

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.20.007
文章编号: 1005-8982 (2022) 20-0041-08

实验研究·论著

姜黄素对脂多糖诱导肺细胞损伤的作用及其机制研究*

邹国涛, 曾毅文, 钟绍文, 潘云波

(重庆医科大学附属永川医院 儿科, 重庆 402160)

摘要: **目的** 探究姜黄素通过介导长链非编码RNA THRIL(lncRNA THRIL)表达对脂多糖(LPS)诱导的人正常肺上皮细胞(BEAS-2B)损伤的影响。**方法** LPS诱导BEAS-2B细胞复制体外急性肺损伤细胞模型,并加入姜黄素处理。采用Lipofectamine[®]2000转染试剂将lncRNA THRIL过表达/敲降载体或空载体转染到BEAS-2B细胞中。通过实时荧光定量聚合酶链反应和酶联免疫吸附试验检测lncRNA THRIL及炎症细胞因子[白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]水平;CCK-8法和流式细胞术分别检测LPS、姜黄素及THRIL对细胞活性和细胞凋亡的影响。**结果** 姜黄素组与对照组lncRNA THRIL相对表达量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),LPS组较对照组升高($P<0.05$),LPS+姜黄素2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、LPS+姜黄素5 $\mu\text{mol/L}$ 组、LPS+姜黄素7.5 $\mu\text{mol/L}$ 组较LPS组降低($P<0.05$)。姜黄素组与对照组细胞凋亡率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),LPS组较对照组升高($P<0.05$),LPS+姜黄素2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、LPS+姜黄素5 $\mu\text{mol/L}$ 组、LPS+姜黄素7.5 $\mu\text{mol/L}$ 组较LPS组降低($P<0.05$)。姜黄素组与对照组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 相对表达量及浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$),LPS组较对照组升高($P<0.05$),LPS+姜黄素2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、LPS+姜黄素5 $\mu\text{mol/L}$ 组、LPS+姜黄素7.5 $\mu\text{mol/L}$ 组较LPS组降低($P<0.05$)。姜黄素组与对照组细胞活性比较,差异无统计学意义($P>0.05$),LPS组较对照组降低($P<0.05$),LPS+姜黄素2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、LPS+姜黄素5 $\mu\text{mol/L}$ 组、LPS+姜黄素7.5 $\mu\text{mol/L}$ 组较LPS组升高($P<0.05$)。敲降THRIL组lncRNA THRIL的相对表达量较敲降阴性对照组降低($P<0.05$)。LPS+敲降阴性对照组与LPS组细胞凋亡率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),LPS组较对照组升高($P<0.05$),LPS+敲降THRIL组较LPS+敲降阴性对照组降低($P<0.05$)。LPS+敲降阴性对照组与LPS组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的相对表达量及浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$),LPS组较对照组升高($P<0.05$),LPS+敲降THRIL组较LPS+敲降阴性对照组降低($P<0.05$)。LPS+敲降阴性对照组与LPS组细胞活性比较,差异无统计学意义($P>0.05$),LPS组较对照组降低($P<0.05$),LPS+敲降THRIL组较LPS+敲降阴性对照组升高($P<0.05$)。过表达THRIL组lncRNA THRIL相对表达量较过表达阴性对照组升高($P<0.05$)。LPS+姜黄素+过表达阴性对照组与LPS+姜黄素组细胞活性比较,差异无统计学意义($P>0.05$),LPS组较对照组降低($P<0.05$),LPS+姜黄素组较LPS组升高($P<0.05$),LPS+姜黄素+过表达THRIL组较LPS+姜黄素+过表达阴性对照组细胞活性降低($P<0.05$)。LPS+姜黄素+过表达阴性对照组与LPS+姜黄素组细胞凋亡率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),LPS组较对照组升高($P<0.05$),LPS+姜黄素组较LPS组降低($P<0.05$),LPS+姜黄素+过表达THRIL组较LPS+姜黄素+过表达阴性对照组升高($P<0.05$)。LPS+姜黄素+过表达阴性对照组与LPS+姜黄素组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的相对表达量及浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$),LPS组较对照组升高($P<0.05$),LPS+姜黄素组较LPS组降低($P<0.05$),LPS+姜黄素+过表达THRIL组较LPS+姜黄素+过表达阴性对照组升高($P<0.05$)。**结论** 姜黄素通过抑制THRIL表达,改善LPS诱导的BEAS-2A细胞凋亡和炎症反应。

关键词: 急性肺损伤;姜黄素;长链非编码RNA;炎症

中图分类号: R563.8

文献标识码: A

Mechanism of curcumin in alleviating LPS-induced lung cell injury*

收稿日期: 2022-05-09

* 基金项目: 重庆市教育委员会科学技术研究项目(No: KJQN201900420);重庆市科学基金项目(No: cstc2021jcyj-jqX0035)

[通信作者] 潘云波, E-mail: panyb198112@163.com

Guo-tao Zou, Yi-wen Zeng, Shao-wen Zhong, Yun-bo Pan
(Department of Pediatrics, Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University,
Chongqing 402160, China)

Abstract: Objective To explore the effect of curcumin on lipopolysaccharide (LPS)-induced lung epithelial injury by mediating the expression of long non-coding RNA THRIL. **Methods** The BEAS-2B cells were subject to LPS to establish the acute lung epithelial injury cell models in vitro, and they were treated with curcumin. LncRNA THRIL overexpression/knockdown vectors or empty vectors were transfected into BEAS-2B cells via Lipofectamine 2000. The expression levels of lncRNA THRIL and inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The effects of LPS, curcumin and lncRNA THRIL on cell viability and apoptosis were measured by flow cytometry and CCK-8. **Results** There was no difference in the expression of lncRNA THRIL between the curcumin group and the control group ($P > 0.05$). However, the expression of lncRNA THRIL was higher in the LPS group than in the control group ($P < 0.05$), whereas it was lower in the LPS + 2.5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, LPS + 5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group and LPS + 7.5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group than in the LPS group ($P < 0.05$). There was no difference in the levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α between the curcumin group and the control group ($P > 0.05$). In contrast, the levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were higher in the LPS group than in the control group ($P < 0.05$), while they were lower in the LPS + 2.5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group, LPS + 5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group and LPS + 7.5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group than in the LPS group ($P < 0.05$). The expression of lncRNA THRIL was lower in the THRIL knockdown group than that in the knockdown negative control group ($P < 0.05$). There was no difference in the apoptosis rate between the LPS + knockdown negative control group and the LPS group ($P > 0.05$), while the apoptosis rate was higher in the LPS group compared with the control group ($P < 0.05$) and was lower in the LPS + THRIL knockdown group compared with the LPS + knockdown negative control group ($P < 0.05$). The levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were not different between the LPS + THRIL knockdown group and the LPS group ($P > 0.05$), while they were higher in the LPS group than those in the control group ($P < 0.05$) and were lower in the LPS + THRIL knockdown group than those in the LPS + knockdown negative control group ($P < 0.05$). The cell viability was not different between the LPS + knockdown negative control group and the LPS group ($P > 0.05$), but was lower in the LPS group than that in the control group ($P < 0.05$) and was higher in the LPS + THRIL knockdown group than that in the LPS + knockdown negative control group ($P < 0.05$). The expression of lncRNA THRIL was higher in the THRIL overexpression group than that in the overexpression negative control group ($P < 0.05$). There was no difference in the cell viability between the LPS + curcumin + overexpression negative control group and the LPS + curcumin group ($P > 0.05$), while the cell viability was lower in the LPS group than that in the control group ($P < 0.05$) and was higher in the LPS + curcumin group than that in the LPS group ($P < 0.05$). Besides, the cell viability was lower in the LPS + curcumin + THRIL overexpression group than that in the LPS + curcumin + overexpression negative control group ($P < 0.05$). There was no difference in the apoptosis rate between the LPS + curcumin + overexpression negative control group and the LPS + curcumin group ($P > 0.05$), whereas the apoptosis rate was higher in the LPS group than that in the control group ($P < 0.05$) and was lower in the LPS + curcumin group than that in the LPS group ($P < 0.05$). Compared with the LPS + curcumin + overexpression negative control group, the apoptosis rate was higher in the LPS + curcumin + THRIL overexpression group ($P < 0.05$). The levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were not different between the LPS + curcumin + overexpression negative control group and the LPS + curcumin group ($P > 0.05$), while they were higher in the LPS group than those in the control group ($P < 0.05$), were lower in the LPS + curcumin group than those in the LPS group ($P < 0.05$), and were higher in the LPS + curcumin + THRIL overexpression group than those in the LPS + curcumin + overexpression negative control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Curcumin ameliorates the apoptosis and inflammatory response induced by LPS in BEAS-2A cells by inhibiting the expression of lncRNA THRIL.

Keywords: acute lung injury; curcumin; long non-coding RNA; inflammation

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是一种危及生命的生活质量^[1]。重症监护病房 ALI 患者病死率达 35% ~ 40%^[2]。其特征是肺内过度炎症反应、肺泡-

毛细血管屏障破坏及肺水肿导致的气体交换严重受损^[3]。大量研究表明,革兰阴性菌感染是引起 ALI 的重要原因之一,而革兰阴性菌外膜的主要成分脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)可引起肺损伤和炎症反应^[4]。因此,深入探究 LPS 诱导的 ALI 炎症发生机制将有助于确定新的治疗靶点。

长链非编码 RNA(lncRNA)是一类长度>200 nt 的非编码 RNA,其在转录沉默/激活、染色体修饰、核内运输等方面具有重要作用^[5]。有研究表明,一些 lncRNAs 能够通过调节炎症介质的表达水平来增强或抑制炎症反应^[6],例如 lncRNA THRIL 在脓毒症小鼠的肺中高表达,对其敲降可减轻脓毒症小鼠肺部炎症反应,减少促炎细胞因子的产生^[7]。最近研究表明,姜黄素能够缓解 ALI 中炎症反应对 ALI 具有一定的保护作用^[8]。然而目前关于姜黄素在 ALI 中的作用机制还有待进一步探究。本研究拟采用体外实验探讨姜黄素通过介导 THRIL 表达对 LPS 诱导的 ALI 的调控机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人正常肺上皮细胞(BEAS-2B)购自美国 ATCC 细胞库,LPS 购自美国 Sigma 公司,姜黄素购自上海生工生物工程股份有限公司,lncRNA THRIL 敲降和过表达载体购自广州瑞宝生物科技有限公司,DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,流式双染试剂盒(Annexin V-FITC/PI)购自日本 TaKaRa 株式会社,RNA 提取试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司,逆转录试剂和 SYBR Green PCR Master Mix 检测试剂盒由北京索莱宝公司提供,DH-5 α 大肠杆菌和 T4 连接酶购自北京擎科生物科技有限公司;Lipofectamine[®]2000 转染试剂和 pcDNA3.1 载体购自美国 Invitrogen 公司,CCK-8 检测试剂盒购自美国 Med Chem Express 公司,ELISA 试剂盒购自美国 Abcam 公司。

1.2 载体构建

根据 NCBI 基因数据库中提供的人 lncRNA THRIL(NR_110375.1)的序列,设计引物及酶切位点(结合 pcDNA3.1 载体上的酶切位点),选择限制性内切酶 *Xho*I 和 *Hind*III。提取人 BEAS-2B 全基因组 DNA,通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction,

PCR)扩增 lncRNA THRIL,全长 1 978 bp。PCR 引物序列正向:5'-ACAACCCTAATATCCCCACTCG-3',反向:5'-CGCCCAGGTGTCAATGGTCGTG-3',均 22 bp。随后 PCR 产物和 pcDNA3.1 载体使用限制性内切酶 *Xho*I 和 *Hind*III 酶切,利用 T4 连接酶 4 $^{\circ}$ C 过夜。连接后产物使用热激法转大肠杆菌 DH-5 α ,接种于含有氨苄青霉素的 LB 平板中,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜,次日挑取 5 个菌落测序验证。挑选测序正确的菌落扩增培养,摇菌过夜,提取重组质粒用于后续的研究。THRIL 敲降载体的构建同上。

1.3 细胞培养及处理

将 BEAS-2B 细胞接种在含有 10% 胎牛血清、100 u/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养箱中,细胞融合度>90% 时用胰蛋白酶消化、传代。培养细胞至稳定传代,分组并进行以下处理:对照组细胞使用 DMSO 溶剂处理;LPS 组使用 1 μ g/mL LPS 刺激细胞 24 h;姜黄素组使用 5 μ mol/L 的姜黄素处理 24 h;先使用 2.5 μ mol/L、5 μ mol/L 和 7.5 μ mol/L 的姜黄素处理 2 h,再使用 1 μ g/mL 的 LPS 处理细胞 22 h,并分别作为 LPS+姜黄素 2.5 μ mol/L 组、LPS+姜黄素 5 μ mol/L 组、LPS+姜黄素 7.5 μ mol/L 组。lncRNA THRIL 过表达载体、敲降载体及空载体(阴性对照)均使用 Lipofectamine[®]2000 转染进入细胞,分为过表达阴性对照组、过表达 THRIL 组、敲降阴性对照组、敲降 THRIL 组。在转染 24 h 后按照上述 LPS 和姜黄素的处理条件进一步处理,分为 LPS+姜黄素组、LPS+姜黄素+过表达阴性对照组、LPS+姜黄素+过表达 THRIL 组、LPS+敲降阴性对照组、LPS+敲降 THRIL 组。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应检测 lncRNA THRIL 及炎症因子表达

实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 lncRNA THRIL、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6(Interleukin-6, IL-6)表达。收集各组细胞,用 TRIzol 提取总 RNA,随后测定 RNA 的浓度,参照逆转录试剂盒说明书将 2 μ g 总 RNA 合成 cDNA,使用 SYBR Green PCR Master Mix 检测试剂盒在 ABI 7500 仪器上进行 qRT-PCR。实验所得数据用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析,以 *GAPDH* 为内参计算各基因

mRNA 相对表达量。所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
THRIL	正向: 5'-AAACAGGTGCACGTTTCAGG-3'	20
	反向: 5'-CCAGGTCTCAGTTTGGAGAAGA-3'	22
IL-1 β	正向: 5'-CGATGCACCTGTACGATCAC-3'	20
	反向: 5'-TCTTTCAACACGCAGGACAG-3'	20
IL-6	正向: 5'-ACAGGGAGAGGGAGCGATAA-3'	20
	反向: 5'-GAGAAGGCAACTGGACCGAA-3'	20
TNF- α	正向: 5'-CCCCAGGGACCTCTCTTAA-3'	20
	反向: 5'-TGAGGTACAGGCCCTCTGAT-3'	20
GAPDH	正向: 5'-CCAGGTGGTCTCTCTGA-3'	18
	反向: 5'-GCTGTAGCCAAATCGTTGT-3'	19

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

各组细胞在 6 孔板中采用胰蛋白酶消化、收集, PBS 洗涤, 添加 300 μ L 缓冲液重悬细胞, 在细胞悬液中分别加入 15 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI, 避光反应 15 min, 加入 200 μ L 的缓冲液, 上机, 利用 Flow Jo 软件分析细胞凋亡情况。

1.6 CCK-8 检测细胞活性

将对数生长期细胞消化并制备细胞悬液, 在 96 孔板中接种细胞悬液(100 μ L/孔), 将培养板放在培养箱中预培养 24 h, 按照 1.4 的方法处理细胞后再培养 24 h, 向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 将培养板置于培养箱内孵育 4 h, 用酶联免疫检测仪(美国赛默飞尔科技公司)测定 450 nm 处的吸光度。

1.7 酶联免疫吸附试验检测炎症因子水平

取各组处理后的细胞培养基上清, 4 200 r/min 离心 10 min, 离心直径 20 cm, 收集上清液。按照酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒说明书要求操作, 将 50 μ L 上清液加入板孔中, 再加入 50 μ L 抗体溶液, 密封并在振荡器上室温孵育 1 h。然后清洗每个孔并加入 100 μ L TMB 显影液, 暗室孵育 10 min 后每孔加入 100 μ L 终止液, 在振荡器上摇匀, 测定 450 nm 处的吸光度值。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较用方差分析, 进

一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞中 lncRNA THRIL 表达的影响

对照组 lncRNA THRIL mRNA 相对表达量为(1.05 \pm 0.16), LPS 组为(2.97 \pm 0.21), 姜黄素组为(1.11 \pm 0.13), LPS+姜黄素 2.5 μ mol/L 组为(2.46 \pm 0.25), LPS+姜黄素 5 μ mol/L 组为(1.58 \pm 0.33), LPS+姜黄素 7.5 μ mol/L 组为(1.28 \pm 0.24), 经方差分析, 差异有统计学意义($F = 36.870, P = 0.000$)。姜黄素组与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), LPS 组较对照组升高($P < 0.05$), LPS+姜黄素 2.5 μ mol/L 组、LPS+姜黄素 5 μ mol/L 组、LPS+姜黄素 7.5 μ mol/L 组较 LPS 组降低($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性降低。

2.2 不同浓度姜黄素处理对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞损伤的影响

对照组细胞凋亡率为(4.43 \pm 1.76)%, LPS 组为(34.87 \pm 1.55)%, 姜黄素组为(9.90 \pm 2.76)%, LPS+姜黄素 2.5 μ mol/L 组为(32.90 \pm 2.75)%, LPS+姜黄素 5 μ mol/L 组为(26.83 \pm 3.25)%, LPS+姜黄素 7.5 μ mol/L 组为(23.50 \pm 3.32)%, 经方差分析, 差异有统计学意义($F = 65.160, P = 0.000$)。姜黄素组与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), LPS 组较对照组升高($P < 0.05$), LPS+姜黄素 2.5 μ mol/L 组、LPS+姜黄素 5 μ mol/L 组、LPS+姜黄素 7.5 μ mol/L 组较 LPS 组降低($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性降低。见图 1。

各组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。姜黄素组与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), LPS 组较对照组升高($P < 0.05$), LPS+姜黄素 2.5 μ mol/L 组、LPS+姜黄素 5 μ mol/L 组、LPS+姜黄素 7.5 μ mol/L 组较 LPS 组降低($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性降低。见表 1。

对照组细胞活性为(100.00 \pm 3.08)%, LPS 组为(67.33 \pm 3.58)%, 姜黄素组为(96.38 \pm 2.07)%, LPS+姜黄素 2.5 μ mol/L 组为(73.49 \pm 4.49)%, LPS+姜黄素 5 μ mol/L 组为(79.16 \pm 4.55)%, LPS+姜黄素 7.5 μ mol/L 组为(85.92 \pm 5.10)%, 经方差分析, 差异有统计学意义($F = 31.750, P = 0.000$)。姜黄素组与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), LPS 组较对照组降低

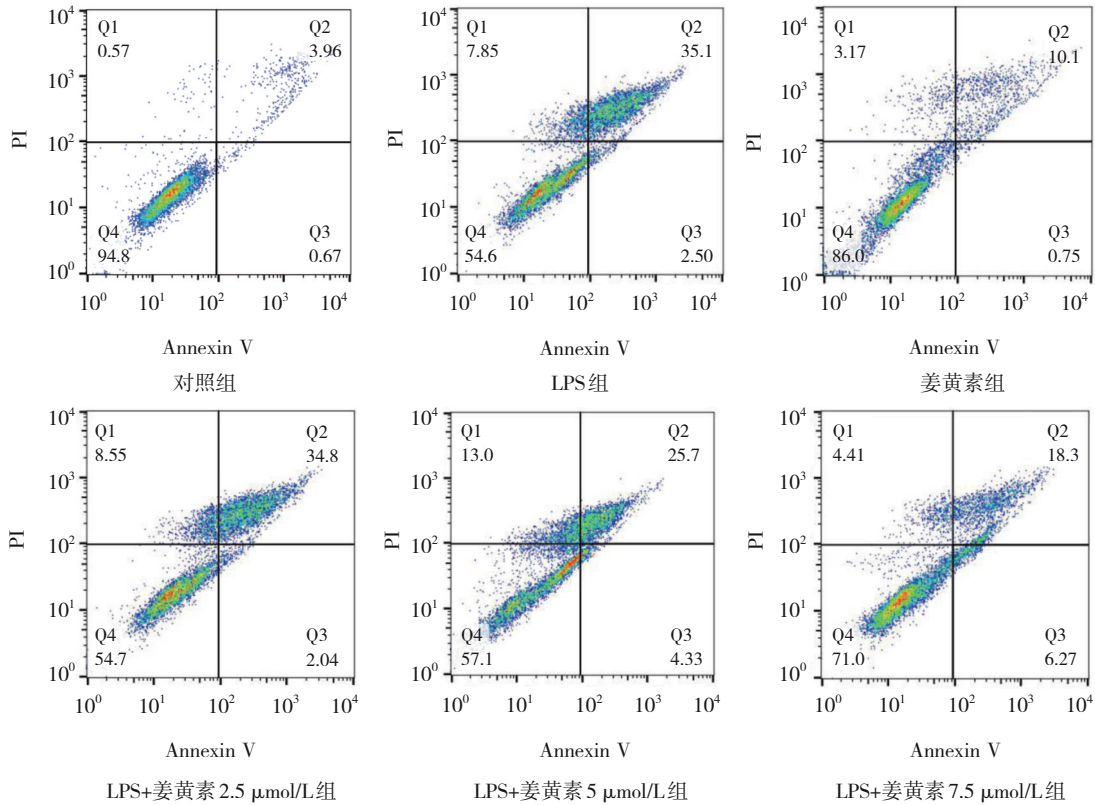


图 1 流式细胞术检测细胞凋亡

表 1 各组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α
对照组	1.00 ± 0.08	1.05 ± 0.17	1.13 ± 0.23
LPS组	3.32 ± 0.66	3.17 ± 0.35	3.55 ± 0.31
姜黄素组	1.29 ± 0.18	1.13 ± 0.21	1.08 ± 0.16
LPS+姜黄素 2.5 μmol/L组	2.94 ± 0.43	2.84 ± 0.38	2.92 ± 0.56
LPS+姜黄素 5 μmol/L组	1.95 ± 0.35	1.90 ± 0.47	1.86 ± 0.45
LPS+姜黄素 7.5 μmol/L组	1.52 ± 0.28	1.58 ± 0.21	1.60 ± 0.28
F 值	18.220	23.300	26.260
P 值	0.000	0.000	0.000

($P < 0.05$), LPS + 姜黄素 2.5 μmol/L 组、LPS + 姜黄素 5 μmol/L 组、LPS + 姜黄素 7.5 μmol/L 组较 LPS 组升高 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性升高。

各组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 质量浓度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。姜黄素组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LPS 组较对照组升高 ($P < 0.05$), LPS+姜黄素 2.5 μmol/L 组、LPS+姜黄素 5 μmol/L 组、LPS+姜黄素 7.5 μmol/L 组较 LPS 组降低 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性降低。见表 2。

2.3 敲降 THRIL 对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞损

表 2 各组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 质量浓度比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α
对照组	169.06 ± 30.32	52.34 ± 10.34	76.03 ± 6.32
LPS组	706.89 ± 54.74	208.46 ± 26.48	428.96 ± 36.64
姜黄素组	177.74 ± 35.47	64.31 ± 12.27	83.37 ± 12.78
LPS+姜黄素 2.5 μmol/L组	639.27 ± 54.98	188.78 ± 16.58	397.96 ± 29.22
LPS+姜黄素 5 μmol/L组	438.49 ± 49.37	139.43 ± 12.74	271.08 ± 28.98
LPS+姜黄素 7.5 μmol/L组	319.59 ± 36.97	96.65 ± 17.58	162.33 ± 29.76
F 值	78.490	43.350	103.300
P 值	0.000	0.000	0.000

伤的影响

敲降阴性对照组 lncRNA THRIL mRNA 的相对表达量为 (1.00 ± 0.06), 敲降 THRIL 组为 (0.31 ± 0.09), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 11.680, P = 0.000$), 敲降 THRIL 组较敲降阴性对照组降低 ($P < 0.05$)。

流式细胞术结果显示, 对照组细胞凋亡率为

(4.47 ± 1.13)%, LPS 组为 (34.73 ± 2.31)%, LPS+ 敲降阴性对照组为 (33.13 ± 4.35)%, LPS + 敲降 THRIL 组为 (25.17 ± 1.03)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=87.380, P=0.000$), LPS + 敲降阴性对照组与 LPS

组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), LPS 组较对照组升高 ($P<0.05$), LPS + 敲降 THRIL 组较 LPS+ 敲降阴性对照组降低 ($P<0.05$)。见图 2。

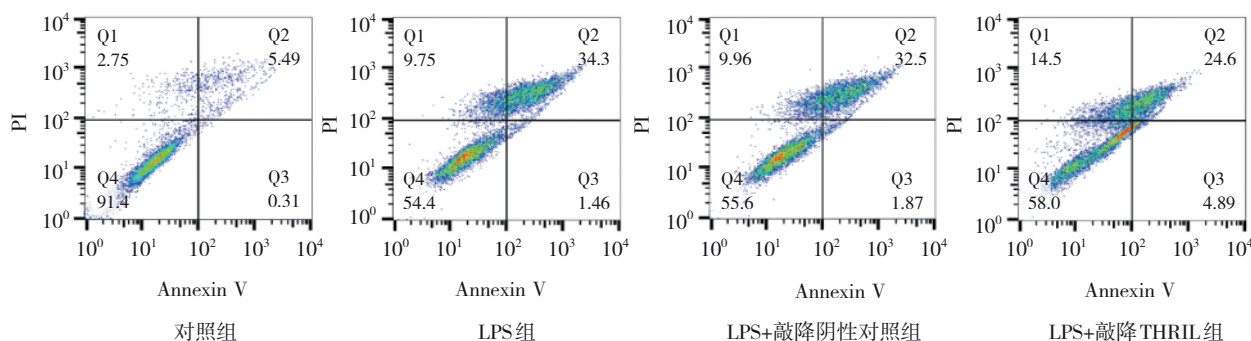


图 2 流式细胞术检测细胞凋亡

各组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), LPS + 敲降阴性对照组与 LPS 组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), LPS 组较对照组升高 ($P<0.05$), LPS+ 敲降 THRIL 组较 LPS+ 敲降阴性对照组降低 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	1.06 \pm 0.15	1.08 \pm 0.14	1.06 \pm 0.23
LPS 组	3.20 \pm 0.68	2.65 \pm 0.35	3.52 \pm 0.58
LPS+敲降阴性对照组	3.08 \pm 0.45	2.71 \pm 0.25	3.56 \pm 0.35
LPS+敲降 THRIL 组	1.89 \pm 0.16	1.83 \pm 0.33	2.32 \pm 0.45
F 值	17.530	22.560	23.710
P 值	0.000	0.000	0.000

CCK-8 结果显示, 对照组细胞活性为 (100.00 ± 2.94)%, LPS 组为 (67.86 ± 4.55)%, LPS+ 敲降阴性对照组为 (66.70 ± 3.84)%, LPS + 敲降 THRIL 组为 (81.90 ± 5.55)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=38.700, P=0.000$), LPS+ 敲降阴性对照组与 LPS 组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), LPS 组较对照组降低 ($P<0.05$), LPS+ 敲降 THRIL 组较 LPS+ 敲降阴性对照组升高 ($P<0.05$)。

各组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的质量浓度比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), LPS+ 敲降阴性对照组与 LPS 组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), LPS 组较

对照组升高 ($P<0.05$), LPS+ 敲降 THRIL 组较 LPS+ 敲降阴性对照组降低 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的质量浓度比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	172.00 \pm 24.30	54.41 \pm 13.56	75.25 \pm 11.82
LPS 组	698.83 \pm 52.70	208.00 \pm 19.54	411.98 \pm 36.69
LPS+敲降阴性对照组	709.78 \pm 65.97	214.88 \pm 27.22	420.74 \pm 45.51
LPS+敲降 THRIL 组	382.93 \pm 64.21	135.43 \pm 21.92	217.03 \pm 35.38
F 值	69.070	37.780	71.800
P 值	0.000	0.000	0.000

2.4 过表达 THRIL 对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞损伤的影响

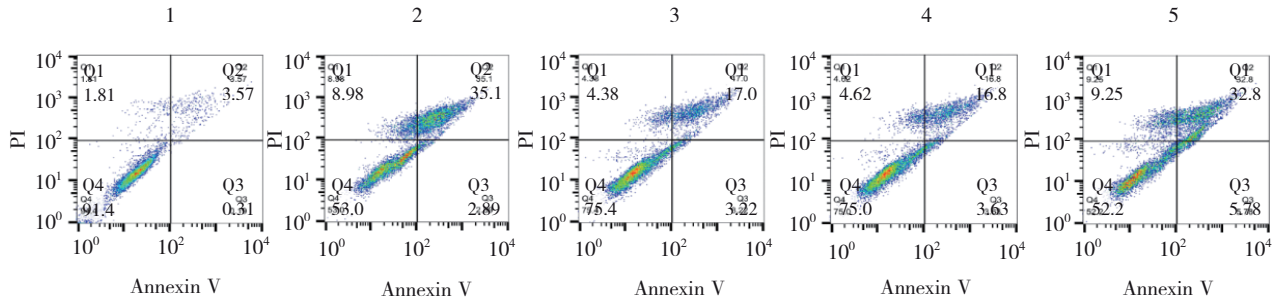
过表达阴性对照组 lncRNA THRIL mRNA 相对表达量为 (1.02 ± 0.12), 过表达 THRIL 组为 (3.23 ± 0.33), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=11.000, P=0.000$), 过表达 THRIL 组较过表达阴性对照组升高 ($P<0.05$)。

CCK-8 结果显示, 对照组细胞活性为 (100.00 ± 3.29)%, LPS 组为 (66.37 ± 3.51)%, LPS+ 姜黄素组为 (80.56 ± 4.62)%, LPS+ 姜黄素+过表达阴性对照组为 (81.21 ± 2.93)%, LPS+ 姜黄素+过表达 THRIL 组为 (67.98 ± 4.63)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=36.710, P=0.000$), LPS+ 姜黄素+过表达阴性对照组与 LPS+ 姜黄素组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), LPS 组较对照组降低 ($P<0.05$), LPS+ 姜黄素

组较 LPS 组升高 ($P < 0.05$), LPS+姜黄素+过表达 THRIL 组较 LPS+姜黄素+过表达阴性对照组细胞活性降低 ($P < 0.05$)。

流式细胞术结果显示, 对照组细胞凋亡率为 (3.87 ± 0.92)%, LPS 组为 (34.43 ± 4.27)%, LPS+姜黄素组为 (21.43 ± 3.73)%, LPS+姜黄素+过表达阴性对照组为 (21.37 ± 2.44)%, LPS+姜黄素+过表达 THRIL

组为 (32.83 ± 2.97)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 46.950, P = 0.000$), LPS+姜黄素+过表达阴性对照组与 LPS+姜黄素组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LPS 组较对照组升高 ($P < 0.05$), LPS+姜黄素组较 LPS 组降低 ($P < 0.05$), LPS+姜黄素+过表达 THRIL 组较 LPS+姜黄素+过表达阴性对照组升高 ($P < 0.05$)。见图 3。



1: 对照组; 2: LPS 组; 3: LPS+姜黄素组; 4: LPS+姜黄素+过表达阴性对照组; 5: LPS+姜黄素+过表达 THRIL 组。

图 3 流式细胞术检测细胞凋亡

各组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), LPS+姜黄素+过表达阴性对照组与 LPS+姜黄素组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LPS 组较对照组升高 ($P < 0.05$), LPS+姜黄素组较 LPS 组降低 ($P < 0.05$), LPS+姜黄素+过表达 THRIL 组较 LPS+姜黄素+过表达阴性对照组升高 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 各组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	1.01 \pm 0.15	1.07 \pm 0.16	1.00 \pm 0.12
LPS 组	3.29 \pm 0.68	3.01 \pm 0.47	3.83 \pm 0.27
LPS+姜黄素组	1.98 \pm 0.45	1.78 \pm 0.32	2.26 \pm 0.35
LPS+姜黄素+过表达阴性对照组	1.90 \pm 0.16	1.90 \pm 0.27	2.37 \pm 0.33
LPS+姜黄素+过表达 THRIL 组	3.04 \pm 0.16	2.83 \pm 0.24	3.30 \pm 0.40
F 值	5.500	20.230	37.510
P 值	0.000	0.000	0.000

各组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的质量浓度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), LPS+姜黄素+过表达阴性对照组与 LPS+姜黄素组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LPS 组较对照组升高 ($P < 0.05$), LPS+姜黄素组较 LPS 组降低 ($P < 0.05$), LPS+姜黄素+过

表达 THRIL 组较 LPS+姜黄素+过表达阴性对照组升高 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 各组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的质量浓度比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	165.01 \pm 26.26	57.58 \pm 10.41	77.65 \pm 11.56
LPS 组	695.17 \pm 52.38	203.29 \pm 24.16	416.89 \pm 36.74
LPS+姜黄素组	314.60 \pm 37.20	123.81 \pm 19.36	180.74 \pm 35.40
LPS+姜黄素+过表达阴性对照组	328.62 \pm 40.76	113.93 \pm 21.59	187.04 \pm 41.34
LPS+姜黄素+过表达 THRIL 组	654.94 \pm 46.75	192.66 \pm 20.62	401.07 \pm 31.24
F 值	92.940	27.770	61.640
P 值	0.000	0.000	0.000

3 讨论

ALI 和急性呼吸窘迫综合征是由多种肺损伤引起的肺部变化的连续体, 常导致严重的发病率和死亡率^[9]。研究表明 LPS 能够显著刺激促炎因子的表达, 引起系统和全身性炎症反应综合征等炎症反应^[10]。本研究利用 LPS 诱导了 BEAS-2B 细胞损伤并给予姜黄素干预, 结果表明, 姜黄素能通过抑制 lncRNA THRIL 的表达, 抑制 LPS 诱导细胞凋亡和炎症损伤。

姜黄素是一种天然多酚化合物,原产于姜科植物姜黄根茎中,具有多种生物和药物性质^[11]。LIANG 等^[12]研究发现姜黄素能够通过降低 miR-21 的表达,减轻急性肺栓塞小鼠中的肺损伤和炎症反应。并且姜黄素下调 ALI 大鼠肺部炎症细胞因子 TNF- α 、IL-8 和巨噬细胞抑制因子水平,使其存活率提高 40%~50%,表明姜黄素对 ALI 具有保护作用^[13]。本研究结果显示,姜黄素呈剂量依赖性抑制 LPS 诱导的炎症因子表达和细胞凋亡,这与前述结果一致,表明姜黄素对 LPS 引起的肺细胞损伤有保护作用。先前研究也表明姜黄素在较低浓度时不会产生细胞毒性,而 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的姜黄素则会显著降低细胞活性^[14]。本研究也证实这一点,5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的姜黄素对细胞活性无显著影响,同时笔者均选用 < 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的姜黄素处理细胞,以规避高浓度姜黄素的细胞毒性带来的影响。

最近研究已经揭示了 lncRNA 在 ALI 中发挥了重要作用,例如 lncRNA CASC2 通过调节 miR-152-3p/PDK4 通路改善 LPS 诱导的人肺上皮细胞损伤^[15];敲降 lncRNA NEAT1 降低了 LPS 诱导的炎症细胞因子的表达,减轻了 LPS 诱导的 ALI^[16]。本研究结果与上述研究一致,lncRNA THRIL 在 LPS 诱导的肺细胞中表达显著升高,对其敲降显著抑制了 LPS 诱导的细胞凋亡以及炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达。

综上所述,本研究显示姜黄素可以抑制 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞中 lncRNA THRIL 的表达,缓解 LPS 诱导的细胞凋亡和炎症损伤,表明姜黄素在 ALI 的治疗中具有重要作用,同时 lncRNA THRIL 可能是诊断和治疗 ALI 的重要靶点。但姜黄素在 LPS 诱导的 ALI 中还可能存在其他的调控机制或通路,其中更多、更详细的分子机制还有待进一步深入研究。

参 考 文 献 :

- [1] LI Y C, CAO Y M, XIAO J, et al. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 inhibits ferroptosis and alleviates intestinal ischemia/reperfusion-induced acute lung injury[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(9): 2635-2650.
- [2] HAYES M, CURLEY G, ANSARI B, et al. Clinical review: stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype?[J]. *Crit Care*, 2012, 16(2): 205.
- [3] HEROLD S, GABRIELLI N M, VADÁSZ I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(10): L665-L681.
- [4] KOLOMAZNIK M, NOVA Z, CALKOVSKA A. Pulmonary

surfactant and bacterial lipopolysaccharide: the interaction and its functional consequences[J]. *Physiol Res*, 2017, 66(Suppl 2): S147-S157.

- [5] 林润, 罗凌青, 饶平, 等. lncRNA A_30_P01029806 减轻脓毒症急性肺损伤的机制研究[J]. *现代医学*, 2021, 49(8): 897-903.
- [6] QIU N, XU X M, HE Y Y. LncRNA TUG1 alleviates sepsis-induced acute lung injury by targeting miR-34b-5p/GAB1[J]. *BMC Pulm Med*, 2020, 20(1): 49.
- [7] CHEN H B, HU X M, LI R T, et al. LncRNA THRIL aggravates sepsis-induced acute lung injury by regulating miR-424/ROCK2 axis[J]. *Mol Immunol*, 2020, 126: 111-119.
- [8] WANG Y, WANG Y J, CAI N, et al. Anti-inflammatory effects of curcumin in acute lung injury: in vivo and in vitro experimental model studies[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96: 107600.
- [9] BUTT Y, KURDOWSKA A, ALLEN T C. Acute lung injury: a clinical and molecular review[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2016, 140(4): 345-350.
- [10] 王利月, 温洁霞, 林洪羽, 等. 丹参酮IIA 抑制 LPS 诱导人单核细胞促炎性分子的表达[J]. *河北农业大学学报*, 2014, 37(6): 85-90.
- [11] NOUREDDIN S A, EL-SHISHTAWY R M, AL-FOOTY K O. Curcumin analogues and their hybrid molecules as multifunctional drugs[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 182: 111631.
- [12] LIANG D A, WEN Z G, HAN W L, et al. Curcumin protects against inflammation and lung injury in rats with acute pulmonary embolism with the involvement of microRNA-21/PTEN/NF- κ B axis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(7): 2823-2835.
- [13] XIAO X F, YANG M S, SUN D, et al. Curcumin protects against sepsis-induced acute lung injury in rats[J]. *J Surg Res*, 2012, 176(1): e31-e39.
- [14] LI R H, FANG H T, SHEN J L, et al. Curcumin alleviates LPS-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in bovine mammary epithelial cells via the NFE2L2 signaling pathway[J]. *Toxins (Basel)*, 2021, 13(3): 208.
- [15] ZHU L L, SHI D W, CAO J H, et al. LncRNA CASC2 alleviates sepsis-induced acute lung injury by regulating the miR-152-3p/PDK4 axis[J]. *Immunol Invest*, 2022, 51(5): 1257-1271.
- [16] CHEN J H, LIU Q, DING Z L, et al. LncRNA NEAT1 aggravates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating the miR-98-5p/TLR4 axis[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(12): e22927.

(李科 编辑)

本文引用格式: 邹国涛, 曾毅文, 钟绍文, 等. 姜黄素对脂多糖诱导肺细胞损伤的作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(20): 41-48.

Cite this article as: ZHOU G T, ZENG Y W, ZHONG S W, et al. Mechanism of curcumin in alleviating LPS-induced lung cell injury[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(20): 41-48.