

miR-146b-5p在高氧诱导的新生大鼠肺血管重塑中的作用：基于铁死亡的调控机制

王薇¹ 赵婷² 王彦梅² 谢鸥¹ 王乐²

(1.新疆医科大学儿科学院, 新疆乌鲁木齐 830017;

2.新疆医科大学第一附属医院新生儿科, 新疆乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的** 探讨 miR-146b-5p 在高氧诱导的新生大鼠支气管肺发育不良相关肺动脉高压 (bronchopulmonary dysplasia-associated pulmonary hypertension, BPD-PH) 肺血管重塑中的作用及机制。**方法** 选取 32 只 Sprague-Dawley 新生大鼠, 随机分为常氧组、BPD-PH 组、过表达组和抑制剂组, 每组 8 只。常氧组于 21% 氧浓度环境中饲养, 其余 3 组置于 $85.0\% \pm 0.5\%$ 的高氧箱中构建 BPD-PH 模型。其中过表达组经尾静脉注射腺病毒 ADV1-miR-146b-5p, 抑制剂组注射 miR-146b-5p 抑制剂。建模 14 d 后, 采用共聚焦显微镜观察腺病毒在肺组织中的转染效率; 采用直接测压法测定右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP), 分离右心室组织称重并计算右心室肥厚指数 (right ventricular hypertrophy index, RVHI); 苏木精-伊红染色观察肺血管形态并计算血管中膜厚度百分比 (medial thickness percentage, MT%)、血管中膜面积百分比 (medial area percentage, MA%); 透射电子显微镜观察肺血管内皮细胞线粒体的超微结构; 3,3'-二氨基联苯胺普鲁士蓝染色和亚铁离子试剂盒检测肺组织铁沉积水平; 实时荧光定量 PCR 检测核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、长链酰基辅酶 A 合成酶 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) mRNA 表达水平, 免疫印迹法检测 Nrf2、GPX4、SLC7A11、ACSL4 蛋白表达水平。**结果** 与常氧组比较, BPD-PH 组新生大鼠 RVSP 升高, RVHI、MT%、MA% 增大, 线粒体肿胀, 铁沉积增多, Nrf2、GPX4、SLC7A11 mRNA 及蛋白表达下调, ACSL4 mRNA 及蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。与 BPD-PH 组比较, 过表达组新生大鼠 RVSP 升高, RVHI、MT%、MA% 增大, 线粒体重度肿胀, 铁沉积明显增多, Nrf2、GPX4、SLC7A11 mRNA 及蛋白表达下调, ACSL4 mRNA 及蛋白表达上调 ($P < 0.05$); 抑制剂组 RVSP 降低, RVHI、MT%、MA% 减小, 线粒体肿胀缓解, 铁沉积减少, Nrf2、GPX4、SLC7A11 mRNA 及蛋白表达上调, ACSL4 mRNA 及蛋白表达下调 ($P < 0.05$)。**结论** 在高氧暴露下, miR-146b-5p 过表达可促进新生大鼠肺血管重塑, 其机制可能与抑制 Nrf2/GPX4 信号通路、调控铁死亡有关。

[中国当代儿科杂志, 2026, 28 (7): 885-892]

[关键词] 支气管肺发育不良相关肺动脉高压; miR-146b-5p; 肺血管重塑; 铁死亡; 新生大鼠

Role of miR-146b-5p in hyperoxia-induced pulmonary vascular remodeling in neonatal rats: mechanisms based on the regulation of ferroptosis

WANG Wei, ZHAO Ting, WANG Yan-Mei, XIE Ou, WANG Le. Department of Neonatology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China (Wang L, Email: wangle200727@163.com)

Abstract: Objective To investigate the role and mechanism of miR-146b-5p in pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with bronchopulmonary dysplasia-associated pulmonary hypertension (BPD-PH) induced by hyperoxia. **Methods** Thirty-two Sprague-Dawley neonatal rats were randomly assigned to normoxia group, BPD-PH group, overexpression group, and inhibitor group ($n=8$ per group). The normoxia group was raised in 21% oxygen, while the

[收稿日期] 2025-12-02; [接受日期] 2026-04-17

[基金项目] 自治区重点研发计划项目 (2024B03038-1); “天山英才”医药卫生高层次人才培养计划 (TSYC202401A041)。

[作者简介] 王薇, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 王乐, 女, 主任医师, 副教授。Email: wangle200727@163.com。

other groups were exposed to $85.0\% \pm 0.5\%$ hyperoxia to induce BPD-PH. The overexpression group received tail vein injection of ADV1-miR-146b-5p adenovirus; the inhibitor group received miR-146b-5p inhibitor injections. After 14 days, adenovirus transfection efficiency in lung tissue was confirmed by confocal microscopy. Right ventricular systolic pressure (RVSP) was measured by direct manometry. Right ventricular hypertrophy index (RVHI) was calculated by weighing isolated ventricular tissues. Hematoxylin-eosin staining was used to assess pulmonary vascular morphology, and medial thickness percentage (MT%) and medial area percentage (MA%) of pulmonary vessels were calculated. Mitochondrial ultrastructure of pulmonary vascular endothelial cells was observed by transmission electron microscopy (TEM). Iron deposition in lung tissue was detected by DAB Prussian blue staining and ferrous ion colorimetric assay. Quantitative real-time PCR was used to measure mRNA expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), glutathione peroxidase 4 (GPX4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4). Protein expression levels of these molecules were detected by Western blotting. **Results** Compared with the normoxia group, the BPD-PH group showed significantly increased RVSP, RVHI, MT%, and MA% ($P < 0.05$), swollen mitochondria, increased iron deposition, downregulated mRNA and protein expression of Nrf2, GPX4, and SLC7A11, and upregulated expression of ACSL4 ($P < 0.05$). Compared with the BPD-PH group, the overexpression group exhibited further increases in RVSP, RVHI, MT%, and MA%, severe mitochondrial swelling, significantly elevated iron deposition, decreased Nrf2, GPX4, and SLC7A11 mRNA and protein levels, and increased ACSL4 expression ($P < 0.05$). In contrast, the inhibitor group demonstrated decreased RVSP, RVHI, MT%, and MA%, alleviated mitochondrial swelling, reduced iron deposition, upregulated mRNA and protein levels of Nrf2, GPX4, and SLC7A11, and downregulated mRNA and protein levels of ACSL4 ($P < 0.05$). **Conclusions** Overexpression of miR-146b-5p promotes pulmonary vascular remodeling in neonatal rats exposed to hyperoxia, likely through inhibition of the Nrf2/GPX4 signaling pathway and regulation of ferroptosis.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2026, 28(7): 885-892]

Key words: Bronchopulmonary dysplasia-associated pulmonary hypertension; miR-146b-5p; Pulmonary vascular remodeling; Ferroptosis; Neonatal rat

新生儿重症医学的发展显著提升了超早产儿与极低出生体重儿的存活率，但也使得支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 的发病率随之升高。支气管肺发育不良相关肺动脉高压 (bronchopulmonary dysplasia-associated pulmonary hypertension, BPD-PH) 作为 BPD 的严重并发症，已成为影响患儿远期预后的重要因素^[1-4]。BPD-PH 病理生理基础主要包括肺血管重塑^[5]、发育异常及气道高反应性。目前因缺乏有效的早期干预靶点与治疗策略，该病仍是新生儿呼吸领域亟待解决的临床难题^[6]。

miR-146b-5p 是微小 RNA 家族的重要成员，参与调控细胞增殖、凋亡、炎症反应等多种生物学过程^[7]。已有研究显示，miR-146b-5p 在高氧性肺损伤小鼠模型中异常高表达，并可通过 Wnt 信号通路参与 BPD 的发生发展^[8]。

研究证实，高氧诱导的小鼠肺损伤存在氧化应激失衡与铁代谢紊乱，二者是铁死亡的关键诱发因素^[9]。铁死亡为脂质过氧化驱动的程序性细胞死亡，其调控机制涉及多条信号通路及关键蛋白^[10-13]。其中，核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 作为抗氧化核心转录因子，可通过激活下游靶基因抑制脂质过氧化，进而拮抗铁死亡；胱氨酸转运体溶质载

体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 为谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 合成提供底物，谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 则依赖 GSH 清除脂质过氧化物，二者共同构成铁死亡核心抑制轴；长链酰基辅酶 A 合成酶 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 可通过调控不饱和脂肪酸代谢、提高脂质过氧化底物水平促进铁死亡。Li 等^[14]研究证实，miR-146b-5p 可靶向含溴结构域蛋白 4 调控 Nrf2 信号通路，进而发挥细胞保护作用。

尽管 miR-146b-5p 对 Nrf2 通路的调控作用，以及 Nrf2/GPX4 轴在 BPD 铁死亡中的作用已得到证实，但 miR-146b-5p 能否通过 Nrf2/GPX4 轴调控铁死亡，并参与 BPD-PH 的病理生理过程，目前尚未见报道。据此，本研究提出假设：miR-146b-5p 可能通过调控铁死亡介导肺血管结构损伤、促进肺血管重塑，进而参与 BPD-PH 的发生与发展。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

主要仪器：BL-420S 生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司)，S1006-S 常量氧浓度控制系统 (上海玉研仪器有限公司)，HT7800 透射电子显微

镜（北京日立科学仪器有限公司），BX61WI 激光共聚焦显微镜（日本 Olympus 公司），Nikon Eclipse E100 光学显微镜（日本 Nikon 公司）等。

主要试剂：miR-146b-5p 过表达腺病毒与 miR-146b-5p 抑制剂（上海吉玛制药技术有限公司）；S1066S 亚铁离子检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；Nrf2 多克隆抗体、GPX4 单克隆抗体、SLC7A11 单克隆抗体、ACSL4 单克隆抗体（杭州华安生物技术有限公司，抗体货号分别为 ER1706-41、ET1706-45、HA600098、HA750469）。引物均由上海生工生物工程股份有限公司提供。

1.2 实验分组及处理

取日龄 12 h 内的 Sprague-Dawley 新生大鼠 32 只，随机分为 4 组（常氧组、BPD-PH 组、过表达组和抑制剂组， $n=8$ ）。建模前 12 h，过表达组经尾静脉注射腺病毒 ADV1-miR-146b-5p（100 μL ，滴度 1×10^{11} PFU/mL），抑制剂组注射 miR-146b-5p 抑制剂（按当天所称的乳鼠体重，80 mg/kg^[8]，生理盐水溶解），其余 2 组给予等体积生理盐水。腺病毒及抑制剂剂量参照文献 [8] 并经预实验优化，以确保 miR-146b-5p 稳定过表达或有效抑制。本研究经新疆医科大学第一附属医院医学伦理委员会

批准（审批号：IACUC-JT-20250114-09），动物使用许可证号：SCXK（新）2018-0003。

1.3 构建 BPD-PH 新生大鼠模型

参照既往研究方法^[15]，构建高氧诱导新生大鼠 BPD-PH 模型。常氧组置于 21% 氧浓度环境中饲养；BPD-PH 组、过表达组及抑制剂组新生大鼠与母鼠共同置于常压高氧箱，每 12 h 与常氧组母鼠互换以避免氧中毒；氧浓度由氧浓度控制仪维持在 $85.0\% \pm 0.5\%$ ，除湿风扇自动排出多余 CO_2 与水蒸气，昼夜节律 12 h/12 h，环境温度 25~28 $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 55%~60%。常氧组除氧浓度外，其余饲养条件与其他 3 组均保持一致。实验期间若新生大鼠死亡，及时补充相同条件新生大鼠，各组均于建模 14 d 后取材。本研究中所有实验均进行 3 次独立重复。

1.4 评估腺病毒在肺组织中的转染效果

建模 14 d 后，取各组新生大鼠右肺组织，经多聚甲醛固定 10 h，脱水后以铝箔避光包裹，包埋制备冰冻切片；切片复温后用丙酮固定，DAPI 染色并封片，采用共聚焦显微镜观察腺病毒载体绿色荧光蛋白的表达。左肺组织于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存，采用实时荧光定量 PCR 检测 miR-146b-5p 转录水平，引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量聚合酶链反应引物序列

基因名称	正向序列	反向序列
miR-146b-5p	5'-CGGCGGTCCATTCTTTGGAT-3'	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
Nrf2	5'-GGTTGCCACATTCCCAAAC-3'	5'-CTCTCAACGTGGCTGGGAAT-3'
GPX4	5'-CTCCATGCACGAATTCGCAG-3'	5'-GGCATGCAGATCGACTAGCT-3'
SLC7A11	5'-GAGGTTACCTGCAGGGCAAT-3'	5'-TGAAGATGCCCCGATCCGATG-3'
ACSL4	5'-CTGAAGGACTGGCAGGAAGG-3'	5'-TCACCACTGCAAAACCACCT-3'
GAPDH	5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3'	5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'

1.5 直接测压法测定各组新生大鼠右心室收缩压，称重右心室并计算右心室肥厚指数

参照课题组前期方法^[16-17]，建模 14 d 后以 10% 水合氯醛（0.3 mL/100 g）腹腔注射麻醉大鼠，仰卧固定，气管切开插管并连接呼吸机；取腹正中切口，暴露膈肌。采用预充肝素生理盐水的 4.5 号头皮针于心尖部进行穿刺，经三通阀连接压力传感器，使用 BL-420S 系统记录右心室收缩压（right ventricular systolic pressure, RVSP），反映肺动脉收缩压。测压后放血处死大鼠，剥离心房与大血管，分离右心室并吸干称重，计算右心室肥厚指数（right ventricular hypertrophy index, RVHI），

以右心室壁重量与左心室壁和室间隔重量之和的比值表示。

1.6 观察各组新生大鼠肺血管并计算血管中膜厚度百分比、血管中膜面积百分比

收集各组大鼠右肺组织，制备石蜡切片，并行苏木精-伊红染色。每张切片随机选取 8 支直径 100~150 μm 的肺动脉，于光学显微镜下观察血管形态，采用 Image J 软件测定肺血管重塑指标：血管中膜厚度百分比（medial thickness percentage, MT%）= $[(\text{血管总直径} - \text{管腔直径}) / \text{血管总直径}] \times 100\%$ ，血管中膜面积百分比（medial area percentage, MA%）=（血管中膜面积/血管总横截面

积) × 100%。

1.7 透射电子显微镜观察各组新生大鼠肺血管内皮细胞线粒体的超微结构

取各组新生大鼠肺组织,经电镜固定液固定后制备电镜包埋块;先切0.8 μm半薄切片,甲苯胺蓝染色后再切成90 nm超薄切片,铜网裱贴。经乙酸铀-柠檬酸铅电子染色后,采用透射电子显微镜观察肺血管内皮细胞线粒体的超微结构。

1.8 3,3'-二氨基联苯胺普鲁士蓝染色和亚铁离子试剂盒检测各组新生大鼠肺组织中的铁沉积

石蜡切片经脱蜡至水后,滴加1:1配制的Perls染色液孵育20 min;蒸馏水冲洗,3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)普鲁士蓝显色,苏木精复染1 min;常规脱水、透明、封片,光镜下观察并采集图像。取右肺组织于4℃匀浆,离心后取上清并测定蛋白浓度;绘制铁离子标准曲线,采用酶标仪检测593 nm波长处吸光度,按公式[亚铁离子浓度(nmol/mg)=样品浓度×总稀释倍数×组织裂解总体积/样品质量]计算亚铁离子含量。

1.9 实时荧光定量PCR检测各组新生大鼠肺组织Nrf2、GPX4、SLC7A11、ACSL4的mRNA水平

各组大鼠肺组织匀浆后,采用TRIzol法提取总RNA,通过实时荧光定量PCR检测基因表达。反应条件:95℃预变性10 s,95℃变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸60 s,共40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对转录水平。引物序列见表1。

1.10 免疫印迹法检测各组新生大鼠肺组织Nrf2、GPX4、SLC7A11、ACSL4的蛋白表达

采用RIPA裂解液提取肺组织总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜及封闭后,分别加入Nrf2(1:1 000)、GPX4(1:1 000)、SLC7A11(1:1 000)、ACSL4(1:1 000)及GAPDH(1:5 000)一抗,4℃孵育过夜。次日孵育二抗2 h,洗涤后曝光显影。采用Image J软件以积分光密度为测量模式,滚动球半径50像素扣除背景,以GAPDH为内参计算目的蛋白相对表达量。

1.11 统计学分析

采用SPSS 27.0软件进行统计学分析,采用GraphPad Prism 10.1.2软件绘图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时组间两两比较采用LSD-*t*检验,方

差不齐时采用Tamhane's T2检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒载体转染效果鉴定

实验期间,各组新生大鼠均存活,未出现死亡。激光共聚焦显微镜下,过表达组肺组织支气管黏膜与肺泡可见明显散在绿色荧光,其余3组仅见蓝色细胞核荧光,见图1。实时荧光定量PCR结果显示,常氧组、BPD-PH组、过表达组和抑制剂组miR-146b-5p转录水平分别为 1.06 ± 0.10 、 3.85 ± 0.22 、 7.24 ± 0.23 、 2.50 ± 0.17 ,差异有统计学意义($F = 1592.988$, $P < 0.001$)。组间两两比较显示,与常氧组相比,BPD-PH组、过表达组和抑制剂组miR-146b-5p表达上调($P < 0.05$);与BPD-PH组相比,过表达组新生大鼠miR-146b-5p表达上调($P < 0.05$),抑制剂组新生大鼠miR-146b-5p表达下调($P < 0.05$)。

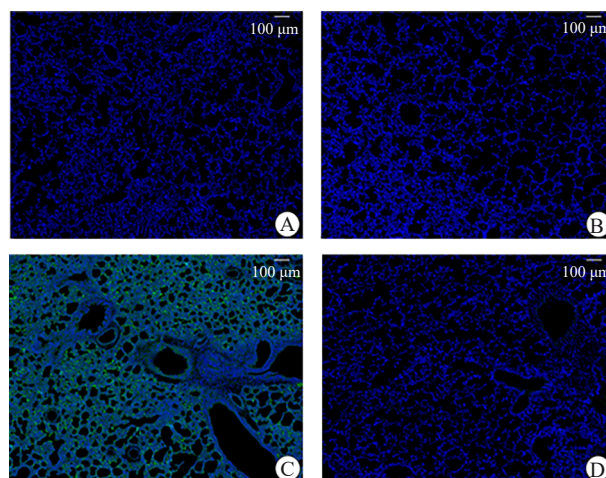


图1 腺病毒的转染效果(激光共聚焦显微镜, ×100) A:常氧组;B:BPD-PH组;C:过表达组;D:抑制剂组。绿色荧光为携带miR-146b-5p的腺病毒,蓝色荧光为DAPI标记的细胞核;常氧组、BPD-PH组和抑制剂组几乎看不见绿色荧光,过表达组可见明显绿色荧光。

2.2 miR-146b-5p对新生大鼠右心室及肺血管重塑指标的影响

与常氧组相比,BPD-PH组新生大鼠RVSP升高,RVHI、MT%、MA%增大($P < 0.05$)。与BPD-PH组相比,过表达组RVSP升高,RVHI、MT%、MA%增大($P < 0.05$);抑制剂组RVSP降低,RVHI、MT%、MA%减小($P < 0.05$)。见表2。苏木精-伊红染色结果显示,常氧组肺动脉管腔通畅无

狭窄、管壁光滑、厚薄均匀；BPD-PH 组肺动脉管壁明显增厚、管腔狭窄，病理改变显著；过表达组肺动脉管壁增厚及管腔狭窄程度明显重于其余 3

组；抑制剂组肺动脉仍可见管壁增厚、管腔狭窄，但病变程度较 BPD-PH 组减轻。见图 2。

表 2 各组新生大鼠右心室收缩压、肥厚指标及肺血管形态学指标比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	RVSP (mmHg)	RVHI	MT%	MA%
常氧组	20.0 ± 0.4	0.261 ± 0.006	36.5 ± 0.6	52.5 ± 1.2
BPD-PH 组	27.9 ± 0.6 ^a	0.453 ± 0.010 ^a	51.1 ± 0.7 ^a	67.3 ± 0.8 ^a
过表达组	32.7 ± 0.4 ^{a,b}	0.499 ± 0.006 ^{a,b}	56.1 ± 0.9 ^{a,b}	73.4 ± 1.4 ^{a,b}
抑制剂组	25.3 ± 0.5 ^{a,b}	0.405 ± 0.009 ^{a,b}	45.9 ± 0.8 ^{a,b}	62.9 ± 1.3 ^{a,b}
<i>F</i> 值	916.059	1229.879	972.143	438.281
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：[BPD-PH] 支气管肺发育不良相关肺动脉高压；[RVSP] 右心室收缩压；[RVHI] 右心室肥厚指数；[MT%] 血管中膜厚度百分比；[MA%] 血管中膜面积百分比。^a与常氧组比较， $P<0.05$ ；^b与 BPD-PH 组比较， $P<0.05$ 。

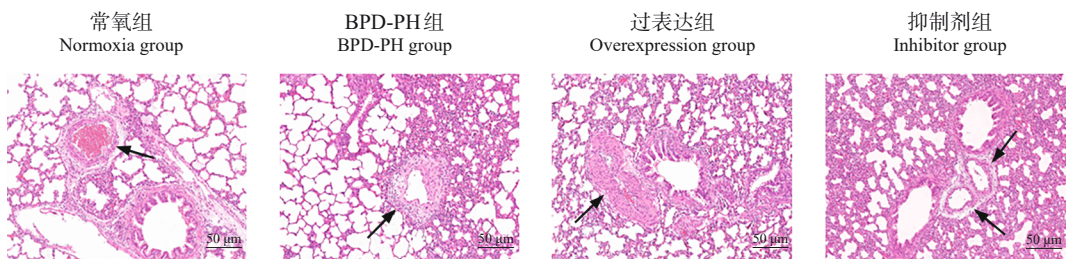


图 2 各组新生大鼠肺血管形态 (苏木精-伊红染色，光学显微镜， $\times 200$) 常氧组肺血管结构完整，血管壁光滑、厚薄均匀，管腔通畅无狭窄；BPD-PH 组肺血管壁增厚、管腔狭窄；过表达组肺血管管壁增厚与管腔狭窄程度高于 BPD-PH 组；抑制剂组肺血管病理改变较 BPD-PH 组减轻。红色为细胞质，蓝色为细胞核。箭头所指为肺血管。

2.3 miR-146b-5p 对新生大鼠肺血管内皮细胞线粒体的影响

常氧组肺血管内皮细胞线粒体形态完整，膜结构清晰、嵴突清晰可辨；BPD-PH 组线粒体肿

胀、嵴紊乱伴局部断裂；过表达组线粒体重度肿胀，部分膜结构破损，嵴广泛破坏；抑制剂组线粒体损伤程度减轻，仅见轻度肿胀、膜局部破损及嵴缺失。见图 3。

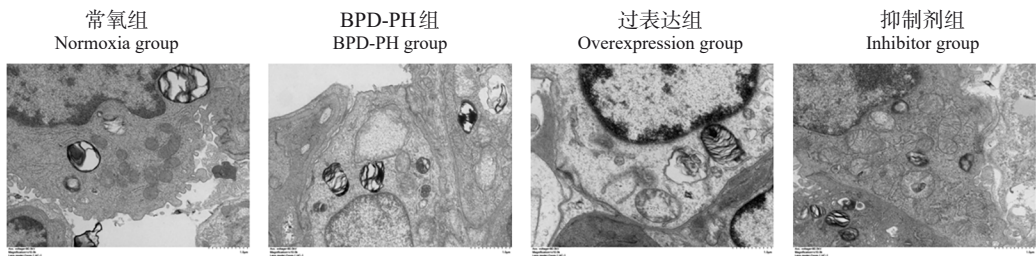


图 3 各组新生大鼠肺血管内皮细胞线粒体超微结构 (透射电子显微镜，80 kV， $\times 10\,000$) 常氧组线粒体形态规整，呈卵圆形或短棒状，结构完整；BPD-PH 组线粒体肿胀，形态不规则，嵴稀疏；过表达组线粒体重度肿胀，嵴消失；抑制剂组线粒体轻度肿胀，嵴部分缺失。

2.4 miR-146b-5p 对各新生大鼠肺组织中铁沉积的影响

常氧组大鼠肺组织未见棕色颗粒沉积，亚铁离子水平处于正常范围。与常氧组比较，BPD-PH

组肺组织可见棕色颗粒沉积，亚铁离子含量显著升高 ($P<0.05$)；与 BPD-PH 组比较，过表达组颗粒沉积增多，亚铁离子水平进一步升高 ($P<0.05$)，抑制剂组颗粒沉积减少、亚铁离子含量显著降低

($P<0.05$)。见图 4、表 3。

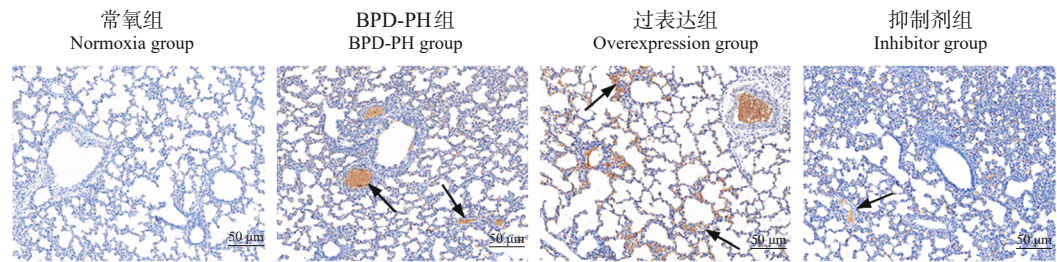


图 4 各组新生大鼠肺组织 DAB 普鲁士蓝染色 (光学显微镜, $\times 200$) 常氧组肺血管及周围肺组织未见明显棕色阳性颗粒; BPD-PH 组肺血管壁及周围间质内可见大量棕色阳性颗粒; 过表达组肺血管壁、血管周围间质及肺泡间隔内可见大量棕色阳性颗粒; 抑制剂组肺血管及肺组织可见少量棕色阳性颗粒。箭头所指为棕色阳性颗粒。

表 3 各组新生大鼠肺组织亚铁离子及各 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Fe ²⁺ (nmol/mg)	Nrf2	GPX4	SLC7A11	ACSL4
常氧组	42 ± 11	0.992 ± 0.035	0.88 ± 0.10	1.04 ± 0.06	1.02 ± 0.10
BPD-PH 组	109 ± 15 ^a	0.682 ± 0.027 ^a	0.62 ± 0.07 ^a	0.59 ± 0.06 ^a	1.61 ± 0.11 ^a
过表达组	213 ± 10 ^{a,b}	0.379 ± 0.024 ^{a,b}	0.37 ± 0.06 ^{a,b}	0.20 ± 0.11 ^{a,b}	2.14 ± 0.20 ^{a,b}
抑制剂组	60 ± 6 ^{a,b}	0.850 ± 0.029 ^{a,b}	0.76 ± 0.06 ^{a,b}	0.80 ± 0.09 ^{a,b}	1.32 ± 0.16 ^{a,b}
F 值	393.384	657.533	71.078	152.987	83.294
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: [BPD-PH] 支气管肺发育不良相关肺动脉高压; [Fe²⁺] 亚铁离子; [Nrf2] 核因子 E2 相关因子 2; [GPX4] 谷胱甘肽过氧化物酶 4; [SLC7A11] 溶质载体家族 7 成员 11; [ACSL4] 长链酰基辅酶 A 合成酶 4。^a与常氧组比较, $P<0.05$; ^b与 BPD-PH 组比较, $P<0.05$ 。

2.5 miR-146b-5p 对各组新生大鼠肺组织 Nrf2、GPX4、SLC7A11、ACSL4 mRNA 表达的影响

与常氧组相比, BPD-PH 组新生大鼠 Nrf2、GPX4、SLC7A11 mRNA 水平下调, ACSL4 mRNA 水平上调 ($P<0.05$); 与 BPD-PH 组相比, 过表达组 Nrf2、GPX4、SLC7A11 mRNA 水平下调, ACSL4 mRNA 水平上调 ($P<0.05$); 抑制剂组 Nrf2、GPX4、SLC7A11 mRNA 水平上调, ACSL4 mRNA 水平下调 ($P<0.05$)。见表 3。

2.6 miR-146b-5p 对各组新生大鼠肺组织 Nrf2、GPX4、SLC7A11、ACSL4 蛋白表达的影响

与常氧组相比, BPD-PH 组新生大鼠 Nrf2、GPX4、SLC7A11 蛋白表达下调, ACSL4 蛋白表达上调 ($P<0.05$); 与 BPD-PH 组相比, 过表达组 Nrf2、GPX4、SLC7A11 蛋白表达下调, ACSL4 蛋白表达上调 ($P<0.05$), 抑制剂组 Nrf2、GPX4、

SLC7A11 蛋白表达上调, ACSL4 蛋白表达下调 ($P<0.05$)。见图 5、表 4。

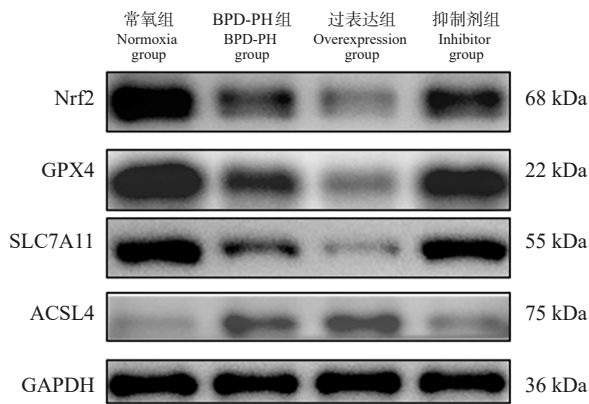


图 5 免疫印迹法检测 Nrf2、GPX4、SLC7A11 和 ACSL4 蛋白表达条带图 [Nrf2] 核因子 E2 相关因子 2; [GPX4] 谷胱甘肽过氧化物酶 4; [SLC7A11] 溶质载体家族 7 成员 11; [ACSL4] 长链酰基辅酶 A 合成酶 4。

表 4 各组新生大鼠肺组织各蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	Nrf2	GPX4	SLC7A11	ACSL4
常氧组	0.935 ± 0.025	1.17 ± 0.07	1.11 ± 0.07	0.48 ± 0.03
BPD-PH 组	0.441 ± 0.014 ^a	0.55 ± 0.09 ^a	0.55 ± 0.06 ^a	0.76 ± 0.04 ^a
过表达组	0.219 ± 0.033 ^{a,b}	0.16 ± 0.06 ^{a,b}	0.24 ± 0.04 ^{a,b}	1.11 ± 0.03 ^{a,b}
抑制剂组	0.692 ± 0.059 ^{a,b}	0.75 ± 0.13 ^{a,b}	0.73 ± 0.10 ^{a,b}	0.57 ± 0.04 ^{a,b}
<i>F</i> 值	562.682	164.927	231.864	514.854
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: [BPD-PH] 支气管肺发育不良相关肺动脉高压; [Nrf2] 核因子 E2 相关因子 2; [GPX4] 谷胱甘肽过氧化物酶 4; [SLC7A11] 溶质载体家族 7 成员 11; [ACSL4] 长链酰基辅酶 A 合成酶 4。^a与常氧组比较, $P<0.05$; ^b与 BPD-PH 组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

BPD-PH 是导致早产儿晚期死亡及远期心肺功能障碍的重要原因, 其核心病理特征为肺血管重塑, 可引发肺动脉压力持续升高与右心负荷增加。目前临床以利尿剂减轻右心负荷、磷酸二酯酶抑制剂短期降低肺动脉压等对症治疗为主^[18], 难以逆转已发生的肺血管重塑, 亟需探寻新的干预靶点以改善患儿预后。

表观遗传学为阐释非 DNA 序列依赖的基因表达调控机制提供了重要理论依据, 微小 RNA 作为关键非编码 RNA, 在表观遗传调控网络中占据重要地位, 且与 BPD-PH 的发生发展存在密切关联^[19]。本研究显示, 新生大鼠经高氧暴露 14 d 后, 肺组织 miR-146b-5p 表达上调, 伴肺血管重塑、右心室肥厚及肺动脉压力显著升高; 过表达 miR-146b-5p 可进一步加重上述损伤, 呈正向调控作用; 而抑制 miR-146b-5p 表达则可显著改善相关指标。提示 miR-146b-5p 在高氧诱导的 BPD-PH 中发挥促病效应, 与既往相关研究结果^[8]一致。

铁死亡为新型程序性细胞死亡方式, 核心机制为 GSH-GPX4 抗氧化系统失衡, 引发脂质活性氧大量堆积, 进而破坏细胞膜完整性并诱发线粒体结构异常^[20]。研究证实, 硫氧还蛋白相互作用蛋白可通过下调 SLC7A11/GPX4 通路介导肺组织细胞铁死亡, 而铁死亡抑制剂可减轻肺损伤^[21]。在少突胶质前体细胞氧糖剥夺模型中, miR-146b-5p 可通过靶向含溴结构域蛋白 4 调控 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1/Nrf2/GPX4 通路, 进而抑制铁死亡。鉴于 miR-146b-5p 的靶基因具有细胞与疾病特异性, 其在 BPD-PH 中的调控通路仍需进一步验证。本研究电镜观察结果显示, BPD-PH 组、过表达组及抑制剂组肺血管内皮细胞线粒体均出现铁死亡样形态学损伤, 其中过表达组损伤最为显著。据

此推测, miR-146b-5p 可能通过调控线粒体功能或铁死亡过程参与肺血管重塑, 进而初步阐明其在高氧诱导的新生大鼠肺血管重塑中的作用。

本研究存在局限性: 仅在动物模型水平验证 miR-146b-5p 的作用, 未开展细胞实验与临床样本验证; 相关靶点与通路的临床转化仍需深入探索。未来可开发雾化吸入靶向制剂^[22]或靶向纳米递送系统^[23]实现局部高效干预, 以减轻肺血管重塑与肺泡损伤, 为临床转化提供实验依据。

综上, 本研究表明, 高氧诱导 miR-146b-5p 过表达可加剧新生大鼠肺血管重塑, 其机制可能与抑制 Nrf2/GPX4 通路、促进铁死亡有关, 为 BPD-PH 的机制研究与干预策略提供了新思路。

作者贡献声明: 王薇负责实验设计、实验实施、文章撰写; 赵婷负责实验实施、数据整理; 王彦梅负责作图和统计分析; 谢鸥负责实验实施、数据收集; 王乐负责论文审阅与指导、经费支持。

利益冲突声明: 所有作者声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Mascarenhas D, Al-Balushi M, Al-Sabahi A, et al. Pulmonary hypertension in preterm neonates with bronchopulmonary dysplasia: a meta-analysis[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2025, 110(4): 344-352. PMID: 39603794. DOI: 10.1136/archdischild-2024-327547.
- [2] Li B, Qu SS, Li LX, et al. Risk factors and clinical outcomes of pulmonary hypertension associated with bronchopulmonary dysplasia in extremely premature infants: a systematic review and meta-analysis[J]. Pediatr Pulmonol, 2024, 59(12): 3117-3129. PMID: 39177287. DOI: 10.1002/ppul.27220.
- [3] 王陈红, 陈军津, 葛佳静, 等. 早产儿早期肺动脉高压的危险因素及近期预后[J]. 中华儿科杂志, 2022, 60(7): 682-687. PMID: 35768356. DOI: 10.3760/cma.j.cn112140-20211222-01068.

- [4] 周应祯, 王婷, 付星梦, 等. 支气管肺发育不良的预后[J]. 中国当代儿科杂志, 2025, 27(1): 115-120. PMID: 39825661. PMCID: PMC11750241. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2406004.
- [5] Jia Z, Wang S, Yan H, et al. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. *J Pers Med*, 2023, 13(2): 366. PMID: 36836600. PMCID: PMC9967990. DOI: 10.3390/jpm13020366.
- [6] 梁若冰, 朱巧棉, 刘建萍, 等. 早产儿支气管肺发育不良相关肺动脉高压治疗进展[J]. 国际儿科学杂志, 2023, 50(3): 154-158. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4408.2023.03.003.
- [7] Bofill-De Ros X, Vang Ørom UA. Recent progress in miRNA biogenesis and decay[J]. *RNA Biol*, 2024, 21(1): 1-8. PMID: 38031325. PMCID: PMC10761092. DOI: 10.1080/15476286.2023.2288741.
- [8] Long Y, Luo Y, Hu L, et al. Targeting miR-146b-5p to regulate KDM6B expression aggravates bronchopulmonary dysplasia[J]. *Mol Biotechnol*, 2024, 66(8): 2078-2086. PMID: 37584827. DOI: 10.1007/s12033-023-00849-1.
- [9] Chou HC, Chen CM. Hyperoxia induces ferroptosis and impairs lung development in neonatal mice[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(4): 641. PMID: 35453326. PMCID: PMC9032171. DOI: 10.3390/antiox11040641.
- [10] Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282. PMID: 33495651. PMCID: PMC8142022. DOI: 10.1038/s41580-020-00324-8.
- [11] Luo Y, Zhang Z, Xi S, et al. Bioinformatics analyses and experimental validation of ferroptosis-related genes in bronchopulmonary dysplasia pathogenesis[J]. *PLoS One*, 2024, 19(6): e0291583. PMID: 38875180. PMCID: PMC11178182. DOI: 10.1371/journal.pone.0291583.
- [12] Fang C, Tu H, Li R, et al. Bronchopulmonary dysplasia: analysis and validation of ferroptosis-related diagnostic biomarkers and immune cell infiltration features[J]. *Pediatr Res*, 2024, 96(7): 1673-1680. PMID: 38760473. DOI: 10.1038/s41390-024-03249-6.
- [13] Zhang F, Liu H. Identification of ferroptosis-associated genes exhibiting altered expression in pulmonary arterial hypertension [J]. *Math Biosci Eng*, 2021, 18(6): 7619-7630. PMID: 34814266. DOI: 10.3934/mbe.2021377.
- [14] Li X, Zhang W, Xiao M, et al. MicroRNA-146b-5p protects oligodendrocyte precursor cells from oxygen/glucose deprivation-induced injury through regulating Keap1/Nrf2 signaling via targeting bromodomain-containing protein 4[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513(4): 875-882. PMID: 31003769. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.045.
- [15] Yang M, Chen Y, Huang X, et al. ETS1 ameliorates hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia in mice by activating Nrf2/HO-1 mediated ferroptosis[J]. *Lung*, 2023, 201(4): 425-441. PMID: 37490064. PMCID: PMC10444662. DOI: 10.1007/s00408-023-00639-1.
- [16] 谢鸥, 李珊珊, 罗洋, 等. 2-甲氧基雌二醇对新生大鼠缺氧性肺动脉高压的保护作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2024, 26(7): 757-764. PMID: 39014954. PMCID: PMC11562046. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2401078.
- [17] 谢鸥, 李珊珊, 罗洋, 等. HIF-1 α 调控 TRPC6 在新生大鼠 HPH 肺血管重塑中的作用机制研究[J]. 新疆医科大学学报, 2025, 48(7): 918-923. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2025.07.007.
- [18] Dillon K, Lamba V, Philip RR, et al. Efficacy of sildenafil in infants with bronchopulmonary dysplasia-associated pulmonary hypertension[J]. *Children (Basel)*, 2023, 10(8): 1397. PMID: 37628395. PMCID: PMC10453183. DOI: 10.3390/children10081397.
- [19] Siddaiah R, Oji-Mmuo C, Aluquin VPR, et al. Multiomics endotyping of preterm infants with bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension: a pilot study[J]. *Pulm Circ*, 2023, 13(2): e12232. PMID: 37123538. PMCID: PMC10142061. DOI: 10.1002/pul2.12232.
- [20] Song X, Hao X, Zhu BT. Role of mitochondrial reactive oxygen species in chemically-induced ferroptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 223: 473-492. PMID: 38992393. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.07.006.
- [21] Chen D, Yin F, Yang P, et al. TXNIP mediates ferroptosis in a bronchopulmonary dysplasia mouse model by regulating the SLC7A11/GPX4 pathway[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 35188. PMID: 41062622. PMCID: PMC12508065. DOI: 10.1038/s41598-025-19092-6.
- [22] Ruan Q, Peng Y, Yi X, et al. The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid alleviates hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia via inhibiting ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2025, 82: 103579. PMID: 40117887. PMCID: PMC11981817. DOI: 10.1016/j.redox.2025.103579.
- [23] Lan J, Chen X, Xu F, et al. Self-assembled miR-134-5p inhibitor nanoparticles ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia (BPD) via suppressing ferroptosis[J]. *Mikrochim Acta*, 2023, 190(12): 491. PMID: 38030848. PMCID: PMC10687138. DOI: 10.1007/s00604-023-06069-3.

(本文编辑: 王颖)

©《中国当代儿科杂志》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 4.0 协议)
© Editorial Office of Chinese Journal of Contemporary Pediatrics. OA under CC BY-NC-ND 4.0 license)