

miR-21-5p 过表达对高氧性急性肺损伤大鼠 AEC II 早期凋亡的影响

张伟¹ 徐乐² 陈淼¹ 梅鸿¹ 李康¹ 覃松¹ 刘国跃¹

¹遵义医学院附属医院重症医学科 563003; ²青岛大学附属医院麻醉科 266003

通信作者: 陈淼, Email: chenmiao64@163.com

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-21-5p (miR-21-5p) 过表达对高氧性急性肺损伤 (HALI) 大鼠 II 型肺泡上皮细胞 (AEC II) 早期凋亡的影响。方法 按随机数字表法将 SD 大鼠分为对照组 (CON 组)、高氧组 (H 组)、过表达组 (OE 组) 及空载体组 (EV 组) 4 组, 每组 20 只。以吸入 90% 以上高浓度氧制备 HALI 动物模型; CON 组则吸入空气。OE 组及 EV 组分别经气管导管往肺内滴入 miR-21-5p 腺相关病毒-6 (AAV-6) 过表达载体或空载体, 饲养 3 周后制备 HALI 模型。各组于制模 0、24、48、60 h 分别取 5 只动物, 检测肺损伤相关指标, 如氧合指数 (OI)、呼吸指数 (RI)、肺湿/干重比值 (W/D)、肺组织病理评分; 同时采用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测 AEC II 中 miR-21-5p 表达, 用流式细胞仪检测 AEC II 早期凋亡率。结果 ① 肺损伤相关指标: H 组 OI 随时间延长逐渐降低, RI、肺 W/D 比值及病理评分均随时间延长逐渐增高, 24 h 即与 CON 组差异有统计学意义 [OI (mmHg, 1 mmHg=0.133 kPa): 336.04±5.79 比 400.22±19.70, RI: 0.20±0.02 比 0.10±0.06, 肺 W/D 比值: 5.04±0.09 比 4.85±0.09, 肺组织病理评分 (分): 0.13±0.01 比 0.07±0.01, 均 $P<0.05$], 表明持续吸入高浓度氧可成功建立 HALI 模型。② miR-21-5p 表达: H 组、OE 组及 EV 组 AEC II 细胞中 miR-21-5p 表达均随时间延长逐渐增高, 且 24、48、60 h 时 miR-21-5p 表达均显著高于 CON 组。OE 组 0、24、48、60 h 时 miR-21-5p 表达较 H 组进一步增高 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 3.75±0.11 比 0.98±0.14, 3.98±0.12 比 1.18±0.13, 4.28±0.18 比 1.49±0.06, 4.66±0.12 比 1.80±0.12, 均 $P<0.05$)。③ AEC II 早期凋亡率: H 组、OE 组及 EV 组 AEC II 细胞早期凋亡率均随时间延长逐渐升高, 且 24、48、60 h 时细胞早期凋亡率均显著高于 CON 组。而 OE 组 24、48、60 h 时 AEC II 早期凋亡率较 H 组显著降低 [(1.22±0.63)% 比 (2.84±0.59)%, (5.76±0.18)% 比 (13.10±2.01)%, (29.48±0.48)% 比 (49.04±1.36)%, 均 $P<0.05$]。④ EV 组各时间点 miR-21-5p 表达和 AEC II 早期凋亡率与 H 组比较差异均无统计学意义。结论 miR-21-5p 过表达可抑制 HALI 大鼠 AEC II 早期凋亡。

【关键词】 微小 RNA-21-5p; 高氧性急性肺损伤; 肺泡上皮细胞, II 型; 凋亡

基金项目: 国家自然科学基金 (81560019)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.013

Effect of overexpression of microRNA-21-5p on early apoptosis of type II alveolar epithelial cells in rats with hyperoxic acute lung injury

Zhang Wei¹, Xu Le², Chen Miao¹, Mei Hong¹, Li Kang¹, Qin Song¹, Liu Guoyue¹

¹Department of Intensive Care Unit, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China;

²Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong, China

Corresponding author: Chen Miao, Email: chenmiao64@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of overexpression of microRNA-21-5p (miR-21-5p) on early apoptosis of type II alveolar epithelial cells (AEC II) in rats with hyperoxic acute lung injury (HALI). **Methods** The Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: control group (CON group), hyperoxia group (H group), overexpression group (OE group) and empty vector group (EV group), with 20 rats in each group. HALI animal model was made by inhaling high concentration oxygen (oxygen concentration $\geq 90\%$); CON group was arranged to inhale room air. The miR-21-5p adeno-associated virus-6 (AAV-6) overexpression vectors or empty vectors were dripped into the lungs of OE group and EV group through tracheal tube, respectively. The hyperoxia model was prepared after 3 weeks of feeding. At 0, 24, 48 and 60 hours after making model, 5 rats were selected to detect lung injury parameters: oxygenation index (OI), respiratory index (RI), wet/dry ratio (W/D), pathological injury score of lung tissue; real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of miR-21-5p in AEC II, and flow cytometry was used to detect the early apoptotic rate of AEC II. **Results** ① The lung injury parameters: in H group, the OI gradually decreased with time, but the RI, lung W/D ratio and pathological score increased gradually with time, the difference between CON group was statistically significant at 24 hours [OI (mmHg, 1 mmHg = 0.133 kPa): 336.04±5.79 vs. 400.22±19.70, RI: 0.20±0.02 vs. 0.10±0.06, lung W/D ratio: 5.04±0.09 vs. 4.85±0.09, lung tissue pathological score: 0.13±0.01 vs. 0.07±0.01, all $P<0.05$]. It indicated that HALI model could be successfully established by inhaling high concentration oxygen continuously. ② The expression of miR-21-5p: the miR-21-5p was gradually increased in H, OE and EV groups, and the expression of miR-21-5p was significantly higher than that in

CON group at 24, 48 and 60 hours. Compared with H group, the expression of miR-21-5p was significantly increased further in OE group at 0, 24, 48 and 60 hours ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 3.75 ± 0.11 vs. 0.98 ± 0.14 , 3.98 ± 0.12 vs. 1.18 ± 0.13 , 4.28 ± 0.18 vs. 1.49 ± 0.06 , 4.66 ± 0.12 vs. 1.80 ± 0.12 , all $P < 0.05$). ③ The early apoptosis of AEC II: the early apoptosis rate gradually increased with time in H, OE and EV groups, and the early apoptosis of AEC II was significantly higher than that in CON group at 24, 48 and 60 hours. Compared with H group, the early apoptosis rate was significantly decreased in OE group at 24, 48 and 60 hours [$(1.22 \pm 0.63)\%$ vs. $(2.84 \pm 0.59)\%$, $(5.76 \pm 0.18)\%$ vs. $(13.10 \pm 2.01)\%$, $(29.48 \pm 0.48)\%$ vs. $(49.04 \pm 1.36)\%$, all $P < 0.05$]. ④ There was no significant difference in the expression of miR-21-5p and the early apoptosis of AEC II cells between EV group and H group at each time point. **Conclusion** Overexpression of miR-21-5p could inhibit the early apoptosis of AEC II in rats with HALI.

【Key words】 MicroRNA-21-5p; Hyperoxic acute lung injury; Alveolar epithelial cell, type II; Apoptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81560019)

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2019.08.013

高氧性急性肺损伤(HALI)是氧疗的常见并发症,在成人可进展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[1],在新生儿可进展为支气管肺发育不良^[2],严重者甚至可危及生命。HALI的发生发展与血管内皮细胞和肺泡上皮细胞(AEC)坏死及凋亡有关。氧化损伤是AEC凋亡的原因之一,AEC II作为AEC的干细胞是氧化损伤的主要靶细胞^[3]。微小RNAs(miRNAs)主要参与调控细胞增殖、迁移及凋亡等^[4-6]。其中miR-21因在许多肿瘤的发生发展过程中起重要作用,越来越受到人们的关注^[7-8]。本课题组前期研究表明miR-21-5p可调控过氧化氢(H₂O₂)诱导的AEC II凋亡^[9],但其在HALI中对AEC II的作用尚不清楚。本实验旨在探讨miR-21-5p过表达对HALI大鼠AEC II早期凋亡的影响,以期从基因层面为HALI治疗提供理论依据及新的小分子靶点。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及试剂: miR-21-5p腺相关病毒-6(AAV-6)过表达载体及空载体购自南京申基生物科技有限公司;胎牛血清、DMEM/F12(1:1)培养基、胰蛋白酶(1:250)购自美国Gibco公司;I型胶原酶购自美国Invitrogen公司;miR-21-5p引物及内参U6引物购自美国Thermo Fisher Scientific公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)试剂盒购自美国BD公司。

1.2 实验动物及分组: 健康雄性SD大鼠购自陆军军医大学实验中心,动物许可证号:SCXK(渝)2012-0005。按随机数字表法将80只大鼠分为对照组(CON组)、高氧组(H组)、过表达组(OE组)及空载体组(EV组),每组20只。

1.3 HALI模型制备及分组处理: 大鼠适应性饲养1周。吸入90%以上高浓度氧制备HALI模型(H组、OE组、EV组);CON组吸入空气。OE组、EV组经气管导管往肺内滴入miR-21-5p AAV-6过表达载

体或空载体,饲养3周后进行制模。本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并经遵义医学院动物实验伦理委员会批准(审批号:81560019)。

1.4 指标检测及方法: 每组于制模0、24、48及60h各取5只动物用于检测动脉血气分析、肺湿/干重比值(W/D)和肺组织病理学改变及病理评分^[10]。

1.4.1 提取、纯化、培养、鉴定 AEC II: 0.25%胰酶与0.1% I型胶原酶1:1混合后消化肺组织,终止液终止消化后剪碎并摇床,不锈钢滤网过滤,破红;用大鼠IgG包被的培养皿纯化细胞;15%胎牛血清(含100 kU/L青/链霉素,10 μg/L表皮生长因子)培养细胞,经固定、切片、染色后电镜下拍片并鉴定。

1.4.2 AAV-6病毒感染形态: 100 μL AAV-6(滴度 1×10^{15} TU/L)经气管导管滴入大鼠肺内,饲养3周后进行AEC II原代提取并培养24 h,荧光显微镜下观察AAV-6病毒感染的AEC II细胞形态。

1.4.3 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞中miR-21-5p表达: 提取AEC II总mRNA,反转录合成cDNA,用探针法检测AEC II中miR-21-5p表达量。miR-21-5p上游引物:5'-GTCAATAGCTTATCAGACTGA-3',下游引物:5'-GTTGGCTCTGGTGCA GGCTCCGAGGTATTCGCA-3'。以U6为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因表达量。

1.4.4 细胞凋亡率检测: 取AEC II细胞,按照凋亡试剂盒(美国BD公司)操作说明染色,用流式细胞仪检测细胞早期凋亡率。

1.5 统计学分析: 采用SPSS 18.0软件分析数据。计量资料以均数±标准($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐采用LSD检验,方差不齐采用Dunnett-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HALI大鼠氧合指数(OI)、呼吸指数(RI)、肺湿/干重比值(W/D)、肺组织病理学改变及病理评

分变化(表1): H组随时间延长, OI 逐渐降低, RI、肺 W/D 比值逐渐增高, 24 h 起即较 0 h 时差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。光镜下观察, CON 组肺间质偶见中性粒细胞; H 组随时间延长, 肺间质中性粒细胞逐渐增多, 可见蛋白质碎片及透明膜形成, 肺泡间隔增厚, 病理评分逐渐增高, 24 h 起即显著高于 0 h 时(均 $P < 0.05$)。H 组 24 h 起 OI 显著低于 CON 组, RI、肺 W/D 比值、肺组织病理评分均显著高于 CON 组(均 $P < 0.05$)。

2.2 原代 AEC II 培养及鉴定: AEC II 原代培养 24 h, 细胞呈贴壁、岛状及梭形生长(图 1A); 培养 48 h, 细胞呈多边形, 且贴壁可达 95% 以上(图 1B)。电镜下可见 AEC II 的特有结构, 即嗜钺性板层小体和微绒毛(图 2)。

2.3 AAV-6 病毒感染形态(图 3): AEC II 原代提取并培养 24 h, 在荧光显微镜下观察可见 AAV-6

病毒感染的 AEC II 呈绿色, 说明 AEC II 已成功被 AAV-6 病毒感染。

2.4 各组大鼠 AEC II 中 miR-21-5p 表达(表 2): H 组、OE 组及 EV 组 AEC II 中 miR-21-5p 表达均随时间延长逐渐增高(均 $P < 0.05$)。H 组 24、48、60 h 时 miR-21-5p 表达较 CON 组显著增高($P < 0.05$); 与 H 组相比, OE 组 0、24、48、60 h 时 miR-21-5p 表达进一步增高(均 $P < 0.05$); 而 EV 组各时间点 miR-21-5p 表达与 H 组比较差异无统计学意义。

2.5 各组大鼠 AEC II 早期凋亡率(表 2; 图 4): H 组、OE 组及 EV 组 AEC II 早期凋亡率均随时间延长逐渐增高(均 $P < 0.05$)。与 CON 组相比, H 组、OE 组及 EV 组 24、48、60 h 时 AEC II 早期凋亡率均显著增高(均 $P < 0.05$); OE 组各时间点 AEC II 早期凋亡率均较 H 组显著降低(均 $P < 0.05$); 而 EV 组早期凋亡率与 H 组差异无统计学意义。

表 1 两组大鼠制模后各时间点 OI、RI、肺 W/D 比值、肺组织病理学评分变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	OI(mmHg)				RI			
		0 h	24 h	48 h	60 h	0 h	24 h	48 h	60 h
CON 组	5	378.94 ± 33.95	400.22 ± 19.70	393.84 ± 18.82	384.26 ± 43.14	0.14 ± 0.07	0.10 ± 0.06	0.09 ± 0.06	0.14 ± 0.02
H 组	5	403.95 ± 13.15	336.04 ± 5.79 ^{ad}	294.95 ± 17.82 ^{abd}	195.75 ± 26.82 ^{abcd}	0.08 ± 0.04	0.20 ± 0.02 ^{ad}	0.34 ± 0.02 ^{abd}	0.66 ± 0.10 ^{abcd}

组别	动物数 (只)	肺 W/D 比值				肺组织病理评分(分)			
		0 h	24 h	48 h	60 h	0 h	24 h	48 h	60 h
CON 组	5	4.78 ± 0.13	4.85 ± 0.09	4.85 ± 0.09	4.83 ± 0.10	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
H 组	5	4.80 ± 0.07	5.04 ± 0.09 ^{ad}	5.30 ± 0.01 ^{abd}	6.04 ± 0.12 ^{abcd}	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.01 ^{ad}	0.30 ± 0.01 ^{abd}	0.50 ± 0.02 ^{abcd}

注: CON 组为对照组, H 组为高氧性急性肺损伤(HALI)组; OI 为氧合指数, RI 为呼吸指数, 肺 W/D 比值为肺湿/干重比值; 1 mmHg = 0.133 kPa; 与本组 0 h 比较, ^a $P < 0.05$; 与本组 24 h 比较, ^b $P < 0.05$; 与本组 48 h 比较, ^c $P < 0.05$; 与 CON 组比较, ^d $P < 0.05$

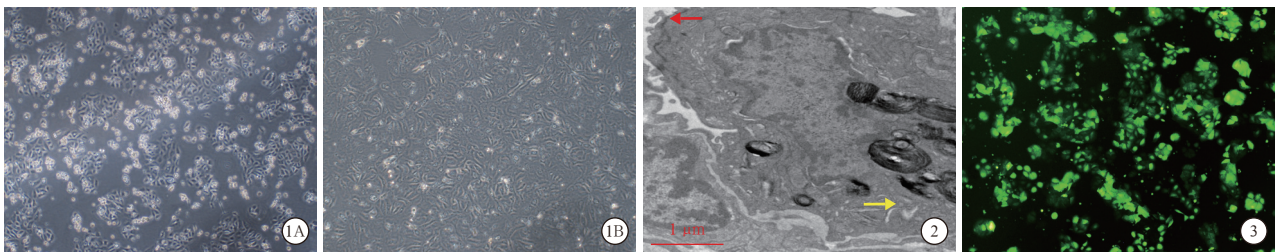
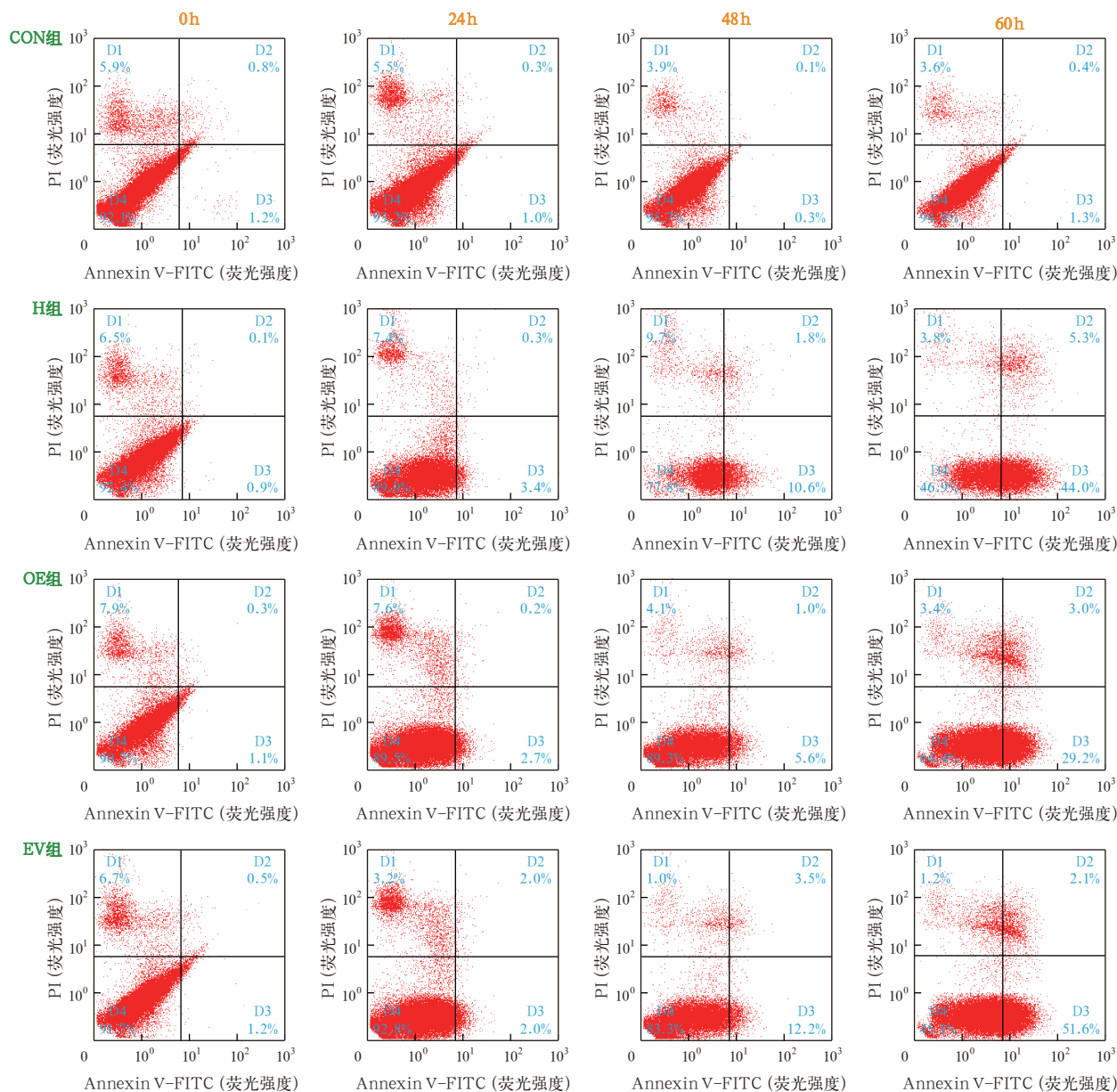


图 1 光镜下观察 II 型肺泡上皮细胞(AEC II)原代培养形态 24 h 时细胞呈贴壁、岛状及梭形生长(A); 48 h 时细胞呈多边形, 贴壁达 95% 以上(B) 低倍放大 图 2 电镜下观察 AEC II 细胞形态 细胞培养后可见 AEC II 特征性结构, 红色箭头示微绒毛, 黄色箭头示嗜钺性板层小体 醋酸铀-枸橼酸铅双染 ×8000 图 3 荧光显微镜下观察微小 RNA-21-5p(miR-21-5p)腺相关病毒-6(AAV-6)的感染形态 AEC II 原代提取并培养 24 h, AAV-6 病毒感染的 AEC II 细胞呈绿色 低倍放大

表 2 各组大鼠制模后不同时间点 AEC II 中 miR-21-5p 表达和细胞早期凋亡率变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	miR-21-5p ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)				细胞早期凋亡率(%)			
		0 h	24 h	48 h	60 h	0 h	24 h	48 h	60 h
CON 组	5	1.05 ± 0.04	1.02 ± 0.04	0.99 ± 0.18	0.96 ± 0.12	0.90 ± 0.24	1.12 ± 0.30	0.86 ± 0.51	1.26 ± 0.67
H 组	5	0.98 ± 0.14	1.18 ± 0.13 ^{ac}	1.49 ± 0.06 ^{acd}	1.80 ± 0.12 ^{acde}	0.84 ± 0.40	2.84 ± 0.59 ^{ac}	13.10 ± 2.01 ^{ace}	49.04 ± 1.36 ^{acde}
OE 组	5	3.75 ± 0.11 ^{ab}	3.98 ± 0.12 ^{abc}	4.28 ± 0.18 ^{abcd}	4.66 ± 0.12 ^{abcde}	1.10 ± 0.07	1.22 ± 0.63 ^{ab}	5.76 ± 0.18 ^{abcd}	29.48 ± 0.48 ^{abcde}
EV 组	5	0.98 ± 0.11	1.21 ± 0.09 ^{ac}	1.46 ± 0.03 ^{acd}	1.78 ± 0.07 ^{acde}	0.80 ± 0.39	2.36 ± 0.32 ^{ac}	14.72 ± 1.52 ^{acd}	51.02 ± 1.65 ^{acde}

注: CON 组为对照组, H 组为高氧性急性肺损伤(HALI)组, OE 组为微小 RNA-21-5p(miR-21-5p)腺相关病毒-6(AAV-6)过表达组, EV 组为空载体组; AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞; 与 CON 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 H 组比较, ^b $P < 0.05$; 与本组 0 h 比较, ^c $P < 0.05$; 与本组 24 h 比较, ^d $P < 0.05$; 与本组 48 h 比较, ^e $P < 0.05$



注: CON组为对照组, H组为高氧性急性肺损伤(HALI)组, OE组为微小RNA-21-5p(miR-21-5p)腺相关病毒-6(AAV-6)过表达组, EV组为空载体组; Annexin V-FITC为膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素, PI为碘化丙啶; D1为坏死细胞, D2为晚期凋亡细胞, D3为早期凋亡细胞, D4为正常细胞

图4 各组大鼠制模后不同时间点 AEC II 细胞早期凋亡率

3 讨论

长时间持续吸入高浓度氧气可导致 HALI, 其严重程度与氧分压〔特别是氧分压 >450 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa), 或吸入氧浓度 (FiO₂) >0.6〕及持续时间成正比^[11]。高氧损伤引起的 AEC II 细胞凋亡是 HALI 发生发展的原因之一。与细胞坏死不同, 细胞凋亡不是一个被动的过程, 其发生发展与细胞内基因及其产物的调控密切相关。

因 HALI 动物模型建立相对简单且具有很高的科学性, 已广泛用于模拟临床 ARDS 的相关研究。HALI 模型建立成功与否至少应满足以下 4 项

中的 3 项^[10]: ① 生理功能紊乱; ② 肺泡毛细血管屏障改变; ③ 组织损伤的组织学证据; ④ 炎症反应。本实验中制备的 HALI 大鼠模型涉及前 3 项指标。OI 反映肺部氧合功能, 与肺损伤呈正相关; RI 反映肺部气体交换功能, 与肺功能呈负相关; 肺 W/D 比值反映肺泡毛细血管膜通透性; 肺组织病理损伤评分是用于反映组织损伤的组织学证据, 对于评估肺损伤程度最为重要。本课题组前期实验证实, 持续吸入高浓度氧 (≥90%) 可成功建立 HALI 模型, 48~72 h 肺损伤程度达高峰^[12]。本实验结果也显示: H 组 OI 随制模时间延长逐渐降低, RI、肺 W/D

比值及病理评分随制模时间延长逐渐增高。说明制模后 24 h 成功建立了 HALI 大鼠模型,且随时间延长 HALI 逐渐加重。

miRNAs 是一组由 19 ~ 20 个核苷酸组成的高度保守的非编码单链 RNAs。到目前为止,已有多种 RNAs 被证实可负性调控人体 30% 左右的基因表达^[13]。miR-21 是一种抗细胞凋亡基因,在多种细胞的凋亡调控中起重要作用^[14-15]。有研究者发现,miR-21 表达降低时 PC-3 细胞增殖受到抑制^[16]; miR-21 过表达时 C-kif⁺ 心脏干细胞内的抗凋亡蛋白表达增高及促凋亡蛋白表达降低,从而使氧化应激诱导的细胞凋亡减少^[17]。AEC II 细胞具有免疫调节、肺水转运、肺泡表面活性物质合成分泌及增殖、分化和修复等功能。在 AEC 受损修复过程中, AEC II 可分化为 AEC I,也可增殖。故对 AEC II 的保护可能是氧疗期间预防 HALI 的关键^[18]。本实验中通过气管导管往大鼠肺内滴入 miR-21-5p AAV-6 过表达载体并饲养 3 周,对原代培养的 AEC II 行 RT-qPCR 发现, miR-21-5p 在 AEC II 内的表达显著增加,从而证明 AAV-6 病毒成功感染 AEC II。进一步对 HALI 模型中 AEC II 进行流式细胞仪检测显示,与 H 组相比, OE 组 24、48 及 60 h AEC II 细胞早期凋亡率显著降低。说明 miR-21-5p 过表达可抑制 HALI 大鼠 AEC II 细胞的早期凋亡。

综上所述, miR-21-5p 作为一种抗细胞凋亡基因,可抑制 HALI 中 AEC II 早期凋亡。但本实验仅仅通过 miR-21-5p 过表达来证实其可抑制细胞凋亡,并没有通过抑制 miR-21-5p 表达进一步证实其对细胞凋亡的作用,故本实验还不够严谨;且本实验中未对 miR-21-5p 抑制 HALI 中 AEC II 早期凋亡的机制进行研究。故本课题组将继续完善相关实验,从而更好地证明 miR-21-5p 在 HALI 中对 AEC II 细胞早期凋亡的调控作用及其调控机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Dinu D, Chu C, Veith A, et al. Mechanistic role of cytochrome P450(CYP)1B1 in oxygen-mediated toxicity in pulmonary cells: a novel target for prevention of hyperoxic lung injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 476 (4): 346-351. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.05.125.

[2] Bhandari A, Bhandari V. Pitfalls, problems, and progress in bronchopulmonary dysplasia [J]. *Pediatrics*, 2009, 123 (6): 1562-1573. DOI: 10.1542/peds.2008-1962.

[3] Lee HS, Kim CK. Cathepsin B is activated as an executive protease in fetal rat alveolar type II cells exposed to hyperoxia [J]. *Exp Mol Med*, 2011, 43 (4): 223-229. DOI: 10.3858/emm.2011.43.4.027.

[4] 李新茂,魏志玄,张婷,等. miR-145 联合替莫唑胺对 U251 胶质瘤细胞恶性行为的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32 (3):

371-375. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.03.009.

Li XM, Wei ZX, Zhang T, et al. Effect of miR-145 combined with tinazolamide on malignant behavior of U251 glioma cells [J]. *J Pract Med*, 2016, 32 (3): 371-375. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.03.009.

[5] 刘红光,张超,曾愈成,等. miR-548a-3p 靶向基质金属蛋白酶-2 抑制胃癌细胞侵袭转移 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33 (8): 1235-1238. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2017.08.011.

Liu HG, Zhang C, Zeng YC, et al. miR-548a-3p targeting MMP-2 inhibits the metastasis and invasion of gastric cancer cells [J]. *J Pract Med*, 2017, 33 (8): 1235-1238. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2017.08.011.

[6] Hou LJ, Han JJ, Liu Y. Up-regulation of microRNA-503 by high glucose reduces the migration and proliferation but promotes the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells by inhibiting the expression of insulin-like growth factor-1 receptor [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22 (11): 3515-3523. DOI: 10.26355/eurrev_201806_15178.

[7] Qi R, Wang DT, Xing LF, et al. miRNA-21 promotes gastric cancer growth by adjusting prostaglandin E2 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22 (7): 1929-1936. DOI: 10.26355/eurrev_201804_14717.

[8] Su C, Cheng X, Li Y, et al. MiR-21 improves invasion and migration of drug-resistant lung adenocarcinoma cancer cell and transformation of EMT through targeting HBP1 [J]. *Cancer Med*, 2018, 7 (6): 2485-2503. DOI: 10.1002/cam4.1294.

[9] 张鑫. miR-21-5p 经 PI3K/Akt 通路在 H₂O₂ 诱导大鼠 AEC II 凋亡的研究 [D]. 遵义: 遵义医学院, 2017.

Zhang X. The study on miR-21-5p via the PI3K/Akt pathway regulating AEC II apoptosis of rats induced by H₂O₂ [D]. Zunyi: Zunyi Medical University, 2017.

[10] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44 (5): 725-738. DOI: 10.1165/ajrmb.2009-0210ST.

[11] Kallet RH, Matthay MA. Hyperoxic acute lung injury [J]. *Respir Care*, 2013, 58 (1): 123-141. DOI: 10.4187/respcare.01963.

[12] 刘国跃,牟胜旭,陈森,等. 一种简便可控的高氧急性肺损伤模型的建立方法 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (1): 27-32. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.01.006.

Liu GY, Mou SX, Chen M, et al. A simple and controllable method for reproduction of a model of high oxygen tension induced acute lung injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28 (1): 27-32. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.01.006.

[13] Wei B, Wei W, Wang L, et al. Differentially expressed microRNAs in conservatively treated nontraumatic osteonecrosis compared with healthy controls [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 9015758. DOI: 10.1155/2018/9015758.

[14] He Y, Cheng Y, Chen M, et al. MicroRNA-21-5p antagonizes oxidant-mediated apoptosis in alveolar epithelial type II cells by targeting PDCD4 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10 (10): 10315-10324.

[15] Wang Z, Yao W, Li K, et al. Reduction of miR-21 induces SK-N-SH cell apoptosis and inhibits proliferation via PTEN/PDCD4 [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13 (6): 4727-4733. DOI: 10.3892/ol.2017.6052.

[16] 刘梦涵,杨琳,刘小军,等. 靶向抑制 miRNA-21 对 K562 细胞增殖及 PTEN-PI3K/AKT 通路的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37 (11): 982-986. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.11.011.

Liu MH, Yang L, Liu XJ, et al. Targeted suppression of miRNA-21 inhibit K562 cells growth through PTEN-PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Chin J Hematol*, 2016, 37 (11): 982-986. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.11.011.

[17] 李天,孙祥宙,江先汉,等. 微小 RNA-21 对前列腺癌 PC-3 细胞增殖的影响及对程序性细胞凋亡因子 4 表达的调控作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34 (12): 2023-2025. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2017.12.002.

Li T, Sun XZ, Jiang XH, et al. Effect of microRNA-21 on proliferation and regulation expression of programmed cell death 4 in prostate cancer cell PC-3 [J]. *Chin J Exp Surg*, 2017, 34 (12): 2023-2025. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2017.12.002.

[18] Liu C, Yang L, Dang H, et al. Effect of Substance P on type II alveolar epithelial cells exposed to hyperoxia and its regulation of the Sonic hedgehog signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10 (3): 1604-1608. DOI: 10.3892/mmr.2014.2330.

(收稿日期: 2019-03-19)