

circSAMD4A靶向miR-141-3p对肺泡上皮细胞损伤的作用和机制

张红^{1*} 丁亮² 陈思³

(¹南通市海门区人民医院, 重症医学科, 南通 226100; ²南通大学附属医院, 呼吸与危重症医学科, 南通 226006; ³南通市海门区人民医院, 呼吸与危重症医学科, 南通 226100)

摘要 该文旨在探讨circSAMD4A对肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)诱导的肺泡上皮细胞损伤的作用, 并分析其分子机制。将肺泡上皮细胞分为对照组、感染组、感染+si-circSAMD4A组、感染+si-NC组、感染+miR-141-3p组、感染+miR-NC组、感染+si-circSAMD4A+anti-miR-NC组、感染+si-circSAMD4A+anti-miR-141-3p组; qRT-PCR测定circSAMD4A和miR-141-3p水平; 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定IL-6、IL-10水平; 流式细胞术检测细胞凋亡率; 蛋白质印迹法检测Cleaved-caspase3和Cleaved-caspase9蛋白水平; 双荧光素酶报告实验检测circSAMD4A和miR-141-3p的靶向关系。SP诱导的肺泡上皮细胞中circSAMD4A表达水平、IL-6水平、细胞凋亡率、Cleaved-caspase3和Cleaved-caspase9蛋白表达水平升高, miR-141-3p和IL-10表达水平、细胞活力降低($P<0.05$)。干扰circSAMD4A或过表达miR-141-3p后, IL-10水平、细胞活力升高, IL-6水平降低, 细胞凋亡率和Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase9蛋白表达水平降低($P<0.05$)。circSAMD4A靶向调控miR-141-3p。下调miR-141-3p导致干扰circSAMD4A对SP诱导的肺泡上皮细胞凋亡、细胞活力和炎症因子表达的影响降低。干扰circSAMD4A通过靶向上调miR-141-3p抑制肺泡上皮细胞损伤。

关键词 circSAMD4A; miR-141-3p; 肺炎链球菌; 肺泡上皮细胞; 损伤; 炎症

Effect and Mechanism of circSAMD4A Targeting miR-141-3p on Alveolar Epithelial Cell Injury

ZHANG Hong^{1*}, DING Liang², CHEN Si³

(¹Department of Critical Medicine, Haimen District People's Hospital, Nantong 226100, China;

²Department of Respiratory and Critical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226006, China;

³Department of Respiratory and Critical Medicine, Haimen District People's Hospital, Nantong 226100, China)

Abstract This study is aimed to investigate the effect of circSAMD4A on the injury of alveolar epithelial cells induced by SP (*Streptococcus pneumoniae*) and analyze its molecular mechanism. Alveolar epithelial cells were divided into control group, infection group, infection+si-circSAMD4A group, infection+si-NC group, infection+miR-141-3p group, infection+miR-NC group, infection+si-circSAMD4A+anti-miR-NC group, and infection+si-circSAMD4A+anti-miR-141-3p group. qRT-PCR was used to detect the expression of circSAMD4A and miR-141-3p. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was used to detect the levels of IL-6 and IL-10. Flow cytometry was used to detect the cell apoptosis rate. Western blot was used to detect protein expression of

收稿日期: 2022-08-19

接受日期: 2022-12-16

2021年度南通市基础研究和民生科技计划指导性项目(批准号: JCZ21059)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18851306245, E-mail: htgffy@163.com

Received: August 19, 2022

Accepted: December 16, 2022

This study was supported by the Guiding Project of Nantong Basic Research and Livelihood Science and Technology Plan in 2021 (Grant No. JCZ21059)

*Corresponding author. Tel: +86-18851306245, E-mail: htgffy@163.com

Cleaved-caspase3 and Cleaved-caspase9. Dual luciferase reporter experiment was used to detect the targeting relationship between circSAMD4A and miR-141-3p. The expression level of circSAMD4A in the alveolar epithelial cells induced by SP was increased; the expression level of miR-141-3p was decreased, the level of IL-10 and cell viability were decreased; the level of IL-6 was increased; the cell apoptosis rate and the expression levels of Cleaved-caspase3 and Cleaved-caspase9 were increased ($P<0.05$). After interference with circSAMD4A or over-expression of miR-141-3p, IL-10 level and cell viability were increased; IL-6 level was decreased; cell apoptosis rate and Cleaved-caspase3 and Cleaved-caspase9 expression levels were decreased ($P<0.05$). circSAMD4A targeted miR-141-3p. Down-regulating the expression of miR-141-3p led to reduced effects of interfering with circSAMD4A on SP-induced alveolar epithelial cell apoptosis, cell viability and inflammatory factor expression. Interference with circSAMD4A can inhibit the damage of alveolar epithelial cells induced by SP by targeting and up-regulating miR-141-3p.

Keywords circSAMD4A; miR-141-3p; *Streptococcus pneumoniae*; alveolar epithelial cells; injury; inflammation

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)是威胁人类健康的重要病原菌,也是社区获得性肺炎最常见的致病菌和急性呼吸窘迫综合征等的重要死因之一。SP可使肺泡上皮细胞损伤与炎症浸润进而导致肺组织纤维化以及坏死,是肺炎发生发展的主要原因,探究SP感染的发病机制有利于肺炎的治疗^[1-3]。研究报道 lncRNA ZEB1-AS1通过调控 miR-141-3p/ZEB1介导的上皮-间质转化促进肺纤维化^[4]。miR-141-3p与II型肺泡上皮细胞的凋亡密切相关^[5]。miR-141-3p过表达可抑制SP诱导的肺上皮细胞凋亡,促进细胞增殖^[6]。然而,miR-141-3p对SP诱导的肺泡上皮细胞炎症的影响及分子机制尚不清楚。生物学软件预测结果表明,miR-141-3p与 circSAMD4A有结合位点。circRNA参与细胞增殖、分化等过程,可通过海绵化miRNA而发挥一系列作用,研究报道缺氧/复氧诱导的心肌细胞中 circSAMD4A表达上调,抑制 circSAMD4A表达可减少缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡并缓解炎症^[7],研究人员猜测 circSAMD4A可能在细胞中发挥促炎、促凋亡作用,而 circSAMD4A能否影响肺泡上皮细胞损伤尚且未知。本实验的目的是研究 circSAMD4A/miR-141-3p轴对肺泡上皮细胞损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

肺泡上皮细胞、SP购自美国 ATCC; TRIzol试剂、荧光定量PCR试剂盒购自日本 TaKaRa公司; IL-6 ELISA、IL-10 ELISA试剂盒购自南京赛泓瑞生物科技有限公司;凋亡试剂盒、蛋白提取试剂盒、双荧光素酶报

告基因检测试剂盒均购自上海贝博生物科技有限公司;兔抗Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase9、GAPDH、HPR标记的羊抗兔二抗购自美国Abcam公司。

1.2 细胞处理与分组

肺泡上皮细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,将经SP(1×10^8 CFU/mL)感染的肺泡上皮细胞记为感染组,未经SP感染的细胞作为对照组;将50 nmol/L circSAMD4A小干扰RNA(si-circSAMD4A,序列5'-GGC UGA UCA CCC UGT ACU CGC TT-3')、阴性对照(si-NC,序列5'-GGC UGA UCA CCC CUG GUG UUA TT-3')、miR-141-3p模拟物(mimics,序列正向5'-UAU UGC ACA UUA CUA AGU UGC A-3',反向5'-CAA CUU AGU AAU GUG CAA UAU U-3')及对照(miR-NC,序列5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACU GUU-3')(均由上海生工生物工程股份有限公司提供)转染至肺泡上皮细胞(均由Lipofectamine 3000试剂进行转染),再用SP(1×10^8 CFU/mL)进行感染,分别记为感染+si-circSAMD4A组、感染+si-NC组、感染+miR-141-3p组、感染+miR-NC组;将si-circSAMD4A分别与miR-141-3p抑制剂(anti-miR-141-3p)及阴性对照(anti-miR-NC)共转染至肺泡上皮细胞,再用 1×10^8 CFU/mL SP进行感染,分别记为感染+si-circSAMD4A+anti-miR-141-3p组、感染+si-circSAMD4A+anti-miR-NC组,本实验均设置3个复孔,并重复3次。

1.3 qRT-PCR检测circSAMD4A和miR-141-3p的表达水平

用TRIzol试剂对细胞中的总RNA进行提取,用特定的逆转录试剂盒将其逆转录成cDNA,进行PCR

扩增, circSAMD4A正向引物5'-ACT GGC AGG ACA AAA GCA TG-3', 反向引物5'-CAG GAT TTT GGG CAG CAG TT-3'; *GAPDH*正向引物5'-TAT GAT GAT ATC AAG AGG GTA GT-3', 反向引物5'-TGT ATC CAA ACT CAT TGT CAT AC-3'; miR-141-3p正向引物5'-GGT CCT AAC ACT GTC TGG TAA AGT GG-3', 反向引物5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; *U6*正向引物5'-TGC GGG YGC YCG CYY CGG CAG C-3', 反向引物5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。设定程序为95 °C预变性15 min, 95 °C变性10 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸32 s, 40个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算circSAMD4A相对于*GAPDH*、miR-141-3p相对于*U6*的表达量。

1.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测IL-6和IL-10水平

对各组细胞培养48 h后的上清液以3 000 r/min离心20 min, 通过ELISA法, 利用IL-6 ELISA试剂盒和IL-10 ELISA试剂盒检测上清中IL-6、IL-10的水平。

1.5 细胞活性测定

收集各组细胞, 消化后接种于96孔板, 每孔加入10 μ L MTT试剂, 37 °C孵育4 h后弃上清, 加入100 μ L DMSO, 混匀, 测定490 nm波长处的吸光度(*D*)值, 细胞活力=(*D*实验组/*D*对照组)×100%。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况

PBS漂洗各组细胞2次, 重悬细胞(5×10^5 个/mL), 按细胞凋亡试剂盒说明书进行操作, 用流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.7 蛋白质印迹法检测Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase9蛋白表达情况

提取各组细胞总蛋白并以BCA试剂盒定量, SDS-PAGE电泳后转膜至PVDF膜。5%脱脂奶粉室温避光封闭2 h后加入Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase9多克隆抗体(稀释比例为1:1 000), 以*GAPDH*

作为内参(稀释比例为1:5 000), 4 °C孵育过夜, TBST洗膜3次, 加入二抗(稀释比例为1:5 000)于室温孵育2 h, TBST洗膜3次, 计算蛋白表达情况。

1.8 双荧光素酶报告实验

利用StarBase生信网站预测circSAMD4A与miR-141-3p之间的结合位点。构建circSAMD4A 3'UTR野生型(WT-circSAMD4A)与突变型(MUT-circSAMD4A), 将WT-circSAMD4A和MUT-circSAMD4A分别与miR-NC或miR-141-3p mimics共转染至肺泡上皮细胞, 48 h后, 测定细胞中的荧光素酶活性。

1.9 统计学分析

用SPSS 20.0软件进行统计学分析。用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示计量资料。用独立样本*t*检验进行两组间比较。用单因素方差分析比较多组间数据, 并进一步采用LSD-*t*检验比较组间数据。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SP对肺泡上皮细胞形态的影响

对照组细胞呈鹅卵石样, 细胞大小均匀、排列紧密, 细胞间无明显间隙; 感染组细胞可见较多圆形细胞, 细胞间隙变大, 细胞核变大。感染+si-NC组细胞表现与感染组差异不明显; 与感染组相比, 感染+si-circSAMD4A组细胞排列整齐, 细胞间隙变小(图1)。

2.2 SP对肺泡上皮细胞中circSAMD4A和miR-141-3p表达的影响

感染组肺泡上皮细胞中circSAMD4A表达水平较对照组显著升高(2.62 ± 0.24 vs 1.00 ± 0.00 , $t = 20.250$, $P < 0.05$), miR-141-3p表达水平较对照组显著降低(0.34 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.00 , $t = 66.000$, $P < 0.05$)(表1)。

2.3 干扰circSAMD4A对SP诱导的肺泡上皮细胞损伤的影响

circSAMD4A在转染si-circSAMD4A的肺泡上皮

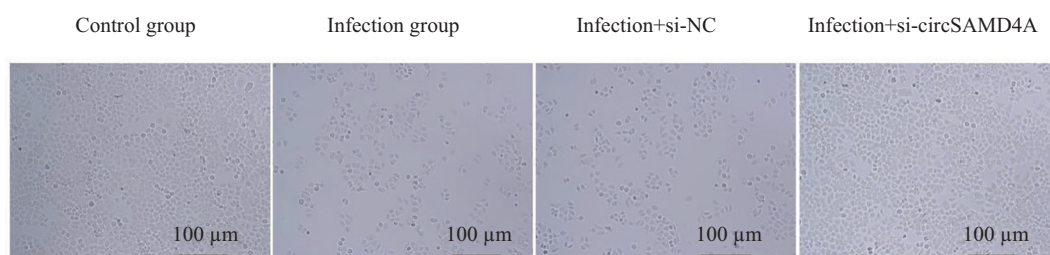


图1 各组细胞形态比较

Fig. 1 Comparison of cell morphology in each group

细胞中的表达量较转染 si-NC 的细胞降低 (0.25 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.00 , $t=56.250$, $P<0.05$)。感染组 IL-10 水平、细胞活力较对照组降低 ($P<0.05$), IL-6 水平、细胞凋亡率和凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase9 表达水平较对照组均升高 ($P<0.05$); 感染+si-circSAMD4A 组 IL-10 水平、细胞活力较感染+si-NC 组升高 ($P<0.05$), IL-6 水平、细胞凋亡率和凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase9 表达水平较感染+si-NC 组均降低 ($P<0.05$) (图2和表2)。

2.4 circSAMD4A 靶向调控 miR-141-3p 的表达

StarBase 预测显示, circSAMD4A 与 miR-141-3p 有互补的核苷酸序列 (图3)。共转染 miR-141-3p 与 WT-

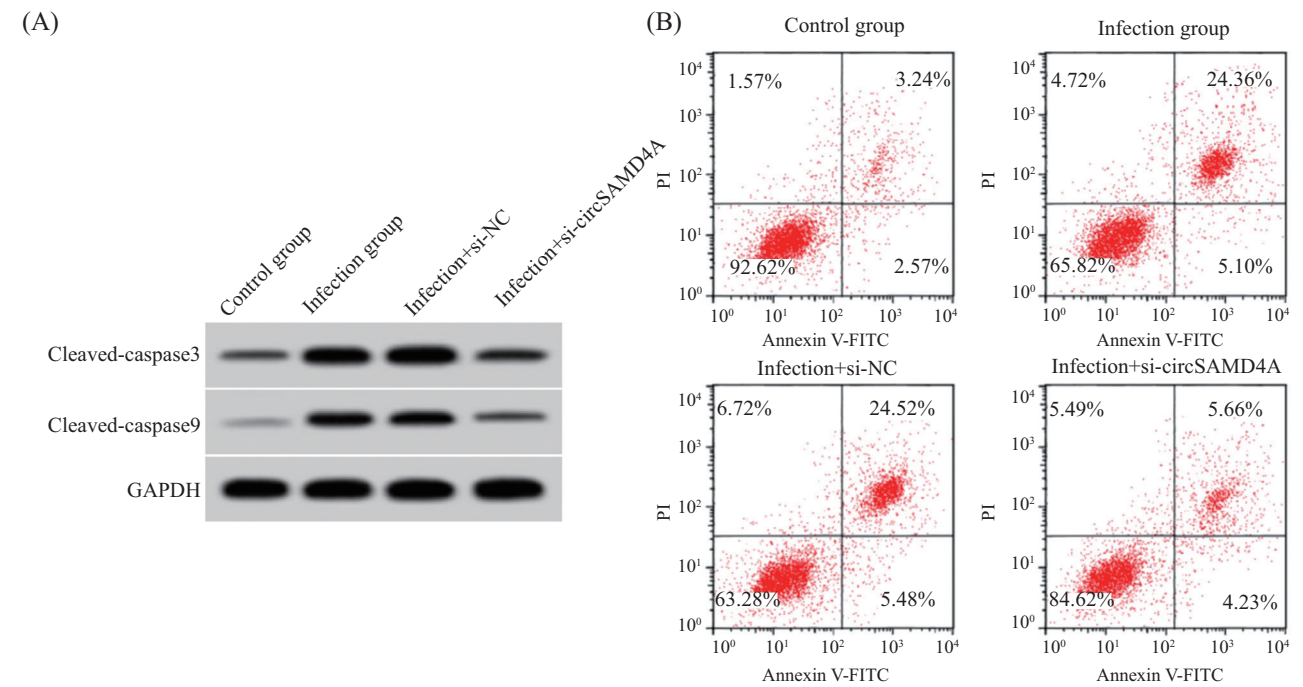
circSAMD4A 的肺泡上皮细胞荧光素酶活性较共转染 miR-NC 与 WT-circSAMD4A 的细胞降低 (0.52 ± 0.05 vs 1.01 ± 0.06 , $t=18.821$, $P<0.05$), 但共转染 miR-141-3p 与 MUT-circSAMD4A 的肺泡上皮细胞荧光素酶活性较共转染 miR-NC 与 MUT-circSAMD4A 的细胞无显著差异 (1.00 ± 0.06 vs 1.02 ± 0.07 , $t=0.651$, $P=0.524$) (表3)。miR-141-3p 在转染 si-circSAMD4A 的肺泡上皮细胞中的表达量较转染 si-NC 的细胞升高 (2.74 ± 0.21 vs 1.00 ± 0.07 , $t=23.582$, $P<0.05$) (表4)。

2.5 miR-141-3p 过表达对肺泡上皮细胞 (SP 诱导) 凋亡和炎症因子的影响

转染 miR-141-3p mimics 的肺泡上皮细胞中

表1 对照组与感染组circSAMD4A、miR-141-3p水平比较

组别 Group	circSAMD4A	miR-141-3p
Control group	1.00±0.00	1.00±0.00
Infection group	2.62±0.24	0.34±0.03
<i>t</i>	20.250	66.000
<i>P</i>	0	0



A: 干扰circSAMD4A的细胞经SP诱导后细胞中Cleaved-caspase3和Cleaved-caspase9蛋白表达情况; B: 流式细胞术检测干扰circSAMD4A的细胞经SP诱导后的凋亡情况。

A: the expression of Cleaved-caspase3 and Cleaved-caspase9 in the cells that interfered with circSAMD4A after SP induction; B: flow cytometry was used to detect the apoptosis of cells interfering with circSAMD4A after SP induction.

图2 干扰circSAMD4A对SP诱导的细胞凋亡的影响
Fig.2 Effect of interference circSAMD4A on SP-induced cell apoptosis

表2 干扰circSAMD4A对SP诱导的细胞损伤的影响

Table 2 Effect of interference circSAMD4A on SP-induced cell injury

组别 Group	白介素10/ng·L ⁻¹ IL-10 /ng·L ⁻¹	白介素6/ng·mL ⁻¹ IL-6 /ng·mL ⁻¹	细胞活力/% Cell viability /%	凋亡率/% Apoptosis rate /%	Cleaved-caspase3	Cleaved-cas-pase9
Control group	82.67±6.15	16.55±1.59	100	5.81±0.54	0.23±0.02	0.12±0.02
Infection group	27.69±2.37*	52.35±4.45*	42.35±5.98*	29.46±2.02*	0.73±0.06*	0.55±0.04*
Infection+si-NC	25.34±2.38	54.07±5.49	45.23±6.14	30.02±2.75	0.75±0.05	0.58±0.05
Infection+si-circSAM-D4A	71.31±6.52 [#]	26.34±2.28 [#]	66.37±6.05 [#]	9.86±0.82 [#]	0.31±0.03 [#]	0.19±0.02 [#]
<i>F</i>	342.525	220.239	231.316	464.686	363.730	418.776
<i>P</i>	0	0	0	0	0	0

**P*<0.05, 与对照组相比; [#]*P*<0.05, 与感染+si-NC组相比。

**P*<0.05 compared with the control group; [#]*P*<0.05 compared with the infection+si-NC group.

WT-circSAMD4A 5' ucauuccaucuccCAGUGUUC 3'
miR-141-3p 3' gguagaauggucuGUCACAAu 5'
MUT-circSAMD4A 5' ucauuccaucuccAGUGACGc 3'

红色为突变位点。

Red is the mutation site.

图3 circSAMD4A与miR-141-3p互补的核苷酸序列

Fig.3 Nucleotide sequences of circSAMD4A complementary to miR-141-3p

表3 circSAMD4A与miR-141-3p的靶向关系

Table 3 Targeting relationship between circSAMD4A and miR-141-3p

组别 Group	荧光酶活性 Fluorescence enzyme activity
mimics NC+WT-circSAMD4A group	1.01±0.06
mimics NC+MUT-circSAMD4A group	1.00±0.06
miR-141-3p mimics+WT-circSAMD4A group	0.52±0.05*
miR-141-3p mimics+MUT-circSAMD4A group	1.02±0.07
<i>F</i>	98.780
<i>P</i>	<0.001

**P*<0.05, 与mimics NC+WT-circSAMD4A相比。

**P*<0.05 compared with mimics NC+WT-circSAMD4A.

表4 circSAMD4A沉默对miR-141-3p的影响

Table 4 Effect of circSAMD4A silencing on miR-141-3p

组别 Group	miR-141-3p
si-NC	1.00±0.07
si-circSAMD4A	2.74±0.21
<i>t</i>	23.582
<i>P</i>	0

miR-141-3p的表达量较转染 miR-NC的细胞升高 (2.86±0.25 vs 1.00±0.00, *t*=22.320, *P*<0.05)(表5)。感染+miR-141-3p组 IL-10水平、细胞活力较感染+miR-NC组升高 (*P*<0.05), IL-6水平、细胞凋亡率和凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase9水平较感染+miR-NC组均降低 (*P*<0.05)(图

4和表6)。

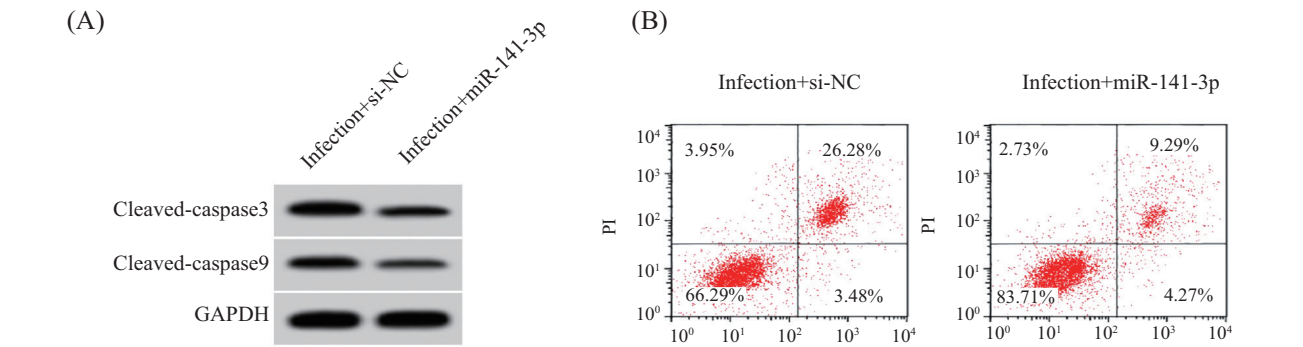
2.6 miR-141-3p下调逆转circSAMD4A沉默对肺泡上皮细胞损伤的抑制作用

miR-141-3p在共转染 si-circSAMD4A和 anti-miR-141-3p的肺泡上皮细胞中的表达量较共转染 si-circSAMD4A和 anti-miR-NC的细胞降低 (0.43±0.04

表5 miR-141-3p过表达对miR-141-3p的影响

Table 5 Effect of miR-141-3p overexpression on miR-141-3p

组别 Group	miR-141-3p
miR-NC group	1.00±0.00
miR-141-3p mimics group	2.86±0.25
<i>t</i>	22.320
<i>P</i>	0



A: 过表达miR-141-3p的细胞经SP诱导后细胞中Cleaved-caspase3和Cleaved-caspase9蛋白表达情况; B: 流式细胞术检测过表达miR-141-3p的细胞经SP诱导后的凋亡情况。

A: expression of Cleaved-caspase3 and Cleaved-caspase9 in cells overexpressing miR-141-3p after SP induction; B: flow cytometry detection of apoptosis in cells overexpressing miR-141-3p after SP induction.

图4 过表达miR-141-3p对SP诱导的细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of overexpression of miR-141-3p on SP-induced cell apoptosis

表6 过表达miR-141-3p对SP诱导的细胞损伤的影响

Table 6 Effects of overexpression of miR-141-3p on SP-induced cell damage

组别 Group	白介素10/ng·L ⁻¹ IL-10 /ng·L ⁻¹	白介素6/ng·mL ⁻¹ IL-6 /ng·mL ⁻¹	细胞活力/% Cell viability %	凋亡率/% Apoptosis rate %	Cleaved-caspase3	Cleaved-caspase9
Infection+miR-NC	23.22±2.21	56.05±4.59	46.23±6.12	30.45±2.53	0.77±0.05	0.57±0.04
Infection+miR-141-3p	62.25±5.03*	33.19±2.38*	63.71±6.04	13.94±1.34*	0.37±0.03*	0.25±0.02*
<i>t</i>	21.312	13.264	6.099	17.300	20.580	21.466
<i>P</i>	0	0	0	0	0	0

**P*<0.05, 与感染+miR-NC组比较。

**P*<0.05 compared with infection+miR-NC group.

vs 1.00±0.00, *t*=42.750, *P*<0.05)(表 7)。感染+si-circSAMD4A+anti-miR-141-3p组 IL-10水平、细胞活力较感染+si-circSAMD4A+anti-miR-NC组降低(*P*<0.05), IL-6水平、细胞凋亡率和凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase9水平较感染+si-circSAMD4A+anti-miR-NC组均升高(*P*<0.05)(图 5和表 8)。

3 讨论

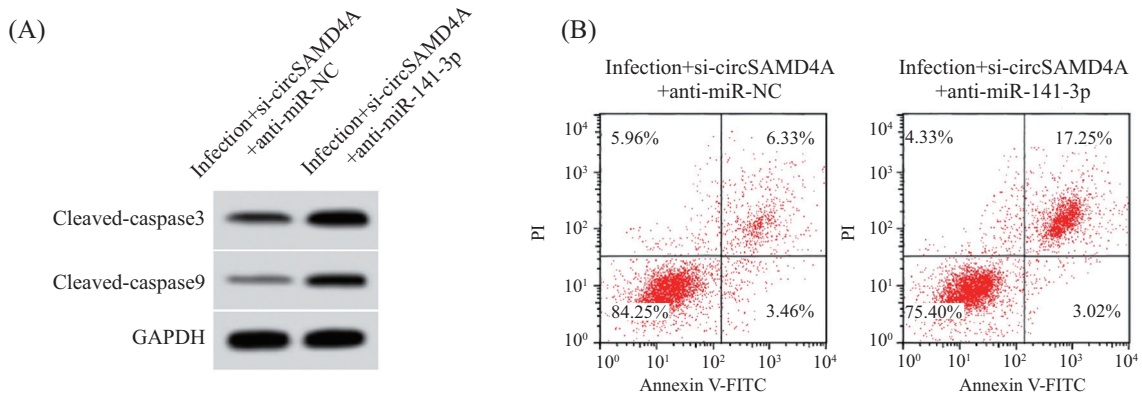
社区获得性肺炎是比较常见的肺部炎性疾病之一,严重威胁人类健康。肺泡上皮细胞凋亡和炎症反

应是社区获得性肺炎的主要病理变化^[8-9]。miRNA可调控炎症因子的表达,为炎症疾病提供了新的靶点和治疗策略; miRNA可鉴别不同病原体导致的肺部感染性疾病,在临床中作用显著^[10-11]。研究报道 miR-141-3p可抑制细菌性脑膜炎中星形胶质细胞的活化和炎症细胞因子的释放^[12]。miR-141-3p通过抑制 RIPK1介导的炎症和坏死性凋亡来保护肠上皮细胞免受脂多糖损伤^[13]。miR-141-3p上调通过抑制 STAT4减轻了实验性自身免疫性心肌炎小鼠的炎症反应^[14]。miR-141-3p在急性肺炎患者血清和脂多糖诱导的人肺成纤维细胞 WI-38中下调;敲低 miR-141-3p表达可减弱脂多

表7 miR-141-3p下调对si-circSAMD4A促进miR-141-3p表达的影响

Table 7 Effect of down-regulation of miR-141-3p on si-circSAMD4A promoting miR-141-3p expression

组别 Group	miR-141-3p
miR-NC group	1.00±0.00
miR-141-3p mimics group	2.86±0.25
<i>t</i>	22.320
<i>P</i>	0



A: 共转染si-circSAMD4A和anti-miR-141-3p的细胞经SP诱导后细胞中Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase9蛋白表达情况; B: 流式细胞术检测共转染si-circSAMD4A和anti-miR-141-3p的细胞经SP诱导后的细胞凋亡情况。

A: expression of Cleaved-caspase3 and Cleaved-caspase9 in cells co-transfected with si-circSAMD4A and anti-miR-141-3p after SP induction; B: flow cytometry detection of apoptosis induced by SP in cells co-transfected with si-circSAMD4A and anti-miR-141-3p.

图5 共转染si-circSAMD4A和anti-miR-141-3p的细胞经SP诱导后的细胞凋亡情况

Fig.5 Apoptosis induced by SP in cells co-transfected with si-circSAMD4A and anti-miR-141-3p

表8 共转染si-circSAMD4A和anti-miR-141-3p的细胞经SP诱导后的细胞损伤情况

Table 8 Cell damage after SP induction in cells co-transfected with si-circSAMD4A and anti-miR-141-3p

分组 Group	miR-141-3p	白介素10/ ng·L ⁻¹ IL-10 /ng·L ⁻¹	白介素6/ ng·mL ⁻¹ IL-6 /ng·mL ⁻¹	细胞活力/% Cell viability /%	凋亡率/% Apoptosis rate /%	Cleaved- caspase3	Cleaved- caspase9
Infection+si-circSAMD4A +anti-miR-NC	1.00±0.00	72.84±6.19	23.86±2.09	62.37±6.23	9.58±0.80	0.30±0.02	0.18±0.02
Infection+si-circSAMD4A +anti-miR-141-3p	0.43±0.04*	36.78±3.24*	45.78±4.02*	41.56±4.06	20.33±2.07*	0.63±0.06*	0.48±0.03*
<i>t</i>	42.750	15.484	14.514	8.395	14.532	15.653	24.962
<i>P</i>	0	0	0	0	0	0	0

**P*<0.05, 与感染+si-circSAMD4A+anti-miR-NC组比较。

**P*<0.05 compared with infection+si-circSAMD4A+anti-miR-NC group.

糖诱导的人肺成纤维细胞 WI-38 凋亡、自噬和炎症反应^[15]。以上研究表明, miR-141-3p 参与调控炎症反应。本实验数据显示, miR-141-3p 是 SP 感染的肺泡上皮细胞中表达降低的 miRNA, 过表达 miR-141-3p 可促进 SP 诱导的抑炎因子 IL-10 的分泌, 而抑制促炎因子 IL-6 的分泌, 同时减少细胞凋亡和凋亡相关蛋白 caspase3 和 caspase9 的活化, 增强细胞活力, 表明过表达 miR-141-3p 可抑制 SP 诱导的肺泡上皮细胞凋亡和炎症反应。

研究表明, 一些 circRNA 也参与肺部炎症反应^[16]。通过生物学软件 StarBase 预测 miR-141-3p 上游可能结合的 circRNA, 发现 miR-141-3p 与 circ-SAMD4A 有结合位点。研究报道 circSAMD4A 在帕金森病动物模型和细胞模型中表达上调, 敲低其表达可抑制 MPP⁺ 诱导的细胞凋亡和自噬^[17]。本实验发现, SP 促进肺泡上皮细胞中 circSAMD4A 的表达, 而干扰 circSAMD4A 可发挥同样的作用,

并增强细胞活力。为了探究circSAMD4A与miR-141-3p之间是否具有靶向关系,本研究利用双荧光素酶实验发现了circSAMD4A可靶向结合miR-141-3p,且干扰circSAMD4A的表达对肺泡上皮细胞中miR-141-3p的表达起促进作用,说明circSAMD4A靶向结合并负调控miR-141-3p。本实验利用回复实验进一步发现下调miR-141-3p导致干扰circSAMD4A对细胞凋亡以及炎症因子表达的抑制作用以及对细胞活力的促进作用显著降低,进一步提示干扰circSAMD4A可能通过靶向上调miR-141-3p抑制SP诱导的肺泡上皮细胞凋亡和炎症反应。

综上,SP促进肺泡上皮细胞中circSAMD4A表达,而对miR-141-3p表达起抑制作用;干扰circSAMD4A可导致SP诱导的肺泡上皮细胞凋亡和炎症因子表达减少。这可能与干扰circSAMD4A造成细胞中miR-141-3p表达上调有关,提示circSAMD4A/miR-141-3p轴可能为SP诱导的肺泡上皮细胞损伤提供了治疗靶点。

参考文献 (References)

- [1] 李小惠, 徐学军, 张建辉, 等. 社区获得性肺炎患者病原微生物特征[J]. 中国微生态学杂志(LI X H, XU X J, ZHANG J H, et al. The pathogenic microbes in community-acquired pneumonia [J]. Chinese Journal of Microecology), 2019, 31(6): 699-702.
- [2] 王洪玉. 社区获得性肺炎的分子诊断研究进展[J]. 中国处方药(WANG H Y. Advances in molecular diagnosis of community-acquired pneumonia [J]. Chinese Prescription Drugs), 2020, 18(9): 31-2.
- [3] 谢丹, 文丹宁, 罗丹. miR-127-5p靶向IRAK4对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞凋亡及炎症因子表达的影响[J]. 临床肺科杂志(XIE D, WEN D N, LUO D. Effect of miR-127-5p targeting IRAK4 on alveolar epithelial cells apoptosis induced by *Streptococcus pneumoniae* and inflammatory factor expression [J]. Journal of Clinical Lung), 2020, 25(2): 261-6,74.
- [4] QIAN W, CAI X, QIAN Q, et al. lncRNA ZEB1-AS1 promotes pulmonary fibrosis through ZEB1-mediated epithelial-mesenchymal transition by competitively binding miR-141-3p [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 129.
- [5] 戢慧, 陈森, 钱明江, 等. II型肺泡上皮细胞凋亡相关微小RNA的筛选[J]. 中华危重病急救医学(JI H, CHEN M, QIAN M J, et al. Screening type II alveolar epithelial cell apoptosis related microRNA [J]. Chinese Critical Care Medicine), 2013, 25(9): 546-547.
- [6] 刘雨东, 何金孝, 吴华杰, 等. miR-141-3p靶向调控FOXA1对肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞增殖凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志(LIU Y D, HE J X, WU H J, et al. Effects of miR-141-3p targeting FOXA1 on proliferation and apoptosis of alveolar epithelial cells infected by *Streptococcus pneumoniae* [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology), 2021, 37(1): 19-22.
- [7] HU X, MA R, CAO J, et al. CircSAMD4A aggravates H/R-induced cardiomyocyte apoptosis and inflammatory response by sponging miR-138-5p [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(6): 1776-84.
- [8] 黄文杰. 社区获得性肺炎的诊治现状[J]. 医学临床研究(HUANG W J. Diagnosis and treatment of community acquired pneumonia [J]. Journal of Clinical Research), 2020, 37(2): 161-3.
- [9] 常大芸, 刘学工, 李宁华, 等. TIMP1基因对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞HEPAPIC凋亡的影响及机制研究[J]. 临床肺科杂志(CHANG D Y, LIU X G, LI N H, et al. Effect of TIMP1 gene on apoptosis of HEPAPIC induced by streptococcus pneumoniae and its mechanism [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine), 2020, 25(1): 40-5.
- [10] 鲁哲, 朱磊. 运动介导microRNA调控炎症因子的研究进展[J]. 亚洲临床医学杂志(LU Z, ZHU L. Research progress on exercise mediated microRNA regulation of inflammatory factors [J]. Asian Journal of Clinical Medicine), 2020, 3(4): 30.
- [11] 付玉梅, 周佳伟, 刘凯, 等. miRNA与肺部疾病的相关性研究[J]. 现代医学与健康研究电子杂志(FU Y M, ZHOU J W, LIU K, et al. Study on the correlation between miRNA and lung diseases [J]. Electronic Journal of Modern Medicine and Health Research), 2018, 2(10): 164.
- [12] FANG X, WANG H, ZHUO Z, et al. miR-141-3p inhibits the activation of astrocytes and the release of inflammatory cytokines in bacterial meningitis through down-regulating HMGB1 [J]. Brain Res, 2021, 1770: 147611.
- [13] LI X, WANG Y, WANG Y, et al. MiR-141-3p ameliorates RIPK1-mediated necroptosis of intestinal epithelial cells in necrotizing enterocolitis [J]. Aging, 2020, 12(18): 18073-83.
- [14] PAN A, TAN Y, WANG Z, et al. STAT4 silencing underlies a novel inhibitory role of microRNA-141-3p in inflammation response of mice with experimental autoimmune myocarditis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019, 317(3): H531-40.
- [15] XIA L, ZHU G, HUANG H, et al. LncRNA small nucleolar RNA host gene 16 (SNHG16) silencing protects lipopolysaccharide (LPS)-induced cell injury in human lung fibroblasts WI-38 through acting as miR-141-3p sponge [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2021, 85(5): 1077-87.
- [16] LI M Z, HUA Q H, SHAO Y T, et al. Circular RNA circBbs9 promotes PM 2.5-induced lung inflammation in mice via NLRP3 inflammasome activation [J]. Environ Int, 2020, 143: 105976.
- [17] WANG W, LÜ R, ZHANG J, et al. circSAMD4A participates in the apoptosis and autophagy of dopaminergic neurons via the miR-29c-3p-mediated AMPK/mTOR pathway in Parkinson's disease [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(1): 540.