

微小 RNA-21-5p 调控 II 型肺泡上皮细胞凋亡的研究

何英¹ 程云² 石磊¹ 邢周雄¹ 陈淼¹

¹遵义医科大学附属医院重症医学科, 贵州遵义 563000; ²遵义医科大学附属医院急诊科, 贵州遵义 563000

通信作者: 陈淼, Email: chenmiao64@163.com

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-21-5p (miR-21-5p) 是否具有抗人 II 型肺泡上皮细胞 (ATII) 凋亡的作用。方法 体外培养人 ATII 细胞, 待细胞生长至光镜下可见层状体和微绒毛时用于实验。将细胞分为空白对照组 (直接培养, 不予任何处理)、过氧化氢 (H₂O₂) 损伤组 (加入 0.5 mmol/L H₂O₂)、miR-21-5p 过表达组 [加入感染复数 (MOI) 为 100 的 miR-21-5p 慢病毒过表达载体与 0.5 mmol/L H₂O₂ 共培养] 和空病毒对照组 (加入 miR-21-5p 慢病毒空白载体与 0.5 mmol/L H₂O₂ 共培养)。各组分别于细胞培养 0、12、24、36、48 h 采用细胞增殖及毒性检测试剂盒 (CCK-8) 检测细胞增殖情况; 于培养 24 h 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。**结果** ① 细胞增殖活性检测结果: 随着细胞培养时间的延长, 空白对照组细胞增殖活性逐渐增强, 而加入 0.5 mmol/L H₂O₂ 处理后细胞增殖活性则逐渐下降; 但 miR-21-5p 过表达组细胞增殖活性较 H₂O₂ 损伤组和空病毒对照组下降缓慢, 48 h 时细胞增殖活性明显高于 H₂O₂ 损伤组和 miR-21-5p 空病毒对照组 [吸光度 (A) 值: 0.295 ± 0.005 比 0.184 ± 0.005、0.169 ± 0.002, 均 $P < 0.05$]。说明 H₂O₂ 及慢病毒均加快了细胞损伤, 而 miR-21-5p 可抑制细胞凋亡。② 细胞凋亡检测结果: 与空白对照组比较, 加入 0.5 mmol/L H₂O₂ 处理后细胞凋亡率明显升高; 而 miR-21-5p 过表达组细胞凋亡率较 H₂O₂ 损伤组和空病毒对照组均明显降低 [早期细胞凋亡率: (14.31 ± 0.12)% 比 (24.50 ± 0.12)%、(23.41 ± 0.13)%, 晚期细胞凋亡率: (8.12 ± 0.13)% 比 (9.71 ± 0.11)%、(10.41 ± 0.15)%, 总体细胞凋亡率: (22.33 ± 0.12)% 比 (34.21 ± 0.10)%、(33.82 ± 0.14)%, 均 $P < 0.05$], 进一步证明 miR-21-5p 具有抗细胞凋亡作用。**结论** miR-21-5p 具有抗人 ATII 凋亡的作用。

【关键词】 肺泡上皮细胞, II 型; 抗凋亡; 微小 RNA-21-5p

基金项目: 国家自然科学基金 (8196010350)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200429-00349

The microRNA-21-5p regulation of type II alveolar epithelial cell apoptosis

He Ying¹, Cheng Yun², Shi Lei¹, Xing Zhouxiong¹, Chen Miao¹

¹Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China;

²Department of Emergency, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China

Corresponding author: Chen Miao, Email: chenmiao64@163.com

【Abstract】 Objective To explore whether microRNA-21-5p (miR-21-5p) has the effect of anti-apoptosis of human alveolar type II epithelial cells (ATII). **Methods** ATII cells derived from the human were cultured *in vitro* and used for experiments when the cells were grown until the presence of lamellar bodies and microvilli were observed by light microscope. The cells were divided into blank control group (direct culture), hydrogen peroxide (H₂O₂) injury group (cultured with 0.5 mmol/L H₂O₂), and miR-21-5p overexpression group (using miR-21-5p with a multiplicity of infection (MOI) of 100 lentiviral overexpression vector with 0.5 mmol/L H₂O₂) and miR-21-5p empty virus control group (miR-21-5p lentiviral blank vector was co-cultured with 0.5 mmol/L H₂O₂). In each group, cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) at 0, 12, 24, 36, and 48 hours of cell culture; cell apoptosis was detected by flow cytometry at 24 hours of culture. **Results** ① Cell proliferation activity test results: with the extension of cell culture time, the cell proliferation activity of the blank control group gradually increased, while the cell proliferation activity gradually decreased after the addition of 0.5 mmol/L H₂O₂. However, the cells proliferation activity in the miR-21-5p overexpression group decreased more slowly than that in the H₂O₂ injury group and the miR-21-5p empty virus control group, and the cell proliferation activity at 48 hours was significantly higher than the H₂O₂ injury group and the miR-21-5p empty virus control group (A value: 0.295 ± 0.005 vs. 0.184 ± 0.005, 0.169 ± 0.002, both $P < 0.05$). It showed that both H₂O₂ and lentivirus accelerated cell damage, while miR-21-5p could reduce cell apoptosis. ② Apoptosis rate test results: compared with the blank control group, the apoptosis rate increased significantly after adding 0.5 mmol/L H₂O₂; while the apoptosis rate of the miR-21-5p overexpression group was lower than that of the H₂O₂ injury group and miR-21-5p empty virus control group [early apoptosis rate: (14.31 ± 0.12)% vs. (24.50 ± 0.12)%, (23.41 ± 0.13)%; late apoptosis rate: (8.12 ± 0.13)% vs. (9.71 ± 0.11)%, (10.41 ± 0.15)%; overall apoptosis rate: (22.33 ± 0.12)% vs. (34.21 ± 0.10)%, (33.82 ± 0.14)%; all $P < 0.05$], which further proved that miR-21-5p had anti-apoptotic effects. **Conclusion** miR-21-5p has an anti-apoptotic effect on human ATII.

【Key words】 Type II alveolar epithelial cell; Anti-apoptosis; MicroRNA-21-5p

Fund program: National Natural Science Foundation of China (8196010350)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200429-00349

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 起病迅速, 发展速度快, 预后不良, 具有较高病死率^[1]。越来越多的证据表明, 不同类型的细胞均参与了 ARDS 的发病机制^[2]。抗感染治疗的失败使人们把专注力投向了细胞微小 RNA (microRNA, miRNA) 凋亡学说。细胞凋亡学说为 ARDS 发病机制的探索和防治策略提出了新的治疗思路, 其中最重要的学说之一是 II 型肺泡上皮细胞 (alveolar type II epithelial cells, ATII) 的凋亡^[3]。血浆 miRNA 分析已成为寻找诊断人类疾病 (尤其是与癌症有关的疾病) 潜在生物标志物的方法^[4]。有研究表明, miR-21-5p 可以对高氧性急性肺损伤 (hyperoxia-induced acute lung injury, HALI) 起到改善作用, 其机制可能是 miR-21-5p 蛋白酪氨酸磷酸酶/蛋白激酶 B (protein tyrosine phosphatase gene/protein kinase B, PTEN/Akt) 诱导的 ATII 凋亡被抑制^[5]。因而人们预测, miR-21-5p 也许是干预 ARDS 的新方向, 可是由于动物机体结构及代谢与人有较大不同, 而且动物实验对临床医疗的可行性有限, 为了使研究结果更接近于临床, 本实验拟用人 ATII 为研究对象, 进一步探讨 miR-21-5p 对人 ATII 凋亡是否具有拮抗效应, 从而为 ATII 凋亡的调节提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料: 人 ATII 实验细胞购自齐一生物科技 (上海) 有限公司。miR-21-5p 内参载体、慢病毒过表达载体、包含靶基因 3' 非翻译区 (3'-untranslated region, 3'UTR) 的报告基因载体及 miR-21-5p 真核表达载体的构建均由齐一生物科技 (上海) 有限公司完成。

1.2 伦理学: 本实验为国家自然科学基金 (8196010350) 的子项目内容, 该基金相关研究符合医学伦理学标准, 并通过遵义医科大学附属医院动物伦理委员会批准 (审批号: 2019-2-22)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的培养: 使用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤细胞, 加入胰蛋白酶消化溶液, 在 37 °C CO₂ 培养箱中放置 2 ~ 3 min, 光镜下观察细胞呈圆粒状将要从瓶壁脱落时, 终止消化, 用吸管吹吸数次使细胞分散, 混匀后补足培养液, 按稀释比例转移至新的培养瓶中, 放入 5% CO₂、饱和

湿度、37 °C 培养箱中继续培养, 直至细胞在光镜下可见层状体和微绒毛时用于实验。

1.3.2 实验分组及处理: 将细胞分为 4 组分别进行培养 0、12、24、36、48 h。空白对照组不予任何处理; 过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 损伤组加入 0.5 mmol/L H₂O₂; miR-21-5p 过表达组加入感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100 的 miR-21-5p 慢病毒过表达载体与 0.5 mmol/L H₂O₂ 共培养; 空病毒对照组加入 miR-21-5p 慢病毒空白载体与 0.5 mmol/L H₂O₂ 共培养。

1.3.3 细胞感染: 通过细胞感染慢病毒实验确认目的细胞的 MOI 为 100。将细胞铺板, 37 °C 孵育 24 h; 次日感染前, 37 °C 水浴快速融化病毒 (以融化后液体中含有少量的冰块为宜), 用 400 μL、37 °C 完全培养基加入 5 mg/L 聚凝胺以稀释病毒原液 (20 ~ 100 μL), 吸去原有细胞培养基, 加入稀释的病毒液, 摇匀后置于培养箱孵育 24 h; 感染后 2 d, 弃细胞培养液, 加入新配制的培养基 (不含聚凝胺), 37 °C 下培养; 感染后期根据细胞增殖情况进行换液及传代, 或根据情况直接收集进行后续检测, 或构建稳定细胞株 (挑选克隆, 进行细胞扩增) 进行后续检测。

1.3.4 细胞增殖及毒性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞增殖活性: 培养 0、12、24、36、48 h 后将细胞消化离心, 弃培养液, 加入适量完全培养基重悬细胞; 将盖片置于计数板上, 吸出少许细胞悬液滴在盖片边缘, 使盖片与计数板之间充满悬液, 静置 3 min; 将细胞密度调整为 1 × 10⁵/mL。混匀细胞悬液, 吸取 100 μL 加入 96 孔板, 放入培养箱; 按实验分组要求处理细胞; 在细胞处理结束前 4 h 吸去培养液, 每孔加入 100 μL CCK-8 混合液, 4 h 后用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度 (absorbance, A) 值, 以反映细胞增殖活性。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞凋亡: 于培养 24 h 检测细胞凋亡情况, 步骤: ① 以每 0.5 mL 1 × Binding 缓冲液加入 5 μL 膜联蛋白 V (Annexin V) 和 10 μL 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 配制成 Annexin V/PI 染色液。② 吸去培养板内培养基, 用 PBS 洗涤后再加入胰蛋白酶消化, 在荧光显微镜下观察细胞形态, 当细胞质回缩时, 吸去胰酶, 加入 2 mL PBS 吹打, 制为单细胞悬液, 置入流式管中离心 5 min, 弃上清, 加

入 200 μL Annexin V/PI 染色液,重悬细胞后轻轻吹打,避光孵育 15 min,在流式细胞仪上检测细胞的凋亡情况。

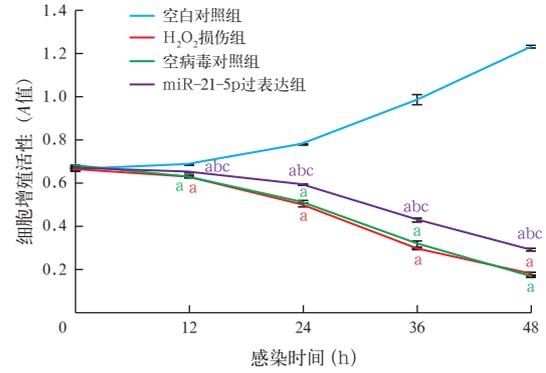
1.4 统计学方法: 使用 SPSS 20.0 软件处理数据。所有数据均符合正态分布,以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,重复测量资料采用重复测量方差分析,配对资料采用成组 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞感染慢病毒实验(图 1): 当 MOI 为 100 时,细胞感染均匀,荧光强度高,且 miR-21-5p 表达呈上升趋势; MOI 为 100 与 MOI 为 200 时细胞感染情况无明显差异,为节约病毒,故选用 MOI 为 100 进行后续实验。

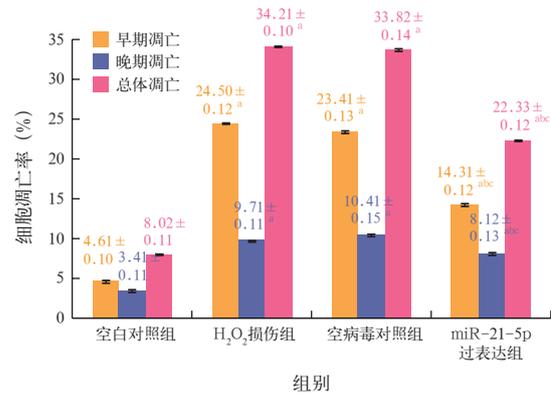
2.2 细胞增殖(图 2;表 1): 随着细胞培养时间的延长,空白对照组细胞增殖活性逐渐增强,而其他 3 组细胞增殖活性均逐渐下降(均 $P < 0.05$),说明 H₂O₂ 和慢病毒对人 ATII 均有损伤作用;而与 H₂O₂ 损伤组和空病毒对照组比较,miR-21-5p 过表达组细胞增殖活性下降缓慢(均 $P < 0.05$),进一步验证 miR-21-5p 进行表达是可以对凋亡作用产生抵抗性的。

2.3 细胞凋亡(图 3~4): 与空白对照组比较,其他 3 组细胞早期、晚期及总体细胞凋亡率均明显升高(均 $P < 0.05$);而 H₂O₂ 损伤组和空病毒对照组比较,miR-21-5p 过表达组细胞凋亡率明显降低(均 $P < 0.05$),说明 miR-21-5p 可起到抵抗 ATII 凋亡的作用。



注: ATII 为 II 型肺泡上皮细胞, H₂O₂ 为过氧化氢, miR-21-5p 为微小 RNA-21-5p, A 为吸光度值; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 H₂O₂ 损伤组比较, ^b $P < 0.05$; 与空病毒对照组比较, ^c $P < 0.05$

图 2 各组人 ATII 感染不同时间点细胞增殖活性的变化比较



注: ATII 为 II 型肺泡上皮细胞, H₂O₂ 为过氧化氢, miR-21-5p 为微小 RNA-21-5p; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 H₂O₂ 损伤组比较, ^b $P < 0.05$; 与空病毒对照组比较, ^c $P < 0.05$

图 3 各组人 ATII 感染 24 h 早期、晚期及总体细胞凋亡率比较

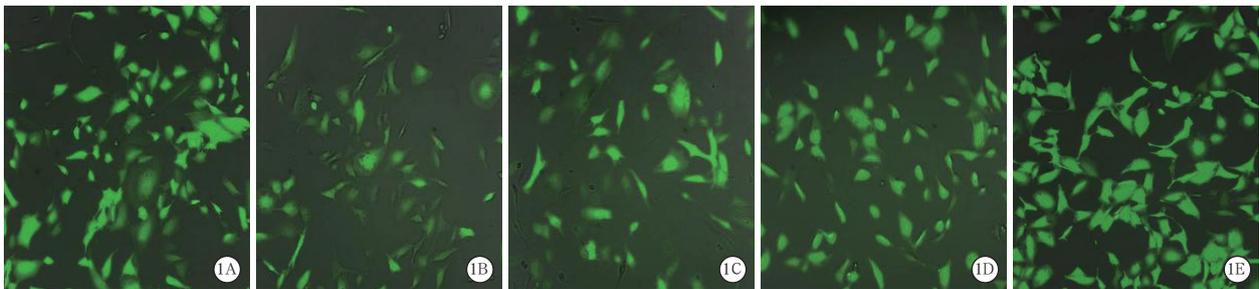
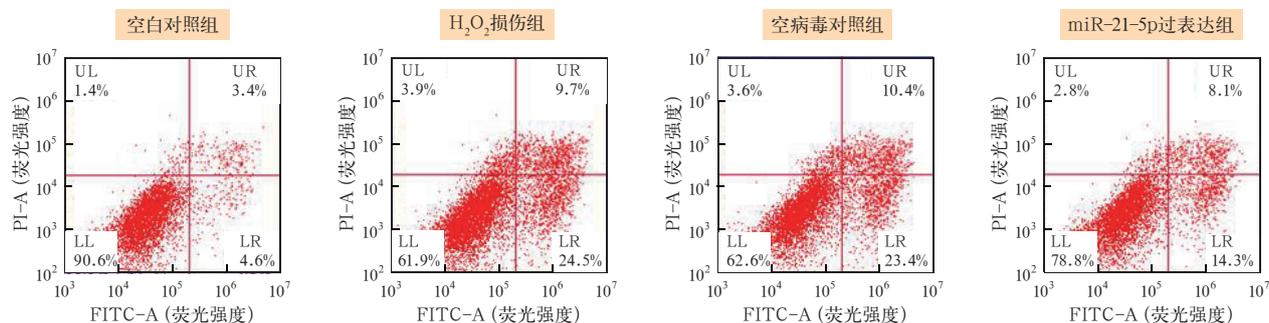


图 1 荧光显微镜下观察不同感染复数(MOI)微小 RNA-21-5p(miR-21-5p)慢病毒对人 II 型肺泡上皮细胞(ATII)的转染情况 绿色荧光代表感染慢病毒的 ATII。空白对照组(A)ATII 感染空病毒;当 miR-21-5p 慢病毒 MOI 为 25(B)和 50(C)时,有少量 ATII 感染; MOI 为 100 时(D),感染慢病毒的 ATII 明显增加; MOI 为 200 时(E),感染慢病毒的 ATII 与 MOI 为 100 时无明显差异 免疫荧光染色 中倍放大

表 1 各组人 ATII 感染不同时间点细胞增殖活性的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(孔)	细胞增殖活性(A 值)				
		0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
空白对照组	10	0.664 ± 0.008	0.689 ± 0.003	0.784 ± 0.003	0.989 ± 0.023	1.234 ± 0.005
H ₂ O ₂ 损伤组	10	0.667 ± 0.004	0.634 ± 0.008 ^a	0.503 ± 0.007 ^a	0.298 ± 0.003 ^a	0.184 ± 0.005 ^a
空病毒对照组	10	0.685 ± 0.004	0.631 ± 0.001 ^a	0.516 ± 0.005 ^a	0.322 ± 0.012 ^a	0.169 ± 0.002 ^a
miR-21-5p 过表达组	10	0.672 ± 0.002	0.652 ± 0.002 ^{abc}	0.596 ± 0.003 ^{abc}	0.432 ± 0.009 ^{abc}	0.295 ± 0.005 ^{abc}

注: ATII 为 II 型肺泡上皮细胞, H₂O₂ 为过氧化氢, miR-21-5p 为微小 RNA-21-5p, A 值为吸光度值; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 H₂O₂ 损伤组比较, ^b $P < 0.05$; 与空病毒对照组比较, ^c $P < 0.05$



注: AT II 为 II 型肺泡上皮细胞, H_2O_2 为过氧化氢, miR-21-5p 为微小 RNA-21-5p, FITC 为异硫氰酸荧光素, PI 为碘化丙啶; 右上象限 (UR) 表示晚期凋亡细胞, 右下象限 (LR) 表示早期凋亡细胞, 左上象限 (UL) 表示碎片细胞, 左下象限 (LL) 表示非凋亡细胞

图 4 流式细胞仪检测各组人 AT II 感染时 24 h 时细胞凋亡情况

3 讨论

ARDS 指的是由于感染等疾病导致人体内肺泡上皮组织细胞功能受损, 包括毛细血管等保护屏障受到损害, 进而导致透明膜的出现。进一步产生肺水肿等症状, 同时在临床上所表现的症状包括有难以治疗的低氧血症和急性呼吸衰竭等症状。其中 ARDS 有相对复杂的反应原理, 也存在多种诱发疾病的原因, 其中不乏有炎症、氧中毒、感染、损伤、休克、脂肪栓塞、误吸等刺激下导致肺泡膜通透性增加, 肺实质渗透性水肿, 肺泡细胞、巨噬细胞、内皮细胞以及呼吸道上皮细胞损伤后, 因其处于过度状态导致抗氧化剂成分呈现明显缺乏的状态, 进而导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 与抗 ROS 失衡^[6], 损伤氧化的细胞也许是造成 ARDS 的关键因素^[7]。

目前治疗 ARDS 的主要方法包括呼吸支持、药物治疗、表面活性剂、机械通气、体外膜肺氧合 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 及体外 CO_2 清除 (extracorporeal carbon dioxide removal, ECCO₂R)。Zhu 等^[8] 研究表明, 胚胎干细胞能分化产生 ATII 和呼吸道上皮细胞, 被认为是细胞治疗急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)/ARDS 的新视角。

肺上皮是由气道上皮细胞和肺泡上皮细胞 (alveolar epithelial cells, AT) 组成的, 而 AT 分为两种类型, 即分泌表面活性剂蛋白的 ATII 和构成薄壁供气体交换的 ATI^[9]。ATII 是 AT 的干细胞, 增殖期以炎症反应和细胞凋亡为主, 基膜严重受损, 导致 ATII 快速增殖、分化, 并最终转化为 ATI, 进而恢复正常的肺组织结构。该过程可能会产生过多的 AT, 激活机体的巨噬细胞和自吞噬作用, 引发 ATII 过度凋亡。前期关于研究 ATII 凋亡的思路多聚集于死亡受体通路和线粒体凋亡通路, 随着 miRNA 的发现, 细胞凋亡机制的研究进入 miRNA 时代, 为深入

探讨 ATII 的凋亡机制提供了全新的方向。有研究表明, 过表达 miR-21-5p 对拮抗大鼠 ATII 的凋亡有一定作用^[10]。但使用实验动物得到的原理, 在应用到人体上还会有较大差异。并且能使用动物进行实验所得到的信息是有限的, 因此本研究选择的还是人 ATII, 希望借此进行的研究所得到的结果更容易被临床所采纳。

本实验中以 0.5 mmol/L H_2O_2 作为 ATII 细胞损伤诱因, 模拟离体凋亡模型, 构建慢病毒载体和过表达 miR-21-5p 的慢病毒载体, 通过检测人 ATII 转染效率及人 ATII 中 miR-21-5p 的表达确定 MOI 值, 以慢病毒载体及过表达 miR-21-5p 慢病毒载体转染 ATII 细胞, 并通过检测各个时间点的细胞增殖活性以及细胞凋亡率, 进一步明确 miR-21-5p 是否具有抗人 ATII 凋亡的作用, 从基因水平为 ALI/ARDS 的临床治疗提供了新的方向。

miRNA 是一类涉及凋亡、癌症等的非编码 RNA, miRNA 的异常表达可导致人乳腺癌、人类慢性淋巴细胞白血病、肺部疾病、组织纤维化和炎症等。Iorio 等^[11] 的研究证明, 在人类差异表达的 miRNA 中, 运用 PicTar 和 TargetScan 软件预测人类 miRNA 的靶基因, 其中 miR-21、miR-125b、miR-10b、miR-145、miR-155 的基因表达差异相对明显。miRNA 参与了人类组织、器官和分子的表达, 当 miRNA 表达出现异常时, 可导致疾病的发生。Haramati 等^[12] 研究了 miRNA 的活性, 发现有丝分裂后脊髓运动神经元在体内的长期存活十分重要, 成人的神经元和神经退行性状态与 miR-9 的功能缺陷有一定联系; Fichtlscherer 等^[13] 通过定量聚合酶链反应 (PCR) 检测冠心病和健康志愿者血浆 miRNA 表达发现, miR-126、miR-17、miR-92a 循环水平和与炎症相关的 miR-155 以及平滑肌富集的 miR-145 在冠心病

患者中均显著降低；与此相反,心肌富集的 miRNA (miR-133a、miR-208A) 常常在冠心病患者中更高。从 miRNA 水平为相关疾病的治疗与干预提供新的靶点,意义深远。

ARDS 除了目前常规的呼吸支持、抗感染等治疗方法外,从细胞基因方面干预和预测疾病的发生,将会是未来研究的重点。有文献报道,在 ARDS 模型中, miR-466 家族分子通过隐匿的方式分泌到气道中,并且通过 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体加剧了炎症,由细胞外小泡 miRNA 调节的 NLRP3 炎症小体途径可作为 ARDS 治疗的靶标^[14]；抑制体内 miR-21 表达可进一步加重 HALI 大鼠肺损伤程度,增加 ATII 凋亡,其机制可能与上调天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 的表达有关^[15]；miR-21-5p 能显著减轻 HALI,可起到保护大鼠肺组织的作用^[16]。然而,来自肺部 miRNA 的大多数研究表明,它们的主要功能是微调基因表达并维持信号通路稳态^[17]。有研究表明,循环性外泌体 miRNA 水平的改变可能对严重社区获得性肺炎患者 ARDS 的生物学诊断和预测很有帮助^[18]。总之, miRNA 在转录后可调控包括 ALI/ARDS 在内的多种生物学和病理学过程中的基因表达,已成为生物医学研究的一个主要领域。miRNA 参与巨噬细胞极化,在调节 ALI/ARDS 的发病机制中起着至关重要的作用^[19]。

目前,使用基因检测方法治疗 ALI/ARDS 还存在多重障碍,包括人体 miRNA 载体系统转导的限制、关于转基因大小的限制、病毒载体转染效率与免疫原性相对较高的限制,且前临床研究均为离体实验,与在个体的生理病理过程均存在一定的差异,在体气道管腔表面内吞作用有限等。未来研究方法应着重克服这些壁垒,采用更有效和开发免疫原性更低的载体输送系统,对 ALI/ARDS 进行伤情分级并确定 miRNA 基因表达区,直接作用于靶基因,对利用基因方法治疗 ARDS/ALI 具有重大意义。

综上所述,本研究证实了 miR-21-5p 具有抗人 AT II 凋亡的作用,为 ALI/ARDS 的临床治疗提供了基因干预手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition [J]. JAMA, 2012, 307 (23): 2526-2533. DOI: 10.1001/jama.2012.5669.

[2] Wong JJM, Leong JY, Lee JH, et al. Insights into the immunopathogenesis of acute respiratory distress syndrome [J]. Ann Transl

Med, 2019, 7 (19): 504. DOI: 10.21037/atm.2019.09.28.

[3] Galani V, Tatsaki E, Bai M, et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review [J]. Pathol Res Pract, 2010, 206 (3): 145-150. DOI: 10.1016/j.prp.2009.12.002.

[4] Rai SN, Qian C, Pan J, et al. Statistical issues and group classification in plasma microma studies with data application [J/OL]. Evol Bioinform Online, 2020, 16: 1176934320913338. DOI: 10.1177/1176934320913338.

[5] Qin S, Chen M, Ji H, et al. miR-21-5p regulates type II alveolar epithelial cell apoptosis in hyperoxic acute lung injury [J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (4): 5796-5804. DOI: 10.3892/mmr.2018.8560.

[6] Soltan-Sharifi MS, Mojtahedzadeh M, Najafi A, et al. Improvement by N-acetylcysteine of acute respiratory distress syndrome through increasing intracellular glutathione, and extracellular thiol molecules and anti-oxidant power: evidence for underlying toxicological mechanisms [J]. Hum Exp Toxicol, 2007, 26 (9): 697-703. DOI: 10.1177/0960327107083452.

[7] Tasaka S, Amaya F, Hashimoto S, et al. Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome [J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10 (4): 739-753. DOI: 10.1089/ars.2007.1940.

[8] Zhu YG, Qu JM, Zhang J, et al. Novel interventional approaches for ALI/ARDS: cell-based gene therapy [J]. Mediators Inflamm, 2011, 2011: 560194. DOI: 10.1155/2011/560194.

[9] Shiraiishi K, Nakajima T, Shichino S, et al. *In vitro* expansion of endogenous human alveolar epithelial type II cells in fibroblast-free spheroid culture [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 515 (4): 579-585. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.05.187.

[10] 张伟,徐乐,陈森,等. miR-21-5p 过表达对高氧性急性肺损伤大鼠 AECII 早期凋亡的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31 (8): 978-982. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.013. Zhang W, Xu L, Chen M, et al. Effect of overexpression of microRNA-21-5p on early apoptosis of type II alveolar epithelial cells in rats with hyperoxic acute lung injury [J]. Chin Crit Care Med, 2019, 31 (8): 978-982. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.013.

[11] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65 (16): 7065-7070. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1783.

[12] Haramati S, Chapnik E, Sztainberg Y, et al. miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (29): 13111-13116. DOI: 10.1073/pnas.1006151107.

[13] Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease [J]. Circ Res, 2010, 107 (5): 677-684. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.215566.

[14] Shikano S, Gon Y, Maruoka S, et al. Increased extracellular vesicle miRNA-466 family in the bronchoalveolar lavage fluid as a precipitating factor of ARDS [J]. BMC Pulm Med, 2019, 19 (1): 110. DOI: 10.1186/s12890-019-0876-9.

[15] 石磊,何英,白冰,等. 微小 RNA-21 抑制剂对高氧性急性肺损伤大鼠 II 型肺泡上皮细胞凋亡的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29 (3): 244-248. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.010.

[16] Shi L, He Y, Bai B, et al. Effects of microRNA-21 inhibitor on apoptosis of type II alveolar epithelial cells in rats with hyperoxia-induced acute lung injury [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (3): 244-248. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.010.

[17] 刘国跃,陈森,戢慧,等. 微小 RNA-21-5p 对大鼠高氧性急性肺损伤的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22 (1): 23-27. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.01.11.

[18] Liu GY, Chen M, Ji H, et al. Effect of microRNA-21-5p on hyperoxic acute lung injury in rats [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (1): 23-27. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.01.11.

[19] Stolzenburg LR, Harris A. The role of microRNAs in chronic respiratory disease: recent insights [J]. Biol Chem, 2018, 399 (3): 219-234. DOI: 10.1515/hsz-2017-0249.

[18] Wu X, Wu C, Gu W, et al. Serum exosomal microRNAs predict acute respiratory distress syndrome events in patients with severe community-acquired pneumonia [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 3612020. DOI: 10.1155/2019/3612020.

[19] Rajasekaran S, Pattarayan D, Rajaguru P, et al. MicroRNA regulation of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. J Cell Physiol, 2016, 231 (10): 2097-2106. DOI: 10.1002/jcp.25316.

(收稿日期: 2020-04-29)