

- [14] PAN H, KIM E, RANKIN GO, et al. Theaflavin-3, 3'-digallate inhibits ovarian cancer stem cells via suppressing Wnt/ β -Catenin signaling pathway[J]. J Funct Foods, 2018, 50(1): 1-7.
- [15] IMRAN A, BUTT MS, XIAO H, et al. Inhibitory effect of black tea (Camellia sinensis) theaflavins and thearubigins against HCT 116 colon cancer cells and HT 460 lung cancer cells[J/OL]. J Food Biochem, 2019, 43(5): e12822-e12832.DOI: 10.1111/jfbc.12822.
- [16] WANG F, ZHU W, YANG R, et al. LncRNA ZEB2-AS1 contributes to the tumorigenesis of gastric cancer via activating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2019, 456 (1/2): 73-83.
- [17] GU YY, CHEN MH, MAY BH, et al. Matrine induces apoptosis in multiple colorectal cancer cell lines in vitro and inhibits tumour growth with minimum side effects in vivo via Bcl-2 and caspase-3 [J]. Phytomedicine, 2018, 51(1): 214-225.
- [18] ZHOU J, ZHOU LY, TANG X, et al. Circ-Foxo3 is positively associated with the Foxo3 gene and leads to better prognosis of acute myeloid leukemia patients [J]. BMC Cancer, 2019, 19 (1): 930-940.
- [19] XING Y, ZHA WJ, LI XM, et al. Circular RNA circ-Foxo3 inhibits esophageal squamous cell cancer progression via the miR-23a/PTEN axis[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(3): 2595-2605.
- [20] WANG C, TAO W, NI S, et al. Circular RNA circ-Foxo3 induced cell apoptosis in urothelial carcinoma via interaction with miR-191-5p[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12(1): 8085-8094.

(收稿日期:2020-10-10,修回日期:2022-05-23)

引用本文:孙利平,宋亚玲,李春艳.阿米卡星调控微小RNA-223对脂多糖诱导的肺泡上皮细胞凋亡以及肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6表达的影响[J].安徽医药,2022,26(7):1310-1314.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.07.009.

◇ 药学研究 ◇



阿米卡星调控微小RNA-223对脂多糖诱导的肺泡上皮细胞凋亡以及肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6表达的影响

孙利平,宋亚玲,李春艳

作者单位:枣庄矿业集团中心医院儿科,山东 枣庄 277000

通信作者:李春艳,女,主任医师,研究方向为新生儿疾病,Email:zf4ysy@163.com

摘要: 目的 探讨阿米卡星对脂多糖(LPS)诱导的肺泡上皮细胞凋亡以及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6表达的影响和分子机制。方法 该研究于2020年1—7月完成,采用LPS诱导肺泡上皮细胞,构建急性肺损伤细胞模型。将肺泡上皮细胞分为对照组、模型组(LPS处理24 h)、实验组(由LPS和不同剂量的阿米卡星处理24 h)、anti-miR-NC组(转染微小RNA阴性对照后进行LPS处理)、anti-miR-223组(转染微小RNA-223抑制剂后进行LPS处理)、实验3+miR-NC组(转染微小RNA阴性对照后进行LPS和15 μ g/L阿米卡星处理)、实验3+miR-223组(转染微小RNA-223激动剂后进行LPS和15 μ g/L阿米卡星处理)。流式细胞术检测细胞凋亡;蛋白质印迹法(Western blotting)检测兔源裂解的胱天蛋白酶3(cl-caspase3)表达。酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞上清液中TNF- α 和IL-6含量。实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测miR-223(微小RNA-223)表达。

结果 与对照组比较,模型组肺泡上皮细胞凋亡率(25.81 $\pm$ 1.82)%、cl-caspase3(0.81 $\pm$ 0.06)和miR-223表达(0.17 $\pm$ 0.02)、细胞上清液中TNF- α (793.92 $\pm$ 34.49)ng/L和IL-6含量(412.04 $\pm$ 23.94)ng/L升高(P <0.05)。与模型组比较,实验组肺泡上皮细胞凋亡率(22.07 $\pm$ 1.69)%、cl-caspase3(0.68 $\pm$ 0.05)和miR-223表达(0.28 $\pm$ 0.03)、细胞上清液中TNF- α (478.38 $\pm$ 25.85)ng/L和IL-6含量(202.95 $\pm$ 15.55)ng/L降低(P <0.05)。与anti-miR-NC组比较,anti-miR-223组肺泡上皮细胞凋亡率(10.12 $\pm$ 1.13)%、cl-caspase3(0.27 $\pm$ 0.03)和miR-223表达(1.69 $\pm$ 0.08)、细胞上清液中TNF- α (403.48 $\pm$ 29.94)ng/L和IL-6含量(166.35 $\pm$ 15.61)ng/L降低(P <0.05)。与实验3+miR-NC组比较,实验3+miR-223组肺泡上皮细胞凋亡率(24.03 $\pm$ 1.64)%、cl-caspase3(0.75 $\pm$ 0.06)和miR-223表达(4.67 $\pm$ 0.22)、细胞上清液中TNF- α (726.18 $\pm$ 33.57)ng/L和IL-6含量(385.07 $\pm$ 22.15)ng/L升高(P <0.05)。

结论 阿米卡星对LPS诱导的肺泡上皮细胞具有明显的抗炎和抗凋亡作用,其机制可能与抑制miR-223表达有关。

关键词: 阿米卡星; 微小RNA-223; 肺泡上皮细胞; 细胞凋亡; 炎症反应; 急性肺损伤

Effects of amikacin on apoptosis, TNF- α and IL-6 expression of effects of amikacin on LPS-induced apoptosis of alveolar epithelial cells and the expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 by regulating miR-223

SUN Liping, SONG Yaling, LI Chunyan

Author Affiliation: Department of Pediatrics, Central Hospital of Zaozhuang Mining Group, Zaozhuang, Shandong 277000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and molecular mechanism of amikacin on the apoptosis, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) expression of lipopolysaccharide (LPS)-induced alveolar epithelial cells. **Methods** The experiment was completed from January to July 2020, LPS was used to induce alveolar epithelial cells to construct an acute lung injury cell model. Alveolar epithelial cells were assigned into control group, model group (treated with LPS for 24-hour), experimental group (treated with LPS and different doses of amikacin for 24-hour), and anti-miR-NC group (transfected with microRNA negative control followed by LPS treatment), anti-miR-223 group (transfected with microRNA-223 inhibitor and then performed LPS treatment), experiment 3+miR-NC group (transfected with microRNA-223 inhibitor) LPS and 15 μ g/L amikacin treatment after microRNA negative control), experiment 3+miR-223 group (LPS and 15 μ g/L amikacin treatment after microRNA-223 agonist transfection). Flow cytometry detected apoptosis; Western blotting detected cl-caspase 3 expression. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit detected the contents of TNF- α and IL-6 in cell supernatants. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) detected miR-223 expression. **Results** Compared with the control group, the apoptosis rate of alveolar epithelial cells in the model group was (25.81 $\pm$ 1.82)%, the expression of cl-caspase3 (0.81 $\pm$ 0.06) and miR-223 (0.17 $\pm$ 0.02), TNF- α in cell supernatant (793.92 $\pm$ 34.49) ng/L and IL-6 content (412.04 $\pm$ 23.94) ng/L increased, and the difference between groups was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the model group, the apoptosis rate of alveolar epithelial cells in the experimental group (22.07 $\pm$ 1.69)%, the expression of cl-caspase 3 (0.68 $\pm$ 0.05) and miR-223 (0.28 $\pm$ 0.03), the contents of TNF- α (478.38 $\pm$ 25.85) ng/L and IL-6 (202.95 $\pm$ 15.55) ng/L in the cell supernatant were decreased, and the difference between groups was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the anti-miR-NC group, the apoptosis rate of alveolar epithelial cells in the anti-miR-223 group was (10.12 $\pm$ 1.13)%, the expression of cl-caspase 3 (0.27 $\pm$ 0.03) and miR-223 (1.69 $\pm$ 0.08), The contents of TNF- α (403.48 $\pm$ 29.94) ng/L and IL-6 (166.35 $\pm$ 15.61) ng/L in the cell supernatant decreased, and the difference between groups was statistically significant ($P<0.05$). Compared with experiment 3+miR-NC group, the apoptosis rate of alveolar epithelial cells in experiment 3+miR-223 group was (24.03 $\pm$ 1.64)%, the expression of cl-caspase 3 (0.75 $\pm$ 0.06) and miR-223 (4.67 $\pm$ 0.22), The contents of TNF- α (726.18 $\pm$ 33.57) ng/L and IL-6 (385.07 $\pm$ 22.15) ng/L in the cells supernatant were increased, and the difference between the groups was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusions** Amikacin has obvious anti-inflammatory and anti-apoptotic effects on LPS-induced alveolar epithelial cells, and its mechanism may be related to the inhibition of miR-223 expression.

Key words: Amikacin; miR-223; Alveolar epithelial cells; Apoptosis; Inflammatory response; Acute lung injury

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种常见的肺部疾病,表现为肺容积减少、顺应性降低、通气/血流量不平衡、急性和持续性肺部炎症、弥漫性肺泡损伤,最终导致血氧不足和呼吸衰竭^[1-2]。阿米卡星是一种常用的氨基糖苷类抗生素,其通过抑制蛋白质合成,破坏细菌细胞壁完整性,对革兰阴性杆菌、青霉素耐药金黄色葡萄球菌感染均具有较强的抗菌作用^[3]。文献资料显示,阿米卡星和头孢他啶的联用可有效降低单独用药带来的并发症和不良反应,对社区获得性肺炎病人疗效显著^[4-5]。此外,阿米卡星和头孢地嗪联用还可明显抑制肺炎克雷伯氏菌感染引起的胸腺细胞凋亡^[6]。然而,阿米卡星对急性肺损伤是否具有保护作用尚未可知。脂多糖(LPS)是革兰阴性菌细胞外膜重要组成部分,其通过激活机体免疫细胞刺激宿主细胞分泌炎症细胞因子,参与机体炎症反应。目前,LPS诱导的肺泡上皮细胞已被广泛用于急性肺损伤机制研究^[7-8]。本研究通过探讨阿米卡星对LPS诱导的肺泡上皮细胞凋亡、炎症反应的影响,初步探索其可能分子机制,以期阿米卡星在ALI中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 大鼠肺泡上皮细胞、Ham's F-12K培养液购于武汉普诺赛生命科技有限公司;脂多糖

购于美国Sigma公司;阿米卡星(海康朗生物科技有限公司,CAS号37517-28-5,纯度 $\geq 98\%$);miR-223模拟物(mimics)及其对照(miR-NC)、miR-223抑制物(anti-miR-223)及其对照(anti-miR-NC)由上海生工公司提供;膜联蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒、免疫沉淀裂解缓冲液、硝酸纤维素膜、二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)、Trizol法试剂盒购于上海碧云天公司;兔源裂解的胱天蛋白酶3(cl-caspase3)抗体、胱天蛋白酶3前体(pro-caspase3)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、山羊抗兔IgG二抗购于上海艾博抗公司;大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购于上海钰博生物;PrimeScript RT试剂盒、SYBR Green Master Mix购于大连Takara公司。

1.2 细胞培养和实验分组 实验于2020年1—7月完成,大鼠肺泡上皮细胞采用Ham's F-12K培养液(添加10%胎牛血清、1%青链霉素双抗)于含95%空气、5%二氧化碳的37℃恒温细胞培养箱中培养。取对数期生长良好的细胞进行实验,实验分组如下:对照组(不作处理)、模型组(15 mg/L的LPS处理细胞24 h)、实验组(加入15 mg/L的LPS+不同浓度

的阿米卡星处理细胞 24 h, 实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组阿米卡星浓度分别为 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、15 $\mu\text{g/L}$ 、anti-miR-NC 组(转染微小 RNA 阴性对照后用 15 mg/L 的 LPS 处理细胞 24 h)、anti-miR-223 组(转染微小 RNA-223 抑制剂后用 15 mg/L 的 LPS 处理细胞 24 h)、实验 3+miR-NC 组(转染微小 RNA 阴性对照后进行 15 mg/L 的 LPS 和 15 $\mu\text{g/L}$ 的阿米卡星处理)、实验 3+miR-223 组(转染微小 RNA-223 激动剂后进行 15 mg/L 的 LPS 和 15 $\mu\text{g/L}$ 的阿米卡星处理)。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡 收集肺泡上皮细胞, 采用 PBS 液洗涤细胞 2 次。用 1 $\times$ 结合缓冲液调整为密度为 1×10^6 个/毫升的单细胞悬液。取 100 μL 细胞悬液, 按照细胞凋亡检测试剂盒步骤分别加入 Annexin V-FITC 和 PI, 室温避光孵育 15 min, 补加 400 μL 的 1 $\times$ 结合缓冲液, 混匀后进行流式细胞术检测。

1.4 Western blotting 检测 cl-caspase3、pro-caspase3 表达 采用含有蛋白酶抑制剂的预冷免疫沉淀裂解缓冲液分离总蛋白, BCA 法进行蛋白定量。取 30 μg 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将分离的细胞蛋白转移到硝酸纤维素膜。5% 脱脂乳 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭膜过夜, 然后分别与稀释的一抗、二抗室温孵育 2 h。GAPDH 作为内部对照, 增强型化学发光试剂进行显色, QuantityOne 软件分析目的蛋白表达水平。

1.5 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 水平 收集各组细胞培养液上清, 用 DMEM 培养液配制标准品。参照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 的含量。

1.6 RT-qPCR 检测 miR-223 表达 Trizol 法提取细胞总 RNA, 微量分光光度计测定 RNA 浓度。利用 PrimeScript RT 试剂盒合成单链互补 DNA, -20°C 保存备用。利用 SYBR Green Master Mix 试剂进行 qPCR 检测, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 miR-223 的表达水平。

miR-223: 正向引物 5'-AGCTGCTGTTGTGAATCAGGCCG-3', 反向引物 5'-TGCTGTCGTGAGTCG-3'。U6: 正向引物 5'-CTCGCTTCGGCAG-

CACATATACT-3', 反向引物 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTG-3'。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 每组设置 3 个平行实验, 重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验评估两组间差异; 采用单因素方差分析评估多组间差异, 进一步两组间比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿米卡星对 LPS 作用肺泡上皮细胞凋亡的影响 与对照组比较, 模型组肺泡上皮细胞凋亡率、cl-caspase3 蛋白表达增加, pro-caspase3 蛋白表达降低; 与模型组比较, 实验组肺泡上皮细胞凋亡率、cl-caspase3 蛋白表达降低, pro-caspase3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 1。

表 1 阿米卡星对脂多糖作用肺泡上皮细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

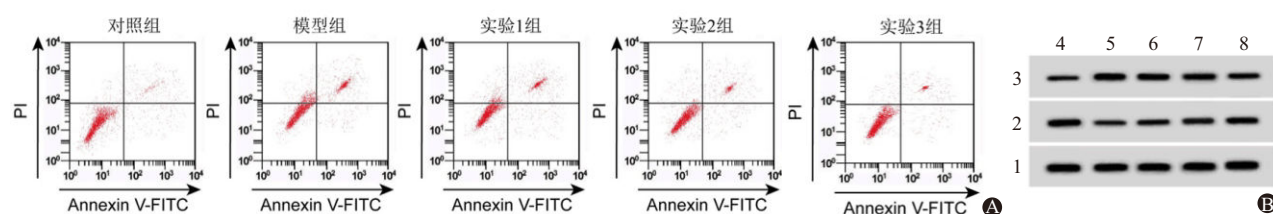
组别	重复次数	凋亡率/%	cl-caspase3	pro-caspase3
对照组	3	8.03 $\pm$ 0.98	0.20 $\pm$ 0.02	0.78 $\pm$ 0.06
模型组	3	25.81 $\pm$ 1.82 ^①	0.81 $\pm$ 0.06 ^①	0.17 $\pm$ 0.02 ^①
实验 1 组	3	22.07 $\pm$ 1.69 ^②	0.68 $\pm$ 0.05 ^②	0.28 $\pm$ 0.03 ^②
实验 2 组	3	18.34 $\pm$ 1.35 ^②	0.56 $\pm$ 0.04 ^②	0.43 $\pm$ 0.04 ^②
实验 3 组	3	13.93 $\pm$ 1.16 ^②	0.35 $\pm$ 0.03 ^②	0.56 $\pm$ 0.05 ^②
F 值		210.84	303.25	185.65
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: cl-caspase3 为兔源裂解的半胱天冬酶-3, pro-caspase3 为半胱天冬酶-3 酶原。

①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与模型组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 阿米卡星对 LPS 作用肺泡上皮细胞中 TNF- α 、IL-6 表达的影响 与对照组比较, 模型组肺泡上皮细胞培养液上清中 TNF- α 、IL-6 含量显著升高; 与模型组比较, 实验组肺泡上皮细胞培养液上清中 TNF- α 、IL-6 含量显著降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 阿米卡星对 LPS 作用肺泡上皮细胞中 miR-223 表达的影响 与对照组 1.00 $\pm$ 0.06 比较, 模型组肺泡上皮细胞中 miR-223 表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组 5.35 $\pm$ 0.14 比较, 实验组肺泡上皮细胞中 miR-223 表达(实验 1 组 4.26 $\pm$ 0.14, 实验 2 组 3.54 $\pm$



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—半胱天冬酶-3 酶原(pro-caspase3); 3—兔源裂解的半胱天冬酶-3(cl-caspase3); 4—对照组; 5—模型组; 6—实验 1 组; 7—实验 2 组; 8—实验 3 组。

图 1 阿米卡星对脂多糖作用肺泡上皮细胞凋亡(A)及 cl-caspase3、pro-caspase3 蛋白(B)表达的影响

表2 阿米卡星对脂多糖作用肺泡上皮细胞中TNF-α、IL-6表达的影响/(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	TNF-α	IL-6
对照组	3	359.13±23.15	135.58±13.50
模型组	3	793.92±34.49 ^①	412.04±23.94 ^①
实验1组	3	689.58±32.11 ^②	356.82±20.12 ^②
实验2组	3	562.29±30.03 ^②	294.81±19.34 ^②
实验3组	3	478.38±25.85 ^②	202.95±15.55 ^②
F值		304.58	318.92
P值		<0.001	<0.001

注:TNF-α为肿瘤坏死因子α,IL-6为白细胞介素6。
①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。

0.12,实验3组 1.89 ± 0.10)显著降低($P<0.05$)。对照组、模型组、实验组肺泡上皮细胞中miR-223表达比较,差异有统计学意义($F=2\,078.82, P<0.001$)。

2.4 抑制miR-223对LPS作用肺泡上皮细胞凋亡及TNF-α、IL-6表达的影响 与anti-miR-NC组比较,anti-miR-223组肺泡上皮细胞miR-223和cl-caspase3蛋白表达、细胞凋亡率显著降低,pro-caspase3蛋白表达显著增加,细胞培养液上清中TNF-α、IL-6含量显著降低($P<0.05$)。见图2,表3。

表3 抑制miR-223对脂多糖作用肺泡上皮细胞凋亡及TNF-α、IL-6表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

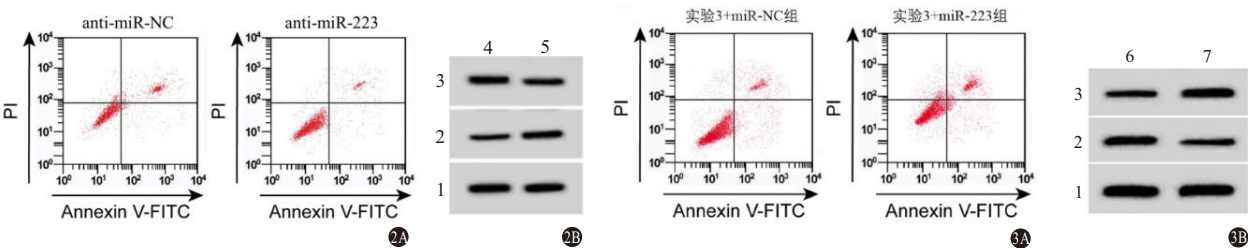
组别	重复次数	miR-223	凋亡率/%	cl-caspase3	pro-caspase3	TNF-α/(ng/L)	IL-6/(ng/L)
anti-miR-NC	3	3.34±0.11	25.80±1.82	0.82±0.06	0.18±0.02	792.93±34.39	411.84±23.92
anti-miR-223	3	1.69±0.08	10.12±1.13	0.27±0.03	0.65±0.05	403.48±29.94	166.35±15.61
t值		36.39	21.96	24.60	26.18	25.62	25.78
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:anti-miR-NC为miR阴性对照,anti-miR-223为miR-223抑制剂,miR-223为微小RNA-223,cl-caspase3为兔源裂解的半胱天冬酶-3,pro-caspase3为半胱天冬酶-3酶原,TNF-α为肿瘤坏死因子α,IL-6为白细胞介素6。

表4 miR-223可逆转阿米卡星对脂多糖作用肺泡上皮细胞凋亡及TNF-α、IL-6表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-223	凋亡率/%	cl-caspase3	pro-caspase3	TNF-α/(ng/L)	IL-6/(ng/L)
实验3+miR-NC组	3	1.86±0.10	13.86±1.08	0.33±0.03	0.58±0.05	470.46±24.28	205.17±14.96
实验3+miR-223组	3	4.67±0.22	24.03±1.64	0.75±0.06	0.22±0.02	726.18±33.57	385.07±22.15
t值		31.71	12.58	16.60	11.84	14.53	16.21
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:miR-223为微小RNA-223,cl-caspase3为兔源裂解的半胱天冬酶-3,pro-caspase3为半胱天冬酶-3酶原,TNF-α为肿瘤坏死因子α,IL-6为白细胞介素6。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—半胱天冬酶-3酶原(pro-caspase3);3—兔源裂解的半胱天冬酶-3(cl-caspase3);4—anti-miR-NC组(miR阴性对照组);5—anti-miR-223组(miR-223抑制剂组);6—实验3+miR-NC组;7—实验3+miR-223组。

图2 抑制miR-223对脂多糖作用肺泡上皮细胞凋亡(2A)及cl-caspase3、pro-caspase3蛋白(2B)表达的影响 图3 miR-223可逆转阿米卡星对脂多糖作用肺泡上皮细胞凋亡(3A)及cl-caspase3、pro-caspase3蛋白(3B)表达的影响

2.5 miR-223可逆转阿米卡星对LPS作用肺泡上皮细胞凋亡及TNF-α、IL-6表达的影响 与实验3+miR-NC组比较,实验3+miR-223组肺泡上皮细胞miR-223表达、cl-caspase3蛋白表达、细胞凋亡率显著升高,pro-caspase3蛋白表达显著降低,细胞培养液上清中TNF-α、IL-6含量显著升高($P<0.05$)。见图3,表4。

3 讨论

既往研究显示,雾化吸入阿米卡星脂质体混悬液除用于治疗禽结核菌引起的难治性非结核分枝杆菌肺病外,还可治疗慢性铜绿假单胞菌引起的呼吸机相关性肺炎,提高病人细菌清除率、治愈率,降低促炎因子分泌^[9-11]。本研究显示LPS诱导后肺泡上皮细胞凋亡率、cl-caspase3蛋白表达显著升高,pro-caspase3蛋白表达显著降低,阿米卡星干预呈剂量依赖性地抑制cl-caspase3蛋白表达,促进pro-caspase3蛋白表达,减轻LPS诱导的肺泡上皮细胞凋亡。当机体受到LPS刺激时,会释放一系列促炎细胞因子如TNF-α,而TNF-α也可激活中性粒细胞促进IL-6等炎症因子的释放,进一步扩大炎症反

应^[12]。本研究显示 LPS 诱导后 TNF- α 、IL-6 分泌量显著升高,而阿米卡星干预可显著抑制 TNF- α 、IL-6 分泌。此外,随着阿米卡星浓度逐渐增加,其对 TNF- α 、IL-6 分泌抑制作用逐渐增强。以上研究说明阿米卡星能够改善 LPS 诱导的肺泡上皮细胞凋亡和炎症反应,进而起到肺泡上皮细胞损伤保护作用。

miR-223 是一种造血细胞特异性微小 RNA (microRNA, miRNA), 它参与调节自然免疫稳态和结核分枝杆菌诱导的应激反应,与 NF- κ B 依赖性巨噬细胞分化、炎症、感染和肿瘤进展有关^[13-14]。近年研究显示,miR-223 在重症肺炎患儿血浆中表达显著增加,是重症肺炎早期诊断、判断炎症严重程度的重要指标^[15-16]。在内毒素血症小鼠肺组织中 miR-223 也呈高表达^[17]。此外,有研究指出 miR-223 从中性粒细胞向肺上皮细胞的细胞间转移可能通过抑制聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 表达而减轻 ALI^[18-19]。本研究发现 LPS 诱导后肺泡上皮细胞 miR-223 表达显著增加,而阿米卡星干预显著降低 miR-223 的表达水平,于是推测阿米卡星对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞损伤的保护作用可能与调控 miR-223 表达有关。进一步研究显示,抑制 miR-223 表达可抑制 cl-caspase3 蛋白表达,促进 pro-caspase3 蛋白表达,抑制 TNF- α 、IL-6 分泌,减轻 LPS 诱导的肺泡上皮细胞凋亡和炎症反应,与阿米卡星对肺泡上皮细胞损伤的保护作用一致。深入研究发现,上调 miR-223 表达还可逆转阿米卡星对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞凋亡和炎症损伤的保护作用。以上研究提示下调 miR-223 表达可能是阿米卡星发挥肺泡上皮细胞保护作用的重要机制。

综上,本研究发现阿米卡星显著降低了 LPS 诱导的肺泡上皮细胞凋亡和炎症反应,其机制可能与下调 miR-223 表达有关。这为阿米卡星在 ALI 中的应用奠定了实验基础。

参考文献

- [1] 杜晓华, 代泽兰, 杨为民. 炎性标记物在 ALI/ARDS 中的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(11): 860-865.
- [2] DKMEN N, CELLAT M, ETYEMEZ M, et al. Ameliorative effects of oleuropein on lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in rats[J]. Inflammation, 2021, 44(6): 2246-2259.
- [3] 郑亮, 仝倩, 周玉法, 等. 雾化吸入及气管滴入阿米卡星、替加环素对健康小鼠支气管和肺组织的损伤[J]. 山东大学学报(医学版), 2017, 55(12): 24-30, 35.
- [4] 郭慎. 头孢他啶联合阿米卡星治疗重症社区获得性肺炎 54 例临床分析[J]. 中国实用医药, 2011, 6(4): 161-162.
- [5] 高桂明. 头孢他啶联合阿米卡星治疗社区获得性肺炎的临床分析[J]. 中外医疗, 2011, 30(31): 115.
- [6] 王雪欣, 钱元恕. 头孢地秦和阿米卡星治疗肺炎克雷伯氏菌感染对小鼠胸腺细胞凋亡的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(1): 40-43.
- [7] DU HL, ZHAI AD, YU H. Synergistic effect of halofuginone and dexamethasone on LPS induced acute lung injury in type II alveolar epithelial cells and a rat model[J]. Mol Med Rep, 2020, 21(2): 927-935.
- [8] ZHU Q, ZHANG W, MU D, et al. Effects of genistein on lipopolysaccharide-induced injury of mouse alveolar epithelial cells and its mechanism[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(3): 544-551.
- [9] SWENSON C, PARIGI ADEL. Amikacin liposome inhalation suspension as a treatment option for refractory nontuberculous mycobacterial lung disease caused by mycobacterium avium complex[J]. Mayo Clin Proc, 2020, 95(1): 201-202.
- [10] 李虎, 杨春辉, 薛杨勇, 等. 雾化吸入阿米卡星治疗铜绿假单胞菌引起的呼吸机相关性肺炎的临床观察[J]. 内科急危重症杂志, 2016, 22(5): 335-337.
- [11] 陈山. 雾化吸入阿米卡星对老年呼吸机相关性肺炎血气指标和炎性因子的影响[J]. 安徽医药, 2018, 22(5): 965-967.
- [12] HANEKLAUS M, GERLIC M, O'NEILL LA, et al. miR-223: infection, inflammation and cancer[J]. J Intern Med, 2013, 274(3): 215-226.
- [13] GAO H, ZHANG Q, CHEN J, et al. Porcine IL-6, IL-1 β , and TNF- α regulate the expression of pro-inflammatory-related genes and tissue factor in human umbilical vein endothelial cells [J/OL]. Xenotransplantation, 2018, 25(5): e12408. DOI: 10.1111/xen.12408.
- [14] BAGHERI A, KHORRAM KHORSHID HR, MOWLA SJ, et al. Altered miR-223 expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. Avicenna J Med Biotechnol, 2017, 9(4): 189-195.
- [15] 邵慧芝, 吕勤, 陈赫赫. microRNA-223 在重症肺炎患儿血浆中的表达意义及其与预后的关系[J]. 中国医师杂志, 2016, 18(3): 402-405, 409.
- [16] 孙卉芳, 孙永法, 王丹凤. miR-223 和 miR-192 在重症肺炎患儿血清中的表达意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5): 647-650, 665.
- [17] 区丹敏. 内毒素血症小鼠肺组织中 miRNAs 的表达变化及功能的初步研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [18] JUDIT BÉRESN, KISS Z, KE MÜLLER, et al. Role of microRNA-223 in the regulation of poly (ADP-ribose) polymerase in pediatric patients with Crohn's disease[J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2018, 53(9): 1066-1073.
- [19] NEUDECKER V, BRODSKY KS, CLAMBIEY ET, et al. Neutrophil transfer of miR-223 to lung epithelial cells dampens acute lung injury in mice[J]. Sci Transl Med, 2017, 9(408): 5360.

(收稿日期: 2020-08-26, 修回日期: 2021-09-10)