR-132-3p mimic group was lower than that of the LPS group ($P < 0.05$). The cell viability of the LPS+miR-132-3p inhibitor group was higher than that of the LPS group ($P < 0.05$). Comparing the number of migrated cells in the LPS group and the LPS+NC group, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The number of migrated cells in the LPS+miR-132-3p mimic group was decreased ($P < 0.05$), and the number of migrated cells in the LPS+miR-132-3p inhibitor group was increased ($P < 0.05$) compared with that in LPS group. The difference in the cell scratch healing rate between the LPS group and the LPS+NC group was not statistically significant ($P > 0.05$), the cell scratch healing rate in the LPS+miR-132-3p mimic group was lower than that of the LPS group ($P < 0.05$), and the cell scratch healing rate in the LPS+miR-132-3p inhibitor group was higher than that in the LPS group ($P < 0.05$). LDH, TNF- α , IL-6, IL-1 β , ROS, MDA and SOD levels in the LPS group were not different from those in the LPS+NC group ($P > 0.05$). The levels of LDH, TNF- α , IL-6, IL-1 β , ROS, and MDA were higher, but the level of SOD was lower in the LPS+miR-132-3p mimic group than in the LPS group ($P < 0.05$). Compared with the LPS group, LDH, TNF- α , IL-6, IL-1 β , ROS, and MDA levels were lower ($P < 0.05$), and the SOD levels were higher in the LPS+miR-132-3p inhibitor group ($P < 0.05$). The luciferase activities of Nrf2-WT in the control group and the negative control group were not statistically significant ($P < 0.05$). The miR-132-3p mimic inhibited the luciferase activity of Nrf2-WT ($P < 0.05$), and miR-132-3p inhibitor enhanced the luciferase activity of Nrf2-WT ($P < 0.05$). Comparison of the luciferase activities of Nrf2-MUT in each group showed no statistically significant difference ($P > 0.05$). Comparison of the relative mRNA expression of Nrf2 in the LPS group and the LPS+NC group showed no statistically significant difference ($P > 0.05$). The relative mRNA expression of Nrf2 in the LPS+miR-132-3p mimic group was lower compared with that in the LPS group ($P < 0.05$). The relative mRNA expression of Nrf2 in the LPS+miR-132-3p inhibitor group was higher compared with that in the LPS group ($P < 0.05$). Comparison of the relative protein expression of Nrf2 in the LPS group and the LPS+NC group showed no statistically significant difference ($P > 0.05$), the relative protein expression of Nrf2 in the LPS+miR-132-3p mimic group was lower compared with that in the LPS group ($P < 0.05$), and the relative protein expression of Nrf2 in the LPS+miR-132-3p inhibitor group was higher compared with that in the LPS group ($P < 0.05$). **Conclusions** The experiment determined that miR-132-3p aggravated LPS-induced endothelial cell injury by downregulating Nrf2 expression, indicating that miR-132-3p might be a novel potential target for sepsis treatment.

Keywords: sepsis; microRNA-132-3p; endothelial cells; lipopolysaccharide; nuclear factor erythroid 2-related factor 2

脓毒症是由宿主对感染反应失调而引起的可危及生命的器官功能障碍,是一种复杂的综合征^[1]。其是一种全身炎症状态,可诱导内皮细胞活化,导致内皮功能障碍和多器官衰竭^[2]。近年来,越来越

多证据表明血管内皮损伤在脓毒症中起核心作用,保护内皮细胞免受炎症和氧化应激的影响可能是防治脓毒症的一种有效策略^[3-4]。

MicroRNAs (miRNAs) 是长度 20~22 个核苷酸的非编码 RNA^[5]。miRNAs 通常降解 mRNA 或抑制 mRNA 的后翻译,从而降低基因的表达,在许多疾病中调控不同的病理生理过程^[6]。MicroRNA-132-3p (miR-132-3p) 在某些疾病中发挥着多重作用,有研究发现,萘萘酰胺可能通过 miR-132-3p 调控 FOXO1 的表达从而缓解脓毒症肾损伤^[7]。此外,也有研究发现,miR-132 通过阻断 SREBP-1c 代谢途径诱导血管内皮的促炎过程,主要参与内皮细胞凋亡和炎症^[8]。然而,目前尚不清楚 miR-132-3p 如何参与脓毒症的血管内皮损伤。Nrf2 已被证明是调节细胞氧化还原状态和抗氧化反应的一种关键转录因子,对血管内皮具有细胞保护作用^[9-10]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 购自德国 Sigma 公司,DMEM 培养基、胎牛血清、双抗 (青霉素-链霉素溶液) 及 0.25% 胰酶均购自美国 Gibco 公司,miR-132-3p 模拟物、miR-132-3p 抑制剂和阴性对照购自广州锐博生物有限公司,Lipofectamine 3000 试剂购自上海赛默飞世尔科技公司,TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit 逆转录试剂盒购自宝日医生物技术北京有限公司,Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 试剂购自上海翌圣生物科技有限公司,细胞裂解液和 Western blotting 试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自美国 Abclonal 公司,CCK-8、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、EdU 检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,Transwell 小室购自美国康宁公司,抗 Nrf2 抗体购自英国 Abcam 公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海翌圣生物科技有限公司,实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪购自上海赛默飞世尔科技公

司,显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 细胞培养

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 购自中国科学院上海细胞研究所,经过细胞复苏后,在恒温培养箱中用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基以 5% 二氧化碳、37 °C、饱和湿度条件下松盖培养,当细胞铺满至 80% 时再进行后续实验。

1.3 方法

1.3.1 细胞分组及转染 将 LPS (10 μg/mL) 作用于 HUVECs 24 h,建立脓毒症模型,细胞分为对照组和模型组 (LPS 组)。HUVECs 细胞培养 24 h 后,使用 Lipofectamine 3000 试剂进行转染,将 LPS 组细胞分为 LPS 组 (不做转染处理)、LPS+ 阴性对照组 (转染 miR-132-3p 阴性对照)、LPS+miR-132-3p 模拟物组 (转染 miR-132-3p 模拟物 50 nmol/L)、LPS+miR-132-3p 抑制剂组 (转染 miR-132-3p 抑制剂 100 nmol/L)。转染 48 h 后进行后续实验。

1.3.2 EdU 法检测阳性细胞百分比 将 10 μmol/L 的 EdU 染色液加入对照组和 LPS 组细胞,置于培养箱 2 h。4% 多聚甲醛固定 15 min,每孔加入 0.1 mL 0.5% Triton X-100 in 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS),室温孵育 20 min。PBS 洗涤细胞 2 次,加入 Click 工作液,室温避光孵育 30 min。最后加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液对细胞核染色。采用显微镜观察细胞并采集图像,计算 EdU 阳性细胞百分比。

1.3.3 CCK-8 法测定 HUVECs 细胞活力 以 5 × 10³ 个/孔密度将细胞接种于 96 孔板,各组每孔加 10 μL CCK-8,细胞孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。

1.3.4 LDH 活性测定 以 5 × 10³ 个/孔密度将细胞接种于 96 孔板,使用 LDH 细胞毒性检测试剂盒检测在 490 nm 波长下的 LDH 活性。

1.3.5 ELISA 检测细胞因子水平 以 5 × 10⁴ 个/孔密度将细胞接种于 24 孔板中,采用 ELISA 试剂盒检测炎症因子肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) (RK00030)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) (RK00004)、IL-1β (RK00001) 水平。

1.3.6 ROS、SOD 和 MDA 水平测定 以 5 × 10³ 个/孔

密度将细胞接种到96孔板中,用相应试剂盒按说明书分别测定 ROS、SOD 和 MDA 水平。

1.3.7 Western blotting 检测蛋白表达 用 RIPA 裂解缓冲液提取蛋白样品,用 BCA 试剂盒定量,用 SDS-PAGE 分离,转膜后用 5% 牛血清白蛋白阻断 2 h,加入一抗 4 ℃ 孵育过夜,次日于室温下加入山羊抗兔免疫球蛋白 G (稀释比 1:2 000) 孵育 2 h。采用增强化学发光法检测,并用 Image J 软件分析条带强度。

1.3.8 qRT-PCR 检测基因表达 用 TRIzol 试剂提取总 RNA。利用 Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit 合成 cDNA, qRT-PCR 扩增反应采用 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 共 40 次循环。qRT-PCR 引物由上海华津生物科技有限公司合成,各引物序列见表 1。检测 miR-132-3p、Nrf2 的表达, U6 和 GAPDH 分别作为内源对照。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
miR-132-3p	正向: 5'-CCAGCATAACAGTCTACAGCCA-3'	22
	反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCCGT-3'	20
Nrf2	正向: 5'-TTTATAGCGTGCAAACCTCG-3'	20
	反向: 5'-TGGGCAACCTGGGAGTAG-3'	18
GAPDH	正向: 5'-GGAGCGAGATCCCTGCCAAAAT-3'	21
	反向: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'	23
U6	正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	17
	反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCCGT-3'	20

1.3.9 细胞划痕实验检测细胞迁移 将各组细胞接种于 6 孔板中,用 1 mL 无菌吸头尖划伤单层细胞制造划痕, PBS 洗涤细胞 3 次,除去细胞碎片。孔中加入培养基(无血清)继续培养于培养箱中。使用显微镜对 0、48 h 的划痕进行拍照,计算划痕愈合率。

1.3.10 Transwell 实验检测细胞侵袭 取出细胞并消化,加入无血清的 DMEM 培养基重悬为单细胞悬液。将涂有基质胶的 Transwell 放置在 24 孔板中,按 5×10^4 个/孔密度的细胞加入 Transwell 上室,下室加入含 10% 胎牛血清的培养液 800 μ L,放入培养箱中继续培养 24 h,然后 4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,对膜下细胞进行计数。

1.3.11 双荧光素酶活性检测 根据生物信息网

站预测 miR-132-3p 的靶基因,构建野生型 Nrf2 (Nrf2-WT) 和突变型 Nrf2 (Nrf2-MUT) 质粒,然后将 Nrf2-WT 或 Nrf2-MUT 分别与阴性对照、miR-132-3p 模拟物和 miR-132-3p 抑制剂共转染至 HUVECs 中, 24 h 后分别测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的荧光强度。细胞分组为 Nrf2-WT+对照组(将野生型 Nrf2 质粒转染至细胞中)、Nrf2-WT+阴性对照组(将野生型 Nrf2 质粒和阴性对照共转染至细胞中)、Nrf2-WT+miR-132-3p 模拟物组(将野生型 Nrf2 质粒和 miR-132-3p 模拟物共转染至细胞中)、Nrf2-WT+miR-132-3p 抑制剂组(将野生型 Nrf2 质粒和 miR-132-3p 抑制剂共转染至细胞中)、Nrf2-MUT+对照组(将突变型 Nrf2 质粒转染至细胞中)、Nrf2-MUT+阴性对照组(将突变型 Nrf2 质粒和阴性对照共转染至细胞中)、Nrf2-MUT+miR-132-3p 模拟物组(将突变型 Nrf2 质粒和 miR-132-3p 模拟物共转染至细胞中)、Nrf2-MUT+miR-132-3p 抑制剂组(将突变型 Nrf2 质粒和 miR-132-3p 抑制剂共转染至细胞中)。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用 t 检验或方差分析,进一步两两比较用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

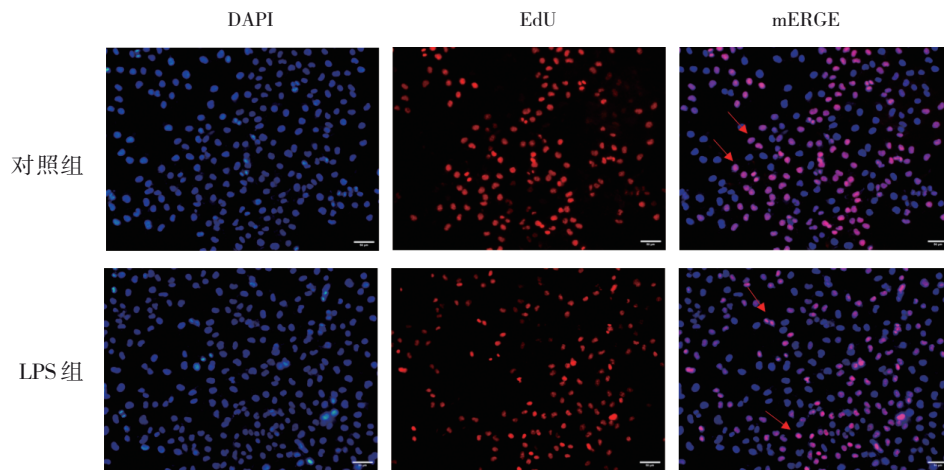
2.1 LPS 对细胞活力和增殖能力的影响

CCK-8 结果显示,对照组与 LPS 组细胞活力分别为 $(99.88 \pm 2.00)\%$ 、 $(83.58 \pm 0.56)\%$,经 t 检验,差异有统计学意义 ($t = 13.630$, $P = 0.000$),对照组较 LPS 组升高。

EdU 染色法结果显示,对照组与 LPS 组细胞阳性比分别为 $(66.32 \pm 5.20)\%$ 、 $(48.65 \pm 1.37)\%$,经 t 检验,差异有统计学意义 ($t = 8.052$, $P = 0.000$),对照组较 LPS 组升高。见图 1。

2.2 LPS 对细胞 LDH、炎症因子和氧化应激产物水平的影响

对照组与 LPS 组 LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA、SOD 水平比较,经 t 检验,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),LPS 组 LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA 水平均较对照组升高,SOD 水平较对照组降低。见表 2。



红色箭头示 Edu 阳性细胞。

图 1 EdU 染色细胞增殖情况 (标尺= 50 μm)

表 2 对照组与 LPS 组的 LDH、TNF-α、IL-6、IL-1β、ROS、MDA、SOD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LDH/(u/L)	TNF-α/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	ROS	MDA/(nmol/mg)	SOD/(u/mg)
对照组	49.98 ± 2.15	101.80 ± 8.23	91.65 ± 7.14	121.60 ± 12.25	1.03 ± 0.09	1.08 ± 0.21	52.64 ± 4.21
LPS 组	165.80 ± 4.21	502.60 ± 33.60	289.60 ± 42.84	376.10 ± 17.09	3.22 ± 0.21	4.02 ± 0.17	29.07 ± 3.60
t 值	42.480	20.060	7.894	20.960	16.320	18.870	7.372
P 值	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001

2.3 LPS 对 miR-132-3p 和 Nrf2 基因表达与蛋白表达的影响

qRT-PCR 结果显示,对照组与 LPS 组细胞 miR-132-3p mRNA 相对表达量分别为 (1.03 ± 0.10)、(2.36 ± 0.25), Nrf2 mRNA 相对表达量分别为 (1.05 ± 0.11)、(0.69 ± 0.08), 两组 miR-132-3p、Nrf2 mRNA 相对表达量比较,经 t 检验,差异均有统计学意义 (t = 8.498 和 4.563, P = 0.001 和 0.010), LPS 组 miR-132-3p mRNA 相对表达量较对照组升高, Nrf2 mRNA 相对表达量较对照组降低。

Western blotting 检测结果显示,对照组与 LPS 组 Nrf2 蛋白相对表达量分别为 (1.02 ± 0.04)、(0.80 ± 0.09), 经 t 检验,差异有统计学意义 (t = 3.946, P = 0.017), LPS 组 Nrf2 蛋白相对表达量较对照组降低。见图 2。

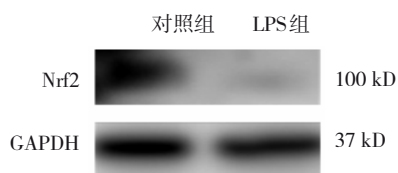


图 2 两组 Nrf2 蛋白条带图

2.4 过表达和抑制 miR-132-3p 对细胞活力和细胞迁移能力的影响

CCK-8 实验结果显示, LPS 组、LPS + 阴性对照组、LPS Nrf+ miR-132-3p 模拟物组、LPS + miR-132-3p 抑制剂组细胞活力分别为 (73.45 ± 0.27)%、(73.74 ± 0.41)%、(43.65 ± 2.82)%、(80.29 ± 1.82)%, 经单因素方差分析,差异有统计学意义 (F = 280.300, P = 0.000), LPS 组与 LPS + 阴性对照组比较,差异无统计学意义 (P > 0.05), LPS + miR-132-3p 模拟物组较 LPS 组降低 (P < 0.05), LPS + miR-132-3p 抑制剂组较 LPS 组升高 (P < 0.05)。

Transwell 实验结果显示, LPS 组、LPS + 阴性对照组、LPS + miR-132-3p 模拟物组、LPS + miR-132-3p 抑制剂组侵袭细胞数分别为 (268.00 ± 5.00)、(270.70 ± 4.73)、(205.70 ± 9.08)、(325.00 ± 9.64) 个/HP, 经单因素方差分析,差异有统计学意义 (F = 126.200, P = 0.000), LPS 组与 LPS + 阴性对照组比较,差异无统计学意义 (P > 0.05), LPS + miR-132-3p 模拟物组较 LPS 组减少 (P < 0.05), LPS + miR-132-3p 抑制剂组较 LPS 组增多 (P < 0.05)。见图 3。

细胞划痕实验结果显示, LPS 组、LPS + 阴性对

照组、LPS + miR-132-3p 模拟物组、LPS + miR-132-3p 抑制剂组细胞划痕愈合率分别为 $(42.91 \pm 0.29)\%$ 、 $(42.02 \pm 1.31)\%$ 、 $(37.25 \pm 0.26)\%$ 、 $(54.77 \pm 1.21)\%$, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义

($F=200.200, P=0.000$), LPS 组与 LPS + 阴性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), LPS + miR-132-3p 模拟物组较 LPS 组降低 ($P<0.05$), LPS + miR-132-3p 抑制剂组较 LPS 组升高 ($P<0.05$)。见图 4。

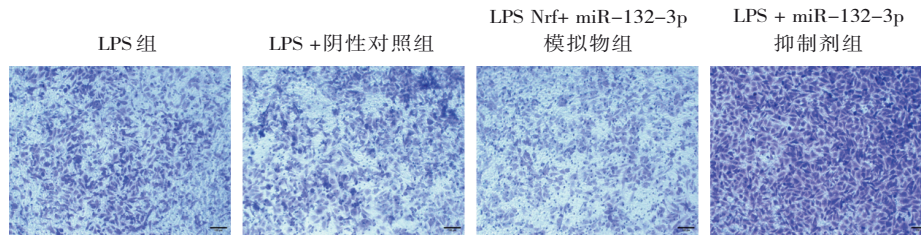


图 3 各组细胞侵袭能力比较 (标尺 = 100 μm)

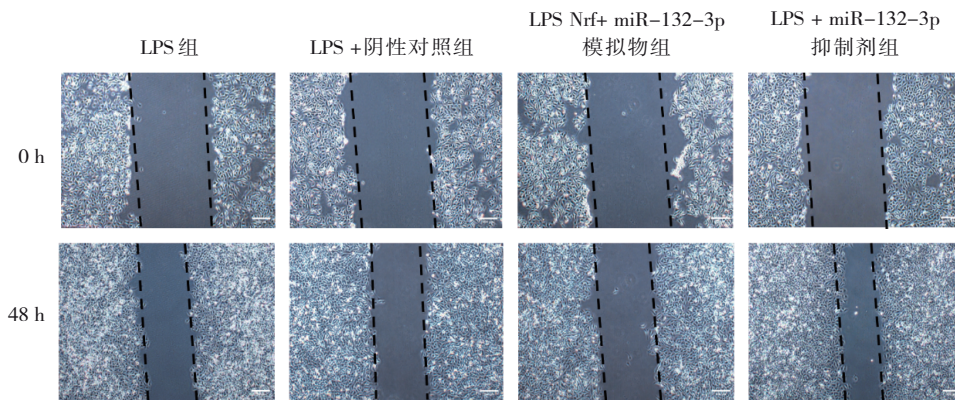


图 4 各组细胞划痕实验结果 (标尺 = 200 μm)

2.5 过表达和抑制 miR-132-3p 对细胞内 LDH、炎症因子和氧化应激产物水平的影响

各组 LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA 和 SOD 水平比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。LPS 组与 LPS+阴性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); LPS + miR-132-3p 模拟

物组 LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA 水平均较 LPS 组升高 ($P<0.05$), SOD 水平较 LPS 组降低 ($P<0.05$); LPS + miR-132-3p 抑制剂组 LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA 水平均较 LPS 组降低 ($P<0.05$), SOD 水平较 LPS 组升高 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组 LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ROS、MDA 和 SOD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LDH/ (u/L)	TNF- α / (pg/mL)	IL-6/ (pg/mL)	IL-1 β / (pg/mL)	ROS	MDA/ (nmol/mg)	SOD/ (u/mg)
LPS 组	153.10 \pm 1.53	530.70 \pm 4.60	370.50 \pm 15.72	408.50 \pm 8.82	3.15 \pm 0.24	4.68 \pm 0.18	31.02 \pm 2.33
LPS+阴性对照组	151.80 \pm 0.39	538.20 \pm 19.66	370.30 \pm 10.08	405.80 \pm 2.05	3.15 \pm 0.27	4.71 \pm 0.16	31.23 \pm 1.50
LPS + miR-132-3p 模拟物组	249.20 \pm 12.76	818.90 \pm 5.55	489.50 \pm 2.56	616.70 \pm 13.20	4.64 \pm 0.46	12.57 \pm 0.44	15.87 \pm 1.89
LPS + miR-132-3p 抑制剂组	134.70 \pm 3.69	365.80 \pm 14.91	199.10 \pm 11.59	367.40 \pm 18.83	1.68 \pm 0.18	3.15 \pm 0.11	50.71 \pm 1.58
F 值	181.500	642.000	350.300	250.700	47.460	829.600	177.300
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.6 miR-132-3p 靶向 Nrf2

通过 TargetScan 生物信息学预测工具检测 Nrf2 是否为 miR-132-3p 靶基因, 发现 Nrf2 3'-UTR 与

miR-132-3p 的特异性结合位点(见图 5)。荧光素酶测定结果显示, 各组 Nrf2-WT 的荧光素酶活性分别为 (74.74 ± 1.29) 、 (75.07 ± 1.09) 、 (28.63 ± 1.85) 、

(126.60 ± 4.46), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 735.200, P = 0.000$), 对照组与阴性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), miR-132-3p 模拟物抑制了 Nrf2-WT 的荧光素酶活性 ($P < 0.05$), miR-132-3p 抑制剂增强了 Nrf2-WT 的荧光素酶活性 ($P < 0.05$)。各组 Nrf2-MUT 的荧光素酶活性分别为 (75.53 ± 0.31)、(75.43 ± 0.95)、(76.43 ± 1.07)、(75.28 ± 0.71), 经单因素方差分析, 差异无统计学意义 ($F = 1.224, P = 0.362$)。以上结果表明 Nrf2 是 miR-132-3p 的直接靶点。

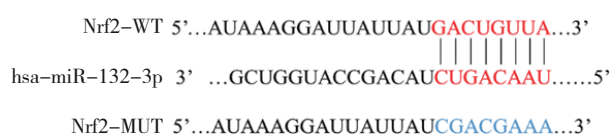
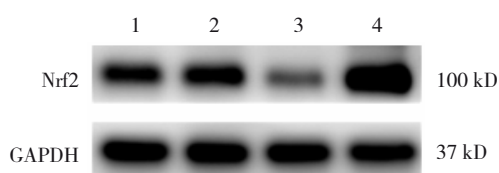


图5 预测 miR-132-3p 和 Nrf2 之间的结合位点

2.7 miR-132-3p 对 Nrf2 mRNA 和蛋白表达的影响

qRT-PCR 结果显示, LPS 组、LPS + 阴性对照组、LPS + miR-132-3p 模拟物组、LPS + miR-132-3p 抑制剂组 Nrf2 mRNA 相对表达量分别为 (1.01 ± 0.05)、(0.98 ± 0.04)、(0.46 ± 0.02)、(2.30 ± 0.16), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 235.100, P = 0.000$), LPS 组与 LPS + 阴性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LPS + miR-132-3p 模拟物组较 LPS 组降低 ($P < 0.05$), LPS + miR-132-3p 抑制剂组较 LPS 组升高 ($P < 0.05$)。

Western blotting 检测结果显示, LPS 组、LPS + 阴性对照组、LPS + miR-132-3p 模拟物组、LPS + miR-132-3p 抑制剂组 Nrf2 蛋白相对表达量分别为 (1.01 ± 0.03)、(1.00 ± 0.07)、(0.42 ± 0.01)、(1.31 ± 0.03), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 241.400, P = 0.000$), LPS 组与 LPS + 阴性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LPS + miR-132-3p 模拟物组较 LPS 组降低 ($P < 0.05$), LPS + miR-132-3p 抑制剂组较 LPS 组升高 ($P < 0.05$)。见图 6。



1: LPS 组; 2: LPS + 阴性对照组; 3: LPS + miR-132-3p 模拟物组; 4: LPS + miR-132-3p 抑制剂组。

图6 各组 Nrf2 蛋白条带图

3 讨论

脓毒症是一种宿主对感染的反应失调, 了解脓毒症的发病机制对防治脓毒症具有重要意义。近年来, 越来越多的证据表明脓毒症以严重的内皮损伤为特征^[11], 现在对脓毒症治疗的新认识已经集中在内皮细胞的保护上。如 FERNÁNDEZ 等^[12]发现内皮损伤的标志物随着脓毒症的严重程度而增加, 内皮细胞成为防治脓毒症的重要治疗靶点。本研究发现 miR-132-3p 通过靶向 Nrf2 影响 LPS 诱导的内皮损伤, 这可能为脓毒症的治疗提供新思路。

LPS 是革兰阴性菌的活性成分, 在脓毒症中起重要作用, 常被用于体外建立脓毒症模型^[13]。在脓毒症发病过程中, LDH 水平升高, TNF- α 、IL-6、IL-1 等促炎因子过度释放, 继而引发级联炎症反应会引起细胞损伤^[14]。此外, 脓毒症发病过程中也会发生氧化应激, 可通过 ROS、MDA 和 SOD 水平检测^[15]。本研究中 HUVECs 经 LPS 刺激后, 细胞活力和增殖能力降低, 细胞内 LDH 和炎症因子的释放增加, ROS 和 MDA 的水平升高, 而 SOD 水平下降, 这表明 LPS 刺激内皮细胞后, 成功建立体外脓毒症模型, 诱导了内皮细胞的损伤。

有研究显示, 许多 miRNA 作为转录后抑制剂发挥关键作用, 调节多种细胞过程, 如细胞增殖和炎症等^[16]。有研究证明, miR-21、miR-30、miR-146a、miR-150 等 miRNA 过表达或低表达对脓毒症起到重要调节功能^[17]。先前有研究表明, 在 LPS 诱导的脓毒症肺损伤模型中, miR-132 在肺组织中的表达显著升高^[18]; miR-132-3p 过表达也可通过抑制 Sirt1 加重缺血性肾损伤^[19]。与这些研究一致, 本研究验证 LPS 诱导 HUVECs 损伤中 miR-132-3p 上调, 且过表达 miR-132-3p 会加重细胞损伤, 而抑制 miR-132-3p 对 LPS 处理的 HUVECs 具有保护作用, 这一点在细胞活力、炎症和氧化应激, 以及细胞功能等方面均得到了证实。

Nrf2 作为一种对氧化应激敏感的转录因子, 对血管内皮具有细胞保护作用^[20]。据报道, miR-132-3p 在 Nrf2 的 3'-UTR 序列中有结合位点^[21]。有研究表明, 激活 Nrf2 可以增强巨噬细胞的抗菌功能, 减轻脓毒症病情^[22]。本研究证明, Nrf2 是 miR-132-3p 的靶基因, 在 LPS 处理的 HUVECs 中, miR-132-3p 过表达抑制了 Nrf2 的表达, Nrf2 的 mRNA 和蛋白表达

降低,miR-132-3p对Nrf2有负向调控作用。

综上所述,在LPS诱导的内皮细胞损伤中,miR-132-3p上调,Nrf2下调,Nrf2可能是miR-132-3p的负向调控靶基因,调控抗炎和抗氧化基因的表达来保护细胞免受各种损伤。在脓毒症发病过程中,miR-132-3p可能通过抑制Nrf2通路加重了内皮细胞损伤,从而进一步加重脓毒症的发病程度,通过该机制通路的研究,表明miR-132-3p可能是治疗脓毒症的一个潜在的新靶点,需要进一步探索。

参 考 文 献 :

- [1] SRZIĆ I, NESEK ADAM V, TUNJIĆ PEJAK D. Sepsis definition: what's new in the treatment guidelines[J]. Acta Clin Croat, 2022, 61(Suppl 1): 67-72.
- [2] GIRARDIS M, DAVID S, FERRER R, et al. Understanding, assessing and treating immune, endothelial and haemostasis dysfunctions in bacterial sepsis[J]. Intensive Care Med, 2024, 50(10): 1580-1592.
- [3] DOLMATOVA E V, WANG K K, MANDAVILLI R, et al. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications[J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(1): 60-73.
- [4] ZIVERI J, LE GUENNEC L, DOS SANTOS SOUZA I, et al. Angiotensin-like 4 protects against endothelial dysfunction during bacterial sepsis[J]. Nat Microbiol, 2024, 9(9): 2434-2447.
- [5] K T, DONG J H, WANG D, et al. MIR-147B regulated proliferation and apoptosis of gastric cancer cells by targeting CPEB2 via the PTEN pathway[J]. Balkan J Med Genet, 2023, 25(1): 61-70.
- [6] 王强, 蒋晓伟, 江文涛, 等. 2型糖尿病患者血清microRNA-187、microRNA-210水平在骨质疏松诊断中的价值[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(24): 92-98.
- [7] 张建成, 石峻, 林武, 等. 萜萜酰胺通过miR-132-3p调控FOXO1改善脓毒症肾损伤机制研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2024, 34(6): 501-506.
- [8] GU Y T, CAI R P, ZHANG C, et al. miR-132-3p boosts caveolae-mediated transcellular transport in glioma endothelial cells by targeting PTEN/PI3K/PKB/Src/Cav-1 signaling pathway[J]. FASEB J, 2019, 33(1): 441-454.
- [9] ZWEIG J A, BRANDES M S, BRUMBACH B H, et al. Loss of NRF2 accelerates cognitive decline, exacerbates mitochondrial dysfunction, and is required for the cognitive enhancing effects of *Centella asiatica* during aging[J]. Neurobiol Aging, 2021, 100: 48-58.
- [10] ZHU L, WU Z H, LIU Y L, et al. Acod1/itaconate activates Nrf2 in pulmonary microvascular endothelial cells to protect against the obesity-induced pulmonary microvascular endotheliopathy[J]. Respir Res, 2024, 25(1): 205.
- [11] VINCENT J L, INCE C, PICKKERS P. Endothelial dysfunction: a therapeutic target in bacterial sepsis? [J]. Expert Opin Ther Targets, 2021, 25(9): 733-748.
- [12] FERNÁNDEZ S, PALOMO M, MOLINA P, et al. Progressive endothelial cell damage in correlation with sepsis severity. Defibrotide as a contender[J]. J Thromb Haemost, 2021, 19(8): 1948-1958.
- [13] ZHOU P, ZHAO C C, CHEN Y H, et al. Klotho activation of Nrf2 inhibits the ferroptosis signaling pathway to ameliorate sepsis-associated acute kidney injury[J]. Transl Androl Urol, 2023, 12(12): 1871-1884.
- [14] 胡培静, 张学丹, 杜占奎, 等. 尾静脉注射衰老标志蛋白30对脓毒症小鼠心肌损伤的抑制作用及其机制[J]. 山东医药, 2024, 64(26): 41-46.
- [15] MARGOTTI W, GOLDIM M P D S, MACHADO R S, et al. Oxidative stress in multiple organs after sepsis in elderly rats[J]. Exp Gerontol, 2022, 160: 111705.
- [16] ZHU L, XU Y, WANG J Q, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes carrying microRNA-30b confer protection against pulmonary fibrosis by downregulating Runx1 via Spred2[J]. Mol Genet Genomics, 2024, 299(1): 33.
- [17] ANTONAKOS N, GILBERT C, THÉROUDE C, et al. Modes of action and diagnostic value of miRNAs in sepsis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 951798.
- [18] ZHU H C, SONG W W, ZHAO M L, et al. Effect of miR-132 on lung injury in sepsis rats via regulating Sirt1 expression[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(2): 1042-1049.
- [19] LI C L, HAN S T, ZHU J F, et al. MiR-132-3p activation aggravates renal ischemia-reperfusion injury by targeting Sirt1/PGC1alpha axis[J]. Cell Signal, 2023, 110: 110801.
- [20] HWANG H J, KIM N, HERMAN A B, et al. Factors and pathways modulating endothelial cell senescence in vascular aging[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 10135.
- [21] STACHURSKA A, CIESLA M, KOZAKOWSKA M, et al. Cross-talk between microRNAs, nuclear factor E2-related factor 2, and heme oxygenase-1 in ochratoxin A-induced toxic effects in renal proximal tubular epithelial cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2013, 57(3): 504-515.
- [22] WANG Y W, TANG B L, LI H J, et al. A small-molecule inhibitor of Keap1-Nrf2 interaction attenuates sepsis by selectively augmenting the antibacterial defence of macrophages at infection sites[J]. EBioMedicine, 2023, 90: 104480.

(李科 编辑)

本文引用格式: 马寒玉, 赵宇浩, 张铭, 等. MicroRNA-132-3p靶向Nrf2加重脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2025, 35(6): 24-31.

Cite this article as: MA H Y, ZHAO Y H, ZHANG M, et al. MicroRNA-132-3p targets Nrf2 to exacerbate lipopolysaccharide-induced injury in human umbilical vein endothelial cells[J]. China Journal of Modern Medicine, 2025, 35(6): 24-31.