

· 基础研究 ·

hsa_circ_0005389在新生儿急性呼吸窘迫综合征细胞炎症模型中的作用研究

游铭钰¹, 周欢², 张宇涵¹, 李冰洁¹, 陈筱青^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院儿科, 江苏 南京 210029; ²空军军医大学附属唐都医院儿科, 陕西 西安 710038

[摘要] 目的: 基于人环状RNA(circular RNA, circRNA)高通量测序和生物信息学分析结果, 研究 hsa_circ_0005389 与新生儿急性呼吸窘迫综合征(neonatal acute respiratory distress syndrome, NARDS)的关系, 以为 NARDS 的诊断和治疗提供新的方向。方法: 建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导急性肺损伤细胞模型。通过 RT-qPCR 及 Western blot 检测炎症标志物及相关通路指标在阴性对照组和敲低 hsa_circ_0005389 表达的干预组中的表达变化情况, 同时用 CCK-8 与流式细胞仪检测正常 A549 细胞与建立急性肺损伤模型的 A549 细胞敲低或者过表达 hsa_circ_0005389 后的增殖与凋亡情况。结果: RT-qPCR 及 Western blot 结果显示, A549 细胞暴露于 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ LPS 48 h 时, 各炎症标志物及相关通路指标高表达($P < 0.05$)。与阴性对照组相比, 敲低 hsa_circ_0005389 表达后, A549 细胞中可溶性肿瘤坏死因子受体 1(soluble tumor necrosis factor receptor 1, sTNFR1)mRNA 相对表达量和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)蛋白表达量显著降低($P < 0.05$); 在急性肺损伤模型中, 敲低 hsa_circ_0005389 表达后, 各炎症标志物及相关通路指标 mRNA 相对表达量均下降($P < 0.001$)。CCK-8 与流式细胞仪检测结果显示, 与阴性对照组相比, 敲低 hsa_circ_0005389 表达的 A549 细胞增殖加快, 凋亡率降低($P < 0.05$), 而过表达 hsa_circ_0005389 后 A549 细胞增殖减慢, 凋亡率增加($P < 0.05$)。结论: 急性肺损伤细胞模型中, hsa_circ_0005389 促进肺损伤炎症标志物的表达, 并且影响肺上皮细胞的增殖和凋亡, 提示 hsa_circ_0005389 参与 NARDS 的炎症过程, 可能是 NARDS 潜在的干预靶标。

[关键词] hsa_circ_0005389; 新生儿急性呼吸窘迫综合征; 炎症; 环状 RNA; 肺损伤

[中图分类号] R563.8

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)07-945-09

doi: 10.7655/NYDXBNS20230707

Experimental study on the involvement of hsa_circ_0005389 in the inflammatory process of neonatal acute respiratory distress syndrome

YOU Mingyu¹, ZHOU Huan², ZHANG Yuhan¹, LI Bingjie¹, CHEN Xiaoqing^{1*}

¹Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Department of Pediatrics, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, China

[Abstract] **Objective:** The current study aims to investigate the relationship between hsa_circ_0005389 and neonatal acute respiratory distress syndrome (NARDS) based on high-throughput sequencing and bioinformatics analysis of human circular RNA (circRNA) to provide a new direction for the diagnosis and treatment of NARDS. **Methods:** The acute lung injury model was induced by lipopolysaccharide (LPS). The expression of inflammatory markers and related pathway indexes were detected by RT-qPCR and Western blot in the negative control group and the intervention group with knockdown of hsa_circ_0005389 expression. CCK-8 and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of blank A549 cells and A549 cells with establishment of acute lung injury model, both of which were knocked-down or over-expressed hsa_circ_0005389. **Result:** The mRNA relative expression and the protein expression of inflammatory markers and related pathway indexes were highly expressed and increased significantly after exposed to 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ LPS for 48 h ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, the relative mRNA expression level of soluble tumor necrosis factor receptor 1 (sTNFR1) and the protein expression of tumor necrosis factor α (TNF- α) in A549 cells were

[基金项目] 国家自然科学基金(81871195)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xqchen@njmu.edu.cn

significantly decreased ($P < 0.05$) after knocking down the expression of hsa_circ_0005389. Inflammatory markers and related pathway indexes decreased significantly ($P < 0.001$) in the acute lung injury model after knocking down the express of hsa_circ_0005389. The proliferation of A549 cells were accelerated and the apoptosis rate was decreased ($P < 0.05$) when the expression of hsa_circ_0005389 was down-regulated, while the proliferation of A549 cells was slowed down and the apoptosis rate was increased after hsa_circ_0005389 expression was over-regulated ($P < 0.05$) by using CCK-8 and flow cytometry as compared with the negative control group. **Conclusion:** In acute lung injury cell model, hsa_circ_0005389 promoted the expression of inflammatory markers of lung injury, affecting the proliferation and apoptosis of lung epithelial cells. These results suggested that hsa_circ_0005389 was involved in the inflammatory process of NARDS, which may be a potential intervention target.

[Key words] hsa_circ_0005389; neonatal ARDS; circRNA; inflammation; lung injury

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(07):945-953]

新生儿急性呼吸窘迫综合征(neonatal acute respiratory distress syndrome, NARDS)是一种以肺泡损伤和免疫细胞浸润为特征的、威胁生命的严重呼吸系统疾病,其病理特征是炎症增加微血管通透性导致肺泡内富含蛋白质的液体渗出,从而引发顽固性低氧血症^[1]。该病于1989年被首次定义,2017年Montreux标准重新定义了NARDS,将其与新生儿呼吸窘迫综合征(neonatal respiratory distress syndrome, NRDS)和新生儿短暂性呼吸急促(transient tachypnoea of the neonate, TTN)区分开来,为早期诊断提供了依据^[2-3]。目前对于NARDS的管理,主要采用对因治疗,在施以呼吸支持和气管内注入肺泡表面活性剂治疗的基础上,积极寻找病因,对于肺内原因应尽早查清病原体或吸入证据,对于肺外原因应及时给予多器官支持手段,实现治疗的整体性,真正改善预后^[4-7]。NARDS过程复杂,常伴有弥漫性肺泡损伤(diffuse alveolar damage, DAD)和全身炎症反应综合征,可以引起或加重肺上皮和血管内皮的损伤和炎症^[8],因此NARDS的早期诊断和及时治疗很重要。然而有关NARDS治疗的深入研究却滞后于成人和儿童。先前研究表明NARDS中存在差异表达的环状RNA(circular RNA, circRNA),并可能参与NARDS的发病机制;此外有研究表明,多种小RNA(microRNA, miRNA)参与NARDS的发病机制,并在其病理过程中发挥着不同的作用^[9]。在先前的研究中,本课题组对患有NARDS以及仅患有高胆红素血症的新生儿血标本进行人类高通量circRNA微阵列分析,发现hsa_circ_0005389在两组间的表达差异23.9倍,并且在NARDS患儿组中表达量增加^[10]。故本研究在人类circRNA高通量芯片测序和相关生物信息学分析的基础上研究hsa_circ_0005389与NARDS之间的联系,以期为NARDS的治疗提供新方向。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM(南京凯基生物);胎牛血清(BI公司,南美);青链霉素双抗、胰蛋白酶消化液、DEPC水、SDS-PAGE凝胶试剂盒(上海碧云天);PBS缓冲液(南京森贝伽);Lipofectamine™ 3000、TRIzol(Invitrogen公司,美国);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(Sigma公司,美国);mRNA逆转录试剂盒、实时荧光定量试剂盒、CCK-8试剂盒(南京诺维赞);ECL化学发光试剂盒(合肥白鲨生物科技有限公司);PI3K抗体(CST公司,美国);肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α)抗体、 β -actin抗体(沈阳万类生物科技有限公司);白细胞介素(interleukin, IL)-6抗体(北京Proteintech公司);山羊抗兔IgG、山羊抗小鼠IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);流式细胞凋亡检测试剂盒(杭州联科生物公司);RNA荧光原位杂交试剂盒(上海吉玛基因生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

人肺泡上皮细胞(A549)购自上海生命科学研究院,在6孔板中加入添加10%胎牛血清和青链霉素(100 U/mL)的DMEM培养液并放置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。通过Lipofectamine™ 3000将siRNA(si-hsa_circ_0005389)或其阴性对照序列(NC)3.75 μ L、过表达质粒或其对照Vector(2.5 μ g)转染A549细胞。24 h后更换完全培养基,培养48 h或加LPS培养48 h。siRNA、NC、Vector及过表达质粒均购于上海吉玛基因生物有限公司。

1.2.2 核质分离

将A549用1 mL PBS重悬后留取200 μ L作为对照组,剩余细胞用液氮速冻,37℃水浴快速溶解,反复3次后离心,辅以不同蔗糖密度梯度达到分离的

效果,上清为细胞质,沉淀为细胞核,分别提取细胞质RNA、细胞核RNA,提取后的RNA进行逆转录以及RT-qPCR用于检测 hsa_circ_0005389在细胞质以及细胞核中的相对表达量。

1.2.3 荧光原位杂交

从上海吉玛制药技术有限公司处购得带 Cy3 荧光的 hsa_circ_0005389 探针及试剂盒,按照说明书完成此实验。

将适当数量的 A549 细胞接种于 48 孔板,24 h 后 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 100 μ L 0.1% Buffer A, 室温孵育 15 min, PBS 洗涤 2 次后加入 100 μ L 2 \times Buffer C, 37 $^{\circ}$ C 培养箱放置 30 min; Buffer E 在 73 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 30 min 后加入稀释后的探针中,继续 73 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 吸弃 Buffer C, 每孔加入 100 μ L 探针混合液,避光 37 $^{\circ}$ C 培养箱杂交过夜;次日吸弃探针混合液,每孔加入 100 μ L 42 $^{\circ}$ C 预热的 0.1% Buffer F 洗涤 5 min, 每孔加入 100 μ L 42 $^{\circ}$ C 预热的 2 \times Buffer C 洗涤 5 min, 吸弃 Buffer C 后进行 DAPI 避光染色 20 min, PBS 洗涤 2 次,置于显微镜下观察。

1.2.4 细胞增殖与凋亡测定

按照 1.2.1 中所述方法转染 siRNA、NC、Vector、过表达质粒,测定起始吸光度,待细胞生长(不加或加入 LPS)1、2、3 d 后更换为无血清培养基且每孔加 10 μ L CCK-8, 孵育 1 h, 测定 450 nm 处的吸光度。另外,将已转染 A549 细胞再培养 48 h, 收集上清后消化离心至 5 mL EP 管,按照细胞凋亡试剂盒说明书步骤测定凋亡程度。

1.2.5 Western blot

使用 RIPA 裂解缓冲液从 A549 细胞中提取总蛋白。将 5 μ L 蛋白样品通过 10% SDS-PAGE 凝胶分离并印迹在 PVDF 膜上,随后用 TBST 配制的 5% 脱脂奶粉溶液将膜封闭 2 h 阻断非特异性位点。加入抗 IL-6、抗 PI3K、抗 TNF- α 和抗 β -actin 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。次日 TBST 洗涤 3 次后用山羊抗兔 IgG 或山羊抗小鼠 IgG 孵育 1.5 h。最后加入 ECL 化学发光试剂,通过 Tanon 5200 Multi 仪器进行曝光扫描。

1.2.6 实时定量 PCR(RT-qPCR)

用 TRIzol 提取 A549 细胞总 RNA,通过 NanoDrop ND-1000 进行 RNA 质控,合格后进行逆转录。将 cDNA(1 μ L)与按照 PCR 试剂盒说明书配制的反应体系(4 μ L)混合,于 LightCycler480II 仪器运行 PCR 试剂盒程序,测定相应 mRNA 相对表达量(计算方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$)。所用引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物

Table 1 RT-qPCR primers

基因	引物序列(5'→3')
hsa_circ_0005389	上游:AGTCCATTCCACGCCTAC 下游:GAGCACGATCACGAACAT
PI3K	上游:TGGTTTGGATCTTCGGATGT 下游:GCCAGCACAGGACAGTGTA
Akt	上游:TCACCATCACACCACCTGAC 下游:CTCAAATGCACCCGAGAAAT
IL-6	上游:CCTTCCAAAGATGGCTGAAA 下游:AGCTCTGGCTTGTTCCTCAC
IL-8	上游:TGCAGCTCTGTGTGAAGGTG 下游:ACTTCTCCACAACCCTCTGC
sTNFR1	上游:GAGAGGCCATAGCTGTCTGG 下游:GCACCTGGTACAGCAAATCG
GAPDH	上游:GAACGGGAAGCTCACTG 下游:GCCTGCTTCACCACCTTCT

1.3 统计学方法

使用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 9.0 版软件对数据进行分析。各种实验均重复至少 3 次,定量数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组独立样本之间的差异采用重复测量方差分析检验,SNK 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞中 hsa_circ_0005389 的表征

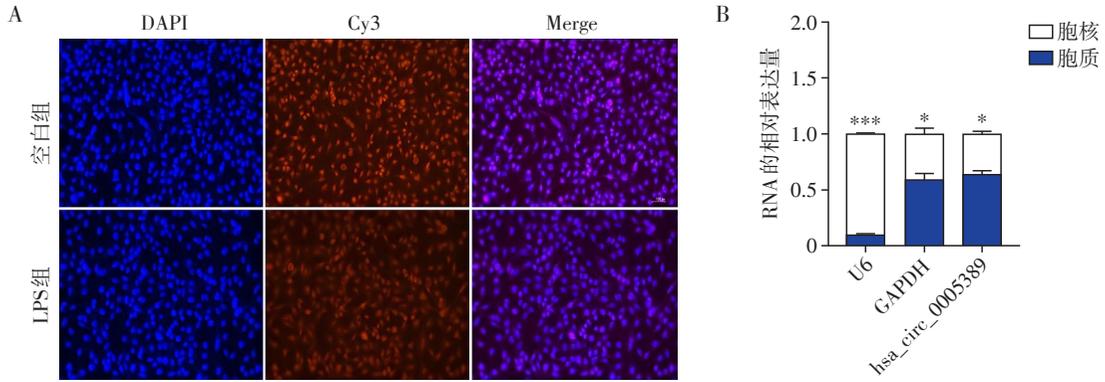
检索从 circBase 数据库网站(<http://www.circ-base.org/>)及 circprimer 1.2.0.5 版软件可知 hsa_circ_0005389 位于 17 号染色体,由多个外显子剪接而成,亲本基因为 SLC38A10,包含 409 个碱基。为了进一步了解 hsa_circ_0005389,对未用 LPS 处理的 A549 细胞(空白组)与 LPS 处理的 A549 细胞(LPS 组)进行 hsa_circ_0005389 荧光原位杂交分析,无论是空白组还是 LPS 组均提示 hsa_circ_0005389 在 A549 细胞中表达(图 1A),另结合核质分离实验提示 hsa_circ_0005389 主要在 A549 细胞质中表达(图 1B)。

2.2 急性肺损伤细胞炎症模型的建立

以 LPS(10 μ g/cm²)作用于 A549 细胞不同时间,如图 2A 所示,A549 细胞暴露于 LPS(10 μ g/cm²)48 h 后,CCK-8 结果显示与不加 LPS 的对照组比较,细胞活力显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。将 A549 细胞于不同浓度的 LPS 中暴露 48 h,图 2B~G 所示,10 μ g/cm² 处理组各炎症标志物和相关通路指标的表达最高,与对照组比较,差异均具统计学意

义 ($P < 0.001$), 且 $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 处理组 hsa_circ_0005389 的表达也最高 ($P < 0.001$)。如图 2H 所示,

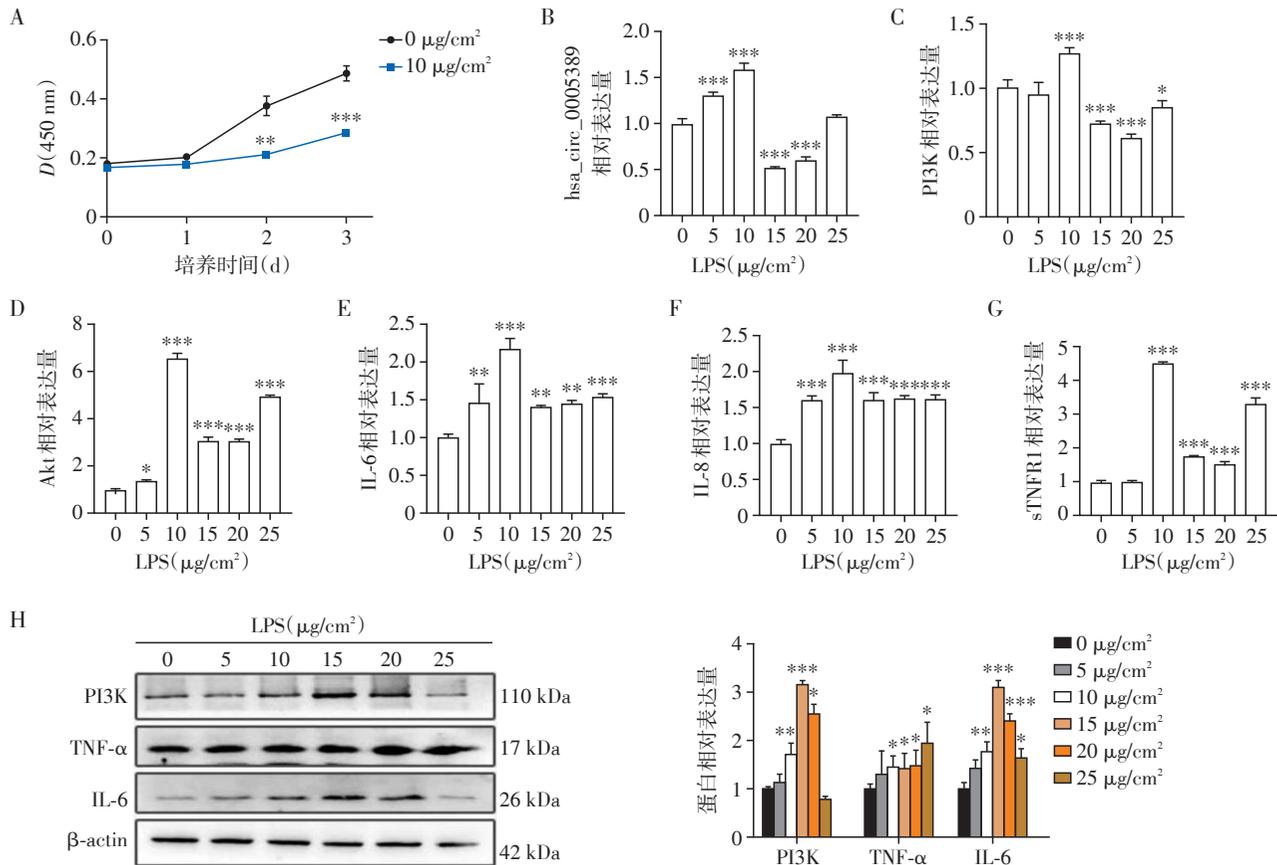
所选研究指标的蛋白表达量在 $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 处理组均升高 ($P < 0.05$)。



A: 荧光原位杂交观察 hsa_circ_0005389 在 A549 细胞中表达, hsa_circ_0005389 探针带有 Cy3 荧光, 细胞核用 DAPI 染色 ($\times 200$); B: 核质分离: qRT-PCR 验证 A549 细胞核以及细胞质中 hsa_circ_0005389 的相对表达量, 提示 hsa_circ_0005389 主要定位于 A549 细胞质; 核质间比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ ($n=3$)。

图 1 A549 细胞中 hsa_circ_0005389 的表征

Figure 1 Characterization of hsa_circ_0005389 in A549 cells



A: LPS ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 处理不同时间后 A549 细胞的 CCK-8 结果; B~G: 不同浓度 LPS 处理 48 h 后 A549 细胞中 hsa_circ_0005389、PI3K、Akt、IL-6、IL-8、sTNFR1 的 mRNA 表达量; H: 不同浓度 LPS 处理 48 h 后 A549 细胞中 IL-6、PI3K、TNF- α 的蛋白表达量; 与对照组 ($0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ ($n=3$)。

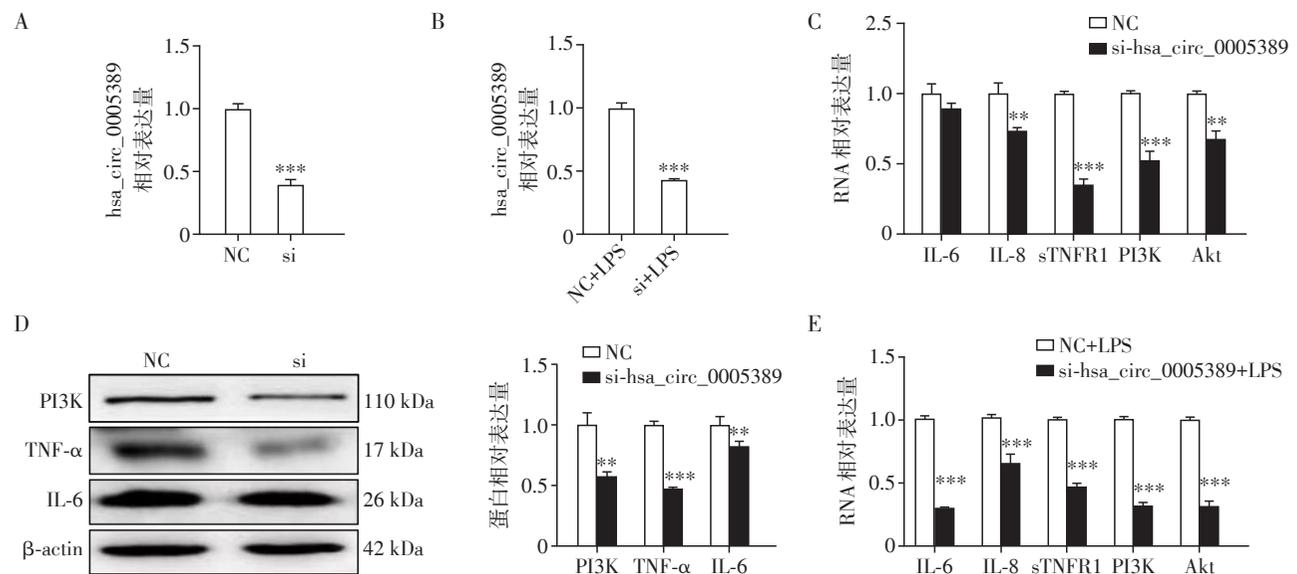
图 2 LPS 诱导急性肺损伤细胞炎症模型的建立

Figure 2 Establishment of LPS-induced cell inflammation model of acute lung injury

2.3 敲低 hsa_circ_0005389 可降低炎症标志物的表达

转染 si-hsa_circ_0005389 后 hsa_circ_0005389 表达降低,并且在 LPS 诱导的肺损伤 A549 细胞炎症模型中同样有效($P < 0.001$,图 3A、B)。与空白组及阴性对照组相比,敲低 hsa_circ_0005389 表达后 sTNFR1 mRNA 下降最为明显,差异具有统计学意义

($P < 0.001$,图 3C),同时 TNF- α 蛋白表达量较阴性对照组明显降低($P < 0.001$,图 3D);如图 3E 所示,建立 A549 细胞肺损伤炎症模型($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ LPS 作用 48 h)后,与 NC+LPS 组相比,敲低 hsa_circ_0005389 表达的干预组炎症标志物及相关通路指标显著下降(P 均 < 0.001)。



A: 敲低 hsa_circ_0005389 后 hsa_circ_0005389 表达量; B: 敲低 hsa_circ_0005389 后建立 LPS 诱导的肺损伤 A549 细胞炎症模型中 hsa_circ_0005389 表达量; C: 敲低 hsa_circ_0005389 后 IL-6、IL-8、sTNFR1、PI3K、Akt 的 mRNA 表达量; D: 敲低 hsa_circ_0005389 后 PI3K、TNF- α 、IL-6 的蛋白表达量; E: 敲低 hsa_circ_0005389 后建立 LPS 诱导的肺损伤 A549 细胞炎症模型中 hsa_circ_0005389、PI3K、Akt、IL-6、IL-8、sTNFR1 的 mRNA 表达量; 两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 3 敲低 hsa_circ_0005389 后炎症标志物及相关通路指标的表达

Figure 3 The expression of inflammatory markers and related pathway indicators after hsa_circ_0005389 knockdown

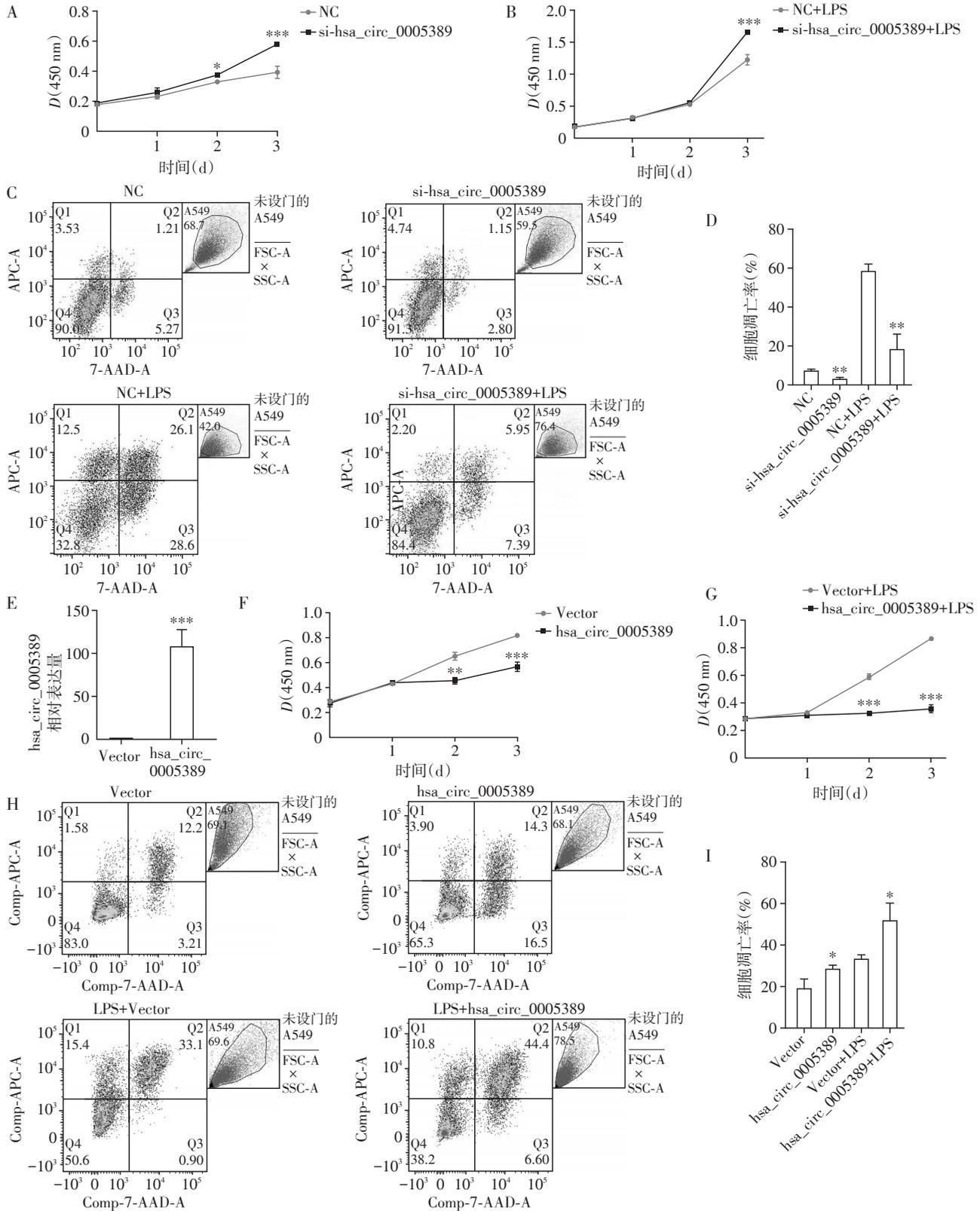
2.4 敲低/过表达 hsa_circ_0005389 对 A549 细胞增殖及凋亡的影响

与阴性对照组相比,敲低 hsa_circ_0005389 后 A549 细胞于 2 d 开始出现增殖加快,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4A);而 LPS 诱导的肺损伤 A549 细胞炎症模型中,与阴性对照组相比,培养 3 d 的干预组表现出增殖加快,差异具有统计学意义($P < 0.001$,图 4B)。同时,与阴性对照组的凋亡率相比,敲低 hsa_circ_0005389 表达的 siRNA 组的凋亡率降低;在 LPS 诱导的肺损伤 A549 细胞炎症模型中,与阴性对照组的凋亡率相比,敲低 hsa_circ_0005389 表达的 siRNA 组的凋亡率显著降低($P < 0.01$,图 4C、D)。过表达 hsa_circ_0005389 后 A549 细胞中 hsa_circ_0005389 的相对表达量升高($P < 0.001$,图 4E)。相对于阴性对照组,过表达 hsa_circ_0005389 后增殖于 2 d 开始减慢,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 4F);在 LPS 诱导的肺损伤 A549 细胞炎症模型中,相比

于阴性对照组,培养 2、3 d 的干预组表现出增殖抑制,差异具有统计学意义($P < 0.001$,图 4G)。与过表达的阴性对照的凋亡率相比,过表达 hsa_circ_0005389 后凋亡率升高;同时在 LPS 诱导的肺损伤 A549 细胞炎症模型中,相比于阴性对照组,过表达 hsa_circ_0005389 后凋亡率进一步增加($P < 0.05$,图 4H、I)。

3 讨论

NARDS 是常发生于足月儿及晚期早产儿的一种严重威胁生命的呼吸危重症,由宫内外多种因素引起^[11-13],本课题组在之前的研究中发现 hsa_circ_0005389 在 NARDS 中位于上调 circRNA 表达谱前列^[10],同时 在人血样本中通过 qPCR 分析表明 hsa_circ_0005389 在 NARDS 中表达增加。hsa_circ_0005389 是 SLC38A10 pre-mRNA 反向剪接的产物,它的功能以及在 NARDS 中发挥的作用尚不清楚。



A, B: 敲低 hsa_circ_0005389 表达促进 A549 细胞(A)和 LPS 诱导的肺损伤炎症模型细胞(B)增殖; C, D: 敲低 hsa_circ_0005389 表达抑制 A549 细胞凋亡; E: 过表达 hsa_circ_0005389 的 A549 细胞中 hsa_circ_0005389 相对表达量; F, G: 过表达 hsa_circ_0005389 抑制 A549 细胞(F)和 LPS 诱导的肺损伤炎症模型细胞(G)增殖; H, I: 过表达 hsa_circ_0005389 促进 A549 细胞和 LPS 诱导的肺损伤炎症模型细胞凋亡; 与 NC 组或 Vector 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n=3$ 。

图4 敲低/过表达 hsa_circ_0005389 对 A549 细胞增殖及凋亡的影响

Figure 4 Effects of knockdown/overexpression of hsa_circ_0005389 on proliferation and apoptosis in A549 cells

现阶段,有文章指出IL-6、IL-8、可溶性肿瘤坏死因子受体1(soluble tumor necrosis factor receptor 1, sTNFR1)为ARDS炎性标志物^[11,14];同时,在差异表达的circRNA的亲本基因谱的KEGG通路富集分析(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)中有PI3K/Akt信号通路富集,另外也有文章指出PI3K/Akt通路在LPS诱导的急性炎症反应中扮演重要角色^[15-16],故而研究中将IL-6、IL-8、sTNFR1、PI3K、Akt、TNF- α 作为ARDS炎性标志物。

急性肺损伤A549细胞炎症模型的建立是研究基础,本研究采用LPS诱导的急性肺损伤细胞模型。首先,LPS暴露时间的确定:参考Wang等^[17]的文章建立鼠模型时采用的是48 h、转染后蛋白表达含量改变时间、CCK-8功能实验结果中细胞增殖开始出现差异的时间为48 h。其次,LPS暴露浓度的确定:研究中设置不同LPS暴露浓度梯度(0、5、10、15、20、25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$),观察hsa_circ_0005389与ARDS炎性标志物和相关通路指标的mRNA及蛋白变化,最终建立LPS诱导的急性肺损伤A549细胞模型(10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 作用48 h)。

LPS诱导的急性肺损伤模型是研究中常见的诱导方式,多数研究选用小鼠/大鼠体内注射LPS建立急性肺损伤体内模型,其中有部分研究选用LPS诱导的A549细胞系建立体外模型。Chen等^[18]在2022年发表的文章中利用LPS(200 ng/mL)2 h诱导急性肺损伤;Ning等^[19]研究中采用的细胞模型是A549细胞系暴露于LPS(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)6 h后建立;在另外一篇报道中,使用LPS刺激(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)24 h诱导急性肺损伤^[20]。以上研究中LPS使用的浓度和时间都存在差异,与本研究采用的LPS(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)48 h也不相同,这可能与研究目的不同有关,另外即使是相同的细胞系在不同生长环境中细胞状态也有所不同,或者因为使用的LPS厂家和货号不同,药物溶解和稀释时产生的误差等。ARDS和新生儿急性肺损伤具有性质相同的病理变化,且都是全身炎症反应的肺部表现,因此本研究采用LPS诱导的急性肺损伤模型作为体外研究的细胞炎症模型。

敲低 hsa_circ_0005389 表达的 A549 细胞中 sTNFR1 mRNA 相对表达量及 TNF- α 蛋白表达量显著降低。sTNFR1 是 TNFR1 胞外域的蛋白水解裂解(脱落)产生的仍然能够与 TNF- α 结合的同源可溶性受体,与 TNF- α 在炎症中均有着不可或缺的作用,其表达水平与炎症的程度存在相关关系^[21],有文章指出抗 sTNFR1 药物治疗可抑制肺损伤中的炎症反

应^[22-23];同时,在敲低 hsa_circ_0005389 表达的 A549 细胞上建立急性肺损伤细胞炎症模型,每一个炎性指标都出现明显降低,更进一步说明了 hsa_circ_0005389 与炎症过程的正向调节作用。另外, hsa_circ_0005389 的亲本基因溶质载体家族 38 成员 10(solute carrier family 38 member 10, SLC38A10)在垂体、肾上腺、胃和上消化道中表达,是一种氨基酸转运蛋白,可能参与内分泌代谢轴,对细胞的增殖、新蛋白质的合成以及氧化应激起着支持作用^[24-25]。敲低 hsa_circ_0005389 表达的 A549 细胞的 CCK-8 增殖及凋亡测定结果也证实 hsa_circ_0005389 具有抑制增殖与促进凋亡的功能。同时过表达 hsa_circ_0005389 的 A549 细胞 CCK-8 增殖及流式凋亡测定结果进一步证实以上结果。上皮细胞的损伤修复能力关系到ARDS的严重程度,但是内源性修复机制被特异性抑制^[11],且启动修复过程对ARDS的预后至关重要^[8]。这无形中佐证了 hsa_circ_0005389 的促炎作用。

circRNA 被发现的作用机制有很多种,它可以通过吸附 miRNA 来调控下游 mRNA,或者通过结合蛋白质来影响其功能,或者直接参与基因转录调控发挥作用^[26]。在以往相似的研究中,关于 circRNA 发挥作用的机制有较为完善的探究,如 Lu 等^[27]报道敲低 circ_0001679 通过调节 miR-12-338p/丝裂原活化蛋白激酶 1 来减轻肺损伤;Ke 等^[28]研究表明 circRNA VMA21 通过靶向 microRNA-497-5p/CD2 改善化肺损伤。相比于此类研究,本研究存在两处不足:首先 hsa_circ_0005389 的下游靶基因以及作用通路尚未明确;其次,虽已证实过表达 hsa_circ_0005389 后对 A549 细胞增殖和凋亡的作用,但未能阐明相关炎症标志物表达的动态变化。

现有研究已经表明 circRNA 在 LPS 诱导的急性呼吸窘迫综合征^[29]、急性肺损伤^[30]、创伤性肺损伤^[31]等肺损伤疾病中发挥作用,但在ARDS中,本研究基于前期研究,第一次阐述 circRNA 在ARDS中的作用,在ARDS中首次检测出差异表达的 circRNA 表达谱。在成人肺损伤疾病中, circRNA 可作为诊断或者疾病预后的潜在生物标志^[32-33],在ARDS中, hsa_circ_0005389 可能作为潜在生物标志预测疾病预后或者作为诊断标准。另外先前研究表明 miRNA 在ALI的发展和治理中发挥着重要作用, circRNA 作为 miRNA 的海绵提供了一种新的治疗思路,目前关于在急性呼吸窘迫综合征/急性肺损伤^[29,34]中 circRNA 的作用机制已有初步研究,

但是关于 circRNA 具体的分子机制和生物学功能仍需大量工作,并且在临床中验证。

综上所述,本研究表明 hsa_circ_0005389 对 LPS 诱导的 A549 细胞急性肺损伤模型有促炎作用,是 NARDS 诊断和治疗的潜在靶标,其下游分子生物学机制通路有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 迟明,梅亚波,封志纯. 新生儿急性呼吸窘迫综合征研究进展[J]. 中国当代儿科杂志, 2018, 20(9): 724-728
- [2] DE LUCA D, VAN KAAM A H, TINGAY D G, et al. The Montreux definition of neonatal ARDS: biological and clinical background behind the description of a new entity [J]. *Lancet Respir Med*, 2017, 5(8): 657-666
- [3] 中国医师协会新生儿科医师分会. “新生儿急性呼吸窘迫综合征”蒙特勒标准(2017年版)[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(19): 1456-1458
- [4] 邹远霞,张家瑜,周波,等. 新生儿急性呼吸窘迫综合征诊疗研究进展[J]. 医学研究杂志, 2021, 50(3): 129-132
- [5] MEYER N J, CALFEE C S. Novel translational approaches to the search for precision therapies for acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet Respir Med*, 2017, 5(6): 512-523
- [6] 洪小杨,封志纯. 重度儿科急性呼吸窘迫综合征临床救治的出路[J]. 中华儿科杂志, 2018, 56(5): 324-326
- [7] HONG X, ZHAO Z, LIU Z, et al. Venoarterial extracorporeal membrane oxygenation for severe neonatal acute respiratory distress syndrome in a developing country [J]. *Front Pediatr*, 2020, 8: 227
- [8] THOMPSON B T, CHAMBERS R C, LIU K D. Acute respiratory distress syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(6): 562-572
- [9] ZHU Z, LIANG L, ZHANG R, et al. Whole blood micro RNA markers are associated with acute respiratory distress syndrome [J]. *Intensive Care Med Exp*, 2017, 5(1): 38
- [10] ZHOU H, CHANDA B, CHEN Y F, et al. Microarray and bioinformatics analysis of circular RNA differential expression in newborns with acute respiratory distress syndrome [J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 728462
- [11] MATTHAY M A, ZEMANS R L, ZIMMERMAN G A, et al. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 18
- [12] LUO J, CHEN J, LI Q, et al. Differences in clinical characteristics and therapy of neonatal acute respiratory distress syndrome (ARDS) and respiratory distress syndrome (rds): a retrospective analysis of 925 cases [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 4992-4998
- [13] 中国新生儿急性呼吸窘迫综合征研究协作组基于蒙特勒标准诊断新生儿急性呼吸窘迫综合征多中心横断面调查和影响因素分析[J]. 中国循证儿科杂志, 2018, 13(1): 70-74
- [14] KITSIOS G D, YANG L, MANATAKIS D V, et al. Host-response subphenotypes offer prognostic enrichment in patients with or at risk for acute respiratory distress syndrome [J]. *Crit Care Med*, 2019, 47(12): 1724-1734
- [15] 李雯,戚迪,陈兰,等. Vaspin通过PI3K/Akt通路发挥抗炎及血管内皮保护作用减轻脂多糖致急性呼吸窘迫综合征小鼠肺损伤[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(3): 283-288
- [16] FAN S, QI D, YU Q, et al. Intermedin alleviates the inflammatory response and stabilizes the endothelial barrier in LPS-induced ARDS through the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106951
- [17] WANG X, ZHANG C, ZOU N, et al. Lipocalin-2 silencing suppresses inflammation and oxidative stress of acute respiratory distress syndrome by ferroptosis via inhibition of MAPK/ERK pathway in neonatal mice [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 508-520
- [18] CHEN Z, DONG W H, CHEN Q, et al. Downregulation of miR-199a-3p mediated by the CtBP2-HDAC1-FOXP3 transcriptional complex contributes to acute lung injury by targeting NLRP1 [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(12): 2627-2640
- [19] NING L, RUI X, GUORUI L, et al. A novel mechanism for the protection against acute lung injury by melatonin: mitochondrial quality control of lung epithelial cells is preserved through SIRT3-dependent deacetylation of SOD2 [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(12): 610
- [20] WANG B, LIN Y, ZHOU M, et al. Polysaccharides from tetrastigma hemsleyanum diels et gilg attenuate LPS-induced acute lung injury by modulating TLR4/COX-2/NF- κ B signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113755
- [21] MORTAZ E, TABARSI P, JAMAATI H, et al. Increased serum levels of soluble TNF- α receptor is associated with ICU mortality in COVID-19 patients [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 592727
- [22] PROUDFOOT A, BAYLIFFE A, O'KANE C M, et al. Novel anti-tumour necrosis factor receptor-1 (TNFR1) domain antibody prevents pulmonary inflammation in experimental acute lung injury [J]. *Thorax*, 2018, 73(8): 723-730

- [23] SINHA P, WARE L B. Selective tumour necrosis factor receptor-1 inhibition in acute lung injury: a new hope or a false dawn?[J]. *Thorax*, 2018, 73(8):699-701
- [24] TRIPATHI R, HOSSEINI K, ARAPI V, et al. SLC38A10 (SNAT10) is located in ER and golgi compartments and has a role in regulating nascent protein synthesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24):6265
- [25] TRIPATHI R, AGGARWAL T, FREDRIKSSON R. SLC38A10 transporter plays a role in cell survival under oxidative stress and glutamate toxicity[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8:671865
- [26] CHEN L L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8):475-490
- [27] LU S, WU X, XIN S, et al. Knockdown of circ_0001679 alleviates lipopolysaccharide-induced MLE-12 lung cell injury by regulating the miR-338-3p/ mitogen-activated protein kinase 1 axis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3):5803-5817
- [28] KE J, CHEN M, MA S, et al. Circular RNA VMA21 ameliorates lung injury in septic rat via targeting microRNA-497-5p/CD2-associated protein axis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3):5453-5466
- [29] XU F, CHEN R, SHEN Y, et al. CircUBXN7 suppresses cell proliferation and facilitates cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced cell injury by sponging miR-622 and regulating the IL6/STAT3 axis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2022, 153:106313
- [30] YANG C L, YANG W K, HE Z H, et al. Quietness of circular RNA circ_0054633 alleviates the inflammation and proliferation in lipopolysaccharides-induced acute lung injury model through NF- κ B signaling pathway [J]. *Gene*, 2021, 766:145153
- [31] JIANG Y, ZHU F, WU G S, et al. Microarray and bioinformatics analysis of circular RNAs expression profile in traumatic lung injury [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(1):227-234
- [32] GUO W, WANG Z, WANG S, et al. Transcriptome sequencing reveals differential expression of circRNAs in sepsis induced acute respiratory distress syndrome [J]. *Life Sci*, 2021, 278:119566
- [33] WANG J, ZHANG Y, ZHU F, et al. CircRNA expression profiling and bioinformatics analysis indicate the potential biological role and clinical significance of circRNA in influenza A virus-induced lung injury [J]. *J Biosci*, 2021, 46(2):38
- [34] LIN Q, LIANG Q, QIN C, et al. CircANKRD36 Knockdown suppressed cell viability and migration of lps-stimulated RAW264.7 cells by sponging MiR-330 [J]. *Inflammation*, 2021, 44(5):2044-2053

[收稿日期] 2022-12-31

(责任编辑:蒋莉)