

黄钟,孙洁,姚振滨,等. 下调 miR-128-3p 缓解脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 9-16.

Huang Z, Sun J, Yao ZB, et al. Alleviation of the inflammatory response induced by acute lung injury in sepsis rats by miR-128-3p down-regulation and effects on lung tissue morphology [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 9-16.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.002

下调 miR-128-3p 缓解脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响

黄 钟¹, 孙 洁², 姚振滨¹, 李桂花^{1*}, 许晓刚¹

(1. 石河子大学医学院第一附属医院 急诊内科, 新疆 石河子 832000;
2. 石河子大学医学院第一附属医院 院内感染控制办公室, 新疆 石河子 832000)

【摘要】 目的 探究下调 miR-128-3p 缓解脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响。方法 选取 60 只健康 3 周龄 SD 大鼠, 采用随机分组法将大鼠分为: 假手术组、脓毒症模型组、空白转染组和 miR-128-3p 沉默组, 每组 15 只。除假手术组外各组大鼠采用盲肠结扎穿孔法制备大鼠脓毒症模型; 空白转染组构建空白质粒并转染大鼠; miR-128-3p 沉默组构建慢病毒质粒并转染大鼠。RT-PCR 检测 miR-128-3p 表达, 确定干扰成功; 检测各组大鼠静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换情况; 采用 ELISA 检测外周血清 IL-6、TNF- α 、iNOS 的含量; 采用 HE 染色观察肺上皮组织纤维化情况及病理损伤情况; 采用 TUNEL 染色结合蛋白质印记检测肺组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达; 采用 MASSON 染色结合蛋白质印记检测 TGF- β 和 α -SMA 的表达情况。结果 HE 染色结果显示: miR-128-3p 沉默组细胞分布较为均匀, 且坏死细胞较少。MASSON 染色果显示: 脓毒症模型组肺组织出现严重纤维化和损伤, miR-128-3p 沉默组肺组织纤维化程度得到改善。相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠 miR-128-3p 表达、气道阻力、IL-6 含量水平、iNOS 含量水平、TNF- α 含量水平、肺组织细胞凋亡率、cleaved cas3/Caspase-3、cleaved cas9/Caspase-9、TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达均显著升高 ($P<0.05$), 静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换显著降低 ($P<0.05$)。相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组 miR-128-3p 表达、气道阻力、IL-6 含量水平、iNOS 含量水平、TNF- α 含量水平、肺组织细胞凋亡率、cleaved cas3/Caspase-3、cleaved cas9/Caspase-9、TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达均显著降低 ($P<0.05$), 静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换显著升高 ($P<0.05$)。结论 下调 miR-128-3p 可以缓解脓毒症大鼠急性肺损伤, 其作用机制可能与降低大鼠体内炎症反应并抑制肺组织细胞的凋亡相关。

【关键词】 脓毒症; 急性肺损伤; 组织形态学; 炎症反应

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0009-08

Alleviation of the inflammatory response induced by acute lung injury in sepsis rats by miR-128-3p down-regulation and effects on lung tissue morphology

HUANG Zhong¹, SUN Jie², YAO Zhenbin¹, LI Guihua^{1*}, XU Xiaogang¹

(1. the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College Department of Emergency Medicine, Shihezi 832000, China.
2. the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College Nosocomial Infection Control Office, Shihezi 832000)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区地区科学基金项目 (81260363)。

[作者简介] 黄钟 (1981—), 男, 本科, 主治医师, 主要从事急诊危重症、急性肺损伤方面研究。E-mail: hz09932121@163.com

[通信作者] 李桂花 (1965—), 女, 硕士, 主任医师, 主要从事急诊危重症研究。E-mail: lgh169@126.com

【Abstract】 Objective To explore alleviation of the inflammatory response induced by acute lung injury in sepsis rats by down-regulation of miR-128-3p and effects on lung tissue morphology. **Methods** Sixty healthy 3-week-old SD rats were divided into a sham-operated group, a sepsis model group, a blank transfection group and an miR-128-3p inhibitor group by a random grouping method with 15 rats in each group. Sepsis models were prepared by cecal ligation and puncture. In the blank transfection group, blank plasmids were constructed and were transfected into rats. In the miR-128-3p inhibitor group, lentiviral plasmids were constructed and were transfected into rats. The expression of miR-128-3p was detected by RT-PCR to determine the success of interference. Resting ventilation, changes in airway resistance and lung volume were determined in each group. The contents of serum IL-6, TNF- α and iNOS in peripheral blood were detected by ELISA. Lung tissues and pathological injury were observed by hematoxylin & eosin (HE) staining. The expression of Caspase-3 and Caspase-9 in lung tissue was detected by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) staining and western blotting. The expression of TGF- β and α -SMA was detected by Masson's trichrome staining and western blotting. **Results** HE staining showed that cell distribution was even in the miR-128-3p inhibitor group, with few necrotic cells. MASSON staining showed that there was severe fibrosis and damage of lung tissues in sepsis model group, and degree of lung tissue fibrosis in miR-128-3p silencing group was improved. Compared with the sham-operated group, expression of miR-128-3p, airway resistance, levels of IL-6, iNOS and TNF- α , apoptosis rate of lung tissue cells, relative expression of cleared cas3/Caspase-3, cleared cas9/Caspase-9, and TGF- β and α -SMA protein levels were significantly increased ($P < 0.05$), while resting ventilation, changes in airway resistance and lung volume were significantly decreased in the sepsis model group ($P < 0.05$). Compared with the blank transfection group, expression of miR-128-3p, airway resistance, levels of IL-6, iNOS and TNF- α , apoptosis rate of lung tissue cells, relative expression of cleared cas3/Caspase-3, cleared cas9/Caspase-9, and TGF- β and α -SMA protein levels were significantly decreased ($P < 0.05$), while resting ventilation, changes in airway resistance and lung volume were significantly increased in the miR-128-3p inhibitor group ($P < 0.05$). **Conclusions** Down-regulation of miR-128-3p can alleviate acute lung injury in sepsis rats and the mechanism of action may be related to a reduced inflammation response and inhibited apoptosis of lung tissue cells.

【Keywords】 sepsis; acute lung injury; histomorphology; inflammatory response

脓毒症是机体对感染反应失调所致的危及生命的器官功能障碍,其发病率和死亡率均较高^[1]。虽然近年来,医药发展迅速,但对于严重的脓症患者机体对感染刺激的机体的免疫、内分泌代谢、炎症、凝血等系统在感染时的综合反应的治疗仍不完善^[2]。临床上所采取的治疗方法以支持治疗为主,但随着对分子细胞学研究的深入,miRNA 在调控细胞凋亡及相关恶性生物学特征中发挥了重要作用^[3]。近年来随着研究的深入发现 miR-128-3p 在相关疾病中扮演重要角色。赵阳等^[4]研究表明 miR-128-3p 过表达可以靶向 MAPK1 抑制膀胱癌细胞株的侵袭,迁移和上皮间质转化。侯绍蔚研究表明 miR-128-3p 靶向 TCF4 抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖、侵袭^[5]。张华东等^[6]研究表明 miR-128-3p 能通过靶向 BMI 调控炎症反应。由此我们推测 miR-128-3p 对毒症大鼠急性肺损伤中相关细胞的凋亡及炎症反应可能有一定的影响。但目前关于 miR-128-3p 在脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响研究较少。本文旨在研究 miR-128-3p 对脓毒症大鼠急性肺损伤炎症反应、肺组织形态学的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 3 周龄 SD 大鼠,体重(60 $\pm$ 6)g,60 只,购自广东医学院实验动物中心[SCXK(粤)2019-0050],于广东省检迅检测科技有限公司 SPF 级动物房中进行饲养[SYXK(粤)2019-0216],自由饮水和进食,温度维持 25℃ 左右,光照/黑暗各 12 h,常规饲养。本实验通过本院动物伦理委员会批准(20180201);动物实验严格遵循动物实验减少(reduction)、优化(refinement)和替代(replacement)-3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

TRAIL(英国 Pepro Tech 公司);Caspase-3、Caspase-9、转化生长因子- β (Transformed growth factor- β , TGF- β)抗体(货号:ab179695;批号:20190103)和 α -平滑肌肌动蛋白(Alpha-smooth muscle actin, α -SMA)抗体(货号:ab240678;批号:20190401)(艾博抗公司);HRP 羊抗兔 IgG、HRP 羊抗鼠 IgG 抗体(美国 Thermo 公司);白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒(货号:SBJ-H0465;

批号 20190301)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒(货号: SBJ-H0038; 批号 20190304)、一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) ELISA 试剂盒购(货号: SBJ-H1350; 批号: 20190307)(南京森贝伽生物科技有限公司); MASSON 染液(货号: SNM346, 北京百奥莱博科技有限公司); TUNEL 染液(货号: 11684817910, 上海意杰生物科技)。

Sysmex-chemix-180 全自动生化分析仪(日本 Furuno Electric 公司); TDL-5 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 3w-5 低温离心机(湖南恒诺离心机有限公司); SG-51 金相显微镜(上海光学仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及建立模型

将 60 只大鼠适应性喂养 1 周, 采用随机分组法将大鼠分为: 假手术组、脓毒症模型组、空白转染组和 miR-128-3p 沉默组, 每组 15 只, 除假手术组其余各组大鼠采用盲肠结扎穿孔法制备大鼠脓毒症模型, 操作流程参考文献^[7]: 大鼠麻醉, 去毛发, 腹正中中线作长 3 cm 的切口, 结扎位置选取距离盲端 1.5 cm 处, 结扎远端进行针穿并挤出少许肠管内粪便, 再将盲肠回纳腹腔, 关腹并进行补液。假手术组不结扎及针头对穿盲肠, 其余步骤相同。判断模型成功标准参考秦怡等^[8]研究, 大鼠活动减少、摄食减少、嗜睡、蜷缩、眼角出现分泌物等, 7 h 血培养阳性为模型成功, 同时导致肺功能损伤为造模成功。肺纤维化评价标准^[9]: 呈现出慢性肺泡炎且其中成分出现进行性损害, 纤维组织大量增生、间质胶原紊乱甚至出现囊性变化, 肺泡阴影呈现出磨玻璃状, 严重进展时可出现结节状或网状阴影。

1.3.2 干预

空白转染组构建空白质粒并转染大鼠; miR-128-3p 沉默组构建慢病毒质粒并通过尾静脉注射转染大鼠, 设计 3 个 miR-128-3p 基因的干扰片段, 合成单链 DNA 片段, 片段两端分别含酶切位点, 退火形成双链 DNA。双酶切 miR-128-3p 沉默基因载体和 DNA 片段, 3"4 DNA 连接酶连接(由武汉华联科有限公司完成)。

1.3.3 RT-PCR 检测 miR-128-3p 表达

肺功能检测完毕 24 h 后, 处死大鼠并取出肺组织, TRIzol 提取总 RNA、反转录 cDNA 链并作为 PCR 扩增模板, 95℃ 2 min、95℃ 8 s、58℃ 35 s、72℃ 40 s、

40 个循环, 使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 计算出待测基因相对表达量。miR-128-3p: 上游引物: 5'-GTGCAGGGTCCGA GGT-3' 下游引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'。

GADPH: 上游引物: 5'-CTCAGACACCATGGG GAGGTGA-3' 下游引物: 5'-ATGATCTTGAGGCTG TTGTCATA-3'。

1.3.4 各组大鼠肺功能的检测

完成大鼠基因干预 24 h 后, 采用 AniRes2005 动物肺功能分析系统, 在常温下, 将大鼠置体描器内, 检测大鼠静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换情况。

1.3.5 大鼠外周血相关因子检测

断颈法处死大鼠后立即取大鼠血液 2 mL, 在离心机中以 1500 r/min 离心 15 min, 取上清液用 ELISA 法检测 IL-6、TNF- α 、iNOS 含量水平, 按照试剂盒说明书操作。

1.3.6 HE 染色观察肺组织及病理损伤情况

HE 染色观察大鼠肺上皮组织及病理损伤情况, 取大鼠肺上皮组织, 依次进行常规石蜡包埋、切片、苏木精染色、伊红染色、封片、高倍镜观察大鼠肺组织情况。

1.3.7 TUNEL 染色检测大鼠肺组织细胞凋亡情况

将肺上皮组织切片, 依次经过二甲苯清洗、乙醇清洗、蛋白酶 K 室温反应 15 min、10% 中性甲醛固定、乙醇乙酸浸润、3% 过氧化氢浸润、TdT 酶缓冲溶液孵育 5 min、终止液终止反应 20 min、过氧化酶标记物抗体孵育 20 min、DAB 显色 30 min、无水乙醇和二甲苯固定、晾干、封片, 于荧光显微镜下观察, 凋亡率=阳性细胞/总细胞 $\times$ 100%。

1.3.8 Western blot 检测蛋白表达水平

提取肺组织总蛋白, 依次经过 SDS 电泳、蛋白转 PVDF 膜、室温封闭 2 h、加入待检测蛋白一抗, 4℃ 孵育过夜, 加入二抗 37℃ 孵育 2 h, 显色液显色, 进行目标蛋白条带灰度值吸光度分析。

1.3.9 MASSON 染色检测大鼠肺组织情况

大鼠肺组织石蜡切片, 进行 Masson 染色试剂盒中 A、B 染色液染色前和染色后步骤与 HE 染色相同。

1.4 统计学方法

使用 Sigma Stat 3.5 软件进行数据统计, 使用 GraphPad Prism 5 软件作图, 计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组间用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 miR-128-3p 表达

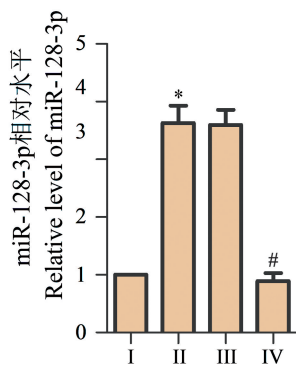
由 RT-PCR 检测 miR-128-3p 表达发现, 相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠 miR-128-3p 表达显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 12.321; P = 0.000$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠 miR-128-3p 表达显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 13.368; P = 0.000$), 见图 1。

2.2 各组大鼠肺功能的检测结果

检测大鼠肺功能可以看出, 相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 大鼠外周血相关因子检测

使用 ELISA 检测大鼠外周血炎症因子检测结果显示, 相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠外周血 IL-6 含量水平、iNOS 含量水平和 TNF- α 含量水平均显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠 IL-6 含量水平、iNOS 含量水平和 TNF- α 含量水平均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。



注: I: 假手术组; II: 脓毒症模型组; III: 空白转染组; IV: miR-128-3p 沉默组。与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与空白转染组相比, # $P < 0.05$ 。

图 1 RT-PCR 检测 miR-128-3p 表达

Note. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IV, miR-128-3p silencing group. Compared with sham-operated group, * $P < 0.05$. Compared with blank transfection group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Expression of miR-128-3p detected by RT-PCR

2.4 HE 染色观察肺组织及病理损伤情况

HE 染色观察各组大鼠肺组织病理损伤发现, 假手术组细胞分布均匀, 且基本无坏死细胞; 脓毒症模型组和空白转染组大鼠肺组织细胞排列散乱, 且数量缺失明显增多, 坏死细胞较多; miR-128-3p 沉默组细胞排列较均匀, 坏死细胞明显较少, 见图 2。

2.5 TUNEL 染色检测大鼠肺组织细胞凋亡情况

TUNEL 染色观察各组大鼠肺组织细胞凋亡情况发现, 相比假手术组凋亡率为 $(2.00 \pm 2.00)\%$, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠肺组织细胞凋亡率分别为 $(38.50 \pm 5.00)\%$ 和 $(41.05 \pm 7.00)\%$ 显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 8.984; P = 0.000$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠肺组织细胞凋亡率为 $(9.00 \pm 3.00)\%$ 显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 5.321; P = 0.000$), 见图 3。

2.6 各组大鼠肺组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达检测结果

蛋白质印记实验检测大鼠肺组织凋亡蛋白表达结果发现, 相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠肺组织 cleaved cas3/Caspase-3 和 cleaved cas9/Caspase-9 比值显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 15.054, P = 0.000; t = 9.698, P = 0.000$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠 cleaved cas3/Caspase-3 和 cleaved cas9/Caspase-9 比值显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 33.696, P = 0.000; t = 7.369, P = 0.000$), 见图 4。

2.7 MASSON 染色检测大鼠肺组织情况

MASSON 染色观察各组大鼠肺组织伤发现, 假手术组的大鼠肺组织细胞分布均与且有序, 脓毒症模型组肺组织纤维化和损伤程度严重, miR-128-3p 沉默组肺组织纤维化和损伤程度减轻, 见图 5。

2.8 各组大鼠肺组织 TGF- β 和 α -SMA 表达情况

蛋白质印记实验检测大鼠肺组织炎症相关蛋白表达结果发现, 相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠 TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 15.874, P = 0.000; t = 10.087, P = 0.000$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠 TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 10.344, P = 0.000; t = 5.360, P = 0.000$), 见图 6。

表 1 各组大鼠肺功能的检测结果($\bar{x} \pm s, n = 15$)
Table 1 Test results of lung function of rates in each group

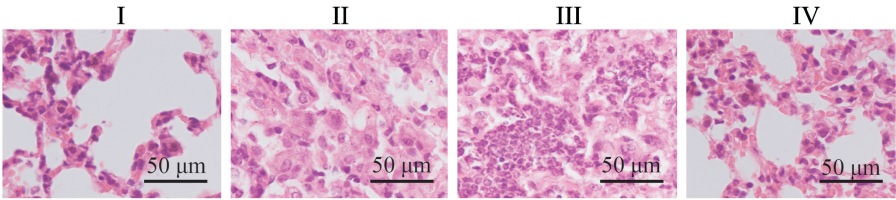
组别 Groups	静息通气量(mL/kg) Resting ventilation	气道阻力改变 Airway resistance changes	肺容积变换(mL) Lung volume changes
假手术组 Sham-operated group	3.42±0.19	74.34±6.36	0.27±0.03
脓毒症模型组 Sepsis model group	1.59±0.22 *	53.42±9.23 *	0.11±0.04 *
空白转染组 Blank transfection group	1.62±0.24 *	52.46±5.16 *	0.12±0.01 *
miR-128-3p 沉默组 miR-128-3p silencing group	2.81±0.32 #	68.02±7.18 #	0.24±0.02 #
F	201.767	34.370	134.000
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与空白转染组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with sham-operated group, * $P < 0.05$. Compared with blank transfection group, # $P < 0.05$.

表 2 大鼠外周血炎症因子检测($\bar{x} \pm s, n = 15$)
Table 2 Detection of inflammatory factors in peripheral blood of rats

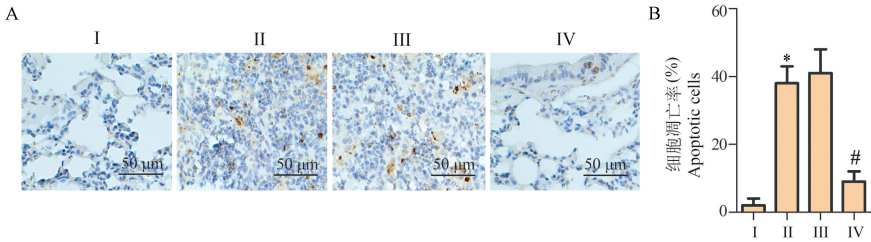
组别 Groups	IL-6(pg/mL)	iNOS(pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
假手术组 Sham-operated group	18.07±3.35	42.08±6.09	27.03±2.35
脓毒症模型组 Sepsis model group	94.85±11.23 *	205.92±24.11 *	136.35±17.43 *
空白转染组 Blank transfection group	98.83±16.44 *	201.08±21.24 *	138.53±13.26 *
miR-128-3p 沉默组 miR-128-3p silencing group	37.12±4.67 #	81.77±7.52 #	59.19±8.28 #
F	232.139	370.188	340.164
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与空白转染组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with sham-operated group, * $P < 0.05$. Compared with blank transfection group, # $P < 0.05$.



注:I:假手术组;II:脓毒症模型组;III:空白转染组;IIV:miR-128-3p 沉默组。
图 2 HE 染色观察肺组织病理损伤情况($n = 15$)
Note. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IIV, miR-128-3p silencing group.

Figure 2 Observation of lung tissue and pathological damage by HE staining

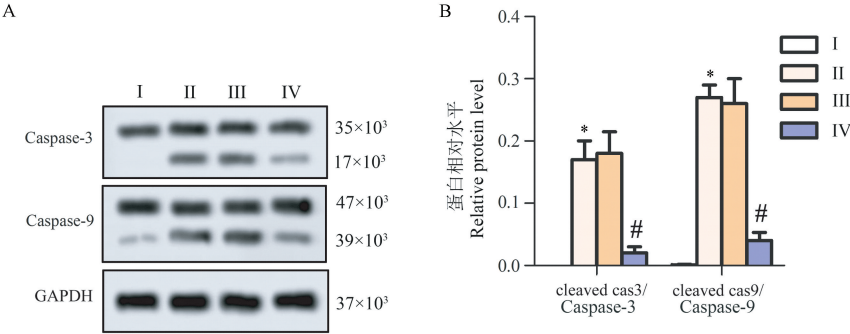


注:A:TUNEL 染色图;B:肺组织细胞凋亡率。I:假手术组;II:脓毒症模型组;III:空白转染组;IIV:miR-128-3p 沉默组。与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与空白转染组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 TUNEL 染色检测大鼠肺组织细胞凋亡情况($n = 15$)

Note. A, TUNEL staining images. B, Apoptosis rates of lung tissues. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IIV, miR-128-3p silencing group. Compared with sham-operated group, * $P < 0.05$. Compared with blank transfection group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Apoptosis of lung tissues detected by TUNEL staining

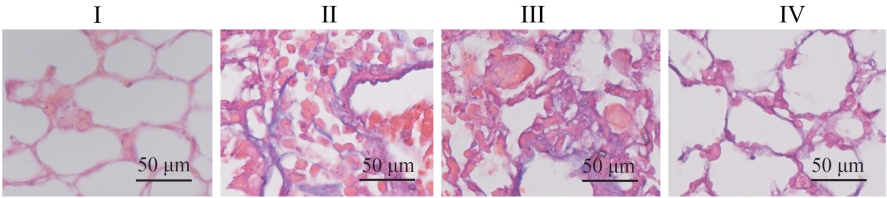


注:A:蛋白质印记图;B:相关蛋白相对表达量。I:假手术组;II:脓毒症模型组;III:空白转染组;IV:miR-128-3p 沉默组。与假手术组相比, * $P<0.05$;与空白转染组相比, # $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠肺组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达情况 (n = 15)

Note. A, Western blot images. B, Relative expression levels of related proteins. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IIV, miR-128-3p silencing group. Compared with sham-operated group, * $P < 0.05$. Compared with blank transfection group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Expression of Caspase-3 and Caspase-9 in lung tissues of rats in each group

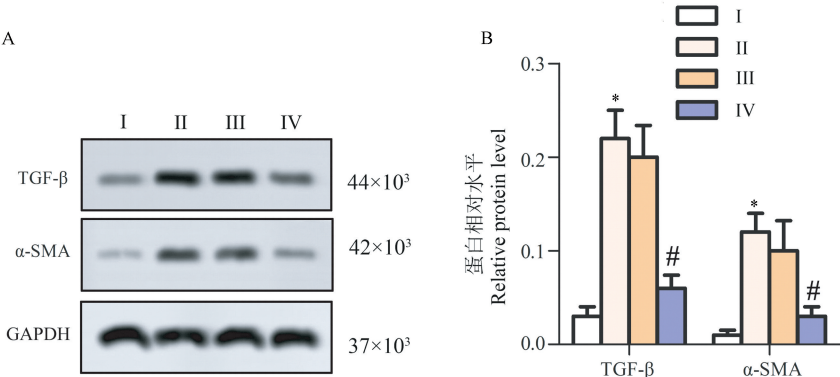


注:I:假手术组;II:脓毒症模型组;III:空白转染组;IV:miR-128-3p 沉默组。

图 5 MASSON 染色检测大鼠肺组织情况结果 (n = 15)

Note. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IIV, miR-128-3p silencing group.

Figure 5 Lung tissue conditions of rats detected by MASSON staining



注:A:蛋白质印记图;B:相关蛋白相对表达量。I:假手术组;II:脓毒症模型组;III:空白转染组;IV:miR-128-3p 沉默组。与假手术组相比, * $P<0.05$;与空白转染组相比, # $P<0.05$ 。

图 6 各组大鼠肺组织 TGF-β 和 α-SMA 表达情况 (n = 15)

Note. A, Western blot images. B, Relative expression levels of related proteins. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IIV, miR-128-3p silencing group. Compared with sham-operated group, * $P < 0.05$. Compared with blank transfection group, # $P < 0.05$.

Figure 6 Expression of TGF-β and α-SMA in lung tissues of rats in each group

3 讨论

脓毒症可以序贯出现多个器官功能损伤,其中肺部损伤较为常见^[10]。其中静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换是常见的几个肺功能指标。静息通气量是指每分钟静息通气量是指在平静状态下每分钟进或出肺的气体总量^[11];气道阻力是指气道内单位流量所产生的压力差^[12];当静息通气量和气道阻力改变降低后可能因为肺部出现水肿或炎症反应引起肺阻塞。本研究发现,相比空白转染组,miR-128-3p 沉默组大鼠静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换显著升高。说明抑制 miR-128-3p 的表达后,大鼠肺功能的到了有效缓解,这可能是因为炎症得到了有效抑制,使得大鼠肺部的水肿也得到了缓解。黄小洵等^[13]研究表明:改善静息通气量及相关肺功能指标可以有效缓解脓毒症导致的肺损伤,与本研究得出的结论相一致。

细胞因子主要可分为促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子两种^[14]。目前研究较多的促炎性细胞因子包括:TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 等;抗炎性细胞因子则包括:IL-4、IL-10、TNF 受体(TNF-sr)等^[15],本研究中主要研究 IL-6、iNOS 和 TNF- α 这几种相关因子。为探究大鼠肺功能得到了改善是否与降低炎症反应相关,本研究检测了大鼠外周血的相关因子发现,相比空白转染组,miR-128-3p 沉默组大鼠 IL-6 含量水平、iNOS 含量水平和 TNF- α 含量水平均显著降低。说明大鼠的肺功能得到有效的改善确实与炎症反应相关。同时为了进一步验证,通过 MASSON 染色观察各组大鼠肺组织发现,miR-128-3p 沉默组大鼠肺组织损伤及炎性浸润也有显著的改善。吴松林等^[16]研究表明:长链非编码 RNA 的表达可以有效抑制脓毒症导致的肺损伤患者外周血内的炎症因子水平,与本研究得出的结论相类似。

除了抑制炎症反应以外,防止细胞的凋亡也是重要方法之一。本研究通过 TUNEL 染色,相比空白转染组,miR-128-3p 沉默组大鼠肺组织细胞凋亡数目显著降低,为了探究其原因,使用蛋白质印迹检测了相关凋亡基因的表达发现,相比空白转染组,miR-128-3p 沉默组大鼠 cleaved cas3/Caspase-3 和 cleaved cas9/Caspase-9 比值显著降低。这可能是因为 Caspase 家族蛋白为调控凋亡的主要蛋白之一。抑制了 miR-128-3p 的表达,使得肺组织细胞凋亡启

动子 Caspase-3 的表达受到了抑制,减缓了下游 caspase-9 的活化,使得凋亡信号减弱,反过来抑制了 Caspase-3 的激活,防止了肺组织细胞的凋亡。姜永帅等^[17]研究表明:抑制脓症患者体内的 Caspase 家族凋亡蛋白的表达可以有效缓解脓毒症导致的相关器官功能损伤,与本研究得出的结论相一致。

肺纤维化是以成纤维细胞增殖及大量细胞外基质聚集并伴炎症损伤、组织结构破坏为特征的一大类肺疾病的终末期改变^[18]。大鼠肺部出现损伤后会伴随肺部纤维化。肺纤维化主要标志包括: α -SMA 和 TGF- β 等; α -SMA 主要存在于肌成纤维细胞浆,是肌成纤维细胞的主要标志分子^[19];TGF- β 是肺纤维化最关键的细胞因子,它与肺纤维化发生发展、细胞外基质代谢关系密切^[20]。本实验通过 MASSON 染色观察发现,脓毒症模型组大鼠肺组织出现明显的组织纤维化,与脓毒症模型组相比,肺组织的纤维化和损伤明显得到改善为探究其原因,检测了与肺纤维化相关的蛋白,发现相比空白转染组,miR-128-3p 沉默组大鼠 TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达显著降低。说明抑制 miR-128-3p 基因的表达可以有效防止肺纤维化,其作用机制可能与抑制肺纤维化相关蛋白的表达相关。秦静等^[21]研究表明:抑制大鼠体内 TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达可以有效治疗肺纤维化进展,与本研究得出的结论相一致。

综上所述,下调 miR-128-3p 可以缓解脓毒症大鼠急性肺损伤,其作用机制可能与降低大鼠体内炎症反应并抑制肺组织细胞的凋亡相关。

参考文献:

- [1] 全锦花, 张新超, 王红霞. 白细胞分化抗原 14 亚型在老年急性感染患者诊断和预后评价中的作用 [J]. 中华老年医学杂志, 2019, 38(3): 246-250.
- [2] 刘宏飞, 聂宏光. 肺上皮跨膜离子通道与急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征关系研究进展 [J]. 生理科学进展, 2019, 50(4): 307-315.
- [3] 侯果, 余追. miRNA 作为脓毒症及其并发症生物标志物的研究进展 [J]. 微循环学杂志, 2018, 28(4): 81-85.
- [4] 赵阳, 万银绪, 车吉忠, 等. miR-128-3p 过表达靶向 MAPK1 抑制膀胱癌 5637 细胞株的侵袭, 迁移和上皮间质转化 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2019, 37(5): 534-541.
- [5] 侯绍蔚, 张连清, 席海英, 等. miR-128-3p 靶向 TCF4 抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖、侵袭和上皮-间充质转化 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(11): 1999-2005.
- [6] 张华东, 张显峰, 刘桂琴, 等. miR-128-3p 在宫颈癌中的表

- 达及其发病机制 [J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(7): 1405-1401.
- [7] 周凤高, 徐冕, 颜悦新, 等. 盲肠结扎穿孔术致脓毒症的代谢网络基础研究 [J]. 重庆医学, 2019, 48(5): 765-769, 774.
- [8] 秦怡, 李新宇, 王晓燕, 等. 腹腔注射人粪便悬液建立大鼠脓毒症及严重脓毒症模型 [J]. 内科急危重症杂志, 2013, 19(6): 362-364.
- [9] 刘春明, 张洪, 李一鸣. Fleischner 学会关于特发性肺纤维化诊断标准的白皮书解读 [J]. 国际医学放射学杂志, 2018, 41(6): 653-657.
- [10] 覃小兰, 郭权来, 刘云涛, 等. 降钙素原及 C-反应蛋白联合序贯器官衰竭评分对肺部感染致脓毒症老年患者预后的评估价值 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(5): 562-565.
- [11] 孙建, 代文静, 马春兰, 等. 适应性支持通气在慢性阻塞性肺疾病呼吸衰竭治疗中的应用分析 [J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(9): 667-671.
- [12] 叶蕊, 王翠红, 赵立, 等. 慢性阻塞性肺疾病频繁急性加重表型气道阻力的研究 [J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(6): 511-514.
- [13] 黄小洵, 孟繁魁, 谢昌联, 等. 脓毒症患者静息能量代谢测定指导营养目标能量治疗的临床研究 [J]. 吉林医学, 2018, 39(6): 1061-1063.
- [14] 吴建魏, 黄觉生, 谭利斌, 等. 姜黄素预处理对肺缺血再灌注损伤模型大鼠炎性及抗炎性细胞因子的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(4): 668-672.
- [15] Khan J, Noboru N, Young A, et al. Pro and anti-inflammatory cytokine levels (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10) in rat model of neuroma [J]. Pathophys, 2017, 24(3): 155-159.
- [16] 吴松林, 田小利, 徐陶, 等. microRNA-125b 在脓毒症急性肺损伤中的表达及其与炎症因子水平相关性 [J]. 天津医药, 2019, 47(8): 810-814, 898.
- [17] 姜永帅, 姜树民, 宋囡, 等. 养胃解毒合剂对脓毒症大鼠肠组织凋亡因子 Bax、Bcl2 和 Caspase3 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1450-1453.
- [18] 许露, 张妍蓓, 徐蒙蒙, 等. 肺纤维化小鼠模型建立方法的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(23): 1830-1834.
- [19] 孙丽霞, 李英俊, 崔仁哲, 等. 氯离子通道阻滞剂 NPPB 在 TGF- β 1 诱导 HConF 细胞纤维化中的作用及其机制 [J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(6): 411-418.
- [20] 周钱辉, 彭红, 颜又新, 等. TGF- β 1 及其信号通路对话在肺纤维化中的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(4): 315-320.
- [21] 秦静, 赵铭山, 李君. 丹参素干预对肺纤维化大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(5): 937-940, 946.

[收稿日期] 2020-05-15

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(双月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊、被中国生物医学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!