

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research苹果多酚调节 *miR* - 21 - 5p/SKP2 通路对
慢性阻塞性肺疾病急性加重期大鼠
肺功能及免疫失衡的影响

The effects of apple polyphenols on lung function and immune imbalance in rats with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease by adjusting the *miR* - 21 - 5p/SKP2 pathway

冯 平, 姬泽萱, 宋凯艳,
陈丽萍, 王 布, 钱海红,
张志华

(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)

FENG Ping, JI Ze - xuan,
SONG Kai - yan, CHEN Li - ping,
WANG Bu, QIAN Hai - hong,
ZHANG Zhi - hua

(Department of Respiratory and Critical
Care Medicine, Affiliated First Hospital of
Hebei Northern University, Zhangjiakou
075000, Hebei province, China)

基金项目: 2020 年度河北省医学科学研究课题
(20200534); 张家口市 2023 年市级
科技计划自筹经费项目(2322090D)

作者简介: 冯平(1986 -), 女, 主治医师, 主要从
事慢性气道疾病相关研究

通信作者: 张志华, 博士, 主任医师

MP: 15530330015

E - mail: ZZH19641229@163.com

摘要:目的 探讨苹果多酚(AP)调节 *miR* - 21 - 5p/SKP2 通路对慢性阻塞性肺疾病急性加重期(AECOPD)大鼠肺功能及免疫失衡的影响。**方法** 通过香烟烟熏及滴注内毒素建立 COPD 稳定期, 随后以鼻腔内滴注金黄色葡萄球菌菌液建立 AECOPD 大鼠, 随机分为 AECOPD 组、AP - 25 组、AP - 100 组、地塞米松组、AP - 100 + NC agomir 组、AP - 100 + *miR* - 21 - 5p agomir 组, 并以生理盐水干预的大鼠为对照组, 随后气管插管测量呼、吸气峰值流量(PEF、PIF)、0.3 s 用力呼气容积与用力肺活量比值(FEV0.3/FVC); 收集血清检测肿瘤坏死因子 α (TNF - α)、白细胞介素 - 6(IL - 6)水平; 回收支气管肺泡灌洗液(BALF), 测定中性粒细胞、淋巴细胞及巨噬细胞数量; 制备左肺叶切片, 观察肺组织病变并评分; 取大鼠右肺组织, 检测肺组织中 Th17、Treg 细胞比例、*miR* - 21 - 5p、SKP2 mRNA 表达及维 A 酸相关孤儿受体 γ t (ROR γ t)、IL - 17A、叉头框蛋白 P3 (Foxp3)、IL - 10、SKP2 蛋白表达。**结果** AECOPD 组 ROR γ t、IL - 17A、*miR* - 21 - 5p、TNF - α 、IL - 6、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数、Th17 细胞比例、Th17/Treg 较对照组增加, Foxp3、IL - 10、SKP2 mRNA 及蛋白表达、Treg 细胞比例、PEF、PIF、FEV0.3/FVC 较对照组降低($P < 0.05$); AP - 25 组、AP - 100 组、地塞米松组 ROR γ t、IL - 17A、*miR* - 21 - 5p、TNF - α 、IL - 6、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数、Th17 细胞比例、Th17/Treg 较 AECOPD 组降低, Foxp3、IL - 10、SKP2 mRNA 及蛋白表达、Treg 细胞比例、PEF、PIF、FEV0.3/FVC 较 AECOPD 组增加($P < 0.05$); *miR* - 21 - 5p agomir 逆转了 AP 对 AECOPD 大鼠的保护作用。**结论** AP 通过抑制 *miR* - 21 - 5p/SKP2 通路改善 AECOPD 大鼠肺功能及免疫失衡。

关键词: 苹果多酚; 慢性阻塞性肺疾病急性加重期; 肺功能; 免疫失衡

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.23.006

中图分类号: R961 文献标志码: A

文章编号: 1001 - 6821(2025)23 - 3335 - 08

Abstract: Objective To explore the effects of apple polyphenols (AP) on lung function and immune imbalance in rats with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD) by adjusting the *miR* - 21 - 5p/SKP2 pathway. **Methods** The stable stage of COPD was established by cigarette smoking and endotoxin infusion, and then AECOPD rats were established by nasal infusion of *Staphylococcus aureus* bacterial solution. They were randomly assigned into the AECOPD group, the AP - 25 group, the AP - 100 group, the dexamethasone group, the AP - 100 + NC agomir group, and the AP - 100 + *miR* - 21 - 5p agomir

group. And rats intervened with normal saline were as the control group. Subsequently, tracheal intubation was performed to measure the peak expiratory and inspiratory flow rates (PEF, PIF), and the ratio of forced expiratory volume to forced vital capacity in 0.3 seconds (FEV_{0.3}/FVC). Serum was collected to measure the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was recovered, and the numbers of neutrophils, lymphocytes and macrophages were determined. Left lung lobe sections were prepared, and lung tissue lesions and scores were observed. The right lung tissue of rats was taken. The proportions of Th17 and Treg cells, the mRNA expression of *miR-21-5p* and SKP2, and the protein expression of retinoic acid-related orphan receptor γ t (ROR γ t), IL-17A, forkhead box protein P3 (Foxp3), IL-10 and SKP2 in the lung tissue were detected. **Results** The AECOPD group had higher ROR γ t, IL-17A, *miR-21-5p*, TNF- α , IL-6, macrophages, neutrophils, lymphocytes, Th17 cell proportion, and Th17/Treg than the control group, and had lower Foxp3, IL-10, SKP2 mRNA and protein expression, Treg cell proportion, PEF, PIF, and FEV_{0.3}/FVC than the control group ($P < 0.05$). The AP-25 group, AP-100 group and dexamethasone group had lower ROR γ t, IL-17A, *miR-21-5p*, TNF- α , IL-6, macrophages, neutrophils, lymphocytes, Th17 cell proportion, and Th17/Treg than the AECOPD group, and had higher Foxp3, IL-10, SKP2 mRNA and protein expression, Treg cell proportion, PEF, PIF, and FEV_{0.3}/FVC than the AECOPD group ($P < 0.05$). In addition, *miR-21-5p* agomir reversed the protective effect of AP on AECOPD rats. **Conclusion** AP improves lung function and immune imbalance in AECOPD rats by inhibiting the *miR-21-5p*/SKP2 pathway.

Key words: apple polypheno; acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease; lung function; immune imbalance

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)作为全球范围内高发且常见的慢性呼吸系统疾病,已成为全球人口死亡的主要原因之一,需要长期、系统的干预,给个人健康、家庭生活及社会医疗体系带来了沉重负担^[1],而急性加重期(acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, AECOPD)的出现,会导致局部和全身炎症增加以及肺功能下降,加重了疾病管理的复杂性,目前治疗方案主要有使用长效支气管扩张剂、长期大环内酯类药物、粘液溶解剂、吸入类固醇等,然而这些方法并不能阻止疾病的进展^[2],因此仍需寻求有效的治疗药物。苹果是人类的重要膳食剂,苹果多酚(apple polypheno, AP)是苹果的主要次级代谢产物,因其强大的抗氧化、抗炎、抗癌和抗衰老特性而受到广泛关注^[3]。已有研究表明 AP 具有肺保护作用,但其在 AECOPD 中的作用效果及机制尚未阐明^[4]。miRNA 是由 19-23 个核苷酸组成的非编码 RNA,可通过结合 mRNA 的 3'-非翻译区抑制基因表达,在细胞关键生物学过程中起调控作用,已有研究表明靶向调控相关功能基因,参与 AECOPD 气道炎症加剧等核心病理生理过程的调节,在 AECOPD 病理发展及治疗中意义重大^[5]。*miR-21-5p* 是一种高度保守的 miRNA 物种,在肺损伤引发的炎症和免疫调节中起着至关重要的作用^[6]。Starbase 数据库预测结果显示,SKP2 作为 *miR-21-5p* 靶点,参与支气管肺发育不良等肺疾病发展^[7]。但 AP 能

否通过调节 *miR-21-5p*/SKP2 通路参与 AECOPD 发展的改善尚不明确,本研究通过建立 AECOPD 大鼠模型,旨在探讨 AP 对 AECOPD 的治疗效果及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

冠科生物技术(中山)有限公司提供 SD 大鼠(雄性,7 周龄,体重 190~230 g),无特异性病原体级,许可证号:SYXK(粤)2020-0240。实验方案经实验动物护理与伦理委员会审定通过(批号:K2025039),实验前大鼠适应实验室条件 1 周,将大鼠饲养在标准条件的聚丙烯笼中,自由取水和正常饮食。

1.1.2 实验试剂与仪器

北京索莱宝科技有限公司提供 PA(纯度 $\geq 85\%$);广州锐博生物科技有限公司提供 SKP2 野生型(WT)及突变型(MUT)荧光素酶报告载体;上海经科化学科技有限公司提供脂多糖;ATCC 提供 ATCC 25923 标准菌株金黄色葡萄球菌;上海卷烟厂提供大前门牌香烟;上海吉泰依科赛生物科技有限公司提供肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA 试剂盒;上海信裕生物科技有限公司提供白细胞介素-6(IL-6)、HiScript II Q RT SuperMix;上海研谨生物科技有限公司提供地塞米松(YJ-B25793-100mg);Abcam 公司提供维 A 酸相关孤儿受体 γ t (ROR γ t)、IL-17A、叉头框蛋白 P3 (Foxp3)、IL-10、SKP2 抗体。

日本 Olympus 公司提供 1X70 倒置显微镜;中生(苏州)医疗科技有限公司提供 ZS-AE7S 流式细胞仪;德国 Leica 公司提供 H11220 烤片机、EG1160 包埋机、RM2035 轮转切片机;上海闪谱生物科技有限公司提供 Read Max1900Plus 全自动酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 制备 AECOPD 大鼠模型及分组、干预

随机选取 12 只大鼠为对照组,其余各组均参考张孝侠^[8]等方法建立 AECOPD 大鼠模型,将大鼠置于有机玻璃仓内,并适应仓内环境,插入香烟,维持仓内烟雾浓度稳定在 5% (V/V),每次烟雾暴露持续 30 min,每天 1 次,但在第 7、14、28 天进行内毒素气管内滴注,需暂停烟雾暴露;气管内滴注内毒素时,麻醉大鼠、仰卧固定于手术台上,消毒颈部并沿正中中线剪开皮肤,将移液器针头斜插入气管腔内,缓慢推注内毒素溶液(0.2 mL, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),通过香烟烟熏及滴注内毒素建立 COPD 稳定期;随后在第 29-32 天通过鼻腔内滴注高浓度金黄色葡萄球菌菌液建立 AECOPD 大鼠,保持大鼠头部略微后仰,使鼻腔朝上,将移液器针头对准大鼠一侧鼻腔,缓慢滴注 0.3 mL 金黄色葡萄球菌菌液($2.4 \times 10^9 \text{ CFU/mL}$),每天 2 次鼻腔滴注,连续滴注 4 天,如大鼠出现精神萎靡、体温升高、频繁打喷嚏、呼吸喘促等症状,提示大鼠造模成功。该过程共有 72 只大鼠造模成功,随机分为 AECOPD 组、AP-25 组、AP-100 组、地塞米松组、AP-100 + NC agomir 组、AP-100 + miR-21-5p agomir 组,其中 AP-25 组、AP-100 组是参考 AP 在急性肺损伤模型中的有效干预剂量范围^[9],并结合预实验结果确定:预实验设置 5、25、50、100、200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 5 个剂量梯度,结果显示 25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量可初步改善大鼠肺功能,100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量干预效果显著且无明显肝肾毒性,200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组则出现轻微腹泻等不良反应;综合有效性与安全性评估,最终选取上述 2 个剂量,采用每日 1 次腹腔注射的方式给^[9];地塞米松组灌胃 0.09 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 药物,每天 1 次^[10];AP-100 + NC agomir 组腹腔注射 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ AP 时,尾静脉注射 NC agomir,每周 1 次;AP-100 + miR-21-5p agomir 组腹腔注射 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ AP 时,尾静脉注射 miR-21-5p agomir,每周 1 次;对照组仅以上述方式注射、灌胃生理盐水,各组连续干预 4 周。

1.2.2 肺功能

末次给药 24 h 后,麻醉大鼠,气管插管测量呼吸气峰值流量(peak expiratory flow, PEF; peak inspiratory flow, PIF)、0.3 s 用力呼气容积与用力肺活量比值

(FEV0.3/FVC)。

1.2.3 炎症因子水平检测

肺功能检测结束后,大鼠经 4% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后收集血清,按照 ELISA 操作步骤检测 TNF- α 、IL-6 水平。

1.2.4 支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中细胞学分析

颈椎脱臼法处死大鼠,用生理盐水冲洗左肺叶,回收 BALF,并在倒置和正置显微镜下测定中性粒细胞、淋巴细胞及巨噬细胞数量。

1.2.5 苏木精-伊红 (hematoxylin-osin, HE) 检测肺组织病理学变化

将灌洗后的左肺叶,用 10% 中性缓冲福尔马林灌注固定 2 h,常规包埋石蜡中,切成 5 μm 的连续切片,用二甲苯脱蜡、乙醇脱水,用伊红和苏木精染色,并用中性胶密封观察肺组织病变并评分^[11]。

1.2.6 肺组织中 Th17、Treg 细胞的比例

取大鼠右肺部分组织,单细胞悬液通过剪碎、胶原酶消化、滤网过滤制备,调整细胞浓度后,加入 CD4⁺ 孵育标记表面抗原,暴露胞内抗原,加入 IL-17⁺ (标记 Th17)、Foxp3⁺ (标记 Treg) 荧光抗体孵育;孵育结束后除去未结合抗体,将细胞重悬于 PBS 中,通过流式细胞仪检测,以 CD4⁺ IL-17⁺ 细胞群判定为 Th17 细胞、CD4⁺ Foxp3⁺ 细胞群为 Treg 细胞,分析二者在肺组织单细胞悬液中的比例。

1.2.7 组织中 miR-21-5p、SKP2 mRNA 表达

从右肺组织提取总 RNA,使用 HiScript II Q RT SuperMix 逆转录 RNA,使用 SYBR[®] Green Super Mix 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 反应。反应条件包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 循环 40 次。在每次运行中,生成熔解曲线以评估靶基因的特异性扩增, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 用于计算基因的相对表达。SKP2 正向:5'-ATGGACAAGAACGCCATCCT-3',反向:5'-TCGGCTCGTTGATGTTCTGG-3';miR-21-5p 正向:5'-CGGGATCCAGCCACTACCAAGGCATGTT-3',反向:5'-CGGAATTCAACCACGACTAGAGGCTGAC-3'; β -actin 正向 5'-TACCCAGGCATTGCTGACAG-3'和反向 5'-TATGGGTCCAGGCTAAGGCT-3';U6 正向:5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3',反向:5'-TTCACGAATTTGCGTGTCTATC-3。

1.2.8 SKP2 及 Th17、Treg 标志物 - ROR γ t、IL-17A、Foxp3、IL-10 蛋白表达

RIPA 缓冲液分离肺组织中总蛋白,使用蛋白质凝胶电泳制备和检测,将蛋白质转移到 PVDF 膜上并封

闭,然后与稀释的一抗一起孵育,然后与二抗一起孵育,一抗和二抗分别孵育 24 h 和 2 h,随后进行蛋白质可视化,采用 Image J 软件测定蛋白条带和 β -actin 的光密度值,并根据两者的比值计算各组蛋白质相对表达。

1.2.9 靶向关系验证

Starbase 数据库预测 *miR-21-5p*、*SKP2* 的结合位点。构建含结合位点的 *SKP2* 野生型序列或突变型序列载体,并将 *miR-21-5p*、NC 与构建的载体转染至 293T 细胞中,48 h 后检测荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

计量资料以均数/标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 27.0 软件分析, $P < 0.05$ 时,差异有统计学意义。单因素方差分析用于多组间比较,以 *snk-q* 检验进一步两两比较。

2 结果

2.1 AP 对各组大鼠 PEF、PIF、FEV0.3/FVC 的影响

PEF、PIF、FEV0.3/FVC 比较:AECOPD 组较对照组降低($P < 0.05$);AP-25 组、AP-100 组、地塞米松组较 AECOPD 组增加($P < 0.05$);AP-100 + *miR-21-5p* agomir 组较 AP-100 + NC agomir 组降低($P < 0.05$),见表 1。

2.2 AP 对各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 及 BALF 中细胞学的影响

TNF- α 、IL-6、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞

数比较:AECOPD 组较对照组增加($P < 0.05$);AP-25 组、AP-100 组、地塞米松组较 AECOPD 组降低($P < 0.05$);AP-100 + *miR-21-5p* agomir 组较 AP-100 + NC agomir 组增加($P < 0.05$),见表 2。

2.3 AP 对各组大鼠肺组织病理学变化的影响

对照组肺组织结构如支气管黏膜、肺泡正常,无显著损伤;AECOPD 组肺泡壁变薄和破裂,气道粘膜上皮脱离,肺组织毛细血管扩张和充血,炎性浸润显著;不同剂量的 AP 及地塞米松干预后,肺组织病理变化得到减轻,病理评分较 AECOPD 组降低($P < 0.05$);AP-100 + NC agomir 组病理变化接近 AP-100 组,AP-100 + *miR-21-5p* agomir 组炎性浸润增加,病理损伤加重,并接近 AP-25 组,病理评分较 AP-100 + NC agomir 组增加($P < 0.05$),见图 1 及表 3。

2.4 AP 对各组大鼠肺组织 Th17、Treg 细胞比例的影响

AECOPD 组 Th17 细胞比例、Th17/Treg 较对照组增加,Treg 细胞比例较对照组降低($P < 0.05$);AP-25 组、AP-100 组、地塞米松组 Th17 细胞比例、Th17/Treg 较 AECOPD 组降低,Treg 细胞比例较 AECOPD 组增加($P < 0.05$);AP-100 + *miR-21-5p* agomir 组 Th17 细胞比例、Th17/Treg 较 AP-100 + NC agomir 组增加,Treg 细胞比例较 AP-100 + NC agomir 组降低($P < 0.05$),见图 2、表 4。

表 1 各组 PEF、PIF、FEV0.3/FVC 的比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Comparison of PEF, PIF, FEV0.3/FVC among different groups ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

group	PEF (mL/s)	PIF (mL/s)	FEV0.3/FVC
control group	28.64 $\pm$ 2.92	50.63 $\pm$ 5.02	84.57 $\pm$ 8.55
AECOPD group	11.24 $\pm$ 1.42 ^a	22.34 $\pm$ 2.75 ^a	48.02 $\pm$ 4.93 ^a
AP-25 group	17.53 $\pm$ 1.86 ^b	32.34 $\pm$ 3.28 ^b	62.11 $\pm$ 6.25 ^b
AP-100 group	26.34 $\pm$ 2.77 ^{bc}	49.34 $\pm$ 4.97 ^{bc}	83.02 $\pm$ 8.32 ^{bc}
dexamethasone group	27.05 $\pm$ 2.74 ^{bc}	50.05 $\pm$ 5.01 ^{bc}	83.11 $\pm$ 8.38 ^{bc}
AP-100 + NC agomir group	26.85 $\pm$ 2.81	49.85 $\pm$ 4.98	82.97 $\pm$ 8.34
AP-100 + <i>miR-21-5p</i> agomir group	18.05 $\pm$ 1.88 ^d	32.44 $\pm$ 3.31 ^d	61.89 $\pm$ 6.22 ^d

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 AECOPD 组比较,^b $P < 0.05$;与 AP-25 组比较,^c $P < 0.05$;与 AP-100 + NC agomir 组比较,^d $P < 0.05$

表 2 各组 TNF- α 、IL-6、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数的比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Comparison of TNF- α , IL-6, macrophage, neutrophil granulocyte, lymphocyte among different groups ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

group	TNF- α (ng/mL)	IL-6 (ng/mL)	macrophage ($\times 10^6$ /L)	neutrophil granulocyte ($\times 10^6$ /L)	lymphocyte ($\times 10^6$ /L)
control group	9.48 $\pm$ 1.55	57.84 $\pm$ 6.42	180.18 $\pm$ 19.06	78.11 $\pm$ 8.84	82.11 $\pm$ 8.84
AECOPD group	28.13 $\pm$ 2.85 ^a	121.22 $\pm$ 12.22 ^a	388.37 $\pm$ 39.84 ^a	168.84 $\pm$ 17.02 ^a	171.62 $\pm$ 17.24 ^a
AP-25 group	17.22 $\pm$ 1.83 ^b	84.18 $\pm$ 8.84 ^b	281.07 $\pm$ 28.22 ^b	111.14 $\pm$ 11.38 ^b	120.18 $\pm$ 12.38 ^b
AP-100 group	9.94 $\pm$ 1.61 ^{bc}	61.24 $\pm$ 6.88 ^{bc}	192.74 $\pm$ 19.54 ^{bc}	80.02 $\pm$ 9.05 ^{bc}	88.34 $\pm$ 9.09 ^{bc}
dexamethasone group	9.77 $\pm$ 1.58 ^{bc}	60.86 $\pm$ 6.75 ^{bc}	193.05 $\pm$ 19.64 ^{bc}	79.85 $\pm$ 8.95 ^{bc}	85.37 $\pm$ 8.61 ^{bc}
AP-100 + NC agomir group	9.81 $\pm$ 1.60	60.94 $\pm$ 6.81	192.87 $\pm$ 19.58	79.94 $\pm$ 9.01	85.54 $\pm$ 8.61
AP-100 + <i>miR-21-5p</i> agomir group	17.34 $\pm$ 1.88 ^d	85.02 $\pm$ 8.91 ^d	280.95 $\pm$ 28.19 ^d	113.05 $\pm$ 11.40 ^d	120.34 $\pm$ 12.15 ^d

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 AECOPD 组比较,^b $P < 0.05$;与 AP-25 组比较,^c $P < 0.05$;与 AP-100 + NC agomir 组比较,^d $P < 0.05$

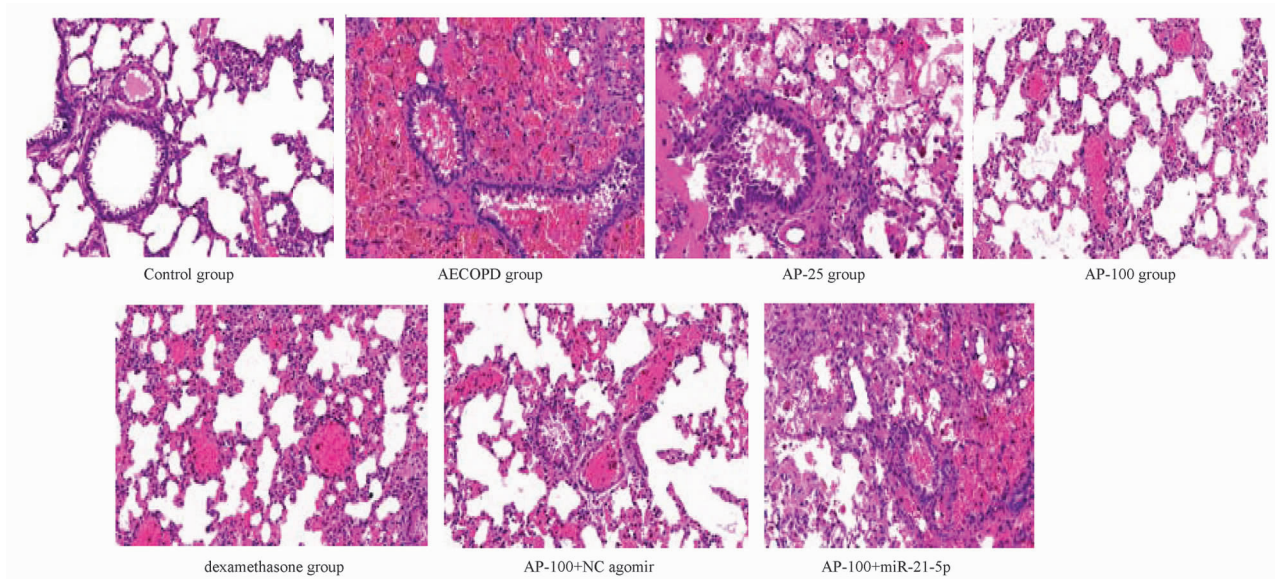


图 1 肺组织病理学变化(HE, ×200)

Figure 1 Pathological changes of lung tissue (HE, ×200)

表 3 各组大鼠病理评分比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Comparison of pathological scoring of rats among different groups ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

group	score
control group	1. 21 ± 0. 21
AECOPD group	7. 54 ± 0. 77 ^a
AP - 25 group	4. 52 ± 0. 46 ^b
AP - 100 group	2. 01 ± 0. 22 ^{bc}
dexamethasone group	2. 15 ± 0. 24 ^{bc}
AP - 100 + NC agomir group	2. 09 ± 0. 25
AP - 100 + miR - 21 - 5p agomir group	4. 64 ± 0. 48 ^d

注:与对照组比较,^a $P < 0. 05$;与 AECOPD 组比较,^b $P < 0. 05$;与 AP - 25 组比较,^c $P < 0. 05$;与 AP - 100 + NC agomir 组比较,^d $P < 0. 05$

2.5 AP 对各组大鼠肺组织 *miR - 21 - 5p*、*SKP2* mRNA 表达的影响

AECOPD 组 *miR - 21 - 5p* 表达较对照组增加, *SKP2* mRNA 表达较对照组降低 ($P < 0. 05$); AP - 25 组、AP - 100 组、地塞米松组 *miR - 21 - 5p* 表达较 AECOPD 组降低, *SKP2* mRNA 表达较 AECOPD 组增加 ($P < 0. 05$); AP - 100 + *miR - 21 - 5p* agomir 组 *miR - 21 - 5p* 表达较 AP - 100 + NC agomir 组增加, *SKP2* mRNA 表达较 AP - 100 + NC agomir 组降低 ($P < 0. 05$), 见表 5。

2.6 AP 对各组大鼠肺组织 *RORγt*、*IL - 17A*、*Foxp3*、*IL - 10*、*SKP2* 表达的影响

AECOPD 组 *RORγt*、*IL - 17A* 表达较对照组增加,

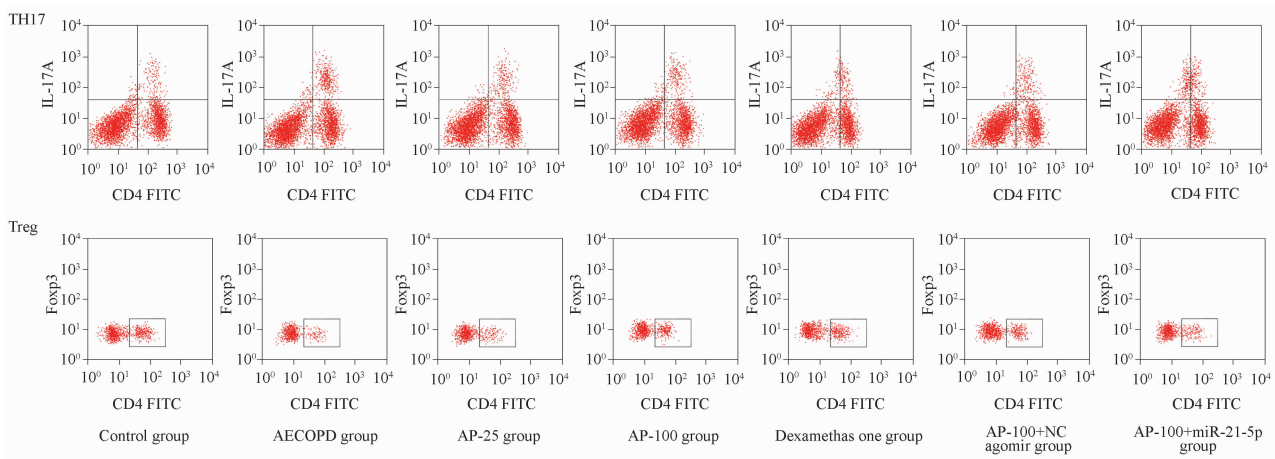


图 2 流式细胞术检测 Th17、Treg 细胞比例

Figure 2 Flow cytometry detection of cell ratios of Th17 and Treg

表4 各组大鼠 Th17、Treg 细胞比例比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Comparison of cell proportions of Th17, Treg in rats among different groups ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

group	Th17 (%)	Treg (%)	Th17/Treg
control group	3.33 ± 0.81	16.87 ± 1.72	0.20 ± 0.05
AECOPD group	18.35 ± 1.88 ^a	5.12 ± 0.89 ^a	3.58 ± 0.36 ^a
AP - 25 group	10.28 ± 1.14 ^b	8.87 ± 0.95 ^b	1.15 ± 0.15 ^b
AP - 100 group	5.58 ± 0.94 ^{bc}	15.64 ± 1.59 ^{bc}	0.36 ± 0.07 ^{bc}
dexamethasone group	5.37 ± 0.91 ^{bc}	15.68 ± 1.61 ^{bc}	0.34 ± 0.06 ^{bc}
AP - 100 + NC agomir group	5.44 ± 0.93	15.57 ± 1.58	0.35 ± 0.06
AP - 100 + miR - 21 - 5p agomir group	10.37 ± 1.16 ^d	8.72 ± 0.92 ^d	1.18 ± 0.16 ^d

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 AECOPD 组比较,^b $P < 0.05$;与 AP - 25 组比较,^c $P < 0.05$;与 AP - 100 + NC agomir 组比较,^d $P < 0.05$

表5 各组大鼠 miR - 21 - 5p、SKP2 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Comparison of mRNA expressions of miR - 21 - 5p, SKP2 in rats among different groups ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

group	miR - 21 - 5p	SKP2 mRNA
control group	1.06 ± 0.11	0.98 ± 0.10
AECOPD group	2.24 ± 0.22 ^a	0.38 ± 0.04 ^a
AP - 25 group	1.54 ± 0.16 ^b	0.59 ± 0.06 ^b
AP - 100 group	1.08 ± 0.12 ^{bc}	0.88 ± 0.09 ^{bc}
dexamethasone group	1.02 ± 0.11 ^{bc}	0.91 ± 0.10 ^{bc}
AP - 100 + NC agomir group	1.05 ± 0.11	1.01 ± 0.11
AP - 100 + miR - 21 - 5p agomir group	1.61 ± 0.17 ^d	0.55 ± 0.06 ^d

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 AECOPD 组比较,^b $P < 0.05$;与 AP - 25 组比较,^c $P < 0.05$;与 AP - 100 + NC agomir 组比较,^d $P < 0.05$

Foxp3、IL - 10、SKP2 表达较对照组降低($P < 0.05$); AP - 25 组、AP - 100 组、地塞米松组 ROR γ t、IL - 17A 表达较 AECOPD 组降低,Foxp3、IL - 10、SKP2 表达较 AECOPD 组增加($P < 0.05$); AP - 100 + miR - 21 - 5p agomir 组 ROR γ t、IL - 17A 表达较 AP - 100 + NC agomir 组增加,Foxp3、IL - 10、SKP2 表达较 AP - 100 + NC agomir 组降低($P < 0.05$),见图 3、表 6。

2.7 验证 miR - 21 - 5p、SKP2 靶向关系

miR - 21 - 5p、SKP2 具体结合区域为 SKP2 基因

的 chr5:36183929 - 36183935 位点,二者的结合序列匹配如图 4 所示,结合类型为 8 mer;荧光素酶活比较,miR - 21 - 5p 共转染 SKP2 野生载体低于 NC ($P < 0.05$),见表 7。

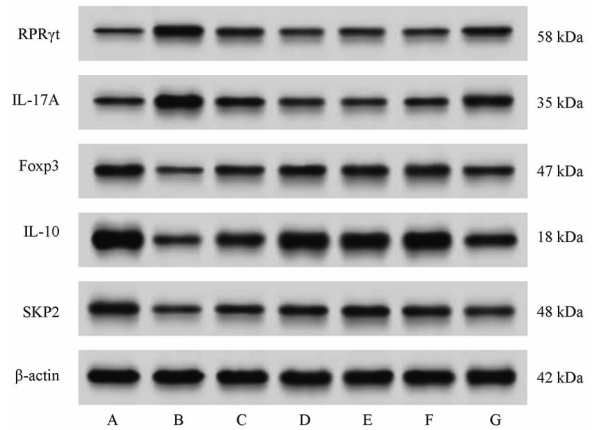


图3 细胞中 ROR γ t、IL - 17A、Foxp3、IL - 10、SKP2 蛋白表达 (Western blot 图)

Figure 3 Protein expressions of ROR γ t, IL - 17A, Foxp3, IL - 10, SKP2 in cells (Western blot)

注:A 为对照组;B 为 AECOPD 组;C 为 AP - 25 组;D 为 AP - 100 组;E 为地塞米松组;F 为 AP - 100 + NC agomir 组;G 为 AP - 100 + miR - 21 - 5p agomir 组。

表6 组织中 ROR γ t、IL - 17A、Foxp3、IL - 10、SKP2 表达的比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 6 Comparison of expressions of ROR γ t, IL - 17A, Foxp3, IL - 10, SKP2 in tissues ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

group	ROR γ t/ β - actin	IL - 17A/ β - actin	Foxp3/ β - actin	IL - 10/ β - actin	SKP2/ β - actin
control group	0.25 ± 0.03	0.37 ± 0.05	0.85 ± 0.10	1.27 ± 0.14	0.76 ± 0.09
AECOPD group	0.87 ± 0.10 ^a	1.05 ± 0.11 ^a	0.28 ± 0.04 ^a	0.57 ± 0.06 ^a	0.27 ± 0.03 ^a
AP - 25 group	0.57 ± 0.06 ^b	0.72 ± 0.08 ^b	0.49 ± 0.05 ^b	0.87 ± 0.10 ^b	0.43 ± 0.05 ^b
AP - 100 group	0.31 ± 0.04 ^{bc}	0.48 ± 0.06 ^{bc}	0.75 ± 0.08 ^{bc}	1.21 ± 0.13 ^{bc}	0.64 ± 0.07 ^{bc}
dexamethasone group	0.38 ± 0.05 ^{bc}	0.42 ± 0.05 ^{bc}	0.78 ± 0.08 ^{bc}	1.17 ± 0.12 ^{bc}	0.72 ± 0.08 ^{bc}
AP - 100 + NC agomir group	0.34 ± 0.04	0.46 ± 0.05	0.81 ± 0.09	1.19 ± 0.13	0.69 ± 0.07
AP - 100 + miR - 21 - 5p agomir group	0.61 ± 0.07 ^d	0.78 ± 0.09 ^d	0.45 ± 0.05 ^d	0.81 ± 0.09 ^d	0.48 ± 0.05 ^d

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 AECOPD 组比较,^b $P < 0.05$;与 AP - 25 组比较,^c $P < 0.05$;与 AP - 100 + NC agomir 组比较,^d $P < 0.05$

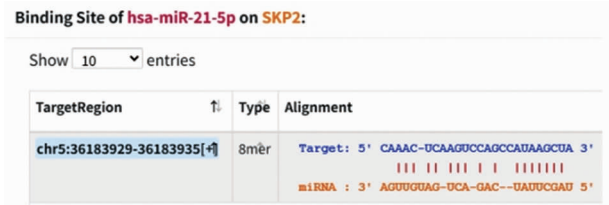


图 4 miR-21-5p、SKP2 预测结合位点

Figure 4 Predicting binding sites of miR-21-5p and SKP2

表 7 靶向关系验证 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Targeted relationship verification ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

group	wild SKP2	mutant SKP2
NC	1.02 ± 0.11	1.07 ± 0.11
miR-21-5p	0.61 ± 0.07 ^a	1.04 ± 0.12

注：与 NC 与 SKP2 野生型共转染比较，^a $P < 0.05$ 。

3 讨论

AECOPD 的特征是呼吸道症状恶化,不仅是导 COPD 患者住院的首要原因,还因较高的死亡率给患者生命健康带来严重威胁,然而当前临床上用于治疗 AECOPD 的药物效果仍存在明显局限,如改善疾病预后^[12],因此开发新的、有效的 AECOPD 疗法是当务之急。

机体免疫失衡在 AECOPD 的发生发展中扮演重要作用,AECOPD 发作可导致免疫应答紊乱,加剧气道炎症与肺组织损伤,而 Th17 与 Treg 的平衡失调在其中扮演核心角色,ROR γ t 是 Th17 的特异性转录因子,可促进 Th17 分化并促进编码 IL-17 的基因的表达,IL-17A 是一种典型的促炎细胞因子,可招募炎症细胞并诱导浸润,促进 IL-6、和 TNF- α 的表达。Foxp3 是 Treg 分化的特定转录因子,其水平降低导致严重的自身免疫性和炎症性疾病,IL-10 主要由 Treg 产生,抑制促炎细胞因子和趋化因子的分泌,抑制 Th17 的分化和功能^[13-14]。本研究结果显示,AECOPD 大鼠炎症因子(TNF- α 、IL-6)及细胞(巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数)明显增加,Th17 和 Th17 相关细胞因子的生成增加,Treg 和 Treg 相关细胞因子的生成降低,肺功能指标(PEF、PIF、FEV0.3/FVC)降低,提示 Th17/Treg 失衡可能促进 AECOPD 大鼠炎症反应发生,加重肺损伤,呼吸功能受损。AP 具有高抗氧化和抗炎特性,可降低胆固醇、预防乙醇暴露引起的神经损伤、降低心血管和肠道疾病发生^[15]。研究表明,AP 可预防细菌引起的粘液分泌过度,减轻慢性呼吸道疾病的急性加重,改善肺功能^[16]。本研究结果显示,AP 可降低 AECOPD 大鼠炎症因子水平及巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数,调节 Th17/Treg 失衡,

进而减轻炎症反应,改善肺功能,但本研究仅初步阐述了 AP 对 Th17/Treg 免疫平衡的调控作用,尚未深入探讨其对中性粒细胞、巨噬细胞等免疫细胞功能的直接影响,如中性粒细胞的趋化、吞噬能力,巨噬细胞的 M1/M2 极化方向等,可作为后续研究的重点。

miRNA 可与多个基因相互作用,参与细胞分化、免疫反应等病理生理过程,其异常与 AECOPD 的发生相关,使其成为 AECOPD 治疗的潜在靶点^[17]。miR-21-5p 位于染色体 17q23.1 上,作为 miRNA 家族的关键组成部分,参与肺疾病的发生。如二氧化硅纳米颗粒通过 miR-21-5p/GCLM 信号传导引发上皮铁死亡,从而促进纤维化病变的成纤维细胞激活,参与肺部纤维化发展^[18]。在哮喘小鼠的肺部炎症中,罗汉果苷 V 对哮喘小鼠的保护作用,与 miR-21-5p 的下调有关^[19]。本研究结果显示,AECOPD 大鼠肺组织中 miR-21-5p 表达明显增加,提示 miR-21-5p 参与 AECOPD 发展。miRNA 是通过负向调节 mRNA 并抑制翻译过程发挥功能作用,结合生物信息学分析和荧光素酶报告基因实验,发现 miR-21-5p 可以靶向 SKP2,并负调控 SKP2 表达参与 AECOPD 发展。SKP2 作为特定的 E3 泛素连接酶,其核心功能是识别细胞内的特定底物,并通过泛素化介导蛋白酶体降解,研究表明 SKP2 蛋白在肺部的过表达可降低脓毒症小鼠死亡率并改善肺损伤^[20]。本研究结果显示,AP 干预后,可显著抑制 AECOPD 大鼠肺组织 miR-21-5p 表达,促进 SKP2 表达,调节 Th17/Treg 失衡,改善肺功能,推断 AP 对 AECOPD 大鼠的保护作用,是通过抑制 miR-21-5p/SKP2 通路实现。回复实验表明,miR-21-5p 过表达逆转了 AP 对 AECOPD 大鼠的保护作用,表明 AP 可能通过调节 miR-21-5p/SKP2 通路参与改善 AECOPD 大鼠肺功能及免疫调节。STAT3、TGF- β 等信号通路为调控 Th17/Treg 分化的上游核心分子机制,有研究显示在肺损伤研究中^[21-23],调节肺组织 STAT3、TGF- β /Smad,促进 Th17/Treg 平衡。但 SKP2 可能通过泛素化降解 STAT3 等 Th17 分化关键转录因子,或调控 TGF- β /Smad 通路影响 Treg 细胞的分化与功能,这些上游靶点仍有待验证,可作为后续研究的重点方向。

综上所述,AP 可调节 AECOPD 大鼠 Th17/Treg 失衡,进而减轻炎症反应,改善肺功能,其机制可能与抑制 miR-21-5p/SKP2 通路有关。本研究发现 100 mg·kg⁻¹ AP 组对肺功能及炎症指标的改善效果与地塞米松组相当,提示 AP 具有潜在的临床替代应用价值,但本研究存在一定局限性:未开展 AP 的毒理

学及长期安全性评估,其长期应用安全性需后续通过肝肾功能检测、组织病理观察等验证;但本研究未检测血清中 AP 及其主要代谢物(如根皮素)浓度,无法明确血药浓度-药效的量效关系,后续可借助高效液相色谱法完善相关分析,未来也将进一步探究 AP 是否通过其他通路发挥作用,为其在 AECOPD 临床应用提供更充分依据。

参考文献:

- [1] XU Z, LI F, XIN Y, *et al.* Prognostic risk prediction model for patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD): A systematic review and Meta-analysis [J]. *Respir Res*, 2024, 25(1): 410—421.
- [2] HAO Y, WANG T, HOU Y, *et al.* Therapeutic potential of Lianhua Qingke in airway mucus hypersecretion of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 145—154.
- [3] CHEN L C, CHANG H S, HO Y S. A deep dive into the orchard of health: Exploring the anti-cancer and anti-aging potential of apple polyphenols [J]. *J Food Drug Anal*, 2025, 33(1): 1—12.
- [4] SONGYANG Y, LI W, LI W, *et al.* The inhibition of GLUT1-induced glycolysis in macrophage by phloretin participates in the protection during acute lung injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 110(1): 109049—109058.
- [5] WANG F, YANG B, QIAO J, *et al.* Serum exosomal microRNA-1258 may as a novel biomarker for the diagnosis of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 18332—18341.
- [6] ZENG H, ZHOU Y, LIU Z, *et al.* MiR-21-5p modulates LPS-induced acute injury in alveolar epithelial cells by targeting SLC16A10 [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 11160—11171.
- [7] 蒋焰, 王小勤, 梅鸿, 等. II. 型肺泡上皮细胞来源外泌体 miR-21-5p 靶向 SKP2 缓解支气管肺发育不良 [J]. *实用医学杂志*, 2024, 40(23): 3298—3305.
- [8] 张孝侠, 吴友涛. 金雀异黄酮对慢性阻塞性肺疾病急性加重期模型大鼠肺组织炎症反应的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(24): 3633—3637.
- [9] 汤建华, 詹旭莉, 冯平, 等. 苹果多酚通过调控 Keap1/Nrf2 通路减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(10): 1840—1847.
- [10] 廖小红, 张毅靖, 唐洪梅, 等. 苇茎汤对慢性阻塞性肺疾病急性加重期模型大鼠的改善作用及机制 [J]. *中国药房*, 2021, 032(021): 2593—2598.
- [11] 杨善军, 王玥, 邢露茗, 等. 麦粒灸补肺祛瘀方对肺纤维化大鼠肺功能和核因子 κ B 信号通路的影响 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(24): 3501—3505.
- [12] TAO L, LU X, FU Z, *et al.* Tong Sai granule improves AECOPD via regulation of MAPK-SIRT1-NF- κ B pathway and cellular senescence alleviation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 314(1): 116622—116631.
- [13] FOUKA E, LINDÉN A, BOSSIOS A. The role of T-helper and T regulatory cells in driving neutrophilic and eosinophilic inflammation in bronchiectasis [J]. *Front Immunol*, 2025, 16(1): 1598257—1598266.
- [14] 李星虹, 李振生, 龙雪娟, 等. AECOPD 患者治疗前后 Th17/Treg 免疫平衡, FeNO 水平变化及对预后的影响 [J]. *河北医科大学学报*, 2024, 45(4): 389—394.
- [15] ZHANG YJ, HUANG Q, LI AR, *et al.* Apple polyphenols delay postharvest senescence and quality deterioration of 'Jinshayou' pummelo fruit during storage [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 13(1): 1117106—1117115.
- [16] Birru RL, Bein K, Wells H, *et al.* Phloretin, an apple polyphenol, inhibits pathogen-induced mucin overproduction [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2021, 65(2): e2000658.
- [17] 张松松, 刘曼莉, 王金龙, 等. miR-132 基于 PGC-1 α /SIRT3 信号通路对肺炎链球菌诱慢性阻塞性肺疾病急性加重期大鼠的干预作用 [J]. *实用医学杂志*, 2024, 45(4): 389—394.
- [18] LV S, LI Y, LI X, *et al.* Silica nanoparticles triggered epithelial ferroptosis via miR-21-5p/GCLM signaling to contribute to fibrogenesis in the lungs [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 399: 111121.
- [19] HAN M, LIU H, LIU G, *et al.* Mogroside V alleviates inflammation response by modulating miR-21-5p/SPRY1 axis [J]. *Food Funct*, 2024, 15(4): 1909—1922.
- [20] CHEN Z, ZHANG J, GAO S, *et al.* Suppression of Skp2 contributes to sepsis-induced acute lung injury by enhancing ferroptosis through the ubiquitination of SLC3A2 [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 325—336.
- [21] ZHANG Y, CHEN L, OUYANG H. Shikonin alleviates asthma phenotypes in mice via an airway epithelial STAT3-dependent mechanism [J]. *Open Med (Wars)*, 2024, 19(1): 20241016.
- [22] LI X, LIU J, JING Z, *et al.* SLC27A3 downregulation restores Th17/Treg balance and alleviates COPD via JAK2/STAT3 pathway inhibition [J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2025, 53(1): 91—98.
- [23] ZHANG Y, JIANG X, WANG Q, *et al.* Dexamethasone alleviates pulmonary sarcoidosis by regulating the TGF- β /Smad3 signaling to promote Th17/Treg cell rebalance [J]. *Cell Immunol*, 2024, 395—396: 104781.

(收稿日期 2025-10-30)