# CircTMOD3调节miR-139-5p/ROCK2轴 对LPS诱导的肺泡上皮细胞损伤的影响

杨小军<sup>1\*</sup> 欧阳运萍<sup>2</sup> 陈涛<sup>2</sup> 李鹏<sup>2</sup> 赵博<sup>2</sup> ('唐山职业技术学院附属医院重症医学科, 唐山 063000; <sup>2</sup>唐山职业技术学院附属医院急诊科, 唐山 063000)

摘要 该文旨在探讨CircTMOD3调节miR-139-5p/Rho相关的卷曲螺旋激酶(ROCK2)轴对 LPS诱导的肺泡上皮细胞损伤的影响。该研究采用体外培养人肺泡上皮细胞A549,将A549细胞分 为 control 组、LPS 组、LPS+si-NC 组、LPS+si-CircTMOD3 组、LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC 组、LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor组;用qRT-PCR检测各组细胞CircTMOD3、miR-139-5p和ROCK2表达水平; CCK-8和EdU法检测细胞增殖情况; 流式细胞术检测细胞凋亡率; ELISA试 剂盒检测TNF-α、IL-6和IL-1β水平;相关试剂盒检测MDA、SOD、CAT水平; Western blot检测细 胞中Bax、Bcl-2、ROCK2蛋白表达量;双荧光素酶报告基因实验验证miR-139-5p与CircTMOD3和 ROCK2的关系。结果显示,与control组相比,LPS组A549细胞中CircTMOD3水平、ROCK2 mRNA 表达水平、TNF-α水平、IL-6水平、IL-1β水平、MDA水平、凋亡率、Bax表达水平、ROCK2蛋 白表达水平显著升高,miR-139-5p表达水平、增殖活力、CAT水平、SOD水平、Bcl-2蛋白表达水 平显著降低(P<0.05); 与LPS组和LPS+si-NC组比较, LPS+si-CircTMOD3组A549细胞中CircTMOD3 表达水平、ROCK2 mRNA表达水平、TNF-α水平、IL-6水平、IL-1β水平、MDA水平、细胞凋亡 率、Bax蛋白水平、ROCK2蛋白水平显著降低,miR-139-5p表达水平、增殖活力、CAT水平、SOD 水平、Bcl-2蛋白表达水平显著升高(P<0.05); 与LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组相比, LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor组A549细胞中ROCK2 mRNA表达水平、TNF-α水平、IL-6水平、 IL-1β水平、MDA水平、细胞凋亡率、Bax蛋白表达水平、ROCK2蛋白表达水平显著升高, miR-139-5p表达水平、增殖活力、CAT水平、SOD水平、Bcl-2蛋白表达水平显著降低(P<0.05)。双荧 光素酶报告基因实验证实miR-139-5p与CircTMOD3和ROCK2存在靶向调控关系。该研究得出,干 扰CircTMOD3表达可以上调miR-139-5p表达抑制ROCK2表达,减轻LPS诱导的肺泡上皮细胞损伤。 CircTMOD3; miR-139-5p/ROCK2轴; LPS; 肺泡上皮细胞 关键词

### The Effect of CircTMOD3 on LPS-Induced Alveolar Epithelial Cell Injury by Regulating the miR-139-5p/ROCK2 Axis

YANG Xiaojun1\*, OUYANG Yunping2, CHEN Tao2, LI Peng2, ZHAO Bo2

(<sup>1</sup>Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Tangshan Vocational and Technical College, Tangshan 063000, China; <sup>2</sup>Department of Emergency, Affiliated Hospital of Tangshan Vocational and Technical College, Tangshan 063000, China)

**Abstract** The aim of this study was to investigate the impact of CircTMOD3 on LPS-induced alveolar epithelial cell injury by regulating the miR-139-5p/ROCK2 (Rho associated coiled coil containing protein kinase 2) axis. Human alveolar epithelial cells A549 were cultured *in vitro* and grouped into control group, LPS group, LPS+si-NC group, LPS+si-CircTMOD3 group, LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC group, and LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor group; qRT-PCR was applied to detect the expression levels of CircTMOD3, miR-139-5p, and ROCK2 of cells in each group; CCK-8 and EdU method were applied to detect cell proliferation; flow cytometry was applied to detect cell apoptosis rate; ELISA kits were applied to detect TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  levels; the commercial reagent kits were applied to analyze MDA, SOD, and CAT levels; Western blot was applied to detect the expression levels of Bax, Bcl-2, and ROCK2 proteins in cells; the relationship of miR-139-5p with CircTMOD3 and ROCK2 was verified by double luciferase reporter gene experiment. Compared with the control group, the levels of CircTMOD3, ROCK2 mRNAs, TNF-α, IL-6, IL-1β, MDA, apoptosis rate, Bax and ROCK2 proteins of A549 cells in the LPS group were obviously increased, and the expression of miR-139-5p, proliferative activity, CAT, SOD, Bcl-2 protein were obviously reduced (P < 0.05); compared with the LPS group and the LPS+si-NC group, the levels of CircTMOD3 and ROCK2 mRNAs, TNF-α, IL-6, IL-1β and MDA, apoptosis rate, Bax and ROCK2 proteins of A549 cells in the LPS+si-CircTMOD3 group were obviously reduced, and the levels of miR-139-5p, proliferative activity, CAT, SOD, and Bcl-2 protein were obviously increased (P < 0.05); compared with the LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC group, the levels of ROCK2 mRNA, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MDA, apoptosis rate, Bax and ROCK2 proteins of A549 cells in the LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor group were obviously increased, and the levels of miR-139-5p, proliferative activity, CAT, SOD, and Bcl-2 protein were obviously reduced (P < 0.05). Dual luciferase reporter gene experiment confirmed that miR-139-5p had a targeted regulatory relationship with TMOD3 and ROCK2. The study concluded that interference with CircTMOD3 expression could up-regulate miR-139-5p expression and inhibit ROCK2 expression, alleviating LPS-induced alveolar epithelial cell injury.

Keywords CircTMOD3; miR-139-5p/ROCK2 axis; LPS; alveolar epithelial cells

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的主要临床 特征为呼吸窘迫、非心源性肺水肿、顽固性低氧血 症<sup>[1]</sup>。细菌感染是ALI发病的主要诱因,ALI具有较 高的发病率和死亡率<sup>[2]</sup>。ALI发生时会发生急性炎症、 氧化损伤和肺水肿,进而诱导细胞凋亡<sup>[3]</sup>。目前ALI 的发病机制尚不完全清楚,针对该疾病也没有有效 的治疗手段。因此进一步探究ALI的发病机制,减 少炎症反应和氧化应激进而降低细胞凋亡有望成为 治疗ALI的研究方向<sup>[4]</sup>。环状RNA是一种反式剪接 而成的一种非编码RNA,研究表明,其与肺炎的分子 病理过程有关<sup>[5]</sup>。LIU等<sup>[6]</sup>研究表明, Circ 0038467 在LPS处理的16HBE细胞中上调, 敲低Circ 0038467 可减弱LPS诱导的16HBE细胞炎症损伤。MA等<sup>[7]</sup> 研究表明, CircTMOD3在LPS诱导的人肺成纤维细 胞WI-3中表达上调,下调CircTMOD3表达可以减轻 LPS引发的WI-3细胞损伤和炎症反应。miRNA是内 源性非编码RNA,具有调节蛋白质编码和非编码基 因表达的作用<sup>[8]</sup>。WANG等<sup>[9]</sup>研究表明, 过表达miR-143-3p可通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB信号通路降 低支原体肺炎小鼠肺部炎症水平并减少肺泡上皮 细胞凋亡。ZHANG等<sup>[10]</sup>研究表明, miR-139-5p在败

血症小鼠肺组织中低表达,上调miR-139-5p表达后可以显著减轻败血症小鼠炎症反应和氧化应激,抑制肺组织损伤。Rho相关的卷曲螺旋激酶(Rho associated coiled coil containing protein kinase, ROCK) 是重要的神经炎症及氧化应激调控信号。生物信息学分析发现,CircTMOD3与miR-139-5p,miR-139-5p与*ROCK2*2和影响LPS诱导的肺泡上皮细胞损伤尚不清楚。因此本研究就CircTMOD3调节miR-139-5p/ROCK2轴对LPS诱导的肺泡上皮细胞损伤的影响进行探究,以期为ALI治疗提供新的监测靶点。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

人肺泡上皮细胞A549购自中国科学院上海细胞库。

#### 1.2 主要试剂

LPS购自上海赛抑生物科技有限公司;TNF-α、 IL-6和IL-1β试剂盒购自上海道鹏生物科技有限公 司;MDA、SOD、CAT试剂盒购自上海瓦兰生物科 技有限公司;RPMI 1640培养基购自成都攀达生物 科技有限公司; 胎牛血清购自上海江林生物科技有限公司; Trizol试剂购自武汉纯度生物科技有限公司; SRNA提取试剂盒购自上海瑞楚生物科技有限公司; 胰蛋白酶购自深圳海思安生物技术有限公司; qRT-PCR试剂盒购自艾美捷科技有限公司; CCK-8 试剂盒购自上海西格生物科技有限公司; Bax、Bcl-2、ROCK2一抗和二抗均购自美国Abcam公司; si-NC、si-CircTMOD3、inhibitor NC、miR-139-5p inhibitor购自上海吉凯基因医学科技有限公司。

#### 1.3 方法

1.3.1 细胞转染与分组培养 将A549细胞接种于 RPMI 1640培养基进行培养(培养条件: 37°C、5% CO<sub>2</sub>),待细胞融合度达到85%左右时加入胰蛋白酶 消化传代。

将对数生长期的A549细胞分为对照组、LPS 组(10 mg/L的LPS<sup>[11]</sup>处理)、LPS+si-NC组(10 mg/L 的LPS+转染si-NC共同处理)、LPS+si-CircTMOD3 组(10 mg/L的LPS+转染si-CircTMOD3共同处理)、 LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组(10 mg/L的 LPS+转染si-CircTMOD3和inhibitor NC共同处理)、 LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor组(10 mg/L 的LPS+转染si-CircTMOD3和miR-139-5p inhibitor共 同处理)。对A549细胞进行上述转染和处理48 h, 然 后进行后续实验。

1.3.2 qRT-PCR检测各组细胞CircTMOD3、miR-139-5p、ROCK2 mRNA表达 Trizol试剂提取各组 细胞总RNA,将RNA逆转录为cDNA后,荧光定量 PCR法对cDNA进行扩增。CircTMOD3和ROCK2以 GAPDH为内参, miR-139-5p以U6为内参, 使用2-<sup>ΔΔCt</sup> 方法计算CircTMOD3、miR-139-5p、ROCK2 mRNA 的相对表达量。CircTMOD3引物:正向5'-TAC ACA GCA GGG ACC ACG AAC-3',反向5'-CCC TGT GGT GGA CTT TGA TGT-3'; ROCK2 mRNA引物: 正向5'-ATT CAG CAG CTG GAA TCT AA-3',反向5'-GTC TCT TCT CCA GTT CTA C-3'; miR-139-5p引物: 正向 5'-TCT ACA GTG CAC GTG TCT CCA G-3',反向5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; GAPDH引物: 正向 5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3',反向5'-AAT GGT CGT TGA GGG CAA TG-3'; U6引物: 正向 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',反向5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

1.3.3 CCK-8、EdU法检测细胞增殖 将转染之后

的A549细胞接种到96孔板中,每孔5×10<sup>4</sup>个细胞, 于37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下培养,分别在培养24、48h后, 弃去细胞上清液,再向各孔中加入含有10 μL CCK-8 溶液的100 μL完全培养基。37°C孵育2h后,使用酶 标仪测定其吸光度(波长为450 nm)值。

将各组A549细胞以5×10<sup>4</sup>个/孔接种到24孔板中, 培养36 h,向各孔中加入EdU于37 °C孵育2 h,根据 细胞增殖检测试剂盒说明书要求进行EdU及DAPI染 色。荧光显微镜采集图像,ImageJ软件分析EdU阳性 细胞数及总细胞数,计算增殖率。增殖率=(EdU阳性 细胞数/总细胞数)×100%。

1.3.4 TNF-α、IL-6和IL-1β水平检测 将各转染组 细胞4°C、3 500 r/min离心10 min,获得细胞上清液, 然后按照 ELISA试剂盒说明书进行相关操作,最后 添加底物显色。利用酶标仪检测各孔吸光度值,再 计算各检测指标水平。

1.3.5 CAT、SOD、MDA含量检测 将各转染组 细胞4 ℃、4 000 r/min离心10 min收集细胞,加入1 mL 提取液,超声破碎细胞,然后按照试剂盒说明书加入 相应试剂,检测CAT、SOD、MDA水平。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡 4°C、1000 r/min 离心10 min收集上述培养的各组细胞, PBS清洗后, 用1×结合缓冲液悬浮细胞, 根据凋亡试剂盒说明书 操作步骤, 依次加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI 试剂, 室温避光孵育15 min。上样用流式细胞仪检 测各组细胞凋亡率, 重复3次。

1.3.7 Western blot检测蛋白表达情况 使用RIPA 裂解法裂解各组细胞,提取各组细胞总蛋白,检测各 组细胞蛋白浓度,用SDS-PAGE电泳分离蛋白,将蛋白 转移到PVDF膜上,封闭液中室温封闭2h后加入一抗 Bax、Bcl-2、ROCK2(稀释比例为1:1500)4°C孵育 过夜,洗膜后加入二抗(稀释比例为1:5000)室温下 孵育2h,使用ECL发光液显影,用Image-Pro Plus软 件对蛋白质进行定量分析。

1.3.8 双荧光素酶报告基因检测 构建CircT-MOD3野生型载体(CircTMOD3-WT)和突变型载体(CircTMOD3-MUT),将CircTMOD3-WT和CircT-MOD3-MUT分别与miR-NC和miR-139-5p mimic共转染于A549细胞中,转染48 h后,检测荧光素酶活性。

构建ROCK2野生型载体(ROCK2-WT)和突变 型载体(ROCK2-MUT),将ROCK2-WT和ROCK2-MUT分别与miR-NC和miR-139-5p mimic共转染于 A549细胞中,转染48h后检测荧光素酶活性。

#### 1.4 统计分析

用SPSS 25.0软件分析实验统计结果,统计结果 表示为平均数±标准差(*x*±*s*)。多组间比较采用单因素 方差分析,用SNK-*q*检验进行组内两两比较,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

#### 2 结果

## 2.1 各组细胞CircTMOD3、miR-139-5p、ROCK2 mRNA表达水平比较

如图1所示:与对照组相比,LPS组A549细胞中 CircTMOD3、*ROCK2* mRNA表达水平显著升高, miR-139-5p表达水平显著降低(*P*<0.05);与LPS组 和LPS+si-NC组比较,LPS+si-CircTMOD3组A549 细胞中CircTMOD3、*ROCK2* mRNA表达水平显著 降低,miR-139-5p表达水平显著升高(*P*<0.05);与 LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组相比,LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor组A549中*ROCK2* mRNA表达水平显著升高,miR-139-5p表达水平显 著降低(*P*<0.05),CircTMOD3表达水平的变化无统 计学意义(*P*>0.05)。

#### 2.2 各组A549细胞增殖能力比较

如图2所示:与对照组相比,LPS组A549细 胞*D*<sub>450</sub>值(24、48 h)显著降低(*P*<0.05);与LPS 组和LPS+si-NC组比较,LPS+si-CircTMOD3组 A549细胞*D*<sub>450</sub>值(24、48 h)显著升高(*P*<0.05);与 LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组相比,LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor组A549细胞*D*<sub>450</sub>值 (24、48 h)显著降低(*P*<0.05)。

#### 2.3 各组A549细胞TNF-α、IL-6和IL-1β水平比较

如图3所示:与对照组相比,LPS组A549细胞 TNF-α、IL-6和IL-1β水平显著升高(P<0.05);与LPS 组和LPS+si-NC组比较,LPS+si-CircTMOD3组A549 细胞TNF-α、IL-6和IL-1β水平显著降低(P<0.05);与 LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组相比,LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor组A549细胞TNF-α、 IL-6和IL-1β水平显著升高(P<0.05)。

#### 2.4 各组A549细胞CAT、SOD、MDA水平比较

如图4所示:与对照组相比,LPS组A549细胞 中MDA水平显著升高,CAT水平、SOD水平显 著降低(P<0.05);与LPS组和LPS+si-NC组比较, LPS+si-CircTMOD3组A549细胞中MDA水平显著 降低,CAT水平、SOD水平显著升高(P<0.05);与 LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组相比,LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor组A549中MDA水 平显著升高,CAT水平、SOD水平显著降低(P<0.05)。

#### 2.5 各组细胞凋亡率比较

如图5所示:与对照组相比,LPS组A549细胞凋 亡率显著升高(P<0.05);与LPS组和LPS+si-NC组比 较,LPS+si-CircTMOD3组A549细胞凋亡率显著降低



<sup>a</sup>P<0.05, 与control比较; <sup>b</sup>P<0.05, 与LPS组比较; <sup>c</sup>P<0.05, 与LPS+si-NC组比较; <sup>d</sup>P<0.05, 与LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组比较。 <sup>a</sup>P<0.05 compared with control group; <sup>b</sup>P<0.05 compared with LPS group; <sup>c</sup>P<0.05 compared with LPS+si-NC group; <sup>d</sup>P<0.05 compared with LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC group.

> 图1 各组细胞CircTMOD3、miR-139-5p、ROCK2 mRNA水平比较 Fig.1 Comparison of CircTMOD3, miR-139-5p and ROCK2 mRNA levels in each group



A: EdU染色检测各组A549细胞增殖情况; B、C: 各组A549细胞增殖能力比较。\*P<0.05, 与 control比较; \*P<0.05, 与 LPS组比较; \*P<0.05, + 100, + 10

A: proliferation of A549 cells in each group was detected by EdU staining; B,C: comparison of proliferation capacity of A549 cells in each group. <sup>a</sup>P<0.05 compared with control group; <sup>b</sup>P<0.05 compared with LPS group; <sup>c</sup>P<0.05 compared with LPS+si-NC group; <sup>d</sup>P<0.05 compared with LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC group.



(P<0.05); 与LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组相比, LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor组A549细 胞凋亡率显著升高(P<0.05)。

#### 2.6 各组A549细胞Bax、Bcl-2、ROCK2蛋白表 达比较

如图6所示:与control组相比,LPS组A549细胞 中Bax、ROCK2蛋白表达水平显著升高,Bcl-2蛋 白表达水平显著降低(P<0.05);与LPS组和LPS+si-NC组比较,LPS+si-CircTMOD3组A549细胞中Bax、 ROCK2蛋白表达水平显著降低,Bcl-2蛋白表达水平 显著升高(P<0.05);与LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组相比,LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor组A549中Bax、ROCK2蛋白表达水平显著升高, Bcl-2蛋白表达水平显著降低(P<0.05)。

#### 2.7 双荧光素酶报告基因检测

采用生物信息学网站预测miR-139-5p与ROCK2、 CircTMOD3的靶向结合位点(图7A)。与miR-NC和 CircTMOD3-WT共转染组比较,miR-139-5p mimic和 CircTMOD3-WT共转染组荧光素酶活性显著降低 (P<0.05,图7B);与miR-NC和CircTMOD3-MUT共转 染组比较,miR-139-5p mimic与CircTMOD3-MUT共转 转染组荧光素酶活性差异无统计学意义(P>0.05,图 7B)。与miR-NC和ROCK2-WT共转染组比较,miR-139-5p mimic和ROCK2-WT共转染组荧光素酶活性 显著降低(P<0.05,图7B);与miR-NC和ROCK2-MUT 共转染组比较,miR-139-5p mimic和ROCK2-MUT 转染组荧光素酶活性差异无统计学意义(P>0.05,图 7C)。



<sup>a</sup>P<0.05, 与control比较; <sup>b</sup>P<0.05, 与LPS组比较; <sup>c</sup>P<0.05, 与LPS+si-NC组比较; <sup>d</sup>P<0.05, 与LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组比较。 <sup>a</sup>P<0.05 compared with control group; <sup>b</sup>P<0.05 compared with LPS group; <sup>c</sup>P<0.05 compared with LPS+si-NC group; <sup>d</sup>P<0.05 compared with LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC group.

图3 各组A549细胞TNF-α、IL-6和IL-1β水平比较





<sup>a</sup>P<0.05, 与control比较; <sup>b</sup>P<0.05, 与LPS组比较; <sup>c</sup>P<0.05, 与LPS+si-NC组比较; <sup>d</sup>P<0.05, 与LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组比较。 <sup>a</sup>P<0.05 compared with control group; <sup>b</sup>P<0.05 compared with LPS group; <sup>c</sup>P<0.05 LPS+si-NC group compared; <sup>d</sup>P<0.05 compared with LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC group.

图4 各组A549细胞CAT、SOD、MDA水平比较 Fig.4 Comparison of CAT, SOD and MDA levels in A549 cells in each group

#### 3 讨论

ALI是一种多因素引起的严重的炎症综合征, 其病变主要特征为肺泡上皮细胞急性损伤<sup>[12]</sup>。炎症 反应在ALI发生过程中起主导作用,损伤因子通过 分泌释放多种炎症因子参与ALI发生发展<sup>[13]</sup>,炎症介 质相互促进激活导致全身炎症发生,最终引起包括 肺器官在内的多种器官功能障碍<sup>[14]</sup>。由于ALI的致 病因素较多,目前对ALI的治疗主要是控制全身炎 症反应,但治疗效果并不理想<sup>[15]</sup>。因此探究ALI和炎 症发生的分子机制,从分子水平干预治疗具有重要 意义。本实验以CircTMOD3/miR-139-5p/ROCK2为 分子切入点探究其在LPS诱导的肺泡上皮细胞损伤 中的作用,以探寻ALI的治疗靶点。

环状RNA是一种闭合和连续的环状结构RNA, 参与多种疾病的病理过程<sup>[16]</sup>。WANG等<sup>[17]</sup>研究表 明,肺炎患者和LPS诱导的Wl-38细胞中Circ-BICC1



\*P<0.05, 与control比较; <sup>b</sup>P<0.05, 与LPS组比较; <sup>c</sup>P<0.05, 与LPS4比较; <sup>d</sup>P<0.05, 与LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组比较。 \*P<0.05 compared with control group; <sup>b</sup>P<0.05 compared with LPS group; <sup>c</sup>P<0.05 LPS+si-NC group compared; <sup>d</sup>P<0.05 compared with LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC group.

#### 图5 各组细胞A549凋亡结果 Fig.5 Apoptosis results of A549 cells in each group



<sup>a</sup>*P*<0.05, 与control比较; <sup>b</sup>*P*<0.05, 与LPS组比较; <sup>c</sup>*P*<0.05, 与LPS+si-NC组比较; <sup>d</sup>*P*<0.05, 与LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组比较。 <sup>a</sup>*P*<0.05 compared with control group; <sup>b</sup>*P*<0.05 compared with LPS group; <sup>c</sup>*P*<0.05 compared with LPS+si-NC group; <sup>d</sup>*P*<0.05 compared with LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC group.

图6 各组A549细胞Bax、Bcl-2、ROCK2蛋白表达情况 Fig.6 Expression of Bax, Bcl-2 and ROCK2 in A549 cells of each group

表达上调, 敲低 Circ-BICC1表达可缓解 LPS诱导的 W1-38细胞炎症反应, 降低细胞损伤。YU等<sup>[18]</sup>研究 表明 Circ-0026579在 LPS诱导的 W1-38细胞过表达, 敲低 Circ-0026579可减轻 LPS诱导的 W1-38细胞炎症 反应, 降低婴儿肺炎进展。本研究结果表明, 与对

照组相比, LPS诱导的A549细胞中CircTMOD3表达 水平显著上调, TNF-α、IL-6和IL-1β水平、MDA水 平、凋亡率、Bax蛋白表达水平显著升高, D<sub>450</sub>值(24、 48 h)、CAT、SOD水平、Bcl-2蛋白表达水平显著 降低。这提示LPS诱导A549细胞发生炎症反应和氧



A: miR-139-5p与CircTMOD3和ROCK2的结合位点; B、C:miR-139-5p与CircTMOD3/ROCK2的靶向关系验证。\*P<0.05,与miR-NC+CircTMOD3-WT比较;\*P<0.05,与miR-NC+ROCK2-WT比较。

A: binding sites of miR-139-5p with CircTMOD3 and *ROCK2*; B,C: verification of the targeting relationship between miR-139-5p and CircTMOD3/*ROCK2*. <sup>a</sup>P<0.05 compared with miR-NC+CircTMOD3-WT; <sup>b</sup>P<0.05 compared with miR-NC+ROCK2-WT.

图7 miR-139-5p与CircTMOD3/ROCK2的靶向关系验证

Fig.7 Verification of the targeting relationship between miR-139-5p and CircTMOD3/ROCK2

化应激,降低细胞活性,促进细胞凋亡,CircTMOD3 可能参与该过程。敲低CircTMOD3表达后,LPS诱 导的A549细胞中TNF-α、IL-6水平、IL-1β水平、 MDA水平、细胞凋亡率、Bax蛋白表达水平显著降 低,D450值(24、48 h)、CAT水平、SOD水平、Bcl-2 蛋白表达水平显著升高。这提示敲低CircTMOD3 表达可降低细胞炎症反应和氧化应激,提高细胞活 性,抑制细胞凋亡。

miRNA是一种高度保守的非编码小RNA分子,可以与靶基因碱基互补结合调控其基因表达,参与细胞各种生物学过程<sup>[19]</sup>。JU等<sup>[20]</sup>研究表明miR-27a通过阻断TLR4/MyD88/NF-кВ来减少炎症反应和细胞凋亡,从而减轻LPS诱导的小鼠ALI。WU等<sup>[21]</sup>研究表明,过表达miR-224-5p可能通过抑制TLR4/MyD88/NF-кВ 信号通路来缓解小鼠过敏性鼻炎。本研究结果表明,与对照组相比,LPS组A549细胞中miR-139-5p表达显著下调,*ROCK2*显著上调,促进A549细胞损伤。 干扰CircTMOD3表达时,miR-139-5p表达显著上调, *ROCK2*表达显著下调,减弱LPS诱导的A549细胞损

伤。生物信息学显示CircTMOD3与miR-139-5p存在 靶向结合位点,荧光素酶活性实验也证实两者存在 靶向关系。这提示CircTMOD3可能通过调控miR-139-5p来影响LPS诱导的A549细胞损伤。当miR-139-5p表达下调时, ROCK2表达显著上调; 而当miR-139-5p表达上调时, ROCK2表达显著下调, 推测miR-139-5p与ROCK2存在靶向调控关系。本研究在下调 CircTMOD3的基础上,通过抑制miR-139-5p表达进 行验证,结果表明,与LPS+si-CircTMOD3+inhibitor NC组相比, LPS+si-CircTMOD3+miR-139-5p inhibitor组A549细胞中miR-139-5p表达水平显著降低, ROCK2表达显著升高,可以逆转敲低CircTMOD3对 LPS诱导的A549细胞的保护作用。而miRNA发挥 基因调控作用一般是其与mRNA基因结合之后通过 抑制靶基因翻译或降解靶基因来抑制目的基因的 转录,进而发挥其生物学作用,因此ROCK2过表达 可促进A549细胞炎症和氧化损伤,与DENG等<sup>[22]</sup>和 REN等<sup>[23]</sup>研究一致。生物信息学显示, miR-139-5p 与ROCK2之间存在靶向结合位点,荧光素酶活性实 验也证实两者之间存在靶向调控关系。这提示miR-139-5p可调控*ROCK2*表达来影响LPS诱导的A549细 胞损伤过程。

综上所述,干扰CircTMOD3通过可以上调miR-139-5p表达,抑制*ROCK2*表达,来降低LPS诱导的肺 泡上皮细胞炎症反应,减少细胞凋亡。本实验仅在 细胞水平进行探究,后续还需进行动物实验验证。

#### 参考文献 (References)

- LIU C, XIAO K, XIE L. Progress in preclinical studies of macrophage autophagy in the regulation of ALI/ARDS [J]. Front Immunol, 2022, 13: 922702.
- [2] LI Y, CHEN X, ZHANG H, et al. 4-octyl itaconate alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting oxidative stress and inflammation [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 5547-58.
- [3] XU Q, WANG J. IGFBP7 aggravates sepsis-induced acute lung injury by activating the ERK1/2 pathway [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2020, 58(4): 247-54.
- [4] ZHOU Y, LI P, GOODWIN A J, et al. Exosomes from endothelial progenitor cells improve outcomes of the lipopolysaccharideinduced acute lung injury [J]. Crit Care, 2019, 23(1): 44.
- [5] GAO P, DUAN W, SHI H, et al. Silencing CircPALM2 inhibits sepsis-induced acute lung injury by sponging miR-376b-3p and targeting MAP3K1 [J]. Toxicol Res, 2023, 39(2): 275-94.
- [6] LIU G, WAN Q, LI J, et al. Circ\_0038467 regulates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in human bronchial epithelial cells through sponging miR-338-3p [J]. Thorac Cancer, 2020, 11(5): 1297-308.
- [7] MA K, WANG W, GAO C, et al. The role of circTMOD3 in regulating LPS-induced acute inflammation and injury in human lung fibroblast WI-38 cells [J]. Exp Lung Res, 2021, 47(7): 311-22.
- [8] JI X, GUO H, YIN S, et al. miR-139-5p functions as a tumor suppressor in cervical cancer by targeting TCF4 and inhibiting Wnt/β-catenin signaling [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 7739-48.
- [9] WANG Y, LI H, SHI Y, et al. miR-143-3p impacts on pulmonary inflammatory factors and cell apoptosis in mice with mycoplasmal pneumonia by regulating TLR4/MyD88/NF-κB pathway [J]. Biosci Rep, 2020, 40(7): BSR20193419.
- [10] ZHANG X, LIU X, CHANG R, et al. miR-139-5p protects septic mice with acute lung injury by inhibiting Toll-like receptor 4/Myeloid differentiation factor 88/Nuclear factor-κB signaling pathway [J]. Clinics, 2021, 76: e2484.

- [11] 汤建华, 刘建华, 徐涛, 等. 微RNA-203通过TLR4/NF-κB/NLRP3 通路保护肺泡上皮细胞免受脂多糖诱导损伤 [J]. 中国呼吸与 危重监护杂志 (TANG J H, LIU J H, XU T, et al. MiR-203 targets TLR4 to regulate NF-κB/NLRP3 pathway to protect alveolar epithelial cells from LPS-induced injury [J]. Chinese Journal of Respiratory and Critical Care Medicine), 2022, 21(6): 425-31.
- [12] CHEN X, ZHAO Y, WANG X, et al. FAK mediates LPSinduced inflammatory lung injury through interacting TAK1 and activating TAK1-NFκB pathway [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(7): 589.
- [13] SERRÉ J, MATHYSSEN C, AJIME T T, et al. Local nebulization of 1α,25(OH)2D3 attenuates LPS-induced acute lung inflammation [J]. Respir Res, 2022, 23(1): 76.
- [14] ZHU J, FENG B, XU Y, et al. Mesenchymal stem cells alleviate LPS-induced acute lung injury by inhibiting the proinflammatory function of Ly6C<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(10): 829.
- [15] GU L Z, SUN H. Lonicerin prevents inflammation and apoptosis in LPS-induced acute lung injury [J]. Front Biosci, 2020, 25(3): 480-97.
- ZHU J, ZHONG F, CHEN F, et al. circRNA\_0001679/miR-338-3p/DUSP16 axis aggravates acute lung injury [J]. Open Med, 2022, 17(1): 403-13.
- [17] WANG J, LI G, LIN S, et al. Circ-BICC1 knockdown alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced WI-38 cell injury through miR-338-3p/MYD88 axis [J]. Biochem Genet, 2023, 61(1): 170-86.
- [18] YU Y, YANG T, DING Z, et al. Circ\_0026579 alleviates LPSinduced WI-38 cells inflammation injury in infantile pneumonia [J]. Innate Immun, 2022, 28(1): 37-48.
- [19] ZHU X, JIANG S, WU Z, et al. Long non-coding RNA TTN antisense RNA 1 facilitates hepatocellular carcinoma progression via regulating miR-139-5p/SPOCK1 axis [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 578-88.
- [20] JU M, LIU B, HE H, et al. MicroRNA-27a alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis through modulating TLR4/MyD88/NF-κB pathway [J]. Cell Cycle, 2018, 17(16): 2001-18.
- [21] WU J, WU L, ZHANG L, et al. Overexpression of miR-224-5p alleviates allergic rhinitis in mice via the TLR4/MyD88/NF-κB pathway [J]. Exp Anim, 2021, 70(4): 440-9.
- [22] DENG Y, HUANG X, HU Y, et al. Deficiency of endothelial FGFR1 signaling via upregulation of ROCK2 activity aggravated ALI/ARDS [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1041533.
- [23] REN Y, LI L, WANG M, et al. Knockdown of circRNA paralemmin 2 ameliorates lipopolysaccharide-induced murine lung epithelial cell injury by sponging miR-330-5p to reduce ROCK2 expression [J]. Immunol Invest, 2022, 51(6): 1707-24.