

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1491-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240602

## 抑制 miR-193a-5p 表达对急性呼吸窘迫综合征大鼠肺纤维化的改善作用及其机制

龙光文, 张 谦, 杨秀林, 孙鸿鹏, 吉春玲  
(贵州省人民医院急诊内科, 贵州 贵阳 550002)

**[摘要]** **目的:** 探讨抑制微小RNA (miR) -193a-5p 表达对急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 大鼠肺纤维化的影响, 并阐明相关作用机制。**方法:** 60只雄性SD大鼠分为假手术组、模型组、miR-193a-5p拮抗剂组 (Antagomir组) 和阴性对照组 (Antagomir-NC组), 每组15只。采用暴露气管法滴注  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  脂多糖 (LPS) 诱导构建 ARDS 大鼠模型, 假手术组大鼠滴注等体积生理盐水, 造模成功后 Antagomir组和 Antagomir-NC组大鼠给予 miR-193a-5p Antagomir或 Antagomir-NC尾静脉注射。测定各组大鼠动脉血氧分压 ( $\text{PaO}_2$ ) 和氧合指数 (OI), HE和Masson染色观察各组大鼠肺组织病理形态表现及肺组织中胶原纤维沉积情况, 试剂盒检测各组大鼠肺组织中羟脯氨酸 (Hyp) 水平, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组大鼠肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL)-1 $\beta$  和 IL-6水平, 实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测各组大鼠肺组织中 miR-193a-5p 表达水平, Western blotting法检测各组大鼠肺组织中  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin)、蜗牛家族转录抑制因子1 (Snail1) 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 蛋白表达水平。**结果:** 与假手术组比较, 模型组大鼠  $\text{PaO}_2$  和 OI均明显降低 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, Antagomir组大鼠  $\text{PaO}_2$  和 OI均明显升高 ( $P<0.05$ )。HE染色观察, 假手术组大鼠肺组织结构正常, 未见明显的炎性改变; 与假手术组比较, 模型组和 Antagomir-NC组大鼠肺组织结构轻度异常, 肺泡萎缩塌陷, 肺泡腔内发现有大量的淋巴细胞和少量的中性粒细胞浸润, 肺泡间隙增宽; 与模型组比较, Antagomir组大鼠肺组织的肺泡腔内淋巴细胞明显减少, 中性粒细胞浸润较少, 未见明显增生。Masson染色观察, 假手术组大鼠肺组织无明显蓝色胶原纤维沉积; 与假手术组比较, 模型组和 Antagomir-NC组大鼠肺组织中出现大量蓝色胶原纤维沉积, 肺泡结构损坏严重, 呈现明显的肺纤维化情况; 与模型组比较, Antagomir组大鼠肺组织黏液中蓝色染色的胶原纤维沉积明显减少。与假手术组比较, 模型组大鼠肺组织中 Hyp水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, Antagomir组大鼠肺组织中 Hyp水平明显降低 ( $P<0.05$ )。ELISA法检测, 与假手术组比较, 模型组大鼠BALF中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6水平均明显升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, Antagomir组大鼠BALF中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6水平均明显降低 ( $P<0.05$ )。RT-qPCR法检测, 与假手术组比较, 模型组大鼠肺组织中 miR-193a-5p 表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, Antagomir组大鼠肺组织中 miR-193a-5p 表达水平明显降低 ( $P<0.05$ )。Western blotting法检测, 与假手术组比较, 模型组大鼠肺组织中  $\beta$ -catenin、Snail1和  $\alpha$ -SMA蛋白表达水平均明显升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, Antagomir组大鼠肺组织中  $\beta$ -catenin、Snail1和  $\alpha$ -SMA蛋白表达水平均明显降低 ( $P<0.05$ )。**结论:** 抑制 miR-193a-5p 表达可通过降低肺组织炎症反应和下调  $\beta$ -catenin、Snail1及  $\alpha$ -SMA 等蛋白表达, 改善 ARDS 大鼠肺功能和肺纤维化。

**[关键词]** 微小RNA-193a-5p; 急性呼吸窘迫综合征; 肺纤维化; Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路

**[中图分类号]** R563.9 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-09-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (82160021)

**[作者简介]** 龙光文 (1975—), 男, 贵州省贵阳市人, 副主任医师, 医学博士, 主要从事急诊内科学基础和临床方面的研究。

**[通信作者]** 龙光文, 副主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: fpx7833@163.com)

## Improvement effect of inhibiting miR-193a-5p expression on pulmonary fibrosis in rats with acute respiratory distress syndrome and its mechanism

LONG Guangwen, ZHANG Qian, YANG Xiulin, SUN Hongpeng, JI Chunling

(Department of Emergency, People's Hospital, Guizhou Province, Guiyang 550002, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To discuss the effect of inhibiting microRNA (miR)-193a-5p expression on pulmonary fibrosis in the rats with acute respiratory distress syndrome (ARDS), and to clarify the related mechanism. **Methods:** A total of 60 male SD rats were divided into sham operation group, model group, miR-193a-5p antagonist group (Antagomir group), and negative control group (Antagomir-NC group), and there were 15 rats in each group. The ARDS animal model was induced by administering  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  lipopolysaccharide (LPS) via tracheal instillation, while the rats in sham operation group received an equal volume of saline. After successful modeling, the rats in Antagomir group and Antagomir-NC group were treated with miR-193a-5p Antagomir or Antagomir-NC via tail vein injection. The arterial partial pressure of oxygen ( $\text{PaO}_2$ ) and oxygenation index (OI) of the rats in various groups were measured; HE staining and Masson staining were used to observe the pathology and collagen fiber deposition in lung tissue of the rats; kit was used to detect the level of hydroxyproline (Hyp) in lung tissue of the rats in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the levels of inflammatory factors tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of the rats in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of miR-193a-5p in lung tissue of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of  $\beta$ -catenin, Snail family transcriptional repressor 1 (Snail1), and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) proteins in lung tissue of the rats in various groups. **Results:** Compared with sham operation group, the  $\text{PaO}_2$  and OI of the rats in model group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the  $\text{PaO}_2$  and OI of the rats in Antagomir group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The HE staining results showed that the lung tissue structure of the rats in sham operation group was normal, and there were no obvious inflammatory changes; compared with sham operation group, mild abnormalities in lung tissue structure, alveolar atrophy, and collapse were observed in the rats in model group and Antagomir-NC group, with a large number of lymphocytes and a small number of neutrophils infiltrating in the alveolar cavities, and widened alveolar spaces; compared with model group, the rats in Antagomir group showed a significant reduction in lymphocytes and neutrophil infiltration in the alveolar cavities and there were no obvious hyperplasia. The Masson staining results showed no obvious blue collagen fiber deposition in lung tissue of the rats in sham operation group; compared with sham operation group, significant blue collagen fiber deposition was observed in lung tissue of the rats in model group and Antagomir-NC group, with severe damage of the alveolar structure, indicating obvious pulmonary fibrosis; compared with model group, the deposition of blue-stained collagen fibers in lung tissue of the rats in Antagomir group was significantly reduced. Compared with sham operation group, the level of Hyp in lung tissue of the rats in model group was significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the level of Hyp of the rats in Antagomir group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The ELISA results showed that compared with sham operation group, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in BALF of the rats in model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 of

the rats in Antagomir group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The RT-qPCR results showed that compared with sham operation group, the expression level of miR-193a-5p in lung tissue of the rats in model group was significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the expression level of miR-193a-5p of the rats in Antagomir group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The Western blotting results showed that compared with sham operation group, the expression levels of  $\beta$ -catenin, Snail1, and  $\alpha$ -SMA proteins in lung tissue of the rats in model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the expression levels of  $\beta$ -catenin, Snail1, and  $\alpha$ -SMA proteins in lung tissue of the rats in Antagomir group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Inhibition of miR-193a-5p expression can improve the lung function and alleviate the pulmonary fibrosis in the ARDS rats by reducing the inflammatory responses and downregulating the expressions of  $\beta$ -catenin, Snail1, and  $\alpha$ -SMA proteins.

**KEYWORDS** Micro RNA-193a-5p; Acute respiratory distress syndrome; Pulmonary fibrosis; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是由休克、创伤或严重感染等肺内外多种直接或间接病因引起的, 以肺实质和脉管系统损伤为主要特征的临床综合征, 主要表现为进行性呼吸困难和顽固性低氧血症<sup>[1]</sup>。ARDS 是更严重的急性肺损伤 (acute lung injury, ALI), 其病理特征为肺间质和肺泡水肿、肺小血管内微血栓形成、呼吸性细支气管和肺泡内透明膜形成及肺泡萎陷, 晚期可发展为肺纤维化<sup>[2]</sup>。肺纤维化是受损的肺组织自我修复留下瘢痕的过程, 可导致肺换气功能障碍且不可逆, 持续进展会出现呼吸衰竭<sup>[3]</sup>。临床上肺纤维化一般指间质性肺疾病的终末期改变, 由于其发病机制复杂, 确诊后生存期短, 目前缺乏确切有效的临床治疗方法。因此, 明确 ARDS 转变成肺纤维化疾病的发病和分子调控机制对于寻找有效的临床治疗靶点十分重要。微小 RNA (micro RNA, miRNA) 是一种天然存在于体内的微小型内源性非编码 RNA, 其通过与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区域结合, 抑制靶基因翻译或降解靶基因 mRNA, 行使生物学功能<sup>[4]</sup>。近年来, miRNA 的生物学作用成为研究热点, 作为研究较为成熟的非编码 RNA, miRNA 在临床医学领域逐渐深入和完善, 通过将 miRNA 或 miRNA 拮抗剂导入患者体内, 以升高或降低 miRNA 表达水平, 从而调节下游基因表达, 最终实现治疗效果<sup>[5]</sup>。PARZIBUT 等<sup>[6]</sup> 研究表明: 与健康对照者比较, ARDS 患者血液外泌体中 miR-193a-5p 表达水平明显升高, 并对 ARDS 具有较高的诊断潜能。JOHNSON 等<sup>[7]</sup> 研究显示: 血清 miR-193a-5p 水平与非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 患者活动等级和纤维化分期呈正向关系。

ROY 等<sup>[8]</sup> 发现: miR-193 是肝纤维化中转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 依赖细胞外基质形成的重要调控基因。研究<sup>[9]</sup> 显示: Wnt/ $\beta$  连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 信号通路参与早期纤维化的发生发展过程, 抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可减轻细胞表型转变, 减少肺纤维化发生。然而, miR-193a-5p 通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路参与调控 ARDS 患者肺纤维化进程尚未完全阐明。本研究构建 ARDS 大鼠模型, 采用分子生物学方法, 探讨抑制 miR-193a-5p 表达对 ARDS 模型大鼠肺纤维化的影响, 并阐明其可能的分子机制, 为临床治疗 ARDS 提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、主要试剂和仪器** SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 240~280 g, 鼠龄 8 周, 购自西南医科大学动物实验中心, 实验动物使用许可证号: SYSK (川) 2018-065。动物均饲养于温度为 22 °C~24 °C, 湿度为 50%~70% 的 SPF 环境下, 自由饮水进食, 每日光照 12 h, 定期更换垫料。miR-193a-5p 拮抗剂 Antagomir 及其阴性对照试剂 Antagomir-NC (广州锐博生物科技有限公司), 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 $\beta$  和 IL-6 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], 羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司), HE 染色试剂盒和 Masson 染色试剂盒 (上海康朗生物科技有限公司), 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒 (北京缔一

生物科技有限公司)。光学显微镜(日本Nikon公司), ChemiDoc XRS<sup>+</sup>化学发光凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司), 7500 RT-qPCR仪(美国ABI公司)。

**1.2 实验动物模型制备和分组** 将60只适应性饲养1周后的雄性SD大鼠随机分成假手术组、模型组、Antagomir组和Antagomir-NC组, 每组15只。开始实验前, 大鼠禁食12 h, 假手术组大鼠经气管暴露后滴注等体积生理盐水, 模型组、Antagomir组和Antagomir-NC组大鼠均经气管暴露后滴注10 mg·kg<sup>-1</sup>脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 构建ARDS大鼠模型<sup>[10-11]</sup>。假手术组大鼠毛发光滑, 好动, 食欲佳; 行ARDS造模的大鼠出现呼吸急促、精神萎靡和食欲不佳等症状且肺呼吸功能指标氧合指数(oxygenation index, OI) < 200 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa), 表明ARDS模型构建成功<sup>[12]</sup>。造模成功后, Antagomir组和Antagomir-NC组大鼠经尾静脉注射75 nmol Antagomir-NC和75 nmol miR-193a-5p Antagomir, 假手术组和模型组大鼠经尾静脉注射同等体积的生理盐水, 每周1次, 2周后处死大鼠, 取样进行后续实验。

**1.3 采用试剂盒检测各组大鼠动脉血氧分压(partial pressure of oxygen in arterial blood, PaO<sub>2</sub>)和OI** 应用呼吸麻醉机吸入麻醉大鼠后, 将大鼠固定于手术台上, 仰卧姿势, 常规消毒后, 行中线切口开腹手术, 推开肠管后, 完全暴露腹主动脉。于腹主动脉分叉处采用含肝素钠的注射器针刺抽取1 mL大鼠动脉血, 通过血气分析仪和PT1000血气测定试剂盒检测大鼠OI和PaO<sub>2</sub>。OI=PaO<sub>2</sub>/吸入气中的氧浓度分数(fraction of inspiration O<sub>2</sub>, FiO<sub>2</sub>)<sup>[13]</sup>。

**1.4 HE和Masson染色观察各组大鼠肺组织病理形态表现及肺组织中胶原纤维沉积情况** 取大鼠肺组织, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗后, 4%多聚甲醛固定24~48 h, 石蜡包埋, 制备3 μm厚的切片, 进行HE染色和Masson染色。HE染色: 切片经过二甲苯脱蜡和乙醇梯度水化后, 分别用苏木精和伊红染色, 乙醇梯度脱水 and 二甲苯透明化, 最后封片, 于光学显微镜下观察各组大鼠肺组织病理形态表现。Masson染色: 切片经二甲苯脱蜡和乙醇梯度脱水后, 依次使用Weigert铁苏木精、酸性乙醇、Masson蓝化液、丽春红品红和苯胺蓝染色, 脱水、透明化并封片, 于光学显

显微镜下观察各组大鼠肺组织中胶原纤维沉积情况。

**1.5 试剂盒检测各组大鼠肺组织中Hyp水平** 取各组大鼠肺组织约50 mg, 用生理盐水充分清洗干净, 加入1 mL水解液混匀后, 沸水浴水解1 h, 按照Hyp检测试剂盒说明书操作, 分别加入蒸馏水、标准应用液、检测液和试剂应用液, 混匀后室温静置10 min, 加入0.5 mL试剂二, 室温静置10 min, 加入0.5 mL试剂三, 混匀后置于60 °C水浴15 min。待冷却至室温后, 3 500 g离心10 min, 取上清, 采用酶标仪检测波长560 nm处吸光度(A)值, 绘制标准曲线, 计算各组大鼠肺组织中Hyp水平。Hyp水平=(实验管A值-空白管A值)/(标准管A值-空白管A值)×标准管浓度(5 mg·L<sup>-1</sup>)×稀释倍数。

**1.6 ELISA法检测各组大鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中TNF-α、IL-1β和IL-6水平** 处死各组大鼠后, 剪开大鼠胸腔, 去除心脏, 取预冷的生理盐水冲洗肺部2次后, 利用手术线小心将左肺肺门结扎, 分离颈部气管, 于气管分叉处作T形切口, 插入静脉留置针套管至支气管下端分叉处, 缓慢注入37 °C预热的500 μL生理盐水, 肉眼可见肺部膨隆, 随机缓慢抽回灌洗液, 反复抽注支气管肺泡3次后, 用无菌管收集BALF, 4 °C、3 000 g离心10 min, 取上清液。按照ELISA试剂盒说明书操作, 检测各组大鼠BALF中炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-6水平。

**1.7 RT-qPCR法检测各组大鼠肺组织中miR-193a-5p表达水平** 采用TRIzol法提取各组大鼠肺组织总RNA, 分光光度计测定所提样本RNA的浓度和纯度。使用逆转录试剂盒将浓度和纯度达标的RNA样本经逆转录酶于50 °C水浴1 h逆转录后, 合成单链cDNA。根据RT-qPCR试剂盒说明书操作, 使用7500 RT-qPCR仪进行RT-qPCR反应。反应条件: 95 °C、30 s; 95 °C、5 s; 60 °C、30 s, 45个循环。以U6为内参, 采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算目的基因表达水平。引物序列见表1。

表1 RT-qPCR的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Primer sequence
MiR-193a-5p	F 5'-AATGCGGGGCTAGGGCTA-3'
	R 5'-GCCCGGTGAAATGTTTA GGACCAC-3'
U6	F 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'
	R 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

**1.8 Western blotting 法检测各组大鼠肺组织中  $\beta$  连环蛋白 ( $\beta$ -catenin)、蜗牛家族转录抑制因子 1 (snail family transcriptional repressor 1, Snail1) 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 蛋白表达水平** 取大鼠右肺叶组织约 100 mg, 剪碎后加入 1 mL 预冷 RIPA 裂解液, 于 4 °C 制备匀浆并冰浴 10 min。4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清, 收集蛋白。SDS-PAGE 电泳分离, 湿转至 PVDF 膜。封闭后, 加入  $\beta$ -catenin (1:1 000)、Snail1 (1:1 000)、 $\alpha$ -SMA (1:1 000) 和 GAPDH 抗体 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜。次日, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:10 000) 孵育 30 min。使用 ECL 发光液处理 PVDF 膜后, 进行 X 光胶片曝光、显影和定影。采用 Quantity One 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.9 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。各组大鼠 PaO<sub>2</sub> 和 OI, BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平, 肺组织中  $\beta$ -catenin、Snail1 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠 PaO<sub>2</sub> 和 OI** 与假手术组比较, 模型组大鼠 PaO<sub>2</sub> 和 OI 均明显降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, Antagomir 组大鼠 PaO<sub>2</sub> 和 OI 均明显升

高 ( $P < 0.05$ ), Antagomir-NC 组大鼠上述指标差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠 PaO<sub>2</sub> 和 OI

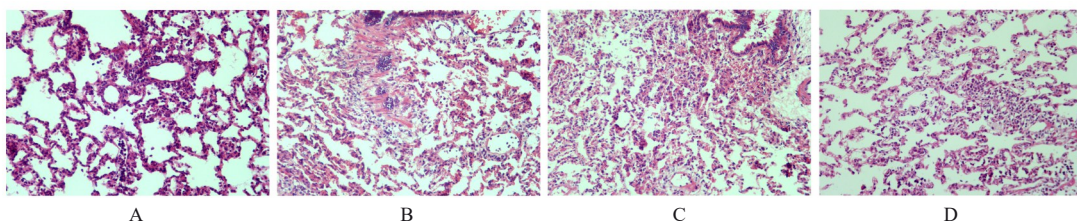
Tab. 2 PaO<sub>2</sub> and OI of rats in various groups

( $n=15, \bar{x} \pm s, P/\text{mmHg}$ )

Group	PaO <sub>2</sub>	OI
Sham operation	97.73 ± 7.49	459.30 ± 21.27
Model	68.11 ± 1.99*	158.94 ± 18.48*
Antagomir-NC	69.60 ± 1.55	157.19 ± 13.64
Antagomir	80.24 ± 1.91 <sup>△</sup>	268.27 ± 22.52 <sup>△</sup>

\* $P < 0.05$  compared with sham operation group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with model group.

**2.2 各组大鼠肺组织病理形态表现和肺组织中胶原纤维沉积情况** HE 染色结果显示: 假手术组大鼠肺组织结构正常, 未见明显的炎症改变。与假手术组比较, 模型组和 Antagomir-NC 组大鼠肺组织结构轻度异常, 肺泡萎缩塌陷, 肺泡腔内发现有大量的淋巴细胞和少量的中性粒细胞浸润, 肺泡间隙增宽。与模型组比较, Antagomir 组大鼠肺组织的肺泡腔内淋巴细胞明显减少, 中性粒细胞浸润较少, 未见明显增生。见图 1。Masson 染色结果显示: 假手术组大鼠肺组织无明显蓝色胶原纤维沉积。与假手术组比较, 模型组和 Antagomir-NC 组大鼠肺组织中出现大量蓝色胶原纤维沉积, 肺泡结构损坏严重, 呈现明显的肺纤维化情况。与模型组比较, Antagomir 组大鼠肺组织黏液中蓝色染色的胶原纤维沉积明显减少。见图 2。



A: Sham operation group; B: Model group; C: Antagomir-NC group; D: Antagomir group.

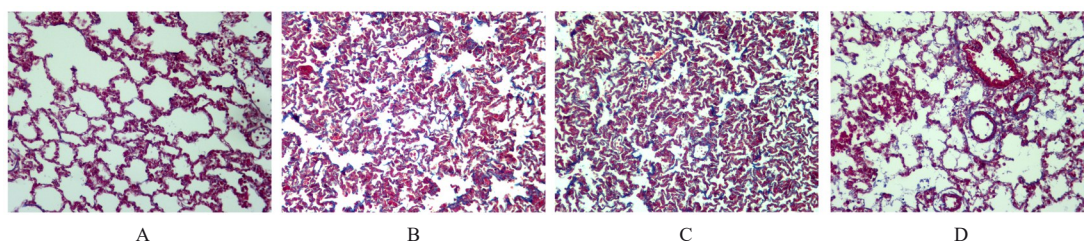
图 1 HE 染色观察各组大鼠肺组织病理形态表现 (×200)

Fig. 1 Pathomorphology of lung tissue of rats in various groups observed by HE staining (×200)

**2.3 各组大鼠肺组织中 Hyp 水平** 与假手术组比较, 模型组大鼠肺组织中 Hyp 水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, Antagomir 组大鼠肺组织中 Hyp 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), Antagomir-NC 组大鼠 Hyp 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

**2.4 各组大鼠 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平**

与假手术组比较, 模型组大鼠 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, Antagomir 组大鼠 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ),



A: Sham operation group; B: Model group; C: Antagomir-NC group; D: Antagomir group.

图2 Masson染色观察各组大鼠肺组织中胶原纤维沉积情况( $\times 200$ )

Fig. 2 Collagen fiber deposition in lung tissue of rats in various groups observed by Masson staining( $\times 200$ )

表3 各组大鼠肺组织中Hyp水平

Tab. 3 Levels of Hyp in lung tissue of rats in various groups  
( $n=15, \bar{x} \pm s$ )

Group	Hyp [ $m_B / (\mu g \cdot g^{-1})$ ]
Sham operation	412.04 $\pm$ 31.62
Model	812.67 $\pm$ 28.57*
Antagomir-NC	810.63 $\pm$ 38.81
Antagomir	537.68 $\pm$ 29.14 $\Delta$

\* $P < 0.05$  compared with sham operation group;  $\Delta P < 0.05$  compared with model group.

Antagomir-NC组大鼠上述指标差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表4。

表4 各组大鼠BALF中炎症因子水平

Tab. 4 Levels of inflammatory cytokines in BALF of rats in various groups  
( $n=15, \bar{x} \pm s, \rho_B / (ng \cdot L^{-1})$ )

Group	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
Sham operation	24.42 $\pm$ 1.15	35.42 $\pm$ 1.77	13.28 $\pm$ 0.56
Model	78.36 $\pm$ 5.24*	128.96 $\pm$ 9.33*	45.83 $\pm$ 3.53*
Antagomir-NC	77.54 $\pm$ 5.18	134.87 $\pm$ 7.48	65.03 $\pm$ 7.86
Antagomir	45.58 $\pm$ 2.28 $\Delta$	55.21 $\pm$ 5.02 $\Delta$	25.18 $\pm$ 6.94 $\Delta$

\* $P < 0.05$  compared with sham operation group;  $\Delta P < 0.05$  compared with model group.

## 2.5 各组大鼠肺组织中miR-193a-5p表达水平

与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中miR-193a-5p表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较, Antagomir组大鼠肺组织中miR-193a-5p表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), Antagomir-NC组大鼠肺组织中miR-193a-5p表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表5。

2.6 各组大鼠肺组织中 $\beta$ -catenin、Snail1和 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平 与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 $\beta$ -catenin、Snail1和 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平均明显

表5 各组大鼠肺组织中miR-193a-5p表达水平

Tab. 5 Expression levels of miR-193a-5p in lung tissue of rats in various groups  
( $n=15, \bar{x} \pm s$ )

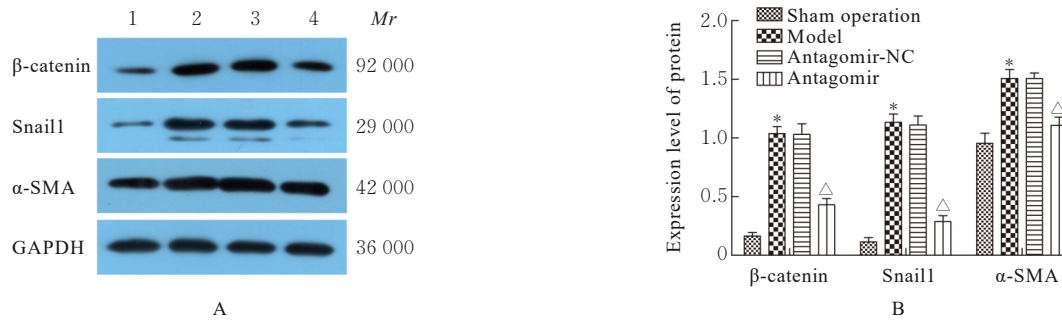
Group	MiR-193a-5p
Sham operation	1.03 $\pm$ 0.09
Model	8.07 $\pm$ 0.76*
Antagomir-NC	8.05 $\pm$ 0.46
Antagomir	3.28 $\pm$ 0.24 $\Delta$

\* $P < 0.05$  compared with sham operation group;  $\Delta P < 0.05$  compared with model group.

升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较, Antagomir组大鼠肺组织中 $\beta$ -catenin、Snail1和 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平均明显降低( $P < 0.05$ ), Antagomir-NC组大鼠上述指标差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图3。

## 3 讨论

ALI是一种与肺泡毛细血管屏障有关的常见临床急危重症,其严重程度与ARDS患者的死亡率有密切关联<sup>[14-15]</sup>。近年来,随着LPS构建ALI动物模型研究的不断深入,有望降低ALI和ARDS患者的死亡率,但目前尚无积极有效的治疗方法。本研究结果显示:LPS可诱导炎症的物质进入机体后快速诱发大鼠炎症反应,导致大鼠肺损伤。BOWMAN等<sup>[16]</sup>研究表明:肺纤维化是ARDS的关键病理过程,其病变情况在肺组织中分布不一,能够在同一低倍视野内观察到正常肺组织、肺间质炎症、肺纤维增生和蜂窝肺的细微变化,以下肺和胸膜下区域病变表现较为明显。肺纤维化病理表现为肺泡壁增厚,同时有胶原沉积、细胞外基质增加和灶性单核细胞浸润<sup>[17]</sup>。本研究结果显示:大鼠经颈部气管滴注LPS诱导后出现肺功能障碍和肺组织炎症浸润及呈纤维化的表现,肺组织miR-193a-5p表达水平和Hyp水平明显升高,且BALF中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平明显升高,提示ARDS模型制备成功。



Lane 1: Sham operation group; Lane 2: Model group; Lane 3: Antagomir-NC group; Lane 4: Antagomir group. \* $P < 0.05$  compared with sham operation group;  $^{\Delta}P < 0.05$  compared with model group.

图3 Western blotting法检测各组大鼠肺组织中β-catenin、Snail1和α-SMA蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 3 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of β-catenin, Snail1, α-SMA proteins in lung tissue of rats in various groups detected by Western blotting method

Wnt蛋白是一类在机体各个器官组织中广泛存在的分泌性糖蛋白,参与动物胚胎的早期发育、器官形成、组织再生和其他生理过程,对机体的生长发育具有重要作用<sup>[18]</sup>。Wnt分泌后能与细胞表面特异性受体互相作用,通过诱导下游蛋白的磷酸化和去磷酸化过程,引起β-catenin在胞浆内积累并转移至细胞核内,进而实现对下游基因(如Snail1和α-SMA等)表达的调控,参与调控组织器官纤维化进展过程<sup>[19-21]</sup>。Snail1是诱导上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的重要调控因子,可诱导肺泡上皮细胞通过EMT过程转化为间质细胞,进而促进肺纤维化的形成<sup>[22-23]</sup>。α-SMA是肌成纤维细胞的标志物,而纤维细胞是致纤维化的主要效应细胞。研究<sup>[24-25]</sup>显示:随着器官纤维化程度的加重,α-SMA在肺和其他器官纤维化中表达水平升高。本研究结果显示:与对照组比较,模型组大鼠肺组织中β-catenin、Snail1和α-SMA蛋白表达水平明显升高,提示ARDS大鼠肺组织中Wnt/β-catenin信号通路异常活化,且可能与ARDS大鼠肺纤维化进程有关。

miR-193家族成员包括miR-193a-3p、miR-193a-5p、miR-193b-3p和miR-193b-5p,通过与特殊靶向基因和信号传导相互作用,在健康和疾病生物学过程中发挥重要作用。研究<sup>[26-27]</sup>显示:miR-193a-5p表达水平与肝脏和瘢痕疙瘩等纤维化进程有关。miR-193a-5p可激活Wnt/β-catenin信号通路的转导<sup>[28]</sup>。因此,miR-193a-5p可能通过调控Wnt/β-catenin信号通路,参与ARDS肺纤维化进程。本研究结果显示:miR-193a-5p在ARDS模型大鼠肺组织中高表达,给予miR-193a-5p Antagomir干预

抑制miR-193a-5p表达后,ARDS大鼠肺功能和肺纤维化程度明显改善,BALF中炎症因子水平明显降低,提示抑制miR-193a-5p表达可改善ARDS大鼠肺纤维化。抑制miR-193a-5p表达可降低ARDS大鼠肺组织中β-catenin、Snail1和α-SMA蛋白表达水平,提示抑制miR-193a-5p表达可能通过下调Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白表达而改善ARDS大鼠肺纤维化。

综上所述,抑制miR-193a-5p表达可通过降低肺组织炎症反应和下调β-catenin、Snail1及α-SMA蛋白表达,改善ARDS大鼠肺功能和肺纤维化。靶向抑制miR-193a-5p表达可能是研发治疗ARDS相关肺纤维化药物新的思路,但仍需进行更加深入的研究。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

龙光文参与实验设计、数据整理和统计学分析及论文撰写,张谦参与数据整理和统计学分析,杨秀林参与实验操作,吉春玲参与实验操作和论文审校。

#### [参考文献]

- [1] KAKU S, NGUYEN C D, HTET N N, et al. Acute respiratory distress syndrome: etiology, pathogenesis, and summary on management[J]. J Intensive Care Med, 2020, 35(8): 723-737.
- [2] TOMASHEFSKI J F Jr. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome [J]. Clin Chest Med, 2000, 21(3): 435-466.
- [3] KOUDSTAAL T, FUNKE-CHAMBOUR M, KREUTER M, et al. Pulmonary fibrosis: from pathogenesis to clinical decision-making[J]. Trends Mol

- Med, 2023, 29(12): 1076-1087.
- [4] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [5] DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic[J]. Trends Genet, 2022, 38(6): 613-626.
- [6] PARZIBUT G, HENKET M, MOERMANS C, et al. A blood exosomal miRNA signature in acute respiratory distress syndrome [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 640042.
- [7] JOHNSON K, LEARY P J, GOVAERE O, et al. Increased serum miR-193a-5p during non-alcoholic fatty liver disease progression: diagnostic and mechanistic relevance[J]. JHEP Rep, 2021, 4(2): 100409.
- [8] ROY S, BENZ F, VARGAS CARDENAS D, et al. MiR-30c and miR-193 are a part of the TGF- $\beta$ -dependent regulatory network controlling extracellular matrix genes in liver fibrosis[J]. J Dig Dis, 2015, 16(9): 513-524.
- [9] 宋 萍. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在肺纤维化形成中的机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2014.
- [10] 马绍磊, 王宇杰, 左祥荣, 等. 内毒素诱导ARDS对大鼠右心功能的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30(3): 204-208.
- [11] 马绍磊, 左祥荣, 王宇杰, 等. 4-苯基丁酸钠通过减轻内质网应激对大鼠ARDS相关右心功能障碍的保护作用[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(10): 1269-1274.
- [12] 赵赞梅, 赵金垣. 黄芩苷对急性呼吸窘迫综合征大鼠心功能的影响[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(9): 517-520.
- [13] 姜黎珊, 姚 明, 杨茂宪, 等. 不同方式下气管内滴注脂多糖方法制作急性呼吸窘迫综合征大鼠模型[J]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2019, 12(2): 80-84.
- [14] PRASERTSAN P, ANUNTASEREE W, RUANGNAPA K, et al. Severity and mortality predictors of pediatric acute respiratory distress syndrome according to the pediatric acute lung injury consensus conference definition[J]. Pediatr Crit Care Med, 2019, 20(10): e464-e472.
- [15] PANICO F F, TROSTER E J, OLIVEIRA C S, et al. Risk factors for mortality and outcomes in pediatric acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. Pediatr Crit Care Med, 2015, 16(7): e194-e200.
- [16] BOWMAN W S, ECHT G A, OLDHAM J M. Biomarkers in progressive fibrosing interstitial lung disease: optimizing diagnosis, prognosis, and treatment response[J]. Front Med, 2021, 8: 680997.
- [17] THANNICKAL V J, TOEWS G B, WHITE E S, et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis[J]. Annu Rev Med, 2004, 55: 395-417.
- [18] RIM E Y, CLEVERS H, NUSSE R. The Wnt pathway: from signaling mechanisms to synthetic modulators[J]. Annu Rev Biochem, 2022, 91: 571-598.
- [19] WANG Z, LI Z L, JI H T. Direct targeting of  $\beta$ -catenin in the Wnt signaling pathway: current progress and perspectives[J]. Med Res Rev, 2021, 41(4): 2109-2129.
- [20] 丁文君, 沈明霞, 谢海彬, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关调控因子在气虚血瘀型特发性肺纤维化中的动态表达研究[J]. 中医研究, 2023, 36(4): 71-74.
- [21] 黄 晶, 孙兆瑞, 杨志洲, 等. 调控Wnt信号通路对百草枯中毒大鼠肺纤维化的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(3): 228-232.
- [22] QIAN W B, CAI X R, QIAN Q H, et al. Metastasis-associated protein 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in idiopathic pulmonary fibrosis by up-regulating Snail expression[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(11): 5998-6007.
- [23] WANG Y, LI S L, ZHAO J, et al. Snail-mediated partial epithelial mesenchymal transition augments the differentiation of local lung myofibroblast [J]. Chemosphere, 2021, 267: 128870.
- [24] 潘军强, 张殿新, 孙超峰, 等.  $\alpha$ -SMA与瓣膜性心房颤动患者心房纤维化的关系[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2017, 38(2): 242-246.
- [25] 涂容芳, 张秀峰, 何振华. 5-HTR2B、E-cad、 $\alpha$ -SMA在博莱霉素致大鼠肺纤维化中的表达变化[J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(4): 365-369.
- [26] WANG S H, CHEN Y, LEI G L, et al. Serum exosome-derived microRNA-193a-5p and miR-381-3p regulate adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/transforming growth factor beta/Smad2/3 signaling pathway and promote fibrogenesis [J]. Clin Transl Gastroenterol, 2024, 15(2): e00662.
- [27] HU H, MAO G Y, ZHENG J H, et al. Keloid patient plasma-derived exosomal hsa\_circ\_0020792 promotes normal skin fibroblasts proliferation, migration, and fibrogenesis via modulating miR-193a-5p and activating TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling[J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 4223-4234.
- [28] TAN L L, CHEN Z H. MiR-193a-5p enhances the radioresistance of pancreatic cancer cells by targeting ZFP57 and activating the Wnt pathway [J]. J Oncol, 2022, 2022: 8071343.