

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.04.002

❖ 基础研究 ❖

# MicroRNA-7-5p 通过 mTORC2/SGK-1 信号通路负向调控人肺泡上皮细胞钠离子通道

秦克, 李同林, 宫帅, 江美芳

(三六三医院呼吸与危重症医学科, 四川 成都 610000)

**【摘要】目的:** 探讨 microRNA-7-5p 通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 2 (mTORC2)/血清糖皮质激素诱导激酶-1 (SGK-1) 信号通路负向调控人肺泡上皮细胞钠离子通道 (ENaC) 的机制。**方法:** 对人类非小细胞肺癌肺泡上皮细胞系 A549 细胞转染 microRNA-7-5p 模拟剂, 设为 microRNA-7-5p 组, 阴性对照组 A549 细胞转染与目的基因序列无同源性的不表达 microRNA-7-5p 的阴性对照剂。雷帕霉素组在 A549 细胞培养基中加入雷帕霉素。PP242 组在 A549 细胞培养基中加入 PP242。空白对照组仅加入 lipo fectamine<sup>TM</sup> 2000 试剂。采用 RT-qPCR 检测各组 SGK-1 mRNA; 免疫印迹法检测 SGK-1 蛋白、ENaC 蛋白的表达量。比较各组的 microRNA-7-5p 表达水平、SGK-1 mRNA 及蛋白表达量、ENaC 蛋白表达量。**结果:** microRNA-7-5p 组的 microRNA-7-5p 表达水平高于空白对照组、阴性对照组、雷帕霉素组和 PP242 组, A549 细胞转染成功上调 microRNA-7-5p 表达水平 ( $P < 0.05$ )。microRNA-7-5p 组中, SGK-1 mRNA 水平、SGK-1 及 ENaC- $\alpha$ 、ENaC- $\beta$ 、ENaC- $\gamma$  蛋白表达量均低于空白对照组、阴性对照组、雷帕霉素组 ( $P < 0.05$ )。**结论:** microRNA-7-5p 可能通过 mTORC2/SGK-1 信号通路负向调控 ENaC。

**【关键词】** microRNA-7-5p; 上皮细胞钠离子通道; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 2; 血清糖皮质激素诱导激酶-1

**【中图分类号】** R563 **【文献标志码】** A

## MicroRNA-7-5p negatively regulate ENaC by mTORC2/SGK-1 signaling pathways

QIN Ke, LI Tong-lin, GONG Shuai, JIANG Mei-fang

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, 363 Hospital, Chengdu 610000, Sichuan, China)

**【Abstract】Objective:** To explore the mechanism of microRNA-7-5p negatively regulate epithelial sodium channel (ENaC) by human alveolar cells by mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2)/serum glucocorticoid-regulated kinase-1 (SGK-1) signaling pathways. **Methods:** Human alveolar epithelial cell lines (A549 cells) in non-small cell lung cancer were transfected with microRNA-7-5p mimics, which was set as microRNA-7-5p group. In negative control group, A549 cells were transfected with a negative control agent that did not express microRNA-7-5p and had no homology with the target gene sequence. In rapamycin group, rapamycin was added to A549 cell culture medium. In PP242 group, PP242 was added to A549 cell culture medium. The blank control group was only added with lipo fectamine<sup>TM</sup> 2000. The mRNA levels of SGK-1 were detected by RT-qPCR. The expression levels of SGK-1 and ENaC proteins were detected by Western blot. The expression levels of microRNA-7-5p, SGK-1 mRNA, SGK-1 protein and ENaC protein in groups were compared. **Results:** The expression level of microRNA-7-5p in micro RNA-7-5p group was higher than that in blank control group, negative control group, rapamycin group, and PP242 group, the expression levels of microRNA-7-5p was successfully up-regulated by transfected A549 cells ( $P < 0.05$ ). The SGK-1 mRNA level, SGK-1, and the expression levels of ENaC- $\alpha$ , ENaC- $\beta$  and ENaC- $\gamma$  proteins in microRNA-7-5p group were lower than those in blank control group, negative control group and rapamycin group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** microRNA-7-5p may negatively regulate ENaC by mTORC2/SGK-1 signaling pathways.

**【Key words】** MicroRNA-7-5p; Epithelial sodium channel; Mammalian target of rapamycin complex 2; Serum glucocorticoid-regulated kinase-1

肺泡上皮细胞钠离子通道 (epithelial sodium channel, ENaC) 由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三种亚基组成, 共同维持钠离子转运, 在调节肺泡上皮功能中具有重要的生理作用<sup>[1-2]</sup>。ENaC 受哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复

合物 2 (mammalian target of rapamycin complex 2, mTORC2)/血清糖皮质激素诱导激酶-1 (serum and glucocorticoid-regulated kinase-1, SGK-1) 信号通路调控<sup>[3]</sup>, 但其具体的分子机制尚未明确。近年研

基金项目: 四川省科技计划项目 (2019YJ0263)

作者简介: 秦克 (1982 -), 男, 博士, 副主任医师。E-mail: hx363yy@163.com

究<sup>[4-5]</sup>发现微小 RNA-7-5p (microRNA-7-5p) 可抑制肿瘤细胞的侵袭转移,并与离子通道的调控密切相关。microRNA-7-5p 在肺泡组织中的含量较为丰富,且 mTOR 是 microRNA-7-5p 的靶点<sup>[6-7]</sup>,ENaC 的调控机制可能与 mTORC2/SGK-1 信号通路有关<sup>[3]</sup>。但既往研究多局限于 mTORC2/SGK-1 与 ENaC 关系的初步假设,对肺泡 ENaC 的调控作用仍缺乏科学的论据。因此,本研究拟探讨 microRNA-7-5p 是否通过 mTORC2/SGK-1 信号通路调控人肺泡 ENaC。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 microRNA-7-5p 试剂盒(内含 microRNA-7-5p 模拟剂、与目的基因序列无同源性的不表达 microRNA-7-5p 的阴性对照剂),购自 GenePharma 公司。SGK-1 抗体,购自英国艾博抗公司;ENaC- $\alpha$ 、ENaC- $\beta$ 、ENaC- $\gamma$  抗体,购自美国圣克鲁斯公司;PRMI1640 细胞培养液、10% 新鲜胎牛血清、LB amp 液体培养基、Lipo fectamine TM2000 转染 48 孔板、Trizol 溶液,购自美国 Invitrogen 公司;XhoI 内切酶、NotI 内切酶、psiCHECK-2 载体,购自英国 New England Biolabs 公司;无水乙醇、氯仿、异丙醇,购自上海国药集团化学试剂有限公司;雷帕霉素,购自美国 Wyeth Pharmaceuticals 公司;mTOR 抑制剂 (PP242),购自美国 InvivoChem 公司。

1.1.2 人肺泡上皮细胞 采用人类非小细胞肺癌肺泡上皮细胞系 (A549 细胞),购自中国科学院上海细胞库。PRMI1640 细胞培养基,37 °C 的 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱进行传代培养。

### 1.2 方法

1.2.1 microRNA-7-5p 靶基因验证 应用数据库 TargetScan 查找 microRNA-7-5p 的靶基因位点,并与 mTOR 与 SGK-1 位点作对比。委托上海生工生物工程有限公司完成目的基因片段克隆。再行双荧光素酶靶基因实验验证,分别加入 25  $\mu$ L 荧光素酶缓冲液和 5  $\mu$ L 底物,测量荧光强度。

1.2.2 A549 细胞转染 使用 25  $\mu$ L Lipo fectamineTM 2000 转染培养在 48 孔板中的 A549 细胞。设置阴性对照组(不表达 microRNA-7-5p 的阴性对照剂 100 ng)、microRNA-7-5p 组、雷帕霉素组 (mTORC1 抑制剂,100 ng 雷帕霉素)、PP242 组 (mTORC1 和 mTORC2 双效抑制剂,100 ng PP242 试剂)。microRNA-7-5p 组:转染 48 孔板中加入 Lipo fectamineTM 2000 试剂和 100 ng microRNA-7-5p 模拟剂。阴性对照组:加入 Lipo fectamineTM 2000 试

剂和试剂盒中附带的与目的基因序列无同源性的不表达 microRNA-7-5p 的阴性对照剂。雷帕霉素组:加入 Lipo fectamineTM 2000 试剂和雷帕霉素。PP242 组:加入 Lipo fectamineTM 2000 试剂和 PP242。空白对照组:仅加入 Lipo fectamineTM 2000 试剂。所有组别的细胞均 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。

1.2.3 细胞总 RNA 提取 将转染后的 A549 细胞加入 Trizol 溶液 1 mL,室温静置裂解 2 min,然后使用移液器均匀吹细胞,转移至 EP 管中,轻轻摇晃均匀,再室温静置 5 min。加入 0.2 mL 氯仿,轻轻摇晃均匀,再室温静置 5 min。在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 20 min,取上层清液转移至 EP 管中,加入 0.1 mL 异丙醇。4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min,弃去上清,底物加入 0.1 mL 75% 乙醇。4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,室温下倒置静置,直至干燥沉淀即得到细胞总 RNA。

### 1.2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR)

提取的细胞总 RNA 先逆转录成 cDNA,将 0.5  $\mu$ L Oligo (dT) (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L) 加入 4  $\mu$ L RNA 模板样品中,置于冰上冰浴 5 min。加入 4  $\mu$ L 5 $\times$  逆转录反应缓冲液,混匀后 37 °C 恒温水浴 5 min。在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 8 s。加入 1  $\mu$ L M<sup>-</sup>MuLV 逆转录酶,42 °C 恒温水浴下反转录 60 min。qRT-PCR 的引物序列:mTORC2 上游引物 ATGCCACGCTCTGGC-TACGTG,下游引物 CTGGGAGCCCACCTTGA AG-GAGT;SGK-1 上游引物 CCCCCACGCCCCGCTCTAG,下游引物 CCGGGCAGCACTGACGTTT。反应体系:cDNA 模板 2  $\mu$ L,上游引物和下游引物各 0.5  $\mu$ L,SYBR Green Mix 试剂 32  $\mu$ L,ROX II 试剂 0.5  $\mu$ L,双蒸水 14.5  $\mu$ L,总体积 50  $\mu$ L。95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 45 s,40 个循环。以  $\beta$ -actin 作为内参, $\beta$ -actin 上游引物 ACCCCGTGCTGCTGACCGAG,下游引物 TCCCGGCCAGCCAGGTCCA。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法分析相对表达量。

1.2.5 免疫印迹法 将转染后的 A549 细胞加入 120  $\mu$ L 细胞裂解液,转移至新的 EP 离心管。配制 5 $\times$  电泳缓冲液,上样。取制备好的蛋白样品加入 5 $\times$  上样缓冲液至 25  $\mu$ L,12 000 r/min 离心 1 min。加样蛋白 Marker,上层胶电压 120 V,下层胶电压 160 V,电泳 9 min。将凝胶转膜夹子放入电转槽,SGK-1 蛋白、ENaC- $\alpha$ 、ENaC- $\beta$ 、ENaC- $\gamma$  蛋白 100 V 转移 2 h。后续封闭、抗体杂交、进行化学发光法检测,分析蛋白条带灰度值。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组

间比较采用方差分析,并行 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 验证 mTOR 和 SGK-1 为 microRNA-7-5p 的靶基因

对比 microRNA 生物信息学数据库发现, mTOR 的 3' 非编码区 (GAGUACAAAAGGUCUGUCUUC-CA) 存在 8 个配对的核酸位点 (UGUUGUUUUAUGAUCAGAAGGU)。SGK-1 的 3' 非编码区 (GG-GACAUGUUUGUUUCUCC) 存在 7 个配对的核酸位点 (UGUUGUUUUAUGAUCAGAAGGU), 提示 mTOR 和 SGK-1 可能是 microRNA-7-5p 的靶基因。

双荧光素酶报告基因分析: psiCHECK-2-mTOR 的荧光表达相对强度为  $(7.25 \pm 0.59)$ , 阴性对照的荧光表达相对强度为  $(12.48 \pm 0.97)$ , 提示 microRNA-7-5p 一定程度上抑制 psiCHECK-2-mTOR 表达。psiCHECK-2-SGK-1 的荧光表达相对强度为  $(5.33 \pm 0.48)$ , 阴性对照的荧光表达相对强度为  $(11.37 \pm 1.36)$ , 提示 microRNA-7-5p 可较大程度上抑制 psiCHECK-2-SGK-1 的荧光表达。

### 2.2 A549 细胞转染上调 microRNA-7-5p 表达

A549 细胞转染 microRNA-7-5p 后进行 qRT-PCR 检测 microRNA-7-5p 表达水平, microRNA-7-5p 组的 microRNA-7-5p 表达水平高于阴性对照组、雷帕霉素组和 PP242 组 ( $P < 0.05$ ), 提示 A549 细胞转染成功上调 microRNA-7-5p 表达。见图 1。

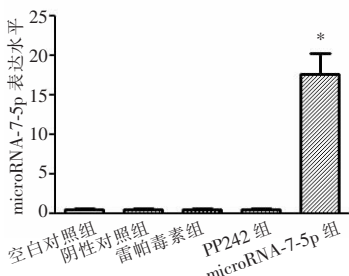


图 1 qRT-PCR 检测 A549 细胞转染后 microRNA-7-5p 表达水平。

\* $P < 0.05$ , 与阴性对照组比较。

### 2.3 microRNA-7-5p 下调 SGK-1 mRNA 及蛋白表达

A549 细胞转染 microRNA-7-5p 后进行 RT-qPCR 检测 SGK-1 的 mRNA 水平, microRNA-7-5p 组的 SGK-1 mRNA 水平低于空白对照组、阴性对照组和雷帕霉素组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。但 microRNA-7-5p 组的 SGK-1 mRNA 水平与 PP242 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。免疫印迹法检测 SGK-1 的蛋白表达量, microRNA-7-5p 组的

SGK-1 蛋白表达量低于阴性对照组和雷帕霉素组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。但 microRNA-7-5p 组的 SGK-1 蛋白表达量和 PP242 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

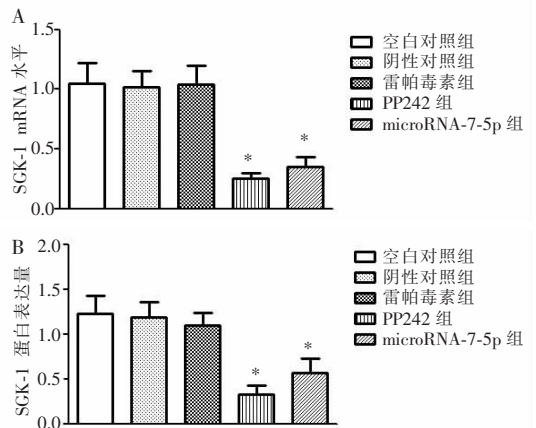


图 2 不同处理对 SGK-1 mRNA 及蛋白表达的影响

A. 各组 SGK-1 mRNA 表达水平比较; B. 各组 SGK-1 蛋白表达量比较。\* $P < 0.05$ , 与阴性对照组比较。

### 2.4 microRNA-7-5p 下调 ENaC 蛋白表达

A549 细胞转染 microRNA-7-5p 后进行免疫印迹法检测 ENaC, microRNA-7-5p 组的 ENaC- $\alpha$ 、ENaC- $\beta$ 、ENaC- $\gamma$  蛋白相对表达量均低于空白对照组、阴性对照组、雷帕霉素组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。但 microRNA-7-5p 组的 ENaC- $\alpha$ 、ENaC- $\beta$ 、ENaC- $\gamma$  蛋白表达量和 PP242 组比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

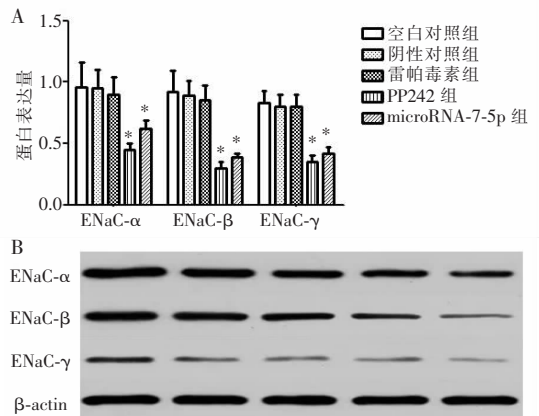


图 3 不同处理对 ENaC 蛋白表达的影响

A. 各组 ENaC- $\alpha$ 、ENaC- $\beta$ 、ENaC- $\gamma$  三个亚基的蛋白表达量比较; B. 免疫印迹法检测 ENaC- $\alpha$ 、ENaC- $\beta$ 、ENaC- $\gamma$  三个亚基的蛋白表达量。\* $P < 0.05$ , 与阴性对照组比较。

## 3 讨论

ENaC 是完成肺泡内钠离子转运的重要蛋白, 肺泡上皮细胞可使钾离子通过细胞膜上的 ENaC 蛋白并协同钠/钾 ATP 酶, 控制钠、钾离子从细胞外内

环境向细胞内转运<sup>[8-9]</sup>,同时在钠、钾离子的转运过程中产生的能量也可以推动水分子的转运,增强 ENaC 蛋白表达以促进肺泡水肿液的清除,从而治疗肺水肿<sup>[10]</sup>。microRNA-7-5p 是最早发现的能够调控肺泡上皮离子通道的 microRNA<sup>[11]</sup>,可调控 ENaC 的转运功能。

mTOR 包括 mTORC1 和 mTORC2 两类复合物, mTORC2 作为传导信号可将细胞上游的信号向下游传导,活化下游的 SGK-1 表达<sup>[12]</sup>。本研究发现,采用雷帕霉素处理后,SGK-1 mRNA 以及蛋白表达均无明显改变,EnaC 蛋白表达也无改变;而采用 PP242 处理后,SGK-1 mRNA 以及蛋白表达均下调,EnaC 蛋白表达也存在下调,说明 mTORC2/SGK-1 是调控肺泡上皮细胞 EnaC 的关键途径。本研究通过转染 microRNA-7-5p 进入肺泡上皮细胞,提高了在肺泡上皮细胞中的表达水平,进一步的 RT-qPCR 检测以及免疫印迹检测发现下调 SGK-1 的表达,说明 microRNA-7-5p 可能抑制 mTORC2/SGK-1 的活性。

多项研究<sup>[13]</sup>显示,SGK-1 是 ENaC 的上游信号通路,细胞受到调控后一氧化氮合酶被激活,减少了一氧化氮的生成,保护内皮细胞的功能,增强 ENaC 表达。本研究进一步的免疫印迹检测也发现, microRNA-7-5p 下调 ENaC 的表达,抑制 mTORC2/SGK-1 的活性。mTORC2/SGK-1 调控 ENaC 的具体作用机制较为复杂,体外试验<sup>[14]</sup>表示 SGK-1 可阻止 ENaC 与受体结合,减少 ENaC- $\alpha$ 、ENaC- $\beta$ 、ENaC- $\gamma$  降解,从而提高 ENaC 介导的肺泡液清除率;唐旭毛等<sup>[15]</sup>研究发现 SGK1 磷酸化水平降低,提示 SGK1 信号通路可能下调 ENaC- $\alpha$  表达;马青等<sup>[16]</sup>研究也发现,肺泡上皮细胞转染 SGK1 siRNA 后,ENaC 各亚基的 mRNA 和蛋白表达均显著减少,SGK1 磷酸化水平显著降低,说明激活 SGK1 信号通路可以上调肺泡 ENaC 各亚基的表达,均与本研究观点基本相符。本研究推测,miRNA-7-5p 过度表达可能抑制了 mTORC2/SGK-1 活性,加速 ENaC 的降解,加重了肺泡水肿。若抑制 miRNA-7-5p 表达,则可能增加 ENaC 的稳定性,减轻肺水肿。

综上,microRNA-7-5p 抑制 mTOR 和 SGK-1 的活性从而下调 ENaC 表达,通过 mTORC2/SGK-1 信号通路负向调控 ENaC。

#### 参考文献

[1] Rotin D, Staub O. Function and regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel ENaC [J]. *Comprehensive Physiology*, 2021, 11 (3):

2017 - 2045.

- [2] Ali G, Zhang M, Zhao R, *et al.* Fibrinolytic niche is required for alveolar type 2 cell-mediated alveologenesis via a uPA-A6-CD44 + -ENaC signal cascade [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 97 - 99.
- [3] Qin K, Zhong X, Wang D. MicroRNA-7-5p regulates human alveolar epithelial sodium channels by targeting the mTORC2/SGK-1 signaling pathway [J]. *Experimental Lung Research*, 2016, 42(5): 237 - 244.
- [4] 田丹, 李新, 尚学琴, 等. MicroRNA-7-5p 调控 p53 表达对非小细胞肺癌增殖及侵袭能力的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(22): 12 - 17.
- [5] 晓红, 南琼, 吴秀方, 等. MicroRNA-7-5p 在人结肠癌组织中的表达及其对 CaCo2 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(1): 67 - 71.
- [6] Woo SY, Lee SY, Yu SL, *et al.* MicroRNA-7-5p's role in the O-GlcNAcylation and cancer metabolism [J]. *Noncoding RNA Research*, 2020, 5(4): 201 - 207.
- [7] Tang Y, Tang Z, Yang J, *et al.* MicroRNA-7-5p inhibits migration, invasion and metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma by inhibiting MyD88 [J]. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 2021, 9(6): 809 - 817.
- [8] Ayasse N, Berg P, Leipziger J, *et al.* ENaC expression correlates with the acute furosemide-induced K<sup>+</sup> excretion [J]. *Physiological Reports*, 2021, 9(1): 1466 - 1468.
- [9] Vandenbeuch A, Kinnamon SC. Is the amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel in taste cells really ENaC [J]. *Chemical Senses*, 2020, 45(4): 233 - 234.
- [10] Aubin M, Chupin C, Massé C, *et al.* Impact of ENaC downregulation in transgenic mice on the outcomes of acute lung injury induced by bleomycin [J]. *Experimental Physiology*, 2021, 106(4): 1110 - 1119.
- [11] Gao J, Ding C, Zhou J, *et al.* Propofol suppresses lung cancer tumorigenesis by modulating the circ-ERBB2/miR-7-5p/FOXM1 axis [J]. *Thoracic Cancer*, 2021, 12(6): 824 - 834.
- [12] Ballesteros J, Andersen JK. mTORC2: The other mTOR in autophagy regulation [J]. *Aging Cell*, 2021, 20(8): e13431.
- [13] Liang C, Wang QS, Yang X, *et al.* Homocysteine causes endothelial dysfunction via inflammatory factor-mediated activation of epithelial sodium channel (ENaC) [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 17(9): 6723 - 6735.
- [14] He J, Qi D, Tang XM, *et al.* Rosiglitazone promotes ENaC-mediated alveolar fluid clearance in acute lung injury through the PPAR $\gamma$ /SGK1 signaling pathway [J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2019, 28(24): 35.
- [15] 唐旭毛, 戚迪, 王导新. 白藜芦醇通过激活 SGK1 上调急性肺损伤小鼠肺泡上皮钠离子通道的表达 [J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(9): 1215 - 1219.
- [16] 马青, 李长毅, 王导新, 等. PI3K/SGK1 信号通路上调小鼠肺上皮钠通道表达的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(1): 50 - 55.

(收稿日期: 2022 - 11 - 15

修回日期: 2022 - 12 - 24)