

本文引用: 郭超凡, 李娇艳, 田娅玲, 舒文俊, 戴孟庭, 周娅微, 邓婷, 董晓斐. 五虎汤调控 miR-182-5p 表达靶向 NOX4/NLRP3/IL-1 β 信号通路缓解哮喘小鼠气道炎症的作用机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(1): 14-22.

五虎汤调控 miR-182-5p 表达靶向 NOX4/NLRP3/IL-1 β 信号通路缓解哮喘小鼠气道炎症的作用机制研究

郭超凡¹, 李娇艳^{1*}, 田娅玲¹, 舒文俊², 戴孟庭¹, 周娅微¹, 邓婷¹, 董晓斐¹

1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南长沙 410208

[摘要] **目的** 探讨五虎汤通过调控 miR-182-5p 表达靶向烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4(NOX4)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)/白细胞介素-1 β (IL-1 β)信号通路缓解哮喘小鼠气道炎症的作用机制。**方法** 将 42 只 Balb/c 小鼠随机分为空白组(A组,6只)和造模组(36只)。通过腹腔注射屋尘螨诱导小鼠致敏,并予聚肌胞苷酸模拟病毒感染诱发哮喘急性发作模型。将造模成功的 36 只小鼠随机分为 6 组[模型组(B组)、miR-182-5p agomir 组(C组)、MicroRNA Agomir negative control 组(D组)、五虎汤+miR-182-5p agomir 组(E组)、五虎汤+MicroRNA Agomir negative control 组(F组)、五虎汤组(G组)],每组 6 只。C、D 组给予纯水灌胃并分别予 miR-182-5p agomir、MicroRNA Agomir negative control 滴鼻,E、F、G 组予以五虎汤灌胃并分别予 miR-182-5p agomir、MicroRNA Agomir negative control、DEPC 水滴鼻,A、B 组予等体积纯水灌胃和 DEPC 水滴鼻,以上处理均 1 次/d,连续处理 7 d 后处死小鼠取材。观察小鼠一般行为学表现;HE、Masson 染色法观察小鼠肺组织气道炎症细胞浸润、气道胶原纤维沉积情况;Western blot 法检测小鼠肺组织中 NOX4、NLRP3、IL-1 β 的蛋白表达水平;qPCR 检测 miR-182-5p 含量。**结果** 与 A 组相比,B 组小鼠可见不同程度的频繁抓鼻、呼吸加快、腹肌抽动,甚至口唇青紫,行为改变显著。与 B 组相比,C、F、G 组行为改变好转,偶有挠鼻、呼吸频率减慢,无喘息、缺氧表现;E 组呼吸频率明显减慢,呼吸平稳;D 组行为学无明显改善,呼吸频率快。与 A 组相比,B 组可见大量炎症细胞浸润,支气管间隙水肿;气道及血管下胶原纤维明显沉积。与 B 组相比,C、F、G 组病理表现缓解,炎症细胞浸润减少,间质水肿不同程度吸收,胶原纤维沉积减少;E 组改变更加明显,仅有少量炎症细胞浸润,无明显间质水肿,支气管下方胶原纤维沉积明显减少;D 组 HE 染色仍见较多炎症细胞,胶原纤维沉积改善不明显。与 A 组相比,B 组 miR-182-5p 含量下降($P<0.05$),NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达升高($P<0.05$)。与 B 组相比,C、E、F、G 组小鼠 miR-182-5p 含量上升($P<0.05$, $P<0.001$),NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达下降($P<0.05$, $P<0.001$)。与 C 组相比,D 组 miR-182-5p 含量下降($P<0.05$),NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达升高($P<0.05$)。与 E 组相比,F、G 组 miR-182-5p 含量下降($P<0.05$),NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达升高($P<0.05$)。**结论** 五虎汤可以改善哮喘小鼠哮喘表现,减轻气道炎症,可能与促进 miR-182-5p 高表达、抑制 NOX4/NLRP3/IL-1 β 通路激活有关。

[关键词] 支气管哮喘;五虎汤;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4;miR-182-5p;NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3;白细胞介素-1 β

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.01.003

Mechanism of action of Wuhu Decoction in alleviating airway inflammation in asthmatic mice by regulating miR-182-5p expression to target the NOX4/NLRP3/IL-1 β signaling pathway

GUO Chaofan¹, LI Jiaoyan^{1*}, TIAN Yaling¹, SHU Wenjun², DAI Mengting¹, ZHOU Yawei¹,
DENG Ting¹, DONG Xiaofei¹

[收稿日期]2025-09-19

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(2024JJ9434);湖南省卫生健康委员会科研计划项目(D202306018341);湖南中医药大学校级科研联合基金项目(2020XJJ042)。

[通信作者]*李娇艳,女,硕士,主治医师,E-mail:997626346@qq.com。

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] Objective To investigate the mechanism of action by which Wuhu Decoction alleviates airway inflammation in asthmatic mice by regulating the expression of miR-182-5p to target the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4)/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3)/interleukin-1 β (IL-1 β) signaling pathway. **Methods** A total of 42 Balb/c mice were randomly divided into blank group (Group A, $n=6$) and modeling group ($n=36$). The mice were sensitized by intraperitoneal injection of house dust mite, and acute asthma attack was induced by polyinosinic-polycytidylic acid to simulate viral infection. Thirty-six successfully modeled mice were further randomized into six subgroups with six mice each: model group (Group B), miR-182-5p agomir group (Group C), MicroRNA Agomir negative control group (Group D), Wuhu Decoction+miR-182-5p agomir group (Group E), Wuhu Decoction+MicroRNA Agomir negative control group (Group F), and Wuhu Decoction group (Group G). Mice in Groups C and D received pure water by gavage and were treated with miR-182-5p agomir or MicroRNA Agomir negative control via intranasal instillation, respectively. Mice in Groups E, F, and G received Wuhu Decoction by gavage, followed by nasal drip of miR-182-5p agomir, MicroRNA Agomir negative control, or diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water, respectively. Mice in Groups A and B were given pure water by gavage and DEPC-treated water via intranasal instillation. All treatments were performed once daily for seven consecutive days, after which the mice were sacrificed for sample collection. General behavioral performance of the mice were observed. HE and Masson staining were used to evaluate airway inflammatory cell infiltration and collagen fiber deposition in mouse lung tissues. Western blot was employed to examine the protein expression levels of NOX4, NLRP3, and IL-1 β in mouse lung tissues, and qPCR was used to measure the expression of miR-182-5p. **Results** Compared with Group A, mice in Group B exhibited significant behavioral changes, including frequent nose scratching, accelerated respiration, abdominal muscle twitching, and even cyanosis of the lips and mouth to varying degrees. In contrast to Group B, mice in Groups C, F, and G showed improved behavioral performance, with occasional nose scratching, reduced respiratory rate, and no wheezing or hypoxia; mice in Group E presented with a markedly decreased and stable respiratory rate; while mice in Group D showed no significant improvement in behavior and maintained a high respiratory rate. Histopathologically, Group B displayed massive inflammatory cell infiltration, bronchial interstitial edema, and obvious collagen fiber deposition around the airways and blood vessels compared with Group A. Compared with Group B, Groups C, F, and G showed alleviated pathological manifestations, with reduced inflammatory cell infiltration, partial resolution of interstitial edema and decreased collagen fiber deposition; these improvements were more pronounced in Group E, with only a small amount of inflammatory cell infiltration, no obvious interstitial edema, and significantly reduced collagen fiber deposition under the bronchi; Group D still had a large number of inflammatory cells observed by HE staining, and the improvement of collagen fiber deposition was not obvious. At the molecular level, compared with Group A, Group B had a significantly decreased expression of miR-182-5p ($P<0.05$) and increased protein expression levels of NOX4, NLRP3, and IL-1 β ($P<0.05$). Compared with Group B, Groups C, E, F, and G showed elevated expression of miR-182-5p ($P<0.05$, $P<0.001$) and downregulated protein expression of NOX4, NLRP3, and IL-1 β ($P<0.05$, $P<0.001$). In comparison with Group C, Group D had lower expression of miR-182-5p ($P<0.05$) and higher protein expression levels of NOX4, NLRP3, and IL-1 β ($P<0.05$). Moreover, compared with Group E, Groups F and G exhibited decreased miR-182-5p expression ($P<0.05$) and upregulated protein expression of NOX4, NLRP3, and IL-1 β ($P<0.05$). **Conclusion** Wuhu Decoction can ameliorate asthmatic symptoms and reduce airway inflammation in asthmatic mice, which may be associated with promoting the high expression of miR-182-5p and inhibiting the activation of the NOX4/NLRP3/IL-1 β signaling pathway.

[Keywords] bronchial asthma; Wuhu Decoction; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4; miR-182-5p; NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; interleukin-1 β

支气管哮喘(bronchial asthma, BA)是儿童时期最常见的慢性呼吸系统疾病之一,近几年本病的发病率在全球呈现逐年上升趋势^[1]。BA严重影响患儿

身心健康,并会给家庭和社会造成沉重负担。近年来,我国儿童 BA 诊治取得巨大进展,但治疗效果有限^[2],病毒感染导致的 BA 急性发作是造成儿童住院

的主要原因^[3]。BA 的病理特征为慢性气道炎症以及气道高反应性(airway hyper reactivity, AHR)^[2]。研究发现,BA 发病与氧化应激异常密切相关^[4]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX4)负责活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成,是加重氧化应激的重要蛋白分子,而 ROS 过度积累则会进一步导致细胞功能紊乱^[5]。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体是引发气道上皮细胞炎症反应的经典蛋白^[6]。在细胞氧化应激过程中,ROS 失控性增加导致 NLRP3 小体激活^[7-8],激活的 NLRP3 将下游无活性的前体白细胞介素-1 β (pro-interleukin-1 β , pro-IL-1 β)变为有活性的白细胞介素(interleukin, IL)-1 β ,从而发挥炎症效应^[8]。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一种内源性非编码 RNA^[9],通过抑制靶点信使 RNA(message RNA, mRNA)介导的目的蛋白翻译过程发挥作用^[10]。近期研究表明,miRNA 可参与细胞生命周期的多个阶段,对 BA 等慢性疾病的发生发展有重要作用^[11]。miR-182-5p 是与 NOX4 mRNA 密切相关的一类 miRNA,影响着呼吸系统相关疾病的发生发展^[12]。目前,吸入性糖皮质激素和 β_2 受体激动剂是 BA 发作时常用的缓解药物,但对激素抵抗型患儿的治疗效果不佳^[13]。

中医治疗小儿 BA 历史悠久,临床疗效确切且不良反应较少,在防治哮喘方面独具特色^[14]。名方五虎汤可用于治疗小儿痰哮、胎前咳嗽等多种疾病^[15]。前期实验证明,五虎汤及其加减方具有改善气道炎症、缓解气道重塑、调控 miRNA 表达的诸多作用,并证明其可能通过干预 miRNA21a-5p 介导的信号转导及转录活化因子 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)通路的变化改善哮喘小鼠气道炎症^[16-18]。目前,针对 miR-182-5p 的研究仍处于初始阶段,中医药调控 miR-182-5p 的研究较少。因此,本研究基于既往实验成果,旨在研究五虎汤对 miR-182-5p 的调控作用,进一步明确以 NOX4/NLRP3/IL-1 β 为代表的氧化应激-炎症反应通路在 BA 疾病中的重要作用,揭示五虎汤治疗 BA 的可能作用靶点,补充中医药治疗 BA 的现代科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性 Balb/c 小鼠 42 只,6 周龄,体质量(21.1 \pm 1.0) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[动物许可证号:SCXK(湘)2021-0002],饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心:环境湿度 40%~60%,温度 19~23 $^{\circ}\text{C}$,保持正常的明暗交替及自由进食、饮水。本实验已获湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(编号:ZYFY20220615-21)。

1.2 主要药品及试剂

屋尘螨(北京博蕾德生物科技有限公司,批号:XPB91D3A2.5);聚肌胞苷酸、mmu-miR-182-5p agomir、MicroRNA Agomir negative control(美国 Med-ChemExpress 公司,批号:HY-107202、HY-R02701A、HY-R04602A);山羊抗兔二抗、NOX4 兔多克隆抗体、IL-1 β 兔多克隆抗体、NLRP3 兔多克隆抗体、 β -actin 兔多克隆抗体、增强型 RIPA 裂解液、超敏 ECL 化学发光即用型底物(武汉博士德生物,批号:BA1055、BM4135、A00101、BA3677、BA2305、AR0102-100、AR1171);预染标准蛋白、PBS 缓冲液(瑞典麦迪逊加公司,批号:N6616、PBS-1050);HE 染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:C0105S);Masson 三色染色试剂盒、无菌无酶水(北京兰杰科技有限公司,批号:BL1059B、BL510B);吐温-20(北京索莱宝科技有限公司,批号:T8220);超纯总 RNA 提取试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司,批号:5003050);NovoStart[®]SYBR 高灵敏度 SYBR 荧光定量 PCR 预混液、NovoScript[®]Plus 全能型第一链 cDNA 合成预混液(苏州近岸蛋白科技股份有限公司,批号:E099-01A、E047-01B)。

1.3 主要仪器

台式高速冷冻离心机(长沙湘锐离心机有限公司,型号:TGD-22MC);电子分析天平(美国奥豪斯公司,型号:AX223ZH);化学发光系统(美国伯乐生命科学产品有限公司,型号:CheemiDoc XRS+Imager);垂直电泳仪[韦克斯科技(北京)有限公司,型号:WIX-miniPRO4];酶标检测仪(美国铂金埃尔默股份有限公司,型号:Enspire);紫外可见分光光度计(日

本岛津公司,型号:UV1800);荧光定量 PCR 仪(德国艾本德股份公司,型号:Realplex2)。

1.4 五虎汤的制备

根据前期相关实验的最佳疗效^[19],得出药物剂量为:麻黄 2.4 g,苦杏仁 6.0 g,生石膏 9.0 g,生甘草 2.4 g,细茶叶 4.8 g(处方为 5~6 岁儿童剂量)。根据《药理学实验方法》^[20]中记载的药物计算公式,参照 5~6 岁儿童临床剂量折合 20 g 小鼠等效剂量为 $[(24.6 \text{ g}/20 \text{ kg}) \times 9.1 \times 0.02 = 0.22 \text{ g/d}]$ 。取麻黄置于提取罐中先煎煮,药汁去沫后加入其他药物,煎煮 0.5 h,待药液浓缩至大约 20 mL 时滤出药液;再向药渣中加入纯水,第二次煎煮 0.5 h,待药液约 20 mL 时滤出,合并 2 次滤液再次过滤后,浓缩至约 20 mL,生药浓度 1.23 g/mL,置于 4 °C 保存待用。五虎汤药材均购自湖南中医药大学第一附属医院门诊中药房。

1.5 其他药物的制备

致敏工作液:将屋尘螨制剂干粉溶于 PBS 液体中,再将溶液稀释到 0.5 mg/mL,待其完全溶解后使用。激发工作液:将聚肌胞苷酸制剂溶于 PBS 中,将混合液体按照 1 mg:2 mL 进行稀释,现配现用。miR-182-5p 干预试剂:根据试剂说明书要求,将 mmu-miR-182-5p agomir、MicroRNA Agomir negative control 试剂干粉溶于 DEPC 水中,配制成 5 pmol/ μL 的工作液,分装后于 -20 °C 冰箱中保存。

2 方法

2.1 分组与给药方法

42 只小鼠适应性喂养 1 周,根据体质量随机选取 6 只作为空白组(A 组),余 36 只为造模组。根据既往造模方法^[21],制定急性 BA 小鼠模型:将造模组小鼠适应性喂养结束后定为实验第 0 天,分别于实验第 0、7、14 天向造模组小鼠腹腔注射致敏工作液 0.1 mL(0.5 mg/mL)进行致敏。自实验第 21 天起,每日在小鼠鼻腔内滴注聚肌胞苷酸激发工作液 40 μL (0.5 mg/mL)进行激发,连续干预 3 d。当小鼠呈现出烦躁不安、频繁抓鼻,呼吸加快、程度加深,或静伏于一处、弓背,严重者出现颈部前伸、胸部内缩,呈现类似喘息样动作,可判定造模成功^[22]。将造模成功后

的小鼠随机分为 6 组:模型组(B 组)、miR-182-5p agomir 组(C 组)、MicroRNA Agomir negative control 组(D 组)、五虎汤+miR-182-5p agomir 组(E 组)、五虎汤+MicroRNA Agomir negative control 组(F 组)、五虎汤组(G 组),每组 6 只。

根据既往研究的给药方法^[23],自实验第 17 天开始进行药物干预,自实验第 21 天起调整给药时间为激发开始前 3 h,干预方法如下:A、B 组每日灌胃纯水 0.4 mL+鼻腔滴注 DEPC 20 μL ;C、D 组每日灌胃等体积纯水,鼻腔分别滴注等量 miR-182-5p agomir、MicroRNA Agomir negative control;E、F 组每日灌胃等量五虎汤,鼻腔分别滴注等量 miR-182-5p agomir、MicroRNA Agomir negative control;G 组每日灌胃等量五虎汤+鼻腔滴注等量 DEPC。以上干预 1 次/d,连续干预 7 d。最后一次激发/给药 24 h 后处死小鼠并取材。

2.2 肺组织标本提取及病理染色

造模给药并完成行为学观察后,断颈处死小鼠,迅速提取小鼠肺组织,置于多聚甲醛中固定,包埋、切片、脱蜡、水化、HE 染色/Masson 染色、脱水、封片等处理后镜下观察。

2.3 Western blot 检测肺组织 NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白的表达

称取适量肺组织,配制裂解工作液,按照 100 mg:1 mL 的比例进行裂解,随后离心取上清,按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书要求进行蛋白定量,随后加入缓冲液进行蛋白变性;配制好 10% 电泳凝胶依次上样,以 80 V 电压电泳 30 min 后,切换至 120 V 电泳直至结束;取出电泳凝胶,裁剪大小合适的 PVDF 膜,按照 300 mA 恒定电流转膜 30 min。转膜结束后,使用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 清洗 1 次, 10 min 后加入配制好的一抗稀释液:兔多克隆抗体 NOX4(1:1 000)、NLRP3(1:1 000)、兔多克隆抗体 IL-1 β (1:1 000)、兔多克隆抗体 β -actin(1:10 000), 4 °C 缓慢摇床孵育过夜。第二天, TBST 清洗 3 次, 10 min/次,加入配制好的二抗稀释液,室温孵育 1 h,再次 TBST 清洗 3 次, 10 min/次。清洗完毕后,使用 ECL 化学发光液,在化学发光系统上曝光操作,使用 ImageJ 软件对图像进行灰度分析。

2.4 qPCR 法检测小鼠肺组织 miR-182-5p 表达

称取适量肺组织,加入 RNA 提取液,按照试剂盒说明书进行 RNA 提取,沉淀、洗涤、干燥后,进行浓度测定。根据逆转录试剂盒说明,配制 20 μL 反应体系于 PCR 仪上进行逆转录。将 cDNA 根据试剂盒说明,配制反应体系,并加入相应上下游引物,于荧光定量 PCR 仪上进行扩增。使用 U6 作为内参对照,使用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算表达量。引物序列详见表 1。

2.5 统计学分析

本研究采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布且方差齐则以“ $\bar{x}\pm s$ ”描述,所有数据图表均采用 Prism 10.6.1 绘制而成。组间比较采用单因素方差分析(*one-way ANOVA*),进一步两两比较用 *LSD* 法,若指标不符合正态分布或方差不齐,则采用 *Kruskal-Wallis H* 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠一般行为学表现比较

A 组小鼠干预前后行为学改变不明显,饮水、进食正常,呼吸平稳,无挠鼻、喘息等表现,体质量增长正常。与 A 组相比,B 组小鼠可见频繁挠鼻、喷嚏,部分存在喘息,腹肌抽动,甚至口唇青紫,静卧不动等提示为 BA 急性发作的表现,随着干预时间增加,小鼠口唇发绀更为明显,皮毛光泽度下降,动作缓慢等。与 B 组相比,C、F、G 组小鼠行为学表现好转,偶有挠鼻、呼吸频率减慢,无喘息、缺氧表现;E 组小鼠行为学表现改善更加明显,呼吸频率明显减慢,呼吸尚平稳;D 组行为无明显改善,小鼠精神萎靡,行动迟缓,呼吸频率快。与 C 组相比,D 组小鼠行为学改变明显加重。与 E 组相比,F、G 组小鼠行为学改变

加重,偶有挠鼻,呼吸频率轻度加快。与 F 组相比,G 组小鼠行为学表现无明显差异。

3.2 各组小鼠肺组织 HE 染色比较

A 组肺组织切片支气管及肺泡完整,周围未见炎症细胞浸润及肺间质水肿。与 A 组相比,B 组支气管周围广泛炎症细胞浸润,有较广面的肺泡出血和支气管间质水肿。与 B 组相比,C、F、G 组小鼠的肺组织炎症细胞浸润减少,间质水肿不同程度吸收;E 组肺组织病理改变更加明显,仅可见支气管周围少量炎症细胞浸润;D 组则未见以上变化,仍见较多炎症细胞。与 C 组相比,D 组炎症细胞和支气管间质水肿较严重。与 E 组相比,F、G 组小鼠支气管周围可见部分混合性炎症细胞浸润,支气管间质轻度水肿。与 F 组相比,G 组小鼠病理表现未见明显差异。详见图 1。

3.3 各组小鼠肺组织 Masson 染色比较

A 组气道及血管下胶原沉积不明显。与 A 组相比,B 组中可见血管及支气管下方大量的胶原纤维沉积。与 B 组相比,C、F、G 组小鼠胶原纤维沉积明显减少,E 组改变则更为明显,仅有少量胶原纤维沉积表现;D 组沉积范围则无明显减少,仍有较多纤维沉积。与 C 组相比,D 组胶原纤维沉积面积较大。与 E 组相比,F、G 组小鼠沉积范围较大;与 F 组相比,G 组小鼠胶原纤维沉积无明显差异。详见图 2。

3.4 各组小鼠肺组织 NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达比较

与 A 组相比,B 组 NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平均升高($P<0.05$);与 B 组相比,C、E、F、G 组 NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平均降低($P<0.05$, $P<0.001$)。与 C 组相比,D 组 NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与 E 组相比,F、G 组 NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primer Sequences for qPCR

引物名称	引物序列(5'-3')	长度/bp
U6	正向:CTCGCTTCGGCAGCACA 反向:AACGCTTCACGAATTTGCGT	75
mmu-miR-182-5p	正向:ACACTCCAGCTGGGTTTGGAATGGTAGAACTC 反向:CTCAACTGCTGCTGGAGTCGCAATTCAGTTGAGCGGTGTGA	69

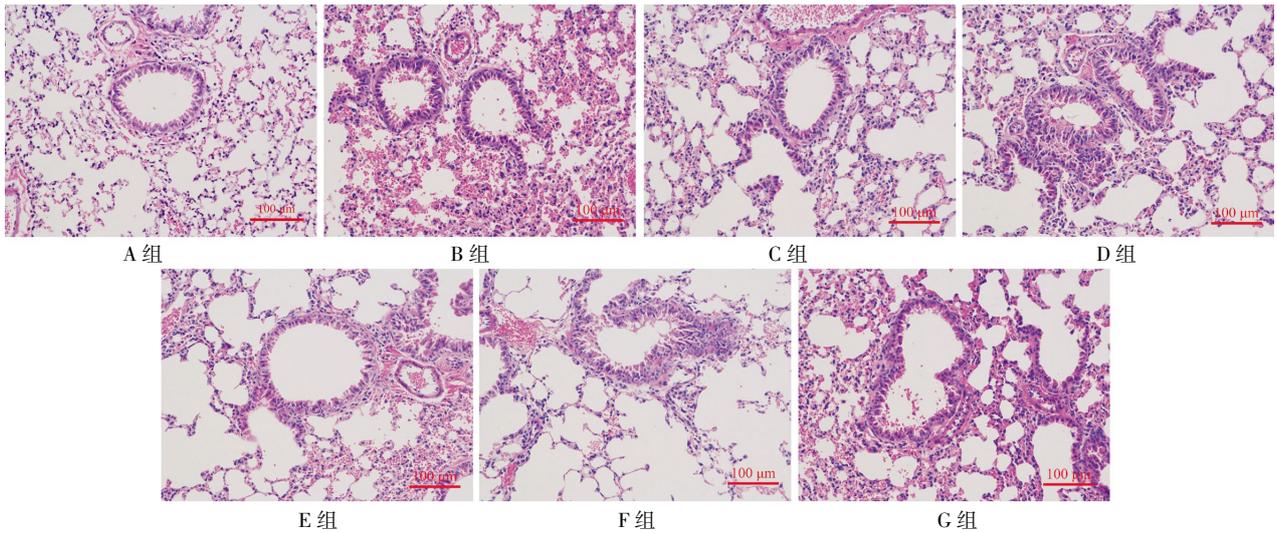


图1 五虎汤对各组小鼠肺组织气道炎症的影响(HE,×200)

Fig.1 Effects of Wuhu Decoction on airway inflammation in lung tissues of mice in different groups (HE staining, ×200)

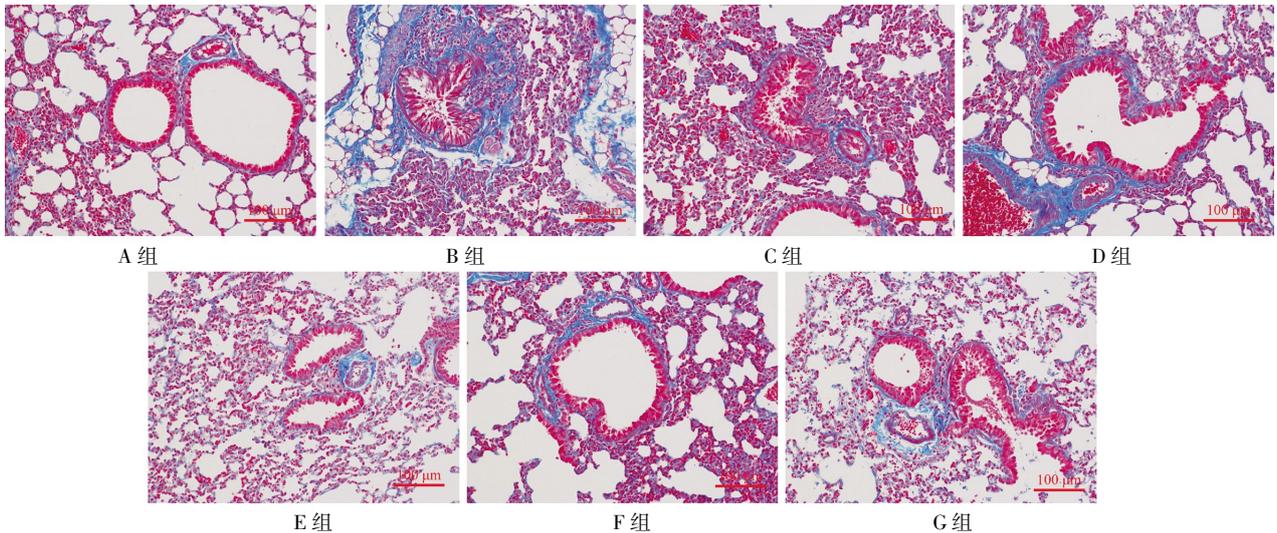


图2 五虎汤对BA小鼠肺组织气道胶原纤维沉积的影响(Masson,×200)

Fig.2 Effects of Wuhu Decoction on airway collagen fiber deposition in lung tissues of mice in different groups (Masson staining, ×200)

注:蓝色部分为胶原纤维。

与F组相比,G组NOX4,NLRP3,IL-1β蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图3—4。

3.5 各组小鼠肺组织miR-182-5p表达比较

与A组相比,B组miR-182-5p表达水平降低($P<0.05$)。与B组相比,C、E、F、G组miR-182-5p表达水平上升($P<0.05, P<0.001$)。与C组相比,D组miR-182-5p表达水平降低($P<0.05$)。与E组相比,F、G组miR-182-5p表达水平降低($P<0.05$)。与F组相比,G组miR-182-5p表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图5。

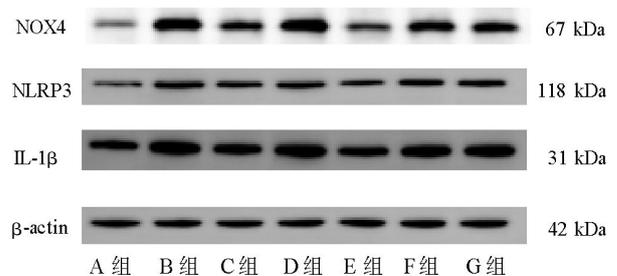


图3 各组小鼠肺组织NOX4、NLRP3、IL-1β蛋白电泳图

Fig.3 Western blot analysis of NOX4, NLRP3, and IL-1β protein expression in lung tissues of mice in different groups

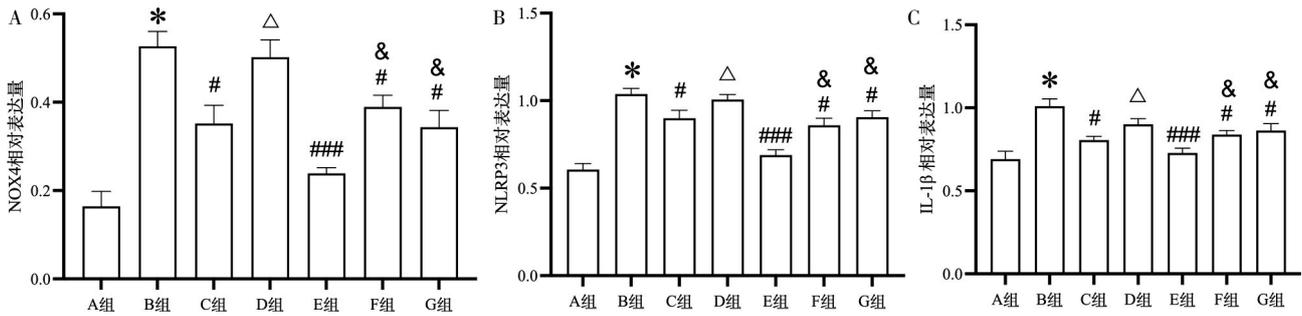


图4 五虎汤对 BA 小鼠肺组织 NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig.4 Effects of Wuhu Decoction on NOX4, NLRP3, and IL-1 β protein levels in lung tissues of BA mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

注:与 A 组相比,* $P<0.05$;与 B 组相比,# $P<0.05$,### $P<0.001$;与 C 组相比,[△] $P<0.05$;与 E 组相比,& $P<0.05$ 。

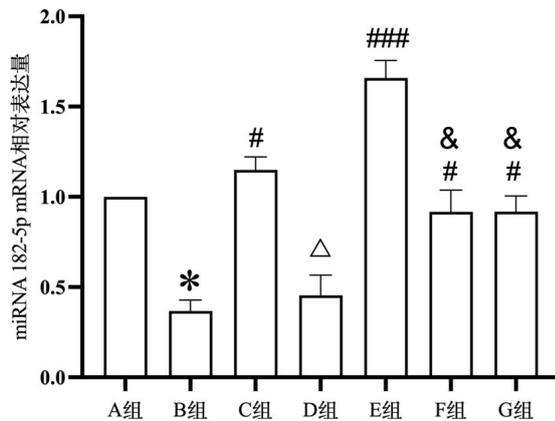


图5 五虎汤对 BA 小鼠肺组织 miR-182-5p 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig.5 Effects of Wuhu Decoction on miR-182-5p expression in lung tissues of BA mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

注:与 A 组相比,* $P<0.05$;与 B 组相比,# $P<0.05$,### $P<0.001$;与 C 组相比,[△] $P<0.05$;与 E 组相比,& $P<0.05$ 。

4 讨论

BA 是儿童期常见的慢性呼吸系统炎症疾病,过敏原、感染等刺激源易诱发其急性发作,严重影响患儿的生长发育、学习及运动功能^[24]。尘螨是儿童 BA 最主要的致敏原,85% 以上的过敏性哮喘与尘螨过敏相关^[25],而病毒感染是诱发其急性发作的重要因素^[26]。氧化应激-炎症反应通路是 BA 研究的核心,控制气道炎症为治疗关键。NOX4 作为 ROS 生成的关键催化剂,与 BA 上皮细胞纤毛运动、平滑肌及成纤维细胞分化密切相关,并参与 BA 的气道重塑与炎症进程^[27]。BA 小鼠模型研究证实,NOX4 与 IL-13、IL-4 等炎症因子表达趋势一致,抑制 NOX4 可显著改善气道重塑及炎症^[28]。

BA 上皮细胞炎症反应涉及多条信号通路,研究表明,NLRP3 作为主要炎症小体之一,在先天免

疫中发挥重要作用,其过度激活可以导致组织损伤,并加重卵清蛋白诱导的过敏性哮喘小鼠模型的 2 型免疫炎症反应,加重气道炎症表现^[29]。氧化应激过程是 NLRP3 激活的关键驱动因素,研究发现,NOX4 与 NLRP3 激活存在明确的相关性^[30]。ROS 可诱导 NLRP3 小体激活,使其中的关键效应蛋白胱天蛋白酶-1 活化,从而将 pro-IL-1 β 剪切转化为有活性的 IL-1 β ,后者分泌至细胞外与白细胞介素-1 受体 1 型(interleukin-1 receptor type 1, IL-1 R1)结合,招募 IL-1R 辅助蛋白激活下游信号,启动包括 Toll 样受体介导的核因子 κ B 通路在内的炎症基因表达,放大炎症反应^[31]。同时,IL-1 β 可激活嗜酸性粒细胞合成主要碱性蛋白拮抗 M2 受体,导致乙酰胆碱过量产生,诱导平滑肌收缩并加重 AHR^[32]。在激素抵抗的重症 BA 患者中,NLRP3、IL-1 β 高表达会加剧气道中性粒细胞炎症,抑制 NLRP3 活化可明显缓解 BA 症状^[33]。

miRNA 作为非编码 RNA 家族成员,可以通过结合 mRNA 3' 端介导其翻译抑制,是疾病调控的重要靶点^[34]。研究表明,miR-182-5p 在 BA 体内外模型中均存在差异表达,外源性激活 miR-182-5p 可改善 BA 小鼠肺组织氧化应激及气道炎症,显著降低 NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达及 ROS 含量,为 BA 的 miRNA 靶向治疗提供理论依据^[35]。本研究基于真实世界尘螨致敏背景,采用屋尘螨致敏联合病毒类似物聚肌胞苷酸激活小鼠 Toll 样受体 3 模拟呼吸道感染,构建 BA 急性发作小鼠模型^[36]。造模成功后,小鼠出现喘息、腹肌抽动、唇口发绀等典型表现,HE 染色显示炎症细胞浸润,Masson 染色提示胶原纤维沉积;经 miR-182-5p 激动剂干预后,上述症状及病理改变均显著改善。MicroRNA Agomir nega-

tive control 制剂是进行 miRNA 激动实验的标准对照试剂,通过随机非同源序列排除脂质载体及非特异性结合干扰^[37],证实了 miR-182-5p 激动剂的特异性作用。

中医学对儿童 BA 的认识始于《素问·通评虚实论篇》“乳子中风热,喘鸣肩息”,认为其发病为内外因共同作用所致。因小儿特殊的生理病理特点,故 BA 的发病及治疗与成人存在明显差异,历代治喘名家高度重视夙根伏痰、伏火、伏风等内在儿童 BA 中的作用,并认为风、寒、火等外邪侵袭引动伏痰为 BA 急性发作的主要原因^[38]。现代医家认为,病毒感染作为一种时行外邪侵袭人体后常迅速化热入里,BA 发作的急性期常表现为痰饮与邪热搏结于肺及气道,由内至外呈现一派热象^[39]。五虎汤具有宣肺平喘、清热化痰的功效。方中石膏为君,清泄肺热,麻黄宣肺平喘,苦杏仁宣降肺气助平喘,细茶叶清热解毒化痰,甘草调和诸药。现代药理学证实,五虎汤具有抗炎、降低气道反应性、抑制气道重塑及调控 miRNA 表达的作用,但其具体机制尚未完全明确^[40]。

本研究结果显示,miR-182-5p 激动剂与五虎汤均能有效缓解 BA 急性发作小鼠的行为学表现,改善气道炎症及重塑。与模型小鼠相比,五虎汤干预的小鼠肺组织 NOX4、NLRP3、IL-1 β 蛋白含量降低,miR-182-5p 表达升高,提示五虎汤可能通过激活 miR-182-5p 抑制 NOX4/NLRP3/IL-1 β 通路发挥作用;且五虎汤+miR-182-5p agomir 联合干预效果更显著。

综上,本实验证实 miR-182-5p 调控的 NOX4/NLRP3/IL-1 β 通路在 BA 小鼠中具有关键作用,五虎汤可能通过激活 miR-182-5p 减少肺组织炎症细胞浸润及胶原纤维沉积,抑制 NOX4 介导的 NLRP3/IL-1 β 炎症通路激活,降低相关蛋白表达,从而发挥治疗效果。本研究的局限性在于未开展体外实验以排除体内其他因素干扰,后续将通过细胞实验进一步明确机制。

参考文献

[1] LICARI A, BRAMBILLA I, MARSEGLIA A, et al. Difficult vs. severe asthma: Definition and limits of asthma control in the pediatric population[J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2018, 6: 170.

[2] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中华儿科杂志编辑委员会,

中国医药教育协会儿科专业委员会, 等. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2025)[J]. *中华儿科杂志*, 2025, 63(4): 324-337.

- [3] MANTI S, MAGRI P, DE SILVESTRI A, et al. Epidemiology of severe asthma in children: A systematic review and meta-analysis[J]. *European Respiratory Review*, 2024, 33(174): 240095.
- [4] KLENIEWSKA P, PAWLICZAK R. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 94: 100-108.
- [5] XUAN A L, YANG M, XIA Q, et al. Downregulation of NOX4 improves airway remodeling and inflammation by the TGF- β 1-Smad2/3 pathway in asthma[J]. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 2023, 69(9): 201-206.
- [6] WU Y X, DI X, ZHAO M, et al. The role of the NLRP3 inflammasome in chronic inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Immunity, Inflammation and Disease*, 2022, 10(12): e750.
- [7] PANEK I, LICZEK M, GABRYELSKA A, et al. Inflammasome signalling pathway in the regulation of inflammation—its involvement in the development and exacerbation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 2023, 40(4): 487-495.
- [8] THEOFANI E, SEMITEKOLOU M, MORIANOS I, et al. Targeting NLRP3 inflammasome activation in severe asthma[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8(10): 1615.
- [9] KALLA R, VENTHAM N T, KENNEDY N A, et al. microRNAs: New players in IBD[J]. *Gut*, 2015, 64(3): 504-513.
- [10] FAN M Z, SONG W J, HAO Z, et al. Construction of lncRNA-miRNA-mRNA regulatory network in severe asthmatic bronchial epithelial cells: A bioinformatics study[J]. *Medicine*, 2023, 102(35): e34749.
- [11] CHEN L, HEIKKINEN L, WANG C L, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2019, 20(5): 1836-1852.
- [12] MA C H, LIU K, WANG F, et al. Neutrophil membrane-engineered Panax ginseng root-derived exosomes loaded miRNA 182-5p targets NOX4/Drp-1/NLRP3 signal pathway to alleviate acute lung injury in sepsis: Experimental studies[J]. *International Journal of Surgery*, 2024, 110(1): 72-86.
- [13] 洪建国, 鲍一笑. 重视儿童支气管哮喘的规范化诊治[J]. *中华儿科杂志*, 2016, 53(3): 161-162.
- [14] 王娜. 白金平喘方联合雾化吸入治疗小儿哮喘发作期(热哮证)的临床观察[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [15] 刘志平, 苏坤, 李娜, 等. 经典名方五虎汤的关键信息考证与现代临床应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(18): 200-207.
- [16] 杨婷, 屈波, 董晓斐. 哮喘宁对哮喘豚鼠 IL-6、TNF- α 的调节作用研究[J]. *湖南中医杂志*, 2020, 36(7): 144-146.

- [17] 丁 伊, 王孟清. RSV 诱导树突细胞自噬对哮喘小鼠气道反应性的影响及五虎汤的干预作用[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 59-65.
- [18] 刘靖雷, 王孟清, 罗银河, 等. 基于 miRNA-21a-5p/STAT3 轴探讨五虎汤对呼吸道合胞病毒诱导的外泌体诱发哮喘的影响[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(14): 3163-3170.
- [19] 陈罗枚. RSV 诱导的树突细胞自噬对哮喘小鼠气道重塑的影响及五虎汤干预作用[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [20] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理学实验方法[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1991: 178-179.
- [21] 步美玲, 王金荣, 冯 梅, 等. FOXM1 在呼吸道病毒感染致哮喘小鼠急性发作中的机制[J]. 山东大学学报(医学版), 2023, 61(6): 1-9.
- [22] 邓羿馥, 曾 洁, 谢 静, 等. 五虎汤通过干预 P53/NF- κ B 串扰改善幼龄哮喘小鼠气道炎症机制研究[J]. 陕西中医, 2024, 45(12): 1609-1613.
- [23] YANG Y P, HUANG G D, XU Q, et al. miR-146a-5p attenuates allergic airway inflammation by inhibiting the NLRP3 inflammasome activation in macrophages[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2022, 183(9): 919-930.
- [24] LI E, MORGAN KNIGHT J, WU Y F, et al. Airway mycosis in allergic airway disease[J]. Advances in Immunology, 2019, 142: 85-140.
- [25] 胡 行. 屋尘螨诱导的内质网应激通过激活 TBK1 促进哮喘黏液高分泌[D]. 泸州: 西南医科大学, 2023.
- [26] ZHENG X Y, XU Y J, GUAN W J, et al. Regional, age and respiratory secretion-specific prevalence of respiratory viruses associated with asthma exacerbation: A literature review [J]. Archives of Virology, 2018, 163(4): 845-853.
- [27] WANG D X, LI J Y, LUO G, et al. Nox4 as a novel therapeutic target for diabetic vascular complications[J]. Redox Biology, 2023, 64: 102781.
- [28] ZHOU T, LI S N, YANG L H, et al. Correction for: microRNA-363-3p reduces endothelial cell inflammatory responses in coronary heart disease via inactivation of the NOX4-dependent p38 MAPK axis[J]. Aging, 2022, 14(3): 1589.
- [29] CAI X L. NOD2-NLRP3 axis and asthma[J]. Journal of Asthma and Allergy, 2025, 18: 769-777.
- [30] ZHANG D D, JI P M, SUN R, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates LPS-induced chronic renal injury by inhibiting NOX4-NLRP3 signaling in mice[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 150: 112936.
- [31] GARLANDA C, DI CEGLE I, JAILLON S. IL-1 family cytokines in inflammation and immunity[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2025, 22(11): 1345-1362.
- [32] HUANG C, WANG J, ZHENG X D, et al. Commensal bacteria aggravate allergic asthma via NLRP3/IL-1 β signaling in post-weaning mice[J]. Journal of Autoimmunity, 2018, 93: 104-113.
- [33] WILLIAMS E J, NEGEWO N A, BAINES K J. Role of the NLRP3 inflammasome in asthma: Relationship with neutrophilic inflammation, obesity, and therapeutic options[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2021, 147(6): 2060-2062.
- [34] XIAO Y L, ZHU H, LEI J H, et al. miR-182/Sestrin2 affects the function of asthmatic airway smooth muscle cells by the AMPK/mTOR pathway[J]. Journal of Translational Internal Medicine, 2021, 11(3): 282-293.
- [35] WANG Z G, SONG Y L, JIANG J Z, et al. microRNA-182-5p attenuates asthmatic airway inflammation by targeting NOX4[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 853848.
- [36] 杨上松, 张庭瑞, 周 泽, 等. 聚肌胞苷酸诱导急性肺损伤湿热证小鼠模型的建立及评价[J]. 中国中西医结合杂志, 2025, 45(2): 220-228.
- [37] WANG H Y, JIANG Y F, PENG H G, et al. Recent progress in microRNA delivery for cancer therapy by non-viral synthetic vectors[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015, 81: 142-160.
- [38] 李梦雯. 麻杏石甘汤干预哮喘气道炎症的效应机制及配伍研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [39] 周 智, 王孟清, 罗银河, 等. 五虎汤抑制 miRNA 以改善病毒诱发的哮喘气道炎症[J]. 长春中医药大学学报, 2024, 40(2): 160-166.
- [40] 周 智, 王孟清, 罗银河, 等. 五虎汤对呼吸道合胞病毒诱导的外泌体引起哮喘小鼠气道炎症的干预作用研究[J]. 中国中西医结合儿科学, 2025, 17(5): 402-409, 461.

(本文编辑 田梦妍)