

# 长链非编码基因 *MALAT1* 对 LPS 诱导的脓毒症大鼠免疫反应的调节作用及机制

周侑龙<sup>1</sup>, 杨韶华<sup>2</sup>, 张弛<sup>1</sup>, 张斌<sup>2</sup>, 杨新娟<sup>2</sup>

1. 河南省三门峡市中心医院 急诊科 (三门峡 472000); 2. 河南省三门峡市中心医院 ICU (三门峡 472000)

**【摘要】** 目的 探索长链非编码基因 *MALAT1* 对脂多糖(LPS)诱导的 U937 细胞和脓毒症大鼠体内免疫反应的调节作用及其分子机制。方法 将 U937 细胞分为 6 组:U937 对照组, LPS 组, scramble 组, si-*MALAT1* 组, miR-146a inhibitor 组和 si-*MALAT1* + miR-146a inhibitor 组。将 20 只 SD 大鼠分为健康对照组, LPS 模型组, scramble 干预组和 si-*MALAT1* 干预组。运用实时定量 PCR (qRT-PCR)检测各组 U937 细胞和大鼠肺组织中 *MALAT1* 与 miR-146a 的表达;荧光素酶报告分析确认 *MALAT1* 与 miR-146a 的靶向关系;Western blot 检测 p-P65, P65, TNF- $\alpha$  和 iNOS 表达;免疫组化检测肺组织 TNF- $\alpha$  和 iNOS 表达情况。结果 在 LPS 组 U937 细胞中 *MALAT1* 相对表达量高于 U937 ( $P < 0.001$ )。与 scramble 组相比, si-*MALAT1* 组 *MALAT1* 相对表达量降低, miR-146a 相对表达量升高 ( $P < 0.001$ )。 *MALAT1* 与 miR-146a 存在靶向关系。与 LPS 组相比, si-*MALAT1* 组 p-P65/P65 的比值, TNF- $\alpha$  和 iNOS 的相对表达量降低;miR-146a inhibitor 组 p-P65/P65 的比值, TNF- $\alpha$  和 iNOS 的相对表达量升高 ( $P < 0.001$ )。与 miR-146a inhibitor 组相比, si-*MALAT1* 和 miR-146a inhibitor 共转染组 p-P65/P65 的比值, TNF- $\alpha$  和 iNOS 的相对表达量降低 ( $P < 0.001$ )。与健康对照组相比, LPS 组和 scramble 组大鼠 miR-146a 相对表达量降低, p-P65/P65 的比值升高 ( $P < 0.01$ )。与 scramble 组相比, si-*MALAT1* 组大鼠 miR-146a 相对表达量升高, p-P65/P65 的比值降低 ( $P < 0.01$ )。LPS 组和 scramble 组大鼠中 TNF- $\alpha$  和 iNOS 阳性细胞数目高于健康对照组 ( $P < 0.001$ )。与 scramble 组相比, si-*MALAT1* 组大鼠中 TNF- $\alpha$  和 iNOS 阳性细胞数目减少 ( $P < 0.01$ )。结论 *MALAT1* 可靶向 miR-146a/NF- $\kappa$ B P65 对 LPS 诱导的脓毒症大鼠的免疫反应进行调节。

**【关键词】** *MALAT1* 脓毒症 miR-146a NF- $\kappa$ B P65 免疫反应

**LncRNA *MALAT1* Modulates the Immunoreaction of Rats with Lipopolysaccharide-induced Sepsis by Targeting the miR-146a/NF- $\kappa$ B P65 Pathway** ZHOU Yi-long<sup>1</sup>, YANG Shao-hua<sup>2</sup>, ZHANG Chi<sup>1</sup>, ZHANG Bin<sup>2</sup>, YANG Xin-juan<sup>2</sup>. 1, Department of Emergency of Sanmenxia Central Hospital of Henan Province, Sanmenxia 472000, China; 2, ICU of Sanmenxia Central Hospital of Henan Province, Sanmenxia 472000, China

**【Abstract】** **Objective** To determine the regulatory and molecular mechanism of lncRNA *MALAT1* in response to sepsis induced by lipopolysaccharide (LPS) in rats. **Methods** The expressions of lncRNA *MALAT1* and miR-146a in U937 cells and peripheral blood samples of the rats with and without LPS-induced sepsis were detected using quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR). The relationship between lncRNA *MALAT1* and miR-146a was affirmed through luciferase assay. The expressions of p-P65, P65, TNF- $\alpha$  and iNOS were tested by Western blot. The expressions of TNF- $\alpha$  and iNOS in the lung tissues of the rats were measured by immunohistochemistry. **Results** The rats with LPS-induced sepsis had higher expressions of lncRNA *MALAT1* in U937 cells than those without sepsis ( $P < 0.001$ ). In comparison with scramble, si-*MALAT1* attenuated the expression of lncRNA *MALAT1* and increased the expression of miR-146a ( $P < 0.001$ ). MiR-146a was the target of lncRNA *MALAT1*. si-*MALAT1* decreased the p-P65/P65 ratio and the expressions of TNF- $\alpha$  and iNOS in the rats with LPS-induced sepsis. In contrast, miR-146a inhibitor increased p-P65/P65 ratio and the expressions of TNF- $\alpha$  and iNOS in the rats with LPS-induced sepsis ( $P < 0.001$ ). Co-transfection with si-*MALAT1* attenuated the elevated level of p-P65/P65 ratio and expressions of TNF- $\alpha$  and iNOS resulting from miR-146a inhibitor ( $P < 0.001$ ). LPS and scramble decreased the expression of miR-146a and increased the p-P65/P65 ratio compared with the healthy controls ( $P < 0.01$ ). Compared with scramble, si-*MALAT1* increased the expression of miR-146a and attenuated the p-P65/P65 ratio ( $P < 0.01$ ). Higher numbers of TNF- $\alpha$  and iNOS positive cells were found in those with LPS-induced sepsis and those with scramble interventions ( $P < 0.001$ ). Compared with scramble, si-*MALAT1* reduced the number of TNF- $\alpha$  and iNOS positive cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** LncRNA *MALAT1* modulates the immunoreaction of rats with LPS-induced sepsis by targeting miR-146a/NF- $\kappa$ B P65.

**【Key words】** LncRNA *MALAT1* Sepsis miR-146a NF- $\kappa$ B P65 Immunoreaction

脓毒症是重症监护病房患者常见并发症,也是重症患者入院治疗的主要原因<sup>[1]</sup>。高死亡率和高昂的治疗成本使得脓毒症已成为重大医疗保健问题<sup>[2]</sup>。目前脓毒症的发病机制尚未明确,深入研究脓毒症的分子机制对脓毒症诊断及治疗具有重要意义。*MALAT1*是第一个被证实与非小细胞肺癌有关的长链非编码 RNA(lncRNA)<sup>[3]</sup>。*MALAT1*长为 8 700 nt,位于人染色体 11q13.1。*MALAT1*与多种疾病相关,尤其是各种癌症的增殖,侵袭和转移<sup>[4-5]</sup>。另外 *MALAT1*还与糖尿病内皮细胞功能紊乱、糖尿病视网膜病变、心肌梗死等多种疾病有关<sup>[1,6]</sup>。但关于 *MALAT1*在脓毒症中的功能及其调控机制鲜有报道。本研究主要探索 *MALAT1*对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的脓毒症大鼠免疫反应的调节作用及其分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系与主要试剂

人巨噬细胞 U937 购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),由郑州大学附属肿瘤医院提供。RPMI-1640 培养基和胎牛血清及转染试剂 TurboFect Transfection Regent 购自赛默飞世尔科技公司。RNA 提取试剂盒 RNaiso Plus reagent 和 miRNAs 表达检测试剂盒 RR718 购自日本 TaKaRa 公司。LPS 购自 Sigma 公司。双荧光素酶报告系统购自 Promega 公司。p-P65、P65、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )和一氧化氮合成酶(iNOS)抗体购自 Abcam 公司。

### 1.2 细胞培养及转染和药物处理

U937 细胞于含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养,当细胞增殖到约 80% 时传代继续培养。细胞分为 6 组:U937 对照组、LPS 组、scramble 组、si-*MALAT1* 组、miR-146a inhibitor 组和 si-*MALAT1* + miR-146a inhibitor 组。用于沉默 *MALAT1* 表达的干扰序列 si-*MALAT1* (正义链:5'-GAGGUGUAAAGGGAAUUUAUTT-3', 反义链:5'-AUAAAUCCCUUUACACCUCTT-3'), si-*MALAT1* 的阴性对照随机序列 scramble (正义链:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 反义链:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3') 购自上海 Genepharma 公司,并构建到 pHBLV-U6 载体上;抑制 miR-146a 表达的抑制子 miR-146a inhibitor (5'-AACCCAUGGAAUUCAGUUCUCA-3') 购自

上海 Genepharma 公司<sup>[7-8]</sup>。按照 TurboFect Transfection Regent 试剂盒说明书将 scramble、100 nmol/L si-*MALAT1* 质粒和 100 nmol/L miR-146a inhibitor 分别转染到 scramble 组, si-*MALAT1* 组和 miR-146a inhibitor 组的 U937 细胞中。si-*MALAT1* + miR-146a inhibitor 组 U937 细胞则同时转染 si-*MALAT1* 和 miR-146a inhibitor, 对照组和 LPS 组 U937 细胞则加入无菌水。转染 48 h 后 LPS 组、scramble 组、si-*MALAT1* 组、miR-146a inhibitor 组和 si-*MALAT1* + miR-146a inhibitor 组用 LPS (0.5  $\mu$ g/mL) 处理细胞 12 h, 对照组 U937 细胞用生理盐水处理。

### 1.3 脓毒症大鼠模型的建立和取材

20 只 SD 大鼠购自四川省医学科学院实验动物研究中心。大鼠随机分为 4 组( $n=5$ ):健康对照组、脓毒症模型组(模型组)、scramble 干预组和 si-*MALAT1* 干预组。scramble 干预组和 si-*MALAT1* 干预组大鼠分别静脉注射 scramble 和 si-*MALAT1* (2.5 mg/kg),每周一次,注射两周;健康对照组和模型组注射等量生理盐水。2 周之后,模型组、scramble 干预组和 si-*MALAT1* 干预组均注射 LPS (10 mg/kg)。12 h 后,处死大鼠并取出肺组织用于 qRT-PCR,蛋白印记及免疫组化检测。

### 1.4 实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *MALAT1* 与 miR-146a 的表达

用 RNA 提取试剂盒提取 U937 细胞和脓毒症大鼠肺组织的总 RNA 后反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 检测 *MALAT1* 与 miR-146a 的表达。*MALAT1* 上游引物:5'-AAAGCAAGG TCTCCCCACAAG-3', 下游引物:5'-GGTCTGT GCTAGATCAAAAGGCA-3'。miR-146a 上游引物:5'-CATGAGAACTGAATTCCATGGGTT-3', 下游通用引物及内参 *RNU6B* 引物由 RR718 试剂盒提供。根据说明书进行 qRT-PCR,用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 lncRNA *MALAT1* 和 miR-146a 的相对表达量。

### 1.5 靶向结合检测

lncRNA *MALAT1* 与 miR-146a 的靶向关系通过 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 和 miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 进行分析。

增强 miR-146a 表达的增强子 miR-146a mimic 质粒 (5'-UGAGAACUGAAUUCUCCAUUGGGUU-3'), miR-146a mimic 阴性对照随机序列 mimic-NC 质粒 (5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'),

以及 miR-146a mutant 购自上海 Genepharma 公司<sup>[8]</sup>。细胞分为 4 组: mimic-NC 阴性对照组, miR-146a mimic (50、100 nmol/L) 组和 miR-146a mutant 突变组。按照 TurboFect Transfection Regent 试剂盒说明书将 mimic-NC、miR-146a mimic (50、100 nmol/L) 和 miR-146a mutant 分别转入 U937 细胞, 48 h 后移去细胞培养板中的培养液, 加入 PBS 洗涤细胞, 弃去洗涤液, 在孔中加入 1× 的细胞裂解液将细胞裂解。室温下振荡器上振荡 5~10 min, 移入离心管中 3 000 r/min 离心 5 min 取上清进行发光测定。按照试剂盒说明书和仪器操作说明对待测样品进行发光值测定, 记录海肾荧光素酶 (Ranilla luciferase) 和萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase) 的发光值的比值表示。

## 1.6 Western blot 检测 p-P65、P65、TNF- $\alpha$ 和 iNOS 表达

收集待测 U937 细胞, 用 PBS 洗 3 次后加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 提取总蛋白。脓毒症大鼠肺组织经匀浆后进行总蛋白的提取。等量的蛋白经 SDS-PAGE 凝胶 (10%) 电泳分离后转至 PVDF 膜。用 5% 的牛血清白蛋白 (BSA) 进行封闭, 然后依次孵育一抗 (抗 p-P65、抗 P65、抗 TNF- $\alpha$  和抗 iNOS 抗体) 和二抗, 最后进行显色。蛋白的相对表达量为目标蛋白条带的灰度值与内参蛋白条带的灰度值的比值<sup>[9]</sup>。

## 1.7 免疫组化检测肺组织 TNF- $\alpha$ 和 iNOS 表达情况

将各组大鼠取出的肺组织用 PBS 清洗 8 次, 去掉坏死组织及血凝块。体积分数为 4% 多聚甲醛于 4℃ 下固定 24 h。PBS 清洗 3 次, 用 30%、50% 酒精分别脱水 10 min, 再用 70% 酒精脱水 3 次, 每次 10 min。脱水机中脱水后进行石蜡包埋和切片。石蜡切片经脱蜡和水化后用 1% triton-100 处理 15 min, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 15 min, 然后进行抗原修复。组织切片经 5% 羊血清封闭 30 min 后依次孵育一抗和二抗, 最后进行染色封片。显微镜下观察并拍照, 使用软件 ImagePro plus 计算阳性细胞数。

## 1.8 统计学方法

数据之间两两比较用独立的 *t* 检验,  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MALAT1 在 LPS 诱导的 U937 中过表达

如图 1A 所示, U937 经 LPS 诱导后, MALAT1

相对表达量约增加 5 倍 ( $P < 0.001$ )。

### 2.2 MALAT1 沉默后对 miR-146a 表达的影响

图 1A 显示, LPS 组和 scramble 组 MALAT1 相对表达量远高于对照组和 si-MALAT1 组 ( $P < 0.001$ )。由图 1B 可知, LPS 组和 scramble 组 miR-146a 相对表达量远低于对照组和 si-MALAT1 组 ( $P < 0.001$ )。MALAT1 沉默后可上调 miR-146a 的表达。

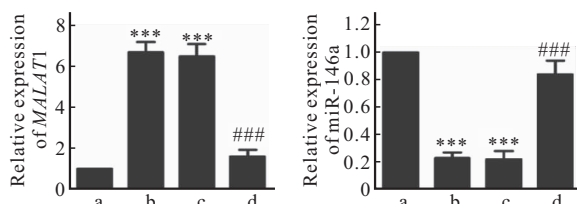


图 1 qRT-PCR 检测 LPS 诱导的 U937 细胞转染 si-MALAT1 后 MALAT1 和 miR-146a 的表达

Fig 1 The expression of MALAT1 and miR-146a detected by qRT-PCR in LPS-induced U937 cells transfected with si-MALAT1

a: U937 control group; b: LPS group; c: Scramble group; d: si-MALAT1 group. \* \* \*  $P < 0.001$ , vs. U937 control group and si-MALAT1 group; # # #  $P < 0.001$ , vs. scramble group and LPS group

### 2.3 MALAT1 与 miR-146a 靶向结合

见图 2。MALAT1 与 miR-146a 的靶向位点及 miR-146a 突变序列见图 2A。与 mimic-NC 阴性对照组相比, 50 nmol/L 的 miR-146a mimic 组荧光素酶活性减弱 ( $P < 0.05$ ), 100 nmol/L miR-146a mimic 组荧光素酶活性进一步

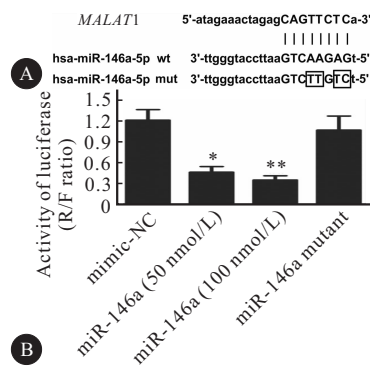


图 2 LncRNA MALAT1 靶向 miR-146a

Fig 2 MiR-146a was a target of lncRNA MALAT1

A: The targeted relationship between lncRNA MALAT1 and miR-146a was predicted by bioinformatics; B: The targeted relationship between lncRNA MALAT1 and miR-146a was affirmed through luciferase assay. \* \*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ , vs. mimic-NC group

步降低( $P < 0.01$ )。miR-146a 突变组荧光素酶活性与 mimic-NC 组无明显差异。上述结果表明, MALAT1 与 miR-146a 确实存在靶向关系。

#### 2.4 si-MALAT1 和 miR-146a inhibitor 对 LPS 诱导的 U937 细胞 miR-146a 表达和炎症反应的影响

图 3A 显示,与 LPS 组相比,转染 si-MALAT1 后 U937 细胞中 miR-146a 相对表达量升高,转染 miR-146a inhibitor 后 miR-146a 相对表达量降低( $P < 0.001$ )。与 miR-146a inhibitor 组相比,同时转染 si-MALAT1 和 miR-146a inhibitor 后 miR-146a 相对表达量升高( $P < 0.001$ )。如图 3B 所示,与 LPS 组相比,转染 si-MALAT1 后 p-P65/P65 的比值降低,转染 miR-146a inhibitor 后 p-P65/P65 的比值升高( $P < 0.001$ )。与 miR-146a inhibitor 组相比,同时转染 si-MALAT1 和 miR-146a inhibitor 后 p-P65/p65 的比值降低( $P < 0.001$ )。由图 3C 可知,si-MALAT1 组 TNF- $\alpha$  和 iNOS 的相对表达量低于 LPS 组,miR-146a inhibitor 组 TNF- $\alpha$  和 iNOS 的相对表达量远高于 LPS 组( $P < 0.001$ )。与 miR-

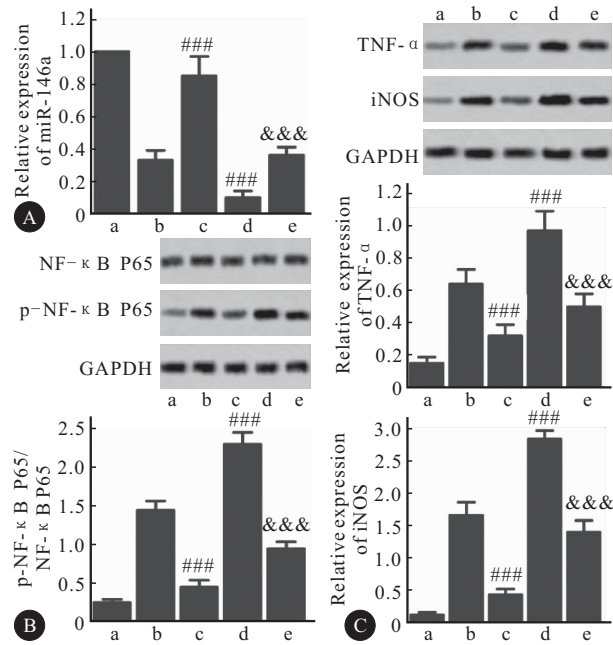


图 3 qRT-PCR 和蛋白印记分别检测 LPS 诱导的 U937 中 miR-146a (A) 的表达和炎症反应相关蛋白(B,C)的表达

Fig 3 The expression of miR-146a (A) and inflammatory reaction related proteins (B,C) detected by qRT-PCR and Western blot in LPS-induced U937 cells

a: U937 control group; b: LPS group; c: si-MALAT1 group; d: miR-146a inhibitor group; e: si-MALAT1 + miR-146a inhibitor group. ###  $P < 0.001$ , vs. b group; &&&  $P < 0.001$ , vs. d group

146a inhibitor 组相比, si-MALAT1 和 miR-146a inhibitor 共转染组 TNF- $\alpha$  和 iNOS 的相对表达量降低( $P < 0.001$ )。

#### 2.5 干扰 MALAT1 对 LPS 诱导的脓毒症大鼠 miR-146a 表达及 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达的影响

图 4A 显示,在 LPS 诱导的脓毒症大鼠模型肺组织中,模型组和 scramble 组大鼠 MALAT1 相对表达量高于健康对照组( $P < 0.01$ )。与 scramble 组相比, si-MALAT1 组大鼠 MALAT1 相对表达量降低( $P < 0.01$ )。图 4B 显示,与健康对照组相比,模型组和 scramble 组大鼠肺组织 miR-146a 相对表达量降低( $P < 0.01$ )。si-MALAT1 组大鼠肺组织 miR-146a 相对表达量高于 scramble 组( $P < 0.01$ )。由图 4C、4D 可知, LPS 组和 scramble 组大鼠肺组织 p-P65/P65 的比值高于健康对照组( $P < 0.01$ )。与 scramble 组相比, si-MALAT1 组大鼠肺组织 p-P65/P65 的比值降低( $P < 0.01$ )。

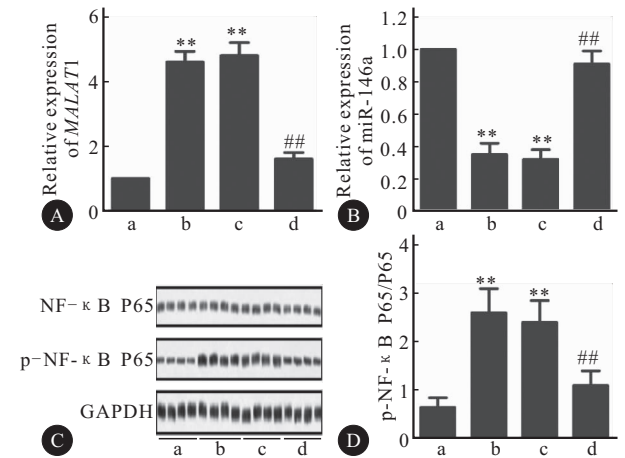


图 4 LPS 诱导的脓毒症大鼠中 MALAT1(A) 和 miR-146a(B) 的表达及 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白(C,D)的表达

Fig 4 The expression of MALAT1 (A), miR-146a (B) and NF- $\kappa$ B pathway related proteins (C, D) detected by qRT-PCR and Western blot in the rats with LPS-induced septic

a: Healthy control group; b: LPS model group; c: LPS + scramble group; d: LPS + si-MALAT1 group. \*  $P < 0.01$ , vs. a group; #  $P < 0.01$ , vs. c group

#### 2.6 干扰 MALAT1 对脓毒症大鼠肺组织 TNF- $\alpha$ 和 iNOS 表达的影响

图 5 显示, LPS 组和 scramble 组大鼠肺组织中 TNF- $\alpha$  和 iNOS 阳性细胞数高于健康对照组( $P < 0.001$ )。与 scramble 组相比, si-MALAT1 组大鼠中 TNF- $\alpha$  和 iNOS 阳性细胞数目减少( $P < 0.01$ )。上述结果表明,在 LPS 诱导的脓毒症大鼠模型中,



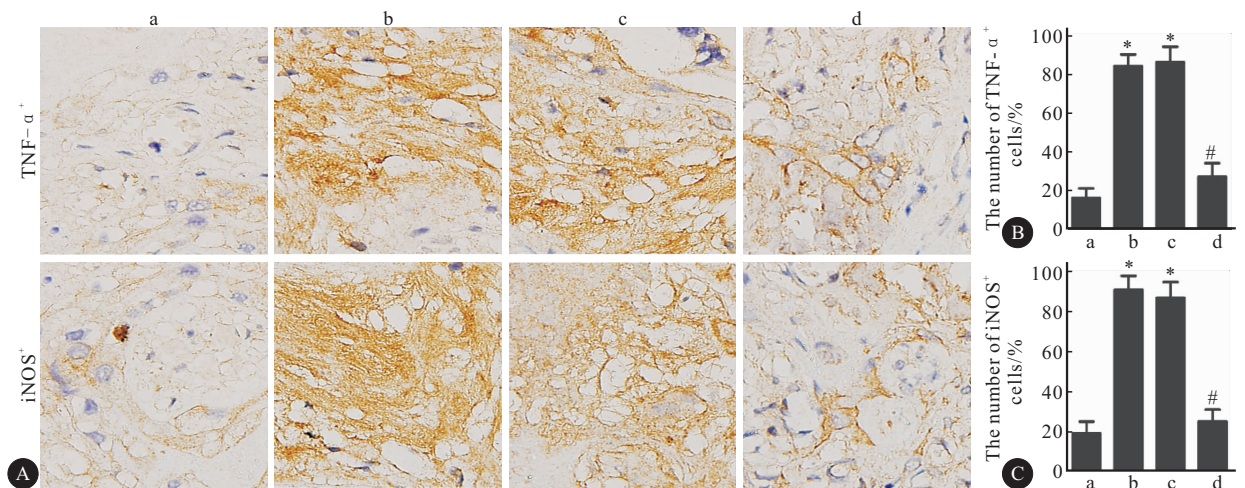


图 5 LPS 诱导的脓毒症大鼠中 TNF- $\alpha$  和 iNOS 的表达

Fig 5 The expression of TNF- $\alpha$  and iNOS detected by immunohistochemistry in the rats with LPS-induced septic

A: Representative pictures of the expression of TNF- $\alpha$  and iNOS immunohistochemical staining.  $\times 200$ ; B: Histogram of the expression of TNF- $\alpha$ ; C: Histogram of the expression of iNOS; a: Healthy control group; b: LPS model group; c: LPS + scramble group; d: LPS + si-MALAT1 group. \*  $P < 0.001$ , vs. healthy control group; #  $P < 0.01$ , vs. scramble group

干扰 MALAT1 可减弱 TNF- $\alpha$  和 iNOS 表达的升高,抑制炎症反应。

### 3 讨论

据报道脓毒症患者中存在多种 lncRNAs 和 miRNAs 的异常调控,这些 lncRNAs 和 miRNA 可能影响炎症反应<sup>[10]</sup>。CUI 等<sup>[11]</sup>发现 LPS 处理的人单核细胞 THP1 细胞中有 443 种 lncRNAs 上调表达,718 种 lncRNAs 下调表达。LPS 刺激骨髓来源的小鼠巨噬细胞后出现了 27 种异常表达的 lncRNAs,且大部分 lncRNAs 具有与 P65 结合的位点,这表明 lncRNAs 在骨髓来源的巨噬细胞的先天免疫反应中起着重要的调节作用<sup>[12]</sup>。据报道 LPS 刺激源自外周血单核细胞的巨噬细胞后 1 479 种 lncRNAs 表达异常,炎症因子水平升高,这揭示 lncRNAs 可能与源自外周血单核细胞的巨噬细胞的炎症反应相关<sup>[13]</sup>。有研究表明 MALAT1 可调节高糖诱导的内皮细胞炎症反应<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,在 LPS 诱导的人巨噬细胞 U937 中 MALAT1 高表达,miR-146a 低表达。干扰 MALAT1 后 MALAT1 表达降低,miR-146a 表达升高。这说明, MALAT1 和 miR-146a 可能与 LPS 诱导的 U937 炎症反应相关。

许多 lncRNAs 可通过靶向 miRNAs 来发挥功能<sup>[15-16]</sup>。KE 等<sup>[17]</sup>发现沉默 lncRNA HPTAIR 可调节 miR-326 表达抑制胶质神经瘤细胞增殖,迁

移及侵袭,诱导细胞凋亡。有数据显示 lncRNA CCAT1 可通过负向调控 miR-218 促进胆囊癌增殖及侵袭<sup>[18]</sup>。ZHOU 等<sup>[19]</sup>研究表明 lncRNA H19 与 miR-141 相互作用调节胃癌细胞增殖和迁移。在胆囊癌中,lncRNA MALAT1 可通过靶向 miR-363 促进细胞增殖抑制细胞凋亡<sup>[20]</sup>。炎症反应在脓毒症中起着重要作用<sup>[21]</sup>。NF- $\kappa$ B 是典型的炎症激活调节子<sup>[22]</sup>。有研究表明在由 THP1 诱导而来的巨噬细胞中,LPS 诱导处理后 MALAT1 高表达,且 MALAT1 可通过 NF- $\kappa$ B 通路调节巨噬细胞炎症反应<sup>[23]</sup>。据报道多种 miRNAs 可负向调控 NF- $\kappa$ B 通路,在炎症反应中起着重要的作用<sup>[24]</sup>。HUANG 等<sup>[25]</sup>研究显示在血管内皮细胞中, TGFB2-OT1 可靶向 miR4459 通过 NF- $\kappa$ B 通路调节炎症反应。miR-146a 已在多项研究中证实可抑制 NF- $\kappa$ B 通路减轻炎症反应<sup>[26-28]</sup>。本研究发现,通过生物信息学预测 MALAT1 与 miR-146a 具有靶向关系,荧光素酶实验也进一步证实了 MALAT1 与 miR-146a 的靶向关系。沉默 MALAT1 可通过上调 miR-146a 的表达,降低 NF- $\kappa$ B 的磷酸化水平,减弱 TNF- $\alpha$  和 iNOS 的表达,从而抑制 LPS 诱导的 U937 的炎症反应。

大量数据表明 lncRNAs 可调节免疫反应<sup>[29]</sup>。ZHOU 等<sup>[9]</sup>研究显示沉默 lncRNA Arid2-IR 可抑制小鼠肾小管上皮细胞促炎因子 TNF- $\alpha$  的表达,调控 NF- $\kappa$ B 依赖的肾脏炎症反应。有数据显示沉默

脓毒症小鼠 lncRNA *HOTAIR* 的表达可抑制心肌细胞 P65 磷酸化水平的升高和 TNF- $\alpha$  水平的增加<sup>[30]</sup>。XIAO 等<sup>[31]</sup>通过体外实验发现在肾脏透明细胞癌中, *MALAT1* 可靶向 miR-200s 促进肿瘤细胞增殖和转移。在糖尿病大鼠模型中, 沉默 *MALAT1* 可抑制视网膜的 TNF- $\alpha$  表达的升高, 减轻视网膜炎症反应<sup>[6]</sup>。本研究结果显示, 在 LPS 诱导的脓毒症大鼠模型中, 干扰 *MALAT1* 可上调 miR-146a 表达减弱 NF- $\kappa$ B P65 磷酸化水平的升高而抑制 NF- $\kappa$ B 通路活化, 减弱 TNF- $\alpha$  和 iNOS 表达的升高, 抑制炎症反应。综上所述, 本研究发现, *MALAT1* 可靶向 miR-146a/NF- $\kappa$ B P65 对 LPS 诱导的脓毒症大鼠的免疫反应进行调节。下一步计划研究 *MALAT1* 在脓毒症并发症中的作用, 为脓毒症的分子机制研究奠定基础。

### 参 考 文 献

- [1] VINCENT JL, BEUMIER M. Diagnostic and prognostic markers in sepsis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013, 11(3): 265-275.
- [2] YUKI K, MURAKAMI N. Sepsis pathophysiology and anesthetic consideration. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2015, 15(1): 57-69.
- [3] WU Y, HUANG C, MENG X, *et al.* Long noncoding RNA *MALAT1*: insights into its biogenesis and implications in human disease. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(34): 5017-5028.
- [4] HUANG JL, LIU W, TIAN LH, *et al.* Upregulation of long non-coding RNA *MALAT-1* confers poor prognosis and influences cell proliferation and apoptosis in acute monocytic leukemia. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1353-1362.
- [5] TIAN X, XU G. Clinical value of lncRNA *MALAT1* as a prognostic marker in human cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 2015, 5(9): e008653 [2018-01-12]. <https://bmjopen.bmj.com/content/5/9/e008653>. doi: 10.1136/bmjopen-2015-008653.
- [6] LIU JY, YAO J, LI XM, *et al.* Pathogenic role of lncRNA-*MALAT1* in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1506 [2018-01-12]. <https://www.nature.com/articles/cddis2014466>. doi: 10.1038/cddis.2014.466.
- [7] WANG SH, ZHANG WJ, WU XC, *et al.* The lncRNA *MALAT1* functions as a competing endogenous RNA to regulate MCL-1 expression by sponging miR-363-3p in gallbladder cancer. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(12): 2299-2308.
- [8] HE Y, SUN X, HUANG C, *et al.* MiR-146a regulates IL-6 production in lipopolysaccharide-induced RAW264. 7 macrophage cells by inhibiting Notch1. *Inflammation*, 2014, 37(1): 71-82.
- [9] ZHOU Q, HUANG XR, YU J, *et al.* Long noncoding RNA *Arid2-IR* is a novel therapeutic target for renal inflammation. *Mol Ther*, 2015, 23(6): 1034-1043.
- [10] HO J, CHAN H, WONG SH, *et al.* The involvement of regulatory non-coding RNAs in sepsis: a systematic review. *Crit Care*, 2016, 20(1): 383 [2018-01-13]. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1555-3>.
- [11] CUI H, XIE N, TAN Z, *et al.* The human long noncoding RNA lnc-IL7R regulates the inflammatory response. *Eur J Immunol*, 2014, 44(7): 2085-2095.
- [12] MAO AP, SHEN J, ZUO Z. Expression and regulation of long noncoding RNAs in TLR4 signaling in mouse macrophages. *BMC Genomics*, 2015, 16: 45 [2018-01-14]. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1270-5>.
- [13] 邓 桢, 姚芳苒, 叶建青, 等. 长链非编码 RNA 在脂多糖诱导人巨噬细胞炎症反应中的表达变化. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(4): 306-310.
- [14] PUTHANVEETIL P, CHEN S, FENG B, *et al.* Long non-coding RNA *MALAT1* regulates hyperglycaemia induced inflammatory process in the endothelial cells. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(6): 1418-1425.
- [15] PARASKEVOPOULOU MD, HATZIGEORGIOU AG. Analyzing miRNA-lncRNA interactions. *Methods Mol Biol*, 2016, 1402: 271-286.
- [16] DENG K, WANG H, GUO X, *et al.* The cross talk between long, non-coding RNAs and microRNAs in gastric cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(2): 111-116.
- [17] KE J, YAO YL, ZHENG J, *et al.* Knockdown of long non-coding RNA *HOTAIR* inhibits malignant biological behaviors of human glioma cells via modulation of miR-326. *Oncotarget*, 2015, 6(26): 21934-21949.
- [18] MA MZ, CHU BF, ZHANG Y, *et al.* Long non-coding RNA *CCAT1* promotes gallbladder cancer development via negative modulation of miRNA-218-5p. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1583 [2018-01-15]. <https://www.nature.com/articles/cddis2014541>. doi: 10.1038/cddis.2014.541.
- [19] ZHOU X, YE F, YIN C, *et al.* The interaction between miR-141 and lncRNA-H19 in regulating cell proliferation and migration in gastric cancer. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4): 1440-1452.
- [20] WANG SH, ZHANG WJ, WU XC, *et al.* The lncRNA *MALAT1* functions as a competing endogenous RNA to regulate MCL-1 expression by sponging miR-363-3p in gallbladder cancer. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(12): 2299-2308.
- [21] HAMERS L, KOX M, PICKKERS P. Sepsis-induced immunoparalysis: mechanisms, markers, and treatment options. *Minerva Anestesiol*, 2015, 81(4): 426-739.
- [22] MEDZHITOV R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 2010, 140(6): 771-776.
- [23] ZHAO G, SU Z, SONG D, *et al.* The long noncoding RNA *MALAT1* regulates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response through its interaction with NF-kappaB. *FEBS Lett*, 2016, 590(17): 2884-2895.
- [24] CHENG HS, NJOCK MS, KHYZHA N, *et al.* Noncoding RNAs regulate NF-kappaB signaling to modulate blood vessel inflammation. *Front Genet*, 2014, 5: 422 [2018-01-15]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00422>.
- [25] HUANG S, LU W, GE D, *et al.* A new microRNA signal pathway regulated by long noncoding RNA *TGFB2-OT1* in autophagy and inflammation of vascular endothelial cells. *Autophagy*, 2015, 11(12): 2172-2183. (下转第 875 页)

- 2016-who-2016.
- [2] LÜTHI B, DIACON AH. Tuberculosis and HIV-features of the co-infection. *Ther Umsch*,2011,68(7):389-394.
- [3] SAYES F, SUN L, DI LUCA M, *et al.* Strong immunogenicity and cross-reactivity of *Mycobacterium tuberculosis* ESX-5 type VII secretion: encoded PE-PPE proteins predicts vaccine potential. *Cell Host Microbe*,2012, 11(4):352-363.
- [4] MCNAMARA M, DANELISHVILI L, BERMUDEZ LE. The *Mycobacterium avium* ESX-5 PPE protein, PPE25-MAV, interacts with an ESAT-6 family Protein, MAV\_2921, and localizes to the bacterial surface. *Microb Pathog*, 2012,52(4):227-238.
- [5] BOTTAI D, DI LUCA M, MAJLESSI L, *et al.* Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation. *Mol Microbiol*,2012, 83(6):1195-1209.
- [6] ABDALLAH AM, SAVAGE ND, VAN ZON M, *et al.* The ESX-5 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates the macrophage response. *J Immunol*,2008,181(10):7166-7175.
- [7] MI Y, BAO L, GU D, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* PPE25 and PPE26 proteins expressed in *Mycobacterium smegmatis* modulate cytokine secretion in mouse macrophages and enhance mycobacterial survival. *Res Microbiol*,2016,168(3):234-243.
- [8] PARISH T, ROBERTS DM. *Mycobacteria* Protocols. 3 ed. New York: Humana Press Inc. ,2015:343-355.
- [9] AHMED A, DAS A, MUKHOPADHYAY S. Immunoregulatory functions and expression patterns of PE/PPE family members: roles in pathogenicity and impact on anti-tuberculosis vaccine and drug design. *IUBMB Life*, 2015,67(6):414-427.
- [10] FISHBEIN S, VAN WYK N, WARREN RM, *et al.* Phylogeny to function:PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol*, 2015,96(5):901-916.
- [11] SINGH P, RAO RN, REDDY JR, *et al.* PE11, a PE/PPE family protein of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in cell wall remodeling and virulence. *Sci Rep*,2016, 6:21624 [2017-08-21]. <https://www.nature.com/articles/srep21624>. doi:10.1038/srep21624.
- [12] SCHOREY JS, SCHLESINGER LS. Innate immune responses to tuberculosis. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(6) [2017-08-21]. <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819569.chap1>. doi:10.1128/microbiolspec.TB2-0010-2016.
- [13] FANG FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*,1997,99(12):2818-2825.
- [14] WARREN E, TESKEY G, VENKETARAMAN V. Effector mechanisms of neutrophils within the innate immune system in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Med*,2017,6(2):pii:E15 [2017-08-21]. <http://www.mdpi.com/2077-0383/6/2/15>. doi:10.3390/jcm6020015.
- [15] BENNOUNA S, BLISS SK, CURIEL TJ, *et al.* Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol*,2003,171(11):6052-6058.
- [16] LOWE DM, REDFORD PS, WILKINSON RJ, *et al.* Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends Immunol*, 2012,33(1):14-25.

(2018-05-30 收稿,2018-09-10 修回)

编辑 沈进

(上接第 870 页)

- [26] CHENG HS, SIVACHANDRAN N, LAU A, *et al.* MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol Med*,2013,5(7):1017-1034.
- [27] LI K, CHING D, LUK FS, *et al.* Apolipoprotein E enhances microRNA-146a in monocytes and macrophages to suppress nuclear factor-kappaB-driven inflammation and atherosclerosis. *Circ Res*, 2015, 117(1):e1-e11 [2018-01-30]. <http://circres.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.305844/-/DC1>.
- [28] HOESEL B, SCHMID JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*,2013,12:86 [2018-01-16]. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>.
- [29] LI CH, CHEN Y. Targeting long non-coding RNAs in cancers: progress and prospects. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013,45(8):1895-1910.
- [30] WU H, LIU J, LI W, *et al.* LncRNA-HOTAIR promotes TNF-alpha production in cardiomyocytes of LPS-induced sepsis mice by activating NF-kappaB pathway. *Biochem Biophys Res Commun*,2016,471(1):240-246.
- [31] XIAO H, TANG K, LIU P, *et al.* LncRNA MALAT1 functions as a competing endogenous RNA to regulate ZEB2 expression by sponging miR-200s in clear cell kidney carcinoma. *Oncotarget*,2015,6(35):38005-38015.

(2018-06-10 收稿,2018-09-20 修回)

编辑 汤洁