

网络出版时间: 2021-7-28 15:51 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20210728.1032.053.html>

抑制 miR-128-3p 表达对油酸致大鼠肺损伤的保护作用研究

龙光文, 张 谦, 杨秀林, 吉春玲, 董裕康

摘要 目的 探讨抑制 miR-128-3p 表达对油酸致大鼠肺损伤的保护作用及可能机制。方法 随机将 100 只 SD 大鼠分成 5 组: 假手术组 (sham 组)、模型组 (Model 组)、antagomir NC 组 (NC 组)、miR-128-3p antagomir 组 (antagomir 组) 和 miR-128-3p antagomir + Nrf2 抑制剂 ML385 组 (antagomir + ML385 组), 每组 20 只。采用尾静脉注射油酸 (0.15 ml/kg) 的方法建立肺损伤大鼠模型, 术前 1 h 给予 miR-128-3p antagomir 或 ML385 进行干预。造模成功 24 h 后, 测定动脉血氧分压 (PaO₂)、氧合指数 (OI) 及肺组织湿/干重比 (W/D); 苏木精-伊红染色法 (HE) 观察肺组织病理学改变并评分; 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 含量; 比色法测定肺组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 和活性氧 (ROS) 水平; 反转录酶-聚合酶链锁反应 (RT-PCR) 检测肺组织中 miR-128-3p 表达水平以及 E2 相关因子 2 (Nrf2) 和血红素氧合酶-1 (HO-1) 的 mRNA 水平; 蛋白质印迹免疫 (Western blot) 检测肺组织中 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达水平; 荧光素酶报告基因实验验证 miR-128-3p 与 Nrf2 的靶向作用关系。结果 与 sham 组比较, Model 组大鼠肺组织损伤严重, 肺组织病理评分、W/D 值、BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量, 肺组织中 ROS 和 MDA 水平以及 miR-128-3p 表达水平增加 ($P < 0.01$), 而 PaO₂、OI 值和 SOD 活性以及 Nrf2、HO-1 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低 ($P < 0.01$); 与 Model 组比较, antagomir 组大鼠肺组织损伤程度得到明显改善, 肺组织病理评分、W/D 值、BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量, 肺组织中

ROS 和 MDA 水平以及 miR-128-3p 表达水平下降 ($P < 0.01$), 而 PaO₂、OI 值和 SOD 活性以及 Nrf2、HO-1 的 mRNA 和蛋白表达水平均上升 ($P < 0.01$), 而 NC 组大鼠以上各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 antagomir 组比较, antagomir + ML385 组大鼠以上各指标变化趋势又发生逆转 (均 $P < 0.01$)。荧光素酶报告基因实验证实, miR-128-3p 能靶向调控 Nrf2 的表达。结论 抑制 miR-128-3p 表达可显著减轻模型大鼠的肺损伤, 其作用机制可能与通过靶向调控 Nrf2 表达, 抑制肺组织炎症反应有关。

关键词 miR-128-3p; E2 相关因子 2; 油酸; 肺损伤

中图分类号 R 563.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)09-1451-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.09.020

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是一种非心源性因素诱发的急性肺水肿, 是以严重低氧血症、呼吸窘迫、肺顺应性下降为主要临床特征的肺部急性炎症性综合征^[1]。MicroRNA (miRNA) 是一类长度为 20~25 个核苷酸的非编码 RNA 分子, 主要参与调控细胞增殖、迁移及凋亡等过程。近些年的研究显示^[2-4], miRNA 可以作为 ARDS 诊断的生物标志物或治疗靶点。且 Huang et al^[5] 研究发现, miR-128-3p 在 ARDS 大鼠模型肺组织中高表达。提示, miR-128-3p 在 ARDS 疾病发生过程中可能起重要作用, 但其作用机制还有待进一步探讨。该研究拟通过尾静脉注射油酸的方法建立肺损伤大鼠模型, 探讨 miR-128-3p 在肺损伤大鼠肺组织中的表达变化及下调 miR-128-3p 表达对模型大鼠肺组织的保护作用及可能作用机制, 以期从基因层面为 ARDS 治疗提供理论依据及新的小分子靶点。

2021-03-10 接收

基金项目: 贵州省科技计划项目 (编号: 黔科合 LH 字 [2016] 7152、黔科合基础 [2017] 1101)

作者单位: 贵州省人民医院急诊内科, 贵阳 550002

作者简介: 龙光文, 男, 博士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: fxpx7833@163.com

female rats were 6 and 18 months, the spatial learning and memory ability was detected by Morris water maze (MWM), the level of hippocampal GSNOR was detected by Western blot. **Results** Compared with the 6-CON group, the 18-CON group had a longer average swim length in the water maze ($P < 0.01$), lower percentage of target quadrant swimming distance and hippocampal GSNOR level ($P < 0.01$), and the comparison between 18-LPS group and 18-CON group also showed the same results. **Conclusion** Exposure to inflammation in late pregnancy aggravates age-related changes of GSNOR levels in the hippocampus of mice, which may be related to spatial learning and memory impairment in old age.

Key words aging; pregnancy; lipopolysaccharide; cognition; mitochondria

1 材料与方法

1.1 材料 SPF级雄性SD大鼠100只,鼠龄6~7周,体质量(220 ± 10) g,由贵州医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证:SCXK(黔)2018-0001。油酸购自湖南长沙恒昌化工有限公司;miR-128-3p拮抗剂(antagomir)及其阴性对照(antagomir NC)购自广州锐博生物科技有限公司;Nrf2抑制剂ML385购自美国Selleck公司;丙二醛(malonaldehyde,MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所;组织活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司;逆转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;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)和白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;E2相关因子2(E2 related factor 2,Nrf2)、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)和磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase,GAPDH)抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物造模与分组 100只SD大鼠随机分成假手术组(sham组)、模型组(Model组)、antagomir NC组(NC组)、miR-128-3p antagomir组(antagomir组)和miR-128-3p antagomir + Nrf2抑制剂ML385组(antagomir + ML385组),每组20只。其中antagomir组和NC组在造模前1 h,采用微量注射器经颈部气管注射antagomir或antagomir NC(根据相关文献^[8]和预实验结果确定给予剂量为40 nmol/只),antagomir + ML385组在antagomir组的基础上给予30 mg/kg ML385^[9]腹腔注射,而sham组和Model组注射等量生理盐水。随后除sham组,其他各组大鼠均参考文献^[8]采用尾静脉注射油酸(0.15 ml/kg)的方法建立肺损伤模型。造模后若大鼠呼吸频次增加,动脉血氧合指数(oxygenation index,OI) < 200 mmHg,表明造模成功。造模成功24 h后处死大鼠,收集样本检测。

1.2.2 动脉血氧分压(partial pressure of oxygen, PaO₂)、OI测定 分离大鼠股动脉,取股动脉血1 ml,立即进行血气分析,记录PaO₂,根据吸入空气中的氧浓度分数(fraction of inspiration O₂,FiO₂)计算OI,

$OI = PaO_2 / FiO_2$ 。

1.2.3 肺组织湿/干重比值(W/D)计算 取大鼠右肺中叶组织,滤纸吸干表面水分,称湿重(W),将肺组织置于80℃烘箱72 h至恒重,称其干重(D),计算肺组织W/D。

1.2.4 ELISA检测肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的含量 实验结束后结扎各组大鼠右主支气管,用4℃预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)灌洗支气管肺泡,反复灌洗3次并收集BALF,采用ELISA法检测BALF中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量,按照试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的光密度(optical density,OD)值,根据标准曲线计算各指标含量。

1.2.5 比色法测定肺组织中SOD活性及MDA和ROS水平 收集各组大鼠左肺部分组织,根据RIPA裂解液使用说明书制备肺组织匀浆,用玻璃匀浆器上下、旋转充分碾磨,在冰上充分裂解后于12 000 r/min离心20 min取上清液,按照试剂盒操作说明书加入相应试剂,孵育后测各样品吸光度值,根据说明书提供的计算公式分别计算肺组织中SOD活性及MDA和ROS水平。

1.2.6 苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining,HE)观察肺组织病理变化及评分 取大鼠右肺下叶,10%甲醛固定,冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋后切片,HE染色,光镜下观察病理学结果,并对肺损伤程度进行评分^[8]:从肺泡水肿、肺间质水肿、中性粒细胞浸润、肺泡充血4个方面,损伤程度由轻到重依次标记为0、1、2、3、4分,累计总分为最终损伤评分。

1.2.7 反转录酶-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)检测肺组织中miR-128-3p表达水平以及Nrf2和HO-1的mRNA水平 取各组大鼠的适量左肺组织,采用TRIzol法提取各样本的总RNA,紫外分光光度计测定总RNA浓度,取总RNA 2 μ g按照逆转录试剂盒提供的方法合成cDNA,引物序列见表1。取10 μ l逆转录产物进行PCR反应,反应条件:95℃预变性3 min,95℃变性30 s,60℃退火15 s,72℃延伸45 s,共40个循环。以U6和GAPDH为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算各基因mRNA相对表达量。

1.2.8 Western blot检测肺组织中Nrf2和HO-1的蛋白表达水平 收集各组大鼠部分左肺组织用于蛋白质提取,采用BCA法测定肺组织中蛋白浓度。

表1 引物序列

基因	引物序列
miR-128-3p	F: 5'-GGTCACAGTGAACCGGTC-3' R: 5'-GTGCAGGTCGCCAGGT-3'
Nrf2	F: 5'-GGTTGCCACATTCCTCAATC-3' R: 5'-CAAGTGAAGTGAACCTAGCCG-3'
HO-1	F: 5'-TTCAAGCAGCTCTACCGCTC-3' R: 5'-GAACGAGCTCTTGGCCTCTT-3'
U6	F: 5'-CCTGCTTCGGCAGCACA-3' R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
GAPDH	F: 5'-CCTCGTCTCATAGACAAGATGCT-3' R: 5'-GGGTAGATCATACTGGAACATG-3'

向 SDS-PAGE 通道中加入等体积蛋白质,并将蛋白质转移到 PVDF 膜上,随后 5% 脱脂牛奶封闭。PBS 洗涤 3 次,加入一抗 Nrf2、HO-1 和 GAPDH 一起孵育过夜,PBS 洗涤后,将膜进一步与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗一起孵育,通过增强的化学发光法使膜上的条带可视化。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行灰度分析,以 GAPDH 为内参计算各蛋白相对表达量。

1.2.9 荧光素酶报告实验检测 miR-128-3p 与 Nrf2 的靶向作用关系 利用 TargetScan 软件预测 miR-128-3p 和 Nrf2 mRNA 上的结合位点,构建 miR-128-3p 结合位点的 Nrf2 野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 荧光素酶报告基因质粒,分别与 miR-128-3p mimic 或 miR-NC 共转染至 293T 细胞中。转染 48 h 后,根据双荧光素酶报告基因试剂盒说明进行测定,用萤火虫荧光素酶活性和肾荧光素酶活性比值表示荧光素酶的相对活性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 版统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 miR-128-3p 表达对各组大鼠动脉 PaO₂、OI 以及肺组织 W/D 值的影响 与 sham 组比较, Model 组大鼠肺组织 W/D 值增加, PaO₂ 和 OI 值降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 Model 组比较, antagomir 组大鼠肺组织 W/D 值降低, PaO₂ 和 OI 值增加,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 antagomir 组比较, antagomir + ML385 组大鼠肺组织 W/D 值增加, 而 PaO₂ 和 OI 值降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

表2 各组大鼠动脉 PaO₂、OI 以及肺组织 W/D 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PaO ₂ (mmHg)	OI (mmHg)	W/D
sham	92 ± 5.33	465 ± 23	4.14 ± 0.11
Model	54 ± 2.07 **	174 ± 12 **	5.23 ± 0.25 **
NC	60 ± 2.59	188 ± 15	5.17 ± 0.16
antagomir	88 ± 4.81 ##	387 ± 17 ##	4.69 ± 0.18 ##
antagomir + ML385	63 ± 3.18 **	294 ± 11 **	5.07 ± 0.04 **
F 值	73.322	40.594	112.405
P 值	0.000	0.000	0.000

与 sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$; 与 antagomir 组比较: ** $P < 0.01$

2.2 抑制 miR-128-3p 表达对各组大鼠肺组织中 miR-128-3p 表达水平的影响 与 sham 组比较, Model 组大鼠肺组织中 miR-128-3p 表达水平上升,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 Model 组比较, antagomir 组大鼠肺组织中 miR-128-3p 表达水平降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 antagomir 组比较, antagomir + ML385 组大鼠肺组织中 miR-128-3p 表达水平无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。

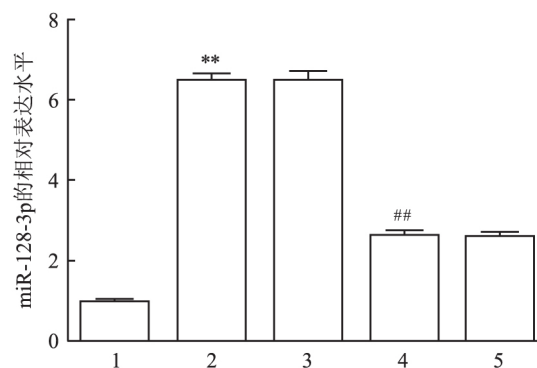


图1 各组大鼠肺组织中 miR-128-3p 表达水平比较

1: sham 组; 2: Model 组; 3: NC 组; 4: antagomir 组; 5: antagomir + ML385 组; 与 sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$

2.3 抑制 miR-128-3p 表达对各组大鼠 BALF 中相关因子含量的影响 与 sham 组比较, Model 组大鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量上升,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 Model 组比较, antagomir 组大鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 antagomir 组比较, antagomir + ML385 组大鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量上升,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 3。

表3 各组大鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
sham	40.41 $\pm$ 5.57	50.10 $\pm$ 5.41	35.03 $\pm$ 2.70
Model	107.06 $\pm$ 7.55 **	126.32 $\pm$ 3.22 **	161.87 $\pm$ 6.99 **
NC	110.06 $\pm$ 7.94	127.34 $\pm$ 6.03	162.60 $\pm$ 4.64
antagomir	66.33 $\pm$ 7.71 ##	87.10 $\pm$ 8.16 ##	58.17 $\pm$ 3.88 ##
antagomir + ML385	95.34 $\pm$ 5.75 **	105.42 $\pm$ 5.39 **	104.10 $\pm$ 5.85 **
F 值	65.411	230.945	312.700
P 值	0.000	0.000	0.000

与 sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$; 与 antagomir 组比较: ** $P < 0.01$

2.4 抑制 miR-128-3p 表达对各组大鼠肺组织中氧化应激水平的影响 与 sham 组比较, Model 组大鼠肺组织中 MDA 和 ROS 水平上升, SOD 活性下降, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与 Model 组比较, antagomir 组大鼠肺组织中 MDA 和 ROS 水平下降, SOD 活性上升, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 而 NC 组差异无统计学意义($P > 0.05$); 与 antagomir 组比较, antagomir + ML385 组大鼠肺组织中 MDA 和 ROS 水平上升, SOD 活性下降($P < 0.01$), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 4。

表4 各组大鼠肺组织中 SOD、MDA 和 ROS 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)	ROS 水平
sham	48.33 $\pm$ 3.21	1.77 $\pm$ 0.21	1.00 $\pm$ 0.02
Model	16.34 $\pm$ 4.09 **	5.45 $\pm$ 0.25 **	5.30 $\pm$ 0.17 **
NC	17.10 $\pm$ 0.85	5.60 $\pm$ 0.20	5.51 $\pm$ 0.10
antagomir	34.15 $\pm$ 2.02 ##	2.17 $\pm$ 0.21 ##	2.10 $\pm$ 0.20 ##
antagomir + ML385	27.15 $\pm$ 1.03 **	3.03 $\pm$ 0.25 **	3.43 $\pm$ 0.15 **
F 值	79.402	51.225	66.778
P 值	0.000	0.000	0.000

与 sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$; 与 antagomir 组比较: ** $P < 0.01$

2.5 抑制 miR-128-3p 表达对各组大鼠肺组织病理学的影响 sham 组大鼠肺组织结构完整, 未见明显异常; Model 组、NC 组和 antagomir + ML385 组大鼠肺组织损伤严重, 表现为间质水肿, 肺泡萎陷、肺泡壁增大甚至出血, 有肺透明膜形成; antagomir 组大鼠肺组织结构相对完整, 肺泡和间质肿胀程度明显减轻, 较少炎症细胞出现, 肺泡出血不明显。与 sham 组比较, Model 组大鼠肺损伤评分增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与 Model 组比较, antagomir 组大鼠肺损伤评分降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 而 NC 组差异无统计学意义($P > 0.05$); 与 antagomir 组比较, antagomir + ML385 组大鼠肺损伤

评分增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。

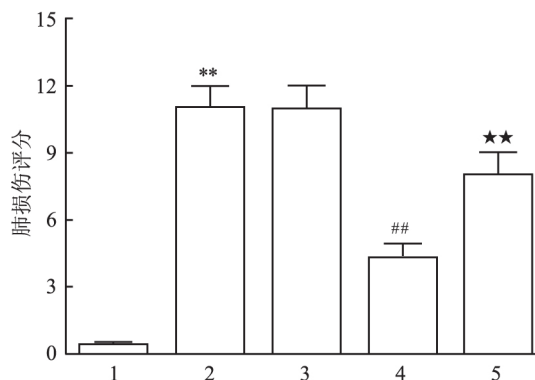
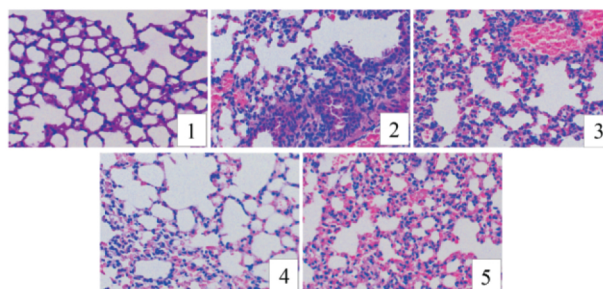


图2 各组大鼠肺组织病理学观察 HE $\times 200$

1: sham 组; 2: Model 组; 3: NC 组; 4: antagomir 组; 5: antagomir + ML385 组; 与 sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$; 与 antagomir 组比较: ** $P < 0.01$

2.6 抑制 miR-128-3p 表达对各组大鼠肺组织中 Nrf2 和 HO-1 表达水平的影响 与 sham 组比较, Model 组大鼠肺组织中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 及蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与 Model 组比较, antagomir 组大鼠肺组织中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 及蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 而 NC 组差异无统计学意义($P > 0.05$); 与 antagomir 组比较, antagomir + ML385 组大鼠肺组织中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 及蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 3。

2.7 miR-128-3p 与 Nrf2 的靶向作用关系 如图 4A 的 miRNAs 靶基因预测软件(TargetScan)分析结果显示, miR-128-3p 在 Nrf2 基因 3'-UTR 区域存在靶向结合位点。如图 4B 的荧光素酶报告基因实验结果进一步证实, miR-128-3p 显著降低野生型 Nrf2 荧光素酶活性($P < 0.01$), 而对突变型 Nrf2 荧光素酶活性无影响($P > 0.05$)。表明 miR-128-3p 与 Nrf2 确实存在靶向作用关系。

3 讨论

ARDS 是威胁着人类健康的肺部急性炎症性综

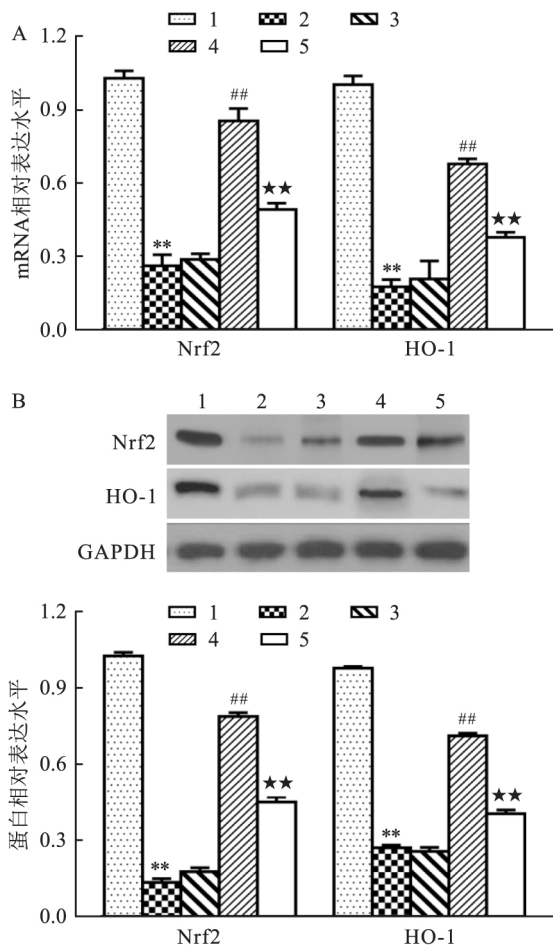


图3 各组大鼠肺组织中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 及蛋白表达水平比较

A: RT-PCR 检测基因 mRNA 水平; B: Western blot 检测基因蛋白表达水平; 1: sham 组; 2: Model 组; 3: NC 组; 4: antagomir 组; 5: antagomir + ML385 组; 与 sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$; 与 antagomir 组比较: ** $P < 0.01$

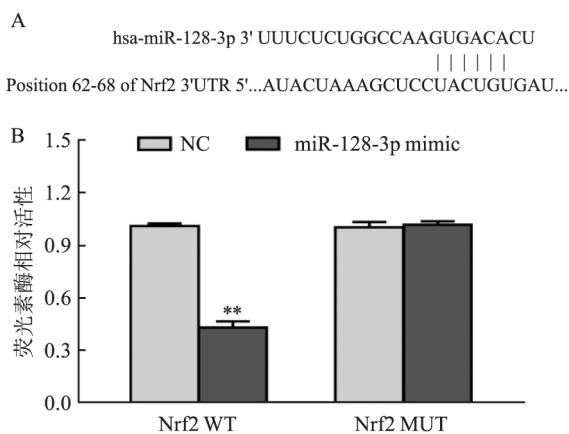


图4 miR-128-3p 与 Nrf2 的靶向关系

A: TargetScan 预测 miR-128-3p 在 Nrf2 3'-UTR 区域的靶向结合位点; B: 双荧光素酶实验证实 miR-128-3p 和 Nrf2 的结合关系; 与 NC 组比较: ** $P < 0.01$

合征,目前无特异性和有效的治疗方法,miRNAs 的发现,将成为 ARDS 潜在的诊断新指标和治疗新靶点^[4]。近些年来,不少学者用不同的 ARDS 动物模型筛选出了有表达差异的 miRNAs,来探索 miRNAs 对 ARDS 的调控作用。Huang et al^[5] 通过高潮气量机械通气法建立大鼠 ARDS 模型,发现 miR-24 和 miR-26a 等表达下调,而 miR-128-3p、miR-127 和 miR-135b 等表达显著上调,暗示它们在 ARDS 的发病过程中可能有重要的调节作用。miR-128-3p 在多种组织中表达,但其功能研究相对较少,有研究报道^[11-12] miR-128-3p 具有调控脂肪生成和脂肪分解、保护心肌细胞、保护神经、抑制炎症反应和抗肿瘤等多种生理作用,但 miR-128-3p 在 ARDS 中的作用及机制尚不明确。本研究通过构建肺损伤大鼠模型,经颈部气管注射 miR-128-3p 抑制剂来探讨 miR-128-3p 对大鼠肺组织的保护作用及可能作用机制,研究结果显示,miR-128-3p 在模型大鼠肺组织中高表达,抑制 miR-128-3p 表达可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,增强机体抗氧化能力,从而改善模型大鼠肺损伤。

本研究通过尾静脉注射油酸(0.15 ml/kg)的方法建立肺损伤大鼠模型,结果显示,模型大鼠动脉 OI < 200 mmHg,同时肺 W/D 比值较 Sham 组升高,肺组织 HE 染色结果显示肺部结构明显损伤、肺泡腔萎陷、出血,肺泡壁明显增厚,有大量红细胞渗出,与前人研究结果一致^[3],提示模型制备成功。进一步通过 RT-PCR 检测大鼠肺组织中 miR-128-3p 表达,发现模型大鼠肺组织中 miR-128-3p 表达水平明显升高,提示 miR-128-3p 在 ARDS 可能发挥着重要作用。为进一步验证其具体作用,本研究通过颈部气管注射的方式给模型大鼠注射 miR-128-3p 抑制剂 miR-128-3p antagomir,结果显示模型大鼠肺组织 miR-128-3p 表达水平下调,同时肺组织病理性改变明显减轻,肺 W/D 比值降低,提示抑制 miR-128-3p 表达可缓解模型大鼠肺组织损伤。

ARDS 的主要发病机制之一就是各种病因诱发的肺内或全身过度炎症反应,肺内炎症反应会造成内皮细胞和上皮细胞损伤,导致肺泡毛细血管通透性增高,从而使肺组织换气功能恶化引起低氧血症,导致严重肺水肿,引起蛋白渗出导致肺透明膜形成^[4]。TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等细胞炎症因子整体水平变化而导致肺内皮、上皮屏障损伤是 ARDS 的主要特征之一,这些炎症因子可反映机体的免疫情

况,作为反映肺组织损伤严重程度的指标^[3]。近年来研究发现^[4],增强抗氧化能力,抑制氧化应激是干预 ARDS 的重要的策略之一。SOD、MDA 和 ROS 是氧化应激损伤的标志物,其含量可反映机体清除氧自由基的能力。本研究对各组大鼠 BALF 中炎症因子含量以及肺组织中的氧化应激水平进行了检测,研究结果显示:与 Sham 组比较,Model 组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量以及 ROS 和 MDA 水平增加,SOD 活性下降,说明机体内的氧化与抗氧化平衡被打破,产生氧化应激损伤,与冯敏等^[5]研究结果一致。抑制 miR-128-3p 表达可显著降低 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量,以及 ROS 和 MDA 水平,增加 SOD 活性,提示抑制 miR-128-3p 表达可通过降低肺部炎症反应,减轻机体氧化应激损伤来改善模型大鼠肺损伤。

Nrf2/HO-1 信号通路是细胞内经典的抗氧化应激通路,其激活可降低氧化应激损害起到保护细胞的作用。进一步探究抑制 miR-128-3p 表达可增强肺损伤大鼠抗氧化能力的具体作用机制,本研究对各组大鼠肺组织中 Nrf2 和 HO-1 的表达水平进行了检测,研究结果显示:与 Sham 组比较,Model 组大鼠肺组织中 Nrf2 和 HO-1 的表达水平降低,抑制 miR-128-3p 表达可增加 Nrf2 和 HO-1 在肺组织中的表达水平,进一步在抑制 miR-128-3p 表达的基础上对模型鼠腹腔注射 Nrf2 抑制剂 ML385,发现 Nrf2 和 HO-1 的表达水平又随之下降。而通过生物信息预测发现,miR-128-3p 基因序列上存在 Nrf2 的结合位点,进一步通过荧光素酶报告实验确定了 miR-128-3p 能靶向调控 Nrf2 的表达。说明抑制 miR-128-3p 表达确可通过促进模型大鼠肺组织中 Nrf2/HO-1 信号通路的激活,增强其抗氧化能力,从而减轻大鼠肺损伤。

综上所述,抑制 miR-128-3p 表达可显著减轻大鼠的肺损伤,其作用机制可能与通过靶向调控 Nrf2 表达,促进 Nrf2/HO-1 信号通路激活,抑制肺组织炎症反应有关,该研究结果可为 ARDS 临床治疗药物的研发提供实验依据。

参考文献

- [1] Silva P L, Pelosi P, Rocco P R M. Personalized pharmacological therapy for ARDS: a light at the end of the tunnel [J]. Expert

- Opin Investig Drugs, 2020, 29(1):49-61.
- [2] Rajasekaran S, Pattarayan D, Rajaguru P, et al. MicroRNA regulation of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. J Cell Physiol, 2016, 231(10):2097-106.
- [3] Shikano S, Gon Y, Maruoka S, et al. Increased extracellular vesicle miRNA-466 family in the bronchoalveolar lavage fluid as a precipitating factor of ARDS [J]. BMC Pulm Med, 2019, 19(1):110-9.
- [4] 蒲清璐, 刘国跃, 王洪亮, 等. MicroRNAs 与急性呼吸窘迫综合征关系的研究进展 [J]. 遵义医学院学报, 2016, 39(5):535-46.
- [5] Huang C, Xiao X, Chintagari N R, et al. MicroRNA and mRNA expression profiling in rat acute respiratory distress syndrome [J]. BMC Med Genomics, 2014, 7(2):46-55.
- [6] 刘理静, 钱红, 胡柯, 等. miR-27a-3p 通过阻断 Wnt3a/ β -catenin 途径抑制大鼠肺纤维化 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(11):1015-20.
- [7] 邱彦橙, 王志龙, 张智慧, 等. 白藜芦醇通过调控 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路抑制大鼠肾草酸钙结石的形成 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(1):70-4.
- [8] 冯敏, 刘刚, 徐大千. 盐酸纳洛酮对急性呼吸窘迫综合征大鼠 β -内啡肽及 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. 东南大学学报(医学版), 2018, 37(5):824-8.
- [9] 林新, 徐礼裕, 李小华, 等. 微 RNA-146a 对机械通气大鼠肺损伤 TLR4 炎症信号通路的影响及机制 [J]. 中华医学杂志, 2018, 98(34):2749-53.
- [10] 龙春艺, 黄霞, 廖品琥. MicroRNA 在急性呼吸窘迫综合征中的作用 [J]. 右江医学, 2019, 47(1):7-10.
- [11] Chen C, Deng Y, Hu X, et al. miR-128-3p regulates 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis by targeting Pparg and Sertad2 [J]. J Physiol Biochem, 2018, 74(3):381-93.
- [12] Zhao J, Li D, Fang L. MiR-128-3p suppresses breast cancer cellular progression via targeting LIMK1 [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 22(2):234-45.
- [13] Gao W, Ju Y N. Budesonide attenuates ventilator-induced lung injury in a rat model of inflammatory acute respiratory distress syndrome [J]. Arch Med Res, 2016, 7(4):275-84.
- [14] Huang L, Zhang X, Ma X, et al. Berberine alleviates endothelial glycocalyx degradation and promotes glycocalyx restoration in LPS-induced ARDS [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 65(4):96-107.
- [15] 凌亚豪, 魏金锋, 王爱平, 等. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征发病机制的研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2017, 29(2):151-4.
- [16] 王贵佐, 韩冬, 马惠辉, 等. 二甲双胍对小鼠急性肺损伤的保护作用及可能机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(8):919-22.

Protective effect of inhibition of miR-128-3p expression on oleic acid-induced lung injury in rats

Long Guangwen, Zhang Qian, Yang Xiulin, et al

(Dept of Emergency Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002)

Abstract Objective To investigate the protective effect and possible mechanism of inhibiting miR-128-3p expression on oleic acid-induced lung injury in rats. **Methods** One hundred SD rats were randomly divided into five groups: sham operation group (sham), Model group (Model), antagomir NC group (NC), miR-128-3p antagomir group (antagomir) and miR-128-3p antagomir + ML385 group (antagomir + ML385), with 20 rats in each group. ARDS rat model was established by injecting oleic acid (0.15 ml/kg) into tail vein. miR-128-3p antagomir or ML385 were given for intervention 1 h before surgery. After 24 h of successful modeling, arterial blood oxygen partial pressure (PaO_2), oxygenation index (OI) and lung tissue wet/dry weight ratio (W/D) were measured. Lung histopathological changes were observed and scored by hematoxylin-eosin (HE) staining. The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) levels in lung tissue were determined by colorimetric method. The expression levels of miR-128-3p and mRNA levels of Nrf2 and HO-1 in lung tissues were detected by RT-PCR, and the protein expression levels of E2 related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in lung tissues were detected by Western blot. Luciferase reporting experiments verified the targeting relationship between miR-128-3p and Nrf2. **Results** Compared with the sham group, the lung tissues of the Model group were seriously damaged, and the lung pathological scores, W/D values, TNF- α , IL-1 β and IL-6 contents in BALF, ROS and MDA levels and miR-128-3p expression levels in the lung tissues increased ($P < 0.01$). However, the values of PaO_2 , OI, SOD activity, mRNA and protein expression levels of Nrf2 and HO-1 reduced ($P < 0.01$). Compared with the Model group, the degree of lung tissue injury in antagomir group improved, the lung pathological scores, W/D values, TNF- α , IL-1 β and IL-6 contents in BALF, ROS and MDA levels and miR-128-3p expression levels in the lung tissues decreased ($P < 0.01$). However, the values of PaO_2 , OI, SOD activity, mRNA and protein expression levels of Nrf2 and HO-1 were induced ($P < 0.01$), there was no significant difference in antagomir NC group ($P > 0.05$). Compared with the antagomir group, the variation trend of antagomir + ML385 group was reversed ($P < 0.01$). Luciferase reporting experiments confirmed that miR-128-3p could target and regulate Nrf2 expression. **Conclusion** Inhibition of miR-128-3p expression can reduce lung injury in rats, and its mechanism may be related to the inhibition of inflammation in lung tissues through targeted regulation of Nrf2 expression.

Key words miR-128-3p; E2 related factor 2; oleic acid; lung injury