

COPD 患者血清 microRNA 表达谱 及相关生物信息学分析*

胡雪茹 刘军辉 申永春 秦江月 文富强

(四川大学华西医院呼吸与危重症医学科, 四川 成都 610041)

【摘要】 目的 探讨慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者血清中 microRNA(miRNA)的差异性表达谱,并通过生物信息学探索其意义。方法 下载 GEO 数据库开源数据集(GSE70080),分析慢阻肺患者与正常人血清的 miRNA 差异性表达谱,分析其对慢阻肺的诊断价值,运用 miRTarbase、Target Scan、PicTar、miRDB 等软件预测和筛选 miRNAs 的靶基因,并将得出的上述靶基因功能富集、信号通路及蛋白质互作网络分析。结果 该数据集中慢阻肺与健康对照组血清差异表达的 miRNA 共 62 个($P < 0.05$),其中较对照组上调 8 个,下调 54 个,上调 miRNA 和下调 miRNA 诊断慢阻肺的受试者曲线下面积分别为 0.938 和 0.969。靶基因预测显示差异性表达 miRNA 共有 15099 个靶基因,GO 功能分析显示上述靶基因主要涉及 Wnt、MAPK、NF- κ B 等重要生物学过程,KEGG 分析主要富集于 Wnt、NF- κ B、MAPK 等信号通路。miRNA 和 mRNA 的网络图显示 SLC4A8 与多个 miRNA 相关。蛋白质互作网络显示靶基因编码蛋白质间存在复杂的相互作用,ACVR1B、ACVRL1、KRT2、KRT74、KRT82 在互作网络中具有核心地位。结论 慢阻肺患者的血清 miRNA 存在差异性表达,miRNA 可能通过调控靶基因参与调控相关的生物功能和通路参与慢阻肺发病机制调控。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病; microRNA; 生物信息学分析

【中图分类号】 R563 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2023.01.003

Serum microRNA expression profiles and bioinformatics analysis in patients with chronic obstructive pulmonary disease

HU Xueru, LIU Junhui, SHEN Yongchun, QIN Jiangyue, WEN Fuqiang

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the clinical significance of microRNAs (miRNAs) in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Serum miRNA dataset (GSE70080) was downloaded from GEO and differentially expressed miRNAs were identified between COPD and controls. The receiver operating characteristic curve for the miRNA diagnosis performance in COPD were performed. The final target genes were predicted and validated by miRTarbase, Targetscan, PicTar, miRDB. Bioinformatics function analysis was constructed including Gene Ontology analysis, signal pathway analysis, miRNAs-target gene network and the protein-protein interaction (PPI). **Results** Sixty-two (eight upregulated and fifty-four downregulated) miRNAs were screened out. The area under the receiver operating characteristic curve of up and down regulated miRNAs for the diagnosis of COPD were 0.938 and 0.969, respectively. The target genes of miRNA were mainly enriched in WNT, MAPK, NF- κ B signaling pathway. Through the miRNAs-target gene network construction, the hub genes were SLC4A8, found to be potentially modulated by seven miRNAs. ACVR1B, ACVRL1, KRT2, KRT74 and KRT82 maybe play a core role in PPI network. **Conclusion** Significant differential expressed miRNAs exist in the serum of patients with COPD, and they may be involved in the pathogenesis of COPD through a serial of mechanisms.

【Key words】 Chronic obstructive pulmonary disease; microRNA; Bioinformatics analysis

基金项目:国家自然科学基金(31871157,82170046);四川省重点研发计划(2020YFS0147)

通讯作者:申永春,博士生导师,E-mail:shen_yongchun@126.com

引用本文:胡雪茹,刘军辉,申永春,等. COPD 患者血清 microRNA 表达谱及相关生物信息学分析[J]. 西部医学,2023,35(1):14-20,27. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2023.01.003

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)又称慢阻肺,是一种常见的可预防和治疗的慢性气道疾病,特征是持续存在的气流受限和相应的呼吸系统症状^[1]。2021GOLD 报道,全球范围到 2060 年,每年可能有 540 万以上的人死于慢阻肺和其相关疾病^[2]。国内的流行病学研究显示,我国 20 岁及以上成人慢阻肺患病率为 8.6%,40 岁以上的人群将近 1 亿人,其已成为我国乃至世界范围内的重大慢性非传染性疾病,造成了巨大的公共卫生负担^[3]。早期明确慢阻肺的诊断对后续的治疗有重要的临床意义,目前肺功能检查仍是确诊慢阻肺的必备条件,但当前基于肺功能的慢阻肺诊断在我国的临床实践中仍存在较大的挑战^[4],寻找到简单易行的慢阻肺诊断标志物具有重要的临床意义。microRNA(miRNA)是一组小的非编码 RNA(长度大约为 22 个核苷酸),通过 mRNA 降解、抑制蛋白质翻译或通过这两种机制的组合,在转录后负调控基因表达,是细胞增殖和分化、发育和凋亡的多个生物途径中的关键调节剂^[5]。miRNA 已成为包括神经胶质瘤、结直肠癌、肺癌、心力衰竭在内的多种疾病的生物标志物^[6],在疾病的诊断、分期中具备广阔的临床运用前景。近年来研究发现,miRNA 与慢阻肺的关系密切,有可能被用作潜在慢阻肺的生物标志物。目前研究发现 miRNA 可能主要通过调控 MAPK、Wnt、NF- κ B、JAK-STAT 等信号通路参与慢阻肺的发病机制^[7],但其在慢阻肺诊断和致病的详细机制中尚未完全被阐释。因此本研究旨在探索慢阻肺患者血清 miRNA 差异性表达谱,并通过生物信息学预测差异性 miRNA 的靶基因并进一步分析其靶基因在调控生物学过程功能分析、信号通路、蛋白质互作中的机制,探索 miRNA 对慢阻肺的临床诊断意义及潜在相关的分子生物学机制。

1 资料与方法

1.1 数据的提取及分析 GSE70080 的 miRNA 表达谱数据集从 GEO(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载^[8],GSE70080 位于平台 GPL20591 中,其中包括 16 个慢阻肺患者和 16 个正常血清样本。从 GSE70080 数据集下载微阵列数据的归一化表达矩阵。然后用数据集中的注释文件对探针进行注释。R 软件的“limma”包用于识别差异表达的 miRNA。 $P < 0.05$ 基因被认为是差异表达的基因。受试者曲线及火山图、热图聚类图使用 R 软件的“ggplot2”包进行。受试者工作特征(Receiver operating characteristic, ROC)曲线法评估差异性表达 miRNA 对慢阻肺的诊断价值。

1.2 靶基因的预测 运用靶基因预测软件 TargetScan、PicTar2 和 miRanda 分别预测差异 miRNA 的靶基因^[9],再分别取各自在 3 个软件下预测所得靶基因的交集,然后利用 miTarbase 数据库获取经过至少 3 种实验验证并且靶向关系类型为具有功能的 miRNA-靶基因相互作用的靶基因,将软件预测所得结果与靶向关系预测结果取交集作为所纳入每个 miRNA 的靶基因集合,绘制 miRNA-mRNA 网络图。

1.3 靶基因生物信息分析 基因本体(Gene Ontology, GO)分析和京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路富集分析在 R 软件中使用“GO plot”包进行。GO 分析包括细胞成分(CC)、生物过程(BP)和分子功能(MF)^[10]。

1.4 miRNA 靶基因的蛋白互作分析 使用 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)和 Cytoscape 软件对差异性表达 miRNA 的靶基因进行蛋白互作网络(Protein protein interaction network, PPI network)分析^[11]。

2 结果

2.1 差异性 miRNA 表达分析 对于慢阻肺组和对照组的高通量测序结果,见图 1。根据 $P < 0.05$ 筛选出 8 个上调和 54 个下调差异 miRNA,与慢阻肺患者相比,miR-655 和 miR-337 在慢阻肺样本中的表达增加了近两倍,miR-645 在慢阻肺组织中的表达平均降低了 4 倍,见图 2。

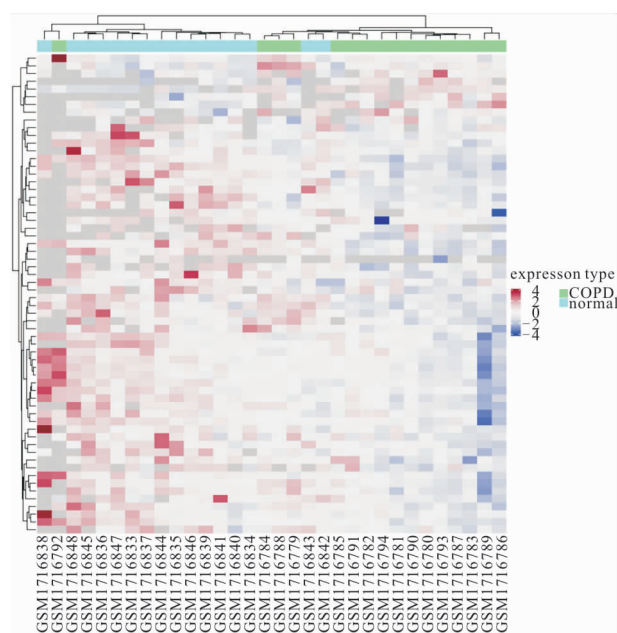


图 1 慢阻肺患者与健康对照者血清 miRNA 差异性表达热图

Figure 1 Heatmap of miRNA differential expression in serum of COPD patients and healthy controls

2.2 差异性表达 miRNA 对慢阻肺的诊断价值 ROC 曲线分析显示下调的 54 个 miRNA 诊断慢阻肺

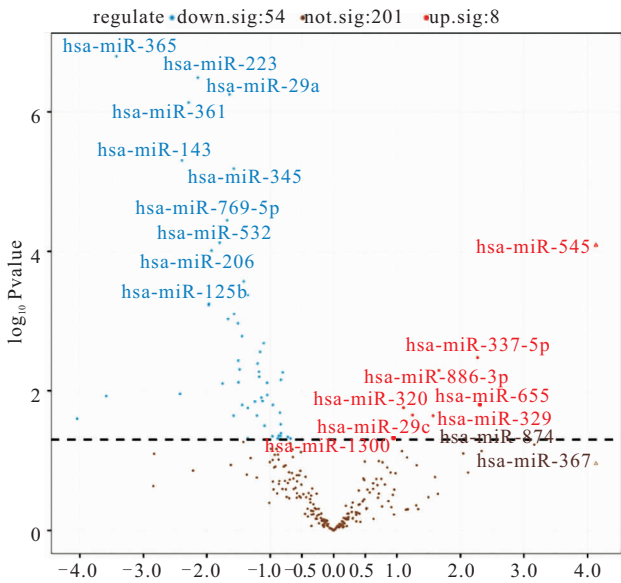


图 2 慢阻肺患者与健康对照者血清 miRNA 差异性表达火山图
Figure 2 Volcanic diagram of miRNA differential expression in serum of COPD patients and healthy controls

的 ROC 曲线下面积为 0.969, 上调的 8 个 miRNA 诊断慢阻肺 ROC 曲线下面积是 0.938, 见图 3。

2.3 靶基因的预测与生物富集分析 通过 3 个靶基因预测软件 TargetScan, PicTar2 和 miRanda 预测靶基因, 结合 miTarbase 数据库中经过验证, 共 15099 个靶基因。GO 富集结果见表 1, 其中下调差异 miRNA 的靶基因 GO 富集的主要生物过程涉及 Wnt、MAPK、NF-KB 信号通路; 上调 miRNA 的靶基因集合生物过程主要涉及 Wnt 信号通路; 在 KEGG 富集分析中, 下调差异 miRNA 富集于 MAPK 信号通路; 上调差异 miRNA 富集于 Wnt、MAPK 信号通路。见图 4。

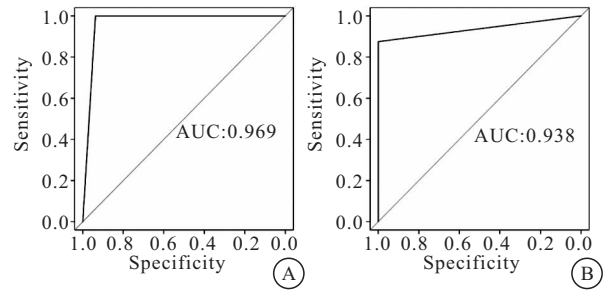


图 3 差异性表达 miRNA 诊断慢阻肺的价值
Figure 3 Differential expression of miRNA in the diagnosis value of COPD

注: A. 下调 miRNA; B. 上调 miRNA

表 1 差异性表达 miRNA 靶基因 GO 分析结果
Table 1 GO analysis results of miRNA target genes with differential expression

	下调基因	上调基因
生物学过程	细胞内信号转导	树突棘形态发生的正调控
	细胞内蛋白转运	轴突导向
	Wnt 信号通路	离子跨膜转运的调控
	MAPK 信号通路	钾离子转运
	NFKB 信号通路	Wnt 信号通路
细胞组分	谷氨酸能突触	神经元投射
	神经元投射	轴突
	膜筏	突出后密度
	突触后膜	谷氨酸能突触
	树突	树突
分子功能	激活脱氧核糖核酸-结合转录活性, 结合特定 RNA 聚合酶 II	激活脱氧核糖核酸-结合转录活性, 结合特定 RNA 聚合酶 II
	蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性	结合 mRNA
	结合蛋白激酶	结合胰岛素受体
	结合蛋白质复合物	活化电压-门控离子通道
	结合转录因子	活化同向转运体

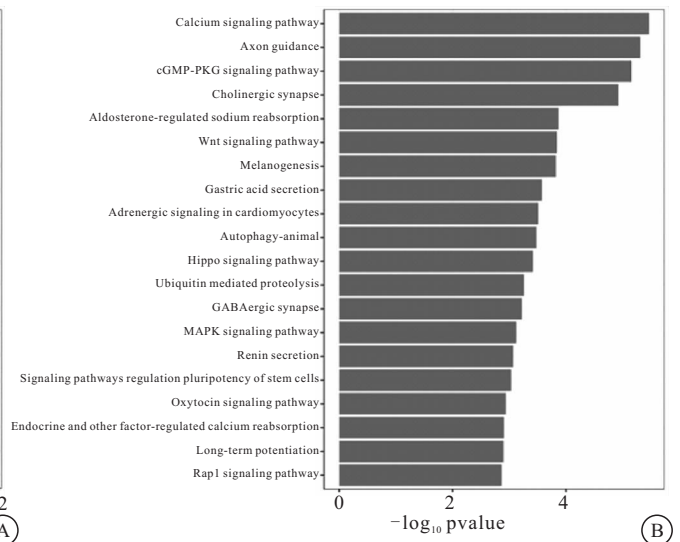
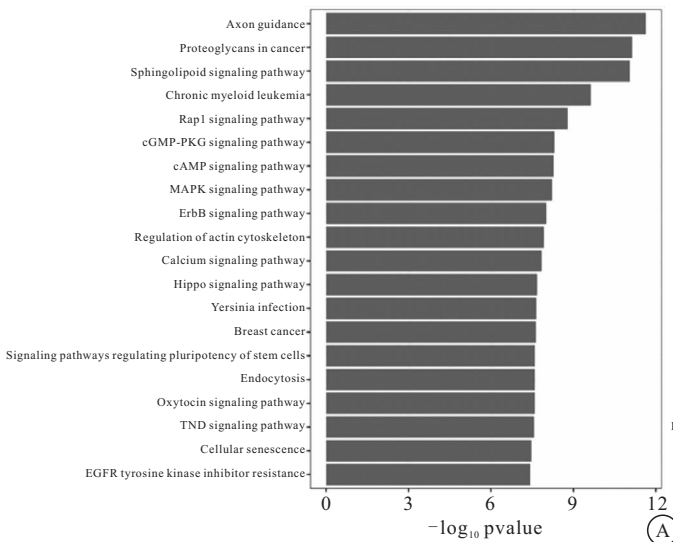


图 4 差异性表达 miRNA 靶基因 KEGG 分析结果
Figure 4 KEGG analysis results of differentially expressed miRNA target gene

注: A. 下调 miRNA; B. 上调 miRNA

2.4 miRNA 与靶基因网络分析 经过实验验证并且靶向关系类型为具有功能的 miRNA-mRNA 网络图,见图 5。其中 13 种 miRNA(hsa-miR-140-3p、hsa-miR-206、hsa-miR-337-5p、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-645、hsa-miR-769-5p、hsa-miR-107、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-628-3p、hsa-miR-375 和 hsa-miR-543),其中 12 种下调,1 种 miRNA(hsa-miR-337-5p)在上调。4 个核心 miRNA 为:miR-574-3p、hsa-miR-628-3p、hsa-miR-107、hsa-miR-769-5p;多个 miRNA 与其靶基因相互作用,其中 SLC4A8 受 7 个 miRNA 的调节。

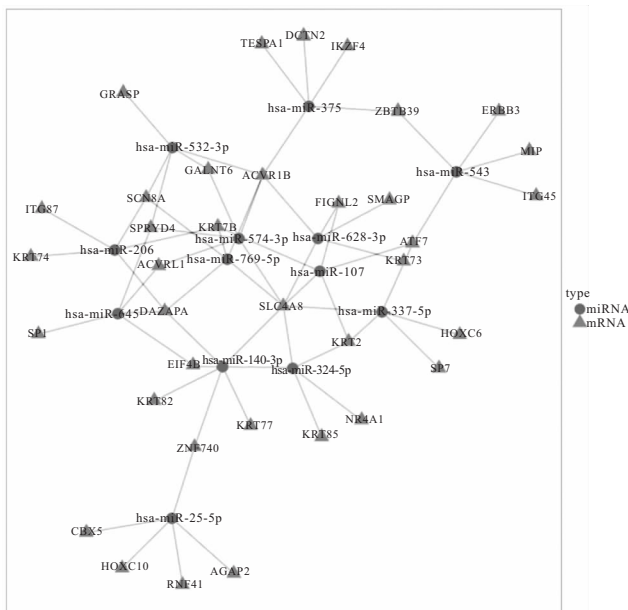


图 5 miRNA 与靶基因网络分析图

Figure 5 miRNA and target gene network analysis diagram

2.5 miRNA 靶基因 PPI 分析 将 miRNA 的靶基因合并,导入 STRING 数据库,选择高可信度的互作关系,删除没有互作关系的靶基因点后蛋白互作网络,见图 6。根据该网络结构中节点的连通性即按 Degree 对靶基因进行排序,其中前 5 位分别是 ACVR1B、ACVRL1、KRT2、KRT74、KRT82。

3 讨论

慢阻肺的早期诊断与发病机制的探索对其患者的诊治具有重要的临床意义。本研究通过现代生物信息学分析方法研究慢阻肺患者血清样本中的差异性 miRNA,寻找潜在的 miRNA 生物标志物,并通过生物信息分析基于 miRNA 的慢阻肺发病机制。

慢阻肺差异 miRNA 的研究在多种样本中得到证实,包括血清、肺组织、痰液、肺泡灌洗液,在临床研究过程中发现异常表达的 miRNA 与体外研究中的表达趋势一致,并且观察到失调的 miRNA 与慢阻肺临床

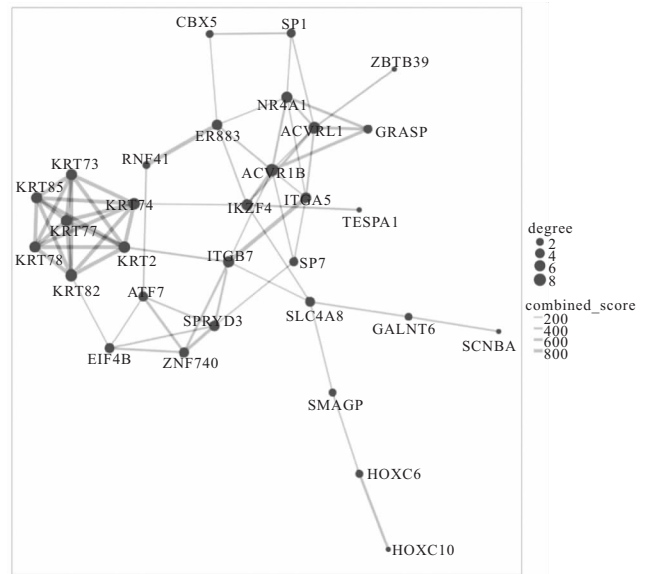


图 6 miRNA 靶基因编码蛋白互作网络分析图

Figure 6 Target gene coding protein interaction

严重程度相关,并且会增加稳定的慢阻肺患者急性加重的风险。本次研究发现慢阻肺组和正常对照组血清中 miRNA 表达存在差异,上调基因有 8 个,下调基因 54 个,根据差异 miRNA 绘制 ROC 曲线,曲线下面积均大于 0.9 ($P < 0.05$),提示 miRNA 对慢阻肺有一定的诊断价值。其中血清中 miR-320 表达增加,这与以往研究一致,研究报道 miR-320 表达增加与生存率正相关,可作为慢阻肺的预后标志物^[12]。有研究发现暴露于烟雾主要影响 miRNA 的下调^[13],在本研究中 54 个基因表达下调,其中 miR-106b 被报道可作为反映慢阻肺患者持续或者全身变化的指标^[14]。miR-23a、miR-25、miR-145 和 miR-224,与慢阻肺全球倡议 (GOLD) 阶段相关。miR-23a 和 miR-145 在慢阻肺的非频繁和频繁加重者之间有显著差异,miR-23a 可能是区分频繁加重和非频繁加重的潜在且有希望的生物标志物^[15]。6 个差异 miRNA (let-7c、miR-125b、miR-324、miR-642、miR-340、miR-532) 表达下调,与诱导痰中的表达一致,其中 let-7c 降低显著。研究发现 let-7c 的主要靶点是肿瘤坏死因子受体 II (TNFR-II),且痰中 let-7c 水平与一秒用力呼气容积 (FEV1) 呈正相关,与痰肿瘤坏死因子受体 II (sTNFR-II) 的蛋白水平呈显著负相关^[16],在慢阻肺小鼠模型中进一步证明, TNFR-II 基因敲除小鼠受到保护,免受香烟烟雾引起的炎症和肺气肿^[17]。通过文献学习,本研究发现下调的 miRNA-206 在肺组织中表达上调,且与重度慢阻肺患者的循环炎症细胞因子有关^[18],如 TNF- α 、IL-2 和 IL-5,可通过调节人肺成纤维细胞 MRC-5 细胞中的 IRAK1 促进脂多糖诱导炎症损

伤^[19],其靶基因 Notch3 和 VEGFA 被证明在慢阻肺中可增强诱导细胞凋亡作用^[20]。因此 miRNA 在不同样本之间可能存在表达趋势的差异,还需要进一步探索相关 miRNA 在慢阻肺中的确切作用。

有研究报道 miRNA 具有高稳定性、强特异性、高灵敏度和易于在血液中检测,因此可用于临床诊断及预后评估^[21]。如 miR-3620-3p 可以区分慢阻肺和哮喘^[22]。Leidinger 等^[23]表明特定的外周 miRNA 谱可以区分肺癌和慢阻肺。miR-146a 的表达与慢阻肺急性加重期的严重程度呈负相关;miR-218-5p 与严重慢阻肺有相关性,但与吸烟状况无关^[24]。miR-146a 和 miR-146b 可以预测慢阻肺患者慢阻肺急性加重期的风险^[25]。miR-1273-3p、miR-126、miR-503、miR-34b/c、miR-342-3p、miR-30e-3p、miR-125a-5p 与 FEV1% 呈正相关,miR-106b-5p、miR-15b、miR-195、miR-24-3p、miR-320a、miR-320b、miR-34a 和 miR-199a-5p 的水平与 FEV1 % 负相关^[26]。综上,慢阻肺患者血清中存在显著的 miRNA 差异性表达,并且对慢阻肺具有一定的诊断及预后价值。鉴于其样本可及性,患者配合程度高,miRNA 有望成为慢阻肺的诊断标志物,并且有助于慢阻肺的严重程度评估。

miRNA 一般通过其对靶基因的调控发挥其调节作用,本研究对差异性表达 miRNA 的靶基因进行 GO 注释和 KEGG pathway 分析,其结果示差异 miRNA 的靶基因主要参与 NF- κ B、Wnt、MAPK 信号通路。Wnt 信号通路包含控制各种发育和生理过程的信号分子家族,研究表明,Wnt/ β -连环蛋白信号传导参与肺发育、体内平衡、肺上皮损伤和修复过程^[27]。慢阻肺的特点是由气道重塑和慢性支气管炎组成的小气道疾病和导致肺气肿的肺实质破坏引起的慢性气流受限。研究显示 Wnt/ β -catenin 信号在慢阻肺和肺气肿患者及其动物模型中降低,通过 Wnt/ β -catenin 信号的激活可减少空腔扩大和胶原含量来减轻慢阻肺的症状^[28]。典型 Wnt/ β -连环蛋白激活还可导致肺上皮细胞增殖增加,表明激活 Wnt 信号传导可引起上皮细胞的修复机制^[29]。本研究发现 miR-130a 上调,与之前研究表达一致,研究发现抑制 miR-130a 显著减轻香烟诱导的对细胞迁移和增殖的抑制,miR-130a 过表达可阻断香烟刺激引起 Wnt 信号的激活,抑制 miR-130a 可通过 Wnt/ β -Catenin 信号通路减轻香烟烟雾引起的肺损伤^[30]。miR-23a、miR-25、miR-145 和 miR-224 也被证明参与了 Wnt 信号通路^[15]。目前研究发现 Wnt 信号通路以不同方式参与慢阻肺中的慢性气道炎症、气道重塑、肺气肿的发生发展^[31],但仍需要进一步研究以确定 miRNA 如何调控 Wnt 信号通

路在慢阻肺中的调节机制。

NF- κ B 作为一种核转录因子,与免疫应答、炎症反应及细胞的增生、转化、凋亡等病理生理过程密切相关。NF- κ B 的活化是慢阻肺发病的重要炎症通路之一,通过调控 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-12、COX-2、粘附分子、趋化因子、集落刺激因子等参与了炎症反应各阶段和早期的免疫反应^[32]。在啮齿动物中有研究报道 miR-30、miR-146、miR-132 和 miR-155 参与 NF- κ B 通路激活^[33],进一步研究证实在慢阻肺患者的气道或样本中 NF- κ B 通路活性标志物的增加,包括慢阻肺恶化期间的痰巨噬细胞以及在稳定期慢阻肺患者的支气管活检中^[34]。如 miR-218 通过肿瘤坏死因子受体 I(TNFR1)介导的 NF- κ B 激活起作用,参与炎症和粘蛋白(MUC5AC)过度产生,而显著下调的 MiR-218 被认为是慢阻肺的保护因素^[24]。香烟烟雾诱导慢阻肺小鼠气道上皮和肺巨噬细胞中 miR-21 表达上调,通过 miR-21/SATB1/S100A9/ NF- κ B 轴在慢阻肺中发挥致病作用,遂 miR-21 可作为慢阻肺的潜在治疗靶点^[35]。因此,抑制 NF- κ B 信号通路的活化,可能减少气道细胞中炎症基因的表达,NF- κ B 抑制剂或调节剂可能具有干预及治疗慢阻肺的潜力。参与 NF- κ B 通路的 miRNA 可能成为慢阻肺治疗新靶点。

本文通过 miRNA 靶基因的预测,进一步构建了潜在的 miRNA-mRNA 调控网络。其中 4 个 miRNA (miR-574-3p、hsa-miR-628-3p、hsa-miR-107、hsa-miR-769-5p)为核心基因。之前研究报道 miR-628-3p 在慢阻肺和有无吸烟患者中表达下调,miR-574-5p 在香烟烟雾(0.5%)处理 3 天的人支气管上皮细胞,较对照组表达下调^[36],这均与本研究结果一致,提示吸烟可能影响慢阻肺患者 miRNA 的表达。miR-107、miR-769-5p 的失调与各种肿瘤发展有关,尚未有研究探索 miR-107、miR-769-5p 与慢阻肺之间的关系。本研究中 SLC4A8 受 7 种 miRNA 调控,可能成为慢阻肺的核心基因。预测 SLC4A8 存在多个 miRNA 结合位点,后续的研究需进一步探索其在慢阻肺中的作用机制。通过 PPI 分析,ACVR1B、ACVRL1、KRT2、KRT74、KRT82、NR4A1 可能是参与慢性阻塞性肺疾病发生发展的核心基因。其中 ACVR1B 是 TGF- β 配体家族的成员,可控制许多细胞过程,研究显示其表达水平与肺气肿的分布具有显著关联^[37]。ACVRL1 是一种参与血管生成的内皮转化生长因子 β 受体^[38],在肺动脉高压中发现 ACVRL1 突变,会导致 TGF- β /(BMP)信号受损,改变的 BMP 受体信号影响炎症及其消退、DNA 损伤及其修复以及细胞代谢的调节^[39]。NR4A1 参与 FSTL-1(卵泡抑素样 1)缺陷型肺气肿的

形成^[40],也可通过 NF- κ B 信号传导,进而以负反馈方式下调炎症因子,减轻气道炎症^[41]。KRT2、KRT74、KRT82 编码不同角蛋白,其与角质形成细胞活化、增殖和角质化相关,但目前在慢阻肺中的报道有限,还需要进一步研究。综上所述,绕着这些基因深入研究,有望进一步阐明慢阻肺的发病机制,为慢阻肺的干预寻找到新的靶点。

研究已发现 miRNA 促进肺部发育、成熟,且在维持肺功能中发挥重要作用^[42]。miRNA 可从多个层面、多个机制参与慢阻肺的发病机制。慢阻肺一个重要发病机制是由慢性炎症引起的支气管上皮细胞的凋亡和增殖变化。多种 miRNA 被发现参与气道炎症,如 miR-24-3p, miR-93-5p, miR-320a/b, miR-1273-3p,其靶基因主要是促炎基因,富集于 NOD 样受体(NLR)和 Toll 样受体(TLR)通路^[43]。此外还有 miR-233 被证实可控制肺细胞中 HDAC2 的表达和活性,从而调节慢阻肺的肺部炎症^[44]。Izzotti 等^[45]的研究分析了暴露于香烟烟雾环境的大鼠肺中 126 个 miRNAs 下调,其主要调节应激反应、细胞凋亡、增殖、血管生成和基因表达,提示 miRNA 可能与慢阻肺的损伤与修复有关。Conickx 等^[24]的研究发现 miR-218-5p 的表达与气道阻塞密切相关,在没有气流受限的吸烟者的肺中,miR-218-5p 在戒烟至少 1 年后表现出正常的表达水平,无论是否吸烟,慢阻肺患者 miR-218-5p 的不可逆下调可能导致持续的全身和肺部炎症。miR-195 在慢阻肺患者中表达增加,进一步研究发现抑制 miR-195 可减轻吸烟诱导的肺损伤并阻断体内炎症过程,可能为慢阻肺的治疗提供新靶点^[46]。

免疫失调是慢阻肺的另一个重要发病机制。Shi 等^[47]证明 miR-203 通过靶基因 TAK1 和 PIK3CA 发挥免疫反应抑制剂的作用,miR-203 可能通过抑制吸烟者的免疫反应,促进慢阻肺的发生发展。据报道,慢阻肺患者的调节性 T 细胞中的 miRNA 表达谱显著改变。其中 miR-199a-5p 对调节性 T 细胞具有特异性,miR-199a-5p 可通过影响 Th1-Th17 平衡从而导致慢阻肺的发生^[48]。自噬和细胞凋亡也在慢性阻塞性中发挥重要作用。在人支气管上皮细胞中 miR-21 参与香烟烟雾诱导的自噬和细胞凋亡^[49]。过表达 miR-34a 可显著增加人肺微血管内皮细胞的凋亡率。Notch1 的过表达对由 miR-34a 升高引起的人肺微血管内皮细胞凋亡具有保护作用^[50]。差异表达的 miRNA 对慢阻肺也有保护作用。如 miRNA-212-5p 在体外细胞通过促进细胞增殖和抑制香烟烟雾诱导的慢阻肺相关基因和蛋白质的表达对慢阻肺发挥保护作用^[51]。miR-483 通过促进细胞生长和激活 α -SMA 和

纤连蛋白发挥保护作用^[52]。以上研究表明,miRNA 从多个方面参与了慢阻肺的发病机制,未来需更多的研究明确与发病机制相关的 miRNA 和其关键通路,为慢阻肺探索新生物标志物。

4 结论

本研究结果发现慢阻肺患者血清中存在差异 miRNA,其对于慢阻肺的诊断有一定帮助。经过靶基因的预测及和相关通路分析,提示 miRNA 与慢阻肺发病机制密切相关,也为后续的研究提供了生物信息学的基础。

【参考文献】

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组,中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2021 年修订版)[J].中华结核和呼吸杂志,2021,44(3):170-205.
- [2] NHLBI. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2021 Report) [C]. 2021.
- [3] WANG C, XU J, 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.
- [4] 文富强,申永春,陈磊.肺功能检查在中国慢性阻塞性肺疾病患者中的实践:挑战与对策[J].中华结核和呼吸杂志,2017,(12):891-893.
- [5] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [6] SHAO C, YANG F, QIN Z, *et al.* The value of miR-155 as a biomarker for the diagnosis and prognosis of lung cancer: a systematic review with meta-analysis [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1103.
- [7] 丛文娟,鲁静,项水英,等.慢性阻塞性肺疾病炎症相关信号通路作用的研究进展[J].山西医科大学学报,2018,49(3):305-310.
- [8] BARRETT T, WILHITE S E, LEDOUX P, *et al.* NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D991-D995.
- [9] RIFFO-CAMPOS Á L, RIQUELME I, BREBI-MIEVILLE P. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12):1987.
- [10] BOYLE E I, WENG S, GOLLUB J, *et al.* GO::TermFinder—open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(18): 3710-3715.
- [11] VON MERING C, HUYNEN M, JAEGGI D, *et al.* STRING: a database of predicted functional associations between proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1): 258-261.
- [12] KELLER A, LUDWIG N, FEHLMANN T, *et al.* Low miR-150-5p and miR-320b Expression Predicts Reduced Survival of

- COPD Patients [J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1162.
- [13] IZZOTTI A, CALIN G A, STEELE V E, *et al.* Relationships of microRNA expression in mouse lung with age and exposure to cigarette smoke and light [J]. *FASEB J*, 2009, 23(9): 3243-3250.
- [14] SOEDA S, OHYASHIKI J H, OHTSUKI K, *et al.* Clinical relevance of plasma miR-106b levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(3): 533-539.
- [15] LIU X, QU J, XUE W, *et al.* Bioinformatics-based identification of potential microRNA biomarkers in frequent and non-frequent exacerbators of COPD [J]. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 2018, 13: 1217-1228.
- [16] VAN POTTELBERGE G R, MESTDAGH P, BRACKE K R, *et al.* MicroRNA expression in induced sputum of smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(7): 898-906.
- [17] DHULST A I, BRACKE K R, MAES T, *et al.* Role of tumour necrosis factor-alpha receptor p75 in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema [J]. *Eur Respir J*, 2006, 28(1): 102-112.
- [18] DONALDSON A, NATANEK S A, LEWIS A, *et al.* Increased skeletal muscle-specific microRNA in the blood of patients with COPD [J]. *Thorax*, 2013, 68(12): 1140-1149.
- [19] CHU H, QU X, WANG F, *et al.* MicroRNA-206 promotes lipopolysaccharide-induced inflammation injury via regulation of IRAK1 in MRC-5 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73: 590-598.
- [20] SUN Y, AN N, LI J, *et al.* miRNA-206 regulates human pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis via targeting in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 6223-6236.
- [21] WANG R, XU J, LIU H, *et al.* Peripheral leukocyte microRNAs as novel biomarkers for COPD [J]. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 2017, 12: 1101-1112.
- [22] WANG M, HUANG Y, LIANG Z, *et al.* Plasma miRNAs might be promising biomarkers of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Clin Respir J*, 2016, 10(1): 104-111.
- [23] LEIDINGER P, KELLER A, BORRIES A, *et al.* Specific peripheral miRNA profiles for distinguishing lung cancer from COPD [J]. *Lung Cancer*, 2011, 74(1): 41-47.
- [24] CONICKX G, MESTDAGH P, AVILA COBOS F, *et al.* MicroRNA Profiling Reveals a Role for MicroRNA-218-5p in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(1): 43-56.
- [25] CHEN B B, LI Z H, GAO S. Circulating miR-146a/b correlates with inflammatory cytokines in COPD and could predict the risk of acute exacerbation COPD [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(7): e9820.
- [26] HUANG X, ZHU Z, GUO X, *et al.* The roles of microRNAs in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 335-347.
- [27] KÖNIGSHOFF M, EICKELBERG O. WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal? [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42(1): 21-31.
- [28] KNEIDINGER N, YILDIRIM A, CALLEGARI J, *et al.* Activation of the WNT/ β -catenin pathway attenuates experimental emphysema [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(6): 723-733.
- [29] KÖNIGSHOFF M, BALSARA N, PFAFF E M, *et al.* Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *PLoS One*, 2008, 3(5): e2142.
- [30] WU Y, GUAN S, GE Y, *et al.* Cigarette smoke promotes chronic obstructive pulmonary disease (COPD) through the miR-130a/Wnt1 axis [J]. *Toxicology in Vitro*, 2020, 65: 104770.
- [31] 张香红, 王荟荟, 黄小燕, 等. Wnt 信号通路在慢性阻塞性肺疾病中的研究进展 [J]. *临床肺科杂志*, 2021, 26(4): 628-631, 645.
- [32] 罗清, 刘萌, 廖俊城. NF- κ B 信号通路影响慢性阻塞性肺疾病进展的研究 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(6): 124-126.
- [33] OGLESBY I K, MCELVANEY N G, GREENE C M. MicroRNAs in inflammatory lung disease—master regulators or target practice? [J]. *Respiratory research*, 2010, 11(1): 148.
- [34] CARAMORI G, ROMAGNOLI M, CASOLARI P, *et al.* Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations [J]. *Thorax*, 2003, 58(4): 348-351.
- [35] KIM R Y, SUNKARA K P, BRACKE K R, *et al.* A microRNA-21-mediated SATB1/S100A9/NF- κ B axis promotes chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(621): eaav7223.
- [36] SUNDAR I K, LI D, RAHMAN I. Small RNA-sequence analysis of plasma-derived extracellular vesicle miRNAs in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease as circulating biomarkers [J]. *Journal of extracellular vesicles*, 2019, 8(1): 1684816.
- [37] BOUEIZ A, PHAM B, CHASE R, *et al.* Integrative Genomics Analysis Identifies ACVR1B as a Candidate Causal Gene of Emphysema Distribution [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60(4): 388-398.
- [38] GARRIDO-MARTÍN E M, BLANCO F J, ROQUÈ M, *et al.* Vascular injury triggers Krüppel-like factor 6 mobilization and cooperation with specificity protein 1 to promote endothelial activation through upregulation of the activin receptor-like kinase 1 gene [J]. *Circ Res*, 2013, 112(1): 113-127.
- [39] HUERTAS A, TU L, GUIGNABERT C. New targets for pulmonary arterial hypertension: going beyond the currently targeted three pathways [J]. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2017, 23(5): 377-385.
- [40] HENKEL M, PARTYKA J, GREGORY A D, *et al.* FSTL-1 Attenuation Causes Spontaneous Smoke-Resistant Pulmonary Emphysema [J]. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2020, 201(8): 934-945.
- [41] KURAKULA K, VOS M, LOGIANTARA A, *et al.* Nuclear Receptor Nur77 Attenuates Airway Inflammation in Mice by Suppressing NF- κ B Activity in Lung Epithelial Cells [J]. *J Immunol*, 2015, 195(4): 1388-1398.

- Res, 2019, 25(13):3873-3886.
- [16] YAMAGUCHI M, TAKAGI K, NARITA K, *et al.* Stromal CCL5 Promotes Breast Cancer Progression by Interacting with CCR3 in Tumor Cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1918.
- [17] GAO D, RAHBAR R, FISH E N, *et al.* CCL5 activation of CCR5 regulates cell metabolism to enhance proliferation of breast cancer cells[J]. *Open Biol*, 2016, 6(6): 160122
- [18] CHA Y J, KOO J S. Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Breast Cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1785.
- [19] URATA S, IZUMI K, HIRATSUKA K, *et al.* C - C motif ligand 5 promotes migration of prostate cancer cells in the prostate cancer bone metastasis microenvironment[J]. *Cancer Sci.*, 2018, 109(3): 724-731.
- [20] LUO J, LEE S O, CUI Y, *et al.* Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) increase prostate cancer cell invasion via altering the CCL5/HIF2 α /androgen receptor signals [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29):27555-27565.
- [21] HUANG R, GUO L, GAO M, *et al.* Research Trends and Regulation of CCL5 in Prostate Cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 1417-1427.
- [22] AN G, WU F, HUANG S, *et al.* Effects of CCL5 on the biological behavior of breast cancer and the mechanisms of its interaction with tumor associated macrophages[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(6):2499-2511.
- [23] HUANG R, QI S, WANG W, *et al.* CCL5 derived from tumor-associated macrophages promotes prostate cancer stem cells and metastasis via activating β -catenin/STAT3 signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4):234.
- [24] BAI S, WU Y, YAN Y, *et al.* The effect of CCL5 on the immune cells infiltration and the prognosis of patients with kidney renal clear cell carcinoma[J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(18): 2917-2925.
- [25] HUANG R, GUO L, GAO M, *et al.* Research Trends and Regulation of CCL5 in Prostate Cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14:1417-1427.
- (收稿日期: 2022-04-17; 修回日期: 2022-05-13; 编辑: 张翰林)

(上接第 20 页)

- [42] 申永春, 万春, 文富强. MicroRNA 在气道炎症性疾病中的研究进展 [J]. *国际呼吸杂志*, 2010, (21): 1336-1340.
- [43] DANG X, QU X, WANG W, *et al.* Bioinformatic analysis of microRNA and mRNA Regulation in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Respiratory research*, 2017, 18(1): 4.
- [44] LEUENBERGER C, SCHUOLER C, BYE H, *et al.* MicroRNA-223 controls the expression of histone deacetylase 2: a novel axis in COPD [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(6): 725-734.
- [45] IZZOTTI A, CALIN G A, ARRIGO P, *et al.* Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke [J]. *FASEB J*, 2009, 23(3): 806-812.
- [46] GU W, YUAN Y, YANG H, *et al.* Role of miR-195 in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55:49-54.
- [47] SHI L, XIN Q, CHAI R, *et al.* Ectopic expressed miR-203 contributes to chronic obstructive pulmonary disease via targeting TAK1 and PIK3CA [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10662-10670.
- [48] CHATILA W M, CRINER G J, HANCOCK W W, *et al.* Blunted expression of miR-199a-5p in regulatory T cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease compared to unaffected smokers [J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 177(1): 341-352.
- [49] ZENG Z, HE S, LU J, *et al.* MicroRNA-21 aggravates chronic obstructive pulmonary disease by promoting autophagy [J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(2): 89-97.
- [50] SONG Q, CHEN P, LIU X M. The role of cigarette smoke-induced pulmonary vascular endothelial cell apoptosis in COPD [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 39.
- [51] JIA Q, CHANG J, HONG Q, *et al.* MiR-212-5p exerts a protective effect in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Discov Med*, 2018, 26(144): 173-183.
- [52] SHEN Z, TANG W, GUO J, *et al.* miR-483-5p plays a protective role in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(1): 193-200.
- (收稿日期: 2022-03-31; 修回日期: 2022-04-21; 编辑: 张翰林)