

研究论文

长链非编码RNA KCNQ1OT1影响脂多糖诱导的血管内皮细胞凋亡及其炎症因子表达的机制

谢斌¹ 邓超¹ 陈栩栩¹ 王红梅² 苏醒^{1*}¹中南大学湘雅医学院附属海口医院重症医学科,海口 570203;²中南大学湘雅医学院附属海口医院检验科,海口 570203)

摘要 该研究探讨了长链非编码RNA KCNQ1OT1对脂多糖(LPS)诱导的血管内皮细胞(VEC)凋亡和炎症因子表达的影响以及其可能机制。通过体外培养VEC,分别转染KCNQ1OT1过表达载体、miR-223抑制剂或共转染KCNQ1OT1过表达载体与miR-223模拟物后,用1.0 mg/mL LPS干预24 h,然后采用RT-qPCR法检测细胞中KCNQ1OT1和miR-223的表达水平,流式细胞仪检测细胞凋亡,Western blot检测细胞中Bcl-2和Bax蛋白表达,ELISA试剂盒检测细胞培养上清中TNF- α 、IL-1和IL-6水平。双荧光素酶报告基因实验验证KCNQ1OT1与miR-223的调控关系。结果显示,LPS可抑制VEC中KCNQ1OT1的表达,而促进miR-223表达;上调KCNQ1OT1或下调miR-223后均可降低LPS诱导的VEC凋亡率、Bax蛋白及TNF- α 、IL-1和IL-6表达($P < 0.05$),而促进Bcl-2蛋白表达($P < 0.05$)。KCNQ1OT1靶向负调控miR-223表达,上调miR-223则逆转上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC凋亡及炎症因子表达的抑制作用。这表明,上调KCNQ1OT1抑制LPS诱导的VEC凋亡及炎症因子表达,其作用机制可能与靶向负调控miR-223有关,KCNQ1OT1/miR-223轴可能为血管内皮细胞损伤的治疗提供了新靶点。

关键词 血管内皮细胞; KCNQ1OT1; miR-223; 细胞凋亡; 炎症因子

LncRNA KCNQ1OT1 Affects LPS-Induced Apoptosis and Inflammatory Response of Vascular Endothelial Cells: the Underlying Mechanism

XIE Bin¹, DENG Chao¹, CHEN Xuxu¹, WANG Hongmei², SU Xing^{1*}¹Department of Critical Care Medicine, Central South University Xiangya School of Medicine Affiliated Haikou Hospital,Haikou 570203, China; ²Department of Laboratory Medicine, Central South University Xiangya School of

Medicine Affiliated Haikou Hospital, Haikou 570203, China)

Abstract This study investigated whether lncRNA KCNQ1OT1 acted on LPS-induced VEC (vascular endothelial cell) apoptosis and the expression of pro-inflammatory cytokines, as well as elucidated its action mechanism. VECs were stimulated with 1.0 mg/mL LPS for 24 h following transfection of KCNQ1OT1 overexpression vector and/or miR-223 inhibitor. The expression of KCNQ1OT1 and miR-223 was detected by RT-qPCR. Cell apoptosis was examined with flow cytometry. The protein expression of Bcl-2 and Bax was assayed by Western

收稿日期: 2020-11-18 接受日期: 2021-01-03

海南省卫生计生行业科研项目(批准号: 19A200164)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13707565260, E-mail: 280652847@qq.com

Received: November 18, 2020 Accepted: January 3, 2021

This work was supported by the Scientific Research Project of Health and Family Planning Industry in Hainan Province (Grant No.19A200164)

*Corresponding author. Tel: +86-13707565260, E-mail: 280652847@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5478>

blot. The level of TNF- α , IL-1 and IL-6 in the supernatant was measured utilizing ELISA kit. The regulatory interaction between KCNQ1OT1 and miR-223 was verified by dual-luciferase reporter assay. The results showed LPS stimulation inhibited KCNQ1OT1 expression and promoted miR-223 expression. KCNQ1OT1 upregulation or miR-223 downregulation decreased LPS-induced VEC apoptosis and the expression of Bax, TNF- α , IL-1 and IL-6 ($P < 0.05$), while increased that of Bcl-2 ($P < 0.05$). KCNQ1OT1 negatively regulated miR-223 expression, as miR-223 upregulation reversed the inhibitory effect of KCNQ1OT1 upregulation on the apoptosis of VECs and the inflammatory cytokine expression both induced by LPS. These results collectively suggest that KCNQ1OT1 upregulation inhibits LPS-induced VEC apoptosis and inflammatory response. Its action mechanism is possible associated with the negative regulation of miR-223. The KCNQ1OT1/miR-223 axis may serve as a novel target in the treatment of vascular endothelial cell injury.

Keywords vascular endothelial cells; KCNQ1OT1; miR-223; apoptosis; inflammatory factors

脓毒症是由于感染而引起的全身炎症反应综合征,其病死率极高,严重威胁患者生命安全。研究显示,血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)损伤在脓毒症的发生发展中起关键作用^[1],减轻血管内皮细胞损伤对脓毒症的治疗尤为重要。KCNQ1重叠转录物1(KCNQ1 overlapping transcript 1, KCNQ1OT1)是一种长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA),参与调控细胞凋亡及炎症因子表达,在多种疾病中发挥重要调控作用^[2-3]。有报道称,脓毒症大鼠心肌组织中KCNQ1OT1表达下调,上调其表达可调控miR-192-5p/X染色体相关凋亡抑制蛋白(X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)轴减轻脓毒症大鼠心肌损伤^[4]。lncRNA可作为竞争性内源性RNA与微小RNA(microRNA, miRNA)靶向结合,调控miRNA靶基因的表达,进而发挥生物学功能^[5]。Starbase生物信息学软件预测显示, KCNQ1OT1可能靶向结合miR-223。研究显示,氧化型低密度脂蛋白抑制了人VEC中miR-223的表达,而过表达miR-223可靶向负调控NLRP3抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的人VEC凋亡^[6]。本研究采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导VEC建立细胞损伤模型,观察KCNQ1OT1能否靶向调控miR-223影响LPS诱导的VEC炎症因子表达及其凋亡,以期对脓毒症的治疗提供分子靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自浙江天杭生物科技公司;DMEM

培养基、膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡试剂盒和二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒购自北京索莱宝公司科技有限公司; Lipofectamine™ 2000试剂盒和Trizol试剂购自美国Invitrogen公司;逆转录试剂盒和PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;PCR引物、KCNQ1OT1过表达载体(pcDNA-KCNQ1OT1)、空载体(pcDNA)、miR-223抑制剂(anti-miR-223)、抑制剂阴性对照序列(anti-miR-NC)、KCNQ1OT1突变型质粒(MUT-KCNQ1OT1)及野生型质粒(WT-KCNQ1OT1)miR-223模拟物(mimics)、模拟对照序列(miR-NC)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)和IL-6检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、B淋巴细胞瘤-2相关蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;双荧光素酶活性检测试剂盒购自美国Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 复苏VEC,将其加入至含10% FBS的DMEM培养基中培养。将对数生长长期的VEC以 5.0×10^5 个/孔接种于6孔板中,采用Lipofectamine™ 2000脂质体法分别转染pcDNA-NC、pcDNA-KCNQ1OT1、anti-miR-NC、anti-miR-223、共转染pcDNA-KCNQ1OT1与miR-NC、pcDNA-KCNQ1OT1与miR-223 mimics,转染6 h后,更换培养基。再培养24 h,收集细胞备用。

1.2.2 细胞分组 未转染的VEC分为对照组(Con组)和LPS组, Con组细胞用常规培养基培养, LPS组细胞用含1.0 mg/mL LPS的培养基培养。转染pcDNA、pcDNA-KCNQ1OT1、anti-miR-NC、anti-miR-223、共转染pcDNA-KCNQ1OT1与miR-NC、pcDNA-KCNQ1OT1与miR-223 mimics的VEC细胞均用含1.0 mg/mL LPS的培养基培养, 并分别记为LPS+pcDNA-NC组、LPS+pcDNA-KCNQ1OT1组、LPS+anti-miR-NC组、LPS+anti-miR-223组、LPS+pcDNA-KCNQ1OT1-miR-NC组、LPS+pcDNA-KCNQ1OT1-miR-223组。

1.2.3 RT-qPCR检测KCNQ1OT1和miR-223表达 各组细胞以 5.0×10^4 个/孔接种于24孔板中, 按照1.2.2进行处理, 培养24 h后, 用0.25%胰蛋白酶消化, 收集细胞。采用Trizol试剂提取细胞中总RNA, 逆转录为cDNA, 行PCR扩增。扩增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共35个循环。引物序列: KCNQ1OT1上游5'-TGG TAA GTT ACA GGG CAG GG-3', 下游5'-TGA ACA TCC ATC CCC AAG CT-3'; GAPDH上游5'-GTA GAG CGG AGG CAG AGG C-3', 下游5'-CCA GAG TCG CGG AGA TA G C-3'; miR-223上游5'-CCC ACA CGC TGC TCT CGA G-3', 下游5'-CCC CAA GGC GCG CTA GAT CGA GC-3'; U6上游5'-CGC GCC CAA CAA ACG TGA-3', 下游5'-TGC GAA AGG CAG GGG GAA-3'。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算KCNQ1OT1相对于内参GAPDH, miR-223相对于内参U6的表达水平。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 各组细胞以 5.0×10^4 个/孔接种于24孔板中, 按照1.2.2进行处理, 培养24 h后, 用0.25%胰蛋白酶消化, 收集细胞, PBS清洗2次。参照Annexin V-FITC/PI试剂盒说明书, 加500 μ L结合缓冲液, 混悬细胞。加10 μ L Annexin V-FITC, 室温避光孵育10 min。再加5 μ L PI, 室温避光孵育5 min, 上流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.5 Western blot法检测Bax和Bcl-2蛋白表达 各组细胞以 5.0×10^4 个/孔接种于24孔板中, 按照1.2.2进行处理, 培养24 h后, 用0.25%胰蛋白酶消化, 收集细胞。RIPA试剂提取细胞中总蛋白, BCA法检测蛋白定量后, 行10% SDS-PAGE电泳。电泳后, 将分离蛋白转至PVDF膜, 并于5%脱脂奶粉溶液中室温条件下封闭1 h。分别置于Bax(1:500)、Bcl-2(1:500)和GAPDH(1:1 000)一抗孵育液中, 4 °C孵育过夜。再置

于山羊抗兔二抗(1:1 000)孵育液中, 37 °C孵育1 h。加显影液避光显影, 曝光拍照。

1.2.6 ELISA试剂盒检测TNF- α 、IL-1和IL-6水平 各组细胞以 5.0×10^4 个/孔接种于24孔板中, 按照1.2.2进行处理, 培养24 h后, 收集细胞培养上清液, 3 500 r/min离心5 min, 保留上清。分别参照TNF- α 、IL-1和IL-6试剂盒说明书检测上清中其表达水平。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 将对数生长期的VEC以 5.0×10^5 个/孔接种于6孔板中, 用Lipofectamine™ 2000脂质体法, 分别共转染WT-KCNQ1OT1与miR-NC或miR-223 mimics、MUT-KCNQ1OT1与miR-NC或miR-223 mimics。转染6 h后, 更换培养基。再培养24 h, 收集细胞。参照双荧光素酶活性检测试剂盒说明书, 检测细胞荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

SPSS 22.0软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较用独立样本t检验; 多组间比较用单因素方差分析。进一步两两比较用SNK-q检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS对VEC细胞中KCNQ1OT1和miR-223表达的影响

如表1所示, 与Con组比较, LPS组VEC细胞中KCNQ1OT1表达水平降低($P < 0.05$), 而miR-223表达水平升高($P < 0.05$)。

2.2 上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC细胞炎症因子表达的影响

如表2所示, 与Con组比较, LPS组TNF- α 、IL-1和IL-6水平均升高($P < 0.05$); 与LPS+pcDNA-NC组比较, LPS+pcDNA-KCNQ1OT1组TNF- α 、IL-1和IL-6水平均降低($P < 0.05$)。

2.3 上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC细胞凋亡的影响

如图1所示, 与Con组比较, LPS组VEC细胞凋亡率、Bax蛋白表达升高($P < 0.05$), 而Bcl-2蛋白表达降低($P < 0.05$); 与LPS+pcDNA-NC组比较, LPS+pcDNA-KCNQ1OT1组细胞中KCNQ1OT1表达升高($P < 0.05$), VEC细胞凋亡率、Bax蛋白表达降低($P < 0.05$), 而Bcl-2蛋白表达升高($P < 0.05$)。

2.4 KCNQ1OT1靶向调控miR-223的表达

如图2所示, 生物信息学软件预测显示, KC-

表1 KCNQ1OT1和miR-223在LPS诱导的VEC中的表达($n=5$)Table 1 The expression of KCNQ1OT1 and miR-223 in VEC induced by LPS ($n=5$)

分组 Group	KCNQ1OT1	miR-223
Con	0.99±0.03	1.01±0.02
LPS	0.43±0.02*	3.43±0.03
<i>t</i>	16.550	64.420
<i>P</i>	<0.001	<0.001

* $P<0.05$, 与Con组比较。* $P<0.05$ compared with Con group.表2 上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC培养上清液中IL-1、IL-6和TNF- α 表达的影响($n=5$)Table 2 The effect of up-regulating KCNQ1OT1 on the expression of IL-1, IL-6 and TNF- α in VEC culture supernatant induced by LPS ($n=5$)

分组 Group	TNF- α /ng·mL ⁻¹	IL-1 /ng·mL ⁻¹	IL-6 /ng·mL ⁻¹
Con	0.78±0.02	0.13±0.01	0.15±0.01
LPS	1.19±0.04*	0.22±0.01*	0.25±0.04*
LPS+pcDNA-NC	1.16±0.01	0.21±0.01	0.23±0.01
LPS+pcDNA-KCNQ1OT1	0.90±0.03 [#]	0.16±0.01 [#]	0.20±0.01 [#]
<i>F</i>	46.760	19.010	4.361
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

* $P<0.05$, 与Con组比较; [#] $P<0.05$, 与LPS+pcDNA-NC组比较。* $P<0.05$ compared with Con group; [#] $P<0.05$ compared with LPS+pcDNA-NC group.表3 双荧光素酶报告基因结果($n=5$)Table 3 The luciferase activity in VEC by dual-luciferase reporter assay ($n=5$)

分组 Group	荧光素酶活性 Luciferase activity
LPS+pcDNA-WT-KCNQ1OT1-miR-NC	1.01±0.02
LPS+pcDNA-WT-KCNQ1OT1-miR-223 mimics	0.39±0.01*
LPS+pcDNA-MUT-KCNQ1OT1-miR-NC	0.95±0.05
LPS+pcDNA-MUT-KCNQ1OT1-miR-223 mimics	1.02±0.03
<i>t</i>	27.050
<i>P</i>	<0.05

* $P<0.05$, 与LPS+pcDNA-WT-KCNQ1OT1-miR-NC组比较。* $P<0.05$ compared with LPS+pcDNA-WT-KCNQ1OT1-miR-NC group.

NQ1OT1与miR-223的核苷酸序列存在连续结合位点。双荧光素酶报告基因实验结果(表3)显示, 与共转染WT-KCNQ1OT1与miR-NC的细胞比较, 共转染WT-KCNQ1OT1与miR-223 mimics的细胞荧光素酶活性显著降低($P<0.05$), 而共转染MUT-KCNQ1OT1与miR-NC的细胞比较, 共转染MUT-KCNQ1OT1与miR-223 mimics的细胞荧光素酶活性无显著变化($P=0.547$), 说明KCNQ1OT1可靶向结合miR-223。同时, 转染pcDNA-KCNQ1OT1的细胞中miR-223表达显著低于转染pcDNA-NC的细胞(0.40 ± 0.02 vs 0.99 ± 0.01 , $P<0.05$), 进一步说明KCNQ1OT1负调控

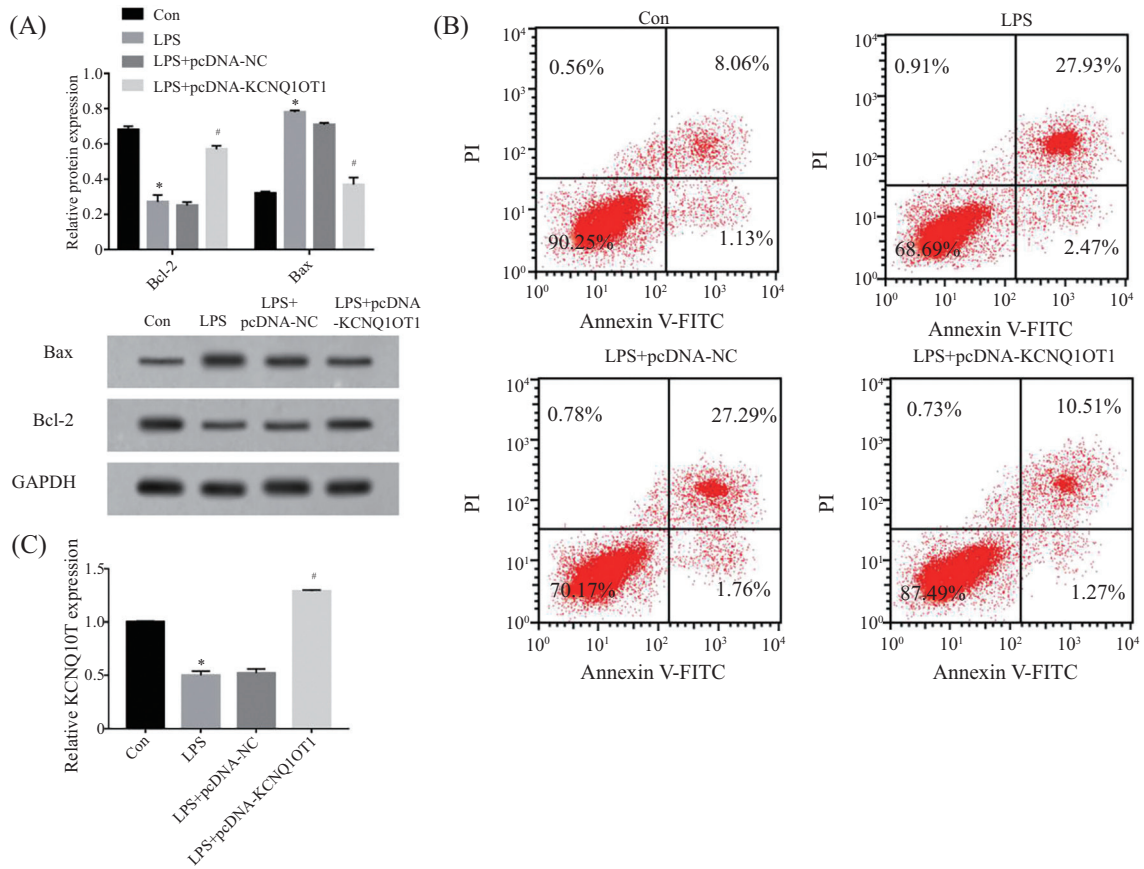
miR-223。

2.5 下调miR-223对LPS诱导的VEC细胞炎性因子表达及凋亡的影响

如图3和表4所示, 与LPS+anti-miR-NC组比较, LPS+anti-miR-223组VEC细胞中miR-223表达降低($P<0.05$), TNF- α 、IL-1和IL-6水平均降低($P<0.05$), 细胞凋亡率、Bax蛋白表达降低($P<0.05$), 而Bcl-2蛋白表达升高($P<0.05$)。

2.6 上调miR-223逆转上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC炎性因子表达及凋亡的影响

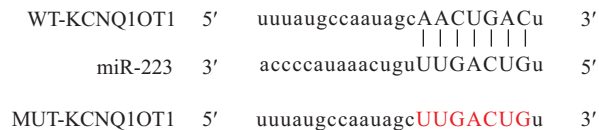
如图4和表5所示, 与LPS+pcDNA-KCNQ1OT1-



A: 上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC中Bcl-2和Bax蛋白表达的影响; B: 上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC凋亡的影响; C: 上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC中KCNQ1OT1表达的影响。* $P < 0.05$, 与Con组比较; # $P < 0.05$, 与LPS+pcDNA-NC组比较。
 A: the effect of up-regulating KCNQ1OT1 on the protein expression of Bcl-2 and Bax in VEC induced by LPS; B: the effect of up-regulating KCNQ1OT1 on the apoptosis of VEC induced by LPS; C: the effect of up-regulating KCNQ1OT1 on the expression of KCNQ1OT1 in VEC induced by LPS. * $P < 0.05$ compared with the Con group; # $P < 0.05$ compared with the LPS+pcDNA-NC group.

图1 上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC细胞凋亡及Bcl-2和Bax蛋白表达的影响

Fig.1 The effect of up-regulating KCNQ1OT1 on the apoptosis of VEC induced by LPS and the protein expression of Bcl-2 and Bax



标红色的碱基表示突变碱基。

The bases marked in red indicates mutated bases.

图2 KCNQ1OT1与miR-223互补的核苷酸序列

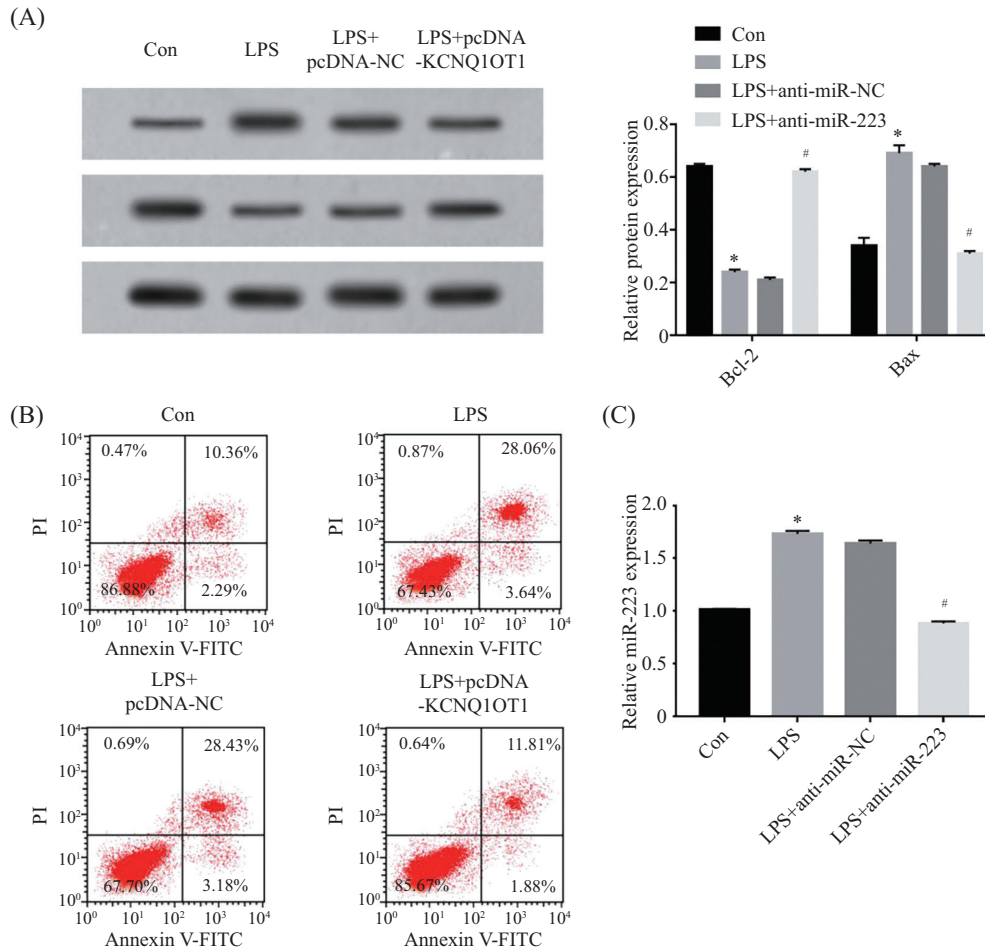
Fig.2 The complementary nucleotide sequence between KCNQ1OT1 and miR-223

miR-NC组比较, LPS+pcDNA-KCNQ1OT1-miR-223组VEC细胞中miR-223表达升高($P < 0.05$), TNF- α 、IL-1和IL-6水平均升高($P < 0.05$), 细胞凋亡率、Bax蛋白表达升高($P < 0.05$), 而Bcl-2蛋白表达降低($P < 0.05$)。

3 讨论

脓毒症多见于大型手术、严重创伤及休克后,

是临床重症监护病房危重病患者死亡的常见原因之一。目前, 脓毒症发病机制尚未明确, 且临床缺乏有效的治疗方法。研究显示, 多数脓症患者免疫失调, 大量炎症介质释放, 导致血管内皮细胞受损、血管通透性增加、血小板聚集、机体凝血功能异常等, 进而引起多器官功能障碍综合征和炎症反应综合征^[7]。因此, 血管内皮细胞细胞损伤与脓毒症



A: 下调miR-223对LPS诱导的VEC中Bcl-2和Bax蛋白表达的影响; B: 下调miR-223对LPS诱导的VEC凋亡的影响; C: 下调miR-223对LPS诱导的VEC中miR-223表达的影响。* $P < 0.05$, 与Con组比较; # $P < 0.05$, 与LPS+anti-miR-NC组比较。

A: the effect of down-regulating miR-223 on the protein expression of Bcl-2 and Bax in VEC induced by LPS; B: the effect of down-regulating miR-223 on the apoptosis of VEC induced by LPS; C: the effect of down-regulating miR-223 on the expression of miR-223 in VEC induced by LPS. * $P < 0.05$ compared with Con group; # $P < 0.05$ compared with LPS+anti-miR-NC group.

图3 下调miR-223对LPS诱导的VEC凋亡及Bcl-2和Bax蛋白表达的影响

Fig.3 The effect of down-regulating miR-223 on the apoptosis of VEC induced by LPS and the protein expression of Bcl-2 and Bax

表4 下调miR-223对LPS诱导的VEC细胞炎症因子表达的影响($n=5$)

Table 4 The effect of down-regulating miR-223 on the expression of inflammatory factors in VEC induced by LPS ($n=5$)

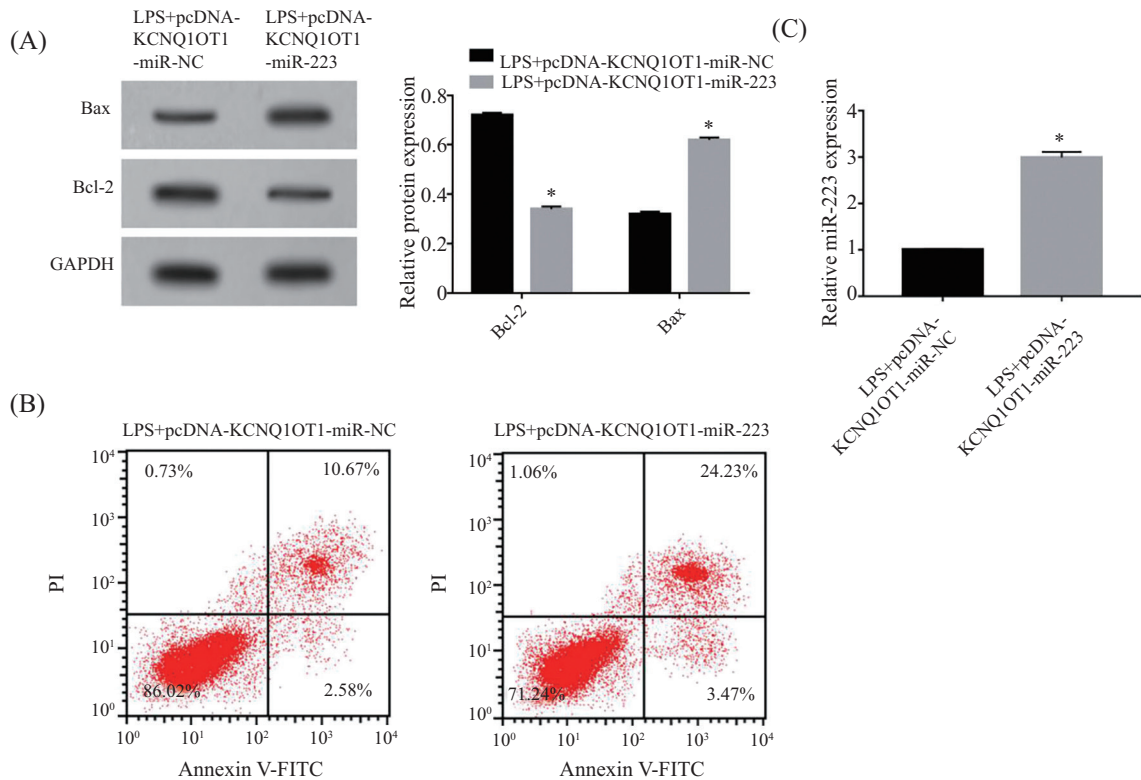
分组 Group	TNF- α /ng·mL ⁻¹	IL-1 /ng·mL ⁻¹	IL-6 /ng·mL ⁻¹
Con	0.77±0.02	0.16±0.01	0.17±0.01
LPS	1.21±0.01*	0.23±0.01*	0.26±0.01*
LPS+anti-miR-NC	1.19±0.01	0.20±0.01	0.23±0.01
LPS+anti-miR-223	0.96±0.03#	0.18±0.01#	0.20±0.01#
<i>F</i>	127.700	14.500	23.770
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$, 与Con组比较; # $P < 0.05$, 与LPS+anti-miR-NC组比较。

* $P < 0.05$ compared with Con group; # $P < 0.05$ compared with LPS+anti-miR-NC group.

的发生发展密切相关,减轻血管内皮细胞损伤对防治脓毒症的发生发展非常重要。LPS是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,LPS诱导的脓毒症可导致组

织细胞损伤,加重炎症反应,导致组织细胞坏死和凋亡,最终引起器官功能衰竭^[8]。本研究显示,LPS加剧了血管内皮细胞炎症因子TNF- α 、IL-1和IL-6的



A: 上调miR-223逆转上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC中Bcl-2和Bax蛋白表达的影响; B: 上调miR-223逆转上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC凋亡的影响; C: 上调miR-223逆转上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC中miR-223表达的影响。**P*<0.05, 与LPS+pcDNA-KCNQ1OT1组比较。

A: up-regulating miR-223 reversed the effect of up-regulating KCNQ1OT1 on the protein expression of Bcl-2 and Bax in VEC induced by LPS. B: up-regulating miR-223 reversed the effect of up-regulating KCNQ1OT1 on LPS-induced VEC apoptosis; C: up-regulating miR-223 reversed the effect of up-regulating KCNQ1OT1 on the expression of miR-223 in VEC induced by LPS. **P*<0.05 compared with LPS+pcDNA-KCNQ1OT1 group.

图4 上调miR-223逆转上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC凋亡及Bcl-2和Bax蛋白表达的影响

Fig.4 Up-regulating miR-223 reversed the effect of up-regulating KCNQ1OT1 on LPS-induced VEC apoptosis and the protein expression of Bcl-2 and Bax

表5 上调miR-223逆转上调KCNQ1OT1对LPS诱导的VEC细胞炎症因子表达的影响(*n*=5)

Table 5 Up-regulating miR-223 reversed the effect of up-regulating KCNQ1OT1 on the expression of inflammatory factors in VEC induced by LPS (*n*=5)

分组 Group	TNF- α /ng·mL ⁻¹	IL-1 /ng·mL ⁻¹	IL-6 /ng·mL ⁻¹
LPS+KCNQ1OT1-anti-miR-NC	0.91±0.01	0.19±0.01	0.22±0.01
LPS+KCNQ1OT1-anti-miR-223	1.31±0.01*	0.28±0.02*	0.29±0.01*
<i>t</i>	21.440	6.016	4.362
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与LPS+KCNQ1OT1-anti-miR-NC组比较。

**P*<0.05 compared with LPS+KCNQ1OT1-anti-miR-NC group.

表达及凋亡, 与相关报道结果一致^[9], 说明LPS诱导的血管内皮细胞损伤模型建立成功。

作为一种lncRNA, KCNQ1OT1参与调控多种细胞增殖、凋亡和炎症反应, 是多种疾病的潜在治疗靶点。研究显示, KCNQ1OT1在急性心肌梗死小鼠模型心脏微血管内皮细胞中高表达, 敲减其表达可减轻心脏微血管内皮细胞凋亡和炎症反应^[10]; 抑

制KCNQ1OT1可降低氧糖剥夺/再灌注诱导的心肌细胞凋亡及炎症因子TNF- α 、IL-6和IL-1 β 表达, KCNQ1OT1可作为预防急性心肌梗死后的心肌缺血再灌注损伤的分子靶点^[11]; 敲减KCNQ1OT1降低了氧糖剥夺/再灌注诱导的神经元炎症反应、氧化应激和凋亡, 其作用机制与调控miR-140-3p/低氧诱导因子1 α 轴有关, 为脑缺血性中风的治疗提供了新靶点^[12]。但

KCNQ1OT1对血管内皮细胞损伤的影响和调控机制还未见相关报道。

TNF- α 和IL-6是重要的促炎因子,可通过生成细胞因子和炎性趋化因子激活炎症级联反应,增加内皮黏附因子的表达,促进中性粒细胞对血管内皮细胞的黏附,进而引起靶器官损伤^[13]。IL-1可促进多种炎症因子的产生和释放,且与TNF- α 具有协同作用,促进血管内皮细胞黏附分子的表达,增加血管内皮的通透性,加重多器官损伤^[14]。本研究显示,LPS抑制了血管内皮细胞中KCNQ1OT1的表达,而上调KCNQ1OT1降低了LPS诱导的血管内皮细胞TNF- α 、IL-1和IL-6的表达,说明上调KCNQ1OT1可抑制LPS诱导的血管内皮细胞炎症反应。

过度的炎症反应可引起组织细胞凋亡,引起机体组织损伤。本研究显示,上调KCNQ1OT1表达降低了LPS诱导的血管内皮细胞凋亡率,提示上调KCNQ1OT1表达可抑制LPS诱导的血管内皮细胞。细胞凋亡是一种程序性死亡过程,受多种基因分子的调控。Bax和Bcl-2在细胞凋亡过程中起重要调控作用,其中Bax是促凋亡分子,其表达升高形成同源二聚体,引起线粒体膜通透性改变,细胞色素C释放量增加,激活下游caspases级联反应,进而诱导细胞凋亡;而Bcl-2是抗凋亡分子,其表达升高时则与Bax形成异源二聚体,抑制Bax的促凋亡作用^[15]。本研究显示,上调KCNQ1OT1抑制了LPS诱导的血管内皮细胞中Bax蛋白的表达,而促进了Bcl-2蛋白的表达,进一步说明上调KCNQ1OT1抑制了LPS诱导的血管内皮细胞凋亡。

为了进一步探究KCNQ1OT1抑制LPS诱导的血管内皮细胞炎症反应和凋亡的分子机制,本研究利用双荧光素酶报告基因实验证实了KCNQ1OT1可靶向结合miR-223,且上调KCNQ1OT1抑制了细胞中miR-223的表达,进一步说明了KCNQ1OT1负调控miR-223表达。研究显示,miR-223在柯萨奇病毒B3诱导的病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)小鼠模型中表达降低,上调其表达可靶向抑制TNF-6的表达提高VMC小鼠存活率,减轻心肌炎症^[16]。上调miR-223可能通过抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3炎性小体表达来减轻血栓闭塞性血管炎大鼠血栓形成和炎症反应^[17]。本研究显示,LPS促进了血管内皮细胞中miR-223的表达,而下调miR-223抑制了LPS诱导的血管内皮细胞凋亡及炎性因子TNF- α 、

IL-1和IL-6的表达,说明miR-223可作为减轻血管内皮细胞损伤的分子靶点。本研究还显示,上调miR-223逆转了上调KCNQ1OT1对LPS诱导的血管内皮细胞凋亡及炎性因子TNF- α 、IL-1和IL-6表达的抑制作用,提示上调KCNQ1OT1通过靶向负调控miR-223的表达来减轻LPS诱导的血管内皮细胞凋亡及炎性损伤。

此外,LPS还可诱导血管内皮细胞产生氧化应激,过度的氧化应激也可引起血管内皮细胞凋亡。KCNQ1OT1和miR-223除参与调控细胞凋亡和炎症反应之外,还参与调控细胞氧化应激水平。有报道称,KCNQ1OT1可靶向miR-140-3p缓解氧糖剥夺/再灌注引起的PC12细胞的炎症、氧化应激和细胞凋亡,为脑缺血性中风的治疗提供了新的分子靶点^[18];靶向上调miR-223可降低过氧化氢引起的人晶状体上皮细胞氧化应激及细胞凋亡^[19];miR-223基因的表达缺失可加剧乙醇诱导的肝损伤、中性粒细胞浸润、活性氧以及IL-6表达上调^[20]。这提示,KCNQ1OT1还可能通过靶向miR-223影响LPS诱导的血管内皮细胞氧化应激水平。

综上,LPS可促进血管内皮细胞炎性因子的表达和凋亡,诱导血管内皮细胞损伤。上调KCNQ1OT1可能通过靶向抑制miR-223表达降低LPS诱导的血管内皮细胞炎性因子表达及细胞凋亡,KCNQ1OT1/miR-223轴可能为减轻血管内皮细胞损伤及防治脓毒症的治疗提供新的分子靶点。

参考文献 (References)

- [1] 王静,戴琳,于鲁欣,等.过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 激动剂对脓毒症大鼠内皮损伤的作用[J].中华医学杂志(WANG J, DAI L, YU L X, et al. Effects of proliferator-activated receptor- γ agonist on vascular endothelial injuries in septic rats [J]. Natl Med J China), 2015, 95(15): 1179-83.
- [2] WANG H J, TANG X L, HUANG G, et al. Long non-coding KCNQ1OT1 promotes oxygen-glucose-deprivation/reoxygenation-induced neurons injury through regulating miR-153-3p/FOXO3 axis [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2020, 29(10): 105126-36.
- [3] JIANG X H, YU M H, ZHU T P, et al. Kcnq1ot1/miR-381-3p/ETS2 axis regulates inflammation in mouse models of acute respiratory distress syndrome [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19(5): 179-89.
- [4] SUN F Y, YUAN W F, WU H, et al. LncRNA KCNQ1OT1 attenuates sepsis-induced myocardial injury via regulating miR-192-5p/XIAP axis [J]. Exp Biol Med, 2020, 245(7): 620-30.
- [5] LIANG D S, JIN Y M, LIN M M, et al. Down-regulation of Xist and Mir-7a-5p improves LPS-induced myocardial injury [J]. Int J Med Sci, 2020, 17(16): 2570-7.

- [6] WANG X M, LI X W, WU Y H, et al. Upregulation of miR-223 abrogates NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis to attenuate oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced cell death in human vascular endothelial cells (ECs) [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2020, 56(8): 670-9.
- [7] 刘峰. MicroRNA-23b对脓毒症血管内皮细胞炎症因子表达的调节及机制探讨[J]. *现代中西医结合杂志*(LIU F. Discussion on the regulation of MicroRNA-23b on expression of inflammation factor of vascular endothelial cells in sepsis and its mechanism [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*), 2017, 26(34): 3797-800.
- [8] 宋洁琼, 吴威, 陈嵩, 等. 褪黑素对脂多糖诱导的脓毒症大鼠肺损伤的保护作用[J]. *中国临床医学*(SONG J Q, WU W, CHEN S, et al. Protective effects of melatonin on lung injury induced by lipopolysaccharide in rats with sepsis [J]. *Chin Clin Med*), 2016, 23(5): 550-3.
- [9] 刘源, 李利娜, 高路, 等. 桂皮醛对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞炎症反应及凋亡的影响及其机制[J]. *中华心血管病杂志*(LIU Y, LI L N, GAO L, et al. Cinnamaldehyde attenuates lipopolysaccharide induced inflammation and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chin J Cardiol*), 2019, 47(6): 465-70.
- [10] WANG Y B, YANG X D, JIANG A, et al. Methylation-dependent transcriptional repression of RUNX3 by KCNQ1OT1 regulates mouse cardiac microvascular endothelial cell viability and inflammatory response following myocardial infarction [J]. *FASEB J*, 2019, 33(12): 13145-60.
- [11] LI X, DAI Y N, YAN S J, et al. Down-regulation of lncRNA KCNQ1OT1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(4): 1026-33.
- [12] YI M, LI Y, WANG D, et al. KCNQ1OT1 exacerbates ischemia-reperfusion injury through targeted inhibition of miR-140-3p [J]. *Inflammation*, 2020, 43(5): 1832-45.
- [13] ZHANG T, LI K, ZHANG Z L, et al. LncRNA airsei increases the inflammatory response after spinal cord injury in rats through the nuclear factor kappa B signaling pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(4): 772-7.
- [14] WANG S M, LIU G Q, XIAN H B, et al. LncRNA NEAT1 alleviates sepsis-induced myocardial injury by regulating the TLR2/NF- κ B signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11): 4898-907.
- [15] ZHU Y H, CHEN X B, ZHENG C H, et al. Down-regulation of LncRNA UCA1 alleviates liver injury in rats with liver cirrhosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(2): 455-65.
- [16] XUE Y L, ZHANG S X, ZHENG C F, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits M2 macrophage polarization by activating TRAF6 via microRNA-223 down-regulation in viral myocarditis [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12341-54.
- [17] ZHOU H, LI C L, XIA P Z, et al. MiR-223 alleviates thrombus and inflammation in thromboangiitis obliterans rats by regulating NLRP3 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(20): 10605-11.
- [18] YI M, LI Y, WANG D, et al. KCNQ1OT1 exacerbates ischemia-reperfusion injury through targeted inhibition of miR-140-3P [J]. *Inflammation*, 2020, 43(5): 1832-45.
- [19] TU Y Y, XIE L Q, CHEN L L, et al. Long non-coding RNA MEG3 promotes cataractogenesis by upregulating TP53INP1 expression in age-related cataract [J]. *Exp Eye Res*, 2020, 199: 108185-93.
- [20] LI M, HE Y, ZHOU Z, et al. MicroRNA-223 ameliorates alcoholic liver injury by inhibiting the IL-6-p47-oxidative stress pathway in neutrophils [J]. *Gut*, 2017, 66(4): 705-15.