

miR-34a/SIRT1 在重症监护病房获得性衰弱中的作用及其机制

林正霄^{1,2}, 徐朝霞³, 陈娟², 胡健², 祝国芸², 朱忠立², 冯健^{2*}, 李福祥^{1,2*}

¹西南交通大学医学院, 四川成都 611756; ²西部战区总医院重症医学科, 四川成都 610083; ³西部战区总医院急诊医学科, 四川成都 610083

[中图分类号] R329.27; R363.21; R746.4

[文献标志码] A

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1050.2024.0329

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 林正霄, 徐朝霞, 陈娟, 等. miR-34a/SIRT1 在重症监护病房获得性衰弱中的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(7): 796-803.

[收稿日期] 2023-08-21

[录用日期] 2023-09-27

[上线日期] 2024-03-29

[摘要] 目的 探讨 miR-34a/SIRT1 在重症监护病房获得性衰弱(ICU-AW)中的作用及其机制。方法 (1)诱导 C2C12 小鼠骨骼肌细胞分化成肌管, 并分为 ICU-AW 模型组[ICU-AW 组, 用脂多糖(LPS)干预 12 h]与正常对照组(等量无菌水干预 12 h)。采用 Western blotting 检测两组肌肉环指蛋白 1(MuRF-1)、萎缩相关基因 1(Atrogin-1)蛋白、沉默调节蛋白 1(SIRT1)表达水平, RT-qPCR 检测两组微小核糖核酸-34a(miR-34a)及 *MuRF-1*、*Atrogin-1*、*SIRT1* mRNA 的表达水平, 并在光镜下观察两组小鼠 C2C12 骨骼肌细胞生长及分化情况。(2)将 ICU-AW 细胞分为对照组(siRNA 的转染剂干预)、Scra siRNA 组(转染剂和非特异性 siRNA 干预)、miR-34a siRNA 组(miR-34a siRNA 转染剂和特异性 siRNA 干预)、Vehicle 组(SIRT1 激动剂的溶剂二甲基亚砜干预)及 SRT1720 组(SIRT1 激动剂 SRT1720 干预)。采用 Western blotting 检测各组 SIRT1、Atrogin-1、MuRF-1 蛋白表达水平, RT-qPCR 检测各组 miR-34a 及 *MuRF-1*、*Atrogin-1*、*SIRT1* mRNA 表达水平。(3)将 ICU-AW 细胞分为对照组(miR-34a siRNA 的转染剂干预)、miR-34a siRNA 组(转染剂和特异性 siRNA 干预)、miR-34a siRNA+Vehicle 组(转染剂、特异性 siRNA 和二甲基亚砜干预)及 miR-34a siRNA+EX-527 组(转染剂、特异性 siRNA 和 SIRT1 抑制剂 EX-527 干预), 采用 Western blotting 检测并比较各组 Atrogin-1、MuRF-1 蛋白表达水平, RT-qPCR 检测并比较各组 *Atrogin-1*、*MuRF-1* mRNA 表达水平。结果 光镜下可见第 4 天 C2C12 小鼠骨骼肌细胞肌管分化形成, 与正常对照组比较, ICU-AW 组肌管明显萎缩。RT-qPCR 及 Western blotting 检测结果显示, 与正常对照组比较, ICU-AW 组 *Atrogin-1*、*MuRF-1* mRNA 及蛋白相对表达水平明显升高 ($P<0.05$), miR-34a 相对表达水平明显升高 ($P<0.001$), *SIRT1* mRNA 及蛋白相对表达水平明显降低 ($P<0.01$)。RT-qPCR 检测结果显示, 与对照组(转染剂干预)比较, miR-34a siRNA 组的 miR-34a 及 *Atrogin-1*、*MuRF-1* mRNA 和蛋白相对表达水平明显降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.001$), *SIRT1* mRNA 和蛋白相对表达水平明显升高 ($P<0.01$); 与 Vehicle 组比较, SRT1720 组 *SIRT1* mRNA 和蛋白相对表达水平明显升高 ($P<0.05$), 而 *Atrogin-1*、*MuRF-1* mRNA 和蛋白相对表达水平明显降低 ($P<0.05$)。与 miR-34a siRNA 组比较, Scra siRNA 组 miR-34a 及 *Atrogin-1*、*MuRF-1* mRNA 和蛋白相对表达水平明显升高 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 而 *SIRT1* mRNA 和蛋白相对表达水平明显降低 ($P<0.01$)。RT-qPCR 及 Western blotting 检测结果显示, 与 miR-34a siRNA+Vehicle 组比较, miR-34a siRNA+EX-527 组 *Atrogin-1*、*MuRF-1* mRNA 及蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$)。结论 ICU-AW 状态下 miR-34a 过度激活, 通过抑制 SIRT1 的表达导致骨骼肌萎缩, 可能在 ICU-AW 发病过程中起重要作用。

[关键词] 重症监护病房获得性衰弱; 骨骼肌萎缩; miR-34a; 沉默调节蛋白 1; 萎缩相关基因 1; 肌肉环指蛋白 1

The role and mechanism of miR-34a/SIRT1 in intensive care unit acquired weakness

Lin Zheng-Xiao^{1,2}, Xu Zhao-Xia³, Chen Juan², Hu Jian², Zhu Guo-Yun², Zhu Zhong-Li², Feng Jian^{2*}, Li Fu-Xiang^{1,2*}

¹College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 611756, China

²Department of Intensive Care Medicine, ³Department of Emergency Medicine, General Hospital of Western Theater Command,

[基金项目] 四川省干部保健科研课题(川干研 2022-1303); 西部战区总医院军事医学科研项目(2019LH05)

[作者简介] 林正霄, 医学硕士, 主要从事重症获得性衰弱方面的研究

[通信作者] 李福祥, E-mail: lfx98@163.com; 冯健, E-mail: ironvon@foxmail.com

Chengdu, Sichuan 610083, China

*Corresponding author. Li Fu-Xiang, E-mail: lfx98@163.com; Feng Jian, E-mail: ironvon@foxmail.com

This study was supported by the Scientific Research Project of Cadre Health Care in Sichuan Province (2022-1303), and the Military Medical Research Project of General Hospital of Western Theater Command (2019LH05)

[Abstract] Objective To investigate the role and underlying mechanisms of miR-34a/SIRT1 in intensive care unit acquired weakness (ICU-AW). **Methods** (1) C2C12 mouse skeletal muscle cells were induced to differentiate into myotubes, and were divided into two groups: model group [ICU-AW group, treated with lipopolysaccharides (LPS) for 12 hours] and normal control group (treated with the same amount of sterile water for 12 hours). Western blotting was used to detect the protein expression level of Muscle ring finger 1 (MuRF-1), atrophy gene 1 (Atrogin-1) and Sirtuin-1 (SIRT1). RT-qPCR was used to assess the mRNA expression level of microRNA-34a (miR-34a), *MuRF-1*, *Atrogin-1* and *SIRT1*, and light microscope was used to observe the growth and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells in each group. (2) ICU-AW cells were further subdivided into control group (treated with siRNA transfection agent intervention), Scra siRNA group (treated with transfection agent and non-specific siRNA), miR-34a siRNA group (treated with transfection agent and specific siRNA intervention), vehicle group (treated with agonist solvent dimethyl sulfoxide) and SRT1720 group (treated with SIRT1 agonist SRT1720). Western blotting was used to detect the protein expression level of SIRT1, Atrogin-1 and MuRF-1 in each group. RT-qPCR was used to detect the miR-34a and the mRNA expression level of *SIRT1*, *Atrogin-1* and *MuRF-1* in each group. (3) In addition, another group of ICU-AW cells were divided into control group (treated with siRNA transfection), miR-34a siRNA group (treated with transfection agent and specific siRNA intervention), miR-34a siRNA+vehicle group (treated with transfection agent, specific siRNA and Dimethyl sulfoxide intervention) and miR-34a siRNA+EX-527 group (treated with transfection agent, specific siRNA and SIRT1 inhibitor EX-527). Western blotting was used to detect the protein expression level of Atrogin-1 and MuRF-1. RT-qPCR was used to assess the mRNA expression level of *Atrogin-1* and *MuRF-1*. **Results** Myotube differentiation was observed on the 4th day. Compared with control group, myotube atrophy was obvious in ICU-AW group. RT-qPCR and Western blotting results revealed that, compared with normal control group, in ICU-AW group, the mRNA and protein expression levels of *Atrogin-1* and *MuRF-1* significantly increased ($P<0.05$), and the expression level of miR-34a significantly increased ($P<0.05$), while the mRNA and protein expression levels of *SIRT1* significantly decreased ($P<0.05$). RT-qPCR results showed that, compared with control group (treated with siRNA transfection agent intervention) and Scra siRNA group, the expression of miR-34a and mRNA expression of *Atrogin-1* and *MuRF-1* in miR-34a siRNA group significantly decreased ($P<0.05$), while the mRNA expression of *SIRT1* significantly increased ($P<0.05$), meanwhile the protein expression of Atrogin-1 and MuRF-1 decreased significantly ($P<0.01$), and the protein expression of SIRT1 significantly increased ($P<0.05$). RT-qPCR results also showed that, compared with vehicle group, the mRNA expression of *Atrogin-1* and *MuRF-1* in SRT1720 group decreased significantly ($P<0.05$), while *SIRT1* increased significantly ($P<0.05$). Western blotting results demonstrated that, compared with control group and Scra siRNA group, the protein expression of *Atrogin-1* and *MuRF-1* in miR-34a siRNA group decreased significantly ($P<0.05$), while *SIRT1* increased significantly ($P<0.05$). RT-qPCR and Western blotting results indicated that, compared with miR-34a siRNA+vehicle group, the mRNA and protein expression of *Atrogin-1* and *MuRF-1* in miR-34a siRNA+EX-527 group increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Overactivation of miR-34a in ICU-AW contributes to skeletal muscle atrophy by inhibiting the expression of SIRT1, which may play an important role in the pathogenesis of ICU-AW.

[Key words] intensive care unit acquired weakness; muscular atrophy; miR-34a; Sirtuin-1; atrophy gene 1; muscle ring finger 1

重症监护病房获得性衰弱(intensive care unit acquired weakness, ICU-AW)是危重症患者在疾病过程中出现的以神经肌肉功能障碍为病理基础、全身疲乏无力为临床表现的综合征,好发于机械通气、急性呼吸窘迫、严重脓毒血症等患者^[1-2]。ICU-AW可增高危重症患者疾病中后期病死率及致残率,延长住院时间,增加住院费用等^[3]。流行病学数据显示,患者重症监护病房(ICU)内ICU-AW发生率为30%~50%^[3],院内病死率为17%,出院6个月后病死率为31%,远高于非ICU-AW患者^[4],且ICU-AW发生率呈逐年上升趋势^[5]。ICU-AW给患者家庭和社会造成了沉重的负担,已成为亟需解决的医学难题。

骨骼肌萎缩是ICU-AW的重要组成部分,其萎缩程度与病情严重程度相关^[6]。目前认为,骨骼肌蛋白泛素化降解代谢是ICU-AW发生的重要机制,而泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)在泛素化降解代谢中起着重要作用。目前普遍认同肌肉环指蛋白1(muscle ring finger 1, MuRF-1)及萎缩相关基因1(atrophy gene 1, Atrogin-1)是重要的UPS因子^[7],但其如何调控尚不完全清楚^[8-9]。miR-34a为新近发现且备受关注的微小RNA(microRNA, miR)之一,是一种在基因转录调控中具有重要作用的小分子RNA。最新研究发现,miR-34a能够通过调控下游分子沉默调节蛋白1(Sirtuin-1, SIRT1)参与血管平滑

肌衰老及钙化^[10], 而 SIRT1 可调节核因子- κ B(NF- κ B)、叉头转录因子1/叉头转录因子3(FoxO1/FoxO3)介导的特异性泛素连接酶 Atrogin-1 及 MuRF-1 的表达, 从而在骨骼肌代谢中发挥重要作用^[11-12], 但 miR-34a/SIRT1 信号通路能否通过调控骨骼肌蛋白泛素化降解参与 ICU-AW 发病过程鲜有报道。因此, 深入研究 miR-34a/SIRT1 在 ICU-AW 中的作用及其调控机制, 对防治 ICU-AW 具有重要意义。本研究通过构建 ICU-AW 小鼠骨骼肌细胞模型, 探讨 miR-34a/SIRT1 信号通路在其中的作用及机制, 旨在为 ICU-AW 的防治提供新的干预靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料 DMEM(高糖)培养基、胎牛血清(FBS)、马血清、青霉素-链霉素溶液及磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国 HyClone 公司; 细胞培养瓶购自美国 Corning 公司; 脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司; RIPA 裂解液及 BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所; GAPDH 一抗购自美国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 实时定量 PCR(RT-qPCR)试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; PCR 引物购自上海生工生物工程股份有限公司; Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; miR-34a 拮抗剂序列、阴性对照序列购自上海吉玛制药技术有限公司; SIRT1 激动剂(SRT1720)、SIRT1 抑制剂(EX-527)购自上海皓元生物医药科技有限公司; 二甲基亚砜(DMSO)购自北京索莱宝科技有限公司; 倒置光学显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠骨骼肌细胞培育及肌管分化 C2C12 小鼠骨骼肌细胞购自美国 ATCC 细胞库, 于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的湿化培养箱中培养, 直至细胞融合度达 80%~90%。更换含有 2% 马血清的 DMEM 分化培养基, 每天换液 1 次, 直至第 4 天肌管形成^[13], 利用倒置光学显微镜观察骨骼肌细胞。

1.2.2 ICU-AW 细胞模型构建及实验分组 肌管形成后, 使用 1 μ g/ml LPS 干预并继续培养细胞 12 h, 构建 ICU-AW 细胞模型^[14-15], 并设置为 ICU-AW 模型组(ICU-AW 组)。以等量无菌水干预则设置为正常对照组。

为了明确 miR-34a 及 SIRT1 在 ICU-AW 中的作用, 将 ICU-AW 组细胞分为对照组、Scra siRNA 组、miR-34a siRNA 组、Vehicle 组及 SRT1720 组。对照组采用 miR-34a siRNA 的转染剂干预; Scra siRNA 组采用转染

剂及非特异性 siRNA 干预; miR-34a siRNA 组采用转染剂及特异性 siRNA 干预; Vehicle 组采用含 SIRT1 激动剂的溶剂 DMSO 干预 6 h; SRT1720 组将 SIRT1 激动剂 SRT1720 用 DMSO 配置成 5 mg/ml 溶液, 按 5 μ mol/ml 培养基浓度干预 6 h。

为了明确 miR-34a 在 ICU-AW 中的作用是否依赖于 SIRT1, 将 ICU-AW 组细胞进一步分为对照组、miR-34a siRNA 组、miR-34a siRNA+Vehicle 组及 miR-34a siRNA+EX-527 组, 对照组采用 miR-34a siRNA 的转染剂干预; miR-34a siRNA 组采用转染剂及特异性 siRNA 干预; miR-34a siRNA+Vehicle 组采用转染剂、特异性 siRNA 及 DMSO 干预; miR-34a siRNA+EX-527 组采用转染剂、特异性 siRNA 干预及 SIRT1 抑制剂 EX-527 干预, SIRT1 抑制剂使用 DMSO 配置成 5 mg/ml 溶液, 按照 5 μ mol/ml 培养基浓度干预 6 h。

1.2.3 细胞转染 miR-34a siRNA 组使用 50 μ l DMEM 无血清培养基加入 20 pmol miR-34a siRNA(miR-34a Antagomir); Scra siRNA 组使用 50 μ l DMEM 无血清培养基加入等量 miR-34a 拮抗剂阴性序列(miR-34a Antagomir N.C); 对照组加入等量无菌水。使用 50 μ l DMEM 无血清培养基稀释 1 μ l 脂质体(lipofectamin)试剂以配置 lipofectamin 配制液, 并室温放置 5 min。分别将 miR-34a Antagomir 配置液/miR-34a Antagomir N.C 配置液/无菌水与 lipofectamin 配制液混匀并放置 20 min, 加入 24 孔板孔中, 轻柔摇晃培养板。将细胞在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中温育 6 h 后, 换成完全培养基培养 48 h 后收集细胞。

1.2.4 RT-qPCR 检测目的基因 miR-34a、Atrogin-1、MuRF-1、SIRT1 mRNA 表达水平 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 并测定总 RNA 浓度。取 0.8 μ g 总 RNA, 反转录成 cDNA, 按照反转录试剂盒说明书步骤操作。采用 SYBR Green 染料法进行 RT-qPCR, 总反应体积为 20 μ l。反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s、60 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 共进行 40 次循环。设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。以 GAPDH 为内参照, 引物序列见表 1。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法确定目的基因 mRNA 相对表达量。

1.2.5 Western blotting 检测 Atrogin-1、MuRF-1、SIRT1 蛋白表达水平 收取处理后的细胞, 加入 RIPA 裂解液 100 μ l, 提取总蛋白后进行定量, 取 40 μ g 蛋白加入 5 \times 上样缓冲液, 100 °C 变性 15 min 后上样。浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V, SDS-PAGE 电泳后 300 mA 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗后于 4 °C 孵育 16 h, TBST 洗 10 min \times 3 次, 加入由 TBST 稀释的 HRP 标记的二抗后孵育 1 h, TBST 洗 10 min \times 3 次, 加入 ECL 液 A 及 B, 暗室中曝光, 拍照分析。实验独立重复 3 次。

表1 目的基因的引物序列

Tab.1 Primer sequences of target gene

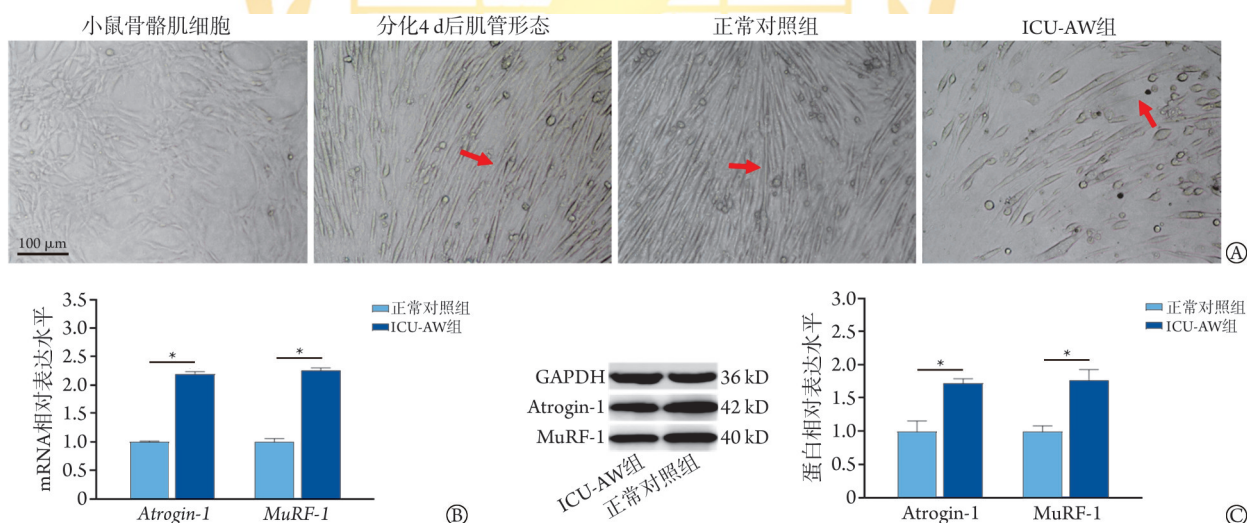
基因	引物序列(5'-3')
SIRT1	正义: GCTGACGACTTCGACGACG
	反义: TCGGTCAACAGGAGGTTGTCT
U6	正义: CTCGCTTCGGCAGCACA
	反义: AACGCTTCATGAATTTGCGT
miR-34a	正义: GGCAGTGTCTTAGCTGGTTG
	反义: AAGAGCTTCCGAAGT CCTGG
miR-34a Antagomir	正义: ACAACCAGCUAAGACACUGCCA
miR-34a Antagomir N.C	正义: CAGUACUUUUGUGUAGUACAA
Atrogin-1	正义: CAGTTCGTGAGCGACCTC
	反义: GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC
MuRF-1	正义: GTGTGAGGTGCCTACTTGCTC
	反义: GCTCAGTCTTCTGTCCTTGG
GAPDH	正义: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	反义: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

SIRT1. 沉默调节蛋白1; MuRF-1. 肌肉环指蛋白1; Atrogin-1. 萎缩相关基因1蛋白

1.3 统计学处理 采用SPSS 22.0及GraphPad Prism 8.0.0软件进行统计分析。所有数据均为计量资料,并行方差齐性检测,若满足正态分布且方差齐时以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本t检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Kruskal-Wallis H检验;不满足正态分布者以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,组间比较采用Mann-Whitney U检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS干预后C2C12骨骼肌细胞形态及骨骼肌萎缩情况 光镜下观察显示,C2C12小鼠骨骼肌细胞分化4d后可见肌管形成;与正常对照组比较,ICU-AW组肌管明显萎缩(图1A)。RT-qPCR检测结果显示,ICU-AW组Atrogin-1、MuRF-1 mRNA相对表达水平明显高于正常对照组($P<0.05$,图1B);Western blotting检测结果显示,ICU-AW组Atrogin-1、MuRF-1蛋白相对表达水平明显高于正常对照组($P<0.05$,图1C)。



LPS. 脂多糖; ICU-AW组. 重症监护病房获得性衰弱组; MuRF-1. 肌肉环指蛋白1; Atrogin-1. 萎缩相关基因1蛋白; A. 骨骼肌肌管形成及干预后形态; B. 两组Atrogin-1、MuRF-1 mRNA相对表达水平比较; C. 两组Atrogin-1、MuRF-1蛋白相对表达水平比较; * $P<0.05$

图1 LPS干预后C2C12骨骼肌细胞形态的变化及萎缩标志物的表达情况

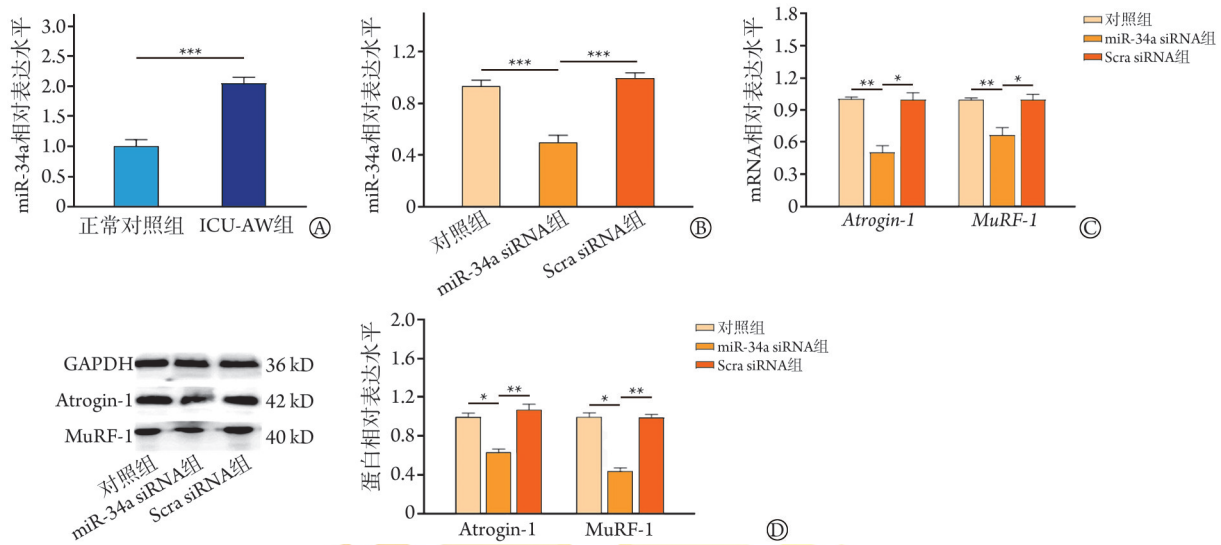
Fig.1 Morphological changes and expression of atrophy markers in C2C12 skeletal muscle cells after LPS intervention

2.2 miR-34a抑制剂干预后骨骼肌萎缩标志物的表达情况 RT-qPCR检测结果显示,与正常对照组比较,ICU-AW组miR-34a相对表达水平明显升高($P<0.001$,图2A);与对照组比较,miR-34a siRNA组miR-34a相对表达水平明显降低($P<0.001$),与miR-34a siRNA组比较,Scra siRNA组miR-34a表达水平明显升高($P<0.001$,图2B)。RT-qPCR及Western blotting检测结果显示,与对照组比较,miR-34a siRNA组Atrogin-1、MuRF-1 mRNA及蛋白相对表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与miR-34a siRNA组比较,Scra

siRNA组Atrogin-1、MuRF-1 mRNA及蛋白相对表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图2C、D)。

2.3 SIRT1激动剂干预后骨骼肌萎缩标志物表达情况 RT-qPCR及Western blotting检测结果显示,与正常对照组比较,ICU-AW组SIRT1 mRNA及蛋白相对表达水平明显降低($P<0.01$,图3A、B);与Vehicle组比较,SRT1720组SIRT1 mRNA及蛋白相对表达水平明显升高($P<0.05$),Atrogin-1及MuRF-1 mRNA及蛋白相对表达水平明显降低($P<0.05$,图3C、D)。

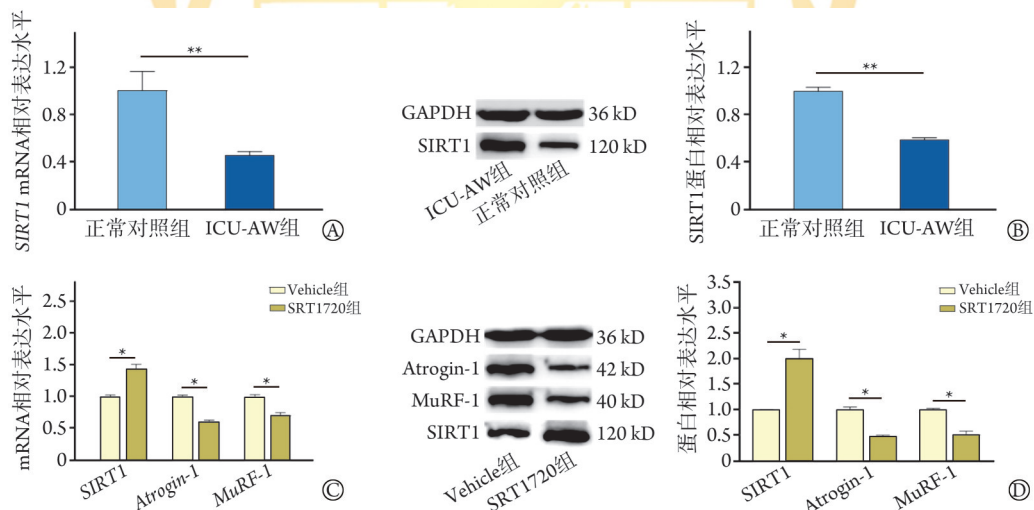
2.4 miR-34a抑制剂与SIRT1抑制剂共同干预后骨骼



ICU-AW组.重症监护病房获得性衰弱组;对照组.LPS及转染剂干预;Scra siRNA组.LPS、转染剂及非特异性siRNA干预;miR-34a siRNA组.LPS、转染剂及特异性siRNA干预;MuRF-1.肌肉环指蛋白1;Atrogin-1.萎缩相关基因1蛋白;A.两组miR-34a mRNA相对表达水平比较;B.三组miR-34a mRNA相对表达量比较;C.三组Atrogin-1、MuRF-1 mRNA相对表达量比较;D.三组Atrogin-1、与MuRF-1蛋白相对表达水平比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图2 miR-34a抑制剂干预后C2C12骨骼肌细胞中萎缩标志物表达情况

Fig.2 Expression of atrophy markers in C2C12 skeletal cells after miR-34a inhibitor intervention



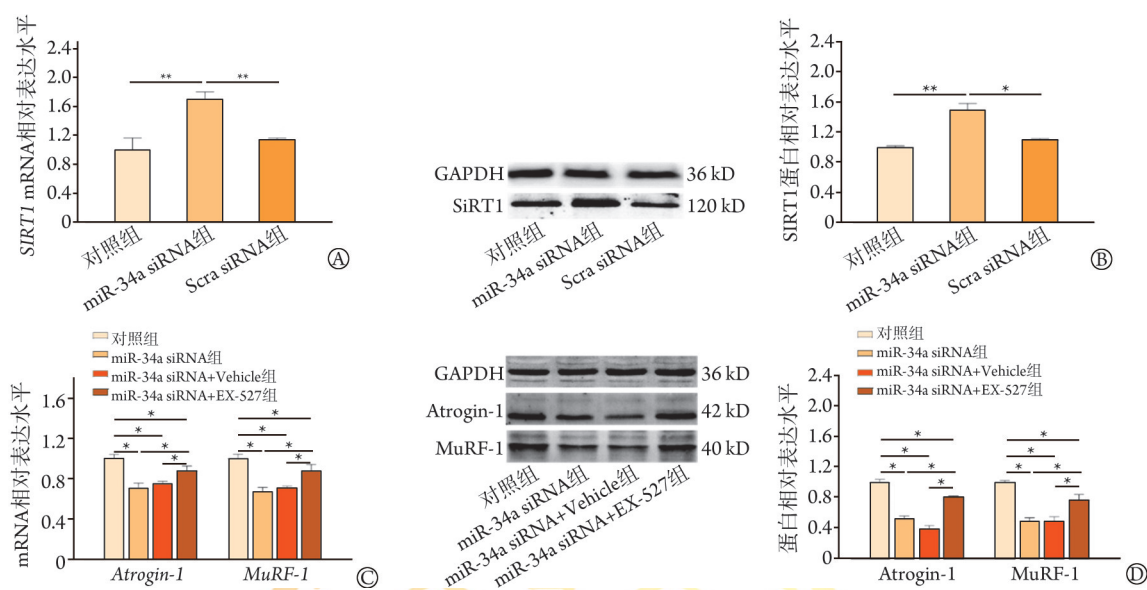
ICU-AW组.重症监护病房获得性衰弱组;Vehicle组.LPS及DMSO干预;SRT1720组.LPS及SRT1720干预;MuRF-1.肌肉环指蛋白1;Atrogin-1.萎缩相关基因1蛋白;SIRT1.沉默调节蛋白1;A.两组SIRT1 mRNA相对表达水平比较;B.两组SIRT1蛋白相对表达水平比较;C.两组SIRT1、Atrogin-1、MuRF-1 mRNA相对表达水平比较;D.两组SIRT1、Atrogin-1、MuRF-1蛋白相对表达水平比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 SIRT1激动剂干预后C2C12骨骼肌细胞中萎缩标志物表达情况

Fig.3 Expression of atrophy markers in C2C12 skeletal cells after intervention with SIRT1 agonist

肌萎缩标志物的表达情况 RT-qPCR及Western blotting检测结果显示,与对照组比较,miR-34a siRNA组SIRT1 mRNA及蛋白相对表达水平明显升高($P < 0.01$),而Scra siRNA组差异无统计学意义($P > 0.05$);与miR-34a siRNA组比较,Scra siRNA组SIRT1 mRNA及蛋白相对表达水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图4A、B)。与对照组比较,miR-34a siRNA组、miR-34a siRNA+Vehicle组、miR-34a siRNA+EX-527组Atrogin-1及MuRF-1 mRNA及蛋白相对表达水平均明显降低

($P < 0.05$);与miR-34a siRNA组比较,miR-34a siRNA+Vehicle组Atrogin-1及MuRF-1 mRNA及蛋白相对表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),而miR-34a siRNA+EX-527组Atrogin-1及MuRF-1 mRNA及蛋白相对表达水平明显升高($P < 0.05$);与miR-34a siRNA+Vehicle组比较,miR-34a siRNA+EX-527组Atrogin-1及MuRF-1 mRNA及蛋白相对表达水平明显升高($P < 0.05$,图4C、D)。



MuRF-1. 肌肉环指蛋白1; Atrogin-1. 萎缩相关基因1蛋白; SIRT1. 沉默调节蛋白1; 对照组. LPS及转染剂干预; Scra siRNA组. LPS、转染剂及非特异性siRNA干预; miR-34a siRNA组. LPS、转染剂及特异性siRNA干预; miR-34a siRNA+Vehicle组. LPS、转染剂、特异性siRNA及DMSO干预; miR-34a siRNA+EX-527组. LPS、转染剂、特异性siRNA及EX-527干预; A. RT-qPCR检测三组SIRT1 mRNA相对表达水平比较; B. Western blotting检测三组SIRT1蛋白相对表达量比较; C. RT-qPCR检测四组萎缩标志物Atrogin-1及MuRF-1 mRNA相对表达水平比较; D. Western blotting检测四组萎缩标志物Atrogin-1及MuRF-1蛋白相对表达水平比较; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图4 miR-34a抑制剂与SIRT1抑制剂共同干预后C2C12骨骼肌细胞中萎缩标志物的表达情况

Fig.4 Expression of atrophy markers in C2C12 skeletal cells after co-intervention of miR-34a inhibitor and SIRT1 inhibitor

3 讨论

ICU-AW主要分为危重病性多发性神经病(critical illness polyneuropathy, CIP)、危重病性肌病(critical illness myopathy, CIM)及危重病性多神经肌病(critical illness polyneuromyopathy, CIPMN)^[16],其中以骨骼肌萎缩为主要表现的CIM在ICU-AW中占绝大部分^[5,17]。脓毒症、脓毒性休克、严重创伤、烧伤等危重症疾病可诱发全身炎症反应及多器官损伤,进而导致蛋白质分解增强,出现负氮平衡(危重症疾病中支链氨基酸非营养代谢作用),可能是导致危重症患者骨骼肌萎缩的重要机制。但目前ICU-AW状态下骨骼肌蛋白分解过度激活的机制及调控靶点尚不完全清楚。

目前普遍认为,肌肉蛋白质的降解主要依赖于UPS、自噬-溶酶体途径(autophagy-lysosomal pathway, ALP)、胱天蛋白酶(caspases)及钙蛋白酶系统(calpains)^[18]等蛋白水解酶系统的高度调节。而UPS是介导危重患者肌肉降解的主要蛋白水解系统^[9],其中两个关键的E₃泛素连接酶MuRF-1及Atrogin-1是肌肉萎缩最重要的标志物^[19]。另有研究发现,在脓毒症状态下,NF- κ B的表达增加,从而激活UPS,进一步加速骨骼肌蛋白水解^[20]。而靶向敲除NF- κ B的内源性抑制因子即核因子- κ B抑制剂(inhibitor of nuclear factor- κ B, I κ B)的蛋白激酶2(I κ B kinase 2,

IKK2),可降低NF- κ B的抑制作用,改变肌纤维分布,增强肌肉力量^[21]。细胞模型具有成本低、周期短、可重复性强及便于精细控制等优点,因而成为研究某一疾病发病机制的重要手段之一。目前对脓毒症相关性ICU获得性衰弱的研究中,LPS诱导的骨骼肌损伤细胞模型是较为理想及广泛应用的细胞模型之一。本研究利用含10% PBS的DMEM高糖培养基及含有2%马血清的DMEM分化培养基将C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞分化培养,4 d后可见肌管形成。进一步利用LPS构建ICU-AW细胞模型,发现ICU-AW组肌管较正常对照组明显萎缩,且ICU-AW组Atrogin-1、MuRF-1 mRNA及蛋白表达均高于正常对照组,提示ICU-AW细胞模型构建成功,与Fang等^[14]的研究结果一致,为后续实验奠定了基础。

miRNA是一类在转录后基因调控中起重要作用的小分子RNA,因其广泛参与急性肾损伤^[22]、冠状病毒感染^[23]、癌症^[24]等多种危重症疾病的发病过程而成为近年来的研究热点^[25]。miR-34a为新近发现且备受关注的miRNA之一,有研究发现其在血管平滑肌中能够抑制平滑肌增殖,促进平滑肌细胞的衰老及钙化^[10]。在脓毒症小鼠中,miR-34a通过介导心肌细胞死亡及心肌纤维化过程参与脓毒症的心功能调控^[26];在衰老的骨骼肌中,miR-34a的表达明显增高,可诱导肌肉萎缩、加剧肌质疏松^[27]。不仅如此,在盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)模

型诱导的脓毒症小鼠中,下调 miR-34a 对小鼠炎症反应及肺损伤有明显抑制作用^[28]。上述研究提示,miR-34a 与骨骼肌代谢及脓毒症发病过程密切相关,但其在脓毒症相关性 ICU-AW 中的作用及机制尚无报道。为了明确 miR-34a 在 ICU-AW 中的作用,本研究利用 RT-qPCR 及 Western blotting 检测了正常对照组与 ICU-AW 组的 miR-34a 的表达,发现 ICU-AW 组 miR-34a 表达明显升高,提示其可能参与了 ICU-AW 发病过程。本研究进一步通过细胞转染技术抑制 ICU-AW 组 miR-34a 的表达,结果发现,与对照组及 Scra siRNA 组比较,miR-34a siRNA 组骨骼肌萎缩标志物 *Atrogin-1*、*MuRF-1* mRNA 及蛋白表达水平均明显降低,提示 miR-34a 可能参与了 ICU-AW 的发病过程,但其如何调控 *Atrogin-1*、*MuRF-1* 的表达仍需进一步研究。

Sirtuins 是依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的脱乙酰化酶及 ADP 核糖基转移酶的保守家族,其位于细胞核及细胞质中,可通过底物的脱乙酰化作用在细胞凋亡、自噬、衰老、增殖等多种代谢过程中发挥重要作用^[29]。SIRT1 是该家族中研究最为充分的一员,可通过去乙酰化 NF- κ B 的 RelA/p65 亚基阻断 FoxO1/FoxO3 的激活^[11],进而调控 *Atrogin-1* 及 *MuRF-1* 的表达,最终减少肌肉损耗、促进肌肉再生、抑制骨骼肌萎缩^[12]。另有研究发现,SIRT1 也可作为 miR-34a 的靶标之一,在平滑肌细胞衰老及钙化^[10]、肿瘤的发生^[30]、大鼠肝纤维化^[31]、间充质干细胞(MSCs)衰老^[32]中发挥重要作用,以上研究提示 miR-34a 可介导 SIRT1 对 *Atrogin-1* 及 *MuRF-1* 的调控过程,从而参与多种疾病过程,且与骨骼肌功能密切相关,但这一信号通路在 ICU-AW 中的作用尚无报道。本研究发现,与正常对照组比较,ICU-AW 组 *SIRT1* mRNA 及蛋白表达水平均明显降低,提示 SIRT1 表达受抑制可能参与了 ICU-AW 的发病过程。为证实这一推测,本研究利用 SIRT1 激动剂 SRT1720 进行了验证;结果显示,与 Vehicle 组比较,SRT1720 组 *SIRT1* mRNA 及蛋白表达水平明显升高,而 *Atrogin-1*、*MuRF-1* mRNA 及蛋白表达水平明显降低,提示激活 SIRT1 对骨骼肌具有保护作用。本研究进一步对 ICU-AW 组在 siRNA 转染抑制 miR-34a 的基础上给予 SIRT1 抑制剂 EX-527 干预,结果发现 EX-527 能够逆转 siRNA 转染抑制 miR-34a 的保护作用,提示 ICU-AW 状态下 miR-34a 存在过度激活,并通过抑制 SIRT1 的表达调控 E₃ 泛素连接酶 *MuRF-1* 及 *Atrogin-1* 的表达,最终导致骨骼肌萎缩。

综上所述,ICU-AW 状态下 miR-34a 过度激活,并通过抑制 SIRT1 的表达导致骨骼肌萎缩,可能在 ICU-AW 发病过程中发挥重要作用。本研究的不足之

处在于均为骨骼肌细胞层面的研究,结论缺乏动物实验的验证,能否作为 ICU-AW 患者治疗的潜在干预靶点仍需深入研究。因此,笔者下一步将通过腹腔注射 LPS 构建 ICU-AW 小鼠模型,并对其中 miR-34a/SIRT1 的作用及其下游机制进行深入探讨。

【参考文献】

- [1] Vanhorebeek I, Latronico N, van den Berghe G. ICU-acquired weakness[J]. *Chest*, 2020, 46(4): 637-653.
- [2] 潘晓佳,徐朝霞,李宁,等. HMB 在小鼠急性呼吸窘迫综合征相关 ICU 获得性衰弱中的作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(9): 886-892.
- [3] Fan E, Cheek F, Chlan L, et al. An official American Thoracic Society Clinical Practice guideline: the diagnosis of intensive care unit-acquired weakness in adults[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190(12): 1437-1446.
- [4] Sidiras G, Patsaki I, Karatzanos E, et al. Long term follow-up of quality of life and functional ability in patients with ICU acquired weakness - a post hoc analysis[J]. *J Crit Care*, 2019, 53: 223-230.
- [5] Jolley SE, Bunnell AE, Hough CL. ICU-acquired weakness[J]. *Chest*, 2016, 150(5): 1129-1140.
- [6] Kanova M, Kohout P. Molecular mechanisms underlying intensive care unit-acquired weakness and sarcopenia[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8396.
- [7] Yin L, Li N, Jia WH, et al. Skeletal muscle atrophy: from mechanisms to treatments[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 172: 105807.
- [8] Schefold JC, Wollersheim T, Grunow JJ, et al. Muscular weakness and muscle wasting in the critically ill[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2020, 11(6): 1399-1412.
- [9] Batt J, Herridge MS, Dos Santos CC. From skeletal muscle weakness to functional outcomes following critical illness: a translational biology perspective[J]. *Thorax*, 2019, 74(11): 1091-1098.
- [10] Badi I, Mancinelli L, Polizzotto A, et al. miR-34a promotes vascular smooth muscle cell calcification by downregulating SIRT1 (Sirtuin-1) and AXL (AXL receptor tyrosine kinase) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(9): 2079-2090.
- [11] Nakazawa H, Chang K, Shinozaki S, et al. iNOS as a driver of inflammation and apoptosis in mouse skeletal muscle after burn injury: possible involvement of Sirt1 S-nitrosylation-mediated acetylation of p65 NF- κ B and p53[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170391.
- [12] Lee D, Goldberg AL. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(42): 30515-30526.
- [13] Yao X, Yu T, Zhao C, et al. Evodiamine promotes differentiation and inhibits proliferation of C2C12 muscle cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1627-1634.
- [14] Fang WY, Tseng YT, Lee TY, et al. Triptolide prevents LPS-induced skeletal muscle atrophy via inhibiting NF- κ B/TNF- α and regulating protein synthesis/degradation pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(15): 2998-3016.
- [15] 李玫,李霜,胡健,等. GSDMD 介导的细胞焦亡对小鼠骨骼肌肌肉萎缩的影响及机制研究[J]. *第三军医大学学报*, 2021, 43(15): 1486-1492.

- [16] Wang WK, Xu CJ, Ma XL, *et al.* Intensive care unit-acquired weakness: a review of recent progress with a look toward the future [J]. *Front Med*, 2020, 7: 559789.
- [17] Wunsch H, Guerra C, Barnato AE, *et al.* Three-year outcomes for Medicare beneficiaries who survive intensive care[J]. *JAMA*, 2010, 303(9): 849-856.
- [18] Webster JM, Kempen LJAP, Hardy RS, *et al.* Inflammation and skeletal muscle wasting during Cachexia[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 597675.
- [19] Lad H, Saumur TM, Herridge MS, *et al.* Intensive care unit-acquired weakness: not just another muscle atrophy condition [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 7840.
- [20] Thoma A, Lightfoot AP. NF- κ B and inflammatory cytokine signalling: role in skeletal muscle atrophy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1088: 267-279.
- [21] Mourkioti F, Kratsios P, Luedde T, *et al.* Targeted ablation of IKK₂ improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(11): 2945-2954.
- [22] Jones T, Bekele S, O'Dwyer M, *et al.* microRNAs in acute kidney injury[J]. *Nephron*, 2018, 140(2): 124-128.
- [23] Ardalan M, Chodari L, Zununi Vahed S, *et al.* Stem cell-derived biofactors fight against coronavirus infection[J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(12): 1813-1825.
- [24] Fu ZW, Wang L, Li SJ, *et al.* microRNA as an important target for anticancer drug development[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 736323.
- [25] 杨佳楠, 姜同连, 朱福彬, 等. miRNA在糖尿病肾病足细胞损伤中作用及其机制的研究进展[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(6): 1677-1682.
- [26] Boon RA, Iekushi K, Lechner S, *et al.* microRNA-34a regulates cardiac ageing and function[J]. *Nature*, 2013, 495(7439): 107-110.
- [27] Kukreti H, Amuthavalli K. microRNA-34a causes ceramide accumulation and effects insulin signaling pathway by targeting ceramide kinase (CERK) in aging skeletal muscle[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(S/6): 3070-3089.
- [28] Chen S, Ding RY, Hu ZW, *et al.* microRNA-34a inhibition alleviates lung injury in cecal ligation and puncture induced septic mice[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1829.
- [29] Wang L, Xu CY, Johansen T, *et al.* SIRT1 – a new mammalian substrate of nuclear autophagy[J]. *Autophagy*, 2021, 17(2): 593-595.
- [30] Ong ALC, Ramasamy TS. Role of Sirtuin-1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming[J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 43: 64-80.
- [31] Song L, Chen TY, Zhao XJ, *et al.* Pterostilbene prevents hepatocyte epithelial-mesenchymal transition in fructose-induced liver fibrosis through suppressing miR-34a/Sirt1/p53 and TGF- β_1 /Smads signalling[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(11): 1619-1634.
- [32] Pi CC, Ma C, Wang H, *et al.* miR-34a suppression targets Nampt to ameliorate bone marrow mesenchymal stem cell senescence by regulating NAD⁺-Sirt1 pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 271.

(责任编辑: 张小利)

解放军医学杂志®