

miR - 205 通过 NKD1 - Wnt - EMT 通路调节 特发性肺纤维化

姜逸林, 陈天源, 李泽艳, 鲍其雪, 姚于勤, 伍东升, 彭莉君, 张凌

四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院卫生毒理学与病理学系, 四川省教育厅分子毒理学重点实验室, 四川 成都 610041

摘要:目的 筛选影响特发性肺纤维化的关键 miRNA, 探究其具体机制与信号通路。**方法与结果** 通过分析 IPF 患者肺组织中的 miRNA, 发现 miR - 205 显著上调 ($\log_{FC} = 1.91$, adj. P Value < 0.05)。体外实验证实, miR - 205 直接靶向并抑制 NKD1 的表达, 进而调控 Wnt/ β - Catenin 信号通路, 影响 EMT 过程, 从而调节细胞迁移及纤维化进程。制备包含 miR - 205 抑制剂的脂质纳米颗粒, 并在小鼠肺纤维化模型中评估其治疗效果。经气管滴注给药后, i205 - LNP 显著上调 NKD1 的表达, 与造模组相比提高约 4.05 倍 ($P < 0.05$), 并降低肺组织中纤维化相关标志物 α - sma (约 15%, $P < 0.001$) 及 Col1a1 (约 25%, $P < 0.001$) 的表达水平, 小鼠肺部炎症与纤维化得到缓解, 体重下降减轻, 生存率提高。**结论** miR - 205 抑制靶基因 NKD1 的表达, 通过 Wnt - EMT 信号通路促进特发性肺纤维化的发生。

关键词: 特发性肺纤维化; miR - 205; NKD1; Wnt/ β - Catenin; 上皮间质转化

中图分类号: R114 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003 - 8507(2026)14 - 2648 - 09

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202604070

miR - 205 regulates idiopathic pulmonary fibrosis through NKD1 - Wnt - EMT pathway

JIANG Yi - lin, CHEN Tian - yuan, LI Ze - yan, BAO Qi - xue, YAO Yu - qin, WU Dong - sheng,

PENG Li - jun, ZHANG Lin

Department of Health Toxicology and Pathology, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Key Laboratory of Molecular Toxicology of Sichuan Provincial Department of Education, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: Objective To identify key microRNAs involved in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and investigate the underlying mechanisms. **Methods & Results** Analysis of miRNA expression in lung tissues from IPF patients revealed a significant upregulation of miR - 205 ($\log_{FC} = 1.91$, adj. P Value < 0.05). In vitro experiments confirmed that miR - 205 directly targets and suppresses NKD1 expression, thereby modulating the Wnt/ β - Catenin signaling pathway and influencing epithelial - mesenchymal transition (EMT), which in turn regulates cell migration and fibrotic progression. Lipid nanoparticles encapsulating a miR - 205 inhibitor (i205 - LNP) were formulated and evaluated for therapeutic efficacy in a mouse model of pulmonary fibrosis. Following intratracheal administration, i205 - LNP significantly upregulated NKD1 expression by approximately 4.05 - fold compared to the model group ($P < 0.05$) and reduced the levels of fibrosis - related markers, including α - SMA (approximately 15%, $P < 0.001$), and Col1a1 (approximately 25%, $P < 0.001$) in lung tissues. Consequently, pulmonary inflammation and fibrosis were alleviated, accompanied by attenuated body weight loss and improved survival rates in treated mice. **Conclusion** miR - 205 promotes the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis by suppressing its target gene NKD1 via the Wnt - EMT signaling pathway.

Keywords: Idiopathic pulmonary fibrosis; miR - 205; NKD1; Wnt/ β - Catenin; Epithelial - mesenchymal transition

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性、进行性、纤维化性间质性肺疾病, 组织学和 (或) 胸部 HRCT 特征性表现为普通型间质性

肺炎 (UIP)。IPF 病情凶险, 确诊后的中位生存时间为 3 ~ 5 年^[1]。目前有两种治疗 IPF 药物, 吡非尼酮和尼达尼布^[2]。虽然这两种药物都能减缓疾病的进展, 但它们并不能治愈 IPF。目前迫切的需要研究新的疗法来提高患者的生存率。

全球 IPF 的患病率和年发病率分别是 (3 ~ 45)/10 万人口和 (1 ~ 13)/10 万人口^[3]。随着全球人口老

基金项目: 国家自然科学基金联合项目 (U23A20495); 国家重点研发计划 (2023YFC2509300)

作者简介: 姜逸林 (2000—), 男, 硕士在读, 研究方向: 卫生毒理学

通信作者: 张凌, E - mail: zhangling83@scu.edu.cn

龄化及潜在危险因素的增多,IPF 将带来更加沉重的疾病负担。IPF 的病因不明确,诊断时间通常为 56 ~ 69 岁,且发病率及患病率有随年龄升高而增高的趋势,可能反应衰老相关的过程^[4-5]。衰老是一个动态的过程^[6],其定义为机体各系统随时间推移而出现的功能衰退^[7]。衰老涉及多种细胞及分子水平的改变。其中,表观遗传学的改变是衰老的重要细胞机制之一^[8-9]。

MicroRNAs (miRNAs) 是长度在 19 ~ 25 nt 的内源性非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 是调控蛋白质生物合成的一类重要的 ncRNA^[10]。miRNA 通过与蛋白质结合形成复合物,即 miRNA 诱导的沉默复合物(miRISC),通过复合物中的蛋白成分对翻译过程产生抑制作用^[11]。miRNA 是影响 IPF 发生的重要因素,研究表明,let-7d、miR-142-3p、miR-15a 等多种 miRNA 通过调节上皮-间质转化(EMT)过程参与 IPF 的形成^[12-14]。值得关注的是,Wnt/ β -Catenin 信号通路在 IPF 病理过程中呈异常激活状态,并与 EMT、炎症反应及氧化应激等病理过程密切相关^[15]。最近的研究发现,多种 miRNA 可通过直接靶向 Wnt/ β -Catenin 通路的关键因子参与纤维化调控。Liu 等研究表明,miR-27a-3p 通过靶向 Wnt3a 的 3'-非翻译区,抑制 Wnt3a/ β -Catenin 信号通路活性,从而减少肺成纤维细胞 I 型和 III 型胶原合成^[16]。Yu 等则揭示了 miR-29b-TRIOBP-TRIO- β -Catenin 调控轴在 IPF 疾病发展过程的重要作用^[17]。此外,外泌体介导的 miRNA 转运途径进一步丰富了 miRNA 调控 Wnt/ β -catenin/EMT 轴的机制网络。研究表明,miR-4687-5p 通过靶向 β -Catenin 抑制其核转位,阻断 Wnt/ β -catenin 通路对 EMT 的驱动作用,从而发挥抗纤维化的作用^[18]。然而,目前关于 miRNA 通过 Wnt/ β -Catenin-EMT 通路调节特发性肺纤维的研究较少,miRNA 参与纤维化信号传导通路也有待进一步验证与探索。

本研究通过生物信息分析、肺纤维化动物及细胞模型的构建,分析 miRNA 在正常与疾病模型之间表达的差异,探究其对肺纤维化的影响及其潜在的机制。研究将肺纤维发生的过程与相关的组织病理学机制提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 SPF 级 C57BL6/J 小鼠(6 ~ 8 周龄,18 ~ 22 g)购自北京维通利华。于四川大学华西药学院 SPF 级实验动物中心适应性饲养 1 周,自由饮水摄食,温度 20 ~ 24℃、湿度 40% ~ 60%、12 h 明暗交替。所有实验操作均通过四川大学医学伦理

委员会批准(Gwll2023055)。

1.2 试剂 盐酸博来霉素(67763-87-5)购自 KKL 公司;1,2-二油醇-3-二甲基氨基-丙烷(104162-47-2)、1,2-二油酰基-sn-丙三基-3-磷脂酰乙醇胺(4004-05-1)、胆固醇(57-88-5)购自阿拉丁试剂公司;兔抗 Collagen I 多抗(ab316222)、兔抗 α -SMA 单抗(ab124964)、鼠抗 GAPDH 单抗(ab8245)购自 Abcam 公司;兔抗 NKD1 多抗(HA500419)、山羊抗兔 HRP 标记二抗(HA1001)、山羊抗鼠 HRP 标记二抗(HA1006)购自杭州华安生物有限公司;细胞总 RNA 提取试剂盒(RE-03113)、动物组织总 RNA 提取试剂盒(RE-03014)购自福际生物技术有限公司;RNA 逆转录试剂(RK20429)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;实时荧光定量 PCR 试剂盒(Q712-01)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;has-miR-205-5p inhibitor(HY-RI00421)购自 MCE 公司;Human/Mouse TGF- β 检测试剂盒(EK981)、Mouse TNF- α 检测试剂盒(EK282)、Mouse IL-6 检测试剂盒(EK206)购自联科生物;RNA 转染试剂(E607402)购自生工公司。

1.3 仪器 Olympus 全自动病理切片扫描机(奥林巴斯);酶标仪(赛默飞世尔科技公司);QuantStudio 3 实时荧光定量 PCR 系统(赛默飞世尔科技公司);iBright™ CL750 成像系统(赛默飞世尔科技公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠肺纤维化模型构建 小鼠随机分为 3 组(每组 20 只):生理盐水对照组、博来霉素模型组、博来霉素+iLNP-205 治疗组。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,经非暴露气管滴注博来霉素(3 mg/ml,50 μ l)或等体积生理盐水。治疗组于第 1、7、14、21 天经气管滴注 i205-LNP(50 μ l,含 8 μ g miR-205 反义链)。第 28 天处死取肺:肺尖固定于 4% 多聚甲醛,其余组织液氮速冻后-80℃保存。

1.4.2 组织切片与染色 肺组织经 4% 多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋后,以 4 μ m 厚度切片,贴片后烘干。使用苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠肺部炎症状况,使用 Masson 三色染色技术评估肺组织纤维化情况,采用 Image J 对胶原纤维区域进行识别,评价胶原纤维蓝色区域占全肺染色比重。

1.4.3 细胞培养 A549 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,细胞密度达到 90% 时消化,取 5×10^5 个细胞接种于六孔板上。12 h 贴壁后更换无血清 DMEM 培养基饥饿 6 h,将 RNA 转染试剂与无血清培养基混合并加入相应 miRNA inhibitor,转染 6 h 后,换液并进行后续操作。

1.4.4 RT-qPCR 细胞或组织用试剂盒提取总

RNA ,NanoDrop 2000 检测纯度(A260/A280 及 A260/A230 在 1.8 ~ 2.1)。mRNA 逆转录体系含 ABScript III RT Mix 4 μl、gDNA Remover Mix 1 μl、总 RNA 1 μg,RT 反应程序设定为:37℃ 2 min,55℃ 15 min,85℃ 5 min。miRNA 逆转录体系含 miRNA P - RT Solution mix 10 μl、Enzyme mix 2 μl、总 RNA 1 μg,反

应程序设定为程序:37℃ 60 min,85℃ 5 min。qPCR 反应条件为 95℃ 5 min,95℃ 10 s,60℃ 10 s,72℃ 10 s,共 40 个循环;溶解曲线为 95℃ 10 s,60℃ 60 s,95℃ 10 s。mRNA 以 GAPDH 作为内参,miRNA 以 U6 作为内参,使用 2⁻ΔΔCt 法定量分析。引物序列详见表 1,均购自生工公司。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers used for RT - qPCR

Gene name		Primer sequence(5' -3')
Hsa - miR205	Forward	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG
	Reverse	加尾法通用引物 R
Hsa - miR652	Forward	AATGGCGCCACTAGGGTTGT
	Reverse	加尾法通用引物 R
U6	Forward	CTCGCTTCGGCAGCAC
	Reverse	AACGCTTCACGAATTTGCCGT
Human GAPDH	Forward	GGGGTCGTTGATGGCAACA
	Reverse	AGGTCGGTGTAACGGATTTG
Human COL1A1	Forward	GTGCGATGACGTGATCTGTGA
	Reverse	CGGTGGTTTCTTGCTCGGT
Human Vimentin	Forward	GGCTCAGATTCAGGAACAGC
	Reverse	GCTTCAACGGCAAAGTTCCTC
Human Ecadherin	Forward	CAGAAAGTTTTCCACCAAAG
	Reverse	AAATGTGAGCAATTVTGCTT
Human TGFβ	Forward	TGTTGCTACCCAAGGAAAGC
	Reverse	CACTCTGTGTTTGGAGCAA
Human β - Catenin	Forward	CATCTACACAGTTTGATGCTGC
	Reverse	GCAGTTTTTGTCACTTCAGGGA
Mouse Col1a1	Forward	CGCAAAGAGTCTACATGTCTAG
	Reverse	CATTGTGTATGCAGCTGACTTC
Mouse Vimentin	Forward	GGAATGCAGCCGTGGAACCTT
	Reverse	TTGCAGCCTGCTGGGATCTT
Mouse αSMA	Forward	GGACGTACAACTGGTATTGTGC
	Reverse	TCGGCACTAGTCACGAAGGA
Mouse Gapdh	Forward	AGGTCGGTGTAACGGATTTG
	Reverse	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1.4.5 Western blot 细胞或组织(约 10 mg)用 RIPA 裂解液(含蛋白酶/磷酸酶抑制剂)提取蛋白,使用 BCA 法定量。样品与 5 × 上样缓冲液混合后 100℃ 加热 5 min。SDS - PAGE (150 V, 60 min) 后湿转至 PVDF 膜(260 mA, 60 min),封闭后一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,ECL 显影,以 GAPDH 作为内参,使用 Image J 分析蛋白表达强度。

1.4.6 免疫荧光 细胞爬片经 PBS 预处理后接种细胞(1 × 10⁴/ml),干预后用 4% 多聚甲醛固定 30 min,1% Triton X - 100 通透 20 min,10% 山羊血清封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜,荧光二抗室温避光孵育 1 h,DAPI 染核 5 min,封片后荧光显微镜观察。

1.4.7 划痕实验 6 孔板背面划线,接种细胞(5 × 10⁵/ml)。培养至 90% 融合,用 200 μl 枪头划痕,PBS 洗涤去除脱落细胞。于 0、6、12 h 拍照,Image J 测量划痕面积,细胞迁移能力通过伤口愈合百分比表示,

计算公式如下:
伤口愈合百分比(%) =
$$\frac{\text{初始划痕面积}(0\text{ h}) - \text{各时间点划痕面积}(t)}{\text{初始划痕面积}(0\text{ h})} \times 100\%$$

1.4.8 细胞迁移实验 转染 miR - 205 inhibitor 的细胞以无血清 DMEM 重悬,取 200 μl(5 × 10⁴ 个)加入上室,下室加 700 μl 含 10% FBS 的 DMEM。培养 24 h 后,擦除上室未迁移细胞,4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,镜下随机 5 个视野计数。

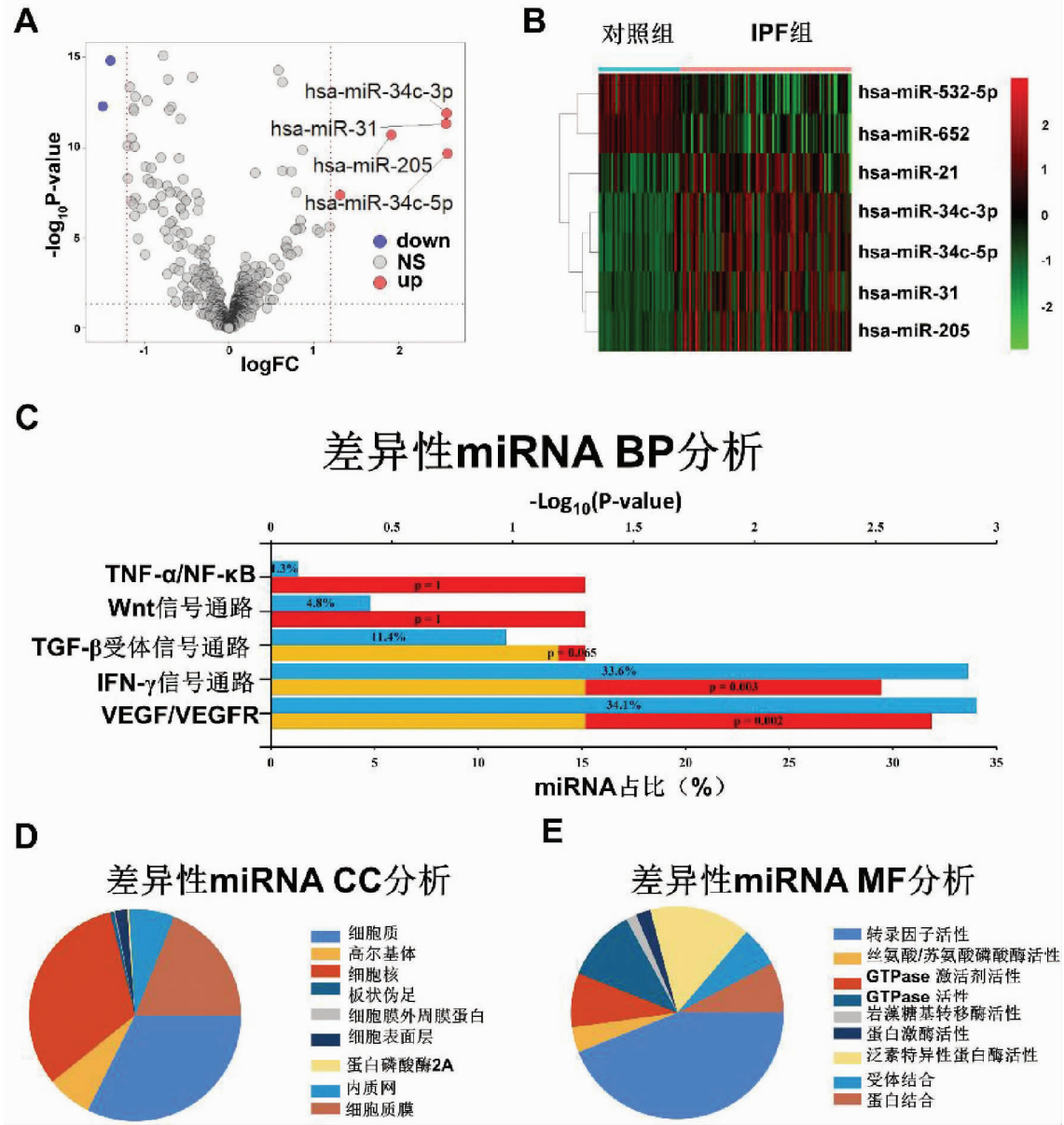
1.4.9 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行单因素方差分析(LSD 或 Dunnett's T3 法)或非配对 *t* 检验。检验水准 α = 0.05。

2 结 果

2.1 IPF 患者与对照组差异性 miRNA 生物信息学分

析 本研究利用 GEO 公开数据集 (GEO accession: GSE32538), 通过生物信息学方法分析特发性肺纤维化 (IPF) 患者与对照人群之间 miRNA 表达的差异。计算基因表达折叠变化 (logFC), 方法如前所述^[16]。对每个 miRNA 的表达拟合线性模型, 采用经验贝叶斯方法进行残差分析, 获得 *t* 统计量及校正后 *P* 值 (adj. *P*. Val)。以 logFC > 1.2 且 adj. *P*. Val < 0.05 为阈值, 绘制火山图和热图 (图 1A、B)。与对照组相比, IPF 患者 miR-205 表达升高, 差异具有统计学意义。

采用 Funrich 软件^[19] 分析差异表达 miRNA 可能参与的通路及机制。如图 1C 所示, IPF 与对照组差异表达 miRNA 潜在涉及的生物学通路包括: VEGF-VEGFR 通路 (34.1%, *P* = 0.002)、IFN- γ 通路 (33.6%, *P* = 0.003)。分子功能 (MF) 网络分析显示, 差异表达 miRNA 主要作用于转录因子活性、泛素特异性蛋白酶活性调控及蛋白结合调控。细胞组分 (CC) 网络分析表明, 差异性 miRNA 主要在细胞质和细胞核中发挥作用 (图 1D、E)。



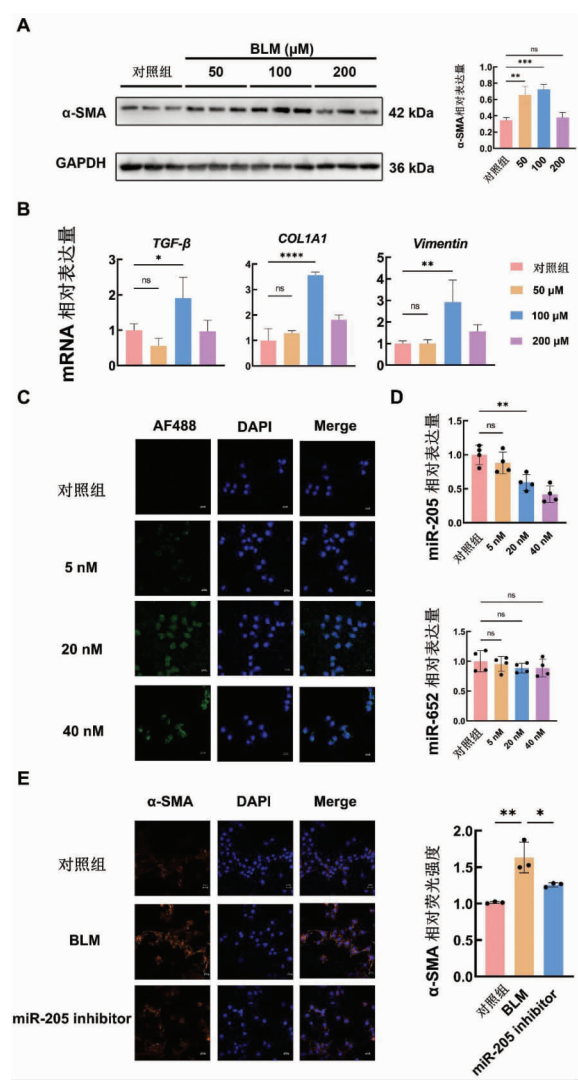
注: A, IPF 患者与对照组中差异表达 miRNA 火山图。B, IPF 患者与对照组中差异表达 miRNA 热图。C, IPF 患者与对照组中差异表达 miRNA 生物通路富集分析。D, IPF 患者与对照组中差异表达 miRNA 分子功能分析。E, IPF 患者与对照组中差异表达 miRNA 细胞组分分析。

图 1 IPF 患者与对照组 miRNA 生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of miRNA in IPF patients and controls

2.2 miR-205 对特发性肺纤维化的影响 本研究进一步在体外模型中探究 miR-205 对特发性肺纤维

的影响及机制。采用博来霉素刺激 A549 细胞建立纤维化模型, 通过 RT-qPCR 和 Western blot 确定诱导



注:A,同浓度博来霉素处理 A549 细胞中 α -SMA 蛋白的表达($n=3$)。B,不同浓度博来霉素处理 A549 细胞中纤维化相关基因表达水平($n=3$)。C,不同浓度 miR-205 inhibitor 转染下细胞摄取效率。D,不同浓度 miR-205 inhibitor 转染后细胞中 miR-205 表达水平($n=4$)。E,miR-205 inhibitor 转染后 A549 细胞中 α -SMA 表达水平($n=3$)。ns $P\geq 0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ (下同)。

图 2 干扰 miR-205 在细胞水平减轻纤维化
Fig. 2 Knockdown of miR205 Ameliorates Fibrosis at the Cellular Level

纤维化最佳浓度。100 μ M 博来霉素处理 24 小时后,纤维化相关基因及蛋白(COL1A1、Vimentin 和 α -SMA)表达显著升高,因此选定该条件作为造模方案(图 2A、B)。采用 AF488 标记 miR-205 inhibitor 转染并通过共聚焦显微镜观测,确定 miR-205 抑制剂的最佳转染浓度为 20 nM(图 2C)。RT-qPCR 分析证明 miR-205 被浓度依赖性地沉默(最高剂量下敲低约 60%),且无脱靶效应(图 2D)。 α -SMA 免疫荧光评估显示,博来霉素可诱导 A549 细胞发生纤维化,而干扰 miR-205 可明显减弱这一效应(图 2E)。这

些结果表明,在体外模型中抑制 miR-205 具有一定的抗纤维化作用。

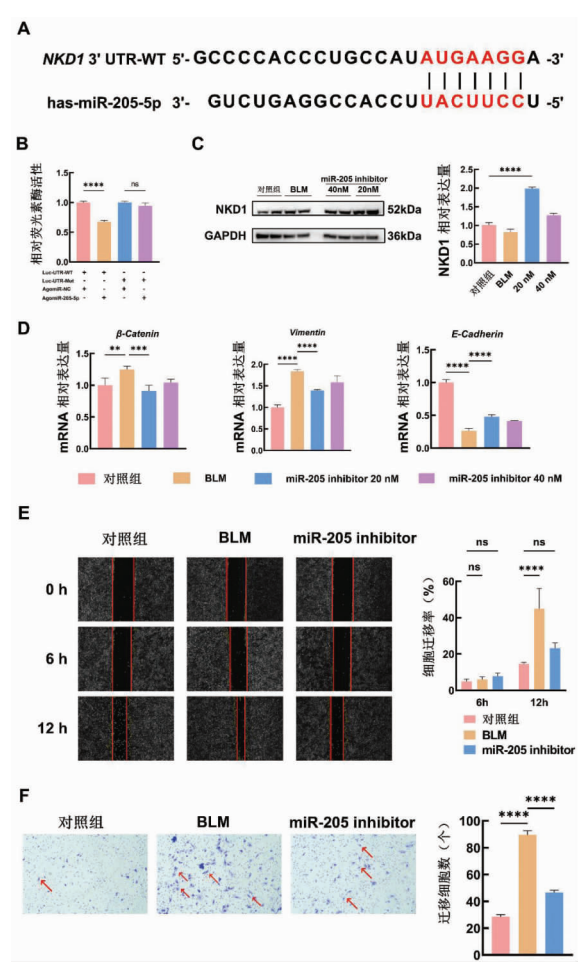
2.3 miR-205 通过 NKD1-Wnt-EMT 通路调节特发性肺纤维化 既往研究表明,miRNA 通过与靶基因 3'-非翻译区(3'-UTR)结合发挥其生物学功能^[20]。因此,鉴定 miR-205 的潜在靶点对于阐明其在 IPF 中的作用至关重要。利用 TargetScan 预测 miR-205 的潜在靶基因。分析显示,在 NKD1(naked cuticle homolog 1)mRNA 的 3'-UTR 内存在 7 个 miR-205 的潜在结合位点,提示 NKD1 是 miR-205 的潜在靶基因(图 3A)。

为验证这一靶向关系,本研究进行了双荧光素酶报告基因检测。结果表明 miR-205 与 NKD1 3'-UTR 上的预测位点特异性结合发挥调控作用(图 3B)。Western blot 实验进一步在蛋白水平证实了这一调控关系。如图 3C 所示,博来霉素处理显著下调 A549 细胞中 NKD1 蛋白的表达。使用 miR-205 inhibitor 干扰后,NKD1 表达呈剂量依赖性恢复。

之前的研究表明,NKD1 是 Wnt 信号通路的负调控因子^[21],而 Wnt 信号通路失调可通过驱动上皮-间充质转化(EMT)过程促进肺纤维化^[22],本研究推测抑制 miR-205 可能通过上调 NKD1 抑制 Wnt-EMT 信号通路。为验证这一假设,本研究检测 A549 细胞中相关基因的表达。结果发现,抑制 miR-205 可下调 Wnt 通路标志物 β -Catenin 的表达,并缓解了博来霉素诱导间质标志物 Vimentin 的过表达与上皮标志物 E-cadherin 的下调(图 3D)。细胞形态学的变化进一步证明了 miR-205 对 EMT 过程的影响,划痕实验显示,博来霉素显著增强 A549 细胞的迁移能力,而干扰 miR-205 可有效抑制该效应(图 3E)。同样,Transwell 迁移实验表明,博来霉素诱导的细胞迁移可被 miR-205 抑制剂显著减弱(图 3F)。综上所述,这些数据揭示了一条机制通路:抑制 miR-205 通过 NKD1-Wnt-EMT 通路减轻 IPF。

2.4 干扰 miR-205 减轻博来霉素诱导小鼠肺纤维化 本研究在博来霉素诱导的 IPF 小鼠模型中评估了体内抑制 miR-205 的治疗效果。根据之前的研究^[23],合成包含 miR-205 反义寡核苷酸的阳离子脂质纳米颗粒(i205-LNP),通过气管滴注实现对 miR-205 表达的敲低。对合成的 i205-LNP 进行表征,其平均流体动力学直径(Z-Average)为(255.9 ± 6.8) nm,粒径分布窄且单分散性良好。Zeta 电位为 +39.7 mV,有利于细胞高效摄取^[24]。

经过一周的检疫和适应期后,根据体重将小鼠随机分为三组:对照组、博来霉素诱导的 IPF 模型组(BLM 组)和 i205-LNP 治疗组。在第 0 天通过气管



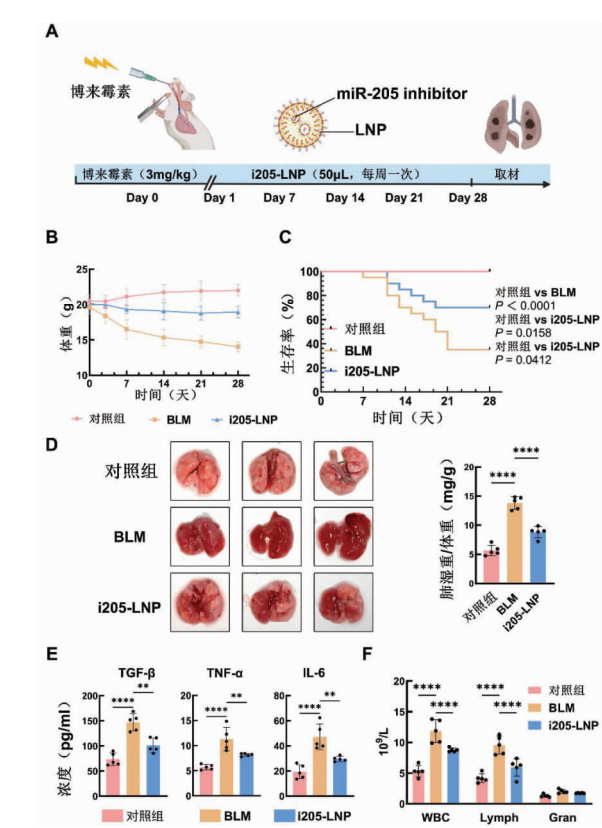
注:A,miR-205 与 NKD1 mRNA 之间的预测结合位点。B,不同浓度 miR-205 inhibitor 处理后 A549 细胞 NKD1 蛋白表达($n=4$)。C,双荧光素酶报告基因实验($n=3$)。D,不同浓度 miR-205 inhibitor 处理后 A549 细胞中 Wnt 及 EMT 通路相关基因表达水平($n=4$)。E,细胞划痕实验($n=3$)。F,细胞迁移实验($n=3$)。

图 3 miR-205 通过 NKD1-Wnt-EMT 信号通路调控肺纤维化

Fig. 3 miR205 Modulates Pulmonary Fibrosis via the NKD1-Wnt-EMT Signaling Pathway

滴注博来霉素(3 mg/ml,50 μ l)构建肺纤维化模型。根据之前的研究^[25],在造模后第 1 天通过气管滴注 i205-LNP(50 μ l,含 8 μ g miR-205 反义链)进行预防性治疗,之后在第 7 天、第 14 天、第 21 天同样操作给药进行治疗,造模后第 28 天处死小鼠收集组织进行后续分析,具体流程图见图 4A。体重监测显示,与对照组相比,BLM 小鼠体重显著下降;而 i205-LNP 可有效改善这趋势(图 4B)。与 BLM 组相比,i205-LNP 治疗组小鼠死亡率显著降低(图 4C)。治疗后第 28 天,处死小鼠并收集组织。对小鼠肺组织称重发现,BLM 组肺湿重较对照组显著增加;而 i205-LNP 治疗组的肺重/体重比呈现下降趋势,提示该干预具有潜在抗纤维化效应(图 4D)。此外,经 i205-LNP 治疗后,IPF 模型小鼠的炎症明显减轻。对促炎及促

纤维化因子的分析显示,BLM 组与治疗组之间 TGF- β 、TNF- α 和 IL-6 水平存在显著差异(图 4E)。此外,外周血细胞计数表明,抑制 miR-205 可有效减轻 BLM 造成的小鼠全身性炎症反应(图 4F)。



注:A,小鼠肺纤维化模型建立及给药方案。B,小鼠体重变化曲线($n=5$)。C,小鼠生存曲线。D,小鼠肺大体形态、肺重与体重比($n=5$)。E,小鼠肺脏炎症因子水平($n=5$)。F,小鼠外周全血细胞计数分析($n=5$)。

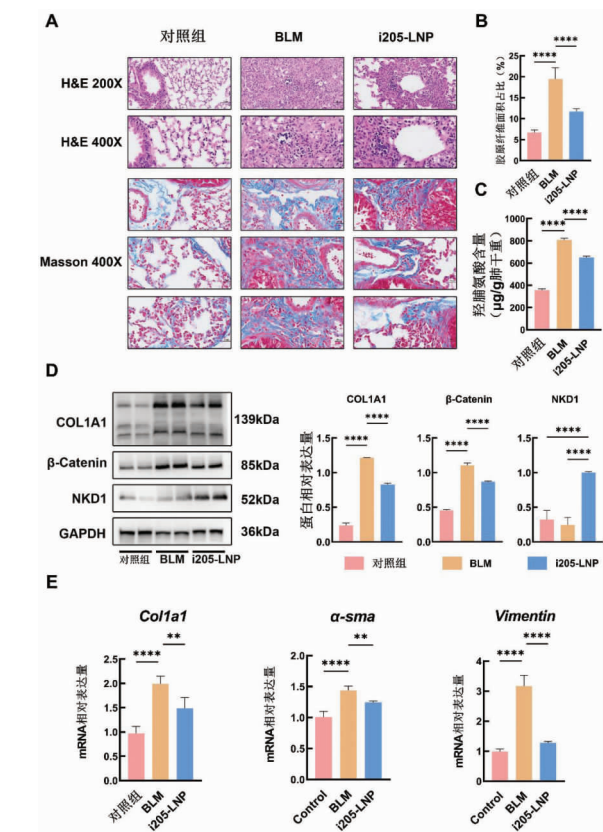
图 4 干扰 miR-205 减轻博来霉素诱导肺部炎症

Fig. 4 Knockdown of miR-205 Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Inflammatory Injury

本研究进一步评估了抑制 miR-205 对肺组织病理学重塑的影响。组织病理学染色显示,i205-LNP 治疗后肺内纤维化区域减少(图 5A, B)。通过羟脯氨酸法对肺组织中总胶原进行定量,得到了相互印证的结果(图 5C)。采用 Western blot 进一步验证 i205-LNP 的治疗机制。抑制 miR-205 后,BLM 小鼠肺组织中 NKD1 蛋白表达显著上调,同时伴随 β -Catenin 的抑制,进而减弱了 BLM 诱导的肺纤维化标志蛋白 COL1A1 的表达(图 5D)。

此外,从小鼠肺组织中提取总 RNA,通过 RT-qPCR 分析纤维化相关基因(Vimentin、 α -sma、Col1a1)的表达。与 BLM 组相比,i205-LNP 治疗组小鼠纤维化标志物的表达均显著下调(图 5E)。综上所述,抑制 miR-205 通过发挥抗炎与抗纤维化的作

用,显著减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化。



注:A,小鼠肺组织 H&E 染色及 Masson 染色代表性图像。B,小鼠肺组织胶原体积分数($n=5$)。C,小鼠肺组织羟脯氨酸含量($n=5$)。D,各组小鼠肺组织中 COL1A1、 β -Catenin、NKD1 蛋白表达水平($n=6$)。E,小鼠肺组织中纤维化相关基因表达水平($n=5$)。

图 5 干扰 miR - 205 缓解博来霉素诱导的肺纤维化
Fig. 5 Knockdown of miR205 Suppresses Bleomycin - Induced Pulmonary Fibrosis

3 讨论

特发性肺纤维化(IPF)是一种慢性、进行性且致命的间质性肺病。其发病机制尚不完全明确,目前公认的核心机制包括上皮细胞损伤、异常修复、成纤维细胞灶的形成以及细胞外基质代谢失调^[26-27]。

近年来,表观遗传调控,尤其是微小 RNA(miRNA)的作用,因其在体内功能的多样性而引起了广泛关注^[28]。miRNA 是一类长约 22 个核苷酸的非编码 RNA,主要通过结合靶 mRNA 的 3' 非翻译区,在转录后水平调控基因表达^[29-30]。一个 miRNA 可调控数百个不同的 mRNA,形成复杂的调控网络,在细胞命运决定、个体发育及疾病发生发展中扮演关键角色^[31-32]。

通过整合生物信息学分析、动物模型验证和体外细胞实验,我们系统揭示了 miR - 205 在 IPF 中的关

键作用,并阐明其通过靶向 NKD1 调控 Wnt/ β - Catenin 信号通路进而影响上皮 - 间充质转化过程的新机制。通过 TargetScan 预测及双荧光素酶报告基因实验,我们发现 NKD1 是 miR - 205 的直接靶基因。NKD1 是 Wnt/ β - Catenin 通路的经典内源性负调控因子,通过促进 β - Catenin 降解来抑制该通路活性^[33-34]。虽然已知 Wnt 通路的异常激活是 EMT 及肺纤维化发病机制的关键驱动因素^[35-36],但本研究首次将 NKD1 与肺纤维化相关联,也为纤维化研究提供了新的潜在蛋白靶点。此外,本研究的划痕实验和 Transwell 实验表明,抑制 miR - 205 可有效减弱博来霉素诱导的 A549 细胞迁移和侵袭能力的增强,提示 miR - 205 的促纤维化作用和其促进 EMT 相关。这与 miR - 205 在多种癌症中高表达并促进 EMT 的现象一致^[37-38]。

随后,本研究通过气道给予 LNP 递送系统,在体内验证了 miR - 205 的治疗潜力。该治疗系统简单有效,显示了 miR - 205 以及在肺部疾病中的转化可能性。同时实验结果证明了 miR - 205 在体内外均可一致性地调控其靶基因 NKD1,揭示了 NKD1 - Wnt - EMT 轴是肺纤维化的一个可行且关键的治疗靶点。

然而,本研究仍存在一些局限性。博来霉素诱导的小鼠模型虽然是研究 IPF 最广泛使用的模型之一,但它是一种急性损伤模型,其病理过程与人类 IPF 的慢性、进行性特征不同^[39-40]。此外,虽然博来霉素可造成肺上皮细胞损伤、成纤维细胞异常活化和上皮间质转化(EMT)等病理过程,反映从炎症到纤维化的疾病过程^[41],但其诱导的肺纤维化在啮齿动物上存在着自限性与可逆性等局限^[42]。最后,尽管本研究已通过双荧光素酶报告基因实验初步证明 miR - 205 对 NKD1 基因的靶向调控作用,但由于单个 miRNA 可以调控广泛的靶点,单个基因也可能受多个 miRNA 的调控^[43],miR - 205 在肺纤维化环境中复杂的调控网络还有待深入探究,miR - 205 - NKD1 调节通路也有待进一步的验证。这在一定程度上限制了结论的普适性。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Raghu G, Remy - Jardin M, Richeldi L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: an official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2022, 205(9): e18 - e47.
- [2] Chianese M, Screm G, Salton F, et al. Pirfenidone and Nintedanib in pulmonary fibrosis: lights and shadows [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2024, 17(6).
- [3] Podolanczuk AJ, Thomson CC, Remy - Jardin M, et al. Idiopathic

- pulmonary fibrosis: state of the art for 2023 [J]. *European Respiratory Journal*, 2023, 61(4): 2200957.
- [4] Kato K, Shin YJ, Palumbo S, et al. Leveraging ageing models of pulmonary fibrosis: the efficacy of Nintedanib in ageing [J]. *European Respiratory Journal*, 2021, 58(5): 2100759.
- [5] 欧阳小荔,彭红. 特发性肺纤维化预后的影响因素[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2021, 20(11): 824–830.
- Ou Yang XL, Peng H. Factors affecting the prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Chinese Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2021, 20(11): 824–830. (In Chinese)
- [6] Yan CX, Liu CQ, Liu BF, et al. Fluorescence lifetime clocks quantify senescence and aging[J]. *Nature Aging*, 2025, 5(12): 2532–2545.
- [7] Moqri M, Herzog C, Poganik JR, et al. Biomarkers of aging for the identification and evaluation of longevity interventions[J]. *Cell*, 2023, 186(18): 3758–3775.
- [8] Oh ES, Petronis A. Origins of human disease: the chrono – epigenetic perspective [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2021, 22(8): 533–546.
- [9] Wu ZM, Zhang WQ, Qu J, et al. Emerging epigenetic insights into aging mechanisms and interventions[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2024, 45(2): 157–172.
- [10] Chen LL, Kim VN. Small and long non – coding RNAs: past, present, and future[J]. *Cell*, 2024, 187(23): 6451–6485.
- [11] Alaei A, Kakumani PK. MicroRNA chemical modifications in post – transcriptional gene silencing and human diseases[J]. *Molecular Therapy – Nucleic Acids*, 2025, 36(4): 102745.
- [12] Liang HH, Liu SS, Chen Y, et al. miR – 26a suppresses EMT by disrupting the Lin28B/let – 7d axis: potential cross – talks among miRNAs in IPF [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2016, 94(6): 655–665.
- [13] Chen YZ, Zhao XG, Sun J, et al. YAP1/twist promotes fibroblast activation and lung fibrosis that conferred by miR – 15a loss in IPF [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2019, 26(9): 1832–1844.
- [14] Njock MS, Guiot J, Henket MA, et al. Sputum exosomes: promising biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Thorax*, 2019, 74(3): 309–312.
- [15] Zheng C, Zhang L, Sun Y, et al. Alveolar epithelial cell dysfunction and epithelial – mesenchymal transition in pulmonary fibrosis pathogenesis [J]. *FrontMol Biosci*, 2025, 12(2): 1564176.
- [16] 刘理静,钱红,胡柯,等. miR – 27a – 3p 通过 Wnt3a/ β – catenin 信号通路抑制肺成纤维细胞 I、III 型胶原合成[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(2): 229–234.
- Liu LJ, Qian H, Hu K, et al. miR – 27a – 3p inhibited synthesis of col I and col III in pulmonary fibroblasts through Wnt3a/ β – catenin signaling pathway [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2019, 35(2): 229–234. (In Chinese)
- [17] Wang L, Zhao WY, Xia C, et al. TRIOBP modulates β – catenin signaling by regulation of miR – 29b in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *CMLS – Cellular and Molecular Life Sciences*, 2023, 81(1): 13.
- [18] Qu HY, Xie WD, Zhang J, et al. Exosomal miR – 4687 – 5p alleviates silica – induced fibrosis by inhibiting EMT via β – catenin targeting[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2026, 776(1): 110714.
- [19] Fonseka P, Pathan M, Chitti SV, et al. FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2021, 433(11): 166747.
- [20] Diener C, Keller A, Meese E. The miRNA – target interactions: An underestimated intricacy [J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(4): 1544–1557.
- [21] Dai Y, Liu J, Li X, et al. Let – 7b – 5p inhibits colon cancer progression by prohibiting APC ubiquitination degradation and the Wnt pathway by targeting NKD1 [J]. *Cancer Science*, 2023, 114(5): 1882–1897.
- [22] Zhang EG, Geng X, Shan S, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells reverse epithelial – mesenchymal transition potentially via attenuating Wnt/ β – catenin signaling to alleviate silica – induced pulmonary fibrosis [J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2021, 31(9): 655–666.
- [23] Passos gibson V, Tahiri H, Yang C, et al. Hyaluronan decorated layer – by – layer assembled lipid nanoparticles for miR – 181a delivery in glioblastoma treatment [J]. *Biomaterials*, 2023, 302(2): 122341.
- [24] Yu MZ, Liu DS, Shah P, et al. Optimizing microfluidic channel design with tilted rectangular baffles for enhanced mRNA – Lipid nanoparticle preparation [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2025, 11(6): 3762–3772.
- [25] Moeller A, Ask K, Warburton D, et al. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008, 40(3): 362–382.
- [26] Spagnolo P, Kropski JA, Jones MG, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: disease mechanisms and drug development [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2021, 222(2): 107798.
- [27] Tanaka KI, Shimoda M, Sugizaki T, et al. Therapeutic effects of eperisone on pulmonary fibrosis via preferential suppression of fibroblast activity [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 52.
- [28] Wang K, Liu HC, Hu QC, et al. Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1): 374.
- [29] Zhang YH, Ding YQ, Li M, et al. MicroRNA – 34c – 5p provokes isoprenaline – induced cardiac hypertrophy by modulating autophagy via targeting ATG4B [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(5): 2374–2390.
- [30] Poliseno L, Lanza M, Pandolfi PP. Coding, or non – coding, that is the question [J]. *Cell Research*, 2024, 34(9): 609–629.
- [31] Van der zee YY, Eijssen LMT, Mews P, et al. Blood miR – 144 – 3p: a novel diagnostic and therapeutic tool for depression [J]. *Molecular Psychiatry*, 2022, 27(11): 4536–4549.
- [32] Zhao XS, Jin XD, Zhang QN, et al. Silencing of the lncRNA H19 enhances sensitivity to X – ray and carbon – ions through the miR – 130a – 3p /WNK3 signaling axis in NSCLC cells [J]. *Cancer Cell International*, 2021, 21(1): 644.
- [33] Zhou J, Lin Y, Kang XH, et al. microRNA – 186 in extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem cells alleviates idiopathic pulmonary fibrosis via interaction with SOX4 and DKK1 [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, 12(1): 96.

耐药性中有重要作用^[18];PTPN11 高表达水平与宫颈癌风险升高相关^[12];PIK3R1 通过 PIK3/AKT 通路调控肿瘤细胞的增殖和迁移^[19]。从蛋白质互作角度验证了基因和通路层面发现的内在一致性。

本研究存在一定局限性:第一,样本量有限,仅使用两种组学数据,未纳入甲基化数据、蛋白质组学数据等更多复杂数据;第二,只探讨了宫颈鳞状细胞癌数据,未扩展到其他癌症类型;第三,部分分析结果的统计效能有限,但所有评估指标均指向同一方向,Bootstrap 置信区间排除无效假设,生物学解释与已知通路相符。后续研究将纳入更多类型的组学数据,在更大样本量的独立队列中进行验证,深入探索模型识别的其他通路和靶点。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

[1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. CA - A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(1): 7 - 33.

[2] Ge S, Liu J, Cheng Y, et al. Multi - view spectral clustering with latent representation learning for applications on multi - omics cancer subtyping[J]. Brief Bioinform, 2023, 24(1): bbac500.

[3] Qi J, Lin W. Dynamic modeling, optimization, and deep learning for high - dimensional complex biological data [J]. Sci Sin Math, 2025, 55(7): 1413.

[4] Jiang LD, Xu C, Bai YT, et al. Autosurv: interpretable deep learning framework for cancer survival analysis incorporating clinical and multi - omics data[J]. NPJ Precis Oncol, 2024, 8(1): 4.

[5] Katzman JL, Shaham U, Cloninger A, et al. Deepsurv: personalized treatment recommender system using a cox proportional hazards deep neural network [J]. BMC Medical Research Methodology, 2018, 18(1): 24.

[6] Ching T, Zhu X, Garmire LX. Cox - nnet: an artificial neural network method for prognosis prediction of high - throughput omics data[J]. PLOS Computational Biology, 2018, 14(4): e1006076.

[7] Cambridge Explorations in Arts and Sciences. Auto - Encoding Variational Bayes[EB/OL]. [2026 - 06 - 08]. <https://arxiv.org/abs/1312.6114>.

[8] Bhandari N, Acharya D, Chatterjee A, et al. Pan - cancer integrated bioinformatic analysis of RNA polymerase subunits reveal

RNA Pol I member CD3EAP regulates cell growth by modulating autophagy[J]. Cell Cycle, 2023, 22(18): 1986 - 2002.

[9] Hałas - Wiśniewska M, Zawadka P, Arendt W, et al. From adhesion to invasion: Integrins, focal adhesion signaling, and actin binding proteins in cervical cancer progression - a scoping review [J]. Cells, 2025, 14(20): 1640.

[10] Yan ZC, Yu JW, Wang SY, et al. Identification of E3 ubiquitin ligase - associated prognostic genes and construction of a prediction model for uterine cervical cancer based on bioinformatics analysis [J]. Hormones & Cancer, 2024, 15(1): 395.

[11] Yao S, Chen S, Wang A, et al. BAG2 inhibits cervical cancer progression by modulating type I interferon signaling through stabilizing Sting[J]. Advanced Science, 2025, 12(29): e70005.

[12] Li S, Wang X, Li Q, et al. Role of SHP2/PTPN11 in the occurrence and prognosis of cancer: a systematic review and meta - analysis[J]. Oncology Letters, 2022, 25(1): 19.

[13] Elayappillai SP, Dogra S, Lausen J, et al. ATR inhibition increases reliance on PARP - mediated DNA repair revealing an improved therapeutic strategy for cervical cancer[J]. Gynecologic Oncology, 2024, 191(2): 182 - 193.

[14] Zhong L, Li J, Zhong J, et al. IFI16 induced by p53 activates the NF - κB pathway to counteract cisplatin - induced apoptosis in cervical cancer cells [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2025, 29(15): e70728.

[15] Khan A, Das BC, Abiha U, et al. Insights into the role of complement regulatory proteins in HPV mediated cervical carcinogenesis[J]. Seminars in Cancer Biology, 2022, 86(15): 583 - 589.

[16] Hazelbag S, Kenter G, Gorter A, et al. Overexpression of the αvβ6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival[J]. Journal of Pathology, 2007, 212(3): 316 - 324.

[17] Spears ME, Lee N, Hwang S, et al. De novo sphingolipid biosynthesis necessitates detoxification in cancer cells [J]. Cell Reports, 2022, 40(13): 111415.

[18] Jin S, Wang W, Xu X, et al. miR - 34b - 3p - mediated regulation of STC2 and FN1 enhances chemosensitivity and inhibits proliferation in cervical cancer: MiR - 34b - 3p targets STC2 and FN1 to enhance chemosensitivity [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2024, 56(5): 740.

[19] Wang Y, Chen A, Zheng C, et al. miR - 92a promotes cervical cancer cell proliferation, invasion, and migration by directly targeting PIK3R1 [J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2021, 35(8): e23893.

收稿日期:2025-09-06

(上接第 2655 页)

[34] Ali FEM, Badran KSA, El - Maksoud MSA, et al. The role of Wnt/β - catenin signaling in lung cancer progression and therapy: a comprehensive review [J]. Medical Oncology, 2025, 42(6): 183.

[35] Lam AP, Gottardi CJ. β - catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target[J]. Current Opinion in Rheumatology, 2011, 23(6): 562 - 567.

[36] Liu T, GonzalezDLSF, Hirsch M, et al. Noncanonical Wnt signaling promotes myofibroblast differentiation in pulmonary fibrosis [J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2021, 65(5): 489 - 499.

[37] Chai D, Du H, Shi Y. Advances in the biological functions of miR - 205 in various diseases (Review)[J]. Mol Med Rep, 2026, 33(5).

[38] Yang WJ, Tan SM, Yang LX, et al. Exosomal miR - 205 - 5p enhances angiogenesis and nasopharyngeal carcinoma metastasis by targeting desmocollin - 2 [J]. Molecular Therapy - Oncolytics, 2022, 24(2): 612 - 623.

[39] 朱梦杰,丁文俊,冯天照,等. 特发性肺纤维化实验模型构建现状与应用进展[J]. 中国实验动物学报,2025,33(10):1522 -

1530.

Zhu MJ, Ding WJ, Feng TZ, et al. Current status and application advances in experimental models of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2025, 33(10): 1522 - 1530. (In Chinese)

[40] Ishida Y, Kuninaka Y, Mukaida NFI, et al. Immune mechanisms of pulmonary fibrosis with bleomycin[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(4): 3149.

[41] Della latta V, Cecchettiini A, Del Ry S, et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions[J]. Pharmacological Research, 2015, 97(1): 122 - 130.

[42] Li R, Jia YZ, Kong XH, et al. Novel drug delivery systems and disease models for pulmonary fibrosis [J]. Journal of Controlled Release, 2022, 348(2): 95 - 114.

[43] Diener C, Keller A, Meese E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic[J]. Trends in Genetics, 2022, 38(6): 613 - 626.

收稿日期:2026-04-04