

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003972

# miR-181a-5p 调控 ATM/CHK2 对人皮肤成纤维细胞衰老的影响及机制研究

何宛玥, 果 磊, 冯伟华, 胡志威

(重庆医科大学附属第一医院整形烧伤外科, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**探讨微小RNA-181a-5p(microRNA-181a-5p)通过调控共济失调毛细血管扩张突变激酶(ataxia-telangiectasia mutated kinase, ATM)/DNA 损伤检查点激酶 2(checkpoint kinase 2, CHK2)对人皮肤成纤维(human skin fibroblasts, HSF)衰老的影响及机制。**方法:**生物信息学数据库预测 miR-181a-5p 的靶向基因, 确定 ATM 作为研究对象; 构建人皮肤成纤维细胞衰老模型, 分别转染 miR-181a-5p mimics、mimics negative control、miR-181a-5p inhibitor、inhibitor negative control 后将细胞分为 4 组: 实验(miR-181a-5p mimics)组、对照(mimics-NC)组、抑制剂(miR-181a-5p inhibitor)组、抑制剂对照(inhibitor-NC)组; 聚合酶链式反应检测各组细胞 miR-181a-5p、ATM、CHK2 mRNA 的表达。蛋白质印迹法检测各组细胞 GSDMD、Caspase-1、NLRP3、DDB1、p53 蛋白的表达; 酶联免疫吸附测定法检测各组细胞 IL-18 和 IL-1 $\beta$  浓度。**结果:**聚合酶链式反应检测结果显示, 与对照组相比, 转染 miR-181a-5p mimics 可以显著降低细胞内 DNA 损伤相关基因 ATM 和 CHK2 的 mRNA 水平( $P < 0.01$ ); 蛋白质印迹法结果显示, 与对照组相比, 实验组细胞衰老通路相关基因 DDB1、p53, 细胞焦亡相关基因 NLRP3、GSDMD、Caspase 1 蛋白水平明显上升( $P < 0.05$ )。酶联免疫吸附测定法检测结果显示, 与对照组相比, 实验组焦亡相关指标 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平显著上升( $P < 0.01$ )。**结论:**抑制 miR-181a-5p 可促进 ATM/CHK2 信号通路, 进而抑制细胞衰老与焦亡。

**【关键词】**成纤维细胞; miR-181a-5p; DNA 损伤反应; 细胞衰老; 细胞焦亡

**【中图分类号】**R334<sup>+.5</sup>

**【文献标志码】**A

## Effect of ATM/CHK2 regulation by miR-181a-5p on the senescence of human skin fibroblasts and its mechanism

He Wanyue, Guo Lei, Feng Weihua, Hu Zhiwei

(Department of Plastic and Burn Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effect of ataxia-telangiectasia mutated kinase(ATM)/checkpoint kinase 2 (CHK2) regulation by miR-181a-5p on the senescence of human skin fibroblasts and its mechanism. **Methods:** The target genes of miR-181a-5p were predicted using bioinformatic databases, and ATM was selected for further study. A human skin fibroblast senescence model was constructed. The cells were transfected with miR-181a-5p mimics, mimics negative control, miR-181a-5p inhibitor, or inhibitor negative control, yielding the experimental group (miR-181a-5p mimics), control group (mimics-NC), inhibitor group (miR-181a-5p inhibitor), and inhibitor control group(inhibitor-NC). Quantitative polymerase chain reaction was performed to assess mRNA expression levels of miR-181a-5p, ATM, and CHK2. Western blotting was performed to measure the protein levels of GSDMD, Caspase-1, NLRP3, DDB1, and p53. Enzyme-linked immunosorbent assay was employed to determine IL-18 and IL-1 $\beta$  concentrations in each group of cells. **Results:** Quantitative polymerase chain reaction showed that transfection with miR-181a-5p mimics significantly decreased the mRNA levels of intracellular DNA damage-related genes encoding ATM and CHK2 compared with the control group ( $P < 0.01$ ). Western blotting showed that compared with the control group, proteins associated with cellular senescence (DDB1, p53) and pyroptosis (NLRP3, GSDMD, Caspase-1) were significantly increased in the experimental group ( $P < 0.05$ ). Enzyme-linked immunosorbent assay showed that compared with the control group, the levels of pyroptosis-associated cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 were significantly increased in the experimental group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Inhibition of miR-181a-5p can promote the ATM/CHK2 signaling pathway, thereby suppressing cellular senescence and pyroptosis.

**【Key words】**fibroblast; miR-181a-5p; DNA damage response; cellular senescence; pyroptosis

作者介绍: 何宛玥, Email: wyh\_1425@126.com,

研究方向: 细胞抗衰老。

通信作者: 果 磊, Email: 841602937@qq.com。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20251023.1719.002>

(2025-10-24)

衰老是一个内在的、多层面的过程,是与复杂细胞过程相关的生物退化,包括干细胞衰竭、线粒体功能障碍、细胞衰老、端粒缩短和代谢失调等<sup>[1]</sup>。细胞衰老是一种细胞对生长因子的刺激没有反应而处于终末生长停滞的状态。当细胞遇到异常短的端粒、DNA 损伤、致癌基因激活、缺氧和氧化应激时,就会触发衰老程序<sup>[2]</sup>。近年来人们对衰老的机制提出了许多学说,如端粒学说、自由基学说、线粒体学说、神经内分泌免疫网络学说及细胞凋亡学说、衰老基因学说、DNA 损伤学说等理论<sup>[3]</sup>。

DNA 损伤反应(DNA damage reaction, DDR)是细胞受到 DNA 损伤而启动的分子通路,对基因组稳定性和生物存活至关重要<sup>[4]</sup>。DNA 损伤会导致各种突变并破坏翻译和转录。内源性和外源性因素均可诱导 DNA 损伤,例如核苷酸改变(替换、缺失和插入)、单链断裂和 DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSB)。共济失调毛细血管扩张突变激酶(ataxia-telangiectasia mutated kinase, ATM)是一种与衰老相关的 DNA 损伤传感器蛋白激酶,也是 DDR 信号的核心组成部分。ATM 在 Ser1981 处的自磷酸化增强了其激酶活性,导致受损部位周围核小体中的  $\gamma$ H2AX 磷酸化,并募集了更多的 ATM 和其他修复因子<sup>[5-6]</sup>。其他的 DDR 蛋白,包括 KRAB 相关蛋白 1(KAP1), p53 和 DNA 损伤检查点激酶 2(checkpoint kinase 2, CHK2), 会被 ATM 激酶磷酸化,从而促进 DNA 修复,细胞周期停滞、凋亡、衰老。CHK2 激酶广泛存在于哺乳动物中,可在 DSB 后参与 DNA 修复应答并作为重要的信号转导蛋白使细胞周期进程发生阻滞从而促进 DNA 修复或诱导细胞凋亡<sup>[7]</sup>。

ATM/CHK2 通路是细胞响应 DSB 的核心信号级联,在皮肤衰老进程中起关键调控作用。作为皮肤衰老主要环境诱因的紫外线辐射可诱导 DSB 生成,进而激活 ATM 激酶<sup>[8]</sup>。ATM/CHK2 的磷酸化可诱导 G1/S 细胞周期阻滞,还可促进自噬以维持氧化应激下的 ROS 稳态,从而影响细胞衰老<sup>[9]</sup>。该通路同时募集修复因子至损伤位点,启动相关修复途径。研究表明,衰老皮肤中 ATM/CHK2 通路活性降低与 DSB 修复效率下降显著相关。当 DNA 损伤累积时,CHK2 磷酸化稳定 p53 蛋白,上调 p21 表达,引发不可逆的细胞周期阻滞,最终诱导细胞衰老。衰老细胞通过分泌衰老相关分泌表型(包含促炎因子及基质金属蛋白酶等)破坏组织微环境,直接导致皮肤变薄、皱纹形成及弹性纤维降解等表型<sup>[10]</sup>。在应对内源性压力方面,ROS 积累可非 DSB 依赖性地激活 ATM/CHK2 通路,而端粒功能障碍亦可被识别为 DSB 激活该通路,共同促进复制性衰老<sup>[11-12]</sup>。自

然衰老及光老化皮肤中普遍存在 ATM/CHK2 通路功能衰减,导致:①DSB 修复能力减弱;②细胞周期检查点失活;③衰老细胞清除障碍。这些改变造成基因组不稳定性增加及衰老细胞负荷升高,形成加速皮肤老化的正反馈循环<sup>[10]</sup>。因此,靶向增强 ATM/CHK2 介导的 DNA 损伤应答(如修复功能激活)成为潜在抗衰老策略。

MicroRNAs (miRNAs) 是一类长度约为 22 个核苷酸的 ncRNA 分子。miRNA 参与影响多种基因的表达,可以调控胚胎发育、细胞增殖、分化和凋亡、细胞骨架的再生等多种生理过程<sup>[13]</sup>。与其他 miRNA 类似,miRNA-181a(miR-181a-5p)在许多细胞过程中起着关键作用:如决定细胞寿命和细胞侵袭<sup>[14]</sup>。目前已发现 miR-181a-5p 能够抑制平滑肌细胞的衰老、与海马记忆形成有关并参与阿尔茨海默病的发展、改善衰老骨骼肌细胞中的线粒体质量、促进宫颈癌细胞的凋亡和衰老等<sup>[15-18]</sup>。Gerasymchuk M 等<sup>[19]</sup>发现 miR-181a-5p 在复制性衰老的角质形成细胞和内皮细胞中表达上调。Mancini M 等<sup>[20]</sup>证实 miR-181a-5p 参与了人皮肤成纤维(human skin fibroblasts, HSF)细胞衰老,且 miR-181a-5p 过表达可以诱导 HSF 细胞的衰老。但 miR-181a-5p 在衰老细胞中的调控作用尚不清楚。Zhang XY 等<sup>[21]</sup>证明 ATM 是 miR-181a-5p 的直接靶点,模拟转染的 miR-181a-5p 会下调 ATM 在 mRNA 和蛋白质水平上的表达。此外,与阴性对照组和空白组相比,转染 miR-181a-5p 抑制剂能够抑制增殖、侵袭和迁移,同时促进胃癌腺细胞(SGC7901 细胞)凋亡。这些数据共同表明 miR-181a-5p 的过度表达促进了胃癌细胞的增殖,同时通过直接靶向 ATM 基因抑制胃癌细胞的凋亡。本实验拟用 D-半乳糖(D-galactose, D-gal)诱导的正常 HSF 细胞为衰老模型,探讨 miR-181a-5p 是否能够通过调控 ATM/CHK2 影响 HSF 细胞的衰老。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验细胞 HSF 细胞购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

1.1.2 主要试剂与仪器 D-半乳糖(D-galactose, D-gal)购自美国 Sigma 公司;DMEM 高糖培养基由美国康宁 CellGro 公司提供;FBS Premium 优等胎牛血清采购于德国 PAN 公司;转染所用 miRNA mimics 序列由上海吉玛制药公司设计并合成。RNAiso Plus 试剂盒、反转录试剂及荧光实时定量 PCR 反应体系相关试剂均购自日本 TaKaRa 公司;PCR 引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成;GSDMD、Caspase-1、NLRP3、DDB1、P53 等抗体以及 IL-18、IL-1 $\beta$  的 ELISA 检测

试剂盒均购自 Proteintech 公司;  $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -Gal) 细胞化学染色试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测试盒(增强型)、RIPA 裂解液、PMSF 均为江苏碧云天生物公司产品; Cell Counting Kit-8(CCK-8)细胞增殖与细胞毒性检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; PCR 扩增仪和荧光定量 PCR 仪均为美国 BioRad 公司仪器。

## 1.2 方法

1.2.1 预测靶向基因 TargetScan 数据库(targetscan.org/vert\_80/)、miRDB 数据库(mirdb.org/)、mirDIP 数据库(ophid.utoronto.ca/mirDIP/)进行生物信息学分析后预测 miR-181a-5p 的靶向基因, 并取交集。查阅文献确定细胞衰老相关基因 ATM 作为研究对象。

1.2.2 在线验证结合位点 TargetScan(targetscan.org/vert\_80/)在线进行生物信息学分析验证 miR-181a-5p 与 ATM 的靶向结合位点。

1.2.3 细胞培养与衰老模型建立及验证 HSF 细胞培养在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中, 使用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基进行孵育, 每 2~3 d 更换一次培养液。待细胞融合度达到 70%~80% 时进行传代操作。当传代细胞融合度达到 50% 时, 采用 10 g/L 的 D-gal 对 HSF 细胞处理 72 h, 以构建细胞衰老模型。

1.2.3.1 细胞分组 将细胞分为对照组、衰老模型组。对照组为使用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养的 HSF 细胞, 衰老模型组为采用 10g/L 的 D-gal 对 HSF 细胞处理 72 h 后的细胞。

1.2.3.2 CCK-8 法检测细胞存活率 取对数生长期的细胞 200  $\mu$ L, 按 1 000 个/孔的密度接种至 96 孔培养板。使用 10 g/L 的 D-半乳糖溶液诱导细胞 72 h, 以构建细胞衰老模型。对照组各孔加入 200  $\mu$ L 培养基, 每组设 5 个复孔。诱导结束后更换培养基, 每孔加入 200  $\mu$ L 培养基与 20  $\mu$ L CCK-8 试剂的混合液, 于 37 °C 孵育 1 h。随后利用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度(absorbance, A 值), 通过计算细胞存活率验证衰老模型的构建效果。实验独立重复 3 次。

1.2.3.3 衰老特异性  $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -Gal) 染色 选取细胞融合度达 80% 的对数生长期细胞, 采用移液器以 2 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/孔的精确密度接种至 6 孔细胞培养板中, 每组设置 1 个独立孔位。参照前期建立的细胞分组方案完成处理后, 开展 SA- $\beta$ -Gal 细胞化学染色实验。具体操作严格遵循试剂盒说明书流程: 将样本置于 37 °C 无 CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中孵育 12 h(过夜)。次日使用普通光学显微镜观察细胞染色状态, 每孔随机选取 5 个具有代表性的视野, 通过计数软件对蓝染细胞进行自动计数, 计算阳性细胞占比并求取各组平均值。该实验独立重复 3 次。

1.2.4 miR-181a-5p 和 ATM/CHK2 在人皮肤成纤维细胞衰老模型中表达情况及其对细胞衰老与凋亡的影响

1.2.4.1 细胞分组与转染 实验将细胞分为模拟物组(miR-181a-5p mimic)、抑制剂组(miR-181a-5p inhibitor)、模拟物对照组(miR-181a-5p mimic-NC)及抑制剂对照组(miR-181a-5p inhibitor-NC)共 4 组。当模拟物组在细胞融合度达 50% 时, 先以 10 g/L D-gal 诱导 72 h, 随后转染 miR-181a-5p 模拟物(miR-181a-5p mimic); 抑制剂组在细胞融合度达到 50% 时, 经 10 g/L D-gal 诱导 72 h 后, 转染 miR-181a-5p 抑制

剂(miR-181a-5p inhibitor); 模拟物对照组在细胞融合度达 50% 时, 先用 10 g/L D-gal 诱导 72 h, 再转染模拟物对照序列(miR-181a-5p mimic-NC); 抑制剂对照组则在细胞融合度达到 50% 后, 经 10 g/L D-gal 诱导 72 h, 继而转染抑制剂对照序列(miR-181a-5p inhibitor-NC)。

1.2.4.2 聚合酶链式反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 miR-181a-5p、ATM、CHK2、mRNA 的表达 将各实验组细胞接种至 6 孔细胞培养板中, 接种操作及处理流程参照 1.2.3.3 节所述。采用 Trizol 试剂进行总 RNA 的提取, 依照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书的标准流程合成 cDNA, 并开展后续的扩增反应。实验以 GAPDH 作为内参基因, 对 miR-181a-5p、ATM、CHK2 mRNA 的表达水平及端粒长度进行检测分析。具体反应体系设定为 10  $\mu$ L, 其组成如下: TB Green 荧光染料 5  $\mu$ L、DEPC 处理水 3.2  $\mu$ L、正反向引物各 0.4  $\mu$ L、cDNA 模板 1  $\mu$ L。每个样本均设置 3 个技术重复孔。PCR 扩增程序如下: 首先在 95 °C 条件下进行 30 s 的预变性处理; 随后进入 40 个循环的扩增阶段, 每个循环包括 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 30 s 的操作步骤。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 相对定量法对 miR-181a-5p、ATM 和 CHK2 基因的 mRNA 相对表达量进行计算分析。实验所用的特异性引物序列详见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
miR-181a-5p(正向)	ACACTCCAGCTGGGAACATTCAACGCTGTGC
miR-181a-5p(反向)	GGTGTCTGGAGTCGGCAATTTCAGTTGAG
GADPH(正向)	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
GADPH(反向)	GAAGATGGTGATGGGATTTC
ATM(正向)	CAGCAACAGTGGTTAGAAT
ATM(反向)	CTGAATAGCCTTGAAAA
CHK2(正向)	CGGGAGTCCGATGTTGAG
CHK2(反向)	GTTTGGCATCGTGCTGCT

1.2.4.3 蛋白质印迹(Western blot, WB)检测 DDB1、p53、NLRP3、GSDMD、Caspase 1 蛋白的表达 各实验组细胞经冰浴处理后, 采用含 PMSF(1 mmol/L) 和蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液进行总蛋白提取。具体操作如下: 每孔加入 100  $\mu$ L 裂解液, 冰上裂解 30 min 并辅以超声破碎, 离心后收集上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定裂解液蛋白浓度, 将样本与 BCA 工作液按 1:10 比例混合, 37 °C 孵育 30 min 后, 在酶标仪 562 nm 波长处读取 A 值, 随后进行凝胶电泳、将蛋白转移至 PVDF 膜。经封闭液室温封闭 1.5 h 后, 将膜置于含一抗的封闭液中, 于 4 °C 恒温摇床(转速 80 r/min) 孵育过夜。一抗包含: GAPDH(1:3 000)、p53(1:1 000)、Caspase-1(1:500)、NLRP3(1:500)、DDB1(1:500) 及 GSDMD(1:500)。次日用 TBST 缓冲液洗涤 3 次后, 加入二抗(1:8 000), 室温摇床孵育 1 h。经 TBST 洗涤 5 次后, 使用 ECL 化学发光试剂显影, 通过成像系统获取条带图像, 采用 Image J 软件对灰度值进行定量分析, 以 GAPDH 为内参计算目标蛋白的相对表达量。

1.2.4.4 酶联免疫吸附测定法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 IL-18 和 IL-1 $\beta$  浓度 收集各组培养上清液, 300  $\times$  g 离心 10 min, 取上清作为待检测样本。按照

IL-18、IL-1 $\beta$  ELISA 检测试剂盒说明进行操作,最后测量 A450 值,评估上清中 IL-18、IL-1 $\beta$  的浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,使用 GraphPad Prism 9.5.0 软件绘制统计学图表。每项检测独立重复 3 次,结果取均值进行分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,对符合正态分布且方差齐性 (Levene 检验  $P > 0.05$ ) 的多组间数据,采用单因素方差分析进行整体比较;组间两两比较采用 LSD 法 (Least Significant Difference test)。统计分析采用双侧检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 ATM 是 miR-181a-5p 的靶向基因

结果显示,在 3 个数据库的交集基因中查阅文献确定细胞衰老相关基因 ATM 作为研究对象 (图 1)。

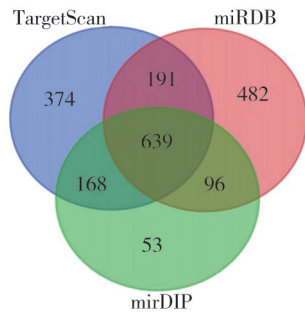


图 1 TargetScan 数据库、miRDB 数据库、mirDIP 数据库的交集基因维恩图

2.2 miR-181a-5p 与 ATM 之间存在靶向结合位点

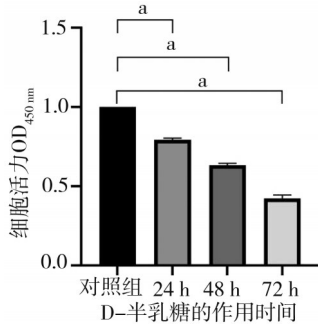
TargetScan 网站进行在线生物信息学分析,显示 ATM 与 miR-181a-5p 之间存在靶向结合位点 (图 2)。

Position 3525-3532 of ATM 3' UTR	5'...ACAUUUUAGUACUAUUGAAUGUA...
hsa-miR-181a-5p	3' UGACUGGCUGUCGCAACUACAA

图 2 miR-181a-5p 与 ATM 的结合位点分析图

2.3 CCK-8 法测定细胞活力

结果显示,各组间细胞活力 ( $F = 42.42, P < 0.001$ ) 的比较差异均具有统计学意义。与对照组相比,实验组在不同时间 (24、48、72 h) 细胞活力 ( $0.79 \pm 0.02, 0.63 \pm 0.02, 0.42 \pm 0.04$ ) 均显著降低 ( $LSD-t = 19.020, P < 0.001, LSD-t = 33.450, P < 0.001, LSD-t = 26.120, P < 0.001$ ) (图 3)。



注:a,  $P < 0.01$

图 3 不同作用时间的 D-gal 对 HSF 活力的影响

2.4 SA- $\beta$ -Gal 染色验证人皮肤成纤维衰老细胞模型的建立

染色结果显示,与对照组 ( $0.29 \pm 0.02$ ) 相比,诱导 72 h 模型组 ( $0.77 \pm 0.03$ ) SA- $\beta$ -Gal 染色阳性比例明显升高 ( $LSD-t = 23.880, P < 0.001$ ),由此可验证人皮肤成纤维衰老模型建立成功。后续使用 10 g/L D-gal 诱导 HSF 72 h 以建立人皮肤成纤维衰老细胞模型 (图 4、图 5)。

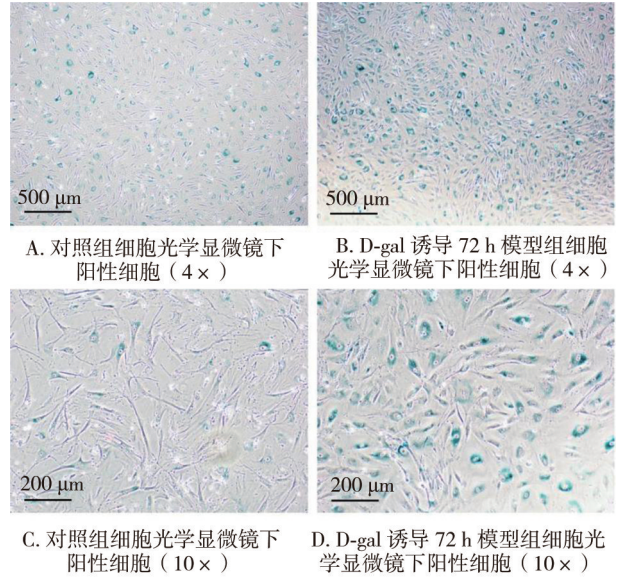
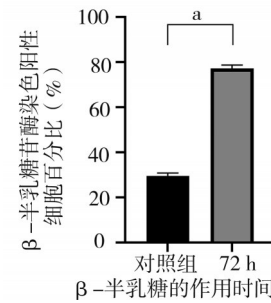


图 4 SA- $\beta$ -Gal 染色验证衰老细胞模型建立



注:a,  $P < 0.01$

图 5 各组  $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞染色率

2.5 转染 miR-181a-5p mimics 和 inhibitor 的效率检测

用 miR-181a-5p mimics 和 inhibitor 分别转染衰老 HSF 模型,48 h 后 qPCR 测各组细胞转染效率。结果显示,4 组间 miR-181a-5p 的表达量 ( $F = 49.52, P < 0.001$ ) 的比较差异均具有统计学意义。进一步两两比较结果显示:与模拟物对照组相比,转染 miR-181a-5p mimics 可以显著提高细胞内 miR-181a-5p 的表达量 ( $LSD-t = 12.210, P < 0.001$ );与模拟物组、抑制剂对照组相比,转染 miR-181a-5p inhibitor 可以显著降低细胞内 miR-181a-5p 的表达量 ( $LSD-t = 15.000, P < 0.001, LSD-t = 7.188, P = 0.002$ ) (表 2, 图 6)。

2.6 miR-181a-5p 抑制 ATM、CHK2 的表达

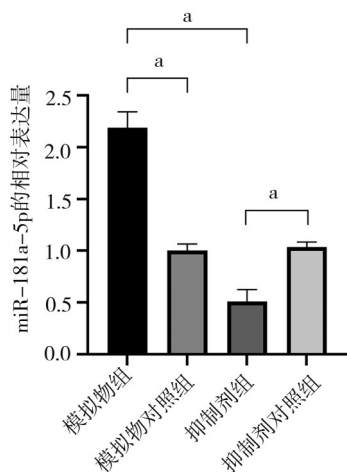
结果显示,4 组间 ATM 的 mRNA 相对表达量 ( $F = 148.76, P < 0.001$ )、CHK2 的 mRNA 相对表达量 ( $F = 321.45, P < 0.001$ ) 的比较差异均具有统计学意义。进一步两两比较显示:与模

拟物对照组, 转染 miR-181a-5p mimics 可以显著降低细胞内 DNA 损伤相关基因 ATM 和 CHK2 的 mRNA 水平 ( $LSD-t=8.74, P<0.001, LSD-t=16.880, P<0.001$ ) (表 3, 图 7); 与模拟物组、抑制剂对照组相比, 转染 miR-181a-5p inhibitor 可以显著提高 ATM 和 CHK2 的 mRNA 水平 ( $LSD-t=15.500, P<0.001, LSD-t=11.960, P<0.001, LSD-t=14.090, P<0.001, LSD-t=9.277, P<0.001$ ) (表 3, 图 7)。

表 2 各组 miR-181a-5p mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	miR-181a-5p
模拟物组	2.19 ± 0.15 <sup>a</sup>
模拟物对照组	1.00 ± 0.07
抑制剂组	0.51 ± 0.12 <sup>bc</sup>
抑制剂对照组	1.00 ± 0.04
F 值	49.52
P 值	<0.001

注: a, 与模拟物对照组相比,  $P<0.01$ ; b, 与抑制剂对照组相比,  $P<0.01$ ; c, 与模拟物组相比,  $P<0.01$



注: a,  $P<0.01$

图 6 miR-181a-5P 与 inhibitor 的转染效率

表 3 各组 ATM、CHK2 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

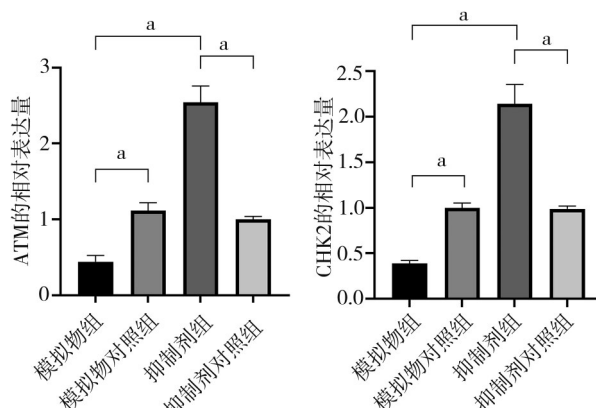
组别	ATM	CHK2
模拟物组	0.44 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.03 <sup>a</sup>
模拟物对照组	1.11 ± 0.10	1.00 ± 0.05
抑制剂组	2.54 ± 0.22 <sup>bc</sup>	2.14 ± 0.21 <sup>bc</sup>
抑制剂对照组	1.00 ± 0.04	0.99 ± 0.03
F 值	148.76	321.45
P 值	<0.001	<0.001

注: a, 与模拟物对照组相比,  $P<0.01$ ; b, 与抑制剂对照组相比,  $P<0.01$ ; c, 与模拟物组相比,  $P<0.01$

表 4 各组 DDB1、p53、NLRP3、GSDMD、Caspase 1 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	DDB1	p53	NLRP3	GSDMD	Caspase 1
模拟物组	2.38 ± 0.77 <sup>a</sup>	1.90 ± 0.43 <sup>a</sup>	3.13 ± 0.62 <sup>a</sup>	3.05 ± 0.95 <sup>a</sup>	2.02 ± 0.53 <sup>a</sup>
模拟物对照组	1.00 ± 0.24	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.14
抑制剂组	0.44 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.60 ± 0.13 <sup>bc</sup>	0.53 ± 0.19 <sup>bc</sup>	0.42 ± 0.14 <sup>bc</sup>	0.52 ± 0.19 <sup>bc</sup>
抑制剂对照组	1.00 ± 0.27	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.31	1.00 ± 0.05

注: a, 与模拟物对照组相比,  $P<0.05$ ; b, 与抑制剂对照组相比,  $P<0.05$ ; c, 与模拟物组相比,  $P<0.05$



A. 转染 miR-181a-5p mimics 和 inhibitor 后 ATM 的 mRNA 相对表达量

B. 转染 miR-181a-5p mimics 和 inhibitor 后 CHK2 的 mRNA 相对表达量

注: a,  $P<0.01$

图 7 miR-181a-5p 抑制 ATM、CHK2 的表达

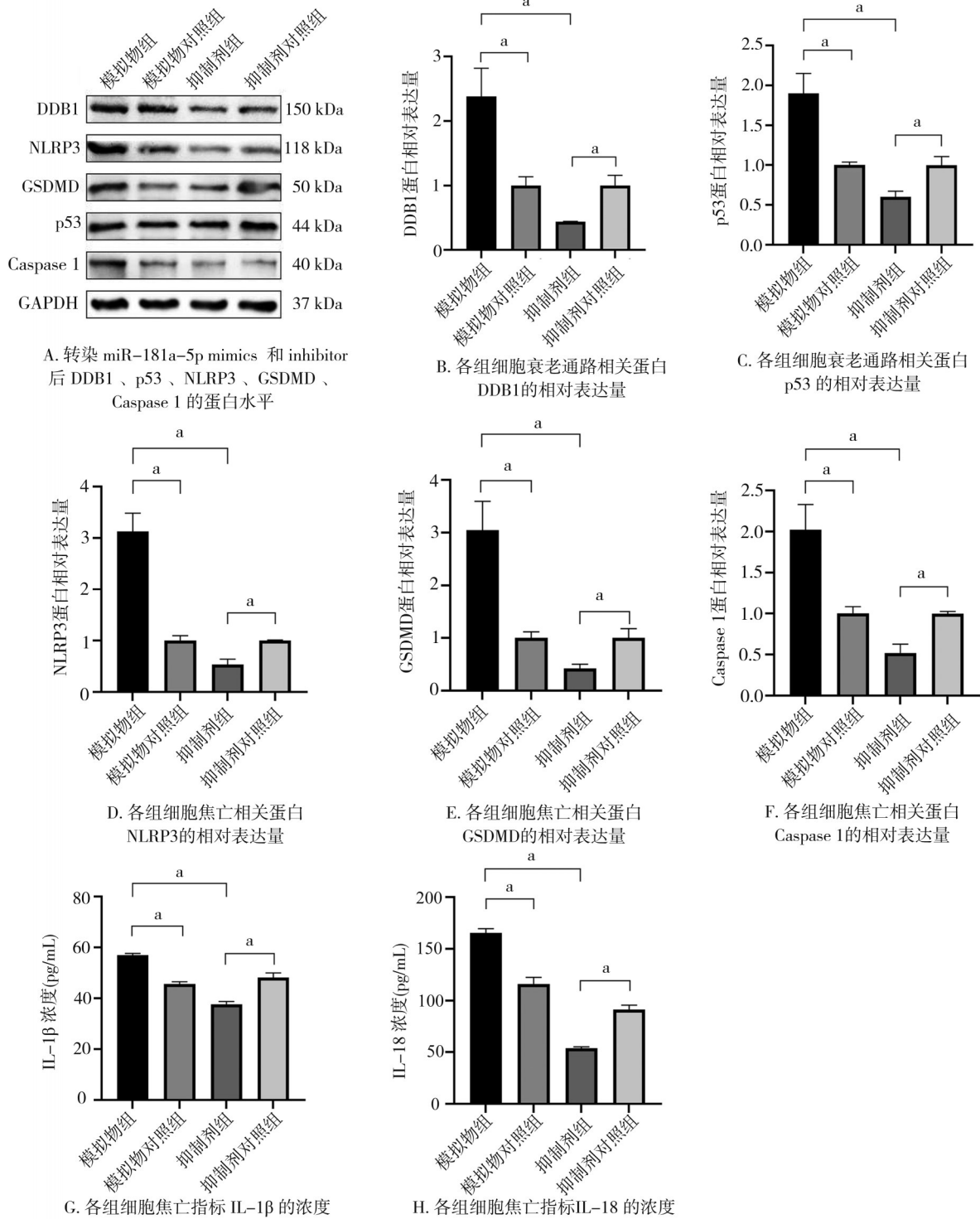
### 2.7 miR-181a-5p 对 HSF 细胞衰老及细胞凋亡的影响

Western blot 结果显示, 4 组间 DDB1 的蛋白相对表达量 ( $F=10.20, P=0.003$ )、p53 的蛋白相对表达量 ( $F=8.90, P=0.005$ )、NLRP3 的蛋白相对表达量 ( $F=33.6, P<0.001$ )、GSDMD 的蛋白相对表达量 ( $F=12.80, P=0.001$ )、Caspase 1 的蛋白相对表达量 ( $F=9.50, P=0.004$ ) 的比较差异均具有统计学意义。进一步两两比较显示: 与模拟物对照组相比, 模拟物组细胞衰老通路相关基因 DDB1、p53, 细胞凋亡相关基因 NLRP3、GSDMD、Caspase 1 蛋白水平明显上升 ( $LSD-t=2.977, P=0.041, LSD-t=3.558, P=0.024, LSD-t=5.764, P=0.005, LSD-t=3.650, P=0.022, LSD-t=3.194, P=0.033$ ); 与模拟物组、抑制剂对照组相比, 抑制剂组细胞衰老通路相关基因 DDB1、p53, 细胞凋亡相关基因 NLRP3、GSDMD、Caspase 1 蛋白水平明显下降 ( $LSD-t=4.385, P=0.012, LSD-t=3.538, P=0.024, LSD-t=4.986, P=0.008, LSD-t=3.056, P=0.038, LSD-t=6.978, P=0.002, LSD-t=4.272, P=0.013, LSD-t=4.737, LSD-t=4.272, P=0.009, LSD-t=2.957, P=0.042, LSD-t=2.957, LSD-t=4.587, P=0.010, LSD-t=4.256, P=0.013$ ) (表 4, 图 8A-F)。ELISA 法检测结果显示, 与模拟物对照组相比, 模拟物组细胞凋亡相关指标 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平显著上升 ( $LSD-t=10.520, P=0.001, LSD-t=6.461, P=0.003$ ); 与模拟物组、抑制剂对照组相比, 抑制剂组细胞凋亡相关指标 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平显著下降 ( $LSD-t=16.020, P<0.001, LSD-t=4.827, P=0.008, LSD-t=25.100, P<0.001, LSD-t=8.368, P=0.001$ ) (表 5, 图 8G-H)。

表 5 各组细胞焦亡指标 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的浓度 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	IL-1 $\beta$	IL-18
模拟物组	57.05 $\pm$ 1.09 <sup>a</sup>	165.20 $\pm$ 7.34 <sup>a</sup>
模拟物对照组	45.67 $\pm$ 1.52	116.03 $\pm$ 10.95
抑制剂组	37.72 $\pm$ 1.78 <sup>bc</sup>	53.88 $\pm$ 2.27 <sup>bc</sup>
抑制剂对照组	48.15 $\pm$ 3.29	91.30 $\pm$ 7.40

注:a,与模拟物对照组相比, $P<0.05$ ;b,与抑制剂对照组相比, $P<0.05$ ;c,与模拟物组相比, $P<0.05$



注:a, $P<0.05$

图 8 miR-181a-5p 促进 HSF 细胞衰老及细胞焦亡

### 3 讨论

皮肤作为人体与外界自然环境直接接触的器官,是人体与外界环境的第一道屏障,它肩负着多项重要生理功能,包括排泄代谢废物、分泌皮脂等物质、形成保护屏障抵御外界侵害、感知外界的各种刺激以及调节机体体温平衡<sup>[22]</sup>等。皮肤老化是一个复杂的现象,涉及2个同时发生的过程:内在老化和外在老化。内在老化由基因决定,又称为自然老化;外在老化受环境因素影响,包括紫外线照射、化学物质、营养和生活方式,又称为光老化<sup>[23]</sup>。光老化的特征有活性氧过量产生、DNA损伤、端粒缩短、激素变化<sup>[24]</sup>、基因组缺乏稳定、自噬途径受损、表观遗传学的改变、线粒体突变、增殖减少、细胞衰老、高炎症状态和干细胞耗尽<sup>[25]</sup>。DNA损伤反应是细胞响应DNA损伤而启动的分子通路,对基因组稳定性和生物存活至关重要<sup>[26]</sup>。DNA损伤会导致各种突变并破坏翻译和转录。内源性和外源性因素均可诱导DNA损伤,例如核苷酸改变(替换、缺失和插入)、核苷酸单链断裂和双链断裂。ATM激酶因在共济失调毛细血管扩张症中发挥的致病性作用而广为人知,这是一种罕见的常染色体隐性遗传病,主要表现为进行性神经退化、免疫功能缺陷、癌症易感性增加、对辐射敏感以及皮肤提前老化等特征<sup>[27-29]</sup>。研究表明,ATM/CHK2的磷酸化可诱导G1/S细胞周期阻滞,还可促进自噬以维持氧化应激下的活性氧稳态,从而影响细胞衰老<sup>[30-31]</sup>。

细胞焦亡又可以称为细胞炎性坏死,是一种细胞程序性坏死(由GSDMD介导)。这种情况体现为细胞持续增大,最终造成细胞膜破裂、细胞内物质外泄,由此引发剧烈的炎症反应<sup>[32]</sup>。细胞焦亡是机体内一种关键的天然免疫反应,能积极地对抗感染。在细胞焦亡的发生机制中,NLRP3/caspase-1通路借助炎症小体识别危险信号,进而招募并激活caspase-1。被激活的caspase-1会对IL-18、IL-1 $\beta$ 等炎症因子进行切割以使其活化,同时还能切割GSDMD的N端序列,促使其与细胞膜结合并形成膜孔,最终引发细胞焦亡<sup>[33]</sup>。

诸多研究表明,miRNAs可以调控皮肤成纤维细胞的增殖和衰老。例如,miR-4535能够靶向调节Smad4,从而影响TGF- $\beta$ /Smad介导的信号通路。而高良姜素可以通过此机制缓解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UVB诱导的HDF胶原蛋白降解,从而延缓皮肤细胞衰老,这也

给皮肤的抗衰老提供了新思路<sup>[34]</sup>。目前已发现miR-181a能够抑制平滑肌细胞的衰老、与海马记忆形成有关并参与阿尔茨海默病的发展、改善衰老骨骼肌细胞中的线粒体质量、促进宫颈癌细胞的凋亡和衰老等<sup>[35-38]</sup>。

本研究结果表明,衰老人皮肤成纤维细胞中miR-181a-5p的表达受到干预以后,DNA损伤相关的ATM/CHK2通路中关键基因的表达也随其浓度的变化而发生变化。过表达miR-181a-5p时可抑制ATM和其下游底物CHK2的表达,从而通过阻断ATM/CHK2轴来增加通路相关衰老分子DDB1、p53,细胞焦亡相关分子GSDMD、NLRP3、Caspase 1的表达,从而促进细胞衰老与焦亡。miR-181a-5p通过直接靶向结合ATM基因的3'-UTR抑制其翻译,进而降低下游CHK2激酶的磷酸化水平,导致DNA损伤修复能力显著削弱。ATM/CHK2信号通路受阻引发基因组不稳定性累积,使细胞丧失周期阻滞修复能力,进而激活NLRP3炎症小体及caspase-1。该过程同时解除CHK2对焦亡执行蛋白GSDMD的间接调控,并通过促进p53等下游因子促进促炎因子IL-1 $\beta$ /IL-18释放,最终协同放大细胞焦亡信号。其通过靶向抑制ATM/CHK2通路,解除对p53的负调控(如MDM2介导的降解)并加剧代偿性应激,导致p53蛋白显著积累。p53进一步通过转录激活、泛素化保护及DNA损伤信号放大,驱动DDB1表达上调并促进p53-DDB1复合体形成。

综上所述,由此推测miR-181a-5p可以促进人皮肤成纤维细胞的衰老,其模拟物或抑制剂将有可能用于调节皮肤细胞衰老信号通路、干预细胞衰老过程,为皮肤老化及相关疾病的发生和治疗提供新的视角。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 何宛玥:实施研究、分析数据、论文撰写;冯伟华:文献查阅、图表制作;胡志威:数据收集与整理、辅助实验研究;果磊:实验设计、论文修改与定稿

### 参 考 文 献

- [1] Degirmenci U, Lei S. Role of lncRNAs in cellular aging[J]. Front Endocrinol, 2016, 7: 151.
- [2] Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, et al. The essence of senescence[J]. Genes Dev, 2010, 24(22): 2463-2479.
- [3] Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(2): 75-95.
- [4] Ou H-L, Schumacher B. DNA damage responses and p53 in the

- aging process[J]. *Blood*, 2018, 131(5):488–495.
- [5] Chen S, Zhou Q, Guo ZC, et al. Inhibition of MELK produces potential anti-tumour effects in bladder cancer by inducing G1/S cell cycle arrest *via* the ATM/CHK2/p53 pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(2):1804–1821.
- [6] Guo QQ, Wang SS, Zhang SS, et al. ATM-CHK2-Beclin 1 axis promotes autophagy to maintain ROS homeostasis under oxidative stress[J]. *EMBO J*, 2020, 39(10):e103111.
- [7] Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond[J]. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(6):442–457.
- [8] 豆晓阳, 玄鸿文, 穆永林, 等. 衰老过程中的表观遗传调控[J]. *生命科学*, 2017, 29(10):1052–1065.
- Dou XY, Xuan HW, Mu YL, et al. Epigenetic regulation in aging[J]. *Chin Sci Life Sci*, 2017, 29(10):1052–1065.
- [9] Sławińska N, Krupa R. Molecular aspects of senescence and organismal ageing—DNA damage response, telomeres, inflammation and chromatin[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2):590.
- [10] Wang AS, Dreesen O. Biomarkers of cellular senescence and skin aging[J]. *Front Genet*, 2018, 9:247.
- [11] Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, et al. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence[J]. *PLoS Biol*, 2007, 5(5):e110.
- [12] Victorelli S, Passos JF. Telomeres and cell senescence – size matters not[J]. *EBioMedicine*, 2017, 21:14–20.
- [13] Dolati S, Shakouri SK, Dolatkhan N, et al. The role of exosomal non-coding RNAs in aging-related diseases[J]. *Biofactors*, 2021, 47(3):292–310.
- [14] Neel JC, Lebrun JJ. Activin and TGF $\beta$  regulate expression of the microRNA-181 family to promote cell migration and invasion in breast cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(7):1556–1566.
- [15] Tan P, Guo YH, Zhan JK, et al. LncRNA-ANRIL inhibits cell senescence of vascular smooth muscle cells by regulating miR-181a/Sirt1[J]. *Biochem Cell Biol*, 2019, 97(5):571–580.
- [16] Rodriguez-Ortiz CJ, Prieto GA, Martini AC, et al. miR-181a negatively modulates synaptic plasticity in hippocampal cultures and its inhibition rescues memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3):e13118.
- [17] Goljanek-Whysall K, Soriano-Arroquia A, McCormick R, et al. miR-181a regulates p62/SQSTM1, parkin, and protein DJ-1 promoting mitochondrial dynamics in skeletal muscle aging[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(4):e13140.
- [18] Zhu LH, Zhang QH, Li SP, et al. Interference of the long noncoding RNA CDKN2B-AS1 upregulates miR-181a-5p/TGF $\beta$ I axis to restrain the metastasis and promote apoptosis and senescence of cervical cancer cells[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(4):1721–1730.
- [19] Gerasymchuk M, Cherkasova V, Kovalchuk OV, et al. The role of microRNAs in organismal and skin aging[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15):5281.
- [20] Mancini M, Saintigny G, Mahé C, et al. MicroRNA-152 and-181a participate in human dermal fibroblasts senescence acting on cell adhesion and remodeling of the extra-cellular matrix[J]. *Aging*, 2012, 4(11):843–853.
- [21] Zhang XY, Nie YQ, Li XR, et al. MicroRNA-181a functions as an oncomir in gastric cancer by targeting the tumour suppressor gene *ATM*[J]. *Pathol Oncol Res*, 2014, 20(2):381–389.
- [22] Rittié L, Fisher GJ. Natural and Sun-induced aging of human skin[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, 5(1):a015370.
- [23] Krutmann J, Bouloc A, Sore G, et al. The skin aging exposome[J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 85(3):152–161.
- [24] Lee AY. Skin pigmentation abnormalities and their possible relationship with skin aging[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7):3727.
- [25] Pyo JS, Kim NY, Son BK, et al. Clinicopathological features and prognostic implication of gastric carcinoma with lymphoid stroma[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2020, 2020:6628412.
- [26] Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(4):197–210.
- [27] Angèle S, Romestaing P, Moullan N, et al. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(24):8717–8725.
- [28] McKinnon PJ. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep*. 2004, 5(8):772–776.
- [29] McKinnon PJ. ATM and the molecular pathogenesis of *Ataxia telangiectasia*[J]. *Annu Rev Pathol*, 2012, 7:303–321.
- [30] Chen S, Zhou Q, Guo ZC, et al. Inhibition of MELK produces potential anti-tumour effects in bladder cancer by inducing G<sub>1</sub>/S cell cycle arrest *via* the ATM/CHK2/p53 pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(2):1804–1821.
- [31] Guo QQ, Wang SS, Zhang SS, et al. ATM-CHK2-Beclin 1 axis promotes autophagy to maintain ROS homeostasis under oxidative stress[J]. *EMBO J*, 2020, 39(10):e103111.
- [32] Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1):99–114.
- [33] Yu P, Zhang X, Liu N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):128.
- [34] Lee JJ, Ng SC, Ni YT, et al. Protective effects of galangin against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UVB-induced dermal fibroblast collagen degradation *via* hsa-microRNA-4535-mediated TGF $\beta$ /Smad signaling[J]. *Aging*, 2021, 13(23):25342–25364.
- [35] Tan P, Guo YH, Zhan JK, et al. LncRNA-ANRIL inhibits cell senescence of vascular smooth muscle cells by regulating miR-181a/Sirt1[J]. *Biochem Cell Biol*, 2019, 97(5):571–580.
- [36] Rodriguez-Ortiz CJ, Prieto GA, Martini AC, et al. miR-181a negatively modulates synaptic plasticity in hippocampal cultures and its inhibition rescues memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3):e13118.
- [37] Goljanek-Whysall K, Soriano-Arroquia A, McCormick R, et al. miR-181a regulates p62/SQSTM1, parkin, and protein DJ-1 promoting mitochondrial dynamics in skeletal muscle aging[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(4):e13140.
- [38] Zhu LH, Zhang QH, Li SP, et al. Interference of the long noncoding RNA CDKN2B-AS1 upregulates miR-181a-5p/TGF $\beta$ I axis to restrain the metastasis and promote apoptosis and senescence of cervical cancer cells[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(4):1721–1730.

(收稿:2025-07-06;修回:2025-09-10;录用:2025-09-12)

(责任编辑:李青颖)

本文引用格式:

何宛玥, 果磊, 冯伟华, 等. miR-181a-5p 调控 ATM/CHK2 对人皮肤成纤维细胞衰老的影响及机制研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2026, 51(2):241–248.