

[文章编号] 1000-4718(2019)04-0710-08

miR-181a 参与调控香烟提取物诱导的 NR8383 肺泡巨噬细胞自噬紊乱与促炎因子的生成*

梁珍珍[△], 吕燕平, 张艳莉, 解玉东, 韩丽丽
(周口市中心医院呼吸科, 河南 周口 466000)

[摘要] **目的:** 探讨微小 RNA-181a(miR-181a)对香烟提取物(CSE)诱导的 NR8383 大鼠肺泡巨噬细胞自噬紊乱与促炎因子生成的影响。**方法:** 采用 5%、10% 和 20% 浓度的 CSE 刺激 NR8383 细胞, ELISA 法检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6) 和 IL-8 的分泌, RT-qPCR 检测 miR-181a 水平, Cyto-ID 染色检测自噬体数量, Western blot 法检测 LC3-II、beclin-1 和 p62 的表达。在 20% CSE 条件下, 采用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)或自噬激动剂雷帕霉素(Rapa)预处理细胞, ELISA 检测 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的分泌; 进一步转染 miR-181a mimic 或 miR-181a inhibitor 后, 分别采用 ELISA 和 Western blot 观察在 20% CSE 条件下, 细胞 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 分泌及 LC3-II、beclin-1 和 p62 表达的情况。**结果:** CSE 浓度依赖性促进 NR8383 细胞促炎因子生成和自噬紊乱; 3-MA 促进 CSE 诱导的 NR8383 细胞促炎因子释放, 而 Rapa 部分逆转 CSE 诱导的 NR8383 细胞促炎因子释放; miR-181a mimic 显著抑制 CSE 诱导的 NR8383 细胞促炎因子生成, 促进自噬, miR-181a inhibitor 促进 CSE 诱导的 NR8383 细胞促炎因子生成, 加剧自噬紊乱。**结论:** miR-181a 调控 CSE 诱导的 NR8383 细胞促炎因子释放可能与其调控自噬紊乱有关。

[关键词] 微小 RNA-181a; 肺泡巨噬细胞; 慢性阻塞性肺疾病; 炎症; 自噬

[中图分类号] R563; R363.2

[文献标志码] A

doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.04.021

miR-181a regulates CSE-induced autophagy dysfunction and releases of pro-inflammatory factors in NR8383 alveolar macrophages

LIANG Zhen-zhen, LÜ Yan-ping, ZHANG Yan-li, XIE Yu-dong, HAN Li-li

(Department of Respiratory Medicine, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou 466000, China. E-mail: 2260470793@qq.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of microRNA-181a (miR-181a) on cigarette smoke extract (CSE)-induced autophagy disorder and releases of pro-inflammatory factors in NR8383 rat alveolar macrophages. **METHODS:** The NR8383 cells were treatment with 5%, 10% and 20% CSE. The release levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-8 were measured by ELISA. The level of miR-181a was detected by RT-qPCR. The numbers of autophagosomes were observed by Cyto-ID staining. The expression levels of LC3-II, beclin-1 and p62 were determined by Western blot. NR8383 cells were pretreated with autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) or autophagy agonist rapamycin (Rapa) before treatment with 20% CSE, and the release levels of TNF- α , IL-6 and IL-8 were measured by ELISA. Furthermore, NR8383 cells were transfected with miR-181a mimic or miR-181a inhibitor before treatment with 20% CSE, and the release levels of TNF- α , IL-6 and IL-8, and the expression of LC3-II, beclin-1 and p62 were detected by ELISA and Western blot, respectively. **RESULTS:** CSE increased release levels of pro-inflammatory factors and autophagy disorder in a concentration-dependent manner in the NR8383 cells ($P < 0.05$). 3-MA increased CSE-induced releases of pro-inflammatory factors. However, Rapa partially reversed CSE-induced releases of pro-inflammatory factors. Additionally, miR-181a mimic inhibited CSE-induced releases of pro-inflammatory factors and promoted autophagy. However, miR-181a inhibitor increased CSE-induced releases of pro-inflammatory factors and autophagy disorder. **CONCLUSION:** miR-181a regulates CSE-induced releases of pro-inflammatory factor in the NR8383 cells, which may be related to the regu-

[收稿日期] 2018-08-01

[修回日期] 2018-09-04

* [基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目 (No. 201401011)

[△]通讯作者 Tel: 0394-8521617; E-mail: 2260470793@qq.com

latory role of miR-181a in autophagy disorder.

[KEY WORDS] MicroRNA-181a; Alveolar macrophages; Chronic obstructive pulmonary disease; Inflammation; Autophagy

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以持续性呼吸气流受限为主要特征的慢性气道炎性疾病,严重威胁着人类的生命健康,造成严重的经济负担^[1]。据统计,20%的吸烟者会发展为 COPD,终身吸烟者有 50% 发展为 COPD^[2]。而自噬在 COPD 发生和进展发挥着重要作用^[3-5]。有研究发现,在 COPD 患者和香烟提取物(cigarette smoke extract, CSE)暴露的小鼠肺组织切片的分析中发现, beclin-1 和 LC3 的蛋白水平升高^[3]。Li 等^[4]在支气管上皮细胞研究中发现,在香烟提取物刺激下,自噬基因 *LC3* 表达上调,炎症因子释放的水平增强,两者呈正相关。Chen 等^[5]在细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和香烟提取物诱导的小鼠 COPD 模型发现支气管肺泡灌洗液中炎症细胞和炎症因子生成增多,同时伴随着自噬基因 *beclin-1* 表达上调。肺泡巨噬细胞是肺脏防御系统的第一道防线,暴露于香烟烟雾状态下的肺泡巨噬细胞自噬水平异常,代谢紊乱,炎症因子分泌失常,可导致气道炎症发生与进展^[6]。因此,研究肺泡巨噬细胞自噬调节作用对解释 COPD 发生与进展机制具有重要意义。

最近研究发现,微小 RNA-181a (microRNA-181a, miR-181a) 参与肺部炎症发生与进展^[7-9]。而关于 miR-181a 调控肺泡巨噬细胞自噬与炎症方面的研究偏少。本研究以大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 为研究对象,观察 miR-181a 对 CSE 条件下 NR8383 细胞自噬和促炎因子分泌的影响,从一个新角度认识 miR-181a 在 COPD 炎症反应中的调控作用,为评估 miR-181a 是否可作为防治 COPD 的新靶点提供更多的理论依据。

材 料 和 方 法

1 材料与试剂

大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383 购于中国科学院上海细胞库。胎牛血清购于 PAA; Ham's F12-K 培养基购于 Gibco; Cyto-ID 细胞自噬体检测试剂盒购于 ENZO; 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)和自噬激动剂雷帕霉素(rapamycin, Rapa)购于 Sigma; 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-8 ELISA 试剂盒购于武汉博士德生物公司; 抗 LC3-II、beclin-1、p62 和 GAPDH 抗体于购自 Santa Cruz; miR-

181a 引物、miR-181a mimic (miR-181a-m)、mimic negative control (NC-m) 和 miR-181a inhibitor (miR-181a-i) 和 inhibitor negative control (NC-i) 由上海吉玛公司合成; Western blot 实验试剂套装购于广州赖德生物公司。

2 香烟提取物的制备

参照 Kent 等^[10]文献方法进行提取 CSE。取 20 支市售黄金叶牌香烟(焦油量 11 mg, 烟碱量 1.0 mg, 一氧化碳量 11 mg) 完全燃烧后产生的烟雾溶于 20 mL 无血清 Ham's F12-K 培养基中, 0.22 μm 微孔过滤, 此培养基视为 CSE 母液。实验采用的 CSE 浓度为此培养基所占终体积的稀释比例。

3 实验方法

3.1 细胞培养与 CSE 处理 NR8383 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 Ham's F12-K 培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中, 每 2 d 换液 1 次。取 NR8383 细胞以 $1 \times 10^6/\text{L}$ 的密度接种于 6 孔板, 采用终浓度为 5%、10% 和 20% CSE 分别刺激细胞 48 h。RT-qPCR 检测 miR-181a 的表达水平; ELISA 检测细胞培养液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的水平; 并采用 Spearman 相关分析法分析 miR-181a 的表达水平与 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平的相关性。

3.2 miR-181a mimic 与 miR-181a inhibitor 的转染实验 按照转染说明书步骤, 进行 miR-181a mimic 和 miR-181a inhibitor 转染。取 LipofectamineTM 3000 溶于 100 μL 无血清培养基, 孵育 5 min; miR-181a mimic、NC-m、miR-181a inhibitor 和 NC-i 分别溶于 100 μL 无血清培养基, 孵育 10 min; 取含有 LipofectamineTM 3000 的无血清培养基分别与含有 miR-181a mimic、NC-m、miR-181a inhibitor 和 NC-i 的无血清培养基轻柔混匀, 室温孵育 25 min; 将混合物分别加入 800 μL 含有 1×10^6 个 NR8383 细胞的无血清培养基中孵育 6 h; 500 $\times g$ 离心细胞 5 min, 弃旧培养基, 更换为 6 mL 含 10% 胎牛血清培养基继续培养细胞 48 h。此细胞用于后续实验。

3.3 细胞分组 细胞分组为正常对照组(control 组, 细胞正常培养)、CSE 处理组(20% CSE 处理细胞)、CSE + miR-181a-m 组(20% CSE 处理 miR-181a mimic 转染的细胞)、CSE + NC-m 组(20% CSE 处理 NC-m 转染的细胞)、CSE + miR-181a-i 组(20% CSE 处理 miR-181a inhibitor 转染的细胞)、CSE + NC-i 组

(20% CSE 处理 NC-i 转染的细胞)、3-MA 组(5 mmol/L 3-MA 处理细胞)、CSE + 3-MA 组(5 mmol/L 3-MA 预处理细胞 30 min,再用 20% CSE 处理细胞)、Rapa 组(100 nmol/L Rapa 处理细胞)和 CSE + Rapa 组(100 nmol/L Rapa 预处理细胞 30 min,再用 20% CSE 处理细胞)。以上各组细胞以 1×10^9 /L 的密度接种于 6 孔板,继续培养 48 h,进行后续实验。

3.4 ELISA 检测 取各组已处理后的 NR8383 细胞,800 × *g* 离心细胞 5 min,离心收集各组细胞培养液,每组取 100 μL 细胞培养液转入已被抗体包被的 96 孔酶标板,按照对应 ELISA 试剂盒说明书进行检测 TNF-α、IL-6 和 IL-8 的含量。

3.5 自噬体的检测 取各组已处理后的 NR8383 细胞,1 000 × *g* 离心 5 min 收集细胞,PBS 重悬 2 次,按照 Cyto-ID 细胞自噬体检测试剂盒说明书方法,用 250 μL 试剂盒缓冲液制备单细胞悬液并转入激光共聚焦培养皿,加入 250 μL Cyto-ID 自噬检测试剂,室温避光 30 min,激光共聚焦显微镜下(激发波长 $E_x = 488$ nm,发射波长 $E_m = 530$ nm)拍照,各组采用 Image-Pro Plus 6.0 软件扫描 100 个细胞,并统计每组平均单个细胞中 Cyto-ID 自噬点数。

3.6 RT-qPCR 实验 提取各组已处理后 NR8383 细胞的总 RNA,然后逆转录为 cDNA。利用 TaqMan MicroRNA Assay Kit 的说明书,RT-qPCR 检测 miR-181a 的表达水平。各组细胞的 cDNA、TaqMan MicroRNA Master Mix 和 miR-181a 的正反向引物序列先 95 °C 孵育 5 min,然后进行 45 个循环(95 °C 15 s、55 °C 30 s、74 °C 25 s)进行 qPCR,以 U6 作为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算表达水平。

miR-181a 的上游引物序列为 5'-TCACTCCTCTC-CTCCCG-3',下游引物序列为 5'-GTGCAGGGTC-CGAGGT-3';U6 的上游引物序列为 5'-GCTTCGGCA-CATATACTAAAAT-3',下游引物序列为 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3'。

3.7 Western blot 实验 按照 Western blot 实验试剂套装说明书方法,提取细胞总蛋白,依次进行 SDS-PAGE、湿法电转、PVDF 膜封闭。待 Western blot 结束后,按抗体说明书方法分别孵育抗 LC3-II、beclin-1、p62 和 GAPDH 抗体,暗室 ECL 发光显影,Image-Pro Plus 6.0 软件扫描灰度值。

4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 进行统计分析。数据以均数 ± 标准差(mean ± SD)表示。3~4 组间数据比较采用单因素方差分析及 Bonferroni-*t* 检验,6 组间数据比较采用单因素方差分析及 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

结 果

1 miR-181a 表达水平与 CSE 诱导的 NR8383 细胞炎症反应的相关性

选择不同浓度(终浓度 0、5%、10% 和 20%)的 CSE 分别处理 NR8383 细胞 48 h,采用 RT-qPCR 检测 miR-181a 的表达,采用 ELISA 检测细胞培养液促炎因子的含量。RT-qPCR 检测结果显示,CSE 浓度依赖性抑制 miR-181a 的表达($P < 0.05$),见图 1A。ELISA 结果显示,CSE 浓度依赖性促进 NR8383 细胞 TNF-α、IL-6 和 IL-8 的生成($P < 0.05$),见图 1B。Spearman 相关分析结果显示 miR-181a 表达水平与 TNF-α、IL-6 和 IL-8 的水平呈负相关($P < 0.05$),见图 1C。这些结果提示 miR-181a 可能参与 CSE 诱导的 NR8383 细胞炎症反应。

2 miR-181a 参与调控 CSE 诱导的 NR8383 细胞炎症反应

RT-qPCR 检测结果显示,在 CSE 刺激下,miR-181a-i 能进一步抑制 miR-181a 的表达,而 miR-181a-m 能升高 miR-181a 的表达($P < 0.05$),见图 2A。ELISA 结果显示,miR-181a-i 能进一步促进 NR8383 细胞 TNF-α、IL-6 和 IL-8 的生成,与 CSE 具有协同作用;而 miR-181a-m 能部分抑制 CSE 诱导的 NR8383 细胞 TNF-α、IL-6 和 IL-8 生成($P < 0.05$),见图 2B。

3 自噬对 CSE 诱导的 NR8383 细胞炎症反应的影响

分别用自噬抑制剂 3-MA 和激动剂 Rapa 预处理细胞 30 min,再用 20% CSE 处理细胞 48 h,ELISA 结果显示,3-MA 能进一步促进 NR8383 细胞 TNF-α、IL-6 和 IL-8 的生成,与 CSE 具有协同作用;而 Rapa 能部分抑制 CSE 诱导的 NR8383 细胞 TNF-α、IL-6 和 IL-8 的生成($P < 0.05$),见图 3A。同时,我们观察了 3-MA 和 Rapa 对 miR-181a 表达的影响,我们发现 3-MA 和 Rapa 均对 miR-181a 表达不产生影响,见图 3B。进一步观察 3-MA 和 Rapa 对 NR8383 细胞自噬的影响,发现无 CSE 刺激条件下,3-MA 对 LC3-II、beclin-1 和 p62 表达无影响,而 Rapa 升高 LC3-II 和 beclin-1 表达,但对 p62 表达无影响;在 CSE 刺激条件下,3-MA 能抑制 CSE 诱导的 LC3-II 和 beclin-1 表达,促进 p62 表达;而 Rapa 能促进 CSE 诱导的 LC3-II 和 beclin-1 表达,抑制 p62 表达($P < 0.05$),见图 3C。这些结果提示自噬对 NR8383 细胞起保护作用,能部分抑制 CSE 诱导的炎症反应。

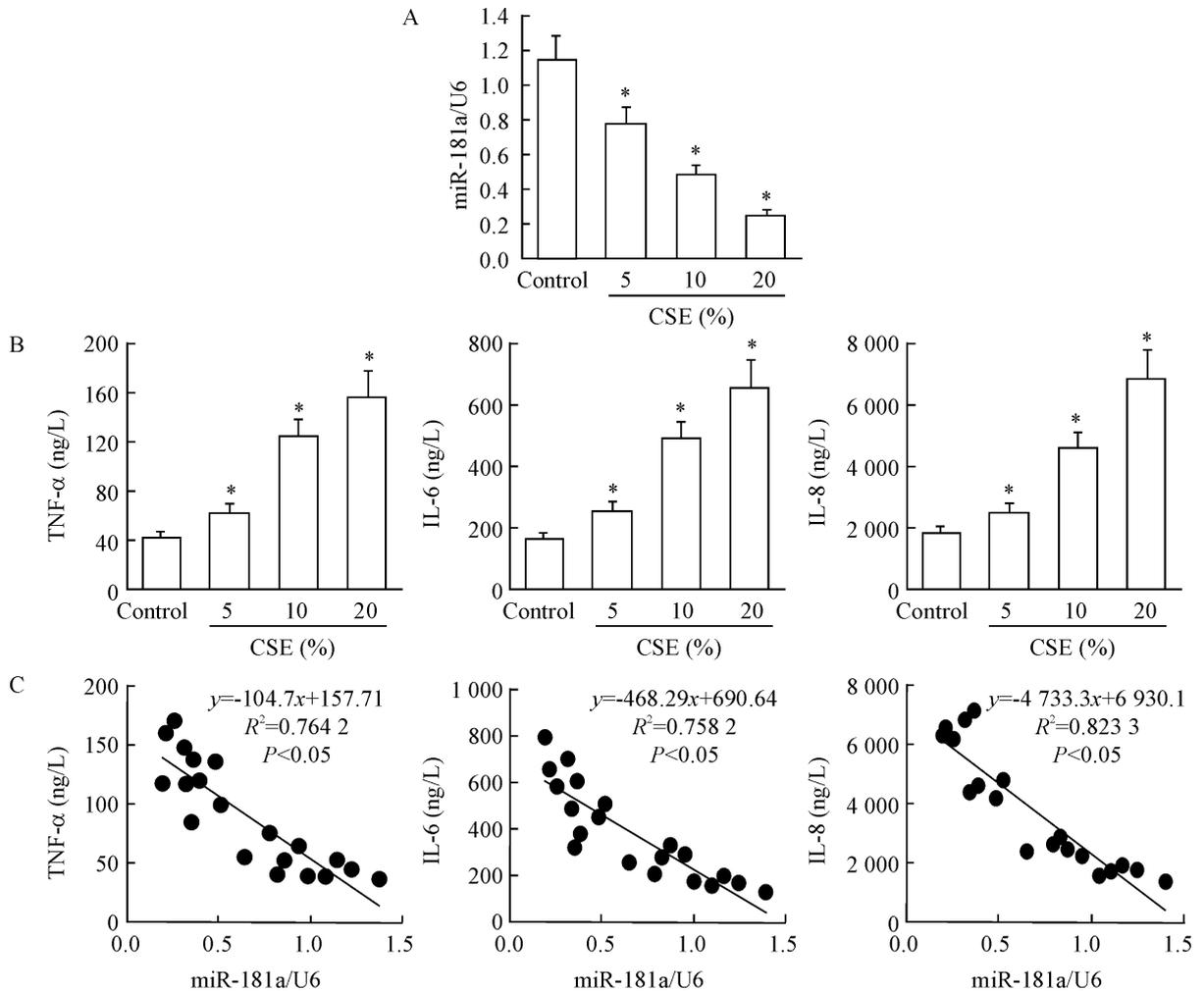


Figure 1. The level of miR-181a was negatively correlated with CSE-induced inflammatory response in the NR8383 cells. A: the expression level of miR-181a was detected by RT-qPCR; B: the levels of TNF- α , IL-6 and IL-8 were detected by ELISA; C: miR-181a was negatively correlated with TNF- α , IL-6 and IL-8. Mean \pm SD. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control group.

图1 miR-181a 表达水平与 CSE 诱导的 NR8383 细胞炎症反应呈负相关

4 miR-181a 参与调控 NR8383 细胞自噬

首先观察 CSE 诱导的 NR8383 细胞是否发生自噬现象。Cyto-ID 检测结果显示, CSE 浓度依赖性促进 NR8383 细胞自噬体生成 ($P < 0.05$), 见图 4A; Western blot 检测结果发现, CSE 浓度依赖性促进 LC3-II、beclin-1 和 p62 表达, 见图 4B。这些结果提示 CSE 诱导 NR8383 细胞自噬紊乱。进一步, 通过转染 miR-181a-m 或 miR-181a-i 的方法改变 miR-181a 的表达水平, 观察在 CSE 刺激条件下 NR8383 细胞的自噬情况, Western blot 检测结果显示, 在 CSE 刺激下, miR-181a-i 和 miR-181a-m 均能促进 LC3-II 和 beclin-1 表达; 但 miR-181a-i 促进 p62 表达, 提示 miR-181a-i 加剧 NR8383 细胞自噬紊乱, 而 miR-181a-m 抑制 p62 表达, 提示 miR-181a-m 促进 NR8383 细胞自噬, 见图 4C、D。

讨 论

慢性阻塞性肺疾病的发病率和死亡率极高, 且近年来其发病率呈高速增长趋势^[11]。而目前现有的 COPD 防治手段效果并不十分的理想, 因此探索 COPD 的发病机制, 寻找新靶点对 COPD 的治疗具有重要的科学意义。

近来研究发现, miR-181a 可参与肺部炎症性疾病的发病过程^[7,9]。如过表达 miR-181a mimic 能显著抵抗 LPS 诱导的肺上皮细胞损伤和炎症因子生成, 而 miR-181a inhibitor 能加剧 LPS 诱导的肺上皮细胞损伤和炎症因子生成^[7]; COPD 患者肺组织和动物 COPD 模型中发现 miR-181 表达下调^[8]; 在急性肺损伤模型上, miR-181a 通过下调靶基因 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4), 负调控 LPS 诱导的

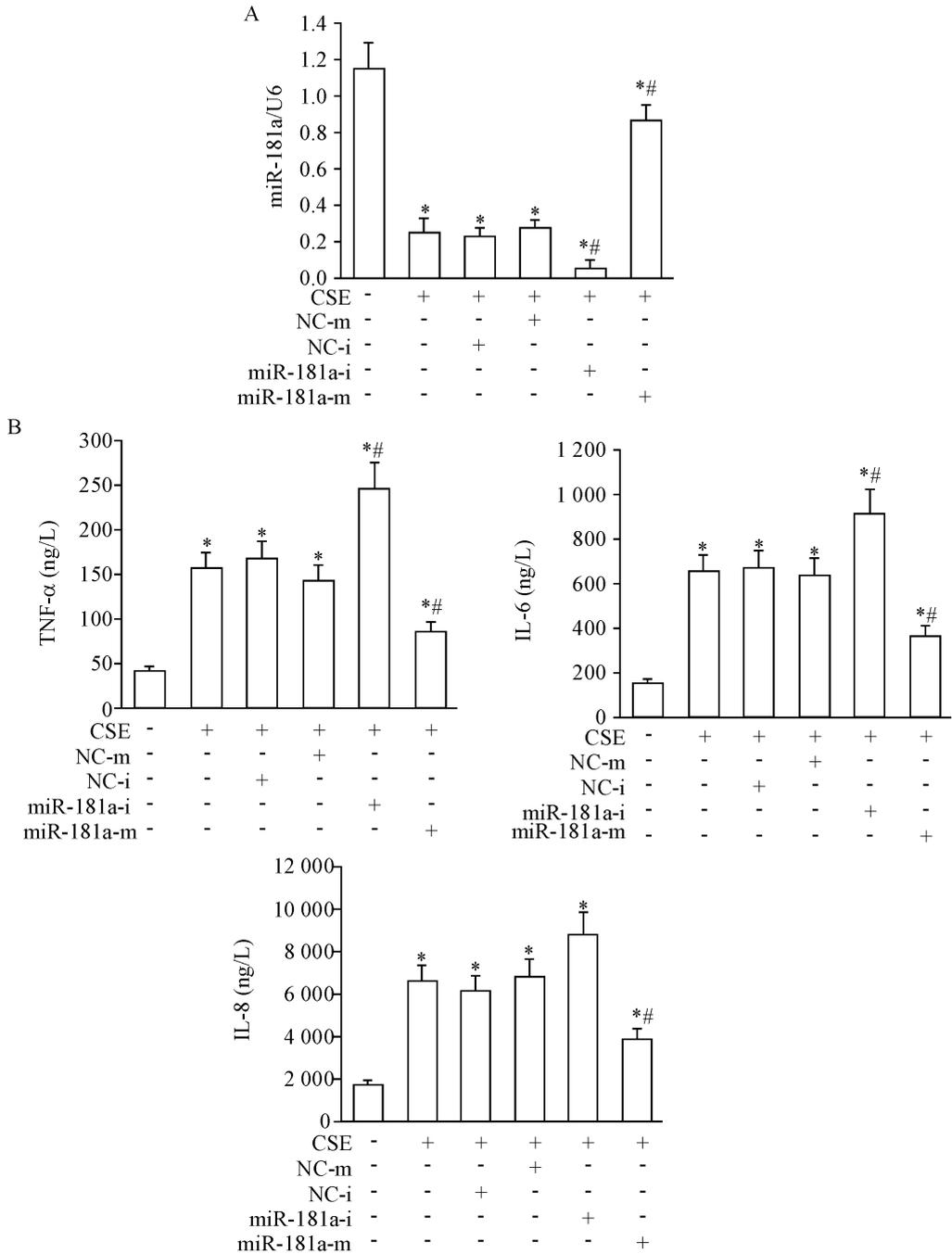


Figure 2. miR-181a was involved in the regulation of CSE-induced inflammatory responses in the NR8383 cells. A: the transfection efficiency of miR-181a mimic and miR-181a inhibitor examined by RT-qPCR; B: the levels of TNF-α, IL-6 and IL-8. Mean ± SD. n = 3. * P < 0.05 vs control group; # P < 0.05 vs CSE group.

图 2 miR-181a 参与调控 CSE 诱导的 NR8383 细胞炎症反应

THP-1 巨噬细胞炎症因子分泌^[9]。肺泡巨噬细胞是肺脏的主要细胞和防御系统的第一道防线,其与气道炎症性疾病发生和进展直接相关^[6, 12]。因此,本研究以香烟提取物诱导的大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383 细胞炎症模型为参考对象,发现 CSE 能浓度依赖性促进促炎因子 TNF-α、IL-6 和 IL-8 生成;进一步研究发现,在 CSE 条件下,抑制 miR-181a 表达能进一步促进 NR8383 细胞炎症反应,与 CSE 具有协同作用;而过表达 miR-181a 能部分逆转 CSE 诱导的

NR8383 细胞 TNF-α、IL-6 和 IL-8 生成。这提示 miR-181a 负调控 CSE 诱导的 NR8383 肺泡巨噬细胞生成炎症因子。

自噬参与调控肺部炎症性疾病的发病和进展^[3-6, 13-14]。如:SiO₂ 致肺泡巨噬细胞自噬紊乱促进炎症相关因子的分泌^[13];BBC3 通过肺泡巨噬细胞自噬促进矽肺肺纤维化进展^[14]。本研究发现,在 CSE 条件下,自噬抑制剂 3-MA 能进一步促进 NR8383 细胞炎症反应,而激动剂雷帕霉素能部分逆

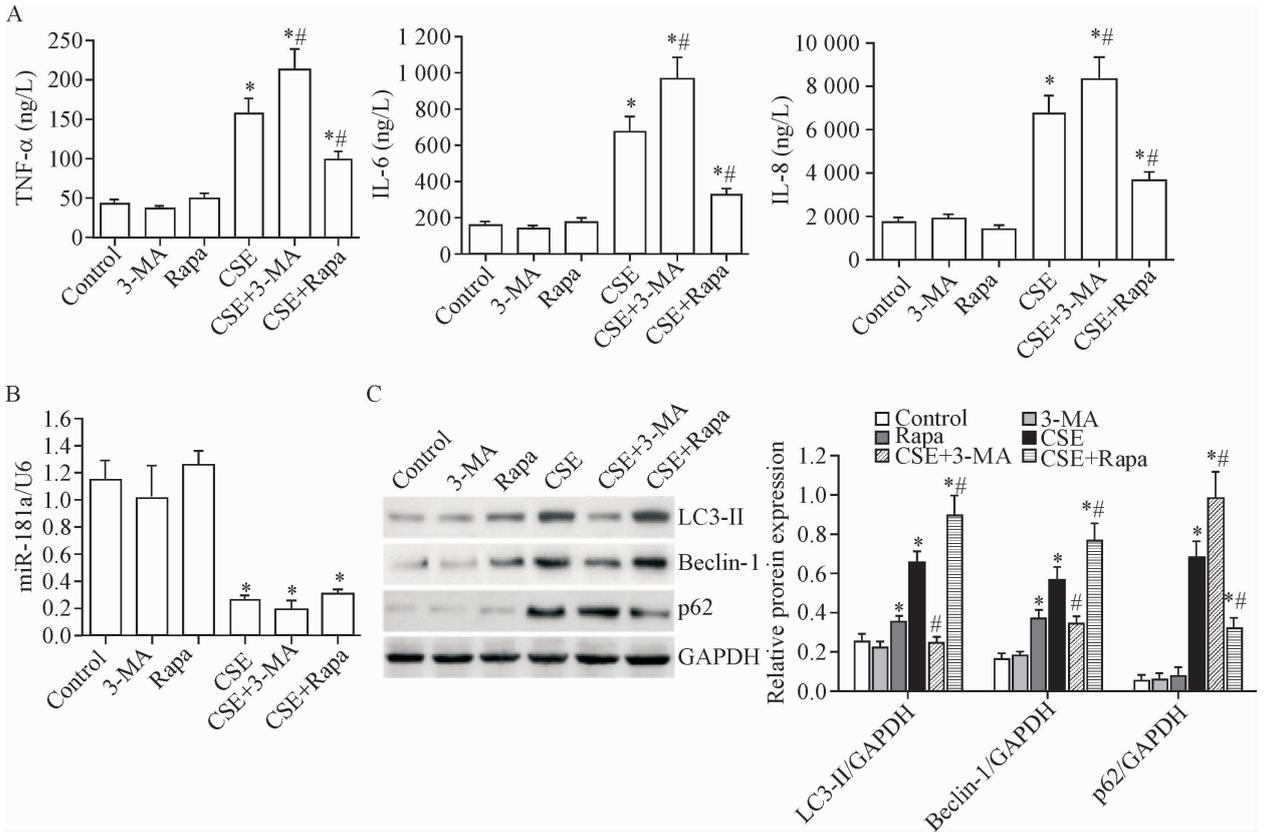


Figure 3. The effect of autophagy on the level of miR-181a and CSE-induced production of pro-inflammatory factors in the NR8383 cells. A: the level of TNF- α , IL-6 and IL-8 were detected by ELISA; B: the levels of miR-181a; C: the expression of LC3-II, beclin-1 and p62. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs CSE group.

图3 自噬对 NR8383 细胞 miR-181a 水平和 CSE 诱导的促炎因子生成的影响

转 CSE 诱导的 NR8383 细胞生成 TNF- α 、IL-6 和 IL-8,提示自噬抑制 NR8383 细胞的炎症反应功能,也能部分抑制 CSE 诱导的 NR8383 细胞炎症反应。完整的自噬过程包含自噬体生成、自噬体结合降解底物、结合降解底物的自噬体与溶酶体融合、自噬底物降解 4 个过程^[15]。本研究发现,CSE 能促进 NR8383 细胞自噬体的生成和 LC3-II、beclin-1 和 p62 高表达。Beclin1 参与自噬发生的初始阶段,发挥启动自噬的作用^[16];LC3-II 是自噬体形成的标记物^[17];自噬底物 p62 能够识别泛素化的降解底物,随同降解底物一起被自噬体结合并降解、蛋白水平下调^[18]。因此本结果提示 CSE 能促使自噬体生成,但自噬性降解阻滞,使得 NR8383 细胞自噬紊乱,导致炎症因子生成增多。我们的研究还发现在 CSE 刺激下,miR-181a mimic 和 miR-181a inhibitor 均能促进 LC3-II 和 beclin-1 表达;但 miR-181a inhibitor 能促进 p62 表达,miR-181a mimic 能抑制 p62 表达,提示在 CSE 刺激下,下调 miR-181a 能加剧 NR8383 细胞自噬紊乱,而上调 miR-181a 能促进 NR8383 细胞自噬。虽然已经发表的文献关于 miR-181a 与自噬的关系和

我们并不一致,如 Tekirdag 等^[19]在 MCF-7、Huh-7 和 K562 细胞上发现 miR-181a 通过靶基因 ATG5 抑制自噬;Zhao 等^[20]在胃癌顺铂耐药 SGC7901/CDDP 细胞上发现 miR-181a 通过靶基因 ATG5 抑制自噬,从而增强胃癌细胞对顺铂敏感性。我们推测有以下几个原因:首先,上述文献作者只考察上调 miR-181a 能促进 LC3-II 和 beclin-1 表达,这和我们研究是一致的,但上述作者并没检测自噬性降解变化(如 p62 表达);其次,miR-181a 是多功能 miRNA,可能在不同细胞种类自噬调控存在差异;再次,刺激条件并不一致,我们采用的是 CSE 刺激诱导的 NR8383 细胞炎症,并且炎性微环境中的炎症因子也可能反馈影响细胞自噬流程。另外,诱导细胞自噬的阈值可能不同,造成的结果差异有待进一步研究。

综上所述,miR-181a 调控 CSE 诱导的 NR8383 肺泡巨噬细胞炎症,其作用机制可能与 miR-181a 调控 CSE 诱导的 NR8383 肺泡巨噬细胞自噬紊乱相关。以上结果提示 miR-181a 在 COPD 的肺泡巨噬细胞炎症反应中发挥一定的调节作用。

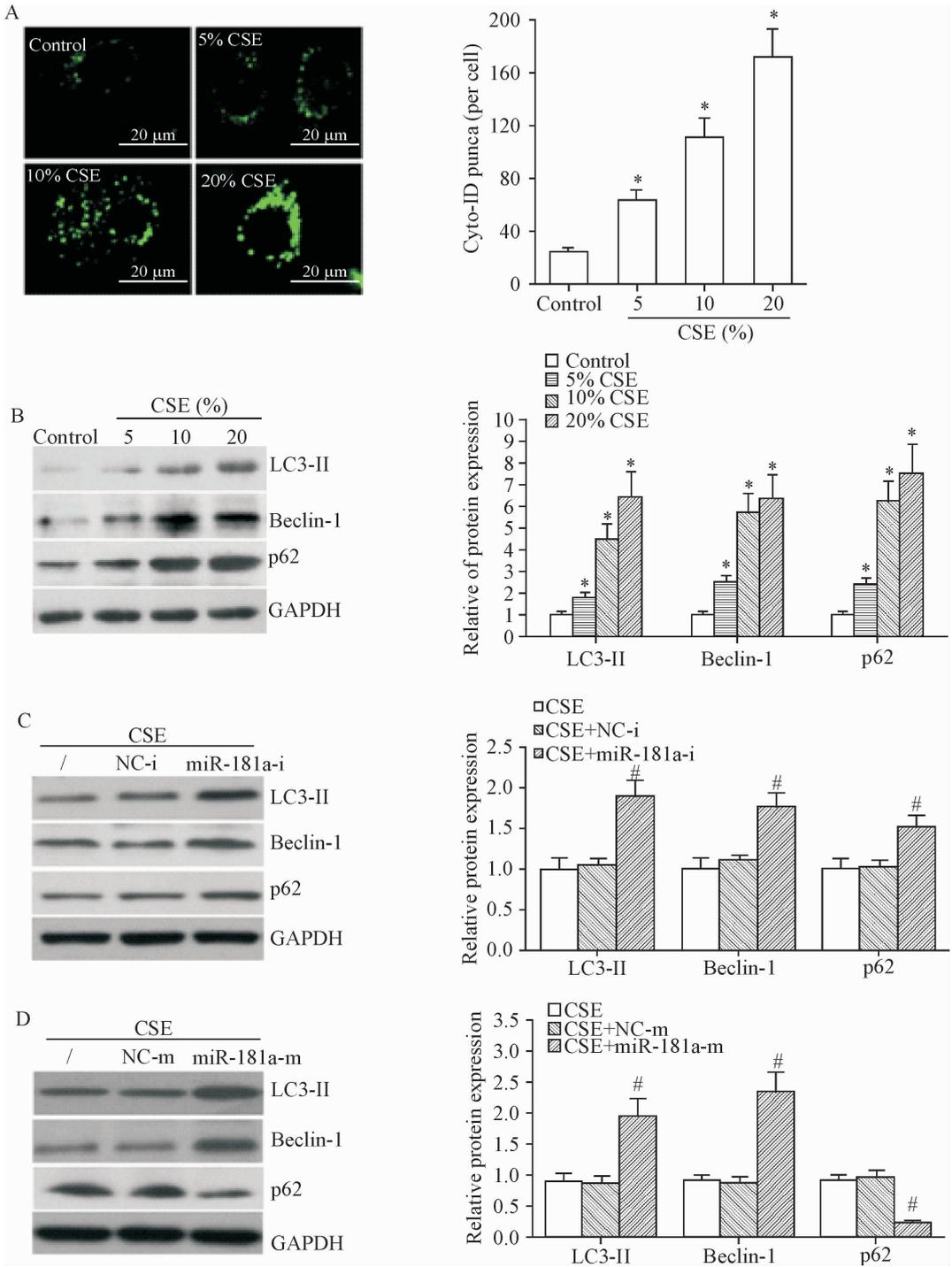


Figure 4. miR-181a was involved in the regulation of CSE-induced autophagy dysfunction in the NR8383 cells. A: representative images and quantitative analysis of Cyto-ID staining; B: Western blot for determining CSE-induced protein levels of LC3- II , beclin-1 and p62; C: the effect of miR-181a inhibitor on CSE-induced protein expression of LC3- II , beclin-1 and p62; D: the effect of miR-181a mimic on CSE-induced protein expression of LC3- II , beclin-1 and p62. Mean ± SD. n = 3. * P < 0.05 vs control group; # P < 0.05 vs CSE group.

图 4 miR-181a 参与调控 CSE 诱导的 NR8383 细胞自噬功能障碍

[参 考 文 献]

[1] 汪 露, 江 涛. 外周血 Th17 细胞对慢性阻塞性肺疾病症状严重程度及预后的评估价值[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(2):273-277.

[2] Capistrano SJ, van Reyk D, Chen H, et al. Evidence of biomass smoke exposure as a causative factor for the development of COPD[J]. Toxics, 2017,5(4):E36.

[3] Mizumura K, Cloonan S, Choi ME, et al. Autophagy: friend or foe in lung disease? [J]. Ann Am Thorac Soc,

2016, 13(Suppl 1):S40-S47.

- [4] Li D, Hu J, Wang T, et al. Silymarin attenuates cigarette smoke extract-induced inflammation via simultaneous inhibition of autophagy and ERK/p38 MAPK pathway in human bronchial epithelial cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37751.
- [5] Chen J, Yang X, Zhang W, et al. Therapeutic effects of resveratrol in a mouse model of LPS and cigarette smoke-induced COPD [J]. *Inflammation*, 2016, 39(6):1949-1959.
- [6] Murugan V, Peck MJ. Signal transduction pathways linking the activation of alveolar macrophages with the recruitment of neutrophils to lungs in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Exp Lung Res*, 2009, 35(6):439-485.
- [7] Jiang K, Guo S, Zhang T, et al. Downregulation of TLR4 by miR-181a provides negative feedback regulation to lipopolysaccharide-induced inflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:142.
- [8] Xie L, Wu M, Lin H, et al. An increased ratio of serum miR-21 to miR-181a levels is associated with the early pathogenic process of chronic obstructive pulmonary disease in asymptomatic heavy smokers [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(5):1072-1081.
- [9] Du XJ, Lu JM, Sha Y. MiR-181a inhibits vascular inflammation induced by ox-LDL via targeting TLR4 in human macrophages [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(10): 6996-7003.
- [10] Kent LM, Fox SM, Farrow SN, et al. The effects of dexamethasone on cigarette smoke induced gene expression changes in COPD macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(1):57-64.
- [11] Marçôa R, Rodrigues DM, Dias M, et al. Classification of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) according to the new Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017: comparison with GOLD 2011 [J]. *COPD*, 2018, 15(1):21-26.
- [12] 刘芬, 李勇, 赵宁, 等. MicroRNA-132 通过调控胆碱能通路减轻肺泡巨噬细胞炎症反应 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(2):261-266.
- [13] Liu H, Fang S, Wang W, et al. Macrophage-derived MCP1 mediates silica-induced pulmonary fibrosis via autophagy [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2016, 13:55.
- [14] Liu H, Cheng Y, Yang J, et al. BBC3 in macrophages promoted pulmonary fibrosis development through inducing autophagy during silicosis [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3):e2657.
- [15] Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of auto-phagy: morphology, mechanism, and regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3):460-473.
- [16] Ha J, Kim J. Novel pharmacological modulators of autophagy: an updated patent review (2012-2015) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(11):1273-1289.
- [17] Heckmann BL, Boada-Romero E, Cunha LD, et al. LC3-associated phagocytosis and inflammation [J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(23):3561-3576.
- [18] Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor [J]. *FEBS J*, 2015, 282(24):4672-4678.
- [19] Tekirdag KA, Korkmaz G, Ozturk DG, et al. MiR-181a regulates starvation- and rapamycin-induced autophagy through targeting of ATG5 [J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 374-385.
- [20] Zhao J, Nie Y, Wang H, et al. MiR-181a suppresses autophagy and sensitizes gastric cancer cells to cisplatin [J]. *Gene*, 2016, 576(2 Pt 2):828-833.

(责任编辑: 卢萍, 罗森)