

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002212

MicroRNA-34a 在脂多糖诱导急性呼吸窘迫综合征中的表达及作用机制

陈 怡, 周发春

(重庆医科大学附属第一医院重症医学科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨 microRNA-34a(miR-34a)在脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)中表达的意义及作用机制。**方法:**40 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组:对照组,腹腔注射 10 mg/kg LPS 3、6、12、24 h 组,人肺泡 II 型上皮细胞株(A549)分为 5 组:对照组,10 μ g/mL LPS 刺激 3、6、12、24 h 组。在 A549 细胞中转染 miR-34a inhibitor,24 h 后加入 10 μ g/mL LPS,再刺激 24 h。测定肺湿/干重值,观察肺组织病理学改变,实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测肺组织及细胞 miR-34a 表达,ELISA 检测肺组织及细胞肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)浓度,Western blot 检测细胞磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)的蛋白表达。**结果:**实验组肺湿/干重值较对照组明显升高。苏木素-伊红(HE)染色显示实验组肺组织肺泡间隔增厚,肺泡腔内有粉红色水肿液,肺间质炎症细胞浸润及出血。miR-34a 表达在实验组的各个时间点较对照组升高, TNF- α 、IL-1 β 浓度在实验组的各个时间点较对照组升高, miR-34a 表达与 TNF- α 、IL-1 β 浓度呈正相关。PI3K、p-AKT 蛋白表达在实验组的各个时间点较对照组升高。转染 miR-34a inhibitor 能够明显下调 LPS 作用于 A549 细胞后 TNF- α 、IL-1 β 浓度及 PI3K、p-AKT 蛋白表达。**结论:**miR-34a 可能通过抑制 PI3K/AKT 通路减轻 LPS 诱导的肺组织损伤,为 ARDS 的治疗提供新的靶点。

【关键词】microRNA-34a;急性呼吸窘迫综合征;脂多糖;PI3K;AKT

【中图分类号】R563

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-01-03

Expression of microRNA-34a in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome and its mechanism of action

Chen Yi, Zhou Fachun

(Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the significance of the expression of microRNA-34a(miR-34a) in lipopolysaccharide(LPS)-induced acute respiratory distress syndrome(ARDS) and its mechanism of action. **Methods:** Forty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: control group and 10 mg/kg LPS intraperitoneal injection groups(3, 6, 12, and 24 hours); the human alveolar type II epithelial cell line(A549) was divided into five groups: control group and 10 μ g/mL LPS stimulation groups(3, 6, 12, and 24 hours). The A549 cells were transfected with a miR-34a inhibitor and were treated with 10 μ g/mL LPS(added 24 hours later) for 24 hours. The wet/dry weight(W/D) ratio of the lungs was measured and the histopathological changes in the lung tissue were evaluated. Quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR) was used to determine the expression of miR-34a in the lung tissue and cells; enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 beta(IL-1 β) in the lung tissue and cells; Western blot was used to determine the protein expression of phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K) and phosphorylated protein kinase B(p-AKT) in the cells. **Results:** The W/D ratio of the lungs was significantly higher in the experimental groups than in the control group. The hematoxylin-eosin staining indicated that the experimental groups showed the presence of thickened alveolar septa in the lung tissue, pink edema fluids in the alveolar cavities, and inflammatory

cell infiltration and hemorrhage in the pulmonary interstitium. The expression of miR-34a, the concentrations of TNF- α and IL-1 β , and the protein expression of PI3K and p-AKT were higher in the experimental groups than in the control group at each time point, with a positive correlation observed between

作者介绍: 陈 怡, Email: 570509983@qq.com,

研究方向: 急性呼吸窘迫综合征。

通信作者: 周发春, Email: zfc88@126.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190604.1558.018.html>

(2019-06-05)

the expression of miR-34a and the concentrations of TNF- α and IL-1 β . Transfection with the miR-34a inhibitor significantly down-regulated the concentrations of TNF- α and IL-1 β and the protein expression of PI3K and p-AKT in the LPS-treated A549 cells.

Conclusion: miR-34a can attenuate LPS-induced lung injury by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway, which provides a new target for ARDS treatment.

【Key words】microRNA-34a; acute respiratory distress syndrome; lipopolysaccharide; PI3K; AKT

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是一种急性弥漫性肺部炎性反应, 可导致肺血管通透性升高, 肺质量增加, 参与通气的肺组织减少^[1], 是重症监护病房 (intensive care unit, ICU) 的常见危重病, 占 ICU 住院人数的 10%。尽管经过几十年的研究, ARDS 的治疗仍然有限, 最新研究显示 ARDS 的死亡率为 35%~46%, 成为 ICU 患者死亡的主要原因之一^[2]。研究 ARDS 发病的分子机制有利于为 ARDS 治疗发现新的靶点。

microRNA (miR) 是由 19~25 个核苷酸组成的小、非编码 RNA 片段, 通过与靶 mRNA 结合和抑制其翻译来调控基因表达^[3]。已有研究发现 microRNAs 在 ARDS 模型中的表达发生了变化^[4], microRNA-34a (miR-34a) 是 microRNA 家族中的一个亚型, miR-34a 在多种炎症状态下表达上调, 广泛参与机体抗炎免疫反应, miR-34a 通过不同的分子机制参与调节脓毒症等炎症反应过程^[5], 但在 ARDS 发病中的作用还有待研究。

本研究就大鼠腹腔注射脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 建立的 ARDS 炎症模型及 LPS 刺激的 A549 细胞不同时间点 miR-34a 的表达变化展开研究, 探讨 miR-34a 与肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的相关性及在 ARDS 中的作用机制, 以期 ARDS 治疗发现新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

LPS (美国 Sigma 公司), F-12K 培养基 (Hyclone), 胎牛血清 (Gibco), RNAiso for small RNA、逆转录及荧光实时定量 PCR 反应试剂盒 (Takara), PCR 引物构建于北京宝日生物技术有限公司, 兔抗 PI3K (p110 α) 抗体、兔抗 AKT 抗体、兔抗 p-AKT (Ser473) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司), 兔抗 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (proteintech), TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒 (武汉博士德生物), miR-NC (negative control, miR-34a 的阴性对照)、miR-34a inhibitor (上海吉玛基因), Lipofectamine™ 3000 transfection

reagent (Life Invitrogen 公司)。

1.2 实验动物分组

Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠, 体质量 200~250 g, 40 只, 购自重庆医科大学动物实验中心, 实验动物适应性喂养一周, 实验前禁食 6 h, 自由饮水, 实验中对待动物遵循重庆医科大学伦理委员会批准, 动物处置方法符合动物伦理学。实验动物使用许可证: SYXK (渝) 2017-0023。40 只 SD 雄性大鼠随机分为 5 组: 对照组腹腔注射等量生理盐水、腹腔注射 10 mg/kg LPS 3、6、12、24 h 建立 ARDS 动物模型 (LPS-3h 组、LPS-6h 组、LPS-12h 组、LPS-24h 组), 每组 8 只。对照组腹腔注射生理盐水后立即留取肺组织标本。实验组于 LPS 注射后相应时间点留取肺组织标本。左肺叶测定肺湿/干重 (wet dry weight ratio, W/D) 值, 右肺上叶用 4% 多聚甲醛固定留待组织病理学检测, 右肺中叶立即置于液氮中保存留待 qRT-PCR 检测, 右肺下叶置于液氮中保存留待 ELISA 测定 TNF- α 、IL-1 β 。

1.3 细胞培养和分组

A549 细胞购自 Procell 公司。A549 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 F-12K 培养基中, 细胞培养瓶置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 1~2 d 换液, 3~4 d 传代, 实验分为 5 组: 对照组及 10 μ g/mL LPS 处理 3、6、12、24 h 组 (LPS-3h 组、LPS-6h 组、LPS-12h 组、LPS-24h 组)。

1.4 细胞转染

细胞转染实验分为 4 组。对照组: A549 细胞无细胞转染, 无 LPS 处理; Inhibitor+LPS 组: A549 细胞贴壁达 50% 时加入 miR-34a inhibitor, 24 h 后加入 10 μ g/mL LPS, 再刺激 24 h; NC+LPS 组: A549 细胞贴壁达 50% 时加入 miR-NC, 24 h 后加入 10 μ g/mL LPS, 再刺激 24 h; LPS 组: 细胞贴壁达 70%~80% 时加入 10 μ g/mL LPS 刺激 24 h。

1.5 测定肺湿/干重值

左肺叶, 滤纸吸干表面水分, 称量湿重; 然后将肺组织置于 60 °C 烤箱 72 h 至恒重后再次称量干重, 计算 W/D 值, 以此评估肺组织水肿程度。

1.6 肺组织病理学检测

右肺上叶, 经 4% 多聚甲醛固定、酒精脱水、石蜡包埋、切片、病理 HE 染色后观察各组大鼠肺组织病理学改变。

1.7 MicroRNA 的提取、逆转录及 qRT-PCR

肺组织及 A549 细胞的 microRNA 的提取按照 RNAiso for small RNA 说明书操作, 并测定浓度, 逆转录成 cDNA, 进行 qRT-PCR 反应, 以 U6 为内参, 反应体系 10 μ L, 扩增条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个

循环。每个样本设置 3 个复孔。最后结果采用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.8 ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β

ELISA 检测肺组织匀浆上清及 A549 细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 浓度,操作按试剂盒说明书进行。

1.9 Western blot

将细胞加入适量 RIPA 裂解液,BCA 法检测蛋白浓度,经电泳、转膜、封闭后,加入一抗孵育过夜(PI3K 稀释比 1:1 000,AKT 稀释比 1:1 000,p-AKT 稀释比 1:2 000,GAPDH 稀释比 1:20 000),洗膜,二抗孵育 1 h(稀释比 1:8 000)后洗膜,显影,用 Image J 软件分析条带灰度值。

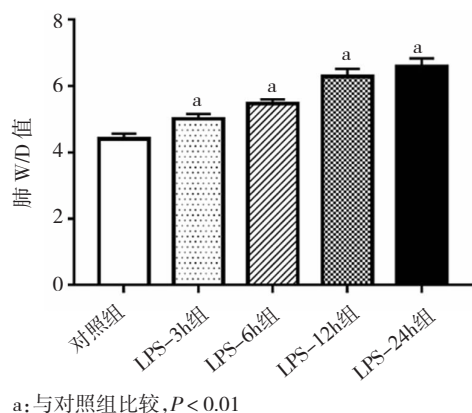
1.10 统计学处理

采用 GraphPad 7.0 及 SPSS 22.0 统计分析软件。计量资料均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验(方差齐)或 Dunnett T_3 检验(方差不齐),行相关性检验,双变量都服从正态分布时采用 Pearson 相关分析,不服从正态分布采用 Spearman 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肺 W/D 值

5 组大鼠肺 W/D 值如下。对照组(4.401 ± 0.168);LPS-3h 组(5.010 ± 0.154);LPS-6h 组(5.473 ± 0.133);LPS-12h 组(6.289 ± 0.237);LPS-24h 组(6.583 ± 0.254),实验组(LPS-3h 组、LPS-6h 组、LPS-12h 组、LPS-24h 组)各个时间点的大鼠肺 W/D 值较对照组明显升高,各组比较差异有统计学意义($F=169.710, P=0.000$),其中 LPS-24h 组升高最明显,且肺 W/D 值与时间呈正相关($r=0.900, P=0.000$)(图 1)。



a: 与对照组比较, $P < 0.01$

图 1 大鼠肺 W/D 值的比较

2.2 肺组织病理学改变

肺组织石蜡切片 HE 染色显示,对照组大鼠肺泡结构完整,肺泡腔清晰,肺泡壁薄无充血,肺泡和肺间质无炎性细胞浸润;实验组大鼠病变呈弥漫性改变,肺泡膨胀不全、肺泡融合或塌陷,肺泡间隔明显增厚,肺泡腔内有渗出液,肺间质大量炎性细胞浸润及出血,随着 LPS 损伤时间延长,肺组织损伤程度不断加重(图 2)。

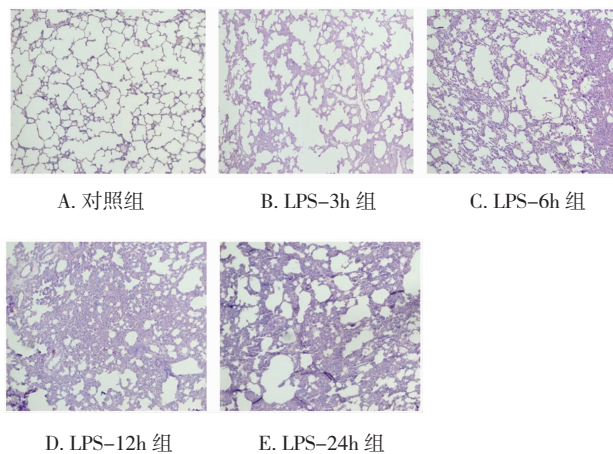
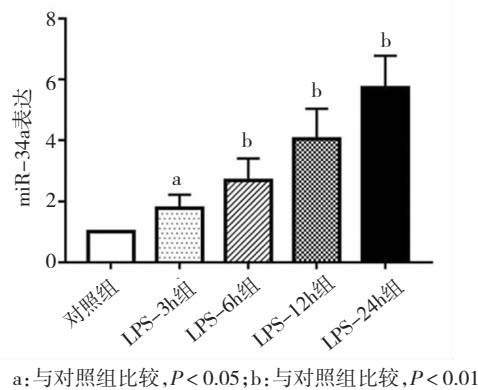


图 2 各组大鼠肺组织病理学改变 (HE 染色, 200 $\times$)

2.3 大鼠肺组织 miR-34a 表达

采用 qRT-PCR 检测对照组和实验组大鼠肺组织的 miR-34a 表达,结果表明,与对照组(1.000 ± 0.000)相比,实验组(LPS-3h 组、LPS-6h 组、LPS-12h 组、LPS-24h 组)大鼠肺组织 miR-34a 表达均升高($1.774 \pm 0.451, 2.689 \pm 0.724, 4.052 \pm 0.992, 5.724 \pm 1.053$),各组比较差异有统计学意义($F=50.073, P=0.000$),大鼠肺组织 miR-34a 表达随 LPS 处理时间的延长而表达增加,其中 LPS-24h 组表达最高,且 miR-34a 表达与时间呈正相关($r=0.910, P=0.000$)(图 3)。

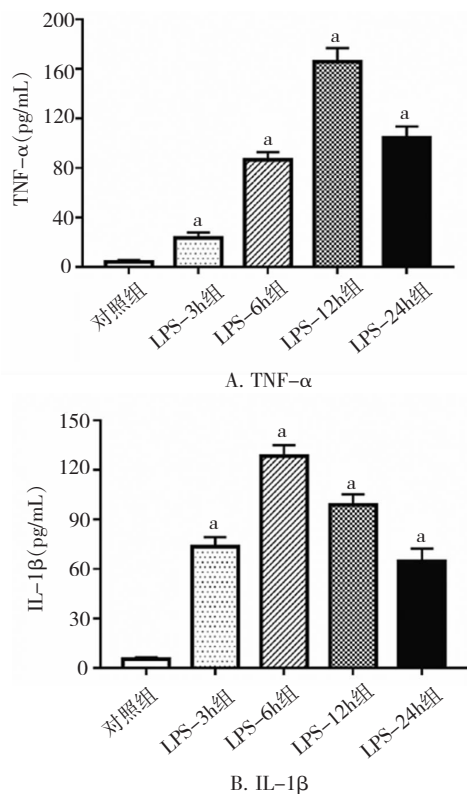


a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

图 3 miR-34a 在大鼠肺组织中的表达

2.4 大鼠肺组织 TNF- α 、IL-1 β 浓度

采用 ELISA 法检测对照组和实验组大鼠肺组织的 TNF- α 、IL-1 β 浓度,结果表明,与对照组($4.217 \pm 1.594, 5.446 \pm 1.132$)相比,实验组(LPS-3h 组、LPS-6h 组、LPS-12h 组、LPS-24h 组)大鼠肺组织 TNF- α 、IL-1 β 浓度均升高(TNF- α : $23.501 \pm 4.514, 86.751 \pm 6.236, 165.880 \pm 10.950, 104.186 \pm 9.597$; IL-1 β : $73.596 \pm 5.841, 128.447 \pm 6.784, 98.751 \pm 6.527, 64.676 \pm 7.600$),各组比较差异有统计学意义($F=616.971, P=0.000; F=460.044, P=0.000$),TNF- α 浓度在 LPS-12h 组达到最高峰,随后开始下降,IL-1 β 浓度在 LPS-6h 组达到最高峰,随后开始下降,且 TNF- α 浓度与时间呈正相关($r=0.651, P=0.000$)(图 4)。

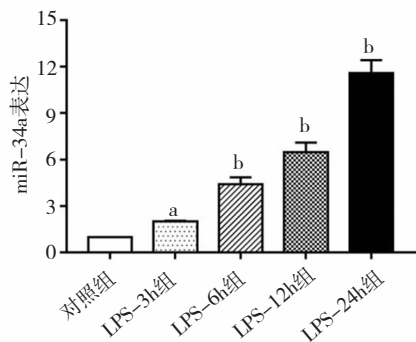


a: 与对照组比较, $P < 0.01$

图 4 TNF-α、IL-1β 在大鼠肺组织中的浓度

2.5 LPS 刺激 A549 细胞的 miR-34a 表达

采用 qRT-PCR 检测对照组和实验组 A549 细胞的 miR-34a 表达,结果表明,与对照组 (1.000 ± 0.000) 相比,实验组 (LPS-3h 组、LPS-6h 组、LPS-12h 组、LPS-24h 组) 的 miR-34a 表达均升高 (2.000 ± 0.062 、 4.417 ± 0.443 、 6.480 ± 0.631 、 11.587 ± 0.846),各组比较差异有统计学意义 ($F=202.301$, $P=0.000$),miR-34a 表达随 LPS 处理时间延长表达增加,其中 LPS-24h 组表达最高,且 miR-34a 表达与时间呈正相关 ($r=0.989$, $P=0.000$) (图 5)。



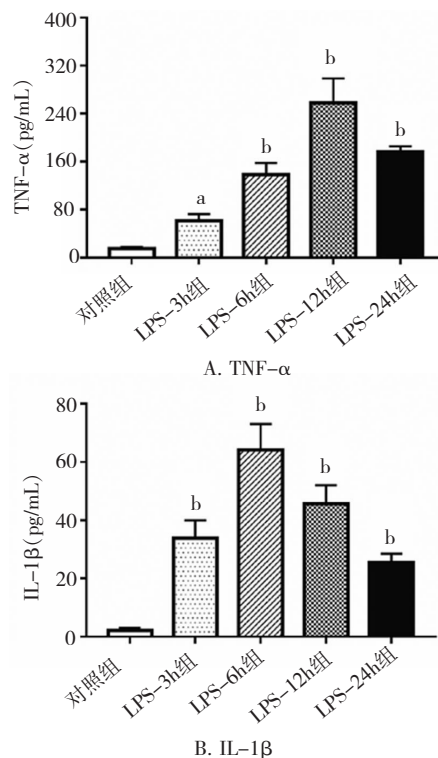
a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

图 5 miR-34a 在 A549 细胞中的表达

2.6 LPS 刺激 A549 细胞的 TNF-α、IL-1β 浓度

采用 ELISA 法检测对照组和实验组 A549 细胞的 TNF-α、IL-1β 浓度,结果表明,与对照组 (15.223 ± 2.539 、 $2.160 \pm$

0.841) 相比,实验组 (LPS-3h 组、LPS-6h 组、LPS-12h 组、LPS-24h 组) 的 TNF-α、IL-1β 浓度均升高 (61.690 ± 11.086 、 138.273 ± 19.578 、 257.753 ± 41.087 、 176.650 ± 8.725 、 33.903 ± 6.149 、 64.247 ± 8.773 、 45.560 ± 6.535 、 25.507 ± 3.092),各组比较差异有统计学意义 ($F=59.958$, $P=0.000$; $F=47.703$, $P=0.000$),TNF-α 浓度在 LPS-12h 组达到最高峰,随后开始下降,IL-1β 浓度在 LPS-6h 组达到最高峰,随后开始下降,且 TNF-α 浓度与时间呈正相关 ($r=0.675$, $P=0.006$) (图 6)。



a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

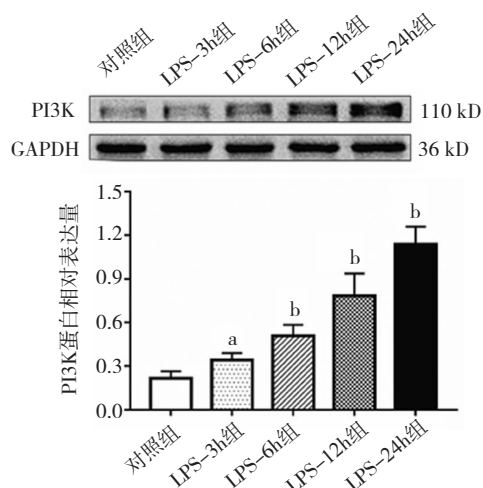
图 6 TNF-α、IL-1β 在 A549 细胞中的浓度

2.7 LPS 刺激 A549 细胞的 PI3K、p-AKT 的蛋白表达

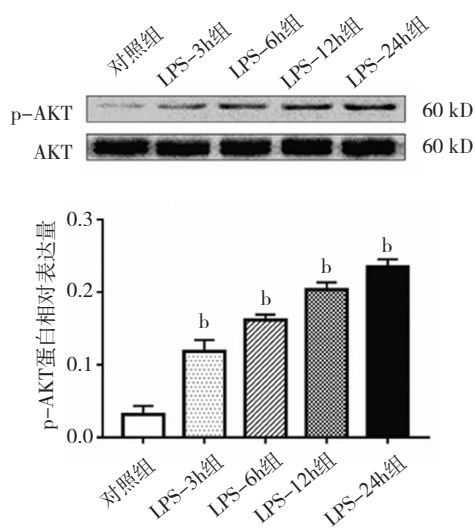
采用 Western blot 检测 A549 细胞 PI3K、p-AKT 的蛋白表达结果表明,与对照组 (0.215 ± 0.051 、 0.032 ± 0.012) 相比,实验组 (LPS-3h 组、LPS-6h 组、LPS-12h 组、LPS-24h 组) 的 PI3K、p-AKT 蛋白表达均升高 (0.342 ± 0.048 、 0.508 ± 0.076 、 0.783 ± 0.153 、 1.140 ± 0.119 、 0.118 ± 0.016 、 0.162 ± 0.007 、 0.203 ± 0.010 、 0.235 ± 0.010),各组比较差异有统计学意义 ($F=84.844$, $P=0.000$; $F=283.625$, $P=0.000$)。PI3K、p-AKT 的蛋白表达随 LPS 处理时间延长而表达增加,其中 LPS-24h 组表达最高,且 PI3K、p-AKT 的蛋白表达与时间呈正相关 ($r=0.957$, $P=0.000$; $r=0.870$, $P=0.000$) (图 7)。

2.8 miR-34a 表达与 TNF-α、IL-1β 浓度、PI3K、p-AKT 蛋白表达的相关性分析

各组大鼠肺组织 miR-34a 表达与 TNF-α、IL-1β 浓度均呈正相关 ($r=0.704$, $P=0.000$; $r=0.325$, $P=0.041$);各组 A549 细胞 miR-34a 表达与 TNF-α 浓度呈正相关 ($r=0.707$, $P=0.003$);各组 A549 细胞 miR-34a 表达与 PI3K、p-AKT 蛋白表达呈正相关 ($r=0.896$, $P=0.000$; $r=0.900$, $P=0.000$)。



A. PI3K 的表达



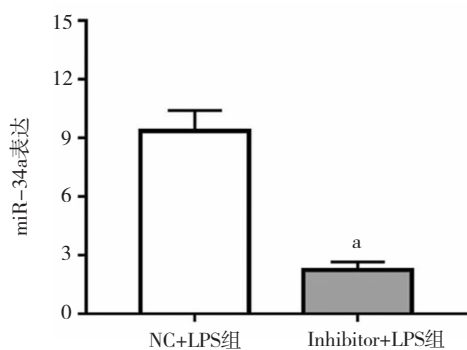
B. p-AKT 的表达

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

图 7 Western blot 检测 PI3K、磷酸化的 AKT 在各组的表达情况

2.9 miR-34a inhibitor 转染效率的检测

细胞转染实验结果表明, Inhibitor+LPS 组 (2.238 ± 0.419) 的 miR-34a 表达较 NC+LPS 组 (9.353 ± 1.047) 明显下降 ($t=15.451, P=0.000$), 表明转染成功 (图 8)。

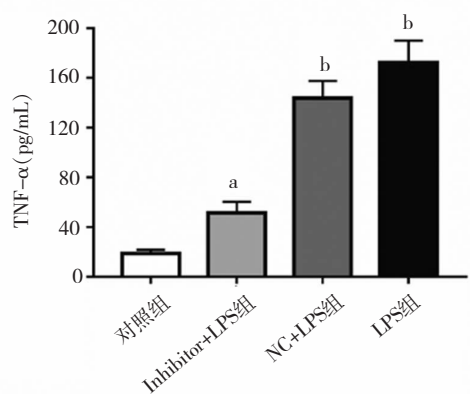
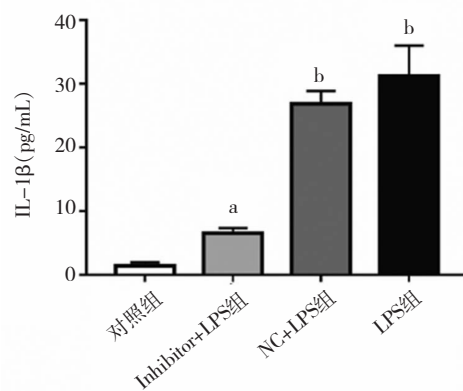


a: 与 NC+LPS 组比较, $P < 0.01$

图 8 转染效率检测

2.10 miR-34a inhibitor 对 LPS 诱导 A549 细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 的影响

细胞转染实验结果表明, 与对照组 ($18.767 \pm 3.097, 1.430 \pm 0.555$) 相比, NC+LPS 组和 LPS 组的 TNF- α 、IL-1 β 浓度 (TNF- α : $143.783 \pm 13.749, 172.613 \pm 17.452$; IL-1 β : $26.860 \pm 2.021, 31.237 \pm 4.790$) 明显升高; 同时, 与 NC+LPS 组 ($143.783 \pm 13.749, 26.860 \pm 2.021$) 相比, Inhibitor+LPS 组的 TNF- α 、IL-1 β 浓度 ($51.653 \pm 8.740, 6.557 \pm 0.785$) 明显下降, 各组比较差异有统计学意义 (TNF- α : $F=110.994, P=0.000$; IL-1 β : $F=93.077, P=0.000$) (图 9)。

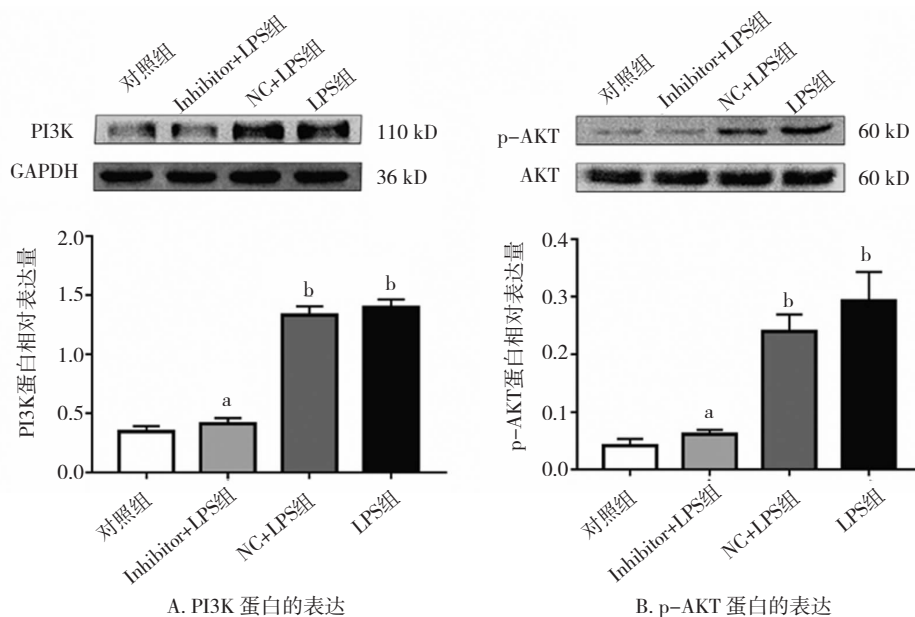
A. TNF- α B. IL-1 β

a: 与 NC+LPS 组比较, $P < 0.01$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

图 9 miR-34a inhibitor 对 LPS 诱导 A549 细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 的影响

2.11 miR-34a inhibitor 对 LPS 诱导 A549 细胞 PI3K、p-AKT 蛋白表达的影响

细胞转染实验结果表明, 与对照组 ($0.345 \pm 0.048, 0.042 \pm 0.012$) 相比, NC+LPS 组和 LPS 组的 PI3K、p-AKT 蛋白表达 (PI3K: $1.330 \pm 0.073, 1.397 \pm 0.068$; p-AKT: $0.240 \pm 0.030, 0.293 \pm 0.050$) 明显升高; 同时, 与 NC+LPS 组 ($1.330 \pm 0.073, 0.240 \pm 0.030$) 相比, Inhibitor+LPS 组的 PI3K、p-AKT 蛋白表达 ($0.412 \pm 0.047, 0.062 \pm 0.007$) 明显下降, 各组比较差异有统计学意义 (PI3K: $F=537.255, P=0.000$; p-AKT: $F=106.921, P=0.000$) (图 10)。



a: 与 NC+LPS 组比较, $P < 0.01$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

图 10 Western blot 检测 A549 细胞转染后 PI3K、p-AKT 蛋白表达变化

3 讨论

自 1967 年 Ashbaugh 等首次报道了 ARDS 的临床病例, 自此以来, ARDS 成为临床和基础研究的热点, 尽管不断出现新的治疗 ARDS 的方法, 但每年仍有超过 300 万例的 ARDS 患者^[2], 成为 ICU 的主要死亡原因。ARDS 的发病机制复杂, 临床上发现肺部感染是导致 ARDS 形成的主要原因之一, 特别是革兰阴性杆菌合成的 LPS 可以引起肺泡上皮和肺毛细血管内皮通透性增加, 形成 ARDS 的非心源性肺水肿。本研究中, 首先通过 LPS 构建大鼠 ARDS 模型。通过肺 W/D 值提示肺含水量与 LPS 诱导的时间呈正相关, HE 染色显示实验组肺泡间隔增厚, 肺泡腔内有粉红色水肿液, 肺间质炎性细胞浸润及出血, 且随着 LPS 诱导时间延长肺组织损伤程度不断加重, 通过以上结果证实了 ARDS 中肺水肿的形成。

ARDS 以弥漫性肺泡损伤为其病理学特征, 由于肺泡上皮损伤是导致 ARDS 的重要原因, 故减少肺泡上皮损伤有利于肺水肿和肺损伤的治疗^[7]。II 型肺泡上皮细胞在肺内具有多种重要功能, 包括离子转运、修复损伤的肺泡、释放细胞因子等, II 型肺泡上皮细胞已被证明是炎症反应中的重要效应细胞, 在 ARDS 的发生发展中起着重要作用^[8]。正常人肺组织的 II 型肺泡上皮细胞难于体外传代培养, 很快转化成 I 型肺泡上皮细胞, 而 A549 细胞具有 II 型肺泡上皮细胞的生物学功能, 能稳定的传代培养^[9], 国内外在建立 ARDS 炎性模型时常选用 A549 细

胞^[10], 因此选用 A549 细胞作为体外 ARDS 的研究对象。

LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分, 是 ARDS 的一种致病因素, 可引起 II 型肺泡上皮细胞释放 TNF- α 、IL-1 β 等多种细胞因子^[11]。TNF- α 、IL-1 β 是快速反应性炎症因子, 是瀑布样炎症反应最早期的细胞因子, 在一定程度上可反应病情的严重程度。本实验在动物及细胞层面, 通过 LPS 刺激大鼠及 A549 细胞 3、6、12、24 h, 通过 ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 浓度的动态变化过程, 结果显示, TNF- α 、IL-1 β 浓度在实验组的各个时间点较对照组明显升高, TNF- α 浓度在 LPS-12h 组达到最高峰, 随后开始下降但仍高于对照组, IL-1 β 浓度在 LPS-6h 组达到最高峰, 随后开始下降但仍高于对照组, 提示 TNF- α 、IL-1 β 是 ARDS 升高较早的炎症因子。Li 等^[12]研究发现在心脏分流术后的 ARDS 患者中 TNF- α 的表达在早期明显升高。罗显荣等^[13]研究也发现 ARDS 患者血清和支气管肺泡灌洗液中的 IL-1 β 表达升高, 这与本研究结果一致, 因此 TNF- α 、IL-1 β 浓度可以反映 ARDS 的肺损伤程度。

miR-34a 是 miR-34 家族的一个成员, miR-34 家族是一类在进化上高度保守的 microRNA, 这一家族包括 3 种相互关联的 microRNA: miR-34a、miR-34b、miR-34c, 其中 miR-34a 由位于 1 号染色体 p36.23 的基因编码。近来大量研究表明, miR-34a 在多种炎症状态下表达上调, 可见 miR-34a 广泛参与调节机体抗炎免疫反应。本实验通过 qRT-PCR 检测大鼠肺组织及 A549 细胞的 miR-34a 表达, 结果

显示,与对照组比较,miR-34a 表达在 LPS 刺激 3、6、12、24 h 时间点升高,并且随 LPS 诱导时间延长表达增加,与时间呈正相关,姜启栋等^[14]也证实,LPS 刺激后可引起 miR-34a 表达上调,此研究结果在本实验中也得到证实。同时,结果还显示,miR-34a 表达与 TNF- α 浓度呈正相关,因为 TNF- α 、IL-1 β 浓度可以反映 ARDS 的肺损伤程度,因此 miR-34a 表达与 LPS 诱导的 ARDS 的发生发展具有相关性。Ma 等^[15]研究发现 miR-34a 在乳头状甲状腺癌中通过 PI3K/AKT/Bad 通路促进细胞增殖和抑制细胞凋亡,Wang 等^[16]研究也发现 miR-34a 在胃癌中通过 PI3K/AKT 通路抑制侵袭和促进凋亡,但 miR-34a 是否通过 PI3K/AKT 通路在 ARDS 中发挥作用还有待进一步实验。

磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B,AKT)信号通路是与新陈代谢、增殖、分化、粘附及凋亡关系密切的信号通路^[17],AKT 是 PI3K/AKT 信号通路的关键蛋白之一,AKT 的活化(p-AKT)是 PI3K/AKT 信号通路发挥作用的关键^[18]。许多研究表明 PI3K/AKT 信号通路在 ARDS 之间存在密切关系^[19-20],为了探究 PI3K/AKT 信号通路是否在 miR-34a 在 LPS 诱导的 ARDS 中起重要作用,本研究通过 LPS 刺激 A549 细胞 3、6、12、24 h 后,PI3K、p-AKT 的蛋白表达较对照组明显增加,且与时间呈正相关,推测 miR-34a 可能通过 PI3K/AKT 信号通路在 ARDS 的发生发展中起作用。本研究使用 miR-34a inhibitor 进行细胞转染,转染 miR-34a inhibitor 能够明显下调 LPS 作用于 A549 细胞后 TNF- α 、IL-1 β 的浓度及 PI3K、p-AKT 的蛋白表达。这些结果表明,miR-34a 可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路减轻 LPS 诱导的肺组织损伤。

本研究结果是在动物及细胞实验获得,由于 ARDS 发病过程的复杂性,故需要在 ARDS 患者中进一步研究。综上推测:LPS 诱导的 ARDS 模型中 miR-34a 表达升高,并与炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 浓度呈正相关,其作用机制可能是通过 PI3K/AKT 信号通路来完成的。miR-34a 可能通过抑制 PI3K/AKT 通路减轻 LPS 诱导的肺组织损伤,为 ARDS 的治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Ferguson ND, Fan E, Camporota L, et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material[J]. *Intensive Care Med*, 2012, 38(10): 1573-1582.
- [2] Fan E, Brodie D, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: advances in diagnosis and treatment[J]. *JAMA*, 2018, 319(7): 698-710.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.

- [4] Zhu ZZ, Liang LM, Zhang RY, et al. Whole blood microRNA markers are associated with acute respiratory distress syndrome[J]. *Intensive Care Med*, 2017, 5(1): 38-49.
- [5] Ge Y, Huang M, Ma YF. The effects of microRNA-34a regulating Notch-1/NF- κ B signaling pathway on lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cells[J]. *World J Emerg Med*, 2017, 8(4): 292-296.
- [6] Cho YJ, Moon JY, Shin ES, et al. Clinical practice guideline of acute respiratory distress syndrome[J]. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 2016, 79(4): 214-233.
- [7] Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(6): 1376-1383.
- [8] Chuquimia OD, Petursdottir DH, Rahman MJ, et al. The role of alveolar epithelial cells in initiating and shaping pulmonary immune responses: communication between innate and adaptive immune systems[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32125.
- [9] 胡小勇, 周发春. 川芎嗪抑制 LPS 诱导的人 II 型肺泡上皮细胞炎症反应[J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(6): 839-844.
- [10] Jiang YJ, Zeng Y, Huang X, et al. Nur77 attenuates endothelin-1 expression via downregulation of NF- κ B and p38 MAPK in A549 cells and in an ARDS rat model[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(6): L1023-1035.
- [11] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(5): 979-987.
- [12] Li T, Luo NF, Du L, et al. Early and marked up-regulation of TNF- α in acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass[J]. *Front Med*, 2012, 6(3): 296-301.
- [13] 罗显荣, 伍伟玲, 王琳, 等. 急性呼吸窘迫综合征患者血清和支气管肺泡灌洗液中白介素-1 β 的变化[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(6): 365-366.
- [14] 姜启栋, 伍长学, 张琼. miR-34a 调控 Kruppel 样因子 4 参与脂多糖介导的脓毒症相关性肾损伤[J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30(4): 351-354.
- [15] Ma YF, Qin HD, Cui YF. MiR-34a targets GAS1 to promote cell proliferation and inhibit apoptosis in papillary thyroid carcinoma via PI3K/Akt/Bad pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(4): 958-963.
- [16] Wang GJ, Liu GH, Ye YW, et al. Upregulation of miR-34a by diallyl disulfide suppresses invasion and induces apoptosis in SGC-7901 cells through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(4): 2661-2667.
- [17] Naumann RW. The role of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway in the development and treatment of uterine cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 123(2): 411-420.
- [18] Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(1): 34-44.
- [19] Vergadi E, Vaporidi K, Theodorakis EE, et al. Akt2 deficiency protects from acute lung injury via alternative macrophage activation and miR-146a induction in mice[J]. *J Immunol*, 2014, 192(1): 394-406.
- [20] Ding Q, Liu GQ, Zeng YY, et al. Role of IL-17 in LPS-induced acute lung injury: an in vivo study[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(55): 93704-93711.

(责任编辑:张辉洁)