

miR-96-5p 通过调节 JAK/STAT 信号通路对 2 型糖尿病相关肺结核小鼠炎症 反应的机制研究

于文昭

(黑龙江省传染病防治院结核内科三病区, 黑龙江 哈尔滨 150500)

[摘要] **目的** 探讨 miR-96-5p 在 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 相关肺结核 (pulmonary tuberculosis, PTB) 调节中的作用。**方法** 构建 T2DM 相关 PTB 小鼠模型, 实时定量反转录聚合酶链式反应分析 miR-96-5p 在 T2DM 相关 PTB 小鼠肺组织中的表达, Masson 染色和 HE 染色分析肺纤维化和肺损伤情况; 免疫组织化学和 Western blot 检测 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK)/信号传导及转录激活蛋白 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 信号通路相关蛋白的表达; 试剂盒分析血清中游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 和三酰甘油水平。**结果** miR-96-5p 在 T2DM 相关 PTB 小鼠肺组织中显著高表达, 抑制 miR-96-5p 可以减轻肺组织的纤维化和肺损伤, 降低 T2DM 相关 PTB 小鼠肺组织和血清中白细胞介素 (interleukin, IL)-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 IL-1 β 的水平, 降低 T2DM 相关 PTB 小鼠肺组织中 FFA 和三酰甘油水平。p-JAK2 和 p-STAT3 在 T2DM 相关 PTB 小鼠的肺组织中表达上调。JAK/STAT 信号通路抑制剂 (AZD1480) 可以逆转 miR-96-5p 过表达对 T2DM 相关 PTB 小鼠模型中的肺纤维化和肺损伤的促进作用, 可以减弱 miR-96-5p 过表达对 T2DM 相关 PTB 小鼠肺组织和血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平的促进作用, 降低血清中 FFA 和三酰甘油水平。**结论** miR-96-5p 通过调节 JAK/STAT 信号通路促进对 T2DM 相关 PTB 小鼠的炎症反应。

[关键词] 糖尿病, 2 型; 结核, 肺; 微 RNAs doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.11.011

[中图分类号] R587.1; R521 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2024)11-1301-09

The mechanism of miR-96-5p regulating inflammatory response of mice with type 2 diabetes mellitus-associated pulmonary tuberculosis via the JAK/STAT signaling pathway

YU Wen-zhao

(The Third Department of Tuberculosis, Infectious Disease Prevention and Control Hospital of Heilongjiang Province, Harbin 150500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of miR-96-5p in the regulation of type 2 diabetes mellitus (T2DM)-associated pulmonary tuberculosis (PTB). **Methods** A T2DM-associated PTB mouse model was constructed. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to analyze the expression of miR-96-5p in lung tissue of mice with T2DM-associated PTB. Masson staining and HE staining were used to analyze pulmonary fibrosis and lung injury. The expression of Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway-related proteins was detected by immunohistochemistry and Western blot. The levels of free fatty acids (FFA) and triglyceride in serum were analyzed by kits. **Results** MiR-96-5p was highly expressed in the lung tissue of mice with T2DM-associated PTB. Inhibition of miR-96-5p could reduce fibrosis and lung injury in lung

[收稿日期] 2023-03-23

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (14251743)

[作者简介] 于文昭 (1987-), 女, 回族, 黑龙江哈尔滨人, 黑龙江省传染病防治院主治医师, 医学学士, 从事结核内科疾病诊治研究。

tissue, reduce the levels of interleukin (IL) -6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-1 β in lung tissue and serum of mice with T2DM-related PTB, and reduce the levels of FFA and triglyceride in lung tissue of mice with T2DM-related PTB. The expression of p-JAK2 and p-STAT3 was up-regulated in the lung tissue of mice with T2DM-related PTB. JAK/STAT signaling pathway inhibitor (AZD1480) could reverse the promoting effect of miR-96-5p overexpression on pulmonary fibrosis and lung injury in T2DM-related PTB mouse model, and could weaken the promoting effect of miR-96-5p overexpression on the levels of IL-6, TNF- α and IL-1 β in lung tissue and serum of mice with T2DM-related PTB, and reduce the levels of FFA and triglyceride in serum. **Conclusion** miR-96-5p promotes inflammatory responses of mice with T2DM-associated PTB by regulating the JAK/STAT signaling pathway.

[**Key words**] diabetes mellitus, type 2; tuberculosis, pulmonary; microRNAs

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是结核病(pulmonary tuberculosis, PTB)的一个主要危险因素^[1]。T2DM患者患PTB的风险是非T2DM患者的2~8倍^[2]。如今,新出现的T2DM大流行给全球公共卫生带来了重大挑战,这使得T2DM和PTB成为主要的健康问题^[3]。病理学上,结核分枝杆菌(*mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染是PTB的主要因素^[4-5]。T2DM不仅会增加MTB的易感性,还会通过影响疾病表现增加对PTB治疗的无反应性以及治疗失败、复发和死亡的风险,加重PTB的严重程度^[6-7]。因此,探索影响T2DM相关PTB的发病机制至关重要。miRNAs是一类非编码RNA,参与包括炎症和免疫反应在内的各种细胞过程^[8-9]。先前报道了诸多影响PTB进展的miRNA, miR-30c、miR-29a-3p、miR-378、miR-892b、miR-199b-5p和miR-582-5p等在PTB中异常表达,可能作为PTB的诊断标志物^[10-13]。Yuan等^[14]报道,miR-196b-5p的上调通过靶向细胞因子信号传导抑制剂3(suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3)蛋白和激活长期吸烟相关活动性肺结核患者巨噬细胞中的STAT3蛋白来减弱卡介苗的摄取。miR-96-5p是最近报道的参与疾病进展的调节因子。Qin等^[15]发现,miR-96-5p可促进乳腺癌转移。Liu等^[16]报道,miR-96-5p通过靶向Rho GTP酶激活蛋白6(rho GTPase activating protein 6, ARHGAP6)蛋白促进肺腺癌增殖、迁移和侵袭。在脓毒症的研究中发现,泛素特异性肽酶7(ubiquitin-specific protease 7, USP7)通过去泛素化上调SRY盒转录因子9(SRY-box transcription factor 9, SOX9)的表达,SOX9通过与miR-96-5p启动子区结合抑制miR-96-5p的表达,从而促进NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein

3, NLRP3)的表达,进而加剧脓毒症引起的心肌损伤和心肌细胞焦亡^[17]。目前关于miR-96-5p在PTB中的作用和功能尚未可知。本研究通过建立T2DM相关PTB小鼠模型,探索miR-96-5p在T2DM相关PTB的炎症反应中所发挥的作用及机制,并进一步探索miR-96-5p下游调控通路。围绕该通路作为抗结核治疗的靶点有望降低T2DM患者PTB进展的风险、提高T2DM相关PTB患者的治疗、开发潜在的治疗药物。报告如下。

1 材料与 方法

1.1 动物模型构建

建立链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导的T2DM小鼠模型。4周龄C57BL/6J小鼠购自Vital River实验室(China)。连续5d腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(60 mg/kg)。然后,每周检查1次血糖水平。超过16.7 mmol/L即可视为成功建立T2DM小鼠模型。本研究经医院动物伦理委员会批准通过。所有实验程序均符合ARRIVE指南。

将构建成功的T2DM小鼠模型进行MTB, H37Rv(ATCC, USA)处理,用于诱导小鼠PTB。将细菌在7H9液体培养基中培养至中对数生长阶段,然后在-70℃下冷冻。细菌计数在补充有油白蛋白葡萄糖过氧化氢酶(oleic albumin dextrose catalase, OADC)的7H10琼脂平板上进行。对于感染,将细菌在10 mL盐水中稀释至 0.5×10^6 菌落形成单位(colony forming units, CFU)/mL、 1×10^6 CFU/mL、 2×10^6 CFU/mL和 3×10^6 CFU/mL,然后装入雾化器中进行气溶胶暴露。在初步实验中,每个笼中有3只小鼠,暴露于不同H37Rv浓度的气溶胶中15 min。24 h后,对小鼠实施安乐死,并通过神经反射、眨眼反射和心跳的丧失确认动物死亡,排除心脏骤停的可能性。然后,将全肺匀浆样品涂

覆在含有 OADC 的 7H10 琼脂板上。在 37 °C 和 5% CO₂ 孵育 22 d 后,测定肺组织中的 CFU。选择气溶胶暴露期间在肺部沉积约 100 个细菌的浓度。对照组 T2DM 小鼠模型给予 PBS 处理。

1 个月后,将 miR-96-5p AntagomiR(5 nmol)、miR-96-5p agomiR(5 nmol)、JAK/STAT 通路抑制剂(AZD1480)(1 mg · mL⁻¹ · kg⁻¹)通过腹腔注射 2 次。治疗 2 周后,对小鼠进行安乐死后。收集血清用于炎症细胞因子检测,收集肺组织,将左侧组织切成切片进行组织病理学染色,而将右侧组织制成匀浆进行 RNA 和蛋白质表达检测。

1.2 动物实验分组 将动物进行分组,每组 10 只。PBS 组(T2DM 小鼠模型给予 PBS 治疗);MTB 组(T2DM 小鼠模型给予 MTB 处理);miR-96-5p AntagomiR 组(T2DM 小鼠模型给予 MTB 处理后进行 miR-96-5p AntagomiR 治疗);agomiR NC+PBS 组(T2DM 小鼠模型给予 MTB 处理后进行 agomiR NC 和 PBS 治疗);miR-96-5p agomiR+PBS 组(T2DM 小鼠模型给予 MTB 处理后进行 miR-96-5p agomiR 和 PBS 治疗);miR-96-5p agomiR +AZD1480 组(T2DM 小鼠模型给予 MTB 处理后进行 miR-96-5p agomiR 和 AZD1480 治疗)。

1.3 组织病理学染色 将肺组织在 4%多聚甲醛中固定 48 h,包埋在石蜡中,切成切片。然后对切片进行苏木精和伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色和马松(Masson)染色。对于 HE 染色,将组织切片去角质并用苏木精和伊红染色以进行组织学检查。对于 Masson 染色,切片依次用苏木精和氧化铁、酸性品红、磷钼酸和乙酸处理,然后涂上中性胶。拍摄照片并在 HE 切片中测量皮肤厚度。然后根据肺组织中的炎症浸润进行组织病理学评分,评分范围为 0~4 分^[18]:0 分,无炎症;1 分,1%~5%浸润面积;2 分,26%~50%浸润面积;3 分,51%~75%浸润面积;4 分,76%~100%浸润面积。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因	正向引物	反向引物
miR-96-5p	5'-ACGATGCACCTGTACGATCA-3'	5'-TCTTTCAACACGCAG GACAG-3'
U6	5'-CGCGCTTCGGCAGCAC-3'	5'-AAGCGAAGTGCTTAAAGCGT-3'

1.8 蛋白质免疫印迹法(Western blot, WB) 蛋白质提取以及 Western Blot 检验的相关步骤参考 Qin 等^[15]的方法进行。一抗主要有兔抗人 β -actin、JAK2/p-JAK2、STAT3/p-STAT3 (Abcam)。二抗山羊抗兔 IgG (Thermo Fisher Scientific, USA)。

1.9 统计学方法 应用 SPSS 21.0 统计软件分析

在显微镜下测定每个组织切片,随机选择 8 个场以评估纤维组织的比率。使用 Image-ProRPlus 6.0 软件(Media Cybernetics, USA)测定纤维化面积。

1.4 免疫组织化学 对肺组织切片脱蜡后,用 100 μ L 3% H₂O₂ 在湿箱中处理 20 min,阻断内源性过氧化物酶。用柠檬酸盐微波修复液进行抗原修复。用 tris buffered saline tween (TBST)缓冲液稀释的 5%脱脂牛奶堵塞切片,在室温下孵育 20 min。然后,丢弃孵育的缓冲液,加入 p-JAK2、p-STAT3 抗体 (Abcam),在 4 °C 孵育过夜。切片用二抗 (Abcam)培养 20 min。切片用 2,4-二氨基丁酸显色,苏木精复染,显微镜下观察。

1.5 酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 使用相应的商品化 ELISA 试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, China)测定血清和组织匀浆中的白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)蛋白水平。在 96 孔板上进行测量,并使用分光光度计测定 450 nm 波长下的吸光值。

1.6 血脂水平测定 对血液进行离心,收集血清,通过商业检测试剂盒 (Solarbio, China)测量游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA)和三酰甘油的水平。

1.7 实时定量反转录聚合酶链式反应 (real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 使用 RNAPure Total RNA Fast Extraction Kit (BioTeke Corporation)提取肺组织的总 RNA,并按照试剂盒的说明使用 PromeScript RT Kit (Takara Biotechnology Ltd.) 反转录成 cDNA。使用 iQ SYBR Green Supermix kit (BIO-RAD) 在 ABI 7300 仪器 (Applied Biosystem)上进行 qRT-PCR。以 U6 作为 miRNA 的内参,使用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法测定目的基因的相对表达。qRT-PCR 引物序列见表 1。

数据。计量资料比较采用 *t* 检验、单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-96-5p 在 T2DM 相关 PTB 小鼠模型中表达增加 建立了 T2DM 相关 PTB 小鼠模型,并评

估了 miR-96-5p 的表达。Masson 染色结果显示,在 T2DM 相关 PTB 小鼠中观察到肺组织纤维化(图 1A)。HE 染色结果显示,在 T2DM 相关 PTB 小鼠的肺组织有大面积炎症细胞浸润和明显肺损伤(图 1B)。与 PBS 组比较,MTB 组小鼠肺组织和血清中

IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2,3。与 PBS 组比较,MTB 组小鼠肺组织中 miR-96-5p、p-JAK 和 p-STAT3 表达明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4、5,图 1C~D。

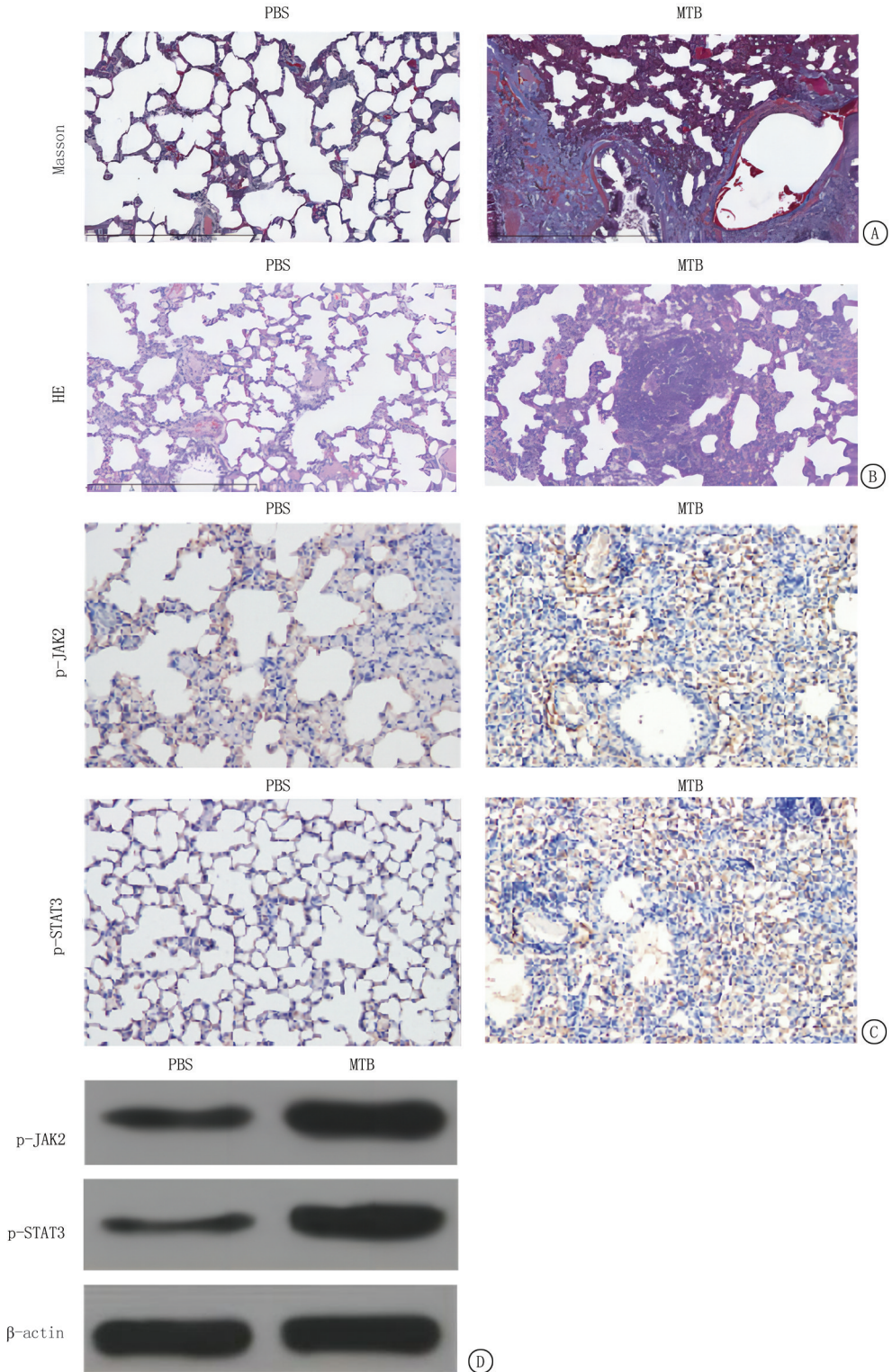


图 1 miR-96-5p 在 T2DM 相关 PTB 小鼠模型中表达增加

A. Masson 染色检测肺组织纤维化($\times 200$); B. HE 染色检测肺损伤($\times 200$); C. 免疫组织化学分析 p-JAK 和 p-STAT3 的表达($\times 200$); D. WB 检测 p-JAK 和 p-STAT3 的表达

Figure 1 Increased expression of miR-96-5p in T2DM-associated PTB mouse model**表2** PBS组和MTB组小鼠肺组织中IL-6、TNF- α 和IL-1 β 水平比较**Table 2** Comparison of the levels of IL-6, TNF- α and IL-1 β in lung tissue of mice in PBS group and MTB group
($n=10, \bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	IL-6	TNF- α	IL-1 β
PBS组	16.52 \pm 1.07	11.14 \pm 1.21	13.18 \pm 1.09
MTB组	68.46 \pm 2.24	74.57 \pm 5.28	125.42 \pm 6.58
<i>t</i> 值	66.164	37.029	53.216
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

表3 PBS组和MTB组小鼠血清中IL-6、TNF- α 和IL-1 β 水平比较**Table 3** Comparison of the levels of IL-6, TNF- α and IL-1 β in serum of mice in PBS group and MTB group
($n=10, \bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	IL-6	TNF- α	IL-1 β
PBS组	12.32 \pm 1.45	39.15 \pm 1.47	23.35 \pm 1.23
MTB组	69.26 \pm 2.12	119.34 \pm 9.43	133.87 \pm 8.76
<i>t</i> 值	70.105	26.570	39.509
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

表4 PBS组和MTB组小鼠肺组织中miR-96-5p水平
Table 4 The level of miR-96-5p in lung tissue of mice in PBS group and MTB group
($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	miR-96-5p 水平
PBS组	1.00 \pm 0.11
MTB组	4.65 \pm 0.19
<i>t</i> 值	52.574
<i>P</i> 值	<0.001

表5 PBS组和MTB组小鼠肺组织中p-JAK2和p-STAT3阳性细胞百分比**Table 5** The percentage of p-JAK2 and p-STAT3 positive cells in lung tissue of mice in PBS group and MTB group
($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	p-JAK2	p-STAT3
PBS组	9.51 \pm 1.07	38.04 \pm 4.59
MTB组	12.12 \pm 1.31	48.13 \pm 5.54
<i>t</i> 值	4.880	4.435
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

2.2 抑制 miR-96-5p 可以减轻 T2DM 相关 PTB 小鼠模型的炎症和肺损伤 探究了对 miR-96-5p 对 T2DM 相关 PTB 小鼠的炎症和肺损伤的影响。Masson 染色结果显示,与 AntagomiR NC 组比较,miR-96-5p AntagomiR 组抑制了 T2DM 相关 PTB 小鼠的肺组织纤维化(图 2A)。HE 染色结果显示,与 AntagomiR NC 组比较,miR-96-5p AntagomiR 组抑制了 T2DM 相关 PTB 小鼠的肺损伤(图 2B)。与 AntagomiR NC 组比较,miR-96-5p AntagomiR 组肺组织和血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 6,7。与 AntagomiR NC 组比较,miR-96-5p AntagomiR 组血清中 FFA 和三酰甘油水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 8。

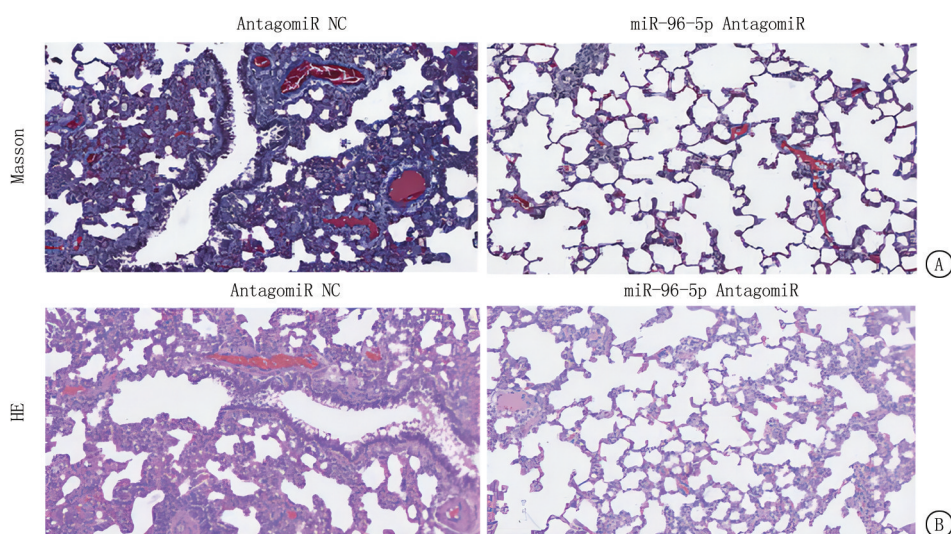
**图2** 抑制 miR-96-5p 可以减轻 T2DM 相关 PTB 小鼠模型的炎症和肺损伤A. Masson 染色检测肺组织纤维化($\times 200$); B. HE 染色检测肺损伤($\times 200$)**Figure 2** Inhibiting miR-96-5p that can alleviate inflammation and lung injury in T2DM-associated PTB mouse models

表 6 AntagomiR NC 组和 miR-96-5p AntagomiR 组小鼠肺组织中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平比较

Table 6 Comparison of the levels of IL-6, TNF- α and IL-1 β in lung tissue of mice in AntagomiR NC group and miR-96-5p AntagomiR group

(n = 10, $\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	IL-6	TNF- α	IL-1 β
AntagomiR NC 组	63.29 \pm 1.32	67.45 \pm 1.29	123.21 \pm 9.78
miR-96-5p AntagomiR 组	30.08 \pm 3.05	24.52 \pm 2.18	45.32 \pm 3.04
t 值	31.600	53.594	24.050
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

表 7 AntagomiR NC 组和 miR-96-5p AntagomiR 组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平比较

Table 7 Comparison of the levels of IL-6, TNF- α and IL-1 β in serum of mice in AntagomiR NC group and miR-96-5p AntagomiR group

(n = 10, $\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	IL-6	TNF- α	IL-1 β
AntagomiR NC 组	73.38 \pm 1.37	69.17 \pm 1.94	113.76 \pm 10.04
miR-96-5p AntagomiR 组	32.32 \pm 2.04	29.45 \pm 2.48	35.54 \pm 2.76
t 值	52.839	39.892	23.756
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

表 8 AntagomiR NC 组和 miR-96-5p AntagomiR 组小鼠血清中 FFA 和三酰甘油水平比较

Table 8 Comparison of the levels of FFA and triglyceride in serum of mice in AntagomiR NC group and miR-96-5p AntagomiR group

(n = 10, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	FFA	三酰甘油
AntagomiR NC 组	0.43 \pm 0.02	0.86 \pm 0.06
miR-96-5p AntagomiR 组	0.28 \pm 0.02	0.63 \pm 0.07
t 值	18.496	8.203
P 值	<0.001	<0.001

agomiR NC+PBS 组比较,miR-96-5p agomiR 组促进了 T2DM 相关 PTB 小鼠的肺组织纤维化和肺损伤,而进一步添加 JAK/STAT 通路抑制剂(AZD1480)处理逆转了 T2DM 相关 PTB 小鼠中 miR-96-5p agomiR 处理对肺纤维化和肺损伤的促进作用(图 3A,B)。与 agomiR NC+PBS 组比较,miR-96-5p agomiR 组肺组织和血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平明显升高,而进一步添加 AZD1480 处理逆转了这一结果,差异有统计学意义(P<0.05),见表 9、10。miR-96-5p agomiR 组血清中 FFA 和三酰甘油水平明显升高,添加 AZD1480 处理使血清中 FFA 和三酰甘油的水平降低,差异有统计学意义(P<0.05),见表 11。

2.3 抑制 JAK/STAT 通路可以减轻 T2DM 相关 PTB 小鼠模型的炎症和肺损伤 探究了对 miR-96-5p 通过 JAK/STAT 通路对 T2DM 相关 PTB 小鼠的炎症和肺损伤的影响。Masson 染色结果显示,与

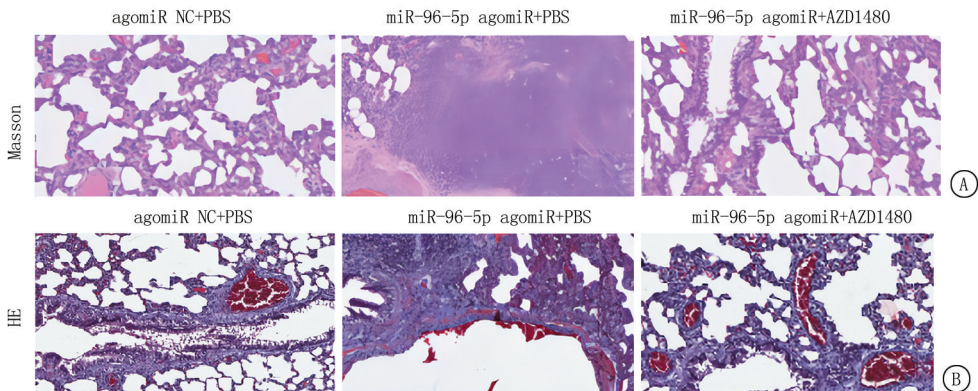


图 3 抑制 JAK/STAT 通路可以减轻 T2DM 相关 PTB 小鼠模型的炎症和肺损伤

A.Masson 染色检测肺组织纤维化(×200);B.HE 染色检测肺损伤(×200)

Figure 3 Inhibiting the JAK/STAT pathway that can alleviate inflammation and lung injury in T2DM-associated PTB mouse models

表9 各组小鼠肺组织中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平比较Table 9 Comparison of the levels of IL-6, TNF- α and IL-1 β in lung tissue of mice in each group(n=10, $\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	IL-6	TNF- α	IL-1 β
agomiR NC+PBS 组	65.26 \pm 1.38	69.16 \pm 1.34	126.34 \pm 9.21
miR-96-5p agomiR+PBS 组	103.16 \pm 9.07*	124.53 \pm 12.11*	230.39 \pm 13.04*
miR-96-5p agomiR+AZD1480 组	59.37 \pm 6.05 [#]	62.33 \pm 7.12 [#]	117.04 \pm 12.37 [#]
F 值	140.292	175.285	291.274
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与 agomiR NC+PBS 组比较 # P 值<0.05 与 miR-96-5p agomiR+PBS 比较(SNK-q 检验)

表10 各组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平比较Table 10 Comparison of the levels of IL-6, TNF- α and IL-1 β in serum of mice in each group(n=10, $\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	IL-6	TNF- α	IL-1 β
agomiR NC+PBS 组	73.38 \pm 1.37	69.86 \pm 5.06	111.65 \pm 9.06
miR-96-5p agomiR+PBS 组	132.38 \pm 12.04*	129.49 \pm 7.43*	235.52 \pm 14.23*
miR-96-5p agomiR+AZD1480 组	69.59 \pm 7.28 [#]	65.52 \pm 5.28 [#]	103.24 \pm 9.37 [#]
F 值	186.101	352.698	441.929
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与 agomiR NC+PBS 组比较 # P 值<0.05 与 miR-96-5p agomiR+PBS 比较(SNK-q 检验)

表11 各组小鼠血清中 FFA 和三酰甘油水平比较

Table 11 Comparison of the levels of FFA and triglyceride in serum of mice in each group

(n=10, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	FFA	三酰甘油
agomiR NC+PBS 组	0.42 \pm 0.03	0.88 \pm 0.05
miR-96-5p agomiR+PBS 组	0.78 \pm 0.08*	1.77 \pm 0.07*
miR-96-5p agomiR+AZD1480 组	0.39 \pm 0.05 [#]	0.79 \pm 0.09 [#]
F 值	155.955	553.792
P 值	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与 agomiR NC+PBS 组比较 # P 值<0.05 与 miR-96-5p agomiR+PBS 比较(SNK-q 检验)

3 讨论

T2DM 已被视为 PTB 的关键风险因素^[19-20]。最近研究表明,PTB 通常与人体免疫密切相关。因此,与免疫系统相关的因素始终是结核病的重要研究课题^[21]。在 PTB 的发生和发展过程中,存在细胞和体液免疫缺陷。参与细胞免疫应答的细胞主要包括巨噬细胞、T 淋巴细胞和自然杀伤细胞^[22-23]。一项研究表明,参与结核病免疫应答的细胞因子包括 Th1 型细胞因子,如 IL-2 和干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ),Th2 型细胞因子如 IL-5 和 IL-4,以及促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-1 和 IL-6。当肺部受到结核分枝杆菌攻击时,结核分枝杆菌的抗原或代谢产物会激活肺部巨噬细胞产生炎性因子,如 TNF- α 和 IL-2。随后,炎症因子促进肺部巨噬细胞和支气管上皮细胞产生 IL-6。细胞因子和内毒素激活单核吞噬细胞可诱导血液中 TNF- α 和 IL-6 的升高^[24]。

本研究结果显示,T2DM 相关 PTB 小鼠模型肺组织和血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的水平显著增加,说明 T2DM 相关的 PTB 小鼠肺组织有大面积炎症细胞浸润。还发现使用 miR-96-5p AntagomiR 处理抑制了 T2DM 相关 PTB 小鼠的肺组织纤维化和肺损伤,并降低了肺组织和血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的水平。

miRNAs 被报道参与包括炎症和免疫反应在内的各种细胞过程^[8-9]。在 PTB 的研究中,发现许多 miRNAs 对 PTB 具有很高的诊断价值,并且可能作为诊断和预后标志物^[11,25]。Sun 等^[12]研究发现,miR-378 在 PTB 中高度表达,活性组表达高于潜在组,血清 miR-378 表达>1.490 在 PTB 诊断中具有较高的敏感度和特异度,miR-378 的高表达预示着更高的不良结局发生率。Wang 等^[26]报道,磷酸化 STAT3 抑制 microRNA-19b/1281 加重 T2DM 相关 PTB 小鼠的肺损伤。本研究结果显示,miR-96-5p 在 T2DM 相关 PTB 小鼠模型肺组织中显著上调。抑制 miR-96-5p 可以减轻 T2DM 相关 PTB 小鼠模型的炎症和肺损伤。先前研究报道,miR-96-5p 在卵巢癌中高表达,circFBXO7 调控 miR-96-5p/MTSS1 轴促进卵巢进展^[27]。Park 等^[28]发现 miR-96-5p 靶向磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog,PTEN)介导透明细胞肾细胞癌对舒尼替尼的耐药性。在炎症相关疾病中,Wu 等^[29]报道,lncRNA ZFAS1 的沉默通过介导脓毒症中 miR-96-5p/氧化应激反应激酶 1(oxidative stress responsive kinase 1,OXSR1)

轴减轻脂多糖诱导的急性肺损伤。Chen 等^[30]报道 miR-96-5p 在新生儿败血症中通过靶向烟酰胺磷酸核糖转移酶和调节核因子 κ B 途径减轻炎症反应。本研究首次在 PTB 中证实了 miR-96-5p 的表达,以及 miR-96-5p 在 T2DM 相关 PTB 小鼠炎症反应中作用及分子机制。还发现 miR-96-5p 调控 JAK/STAT 通路可以增强 T2DM 相关 PTB 小鼠模型的炎症和肺损伤。

近年来,JAK/STAT 信号通路被诸多研究证实,在调节肿瘤增殖、分化、凋亡、炎症反应和免疫反应中发挥关键作用^[31-33]。如 miR-203 通过靶向 SOCS3 调节 JAK-STAT 通路促进胰腺癌癌细胞增殖,并抑制细胞凋亡^[34];miR-409 下调 JAK/STAT 通路以抑肝癌细胞增殖^[35]。在其他疾病中发现,补阳还五汤中的有效成分糖苷通过 JAK/STAT 信号通路抑制动脉粥样硬化炎症^[36]。Li 等^[37]研究发现,黄芩苷乙醇片治疗 PTB 大鼠可以降低 PTB 大鼠肺组织中磷酸化 JAK2 和磷酸化 STAT3 的蛋白水平。本研究通过 JAK/STAT 信号通路 AZD1480 处理 T2DM 相关 PTB 小鼠模型,发现 AZD1480 处理逆转了 T2DM 相关 PTB 小鼠中 miR-96-5p agomiR 处理对肺纤维化和肺损伤的促进作用。

综上所述,miR-96-5p 通过激活 JAK/STAT 信号通路,从而加重对 2 型糖尿病相关肺结核小鼠的炎症反应。这是首次发现 miR-96-5p 在 PTB 中的作用机制。本研究尚未探究 miR-96-5p 在 PTB 中的下游机制,是否涉及其他调控机制尚不清楚。此外,本研究仅验证了 JAK/STAT 通路的抑制作用,PI3K/AKT 的功能还需在后续实验中进一步探讨。未来,将探索 miR-96-5p/PI3K/AKT 调控网络的具体机制,并确定 miR-96-5p 作为 PTB 治疗靶点口的可行性。

[参考文献]

- [1] Al-Rifai RH, Pearson F, Critchley JA, et al. Association between diabetes mellitus and active tuberculosis: A systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(11):e0187967.
- [2] Ayelign B, Negash M, Genetu M, et al. Immunological impacts of diabetes on the susceptibility of mycobacterium tuberculosis[J]. J Immunol Res, 2019, 2019:6196532.
- [3] Workneh MH, Bjune GA, Yimer SA. Prevalence and associated factors of tuberculosis and diabetes mellitus comorbidity: A systematic review[J]. PLoS One, 2017, 12(4):e0175925.
- [4] Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis[J]. Lancet, 2019, 393(10181):1642-1656.
- [5] Dheda K, Barry CE, Maartens G. Tuberculosis[J]. Lancet, 2016, 387(10024):1211-1226.
- [6] Martinez N, Kornfeld H. Diabetes and immunity to tuberculosis[J]. Eur J Immunol, 2014, 44(3):617-626.
- [7] Dooley KE, Chaisson RE. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(12):737-746.
- [8] Iwakawa HO, Tomari Y. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression[J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(11):651-665.
- [9] Nejad C, Stunden HJ, Gantier MP. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses[J]. Febs J, 2018, 285(20):3695-3716.
- [10] Spinelli SV, Fernandez RDV, Zoff L, et al. miR-30c is specifically repressed in patients with active pulmonary tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb), 2017, 105:73-79.
- [11] Angria N, Massi MN, Bukhari A, et al. Expression of miRNA-29a-3p and IFN-gamma as biomarkers in active and latent pulmonary tuberculosis[J]. Ann Med Surg (Lond), 2022, 83:104786.
- [12] Sun X, Liu K, Zhao Y, et al. High miRNA-378 expression has high diagnostic values for pulmonary tuberculosis and predicts adverse outcomes[J]. BMC Mol Cell Biol, 2022, 23(1):14.
- [13] Zhang Y, Zhang X, Zhao Z, et al. Integrated bioinformatics analysis and validation revealed potential immune-regulatory miR-892b, miR-199b-5p and miR-582-5p as diagnostic biomarkers in active tuberculosis[J]. Microb Pathog, 2019, 134:103563.
- [14] Yuan Y, Lin D, Feng L, et al. Upregulation of miR-196b-5p attenuates BCG uptake via targeting SOCS3 and activating STAT3 in macrophages from patients with long-term cigarette smoking-related active pulmonary tuberculosis[J]. J Transl Med, 2018, 16(1):284.
- [15] Qin WY, Feng SC, Sun YQ, et al. MiR-96-5p promotes breast cancer migration by activating MEK/ERK signaling[J]. J Gene Med, 2020, 22(8):e3188.
- [16] Liu Z, Cui Y, Wang S, et al. MiR-96-5p is an oncogene in lung adenocarcinoma and facilitates tumor progression through ARHGAP6 downregulation[J]. J Appl Genet, 2021, 62(4):631-638.
- [17] Gong X, Li Y, He Y, et al. USP7-SOX9-miR-96-5p-NLRP3 network regulates myocardial injury and cardiomyocyte pyroptosis in sepsis[J]. Hum Gene Ther, 2022, 33(19/20):1073-1090.
- [18] Liu W, Li WM, Gao C, et al. Effects of atorvastatin on the Th1/Th2 polarization of ongoing experimental autoimmune myocarditis in lewis rats[J]. J Autoimmun, 2005, 25(4):258-263.
- [19] Xia LL, Li SF, Shao K, et al. The correlation between CT features and glycosylated hemoglobin level in patients with T2DM complicated with primary pulmonary tuberculosis[J]. Infect Drug Resist, 2018, 11:187-193.

- [20] Yang WB, Wang HL, Mao JT, et al. The correlation between CT features and insulin resistance levels in patients with T2DM complicated with primary pulmonary tuberculosis[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(12):9370-9377.
- [21] Dorhoi A, Kaufmann SH. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis [J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(2):153-166.
- [22] Chae J, Choi Y, Tanaka M, et al. Inhalable nanoparticles delivery targeting alveolar macrophages for the treatment of pulmonary tuberculosis[J]. *J Biosci Bioeng*, 2021, 132(6):543-551.
- [23] Mayer-Barber KD, Barber DL. Innate and adaptive cellular immune responses to mycobacterium tuberculosis infection [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, 5(12):a018424.
- [24] Aktas E, Ciftci F, Bilgic S, et al. Peripheral immune response in pulmonary tuberculosis [J]. *Scand J Immunol*, 2009, 70(3):300-308.
- [25] Chen YC, Hsiao CC, Wu CC, et al. Next generation sequencing reveals miR-431-3p/miR-1303 as immune-regulating microRNAs for active tuberculosis [J]. *J Infect*, 2022, 85(5):519-533.
- [26] Wang X, Lin Y, Liang Y, et al. Phosphorylated STAT3 suppresses microRNA-19b/1281 to aggravate lung injury in mice with type 2 diabetes mellitus-associated pulmonary tuberculosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(23):13763-13774.
- [27] Wu M, Qiu Q, Zhou Q, et al. circFBXO7/miR-96-5p/MTSS1 axis is an important regulator in the Wnt signaling pathway in ovarian cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1):137.
- [28] Park SE, Kim W, Hong JY, et al. miR-96-5p targets PTEN to mediate sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):3537.
- [29] Wu W, Zhong W, Xu Q, et al. Silencing of long non-coding RNA ZFAS1 alleviates LPS-induced acute lung injury by mediating the miR-96-5p/OXSR1 axis in sepsis [J]. *Am J Med Sci*, 2022, 364(1):66-75.
- [30] Chen X, Chen Y, Dai L, et al. MiR-96-5p alleviates inflammatory responses by targeting NAMPT and regulating the NF-kappaB pathway in neonatal sepsis [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(7):BSR20201267.
- [31] Wang F, Wang X, Li J, et al. CircNOL10 suppresses breast cancer progression by sponging miR-767-5p to regulate SOCS2/JAK/STAT signaling [J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1):4.
- [32] Huang W, Li Y, Zhang C, et al. IGF2BP3 facilitates cell proliferation and tumorigenesis via modulation of JAK/STAT signalling pathway in human bladder cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(23):13949-13960.
- [33] Owen KL, Brockwell NK, Parker BS. JAK-STAT Signaling: a double-edged sword of immune regulation and cancer progression [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12):2002.
- [34] Lin XM, Chen H, Zhan XL. MiR-203 regulates JAK-STAT pathway in affecting pancreatic cancer cells proliferation and apoptosis by targeting SOCS3 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(16):6906-6913.
- [35] Zhang CS, Lin Y, Sun FB, et al. miR-409 down-regulates Jak-Stat pathway to inhibit progression of liver cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(1):146-154.
- [36] Fu X, Sun Z, Long Q, et al. Glycosides from Buyang Huanwu Decoction inhibit atherosclerotic inflammation via JAK/STAT signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 105:154385.
- [37] Li JJ, Wu SF, Bai FX. Action mechanism of ethambutol tablets on pulmonary tuberculosis rat model based on janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway [J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2022, 44(4):555-562.

(本文编辑:赵丽洁)