

网络出版时间: 2023-12-28 12:02:52 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0757.015>

miR-141-3p 靶向调控 HMGB1 对 LPS 诱导的 A549 细胞损伤的影响

龙光文 张 谦 杨秀林 孙鸿鹏 吉春玲

摘要 目的 探讨 miR-141-3p 通过靶向调控高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 对脂多糖 (LPS) 诱导的 A549 细胞损伤的影响。方法 以 II 型肺泡上皮细胞来源的 A549 细胞作为研究对象,将 miR-141-3p mimics、mimics NC、HMGB1 基因过表达质粒 (pcDNA3.1-HMGB1) 和空载质粒 (Vector) 分别或共转染至 A549 细胞中,再采用 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 处理 24 h。细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 检测各组细胞增殖活性;比色法检测各组细胞培养上清液中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性;流式细胞术检测各组细胞凋亡水平;酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测各组细胞中白介素 (IL) -1β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平;双荧光素酶报告基因实验验证 miR-141-3p 与 HMGB1 之间的靶向调控关系。结果 LPS 干预后, A549 细胞增殖活性及细胞中 miR-141-3p 表达水平降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$) 细胞中 IL- 1β 、IL-6、TNF- α 水平及上清液中 LDH 活性升高 ($P < 0.05$)。过表达 miR-141-3p 可增强

LPS 处理后的 A549 细胞增殖活性 ($P < 0.05$), 降低细胞凋亡率及细胞中 IL- 1β 、IL-6、TNF- α 水平和上清液中 LDH 活性 ($P < 0.05$)。然而, HMGB1 基因过表达可逆转 miR-141-3p 对 LPS 诱导 A549 细胞损伤的改善作用。双荧光素酶报告基因实验证实 HMGB1 是 miR-141-3p 下游靶基因。结论 miR-141-3p 可抑制 LPS 诱导的 A549 细胞凋亡, 降低炎症因子表达水平, 改善 A549 细胞损伤, 其作用机制可能与靶向调控 HMGB1 表达有关。

关键词 II 型肺泡上皮细胞; A549; 脂多糖; miR-141-3p; 高迁移率族蛋白 1

中图分类号 R 563.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0085-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.014

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是由严重感染、创伤等肺内外致病因素导致的一种急性弥漫性肺损伤, 具有发病时间短、病死率高等特点, 已成为严重威胁人类身心健康的呼吸系统重症之一。近年来, 新冠肺炎的流行导致 ARDS 病例急速增加, 临床常用的机械通气治疗因无法有效修复肺部损伤, 导致大多数幸存者仍

2023-11-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82160021)

作者单位: 贵州省人民医院急诊内科, 贵阳 550002

作者简介: 龙光文, 男, 博士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: fxpx7833

@163.com

and the lipid metabolomic analysis of liver tissue samples in the two groups of mice was performed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, mainly detecting endogenous metabolites. Principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and other models were used to screen potential biomarkers, and the metabolic pathway analysis of the identified metabolites was performed by MetaboAnalyst 5.0. **Results** Compared with the WT group, the ob/ob group had significantly increased body weight, fasting blood glucose, serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), low-density lipoprotein (LDL-C) and cholesterol (CHO) ($P < 0.01$). Liver hematoxylin-eosin staining (HE) staining showed that the mice in ob/ob group had structural disorder of liver lobules, swelling of liver cells, a large number of fat vacuoles in cells, diffuse distribution and loose cytoplasm. Oil red O staining showed that there was a large amount of lipid deposition in the hepatocytes of ob/ob mice. The high resolution spirometer showed that the ob/ob mice had mitochondrial oxidative phosphorylation disorder and the activity of complex IV decreased. Lipid metabolomic analysis showed that the lipid metabolic profile of ob/ob mice changed, and the metabolic pathways involved mainly included glycerophospholipid metabolism, glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor biosynthesis, triglyceride metabolism, linoleic acid metabolism, α -linolenic acid metabolism and arachidonic acid metabolism. **Conclusion** The liver injury of ob/ob group mice may be related to the disorder of lipid metabolism, in which the disorder of glycerophospholipid metabolism is the most critical metabolic pathway.

Key words type 2 diabetes; liver injury; metabolomics; biomarker; metabolic pathway

然留有肺功能不全、肌无力等后遗症^[1]。因此,探讨 ARDS 发病机制可为后期研发 ARDS 相关治疗药物奠定理论基础。II 型肺泡上皮细胞 (type II alveolar epithelial cell, AT II) 参与肺组织的水分调节、损伤修复、炎症反应等,维持着肺的呼吸功能。ARDS 发病过程中炎症和凝血机制异常促使 AT II 大量凋亡,而 AT II 损伤后可导致急性呼吸窘迫和顽固性低氧血症^[2]。高婧等^[3]研究显示,通过药物干预降低 AT II 表面抗原,可有效修复 ARDS 导致的肺损伤。因此,推测修复 AT II 损伤可能是治疗 ARDS 的潜在途径。MicroRNA (miRNA) 是一种内源性小 RNA,其通过调控不同基因参与细胞增殖、细胞分化等过程。miR-141-3p 作为 miRNA 家族一员,具有抗炎、抗凋亡、促增殖等多种生物学作用,还可通过与靶基因的相互作用抑制肺炎链球菌导致的肺泡上皮细胞损伤^[4-5]。同时 Zhu et al^[6]发现,过表达 miR-141-3p 可通过促进肺上皮细胞增殖、抑制上皮间质转化和凋亡改善小鼠肺纤维化。然而,miR-141-3p 是否具有改善 AT II 损伤进而治疗 ARDS 的作用,以及是什么可能机制,目前尚未见报道。该研究拟采用脂多糖 (lipolysaccharide, LPS) 处理 II 型肺泡上皮细胞来源的 A549 细胞,观察 miR-141-3p 对 A549 细胞损伤可能的修复作用和机制,为后续 ARDS 治疗药物的研发提供前期依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 II 型肺泡上皮细胞来源的人肺癌 A549 细胞购自北京中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; F-12K 培养基、胎牛血清购自赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司; LPS 购自北京索莱宝科技有限公司; miR-141-3p mimics 及其阴性对照 mimics NC、高迁移率族蛋白 1 (high mobility group protein 1, *HMGB1*) 基因过表达质粒 (pcDNA3.1-*HMGB1*) 及空载质粒 (Vector) 由广州锐博生物技术有限公司提供; *HMGB1* 抗体、GAPDH 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (比色法) 购自南京建成生物工程研究所; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、双萤光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 白细胞介素 (interleukin, IL) β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 酶联免疫吸附测定试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; Lipofectamine 2000 试剂盒购自美国 Introvigen 公司; BCA 蛋白浓度测定

试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、cDNA 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒购自上海吉至生化科技有限公司; IX73 倒置生物显微镜购自日本 OLYMPUS 公司; CFX96 荧光定量 PCR 仪、GelDoc Go 凝胶成像分析仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清的 F-12K 培养基培养 A549 细胞,于 37 °C、5% CO₂ 环境下培养,细胞密度达 80% ~ 90% 时进行传代。

1.3 细胞转染及分组处理 取对数期 A549 细胞,调整细胞密度至 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中继续培养,待细胞密度达到 70% 时,使用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒将 miR-141-3p mimics、mimics NC、pcDNA3.1-*HMGB1* 和 Vector 质粒转染至 A549 细胞中,于培养箱培养 48 h 后,采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测转染效率。根据实验需要进行实验分组及分组处理: ① 对照 (Con) 组和空白 (blank) 组, A549 细胞不经过任何处理; ② mimics NC 组,将 mimics NC 转染至 A549 细胞中; ③ mimics 组,将 miR-141-3p mimics 转染至 A549 细胞中; ④ LPS 组, A549 细胞经过 10 μ g/ml LPS 处理 24 h; ⑤ LPS + mimics NC 组,转染 mimics NC 的 A549 细胞经过 10 μ g/ml LPS 处理 24 h; ⑥ LPS + mimics 组,转染 miR-141-3p mimics 的 A549 细胞经过 10 μ g/ml LPS 处理 24 h; ⑦ LPS + mimics + Vector 组,将 miR-141-3p mimics 和 Vector 质粒共转染至 A549 细胞中,再经过 10 μ g/ml LPS 处理 24 h; ⑧ LPS + mimics + *HMGB1* 组,将 miR-141-3p mimics 和 pcDNA3.1-*HMGB1* 质粒共转染至 A549 细胞中,再经过 10 μ g/ml LPS 处理 24 h。

1.4 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 采用 10 μ g/ml LPS 处理 A549 细胞 12、24、48 h 后收集细胞沉淀或收集转染后未经 LPS 处理的 A549 细胞沉淀,加入 1 ml TRIzol 裂解液,按试剂盒说明书操作提取总 RNA,然后用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应,反应条件为 95 °C 预变性 300 s, 95 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 扩增 40 个循环后, 72 °C 终末延伸 10 min。以 U6 或 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-141-3p 和 *HMGB1* 相对表达量。引物序列如下: miR-141-3p 上游引物 5'-GCCGAG-TAACACTGTCTGGT-3', 下游引物 5'-CTCAACTGGT-GTCGTGGAGT-3'; U6 上游引物 5'-CTCGCTTCGGC-AGCACA-3', 下游引物 5'-AACGCTTCACGAATTT-GCGT-3'; *HMGB1* 上游引物 5'-TGTGCAAACCTT-

GTCGGGAG-3', 下游引物 5'-TCTTTCATAACGGGC-CTTGTC-3'; GAPDH 上游引物 5'-GACAGTCAGCCG-CATCTTCT-3', 下游引物 5'-GCGCCCAATACGAC-CAAATC-3'。

1.5 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞增殖活性 取对数期 A549 细胞接种于 96 孔板中, 细胞密度为 3×10^3 个/孔, 采用不同浓度 (0、1、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) LPS 处理 24 h 或按照 1.3 项中不同分组处理细胞, 在各时间点结束前 4 h 于每孔中加入 10 μl CCK-8 溶液, 继续培养 4 h, 采用酶标仪于 450 nm 处测量各孔的吸光度 (absorbance, A) 值, 每组 3 复孔, 计算。细胞增殖率 (%) = $(A_{\text{实验孔}} - A_{\text{调零孔}}) / (A_{\text{空白孔}} - A_{\text{调零孔}}) \times 100\%$ 。

1.6 比色法检测细胞培养上清液中 LDH 活性 分组处理后收集各组细胞培养上清液, 按试剂盒说明书步骤, 加入样本和基质缓冲液、辅酶 I, 漩涡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 加入 2,4-二硝基苯肼, 混匀后再次孵育 15 min, 最后加入 NaOH 溶液室温放置 3 min, 于酶标仪 440 nm 波长下测定 A 值, 根据标准曲线计算 LDH 浓度。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡水平 分组处理后, 收集细胞于离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 加入 1 ml 预冷 1 \times PBS 重悬细胞, 并转移至 1.5 ml Doff 管中, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 500 μl Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 再加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl 碘化丙啶染色液混匀, 室温避光孵育 10 min, 上机检测, 细胞凋亡率 (%) = 早期凋亡率 (%) + 晚期凋亡率 (%)。

1.8 ELISA 法检测细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 分组处理细胞后, 收集细胞, 再加入冷的 PBS 洗涤 3 次, 裂解细胞, 离心后取上清液, 设置标准孔和空白孔, 按照试剂盒说明书依次加入生物素化抗体工作液、酶结合物工作液、底物溶液进行反应, 最后加入终止液, 然后在酶标仪上以 450 nm 波长测量各孔 A 值, 绘制标准曲线, 并计算细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量。

1.9 Western blot 检测细胞中 HMGB1 蛋白表达水平 收集各组细胞沉淀, 加入 RIPA 裂解液充分裂解后离心取上清液, 以上所有步骤均在冰上操作, BCA 试剂盒测定总蛋白含量。取 40 μg 蛋白经金属浴煮沸 10 min 变性, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳、转 PVDF 膜后, 将膜移至含有 5% 脱脂牛奶粉封闭液的孵育盒中, 室温下脱色, 摇床上摇动封闭 1 h 左右, 加入一抗 (HMGB1 抗体、GAPDH 抗体, 稀释比例为

1 : 1 000) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, PBST 洗膜, 加入二抗 (稀释比例为 1 : 10 000), 于室温下孵育 1 h, PBST 洗膜, 加入 ECL 显影液显影, 曝光仪曝光。使用 Image J 软件分析目标条带 A 值, 计算目的蛋白与内参蛋白比值。

1.10 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-141-3p 与 HMGB1 之间的靶向调控关系 使用在线 miRNA 靶基因预测网站 (https://www.targetscan.org/vert_71/) 预测 miR-141-3p 与 HMGB1 基因 3'-UTR 区域结合位点。设计合成 HMGB1 野生型 (HMGB1-WT) 和 HMGB1 突变型 (HMGB1-MUT) 载体, 合成相应的荧光素酶载体质粒, 将 HMGB1-WT、HMGB1-MUT 分别与 miR-141-3p mimics、mimics NC 转染至 A549 细胞中, 根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书要求操作, 检测转染后荧光素酶活性, 在以海肾荧光素酶为内参的情况下, 结果以萤火虫荧光素酶测定得到的 RLU 值与海肾荧光素酶测定得到的 RLU 值的比值表示。

1.11 统计学处理 使用 SPSS 26.0 软件分析统计数据, 结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD- t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 对 A549 细胞中 miR-141-3p 的表达影响

不同浓度的 LPS 可抑制 A549 细胞增殖活性, 呈浓度依赖性 ($F = 39.928, P < 0.05$), 见图 1A, 其中 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 处理时细胞增殖活性大约为 60%, 为此选择该浓度作为诱导 II 型肺泡上皮细胞损伤的条件。与 0 h 组比较, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 处理细胞 24、48 h 时, miR-141-3p 相对表达水平降低 ($P < 0.01$), 处理 12 h 时的差异无统计学意义。见图 1B。

2.2 miR-141-3p 过表达对 LPS 诱导的 A549 细胞损伤影响 qPCR 结果显示 (图 2A), 与 blank 组或 mimics NC 组比较, mimics 组细胞中 miR-141-3p 相对表达水平升高 ($P < 0.01$)。如图 2B ~ D 及表 1 所示, 与 Con 组比较, LPS 组细胞增殖活性降低 ($P < 0.01$), 细胞凋亡水平、LDH 活性及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量均升高 ($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, LPS + mimics 组细胞增殖活性升高 ($P < 0.01$), 细胞凋亡水平、LDH 活性及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量均降低 ($P < 0.01$), 而 LPS + mimics NC 组细胞以上各指标改变差异无统计学意义。

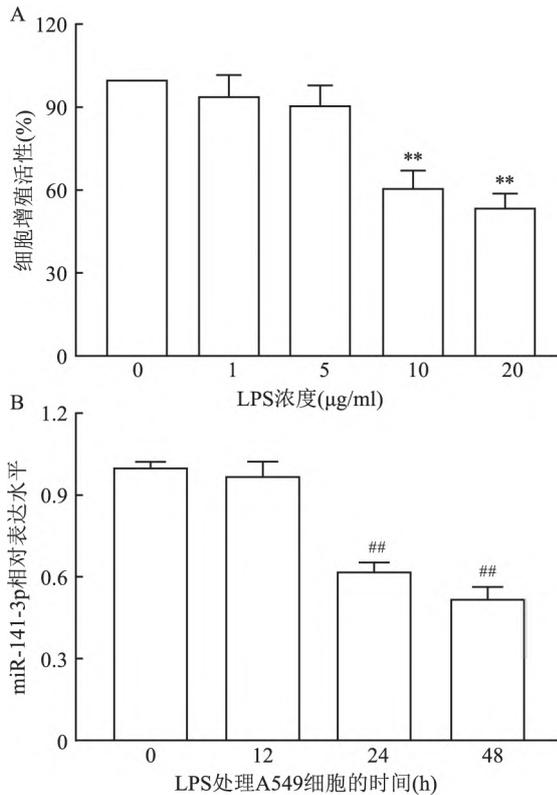


图1 LPS对A549细胞中miR-141-3p的表达影响

A: CCK-8 检测不同浓度 LPS 处理 A549 细胞时的细胞增殖活性; B: qRT-PCR 检测 LPS 处理 A549 细胞不同时间点时的 miR-141-3p 相对表达水平; 与 0 µg/ml LPS 组比较: ** $P < 0.01$; 与 LPS 处理 0 h 比较: ## $P < 0.01$

2.3 HMGB1 与 miR-141-3p 靶向调控情况 qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示(图 3A、B), 与 Con 组比较 LPS 组细胞中 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平均升高($P < 0.01$)。在线靶基因预测数据库预测结果显示(图 3C), HMGB1 3'-UTR 区域存在与 miR-141-3p 互补序列。双荧光素酶报告基因实验结果显示(图 3D), 在转染 HMGB1-WT 的细胞中, 与共转染 mimics NC 组比较, 共转染 miR-141-3p mimics 组转染后荧光素酶活性降低($P < 0.01$)。在转染 HMGB1-MUT 的细胞中, 共转染 mimics NC 组和 miR-141-3p mimics 组细胞荧光素酶活性差异无统计学意义。Western blot 结果显示(图 3E), 与 blank 组或 mimics NC 组比较, mimics 组细胞中 HMGB1 蛋白表达水平降低($P < 0.01$)。

2.4 HMGB1 基因过表达对 miR-141-3p 改善 LPS 诱导 A549 细胞损伤的影响 Western blot 检测结果显示(图 4A), 与 mimics NC 组或 mimics + Vector 组比较, mimics 组细胞中 HMGB1 蛋白表达水平降低($P < 0.01$)。mimics + HMGB1 组细胞中 HMGB1 蛋白表达水平升高($P < 0.01$)。与 LPS + mimics NC 组比较, LPS + mimics 组细胞增殖活性升高($P < 0.01$)。细胞凋亡水平、LDH 活性及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量降低($P < 0.01$)。与 LPS + mimics 组比较, LPS + mimics + HMGB1 组细胞增殖活性降低

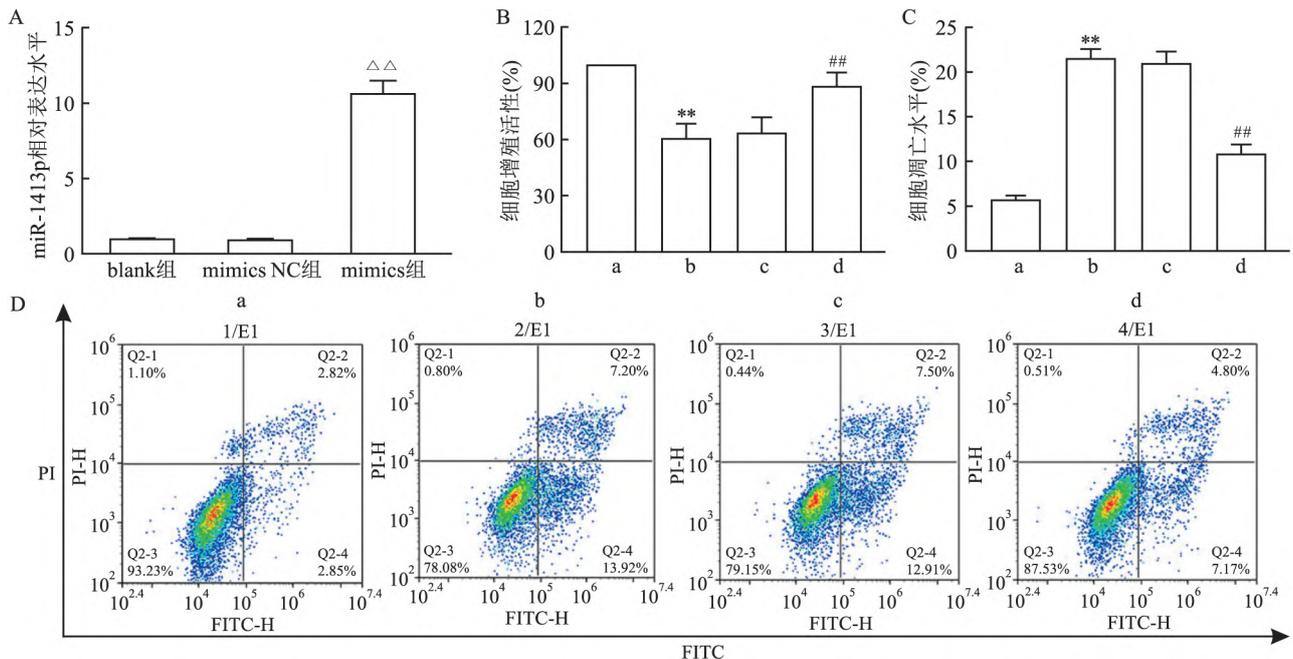


图2 miR-141-3p 过表达对 LPS 诱导的 A549 细胞损伤影响

A: qRT-PCR 检测各组细胞 miR-141-3p 相对表达水平; 与 blank 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; B: CCK-8 检测各组细胞增殖活性; C: 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平直方图; D: 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平流式图; a: Con 组; b: LPS 组; c: LPS + mimics NC 组; d: LPS + mimics 组; 与 Con 组比较: ** $P < 0.01$; 与 LPS + mimics NC 组比较: ## $P < 0.01$

表1 各组细胞上清中 LDH 活性及细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	LDH(U/L)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6(pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Con	183.62 \pm 20.96	215.84 \pm 11.93	85.32 \pm 8.50	133.40 \pm 10.68
LPS	562.17 \pm 39.75 **	367.30 \pm 22.67 **	142.50 \pm 15.50 **	200.92 \pm 13.10 **
LPS + mimics NC	548.13 \pm 38.78	334.17 \pm 22.07	139.85 \pm 10.70	205.17 \pm 14.90
LPS + mimics	258.83 \pm 20.49##	257.83 \pm 14.09##	90.49 \pm 7.25##	143.86 \pm 10.38##

与 Con 组比较: ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较: ## $P < 0.01$

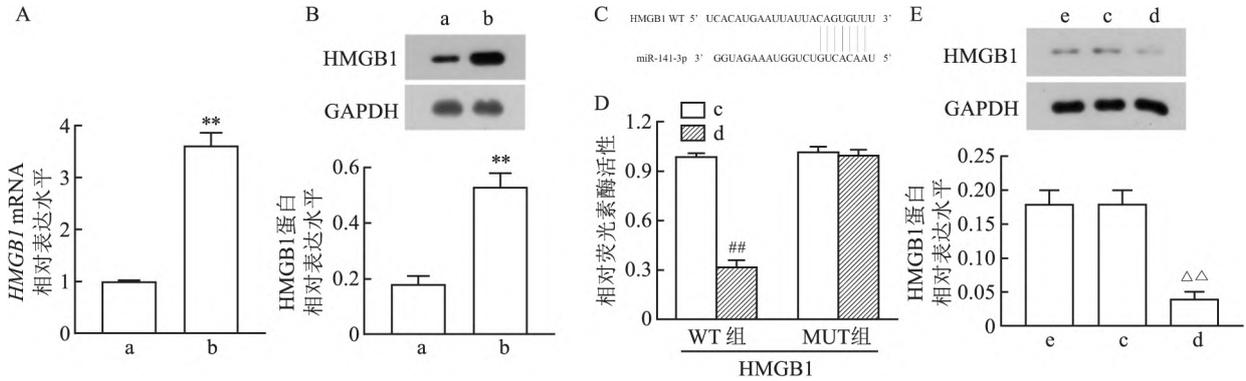


图3 HMGB1 和 miR-141-3p 靶向关系验证

A: qRT-PCR 检测各组细胞 HMGB1 mRNA 相对表达水平; B: Western blot 检测各组细胞 HMGB1 蛋白表达水平; a: Con 组; b: LPS 组; 与 Con 组比较: ** $P < 0.01$; C: 数据库预测 HMGB1 3'-UTR 区域与 miR-141-3p 的互补序列; D: 双荧光素酶报告基因检测各组细胞相对荧光素酶活性; 与 mimics NC 组比较: ## $P < 0.01$; E: Western blot 检测各组细胞 HMGB1 蛋白表达水平; c: mimics NC 组; d: mimics 组; e: blank 组; 与 blank 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

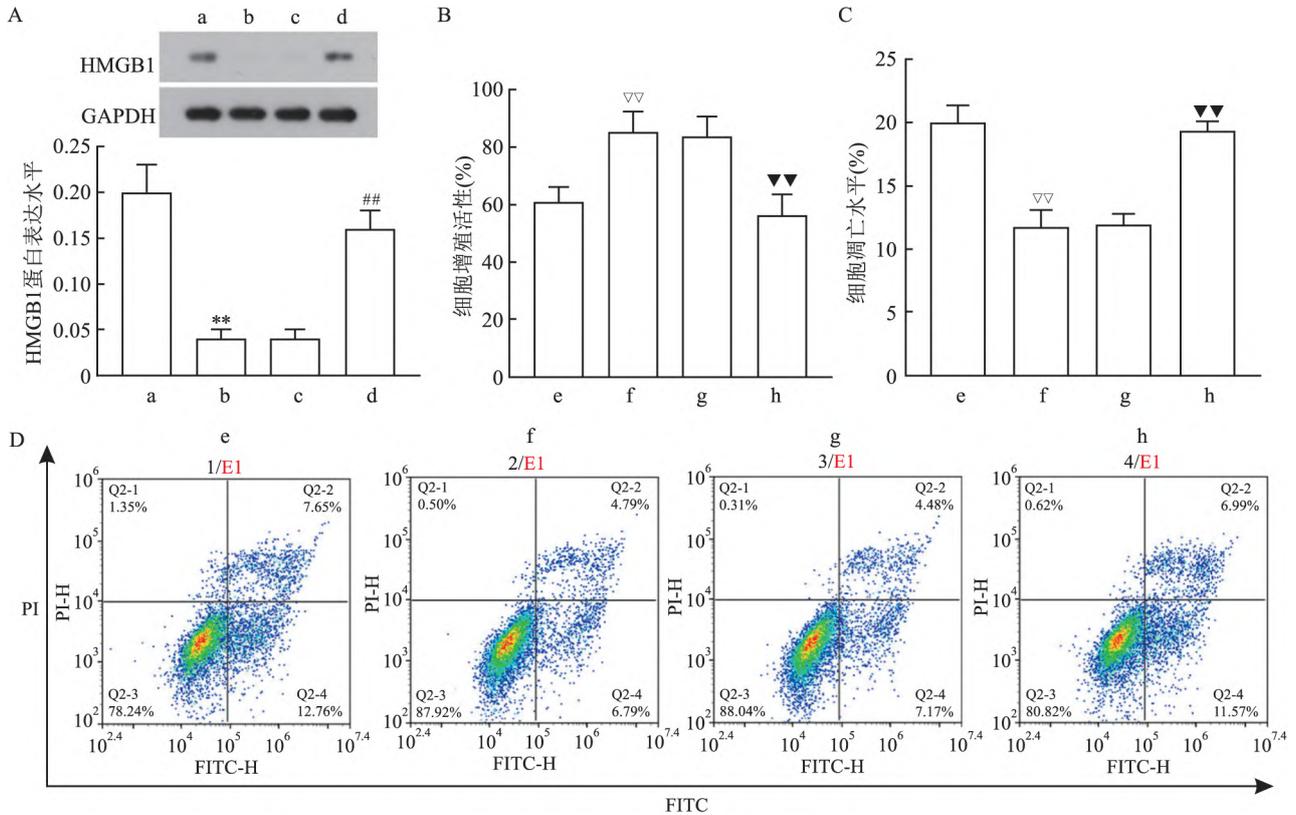


图4 HMGB1 基因过表达对 miR-141-3p 改善 LPS 诱导 A549 细胞损伤的影响

A: Western blot 检测各组细胞 HMGB1 蛋白表达水平; a: mimics NC 组; b: mimics 组; c: mimics + Vector 组; d: mimics + HMGB1 组; 与 mimics NC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 mimics 组比较: ## $P < 0.01$; B: CCK-8 检测各组细胞增殖活性; C: 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平直方图; D: 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平流式图; e: LPS + mimics NC 组; f: LPS + mimics 组; g: LPS + mimics + Vector 组; h: LPS + mimics + HMGB1 组; 与 LPS + mimics NC 组比较: $\nabla\nabla P < 0.01$; 与 LPS + mimics 组比较: $P < 0.01$

表 2 各组细胞上清液中 LDH 活性及细胞中 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量($\bar{x} \pm s$ n=3)

组别	LDH(U/L)	IL-1β(pg/ml)	IL-6(pg/ml)	TNF-α(pg/ml)
LPS + mimics NC	582.24 ± 26.30	384.83 ± 27.04	155.87 ± 6.88	214.24 ± 12.72
LPS + mimics	240.83 ± 13.82**	253.21 ± 16.94**	90.83 ± 3.51**	113.17 ± 8.98**
LPS + mimics + Vector	246.61 ± 15.36	260.18 ± 11.86	93.18 ± 5.73	120.83 ± 9.00
LPS + mimics + HMGB1	544.76 ± 19.21##	366.50 ± 17.50##	137.17 ± 9.86##	198.66 ± 6.98##

与 LPS + mimics NC 组比较: ** P < 0.01; 与 LPS + mimics 组比较: ## P < 0.01

(P < 0.01) ,细胞凋亡水平、LDH 活性及 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量升高 (P < 0.01) ,而 LPS + mimics + Vector 组细胞以上各指标差异无统计学意义。见图 4B ~ D 和表 2。

3 讨论

近年来,越来越多研究^[7-8]表明,miRNA 的差异表达可修复 AT II 损伤。如 miR-203 可通过靶向调节 TLR4/NF-κB/NLRP3 保护肺泡上皮细胞免受 LPS 诱导的细胞凋亡和炎症反应; miR-143-3p 可通过抑制 CX3CL1/CX3CR1 信号通路,减轻 LPS 诱导的肺泡上皮细胞损伤。A549 细胞来源于 AT II,因人源原代细胞获取困难,且传代次数有限,而 A549 细胞具有 AT II 相同特性,故常用 A549 细胞代替 AT II 进行体外研究^[9]。为了验证 miR-141-3p 在 AT II 损伤再修复过程中发挥的作用及其可能机制,该研究使用 LPS 诱导 A549 细胞损伤并调控 miR-141-3p 进行干预,通过各种方法检测各组间差异。既往研究^[10]表明,临床 ARDS 患者血清和支气管肺泡灌洗液中炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平常表现为异常升高,而各炎症因子间相互作用促进了 AT II 的凋亡,加重肺损伤并阻止肺组织的自我修复。

既往研究^[10]表明,临床 ARDS 患者血清和支气管肺泡灌洗液中炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平常表现为异常升高,各炎症因子间相互作用促进了 AT II 的凋亡,加重肺损伤并阻止肺组织的自我修复。LDH 是一种含锌离子的金属蛋白,广泛存在于各个人体组织中,在细胞内可催化还原与氧化反应,肺损伤时机体内 LDH 活性异常升高^[11-12]。该研究结果显示,LPS 诱导后,A549 细胞增殖活性降低,细胞凋亡水平升高,TNF-α、IL-1β、IL-6 含量及 LDH 水平均升高;过表达 miR-141-3p 后,损伤的 A549 细胞增殖活性升高,细胞凋亡水平降低,TNF-α、IL-1β、IL-6 含量及 LDH 水平均降低。这些研究表明过表达 miR-141-3p 可能通过降低炎症反应抑制细胞凋亡,从而修复 LPS 诱导的 AT II 损伤。

HMGB1 是一种高度保守的核蛋白,在 1999 年

被 Wang et al^[13]首次报道作为潜在的晚期炎症介质参与脓毒症的发病过程,后又有高峰等^[14]研究阐述,ARDS 发生时, HMGB1 由细胞核进入到细胞质中,再与特定受体结合诱导靶细胞产生炎症细胞因子,从而导致损伤。本研究中,经 LPS 诱导后 A549 细胞中 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平均升高,说明 HMGB1 在 ARDS 中发挥重要作用。而多项研究^[15-16]表明, HMGB1 是 miR-141-3p 的下游靶基因,共同参与乳腺癌、慢性炎症疼痛等疾病发展,推测 miR-141-3p 可能是通过调控 HMGB1 基因发挥对 AT II 损伤的改善作用。为了进一步验证 miR-141-3p 与 HMGB1 的靶向调控关系,本研究通过在线 miRNA 靶基因预测网站预测发现了二者存在结合位点,并通过双荧光素酶基因报告实验确认了 miR-141-3p 可负向调控 HMGB1。然后通过将 miR-141-3p mimics 及其阴性对照 mimics NC 与 HMGB1 基因过表达质粒(pcDNA3.1-HMGB1) 和空载质粒(Vector) 共转染至 A549 细胞检测相关指标变化。结果显示过表达 HMGB1 可抑制 miR-141-3p 表达,说明 miR-141-3p 对 LPS 诱导的 AT II 损伤的修复作用是通过下调 HMGB1 基因实现的。

综上所述,该研究验证了过表达 miR-141-3p 可通过负向调控 HMGB1 基因减轻炎症反应,从而抑制细胞凋亡,进一步改善 LPS 诱导导致的 AT II 损伤。该机制的发现从体外水平为 ARDS 的临床药物开发提供了新的思路。

参考文献

- [1] Meyer N J, Gattinoni L, Calfee C S. Acute respiratory distress syndrome [J]. Lancet, 2021, 398(10300): 622 - 37.
- [2] 陈飞杨, 张 谦, 李健权. 肺泡 II 型上皮细胞周期调控在 ARDS 发病中的研究进展 [J]. 贵州医药 2021, 45(7): 1037 - 8.
- [3] 高 婧, 杨艳荣, 梁显泉. 人肺泡 II 型上皮细胞表面抗原在急性呼吸窘迫综合征患者中的变化及地塞米松的保护作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志 2012, 19(2): 3.
- [4] 刘大朋, 李 影, 孙作乾, 等. 槲皮多糖调控 miR-141-3p 对 LPS 诱导的心肌细胞炎症反应及凋亡的影响 [J]. 中国免疫学杂志 2022, 38(18): 2226 - 30.

- [5] 张红, 丁亮, 陈思. circSAMD4A 靶向 miR-141-3p 对肺泡上皮细胞损伤的作用和机制 [J]. 中国细胞生物学学报, 2023, 45(1): 56-63.
- [6] Zhu L, Chen M, Wang W, et al. microRNA-141-3p mediates epithelial cell proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition and alleviates pulmonary fibrosis in mice *via* Spred2 [J]. *Histol Histopathol* 2023, 38(11): 1269-82.
- [7] 汤建华, 刘建华, 徐涛, 等. 微RNA-203 通过 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路保护肺泡上皮细胞免受脂多糖诱导损伤 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2022, 21(6): 425-31.
- [8] 荆忻, 邵萍, 李学莉. miR-143-3p 通过调控 CX3CL1/CX3CR1 信号通路对脂多糖诱导肺泡上皮细胞损伤的影响 [J]. 实用医学杂志, 2022, 38(21): 2649-56.
- [9] Dehmel S, Weiss K J, El-Merhie N, et al. microRNA expression profile of purified alveolar epithelial type II cells [J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13(8): 1420.
- [10] 冯志成. 血清及支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 在急性呼吸窘迫综合症中的变化及意义 [J]. 现代预防医学, 2011, 38(18): 3804-5.
- [11] 雍朝英, 焦阳, 戚迪, 等. 法舒地尔减轻脂多糖诱导急性肺损伤的作用及其机制 [J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(1): 27-33.
- [12] 刘雨露, 朱子贵, 张建新, 等. miR-346 缓解心肌缺血再灌注大鼠心肌氧化应激损伤 [J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(1): 90-5.
- [13] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice [J]. *Science*, 1999, 285(5425): 248-51.
- [14] 高峰, 徐昉. HMGB1 在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中的研究进展 [J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(9): 1193-6.
- [15] Sun S, Ma J, Xie P, et al. Hypoxia-responsive miR-141-3p is involved in the progression of breast cancer *via* mediating the HMGB1/HIF-1 α signaling pathway [J]. *J Gene Med*, 2020, 22(10): e3230.
- [16] Shen W S, Xu X Q, Zhai N N, et al. Potential mechanisms of microRNA-141-3p to alleviate chronic inflammatory pain by down-regulation of downstream target gene HMGB1: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Gene Ther*, 2017, 24(6): 353-60.

Effect of miR-141-3p targeting *HMGB1* on LPS-induced A549 cell injury

Long Guangwen, Zhang Qian, Yang Xiulin, Sun Hongpeng, Ji Chunling

(Dept of Emergency Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-141-3p on LPS induced A549 cell injury by targeting high mobility group protein 1 (*HMGB1*). **Methods** A549 cells derived from type II alveolar epithelial cells were taken as the study object, miR-141-3p mimics, mimics NC, *HMGB1* gene overexpression plasmid (pcDNA3.1-*HMGB1*) and empty Vector were transfected into A549 cells respectively or co-transfected, then 10 μ g/ml LPS was used for 24 h. Cell proliferation activity was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant of cell culture was detected by colorimetry. The apoptosis level of each group was detected by flow cytometry. The levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa). Dual luciferase reporter gene assay verified the targeted regulatory relationship between miR-141-3p and *HMGB1*. **Results** After treatment with LPS, the proliferative activity of A549 cells and the expression level of miR-141-3p decreased ($P < 0.05$), the apoptosis rate increased ($P < 0.05$), the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and the activity of LDH in supernatant increased ($P < 0.05$). Overexpression of miR-141-3p increased the proliferation activity of A549 cells treated with LPS ($P < 0.05$), and decreased the apoptosis rate and the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α in cells and LDH activity in supernatant ($P < 0.05$). However, overexpression of *HMGB1* gene could reverse the ameliorative effect of miR-141-3p on LPS-induced A549 cell injury. Dual luciferase reporter gene experiment confirmed that *HMGB1* was the downstream target gene of miR-141-3p. **Conclusion** miR-141-3p can inhibit LPS-induced apoptosis, reduce the expression level of inflammatory factors, and improve the damage of A549 cells, which may be related to the targeted regulation of *HMGB1* expression.

Key words type II alveolar epithelial cells; A549; lipopolysaccharide; miR-141-3p; high mobility group protein 1