

• 论 著 •

miR-29a-3p 通过靶向 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号轴减轻哮喘患儿气道炎症的机制研究*

蹇 强¹, 李 丹², 程 玮³, 唐甜甜^{2△}

陕西省西安市儿童医院:1. 急诊科;2. 感染科;3. 呼吸科, 陕西西安 710003

摘 要:目的 探讨 miR-29a-3p 通过靶向高迁移率族蛋白 1(HMGB1)/toll 样受体 4(TLR4)/核因子-κB(NF-κB)信号轴减轻哮喘患儿气道炎症的机制。方法 收集 52 例哮喘患儿与 50 例健康对照儿童外周血,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测血浆 miR-29a-3p 表达情况,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆中炎症因子水平。使用卵清蛋白构建哮喘大鼠模型,腹腔注射 miR-29a-3p 激动剂过表达 miR-29a-3p,收集一侧支气管肺泡灌洗液(BALF),计数总白细胞与嗜酸性粒细胞并检测炎症因子水平,取另一侧肺组织行 HE 染色观察病理表现。采用双荧光素酶报告基因系统验证 miR-29a-3p 与 HMGB1 的靶向关系,并检测 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号轴的主要蛋白表达情况。血小板激活因子(PAF)干预人支气管上皮细胞系 16HBE 模拟哮喘体外模型,通过转染过表达 miR-29a-3p 与 HMGB1,检测细胞 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号轴的主要蛋白与炎症因子表达情况。**结果** 与健康儿童比较,哮喘患儿血浆中 miR-29a-3p 表达水平显著降低($P<0.05$),而炎症因子肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1β 水平均升高($P<0.05$),miR-29a-3p 表达水平与 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平均呈负相关($P<0.05$)。过表达 miR-29a-3p 能改善哮喘模型大鼠支气管管腔变窄、管壁增厚、支气管及周围血管炎症细胞浸润的现象,显著降低肺组织炎症评分,减少 BALF 中的总白细胞数与嗜酸性粒细胞(EOS)计数,降低炎症因子水平($P<0.05$)。经双荧光素酶报告基因系统证实 miR-29a-3p 能靶向抑制 HMGB1,且 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号轴的主要蛋白表达水平在哮喘模型中显著增加($P<0.05$)。过表达 miR-29a-3p 可以减少 PAF 刺激细胞后 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号轴的主要蛋白及其调控的炎症因子表达,但过表达 HMGB1 会抵消这种作用($P<0.05$)。**结论** miR-29a-3p 在哮喘患儿中的表达水平显著降低,与气道炎症水平的升高密切相关,过表达 miR-29a-3p 可以通过靶向抑制 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号轴的主要蛋白表达减轻炎症。

关键词:miR-29a-3p; 高迁移率族蛋白 1; toll 样受体 4; 核因子-κB; 哮喘; 气道炎症; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.006

中图法分类号:R725.6

文章编号:1673-4130(2022)18-2201-06

文献标志码:A

Mechanism of miR-29a-3p for alleviating airway inflammation in children patients with asthma by targeting HMGB1/TLR4/NF-κB signal axis*

JIAN Qiang¹, LI Dan², CHENG Wei³, TANG Tiantian^{2△}

1. Department of Emergency; 2. Department of Infectious Diseases; 3. Department of Respiration, Xi'an Municipal Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710003, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of miR-29a-3p in alleviating airway inflammation in children patients with asthma by targeting high mobility group protein 1(HMGB1)/toll like receptor 4(TLR4)/nuclear factor kappa-B(NF-κB) signal axis. **Methods** The peripheral blood samples of 52 asthmatic children and 50 healthy children were collected. The expression level of plasma miR-29a-3p was detected by qPCR and the levels of plasma inflammatory factors were detected by ELISA. The asthmatic rat model was constructed by ovalbumin, and then miR-29a-3p agomir was intraperitoneally injected to overexpress miR-29a-3p. The bronchoalveolar lavage fluid(BALF) at one side was collected. The total number of leukocytes and eosinophils(EOS) were counted and the levels of inflammatory factors were detected. The lung tissue at the other side was taken and stained with HE to observe the pathological situation. The double luciferase reporter gene system experiment verified the targeting relationship between miR-29a-3p and HMGB1, and the expression levels of main proteins in the HMGB1/TLR4/NF-κB signal axis were detected. Human bronchial epitheli-

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目(2019SF-052)。

作者简介:蹇强,男,主治医师,主要从事小儿心血管内科、小儿急救方面的临床和基础研究。△ 通信作者, E-mail:250581680@qq.com。

al cell line 16HBE was intervened with platelet activating factor (PAF) to simulate the asthma in vitro model. After overexpression of miR-29a-3p and HMGB1 by transfection, the expression levels of main proteins and inflammatory factors in HMGB1/TLR4/NF- κ B signal axis were detected. **Results** Compared with the healthy children, the expression level of plasma miR-29a-3p in asthmatic children was significantly decreased ($P < 0.05$), while the levels of inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 1 β (IL-1 β) were increased ($P < 0.05$), and the expression level of miR-29a-3p was negatively correlated with the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05$). Overexpressing miR-29a-3p could improve the narrowing of bronchial lumen, thickening of bronchial wall, infiltration of inflammatory cells in bronchus and surrounding blood vessels, significantly reduced the inflammatory score of lung tissue, reduced the total leukocyte count and EOS count in BALF, and reduced the level of inflammatory factors in asthmatic rats ($P < 0.05$). The double luciferase reporter gene system confirmed that miR-29a-3p could targeted inhibiting HMGB1 in asthma model rats, moreover, the expression levels of main proteins in HMGB1/TLR4/NF- κ B signal axis in the asthma model were increased significantly ($P < 0.05$). Overexpression of miR-29a-3p could reduce the expression of HMGB1/TLR4/NF- κ B signal axis and its regulated inflammatory factors after PAF stimulating the cells, but this effect could be counteracted by overexpression of HMGB1 ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression level of miR-29a-3p is significantly decreased in asthmatic children patients, which is closely related to the increase of airway inflammation level. Overexpressing miR-29a-3p can alleviate inflammation by targeted inhibiting the expression of main proteins in HMGB1/TLR4/NF- κ B signal axis.

Key words: miR-29a-3p; high mobility group protein 1; toll like receptor 4; nuclear factor kappa-B; asthma; airway inflammation; children

哮喘是一种气道慢性炎症性疾病,其特征是气道炎症和高反应性,造成气道功能障碍^[1]。哮喘是儿童常见的慢性疾病之一,近 20 年间该病患病率有所上升^[2]。一方面,目前治疗哮喘的处方药物效力有限,且不良反应较多;另一方面,儿童的治疗依从性较差,导致药效降低,哮喘控制不佳,增加了不良预后的风险^[3-4]。如何采取更加有效的方法预防哮喘与对症治疗是儿科医生面临的难题。

分子靶向药物是近年来临床研究的热点,探讨哮喘发病的分子机制有助于寻找潜在的治疗靶点^[5]。miR-29a-3p 具有抗炎和减轻过敏反应和缓解症状的作用^[6-7]。miR-29a-3p 在哮喘模型小鼠中水平降低,被认为是重塑细胞外基质的关键调控分子,参与了气道结构改建与功能改善^[8]。但 miR-29a-3p 具体的下游调控机制目前仍未得到明确阐释,探讨其下游调控机制的分子信号通路有助于更深入地理解哮喘的进展机制。高迁移率族蛋白 1(HMGB1)/toll 样受体 4(TLR4)/核因子- κ B(NF- κ B)是促成炎症损伤的主要信号通路^[9]。前期研究中发现 miR-29a-3p 与 HMGB1 mRNA 的 3'非编码区域(3'UTR)存在结合位点,且 REN 等^[10]研究指出,miR-29a-3p 可以抑制 HMGB1 的表达,并下调 TLR4 表达。由此推测 miR-29a-3 可能通过靶向抑制 HMGB1 的表达,进一步抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号轴的激活,从而在哮喘中发挥抗炎作用。本研究采用临床指标检测、体内外实验来验证该推论,旨在为儿童哮喘的发病机制提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2019 年 3 月至 2021 年 1 月本

院确诊的哮喘患儿 52 例作为研究对象,其中男 30 例、女 22 例,平均年龄(8.81 $\pm$ 3.05)岁。患儿在入组前 2 个月未接受过肾上腺皮质激素或免疫调节剂治疗,经纤维支气管镜检查排除气道异物,排除合并其他呼吸系统疾病,自身免疫性疾病,心脏、肾脏等重要器官功能障碍患儿,以及病毒/细菌感染患儿。另收集 50 例在本院体检的健康儿童作为对照,其中男 29 例,女 21 例、平均年龄(8.97 $\pm$ 3.81)岁。本研究获得了本院伦理委员会的批准,且在研究前,所有受试儿童家属均签署了知情同意书。

1.2 实验动物及细胞 18 只雌性、SPF 级 Wistar 大鼠购自西安交通大学实验动物中心,鼠龄 3 个月,体质量 160~180 g,饲养于通风的笼子,可以自由获取食物与水。人类支气管上皮细胞系 16HBE 购自美国 ATCC 细胞库,培养于添加有 10%牛血清清蛋白、1%青霉素/链霉素和 1%谷氨酰胺的 EMEM 培养基中。

1.3 仪器与试剂 Bio-Rad iQ5 实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)系统购自美国伯乐公司,血细胞分类计数器 Qi3537 购自上海旌派仪器公司,FC 酶标仪购自上海赛默飞世尔科技公司,CX43 显微镜购自日本奥林巴斯公司,WD-9413C 凝胶成像分析仪购自北京六一仪器厂。EMEM 培养基购自美国组织培养库,人和鼠酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 Abcam 公司,卵清蛋白、血小板激活因子(PAF)购自美国 Sigma 公司,激动剂与阴性对照(NC)购自苏州吉玛基因公司,真核表达载体(pcDNA)购自上海生工生物工程有限公司,转染试剂购自上海赛默飞世尔科技公司,双荧光素酶报告基因系统试剂购自北京

Promega 公司,二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量分析试剂盒、电化学发光(ECL)试剂与 HE 染色液购自上海碧云天生物公司,一抗、二抗均购自美国 Introvigen 公司。

1.4 方法

1.4.1 qPCR 检测 收集所有受试儿童空腹外周静脉血,分离血浆,采用 qPCR 对血浆/后续细胞中 miRNA 与 mRNA 进行相对定量测定。qPCR:使用 Trizol 试剂盒提取血浆/组织/细胞中的总 RNA,通过反转录酶反转录为 cDNA,使用 SYBR Green 试剂进行检测,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。miR-29a-3p 检测采用 U6 作为内参。U6 前向引物序列:5'-GCT-TCGGCAGCACATATACTAAAAT-3';反向引物序列:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT-3'。miR-29a-3p 前向引物序列:5'-CGCTAGCACCATCTGAAAT-3';反向引物序列:5'-AGTGCAGGGTC-CGAGGTATT-3'。mRNA 检测采用 β -actin 作为内参。 β -actin 前向引物序列:5'-ATACGCTGGGATGAGCACTGG-3';反向引物序列:5'-TCTTTGCGGATGTCCACGTC-3'。HMGB1 前向引物序列:5'-ACATCCAAAATCTTGATCAGTTA-3';反向引物序列:5'-AGGACAGACTTTCAAAAATGTTT-3'。肿瘤坏死因子(TNF)- α 前向引物序列:5'-TCCTTCAGACACCCTCAACC-3';反向引物序列:5'-AGGCCCCAGTTTGAATTCTT-3'。白细胞介素(IL)-1 β 前向引物序列:5'-GCTGTGCAGGAGATCACA-GA-3';反向引物序列:5'-GGGCTCCATAAAGT-CACCAA-3'。IL-6 前向引物序列:5'-ATGCTTCAATCTGGGTTCAATC-3';反向引物序列:5'-ACTCGTTCTGGAGGTAGTCCAGGTA-3'。

1.4.2 ELISA 儿童血浆采用人类 ELISA 试剂盒检测炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,使用 ELISA 试剂盒检测大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症因子水平,采用酶标仪进行定量分析。

1.4.3 动物分组干预 采用卵清蛋白诱导建立支气管哮喘模型,将 Wistar 大鼠分为对照组、模型组、miR-29a-3p 过表达组 3 组,每组 6 只。模型组大鼠在第 1 天与第 8 天经腹腔注射含有 100 mg 卵清蛋白与 100 mg 氢氧化铝的溶液致敏,对照组则注射等量的生理盐水。从第 15 天开始,大鼠每天雾化吸入 1% 卵清蛋白溶液进行激发,对照组用生理盐水代替,连续 2 周。miR-29a-3p 过表达组大鼠在每日卵清蛋白激发前 4 h 通过腹腔注射 miR-29a-3p 激动剂,随后操作同模型组,另两组注射等量的 NC 激动剂。

1.4.4 BALF 测定 在最后 1 次激发后 24 h 内处死大鼠,将大鼠一侧支气管结扎,另一侧气道用 1 mL 生理盐水冲洗 3 次,回收 80% 的冲洗液,然后将冲洗后的样品以 2 000 r/min 离心 10 min,收集上清液并将其储存于 -80 °C 的冰箱备用,测定炎症因子水平。将

细胞沉淀采用磷酸盐缓冲液重悬,使用血细胞分析仪检测总白细胞数与嗜酸性粒细胞(EOS)计数。

1.4.5 HE 染色 处死大鼠后取出非灌洗侧肺组织,将大鼠肺组织固定后制成 5 μ m 石蜡切片,然后分别采用苏木精与伊红染色液染色,显微镜下拍摄图像,根据炎症细胞浸润程度进行炎症评分:0 分为无炎症细胞浸润;1 分为炎症细胞少量浸润;2 分为气道周围出现单层炎症细胞;3 分为气道周围出现双层炎症细胞;4 分为气道周围出现 4 层炎症细胞。

1.4.6 双荧光素酶报告基因系统检测 使用在线生物信息学软件 Starbase 分析 miR-29a-3p 的目标基因,将 wt-HMGB1 靶向结合位点片段或 mut-HMGB1 靶向结合位点片段连接到 psiCHECK-2 质粒,使用转染试剂与 NC 或 miR-29a-3p 激动剂共同转染至细胞内,转染 48 h 后测定双荧光素酶活性。

1.4.7 Western blot 试验 采用 Western blot 检测 HMGB1、TLR4、NF- κ B 蛋白的表达量。使用 RIPA 裂解缓冲液从组织/细胞中提取总蛋白,用 BCA 蛋白分析试剂盒对蛋白进行定量,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,将膜与一抗在 4 °C 孵育过夜,随后加入二抗在 37 °C 孵育 1 h,ECL 化学发光试剂显色后观察条带,分析蛋白的相对表达量,以 β -actin 作为内参。

1.4.8 细胞干预 将 16HBE 细胞分为 4 组:对照组、PAF 组、miR-29a-3p 过表达组与 miR-29a-3p + HMGB1 过表达组,对照组、PAF 组细胞转染 NC 激动剂,miR-29a-3p 过表达组细胞转染 miR-29a-3p 激动剂,miR-29a-3p + HMGB1 过表达组同时转染 miR-29a-3p 激动剂与 pcDNA-HMGB1,转染 24 h 后除对照组外,其余 3 组均在培养基中添加 10 ng/mL PAF 培养 24 h。

1.5 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件分析数据。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用秩和检验;采用 Pearson 相关分析数据间的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健康儿童、哮喘患儿血浆 miR-29a-3p、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平比较 与健康儿童比较,哮喘患儿血浆中 miR-29a-3p 表达水平显著下调($P < 0.05$),而炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均升高($P < 0.05$),见表 1。随后对哮喘患儿血浆中 miR-29a-3p 表达水平与炎症因子水平的相关性进行分析发现,miR-29a-3p 表达水平与 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均呈负相关($r = -0.403$ 、 -0.290 、 -0.282 , $P < 0.05$)。

2.2 过表达 miR-29a-3p 减轻哮喘模型大鼠气道炎症 使用卵清蛋白诱导 Wistar 大鼠构建支气管哮喘模型,哮喘大鼠在每次激发后,出现鼻子抓痒和打喷嚏

嚏的频率升高、弓背、呼吸加快加深等表现。干预 4 周后取大鼠一侧的肺组织,通过 HE 染色观察病理表现,相比于对照组大鼠,模型组大鼠支气管管腔变窄,管壁增厚,支气管及周围血管呈明显炎症细胞浸润,炎症评分升高($P<0.05$),而与模型组比较,miR-29a-3p 过表达组大鼠上述病理变化有所恢复,炎症评分显

著降低($P<0.05$)。同时收集大鼠另一侧 BALF,测得模型组大鼠总白细胞数、EOS 计数较对照组显著增加($P<0.05$),炎症因子水平显著升高($P<0.05$),而 miR-29a-3p 过表达组与模型组比较,总白细胞数与 EOS 计数显著减少($P<0.05$),炎症因子水平显著降低($P<0.05$)。见图 1、表 2。

表 1 健康儿童、哮喘患儿血浆 miR-29a-3p、TNF-α、IL-1β、IL-6 水平比较

项目	<i>n</i>	miR-29a-3p 相对表达量	TNF-α(ng/L)	IL-1β(ng/L)	IL-6(ng/L)
健康儿童	50	1.36±0.49	175.21±67.52	8.38±3.55	416.50±160.51
哮喘患儿	52	0.33±0.13 [*]	432.52±135.24 [*]	13.15±5.49 [*]	765.08±312.69 [*]

注:与健康儿童比较,^{*} $P<0.05$ 。

2.3 miR-29a-3p 靶向抑制 HMGB1 表达 Starbase 软件分析显示,miR-29a-3p 与 HMGB1 mRNA 3' UTR 区域存在靶向结合(图 2A),于是采用双荧光素酶报告基因系统进行验证,结果显示,wt-HMGB1 与 miR-29a-3p 共转染降低了荧光素酶活性($P<0.05$),而 mut-HMGB1 与 miR-29a-3p 共转染不会影响荧光素酶活性($P>0.05$,图 2B)。随后对比了健康儿童与哮喘患儿血浆中 HMGB1 mRNA 表达水平,发现哮喘患儿血浆中 HMGB1 mRNA 表达水平(13.13±

5.49)较健康儿童(8.38±2.55)显著升高($P<0.05$),而 HMGB1 mRNA 与 miR-29a-3p 表达水平呈负相关($r=-0.426$, $P<0.05$)。同时,对比 3 组大鼠肺组织中 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号轴的主要蛋白表达量,发现模型组大鼠中 HMGB1/TLR4/NF-κB 轴的主要蛋白表达量较对照组大鼠显著增加,而 miR-29a-3p 过表达组 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号轴的主要蛋白表达量较模型组显著减少($P<0.05$)。见图 2C、表 3。

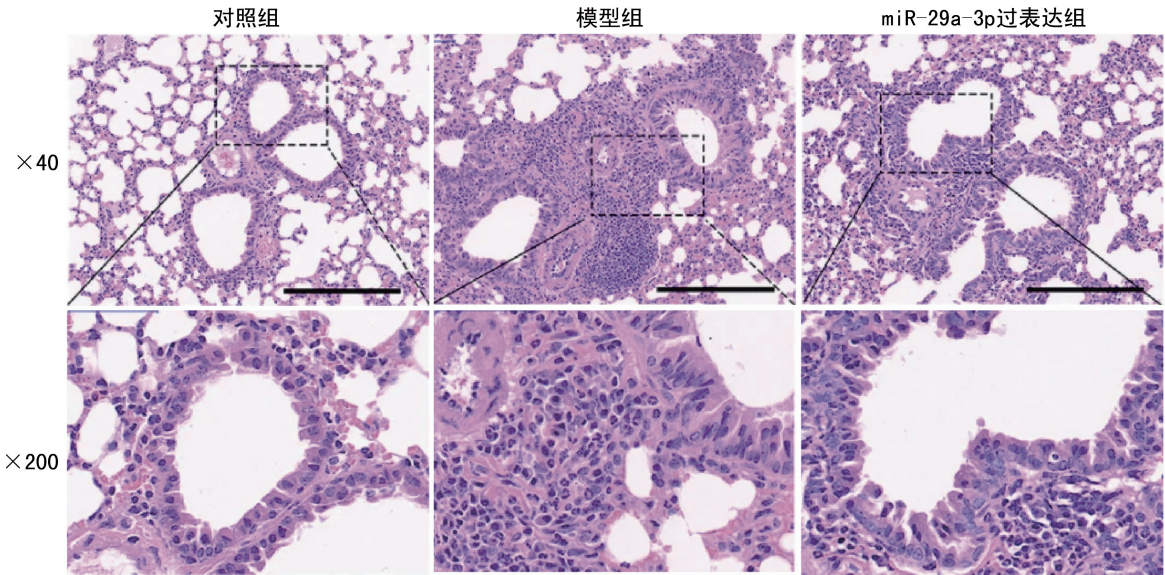


图 1 3 组大鼠肺组织的 HE 染色结果(标尺=200 μm)

表 2 3 组大鼠肺组织炎症评分,BALF 中总白细胞数、EOS 计数与炎症因子水平的比较[$M(P_{25}, P_{75})$ 或 $\bar{x}\pm s$]

组别	<i>n</i>	炎症评分(分)	总白细胞数 ($\times 10^5$)	EOS 计数 ($\times 10^5$)	TNF-α (ng/L)	IL-1β (ng/L)	IL-6 (ng/L)
对照组	6	0(0.0,0.5)	0.99±0.16	0.10±0.03	0.99±0.06	1.09±0.18	6.12±1.39
模型组	6	3.5(30.0,40.0) [*]	7.47±1.10 [*]	3.60±0.41 [*]	30.05±2.75 [*]	8.70±2.33 [*]	69.78±3.52 [*]
miR-29a-3p 过表达组	6	1.5(10.0,20.0) [#]	3.70±0.49 [#]	1.25±0.17 [#]	9.23±2.07 [#]	3.81±0.64 [#]	21.55±3.87 [#]

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

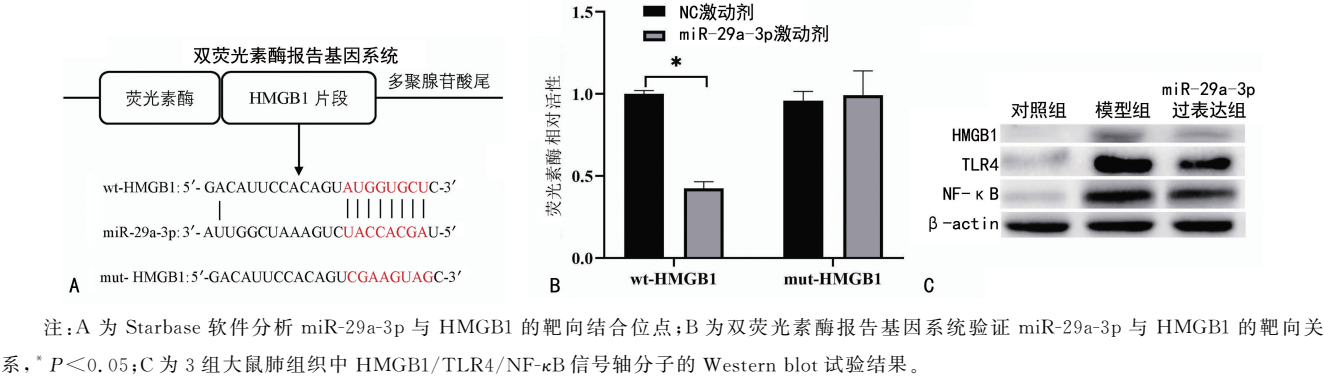


图 2 miR-29a-3p 与 HMGB1 的靶向调控关系验证

表 3 3 组大鼠肺组织 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号轴主要蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	HMGB1	TLR4	NF- κ B
对照组	6	1.03±0.06	0.96±0.15	1.05±0.27
模型组	6	2.89±0.38*	3.43±0.40*	3.98±0.54*
miR-29a-3p 过表达组	6	1.26±0.23 [#]	1.84±0.43 [#]	1.40±0.29 [#]

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, [#] $P<0.05$ 。

2.4 miR-29a-3p 通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号轴减少细胞内炎症因子表达 与对照组相比, PAF 组细胞 miR-29a-3p 表达水平降低 ($P<0.05$), 而 HMGB1、TLR4、NF- κ B 蛋白及炎症因子表达水平升高 ($P<0.05$); 与 PAF 组比较, miR-29a-3p 过表达组细胞内 miR-29a-3p 表达水平升高 ($P<0.05$), 而

HMGB1、TLR4、NF- κ B 蛋白及炎症因子表达水平降低 ($P<0.05$); 与 miR-29a-3p 过表达组比较, miR-29a-3p+HMGB1 过表达组 miR-29a-3p 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但 HMGB1、TLR4、NF- κ B 蛋白及炎症因子表达水平升高 ($P<0.05$)。见图 3、表 4。

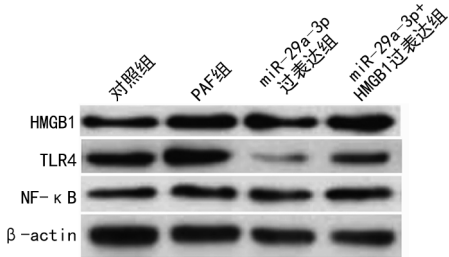


图 3 4 组细胞干预后 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号轴分子的 Western blot 检测结果

表 4 4 组细胞 miR-29a-3p、HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号轴蛋白与炎症因子 mRNA 相对表达量的比较

组别	miR-29a-3p	HMGB1	TLR4	NF- κ B	TNF- α mRNA	IL-1 β mRNA	IL-6 mRNA
对照组	0.98±0.07	0.99±0.01	1.01±0.15	1.03±0.08	1.02±0.08	0.94±0.08	1.03±0.09
PAF 组	0.28±0.04*	2.76±0.44*	3.11±0.14*	3.58±0.36*	2.14±0.18*	1.73±0.22*	2.66±0.08*
miR-29a-3p 过表达组	1.28±0.06 [#]	1.22±0.10 [#]	1.83±0.06 [#]	1.59±0.07 [#]	1.21±0.10 [#]	1.09±0.19 [#]	1.13±0.15 [#]
miR-29a-3p+HMGB1 过表达组	1.32±0.03	3.17±0.11 ^{&}	2.64±0.19 ^{&}	2.87±0.13 ^{&}	2.18±0.26 ^{&}	2.05±0.11 ^{&}	2.80±0.22 ^{&}

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 PAF 组比较, [#] $P<0.05$;与 miR-29a-3p 过表达组比较, [&] $P<0.05$ 。

3 讨 论

哮喘是儿童普遍存在的呼吸道疾病,其主要临床特征是过敏性气道炎症、气道改造和气道反应过度^[11-12]。本研究首先检测了健康儿童与哮喘患儿血浆中 miR-29a-3p 与炎症因子水平,结果显示与健康儿童比较,哮喘患儿血浆中 miR-29a-3p 表达水平显著降低 ($P<0.05$),而炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均升高 ($P<0.05$), miR-29a-3p 表达水平与 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 均呈负相关 ($P<0.05$)。该结果提示 miR-29a-3p 可能参与了哮喘患儿的抗炎过程。为了证实 miR-29a-3p 在哮喘中的作用,本研究采用卵清蛋白刺激来构建哮喘大鼠模型。卵清蛋白

致敏与激发已被广泛用于哮喘模型的构建,卵清蛋白具有易获取、免疫原性强的优势,而选择雌性大鼠是由于其炎性反应更加明显^[13]。在构建成功后大鼠出现鼻子抓痒和打喷嚏的频率升高、弓背、呼吸加快加深等表现。本研究发现,过表达 miR-29a-3p 能改善哮喘模型大鼠支气管管腔变窄、管壁增厚、支气管及周围血管炎症细胞浸润的现象,显著降低肺组织炎症评分,减少总白细胞数与 EOS 计数,降低炎症因子水平 ($P<0.05$)。EOS 计数升高是机体过敏的一个重要指标,且临床上 EOS 性哮喘表型占大多数。BALF 中白细胞数升高反映炎症细胞的增多,加上炎症因子水平升高,均说明了气道的高炎症水平^[14-15]。SHI

等^[16]研究发现,哮喘患儿 BALF 的炎症因子水平高于对照者。虽然本研究由于临床样本取材的问题,检测的是患儿血浆,但在哮喘模型大鼠得到了同样的结论,且证实了 miR-29a-3p 在哮喘中的抗炎作用。

本研究动物实验证实 miR-29a-3p 能靶向抑制 HMGB1,且 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号轴的主要蛋白表达量在哮喘模型中显著增加。HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路在哮喘的发病机制中起重要作用。SHANG 等^[17]研究发现,沉默 HMGB1 后降低了卵清蛋白诱导的炎症因子水平和气道高反应性。TLR4 表达增加能激活机体的固有免疫系统,进而活化转录因子 NF- κ B、诱发炎症^[18]。

气道上皮细胞在外界因素的干扰下能分泌与释放多种炎症因子^[19]。本研究细胞实验发现,过表达 miR-29a-3p 可以减少 PAF 刺激 16HBE 细胞后 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号轴的主要蛋白及其调控的炎症因子表达,但过表达 HMGB1 会抵消这种作用,进一步证实了 miR-29a-3p 在哮喘抗炎过程中对 HMGB1 信号轴的负调控作用。

综上所述,miR-29a-3p 在哮喘患儿中的表达水平显著降低,与气道炎症因子水平的升高密切相关,过表达 miR-29a-3p 可以通过靶向抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号轴主要蛋白的表达减轻炎症。靶向该信号轴将对哮喘预防与抗炎治疗有一定的启示。

参考文献

[1] HAKTANIR A M, PHIPATANAKUL W. Severe asthma in children: evaluation and management[J]. *Allergol Int*, 2019, 68(2): 150-157.

[2] ZHOU Y, DO D C, ISHMAEL F T, et al. Mannose receptor modulates macrophage polarization and allergic inflammation through miR-511-3p[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(1): 350-364.

[3] WEIDNER J, BARTEL S, KILIÇ A, et al. Spotlight on microRNAs in allergy and asthma[J]. *Allergy*, 2021, 76(6): 1661-1678.

[4] LI J, PANGANIBAN R, KHO A T, et al. Circulating microRNAs and treatment response in childhood asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202(1): 65-72.

[5] FEKONJA S, KOROSK P, RIJAVEC M, et al. Asthma microRNA regulome development using validated miRNA-target interaction visualization[J]. *Omics*, 2018, 22(9): 607-615.

[6] WANG J, YIN J, PENG H, et al. MicroRNA-29 mediates anti-inflammatory effects and alleviation of allergic responses and symptoms in mice with allergic rhinitis[J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2021, 17(1): 24.

[7] ZHANG X, ZHAO X, SUN H, et al. The role of miR-

29c/B7-H3 axis in children with allergic asthma[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 218.

[8] ZHANG X, XIE J, SUN H, et al. miR-29a-3p regulates the epithelial-mesenchymal transition via the SPARC/ERK signaling pathway in human bronchial epithelial cells[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(3): 171.

[9] SHANG J, LIU W, YIN C, et al. Cucurbitacin E ameliorates lipopolysaccharide-evoked injury, inflammation and MUC5AC expression in bronchial epithelial cells by restraining the HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling[J]. *Mol Immunol*, 2019, 114: 571-577.

[10] REN S, PAN L, YANG L, et al. miR-29a-3p transferred by mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles protects against myocardial injury after severe acute pancreatitis[J]. *Life Sci*, 2021, 272: 119189.

[11] MA L, ZHANG Q, HAO J, et al. LncRNA PVT1 exacerbates the inflammation and cell-barrier injury during asthma by regulating miR-149[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(11): e22563.

[12] KERCSMAR C M, SHIPP C. Management/comorbidities of school-aged children with asthma[J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2019, 39(2): 191-204.

[13] CASARO M, SOUZA V R, OLIVEIRA F A, et al. OVA-induced allergic airway inflammation mouse model[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 297-301.

[14] HE Y, LOU X, JIN Z, et al. Mahuang decoction mitigates airway inflammation and regulates IL-21/STAT3 signaling pathway in rat asthma model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224: 373-380.

[15] CORREN J, DU E, GUBBI A, et al. Variability in blood eosinophil counts in patients with eosinophilic asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2021, 9(3): 1224-1231.

[16] SHI Z G, SUN Y, WANG K S, et al. Effects of miR-26a/miR-146a/miR-31 on airway inflammation of asthma mice and asthma children[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12): 5432-5440.

[17] SHANG L, WANG L, SHI X, et al. HMGB1 was negatively regulated by HSF1 and mediated the TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway in asthma[J]. *Life Sci*, 2020, 241(385 Suppl 1): 117120.

[18] 乔俊英, 宋丽, 张艳丽, 等. 哮喘小鼠 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路及维生素 D 的作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(1): 95-103.

[19] LIU T, LIU Y, MILLER M, et al. Autophagy plays a role in FSTL1-induced epithelial mesenchymal transition and airway remodeling in asthma[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 313(1): L27-L40.