

网络出版时间: 2021-7-28 11:54 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1031.039.html>

miR-181a 通过调控 Smad7 对 COPD 大鼠气道重塑的作用研究

王雅杰, 王 嘉, 岳洪娟, 窦亚平, 李 娜

摘要 目的 探讨微小 RNA-181a(miR-181a)对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠肺组织中气道重塑的作用及其可能的机制。方法 80 只大鼠随机取 65 只建立 COPD 模型,建模成功 56 只,随机分为模型组、mimics 组、inhibitors 组、NC 组各 14 只,剩余 15 只为假手术组。建模 2 h 后,mimics 组、inhibitors 组和 NC 组分别尾静脉注射 miR-181a mimics、miR-181a inhibitors 和 control mimics,假手术组和模型组注射生理盐水。干预 24 h 后取材,RT-qPCR 检测肺组织 miR-181a、母亲信号蛋白同源物 7(Smad7) mRNA 相对表达水平,ELISA 法检测肺组织匀浆白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,荧光素酶报告基因分析 miR-181a 对 Smad7 的靶向性,HE 染色观察大鼠肺组织病理学变化,测量支气管壁及支气管壁胶原纤维厚度,Western blot 检测肺组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、Smad7、p-Smad7 蛋白相对表达水平。结果 与假手术组比较,模型组、NC 组和 inhibitors 组肺组织 miR-181a 相对表达水平降低,mimics 组肺组织 miR-181a 相对表达水平升高,且 mimics 组 > 模型组和 NC 组 > inhibitors 组($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组、NC 组、mimics 组、inhibitors 组肺组织匀浆 IL-1 β 、TNF- α 水平升高,且 mimics 组 > 模型组和 NC 组 > mimics 组($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因分析系统结果显示,miR-181a 可显著抑制野生型 Smad7 相对荧光素酶活性($P < 0.05$),而对突变型 Smad7 相对荧光素酶活性无显著影响($P > 0.05$)。HE 染色显示,假手术组大鼠肺泡细胞正常,模型组、NC 组和 inhibitors 组大鼠肺实质破坏,有炎症细胞浸润和胶原纤维形成。mimics 组肺泡细胞趋于正常,炎症减轻,胶原纤维减少,肺泡结构紊乱明显好转。与假手术组比较,模型组、NC 组、mimics 组、inhibitors 组支气管壁和支气管壁胶原纤维厚度增加,且 inhibitors 组 > 模型组和 NC 组 > mimics 组($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组、NC 组、mimics 组和 inhibitors 组肺组织 TGF- β 1、MMP-9 蛋白相对表达水平升高,p-Smad7 蛋白相对表达水平降低,且 TGF- β 1、MMP-9 蛋白相对表达水平 inhibitors 组 > 模型组和 NC 组 > mimics 组,p-Smad7 蛋白相对表达 mimics 组 > 模型组和 NC 组 > inhibitors 组($P < 0.05$)。模型组和 NC 组之间的肺组织 miR-181a 相对表达水平,IL-1 β 、TNF- α 水平,支气管壁

和支气管壁胶原纤维厚度,MMP-9、p-Smad7、TGF- β 1 蛋白相对表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 miR-181a 对 COPD 模型大鼠肺组织中气道重塑有改善作用,可能通过靶向调控 Smad7 表达发挥作用。

关键词 微小 RNA-181a; 慢性阻塞性肺疾病; 气道重塑; Smad7

中图分类号 R 563

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)09-1379-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.09.007

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)是常见的慢性呼吸系统疾病,发病率高、致死率高,严重威胁人类健康^[1]。微小 RNA(microRNA,miRNA)是一类小分子非编码单链 RNA,其异常表达与多种疾病密切相关^[2]。研究^[3-5]发现 COPD 患者肺组织多种 miRNA 上调,可能影响缺氧诱导因子-1 α 相关的肺结构修复程序,与 COPD 发病机制有关。母亲信号蛋白同源物(mothers against decapentaplegic homolog,Smad)蛋白家族是转化生长因子 β 家族(transforming growth factor- β s,TGF- β s)的重要底物,分为受体激活型、通用型和抑制型三种,Smad7 是抑制型 Smad,可以选择性抑制 TGF- β s 信号通路。研究^[6]发现 COPD 患者肺组织 Smad7 表达下调,且与气道壁厚度、气道平滑肌厚度呈负相关。miR-181a 在 COPD 中是否通过调控 Smad7 发挥作用,尚不清楚,该研究通过建立 COPD 大鼠模型,探讨 miR-181a 是否通过调控 Smad7 对 COPD 大鼠气道重塑发挥作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 SD 雄性大鼠 80 只,8 周龄,体质量 200~250 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005。大鼠购入后于清洁通风环境中适应性饲养 7 d,温度 20~26℃,湿度 40%~60%,明暗周期 12 h/12 h 循环。

1.1.2 主要试剂与仪器 miR-181a mimics、miR-181a inhibitors、control mimics(广州市锐博生物科技

2021-02-26 接收

基金项目:河北省卫健委医学科学研究项目(编号:20190042)

作者单位:河北医科大学第一医院呼吸与危重症医学科,石家庄 050000

作者简介:王雅杰,女,副主任医师,责任作者,E-mail: chu895litao@163.com

有限公司), 脂多糖(北京索莱宝公司, 批号: 224R032), 大前门牌香烟(上海烟草公司), 兔抗大鼠基质金属蛋白酶-9(matrix metallo proteinase, MMP-9)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 单克隆抗体、兔抗大鼠 Smad7、p-Smad7 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(美国 Abcam 公司), ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司), SA-ALC-V8S 小动物呼吸机(北京中西华大科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 建模与分组 80 只大鼠随机取 65 只参考黄文锋等^[5]的方法建立 COPD 大鼠模型, 分别于第 1、15 天气管内注入 200 μ l 脂多糖溶液(1 g/L), 并且于第 2~28 天(除第 15 天)将大鼠置于留有两个通气孔的 72 L 玻璃箱中被动吸烟, 每次 30 min, 每天 2 次, 间隔 8 h, 每天 12 支烟。4 周后, 所有大鼠腹腔注射 30 mg/kg 的 3% 戊巴比妥钠麻醉后, 固定头部及四肢, 正中切开气管、插管, 然后将大鼠仰卧于小动物呼吸机支撑板上, 气管插管与体描箱气路相连, 气道压力曲线显示正常后, 关闭体描箱, 测量气体压力变化, 间接获取肺容积变化, 计算机处理后得到肺功能指标, 计算第一秒用力呼气量(forced expiratory volume, FEV) 占用力肺活量(forced vital capacity, FVC) 的比值, FEV/FVC < 70% 即为建模成功。将建模成功的 56 只大鼠随机分为模型组、mimics 组、inhibitors 组、NC 组, 各 14 只, 剩余 15 只大鼠为假手术组。本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2.2 干预方法 建模 2 h 后进行干预, mimics 组尾静脉注射 miR-181a mimics, inhibitors 组尾静脉注射 miR-181a inhibitors, NC 组尾静脉注射 control mimics, 注射速度 1 μ l/min, 共注射 10 μ l。假手术组、模型组尾静脉注射 10 μ l 生理盐水。

1.2.3 组织取材 干预 24 h 后, 所有大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg) 麻醉, 腹主动脉穿刺放血后处死, 开胸暴露双肺, 分离左肺和右肺组织。各组取 7 只大鼠右肺组织, 10% 甲醛固定液内清洗并浸泡 30 min, 放进 40% 甲醛溶液中固定备用。其余右肺剪取前叶、中叶及后叶, 用无菌纱布蘸去表面的血迹, 加入生理盐水用匀浆器制备肺组织匀浆, 3 000 r/min, 离心半径 8 cm, 离心 15 min, 留取上清液 -20 $^{\circ}$ C 保存。所有左肺剔除肺外组织, 液氮速冻后 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 RT-qPCR 检测肺组织 miR-181a、Smad7 mRNA

相对表达水平 取 -80 $^{\circ}$ C 保存的左肺组织 100 mg, 冰上研磨, TRIzol 法提取总 RNA, 检测 RNA 的浓度和纯度, 按照反转录试剂盒说明书反转录为 cDNA, 进行荧光定量 PCR, 反应体系包括模板 cDNA 2 μ l, 上下游引物各 1.5 μ l, Taq DNA 聚合酶 7.5 μ l, 加双蒸水至总体积 15 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 70 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 共 45 个循环, 分别以 U6 和 GAPDH 为内参基因, 依据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物由擎科生物技术有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列
miR-181a	F: 5'-TCACTCCGTTCTCTCCCG-3' R: 5'-CGTGCAGGAGTCCGAGGT-3'
U6	F: 5'-AGCATGCTAGCTAGCGTGAATGA-3' R: 5'-GTAGCGCTAGATGCATGCCATCA-3'
Smad7	F: 5'-ATGTGATCTATGCCGTCTC-3' R: 5'-ACAACGATGGCTGTCCGCT-3'
GAPDH	F: 5'-AGACAGCGAGCATCTTCTTGT-3' R: 5'-TGATGGCAACGAATGTCCACT-3'

1.2.5 各组肺组织匀浆 IL-1 β 、TNF- α 水平检测

取 -20 $^{\circ}$ C 保存的肺组织匀浆上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书加样, 用全自动酶标仪测定 450 nm 处的吸光值, 通过绘制标准曲线得出 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度。

1.2.6 荧光素酶报告系统检测 miR-181a 对 Smad7 的靶向性 首先使用靶基因预测数据库 TargetScan, miRanda 和 PicTar 预测 miRNA-181a 的靶基因, 结合文献研究、基因序列及功能挑选预测值较高的靶点(即 Smad7) 进行验证。构建野生型及突变型 Smad7 基因 3'-UTR-荧光素酶表达载体, 接种支气管上皮细胞于 24 孔板中, 待细胞培养至融合度约为 60%, 用 Lipofectamine 2000 将野生型或突变型质粒分别与 miRNA-181a mimics(miRNA-181a mimics 组) 和 miR-181a inhibitors(miR-181a inhibitors 组) 共转染到细胞内, 常规培养 48 h, 细胞裂解液裂解后, 4 $^{\circ}$ C, 3 600 r/min 离心 10 min 收集上清液, 检测相对荧光素酶活性。

1.2.7 HE 染色观察大鼠肺组织病理学变化 取 10% 甲醛溶液中固定的右肺组织, 在最大横径处切 2 mm 厚的组织块, 常规脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切成 5 μ m 厚的切片, 做苏木精-伊红(HE) 染色, 封片, 置于显微镜下拍照, 用图像分析软件测量

支气管壁厚度及支气管壁胶原纤维厚度。

1.2.8 Western blot 检测肺组织 TGF- β 1、Smad7、p-Smad7、MMP-9 蛋白相对表达水平 取 -80 °C 保存的左肺组织 100 mg, 加入蛋白提取裂解液, 冰上裂解, 离心取上清液用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量, 100 °C 水浴使蛋白变性, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 1 h, 洗膜, 加入 1 : 1 000 稀释的 TGF- β 1、Smad7、p-Smad7、MMP-9 一抗, 4 °C 孵育过夜, 洗膜后加入 1 : 4 000 辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜后加入 ECL 发光液显影, 采用 Image J 软件分析图像, 以 β -actin 为内参, TGF- β 1、Smad7、p-Smad7、MMP-9 相对表达量以各蛋白条带灰度值/ β -actin 蛋白条带灰度值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计学软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本计量资料比较采用单因素方差分析, 两两样本比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织 miR-181a、Smad7 mRNA 相对表达水平 肺组织 miR-181a mRNA 相对表达水平组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组、NC 组和 inhibitors 组 miR-181a mRNA 相对表达水平降低, mimics 组 miR-181a mRNA 相对表达水平升高 ($P < 0.05$) ; 与模型组和 NC 组比较, mimics 组 miR-181a mRNA 相对表达水平升高, inhibitors 组 miR-181a mRNA 相对表达水平降低 ($P < 0.05$) ; 与 mimics 组比较, inhibitors 组 miR-181a mRNA 相对表达水平降低 ($P < 0.05$) ; 模型组和 NC 组 miR-181a mRNA 相对表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。肺组织 Smad7 mRNA 相对表达水平组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 肺组织 miR-181a、Smad7 mRNA 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	miR-181a	Smad7
假手术	0.89 $\pm$ 0.10	1.02 $\pm$ 0.11
模型	0.54 $\pm$ 0.07*	1.03 $\pm$ 0.10
NC	0.56 $\pm$ 0.07*	1.01 $\pm$ 0.10
mimics	1.67 $\pm$ 0.19* #&	1.07 $\pm$ 0.12
inhibitors	0.21 $\pm$ 0.05* #&△	1.05 $\pm$ 0.11
F 值	54.687	0.774
P 值	<0.001	0.632

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与 NC 组比较: & $P < 0.05$; 与 mimics 组比较: △ $P < 0.05$

2.2 各组肺组织匀浆 IL-1 β 、TNF- α 水平比较 肺组织匀浆 IL-1 β 、TNF- α 水平组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组、NC 组、mimics 组、inhibitors 组肺组织匀浆 IL-1 β 、TNF- α 水平升高 ($P < 0.05$) ; 与模型组和 NC 组比较, mimics 组肺组织匀浆 IL-1 β 、TNF- α 水平降低, inhibitors 组肺组织匀浆 IL-1 β 、TNF- α 水平升高 ($P < 0.05$) ; 与 mimics 组比较, inhibitors 组肺组织匀浆 IL-1 β 、TNF- α 水平升高 ($P < 0.05$) ; 模型组和 NC 组肺组织匀浆 IL-1 β 、TNF- α 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组肺组织匀浆 IL-1 β 、TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	IL-1 β (ng/L)	TNF- α (ng/L)
假手术	120.31 $\pm$ 13.41	132.52 $\pm$ 14.27
模型	284.63 $\pm$ 30.01*	302.13 $\pm$ 31.21*
NC	291.51 $\pm$ 30.21*	301.83 $\pm$ 31.27*
mimics	175.63 $\pm$ 18.38* #&	181.28 $\pm$ 19.23* #&
inhibitors	346.53 $\pm$ 35.52* #&△	352.52 $\pm$ 36.42* #&△
F 值	67.49	85.62
P 值	<0.001	<0.001

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与 NC 组比较: & $P < 0.05$; 与 mimics 组比较: △ $P < 0.05$

2.3 miR-181a 潜在的靶基因预测 TargetScan 在线预测发现, Smad7 3'-UTR 上存在 miR-181a 的结合位点。见图 1。

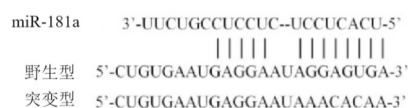


图 1 Smad7 3'-UTR 与 miR-181a 的互补序列

采用双荧光素酶报告基因实验进一步验证结果发现, 与 Smad7 3'-UTR 野生型质粒共转染时, miR-181a mimics 组荧光素酶活性明显低于 miR-181a inhibitors 组 ($P < 0.05$) ; 与 Smad7 3'-UTR 突变型质粒共转染时, miR-181a mimics 组和 miR-181a inhibitors 组荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 支气管上皮细胞相对荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	野生型	突变型
miR-181a mimics	0.49 $\pm$ 0.06	1.49 $\pm$ 0.15
miR-181a inhibitors	1.52 $\pm$ 0.16	1.51 $\pm$ 0.17
t 值	19.061	0.279
P 值	<0.001	0.783

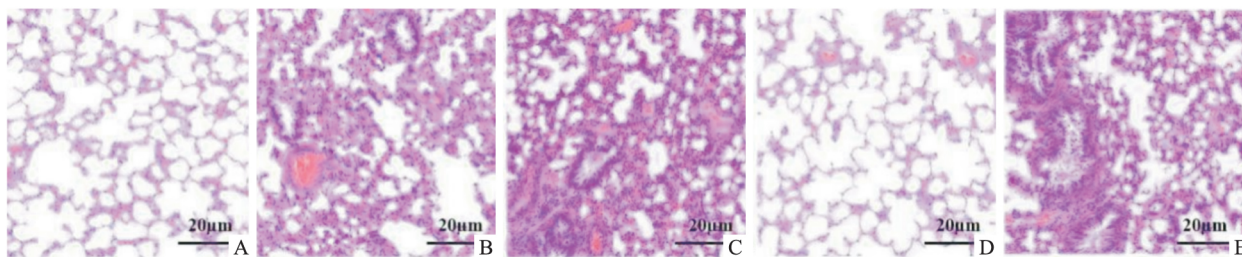


图2 各组大鼠肺组织病理学变化 HE ×400

A: 假手术组; B: 模型组; C: NC 组; D: mimics 组; E: inhibitors 组

2.4 各组大鼠肺组织病理学变化 假手术组大鼠肺泡细胞正常,呈空泡状,薄壁结构,小支气管无腺体及炎性细胞浸润,无纤维组织增生;模型组、NC 组大鼠肺实质破坏,肺泡明显扩张,相邻肺泡融合成较大囊腔,气道管增厚并可见炎性细胞浸润,大量胶原纤维形成。mimics 组肺泡细胞趋于正常,炎症明显减轻,胶原纤维明显减少,肺泡结构紊乱明显好转。inhibitors 组肺组织病理学变化与模型组和 NC 组相似。见图 2。

2.5 各组大鼠支气管壁厚度和支气管壁胶原纤维厚度 支气管壁厚度和支气管壁胶原纤维厚度组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组、NC 组、mimics 组、inhibitors 组支气管壁和支气管壁胶原纤维加厚($P < 0.05$);与模型组和 NC 组比较,mimics 组支气管壁和支气管壁胶原纤维变薄,inhibitors 组加厚($P < 0.05$);与 mimics 组比较,inhibitors 组支气管壁和支气管壁胶原纤维加厚($P < 0.05$);模型组和 NC 组支气管壁厚度和支气管壁胶原纤维厚度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 5。

表5 各组大鼠支气管壁厚度和支气管壁胶原纤维厚度($\mu\text{m}, \bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	支气管壁厚度	支气管壁胶原纤维厚度
假手术	378.54 ± 40.13	120.32 ± 13.54
模型	585.53 ± 60.46 [*]	365.86 ± 48.76 [*]
NC	579.85 ± 59.64 [*]	376.82 ± 50.63 [*]
mimics	448.67 ± 47.54 ^{* #&}	276.69 ± 29.54 ^{* #&}
inhibitors	634.76 ± 65.76 ^{* #& Δ}	478.65 ± 48.69 ^{* #& Δ}
F 值	127.465	143.542
P 值	<0.001	<0.001

与假手术组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与 NC 组比较: [&] $P < 0.05$; 与 mimics 组比较: ^Δ $P < 0.05$

2.6 肺组织 TGF-β1、Smad7、p-Smad7、MMP-9 蛋白相对表达水平比较 肺组织 TGF-β1、p-Smad7、MMP-9 蛋白相对表达水平组间比较,差异有统计学

意义($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组、NC 组、mimics 组和 inhibitors 组肺组织 TGF-β1、MMP-9 蛋白相对表达水平升高,p-Smad7 蛋白相对表达水平降低($P < 0.05$);与模型组和 NC 组比较,mimics 组肺组织 TGF-β1、MMP-9 蛋白相对表达水平降低,p-Smad7 蛋白相对表达水平升高,inhibitors 组肺组织 TGF-β1、MMP-9 蛋白相对表达水平升高,p-Smad7 蛋白相对表达水平降低($P < 0.05$);与 mimics 组比较,inhibitors 组肺组织 TGF-β1、MMP-9 蛋白相对表达水平升高,p-Smad7 蛋白相对表达水平降低($P < 0.05$);模型组和 NC 组肺组织 TGF-β1、p-Smad7、MMP-9 蛋白相对表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。肺组织 Smad7 蛋白相对表达水平组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 6,图 3。

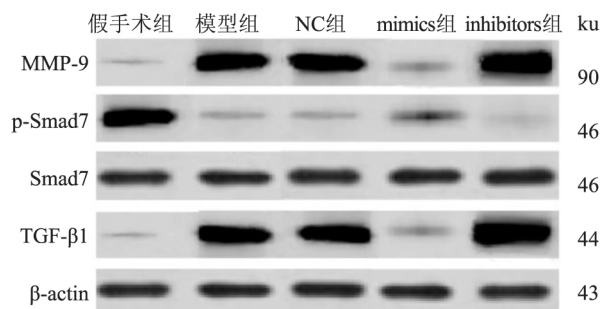


图3 肺组织 TGF-β1、Smad7、p-Smad7、MMP-9 蛋白相对表达水平

3 讨论

COPD 是一种具有气流阻塞特征的慢性支气管炎或肺气肿,可进一步发展为肺心病和呼吸衰竭等常见慢性疾病,其发病与有害气体及有害颗粒引起的炎症反应有关^[8]。miRNA 通过与其靶向的 mRNA 碱基互补配对,参与基因转录后表达调控,诱导 mRNA 降解或抑制其翻译,在生物生长分化、细胞凋亡、炎症反应中发挥重要作用。研究发现 miRNA 可

表6 肺组织 TGF- β 1、Smad7、p-Smad7、MMP-9 蛋白相对表达水平($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	TGF- β 1	Smad7	p-Smad7	MMP-9
假手术	0.39 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.11	1.17 $\pm$ 0.13	0.40 $\pm$ 0.05
模型	1.17 $\pm$ 0.12 [*]	1.01 $\pm$ 0.12	0.50 $\pm$ 0.05 [*]	1.15 $\pm$ 0.12 [*]
NC	1.16 $\pm$ 0.12 [*]	1.04 $\pm$ 0.12	0.51 $\pm$ 0.06 [*]	1.16 $\pm$ 0.12 [*]
mimics	0.69 $\pm$ 0.07 ^{* #&}	1.02 $\pm$ 0.11	0.87 $\pm$ 0.09 ^{* #&}	0.70 $\pm$ 0.08 ^{* #&}
inhibitors	1.40 $\pm$ 0.15 ^{* #&△}	1.02 $\pm$ 0.10	0.33 $\pm$ 0.04 ^{* #&△}	1.38 $\pm$ 0.14 ^{* #&△}
F 值	55.963	0.421	36.452	48.645
P 值	<0.001	0.681	<0.001	<0.001

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与 NC 组比较: & $P < 0.05$; 与 mimics 组比较: △ $P < 0.05$

参与多种肺部疾病的发病过程,如肺结核、肺癌、COPD、哮喘和特发性肺间质纤维化等^[1]。通过检测 COPD 患者组和健康组肺组织中 miRNAs 的表达情况,发现 COPD 患者肺组织中有多种 miRNAs 异常表达^[1]。COPD 目前尚缺少有效灵敏的分子标记物,miRNA 通过调节靶基因的表达,参与多种肺部疾病的发病过程,可以作为早期治疗的潜在分子标记物。

miR-181 是关键的基因表达调控因子,参与生物体免疫、炎症反应,细胞周期调控、凋亡等过程。最近研究发现,miR-181a 能够参与肺部炎症性疾病的发生发展,参与肺上皮细胞损伤及炎症因子形成过程^[1]。Du et al^[2] 发现在急性肺损伤模型中,miR-181a 可以通过下调靶基因 Toll 样受体 4,负调控 THP-1 巨噬细胞炎症因子分泌,与气道炎症性疾病有关。李翠娟等^[3] 研究发现 COPD 患者血清 miR-181a 与炎症因子变化密切相关。本研究中 mimics 组 miR-181a mRNA 相对表达水平高于其他组,HE 染色显示其肺泡细胞趋于正常、炎症明显减轻、胶原纤维明显减少、肺泡结构紊乱明显好转,支气管壁厚度和支气管壁胶原纤维厚度较高,且肺组织中 IL-1 β 、TNF- α 水平显著降低,而 inhibitors 组上述指标与 mimics 组相反,提示 miR-181a 可降低 COPD 模型大鼠炎症反应,对气道重塑、肺组织病理形态有改善作用。

Smad7 作为抑制性 Smad,能够被 TGF- β 诱导,反过来抑制 TGF- β ,是 TGF- β 信号通路负调节剂,Smad7 与 R-Smad2/3 竞争性结合跨膜 I 型丝/苏氨酸激酶受体抑制受体激活型 Smad 磷酸化,从而抑制 COPD 的发生与发展^[4]。TGF- β 是生长因子家族,哺乳动物中有 3 种亚型,即 TGF- β 1 ~ 3,肺组织含量最高且具有生物活性的是 TGF- β 1。MMP-9 与 COPD 发病密切相关,参与肺组织的损害和重构、促进气道杯状细胞增生和黏液表达。张喆等^[5] 研究发现,COPD 模型组小鼠肺泡灌洗液中 MMP-2、

MMP-9、TGF- β 1 水平显著上升,说明该时期模型组小鼠发生气道重塑。梁珍珍等^[6] 研究发现 miR-181a 过表达可以缓解 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 TGF- β 1 的生成及 IV 型胶原蛋白、纤连蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白表达,从而在 COPD 气道重塑中发挥拮抗作用。模型组 MMP-9 和 TGF- β 1 表达上调,p-Smad7 表达下调,inhibitors 组加重了这一现象,而 mimics 组与模型组和 inhibitors 组结果相反。本研究中荧光素酶报告基因实验结果提示:miR-181a 通过调控 Smad7 发挥作用。以上研究结果提示 miR-181a 过表达通过促进 p-Smad7 的表达,抑制 MMP-9 和 TGF- β 1 表达,改善气道重塑。

综上所述,miR-181a 对 COPD 模型大鼠肺组织中气道重塑有改善作用,可能通过靶向调控 Smad7 的表达发挥作用,为临床治疗 COPD 提供一定理论依据。

参考文献

- [1] 刘晓黎,王昌明,蒋明,等. NF- κ B 在大鼠 COPD 中的表达及 PDTC 与肺血管重构的关系 [J]. 安徽医科大学学报,2018,53(10):1503-8.
- [2] Witvrouw I, Gevaert A B, Van Craenenbroeck E M, et al. MicroRNA isolation from plasma for real-time qPCR array [J]. Curr Protoc Hum Genet,2018,99(1):e69.
- [3] Tasena H, Faiz A, Timens W, et al. microRNA-mRNA regulatory networks underlying chronic mucus hypersecretion in COPD [J]. Eur Respir J,2018,52(3):1701556.
- [4] Kim J, Kim D Y, Heo H R, et al. Role of miRNA-181a-2-3p in cadmium-induced inflammatory responses of human bronchial epithelial cells [J]. J Thorac Dis, 2019,11(7):3055-69.
- [5] Musri M M, Coll-Bonfill N, Maron B A, et al. MicroRNA dysregulation in pulmonary arteries from chronic obstructive pulmonary disease: relationships with vascular remodeling [J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2018,59(4):490-9.
- [6] 管频,陈娟,冯光球,等. COPD 患者肺组织中 Smad 蛋白, TGF- β 1 表达与气道重塑的关系 [J]. 海南医学,2014,25(12):1720-2.
- [7] 黄文锋,陈斯宁,吴嘉冬,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的构

- 建 [J]. 现代医药卫生, 2019, 35(6): 801-3.
- [8] 杨柳柳, 刘小虹, 詹少锋, 等. 肺康颗粒通过 TLR4/NF- κ B 信号通路干预 COPD 大鼠炎症的相关机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(6): 687-92.
- [9] Asensio V J, Tomás A, Iglesias A, et al. Eosinophilic COPD patients display a distinctive serum miRNA profile from asthma and Non-eosinophilic COPD [J]. Arch Bronconeumol, 2020, 56(4): 234-41.
- [10] 邓嘉秋, 冯德魁, 吕生辉, 等. 结直肠癌患者血清, 粪便和癌组织中 miR-21, miR-217, miR-29b 和 miR-92a-1 的检测及其临床意义 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(1): 85-8.
- [11] Jiang K, Guo S, Zhang T, et al. Downregulation of TLR4 by miR-181a provides negative feedback regulation to lipopolysaccharide-induced inflammation [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 142.
- [12] Du X J, Lu J M, Sha Y. MiR-181a inhibits vascular inflammation induced by ox-LDL via targeting TLR4 in human macrophages [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(10): 6996-7003.
- [13] 李翠娟, 唐颖, 慕丽娜, 等. 稳定期 COPD 患者血清 miR-181a 与炎症因子的关系及对急性加重和死亡的预测价值 [J]. 临床急诊杂志, 2020, 21(7): 567-71.
- [14] Lee C M, He C H, Park J W, et al. Chitinase 1 regulates pulmonary fibrosis by modulating TGF- β /SMAD7 pathway via TGFBRAP1 and FOXO3 [J]. Life Sci Alliance, 2019, 2(3): e201900350.
- [15] 张喆, 李娜, 刘谦, 等. 阿胶对 COPD 模型小鼠的保护作用以及对 MMP-2、MMP-9、TGF- β 1 水平的影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(4): 1813-9.
- [16] 梁珍珍, 吕燕平, 张艳莉, 等. miR-181a 参与调控香烟提取物诱导的 NR8383 肺泡巨噬细胞自噬紊乱与促炎因子的生成 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(4): 710-7.

Study on the effect of miR-181a on airway remodeling of COPD rats by regulating Smad7

Wang Yajie, Wang Jia, Yue Hongjuan, et al

(Dept of Pulmonary and Critical Care Medicine, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

Abstract Objective To investigate the effect and possible mechanism of microRNA-181a (miR-181a) on airway remodeling in the lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Sixty-five rats were randomly selected from 80 rats to establish COPD models, 56 rats were successfully modeled. They were randomly divided into model group, NC group, mimics group and inhibitors group with 14 rats in each group, and the remaining 15 rats were sham operation group. Two hours after modeling, the mimics group, the inhibitors group and the NC group were injected with miR-181a mimics, miR-181a inhibitors and control mimics through the tail vein, and the sham operation group and the model group were injected with saline. After 24 hours of intervention, RT-qPCR was used to detect the relative expression levels of miR-181a and maternal signal protein homolog 7 (Smad7) mRNA in lung tissue, ELISA method was used to detect the levels of interleukin 1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in lung tissue homogenate, luciferase reporter gene analysis miR-181a targeting Smad7, HE staining to observe rat lung tissue disease physiological changes, measure bronchial wall and bronchial wall collagen fiber thickness, Western blot was used to detect lung tissue matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), Smad7, p-Smad7 protein relative expression level. **Results** Compared with the sham operation group, the relative expression level of miR-181a in lung tissues of the model group, NC group and inhibitors group decreased, and the relative expression level of miR-181a in lung tissue of the mimics group increased, and the mimics group > model group and NC group > inhibitors group ($P < 0.05$). Compared with the sham operation group, the levels of IL-1 β and TNF- α in lung tissue homogenate of the model group, NC group, mimics group, and inhibitors group increased, and the inhibitors group > model group and NC group > mimics group ($P < 0.05$). The results of the dual luciferase reporter gene analysis system showed that miR-181a could significantly inhibit the relative luciferase activity of wild-type Smad7 ($P < 0.05$), but had no significant effect on the relative luciferase activity of mutant Smad7 ($P > 0.05$). HE staining showed that the alveolar cells of the rats in the sham operation group were normal, and the lung parenchyma of the rats in the model group, NC group and inhibitors group was destroyed, with inflammatory cell infiltration and collagen fiber formation. In the mimics group, alveolar cells tended to be normal, inflammation reduced, collagen fibers decreased, and alveolar structural disorder was significantly improved.

网络出版时间: 2021-7-28 13:59 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1031.040.html>

固定位置 Er,Cr: YSGG 激光对根管壁玷污层去除效果的研究

胡光亚, 夏 荣, 徐基亮, 章润贞, 刘 春, 余金兰

摘要 目的 光纤头固定在根管入口处比较不同功率的 Er,Cr: YSGG 激光活化荡洗(LAI)对根管壁上玷污层的去除效果。方法 收集48颗无龋坏单根管恒前牙,按处理方法的不同随机均分为4组($n=12$):0.5 W LAI组、1.0 W LAI组、超声荡洗组和注射冲洗组,冲洗结束后将牙纵向劈开分成两份,随机选取其中一份进行电镜扫描,分别扫描根管壁的冠部1/3、根中1/3、根尖1/3,并对残留玷污层用Hülsmann的评分系统进行评分,比较4组冲洗方法对玷污层去除效果。结果 在冠部1/3,1.0 W LAI组清除玷污层比注射冲洗组和超声荡洗组更为有效($P<0.05$),在根中1/3和根尖1/3,1.0 W LAI组与超声荡洗组之间差异无统计学意义($P>0.05$),但比其他两组更为有效($P<0.05$)。结论 光纤头置于根管入口处且功率为1.0 W的Er,Cr: YSGG激光LAI可有效去除玷污层,且优于0.5 W LAI组和注射冲洗组,并在冠部1/3优于超声荡洗组。

关键词 Er,Cr: YSGG 激光; 注射器冲洗; 激光活化荡洗; 超声荡洗; 玷污层

中图分类号 R 781.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)09-1385-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.09.008

传统的激光活化荡洗(laser-activated irrigation, LAI)技术要求光纤在根管内以螺旋的方式反复提拉,用以尽量扩大根管壁暴露于激光照射的面积,但由于光纤不易弯曲,不易进入根尖狭窄区和弯曲度较大的根尖部,这样操作不仅不适用于复杂弯曲根管,还增加了将荡洗液溢出根尖孔和造成热损伤的风险。近年来 Er: YAG 激光发明了特制的 PIPS 光纤头,使激光荡洗时仅需将光纤头放置在根管入口处即可有效去除玷污层,避免了根尖区复杂的根管情况^[1]。Peeters et al^[2]的相关研究显示,Er,Cr: YSGG 激光使用 MZ6 普通光纤头时固定在根管口处不移动时对根尖部玷污层有一定的清除能力,但近年来,使用 Er,Cr: YSGG 激光在进行 LAI 时依旧选择在根管中反复提拉进行荡洗^[3-5],罕见有对固定光纤位置进行 LAI 时其玷污层去除效果进一步研究的相关报道。因此,该研究将光纤头位置固定于根管入口处,使用 RFT3 锥形光纤头,选择 0.5 W 和 1.0 W 两个功率研究 Er,Cr: YSGG 激光进行 LAI 时对玷污层的去除效果。

1 材料与方法

1.1 材料准备 收集48个非龋坏的完整的人类单根离体牙(上下颌切牙、侧切牙以及尖牙),刮除表面的牙石以及肉芽组织,将其放入生理盐水中1周内用于实验。

2021-03-16 接收

基金项目: 国家重点研发计划项目(编号:2018YFB0407204)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601

作者简介: 胡光亚,男,硕士研究生;

夏 荣,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xiarongqh@aliyun.com

Compared with the sham operation group, the bronchial wall and bronchial wall collagen fibers in the model group, NC group, mimics group, and inhibitors group were thickened, and the inhibitors group > model group and NC group > mimics group ($P<0.05$). Compared with the sham operation group, the relative expression levels of MMP-9 and TGF- β 1 protein in the lung tissues of the model group, NC group, mimics group and inhibitors group increased, while the relative expression level of p-Smad7 protein decreased, and MMP-9, TGF- β 1 protein relative expression level inhibitors group > model group and NC group > mimics group, relative expression of p-Smad7 protein mimics group > model group and NC group > inhibitors group ($P<0.05$). Comparison of the relative expression levels of miR-181a, IL-1 β , TNF- α levels, bronchial wall and bronchial wall collagen fiber thickness, MMP-9, p-Smad7, and TGF- β 1 protein expression levels in the model group and NC group, there was no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** miR-181a can improve the airway remodeling in the lung tissue of COPD model rats, and may play a role in the targeted regulation of Smad7 expression.

Key words microRNA-181a; chronic obstructive pulmonary disease; airway remodeling; Smad7