血清微小 RNA-17-5p 表达与百草枯中毒预后的关系及对肺泡上皮细胞线粒体凋亡和内质网应激的影响

徐飞[1] 刘超[1] 周乔枝[1] 范志刚[1] 周世泰[2]

[1]西安交通大学附属三二〇一医院急诊科,陕西汉中 725000;[2] 汉中市中心医院急诊科,陕西汉中 723000

摘要 目的:分析血清微小 RNA(miR)-17-5p 表达与百草枯中毒患者预后的关系及对肺泡上皮细胞线粒体凋亡和内质网应激的影响。方法:选取百草枯中毒患者 51 例作为研究组,并选择同期健康体检者 51 例作为对照组,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 2 组血清 miR-17-5p 表达水平,比较不同预后、不同中毒程度的百草枯中毒患者血清 miR-17-5p 表达水平,分析血清 miR-17-5p 表达水平与患者中毒严重程度、预后的相关性,绘制受试者工作特征(ROC)曲线评估血清 miR-17-5p 预测百草枯中毒患者不良预后的价值。检测不同浓度百草枯对肺泡上皮细胞中 miR-17-5p 表达、细胞的增殖活性及凋亡的影响。将肺泡上皮细胞分为对照组、百草枯组、百草枯 + miR-NC 组、百草枯 + miR-17-5p 组,CCK8 和流式细胞术检测细胞增殖活性和凋亡率,采用 RT-qPCR 检测 miR-17-5p 表达水平,Western blot 检测细胞色素 C(Cyt-C)、活化的胱天蛋白酶 3(Cleaved-caspase3)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)、活化转录因子 6(ATF4)、C/EBP 同源转录蛋白(CHOP)的表达。结果:与对照组比较,百草枯中毒患者血清中 miR-17-5p 表达水平显著降低($P<0.05$);不同预后、不同百草枯中毒程度患者间,血清 miR-17-5p 表达水平的差异有统计学意义(P 均 <0.05),血清 miR-17-5p 水平与中毒严重程度、不良预后呈负相关($r=-0.623$、-0.748,P 均 <0.05),血清 miR-17-5p 水平预测患者预后不良的曲线下面积为 0.838,特异性为 82.10%、灵敏度为 78.36%。与 0μmol/L 组相比,50μmol/L、100μmol/L、250μmol/L、500μmol/L、1 000μmol/L组 miR-17-5p 表达水平、细胞活性逐渐降低,凋亡率逐渐升高(P 均 <0.05),但 500μmol/L、1000μmol/L 组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,百草枯组 miR-17-5p 表达水平、Bcl-2 蛋白表达、细胞活性显著降低,凋亡率、Cyt-C、Cleaved-caspase3、Bax、PERK、ATF4、CHOP 蛋白表达显著增加(P 均 <0.05);与百草枯 + miR-NC 组比较,百草枯 + miR-17-5p 组 miR-17-5p 表达水平、Bcl-2 蛋白表达、细胞活性显著增加,凋亡率、Cyt-C、Cleaved-caspase3、Bax、PERK、ATF4、CHOP 蛋白表达显著降低(P 均 <0.05)。结论:百草枯中毒患者血清中 miR-17-5p 表达水平异常降低,且与患者中毒严重程度、预后密切相关;上调 miR-17-5p 可减轻百草枯诱导的肺泡上皮细胞线粒体凋亡和内质网应激。

关键词 miR-17-5p;百草枯;中毒;预后;肺泡上皮细胞;线粒体凋亡;内质网应激

中图分类号 R595.4 **文献标识码** A DOI 10.11768/nkjwzzzz.202403050139

Relationship between serum miR-17-5p expression and prognosis in patients with paraquat poisoning and its effect on mitochondria apoptosis and endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells induced by paraquat

XU Fei[1], LIU Chao[1], ZHOU Qiao-zhi[1], FAN Zhi-gang[1], ZHOU Shi-tai[2]. [1]Department of Emergency Medicine, Affiliated 3201st Hospital of Xi'an Jiaotong University, Shaanxi Hanzhong 725000, China; [2]Department of Emergency Medicine, Hanzhong Central Hospital, Shaanxi Hanzhong 72300, China

Corresponding author: ZHOU Shi-tai, E-mail: zhoushitai1981@163.com

Abstract Objective: To analyze the relationship between serum miR-17-5p expression and prognosis of patients with paraquat poisoning, and its effect on mitochondria apoptosis and endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells induced by paraquat. Methods: Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression level of serum miR-17-5p in paraquat poisoning patients and healthy controls, and the expression level of miR-17-5p in paraquat poisoning patients with different prognosis and poisoning severity was compared, and the relationship between the expression level of miR-17-5p and poisoning severity and prognosis of patients was analyzed. Cell counting kit (CCK8), flow cytometry and RT-qPCR were used to detect the effects of different concentrations of paraquat on the expression, proliferation and apoptosis of miR-17-5p in alveolar epithelial cells. Alveolar epithelial cells were divided into control group (Con), paraquat group, paraquat + miR-NC group, and paraquat + miR-17-5p group. The cell proliferation activity and apoptosis rate were detected by CCK8 and flow cytometry, and the expression level of miR-17-5p was detected by RT-qPCR. Western blot was used to detect the protein expression of cytochrome C (Cyt-C), activated caspase3 (Cleaved caspase3), Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma/leukemic-2 (Bcl-2), protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), activated transcription factor 6 (ATF4), and C/EBP homologous transcription protein (CHOP). Results: Compared with

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(2021SF-044)

通信作者:周世泰,E-mail:zhoushitai1981@163.com,陕西省汉中市汉台区康复路 22 号

healthy controls, the expression level of miR-17-5p in serum of paraquat poisoning patients was significantly decreased ($P < 0.05$). The expression level of miR-17-5p in paraquat poisoning patients with different prognosis and poisoning severity showed statistical significance ($P < 0.05$). The AUC of serum miR-17-5p level predicting poor prognosis was 0.838, the specificity was 82.10%, and the sensitivity was 78.36%. Compared with 0 μmol/L group, the expression level and cell activity of miR-17-5p in 50, 100, 250, 500 and 1 000 μmol/L paraquat groups were gradually decreased, and the apoptosis rate was gradually increased ($P < 0.05$). There was no significant difference between 500 and 1000 μmol/L paraquat groups ($P > 0.05$). Compared with Con group, the expression level of miR-17-5p, Bcl-2 protein expression, and cell activity in paraquat group were significantly decreased, and the apoptosis rate, Cyt-C, Cleaved-caspase3, Bax, PERK, ATF4, and CHOP protein expression levels were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with paraquat + miR-NC group, the expression level of miR-17-5p, the expression of Bcl-2 protein and cell activity in paraquat + miR-17-5p group were significantly increased. The expression of apoptosis rate, Cyt-C, Cleaved-caspase3, Bax, PERK, ATF4 and CHOP were significantly decreased ($P < 0.05$). Conclusion: The expression level of miR-17-5p in serum of paraquat poisoning patients was abnormally decreased, and it was closely related to the severity of poisoning and prognosis of patients. Updown of miR-17-5p alleviates paraquat-induced mitochondrial apoptosis and endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells.

Key words miR-17-5p; Paraquat; Poisoning; Prognosis; Alveolar epithelial cells; Mitochondrial apoptosis; Endoplasmic reticulum stress

百草枯是一种毒性较强的除草剂，对啮齿类动物有较强的毒性，可引起急性中毒，是农药中毒致死事件的主要病因[1]。百草枯中毒严重者可致多器官功能不全，肺是主要靶器官，早期表现为急性肺损伤或呼吸窘迫综合征，后期出现肺纤维化，是致死的主要原因[2,3]。微小 RNA（MicroRNAs，miRNAs）是一类较为特殊的小分子 RNA，长度约为 19～22 个核苷酸，广泛在动植物、病毒和单个细胞中表达，通过调节细胞增殖、线粒体凋亡、内质网应激等途径参与疾病发展[4]。近年研究发现，miR-17-5p 在肺组织和成纤维细胞中低表达，参与肺间质纤维化发展[5]。研究发现，miR-17-5p 在百草枯所致的肺上皮间质转化中低表达[6]。本研究分析血清 miR-17-5p 表达与百草枯中毒患者预后的关系及对肺泡上皮细胞线粒体凋亡和内质网应激的影响。

材料与方法

1. 研究对象：回顾性选取 2018 年 11 月-2023 年 6 月西安交通大学附属三二〇一医院急诊收治的百草枯中毒患者 51 例作为研究组，并选择同期健康体检者 51 例作为对照组。研究组纳入标准：①口服百草枯中毒，②尿液百草枯点滴试验结果阳性；③中毒至就诊时间≤12 h。排除标准：①合并其他药物中毒；②既往存在陈旧性心脑肺等病变；③妊娠期或哺乳期女性；④有血液系统或免疫系统疾病；⑤有原发性急慢性感染等疾病。中毒严重程度评估参考《急性百草枯中毒诊治专家共识（2013）》[7]；统计研究组入院 14 d 后病死情况，死亡归为预后不良，生存归为预后良好。本研究经医院伦理委员会审核（批号：LLSC-KYLW-2024-027），患者及家属均知情并签署同意书。

2. 细胞和主要试剂：大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞购自上海沪震实业公司。细胞培养在含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基中，置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养。Trizol 试剂盒、miRNA RT 反转录试剂盒和荧光定量试剂盒购自北京天根生化公司；细胞计数试剂盒（Baxcell counting Kit-8，CCK8）和凋亡试剂盒购自北京索莱宝公司；Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体、细胞色素 C（cytochrome C，Cyt-C）抗体、B 细胞淋巴瘤/白血病-2（B cell lymphoma/lewkmia-2，Bcl-2）抗体、活化的胱天蛋白酶 3（cleaved-cysteinyl aspartate specific proteinase3，cleaved-caspase3）抗体、蛋白激酶 R 样内质网激酶（protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase，PERK）抗体、活化转录因子 4（activating transcription factor 4，ATF4）抗体、C/EBP 同源转录蛋白（C/EBP-homologous protein，CHOP）抗体购自美国赛默飞世尔公司。

3. 检测 miR-17-5p 表达水平：采集研究组（入院 24 h）、对照组（体检当日）静脉血；取对数生长期肺泡上皮细胞，调整密度至 2×10^4 个/mL，接种 96 孔中，先后加入不同浓度（0、50、100、250、500、1000 μmol/L）的百草枯，继续培养 24 h。用 Trizol 试剂提取样本总 RNA，4℃下 10 000 转/min 离心 15 min，室温晾干取沉淀物，溶于 50～100 μL RNA 溶解液内，检测 RNA 浓度和纯度，按照 miRNA RT 反转录试剂盒合成 cDNA，配置 PCR 扩增体系，在 Applied Biosystems PCR 仪器上进行扩增。U6 作为内参，用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 miR-17-5p 表达水平。

4. CCK8 检测细胞增殖活性：取对数生长期肺

泡上皮细胞，调整密度至 2×10^4 个/mL，接种 96 孔中，先后加入不同浓度（0、50、100、250、500、1000 μmol/L）的百草枯，继续培养 24 h，每孔内加入 10 μL CCK-8 溶液，继续培养 4 h，用酶标仪测定450 nm处吸光度，计算细胞增殖活性。根据吸光度值计算细胞相对速率，计算 IC50 值。

5. 流式细胞术检测细胞凋亡：取对数生长期肺泡上皮细胞，调整密度至 2×10^4 个/mL，接种 96 孔中，先后加入不同浓度（0、50、100、250、500、1 000 μmol/L）的百草枯，继续培养 24 h 后，用预冷磷酸盐缓冲液洗 3 次，1 000 转/min 离心 3 min 弃上清，制备细胞悬液后转移至流式管内，加 Binding Solution，先后加入 5μL 异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V（Annexin V-FITC）和碘化丙啶（PI）试剂，室温孵育 20 min 后，上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

6. 细胞分组：将肺泡上皮细胞分为对照组（Con）、百草枯组、百草枯 + miR-NC 组、百草枯 + miR-17-5p 组。百草枯组：500 μmol/L 的百草枯处理细胞；百草枯 + miR-NC 组、百草枯 + miR-17-5p 组：500 μmol/L 的百草枯处理细胞，转染 miR-NC、miR-17-5p；Con 组：细胞不做任何处理。各组细胞培养 24 h，按照 3、4、5 实验步骤检测各组细胞 miR-17-5p、增殖活性和凋亡。

7. Western blot 检测线粒体凋亡和内质网应激蛋白表达：RIPA 裂解液与 PMSF 按照 100∶1 比例混合，从培养箱中取出 6 中各组细胞，预冷磷酸盐缓冲液洗 2 次，用细胞刮刀收集各组细胞，4℃下 1 000 转/min 离心 5 min 后，冰上裂解 1 h，4℃下 12 000 转/min 离心 30 min 取上清液，BCA 法定量蛋白浓度，加 5 × 上样缓冲液与 PBS 混合，高温变性 5 min。取等量蛋白（每孔 30 μg）经凝胶电泳分离蛋白，转膜、封闭培养，先后加入 Cyt-C、Cleaved-caspase3、Bax、Bcl-2、PERK、ATF4、CHOP 一抗，4℃下过夜孵育，次日加相应二抗室温孵育 1 h，最后加电化学发光试剂，显影、定影、拍照。用 Image J 软件分析蛋白条带密度值。

8. 统计学分析：采用 SPSS 27.0 统计学用软件。计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，2 组间比较用独立样本 t 检验，同组不同预后患者比较用配对 t 检验；采用受试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线及曲线下面积（the area under curve，AUC）评估 miR-17-5p 预测百草枯中毒患者不良预后的价值；5 组间比较采用单因素方差分析，组内比较用 LSD-t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1. 研究组和对照组一般资料及血清 miR-17-5p 表达情况：2 组基线资料均衡可比（P 均 >0.05，扫描文前二维码查看详细基线资料）。与健康对照组比较，百草枯中毒患者血清中 miR-17-5p 表达水平显著降低（0.50 ± 0.11 *vs* 1.12 ± 0.24，$P<0.05$），见图 1。

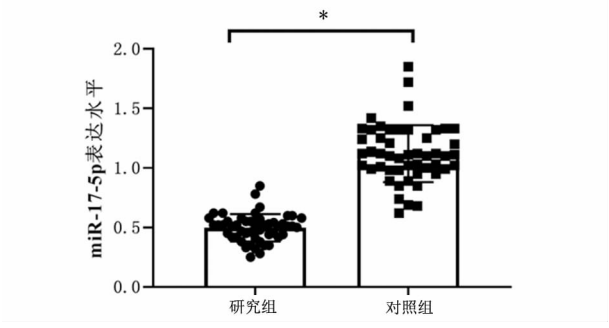
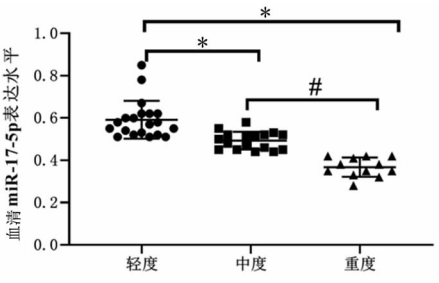


图 1　研究组和对照组血清 miR-17-5p 表达水平（与对照组比较，$^*P<0.05$）

2. 血清 miR-17-5p 表达水平与中毒严重程度、预后的关系：预后良好患者 miR-17-5p 表达水平高于预后不良患者（0.57 ± 0.11 *vs* 0.43 ± 0.10，$P<0.05$），轻度患者 miR-17-5p 表达水平 > 中度 > 重度（0.59 ± 0.09、0.49 ± 0.04、0.37 ± 0.05，P 均 <0.05），见图 2。相关性分析显示，miR-17-5p 与中毒严重程度、预后呈负相关（$r=-0.623$、-0.748，P 均 <0.05）。



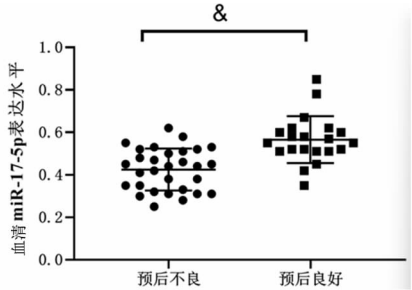


图 2　不同预后、中毒程度患者血清 miR-17-5p 表达水平（与轻度组比较，$^*P<0.05$；与中度组比较，$^\#P<0.05$；与预后不良组比较，$^\&P<0.05$）

以预后不良患者作为阳性样本，以预后良好为阴性样本，绘制 miR-17-5p 预测预后的 ROC 曲线，AUC 为 0.835（95% *CI*：0.724-0.946），特异性为 82.10%，灵敏度为 78.36%，见图 3。

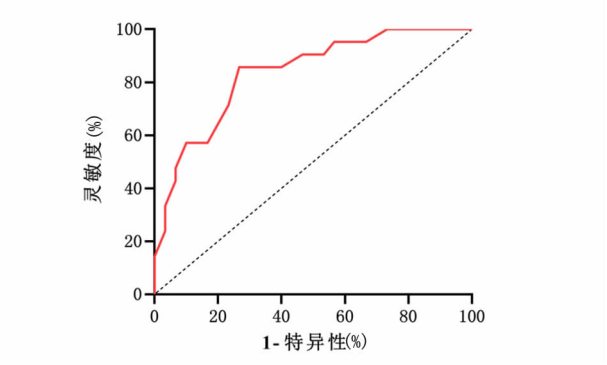


图 3 miR-17-5p 预测百草枯中毒患者不良预后的 ROC 曲线

3. 不同浓度百草枯对肺泡上皮细胞中 miR-17-5p 表达、细胞增殖活性和凋亡的影响：与 0 μmol/L 组相比，50 μmol/L、100 μmol/L、250 μmol/L、500 μmol/L组 miR-17-5p 表达水平、细胞活性呈剂量依赖性降低，凋亡率呈剂量依赖性升高（$P<0.05$）；500 μmol/L与 1000 μmol/L 组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。IC50 的百草枯浓度为 535.78 μmol/L，故本次实验中以 500 μmol/L 的百草枯作为诱导浓度，见表 1、图 4。

4. 上调 miR-17-5p 表达对百草枯诱导的肺泡上皮细胞增殖活性和凋亡的影响：与 Con 组比较，百草枯组 miR-17-5p 表达水平、细胞活性显著降低，凋亡率显著增加（$P<0.05$）；与百草枯 + miR-NC 组比较，百草枯 + miR-17-5p 组 miR-17-5p 表达水平、细胞活性显著增加，凋亡率显著降低（P 均 <0.05），见表 2、图 5。

5. 上调 miR-17-5p 表达对百草枯诱导的肺泡上皮细胞线粒体凋亡相关蛋白的影响：与 Con 组比较，百草枯组 Bcl-2 蛋白表达显著降低，Cyt-C、Cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达显著增加（P 均 <0.05）；与百草枯 + miR-NC 组比较，百草枯 + miR-17-5p 组 Bcl-2 蛋白表达显著增加，Cyt-C、Cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达显著降低（P 均 <0.05），见表 3、图 6。

表 1 百草枯对肺泡上皮细胞中 miR-17-5p 表达、细胞增殖活性和凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	n（孔）	miR-17-5p	细胞活性（%）	凋亡率（%）
0 μmol/L	9	1.00 ± 0.12	100.02 ± 1.02	3.96 ± 0.32
50 μmol/L	9	0.85 ± 0.06*	86.35 ± 10.62*	8.94 ± 1.24*
100 μmol/L	9	0.68 ± 0.11*	75.19 ± 8.74*	15.43 ± 2.44*
250 μmol/L	9	0.46 ± 0.05*	59.48 ± 9.41*	19.00 ± 1.52*
500 μmol/L	9	0.24 ± 0.05*	38.95 ± 6.58*	25.80 ± 3.11*
1000 μmol/L	9	0.26 ± 0.07*	41.26 ± 7.02*	24.84 ± 2.45*
F 值		132.755	88.347	159.462
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注：与 0 μmol/L 组比较，*$P<0.05$

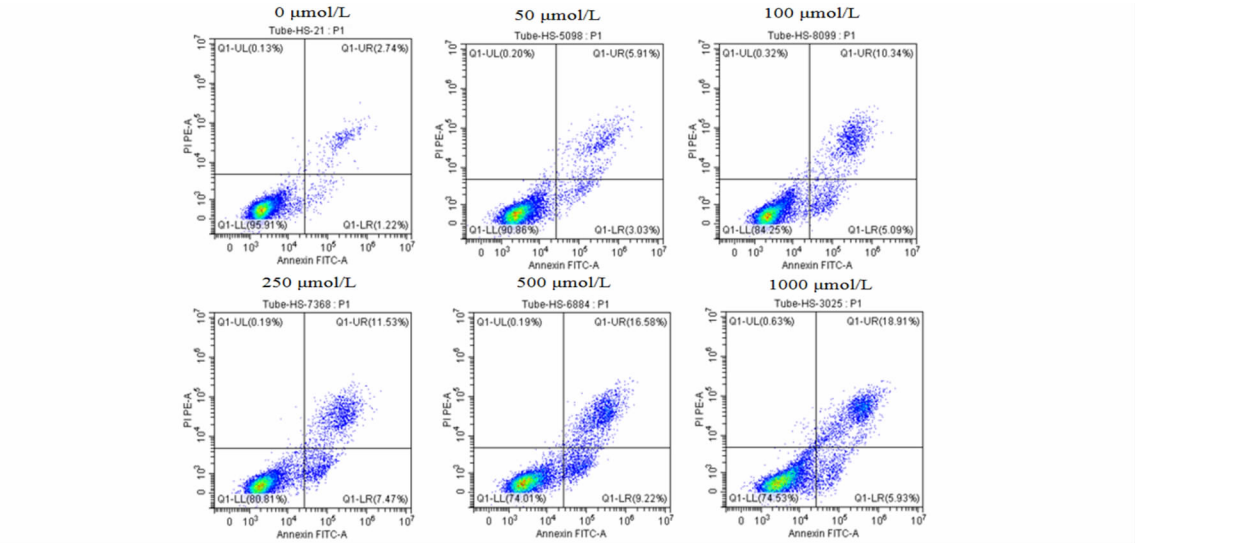


图 4 不同百草枯浓度对肺泡上皮细胞凋亡的影响

表 2　各组 miR-17-5p 表达、增殖活性和凋亡比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n(孔)	miR-17-5p	细胞活性(%)	凋亡率(%)
Con	9	1.01 ± 0.11	100.05 ± 1.05	4.29 ± 0.38
百草枯	9	0.28 ± 0.05*	43.52 ± 6.78*	24.73 ± 3.08*
百草枯 + miR-NC	9	0.30 ± 0.04	45.19 ± 5.44	26.37 ± 2.87
百草枯 + miR-17-5p	9	0.43 ± 0.05#	59.38 ± 5.74#	18.66 ± 1.88#
F 值		226.717	227.575	169.721
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注：与 Con 组比较，*P <0.05；与百草枯 + miR-NC 组比较，#P <0.05

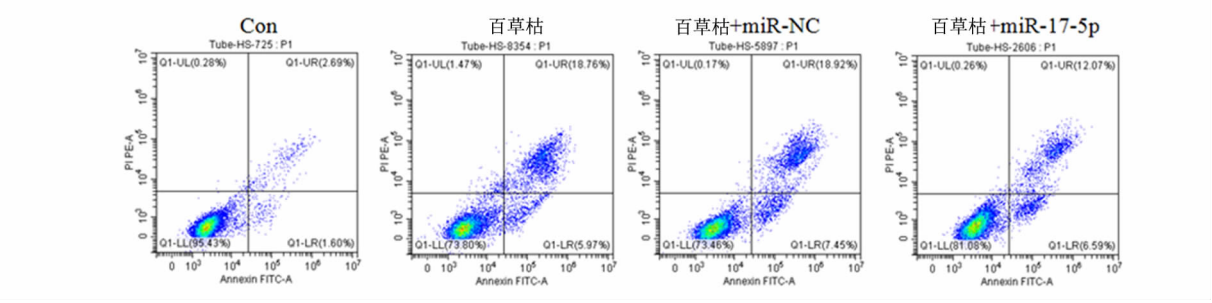


图 5　各组肺泡上皮细胞凋亡率

表 3　各组线粒体凋亡相关基因表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n(孔)	Cleaved-caspase3	Bax	Cyt-C	Bcl-2
Con	9	0.16 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.26 ± 0.08	0.70 ± 0.06
百草枯	9	0.75 ± 0.12*	0.95 ± 0.18*	0.85 ± 0.13*	0.35 ± 0.03*
百草枯 + miR-NC	9	0.77 ± 0.10	0.92 ± 0.12	0.83 ± 0.11	0.34 ± 0.04
百草枯 + miR-17-5p	9	0.61 ± 0.08#	0.79 ± 0.08#	0.67 ± 0.08#	0.49 ± 0.05#
F 值		91.637	80.606	64.557	118.047
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与 Con 组比较，*P <0.05；与百草枯 + miR-NC 组比较，#P <0.05

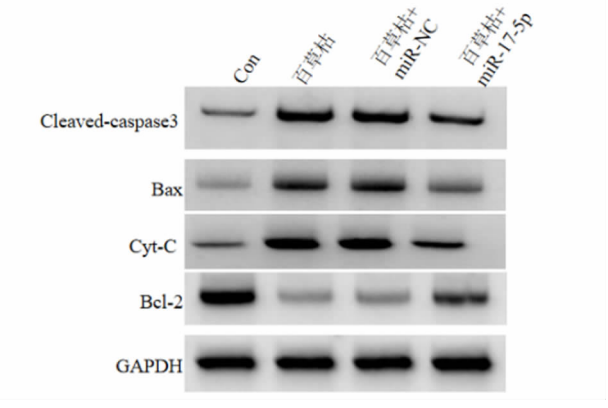


图 6　Western blot 检测 Cyt-C、Cleaved-caspase3、Bax、Bcl-2 蛋白

6. 上调 miR-17-5p 表达对百草枯诱导的肺泡上皮细胞内质网应激相关蛋白表达的影响：与 Con 组比较，百草枯组 PERK、ATF4、CHOP 蛋白表达显著增加(P 均 <0.05)；与百草枯 + miR-NC 组比较，百草枯 + miR-17-5p 组 PERK、ATF4、CHOP 蛋白表达显著降低(P 均 <0.05)，见表 4、图 7。

讨　论

百草枯中毒是临床常见的农药中毒类型，病情进展迅速，累及全身多个器官，病死率高达 50% ~ 80%[8]。研究显示，百草枯中毒可能与细胞氧化应激、线粒体凋亡、细胞焦亡、上皮间质转化等有关[9,10]。miRNAs 是内源性小分子单链 RNA，在哺乳动物中广泛表达，目前被发现的 miRNAs 约有 3000 多个，通过调节多个下游基因或信号转导途径参与多种疾病进展[11]。在百草枯中毒患者血清 miRNAs 异常表达[12]，如 miR-200b-3p、miR-30a-3p/5p、miR-92a 等已被报道，可用于百草枯中毒诊断、评估中毒严重程度和预后[13,14]。miR-17-5p 属于 miR-17 家族成员，在多种疾病和肿瘤中失常表达，与疾病多个生物学功能有关[15]。Curcio 等[16]发现，miR-17-5p 在呼吸窘迫综合征患者血清中低表达，且与患者纤维化病变、肺部阴影密切相关。詹燕婷

表 4 各组细胞内质网应激相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n(孔)	PERK	ATF4	CHOP
Con	9	0.35 ± 0.06	0.29 ± 0.05	0.48 ± 0.05
百草枯	9	0.69 ± 0.08*	0.53 ± 0.04*	0.87 ± 0.07*
百草枯 + miR-NC	9	0.70 ± 0.10	0.54 ± 0.06	0.85 ± 0.08
百草枯 + miR-17-5p	9	0.56 ± 0.06#	0.38 ± 0.05#	0.59 ± 0.06#
F 值		40.525	51.882	77.155
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Con 组比较,*P <0.05;与百草枯 + miR-NC 组比较,#P <0.05

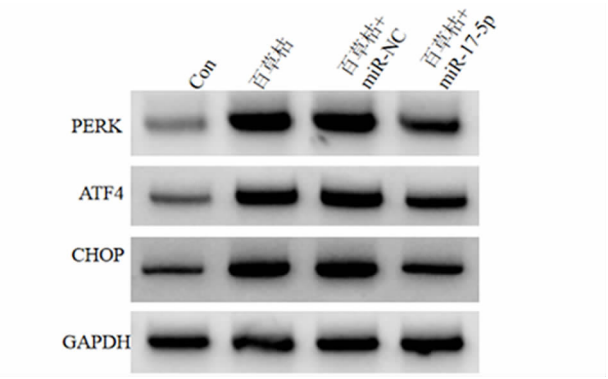


图 7 Western blot 检测 PERK、ATF4、CHOP 蛋白

等[17]研究显示,miR-17-5p 在百草枯所致的神经细胞中表达下调,体内实验显示,miR-17-5p 与百草枯所致的小鼠神经细胞瘤细胞增殖、凋亡和周期改变有关。贾茹珺等[6]研究也显示,miR-17-5p 与百草枯所致的肺上皮-间质转化有关。本研究发现,百草枯中毒患者血清中 miR-17-5p 表达水平低于对照组,且与中毒严重程度、预后呈负相关。ROC 曲线分析显示,miR-17-5p 预测预后的 AUC 为 0.835,特异性为 82.10%,灵敏度为 78.36%,提示血清 miR-17-5p 预测患者预后具有良好的参考价值。

研究表明,百草枯诱导Ⅱ型肺泡上皮细胞异常损伤[18,19]。Bax 和 Bcl-2 均为 Bcl-2 家族成员,二者通常以异源二聚体形式存在,相互拮抗可诱导细胞凋亡;当机体膜电位升高时,Bcl-2 通过抑制 Cyt-C 维持线粒体平衡,发挥抗凋亡作用,Bax 表达上调可导致膜电位降低,促进线粒体释放大量 Cyt-C 进入细胞质中,进而激活 caspase 级联反应[20]。本研究发现,不同浓度百草枯处理肺泡上皮细胞后,细胞凋亡异常升高,miR-17-5p 表达、增殖活性逐渐减低,可见百草枯诱导肺泡上皮细胞凋亡和抑制细胞增殖。本研究中上调 miR-17-5p 可降低百草枯肺泡上皮细胞凋亡,并增加细胞增殖活性,下调 Cyt-C、Cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达,上调 Bcl-2 蛋白表达,提示上调 miR-17-5p 可缓解百草枯诱导肺泡上皮细胞损伤。

内质网主要参与蛋白质加工和修饰,在各种因素刺激下内质网发生紊乱,诱发内质网应激,促进细胞凋亡[21]。内质网应激可参与多种肺部疾病发生发展[22]。PERK、ATF4、CHOP 等是内质网应激常见蛋白,在应激状态下,PERK 发生二聚化和自磷酸化,激活后通过调控 ATF4、CHOP 等基因,进而触发细胞凋亡[23]。本研究中,在百草枯诱导的肺泡上皮细胞中 PERK、ATF4、CHOP 蛋白表达异常升高,上调 miR-17-5p 可降低百草枯肺泡上皮细胞 PERK、ATF4、CHOP 蛋白表达,提示上调 miR-17-5p 可通过调节内质网应激缓解百草枯诱导肺泡上皮细胞损伤。

百草枯中毒患者血清 miR-17-5p 表达水平下降,与患者中毒严重程度、预后密切相关;上调 miR-17-5p 可减轻百草枯诱导的肺泡上皮细胞线粒体凋亡和内质网应激,有望成为百草枯中毒的潜在作用靶点。本研究对 miR-17-5p 下游靶基因未做探讨,下一步考虑分析 miR-17-5p 靶向调控 mRNA 对百草枯诱导的肺泡上皮细胞线粒体凋亡和内质网应激的影响。

参 考 文 献

1 Chandra A, Shah KA, Mahato S, et al. Paraquat poisoning[J]. BMJ Case Rep, 2021, 14(11): e246585.

2 Ren WB, Chen YQ, Wang YT, et al. Inhibitory effect of pirfenidone on pulmonary fibrosis in patients with acute paraquat poisoning[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(11): 13192-13199.

3 Dambal A, Naik S, Hemamalini G, et al. Reasons for under-reporting of paraquat poisoning in India[J]. Natl Med J India, 2021, 34(3): 138-142.

4 Liu YH, Nie HG, Ding Y, et al. MiRNA, a new treatment strategy for pulmonary fibrosis[J]. Curr Drug Targets, 2021, 22(7): 793-802.

5 Liu Q, Bi YK, Song SL, et al. Exosomal miR-17-5p from human embryonic stem cells prevents pulmonary fibrosis by targeting thrombospondin-2[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 234.

(下转第 377 页)

teristics in extracranial carotid artery disease using CT angiography - Risk predictors beyond luminal stenosis[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2022,222(1):1-25.

11 Manrique-Zegarra M, García-Pastor A, Castro-Reyes E, et al. CT angiography for diagnosis of carotid near-occlusion: a digital subtraction angiography validation study[J]. Neuroradiology, 2022, 64(9): 1729-1735.

12 Kong P, Cui ZY, Huang XF, et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 131-145.

13 Rydell E, Jacobsson LT, Saxne T, et al. Cardiovascular disease risk in early rheumatoid arthritis: the impact of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and disease activity[J]. BMC Rheumatol, 2023, 7(1): 43-60.

14 Lv H, Wang H, Quan M, et al. Cartilage oligomeric matrix protein fine-tunes disturbed flow-induced endothelial activation and atherogenesis[J]. Matrix Biol, 2021, 95(1): 32-51.

15 Sandstedt J, Vargmar K, Björkman K, et al. COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) Neoepitope: a novel biomarker to identify symptomatic carotid stenosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(3): 1218-1228.

16 恩歌, 刘阳. 血清 TSG-6, FGF23 水平对慢性心力衰竭患者预后的预测价值[J]. 中国实验诊断学, 2023, 27(9): 1016-1020

17 Qu Y, Yang F, Meng F, et al. Plasma concentration of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 as a novel diagnostic and 3-month prognostic indicator in non-cardioembolic acute ischemic stroke[J]. Front Immunol, 2022, 13(1): 1-19.

18 Di Santo C, La Russa D, Greco R, et al. Characterization of the involvement of tumour necrosis factor (TNF)-α-stimulated gene 6 (TSG-6) in ischemic brain injury caused by middle cerebral artery occlusion in mouse[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6): 5800-5812.

(2024-10-01 收稿 2026-07-20 修回)

(上接第 368 页)

6 贾茹珺, 李铁刚. miR-17-5p 和 MMP2 在百草枯致肺上皮-间质转化中的机制研究[J]. 实用药物与临床, 2020, 23(8): 673-678.

7 中国医师协会急诊医师分会. 急性百草枯中毒诊治专家共识(2013)[J]. 中国急救医学, 2013, 33(6): 484-489.

8 Chen LP, Chen JY, Wang FR, et al. Host-guest formulation of carboxylatopillar6‖arene with ergothioneine as a new antidote for combinational detoxification of paraquat[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2023, 15(22): 26407-26416.

9 Jiang FY, Li S, Jiang Y, et al. Fluorofenidone attenuates paraquat-induced pulmonary fibrosis by regulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and autophagy[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(6): 405.

10 Huang J, Cao Y, Li X, et al. E2F1 regulates miR-215-5p to aggravate paraquat-induced pulmonary fibrosis via repressing BMPR2 expression [J]. Toxicol Res (Camb), 2022, 11(6): 940-950.

11 Iacomino G. miRNAs: The road from bench to bedside[J]. Genes (Basel), 2023, 14(2): 314.

12 Zhao HW, Liu H, Liu LY, et al. Analysis of microRNA expression profiling during paraquat-induced injury of murine lung alveolar epithelial cells[J]. J Toxicol Sci, 2020, 45(8): 423-434.

13 Shihana F, Wong WKM, Joglekar MV, et al. Urinary microRNAs as non-invasive biomarkers for toxic acute kidney injury in humans[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 9165.

14 Ding MG, Zhang Y, Xu WJ, et al. MicroRNA-200b-3p as a biomarker for diagnosis and survival prognosis of multiple organ dysfunction syndrome caused by acute paraquat poisoning[J]. Hum Exp Toxicol, 2022, 41: 9603271221094008.

15 Pimenta R, Camargo JA, Gonçalves GL, et al. Overexpression of miR-17-5p may negatively impact p300/CBP factor-associated inflammation in a hypercholesterolemic advanced prostate cancer model[J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(9): 7333-7345.

16 Curcio R, Poli G, Fabi C, et al. Exosomal miR-17-5p, miR-146a-3p, and miR-223-3p correlate with radiologic sequelae in survivors of COVID-19-related acute respiratory distress syndrome[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13037.

17 詹燕婷. miR-17-5p 在百草枯致神经细胞损害中的作用及其改变的可能途径探讨[D]. 福建医科大学, 2017.

18 Subbiah R, Tiwari RR. The herbicide paraquat-induced molecular mechanisms in the development of acute lung injury and lung fibrosis [J]. Crit Rev Toxicol, 2021, 51(1): 36-64.

19 Liu C, Sun ZR, Wang MM, et al. Arctigenin attenuates paraquat-induced human lung epithelial A549 cell injury by suppressing ROS/p38 mitogen-activated protein kinases-mediated apoptosis[J]. World J Emerg Med, 2022, 13(5): 373-378.

20 Xiao LF, Xu CC, Lin PY, et al. Novel dihydroartemisinin derivative Mito-DHA5 induces apoptosis associated with mitochondrial pathway in bladder cancer cells[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2022, 23(1): 10.

21 Dobrinskikh E, Hennessy CE, Kurche JS, et al. Epithelial endoplasmic reticulum stress enhances the risk of muc5b-associated lung fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2023, 68(1): 62-74.

22 Tepebaş MY, Büyükbayram Hi, Özmen ö, et al. Dexpanthenol ameliorates doxorubicin-induced lung injury by regulating endoplasmic reticulum stress and apoptosis[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2023, 396(8): 1837-1845.

23 Kim TW. Fisetin, an anti-inflammatory agent, overcomes radioresistance by activating the PERK-ATF4-CHOP axis in liver cancer[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 9076.

(2024-03-12 收稿 2026-05-15 修回)