

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.06.001

❖ 基础研究 ❖

# miR-204-5p 通过调节 TLR2 的表达减轻哮喘小鼠的炎症反应和气道重塑

董学峰, 杨亚龙

(泉州医学高等专科学校内科教研室, 福建 泉州 362000)

**【摘要】目的:** 探讨 miR-204-5p 对哮喘小鼠的炎症反应和气道重塑的影响及其可能的分子机制。**方法:** 40 只 7 周龄的 SPF 级昆明雄性小鼠, 挑选 10 只作为对照组, 其余 30 只小鼠采用卵白蛋白 (OVA) 致敏, 激发建立哮喘模型并随机分为哮喘组、表达上调组、表达下调组, 每组 10 只。表达上调组小鼠尾静脉注射 miR-204-5p 激动剂干预, 表达下调组尾静脉注射 miR-204-5p 拮抗剂干预。对照组及哮喘组小鼠以同种方式注射等量 0.9% 生理盐水。HE 染色观察小鼠肺组织的病理变化, RT-qPCR 检测各组小鼠 miR-204-5p 及 TLR2 mRNA 的表达水平, Western blot 检测 TLR2、肿瘤转化生长因子  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) 及 NF- $\kappa B$  p65 蛋白表达水平, ELISA 法检测各组小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中侧支气管中白细胞介素 4 (IL-4)、IL-5、IL-13 等细胞炎症因子浓度。**结果:** 对照组小鼠肺组织及支气管结构正常, 肺泡轮廓清晰, 哮喘组、上调组、下调组小鼠均出现气道壁增厚, 细胞排列杂乱, 炎性细胞浸润。与对照组相比, 哮喘组小鼠 miR-204-5p mRNA 表达水平下降、TLR2 mRNA 表达上升 ( $P < 0.05$ ), 哮喘组、表达上调组、表达下调组小鼠 TLR2、TGF- $\beta 1$ 、NF- $\kappa B$  p65、IL-4、IL-5、IL-13 等细胞炎症因子的蛋白表达水平均上升 ( $P < 0.05$ ); 与哮喘组相比, 表达上调组的 miR-204-5p mRNA 表达水平上升、TLR2 mRNA 下降 ( $P < 0.05$ ); TLR2、TGF- $\beta 1$ 、NF- $\kappa B$  p65、IL-4、IL-5、IL-13 等细胞炎症因子的蛋白表达水平均下降 ( $P < 0.05$ ), 表达下调组 miR-204-5p mRNA 表达水平下降、TLR2 mRNA 表达上升 ( $P < 0.05$ ), TLR2、TGF- $\beta 1$ 、NF- $\kappa B$  p65、IL-4、IL-5、IL-13 等细胞炎症因子的蛋白表达水平均上升 ( $P < 0.05$ )。**结论:** miR-204-5p 可能通过调节 TLR2 的表达抑制哮喘小鼠由 TGF- $\beta 1$  及 NF- $\kappa B$  p65 诱导的气道重塑, 有效减轻小鼠的炎症反应, 可作为预防哮喘气道重塑的潜在治疗靶点。

**【关键词】** miR-204-5p; TLR2; 哮喘; 气道重塑; 炎症反应

**【中图分类号】** R562.25 **【文献标志码】** A

## miR-204-5p alleviates inflammation and airway remodeling in asthmatic mice by regulating the expression of TLR2

DONG Xue-feng, YANG Ya-long

(Department of Internal Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, Fujian, China)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effect of miR-204-5p on the inflammatory response and airway remodeling in asthmatic mice, and to study its potential molecular mechanism. **Methods:** 40 seven-week-old SPF kunming white male mice were selected, and 10 mice were randomly selected as the control group. The other 30 mice were sensitized and stimulated by ovalbumin (OVA) to establish asthma model, and randomly divided into asthma group, up-regulated group and down-regulated group, with 10 mice in each group. miR-204-5p agonist was injected into the tail vein of the up-regulated group, and miR-204-5p antagonist was injected into the tail vein of the down-regulated group. Mice in control group and asthma group were injected with 0.9% normal saline in the same way. He staining was used to observe the pathological changes of lung tissues of mice. The expression levels of miR-204-5p and TLR2 mRNA were detected by RT-QPCR. The expression levels of TLR2, TGF- $\beta 1$  and NF- $\kappa B$  P65 protein were detected by Western blot. The concentrations of IL-4, IL-5, IL-13 and other inflammatory cytokines in the middle bronchus of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by ELISA. **Results:** The lung tissue and bronchial structure of mice in the control group were normal, and the alveolar contour was clear. The airway wall of mice in asthma group, up-regulation group and down-regulation group were thickened, and the cells were disorderly and inflammatory cells were infiltrated. Compared with the control group, the expression level of miR-204-5p mRNA in asthmatic mice decreased ( $P < 0.05$ ), the expression levels of TLR2 mRNA increased, the protein expression levels of inflammatory cytokines such as TLR2, TGF- $\beta 1$  and NF- $\kappa B$  P65 protein, IL-4, IL-5 and IL-13 in asthma group, up-regulated group and down-regulated group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with asthma group, miR-204-5p mRNA expression level was significantly increased in up-

基金项目: 福建省教育厅中青年骨干教师教育科研项目 (JAT171163)

作者简介: 董学峰 (1964 - ), 男, 硕士, 副教授。E-mail: dxuefeng2021@163.com

regulated group ( $P < 0.05$ ), the expression levels of TLR2 mRNA decreased, the protein expression levels of inflammatory cytokines such as TLR2, TGF- $\beta$ 1, NF- $\kappa$ B P65 protein, IL-4, IL-5, and IL-13 were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). miR-204-5p mRNA expression level was significantly decreased in down-regulated group ( $P < 0.05$ ), the expression levels of TLR2 mRNA increased, the protein expression levels of inflammatory cytokines such as TLR2, TGF- $\beta$ 1, NF- $\kappa$ B P65 protein, IL-4, IL-5 and IL-13 were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** miR-204-5p may inhibit airway remodeling induced by TGF- $\beta$ 1 and NF- $\kappa$ B P65 in asthmatic mice by regulating the expression of TLR2, and effectively reduce the inflammatory response in mice, which may be a potential therapeutic target for preventing airway remodeling in asthma.

**【Key words】** miR-204-5p; TLR2; Asthma; Airway remodeling; Inflammatory response

哮喘是一种慢性气道炎症性疾病,受遗传及环境等多种因素的介导,由多基因参与调控,发病机制涉及多种炎性细胞、炎症因子及细胞因子<sup>[1-2]</sup>。近年来,由于生活环境的变化,哮喘的发病率呈上升趋势,据调查统计在全球范围内有近 3 亿哮喘患者,因此寻找治疗哮喘的有效方法具有重要意义<sup>[3]</sup>。miRNA 是真核生物内源性具有调控功能的微小非编码 RNA,通过靶向 mRNA 的转录后沉默来调节基因表达<sup>[4]</sup>, miR-204-5p 作为一种潜在的癌症治疗分子,多项研究<sup>[5-7]</sup>表明,其通过外泌体转染至细胞内可调控抑制肿瘤细胞的生长,促进肿瘤细胞的凋亡。有研究<sup>[8]</sup>报道,miR-204-5p 的过表达可抑制肿瘤转换生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 诱导的气道平滑肌细胞增殖和 ECM 的沉积,有效预防哮喘气道重塑。TLR2 为参与非特异性免疫的 TLRs 家族成员之一,其与 TLR4 可识别侵入的微生物病原体,促进机体炎性细胞及炎症因子的释放,是哮喘易感性的主要影响因素<sup>[9]</sup>。本研究旨在通过探讨 miR-204-5p 对哮喘小鼠的炎症反应和气道重塑的影响及其可能分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验仪器及试剂 离心机 (Multifuge X1/X1R Pro, 赛默飞)、DNA 扩增仪 (T100, BIORAD) 实时荧光定量 PCR 仪 (LightCycler 480, 罗氏诊断)、激光共聚焦显微镜 (Echo REVOLUTION, ECHO)、紫外分光光度计 (U-3900/3900H, 日立) 酶标仪 (Multi-skan FC, 赛默飞)、灰度分析软件 (alphaEaseFC, Alpha Innotech)。miR-204-5p 激动剂 (miR-204-5p agomir), miR-204-5p 拮抗剂 (miR-204-5p antagomir) (货号: miR40000237-4-5、miR30000237-4-5, 广州锐博), BCA 蛋白质定量试剂盒 (货号: AR1110, 武汉博士德生物工程有限公司), TLR2/ toll 样受体 2 兔多克隆抗体、TGF- $\beta$  1/2 兔多克隆抗体、NF- $\kappa$ B p65 兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H + L) (货号: AF8181、AF0297、AF0246、A0208, 上海碧云天), Trizol、TaqMan™ MicroRNA 逆转录试剂盒

及荧光定量试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ (货号: RR036A、RR820A, TaKaRa), 小鼠白细胞介素 4 (IL-4) ELISA 试剂盒、小鼠 IL-5 ELISA 试剂盒 (货号: PI612、PI620, 上海碧云天), 小鼠 IL-13 ELISA 试剂盒 (货号: ml063123, 上海酶联)。

1.1.2 实验动物 40 只 7 周龄的 SPF 级昆明白雄性小鼠, 体重 ( $24.6 \pm 3.4$ ) g, 购自洛阳普万泰生物技术有限公司, 室温保持在 ( $25 \pm 2$ ) °C, 湿度保持 ( $55 \pm 5$ )%, 动物自由饮食, 保持 12 h/d 的昼夜循环。实验动物使用获得本院实验动物管理委员会批准。

### 1.2 方法

1.2.1 哮喘小鼠模型建立与分组 挑选 10 只作为对照组, 其余 30 只小鼠于实验第 1、3、5 天腹腔注射 200  $\mu$ L 致敏液 [ $3 \text{ mg/mL OVA} + 5\% \text{ Al}(\text{OH})_3$ ], 1 次/d; 于第 6 天开始以 25  $\mu$ L/10 g 的剂量致敏液 [ $6 \text{ mg/mL OVA} + 5\% \text{ Al}(\text{OH})_3$ ] 滴鼻激发引喘, 1 次/d, 连续 7 d, 以激发时出现呼吸急促、腹肌抽动及肢体呈团等症状为哮喘模型成功<sup>[10]</sup>。建模成功后随机分为哮喘组、表达上调组、表达下调组, 每组各 10 只。表达上调组小鼠尾静脉注射 30 mg/kg miR-204-5p agomir 干预; 表达下调组尾静脉注射 30 mg/kg miR-204-5p antagomir 干预。对照组及哮喘组小鼠以同种方式注射等量 0.9% 生理盐水。干预结束后 24 h 颈椎脱臼法处死小鼠, 剪开其颈部皮肤, 于气管正中处剪一小口, 插入气管套管。用磷酸盐缓冲液对支气管肺泡进行灌洗, 来回冲洗 3 次, 收集小鼠肺泡灌洗液 (BALF)<sup>[11]</sup>, 并留取小鼠肺组织, 放入液氮中速冻, -80 °C 保存。

1.2.2 HE 染色观察各组小鼠肺组织病理学改变 切取适量的肺组织, 固定于 10% 的磷酸盐缓冲福尔马林溶液, 经脱水、包埋后切片 (切片厚度为 5  $\mu$ m), 行 HE 染色, 中性树脂封片, 显微镜下观察小鼠肺组织形态学变化。

1.2.3 RT-qPCR 检测肺组织中 miR-204-5p 及 TLR2 mRNA 水平 取各组小鼠新鲜肺组织 50 mg, Trizol 法提取组织中的总 RNA, 分光光度计测定 RNA 的浓度。依据试剂盒说明逆转录合成 cDNA,

反应体系 5  $\mu\text{L}$  ( $5 \times$  Prime Script RT Master MiX 2  $\mu\text{L}$ , RNase-free ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu\text{L}$ ), 轻柔混匀后加入 DNA 扩增仪中, 反应条件为: 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min 反转录, 85  $^{\circ}\text{C}$  5 s 反转录酶失活后, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 扩增反应体系 (20  $\mu\text{L}$ ): SYBR Premix Ex Taq II ( $2 \times$ ) 10  $\mu\text{L}$ 、PCR 正反向引物 (10  $\mu\text{M}$ ) 各 0.8  $\mu\text{L}$ 、ROX Reference Dye ( $50 \times$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ 、cDNA 2  $\mu\text{L}$ 、灭菌蒸馏水 6  $\mu\text{L}$ , 反应条件: 预变性: 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s 循环 40 次, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  60 s 融解, 50  $^{\circ}\text{C}$  30 s 降温。以相对对量  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算目的基因的相对表达量, 以 U6 为内参对 miR-204-5p 定量, 以  $\beta$ -actin 为内参对 TLR2 定量。miR-204-5p F: 5'-AAC ACG CTT CCC TTT GTC ATC C-3', R: 5'-GCC UAU CCU ACU GUU UCC CUU-3', 扩增片段大小 256 bp。U6 F: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', R: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3', 扩增片段大小 287 bp。TLR2 F: 5'-AGA ATC AAT ACA ATA GAG GGA GAC-3', R: 5'-TCG ACT TTA GAC TTT GGG AC-3', 扩增片段大小 354 bp。 $\beta$ -actin F: 5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT G-3', R: 5'-ATG AGG TAG TCT GTC AGG-3', 扩增片段大小 382 bp。

1.2.4 Western blot 检测 TLR2、TGF- $\beta$ 1 及 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平 分别取各组小鼠的新鲜肺组织 100 mg, 4  $^{\circ}\text{C}$  PBS 浸洗 5 min, 2 000 rpm 离心 10 min, 去上清后加入 200  $\mu\text{L}$  RIPA 细胞裂解液与 2  $\mu\text{L}$  蛋白酶抑制剂混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$  2 000 rpm 离心 10 min, 收集总蛋白悬液。BCA 蛋白质定量试剂盒所取组织中各蛋白的表达浓度。取蛋白溶液每孔上样 50  $\mu\text{L}$ , 行 SDS-PAGE 电泳 (12% 或 15%), 电泳仪分别按 80 V 20 min, 120 V 60 min 操作, 至溴酚蓝刚达胶底部立刻关闭电泳仪。PVDF 膜置于转移缓冲液中平衡后转膜, 装置从下至上依次按阳极碳板、24 层滤纸、PVDF 膜、凝胶、24 层滤纸、阴极碳板。接通电源, 根据蛋白量大小, 决定转膜需要的电压和时间。转移结束后取出 PVDF 膜, 割取待测膜条做免疫印迹: 将有蛋白标准的条带染色, 放入膜染色液中 50 s 后, 50% 甲醇脱色至背景清晰, PBS 反复洗膜 3 次, 10%

脱脂奶粉的 PBST 封闭液室温封闭 1 h, 弃封闭液, 以 5% 脱脂奶粉的 PBS 配制的一抗 (TLR2: 1:1 000、TGF- $\beta$ 1: 1:2 000、NF- $\kappa$ B p65: 1:2 000), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。回收一抗, 加入辣根标记二抗 (1:1 000) 室温慢慢摇下孵育 1 h, 弃二抗, PBST 清洗条带 15 min。以  $\beta$ -actin 为内参, 采取 ECL 发光试剂盒显影成像, 然后使用 Image J 软件分析各蛋白的相对表达。

1.2.5 ELISA 法检测各组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子浓度 在 EP 管中加入 1 mL BALF, 1 000 rpm 离心 10 min, 取上清。采用 ELISA 试剂盒检测各细胞因子浓度: 分别取 100  $\mu\text{L}$  稀释样品与不同浓度标准品加入相应孔, 封板膜封孔, 室温孵育 2 h, 洗板 5 次并吸干水分后加入生物素化抗体 100  $\mu\text{L}$ /孔, 封板膜封孔, 室温孵育 1 h, 洗板 5 次并吸干水分后加入辣根过氧化物酶标记 100  $\mu\text{L}$ /孔, 封板膜封孔, 室温避光孵育 20 min, 洗板 5 次并吸干水分后加入显色剂 TMB 溶液 100  $\mu\text{L}$ /孔, 封板膜封孔, 室温避光孵育 20 min, 加入终止液 50  $\mu\text{L}$ /孔, 混匀后立即测量 A450 值。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 Mann-Whitney  $U$  检验或方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠一般行为特征

对照组小鼠饮食及行为正常, 呼吸节律平稳, 无异常症状; 哮喘模型小鼠出现呼吸急促、腹肌抽动及肢体呈团; miR-204-5p 表达干预后, 表达上调组小鼠呼吸急促、腹肌抽动现象减轻, 表达下调组小鼠呼吸急促、腹肌抽动等现象加重, 出现点头呼吸现象。

### 2.2 各组小鼠肺组织病理学改变

对照组小鼠肺组织及支气管结构正常, 肺泡结构轮廓清晰, 哮喘组、表达下调组小鼠气道壁严重增厚, 细胞排列杂乱且疏松; 表达上调组小鼠气道壁增厚情况明显减轻, 细胞排列较为整齐, 结构较为清晰。见图 1。

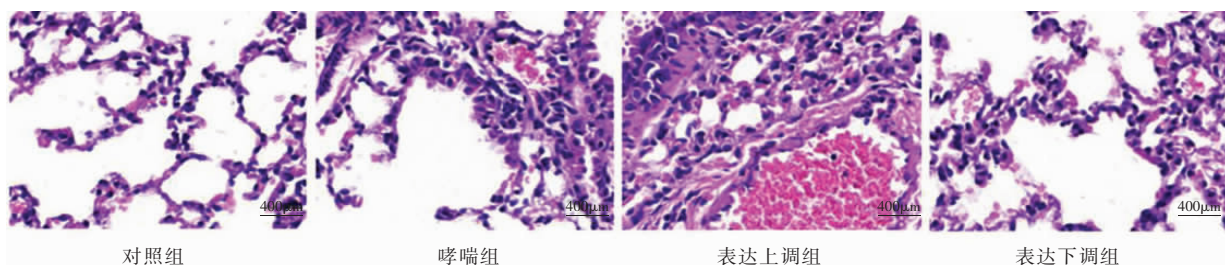


图 1 各组小鼠肺组织病理学改变 (400 $\times$ )

### 2.3 各组小鼠肺组织中 miR-204-5p 及 TLR2 mRNA 水平

与对照组相比,哮喘组小鼠的 miR-204-5p mRNA 表达水平下降 ( $P < 0.05$ ), TLR2 mRNA 表达水平上升 ( $P < 0.05$ ); 与哮喘组相比,表达上调组 miR-204-5p mRNA 表达水平上升 ( $P < 0.05$ ), TLR2 mRNA 表达水平下降 ( $P < 0.05$ ); 表达下调组 miR-204-5p mRNA 表达水平下降 ( $P < 0.05$ ), TLR2 mRNA 表达水平上升 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组小鼠肺组织中 miR-204-5p 及 TLR2 mRNA 水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-204-5p	TLR2
对照组 ( $n = 10$ )	1.01 ± 0.08	0.38 ± 0.03
哮喘组 ( $n = 10$ )	0.86 ± 0.06 *	1.38 ± 0.11 *
表达上调组 ( $n = 10$ )	1.32 ± 0.09 **	0.73 ± 0.06 **
表达下调组 ( $n = 10$ )	0.63 ± 0.07 **	1.56 ± 0.12 **

\*  $P < 0.05$ , 与对照组相比; #  $P < 0.05$ , 与哮喘组相比。

### 2.4 各组小鼠 TLR2、TGF-β1 及 NF-κB p65 蛋白表达水平

与对照组相比,各组小鼠 TLR2、TGF-β1 及 NF-κB p65 蛋白表达水平均上升 ( $P < 0.05$ ); 与哮喘组相比,表达上调组 TLR2、TGF-β1 及 NF-κB p65 蛋白表达水平下降 ( $P < 0.05$ ), 表达下调组 TLR2、TGF-β1 及 NF-κB p65 蛋白表达水平上升 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

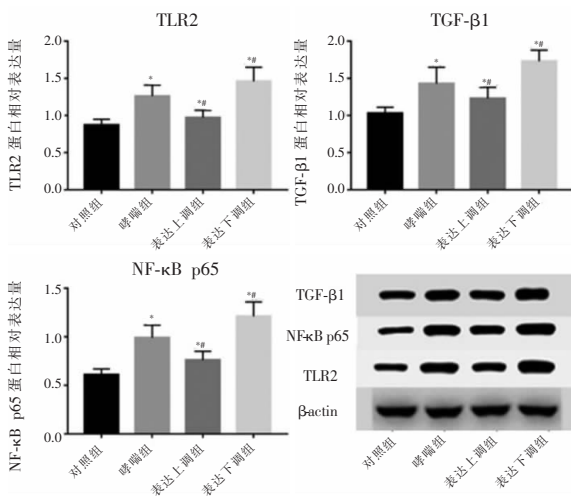


图 2 各组小鼠 TLR2、TGF-β1 及 NF-κB p65 蛋白表达水平

\*  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #  $P < 0.05$ , 与哮喘组比较。

### 2.5 各组小鼠肺组织 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞炎症因子浓度

与对照组相比,各组小鼠的 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子浓度均上升 ( $P < 0.05$ ); 与哮喘组相比,表达上调组 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子浓度下降 ( $P < 0.05$ ), 表达下调组 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因

子浓度上升 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组小鼠肺组织 IL-4、IL-5、IL-13 细胞炎症因子浓度 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-4	IL-5	IL-13
对照组 ( $n = 10$ )	20.10 ± 3.66	15.87 ± 2.69	29.78 ± 3.26
哮喘组 ( $n = 10$ )	73.12 ± 5.34 *	64.27 ± 6.60 *	88.39 ± 6.30 *
表达上调组 ( $n = 10$ )	37.05 ± 5.42 **	42.33 ± 6.75 **	65.41 ± 5.87 **
表达下调组 ( $n = 10$ )	80.95 ± 5.51 **	74.61 ± 4.40 **	96.73 ± 5.90 **

\*  $P < 0.05$ , 与对照组相比; #  $P < 0.05$ , 与哮喘组相比。

### 3 讨论

哮喘是常见的呼吸系统慢性气道疾病,主要表现为气道表皮细胞组织得损伤及脱落,且气道表皮细胞及组织损伤越严重,气道得高反应会越明显;主要发病原因之一为气道重塑,气道平滑肌细胞增殖和细胞外基质的产生在气道重塑过程中具有重要作用<sup>[12]</sup>。miRNA 是真核生物内源性具有调控功能的微小非编码 RNA,研究<sup>[13]</sup>发现,在哮喘的发病机制中有多种 miRNA 参与调控。相关研究<sup>[8]</sup>报道,miR-204-5p 可通过调节 Six1 抑制 TGF-β1 诱导的气道平滑肌细胞增殖和细胞外基质产生,作为预防哮喘气道重塑的潜在治疗靶点。

本研究通过探讨 miR-204-5p 对哮喘小鼠的炎症反应和气道重塑的影响,并对其潜在的分子机制进行研究。结果显示,miR-204-5p 的上调会抑制 TLR2 的表达,且与哮喘组相比,miR-204-5p 表达上调组 TGF-β1 及 NF-κB p65 蛋白表达水平下降 ( $P < 0.05$ ), miR-204-5p 表达下调组 TGF-β1 及 NF-κB p65 蛋白表达水平上升 ( $P < 0.05$ )。气道平滑肌细胞增生会直接导致气道壁增厚,从而影响气道反应性,使气流受限。TGF-β1 具有强烈的促纤维化作用,可刺激气道平滑肌细胞增殖,促使气道重塑。作为启动及维持气道重塑的潜在关键因子, TGF-β1 通过参与上皮间质转化、成纤维细胞分化等气道重塑的相关途径,并通过激活多条细胞内信号转导途径从而影响细胞周期,最终导致气道重塑的发生<sup>[14]</sup>。有研究<sup>[15]</sup>表明, TGF-β1 可通过增强气道平滑肌细胞之间的兴奋-收缩偶联机制从而上调的信号转导蛋白 Smad3 和 TGF-βRII 的表达导致平滑肌细胞增殖。而 NF-κB 为多条信号传导通路的枢纽,在调控哮喘气道重塑过程中同样具有重要作用,其活性的增强与哮喘的发生密切相关,可通过调控细胞炎症因子、生长因子、VCAM-1、ICAM-1 及 MMP 等参与哮喘发病机制的多个环节。另研究<sup>[16]</sup>表明, TLR2/MyD88/NF-κB 信号通路中关键蛋白的表达水平可有效影响机体的炎症反应,可参与气道炎症

反应的发生及发展。TLR2 为参与非特异性免疫的 TLRs 家族成员之一,是哮喘易感性的主要决定因素,多项研究均表明 TLR2 可通过介导下游的 NF- $\kappa$ B 通路和 JNK 信号分子参与过敏性气道炎症及支气管哮喘<sup>[17]</sup>。在本研究中,miR-204-5p 的上调与 TLR2 的表达成负相关,且 miR-204-5p 表达上调组 TGF- $\beta$ 1 及 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平均下降( $P < 0.05$ ),miR-204-5p 表达下调组 TGF- $\beta$ 1 及 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平均上升( $P < 0.05$ )。因此推测 miR-204-5p 可通过调控 TLR2 抑制 TGF- $\beta$ 1 及 NF- $\kappa$ B p65 的表达,有效抑制气道平滑肌细胞增殖和细胞外基质的产生。

在过敏性气道炎症及支气管哮喘发生过程中,TLR2 被激活与连接蛋白髓样分化蛋白的结合,从而激活下游的信号传递通路,启动细胞合成及释放炎症因子<sup>[18]</sup>,且 NF- $\kappa$ B 为一种多效转录因子,可对哮喘气道炎症过程中相关细胞炎症因子的基因转录水平进行调控<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,表达上调组 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子浓度下降( $P < 0.05$ ),表达下调组 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子浓度上升( $P < 0.05$ )。IL-13、IL-4、IL-5 为 Th2 型细胞炎症因子,Th1 及 Th2 趋化因子的表达水平变化同哮喘患者机体免疫应答反应关系密切。在哮喘发病过程中,气道平滑肌处于活跃状态,平滑肌细胞过度增殖,合成分泌多种因子。在该过程中 IL-4、IL-5 等细胞炎症因子可通过 ERK1/2 通路与细胞外基质与气道平滑肌细胞上相应受体结合,促使气道平滑肌细胞的增殖,同时上调 TGF- $\beta$ 1 的水平,诱导纤维化的发生,并且导致炎症反应<sup>[2,20]</sup>。因此推测哮喘气道炎症的发生机制可能为 miR-204-5p 通过调控 TLR2 从而抑制 Th2 型细胞的活化及 NF- $\kappa$ B 的活性,减少 IL-13、IL-4、IL-5 等炎症因子的释放<sup>[20]</sup>。

综上所述,miR-204-5p 可能通过调节 TLR2 的表达抑制哮喘小鼠由 TGF- $\beta$ 1 及 NF- $\kappa$ B p65 诱导的气道重塑,有效减轻小鼠的炎症反应,可作为预防哮喘气道重塑的潜在治疗靶点。

## 参考文献

[1] Meng L, Song Z, Liu A, *et al.* Effects of Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in Infections, Inflammatory Diseases, Metabolic Disorders and Cancers [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 681810.

[2] 邓鹏辉, 马常亭, 张健. 布地奈德干预对哮喘小鼠 NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$ 1 通路及早期气道重塑的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(9): 1337 - 1342.

[3] Khan I, Ul-Haq Z, Shaheen A, *et al.* Association of arg16gly and gln27glu, b2-adrenergic receptor gene polymorphism with asthma. A

systematic review and meta-analysis of case control studies [J]. *J Pak Med Assoc*, 2018, 68(1): 90 - 97.

[4] Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing [J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(7): 421 - 433.

[5] Yin Y, Zhang B, Wang W, *et al.* miR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(23): 6187 - 6199.

[6] Bian Z, Jin L, Zhang J, *et al.* LncRNA-UCA1 enhances cell proliferation and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by inhibiting miR-204-5p [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23892.

[7] Yao S, Yin Y, Jin G, *et al.* Exosome-mediated delivery of miR-204-5p inhibits tumor growth and chemoresistance [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(16): 5989 - 5998.

[8] Zhao J, Shang H, Cao X, *et al.* Association of polymorphisms in TLR2 and TLR4 with asthma risk: An update meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(35): e7909.

[9] Yang Z, Qu Z, Yi M, *et al.* MiR-204-5p Inhibits Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Induced Proliferation and Extracellular Matrix Production of Airway Smooth Muscle Cells by Regulating Six1 in Asthma [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2020, 181(4): 239 - 248.

[10] 孙雅妮, 陈诗, 唐寒. 三种证型对哮喘小鼠特异性/非特异性免疫功能及气道炎症的相关性研究 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2021, 40(6): 597 - 604.

[11] 杨艳, 薛征. TLR4 基因敲除对哮喘小鼠气道炎症的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(24): 2945 - 2949.

[12] Puzzovio PG, Levi-Schaffer F. Latest Progresses in Allergic Diseases Biomarkers: Asthma and Atopic Dermatitis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 747364.

[13] Huang Y, Zhang S, Fang X, *et al.* Plasma miR-199a-5p is increased in neutrophilic phenotype asthma patients and negatively correlated with pulmonary function [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193502.

[14] 吴媛媛, 孙秀珍, 刘昀, 等. Apelin 抑制小鼠气道平滑肌细胞增殖的作用及机制 [J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(2): 177 - 180.

[15] Ojiaku CA, Cao G, Zhu W, *et al.* TGF- $\beta$ 1 Evokes Human Airway Smooth Muscle Cell Shortening and Hyperresponsiveness via Smad3 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(5): 575 - 584.

[16] Fu L, Guan J, Zhang Y, *et al.* Tulobuterol patch alleviates allergic asthmatic inflammation by blockade of Syk and NF- $\kappa$ B activation in mice [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(15): 12154 - 12163.

[17] Wang M, Wang L, Fang L, *et al.* NLR5 negatively regulates LTA-induced inflammation via TLR2/NF- $\kappa$ B and participates in TLR2-mediated allergic airway inflammation [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 19990 - 20001.

[18] 余思菲, 吴长有. 组织定居记忆性 T 细胞的免疫学特征研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(7): 1093 - 1100.

[19] Xu T, Ge X, Lu C, *et al.* Baicalein attenuates OVA-induced allergic airway inflammation through the inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(21): 9310 - 9327.

[20] 王珏, 李竹英. 平喘颗粒对哮喘小鼠肺组织 TLR2 和 TLR4 表达的影响 [J]. *中医学报*, 2021, 36(7): 1486 - 1490.

(收稿日期: 2022-01-12)

修回日期: 2022-02-18)