

miR-200b 对小鼠矽肺纤维化的抑制作用

袁翠芳¹,李航¹,熊余璐¹,郭梓焯¹,王颢¹,陈茹茹¹,郝小惠^{1,2},刘和亮^{1,2},郭灵丽^{1,2}

摘要 目的 探究微小 RNA-200b (miR-200b) 对二氧化硅 (SiO₂) 诱导的小鼠矽肺纤维化的抑制作用。方法 将 24 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、SiO₂ 组、SiO₂ + agomir-NC 组和 SiO₂ + miR-200b agomir 组,每组 6 只。SiO₂ 组小鼠予以气管滴注 5 mg SiO₂ 悬液, SiO₂ + miR-200b agomir 组和 SiO₂ + agomir-NC 组小鼠分别在造模第 1 天、第 7 天气管滴注 miR-200b 模拟物 (miR-200b agomir) 和 agomir 的阴性对照 (agomir-NC)。造模第 14 天检测小鼠肺功能后将其处死,采用 HE 和 Masson 染色观察小鼠肺组织病理变化;对支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中总蛋白浓度和白细胞总数进行测定,并使用 ELISA 试剂盒检测小鼠 BALF 中转化生长因子-β1 (TGF-β1) 的含量。结果 与对照组相比, SiO₂ 组和 SiO₂ + agomir-NC 组小鼠肺内可见炎性细胞聚集且伴有胶原沉积,而 SiO₂ + miR-200b agomir 组小鼠肺组织中炎症减轻、胶原沉积减少。与对照组相比, SiO₂ 组和 SiO₂ + agomir-NC 组小鼠呼吸频率 (f) 加快、呼吸暂停 (PAU) 次数增加 ($P < 0.05$), 呼气峰值时间比率 (Rpef) 降低 ($P < 0.05$), 经过 miR-200b agomir 干预后, 小鼠肺功能得到改善。此外, miR-200b agomir 干预也可以有效缓解 SiO₂ 刺激引起的小鼠 BALF 中总蛋白浓度、白细胞总数和 TGF-β1 含量的增加。结论 miR-200b 可以有效减缓矽肺小鼠肺功能下降, 抑制小鼠矽肺纤维化的发生发展。

关键词 矽肺; miR-200b; 纤维化

中图分类号 R 135.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1313-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.011

矽肺是一种由于吸入游离二氧化硅 (silicon dioxide, SiO₂) 粉尘而引起的慢性间质性肺病,其主要特征包括慢性炎症、肺部炎性肉芽肿、迟发性肺间质纤维化和进行性呼吸功能障碍^[1]。矽肺是我国最严重的职业病,国家卫生健康委员会发布的文件显示,2020 年我国新增职业性尘肺病患者 14 367 例,

死亡 6 668 例^[2]。矽肺不仅威胁着工人的身心健康,还给国家带来了巨大的经济负担,是许多国家迫切需要解决的严重公共卫生问题。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一种长度为 19 ~ 22 个核苷酸的内源性非编码小 RNA,微小 RNA-200b (microRNA-200b, miR-200b) 是 miR-200 家族中的一员^[3],有研究^[4-6]报道 miR-200b 在肾脏纤维化、口腔黏膜纤维化和心脏纤维化等多种纤维化疾病中发挥重要作用。然而,miR-200b 在矽肺纤维化中的作用及机制尚不清楚。该研究通过构建小鼠矽肺纤维化模型并给予 miR-200b 模拟物 (miR-200b agomir) 干预,通过肺功能检测、肺组织病理学检测等手段,以期明确 miR-200b 在矽肺纤维化发病过程中的可能作用,为寻找有效治疗矽肺纤维化的靶点提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 24 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 (6 ~ 8 周龄,体质量 16 ~ 18 g) 购自北京华阜康生物科技股份有限公司。实验小鼠饲养在温度 (23℃ ± 2℃) 和湿度 (60% ± 10%) 可控的室内,光照-黑暗交替循环 12 h,可以自由进食和饮水。所有实验操作均得到了华北理工大学实验动物伦理委员会批准 (编号:SQ2022122)。

1.1.2 主要仪器和试剂 SiO₂ (美国 Sigma 公司),其中 99% 粒径为 0.5 ~ 10 μm,使用前充分研磨并于 180℃ 烘烤 2 h,脱水除去内毒素;miR-200b agomir (广州市锐博生物科技有限公司);转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) ELISA 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司);甲醛溶液 (天津市津东天正精细化学试剂厂);伊红和苏木精染液 (珠海贝索生物技术有限公司);Masson 染液试剂盒 (北京雷根生物科技有限公司)。Fine Pointe Whole Body Plethysmography 全身体积描记系统 (美国 Buxco 公司);酶标仪 (美国 Molecular Device 公司)。

1.2 方法

2023-06-07 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81602814);河北省高等学校科学技术研究项目 (编号:BJ2017006)

作者单位:¹ 华北理工大学公共卫生学院,唐山 063210

² 河北省器官纤维化重点实验室,唐山 063210

作者简介:袁翠芳,女,硕士研究生;

郭灵丽,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

lisjane@126.com

1.2.1 动物分组与处理 将 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组:对照组、SiO₂ 组、SiO₂ + agomir-NC 组和 SiO₂ + miR-200b agomir 组,每组 6 只。SiO₂ 组小鼠予以一次性气管滴注 50 μl 生理盐水溶解的 SiO₂ (5 mg/只) 悬液;SiO₂ + agomir-NC 组、SiO₂ + miR-200b agomir 组气管分别注入 50 μl 含 5 nmol agomir 的阴性对照 (agomir-NC)、miR-200b agomir 的 SiO₂ 悬液,造模第 7 天再次气道滴注 2.5 nmol agomir-NC、miR-200b agomir 干预;对照组滴注等量生理盐水。造模第 14 天测定小鼠肺功能后将其处死。

1.2.2 小鼠支气管肺泡灌洗 使用 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉小鼠后,将小鼠仰卧位固定于手术板上,沿颈正中线处剪开约 1 cm 的小口,钝性分离气管周围肌肉以暴露气管,在气管插管的情况下,采用止血钳将小鼠右肺结扎,使用 1.5 ml (0.5 ml × 3 次) 无菌 PBS 溶液缓慢灌洗左肺,收集支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。将得到的 BALF 在 4 °C 以 1 000 r/min 离心 6 min,吸出上清液并储存在 -80 °C 用于总蛋白浓度测定和 ELISA 分析。加入 0.1 ml PBS 重悬剩余的细胞沉淀,随后使用血细胞计数板计算白细胞总数。

1.2.3 小鼠肺组织病理学检查 在室温下将小鼠右下部肺组织置于 10% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后流水过夜,然后将肺组织依次放入 60%、70%、80%、90% 和无水乙醇中各 2 h 进行脱水,随后放入醇苯混合液、二甲苯 I 和二甲苯 II 中各 20 min 进行透明,接着将肺组织在 60 °C 下浸入蜡液中 6 h 以上,最后将标本包埋于石蜡中并切成 5 μm 的切片。进行 HE 和 Masson 染色,染色操作均按试剂盒说明书进行,最后使用光学显微镜观察拍照。

1.2.4 小鼠 BALF 中 TGF-β1 含量的测定 采用酶联免疫双抗夹心法测定上述 BALF 中 TGF-β1 的水平,实验操作均按照试剂盒说明书进行,根据样本在波长 450 nm 处吸光度值以及标准曲线,计算样品中 TGF-β1 的浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。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 (ANOVA)。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果 如图 1 所示,与对照组相比, SiO₂ 组和 SiO₂ + agomir-NC 组小鼠肺泡壁增厚,肺组织存在炎症细胞浸润和少量细胞结节,而 SiO₂ +

miR-200b agomir 组小鼠肺组织中炎症细胞浸润程度减轻、细胞结节数量减少。

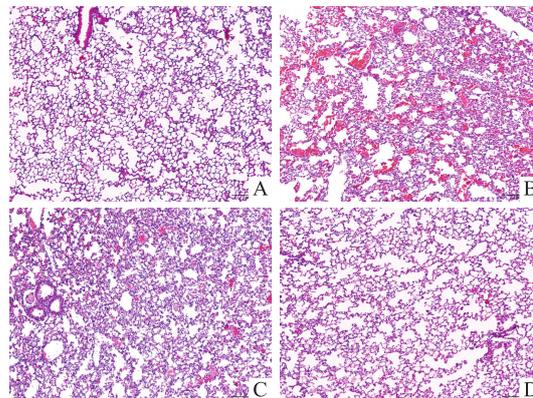


图 1 小鼠肺组织 HE 染色结果 ×200

A: 对照组; B: SiO₂ 组; C: SiO₂ + agomir-NC 组; D: SiO₂ + miR-200b agomir 组

2.2 Masson 染色结果 Masson 染色结果 (图 2) 显示,与对照组相比, SiO₂ 组和 SiO₂ + agomir-NC 组小鼠肺泡间隔和细支气管区可以看到胶原沉积,而 SiO₂ + miR-200b agomir 组小鼠肺间质胶原沉积显著减少。

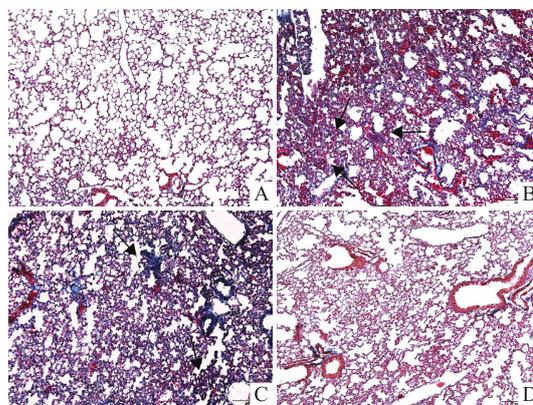


图 2 小鼠肺组织 Masson 染色结果 ×200

A: 对照组; B: SiO₂ 组; C: SiO₂ + agomir-NC 组; D: SiO₂ + miR-200b agomir 组

2.3 小鼠肺功能检测结果 如表 1 所示,与对照组比较, SiO₂ 组和 SiO₂ + agomir-NC 组小鼠呼吸频率 (frequency, *f*) 加快、呼吸暂停 (pause, PAU) 次数增加 (*P* < 0.05), 呼气峰值时间比率 (ratio rate of achieving peak expiratory flow, Rpef) 降低 (*P* < 0.05)。与 SiO₂ 组相比, SiO₂ + miR-200b agomir 组小鼠 *f* 和 PAU 减少, Rpef 升高 (*P* < 0.05)。

2.4 小鼠 BALF 中总蛋白浓度、白细胞总数和 TGF-β1 的含量 BALF 中总蛋白浓度的高低和白

表1 各组小鼠肺功能检测结果($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	f	PAU	Rpef
对照	367.015 ± 52.093	0.821 ± 0.101	0.514 ± 0.577
SiO ₂	479.331 ± 57.410*	1.018 ± 0.163*	0.369 ± 0.596*
SiO ₂ + agomir-NC	500.063 ± 69.764*	0.998 ± 0.126*	0.398 ± 0.481*
SiO ₂ + miR-200b agomir	436.148 ± 48.328	0.829 ± 0.122#	0.479 ± 0.733#
F 值	6.278	3.996	7.591
P 值	0.004	0.022	0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 SiO₂ 组比较: # $P < 0.05$

细胞数量的多少可以反映肺部炎症的水平,而 TGF- β 1 作为一个经典的促纤维化细胞因子与肺部的纤维化水平密切相关。由表 2 可知,与对照组比较, SiO₂ 组和 SiO₂ + agomir-NC 组小鼠 BALF 中总蛋白浓度、白细胞总数和 TGF- β 1 的含量均增加($P < 0.05$),而 SiO₂ + miR-200b agomir 组小鼠上述 3 项指标的含量均低于 SiO₂ 组($P < 0.05$)。

表2 各组小鼠 BALF 中总蛋白浓度、白细胞总数和 TGF- β 1 含量的比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	总蛋白浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	白细胞总数 ($\times 10^4/\text{ml}$)	TGF- β 1 含量 (pg/ml)
对照	220.487 ± 31.314	25.316 ± 13.421	45.825 ± 5.083
SiO ₂	427.651 ± 144.344*	80.266 ± 19.607*	123.223 ± 32.485*
SiO ₂ + agomir-NC	377.115 ± 75.553*	94.066 ± 71.619*	113.448 ± 35.106*
SiO ₂ + miR-200b agomir	252.141 ± 79.687#	38.031 ± 22.701	81.563 ± 9.564#
F 值	6.933	4.194	12.214
P 值	0.002	0.019	<0.000 1

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 SiO₂ 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

矽肺是一种由于吸入 SiO₂ 粉尘而引起的严重的职业性呼吸系统疾病,以肺部炎症和纤维化为主要特征。我国是矽肺患者最多的国家,每年因矽肺造成的直接经济损失超过 80 亿元人民币^[7]。然而,矽肺的发病机制目前尚不明确,临床上缺乏有效的治疗药物。因此,研究矽肺的发病机制,探索新的防治方法具有重要意义。miRNAs 是一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA,它可以与靶基因 mRNA 序列的 3'UTR 区域互补结合,抑制靶基因的翻译或降解其信使 RNA^[8]。已有研究^[9-10]证实多种 miRNAs 参与了矽肺纤维化,然而,有关 miR-200b 在矽肺纤维化中的作用及机制还不清楚。

本研究通过一次性气管滴注 SiO₂ 颗粒建立小鼠矽肺纤维化模型,病理染色结果显示, SiO₂ 组和 SiO₂ + agomir-NC 组小鼠肺组织均存在明显的炎症细胞浸润和胶原的沉积,而经 miR-200b agomir 干预可以缓解 SiO₂ 引起的病理变化。BALF 中总蛋白浓

度和白细胞总数是反映肺部炎症的重要指标,此研究表明 miR-200b agomir 干预可以降低以上指标的变化。上述结果均说明 miR-200b agomir 可以一定程度减轻小鼠肺部炎症反应,抑制肺部纤维化的发生发展。已有研究^[11]报道吸入 SiO₂ 可诱导大鼠双期肺反应,表明暴露于 SiO₂ 的大鼠存在“炎症”和“纤维化”阶段。在本研究中, SiO₂ 组小鼠肺组织存在明显的炎症细胞浸润而无明显的矽结节,可能是暴露于 SiO₂ 14 d 时小鼠仍处于炎症阶段,暴露时间较短,不足以形成明显的矽结节,在后续的实验应适当延长 SiO₂ 暴露时间。

随着肺组织纤维化病情的发展,会引发气体交换功能障碍和肺功能损伤^[12]。小鼠肺功能检测结果发现, SiO₂ + miR-200b agomir 组小鼠 f、PAU 和 Rpef 较 SiO₂ 组和 SiO₂ + agomir-NC 组均得到明显改善。另外,矽肺是一种复杂的慢性炎症过程,涉及多种细胞、细胞因子和多种介质。肺泡巨噬细胞是矽肺的主要免疫细胞,在矽肺的发生发展中起着至关重要的作用。多项研究^[13]表明,肺泡巨噬细胞可以通过清道夫受体以电荷依赖的方式识别并吞噬 SiO₂ 颗粒,从而增加炎性和纤维化介质的释放。在这些与纤维化相关的细胞因子中, TGF- β 1 起着关键作用,被认为是矽肺的起点。越来越多的证据^[14]表明, TGF- β 1 作为一种强大的促纤维化细胞因子,它可以通过诱导成纤维细胞合成细胞外基质,包括胶原、层粘连蛋白和纤维连接蛋白等。本研究中, SiO₂ 组和 SiO₂ + agomir-NC 组小鼠 BALF 中 TGF- β 1 的表达水平升高,但是给予 miR-200b agomir 干预后 TGF- β 1 的分泌降低,这提示 SiO₂ 暴露可以促进呼吸道和肺组织免疫细胞合成和释放 TGF- β 1,而当使用 miR-200b agomir 干预后,可以有效阻止该因子的合成,进而缓解矽肺纤维化。

综上所述,该研究表明 miR-200b 可以有效减缓矽肺小鼠肺功能的下降、抑制矽肺纤维化的发生发展,提示 miR-200b 可能是治疗矽肺纤维化的潜在靶点。该研究仅从靶向干预的角度阐述了 miR-200b 在实验性小鼠矽肺纤维化中的作用,然而其对矽肺进程的具体作用机制仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] Peng Z Y F, Duan M W, Tang Y T, et al. Impaired interferon- γ signaling promotes the development of silicosis [J]. iScience, 2022, 25(7): 104647.
- [2] 国家卫生健康委员会规划发展与信息化司. 2020 年我国卫生健康事业发展统计公报 [J]. 中国病毒病杂志, 2021, 11(5):

- 321–9.
- [3] Sundararajan V, Burk U C, Bajdak-Rusinek K. Revisiting the miR-200 family: a clan of five siblings with essential roles in development and disease[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(6): 781.
- [4] Yu S J, Zhao H R, Yang W J, et al. The alcohol extract of *Coreopsis tinctoria* nutt ameliorates diabetes and diabetic nephropathy in db/db mice through miR-192/miR-200b and PTEN/AKT and ZEB2/ECM pathways [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5280514.
- [5] Liao Y W, Yu C C, Hsieh P L, et al. miR-200b ameliorates myofibroblast transdifferentiation in precancerous oral submucous fibrosis through targeting ZEB2[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(9): 4130–8.
- [6] Zhao X D, Qin R H, Yang J J, et al. DNMT3A controls miR-200b in cardiac fibroblast autophagy and cardiac fibrosis[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(8): 681–90.
- [7] Li N N, Wu K, Feng F F, et al. Astragaloside IV alleviates silica-induced pulmonary fibrosis *via* inactivation of the TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(3): 16.
- [8] Sun J P, Li Q Y, Lian X M, et al. MicroRNA-29b mediates lung mesenchymal-epithelial transition and prevents lung fibrosis in the silicosis model[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 20–31.
- [9] Gao X M, Xu H, Xu D J, et al. MiR-411-3p alleviates Silica-induced pulmonary fibrosis by regulating Smad2/TGF- β signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 388(2): 111878.
- [10] Niu Z Y, Wang L, Qin X F, et al. Macrophage derived miR-7219-3p-containing exosomes mediate fibroblast trans-differentiation by targeting SPRY1 in silicosis[J]. *Toxicology*, 2022, 479: 153310.
- [11] Li Y Q, Jin F Y, Li T, et al. Minute cellular nodules as early lesions in rats with silica exposure *via* inhalation [J]. *Vet Sci*, 2022, 9(6): 251.
- [12] 张 静, 郭一铭, 李恩红, 等. 甘草甜素对小鼠矽肺纤维化的干预作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(1): 121–5.
- [13] Zhang Z Q, Tian H T, Liu H, et al. The role of macrophage-derived TGF- β 1 on SiO₂-induced pulmonary fibrosis: a review[J]. *Toxicol Ind Health*, 2021, 37(4): 240–50.
- [14] Shieh J M, Tsai Y J, Chi J C-Y, et al. TGF β mediates collagen production in human CRSsNP nasal mucosa-derived fibroblasts through Smad2/3-dependent pathway and CTGF induction and secretion[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10489–99.

Inhibitory effect of miR-200b on silicotic fibrosis in mice

Yuan Cuifang¹, Li Hang¹, Xiong Yulu¹, Guo Ziyue¹, Wang Fan¹, Chen Ruru¹,
Hao Xiaohui^{1,2}, Liu Heliang^{1,2}, Guo Lingli^{1,2}

(¹*School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210;*

²*Hebei Key Laboratory of Organ Fibrosis, Tangshan 063210)*

Abstract Objective To explore the inhibitory effect of microRNA-200b (miR-200b) on pulmonary fibrosis in silicotic mice. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, SiO₂ group, SiO₂ + agomir-NC group and SiO₂ + miR-200b agomir group, with 6 mice in each group. The mice in the SiO₂ group were instilled intratracheally with 50 μ l of saline containing 5 mg SiO₂ particles. miR-200b agomir and agomir-NC were delivered to mice in the SiO₂ + miR-200b agomir and SiO₂ + agomir-NC groups respectively by intratracheal instillation on day 1 and 7 after SiO₂ exposure. Animals were sacrificed after the lung function test on the 14th day. The pathological changes of lung tissues were observed by HE and Masson staining. Then the concentration of total proteins and the numbers of leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured. The content of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in BALF was detected by ELISA kit. **Results** Compared with the control group, inflammatory cell infiltration and collagen deposition were observed in the lungs tissues of the mice in the SiO₂ group and the SiO₂ + agomir-NC group, while these detrimental effects were weakened in the SiO₂ + miR-200b agomir group. In addition, compared with the control group, the frequency (f) was accelerated and the number of Pause (PAU) increased ($P < 0.05$), while the ratio rate of achieving peak expiratory flow (Rpef) decreased in the SiO₂ group and the SiO₂ + agomir-NC group ($P < 0.05$). After miR-200b agomir intervention, the lung function of silicotic mice was improved. Moreover, miR-200b agomir intervention could also effectively alleviate the increase in the concentrations of total protein, the numbers of total leukocytes and the secretion of TGF- β 1 in the BALF of mice induced by SiO₂ stimulation. **Conclusion** miR-200b can effectively ameliorate the lung function of silicotic mice and inhibit the progress of fibrosis.

Key words silicosis; miR-200b; fibrosis