论著·基础医学

SIRT3在肺泡Ⅱ型上皮细胞氧化应激及线粒体生物合成中的作用及机制研究

周 俊[1],刘耀君[1],刘 婧[2],高若冰[4],李昌鸿[3],冯习锋[2],沈 浩[2],黄 宏[2],熊 玮[1] [1]陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院(西南医院)老年医学与特勤医学科,重庆;[2]陆军军医大学大坪医院野战外科研究部,重庆;[3]重庆医科大学干细胞与组织工程研究室,重庆;[4]安徽医科大学解剖人体解剖学教研室,安徽合肥

［**摘要**］ **目的** 探讨沉默信息调节因子3(silent information regulator 3,SIRT3)在氧化应激条件下对小鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞株MLE-12线粒体生物合成的调控作用及分子机制。**方法** 应用H_2O_2建立细胞氧化应激模型。采用siRNA特异性敲低MLE-12细胞*Sirt3*基因,实验分为6组,每组样本量为3:对照组(NC组)、siRNA阴性对照组(NCsiRNA组)、*Sirt3*敲低组(siSIRT3组)、H_2O_2损伤组(NC+H_2O_2组)、阴性对照加H_2O_2损伤组(NCsiRNA+H_2O_2组)及*Sirt3*敲低加H_2O_2损伤组(siSIRT3+H_2O_2组)。采用白藜芦醇(resveratrol)刺激MLE-12细胞增加SIRT3蛋白表达,实验分为10组,每组样本量为3:对照组(NC组)、siRNA阴性对照组(NCsiRNA组)、DMSO对照组(DMSO组)、*Sirt3*敲低组(siSIRT3组)、白藜芦醇组(RSV组)、H_2O_2损伤组(NC+H_2O_2组)、siRNA阴性对照加H_2O_2损伤组(NCsiRNA+H_2O_2组)、DMSO对照加H_2O_2损伤组(DMSO+H_2O_2组)、*Sirt3*敲低加H_2O_2损伤组(siSIRT3+H_2O_2组)、白藜芦醇组加H_2O_2损伤组(RSV+H_2O_2组)。应用MitoSOX Red荧光探针检测线粒体超氧阴离子($O_2•^-$)水平,荧光素酶法测定细胞ATP含量,通过Western blot检测SIRT3、PGC-1α、AMPKα1、TFAM、Nrf1、SOD2及乙酰化SOD2的表达;**结果** 500 μmol/L浓度H_2O_2能明显降低MLE-12细胞SIRT3蛋白表达水平(P<0.0001);与NC组相比,基础状态下敲低*Sirt3*能导致细胞ATP水平下降(P<0.01)与MitoSOX Red荧光强度增强(P<0.05)。H_2O_2处理后,所有H_2O_2处理组ATP水平进一步下降且荧光强度进一步增强(P<0.05),其中,siSIRT3+H_2O_2组相较于NCsiRNA+H_2O_2组ATP水平降低最明显(P<0.01),荧光强度增强最明显(P<0.0001)。Western blot结果显示:与NCsiRNA组相比,敲低*Sirt3*后,siSIRT3组AMPKα1、Nrf1、PGC-1α、SIRT3表达下降(P<0.05),而SOD2、乙酰化SOD2(Acetyl-SOD2)、TFAM表达水平则升高(P<0.01),予以白藜芦醇刺激MLE-12细胞后SIRT3增高(P<0.05)进一步导致PGC-1α表达增高(P<0.05);H_2O_2处理组AMPKα1、Nrf1、PGC-1α、SIRT3表达较相应对照组进一步下降(P<0.05),NC+H_2O_2组、NCsiRNA+H_2O_2组SOD2、乙酰化SOD2(Acetyl-SOD2)、TFAM水平较相应对照组升高(P<0.05),与NCsiRNA+H_2O_2组相比siSIRT3+H_2O_2组AMPKα1、Nrf1、PGC-1α、TFAM、SOD2、Acetyl-SOD2、SIRT3的表达水平均显著降低(P<0.05),而RSV+H_2O_2组的PGC-1α、SIRT3表达水平均显著高于NC+H_2O_2组和siSIRT3+H_2O_2组(P<0.05)。**结论** SIRT3通过调控AMPKα1/PGC-1α/Nrf1/TFAM通路增强线粒体生物合成,改善肺泡Ⅱ型上皮细胞线粒体功能减轻肺损伤。调控SIRT3蛋白可能减轻肺Ⅱ型细胞氧化损伤,为治疗急性肺损伤(acute lung injury,ALI)提供新策略。

［**关键词**］ SIRT3;急性肺损伤;肺Ⅱ型上皮细胞;氧化应激;线粒体生物合成

［**中图法分类号**］ R322.35;R329.25;R394.3 ［**文献标志码**］ A

［**基金项目**］ 国家自然科学基金(82272282,81571912)

［**通信作者**］ 熊 玮,E-mail:xiongwei@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:周俊,刘耀君,刘婧,等.SIRT3在肺泡Ⅱ型上皮细胞氧化应激及线粒体生物合成中的作用及机制研究[J].陆军军医大学学报,2025,47(24):3033-3044.DOI:10.16016/j.2097-0927.202508076.

Citation:ZHOU J,LIU Y J,LIU J,*et al*. Role and mechanism of SIRT3 in oxidative stress and mitochondrial biogenesis in alveolar type II cells[J]. J Army Med Univ,2025,47(24):3033-3044.DOI:10.16016/j.2097-0927.202508076.

Role and mechanism of SIRT3 in oxidative stress and mitochondrial biogenesis in alveolar type II cells

ZHOU Jun[1], LIU Yaojun[1], LIU Jing[2], GAO Ruobing[4], LI Changhong[3], FENG Xifeng[2], SHEN Hao[2], HUANG Hong[2], XIONG Wei[1] [1]Department of Geriatrics and Special Service Medicine, First Affiliated Hospital (Southwest Hospital), Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing; [2]Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing; [3]Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing; [4]Department of Human Anatomy, Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China

[**Abstract**] Objective To elucidate the regulatory role and molecular mechanism by which silent information regulator 3 (SIRT3) modulates mitochondrial biogenesis in murine alveolar type II epithelial (MLE-12) cells under oxidative stress. Methods Oxidative stress was induced in MLE-12 cells by exposure to H_2O_2. MLE-12 cells were transfected with siRNA specifically targeting *Sirt3* to achieve knockdown. Thus, the experiment included 6 groups (n=3): normal control group (NC), scrambled negative control siRNA group (NCsiRNA group), *Sirt3* siRNA group (siSIRT3 group), H_2O_2 injury group (NC+H_2O_2 group), scrambled negative control siRNA+H_2O_2 injury group (NCsiRNA+H_2O_2 group), and *Sirt3* siRNA+H_2O_2 injury group (siSIRT3+H_2O_2 group). Resveratrol was used to stimulate MLE-12 cells to increase SIRT3 protein expression. Another 10 experiment groups (n=3) were also included, that is, normal control group (NC), scrambled negative control siRNA group (NCsiRNA group), DMSO group (DMSO group), *Sirt3* siRNA group (siSIRT3 group), resveratrol-treated group (RSV group), H_2O_2 injury group (NC+H_2O_2 group), scrambled negative control siRNA+H_2O_2 injury group (NCsiRNA+H_2O_2 group), DMSO+H_2O_2 injury group (DMSO+H_2O_2 group), *Sirt3* siRNA+H_2O_2 injury group (siSIRT3+H_2O_2 group), and resveratrol-treated+H_2O_2 injury group (RSV+H_2O_2 group). Mitochondrial superoxide ($O_2^{\bullet -}$) were detected using MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator, and ATP production was measured by using luciferase-based luminescence assay. The protein levels of SIRT3, AMPKα1, PGC-1α, TFAM, Nrf1, SOD2 and Acetyl-SOD2 were detected with Western blotting. Results Exposure to 500 μmol/L H_2O_2 significantly reduced SIRT3 protein level in MLE-12 cells (P<0.000 1). Following H_2O_2 treatment, all H_2O_2-treated groups exhibited a further reduction in ATP level and a more pronounced increase in fluorescence intensity (P<0.000 1). Among these, the siSIRT3+H_2O_2 group demonstrated the most significant decrease in ATP level (P<0.01) and the greatest enhancement in fluorescence intensity (P<0.000 1) relative to the NCsiRNA+H_2O_2 group. Western blot analysis revealed that *Sirt3* knockdown resulted in reduced protein levels of AMPKα1, Nrf1, PGC-1α and SIRT3 (P<0.05), while the protein levels of SOD2, acetylated SOD2 (Acetyl-SOD2), and TFAM were increased (P<0.01) when compared to the NCsiRNA group. Resveratrol treatment increased the SIRT3 protein level in MLE-12 cells (P<0.05), subsequently leading to increased protein level of PGC-1α (P<0.05). In H_2O_2 treated groups, the protein expression levels of AMPKα1, Nrf1, PGC-1α and SIRT3 were reduced compared to their corresponding control groups (P<0.05). The NC+H_2O_2 and NCsiRNA+H_2O_2 groups showed increased protein levels of SOD2, Acetyl-SOD2, and TFAM when compared to their corresponding control groups (P<0.05). Compared to the NCsiRNA+H_2O_2 group, the siSIRT3+H_2O_2 group exhibited notably reduced protein levels of AMPKα1, Nrf1, PGC-1α, TFAM, SOD2, Acetyl-SOD2 and SIRT3 (P<0.05). Conversely, the RSV+H_2O_2 group demonstrated significantly higher PGC-1α and SIRT3 protein levels than both the NC+H_2O_2 and siSIRT3+H_2O_2 groups (P<0.05). Conclusion SIRT3 enhances mitochondrial biogenesis *via* the AMPKα1/PGC-1α/Nrf1/TFAM signaling pathway, improves mitochondrial function of lung epithelial cells and alleviates lung injury. Regulation of SIRT3 protein may reduce oxidative damage of type II alveolar cells, suggesting a potential therapeutic target for acute lung injury.

[**Key words**] SIRT3; acute lung injury; alveolar type II epithelial cells; oxidative stress; mitochondrial biogenesis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82272282, 81571912). Corresponding author: XIONG Wei, Email: xiongwei@tmmu.edu.cn

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)及其重症形式——急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是由创伤、感染脓毒症、休克等非心源性因素诱发的进行性缺氧性呼吸衰竭。ALI/ARDS是临床常见危重症,迄今虽然ALI的发病机制及治疗手段取得了一定进展,但发病率和死亡率仍居高不下。肺组织内过度炎症反应与高氧化应激状态是其核心病理生理特征和致病诱因,也因此引发肺细胞尤其是肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type II epithelial cells, AT2)的弥漫性损伤,构成了ALI/ARDS的主要病理学基础。AT2是ALI/ARDS发生、发展的重要参与者[1],其损伤程度直接影响肺功能并决定患者愈后[2-3]。因此有效保护AT2细胞、减轻其损伤或促进其再生,是恢复肺泡气血屏障结构和肺功能的前提,更是防止ALI/ARDS发生发展的关键环节[4]。

大量证据表明,氧化应激在ALI/ARDS的发病机制中至关重要[5]。活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的过度产生是ALI/ARDS中肺泡细胞氧化应激(oxidative stress)损伤的主要诱因[6]。肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type II epithelial cells, AT2)和肺泡Ⅰ型上皮细胞(alveolar type I epithelial cells, AT1)是构成功能单位肺泡的主要细胞,发生ALI时AT2可分化为AT1以修复损伤肺泡,因此AT2被誉为损伤肺修复和再生的主要干细胞,是影响损伤肺修复进程和ALI转归的关键效应细胞[7]。抑制肺AT2凋亡有助于减轻多种因素诱导的ALI[8]。因此保护AT2细胞并减轻其氧化损伤,是促进肺泡结构重建和肺功能恢复的前提与基础,也是针对ALI/ARDS关键病理环节进行干预的重要策略。

发生ALI时,在缺血缺氧、炎症等病理情况下,组织细胞内大约95%的ROS源自线粒体(mitochondrion)产生,而这些线粒体内过多ROS蓄积可引发线粒体氧化应激反应[9-10],导致线粒体结构及功能的损害。因此线粒体既是病理条件下细胞内源性ROS的主要来源,也是ROS攻击和损伤的首要靶细胞器[10]。线粒体内高水平的ROS(mtROS)直接损伤线粒体蛋白质、DNA、脂质膜及抗氧化酶等生物大分子,特别是对编码呼吸链蛋白的线粒体DNA(mtDNA)造成损害,导致呼吸链复合物合成障碍、氧化磷酸化抑制及ATP生成减少,而ATP生成不足是触发线粒体途径细胞凋亡的强烈信号[11]。综上,氧化应激导致的线粒体损伤及功能障碍是诱发AT2细胞凋亡的关键原因。因此探讨肺AT2细胞线粒体稳态和功能调控机制对于防治ALI具有重要科学意义。

在活细胞中,线粒体通过适应性重构保持其数量及功能的相对恒定状态称为线粒体稳态,线粒体稳态是细胞存活的前提。沉默信息调节因子3(silent information regulator 3, SIRT3)是一种NAD^+依赖的去乙酰化酶,分子量44×10^3的SIRT3存在于细胞质,功能尚不清楚,28×10^3的SIRT3亚型定位于线粒体基质,是调控线粒体质量控制体系、维持线粒体稳态的关键抗线粒体氧化应激分子[12]。在氧化应激情况下SIRT3可通过调控线粒体生物合成等质量控制机制,维持细胞内功能线粒体的数量与稳态,从而抵抗氧化损伤对线粒体发挥抗氧化保护作用[13]。研究表明,激活细胞SIRT3能有效减轻ALI[14],对ALI具有潜在的治疗应用前景。然而,SIRT3如何调控AT2细胞氧化应激与线粒体生物合成相关机制尚不清楚。本研究以小鼠AT2细胞株MLE-12为研究对象,应用H_2O_2建立AT2以及基因敲低AT2细胞的氧化应激模型,通过观察SIRT3对氧化应激AT2细胞mtROS和线粒体生物合成相关分子表达的影响,阐明SIRT3对AT2细胞线粒体生物合成功能调控的作用及相关分子机制,为SIRT3激动剂靶向线粒体途径治疗ALI/ARDS提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 小鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞MLE-12(Mouse Lung Epithelial-12)(CTCC-003-0020),购自美森生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 3%过氧化氢(3%H_2O_2)购自中国利尔康公司;SDS-PAGE凝胶(12.5%)购自中国雅酶生物科技有限公司;ATP检测试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、RIPA细胞裂解液、抗荧光淬灭封片剂和DAPI染色液均购自上海碧云天公司;预染蛋白分子量标准购自美国Thermo Fisher Scientific公司;超敏化学发光试剂(ECL Reagent)购自澳大利亚Affinity Biosciences公司;*Sirt3*-siRNA购自中国吉玛基因公司;MitoSOX Red检测试剂购自美国MedChem Express公司;核呼吸因子1(nuclear respiratory factor 1, Nrf1)抗

体、腺苷酸活化蛋白激酶α1(AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1, AMPKα1)抗体、线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)抗体均购自美国Abcam公司;沉默调节蛋白3(sirtuin 3, SIRT3)抗体、超氧化物歧化酶2(superoxide dismutase 2, SOD2)抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司;乙酰化锰超氧化物歧化酶2(acetylated manganese superoxide dismutase 2, Acetyl-SOD2)抗体购自中国Affinity Biosciences公司;过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子1α(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha,PGC-1α)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)抗体、β-actin抗体均购自美国Proteintech公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔/小鼠IgG二抗(horseradish peroxidase, HRP)购自中国北京中杉金桥公司;白藜芦醇(resveratrol)购自中国Saimike公司;DMEM/F-12(1∶1)培养基购自美国Gibco公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与处理 肺泡Ⅱ型上皮细胞MLE-12培养于含2%胎牛血清的DMEM/F12(1∶1)培养基中,置于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的细胞培养箱中,每48 h更换培养基并传代。实验选用对数生长期细胞,胰酶消化后以2×10^5个/孔密度接种于6孔板,待细胞融合度达50%时进行后续处理。

1.2.2 实验分组 *Sirt3*敲低实验分为以下6组,每组样本量为3:对照组(NC组):未进行任何转染或H_2O_2处理的MLE-12细胞,仅用完全培养基培养72 h;siRNA阴性对照组(NCsiRNA组):加入含阴性对照NCsiRNA序列及转染试剂复合物刺激细胞72 h;*Sirt3*敲低组(siSIRT3组):加入含*Sirt3*-siRNA干扰序列及转染试剂复合物刺激72 h;500 μmol/L H_2O_2处理组(共3组):对照加H_2O_2损伤组(NC+H_2O_2组):MLE-12培养基培养72 h后予以500 μmol/L H_2O_2刺激24 h;siRNA阴性对照加H_2O_2损伤组(NCsiRNA+H_2O_2组):加入含阴性对照NCsiRNA序列及转染试剂复合物刺激细胞72 h后予以500 μmol/L H_2O_2刺激24 h;*Sirt3*敲低加H_2O_2损伤组(siSIRT3+H_2O_2组):加入含*Sirt3*-siRNA干扰序列及转染试剂复合物刺激72 h后予以500 μmol/L H_2O_2刺激24 h。白藜芦醇刺激MLE-12细胞SIRT3表达实验分为10组,每组样本量为3:对照组(NC)、siRNA阴性对照组(NCsiRNA组);DMSO对照组(DMSO组):加入含有0.0685%浓度的DMSO培养基处理24 h;*Sirt3*敲低组(siSIRT3组);白藜芦醇组(RSV组):加入含有30 μmol/L的白藜芦醇与0.068 5%浓度DMSO的培养基处理24 h;500 μmol/LH_2O_2处理组(共5组):H_2O_2损伤组(NC+H_2O_2组);siRNA阴性对照加H_2O_2损伤组(NCsiRNA+H_2O_2组);DMSO对照加H_2O_2损伤组(DMSO+H_2O_2组):加入含有0.068 5%浓度的DMSO培养基同时含有500 μmol/LH_2O_2的培养基处理24 h;*Sirt3*敲低加H_2O_2损伤组(siSIRT3+H_2O_2组);白藜芦醇加H_2O_2损伤组(RSV+H_2O_2组):加入含有30 μmol/L的白藜芦醇与0.068 5%浓度的DMSO并含有500 μmol/L H_2O_2的培养基处理24 h。

1.2.3 H_2O_2损伤模型建立 采用H_2O_2损伤诱导的MLE-12肺泡Ⅱ型上皮细胞建立体外氧化应激模型,H_2O_2浓度的选择参照QIN等[15]的浓度参数500 μmol/L H_2O_2可诱导肺泡Ⅱ型上皮细胞明显损伤。选用对数生长期细胞,胰酶消化后以2×10^5个/孔密度接种于6孔板,待细胞融合度达50%~80%时或转染siRNA 72 h后以500 μmol/L H_2O_2处理MLE-12细胞24 h。

1.2.4 siRNA转染 实验选用对数生长期的MLE-12细胞,胰酶消化后以2×10^5个/孔密度接种于6孔板,置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养24 h,待细胞贴壁融合度达50%左右时予以siRNA转染,首先制备siRNA预混液,取Buffer 42.5 μL置于无菌无酶EP管中,加入3.75 μL *Sirt3* siRNA,吹打混匀,即得46.25 μL siRNA预混液,下一步制备siRNA/plus复合物,向上述EP管中,按每46.25 μL siRNA预混液加入7.5 μL plus转染试剂,立即用移液枪吹打数十次进行混匀,即得siRNA/plus复合物,最后将制得的siRNA/plus复合物加样至细胞培养基中,转染72 h后进行后续处理。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blot)检测蛋白表达水平 收集细胞,加入RIPA蛋白裂解液裂解细胞提取细胞总蛋白。4 ℃ 13 225 ×*g*离心10 min后吸取上清,采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白定量法检测蛋白浓度。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳分离蛋白样品,采用含20%甲醇的湿转液将分离好的蛋白样品转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上,随后使用5%脱脂牛奶于室温下封闭膜60 min,封闭后加入以下按1∶1 000稀释的一抗:SIRT3、AMPKα1、PGC-1α、Nrf1、TFAM、SOD2、Acetyl-SOD2 ,内参GAPDH(1∶3 000稀释),4 ℃孵育过夜。次日予以TBST洗膜,再加入辣根过氧化物酶标记IgG二抗(羊抗兔或鼠,1∶5 000稀释),室温孵育1 h。最后,加入ECL发光液,放入化学发光成像系统中对目标蛋白进

行显影,使用ImageJ对蛋白表达定量分析。所有组的培养体系为2 mL,各组细胞分别在上述条件下培养后,收集细胞及培养基,提取总蛋白。每组实验均重复3次。

1.2.6　线粒体ROS检测　　将MLE-12细胞接种于铺有细胞玻片的6孔板中,接种密度为4×10^4个细胞/孔,培养体系为2 000 μL,分组同前述细胞分组,每组设置3个复孔,处理同前。处理完毕后进行MitoSOX Red染色,配置5 μmol/L浓度的MitoSOX Red工作液,弃去爬片上的培养基加入100 μL 5 μmol/L MitoSOX Red工作液常温避光孵育30 min,PBS洗涤2次,每次5 min,再加入4%多聚甲醛(PFA)固定20 min,弃去4%PFA后PBS洗涤2次,每次5 min,加入DAPI染液避光孵育15 min,弃去DAPI,再用PBS洗涤2次,每次5 min,最后予以封片剂封片观察。荧光显微镜下观察荧光强度;ImageJ软件定量分析荧光强度。

1.2.7　三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)水平检测　　将细胞接种在6孔板中,接种密度为2×10^5个细胞/孔,培养体系为2 mL/孔。实验分组同前,每组设置3个复孔。处理完毕后,弃去培养基并用PBS将各组细胞润洗后每孔加入200 μL裂解液,裂解后将裂解液收集至对应离心管中,在4 ℃、13 225 ×*g*离心10 min,吸取上清于新的对应离心管中。配置0.01、0.03、0.10、0.30、1.00、3.00和10.00 μmol/L的ATP标准溶液(用于绘制标准曲线)。按照每个样品或标准品需100 μL ATP检测工作液的比例配制适当量的ATP检测工作液。加100 μL ATP检测工作液到检测孔或检测管内。室温放置3~5 min。在检测孔或检测管内加上20 μL样品或标准品,迅速用微量移液器混匀,至少间隔2 s后,用化学发光仪测定相对光单位(RLU)值,根据ATP标准品算出待测样品的ATP含量。

1.2.8　白藜芦醇刺激MLE-12细胞SIRT3表达模型的建立　　采用白藜芦醇刺激MLE-12肺泡Ⅱ型上皮细胞建立体外模型,白藜芦醇浓度的选择参照GONZÁLEZ-BLANCO等[16]的浓度参数。选用对数生长期细胞,胰酶消化后以2×10^5个/孔密度接种于6孔板,待细胞融合度达50%~80%时予以30 μmol/L白藜芦醇处理MLE-12细胞24 h,DMSO溶剂终浓度为0.068 5%。

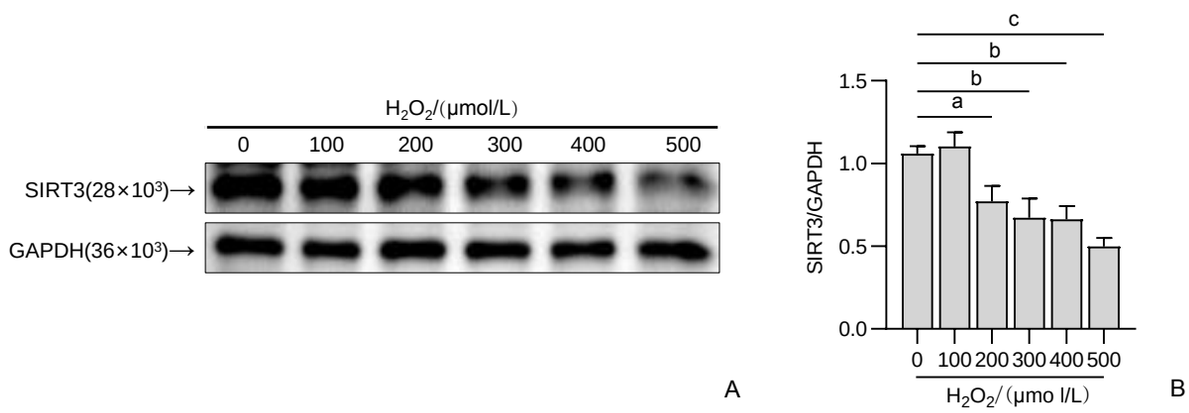
1.3　统计学方法

实验组数据均以同期对照组的平均值进行归一化,结果表示为相对于对照组的倍数变化。应用GraphPad Prism 10.0统计软件分析,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用Student's *t*检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　氧化应激对SIRT3蛋白表达的影响

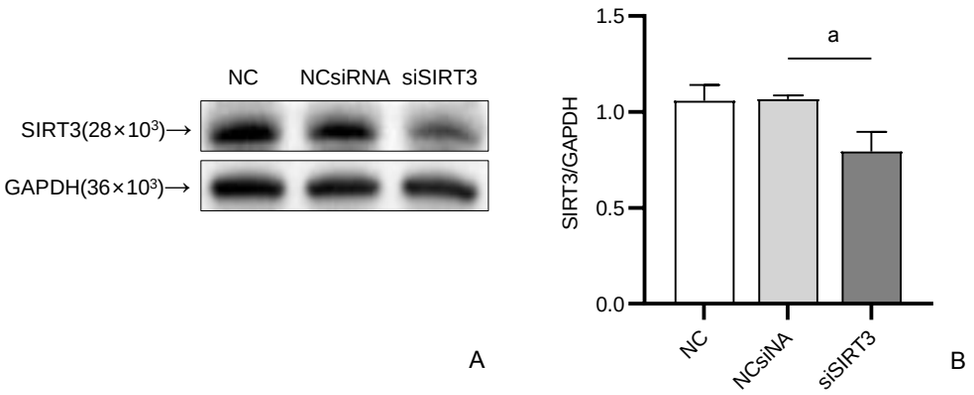
Western blot检测结果显示:随着H_2O_2浓度升高,28×10^3的SIRT3蛋白表达水平呈剂量依赖性下降。H_2O_2浓度在200~500 μmol/L范围时,SIRT3蛋白表达显著低于正常对照组(0 μmol/L H_2O_2)水平($P<0.01$或$P<0.001$或$P<0.000\ 1$,图1)。在500 μmol/L H_2O_2处理组中,SIRT3表达量较对照组显著下降($P<0.000\ 1$,图1)。结果提示200~500 μmol/L H_2O_2能诱导肺泡Ⅱ型上皮细胞发生氧化应激,可能导致线粒体内SIRT3蛋白水平下降。



A, B: Western blot analysis (A) and relative quantification (B) of SIRT3 expression in MLE-12 cells treated with varying concentrations of H_2O_2. a: $P<0.01$, b: $P<0.001$, c: $P<0.000\ 1$

图1　H_2O_2诱导氧化应激对小鼠肺Ⅱ型细胞MLE-12线粒体SIRT3蛋白水平的影响(n=3)

Figure 1　Effect of H_2O_2-induced oxidative stress on mitochondrial SIRT3 protein levels in mouse lung type II epithelial MLE-12 cells (n=3)



A, B: Western blot analysis (A) and relative quantification (B) of SIRT3 following siRNA-mediated knockdown. a: $P<0.001$

图2 Western blot鉴定*Sirt3* siRNA敲低效果(n=3)

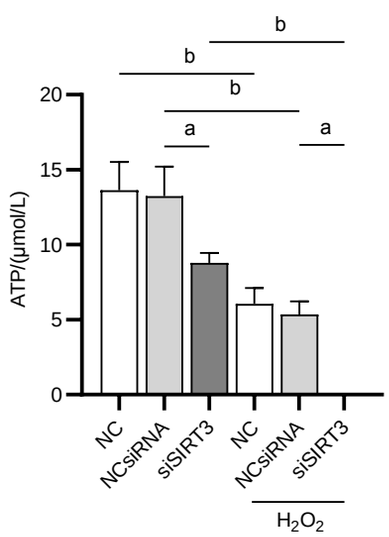
Figure 2 Evaluation of *Sirt3* knockdown efficiency in MLE-12 cells by Western blotting (n=3)

2.2 建立敲低*Sirt3*基因的MLE-12细胞模型

Western blot检测结果显示:与NC组比较,NCsiRNA组细胞SIRT3蛋白表达水平无变化;但*Sirt3*敲低组(siSIRT3组)较NCsiRNA组的SIRT3表达水平显著降低($P<0.001$,图2),提示该序列能成功敲低MLE-12细胞的*Sirt3*基因。

2.3 敲低*Sirt3*基因加重氧化应激MLE-12细胞的ATP合成障碍

细胞ATP检测结果显示:与NCsiRNA组相比,siSIRT3组ATP水平下降($P<0.01$,图3);氧化应激情况下,NC+H_2O_2组、NCsiRNA+H_2O_2组、siSIRT3+H_2O_2组MLE-12细胞ATP水平相较于对应组(未加H_2O_2)显著降低($P<0.0001$,图3),其中siSIRT3+H_2O_2组细胞ATP降低最为显著,甚至低于NCsiRNA+H_2O_2组($P<0.01$,图3)。结果表明敲低*Sirt3*基因会抑制肺AT2细胞ATP合成,影响线粒体功能,而氧化应激情况下,敲低*Sirt3*基因可能进一步损害线粒体功能,加重细胞ATP合成障碍。



a: $P<0.01$, b: $P<0.0001$

图3 敲低*Sirt3*对MLE-12细胞ATP合成的影响(n=3)

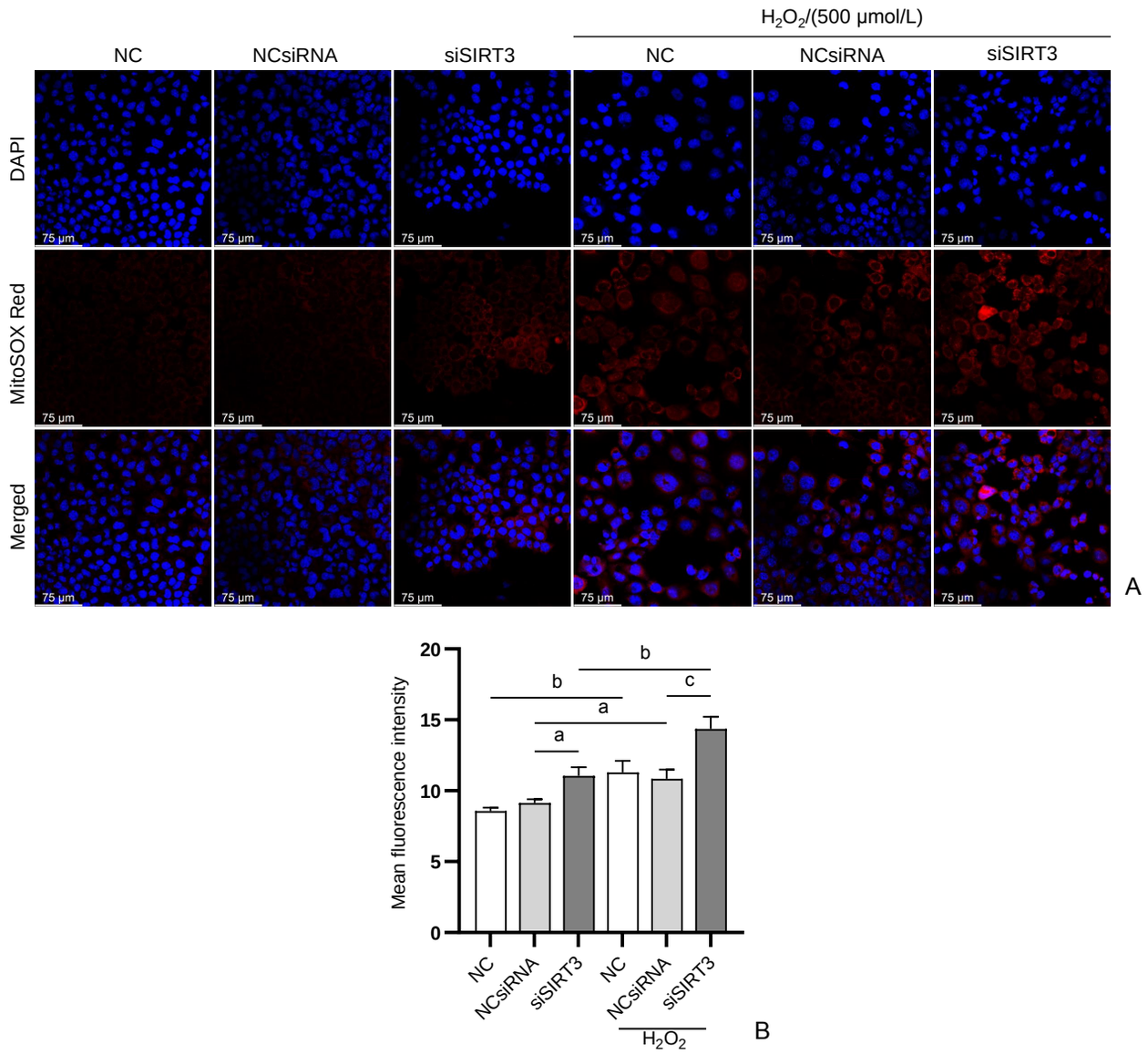
Figure 3 Effect of *Sirt3* knockdown on ATP synthesis in MLE-12 cells (n=3)

2.4 敲低*Sirt3*基因加剧氧化应激MLE-12细胞线粒体ROS(mtROS)的产生

MitoSOX Red染色结果显示:红色荧光增强提示线粒体内$O_2^{\bullet-}$产生增加。检测结果显示,NC组和NCsiRNA组细胞红色荧光微弱;与NCsiRNA组相比,siSIRT3组红色荧光显著增强($P<0.05$,图4);加入H_2O_2后,NC+H_2O_2组、NCsiRNA+H_2O_2组、siSIRT3+H_2O_2 3个氧化应激组细胞的红色荧光较相应对照组明显增强($P<0.05$或$P<0.001$,图4),其中siSIRT3+H_2O_2组细胞的红色荧光强度显著高于NCsiRNA+H_2O_2组细胞($P<0.0001$,图4)。结果表明敲低*Sirt3*基因直接导致mtROS产生增加,氧化应激则会加剧敲低*Sirt3*基因AT2细胞的mtROS产生,增加mtROS积累,进而加重线粒体的氧化应激损伤。

2.5 敲低*Sirt3*及氧化应激对MLE-12细胞线粒体抗氧化酶及线粒体生物合成的影响

2.5.1 敲低*Sirt3*抑制MLE-12细胞线粒体抗氧化酶表达及其活性 Western blot检测结果显示:与NCsiRNA组相比,siSIRT3组SOD2和Acetyl-SOD2表达水平升高($P<0.0001$,图5A~C);加入H_2O_2后,NC+H_2O_2组、NCsiRNA+H_2O_2组SOD2和Acetyl-SOD2表达水平较相应对照组明显升高($P<0.01$或$P<0.0001$,



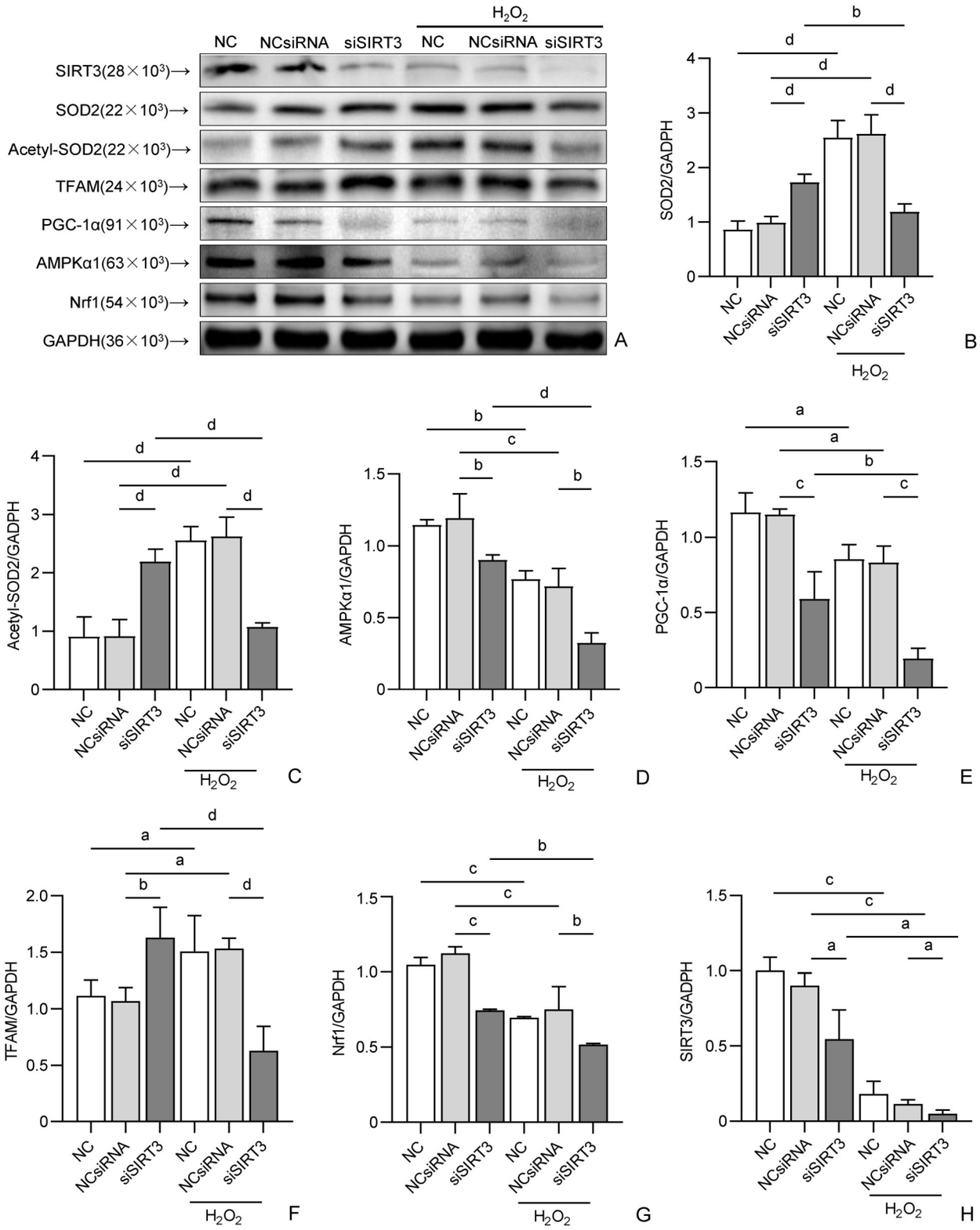
a: P<0.05, b: P<0.001, c: P<0.000 1

图4　敲低*Sirt3*后及氧化应激条件下对MLE-12细胞线粒体O_2•⁻的影响(n=3)

Figure 4　Effects of *Sirt3* knockdown and oxidative stress on mitochondrial O_2•⁻ level in MLE-12 cells (n=3)

图5A~C),但是与NCsiRNA+H_2O_2组相比,siSIRT3+H_2O_2组的SOD2和Acetyl-SOD2表达明显下降(P<0.000 1,图5A~C)。以上结果表明单纯敲低*Sirt3*基因和在氧化应激情况下均可能会刺激肺泡Ⅱ型上皮细胞MLE-12的总SOD2蛋白及其乙酰化水平反应性增加,但在氧化应激情况下,敲低*Sirt3*则显著降低细胞SOD2总蛋白及其乙酰化水平(图5A~C),提示氧化应激或抑制SOD2蛋白的表达。

2.5.2　敲低*Sirt3*抑制肺AT2细胞株MLE-12线粒体的生物合成相关蛋白表达　　Western blot结果显示,与NCsiRNA组相比,siSIRT3组细胞的AMPKα1、PGC-1α、Nrf1、SIRT3表达水平显著下降(P<0.05或P<0.01或P<0.001,图5A、D、E、G、H),但TFAM表达升高(P<0.01,图5A、F)。氧化应激情况下,NC+H_2O_2组、NCsiRNA+H_2O_2组、siSIRT3+H_2O_2组3组细胞的AMPKα1、PGC-1α、Nrf1、SIRT3蛋白表达水平较相应的对照组显著下降(P<0.05或P<0.01或P<0.001或P<0.000 1,图5A、D、E、G、H),NC+H_2O_2组、NCsiRNA+H_2O_2组TFAM较对应组表达水平升高(P<0.05,图5A、F),而siSIRT3+H_2O_2组细胞的AMPKα1、PGC-1α、Nrf1、TFAM、SIRT3蛋白表达水平较NCsiRNA+H_2O_2组进一步下降(P<0.05或P<0.01或P<0.001或P<0.000 1,图5A、D~H)。



A: Representative Western blot images of SOD2, Acetyl-SOD2, TFAM, PGC-1α, AMPKα1, Nrf1 and SIRT3 from different groups. B~H: Quantitative analysis of the relative protein expression levels of the respective proteins shown in A. All bands were derived from a same sample. a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$, d: $P<0.0001$

图5 敲低*Sirt3*及氧化应激条件下MLE-12细胞粒体抗氧化及生物合成蛋白相关表达变化(n=3)

Figure 5 Effects of *Sirt3* knockdown and oxidative stress on the expression of mitochondrial biogenesis and antioxidant proteins in MLE-12 cells (n=3)

2.6　建立增加MLE-12细胞SIRT3蛋白表达的模型

Western blot检测结果显示:RSV处理MLE-12细胞24 h后,Western blot检测28×10³ SIRT3蛋白的表达水平。结果显示:与NC组比较,DMSO组细胞SIRT3蛋白表达水平无变化;但白藜芦醇刺激组(RSV组)较NC组的SIRT3表达水平明显升高(P<0.05,图6),提示白藜芦醇成功刺激MLE-12细胞的SIRT3蛋白表达增加。

2.7　白藜芦醇刺激MLE-12细胞对SIRT3与PGC-1α的影响

Western blot检测结果显示:与NC组相比,RSV组PGC-1α、SIRT3表达水平显著升高(P<0.05,图7);在氧化应激条件下,NC+H_2O_2组、NCsiRNA+H_2O_2组、DMSO+H_2O_2组、siSIRT3+H_2O_2组及RSV+H_2O_2组MLE-12细胞的PGC-1α、SIRT3水平相较于各自未加H_2O_2的对照组均显著降低(P<0.05,图7),RSV+H_2O_2组的PGC-1α、SIRT3表达显著高于NC+H_2O_2组和siSIRT3+H_2O_2组(P<0.05,图7),其中与siSIRT3+H_2O_2组相比升高最为显著(P<0.01,图7),结果表明增加SIRT3蛋白表达能促进PGC-1α的表达,在氧化应激条件下能减少PGC-1α的表达下降从而改善线粒体功能。

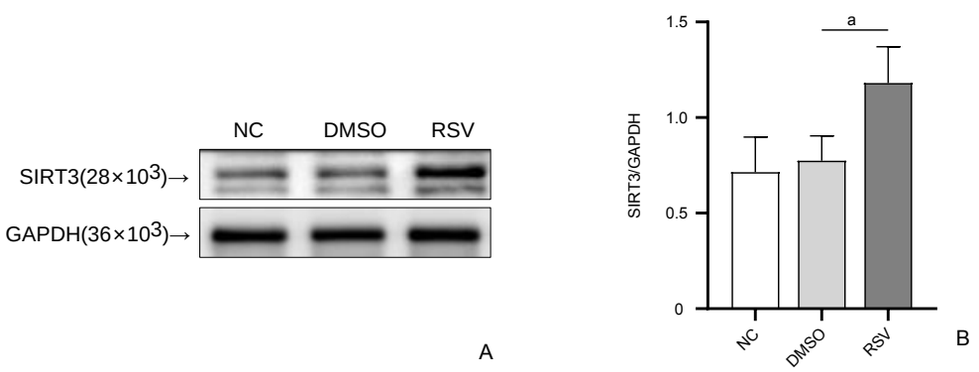
3　讨论

3.1　SIRT3通过调控SOD2与ATP介导肺泡Ⅱ型上皮细胞氧化应激损伤

氧化应激介导的组织细胞损伤,特别是肺泡AT2细胞的损伤在ALI/ARDS的发病机制中具有重要作用[17],并显著影响病程的发展和预后。28×10³的SIRT3是线粒体重要的去乙酰化酶,SITR3以NAD+依赖的方式催化线粒体蛋白发生去乙酰化[18],其能调节线粒体的许多方面包括代谢、ATP生成、调节氧化应激反应等,在调控线粒体功能中占据关键地位。

SIRT3能通过上调细胞叉头框蛋白O3α(forkhead box O3α, FOXO3α)、超氧化物歧化酶2(superoxide dismutase 2, SOD2)及过氧化氢酶从而清除mtROS。本研究观察到,随着H_2O_2浓度的增加,细胞28KD的SIRT3表达水平呈剂量依赖性下降,敲低*Sirt3*基因后,MLE-12细胞的mtROS(O_2•⁻)水平显著升高,相反细胞ATP水平显著下降,而氧化应激情况下,在氧化应激条件下,上述变化进一步加剧。由此证实氧化应激可以直接导致线粒体内SIRT3蛋白水平下降,进而导致线粒体的氧化还原失衡(即mtROS水平增加)及线粒体功能障碍(表现为ATP生成减少),提示敲低*Sirt3*基因会加重AT2细胞线粒体内氧化还原失衡,加剧细胞mtROS产生和蓄积,进而加重线粒体氧化应激并导致线粒体结构及功能损害[19]。氧化应激时,由于缺乏SIRT3加剧mtROS产生,从而直接加剧线粒体蛋白质、DNA和脂质膜的氧化损伤。编码呼吸链蛋白的线粒体DNA(mtDNA)损伤会抑制呼吸链复合物合成,同时,呼吸链的电子漏出增加促进更多ROS产生[20],如此形成恶性循环最终加重线粒体结构和功能损害[21]。因此SIRT3是增强线粒体抗氧化应激的关键分子,发挥线粒体内源性保护作用。

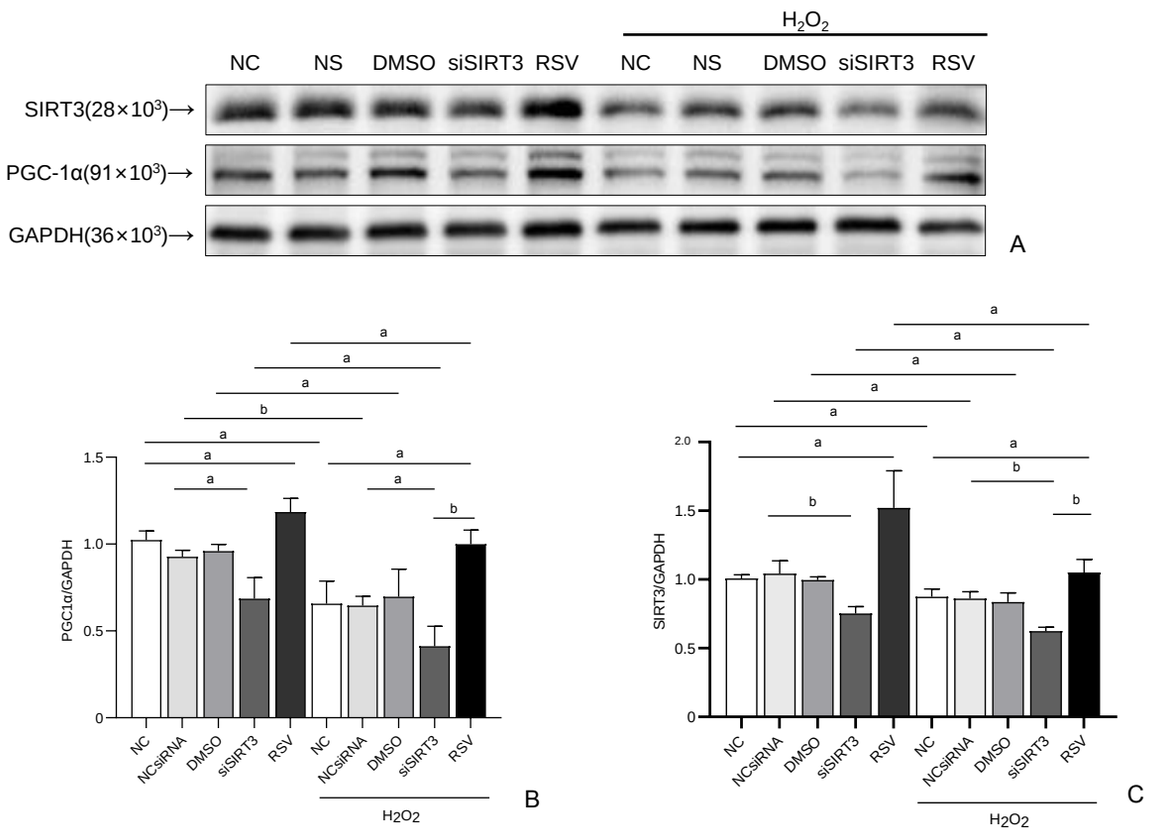
SOD2是线粒体内重要抗氧化酶之一,SIRT3通过去乙酰化SOD2蛋白的第68位赖氨酸(Lys68)位点激活其酶活性。有研究显示,SIRT3缺失直接导致SOD2功能失活[22],Acetyl-SOD2的增加提示SOD2去乙酰化不足与酶活性降低有关。本研究发现,敲低*Sirt3*会导致细胞SOD2总蛋白和乙酰化SOD2(Acetyl-SOD2)蛋白反应性表达增加,其机制可能是细胞通过代偿性反馈机制上调SOD2的表达以应对其活性不足。此外,本研究还发现氧化应激时,敲低*Sirt3*基因情况下,



A: Representative Western blot analysis of SIRT3 expression in MLE-12 cells following resveratrol treatment. B: Quantitative analysis of relative SIRT3 protein level. All bands were derived from a same sample. a: P<0.05

图6　白藜芦醇刺激MLE-12细胞后SIRT3蛋白影响(n=3)

Figure 6　Effect of resveratrol on SIRT3 protein expression in MLE-12 cells(n=3)



A: Representative Western blot analysis of PGC-1α and SIRT3 expression in MLE-12 cells following resveratrol treatment and oxidative stress. B~C: Quantitative analysis of relative PGC-1α and SIRT3 protein levels. All bands were derived from a same sample. a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

图7 白藜芦醇刺激MLE-12细胞后后及氧化应激条件下对PGC-1α、SIRT3的影响(n=3)

Figure 7 Effects of resveratrol and oxidative stress on PGC-1α and SIRT3 in MLE-12 cells(n=3)

SOD2总蛋白和Acetyl-SOD2蛋白水平均显著下降,提示氧化应激时敲低*Sirt3*会严重抑制SOD2蛋白合成,原因可能是敲低*Sirt3*后导致细胞的细胞基础抗氧化能力受损,严重氧化应激时氧化还原系统崩溃,大量的ROS损伤DNA、抑制mRNA合成或翻译过程,导致包括SOD2在内的蛋白合成受阻,或者细胞损伤过重进入凋亡程序导致SIRT3、SOD2和Acetyl-SOD2表达下调。有研究报道SIRT3敲除动物的线粒体功能较低,并且更容易遭受缺血缺氧损伤[23],这与本研究体外观察结果相一致。而ATP生成不足会强烈触发线粒体途径的细胞凋亡,这可能是ALI/ARDS时肺组织出现大量细胞凋亡坏死的重要原因[24]。

3.2 SIRT3通过调节线粒体生物合成在肺泡Ⅱ型上皮细胞中发挥保护作用

线粒体生物合成是线粒体质量控制的重要机制之一,通过促进新生线粒体生成以替代损伤线粒体功能来维持细胞正常线粒体数量和功能。研究表明,SIRT3在线粒体质量控制中发挥重要作用[25]。线粒体生物合成包括mtDNA的复制、转录和翻译、核编码线粒体蛋白的合成和输入、新合成蛋白质和脂质的募集以及线粒体网络的构建[26]。PGC-1α被认为是线粒体生物合成的主要调节因子,它与核呼吸因子1和2(NRF 1,2)相互作用可激活TFAM,从而影响mtDNA的转录促进新生线粒体合成[27]。PGC-1α的表达受SIRT3和AMPK双重调控。AMPK作为细胞能量感应器能感知细胞内的能量状态(如ATP合成减少)[28]。线粒体损伤及ATP合成减少时AMPK活化并通过启动PGC-1α促进线粒体生物合成即通过恢复线粒体数量增强ATP合成。SIRT3可通过去乙酰化作用正反馈激活AMPK,进而激活PGC-1α并促进线粒体生物合成、改善线粒体功能[29]。然而,在ALI/ARDS时,由于长时间的缺血或氧化应激会导致PGC-1α和TFAM下降,与此同时,线粒体SIRT3水平下降或SIRT3被敲低会直接抑制TFAM的去乙酰化活化与线粒体生物合成

的关键通路PGC-1α/Nrf1/TFAM[30],导致新生线粒体生成障碍,最终因损伤线粒体得不到及时补充以及线粒体功能障碍促进线粒体途径的细胞凋亡坏死。

本研究中发现,敲低*Sirt3*时会导致肺泡Ⅱ型上皮细胞AMPKα1、PGC-1α、Nrf1表达下调,氧化应激导致敲低和非敲低*Sirt3*基因的肺泡Ⅱ型上皮细胞这些蛋白表达进一步下调,增加SIRT3表达可以促进PGC-1α表达上调并减轻氧化应激导致的SIRT3表达下降,这一结果提示SIRT3缺失可能会抑制线粒体生物合成相关通路AMPKα1/PGC-1α/Nrf1活化,而氧化应激情况下,对该通路的抑制作用会进一步增加,进而损害线粒体生物合成功能,抑制新生线粒体生成。增加SIRT3表达有助于恢复肺泡Ⅱ型上皮细胞的线粒体生物合成功能,这与文献报道相一致[31]。因此我们认为SIRT3是维持肺AT2细胞线粒体氧化还原平衡和调控线粒体生物合成以维持线粒体稳态的关键分子。

综上所述,本研究不仅确立了SIRT3在保护肺泡Ⅱ型上皮细胞抵御氧化应激中的核心地位,SIRT3通过其去乙酰化作用直接激活SOD2增强线粒体内抗氧化防御以维持细胞氧化还原平衡,从而维持线粒体稳态。同时,SIRT3通过调控AMPK-PGC-1α-Nrf1/TFAM级联信号调控线粒体生物合成,以维持线粒体功能减轻细胞损伤。最终阐明SIRT3是维持线粒体稳态的关键分子,通过维持肺AT2细胞线粒体氧化还原平衡和增强线粒体生物合成发挥细胞抗氧化应激保护作用。因此调控SIRT3表达可能增强肺泡Ⅱ型细胞抵抗氧化应激凋亡,为ALI/ARDS防治提供新的靶点。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] BI W D, WANG R, HOU S Y, *et al*. Alveolar epithelial type 2 cells in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: spatiotemporal fate and regulation [J]. Burns Trauma, 2025, 13: tkaf050. DOI:10.1093/burnst/tkaf050.

[2] OLAJUYIN A M, ZHANG X J, JI H L. Alveolar type 2 progenitor cells for lung injury repair[J]. Cell Death Discov, 2019, 5: 63. DOI:10.1038/s41420-019-0147-9.

[3] WENG A, MACIEL HERRERIAS M, WATANABE S, *et al*. Lung injury induces alveolar type 2 cell hypertrophy and polyploidy with implications for repair and regeneration [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2022, 66(5): 564-576. DOI: 10.1165/rcmb.2021-0356OC.

[4] CHEN X Y, ZHANG C P, WEI T C, *et al*. α7nAChR activation in AT2 cells promotes alveolar regeneration through WNT7B signaling in acute lung injury[J]. JCI Insight, 2023, 8(15): e162547. DOI:10.1172/jci.insight.162547.

[5] WANG F Y, GE R Q, CAI Y, *et al*. Oxidative stress in ARDS: mechanisms and therapeutic potential [J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1603287. DOI: 10.3389/fphar.2025.1603287.

[6] LIU H L, PAN Z H, MA X D, *et al*. ROCK inhibitor fasudil reduces the expression of inflammatory factors in LPS-induced rat pulmonary microvascular endothelial cells *via* ROS/NF-κB pathway[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2022, 23(1): 24. DOI:10.1186/s40360-022-00565-7.

[7] GUILD J, JUUL N H, ANDALON A, *et al*. Evidence for lung barrier regeneration by differentiation prior to binucleated and stem cell division[J]. J Cell Biol, 2023, 222(12): e202212088. DOI:10.1083/jcb.202212088.

[8] BROWNFIELD D G, DE ARCE A D, GHELFI E, *et al*. Alveolar cell fate selection and lifelong maintenance of AT2 cells by FGF signaling [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 7137. DOI:10.1038/s41467-022-34059-1.

[9] PURI G, NAURA A S. Critical role of mitochondrial oxidative stress in acid aspiration induced ALI in mice [J]. Toxicol Mech Methods, 2020, 30(4): 266-274. DOI: 10.1080/15376516.2019.1710888.

[10] FOCK E M, PARNOVA R G. Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants against inflammatory response to lipopolysaccharide challenge: a review [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(2): 144. DOI: 10.3390/pharmaceutics13020144.

[11] MARCUS J M, ANDRABI S A. SIRT3 regulation under cellular stress: making sense of the ups and Downs [J]. Front Neurosci, 2018, 12: 799. DOI: 10.3389/fnins.2018.00799.

[12] COOPER H M, HUANG J-Y, VERDIN E, *et al*. A new splice variant of the mouse SIRT3 gene encodes the mitochondrial precursor protein [J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4986. DOI:10.1371/journal.pone.0004986.

[13] ZHANG Y, WEN P, LUO J, *et al*. Sirtuin 3 regulates mitochondrial protein acetylation and metabolism in tubular epithelial cells during renal fibrosis [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(9): 847. DOI:10.1038/s41419-021-04134-4.

[14] WU Z Q, WANG Y, LU S J, *et al*. SIRT3 alleviates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting pyroptosis *via* regulating the deacetylation of FoxO3a[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2023, 82: 102244. DOI: 10.1016/j. pupt. 2023. 102244.

[15] 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.

[16] GONZÁLEZ-BLANCO C, LOCKWOOD Á C, JIMÉNEZ B, *et al*. Resveratrol protects pancreatic beta cell and hippocampal cells from the aggregate-prone capacity of hIAPP[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 27523. DOI: 10.1038/s41598-024-78967-2.

[17] HE Y Q, ZHOU C C, YU L Y, *et al*. Natural product derived phytochemicals in managing acute lung injury by multiple mechanisms [J]. Pharmacol Res, 2021, 163: 105224. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105224.

[18] HONG C B, WEI Y P, WANG Y C, *et al*. The mechanism and therapeutic potential of SIRT3 in central nervous system diseases: a review [J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1652296. DOI: 10.3389/fphar.2025.1652296.

[19] REHAN M, KURUNDKAR D, KURUNDKAR A R, *et al*. Restoration of SIRT3 gene expression by airway delivery resolves age-associated persistent lung fibrosis in mice [J]. Nat Aging, 2021, 1(2): 205-217. DOI: 10.1038/s43587-021-00027-5.

[20] DAI K, WANG Z Q, GAO B X, *et al*. APE1 regulates mitochondrial DNA damage repair after experimental subarachnoid haemorrhage *in vivo* and *in vitro* [J]. Stroke Vasc Neurol, 2024, 9(3): 230-242. DOI: 10.1136/svn-2023-002524.

[21] PHILIPPONNET C, ANIORT J, GARROUSTE C, *et al*. Ischemia reperfusion injury in kidney transplantation: a case report [J]. Medicine, 2018, 97(52): e13650. DOI: 10.1097/MD.0000000000013650.

[22] LAMBONA C, ZWERGEL C, VALENTE S, *et al*. SIRT3 activation a promise in drug development? new insights into SIRT3 biology and its implications on the drug discovery process [J]. J Med Chem, 2024, 67(3): 1662-1689. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c01979.

[23] WANG L Q, CHEN C G, ZHOU H, *et al*. Nicotinamide riboside-driven modulation of SIRT3/mtROS/JNK signaling pathways alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Int J Med Sci, 2024, 21(11): 2139-2148. DOI: 10.7150/ijms.97530.

[24] WANG T T, HAN T T, XIAO X Y, *et al*. SIRT3 deficiency reduces PFKFB3-driven T-cell glycolysis and promotes arthritic inflammation [J]. Sci China Life Sci, 2025, 68(6): 1755-1769. DOI: 10.1007/s11427-024-2823-2.

[25] MENG H, YAN W Y, LEI Y H, *et al*. SIRT3 regulation of mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases [J]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 313. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00313.

[26] KUMMER E, BAN N. Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021, 22(5): 307-325. DOI: 10.1038/s41580-021-00332-2.

[27] HAN X Q, ZHANG M, LIU D W, *et al*. PGC-1 alpha regulates mitochondrial biogenesis to promote silica-induced pulmonary fibrosis [J]. Toxicol Res, 2025, 14(3): tfaf070. DOI: 10.1093/toxres/tfaf070.

[28] HAWLEY S A, RUSSELL F M, HARDIE D G. AMP-activated protein kinase can be allosterically activated by ADP but AMP remains the key activating ligand [J]. Biochem J, 2024, 481(8): 587-599. DOI: 10.1042/BCJ20240082.

[29] LI Y Z, WANG Q, LI J Y, *et al*. SIRT3 affects mitochondrial metabolic reprogramming *via* the AMPK-PGC-1α axis in the development of benign prostatic hyperplasia [J]. Prostate, 2021, 81(15): 1135-1148. DOI: 10.1002/pros.24208.

[30] YIN W, SIGNORE A P, IWAI M, *et al*. Rapidly increased neuronal mitochondrial biogenesis after hypoxic-ischemic brain injury [J]. Stroke, 2008, 39(11): 3057-3063. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.520114.

[31] LEE J, KIM Y, LIU T, *et al*. SIRT3 deregulation is linked to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. Aging Cell, 2018, 17(1): e12679. DOI: 10.1111/acel.12679.

(收稿:2025-08-25;修回:2025-12-04)

(编辑 汤锦波)