

本文引文格式:潘春风,陶丽菊,覃宗帅,等. miR-181a-5p 靶向 HMGB1 调节急性胰腺炎腺泡细胞凋亡的实验研究[J]. 右江民族医学院学报, 2023, 45(1): 1-8.

【论著与临床报道】

miR-181a-5p 靶向 HMGB1 调节急性 胰腺炎腺泡细胞凋亡的实验研究

潘春风^{1,2}, 陶丽菊¹, 覃宗帅¹, 郑频¹, 王语阳^{1,2}, 苏拾香^{1,2}, 岑兰英^{1,2}, 覃月秋¹

(1. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨 miR-181a-5p 调控 HMGB1 的表达在雨蛙素(cerulein)联合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的严重急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)大鼠胰腺腺泡细胞(AR42J)凋亡相关基因半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)的影响。方法 以未处理的 AR42J 细胞作为正常组, 1×10^{-8} mol/L 的 cerulein 联合 10 μ g/mL 的 LPS 诱导 AR42J 细胞 24 h 建立体外严重 AP 组, 用脂质体转染法将 miR-NC(空载体)和 miR-181a-5p mimic 转染至严重 AP 组作为 miR-NC 对照组和 miR-181a-5p 过表达组。采用 qRT-PCR 检测 AR42J 细胞中 miR-181a-5p、HMGB1 和 Caspase-3 mRNA 的表达水平; Western Blot 检测 HMGB1 和 Caspase-3 蛋白表达; 双荧光素酶报告基因实验明确 miR-181a-5p 和 HMGB1 的靶向关系; Pearson 相关分析确定 miR-181a-5p、HMGB1 和 Caspase-3 mRNA 表达的相互关系。结果 与正常组相比, 严重 AP 组中 miR-181a-5p mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.01$), HMGB1 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), Caspase-3 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$), HMGB1、Caspase-3 的蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与 miR-NC 对照组相比, miR-181a-5p 过表达组 miR-181a-5p mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.01$), HMGB1、Caspase-3 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.01$), HMGB1、Caspase-3 的蛋白表达下降 ($P < 0.05$); 双荧光素酶报告基因显示 miR-181a-5p 可抑制野生型 HMGB1 细胞的荧光活性, miR-181a-5p 可靶向调控 HMGB1 的表达; Pearson 相关性分析显示, miR-181a-5p 与 HMGB1 表达水平呈负相关 ($r = -0.905, P < 0.01$); miR-181a-5p 与 Caspase-3 表达水平呈负相关 ($r = -0.809, P < 0.01$); HMGB1 与 Caspase-3 表达水平呈正相关 ($r = 0.691, P < 0.05$)。结论 miR-181a-5p 在 cerulein+LPS 诱导 AR42J 细胞中低表达, HMGB1 和 Caspase-3 高表达, 过表达 miR-181a-5p 可抑制凋亡相关基因 Caspase-3 的表达, 其机制可能与靶向 HMGB1 有关, 这将为 AP 的诊断及治疗提供新的思路。

关键词: miR-181a-5p; 高迁移率族蛋白 B1; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; 急性胰腺炎

中图分类号: R576 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2023)01-0001-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.01.001

Experimental study on the effect of miR-181a-5p targeting HMGB1 regulation of on apoptosis in acinar cells of acute pancreatitis

Pan Chunfeng^{1,2}, Tao Liju¹, Qin Zongshuai¹, Zheng Pin¹, Wang Yuyang^{1,2},
Su Shixiang^{1,2}, Cen Lanying^{1,2}, Qin Yueqiu¹

(1. The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000,
Guangxi, China; 2. Graduate School, Youjiang Medical University for
Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

基金项目:国家自然科学基金项目(82260134);右江民族医学院附属医院高层次人才科研项目(R202011702);广西研究生教育创新计划项目(YCSW2022462)

第一作者简介:潘春风(1987-),女,硕士,主治医师,研究方向:胰腺疾病基础与临床研究, E-mail:260261607@qq.com

通讯作者简介:覃月秋(1976-),女,博士,教授,博士、硕士研究生导师,研究方向:胰腺疾病发病机制及诊治, E-mail:gxbssyq

@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of miR-181a-5p regulation of HMGB1 expression on the apoptosis-related gene Caspase-3 in pancreatic acinus cells (AR42J) of rats with severe acute pancreatitis (AP) induced by cerulein combined with lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Untreated AR42J cells were used as the normal group, and AR42J cells were induced by 1×10^{-8} mol/L cerulein combined with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS for 24 h to establish in vitro the severe AP group. By liposome method, miR-NC (empty vector) and miR-181a-5p mimic were transfected into the severe AP group as miR-NC control group and miR-181a-5p over-expression group, respectively. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-181a-5p, HMGB1, and Caspase-3 mRNA in AR42J cells. Western Blot was used to detect the protein expression of HMGB1 and Caspase-3. The dual-luciferase reporter assay was conducted to confirm the targeting relationship between miR-181a-5p and HMGB1. Pearson correlation analysis was used to determine the relationship between the expression of miR-181a-5p, HMGB1, and Caspase-3 mRNA. **Results** Compared with the normal group, the severe AP group had significantly down-regulated mRNA expression of miR-181a-5p ($P < 0.01$), significantly increased mRNA expression of HMGB1 ($P < 0.01$), increased mRNA expression of Caspase-3 ($P < 0.05$), and increased protein expressions of HMGB1 and Caspase-3 ($P < 0.05$). Compared with the miR-NC control group, the miR-181a-5p over-expression group had significantly increased mRNA expression of miR-181a-5p ($P < 0.01$), significantly decreased mRNA expression of HMGB1 and Caspase-3 ($P < 0.01$), and decreased protein expression of HMGB1 and Caspase-3 ($P < 0.05$). The dual-luciferase reporter gene assay showed that miR-181a-5p could inhibit the fluorescence activity of wild-type HMGB1 cells, and miR-181a-5p could target and regulate the expression of HMGB1. Pearson correlation analysis showed a negative correlation between miR-181a-5p and HMGB1 expression ($r = -0.905$, $P < 0.01$), while there was a negative correlation between the expression of miR-181a-5p and Caspase-3 ($r = -0.809$, $P < 0.01$). And there was a positive correlation between HMGB1 and Caspase-3 expression ($r = 0.691$, $P < 0.05$). **Conclusion** miR-181a-5p is low-expressed in cerulein + LPS-induced AR42J cells, while HMGB1 and Caspase-3 are high-expressed. Over-expression of miR-181a-5p can inhibit the expression of apoptosis-related gene Caspase-3, and its mechanism may be related to targeting HMGB1. This study provides a new direction for the diagnosis and treatment of AP.

Key words: miR-181a-5p; high mobility group protein B1; Caspase-3; acute pancreatitis

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 是临床常见的急腹症, 20% 患者可发展为重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP)^[1], 引起全身炎症反应综合征 (SIRS), 最终导致多器官衰竭 (MOF)^[2], 病情进展快, 治疗困难, 病死率高达 30%^[3]。AP 的严重程度取决于胰腺腺泡细胞死亡和炎症损伤程度^[4], 通过调节致炎/抗炎细胞因子, 改善机体免疫功能状态, 有利于炎症的控制和改善患者的预后^[5]。研究发现, 在 AP 病理组织中, 胰腺腺泡细胞自噬及凋亡水平出现显著升高趋势, 抑制胰腺腺泡细胞自噬及凋亡可显著减轻 AP 造成的病理损伤^[6-7]。

高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 是一种高度保守的核蛋白, 在炎症、细胞分化、细胞迁移和肿瘤转移过程中充当细胞外信号分子^[8], 由活化的巨噬细胞、自然杀伤细胞和成熟的树突状细胞分泌, 从坏死细胞中释放出来, 介导感染、损伤和炎症反应^[9]。新近研究发现 HMGB1 参与了胰腺腺泡细胞自噬、凋亡的调节, HMGB1 表达异常与 AP 严重程度呈正相关^[10]。miR-181a-5p 是一类与细胞自

噬及凋亡密切相关的小分子 RNA, 参与发育、再生、细胞增殖、自噬和凋亡的调节^[11]。生物信息学分析及文献报道表明^[12-14], miR-181a-5p 与 HMGB1 具有靶向调控关系, 但具体作用及机制尚不明确。本研究探讨 miR-181a-5p 调控 HMGB1 的表达对 AP 胰腺腺泡细胞凋亡相关基因半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 表达的影响, 这将为 AP 的诊断及治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 大鼠胰腺外分泌细胞 AR42J 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 Ham's F-12K 培养基、多聚赖氨酸均购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 胎牛血清、opti-MEM 培养基均购自 Gibco 公司; 青-链霉素、胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司; 雨蛙素 (cerulein)、联合肽多糖 (LPS) 购自上海源叶生物科技有限公司; 质粒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司; Lipofectamine 3000、Trizol 购自美国赛默飞世尔科技

公司;qRT-PCR 引物购自南宁捷尼斯生物科技有限公司;miRNA 第一链 cDNA 逆转录试剂盒(茎环法)均购自生工生物工程(上海)有限公司;SYBR Master Mix 扩增试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;mRNA 第一链 cDNA 试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、一抗稀释液、二抗稀释液、电泳缓冲液、转膜缓冲液、20×TBST、封闭液、彩虹 Marker 均购自上海碧云天生物技术有限公司;PAGE 凝胶快速制备试剂盒、Omni-Easy™ 速溶型蛋白上样缓冲液(变性,还原型,5×)、超敏 ECL 化学发光试剂盒均购自上海雅酶生物医药科技有限公司;HMGB1 抗体、Caspase-3 抗体购自英国 Abcam 公司;GAPDH 抗体、兔抗鼠 IgGHRP 购自 Affinity 公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 用含 20%胎牛血清+1%青-链霉素+Ham's F-12K 培养基,置于 37℃,5% CO₂ 的恒温培养箱中常规培养,每 2~3 d 换 1 次液,1 周待细胞生长至融合度 80%左右,用胰蛋白酶消化约 1 min,以 1:2~1:4 的比例传代。传代后 24 h 贴壁,贴壁困难时,可采用 0.1 mg/mL 的多聚赖氨酸提前包被培养瓶。包被好的培养瓶,封口膜封口后存于 4℃冰箱,1 周内用完。

1.2.2 严重 AP 模型的建立 根据文献,采用 1×10⁻⁸ mol/L cerulein 联合 10 μg/mL 的 LPS 诱导

AR42J 细胞 24 h,建立严重 AP 细胞模型^[11-12]。

1.2.3 细胞分组和转染 将处于对数生长期的 AR42J 细胞以 1×10⁵ 个/毫升接种于 6 孔板,培养 24 h 后,实验共分为 4 组,正常组:加入正常培养基 2 mL 培养;严重 AP 组:在 2 mL 完全培养基中添加含 1×10⁻⁸ mol/L 的 cerulein 及 10 μg/mL 的 LPS 培养细胞;miR-NC 对照组:在 2 mL 完全培养基中添加含 1×10⁻⁸ mol/L 的 cerulein 及 10 μg/mL 的 LPS 培养细胞 24 h 后,细胞转染时加入适量的 opti-MEM 培养基饥饿 2 h,在培养基中添加 miR-NC(空载体)及 Lipofectamine 3000,培养 6 h 后更换新的含血清无双抗的培养基;miR-181a-5p 过表达组:在 2 mL 完全培养基中添加含 1×10⁻⁸ mol/L 的 cerulein 及 10 μg/mL 的 LPS 培养细胞 24 h 后,细胞转染时加入适量的 opti-MEM 培养基饥饿 2 h,在培养基中添加 miR181a-5p mimic 及 Lipofectamine 3000,培养 6 h 后更换新的含血清无双抗的培养基,继续培养用于后续试验。

1.2.4 qRT-PCR 转染 24 h 后用 Trizol 提取各组细胞 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。使用赛默飞逆转录试剂盒合成 cDNA,以 U6 作为 miR-181a-5p 的内参,β-actin 作为 HMGB1 和 Caspase-3 的内参,qRT-PCR 反应条件为:预变性 95℃ 300 s,变性 95℃ 10 s,退火/延伸 60℃ 30 s,40 个循环。结果使用 2^{-ΔΔCt} 法来分析。实验重复 3 次,引物见表 1。

表 1 RT-qPCR 实验各基因引物序列

基因名称	上游(5'→3')	下游(5'→3')
U6	GCT TCGGCAGCACATATACATAAA T	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT
miR-181a-5p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACTCAC	
miR-181a-5p	CGAACATTCAACGCTGTCGAGTG	CAGGGTCCGAGGTATT
Caspase-3	GGAAAGCATCCAGCAATAGGC	CCAGCGATGACTCAGCACCT
HMGB1	ATGCCTTTGCCCTTCTATC	ATCCGCTTTCCTTGTATCTG
β-actin	ATCATTGCTCCTCTGAGCG	CAGCTCAGTAACAGTCCGCC

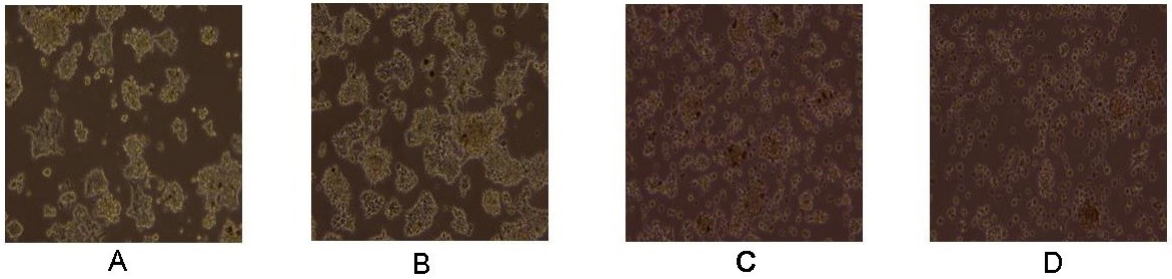
1.2.5 Western Blot 实验 转染 48 h 后在各组细胞中加入含有 1%蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 裂解液(强)冰上裂解 35 min,以 12 000 r/min,4℃,离心 15 min,取上清置于 EP 管中,用 BCA 试剂盒测定各组样品蛋白的浓度,加入 5×蛋白上样缓冲液,沸水煮沸 15 min,以 30 μg 蛋白浓度进行 PAGE 凝胶电泳,常规湿法转膜后,5%牛血清白蛋白封闭 2 h,分别用 1:16 500 的鼠抗兔单克隆抗体 GAPDH、1:25 000 的鼠抗兔单克隆抗体 HMGB1、1:1 000 鼠抗兔的单克隆抗体 Caspase-3 的一抗 4℃摇床孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,IgG-HRP 标记的鼠抗兔二抗 4℃摇

床孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,后增强化学发光(ECL)显影。利用 Image J 软件进行灰度值分析,用 Caspase-3 和 HMGB1 蛋白条带与 GAPDH 灰度值的比值计算各自的相对表达量。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验 将构建的 HMGB1 3' UTR-WT(含 HMGB1 3' UTR 片段)和 HMGB1 3' UTR-MUT(含 HMGB1' UTR 片段突变体)的荧光素酶报告载体,采用 Lipofectamine TM 3000 分别将 HMGB1 3' UTR-WT 和 HMGB1 3' UTR-MUT 与 miR-181a-5p mimic、miR-NC 共转染,转染后培养 48 h,按双荧光素酶报告基因检测试剂盒

技术手册操作,记录萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶激发值,以两者的比值评价 HMGB1 基因的激活程度。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,用 R 软件(版本 4.0.5)作图。所有数据均进行正态分布和方差齐性检验,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间的比较采用两独立样本 t 检验,miR-181a-5p、HMGB1、Caspase-3 之间相关性采用 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$ 说明结果有医学统计学意义。



注:A.正常 AR42J 细胞;B. cerulein+LPS 造模后 24 h;C. 转染后 24 h;D. 转染后 48 h。

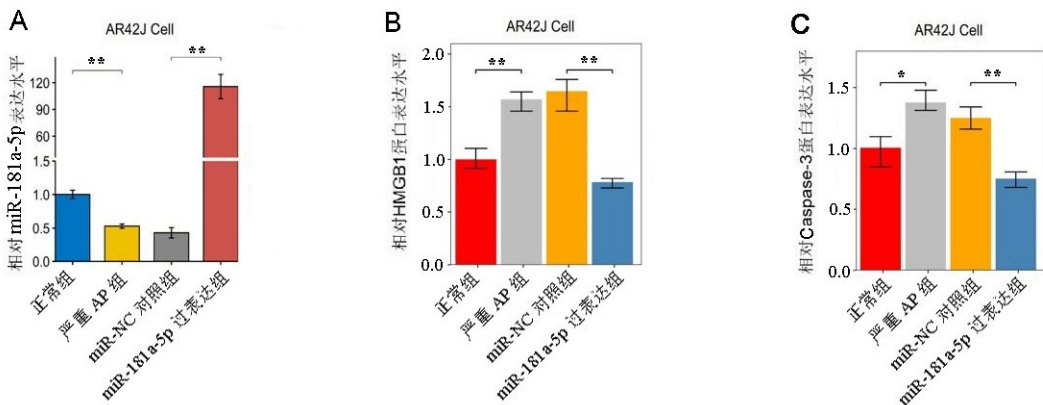
图 1 细胞培养及转染效果(10×)

2.2 各组细胞 miR-181a-5p、HMGB1、Caspase-3 mRNA 表达 qRT-PCR 检测结果 与正常组相比,严重 AP 组的 miR-181a-5p 表达水平下调($P < 0.01$),HMGB1 mRNA 表达水平升高($P < 0.01$),Caspase-3 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$);与 miR-NC 对照组相比,miR-181a-5p 过表达组 miR-181a-5p 表达水

2 结果

2.1 细胞培养及转染 AR42J 细胞在适宜的培养条件下,细胞贴壁生长,状态良好,细胞生长缓慢,呈中空球形集落,上皮细胞样,团簇状生长(见图 1A)。给药 24 h 后,细胞胞质内出现大量空泡,部分细胞变形,伪足增多(见图 1B),转染后细胞松散,变圆,部分细胞脱落死亡(见图 1C、图 1D)。

平上调($P < 0.01$),HMGB1、Caspase-3 mRNA 表达水平下降($P < 0.01$)。可见,在 cerulein+LPS 诱导的 AR42J 细胞中 miR-181a-5p 低表达,HMGB1 和 Caspase-3 高表达,过表达 miR-181a-5p 可抑制 HMGB1 的表达,抑制凋亡相关基因 Caspase-3 的表达。见图 2。



注:A.各组细胞 miR-181a-5p 相对表达量;B.各组细胞 HMGB1 相对表达量;C.各组细胞 Caspase-3 相对表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 各组细胞内 miR-181a-5p、HMGB1、Caspase-3 mRNA 的相对表达量

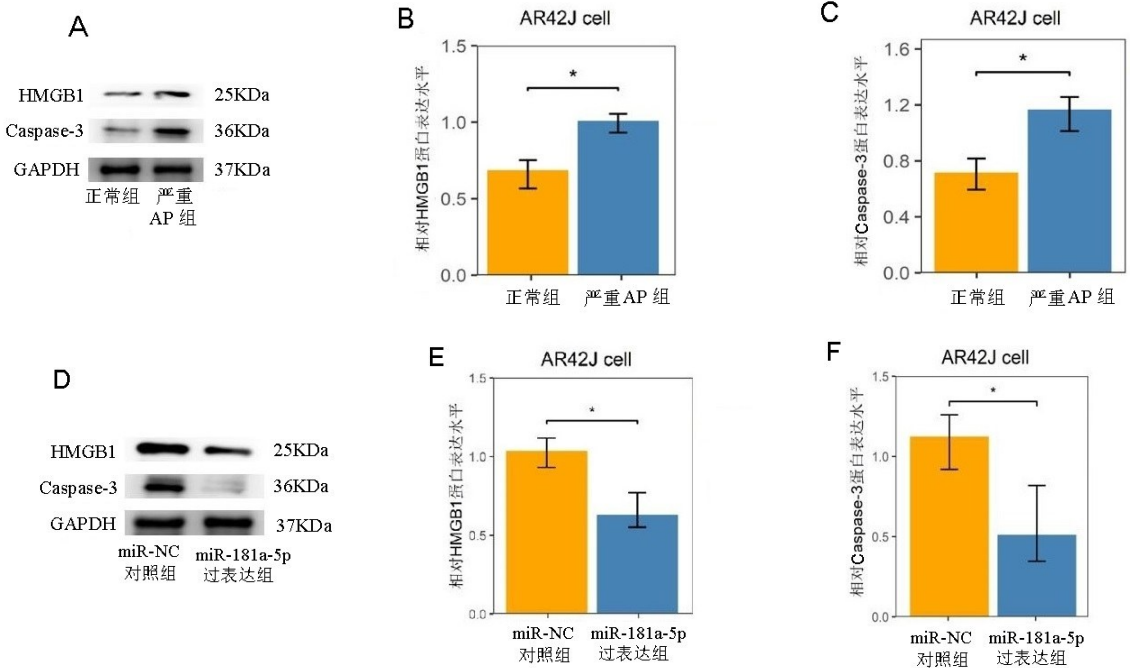
2.3 各组细胞 HMGB1、Caspase-3 蛋白表达 与正常组相比,严重 AP 组的 HMGB1 蛋白表达升高($P < 0.05$),Caspase-3 蛋白表达升高($P < 0.05$);与 miR-NC 对照组相比,miR-181a-5p 过表达组 HMGB1 蛋白表达降低($P < 0.05$),Caspase-3 蛋白表达降低($P < 0.05$)。可见,在 cerulein + LPS 处理的 AR42J 细胞

中 HMGB1 及 Caspase-3 蛋白表达升高,过表达 miR-181a-5p 可抑制 HMGB1 及 Caspase-3 蛋白的表达。见图 3。

2.4 miR-181a-5p 靶向调控 HMGB1 的表达 miR-181a-5p 靶向 HMGB1 运用 Starbase 软件预测到 miR-181a-5p 与 HMGB1 存在结合位点(见图 4A),荧光素

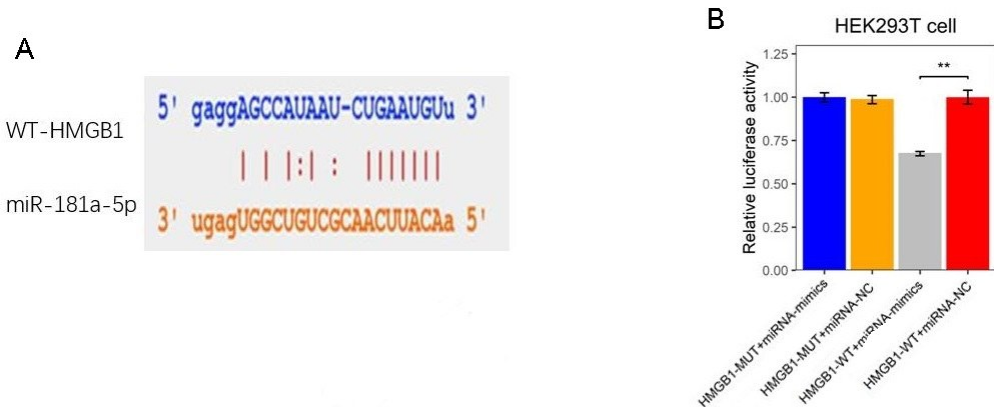
酶报告基因检测实验结果显示(见图 4B),转染野生型 HMGB1 基因表达载体 WT-HMGB1 后,相较于 miR-NC 对照组,miR-181a-5p 过表达组 AR42J 细胞的荧光素酶活性差异不显著。可见,miR-181a-5p 可靶向调控 HMGB1 的表达。

基因表达载体 MUT-HMGB1 后,相较于 miR-NC 对照组,miR-181a-5p 过表达组 AR42J 细胞的荧光素酶活性差异不显著。可见,miR-181a-5p 可靶向调控 HMGB1 的表达。



注: B、E. 各组细胞 HMGB1 蛋白表达; C、F. 各组细胞 Caspase-3 蛋白表达。* $P < 0.05$ 。

图 3 各组细胞内 HMGB1 和 Caspase-3 的蛋白表达



注: A. WT-HMGB1 的 3'UTR 中含有与 miR-181a-5p 互补的核苷酸序列;

B. 双荧光素酶报告实验, ** $P < 0.01$ 。

图 4 miR-181a-5p 靶向调控 HMGB1 的表达

2.5 miR-181a-5p、HMGB1、Caspase-3 mRNA 表达水平相关性分析 使用 Pearson 相关分析对 miR-181a-5p、HMGB1、Caspase-3 mRNA 表达水平进行相关性分析发现(见图 5),miR-181a-5p 和 HMGB1 的表达水平呈负相关($r = -0.905, P < 0.01$);miR-181a-5p 和 Caspase-3 mRNA 的表达水平呈负相关($r = -0.809, P < 0.01$);HMGB1 和 Caspase-3 mRNA 的表达水平呈正相关($r = 0.691, P < 0.05$)。

3 讨论

AP 是一种以胰腺出血、组织水肿、脂肪坏死和腺泡坏死为特征的炎症性疾病^[12],部分病人发展为 SAP,导致严重并发症,死亡率高达 30%^[3,12-13],给家庭和社会带来沉重负担。目前 AP 的发病机制尚不完全清楚。各类型 AP 均起始于腺泡细胞受损所致炎症反应^[4,14],腺泡细胞损伤可诱发 3 种死亡途径:凋亡、坏死和自噬^[15]。AP 过程中胰腺腺泡细胞的损伤通常

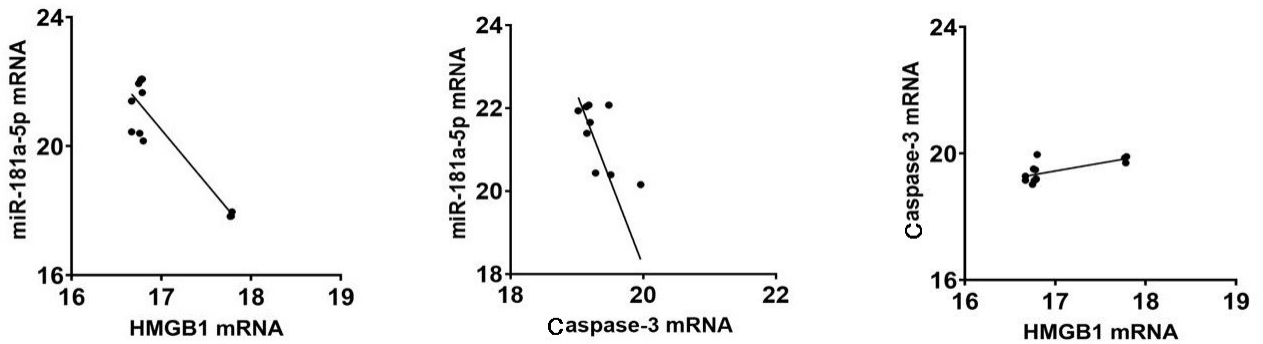


图 5 miR-181a-5p、HMGB1、Caspase-3 mRNA 相关性分析

是通过凋亡和坏死的相互作用^[16],有研究认为,细胞凋亡是 AP 早期的病理生理变化,坏死主导疾病进展和预后,但凋亡和坏死之间并没有明确的界限,在疾病的某些阶段,凋亡和坏死可能会发生改变^[17],两者之间的平衡可能是决定疾病严重程度和进展的支点^[18]。Caspase-3 是诱导细胞凋亡的重要蛋白酶,也是参与凋亡的最终效应者,它也可以作为细胞凋亡的标志物^[16]。有研究表明,在 AP 患者血清中,Caspase-3 的水平明显上升^[19-20]。另有研究发现 AP 胰腺腺泡细胞 Caspase-3 mRNA 和蛋白水平升高^[21]。FERRERO-ANDRÉS A 等^[22]研究发现,在 AP 及其相关肺损伤中,细胞凋亡明显升高。ZHU Y^[19]等研究证实,cerulein 诱导的 AR42J 细胞凋亡增加,Caspase-3 表达水平升高。本研究发现,与正常组比较,严重 AP 组中 Caspase-3 表达水平显著升高,这与前人的研究结果一致。

HMGB1 是一种高度保守的核蛋白,在炎症、细胞分化、细胞迁移和肿瘤转移过程中充当细胞外信号分子,由免疫细胞和坏死细胞合成分泌,其本身作为一种炎症因子,当细胞坏死或受损时,核内的 HMGB1 可释放到核外,引发单核巨噬细胞诱导早期炎症介质产生,比如 TNF- α 和 IL-6 等为 SAP 早期促炎因子,其能扩大机体的炎症反应,导致多个器官组织损伤^[23]。有研究表明,AP 患者血清 HMGB1 水平升高,且与疾病严重程度呈正相关^[24];动物实验表明,腹腔注射 cerulein+LPS 诱导的 SAP 脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA 和血清 HMGB1 表达水平较对照组显著增加,而腹腔注射 HMGB1 中和抗体则能明显改善 AP 程度^[25-26];细胞实验表明,胰蛋白酶原激活肽能够诱导胰腺腺泡细胞表达和释放 HMGB1,抑制 HMGB1 的释放或细胞因子活性可保护 SAP 的细胞损害^[24]。本研究发现,与正常组比较,严重 AP 组中 HMGB1 表达显著升高,这与前人的研究结果一致。

miR-181a 属于一个保守的 microRNA 家族^[27],参与细胞分化、自噬、细胞凋亡和增殖等^[11,28]。在人眼

小梁细胞中,miR-181a-5p 通过降低细胞凋亡水平抑制 H₂O₂ 诱导青光眼的发生;在骨肉瘤组织中,高度表达的 miR-181a-5p 通过靶向下调 PTEN 显著促进肿瘤细胞增殖并抑制细胞凋亡^[29]。YANG M 等^[30]研究发现 miR-181a-5p mimic 转染的 SiHa 细胞中 Bcl-2 和 Bax 的表达分别显著增强和抑制,因此 Bcl-2/Bax 比值显著增加。临床研究发现^[31],miR-181a-5p 的表达在 AP 中显著下调,并参与胰腺腺泡细胞自噬及凋亡的调节。龚倩倩等^[32]研究发现,miR-181a-5p 可通过直接抑制白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 的表达抑制 cerulein 诱导的大鼠胰腺腺泡细胞凋亡;王晓华等^[5]发现,miR-181a-5p 靶向负调控 PIAS1 抑制胰腺腺泡细胞凋亡和 TNF- α 、IL-6 的表达影响 AP 的进展。miR-181a mimic 可通过靶向下调 PTEN 激活 P13K/AKT/mTOR 信号通路,从而抑制胰腺炎模型细胞的自噬及凋亡^[29]。这提示 miR-181a-5p 在 AP 中的作用及机制值得深入探究。本研究结果发现,与正常组比较,严重 AP 组中 miR-181a-5p 表达显著下调,与前人的研究结果一致。

目前 AP 腺泡细胞凋亡的调控机制尚不清楚,研究发现 miR-181a-5p、HMGB1 均参与了 AP 细胞凋亡的发生并影响疾病的进展,但 miR-181a-5p 是否通过调控 HMGB1 影响细胞凋亡尚不明确。本课题组通过生物信息分析发现 miR-181a-5p 与 HMGB1 两者之间存在连续结合片段,此外,miR-181a-5p 可靶向结合 HMGB1,下调 HMGB1 可减少炎症因子和心肌损伤,并抑制脓毒症中的心肌细胞凋亡^[33]。HMGB1 可与具有高亲和力的跨膜受体 RAGE 结合,激活 RAGE 依赖的信号转导机制,比如 MAPK 通路,以此活化核转录因子(nuclear factor kappa B,NF- κ B)介导炎症瀑式反应^[8,18-19],诱导细胞凋亡。进一步通过荧光素酶报告实验发现,miR-181a-5p 可靶向调控 HMGB1 的表达。

由此,推测 miR-181a-5p 可能通过 HMGB1 调控 Caspase-3 的表达,为证实这一推测,本研究采用 cerulein+LPS 建立严重 AP 细胞模型,探讨三者间的相

互关系,结果证实,严重 AP 组 miR-181a-5p 低表达, HMGB1 和 Caspase-3 mRNA 及蛋白高表达,利用 miR-181a-5p mimic 上调 miR-181a-5p 的表达后, HMGB1 和凋亡相关基因 Caspase-3 mRNA 及蛋白出现显著下降,提示 miR-181a-5p 与 HMGB1、Caspase-3 存在潜在关系。为明确 miR-181a-5p 与 HMGB1 及凋亡相关基因 Caspase-3 表达的相互关系,进一步进行了 Pearson 相关分析,结果显示 miR-181a-5p 与 HMGB1 表达呈负相关;miR-181a-5p 与 Caspase-3 表达呈负相关;HMGB1 与 Caspase-3 表达呈正相关。

综上,AP 的发生发展主要与胰酶的过度释放及各种炎症介质介导的胰腺腺泡细胞自噬、凋亡有关, HMGB1 作为晚期炎症介质,参与了胰腺腺泡细胞自噬及凋亡,miR-181a-5p 可靶向调控 HMGB1 的表达,miR-181a-5p 在 cerulein +LPS 诱导 AR42J 细胞中低表达, HMGB1 和 Caspase-3 高表达,过表达 miR-181a-5p 可抑制凋亡相关基因 Caspase-3 的表达,其机制可能与靶向 HMGB1 有关,这将为 AP 的诊断及治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] SONG G D, MA Z L, LIU D L, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate severe acute pancreatitis via regulation of microRNA-9 to inhibit necroptosis in rats[J]. *Life Sci*, 2019, 223: 9-21.
- [2] LI H Y, LIN Y J, ZHANG L, et al. Autophagy in intestinal injury caused by severe acute pancreatitis[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2021, 134(21): 2547-2549.
- [3] WANG H L, LI C, JIANG Y J, et al. Effects of bacterial translocation and autophagy on acute lung injury induced by severe acute pancreatitis[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2020; 8953453.
- [4] 王建,高明. 外周血 HMGB1、MCP-1、RDW 动态检测在急性胰腺炎病情严重程度评估中的价值研究[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2020, 25(9): 1151-1155.
- [5] 王晓华,陈铁江,楼一波. miR-181a-5p 靶向 PIAS1 对雨蛙肽诱导的急性胰腺炎腺泡细胞损伤的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2019, 27(15): 927-935.
- [6] YU X Z, LI C Y, SONG H C, et al. Emodin attenuates autophagy response to protect the pancreas from acute pancreatitis failure[J]. *Pancreas*, 2018, 47(7): 892-897.
- [7] XIE Q, FEI M M, FA Z Z, et al. Methane-rich saline alleviates cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting inflammatory response, oxidative stress and pancreatic apoptosis in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 51: 17-24.
- [8] 方从文,石莹,杜凤,等. 高迁移率族蛋白 B1 在小鼠肝再生中对细胞增殖的作用及机制[J]. *癌变·畸变·突变*, 2020, 32(2): 81-86.
- [9] 高双骑. HMGB1 在可卡因诱导大鼠奖赏行为中的作用及机制[D]. 武汉:华中科技大学, 2019.
- [10] 罗欢,孙昀,余维丽,等. MicroRNA141 在高脂血症急性胰腺炎中的作用机制[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(12): 1496-1499, 1504.
- [11] FU Y, XIN Z L, LING Z J, et al. A CREB1-miR-181a-5p loop regulates the pathophysiologic features of bone marrow stromal cells in fibrous dysplasia of bone[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 81.
- [12] LUO Y L, FAN L, HUANG L X, et al. Expression of serum autophagy-related protein P62 in patients with severe pancreatitis and its correlation with prognosis[J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(2): 1376-1383.
- [13] HU F L, TAO X F, ZHAO L, et al. LncRNA-PVT1 aggravates severe acute pancreatitis by promoting autophagy via the miR-30a-5p/Beclin-1 axis[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 5551-5562.
- [14] SONG G D, ZHOU J, SONG R M, et al. Long noncoding RNA H19 regulates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells in rats with severe acute pancreatitis by sponging miR-138-5p and miR-141-3p[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 420.
- [15] ZHAO S P, YU C, XIANG K M, et al. miR-375 inhibits autophagy and further promotes inflammation and apoptosis of acinar cells by targeting ATG7[J]. *Pancreas*, 2020, 49(4): 543-551.
- [16] LUO C, HUANG Q L, YUAN X H, et al. Abdominal paracentesis drainage attenuates severe acute pancreatitis by enhancing cell apoptosis via PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Apoptosis*, 2020, 25(3-4): 290-303.
- [17] XU X F, LOU W H, WANG D S, et al. Influence of glutamine on pancreatic blood flow and apoptosis of pancreatic acinar in rats with severe acute pancreatitis[J]. *Chin J Dig Dis*, 2006, 7(2): 121-126.
- [18] WANG G, HAN B, ZHOU H X, et al. Inhibition of hydrogen sulfide synthesis provides protection for severe acute pancreatitis rats via apoptosis pathway[J]. *Apoptosis*, 2013, 18(1): 28-42.
- [19] ZHU Y, LIU S G, WANG F. MicroRNA miR-27a-5p alleviates the cerulein-induced cell apoptosis and inflammatory injury of AR42J cells by targeting traf3 in acute pancreatitis[J]. *Inflammation*, 2020, 43(5): 1988-1998.
- [20] 朱绍华,何创业,赵芯. 血清微管相关蛋白 1 轻链 3-II、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3 及高迁移率族蛋白 B1 在不同程度急性胰腺炎中的表达及意义[J]. *陕西医学杂志*, 2022, 51(9): 1098-1101.
- [21] 刘东菊,潘路娟,梁华益,等. miR-let-7b-5p 对急性胰腺炎 AR42J 细胞凋亡及自噬的作用研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2022, 44(1): 6-10.
- [22] FERRERO-ANDRÉS A, PANISELLO-ROSELLÓ A,

- SERAFIN A, et al. Polyethylene glycol 35 (PEG35) protects against inflammation in experimental acute necrotizing pancreatitis and associated lung injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3):917.
- [23] 罗灵和, 刘海燕, 杨珠莹, 等. 急性重症胰腺炎肺损伤大鼠 HMGB1 的表达及意义[J]. *现代实用医学*, 2020, 32(3):309-310.
- [24] ZHU H W, HUANG L H, ZHU S H, et al. Regulation of autophagy by systemic admission of microRNA-141 to target HMGB1 in l-arginine-induced acute pancreatitis in vivo[J]. *Pancreatol*, 2016, 16(3):337-346.
- [25] PAN L F, YU L, WANG L M, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) regulates acute pancreatitis via inhibiting HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(2):402-410.
- [26] 杨复镛, 刘东菊, 潘路娟, 等. HMGB1 调控重症急性胰腺炎脾淋巴细胞凋亡的实验研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2021, 43(1):22-27.
- [27] LIU N, ZHANG Z C, LI L, et al. MicroRNA-181 regulates the development of ossification of posterior longitudinal ligament via epigenetic modulation by targeting PBX1[J]. *Theranostics*, 2020, 10(17):7492-7509.
- [28] REZAEI T, AMINI M, HASHEMI Z S, et al. microRNA-181 serves as a dual-role regulator in the development of human cancers[J]. *Free Radi Biol Med*, 2020, 152:432-454.
- [29] 赵明一, 陈涛, 吴天鸣. microRNA-181 通过靶向 PTEN 对胰腺泡细胞自噬及凋亡的影响及作用机制研究[J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(3):215-223.
- [30] YANG M, ZHAI X, GE T T, et al. miR-181a-5p promotes proliferation and invasion and inhibits apoptosis of cervical cancer cells via regulating inositol polyphosphate-5-phosphatase A (INPP5A)[J]. *Oncol Res*, 2018, 26(5):703-712.
- [31] AN F M, ZHAN Q, XIA M, et al. From moderately severe to severe hypertriglyceridemia induced acute pancreatitis: circulating miRNAs play role as potential biomarkers[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e111058.
- [32] 龚倩倩, 陈铁江. miR-181a-5p 调控 LIF 的表达调节胰腺腺泡细胞凋亡的分子机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2019, 27(8):494-502.
- [33] LING L, ZHI L D, WANG H F, et al. MicroRNA-181b inhibits inflammatory response and reduces myocardial injury in sepsis by downregulating HMGB1[J]. *Inflammation*, 2021, 44(4):1263-1273.

收稿日期:2022-12-30;修回日期:2023-01-12

【读者·作者·编者】

本刊对稿件图表格式的要求

本刊对来稿中的图表一律以其在正文中出现的先后次序连续编码。每帧图表应冠以中文图(表)题。说明性资料应以中文格式置于图(表)下方注释中。

1. 表格:采用三横线表(顶线、表头线、底线格式),应使表中每一列数据的单位相同,统计值结果(如 t 值、 P 值等)保留小数点后三位,百分率、均数、标准差等保留小数点后两位。

2. 图片:图片要求有良好的清晰度和对比度,并注明图号及图的上下方向,大体标本图片务必在图内有尺度标记,病理图请注明染色方法和放大倍数,以图形文件格式(.jpg)插入到正文中。

《右江民族医学院学报》编辑部