

TLR4/NF- κ B 信号通路激活 LncRNA RP11-20G6 调控慢性阻塞性肺疾病气道炎症和重塑

陈训春¹, 李名兰¹, 潘碧云¹, 王燕英¹, 丁毅鹏²

摘要 目的 探讨 LncRNA RP11-20G6.3 和 Toll 样受体 4 (TLR4)/核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路在调控慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 气道炎症和重塑中的作用。方法 采用野生型 (WT) 和 TLR4 基因敲除 (KO) C57BL/6 雄性小鼠为研究对象, 构建 COPD 模型。采用 HE 染色和 Masson 三色染色进行组织学评价; 免疫印迹分析 TLR4/NF- κ B 信号通路蛋白表达; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。通过 RNA 测序与功能富集分析确定差异表达的 LncRNAs, 利用 RNAhybrid 对内源竞争 RNA (ceRNA) 网络进行预测。结合荧光素酶报告探讨基因之间的关系。结果 在 COPD 模型中, 与 WT 小鼠相比, TLR4 -/- 小鼠肺组织炎症减弱, 肺组织 NF- κ B 相关蛋白表达、BALF 中炎症因子 [白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α)] 水平以及 Masson 三色染色面积降低。RNA 测序与功能富集分析确定 RP11-20G6.3 是差异表达 LncRNAs 之一, RP11-20G6.3 在 COPD 患者的肺组织中上调, 并与 FEV1/用力肺活量的比值 (FEV1%) 相关 ($\rho = 0.549$, $P = 0.047$)。RP11-20G6.3 质粒干预加重了 TLR4 -/- COPD 小鼠肺组织炎症, 以及支气管周围 Masson 三色面积和 BALF 中炎症因子 (IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α) 水平提高。荧光素酶报告基因检测显示, RP11-20G6.3 在 COPD 中充当 miR-34c-5p 的 ceRNA, 并通过海绵作用使后者上调 Col1a1。结论 TLR4/NF- κ B 将 COPD 损伤信号传递并激活下游 RP11-20G6.3/miR-34c-5p/Col1a1 的 ceRNA 网络触发气道炎症、重塑。

关键词 LncRNA RP11-20G6.3; TLR4/NF- κ B 信号通路; 慢性阻塞性肺疾病; 气道炎症; 气道重塑

中图分类号 R 563.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0586-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.015

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种进行性退行性肺疾病。吸

烟是 COPD 最重要的病因, 香烟烟雾中含有许多颗粒物和氧化剂, 它们通过激活在小鼠肺上皮细胞和肺组织中 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 诱导氧化应激、炎症、上皮间充质转化和纤维化^[1]。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是先天性免疫反应中的关键分子, 它识别病原体相关分子模式 (PAMPs) 和损伤相关分子模式 (DAMPs), 并激活促炎性核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)^[2]。研究^[3]表明, 在 COPD 大鼠中, 香烟烟雾通过激活肺上皮细胞和肺组织中 TLR4 诱导氧化应激、炎症、上皮间充质转化 (EMT) 和纤维化。研究^[4]显示 TLR4 可以通过长的非编码 RNA (lncRNA) 调节炎症。基于以上研究, TLR4 是否通过 lncRNAs 调节 COPD 炎症反应并抑制气道重塑值得关注。

LncRNAs 是参与各种病理过程的调节转录本^[5-6]。LncRNAs 通过竞争性结合 microRNAs (miRNAs) 调节下游基因的表达^[7]。本研究利用 RNA 测序法筛选了对照组、WT-COPD 组和 TLR4 -/- COPD 组之间差异表达的 LncRNAs 和 mRNAs。其中, lncRNA RP11-20G6.3 (RP11-20G6.3) 是常见的差异表达 LncRNAs 之一。ceRNA 网络预测发现 RP11-20G6.3/miR-34c-5p 轴与 TLR4/NF- κ B 通路相关。根据以往的研究^[8], miR-34c-5p 直接参与 TLR4 通路的调节, 并与炎症反应密切相关。因此, 笔者假设 COPD 中 TLR4 促进 RP11-20G6.3 的表达上调, 并通过激活下游信号最终促进气道炎症和气道重塑。因此, 该研究的目的是确定内源竞争 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA) 网络在 COPD 分子机制中的潜在作用, 为 COPD 的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源 肺组织取自海口市人民医院 20 例确诊为孤立性肺肿瘤患者。将患者分为 3 个亚组: 5 名不吸烟者 (非吸烟组), 5 名吸烟者 (吸烟组), 10 名当前吸烟者合并 COPD (COPD 组)。手术切除后, 取离肿瘤边缘至少 5 cm 的肺组织立即在液氮中

2022-03-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81860015)

作者单位: ¹海口市人民医院全科医学科, 海口 570208

²海南省人民医院呼吸内科, 海口 570311

作者简介: 陈训春, 男, 主治医师, 责任作者, E-mail: mckxnvioshddoas@163.com

冷冻,并在 -80 °C 下储存,直到用于 RNA 分离。

1.2 质粒、试剂及仪器 miR-34c-5p 模拟物及其阴性对照模拟物 (miR-NC), 以及 RP11-20G6.3 序列由广州市锐博生物科技有限公司合成并克隆到 pcDNA3.1 (+) 载体 (pcDNA3.1-20G6.3)。

娇子香烟购自中国成都卷烟厂 (每支卷烟含焦油 11 mg、尼古丁 0.9 mg); 脂多糖, 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司; RIPA 裂解缓冲液购自北京 Solarbio 公司; 一抗 (TLR4、P-I κ B α 、I κ B α 、P-NF- κ B、NF- κ B 和 GAPDH) 均购自美国 Abcam 公司; TRIzol、LipofectamineTM 3000 购自美国 Invitrogen 公司; 大容量 cDNA 反转录试剂盒购自美国 Qiagen 公司; PCR 引物购自美国 Thermo fisher 公司; NEBNext[®] UltraTM II RNA 文库制备试剂盒购自美国 NEB 公司。

7300 实时 PCR 系统购自美国 Applied Biosystem 公司; Agilent 2200 TapeStation 购自美国 Agilent 公司; 2200 TapeStation 和 Qubit[®] 2.0 购自美国 Life Technologies 公司; Veritas 9100-002 工具购自美国 Turner BioSystems 公司。

1.3 动物及 COPD 模型建立 野生型 (WT) 和 TLR4 基因敲除 (KO) C57BL/6 雄性小鼠 (6 ~ 8 周龄) 购自中国科学院上海实验动物中心, 饲养在无病原体的动物房中, 提供食物和水。参照文献^[3]方法建立 COPD 模型, 具体操作: 小鼠被放置在一个有机玻璃室 (50 cm \times 60 cm \times 70 cm), 由一次性过滤器覆盖。在第 1 周, 这些动物每天接受 4 支香烟, 每次间隔 30 min, 每周 5 d。从第 2 周开始, 小鼠每天暴露于 6 支香烟的烟雾中, 剂量维持到第 6 周。在第 3 周和第 5 周末, 小鼠鼻腔内滴入脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) (30 μ g/6 μ l)。第 2 组和第 4 组小鼠于第 3 周至第 6 周每天腹腔注射 pcDNA3.1-NC 或 pcDNA3.1-20G6.3 (5×10^7 IU)。最后一次暴露香烟后 1 周处死动物, 收集支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 和肺组织。

1.4 免疫印迹分析 采用 RIPA 裂解缓冲液从肺组织中提取蛋白质。将含有 20 μ g 蛋白质的样品与 SDS 样品缓冲液混合并煮沸, 然后在 10% 的 SDS-PAGE 凝胶上分离并转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭膜 2 h, 然后用相应的主要一抗 [TLR4 (1 : 4 000 稀释)、P-I κ B α (1 : 1 000 稀释)、I κ B α (1 : 1 000 稀释)、P-NF- κ B (1 : 2 000 稀

释)、NF- κ B (1 : 2 000 稀释) 和 GAPDH (1 : 5 000 稀释)] 在 4 °C 下培养过夜。最后用 HRP 结合的二抗 (1 : 5 000 稀释) 孵育 2 h。用增强化学发光系统观察蛋白质条带。通过 GAPDH 免疫印迹法验证样品的等载量。用图像测量软件对谱带强度进行量化。

1.5 肺组织学评价 小鼠左肺用 4% 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片厚 3 ~ 4 μ m。肺切片用 HE 染色和 Masson 三色染色进行检测。炎症评分如前所述^[9]。支气管周围和血管周围炎症的程度由主观评分 0 到 3 来评估。当检测不到炎症时, 判定值为 0; 偶尔有炎性细胞缠绕时, 值为 1; 炎性细胞包围大多数支气管或血管时, 值为 2; 当大多数支气管或血管被一层厚的 (超过 5 个细胞) 炎性细胞包围时, 值为 3。全肺炎症定义为支气管周围和血管周围炎症评分的平均值。

1.6 酶联免疫吸附试验 (ELISA) BALF 中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平使用 ELISA 试剂盒进行分析。

1.7 定量实时 PCR (RT-PCR) 使用 TRIzol 从肺组织中提取 RNA。使用大容量 cDNA 反转录试剂盒将总 RNA 转换为 cDNA。所有实时 PCR 反应均使用 7300 实时 PCR 系统进行。以 GAPDH 为管家基因, 用比较 $\Delta\Delta$ CT 法计算 mRNAs 的相对表达水平。使用引物序列见表 1 所示。

表 1 引物序列

| 引物 | 序列 |
|-------------|--|
| TLR4 | 正向: 5'-ATGGCATGGCTTACACCACC-3' 反向: 5'-GAGGCCAATTTTGTCTCCACA-3' |
| GAPDH | 正向: 5'-AGGTCGGTGTGAACCGAATTTG-3' 反向: 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' |
| RP11-20G6.3 | 正向: 5'-AAGACAAAGGCCACCACTTCAATG-3' 反向: 5'-CCACCAGCAGTTTTCTAAAGGATG-3' |
| 252N01Rik | 正向: 5'-CTCCATCCTGCGCCTCGCTGT-3' 反向: 5'-GCTGTACCTTCACCGTTCC-3' |
| 11B03Rik | 正向: 5'-GCCTGGTGTGATGGGAAC-3' 反向: 5'-GCCCAGTTCTGATTCCACCA-3' |
| Neat1 | 正向: 5'-CTCAGACCCTCAGTTTCCACC-3' 反向: 5'-ATGCCATCCAGTTTCCAAGG-3' |
| Gm15521 | 正向: 5'-TGTGACAGAACAACAGTTTGGTTC-3' 反向: 5'-TCAGTGAGAGAAGCCAATGCAG-3' |
| Xist | 正向: 5'-CTCAGACCCTCAGTTTCCACC-3' 反向: 5'-ATGCCATCCAGTTTCCAAGG-3' |
| Sox2ot | 正向: 5'-TACCAGAGAAGCAAACCTGACA-3' 反向: 5'-AAGCACGGAGAATCCATTAGG-3' |
| Col1a1 | 正向: 5'-CGGTGCTACTGGAGTTCAAGGT-3' 反向: 5'-GCTACCAGGTCCACCACGCT-3' |

1.8 RNA 测序与功能富集分析 使用 TRIzol 从肺

组织中分离总 RNA。使用 Agilent 2200 TapeStation 评估 RNA 完整性。RIN 评分 >7 的纯化 RNAs 进行反向转录,然后使用 NEBNext[®] Ultra[™] II RNA 文库制备试剂盒进行接头连接和低周期富集。使用安捷伦 2200 TapeStation 和 Qubit[®] 2.0 对纯化后的文库进行评估,然后稀释至 10 pmol/L,在对端流动细胞上原位生成簇,并在 HiSeq3000 上进行测序(2 × 150 bp)。清除低质量以及包含适配器和 poly-N 序列的读取后,获得干净的读取数据。然后使用 HISAT2 默认参数将读取数据与小鼠参考基因组 mm10 对齐,通过 HTseq 转换为每个基因模型的读取计数。差异表达通过 DESeq 评估,以读取计数为输入,进行 Benjamini-Hochberg 多重测试校正。差异表达基因(DEGs)以折叠变化 >2 和校正 $P < 0.05$ 为阈值进行筛选。利用 RNAhybrid (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) 对 ceRNA 网络进行了预测。

1.9 双荧光素酶报告分析 将 Lnc RNA RP11-20G6.3 和 TLR4 克隆到 pISCHECK 载体中,产生荧光素酶报告系统。通过 Lipofectamine[™] 3000 介导的基因转移将每孔 100 ng 报告系统和 100 nmol/L mmu-miR-34c-5p 试剂转染到 293 T 细胞。8 h 后用完整培养基代替培养基。转染 48 h 后收获细胞,使用 Veritas 9100-002 工具测量荧光素酶活性,并标准化为海肾荧光素酶活性。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,所有结果均以平均值 ± 标准差表示。数据分析采用 Student *t* 检验、双因素方差分析(ANOVA)和 Dunnett 检验。RP11-20G6.3 表达与 FEV1/用力肺活量的比值(forced expiratory volume in one second/forced vital capacity, FEV1%)、Coll1a1 的关系采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR4 缺乏减轻 COPD 小鼠的气道炎症和重塑 为了确定 TLR4 在 COPD 中的潜在作用,首先分析了野生型(WT) COPD 小鼠肺组织中的表达,并检测到 TLR4 蛋白($t = 11.264, P < 0.001$)和 mRNA($t = 4.312, P = 0.003$)水平高于对照小鼠(图 1A、1B)。在 COPD 模型中,与 WT 小鼠相比,TLR4 -/- 小鼠肺组织炎症减弱,肺组织 NF- κ B 相关蛋白表达降低(图 1C、1D)。与这些一致,TLR4 -/- 小鼠 BALF 中炎症因子(IL-1 β 、IL-6 和

TNF- α)水平低于 WT 小鼠(图 1E)。观察 COPD 气道结构慢性重塑的特征性变化。如图 2A、2B 所示,WT 组小鼠支气管周围三色染色(Masson's trichrome)面积大于 TLR4 -/- 小鼠($t = 3.910, P = 0.007$)。这些结果提示 TLR4 是引发 COPD 小鼠的气道炎症和重塑的重要因素。

2.2 RP11-20G6.3 在 COPD 中的异常表达 WT-Con 和 WT-COPD 小鼠的转录组分析显示 621 个差异表达的 lncRNAs(DELs)和 2 601 个差异表达的基因/mRNAs(DEGs)。在这些 DEGs 中,328 个 lncRNAs 上调,293 个下调,而 1 897 个和 704 个 mRNAs 分别上调和下调。类似地,在 WT-COPD 和 TLR4 -/- COPD 小鼠之间,124 个 lncRNAs 和 511 个 mRNAs 上调,158 个 lncRNAs 和 899 个 mRNAs 下调。然后预测 DELs 和 DEGs 之间的 ceRNA 网络,KEGG 途径分析表明 NF- κ B 途径和 TLR 途径富集(图 3A)。RP11-20G6.3 是常见的差异表达 lncRNAs 之一;进一步 RT-qPCR 验证表明,RP11-20G6.3 是 TLR4 调节动物中差异表达最大的 lncRNA(图 3B)。为了确定 RP11-20G6.3 表达是否与 COPD 相关,并确定其与气道重塑的可能相关性,进行了 RT-qPCR。RP11-20G6.3 在 COPD 患者的肺组织中上调,并与 FEV1% 相关($\rho = 0.549, P = 0.047$)(图 4A、4B)。这些结果表明,随着 COPD 的进展,RP11-20G6.3 水平升高,其在病变组织中的上调依赖于 TLR4。

2.3 RP11-20G6.3 逆转 TLR4 缺乏减轻 COPD 小鼠气道炎症和重塑 为了确定 RP11-20G6.3 在气道重塑发病机制中的潜在作用,将 RP11-20G6.3 质粒滴鼻给予 TLR4 -/- COPD 小鼠。与其他组相比,加入 RP11-20G6.3 质粒增加了肺组织 RP11-20G6.3 水平(图 5A)。HE 染色显示,RP11-20G6.3 质粒干预后 TLR4 -/- 小鼠肺组织炎症增强($t = 3.952, P = 0.007$),支气管周围 Masson 三色面积增加($t = 4.062, P = 0.004$),并且 BALF 中炎症因子(IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)水平提高(图 5B-5D)。因此,RP11-20G6.3 介导 TLR4 诱导的 COPD 小鼠气道炎症和重塑。

2.4 RP11-20G6.3 海绵 miR-34c-5p 上调 Coll1a1

使用 RNAhybrid 预测了靶向 RP11-20G6.3 的 ceRNA 网络,并发现 RP11-20G6.3 海绵 miR-34c-5p 上调 Coll1a1。使用在线生物信息数据库预测 miRNA 靶点,并确定 miR-34c-5p 在 RP11-20G6.3 mRNA 中具有相关的结合位点(图 6A)。miR-34c-5p

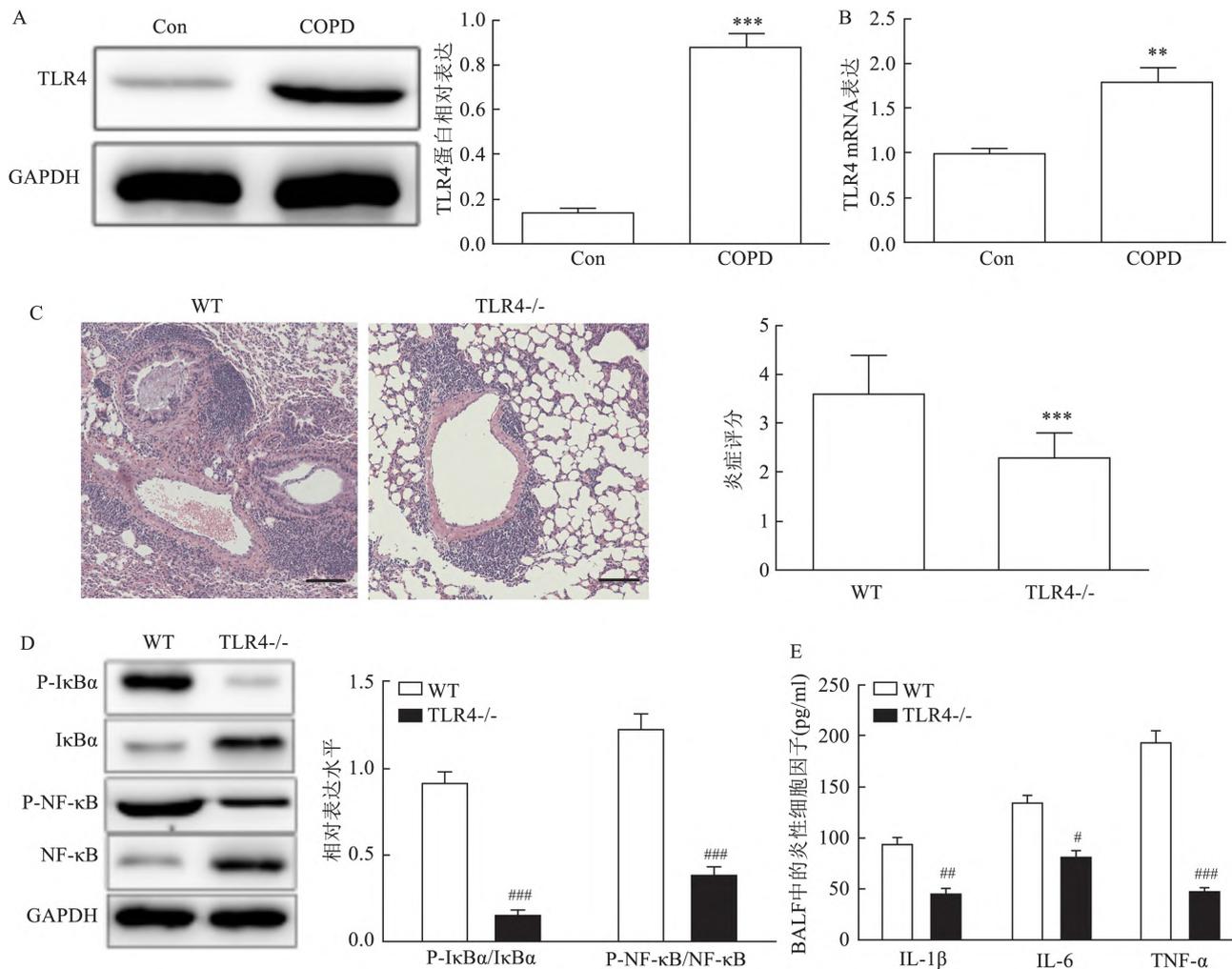


图1 TLR4 缺乏减轻 COPD 小鼠气道炎症

A: WT 对照和 COPD 小鼠的肺组织中 TLR4 蛋白水平; B: WT 对照和 COPD 小鼠的肺组织中 TLR4 mRNA 水平; C: WT 和 TLR4^{-/-} COPD 小鼠肺组织代表性 HE 染色及炎症评分 ×100; D: WT 和 TLR4^{-/-} COPD 小鼠肺组织 NF-κB 相关蛋白表达; E: WT 和 TLR4^{-/-} COPD 小鼠 BALF 中炎症因子水平; 与 Con 组比较: ***P* < 0.01, ****P* < 0.001; 与 WT 组比较: #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001

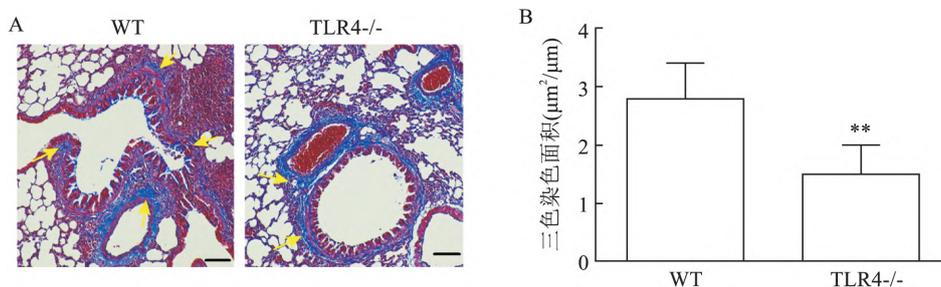


图2 TLR4 缺乏减轻 COPD 小鼠气道重塑

A: 肺组织中 Masson 三色染色(黄色箭头表示胶原沉积) ×100; B: 以 Masson 三色染色的支气管周围区域来量化皮下纤维化的程度; 与 WT 组比较: ***P* < 0.01

与 RP11-20G6.3 之间的关系通过荧光素酶报告基因检测进行验证。如图 6B 所示, miR-34c-5p 抑制 WT 控制的荧光素酶报告活性 ($t = 7.837, P <$

0.001), 但不抑制突变型 RP11-20G6.3 启动子的活性。miR-34c-5p 与 Col1a1 mRNA 的 3'UTR 相互作用 (图 6C)。miR-34c-5p 还抑制 Col1a1 启动子报告基

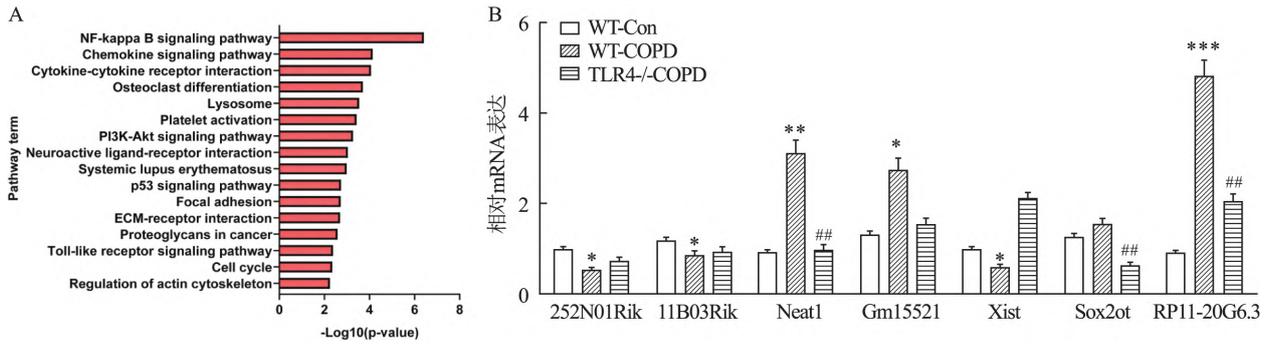


图3 COPD后 RP11-20G6.3 上调 与疾病严重程度相关

A: KEGG 通路分析 WT-Con、WT-COPD 和 TLR4 - / - COPD 小鼠的 DELs 和 DEGs; B: WT-Con、WT-COPD 和 TLR4 - / - COPD 小鼠肺组织的 LncRNA 水平; 与 WT-Con 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 WT-COPD 组比较: ## $P < 0.01$

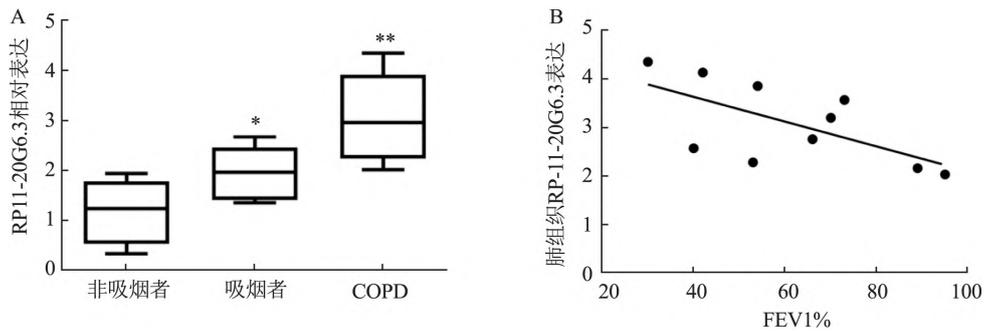


图4 RP11-20G6.3 在 COPD 患者中表达较高

A: qRT-PCR 检测非吸烟者 ($n = 5$)、吸烟者 ($n = 5$) 和 COPD 患者 ($n = 10$) 肺组织中 RP11-20G6.3 的表达; B: RP11-20G6.3 表达与 FEV1% 的 Spearman 相关分析; 与非吸烟者组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

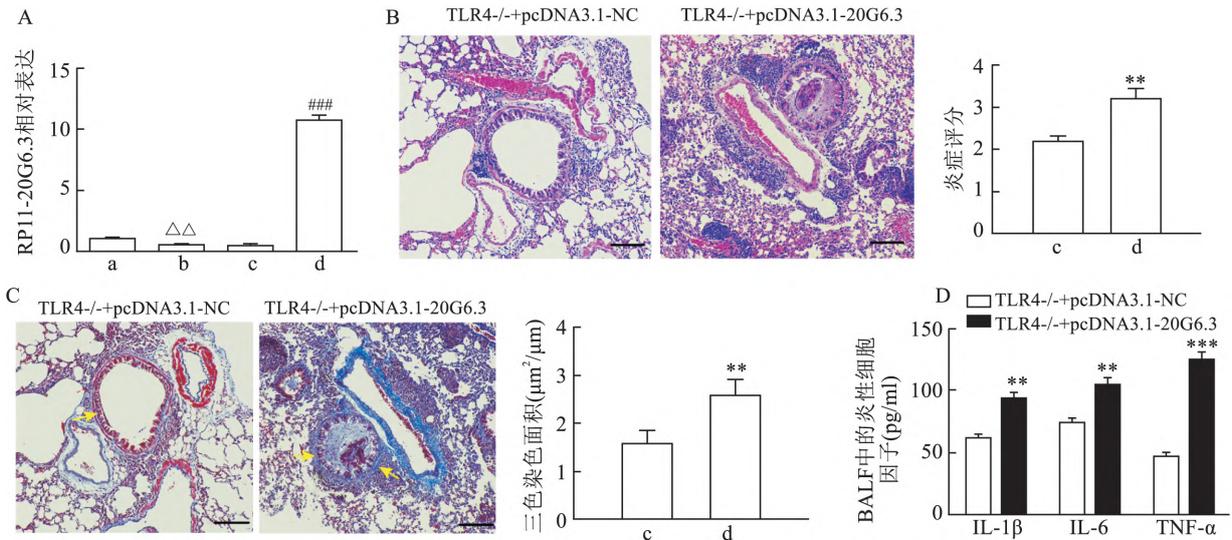


图5 RP11-20G6.3 逆转 TLR4 缺乏减轻 COPD 小鼠气道炎症和重塑

A: qRT-PCR 检测小鼠肺组织中 RP11-20G6.3 的表达; 与 WT 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 TLR4 - / - 组比较: ### $P < 0.001$; B: 经 RP11-20G6.3 处理的 TLR4 - / - COPD 小鼠肺组织代表性 HE 染色及炎症评分 $\times 100$; C: 经 RP11-20G6.3 处理的 TLR4 - / - COPD 小鼠肺组织代表性 Masson 三色染色及纤维化的程度 (黄色箭头表示胶原沉积) $\times 100$; D: 经 RP11-20G6.3 处理的 TLR4 - / - COPD 小鼠 BALF 中炎症因子水平; a: WT 组; b: TLR4 - / - 组; c: TLR4 - / - + pcDNA3.1-NC 组; d: TLR4 - / - + pcDNA3.1-20G6.3 组; 与 TLR4 - / - + pcDNA3.1-NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

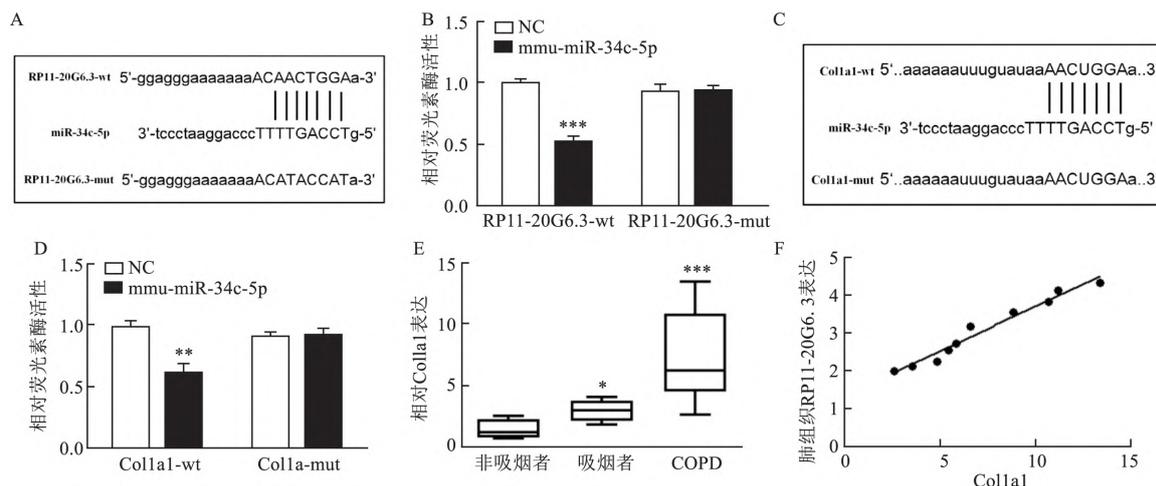


图6 RP11-20G6.3 海绵 miR-34c-5p 上调 COPD 后 Col1a1

A、B: RP11-20G6.3 mRNA 的 miR-34c-5p 结合序列 (A) 及测定荧光素酶活性 (B); C、D: Col1a1 mRNA 的 miR-34c-5p 结合序列 (C) 及测定荧光素酶活性 (D); E: qRT-PCR 检测非吸烟者 ($n=5$)、吸烟者 ($n=5$) 和 COPD 患者 ($n=10$) 肺组织中 Col1a1 的表达; F: RP11-20G6.3 表达与 Col1a1 的 Spearman 相关分析; 与 NC 或非吸烟者组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

因的荧光素酶活性 ($t = 4.124$, $P = 0.002$) (图 6D)。因此, RP11-20G6.3 和 Col1a1 的 3'-UTR 序列是 miR-34c-5p 的直接靶点。此外, COPD 患者的 Col1a1 水平升高, 并与 RP11-20G6.3 呈正相关 ($\rho = 0.936$, $P < 0.001$) (图 6E、6F)。总之, RP11-20G6.3 在 COPD 中充当 miR-34c-5p 的 ceRNA, 并通过海绵作用使后者上调 Col1a1。

3 讨论

COPD 因其复杂的病理机制, 目前尚无有效的治疗方法。气道炎症和重塑是 COPD 呼吸系统损伤的重要因素^[10]。目前认为气道壁损伤和修复的重复循环引起的慢性炎症最终导致气道重塑^[11]。本研究显示, TLR4 在 COPD 中上调, 其缺乏可通过下调肺组织 NF- κ B 相关蛋白表达来减轻 COPD 小鼠 BALF 中炎症因子释放, 并减轻气道纤维化的程度。这些结果与先前的研究^[2]结果一致, 即 TLR4 的下调可以减轻炎症并阻止 COPD 后的气道重塑。NF- κ B 家族是研究最广泛的转录因子, 因为它在炎症相关反应中起关键作用^[12]。它们可以通过 N 端 DNA 结合域形成同源二聚体和异二聚体, 并与 κ B 位点的各种相关靶 DNA 序列结合以调节基因表达。TLR4 是先天性免疫反应中的一个关键分子, 它识别 PAMPs (主要是 LPS), 激活 NF- κ B 途径, 这可能是其参与 COPD 炎症和气道重塑的最重要信号^[2]。

lncRNAs 调节各种病理状态下的炎症反应, 其异常表达是多种肺部疾病的分子标志, 提示 lncR-

NAs 在这些肺部疾病的发病机制中具有潜在的作用^[13]。研究^[14]表明, lncRNA-NEAT1 在肺炎中通过海绵 miR-193a-3p 介导 LPS 诱导的细胞凋亡和炎症损伤。先前的研究^[15]表明, 差异表达的 lncRNAs 和 miRNAs 之间的相互作用可能为确定 COPD 全新的治疗靶点提供了新的思路。此外, 最近研究^[16]显示, NNT-AS1 基因敲除可阻断香烟烟雾提取物对细胞增殖、凋亡、炎症和气道重塑的抑制作用。与这些发现一致, RP11-20G6.3 在 COPD 患者和 WT-COPD 小鼠肺组织中异常上调, 并与 COPD 患者的 FEV1% 相关, 而强制表达 RP11-20G6.3 则加重了 TLR4 缺失的药理抑制作用。因此, RP11-20G6.3 是 TLR4 诱发 COPD 气道炎症、重塑的重要介质。

大量证据支持 lncRNAs 通过多种机制靶向 miRNAs 间接调控基因表达, 从而改变了多种生物过程^[6]。它们可以充当 miRNA 海绵 (也称为 ceRNAs), 与 miRNAs 竞争靶 mRNAs 被加工成 miRNA, 并将 miRNA 转运到靶 mRNAs。在 COPD 中发现了多种 ceRNAs。例如, Mei et al^[16]报道了 lncRNA-NNT-AS1 通过靶向 miR-582-5p 来促进香烟烟雾提取物对细胞增殖、凋亡、炎症和气道重塑的作用。同样, 本研究表明 RP11-20G6.3/miR-34c-5p/Col1a1 ceRNA 网络调节 COPD 气道重塑。胶原蛋白是一种主要的细胞外基质蛋白, 而 I 型胶原尤其在炎症中起着信号分子的作用。Zhang et al^[17]研究发现, I 型胶原通过增加 ROS 水平刺激小鼠腹腔巨噬细胞的募集和聚集, 以及促炎性细胞因子的产生。Molo-

kanova et al^[18] 发现, I 型胶原缺乏减弱受损肝脏的炎性细胞活化/募集。本研究在 COPD 患者的肺组织标本中检测到较高的 Col1a1 水平, 进一步强调了其作为 RP11-20G6.3 下游信号与 COPD 气道炎症和重塑的关系。

总之, TLR4/NF-κB 将 COPD 损伤信号传递并激活下游 RP11-20G6.3/miR-34c-5p/ Col1a1 的 ceRNA 网络触发气道炎症、重塑。

参考文献

[1] 曹磊, 平芬, 韩书芝, 等. 吸烟在慢性阻塞性肺部疾病中的发病机理及其对免疫功能的影响[J]. 重庆医学, 2018, 12(1): 187-8.

[2] 王旭, 邹新中, 张彩娣, 等. COPD 肺部炎症反应与血管重构中 PPAR-α 及 TLR4 表达的关系[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(12): 234-6.

[3] 石雅娴, 隗世波, 刘俊, 等. 瑞舒伐他汀对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症的抑制作用及对 TLR4/NF-κB 信号通路的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(7): 15-8.

[4] Halstead J M, Lionnet T, Wilbertz J H, et al. An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals[J]. *Science*, 2015, 347(6228): 1367-671.

[5] Pan J, Bian Y, Cao Z, et al. Long noncoding RNA MALAT1 as a candidate serological biomarker for the diagnosis of non-small cell lung cancer: A meta-analysis[J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(2): 329-35.

[6] Fernandes J C R, Acuña S M, Aoki J I, et al. Long non-coding RNAs in the regulation of gene expression: physiology and disease[J]. *Noncoding RNA*, 2019, 5(1): 17.

[7] Bossi L, Figueroa-Bossi N. Competing endogenous RNAs: a target-centric view of small RNA regulation in bacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(12): 775-84.

[8] Lu Y, Zhang Y, Lu Q, et al. Differential expression profiles assay of miRNAs in rat serum after traumatic hemorrhagic shock[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, 9(12): 12262-74.

[9] 冯一, 陈丽, 李红, 等. FIZ1 在吸烟大鼠 COPD 模型

肺组织的表达及与气道炎症的相关性研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(6): 1101-8.

[10] 刘雪宁, 崔姗姗, 陈玉龙, 等. 肺泡巨噬细胞胞葬功能对 COPD 作用的研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31(7): 913-5.

[11] Chen Y, Huang G, Wang Y, et al. Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) protects against airway inflammation and airway remodeling in asthmatic mice[J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 285.

[12] Huang N, Liu K, Liu J, et al. Interleukin-37 alleviates airway inflammation and remodeling in asthma via inhibiting the activation of NF-κB and STAT3 signalings[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 198-204.

[13] Yu W D, Wang H, He Q F, et al. Long noncoding RNAs in cancer-immunity cycle[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6518-23.

[14] Nong W. Long non-coding RNA NEAT1/miR-493a-3p regulates LPS-induced apoptosis and inflammatory injury in WI-38 cells through TLR4/NF-κB signaling[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9): 5944-55.

[15] Qian Y, Mao Z, Shi Y, et al. Comprehensive analysis of miRNA-mRNA-lncRNA networks in non-smoking and smoking patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(3): 1140-53.

[16] Mei J, Zhang Y, Lu S, et al. Long non-coding RNA NNT-AS1 regulates proliferation, apoptosis, inflammation and airway remodeling of chronic obstructive pulmonary disease via targeting miR-582-5p/FBXO11 axis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110326.

[17] Zhang X, Chen Y R, Zhao Y L, et al. Type I collagen or gelatin stimulates mouse peritoneal macrophages to aggregate and produce pro-inflammatory molecules through upregulated ROS levels[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76: 105845.

[18] Molokanova O, Schöning K, Weng S Y, et al. Inducible knock-down of procollagen I protects mice from liver fibrosis and leads to dysregulated matrix genes and attenuated inflammation[J]. *Matrix Biol*, 2018, 66: 34-49.

Role of LncRNA RP11-20G6.3 and TLR4/NF-κB signaling pathway in airway inflammation and remodeling in COPD

Chen Xunchun¹, Li Minglan¹, Pan Biyun¹, Wang Yanying¹, Ding Yipeng²

(¹Dept of General Medicine, Haikou People's Hospital, Haikou 570208;

²Dept of Respiratory, Hainan General Hospital, Haikou 570311)

Abstract Objective To investigate the role of LncRNA RP11-20G6.3 and Toll-like receptor 4 (TLR4) /nuclear factor kappa-B (NF-κB) signaling pathway in airway inflammation and remodeling in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** The wild-type (WT) and TLR4 knock out (KO) C57BL/6 male mice were used to construct COPD model. The expression of TLR4/NF-κB signaling pathway protein was analyzed by Western blot; the levels of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in bronchoalveo-

网络出版时间: 2022-04-01 10:28 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220330.1419.016.html

红花椒提取物和青花椒提取物对慢性束缚应激小鼠的抗抑郁作用

谭邦银^{1,2*}, 于浩飞^{2*}, 谢建平³, 张素婷¹, 王晶¹, 尹文耀¹, 丁彩凤², 张荣平², 郭英¹, 张兰春²

摘要 目的 研究红花椒提取物和青花椒提取物对慢性束缚应激抑郁模型小鼠的抗抑郁作用。方法 45只SPF级雄性ICR小鼠,随机分成5组,即正常组、模型组、盐酸舍曲林组、红花椒提取物组和青花椒提取物组,每组9只。除正常组外,其他组小鼠用慢性束缚应激复制小鼠抑郁模型。在正常组和模型组经灌胃给予橄榄油,其他组依次给予盐酸舍曲林(10 mg/kg)、红花椒提取物(200 mg/kg)和青花椒提取物

(200 mg/kg)治疗后,以旷场实验、强迫游泳实验评价各组小鼠抑郁行为,ELISA法测定小鼠血清和皮层脑源性神经营养因子(BDNF)、5-羟色胺(5-HT)、谷胱甘肽(GSH)及血清和脑组织一氧化氮(NO)的水平。结果 与模型组相比,红花椒提取物能降低小鼠强迫游泳的不动时间百分比,增加皮层BDNF水平,改善皮层和血清5-HT、GSH水平,差异均有统计学意义($P < 0.05$);青花椒提取物能改善小鼠旷场实验及强迫游泳中的行为,增加皮层5-HT和血清GSH水平,降低血清和皮层NO的含量。结论 红花椒提取物和青花椒提取物均能改善慢性束缚应激小鼠的抑郁样行为。

关键词 红花椒;青花椒;抑郁;慢性束缚

中图分类号 R 965.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)04-0593-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.016

2022-03-07 接收

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(编号:82060650); 云南省科技计划项目基础研究项目(编号:202001AT070137、202001AY070001-017、2019FA033); 云南省重大科技专项(编号:202002AA100007); 云南省天然药物药理重点实验室开放研究基金项目

作者单位: ¹昆明医科大学基础医学院,昆明 650500

²昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室、实验动物学部,昆明 650500

³云南民族大学图书馆,昆明 650500

作者简介: 谭邦银,男,硕士研究生;

郭英,女,副教授,责任作者,E-mail: guoying@kmmu.edu.cn;

张兰春,女,实验师,责任作者,E-mail: zhlch_2010@163.com;

* 对本文具有同等贡献

目前,临床多用西药治疗抑郁症,存在副作用大等问题,中药治疗副作用则相对较小,因而从中药中筛选抗抑郁的药用资源,逐渐受到关注^[1]。花椒为芸香科植物青花椒 *Zanthoxylum schinifolium* 或花椒 *Zanthoxylum bungeanum* 的干燥成熟果皮,其含有生物碱等化合物^[2]。花椒根部提取物可通过调节海马中的神经炎症和单胺类神经递质抑制脂多糖诱导

lar lavage fluid (BALF) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The differentially expressed lncRNAs were identified by RNA sequencing and functional enrichment analysis, and the competing endogenous RNAs (ceRNA) networks were predicted using RNAhybrid. Luciferase reporter was used to explore relationships between genes. **Results** In COPD model, compared with WT mice, the lung inflammation of TLR4-/- mice was significantly reduced, the expression of NF- κ B related protein, the levels of inflammatory factors (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) in BALF and Masson trichromatic staining area significantly decreased in TLR4-/- mice. RNA sequencing and functional enrichment analysis confirmed that RP11-20G6.3 was one of the differentially expressed lncRNA. RP11-20G6.3 was up-regulated in lung tissue of COPD patients, and its expression was significantly correlated with FEV1 ($\rho = 0.549$, $P = 0.047$). RP11-20G6.3 plasmid intervention aggravated the inflammation of lung tissue in TLR4-/- COPD mice, and increased the Masson tricolor area around bronchi and the levels of inflammatory factors (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) in BALF. Luciferase reporter gene analysis showed that RP11-20G6.3 acted as a ceRNA for miR-34c-5p in COPD, and sponges the latter to upregulate Col1a1. **Conclusion** TLR4/NF- κ B relays the damage signals following COPD and activates the downstream RP11-20G6.3/miR-34c-5p/Col1a1 ceRNA network which triggers airway inflammation and remodeling.

Key words lncRNA RP11-20G6.3; TLR4/NF- κ B signaling pathway; chronic obstructive pulmonary disease; airway inflammation; airway remodeling