

# 氧化应激环境下 LncRNA MALAT1 对内皮细胞 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响



扫描二维码  
获取更多

纪海涛<sup>1</sup>, 赵颖馨<sup>1</sup>, 于锡巧<sup>1</sup>, 柴强<sup>1</sup>, 刘振东<sup>1</sup>, 张丛丛<sup>2</sup>

**【摘要】** 目的 探究氧化应激环境下长链非编码RNA肺腺癌转移相关转录物1 (LncRNA MALAT1) 对内皮细胞 Toll样受体4 (TLR4) /髓样分化因子88 (MyD88) /核因子 $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路的影响。方法 本实验时间为2022年10—12月。将人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 分为A、B、C、D组, 分别使用600  $\mu$ mol/L的过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 处理0、6、8、10 h, 随后采用CCK-8法测定细胞活性以分析 $H_2O_2$ 诱导氧化应激细胞模型的最佳干预时间。将HUVEC分为对照组 (不做任何处理)、 $H_2O_2$ 组 (使用600  $\mu$ mol/L的 $H_2O_2$ 处理8 h以构建氧化应激细胞模型), 采用q-PCR检测LncRNA MALAT1表达水平。将HUVEC分为对照组 (不做任何处理)、 $H_2O_2$ 组 (使用600  $\mu$ mol/L的 $H_2O_2$ 处理8 h以构建氧化应激细胞模型)、 $H_2O_2$ +siRNA组 (转染LncRNA MALAT1的siRNA后使用600  $\mu$ mol/L的 $H_2O_2$ 处理8 h以构建氧化应激细胞模型), 采用Western blot法检测TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B表达水平。将HUVEC分为对照组 (不做任何处理)、 $H_2O_2$ 组 (使用600  $\mu$ mol/L的 $H_2O_2$ 处理8 h以构建氧化应激细胞模型)、 $H_2O_2$ +siRNA组 (转染LncRNA MALAT1的siRNA后使用600  $\mu$ mol/L的 $H_2O_2$ 处理8 h以构建氧化应激细胞模型), 采用q-PCR检测TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA表达水平。结果 B、C、D组细胞活性均小于A组 ( $P<0.05$ ); C组细胞活性最接近60%, 故 $H_2O_2$ 诱导氧化应激细胞模型的最佳干预时间为8 h。 $H_2O_2$ 组LncRNA MALAT1表达水平低于对照组 ( $P<0.05$ )。  $H_2O_2$ +siRNA组TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B表达水平高于对照组 ( $P<0.05$ );  $H_2O_2$ +siRNA组MyD88、NF- $\kappa$ B表达水平高于 $H_2O_2$ 组 ( $P<0.05$ )。  $H_2O_2$ 组TLR4、MyD88 mRNA表达水平高于对照组 ( $P<0.05$ );  $H_2O_2$ +siRNA组TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA表达水平高于对照组、 $H_2O_2$ 组 ( $P<0.05$ )。结论 氧化应激环境下, LncRNA MALAT1表达水平降低, 进而导致内皮细胞TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路被激活。

**【关键词】** 氧化性应激; 长链非编码RNA肺腺癌转移相关转录物1; Toll样受体4; 髓样分化因子88; NF- $\kappa$ B

**【中图分类号】** R 349.1 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.214

## Effect of LncRNA MALAT1 on TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Endothelial Cells under Oxidative Stress

Ji Haitao<sup>1</sup>, Zhao Yingxin<sup>1</sup>, Yu Xiqiao<sup>1</sup>, Chai Qiang<sup>1</sup>, Liu Zhendong<sup>1</sup>, Zhang Congcong<sup>2</sup>

1.School of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University, Jinan 250000, China

2.Department of Endodontics, Jinan Zhangqiu Stomatological Hospital, Jinan 250000, China

Corresponding author: ZHAO Yingxin, E-mail: xiaoying781013@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of long chain non-coding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma tran 1 (LncRNA MALAT1) on Toll-like receptor 4 (TLR4) /myeloid differentiation factor 88 (MyD88) /nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) in endothelial cells under oxidative stress. **Methods** This experiment was conducted from October to December 2022. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into groups A, B, C and D, and treated with 600  $\mu$ mol/L hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) for 0, 6, 8 and 10 h, respectively. Then the cell activity was determined by CCK-8 method to analyze the optimal intervention time of  $H_2O_2$  to induce oxidative stress cell model. HUVECs were divided into control group (without any treatment) and  $H_2O_2$  group (treated with 600  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  for 8 h to construct oxidative stress cell model), and the expression level of LncRNA MALAT1 was detected by q-PCR. HUVECs were divided into control group (without any treatment),  $H_2O_2$  group (treated with 600  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  for 8 h to construct oxidative stress cell model),  $H_2O_2$ +siRNA group (transfected with LncRNA MALAT1 siRNA and treated with 600  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  for 8 h to construct oxidative stress cell model). The expression levels of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B were detected by Western blot. HUVECs were divided into control group (without any treatment),  $H_2O_2$  group (treated with 600  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  for 8 h to construct oxidative stress cell model),  $H_2O_2$ +siRNA group (transfected with LncRNA MALAT1 siRNA and treated with 600  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  for 8 h to construct oxidative stress cell model).

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2020MH043)

作者单位: 1.250000山东省济南市, 山东第一医科大学临床与基础医学院 2.250000山东省济南市章丘区口腔医院牙体牙髓科

通信作者: 赵颖馨, E-mail: xiaoying781013@126.com

The mRNA expression levels of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B were detected by q-PCR. **Results** The cell activity of groups B, C and D was lower than that of group A ( $P < 0.05$ ). The cell activity of group C was the closest to 60%, so the optimal intervention time of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to induce oxidative stress cell model was 8 h. The expression level of LncRNA MALAT1 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group was lower than that in control group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA group were higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of MyD88 and NF- $\kappa$ B in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA group were higher than those in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression levels of TLR4 and MyD88 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group were higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression levels of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA group were higher than those in control group and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Under oxidative stress, the expression level of LncRNA MALAT1 is decreased, which leads to the activation of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway in endothelial cells.

**【Key words】** Oxidative stress; Long chain non-coding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma tran 1; Toll-like receptor 4; Myeloid differentiation factor 88; NF-kappa B

随着老龄化加重,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发病率逐年升高,其病变部位主要是血管壁<sup>[1]</sup>。血管内壁是由内皮细胞组成的,而内皮细胞在机体器官中广泛分布<sup>[2]</sup>;此外,其还可以充当血管壁的调节器,释放血管活性物质,调节血管的舒张与收缩<sup>[3]</sup>。AS的主要病因是内皮细胞对氧化低密度脂蛋白胆固醇(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)的调控失衡<sup>[4]</sup>,而ox-LDL是氧化应激刺激低密度脂蛋白产生的,所以氧化应激是引发AS的重要因素。研究表明,Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)与AS的发生有关<sup>[5-6]</sup>。TLR4主要分布在内皮细胞表面,其被激活后可与髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)结合,从而激活MyD88依赖的信号通路,进而促进核因子 $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)的活化及促炎因子的释放<sup>[7]</sup>。

近年来长链非编码RNA(long chain non-coding RNA, LncRNA)持续受到学者们的关注,而长链非编码RNA肺腺癌转移相关转录物1(long chain non-coding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma tran 1, LncRNA MALAT1)作为LncRNA家族的一员,在细胞核中表达,具有高度保守性<sup>[8]</sup>。研究发现,LncRNA MALAT1在血管疾病中发挥作用,可以促进血管生成<sup>[9]</sup>,并且可以保护发生氧化损伤的内皮细胞<sup>[10]</sup>。但目前LncRNA MALAT1与TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路的关系尚不清楚。为此,本研究使用过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导氧化应激细胞模型,然后探究氧化应激环境下LncRNA MALAT1对内皮细胞TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路的影响,以期研究氧化应激导致AS等心血管疾病的机制提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验时间 本实验时间为2022年10—12月。

1.2 实验材料 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)由山东省医学科学院提供;LncRNA MALAT1的小干扰RNA(small interfering

RNA, siRNA)购自上海吉码制药技术有限公司;TLR4抗体购自美国Abcam公司;MyD88抗体、NF- $\kappa$ B抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;Actin、LncRNA MALAT1、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B的引物购自铂尚生物技术(上海)有限公司;反转录试剂盒和q-PCR试剂盒购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;蛋白凝胶购自武汉博士德生物工程有限公司;CCK-8试剂购自MCE公司。

### 1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 将HUVEC置于含5%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的低糖DMEM培养液中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养2~3d,待细胞贴壁且在培养皿中的覆盖率达80%左右时进行实验分组与处理。

1.3.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化应激细胞模型的最佳干预时间 将HUVEC悬液接种在96孔板中(100  $\mu$ l/孔),将培养板放在培养箱中预培养6~8h,将其分为A、B、C、D组,分别使用600  $\mu$ mol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理0、6、8、10h,随后采用CCK-8法测定细胞活性,具体方法为:用PBS清洗掉残留的培养液和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,再向每孔加入10  $\mu$ l CCK-8试剂与90  $\mu$ l低糖DMEM培养液,将培养板置于培养箱内孵育1~4h,采用酶标仪测定450 nm处的吸光度。以细胞活性为60%时的时间作为本实验的最佳干预时间,实验独立重复3次。

1.3.3 q-PCR检测LncRNA MALAT1表达水平 将密度为30  $\times$  10<sup>4</sup>/ml的HUVEC均匀接种至6孔板中,每孔加入2 ml,培养12 h,将其分为对照组(不做任何处理)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组(使用600  $\mu$ mol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理8 h以构建氧化应激细胞模型),采用q-PCR检测LncRNA MALAT1表达水平,具体方法为:弃去培养基,用PBS清洗1遍,加入500  $\mu$ l的Trizol以提取细胞中的总RNA,将总RNA吸出并移至EP管,加入200  $\mu$ l双重去离子水(double distilled water, ddH<sub>2</sub>O),放入常温离心机进行离心,条件为6 720 r/min、15 min(离心半径为6 cm);吸出上层清液(300~500  $\mu$ l),加入等量

异丙醇后再次离心, 条件为6 720 r/min、10 min (离心半径为6 cm); 弃去液体, 用75%乙醇溶液清洗, 再次离心, 条件为4 480 r/min、3 min (离心半径为6 cm); 弃去乙醇溶液后, 加入ddH<sub>2</sub>O以溶解沉淀的LncRNA MALAT1。按照50 °C 15 min, 75 °C 5 min的条件对提取出的LncRNA MALAT1进行反转录。以Actin为内参, 使用PCR试剂盒对Actin、LncRNA MALAT1进行PCR扩增, 加入0.4 μl上/下游引物、2.0 μl cDNA、10.0 μl PCR试剂, 用ddH<sub>2</sub>O将总反应体系补齐到20.0 μl。PCR反应条件: 94 °C 90 s, 94 °C 20 s, 57 °C 20 s, 共30个循环; 72 °C 5 min。Actin的上游引物序列为5'-GAAGAGCTACGAGCTGCCTGA-3', 下游引物序列为5'-CAGACAGCACTGTGTTGGCG-3'; LncRNA MALAT1的上游引物序列为5'-GGATTCCAGGAAGGAGCGAG-3', 下游引物序列为5'-ATTGCCGACCTCACGGATTT-3'。根据公式( $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}$ )计算LncRNA MALAT1表达水平。实验独立重复3次。

**1.3.4 Western blot法检测TLR4、MyD88、NF-κB表达水平** 将密度为 $30 \times 10^4$ /ml的HUVEC均匀接种至6孔板中, 每孔加入2 ml, 培养12 h, 将其分为对照组(不做任何处理)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组(使用600 μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理8 h以构建氧化应激细胞模型)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组(转染LncRNA MALAT1的siRNA后使用600 μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理8 h以构建氧化应激细胞模型), 采用Western blot法检测TLR4、MyD88、NF-κB表达水平, 具体方法为: 弃去培养基, 用PBS清洗1遍, 加入200~300 μl RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂的混合液(1:100), 于冰上孵育5~10 min, 用刮刀将细胞刮离六孔板并转移至EP管内, 每个样本进行超声破碎3次, 5 s/次; 将其转移到4 °C的离心机中, 12 000 r/min离心15 min (离心半径为6 cm); 用移液枪吸取上清液, 采用BCA法测量蛋白浓度, 加入5×Buffer(与提取蛋白样本量的比例为1:4), 置于干式恒温器煮蛋白(100 °C 10 min); 添加10~15 μl的样品并将其置于蛋白凝胶中电泳1 h, 电压保持在80 V; 将蛋白转移到PVDF膜, 转膜方式为湿转, 时间1 h, 电压保持在100 V; 将含有蛋白的PVDF膜用5%脱脂奶粉封闭90 min; 用1×TBST清洗3次, 5 min/次; 加入TLR4、MyD88、NF-κB抗体(稀释比例分别为1:500、1:1 000、1:1 000), 于4 °C孵育6~8 h; 于室温下用1×TBST清洗3次, 5 min/次; 用相应种属二抗孵育1 h(稀释比例为1:5 000), 用1×TBST清洗3次, 5 min/次; 进行蛋白显影, 分析目标蛋白表达水平。实验独立重复3次。

**1.3.5 q-PCR检测TLR4、MyD88、NF-κB mRNA表达水平** 将密度为 $30 \times 10^4$ /ml的HUVEC均匀接

种至6孔板中, 每孔加入2 ml, 培养12 h, 将其分为对照组(不做任何处理)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组(使用600 μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理8 h以构建氧化应激细胞模型)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组(转染LncRNA MALAT1的siRNA后使用600 μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理8 h以构建氧化应激细胞模型), 采用q-PCR检测TLR4、MyD88、NF-κB mRNA表达水平, 方法同1.3.3。TLR4的上游引物序列为5'-TGGATCAAGGACCAGAGGCA-3', 下游引物序列为5'-GAGGACCGACACACCAATGA-3'; MyD88的上游引物序列为5'-AAGCGACTGATCCCCATCAAG-3', 下游引物序列为5'-TCGCAGACAGTGATGAACCTC-3'; NF-κB的上游引物序列为5'-TCTTTGACAATCGTGCCCCC-3', 下游引物序列为5'-CAGCCIGGTC CCGTGAATA-3'。

**1.4 统计学方法** 采用SPSS Statistics 26软件进行数据分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两组间比较采用成组t检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化应激细胞模型的最佳干预时间** A、B、C、D组细胞活性分别为(1.00±0.00)、(0.77±0.05)、(0.61±0.09)、(0.52±0.04)。四组细胞活性比较, 差异有统计学意义(F=40.08, P=0.001); B、C、D组细胞活性均低于A组, 差异有统计学意义(P<0.05)。C组细胞活性最接近60%, 故H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化应激细胞模型的最佳干预时间为8 h。

**2.2 对照组与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组LncRNA MALAT1表达水平比较** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组LncRNA MALAT1表达水平为(0.76±0.25), 低于对照组的(1.28±0.38), 差异有统计学意义(t=2.776, P=0.020)。

**2.3 对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB表达水平比较** 对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB表达水平比较, 差异有统计学意义(P<0.05); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB表达水平高于对照组, 差异有统计学意义(P<0.05); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组MyD88、NF-κB表达水平高于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组, 差异有统计学意义(P<0.05), 见表1、图1。

**2.4 对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB mRNA表达水平比较** 对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB mRNA表达水平比较, 差异有统计学意义(P<0.05); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组TLR4、MyD88 mRNA表达水平高于对照组, 差异有统计学意义(P<0.05); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB mRNA表达水平高于对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组, 差异有统计学意义(P<0.05), 见表2。

### 3 讨论

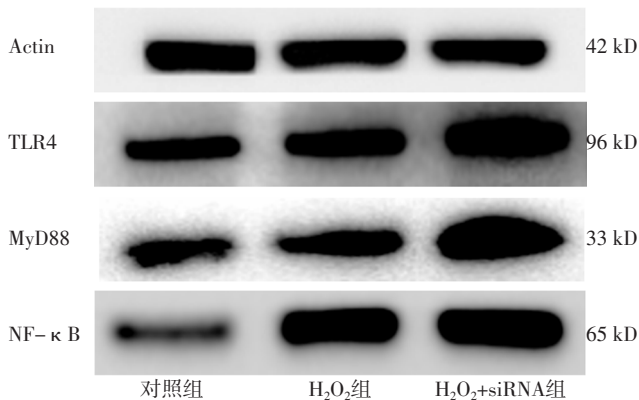
AS是目前比较常见的心血管疾病,能够导致血管内膜结构与功能发生变化,管壁增厚是其主要病理特点<sup>[1]</sup>。氧化应激是导致AS发生发展的主要因素之一,当内皮细胞受到氧化应激的刺激后,会引起低密度脂蛋白发生氧化,刺激黏附因子表达,导致细胞黏附性增加及细胞聚集,其还会促进NO的释放,造成血管功能障碍

表1 对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

Table 1 Comparison of expression levels of TLR4, MyD88, NF-κB in control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA group

组别	TLR4	MyD88	NF-κB
对照组	0.72 ± 0.21	0.41 ± 0.14	0.74 ± 0.07
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	0.95 ± 0.39	0.52 ± 0.14	1.01 ± 0.23
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +siRNA组	1.27 ± 0.44 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.23 <sup>ab</sup>	1.37 ± 0.24 <sup>ab</sup>
F值	4.84	11.51	12.66
P值	0.019	0.001	0.001

注: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=过氧化氢, siRNA=小干扰RNA, TLR4=Toll样受体4, MyD88=髓样分化因子88, NF-κB=核因子κB; <sup>a</sup>表示与对照组比较, P<0.05; <sup>b</sup>表示与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较, P<0.05



注: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=过氧化氢, siRNA=小干扰RNA, TLR4=Toll样受体4, MyD88=髓样分化因子88, NF-κB=核因子κB

图1 Western blot法检测对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB表达水平的电泳图

Figure 1 Electropherogram of TLR4, MyD88 and NF-κB expression levels in control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA group detected by Western blot method

表2 对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB mRNA表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

Table 2 Comparison of mRNA expression levels of TLR4, MyD88, NF-κB in control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA group

组别	TLR4 mRNA	MyD88 mRNA	NF-κB mRNA
对照组	1.09 ± 0.05	0.99 ± 0.06	1.02 ± 0.04
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	2.78 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +siRNA组	6.10 ± 0.60 <sup>ab</sup>	2.52 ± 0.11 <sup>ab</sup>	2.23 ± 0.19 <sup>ab</sup>
F值	49.53	32.64	26.66
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注: <sup>a</sup>表示与对照组比较, P<0.05; <sup>b</sup>表示与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较, P<0.05

碍<sup>[11]</sup>。同时,慢性炎症也是造成AS加重的主要原因,研究表明,TLR4/MyD88/NF-κB信号通路在AS的炎症反应中发挥着重要作用,其中MyD88作为TLR4的衔接蛋白,起着关键的信号转导功能,其在接收到TLR4信号后可激活NF-κB<sup>[12]</sup>。

本研究构建氧化应激细胞模型前,首先探索合适的诱导条件。氧化应激细胞模型的诱导手段有很多,本研究选择H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,因为其应用较广泛,作用直接,性质稳定<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, B、C、D组细胞活性均小于A组,且C组细胞活性最接近60%,故H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化应激细胞模型的最佳干预时间为8 h。

LncRNA MALAT1定位于染色体11q13.1上,首次在非小细胞肺癌中被发现,其可以调控细胞增殖,影响肿瘤的发生<sup>[14]</sup>。研究显示,抑制LncRNA MALAT1可促进乳腺癌模型小鼠癌细胞迁移<sup>[15]</sup>。同时,LncRNA MALAT1在氧化应激引发的心血管疾病中也能发挥一定作用。LI等<sup>[16]</sup>研究发现,心肌梗死患者LncRNA MALAT1表达水平升高,LncRNA MALAT1可能成为预测心肌梗死的标志物。有研究者在高脂饮食诱导的AS模型小鼠中发现,过表达LncRNA MALAT1可以通过ox-LDL来调控Wnt/β环,从而促进AS的发生<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组LncRNA MALAT1表达水平低于对照组,与CHEN等<sup>[18]</sup>研究结果类似,该研究表明,靶向敲除LncRNA MALAT1后小鼠心脏微血管内皮细胞的氧化应激反应更加剧烈。但本研究结果与RADHAKRISHNAN等<sup>[19]</sup>研究结果不同,可能是所用细胞系及干预方式不同导致的,RADHAKRISHNAN等<sup>[19]</sup>选择的细胞系为视网膜内皮细胞,且使用高糖诱导氧化应激。

有研究者采用脂多糖诱导小鼠心肌细胞氧化应激,结果显示,心肌细胞中TLR4、MyD88、NF-κB表达水平升高<sup>[20]</sup>。研究显示,在中枢神经系统中,抑制小胶质细胞TLR4、MyD88、NF-κB的表达,可以减轻氧化应激,进而抑制神经元凋亡<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB表达水平高于对照组,MyD88、NF-κB表达水平高于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组TLR4、MyD88 mRNA表达水平高于对照组,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+siRNA组TLR4、MyD88、NF-κB mRNA表达水平高于对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组;提示在氧化应激环境下,LncRNA MALAT1表达水平降低,进而导致TLR4/MyD88/NF-κB信号通路被激活,这与既往研究结果<sup>[22]</sup>类似。但本研究结果与JIA等<sup>[23]</sup>研究结果存在差异,可能是采用的细胞和模拟的病理环境不同导致的,JIA等<sup>[23]</sup>使用人心肌细胞模拟心肌炎,结果显示,下调LncRNA MALAT1可抑制TLR4/MyD88/NF-κB信号通路的激活。

综上所述,氧化应激环境下,LncRNA MALAT1表达水平降低,进而导致内皮细胞TLR4/MyD88/NF-κB

信号通路被激活, 这为预防和治疗AS提供了新的理论依据。但本研究为细胞实验, 且未进行动物实验, 后期尚需要进行动物实验进一步验证本研究结论。此外, LncRNA MALAT1与多种微小RNA有关, SUN等<sup>[24]</sup>研究发现, LncRNA MALAT1与miR-503位点结合后可抑制下游JAK2/STAT3信号通路的激活, 本研究组后续会对此展开研究。

作者贡献: 纪海涛进行文章的撰写、数据分析; 赵颖馨、柴强、刘振东进行文章的构思与设计; 于锡巧、张丛丛进行文献的收集与整理; 赵颖馨进行文章的质量控制及审校, 并对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

### 参考文献

- [1] ZIEGLER T, ABDEL RAHMAN F, JURISCH V, et al. Atherosclerosis and the capillary network; pathophysiology and potential therapeutic strategies [J]. *Cells*, 2019, 9 (1): 50. DOI: 10.3390/cells9010050.
- [2] HASAN S S, FISCHER A. The endothelium: an active regulator of lipid and glucose homeostasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2021, 31 (1): 37-49. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.10.003.
- [3] CONG X, KONG W. Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease [J]. *Cell Signal*, 2020, 66: 109485. DOI: 10.1016/j.cellsig.2019.109485.
- [4] LOVATT M, ADNAN K, KOCABA V, et al. Peroxiredoxin-1 regulates lipid peroxidation in corneal endothelial cells [J]. *Redox Biol*, 2020, 30: 101417. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101417.
- [5] ROSHAN M H K, TAMBO A, PACE N P. The role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Int J Inflam*, 2016, 2016: 1532832. DOI: 10.1155/2016/1532832.
- [6] SUN Z, YUAN W, LI L H, et al. Macrophage CD36 and TLR4 cooperation promotes foam cell formation and VSMC migration and proliferation under circadian oscillations [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2022, 15 (5): 985-997.
- [7] SINGH S, SAHU K, SINGH C, et al. Lipopolysaccharide induced altered signaling pathways in various neurological disorders [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2022, 395 (3): 285-294. DOI: 10.1007/s00210-021-02198-9.
- [8] ABRISHAMDAR M, JALALI M S, RASHNO M. MALAT1 lncRNA and Parkinson's disease: the role in the pathophysiology and significance for diagnostic and therapeutic approaches [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59 (9): 5253-5262. DOI: 10.1007/s12035-022-02899-z.
- [9] YU B, WANG S S. Angio-LncRs: LncRNAs that regulate angiogenesis and vascular disease [J]. *Theranostics*, 2018, 8 (13): 3654-3675. DOI: 10.7150/thno.26024.
- [10] SIMION V, HAEMMIG S, FEINBERG M W. LncRNAs in vascular biology and disease [J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, 114: 145-156. DOI: 10.1016/j.vph.2018.01.003.
- [11] MARCHIO P, GUERRA-OJEDA S, VILA J M, et al. Targeting early atherosclerosis: a focus on oxidative stress and inflammation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8563845. DOI: 10.1155/2019/8563845.
- [12] ZUSSO M, LUNARDI V, FRANCESCHINI D, et al. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16 (1): 148. DOI: 10.1186/s12974-019-1538-9.
- [13] LIU R F, HU L, WU J N, et al. Changes in tumor suppressors and inflammatory responses during hydrogen peroxide-induced senescence in rat fibroblasts [J]. *Free Radic Res*, 2022, 56 (1): 77-89. DOI: 10.1080/10715762.2022.2037582.
- [14] GOYAL B, YADAV S R M, AWASTHEE N, et al. Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of long non-coding RNA MALAT1 in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875 (2): 188502. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188502.
- [15] KIM J, PIAO H L, KIM B J, et al. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis [J]. *Nat Genet*, 2018, 50 (12): 1705-1715. DOI: 10.1038/s41588-018-0252-3.
- [16] LI R R, JIN J, LIU E X, et al. A novel circulating biomarker lnc-MALAT1 for acute myocardial infarction: its relationship with disease risk, features, cytokines, and major adverse cardiovascular events [J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36 (12): e24771. DOI: 10.1002/jcla.24771.
- [17] LI H R, ZHAO Q F, CHANG L P, et al. LncRNA MALAT1 modulates ox-LDL induced EndMT through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18 (1): 62. DOI: 10.1186/s12944-019-1006-7.
- [18] CHEN Y Q, LI S, ZHANG Y, et al. The lncRNA Malat1 regulates microvascular function after myocardial infarction in mice via miR-26b-5p/Mfn1 axis-mediated mitochondrial dynamics [J]. *Redox Biol*, 2021, 41: 101910. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101910.
- [19] RADHAKRISHNAN R, KOWLURU R A. Long noncoding RNA MALAT1 and regulation of the antioxidant defense system in diabetic retinopathy [J]. *Diabetes*, 2021, 70 (1): 227-239. DOI: 10.2337/db20-0375.
- [20] REN G C, ZHOU Q J, LU M L, et al. Rosuvastatin corrects oxidative stress and inflammation induced by LPS to attenuate cardiac injury by inhibiting the NLRP3/TLR4 pathway [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021, 99 (9): 964-973. DOI: 10.1139/cjpp-2020-0321.
- [21] RAHIMIFARD M, MAQBOOL F, MOEINI-NODEH S, et al. Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: a novel therapeutic strategy for neuroinflammation [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 36: 11-19. DOI: 10.1016/j.arr.2017.02.004.
- [22] LI H B, SHI H J, MA N, et al. BML-111 alleviates acute lung injury through regulating the expression of lncRNA MALAT1 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 649: 15-21. DOI: 10.1016/j.abb.2018.04.016.
- [23] JIA P Y, WU N, JIA D L, et al. Downregulation of MALAT1 alleviates saturated fatty acid-induced myocardial inflammatory injury via the miR-26a/HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B axis [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 655-665. DOI: 10.2147/DMSO.S203151.
- [24] SUN Q, LI Q, XIE F F. LncRNA-MALAT1 regulates proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells by targeting miR-503-5p [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 6297-6307. DOI: 10.2147/OTT.S214689.

(收稿日期: 2023-03-06; 修回日期: 2023-06-01)

(本文编辑: 崔丽红)