

【基础研究】

通信作者:马 骏(1964-),男,上海人,博士,主任医师,主要从事尿毒症、肾性贫血、尿毒症周围神经病变的临床和基础相关研究;E-mail: 18939885272@189.cn。

(Department of Renal Medicine, Jing'an Branch Hospital, Huashan Hospital, Jing'an District Central Hospital, Shanghai 200040, China)

Abstract: Objective To investigate the role of particulate matter 2.5 ($PM_{2.5}$) in oxidative damage of renal tubular epithelial cell HK-2 cells and its regulatory mechanism. **Methods** Human renal tubular epithelial cell HK-2 cells in logarithmic growth phase were selected, and they were randomly divided into the blank control group, negative control group, low-dose $PM_{2.5}$ group, medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group. The HK-2 cells in the blank control group were normal cultured without any treatment; the HK-2 cells in the negative control group were treated with phosphate buffer solution; the HK-2 cells in the low-dose $PM_{2.5}$ group were treated with $PM_{2.5}$ at a concentration of $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h; the HK-2 cells in the medium-dose $PM_{2.5}$ group were treated with $PM_{2.5}$ at a concentration of $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h; the HK-2 cells in the high-dose $PM_{2.5}$ group were treated with $PM_{2.5}$ at a concentration of $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h. The apoptosis rate and Edu positive cell rate of HK-2 cells in each group were detected by flow cytometry and Edu labeling assay. The levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), total reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) were measured by enzyme linked immunosorbent assay. The expression of micro RNA (miRNA)-590-3p in HK-2 cells was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. In addition, the HK-2 cells in logarithmic phase were selected and randomly divided into the miRNA mimics control group, miRNA mimics group, miRNA inhibitor control group and miRNA inhibitor group. The HK-2 cells in the miRNA mimics group and miRNA mimics control group were transfected with miRNA mimics and miRNA mimics control sequence, respectively. The HK-2 cells in the miRNA inhibitor group and miRNA inhibitor control group were transfected with miRNA inhibitor and miRNA inhibitor control sequence, respectively. The targets of miRNA-590-3p were predicted and verified by targetscan database and double Luciferase report experiment. The expression of nuclear factor-erythroid-2-related factor-2 (NFE2L2) was detected by Western blot. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the levels of SOD, GSH-Px, ROS and MDA in the HK-2 cells. **Results** The apoptosis rate of HK-2 cells in the low-dose $PM_{2.5}$ group, medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group were significantly higher than that in the blank control group and negative control group ($P < 0.05$), the apoptosis rate of HK-2 cells in the medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group were significantly higher than that in the low-dose $PM_{2.5}$ group ($P < 0.05$), the apoptosis rate of HK-2 cells in the high-dose $PM_{2.5}$ group were significantly higher than that in the medium-dose $PM_{2.5}$ group ($P < 0.05$). The percentage of Edu positive cells in HK-2 cells in the low-dose $PM_{2.5}$ group, medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group was significantly lower than that in the blank control group and negative control group ($P < 0.05$), the percentage of Edu positive cells in HK-2 cells in the medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group was significantly lower than that in the low-dose $PM_{2.5}$ group ($P < 0.05$), the percentage of Edu positive cells in HK-2 cells in the high-dose $PM_{2.5}$ group was significantly lower than that in the medium-dose $PM_{2.5}$ group ($P < 0.05$). The levels of ROS and MDA in the low-dose $PM_{2.5}$ group, medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group were significantly higher than those in the blank control group and negative control group ($P < 0.05$), the levels of ROS and MDA in the medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group were significantly higher than those in the low-dose $PM_{2.5}$ group ($P < 0.05$), the levels of ROS and MDA in the high-dose $PM_{2.5}$ group were significantly higher than those in the medium-dose $PM_{2.5}$ group ($P < 0.05$). The levels of SOD and GSH-Px in low-dose $PM_{2.5}$ group, medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group were significantly lower than those in the blank control group and negative control group ($P < 0.05$), the levels of SOD and GSH-Px in the medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group were significantly lower than those in the low-dose $PM_{2.5}$ group, the levels of SOD and GSH-Px in the high-dose $PM_{2.5}$ group were significantly lower than those in the medium-dose $PM_{2.5}$ group ($P < 0.05$). The relative expression level of miRNA-590-3p in the low-dose $PM_{2.5}$ group, medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group was significantly higher than that in the blank control group and negative control group ($P < 0.05$), the relative expression level of miRNA-590-3p in the medium-dose $PM_{2.5}$ group and high-dose $PM_{2.5}$ group was significantly higher than that in the low-dose $PM_{2.5}$ group ($P < 0.05$), the relative expression level of miRNA-590-3p in the high-dose $PM_{2.5}$ group was significantly higher than that in the medium-dose $PM_{2.5}$ group ($P < 0.05$). There was a binding target between miRNA-590-3p and 3' untranslated region (UTR) of NFE2L2. The total NFE2L2 levels and nuclear NFE2L2 levels in the miRNA mimics group were significantly lower than those in the miRNA mimics control group ($P < 0.05$). The total NFE2L2 levels and nuclear NFE2L2 levels in the miRNA inhibitor group were significantly higher than those in the miRNA inhibitor group ($P < 0.05$). Compared with the miRNA mimics control group, the levels of ROS and MDA in HK-2 cells in the miRNA mimics group increased, while the levels of SOD and GSH-Px decreased ($P < 0.05$). Compared with the miRNA inhibitor control group, the levels of ROS and MDA in HK-2 cells in the miRNA inhibitor group decreased, and the levels of SOD and GSH-Px increased ($P < 0.05$). **Conclusion** $PM_{2.5}$ can inhibit the expression of NFE2L2 by up-regulating the expression of miRNA-590-3p, thus aggravating the oxidative damage of renal tubular epithelial cells.

Key words: particulate matter 2.5; renal tubular epithelial cells; micro RNA-590-3p; oxidative damage; nuclear factor-erythroid-2-related factor-2

空气污染在全世界都是一个非常严重的问题,尤其是在发展中国家。细颗粒物 2.5 (particulate matter 2.5, $PM_{2.5}$) 是一种由不同粒径和化学成分构成的非均质混合物的空气污染物^[1-3]。ZHANG 等^[4]通过蛋白互作网络发现 $PM_{2.5}$ 对耳鼻喉、胃肠、肾脏、心血管等疾病有一定的影响。LEIVA 等^[5]研究发现,环境中 $PM_{2.5}$ 明显增加脑血管疾病发生的风险。随着研究的深入, $PM_{2.5}$ 对肾脏氧化应激损伤的作用越来越得到重视。AZTATZI-AGUILAR 等^[6]发现,亚慢性暴露于 $PM_{2.5}$ 可导致抗氧化和免疫系统失衡而引起早期肾脏损伤。然而, $PM_{2.5}$ 所致肾脏氧化损伤的分子机制目前尚未完全阐明。目前,大量研究发现微 RNA (microRNA, miRNA) 在调控氧化应激中具有重要作用。WANG 等^[7]研究发现, miRNA-873-5p 通过调节 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein1, Keap1)/核因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid-2-related factor-2, NFE2L2) 通路可减轻氧化应激和细胞凋亡,进而减轻黏菌素诱导的肾脏损伤。ZHOU 等^[8]研究发现, $PM_{2.5}$ 通过下调 miRNA-194-3p 而加重支气管上皮细胞凋亡。由此推测, $PM_{2.5}$ 可能通过调控 miRNA 异常表达而加重肾脏氧化损伤。基于此推测,本研究探索 $PM_{2.5}$ 在肾小管上皮细胞 HK-2 细胞氧化损伤中的作用及其调控机制,以期揭示 $PM_{2.5}$ 所致肾脏氧化损伤的分子机制,为 $PM_{2.5}$ 所致肾脏损伤的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞、仪器与试剂 人肾小管上皮细胞株 HK-2 细胞购自中国科学院细胞库。Annexin V 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate isomer, FITC)/碘化丙啶 (propidine iodide, PI) 凋亡检测试剂盒、EdU-647 细胞增殖检测试剂盒、总 RNA 提取试剂盒及反转录试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, NFE2L2 基因片段由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,胎牛血清和达尔博克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)/F12 培养液购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,总活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 分析试剂盒购自美国 Sigma Aldrich 公司,放射免疫沉淀测定 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、细胞核蛋白提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒购自美国 R&D Systems 公司, NFE2L2 兔多克隆抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)

兔多克隆抗体、Lamin B 兔多克隆抗体和羊抗兔二抗购自英国 Abcam 公司; BD FACSCanto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司, JIDI-16R 台式多用途高速冷冻离心机购自广州吉迪仪器有限公司, PT-350C 全波长酶标仪购自北京普天新桥技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和分组 取 HK-2 细胞,将细胞稀释于含胎牛血清的 DMEM/F12 (1:1) 培养液中,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养;待达到 70% ~ 80% 融合时,应用 $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰酶消化, $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 随后制成单细胞悬液,并按 1:4 比例传代。收集对数生长期的 HK-2 细胞,应用 $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰酶消化, $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 然后加入含二甲亚砜的培养液,调整细胞浓度至 $(1 \sim 5) \times 10^9\text{ L}^{-1}$, 置于冻存管中,于 -20 ℃ 冰箱中冻存,最后放入液氮罐中保存。取对数生长期的 HK-2 细胞随机分为空白对照组、阴性对照组、 $PM_{2.5}$ 低剂量组、 $PM_{2.5}$ 中剂量组和 $PM_{2.5}$ 高剂量组 5 组。空白对照组细胞正常培养,不给予任何处理;阴性对照组细胞给予 10 μL 的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 孵育 24 h; $PM_{2.5}$ 低剂量组 HK-2 细胞给予含 $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $PM_{2.5}$ 的细胞培养基孵育 24 h; $PM_{2.5}$ 中剂量组 HK-2 细胞给予含 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $PM_{2.5}$ 的细胞培养基孵育 24 h; $PM_{2.5}$ 高剂量组 HK-2 细胞给予含 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $PM_{2.5}$ 的细胞培养基孵育 24 h。

1.2.2 流式细胞仪检测 HK-2 细胞凋亡 取各组 HK-2 细胞,重悬于 0.1 mL Binding Buffer 缓释液中,加入 $20\text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ Annexin-V-FITC 10 μL , 轻轻混匀,并在 37 ℃、避光条件下孵育 0.5 h,加入 $50\text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ PI 5 μL , 轻轻混匀后,在 37 ℃、避光条件下孵育 5 min,加入 0.4 mL Binding Buffer 缓冲液,应用 BD FACSCanto II 流式细胞仪进行检测凋亡率,光源为 488 nm 氩离子激光器, FITC 受激发后发绿色荧光, PI 发红色荧光。Annexin V FITC⁻/PI⁻ 细胞表示活细胞, Annexin V FITC⁺/PI⁻ 细胞表示早期凋亡细胞, Annexin V FITC⁺/PI⁺ 细胞表示晚期凋亡细胞, Annexin V FITC⁻/PI⁺ 细胞表示坏死细胞。计量细胞凋亡率, 凋亡率 = $100\% \times [(\text{早期凋亡细胞数目} + \text{晚期凋亡细胞数目}) / \text{全部细胞数目} - 1]$ 。实验重复 3 次,取均值。

1.2.3 Edu 标记实验测定 HK-2 细胞增殖能力 取各组 HK-2 细胞,调整细胞密度为 $4 \times 10^6\text{ L}^{-1}$, 每孔 0.1 mL 接种于 96 孔板,于 37 ℃、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养 12 h, PBS 清洗后更换含 Edu 的无血清培养基,孵育 2 h;用预冷的 PBS 清洗 2 次,加入 $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛 200 μL 进行固定,孵育 0.5 h 后应用 PBS 清洗,加入 $2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘氨酸,室

温孵育 5 min;清洗后加入 300 μL 含 Triton X-100 PBS 渗透剂,室温孵育 10 min 后应用 PBS 清洗;0.1 mL Apollo[®] 染色反应液避光孵育 45 min,清洗后避光孵育 30 min,应用 BD FACSCanto II 流式细胞仪检测 EdU 染色阳性细胞比例。EdU 染色阳性细胞比例高低表示细胞增殖能力强弱。实验重复 3 次,取均值。

1.2.4 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测 HK-2 细胞中 ROS、MDA 水平及 GSH-Px、SOD 活性 取各组 HK-2 细胞,去除培养液后用 PBS 液洗,6 孔板中每孔加入 200 μL RIPA 裂解液并吹打数下,10 000 $\times g$ 离心 5 min 后收集上清液;将上清液加入到冷的线粒体分离缓冲液中,摇匀。分别应用 ROS 分析试剂盒、MDA 检测试剂盒检测 ROS 和 MDA 水平;分别应用 GSH-Px 检测试剂盒、SOD 活性检测试剂盒检测抗氧化酶 GSH-Px、SOD 水平;严格按照试剂盒说明进行操作。实验重复 3 次,取均值。

1.2.5 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 HK-2 细胞中 miRNA-590-3p 表达

取“1.2.1”中的各组 HK-2 细胞,2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰酶消化后离心收集细胞,应用总 RNA 提取试剂盒提取各组总 RNA,采用反转录试剂盒反转录制备 cDNA。应用 qRT-PCR 检测 miRNA 相对表达量。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;miRNA-590-3p 上游引物:5'-AAAGATTCCAAGAAGCTAAGGCTG-3',下游引物:5'-CCTAACTGGTTTCCTGTGCTA-3'。U6 做内参照,U6 上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCA-CA-3',下游引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 miRNA 相对表达量。实验重复 3 次,取均值。

1.2.6 细胞转染 取未经处理的对数生长期的 HK-2 细胞,按每孔 $(1 \sim 5) \times 10^6$ 个接种到 6 孔板并过夜培养;100 μL 无血清无双抗培养基与 4 μg miRNA mimics 或 miRNA inhibitor 混匀,设 miRNA mimics 对照序列和 miRNA inhibitor 对照序列,加入 4 μL LipofectamineTM 2000 转染试剂并混匀,然后再加入到 PBS 清洗后的细胞中;加入 800 μL 无血清无双抗培养基培养 6 h 后,更换为含胎牛血清的培养基继续培养 1~2 d。将转染 miRNA mimics 对照序列、miRNA mimics、miRNA inhibitor 对照序列和 miRNA inhibitor 的细胞分别设为 miRNA 类似物对照组、miRNA 类似物组、miRNA 抑制剂对照组和 miRNA 抑制剂组,收集各组细胞进行后续实验。

1.2.7 双荧光素酶报告实验检测 miRNA-590-3p 和 NFE2L2 mRNA 的结合 将 NFE2L2 3'非翻译区

(3'-untranslated region, 3' UTR) 野生型基因片段 (wild type, WT) 和突变型基因片段 (mutant type, MUT) 引入到 pMIR-reporter 后,插入 pMIR-REPORTREPORT 荧光素酶报告质粒,随后经测序检测,然后分别与 mimics control (阴性转染组) 或 miRNA-590-3p mimics 共转染至 HEK-293T 细胞中 (miRNA-590-3p mimics + WT 转染组、miRNA-590-3p mimics + MUT 转染组)。转染 2 d 后收集 HEK-293T 细胞;去除培养液后用 PBS 液洗,6 孔板中每孔加入 500 μL 的报告基因细胞裂解液,充分裂解后,10 000 $\times g$ 离心 5 min 并收集上清,利用荧光素酶检测系统分别检测 2 种酶活性,随后计算相对荧光素酶活力。相对荧光素酶活力以萤火虫荧光素酶反应强度与内参海肾荧光素酶反应强度比值表示。实验重复 3 次,取均值。

1.2.8 Western blot 法检测转染后各组 HK-2 细胞中 NFE2L2 表达 取“1.2.6”中的各组细胞,去除培养液后用 PBS 液洗,6 孔板中每孔加入 200 μL 的 RIPA 裂解液并用枪吹打数下。10 000 $\times g$ 离心 5 min 后收集上清后,收集总蛋白;应用细胞核蛋白提取试剂盒提取细胞核蛋白。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭。分别滴加一抗 NFE2L2 抗体 (1:500) 和 GAPDH 抗体 (1:1 000),过夜孵育;洗膜后滴加羊抗兔二抗 (1:2 000) 孵育,2 h 后添加增强化学发光反应底物,暗室曝光后扫描底片,最后计算灰度值,蛋白相对表达量以目的蛋白灰度值与 GAPDH 灰度值比值表示。实验重复 3 次,取均值。

1.2.9 ELISA 法检测各组转染后 HK-2 细胞中 ROS、MDA 水平及 GSH-Px、SOD 活性 取“1.2.6”中的各组对数生长期细胞,qRT-PCR 检测各组细胞 ROS、MDA 水平及 GSH-Px、SOD 活性,方法同“1.2.4”。

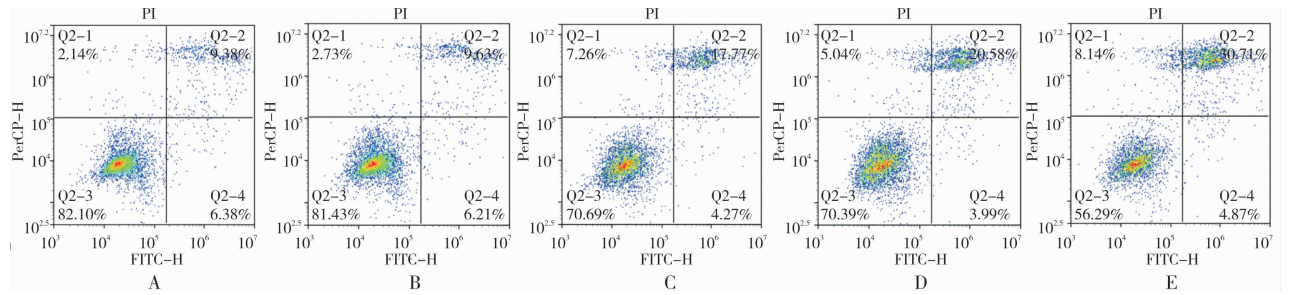
1.3 统计学处理 应用 SPSS 21.0 统计软件进行数据统计与分析,符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5 组 HK-2 细胞凋亡率及 Edu 标记阳性率比较 结果见图 1 和图 2。流式凋亡检测结果显示,空白对照组、阴性对照组、PM_{2.5} 低剂量组、PM_{2.5} 中剂量组、PM_{2.5} 高剂量组细胞凋亡率分别为 $(9.51 \pm 0.56)\%$ 、 $(9.59 \pm 0.41)\%$ 、 $(18.22 \pm 0.59)\%$ 、 $(20.66 \pm 0.62)\%$ 、 $(30.88 \pm 0.92)\%$ 。PM_{2.5} 低剂量组、PM_{2.5} 中剂量组、PM_{2.5} 高剂量组细胞凋亡率均显

著高于空白对照组和阴性对照组,PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组细胞凋亡率均显著高于 PM_{2.5}低剂量组,PM_{2.5}高剂量组细胞凋亡率显著高于 PM_{2.5}中剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组与阴性对照组细胞凋亡率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。EdU 细胞增殖检测结果显示,空白对照组、阴性对照组、PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组 HK-2 细胞 Edu 阳性细胞率分别为 $(37.61 \pm 1.21)\%$ 、 $(35.68 \pm 0.59)\%$ 、 $(32.17 \pm 0.86)\%$ 、

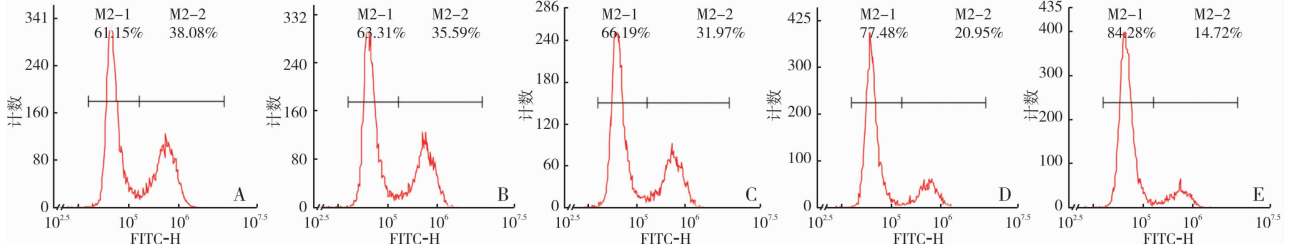
$(20.85 \pm 0.45)\%$ 、 $(14.88 \pm 0.57)\%$ 。PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组 HK-2 细胞 Edu 阳性细胞率均显著低于空白对照组和阴性对照组,PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组 HK-2 细胞 Edu 阳性细胞率均显著低于 PM_{2.5}低剂量组,PM_{2.5}高剂量组 HK-2 细胞 Edu 阳性细胞率显著低于 PM_{2.5}中剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组与阴性对照组 HK-2 细胞 Edu 阳性细胞率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:PM_{2.5}低剂量组;D:PM_{2.5}中剂量组;E:PM_{2.5}高剂量组。

图 1 5 组 HK-2 细胞凋亡率

Fig.1 The apoptosis rate of HK-2 cells in the five groups



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:PM_{2.5}低剂量组;D:PM_{2.5}中剂量组;E:PM_{2.5}高剂量组。

图 2 5 组 HK-2 细胞 Edu 标记阳性率

Fig.2 The positive Edu labeling rate of HK-2 cells in the five groups

2.2 5 组 HK-2 细胞中 ROS、MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性比较 结果见表 1。PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组细胞中 ROS 和 MDA 水平均显著高于空白对照组和阴性对照组,PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组细胞中 ROS 和 MDA 水平均显著高于 PM_{2.5}低剂量组,PM_{2.5}高剂量组细胞中 ROS 和 MDA 水平显著高于 PM_{2.5}中剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组与阴性对照组细胞中 ROS 和 MDA 水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组细胞中 SOD 和 GSH-Px 活性均显著低于空白对照组和阴性对照组,PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组细胞中 SOD 和 GSH-Px 活性均显著低于 PM_{2.5}低剂量组,PM_{2.5}高剂量组细胞中 SOD 和 GSH-Px 活性显著低于 PM_{2.5}中剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组与阴性对照组细胞中 SOD 和 GSH-Px 活性比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 5 组 HK-2 细胞 ROS、MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性比较

Tab.1 Comparison of the levels of ROS,MDA,SOD and GSH-Px in HK-2 cells among the five groups					
组别	n	ROS/(F/F0)	MDA/(mmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)
空白对照组	3	1.18 ± 0.12	1.47 ± 0.21	16.57 ± 2.06	1.55 ± 0.19
阴性对照组	3	1.16 ± 0.14	1.42 ± 0.18	16.63 ± 2.15	1.48 ± 0.15
PM _{2.5} 低剂量组	3	1.61 ± 0.17 ^a	1.86 ± 0.23 ^a	13.09 ± 1.59 ^a	1.26 ± 0.14 ^a
PM _{2.5} 中剂量组	3	2.18 ± 0.21 ^{ab}	2.43 ± 0.26 ^{ab}	8.86 ± 1.32 ^{ab}	0.89 ± 0.13 ^{ab}
PM _{2.5} 高剂量组	3	2.73 ± 0.32 ^{abc}	3.05 ± 0.35 ^{abc}	6.14 ± 1.10 ^{abc}	0.58 ± 0.10 ^{abc}

注:与空白对照组、阴性对照组比较^a $P < 0.05$;与 PM_{2.5}低剂量组比较^b $P < 0.05$;与 PM_{2.5}中剂量组比较^c $P < 0.05$ 。

2.3 miRNA-590-3p 对 NFE2L2 表达水平的影响 结果见图 3 和图 4。空白对照组、阴性对照组、PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组和 PM_{2.5}高剂量组细胞 miRNA-590-3p 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14、1.01 ± 0.09、2.08 ± 0.10、2.48 ± 0.11、3.11 ± 0.12。PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组细胞 miRNA-590-3p 相对表达水平均显著高于空白对照组和阴性对照组,PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组细胞 miRNA-590-3p 相对表达水平均显著高于 PM_{2.5}低剂量组,PM_{2.5}高剂量组细胞 miRNA-590-3p 相对表达水平显著高于 PM_{2.5}中剂量组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);空白对照组与阴性对照组 miRNA-590-3p 相对表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Targetscan 对 miRNA-590-3p 下游靶点预测结果显示,miRNA-590-3p 和 NFE2L2 的 3'UTR 存在结合位点。阴性转染组、miRNA-590-3p mimics + WT 转染组、miRNA-590-3p mimics + MUT 转染组相对荧光强度分别为 (100.00 ± 4.36)%、(40.33 ± 7.57)%、(100.67 ± 14.36)%、(102.33 ± 6.11)%。miRNA-590-3p mimics + WT 转染组细胞相对荧光强度显著低于阴性转染组和 miRNA-590-3p mimics + MUT 转染组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);阴性转染组和 miRNA-590-3p mimics + MUT 转染组细胞相对荧光强度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。miRNA 类似物对照组、miRNA 类似物组、miRNA 抑制剂对照组、miRNA 抑制剂组细胞中总 NFE2L2 水平分别为 1.00 ± 0.09、0.39 ± 0.05、1.00 ± 0.09、3.02 ± 0.17。miRNA 类似物对照组、miRNA 类似物组、miRNA 抑制剂对照组、miRNA 抑制剂组细胞核内 NFE2L2 水平分别为 1.00 ± 0.08、0.39 ± 0.04、1.00 ± 0.10、2.03 ± 0.11。miRNA 类似物组细胞中总 NFE2L2 水平和细胞核中 NFE2L2 水平显著低于 miRNA 类似物对照组,miRNA 抑制剂组细胞中总 NFE2L2 水平和细胞核中 NFE2L2 水平显著高于 miRNA 抑制剂对照组,miRNA 类似物组细胞中总 NFE2L2 水平和细胞核中 NFE2L2 水平显著低于 miRNA 抑制剂组,差异均有统

计学意义 ($P < 0.05$);miRNA 类似物对照组细胞中总 NFE2L2 水平和细胞核中 NFE2L2 水平与 miRNA 抑制剂对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

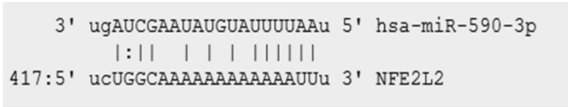
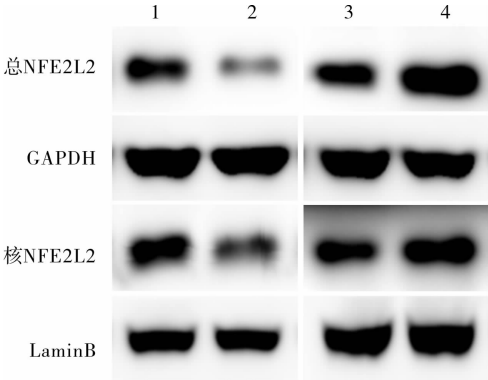


图 3 Targetscan 预测 miRNA-590-3p 下游结合位点
Fig. 3 Downstream binding sites of miRNA-590-3p predicted by targetscan



1:miRNA 类似物对照组;2:miRNA 类似物组;3:miRNA 抑制剂对照组;4:miRNA 抑制剂组。
图 4 4 组 HK-2 细胞中 NFE2L2 水平比较
Fig. 4 Comparison of NFE2L2 level of HK-2 cells among the four groups

2.4 miRNA-590-3p 对细胞氧化应激指标的影响 结果见表 2。与 miRNA 类似物对照组比较,miRNA 类似物组 HK-2 细胞中 ROS、MDA 水平增高,SOD、GSH-Px 活性降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 miRNA 抑制剂对照组比较,miRNA 抑制剂组 HK-2 细胞中 ROS 和 MDA 水平降低,SOD 和 GSH-Px 活性升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与 miRNA 类似物组比较,miRNA 抑制剂组 HK-2 细胞 ROS 和 MDA 水平降低,SOD 和 GSH-Px 活性升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);miRNA 类似物对照组与 miRNA 抑制剂对照组细胞 ROS、MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 4 组 HK-2 细胞氧化应激相关指标水平变化

Tab. 2 Comparison of oxidative stress related indexes of HK-2 cells among the four groups						($\bar{x} \pm s$)
组别	n	ROS/(F/F0)	MDA/(mmol · mg ⁻¹)	SOD/(U · mg ⁻¹)	GSH-Px/(U · mg ⁻¹)	
miRNA 类似物对照组	3	1.22 ± 0.11	1.51 ± 0.17	16.52 ± 1.83	1.54 ± 0.17	
miRNA 类似物组	3	2.26 ± 0.28 ^a	2.84 ± 0.30 ^a	6.17 ± 0.89 ^a	0.59 ± 0.10 ^a	
miRNA 抑制剂对照组	3	1.24 ± 0.10	1.49 ± 0.20	16.53 ± 1.92	1.57 ± 0.19	
miRNA 抑制剂组	3	1.01 ± 0.09 ^{bc}	1.45 ± 0.26 ^{bc}	12.31 ± 1.33 ^{bc}	1.27 ± 0.14 ^{bc}	

注:与 miRNA 类似物对照组比较^a $P < 0.05$;与 miRNA 抑制剂对照组比较^b $P < 0.05$;与 miRNA 类似物组比较^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

PM_{2.5}已经成为肺、脑、肝等器官损伤和疾病进展的危险因素^[9-10]。CHENXU等^[11]研究发现,PM_{2.5}长期暴露可导致大鼠炎症反应和氧化应激加重,引起肾损伤。多项纵向研究表明,PM_{2.5}暴露与肾功能下降有关,且随时间推移,肾功能恶化速度加快^[12-13]。目前,PM_{2.5}所致肾损伤已经成为研究的热点。然而,PM_{2.5}引起肾氧化损伤的分子机制尚未被完全阐明。阐明PM_{2.5}所致肾氧化损伤的分子机制将有助于肾损伤的临床治疗和相关药物的开发。因此,本研究探讨PM_{2.5}引起肾小管上皮细胞氧化损伤的作用及其分子机制。本研究结果显示,PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组HK-2细胞凋亡率均显著高于空白对照组和阴性对照组,且细胞凋亡率随PM_{2.5}浓度的增加而增加;PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组HK-2细胞Edu阳性率均显著低于空白对照组和阴性对照组,且HK-2细胞Edu阳性率随PM_{2.5}浓度的增加而降低,说明PM_{2.5}处理可显著提高肾小管上皮细胞凋亡率,降低其增殖能力,且呈剂量依赖性,进一步证实PM_{2.5}是导致肾功能损伤的危险因子。有研究显示,氧化应激是PM_{2.5}所致损伤的关键机制^[14-15]。因此,本研究对肾小管上皮细胞ROS、MDA水平以及其抗氧化酶SOD和GSH-Px活性进行检测,结果显示,PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组HK-2细胞中ROS和MDA水平均显著高于空白对照组和阴性对照组,且随PM_{2.5}浓度的增加而增加;PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组HK-2细胞中SOD和GSH-Px活性均显著低于对照组和阴性对照组,且随PM_{2.5}浓度的增加而降低,呈剂量依赖性。以上结果均说明,PM_{2.5}处理可明显提高肾小管上皮细胞ROS和MDA水平,降低肾小管上皮细胞抗氧化酶SOD和GSH-Px水平,且呈剂量依赖性,证实PM_{2.5}导致的肾损伤是由氧化应激引起的。

目前,miRNA已经被证实广泛参与氧化应激、炎症、自噬、上皮间充质转化等生物学过程^[16-17]。SONG等^[18]报道,PM_{2.5}能够下调miRNA-331的表达,从而诱发人类呼吸道上皮细胞中核因子 κ B异常激活,并通过ROS加重肺损伤。因此,推测PM_{2.5}可能是通过调控miRNA异常表达而影响氧化应激。WANG等^[19]研究发现,上调miRNA-590-3p能够加重氧化应激。然而,PM_{2.5}是否通过调控miRNA-590-3p加重氧化应激目前尚未见报道。因此,本研究对PM_{2.5}和miRNA-590-3p间的关系进行分析,结果显示,PM_{2.5}低剂量组、PM_{2.5}中剂量组、PM_{2.5}高剂量组细胞中miRNA-590-3p相对表达水平均显著高于空

白对照组和阴性对照组,且miRNA-590-3p相对表达水平随PM_{2.5}浓度的增加而增加,说明PM_{2.5}处理可显著增加肾脏上皮细胞miRNA-590-3p的表达水平,且呈剂量依赖性,提示PM_{2.5}可能通过上调miRNA-590-3p水平而发挥肾脏氧化损伤作用。NFE2L2是氧化应激调控的关键因子,其入核后能够启动下游抗氧化蛋白的表达,清除ROS等分子,而发挥保护作用。WU等^[20]研究发现,C66通过上调NFE2L2和抑制miR-21来改善小鼠糖尿病肾病。本研究对miRNA-590-3p的下游靶点进行验证发现,其能够与NFE2L2的3'UTR区域结合;miRNA-590-3p mimics + WT转染组相对荧光强度显著低于阴性转染组和miRNA-590-3p mimics + MUT转染组,说明miRNA-590-3p能够与NFE2L2的3'UTR区域结合;进一步检测发现miRNA类似物组细胞内总NFE2L2水平和细胞核内NFE2L2水平显著低于miRNA类似物对照组,miRNA抑制剂组细胞内总NFE2L2水平和细胞核NFE2L2水平显著高于miRNA抑制剂对照组,miRNA类似物组细胞内总NFE2L2水平和细胞核NFE2L2水平显著低于miRNA抑制剂组,说明上调miRNA-590-3p可以导致NFE2L2表达显著下调。另外,本研究结果显示,与miRNA类似物对照组比较,miRNA类似物组HK-2细胞中ROS、MDA水平增高,SOD、GSH-Px活性降低;与miRNA抑制剂对照组比较,miRNA抑制剂组HK-2细胞中ROS和MDA水平降低,SOD和GSH-Px活性升高;与miRNA类似物组比较,miRNA抑制剂组HK-2细胞中ROS和MDA水平降低,SOD和GSH-Px活性升高。由此推测PM_{2.5}是通过miRNA-590-3p/NFE2L2通路发挥氧化损伤作用。因此,miRNA-590-3p将来可能成为减轻PM_{2.5}所致肾氧化损伤的理想靶点,为PM_{2.5}所致肾氧化损伤的治疗提供新的思路。

综上所述,PM_{2.5}能够促进肾小管上皮细胞氧化损伤,其机制可能是通过上调miRNA-590-3p而抑制NFE2L2表达,进而实现氧化损伤。这将为PM_{2.5}所致肾氧化损伤的治疗提供新的靶点。然而,本研究仅从细胞层面进行探究,后续仍需进行深入的在体层面探究。同时PM_{2.5}如何影响miRNA-590-3p表达以及是否对其他miRNA表达产生影响仍是后续研究的焦点。

参考文献:

- [1] CHO C,HSIEH W, TSAI C, et al. *In vitro* and *in vivo* experimental studies of PM_{2.5} on disease progression[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(7):1380.
- [2] WANG H, SHEN X, TIAN G, et al. AMPK α 2 deficiency exacerbates long-term PM_{2.5} exposure-induced lung injury and cardiac

dysfunction[J]. *Free Radic Biol Med*,2018,121:202-214.

[3] GUO Y,LIN H,SHI Y,*et al.* Long-term exposure to ambient PM_{2.5} associated with fall-related injury in six low- and middle-income countries[J]. *Environ Pollut*,2018,237:961-967.

[4] ZHANG Q,ZHANG P,CAI Y. The use of protein-protein interactions for the analysis of the associations between PM_{2.5} and some diseases[J]. *Biomed Res Int*,2016,2016:4895476.

[5] LEIVA G,SANTIBAÑZ D A,IBARRA E S,*et al.* A five-year study of particulate matter (PM_{2.5}) and cerebrovascular diseases[J]. *Environ Pollut*,2013,181:1-6.

[6] AZTATZI-AGUILAR O G, URIBE-RAMÍREZ M, NARVÁEZ-MORALES J,*et al.* Early kidney damage induced by subchronic exposure to PM_{2.5} in rats[J]. *Part Fibre Toxicol*,2016,13(1):68.

[7] WANG J,ISHFAQ M,XU L,*et al.* METTL3/m6A/miRNA-873-5p attenuated oxidative stress and apoptosis in colistin-induced kidney injury by modulating Keap1/Nrf2 pathway[J]. *Front Pharmacol*,2019,10:517.

[8] ZHOU T,ZHONG Y,HU Y,*et al.* PM_{2.5} downregulates miR-194-3p and accelerates apoptosis in cigarette-inflamed bronchial epithelium by targeting death-associated protein kinase 1[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*,2018,13:2339-2349.

[9] ZHANG S,ZHANG W,ZENG X,*et al.* Inhibition of Rac1 activity alleviates PM_{2.5}-induced pulmonary inflammation via the AKT signaling pathway[J]. *Toxicol Lett*,2019,310:61-69.

[10] CHEN C,ZHU P,LAN L,*et al.* Short-term exposures to PM_{2.5} and cause-specific mortality of cardiovascular health in China[J]. *Environ Res*,2018,161:188-194.

[11] CHENXU G,MINXUAN X,YUTING Q,*et al.* iRhom2 loss alleviates renal injury in long-term PM_{2.5}-exposed mice by suppression of inflammation and oxidative stress[J]. *Redox Biol*,2018,19:147-157.

[12] SELTENRICH N. PM_{2.5} and kidney function:long-term exposures may lead to modest declines[J]. *Environ Health Perspect*,2016,124(9):A168.

[13] CHEN S,CHU D C,LEE J H,*et al.* Traffic-related air pollution associated with chronic kidney disease among elderly residents in Taipei City[J]. *Environ Pollut*,2018,234:838-845.

[14] XU M,ZHU Y F,CHANG H F,*et al.* Nanoceria restrains PM_{2.5}-induced metabolic disorder and hypothalamus inflammation by inhibition of astrocytes activation related NF-κB pathway in Nrf2 deficient mice[J]. *Free Radic Biol Med*,2016,99:259-272.

[15] DENG X,ZHANG F, RUI W, *et al.* PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells[J]. *Toxicol In Vitro*,2013,27(6):1762-1770.

[16] 徐佳佳,程旸,耿岚岚,等. 探讨靶向调控蛋白激酶 D1 的微小 RNA 及其对大鼠急性胰腺炎的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(19):1473-1477.

[17] 张新霞,陆丽红,狄文玉,等. miR-140-5p 靶向 Nrf2 对高糖诱导的视网膜色素上皮细胞氧化应激的调节作用[J]. 眼科新进展,2020,40(8):727-730.

[18] SONG L,LI D,LI X,*et al.* Exposure to PM_{2.5} induces aberrant activation of NF-κB in human airway epithelial cells by downregulating miR-331 expression[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*,2017,50:192-199.

[19] WANG J,LE T,WEI R,*et al.* Knockdown of JMJD1C, a target gene of hsa-miR-590-3p, inhibits mitochondrial dysfunction and oxidative stress in MPP+ -treated MES23.5 and SH-SY5Y cells[J]. *Cell Mol Biol*,2016,62(3):39-45.

[20] WU H,KONG L,TAN Y,*et al.* C66 ameliorates diabetic nephropathy in mice by both upregulating NRF2 function via increase in miR-200a and inhibiting miR-21 [J]. *Diabetologia*,2016,59(7):1558-1568.

(本文编辑:周二强)

《眼科新进展》2021 年征订启事

《眼科新进展》杂志是由新乡医学院主办的眼科学高级学术刊物,创刊于 1980 年,大 16 开,100 页,国内外公开发行人。1999 年加入国家科技部《万方数据系统科技期刊群》和《中国学术期刊(光盘版)》,1997 年被上海医科大学图书馆选定为医学类核心期刊,2000 年被美国《化学文摘》收录,2001 年被俄罗斯《文摘杂志》收录,自 2002 年连续入选中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),自 2008 年连续入选中国中文核心期刊,并连续被评为河南省二十佳科技期刊。2009 年入选 WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM),并被评为 RCCSE 中国核心学术期刊。国际标准连续出版物号为:ISSN 1003-5141,国内统一刊号:CN 41-1105/R,邮发代号:36-42。

本刊辟有名家讲坛(述评)(Editorial)、实验研究(Experimental study)、应用研究(Applied study)、文献综述(Review article)、海外信息(Overseas information)、消息(News)、读者来信(Letters)等栏目。本刊读者对象主要是眼科学临床、科研和教学工作者。欢迎国内外眼科医学工作者踊跃投稿和订阅。国内每期定价 10.00 元,全年定价 120.00 元。如错过邮局订阅,可直接汇款到我刊编辑部。联系地址:河南省新乡市金穗大道 601 号,新乡医学院期刊社《眼科新进展》杂志编辑部,邮编:453003。联系电话:0373-3029404;E-mail:ykxjz@xxmu.edu.cn、ykxjz@163.com;网址:http://www.ykxjz.com。