

王艳琼, 董利利, 李敏, 等. miR-27a 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路介导的自噬对肺炎链球菌诱导人肺泡上皮细胞损伤的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 27-34.

Wang YQ, Dong LL, Li M, et al. Effect of miR-27a on *Streptococcus pneumoniae* (SP)-induced injury of human alveolar epithelial cells by regulating autophagy mediated by the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 27-34.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.11.005

miR-27a 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路介导的自噬对肺炎链球菌诱导人肺泡上皮细胞损伤的影响

王艳琼, 董利利, 李敏, 张磊, 徐沙沙, 汤昱*

(郑州大学附属儿童医院 河南省儿童医院 郑州儿童医院呼吸科, 郑州 450018)

【摘要】 目的 探讨 miR-27a 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路介导的自噬对肺炎链球菌 (SP) 诱导人肺泡上皮细胞 (HPAEPiC) 损伤的影响。方法 用 1×10^8 CFU/mL SP 诱导 HPAEPiC, 在诱导前 48 h 使用 Lipofectamine 3000 转染试剂盒分别转染细胞 miR-27a-NC (miR-27a-NC 组)、miR-27a-inhibitor (miR-27a-inhibitor 组)、pcDNA-NC (pcDNA-NC 组)、pcDNA-PI3K (pcDNA-PI3K 组), 共转染细胞 miR-27a-NC 和 Si-NC (miR-27a-NC + Si-NC 组)、miR-27a-inhibitor 和 Si-NC (miR-27a-inhibitor + Si-NC 组)、miR-27a-NC 和 Si-PI3K (miR-27a-NC + Si-PI3K 组)、miR-27a-inhibitor 和 Si-PI3K (miR-27a-inhibitor + Si-PI3K 组)。另取非诱导细胞为对照组, 诱导且未转染细胞为诱导组。qRT-PCR 检测正常 HPAEPiC 和 SP 诱导的 HPAEPiC 中 miR-27a 表达水平; 生物信息学预测和双荧光素酶验证 miR-27a 和 PI3K 靶向关系; CCK-8 法检测细胞增殖活性; 流式细胞仪检测细胞凋亡率; ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6 和 IL-10 含量; Western blot 检测细胞中 PI3K、Beclin1 蛋白表达水平、LC3-II/I 比值以及 AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平。结果 与对照组相比, 诱导组细胞 miR-27a 表达水平、细胞凋亡率、IL-6 含量、Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值升高 ($P < 0.05$), PI3K 蛋白表达水平、细胞增殖率、IL-10 含量、AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平降低 ($P < 0.05$)。与 miR-27a-NC 组相比, miR-27a-inhibitor 组细胞 miR-27a 表达水平、细胞凋亡率、IL-6 含量、Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值降低 ($P < 0.05$), 细胞增殖率、IL-10 含量、AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平升高 ($P < 0.05$)。与 pcDNA-NC 组相比, pcDNA-PI3K 组细胞凋亡率、IL-6 含量、Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值降低 ($P < 0.05$), PI3K 蛋白表达水平、细胞增殖率、IL-10 含量、AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平升高 ($P < 0.05$)。结论 在 SP 诱导 HPAEPiC 损伤过程中, miR-27a 能够靶向抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 促进自噬, 而抑制 miR-27a 可激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 抑制自噬, 缓解 SP 所致 HPAEPiC 损伤。

【关键词】 miR-27a; PI3K/AKT/mTOR; 自噬; 肺炎链球菌; 肺泡上皮细胞; 损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 11-0027-08

Effect of miR-27a on *Streptococcus pneumoniae* (SP)-induced injury of human alveolar epithelial cells by regulating autophagy mediated by the PI3K/AKT/mTOR pathway

WANG Yanqiong, DONG Lili, LI Min, ZHANG Lei, XU Shasha, TANG Yu*

(Department of Respiratory, Children's Hospital Affiliated of Zhengzhou University, Henan Children's Hospital, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450018, China)

【基金项目】 2018 年河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (2018020614)。

【作者简介】 王艳琼 (1987—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 儿童呼吸。E-mail: yanqiongwork87@163.com

【通信作者】 汤昱 (1970—), 女, 本科, 主任医师, 研究方向: 儿童呼吸系统疾病及变态反应性疾病。E-mail: tangyu010312@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of miR-27a on *Streptococcus pneumoniae* (SP)-induced injury of HPAEpiCs by regulating autophagy mediated by the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Methods** HPAEpiCs were infected with 1×10^8 CFU/mL SP. At 48 hours before induction the cells were transfected with miR-27a-NC (miR-27a-NC group), miR-27a-inhibitor (miR-27a-inhibitor group), pcDNA-NC (pcDNA-NC group) or pcDNA-PI3K (pcDNA-PI3K group) or cotransfected with miR-27a-NC and Si-NC (miR-27a-NC+Si-NC group), miR-27a inhibitor and Si-NC (miR-27a inhibitor+Si-NC group), miR-27a-NC and Si-PI3K (miR-27a-NC+Si-PI3K group), or miR-27a-inhibitor and Si-PI3K (miR-27a-inhibitor+Si-PI3K group) using a Lipofectamine 3000 transfection kit. Non-induced cells were used as the control group, and induced, but untransfected, cells were used as the induction group. qRT-PCR was used to measure the expression level of miR-27a in normal and SP-induced alveolar epithelial cells. Bioinformatics prediction and dual luciferase assays were used to verify the targeting relationship between miR-27a and PI3K. CCK-8 Assays was used to assess proliferation activity. Flow cytometry was used to measure the apoptosis rate. ELISA were used to detect the contents of IL-6 and IL-10 in culture supernatants. Western blot was used to measure the expression levels of PI3K and Beclin1, the LC3-II/I ratio and the phosphorylation levels of AKT and mTOR. **Results** Compared with the control group, the expression level of miR-27a, apoptosis rate, IL-6 content, Beclin1 protein expression level and LC3-II/I ratio were higher in the induction group ($P < 0.05$) and the PI3K protein expression level, cell proliferation rate, IL-10 content and phosphorylation levels of AKT and mTOR were lower ($P < 0.05$). Compared with the miR-27a-NC group, the expression level of miR-27a, apoptosis rate, IL-6, Beclin1 protein expression level and LC3-II/I ratio were lower in the miR-27a-inhibitor group content ($P < 0.05$), the cell proliferation rate, content of IL-10, the protein phosphorylation levels of AKT and mTOR were higher ($P < 0.05$). Compared with the pcDNA-NC group, the apoptosis rate, IL-6 content, Beclin1 protein expression level and LC3-II/I ratio were lower in the pcDNA-PI3K group ($P < 0.05$) and the PI3K protein expression level, cell proliferation rate, IL-10 content and phosphorylation levels of AKT and mTOR were higher ($P < 0.05$). **Conclusions** During injury of HPAEpiCs induced by SP, miR-27a inhibits the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and promotes autophagy. Inhibition of miR-27a activates the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, inhibits autophagy and alleviates SP-induced injury of HPAEpiCs.

【Keywords】 miR-27a; PI3K/AKT/mTOR; autophagy; *Streptococcus pneumoniae*; alveolar epithelial cells; injury

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, SP) 是一种革兰氏阳性的胞外细菌,通常是定植在人们口腔和鼻咽部的正常菌群,当机体免疫功能受损时可引起急性感染,是造成社区获得性肺炎的常见原因,重者可危及生命^[1],其在人肺泡上皮细胞 (human alveolar epithelial cells, HPAEpiC) 中可通过活性氧的过度生成和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路的抑制,显著增加微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 的表达来激活自噬^[2]。而自噬可通过调节炎症介质的释放,进一步调控肺泡上皮细胞的损伤^[3]。另外,miRNAs 是在真核生物中发现的一类内源性的具有基因调控功能的非编码 RNA,其大小长约 20~25 个核苷酸,其中,miR-27a 在细胞生长和发育过程中起关键作用^[4]。前人研究发现,miR-27a 可通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (AKT)/mTOR 信号通路调节骨关节炎中关节软骨细胞的自噬和凋亡^[5],而沉默 miR-27a 可通过激活脾酪氨酸激酶依赖的 mTOR 信号通路,调控黑色素瘤细胞自噬和凋亡^[6]。但是,目前 miR-27a 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路对 SP 诱导 HPAEpiC 自噬和

损伤的影响尚未见报道。因此,本研究使用 SP 诱导 HPAEpiC 同时下调 miR-27a 或过表达/干扰 PI3K,观察其对细胞增殖、凋亡、自噬及 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响,初步探讨其分子机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株和菌株

HPAEpiC (货号:XY-XB-1271) 购自上海烜雅生物科技有限公司;肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, SP; 货号:ATCC 49619), 购自上海欣硕生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI1640 培养基, Gibco 公司;白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-10 (IL-10) ELISA 试剂盒,上海酶联生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司;逆转录试剂盒,Genecopoeia 公司;双荧光素酶检测试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒,索莱宝生物科技有限公司;qRT-PCR 检测试剂盒,上海生工生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒,济南远达晶

美生物科技有限公司;野生型和突变型 PI3K 3' UTR 荧光素酶报告基因载体 (PI3K-WT、PI3K-MUT)、pcDNA-NC(过表达阴性对照)、pcDNA-PI3K (PI3K 过表达载体)、Si-NC(RNA 干扰阴性对照)和 Si-PI3K(RNA 干扰 PI3K 载体)、miR-27a NC(miR-27a 阴性对照)、miR-27a 模拟物(miR-27a mimics)、miR-27a 抑制物(miR-27a inhibitor)以及 miR-27a、U6 引物,上海生工生物工程有限公司;Lipofectamine 3000 转染试剂盒,Invitrogen 公司;PVDF 膜、 β -actin 鼠抗,Sigma 公司;ECL 显色试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒,北京中山金桥生物科技有限公司;PI3K、Beclin1、LC3-I、LC3-II、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR、 β -actin 鼠抗和辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 二抗,Abcam 公司;尼康 SMZ745 光学显微镜,上海普赫生物科技有限公司;FACSCanto 流式细胞仪,Beckman 公司;TL988 qRT-PCR 仪,西安天隆科技有限公司;ChemiDoc-MP 全能型凝胶成像分析系统,山东三瑞科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与分组

HPAEPiC 使用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基(含 100 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素),置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞生长密度达 90%左右时,在培养基中加入菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL 的 SP 诱导损伤^[7]。在加入 SP 诱导前 48 h 使用 Lipofectamine 3000 转染试剂盒分别转染细胞 miR-27a-NC(miR-27a-NC 组)、miR-27a-inhibitor(miR-27a-inhibitor 组)、pcDNA-NC(pcDNA-NC 组)、pcDNA-PI3K(pcDNA-PI3K 组),共转染细胞 miR-27a-NC 和 Si-NC(miR-27a-NC+Si-NC 组)、miR-27a-inhibitor 和 Si-NC(miR-27a-inhibitor+Si-NC 组)、miR-27a-NC 和 Si-PI3K(miR-27a-NC+Si-PI3K 组)、miR-27a-inhibitor 和 Si-PI3K(miR-27a-inhibitor+Si-PI3K 组)。另取非诱导细胞为对照组,诱导且未转染细胞为诱导组。

1.3.2 qRT-PCR 检测正常 HPAEPiC 和 SP 诱导的 HPAEPiC 中 miR-27a 表达水平

RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA,逆转录试剂盒得到 cDNA,以 cDNA 为模板,按照 qRT-PCR 试剂盒说明书配置 PCR 反应体系、设定反应条件。以 U6 作为内参,根据 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 算法计算 miR-27a 表达水平,miR-27a 正、反向引物为 5'-TCCGTGAGAGC TGGAACACC-3'、5'-TGTTCTAACTAAGTCCAGCC G-3'、U6 正、反向引物为 5'-GACGGCTTCCCAATAA

CAG-3'、5'-ATTGAGGCTTCAGCACCAC-3'。

1.3.3 生物信息学预测和双荧光素酶验证 miR-27a 和 PI3K 的靶向关系

采用 TargetScan 在线网站(<http://www.targetscan.org/>)对 miR-27a 和 PI3K 的结合位点进行分析。取对数生长期的 HPAEPiC 接种于 96 孔板,常规培养 24 h 后,将细胞分为 miR-27a-mimics + PI3K-WT 组、miR-27a-NC + PI3K-WT 组、miR-27a-mimics + PI3K-MUT 组和 miR-27a-NC + PI3K-MUT 组,每组设 6 个复孔,使用 Lipofectamine 3000 转染试剂盒进行细胞共转染。转染 48 h 后,按照双荧光素酶检测试剂盒说明书检测荧光素酶活性,验证 miR-27a 与 PI3K 的靶向关系。

1.3.4 CCK-8 法检测各组细胞增殖活性

收集各组细胞,每孔 100 μ L 接种至 96 孔板中,加入浓度为 10% 的 CCK-8 溶液,继续培养 2 h 后,于酶标仪上测定各孔在 450 nm 波长下的 OD 值,细胞增殖率(%) = (实验组 OD_{450 nm} - 空白组 OD_{450 nm}) / (对照组 OD_{450 nm} - 空白组 OD_{450 nm})。

1.3.5 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率

收集各组细胞,1200 r/min 离心 5 min,弃培养基,参照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书上流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.3.6 ELISA 检测各组细胞上清液中 IL-6 和 IL-10 含量

每组各取约 2 mL 细胞悬液,1200 r/min 离心 10 min,取上清,严格按照 IL-6 和 IL-10 ELISA 试剂盒说明书进行检测,每组设置 6 个重复。

1.3.7 Western blot 法检测各组细胞中 PI3K/AKT/mTOR 通路及自噬相关蛋白表达水平

收集各组细胞,使用蛋白提取试剂盒提取总蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量,依次进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、转 PVDF 膜、5%脱脂奶粉封闭、1:2000 浓度稀释后的 PI3K、Beclin1、LC3-I、LC3-II、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR、 β -actin 鼠抗 4℃ 过夜孵育、含辣根过氧化物酶缀合的二抗(1:5000)中室温孵育 2 h,用 ECL 显色试剂盒显色,以 β -actin 内参,全能型凝胶成像分析系统分析蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 正常和 SP 诱导的 HPAEpiC 中 miR-27a 及 PI3K 蛋白表达水平

与对照组 miR-27a (1.00 ± 0.00)、PI3K 蛋白 (0.84 ± 0.09) 相比,诱导组细胞中 miR-27a 表达水平 (1.73 ± 0.18) 升高 ($P < 0.05$), PI3K 蛋白表达水平 (0.29 ± 0.03) 降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 下调 miR-27a 或过表达 PI3K 对 SP 诱导 HPAEpiC 增殖、凋亡及炎症因子影响

与对照组相比,诱导组 miR-27a 表达水平、细胞凋亡率、IL-6 含量升高 ($P < 0.05$), PI3K 蛋白水平、细胞增殖率和 IL-10 含量降低 ($P < 0.05$); 与 miR-27a-NC 组相比, miR-27a-inhibitor 组 miR-27a 表达水平、细胞凋亡率、IL-6 含量降低 ($P < 0.05$), 细胞增殖率和 IL-10 含量升高 ($P < 0.05$); 与 pcDNA-NC 组相比, pcDNA-PI3K 组细胞凋亡率、IL-6 含量降低 ($P < 0.05$), PI3K 蛋白水平、细胞增殖率和 IL-10 含量升高 ($P < 0.05$)。见图 2、表 1。

2.3 下调 miR-27a 或过表达 PI3K 对 SP 诱导 HPAEpiC 中 Beclin1、LC3-I、LC3-II、AKT、mTOR 蛋白表达影响

与对照组相比,诱导组、miR-27a-NC 组和 pcDNA-NC 组细胞 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值升高 ($P < 0.05$), AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平降低 ($P < 0.05$); miR-27a-inhibitor 组细胞 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值降低 ($P < 0.05$), AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平升高 ($P < 0.05$); 与 pcDNA-NC 组相比, pcDNA-PI3K 组细胞 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值降低 ($P < 0.05$), AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平升高 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 miR-27a 和 PI3K 基因靶向关系的预测与验证

生物信息学预测结果显示, miR-27a 序列上存在与 PI3K 3' UTR 结合的连续位点。与 miR-27a-NC+PI3K-WT 组 (1.00 ± 0.00) 相比, miR-27a-mimics+PI3K-WT 组 (0.37 ± 0.04) 荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$), 而 miR-27a-NC+PI3K-MUT 组 (0.95 ± 0.10) 和 miR-27a-mimics+PI3K-MUT 组 (1.03 ± 0.11) 荧光素酶活性无明显变化。见图 4。

2.5 下调 miR-27a 和干扰 PI3K 对 SP 诱导 HPAEpiC 增殖、凋亡及炎症因子含量的影响

与 miR-27a-NC+Si-NC 组相比, miR-27a-inhibitor+

Si-NC 组细胞增殖率和 IL-10 含量升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率和 IL-6 含量降低 ($P < 0.05$); miR-27a-NC+Si-PI3K 组细胞增殖率和 IL-10 含量降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率和 IL-6 含量升高 ($P < 0.05$)。miR-27a-inhibitor+Si-PI3K 组细胞增殖率和 IL-10 含量较 miR-27a-inhibitor+Si-NC 组降低 ($P < 0.05$), 较 miR-27a-inhibitor+Si-PI3K 组升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率和 IL-6 含量较 miR-27a-inhibitor+Si-NC 组升高 ($P < 0.05$), 较 miR-27a-inhibitor+Si-PI3K 组降低 ($P < 0.05$)。见图 5、图 6。

2.6 下调 miR-27a 和干扰 PI3K 对 SP 诱导 HPAEpiC 的蛋白表达影响

与 miR-27a-NC+Si-NC 组相比, miR-27a-inhibitor+Si-NC 组细胞 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值降低 ($P < 0.05$), AKT 和 mTOR 蛋白磷酸化水平升高 ($P < 0.05$); miR-27a-NC+Si-PI3K 组细胞 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值升高 ($P < 0.05$), AKT 和 mTOR 蛋白磷酸化水平降低 ($P < 0.05$)。miR-27a-inhibitor+Si-PI3K 组细胞 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值较 miR-27a-inhibitor+Si-NC 组升高 ($P < 0.05$), 较 miR-27a-NC+Si-PI3K 组降低 ($P < 0.05$), AKT 和 mTOR 蛋白磷酸化水平较 miR-27a-inhibitor+Si-NC 组降低 ($P < 0.05$), 较 miR-27a-NC+Si-PI3K 组升高 ($P < 0.05$)。见图 7。

3 讨论

细菌性肺炎每年可造成多达 200 万人死亡, 最常见的肺炎病原体是肺炎球菌和 SP, 约占社区获得性肺炎的半数, 医院获得性肺炎的 3%~10%^[8], 对人类健康造成严重威胁。刘煌等^[9]研究发现 SP 感染肺泡上皮细胞后, IL-10 含量显著降低, IL-6 含量显著升高, 引起炎症反应且使肺泡上皮细胞凋亡。本研究参照王勇等^[7]方法, 用 1×10^8 CFU/mL SP 诱导 HPAEpiC, 发现细胞凋亡率、IL-6 含量显著升高,

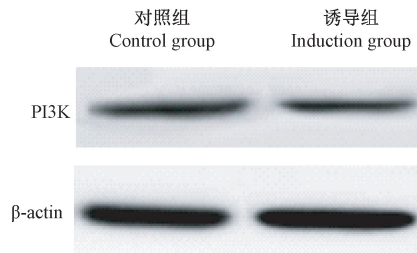


图 1 对照组和诱导组 PI3K 蛋白表达图

Figure 1 PI3K protein expression in control group and induction group

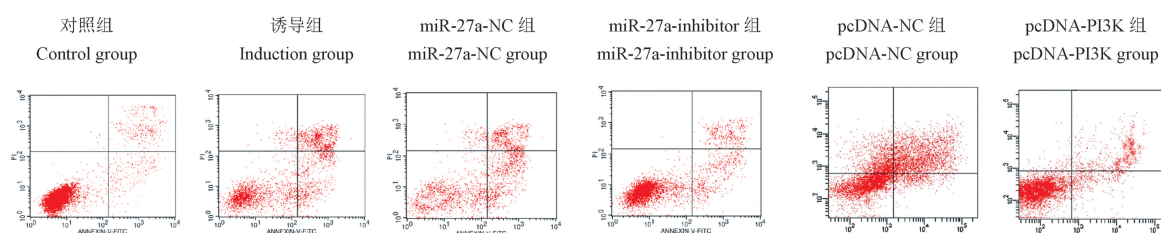


图 2 各组细胞凋亡检测图

Figure 2 Apoptosis detection of each group

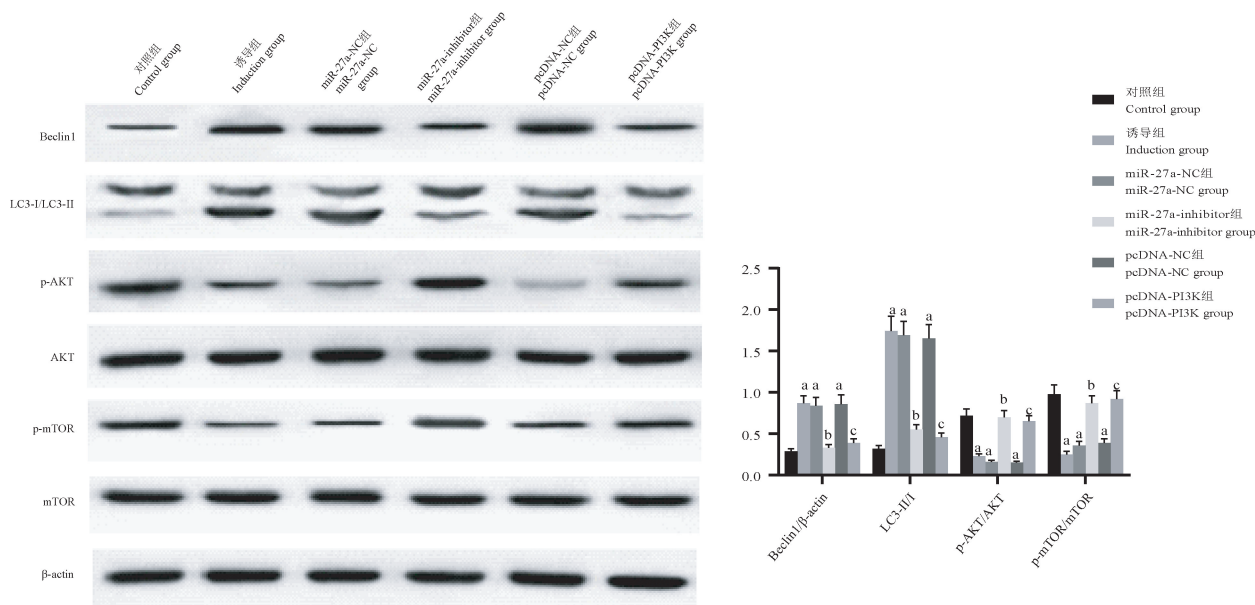
表 1 各组细胞增殖、凋亡及炎症因子含量比较 ($n=6$)

Table 1 Proliferation, apoptosis and inflammatory factor content of each group

组别 Groups	miR-27a	PI3K 蛋白 PI3K protein	增殖率 (%) Proliferation rate	凋亡率 (%) Apoptosis rate	IL-10 (ng/L)	IL-6 (ng/mL)
对照组 Control group	1.00±0.00	1.00±0.00	100.00±0.00	6.58±0.67	24.39±2.55	5.46±0.59
诱导组 Induction group	1.73±0.18 ^a	0.36±0.04 ^a	37.58±3.85 ^a	43.29±4.49 ^a	9.27±0.94 ^a	18.46±1.92 ^a
miR-27a-NC 组 miR-27a-NC group	1.69±0.17 ^a	—	36.77±3.79 ^a	45.82±4.63 ^a	8.69±0.88 ^a	19.32±2.04 ^a
miR-27a-inhibitor 组 miR-27a-inhibitor group	0.92±0.10 ^b	—	89.24±9.33 ^b	14.58±1.56 ^b	19.35±1.97 ^b	8.33±0.87 ^b
pcDNA-NC 组 pcDNA-NC group	—	0.45±0.05 ^a	35.24±3.69 ^a	46.38±4.73 ^a	10.32±1.18 ^a	17.55±1.84 ^a
pcDNA-PI3K 组 pcDNA-PI3K group	—	1.32±0.16 ^c	87.11±8.92 ^c	12.74±1.39 ^c	20.25±2.19 ^c	9.27±0.98 ^c

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 miR-27a-NC 组相比,^b $P<0.05$;与 pcDNA-NC 组相比,^c $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the miR-27a-NC group, ^b $P<0.05$. Compared with the pcDNA-NC group, ^c $P<0.05$.

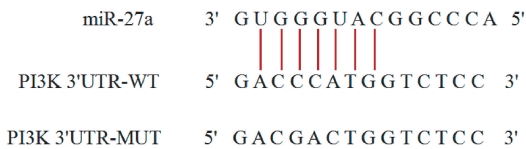


注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 miR-27a-NC 组相比,^b $P<0.05$;与 pcDNA-NC 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 3 各组细胞自噬相关蛋白及 AKT, mTOR 蛋白磷酸化水平比较

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the miR-27a-NC group, ^b $P<0.05$. Compared with the pcDNA-NC group, ^c $P<0.05$.

Figure 3 Autophagy related proteins and phosphorylation levels of AKT and mTOR proteins of each group



注: WT: 野生型; MUT: 突变型; UTR: 非翻译区。

图 4 生物信息学预测 miR-27a 和 PI3K3' UTR 结合位点

Note. WT, Wild-type. MUT, Mutant-type. UTR, Untranslated region.

Figure 4 Bioinformatics prediction of miR-27a and PI3K3' UTR binding sites

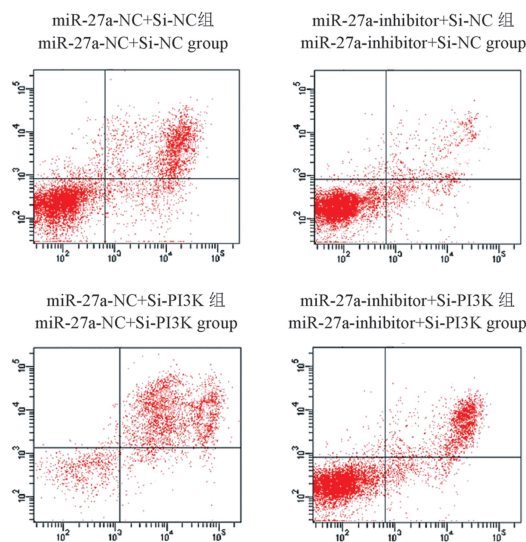
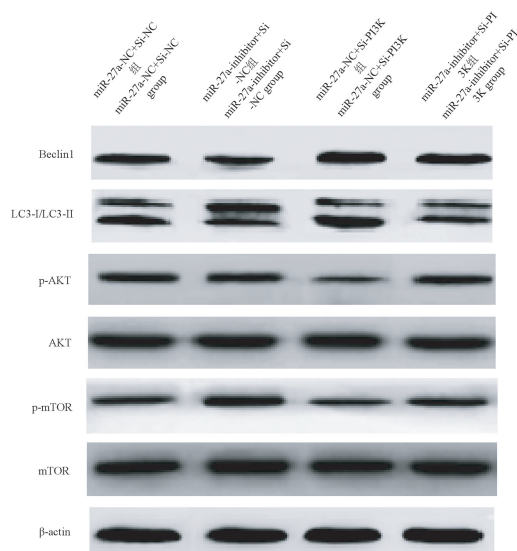


图 6 各组细胞凋亡检测图

Figure 6 Apoptosis detection of each group

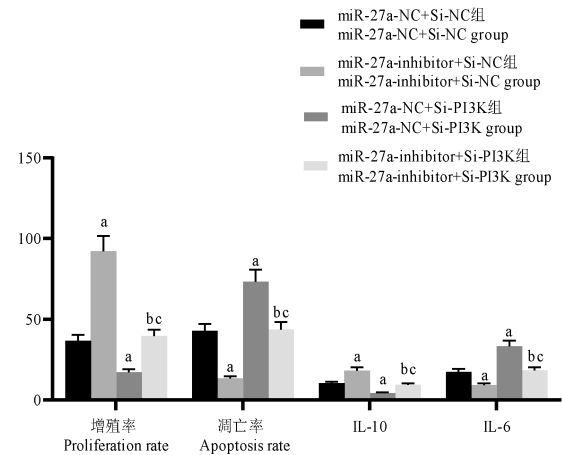


注: 与 miR-27a-NC+Si-NC 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 miR-27a-inhibitor+Si-NC 组相比, ^b $P < 0.05$; 与 miR-27a-NC+Si-PI3K 组相比, ^c $P < 0.05$ 。

图 7 各组细胞自噬相关蛋白及 AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平

Note. Compared with the miR-27a-NC+Si-NC group, ^a $P < 0.05$. Compared with the miR-27a-inhibitor+Si-NC group, ^b $P < 0.05$. Compared with the miR-27a-NC+Si-PI3K group, ^c $P < 0.05$.

Figure 7 Autophagy related proteins and phosphorylation levels of AKT and mTOR proteins of each group



注: 与 miR-27a-NC+Si-NC 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 miR-27a-inhibitor+Si-NC 组相比, ^b $P < 0.05$; 与 miR-27a-NC+Si-PI3K 组相比, ^c $P < 0.05$ 。

图 5 各组细胞增殖、凋亡及炎症因子含量比较

Note. Compared with the miR-27a-NC+Si-NC group, ^a $P < 0.05$. Compared with the miR-27a-inhibitor+Si-NC group, ^b $P < 0.05$. Compared with the miR-27a-NC+Si-PI3K group, ^c $P < 0.05$.

Figure 5 Proliferation, apoptosis and inflammatory factor content of each group

细胞增殖率、IL-10 含量显著降低,与刘煌等^[9]一致,表明模型制备成功。本研究还发现,诱导细胞中 miR-27a 表达水平、Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著升高,PI3K 蛋白表达及 AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平显著降低,提示 SP 诱导 HPAEpiC 损伤与 miR-27a 和 PI3K/AKT/mTOR 通路密切相关。

miR-27a 对调节多态性、肿瘤发生、细胞增殖、凋亡及血管生成中发挥重要作用。miR-27a 水平增加可导致细胞周期阻滞,抑制人少突胶质细胞增殖^[10]。而敲低 miR-27a-3p 可通过增加人脐带静脉内皮细胞的狭缝引导配体 2 表达来抑制脂多糖诱导的损伤^[11]。miR-27a 上调还可引起糖尿病肾病中足细胞损伤^[12]。本研究发现,抑制 miR-27a 可提高 SP 诱导的 HPAEpiC 增殖率、IL-10 含量、AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平,降低 miR-27a 表达水平、细胞凋亡率、IL-6 含量、Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值,其中 Beclin1 和 LC3-II/I 为自噬标志物,可用于反映自噬强度^[13],提示抑制 miR-27a,可能通过抑制细胞凋亡及自噬,缓解 SP 诱导的 HPAEpiC 损伤。但 miR-27a 是否通过调控 PI3K 发挥作用,尚需进一步研究。

PI3K 参与多种细胞功能,可与 AKT 结合,磷酸化 AKT 的 Ser308 致使 AKT 活化,AKT 通过下游多种途径对靶蛋白进行磷酸化而发挥抗凋亡作用。PI3K/AKT/mTOR 信号通路与自噬密切相关^[14]。本研究发现,过表达 PI3K 可提高 SP 诱导的 HPAEpiC 增殖率、IL-10 含量、AKT、mTOR 蛋白磷酸化水平,降低细胞凋亡率、IL-6 含量、Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值,提示过表达 PI3K,可能通过抑制细胞凋亡及自噬,缓解 SP 诱导的 HPAEpiC 损伤。Zeng 等^[15]研究发现 4 苯基丁酸能够上调急性肺损伤模型中 AKT/mTOR 通路,抑制自噬,缓解 LPS 诱导的肺泡上皮细胞损伤,与本研究结果一致。然而,Du 等^[16]研究发现蛋白酶激活受体-2 能够通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,抑制自噬,从而引发肾小管上皮细胞炎症,另有研究发现抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,可通过促进自噬,减轻动脉粥样硬化病变斑块的形成^[17]。这与本研究并不一致,这可能是由于自噬过程较快,而且细胞既可通过提高自噬减少细胞坏死,减轻有毒物质的积累,又可通过主动降低自身自噬活性,减少因自噬引起的细胞死亡,并且来自于外界的多种刺激条件

及环境因素各不相同^[18],所以不同细胞和组织间的自噬活性存在一定的差异性。早期 Liu 等^[19]研究发现 miR-27a 通过靶向 PI3K 调控髓核细胞凋亡。本研究通过生物信息学预测及双荧光素酶实验验证发现,miR-27a 和 PI3K 存在靶向关系,将 miR-27a-inhibitor 和 Si-PI3K 共转染 SP 诱导 HPAEpiC,发现 miR-27a-inhibitor+Si-PI3K 组细胞增殖率、IL-10 含量、Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值较 miR-27a-inhibitor+Si-NC 组降低,而细胞凋亡率、IL-6 含量、AKT 和 mTOR 蛋白磷酸化水平升高,提示抑制 miR-27a 表达对 SP 诱导 HPAEpiC 损伤的缓解作用,可被干扰 PI3K 逆转。

综上所述,在 SP 诱导 HPAEpiC 损伤过程中,miR-27a 表达上调,而抑制 miR-27a 可靶向上调 PI3K 蛋白表达,激活其下游 AKT/mTOR 信号通路,进而抑制细胞自噬,缓解 SP 所致 HPAEpiC 损伤。但是,关于 miR-27a 的靶基因较多,是否还涉及其它信号通路,尚需深入研究。

参考文献:

- [1] Bhowmick R, Clark S, Bonventre JV, et al. Cytosolic phospholipase A₂α promotes pulmonary inflammation and systemic disease during *Streptococcus pneumoniae* infection [J]. Infect Immun, 2017, 85(11): e00280-17.
- [2] Li P, Shi J, He Q, et al. *Streptococcus pneumoniae* induces autophagy through the inhibition of the PI3K-I/Akt/mTOR pathway and ROS hypergeneration in A549 cells [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0122753.
- [3] Fan T, Yang S, Huang Z, et al. Autophagy decreases alveolar epithelial cell injury by regulating the release of inflammatory mediators [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 7982-7995.
- [4] Li X, Xu M, Ding L, et al. MiR-27a: a novel biomarker and potential therapeutic target in tumors [J]. J Cancer, 2019, 10(12): 2836-2848.
- [5] Cai C, Min S, Yan B, et al. MiR-27a promotes the autophagy and apoptosis of IL-1β treated-articular chondrocytes in osteoarthritis through PI3K/AKT/mTOR signaling [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(16): 6371-6384.
- [6] Tang H, Xu X, Xiao W, et al. Silencing of microRNA-27a facilitates autophagy and apoptosis of melanoma cells through the activation of the SYK-dependent mTOR signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 13262-13274.
- [7] 王勇,孙朝峰,胡钱红. NF-κB p65 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]. 实用预防医学, 2018, 25(5): 547-550, 556.
- [8] Olotu C, Lehmsiek F, Koch B, et al. *Streptococcus pneumoniae* inhibits purinergic signaling and promotes purinergic receptor P2Y2 internalization in alveolar epithelial cells [J]. J Biol

- Chem, 2019, 294(34): 12795–12806.
- [9] 刘煌, 王玮, 李芹, 等. 延龄草苷对肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞损伤的保护作用及其机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(10): 1228–1232.
- [10] Tripathi A, Volsko C, Garcia JP, et al. Oligodendrocyte intrinsic miR-27a controls myelination and remyelination [J]. Cell Rep, 2019, 29(4): 904–919, e9.
- [11] Dong Y, Fan G, Li Y, et al. TUG1 represses apoptosis, autophagy, and inflammatory response by regulating miR-27a-3p/SLIT2 in LPS-Treated vascular endothelial cells [J]. J Surg Res, 2020, 256: 345–354.
- [12] Zhou Z, Wan J, Hou X, et al. MicroRNA-27a promotes podocyte injury via PPAR γ -mediated β -catenin activation in diabetic nephropathy [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2658.
- [13] Wang SL, Shao BZ, Zhao SB, et al. Intestinal autophagy links psychosocial stress with gut microbiota to promote inflammatory bowel disease [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 391.
- [14] Varshney P, Saini N. PI3K/AKT/mTOR activation and autophagy inhibition plays a key role in increased cholesterol during IL-17A mediated inflammatory response in psoriasis [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(5): 1795–1803.
- [15] Zeng M, Sang W, Chen S, et al. 4-PBA inhibits LPS-induced inflammation through regulating ER stress and autophagy in acute lung injury models [J]. Toxicol Lett, 2017, 271: 26–37.
- [16] Du C, Zhang T, Xiao X, et al. Protease-activated receptor-2 promotes kidney tubular epithelial inflammation by inhibiting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway [J]. Biochem J, 2017, 474(16): 2733–2747.
- [17] 谢盈斌, 许晓敏, 张军平, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨补肾抗衰片介导自噬调控动脉粥样硬化的机制 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(5): 586–593.
- [18] Thorburn A. Autophagy and its effects: making sense of double-edged swords [J]. PLoS Biol, 2014, 12(10): e1001967.
- [19] Liu G, Cao P, Chen H, et al. MiR-27a regulates apoptosis in nucleus pulposus cells by targeting PI3K [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75251.

[收稿日期]2020-11-27

(上接第 26 页)

- [11] Dingeldein APG, Sparman T, Åden J, et al. Oxidatively stressed mitochondrial membranes: insight into their organization and function during apoptosis [J]. Biophys J, 2018, 114(3): 33a.
- [12] Araniti F, Costas-Gil A, Cabeiras-Freijanes L, et al. Rosmarinic acid induces programmed cell death in Arabidopsis seedlings through reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction [J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0208802.
- [13] Li W, Yu KN, Ma J, et al. Non-thermal plasma induces mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway via ROS generation in HeLa cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2017, 633: 68–77.
- [14] Yan Z, Xu T, An Z, et al. Costunolide induces mitochondria-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma BGC-823 cells [J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 1–10.
- [15] Kwon YH, Kim N, Nam RH, et al. Change in the interstitial cells of Cajal and nNOS positive neuronal cells with aging in the stomach of F344 rats [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169113.
- [16] Ma X, Luo Q, Zhu H, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 activation ameliorates CC $_4$ -induced chronic liver fibrosis in mice by up-regulating Nrf2/HO-1 antioxidant pathway [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(8): 3965–3978.

[收稿日期]2020-11-17