DOI:10.16016/j.2097-0927.202402031

COPD 患者肺泡灌洗液来源外泌体通过 miR-223-3p/FOXO3 通路抑制成骨细胞成骨分化的作用

陈红娅[1],唐渝镇[2],曹 英[1],陈墨龙[2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院:重症医学科[1],运动医学中心[2]

[摘要] **目的** 探索慢性阻塞性肺病患者肺泡灌洗液来源的外泌体(COPD-bronchoalveolar lavage fluid-exosome,COPD-Exo)调控成骨细胞分化的作用及机制。**方法** 选取 2023 年 6 月于陆军军医大学第一附属医院就诊的 6 例 COPD 患者和 6 例非 COPD 患者(对照),在临床肺泡灌洗过程中收集肺泡灌洗液,提取 COPD-Exo、非 COPD 患者肺泡灌洗液来源的外泌体(ctrl-bronchoalveolar lavage fluid-exosome,Ctrl-Exo),使用电镜和 Western blot 进行鉴定。使用茜素红染色、qRT-PCR 检测 COPD-Exo 干预成骨细胞后成骨分化水平的改变。对 GEO 数据库数据集(GSE218571)中 COPD-Exo 的微小 RNA(microRNA,miRNA)表达谱进行生物信息学分析,获得 COPD-Exo 中差异表达的 miRNA,使用 Antagomir 阻碍 MircoRNA 功能,明确具有成骨分化调控功能的 miRNA,使用 Targetscan 软件预测 miRNA 的下游靶基因并进行验证。**结果** COPD 患者和非 COPD 患者的肺泡灌洗液内均可提取出外泌体。茜素红染色及 PCR 结果表明,COPD-Exo 可以抑制人 hFOB 1.19 成骨细胞的成骨分化($P<0.05$)。生物信息学分析显示,COPD-Exo 中 miR-223-3p 表达水平显著上调。使用 Antagomir 阻碍 miR-223-3p 可减轻 COPD-Exo 对于人 hFOB 1.19 成骨细胞的成骨分化抑制($P<0.05$)。Targetscan 预测和 Western blot 结果显示 miR-223-3p 可能靶向抑制成骨分化相关因子 FOXO3 的表达($P<0.05$)。**结论** COPD-Exo 可能通过 miR-223-3p 抑制人 hFOB 1.19 成骨细胞的成骨分化,该过程与 miR-223-3p 抑制 FOXO3 表达有关。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;外泌体;成骨分化;miR-223-3p

[中图法分类号] R322.71;R394.3;R563.9 [文献标志码] A

COPD patients' bronchoalveolar lavage fluid-derived exosomes inhibit osteoblast differentiation *via* miR-223-3p/FOXO3 pathway

CHEN Hongya[1], TANG Yuzhen[2], CAO Ying[1], CHEN Molong[2] [1]Department of Intensive Care Medicine, [2]Sports Medical Center, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role and mechanism of the exosomes derived from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD-Exo) in regulating osteoblast differentiation. **Methods** A total of 6 COPD patients and 6 non-COPD patients admitted in our hospital in June 2023 were recruited, and their BALF samples were collected during the process. COPD-Exo and exosomes from the non-COPD patients (Ctrl-Exo) were extracted and identified by electron microscopy and Western blotting. Alizarin red staining and qRT-PCR were used to detect the differences in osteoblast differentiation after COPD-Exo and Ctrl-Exo intervention. Bioinformatics analysis was performed on

[通信作者] 陈墨龙,E-mail:chenmlorthop@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the microRNA (miRNA) expression profiles of COPD-Exo and Ctrl-Exo in the GEO database (GSE218571) to obtain differentially expressed miRNAs. Antagomir was used to block mircoRNA function, and the miRNAs with osteogenic differentiation regulatory function were identified. Targetscan software was used to predict the downstream target genes of the miRNAs, and then these miRNAs were verified. **Results** Exo could be extracted from BALF of both COPD and non-COPD patients. Alizarin red staining and qRT-PCR results showed that COPD-Exo inhibited the osteogenic differentiation of human hFOB 1.19 osteoblasts ($P<0.05$). Bioinformatics analysis indicated that the expression level of miR-223-3p was significantly up-regulated in COPD-Exo. Blocking miR-223-3p with Antagomir could alleviate the osteogenic differentiation of human hFOB 1.19 osteoblasts inhibited by COPD-Exo ($P<0.05$). Targetscan prediction revealed that miR-223-3p may target and inhibit the expression of osteogenic differentiation-related factor FOXO3 ($P<0.05$). **Conclusion** COPD-Exo can inhibit the osteogenic differentiation of human hFOB 1.19 osteoblasts through miR-223-3p, which may be related to the inhibition of FOXO3 expression by miR-223-3p.

[**Key words**] chronic obstructive pulmonary disease; exosomes; osteogenic differentiation; miR-223-3p

Corresponding author: CHEN Molong, E-mail: chenmlorthop@tmmu.edu.cn

慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)是一种具有异质性的全身炎症性疾病,临床主要表现为不能完全逆转的进行性气流受限,其与肺部对有害颗粒和气体的异常炎症反应有关[1]。尽管 COPD 主要表现为肺部症状,但它对肺外组织的影响亦十分显著。其中骨质疏松症作为 COPD 常伴有的疾病类型,显著影响 COPD 患者的管理与预后。在 COPD 中,骨质疏松的患病率被认为比没有气流阻塞的年龄匹配的受试者高 2~5 倍[2]。在最近开发的男性骨质疏松风险筛查工具中,合并 COPD 将患骨质疏松的概率增加近 4 倍[3]。然而,COPD 诱发骨质疏松的潜在机制并不清楚。

外泌体是活细胞分泌的具有生物活性的纳米级双层膜囊泡,多位于血液、体液、组织液中[4]。外泌体内包含 miRNA、蛋白、脂质等活性成分,在外泌体被靶细胞摄取后,通过基因表达调控、蛋白质翻译或翻译后修饰调控完成对靶细胞的调控[5]。miRNA 是一类长度较短的内源性非编码单链 RNA,可通过介导信使 RNA 的翻译抑制和/或信使 RNA 的降解来调节基因表达[6]。多项研究显示外泌体可通过 miRNA 介导肺脏-骨骼器官间的通讯[7]。新近研究显示,COPD 患者肺泡灌洗液内存在大量的外泌体[8],同时 miRNA 测序显示 COPD 患者来源的外泌体 COPD-Exo 与非 COPD 患者肺泡灌洗液来源的外泌体 Ctrl-Exo 具有不同的 miRNA 表达谱[9]。但 COPD-Exo 是否通过 miRNA 进而导致骨质疏松并不清楚。因此,本研究拟借助生物信息学分析、miRNA 靶基因预测解析、成骨分化诱导实验及成骨分化能力评估等手段,明确 COPD-Exo 在成骨细胞分化中的具体作用及机制,研究结果有望为 COPD 伴随的骨质疏松提供新的检测指标,并为其临床治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 COPD 患者与非 COPD 患者肺泡灌洗液的采集

选择 2023 年 6 月于陆军军医大学第一附属医院就诊的 6 例 COPD 患者和 6 例非 COPD 患者(对照)作为研究对象,其性别、年龄、COPD 病程等基本资料间无统计学差异。患者均签署知情同意书,该研究已经陆军军医大学第一附属医院伦理委员会批准[(A)KY2024060]。纳入标准:①COPD 组:临床诊断为 COPD 的住院患者;非 COPD 组:因创伤、急性肺部感染等急性症状入院,临床诊断未合并 COPD 的住院患者;②年龄 45~65 岁。排除标准:①住院期间存在活动性严重感染者;②近 3 个月内曾服用过影响钙代谢的药物者;③合并有严重的全身代谢性疾病;④患有严重心、脑、肝、肾等脏器疾病者;⑤精神疾病者及不能配合治疗者。取 0.9%无菌生理盐水 100 mL 进行灌洗,操作前加热至 37 ℃,用注射器经支气管镜操作孔注入,每次注入 20~50 mL,常规灌洗 3~5 次。生理盐水注入目标肺段后,立即给予适当负压 25~100 mmHg,轻吸回收肺泡灌洗液。每个受试者回收的肺泡灌洗液按照 15 mL 进行分装,用于后续外泌体的提取及分析。

1.2 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 的提取

肺泡灌洗液来源 Exo 的采集步骤参考既往文献[10-11]。肺泡灌洗液来源 Exo 分为 COPD-Exo 组和 Ctrl-Exo 组,置于离心机中 300×*g* 离心 10 min,去除细胞碎屑和大颗粒物;2 000×*g* 离心 30 min,去除大量细胞碎屑和细胞器;10 000×*g* 离心 70 min,去除小型碎片和膜片;使用 0.22 μm 细菌滤器进行过滤,超高速离心机(贝克曼,德国)进行 100 000×*g* 离心 120 min 以上,去除残留蛋白和低密度颗粒物,得到纯化 Exo 沉淀。使用 BCA 试剂盒测定 Exo 浓度。

1.3 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 的鉴定

使用透射电子显微镜对 Exo 的形态进行表征。具体操作如下:将 Exo 悬浮液滴在碳涂层的铜网上,用 1%的磷钨酸染色 1 min 以增强对比度,然后风干。随后,使用透射电子显微镜(JSM-1400PLUS,日本)在 100 kV 的电压下进行观察。将等量的 Exo 和细胞裂解物通过 SDS-PAGE 分离,然后转移到硝酸纤维素膜上。随后,用 CD63、TSG101、Calnexin 特异性抗体(#sc-5275, #sc-7964, #sc-23954, Santa Cruz, 美国)进行 Western blot 检测。

1.4 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 的细胞摄取实验

COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 使用 DIL(#C1991S,碧云天,中国)在 37 ℃的黑暗环境中孵育 30 min 行标记。100 000×*g* 离心 120 min 以去除未结合的 DIL。然后,将 Exo 和人 hFOB 1.19 成骨细胞(CL-0353,普诺赛,中国武汉)混合并在 37 ℃下孵育 8 h。使用激光共聚焦显微镜(LSM880,ZEISS,德国)观察成骨细胞对携带 EGFP 的 Exo 的摄取情况,并使用 Image J 软件分析图像。

1.5 人成骨细胞的培养及诱导成骨分化

人 hFOB 1.19 成骨细胞接种于 12 孔板,使用含有 DMEM/F-12 培养基(PM150315,普诺赛,中国武汉)和 10%胎牛血清(11011-8611,四季青,中国上海)、1%青霉素/链霉素双抗(C0222, 碧云天,中国上海)的完全培养基进行培养。细胞在含 5% CO_2 的 37 ℃细胞培养箱中培养。每 3 天更换 1 次培养基,当融合度达到 80%~90%时传代,传代 3 代以内的细胞被用于后续实验。将培养基替换为成骨分化培养基(#MUXMX-90021,赛业生物,中国),并继续培养细胞 14 d。随后,使用 4%多聚甲醛固定细胞,并使用茜素红染色试剂盒(#C3206,碧云天,中国)对细胞进行染色。使用 Image J 软件分析图像。

1.6 Antago-miR 干预和 Exo 干预

Exo 干预方法参考文献[12-13]。传代后的人 hFOB 1.19 成骨细胞接种于 12 孔板,每孔细胞数为 1×10^5 个。将 DMEM/F-12 培养基替换为成骨分化培养基(#MUXMX-90021,赛业生物,中国),分别添加 100 μg/mL 的 COPD-Exo、Ctrl-Exo 和 PBS 孵育,继续诱导细胞分化 14 d 后进行检测。Antago-miR-223-3p(B05003,吉玛基因,中国)和对照 Antago-miR(Antago-miR-NC)被用于 Antago-miR 转染实验。Antago-miR-223-3p 参照说明书加入配套转染试剂和 PBS 稀释至 100 μmol/L,添加入成骨分化培养基后,继续诱导细胞分化 14 d 进行检测。

1.7 qRT-PCR 检测

成骨细胞用 PBS 洗涤 3 次,在冰上用 TRIzol(9109,TaKaRa,日本)处理以从细胞中提取总 RNA。RNA 的质量通过 NanoDrop 分光光度计(ND-1000,Thermo Scientific,美国)进行分析。使用 PrimeScript RT 试剂盒(RR047A,TaKaRa,日本)进行 RNA 反转录,并使用 Premix Ex Taq Ⅱ 试剂盒(RR390A,TaKaRa,日本)进行扩增,然后通过 ViiA 7 实时 PCR 系统(Thermo Scientific,美国)检测目标基因的 mRNA 表达量。使用 β-actin 来标准化细胞内的目标基因 mRNA,U6 来标准化外泌体内的目标基因 miRNA[14]。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法计算 mRNA 相对表达量。

1.8 生物信息学分析

选择 GEO 数据库的外泌体 miRNA 基因集(GSE218571)进行分析,该数据集共纳入 24 名 COPD 患者以及 20 名非 COPD 患者的肺泡灌洗液来源外泌体的 miRNA 高通量测序结果。使用 DESeq R 软件(1.10.1)对 2 组进行差异表达分析。以 $-\log_{10}$(*P*-value)>1.3(*P*<0.05)和$|\log_2\text{foldchange}|\geq1$ 作为阈值来识别显著差异表达。使用 RStudio 软件(RStudio,美国洛杉矶)进行聚类分析和火山图分析。使用 Targetscan8.0 在线预测网站(https://www.targetscan.org/vert_80/)进行 miRNA 的靶基因预测。

1.9 Western blot 实验

使用 RIPA 裂解缓冲液(P0013C,碧云天)裂解成骨细胞,用 BCA 测定试剂盒(P0012,碧云天)测定蛋白浓度。样品加入上样缓冲液后,放置在沸水浴中 5 min。不同分子量的蛋白质通过 SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶阻断 PVDF 膜 1 h,添加 FOXO3(#12829,CST,美国)一抗置于 4 ℃孵育过夜。用 TBST 清洗未结合的抗体,然后用二抗孵

育 1 h。使用 ECL 试剂盒(1705060,Bio-Rad,美国)和 ChemiDoc 成像系统(Bio-Rad,美国)对条带进行成像。使用 Image J 软件测量和分析条带的灰度值。使用 β-actin 对蛋白质的相对表达量进行标准化。

1.10　统计学分析

每个实验至少重复 3 次。使用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析。数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 Bonferroni 事后检验对多个组间的比较进行评估。P <0.05 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　COPD-Exo 及 Ctrl-Exo 的鉴定

收集 COPD 患者的肺泡灌洗液和非 COPD 患者的肺泡灌洗液,提取 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 并进行鉴定。电镜结果显示 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 表现为典型的双凹圆盘状(图 1A)。Western blot 结果显示 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 均表达外泌体阳性标志物 CD63、TSG101,不表达阴性标志物 Calnexin(图 1B)。外泌体摄取实验显示 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 均可被人 hFOB 1.19 成骨细胞摄取(图 1C)。

2.2　COPD-Exo 可抑制人成骨细胞的成骨分化

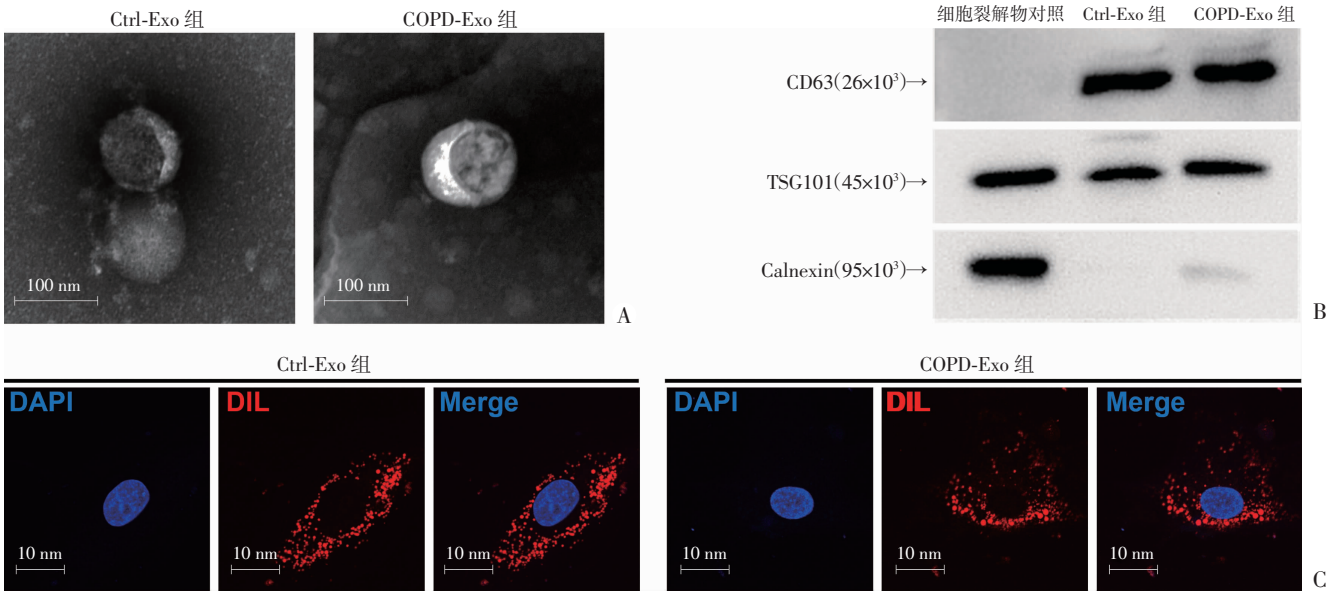
使用 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 添加到人 hFOB 1.19 成骨细胞的诱导成骨分化体系中。茜素红染色显示,相对 PBS 组和 Ctrl-Exo 组,COPD-Exo 组茜素红阳性的茜素红阳性钙结节面积减少(P<0.05,图 2A、B)。PCR 结果显示,相对 PBS 组和 Ctrl-Exo 组,COPD-Exo 组的成骨分化相关基因 Runx2、ALP、Spp1、BGLAP 的 mRNA 表达含量下降(P<0.05,图 2C~F)。

2.3　COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 的 miRNA 表达谱

使用 GEO 数据库的 GPL32872 数据集对比分析 24 名 COPD 患者的 COPD-Exo 和 20 名健康对照患者的 Ctrl-Exo 的 miRNA 表达谱。结果共检测到 7 个差异表达 miRNA(图 3A)。聚类分析图显示,miR-223-3p、miR-2110、miR-182-5p、miR-200b-5p 和 miR-625-3p 在 COPD-Exo 中为潜在高表达 miRNA;miR-138-5p、miR-338-3p 和 miR-204-5p 在 COPD-Exo 中为潜在低表达 miRNA(图 3B)。

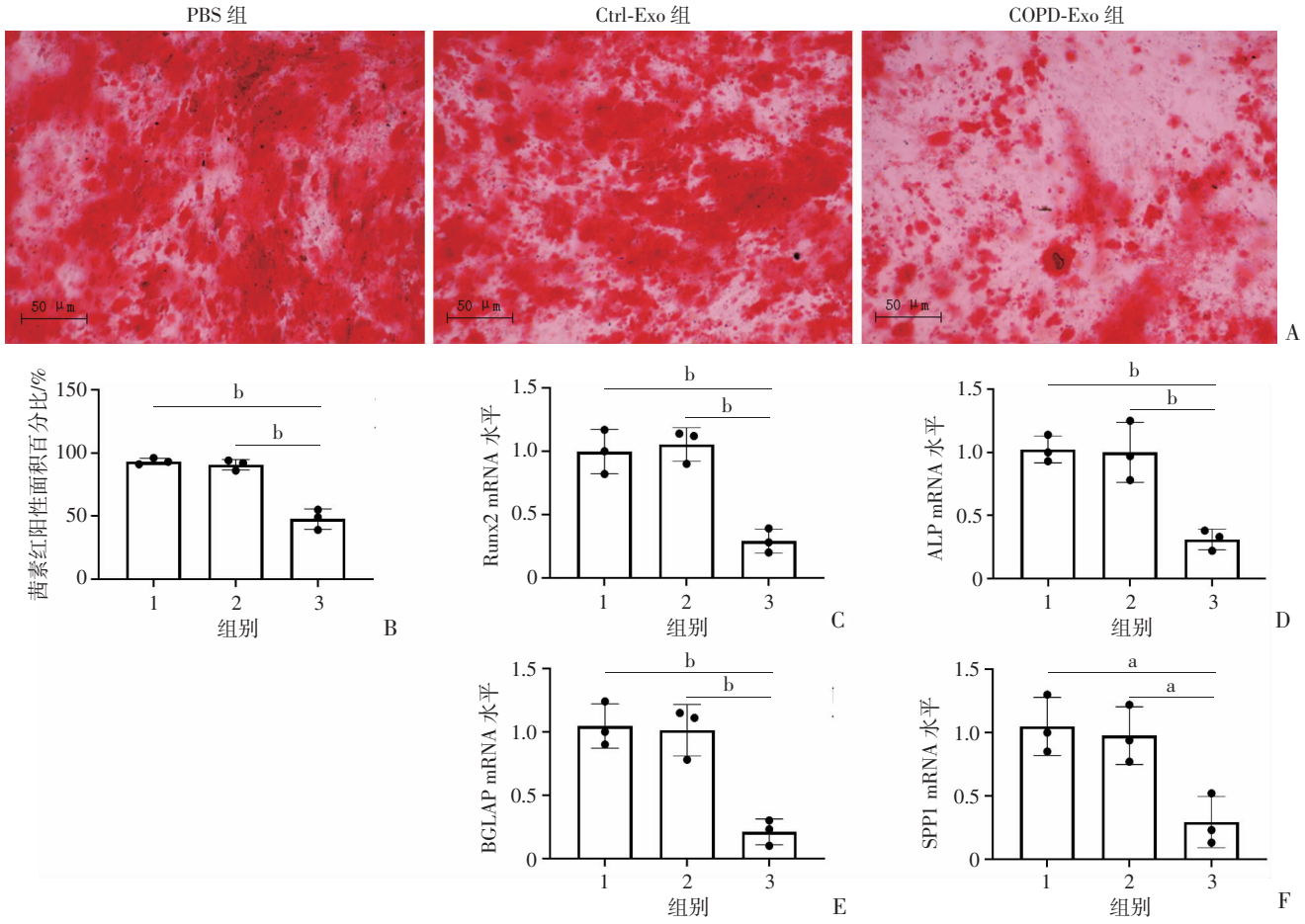
2.4　miR-223-3p 在 COPD-Exo 中表达显著升高

使用 qRT-PCR 进一步验证 COPD-Exo 中的差异 miRNA。结果显示,COPD-Exo 的潜在高表达 miRNA 中,miR-223-3p 表达增高变化倍数约 12.5 倍,miR-2110 表达增高变化倍数约 4.1 倍,miR-182-5p 表达增高变化倍数为 7.3 倍,miR-200b-5p 表达增高变化倍数约 2.6 倍(P<0.05,图 4A~D)。miR-138-5p 表达降低变化倍数约 7.4 倍,miR-338-3p 表达降低变化倍数约 1.8 倍(P<0.05,图 4F、G)。miR-625-3p、miR-204-5p 表达无显著变化(图 4E、H)。因此,miR-223-3p 被选择用于后续研究。



A:外泌体电镜染色;B:外泌体 Western blot 鉴定;C:外泌体摄取实验　红色为 DIL 染色的外泌体;蓝色为细胞核

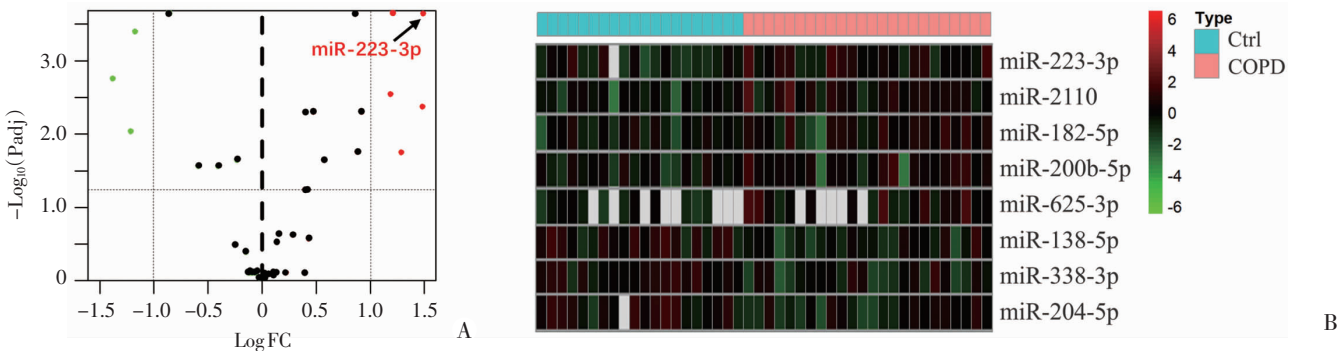
图 1　COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 的鉴定及摄取



1:PBS 组;2:Ctrl-Exo 组;3:COPD-Exo 组;a: $P<0.05$,b: $P<0.01$

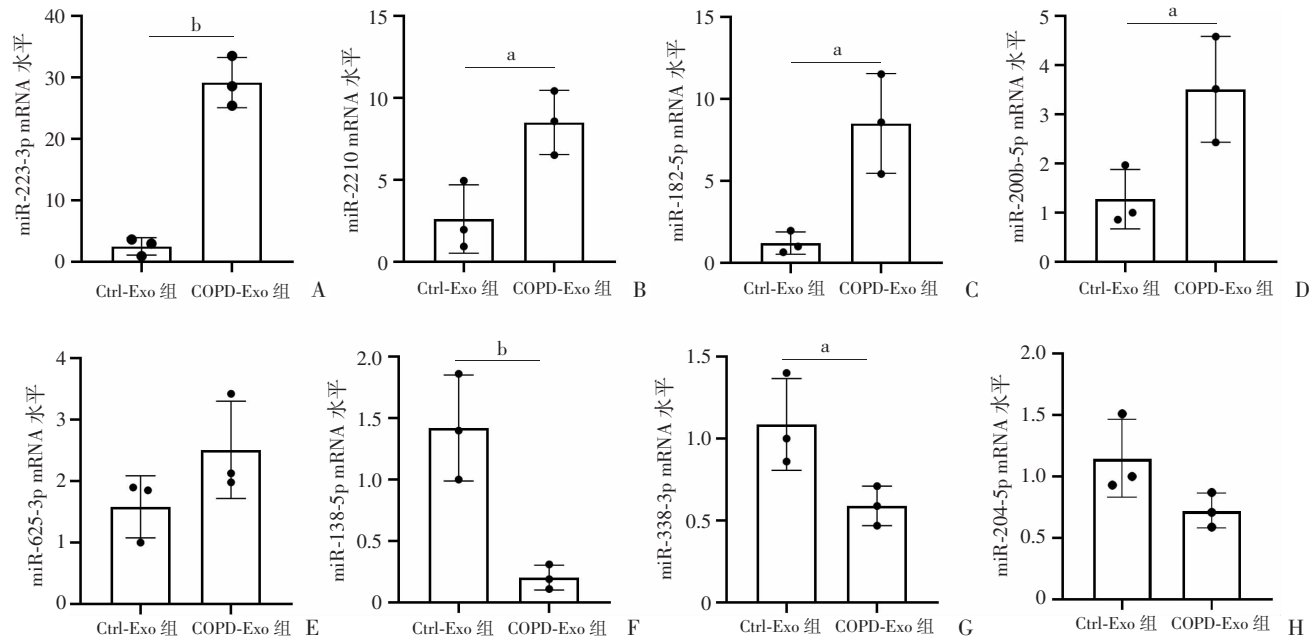
A:茜素红染色;B:茜素红染色统计分析;C~F:PCR 检测成骨相关基因的表达

图 2 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 对人 hFOB 1.19 成骨细胞成骨分化的影响($n=3$)



A: COPD-Exo 相对 Ctrl-Exo 的 miRNA 表达的火山图分析;B:COPD-Exo 相对 Ctrl-Exo 的 miRNA 表达的聚类分析;红色为表达上调,绿色为表达下调

图 3 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 的 miRNA 表达谱



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

A~E: COPD-Exo 相对 Ctrl-Exo 的潜在高表达 miRNA 的 PCR 验证;F~H:COPD-Exo 相对 Ctrl-Exo 的潜在低表达 miRNA 的 PCR 验证

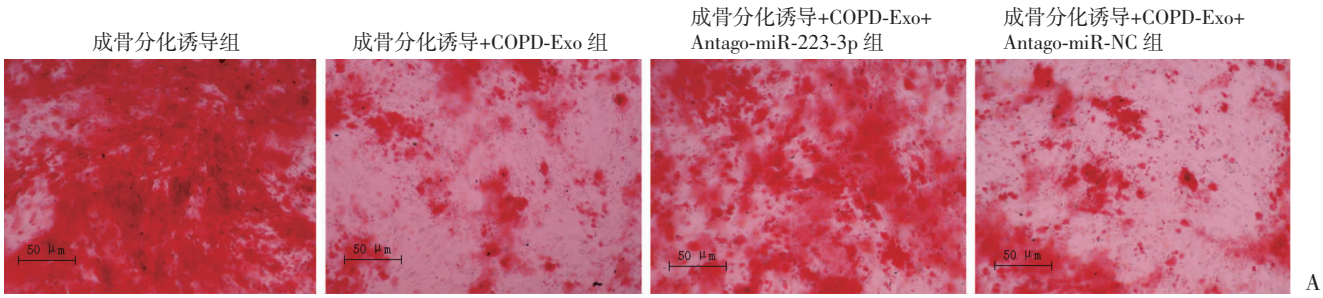
图 4 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 的差异表达 miRNA 的 PCR 验证($n=3$)

2.5 拮抗 miR-223-3p 可缓解 COPD-Exo 对成骨分化的抑制

使用 Antago-miR-223-3p 添加到 COPD-Exo 干预的人 hFOB 1.19 成骨细胞的诱导成骨分化体系中。茜素红染色显示,正常成骨分化诱导组茜素红结节覆盖面积较多,而 COPD-Exo 组茜素红结节覆盖面积明显减少;添加 Antago-miR-223-3p 有效缓解了 COPD-Exo 导致的茜素红结节覆盖面积的减少($P<0.05$,图 5A、B),而添加 Antago-miR-NC 后则无显著改变。PCR 结果显示,在正常成骨分化诱导组中添加 COPD-Exo 可导致成骨分化相关基因 Runx2、ALP、Spp1、BGLAP 表达水平下降;添加 Antago-miR-223-3p 有效缓解了 COPD-Exo 导致的 Runx2、ALP、Spp1、BGLAP 水平下降($P<0.05$,图 5C~F),添加 Antago-miR-NC 则无显著改变。表明 Antago-miR 拮抗 miR-223-3p 可缓解 COPD-Exo 对成骨分化的抑制。

2.6 miR-223-3p 通过靶向 FOXO3 导致成骨细胞的成骨分化抑制

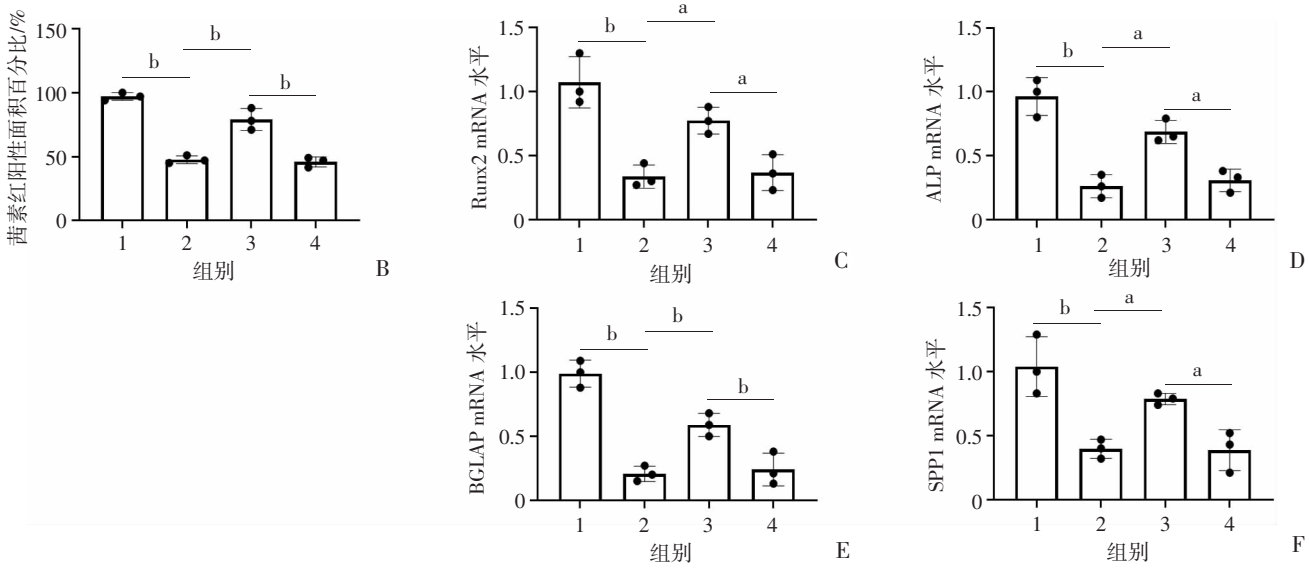
Targetscan 数据库预测分析显示,miR-223-3p 可通过 AACUGACA 靶向成骨相关因子 FOXO3 的 UUGACUG 序列(图 6A)。Western blot 结果显示,在正常成骨分化诱导组中添加 COPD-Exo 可导致 FOXO3 蛋白表达水平下降;添加 Antago-miR-223-3p 有效缓解了 COPD-Exo 导致的 FOXO3 蛋白表达水平下降,而添加 Antago-miR-NC 则无显著改变(图 6B、C),提示 COPD-Exo 中高表达的 miR-223-3p 可能通过靶向 FOXO3 导致成骨分化的抑制。



A: 茜素红染色

图 5 拮抗 miR-223-3p 对 COPD-Exo 干预的成骨细胞成骨分化的影响($n=3$)

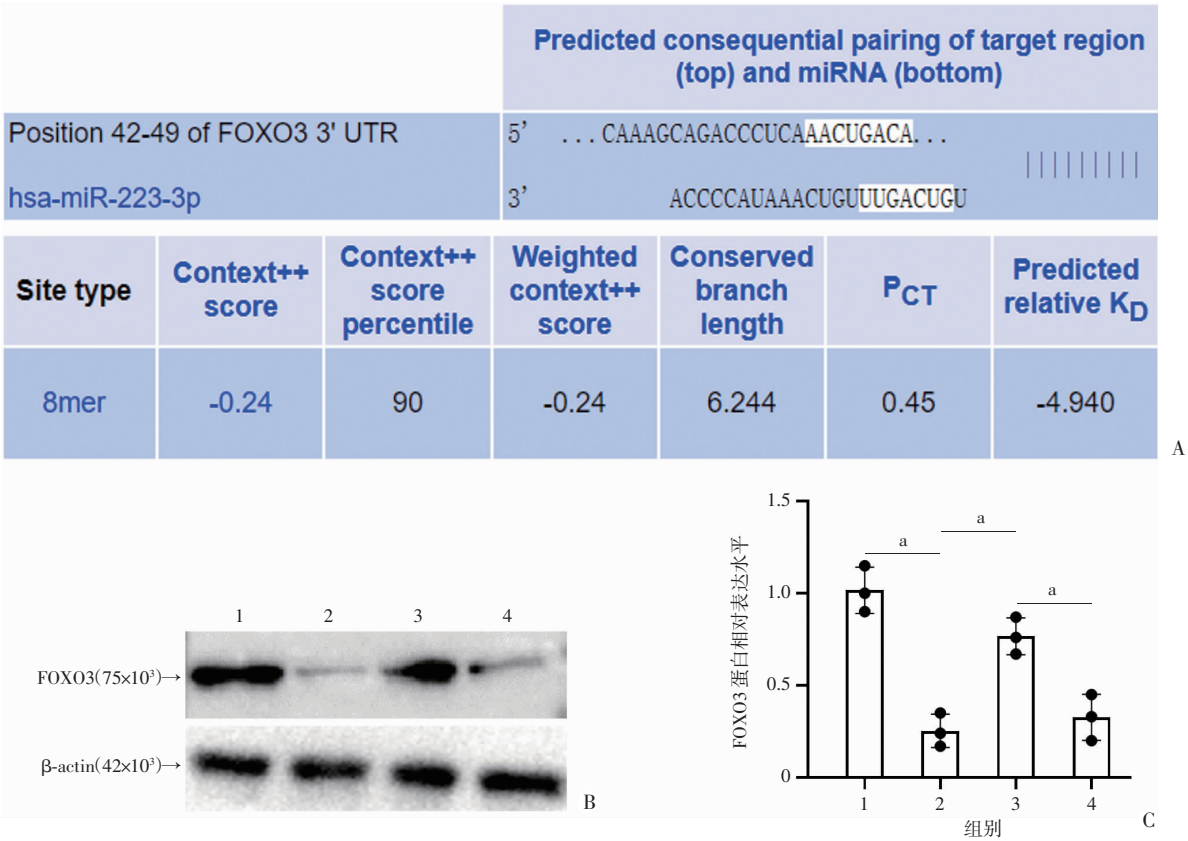
(图 5B~F 续下页)



1:成骨分化诱导组;2:成骨分化诱导+COPD-Exo 组;3:成骨分化诱导+COPD-Exo+Antago-miR-223-3p 组;4:成骨分化诱导+COPD-Exo+Antago-miR-NC 组;a: $P<0.05$,b: $P<0.01$

B:茜素红染色统计分析;C~F:PCR 检测成骨相关基因表达

续图 5 拮抗 miR-223-3p 对 COPD-Exo 干预的成骨细胞成骨分化的影响($n=3$)



1:成骨分化诱导组;2:成骨分化诱导+COPD-Exo 组;3:成骨分化诱导+COPD-Exo+Antago-miR-223-3p 组;4:成骨分化诱导+COPD-Exo+AntagomiR-NC 组;a: $P<0.01$

A: Targetscan 数据库预测 miR-223-3p 和 FOXO3 的结合;B:Western blot 检测 FOXO3 蛋白水平;C:Western blot 结果统计分析

图 6 miR-223-3p 对成骨细胞中 FOXO3 蛋白表达的影响($n=3$)

3 讨论

骨质疏松症是 COPD 常伴有的疾病,骨质疏松显著影响 COPD 患者的管理与预后。全球 COPD 疾病倡议已将包括骨质疏松在内的肺外组织影响纳入 COPD 的定义中[15-16]。然而 COPD 导致骨质疏松的潜在机制并不清楚。本研究发现 COPD-Exo 存在于 COPD 患者的肺泡灌洗液中,且 COPD-Exo 通过 miR-223-3p 抑制成骨细胞的成骨分化,该过程与 miR-223-3p 抑制成骨细胞相关因子 FOXO3 有关。本研究揭示了 COPD-Exo 抑制成骨细胞分化的作用及机制,可能有助于未来临床上 COPD 诱发骨质疏松的治疗。

外泌体是活细胞产生的纳米级别双层膜结构生物囊泡,以往被认为是细胞生物学进程产生的废物,现在被证实是介导细胞间通讯、组织器官间通讯的介质[17]。本研究使用超速离心法提取 COPD-Exo 与 Ctrl-Exo,发现其在电镜下均呈现为双凹圆盘型。Western blot 结果亦显示外泌体均表达阳性标志物 CD63、TSG101,不表达阴性标志物 Calnexin。将 COPD-Exo 和 Ctrl-Exo 分别加入诱导成骨分化的人 hFOB 1.19 成骨细胞中,结果显示 COPD-Exo 抑制了成骨细胞诱导分化后的茜素红阳性钙结节含量和成骨分化相关基因 Runx2、ALP、Spp1、BGLAP 的表达。以上结果证实,COPD-Exo 可能是 COPD 诱发骨质疏松的重要媒介。

miRNA 广泛存在于真核生物的外泌体中。研究显示外泌体可通过 miRNA 介导肺脏-骨骼间的通讯[7, 18]。既往研究选取 24 名 COPD 患者和 20 名对照患者的肺泡灌洗液进行 miRNA 测序,证实 COPD-Exo 与 Ctrl-Exo 具有不同的 miRNA 表达谱,本研究选取 $|\log_2 foldchange| \geq 1$(代表基因表达差异 1 倍以上)同时 $-\log_{10}(P\text{-value}) > 1.3$(代表 $P<0.05$)的上调 miRNA 进行生物信息学分析,发现其中上调 miRNA 有 miR-223-3p、miR-2110、miR-182-5p、miR-200b-5p 和 miR-625-3p,下调 miRNA 有 miR-138-5p、miR-338-3p 和 miR-204-5p。PCR 验证发现 miR-223-3p 差异表达倍数最为显著,同时既往研究表明 miR-223-3p 有可能参与牙髓干细胞成骨分化调控[19],因此 miR-223-3p 被用于后续实验分析。进一步实验显示,使用 Antago-miR-223-3p 拮抗 miR-223-3p 作用后,被 COPD-Exo 抑制的成骨分化进程得到了缓解,表明 miR-223-3p 是 COPD-Exo 中发挥抑制成骨作用的 miRNA。

miRNA 通过碱基互补配对的方式识别靶基因的 3' UTR 区,并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译。Targetscan 预测分析显示,miR-223-3p 的 AACUGACA 序列可识别 FOXO3 的 UUGACUG 序列。FOXO3 是调控氧化应激、自噬、衰老等细胞生物学现象的转录因子[20],多项研究表明 FOXO3 亦是成骨分化转录调控的关键,可促进下游成骨相关因子 Runx2、ALP 等基因的转录[21-23]。Western blot 结果显示,COPD-Exo 干预可抑制成骨细胞中 FOXO3 蛋白的表达,而在 Antago-miR-223-3p 干预后,FOXO3 蛋白水平增多。以上结果证实,COPD-Exo 中高表达的 miR-223-3p 可能通过靶向 FOXO3 导致 hFOB 1.19 成骨细胞成骨分化的抑制,进而促进骨质疏松的发生。

本研究亦存在局限之处:①本研究仅对 COPD-Exo 中的 miRNA 进行了分析,因此 COPD-Exo 中是否存在有成骨分化调控作用的蛋白目前尚不清楚;②本研究未进一步使用双荧光素报告载体证实 miR-223-3p 和 FOXO3 的靶向结合;③肺泡灌洗液来源的 Exo 经过血液循环至骨组织是其发挥作用的关键环节,本研究仅对 COPD 患者肺泡灌洗液来源的 Exo 进行了检测,但未使用 COPD 患者血液来源的 Exo 进行验证;④本研究未使用模式动物明确 COPD-Exo 是否通过 miR-223-3p/FOXO3 信号导致骨质疏松。在下一步的研究中,将结合动物模型进行 COPD-Exo 的干预实验,以进一步明确 COPD-Exo 在 COPD 诱发的骨质疏松中的作用,并通过双荧光素报告实验明确其致病机制。

综上所述,本研究探讨了 COPD-Exo 在成骨细胞成骨分化中的调控作用,验证了 COPD-Exo 中高表达的 miR-223-3p 可能通过靶向 FOXO3 进而抑制成骨细胞的成骨分化。COPD-Exo 中的 miR-223-3p 有望成为治疗 COPD 诱发的骨质疏松中的潜在治疗靶点。

参考文献:

[1] DECRAMER M, JANSSENS W, MIRAVITLLES M. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. Lancet, 2012, 379(9823): 1341-1351. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60968-9.

[2] BOLTON C E, IONESCU A A, SHIELS K M, *et al*. Associated loss of fat-free mass and bone mineral density in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170(12): 1286-1293. DOI: 10.1164/rccm.200406-754OC.

[3] SHEPHERD A J, CASS A R, CARLSON C A, *et al*. Development and internal validation of the male osteoporosis risk estimation score[J]. Ann Fam Med, 2007, 5(6): 540-546. DOI: 10.1370/afm.753.

[4] QIN Y H, SUN R X, WU C L, *et al*. Exosome: a novel approach to stimulate bone regeneration through regulation of osteogenesis and angiogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(5): 712. DOI: 10.3390/ijms17050712.

[5] ZHANG J, LI S, LI L, *et al*. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2015, 13(1): 17-24. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.02.001.

[6] DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic[J]. Trends Genet, 2022, 38(6): 613-626. DOI: 10.1016/j.tig.2022.02.006.

[7] NI J J, ZHANG X F, LI J, *et al*. Tumour-derived exosomal lncRNA-SOX2OT promotes bone metastasis of non-small cell lung cancer by targeting the miRNA-194-5p/RAC1 signalling axis in osteoclasts[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(7): 662. DOI: 10.1038/s41419-021-03928-w.

[8] LIU Z Y, YAN J Q, TONG L L, *et al*. The role of exosomes from BALF in lung disease[J]. J Cell Physiol, 2022, 237(1): 161-168. DOI: 10.1002/jcp.30553.

[9] BURKE H, CELLURA D, FREEMAN A, *et al*. Pulmonary EV miRNA profiles identify disease and distinct inflammatory endotypes in COPD[J]. Front Med, 2022, 9: 1039702. DOI: 10.3389/fmed.2022.1039702.

[10] QAZI K R, TORREGROSA PAREDES P, DAHLBERG B, *et al*. Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis[J]. Thorax, 2010, 65(11): 1016-1024. DOI: 10.1136/thx.2009.132027.

[11] LEVÄNEN B, BHAKTA N R, TORREGROSA PAREDES P, *et al*. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 131(3): 894-903. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.11.039.

[12] WU J, ZHANG L C, LIU H, *et al*. Exosomes promote hFOB1.19 proliferation and differentiation *via* LINC00520[J]. J Orthop Surg Res, 2023, 18(1): 546. DOI: 10.1186/s13018-023-04021-y.

[13] ZHU L, CHEN Y H, CHEN M, *et al*. Mechanism of miR-204-5p in exosomes derived from bronchoalveolar lavage fluid on the progression of pulmonary fibrosis *via* AP1S2[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(13): 1068. DOI: 10.21037/atm-20-8033.

[14] KLUSZCZYNSKA K, PECZEK Ł, RÓZANSKI A, *et al*. U6/miR-211 expression ratio as a purity parameter for HEK293 cell-derived exosomes[J]. Acta Biochim Pol, 2022, 69(2): 409-415. DOI: 10.18388/abp.2020_5870.

[15] AGUSTÍ A, CELLI B R, CRINER G J, *et al*. Global initiative for chronic obstructive lung disease 2023 report: gold executive summary[J]. Eur Respir J, 2023, 61(4): 2300239. DOI: 10.1183/13993003.00239-2023.

[16] AGUSTÍ A G N. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Proc Am Thorac Soc, 2005, 2(4): 367-370; discussion 371-372. DOI: 10.1513/pats.200504-026SR.

[17] GURUNG S, PEROCHEAU D, TOURAMANIDOU L, *et al*. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling[J]. Cell Commun Signal, 2021, 19(1): 47. DOI: 10.1186/s12964-021-00730-1.

[18] ZHANG J, WU J M. The potential roles of exosomal miR-214 in bone metastasis of lung adenocarcinoma[J]. Front Oncol, 2020, 10: 611054. DOI: 10.3389/fonc.2020.611054.

[19] HUANG X, LIU F, HOU J, *et al*. Inflammation-induced overexpression of microRNA-223-3p regulates odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells by targeting SMAD3[J]. Int Endod J, 2019, 52(4): 491-503. DOI: 10.1111/iej.13032.

[20] MORRIS B J, WILLCOX D C, DONLON T A, *et al*. FOXO3: a major gene for human longevity: a mini-review[J]. Gerontology, 2015, 61(6): 515-525. DOI: 10.1159/000375235.

[21] TSENG P C, HOU S M, CHEN R J, *et al*. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating *RUNX2* gene expression *via* the SIRT1/FOXO3A axis[J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(10): 2552-2563. DOI: 10.1002/jbmr.460.

[22] WANG C G, ZHU M H, YANG D M, *et al*. MiR-29a-3p inhibits proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells *via* targeting FOXO3 and repressing Wnt/β-catenin signaling in steroid-associated osteonecrosis[J]. Int J Stem Cells, 2022, 15(3): 324-333. DOI: 10.15283/ijsc21147.

[23] GÓMEZ-PUERTO M C, VERHAGEN L P, BRAAT A K, *et al*. Activation of autophagy by FOXO3 regulates redox homeostasis during osteogenic differentiation[J]. Autophagy, 2016, 12(10): 1804-1816. DOI: 10.1080/15548627.2016.1203484.

(**收稿**:2024-02-07;**修回**:2024-06-08)

(编辑 张 维)