

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.01.001

❖ 基础研究 ❖

miR-145-5p 通过抑制 ROCK1 的表达减轻脓毒症诱导的急性肺损伤

徐锐峰, 杨威, 王剑冰, 赵鸣雁

(哈尔滨医科大学附属第一医院重症医学科, 黑龙江 哈尔滨 150000)

【摘要】目的: 探讨 miR-145-5p 在脓毒症诱导的急性肺损伤 (ALI) 中的调控作用和分子机制。**方法:** 盲肠结扎穿刺法 (CLP) 建立 C57BL/6 小鼠脓毒症模型, 分为 CLP 组、CLP + NC agomir 组、CLP + miR-145-5p agomir 组和假手术组, 分离原代小鼠肺微血管内皮细胞 (MPVECs), miR-145-5p 模拟物或对照模拟物转染到 MPVECs。采用双荧光素酶报告基因实验验证 ROCK1 和 miR-145-5p 的作用关系。挽救实验中, 在 LPS 处理前 24 h 将 MPVECs 与 ROCK1 过表达载体 (或空载体) 和 miR-145-5p 模拟物共转染。检测 caspase-3 的转录活性、细胞凋亡率、miR-145-5p、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和 ROCK1 的表达水平。**结果:** 与假手术组相比, CLP 组小鼠肺损伤程度, IL-1 β 、IL-6 水平及 caspase-3 活性和细胞凋亡率均显著增加 ($P < 0.05$); MPVECs 细胞中, 与未处理的细胞相比, LPS 刺激可显著诱导炎症细胞因子的分泌和细胞凋亡 ($P < 0.05$)。脓毒症小鼠中过表达 miR-145-5p 可减轻脓毒症诱导的肺损伤、细胞凋亡和炎症反应。在 LPS 处理的 MPVECs 细胞中, miR-145-5p 也表现出抗凋亡和抗炎作用。ROCK1 的上调逆转了 miR-145-5p 抑制 caspase-3 活性、抗凋亡和抗炎作用。**结论:** miR-145-5p 通过下调 ROCK1 的表达, 减轻了脓毒症诱导的急性肺损伤, 有望作为脓毒症诱导的急性肺损伤治疗的潜在靶点。

【关键词】 急性肺损伤; 脓毒症; miRNA; ROCK1; 炎症反应; 细胞凋亡

【中图分类号】 R364.5 **【文献标志码】** A

miR-145-5p alleviates sepsis induced acute lung injury by inhibiting the expression of ROCK1

XU Rui-feng, YANG Wei, WANG Jian-bing, ZHAO Ming-yan

(Department of Critical Medicine, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the regulatory role and molecular mechanism of miR-145-5p in sepsis induced acute lung injury (ALI) by inhibiting ROCK1 expression. **Methods:** The C57BL/6 mouse sepsis model was established by Cecal Ligation and puncture (CLP) and divided into three groups: CLP, CLP + NC agomir, and CLP + miR-145-5p agomir. The primary mouse pulmonary microvascular endothelial cells (MPVECs) were isolated. miR-145-5p mimics or control mimics were transfected into MPVECs. Double luciferase reporter gene assay was used to verify the functional relationship between ROCK1 and miR-145-5p. In the rescue experiment, MPVECs was co-transfected with lentiviral vector expressing ROCK1 (or empty vector) and miR-145-5p mimics 24 hours before LPS treatment. The transcriptional activity of Caspase-3, apoptosis rate, and expression levels of miR-145-5p, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and ROCK1 were detected. **Results:** Compared with the sham group, lung injury, IL-1 β and IL-6 levels, Caspase-3 activity and apoptosis rate were significantly increased in CLP group ($P < 0.05$). LPS stimulation significantly induced inflammatory cytokine secretion and apoptosis in MPVECs cells compared with untreated cells ($P < 0.05$). Overexpression of miR-145-5p in septic mice alleviated lung injury, apoptosis, and inflammatory response induced by sepsis. miR-145-5p also showed anti-apoptotic and anti-inflammatory effects in LPS-treated MPVECs cells. The upregulation of ROCK1 reversed the inhibition of caspase-3 activity, anti-apoptosis and anti-inflammatory effects of miR-145-5p. **Conclusion:** miR-145-5p alleviates sepsis induced acute lung injury by down-regulating the expression of ROCK1, and is expected to be a potential target for the treatment of sepsis induced acute lung injury.

【Key words】 Acute lung injury; Sepsis; miRNA; ROCK1; Inflammatory response; Cell apoptosis

脓毒症是一种危及生命的综合症,其特征是由致病菌、真菌或病毒引起的过度性全身炎症反

应^[1-2]。严重脓症患者通常表现为微血管血栓和多器官功能障碍^[3]。急性肺损伤 (acute lung injury,

ALI)是一种由多种急性低氧性呼吸衰竭疾病组成的临床综合征,已成为严重脓毒症最常见的并发症之一^[4]。脓毒症诱导 ALI 是一种急性炎症过程,同时产生炎症细胞因子和趋化因子。如 ALI 患者的支气管肺泡灌洗液中发现了白细胞介素-1 β (IL-1 β)^[5]。ALI 进展的另一个关键步骤是肺泡上皮细胞的广泛凋亡,是 ALI 患者肺上皮细胞死亡的主要原因^[6]。因此,阻断肺部炎症反应和凋亡信号传导可能是改善脓毒症诱导的 ALI 的有效治疗策略。MicroRNAs (miRNAs)是一类小的非编码 RNA,在许多病理过程中表现出了新兴的调节作用,包括脓毒症诱导的器官功能障碍^[7]。研究^[8]发现 miR-146a 过表达通过抑制 NF- κ B 的激活和炎症细胞因子的表达,在体外减轻脓毒症引发的心肌功能障碍。miR-27a 通过抑制 NF- κ B/TAB3 信号通路,介导紫杉醇对脓毒症小鼠受损肝脏的保护作用^[9]。研究^[10]表明 miR-145-5p 在肺损伤组织中异常表达可能在 ALI 的发展中具有潜在作用,但 miR-145-5p 在 ALI 中的具体机制仍清楚。本研究通过小鼠脓毒症模型和原代小鼠肺微血管内皮细胞,研究 miR-145-5p 在脓毒症诱导 ALI 中的调控作用和潜在分子机制,旨在为脓毒症诱导的 ALI 的治疗提供一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

水合氯醛 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA); 线性聚乙烯亚胺 (PEI) 纳米颗粒 (Sigma-Aldrich, USA); 胎牛血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA); Lipofectamine[®] 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.); 脂多糖 (Sigma-Aldrich, USA); 荧光素酶检测试剂盒 (Promega, USA); miRVanaTM miRNA 分离试剂盒 (Invitrogen); All-in-OneTM miRNA RT-qPCR Detection Kit (GeneCopoeia Inc., Rockville, MD, USA); ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒提取总 RNA (Toyobo, Osaka, Japan); 7300 Real-Time PCR 系统 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA); BD FACS 流式细胞仪分析细胞凋亡率 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); RIA 裂解缓冲液 (PRO-PREP[™], iNtRON Biotechnology, Korea); AlphamagerTM 2000 成像系统 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)。

1.2 脓毒症小鼠模型和质粒 DNA 的体内传导

选取 24 只成年雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠

(28 ~ 32)g, 平均 (30 \pm 2)g, 购买自中国医学科学院放射医学研究所动物实验中心, 饲养于 23 ~ 25 $^{\circ}$ C、相对湿度 45% ~ 60% 及光照 12 h 的环境中, 并可随意获得食物和水, 适应性饲养一周。将 C57BL/6 小鼠随机分为 CLP 组、CLP + NC agomir 组、CLP + miR-145-5p agomir 组和假手术组 (Sham 组), 每组 6 只。CLP 组、CLP + NC agomir 组、CLP + miR-145-5p agomir 组小鼠接受盲肠结扎穿刺 (CLP) 手术, 建立 CLP 诱导的脓毒症模型^[11], 方法如下: 小鼠注射 10% 水合氯醛 (3 mL/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), 并以仰卧位固定在手术台上, 在小鼠腹部做一个 4 mm 的纵向切口以暴露盲肠。将暴露的盲肠在离针尖 10 mm 处用丝线结扎, 然后在离结扎 5 mm 处用针穿刺 1 次。轻轻挤压盲肠, 挤出少量粪便后, 重新定位肠管, 无菌缝合腹部肌肉、腹膜和皮肤。术后立即皮下注射 5 mL/100 g 生理盐水进行复苏。Sham 组进行与其他三组相同的手术过程, 但不结扎或穿孔盲肠。CLP 组、CLP + NC agomir 组、CLP + miR-145-5p agomir 组 miRNA 试剂、miR-145-5p agomir 和 scrambled control (NC agomir) 均购置 GenePharm 公司 (中国上海), 与线性聚乙烯亚胺 (PEI) 纳米颗粒 (Sigma - Aldrich) 混合^[12]。CLP 手术前一周, 经尾静脉将 200 μ L 含 5 nmol miRNA (miR-145-5p agomir 或 NC agomir) 的混悬液经静脉注射到指定组。术后 24 h 对各组小鼠实施二氧化碳窒息安乐死, 收集肺部组织并妥善储存以供进一步分析。

1.3 组织学分析

采集各组同样部位的小鼠肺组织标本用于组织病理学检查, 采用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切成 5 μ m 的切片, 使用苏木精和伊红染色 (HE)。肺损伤的程度由对实验不知情的研究者使用肺损伤评分来估计^[13], 每张切片随机选取 5 个区域在 400 倍数下进行评分, 评分越高, 损伤程度越大。

1.4 细胞培养和转染

分离原代小鼠肺微血管内皮细胞 (primary mouse lung microvascular endothelial cells, MPVECs) 置于 DMEM 培养基中, 辅以 10% 胎牛血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱培养^[14]。miR-145-5p 模拟物 (miR-145-5p mimics) 和对照模拟物 (NC mimics) 均购自上海基因制药有限公司 (中国上海), 根据使用说明, 取对数生长期的 MPVECs 细胞接种于 6 孔

板中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养细胞,当细胞达 60% 融合时,采用 Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 将 miR-145-5p mimics、NC mimics 转染到 MPVECs 细胞中。转染 24 h 后,用 1 mg/mL 脂多糖 (LPS) 刺激细胞。在救援实验中,在 LPS 处理 24 h 前,用过表达 ROCK1 的慢病毒载体 (ROCK1) (或空慢病毒载体) 和 miR-145-5p 模拟物共转染 MPVECs。用空慢病毒载体 (vector) 和对照模拟物 (NC mimics) 共转染 MPVECs 作为对照组。

1.5 双荧光素酶报告分析

扩增含有 miR-145-5p 预测结合位点的 ROCK1 3'-UTR 片段,并克隆到 pmirGlo 载体 (GenePharm) 中荧光素酶基因的下游。将对数生长期的 MPVECs 细胞接种到 24 孔板中 (每孔 1×10^3 个细胞),待细胞达到 60% 融合时,将 miR-145-5p 模拟物和对照模拟物分别与 ROCK1 3'-UTR 野生型或突变型重组质粒共转染。转染 48 h 后,使用 Renilla luciferase 报告基因 (pRL-CMV, Promega, USA) 检测荧光素酶活性。报告基因活性采用荧光素酶检测试剂盒 (Promega, USA) 根据生产厂家的方案进行测定。

1.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

使用 miRvana™ miRNA 分离试剂盒 (Invitrogen) 从小鼠肺组织和 MPVECs 中提取靶 miRNA。采用 All-in-One™ miRNA RT-qPCR Detection Kit (GeneCopoeia Inc., Rockville, MD, USA) 对 miR-145-5p 进行逆转录。根据制造商的说明,使用 ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒提取总 RNA (Toyobo, Osaka, Japan)。目的基因扩增采用 7300 Real-Time PCR 系统 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), U6 作为 miR-145-5p 的内参, β -actin 作为 mRNA 表达的内参。每个样本检测 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算表达情况。所用引物及片段大小如下: miR-145-5p (23 bp): F: 5'-CCT TGT CCT CAC GGT CCA GT-3', R: 5'-AAC CAT GAC CTC AAG AAC AGT ATT T-3'; U6 (75 bp): F: 5'-CGC AAG GAT GAC ACG CAA ATT CG-3', R: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; IL-1 β (314 bp): F: 5'-CCA GGA TGA GGA CCC AAG CA-3', R: 5'-TCC CGA CCA TTG CTG TTT CC-3'; IL-6 (474 bp): F: 5'-TAG CCG CCC CAC ACA GAC AG-3', R: 5'-GGC TGG CAT TTG TGG TTG GG-3'; ROCK1 (230 bp): F: 5'-AAA GAA AGG ATG GAG GAT GAA GT-3', R: 5'-TGT AAC AAC AGC CGC TTA TTT G-3'; β -actin (325 bp) F: 5'-ATC

ACT GCC ACC CAG AAG AC-3', F: 5'-TTT CTA GAC GGC AGG TCA GG-3'。使用 miRvana™ miRNA 分离试剂盒 (Invitrogen) 从 MPVECs 中提取靶 miRNA,采用上述同样的方法进行 qRT-PCR 实验。

1.7 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

提取小鼠肺组织的总蛋白和 MPVEC 裂解液,根据制造商的说明,采用 ELISA 试剂盒 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, XY-EM1810, XY-EM1624) 检测 IL-6 和 IL-1 β 蛋白水平。制备 MPVECs 裂解液,根据制造商的说明,采用 ELISA 试剂盒 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, XY-EM1810, XY-EM1624) 检测 IL-6 和 IL-1 β 蛋白水平。

1.8 转录活性分析

小鼠肺组织中 caspase-3 的转录活性采用 caspase-3 检测试剂盒 (Abcam, Cambridge, UK) 根据生产厂家的方案检测。采用蛋白酶抑制剂 RIPA 缓冲液 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 制备肺组织匀浆。将所有样品的蛋白浓度调整为每 50 μ L 细胞裂解缓冲液对应 100 ~ 150 μ g 蛋白。将 50 μ L 羟色胺 2 \times 反应缓冲液与 10 mM DTT 混合,加入到 50 μ L 的样品中,再加入 5 μ L 4 mM DEVD-p-NA 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h。采用酶标仪在 450 nm 处测定过氧化物酶反应产物的光密度值。采用 caspase-3 检测试剂盒 (Abcam, Cambridge, UK) 根据生产厂家的方案检测 MPVECs 中 caspase-3 的转录活性,经 LPS 处理 30 min 后,在细胞裂解缓冲液中裂解 MPVECs,采用上述同样的方法测定过氧化物酶反应产物的光密度值。

1.9 细胞凋亡检测

采用 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (# 14085, Abcam),根据说明书进行细胞凋亡检测。将转染后的 MPVECs 细胞培养于 6 孔板中,达到 70% ~ 80% 的融合度,经 LPS 处理 24 h 后,收集细胞,离心,重悬于 500 μ L 1 \times 缓冲液中,浓度为 5×10^5 个细胞/mL。然后将 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L 碘化丙啶 (PI) 加入样品中,避光室温孵育 5 min。使用 BD FACS 流式细胞仪分析细胞凋亡率 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)。

1.10 Western blot

采用 RIA 裂解缓冲液 (PRO-PREP™, iNtRON Biotechnology, Korea) 提取转染后 MPVECs 细胞系总蛋白。取相同量总蛋白上样,经 10% SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上 (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA),在 37 $^{\circ}$ C 下用 5% 脱脂乳封闭 1 h,加入一

抗 (ROCK1 浓度 1: 2000, #ab45171, Abcam; β -actin 浓度 1: 2 000, #ab32572, Abcam) 在 4 °C 下, 持续 6 h。随后, 将 PVDF 膜用 TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min。加入羊抗兔二抗 (1: 3000, #ab6721, Abcam), 室温孵育 45 h, TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min。应用 Alphamager™ 2000 成像系统对蛋白条带进行可视化 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA), 并对谱带密度进行量化分析。

1.11 统计学分析

数据分析采用 SPSS 21.0 (New York, USA) 和 GraphPad Prism version 7.0 (California, USA) 进行处理。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验或 one-way ANOVA。**P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 miR-145-5p 表达水平及肺损伤情况比较

与 Sham 组相比, CLP 组肺组织中 miR-145-5p 表达明显降低 (*P* < 0.05); 与 CLP + NC agomir 组相比, 在脓毒症小鼠中注射 miR-145-5p 过表达质粒显著提高了 miR-145-5p 的表达水平 (*P* < 0.05) (图

1A)。采用肺损伤评分法评估肺组织损伤程度, 其中 miR-145-5p 过表达可显著改善 CLP 手术引起的肺组织的损伤程度 (*P* < 0.05) (图 1B)。Sham 组肺泡形态结构正常, 而 CLP 组小鼠肺泡壁和间隔增厚, 肺泡囊塌陷, 可见血管充血和出血。脓毒症小鼠注射对照 agomir 后的组织病理学特征与模型组相似。而 miR-145-5p 的诱导减轻了脓毒症引起的肺泡损伤 (图 1C)。

2.2 miR-145-5p 对各组小鼠肺组织凋亡标志物的活性和炎症因子水平的影响

与 Sham 组相比, CLP 术后肺组织中凋亡标志物 caspase-3 的转录活性显著升高 (*P* < 0.05)。相比 CLP + NC agomir 组, miR-145-5p 过表达导致 caspase-3 的活性显著降低 (*P* < 0.05) (图 2A)。相比 Sham 组, 脓毒症小鼠 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 (*P* < 0.05) (图 2B)。相比 CLP + NC agomir 组, miR-145-5p 过表达可显著降低 IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达水平 (*P* < 0.05) (图 2C)。

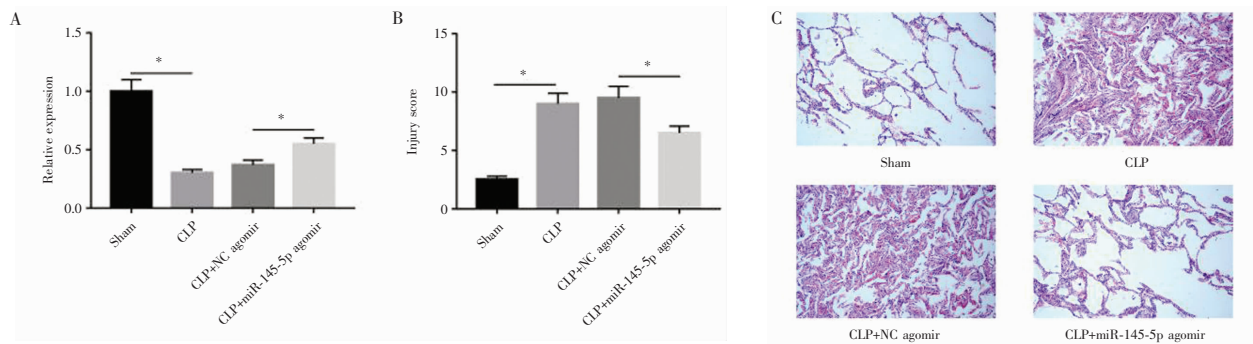


图 1 各组 miR-145-5p 表达水平及肺损伤情况比较

A. qRT-PCR 检测各组肺组织中 miR-145-5p 的表达水平; B. 采用肺损伤评分法测定各组肺损伤程度; C. 各组具有代表性的组织学图像 (×400)。**P* < 0.05。

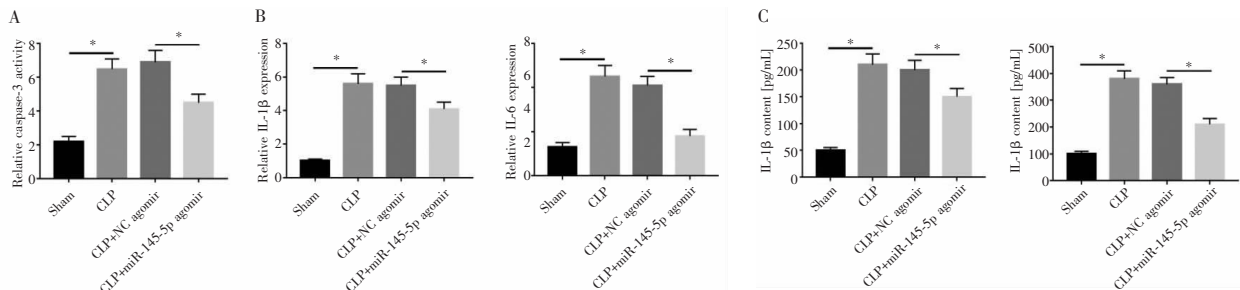


图 2 miR-145-5p 对各组小鼠肺组织凋亡标志物的活性和炎症因子水平的影响

A. 采用 caspase-3 试剂盒检测各肺组织中 caspase-3 的转录活性; B-C. 采用 qRT-PCR 和 ELISA 检测各组肺组织 IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 和蛋白水平。**P* < 0.05。

2.3 过表达 miR-145-5p 对脂多糖诱导的 MPVECs 细胞凋亡和炎症反应的影响

采用 LPS 刺激 MPVECs 模拟体外肺损伤,与未采用 LPS 处理的对照组相比,经 LPS 处理的细胞中 miR-145-5p 水平显著降低($P < 0.05$)。相比 NC mimics 组,miR-145-5p 模拟物转染显著增加 miR-145-5p 的表达水平($P < 0.05$) (图 3A)。经 LPS 处理后 caspase-3 的活性显著提高,而 miR-145-5p 过表达明显降低了 caspase-3 的活性($P < 0.05$) (图 3B)。miR-145-5p 过表达显著抑制了 LPS 诱导的 MPVECs 中 IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达水平($P < 0.05$) (图 3C-D)。流式细胞仪数据显示,与 NC mimics 组相比,

LPS 刺激了 MPVECs 的凋亡(图 3E)。提示转染 miR-145-5p 模拟物可有效地降低细胞凋亡率。

2.4 miR-145-5p 直接靶向 ROCK1

为了探究 miR-145-5p 参与 ALI 的潜在分子机制,使用 TargetScan 预测 miR-145-5p 的下游靶点,发现 ROCK1 是 miR-145-5p 的直接靶基因,并在其 3'-UTR 存在一个结合位点(图 4A)。双荧光素酶报告基因实验显示,转染 miR-145-5p 模拟物的细胞 ROCK1-WT 的荧光素酶活性明显低于 NC mimics 组($P < 0.05$) (图 4B)。此外,相比 NC mimics 组,miR-145-5p 过表达显著降低了 ROCK1 mRNA 和蛋白表达水平($P < 0.05$) (图 4C-D)。

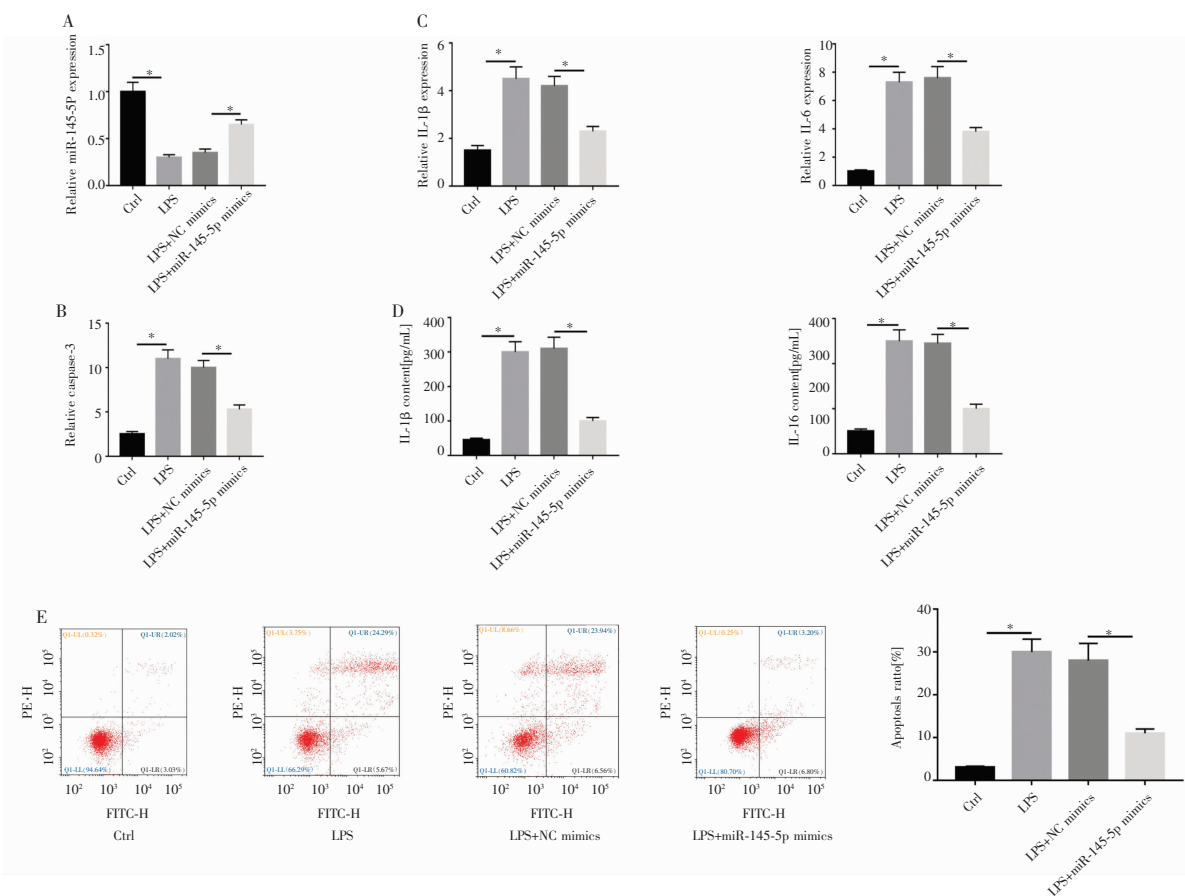


图 3 过表达 miR-145-5p 对脂多糖诱导的 MPVECs 细胞凋亡和炎症反应的影响

A.LPS 处理 6 h 后,qRT-PCR 检测各组 miR-145-5p 的相对表达情况;B.LPS 处理 30 min 后检测各组 caspase-3 的转录活性;C-D.采用 qRT-PCR 和 ELISA 检测各组 IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 和蛋白水平;E.采用流式细胞术分析转染后 MPVECs 细胞凋亡率。 $*P < 0.05$ 。

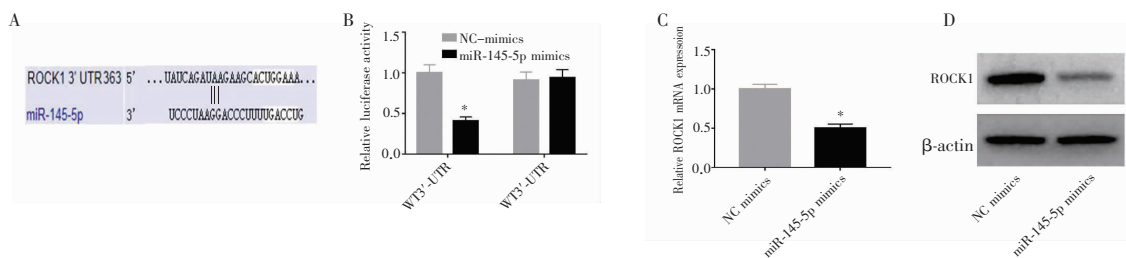


图 4 miR-145-5p 直接靶向 ROCK1

A.TargetScan 预测 ROCK1 是 miR-145-5p 的直接下游靶点;B.采用双荧光素酶报告基因法测定荧光素酶活性;C-D.采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测转染 NC mimic 和 miR-145-5p mimic 的 MPVECs 中的 ROCK1 mRNA 和蛋白表达水平。 $*P < 0.05$ 。

2.5 miR-145-5p 通过抑制 ROCK1 抑制细胞凋亡和炎症反应

为进一步研究 miR-145-5p 是否通过靶向 ROCK1 调控细胞凋亡和炎症反应, LPS 处理前 24 h, 将 miR-145-5p 模拟物和过表达的 ROCK1 的慢病毒载体 (或空载体) 共转染 MPVECs。转染后的 MPVECs 中 ROCK1 mRNA 和蛋白表达水平均显著增加, 证实了其转染成功 (图 5A-B)。与 Vector + NC mimics 相比, miR-145-5p + Vector 共转染 MPVECs 的

caspase-3 活性明显降低 ($P < 0.05$), ROCK1 过表达可使 caspase-3 转录活性恢复到对照组水平 (图 5C)。miR-145-5p 过表达显著抑制 MPVECs 中 IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 而 ROCK1 过表达导致 IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$) (图 5D-E)。此外, 过表达 miR-145-5p 可显著降低 MPVECs 的凋亡率, 而过表达 ROCK1 的则显著促进 MPVECs 细胞凋亡 ($P < 0.05$) (图 5F)。

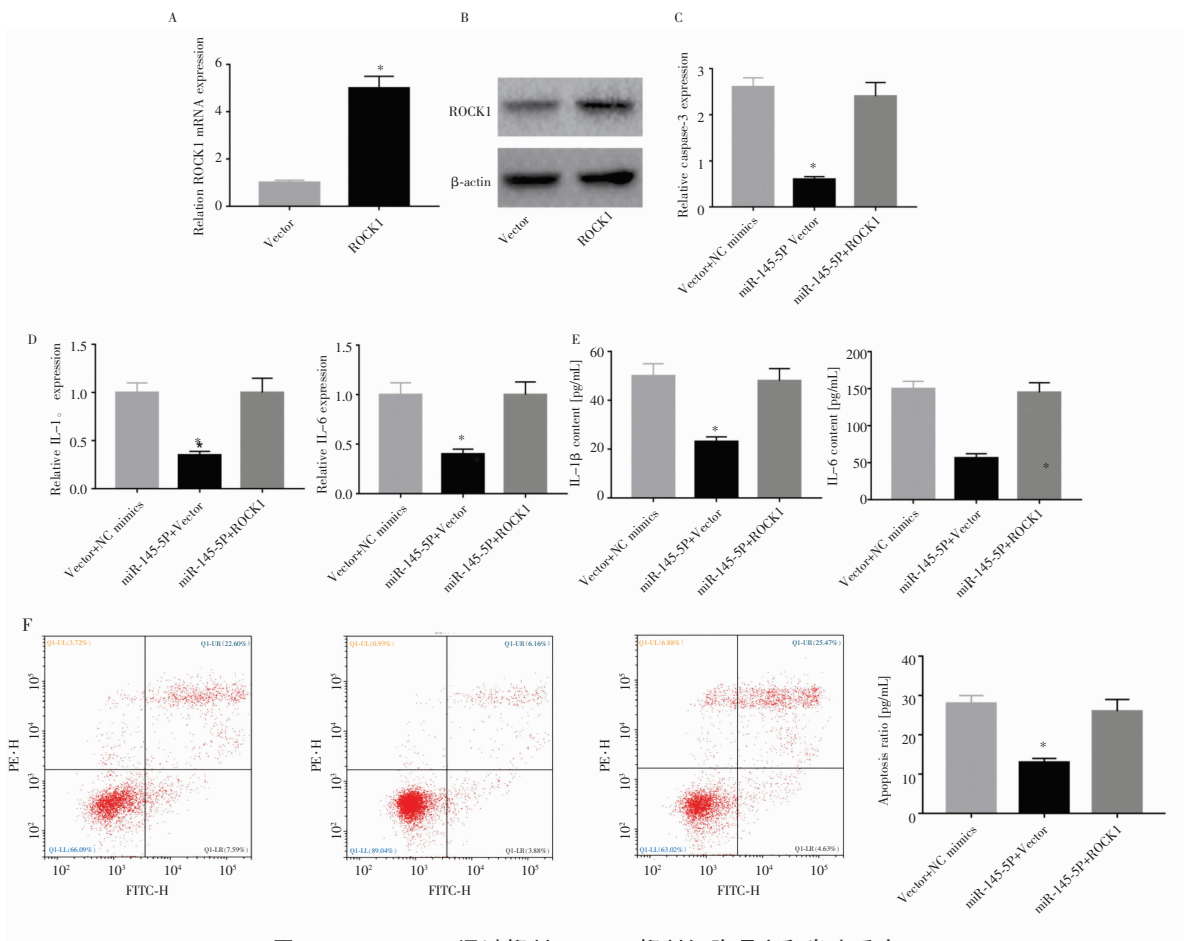


图 5 miR-145-5p 通过抑制 ROCK1 抑制细胞凋亡和炎症反应

注:A、B采用 qRT-PCR 和 Western blot 分析各组转染后 ROCK1 mRNA 和蛋白表达水平;C:LPS 处理 30 min 后,检测各组 caspase-3 的转录活性;D-E采用 qRT-PCR 和 ELISA 检测各组 IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 和蛋白水平;F:采用流式细胞术分析转染后 MPVECs 细胞凋亡率,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

脓毒症会导致更严重的疾病和更高的死亡率, 是造成急性肺损伤的主要病因^[15-16]。ALI 作为一种由过度炎症发展而来的综合征, 具有多种潜在的治疗靶点和信号传导途径^[17]。小鼠 CLP 模型与人类腹部穿孔所致的脓毒症病理生理学相似, 小鼠脓毒症模型已广泛应用于脓毒症所致器官功能障碍的研究中^[18]。脓毒症发生时肺部细胞凋亡的增强和

促炎因子的过度表达在 ALI 的发病机制中起关键作用^[19]。IL-1 β 和 IL-6 是 ALI 炎症级联反应中积极分泌的两种促炎细胞因子^[20]。抑制凋亡信号途径和炎症反应可能改善脓毒症诱导的肺损伤。caspase-3 是细胞凋亡的重要标志, 在 ALI 动物模型中已报道 caspase-3 转录活性增加^[21]。本研究发现 ALI 小鼠模型中 caspase-3 活性增强, IL-1 β 和 IL-6 分泌增多, 细胞凋亡率明显增加。LPS 是构成革兰氏阴性菌外膜的内毒素, 已被广泛用于急性肺损伤的研

究^[22]。另外,在体外模型中,与未处理的细胞相比,LPS 的刺激可导致 MPVECs 炎症细胞因子水平和细胞凋亡率明显增加,由此可见,ALI 的发生发展与细胞凋亡和炎症因子的过度激活密切相关。

研究^[23]表明在 LPS 诱导的肺损伤小鼠模型中 miRNA 可能参与 ALI 的发生发展,其中某些类型的 miRNA 显著下调,而有些 miRNA 显著上调或保持不变。miRNA 在 ALI 中作用的进一步研究表明,miRNA 可通过靶向特定分子或调控下游基因来调控 ALI 进程中的炎症反应和凋亡途径^[24]。Liu 等^[25]研究表明 miR-155 的下调通过靶向 SIRT1 抑制了 CLP 诱导的 ALI 小鼠的肺细胞凋亡和炎症反应,提高了小鼠的存活率。miR-1246 通过抑制其下游靶点 ACE2 降低 ALI 小鼠的细胞凋亡、IL-1 β 的释放和中性粒细胞浸润^[26]。Xie 等^[27]研究表明在肺损伤过程中,miR-127 表达明显降低,而过表达 miR-127 通过调节巨噬细胞的 CD46 来减轻肺部炎症反应。在另一项动物研究^[28]发现 miR-146a 的上调通过抑制 IRAK-1 和 TRAF-6 的表达减轻了脂多糖诱导的 ALI 模型中炎症因子的分泌。本研究发现,与假手术组相比,CLP 手术后小鼠肺部组织 miR-145-5p 水平显著下调。而术前转染 miR-145-5p 模拟物可有效缓解脓毒症诱导的肺损伤,同时可有效降低 caspase-3 的转录活性,抑制炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 的表达,降低细胞凋亡率。此外,miR-145-5p 在脂多糖处理的 MPVECs 中也表现出同样的抗凋亡和抗炎的作用。此外,ROCK1 被预测并证实为 miR-145-5p 的直接下游靶点。前期 CLP 大鼠模型研究^[29]表明,ROCK1 的激活参与了脓毒症诱导 ALI 的发病机制,可能与氧化应激和凋亡有关。在本研究中,ROCK1 过表达可使 caspase-3 转录活性恢复到对照组水平,而 ROCK1 过表达导致 IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达水平显著上调。此外,过表达 ROCK1 则显著促进 MPVECs 细胞凋亡。提示 miR-145-5p 通过抑制其下游目标 ROCK1 的表达,改善脓毒症诱导的急性肺损伤。本研究通过探讨 miR-145-5p 在体内外对脓毒症诱导的 ALI 发生的分子机制,发现 miR-145-5p 在脓毒症模型中诱导降低促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 的表达,抑制凋亡标志物 caspase-3 的转录活性。进一步研究发现,miR-145-5p 通过负调控其下游靶点 ROCK1 的表达,降低脓毒症诱导的 ALI 细胞凋亡和炎症反应。

综上所述,miR-145-5p 通过下调 ROCK1 的表达,减轻了脓毒症诱导的 ALI 肺部细胞凋亡和促炎

细胞因子的产生。miR-145-5p 有望作为脓毒症诱导的 ALI 治疗的潜在靶点。

参考文献

- [1] Qin Y, Wang G, Peng Z. MicroRNA-191-5p diminished sepsis-induced acute kidney injury through targeting oxidative stress responsive 1 in rat models[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(8): BSR20190548.
- [2] 马成龙,刘波,黄柯冰. LncRNA H19 对脂多糖诱导的脓毒症中 microRNA-107 表达的影响[J]. *川北医学院学报*, 2018, 33(6): 824 - 827.
- [3] Papageorgiou C, Jourdi G, Adjambri E, et al. Disseminated Intravascular Coagulation: An Update on Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutic Strategies [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2018, 24(suppl 9): 8S - 28S.
- [4] Zhao G, Zhang T, Ma X, et al. Oridonin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells and acute lung injury[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68153 - 68164.
- [5] Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(10): 1896 - 1903.
- [6] Sun DZ, Song CQ, Xu YM, et al. Role of the MAPK pathway in human lung epithelial-like A549 cells apoptosis induced by paraquat [J]. *Genet Mol Biol*, 2020, 43(2): e20190137.
- [7] Hu Q, Liu F, Yan T, et al. MicroRNA5763p inhibits the migration and proangiogenic abilities of hypoxiatreated glioma cells through hypoxia-inducible factor1 α [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(6): 2387 - 2397.
- [8] Adameova AD, Bhullar SK, Elimban V, et al. Activation of adrenoceptors may not be involved in arrhythmogenesis in ischemic heart disease[J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2018, 19(3): 97 - 101.
- [9] Yang Q, Zhang D, Li Y, et al. Paclitaxel alleviated liver injury of septic mice by alleviating inflammatory response via microRNA-27a/TAB3/NF- κ B signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1424 - 1433.
- [10] Yu YL, Yu G, Ding ZY, et al. Overexpression of miR-145-5p alleviated LPS-induced acute lung injury [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2019, 33(4): 1063 - 1072.
- [11] Ruiz S, Vardon-Boune F, Merlet-Dupuy V, et al. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture [J]. *Intensive Care Med Exp*, 2016, 4(1): 22.
- [12] Morishita Y, Imai T, Yoshizawa H, et al. Delivery of microRNA-146a with polyethylenimine nanoparticles inhibits renal fibrosis in vivo [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 3475 - 3488.
- [13] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44(5): 725 - 738.
- [14] Hebbel RP, Vercellotti GM, Pace BS, et al. The HDAC inhibitors trichostatin A and suberoylanilide hydroxamic acid exhibit multiple modalities of benefit for the vascular pathobiology of sickle transgenic mice [J]. *Blood*, 2010, 115(12): 2483 - 2490.
- [15] Sevransky JE, Martin GS, Shanholtz C, et al. Mortality in sepsis versus non-sepsis induced acute lung injury [J]. *Crit Care*, 2009, 13(5): R150.
- [16] 王小军. 炎症反应及细胞内钙浓度异常升高在脓毒症发展中的作用分析 [J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 48(2): 209 - 213.
- [17] Sweeney RM, Griffiths M, McAuley D. Treatment of acute lung injury: current and emerging pharmacological therapies [J]. *Semin*

Respir Crit Care Med, 2013, 34(4):487-498.

- [18] Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(1):137-143.
- [19] Chopra M, Reuben JS, Sharma AC. Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234(4):361-371.
- [20] Cross LJ, Matthay MA. Biomarkers in acute lung injury: insights into the pathogenesis of acute lung injury [J]. *Crit Care Clin*, 2011, 27(2):355-377.
- [21] Wang L, Ye Y, Su HB, *et al.* The anesthetic agent sevoflurane attenuates pulmonary acute lung injury by modulating apoptotic pathways [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(3):e5747.
- [22] Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, *et al.* Transcriptional profiling of lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(12):7247-7256.
- [23] Cai ZG, Zhang SM, Zhang Y, *et al.* MicroRNAs are dynamically regulated and play an important role in LPS-induced lung injury [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(1):37-43.
- [24] Cao Y, Lyu YI, Tang J, *et al.* MicroRNAs: Novel regulatory molecules in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(5):523-527.
- [25] Liu Y, Guan H, Zhang JL, *et al.* Acute downregulation of miR-199a attenuates sepsis-induced acute lung injury by targeting SIRT1 [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 314(4):C449-C455.
- [26] Fang Y, Gao F, Hao J, *et al.* microRNA-1246 mediates lipopolysaccharide induced pulmonary endothelial cell apoptosis and acute lung injury by targeting angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3):1287-1296.
- [27] Xie T, Liang J, Liu N, *et al.* MicroRNA-127 inhibits lung inflammation by targeting IgG Fcγ receptor I [J]. *J Immunol*, 2012, 188(5):2437-2444.
- [28] Zeng Z, Gong H, Li Y, *et al.* Upregulation of miR-146a contributes to the suppression of inflammatory responses in LPS-induced acute lung injury [J]. *Exp Lung Res*, 2013, 39(7):275-282.
- [29] Cinel I, Ark M, Dellinger P, *et al.* Involvement of Rho kinase (ROCK) in sepsis-induced acute lung injury [J]. *J Thorac Dis*, 2012, 4(1):30-39.

(收稿日期:2020-07-04

修回日期:2020-11-03)