

苏红见, 乔亚红, 安云霞, 等. 二甲双胍调控 miR-34a 对慢阻肺大鼠气道炎症的影响研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (7): 55-61.

Su HJ, Qiao YH, An YX, et al. Effect of metformin on airway inflammation in COPD rats by regulating miR-34a [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 55-61.

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7856. 2021. 07. 009

二甲双胍调控 miR-34a 对慢阻肺大鼠气道炎症的影响研究

苏红见¹, 乔亚红^{1*}, 安云霞², 韩利¹

(1. 河南省胸科医院呼吸与危重症二病区, 郑州 450003;

2. 河南省人民医院呼吸内科, 郑州 450003)

【摘要】 目的 探讨二甲双胍(Met)调控微小 RNA(miR)-34a 对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠气道炎症的影响。**方法** 每天烟熏 30 min, 持续 30 d, 并在第 1、14、28 天经气道滴注 2 mL 脂多糖(LPS)溶液制备 COPD 大鼠模型, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 Met 对肺组织中 miR-34a 水平的影响; 支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞计数和 wright 染色分类检测 Met 对其影响; 苏木精-伊红(HE)检测 Met 对肺组织形态影响; 酶联免疫吸附(ELISA)检测 Met 对血清中白介素 IL-6、IL-8、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平的影响; 蛋白免疫印迹检测 Met 对肺组织中 sirt1 蛋白水平的影响; TargetScan 查找 sirt1 mRNA 的 3'UTR 与 miR-34a 结合位点, 并经双荧光素酶报告基因检测试剂盒鉴定。**结果** 与对照组相比, 模型组肺组织中 sirt1 蛋白水平, 单核-巨噬细胞比例降低($P<0.05$), miR-34a 水平、BALF 中白细胞数量, 中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例, 血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平升高($P<0.05$); 添加 Met 后可缓解肺组织中 sirt1 蛋白水平, 单核-巨噬细胞比例降低, miR-34a 水平、BALF 中白细胞数量, 中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例, 血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平升高现象($P<0.05$); 升高 miR-34a 水平逆转 Met 对 COPD 大鼠的影响。并经双荧光素酶验证, miR-34a 与 sirt1 存在靶向关系。**结论** Met 可下调 miR-34a 从而上调 sirt1 实现对 COPD 气道炎症的缓解, 为临床上 Met 治疗 COPD 提供一定的实验基础和依据。

【关键词】 二甲双胍; 微小 RNA-34a; 慢性阻塞性肺疾病; 气道炎症; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0055-07

Effect of metformin on airway inflammation in COPD rats by regulating miR-34a

SU Hongjian¹, QIAO Yahong^{1*}, AN Yunxia², HAN Li¹

(1. Respiratory and Critical Care Unit 2, Henan Province Chest Hospital, Zhengzhou 450003, China.

2. Department of Respiratory Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of metformin (Met) on airway inflammation in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by regulating microRNA (miR) - 34a. **Methods** The COPD rat model was established by fumigation for 30 min daily for 30 d and instillation of 2 mL lipopolysaccharide (LPS) solution through the

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20190753)。

[作者简介] 苏红见(1984—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 慢性阻塞性肺疾病。E-mail: suhmail@163.com

[通信作者] 乔亚红(1971—), 女, 硕士, 主任医师, 研究方向: 胸腔积液。E-mail: qyh13598037502@163.com

airway on days 1, 14 and 28. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was performed to detect the effect of Met on the miR-34a level in lung tissue; white blood cell count in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and wright staining were used to detect the effect of Met; hematoxylin-eosin (HE) was used to detect the effect of Met on lung morphology; the serum interleukin IL-6, IL-8, IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; Western blot was used to detect the effect of Met on the sirt1 protein level in lung tissue; TargetScan was applied to determine the 3'UTR and miR-34a binding sites of sirt1 mRNA, and was identified by the dual luciferase reporter gene detection kit. **Results** Compared with the control group, in the model group the sirt1 protein level and the proportion of monocytes to macrophages in lung tissue were decreased ($P < 0.05$), whereas the miR-34a level, the number of white blood cells in BALF, the proportions of neutrophils, eosinophils and lymphocytes, and the serum IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α levels were increased ($P < 0.05$). Met in the COPD animals alleviated the reduced sirt1 protein level in lung tissues, the reduced proportion of monocytes to macrophages, and the increased miR-34a levels, number of white blood cells in BALF, proportions of neutrophils, eosinophils and lymphocytes, and the serum IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α levels ($P < 0.05$). An increase of the miR-34a level reversed the effect of Met on COPD rats. Dual luciferase verified that miR-34a and sirt1 had a targeting relationship. **Conclusions** Met down-regulated miR-34a and thereby up-regulated sirt1 to relieve airway inflammation in COPD, which provides an experimental basis for the potential clinical treatment of COPD with Met.

【Keywords】 metformin; miRNA-34a; chronic obstructive pulmonary disease; airway inflammation; rat

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种气流受限疾病, 表现为气流受阻不可逆, 并呈进行性变化, 且肺、气管、支气管因有害物质导致的慢性炎症疾病^[1]。吸烟是 COPD 发生的最主要原因, 生物燃料的大量采集和消耗亦促进 COPD 发生^[2]。目前尚无根治 COPD 的有效方法, 二甲双胍 (metformin, Met) 作为经典的降压药, 是临床上 2 型糖尿病的首选药物^[3]; 随着研究深入, Met 还有抗炎、抗氧化、保护心血管系统等功效, 在多发硬化症中能够降低炎症因子白介素-6 的表达^[4]; 在 COPD 中能减轻肺部炎症反应及氧化应激, 从而改善肺功能^[5], 但针对其具体作用机制尚不清楚。微小 RNA (microRNA, miRNA) 可影响其他物质水平而发挥抗氧化和抗炎作用, 已成为临床上最具潜力的生物标志物^[6], 且 Met 能够调控 miRNA 的表达从而影响多囊卵巢综合症患者卵丘颗粒细胞增殖和凋亡, 从而影响疾病^[7]。推测 Met 可能影响 miRNA 水平而影响疾病。本文建立 COPD 大鼠模型, Met 处理观察对 COPD 的影响, 并观察 miR-34a 高表达是否影响其作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

54 只 SPF 级 SD 大鼠, 雄性、9 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2018-0021], 在河南省中医药研究院实验动物中心暂养

并进行实验 [SYXK (豫) 2019-0001], 体重 (250 ± 10) g。将动物置于温度 (24.5 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 (50 ± 5) %、12 h 光照/12 h 黑暗环境中饲养, 正常饮食, 通风良好。本实验经本院伦理委员会审核并通过 (20190017), 实验符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 试剂盒 (Solarbio 公司, 货号分别为: L8880-10 mg、L9406); 盐酸 Met 片 (悦康药业集团股份有限公司, 批准文号: 国药准字 H-20184075); agomir NC、miR-34a agomir 均购自广州锐博生物科技公司; 引物由茎环法+染料法设计、上海生工生物工程有限公司合成; wright 染色试剂盒 (北京雷根生物技术有限公司, 货号: DM0004); 大鼠白介素 (interleukin, IL)-6、IL-8、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、一抗兔抗沉默信息调节因子 1 (sirtuin 1, sirt1) (英国 abcam 公司, 货号分别为: ab213777、ab108869、ab188865、ab263899、ab110304)。实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 仪 (赛默飞世尔, 型号: PikoREAL); 蛋白凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: 170-8200)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物建模及分组

参考文献^[8]制备 COPD 模型: 将 44 只大鼠放置在点燃 8 支香烟的烟熏箱中烟熏, 每天烟熏 30 min,

持续 30 d,并在第 1、14、28 天经气道滴注 2 mL LPS 溶液(盐水溶解为 1 g/L LPS),气道滴注当日不进行烟熏。造模过程中死亡 4 只,其余 40 只大鼠随机分为模型(model)组、Met 组、Met+阴性对照(Met+agomir NC)组、Met+miR-34a 高表达(Met+miR-34a agomir)组,每组 10 只。另取 10 只大鼠在第 1、14、28 天经气道滴注 2 mL 生理盐水为对照(control)组。模型处理后第 2 天 Met 组每天灌胃 230 mg/kg Met^[5],Met+阴性对照组灌胃 230 mg/kg Met、尾静脉注射 1 μ mol/L agomir NC, Met+miR-34a 高表达组灌胃 230 mg/kg Met、尾静脉注射 1 μ mol/L miR-34a agomir,每天 1 次、连续 2 周。

1.3.2 样品收集

实验前、实验结束后对所有大鼠称重,观察大鼠情况。麻醉大鼠切开胸腔,暴露出心脏,心脏取血约 5 mL;右主支气管结扎,套管针在隆突后穿刺进入左肺,2 mL 生理盐水灌洗左肺,缓慢回抽,每次回抽约 1.5 mL 液体,反复灌洗 3 次,对支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)细胞计数。取右肺,部分置于 4%多聚甲醛中固定;部分置于-80℃冰箱保存待检。

1.3.3 qRT-PCR 检测肺组织中 miR-34a 水平

-80℃取部分肺组织, RNA 提取试剂盒提取总 RNA、cDNA 合成试剂盒合成第一条链 cDNA, qRT-PCR 仪对 miR-34a、U6 扩增。引物序列 miR-34a F: 5'-TGCCAGTGTCTTAGCTGCTT-3', R: 5'-GGCAGTATACTTGCTGATTGCTT-3'; U6 F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3', R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。上样体系 20 μ L: cDNA (50 ng/ μ L) 1 μ L, F/R (10 μ mol/L) (0.5/0.5) μ L, 2 $\times$ Hi SYBR Green QPCR Mix 10 μ L, ddH₂O 8.0 μ L。反应条件: 95℃、5 min; 94℃、50 s, 55.6℃、40 s, 40 个循环。2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算肺组织中 miR-34a 水平。

1.3.4 BALF 细胞计数和分类

4℃、1200 r/min 离心 BALF 10 min, 离心后取细胞沉渣, PBS 重悬后检测白细胞总数。取部分细胞沉渣, 调整浓度后 wright 染色, 计数每 200 个白细胞中的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核-巨噬细胞、淋巴细胞比例。

1.3.5 HE 检测肺组织形态

4%多聚甲醛中固定的肺组织, 脱水后石蜡包埋, 切片(厚度: 6 μ m)。经苏木精染色、伊红复染后显微镜下观察肺组织形态。

1.3.6 ELISA 检测血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平

心脏血室温静置 2 h, 3000 r/min 室温离心 10 min, 取血清, ELISA 试剂盒检测血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平。

1.3.7 Western blot 检测肺组织中 sirt1 蛋白水平

-80℃冰箱中取部分肺组织, 冰上研磨并裂解, 4℃、16000 r/min 离心 20 min, 上清为总蛋白, 凝胶电泳分离蛋白、PVDF 膜转膜; 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h; 对应加入一抗 sirt1、GAPDH, 4℃孵育过夜; 加入对应二抗, 室温孵育 2 h。蛋白凝胶成像仪拍照和灰度分析。

1.3.8 双荧光素酶鉴定 miR-34a 与 sirt1 的靶向关系

TargetScan 查找 sirt1 mRNA 的 3'UTR 与 miR-34a 结合位点。设计合成 sirt1 的野生型(sirt1 3'UTR WT)和突变型(sirt1 3'UTR MUT), 分别与 miR-34a mimic 或 miR-34a mimic NC 共转染至 293 T 细胞, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组荧光素酶活性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 计量数据均采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组间比较行单因素方差分析, 进一步两两比较行 SNK-*q* 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Met 对大鼠一般情况影响

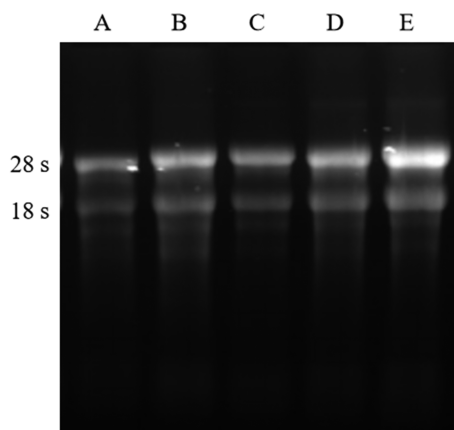
实验前, 对照组、模型组、Met 组、Met+阴性对照组、Met+miR-34a 高表达组体重分别为(246.16 $\pm$ 8.16)g、(245.76 $\pm$ 6.97)g、(246.58 $\pm$ 7.43)g、(251.16 $\pm$ 7.91)g、(247.33 $\pm$ 6.93)g, 差异无统计学意义(P>0.05)。实验结束后, 对照组、模型组、Met 组、Met+阴性对照组、Met+miR-34a 高表达组体重分别为(316.15 $\pm$ 16.59)g、(271.19 $\pm$ 19.45)g、(306.11 $\pm$ 11.36)g、(305.91 $\pm$ 10.67)g、(284.73 $\pm$ 9.73)g, 与对照组比, 模型组体重降低(P<0.05); 与模型组相比, Met 组、Met+阴性对照组体重升高(P<0.05); 分别与 Met 组、Met+阴性对照组比, Met+miR-34a 高表达组体重降低, 差异具有统计学意义(P<0.05)。

对照组大鼠饮食饮水正常, 毛发润泽、色泽度好, 无口鼻分泌物、无咳嗽现象, 且反应敏捷、呼吸平稳; 模型组大鼠饮食饮水减少, 毛色干枯、缺少光

泽,有口鼻分泌物、咳嗽出现,反应迟钝、呼吸急促;Met 组和 Met+阴性对照组大鼠饮食饮水量相较于模型组增加,口鼻分泌物减少、咳嗽减轻,反应欠敏感,呼吸出现急促现象但不明显;Met+miR-34a 高表达组状况介于模型组和 Met 组之间。

2.2 Met 对大鼠肺组织中 miR-34a 的影响

RNA 鉴定结果见图 1。对照组、模型组、Met 组、Met+阴性对照组、Met+miR-34a 高表达组肺组织中 miR-34a 水平分别为 1.01 ± 0.13 、 2.49 ± 0.06 、 1.46 ± 0.15 、 1.84 ± 0.16 、 2.15 ± 0.21 ,与对照组比,模型组肺组织中 miR-34a 水平升高 ($P < 0.05$);与模型组比,Met 组、Met+阴性对照组肺组织中 miR-34a 水平降低 ($P < 0.05$);分别与 Met 组、Met+阴性对照组比,Met+miR-34a 高表达组肺组织中 miR-34a 水平升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注:A:对照组;B:模型组;C:Met 组;D:Met+阴性对照组;E:Met+miR-34a 高表达组。(下同)

图 1 5 组大鼠肺组织 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳

Note. A, Control group. B, Model group. C, Met group. D, Met+agomir NC group. E, Met+miR-34a agomir group. (The same as below)

Figure 1 Lung tissue RNA 1% agarose gel electrophoresis of 5 groups of rats

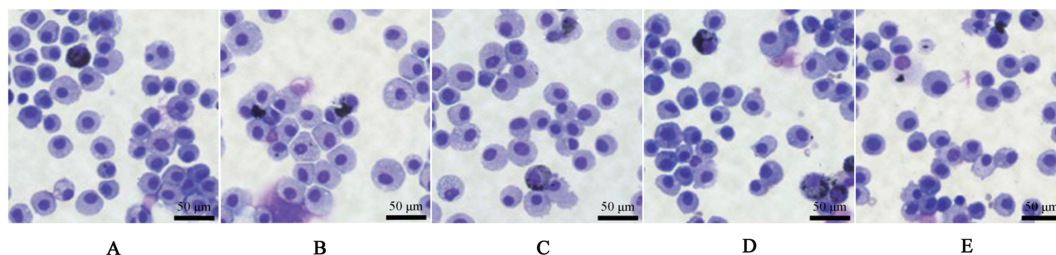


图 2 5 组大鼠 BALF 中 wright 染色结果

Figure 2 Wright staining results in BALF of 5 groups of rats

2.3 Met 对大鼠 BALF 中细胞计数的影响

与对照组相比,模型组 BALF 中白细胞数量,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例升高,单核-巨噬细胞比例降低 ($P < 0.05$);与模型组相比,Met 组、Met+阴性对照组 BALF 中白细胞数量,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例降低,单核-巨噬细胞比例升高 ($P < 0.05$);分别与 Met 组、Met+阴性对照组相比,Met+miR-34a 高表达组 BALF 中白细胞数量,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例升高,单核-巨噬细胞比例降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2、图 3。

2.4 Met 对大鼠肺组织形态影响

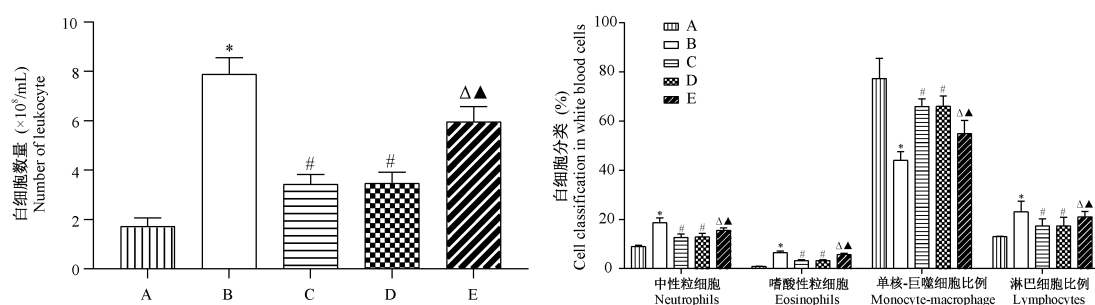
对照组肺组织结构完整,肺泡排列整齐均匀,无明显间隔破坏。模型组大鼠肺组织气管及支气管粘液腺增多,腺管扩张,气道平滑肌肥大,支气管黏膜上皮细胞纤毛粘连,小气道平滑肌增生及纤维化,管腔内可见不同程度粘液栓及大量炎性细胞,肺泡管、肺泡囊、肺泡膨胀,肺泡融合,肺泡简单化,形成肺大泡。Met 组与 Met+阴性对照组类似,肺泡结构有所缓解,炎症现象不明显;Met+miR-34a 高表达组肺泡结构与模型组类似。见图 4。

2.5 Met 对大鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平的影响

与对照组相比,模型组血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,Met 组、Met+阴性对照组血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$);分别与 Met 组、Met+阴性对照组相比,Met+miR-34a 高表达组血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.6 Met 对大鼠肺组织中 sirt1 蛋白的影响

对照组、模型组、Met 组、Met+阴性对照组、Met+miR-34a 高表达组肺组织中 sirt1 水平分别为 $1.16 \pm$



注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 Met 组比较, $\Delta P<0.05$;与 Met+阴性对照组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。

图 3 5 组大鼠 BALF 中细胞计数比较

Note. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$. Compared with Met group, $\Delta P<0.05$. Compared with Met+antagonistic NC group, $\blacktriangle P<0.05$.

Figure 3 Comparison of cell counts in BALF of 5 groups of rats

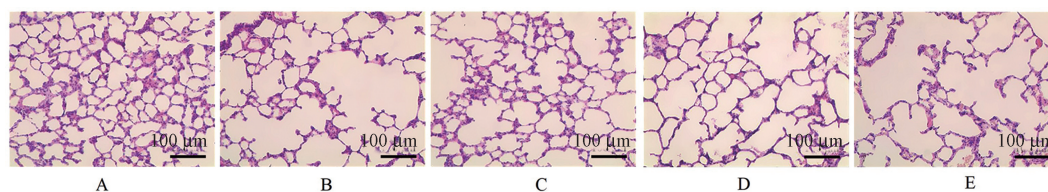


图 4 5 组大鼠肺组织形态学情况

Figure 4 Morphology of the lung tissues of the 5 groups of rats

表 1 5 组大鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平比较 (pg/mL)

Table 1 Comparison of serum levels of IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α in the 5 groups of rats

组别 Groups	IL-6	IL-8	IL-1 β	TNF- α
对照组 Control group	109.68 $\pm$ 4.67	236.26 $\pm$ 6.16	86.58 $\pm$ 9.15	269.12 $\pm$ 11.16
模型组 Model group	358.68 $\pm$ 31.35*	469.15 $\pm$ 47.36*	343.16 $\pm$ 36.63*	695.15 $\pm$ 23.18*
Met 组 Met group	260.72 $\pm$ 27.41#	298.65 $\pm$ 31.18#	186.56 $\pm$ 20.19#	416.56 $\pm$ 39.85#
Met+阴性对照组 Met+antagonistic NC group	263.16 $\pm$ 29.62#	305.19 $\pm$ 33.46#	179.32 $\pm$ 18.48#	409.89 $\pm$ 41.36#
Met+miR-34a 高表达组 Met+miR-34a agomir group	309.65 $\pm$ 26.65 $\Delta\blacktriangle$	369.45 $\pm$ 23.52 $\Delta\blacktriangle$	268.91 $\pm$ 27.33 $\Delta\blacktriangle$	597.15 $\pm$ 36.43 $\Delta\blacktriangle$

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 Met 组比较, $\Delta P<0.05$;与 Met+阴性对照组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$. Compared with Met group, $\Delta P<0.05$. Compared with Met+antagonistic NC group, $\blacktriangle P<0.05$.

0.21、0.11 $\pm$ 0.02、0.86 $\pm$ 0.06、0.84 $\pm$ 0.08、0.36 $\pm$ 0.04,与对照组相比,模型组肺组织中 sirt1 蛋白水平降低($P<0.05$);与模型组相比, Met 组、Met+阴性对照组肺组织中 sirt1 蛋白水平升高($P<0.05$);分别与 Met 组、Met+阴性对照组相比, Met+miR-34a 高表达组肺组织中 sirt1 蛋白水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 5。

2.7 双荧光素酶验证 miR-34a 与 sirt1 的靶向关系

Targetscan 预测结果显示, sirt1 基因 3'UTR 区

存在与 miR-34a 结合位点,见图 6。荧光素酶实验验证二者的靶向关系。miR-34a NC + 3'UTR-WT、miR-34a mimic + 3'UTR-WT、miR-34a NC + 3'UTR-MUT、miR-34a mimic + 3'UTR-MUT 的荧光素酶相对活性分别为 1.02 $\pm$ 0.11、0.43 $\pm$ 0.04、0.98 $\pm$ 0.08、0.99 $\pm$ 0.08,与 miR-34a NC + 3'UTR-WT 组相比, miR-34a + 3'UTR-WT 组细胞荧光素酶相对活性下降($P<0.05$)。

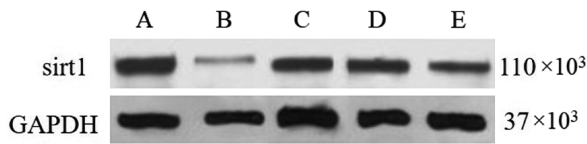


图 5 5 组大鼠肺组织中 sirt1 蛋白表达情况

Figure 5 Protein expression of sirt1 in the lung tissues of the 5 groups of rats

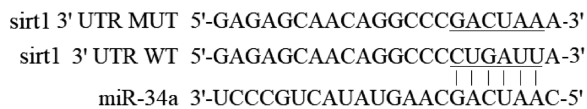


图 6 sirt1 与 miR-34a 结合位点预测

Figure 6 Prediction of the binding site of sirt1 and miR-34a

3 讨论

COPD 会造成大鼠体重减轻、饮食饮水减少,毛色干枯,口鼻中出现分泌物、出现咳嗽等现象,鉴定 BALF,发现 BALF 中白细胞数量,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例升高,单核-巨噬细胞比例降低;提示 COPD 中出现明显的炎症现象。COPD 长期慢性炎症可影响肺实质和周围呼吸道,炎症主要特征为肺泡巨噬细胞、嗜中性粒细胞、T 淋巴细胞等淋巴样细胞数量增加,促进分泌多种促炎性介质,包括细胞因子、趋化因子、生长因子和脂质介质的分泌,从而加速 DNA 损伤、促进细胞衰老,加重疾病^[9-10]。而 Met 具有抗炎作用,在百草枯诱发的急性肺损伤中可降低血浆及肺组织中 IL-6、TNF- α 水平,并减轻肺组织病理损伤^[11]。本研究中使用 Met 后可缓解肺组织气管及支气管粘液腺增多、炎性细胞过多现象,从而减轻肺泡管、肺泡囊、肺泡膨胀,肺泡逐渐恢复。但具体作用机制尚不清楚。

miRNA 可普遍存在于真核细胞中,进化上高度保守,具有组织和时序特异性,在慢性气道炎症性疾病哮喘中参与气道炎症调节,与基质金属蛋白酶、炎症反应、一系列信号通路关系密切,且通过改变 miRNA 在动物体内的表达水平可改变气道嗜酸性粒细胞、气道黏液分泌、Th1/Th2 细胞相关因子的表达情况,从而影响疾病^[12]。miR-29b 通过靶向溴结构域蛋白 4 可调节香烟提取物诱导的 IL-8 表达,从而参与 COPD 的气道炎症,且血浆 miR-29b 可以作为 COPD 疾病严重程度的生物标志物^[13]。miR-34 包括 miR-34a、miR-34b、miR-34c,与肺的发生发展关系密切,与肺支气管发育不良、COPD、肺癌、肺动脉高压等肺部疾病关系密切^[14],上调 miR-34c-5p

可降低动态肺顺应性和降低由于 COPD 升高引起的呼吸频率及气道阻力以及 BALF 中 IL-8 和 TNF- α 的水平升高现象,从而缓解炎性细胞浸润、肺泡破裂、肺泡腔扩大和胶原纤维沉积增加,平均线性截距增加和平均肺泡数降低现象^[15]。在本研究中模型组肺组织中 miR-34a 水平上调,miR-34a 在 COPD 中表达上调,与肺功能关系密切,可能是肺功能损伤的直接指标^[16]。miR-34a 与氧化应激损伤、炎症反应关系密切,miR-34a 水平升高明显加重机体氧化应激损伤、促进炎症反应^[17]。miR-34a 需要调控靶基因发挥生物学作用,研究发现,在溃疡性结肠炎中 miR-34a 水平升高可抑制靶基因 sirt1 的表达从而加重氧化应激、促进炎症损伤^[18]。sirt1 被称为长寿基因,在吸烟者体中 sirt1 水平降低可诱导金属蛋白酶抑制剂-1 乙酰化进而加重肺损伤^[19]。上调 sirt1 的表达来减轻香烟烟雾引起的内质网应激和细胞凋亡,从而预防 COPD^[20-21]。表明在 COPD 中烟熏可诱导 miR-34a 上调,促进分泌多种促炎性介质,包括 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 等的分泌从而加重炎症细胞浸润、肺泡破裂、肺泡腔扩大和胶原纤维沉积增加现象,从而加重疾病。而使用 Met 后炎症因子水平降低,肺泡破裂、肺泡腔扩大现象得以缓解。添加 miR-34a 逆转 Met 作用,提示 Met 可能通过下调 miR-34a 表达轻炎症水平,实现对 COPD 大鼠的保护。进一步研究发现,miR-34a 与 sirt1 存在靶向关系,提示 Met 下调 miR-34a 的表达,从而促进 sirt1 的表达,进而减轻因香烟烟雾引起的内质网应激和细胞凋亡,减缓疾病。

综上所述,Met 通过下调 miR-34a 实现对 COPD 气道炎症的缓解,本文首次验证了 COPD 中 Met 与 miR-34a 的关系。但 miR-34a 靶基因较多,亦可能影响别的靶基因发挥作用,也将成为进一步研究重点。

参考文献:

- [1] 贾敏,樊文花,秦巧红,等. 香烟烟雾颗粒经鼻腔滴入建立小鼠 COPD 肺功能损伤模型 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(10): 1915-1920.
- [2] Jolly MK, Ward C, Eapen MS, et al. Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease [J]. Dev Dyn, 2018, 247(3): 346-358.
- [3] Frias JP. Fixed-dose combination of ertugliflozin and metformin hydrochloride for the treatment of type 2 diabetes [J]. Expert Rev Endocrinol Metab, 2019, 14(2): 75-83.

- [4] Negrotto L, Farez MF, Correale J. Immunologic effects of metformin and pioglitazone treatment on metabolic syndrome and multiple sclerosis [J]. *JAMA Neurol*, 2016, 73(5): 520-528.
- [5] 彭强. 二甲双胍对 COPD 大鼠炎症反应和氧化应激的影响及其机制 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [6] Su X, Zhang J, Wang H, et al. Phenolic acid profiling, antioxidant, and anti-inflammatory activities, and miRNA regulation in the polyphenols of 16 blueberry samples from China [J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 312-321.
- [7] 宋霁. 二甲双胍调控 miRNA-133b 对多囊卵巢综合征患者卵泡颗粒细胞增殖和凋亡的影响 [D]. 广州: 广州医科大学, 2017.
- [8] 张迪, 夏艺, 范丽, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 230-235.
- [9] Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(1): 16-27.
- [10] Uddin M, Watz H, Malmgren A, et al. NETopathic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and severe asthma [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 47.
- [11] 吴潦章, 岑遗芳, 冯梦龙, 等. 二甲双胍对百草枯中毒大鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(10): 1019-1024.
- [12] 李雪静, 张园园. miRNA 调控支气管哮喘研究进展 [J]. *临床儿科杂志*, 2019, 37(6): 466-469.
- [13] Tang K, Zhao JP, Xie JG, et al. Decreased miR-29b expression is associated with airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(4): L621-L629.
- [14] 刘敏. 微小 RNA-34 家族与肺部疾病的研究进展 [J]. *国际儿科学杂志*, 2018, 45(2): 96-99.
- [15] Gao HX, Su Y, Zhang AL, et al. MiR-34c-5p plays a protective role in chronic obstructive pulmonary disease via targeting CCL22 [J]. *Exp Lung Res*, 2019, 45(1-2): 1-12.
- [16] 徐小峰, 戴宏宇, 夏春伟, 等. 吸烟的稳定期慢性阻塞性肺疾病患者血清微小 RNA-34a 的表达及临床意义 [J]. *临床内科杂志*, 2019, 36(8): 539-542.
- [17] Long YJ, Liu XP, Chen SS, et al. miR-34a is involved in CSE-induced apoptosis of human pulmonary microvascular endothelial cells by targeting Notch-1 receptor protein [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 21-26.
- [18] 江巧丽, 朱佳杰, 戴蕾, 等. 基于 miR-34a/SIRT1 轴探讨奥沙拉秦钠治疗溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. *浙江医学*, 2019, 41(23): 2486-2491, 前插 2.
- [19] Quan MX, Lv YN, Dai Y, et al. Tanshinone IIA protects against lipopolysaccharide-induced lung injury through targeting Sirt1 [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(7): 1142-1151.
- [20] He B, Zhang WX, Qiao J, et al. Melatonin protects against COPD by attenuating apoptosis and endoplasmic reticulum stress via upregulating SIRT1 expression in rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2019, 97(5): 386-391.
- [21] Tang F, Ling C. Curcumin ameliorates chronic obstructive pulmonary disease by modulating autophagy and endoplasmic reticulum stress through regulation of SIRT1 in a rat model [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(10): 4764-4774.

[收稿日期] 2020-09-02