

中图分类号: R932; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)16-0034-07  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.16.010



# 百令胶囊上调 miR-145-5p 逆转 TGF- $\beta_1$ / Smad3 通路机制初探\*

冯平, 姬泽萱, 陈丽萍, 王布

(河北北方学院附属第一医院, 河北 张家口 075000)

**摘要:**目的 探讨百令胶囊(BLC)对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠肺损伤的改善作用,以及对香烟烟雾提取物(CSE)作用下人支气管上皮细胞 BEAS-2B 生长的影响。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组(A 组,灌胃生理盐水 2 mL),模型组(B 组,灌胃生理盐水 2 mL),BLC 组(C 组,灌胃 BLC 5.5 mg/kg),miR-145-5p inhibitor NC 组(D 组,灌胃 BLC 5.5 mg/kg + 尾静脉注射 miR-145-5p inhibitor NC 6  $\mu$ L),miR-145-5p inhibitor 组(E 组,灌胃 BLC 5.5 mg/kg + 尾静脉注射 miR-145-5p inhibitor 6  $\mu$ L),各 12 只。以香烟烟雾吸入法复制大鼠 COPD 模型。建模成功后灌胃相应药物或生理盐水(每日 1 次),尾静脉注射相应药物(每周 1 次),连续 8 周。以 0(空白对照),3%,5%,10%,20% CSE,以及加 5%,10%,20%,40% 的 BLC 药物血清(BLC-S)孵育细胞 48 h。检测大鼠潮气量(TV)、呼气峰流量(PEF)、分钟通气量(MV)、用力肺活量(FVC)和第 0.3 秒用力呼气容积(FEV<sub>0.3</sub>);观察肺组织病理形态;免疫组化法检测 Smad3 表达水平,用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定转化生长因子(TGF)- $\beta_1$  表达水平,采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法检测 miR-145-5p mRNA 表达水平。采用 CCK-8 法检测细胞活力。结果 与 B 组比较,C 组及 D 组大鼠 TV, PEF, MV, FVC, FEV<sub>0.3</sub> 均显著升高;与 D 组比较,E 组大鼠上述指标均显著降低( $P < 0.05$ )。与 B 组比较,C 组及 D 组大鼠肺组织病理形态显著改善,平均肺泡数显著增加,肺泡直径显著减小;与 D 组比较,E 组大鼠肺组织病理形态未改善,且平均肺泡数显著减少,肺泡直径显著增长( $P < 0.05$ )。与 5% CSE 条件比较,5% CSE + 20% BLC-S 条件下的细胞活力显著增强( $P < 0.05$ )。与 B 组比较,C 组及 D 组大鼠肺组织中 Smad3, TGF- $\beta_1$  的表达水平均显著降低,miR-145-5p mRNA 表达水平显著升高( $P < 0.05$ );与 D 组比较,E 组大鼠肺组织中 Smad3, TGF- $\beta_1$  的表达水平均显著升高,miR-145-5p mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。与 5% CSE 条件比较,5% CSE + 20% BLC-S 条件下细胞 Smad3 和 TGF- $\beta_1$  的表达水平均显著降低,miR-145-5p mRNA 表达水平显著升高( $P < 0.05$ );与 5% CSE + 20% BLC-S + inhibitor NC 条件比较,同水平 inhibitor 条件下细胞 Smad3 及 TGF- $\beta_1$  表达水平均显著升高( $P < 0.05$ )。结论 BLC 在体内和体外均显示出对香烟诱导 COPD 的保护作用,其机制可能与上调 miR-145-5p 水平逆转香烟暴露激活的 TGF- $\beta_1$  / Smad3 信号通路有关。

**关键词:** 百令胶囊; miR-145-5p; 慢性阻塞性肺疾病; TGF- $\beta_1$  / Smad3 信号通路; 大鼠; 人支气管上皮细胞 BEAS-2B

## Preliminary Study on the Mechanism of Bailing Capsules Reversing TGF- $\beta_1$ / Smad3 Pathway by Upregulation of miR-145-5p

FENG Ping, JI Zexuan, CHEN Liping, WANG Bu

(The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China 075000)

**Abstract: Objective** To investigate the improvement effect of Bailing Capsules (BLC) on the lung injury in model rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and its effect on the growth of human bronchial epithelial cells BEAS-2B exposed to cigarette smoke extract (CSE). **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into the normal control group (group A, 2 mL physiological saline by gavage), the model group (group B, 2 mL physiological saline by gavage), the BLC group (group C, 5.5 mg/kg BLC by gavage), the miR-145-5p inhibitor NC group (group D, 5.5 mg/kg BLC by gavage + 6  $\mu$ L miR-145-5p inhibitor NC by tail vein injection), the miR-145-5p inhibitor group (group E, 5.5 mg/kg BLC by gavage + 6  $\mu$ L miR-145-5p inhibitor by tail vein injection), with 12 rats in each group. Rat models with COPD were replicated by the cigarette smoke inhalation method. After successful modeling, corresponding drugs or physiological saline were given by gavage (once a day), and corresponding drugs were injected into the tail vein (once a week). All rats were administered continuously for eight weeks. Cells were exposed to 0, 3%, 5%, 10%, 20% CSE (with 0 as the blank control) and incubated with the addition of 5%, 10%, 20%, 40% BLC serum (BLC-S) for 48 h. Tidal volume (TV), peak expiratory flow (PEF), minute ventilation (MV), forced vital capacity (FVC) and forced expiratory volume in 0.3 second (FEV<sub>0.3</sub>) of rats were measured. The pathological morphology of lung tissue were observed. The expression level of Smad3 was detected by the immunohistochemical assay, the expression level of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression level of miR-145-5p mRNA

\*基金项目: 河北省卫生健康委员会科研基金[20200534]。

第一作者: 冯平, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为呼吸病学, (电子邮箱)3129285947@qq.com。

was detected by the real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT - qPCR). Cell viability was detected by the CCK - 8 method. **Results** Compared with those in the group B, the TV, PEF, MV, FVC and  $FEV_{0.3}$  in the groups C and D significantly increased, and compared with those in the group D, the above indicators in the group E significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with those in the group B, the pathological morphology of lung tissue in the groups C and D significantly improved, the average alveolus count significantly increased, and the alveolus diameter was significantly shorter ( $P < 0.05$ ). Compared with those in the group D, the pathological morphology of lung tissue in the group E did not improve, the average alveolus count significantly decreased, and the alveolus diameter was significantly longer ( $P < 0.05$ ). Compared with that at 5%CSE, the cell viability at 5%CSE + 20%BLC - S significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with those in the group B, the Smad3 and TGF -  $\beta_1$  expression levels of lung tissue in the groups C and D significantly decreased, and the miR - 145 - 5p mRNA expression level significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with those in the group D, the Smad3 and TGF -  $\beta_1$  expression levels of lung tissue in the group E significantly increased, and the miR - 145 - 5p mRNA expression level significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with those at 5%CSE, the Smad3 and TGF -  $\beta_1$  expression levels at 5%CSE + 20%BLC - S significantly decreased, and the miR - 145 - 5p mRNA expression level significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with those at 5%CSE + 20%BLC - S + inhibitor NC, Smad3 and TGF -  $\beta_1$  expression levels at 5%CSE + 20%BLC - S + inhibitor significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** BLC shows protective effect on the cigarette - induced COPD *in vivo* and *in vitro*, and its mechanism may be related to reversing cigarette - activated TGF -  $\beta_1$  / Smad3 signaling pathway by upregulating the level of miR - 145 - 5p.

**Key words:** Bailing Capsules; miR - 145 - 5p; chronic obstructive pulmonary disease; TGF -  $\beta_1$  / Smad3 signaling pathway; rat; human bronchial epithelial cells BEAS - 2B

慢性阻塞性肺疾病(COPD)属进行性炎性呼吸系统疾病,发病率和死亡率均较高(位列全球第4)<sup>[1]</sup>。药物治疗仅能控制COPD的既定症状,而不能延迟或逆转病程<sup>[2]</sup>。冬虫夏草是虫草和真菌寄生复合体,自清代以来作为补肾安肺的保健品广泛使用<sup>[3]</sup>。有分析表明,含冬虫夏草发酵产物的百令胶囊(BLC)可通过改善动脉血气指数、肺功能指数和运动耐量来预防COPD进展<sup>[4]</sup>。但目前关于BLC的COPD保护机制尚未明晰,有待进一步研究。微小RNA(miRNA)能通过降解或翻译抑制调节其靶标mRNA。miRNA已成为COPD发展过程中的重要调节分子<sup>[5]</sup>。有研究证实,miR - 145 - 5p表达水平降低可作为COPD患者早期肺功能衰退的危险因素<sup>[6]</sup>;miR - 145 - 5p上调可逆转香烟烟雾诱导COPD的气道重塑和炎症反应<sup>[7]</sup>,可知肺组织中miR - 145 - 5p的水平变化可能在COPD的发展过程中发挥重要作用。为此,本研究中探讨了BLC对COPD模型大鼠肺组织中miR - 145 - 5p表达水平和相关信号通路的影响,以及对香烟烟雾提取物(CSE)作用下人支气管上皮细胞BEAS - 2B生长的影响,以揭示BLC对COPD的保护机制。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试药、动物与细胞

仪器:Finepointe型无限制肺功能测试体积描记仪(美国Buxco公司);DSX1000型光学显微镜和摄影系统、BX53型荧光显微镜(日本Olympus公司);SJ - 8型微孔板读取器(美国Thermo Fisher Scientific公司);CR30NX型离心机(美国Eppendorf公司);UV2700型紫

外 - 可见分光光度计(日本Shimadzu公司)。

试药:BLC(杭州中美华东制药有限公司,批号为2005118D);卷烟(芙蓉王滤嘴卷烟,湖南中烟工业有限责任公司,批号为063814,每支含焦油11 mg、尼古丁1.0 mg、一氧化碳12 mg);Smad3一抗(美国Cell Signaling Technologies公司,批号为ybs9316);Alexa Fluor 488共轭二抗(英国Abcam公司,批号为330192);4',6 - 二氨基 - 2 - 苯基吡啶(DAPI,批号为Az402),Trizol试剂(批号为R0024),DMEM培养基(批号为1105119),均购自美国Invitrogen公司;CCK - 8分析试剂盒(日本Dojindo公司,批号为abs50013);转化生长因子(TGF) -  $\beta_1$ 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(天津一安生物技术有限公司,批号为DB203F);TaqMan microRNA逆转录试剂盒(批号为T90F42)、SYBR green(批号为S9137),均购自美国Applied Biosystems公司;Mayer苏木精(批号为A200407),1%伊红(批号为A217362),均购自南京生航生物技术有限公司;10%胎牛血清(FBS,批号为SH30070.03),100 IU / mL青霉素和100  $\mu$ g / mL链霉素(批号为J130061),均购自美国Hyclone公司。

动物:SD大鼠,雌雄各半,年龄6~8周,体质量(200  $\pm$  20)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号SCXK(沪)2022 - 0008。在相对湿度(50  $\pm$  10)%、温度(25  $\pm$  2) $^{\circ}$ C和光照(12 h光 / 暗循环)下适应性饲养7 d,自由进食饮水。

菌种及细胞:肺炎克雷伯菌(中国典型培养物保藏中心,编号为M2019851);BEAS - 2B细胞株(美国细胞培养收藏中心,编号为H - EMC - 63)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 在体实验

模型建立<sup>[7]</sup>:将大鼠置密闭空间(50 cm × 60 cm × 70 cm),暴露于8支香烟的烟雾中,每天2次,每次30 min,前2周内无烟间隔3 h;随后的10周内,暴露于15支香烟的烟雾中,每天3次,每次30 min,无烟间隔3 h。前8周内每5天接种1次肺炎克雷伯菌悬液( $6 \times 10^8$  cfu/mL, 100  $\mu$ L)。对照大鼠暴露于空气中。

分组及给药:建模第9周,将60只大鼠分为正常对照组(2 mL生理盐水)、模型组(2 mL生理盐水)、BLC组(5.5 mg/kg<sup>[8]</sup>)、miR-145-5p inhibitor阴性对照片段(inhibitor NC)组[5.5 mg/kg BLC + 6  $\mu$ L (0.02 nmol/ $\mu$ L生理盐水)inhibitor NC]、miR-145-5p inhibitor(inhibitor)组[5.5 mg/kg BLC + 6  $\mu$ L (0.02 nmol/ $\mu$ L生理盐水)inhibitor],各12只。大鼠分别灌胃相应药物及生理盐水,每天1次,连续8周;inhibitor NC及inhibitor以尾静脉给药,每周1次,连续8周。本研究方案经医院医学伦理委员会批准(批件号K2020047)。

肺功能:大鼠予腹腔注射戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉,置连接Buxco气流传感器的参考室内。每4周评估1次潮气量(TV)、呼气峰流量(PEF)和分钟通气量(MV)。第16周,麻醉大鼠,测定用力肺活量(FVC)和第0.3秒用力呼气容积(FEV<sub>0.3</sub>)。

病理形态:末次给药后,收集大鼠左下叶肺组织样本,用10%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液固定,石蜡包埋,制成4  $\mu$ m厚切片。1)用Mayer苏木精和1%伊红染色,置光学显微镜下观察。使用Adobe Photoshop CC软件的计数工具计算肺泡平均线性截距( $\mu$ m)和平均肺泡数(单位面积为1 mm<sup>2</sup>)。2)将切片在二甲苯中脱蜡,用分级乙醇水合;置121  $^{\circ}$ C高压灭菌器中10 min提取抗原,在25  $^{\circ}$ C条件下、以3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育0.5 h以阻断内源过氧化物酶活性。将切片用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,并用10%山羊血清孵育0.5 h,然后与Smad3的一抗(1:500, V/V)孵育过夜。次日,在37  $^{\circ}$ C条件下用过氧化物酶结合的二抗孵育60 min,再用3,3'-二氨基联苯胺进行免疫染色,以苏木精进行复染,置光学显微镜下观察。

TGF- $\beta_1$ 表达:末次给药后,取0.2 g大鼠肺组织,于2 mL生理盐水中匀浆,1 000 r/min离心15 min,得上清液,用ELISA法测定TGF- $\beta_1$ 的表达水平。

miR-145-5p mRNA表达:采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法。以Trizol法提取RNA,鉴定其纯度和完整性并反转录制备cDNA;PCR反应条件为,95  $^{\circ}$ C预变性1 min;95  $^{\circ}$ C变性15 s,58  $^{\circ}$ C退火20 s,72  $^{\circ}$ C延伸20 s,循环40次;72  $^{\circ}$ C延伸5 min终止反应。RT-qPCR反应结束后,定量分析获得的熔解曲线和扩

增曲线结果,并设定循环阈值(C<sub>t</sub>),以U6小RNA为内源性对照,用2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 法计算RNA的相对表达量。引物如下:miR-145-5p(正向,5'-GGACGGACAGGGAG-GCCAAA-3';反向,5'-TTTGGCCTCCTCTCGCTCGC-GCGTCC-3')和U6(正向,5'-CTCGCTTCGGCAGCA-CA-3';反向,5'-AACGCTTCGCGCAGGCAA-3')。各组设3个复孔,实验重复3次。

### 1.2.2 离体实验

香烟烟雾提取物(CSE)制备<sup>[9]</sup>:将2支点燃香烟的烟雾鼓入10 mL DMEM培养基中,并经0.22  $\mu$ m过滤器滤过,制备新鲜原始溶液,测定吸光度(OD)。将320 nm波长处的溶液作为100% CSE。

BLC药物血清(BLC-S)制备:取10只大鼠,均灌胃5.5 mg/kg BLC,每天1次,连续7 d。末次给药后2 h,腹主动脉取血,3 000 r/min离心15 min,取上清液;56  $^{\circ}$ C条件下灭活30 min,经0.22  $\mu$ m过滤器滤过,得BLC-S,贮藏于-80  $^{\circ}$ C,备用。另取10只大鼠灌胃等体积生理盐水,同法制备空白血清。

细胞活力:采用CCK-8法检测。BEAS-2B细胞培养于含10% FBS、100 IU/mL青霉素和100  $\mu$ g/ml链霉素的DMEM培养基中。取对数生长期的细胞,以每孔3 000个的细胞密度接种于96孔培养板中,孵育12 h,将细胞暴露于0(空白对照),3%,5%,10%,20% CSE中,加5%,10%,20%,40% BLC-S孵育48 h;加10  $\mu$ L CCK-8溶液孵育2 h,检测450 nm波长处的OD。细胞活力(%) = (OD<sub>BLC-S</sub> - OD<sub>blank</sub>) / (OD<sub>con</sub> - OD<sub>blank</sub>) × 100%。实验重复3次。

TGF- $\beta_1$ 表达:取对数生长期的细胞,以BEAS-2B细胞与5% CSE和20% BLC-S孵育48 h,收集培养基,3 000 r/min离心15 min,取上清液,用ELISA法测定TGF- $\beta_1$ 的表达水平。

Smad3表达:取对数生长期的细胞,与5% CSE和20% BLC-S孵育48 h,4  $^{\circ}$ C条件下以4%多聚甲醛冰溶液固定20 min,用0.5% Triton X-100渗透,用3% BSA在室温下封闭1 h。将细胞与Smad3一抗(1:200, V/V)在4  $^{\circ}$ C下孵育过夜;洗涤,将细胞与Alexa Fluor 488共轭二抗(1:5 000, V/V)在室温下孵育2 h;洗涤,用DAPI对细胞核染色5 min,置荧光显微镜下观察。

miR-145-5p mRNA表达:取对数生长期的细胞,将BEAS-2B细胞与5% CSE和20% BLC-S孵育48 h。按相应方法检测miR-145-5p mRNA的表达水平。

### 1.2.3 统计学处理

采用SAS 9.2统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行单因素方差分析和Tukey事后检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



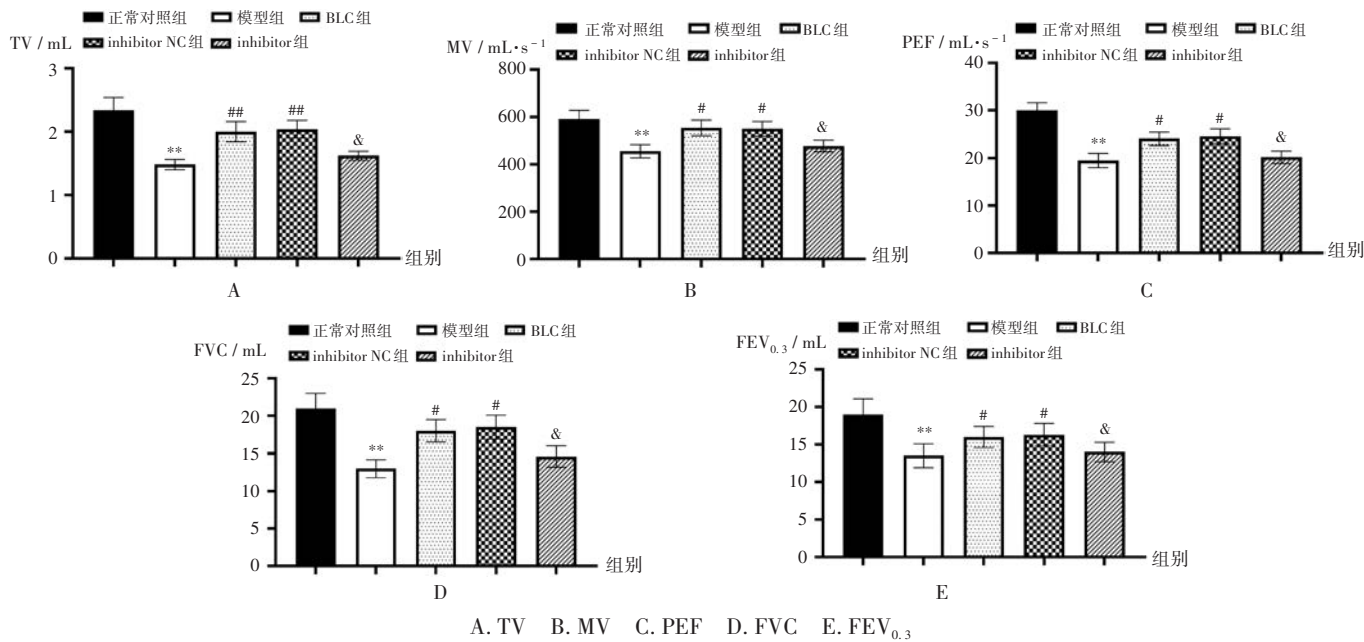


图1 各组大鼠肺功能指标

A. TV B. MV C. PEF D. FVC E. FEV<sub>0.3</sub>

Fig. 1 Lung function indicators in each group

## 2 结果

### 2.1 大鼠肺功能

与正常对照组比较,模型组大鼠 TV, MV, PEF, FVC, FEV<sub>0.3</sub> 均显著降低 ( $P < 0.05$ );与模型组比较, BLC 组及 inhibitor NC 组大鼠上述指标均显著升高 ( $P < 0.05$ );与 inhibitor NC 组比较, inhibitor 组大鼠上述指标均显著降低 ( $P < 0.05$ )。详见图1(其中与正常对照组/空白对照比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ;与模型组/5% CSE 条件比较,  $#P < 0.05$ ,  $##P < 0.01$ ;与 inhibitor NC 组/5% CSE + 20% BLC - S + inhibitor NC 条件比较,  $&P < 0.05$ 。图2,图4至图7同。)

### 2.2 大鼠肺组织病理形态

模型组大鼠肺组织出现如肺泡破坏和肺泡腔扩张等严重病理变化。与模型组比较, BLC 组及 inhibitor NC 组大鼠肺组织病理形态显著改善,平均肺泡数显著增加,肺泡直径显著减小 ( $P < 0.05$ );与 inhibitor NC 组比较, inhibitor 组大鼠肺组织病理形态未改善,且平均肺泡数显著减少,肺泡直径显著增长 ( $P < 0.05$ )。详见图2、图3。

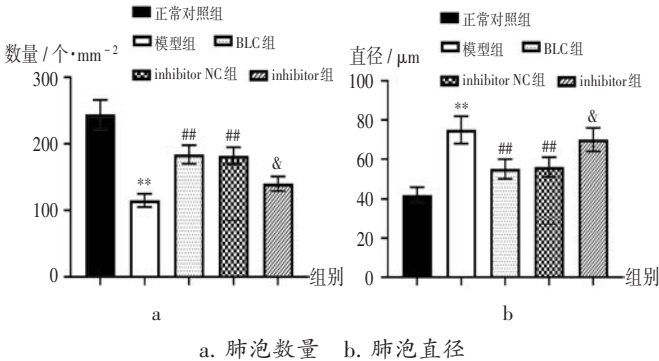


图2 各组大鼠肺泡数及直径

a. Alveolus count b. Alveolus diameter

Fig. 2 Alveolus count and diameter in each group

### 2.3 细胞活力

5% CSE 作用 48 h 时,细胞活力降低约 50% (图4 A)。与空白对照比较, 5% ~ 40% BLC - S 未显示出明显的细胞毒性 (图4 B), 故选择 20% BLC - S 为后续实验浓度。与 5% CSE 条件比较, 5% CSE + 20% BLC - S 条件下的细胞活力显著增强 ( $P < 0.05$ , 图4 C)。

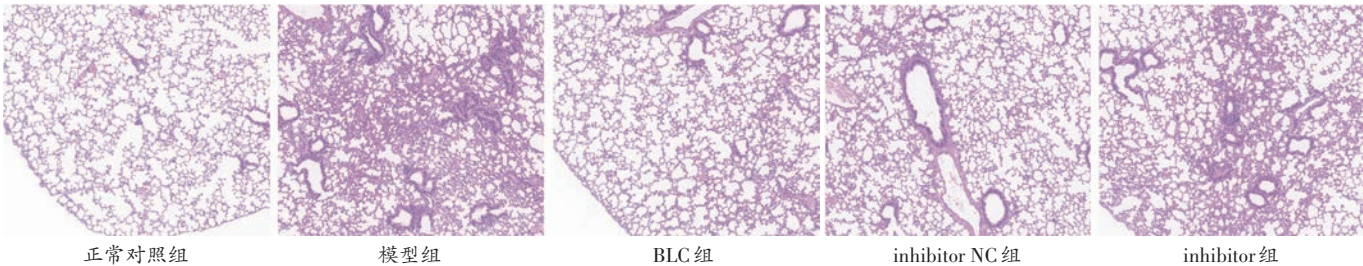


图3 各组大鼠肺组织形态(HE, × 100)

Fig. 3 Morphology of lung tissue in each group (HE, × 100)

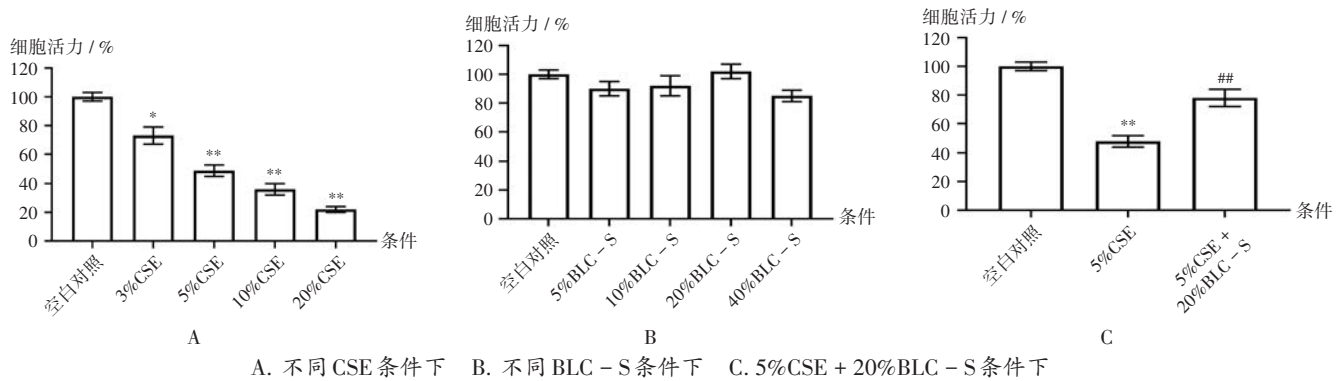


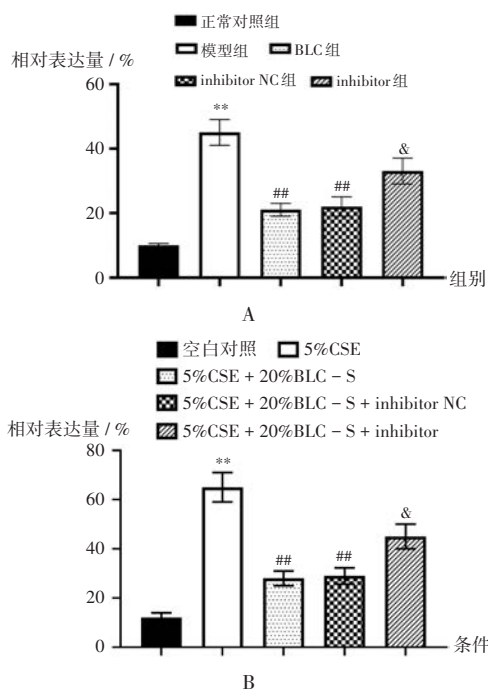
图4 细胞活力

A. Cell viability at CSE with different volume fractions B. Cell viability at BLC-S with different volume fractions C. Cell viability at 5% CSE + 20% BLC-S

Fig. 4 Cell viability

## 2.4 Smad3 表达水平

与正常对照组比较,模型组大鼠肺组织中 Smad3 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,BLC 组和 inhibitor NC 组大鼠肺组织中 Smad3 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ );与 inhibitor NC 组比较,inhibitor 组大鼠肺组织中 Smad3 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。详见图 5 A。与空白对照比较,5% CSE 条件下细胞中 Smad3 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ );与 5% CSE 条件比较,5% CSE + 20% BLC-S 条件下细胞 Smad3 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ );与 5% CSE + 20% BLC-S + inhibitor NC 条件比较,同水平 inhibitor 条件下细胞 Smad3 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。详见图 5 B。



A. 大鼠 B. 细胞

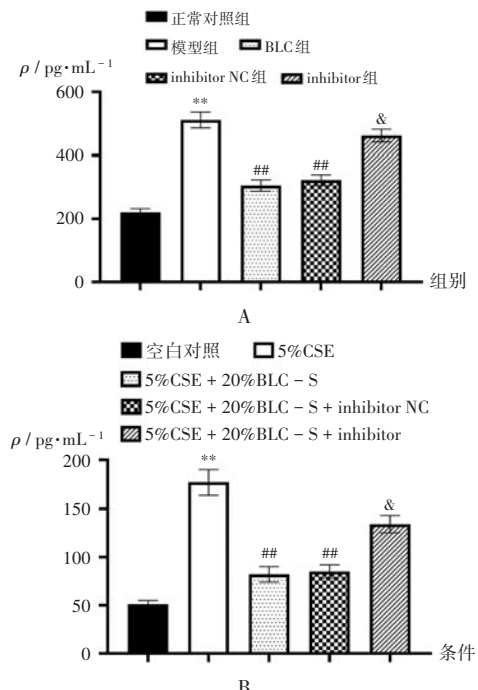
图5 Smad3 的表达

A. Rats B. Cells

Fig. 5 Expression of Smad3

## 2.5 TGF- $\beta_1$ 表达水平

与正常对照组比较,模型组大鼠肺组织中 TGF- $\beta_1$  表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,BLC 组和 inhibitor NC 组大鼠肺组织中 TGF- $\beta_1$  表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ );与 inhibitor NC 组比较,inhibitor 组大鼠肺组织中 TGF- $\beta_1$  表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。详见图 6 A。与空白对照比较,5% CSE 条件下细胞中 TGF- $\beta_1$  表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ );与 5% CSE 条件比较,5% CSE + 20% BLC-S 条件下细胞 TGF- $\beta_1$  表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ );与 5% CSE + 20% BLC-S + inhibitor NC 条件比较,同水平 inhibitor 条件下细胞 TGF- $\beta_1$  表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。详见图 6 B。



A. 大鼠 B. 细胞

图6 TGF- $\beta_1$  的表达水平

A. Rats B. Cells

Fig. 6 Expression level of TGF- $\beta_1$

## 2.6 miR-145-5p mRNA 表达水平

与正常对照组比较,模型组大鼠肺组织中 miR-145-5p mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,BLC组及 inhibitor NC组大鼠肺组织中 miR-145-5p mRNA 表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。与 inhibitor NC组比较, inhibitor组大鼠肺组织中 miR-145-5p mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。详见图7A。与空白对照比较,5%CSE条件下细胞中 miR-145-5p mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与5%CSE条件比较,5%CSE+20%BLC-S条件下细胞 miR-145-5p mRNA 表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。详见图7B。

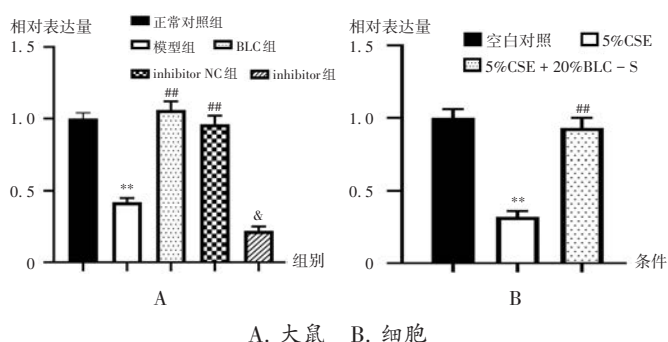


图7 miR-145-5p mRNA 的表达水平

A. Rats B. Cells

Fig. 7 Expression level of miR-145-5p mRNA

## 3 讨论

吸烟被认为是COPD的主要风险因素<sup>[1]</sup>。长期暴露于烟雾会增加轻度稳定期COPD模型小鼠肺组织纤维化<sup>[10]</sup>。有研究表明,COPD患者在常规治疗基础上加上BLC后,其肺通气换气功能、呼吸困难等不适症状有了显著改善<sup>[11]</sup>。本研究中证明了BLC可抑制COPD模型大鼠肺功能下降、病理改变和纤维化反应;此外,BLC能增强暴露于CSE的BEAS-2B细胞活力,并阻断细胞中TGF- $\beta_1$ /Smad通路。

持续暴露于CSE会导致肺部miRNA的失调,这与各种呼吸系统疾病有关,如肺结核、哮喘、肺癌及COPD<sup>[12]</sup>。暴露于香烟的COPD模型大鼠肺组织中miR-145下调,并且已提出miR-145表达水平与COPD的诊断密切相关<sup>[13]</sup>。miR-145-5p水平降低与5~12岁哮喘儿童人群的肺生长早期下降有关,并且基线miR-145-5p水平降低也与随访结束时(23~30岁)研究人群的COPD发生相关<sup>[6]</sup>。本研究中,在COPD模型大鼠肺组织及暴露于CSE的BEAS-2B细胞中均发现miR-145-5p水平显著下调,而BLC显著逆转了该趋势。此外,miR-145-5p inhibitor的加入明显逆转了BLC对COPD模型大鼠的保护作用,体现在肺功能指标降低,平均肺泡数减少和平均线性截距增长。表明BLC可通过上调miR-145-5p水平发挥COPD保护作用。

有研究证实,miR-145-5p上调能减轻COPD模型大鼠肺组织纤维化程度<sup>[9]</sup>。TGF- $\beta_1$ 介导的Smad3信号在与烟雾刺激、博来霉素激发和肿瘤进展/发展相关的上皮间质转化(EMT)中的关键作用已得到证实<sup>[14]</sup>。TGF- $\beta_1$ 信号通过跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体转导,将I型受体内化到核内体中,用于受体激活的Smad锚与Smad3复合物的形成。之后Smad在丝氨酸残基处磷酸化,促进Smad2/3和Smad4之间的相互作用,然后易位到细胞核,并通过与Smad结合元件相互作用来调节EMT相关基因的转录<sup>[15-16]</sup>。基于Smad3在TGF- $\beta_1$ 介导的EMT过程中发挥更关键作用,本研究中重点关注BLC对TGF- $\beta_1$ /Smad通路的影响。结果证实,在COPD模型大鼠肺组织和暴露于CSE的BEAS-2B细胞中TGF- $\beta_1$ /Smad信号通路激活,BLC显著抑制了该通路激活。进一步分析显示,miR-145-5p inhibitor的加入阻断了BLC对TGF- $\beta_1$ /Smad信号通路的抑制作用。但本研究还存在一定局限性,除TGF- $\beta_1$ /Smad外,还应研究与纤维化进展相关的其他信号,包括PI3K/Akt和ERK。

综上所述,BLC在体内和体外均显示出对香烟诱导COPD的保护作用,其机制可能与上调miR-145-5p水平逆转暴露香烟激活的TGF- $\beta_1$ /Smad3信号通路有关。

## 参考文献

- [1] 方利文,王临虹,吴静. 慢性阻塞性肺疾病患者诊断,治疗与管理状况监测评估[J]. 中华流行病学杂志,2020,41(7):1009-1013.
- [2] 郑春霞,郑晓英,孔令希,等. 稳定期慢性阻塞性肺疾病治疗用中成药的潜在用药风险分析[J]. 中国药房,2020,31(7):78-81.
- [3] 倪约翰,马伟明,谷红革,等. 肾衰宁胶囊联合百令胶囊治疗慢性肾衰竭伴血液透析疗效及对肾功能指标的影响[J]. 中华中医药学刊,2020,38(1):244-247.
- [4] ZHANG L, ZHAO Y, JIA J, et al. Evaluation of the curative effects of Bailing capsules for treating chronic obstructive pulmonary disease: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2021, 100(25):e25672.
- [5] DE SMET EG, VAN ECKHOUTTE HP, COBOS FA, et al. The role of miR-155 in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD[J]. Mucosal Immunol, 2020, 13(3):423-436.
- [6] TIWARI A, LI J, KHO AT, et al. COPD-associated miR-145-5p is downregulated in early-decline FEV<sub>1</sub> trajectories in childhood asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2021, 147(6):2181-2190.
- [7] GU W, YUAN Y, WANG L, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes airway remodelling by suppressing the miR-145-5p/DUSP6 axis in cigarette smoke-induced COPD[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(11):7200-7209.