

# miR-22-3p 调控 TXNIP 对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞增殖及凋亡的影响

朱慧敏<sup>1</sup>, 王军<sup>1</sup>, 张婵<sup>2</sup>, 孔维康<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>滕州市中心人民医院儿童重症监护病房, 山东滕州 277500; <sup>2</sup>菏泽医学专科学校儿科教研室, 山东菏泽 274000;

<sup>3</sup>滕州市中心人民医院新生儿科一病区, 山东滕州 277500

[中图分类号] R563 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1846.2025.1218

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 朱慧敏, 王军, 张婵, 等. miR-22-3p 调控 TXNIP 对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞增殖及凋亡的影响[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(3): 427-434.

[收稿日期] 2025-09-03

[录用日期] 2025-10-22

[上线日期] 2025-12-18

**[摘要]** 目的 探讨微小RNA-22-3p(miR-22-3p)对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞增殖、凋亡的影响及与硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP)的关系。方法 将肺泡II型上皮细胞(AECII)随机分为对照组、模型组、miR-NC组、miR-22-3p mimics组、si-NC组、si-TXNIP组、miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组、miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组; 对照组细胞不做处理, 模型组感染肺炎链球菌, 其他各组转染miRNA或DNA后感染肺炎链球菌。采用qRT-PCR检测细胞中miR-22-3p、TXNIP mRNA表达水平; CCK-8法检测细胞增殖能力; Annexin V染色检测细胞凋亡; ELISA法检测白细胞介素(IL)-10、IL-6水平; Western blotting检测B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、活化胱天蛋白酶-3(Cleaved caspase-3)、TXNIP蛋白表达水平; 双荧光素酶报告实验验证miR-22-3p与TXNIP的靶向关系。结果 与对照组比较, 模型组细胞增殖能力和miR-22-3p表达水平、IL-10和Bcl-2蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率、TXNIP mRNA表达水平, IL-6水平, 以及Bax、Cleaved caspase-3、TXNIP蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。与模型组、miR-NC组比较, miR-22-3p mimics组细胞增殖能力, miR-22-3p表达水平, IL-10水平, 以及Bcl-2蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率、TXNIP mRNA和IL-6、Bax、Cleaved caspase-3、TXNIP蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ); si-TXNIP组细胞miR-22-3p表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 增殖能力、IL-10、Bcl-2蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率、TXNIP mRNA和IL-6、Bax、Cleaved caspase-3、TXNIP蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )。与miR-22-3p mimics组、miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较, miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组细胞miR-22-3p表达水平无明显差异( $P>0.05$ ), 细胞增殖能力、IL-10、Bcl-2蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率、TXNIP mRNA和IL-6、Bax、Cleaved caspase-3、TXNIP蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。miR-22-3p与TXNIP存在靶向关系。结论 过表达miR-22-3p可抑制TXNIP的表达, 进而抑制肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞凋亡, 促进细胞增殖。

**[关键词]** 微小RNA-22-3p; 硫氧还蛋白互作蛋白; 肺炎链球菌; 肺泡上皮细胞; 增殖; 凋亡

## Effects of miR-22-3p on *Streptococcus pneumoniae*-induced proliferation and apoptosis of alveolar epithelial cells by regulating TXNIP

Zhu Hui-Ming<sup>1</sup>, Wang Jun<sup>1</sup>, Zhang Chan<sup>2</sup>, Kong Wei-Kang<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Intensive Care Unit, <sup>3</sup>the First Ward of the Neonatology Department, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou, Shandong 277500, China

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Heze Medical College, Heze, Shandong 274000, China

\*Corresponding author, E-mail: zdprr@163.com

This work was supported by the Shandong Provincial Medical and Health Science and Technology Development Plan (202006011247)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of microRNA-22-3p (miR-22-3p) on the proliferation and apoptosis of

**[基金项目]** 山东省医药卫生科技发展计划(202006011247)

**[作者简介]** 朱慧敏, 医学硕士, 主治医师, 主要从事儿科呼吸与急救方面的研究

**[通信作者]** 孔维康, E-mail: zdprr@163.com

alveolar epithelial cells induced by *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), as well as the targeting relationship between miR-22-3p and thioredoxin-interacting protein (TXNIP). **Methods** Alveolar type II epithelial cells (AEC II) were randomly divided into 8 groups: control group, model group, miR-NC group, miR-22-3p mimics group, si-NC group, si-TXNIP group, miR-22-3p mimics+pcDNA3.1 group, and miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP group. Cells in control group received no treatment, while those in model group were infected with *S. pneumoniae*. Cells in other groups were transfected with miRNA or DNA prior to *S. pneumoniae* infection. The expression levels of miR-22-3p and TXNIP mRNA were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Cell proliferation ability was assessed using the cell counting Kit-8 (CCK-8) assay. Cell apoptosis was detected by Annexin V staining. The levels of interleukin (IL)-6 and IL-10 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)-associated X protein (Bax), Bcl-2, Cleaved caspase-3, and TXNIP were determined by Western blotting. A dual-luciferase reporter assay was performed to verify the targeted regulatory relationship between miR-22-3p and TXNIP. **Results** Compared with control group, model group showed decreased cell proliferation ability, as well as reduced expression levels of miR-22-3p, IL-10, and Bcl-2 protein ( $P<0.05$ ), while exhibiting increased cell apoptosis rate, along with elevated expression levels of TXNIP mRNA, IL-6, Bax, Cleaved caspase-3, and TXNIP protein ( $P<0.05$ ). Compared with model group and miR-NC group, miR-22-3p mimics group exhibited enhanced cell proliferation ability, and increased expression levels of miR-22-3p, IL-10, and Bcl-2 protein ( $P<0.05$ ), while the cell apoptosis rate and expression levels of TXNIP mRNA, IL-6, Bax, Cleaved caspase-3, and TXNIP protein were significantly reduced ( $P<0.05$ ). For si-TXNIP group, there was no significant difference in the expression levels of miR-22-3p compared with model group and miR-NC group ( $P>0.05$ ), but cell proliferation ability and the expression levels of IL-10 and Bcl-2 protein were increased ( $P<0.05$ ), and the cell apoptosis rate and expression levels of TXNIP mRNA, IL-6, Bax, Cleaved caspase-3, and TXNIP protein were decreased ( $P<0.05$ ). Compared with miR-22-3p mimics group and miR-22-3p mimics+pcDNA3.1 group, miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP group showed no significant change in the expression levels of miR-22-3p expression ( $P>0.05$ ), but decreased cell proliferation ability and reduced expression levels of IL-10 and Bcl-2 protein ( $P<0.05$ ), along with increased cell apoptosis rate and elevated expression levels of TXNIP mRNA, IL-6, Bax, Cleaved caspase-3, and TXNIP protein ( $P<0.05$ ). Dual-luciferase reporter assay confirmed that miR-22-3p could directly bind to TXNIP. **Conclusions** Overexpression of miR-22-3p can downregulate the expression of TXNIP, thereby inhibiting the apoptosis and promoting the proliferation of alveolar epithelial cells infected with *S. pneumoniae*.

**[Key words]** microRNA-22-3p; thioredoxin-interacting protein; *Streptococcus pneumoniae*; alveolar epithelial cells; proliferation; apoptosis

肺炎链球菌是人体上呼吸道的常见定植菌，其感染可侵袭肺泡上皮细胞，引发细胞凋亡和屏障损伤，还可导致社区获得性肺炎甚至脓毒症<sup>[1-3]</sup>。近年来，中国肺炎链球菌感染的肺炎病死率呈逐年增高的趋势<sup>[4]</sup>。肺炎链球菌感染的临床治疗以抗生素为主，但其耐药菌株检出率持续攀升<sup>[5]</sup>。肺炎链球菌感染的肺炎发生发展机制尚未阐明，当前相关研究多采用脂多糖诱导的肺损伤模型，通过激活相关通路引发“泛炎症激活”；但肺炎链球菌无脂多糖，多依赖荚膜多糖等毒力因子致病，与脂多糖的“急性炎症爆发”差异明显<sup>[6]</sup>。微小RNA(microRNA, miRNA)是包含18~25个核苷酸的非编码小分子RNA，可与信使RNA结合进而调控基因表达及抑制蛋白翻译<sup>[7]</sup>。在脂多糖诱导的急性肺损伤中，miRNA-22-3p(miR-22-3p)过表达可抑制细胞凋亡及炎症反应<sup>[8-9]</sup>；在急性肺损伤中，硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)表达升高<sup>[10]</sup>。但miR-22-3p与TXNIP在肺炎链球菌感染的肺炎中作用尚不明确。本研究前期进行的网站预测结果提示，miR-22-3p与TXNIP可能存在结合位点。本研究旨在探讨miR-22-3p对肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞增

殖、凋亡的影响以及对TXNIP可能的调节作用，旨在为肺炎链球菌感染的肺炎寻找潜在的治疗靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 肺炎链球菌(0380L, 上海宝录生物科技有限公司); RPMI 1640培养基(IMC-202, 厦门逸漠生物科技有限公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(KTA8010, 武汉亚科因生物技术有限公司); qRT-PCR试剂盒(QP116, 美国GeneCopoeia公司); CCK-8(CA1210, 北京索莱宝科技有限公司); Lipofectamine 2000转染试剂(11668083, 美国赛默飞世尔科技公司); miR-NC、miR-22-3p mimics、si-NC、si-TXNIP均由广州锐博生物科技有限公司设计合成; 空载质粒pcDNA3.1及TXNIP过表达质粒pcDNA3.1-TXNIP由上海生工生物公司构建; 人白细胞介素(interleukin, IL)-6 ELISA试剂盒[YLK1371E, 优利科(上海)生命科学有限公司]; 人IL-10 ELISA试剂盒(CSB-E04593h-IS, 武汉益普生物科技有限公司); AnnexinV-FITC/PI试剂盒(SB-F6012, 上海圣尔生物科技有限公司); 兔抗人多克隆B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax)、B细胞淋巴瘤-2蛋白(Bcl-2)、活化胱天

蛋白酶-3(Cleaved caspase-3)、TXNIP、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔多克隆 IgG(ab289364、ab270252、ab32042、ab232330、ab313651、ab133470, 英国 Abcam 公司)。CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(CellXpert C170i, 德国 Eppendorf 公司); 流式细胞仪(NL-CLC 1L-3L, 美国 Cytex Biosciences 公司); 凝胶成像仪、酶标仪(iBright™ CL750、Multiskan™FC, 美国赛默飞世尔科技公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将AECII细胞置于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养,待细胞生长汇合度为80%时,1:3传代,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每2~3 d更换一次培养基。

**1.2.2 AEC II细胞的肺炎链球菌感染和 miRNA、pcDNA 转染** 将人肺泡II型上皮细胞系(AECII)(CP-H209, 上海经科化学科技有限公司)按随机数字表法分为对照组、模型组、miR-NC组、miR-22-3p mimics组、si-NC组、si-TXNIP组、miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组和miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组。其中对照组细胞不做特别处理,作为基线参照;模型组细胞感染肺炎链球菌,构建细胞损伤模型;miR-NC组细胞转染miR-22-3p阴性对照序列,作miR-22-3p mimics的对照,排除转染或序列的非特异性影响;miR-22-3p mimics组细胞转染miR-22-3p模拟物,过表达miR-22-3p以研究其调控作用;si-NC组细胞转染TXNIP的干扰阴性对照,作si-TXNIP的对照,排除RNA干扰操作的非特异性效应;si-TXNIP组细胞转染靶向TXNIP的小干扰RNA,敲低TXNIP以研究其功能;miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组细胞共转染miR-22-3p mimics和空载质粒pcDNA3.1,为miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组的对照,排除外源质粒转染的影响;miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组细胞共转染miR-22-3p mimics和TXNIP过表达质粒pcDNA3.1-TXNIP,在过表达miR-22-3p的同时恢复TXNIP的表达,观察其能否逆转miR-22-3p mimics的效应。将培养的AEC II细胞按照Lipofectamine™ 2000说明书进行转染。对照组细胞不做特别处理;模型组细胞加入肺炎链球菌(1×10<sup>8</sup> CFU/ml)培养24 h;其他各组转染miRNA或pcDNA 48 h后,加入肺炎链球菌(1×10<sup>8</sup> CFU/ml)继续培养24 h。其中肺炎链球菌感染参数按照文献[11]进行预实验:按感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10进行感染,感染时间24 h;结果显示,肺炎链球菌可有效黏附并侵入AECII细胞,模型组细胞死亡率较对照组明显升高,IL-6等炎症因子表达水平符合肺炎链球菌感染的病理特征,同时细胞存活率达55.0%±4.2%,既能保证感染模型建立,又可满足后

续细胞增殖、凋亡及通路蛋白检测所需的样本量,确保实验可行性。

**1.2.3 qRT-PCR 检测细胞 miR-22-3p 和 TXNIP mRNA 表达水平** 收集各组AECII细胞,使用Trizol试剂盒提取总RNA,采用cDNA合成试剂盒反转录为cDNA,并采用qRT-PCR试剂盒进行扩增。以U6为miR-22-3p的内参,GAPDH为TXNIP的内参,用2<sup>-ΔΔCt</sup>计算相对表达量。引物序列:miR-22-3p,上游5'-TCAGT-GCATCACAGAACTTTG-3',下游5'-GC GAG-CACAGAATTAATACACAC-3';U6,上游5'-CT CGCTTCGGCAGCACA-3',下游5'-AAC-GCTTCAG AATTTGCGT-3';TXNIP,上游5'-CATGTTCCCGAA TCGTGGTC-3',下游5'-CTTGGAGCCAGGGACACT AA-3';GAPDH,上游5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAA CG-3',下游5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'。

**1.2.4 CCK-8法检测AECII细胞增殖能力** 收集各组细胞,接种于96孔板(5×10<sup>3</sup>个/孔)中,24 h后加入CCK-8试剂,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中反应2 h,采用酶标仪测定OD<sub>450nm</sub>值。OD<sub>450nm</sub>值越大表示细胞增殖能力越强。

**1.2.5 AnnexinV染色和流式细胞术检测AECII细胞凋亡** 收集1.2.2中各组AEC II细胞,胰蛋白酶消化,3000 r/min离心6 min,随后进行细胞重悬,加入5 μl AnnexinV-FITC,混匀后再加入5 μl PI,暗处孵育10 min,分析细胞凋亡率。

**1.2.6 ELISA法检测AECII细胞培养上清中IL-10、IL-6的水平** 收集各组细胞培养液,离心后取上清,采用ELISA试剂盒检测各组IL-10、IL-6水平。

**1.2.7 Western blotting 检测AECII细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、TXNIP 的表达** 收集各组细胞,清除培养液后加入细胞裂解液提取总蛋白,采用BCA试剂盒测定蛋白浓度。配置浓缩胶及分离胶进行电泳,将得到的蛋白凝胶转至PVDF膜,脱脂奶粉封闭。将膜与一抗Bax(1:1000)、Bcl-2(1:1000)、Cleaved caspase-3(1:1000)、TXNIP(1:1000)及内参GAPDH(1:5000)过夜孵育,洗膜,与二抗(1:5000)37℃孵育2 h。使用Image Lab™软件定量蛋白条带。

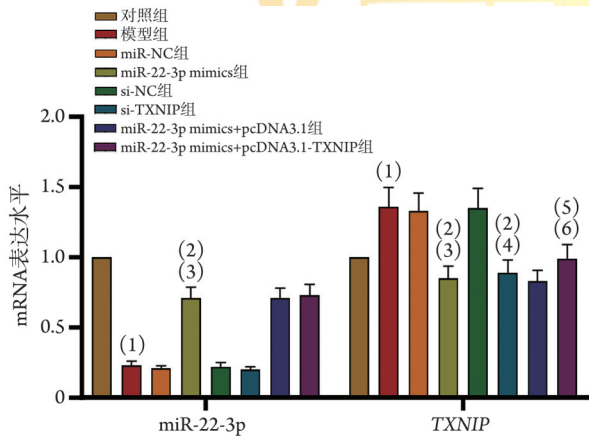
**1.2.8 生物信息学分析和双荧光素酶报告实验验证 miR-22-3p 与 TXNIP 的靶向关系** 在线网站ENCORI(<https://masyu.com/encori/index.php>)预测miR-22-3p与TXNIP的结合位点。构建双荧光素酶报告基因表达载体TXNIP-野生型(WT)、TXNIP-突变型(MUT)载体,分别与miR-NC和miR-22-3p mimic共转染AEC II细胞,得到miR-NC+TXNIP-WT组、miR-NC+TXNIP-MUT组和miR-22-3p mimic+TXNIP-WT组、miR-22-3p mimic+TXNIP-MUT组细胞;48 h后检测荧

光素酶活性。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 25.0软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用SNK-*q*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组AECII细胞miR-22-3p和TXNIP mRNA表达水平比较** qRT-PCR检测结果显示，与对照组比较，模型组miR-22-3p表达水平降低( $P<0.05$ )，TXNIP mRNA表达水平升高( $P<0.05$ )。与模型组、miR-NC组比较，miR-22-3p mimics组miR-22-3p表达水平升高( $P<0.05$ )，TXNIP mRNA表达水平降低( $P<0.05$ )；si-TXNIP组miR-22-3p表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )，TXNIP mRNA表达水平降低( $P<0.05$ )。与miR-22-3p mimics组、miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较，miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组miR-22-3p表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )，TXNIP mRNA表达水平升高( $P<0.05$ )，图1)。

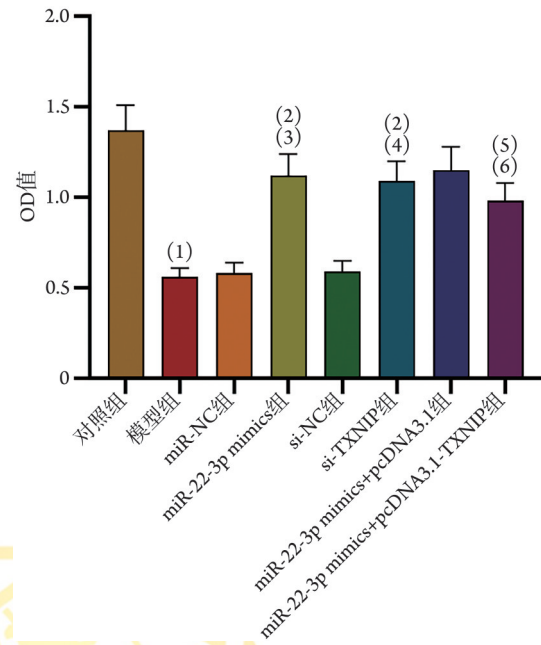


**图1** 各组AECII细胞中miR-22-3p、硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP)mRNA表达水平比较

**Fig.1** Expression of miR-22-3p and thioredoxin-interacting protein (TXNIP) mRNA in AECII cells of each group

与对照组比较，(1) $P<0.05$ ；与模型组比较，(2) $P<0.05$ ；与miR-NC组比较，(3) $P<0.05$ ；与si-NC组比较，(4) $P<0.05$ ；与miR-22-3p mimics组比较，(5) $P<0.05$ ；与miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较，(6) $P<0.05$

**2.2 各组AECII细胞增殖能力比较** CCK-8法检测结果显示，与对照组比较，模型组OD值降低( $P<0.05$ )；与模型组、miR-NC组比较，miR-22-3p mimics组OD值升高( $P<0.05$ )；与模型组、si-NC组比较，si-TXNIP组OD值升高( $P<0.05$ )；与miR-22-3p mimics组、miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较，miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组OD值降低( $P<0.05$ )，图2)。



**图2** 各组AECII细胞增殖能力比较(CCK-8法,  $n=6$ )

**Fig.2** Comparison of the proliferation ability of AECII cells in each group (CCK-8 assay,  $n=6$ )

与对照组比较，(1) $P<0.05$ ；与模型组比较，(2) $P<0.05$ ；与miR-NC组比较，(3) $P<0.05$ ；与si-NC组比较，(4) $P<0.05$ ；与miR-22-3p mimics组比较，(5) $P<0.05$ ；与miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较，(6) $P<0.05$ 。TXNIP、硫氧还蛋白互作蛋白

**2.3 各组AECII细胞凋亡率比较** AnnexinV染色和流式细胞术检测结果显示，与对照组比较，模型组细胞凋亡率增高( $P<0.05$ )；与模型组、miR-NC组比较，miR-22-3p mimics组细胞凋亡率降低( $P<0.05$ )；与模型组、si-NC组比较，si-TXNIP组细胞凋亡率降低( $P<0.05$ )；与miR-22-3p mimics组、miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较，miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组细胞凋亡率增高( $P<0.05$ )，图3)。

**2.4 各组AECII细胞IL-10、IL-6水平比较** ELISA法检测结果显示，与对照组比较，模型组IL-10水平降低( $P<0.05$ )，IL-6水平升高( $P<0.05$ )；与模型组、miR-NC组比较，miR-22-3p mimics组IL-10水平升高( $P<0.05$ )，IL-6水平降低( $P<0.05$ )；与模型组、si-NC组比较，si-TXNIP组IL-10水平升高( $P<0.05$ )，IL-6水平降低( $P<0.05$ )；与miR-22-3p mimics组、miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较，miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组IL-10水平降低( $P<0.05$ )，IL-6水平升高( $P<0.05$ )，图4)。

**2.5 各组AECII细胞Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、TXNIP蛋白表达水平比较** Western blotting检测结果显示，与对照组比较，模型组Bcl-2蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )，Bax、Cleaved caspase-3、TXNIP蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )；与模型组、miR-NC组比较，

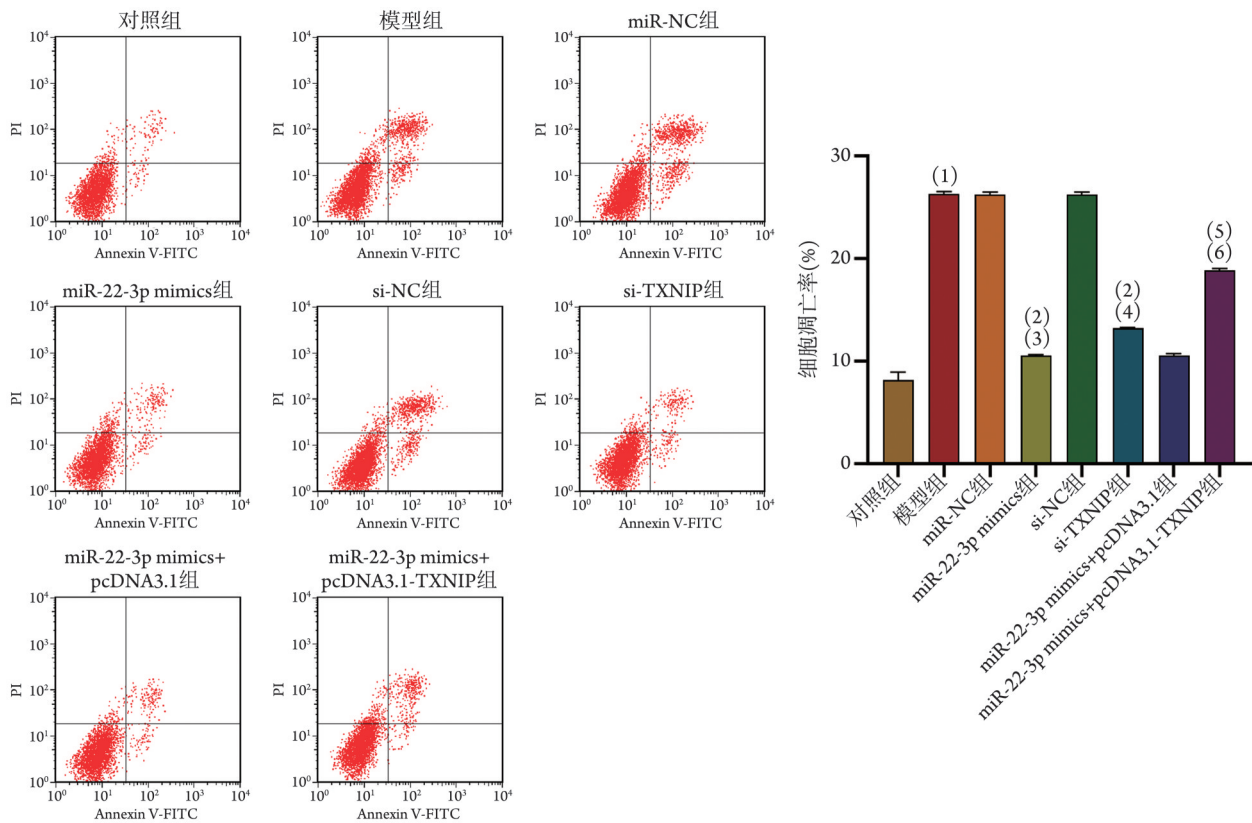


图3 各组AECII细胞凋亡率比较

Fig.3 Comparison of the apoptosis rates in each group of AECII cells

与对照组比较, (1) $P<0.05$ ; 与模型组比较, (2) $P<0.05$ ; 与miR-NC组比较, (3) $P<0.05$ ; 与si-NC组比较, (4) $P<0.05$ ; 与miR-22-3p mimics组比较, (5) $P<0.05$ ; 与miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较, (6) $P<0.05$ . TXNIP, 硫氧还蛋白互作蛋白

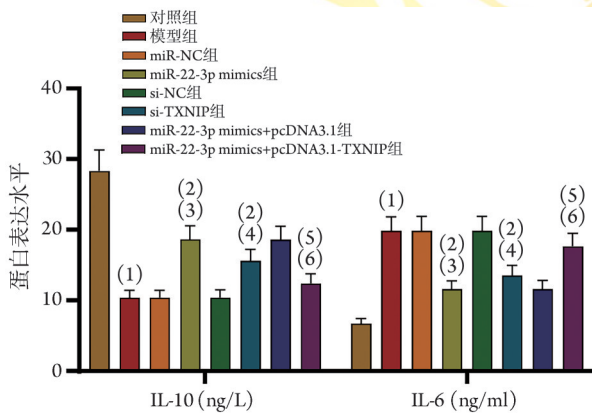


图4 各组AECII细胞IL-10、IL-6水平比较(ELISA法)

Fig.4 Comparison of the levels of IL-10 and IL-6 in each group of AECII cells (ELISA)

与对照组比较, (1) $P<0.05$ ; 与模型组比较, (2) $P<0.05$ ; 与miR-NC组比较, (3) $P<0.05$ ; 与si-NC组比较, (4) $P<0.05$ ; 与miR-22-3p mimics组比较, (5) $P<0.05$ ; 与miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较, (6) $P<0.05$ . TXNIP, 硫氧还蛋白互作蛋白; IL, 白细胞介素

miR-22-3p mimics组 Bcl-2 蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ), Bax、Cleaved caspase-3、TXNIP 蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ); 与模型组、si-NC组比较, si-TXNIP组 Bcl-2 蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ), Bax、Cleaved caspase-3、TXNIP 蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ); 与miR-22-3p

mimics组、miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较, miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组 Bcl-2 蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ), Bax、Cleaved caspase-3、TXNIP 蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )(图5)。

**2.6 miR-22-3p 与 TXNIP 的靶向关系验证** 网站 ENCORI 的预测结果显示, miR-22-3p 与 TXNIP 有结合位点(图6A)。双荧光素酶报告结果显示, 与miR-NC+TXNIP-WT组比较, miR-22-3p mimic+TXNIP-WT组荧光素酶活性降低( $P<0.05$ ); 与miR-NC+TXNIP-MUT组比较, miR-22-3p mimic+TXNIP-MUT组荧光素酶活性差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图6B)。

### 3 讨论

肺泡上皮细胞在肺泡表面张力中发挥重要作用, 且通过对合成及分泌细胞因子的影响参与肺部炎症反应的发生发展过程<sup>[12]</sup>。研究显示, 肺泡上皮细胞感染肺炎链球菌后, 机体免疫反应激活, 从而加重炎症反应及氧化应激, 造成细胞损伤<sup>[13]</sup>; 对肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞的凋亡及炎症进行抑制, 可防止肺炎链球菌感染的肺炎<sup>[14]</sup>。因此, 寻找治疗肺炎链球菌感染的肺炎新靶点并研究其发病机制具有重要意义。

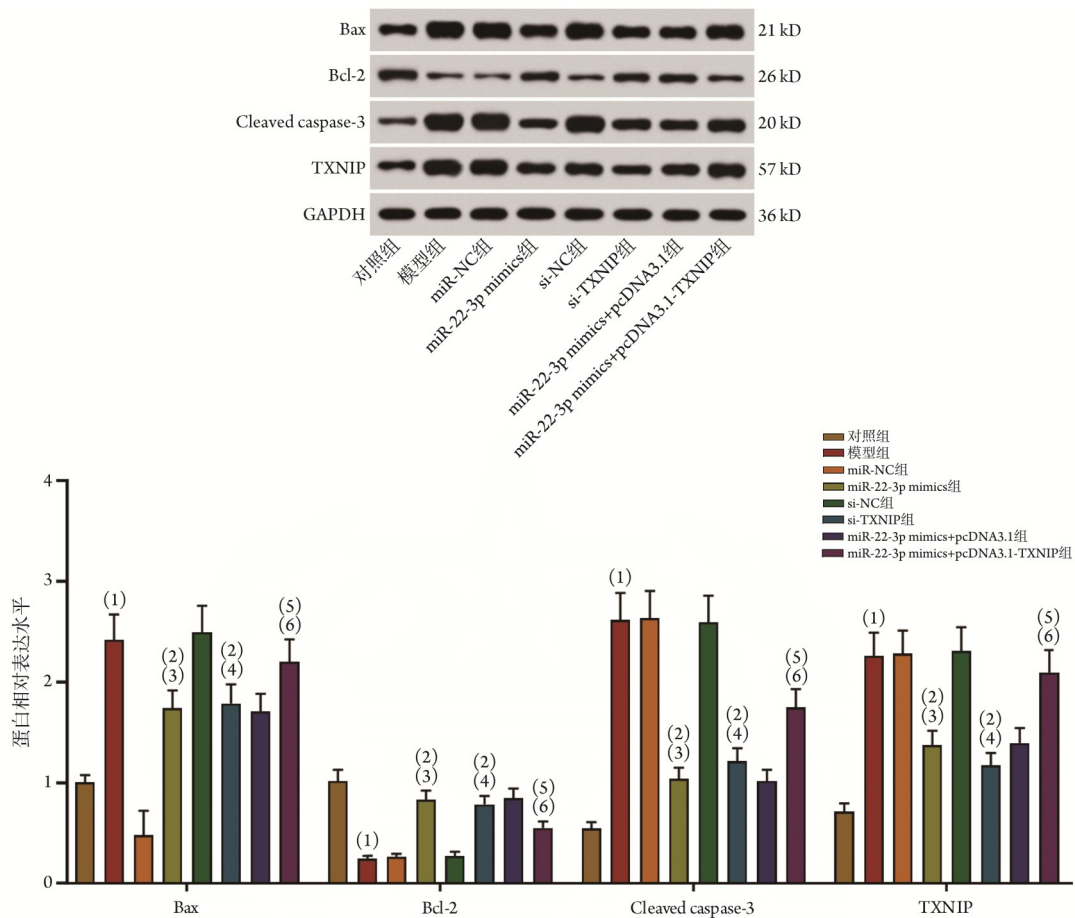


图5 各组AECII细胞Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、TXNIP蛋白表达水平比较(Western blotting)

Fig.5 Comparison of expression of Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、TXNIP in AECII cells of each group (Western blotting)

与对照组比较, (1) $P<0.05$ ; 与模型组比较, (2) $P<0.05$ ; 与miR-NC组比较, (3) $P<0.05$ ; 与si-NC组比较, (4) $P<0.05$ ; 与miR-22-3p mimics组比较, (5) $P<0.05$ ; 与miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组比较, (6) $P<0.05$ 。TXNIP. 硫氧还蛋白互作蛋白; Bax. B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白; Bcl-2. B细胞淋巴瘤-2蛋白; Cleaved caspase-3. 活化胱天蛋白酶-3

miRNA是18~25 bp的小分子, 可参与细胞分化、增殖及凋亡等多种生物学过程<sup>[15-16]</sup>。miRNA对疾病的影响主要通过碱基互补配对原则对相应的靶基因进行调控, 影响其表达, 进而影响相关的生物学过程。miR-22-3p是哺乳动物组织和细胞中常见的一种与炎症反应有关的miRNA<sup>[17]</sup>。Zheng等<sup>[18]</sup>发现, 在视网膜色素上皮炎症损伤中, miR-22-3p可通过对NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)的调控, 减轻炎症反应。沈琪琦等<sup>[19]</sup>发现, 在重症急性胰腺炎患者中, miR-22-3p可参与肺损伤的发生过程。已有研究显示, miR-22-3p可在脂多糖诱导的急性肺损伤中通过抑制炎症因子释放而发挥保护作用<sup>[20]</sup>。值得注意的是, 本研究生物信息学预测及部分研究显示, TXNIP可能是miR-22-3p的潜在靶基因<sup>[21]</sup>。

研究显示, 在脓毒症小鼠的急性肺损伤中, 抑制TXNIP/NLRP3信号通路, 可减少细胞焦亡, 从而减轻急性肺损伤<sup>[22]</sup>。周红等<sup>[23]</sup>发现, 在重症肺炎大

鼠中, 橘皮素可通过调节TXNIP/NLRP3信号通路, 抑制重症肺炎大鼠细胞焦亡及炎症反应。Han等<sup>[24]</sup>发现, 对肺组织中TXNIP的表达进行抑制, 可减轻脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠的严重程度。王亚静等<sup>[25]</sup>发现, 大黄素对重症肺炎大鼠肺损伤的减轻作用是通过抑制ROS/TXNIP/NLRP3信号通路实现的。

然而, miR-22-3p/TXNIP这一信号轴在肺炎链球菌感染中的作用仍不清楚。为探究其机制, 本研究聚焦于细胞凋亡与炎症反应这两个关键病理过程。已有研究显示, 促凋亡蛋白Bax、Cleaved caspase-3与抗凋亡蛋白Bcl-2之间的平衡, 是决定细胞凋亡进程的核心环节<sup>[26-27]</sup>; 同时, 促炎因子IL-6与抗炎因子IL-10的失衡亦是驱动肺炎进展的重要因素<sup>[28]</sup>。

本研究结果显示, 模型组细胞较对照组miR-22-3p表达水平降低, TXNIP mRNA表达水平升高; 上调miR-22-3p的表达或抑制TXNIP的表达, 可促进IL-10、Bcl-2表达及细胞增殖, 抑制IL-6、Bax、Cleaved caspase-3表达及细胞凋亡; 提示过表达miR-

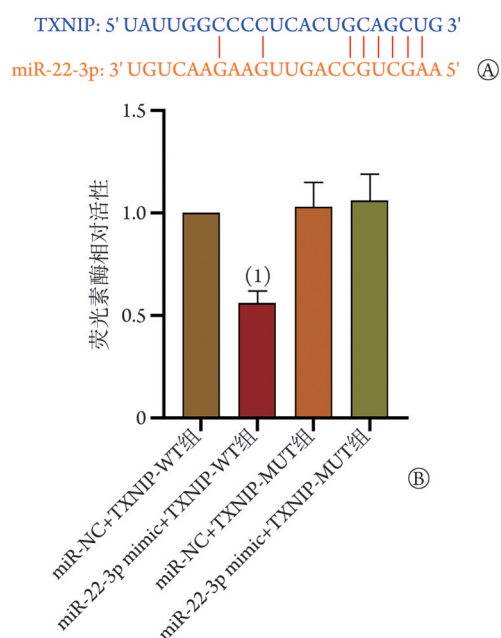


图6 miR-22-3p和TXNIP的结合位点预测(A)和AECII细胞中荧光素酶活性比较(B)

Fig. 6 Prediction of the binding sites (A) between miR-22-3p and TXNIP and comparison of luciferase activity in AEC II cells (B)

与miR-NC+TXNIP-WT组比较。(1) $P < 0.05$ 。TXNIP. 硫氧还蛋白互作蛋白; WT. 野生型; MUT. 突变型

22-3p可抑制肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞凋亡并促进其增殖。本研究生物信息学预测及荧光素酶活性实验结果显示, miR-22-3p与TXNIP之间存在靶向结合位点和靶向调控关系。miR-22-3p mimics+pcDNA3.1-TXNIP组细胞较miR-22-3p mimics+pcDNA3.1组增殖能力、IL-10和Bcl-2蛋白表达水平降低,而细胞凋亡率和IL-6、Bax、Cleaved caspase-3、TXNIP蛋白表达水平升高;提示过表达miR-22-3p可通过抑制TXNIP的表达,进而抑制肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞凋亡,促进细胞增殖。本研究将miR-22-3p/TXNIP轴与肺炎链球菌独特致病机制关联,这一结果与既往研究形成明确区分:一方面,既往针对miR-22-3p的研究多集中于脂多糖等非细菌特异性损伤模型,例如发现其可通过靶向NLRP3等通路抑制泛炎症反应,从而减轻急性肺损伤<sup>[9]</sup>;另一方面, TXNIP的功能研究也多围绕“炎症调控”展开,例如在重症肺炎大鼠模型中,下调TXNIP可通过抑制NLRP3炎症小体活化减少炎症因子释放<sup>[23]</sup>;尚未见将TXNIP与肺炎链球菌感染后的上皮屏障修复直接关联的报道。本研究在肺炎链球菌感染场景中发现, miR-22-3p/TXNIP轴不仅抑制泛炎症,而且还促进肺泡上皮细胞增殖、抑制其凋亡,从而修复上皮屏障。这一作用与肺炎链球菌“以直

接损伤为主、炎症迁延为辅”的病理特点相对应,有利于进一步探究临床肺炎链球菌感染的相关机制。

结合TXNIP功能及本研究结果,可推测其下游涉及细胞焦亡调控。已知TXNIP是NLRP3炎症小体关键激活因子,后者激活会启动caspase-1介导的细胞焦亡,促进IL-1 $\beta$ 、IL-18释放<sup>[29]</sup>;与caspase-3介导的凋亡不同,细胞焦亡会致细胞膜穿孔、加重肺泡屏障损伤,与肺炎链球菌感染病理相关。本研究虽未检测焦亡指标,但据既往研究推测<sup>[29]</sup>,可能涉及如下途径:一是肺炎链球菌感染上调TXNIP, miR-22-3p抑制TXNIP或阻断通路、抑制焦亡;二是miR-22-3p过表达降低IL-6的表达,或间接减少IL-1 $\beta$ 、调控焦亡;三是miR-22-3p改善细胞存活,或通过调控焦亡减少细胞死亡。上述推测尚需后续实验验证,但提示未来研究需重点突破的方向:一是补充细胞焦亡相关指标检测;二是开展焦亡通路干预实验;三是结合临床样本进行验证。

综上所述, miR-22-3p过表达可抑制TXNIP表达,进而抑制肺炎链球菌诱导的肺上皮细胞凋亡,促进细胞增殖。本研究存在一定局限性:首先,仅采用AECII细胞进行体外实验,难以模拟体内复杂的肺部微环境,如体内存在的免疫细胞(如巨噬细胞、中性粒细胞)与上皮细胞的相互作用、完整的气道屏障结构及肺组织细胞间的旁分泌调控等,可能导致研究结果与体内生理或病理状态存在差异;其次,本研究仅局限于体外细胞实验,尚未开展相关的动物体内实验,后续将通过构建动物模型、补充体内实验以完善证据链,验证结论的可靠性和临床转化价值。

#### 【参考文献】

- [1] Peng Y, Wang X, Wang H, et al. Interleukin-4 protects mice against lethal influenza and *Streptococcus pneumoniae* co-infected pneumonia[J]. Clin Exp Immunol, 2021, 205(3): 379-390.
- [2] 代雯文, 妥亚军, 侯滨, 等. 1,25(OH)2D<sub>3</sub>联合NF- $\kappa$ B p65 siRNA保护肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞损伤[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(23): 2838-2844.
- [3] 史继静, 赵靓, 李晓亮, 等. 基于宏基因组学第二代测序技术分析烧伤脓毒症患者感染病原体的特征[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2024, 40(10): 940-947.
- [4] 鲍燕敏, 郑跃杰. 儿童肺炎链球菌疾病及其流行病学研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(7): 510-513.
- [5] 余璐, 李海燕, 温顺航, 等. 姜黄素对肺炎链球菌感染的抗炎和抑菌作用[J]. 医学研究杂志, 2018, 47(2): 87-91.
- [6] Jacques LC, Panagiotou S, Baltazar M, et al. Increased pathogenicity of pneumococcal serotype 1 is driven by rapid autolysis and release of pneumolysin[J]. Nat Commun, 2020, 20(11): 1892-1897.
- [7] Tian Y, Tang L, Yi P, et al. MiRNAs in radiotherapy resistance of nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cancer, 2020, 11(13): 3976-3985.
- [8] 王创业, 王冉, 张健, 等. 脂多糖诱导急性呼吸窘迫综合征小

- 型猪模型的构建与评估[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(9): 1154-1161.
- [9] 王小花, 林坚, 邢东文, 等. lncRNA MALAT1 调节 miR-22-3p/NLRP3 轴对 LPS 诱导的急性肺损伤的影响[J]. 广东医学, 2023, 44(3): 297-306.
- [10] Lenga Ma Bonda W, Fournet M, Zhai R, *et al.* Receptor for advanced glycation end-products promotes activation of alveolar macrophages through the NLRP3 inflammasome/TXNIP axis in acute lung injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11659-11663.
- [11] 王勇, 孙朝峰, 胡钱红. NF- $\kappa$ B p65 对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞凋亡及炎性因子表达的影响[J]. 实用预防医学, 2018, 25(5): 547-550.
- [12] 田林强, 来枫, 张玥, 等. 胡桃醌抑制 II 型肺泡上皮细胞凋亡减轻体外冲击波导致的细胞损伤[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(19): 2453-2457.
- [13] Kamio N, Hayata M, Tamura M, *et al.* Porphyromonas gingivalis enhances pneumococcal adhesion to human alveolar epithelial cells by increasing expression of host platelet-activating factor receptor[J]. *FEBS Lett*, 2021, 595(11): 1604-1612.
- [14] Gonzalez-juarbe N, Riegler AN, Jureka AS, *et al.* Influenza-induced oxidative stress sensitizes lung cells to bacterial-toxin-mediated necroptosis[J]. *Cell Rep*, 2020, 32(8): 108062-108067.
- [15] Liang H, Hu C, Lin X, *et al.* MiR-548d-3p promotes gastric cancer by targeting RSK4[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12(3): 13325-13337.
- [16] Yin H, Wang H, Li Z, *et al.* RNA micelles for the systemic delivery of anti-miRNA for cancer targeting and inhibition without ligand[J]. *ACS Nano*, 2018, 13(1): 706-717.
- [17] Su YJ, Tsai NW, Kung CT, *et al.* Investigation of microRNA in mitochondrial apoptotic pathway in systemic lupus erythematosus[J]. *BioMed Res Int*, 2018, 7(11): 1-8.
- [18] Zheng Y, Liu J, Chen P, *et al.* Retraction notice to exosomal miR-22-3p from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells protects against lipopolysaccharid-induced acute lung injury[J]. *Life Sci*, 2021, 269(1): 119004-119009.
- [19] 沈琪琦, 童小文, 王伟, 等. 重症急性胰腺炎患者外周血 miR-21-3p、miR-22-3p 与并发肺损伤的相关性[J]. 西部医学, 2021, 33(7): 987-991.
- [20] Guo S, Chen R, Zhang L, *et al.* microRNA-22-3p plays a protective role in a murine asthma model through the inhibition of the NLRP3-caspase-1-IL-1 $\beta$  axis[J]. *Exp Physiol*, 2021, 106(8): 1829-1838.
- [21] Zhao Y, Ming WJ, Ma XH, *et al.* LncRNA NKILA promotes cardiomyocytes apoptosis by targeting miR-22-3p-TXNIP signal axis to inhibit proliferation, migration, and invasion of cardiomyocytes under high glucose-induced condition[J]. *Sci Program*, 2021, 1(1): 1-14.
- [22] He G, Chen K, Wang H, *et al.* Fudosteine attenuates acute lung injury in septic mice by inhibiting pyroptosis via the TXNIP/NLRP3/GSDMD pathway[J]. *Eur Pharmacol*, 2022, 926(1): 175047-175057.
- [23] 周红, 张佩佩, 刘会雪, 等. 橘皮素调节 TXNIP/NLRP3 信号通路对重症肺炎大鼠细胞焦亡的影响[J]. 河北医学, 2024, 30(8): 1279-1284.
- [24] Han X, Wu YC, Meng M, *et al.* Linarin prevents LPS induced acute lung injury by suppressing oxidative stress and inflammation via inhibition of TXNIP/NLRP3 and NF- $\kappa$ B pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3): 1460-1472.
- [25] 王亚静, 张静, 宋卫卫, 等. 大黄素通过调控 ROS/TXNIP/NLRP3 轴介导的细胞焦亡途径减轻重症肺炎大鼠肺损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(7): 1240-1245.
- [26] Zhao W, Li HX, Hou Y, *et al.* Combined administration of poly-ADP-ribose polymerase-1 and caspase-3 inhibitors alleviates neuronal apoptosis after spinal coed injury in rats[J]. *World Neurosurg*, 2019, 127(1): e346.
- [27] Bulgurcuoglu KS, Altun A, Karamustafaoglu BB, *et al.* Expression of proapoptotic and antiapoptotic proteins in granulosa cells of women with diminished ovarian reserve[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2022, 39(3): 765-775.
- [28] 罗剑锋, 罗丹, 文丹宁. 藜本内酯通过抑制 DAPK1 表达对肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞损伤的保护作用及其机制[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(24): 5667-5671.
- [29] Cheng F, Wang N. N-lobe of TXNIP is critical in the allosteric regulation of NLRP3 via TXNIP binding[J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14(1): 893919-893926.