Modern Practical Medicine, August 2025, Vol. 37, No. 8

·论 著·

CircRNA-Foxo3 介导BIM/BCL-2 通路调控肺气肿小鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞凋亡的作用研究

杨琪，梁家敏，陶峰，曹林峰，周佳琪，孙悦姣，顾超

【摘要】目的 探讨CircRNA-Foxo3介导的BIM/BCL-2通路在调控肺气肿小鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞（AECII）凋亡中的作用及机制研究。**方法** 24只C57BL/6雄性小鼠分为正常对照组（A组）、肺气肿组（B组）、肺气肿+CircRNA-Foxo3 shRNA阴性对照组（C组）及肺气肿+ CircRNA-Foxo3 shRNA组（D组），每组6只。A组小鼠不予处理，B组、C组及D组采用香烟烟雾暴露建立肺气肿小鼠模型；建立模型后，C组小鼠尾静脉注射CircRNA-Foxo3 shRNA阴性对照，D组小鼠尾静脉注射CircRNA-Foxo3 shRNA，每2周1次。采用HE染色观察小鼠肺组织病理学改变，并测定肺泡平均内衬间隔（MLI）及平均肺泡面积（MAA）。免疫组化检测肺组织SPA及SPC阳性细胞构成比变化。TUNEL与SPC双重免疫荧光染色检测AECII凋亡情况。qRT-PCR和Western blot检测BIM、BCL-2、BAK及BAX mRNA和蛋白表达。**结果** 香烟烟雾暴露后，肺气肿小鼠肺组织出现明显的肺气肿病理学表现，MLI和MAA显著升高（均$P<0.05$），肺组织中SPA和SPC阳性细胞构成比明显下降（均$P<0.05$），同时AECII凋亡率显著增加（均$P<0.05$），与CircRNA-Foxo3、BIM、BAK、BAX表达量增加（均$P<0.05$）和BCL-2表达量下降（均$P<0.05$）有关。CircRNA-Foxo3 shRNA处理肺气肿小鼠后，肺组织中CircRNA-Foxo3表达明显下降（均$P<0.05$），肺气肿病理学改变好转，MLI和MAA明显降低（均$P<0.05$），SPA和SPC阳性细胞构成比增加（均$P<0.05$），AECII凋亡率下降（均$P<0.05$），且BIM、BAK、BAX表达量明显降低（均$P<0.05$）、BCL-2表达量显著上升（均$P<0.05$）。**结论** CircRNA-Foxo3介导BIM/BCL-2通路调控肺气肿小鼠AECII凋亡，阻断CircRNA-Foxo3的表达可能成为肺气肿治疗的新策略。

【关键词】 肺气肿；Ⅱ型肺泡上皮细胞；凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.08.003

【中图分类号】 R563.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2025)08-0780-05

The effect of BIM/BCL-2 pathway mediated by CircRNA-Foxo3 on apoptosis of type Ⅱ alveolar epithelial cells in mice with emphysema

YANG Qi, LIANG Jiamin, TAO Feng, CAO Linfeng, ZHOU Jiaqi, SUN Yuejiao, GU Chao (The First Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314000, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect and mechanism of BIM/BCL-2 pathway mediated by CircRNA-Foxo3 in regulating the apoptosis of type II alveolar epithelial cells (AECII) in mice with emphysema. **Methods** Twenty-four C57BL/6 male mice were selected and divided into nomal control group (group A), emphysema group (group B), emphysema+CircRNA-Foxo3 shRNA negative control group (group C), and emphysema+CircRNA-Foxo3 shRNA group (group D), with six mice in each group. Mice in group A were not treated, while mouse models of emphysema were established by cigarette smoke exposure in groups B, C and D; mice in group C were injected with a negative control of CircRNA-Foxo3 shRNA via the tail vein, while group D were injected with CircRNA-Foxo3 shRNA, once every two weeks. The pathological changes of lung tissue in mice were observed by HE staining, and the mean alveolar lining interval (MLI) and mean alveolar area (MAA) were measured. The changes of composition ratio of SPA and SPC positive cells in lung tissue were detected by immunohistochemistry. The apoptosis of AECII was detected by TUNEL and SPC double immunofluorescence staining. The expressions of BIM, BCL-2, BAK, BAX mRNA and protein

基金项目： 浙江省医药卫生科技计划项目（2025KY1580）

作者单位： 314000 浙江省嘉兴，嘉兴市第一医院（嘉兴大学附属医院）（杨琪、曹林峰、周佳琪、孙悦姣、顾超）；浙江中医药大学研究生院（梁家敏）；嘉兴市第二医院（陶峰）

通信作者： 顾超，Email：storm113590582@126.com

were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results**　The lung tissue of emphysema mice showed obvious pathological manifestations of emphysema. The levels of MLI and MAA in lung tissue were significantly incresed (all $P < 0.05$), the composition ratio of SPA and SPC positive cells were decreased (all $P < 0.05$). Meanwhile, the apoptosis percentage of AECII in lung tissue was significantly increased ($P < 0.05$), which was related to the increase of CircRNA-Foxo3, BIM, BAK, BAX and the decrease of BCL-2 (all $P < 0.05$). The expression of CircRNA-Foxo3 in lung tissue of group D was significantly decreased ($P < 0.05$), the pathological changes of emphysema improved, the expressions of MLI and MAA decreased, the composition ratio of SPA and SPC positive cells increased, the percentage of AECII apoptosis decreased, while the expressions of BIM, BAK and BAX were significantly decresased, the expression of BCL-2 was significantly increased(all $P < 0.05$). **Conclusions**　BIM/BCL-2 pathway mediated by CircRNA-Foxo3 regulates AECII apoptosis in emphysema mice, and blocking the expression of CircRNA-Foxo3 may be a new strategy for emphysema treatment.

【Key words】 Emphysema; Type II alveolar epithelial cells; Apoptosis

[Modern Practical Medicine,2025,37(8):780-784]

慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease，COPD）是导致全球呼吸道疾病患者死亡的主要原因，也是我国第 4 大疾病死亡原因[1]。COPD 的主要病理表现是肺弹性组织降解和肺泡结构破坏，临床特征为肺气肿导致的持续性气流不可逆受限，是肺功能下降的主要原因[2]。Ⅱ型肺泡上皮细胞（type II alveolar epithelial cells，AECII）是肺泡组织的重要组成部分，在香烟烟雾暴露诱导的肺气肿病理改变中起着重要作用[3]。环状 RNA Foxo3（circular RNA foxo3，CircRNA-Foxo3）可以通过核因子κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）信号通路介导炎性细胞因子表达促进香烟烟雾诱导的肺损伤[4]。BIM 是 BCL-2 家族中 BH3-only 亚家族的成员，是一种重要的细胞凋亡调节因子[5]。本研究旨在探讨 CircRNA-Foxo3 在调控肺气肿小鼠 AECII 凋亡中的作用机制，现报道如下。

1　资料与方法

1.1　动物与试剂　选用 6 周龄C57BL/6 雄性小鼠，体质量 16 ～ 20 g，饲养温度（23±2）℃，相对湿度（50±10）%，来源于上海斯莱克实验动物有限责任公司[实验动物许可证号：SYXK（浙）2022-0015]，研究获得嘉兴市第一医院实验动物伦理委员会批准（伦理批号：JXYY2024-040）。

根据circBase基因库中CircRNA-Foxo3 序列及参照 Zhou 等[4]设计的 CircRNA-Foxo3 shRNA 序列，由上海 GenePharma 公司合成。TRIzol 购自 Invitrogen 公司；SPA 和 SPC 一抗抗体购自美国 Santa Cruz 公司；BIM、BCL-2、BAK、BAX 一抗抗体及 TUNEL 法原位标记试剂盒购自江苏碧云天高新技术有限公司；qRT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2　肺气肿小鼠分组及处理　24 只 C57BL/6 雄性小鼠分为 4 组，分别为正常对照组（A 组）、肺气肿组（B 组）、肺气肿+ CircRNA-Foxo3 shRNA 阴性对照组（C 组）及肺气肿+ CircRNA-Foxo3 shRNA 组（D 组），每组 6 只。A 组小鼠不予处理，B 组、C 组及 D 组根据文献[6]采用香烟烟雾暴露建立肺气肿小鼠模型。建模成功后，C 组小鼠尾静脉注射 CircRNA-Foxo3 shRNA 阴性对照，D 组小鼠尾静脉注射 CircRNA-Foxo3 shRNA，每 2 周 1 次。

1.3　实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）验证 CircRNA-Foxo3 表达　TRIzol 法提取 4 组小鼠肺组织总 RNA，去除 rRNA 和线性 RNA。按试剂盒说明合成 cDNA 后行 qRT-PCR 验证 CircRNA-Foxo3 表达，以 GAPDH 作为内参基因。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 CircRNA-Foxo3 的相对表达水平，引物序列见表 1。

1.4　肺组织病理学检测　4 组小鼠肺组织切片 HE 染色后行病理学检测，根据文献[7]测定肺泡平均内衬间隔（mean linear intercept，MLI）及平均肺泡面积

表 1　qRT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列（5’→3’）
CircRNA-Foxo3	上游引物：GTGGGGAACTTCACTGGTGCTAAG
	下游引物：GGGTTGATGATCCACCAAGAGCTCTT
BIM	上游引物：CATCGCGGTATTCGGTTC
	下游引物：GCTTTGCCATTTGGTCTTTTT
BCL-2	上游引物：TTCAGGGATGGGGTGAACTG
	下游引物：CACAGGGCGATGTTGT
BAK	上游引物：ACTGCCGCATCCTCTTCCT
	下游引物：AACCGCTCGTTGCCAATAG
BAX	上游引物：CCCGAGAGGTCTTCTTCC
	下游引物：GCCTTGAGCACCAGTTTG
GAPDH	上游引物：CTTAGGTTCATCAGGTAAACTCAG
	下游引物：CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG

（mean alveolu area，MAA）。

1.5　免疫组化检测肺组织 SPA 及 SPC 阳性细胞构成比　4 组小鼠肺组织切片常规脱蜡至水，灭活内源性氧化酶，高压抗原修复，封闭后分别加 SPA 或 SPC 一抗 4 ℃孵育过夜，PBS 漂洗后 IgG 二抗室温孵育，DAB 显色，苏木素复染，光镜下观察并拍照。参照文献[7]计算 SPA 或 SPC 阳性细胞构成比。

1.6　双重免疫荧光染色检测 AECII 凋亡　4 组小鼠肺组织切片常规脱蜡，蛋白酶 K 室温消化，加入 SPC 一抗 4 ℃孵育过夜，与 FITC 标记的二抗室温孵育；最后与 TUNEL 检测液避光孵育后荧光显微镜下观察拍照并分析。参照文献[7]计算 TUNEL 和 SPC 双阳性细胞百分比，TUNEL 和 SPC 双阳性的细胞即为凋亡的 AECII。

1.7　qRT-PCR 检测 BIM、BCL-2、BAK 及 BAX mRNA 表达　TRIzol 法提取 4 组小鼠肺组织总 RNA，按试剂盒说明合成 cDNA 后进行 qRT-PCR，以 GAPDH 作为内参基因，以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因相对表达水平，引物序列见表 1。

1.8　Western blot 检测 BIM、BCL-2、BAK 及 BAX 蛋白表达　提取 4 组小鼠肺组织的总蛋白，BCA 试剂盒测定蛋白浓度，蛋白质变性、电泳后电转移至硝酸纤维膜上，在 4 ℃下与一抗孵育过夜，二抗室温孵育 1 h，洗膜，显影后扫描摄像，图像灰度分析，计算目的蛋白相对表达水平。以β-actin 作为内参基因。

1.9　统计方法　数据采用 SPSS 20.0 软件分析，计量资料以均数±标准差表示，多组间比较采用 F 检验，多重比较采用 LSD-t 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

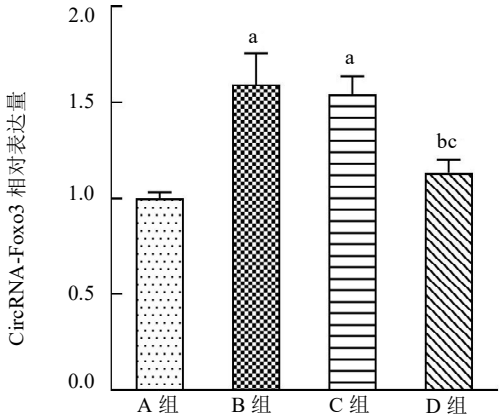
2　结果

2.1　4 组小鼠肺组织 CircRNA-Foxo3 表达　建立肺气肿模型后，B 组肺组织 CircRNA-Foxo3 表达量明显高于 A 组（t=8.91，$P < 0.05$），C 组 CircRNA-Foxo3 表达量与 B 组差异无统计学意义（t=0.72，$P > 0.05$），D 组 CircRNA-Foxo3 表达量明显小于 B 组及 C 组（t=6.45、8.35，均 $P < 0.05$），见图 1。

2.2　4 组小鼠肺组织病理学比较　香烟烟雾暴露后小鼠肺组织出现明显的肺气肿病理学表现，部分肺泡呈现囊状样扩张，肺泡腔大小相差巨大，肺泡数量明显减少，部分肺泡间断裂并融合；CircRNA-Foxo3 shRNA 处理后，肺气肿样病理改变明显好转，见图 2。

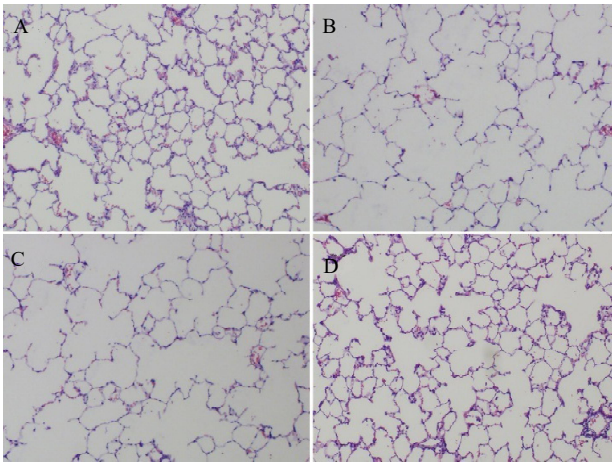
B 组和 C 组肺组织 MLI 和 MAA 水平均高于 A 组（$t \geqslant 33.46$，均 $P < 0.05$）；D 组 MLI 和 MAA 水平均低于 B 组及 C 组，高于 A 组（$t \geqslant 17.52$，均 $P < 0.05$），见表 2。

2.3　4 组小鼠肺组织 SPA 及 SPC 阳性细胞构成比变化　免疫组化结果显示，与 A 组相比，B 组和 C 组小鼠肺组织中 SPA 和 SPC 阳性细胞构成比显著下降（$t \geqslant 9.35$，均 $P < 0.05$）；D 组肺组织 SPA 和 SPC



注：与 A 组比较，a$P < 0.05$；与 B 组比较，b$P < 0.05$；与 C 组比较，c$P < 0.05$

图 1　4 组小鼠肺组织 CircRNA-Foxo3 表达比较



注：图 A 为 A 组，图 B 为 B 组，图 C 为 C 组，图 D 为 D 组

图 2　4 组小鼠肺组织病理学改变（HE 染色，×200）

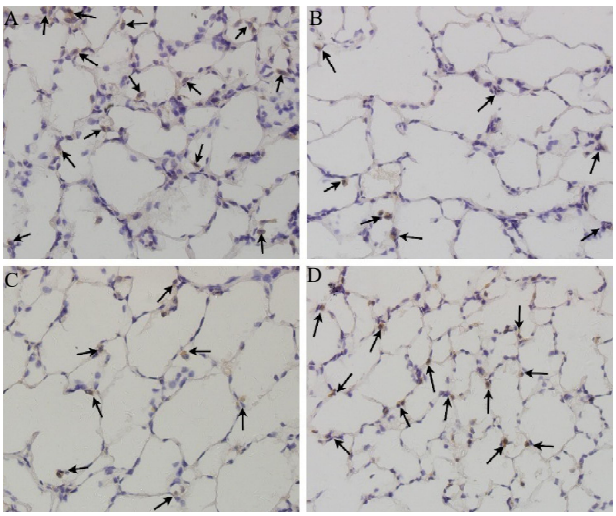
表 2　4 组小鼠肺组织 MLI 和 MAA 水平比较

组别	例数	MLI（μm）	MAA（μm²）
A 组	6	41.96±2.91	4 158.71±149.83
B 组	6	91.39±2.14	10 384.40±931.95
C 组	6	91.51±1.95	10 234.90±503.02
D 组	6	70.55±20.84	7 989.63±164.26
F 值		634.54	172.76
P 值		< 0.05	< 0.05

注：MLI 为肺泡平均内衬间隔，MAA 为平均肺泡面积

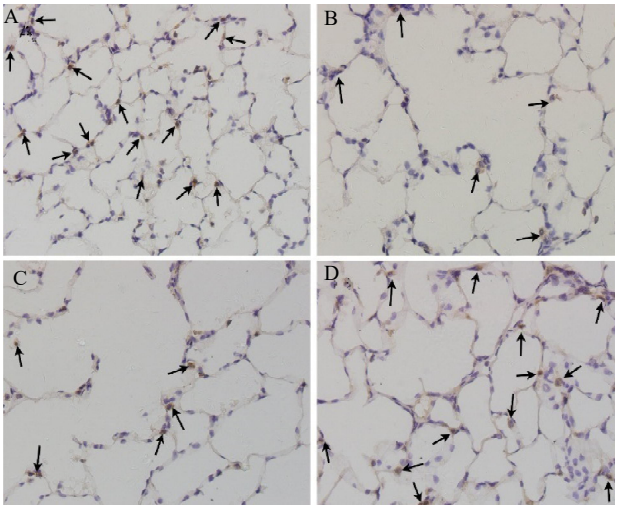
阳性细胞构成比明显高于 B 组及 C 组，低于 A 组（t≥5.12，均 P ＜ 0.05），见图 3 ～ 4 及表 3。

2.4　4 组小鼠肺组织 AECII 凋亡水平比较　与 A 组相比，B 组和 C 组小鼠肺组织中凋亡的 AECII 明显增加（t≥9.05，均 P ＜ 0.05）；D 组肺组织中凋亡的 AECII 明显低于 B 组及 C 组，高于 A 组（t≥4.24，均 P ＜ 0.05），见图 5 及表 4。



注：图 A 为 A 组，图 B 为 B 组，图 C 为 C 组，图 D 为 D 组；箭头所指为 SPA 阳性细胞

图 3　4 组小鼠肺组织 SPA 阳性细胞（HE 染色，×400）



注：图 A 为 A 组，图 B 为 B 组，图 C 为 C 组，图 D 为 D 组；箭头所指为 SPC 阳性细胞

图 4　4 组小鼠肺组织 SPC 阳性细胞（HE 染色，×400）

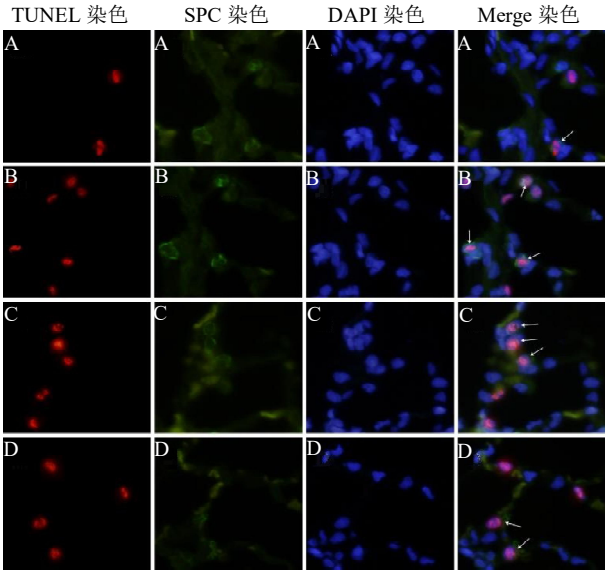
表 3　4 组小鼠肺组织 SPA 和 SPC 阳性细胞构成比比较　%

组别	例数	SPA 阳性细胞构成比	SPC 阳性细胞构成比
A 组	6	13.25±1.10	9.45±0.79
B 组	6	8.04±0.79	5.66±1.03
C 组	6	7.69±0.60	5.96±0.81
D 组	6	10.21±0.66	7.62±0.94
F 值		58.90	22.48
P 值		＜ 0.05	＜ 0.05

2.5　BIM、BCL-2、BAK 及 BAX mRNA 和蛋白表达变化　与 A 组相比，B 组和 C 组小鼠肺组织中 BIM、BAK 及 BAX mRNA 和蛋白表达量明显增加（t≥15.03，均 P ＜ 0.05），BCL-2 mRNA 和蛋白表达量显著下降（t≥14.04，均 P ＜ 0.05）。D 组肺组织 BIM、BAK 及 BAX mRNA 和蛋白表达量明显低于 B 组及 C 组，高于 A 组（t≥6.01，均 P ＜ 0.05）；BCL-2 mRNA 和蛋白表达量明显高于 B 组及 C 组，低于 A 组（t≥4.33，均 P ＜ 0.05），见图 6 ～ 7。

3　讨论

CircRNA-Foxo3 是一种外显子 circRNA，已被证明可增加或减弱多种人类癌症的特定病理变化[8]。CircRNA-Foxo3 可促进心脏衰老，下调 CircRNA-Foxo3 的表达可减轻心脏缺血再灌注损伤[9]。有研究发现，CircRNA-Foxo3 在香烟烟雾暴露的小鼠肺组织和香烟烟雾提取物处理的小鼠肺泡上皮细胞中表达上调[4]。本研究发现，香烟烟雾暴露诱导的肺气肿小鼠肺组织中 CircRNA-Foxo3 表达量明显上升，

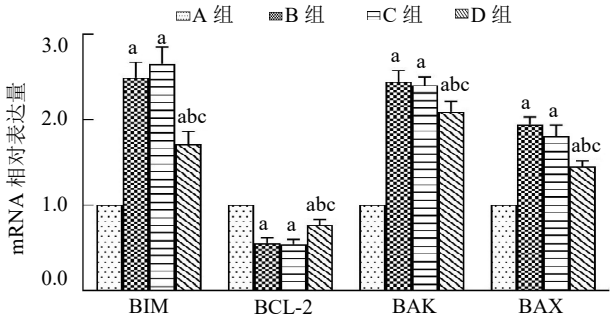


注：图 A 为 A 组，图 B 为 B 组，图 C 为 C 组，图 D 为 D 组；箭头所指为凋亡的 AECII。AECII 为Ⅱ型肺泡上皮细胞

图 5　4 组小鼠肺组织 AECII 凋亡水平比较（荧光染色，×640）

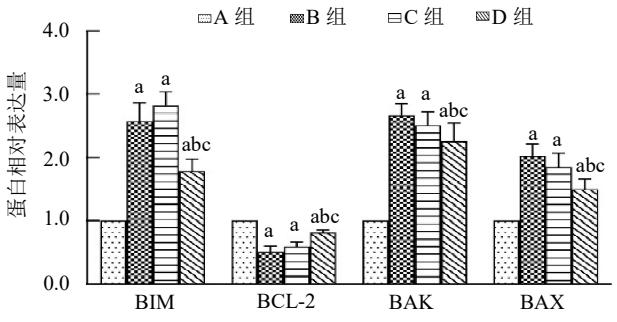
表 4　4 组小鼠肺组织Ⅱ型肺泡上皮细胞凋亡水平比较　%

组别	例数	TUNEL 和 SPC 双阳性构成比
A 组	6	4.16±1.47
B 组	6	13.16±1.94
C 组	6	14.00±1.78
D 组	6	8.50±1.87
F 值		39.45
P 值		＜ 0.05



注：与 A 组比较，a$P < 0.05$；与 B 组比较，b$P < 0.05$；与 C 组比较，c$P < 0.05$

图 6　4 组小鼠肺组织 BIM、BCL-2、BAK、BAX mRNA 表达量



注：与 A 组比较，a$P < 0.05$；与 B 组比较，b$P < 0.05$；与 C 组比较，c$P < 0.05$

图 7　4 组小鼠肺组织 BIM、BCL-2、BAK、BAX 蛋白表达量

通过小鼠尾静脉注射 CircRNA-Foxo3 shRNA 下调 CircRNA-Foxo3 表达后，肺组织中肺气肿样病理改变明显改善。

AECII 是 I 型肺泡上皮细胞的祖细胞，具有自我更新功能，能够分泌表面活性物质来降低肺泡表面张力和稳定肺泡大小[3]。因此，维持 AECII 的数量和有效的生物学功能对改善肺气肿肺损伤至关重要。本研究发现，肺气肿小鼠肺组织中 SPA 和 SPC 阳性细胞构成比明显下降，AECII 凋亡的细胞比例明显增加，且与肺组织损伤程度一致。

BIM 作为 BCL-2 家族促生存成员的死亡配体，在细胞凋亡、预防自身免疫及调控肿瘤的发生中均起着重要作用[10-11]。当受到细胞凋亡信号刺激时，BIM 发生磷酸化，与 BCL-2 作用，通过线粒体途径激活 BAX/BAK 等，从而诱导细胞凋亡和促进疾病的发生发展[12-13]。本研究中，CircRNA-Foxo3 shRNA 处理肺气肿小鼠后，肺组织中 BIM、BAK、BAX 表达量明显降低，BCL-2 表达量显著上升；同时，肺气肿样病理改变明显改善，AECII 凋亡细胞比例显著下降。

综上所述，CircRNA-Foxo3 介导 BIM/BCL-2 通路调控小鼠 AECII 凋亡促进肺气肿发生发展。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　杨琪、梁家敏：实验操作、论文撰写；陶峰：研究指导；曹林峰、周佳琪：数据整理；孙悦姣：统计分析；顾超：论文修改、经费支持

参　考　文　献

[1] GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: 2024 report[R/OL]. (2023-11-13) [2024-08-06]. https://goldcopd.org/2024-gold-report/.

[2] LABAKI W W, ROSENBERG S R. Chronic obstructive pulmonary disease[J]. Ann Intern Med, 2020, 173(3): ITC17-ITC32.

[3] CHEN J X, YANG L, SUN L, et al. Sirtuin 3 ameliorates lung senescence and improves type II alveolar epithelial cell function by enhancing the FoxO3a-dependent antioxidant defense mechanism[J]. Stem Cells Dev, 2021, 30(17): 843-855.

[4] ZHOU L, WU B, YANG J, et al. Knockdown of circFOXO3 ameliorates cigarette smoke-induced lung injury in mice[J]. Respir Res, 2021, 22(1): 294.

[5] NG K P, HILLMER A M, CHUAH C T H, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer[J]. Nat Med, 2012, 18(4): 521-528.

[6] GU C, ZHANG Q, NI D, et al. Therapeutic effects of SRT2104 on lung injury in rats with emphysema via reduction of type II alveolar epithelial cell senescence[J]. COPD, 2020, 17(4): 444-451.

[7] LI Y Q, GU C, XU W L, et al. Therapeutic effects of amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells on lung injury in rats with emphysema[J]. Respir Res, 2014, 15(1): 120.

[8] SHEN Z Y, ZHOU L, ZHANG C, et al. Reduction of circular RNA Foxo3 promotes prostate cancer progression and chemoresistance to docetaxel[J]. Cancer Lett, 2020, 468: 88-101.

[9] SU Y L, ZHU C L, WANG B W, et al. Circular RNA Foxo3 in cardiac ischemia-reperfusion injury in heart transplantation: A new regulator and target[J]. Am J Transplant, 2021, 21(9): 2992-3004.

[10] TANG Q L, CHEN H C, MAI Z H, et al. Bim- and Bax-mediated mitochondrial pathway dominates abivertinib-induced apoptosis and ferroptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2022, 180: 198-209.

[11] SUN W L, HE L Y, LIANG L, et al. Ambra1 regulates apoptosis andchemosensitivity in breast cancer cells through the Akt-FoxO1-Bim pathway[J]. Apoptosis, 2022, 27(5/6): 329-341.

[12] DELBRIDGE A R D, GRABOW S, STRASSER A, et al. Thirty years of BCL-2: Translating cell death discoveries into novel cancer therapies[J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(2): 99-109.

[13] NASIRI-ANSARI N, NIKOLOPOULOU C, PAPOUTSI K, et al. Empagliflozin attenuates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in high fat diet fed ApoE((-/-)) mice by activating autophagy and reducing ER stress and apoptosis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 818.

收稿日期：2025-03-20

（本文编辑：钟美春）