·临床研究·

miR-23家族在脂多糖诱导的人肾小管上皮HK-2细胞损伤中的作用

费丽萍，唐坎凯，刘凤琪

【摘要】目的 研究微小RNA（miR）-23家族在脂多糖（LPS）诱导的人肾小管上皮HK-2细胞损伤中的作用及机制。方法 培养人肾小管上皮HK-2细胞，将细胞分为对照组（给予不含药物的培养液）、LPS组（给予含1 mg/L LPS的培养液）、LPS+miR-NC组（转染NC模拟物6 h后更换为含有1mg/L LPS的培养液）、LPS+miR-23a组（转染miR-23a模拟物6 h后更换为含有1mg/L LPS的培养液）。采用荧光定量PCR检测miR-23a、miR-23b、miR-23c的表达，双荧光素酶报告基因实验检测miR-23a靶向TAK1结合蛋白3（TAB3），CCK-8法检测细胞存活率，Annexin V-FITC/PI法检测细胞凋亡率，ELISA法检测白细胞介素1β（IL-1β）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素6（IL-6）的含量，Western blot法检测TAB3、核因子κB（NF-κB）、B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）的表达水平。结果 LPS组HK-2细胞的miR-23a、Bcl-2表达水平，存活率均低于对照组；凋亡率、IL-1β、TNF-α、IL-6含量，Bax、TAB3、NF-κB表达水平均高于对照组（均$P<0.05$），miR-23b、miR-23c的表达水平与对照组差异均无统计学意义（均$P>0.05$）。miR-23a使野生型TAB3报告基因的活性降低。LPS+miR-23a组HK-2细胞的miR-23a、Bcl-2表达水平，存活率高于LPS+miR-NC组；凋亡率，IL-1β、TNF-α、IL-6含量，Bax、TAB3、NF-κB表达水平低于LPS+miR-NC组（均$P<0.05$）。结论 miR-23家族中miR-23a表达降低与LPS诱导HK-2细胞损伤有关，相关的分子机制是靶向TAB3/NF-κB途径并抑制炎症反应、细胞凋亡。

【关键词】 脓毒症；急性肾损伤；肾小管上皮细胞；miR-23a；TAB3
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.06.010
【中图分类号】 R692 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2024)06-0739-04

急性肾损伤是脓毒症常见的合并症之一，也是导致脓毒症患者多器官功能障碍发生风险及死亡风险增加的重要原因[1-2]。因此，研究脓毒症相关急性肾损伤的分子生物学机制有助于探索更有效的治疗策略。微小RNA（microRNA，miRNA）是含有18～22个核苷酸的一类内源性非编码RNA，能够在转录后水平靶向调控基因表达并发挥生物学作用。miR-23家族中miR-23a、miR-23b、miR-23c等具有抗炎作用，抑制TAK1结合蛋白3（TAK1 binding protein 3，TAB3）和核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）表达是miR-23a和miR-23b发挥抗炎作用的相关分子机制[3-4]。脓毒症患者外周血中miR-23a、miR-23b的表达水平降低[5-6]，提示miR-23家族可能参与脓毒症的发生发展。脂多糖（LPS）诱导肾小管上皮细胞损伤是研究脓毒症相关急性肾损伤常用的细胞模型，为深入认识miR-23家族在脓毒症相关急性肾损伤中的作用及机制，本研究对miR-23家族在LPS诱导人肾小管上皮细胞HK-2损伤中的作用及其调控TAB3/NF-κB的作用展开探索，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 细胞及主要试剂 HK-2细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司；miR-23a模拟物及阴性对照（NC）模拟物购自上海吉玛制药公司；野生型TAB3双荧光素酶报告基因及miR-23a结合位点突变的突变型TAB3双荧光素酶报告基因购自赛默飞世尔公司；CCK-8细胞增殖检测试剂盒，Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒及白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）检测试剂盒购自上海翌圣生物科技有限公司；TAB3、NF-κB、B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）单克隆抗体购自美国Abcam公司。

基金项目：湖州市科技计划项目（2021GYB49）
作者单位：313000 浙江省湖州，湖州市第一人民医院
通信作者：费丽萍，Email：nmqkl0426@163.com

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 使用含有10%胎牛血清的完全培养液在培养瓶内进行HK-2细胞培养，待细胞铺满瓶底90%时进行胰蛋白酶消化，分瓶后继续传代培养。消化收集对数生长期的HK-2细胞，接种在培养板内进行分组，对照组给予不含药物的培养液，LPS组给予含1 mg/L LPS的培养液，LPS+miR-NC组转染NC模拟物6 h后更换为含有1 mg/L LPS的培养液，LPS+miR-23a组转染miR-23a模拟物6 h后更换为含有1 mg/L LPS的培养液。

1.2.2 miR-23a、miR-23b、miR-23c表达水平检测 收集各组HK-2细胞进行检测，使用Trizol法提取细胞的总RNA，测定RNA浓度和纯度后将2 μg合格的RNA反转录为cDNA，以cDNA为模板、U6为内参，对miR-23a、miR-23b、miR-23c的表达进行荧光定量PCR检测，PCR体系为cDNA 2 μl，SYBR Mix 10 μl，10 μmol/L的上游引物1 μl，10 μmol/L的下游引物1 μl，去离子水6 μl，PCR程序为95 ℃ 3 min、(95 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s)×40循环。反应结束后得到miR-23a、miR-23b、miR-23c及U6的循环阈值（Ct），按照相对定量法$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算miR-23a、miR-23b、miR-23c的表达水平。

1.2.3 细胞存活率检测 各组HK-2细胞接种在96孔培养板内，分组处理完成后在每孔加入CCK-8检测液200 μl，培养箱内孵育2 h，在酶标仪中震荡后检测450 nm波长对应的吸光度，计算细胞存活率=实验组吸光度/对照组吸光度×100%。

1.2.4 细胞凋亡率检测 收集各组HK-2细胞并重悬，使细胞密度达到2×10^6个/ml，分别加入Annexin V-FITC染色液5μl和PI染色液5μl，室温避光孵育15 min后在流式细胞仪上检测细胞凋亡率。

1.2.5 IL-1β、TNF-α、IL-6含量检测 收集各组HK-2细胞的培养基，采用酶联免疫吸附法检测IL-1β、TNF-α、IL-6含量。

1.2.6 TAB3、NF-κB、Bcl-2、Bax表达水平检测 收集各组HK-2细胞并提取总蛋白，在聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离蛋白，而后湿法转印至PVDF膜，用浓度50 g/L的脱脂奶粉封闭PVDF膜2 h，洗膜后用TAB3抗体(1 ∶ 500)、NF-κB抗体(1 ∶ 400)、Bcl-2抗体(1∶1 000)、Bax抗体(1∶800)4 ℃孵育过夜。次日洗膜后用辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶2 500)室温孵育1 h，最后在成像系统中进行化学显影，得到TAB3、NF-κB、Bcl-2、Bax及β-actin的图像，以β-actin为内参，计算TAB3、NF-κB、Bcl-2、Bax表达水平。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 HK-2细胞接种在48孔培养板内，进行模拟物与TAB3双荧光素酶报告基因的共转染。miR-NC组HK-2细胞未作任何处理基础上共转染NC模拟物与野生型TAB3双荧光素酶报告基因或突变型TAB3双荧光素酶报告基因；miR-23a组HK-2细胞未作任何处理基础上共转染miR-23a模拟物与野生型TAB3双荧光素酶报告基因或突变型TAB3双荧光素酶报告基因。共转染48 h后，检测报告基因荧光值=萤火虫荧光活性/海参荧光活性。

1.3 统计方法 采用SPSS 25.0统计软件进行分析，符合正态分布计量资料以均数±标准差表示，两组比较采用t检验，多组比较采用方差分析，多重比较采用SNK-q检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组miR-23家族表达水平比较 LPS组HK-2细胞中miR-23a的表达水平低于对照组($P<0.05$)，LPS+miR-NC组与LPS组HK-2细胞的miR-23a表达水平差异均无统计学意义（$P>0.05$），LSP+miR-23a组HK-2细胞的miR-23a表达水平均高于LPS+miR-NC组($P<0.05$)；4组miR-23b、miR-23c表达水平差异均无统计学意义(均$P>0.05$)，见表1。

2.2 miR-23a组与miR-NC组TAB3双荧光素酶报告基因的活性比较 miR-23a组HK-2细胞中野生型TAB3双荧光素酶报告基因的活性低于miR-NC组，突变型TAB3双荧光素酶报告基因的活性与miR-NC组差异无统计学意义($P>0.05$)，见表2。

2.3 4组存活率比较 LPS组HK-2细胞的存活率

表1 4组HK-2细胞中miR-23家族表达水平比较

组别	miR-23a	miR-23b	miR-23c
对照组	1.00±0.10	1.00±0.07	1.00±0.08
LPS组	0.44±0.03[a]	0.94±0.08	0.97±0.10
LPS+miR-NC组	0.40±0.05	0.97±0.09	0.93±0.09
LPS+miR-23组	1.26±0.11[b]	1.02±0.10	0.98±0.07
F值	51.71	0.381	0.291
P值	<0.05	>0.05	>0.05

注：与对照组比较，a$P<0.05$；与LPS+miR-NC组比较，b$P<0.05$

低于对照组（$P < 0.05$），LPS+miR-NC 组与 LPS 组 HK-2 细胞的存活率差异均无统计学意义（$P > 0.05$），LSP+miR-23a 组 HK-2 细胞的存活率高于 LPS+miR-NC 组（$P < 0.05$），见表 3。

2.4 4 组 IL-1β、TNF-α、IL-6 含量比较 LPS 组 HK-2 细胞培养基中 IL-1β、TNF-α、IL-6 含量均高于对照组（均 $P < 0.05$），LPS+miR-NC 组与 LPS 组 IL-1β、TNF-α、IL-6 含量差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$），LSP+miR-23a 组 HK-2 细胞培养基中 IL-1β、TNF-α、IL-6 含量均低于 LPS+miR-NC 组（均 $P < 0.05$），见表 4。

2.5 4 组凋亡率及 Bax、Bcl-2 表达水平比较 LPS 组 HK-2 细胞的凋亡率及 Bax 表达水平高于对照组，Bcl-2 表达水平低于对照组（均 $P < 0.05$）；LPS+miR-NC 组与 LPS 组 HK-2 细胞的凋亡率，Bax、Bcl-2 表达水平差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$），LSP+miR-23a 组 HK-2 细胞的凋亡率及 Bax 表达水平低于 LPS+miR-NC 组，Bcl-2 表达水平高于 LPS+miR-NC 组（均 $P < 0.05$），见表 5。

2.6 4 组 TAB3、NF-κB 表达水平比较 LPS 组 HK-2 细胞的 TAB3、NF-κB 表达水平均高于对照组（均 $P < 0.05$），LPS+miR-NC 组与 LPS 组 HK-2 细胞的 TAB3、NF-κB 表达水平差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$），LSP+miR-23a 组 HK-2 细胞的 TAB3、NF-κB 表达水平均低于 LPS+miR-NC 组（均 $P < 0.05$），见表 6。

表 2 miR-23a 组和 miR-NC 组 HK-2 细胞中 TAB3 双荧光素酶报告基因活性的比较

组别	野生型报告基因的活性	突变型报告基因的活性
miR-NC 组	1.04±0.11	1.01±0.10
miR-23a 组	0.47±0.04	0.95±0.12
t 值	10.89	0.86
P 值	＜0.05	＞0.05

表 3 4 组 HK-2 细胞存活率比较

组别	存活率(%)
对照组	100.00±7.81
LPS 组	57.64±4.42[a]
LPS+miR-NC 组	56.89±5.07
LPS+miR-23 组	79.27±6.74[b]
F 值	37.84
P 值	＜0.05

注：与对照组比较，a$P < 0.05$；与 LPS+miR-NC 组比较，b$P < 0.05$

表 4 4 组 HK-2 细胞培养基中 IL-1β、TNF-α、IL-6 含量比较 ng/ml

组别	IL-1β	TNF-α	IL-6
对照组	15.42±1.33	41.32±3.67	26.65±2.05
LPS 组	28.52±3.03[a]	70.59±6.72[a]	50.03±4.76[a]
LPS+miR-NC 组	29.17±2.63	71.34±6.88	51.84±5.50
LPS+miR-23 组	22.01±1.85[b]	54.75±4.62[b]	37.68±3.42[b]
F 值	38.11	35.62	40.37
P 值	＜0.05	＜0.05	＜0.05

注：与对照组比较，a$P < 0.05$；与 LPS+miR-NC 组比较，b$P < 0.05$

表 5 4 组 HK-2 细胞凋亡率及 Bax、Bcl-2 表达水平比较

组别	凋亡率(%)	Bcl-2	Bax
对照组	3.87±0.26	0.95±0.08	0.20±0.02
LPS 组	16.35±1.56[a]	0.26±0.02[a]	0.78±0.07[a]
LPS+miR-NC 组	16.94±1.74	0.30±0.03	0.80±0.08
LPS+miR-23 组	8.83±0.74[b]	0.78±0.08[b]	0.25±0.03[b]
F 值	64.87	71.73	68.67
P 值	＜0.05	＜0.05	＜0.05

注：与对照组比较，a$P < 0.05$；与 LPS+miR-NC 组比较，b$P < 0.05$

表 6 4 组 HK-2 细胞 TAB3、NF-κB 表达水平比较

组别	TAB3	NF-κB
对照组	0.26±0.03	0.31±0.03
LPS 组	0.89±0.09[a]	0.74±0.06[a]
LPS+miR-NC 组	0.84±0.10	0.77±0.08
LPS+miR-23 组	0.38±0.04[b]	0.35±0.04[b]
F 值	64.91	50.48
P 值	＜0.05	＜0.05

注：与对照组比较，a$P < 0.05$；与 LPS+miR-NC 组比较，b$P < 0.05$

3 讨论

临床研究显示，脓毒症患者外周血 miR-23a、miR-23b 的表达水平降低[5-6]，这提示上述两种 miRNAs 可能与脓毒症发生发展有关。也有研究显示：miR-23 家族的 3 个成员均具有抗炎作用，过表达 miR-23a、miR-23b 和 miR-23c 对 LPS、过氧化氢、高糖等条件诱导的炎症反应均具有抑制作用[7-9]。

LPS 诱导 HK-2 细胞损伤模型是研究脓毒症相关急性肾损伤的常用模型[10-11]。本研究检测该细胞模型中 miR-23 家族的表达，结果显示 LPS 使 HK-2 细胞中 miR-23a 的表达水平显著降低，但不影响 miR-23b、miR-23c 的表达。这提示 miR-23 家族中参与脓毒症相关肾损伤的成员可能是 miR-23a。本研究通过转染模拟物的方式在 LPS 诱导 HK-2 细胞损伤模型中增加 miR-23a 的表达，检测细胞存活率及 IL-1β、TNF-α、IL-6 的含量，结果显示过表达 miR-23a 可减轻 LPS 诱导 HK-2 细胞损伤，并抑制炎症反应。这表明 miR-23a 在 LPS 诱导 HK-2 细胞损伤模型中发挥细胞保护作用及抗炎作用。

TAB3 是炎症反应级联激活过程中介导 NF-κB 活化的重要衔接蛋白，其能够通过延长多聚泛素链的方式使 NF-κB 持续活化并激活炎症反应[12-13]。对脓毒症动物模型研究发现，TAB3 和 NF-κB 均呈高表达，且与肾损伤、肝损伤有关[14-15]。本研究结果显示：LPS 诱导 HK-2 细胞损伤模型中 TAB3 和 NF-κB 的表达水平增加，与文献[14-15]结果一致。研究显示，miR-23a 对 TAB3 和 NF-κB 的表达有抑制作用[3-4, 16]。本研究发现，在 LPS 诱导 HK-2 细胞损伤模型中，过表达 miR-23a 显著降低 TAB3 和 NF-κB 的表达。这表明 miR-23a 对 TAB3/NF-κB 具有靶向抑制作用，miR-23a 减轻 LPS 诱导 HK-2 细胞损伤及炎症反应的作用可能与其靶向调控 TAB3/NF-κB 有关。

炎症反应所引起组织及细胞损伤的过程涉及线粒体功能障碍及细胞凋亡。Bcl-2 和 Bax 是调控线粒体功能和细胞凋亡的重要分子，前者降低线粒体对细胞色素 C 的通透性并抑制细胞凋亡；后者作用与前者相反，能够促进细胞凋亡。本研究结果显示，LPS 诱导 HK-2 细胞损伤模型中凋亡率及 Bax 表达增加，Bcl-2 表达降低。目前已知 miR-23a 在气道上皮细胞、晶状体上皮细胞中发挥抗凋亡作用，能够降低凋亡率，增加 Bcl-2 表达[17-18]。本研究结果显示，在 LPS 诱导 HK-2 细胞损伤模型中，过表达 miR-23a 显著降低凋亡率及 Bax 表达，增加 Bcl-2 表达。这表明 miR-23a 减轻 LPS 诱导 HK-2 细胞损伤的作用与抑制细胞凋亡有关。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　费丽萍：实验的设计及操作，论文撰写；唐坎凯：数据收集和整理、统计学分析；刘凤琪：实验材料采购、设备管理，指导研究、论文审校

参　考　文　献

[1] CHUAH R, WONG W K, ONG V H, et al. Extended mortality and chronic kidney disease after septic acute kidney injury[J]. J Intensive Care Med, 2020, 35(6): 527-535.

[2] WEI Q Q. Novel strategy for septic acute kidney injury rescue: Maintenance ofthetubular integrity[J]. Kidney Int, 2020, 97(5): 847-849.

[3] LI M, GAO Z, WANG S, et al. miR-27a-3p upregulation by p65 facilitates cervical tumorigenesis by increasing TAB3 expression and is involved in the positive feedback loop of NF-κB signaling[J]. Oncol Rep, 2023, 50(1):132.

[4] ROSHAN-MILANI S, SATTARI P, GHADERI-PAKDEL F, et al. MiR-23b/TAB3/NF-κB/p53 axis is involved in hippocampus injury induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats: The protective effect of chlorogenic acid[J]. Biofactors, 2022, 48(4): 908-917.

[5] FATMI A, REBIAHIS A, CHABNI N, et al. miRNA-23b as a biomarker of culture-positive neonatal sepsis[J]. Mol Med, 2020, 26(1): 94.

[6] GEQ M, HUANGC M, ZHUX Y, et al. Differentially expressed miRNAs in sepsis-induced acute kidney injury target oxidative stress and mitochondrial dysfunction pathways[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173292.

[7] SUN Q, WANG B, LI M. MicroRNA-23a-3p targeting of HMGB1 inhibits LPS-induced inflammation in murine macrophages in vitro[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(5):322.

[8] LUOZ F, JIANGX H, LIU H, et al. MiR-23b attenuates LPS-induced inflammatory responses in acute lung injury via inhibition of HDAC2[J]. Biochem Genet, 2021, 59(2): 604-616.

[9] RONG L, XUE H Z, HAO J W, et al. Long non-coding RNA MEG3 silencing weakens high glucose-induced mesangial cell injury by decreasing LIN28B expression by sponging and sequestering miR-23c[J/OL]. Kidney Res Clin Pract, 2023.[2024-02-02].https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38148128/.

[10] HU M, WEI J, YANG L, et al. Linc-KIAA1737-2 promoted LPS-induced HK-2 cell apoptosis by regulating miR-27a-3p/TLR4/NF-κB axis[J]. J Bioenerg Biomembr, 2021, 53(4): 393-403.

[11] 王亚静,贾宝辉,韩方方,等.人环状 RNA_0114428 对脂多糖诱导的人肾小管上皮 HK-2 细胞损伤的作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2023,49(1):101-109.

[12] XUY R, LEIC Q. TAK1-TABs complex: A central signalosome in inflammatory responses[J]. Front Immunol, 2020, 11: 608976.

[13] GAO L L, ZHAO H M, SUN H, et al. TAB3 overexpression promotes NF-κB activation and inflammation in acute pancreatitis[J]. Am J Blood Res, 2020, 10(4): 118-123.

[14] WANG J S, CHEN Y, TANG Z, et al. LncRNA NEAT1 regulated inflammation and apoptosis in a rat model of sepsis-induced acute kidney injury via miR-27a-3p/TAB3 axis[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(11): 2215-2227.

[15] YANG Q, ZHANG D S, LI Y, et al. Paclitaxel alleviated liver injury of septic mice by alleviating inflammatory response via microRNA-27a/TAB3/NF-κB signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 1424-1433.

[16] XU H, WANG Z G. MicroRNA-23a-3p ameliorates acute kidney injury by targeting FKBP5 and NF-κB signaling in sepsis[J]. Cytokine, 2022, 155: 155898.

[17] JIN A, BAO R J, ROTH M, et al. MicroRNA-23a contributes to asthma by targeting BCL2 in airway epithelial cells and CXCL12 in fibroblasts[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 21153-21165.

[18] YAO P X, JIANG J, MA X P, et al. MiR-23a-3p regulates the proliferation and apoptosis of human lens epithelial cells by targeting Bcl-2 in an in vitro model of cataracts[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(5): 436.

收稿日期：2024-02-06

（本文编辑：孙海儿）