

• 论 著 •

lncRNA MIAT 通过调节 miR-338-3p/THBS1 轴促进 脓毒症引起的急性肾损伤^{*}

刘霄岩, 赵秋兰, 代江娜

保定市第二医院重症医学科, 河北保定 071000

摘 要: **目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)心肌梗死相关转录物(MIAT)是否通过调节微小 RNA-338-3p(miR-338-3p)/血小板凝血酶蛋白-1(THBS1)轴促进脓毒症引起的急性肾损伤(AKI)。 **方法** 用盲肠结扎穿孔法建立脓毒症 AKI 模型,将大鼠分为对照组和脓毒症 AKI 组,每组 10 只。采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测肾组织 lncRNA MIAT、miR-338-3p 和 THBS1 基因表达水平,全自动生化分析仪检测血清尿素氮(BUN)和肌酐(Cre)水平。采用脂多糖(LPS)诱导大鼠肾小管上皮 NRK-52E 细胞建立脓毒症 AKI 细胞模型,将 NRK-52E 细胞分为 CK 组、LPS 组、LPS+si-NC 组、LPS+si-lncRNA MIAT 组、LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组、LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibitor 组、LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组、LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 组。采用 qPCR 检测各组细胞 lncRNA MIAT、miR-338-3p 和 THBS1 基因表达水平,细胞计数试剂盒 8 检测各组细胞增殖情况,流式细胞术检测各组细胞凋亡率,酶联免疫吸附试验检测各组乳酸脱氢酶(LDH)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-10、丙二醛(MDA)水平及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性,蛋白质印记法检测细胞中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)、裂解凋亡蛋白酶-3(cleaved caspase-3)、THBS1 蛋白表达。验证 miR-338-3p 与 lncRNA MIAT 和 THBS1 的靶向关系。 **结果** 脓毒症 AKI 组大鼠 BUN、Cre、lncRNA MIAT、THBS1 基因表达水平升高($P<0.05$),miR-338-3p 表达水平降低($P<0.05$)。与 CK 组比较,LPS 组和 LPS+si-NC 组脓毒症 AKI 细胞中 lncRNA MIAT 表达、THBS1 基因表达、凋亡率和 IL-6、LDH、TNF- α 、MDA 水平升高($P<0.05$),NLRP3、Caspase-1、cleaved caspase-3、THBS1 蛋白表达水平升高($P<0.05$),miR-338-3p 表达、 A_{450} (24、48 h)值、IL-10 水平降低($P<0.05$),CAT 和 SOD 活性降低($P<0.05$)。与 LPS+si-NC 组比较,LPS+si-lncRNA MIAT 组脓毒症 AKI 细胞中 lncRNA MIAT 表达、THBS1 基因表达、凋亡率和 IL-6、LDH、TNF- α 、MDA 水平降低($P<0.05$),NLRP3、Caspase-1、cleaved caspase-3、THBS1 蛋白表达水平降低($P<0.05$),miR-338-3p 表达、 A_{450} (24、48 h)值、IL-10 水平升高($P<0.05$),CAT 和 SOD 活性升高($P<0.05$)。沉默 miR-338-3p 表达或上调 THBS1 基因表达均可减弱 lncRNA MIAT 对脓毒症 AKI 的改善作用($P<0.05$)。 **结论** lncRNA MIAT 可调节 miR-338-3p/THBS1 轴促进脓毒症引起的 AKI。

关键词: 长链非编码 RNA 心肌梗死相关转录物; 微小 RNA-338-3p/血小板凝血酶蛋白-1 轴; 脓毒症; 急性肾损伤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.06.008

中图法分类号:R692;R459.7

文章编号:1673-4130(2025)06-0681-08

文献标志码:A

lncRNA MIAT promotes sepsis-induced acute kidney injury by regulating the miR-338-3p/THBS1 axis^{*}

LIU Xiaoyan, ZHAO Qiulan, DAI Jiangna

Department of Intensive Care Medicine, the NO. 2 Hospital of Baoding, Baoding, Hebei 071000, China

Abstract: Objective To investigate whether long non-coding RNA (lncRNA) myocardial infarct-associated transcription factor (MIAT) promotes sepsis-induced acute kidney injury (AKI) by regulating microRNA-338-3p (miR-338-3p)/platelet thromboplastin-1 (THBS1) axis. **Methods** Septic AKI model was established by cecal ligation and puncture. The rats were divided into control group and sepsis AKI group, with 10 rats in each group. The expression levels of lncRNA MIAT, miR-338-3p and THBS1 gene in renal tissue were detected by quantitative real-time PCR (qPCR). The levels of serum urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cre) were detected by automatic biochemical analyzer. Renal tubular epithelial NRK-52E cells were induced by li-

^{*} 基金项目: 河北省中医药类科学研究课题计划项目(2023436)。

作者简介: 刘霄岩, 女, 副主任医师, 主要从事重症医学相关研究。

popolysaccharide (LPS) to establish a cell model of sepsis induced AKI. NRK-52E cells were divided into CK group, LPS group, LPS+si-NC group, LPS+si-lncRNA MIAT group, LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC group, LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibitor group, LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC group, LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 group. qPCR was used to detect the expression levels of lncRNA MIAT, miR-338-3p and THBS1 gene in each group. Cell counting kit 8 was used to detect cell proliferation in each group. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of each group. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of lactate dehydrogenase (LDH), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-10, malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in each group. The expression of NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3), Caspase-1, cleaved caspase-3 and THBS1 protein were detected by Western blot. The targeting relationship between miR-338-3p and lncRNA MIAT and THBS1 was verified. **Results** The expression levels of BUN, Cre, lncRNA MIAT and THBS1 gene were increased ($P<0.05$), and the expression level of miR-338-3p was decreased in sepsis AKI group ($P<0.05$). Compared with CK group, the expression of lncRNA MIAT, THBS1 gene, apoptosis rate and the levels of IL-6, LDH, TNF- α and MDA were significantly increased ($P<0.05$), the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, cleaved caspase-3 and THBS1 were significantly increased ($P<0.05$), while the expression of miR-338-3p, A_{450} (24, 48 h) value and IL-10 level were significantly decreased ($P<0.05$), and the activities of CAT and SOD were significantly decreased in LPS group and LPS+si-NC group ($P<0.05$). Compared with LPS+si-NC group, the expression of lncRNA MIAT, THBS1 gene, apoptosis rate and the levels of IL-6, LDH, TNF- α and MDA were significantly decreased ($P<0.05$), the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, cleaved caspase-3 and THBS1 were significantly decreased ($P<0.05$), while the expression of miR-338-3p, A_{450} (24, 48 h) value and IL-10 level were significantly increased ($P<0.05$), and the CAT and SOD activities were significantly increased in LPS+si-lncRNA MIAT group ($P<0.05$). Silencing miR-338-3p expression or up-regulation of THBS1 gene expression could attenuate the improvement effect of lncRNA MIAT on sepsis AKI ($P<0.05$). **Conclusion** lncRNA MIAT promotes sepsis-induced AKI through regulating miR-338-3p/THBS1 axis.

Key words: long non-coding RNA myocardial infarct-associated transcription factor; microRNA-338-3p/platelet thrombospondin-1 axis; sepsis; acute kidney injury

脓毒症是宿主对感染反应失调引起的危及生命的多器官功能障碍, 诱发因素有生物(细菌、病毒、真菌、寄生虫)感染和非生物感染(急性重型胰腺炎、创伤、烧伤、休克、大手术)等^[1]。急性肾损伤(AKI)是脓毒症常见的并发症之一, 患者主要表现为肾功能突然恶化或完全丧失肾功能, 治疗难度大, 具有较高的死亡风险^[2]。目前脓毒症 AKI 的发病机制尚不清楚, 临床尚无特效药物, 因此探究脓毒症 AKI 的发病机制, 从分子角度干预、治疗脓毒症 AKI 是医学研究者的方向^[3]。

研究显示, 长链非编码 RNA(lncRNA)可参与调控多种疾病的发生发展进程^[4]。有研究表明 lncRNA 心肌梗死相关转录物(lncRNA MIAT)在脓毒症大鼠体内表达上调, 上调 lncRNA MIAT 可促进脓毒症肾细胞凋亡^[4]。脓毒症患者和脂多糖(LPS)诱导的肾细胞中 lncRNA MIAT 表达升高, 沉默 lncRNA MIAT 可减轻 LPS 诱导的炎症反应和细胞凋亡^[5]。lncRNA MIAT 可增加脓毒症 AKI 发生风险, 但其调控脓毒症 AKI 的作用机制不明确。lncRNA 发挥生物调控作用主要是通过调控微小 RNA(miRNA)表达来实现^[6]。微小 RNA-338-3p(miR-338-3p)在脓毒症 AKI

细胞中低表达, 过表达 miR-338-3p 可减轻 LPS 诱导的细胞损伤^[7], 推测 miR-338-3p 可在细胞炎症损伤过程中发挥调控作用。血小板凝血酶蛋白-1 (THBS1)是一种抗血管生成因子, 可抑制内皮细胞增殖迁移和血管生成, 有研究显示激活 THBS1 可加重炎症、氧化损伤和细胞焦亡, 促进脓毒症 AKI 发展^[8]。生物信息学预测发现, miR-338-3p 与 lncRNA MIAT 和 THBS1 存在靶向结合位点。因此本研究对 lncRNA MIAT 是否可通过调节 miR-338-3p/THBS1 轴来影响脓毒症引起的 AKI 进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞 SPF 级 180~200 g 雄性 SD 大鼠 20 只[郑州大学, 生产许可证号: SCXK(豫)2022-0001], 肾小管上皮 NRK-52E 细胞(江苏科晶生物科技有限公司)。本研究已通过医院伦理委员会批准(IACUC-202305-A19)。

1.2 仪器与试剂 HBS-1096B 型酶标仪购自伊艾博科技股份有限公司, SD1 全自动生化分析仪购自上海继圣医疗器械有限公司, BF-710 B4R1 流式细胞仪购自上海聚慕医疗器械有限公司。LPS(批号 L3023)购自 Sigma 公司, 细胞计数试剂盒 8 (CCK-8, 批号

ST74281)、细胞凋亡试剂盒(批号 Q58627)、总 RNA 提取试剂盒(批号 H4861)和实时荧光定量 PCR (qPCR)试剂盒(批号 P53216)均购自上海脱易生物科技有限公司,乳酸脱氢酶(LDH,批号 13282)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,批号 1113)、白细胞介素(IL)-6(批号 3917)和 IL-10(批号 3947)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自江苏酶免实业有限公司,si-NC、si-lncRNA MIAT、inhibitor NC、miR-338-3p inhibitor、oe-NC、oe-THBS1 质粒购自上海生工生物工程有限公司,蛋白提取试剂盒(批号 H4592A)、过氧化氢酶(CAT,批号 H3761A)、丙二醛(MDA,批号 H3784A)、超氧化物歧化酶(SOD,批号 H3756A)试剂盒购自武汉普健生物科技有限公司,NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3,批号 ab263899)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1,批号 ab207802)、裂解凋亡蛋白酶-3(cleaved caspase-3,批号 ab302)、THBS1(批号 ab264934)、 β -actin(批号 ab5694)抗体购自英国 Abcam 公司。

1.3 方法

1.3.1 造模与分组 取 10 只大鼠用盲肠结扎穿孔法建立脓毒症 AKI 模型(脓毒症 AKI 组),麻醉大鼠后将其仰卧固定,切开大鼠腹部长约 2 cm,暴露盲肠,用 4 号线结扎盲肠,20 号针穿刺盲肠 3 次,挤压盲肠待粪便溢出后将盲肠回纳腹腔,缝合伤口并消毒;另取 10 只大鼠作为对照组,只暴露盲肠。造模成功标志:大鼠萎靡不振、活动减少、尿液浑浊、呼吸急促、血清肌酐(BUN)和尿素氮(Cre)水平升高、肾组织明显受损^[9]。24 h 后处死大鼠,取出大鼠完整肾脏组织,待测。

1.3.2 全自动生化分析仪检测血清 BUN、Cre 水平 麻醉大鼠后心脏采血 2 mL,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液直接用全自动生化分析仪检测 BUN 和 Cre 水平。

1.3.3 qPCR 检测肾组织 lncRNA MIAT、miR-338-3p 和 THBS1 基因表达水平 提取对照组和脓毒症 AKI 组大鼠肾组织总 RNA,并将其逆转录为 cDNA,qPCR 扩增 cDNA。lncRNA MIAT 和 THBS1 以 GAPDH 为内参,miR-338-3p 以 U6 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相对表达水平。引物:lncRNA MIAT 正向 5'-TTTACTTTAACAGACCAGAA-3',反向 5'-CTCCTTTGTTGAATCCAT-3';miR-338-3p 正向 5'-ATCCAGTGC GTGTCGTGG-3',反向 5'-TGCT-TCCAGCATCAGTGAT-3';THBS1 mRNA 正向 5'-AGACTCCGCATCGCAAAGG-3',反向 5'-TCAC-CACGTTGTTGTCAAGGG-3';GAPDH 正向 5'-GTTCCAGTATGACTCTACCC-3',反向 5'-AGTCTTCTGAGTGGCAGTGATG-3';U6 正向 5'-AACTC GCTTCGGCAGCACA-3',反向 5'-AACGCTTCACG AATTTGCGT-3'。

1.3.4 细胞转染与分组培养 将 NRK-52E 细胞分为 CK 组、LPS 组、LPS+si-NC 组、LPS+si-lncRNA MIAT 组、LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组、LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibitor 组、LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组、LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 组;按照 Lipofectamine 2 000 试剂说明书分别将相对应质粒转入 NRK-52E 细胞,转染 48 h 后,除 CK 组外其余各组均用 10 mg/mL 的 LPS 干预 24 h 建立脓毒症 AKI 细胞模型^[10],CK 组细胞正常培养。

1.3.5 qPCR 检测各组 NRK-52E 细胞 lncRNA MIAT、miR-338-3p 和 THBS1 基因表达水平 提取各组 NRK-52E 细胞总 RNA,后续检测同 1.3.2。

1.3.6 CCK-8 法检测细胞增殖情况 将各组细胞接种到 96 孔板中,在培养细胞 24、48 h 时,于各孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,培养 2 h,于酶标仪 450 nm 处测定吸光度值。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况 收集各组细胞,重悬后加入 Annexin V-FITC 与 PI 试剂,黑暗调节孵育 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.8 LDH、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平检测 离心收集各组细胞培养上清液,根据 ELISA 试剂盒步骤依次加入反应试剂、终止试剂、显色试剂,酶标仪测定吸光度值,根据标准曲线计算 LDH、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平。

1.3.9 CAT、SOD 活性及 MDA 水平检测 离心收集各组细胞并超声破碎,低温条件离心收集细胞上清液,按照试剂盒说明书加入相应试剂,测定吸光度值,计算细胞 CAT、SOD 活性及 MDA 水平。

1.3.10 蛋白质印迹法(Western blot)检测蛋白表达 提取各组细胞总蛋白并定量蛋白浓度,将蛋白热水浴变性,电泳分离,转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,封闭 2 h,加入 NLRP3、Caspase-1、cleaved caspase-3、THBS1、 β -actin 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育,洗膜,二抗孵育 2 h,采用免疫荧光细胞化学染色(ECL)显色,Image-Pro Plus 软件分析蛋白灰度值。

1.3.11 验证 miR-338-3p 与 lncRNA MIAT 和 THBS1 的靶向关系 分别构建 lncRNA MIAT 野生型(lncRNA MIAT-WT)、突变型(lncRNA MIAT-MUT)和 THBS1 野生型(THBS1-WT)、突变型(THBS1-MUT)载体,将各载体分别与 miR-NC 和 miR-338-3p mimic 共转染于 NRK-52E 细胞中,转染完成后检测荧光素酶活性。

1.4 统计学处理 数据分析用 Graphpad Prism 8.0.1 软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组内两两组比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏功能指标 BUN 和 Cre 水平比

较 与对照组比较,脓毒症 AKI 组大鼠血清 BUN 和 Cre 水平升高($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠肾脏功能指标 BUN 和 Cre 水平比较($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

组别	BUN	Cre
对照组	4.56±0.53	41.38±5.64
脓毒症 AKI 组	8.73±1.24	59.47±7.86
<i>t</i>	9.779	5.913
<i>P</i>	<0.001	<0.001

2.2 肾组织 lncRNA MIAT、miR-338-3p 和 THBS1 基因在大鼠中的表达比较 与对照组比较,脓毒症 AKI 组大鼠 lncRNA MIAT 和 THBS1 基因表达水平升高,miR-338-3p 表达水平降低($P<0.05$),见表 2。

2.3 各组 NRK-52E 细胞中 lncRNA MIAT、miR-338-3p 和 THBS1 基因表达比较 与 CK 组比较,LPS 组和 LPS+si-NC 组细胞中 lncRNA MIAT 和 THBS1 基因表达水平升高,miR-338-3p 表达水平降低($P<0.05$);与 LPS+si-NC 组比较,LPS+si-lncRNA MIAT 组细胞中 lncRNA MIAT 和 THBS1 基因表达水平降低,miR-338-3p 表达水平升高($P<0.05$);与 LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组比较,LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibi-

tor 组细胞中 miR-338-3p 表达水平降低,THBS1 基因表达水平升高($P<0.05$);与 LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组比较,LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 组中 THBS1 基因表达水平升高($P<0.05$)。见表 3。

2.4 各组 NRK-52E 细胞增殖活力比较 与 CK 组比较,LPS 组和 LPS+si-NC 组 NRK-52E 细胞 A_{450} (24、48 h)值降低($P<0.05$);与 LPS+si-NC 组比较,LPS+si-lncRNA MIAT 组 NRK-52E 细胞 A_{450} (24、48 h)值升高($P<0.05$);与 LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组比较,LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibitor 组 NRK-52E 细胞 A_{450} (24、48 h)值降低($P<0.05$);与 LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组比较,LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 组 NRK-52E 细胞 A_{450} (24、48 h)值降低($P<0.05$)。见表 4。

表 2 肾组织 lncRNA MIAT、miR-338-3p 和 THBS1 基因在大鼠中的表达比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	lncRNA MIAT	miR-338-3p	THBS1 基因
对照组	1.01±0.02	1.02±0.01	0.99±0.01
脓毒症 AKI 组	1.84±0.06	0.31±0.01	2.08±0.07
<i>t</i>	41.500	158.761	48.746
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 各组 NRK-52E 细胞中 lncRNA MIAT、miR-338-3p 和 THBS1 基因表达比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	lncRNA MIAT	miR-338-3p	THBS1 基因
CK 组	1.01±0.02	0.99±0.01	1.02±0.01
LPS 组	1.86±0.04 ^a	0.30±0.02 ^a	2.13±0.05 ^a
LPS+si-NC 组	1.85±0.06 ^a	0.31±0.02 ^a	2.11±0.06 ^a
LPS+si-lncRNA MIAT 组	1.32±0.04 ^b	0.75±0.03 ^b	1.43±0.03 ^b
LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组	1.33±0.04	0.76±0.03	1.45±0.04
LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibitor 组	1.34±0.05	0.45±0.02 ^c	1.83±0.06 ^c
LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组	1.31±0.05	0.74±0.07	1.44±0.05
LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 组	1.33±0.06	0.73±0.07	1.92±0.07 ^d
<i>F</i>	16.318	21.507	25.834
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 CK 组比较,^a $P<0.05$;与 LPS+si-NC 组比较,^b $P<0.05$;与 LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组比较,^c $P<0.05$;与 LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组比较,^d $P<0.05$ 。

表 4 各组 NRK-52E 细胞增殖能力比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

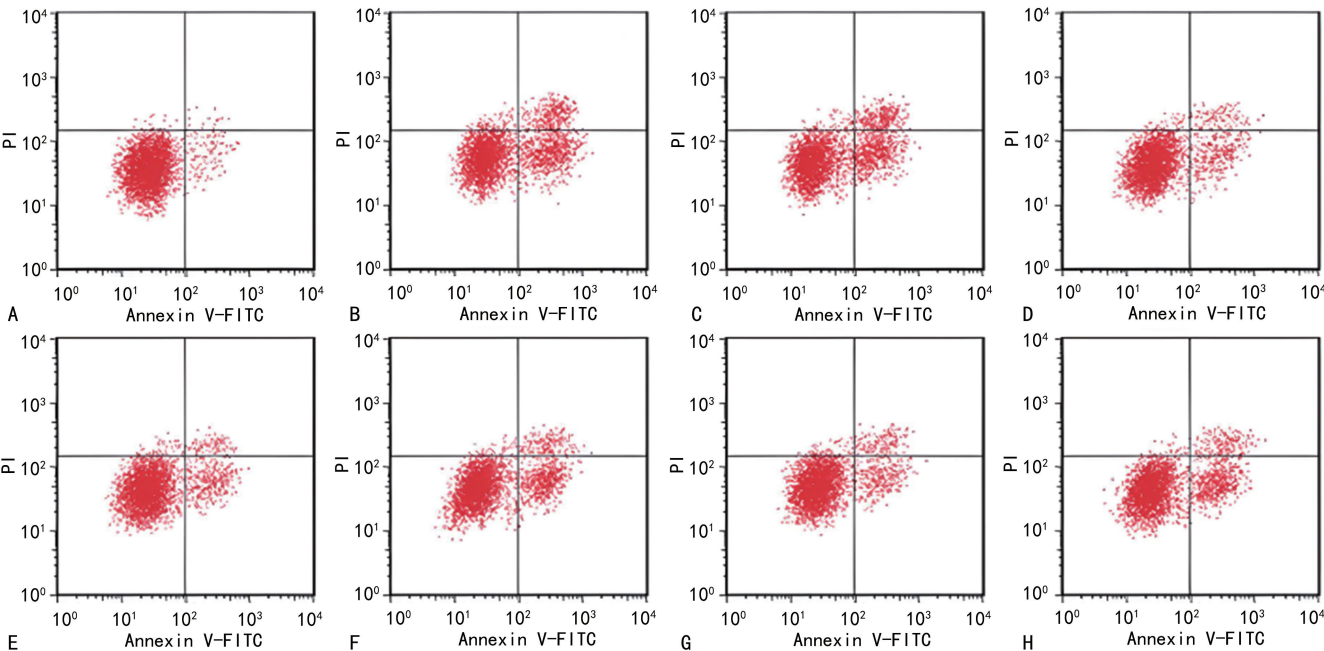
组别	A_{450} 24 h	A_{450} 48 h
CK 组	0.40±0.04	0.82±0.06
LPS 组	0.23±0.02 ^a	0.43±0.03 ^a
LPS+si-NC 组	0.24±0.02 ^a	0.45±0.04 ^a
LPS+si-lncRNA MIAT 组	0.33±0.03 ^b	0.67±0.05 ^b
LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组	0.34±0.02	0.66±0.05
LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibitor 组	0.28±0.02 ^c	0.54±0.04 ^c

续表 4 各组 NRK-52E 细胞增殖能力比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	A_{450} 24 h	A_{450} 48 h
LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组	0.35±0.03	0.68±0.05
LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 组	0.27±0.02 ^d	0.53±0.04 ^d
<i>F</i>	26.819	30.735
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与 CK 组比较,^a $P<0.05$;与 LPS+si-NC 组比较,^b $P<0.05$;与 LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组比较,^c $P<0.05$;与 LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组比较,^d $P<0.05$ 。

2.5 各组 NRK-52E 细胞凋亡率比较 与 CK 组 $[(3.58 \pm 0.47)\%]$ 比较, LPS 组 $[(37.29 \pm 3.38)\%]$ 和 LPS+si-NC 组 $[(38.67 \pm 3.51)\%]$ NRK-52E 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与 LPS+si-NC 组比较, LPS+si-lncRNA MIAT 组 $[(14.76 \pm 1.63)\%]$ NRK-52E 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$); 与 LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组 $[(15.43 \pm 1.72)\%]$ 比较, LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibitor 组 $[(26.84 \pm 2.95)\%]$ NRK-52E 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与 LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组 $[(15.37 \pm 1.82)\%]$ 比较, LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 组 $[(27.65 \pm 3.14)\%]$ NRK-52E 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$)。见图 1。



注:A 为 CK 组;B 为 LPS 组;C 为 LPS+si-NC 组;D 为 LPS+si-lncRNA MIAT 组;E 为 LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组;F 为 LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibitor 组;G 为 LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组;H 为 LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 组。

图 1 细胞凋亡检测图

表 5 各组 NRK-52E 细胞上清液 IL-6、LDH、IL-10、TNF-α 水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)				
组别	TNF-α(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-10(pg/mL)	LDH(U/mL)
CK 组	58.64±6.37	38.71±4.56	105.43±12.37	86.74±11.23
LPS 组	249.32±27.83 ^a	157.63±16.72 ^a	23.37±2.68 ^a	273.62±29.74 ^a
LPS+si-NC 组	246.71±26.42 ^a	155.48±15.39 ^a	22.78±2.52 ^a	276.31±30.42 ^a
LPS+si-lncRNA MIAT 组	121.53±13.36 ^b	61.34±7.48 ^b	81.52±8.64 ^b	138.56±15.65 ^b
LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组	123.46±14.74	59.97±6.86	80.63±8.41	137.28±14.39
LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibitor 组	182.83±21.67 ^c	112.73±11.24 ^c	48.96±3.87 ^c	205.46±23.71 ^c
LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组	124.68±15.26	62.31±7.45	83.17±9.76	135.29±14.86
LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 组	193.47±21.84 ^d	118.59±13.67 ^d	43.58±5.23 ^d	214.37±22.93 ^d
F	42.864	38.291	31.537	28.626
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 CK 组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS+si-NC 组比较,^b $P < 0.05$;与 LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组比较,^c $P < 0.05$;与 LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组比较,^d $P < 0.05$ 。

2.7 各组 NRK-52E 细胞 CAT、SOD 活性及 MDA 水平比较 与 CK 组比较, LPS 组和 LPS+ si-NC 组细胞 MDA 水平升高, CAT、SOD 活性降低 ($P < 0.05$); 与 LPS+ si-NC 组比较, LPS+ si-lncRNA MIAT 组细胞 MDA 水平降低, CAT、SOD 活性升高 ($P < 0.05$); 与 LPS+ si-lncRNA MIAT+ inhibitor

NC 组比较, LPS+ si-lncRNA MIAT+ miR-338-3p inhibitor 组细胞 MDA 水平升高, CAT、SOD 活性降低 ($P < 0.05$); 与 LPS+ si-lncRNA MIAT+ oe-NC 组比较, LPS+ si-lncRNA MIAT+ oe-THBS1 组细胞 MDA 水平升高, CAT、SOD 活性降低 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 各组 NRK-52E 细胞 CAT、SOD 活性及 MDA 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	CAT(U/mg)
CK 组	106.84±7.97	5.73±0.81	87.52±9.36
LPS 组	21.54±2.63 ^a	34.21±3.39 ^a	23.64±2.78 ^a
LPS+ si-NC 组	22.32±2.74 ^a	33.67±3.28 ^a	22.36±2.54 ^a
LPS+ si-lncRNA MIAT 组	75.46±8.36 ^b	15.46±1.72 ^b	65.83±6.29 ^b
LPS+ si-lncRNA MIAT+ inhibitor NC 组	76.29±8.52	16.58±1.83	67.28±7.11
LPS+ si-lncRNA MIAT+ miR-338-3p inhibitor 组	43.27±5.21 ^c	25.34±2.67 ^c	40.19±4.65 ^c
LPS+ si-lncRNA MIAT+ oe-NC 组	74.85±9.14	16.12±1.96	68.47±7.83
LPS+ si-lncRNA MIAT+ oe-THBS1 组	39.78±4.28 ^d	27.83±3.14 ^d	36.76±4.26 ^d
<i>F</i>	46.911	39.827	32.613
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 CK 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS+ si-NC 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 LPS+ si-lncRNA MIAT+ inhibitor NC 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 LPS+ si-lncRNA MIAT+ oe-NC 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.8 各组 NRK-52E 细胞 NLRP3、Caspase-1、cleaved caspase-3、THBS1 蛋白表达比较 与 CK 组比较, LPS 组和 LPS+ si-NC 组 NRK-52E 细胞 NLRP3、Caspase-1、cleaved caspase-3、THBS1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 LPS+ si-NC 组比较, LPS+ si-lncRNA MIAT 组 NRK-52E 细胞上述蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 LPS+ si-lncRNA MIAT+ in-

hibitor NC 组比较, LPS+ si-lncRNA MIAT+ miR-338-3p inhibitor 组 NRK-52E 细胞上述蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 LPS+ si-lncRNA MIAT+ oe-NC 组比较, LPS+ si-lncRNA MIAT+ oe-THBS1 组 NRK-52E 细胞上述蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见表 7、图 2。

表 7 各组 NRK-52E 细胞 NLRP3、Caspase-1、cleaved caspase-3、THBS1 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

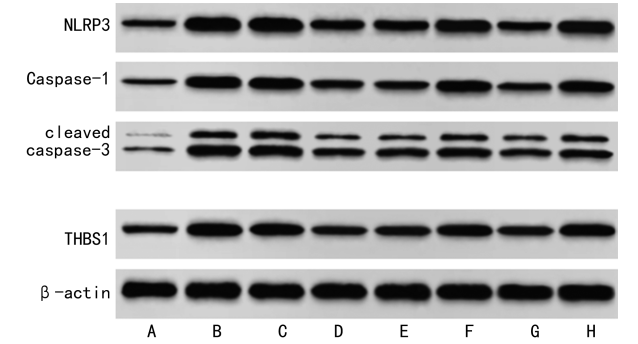
组别	NLRP3	Caspase-1	cleaved caspase-3	THBS1
CK 组	0.31±0.04	0.27±0.04	0.23±0.03	0.34±0.05
LPS 组	1.04±0.13 ^a	0.86±0.10 ^a	0.78±0.09 ^a	0.95±0.12 ^a
LPS+ si-NC 组	1.05±0.13 ^a	0.87±0.11 ^a	0.76±0.09 ^a	0.93±0.11 ^a
LPS+ si-lncRNA MIAT 组	0.49±0.06 ^b	0.48±0.06 ^b	0.42±0.06 ^b	0.52±0.07 ^b
LPS+ si-lncRNA MIAT+ inhibitor NC 组	0.51±0.07	0.49±0.07	0.43±0.06	0.54±0.07
LPS+ si-lncRNA MIAT+ miR-338-3p inhibitor 组	0.82±0.10 ^c	0.71±0.09 ^c	0.61±0.08 ^c	0.78±0.09 ^c
LPS+ si-lncRNA MIAT+ oe-NC 组	0.48±0.07	0.47±0.06	0.42±0.06	0.53±0.07
LPS+ si-lncRNA MIAT+ oe-THBS1 组	0.87±0.10 ^d	0.75±0.09 ^d	0.64±0.08 ^d	0.81±0.09 ^d
<i>F</i>	30.826	25.419	37.461	49.813
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 CK 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS+ si-NC 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 LPS+ si-lncRNA MIAT+ inhibitor NC 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 LPS+ si-lncRNA MIAT+ oe-NC 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.9 miR-338-3p 与 lncRNA MIAT 和 THBS1 的靶向关系验证 miR-338-3p 与 lncRNA MIAT 和 TH-

BS1 的靶向结合位点见图 3。与 miR-NC+ lncRNA MIAT-WT 组(1.08±0.11)比较, miR-338-3p mimic

+lncRNA MIAT-WT 组(0.41 ± 0.04)荧光素酶活性降低($P<0.05$)。与 miR-NC + THBS1-WT 组(1.02 ± 0.07)比较,miR-338-3p mimic+THBS1-WT 组(0.39 ± 0.03)荧光素酶活性降低($P<0.05$)。



注:A 为 CK 组;B 为 LPS 组;C 为 LPS+si-NC 组;D 为 LPS+si-lncRNA MIAT 组;E 为 LPS+si-lncRNA MIAT+inhibitor NC 组;F 为 LPS+si-lncRNA MIAT+miR-338-3p inhibitor 组;G 为 LPS+si-lncRNA MIAT+oe-NC 组;H 为 LPS+si-lncRNA MIAT+oe-THBS1 组。

图 2 各组 NRK-52E 细胞中 NLRP3、Caspase-1、cleaved caspase-3、THBS1、β-actin 蛋白表达



图 3 miR-338-3p 与 lncRNA MIAT 和 THBS1 的结合位点

3 讨 论

大部分危重症 AKI 患者诱因是脓毒症^[11],脓毒症是由病原体感染引起,在病原体的影响下,机体的免疫系统被激活,诱导产生大量炎症介质,引起组织和细胞炎症损伤,进而导致机体组织和细胞功能失调,严重时引起多器官功能障碍综合征^[12]。肾脏是脓毒症受累器官之一,脓毒症发生后,患者肾功能快速下降或尿量持续减少^[13]。近年来,随着对脓毒症研究的深入,全球脓毒症 AKI 的发病率和病死率均有一定改善,但比重仍然较高^[14]。目前针对脓毒症 AKI 尚无较好的治疗策略,传统临床治疗方式效果不佳,因此探究脓毒症 AKI 的分子机制,通过调控分子表达来治疗脓毒症 AKI 是目前研究的热点。

AKI 是一种肾功能障碍的疾病,可导致肾萎缩和肾小球滤过率降低,致使蛋白尿渗出,另外,肾脏受损后血液中的 BUN、Scr 无法排出体外也会造成 BUN、Scr 水平升高^[12]。本研究结果显示,脓毒症 AKI 大鼠肾功能指标 BUN 和 Cre 水平明显升高,提示造模成功。lncRNA 的异常表达与多种疾病的发生有关,郑佳萍等^[15]研究显示,沉默 lncRNA MIAT 表达可提高脓毒症患者免疫功能,改善肠道微生态平衡,缓解临床症状。WANG 等^[16]研究显示抑制 lncRNA MIAT

表达可减轻糖尿病肾病小鼠足细胞损伤,改善肾脏功能。本研究结果显示,脓毒症 AKI 大鼠肾组织和 LPS 诱导的脓毒症 AKI 细胞中 lncRNA MIAT 高表达,推测 lncRNA MIAT 可能参与脓毒症 AKI 进展。脓毒症 AKI 发生时可诱导产生大量炎症介质,引起组织细胞炎症损伤或死亡^[12];细胞焦亡是由炎症引起的细胞程序性死亡,活化的 NLRP3 可激活 Caspase-1,Caspase-1 可进一步切割炎症介质前体产生大量炎症因子,进而损伤细胞膜形成寡聚微孔和细胞膜孔洞,导致细胞肿胀破裂死亡并释放内容物;当细胞膜出现孔洞或死亡时,LDH 可释放到细胞外,是细胞膜损伤的标志物^[17]。LIU 等^[18]研究显示,抑制 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达可减轻脓毒症 AKI 细胞焦亡。本研究也观察到,沉默 lncRNA MIAT 表达可降低炎症因子 IL-6、TNF-α 水平,NLRP3、Caspase-1 蛋白表达和 LDH 活性,减轻细胞炎症损伤和焦亡。脓毒症 AKI 发生时产生的活性氧会引起机体氧化应激,对组织细胞造成氧化损伤^[2]。本研究结果显示,沉默 lncRNA MIAT 表达可降低氧化损伤产物 MDA 水平,提高抗氧化酶 CAT 和 SOD 活性,减轻氧化损伤。提示沉默 lncRNA MIAT 可降低脓毒症 AKI 细胞炎症、氧化损伤和细胞凋亡,促进细胞增殖,改善细胞损伤。

研究显示,lncRNA 主要通过调控 miRNA 表达来发挥其生物学功能^[19-20]。WANG 等^[19]研究表明,miR-338-3p 在脓毒症 AKI 患者血清中低表达,上调 miR-338-3p 表达可提高 LPS 诱导的肾小管细胞,降低细胞炎症和凋亡。HUANG 等^[20]研究表明,上调 miR-338-3p 表达可降低肾癌细胞增殖,并促进其凋亡。本研究结果显示,脓毒症 AKI 大鼠肾组织和 LPS 诱导的脓毒症 NRK-52E 细胞中 miR-338-3p 低表达,推测 miR-338-3p 异常表达与脓毒症 AKI 有关。沉默 lncRNA MIAT 表达后,miR-338-3p 表达升高,AKI 细胞损伤有所改善。荧光素酶活性试验证实 lncRNA MIAT 与 miR-338-3p 存在靶向调控关系。为验证二者靶向关系,在沉默 lncRNA MIAT 表达的基础上下调 miR-338-3p 表达,结果显示,下调 miR-338-3p 表达可抑制脓毒症 AKI 细胞增殖,促进炎症反应、氧化应激和细胞凋亡,促进细胞损伤,本研究与 WANG 等^[18]研究一致。提示 lncRNA MIAT 可能通过调控 miR-338-3p 表达来促进脓毒症 AKI 细胞损伤。

THBS1 是一种内源性血管生成抑制蛋白,具有抑制内皮细胞迁移和抗血管生成的功能^[8]。赵瑞臣等^[21]研究显示,脓毒症 AKI 患者血清 THBS1 水平升高,可导致肾功能下降和 AKI 发展。ZHAO 等^[22]研究显示,THBS1 在脓毒症小鼠心脏中高表达,可促进脓毒症小鼠心肌损伤。本研究结果显示,脓毒症大鼠肾组织和 LPS 诱导的脓毒症 AKI 细胞中 THBS1 基

因表达水平升高。沉默 lncRNA MIAT 表达后, miR-338-3p 水平升高, THBS1 基因水平降低, 细胞损伤程度降低。下调 miR-338-3p 表达后, THBS1 基因水平升高, 细胞损伤程度加重, 荧光素酶活性试验也证实 miR-338-3p 与 THBS1 存在靶向调控关系, 提示 THBS1 表达受到 miR-338-3p 调控。为了验证该结论, 本研究进行回复实验, 在沉默 lncRNA MIAT 的基础上上调 THBS1 表达, 结果显示, 上调 THBS1 表达可抑制脓毒症 AKI 细胞增殖, 促进炎症反应、氧化应激和细胞凋亡, 促进细胞损伤。综合以上结果得出结论, lncRNA MIAT 可能是通过调节 miR-338-3p/THBS1 轴来促进脓毒症 AKI。

综上所述, 沉默 lncRNA MIAT 表达可调节 miR-338-3p/THBS1 轴来减轻脓毒症 AKI 细胞炎症、氧化应激和细胞凋亡, 促进细胞增殖。lncRNA MIAT/miR-338-3p/THBS1 有望成为治疗脓毒症 AKI 的一个靶点。

参考文献

[1] ZAMPIERI F G, BAGSHAW S M, SEMLER M W. Fluid therapy for critically ill adults with sepsis: a review[J]. JAMA, 2023, 329(22): 1967-1980.

[2] WANG M, WANG X, ZHU B, et al. The effects of timing onset and progression of AKI on the clinical outcomes in AKI patients with sepsis: a prospective multicenter cohort study[J]. Ren Fail, 2023, 45(1): 1-10.

[3] PICKKERS P, DARMON M, HOSTE E, et al. Acute kidney injury in the critically ill: an updated review on pathophysiology and management [J]. Intensive Care Med, 2021, 47(8): 835-850.

[4] ZHANG Y, ZHANG Y Y, XIA F, et al. Effect of lncRNA-MIAT on kidney injury in sepsis rats via regulating miR-29a expression [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(24): 10942-10949.

[5] XU M, ZHOU Y. LncRNA MIAT modulates LPS-induced acute kidney injury via BECN1-dependent autophagy by interacting with PTBP1 [J]. Discov Med, 2023, 35(179): 1093-1103.

[6] GENG Y, CHEN P, ZHANG L, et al. LncRNA MALAT1 regulates growth of carcinoma of the lung through modulating miR-338-3p/PYCR2 axis [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2023, 69(4): 133-140.

[7] LU H, CHEN Y, WANG X, et al. Circular RNA HIPK3 aggravates sepsis-induced acute kidney injury via modulating the microRNA-338/forkhead box A1 axis [J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 4798-4809.

[8] 孙建. USF2/THBS1 轴与细胞焦亡和脓毒症急性肾损伤相关性研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2022.

[9] 丁琼莉, 王毅, 杨春波, 等. 西维来司他钠对脓毒症大鼠急

性肾损伤的影响及机制研究[J]. 临床内科杂志, 2023, 40(3): 194-198.

[10] TAN M, BEI R. Circ_0091702 serves as a sponge of miR-545-3p to attenuate sepsis-related acute kidney injury by upregulating THBS2 [J]. J Mol Histol, 2021, 52(4): 717-728.

[11] DENG Z, HE M, HU H, et al. Melatonin attenuates sepsis-induced acute kidney injury by promoting mitophagy through SIRT3-mediated TFAM deacetylation [J]. Autophagy, 2024, 20(1): 151-165.

[12] 李波, 邵素花, 万娅莉, 等. 血清尿调节素、肝素结合蛋白、Klotho 蛋白联合 APACHE II 评分对脓毒症并发急性肾损伤患者 28 天预后的评估价值 [J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(16): 3107-3111.

[13] KIM M J, KIM Y S, KIM S R, et al. β -hydroxybutyrate ameliorates sepsis-induced acute kidney injury [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(11): 8915-8923.

[14] LUTHER T, BÜLOW-ANDERBERG S, PERSSON P, et al. Renal mitochondrial dysfunction in ovine experimental sepsis-associated acute kidney injury [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2023, 324(6): F571-F580.

[15] 郑佳萍, 王倩. 炎调方调控 LncRNA-Miat 对急性脓症患者免疫功能及肠道微生态的保护作用 [J]. 河北医药, 2024, 46(1): 5-9.

[16] WANG Z, CHANG Y, LIU Y, et al. Inhibition of the lncRNA MIAT prevents podocyte injury and mitotic catastrophe in diabetic nephropathy [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 28(4): 136-153.

[17] RAN C, YU B, YIN H, et al. Hugaan buzure granule alleviates acute kidney injury in mice by inhibiting NLRP3/Caspase-1 pathway and TLR4/NF- κ B pathway [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2023, 28(11): 313-324.

[18] LIU Y, FANG Q, MING T, et al. Knockout of Erbin promotes pyroptosis via regulating NLRP3/caspase-1/Gasdermin D pathway in sepsis-induced acute kidney injury [J]. Clin Exp Nephrol, 2023, 27(9): 781-790.

[19] WANG J, LI G, LIN M, et al. microRNA-338-3p suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory response in HK-2 cells [J]. BMC Mol Cell Biol, 2022, 23(1): 60-68.

[20] HUANG Y, WU Y, ZENG L, et al. The tumor suppressor role of microRNA-338-3p in renal cell carcinoma [J]. Oncol Lett, 2018, 16(2): 2195-2200.

[21] 赵瑞臣, 陈春燕, 何琴. 脓毒症急性肾损伤患者血清 USF2 和 THBS1 表达水平及其诊断价值研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(6): 98-102.

[22] ZHAO Z, WANG X, TAN F, et al. Exploration and validation of signature genes and immune associations in septic cardiomyopathy [J]. Clin Exp Hypertens, 2024, 46(1): 2302570.