

沉默PDCD4表达可减轻脓毒症血管内皮细胞损伤 基于改善线粒体动力学

于佳池^{1,2}, 李芮冰^{1,2}, 夏天^{1,2}, 王佳楠², 金家丞^{1,2}, 袁漫秋^{2,3}, 李绵洋^{1,2}

¹解放军医学院, 北京 100853; ²中国人民解放军总医院第一医学中心检验科, 北京 100853; ³南开大学医学院, 天津 300071

摘要:目的 探究程序性细胞死亡因子4(PDCD4)在缓解脓毒症血管内皮细胞损伤中的作用机制。方法 通过体外分别培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和小鼠血管内皮细胞(C166)并给予脂多糖(LPS)处理,建立脓毒症血管内皮损伤细胞模型。分别设立对照组(NC)、LPS诱导组(NC+LPS)、si-PDCD4转染组(si-PDCD4)、si-PDCD4转染后LPS诱导组(si-PDCD4+LPS)、si-PDCD4转染后LPS诱导加线粒体分裂激动剂(FCCP)组(si-PDCD4+LPS+FCCP)。通过LC-MS/MS技术,分析PDCD4敲低前后蛋白组学变化。通过RT-PCR检测对照组和LPS组转染前后PDCD4、细胞炎症、凋亡以及线粒体分裂融合相关基因的mRNA表达量的变化;蛋白质印迹法检测线粒体分裂融合关键蛋白FIS1、DRP1和OPA1的表达水平;通过激光共聚焦技术观察JC-1、MitoSOX探针荧光强度以检测线粒体膜电位和线粒体活性氧变化。结果 与对照组相比,LPS组炎症相关指标白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)和单核细胞趋化蛋白1(MCP1)基因的mRNA表达升高($P<0.05$);PDCD4在脓毒症血管内皮细胞损伤中高表达($P<0.05$);蛋白组学分析结果表明,PDCD4敲低与线粒体动力学存在相关性;Western blot结果表明与对照组相比,LPS组诱导线粒体分裂蛋白FIS1、DRP1表达增加,融合蛋白OPA1减低($P<0.05$);MitoSOX和JC-1荧光探针结果提示LPS诱导下内皮细胞线粒体发生氧化应激,膜电位显著降低($P<0.05$),敲低组的氧化应激和线粒体膜电位有所缓解。PDCD4敲低后的保护效应可被线粒体分裂激动剂FCCP逆转。敲低PDCD4后能够抑制LPS所引起的炎症和氧化应激水平,线粒体分裂和融合指标恢复平衡。结论 沉默PDCD4基因通过调控线粒体的动力学维持线粒体功能正常,减轻氧化应激,从而有利于缓解脓毒症血管内皮细胞损伤。

关键词:脓毒症;血管内皮细胞;线粒体动力学;PDCD4;炎症

PDCD4 knockdown ameliorates lipopolysaccharide-induced endothelial cell damage by improving mitochondrial dynamics

YU Jiachi^{1,2}, LI Ruibing^{1,2}, XIA Tian^{1,2}, WANG Jianan², JIN Jiacheng^{1,2}, YUAN Manqiu^{2,3}, LI Mianyang^{1,2}

¹Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China; ²Department of Clinical Laboratory Medicine, First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³Nankai University School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071 China

Abstract: Objective To elucidate the role of programmed cell death factor 4 (PDCD4) in mitochondrial dysfunction caused by sepsis-related vascular endothelial damage. **Methods** Cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and mouse vascular endothelial cells (C166 cells) were transfected with a small interfering RNA targeting PDCD4 followed by treatment with lipopolysaccharide (LPS) alone or in combination with carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (FCCP). The proteomic changes in the cells after PDCD4 knockdown were analyzed using LC-MS/MS technique. The mRNA expressions of PDCD4 and the genes associated with cell inflammation and apoptosis were detected with RT-PCR, and the expressions of FIS1, DRP1 and OPA1 proteins key to mitochondrial fission and fusion were determined using Western blotting. JC-1 and MitoSOX fluorescent probes were used to observe the changes in mitochondrial membrane potential and mitochondrial reactive oxygen species levels under by a laser confocal microscope. **Results** LPS stimulation of the cells significantly increased the mRNA expressions of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) and enhanced the cellular expression of PDCD4 ($P<0.05$). Proteomic analysis suggested a correlation between PDCD4 knockdown and changes in mitochondrial dynamics in the cells. LPS treatment significantly increased the expressions of mitochondrial fission proteins FIS1 and DRP1 and lowered the expression of the fusion protein OPA1 in the cells ($P<0.05$),

causing also mitochondrial oxidative stress and reduction of the mitochondrial membrane potential ($P<0.05$). In HUVECs, treatment with FCCP significantly attenuated the protective effect of PDCD4 knockdown, which inhibited LPS-induced inflammation and oxidative stress and restored the balance between mitochondrial fission and fusion. **Conclusion** PDCD4 knockdown protects vascular endothelial cells against LPS-induced damages by repressing mitochondrial fission and oxidative stress, promoting mitochondrial fusion, and maintaining normal mitochondrial function.

Keywords: sepsis; vascular endothelial cells; mitochondrial dynamics; PDCD4; inflammation

收稿日期:2023-09-19

基金项目:国家自然科学基金青年项目(82000537);解放军总医院自主创新成长项目(22QNCZ058);解放军总医院优青培育专项(2020-YQPY-005)

Supported by Youth Program of National Natural Science Foundation of China (82000537).

作者简介:于佳池,硕士,E-mail: 18698838411@163.com

通信作者:李绵洋,主任医师,副教授,硕士生导师,E-mail: limianyang@301hospital.com.cn;李芮冰,副主任医师,E-mail: liruibing@plagh.org

脓毒症是由于宿主对感染免疫反应失调而致的危及生命的器官功能障碍综合征,是临床常见的危急重症^[1],可迅速进展为脓毒症休克和多器官功能障碍综合征。该病发病率高、病死率高,统计结果显示^[2],2017年全球共报道约4890万脓毒症病例,其中死亡患者约1100万,占全球死亡人数的19.7%。预防脓毒症的发生、阻断脓毒症进展为全球卫生的重大挑战之一。然而目前脓毒症的救治手段多为抗生素和支持性治疗,其救治过程困难,造成了沉重的医疗负担。

内皮功能障碍是脓毒症发生器官功能障碍的标志^[3]。血管内皮细胞表面表达多种免疫相关抗原成分,机体感染后,可通过与其它免疫效应细胞相互作用的方式参与机体免疫炎症反应,激活内皮细胞释放细胞因子、趋化因子和促凝因子等并引发级联反应,增强炎症过程,然而内皮细胞可能因激活失衡导致细胞结构、功能的损伤^[4]。除了过度炎症级联反应外,线粒体功能紊乱会诱导氧化应激,破坏代谢并进一步激活内皮细胞凋亡,从而加剧脓毒症血管内皮细胞的损伤^[5]。已有文献表明^[6],内毒素所引起的心肌、肝脏、肾脏3种脏器的功能衰竭同时均存在线粒体的功能障碍。而DNA依赖性蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)的缺乏通过改善线粒体功能来缓解脓毒症多器官功能障碍综合征的发展和进展。因此,内皮细胞的线粒体功能障碍是脓毒症内皮细胞损伤的一个关键机制,维持和改善线粒体功能可能成为救治脓毒症患者的新的手段。

线粒体作为细胞有氧代谢的中心,存在于所有血管中。线粒体功能的异常对血管衰老和衰老相关心血管疾病发生和发展的重要贡献现已得到充分证实。过度的应激刺激会影响线粒体功能,也会导致线粒体DNA损伤,从而破坏线粒体电子传递链蛋白的转录和翻译,诱发线粒体融合功能障碍^[7]。同时,过度的线粒体损伤和压力会促进线粒体分裂,从而将网状线粒体网络转化为点状和碎片状线粒体,导致线粒体膜电位失衡,引起内皮功能障碍^[8]。线粒体膜电位紊乱的脓症患者死亡风险增加^[9],线粒体融合/分裂能够有效改善内毒素诱导损伤动物模型的器官功能和线粒体稳态,恢复线粒体膜电位正常水平。因此维持线粒体功能似乎是预防多器官衰竭和改善脓症患者预后的关键。线粒体可以通过融合/分裂动态过程,即线粒体动力学^[10]维持线粒体稳态。寻找脓毒症血管内皮损伤过程中的线粒体途径的上游作用分子,通过调控其表达减轻内皮细胞损伤,对于逆转脓毒症所致内皮细胞功能障碍、探索新的治疗靶点具有重要意义。

程序性细胞死亡因子4(PDCD4)是一种肿瘤抑制基因^[11],可促进细胞凋亡,抑制细胞增殖、侵袭和转移^[12]。在多种疾病中均有相关研究报道^[13,14],如在肺动

脉高压中,PDCD4诱导肺动脉平滑肌细胞增殖迁移和肺血管重塑;在甲状腺髓样癌中,PDCD4是公认的miR-21靶标,直接抑制肿瘤蛋白水平。同时,在Cr(VI)诱导肝毒性的机制中^[15],PDCD4表达增多,参与氧化应激反应,从而损伤线粒体。目前已经证明,在其他疾病中,PDCD4通过氧化应激损伤线粒体,而对于PDCD4在脓毒症血管内皮细胞损伤中线粒体的作用机制尚无研究。因此,本文旨在探讨PDCD4能否通过调控线粒体动力学参与脓毒症血管内皮细胞损伤过程,通过干预PDCD4表达探究其作为治疗靶点对于脓毒症血管内皮细胞中线粒体动力学的改变,深化对于以线粒体动力学为中心的脓毒症血管内皮细胞损伤的理解。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和内皮细胞专用培养基购买于赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。小鼠血管内皮细胞(C166)和DMEM-H完全培养基购买于北纳创联生物技术研究院。脂多糖(LPS)用于构建脓毒症诱导血管内皮细胞损伤模型(Sigma)。转染试剂Lipofectamine[®]RNAiMAX、Opti-MEM培养基、TRIzol、SYBR Green预混液、MitoSOX Red荧光探针(Thermo Fisher)。siRNA PDCD4委托苏州吉玛基因股份有限公司合成。Quick-RNA Miniprep试剂盒(ZYMO RESEARCH)。iScript cDNA逆转录试剂盒(Bio-Rad)。本实验所用引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。RIPA蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂(北京索莱宝科技有限公司)。FuturePAGE[™]蛋白预制胶(常州伯仪生物科技有限公司)。视神经萎缩蛋白1(OPA1)、线粒体分裂蛋白1(FIS1)、线粒体动力相关蛋白(DRPI)等一抗(CST)。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔及羊抗鼠二抗(杭州华安生物技术有限公司)。线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1,上海碧云天生物技术有限公司)。线粒体分裂激动剂(FCCP,MCE)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与模型建立 HUVEC使用内皮细胞专用培养基于37℃、5% CO₂条件下培养。C166使用DMEM-H完全培养基培养。取生长良好的处于对数生长期的细胞用于后续试验。分别设立对照组(NC)、LPS诱导组(NC+LPS)、si-PDCD4转染组(si-PDCD4)、si-PDCD4转染后LPS诱导加线粒体分裂激动剂(FCCP)组(si-PDCD4+LPS+FCCP)。通过Lipofectamine[®]RNAiMAX转染试剂分别转染NC siRNA和PDCD4 siRNA构建相应HUVEC细胞株转染组及C166细胞株转染组。通过LPS体外刺激细胞并产生炎症反应构建脓毒症血管内皮细胞损伤模型。细胞转染siRNA 24 h

后,分在NC+LPS组和si-PDCD4+LPS组中加入LPS(0.5 mg/mL),继续培养48 h,以构建内皮细胞损伤模型,通过后续探索炎症因子表达水平变化判断细胞内炎症反应,评价模型是否构建成功。

1.2.2 RT-PCR 使用Trizol进行细胞裂解,室温静置5 min后收集到1.5 mL的EP管中。加入等体积的无水乙醇,混匀。按照Quick-RNA Miniprep试剂盒说明书进行RNA提取,并通过Nanodrop测定RNA浓度。按照iScript cDNA逆转录试剂盒说明书合成cDNA。使用SYBR Green染料法进行RT-PCR。以GAPDH为内参基因(表1)。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-PCR

Gene	Primer sequence 5'-3'
PDCD4	F: TGTGCCAACAGTCCAAAGGG
	R: CACCTCTCCACATCATAACCTG
IL-6	F: TGGTGTTCCTGCTGCCTTC
	R: GCTGAGATGCCGTCGAGGATG
TNF- α	F: CTCATCTACTCCAGGTCTCTTC
	R: CGATGCGGCTGATGGTGTG
MCP1	F: AAGCAGAAGTGGGTTCAAGATTCC
	R: TCTTGGGTTGTGGAGTGAGTGTTC

F: Forward primer; R: Reverse primer.

1.2.3 Western blot 实验 细胞加入RIPA蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂进行细胞裂解,4 °C静置30 min后,12000 r/min离心30 min,取上清液。采用BCA法测定细胞总蛋白浓度。蛋白变性后采用FuturePAGE™蛋白预制胶进行电泳;采用S-TRANS快速多通道半干转印仪对PVDF膜进行快速转印;经5%脱脂牛奶室温封闭1 h后,孵育相应一抗4 °C过夜;次日,充分洗涤PVDF膜后,室温振摇孵育二抗1 h;再次充分洗涤后使用ECL特超敏发光液进行显影,蛋白成像分析系统进行扫描成像。使用Image J软件分析各蛋白的相对光密度值并计算相对表达水平。

1.2.4 线粒体活性氧和线粒体膜电位检测 HUVEC细胞接种于共聚焦小皿,按照分组进行相应处理后,使用PBS清洗细胞2遍。每孔加入2 μ mol/L MitoSOX Red染色工作液,37 °C避光孵育15 min;再加入1 \times Hoechst活细胞染料,37 °C孵育避光5 min,弃掉工作液,加入新鲜的内皮细胞专用培养基后,在OLYMPUS FV1000激光共聚焦显微镜下观察并拍照。线粒体膜电位检测采用JC-1探针,37 °C避光孵育20 min;再加入1 \times Hoechst活细胞染料,37 °C孵育避光5 min,弃掉工作液。使用1 \times JC-1缓冲液洗涤2次,加入新鲜培养基后,采用OLYMPUS FV1000共聚焦显微镜观察和拍摄。

1.2.5 线粒体形态检测 HUVEC细胞进行相应处理后,使用MitoTracker探针检测线粒体形态。MitoTracker探针37 °C避光孵育20 min,随后加入1 \times Hoechst活细胞染料37 °C孵育避光5 min,弃掉工作液。加入新鲜的内皮细胞专用培养基后,使用OLYMPUS FV1000共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.6 细胞质谱前处理及生信分析 HUVEC细胞分为NC组及si-PDCD4组,采用10 cm细胞培养皿进行细胞培养,并收集细胞沉淀于EP管中。在EP管中加入RIPA蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂后,进行超声破碎,提取蛋白。将超声后的蛋白,离心提取上清液。先后将二硫苏糖醇和碘代乙酰胺加入蛋白溶液中,对蛋白进行二硫键的破坏和还原烷基化。以1:50(胰酶:蛋白)的比例加入胰酶,于37 °C酶解过夜。将酶解后获得的肽段用C18萃取柱除盐后置于热干机中,热干2 h。液相色谱-串联质谱联用分析采用Thermo Q-Executive质谱仪。吸取以制备好的肽段350 ng加入进样瓶中,数据采集模式使用数据依赖型扫描(DDA)程序。质谱获得的数据导入Proteome Discoverer软件进行搜库,用Perseus软件进行分组处理,作为差异蛋白筛选的标准。

1.2.7 细胞活力实验(CCK-8) 细胞在96孔板中孵育,每组设置5个复孔。造模结束后,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,在37 °C、5% CO₂条件下,孵育细胞2 h后,采用酶标仪进行吸光度A_{450nm}测定。分别将每组吸光度去掉一个最大值和一个最小值。细胞存活率(%)=[A_{实验组}-A_{空白组}]/[A_{对照组}-A_{空白组}]

1.3 统计学方法

所有实验均至少进行3次独立重复,各指标以均值 \pm 标准差表示。采用SPSS 26.0、GraphPad Prism 9.4.0软件进行统计分析及图表绘制。采用t检验、单因素方差分析等比较组间差异。P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症血管内皮细胞损伤模型的建立和PDCD4的表达量的变化

RT-PCR 检测结果表明,经LPS诱导48 h后,HUVEC细胞中IL-6、TNF- α 、MCP1的mRNA表达水平高于Ctrl组(P<0.05,图1A~C),脓毒症血管内皮细胞损伤模型构建成功。此外,LPS组细胞中PDCD4的表达量在mRNA水平高于Ctrl组(P<0.05,图1D)。

2.2 PDCD4敲低对LPS诱导的血管内皮细胞的炎症的影响

针对HUVEC细胞所设计的4条不同Human siRNA均可使HUVEC细胞中PDCD4的表达减低(P<0.05,图2A),同时针对C166细胞所设计的3条不同Mouse

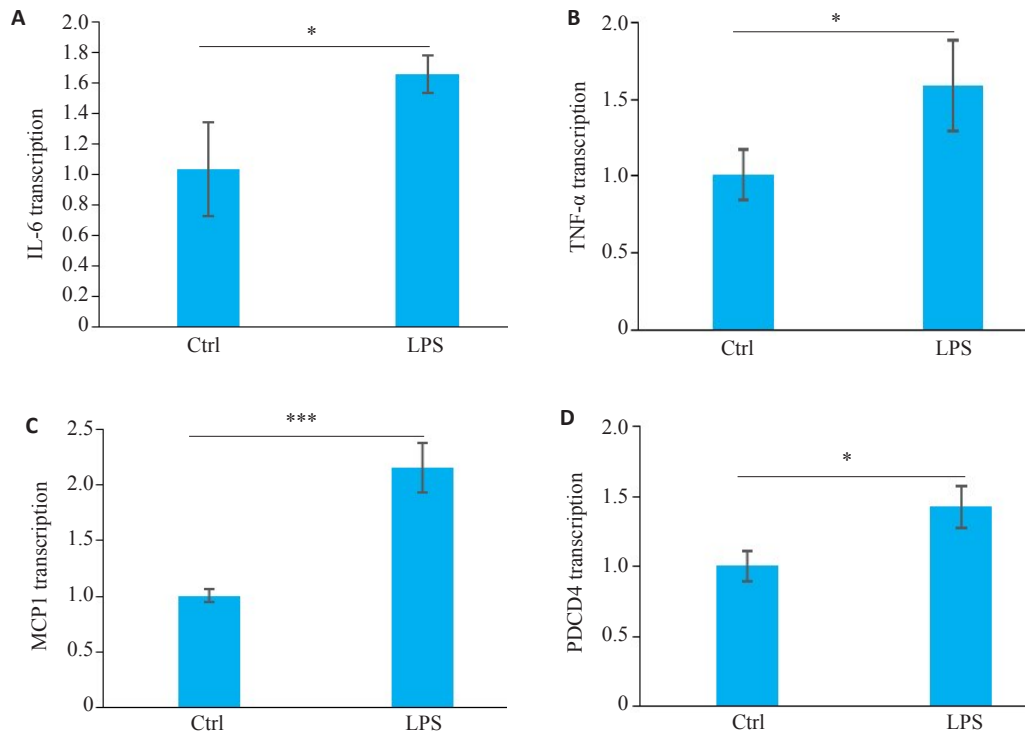


图1 脓毒症诱导血管内皮细胞的炎症因子激活

Fig.1 Sepsis-associated activation of inflammatory factors in vascular endothelial cells. A-C: IL-6, TNF- α , MCP1 mRNA expressions in the control (Ctrl) and LPS groups detected by real-time qPCR ($n=3$). D: PDCD4 mRNA expression in the control (Ctrl) and LPS groups detected by real-time qPCR ($n=3$). * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

siRNA均可减低C166细胞中PDCD4的表达($P<0.05$,图2B)。通过CCK8细胞活力实验,C166细胞在LPS刺激下细胞存活率减低,而PDCD4的敲低后细胞存活率水平恢复($P<0.05$,图2C)。Western blotting检测C166细胞在siRNA转染后,PDCD4蛋白表达水平明显减低($P<0.05$,图2D、E)。HUVEC细胞中,LPS组的IL-6、TNF- α 和Cleaved Caspase3蛋白表达量高于NC组($P<0.05$)。而与LPS组对比,si-PDCD4+LPS组的IL-6和Cleaved Caspase3的蛋白表达均有所减低。

2.3 基于LC/MS-MS技术,PDCD4敲低对HUVEC细胞的影响

NC组与si-PDCD4组体外模型提取血管内皮细胞全蛋白质谱鉴定结果,共鉴定到2510个蛋白,按条件(差异倍数 >1.5 或 <0.67 且 $P<0.05$)筛选差异表达蛋白。根据两组差异蛋白及其表达量信息绘制聚类热图,发现PDCD4敲低前后两组间蛋白表达情况有明显差异($P<0.05$,图3A)。根据差异倍数及 P 值绘制火山图,红色代表上调蛋白,蓝色代表下调蛋白(图3B)。根据GO数据库注释和KEGG富集分析,发现差异蛋白富集于线粒体、线粒体分裂、线粒体融合、氧化应激等通路(图3C~E)。

2.4 PDCD4敲低对血管内皮细胞中线粒体功能的影响

对PDCD4敲低前后的血管内皮细胞蛋白组学进

行分析,观察到PDCD4的敲低改变了大部分线粒体呼吸链复合物I、II、III和IV亚基表达水平(图4A)。通过MitoSOX探针靶向活细胞中线粒体氧化应激情况(图4B),LPS组的线粒体氧化应激明显增强,而PDCD4敲低后线粒体氧化应激减弱($P<0.05$,图4C)。

2.5 PDCD4敲低对线粒体动力学的影响

通过线粒体形态荧光标记探针结果显示,NC组线粒体形态呈棒状或细丝状分布,而LPS组线粒体出现病理性分裂,形态呈碎片状($P<0.05$,图5A、B)。与NC组相比,LPS诱导组的线粒体分裂因子FIS1和DRP1蛋白水平升高,经PDCD4敲低后FIS1和DRP1表达水平明显下降($P<0.05$,图5C~E);此外,Western blot检测结果显示,与NC组相比,LPS诱导组的线粒体融合蛋白OPA1表达水平减低,经转染后OPA1表达水平明显升高($P<0.05$,图5F、G)。

2.6 PDCD4敲低通过线粒体动力学影响血管内皮细胞

HUVEC细胞存活率在LPS刺激下明显减低,而PDCD4敲低后明显增加,后续给予线粒体分裂激活剂FCCP后细胞活力水平再次减低。Cleaved caspase3蛋白相对表达量显示LPS刺激下蛋白水平明显增加,而PDCD4敲低后减低,后续给予FCCP后Cleaved caspase3蛋白相对表达量再次增加($P<0.05$,图6A~C)。通过

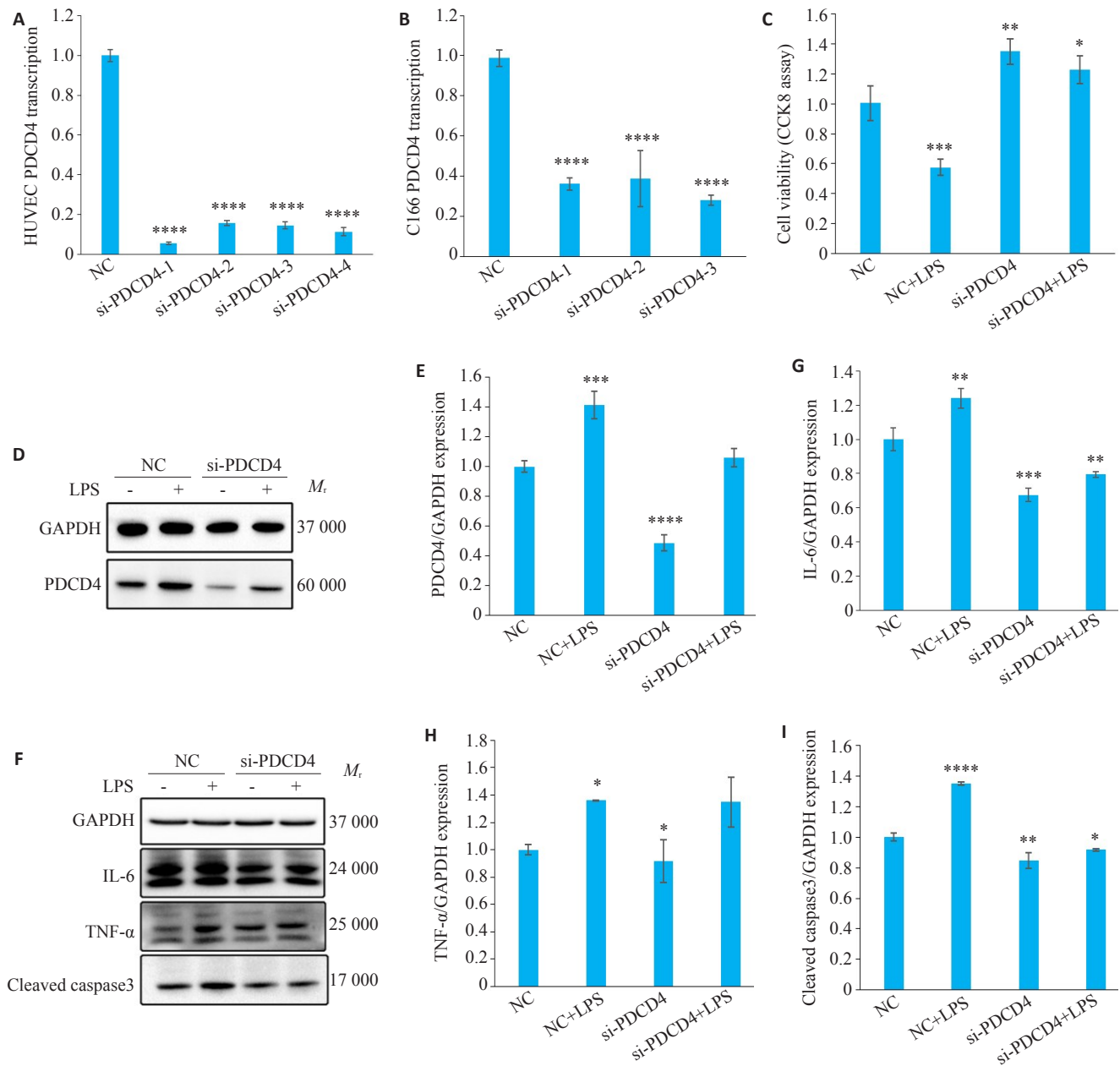


图2 PDCD4敲低对LPS诱导的血管内皮细胞的炎症的影响

Fig.2 Effect of PDCD4 knockdown on LPS-induced inflammation in cultured vascular endothelial cells. **A, B**: Real-time qPCR for verification of the knockdown efficiency of 4 different siRNAs for PDCD4 in HUVEC cells (**A**; $n=3$) and C166 cells (**B**; $n=3$). **C**: C166 cell viability measured by CCK8 assay. **D, E**: Western blotting for detecting PDCD4 expression in C166 cells ($n=3$). **F-I**: Expressions of IL-6, TNF- α and cleaved caspase-3 in the HUVECs ($n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs NC.

JC-1 观察线粒体膜电位情况(图 6E),在线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集产生红色荧光;线粒体损伤后,线粒体膜电位降低,JC-1 呈单体形式,可产生绿色荧光。与NC 组相比,LPS 组的绿色荧光强度增强,红色荧光强度减弱,红色荧光与绿色荧光比值明显减低。而转染后两组的红色荧光与绿色荧光强度比值均明显升高。加入 FCCP 后,红色荧光与绿色荧光强度比值明显减低 ($P<0.05$,图 6D)。

3 讨论

脓毒症目前仍然是危急重症患者最常见的死亡原因^[16],常伴有不明原因的多器官功能障碍,如心血管、肝脏、肾脏等^[17-19],而每个器官系统功能障碍的分子机制均影响到内皮功能^[20,21]。内皮细胞作为排列在血管腔内的单层细胞,在调节炎症、脂肪酸代谢和免疫反应中起重要的作用^[16,17]。在过去的几十年里,随着对脓毒症进展过程中血管内皮细胞作用机制不断深入理解,内皮细

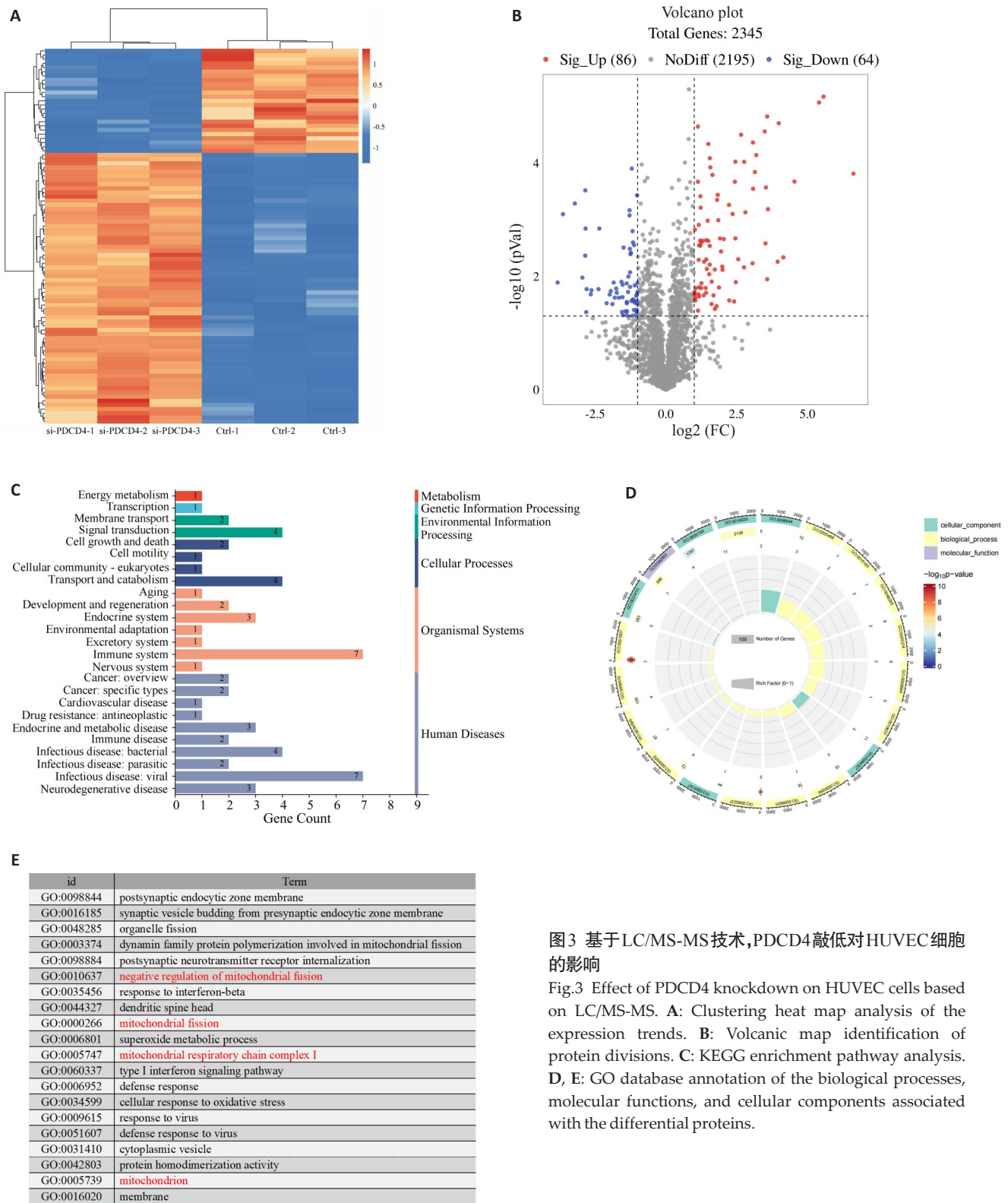


图3 基于LC/MS-MS技术,PDCD4敲低对HUVEC细胞的影响

Fig.3 Effect of PDCD4 knockdown on HUVEC cells based on LC/MS-MS. A: Clustering heat map analysis of the expression trends. B: Volcanic map identification of protein divisions. C: KEGG enrichment pathway analysis. D, E: GO database annotation of the biological processes, molecular functions, and cellular components associated with the differential proteins.

胞已被认为在脓毒症发生发展过程中起至关重要的作用。内皮屏障功能障碍是脓毒症多器官功能衰竭的关键因素^[21]。内皮屏障通透性的增加会促进水肿的形成和微血管灌注减少,与脓毒症内皮破坏造成的功能障碍有关^[22]。脓毒症下的血管内皮细胞功能障碍不仅由过激活炎症和屏障功能受损所引起,在血管内皮细胞消耗

能量的过程中线粒体功能障碍也是其中一个关键机制。血管生成是一个耗能的过程,主要包括内皮细胞活化、迁移、增殖等过程,提供能量的线粒体在这些过程中起着关键作用^[23]。

当线粒体受损时,线粒体无法为相应细胞提供所需能量后,会造成细胞甚至组织的损伤。已有研究报导表

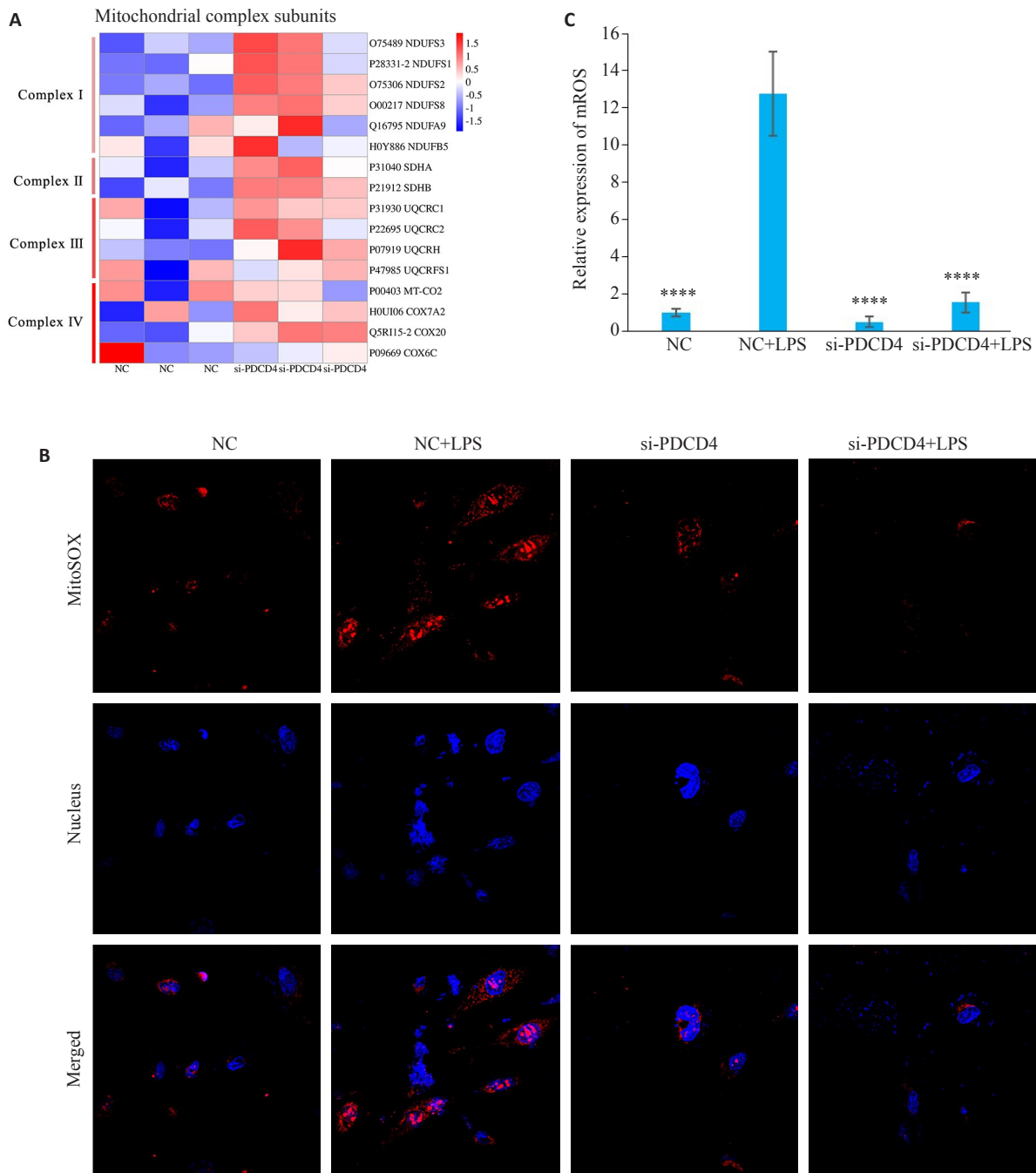


图4 PDCD4敲低对血管内皮细胞中线粒体功能的影响

Fig.4 PDCD4 knockdown protects mitochondrial function in vascular endothelial cells. **A:** Heat maps showing the changes in protein abundance of complex I to IV subunits after PDCD4 knockdown by proteomic enrichment. **B, C:** MitoSOX fluorescence assay for determining mitochondrial ROS production (Original magnification: $\times 60$). ******** $P < 0.0001$ vs NC+LPS group.

明^[24, 25],线粒体损伤可参与脓毒症多器官功能障碍。如DNA-PKcs通过控制线粒体分裂蛋白之间的相互作用并增加线粒体片段化,从而加剧脓毒性急性肾损伤;通过ERK-BAP31途径调控线粒体损伤,参与脓毒性心脏病的进展。因此,内皮细胞的线粒体功能障碍是脓毒症内皮细胞损伤的一个关键机制,但相关的线粒体功能的调控机制仍不清楚。

PDCD4作为肿瘤抑制因子,可促进细胞凋亡,参与

众多细胞和线粒体生理过程。既往已有部分关于PDCD4在肝脏疾病中作用机制的研究^[12],如PDCD4通过减少肝细胞中PPAR α 介导脂肪酸氧化来促进脂质沉积,从而诱发非酒精性脂肪肝^[26];在肝癌细胞中参与蛋白质降解过程的调控,PDCD4受到转化生长因子- β 1的调控抑制其蛋白的降解,受到表皮生长因子的调控刺激其蛋白的降解,最终诱导肝癌细胞凋亡^[27]。同时有相关研究表明,PDCD4对于线粒体功能的影响十分重要。

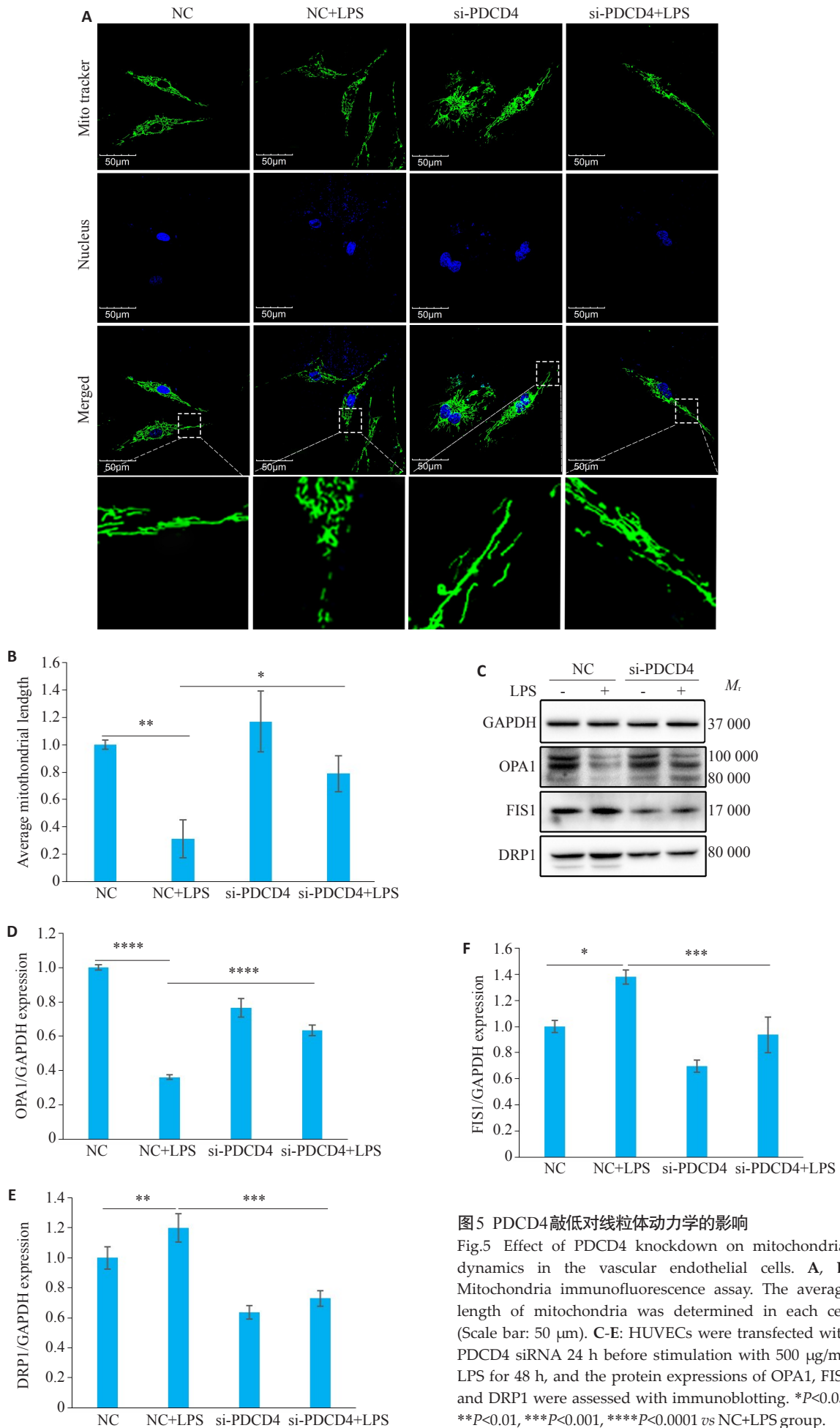


图5 PDCD4敲低对线粒体动力学的影响

Fig.5 Effect of PDCD4 knockdown on mitochondrial dynamics in the vascular endothelial cells. **A, B:** Mitochondria immunofluorescence assay. The average length of mitochondria was determined in each cell (Scale bar: 50 μ m). **C-E:** HUVECs were transfected with PDCD4 siRNA 24 h before stimulation with 500 μ g/mL LPS for 48 h, and the protein expressions of OPA1, FIS1 and DRP1 were assessed with immunoblotting. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001 vs NC+LPS group.

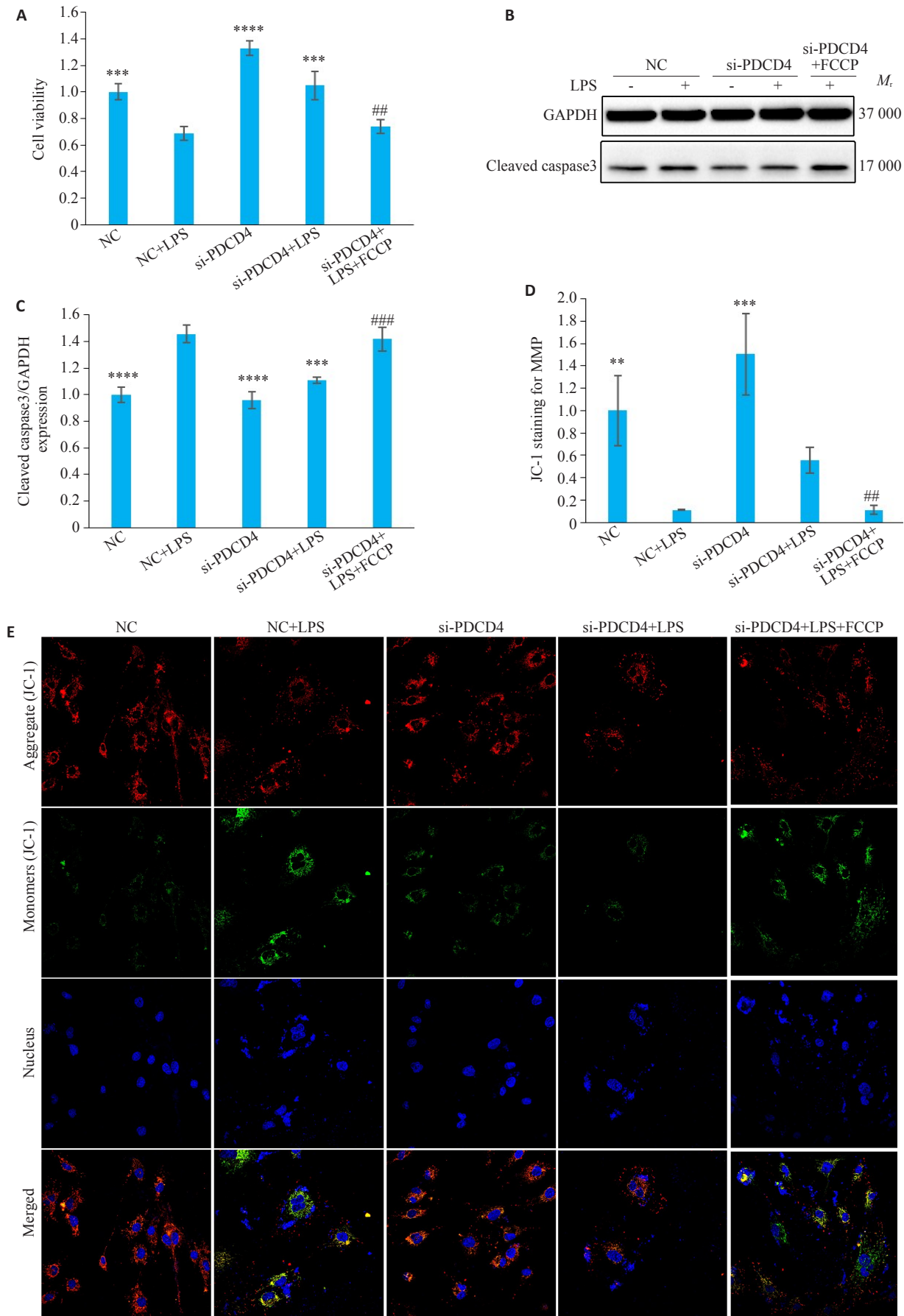


图6 PDCD4敲低通过线粒体动力学影响血管内皮细胞

Fig.6 PDCD4 knockdown protects vascular endothelial cells by maintaining normal mitochondrial dynamics. **A**: Cell viability analyzed by Cell Counting Kit-8. **B**, **C**: Protein expressions of cleaved caspase-3 assessed by immunoblotting. **D**, **E**: Analysis of changes in mitochondrial membrane potential (ratio of red-to-green fluorescence intensity) in the cells using JC-1 probe ($\times 40$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs NC+LPS group. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs si-PDCD4+LPS group.

在神经退行性疾病中, PDCD4 的敲低通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号改善神经细胞凋亡和线粒体损伤, 为帕金森病治疗提供了新的靶点^[28], 但 PDCD4 在脓毒症内皮细胞损伤中的作用未见相关报道。本研究通过 siRNA 技术干扰 PDCD4 表达, 探究 PDCD4 在 LPS 诱导内皮细胞损伤模型中的作用机制。

在 HUVEC 细胞中, LPS 诱导后 PDCD4 表达水平增高, 炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 MCP1 表达明显升高, 而 PDCD4 敲低能减少 HUVEC 炎症因子释放, 改善 LPS 诱导内皮细胞损伤。这种炎症激活的改变与 LPS 诱导的脓毒性心肌病中 H9C2 细胞炎症和凋亡激活的变化趋势一致, 且 LPS 诱导后 PDCD4 表达在两种细胞中均有明显增长^[29]。而且本实验研究结果显示, PDCD4 敲低后既能够维持内皮细胞内线粒体膜电位稳定, 还可以减少线粒体内氧化应激。以上均表明在应激状态下 PDCD4 低表达能够保护线粒体, 维持其动力学平衡。那么, PDCD4 如何维持线粒体结构和功能稳定从而保护内皮细胞, 本研究对其具体机制进行了进一步研究。

线粒体是高度动态变化的细胞器, 不仅能够为维持细胞正常运转提供能量供应, 而且参与多种生理病理过程。线粒体动力学为维持线粒体结构和数量的重要机制, 在生理状态下维持动态平衡, 当平衡紊乱时线粒体功能异常。线粒体动力学包括线粒体分裂和线粒体融合, 两者通过对线粒体受损部分的分割与重组, 减少受损和低效线粒体的积累, 从而维持线粒体细胞稳态^[30]。肝脏疾病、癌症等多种疾病被认为与线粒体分裂和融合平衡异常相关^[31-34]。在乳腺癌中, DRP1 的敲低或 MFN1 的过表达可以促进线粒体延长, 抑制癌症细胞的转移能力^[33]。在肝脏缺血再灌注中, 线粒体分裂蛋白表达上调, 氧化应激增加, 造成肝缺血再灌注损伤^[35]。因此, 线粒体的分裂和融合对维持线粒体生理状态动态平衡十分重要。本研究结果显示, LPS 刺激下, 线粒体分裂蛋白增加、融合蛋白减低, 而 PDCD4 的敲低可以逆转该现象。此外, PDCD4 敲低后线粒体膜电位恢复正常, 缓解线粒体氧化应激, 线粒体损伤减少。因此本研究明确了 PDCD4 通过促进线粒体分裂、抑制线粒体融合, 破坏线粒体动力学平衡, 造成线粒体损伤、炎症因子释放; 而 PDCD4 的敲低可以通过恢复线粒体动力学平衡, 维持线粒体结构和功能的稳定, 减少内皮细胞的损伤; 证明了 PDCD4 可以通过调控线粒体动力学影响脓毒症血管内皮细胞损伤, 丰富了脓毒症内皮细胞损伤的病理生理学机制, 也为后续的临床干预提供了可参考的新型靶点分子。

综上, 本研究以线粒体为中心探讨了脓毒症血管内皮细胞损伤的病理生理学机制, 明确了其上游起重要作用的靶点分子 PDCD4 的作用机制。敲减 PDCD4 通过

调控线粒体的动力学维持线粒体稳态, 缓解 LPS 引起的氧化应激, 从而有利于改善脓毒症血管内皮细胞损伤, 为后续临床转归提供了理论支撑和解决方案。然而, PDCD4 对线粒体动力学的具体调控机制以及线粒体动力学下游效应机制尚未明确, 且 PDCD4 在脓毒症内皮细胞损伤中的机制研究均在体外模型中探索。因此, PDCD4 对于脓毒症血管内皮细胞损伤的病理生理学机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315(8): 801-10.
- [2] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. Lancet, 2020, 395(10219): 200-11.
- [3] van der Poll T, Shankar-Hari M, Wiersinga WJ. The immunology of sepsis[J]. Immunity, 2021, 54(11): 2450-64.
- [4] Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, et al. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis[J]. Intensive Care Med, 2010, 36(8): 1286-98.
- [5] Sun DN, Wang J, Toan S, et al. Molecular mechanisms of coronary microvascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus: focus on mitochondrial quality surveillance [J]. Angiogenesis, 2022, 25(3): 307-29.
- [6] Zou RJ, Tao J, Qiu JX, et al. DNA-PKcs promotes sepsis-induced multiple organ failure by triggering mitochondrial dysfunction[J]. J Adv Res, 2022, 41: 39-48.
- [7] Chang X, Liu RX, Li RB, et al. Molecular mechanisms of mitochondrial quality control in ischemic cardiomyopathy[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(2): 426-48.
- [8] Dumont A, Lee M, Barouillet T, et al. Mitochondria orchestrate macrophage effector functions in atherosclerosis [J]. Mol Aspects Med, 2021, 77: 100922.
- [9] Gründler K, Angstwurm M, Hilge R, et al. Platelet mitochondrial membrane depolarization reflects disease severity in patients with sepsis and correlates with clinical outcome[J]. Crit Care, 2014, 18(1): R31.
- [10] Li MD, Hu YY, Zhou H, et al. NR4A1 aggravates myocardial ischaemia-reperfusion injury by inhibiting OPA1-mediated mitochondrial fusion[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2023, 16(5): 1050-63.
- [11] Ren WH, Hou JF, Yang CG, et al. Extracellular vesicles secreted by hypoxia pre-challenged mesenchymal stem cells promote non-small cell lung cancer cell growth and mobility as well as macrophage M2 polarization via miR-21-5p delivery [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 62.
- [12] Lu KK, Chen Q, Li MD, et al. Programmed cell death factor 4 (PDCD4), a novel therapy target for metabolic diseases besides cancer[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 159: 150-63.
- [13] Mondin A, Bertazza L, Barollo S, et al. Validation of miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers, and possible therapeutic

- targets in medullary thyroid cancers[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1151583.
- [14] Chai LM, Wang QT, Wang Y, et al. Downregulation of PDCD4 through STAT3/ATF6/autophagy mediates MIF-induced PSMCs proliferation/migration and vascular remodeling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 956: 175968.
- [15] Zhang YJ, Xiao YY, Ma Y, et al. ROS-mediated miR-21-5p regulates the proliferation and apoptosis of Cr(VI)-exposed L02 hepatocytes via targeting PDCD4[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 191: 110160.
- [16] Weng L, Zeng XY, Yin P, et al. Sepsis-related mortality in China: a descriptive analysis[J]. *Intensive Care Med*, 2018, 44(7): 1071-80.
- [17] Russell JA, Rush B, Boyd J. Pathophysiology of septic shock[J]. *Crit Care Clin*, 2018, 34(1): 43-61.
- [18] Strnad P, Tacke F, Koch A, et al. Liver-guardian, modifier and target of sepsis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(1): 55-66.
- [19] Liu ZW, Yang DY, Gao JL, et al. Discovery and validation of miR-452 as an effective biomarker for acute kidney injury in sepsis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(26): 11963-75.
- [20] Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases[J]. *Vascul Pharmacol*, 2018, 100: 1-19.
- [21] Lelubre C, Vincent JL. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(7): 417-27.
- [22] Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock[J]. *J Intern Med*, 2015, 277(3): 277-93.
- [23] Li GF, Zhou L, Deng HF, et al. Targeting OPA1-mediated mitochondrial fusion contributed to celastrol's anti-tumor angiogenesis effect[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 15(1): 48.
- [24] Wang SY, Zhu H, Li RB, et al. DNA-PKcs interacts with and phosphorylates Fis1 to induce mitochondrial fragmentation in tubular cells during acute kidney injury [J]. *Sci Signal*, 2022, 15(725): eabh1121.
- [25] Zhang JB, Wang LL, Xie W, et al. Melatonin attenuates ER stress and mitochondrial damage in septic cardiomyopathy: a new mechanism involving BAP31 upregulation and MAPK-ERK pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(3): 2847-56.
- [26] Du XJ, Osoro EK, Chen Q, et al. Pcd4 promotes lipid deposition by attenuating PPAR α -mediated fatty acid oxidation in hepatocytes[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 545: 111562.
- [27] Matsuhashi S, Hamajima H, Xia JH, et al. Control of a tumor suppressor PDCD4: degradation mechanisms of the protein in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(3): 603-10.
- [28] Li YM, Pang JM, Wang J, et al. Knockdown of PDCD4 ameliorates neural cell apoptosis and mitochondrial injury through activating the PI3K/AKT/mTOR signal in Parkinson's disease [J]. *J Chem Neuroanat*, 2023, 129: 102239.
- [29] Ni SY, Xu WT, Liao GY, et al. LncRNA HOTAIR promotes LPS-induced inflammation and apoptosis of cardiomyocytes via Lin28-mediated PDCD4 stability[J]. *Inflammation*, 2021, 44(4): 1452-63.
- [30] Vázquez-Trincado C, García-Carvajal I, Pennanen C, et al. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease [J]. *J Physiol*, 2016, 594(3): 509-25.
- [31] Lemaigre FP. Development of the intrahepatic and extrahepatic biliary tract: a framework for understanding congenital diseases[J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 1-22.
- [32] Chan DC. Mitochondrial dynamics and its involvement in disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 235-59.
- [33] Rodrigues T, Ferraz LS. Therapeutic potential of targeting mitochondrial dynamics in cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 182: 114282.
- [34] Mansouri A, Gattoliat CH, Asselah T. Mitochondrial dysfunction and signaling in chronic liver diseases[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(3): 629-47.
- [35] Bi JB, Zhang J, Ren YF, et al. Irisin alleviates liver ischemia-reperfusion injury by inhibiting excessive mitochondrial fission, promoting mitochondrial biogenesis and decreasing oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2019, 20: 296-306.

(编辑:余诗诗)