

miR-15b-5p 靶向 FOXO1 对缺氧/复氧诱导的人肾小管上皮细胞损伤的调控作用及其机制

李华锋, 张鸿毅, 肖克兵, 杨辉, 李子峰, 赵刚刚*

西安医学院第一附属医院泌尿外科, 陕西西安 710077

[中图分类号] R692 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1100.2024.0204

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 李华锋, 张鸿毅, 肖克兵, 等. miR-15b-5p 靶向 FOXO1 对缺氧/复氧诱导的人肾小管上皮细胞损伤的调控作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(11): 1311-1318.

[收稿日期] 2023-08-16 [录用日期] 2023-10-07 [上线日期] 2024-02-04

[摘要] **目的** 探讨 miR-15b-5p 靶向叉头框蛋白 O1(FOXO1)对缺氧/复氧(H/R)诱导的人肾小管上皮细胞(HK-2)损伤的调控作用及其机制。**方法** 取对数生长期 HK-2 细胞, 设置: (1)对照组(正常培养)与 H/R 组(H/R 诱导培养)。倒置显微镜下观察 HK-2 细胞形态, 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 mi-15b-5p、FOXO1 mRNA 的表达, Western blotting 检测 FOXO1 蛋白的表达。(2)对照组(正常培养)、H/R 组(H/R 诱导培养)、H/R+mimic 对照组(转染 mimic 对照质粒后 H/R 诱导培养)、H/R+miR-15b-5p mimic 组(转染 miR-15b-5p mimic 后 H/R 诱导培养)、H/R+miR-15b-5p mimic+OE-NC 组(共转染 miR-15b-5p mimic 和 OE-NC 质粒后 H/R 诱导培养)与 H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1 组(共转染 miR-15b-5p mimic 和 FOXO1 过表达质粒后 H/R 诱导培养)。采用 qRT-PCR 检测 mi-15b-5p 的表达, Western blotting 检测 FOXO1、cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白的表达, CCK-8 法检测细胞活力, TUNEL 染色检测细胞凋亡情况。(3)对照组(正常培养)、H/R 组(H/R 诱导培养)、H/R+miR-15b-5p mimic 组(转染 miR-15b-5p mimic 后 H/R 诱导培养)与 H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1 组(共转染 miR-15b-5p mimic 和 OE-FOXO1 后 H/R 诱导培养)。采用 Western blotting 检测 LC3、p62、Beclin-1 蛋白的表达, LC3 免疫荧光检测细胞自噬水平。双荧光素酶报告实验检测 miR-15b-5p 与 FOXO1 之间的靶向关系。**结果** 倒置显微镜下观察显示, 对照组细胞数量较多, 细胞大多呈典型鹅卵石形态, 铺路石状生长; H/R 组大部分细胞收缩变圆, 贴壁细胞数量明显减少。与对照组比较, H/R 组 miR-15b-5p 表达水平明显降低, FOXO1 mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。荧光素酶报告实验结果显示 miR-15b-5p 直接靶向作用于 FOXO1 的 3'-UTR。miR-15b-5p 过表达抑制 H/R 诱导的 HK-2 细胞活力, 降低细胞凋亡, 抑制细胞自噬($P<0.05$)。与 H/R+miR-15b-5p mimic 组相比, H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1 组 HK-2 细胞存活率降低, 细胞凋亡和自噬水平增高($P<0.05$)。**结论** miR-15b-5p 通过靶向抑制 FOXO1 降低细胞自噬减缓 H/R 诱导的 HK-2 细胞损伤。

[关键词] miR-15b-5p; 叉头框蛋白 O1; 人肾小管上皮细胞; 缺氧/复氧; 自噬

MiR-15b-5p alleviates hypoxia/reoxygenation-induced human renal tubular epithelial cell HK-2 injury by targeting FOXO1

Li Hua-Feng, Zhang Hong-Yi, Xiao Ke-Bing, Yang Hui, Li Zi-Feng, Zhao Gang-Gang*

Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi 710077, China

*Corresponding author, E-mail: mr_zgg8@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the role and underlying mechanism of miR-15b-5p on hypoxia/reoxygenation (H/R) induced human renal tubular epithelial cell (HK-2) injury by targeting forkhead box O1 (FOXO1). **Methods** HK-2 cells in the log growth phase were set up as follows: (1) control group (normal culture) and H/R group (H/R induced culture). The expressions of miR-15b-5p and FOXO1 mRNA were detected using qRT-PCR, and the protein expression of FOXO1 was detected using Western blotting. (2) Control group (normal culture), H/R group (H/R induced culture), H/R+mimic control group (cells transfected with

[作者简介] 李华锋, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事泌尿系肿瘤和肾损伤疾病诊治方面的研究

[通信作者] 赵刚刚, E-mail: mr_zgg8@163.com

mimic control then induced by H/R), H/R+miR-15b-5p mimic group (cells transfected with miR-15b-5p mimic then induced by H/R), H/R+miR-15b-5p mimic+OE-NC group (cells co-transfected with miR-15b-5p mimic and OE-NC plasmid, then induced by H/R), and H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1 group (cells co-transfected with miR-15b-5p mimic and FOXO1 overexpression plasmid, then induced by H/R). The expression of miR-15b-5p was detected using qRT-PCR, and the protein expressions of FOXO1, cleaved caspase-3, Bax, and Bcl-2 were detected using Western blotting. CCK-8 assay was used to detect cell viability. Cell apoptosis was measured by the TUNEL method. (3) Control group (normal culture), H/R group (H/R induced culture), H/R+miR-15b-5p mimic group (cells transfected with miR-15b-5p mimic then induced by H/R), and H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1 group (cells co-transfected with miR-15b-5p mimic and FOXO1 overexpression plasmid, then induced by H/R). The protein expressions of LC3, p62 and Beclin1 were detected using Western blotting. LC3 immunofluorescence was used to detect the cell autophagy. The target reaction between miR-15b-5p and FOXO1 was assessed using dual luciferase reporting assay. **Results** Under an inverted microscope, it was observed that the control group had a higher number of cells, most of which were in a typical cobblestone shape and grew in a cobblestone-like manner; most of the cells in the H/R group contracted and became round, with a significant decrease in the number of adherent cells. In H/R-induced HK-2 cells, miR-15b-5p was significantly down-regulated, while miRNA and protein expression of FOXO1 was up-regulated ($P<0.05$). Luciferase assay results showed that miR-15b-5p directly targeted the 3'-UTR of FOXO1. Overexpression of miR-15b-5p increased cell viability, reduced cell apoptosis, and decreased autophagy in H/R-induced HK-2 cells ($P<0.05$). Compared with H/R+miR-15b-5p mimic group, the viability of HK-2 cells was decreased, the apoptosis and autophagy level were increased in H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1 group ($P<0.05$). **Conclusion** miR-15b-5p inhibited autophagy and alleviated H/R-induced HK-2 cell injury by targeting FOXO1.

[Key words] miR-15b-5p; forkhead box O1; human renal tubular epithelial cells; hypoxia/reoxygenation; autophagy

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是威胁人类健康的危重疾病,其主要特征为肾功能急剧下降和肾脏损伤^[1]。肾脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是导致AKI的主要原因之一^[2]。目前临床上尚缺少防治IRI发生的有效药物,因此探索IRI的发病机制、寻找新型治疗靶点具有重要的临床意义。叉头框蛋白O1(forkhead box O1, FOXO1)是FOXOs转录因子蛋白家族的一个亚型。作为FOXOs家族中最早被发现的成员,FOXO1可与细胞核内DNA上的反应元件相结合,参与细胞代谢、分化、凋亡等信号转导的调节^[3]。既往研究发现,FOXO1在肾纤维化、糖尿病肾病、肾炎等多种肾脏疾病中发挥作用^[4],且在肾脏IRI中呈高表达,抑制FOXO1可通过抑制自噬缓解IRI损伤^[5]。有研究发现,多种微小RNA(microRNA, miRNA)可通过靶向调节FOXO1参与不同疾病的调节^[6]。miR-15b-5p在慢性肾病和糖尿病肾病患者血清中的表达明显降低,但在缺氧再灌注引起的肾损伤中的作用及其机制尚不明确^[7-8]。本研究以人肾小管上皮细胞HK-2为研究对象,建立缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导的HK-2细胞损伤模型,探讨miR-15b-5p通过靶向FOXO1对H/R诱导的HK-2细胞损伤的调控作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂 人肾小管上皮细胞株HK-2购自武汉普诺赛生物科技有限公司;胎牛血清、DMEM、F12培养基购自美国Gibco公司;Trizol试剂购自美国Life Technology公司;PCR引物、miR-15b-5p模拟

物(miR-15b-5p mimic)、pcDNA3.1质粒购自上海生工生物工程有限公司;抗FOXO1、活化胱天蛋白酶-3(cleaved caspase-3)、Bax、Bcl-2、LC3、p62、Beclin-1、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗购自英国Abcam公司;双荧光素酶报告基因试剂盒、pGL3荧光素酶载体购自美国Promega公司;Lipofectamine™ 3000购自美国Invitrogen公司;TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HK-2细胞H/R模型建立及实验分组 HK-2细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1)培养基中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。每2~3d,当细胞贴壁密度达到85%左右时传代1次。

(1)取对数生长期HK-2细胞,设置对照组与H/R组。对照组细胞正常培养,H/R组细胞进行H/R诱导培养,即将细胞置于含有95% N₂+5% CO₂的密闭容器中缺氧培养4h,随后于含5% CO₂的常规细胞培养箱中培养。倒置显微镜下观察HK-2细胞形态,并拍片;采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测mi-15b-5p、FOXO1 mRNA的表达,Western blotting检测FOXO1蛋白的表达。

(2)取对数生长期HK-2细胞,随机分为6组:对照组(正常培养)、H/R组(H/R诱导培养)、H/R+miR-15b-5p mimic对照组(转染miR-15b-5p mimic后进行H/R诱导培养)、H/R+miR-15b-5p mimic组(转染miR-15b-5p mimic后进行H/R诱导培养)、H/R+miR-15b-5p mimic+OE-NC组(共转染miR-15b-5p和OE-NC质粒后进行H/R诱导

培养)、H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1组(共转染miR-15b-5p mimic和OE-FOXO1后进行H/R诱导培养)。细胞转染过程按照Lipofectamine™ 3000说明书步骤,按照分组分别在HK-2细胞中转染100 nmol的mimic对照、miR-15b-5p mimic、空载质粒pcDNA3.1(OE-NC)或FOXO1过表达质粒pcDNA3.1-FOXO1(OE-FOXO1)。采用qRT-PCR检测mi-15b-5p的表达,Western blotting检测FOXO1、cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白的表达,CCK-8法检测细胞活力,TUNEL检测细胞凋亡情况。

(3)取对数生长期HK-2细胞,随机分为4组:对照组(正常培养)、H/R组(H/R诱导培养)、H/R+miR-15b-5p mimic组(转染miR-15b-5p mimic后进行H/R诱导培养)、H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1组(共转染miR-15b-5p mimic和OE-FOXO1后进行H/R诱导培养)。采用Western blotting检测LC3、p62、Beclin-1蛋白的表达,LC3免疫荧光检测细胞自噬水平。

1.2.2 qRT-PCR检测FOXO1 mRNA和mi-15b-5p的表达 采用Trizol试剂提取HK-2细胞总RNA,并反转录成模板cDNA。采用SYBR Green进行qRT-PCR。反应体系(20 μl): SYBR Green Mix 10 μl、上游引物0.5 μl、下游引物0.5 μl、模版cDNA 1 μl和ddH₂O 8 μl。反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 54 °C 10 s, 72 °C 30 s, 30个循环; 72 °C延伸5 min。引物序列: FOXO1上游5'-CAGCAAATCAAGTTATGGAGGA-3',下游5'-TATCATTGTGGGGAGGAGAGTC-3'; β-actin上游5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3',下游5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'; miR-15b-5p上游5'-ATGAACTTCTCTGTCTTGG-3',下游5'-TCACCGCTCGGCTTGTGACA-3'; U6上游5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3'。所用引物由上海生工生物工程有限公司设计合成。以β-actin和U6为内参,采用2^{-ΔΔCt}法分别计算FOXO1 mRNA和miR-15b-5p的表达量。

1.2.3 Western blotting检测相关蛋白的表达 采用RIPA细胞蛋白裂解液裂解HK-2细胞,提取细胞总蛋白,使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。同等量蛋白经SDS-PAGE电泳后,进行电转膜,随后用5%脱脂奶粉室温封闭2 h。分别加入FOXO1(1:1000)、cleaved caspase-3(1:500)、Bax(1:1000)、Bcl-2(1:2000)、LC3(1:2000)、p62(1:10 000)、Beclin-1(1:1000)、β-actin(1:5000)蛋白一抗于4 °C孵育过夜,漂洗后加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗,室温孵育1 h。滴加ECL化学发光液,凝胶成像分析系统成像,结果采用ImageJ图像处理软件分析,以β-actin为内参,计算目的蛋白相对表达水平。

1.2.4 CCK-8法检测细胞活力 在各组HK-2细胞中加入CCK-8试剂与细胞培养基的培养液(1:10),设置只含培养基而无细胞的空白组,37 °C孵育4 h,用酶标仪检测490 nm波长处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(A_{实验组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})×100%。

1.2.5 TUNEL染色检测细胞凋亡情况 取各组HK-2细胞,用4%多聚甲醛溶液室温下固定30 min;加入蛋白酶K在37 °C下消化10 min;TBS清洗后,加入末端脱氧核糖核酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)和生物素标记的脱氧尿苷三磷酸(biotin-dTUP, BIO-dUTP)标记2 h;加入链霉亲和素(streptavidin-biotin complex, SABC)稀释液在37 °C下反应30 min,随后用DAPI染色液复染。最后于荧光显微镜下观察并拍片。

1.2.6 LC3免疫荧光检测细胞自噬水平 取各组HK-2细胞,加入多聚甲醛溶液固定15 min;加入5%胎牛血清后室温封闭1 h,按说明加入稀释的LC3蛋白一抗(稀释倍数1:100)4 °C孵育过夜;加入二抗室温孵育1 h;滴加DAPI避光孵育5 min染核,清洗后在荧光显微镜下观察并记录细胞的荧光强度。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 采用TargetScan在线软件(https://www.targetscan.org/vert_72/)预测FOXO1与miR-15b-5p的靶向结合位点。根据预测结果,对FOXO1的3'-UTR区与miR-15b-5p的靶向结合序列进行序列突变。将FOXO1的野生(WT)序列和突变(MUT)序列克隆到荧光素酶报告载体pGL3中,构建FOXO1-WT和FOXO1-MUT表达质粒。将对数期生长的HK-2细胞接种于24孔板中,接种密度为1×10⁶个/ml,采用Lipofectamine™ 3000将FOXO1-WT或FOXO1-MUT与miR-15b-5p mimic或mimic对照共转染HK-2细胞。培养48 h后用双荧光酶检测系统测定荧光素酶活性。

1.3 统计学处理 采用GraphPad Prism 7.01软件进行统计分析。所有实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,进一步两两比较采用Bonferroni检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 H/R诱导的HK-2细胞形态 倒置显微镜下观察显示,对照组细胞数量较多,细胞大多呈典型鹅卵石形态,铺路石状生长;H/R组大部分细胞收缩变圆,贴壁细胞数量明显减少(图1)。

2.2 miR-15b-5p、FOXO1在H/R诱导的HK-2细胞中的表达情况 与对照组比较,H/R组HK-2细胞中miR-15b-5p表达水平明显降低(P<0.05,图2A),

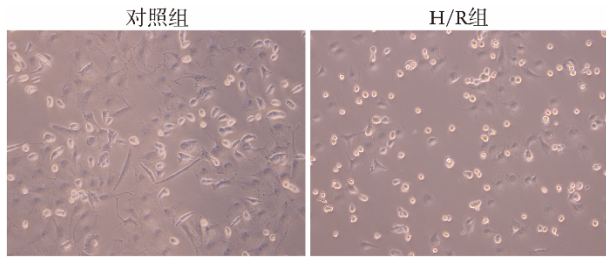
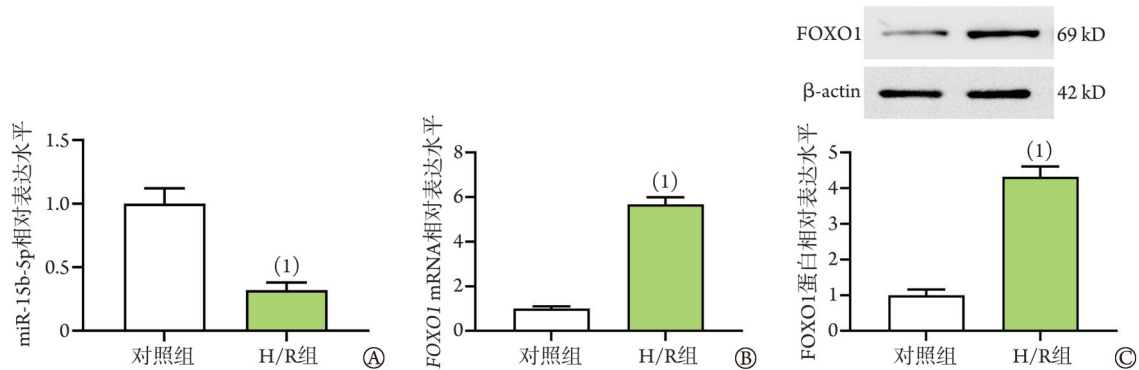


图1 倒置显微镜下观察HK-2细胞形态($\times 200$)

Fig. 1 Observation of HK-2 cell morphology under inverted microscope ($\times 200$)



FOXO1. 叉头框蛋白O1; A. 两组 miR-15b-5p 表达水平比较; B. 两组 FOXO1 mRNA 表达水平比较; C. 两组 FOXO1 蛋白表达水平比较; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$

图2 miR-15b-5p、FOXO1在H/R诱导的HK-2细胞中的表达情况($n=6$)

Fig. 2 Expression of miR-15b-5p and FOXO1 in hypoxia/reoxygenation (H/R) induced HK-2 cells ($n=6$)



FOXO1. 叉头框蛋白O1; A. FOXO1野生型(WT)和突变型(MUT)与miR-15b-5p的结合位点; B. FOXO1与miR-15b-5p的靶向关系验证; 与Mimic对照组比较, (1) $P < 0.05$

图3 miR-15b-5p与FOXO1的靶向关系验证($n=6$)

Fig. 3 Verification of the targeting interaction between miR-15b-5p and FOXO1 ($n=6$)

2.4 miR-15b-5p对H/R诱导的HK-2细胞活性的影响 与对照组比较, H/R组细胞中miR-15b-5p表达水平明显降低, FOXO1蛋白表达水平明显升高, 细胞存活率明显降低($P < 0.05$); 与H/R组比较, H/R+miR-15b-5p mimic组HK-2细胞中miR-15b-5p表达水平明显升高, FOXO1蛋白表达水平明显降低, 细胞存活率明显升高($P < 0.05$); 与H/R+miR-15b-5p mimic组比较, H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1组HK-2细胞中FOXO1蛋白表达水平明显升高, 细胞存活率明显降低($P < 0.05$, 图4)。

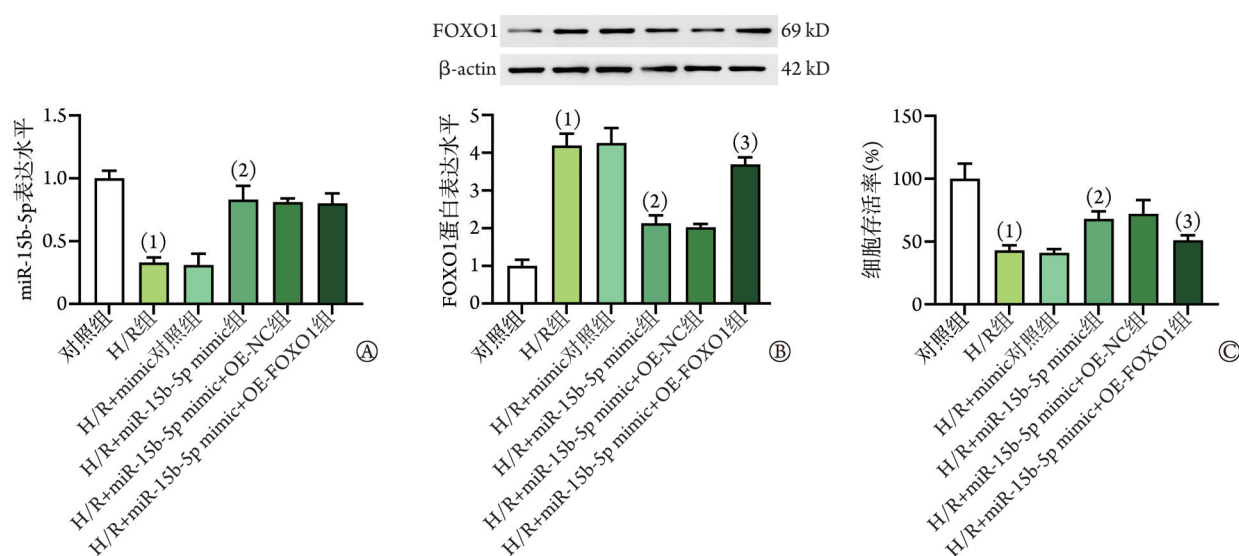
2.5 miR-15b-5p对H/R诱导的HK-2细胞凋亡的影响 TUNEL和Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, H/R组细胞凋亡率以及凋亡相关蛋白

FOXO1 mRNA和FOXO1蛋白表达水平明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2B、C)。

2.3 miR-15b-5p与FOXO1靶向结合 TargetScan在线软件预测结果显示, miR-15b-5p与FOXO1的3'-UTR区有靶向结合的位点(图3A)。双荧光素酶报告实验检测结果显示, miR-15b-5p mimic可明显降低共转染FOXO1-WT的HK-2细胞的荧光素酶活性($P < 0.05$), 而miR-15b-5p mimic与FOXO1-MUT共转染的HK-2细胞荧光素酶活性未见明显变化($P > 0.05$, 图3B)。

cleaved caspase 3、Bax表达水平明显升高($P < 0.05$), 抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平明显降低($P < 0.05$); 与H/R组比较, H/R+miR-15b-5p mimic组细胞凋亡率以及凋亡相关蛋白cleaved caspase 3、Bax表达水平降低($P < 0.05$), 抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平升高($P < 0.05$); 与H/R+miR-15b-5p mimic组比较, H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1组细胞凋亡率以及凋亡相关蛋白cleaved caspase 3、Bax表达水平升高($P < 0.05$), 抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平降低($P < 0.05$, 图5)。

2.6 miR-15b-5p对H/R诱导的HK-2细胞自噬的影响 与对照组比较, H/R组HK-2细胞中LC3-II/LC3-I比值及Beclin-1蛋白表达水平明显增高, p62蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$); 与H/R组比较,



FOXO1. 叉头框蛋白 O1; A. 各组 miR-15b-5p 表达水平比较; B. 各组 FOXO1 蛋白表达水平比较; C. 各组细胞存活率比较; 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与 H/R 组比较, (2) $P<0.05$; 与 H/R+miR-15b-5p mimic 组比较, (3) $P<0.05$

图 4 MiR-15b-5p 对 H/R 诱导的 HK-2 细胞活力的影响 ($n=6$)

Fig. 4 Effect of miR-15b-5p on viability of hypoxia/reoxygenation (H/R) induced HK-2 cells ($n=6$)

H/R+miR-15b-5p mimic 组 HK-2 细胞中 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$), p62 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$); 与 H/R+miR-15b-5p mimic 组比较, H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1 组 HK-2 细胞中 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 蛋白表达水平明显增高 ($P<0.05$), p62 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$) (图 6A)。

LC3 免疫荧光检测结果显示, 对照组 HK-2 细胞中绿色荧光斑点较少, H/R 组 HK-2 细胞中绿色荧光斑点明显聚集。与 H/R 组比较, H/R+miR-15b-5p mimic 组中荧光斑点减少。与 H/R+miR-15b-5p mimic 组比较, H/R+miR-15b-5p mimic+OE-FOXO1 组中绿色荧光斑点增多 (图 6B)。

3 讨论

肾脏 IRI 可引起代谢失衡、系统炎症及细胞凋亡等, 继而导致 AKI^[9]。探索 IRI 发生发展的分子机制是预防和治疗 AKI 的工作重点。肾小管上皮细胞分化良好、代谢旺盛, 对缺血和缺氧高度敏感^[10]。在肾功能损伤时肾小管是较早出现损伤的部位, 因此本研究选用肾小管上皮细胞构建 H/R 模型, 研究 miR-15b-5p 对 H/R 诱导 HK-2 细胞损伤的作用, 探讨 miR-15b-5p 参与 IRI 发生发展的机制。

有研究发现, miRNA 参与糖尿病肾病、肾移植损伤、肾纤维化、AKI 等多种肾脏疾病的调控^[11]。近年来研究表明, miRNA 广泛参与 IRI 的发生和发展。在缺血再灌注诱导的 AKI 小鼠模型中, 上调 miR-20b-5p 可通过抑制铁死亡、减轻炎症及肾纤维化, 从而延缓 IRI 的进展^[12]。miR-6198-5p 可通过抑

制肾小管上皮细胞凋亡, 减缓缺血再灌注引起的肾损伤^[13]。罗庆琳等^[14]报道, miR-141-3p 能够通过促进肾小管上皮细胞焦亡而减缓小鼠 IRI 损伤。miRNA 是一类高度保守的非编码单链 RNA, 不直接参与基因的转录和翻译过程, 而是通过与下游目标靶基因 3'-UTR 区特异性结合, 阻止或抑制靶基因 mRNA 的蛋白翻译过程^[15]。FOXO1 作为转录因子参与多种肾脏疾病的病理机制, 在肾脏 IRI 中也可发挥重要作用^[16]。本研究探讨 miR-15b-5p/FOXO1 调节轴在 IRI 中的作用, 发现 FOXO1 在肾小管上皮细胞 HK-2 H/R 模型中表达上调, 与既往研究一致^[5]。同时 miR-15b-5p 在 H/R 诱导的 HK-2 细胞中表达下调。双荧光素酶报告实验结果显示 miR-15b-5p 能够靶向结合到 FOXO1 的 3'-UTR 区。以上结果提示 miR-15b-5p 可能参与肾脏 IRI 的调控。

本研究发现, 在 H/R 诱导下肾小管上皮细胞 HK-2 的细胞存活率下降, 同时细胞凋亡率明显升高, 凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3、Bax 表达上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调, 表明细胞活力降低和过度凋亡是 H/R 导致肾小管上皮细胞损伤的作用机制之一。miR-15b-5p 的过表达可明显提升 H/R 诱导的细胞活力, 降低细胞凋亡率, 提示 miR-15b-5p 可缓解 H/R 刺激对 HK-2 细胞的损伤, 且 FOXO1 过表达实验结果提示 miR-15b-5p 对 HK-2 细胞损伤的调节作用是通过靶向抑制 FOXO1 表达产生的。

细胞自噬是程序性细胞死亡的一种, 是真核细胞通过溶酶体吞噬异常状态的细胞器、蛋白质等造成细胞死亡而进行自我降解的过程; 该过程广泛存在于多种疾病的病理进程中, 在肾脏 IRI 中也发挥重

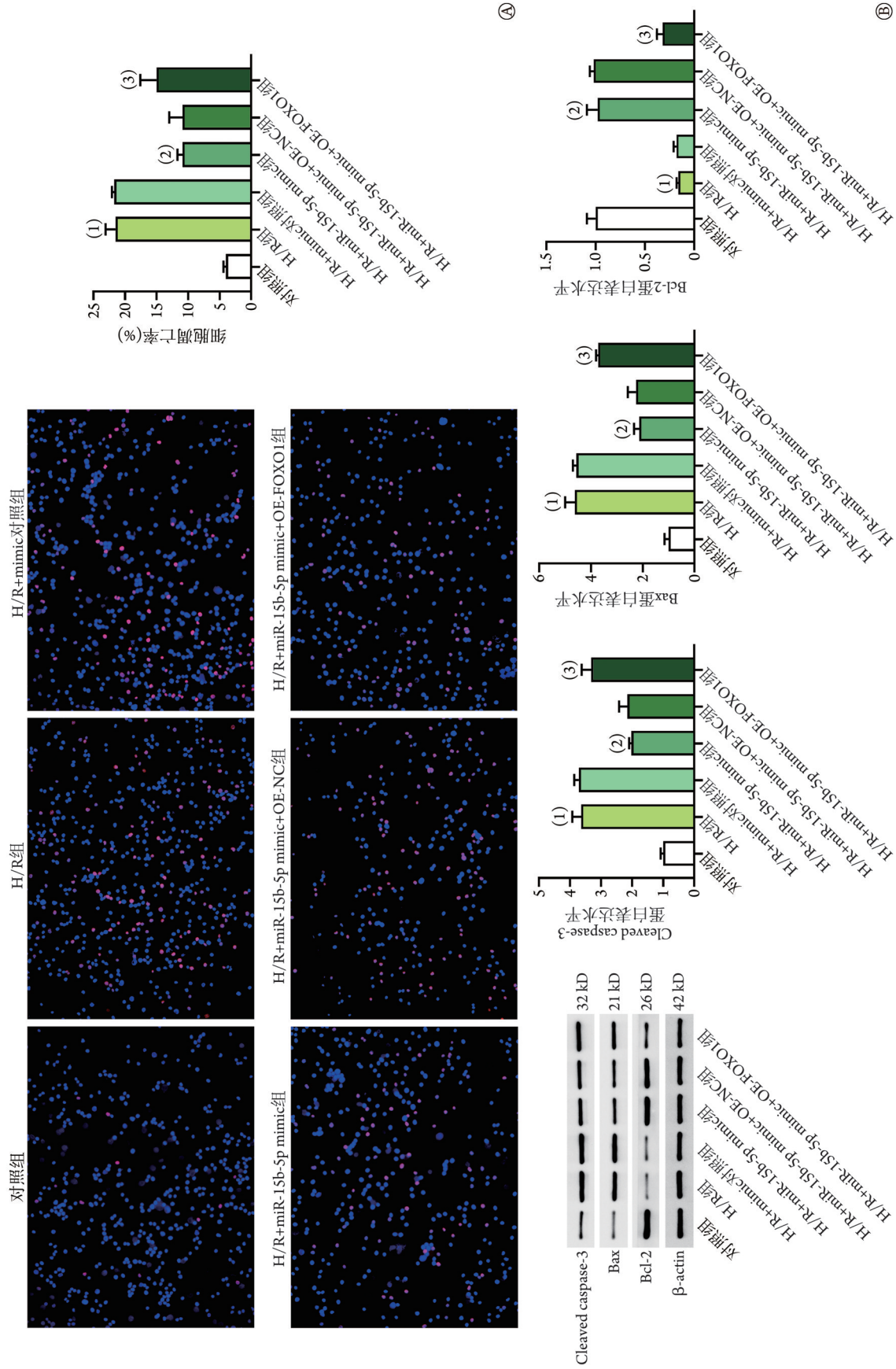


图5 miR-15b-5p对H/R诱导的HK-2细胞凋亡的影响(n=6)

H/R. 缺氧/复氧; A. 各组细胞凋亡率比较(×200); B. 各组细胞中凋亡相关蛋白Cleaved caspase-3、Bax及抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平比较; 与对照组比较, (1)P<0.05; 与H/R组比较, (2)P<0.05; 与H/R+miR-15b-5p mimic组比较, (3)P<0.05

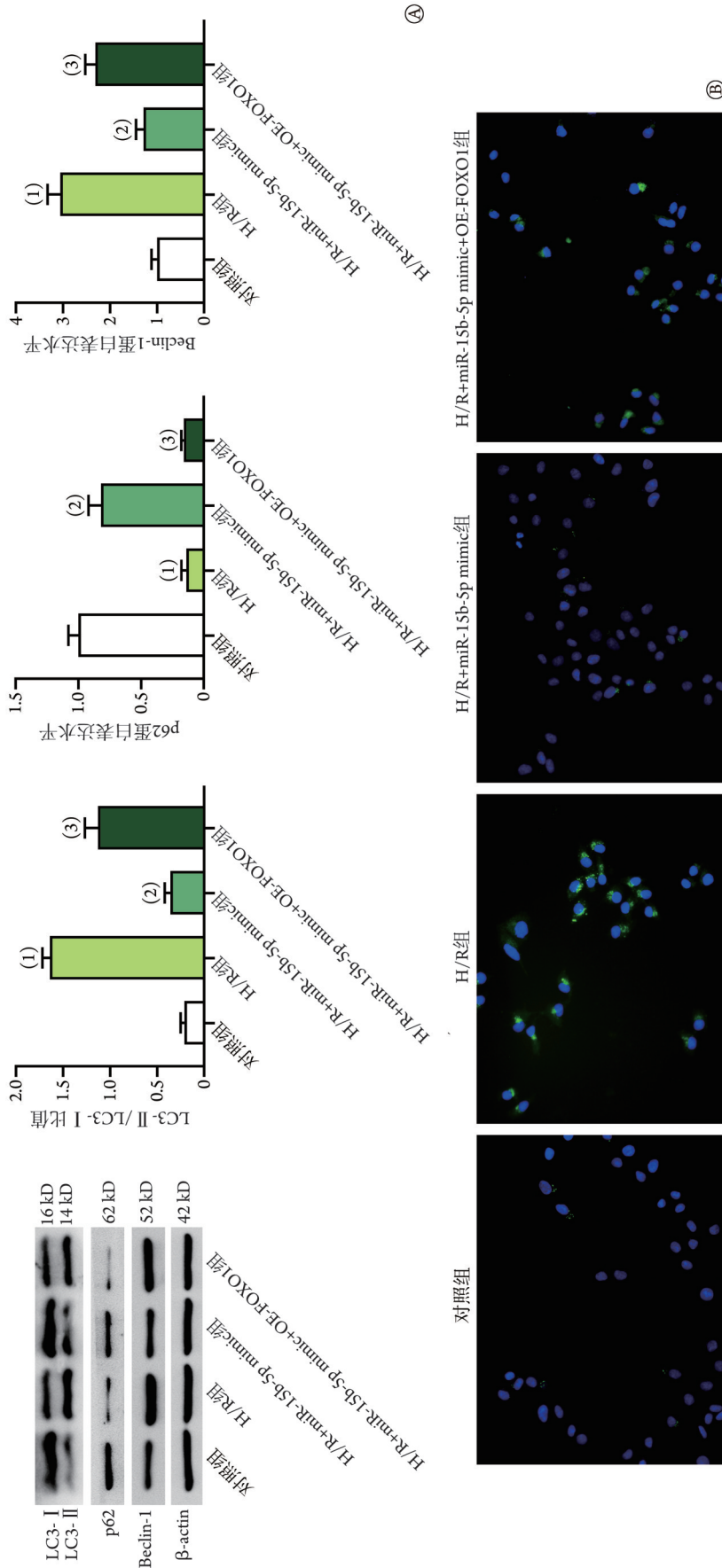


图6 miR-15b-5p对H/R诱导的HK-2细胞自噬的影响(n=6)
 H/R. 缺氧/复氧; A. 各组细胞中LC3- II /LC3- I、p62、Beclin-1 蛋白表达水平比较, (1)P<0.05; 与对照组比较, (2)P<0.05; 与H/R+miR-15b-5p mimic 组比较, (3)P<0.05

图6 Effect of miR-15b-5p on autophagy of hypoxia/reoxygenation (H/R) induced HK-2 cells (n=6)

要作用^[17-18]。有研究发现, FOXO1在心肌病、糖尿病、脑IRI等疾病中对细胞自噬具有调控作用^[19-21];在缺血再灌注肾损伤大鼠中高表达的FOXO1可促进细胞自噬^[5]。自噬过程中I型LC3蛋白在经过泛素样修饰后,结合磷脂酰乙醇胺形成脂溶性的II型LC3蛋白,促进自噬泡膜的延伸和自噬体的成熟^[22]。p62衔接蛋白与LC3结合,转移至自噬体后降解,与自噬的活性呈负相关^[23]。Beclin-1是自噬调节的关键因子之一,可通过招募其他相关蛋白促进自噬前体的形成^[24]。本研究发现,过表达miR-15b-5p可提升H/R诱导的HK-2细胞中LC3-I、p62的表达,抑制LC3-II、Beclin-1的表达。进一步通过免疫荧光法检测发现miR-15b-5p过表达可明显抑制H/R诱导的HK-2细胞自噬,该结果与miR-15b-5p在骨质疏松动物模型中对自噬的抑制作用一致^[25]。同时,FOXO1过表达质粒的共转染促进了HK-2细胞的自噬,提示miR-15b-5p是通过抑制FOXO1而降低H/R诱导的HK-2细胞自噬。

综上所述,本研究发现,miR-15b-5p可通过靶向FOXO1抑制细胞自噬,减缓H/R诱导的肾小管上皮细胞损伤,为肾脏IRI及AKI的有效防治提供了目标靶点与理论基础。但本研究仅在细胞模型中探讨了miR-15b-5p对H/R诱导自噬的作用,未来仍需进一步在动物模型中进行验证,并探讨miR-15b-5p对肾脏IRI中炎症、能量代谢等机制的作用。

【参考文献】

- Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gomez H, et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment[J]. *Kidney Int*, 2019, 96(5): 1083-1099.
- Pefanis A, Ierino FL, Murphy JM, et al. Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2019, 96(2): 291-301.
- Peng S, Li W, Hou N, et al. A review of FoxO1-regulated metabolic diseases and related drug discoveries[J]. *Cells*, 2020, 9(1): 184.
- Wang Y, He W. Improving the dysregulation of FoxO1 activity is a potential therapy for alleviating diabetic kidney disease[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 630617.
- Wang D, Wang Y, Zou X, et al. FOXO1 inhibition prevents renal ischemia-reperfusion injury via cAMP-response element binding protein/PPAR-gamma coactivator-1alpha-mediated mitochondrial biogenesis[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(2): 432-448.
- Liang CY, Huang ZG, Tang ZQ, et al. FOXO1 and hsa-microRNA-204-5p affect the biologic behavior of MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(5): 1146-1158.
- Nandakumar P, Tin A, Grove ML, et al. MicroRNAs in the miR-17 and miR-15 families are downregulated in chronic kidney disease with hypertension[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0176734.
- Shen H, Fang K, Guo H, et al. High glucose-induced apoptosis in human kidney cells was alleviated by miR-15b-5p mimics[J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(5): 758-763.
- 刁爱芹, 张光际, 王卉, 等. TIR/BB环拟似物AS-1对小鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(8): 1080-1086.
- Bejoy J, Qian ES, Woodard LE. Tissue culture models of AKI: from tubule cells to human kidney organoids[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2022, 33(3): 487-501.
- 郝相楠, 栾军军, 马聪, 等. 过表达miR-150的肾小管上皮细胞系HK-2中lncRNA的表达谱[J]. *基础医学与临床*, 2022, 42(7): 1013-1019.
- Shi L, Song Z, Li Y, et al. MiR-20a-5p alleviates kidney ischemia/reperfusion injury by targeting ACSL4-dependent ferroptosis[J]. *Am J Transplant*, 2023, 23(1): 11-25.
- Pan J, Zhang G, Hu Y, et al. MiR-6918-5p prevents renal tubular cell apoptosis by targeting MBD2 in ischemia/reperfusion-induced AKI[J]. *Life Sci*, 2022, 308: 120921.
- 罗庆琳, 邓军辉, 田恩, 等. miR-141-3p调控缺血再灌注肾损伤小管上皮细胞焦亡[J]. *免疫学杂志*, 2022, 38(11): 928-935, 943.
- 程兆瑞, 程小平, 李福堂, 等. 微小RNA-4530通过靶向TRIB1抑制肝癌细胞增殖[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2021, 61(6): 12-18.
- Ji L, Wang Q, Huang F, et al. FOXO1 overexpression attenuates tubulointerstitial fibrosis and apoptosis in diabetic kidneys by ameliorating oxidative injury via TXNIP-TRX[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3286928.
- Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 12.
- 杨冬, 张颖. 自噬、Beclin1与卵巢癌的研究进展[J]. *医学理论与实践*, 2016, 29(17): 3027-3029.
- Li X, Bai C, Wang H, et al. LncRNA MEG3 regulates autophagy and pyroptosis via FOXO1 in pancreatic beta-cells[J]. *Cell Signal*, 2022, 92: 110247.
- Mei ZG, Huang YG, Feng ZT, et al. Electroacupuncture ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the SIRT1-FOXO1 signaling pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(13): 13187-13205.
- Zhang M, Sui W, Xing Y, et al. Angiotensin IV attenuates diabetic cardiomyopathy via suppressing FoxO1-induced excessive autophagy, apoptosis and fibrosis[J]. *Theranostics*, 2021, 11(18): 8624-8639.
- Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, et al. Autophagy in major human diseases[J]. *EMBO J*, 2021, 40(19): e108863.
- Kocak M, Ezazi Erdi S, Jorba G, et al. Targeting autophagy in disease: established and new strategies[J]. *Autophagy*, 2022, 18(3): 473-495.
- Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, Bcl-2 and autophagy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 109-26.
- Lu X, Zhang Y, Zheng Y, et al. The miRNA-15b/USP7/KDM6B axis engages in the initiation of osteoporosis by modulating osteoblast differentiation and autophagy[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(4): 2069-2081.