

# 过表达 miR-203a-3p 对脂多糖致大鼠急性肺损伤后肺纤维化的影响及其机制

任亦频<sup>1</sup>, 周厚荣<sup>2</sup>, 李亚骐<sup>1</sup>, 黄佳<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨过表达 miR-203a-3p 对脂多糖(LPS)致大鼠急性肺损伤后肺纤维化的影响及其机制。方法 采用多次小剂量注射 LPS 制备大鼠急性肺损伤后肺纤维化模型,并将造模成功的大鼠随机分成模型组(Model 组)、agomir 阴性对照组(agomir-NC 组)和 miR-203a-3p agomir 组(agomir 组),另设对照组(Control 组),每组 15 只。造模前 1 d 及造模开始后 1 周,给予尾静脉注射 miR-203a-3p agomir 干预。造模 2 周后,测定肺组织湿/干比重(W/D)及肺组织羟脯氨酸(Hyp)含量;HE 染色和 Masson 染色观察肺组织病理变化及肺纤维化程度;ELISA 法检测各组大鼠肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平;qRT-PCR 检测大鼠肺组织中 miR-203a-3p 和卵泡抑素样蛋白 1(Fstl1) mRNA 表达水平;

Western blot 检测大鼠肺组织中 Fstl1 蛋白表达水平;双荧光素酶报告系统检测 miR-203a-3p 和 Fstl1 的靶向关系。结果 与 Control 组比较,Model 组大鼠肺损伤及肺纤维化程度较为严重,肺组织 W/D 值及 Hyp 含量增加( $P < 0.05$ ),BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.05$ ),肺组织中 miR-203a-3p 表达水平降低( $P < 0.05$ ),而 Fstl1 mRNA 和蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ )。与 Model 组比较,agomir 组大鼠肺损伤及纤维化得到改善,肺组织 W/D 值及 Hyp 含量降低( $P < 0.05$ ),BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平降低( $P < 0.05$ ),肺组织中 miR-203a-3p 表达水平升高( $P < 0.05$ ),而 Fstl1 mRNA 和蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ )。荧光素酶报告基因实验证实 Fstl1 是 miR-203a-3p 靶基因。结论 miR-203a-3p 过表达可改善 LPS 诱导的急性肺损伤后肺纤维化,其机制可能与靶向下调 Fstl1 表达有关。

**关键词** miR-203a-3p; 急性肺损伤; 肺纤维化; 卵泡抑素样蛋白 1

中图分类号 R 563.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0563-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.011

2022-03-07 接收

基金项目:贵州省科技计划项目(编号:黔科合 LH 字[2016]7153 号)

作者单位:贵州省人民医院<sup>1</sup> 急诊内科、<sup>2</sup> 全科医学,贵阳 550002

作者简介:任亦频,女,副主任医师,责任作者,E-mail:13985495366@126.com

## Construction of recombinant adenoviral vector overexpressing PTG

Wang Chenxi, Deng Xia, Zhao Zhicong, Cai Zhensheng, Zhang Panpan, Li Lian,

Li Haoxiang, Zhao Li, Wang Dong, Yang Ling, Yuan Guoyue

(Dept of Endocrinology, The Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001)

**Abstract Objective** To construct and identify an overexpression recombinant adenovirus vector carrying the mouse PTG gene (NM\_016854), and to lay a foundation for in-depth study of the function of PTG. **Methods** The coding sequence of the mouse PTG gene was chemically synthesized, amplified by polymerase chain reaction (PCR), digested with restriction enzymes, and inserted into the GV314 vector (CMV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP) to obtain the recombinant shuttle plasmid pGV314-PTG. BamHI /AgeI double enzyme digestion was further carried out, and the product was transferred into linearized expression vector pDC315 to construct recombinant adenovirus Ad-PTG, which was transfected into HEK293T cells and packaged into recombinant virus particles. After repeated amplification of several generations of HEK293T cells, the recombinant adenovirus was purified and titer detected. Finally PCR, Western blot and sequencing were used to verify the recombinant adenovirus. **Results** After PCR, Western blot and sequencing, the results showed that the pGV314-CMV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP-PTG overexpression adenovirus vector (Ad-PTG) was successfully constructed, and the virus titer measured by end-point dilution method was  $4 \times 10^{10}$  PFU/ml, Western blot and RT-qPCR showed that the protein and mRNA expression levels of PTG increased significantly. **Conclusion** The recombinant adenovirus vector carrying mouse PTG gene is successfully constructed, and the expression of PTG gene in hepatocytes is effectively up regulated.

**Key words** PTG; recombinant adenovirus vector; homologous recombination; type 2 diabetes mellitus

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由多种因素所导致的急性、进行性、缺氧性呼吸功能不全或呼吸衰竭<sup>[1]</sup>。ALI的病因多样,发病机制复杂,其中过度炎症反应已被公认是引发ALI发病的重要原因之一<sup>[2]</sup>。ALI具有较高的发病率,目前仍缺乏有效的治疗手段。ALI后肺部组织会发生纤维细胞聚集、胶原沉积等纤维增生反应,最终形成肺间质纤维化。微小RNA(miRNAs)是由19~25个核苷酸组成的内源性小分子非编码RNA,通过转录调控下游靶基因的表达,参与细胞的增殖、分化、凋亡等多种重要的生命活动<sup>[3]</sup>。众所周知,miRNA在机体的炎症反应过程中也发挥重要作用,并且与ALI的发病密切相关<sup>[4]</sup>。研究发现,miRNA-203a-3p参与调节肺水肿<sup>[5]</sup>、脓毒性休克肺损伤<sup>[6]</sup>、肺纤维化<sup>[7]</sup>等病症,然而其具体机制尚不完全清楚。为此,本研究通过脂多糖诱导建立大鼠ALI模型,探究miR-203a-3p对大鼠ALI后肺纤维化的影响及机制,旨在为临床治疗肺损伤后肺纤维化提供潜在治疗靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 8周龄健康SPF级雄性SD大鼠60只,体质量(200±20)g,购于湖南斯莱克实验动物有限公司,许可证编号:SCXK(湘)2019-2004。饲养环境温度23~25℃,相对湿度50~65%,保持自然昼夜(12h光照/12h黑暗)处理,自由摄食饮水。

**1.2 主要试剂及仪器** 脂多糖(LPS)购自美国Sigma公司;miR-203a-3p模拟物(mimic)及其阴性对照(mimic NC)和miR-203a-3p激动剂(agomir)及激动剂对照(agomir-NC)均购自上海吉玛制药技术有限公司;白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;TRIzol提取液、Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司;反转录试剂盒、qRT-PCR试剂盒购自美国Thermo Fisher公司;PCR引物购自上海Bio-TNT生物公司;羟脯氨酸(HYP)含量检测试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司;兔抗卵泡抑素样蛋白1(follistatin-like 1, Fstl1)抗体、 $\beta$ -actin抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG二抗购自美国CST公司;低温冷冻干燥离心机购自德国Eppendorf公司;石蜡切片机购自德国LEICA公司;蛋白印迹电泳仪购自美国Bio-Rad公司;荧光定量扩增PCR仪

器购自美国ABI公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 大鼠ALI后早期肺纤维化模型建立** 取60只SD大鼠随机分为4组:对照组、模型组、agomir阴性对照组(agomir-NC组)和miR-203a-3p agomir组(agomir组),每组15只。参照文献<sup>[8]</sup>改良的方法构建大鼠ALI后早期肺纤维化模型,先经气管注入含1.5 mg/kg LPS的生理盐水溶液,24 h后腹腔内注入含3 mg/kg LPS的生理盐水溶液,48 h后再经气管注入含3 mg/kg LPS的生理盐水溶液,而对照组注入等量生理盐水。agomir-NC组和agomir组大鼠在造模前1 d及造模后1周,分别经尾静脉注射200  $\mu$ l的agomir-NC和miR-203a-3p agomir,剂量为10 nmol/只。于造模后第14天处死大鼠,取材进行检测。

**1.3.2 肺组织病理学观察及纤维化程度的评估** 取大鼠左肺上叶组织,用4%多聚甲醛固定24 h,石蜡包埋后制成4  $\mu$ m厚切片,HE染色后于光学显微镜200倍视野下选取10个视野观察肺组织形态学变化,参考文献<sup>[9]</sup>对肺损伤程度进行半定量测评,总分为0~16分,分数越高表示肺组织损伤越严重。对制备的大鼠肺组织切片进行Masson染色,于光学显微镜200倍视野下选取10个视野进行观察,参照Ashcroft制定的0~5分评分法<sup>[10]</sup>对大鼠肺组织纤维化程度进行半定量测评,分数越高肺组织纤维化程度越严重。

**1.3.3 肺组织湿/干比重(W/D)测定** 取各组大鼠右肺中叶及下叶组织100 mg,滤纸沾干表面水分,天平称湿重;然后置于烘箱中,60℃烘烤72 h,天平称干重,进行湿/干质量比(W/D)计算。

**1.3.4 肺组织Hyp水平的测定** 精确称取0.2 g新鲜的右肺组织置于玻璃管中,使用玻璃棒碾碎,加入2 ml提取液,置于100℃烘箱中充分消化,16 000 r/min室温离心25 min,取上清液,调整pH值至6~8,蒸馏水定容至4 ml,取上清液按照试剂盒说明书加入相应试剂,混匀后置于60℃水浴20 min,取200  $\mu$ l溶液采用酶标仪于560 nm处测量吸光值,再根据说明书提供的公式计算肺组织中Hyp含量。

**1.3.5 ELISA检测大鼠肺泡灌洗液(BALF)中IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 水平** 将麻醉后大鼠仰卧固定,打开大鼠胸腔,心脏穿刺放血处死,然后结扎右侧肺门,分离出颈部气管,插入导管,2.5 ml生理盐水反复冲洗3次,收集灌洗液,于4℃条件下1 500 r/min离心10 min,取上清液按照ELISA试剂盒说明书检

测 BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平。

**1.3.6 qRT-PCR 检测大鼠肺组织中 miR-203a-3p 和 Fstl1 mRNA 表达水平** 采用 TRIzol 法提取大鼠肺组织总 RNA,应用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,参照 qRT-PCR 试剂盒说明书反应体系进行 qRT-PCR 反应,各基因引物信息如表 1 所示。PCR 反应条件:95  $^{\circ}$ C 30 s;95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 30 s 进行 45 个循环。miR-203a-3p 以 U6 为内参,Fstl1 以  $\beta$ -actin 为内参,miR-203a-3p 和 Fstl1 mRNA 相对表达水平采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算。

表 1 各基因引物信息

基因	序列
miR-203a-3p	F: 5'-GTGCAGGCTCCGAGGTATT-3' R: 5'-GCCGCGTGAAATGTTTA GGACCAC-3'
U6	F: 5'-CTGGCTTCGGCAGCACA -3' R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
Fstl1	F: 5'-TTATGATGGGCACTGCAAAGAA-3' R: 5'-ACTGCCCTTAGAGAACCAGCC-3'
$\beta$ -actin	F: 5'-CCTCTATGCCAACACAGT-3' R: 5'-AGCCACCAATCCACACAG-3'

**1.3.7 Western blot 检测大鼠肺组织中 Fstl1 蛋白表达水平** 取各组大鼠肺组织加入适量 RIPA 裂解液充分裂解 30 min,置于 4  $^{\circ}$ C 条件下 14 000 r/min 离心 10 min 取上清液 采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 30  $\mu$ g 蛋白沸水浴变性后进行 10% SDS-PAGE 电泳 并采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入 Fstl1 抗体 (1:1 000) 和  $\beta$ -actin 抗体 (1:1 000),于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,再加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:10 000),室温孵育 2 h,滴加 ECL 显影,并采用

ImageJ 软件对各条带进行灰度值分析。

**1.3.8 双荧光素酶报告基因实验** 通过 TargetScan 在线软件预测 miR-203a-3p 与 Fstl1 3'UTR 区域结合位点。构建 Fstl1 3'UTR 野生型 (WT) 和 Fstl1 3'UTR 突变型 (MUT) 荧光素酶报告基因质粒。取对数生长期的 293T 细胞 接种于 12 孔板,当细胞汇合度约 70% 时对细胞进行分组,使用 Lipofectamine 2000 分别将其与 mimic NC 和 miR-203a-3p mimic 共转染至 293T 细胞中。转染 48 h 按照试剂盒说明书要求,分别检测萤火虫和海肾荧光素酶活性,用二者比值表示荧光酶相对活性。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- $q$  法。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肺组织形态学观察** 如图 1 所示,Control 组大鼠肺泡形态规则,结构清晰完整,无明显蓝色胶原纤维染色; Model 组和 agomir-NC 组大鼠肺泡腔塌陷、水肿,伴有炎症渗出物和出血,肺泡间隔变宽变厚,且蓝色胶原纤维染色明显,存在致密的胶原沉积; agomir 组大鼠肺泡结构、肺泡壁增厚及水肿程度均较模型组有所改善,炎性细胞浸润及出血情况明显减少,蓝色胶原纤维染色较浅,胶原沉积减少。如表 2 所示,与 Control 组比较,Model 组大鼠肺组织损伤评分及纤维化评分增加 ( $P < 0.05$ ); 与 Model 组比较,agomir 组大鼠肺损伤评分及纤维化评分降低 ( $P < 0.05$ ),而 agomir-NC 组大鼠肺损伤评分及纤维化评分差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

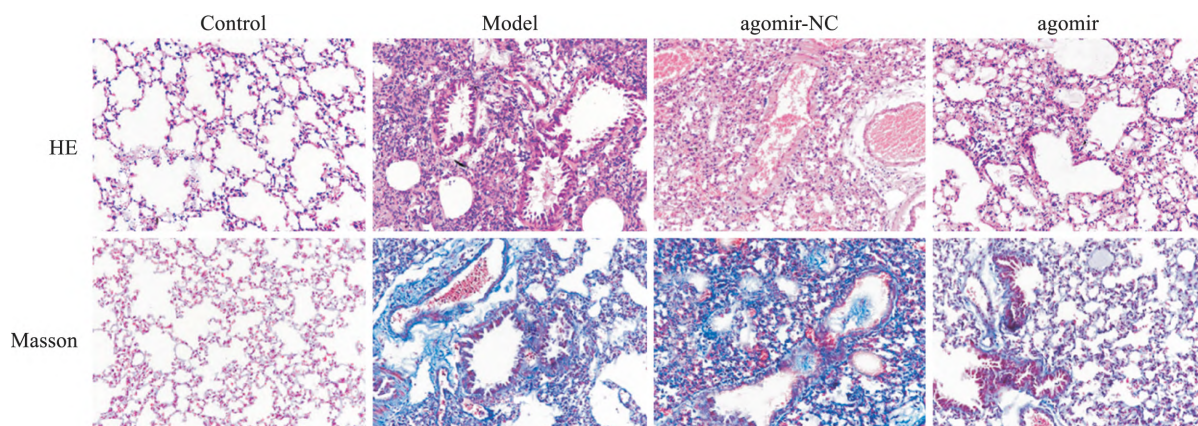


图 1 肺组织 HE 和 Masson 染色  $\times 200$

**2.2 各组大鼠肺组织 W/D 值及 Hyp 水平** 如表 3 所示,与 Control 组比较,Model 组大鼠肺组织 W/D 值及 Hyp 水平增加 ( $P < 0.05$ );与 Model 组比较,agomir 组大鼠肺组织 W/D 值及 Hyp 水平降低 ( $P < 0.05$ ),而 agomir-NC 组大鼠肺组织 W/D 值及 Hyp 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各组大鼠肺组织损伤及纤维化评分( $\bar{x} \pm s$ ,分  $n=15$ )

组别	肺损伤评分	肺纤维化评分
Control	0.31 ± 0.12	0.23 ± 0.15
Model	8.43 ± 1.14*	4.09 ± 0.73*
agomir-NC	8.13 ± 1.08	4.01 ± 0.62
agomir	3.51 ± 0.79#	2.83 ± 0.43#
F 值	68.185	48.874
P 值	<0.001	<0.001

与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 Model 组比较: #  $P < 0.05$

表 3 各组大鼠肺组织 W/D 值及 Hyp 水平比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=15$ )

组别	W/D 值	Hyp( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
Control	3.66 ± 0.24	0.25 ± 0.02
Model	6.41 ± 0.82*	0.88 ± 0.14*
agomir-NC	6.67 ± 0.72	0.84 ± 0.11
agomir	4.35 ± 0.39#	0.51 ± 0.08#
F 值	20.609	46.549
P 值	<0.001	<0.001

与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 Model 组比较: #  $P < 0.05$

**2.3 各组大鼠 BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平** 如表 4 所示,与 Control 组比较,Model 组大鼠 BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平升高 ( $P < 0.05$ );与 Model 组比较,agomir 组大鼠 BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平降低 ( $P < 0.05$ ),而 agomir-NC 组大鼠 BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 4 各组大鼠 BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平 ( $\bar{x} \pm s$   $\mu\text{g}/\text{L}$ ,  $n=15$ )

组别	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-6
Control	13.28 ± 0.56	35.42 ± 1.56	24.42 ± 1.15
Model	45.83 ± 3.53*	128.96 ± 9.27*	78.36 ± 5.24*
agomir-NC	65.03 ± 7.86	134.87 ± 7.83	77.54 ± 5.18
agomir	25.18 ± 6.94#	55.21 ± 5.22#	45.58 ± 2.28#
F 值	51.033	174.383	181.174
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 Model 组比较: #  $P < 0.05$

**2.4 大鼠肺组织中 miR-203a-3p 和 Fstl1 表达水平** 如表 5 和图 2 所示,与 Control 组比较,Model 组大鼠肺组织中 miR-203a-3p 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ),

而 Fstl1 mRNA 和蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。与 Model 组比较,agomir 组大鼠 miR-203a-3p 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ),Fstl1 mRNA 和蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ),而 agomir-NC 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 5 各组大鼠 miR-203a-3p 及 Fstl1 mRNA 和蛋白表达水平( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=15$ )

组别	miR-203a-3p	Fstl1 mRNA	Fstl1 蛋白
Control	1.02 ± 0.06	1.00 ± 0.06	0.07 ± 0.03
Model	0.28 ± 0.13*	5.59 ± 0.17*	0.73 ± 0.10*
agomir-NC	0.36 ± 0.15	5.62 ± 0.19	0.71 ± 0.12
agomir	7.62 ± 0.23#	2.29 ± 0.16#	0.28 ± 0.09#
F 值	452.659	250.169	38.243
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 Model 组比较: #  $P < 0.05$

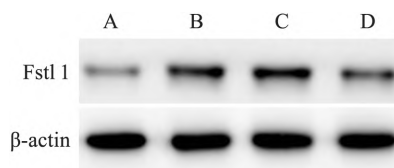


图 2 Western blot 检测各组大鼠肺组织中 Fstl1 蛋白表达水平  
A: Control 组; B: Model 组; C: agomir-NC 组; D: agomir 组

**2.5 miR-203a-3p 与 Fstl1 靶向关系的验证** 如图 3 所示,TargetScan 软件预测 miR-203a-3p 与 Fstl1 3' UTR 区域存在结合位点。双荧光素酶报告基因实验进一步验证,与共转染 mimic-NC 和 Fstl1-WT 质粒组细胞比较,共转染 miR-203a-3p mimic 和 Fstl1-WT 质粒组细胞相对荧光素酶活性降低 ( $P < 0.05$ );

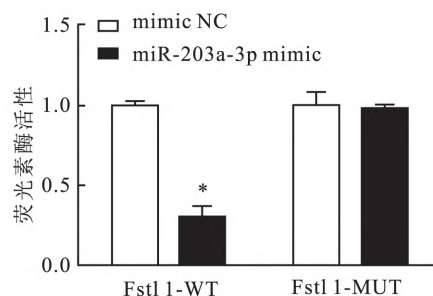
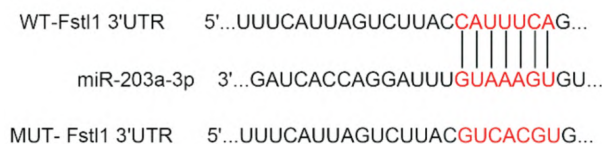


图 3 miR-203a-3p 与 Fstl1 靶向调控关系  
与 mimic NC 组比较: \*  $P < 0.05$

与共转染 mimic-NC 和 Fstl1-MUT 质粒组细胞比较,共转染 miR-203a-3p mimic 和 Fstl1-MUT 质粒组细胞相对荧光素酶活性差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

ALI 是一种复杂的临床并发症,常常伴有炎症反应,微血管损伤以及肺血管和上皮细胞通透性增加,甚至可能发展为更严重的致命性急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。ALI 具有较高的发病率和死亡率,目前尚无特效的治疗方法,不仅增加社会经济负担,还严重降低患者生活质量。众所周知,过度炎症反应是诱发 ALI 的重要因素,有效控制过度炎症反应是治疗 ALI 的常用方案。LPS 是内毒素的主要成分,进入机体后可快速诱发炎症反应,导致弥漫性肺损伤,腹腔注射 LPS 是目前制备 ALI 动物模型常用的理想方法<sup>[11]</sup>。研究<sup>[12]</sup>表明,肺纤维化是 ALI 的关键病理过程,其病理特征是肺上皮细胞损伤、成纤维细胞增殖和细胞外基质沉淀。本研究结果显示,大鼠经 LPS 诱导后出现明显的肺损伤及肺纤维化现象,且 BALF 中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平明显升高,肺组织 W/D 值及 Hyp 含量明显增加,提示本研究 ALI 后肺纤维化模型制备成功。

miRNA 在 ALI 的发生发展中发挥重要的调控作用,吴松林等<sup>[13]</sup>在研究中证实,miR-125b 可能通过调控 Notch1 蛋白的表达影响脓毒症急性肺损伤中炎症因子的表达,参与其免疫炎症调控过程;Wang et al<sup>[14]</sup>发现 miR-19 能够减轻 LPS 诱导所致 ALI 的炎症反应。同时,也有研究<sup>[5]</sup>显示,在高原缺氧所致肺损伤模型中 miR-203a-3p 表达下调,并与肺微血管形成介导的肺水肿有关。Ling et al<sup>[6]</sup>研究显示,在脓毒性休克小鼠模型中 miR-203 低表达,其过表达可通过靶向下调 VNN1 激活 AKT 信号通路,从而减轻脓毒性休克肺损伤。以上提示 miR-203a-3p 在肺损伤过程中发挥重要作用。本研究显示,ALI 组大鼠肺组织中 miR-203a-3p 表达水平明显降低。为了探讨 miR-203a-3p 在 ALI 过程中的作用及其对 ALI 后肺纤维化的影响,本研究通过尾静脉注射 miR-203a-3p agomir 上调 ALI 大鼠肺组织中 miR-203a-3p 表达,进一步研究结果显示,miR-203a-3p 过表达后 agomir 组大鼠肺损伤及纤维化程度得到明显改善,肺组织 W/D 值及 Hyp 含量显著降低,同时 BALF 中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平明显

降低,表明 miR-203a-3p 过表达可显著改善 ALI 大鼠肺损伤及肺纤维化。

Fstl1 是一种由 308 个氨基酸组成的分泌型糖蛋白,定位于 3q13 染色体上,在心血管疾病、自身免疫性疾病、肿瘤、炎症等疾病的发生、发展和转归过程中发挥重要作用。杨华等<sup>[15]</sup>研究显示,Fstl1 可以通过调节 TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 信号通路来调控成纤维细胞活化及细胞外基质合成,具有促纤维化作用。本研究结果显示,ALI 组大鼠肺组织中 Fstl1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高;进一步通过 Targetscan 在线数据库预测,发现 miR-203-3p 与 Fstl1 3'UTR 存在互补序列;随后通过双荧光素酶实验报告证实,Fstl1 是 miR-203a-3p 靶基因。因此,miR-203a-3p 过表达可能通过靶向下调 Fstl1 表达改善 LPS 诱导的急性肺损伤后肺纤维化,但还需要进一步研究证实。

综上所述,本研究初步探明 miR-203a-3p 在 ALI 大鼠肺组织中低表达,其过表达可降低 ALI 大鼠肺组织炎症反应,改善 ALI 大鼠肺损伤及肺纤维化,其机制可能与靶向下调 Fstl1 表达有关。因此,miR-203a-3p 可能成为 ALI 后肺纤维化治疗的潜在靶点,但还需要更多的实验进行论证。

### 参考文献

- [1] 沈陶治,郭剑浩,王小娟,等. 急性肺损伤治疗的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2021,38(3):366-70.
- [2] 孙健,沈巨信. 炎症及细胞自噬与急性肺损伤关系的研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2019,35(17):2163-8.
- [3] Essandoh K, Li Y, Huo J, et al. MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response[J]. Shock, 2016, 46(2):122-31.
- [4] Ferruelo A, Peuelas S, Lorente J A. MicroRNAs as biomarkers of acute lung injury[J]. Ann Transl Med, 2018, 6(2):34.
- [5] Cai W, Liu S, Liu Z, et al. Downregulation of lung miR-203a-3p expression by high-altitude hypoxia enhances VEGF/Notch signaling[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(5):4247-67.
- [6] Ling L, Lu H T, Wang H F, et al. MicroRNA-203 acts as a potent suppressor in septic shock by alleviating lung injury via inhibition of VNN1[J]. Kidney Blood Press Res, 2019, 44(4):565-82.
- [7] Liu W, Feng R, Li X, et al. TGF- $\beta$ - and lipopolysaccharide-induced upregulation of circular RNA PWWP2A promotes hepatic fibrosis via sponging miR-203 and miR-223[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(21):9569-80.
- [8] Hui L, Du S, Yang L, et al. Rapid pulmonary fibrosis induced by acute lung injury via a lipopolysaccharide three-hit regimen[J]. Innate Immun, 2009, 15(3):143.
- [9] Wang K, Zhou F, Zhu X, et al. Neuroprotective properties of ciliary neurotrophic factor on retinoic acid (RA)-predifferentiated

- SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. *Folia Neuropathol*, 2014, 52 (2): 121–7.
- [10] Chen Q, Yang Y, Huang Y, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates lung fibrosis by way of Mas receptor in acute lung injury [J]. *J Surg Res*, 2013, 185(2): 740–7.
- [11] 宋佳, 王春霞, 熊熙, 等. 甲基强的松龙抑制 STAT3-ERK1/2 通路改善脂多糖诱导急性肺损伤 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2019, 28(10): 1266–71.
- [12] 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 (Lausanne)*, 2021, 8: 680997.
- [13] 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): 810–4.
- [14] Wang T, Liu Y P, Wang T, et al. ROS feedback regulates the microRNA-19-targeted inhibition of the p47phox-mediated LPS-induced inflammatory response [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 489(4): 361–8.
- [15] 杨华, 张莉莉. Fstl1-TGF- $\beta$ 1-Smad2/3 信号通路与肺纤维化的靶向治疗 [J]. *实用医药杂志*, 2019, 36(6): 562–6.

## Effect of miR-203a-3p overexpression on pulmonary fibrosis after LPS-induced acute lung injury in rats and its mechanism

Ren Yipin<sup>1</sup>, Zhou Hourong<sup>2</sup>, Li Yaqi<sup>1</sup>, Huang Jia<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Emergency Medicine, <sup>2</sup>Dept of General Practice, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002)

**Abstract Objective** To investigate the effects of miR-203a-3p overexpression on pulmonary fibrosis after acute lung injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in rats and its possible mechanism. **Methods** The rat model of pulmonary fibrosis after acute lung injury was established by multiple low-dose injections of LPS. The successfully modeled rats were randomly divided into model group, agomir-negative control group (agomir-NC group) and miR-203a-3p agomir group (agomir group), and another control group was set, with 15 rats in each group. One day before modeling and one week after modeling, miR-203a-3p agomir was injected by caudal vein for intervention. Two weeks after modeling, the wet/dry specific gravity (W/D) and hydroxyprolinic acid (Hyp) content of lung tissue were determined. The pathological changes and the degree of pulmonary fibrosis of lung tissue were observed by HE staining and Masson staining. The levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by ELISA. The expression levels of miR-203a-3p and follicle-statin like 1 (Fstl1) mRNA in the lung tissues of rats were detected by qRT-PCR. The protein expression level of Fstl1 in lung tissue of rats was detected by Western blot. The targeting relationship between miR-203a-3p and Fstl1 was detected by dual luciferase reporting system. **Results** Compared with control group, the degree of lung injury and pulmonary fibrosis in model group were relatively serious, the W/D value and Hyp content of lung tissue increased ( $P < 0.05$ ), the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in BALF increased ( $P < 0.05$ ), the expression of miR-203a-3p in lung tissue decreased ( $P < 0.05$ ), while the mRNA and protein expression levels of Fstl1 increased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the degree of lung injury and pulmonary fibrosis were improved in agomir group, the W/D value and Hyp content of lung tissue decreased ( $P < 0.05$ ), the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in BALF decreased ( $P < 0.05$ ), the expression of miR-203a-3p in lung tissue increased ( $P < 0.05$ ), while the mRNA and protein expression levels of Fstl1 decreased ( $P < 0.05$ ). The luciferase reporter gene assay confirmed that Fstl1 was the target gene of miR-203a-3p. **Conclusion** Overexpression of miR-203a-3p improves pulmonary fibrosis after LPS-induced acute lung injury, and the mechanism may be related to the targeted down-regulation of Fstl1 expression.

**Key words** miR-203a-3p; acute lung injury; pulmonary fibrosis; follicle-statin like 1