

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.14.001

文章编号: 1005-8982 (2024) 14-0001-08

慢性阻塞性肺疾病专题·论著

MicroRNA-195/497对香烟烟雾提取物诱导的人支气管上皮细胞中TGF-β表达的影响*

迪拉拉·吐尔逊¹, 祖力皮喀尔·阿卜杜热合曼², 钟雪梅¹,
弓慧², 茹克亚木·色麦提¹, 李黎¹

[1.喀什地区第一人民医院呼吸与危重症医学科, 新疆喀什 844000; 2.新疆感染性疾病(结核)临床医学研究中心, 新疆喀什 844000]

摘要: **目的** 探讨microRNA-195/497 (miR-195/497) 在香烟烟雾提取物(CSE)诱导的人支气管上皮细胞中影响转化生长因子-β (TGF-β) 表达的作用机制。**方法** 用3% CSE诱导BEAS-2B细胞模拟慢性阻塞性肺疾病(COPD)的发病机制, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测miR-195、miR-497、SMAD7及TGF-β基因表达。双荧光素酶报告实验验证miR-195、miR-497与SMAD7的靶向关系, 将miR-195 mimic和miR-497 mimic转染至3% CSE处理的细胞中, qRT-PCR检测SMAD7的表达。将miR-195 mimic、miR-497 mimic和si-SMAD7转染至3% CSE处理的细胞中, qRT-PCR检测miR-195、miR-497、SMAD7、TGF-β的基因表达, Western blotting检测SMAD7、TGF-β的蛋白表达。**结果** 3% CSE组miR-195、miR-497 mRNA相对表达量低于正常细胞组($P < 0.05$), SMAD7、TGF-β mRNA相对表达量高于正常细胞组($P < 0.05$)。miR-195 mimic组Wt-SMAD7 mRNA相对表达量低于mimic NC组($P < 0.05$)。miR-195 mimic组与mimic NC组Wt-SMAD7 mRNA相对表达量比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。miR-497 mimic组Wt-SMAD7 mRNA相对表达量低于mimic NC组($P < 0.05$)。miR-497 mimic组与mimic NC组Mut-SMAD7 mRNA相对表达量比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。miR-195 mimic组SMAD7 mRNA相对表达量低于mimic NC组($P < 0.05$)。miR-497 mimic组SMAD7 mRNA相对表达量低于mimic NC组($P < 0.05$)。3% CSE组细胞miR-195和miR-497相对表达量较Control组下降($P < 0.05$), SMAD7及TGF-β蛋白相对表达量升高($P < 0.05$); miR-195 mimic + 3% CSE组细胞miR-195相对表达量较3% CSE组升高($P < 0.05$), SMAD7、TGF-β下降($P < 0.05$), 而miR-497相对表达量无明显差异($P > 0.05$); miR-497 mimic + 3% CSE组细胞miR-497相对表达量较3% CSE组升高($P < 0.05$), SMAD7、TGF-β下降($P < 0.05$), 而miR-195相对表达量无明显差异($P > 0.05$); si-SMAD7 + 3% CSE组SMAD7、TGF-β蛋白相对表达量较3% CSE组下降($P < 0.05$), 而miR-195、miR-497无明显差异($P > 0.05$)。3% CSE组SMAD7、TGF-β蛋白相对表达量较Control组升高($P < 0.05$), miR-195 mimic + 3% CSE组、miR-497 mimic + 3% CSE组、si-SMAD7 + 3% CSE组较3% CSE组下降($P < 0.05$)。**结论** miR-195/497可通过调控SMAD7的表达影响CSE诱导的人支气管上皮细胞中TGF-β表达。

关键词: 慢性阻塞性肺病; microRNA-195; microRNA-497; SMAD7; 转化生长因子-β

中图分类号: R563.9

文献标识码: A

Effects of microRNA-195/497 on the expression of TGF-β in human bronchial epithelial cells exposed to CSE*

Dilala Tuerxun¹, Zulipikaer Abudurehman², Zhong Xue-mei¹, Gong Hui², Rukeyamu Semaiti¹, Li Li¹

[1. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, The First People's Hospital of Kashgar

收稿日期: 2023-06-25

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(No: 2021D01F12); 喀什地区应用技术与开发计划(No: KS2021057)

[通信作者] 李黎, E-mail: 811346876@qq.com

Prefecture, Kashgar, Xinjiang 844000, China; 2. Xinjiang Clinical Research Center for Infectious Diseases (Tuberculosis), Kashgar, Xinjiang 844000, China]

Abstract: Objective To explore the mechanism underlying the effects of miR-195/497 on the expression of TGF- β in human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract (CSE). **Methods** BEAS-2B cells were exposed to 3% CSE to simulate the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and the expression levels of miR-195, miR-497, SMAD7 and TGF- β genes were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The targeting relationship of miR-195 and miR-497 with SMAD7 was validated via the dual luciferase reporter assay. After transfection of miR-195 mimic and miR-497 mimic into cells treated with 3% CSE, the expression of SMAD7 was detected by qRT-PCR. Following transfection of miR-195 mimic, miR-497 mimic and si-SMAD7 into cells treated with 3% CSE, the gene expressions of miR-195, miR-497, SMAD7 and TGF- β were detected by qRT-PCR, and the protein expressions of SMAD7 and TGF- β were measured via Western blotting. **Results** Compared with the normal cells, the relative expression levels of miR-195 and miR-497 were lower ($P < 0.01$), and the relative expression levels of SMAD7 and TGF- β were higher in cells treated with 3% CSE ($P < 0.05$). The relative expression of Wt-SMAD7 in the miR-195 mimic group was lower than that in the mimic NC group ($P < 0.05$). There was no difference in the relative expression of Mut-SMAD7 between the miR-195 mimic group and the mimic NC group ($P > 0.05$). The relative expression of Wt-SMAD7 in the miR-497 mimic group was lower than that in the mimic NC group ($P < 0.05$). There was no difference in the relative expression of Mut-SMAD7 between the miR-497 mimic group and the mimic NC group ($P > 0.05$). The relative mRNA expression of SMAD7 in the miR-195 mimic group was lower than that in the mimic NC group ($P < 0.05$). The mRNA relative expression of SMAD7 in the miR-497 mimic group was lower than that in the mimic NC group ($P < 0.05$). The expressions of miR-195 and miR-497 were lower ($P < 0.05$), and the expressions of SMAD7 and TGF- β were higher in cells treated with 3% CSE than those in cells of the control group ($P < 0.05$). Compared with the 3% CSE group, the expression of miR-195 was higher ($P < 0.05$), the expressions of SMAD7 and TGF- β were lower ($P < 0.05$), and the expression of miR-497 was not significantly altered ($P > 0.05$) in the miR-195 mimic + 3% CSE group. Compared with the 3% CSE group, the expression of miR-497 was higher ($P < 0.05$), the expressions of SMAD7 and TGF- β were lower ($P < 0.05$), and the expression of miR-195 was not significantly altered ($P > 0.05$) in the miR-497 mimic + 3% CSE group. The expressions of SMAD7 and TGF- β in the si-SMAD7 + 3% CSE group were lower than those in the 3% CSE group ($P < 0.05$), while there was no difference in the expressions of miR-195 and miR-497 between the two groups ($P > 0.05$). The relative protein expressions of SMAD7 and TGF- β in the 3% CSE group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), whereas those in the miR-195 mimic + 3% CSE group, miR-497 mimic + 3% CSE group, and si-SMAD7 + 3% CSE group were lower compared to those in the 3% CSE group ($P < 0.05$). **Conclusions** The miR-195/497 could affect the expression of TGF- β in human bronchial epithelial cells exposed to CSE by regulating the expression of SMAD7.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease; miR-195; miR-497; SMAD7; TGF- β

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是最常见的慢性呼吸道疾病之一。COPD 是一种进行性退行性气道疾病, 主要特征是进行性气流受限和持续的呼吸道症状^[1]。据统计, 全世界每年约有 300 万人死于 COPD^[2]。随着时间的流逝, 患者将面临急性症状恶化和肺功能逐渐降低, 导致患者日常活动更加困难, 生活质量严重下降。关于 COPD 的治疗, 临床上主要采用药物治疗, 包括短期或长期使用 β -2 受体激动剂和抗胆碱能药物、皮质类固醇和甲基黄嘌呤。然而, 这些药物不能改善肺功能和提高生存

率^[3]。尽管 COPD 涉及氧化应激、蛋白水解和抗蛋白水解活性失衡、免疫和炎症、细胞凋亡, 以及气道和肺的修复和破坏等方面, 但其确切发病机制尚不清楚^[4]。鉴于 COPD 对人的危害和目前治疗的困难, 有必要明确 COPD 发病机制, 以提高治疗水平。

MicroRNA (miRNA) 是由约 23 个核苷酸组成的单链非编码 RNA, 可参与多种细胞生物过程, 如增殖和凋亡^[5]。据估计, miRNA 可以调节三分之一的人类基因, 并影响其功能和遗传途径^[6]。microRNA-195 (miR-195) 和 microRNA-497 (miR-497) 参与疾病的发生、发展。生物信息学分析发现, miR-195 与过

敏性鼻炎和哮喘显著相关^[7]。使用二代测序鉴定了 COPD 患者和正常受试者的支气管上皮细胞中 miRNA 的表达谱,发现两组 miR-195-5p 表达有显著差异性^[8]。研究表明,miR-497 直接靶向和下调激酶插入域受体表达,并抑制非小细胞肺癌的恶性生长^[9]。另外,分析发现,在过敏性气道疾病中,miR-497 可以作为与中性粒细胞募集相关基因的候选主调节因子^[10]。近年来,一些研究发现 miR-195-5p 在 COPD 大鼠和患者中的表达较低^[11]。基于生物信息学分析 COPD 血浆中潜在的 miRNA-mRNA 调控网络,发现 miR-497 在 COPD 血浆中低表达^[12]。但尚未探讨 miR-195 和 miR-497 调控 COPD 的具体机制。

SMADs 蛋白是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族的成员,参与许多生理功能^[13]。磷酸化的 SMAD2、SMAD3 易位到细胞核,并在那调节靶基因的转录^[14]。相反,SMAD7 通过阻止 SMAD2、SMAD3 的磷酸化,在 TGF- β 信号传导的负反馈调节中起重要作用^[15]。SMAD7 在被肿瘤坏死因子和 γ 干扰素等促炎细胞因子激活后,可诱导成纤维细胞产生 TGF- β ^[16]。文献报道,TGF- β 在慢性肺部疾病中起重要作用,COPD 患者的血清 TGF- β 水平与 COPD 严重程度成正比^[17]。研究发现,在 COPD 患者的肺部检测到 SMAD7 水平升高^[18]。然而,在香烟烟雾提取物 (cigarette smoke extract, CSE) 诱导的人支气管上皮细胞中,miR-195 和 miR-497 是否通过介导 SMAD7 影响 TGF- β 的表达,目前尚未见到相关报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人支气管上皮细胞株 BEAS-2B (货号: CL-0496)、胎牛血清 (货号: 164210)、MEM 培养基 (货号: PM150411B) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。人胚胎肾细胞 HEK-293T (货号: YS002C) 购自上海雅吉生物科技有限公司, Lipofectamine 3000™ 转染试剂盒 (货号: 11668030) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, TRIzol™ 试剂 (货号: T1020931) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司, Prime Script™ RT 试剂盒 (货号: RR047A)、SYBR® Premix Ex Tap™ II 试剂盒 (货号: DRR820A) 均购自日本 TakaRa Bio 公司,引物由通用生物科技有限公司

合成。RIPA 裂解液 (货号: P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: P0010S) 均购自上海碧云天生物技术有限公司。SMAD7 (货号: GTX106211)、TGF- β (货号: GTX03464)、GAPDH (货号: GTX100118) 均购自美国 GeneTex 公司。山羊抗兔二抗 (货号: ab205718)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (货号: ab287865) 均购自英国 Abcam 公司。

1.2 实验仪器

二氧化碳培养箱购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司, PCR 仪购自美国 Bio-rad 公司, 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司, 紫外分光光度仪购自德国 implan 公司; ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 超净工作台购自中国苏净集团, 蛋白垂直电泳仪购自美国 Bio-rad 公司, 高速冷冻型微量台式离心机购自大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司, 超高灵敏度化学发光成像系统购自美国 Bio-rad 公司。

1.3 CSE 制备

CSE 的制备基于参考文献[19]描述的方法,即采用了一种 Hatamen 牌商业香烟,其中含有 11 mg 焦油和 0.8 mg 尼古丁,使用注射器驱动的仪器燃烧无过滤嘴香烟,并通过 20 mL 无血清 RPMI 1640 培养基鼓泡烟雾。将所得悬浮液调节至 pH 值为 7.4,并使用 0.22 μ mol/L 孔过滤器过滤。该溶液被视为 100% CSE 溶液,并在制备后 30 min 内使用。

1.4 细胞培养及处理

人胚胎肾细胞 HEK-293T、人支气管上皮细胞 BEAS-2B 置于含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素溶液的 MEM 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳条件下湿润培养。将 BEAS-2B 细胞分为 Control 组和 3% CSE 组,Control 组细胞正常条件培养,3% CSE 组用 3% CSE 诱导 48 h 模拟 COPD 的发病机制^[20]。上海吉玛生物公司构建 miR-195 mimic、miR-497 mimic 以及 SMAD7 的干扰载体。miR-195 mimic 组和 miR-497 mimic 组是将 miR-195 mimic 或 miR-497 mimic 分别与 Wt-SMAD7 或 Mut-SMAD7 载体通过 Lipofectamine™ 3000 共转染至人胚胎肾细胞 HEK-293T 中。mimic NC 组是将 mimic NC 与 Wt-SMAD7 或 Mut-SMAD7 载体通过共转染至人胚胎肾细胞 HEK-293T 中。miR-195 mimic + 3% CSE 组、miR-497 mimic + 3% CSE 组和 si-SMAD7 + 3% CSE 组是将 miR-195 mimic、miR-497

mimic 和 SMAD7 的 siRNA 分别利用 Lipofectamine™ 3000 转染至人支气管支气管上皮细胞株 BEAS-2B, 给予 3% CSE 干预 48 h。将处理后的细胞通过胰蛋白酶消化, 以 8 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞液待测。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-195、miR-497、Smad7 及 TGF-β mRNA 表达

使用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA。利用紫外可见分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度 (OD_{260}/OD_{280})。对浓度和纯度符合要求的 RNA 样品, 稀释到合适的浓度, 利用 Prime Script™ RT 试剂盒逆转录为 cDNA。采用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪, 使用 SYBR® Premix Ex Tap™ II 试剂盒, 运用 Applied Biosystems 7500HT 系统进行 PCR。反应步骤如下: 95 °C 预变性 10 min、95 °C 变性 10 s、60 °C 退火 20 s、72 °C 延伸 31 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参, 根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-195、miR-497、SMAD7 及 TGF-β mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度/ bp
miR-195	正向: 5'-CGCAGTAGCAGCACAGA-3' 反向: 5'-TCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGCCTA-3'	17 24
miR-497	正向: 5'-GCAGCAGCACACTGT-3' 反向: 5'-CCAGTTTTTTTTTTTTTTTACAAACCA-3'	15 27
U6	正向: 5'-ACACGCCAATTCCTGAAGCCTTC-3' 反向: 5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTATGGAA-3'	23 28
SMAD7	正向: 5'-CCCAATGACCACGAGTTTATGC-3' 反向: 5'-GCTGATGAACTGGCGGGTGTAG-3'	22 22
TGF-β	正向: 5'-CAGCAACAATTCCTGGCGATAC-3' 反向: 5'-CGCTAAGCCGAAAGCCCTCAAT-3'	22 22
GAPDH	正向: 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' 反向: 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'	24 24

1.6 Western blotting 检测蛋白表达

使用 RIPA 裂解缓冲液在冰上提取蛋白质, 以 12 000 r/min 离心 10 min, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒来确定每种裂解物中的总蛋白浓度, 总蛋白置于 -20 °C 保存。根据 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 将等量的蛋白质上样到 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上, 通过电泳分离并转移到 PVDF 膜上。用 PVDF 膜孵育一抗 SMAD7 (1:2 000)、TGF-β (1:1 000), 4 °C 过夜, 次日 PVDF 膜室温孵育山羊抗兔辣根过氧化物

酶偶联的二抗 (1:2 000) 2 h, 洗膜, 用发光液浸湿 PVDF 膜后放置于超高灵敏度化学发光成像系统样品放置区运行程序显影成像。

1.7 双荧光素酶报告实验

根据生物信息学软件 Starbase 预测结果, 设计 miR-195、miR-497 与 SMAD7 结合位点的野生序列和突变序列。将野生序列和突变序列片段克隆并与 pmirGLO 载体结合, 命名为 Wt-SMAD7 和 Mut-SMAD7。将 Wt-SMAD7 或 Mut-SMAD7 和 mimic NC、miR-195 mimic 或 miR-497 mimic 一起转染至 HEK-293T 细胞中。转染 48 h 后使用双荧光素酶报告基因试剂盒进行荧光素酶相对表达量检测。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验或方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3% CSE 组与 Control 组 miR-195、miR-497、SMAD7、TGF-β mRNA 相对表达量比较

3% CSE 组与 Control 组 miR-195、miR-497、SMAD7、TGF-β mRNA 相对表达量比较, 差异均有统计学意义 (P < 0.05)。3% CSE 组 miR-195、miR-497 相对表达量低于 Control 组 (P < 0.05), SMAD7、TGF-β 相对表达量高于 Control 组 (P < 0.05)。见表 1。

表 1 3% CSE 组与 Control 组 miR-195、miR-497、SMAD7、TGF-β mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-195	miR-497	SMAD7	TGF-β
Control 组	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.15
3% CSE 组	0.12 ± 0.03	0.31 ± 0.05	1.79 ± 0.17	2.85 ± 0.21
<i>t</i> 值	16.070	9.891	7.590	12.420
<i>P</i> 值	0.002	0.003	0.009	0.000

2.2 双荧光素酶报告实验验证 miR-195、miR-497 与 SMAD7 基因的靶向关系

miR-195 mimic 组与 mimic NC 组 Wt-SMAD7 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), miR-195 mimic 组低于 mimic NC 组。miR-195 mimic 组与 mimic NC 组 Mut-SMAD7 mRNA 相对表达量比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。miR-497

mimic 组与 mimic NC 组 Wt-SMAD7 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-497 mimic 组低于 mimic NC 组。miR-497 mimic 组与 mimic NC 组 Mut-SMAD7 mRNA 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1、2 和表 2、3。

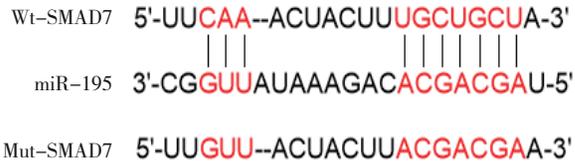


图 1 生物信息学预测 miR-195 和 SMAD7 的靶向调控位点

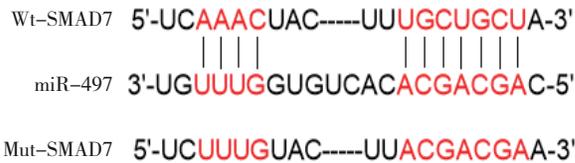


图 2 生物信息学预测 miR-497 和 SMAD7 的靶向调控位点

表 2 miR-195 mimic 组与 mimic NC 组 Wt-SMAD7、Mut-SMAD7 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Wt-SMAD7	Mut-SMAD7
mimic NC 组	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.06
miR-195 mimic 组	0.32 ± 0.03	0.95 ± 0.08
<i>t</i> 值	10.330	13.080
<i>P</i> 值	0.006	0.435

2.3 miR-195、miR-497 对 SMAD7 mRNA 表达的影响

miR-195 mimic 组、mimic NC 组 SMAD7 mRNA 相对表达量分别为 (0.35 ± 0.04)、(1.00 ± 0.06), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 15.610, P = 0.000$), miR-

表 3 miR-497 mimic 组与 mimic NC 组 Wt-SMAD7、Mut-SMAD7 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Wt-SMAD7	Mut-SMAD7
mimic NC 组	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07
miR-497 mimic 组	0.41 ± 0.05	1.03 ± 0.09
<i>t</i> 值	0.866	0.456
<i>P</i> 值	0.000	0.672

195 mimic 组低于 mimic NC 组。miR-497 mimic 组、mimic NC 组 SMAD7 mRNA 相对表达量分别为 (0.46 ± 0.05)、(1.00 ± 0.09), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 9.085, P = 0.002$), miR-497 mimic 组低于 mimic NC 组。

2.4 各组细胞 miR-195、miR-497、SMAD7 及 TGF-β mRNA 相对表达量比较

各组 miR-195、miR-497、SMAD7、TGF-β mRNA 相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。3% CSE 组细胞 miR-195 和 miR-497 较 Control 组下降 ($P < 0.05$), SMAD7 及 TGF-β 较 Control 组升高 ($P < 0.05$); miR-195 mimic+3% CSE 组细胞 miR-19 较 3% CSE 组升高 ($P < 0.05$), SMAD7、TGF-β 较 3% CSE 组下降 ($P < 0.05$), 而 miR-497 无明显差异 ($P > 0.05$); miR-497 mimic+3% CSE 组细胞 miR-497 较 3% CSE 组升高 ($P < 0.05$), SMAD7、TGF-β 较 3% CSE 组下降 ($P < 0.05$), 而 miR-195 无明显差异 ($P > 0.05$); si-SMAD7+3% CSE 组 SMAD7、TGF-β 较 3% CSE 组下降 ($P < 0.05$), 而 miR-195、miR-497 无明显差异 ($P > 0.05$)。结果表明, 过表达 miR-195 或 miR-497 能抑制 SMAD7、TGF-β 表达水平, 敲低 SMAD7 能抑制 TGF-β 的水平, 但对 miR-195 和 miR-497 的表达无影响。见表 4。

表 4 各组细胞中 miR-195、miR-497、SMAD7 及 TGF-β mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

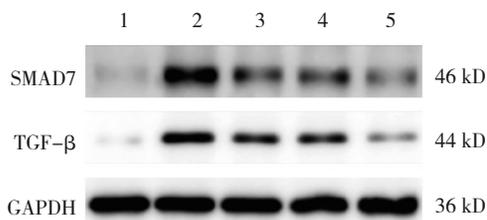
组别	miR-195	miR-497	SMAD7	TGF-β
Control 组	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.11
3% CSE 组	0.15 ± 0.02	0.35 ± 0.04	3.22 ± 0.26	2.05 ± 0.18
miR-195 mimic + 3% CSE 组	0.67 ± 0.06	0.33 ± 0.04	2.05 ± 0.15	1.48 ± 0.13
miR-497 mimic + 3% CSE 组	0.18 ± 0.02	0.73 ± 0.07	2.12 ± 0.18	1.51 ± 0.11
si-SMAD7 + 3% CSE 组	0.17 ± 0.02	0.36 ± 0.03	1.93 ± 0.14	1.41 ± 0.12
<i>F</i> 值	131.100	96.940	62.870	23.920
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

2.5 各组 SMAD7、TGF- β 蛋白相对表达量比较

各组 SMAD7、TGF- β 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。3% CSE 组较 Control 组升高 ($P < 0.05$), miR-195 mimic + 3% CSE 组、miR-497 mimic + 3% CSE 组、si-SMAD7 + 3% CSE 组较 3% CSE 组下降 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 3。

表 5 各组 SMAD7、TGF- β 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SMAD7	TGF- β
Control 组	0.23 \pm 0.03	0.15 \pm 0.03
3% CSE 组	0.65 \pm 0.06	0.51 \pm 0.06
miR-195 mimic + 3% CSE 组	0.45 \pm 0.04	0.32 \pm 0.04
miR-497 mimic + 3% CSE 组	0.43 \pm 0.03	0.33 \pm 0.03
si-SMAD7 + 3% CSE 组	0.35 \pm 0.03	0.25 \pm 0.03
F 值	45.040	62.210
P 值	0.000	0.000



1: Control 组; 2: 3% CSE 组; 3: miR-195 mimic + 3% CSE 组; 4: miR-497 mimic + 3% CSE 组; 5: si-SMAD7 + 3% CSE 组。

图 3 各组细胞 SMAD7 和 TGF- β 蛋白表达

3 讨论

COPD 影响着全世界 3 亿多人的健康。在中国, ≥ 40 岁人群 COPD 患病率为 13.7%, ≥ 70 岁人群患病率为 35.5%^[21]。吸烟是 COPD 最重要的危险因素, 发病率和病死率呈上升趋势^[22]。COPD 仅次于缺血性心脏病和中风, 已成为世界第三大死因, 并造成经济和社会负担^[23]。COPD 常见的治疗策略包括戒烟、支气管扩张剂治疗、辅助供氧、肺康复和肺移植^[24]。没有有效的方法来扭转肺功能的下降, 降低 COPD 急性加重的频率和严重程度的唯一方法是缓解症状, 从而提高 COPD 患者的生活质量。目前的方法主要集中在对症治疗上^[25]。在本研究结果中, 笔者用 3% CSE 诱导 BEAS-2B 细胞 48 h 模拟 COPD 发病, 发现 miR-195 和 miR-497 表达水平降低, SMAD7 及 TGF- β 表达明显升高。miR-195 和 miR-497 均靶向负调控 SMAD7 表达。过表达 miR-195 或

miR-497 抑制 SMAD7 及 TGF- β 的 mRNA 和蛋白表达, 敲低 SMAD7 抑制 TGF- β 的 mRNA 和蛋白表达。从机制上讲, 本研究结果表明, 在 CSE 诱导的人支气管上皮细胞中, miR-195 和 miR-497 均通过抑制 SMAD7 而影响 TGF- β 的表达。

越来越多的证据表明, miRNA 表达异常是许多人类疾病的特征, miRNA 在疾病的形成和进展中具有积极或消极的作用^[26]。其作用于 mRNA 的 3' 非翻译区, 以调节编码靶蛋白的 mRNA 的稳定性和翻译, 并在转录后水平上负调节基因表达^[27]。因此, miRNA 具有影响基因组大部分表达的能力, 失调会对生物体的稳态产生负面影响^[28]。研究发现, miRNA 在许多肺部疾病的发生中起着不可或缺的作用, 例如肺癌、COPD、哮喘和特发性肺纤维化^[29]。在博来霉素诱导的肺纤维化模型中, 分析发现差异表达的 miR-195 可以调节细胞凋亡和 TGF- β 信号传导^[30]。miR-497-5p 的上调可诱导肺间充质干细胞分化为肌成纤维细胞并促进肺纤维化^[31]。此外, 烟草暴露可能是 miRNA 下调或上调的触发因素^[4]。本研究结果表明 miR-195 和 miR-497 可能 COPD 疾病的发展有作用。

为识别 miR-195 和 miR-497 的下游靶标, 笔者通过 StarBase 生物信息学网站分析发现 miR-195、miR-497 与 SMAD7 均存在结合位点。有研究表明, 芍药苷通过调节 SMAD7 抑制肺泡上皮细胞 TGF- β 的表达治疗肺纤维化^[32]。SMAD7 在支气管上皮细胞中的表达水平与哮喘受试者基底膜厚度和气道高反应性呈负相关, 影响哮喘的发展^[33]。在成熟 T 细胞中, 选择性表达 SMAD7 可通过影响 TGF- β 信号传导, 增强气道炎症^[34]。TGF- β 能够诱导炎症细胞浸润肺、血管和呼吸道, 促进成纤维细胞趋化, 产生胶原和纤维连接蛋白, 抑制胶原降解, 促进纤维化发生^[35]。与 TGF- β 在肺纤维化中的作用类似, 在 COPD 患者中, TGF- β 促进纤维化气道重塑, 从而进一步导致肺功能下降^[36]。通过双荧光素酶实验证实 miR-195、miR-497 均可以靶向结合 SMAD7, 过表达 miR-195 或 miR-497 后 SMAD7 的表达水平均明显降低, 证明 miR-195、miR-497 均可以负向调控 SMAD7 的表达。此外, 本研究还发现, 过表达 miR-195 或 miR-497 可以抑制 TGF- β 的 mRNA 和蛋白表达, 敲低 SMAD7 抑制 TGF- β 的 mRNA 和蛋白表达。

综上所述,在 CSE 诱导的人支气管上皮细胞中,miR-195 和 miR-497 均通过抑制 SMAD7 而影响 TGF- β 的表达。表明 miR-195 和 miR-497 参与 COPD 的进展,为 COPD 的治疗提供了新的潜在靶点。

参 考 文 献 :

- [1] SINGH D, AGUSTI A, ANZUETO A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease: the gold science committee report 2019[J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(5): 1900164.
- [2] LIEB W, ENSERRO D M, LARSON M G, et al. Residual cardiovascular risk in individuals on lipid-lowering treatment: quantifying absolute and relative risk in the community[J]. *Open Heart*, 2018, 5(1): e000722.
- [3] CHONG J, LEUNG B, POOLE P. Phosphodiesterase 4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 9(9): CD002309.
- [4] HUANG X W, ZHU Z X, GUO X R, et al. The roles of microRNAs in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 335-347.
- [5] THOMSON D W, DINGER M E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(5): 272-283.
- [6] LI Q G, LIANG X, WANG Y W, et al. miR-139-5p inhibits the epithelial-mesenchymal transition and enhances the chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating BCL2[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27157.
- [7] YAN Z F, LIU L L, JIAO L L, et al. Bioinformatics analysis and identification of underlying biomarkers potentially linking allergic rhinitis and asthma[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e924934.
- [8] TSAI M J, CHANG W A, JIAN S F, et al. Possible mechanisms mediating apoptosis of bronchial epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease - a next-generation sequencing approach[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(9): 1489-1496.
- [9] XIA Y Y, HU C X, LIAN L, et al. miR-497 suppresses malignant phenotype in non-small cell lung cancer via targeting KDR[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(1): 443-452.
- [10] RUTLEDGE H, BARAN-GALE J, de VILLENA F P M, et al. Identification of microRNAs associated with allergic airway disease using a genetically diverse mouse population[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 633.
- [11] LI S, JIANG L, YANG Y, et al. MiR-195-5p inhibits the development of chronic obstructive pulmonary disease via targeting siglec1[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2020, 39(10): 1333-1344.
- [12] ZHU M C, YE M S, WANG J, et al. Construction of potential miRNA-mRNA regulatory network in COPD plasma by bioinformatics analysis[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2020, 15: 2135-2145.
- [13] BIERIE B, MOSES H L. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(1): 49-59.
- [14] DERYNCK R, ZHANG Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 577-584.
- [15] KAVSAK P, RASMUSSEN R K, CAUSING C G, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation[J]. *Mol Cell*, 2000, 6(6): 1365-1375.
- [16] MASSAGUÉ J. How cells read TGF-beta signals[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1(3): 169-178.
- [17] FEI J, FU L, CAO W, et al. Low vitamin D status is associated with epithelial-mesenchymal transition in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Immunol*, 2019, 203(6): 1428-1435.
- [18] HE S Y, SUN S H, LU J J, et al. The effects of the miR-21/SMAD7/TGF- β pathway on Th17 cell differentiation in COPD[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 6338.
- [19] AOSHIBA K, NAGAI A, KONNO K. Nicotine prevents a reduction in neutrophil filterability induced by cigarette smoke exposure[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 150(4): 1101-1107.
- [20] SUN J, GU X M, WU N, et al. Human antigen R enhances the epithelial-mesenchymal transition via regulation of ZEB-1 in the human airway epithelium[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 109.
- [21] WANG C, XU J Y, YANG L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China pulmonary health [CPH] study): a national cross-sectional study[J]. *Lancet*, 2018, 391(10131): 1706-1717.
- [22] TIAN X, XUE Y S, XIE G G, et al. (-)-Epicatechin ameliorates cigarette smoke-induced lung inflammation via inhibiting ROS/NLRP3 inflammasome pathway in rats with COPD[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 429: 115674.
- [23] CHOI J Y, RHEE C K. Diagnosis and treatment of early chronic obstructive lung disease (COPD) [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(11): 3426.
- [24] EASTER M, BOLLENBECKER S, BARNES J W, et al. Targeting aging pathways in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6924.
- [25] LI L C, HAN Y Y, ZHANG Z H, et al. Chronic obstructive pulmonary disease treatment and Pharmacist-Led medication management[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 111-124.
- [26] GÓMEZ-CABELLO D, ADRADOS I, GAMARRA D, et al. DGCR8-mediated disruption of miRNA biogenesis induces cellular senescence in primary fibroblasts[J]. *Aging Cell*, 2013, 12(5): 923-931.
- [27] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [28] ANGULO M, LECUONA E, SZNAJDER J I. Role of MicroRNAs in lung disease[J]. *Arch Bronconeumol*, 2012, 48(9): 325-330.

- [29] ALIPOOR S D, ADCOCK I M, GARSSEN J, et al. The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 791: 395-404.
- [30] XIE T, LIANG J R, GUO R S, et al. Comprehensive microRNA analysis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis identifies multiple sites of molecular regulation[J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(9): 479-487.
- [31] CHEN X, SHI C W, WANG C, et al. The role of miR-497-5p in myofibroblast differentiation of LR-MSCs and pulmonary fibrogenesis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40958.
- [32] JI Y, DOU Y N, ZHAO Q W, et al. Paeoniflorin suppresses TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis through a Smad-dependent pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(6): 794-804.
- [33] NAKAO A, SAGARA H, SETOGUCHI Y, et al. Expression of Smad7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway hyperresponsiveness in patients with asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110(6): 873-878.
- [34] NAKAO A, MIIKE S, HATANO M, et al. Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(2): 151-158.
- [35] 薛智文, 李英. 百令胶囊对肺肾两虚型慢性阻塞性肺疾病患者 BODE 指数、生活质量及对外周血 TGF- β 、MMP-9/TIMP-1 表达的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(25): 2822-2826.
- [36] ASCHNER Y, DOWNEY G P. Transforming growth factor- β : master regulator of the respiratory system in health and disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54(5): 647-655.

(李科 编辑)

本文引用格式: 迪拉拉·吐尔逊, 祖力皮喀尔·阿卜杜热合曼, 钟雪梅, 等. MicroRNA-195/497 对香烟烟雾提取物诱导的人支气管上皮细胞中 TGF- β 表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(14): 1-8.

Cite this article as: DILALA T, ZULIPIKAER A, ZHONG X M, et al. Effects of microRNA-195/497 on the expression of TGF- β in human bronchial epithelial cells exposed to CSE[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(14): 1-8.