

# 脂氧素 A4 调控 miRNA-29b 保护脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的机制研究

纪伟平 Hui Li Arvine Chandoo 蔡爱敏 董佩泓 吴晓燕

**【摘要】目的** 探讨脂氧素 A4(LXA4)调控 miRNA-29 家族分子保护脂多糖(LPS)诱导大鼠急性肺损伤(特征性表现为急性呼吸窘迫综合征)的机制。**方法** 将 30 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 LPS 组(按 20mg/kg 尾静脉注射 LPS)、LPS+LXA4 组(按 20mg/kg 尾静脉注射 LPS 6h 后,再按 2μg/kg 尾静脉注射 LXA4 作用 2h)和对照组(予等量 0.9%氯化钠注射液),每组 10 只。麻醉处死大鼠取肺,左肺用于 HE 染色和 ELISA 法检测促炎因子(TNF-α、IL-6)水平,右肺用于 RT-PCR 法检测 miRNA-29 家族表达水平。**结果** LPS 组大鼠肺组织切片可见明显的炎症改变,肺损伤评分及肺组织内 TNF-α、IL-6 水平较对照组均明显升高(均  $P < 0.05$ )。LPS+LXA4 组大鼠肺组织切片可见炎症反应减轻,肺损伤评分及肺组织内 TNF-α、IL-6 水平较 LPS 组均明显下降(均  $P < 0.05$ )。RT-PCR 结果显示,LPS 组大鼠肺组织内 miRNA-29a、miRNA-29b 表达水平均明显升高(均  $P < 0.05$ ),LPS+LXA4 组 miRNA-29b 表达水平明显下降( $P < 0.05$ )。**结论** miRNA-29a、miRNA-29b 可能在 LPS 诱导的大鼠急性肺损伤炎症发生过程中起着调节作用,LPS 可能通过下调 miRNA-29b 表达来发挥促炎症消退的作用。

**【关键词】** miRNA-29 急性呼吸窘迫综合征 脂多糖 脂氧素 A4

Lipoxigenin A4 regulates miRNA-29b to protect rats from LPS-induced acute lung injury *Ji Weiping, HUI Li, ARVINE Chandoo, et al. Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China*

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of lipoxigenin A4 (LXA4) on protecting rats from LPS-induced acute lung injury and its mechanism. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups with 10 animals in each group. The acute lung injury was induced by caudal vein injection of LPS (20mg/ml) in LPS and LPS+LXA4 groups, and normal saline was injected in control group. The rats in LPS+LXA4 group were challenged with LXA4 (2μg/kg) by caudal vein injection, and saline was used in LPS group. After 2h of LXA4 injection, the left lung tissues were harvested for HE and ELISA examination, and the right lung tissues for measuring miRNA-29a, miRNA-29b and miRNA-29c expression. **Results** Compared with the control group, lung tissue slices in the LPS group showed a significant inflammatory response with infiltrating inflammatory cells and the level of TNF-α and IL-6 increased significantly, while the treatment with LXA4 reduced the inflammatory response. RT-PCR showed that the expression of miRNA-29a and miRNA-29b increased in LPS group, and the expression of miRNA-29b was decreased after LXA4 treatment. **Conclusion** LXA4 may attenuate LPS-induced lung injury through regulating miRNA-29b expression in rats.

**【Key words】** miRNA-29 ARDS Lipopolysaccharides Lipoxin A4

急性肺损伤是临床上常见的急危重症,其特征性表现为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。ARDS 以难以控制的炎症反应、肺泡

毛细血管屏障受损引起的肺水肿为特征,临床表现为肺通气障碍引起的顽固性低氧血症和呼吸衰竭<sup>[1]</sup>。微小 RNA(miRNA)是一类长度约为 20~24 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,用于调控基因转录后表达,有望成为潜在预测疾病发生、调控疾病发展的重要生物标志物<sup>[2]</sup>。miRNA-29 家族包括 miRNA-29a、miRNA-29b 和 miRNA-29c,在很多肺部疾病发生、发展过程中发挥着重要的调节作用<sup>[3]</sup>。研究表明,抗炎促消退介质脂氧素 A4(LXA4)可以减轻脂多糖(LPS)诱导的动物 ARDS<sup>[4]</sup>。

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.2.2018-1223

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院普外科(纪伟平、Arvine Chandoo),麻醉科(董佩泓、吴晓燕),药学部(蔡爱敏);伯明翰大学炎症和衰老学院(Hui Li)

通信作者:纪伟平, E-mail: 18817350420@126.com

尽管如此,LXA4 治疗 ARDS 过程中如何调控 miRNA-29 家族以及 miRNA-29 家族能否成为急性肺损伤的诊治与治疗靶点,目前尚不清楚。本实验通过尾静脉注射 LPS 建立大鼠急性肺损伤的 ARDS 模型,予尾静脉注射 LXA4 作用 2h,观察大鼠肺组织损伤以及肺组织内 miRNA-29 家族水平的变化,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 动物分组及处理** 雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只,体重 200~250g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。实验前禁食 12h,自由饮水。将 30 只大鼠按随机数字表法分为 3 组(LPS 组、LPS+LXA4 组、对照组),每组 10 只。LPS+LXA4 组:戊巴比妥钠(30mg/kg,3g 溶于 100ml 的 0.9%氯化钠注射液中,1ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,先尾静脉注射 LPS(20mg/kg,100mg 溶于 100ml 的 0.9%氯化钠注射液中,20ml/kg)建立大鼠 ARDS 模型;6h 后尾静脉注射 LXA4(2 $\mu$ g/kg,25 $\mu$ g 溶于 25ml 的 0.9%氯化钠注射液中,2ml/kg)作用 2h。LPS 组:麻醉及建模方法同上,6h 后尾静脉注射 0.9%氯化钠溶液(2ml/kg)作用 2h。对照组:麻醉方法同上,先尾静脉注射 0.9%氯化钠注射液(20ml/kg),6h 后尾静脉注射 0.9%氯化钠注射液(2ml/kg)。

**1.2 肺组织病理学检查** 待动物造模成功且药物作用 2h 后,3 组大鼠同时放血处死。取大鼠左肺组织,经 10%中性甲醛溶液固定、脱水、石蜡包埋、切片、二甲苯脱蜡后行 HE 染色,最后封片,光镜下观察肺组织形态学改变。肺损伤评分:按照 Smith 评分体系,依据肺泡及间质炎症细胞浸润、肺水肿、肺不张、透明膜的形成、肺泡及间质出血等 5 项指标进行肺损伤严重程度评分。肺泡、肺血管、支气管及间质均正常为 0 分,病变范围小于整个视野面积的 25%为 1 分,病变范围为整个视野面积的 25%~<50%为 2 分,病变范围为整个视野面积的 50%~<75%为 3 分,病变范围大于或等于整个视野面积的 75%为 4 分;总的肺损伤评分为上述各项之和。

**1.3 ELISA 法检测肺组织匀浆 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平** 取大鼠肺组织匀浆后超声裂解,4 $^{\circ}$ C 5 000r/min 离心 15min,取上清液。严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行肺组织内 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的测定。

**1.4 RT-PCR 法检测 miRNA-29 家族表达水平** 液氮研磨大鼠肺组织,Trizol 法提取 RNA。使用 cDNA 逆转录试剂盒(Thermo Fisher)反转录 cDNA,SYBR 绿色 PCR 混合试剂盒进行 PCR 检测。引物序列如下,rno-miRNA-29a:5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3';rno-

miRNA-29b:5'-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3';rno-miRNA-29c:5'-UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA-3'。反转录条件:95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min,40 个循环;然后进入熔解曲线阶段,60 $^{\circ}$ C 1min,95 $^{\circ}$ C 15s。以 2<sup>- $\Delta\Delta$</sup> 法计算基因表达量,在每次扩增时设置无 cDNA 的阴性对照,U6 为内参。

**1.5 统计学处理** 应用 Graphpad prism 7.0 统计软件。计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,并通过 Tukey's 检验校正;两两比较采用 Dunnett-t 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 3 组大鼠肺组织病理学检查结果比较** 经 HE 染色可见,对照组大鼠肺组织外观正常,肺组织结构完整,肺泡无炎性细胞浸润,见图 1a(插页);LPS 组大鼠肺组织弥漫性的炎性细胞浸润,肺泡结构破坏,见图 1b(插页);LPS+LXA4 组大鼠肺组织肺泡结构破坏减弱,炎性细胞浸润减轻,见图 1c(插页)。对照组、LPS 组、LPS+LXA4 组肺损伤评分为 0、(8.70 $\pm$ 1.22)和 (3.60 $\pm$ 1.33)分,差异有统计学意义( $P<0.05$ );进一步两两比较发现,对照组、LPS+LXA4 组均明显低于 LPS 组(均  $P<0.05$ )。

**2.2 3 组大鼠肺组织内促炎因子水平比较** 对照组、LPS 组、LPS+LXA4 组肺组织内 TNF- $\alpha$  水平分别为 (23.20 $\pm$ 2.56)、(197.55 $\pm$ 27.86)和 (48.40 $\pm$ 7.63)pg/ml,差异有统计学意义( $P<0.05$ );进一步两两比较发现,对照组、LPS+LXA4 组均明显低于 LPS 组(均  $P<0.05$ ),见图 2a。对照组、LPS 组、LPS+LXA4 组肺组织内 IL-6 水平分别为 (38.82 $\pm$ 5.35)、(133.00 $\pm$ 23.64)和 (58.65 $\pm$ 12.42)pg/ml,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2b;进一步两两比较发现,对照组、LPS+LXA4 组均明显低于 LPS 组(均  $P<0.05$ )。

**2.3 3 组大鼠肺组织内 miRNA-29 家族表达水平比较** 对照组、LPS 组、LPS+LXA4 组肺组织内 miRNA-29 相对表达量分别为 0.90 $\pm$ 0.26、2.80 $\pm$ 0.65 和 2.20 $\pm$ 0.53,差异有统计学意义( $P<0.05$ );进一步两两比较发现,对照组明显低于 LPS 组( $P<0.05$ ),而 LPS+LXA4 组与 LPS 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 3a。对照组、LPS 组、LPS+LXA4 组肺组织内 miRNA-29b 相对表达量分别为 1.00 $\pm$ 0.25、1.50 $\pm$ 0.34 和 0.80 $\pm$ 0.23,差异有统计学意义( $P<0.05$ );进一步两两比较发现,对照组、LPS+LXA4 组均明显低于 LPS 组(均  $P<0.05$ ),见图 3b。对照组、LPS 组、LPS+LXA4 组肺组织

内 miRNA-29c 相对表达量分别为  $1.00 \pm 0.27$ 、 $1.10 \pm 0.25$  和  $0.40 \pm 0.12$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 进一步两两比较发现, LPS+LXA4 组明显低于 LPS 组 ( $P <$

$0.05$ ), 而对照组与 LPS 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 3c。

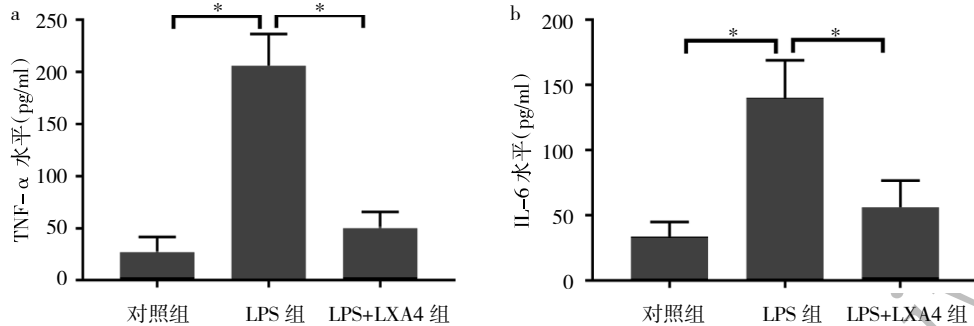


图 2 3 组大鼠肺组织内促炎因子水平比较(a: TNF- $\alpha$ ; b: IL-6; \* $P < 0.05$ )

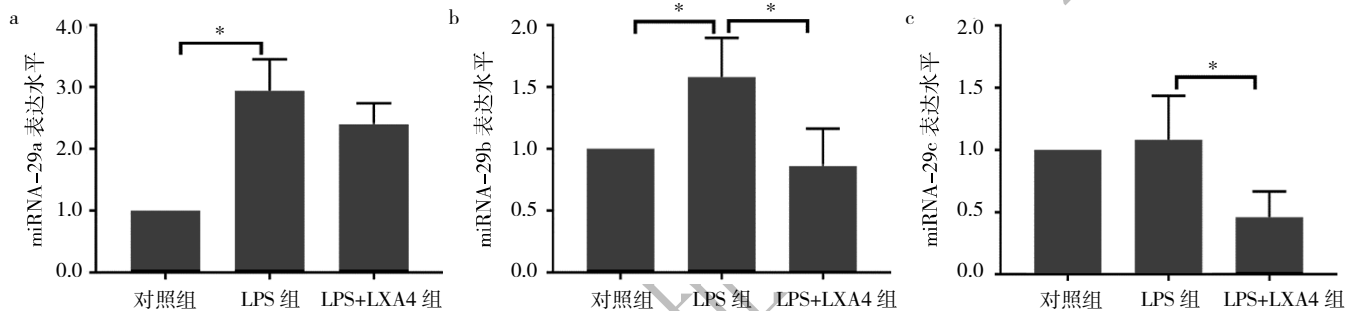


图 3 3 组大鼠肺组织内 miRNA-29 家族表达水平比较(a: miRNA-29a; b: miRNA-29b; c: miRNA-29c; \* $P < 0.05$ )

### 3 讨论

ARDS 是急危重症与呼吸领域研究的热点和难点。LPS 诱导大鼠肺组织发生炎性细胞浸润, 使肺泡结构破坏, 打破肺水平衡, 导致肺水肿发生, 最终引起呼吸功能衰竭, 是人们研究 ARDS 的经典模型<sup>[5]</sup>。探寻其特异性诊断标志物和治疗靶点, 对 ARDS 的预防和治疗有着重要意义。LXA4 是一种重要的抗炎促消退介质, 在炎症消退过程中起着重要作用。研究表明, LXA4 通过促进上皮细胞修复, 促进肺水清除, 减轻 LPS 诱导的急性肺损伤<sup>[6]</sup>。

miRNA 是一类短链基因产物, 作为重要的转录调节因子, 活跃在各个疾病的研究领域。miRNA 可作为部分疾病的生物诊断指标和治疗靶点<sup>[7]</sup>。最新研究表明, miRNA 也是外泌体调控炎症反应的重要机制之一<sup>[8]</sup>。最新研究发现 miRNA-29 在肺部疾病的发生、发展中发挥着重要的作用<sup>[9]</sup>。miRNA-29 可以调节多种免疫因子的表达。在 miRNA-29 介导的免疫调节缺失的树突状细胞中, IL-23 释放明显增多<sup>[10]</sup>。在肺发育过程中, miRNA-29 可以促进肺泡二型上皮细胞分化。miRNA-

29 通过激活 PI3K/AKT 通路介导 TGF- $\beta$  诱导的细胞外基质合成, 在肺纤维化发生、发展中起着重要的调节作用; miRNA-29 在活性氧自由基的产生以及细胞代谢过程中也起着重要的调节作用<sup>[11-12]</sup>。

本实验通过腹腔注射 LPS 建立 ARDS 大鼠模型, 尾静脉注射 LXA4 作用 2h 后, 观察其对 ARDS 的治疗作用。为进一步研究 LXA4 的作用机制, 笔者观察了 miRNA-29 家族在此过程中的变化。结果发现 LPS 诱导的 ARDS 大鼠模型中, 肺组织内 miRNA-29a、miRNA-29b 相对表达量明显升高, miRNA-29c 相对表达量未见明显改变; LXA4 干预后, miRNA-29a 相对表达量未见明显改变, 而 miRNA-29b 相对表达量明显下降, 而 miRNA-29c 相对表达量较 LPS 组明显降低。笔者推测 miRNA-29a、miRNA-29b 在 LPS 诱导的炎症发生过程中起着重要作用; 而 LXA4 对 LPS 诱导的炎症消退作用, 可能是通过降低 miRNA-29b 的表达来发挥作用的。关于 miRNA-29b 在炎症发生与消退过程中发挥着怎样的调节作用, 是下一步研究的重点。

综上所述, miRNA-29b 在 LPS 诱导的急性肺损伤性 ARDS 大鼠模型炎症发生与消退过程中可能起着重

要的调节作用。随着研究的不断深入,miRNA-29b 可能成为急性肺损伤性 ARDS 诊断与治疗的靶点,具有很好的应用前景,也为 LXA4 的临床应用提供新的实验依据。

#### 4 参考文献

- [1] Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome[J]. N Engl J Med, 2017, 377:562-572. DOI:10.1056/NEJMra1608077.
- [2] Sato T, Baskoro H, Rennard SI, et al. MicroRNAs as Therapeutic Targets in Lung Disease: Prospects and Challenges[J]. Chronic Obstr Pulm Dis, 2015, 3: 382-388. DOI:10.15326/jcopdf.3.1.2015.0160.
- [3] Durrani-Kolarik S, Pool CA, Gray A, et al. miR-29b supplementation decreases expression of matrix proteins and improves alveolarization in mice exposed to maternal inflammation and neonatal hyperoxia[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 313(2):L339-L349. DOI:10.1152/ajplung.00273.2016.
- [4] Fang X, Abbott J, Cheng L, et al. Human Mesenchymal Stem (Stromal) Cells Promote the Resolution of Acute Lung Injury in Part through Lipoxin A4[J]. J Immunol, 2015, 195:875-881. DOI:10.4049/jimmunol.1500244.
- [5] Qi D, Tang X, He J, et al. Omentin protects against LPS-induced ARDS through suppressing pulmonary inflammation and promoting endothelial barrier via an AKT/eNOS-dependent mechanism [J]. Cell Death Dis, 2016, 7:e2360. DOI:10.1038/cddis.2016.265.
- [6] Das UN. Combination of aspirin with essential fatty acids is superior to aspirin alone to prevent or ameliorate sepsis or ARDS[J]. Lipids Health Dis, 2016,15:206. DOI:10.1186/s12944-016-0377-2.
- [7] Cushing L, Jiang Z, Kuang P, et al. The roles of microRNAs and protein components of the microRNA pathway in lung development and diseases[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015, 52:397-408. DOI:10.1165/rcmb.2014-0232RT.
- [8] Del VV, Denti MA. microRNA and Lung Cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 889:153-177. DOI:10.1007/978-3-319-23730-5\_9.
- [9] Guo W, Benlhabib H, Mendelson CR. The MicroRNA 29 Family Promotes Type II Cell Differentiation in Developing Lung[J]. Mol Cell Biol, 2016, 36:2141. DOI:10.1128/MCB.00096-16.
- [10] Chen X, Talati M, Fessel JP, et al. Estrogen Metabolite 16 $\alpha$ -Hydroxyestrone Exacerbates Bone Morphogenetic Protein Receptor Type II -Associated Pulmonary Arterial Hypertension Through MicroRNA-29-Mediated Modulation of Cellular Metabolism[J]. Circulation, 2016, 133:82-97. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016133.
- [11] Cushing L, Costinean S, Xu W, et al. Disruption of miR-29 Leads to Aberrant Differentiation of Smooth Muscle Cells Selectively Associated with Distal Lung Vasculature[J]. PLoS Genet, 2015, 11:e1005238. DOI:10.1371/journal.pgen.1005238.
- [12] Cushing L, Kuang PP, Lyu JN. The role of miR-29 in pulmonary fibrosis[J]. Biochem Cell Biol, 2015, 93:109-118. DOI:10.1139/bcb-2014-0095.

(收稿日期:2018-05-10)

(本文编辑:陈丹)

## 《浙江医学》对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计学分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。应写明所用统计学分析方法的具体名称(如:成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等)。

2. 统计结果的解释和表达:当  $P < 0.05$  或  $< 0.01$  时,应说明对比较组之间的差异有统计学意义,而不应说对比较组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;统计量的具体值(如  $t$  值,  $\chi^2$  值,  $F$  值等)应尽可能给出具体的  $P$  值;当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 可信区间。

本刊编辑部