

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20241121.002

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20241121.1459.004>

BMSCs 通过 miR-132-3p 调控巨噬细胞 M2 型极化减轻脓毒症诱导的急性肺损伤

邓乐秀¹, 王苑娣², 常建亮¹, 李琛³, 朱梓嫣¹, 刘建华³, 彭晓翠¹, 张志华³✉

(1. 河北北方学院研究生院, 河北 张家口 075000; 2. 南华大学研究生院, 湖南 衡阳 421001; 3. 河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症医学科, 河北 张家口 075000)

[摘要] **目的:** 探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)通过 miR-132-3p 调控作用影响巨噬细胞向 M2 型极化, 从而揭示并验证这一过程在缓解脓毒症诱导的急性肺损伤中的潜在机制。 **方法:** 采用 Lipofectamine™ 2000 将 miR-132-3p mimics 转染至 BMSCs 中, 通过盲肠结扎穿刺法诱导脓毒症肺损伤模型后进行 Murine Sepsis Score(MSS)评分。采用 qRT-PCR 检测肺组织 miR-132-3p 表达。H&E 染色观察各组肺组织病理变化。ELISA 检测血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达。Western blot 检测支气管肺泡灌洗液中巨噬细胞 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 和 Arg1、CD206 表达水平。细胞实验: 采用 100 ng/mL 脂多糖(LPS)诱导 RAW264.7 细胞, 将 miR-132-3p mimics 转染到 BMSCs 中, 并与 RAW264.7 共培养。双荧光素酶实验验证 *TRIB1* 是 miR-132-3p 的靶基因。Western blot 检测 RAW264.7 TNF- α 、IL-1 β 、Arg1、CD206、TRIB1、p-NF- κ B p65 表达水平。 **结果:** 动物实验中, 与 Sham 组比较, Model 组中 MSS 评分升高, 肺组织损伤严重, miR-132-3p 表达降低, 血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 显著升高, 肺泡巨噬细胞中 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 升高, Arg1、CD206 降低。与 Model 组比较, BMSCs 组中 MSS 评分降低, 肺组织损伤得到改善, miR-132-3p 表达升高, 血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 显著下降, 肺泡巨噬细胞中 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 下降, Arg1、CD206 升高。而 BMSCs-miR-132-3p-OE 组可进一步改善小鼠上述变化。细胞实验中, 双荧光素酶结果示 miR-132-3p 可靶向作用于 *TRIB1*。与 LPS 组比较, LPS-BMSCs-miR-132-3p-OE 组中 TNF- α 、IL-1 β 、p-NF- κ B p65 降低, miR-132-3p、Arg1、CD206、TRIB1 升高。 **结论:** BMSCs 可通过 miR-132-3p 调控巨噬细胞 M2 型极化减轻脓毒症诱导的急性肺损伤。

[关键词] 急性肺损伤; 骨髓间充质干细胞; 巨噬细胞极化; miR-132-3p

[中图分类号] R459.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)18-1418-09

BMSCs reduce sepsis-induced acute lung injury by regulating macrophage M2 polarization through miR-132-3p

DENG Lexiu¹, WANG Yuandi², CHANG Jianliang¹, LI Chen³, ZHU Ziyang¹, LIU Jianhua³, PENG Xiaocui¹, ZHANG Zhihua³✉

(1. Graduate School, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. Graduate School, Nanhua University, Hengyang 421001, China; 3. Department of Respiratory and Critical Care, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (H2023405053)

[Author]: DENG Lexiu, E-mail: denglexiu1823@163.com.

[Correspondence to]: ZHANG Zhihua, Ph.D., Professor, Chief Physician, E-mail: zzh19641229@163.com.

Received: 2024-07-29

Revised: 2024-11-05

JHMu, 2025;31(18):1418-1426

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] Objective: To explore the regulatory effects of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) through

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(H2023405053)

[作者简介] 邓乐秀, E-mail: denglexiu1823@163.com。

[通讯作者] 张志华, 博士, 教授, 主任医师, E-mail: zzh19641229@163.com。

[收稿日期] 2024-07-29

[修回日期] 2024-11-05

[网络出版时间] 2024-11-21 15:59:56

miR-132-3p affecting the polarization of macrophages towards the M2 type, thereby revealing and verifying the potential mechanism of this process in alleviating sepsis-induced acute lung injury. **Methods:** MiR-132-3p mimics were transfected into BMSCs using Lipofectamine™ 2000. A septic lung injury model was induced *via* cecal ligation and puncture, followed by the assessment of the MSS score. qRT-PCR was employed to measure the expression levels of miR-132-3p in lung tissue. H&E staining was performed to observe the pathological changes in lung tissue across the different experimental groups. ELISA was utilized to quantify the serum levels of TNF α , IL-1 β , and IL-6. Western blot analysis was conducted to evaluate the expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), TNF- α , IL-1 β , Arg1, and CD206 in macrophages isolated from bronchoalveolar lavage fluid. In cell experiments, RAW264.7 cells were induced with 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS), and miR-132-3p mimics were transfected into BMSCs, which were then co-cultured with RAW264.7 cells. A dual-luciferase reporter assay confirmed *TRIB1* as the target gene of miR-132-3p. Western blot analysis was performed again to assess the expression levels of TNF- α , IL-1 β , Arg1, CD206, *TRIB1*, and p-NF- κ B p65 in RAW264.7 cells. **Results:** In animal experiments, the Model group exhibited an increase in the MSS score compared to the Sham group, alongside severe lung tissue damage. Additionally, the expression of miR-132-3p decreased, while serum inflammatory factors such as TNF α , IL-1 β , and IL-6 significantly increased. Alveolar macrophages showed elevated levels of iNOS, TNF- α , and IL-1 β , whereas Arg1 and CD206 levels decreased in these cells. In contrast, the BMSCs group demonstrated a reduction in the MSS score, improved lung tissue damage, and an increase in miR-132-3p expression compared to the Model group. Serum inflammatory factors TNF α , IL-1 β , and IL-6 significantly decreased, along with reductions in iNOS, TNF- α , and IL-1 β , while Arg1 and CD206 levels increased. Furthermore, the BMSCs-miR-132-3p-OE group was found to enhance these changes in mice. In cell experiments, dual-luciferase assays indicated that miR-132-3p can target *TRIB1*. Compared to the LPS group, the LPS-BMSCs-miR-132-3p-OE group exhibited decreased levels of TNF- α , IL-1 β , and p-NF- κ B p65, while levels of miR-132-3p, Arg1, CD206, and *TRIB1* were increased. **Conclusion:** BMSCs can mitigate sepsis-induced acute lung injury by regulating macrophage M2 polarization *via* miR-132-3p.

[**Key words**] Acute lung injury; Bone marrow mesenchymal stem cells; Macrophage polarization; miR-132-3p

脓毒症是由感染导致的宿主免疫系统失调而引发的致命性器官功能障碍。脓毒症可以导致肺功能障碍,诱发急性肺损伤(acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。ALI/ARDS 导致的重症患者死亡率高达约 40%^[1,2]。尽管医疗技术的进步提高了临床诊治能力,但 ALI/ARDS 的死亡率并未显著下降,其发病机制仍需进一步深入研究。

脓毒症继发的 ALI/ARDS 的发病机制主要源于促炎与抗炎反应之间的失衡。具有促炎特性的 M1 型巨噬细胞和具有抗炎特性的 M2 型巨噬细胞在调控脓毒症炎症反应平衡中起到了关键作用^[3,4]。据多项研究报道,通过限制过度的促炎反应和组织损伤,并调节巨噬细胞极化以平衡过度的纤维化和组织修复,已成为治疗 ALI/ARDS 的新颖且有潜力的策略^[5]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为一种新兴的治疗手段,已被广泛应用于肺部疾病的治疗,包括 ALI/ARDS^[6]。外源性的 MSCs 是受损肺组织修复“基地”,可以通过直接作用损伤部位进行修复。或者,转化为肺泡上皮细胞或内皮细胞,从而有效地保护肺部组织。此外, MSCs 还通过旁分泌机制和抗纤维化能力参与肺损伤的炎症反应调控与免疫平衡。

MicroRNA(miRNA),作为一类重要的非编码

小分子 RNA,广泛地参与并调控包括肿瘤在内的各种生理与病理过程,其在 ALI/ARDS 的发生与发展过程中发挥着关键作用。miR-132-3p 是 miRNA 的一种亚型,它通过调控靶基因的表达,在炎症反应、血管生成、肿瘤发生等多个生物过程中发挥着广泛的调控作用。研究发现,miR-132-3p 在 ALI/ARDS 中存在差异性表达^[7,8],过表达 miR-132-3p 能够增强 BMSC 对 ALI/ARDS 的治疗作用^[7],但相关机制尚不清楚。本实验主要探讨 BMSCs 能否通过 miR-132-3p 调控巨噬细胞极化减轻脓毒症诱导的急性肺损伤。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠 BMSCs 和 RAW264.7 细胞株均购于武汉普诺赛生命科技有限公司,miR-132-3p mimics、NC mimics 购自上海基因制药公司,miR-132-3p 引物、U6 引物购自生工生物工程股份有限公司,Lipofectamine™ 2000、TRIzol 试剂和逆转录试剂盒购自美国赛默飞世尔科技公司,脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)购自默克, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 ELISA 试剂盒购自 Abclonal, nitric oxide synthase (iNOS) 抗体(Abcam, 英国), TNF- α 抗体(Abcam, 英国), IL-1 β 抗体(Abcam, 英国), Arg-1 抗体(Abcam, 英国), CD206 抗体(Sigma-Aldrich, 美国), *TRIB1* 抗

体(Sigma-Aldrich, 美国), NF- κ B 抗体(Abcam, 英国), p-NF- κ B(Sigma-Aldrich, 美国), 山羊抗兔 IgG 二抗抗体(Abcam, 英国)。Z480 PCR 仪(Roche, 美国), 光学显微镜(Nikon, 日本), 酶标仪(Rayto, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物 成年雄性 C57BL/6 小鼠, 18~22 g, 上海实验动物研究中心[SYXK(沪)2019-0003], 饲养环境(23±2)℃, 相对湿度 42%~60%, 昼夜交替工作 12 h, 并提供足够的食物和水。本动物实验设计及实施经河北北方学院动物伦理委员会同意(伦理批号: HBNU20220305223038)。

1.2.2 细胞培养 将小鼠 BMSCs 接种于 BMSCs 专用培养基中, 置于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养。RAW264.7 接种于含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.3 小鼠 BMSCs 细胞的转染 当六孔板中的小鼠 BMSCs 融合度达到 50%~60% 时, 进行转染。根据预设条件需要, 实验分为以下两组: miR-132-3p 模拟物阴性对照组(negative control, NC)、miR-132-3p 模拟物组(miR-132-3p mimics, OE)。NC 组和 OE 组转染操作步骤按照 Lipofectamine 2000™说明书进行。转染 48 h 后, 对细胞进行后续实验。

1.2.4 ALI 动物模型 将小鼠随机分为 5 组(每组 $n=10$): 假手术组(Sham 组), 模型组(Model 组), BMSCs 组, BMSCs-miR-132-3p-NC 组, BMSCs-miR-132-3p-OE 组。除 Sham 组外, 其余各组均采用盲肠结扎穿刺法建立脓毒症肺损伤模型。腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉后, 在中线切口(4 mm)暴露盲肠, 用 3-0 丝线结扎盲肠, 在距结扎处 5 mm 用 20 号针穿刺并挤出少许粪便。最后, 将盲肠重新定位和消毒。术后, 所有小鼠均通过皮下注射生理盐水(5 mL/100 g)进行复苏。Sham 组仅翻动盲肠, 不做结扎, 其余步骤同手术组。4 h 后, BMSCs 组小鼠尾静脉注射 BMSCs; BMSCs-miR-132-3p-NC 组小鼠尾静脉注射转染 miR-132-3p-NC 的 BMSCs; BMSCs-miR-132-3p-OE 组小鼠经尾静脉注射转染 miR-132-3p-OE 的 BMSCs; Sham 组和 Model 组小鼠分别经尾静脉注射等量的 PBS。48 h 后, 处死所有小鼠, 分离肺组织, 收集血和肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)进行下次实验。

1.2.5 一般情况观察 采用小鼠脓毒症评分 Murine

Sepsis Score(MSS)评估表^[9], 观察各组小鼠 48 h 后的外观、自主意识、活动度、对刺激的反应、眼睛、呼吸频率、呼吸质量 7 个指标并进行评分。

1.2.6 细胞分组及共培养 采用 100 ng/mL LPS 诱导 RAW264.7 细胞 24 h, 将 LPS 诱导后的 RAW264.7 细胞分 3 组: LPS 组(细胞在 DMEM 中培养), LPS+BMSCs-miR-132-3p-NC 组(用空载体转染 BMSCs 作为阴性对照), LPS+BMSCs-miR-132-3p-OE 组(用 miR-132-3p-OE 质粒转染 BMSCs)。共培养系统: 分别将处理后的 BMSCs 接种到下孔室, RAW264.7 细胞以每孔 10⁵ 的密度接种到 6 孔板的上腔室。共培养的细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 中保存 7 d, 传代 2~3 次。

1.2.7 收集 BALF 和巨噬细胞的分离、培养 处死小鼠后, 暴露肺和气管, 随后用细剪刀在气管上部做一个小切口后插入气管导管并用丝线结扎固定, 向导管内注入 5 mL 4℃预冷的无菌生理盐水灌洗肺部并回 BALF, 重复 3~5 次。将收集的 BALF 于 4℃ 400×g 离心 20 min, 收集上清液 -20℃保存备用。取离心后的沉淀, 4℃预冷的 PBS 洗涤 2 次后, 加入含 10% 胎牛血清, L-谷氨酰胺和青-链霉素的 RPMI 培养基进行重悬, 并置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养, 2 h 后 PBS 轻轻洗涤 2 次, 去除未贴壁细胞, 更换培养液继续培养 24 h 以备后续实验使用。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 检测 实时荧光定量 PCR 检测肺组织中 miR-132-3p 的 mRNA 表达水平。采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。引物序列如下: miR-132-3p 上游引物 5'-TAGTAATGCTATAGCA-3', 下游引物 5'-CGATACATTACGAACG-3'; U6 上游引物 5'-CCGATGACGATCAGGCT-3', 下游引物 5'-TGCGGATAGACGACA-3'。实时荧光定量 PCR 在 Z480 PCR 仪上进行。反应条件: 95℃预变性 10 min, 95℃变性 15 s, 60℃退火 20 s, 70℃延伸 60 s, 合计 40 个循环。U6 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 计算^[10]。

1.2.9 H&E 染色 将小鼠的肺组织进行取材, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋后切片(4 μ m), 切片经脱蜡、水化、H&E 染色、脱水、透明和中性树胶封固操作后, 光学显微镜下观察并采集图像。

1.2.10 ELISA 取血样, 放入抗凝血血管中, 1 000×g 离心 10 min。然后, 根据制造商的说明,

使用ELISA试剂盒测量TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的浓度。为了确定特异性,将抗原涂覆在ELISA板上(每孔100 μ L),在37 $^{\circ}$ C下孵育4 h,然后丢弃液体。然后用5%小牛血清在37 $^{\circ}$ C下封闭样品40 min,洗涤3次,加入反应孔(每孔100 μ L)40~60 min,然后与抗体在37 $^{\circ}$ C下孵育60 min。洗涤3次后,加入显色底物。最后,用酶标仪在450 nm波长下测定OD值,并以TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的浓度为基础。

1.2.11 双荧光素酶测定 应用miRNA靶基因在线预测网站Starbase(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)对miR-132-3p靶基因进行预测,筛选TRIB1作为其可能的靶分子。根据LipofectamineTM 2000转染试剂说明书将pmirGLOTRIB1-WT、pmirGLO-TRIB1-MUT的荧光素酶基因报告质粒及miR-132-3p-OE及mimics NC分别转入RAW264.7细胞中,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱培养6 h后换为含10% FBS和1%青霉素/链霉素的RPMI常规培养液。转染48 h后,采用双荧光素酶报告基因检测系统检测萤火虫和肾素酶的活性。

1.2.12 蛋白质印迹分析 使用RIPA裂解液裂解提取总蛋白。使用BCA蛋白检测试剂测定蛋白浓度。用8%~12% SDS-PAGE凝胶分离并转移到PVDF膜上。5%脱脂牛奶室温封闭1 h,一抗iNOS(1:1 000),TNF- α (1:100),IL-1 β (1:1 000),Arg-1(1:5 000),CD206(1:2 000),TRIB1(1:1 000),NF- κ B(1:5 000),p-NF- κ B(1:50)4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜。回收一抗,抗兔二抗(1:100)孵育1 h,使用ECL化学发光试剂盒进行显影, β -actin作为内参进行比较分析,使用ImageJ软件进行条带灰度值分析。

1.3 统计学处理

所有统计分析和图形均使用GraphPad Prism 9.0软件和ImageJ软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。不服从正态分布的计量资料,使用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠MSS评分

对比观察各组小鼠的MSS评分以初步评估建模效果。结果显示:与Sham组相比,Model组MSS评分升高($t=156.50, P < 0.01$),给予BMSCs治疗后,BMSCs组与Model组相比,MSS评分降低($t=$

27.30, $P < 0.01$),而转染miR-132-3p mimics后,BMSCs-miR-132-3p-OE组与BMSCs组、BMSCs-miR-132-3p-NC组和Model组相比,MSS评分降低(分别为 $t=45.45, P < 0.01$; $t=17.79, P < 0.01$),BMSCs-miR-132-3p-NC组与BMSCs组差异无统计学意义($t=0.38, P > 0.05$),见图1。

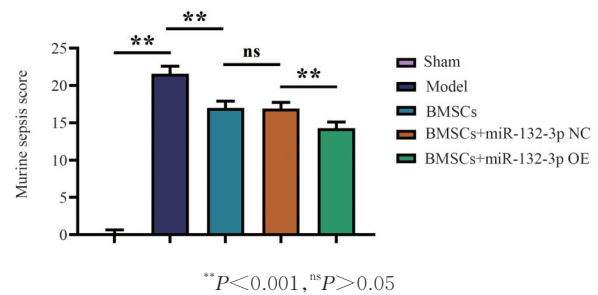


图1 各组小鼠MSS评分

Fig 1 MSS scores of mice in each group

2.2 各组小鼠肺组织中miR-132-3p的表达

脓毒症肺损伤小鼠模型尾静脉注射BMSCs-miR-132-3p-OE实验结果显示:与Sham组相比,Model组miR-132-3p表达显著下降($t=3.96, P < 0.01$),给予BMSCs治疗后,BMSCs组与Model组相比,miR-132-3p表达显著升高($t=14.56, P < 0.01$),而转染miR-132-3p mimics后,BMSCs-miR-132-3p-OE组与BMSCs组、BMSCs-miR-132-3p-NC组和Model组相比,miR-132-3p表达显著升高(分别为 $t=5.31, P < 0.01$; $t=5.54, P < 0.01$),BMSCs-miR-132-3p-NC组与BMSCs组差异无统计学意义($t=0.33, P > 0.05$),见图2。

2.3 BMSCs-miR-132-3p-OE注射可减少脓毒症小鼠的肺损伤,促进巨噬细胞向M2极化

肺组织H&E染色结果显示:Model组小鼠肺组

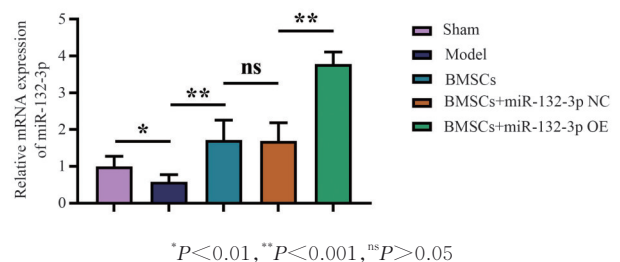
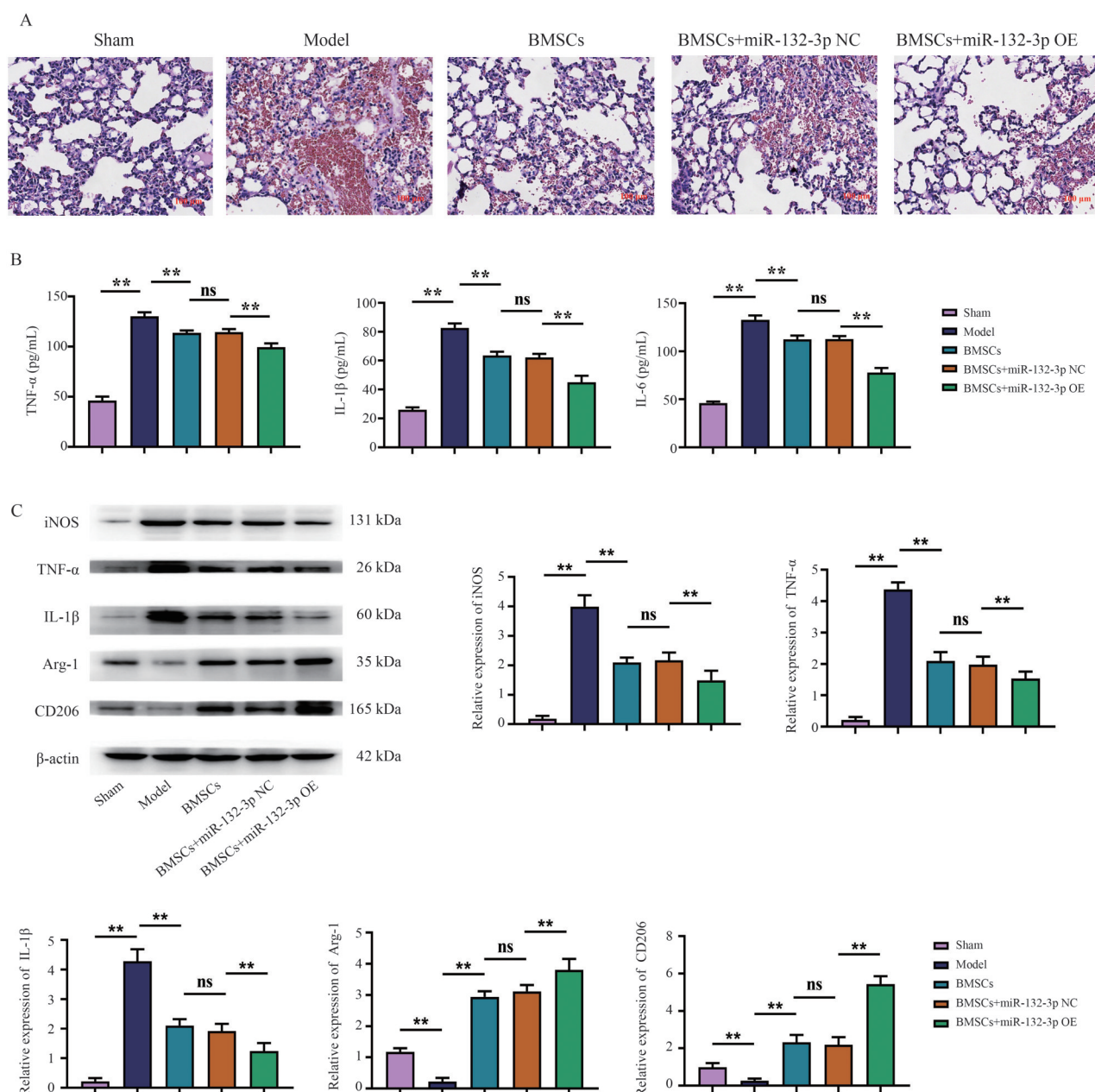


图2 RT-qPCR检测肺组织中miR-132-3p水平

Fig 2 RT-qPCR detection of miR-132-3p levels in lung tissue

织水肿、出血,肺泡间隔增厚,可见炎症细胞渗出;给予BMSCs治疗后,可以改善肺组织损伤,与Model组相比,BMSCs组肺组织水肿、出血程度减轻,炎症细胞浸润减少,肺泡间隔增厚改善。BMSC-miR-132-3p-OE组的肺损伤程度较BMSCs组和BMSC-miR-132-3p-NC组(图3A)在肺泡结构、肺出血和炎症细胞浸润方面有不同程度的改善。上述结果表

明,BMSCs-miR-132-3p-OE注射可减少脓毒症肺损伤程度从而利于提高治疗效果。血清中炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 和IL-6的结果显示:Model组 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 和IL-6的相对蛋白表达显著高于Sham组($P<0.001$);与Model组相比,BMSCs组、BMSCs-miR-132-3p-NC组和BMSCs-miR-132-3p-OE组 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 和IL-6的相对蛋白表达显著降低($P<$



A: H&E染色评估肺损伤情况($\times 100$); B: ELISA测定血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 和IL-6的表达; C: Western blot检测BALF巨噬细胞iNOS、 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、Arg-1和CD206蛋白表达水平; ** $P<0.001$, $^{ns}P>0.05$

图3 BMSCs-miR-132-3p-OE注射可减少脓毒症小鼠的肺损伤,促进巨噬细胞向M2极化

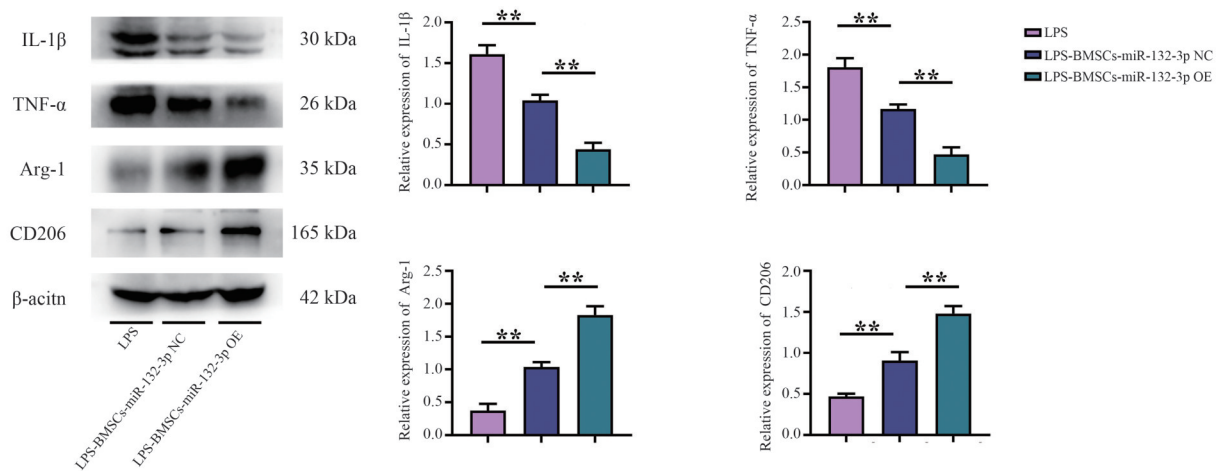
Fig 3 BMSCs-miR-132-3p-OE injection reduces lung injury in septic mice and promotes macrophage polarization towards M2

0.001)。BMSCs-miR-132-3p-OE组TNF α 、IL-1 β 和IL-6的相对蛋白表达明显低于BMSCs组和BMSCs-miR-132-3p-NC组($P<0.001$),见图3B。结果提示:BMSCs-miR-132-3p-OE注射可以减轻炎症反应,并可能与巨噬细胞的M2型极化有关。BALF巨噬细胞的iNOS、TNF α 、IL-1 β (M1标志物)和Arg1、CD206(M2标志物)表达水平检测结果显示:与Sham组相比,Model组、BMSCs组、BMSCs-miR-132-3p-NC组和BMSCs-miR-132-3p-OE组中iNOS、TNF α 和IL-1 β 蛋白表达升高($P<0.001$),而Arg1、CD206蛋白表达降低($P<0.001$);与Model组相比,BMSCs组、BMSCs-miR-132-3p-NC组和BMSCs-miR-132-3p-OE组中iNOS、TNF α 和IL-1 β 蛋白表达显著降低($P<0.001$),而Arg1、CD206蛋白表达升高($P<0.01$);与BMSCs和BMSCs-miR-132-3p-NC组相比,BMSCs-miR-132-

3p-OE组iNOS、TNF α 、IL-1 β 的蛋白表达显著降低($P<0.001$),而Arg1、CD206蛋白表达显著升高($P<0.001$),见图3C。结果提示BMSCs-miR-132-3p-OE注射可以促进肺泡巨噬细胞的M2型极化。

2.4 BMSCs-miR-132-3p-OE可促进LPS诱导巨噬细胞的M2型极化

将BMSCs-miR-132-3p-OE与LPS诱导的RAW264.7细胞共培养,结果显示:与LPS组相比,LPS-BMSCs-miR-132-3p-NC组中的TNF α 和IL-1 β 蛋白表达显著降低($P<0.001$),Arg1和CD206蛋白表达显著升高($P<0.001$);与LPS-BMSCs-miR-132-3p-NC组相比,LPS-BMSCs-miR-132-3p-OE组TNF α 和IL-1 β 蛋白表达进一步降低($P<0.001$),Arg1和CD206蛋白表达进一步升高($P<0.001$),见图4。结果提示BMSCs-miR-132-3p-OE可抑制炎症反应,促进RAW264.7向M2型极化。



Western blot检测各组IL-1 β 、TNF α 、Arg1和CD206蛋白表达水平; ** $P<0.001$

图4 BMSCs-miR-132-3p-OE可促进LPS诱导巨噬细胞的M2型极化

Fig 4 BMSCs-miR-132-3p-OE can promote LPS-induced M2 polarization of macrophages

2.5 miR-132-3p与TRIB1靶向关系验证

Starbase生信分析预测结果显示miR-132-3p和TRIB1具有靶向关系(图5A),TRIB1是miR-132-3p的靶点之一。双荧光素酶实验验证结果显示:在TRIB1-WT中,miR-132-3p-OE组的相对荧光素酶活性显著高于miR-132-3p-NC组($t=9.92$, $P<0.001$);在TRIB1-MUT组中,miR-132-3p-OE组和miR-132-3p的相对荧光素酶活性无显著差异($t=0.81$, $P>0.05$)(图5B)。Western blot检测TRIB1蛋白表达水平实验结果发现,与BMSCs-miR-132-

3p-NC组相比,BMSCs-miR-132-3p-OE组TRIB1蛋白表达量显著增高($P<0.001$)(图5C)。结果提示:TRIB1是miR-132-3p的靶基因之一。

2.6 转染miR-132-3p对信号通路的影响

巨噬细胞p-NF- κ B p65蛋白表达的检测结果显示,与BMSCs-miR-132-3p-NC相比,BMSCs-miR-132-3p-OE组p-NF- κ B p65的蛋白表达量显著降低($P<0.001$),见图6。结果提示miR-132-3p过表达可以抑制NF- κ B信号通路。

MSCs是一类源自中胚层的成体干细胞,它们不仅具备自我更新的能力,还拥有多向分化的潜能^[14]。目前,MSCs已被广泛应用于免疫性疾病和组织损伤性疾病的治疗中,其在ALI/ARDS动物模型中的疗效也已得到了广泛验证^[15,16]。研究发现^[17],MSCs可以通过分泌多种miRNA来影响周围细胞的行为和功能。这些miRNA可以包装在细胞外囊泡中,被输送到受体细胞中,从而调节受体细胞的基因表达^[18]。通过这种方式,MSCs可以远程调控靶细胞的功能,促进组织修复和再生,或者抑制炎症反应和细胞凋亡等。miR-132-3p是一种保守的miRNA,已被证明在结直肠癌^[19]、胃癌^[20]、乳腺癌^[21]中表达,是一种肿瘤抑制调控因子。近期研究发现,miR-132-3p除了在肿瘤中发挥作用外,miR-132-3p还积极参与调控炎症反应。Zhou等^[22]的研究指出,当上调miR-132-3p的表达后,经IL-1 β 诱导的颞下颌关节软骨细胞聚集聚糖和II型胶原的细胞增殖活性和表达水平升高,细胞凋亡率和炎症因子水平降低。本研究发现,BMSCs可减轻肺损伤程度,降低血清炎症因子TNF α 、IL-1 β 和IL-6水平,增加BALF中的巨噬细胞iNOS、TNF- α 、IL-1 β 表达和降低Arg1、CD206表达。而miR-132-3p过表达BMSCs可进一步减轻肺损伤程度,降低血清炎症因子TNF α 、IL-1 β 和IL-6水平,增加BALF中的巨噬细胞iNOS、TNF- α 、IL-1 β 表达和降低Arg1、CD206表达。上述结果表明,miR-132-3p过表达BMSCs可促进巨噬细胞向M2型极化,减轻炎症反应和肺损伤程度。

TRIB1属于Tribbles家族,是一种连接蛋白,参与免疫相关转录因子的蛋白质降解,对巨噬细胞的分化起着关键作用。TRIB1的缺失不仅导致骨髓中巨噬细胞数目显著减少,也会导致脾脏、肺和脂肪组织中巨噬细胞数目显著减少^[23]。此外,研究发现^[24]TRIB1下游功能通路NF- κ B具有广泛的调控作用。NF- κ B通过影响一系列促炎因子如TNF- α 、iNOS和IL-6的表达来调控炎症反应^[25]。这些促炎因子与M1型巨噬细胞的活化过程紧密相关。本研究通过线上网站预测和双荧光素酶实验证明了TRIB1是miR-132-3p靶蛋白,且BMSCs-miR-132-3p-OE组成功上调TRIB1的表达。同时BMSCs-miR-132-3p-OE组p-NF- κ B p65的蛋白表达水平显著降低。上述结果表明,miR-132-3p过表达BMSCs可能通过靶向TRIB1、

抑制NF- κ B信号通路激活,从而调控巨噬细胞向M2型极化。

综上所述,miR-132-3p过表达的BMSCs可促进脓毒症ALI小鼠巨噬细胞M1型向M2型极化。且miR-132-3p过表达BMSCs可能通过TRIB1/NF- κ B信号通路调节巨噬细胞的极化方向减轻炎症反应。本课题组将进一步探讨动物层面与基因之间相关机制的发生、发展。

作者贡献度说明:

张志华:构思该研究的思路及研究的设计;王苑娣、常建亮、朱梓嫣、彭晓翠:进行相关实验;刘建华,李琛:数据分析及做相关统计;邓乐秀:撰写手稿并进行修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 Bauer M, Gerlach H, Vogelmann T, et al. Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America, and Australia between 2009 and 2019-Results from a systematic review and meta-analysis [J]. Crit Care, 2020, 24 (1): 239.
- 2 Liu Y, Yao Y, Yu M, et al. Frequency and mortality of sepsis and septic shock in China: A systematic review and meta-analysis [J]. BMC Infect Dis, 2022, 22 (1): 564.
- 3 Wang J, Li R, Peng Z, et al. GTS-21 reduces inflammation in acute lung injury by regulating M1 polarization and function of alveolar macrophages [J]. Shock, 2019, 51(3): 389-400.
- 4 Zhuo Y, Li D, Cui L, et al. Treatment with 3,4-dihydroxyphenylethyl alcohol glycoside ameliorates sepsis-induced ALI in mice by reducing inflammation and regulating M1 polarization [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 116: 109012.
- 5 Zhu D, Chen C, Liu X, et al. Osteosarcoma cell proliferation suppression *via* SHP-2-mediated inactivation of the JAK/STAT3 pathway by tubocapsenolide A [J]. J Adv Res, 2021, 34: 79-91.
- 6 Mao G, Gong C, Wang Z, et al. BMSC-derived exosomes ameliorate sulfur mustard-induced acute lung injury by regulating the GPRC5A-YAP axis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(12): 2082-2093.
- 7 Liu J, Li C, Cao L, et al. Exosomal miR-132-3p from mesenchymal stem cells alleviated LPS-induced acute lung injury by repressing TRAF6 [J]. Autoimmunity, 2021, 54(8): 493-503.
- 8 Liu Y, Bao C, Deng G, et al. Arid2-IR downregulates miR-132-3p through methylation to promote

- LPS-induced ALI in pneumonia [J]. *Inhal Toxicol*, 2022, 34(11-12): 297-303.
- 9 Mele TS. Scoring sepsis severity in mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2321: 155-159.
- 10 Johnston JM, Angyal A, Bauer RC, et al. Myeloid Tribbles 1 induces early atherosclerosis *via* enhanced foam cell expansion [J]. *Sci Adv*, 2019, 5 (10) : eaax9183.
- 11 Mota RF, Cavalcanti De Araújo PH, Cezine ME, et al. RANKL impairs the TLR4 pathway by increasing TRAF6 and RANK interaction in macrophages [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 7740079.
- 12 Liu L, Guo H, Song A, et al. Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization *via* NF- κ B and MAPK pathways [J]. *BMC Immunol*, 2020, 21 (1): 32.
- 13 Sun X, Gao Y, Li Z, et al. Magnetic responsive hydroxyapatite scaffold modulated macrophage polarization through PPAR/JAK-STAT signaling and enhanced fatty acid metabolism [J]. *Biomaterials*, 2023, 295: 122051.
- 14 Liu C, Xiao K, Xie L. Advances in mesenchymal stromal cell therapy for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 951764.
- 15 Luo Y, Lin S, Mao X, et al. Overexpression of FoxM1 enhanced the protective effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through the activation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 8324504.
- 16 Wang F, Zhou L, Qiang X, et al. Mesenchymal stromal cells attenuate infection-induced acute respiratory distress syndrome in animal experiments: A meta-analysis [J]. *Cell Transplant*, 2020, 29: 963689720969186.
- 17 Peng W, Yang Y, Chen J, et al. Small extracellular vesicles secreted by iPSC-Derived MSCs ameliorate pulmonary inflammation and lung injury induced by sepsis through delivery of miR-125b-5p [J]. *J Immunol Res*, 2023, 2023: 8987049.
- 18 Liu Y, Zhang Z, Wang B, et al. Inflammation-stimulated MSC-derived small extracellular vesicle miR-27b-3p regulates macrophages by targeting CSF-1 to promote temporomandibular joint condylar regeneration [J]. *Small*, 2022, 18(16): e2107354.
- 19 Zhang M, Li Y, Wang H, et al. LncRNA SNHG5 affects cell proliferation, metastasis and migration of colorectal cancer through regulating miR-132-3p/CREB5 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(4): 524-536.
- 20 He L, Qu L, Wei L, et al. Reduction of miR-132-3p contributes to gastric cancer proliferation by targeting MUC13 [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 3055-3061.
- 21 Li S, Xu J, Zhang Q. MicroRNA-132-3p inhibits tumor malignant progression by regulating lysosomal-associated protein transmembrane 4 beta in breast cancer [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(10): 3098-3109.
- 22 Zhou L, Chen D, Liu P, et al. miR-132-3p participates in the pathological mechanism of temporomandibular joint osteoarthritis by targeting PTEN [J]. *Arch Oral Biol*, 2022, 142: 105511.
- 23 Satoh T, Kidoya H, Naito H, et al. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages [J]. *Nature*, 2013, 495(7442): 524-528.
- 24 Wu Z, Xiang Y, Zhu X, et al. Icaritin represses the inflammatory responses and survival of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by regulating the TRIB1/TLR2/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 110: 108991.
- 25 Pflug KM, Sitcheran R. Targeting NF- κ B-Inducing kinase (NIK) in immunity, inflammation, and cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8470.

[本文编辑] 雷燕 宋睿璞 陈思润