doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.10.006

miR-22-3p 通过激活 PTEN/PI3K/AKT/NF-κB 信号通路 加重慢性阻塞性肺疾病 *

白莉敏 1 吕 行 2 任引刚 1 祝松涛 1 杨 璐 14

(1中国人民解放军空军军医大学第二附属医院老年医学科 陕西 西安 710032;

2 中国人民解放军空军军医大学第一附属医院呼吸内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探索 miR-22-3p 对慢性阻塞性肺疾病(COPD)的影响及作用机制。方法:将7周龄(体重 250~280g)雄性 SD 大鼠随机 分为5组(n=12):对照组(Con组)、COPD组、COPD+NC-agomir组、COPD+miR-22-3p-agomir组、COPD+NC-antagomir组和 COPD+miR-22-3p-antagomir 组。Con 组大鼠为正常饲养的大鼠,其他组大鼠均通过香烟烟雾(CS)和脂多糖(LPS)诱导 COPD 动 物模型。在CS暴露当天, Con 组和 COPD 组大鼠鼻腔内注射 50 µL 生理盐水, COPD+NC-agomir 组、COPD+miR-22-3p-agomir 组、COPD+NC-antagomir 组和 COPD+miR-22-3p-antagomir 组大 鼠分别鼻腔内注射 50 µL 10 nmoL 的 NC-agomir、 miR-22-3p-agomir、NC-antagomir 和 miR-22-3p-antagomir, 每2周注射1次, 共注射6次。CS暴露90d后, 检测各组大鼠的最大自 主分钟通气量(MVV)、0.3 s 用力呼气量(FEV0.3)、用力肺活量(FVC)和最大呼气峰流速(PEF)。通过 ELISA 法测定支气管肺泡灌 洗液(BALF)中白细胞介素 -1 $\beta(IL-1\beta)$ 、肿瘤坏死因子 - $\alpha(TNF-\alpha)$ 和巨噬细胞炎性蛋白 -2(MIP-2)水平。通过苏木精 - 伊红(HE)染色评价肺组织损伤。根据试剂盒说明检测肺组织丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平。通过 RT-PCR 检测肺组织 miR-22-3p、磷酸酶与张力蛋白同源物(PTEN)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、CD86、CD206 和精氨酸酶 1(ARG1)mRNA 水平。通 过 Western blot 检测肺组织 PTEN、磷脂酰肌醇 3- 激酶(PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B(AKT)、p-AKT、核因子 -κB(NF-κB) p65 和 p-NF-κB p65 的蛋白表达水平。结果:与 COPD 组和 COPD+NC-antagomir 组相比, COPD+miR-22-3p-antagomir 组大鼠的 MVV、 FEV0.3/FVC 和 PEF 均升高(P<0.05);肺泡出血、肺泡壁断裂、肺泡间隔水肿和炎性细胞浸润等病变减轻;BALF 中的 IL-1β、 TNF-α和 MIP-2 水平均降低(P<0.05);肺组织 SOD 水平升高, MDA 水平降低(P<0.05);肺组织 iNOS 和 CD86 mRNA 相对表达 量降低, CD206 和 ARG1 mRNA 相对表达量升高(P<0.05); 肺组织 miR-22-3p 相对表达量降低, PTEN mRNA 和蛋白相对表达量 升高(P<0.05);肺组织 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 p-NF-κB p65/NF-κB p65 的蛋白相对表达量降低(P<0.05)。结论:miR-22-3p 在 COPD 大鼠肺组织中上调,可能通过激活 PTEN/PI3K/AKT/NF-κB 信号通路,促进肺组织炎症反应和氧化应激,加重大鼠肺功能 障碍和肺组织结构损伤。

关键词:慢性阻塞性肺疾病;miR-22-3p;炎症;磷酸酶与张力蛋白同源物 中图分类号:R-33;R563 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)10-1835-08

miR-22-3p Aggravates Chronic Obstructive Pulmonary Disease through Activating PTEN/PI3K/AKT/NF-_KB Signaling Pathway*

BAI Li-min¹, LÜ Xing², REN Yin-gang¹, ZHU Song-tao¹, YANG Lu^{1Δ}

(1 Department of Geriatrics, The Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Air Force Medical University of PLA,

Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect and mechanism of miR-22-3p on chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods:** Male SD rats aged 7 weeks (weight 250 g to 280 g) were randomly divided into 5 groups (n=12): Control group (Con), COPD group, COPD+NC-agomir group, COPD+miR-22-3p-agomir group, COPD+NC-antagomir group and COPD+miR-22-3p-antagomir group. The rats in the Con group were normally fed, and the other groups were induced by cigarette smoke (CS) and lipopolysaccharide (LPS). On the day of CS exposure, 50 µL saline was injected intranasally in Con group and COPD group rats. And the rats in COPD+NC agomir group, COPD+miR-22-3p-agomir group, COPD+NC antagomir group and COPD group rats. And the rats in COPD+NC agomir group, COPD+miR-22-3p-agomir, miR-22-3p-agomir, group and COPD+miR-22-3p-antagomir group were given intranasal injection of 50 µL 10 nmol of NC agomir, miR-22-3p-agomir, NC antagomir and miR-22-3p-antagomir, respectively. It was injected once every 2 weeks for a total of 6 times. After 90 days of CS exposure, the maximum autonomous ventilation volume per minute (MVV), 0.3 s forced expiratory volume (FEV0.3), forced vital capacity (FVC) and peak expiratory flow (PEF) were measured. The levels

^{*}基金项目:陕西省卫生健康委科研基金项目(2021A006)

作者简介:白莉敏(1988-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:老年衰弱与呼吸,E-mail:Limin864517987@163.com

[△] 通讯作者:杨璐(1985-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:糖尿病,E-mail: tdyanglu@163.com

⁽收稿日期:2022-12-23 接受日期:2023-01-31)

of interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by ELISA method. Lung tissue injury was evaluated by hematoxylin-cosin (HE) staining. The levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in lung tissue were measured according to the instructions of the kit. The mRNA levels of miR-22-3p, phosphatase and tensin homologue (PTEN), inducible nitric oxide synthase (iNOS), CD86, CD206 and argininase 1 (ARG1) in lung tissue were measured by RT-PCR. The protein levels of PTEN, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), p-PI3K, protein kinase B (AKT), p-AKT, nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 and p-NF- κ B p65 in lung tissue were detected by Western blot. **Results**: Compared with COPD group and COPD+NC-antagomir group, the MVV, FEV0.3/FVC and PEF of COPD+miR-22-3p-antagomir group increased (*P*<0.05), alveolar hemorrhage, rupture of alveolar wall, edema of alveolar septum and inflammatory cell infiltration were alleviated, the levels of IL-1β, TNF- α and MIP-2 in BALF decreased (*P*<0.05), the level of SOD in lung tissue increased and the level of MDA decreased(*P*<0.05), he relative expression of iNOS and CD86 mRNA in lung tissue decreased(*P*<0.05), while the relative expression of CD206 and ARG1mRNA increased(*P*<0.05), the relative expression levels of miR-22-3p in lung tissues decreased, while the relative expression levels of PTEN mRNA and protein increased (*P*<0.05), the relative expression of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 decreased in lung tissue (*P*<0.05). **Conclusion:** miR-22-3p is up-regulated in the lung tissues of COPD rats, which may promotes the inflammation and oxidative stress in the lung and aggravates lung dysfunction and lung injury through activating PTEN/PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway.

Key words: Chronic obstructive pulmonary disease; MiR-22-3p; Inflammation; Phosphatase and tensin homologues

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R563 Document code: A Article ID: 1673-6273(2023)10-1835-08

前言

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种常见的呼吸系统疾病,其特征是持续的肺组织慢 性炎症、气流受限、肺组织重塑、肺泡破坏和肺功能下降凹。吸 烟、有毒气体暴露、空气污染等因素是 COPD 的主要风险因 素^[23]。COPD 的发病机制与炎症、氧化应激、蛋白酶 / 抗蛋白酶系 统失衡、表观遗传学改变、线粒体功能障碍、免疫紊乱等有关啊。 microRNAs (miRNAs) 是一种约 19-25 个核苷酸小的非编码 RNA,通过抑制靶基因的表达发挥不同的生物学作用。miRNAs 在各种细胞学(增殖、分化、凋亡和应激等)和生物学(免疫调 节、炎症、自噬、细胞衰老、组织重塑、血管生成和肿瘤发展等) 过程中发挥关键调节作用^[5]。研究表明一些 miRNAs 的异常表 达与 COPD 的发生和进展密切相关 [57],可能作为治疗 COPD 的潜在靶点,如 miR-22-3p 在 COPD 患者外周血和肺组织中表 达均明显上调^[68]。此外,miR-22-3p在肺腺癌组织中呈低表达, 且与肺腺癌的临床病理特征和预后密切相关^[9]。miR-22-3p 还 可调节肌纤维类型转化109,通过靶向磷酸酶与张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homologue, PTEN) 抑制脓毒症诱导的 急性肾损伤^[11],但目前尚不清楚 miR-22-3p 在 COPD 发病过程 中的具体作用及机制。因此,本研究旨在探索 miR-22-3p 对 COPD 的影响及具体机制,以期为 COPD 的临床诊治提供更多 的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 NC-agomir、miR-22-3p-agomir、NC-antagomir和miR-22-3p-antagomir由广州锐博生物技术有限公司 合成。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。脂多糖 (Lipopolysaccharide,LPS,货号:L8880)、苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin,HE)染色试剂盒(货号:G1120)购自北京索莱宝 科技有限公司。香烟购自大前门集团。大鼠白细胞介素 -1β (Interleukin-1, IL-1β)(货号: ER1094) 和肿瘤坏死因子 -α(Tumor necrosis factor-α, TNF-α)(货号: ER1393)ELISA 试剂盒购 自武汉菲恩生物科技有限公司、大鼠巨噬细胞炎性蛋白-2 (Macrophage inflammatory protein-2, MIP-2)ELISA 试剂盒(货 号:CSB-E07419r-1)购自上海恒斐生物科技有限公司。丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)(货号: A003-1-2)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)(货号:A001-3-2)、ECL(货号: W028-2-1)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。Trizol(货号: R0016)、RIPA(货号:P0013B)、BCA(货号:P0010S)试剂盒购 自碧云天生物技术研究所。PrimeScript RT 试剂盒(货号: RR047Q)和 TB Green Premix Ex Taq II(货号: RR820B)购自日 本 Takara 公司。PTEN(货号:ab267787)、磷脂酰肌醇 3- 激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)(货号:ab302958)、p-PI3K (货号:ab278545)、蛋白激酶 B(Protein kinase B, AKT)(货号: ab283852)、p-AKT(货号:ab38449)、核因子-кB(Nuclear factor-kappa B,NF-κB)p65 一抗(货号:ab288751)、磷酸化核因子 кВ p65 (Phosphorylation nuclear factor kappa-B p65, p-NF-кВ p65) 一抗(货号:ab239882)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗 (货号: ab8245)、辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)偶联 的 IgG 二抗(货号: ab6721)购自英国 Abcam 公司。C-260 型全 自动香烟暴露系统购自上海玉研科学仪器有限公司。 AniRes2005 动物肺功能分析系统购自北京贝兰博科技有限公 司。500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.1.2 实验动物 7 周龄(体重 250~280 g)SPF 级雄性 SD 大 鼠购自陕西君行生物科技有限公司,生产许可证:SCXK(陕)
2022-001。将大鼠在 23± 2℃、55± 5%湿度、12 h-12 h 光暗照明 下饲养。

1.2 方法

1.2.1 COPD 大鼠模型建立 参考方苏榕等^[12]的方法建立香

烟烟雾(Cigarette smoke, CS)和 LPS 诱导的 COPD 大鼠模型。 香烟焦油量 11 mg,烟气烟碱量 0.8 mg。使用 C-260 型全自动 香烟暴露系统以 5%烟雾浓度进行烟熏,每天 2 次,每次 30 min, 间隔 8h,共暴露 90 d。第 30 和 60 d 时对大鼠气管内注入 200 μL LPS(1 μg/μL)。

1.2.2 动物分组和处理 将大鼠随机分为 5 组(n=12):Control 组 (Con 组)、COPD 组、COPD+NC-agomir 组、COPD+miR-22-3p-agomir 组、COPD+NC-antagomir 组和 COPD+miR-22-3p-antagomir 组。Con 组大鼠为正常饲养的大鼠,其他组大鼠均进行 COPD 动物模型制作。在 CS 暴露当天,Con 组和 COPD 组大鼠 鼻腔内注射 50 μL 生理盐水,COPD+NC-agomir 组、COPD+ miR-22-3p-agomir 组、COPD+NC-antagomir 组和 COPD+ miR-22-3p-antagomir 组大鼠分别鼻腔内注射 50 μL 10 nmol 的 NC-agomir、miR-22-3p-agomir、NC-antagomir 和 miR-22-3p-antagomir。每 2 周注射 1 次,共注射 6 次。

1.2.3 **肺功能检测** 使用 AniRes2005 动物肺功能分析系统测 定大鼠肺功能参数,包括最大自主分钟通气量(Maximum autonomous ventilation volume per minute, MVV)、0.3 s 用力呼气 量(Forced expiratory volume 0.3, FEV0.3)、用力肺活量(Forced vital capacity, FVC)和最大呼气峰流速(Peak expiratory flow, PEF)。

1.2.4 支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞因子的测定 大鼠左 气管插管,使用 3 mL 生理盐水灌洗肺,重复 3 次,收集支气管 肺泡灌洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF),在 4℃下 1000 r/min 离心 10 min,取上清。通过 ELISA 法测定 BALF 上 清液中细胞因子白细胞介素 -1 β (Interleukin-1, IL-1 β)、肿瘤坏 死因子 - α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)和巨噬细胞炎性蛋 白 -2(Macrophage inflammatory protein-2, MIP-2)水平。

1.2.5 肺组织学染色 分离各组大鼠左肺组织,取部分肺组织 采用 4%多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋,制备 4 μm 厚切片。按照试剂盒说明对肺组织进行 HE 染色。

1.2.6 肺组织 SOD 和 MDA 的水平检测 各组大鼠分别取部 分肺组织匀浆,在4℃下 3000 r/min 离心 10 min,取上清。按照 试剂盒说明检测肺组织中 SOD 和 MDA 的水平。

1.2.7 RT-PCR 检测 使用 Trizol 提取各组大鼠部分肺组织总 RNA,使用 PrimeScript RT 试剂盒进行逆转录。使用 TB Green Premix Ex Taq II 在 7500 实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR。使用 Primer 5.0 设计引物,序列如表 1 所示。U6 和 GAPDH 分别 作为 miRNA 和 mRNA 的内参基因。通过 2^{+, CT}法计算基因相 对表达量。

1.2.8 Western blot 检测 使用 RIPA 裂解各组大鼠部分肺组 织,通过 BCA 法测定蛋白浓度。然后在 10% SDS-PAGE 上电 泳分离蛋白并转移到 PVDF 膜。5%脱脂牛奶封闭 2 h 后将膜与 磷酸酶及张力蛋白同源物(Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)(1:1000)、PI3K(1:1000)、 p-PI3K(1:1000)、AKT(1:2000)、p-AKT(1:2000)、NF- κ B p65(1: 1000)、p-NF- κ B p65(1:1000)和 GAPDH(1:2000)的一抗 4℃孵 育过夜。然后与 HRP 偶联的 IgG 二抗(1:2000)室温孵育 2 h。 使用 ECL 显影, GAPDH 作为内参蛋白。

	表1弓	物序列	信息
--	-----	-----	----

Table 1 Primer sequence information		
Gene	Sequence of primer (5'-3')	
miR-22-3p	F:ACACTCCAGCTGGAAGCTGCCAGTTGAAG	
	R:CTCAACTGGTGTCGTGGA	
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCACA	
	R:AACGCTTCACGAATTTGCGT	
PTEN	F:GGAAAGGACGGACTGGTGTA	
	R:AAAAATCCAGGGCCTCTTGT	
iNOS	F:AGGGAATCTTGGAGCGAGTT	
	R:GCAGCCTCTTGTCTTTGACC	
CD86	F:TGTCTCTTTCTGCTGGTCGT	
	R:ATCGACTCGTCAACACCACT	
CD206	F:GTGGAGTGATGGAACCCCAG	
	R:CTGTCCGCCCAGTATCCATC	
ARG1	F:GCATATCTGCCAAAGACATCG	
	R:CCATCACCTTGCCAATCCC	
GAPDH	F:GCTGAGTATGTCGTGGAGT	
	R:TCTTCTGAGTGGCAGTGA	

1.3 统计学分析

SPSS 22.0 软件用于数据分析。采用单因素方差分析及 LSD 检验分析组间差异。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-22-3p 对 COPD 大鼠肺功能的影响

与 Con 组相比,COPD 组大鼠的 MVV、FEV0.3/FVC 和 PEF 均降低 (P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+NC-agomir 组相 比,COPD+miR-22-3p-agomir 组大鼠的 MVV、FEV0.3/FVC 和 PEF 均降低(P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+NC-antagomir 组 相 比,COPD+miR-22-3p-antagomir 组 大鼠的 MVV、FEV0. 3/FVC 和 PEF 均升高(P<0.05)。见图 1。

2.2 miR-22-3p 对 COPD 大鼠 BALF 中细胞因子的影响

与 Con 组相比, COPD 组大鼠 BALF 中的 IL-1 β 、TNF- α 和 MIP-2 水平均升高(P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+NC-agomir 组相比, COPD+miR-22-3p-agomir 组大鼠 BALF 中的 IL-1 β 、 TNF- α 和 MIP-2 水平均升高 (P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+NC-antagomir 组相比, COPD+miR-22-3p-antagomir 组 大鼠 BALF 中的 IL-1 β 、TNF- α 和 MIP-2 水平均降低(P<0.05)。 见图 2。

2.3 miR-22-3p 对 COPD 大鼠肺组织形态的影响

HE 染色显示: Con 组大鼠肺组织形态正常。COPD 组、 COPD+NC-agomir 组、COPD+miR-22-3p-agomir 组和 COPD+ NC-antagomir 组大鼠肺组织均出现肺泡出血、肺泡壁断裂、肺 泡间隔水肿、明显炎性细胞浸润等病变。COPD+miR-22-3p-antagomir 组大鼠的肺组织病变较 COPD+NC-agomir 组明显减 轻。见图 3。





Note: A-C: The levels of MVV, PEF and FEV0.3/FVC in each group, respectively. Compared with Con group, ^aP<0.05; Compared with COPD group, ^bP<0.05; Compared with COPD+NC-agomir group, ^cP<0.05; Compared with COPD+miR-22-3p-agomir group, ^dP<0.05; Compared with COPD+NC-antagomir group, ^cP<0.05.





Fig. 2 Levels of IL-1 β , TNF- α and MIP-2 in BALF of rats in each group

Note: A-C: Levels of IL-1β, TNF-α and MIP-2 in BALF in each group, respectively. Compared with Con group, ^aP<0.05; Compared with COPD group, ^bP<0.05; Compared with COPD+NC-agomir group, ^aP<0.05; Compared wi

2.4 miR-22-3p 对 COPD 大鼠肺组织氧化应激的影响

与 Con 组相比,COPD 组大鼠肺组织 SOD 水平降低, MDA 水平升高(P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+NC-agomir 组 相比,COPD+miR-22-3p-agomir 组大鼠肺组织 SOD 水平降低, MDA 水平升高(P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+NC-antagomir 组相比,COPD+miR-22-3p-antagomir 组大鼠肺组织 SOD 水平 升高,MDA 水平降低(P<0.05)。见图 4。

2.5 miR-22-3p 对 COPD 大鼠肺组织巨噬细胞 M1 (iNOS 和 CD86)和 M2(CD206 和 ARG1)型极化标记物转录水平的影响

与 Con 组相比,COPD 组大鼠肺组织中 iNOS 和 CD86 的 mRNA 相对表达量升高,CD206 和 ARG1 的 mRNA 相对表达 量降低 (P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+NC-agomir 组相比, COPD+miR-22-3p-agomir 组大鼠肺组织 iNOS 和 CD86 的 mR-NA 相对表达量升高,CD206 和 ARG1 的 mRNA 相对表达量 降低 (P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+NC-antagomir 组相比, COPD+miR-22-3p-antagomir 组大鼠肺组织 iNOS 和 CD86 的 mRNA 相对表达量降低,CD206 和 ARG1 的 mRNA 相对表达

量升高(P<0.05)。见图 5。

2.6 miR-22-3p 对 COPD 大鼠肺组织 PTEN/PI3K/AKT 信号通路的影响

与 Con 组相比, COPD 组大鼠肺组织中 miR-22-3p 相对表 达量升高, PTEN 的 mRNA 相对表达量降低 (P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+NC-agomir 组相比, COPD+miR-22-3p-agomir 组大鼠肺组织中 miR-22-3p 相对表达量升高, PTEN 的 mRNA 相对表达量降低 (P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+ NC-antagomir 组相比, COPD+miR-22-3p-antagomir 组大鼠肺组 织中 miR-22-3p 相对表达量降低, PTEN 的 mRNA 相对表达量 升高(P<0.05)。见图 6。

与 Con 组相比, COPD 组大鼠肺组织中 PTEN 蛋白相对表 达量降低, p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65的蛋白相对表达量升高(P<0.05)。与 COPD 组和 COPD+ NC-agomir 组相比, COPD+miR-22-3p-agomir 组大鼠肺组织中 PTEN 蛋白相对表达量降低, p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 的蛋白相对表达量升高(P<0.05)。与 COPD



COPD+miR-22-3p-agomir









COPD+NC-agomir

图 3 各组大鼠肺组织 HE 染色(400×) Fig.3 HE staining of lung tissues of rats in each group (400×)





Fig.4 SOD and MDA levels in lung tissues of rats in each group Note: A and B: Levels of SOD and MDA in lung tissue of rats in each group, respectively. Compared with Con group, *P<0.05; Compared with COPD group, ^bP<0.05; Compared with COPD+NC-agomir group, ^cP<0.05; Compared with COPD+miR-22-3p-agomir group, 4P<0.05; Compared with COPD+NC-antagomir group, °P<0.05.

COPD 组和 COPD+NC-antagomir 组相比, COPD+miR-22-3p-antagomir 组大鼠肺组织中 PTEN 蛋白相对表达量升高, p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 p-NF-кB p65/NF-кB p65 的蛋白 相对表达量降低(P<0.05)。见图 7。

3 讨论

miR-22-3p 是一种在肺疾病中异常表达的 miRNA,其中包 括肺癌¹⁹和 LPS 诱导的急性肺损伤^[13]。Sundar 等¹⁰用转录组测 序技术检测了健康人和 COPD 患者外周血中的 miR-22-3p 转 录水平,结果显示与健康人相比,COPD 患者外周血中 miR-22-3p 表达上调。Shen 等^[8]分析了 10 例 COPD 患者和 10 例健康人的肺组织中差异表达的 miRNAs, 其中 miR-22-3p 是 上调的 miRNAs 之一。本研究使用 miR-22-3p-agomir 和 miR-22-3p-antagomir 对 COPD 大鼠模型进行干预,探索了 miR-22-3p在COPD中的作用。本研究结果表明COPD大鼠肺 组织中 miR-22-3p 上调,与前文研究结果一致。此外,上调 miR-22-3p 进一步降低了 COPD 大鼠的 MVV、FEV0.3/FVC 和 PEF,损伤了肺功能,并加重了肺组织损伤,但下调 miR-22-3p 则改善了 COPD 大鼠的肺功能,减轻了肺组织损伤。这些结果 说明 miR-22-3p 参与了 COPD 的发生发展。

炎症和氧化应激均参与了 COPD 的发生发展过程,长期吸 入有害气体,如香烟烟雾,是 COPD 炎症和氧化应激的主要原 因^[3,14]。有学者报道 IL-1β 可趋化炎性细胞向损伤组织的募集, 并增加粘附作用^[15]。TNF-α 是众所周知的促炎因子,可诱导炎 性细胞因子的表达。MIP-2 是一种可增加炎症细胞趋化活性和 炎症细胞与内皮细胞粘附的趋化因子[16]。SOD 是一种可有效清 除 ROS 的抗氧化酶,参与机体抗氧化系统的构建。MDA 是一 种氧化产物,对组织具有损伤性。氧化应激可诱导炎症级联反 应,而炎症级联反应又可诱导 ROS 的生成。本研究检测了COPD 大鼠 BALF 中的 IL-1 β 、TNF- α 和 MIP-2 水平,结果显示上调 miR-22-3p 加重了 COPD 大鼠肺组织炎症和氧化应激,而下调 miR-22-3p 则减轻了 COPD 大鼠肺组织炎症和氧化应激。

COPD 中巨噬细胞加重炎症,促进气道纤维化,导致小气 道梗阻。巨噬细胞具分为 M1 表型(促炎表型)和 M2 表型(抗





Note: A-D: The relative expression levels of iNOS, CD86, CD206 and ARG1 mRNA, respectively; Compared with Con group, ^aP<0.05; Compared with COPD group, ^bP<0.05; Compared with COPD+NC-agomir group, ^cP<0.05; Compared with COPD+miR-22-3p-agomir group, ^dP<0.05; Compared with COPD+NC-antagomir group, ^cP<0.05



图 6 各组大鼠肺组织中 miR-22-3p 和 PTEN mRNA 水平 Fig.6 Levels of miR-22-3p and PTEN mRNA in lung tissues of rats in each group

Note: A and B: relative expression levels of miR-22-3p and PTEN mRNA, respectively; Compared with Con group, ^aP<0.05; Compared with COPD group, ^bP<0.05; Compared with COPD+NC-agomir group, ^cP<0.05; Compared with COPD+miR-22-3p-agomir group, ^dP<0.05; Compared with COPD+NC-antagomir group, ^eP<0.05.

炎表型)。多项研究表明 COPD 动物模型和患者中巨噬细胞发生 M1 型极化,从而加剧炎症反应^[17-19]。本研究分析检测了肺组织巨噬细胞 M1(iNOS 和 CD86)和 M2(CD206 和 ARG1)表型标记物的 mRNA 水平。结果显示上调 miR-22-3p 促进了 COPD 大鼠肺组织巨噬细胞 M1 型极化,而下调 miR-22-3p 则促进了 COPD 大鼠肺组织巨噬细胞 M2 型极化。

PTEN 最初被认为是一种肿瘤抑制基因。研究表明吸烟者 和肺癌患者的上皮细胞中 PTEN 缺失^[20]。PTEN 基因多态性是 COPD 的重要危险因素^[21]。我国宣威地区的 COPD 发病率是全 国平均水平的两倍多,与煤炭使用密切相关^[22]。Hosgood 等^[21]进 行了一项病例对照研究(53 例病例,107 例对照),研究显示 PTEN 是与 COPD 关联最显著的基因。单核苷酸多态性(SNP) 分析显示 PTEN rs701848 纯合子变异携带者患 COPD 的风险 显著降低,PTEN 基因变异可能是宣威地区 COPD 的重要危险 因素。此外,香烟烟雾提取物(Cigarette smoke extract,CSE)可 降低 PTEN 蛋白水平^[23]。Yanagisawa 等^[24]检测了 COPD 患者肺 组织中 PTEN 蛋白的表达,结果显示 COPD 患者肺组织中 PTEN 蛋白的表达水平低于非 COPD 患者,且与气流阻塞程度 呈正相关(r=0.500, P=0.001);此外,在原代支气管上皮细胞和 BEAS-2B 细胞中,CSE 降低 PTEN 蛋白的表达,促进促炎细胞 因子的产生。本研究前期通过 TargetScan 数据库预测 miR-22-3p 与 PTEN 存在结合靶点,其他学者也证实了 miR-22-3p 通过与 PTEN 3' UTR 互补配对而调控其转录和表 达^[11,2526]。本研究结果显示上调 miR-22-3p 进一步抑制了 COPD 大鼠肺组织中 PTEN 的表达,而下调 miR-22-3p 则促进了 COPD 大鼠肺组织中 PTEN 的表达,表明 COPD 大鼠肺组织中 miR-22-3p 靶向抑制 PTEN 的表达,miR-22-3p 可能通过影响 PTEN 的表达来参与 COPD 的发病过程。

PTEN 是 PI3K/AKT 通路的负调控因子, 许多报告表明 PI3K/AKT 在 COPD 患者外周血单核细胞中被激活,并与 COPD 疾病的进展相关^[27,28]。在长期感染的 COPD 肺中,持续 CSE 暴露可激活 Akt 并保持较长时间, Akt 的激活增强了巨噬 细胞、中性粒细胞和 T 淋巴细胞等炎症相关细胞存活,并在呼 吸道、实质和肺血管中聚集^[29]。Akt 是诱导关键免疫和炎症反应 所必需的信号通路的一部分。Akt 选择性激活 NF-κB p65/RelA 异二聚体以协调单核细胞和中性粒细胞的募集,NF-κB的结合 位点存在于许多炎症介质的启动子区。NF-KB 通常与其抑制剂 IKB结合而隔离在细胞质中,当细胞暴露于CS、氧化应激和 TNF- α 等激活信号时, I κ B 被磷酸化并降解, 这一过程需要 Akt 的活化^[30]。Akt 也可以通过磷酸化 NF-κB p65 的转录激活域来 增强 NF-κB p65 的 DNA 结合活性^[31]。本研究结果显示 COPD 大鼠肺组织中 PI3K/AKT/NF-κB 信号通路被激活。上调 miR-22-3p 进一步激活了 COPD 大鼠肺组织中 PI3K/AKT/NF-κB 信号通路, 而下调 miR-22-3p 则抑制了 COPD 大鼠肺组织中 PI3K/AKT/NF-κB 信号通路的激活。其他 学者报道,NF-κB是广泛研究的促炎信号,活化的 NF-κB 可促 进巨噬细胞 M1 型极化和炎症因子的释放^[32,33]。此外, NF-κB不 仅调节炎症反应,而且影响氧化应激^[34]。NF-κB可以调节核因 子 E2 相关因子 2(Nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)转录 和活性,从而影响 Nrf2 下游抗氧化基因的转录和表达,而 Nrf2 的缺失有会加剧 NF-κB 的活性,增加促炎细胞因子的产生^[3]。 本研究结果说明 COPD 大鼠肺组织中 miR-22-3p 的上调通过 靶向抑制 PTEN 进而激活PI3K/AKT/NF-κB 信号通路,导致炎



Fig.7 Protein expression levels of PTEN, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and p-NF-κB p65/NF-κB p65 in lung tissues of rats in each group Note: A: The protein expression levels were detected by Western blot; B-E: Relative protein expression of PTEN, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and p-NF-κB p65/NF-κB p65, respectively; Compared with Con group, *P<0.05; Compared with COPD group, *P<0.05; Compared with COPD+NC-agomir group, *P<0.05; Compared with COPD+miR-22-3p-agomir group, 4P<0.05; Compared with COPD+NC-antagomir group, *P<0.05.</p>

症和氧化应激反应的加剧以及巨噬细胞 M1 型极化,最终加重 了 COPD, 相反, 抑制 miR-22-3p 的上调可能通过 PTEN/PI3K/AKT/NF-κB 信号通路减缓 COPD 的进展。

综上所述,本研究表明 miR-22-3p 在 COPD 大鼠肺组织中 上调,可能通过激活 PTEN/PI3K/AKT/NF-κB 信号通路,促进 肺组织炎症反应和氧化应激,加重大鼠肺功能障碍和肺组织结 构损伤。

参考文献(References)

- Agustí A, Vogelmeier C, Faner R. COPD 2020: changes and challenges [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2020, 319(5): L879-1883
- [2] Vogelmeier CF, Román-Rodríguez M, Singh D, et al. Goals of COPD treatment: Focus on symptoms and exacerbations [J]. Respir Med, 2020, 166: 105938
- [3] Yang W, Li F, Li C, et al. Focus on early COPD: definition and early lung development [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2021, 16: 3217-3228
- [4] Adeloye D, Song P, Zhu Y, et al. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis [J]. Lancet Respir Med, 2022, 10(5): 447-458
- [5] Li Y, Yin Z, Fan J, et al. The roles of exosomal miRNAs and lncRNAs in lung diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2019, 4: 47
- [6] Sundar IK, Li D, Rahman I. Small RNA-sequence analysis of plasma-derived extracellular vesicle miRNAs in smokers and patients

with chronic obstructive pulmonary disease as circulating biomarkers [J]. J Extracell Vesicles, 2019, 8(1): 1684816

- [7] Zhu M, Ye M, Wang J, et al. Construction of Potential miRNA-mRNA Regulatory Network in COPD plasma by bioinformatics analysis[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020, 15: 2135-2145
- [8] Shen Z, Tang W, Guo J, et al. miR-483-5p plays a protective role in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(1): 193-200
- [9] Ma DJ, Zhou XY, Qin YZ, et al. MiR-22-3p Expression is down-regulated in lung adenocarcinoma [J]. Acta Biochim Pol, 2021, 68(4): 667-672
- [10] Wen W, Chen X, Huang Z, et al. Resveratrol regulates muscle fiber type conversion via miR-22-3p and AMPK/SIRT1/PGC-1α pathway [J]. J Nutr Biochem, 2020, 77: 108297
- [11] Wang X, Wang Y, Kong M, et al. MiR-22-3p suppresses sepsis-induced acute kidney injury by targeting PTEN[J]. Biosci Rep, 2020, 40(6): BSR20200527
- [12] 方苏榕,谷伟,谭焰,等.烟熏联合内毒素构建 COPD 大鼠模型[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2013,33(9):1226-1230
- [13] Zheng Y, Liu J, Chen P, et al. Exosomal miR-22-3p from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells protects against lipopolysaccharid-induced acute lung injury [J]. Life Sci, 2021, 269: 119004
- [14] Roman-Rodriguez M, Kaplan A. GOLD 2021 Strategy Report: Implications for Asthma-COPD Overlap [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2021, 16: 1709-1715

- [15] Klueh U, Antar O, Qiao Y, et al. Role of interleukin-1/interleukin-1 receptor antagonist family of cytokines in long-term continuous glucose monitoring in vivo [J]. J Diabetes Sci Technol, 2013, 7(6): 1538-1546
- [16] Fu PK, Yang CY, Tsai TH, et al. Moutan cortex radicis improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through anti-inflammation[J]. Phytomedicine, 2012, 19(13): 1206-1215
- [17] 李丽, 郝立妓, 张志华, 等. 巨噬细胞极化及 IL-6、IL-10 对 COPD 大鼠肺血管重塑的作用机制研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(13): 1976-1980
- [18] 李尹,鲁静,张毅,等. 巨噬细胞极化及其在慢性阻塞性肺疾病中的作用[J].生理学报,2019,71(4):604-612
- [19] 李尹,张新芳,刘自兵,等. 电针对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺泡巨 噬细胞 M1 极化的影响[J]. 针刺研究, 2020, 45(3): 173-179
- [20] Kohno T, Takahashi M, Manda R, et al. Inactivation of the PTEN/MMAC1/TEP1 gene in human lung cancers [J]. Genes Chromosomes Cancer, 1998, 22(2): 152-156
- [21] Hosgood HD, 3rd, Menashe I, He X, et al. PTEN identified as important risk factor of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respir Med, 2009, 103(12): 1866-1870
- [22] Chapman RS, He X, Blair AE, et al. Improvement in household stoves and risk of chronic obstructive pulmonary disease in Xuanwei, China: retrospective cohort study[J]. Bmj, 2005, 331(7524): 1050
- [23] Shaykhiev R, Otaki F, Bonsu P, et al. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(5): 877-892
- [24] Yanagisawa S, Baker JR, Vuppusetty C, et al. Decreased phosphatase PTEN amplifies PI3K signaling and enhances proinflammatory cytokine release in COPD [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 313(2): L230-I239
- [25] Li C, Zhang L, Bu X, et al. LncRNA NORAD promotes the progression of myocardial infarction by targeting the miR-22-3p/PTEN axis [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),

2022, 54(4): 463-473

- [26] Xu Y, Cheng M, Mi L, et al. Mir-22-3p enhances the chemosensitivity of gastrointestinal stromal tumor cell lines to cisplatin through PTEN/PI3K/Akt pathway[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2018, 17(4): 318-325
- [27] Ganesan S, Unger BL, Comstock AT, et al. Aberrantly activated EGFR contributes to enhanced IL-8 expression in COPD airways epithelial cells via regulation of nuclear FoxO3A[J]. Thorax, 2013, 68 (2): 131-141
- [28] To Y, Ito K, Kizawa Y, et al. Targeting phosphoinositide-3-kinase-delta with theophylline reverses corticosteroid insensitivity in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(7): 897-904
- [29] Bozinovski S, Vlahos R, Hansen M, et al. Akt in the pathogenesis of COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2006, 1(1): 31-38
- [30] Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, et al. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase [J]. Nature, 1999, 401(6748): 82-85
- [31] Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, et al. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(5): 1626-1638
- [32] Liu L, Guo H, Song A, et al. Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF-κB and MAPK path ways [J]. BMC Immunol, 2020, 21(1): 32
- [33] Wang S, Lu M, Wang W, et al. Macrophage polarization modulated by NF-κB in polylactide membranes-treated peritendinous adhesion [J]. Small, 2022, 18(13): e2104112
- [34] Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling[J]. Cell Res, 2011, 21(1): 103-115
- [35] Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-κB response pathways [J]. Biochem Soc Trans, 2015, 43(4): 621-626