

连翘提取物调控 miR-223-3p 对肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞损伤的影响

陈 丹¹, 胡浚伟², 李红叶¹, 冯 斌^{3*}

1. 驻马店市中心医院 儿内一科, 河南 驻马店 463000

2. 黄淮学院医学院 内科教研室, 河南 驻马店 463000

3. 河南中医药大学第一附属医院 儿科, 河南 郑州 450000

摘 要: **目的** 探讨连翘提取物对肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞 A549 损伤的影响及其可能作用机制。**方法** 采用肺炎链球菌感染肺泡上皮细胞 A549 建立细胞损伤模型, 不同剂量的连翘提取物处理细胞; 微小 RNA-223-3p (micro RNA-223-3p, miR-223-3p) 特异性寡核苷酸抑制剂 (anti-miR-223-3p) 及其阴性对照序列 (anti-miR-NC) 分别转染至 A549 细胞后用肺炎链球菌培养细胞; miR-223-3p 寡核苷酸模拟物 (miR-223-3p mimics) 转染至 A549 细胞后用连翘提取物处理细胞, 然后用肺炎链球菌培养细胞。MTT、流式细胞术分别检测细胞增殖与凋亡能力; ELISA 法检测白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、 γ 干扰素 (interferon γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 的水平; qRT-PCR 法检测 miR-223-3p 的表达量; Western blotting 法检测活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cleaved cysteinyl aspartate-specific protease-3, cleaved Caspase-3) 蛋白表达量。**结果** 连翘提取物能够以剂量相关方式增强肺炎链球菌感染的 A549 细胞活力 ($P < 0.05$), 升高 IL-10 水平 ($P < 0.05$), 降低细胞凋亡率和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 还可降低 miR-223-3p 的表达量和 IL-6、INF- γ 、TNF- α 的水平 ($P < 0.05$); 转染 anti-miR-223-3p 后感染肺炎链球菌的 A549 细胞活力和 IL-10 的水平升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率和 cleaved Caspase-3 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), IL-6、INF- γ 、TNF- α 的水平降低 ($P < 0.05$); 转染 miR-223-3p mimics 可逆转连翘提取物对肺炎链球菌感染的 A549 细胞增殖、凋亡及炎症反应的作用。**结论** 连翘提取物可能通过抑制 miR-223-3p 的表达而促进细胞增殖及抑制细胞凋亡、炎症反应从而减轻肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞损伤。

关键词: 连翘提取物; 肺炎链球菌; 肺泡上皮细胞 A549; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)24-7561-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.018

Effect of *Forsythiae Fructus* extract on damage of alveolar epithelial cells infected by *Streptococcus pneumoniae* by regulating miR-223-3p

CHEN Dan¹, HU Jun-wei², LI Hong-ye¹, FENG Bin³

1. Department of Pediatrics, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, Cina

2. Department of Internal Medicine, Medical College, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China

3. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To explore the effect of Lianqiao (*Forsythiae Fructus*) extract on injury of alveolar epithelial cells A549 infected by *Streptococcus pneumoniae* and its possible mechanism. **Methods** *Streptococcus pneumoniae* was used to infect alveolar epithelial cells A549 to establish a cell injury model, and different doses of *Forsythiae Fructus* extract were used to treat the cells. Micro RNA-223-3p (miR-223-3p) specific oligonucleotide inhibitor (anti-miR-223-3p) and its negative control sequence (anti-miR-NC) were respectively transfected into A549 cells and cultured with *Streptococcus pneumoniae*. After miR-223-3p oligonucleotide mimics (miR-223-3p mimics) was transfected into A549 cells, the cells were treated with *Forsythiae Fructus* extract, and then the cells were cultured

收稿日期: 2021-03-14

作者简介: 陈丹, 硕士研究生, 从事儿科呼吸系统研究。E-mail: chendan8212@126.com

*通信作者: 冯 斌, 医学博士, 从事儿科专业。E-mail: fengbin98765@163.com

with *Streptococcus pneumoniae*. MTT and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis. ELISA method was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6), interferon γ (INF- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-10. qRT-PCR method was used to detect the expression of *miR-223-3p*. Western blotting method was used to detect the expression of cleaved Caspase-3 protein. **Results** *Forsythiae Fructus* extract could enhance the viability of A549 cells infected by *Streptococcus pneumoniae* in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), and could increase the level of IL-10 ($P < 0.05$), but could reduce the apoptosis rate and the protein level of cleaved Caspase3 ($P < 0.05$), it could also reduce the expression of *miR-223-3p* and the levels of IL-6, INF- γ , TNF- α ($P < 0.05$). After transfection with anti-*miR-223-3p*, the viability and IL-10 levels of A549 cells infected by *Streptococcus pneumoniae* were increased ($P < 0.05$), while the apoptosis rate and the protein level of cleaved Caspase-3 were decreased ($P < 0.05$), and the levels of IL-6, INF- γ , TNF- α were decreased ($P < 0.05$). Transfection of *miR-223-3p* mimics could reverse the effects of *Forsythiae Fructus* extract on the proliferation, apoptosis and inflammation of A549 cells infected with *Streptococcus pneumoniae*. **Conclusion** *Forsythiae Fructus* extract may promote cell proliferation and inhibit cell apoptosis and inflammation by inhibiting the expression of *miR-223-3p*, thereby reducing the damage of alveolar epithelial cells infected by *Streptococcus pneumoniae*.

Key words: *Forsythiae Fructus* extract; *Streptococcus pneumoniae*; alveolar epithelial cell A549; cell proliferation; apoptosis

肺炎链球菌属于革兰阳性双球菌,其定植于人体上呼吸道,一旦人体免疫力降低或合并病毒感染时,肺炎链球菌会引起败血症、肺炎等疾病。我国肺炎链球菌肺炎死亡率逐年上升,已严重降低患者生活质量,目前临床常选用抗生素治疗肺炎链球菌肺炎,但部分患者已产生抗生素耐药性,因而研发非抗生素类药物治疗肺炎链球菌肺炎具有重要意义^[1-4]。连翘属于木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,其具有抗菌、抗炎等作用,且具有抗肺炎克雷伯菌的作用,还可减少过度使用抗生素对患者造成的副作用,而连翘提取物是从连翘中提取的主要活性组分,其具有抗炎、抗肿瘤等作用^[5]。但连翘提取物与肺炎链球菌肺炎的相关研究尚未见报道。微小 RNA (miRNA) 可通过调控靶 mRNA 表达而参与多种疾病发生发展过程,并可能作为治疗的潜在靶点,研究表明微小 RNA-223-3p (micro RNA-223-3p, *miR-223-3p*) 在肺炎继发败血症患者中表达水平升高,并可能作为诊断该疾病的潜在生物学标记物^[6]。但 *miR-223-3p* 在肺炎链球菌肺炎中的表达及其可能作用机制尚未阐明。因此,本研究采用肺炎链球菌感染肺泡上皮细胞 A549 建立细胞损伤模型,探讨连翘提取物是否可通过调控 *miR-223-3p* 表达而减缓肺炎链球菌肺炎的发展进程。

1 材料与方法

1.1 试剂

连翘提取物(质量浓度为 1000 g/L)购自天津美伦医药集团有限公司(批号 20190203),连翘提取物倍比稀释成 3、6、12 $\mu\text{g/mL}$ 的给药药液;头孢羟氨苄购自清远华能制药有限公司(批号 171003);

DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司(批号 20180206);胎牛血清购自美国 Gibco 公司(批号 20181203);Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen(批号 20171212);miRNA 提取试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司(批号 20180203);反转录试剂盒(批号 20180506)与 qRT-PCR 试剂(批号 20180204)购自北京天根生化科技有限公司;miR-223-3p 特异性寡核苷酸抑制剂(anti-miR-223-3p)及其阴性对照序列(anti-miR-NC)、miR-223-3p 寡核苷酸模拟物(miR-223-3p mimics)购自广州锐博生物公司;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)检测试剂盒购自上海酶联生物公司(批号分别为 20180302、20180506、20180701、20180603);兔抗人活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(cleaved cysteinyl aspartate-specific protease-3, cleaved Caspase-3)单克隆抗体(批号 20180509)与二抗(批号 20180604)购自美国 Abcam 公司。StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司;FACS Calibur 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司。

1.2 细胞

肺泡上皮细胞 A549 与肺炎链球菌株购自美国 ATCC 公司。

1.3 实验分组及处理

A549 细胞培养于含有 10%胎牛血清的培养基中,于培养箱内培养并消化传代。肺炎链球菌株培养于含有 5%脱纤维羊血的血平板中,实验开始前置于含有 0.5%酵母的托休二氏溶液中培养过夜。A549 细

胞分为对照组,模型组,连翘提取物低、中、高剂量(3、6、12 $\mu\text{g/mL}$)组,anti-miR-NC 组,anti-miR-223-3p 组,miR-223-3p 组,连翘提取物+miR-223-3p 组,头孢羟氨苄(阳性对照)组。对照组:A549 细胞用 DMEM 培养基正常培养。模型组:当 A549 细胞生长融合度达到 90% 时用 1×10^8 CFU/mL 的肺炎链球菌培养细胞^[7]。连翘提取物低、中、高剂量组:A549 细胞先分别加入含有不同质量浓度(3、6、12 $\mu\text{g/mL}$)连翘提取物的培养基培养 48 h^[8],收集细胞后用 1×10^8 CFU/mL 的肺炎链球菌培养细胞。anti-miR-NC 组、anti-miR-223-3p 组、miR-223-3p 组:anti-miR-NC (0.5 $\mu\text{mol/L}$)、anti-miR-223-3p (0.5 $\mu\text{mol/L}$)、miR-223-3p mimics (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 分别转染至 A549 细胞培养 48 h,然后用 1×10^8 CFU/mL 的肺炎链球菌培养细胞。连翘提取物+miR-223-3p 组:miR-223-3p mimics 转染至 A549 细胞 6 h 后加入含有 12 $\mu\text{g/mL}$ 连翘提取物的培养基培养 48 h,收集细胞后用 1×10^8 CFU/mL 的肺炎链球菌培养。头孢羟氨苄(阳性对照)组:A549 细胞加入含有 12 $\mu\text{g/mL}$ 头孢羟氨苄的 DMEM 培养基培养 48 h,收集细胞后用 1×10^8 CFU/mL 的肺炎链球菌培养细胞。

1.4 MTT 检测细胞增殖

收集各组 A549 细胞按照每孔 4×10^3 个接种于 96 孔板,于培养箱内培养 24 h 后每孔加入 MTT 溶液 20 μL ,于培养箱内培养 4 h 后弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,室温避光孵育 5 min,用酶标仪检测各孔吸光度(A)。每组设置 3 个复孔,实验重复 3 次($n=9$)。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集各组 A549 细胞后用预冷 PBS 洗涤细胞,3000 r/min 离心 5 min 后弃上清,收集细胞沉淀,然后加入 500 μL 结合缓冲液重悬细胞(2.5×10^5 个/mL),取 100 μL 细胞悬液加入 5 μL Annexin V-FITC 后室温避光孵育 5 min,然后加入 5 μL PI 充分混匀,避光染色 10 min,于 1 h 内上机(FACS Calibur 流式细胞仪)检测细胞凋亡率。

1.6 ELISA 法检测 IL-6、INF- γ 、TNF- α 、IL-10 水平

收集各组 A549 细胞培养液,采用 ELISA 法检测 IL-6、INF- γ 、TNF- α 、IL-10 的水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.7 qRT-PCR 检测 miR-223-3p 的表达水平

利用 miRNA 提取试剂盒提取各组 A549 细胞总 RNA,应用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。反

转录体系:5 $\times$ gDNA Buffer 2 μL , 10 $\times$ King RT Buffer 2 μL , FastKing RT Enzyme Mix 1 μL , FQ-RT Primer Mix 2 μL , RNA 2 μg , RNase-Free ddH₂O 补足体系至 20 μL 。反应条件:42 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min。RNA 反转录合成 cDNA, cDNA 2 μL 进行 qRT-PCR 实验,根据试剂盒说明书配制反应体系,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 36 次循环。miR-223-3p 以 U6 为内参基因,应用 ABI StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪检测 miR-223-3p 相对表达量。miR-223-3p 正向引物 5'-AGCTGGTGGTTGTGAATCAGGCCG-3',反向引物 5'-TGGTGTCGTGGAGTCG-3'; U6 正向引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.8 Western blotting 检测 cleaved Caspase-3 蛋白表达量

收集各组 A549 细胞后加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,利用 BCA 试剂盒对蛋白进行定量,取适量蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),分离蛋白凝胶转移至 PVDF 膜,室温封闭 2 h 后用 TBST 洗涤,分别加入 cleaved Caspase-3 (1:1000)、糖酵解酶 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glycolytic enzyme 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase, GAPDH)(1:2000)抗体稀释液后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入二抗(1:3000)稀释液室温孵育 1 h,滴加 ECL 显影后用 Image J 软件分析各条带灰度值。

1.9 统计学分析

采用 SPSS21.0 统计学软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示且均符合正态分布,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 连翘提取物对肺炎链球菌感染 A549 细胞的细胞活性和凋亡及 cleaved Caspase-3 蛋白水平的影响

与对照组比较,模型组细胞活力降低($P < 0.05$),细胞凋亡率和 cleaved Caspase-3 蛋白水平升高($P < 0.05$);与模型组比较,连翘提取物各剂量组细胞活力升高($P < 0.05$),凋亡率和 cleaved Caspase-3 蛋白水平降低($P < 0.05$),且不同剂量组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),头孢羟氨苄组与连翘提取物 12 $\mu\text{g/mL}$ 组各指标比较差异无统计学意义,见图 1 和表 1。

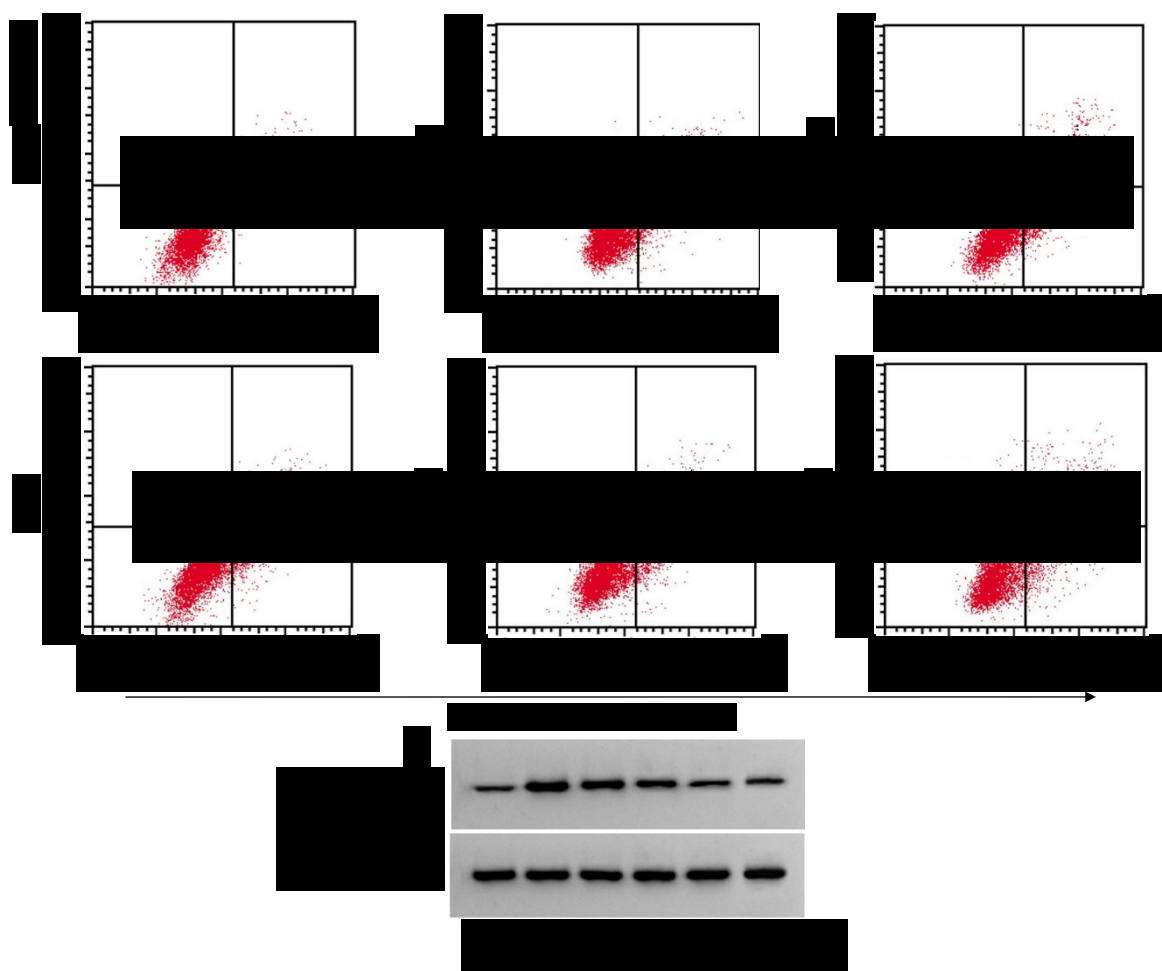


图 1 连翘提取物对 A549 细胞凋亡和 cleaved Caspase-3 蛋白水平的影响

Fig. 1 Effects of *Forsythiae Fructus* extract on apoptosis and cleaved Caspase-3 protein levels of A549 cells

表 1 连翘提取物对 A549 细胞活性和凋亡及 cleaved Caspase-3 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 1 Effects of *Forsythiae Fructus* extract on cell activity, apoptosis and cleaved Caspase-3 protein levels of A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A 值	凋亡率/%	cleaved Caspase-3 表达量
对照	—	1.07 ± 0.05	8.09 ± 0.30	0.16 ± 0.01
模型	—	0.37 ± 0.02^a	24.01 ± 0.92^a	0.65 ± 0.04^a
连翘提取物	3	0.50 ± 0.03^b	20.91 ± 0.61^b	0.50 ± 0.04^b
	6	0.67 ± 0.03^{bc}	17.51 ± 0.44^{bc}	0.34 ± 0.03^{bc}
	12	0.96 ± 0.05^{bcd}	11.48 ± 0.34^{bcd}	0.23 ± 0.01^{bcd}
头孢羟氨苄	12	0.99 ± 0.06^{bcd}	11.12 ± 0.31^{bcd}	0.21 ± 0.01^{bcd}

与对照组比较: $^aP<0.05$; 与模型组比较: $^bP<0.05$; 与连翘提取物 $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^cP<0.05$; 与连翘提取物 $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^dP<0.05$, 表 2、3 同

$^aP<0.05$ vs control group; $^bP<0.05$ vs model group; $^cP<0.05$ vs $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *Forsythiae Fructus* extract group; $^dP<0.05$ vs $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *Forsythiae Fructus* extract group, same as tables 2 and 3

2.2 连翘提取物对肺炎链球菌感染的 A549 细胞中炎症因子的影响

与对照组比较, 模型组 IL-6、INF- γ 、TNF- α 的

水平升高 ($P<0.05$), IL-10 的水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 连翘提取物各剂量组 IL-6、INF- γ 、TNF- α 的水平降低 ($P<0.05$), IL-10 的水平升高

($P<0.05$), 且不同剂量组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 头孢羟氨苄组与连翘提取物 12 $\mu\text{g/mL}$ 组各指标比较差异无统计学意义, 见表 2。

2.3 连翘提取物对肺炎链球菌感染的 A549 细胞中 *miR-223-3p* 表达的影响

与对照组比较, 模型组细胞 *miR-223-3p* 的

表达量明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 连翘提取物各剂量组 *miR-223-3p* 的表达量明显降低 ($P<0.05$), 且不同剂量组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 头孢羟氨苄组与连翘提取物 12 $\mu\text{g/mL}$ 组各指标比较差异无统计学意义, 见表 3。

表 2 连翘提取物对 A549 细胞 IL-6、INF- γ 、TNF- α 、IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 2 Effects of *Forsythiae Fructus* extract on levels of IL-6, INF- γ , TNF- α and IL-10 in A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	INF- γ /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-10/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	113.89 $\pm$ 6.64	68.72 $\pm$ 6.99	129.49 $\pm$ 13.02	343.16 $\pm$ 22.84
模型	—	562.66 $\pm$ 21.62 ^a	420.46 $\pm$ 57.60 ^a	493.74 $\pm$ 23.40 ^a	48.72 $\pm$ 4.30 ^a
连翘提取物	3	426.46 $\pm$ 19.26 ^b	312.75 $\pm$ 29.22 ^b	400.81 $\pm$ 16.98 ^b	83.69 $\pm$ 7.78 ^b
	6	265.74 $\pm$ 14.48 ^{bc}	204.12 $\pm$ 13.12 ^{bc}	291.21 $\pm$ 20.69 ^{bc}	170.96 $\pm$ 12.51 ^{bc}
	12	142.78 $\pm$ 11.61 ^{bcd}	116.23 $\pm$ 8.02 ^{bcd}	157.12 $\pm$ 14.22 ^{bcd}	271.94 $\pm$ 19.36 ^{bcd}
头孢羟氨苄	12	131.58 $\pm$ 11.98 ^{bcd}	98.52 $\pm$ 7.35 ^{bcd}	142.68 $\pm$ 12.46 ^{bcd}	281.42 $\pm$ 16.85 ^{bcd}

2.4 抑制 *miR-223-3p* 表达对肺炎链球菌感染的 A549 细胞的细胞活性、凋亡及 cleaved Caspase-3 蛋白和炎症因子水平的影响

与模型组、anti-*miR*-NC 组比较, anti-*miR*-223-3p 组细胞活力升高 ($P<0.05$), 细胞凋亡率和表 3 连翘提取物对 A549 细胞中 *miR-223-3p* 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 3 Effects of *Forsythiae Fructus* extract on *miR-223-3p* expression in A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	<i>miR-223-3p</i> 相对表达量
对照	—	1.00 $\pm$ 0.00
模型	—	4.21 $\pm$ 0.12 ^a
连翘提取物	3	3.50 $\pm$ 0.09 ^b
	6	2.91 $\pm$ 0.12 ^{bc}
	12	1.67 $\pm$ 0.07 ^{bcd}
头孢羟氨苄	12	1.61 $\pm$ 0.06 ^{bcd}

cleaved Caspase-3 蛋白水平明显降低 ($P<0.05$), IL-6、INF- γ 、TNF- α 水平明显降低 ($P<0.05$), IL-10 的水平明显升高 ($P<0.05$), 见图 2 和表 4。

2.5 过表达 *miR-223-3p* 对连翘提取物作用于肺炎链球菌感染 A549 细胞的细胞活性和凋亡及 cleaved Caspase-3 蛋白水平的影响

与模型组比较, *miR-223-3p* 组细胞活力明显降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡率和 cleaved Caspase-3 蛋白水平明显升高 ($P<0.05$); 与连翘提取物 12 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, 连翘提取物 + *miR-223-3p* 组细胞活力明显降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡率和 cleaved Caspase-3 蛋白水平明显升高 ($P<0.05$), 见图 3 和表 5。

2.6 过表达 *miR-223-3p* 对连翘提取物作用于肺炎链球菌感染的 A549 细胞中炎症因子的影响

与模型组比较, *miR-223-3p* 组细胞 IL-6、INF- γ 、

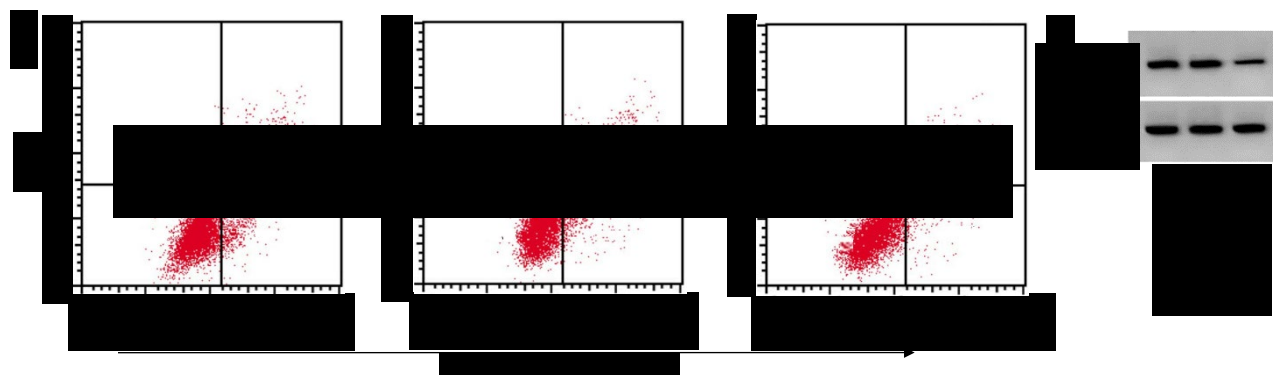


图 2 抑制 *miR-223-3p* 表达对 A549 细胞凋亡及 cleaved Caspase-3 蛋白表达量的影响

Fig. 2 Effects of inhibition of *miR-223-3p* expression on apoptosis and cleaved Caspase-3 protein expression of A549 cell

表 4 抑制 *miR-223-3p* 表达对 A549 细胞活性、凋亡及 cleaved Caspase-3 蛋白表达量和 IL-6、INF- γ 、TNF- α 、IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 4 Effects of inhibition of *miR-223-3p* expression on activity, apoptosis, cleaved Caspase-3 protein expression and IL-6, INF- γ , TNF- α , IL-10 levels of A549 cell ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	<i>miR-223-3p</i> 相对表达量	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	INF- γ /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	A 值	凋亡率/%	cleaved Caspase-3 表达量
模型	1.00 $\pm$ 0.00	565.27 $\pm$ 23.33	419.18 $\pm$ 60.52	495.72 $\pm$ 29.83	49.06 $\pm$ 4.34	0.38 $\pm$ 0.02	23.91 $\pm$ 1.06	0.66 $\pm$ 0.04
anti- <i>miR</i> -NC	0.99 $\pm$ 0.03	566.26 $\pm$ 26.81	418.08 $\pm$ 60.74	494.41 $\pm$ 30.56	49.23 $\pm$ 4.50	0.37 $\pm$ 0.03	24.01 $\pm$ 1.12	0.65 $\pm$ 0.04
anti- <i>miR</i> -223-3p	0.22 $\pm$ 0.01 ^{ab}	118.45 $\pm$ 8.04 ^{ab}	79.17 $\pm$ 9.16 ^{ab}	136.33 $\pm$ 10.05 ^{ab}	312.87 $\pm$ 18.05 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.04 ^{ab}	9.26 $\pm$ 0.25 ^{ab}	0.17 $\pm$ 0.01 ^{ab}

与模型组比较: ^a $P<0.05$; 与 anti-*miR*-NC 组比较: ^b $P<0.05$

^a $P<0.05$ vs model group; ^b $P<0.05$ vs anti-*miR*-NC group

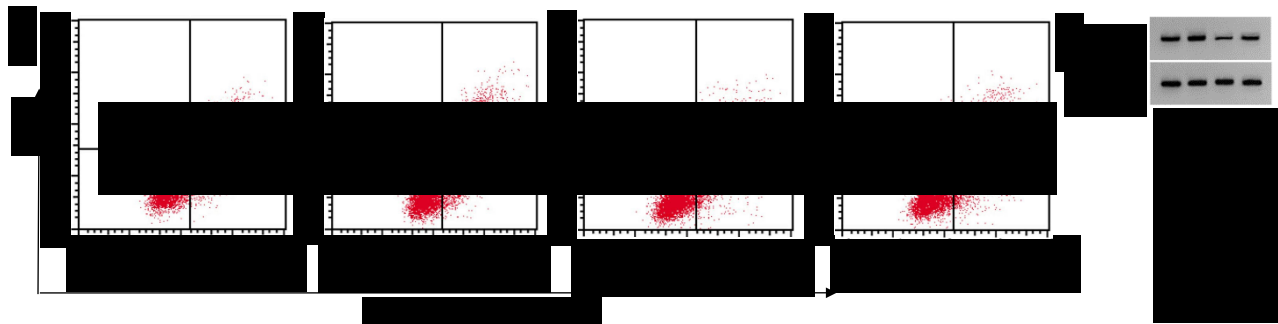


图 3 过表达 *miR-223-3p* 逆转连翘提取物对 A549 细胞凋亡及 cleaved Caspase-3 蛋白水平的作用

Fig. 3 Reversed effects of over expression of *miR-223-3p* for *Forsythiae Fructus* extract on apoptosis and cleaved Caspase-3 protein levels of A549 cells

表 5 过表达 *miR-223-3p* 逆转连翘提取物对 A549 细胞活性、凋亡及 cleaved Caspase-3 蛋白水平的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 5 Reversed effects of over expression of *miR-223-3p* for *Forsythiae Fructus* extract on activity, apoptosis and cleaved Caspase-3 protein levels of A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	剂量	<i>miR-223-3p</i> 相对表达量	A 值	凋亡率/%	cleaved Caspase-3 表达量
模型	—	1.00 $\pm$ 0.00	0.38 $\pm$ 0.03	24.09 $\pm$ 0.90	0.66 $\pm$ 0.05
<i>miR</i> -223-3p	0.5 μ mol·mL ⁻¹	3.51 $\pm$ 0.14 ^a	0.25 $\pm$ 0.01 ^a	32.23 $\pm$ 1.22 ^a	0.89 $\pm$ 0.08 ^a
连翘提取物	12 μ g·mL ⁻¹	0.44 $\pm$ 0.04 ^a	0.94 $\pm$ 0.08 ^a	11.53 $\pm$ 0.41 ^a	0.23 $\pm$ 0.02 ^a
连翘提取物+ <i>miR</i> -223-3p	12 μ g·mL ⁻¹ +0.5 μ mol·mL ⁻¹	0.87 $\pm$ 0.06 ^b	0.49 $\pm$ 0.04 ^b	21.98 $\pm$ 0.74 ^b	0.54 $\pm$ 0.04 ^b

与模型组比较: ^a $P<0.05$; 与连翘提取物 12 μ g·mL⁻¹ 组比较: ^b $P<0.05$, 表 6 同

^a $P<0.05$ vs model group; ^b $P<0.05$ vs 12 μ g·mL⁻¹ *Forsythiae Fructus* extract group, same as table 6

TNF- α 的水平升高 ($P<0.05$), IL-10 的水平降低 ($P<0.05$); 与连翘提取物 12 μ g/mL 组比较, 连翘提取物+*miR*-223-3p 组 IL-6、INF- γ 、TNF- α 的水平升高 ($P<0.05$), IL-10 的水平降低 ($P<0.05$), 见表 6。

3 讨论

肺炎链球菌肺炎患者对抗生素产生耐药性可降低治疗效果, 目前肺炎链球菌致病机制尚未完全阐明, 因而其致病机制及研发新型药物成为研究重点, *miRNA* 在肺泡上皮细胞损伤中表达异常, 并可通过

调控细胞增殖及凋亡等生物学行为而参与肺炎发生发展过程^[9-11]。但 *miRNA* 是否可作为中药治疗肺炎链球菌肺炎的潜在靶点尚需进一步探究。

连翘提取物具有抗流感病毒作用, 并可用于治疗流感病毒肺炎^[12]。连翘提取物主要抗炎活性成分为连翘酯苷 A, 并可抑制上呼吸道上皮细胞炎症反应^[13]。本研究结果显示, 肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞活力降低, 而连翘提取物能够以剂量相关的方式增强细胞活力, 提示连翘提取物可促进肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞增殖。Caspase-3 是细胞凋

表 6 过表达 *miR-223-3p* 逆转连翘提取物对 A549 细胞中 IL-6、INF- γ 、TNF- α 、IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)
Table 6 Reversed effects of over expression of *miR-223-3p* for *Forsythiae Fructus* extract on levels of IL-6, INF- γ , TNF- α and IL-10 in A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	剂量	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	INF- γ /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)
模型	—	567.61 $\pm$ 22.19	423.65 $\pm$ 27.36	495.08 $\pm$ 34.66	48.15 $\pm$ 4.45
<i>miR-223-3p</i>	0.5 μ mol·mL ⁻¹	847.28 $\pm$ 38.22 ^a	704.39 $\pm$ 25.71 ^a	777.04 $\pm$ 45.92 ^a	14.31 $\pm$ 0.92 ^a
连翘提取物	12 μ g·mL ⁻¹	142.98 $\pm$ 11.97 ^a	118.57 $\pm$ 12.97 ^a	158.47 $\pm$ 14.71 ^a	275.62 $\pm$ 22.49 ^a
连翘提取物+ <i>miR-223-3p</i>	12 μ g·mL ⁻¹ +0.5 μ mol·mL ⁻¹	496.58 $\pm$ 16.02 ^b	339.62 $\pm$ 15.12 ^b	415.20 $\pm$ 24.40 ^b	60.87 $\pm$ 7.61 ^b

亡执行因子,其被激活后可形成 cleaved Caspase-3,进而促进细胞凋亡^[14]。本研究结果显示,肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞凋亡率和 cleaved Caspase-3 蛋白水平升高,而连翘提取物可降低细胞凋亡率和 cleaved Caspase-3 蛋白水平,且呈剂量相关性,提示连翘提取物可抑制肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞凋亡。IL-6、INF- γ 、TNF- α 属于促炎因子,其可调控多种细胞的生理功能,当机体感染肺炎链球菌时巨噬细胞活化,并可产生 IL-6、INF- γ 、TNF- α 等促炎因子,还可通过激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号通路而加重肺泡上皮细胞炎症损伤,而 IL-10 属于抗炎因子,随着肺炎链球菌感染时间的延长 IL-10 的水平降低^[15-16]。与上述报道结果相似,本研究结果显示,肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞中 IL-6、INF- γ 、TNF- α 的水平升高,IL-10 的水平降低,提示成功建立细胞肺炎链球菌肺炎模型。进一步研究发现随着连翘提取物剂量的升高,肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞中 IL-6、INF- γ 、TNF- α 的水平降低,IL-10 的水平升高,提示连翘提取物可抑制肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞炎症反应。

连翘提取物减轻肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞损伤的分子机制尚未阐明。本研究结果显示,肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞中 *miR-223-3p* 的表达量升高,而连翘提取物能够以剂量相关的方式降低 *miR-223-3p* 的表达量,提示连翘提取物可能通过下调 *miR-223-3p* 的表达而抑制肺炎链球菌肺炎的发生。抑制 *miR-223-3p* 表达可通过靶向 Kruppel 样因子 15 (Kruppel-like factor 15, KLF15) 抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡及氧化应激从而减轻细胞损伤^[17]。此外,研究报道指出 *miR-223-3p* 通过调节核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptor 3, NLRP3) 表达而减轻高脂肪诱导的内皮细胞损伤^[18]。本研究结

果显示,抑制 *miR-223-3p* 表达后肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞活力升高,凋亡率降低,IL-6、INF- γ 、TNF- α 的水平降低,IL-10 的水平升高,而上调 *miR-223-3p* 表达后肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞活力降低,凋亡率升高,IL-6、INF- γ 、TNF- α 的水平升高,IL-10 的水平降低,提示 *miR-223-3p* 可通过调控肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞增殖、凋亡及炎症反应从而促进肺炎链球菌肺炎的发生。同时本研究发现, *miR-223-3p* 过表达能够逆转连翘提取物对肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞增殖、凋亡及炎症反应的作用,提示连翘提取物可通过调控 *miR-223-3p* 表达而减轻肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞损伤。

综上所述,连翘提取物可促进肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞增殖,抑制肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞凋亡及炎症反应,其作用机制与抑制 *miR-223-3p* 的表达有关,连翘提取物可能作为治疗肺炎链球菌肺炎的药物,并为肺炎链球菌肺炎的治疗提供理论依据。但连翘提取物具有多途径、多靶点等特点,其是否可通过调控其他基因或信号通路而抑制肺炎链球菌肺炎的发生发展尚需进一步探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李莲梅,余博文,毕建朋,等. TLR4 对肺炎链球菌诱导的 A549 细胞凋亡的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2019, 54(1): 73-77.
- [2] Mitsuwan W, Wintachai P, Voravuthikunchai S P. *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract and rhodomyrtone combat *Streptococcus pneumoniae* biofilm and inhibit invasiveness to human lung epithelial and enhance pneumococcal phagocytosis by macrophage [J]. *Curr Microbiol*, 2020, 77(11): 3546-3554.
- [3] 鲍燕敏,郑跃杰. 儿童肺炎链球菌疾病及其流行病学研究进展 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(7): 510-513.

- [4] 余璐, 李海燕, 温顺航, 等. 姜黄素对肺炎链球菌感染的抗炎和抑菌作用 [J]. 医学研究杂志, 2018, 47(2): 87-91.
- [5] 穆廷杰, 杨芬兰, 金海红, 等. 连翘等中草药对肺炎克雷伯菌抑菌作用的实验研究及临床应用 [J]. 西部中医药, 2015, 28(9): 19-21.
- [6] Zhang W P, Jia J C, Liu Z, *et al.* Circulating microRNAs as biomarkers for Sepsis secondary to pneumonia diagnosed via Sepsis 3.0 [J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1): 93.
- [7] 戴彩同, 张少锋, 黄玉洁. miR-23b-3p 靶向 PALM3 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]. 中国实验诊断学, 2020, 24(6): 996-1002.
- [8] 尹洪萍, 袁红, 华春珍, 等. 10 种中药对耐药性肺炎链球菌的抑菌作用 [J]. 医药导报, 2003, 22(7): 483-484.
- [9] Wang Y, Li Y, Zhang P, *et al.* Regenerative therapy based on miRNA-302 mimics for enhancing host recovery from pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(17): 8493-8498.
- [10] Li J, Zhou Q L, Liang Y J, *et al.* miR-486 inhibits PM_{2.5}-induced apoptosis and oxidative stress in human lung alveolar epithelial A549 cells [J]. *Ann Transl Med*, 2018, 6(11): 209.
- [11] Cheng D, Zhu C, Liang Y, *et al.* MiR-424 overexpression protects alveolar epithelial cells from LPS-induced apoptosis and inflammation by targeting FGF2 via the NF- κ B pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 242: 117213.
- [12] 潘翌翌, 王雪峰. 连翘体外、体内抗甲型流感病毒的实验研究 [J]. 西部中医药, 2016, 29(12): 5-8.
- [13] 刘建洲, 张立伟. 基于人呼吸道上皮细胞炎症模型的连翘提取物抗炎活性实验研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(7): 1248-1253.
- [14] You J, Zhou O, Liu J, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles alleviate lung injury in rat model of bronchopulmonary dysplasia by affecting cell survival and angiogenesis [J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29(23): 1520-1532.
- [15] 黄朋伟, 庞天宝, 陈嘉捷, 等. $\alpha 7$ 烟碱样乙酰胆碱受体在重症肌无力患者外周血单个核细胞中的表达及对 T 细胞活化的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2020, 55(4): 463-467.
- [16] 常大芸, 刘学工, 李宁华, 等. TIMP1 基因对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞 HEPAPiC 凋亡的影响及机制研究 [J]. 临床肺科杂志, 2020, 25(1): 40-45.
- [17] Tang Q, Li M Y, Su Y F, *et al.* Absence of miR-223-3p ameliorates hypoxia-induced injury through repressing cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress by targeting KLF15 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 841: 67-74.
- [18] Deng B, Hu Y, Sheng X, *et al.* miR-223-3p reduces high glucose and high fat-induced endothelial cell injury in diabetic mice by regulating NLRP3 expression [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 1514-1520.

[责任编辑 潘明佳]