异丙酚通过上调 lncRNA-MM2P 的表达促进巨噬细胞 M2 极化改善脂多糖诱导的急性肺损伤Δ

马　琳*,张　雯,徐桂萍#(新疆维吾尔自治区人民医院麻醉科,乌鲁木齐　830001)

中图分类号　R971+.2　　文献标志码　A　　文章编号　1672-2124(2023)03-0275-07
DOI　10.14009/j.issn.1672-2124.2023.03.005

摘　要　目的:探讨异丙酚(PPF)对急性肺损伤(ALI)小鼠模型肺部浸润巨噬细胞极化的影响及其作用机制。方法:(1)在体实验选取 6~8 周龄雄性 BALB/C 小鼠 24 只,随机分为对照(Control)组、假手术(Sham)组、模型(Model)组和异丙酚治疗(PPF)组,每组 6 只。构建脂多糖(LPS)诱导的 ALI 小鼠模型。采用苏木精-伊红染色评估肺组织情况;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中促炎因子白细胞介素(IL)1β、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、IL-6 和抗炎因子 IL-10 的水平;采用免疫组织化学法检测肺组织巨噬细胞浸润情况;采用定量聚合酶链反应检测肺中长链非编码 RNA(lnc-RNA)-M2 型巨噬细胞极化感应器(lncRNA-MM2P)的表达情况。(2)体外实验取鼠巨噬细胞系 ANA-1 细胞,分为 Control 组、LPS 组、PPF 组、PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组和 PPF+siRNA NT 组。采用流式细胞术测定巨噬细胞极化情况,采用 ELISA 测定细胞培养上清液中的促炎因子水平。结果:(1)在体实验结果显示,与 Sham 组相比,Model 组小鼠肺间质增厚、水肿;BALF 中促炎因子显著上调,抗炎因子显著下调;肺组织中有大量巨噬细胞浸润,lncRNA-MM2P 表达下调,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与 Model 组相比,PPF 组小鼠上述情况显著逆转。(2)体外实验结果显示,与 Control 组相比,LPS 组巨噬细胞 M1/M2 比率显著升高,大量分泌促炎因子,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与 LPS 组相比,PPF 组巨噬细胞 M1/M2 比率显著降低,促炎因子分泌量显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与 PPF 组相比,PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组的 M1/M2 比率明显升高,促炎因子分泌量显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。结论:PPF 通过上调 lncRNA-MM2P 促进巨噬细胞 M2 极化,减轻脂多糖诱导的 ALI。

关键词　异丙酚; 巨噬细胞; 急性肺损伤; lncRNA-MM2P

Improvement of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Propofol Through Up-Regulating the Expression of lncRNA-MM2P to Promote the Polarization of Macrophage M2Δ

MA Lin, ZHANG Wen, XU Guiping (Dept. of Anesthesiology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To probe into the effects of propofol (PPF) on the polarization of infiltrating macrophages in lungs of mouse model of acute lung injury (ALI) and its mechanism. METHODS: (1) Totally 24 male BALB/C mice aged 6-8 weeks were chose for in vivo experiments and randomly divided into control group, sham-operation (Sham) group, model group and propofol treatment (PPF) group, with 6 mice in each group. Lipopolysaccharide (LPS)-induced ALI mice model were constructed. Hematoxylin-eosin staining was used to assess lung tissue; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of proinflammatory factors interleukin (IL) 1β, tumor necrosis factor α (TNF-α), IL-6 and anti-inflammatory factor IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF); Immunohistochemistry was used to detect macrophage infiltration in lung tissue; quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of lncRNA-MM2P in lung. (2) In vitro experiments were performed by taking macrophage cell line ANA-1 cells of mice and divided into Control group, LPS group, PPF group, PPF+lncRNA-MM2P siRNA group and PPF+siRNA NT group. Polarization of macrophage was determined by flow cytometry, proinflammatory factors in cell culture supernatant fluid were determined by ELISA. RESULTS: (1) In vivo experiments, compared with the Sham group, the Model group mice had thickened and edematous lung interstitial tissue; the proinflammatory factors were significantly up-regulated and anti-inflammatory factors were significantly down-regulated in BALF; there was a large number of macrophage infiltrated in lung tissue, and the lncRNA-MM2P expression was down-regulated, with statistically significant differences ($P<0.01$). Compared with the Model group, the mice in PPF group were significantly reversed in the above situation. (2) In vitro experiments, compared with the Control group, the M1/M2 ratio of macrophages was significantly higher in the LPS group, with a large amount of

Δ 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(No. 2021D01C175)
* 主治医师。研究方向:急危重症患者的临床和基础研究。E-mail:liu9780201@163.com
# 通信作者:主任医师,教授,博士生导师。研究方向:麻醉学。E-mail:xgpsyl@126.com

proinflammatory factors secreted, with statistically significant difference ($P<0.01$). Compared with the LPS group, the M1/M2 ratio of macrophages and the secretion of proinflammatory factors were significantly lower in the PPF group, with statistically significant differences ($P<0.01$). Compared with the PPF group, the M1/M2 ratio and the secretion of proinflammatory factors were significantly higher in the PPF + lncRNA-MM2P siRNA group, with statistically significant differences ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Propofol can promote macrophage M2 polarization through up-regulating lncRNA-MM2P , so as to relieve acute lung injury induced by lipopolysaccharide.
KEYWORDS Propofol; Macrophage; Acute lung injury; LncRNA-MM2P

急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是常见的危重疾病,发病率和病死率都很高。目前认为,ALI 的发病机制涉及氧化应激、凝血、炎症、先天性免疫反应和组织修复等[1]。ALI 可由肺部和肺部以外的多种因素诱导发生,如新型冠状病毒感染、输血、创伤性脑损伤、肠缺血/再灌注损伤或急性辐射等[1]。ALI 的病理特征是炎症细胞的过度积累、细胞因子不受控制的分泌以及包括上皮和内皮在内的肺泡-毛细血管膜的损伤[2]。目前,针对 ALI 的唯一疗法为支持性-保护性机械通气,但并未降低 ALI 的死亡率[3]。肺泡巨噬细胞作为一种高度异质性和可塑性的先天免疫细胞,在肺炎反应和组织修复中发挥着重要作用[4]。已有研究结果表明,调节巨噬细胞极化的化合物可以通过抗炎作用减少肺损伤[5]。长链非编码 RNA(lncRNA)被发现是参与调节多种生物学过程的重要调节因子之一。lncRNA-M2 型巨噬细胞极化感应器(MM2P)在调节巨噬细胞表型极化中发挥积极作用[6]。异丙酚(propofol,PPF)为高度脂溶性麻醉剂,被广泛用于接手术或重症监护患者的麻醉和镇静[7]。研究结果证实,PPF 可通过抗氧化、抗炎和下调促炎细胞因子表达等作用改善缺血/再灌注诱导的心脏、肾、肺和其他器官的损伤[8-10]。然而,PPF 在 ALI 中是否具有改善作用,尚未有研究证实。本研究拟通过在体实验和体外细胞实验评估 PPF 缓解 ALI 的疗效和对巨噬细胞极化方向的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

6~8 周龄雄性 BALB/C 小鼠(SPF 级实验鼠),共 24 只,平均体重(26±5) g,由新疆医科大学提供。小鼠巨噬细胞系 ANA-1 购自上海细胞库。

1.2 仪器

Synergy LX 型酶标仪(美国 BioTek 公司);ELIPSE Ni-E 型正置显微镜、ELIPSE Ti-2U 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 药品与试剂

PPF(批号:02362987)、脂多糖(LPS,货号:35167429)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;TRIzol 试剂(货号:237826)、Lipofectamine 3000 脂质体(货号:1779082)购自美国 Thermo Fisher 公司;白细胞介素(IL)1β(货号:E2105067)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)(货号:E2132416)、IL-6(货号:E3154267)和 IL-10(货号:E3214378)的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司;EasyPure RNA Kit(货号:R35152489)、EasyScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal)(货号:C14121679)及 TransStart Tip Green qPCR SuperMix (+Dye I)(货号:Q34128719)购自北京全式金生物技术有限公司;兔单抗 F4/80 抗体(货号:22341673)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG H&L 抗体(货号:33164287)、FITC-偶联抗小鼠 F4/80 抗体(货号:41231567)、PE/Cy5-偶联抗小鼠 CD11b 抗体(货号:23241572)、FITC-偶联抗小鼠 CD86 抗体(货号:35402328)、Alexa Fluor 647-偶联抗小鼠 CD206 抗体(货号:14322846)及兔单克隆抗 IgG 抗体(货号:02135224)购自美国 Abcam 公司;lncRNA-MM2P siRNA、siRNA NT 寡核苷酸及 lnc-RNA MM2P 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.4 分组与模型建立

小鼠适应性饲养 1 周后,将其随机分为 4 组(每组 6 只):对照(Control)组、假手术(Sham)组、模型(Model)组和 PPF 组。Model 组构建方法:参照文献[11]中的造模方法,对 Model 组小鼠腹腔内注射 LPS(30 mg/kg),作用 24 h 以诱导发生 ALI。Control 组小鼠不进行任何处理。Sham 组小鼠腹腔内注射与 LPS 等体积的 0.9%氯化钠溶液。PPF 组小鼠在腹腔内注射 LPS 后 2 h 进行 PPF 治疗,PPF 剂量为 60 mg/kg,尾静脉注射[12]。取小鼠新鲜双肺肺组织,一侧肺组织进行支气管肺泡灌洗液(BALF)的采集。所有小鼠在 LPS 注射后 24 h 通过颈椎脱臼法处死。取小鼠新鲜肺组织进行病理学分析,检查诱导效果。对侧肺组织用剪刀纵向对半剪开,取一半组织立即浸入 4%福尔马林固定液中 4 ℃固定 48 h;另一半肺组织立即没入液氮冷冻后,置于-80 ℃冰箱冻存。本实验中的所有动物实验方案均符合中国国家动物福利法的规定,并通过我院伦理委员会的批准。

1.5 小鼠 BALF 的采集

颈椎脱臼法处死小鼠后,暴露小鼠气管和胸腔,钝性分离气管和食管。使用眼科镊支撑于气管下方,使气管整体处于撑开状态。在距离环状软骨远端 2~3 个软骨环之间的结缔组织膜处剪开 1 个长度约 2 mm 的切口。然后提起气管壁,水平将塑料硬管插入气管至充分到达左右支气管交叉处。使用注射器注射入磷酸盐缓冲液 0.5 mL 进行灌洗,停留 30 s 后慢慢抽取灌洗液,可见乳白色泡沫状液体,当感觉活塞有阻力抽不动时停止,并将灌洗液转移至 EP 管内,一共重复 3 次。收集的灌洗液于 4 ℃以 1 200 r/min(离心半径 8 cm)离心 15 min,上清液储存于-80 ℃冰箱中备用。

1.6 ELISA 检测

BALF 或细胞培养上清液于 4 ℃以 1 200 r/min(离心半径 8 cm)离心 15 min 后,使用 ELISA 检测试剂盒,按照试剂盒说明书的操作进行 ELISA 检测。最后使用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度值。

1.7 病理学染色分析

取小鼠新鲜肺组织,浸入 4%甲醛固定液中于 4 ℃固定

48 h。然后将组织修剪平整,放入脱水机中依次进行梯度乙醇脱水和二甲苯处理。再经过石蜡包埋和切片(切片厚 4 μm)制备成石蜡组织切片。然后进行苏木精-伊红(HE)染色或免疫组织化学染色(IHC 染色)。(1)HE 染色:石蜡切片经苏木精染色液染色,室温(25 ℃)1 min;1%盐酸乙醇分化 5 s;1%氨水溶液返蓝 1 min;伊红染色液染色 10 s。随后进行梯度乙醇脱水,二甲苯透明化 5 min;中性树胶封片;Nikon 正置显微镜下镜检并进行病理学分析。(2)IHC 染色:石蜡切片经二甲苯脱蜡;梯度乙醇水化;抗原修复;滴加 3%过氧化氢,室温避光封闭 30 min;5% 牛血清白蛋白(BSA)抗原封闭液,室温封闭 1 h;滴加一抗兔单抗 F4/80 抗体工作液,4 ℃孵育过夜;滴加 HRP 标记的二抗工作液,室温孵育 1 h;滴加生物素底物,室温反应 30 min;滴加配制好的 1×DAB 显色液,避光显色 5~10 min,显微镜下观察显色情况并及时用自来水终止显色。苏木精复染,即将润洗过的切片没入苏木精染色液中 20 s,中性树胶封片,Nikon 正置显微镜下镜检。

1.8 定量聚合酶链反应(qPCR)

从-80 ℃冰箱中取出冻存的肺组织,在液氮中使用 TRIzol 裂解液制备组织匀浆。使用 EasyPure RNA Kit 纯化总 RNA。使用 EasyScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal)反转录合成 cDNA。使用 TransStart Tip Green qPCR SuperMix (+Dye I)进行 qPCR 反应。lncRNA MM2P 引物(5′-3′)正向:TAGCTCCCACGAAGACTGGAAT;反向:CTATGCTCGTGATTTATAAAACGCAAGTC。GAPDH 引物(5′-3′)正向:TTCTTTTGCGTCGCCAGGTG;反向:GGAGGGAGAGAACAGTGAGC。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量,计算公式为 $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{实验组}-\Delta Ct_{参照组}$,$\Delta Ct=Ct_{基因}-Ct_{内参}$。

1.9 细胞培养和细胞转染

(1)细胞培养:鼠巨噬细胞系 ANA-1 细胞维持培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,并添加 200 U/mL 青链霉素。细胞培养于充入 5% CO_2 的 37 ℃湿润培养箱。(2)细胞实验分组:①Control 组,不进行任何处理;②LPS 组,向细胞培养液中加入终浓度为 0.5 μg/mL 的 LPS 处理细胞 24 h;③PPF 组,提前 24 h 向细胞培养液中加入 50 μmol/L 的 PPF,处理 24 h 后,加入 LPS(0.5 μg/mL)处理 24 h;④PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组,提前 24 h 向细胞培养液中加入 50 μmol/L 的 PPF,并转染 lncRNA-MM2P siRNA,处理 24 h 后,再加入 LPS(0.5 μg/mL)处理 24 h;⑤PPF+siRNA NT 组,提前 24 h 向细胞培养液中加入 50 μmol/L 的 PPF,并转染 siRNA NT,处理 24 h 后,再加入 LPS(0.5 μg/mL)处理 24 h。(3)细胞转染:提前 12 h 种 ANA-1 细胞于 6 孔板中,使贴壁后的细胞汇合度达到约 30%。开始转染前更换细胞培养液为无血清无抗菌药物的 RPMI 1640 培养液。使用 Lipofectamine 3000 脂质体进行转染。转染后继续培养 48 h,在倒置荧光显微镜下镜检观察转染效率。收获转染好的细胞进行下游指标的检测。lncRNA-MM2P siRNA(5′-3′):CACGAAGACUGG AAUGCAATT;siRNA NT(5′-3′):AUCCGCGCGAUAGUACGUATT。

1.10 流式细胞术(FCM)

制备单细胞悬液,向单细胞悬液中加入 3% BSA 室温封闭 45 min。按照抗体制造商的说明书,单细胞悬液分别与兔单克隆抗 IgG 抗体(Isotype Control)(1∶200)、FITC-偶联抗小鼠 F4/80 抗体(1∶200)、PE/Cy5-偶联抗小鼠 CD11b 抗体(1∶200)、FITC-偶联抗小鼠 CD86 抗体(1∶200)或 Alexa Fluor 647-偶联抗小鼠 CD206 抗体(1∶200)进行孵育。使用流式细胞仪,每个样品至少上机 1×10^6 个细胞进行分析。

1.11 统计学方法

使用 GraphPad Prism v7.0 软件进行数据的统计学分析,计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,三组及多组间比较,采用单向方差分析以及事后 Turkey's 检验进行分析,$P<0.05$ 为组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PPF 对 LPS 诱导的 ALI 的影响

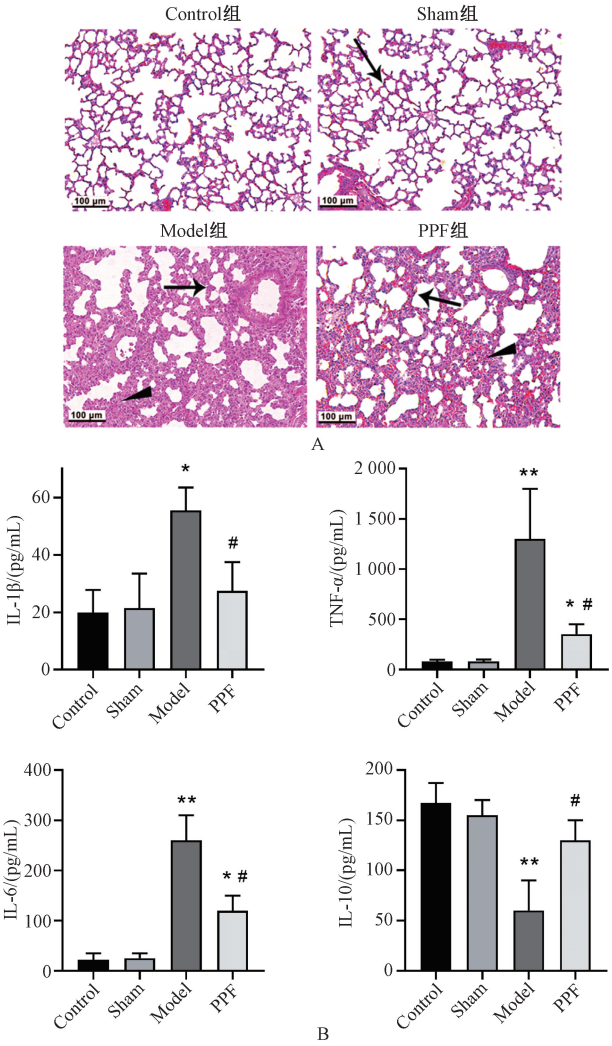
对小鼠肺组织进行 HE 染色,Sham 组与 Control 组相比差异不显著;与 Sham 组相比,Model 组小鼠肺组织能够观察到肺间质增厚和水肿;PPF 治疗后,肺泡结构有所恢复,肺间质增厚减弱,水肿减轻,见图 1(A)。与 Sham 组相比,Model 组 BALF 中促炎因子 IL-1β($P<0.05$)、TNF-α 和 IL-6($P<0.01$)的表达量均显著升高,而抗炎因子 IL-10 的表达量明显降低($P<0.01$),差异均有统计学意义;PPF 组 TNF-α 和 IL-6 的表达量升高,差异有统计学意义($P<0.05$),IL-1β 的表达量的差异无统计学意义($P>0.05$)。与 Model 组相比,PPF 组 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的表达量均明显降低($P<0.05$),而 IL-10 的表达量升高($P<0.05$),差异均有统计学意义,见图 1(B);Control 组与 Sham 组 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的表达量相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 PPF 对 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织中巨噬细胞和 lncRNA-MM2P 表达的影响

ALI 小鼠肺组织 IHC 检测巨噬细胞表面标志物结果显示,Control 组和 Sham 组小鼠肺组织 F4/80 无明显阳性着色;Model 组小鼠肺组织中 F4/80 阳性着色显著升高;PPF 组小鼠肺组织中仅有少量 F4/80 阳性着色,见图 2(A)。对小鼠肺组织中 lncRNA-MM2P 表达量的 qPCR 检测结果显示,Control 组与 Sham 组 lncRNA-MM2P 表达量的差异无统计学意义($P>0.05$);与 Sham 组相比,Model 组 lncRNA-MM2P 表达量显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);PPF 组与 Sham 组 lncRNA-MM2P 表达量的差异无统计学意义($P>0.05$);与 Model 组相比,PPF 组治疗后 lncRNA-MM2P 表达量回升,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2(B)。

2.3 PPF 对巨噬细胞 M2-极化的影响

FCM 检测 ANA-1 细胞的巨噬细胞表面标志物结果显示,各分组细胞的 CD11b 和 F4/80 均为阳性,表明其属于巨噬细胞谱系,见图 3(A)。与 Control 组相比,LPS 组和 PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组 $CD86^+/CD206^-$(M1)升高,而 $CD86^+/CD206^+$(M2)降低,M1/M2 比率显著升高($P<0.01$),差异均有统计学意义,见图 3(B);PPF 组、PPF+siRNA NT 组与 Control 组 M1/M2 比率相比,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3(C)。与 LPS 组相比,PPF 组、PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组及 PPF+siRNA NT 组的 M1/M2 比率显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 3(C)。与 PPF 组相比,PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组的 M1/M2 比率明显升高,差异有统计学意义

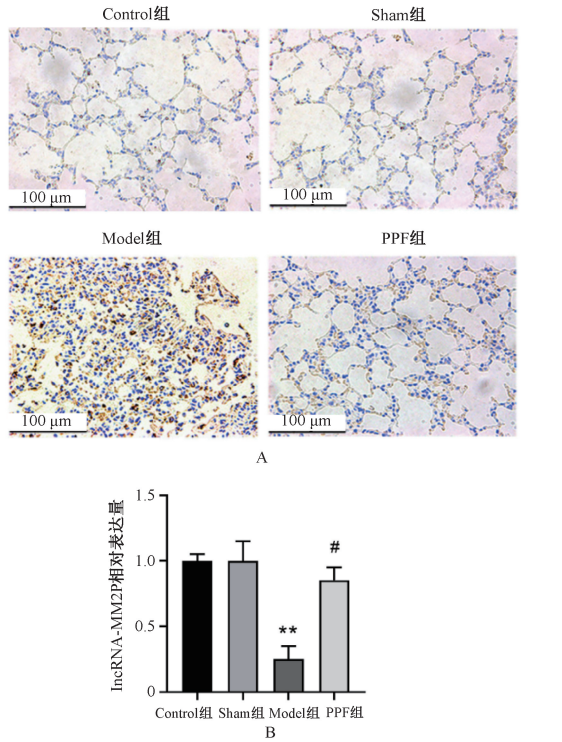


A. 四组小鼠肺组织 HE 染色结果；B. 四组小鼠 BALF 中炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 和 IL-10 的分泌情况；与 Sham 组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 Model 组相比，$^{\#}P<0.05$

A. results of HE staining of lung tissue in four groups of mice; B. secretion of inflammatory factors IL-1β, TNF-α, IL-6 and IL-10 in BALF in four groups of mice; *vs.* Sham group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; *vs.* Model group, $^{\#}P<0.05$

图 1　PPF 治疗前后 LPS 诱导的 ALI 小鼠炎症因子的分泌与肺组织 HE 染色结果

Fig 1　Secretion of inflammatory factors and HE staining results of lung tissues in LPS-induced ALI mice before and after the treatment of PPF



A. IHC 检测四组小鼠肺组织巨噬细胞表面标志物的表达结果；B. 四组小鼠肺组织 lncRNA-MM2P 表达量的 qPCR 检测结果；与 Sham 组相比，$^{**}P<0.01$；与 Model 组相比，$^{\#}P<0.05$

A. IHC detection of macrophage surface marker expression in lung tissue in four groups of mice; B. qPCR detection of lncRNA-MM2P expression in lung tissue in four groups of mice; *vs.* Sham group, $^{**}P<0.01$; *vs.* Model group, $^{\#}P<0.05$

图 2　PPF 治疗前后 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织巨噬细胞浸润和 lncRNA-MM2P 的表达情况测定

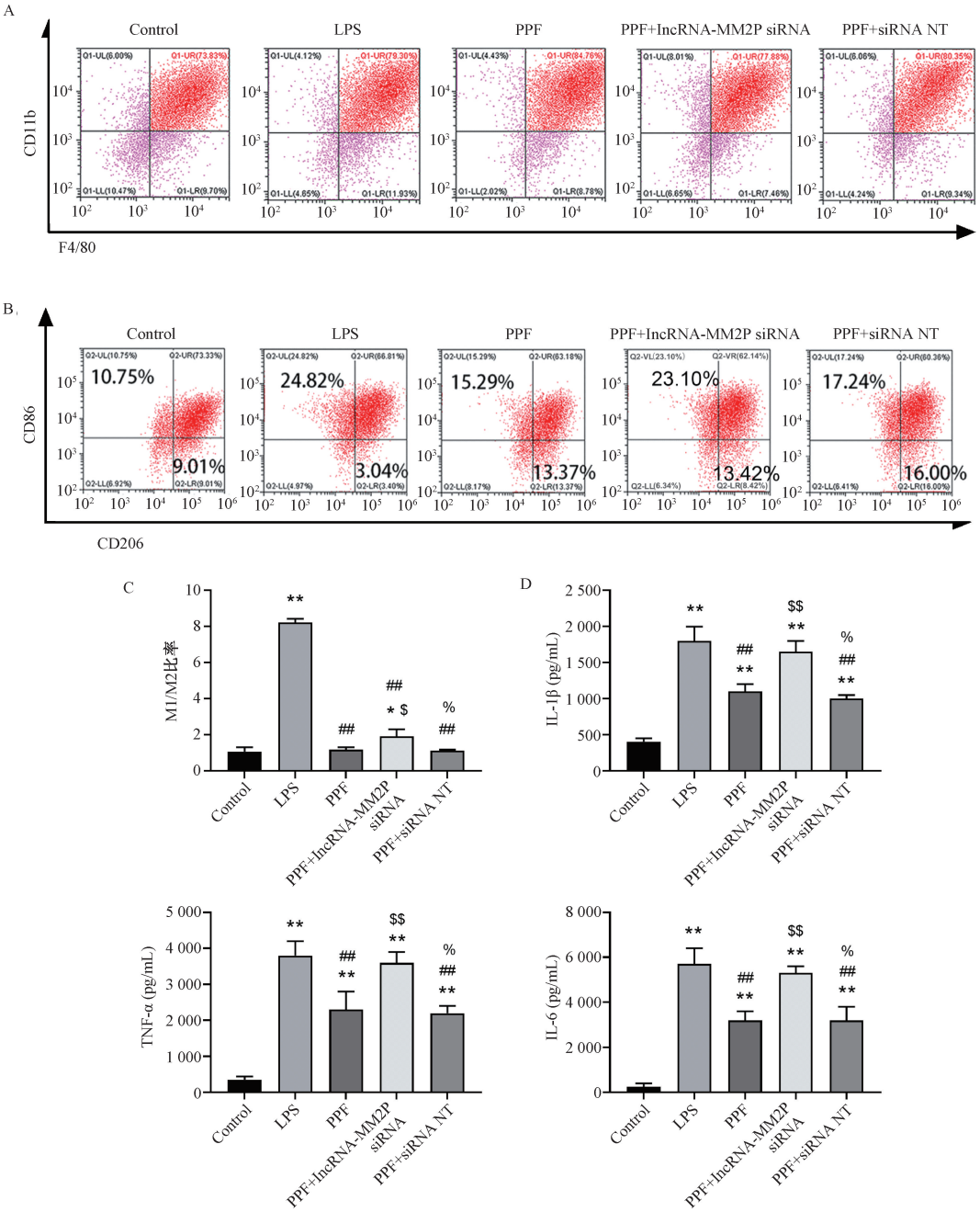
Fig 2　Determination of macrophage infiltration and lncRNA-MM2P expression of lung tissue in LPS-induced ALI mice before and after the treatment of PPF

（$P<0.05$），PPF+siRNA NT 组与 PPF 组 M1/M2 比率的差异无统计学意义（$P>0.05$）。与 PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组相比，PPF+siRNA NT 组的 M1/M2 比率明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 3（B—C）。

各分组巨噬细胞培养上清液中促炎因子 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 水平检测结果显示，与 Control 组相比，LPS 组、PPF 组、PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组和 PPF+siRNA NT 组上述指标水平显著升高（$P<0.01$），差异有统计学意义；与 LPS 组相比，PPF 组和 PPF+siRNA NT 组上述指标水平显著降低（$P<0.01$），差异有统计学意义；PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组与 LPS 组上述指标水平的差异无统计学意义（$P>0.05$）；与 PPF 组相比，PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组上述指标水平显著升高，差异有统计学意义（$P<0.01$），PPF+siRNA NT 组与 PPF 组上述指标水平的差异无统计学意义（$P>0.05$）；与 PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组相比，PPF+siRNA NT 组上述指标水平明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 3（D）。

3　讨论

PPF 作为镇静催眠药，具有类视黄醇的结构。PPF 的药动学特点为起效快、停药后恢复快，被广泛应用于临床[13-14]。近年来的研究结果显示，PPF 具有清除氧自由基、抑制中性粒细胞趋化性、对抗 Ca^{2+} 超载、抗脂质过氧化作用和抗细胞凋亡等活性，能够保护组织器官免受缺血/再灌注损伤[15-17]。研究结果显示，PPF 能够上调 γ-氨基丁酸 a 型受体，减轻 ALI[18]。PPF 能够通过下调磷酸化-p38/核因子 κB 信号通路活性和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体水平，预防炎症和氧化应激，减轻 LPS 诱导的新生大鼠 ALI[19]。PPF 通过上调载脂蛋白 M 激活磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通



A. CD11b 和 F4/80 双标记 FCM 检测 ANA-1 细胞表面标志物；B—C. CD86 和 CD206 双标记 FCM 检测细胞 M1-表型（$CD86^+/CD206^-$）和 M2-表型（$CD86^+/CD206^+$）极化情况结果图（B）和柱状统计图（C）；D. ELISA 法检测细胞培养上清液中促炎因子 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的分泌情况；与 Control 组相比，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 LPS 组相比，$^{\#\#}P<0.01$；与 PPF 组相比，$^{\$}P<0.05$，$^{\$\$}P<0.01$；与 PPF+lncRNA-MM2P siRNA 组相比，$^{\%}P<0.05$

A. CD11b and F4/80 double-tagging FCM to detect ANA-1 cell surface markers; B-C. result graph (B) and histogram (C) of CD86 and CD206 double-tagging FCM to detect cell M1-phenotype ($CD86^+/CD206^-$) and M2-phenotype ($CD86^+/CD206^+$) polarization; D. ELISA method to detect the secretion of proinflammatory factors IL-1β, TNF-α and IL-6 in cell culture supernatant fluid; *vs.* Control group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$; *vs.* LPS group, $^{\#\#}P<0.01$; *vs.* PPF group, $^{\$}P<0.05$, $^{\$\$}P<0.01$; *vs.* PPF+lncRNA-MM2P siRNA group, $^{\%}P<0.05$

图 3　lncRNA-MM2P 参与 PPF 调节 LPS 激活的 ANA-1 巨噬细胞极化

Fig 3　LncRNA-MM2P participates in PPF regulation of LPS-activated ANA-1 macrophage polarization

路，促进人肺微血管内皮细胞迁移，抑制脂多糖诱导的肺微血管内皮细胞炎症和凋亡，缓解 ALI[20]。本研究结果也显示，PPF 能够缓解 LPS 诱导的 ALI。

近年来，研究者越来越重视巨噬细胞作为调节炎症反应进程的中心角色对疾病的影响[21]。巨噬细胞通常分为促炎表型的 M1-巨噬细胞和抗炎表型的 M2-巨噬细胞。M1-表型巨噬细

胞与释放 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 等促炎细胞因子相关[22]。而 M2-表型巨噬细胞上调免疫抑制因子和抗炎细胞因子的表达，如 IL-10 等[22]。M1/M2 巨噬细胞亚群平衡和功能的动态变化显著影响炎症反应的进程[22]。研究结果表明，调节巨噬细胞极化的化合物可以通过抗炎作用减少肺损伤[5]。而 PPF 是否能够调节巨噬细胞极化，尚未有研究证实。本研究结果发现，PPF 能够降低 M1/M2 比率。

正常和病理条件下，调节巨噬细胞极化的转录因子有很大差异，导致其表观遗传学变化不同[23]。然而，控制巨噬细胞可塑性的分子仍然未知。迄今为止，只有少数 lncRNA 被报道与巨噬细胞极化有关。研究发现，在小鼠单核巨噬细胞白血病细胞（RAW264.7 细胞）异种移植物小鼠模型中，敲低 lncRNA-MM2P 能够抑制巨噬细胞的 M2-表型极化，从而抑制其促血管生成作用[8]。有研究采用 lncRNA 微阵列技术，分析了一系列体外诱导巨噬细胞 M2 表型极化模型的 lncRNA 表达谱，发现 lncRNA-MM2P 是唯一一个在 M2 表型极化期间表达上调的 lncRNA[6]。本研究结果发现，PPF 用于 LPS 诱导的 ALI 小鼠模型后，lncRNA-MM2P 的表达上调；而在 ANA-1 细胞中敲低 lncRNA-MM2P 的表达，能够抵消 PPF 对 M1-表型极化的抑制作用和对细胞炎症的抑制作用。说明 PPF 通过上调 lncRNA-MM2P 发挥抑制炎症和促进巨噬细胞向 M2-表型极化的功能。

虽然本研究中未使用过表达 lncRNA-MM2P 的技术手段进一步验证 lncRNA-MM2P 在巨噬细胞 M2 极化及其在 ALI 发病机制中的作用，但本研究初步证明了 PPF 能够通过上调 lncRNA-MM2P 促进巨噬细胞 M2 极化，发挥减轻 LPS 诱导的 ALI。

参考文献

[1] MOKRÁ D. Acute lung injury - from pathophysiology to treatment [J]. Physiol Res, 2020, 69(Suppl 3): S353-S366.

[2] ZHOU H T, FAN E K, FAN J. Cell-cell interaction mechanisms in acute lung injury[J]. Shock, 2021, 55(2): 167-176.

[3] NIEMAN G F, GATTO L A, ANDREWS P, et al. Prevention and treatment of acute lung injury with time-controlled adaptive ventilation: physiologically informed modification of airway pressure release ventilation[J]. Ann Intensive Care, 2020, 10(1): 3.

[4] CAMBERLEIN E, COHEN J M, JOS É R, et al. Importance of bacterial replication and alveolar macrophage-independent clearance mechanisms during early lung infection with Streptococcus pneumoniae[J]. Infect Immun, 2015, 83(3):1181-1189.

[5] LIN F Y, SONG C, ZENG Y J, et al. Canagliflozin alleviates LPS-induced acute lung injury by modulating alveolar macrophage polarization[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 88: 106969.

[6] CAO J, DONG R, JIANG L, et al. LncRNA-MM2P identified as a modulator of macrophage M2 polarization [J]. Cancer Immunol Res, 2019, 7(2): 292-305.

[7] WALSH C T. Propofol: milk of amnesia [J]. Cell, 2018, 175 (1): 10-13.

[8] ROMUK E B,SZCZUREK W,NOWAK P G,et al. Effects of propofol on the liver oxidative-antioxidant balance in a rat model of Parkinson's disease[J]. Adv Clin Exp Med,2016,25(5):815-820.

[9] ZHENG G D, QU H, LI F, et al. Propofol attenuates sepsis-induced acute kidney injury by regulating miR-290-5p/CCL-2 signaling pathway[J]. Braz J Med Biol Res, 2018, 51(11): e7655.

[10] 肖南，唐松江，李曦，等. 丙泊酚抑制 NF-κB p65 的磷酸化缓解葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎小鼠病理损伤和免疫反应[J]. 现代免疫学，2021，41(5)：407-412.

[11] HUANG Y, HUANG L X, ZHU G F, et al. Downregulated microRNA-27b attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via activation of NF-E2-related factor 2 and inhibition of nuclear factor κB signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (5): 6023-6032.

[12] SONG F, LV X, MENG J. Propofol induces postoperative depression and inhibits microglial function in mice[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 7651383.

[13] MICKEY B J, WHITE A T, ARP A M, et al. Propofol for treatment-resistant depression: a pilot study [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2018, 21(12): 1079-1089.

[14] XU F, MA R J, ZHANG G X, et al. Estrogen and propofol combination therapy inhibits endoplasmic reticulum stress and remarkably attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury and OGD injury in hippocampus [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108: 1596-1606.

[15] CHEN C Y, TSAI Y F, HUANG W J, et al. Propofol inhibits endogenous formyl peptide-induced neutrophil activation and alleviates lung injury[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 129: 372-382.

[16] THIRY J C, HANS P, DEBY-DUPONT G, et al. Propofol scavenges reactive oxygen species and inhibits the protein nitration induced by activated polymorphonuclear neutrophils [J]. Eur J Pharmacol, 2004, 499(1-2): 29-33.

[17] LV J, LIANG Y B, TU Y B, et al. Hypoxic preconditioning reduces propofol-induced neuroapoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and downregulation of activated caspase-3 in the hippocampus of neonatal rats[J]. Neurol Res, 2018, 40(9): 767-773.

[18] HUANG T F, ZHANG Y, WANG C J, et al. Propofol reduces acute lung injury by up-regulating gamma-aminobutyric acid type a receptors[J]. Exp Mol Pathol, 2019, 110: 104295.

[19] YU X W, LI C F. Protective effects of propofol on experimental neonatal acute lung injury [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(5): 4507-4513.

[20] WANG L, TANG X M, LI S P. Propofol promotes migration, alleviates inflammation, and apoptosis of lipopolysaccharide-induced human pulmonary microvascular endothelial cells by activating PI3K/AKT signaling pathway via upregulating APOM expression [J]. Drug Dev Res, 2022, 83(2): 397-406.

[21] ANDERS H J, SUAREZ-ALVAREZ B, GRIGORESCU M, et al. The macrophage phenotype and inflammasome component NLRP3 contributes to nephrocalcinosis-related chronic kidney disease independent from IL-1-mediated tissue injury[J]. Kidney Int, 2018, 93(3): 656-669.

（下转第 286 页）