

# DLX6-AS1 通过竞争性结合 miR-15 上调 Caspase-1 诱导巨噬细胞焦亡

何琴<sup>1</sup>, 米娅丽<sup>2</sup>, 冯熙熙<sup>2</sup>, 赵国军<sup>2\*</sup>, 侯连杰<sup>2,3\*</sup>

(1. 大理大学 药学院, 中国云南 大理 671003; 2. 广州医科大学 附属第六医院, 中国广东 清远 511518; 3. 广州华立科技  
职业学院, 中国广东 广州 511325)

**摘要:** 为探讨长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) DLX6-AS1 在巨噬细胞焦亡中的作用及相关机制, 采用生物信息学分析、实时荧光定量 PCR 和双荧光素酶报告基因实验等, 在 THP-1 巨噬细胞中分析并验证 lncRNA DLX6-AS1 下游微 RNA (microRNA, miRNA) 及 miRNA 的下游靶基因; 通过免疫荧光染色等实验检测 DLX6-AS1/miR-15/caspase-1 轴对巨噬细胞焦亡的影响。结果显示, DLX6-AS1 在焦亡巨噬细胞中表达上调, 敲降 DLX6-AS1 可抑制巨噬细胞焦亡, 但这种抑制作用被 miR-15 抑制剂逆转; miR-15 通过调控其靶基因 *caspase-1* 表达, 抑制巨噬细胞焦亡。本研究表明, DLX6-AS1 通过竞争性结合 miR-15, 解除 miR-15 对其靶基因 *caspase-1* 的抑制作用, 从而诱导巨噬细胞焦亡, 这将丰富 lncRNA 调控巨噬细胞焦亡的理论基础。

**关键词:** 长链非编码 RNA (lncRNA); 微 RNA (miRNA); 焦亡; 巨噬细胞

中图分类号: Q25

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)02-0095-08

## DLX6-AS1 Induces Macrophage Pyroptosis Through miR-15/ Caspase-1

HE Qin<sup>1</sup>, MI Yali<sup>2</sup>, FENG Xixi<sup>2</sup>, ZHAO Guojun<sup>2\*</sup>, HOU Lianjie<sup>2,3\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671003, Yunnan, China; 2. The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan 511518, Guangdong, China; 3. Guangzhou Huali Science and Technology Vocational College, Guangzhou 511325, Guangdong, China)

**Abstract:** In order to investigate the role of long noncoding RNA (lncRNA) DLX6-AS1 in macrophage pyroptosis and its related mechanism, the downstream microRNAs (miRNAs) of DLX6-AS1 and the target genes of miRNAs were analyzed in THP-1 cell line by bioinformatics analysis, real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR), a dual-luciferase reporter system, and so on. The effects of DLX6-AS1 and downstream miR-15 on macrophage pyroptosis were detected by immunofluorescence staining. The results showed that the expression of DLX6-AS1 was up-regulated in pyroptotic macrophages, and knocking down DLX6-AS1 inhibited pyroptosis of macrophages, which, however, could be reversed by miR-15 inhibitor. Further studies found that miR-15 inhibited macrophage pyroptosis by regulating the target gene *caspase-1*. These results indicated that DLX6-AS1 induces macrophage pyroptosis by competitively binding to miR-15 and removing the inhibition of miR-15 on its target gene *caspase-1*. The experiments will enrich the theoretical basis of lncRNA in regulating macrophage pyroptosis.

**Key words:** long noncoding RNA (lncRNA); microRNA (miRNA); pyroptosis; macrophage

(Life Science Research, 2024, 28(2): 095-102)

收稿日期: 2023-04-07; 修回日期: 2023-05-25; 网络首发日期: 2023-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82300517); 广东省医学科研基金资助项目(2021354)

作者简介: 何琴(1995-), 女, 四川蓬溪人, 硕士研究生; \*通信作者: 侯连杰(1990-), 男, 山东潍坊人, 博士, 副研究员, 主要从事代谢性疾病发病机制研究, E-mail: houlianjie@gzhmu.edu.cn; 赵国军(1978-), 男, 河南济源人, 博士, 教授, 主要从事代谢性疾病发病机制研究, E-mail: zhaoguojun@gzhmu.edu.cn.

细胞焦亡(pyroptosis)是一种由炎症小体介导的依赖于炎性胱天蛋白酶(caspase-1、caspase-4/5和caspase-11)的新型促炎症细胞程序性死亡方式<sup>[1]</sup>。炎性caspase通过剪切GSDMD(gasdermin D)、白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 前体和IL-18前体,得到GSDMD氨基端结构域(GSDMD-N)、IL-1 $\beta$ 和IL-18。GSDMD-N具有亲脂性和细胞毒性,可改变细胞膜通透性,使细胞发生肿胀和破裂,并伴随着大量IL-1 $\beta$ 和IL-18释放,导致细胞焦亡发生。因此,细胞焦亡也被称为GSDMD介导的细胞程序性死亡<sup>[2]</sup>。

巨噬细胞焦亡与多种疾病的发生发展密切相关。前期研究发现:动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)斑块中焦亡巨噬细胞数量显著增加<sup>[3]</sup>,敲降炎性小体NLRP3(NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3)可抑制巨噬细胞焦亡,减缓低密度脂蛋白受体缺陷小鼠的AS进展<sup>[4]</sup>;扩张型心肌病患者心肌组织中的NLRP3炎性小体表达增加,在多柔比星诱导的扩张型心肌病小鼠模型中,NLRP3或caspase-1的敲除显著减缓了扩张型心肌病的进展<sup>[5]</sup>;IL-37通过抑制腺泡细胞焦亡预防急性胰腺炎,而胰腺中GSDMD的特异性缺失抵消了IL-37对胰腺的保护作用<sup>[6]</sup>。因此,解析巨噬细胞焦亡分子机制对于焦亡相关疾病的治疗具有重要意义。

长链非编码RNA(long noncoding RNA, lnc-RNA)是一类长度超过200个核苷酸的RNA分子,与细胞焦亡密切相关<sup>[7]</sup>。前期研究发现,在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的急性肾损伤中,lnc-RNA DLX6-AS1表达增加,敲降DLX6-AS1通过miR-223-3p/NLRP3途径抑制人肾小管上皮细胞焦亡<sup>[8]</sup>。然而,DLX6-AS1在巨噬细胞焦亡过程中的作用及机制未见报道。本研究发现,DLX6-AS1通过竞争性结合miR-15,促进miR-15靶基因caspase-1表达,最终诱导巨噬细胞焦亡,相关结果可为靶向DLX6-AS1/miR-15/caspase-1抑制巨噬细胞焦亡提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

THP-1巨噬细胞系和293T细胞株购自美国ATCC公司。Lipo3000、LPS和尼日利亚菌素(nigericin)均购买于美国Life公司。胎牛血清、DMEM高糖培养基、RPMI 1640培养基和胰蛋白酶购买

于美国Gibco公司。野生型及突变型DLX6-AS1或caspase-1双荧光素酶pmirGLO质粒,miR-15模拟物、抑制剂及对照核酸片段(negative control, NC),DLX6-AS1的3条干扰小RNA(small interfering RNA, siRNA)均由北京擎科生物科技股份有限公司构建或合成。双荧光素酶报告基因检测试剂盒由美国Promega公司提供。

### 1.2 细胞培养及处理

THP-1巨噬细胞按照 $8 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ 的密度进行接种,随后用佛波酯处理48 h以诱导巨噬细胞贴壁,而后转染miR-15抑制剂、模拟物或si-caspase-1,继续培养24 h;使用含有 $1 \mu\text{g/mL}$  LPS的RPMI 1640完全培养基继续处理细胞24 h后,加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 尼日利亚菌素处理1 h以诱导焦亡。

### 1.3 免疫荧光染色

用4%的多聚甲醛溶液固定不同处理条件的THP-1巨噬细胞10 min,而后用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)浸洗3遍,5%羊血清封闭1 h;加入cleaved caspase-3抗体(美国CST公司,1:200),4℃孵育过夜,随后用PBS浸洗3遍,每遍5 min;按1:1 000加入荧光二抗Alexa Fluor 594(美国Abcam公司,1:200),室温避光孵育1 h;按1:2 000加入细胞核染色剂4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(美国Roche公司,1:1 000),室温孵育5 min, PBS浸洗后在荧光显微镜下观察。

### 1.4 MTT检测细胞活力

取对数生长期的THP-1巨噬细胞,按照 $8 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ 的密度接种于96孔板。根据实验分组(每组6个重复孔)进行转染或药物处理后,每孔加入MTT溶液( $5 \text{ mg/mL}$ ,上海联迈生物工程有限公司)20  $\mu\text{L}$ ,继续培养6 h;除去孔中液体,每孔加入150  $\mu\text{L}$ 二甲基亚砜,振荡10 min,用BioTek酶标仪检测每孔吸光度,计算细胞活力。

### 1.5 实时荧光定量PCR

按照广州美基生物科技有限公司RNA快速提取试剂盒操作说明提取THP-1巨噬细胞RNA。按照日本TaKaRa公司逆转录试剂盒操作说明将总RNA逆转录为cDNA。实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR)操作在本团队前期发表的研究成果<sup>[9]</sup>中有报道,相关引物序列见表1。

### 1.6 lncRNA-miRNA-mRNA靶向关系预测

lncRNA-miRNA-mRNA靶向关系预测方法

表 1 qRT-PCR 引物序列  
Table 1 The primer sequences used in qRT-PCR

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
DLX6-AS1	TGCGCTGGGCATGTTGCT	CGGGAGCTGGTACTGTTTGAC
miR-15	TAGCAGCACATAATGGTTTGTG	TGGTGCCTGGACTCG
miR-223-3p	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA	TGGTGCCTGGACTCG
miR-200a	TAACACTGTCTGTAACGATGT	TGGTGCCTGGACTCG
miR-23b	ATCACATTGCCAGGATTACCAC	TGGTGCCTGGACTCG
miR-138-5p	AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCG	TGGTGCCTGGACTCG
Caspase-1	TTACAGACAAGGGTGTGAACAA	TTCGGAATAACGGAGTCAATCA
LINC01272	GAGCAGAGCCAGTGAATGTC	GAGGACGCTTGCATTTGCTT
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCCGT
GAPDH	ACATCAAGAAGGTGCTGAAG	TCAAAGCTGGAGACTGGGT

参考本团队前期发表的论文<sup>[9]</sup>。具体而言,通过 RISE database (<https://ngdc.cncb.ac.cn/databasecommons/database>), LNCipedia (<https://www.lncipedia.org/>) 和 AnnoLnc2 (<http://annolnc.gao-lab.org/>) 预测 DLX6-AS1 下游可能的微 RNA (microRNA, miRNA); 通过 miRDB (<https://mirdb.org/>)、TargetScan ([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/)) 和 miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) 预测 miR-15 下游可能的靶基因; 从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载焦亡 THP-1 巨噬细胞转录组测序数据 (GSE58959), 通过 GEO2 软件分析 THP-1 巨噬细胞差异表达基因和 miRNA, 将相关数据进行关联分析; 使用 RNAhybrid 在线网站 (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) 分析 miRNA 与 DLX6-AS1 和靶基因的结合自由能 (物种选择“human”, 自由能绝对值 > 20 kcal/mol)。本研究结果是基于 2022 年 10 月 15 日之前的数据库信息分析获得。

### 1.7 双荧光素酶报告基因实验

293T 细胞采用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养, 培养箱条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。取对数生长期 293T 细胞以 20 000 个/孔接种于 24 孔板, 进行双荧光素酶实验。根据双荧光素酶报告基因质粒的不同进行分组, 将野生型质粒、突变型质粒和空质粒分别与 miRNA 阴性对照或 miR-15 模拟物共同转染; 转染 48 h 后按照 Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒操作步骤检测荧光素酶活性。

### 1.8 免疫印迹分析

用蛋白质提取试剂盒 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 提取细胞总蛋白质, 用 Bradford 法进行蛋白质定量。蛋白质样品用 12% SDS-PAGE 分离后, 转移至聚偏氟乙烯 [poly(vinylidene fluoride), PVDF]

膜; 加入兔抗鼠 tublin (美国 CST 公司, 1 : 1 000) 和 caspase-1 (美国 CST 公司, 1 : 1 000) 抗体孵育过夜; PBS 洗膜后加入过氧化物酶偶联的二抗 (美国 CST 公司, 1 : 5 000), 37 °C 孵育 2 h; PBS 清洗后, 用 Bio-Rad 化学发光系统检测目的条带, 以 tublin 作为内参照。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以平均值 ± 标准误 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 数据均符合正态分布及方差齐性, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 干扰 DLX6-AS1 抑制巨噬细胞焦亡

qRT-PCR 结果表明: 在巨噬细胞经典焦亡模型 (LPS+nigericin) 中, DLX6-AS1 显著增加 (图 1A)。为考察增加的 DLX6-AS1 是否参与巨噬细胞焦亡, 我们首先设计 3 条 siRNA 对其进行干扰, qRT-PCR 结果表明: si-DLX6-AS1 能够显著降低巨噬细胞 DLX6-AS1 水平 (图 1B), 可用于后续干扰实验; 随后通过 MTT 法评估细胞活力, 结果表明: LPS+nigericin 处理显著降低细胞活力, 而干扰 DLX6-AS1 后 LPS+nigericin 处理对细胞活力的影响得到明显改善 (图 1C); 进一步的免疫荧光染色结果表明: 焦亡关键蛋白质 GSDMD-N 在 LPS+nigericin 处理后显著增加, 而干扰 DLX6-AS1 可显著抑制 GSDMD-N 蛋白表达 (图 1D)。上述结果表明, 干扰 DLX6-AS1 抑制巨噬细胞焦亡。

### 2.2 DLX6-AS1 通过 miR-15 调控细胞焦亡

由于 lncRNA 功能与其细胞分布密切相关, 我们通过 qRT-PCR 检测了 DLX6-AS1 在巨噬细

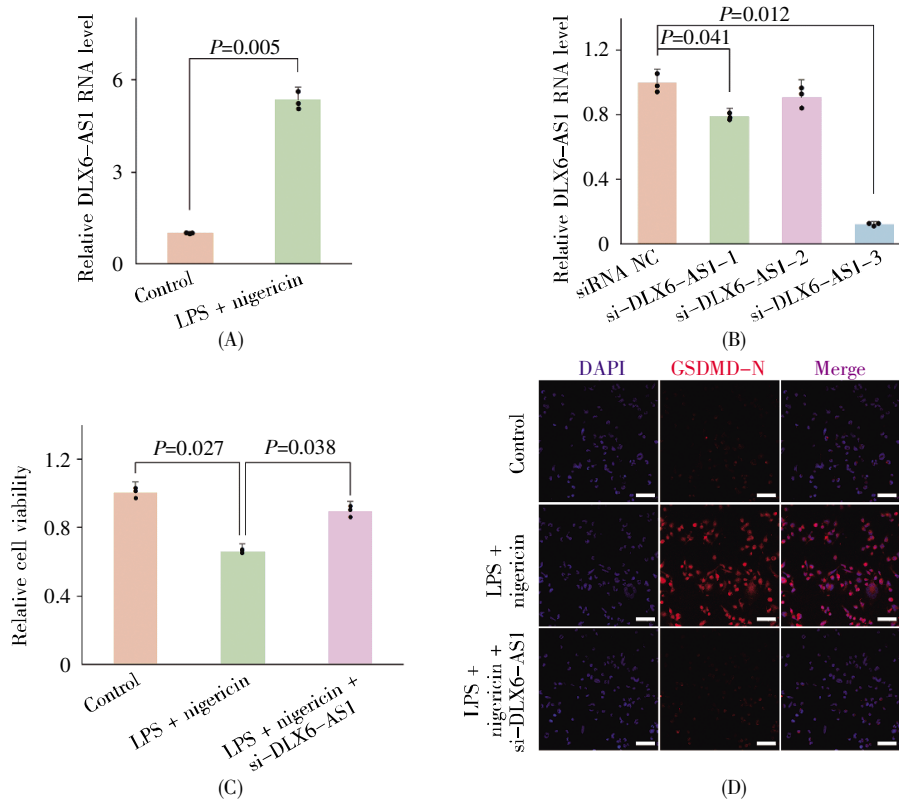


图1 干扰 DLX6-AS1 抑制巨噬细胞焦亡

(A) qRT-PCR 检测 DLX6-AS1 在不同处理条件巨噬细胞中的表达水平; (B) qRT-PCR 检测巨噬细胞中 DLX6-AS1 的敲降效果, NC: 对照核酸片段; (C) MTT 法检测细胞活力; (D) 免疫荧光染色检测细胞焦亡关键蛋白质 GSDMD-N 的表达。P<0.05 代表有统计学差异; 比例尺=40 μm; n=3。

### Fig.1 Interfering DLX6-AS1 inhibits pyroptosis of macrophages

(A) qRT-PCR verification of the DLX6-AS1 levels in macrophages under different treatments; (B) qRT-PCR detection of the DLX6-AS1 knockdown efficiency in macrophages, NC: Negative control; (C) Detection of the cell viability by MTT; (D) Detection of the key pyroptotic protein GSDMD-N expression by immunofluorescence staining. P<0.05 represents a significant statistical difference; scale bar = 40 μm; n=3.

胞中的分布情况, 结果表明 DLX6-AS1 主要分布于细胞质(图 2A), 提示其可能作为 miRNA“海绵”调控细胞焦亡。RISE database、LNCipedia 和 AnnoLnc2 三个数据库的预测结果显示, DLX6-AS1 下游可能存在 22 个 miRNA (图 2B); 将其同 GEO 数据库下载的焦亡巨噬细胞 miRNA 测序数据 (GSE58959) 进行比对发现, 与 DLX6-AS1 互作的 miRNA 中 miR-223-3p、miR-15、miR-200a、miR-23b 和 miR-138-5p 共 5 个 miRNA 在焦亡巨噬细胞中表达下调(图 2B)。采用 qRT-PCR 检测对照组、焦亡组和 DLX6-AS1 干扰组 5 个 miRNA 的表达水平, 结果显示仅 miR-15、miR-223-3p 和 miR-138-5p 的表达水平在干扰 DLX6-AS1 后显著增加(图 2C)。鉴于 miR-15 较 miR-223-3p、miR-138-5p 表达水平更高, 且在干扰 DLX6-AS1 后表达变化倍数更大(图 2C), 后续选择 miR-15 进行验证。使用 RNAhybrid 在线网站分析人 lncRNA DLX6-

AS1 和 miR-15 的结合自由能, 结果显示二者的结合自由能较低(-24.2 kcal/mol, 图 2D)。双荧光素酶报告基因实验结果表明: miR-15 显著抑制包涵野生型 DLX6-AS1 pmirGLO 载体(pmirGLO-DLX6-AS1)的荧光素酶活性, 但对包涵突变型 DLX6-AS1 pmirGLO 载体(pmirGLO-mut)的荧光素酶活性无明显影响(图 2E)。MTT 结果表明, miR-15 抑制剂可阻断 si-DLX6-AS1 对巨噬细胞活力的改善作用(图 2F)。GSDMD-N 蛋白的免疫荧光染色结果显示, miR-15 抑制剂可逆转 si-DLX6-AS1 对巨噬细胞焦亡的抑制作用(图 2G)。

### 2.3 miR-15 抑制巨噬细胞焦亡

为进一步确认 miR-15 对巨噬细胞焦亡的影响, 我们首先通过 miR-15 模拟物转染实验, 在巨噬细胞中过表达 miR-15 (图 3A); MTT 结果表明, miR-15 可改善 LPS+nigericin 处理对巨噬细胞活力的影响(图 3B); 随后的免疫荧光染色结果表明,

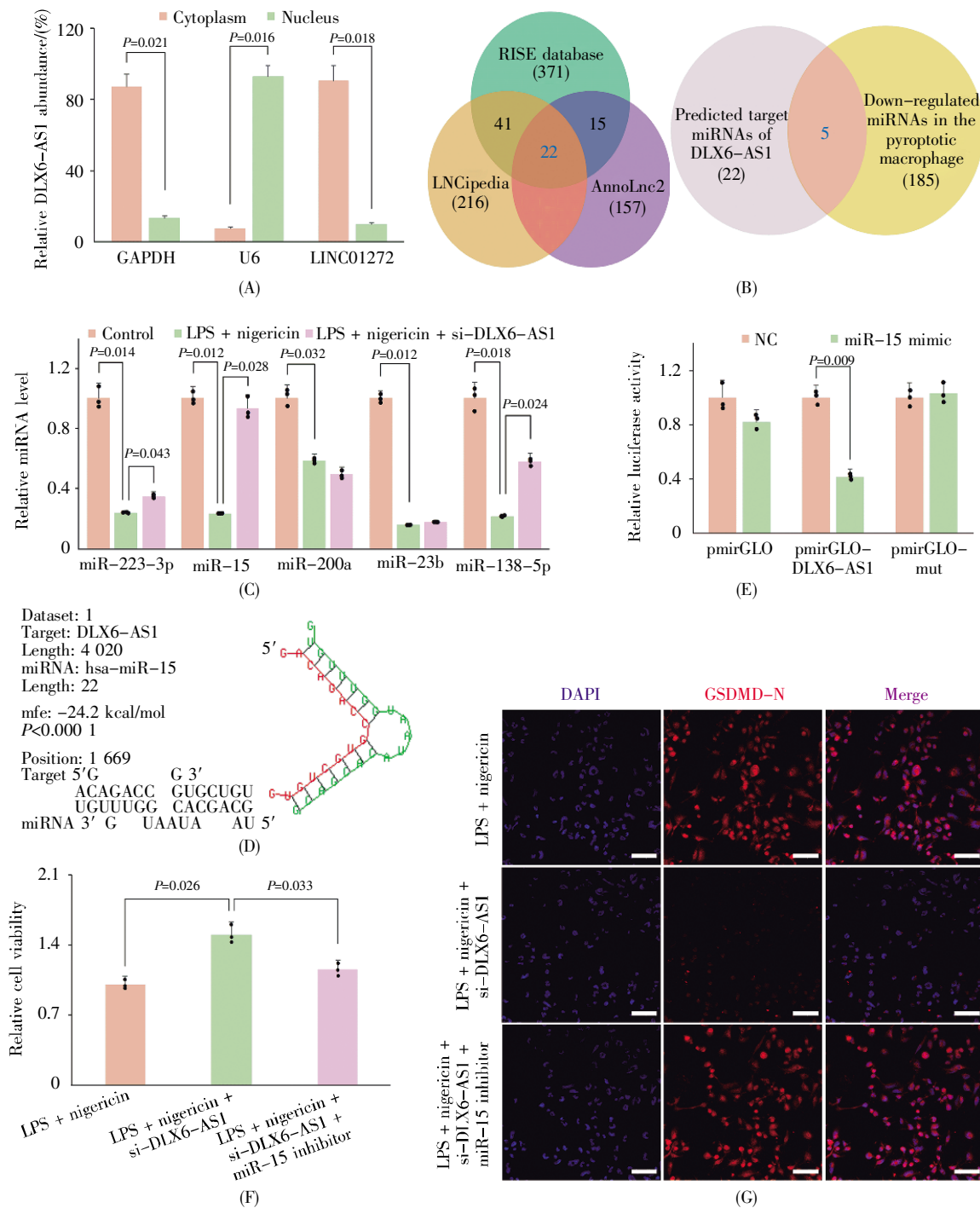


图 2 DLX6-AS1 通过 miR-15 调控细胞焦亡

(A) qRT-PCR 检测 DLX6-AS1 在巨噬细胞中的核质分布; (B) 维恩图展示 DLX6-AS1 下游潜在 miRNA 的预测结果; (C) qRT-PCR 检测候选 miRNA 在不同处理条件下巨噬细胞内的表达; (D) RNAhybrid 预测 DLX6-AS1 与 miR-15 之间的结合自由能; (E) 双荧光素酶报告基因实验检测 DLX6-AS1 与 miR-15 的靶向结合, NC: miR-15 模拟物的对照核酸片段; (F) MTT 法检测细胞活力; (G) 免疫荧光染色检测细胞焦亡关键蛋白质 GSDMD-N 的表达。P<0.05 代表有统计学差异; 比例尺=40  $\mu$ m; n=3。

### Fig.2 DLX6-AS1 regulates pyroptosis of macrophages by miR-15

(A) Detection of DLX6-AS1 distribution in both nucleus and cytoplasm by qRT-PCR; (B) Venn diagram showing the potential target miRNAs of DLX6-AS1; (C) qRT-PCR detection of the candidate miRNA levels in macrophages under different treatment conditions; (D) RNAhybrid prediction of the binding energy between DLX6-AS1 and miR-15; (E) Detection of the targeted binding of DLX6-AS1 and miR-15 by dual-luciferase reporter gene assay, NC: Negative control of miR-15 mimic; (F) Detection of the cell viability by MTT; (G) Detection of the key pyroptotic protein GSDMD-N expression by immunofluorescence staining. P<0.05 represents a significantly statistical difference; scale bar = 40  $\mu$ m; n=3.

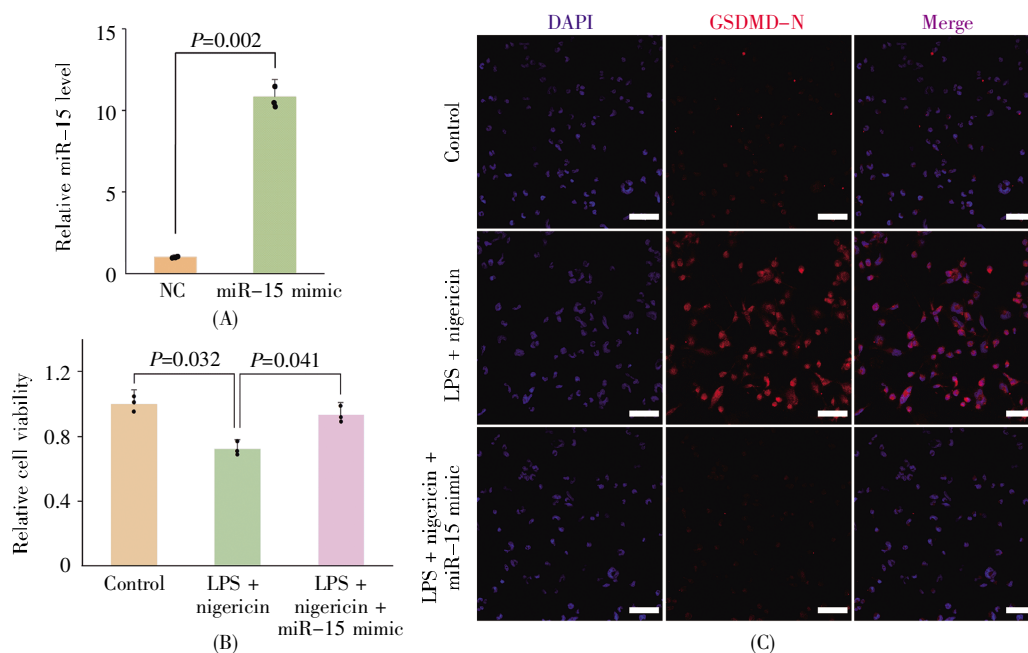


图3 miR-15抑制巨噬细胞焦亡

(A) qRT-PCR检测miR-15模拟物过表达效率, NC: miR-15模拟物的对照核酸片段; (B) MTT法检测细胞活力; (C) 免疫荧光染色检测细胞焦亡关键蛋白质GSDMD-N的表达。 $P<0.05$ 代表有统计学差异; 比例尺=40  $\mu\text{m}$ ;  $n=3$ 。

### Fig.3 miR-15 inhibits pyroptosis of macrophages

(A) Detection of miR-15 over-expression efficiency by qRT-PCR, NC: Negative control of miR-15 mimic; (B) Detection of the cell viability by MTT; (C) Detection of the key pyroptotic protein GSDMD-N expression by immunofluorescence staining.  $P<0.05$  represents a significantly statistical difference; scale bar = 40  $\mu\text{m}$ ;  $n=3$ .

过表达miR-15可显著抑制焦亡执行蛋白质GSDMD-N的表达(图3C)。上述结果表明, miR-15抑制LPS+nigericin处理诱导的巨噬细胞焦亡。

### 2.4 miR-15通过靶向caspase-1调控细胞焦亡

miRNA通过抑制其靶基因表达调控细胞功能。miRDB、TargetScan和miRWalk 3个数据库的预测结果显示, miR-15下游可能存在105个靶基因(图4A); 将其与GEO数据库下载的焦亡巨噬细胞mRNA测序数据(GSE58959)进行关联分析, 发现共有32个基因与miR-15可能存在靶向关系且在焦亡巨噬细胞中表达上调, 其中包含与焦亡密切相关的caspase-1基因(图4A)。使用RNAhybrid在线网站分析人caspase-1 3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)和miR-15的结合自由能, 结果显示二者的结合自由能较低(-26.9 kcal/mol, 图4B)。采用qRT-PCR检测miR-15干扰或过表达后caspase-1的表达水平, 结果表明干扰miR-15显著促进caspase-1基因表达, 过表达miR-15显著抑制caspase-1基因表达(图4C和4D)。双荧光素酶报告基因实验结果表明, miR-15显著抑制包涵野生型caspase-1 3'-UTR pmirGLO载体(pmirGLO-caspase-1)的荧光素酶活性, 但对包涵突变

型caspase-1 3'-UTR pmirGLO载体(pmirGLO-mut)的荧光素酶活性无明显影响(图4E)。MTT结果表明, si-caspase-1可改善miR-15抑制剂对细胞活力的影响(图4F)。GSDMD-N蛋白的免疫荧光染色结果显示, si-caspase-1可缓解miR-15抑制剂诱导的巨噬细胞焦亡(图4G)。

## 3 讨论

细胞焦亡是一种细胞炎症程序性死亡方式, 巨噬细胞焦亡与多种疾病的发生发展密切相关, 解析巨噬细胞焦亡分子机制可为焦亡相关疾病治疗提供新的分子靶标。本研究发现DLX6-AS1在巨噬细胞焦亡过程中显著增加, 且DLX6-AS1通过miR-15/caspase-1调控巨噬细胞焦亡。

lncRNA通过调控基因的表达遗传、转录、mRNA翻译或蛋白质稳定性等, 参与细胞代谢过程<sup>[10]</sup>。lncRNA的调节机制与其核质分布密切相关, 驻留在细胞核中的lncRNA倾向于通过招募染色质修饰因子、转录因子或RNA聚合酶II等调控蛋白质调节基因转录, 而转运至细胞质中的lncRNA则主要通过作为竞争内源性RNA调控翻译, 或影响蛋白质修饰和转运<sup>[11]</sup>。研究发现, 褪黑

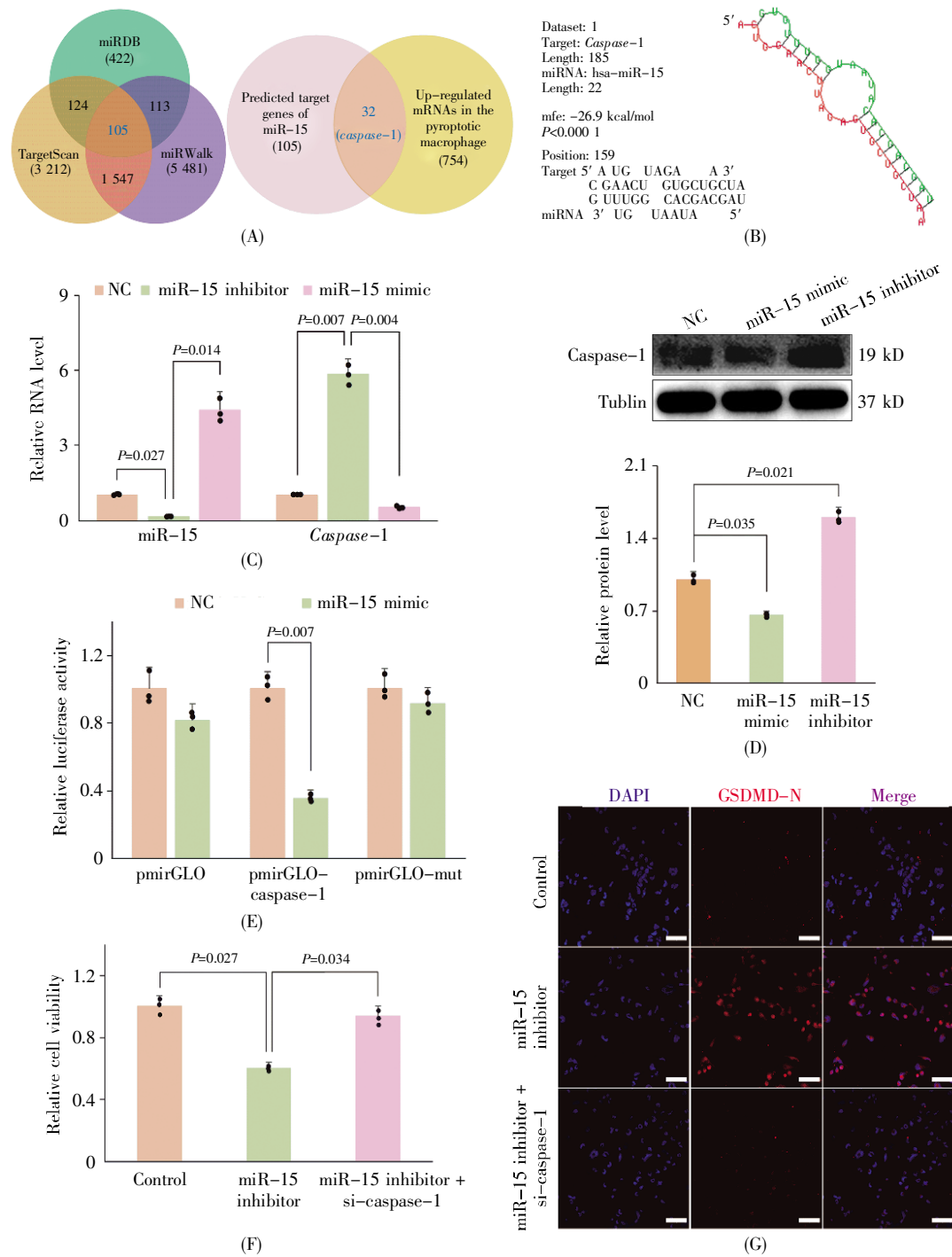


图 4 miR-15 通过靶向 caspase-1 调控细胞焦亡

(A) 维恩图展示 miR-15 下游靶基因的预测结果; (B) RNAhybrid 预测 miR-15 和 caspase-1 之间的结合自由能; (C) qRT-PCR 检测 miR-15 和 caspase-1 在不同处理条件下巨噬细胞内的表达; (D) 蛋白质免疫印迹分析不同处理条件下巨噬细胞内 caspase-1 的表达; (E) 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-15 和 caspase-1 的靶向结合; (F) MTT 法检测细胞活力; (G) 免疫荧光染色检测细胞焦亡关键蛋白质 GSDMD-N 的表达。NC: miR-15 模拟物的对照核酸片段;  $P < 0.05$  代表有统计学差异; 比例尺=40  $\mu\text{m}$ ;  $n=3$ 。

Fig.4 miR-15 regulates pyroptosis of macrophages by targeting caspase-1

(A) Venn diagram showing the potential target genes of miR-15; (B) RNAhybrid prediction of the binding energy between miR-15 and caspase-1; (C) Detection of the RNA levels of miR-15 and caspase-1 in macrophages by qRT-PCR; (D) Detection of the protein content of caspase-1 in macrophages by Western-blot; (E) Detection of the targeted binding of miR-15 and caspase-1 by dual-luciferase reporter gene assay; (F) Detection of the cell viability by MTT; (G) Detection of the key pyroptotic protein GSDMD-N expression by immunofluorescence staining. NC: Negative control of miR-15 mimic;  $P < 0.05$  represents a significantly statistical difference; scale bar = 40  $\mu\text{m}$ ;  $n=3$ .

素通过降低血管内皮细胞 lncRNA MEG3 水平,上调 miR-223,从而降低血管内皮细胞 miR-223 靶标蛋白质 NLRP3 的含量,阻断血管内皮细胞焦亡<sup>[12]</sup>; lncRNA MIAT 在 AS 斑块中显著上调,其通过核因子  $\kappa$ B 信号激活促炎巨噬细胞,并且还可通过增强 Kruppel 样因子 4 转录活性,诱导血管平滑肌细胞分化为巨噬样细胞<sup>[13]</sup>。本研究通过 RNA 核质分离技术发现 DLX6-AS1 主要分布于细胞质,提示 DLX6-AS1 可能通过作为 miRNA“海绵”发挥作用,而进一步的研究也发现 DLX6-AS1 可通过竞争性结合 miR-15 调控巨噬细胞焦亡。

miRNA 是一类长度约 22 个核苷酸的短链非编码 RNA 分子,其通过碱基互补配对原则识别并且结合 RNA 诱导的沉默复合体,直接降解 mRNA 或抑制 mRNA 翻译过程,从而调控细胞生物学过程<sup>[14]</sup>。miRNA 在巨噬细胞焦亡中发挥重要调控作用。前期研究发现,在败血症相关的急性肺损伤中,多形核中性粒细胞外泌体 miR-30d-5p 通过靶向巨噬细胞中的细胞因子抑制信号,诱导巨噬细胞焦亡<sup>[15]</sup>;在内毒素诱发休克过程中,miR-21 通过靶向 A20 基因促进 NLRP3 炎症小体激活,进而诱导巨噬细胞焦亡<sup>[16]</sup>。本研究发现,在焦亡巨噬细胞中 miR-15 表达下调,过表达 miR-15 阻断 LPS+nigericin 处理诱导的巨噬细胞焦亡。

综上所述,本研究发现 DLX6-AS1 在 LPS+nigericin 处理诱导焦亡的巨噬细胞中表达上调;DLX6-AS1 通过竞争性结合 miR-15,解除 miR-15 对其靶基因 *caspace-1* 的抑制作用,进而诱导巨噬细胞焦亡。相关研究结果为靶向巨噬细胞焦亡进而治疗焦亡相关疾病提供了潜在的靶点。

### 参考文献(References):

- [1] COLL R C, SCHRODER K, PELEGRÍN P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2022, 43(8): 653-668.
- [2] SHI J J, GAO W Q, SHAO F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2017, 42(4): 245-254.
- [3] SHI X, XIE W L, KONG W W, *et al.* Expression of the NLRP3 inflammasome in carotid atherosclerosis[J]. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2015, 24(11): 2455-2466.
- [4] WESTERTERP M, FOTAKIS P, OUIOMET M, *et al.* Cholesterol efflux pathways suppress inflammasome activation, NETosis, and atherogenesis[J]. Circulation, 2018, 138(9): 898-912.
- [5] ZENG C, DUAN F Q, HU J, *et al.* NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis contributes to the pathogenesis of non-ischemic dilated cardiomyopathy[J]. Redox Biology, 2020, 34: 101523.
- [6] MA N, YUAN C C, SHI J J, *et al.* Interleukin-37 protects against acinar cell pyroptosis in acute pancreatitis[J]. JCI Insight, 2022, 7(21): e161244.
- [7] LEE H, ZHANG Z L, KRAUSE H M. Long noncoding RNAs and repetitive elements: junk or intimate evolutionary partners?[J]. Trends in Genetics, 2019, 35(12): 892-902.
- [8] TAN J X, FAN J, HE J, *et al.* Knockdown of lncRNA DLX6-AS1 inhibits HK-2 cell pyroptosis via regulating miR-223-3p/NLRP3 pathway in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2020, 52(5): 367-376.
- [9] HOU L J, HE Q, WANG Y, *et al.* Nicotine induces macrophage pyroptosis via LINC01272/miR-515/KLF6 axis[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 263: 115265.
- [10] HERMAN A B, TSITSIPATIS D, GOROSPE M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. Molecular Cell, 2022, 82(12): 2252-2266.
- [11] MATTICK J S, AMARAL P P, CARNINCI P, *et al.* Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2023, 24(6): 430-447.
- [12] ZHANG Y, LIU X, BAI X, *et al.* Melatonin prevents endothelial cell pyroptosis via regulation of long noncoding RNA MEG3/miR-223/NLRP3 axis[J]. Journal of Pineal Research, 2018, 64(2): e12449.
- [13] FASOLO F, JIN H, WINSKI G, *et al.* Long noncoding RNA MIAT controls advanced atherosclerotic lesion formation and plaque destabilization[J]. Circulation, 2021, 144(19): 1567-1583.
- [14] PELLETIER D, RIVERA B, FABIAN M R, *et al.* miRNA biogenesis and inherited disorders: clinico-molecular insights[J]. Trends in Genetics, 2023, 39(5): 401-414.
- [15] JIAO Y, ZHANG T, ZHANG C M, *et al.* Exosomal miR-30d-5p of neutrophils induces M1 macrophage polarization and primes macrophage pyroptosis in sepsis-related acute lung injury[J]. Critical Care, 2021, 25(1): 356.
- [16] XUE Z Y, XI Q, LIU H K, *et al.* miR-21 promotes NLRP3 inflammasome activation to mediate pyroptosis and endotoxic shock[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(6): 461.