



lncRNA EGOT靶向miR-320a对LPS诱导肺泡上皮细胞炎症反应和细胞凋亡的影响

吴云飞, 钟海, 张智慧, 梁鸿章, 陈旭源, 李想, 吴旭

引用本文:

吴云飞, 钟海, 张智慧, 等. lncRNA EGOT靶向miR-320a对LPS诱导肺泡上皮细胞炎症反应和细胞凋亡的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2021, 46(10): 1325-1330.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.10.001>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

淫羊藿通过miR-19a-3p对高糖高脂诱导的胰岛β细胞损伤的影响及机制研究

Effects of Epimedium herb through miR-19a-3p on islet β cells damage induced by high glucose and lipid and its mechanism

蚌埠医学院学报. 2020, 45(6): 725-730 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.06.007>

miR-125b靶向调控HK2表达增强乳腺癌MCF-7细胞放射敏感性的研究

Study on the mechanism of miR-125 b targeting HK2 expression to enhance radiosensitivity of breast cancer MCF-7 cells

蚌埠医学院学报. 2019, 44(9): 1158-1162 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.09.005>

LncRNA PCBP1-AS1对口腔鳞癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

Effect of LncRNA PCBP1-AS1 on the proliferation, invasion and apoptosis of oral squamous carcinoma cells

蚌埠医学院学报. 2021, 46(2): 154-158 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.02.004>

乌司他丁通过miR-146a调节TLR4/NF-κB信号通路减轻失血性休克大鼠肾炎性损伤研究

Study on ulinastatin alleviating the nephritis injury in hemorrhagic shock rats by regulating the TLR4/NF-κ B signaling pathway via miR-146a

蚌埠医学院学报. 2020, 45(3): 286-290,295 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.03.002>

miR-655在上皮性卵巢癌中的表达研究

Study on the miR-655 expression in epithelial ovarian cancer

蚌埠医学院学报. 2020, 45(2): 181-184 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.02.012>

lncRNA EGOT 靶向 miR-320a 对 LPS 诱导肺泡上皮细胞炎症反应和细胞凋亡的影响

吴云飞¹, 钟海², 张智慧³, 梁鸿章⁴, 陈旭源³, 李想⁵, 吴旭³

[摘要] **目的:**探讨长链非编码 RNA(lncRNA)嗜酸性粒细胞转录因子(EGOT)对脂多糖(LPS)诱导的肺泡上皮细胞 A549 凋亡、炎症反应的影响及可能机制。**方法:**将 A549 细胞分为对照组(Con)、LPS 组、LPS + pcDNA 组、LPS + pcDNA-EGOT 组、LPS + anti-miR-NC 组、LPS + anti-miR-320a 组、LPS + pcDNA-EGOT + miR-NC 组、LPS + pcDNA-EGOT + miR-320a 组。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 EGOT 和 miR-320a 表达水平;流式细胞术检测细胞凋亡;试剂盒检测白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 水平。双荧光素酶报告基因实验和 RT-qPCR 确定 EGOT 和 miR-320a 之间靶向作用。**结果:**与 Con 组比较,LPS 组 A549 细胞凋亡率、IL-6 和 IL-1 β 水平均升高($P < 0.05$),EGOT 表达水平降低($P < 0.01$),miR-320a 表达水平明显升高($P < 0.01$)。与 LPS + pcDNA 组比较,LPS + pcDNA-EGOT 组 A549 细胞凋亡率、Bax 蛋白表达、IL-6 和 IL-1 β 水平均降低($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达升高($P < 0.05$)。与 LPS + anti-miR-NC 组比较,LPS + anti-miR-320a 组 A549 细胞凋亡率、Bax 蛋白表达、IL-6 和 IL-1 β 水平均明显降低($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达明显升高($P < 0.01$)。与 LPS + pcDNA-EGOT + miR-NC 组比较,LPS + pcDNA-EGOT + miR-320a 组 A549 细胞凋亡率、Bax 蛋白表达、IL-6 和 IL-1 β 水平均明显升高($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达明显降低($P < 0.01$)。双荧光素酶报告实验显示,EGOT 靶向负性调控 miR-320a 表达。**结论:**lncRNA EGOT 通过靶向 miR-320a 可减轻 LPS 诱导肺泡上皮细胞炎症反应和细胞凋亡。

[关键词] 肺泡上皮细胞;长链非编码 RNA;嗜酸性粒细胞转录因子;miR-320a;脂多糖;细胞凋亡

[中图分类号] R 563 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.10.001

Effect of lncRNA EGOT on LPS-induced inflammation and apoptosis of alveolar epithelial cells by targeting miR-320a

WU Yun-fei¹, ZHONG Hai², ZHANG Zhi-hui³, LIANG Hong-zhang⁴, CHEN Xu-yuan³, LI Xiang⁵, WU Xu³

(1. Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou Sichuan 646000; 2. Department of Cardiothoracic Vascular Surgery, The Second Hospital of Yinzhou District, Ningbo Zhejiang 315100; 3. Department of Thoracic Surgery, 5. Department of Emergency, South Hospital, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong 510000; 4. Department of Thoracic Surgery, The First People's Hospital in Kashigar, Kashigar Xinjiang 844000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of long-chain non-coding RNA eosinophilic transcription factor (EGOT) on lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptosis and inflammation of alveolar epithelial A549 cells and its possible mechanism. **Methods:** A549 cells were divided into control (Con) group, LPS group, LPS + pcDNA group, LPS + pcDNA-EGOT group, LPS + anti-miR-NC group, LPS + anti-miR-320a group, LPS + pcDNA-EGOT + miR-NC group, and LPS + pcDNA-EGOT + miR-320a group. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of EGOT and miR-320a, flow cytometry was applied to detect apoptosis, and the kit was used to detect the levels of interleukin (IL)-6 and IL-1 β . Dual luciferase reporter gene assay and RT-qPCR was employed to confirm the targeting relationship between EGOT and miR-320a. **Results:** Compared with the Con group, the apoptosis rate, IL-6 and IL-1 β levels of A549 cells in the LPS group were increased ($P < 0.01$), the EGOT expression level was reduced ($P < 0.05$), and the miR-320a expression level was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the LPS + pcDNA group, the apoptosis rate, Bax protein expression, IL-6 and IL-1 β levels of A549 cells in the LPS + pcDNA-EGOT group were reduced ($P < 0.05$), and the Bcl-2 protein expression were increased ($P < 0.05$). Compared with the LPS + anti-miR-NC group, the apoptosis rate, Bax

protein expression, IL-6 and IL-1 β levels of A549 cells in the LPS + anti-miR-320a group were significantly reduced ($P < 0.01$), and the Bcl-2 protein expression were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the LPS + pcDNA-EGOT + miR-NC group, the apoptosis rate, Bax protein expression, IL-6 and IL-1 β levels of A549 cells in the LPS + pcDNA-EGOT + miR-320a group were significantly increased ($P < 0.01$), and the Bcl-2 protein expression were significantly

[收稿日期] 2021-05-17 [修回日期] 2021-09-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81671905)

[作者单位] 1. 西南医科大学附属医院 胸外科, 四川 泸州 646000; 2. 浙江省宁波市鄞州区第二医院 心胸血管外科, 315100; 南方医科大学南方医院 3. 胸外科, 5. 急诊科, 广东 广州 510000; 4. 新疆喀什地区第一人民医院 胸外科, 844000

[作者简介] 吴云飞(1978-), 男, 博士, 主治医师。

reduced ($P < 0.01$). The results of dual luciferase reporter gene assay showed that EGOT targeted and negatively regulated the miR-320a expression. **Conclusions:** LncRNA EGOT can alleviate LPS-induced inflammation and apoptosis of alveolar epithelial cells by targeting miR-320a.

[**Key words**] long-chain non-coding RNA eosinophilic transcription factor; alveolar epithelial cells; miR-320a; lipopolysaccharide; apoptosis

急性肺损伤 (ALI) 是一种流行性炎症性肺疾病, 是急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的重要原因, 其发病率和重症病人死亡率均很高。尽管在治疗策略方面已取得重大进展, 但 ARDS 和 ALI 的年死亡率仍为 40%, 且医疗费用较高^[1]。ALI 作为一种进展性疾病, 以促炎性因子的过度产生、炎症细胞浸润以及肺泡上皮细胞的凋亡为主要特征^[2]。因此, 有效地控制肺泡上皮细胞炎症和凋亡对改善病人预后意义重大。长链非编码 RNA (lncRNA) 通过染色体重塑、转录和转录后加工等多种方式参与调节基因表达, 在广泛的生物学领域具有重要功能^[3-4]。研究^[5]证实, 在低氧诱导的心肌细胞损伤中 lncRNA 嗜酸性粒细胞转录因子 (EGOT) 低表达, 脑钠肽能通过促进 lncRNA EGOT 表达, 抑制促凋亡蛋白表达从而缓解低氧诱导的心肌细胞损伤。lncRNABase 网站在线预测显示, EGOT 与 miR-320a 之间存在结合位点。既往研究^[6]显示, 高氧刺激后肺泡上皮细胞微泡中 miR-320a 表达增加促进巨噬细胞介导的肺部炎症反应。基于以上研究, 本研究探讨 lncRNA EGOT、miR-320a 在 ALI/ARDS 中的作用及可能机制, 以期为 ALI/ARDS 提供有效的临床治疗策略。

1 材料与方法

1.1 材料 肺泡上皮细胞 A549 购自中科院上海细胞库; RPMI-1640、胎牛血清购自北京索莱宝生物; 脂多糖 (LPS) 购自美国 Sigma 公司; miR-320a 抑制剂 (anti-miR-320a) 及其阴性对照 (anti-miR-NC)、EGOT 过表达质粒 (pcDNA-EGOT)、质粒空载体 (pcDNA)、miR-320a 模拟物 (miR-320a mimics) 及其阴性对照 (miR-NC)、EGOT 小干扰 RNA (si-EGOT) 及其阴性对照 (si-NC)、双荧光素酶报告基因载体购自广州锐博生物; 白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 酶连免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购自北京博凌科为生物; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物; 兔抗人 B 淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抗体、兔抗人 Bcl 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体、兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体、羊抗兔 IgG 购自上海艾博抗生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和实验分组 A549 细胞采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基置于含 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。将对数期 A549 按照 2×10^5 个/孔接种 24 孔板, 1 h 后加入 LPS 使其终浓度为 10 mg/L 孵育细胞 24 h, 记为 LPS 组^[7], 同时设置不加 LPS 对照 (Con) 组, 收集细胞进行后续试验。为证实 lncRNA EGOT、miR-320a 在 LPS 诱导的 A549 细胞炎症反应和凋亡中的作用, 利用脂质体转染法将 pcDNA、pcDNA-EGOT、anti-miR-NC、anti-miR-320a、pcDNA-EGOT + miR-NC、pcDNA-EGOT + miR-320a mimics 分别转染 A549 细胞, 用含 10 mg/L LPS 的细胞培养液处理转染成功的细胞 24 h, 依次记为 LPS + pcDNA 组、LPS + pcDNA-EGOT 组、LPS + anti-miR-NC 组、LPS + anti-miR-320a 组、LPS + pcDNA-EGOT + miR-NC 组、LPS + pcDNA-EGOT + miR-320a 组, 收集细胞进行后续试验。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 lncRNA EGOT 和 miR-320a 表达 使用 Trizol 试剂盒提取总 RNA 含量。PrimeScript RT 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA, 应用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒通过 ABI7500 系统进行 RT-qPCR。U6 作为 miR-320a 的内参, GAPDH 作为 lncRNA EGOT 内参, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 lncRNA EGOT 和 miR-320a 相对表达量。U6 引物 F: 5'-GTG ATC ACT CCC TGC CTG AG-3', R: 5'-GGA CTT CAC TGG ACC AGA CG-3'; GAPDH 引物 F: 5'-CCG CAT CTT CTT GTG CAG TG-3', R: 5'-CCC AAT ACG GCC AAA TCC GT-3'; miR-320a 引物 F: 5'-AAG GGA TCG CGG GCG-3', R: 5'-TGC GTG TCG TGG AGT C-3'; EGOT 引物 F: 5'-CAC TGC ACA GGG AAA CAC AAA-3', R: 5'-ACC CTG TTC ATA AGC CCT GAT G-3'。

1.2.3 ELISA 检测 IL-6 和 IL-1 β 水平 将未转染或转染后 A549 细胞调整为 4×10^5 个/毫升, 取 500 μ L 细胞悬液加至 24 孔板中, 1 h 后, 按照 LPS 终浓度为 10 mg/L 加入 LPS 再培养 24 h。1 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液参照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6 和 IL-1 β 水平。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 采用结合缓冲液将 LPS 处理 24 h 的各组细胞调整为 1×10^5 个/

毫升单细胞悬液。取 100 μ L 细胞悬液加入到流式管,按照凋亡检测试剂盒说明书加入 Annexin V-FITC 和 PI 试剂进行染色,避光反应 15 min,1 h 内上级检测细胞凋亡。

1.2.5 Western blotting 检测 Bcl-2 和 Bax 表达 用细胞裂解液提取各组细胞总蛋白。定量后,将 30 μ g 蛋白质上样到聚丙烯酰胺电泳凝胶上,恒流转移至聚偏氟乙烯膜。将膜用含 5% 脱脂牛奶封闭液封闭 1 h,并与稀释的兔抗 Bcl-2、兔抗 Bax 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。将膜在洗膜缓冲液中洗涤 2 次后,与 HRP 偶联的羊抗兔二抗在室温下孵育 2 h。加入化学发光试剂显色、定影,图像处理软件分析各条带灰度值, Bcl-2 和 Bax 表达相对表达量以其灰度值与内参灰度值比值表示。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验 应用 lncRNABase 在线预测显示 lncRNA EGOT 与 miR-320a 存在结合位点。基于预测结合位点合成 EGOT 野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 序列,将上述序列分别克隆 pmirGLO 荧光素酶载体构建 WT-EGOT、MUT-EGOT。将 miR-320a mimics、miR-NC 与 WT-EGOT 或 MUT-EGOT 分别共转染至 A549 细胞 48 h 后,双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定相对荧光素酶活性。将 pcDNA-EGOT、pcDNA、si-EGOT、si-NC 分别转染 A549 细胞,转染 48 h RT-qPCR 法检测 miR-320a 表达水平。

1.3 统计学方法 采用 *t* 检验、方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 lncRNA EGOT 和 miR-320a 在 LPS 刺激的肺泡上皮细胞中的表达 与 Con 组相比,LPS 组 A549 细胞中 lncRNA EGOT 表达明显降低 ($P < 0.01$), miR-320a 表达明显升高 ($P < 0.01$) (见表 1)。

表 1 lncRNA EGOT 和 miR-320a 在 LPS 刺激的肺上皮细胞中的表达 ($n_i = 9; \bar{x} \pm s$)

分组	EGOT	miR-320a
Con	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.08
LPS	0.39 \pm 0.03	2.61 \pm 0.23
<i>t</i>	24.03	19.83
<i>P</i>	<0.01	<0.01

2.2 lncRNA EGOT 过表达对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞炎症因子表达的影响 与 Con 组相比,LPS 组 A549 细胞中 EGOT 表达降低 ($P < 0.05$),培养液中

IL-6 和 IL-1 β 水平均升高 ($P < 0.05$);与 LPS + pcDNA 组相比,LPS + pcDNA-EGOT 组 A549 细胞中 EGOT 表达升高 ($P < 0.05$),培养液中 IL-6 和 IL-1 β 水平均降低 ($P < 0.05$) (见表 2)。

表 2 lncRNA EGOT 过表达对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞炎症因子表达的影响 ($n_i = 9; \bar{x} \pm s$)

分组	EGOT	IL-6/(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)
Con	1.00 \pm 0.05	106.48 \pm 10.42	46.17 \pm 4.94
LPS	0.43 \pm 0.04 *	353.51 \pm 25.90 *	180.73 \pm 12.98 *
LPS + pcDNA	0.41 \pm 0.04 *	349.84 \pm 19.43 *	177.28 \pm 14.47 *
LPS + pcDNA-EGOT	2.31 \pm 0.22 ** \blacktriangle	139.69 \pm 12.53 ** \blacktriangle	64.96 \pm 6.26 ** \blacktriangle
<i>F</i>	528.68	482.33	419.16
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	0.014	328.478	110.363

q 检验:与 Con 组比较 * $P < 0.05$;与 LPS 组比较 # $P < 0.05$;与 LPS + pcDNA 组比较 $\blacktriangle P < 0.05$

2.3 lncRNA EGOT 过表达对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞凋亡的影响 与 Con 组相比,LPS 组 A549 细胞凋亡率、Bax 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$);与 LPS + pcDNA 组相比,LPS + pcDNA-EGOT 组 A549 细胞凋亡率、Bax 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$) (见图 1 ~ 2、表 3)。

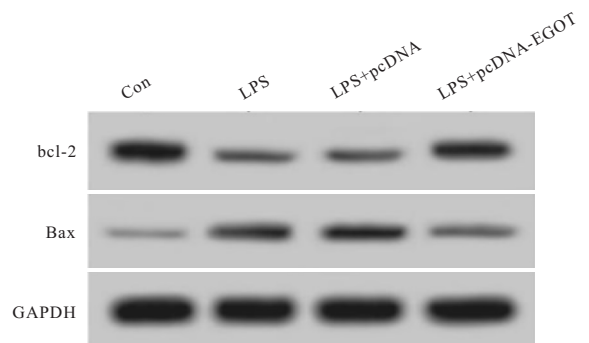


图 1 lncRNA EGOT 过表达后 LPS 诱导的肺泡上皮细胞凋亡相关蛋白表达情况

表 3 lncRNA EGOT 过表达对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞凋亡的影响 ($n_i = 9; \bar{x} \pm s$)

分组	凋亡率/%	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
Con	6.52 \pm 0.60	0.73 \pm 0.07	0.17 \pm 0.02
LPS	25.45 \pm 2.28 *	0.28 \pm 0.03 *	0.55 \pm 0.04 *
LPS + pcDNA	26.34 \pm 2.81 *	0.26 \pm 0.02 *	0.58 \pm 0.05 *
LPS + pcDNA-EGOT	10.59 \pm 1.01 ** \blacktriangle	0.62 \pm 0.05 ** \blacktriangle	0.24 \pm 0.02 ** \blacktriangle
<i>F</i>	256.47	234.86	324.49
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	3.619	0.002	0.001

q 检验:与 Con 组比较 * $P < 0.05$;与 LPS 组比较 # $P < 0.05$;与 LPS + pcDNA 组比较 $\blacktriangle P < 0.05$

2.4 lncRNA EGOT 靶向调控 miR-320a 的表达

LncBase Predicted v. 2 在线预测分析显示,miR-320a 与 EGOT 之间存在结合位点(见图 3)。双荧光素酶报告实验显示,与 miR-NC 和 WT-EGOT 共转染组相比,miR-320a mimics 和 WT-EGOT 共转染组 A549 细胞相对荧光素酶活性降低($P < 0.05$);与 miR-NC 和 MUT-EGOT 共转染组相比,miR-320a mimics 和

MUT-EGOT 共转染组 A549 细胞相对荧光素酶活性变化差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 4)。与 pcDNA 组相比,pcDNA-EGOT 组 A549 细胞 miR-320a 表达水平降低($P < 0.05$);与 si-NC 组相比,si-EGOT 组 A549 细胞 miR-320a 表达水平升高($P < 0.05$)(见表 5)。

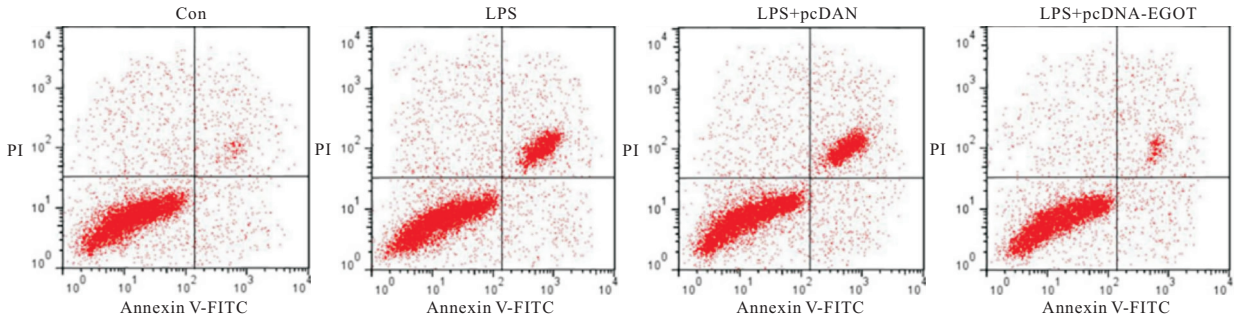


图2 lncRNA EGOT过表达后LPS诱导的肺泡上皮细胞凋亡检测情况

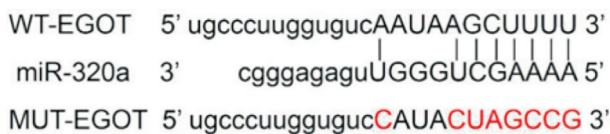


图3 EGOT的序列中含有与miR-320a互补的核苷酸序列

表4 双荧光素酶报告实验结果($n_i = 9; \bar{x} \pm s$)

分组	WT-EGOT	MUT-EGOT
miR-NC	0.99 ± 0.05	0.97 ± 0.06
miR-320a	0.38 ± 0.04	1.00 ± 0.07
<i>t</i>	28.58	0.98
<i>P</i>	<0.01	>0.05

用 与 LPS + pcDNA-EGOT + miR-NC 组比较,LPS + pcDNA-EGOT + miR-320a 组 A549 细胞 miR-320a 表达、Bax 蛋白表达、细胞凋亡率均明显升高($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达明显降低($P < 0.01$),培养液中 IL-6 和 IL-1 β 水平均明显升高($P < 0.01$)(见图 6~7、表 7)。

表5 lncRNA EGOT 靶向调控 miR-320a 的表达($n_i = 9; \bar{x} \pm s$)

分组	miR-320a	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> _{组内}
pcDNA	1.00 ± 0.05			
pcDNA-EGOT	0.50 ± 0.05*	579.59	<0.01	0.018
si-NC	1.03 ± 0.08#			
si-EGOT	2.97 ± 0.25*#▲			

q 检验:与 pcDNA 组比较* $P < 0.05$;与 pcDNA-EGOT 组比较# $P < 0.05$;与 si-NC 组比较▲ $P < 0.05$

2.5 抑制 miR-320a 表达对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞炎症因子和细胞凋亡的影响 与 LPS + anti-miR-NC 组比较,LPS + anti-miR-320a 组 A549 细胞 miR-320a 表达、Bax 蛋白表达、细胞凋亡率均明显降低($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达明显升高($P < 0.01$),培养液中 IL-6 和 IL-1 β 水平均明显降低($P < 0.01$)(见图 4~5、表 6)。

2.6 miR-320a 过表达逆转 lncRNA EGOT 过表达对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞炎症因子和细胞凋亡的作

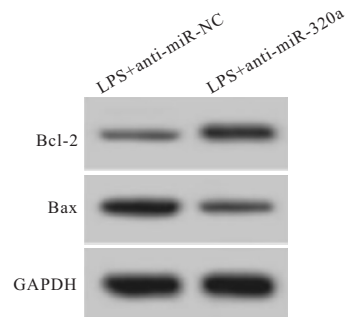


图4 抑制miR-320a表达后LPS诱导的肺泡上皮细胞凋亡相关蛋白表达情况

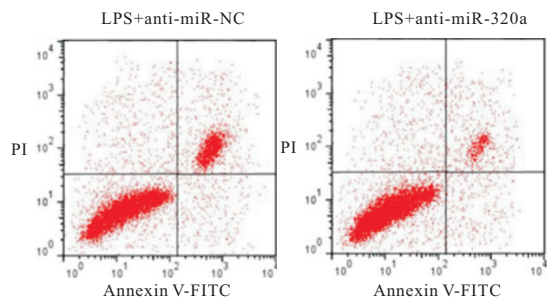


图5 抑制miR-320a表达后LPS诱导的肺泡上皮细胞凋亡检测情况

3 讨论

革兰阴性菌引起的感染是 ALI 的重要病因,其可诱导剧烈的炎症反应和凋亡,导致呼吸膜的形态和功能损伤。本研究以脂多糖诱导肺泡上皮细胞

A549 损伤模拟 ALI, 探讨与 ALI 进展有关的基因和可能机制, 以期为基于对抗肺泡上皮细胞损伤提供有效策略。

表 6 抑制 miR-320a 表达对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞炎症因子和细胞凋亡的影响 ($n_i = 9; \bar{x} \pm s$)

分组	miR-320a	IL-6/(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)	凋亡率/%	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
LPS + anti-miR-NC	1.00 \pm 0.06	348.12 \pm 16.39	181.36 \pm 14.88	27.92 \pm 2.51	0.27 \pm 0.03	0.60 \pm 0.04
LPS + anti-miR-320a	0.54 \pm 0.05	152.01 \pm 16.50	78.06 \pm 7.03	12.56 \pm 1.18	0.58 \pm 0.04	0.30 \pm 0.03
<i>t</i>	17.67	25.30	188.83	16.61	18.60	14.40
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

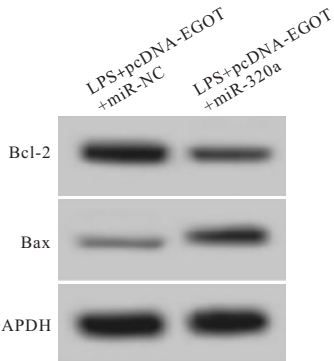


图 6 miR-320a 过表达逆转 lncRNA EGOT 过表达后 LPS 诱导的肺泡上皮细胞凋亡相关蛋白的表达情况

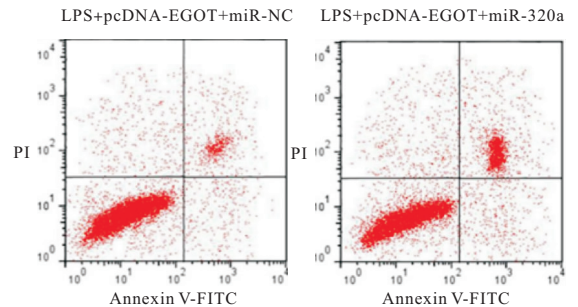


图 7 miR-320a 过表达逆转 lncRNA EGOT 过表达后 LPS 诱导的肺泡上皮细胞凋亡检测情况

表 7 miR-320a 过表达逆转 lncRNA EGOT 过表达对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞炎症因子和细胞凋亡的作用 ($n_i = 9; \bar{x} \pm s$)

分组	miR-320a	IL-6/(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)	凋亡率/%	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
LPS + pcDNA-EGOT + miR-NC	1.00 \pm 0.06	137.82 \pm 11.14	63.34 \pm 6.47	11.79 \pm 1.02	0.64 \pm 0.06	0.22 \pm 0.02
LPS + pcDNA-EGOT + miR-320a	2.53 \pm 0.23	311.34 \pm 28.45	145.64 \pm 12.94	20.51 \pm 1.84	0.32 \pm 0.03	0.45 \pm 0.03
<i>t</i>	19.31	17.04	17.07	12.44	14.31	19.14
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

研究^[8]显示,人脑利钠肽可提高缺氧条件下心肌细胞活力、减轻细胞凋亡和自噬进而改善缺氧诱导的心肌细胞损伤,其机制与促进 lncRNA EGOT 表达有关。lncRNA EGOT 通过调控基因表达还可抑制缺氧诱导肾小管的自噬防止急性损伤^[9]。本研究显示,LPS 诱导后 A549 细胞凋亡率、培养液中 IL-6 和 IL-1 β 水平均明显升高,而 lncRNA EGOT 表达显著降低,提示 lncRNA EGOT 低表达可能与 LPS 诱导的 A549 炎症反应和凋亡有关。一般认为 ALI 的实质为炎症介质的释放导致肺部过度的炎症反应,鸢尾素通过抑制 IL-6 和 IL-1 β 等炎性介质的产生可减轻肺部炎症损伤^[10]。Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡的信号转导中起着重要调节作用,Bax/Bcl-2 比例失衡可导致细胞中线粒体膜电位的变化,促进线粒体细胞色素 C 释放到细胞质,然后激活 caspase-3,最终导致细胞凋亡^[11-13]。本研究显示,转染 pcDNA-

EGOT 上调 EGOT 表达后,LPS 诱导的 A549 中促凋亡蛋白 Bax 表达、凋亡率降低,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加,培养液中 IL-6 和 IL-1 β 水平降低,说明 lncRNA EGOT 减轻 LPS 诱导的 A549 炎症反应和凋亡,是 ALI 临床治疗的潜在靶标。

生物信息学在线分析显示,lncRNA EGOT 与 miR-320a 之间存在结合位点。miRNA 是基因表达的重要调节剂,其在细胞增殖、代谢、凋亡等生物学过程中具有重要作用^[14-15]。研究^[16-17]显示,miR-320a 高表达参与糖尿病肾病肾功能紊乱、骨关节炎进展。在阿霉素诱导的心脏损伤中 miR-320a 高表达,抑制 miR-320a 具有缓解阿霉素心脏损伤的作用^[18]。此外,lncRNA MALAT1 通过下调 miR-320a 表达还可减轻缺氧复氧诱导的血管内皮细胞损伤^[19]。本研究显示,LPS 诱导的 A549 细胞 miR-320a 表达显著升高,转染 miR-320a 抑制物下调

miR-320a 表达可减轻 LPS 诱导的 A549 细胞炎症反应和凋亡,与前人报道 miR-320a 的促炎结论类似^[5]。此外,本研究发现 lncRNA EGOT 对 miR-320a 具有靶向负调控作用,且上调 miR-320a 表达还可逆转 lncRNA OIP5-AS1 对 LPS 诱导的 A549 细胞炎症反应和凋亡的影响,这为 lncRNA OIP5-AS1/miR-320a 分子轴参与 LPS 诱导的 A549 细胞炎症反应和凋亡提供了重要证据。

综上所述,lncRNA OIP5-AS1 通过靶向 miR-320a 可减轻 LPS 诱导肺泡上皮细胞炎症反应和凋亡,进而可能减轻 ALI 严重程度。因此,lncRNA OIP5-AS1/miR-320a 分子轴有望成为 ALI 的新型治疗靶点。

[参 考 文 献]

- [1] BOCHAROW AV, WU T, BARANOVA IN, *et al.* Synthetic amphipathic helical peptides targeting cd36 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammation and acute lung injury [J]. *J Immunol*,2016,197(2):611.
- [2] HEROLD S, GABRIELLI NM, VADÁSZ I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2013,305(10):L665.
- [3] SCHMITZ SU, GROTE P, HERRMANN BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*,2016,73(13):2491.
- [4] 马媛,张大鹏,王想,等. lncRNA TUG1 对高糖诱导的小鼠足细胞 MPC5 凋亡的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*,2019,54(6):863.
- [5] 吴彩霞,张小兰,郭梦. 脑钠肽通过调控 lncRNA EGOT 缓解低氧诱导的大鼠心肌细胞损伤[J]. *临床和实验医学杂志*,2019,18(19):2020.
- [6] LEE H, ZHANG D, ZHU Z, *et al.* Epithelial cell-derived microvesicles activate macrophages and promote inflammation via microvesicle-containing microRNAs[J]. *Sci Rep*,2016,6(1):35250.
- [7] 罗超,吴伟斌,周瑾,等. 奥拉帕尼通过 PARP-1 通路调控脂多糖诱导的 A549 细胞炎症反应[J]. *中国药理学与毒理学杂志*,2019,33(3):193.
- [8] ZHANG C, PAN S, AISHA A, *et al.* Recombinant human brain

natriuretic peptide regulates PI3K/AKT/mTOR pathway through lncRNA EGOT to attenuate hypoxia-induced injury in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018, 503(3):1186.

- [9] WANG IK, PALANISAMY K, SUN KT, *et al.* The functional interplay of lncRNA EGOT and HuR regulates hypoxia-induced autophagy in renal tubular cells [J]. *J Cell Biochem*,2020,121(11):4522.
- [10] SHAO L, MENG D, YANG F, *et al.* Irisin-mediated protective effect on LPS-induced acute lung injury via suppressing inflammation and apoptosis of alveolar epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2017,487(2):194.
- [11] WANG L, TANG L, WANG Y, *et al.* Exendin-4 protects HUVECs from t-BHP-induced apoptosis via PI3K/Akt-Bcl-2-caspase-3 signaling [J]. *Endocr Res*,2016,41(3):229.
- [12] 余鑫,米智华,高巨. 自噬在机械通气致大鼠脑组织神经元凋亡中的作用[J]. *实用临床医药杂志*,2019,23(8):18.
- [13] 王荣俊,童斯浩. 姜黄素联合紫杉醇对肺癌细胞 PC9 凋亡的影响[J]. *蚌埠医学院学报*,2016,41(12):1549.
- [14] 赵华洲,陈凛. 胃癌相关 MicroRNA 的研究进展[J]. *实用临床医药杂志*,2017,21(13):232.
- [15] LIN K, SU HY, JIANG LF, *et al.* Influences of miR-320a on proliferation and apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through targeting MAPK-ERK1/2 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2019,23(5):1907.
- [16] JIN Y, CHEN X, GAO ZY, *et al.* The role of miR-320a and IL-1 β in human chondrocyte degradation [J]. *Bone Joint Res*,2017,6(4):196.
- [17] HE M, WANG J, YIN Z, *et al.* MiR-320a induces diabetic nephropathy via inhibiting MafB [J]. *Aging (Albany NY)*,2019,11(10):3055.
- [18] 何梦颖,殷中伟,赵艳茹,等. MiR-320a 通过靶向抑制 VEGF 信号通路介导阿霉素心脏损伤[J]. *中国分子心脏病学杂志*,2018,18(5):2594.
- [19] ZHU R, HU X, XU W, *et al.* lncRNA MALAT1 inhibits hypoxia/reoxygenation-induced human umbilical vein endothelial cell injury via targeting the microRNA-320a/RAC1 axis [J]. *Biol Chem*,2020,401(3):349.

(本文编辑 赵素容)