

· 论 著 · DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.15.012

## MicroRNA-101 对肺尘埃沉着病肺纤维化影响的研究\*

黄 健<sup>1</sup>, 汪 涛<sup>1</sup>, 苏盈笑<sup>2</sup>, 洪 炳<sup>1△</sup>

江西省胸科医院:1. 呼吸与危重症医学科;2. 麻醉科, 江西南昌 330006

**摘要:**目的 研究 microRNA-101(miR-101)对肺尘埃沉着病肺纤维化的作用机制,为肺尘埃沉着病的二级预防提供新的策略和方法。**方法** 通过体外实验初步探讨 miR-101 在 SiO<sub>2</sub> 粉尘诱导肺纤维化中的调节作用。选取 SPF 级健康成年雄性小鼠 18 只,将其分为空白对照组、生理盐水组和 SiO<sub>2</sub> 组,每组 6 只。采用 SiO<sub>2</sub> 粉尘混悬液构建小鼠肺尘埃沉着病模型,HE 染色观察大鼠肺组织形态学改变;采用实时定量 PCR、蛋白质印迹法检测各组小鼠肺组织中 miR-101 和 I 型胶原蛋白(Col I)表达水平。**结果** 模型组在 28 d 形成肺尘埃沉着病模型。空白对照组及生理盐水组小鼠肺组织结构完整,肺泡间隔均匀,无间质纤维组织增生, SiO<sub>2</sub> 组小鼠肺部组织发生纤维化,肺部结构被破坏,肺间质和肺泡内有大量的细胞浸润,并伴有炎症反应,血管壁增厚。SiO<sub>2</sub> 组的 miR-101 表达水平低于空白对照组,而 Col I 蛋白水平高于空白对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** miR-101 通过参与抑制炎症因子的释放,从而实现对肺尘埃沉着病模型细胞的纤维化的抑制。

**关键词:**肺尘埃沉着病; 微小 RNA-101; 肺纤维化

中图法分类号:R563

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)15-2192-04

**Study of effect of microRNA-101 on pulmonary fibrosis in pneumoconiosis\***HUANG Jian<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>, SU Yingxiao<sup>2</sup>, HONG Bing<sup>1△</sup>

1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine; 2. Department of Anesthesiology, Chest Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of microRNA-101 (miR-101) on delaying pulmonary fibrosis of pneumoconiosis and its mechanism and to provide new strategies and methods for the secondary prevention of pneumoconiosis. **Methods** The regulatory role of miR-101 in SiO<sub>2</sub> dust-induced pulmonary fibrosis was preliminarily explored by in vitro experiments. Eighteen healthy adult male mice of SPF grade were selected and divided into blank control group, saline group and SiO<sub>2</sub> group, 6 mice in each group. The mouse pneumoconiosis model was constructed by using SiO<sub>2</sub> dust suspension, and the morphological changes of mouse lung tissue were observed by HE staining, the expression levels of miR-101 and Col I were detected by real-time quantitative PCR and Western blotting in the lung tissues of each group of mice. **Results** The model group formed a pneumoconiosis model at 28 d. In the blank control group and the saline control group, the lung tissue structure was intact, the alveolar intervals were uniform, and there was no interstitial fibrous tissue proliferation, while in the SiO<sub>2</sub> group, fibrosis occurred in the lung tissue, the lung structure was damaged, and there was a large number of cells infiltrating in the interstitium and alveoli, accompanied by inflammatory reaction and thickening of the vascular wall. miR-101 expression level was lower than that of the blank control group in the SiO<sub>2</sub> group, and the Col I protein level was higher than that of the blank control group, and the differences were all statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** MiR-101 can inhibit the fibrosis of pneumoconiosis model cells by inhibiting the release of inflammatory factors.

**Key words:** pneumoconiosis; microRNA-101; pulmonary fibrosis肺尘埃沉着病是一种不可逆的职业病,由于患者 长期吸入大量游离的二氧化硅(SiO<sub>2</sub>)粉尘导致肺部

\* 基金项目:江西省卫生健康委科技计划项目(202211259)。

作者简介:黄健,男,副主任医师,主要从事呼吸与危重症医学方面的研究。△ 通信作者, E-mail:13767164706@163.com。

出现广泛结节性纤维化病变<sup>[1]</sup>。数据显示,我国至今肺尘埃沉着病患者累计超 70 万人<sup>[2]</sup>。肺尘埃沉着病患者的预后情况都较差,因此找寻新的治疗方向成为当今的研究热点。研究显示,miRNA(miRNA)可通过调控相关的信号通路,参与到纤维化的过程中<sup>[3]</sup>,本研究在此基础上,进行细胞实验,通过观察相关指标水平在不同对照实验组的变化,研究 miRNA-101(miR-101)在延缓肺尘埃沉着病肺纤维化中的作用及机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** SPF 级健康成年雄性 C57BL/6 小鼠 18 只,2 月龄,体质量 20~25 g,购自南昌大学医学院动物中心。

**1.2 仪器与试剂** Olympus 光学显微镜(Olympus 公司),Forma 311CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、ECO0.9 超净工作台、Siemens 低温 -80 °C 冰柜、低温离心机(美国 Thermo 公司),4 °C 冰箱及 -20 °C 冰箱(德国 Siemens 公司)、DYY-7C Western 电泳仪(北京六一生物技术有限公司)、SPL-250 电热恒温水浴锅(北京泰瑞有限公司);兔抗鼠 I 型胶原蛋白(Col I)抗体(Gene-Tex 公司),羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)抗体(碧云天生物技术公司),RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂(上海贝博生物公司);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(庄盟生物公司);BCA 蛋白定量试剂盒(北京百莱公司),SiO<sub>2</sub> 粉尘(Sigma 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 肺尘埃沉着病小鼠的构建** 将 18 只雄性 C57BL/6 小鼠均分为空白对照组、生理盐水组及 SiO<sub>2</sub> 组,各组小鼠称体质量后,用 75%乙醇消毒,钝性分离皮肤,逐层暴露气管。生理盐水组、SiO<sub>2</sub> 组分别使用微量注射器吸取 50 μL 生理盐水或 SiO<sub>2</sub> 粉尘混悬液后,经两气管软骨环间隙朝向心端刺入气管,空白对照组小鼠只做假手术处理。待动物清醒后,常规饲养。

**1.3.2 小鼠肺组织形态** 各组小鼠处死后留取肺组织,取部分肺组织采用 4%的多聚甲醛固定 24 h,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋等步骤后,以 5 ? m 厚度连续切片,HE 染色后,采用光学显微镜观察各组小鼠肺组织形态。

**1.3.3 小鼠肺组织 miR-101 表达水平检测** 小鼠处死后留取肺组织,通过实时定量 PCR 检测各组小鼠肺组织中 miR-101 的表达水平。

**1.3.4 小鼠肺组织 Col I 表达水平检测** 采用 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂预混液裂解细胞,将上清液置于 -80 °C 保存,采用蛋白质印迹法对蛋白质进行定量检测,各组细胞的蛋白样品通过 SDS-PSGE 凝胶电泳进行分离。PVDF 膜恒流 200 mA 进行转膜,转膜结束用考马斯亮蓝染色液观察凝胶中蛋白转移情况。用丽春红染色液对 PVDF 膜进行染色,膜上有粉红色条带表明蛋白转移成功。使用 TBST 缓冲液漂洗干净,进行免疫检测,5%脱脂奶粉封闭膜,4 °C 过夜。按照兔抗鼠一抗说明书配制好反应液,孵育 2 h。TBST 缓冲液漂洗 3 次,按照羊抗兔二抗说明书配制好二抗反应液,孵育 2 h。TBST 缓冲液洗膜 3 次,显色后上机采图。应用 ImageLab 医学图像分析软件对蛋白质印迹所表达的条带进行半定量检测,用平均光密度(A)表示。框取各泳道蛋白,对照彩色 Marker 分层及相应的分子量标记,测出 A,目的蛋白 A/大鼠 β 肌动蛋白(β-actin)A。

**1.4 检测指标** (1)比较各组小鼠肺组织形态学变化;(2)比较各组小鼠肺组织的 miR-101 和 Col I 蛋白表达水平。

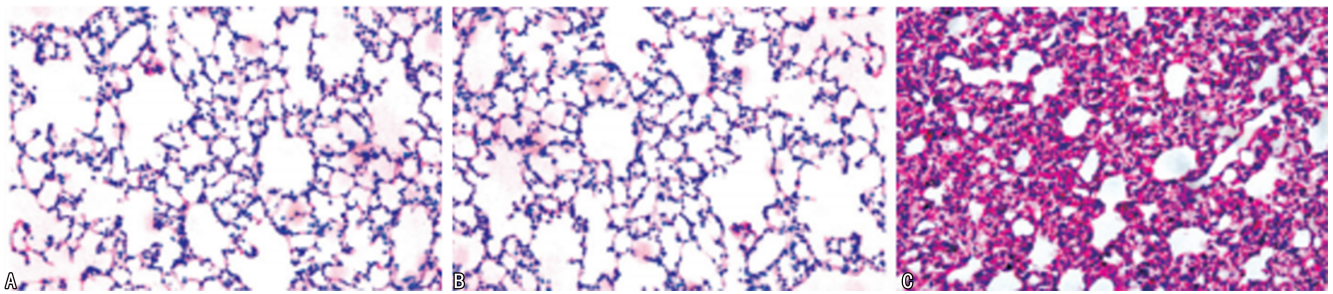
**1.5 统计学处理** 应用 Image Lab<sup>TM</sup> 进行图像采集,采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肺尘埃沉着病小鼠的构建情况** SiO<sub>2</sub> 组在 28 d 形成肺尘埃沉着病模型。空白对照组及生理盐水组小鼠肺组织结构完整,肺泡间隔均匀,无间质纤维组织增生。SiO<sub>2</sub> 组小鼠肺部组织发生纤维化,肺部结构被破坏,肺间质和肺泡内有大量的细胞浸润,并且伴有炎症反应,血管壁增厚。

**2.2 肺尘埃沉着病小鼠肺组织形态学改变** 空白对照组及生理盐水组肺泡结构正常,肺泡壁薄;SiO<sub>2</sub> 组肺泡间隔增宽,肺泡壁增厚,结构塌陷,纤维细胞和肉芽肿明显,炎症细胞大量浸润,肺间质实变充血,残存少量正常肺泡。见图 1。

**2.3 三组小鼠肺组织的 miR-101 和 Col I 蛋白表达水平比较** 生理盐水组肺组织的 miR-101 和 Col I 蛋白表达水平与空白对照组比较,差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。SiO<sub>2</sub> 组的 miR-101 表达水平低于空白对照组,而 Col I 蛋白水平高于空白对照组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 3。



注:A 为空白对照组;B 为生理盐水组;C 为 SiO<sub>2</sub> 组。

图 1 各组小鼠肺组织形态学变化(HE 染色, ×200)

表 3 各组肺尘埃沉着病小鼠肺组织的 miR-101 和 Col I 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                 | miR-101      | Col I 蛋白( $\mu\text{g/L}$ ) |
|--------------------|--------------|-----------------------------|
| 空白对照组              | 1.03 ± 0.04  | 0.48 ± 0.09                 |
| 生理盐水组              | 1.02 ± 0.03  | 0.43 ± 0.07                 |
| SiO <sub>2</sub> 组 | 0.56 ± 0.05* | 0.82 ± 0.11*                |

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

### 3 讨 论

肺尘埃沉着病是我国目前危害最严重和造成严重社会影响的职业病。肺尘埃沉着病的肺纤维化涉及大量细胞因子及细胞因子形成的复杂网络系统。近年来发现 miRNA 可以靶向作用于相关的信号传导通路<sup>[4-5]</sup>,对组织纤维化的发生、发展起到重要作用。国外研究表明 miR-101 在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中表达下调,可抑制成纤维细胞活化<sup>[6-8]</sup>。目前已知肺尘埃沉着病的病理改变包括结节、弥漫性纤维化、尘斑,但肺纤维化发病机制较为复杂尚未完全明确<sup>[9-12]</sup>。肺纤维化是由于各类刺激导致的肺泡上皮细胞损伤,进一步与成纤维细胞作用,在肺损伤区域出现肺成纤维细胞细胞累积,肺成纤维细胞灶从而形成<sup>[13]</sup>。

SiO<sub>2</sub> 进入肺组织后,能够激活细胞自噬,进而释放大量炎症细胞因子,造成持续性循环信号错误传导,导致级联放大效应,造成不可逆的肺组织损伤,致使患者生存质量下降。HE 染色后观察各组小鼠肺组织形态学改变发现,空白对照组及生理盐水对照组肺泡结构正常,肺泡壁薄;SiO<sub>2</sub> 模型组肺泡间隔增宽,肺泡壁增厚,结构塌陷,纤维细胞和肉芽肿明显,炎症细胞大量浸润,肺间质实变充血,残存少量正常肺泡,提示 SiO<sub>2</sub> 干预后肺组织损伤严重。

miRNA 是一类内源基因编码的非编码单链 RNA 分子,可对基因表达进行调控。miR-101 过表达可以减轻心肌梗死后心肌纤维化,也可作为其他器官纤维化疾病潜在治疗靶点。本研究结果表明, SiO<sub>2</sub> 组的 miR-101 表达水平低于空白对照组( $P < 0.05$ ),

提示 miR-101 是一种负性调控因子,在肺尘埃沉着病纤维化中发挥了同样的作用。本研究结果显示,空白对照组与生理盐水对照组小鼠肺组织的 miR-101 和 Col I 表达水平比较,差异无统计学差异( $P > 0.05$ ),而 SiO<sub>2</sub> 组的 miR-101 表达水平显著降低,Col I 蛋白水平则显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明 SiO<sub>2</sub> 粉尘能够激活肺纤维化细胞,使 Col I 蛋白表达水平明显升高,提示有大量成纤维细胞发生了转化,而 miR-101 可改善 SiO<sub>2</sub> 粉尘诱导的肺纤维化。既往研究表明,miR-101 是一种抗纤维化的 microRNA<sup>[14]</sup>,与本研究结果一致。

综上所述,miR-101 的特异性表达抑制了肺纤维化的发病过程,调控 miR-101 可作为肺纤维化治疗的有效方法,为肺纤维化的临床诊断和治疗提供新的依据和方向。

### 参考文献

- [1] 胡晓平,徐洪,杨方. 肾素血管紧张素系统调节肽 Ac-SD-KP 在尘肺纤维化中的作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2017,35(9):718-720.
- [2] 张华,张松泉,王艳,等. 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂对大鼠尘肺纤维化干预的研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2019,37(6):408-415.
- [3] GHAFOURI-FARD S, ABAK A, TALEBI S F, et al. Role of miRNA and lncRNAs in organ fibrosis and aging [J]. Biomed Pharmacother,2021,143:112132.
- [4] 张兆强,王超,林凡忠,等. 矽尘对大鼠脂质过氧化及肺纤维化的影响[J]. 毒理学杂志,2020,34(1):47-50.
- [5] 傅玉琼,周伟. 转化生长因子  $\beta 1$  及成纤维细胞生长因子基因敲除对尘肺小鼠肺纤维化的影响[J]. 解放军医药杂志,2017,29(1):27-30.
- [6] 卫杨林,殷子斐,李霞. 肺纤维化体外模型建立方法的研究进展[J]. 山东医药,2018,58(22):93-96.
- [7] 陈志军,沙焱,黄惠霞,等. 大鼠染矽尘后不同时间重复移植人脐带间充质干细胞对肺纤维化的影响[J]. 职业卫生与应急救援,2019,37(4):302-306. (下转第 2200 页)

- [7] ERDOGAN O, KARAAVVAZ E, ERDOGAN T, et al. A new biomarker that predicts ventricular arrhythmia in patients with ischemic dilated cardiomyopathy: Galectin-3 [J]. *Rev Port Cardiol (Engl Ed)*, 2021, 40(11): 829-835.
- [8] 高润霖. 急性心肌梗死诊断和治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2001, 25(12): 106-129.
- [9] 唐克强, 王芳, 李腾龙. 急性 ST 段抬高型心肌梗死行直接 PCI 术后再灌注心律失常的临床分析[J]. *重庆医学*, 2016, 45(21): 2939-2941.
- [10] 陈礼学. 急性心肌梗死行直接经皮冠状动脉介入治疗后再灌注心律失常的临床分析[J]. *中国临床医生杂志*, 2017, 45(10): 48-50.
- [11] KLEBER M E, DELGADO G, GRAMMER T B, et al. Uric acid and cardiovascular events; a mendelian randomization study[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(11): 2831-2838.
- [12] MAL K, ALI J B, FATIMA K, et al. Incidence of hyperuricemia in patients with acute myocardial infarction - a case-control study[J]. *Cureus*, 2020, 12(1): e6722.
- [13] NODERA M, SUZUKI H, MATSUMOTO Y, et al. Association between serum uric acid level and ventricular tachyarrhythmia in heart failure patients with implantable cardioverter-defibrillator[J]. *Cardiology*, 2018, 140(1): 47-51.
- [14] MANTOVANI A, RIGOLON R, PICHIRI I, et al. Relation of elevated serum uric acid levels to first-degree heart block and other cardiac conduction defects in hospitalized patients with type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Complications*, 2017, 31(12): 1691-1697.
- [15] DENG Y, LIU F, YANG X, et al. The key role of uric acid in oxidative stress, inflammation, fibrosis, apoptosis, and immunity in the pathogenesis of atrial fibrillation[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8(2): 641136.
- [16] MARIÉS L, MANITIÚ I. Diagnostic and prognostic values of B-type natriuretic peptides (BNP) and N-terminal fragment brain natriuretic peptides (NT-pro-BNP) [J]. *Cardiovasc J Afr*, 2013, 24(7): 286-289.
- [17] WANG Y P, WANG J H, WANG X L, et al. Roles of ST2, IL-33 and BNP in predicting major adverse cardiovascular events in acute myocardial infarction after percutaneous coronary intervention [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(11): 2677-2684.
- [18] LEVINE Y C, ROSENBERG M A, MITTLEMAN M, et al. B-type natriuretic peptide is a major predictor of ventricular tachyarrhythmias [J]. *Heart Rhythm*, 2014, 11(7): 1109-1116.
- [19] YANG Z, XU M, ZHANG C, et al. A predictive model using left atrial function and B-type natriuretic peptide level in predicting the recurrence of early persistent atrial fibrillation after radiofrequency ablation [J]. *Clin Cardiol*, 2021, 44(3): 407-414.
- [20] BLANDA V, BRACALE U M, DI TARANTO M D, et al. Galectin-3 in cardiovascular diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9232.
- [21] LI M, YUAN Y, GUO K, et al. Value of Galectin-3 in acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2020, 20(4): 333-342.
- [22] GONG M, CHEUNG A, WANG Q S, et al. Galectin-3 and risk of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(3): e23104.
- [23] 刘韦卓, 吴帮卫, 李剑. 半乳糖凝集素-3 在心房颤动中的致纤维化作用研究进展 [J]. *中华心律失常学杂志*, 2019, 23(2): 175-178.

(收稿日期: 2022-11-06 修回日期: 2023-03-11)

(上接第 2194 页)

- [8] 王路, 孙悦, 刘嘉祺, 等.  $\beta$ -葡聚糖抑制大鼠硅肺纤维化损伤的机制研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(12): 1829-1832.
- [9] 邓海静, 王瑾, 侯晓丽, 等. Ac-SDKP 对炎症因子 MRP-14 (S100A9) 的调节在硅肺大鼠纤维化病变中的作用 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2020, 41(1): 69-73.
- [10] 王宇欣, 周慈, 王和静, 等. 尘肺患者外周血胸腺细胞分化抗原-1 DNA 甲基化的改变及意义 [J]. *环境与职业医学*, 2019, 36(3): 242-247.
- [11] 隋君娜, 郭建, 王展, 等. TNF- $\alpha$  单抗对大鼠矽肺纤维化中 NF- $\kappa$ B 活化和 iNOS 表达的影响 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2017, 35(5): 332-336.
- [12] 朴秀美, 金恩惠, 陈兴华, 等. 白茶提取物对纳米 SiO<sub>2</sub> 诱导的大鼠肺纤维化的抑制作用及机制 [J]. *茶叶科学*, 2020, 40(2): 157-164.
- [13] 张钊, 孙影. 活性氧和硫氧环蛋白过氧化物酶 2 在矽肺纤维化中的作用 [J]. *包头医学院学报*, 2017, 33(11): 131-133.
- [14] HUANG C, XIAO X, YANG Y, et al. MicroRNA-101 attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and activation [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(40): 16420-16439.

(收稿日期: 2023-02-02 修回日期: 2023-06-05)