

·ARTICLES·

·论 著·

miR-16-5p 调控 TXNIP 抑制 NLRP3 信号轴缓解哮喘大鼠气道炎症

余巍巍¹, 余明德², 孙天寿¹, 陈旭¹, 王明东¹, 张饶议¹, 方欢欢¹, 李燕枚¹, 陈美宇¹

(1. 广西壮族自治区南溪山医院呼吸与危重症医学科, 桂林 541002; 2. 西安交通大学医学部, 西安 710061)

[摘要] 目的: 哮喘是一种慢性气道炎症性疾病。硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)是一种硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)结合蛋白, 参与调控炎症反应和细胞凋亡。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)炎症小体是炎症应答的关键环节。微RNA(microRNAs, miRNAs)是一类非编码的小分子RNA, 前期研究发现哮喘大鼠支气管上皮细胞中*miR-16-5p*的表达水平显著下调。然而, *miR-16-5p*是否通过靶向TXNIP调控NLRP3信号通路, 进而影响哮喘气道炎症, 目前仍不清楚。本研究旨在探讨*miR-16-5p*调控TXNIP抑制NLRP3信号轴缓解卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的哮喘大鼠气道炎症的作用机制。**方法:** 雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠经1周适应性喂养后, 随机分为对照组(control)、模型组(model)、*miR-16-5p* mimic组、NC mimic组、*miR-16-5p* inhibitor组和NC inhibitor组, 每组6只。第1、8、15天采用10% OVA和10%氢氧化铝混合液致敏, 第21天后给予4% OVA雾化吸入激发哮喘, 连续1周。第21天起, 在雾化前1 h分别经气管注射20 μ g/0.1 mL *miR-16-5p* mimic、NC mimic、*miR-16-5p* inhibitor和NC inhibitor, 每天1次, 共7次。实验结束后, 收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和肺组织。采用实时反转录聚合酶链反应(real-time reverse transcription PCR, real-time RT-PCR)检测*miR-16-5p*表达; 双荧光素酶报告实验验证靶向结合关系; 显微镜下观察BALF中炎症细胞数量; 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)水平; 苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色观察肺组织形态变化; 过碘酸雪夫(periodic acid-Schiff, PAS)染色检测杯状细胞; 马松(Masson)染色观察支气管胶原沉积; 免疫组织化学染色检测TXNIP和NLRP3蛋白表达; 蛋白质印迹法检测TXNIP、NLRP3、含CARD结构域的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cleaved cysteine-aspartic protease-1, cleaved-caspase-1)和IL-1 β 蛋白表达。**结果:** *miR-16-5p*在哮喘大鼠模型中表达下调。荧光素酶报告实验表明*miR-16-5p*可靶向调控TXNIP。与对照组相比, 模型组大鼠表现为肺组织受损, 气道黏液和杯状细胞增生, 胶原大量沉积; BALF中炎症细胞数量增加; IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和MCP-1表达水平均明显升高(均 $P<0.05$); 肺组织中TXNIP、NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、IL-1 β 蛋白水平均明显升高(均 $P<0.05$)。与模型组相比, 过表达*miR-16-5p*后哮喘大鼠的肺组织病理评分有所改善, 但差异无统计学意义($P>0.05$); 杯状细胞、胶原沉积和炎症细胞数量均显著减少; IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和MCP-1水平均显著降低(均 $P<0.05$); TXNIP、NLRP3、cleaved-caspase-1和IL-1 β 蛋白表达水平均显著降低(均 $P<0.05$)。相反, *miR-16-5p* inhibitor组大鼠的气道炎症反应进一步加重。**结论:** *miR-16-5p*可能通过负调控TXNIP, 进而抑制NLRP3炎症小体活化, 从而缓解哮喘大鼠气道炎症。

[关键词] 哮喘; 气道炎症; *miR-16-5p*; 硫氧还蛋白相互作用蛋白; NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3

收稿日期(Date of reception): 2025-11-24

第一作者(First author): 余巍巍, Email: SWW7871@163.com, ORCID: 0000-0003-1165-5857; 余明德, Email: smd@stu.xjtu.edu.cn, ORCID: 0009-0002-1361-6317

通信作者(Corresponding author): 陈美宇, 副主任医师, Email: 402433719@qq.com, ORCID: 0009-0006-3693-3509

基金项目(Foundation item): 国家自然科学基金(82060009)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82060009).

开放获取(Open access): 本文遵循知识共享许可协议, 允许第三方用户按照署名-非商业性使用-禁止演绎4.0(CC BY-NC-ND 4.0)的方式, 在任何媒介以任何形式复制、传播本作品(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)。

***miR-16-5p* alleviates airway inflammation in asthmatic rats by regulating TXNIP and suppressing the NLRP3 signaling axis**

SHE Weiwei¹, SHE Mingde², SUN Tianshou¹, CHEN Xu¹, WANG Mingdong¹, ZHANG Raoyi¹,
FANG Huanhuan¹, LI Yanmei¹, CHEN Meiyu¹

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Nanxishan Hospital, Guangxi Zhuang Autonomous Region Resident, Guilin 541002; 2. Department of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT

Objective: Asthma is a chronic inflammatory airway disease. Thioredoxin-interacting protein (TXNIP), a thioredoxin (TRX)-binding protein, is involved in the regulation of inflammatory responses and apoptosis. The NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammasome is a key mediator of inflammatory responses. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs. Previous studies have demonstrated that *miR-16-5p* expression is significantly downregulated in bronchial epithelial cells of asthmatic rats. However, whether *miR-16-5p* regulates the NLRP3 signaling pathway by targeting TXNIP and thereby influences airway inflammation in asthma remains unclear. This study aims to investigate the mechanism by which *miR-16-5p* alleviates ovalbumin (OVA)-induced airway inflammation in asthmatic rats through regulation of TXNIP and suppression of the NLRP3 signaling axis.

Methods: After one week of acclimatization, male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to a control group, model group, *miR-16-5p* mimic group, NC mimic group, *miR-16-5p* inhibitor group, and NC inhibitor group ($n=6$ per group). Rats were sensitized on days 1, 8, and 15 with a mixture of 10% OVA and 10% aluminum hydroxide. From day 21, asthma was induced by inhalation of 4% OVA aerosol for one consecutive week. Beginning on day 21, rats received intratracheal administration of 20 $\mu\text{g}/0.1$ mL *miR-16-5p* mimic, NC mimic, *miR-16-5p* inhibitor, or NC inhibitor, respectively, 1 hour before aerosol challenge once daily for 7 days. At the end of the experiment, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissues were collected. *miR-16-5p* expression was determined by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). Dual-luciferase reporter assays were performed to verify the targeting relationship between *miR-16-5p* and TXNIP. Inflammatory cells in BALF were counted microscopically. Levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Histopathological changes in lung tissues were evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. Goblet cells were assessed using periodic acid-Schiff (PAS) staining, and bronchial collagen deposition was examined by Masson's trichrome staining. Immunohistochemistry was used to detect TXNIP and NLRP3 protein expression. Protein expression levels of TXNIP, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cleaved-cysteine-dependent aspartate-directed protease-1 (cleaved-caspase-1), and IL-1 β were determined by Western blotting.

Results: *miR-16-5p* expression was significantly downregulated in asthmatic rats. Dual-luciferase reporter assays confirmed that TXNIP was a direct target of *miR-16-5p*.

Compared with the control group, rats in the model group exhibited lung tissue injury, airway mucus hypersecretion, goblet cell hyperplasia, and extensive collagen deposition. The number of inflammatory cells in BALF was increased. Levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MCP-1 were significantly elevated ($P<0.05$). In addition, protein expression levels of TXNIP, NLRP3, ASC, cleaved-caspase-1, and IL-1 β in lung tissues were significantly increased (all $P<0.05$). Compared with the model group, overexpression of *miR-16-5p* improved the pathological score of lung tissues in asthmatic rats, although the difference was not statistically significant ($P>0.05$). However, goblet cell hyperplasia, collagen deposition, and inflammatory cell infiltration were significantly reduced. Levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MCP-1 were significantly decreased (all $P<0.05$). Protein expression levels of TXNIP, NLRP3, cleaved-caspase-1, and IL-1 β were also significantly reduced (all $P<0.05$). In contrast, airway inflammatory responses were further aggravated in rats treated with the *miR-16-5p* inhibitor.

Conclusion: *miR-16-5p* may alleviate airway inflammation in asthmatic rats by negatively regulating TXNIP and subsequently suppressing activation of the NLRP3 inflammasome.

KEY WORDS

asthma; airway inflammation; *miR-16-5p*; thioredoxin-interacting protein; NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3

哮喘是一种慢性气道炎症性疾病,其发生与气道慢性炎症、气道高反应、神经信号转导、病毒感染和气道重塑密切相关,但具体发病机制尚未完全阐明^[1]。微RNA(microRNAs, miRNAs)是一类非编码的小分子RNA,是调控炎症、氧化应激、细胞凋亡等过程的关键调节因子,在哮喘等过敏性疾病的诊断、评价中发挥重要的作用。Davis等^[2]报道*miR-16-5p*可能作为严重哮喘的生物标志物,通过调节气道平滑肌表型,进而影响气道重塑。

硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)是一种硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)结合蛋白,可调节细胞内的氧化还原平衡,诱发氧化应激,从而参与炎症反应和细胞凋亡的调控^[3]。在哮喘的炎症机制中,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)炎症小体是一种蛋白质复合体,由NLRP3、含CARD结构域的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteine-aspartic protease-1, caspase-1)组成,其激活是炎症应答的关键环节^[4]。当细胞受到刺激时,NLRP3招募ASC,进而招募caspase-1前体,最终形成NLRP3炎症小体。NLRP3炎症小体可进一步激活caspase-1,切割细胞内白细胞介素-1 β 前体(pro-interleukin-1 β , pro-IL-1 β)和白细胞介素-18前体(pro-interleukin-18, pro-IL-18),形成具有活性的白

细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-18并释放到细胞外,促进下游的炎症反应;该过程与过敏性气道炎症的发生、发展密切相关^[5-7]。尽管卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的哮喘模型以Th2型炎症为主要特征,但近年研究^[8]证实NLRP3炎症小体在该模型中被显著激活,参与哮喘的炎症级联反应。例如,OVA激发后,小鼠肺组织中NLRP3、caspase-1及IL-1 β 表达均明显上调,而抑制NLRP3可显著减轻气道炎症和黏液高分泌^[9]。此外,IL-1 β 作为NLRP3下游的关键效应分子,可促进Th2细胞分化及IL-4、IL-5的产生,提示NLRP3信号轴与Th2型炎症存在交互调控。因此,NLRP3炎症小体不仅是先天性免疫的关键节点,亦在过敏性哮喘的病理进程中发挥重要作用。

值得注意的是, TXNIP与NLRP3的相互作用已被证实是激活NLRP3炎症小体的重要机制之一^[10]。TXNIP作为NLRP3炎症小体激活的关键上游分子,在哮喘炎症反应中发挥重要作用。研究^[11]表明, TXNIP可与NLRP3直接结合,促进NLRP3炎症小体的组装与激活,进而诱导IL-1 β 、IL-18等促炎因子的成熟与释放。在过敏性哮喘模型动物中, TXNIP和NLRP3表达均显著上调,而抑制TXNIP/NLRP3通路可有效减轻气道炎症^[12]。已有研究^[13]指出, *miR-16-5p*能够负调控TXNIP的表达,其表达上调可抑制炎症反应,而下调则促进炎症因子释放,但这一关系在哮喘模型中尚未被证实。本课题组前期实验^[14-15]也发现,在哮喘模型大鼠中,支气管上皮细胞内的

miR-16-5p 表达显著降低, 过表达 miR-16-5p 可减轻气道炎症反应、改善肺功能。然而, miR-16-5p 是否通过靶向 TXNIP 调控 NLRP3 信号通路, 进而影响哮喘气道炎症, 目前仍缺乏直接证据。因此, 本研究拟探讨 miR-16-5p 是否通过靶向抑制 TXNIP, 调控 NLRP3 信号轴, 从而缓解哮喘大鼠的气道炎症, 以期对哮喘的机制研究提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 伦理声明

本研究获得广西壮族自治区南溪山医院医学伦理委员会批准(审批号: IRB-2023-100), 并遵循 3R (replacement, reduction, refinement) 原则。

1.2 实验动物

36 只雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (6-8 周龄, 180~200 g, 无特定病原体级), 购自成都达硕实验动物中心[实验动物生产许可证号 SCXK(川)2025-0030, 实验动物使用许可证号 SYXK(川)2024-0189]。所有大鼠以每笼 5 只进行饲养, 允许自由饮水和进食, 并保持在 22~24 °C 环境温度和 55% 相对湿度下, 进行 12 h 光照/暗循环。

1.3 主要试剂与仪器

OVA (grade V, 货号: A5503) 和氢氧化铝粉 (货号: 239186) 均购自美国 Sigma 公司。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 货号: ZC-37624)、IL-1 β (货号: ZC-36391)、IL-6 (货号: ZC-36404) 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1, 货号: ZC-36497) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒均购自上海茁彩生物科技有限公司。NLRP3 (货号: 68102-1-LG) 购自上海全元生物科技有限公司。TXNIP (货号: bs-3897R) 购自北京博奥森生物技术有限公司。HRP 标记的山羊抗兔 IgG (货号: GB23303)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG (货号: GB23301) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。ASC (货号: A16672)、IL-1 β (货号: A20527)、NLRP3 (货号: A5652)、TXNIP (货号: A9342)、 β -actin (货号: AC026) 均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。Cleaved-caspase-1 (货号: AF4005)、生物素化山羊抗兔 IgG (H+L) (货号: S0001) 均购自美国 Affinity 公司。二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: P0009) 购自碧云天生物技术有限公司。全功能酶标仪 MK3 购自美国

ThermoFisher 仪器有限公司, 化学发光凝胶成像仪 5200 购自上海天能科技有限公司。pSI-Check2 载体和 LipoFiter 转染试剂购自汉恒生物科技(上海)有限公司, Dual Luciferase Reporter Gene Assay 试剂盒购自美国 Promega 公司。Total RNA Extraction 试剂盒 (BL1365A) 购自北京兰杰柯科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 动物模型及分组

大鼠随机分为 6 个组 ($n=6$): 对照组, 以等渗盐水代替 OVA 致敏和激发, 实验第 21 天在每次雾化前 1 h, 采用微量注射器经颈部气管注射无菌生理盐水 0.1 mL/次, 每天 1 次, 共 7 次; 模型组, SD 大鼠第 1、8、15 d 分别腹腔内注射 10% OVA 和 10% 氢氧化铝混合液 1.0 mL (OVA 和氢氧化铝各 10 g 加入 100 mL 无菌等渗盐水中) 致敏。于 OVA 致敏后第 21 天开始雾化激发: 将大鼠置于一密闭玻璃容器 (40 cm $\times$ 50 cm $\times$ 60 cm) 中, 给予 4% OVA (4 g OVA 加入 100 mL 无菌等渗盐水中) 雾化吸入 (雾粒直径 3~5 μ m), 30 min/次, 每天 1 次, 共 7 次, 以大鼠出现呼吸加快, 口唇发绀、站立不稳等表现为激发成功。实验第 21 天在每次雾化前 1 h, 采用微量注射器经颈部气管注射无菌生理盐水 0.1 mL/次, 每天 1 次, 共 7 次。miR-16-5p mimic 组、NC mimic 组、miR-16-5p inhibitor 组和 NC inhibitor 组于实验第 21 天起, 在雾化前 1 h 分别经气管注射 20.0 μ g/0.1 mL miR-16-5p mimic、NC mimic、miR-16-5p inhibitor 和 NC inhibitor, 每天 1 次, 共 7 次, 给药方案参考文献[16]中 miRNA 气管内给药的成熟方案。

1.4.2 标本收集

使用异氟烷麻醉大鼠, 然后暴露大鼠颈部气管, 在气管处剪一切口, 插入软管, 将 1.0 mL 生理盐水注入大鼠气管中, 然后缓慢地将液体抽出来, 收集支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 按上述操作重复 3 次。将 BALF 上清液以 3 000 r/min 速度离心 5 min, 保存于 -80 °C 冰箱中。使用过量异氟烷处死大鼠后收集肺组织, 分为两部分, 一部分固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 另一部分保存于 -80 °C 冰箱中。

1.4.3 双荧光素酶报告实验验证 miR-16-5p 与 TXNIP 的靶向结合

通过 TargetScan 数据库 (https://www.targetscan.org/vert_71/) 预测 TXNIP 与 miR-16-5p 的结合位点。构建含有 miR-16-5p 结合位点的 TXNIP 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR) 野生型荧光素酶表达质粒 (WT-TXNIP) 和突变型荧光素酶表达质粒 (Mut-

TXNIP)。然后通过PCR扩增可能与*miR-16-5p*结合的3' UTR,并将其克隆到载体上。对合成的双荧光素酶报告基因质粒进行基因序列比对,测序结果与目标序列一致,说明目标质粒构建成功。将293T细胞接种到96孔板中,培养24 h后,待细胞密度达到70%,更换Opti-MEM培养基并分组如下:WT-TXNIP+NC mimic、WT-TXNIP+*miR-16-5p* mimic、Mut-TXNIP+NC mimic、Mut-TXNIP+*miR-16-5p* mimic。然后使用0.8 mg/mL LipoFiter转染试剂分别进行转染。48 h后,根据说明书检测荧光素酶活性。

1.4.4 BALF 中细胞分类计数

将BALF中的细胞沉淀用PBS重悬,然后置于载玻片上,经晾干、涂片、固定后,用吉姆萨(Giemsa)染色,最后在显微镜下观察白细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞数量。

1.4.5 ELISA 法检测 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 水平

按照ELISA试剂盒说明书检测BALF中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和MCP-1的含量。

1.4.6 苏木精-伊红染色观察肺泡和小支气管组织细胞形态变化

肺组织用4%多聚甲醛溶液固定24 h,然后用石蜡包埋,切成5 μ m厚的切片进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色:先用苏木精染色20 min,再用伊红染色5 min。经脱水、透明、中性树胶封固后,采用显微摄像系统对切片进行图像采集。

1.4.7 过碘酸雪夫染色观察气道黏液和杯状细胞变化

采用过碘酸雪夫(periodic acid-Schiff, PAS)染色法检测大鼠肺组织杯状细胞百分率。取大鼠肺组织,经固定、全自动脱水机梯度脱水、石蜡包埋后切片。切片常规脱蜡至水,经PAS氧化剂氧化5~10 min, Schiff试剂浸染10~20 min,流水冲洗后以苏木精染核1~3 min,盐酸分化、返蓝,梯度乙醇脱水,透明剂透明,中性树胶封固。使用数码三目摄像显微镜采集图像,选取终末细支气管或呼吸性细支气管区域,计数杯状细胞及黏膜上皮细胞数量。杯状细胞百分率=杯状细胞数/黏膜上皮细胞数 $\times$ 100%。

1.4.8 马松染色观察支气管胶原沉积

肺组织脱蜡水化后,使用马松(Masson)复合液浸染5 min,丽春红溶液浸泡10 min,1%磷钼酸浸泡1 min,最后使用苯胺蓝复染5 min,1%冰醋酸冲洗液冲洗1 min。在显微镜下观察支气管周围胶原沉积的情况,计算总管壁面积(total airway wall area, WAt)、气道平滑肌层面积(airway smooth muscle area, WAm)与支气管基底膜周径(perimeter of the basement

membrane, Pbm)的比值。

1.4.9 实时反转录聚合酶链反应检测 *miR-16-5p* 表达

采用实时反转录聚合酶链反应(real-time reverse transcription PCR, real-time RT-PCR)检测大鼠肺组织中*miR-16-5p*的表达水平。按照总RNA提取试剂盒说明书提取大鼠肺组织样本总RNA,使用Hairpin-itTM microRNA 和 U6 snRNA Normalization RT-PCR Quantitation 试剂盒进行反转录及荧光定量检测。以U6 snRNA为内参,反应体系包括5 $\times$ 反转录缓冲液、dNTP、miRNA/U6反转录引物、MMLV反转录及RNA样本,反转录反应程序:26 $^{\circ}$ C 40 min, 42 $^{\circ}$ C 40 min, 85 $^{\circ}$ C 10 min。Real-time RT-PCR使用SYBR Green法,在QuantStudioTM 3实时荧光定量PCR仪上进行,PCR反应程序:95 $^{\circ}$ C 3 min预变性,随后95 $^{\circ}$ C 12 s, 62 $^{\circ}$ C 40 s进行40个循环。引物由苏州吉玛基因股份有限公司提供。采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算*miR-16-5p*的相对表达量。

1.4.10 免疫组织化学染色观察肺组织中 TXNIP 和 NLRP3 表达

将大鼠的肺组织石蜡切片脱蜡水化后,浸入柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0),用微波炉高火加热10 min进行抗原修复。然后使用3%双氧水阻断内源性过氧化物酶活性。滴加山羊血清封闭液,室温孵育20 min;滴加一抗(NLRP3, 1:100; TXNIP, 1:50), 4 $^{\circ}$ C过夜。PBS清洗3次后,分别加入二抗(HRP标记山羊抗兔IgG, 1:100; HRP标记山羊抗小鼠IgG, 1:100), 37 $^{\circ}$ C孵育30 min。最后用3, 3'-二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)显色,苏木精复染3 min,常规脱水、透明、中性树胶封片。每张切片在400倍光镜下,由2名对分组情况设盲的观察者独立分析,随机选取5个不重叠的视野,使用显微摄像系统进行图像采集。采用Halo数据分析系统,以DAB阳性面积指标,计算DAB阳性面积占组织总面积的百分比。

1.4.11 蛋白质印迹法检测肺组织中 TXNIP、NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白水平

用RIPA裂解液提取肺组织样本总蛋白质,离心(4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min离心10 min)后取上清液,用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。蛋白质经过变性、电泳、转膜、封闭后,将PVDF膜放入一抗(ASC, 1:2 000; cleaved-caspase-1, 1:1 000; IL-1 β , 1:2 000; NLRP3, 1:2 000; TXNIP, 1:2 000; β -actin, 1:50 000)中, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。然后将PVDF膜放入二抗[生物素化山羊抗兔IgG(H+L), 1:5 000]中室温孵育2 h。用TBST将PVDF膜清洗3次,每次10 min。最后使用ECL化学发光试剂在化学发光凝胶成像仪

上对条带进行曝光。结果以目的蛋白质的相对表达量表示。以上检测均随机抽取3只大鼠进行。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析。采用 Shapiro-Wilk 法进行正态性检验, Levene 检验方差齐性。正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差检验, 方差齐则用 LSD-*t* 检验, 方差不齐则用 Tamhane's *T*₂ 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-16-5p 在哮喘大鼠中的表达

采用 real-time RT-PCR 检测各组 miR-16-5p 的表达水平。如图 1 所示, 与对照组相比, 模型组的 miR-16-5p 水平显著降低($P<0.001$)。与模型组相比, miR-16-5p mimic 组 miR-16-5p 水平显著升高($P<0.05$), 而 miR-16-5p inhibitor 组 miR-16-5p 水平显著降低($P<0.05$)。结果表明, miR-16-5p 在哮喘模型大鼠中表达下调, 而使用 miR-16-5p mimic 可有效上调其表达, miR-16-5p inhibitor 则进一步抑制其表达。

2.2 miR-16-5p 与 TXNIP 的靶向结合关系

通过 TargetScan 软件预测 TXNIP 与 miR-16-5p 结

合位点, 结果显示 TXNIP 含有 miR-16-5p 的共同潜在结合位点(图 2A)。荧光素酶报告检测结果显示, 与 WT-TXNIP+NC mimic 组相比, WT-TXNIP+miR-16-5p mimic 组的荧光素酶活性明显下降($P<0.001$, 图 2B), 表明两者之间存在结合效应; 突变后, Mut-TXNIP+NC mimic 组和 Mut-TXNIP+miR-16-5p mimic 组差异无统计学意义($P>0.05$, 图 2B), 表明突变成功。

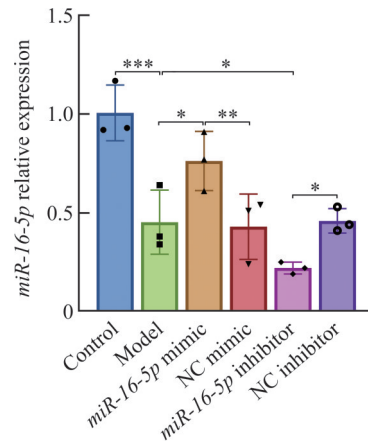
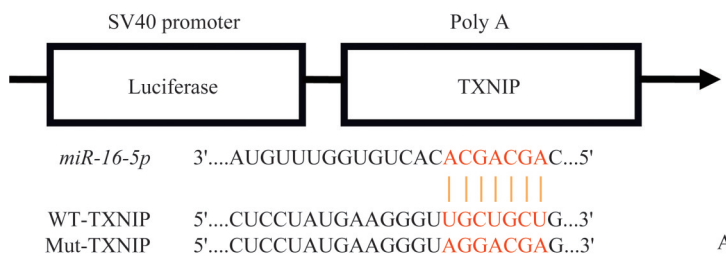


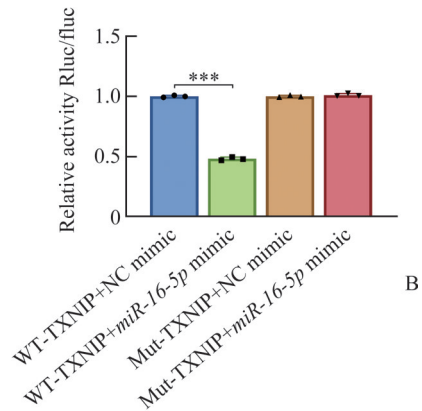
图 1 miR-16-5p 在哮喘大鼠中的表达($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Figure 1 Expression of miR-16-5p in asthmatic rats ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

The expression level of miR-16-5p was detected by PCR. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. NC: Normal control.



A



B

图 2 双荧光素酶报告实验验证 miR-16-5p 和 TXNIP 之间的靶向关系

Figure 2 Dual luciferase reporter assay verified the targeting relationship between miR-16-5p and TXNIP

A: TargetScan predicts that miR-16-5p targets and binds to TXNIP. B: Relative activity of Rluc/fluc ($n=3$). Data are represented as $\bar{x}\pm s$. *** $P<0.001$. TXNIP: Thioredoxin-interacting protein; WT: Wild-type; Mut: Mutation.

2.3 miR-16-5p 对哮喘大鼠肺组织病理形态学的影响

HE 染色观察 miR-16-5p 过表达或抑制对哮喘大鼠肺组织病理形态学的影响, 结果显示, 对照组大鼠肺组织黏膜层上皮排列整齐、紧密, 未见明显变性坏死或脱落; 管腔内未见明显细胞碎片或黏液; 外膜内平滑肌和结缔组织未见明显增厚。模型组大

鼠肺组织可见部分炎症损伤($P<0.05$)。与模型组相比, miR-16-5p mimic 组大鼠肺组织损伤评分有所降低, 但差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组相比, miR-16-5p inhibitor 组大鼠肺组织受损程度加重($P<0.05$, 图 3)。

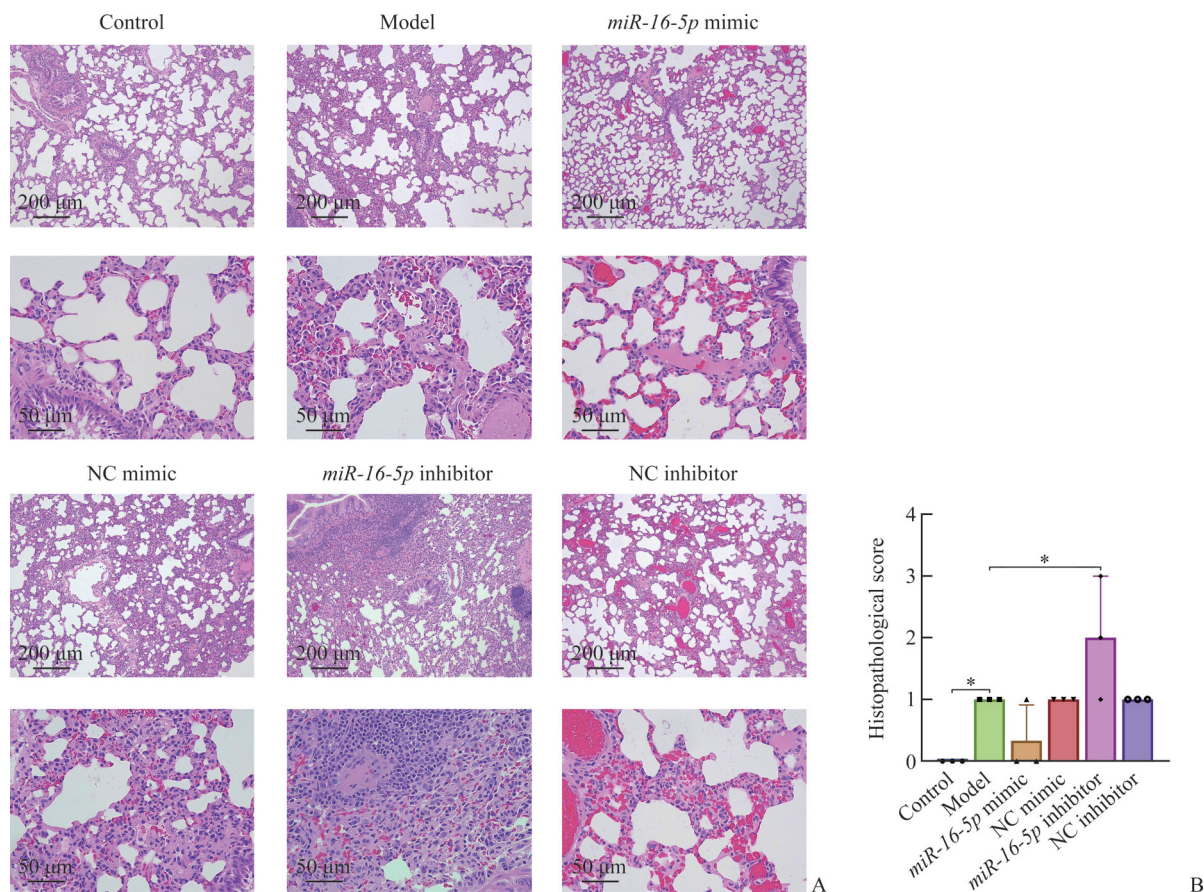


图3 *miR-16-5p*对肺组织病理形态学的影响(HE染色)

Figure 3 Effect of *miR-16-5p* on lung histopathological morphology (HE staining)

A: Representative images of HE staining. B: Histopathological scoring based on inflammatory indicators ($n=3$). Data are represented as $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$. HE: Hematoxylin and eosin.

2.4 *miR-16-5p*对哮喘大鼠气道黏液和杯状细胞的影响

采用PAS染色检测哮喘大鼠气道黏液和杯状细胞变化,结果显示,与对照组相比,模型组可见气道内黏液(红色圆圈)和杯状细胞(黑色箭头)增生(均 $P<0.001$),提示哮喘模型中存在明显的黏液高分泌现象。与模型组相比,*miR-16-5p* mimic组杯状细胞比例显著减少($P<0.05$),而*miR-16-5p* inhibitor组杯状细胞比例显著增加($P<0.001$,图4)。

2.5 *miR-16-5p*对哮喘大鼠支气管胶原沉积的影响

为研究*miR-16-5p*过表达或抑制对哮喘大鼠支气管胶原沉积的影响,采用Masson染色检测WAt/Pbm和WAm/Pbm值。结果显示,对照组气道壁薄,平滑肌无增生,胶原染色较浅;模型组气道壁明显增厚,平滑肌增生,胶原大量沉积,其WAt/Pbm和WAm/Pbm值较对照组显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$);*miR-16-5p*

mimic组气道壁增厚程度减轻,胶原沉积显著减少,WAt/Pbm和WAm/Pbm值较模型组显著降低($P<0.001$);*miR-16-5p* inhibitor组气道壁进一步增厚,胶原大量沉积,WAt/Pbm和WAm/Pbm值较模型组显著升高($P<0.001$)。NC mimic组和NC inhibitor组与模型组相比差异无统计学意义($P>0.05$,图5、表1)。

2.6 *miR-16-5p*对哮喘大鼠BALF中炎症细胞数量的影响

为研究*miR-16-5p*过表达或抑制对哮喘大鼠炎症反应的影响,本研究检测了大鼠BALF中炎症细胞数量。结果显示,与对照组相比,模型组的BALF中白细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞的数量均显著增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。与模型组相比,*miR-16-5p* mimic组的炎症细胞数量均显著下降($P<0.01$ 或 $P<0.001$),而*miR-16-5p* inhibitor组的炎症细胞数量均显著增加($P<0.01$ 或 $P<0.001$,表2)。

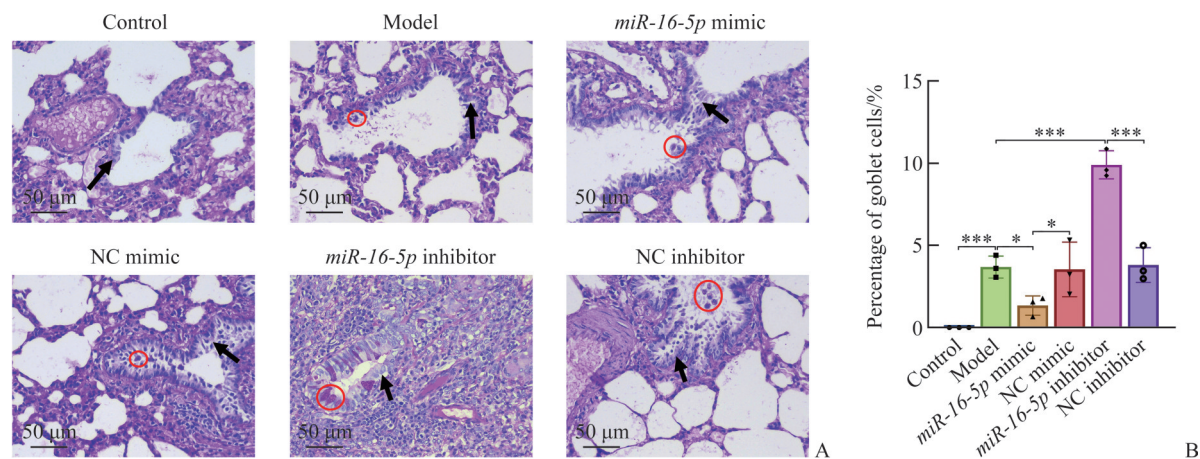


图4 *miR-16-5p* 对哮喘大鼠气道黏液和杯状细胞的影响(PAS 染色)
Figure 4 Effect of *miR-16-5p* on airway mucus and goblet cells in asthmatic rats (PAS staining)
A: Representative images of PAS staining (Red circles represent mucus in the airways, black arrows represent goblet cells).
B: Percentage of goblet cells ($n=3$). Data are represented as $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$, *** $P<0.001$. PAS: Periodic acid-Schiff.

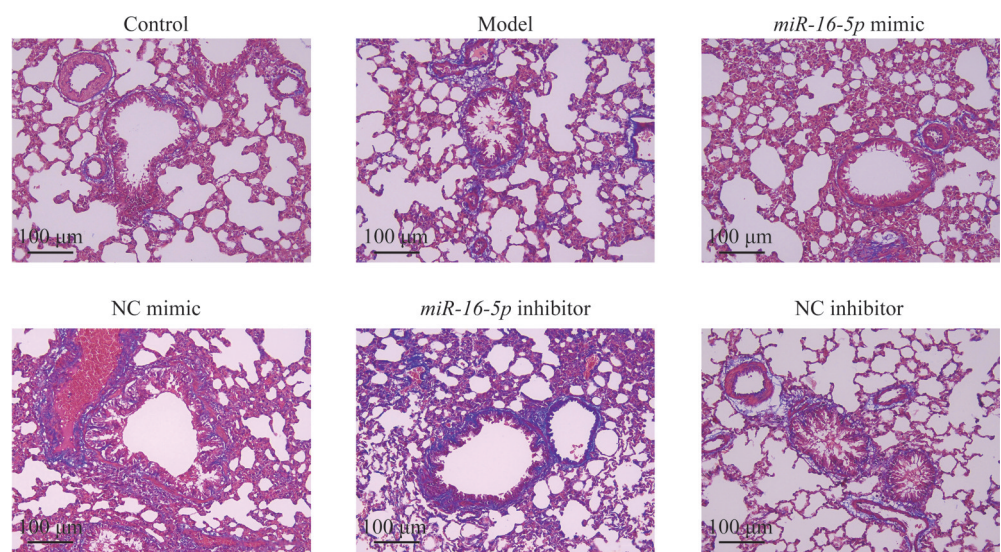


图5 Masson 染色观察支气管胶原沉积
Figure 5 Masson staining for bronchial collagen deposition

表1 各组大鼠 WAt/Pbm 和 WAm/Pbm 比较($n=3$, $\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of WAt/Pbm and WAm/Pbm of rats in each group ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	WAt/Pbm	WAm/Pbm
对照组	27.88±1.86	8.67±0.29
模型组	36.39±3.25**	11.66±1.33***
miR-16-5p mimic 组	25.93±1.05†††	5.28±0.54†††
NC mimic 组	31.38±1.67	7.87±0.64
miR-16-5p inhibitor 组	49.38±2.76†††	9.27±0.17†††
NC inhibitor 组	31.63±2.16	6.76±0.92

WAt: 总管壁面积; WAm: 气道平滑肌层面积; Pbm: 支气管基底膜周径; NC: 正常对照。与对照组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与模型组比较, ††† $P<0.001$ 。

2.7 *miR-16-5p*对哮喘大鼠BALF中炎症因子的影响

用ELISA法检测大鼠BALF中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和MCP-1的水平,结果显示,与对照组相比,模型组大鼠BALF中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和MCP-1水平升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。与模型组相比,*miR-16-5p* mimic组BALF中细胞因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和MCP-1水平均显著降低,而*miR-*

16-5p inhibitor组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和MCP-1水平均显著升高,且差异均有统计学意义($P<0.001$)。此外,*miR-16-5p* mimic组和NC mimic组,*miR-16-5p* inhibitor组和NC inhibitor组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和MCP-1水平差异均具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.001$,图6)。

表2 各组大鼠的炎症细胞数比较($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of inflammatory cells number in each group of rats ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	白细胞/($10^8\cdot L^{-1}$)	嗜酸性粒细胞/ ($10^8\cdot L^{-1}$)	淋巴细胞/ ($10^8\cdot L^{-1}$)	中性粒细胞/ ($10^8\cdot L^{-1}$)	单核细胞/ ($10^8\cdot L^{-1}$)
对照组	33.00 $\pm$ 6.24	0.21 $\pm$ 0.03	17.33 $\pm$ 1.53	1.16 $\pm$ 0.29	1.17 $\pm$ 0.06
模型组	166.00 $\pm$ 8.18***	24.33 $\pm$ 3.06***	65.33 $\pm$ 4.51***	29.67 $\pm$ 6.51***	18.00 $\pm$ 2.00***
<i>miR-16-5p</i> mimic组	113.00 $\pm$ 6.00†††	16.67 $\pm$ 1.53††	40.67 $\pm$ 1.53†††	18.67 $\pm$ 1.53††	10.67 $\pm$ 1.53†††
NC mimic组	152.33 $\pm$ 3.51	27.67 $\pm$ 4.16	66.33 $\pm$ 3.21	32.33 $\pm$ 3.06	15.33 $\pm$ 2.52
<i>miR-16-5p</i> inhibitor组	211.67 $\pm$ 10.02†††	39.00 $\pm$ 1.00†††	76.33 $\pm$ 3.79††	40.33 $\pm$ 1.53††	25.00 $\pm$ 2.00††
NC inhibitor组	159.33 $\pm$ 12.89	22.33 $\pm$ 3.51	61.00 $\pm$ 4.58	31.33 $\pm$ 2.52	17.67 $\pm$ 2.08

与对照组比较, *** $P<0.001$; 与模型组比较, †† $P<0.01$, ††† $P<0.001$ 。

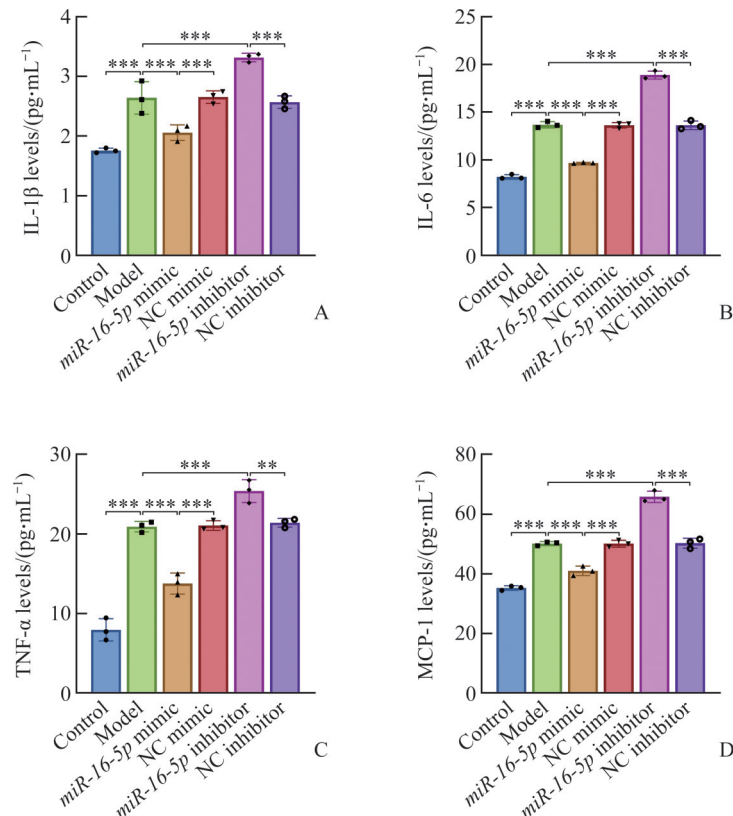


图6 *miR-16-5p*对哮喘大鼠BALF中炎症因子的影响($n=3$)

Figure 6 Effect of *miR-16-5p* on inflammatory factors in BALF of asthmatic rats ($n=3$)

A: IL-1 β levels. B: IL-6 levels. C: TNF- α levels. D: MCP-1 levels. Data are represented as $\bar{x}\pm s$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. BALF: Bronchoalveolar lavage fluid; IL: Interleukin; TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1.

2.8 miR-16-5p 对哮喘大鼠肺组织中 TXNIP 和 NLRP3 表达的影响

用免疫组织化学染色检测 TXNIP 和 NLRP3 在哮喘大鼠肺组织中的表达, 结果显示, 苏木精染色的细胞核为蓝色, TXNIP 和 NLRP3 阳性表达呈棕黄色, TXNIP 主要表达在肺泡上皮细胞和肺巨噬细胞的细胞质、细胞核; NLRP3 主要表达在肺巨噬细胞、肺泡上皮细胞和中性粒细胞的细胞质。与对照组比较, 模型组大鼠肺组织中 TXNIP 和 NLRP3 阳性细胞数量均明显增加(均 $P<0.001$)。与模型组比较, miR-16-5p mimic 组的 TXNIP 和 NLRP3 阳性细胞数量均显著减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 而 miR-16-5p inhibitor 组的 TXNIP 和 NLRP3 阳性细胞数量均显著增加 ($P<0.01$ 或 $P<0.001$, 图 7)。

2.9 miR-16-5p 对哮喘大鼠肺组织中 NLRP3 炎症小体相关通路的影响

采用蛋白质印迹法检测 TXNIP、NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白的表达水平, 结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠肺组织中 TXNIP、NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$, $P<0.01$ 或 $P<0.001$)。与模型组比较, miR-16-5p mimic 组 TXNIP、NLRP3、cleaved-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达水平均显著减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而 miR-16-5p inhibitor 组 TXNIP、NLRP3、cleaved-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达水平均显著增加 ($P<0.01$ 或 $P<0.001$); 但 ASC 在各组间的表达水平差异均无统计学意义(均 $P>0.05$, 图 8)。

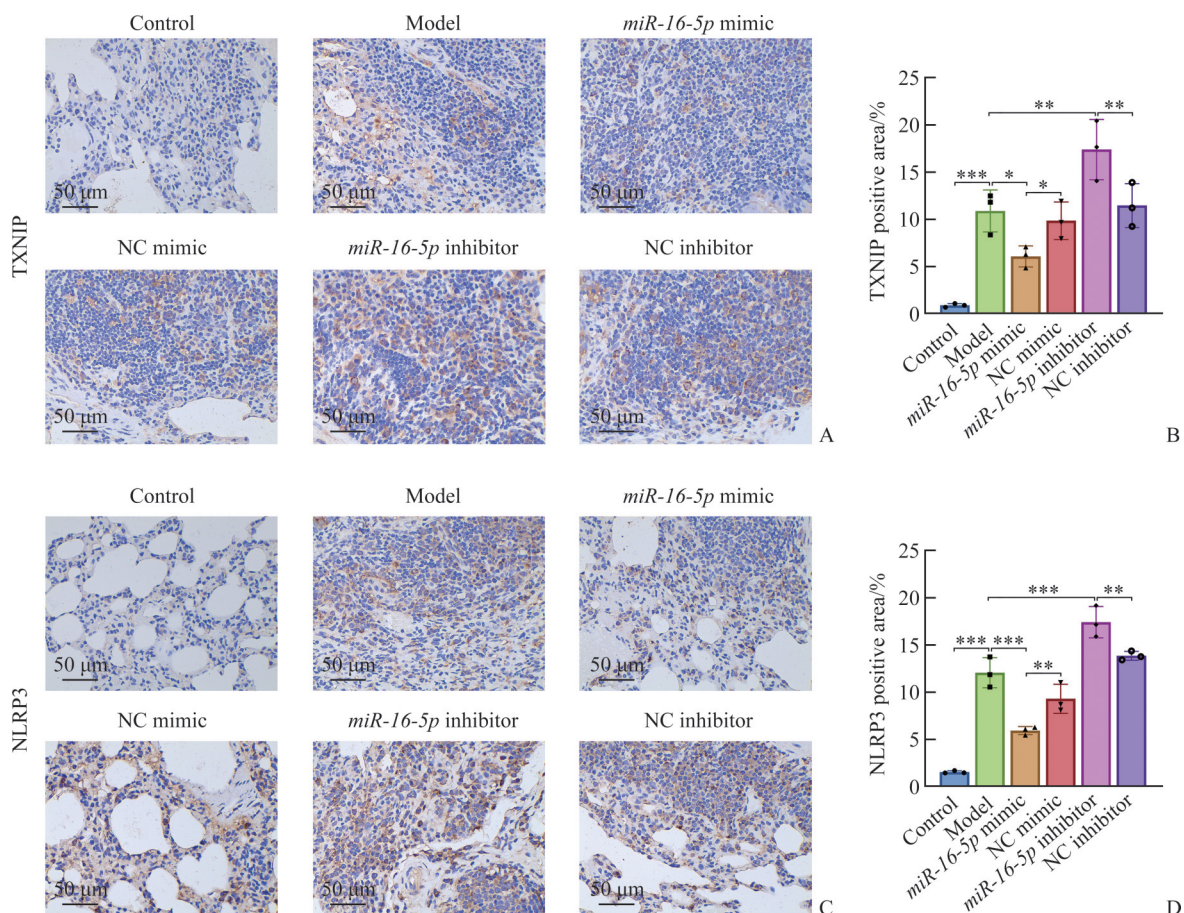


图 7 miR-16-5p 对哮喘大鼠肺组织中 TXNIP 和 NLRP3 表达的影响(免疫组织化学染色)

Figure 7 Effect of miR-16-5p on TXNIP and NLRP3 expression in lung tissue of asthmatic rats (immunohistochemistry)

A: Representative images of immunohistochemistry staining for TXNIP. B: Quantitative analysis of the proportion of TXNIP positive area ($n=3$). C: Representative images of NLRP3 immunohistochemistry staining. D: Quantitative analysis of the proportion of NLRP3 positive area. The proportion of positive area was calculated as the percentage of DAB positive area to the total tissue area ($n=3$). Data are represented as $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. TXNIP: thioredoxin-interacting protein; DAB: 3, 3'-Diaminobenzidine; NLRP3: NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3.

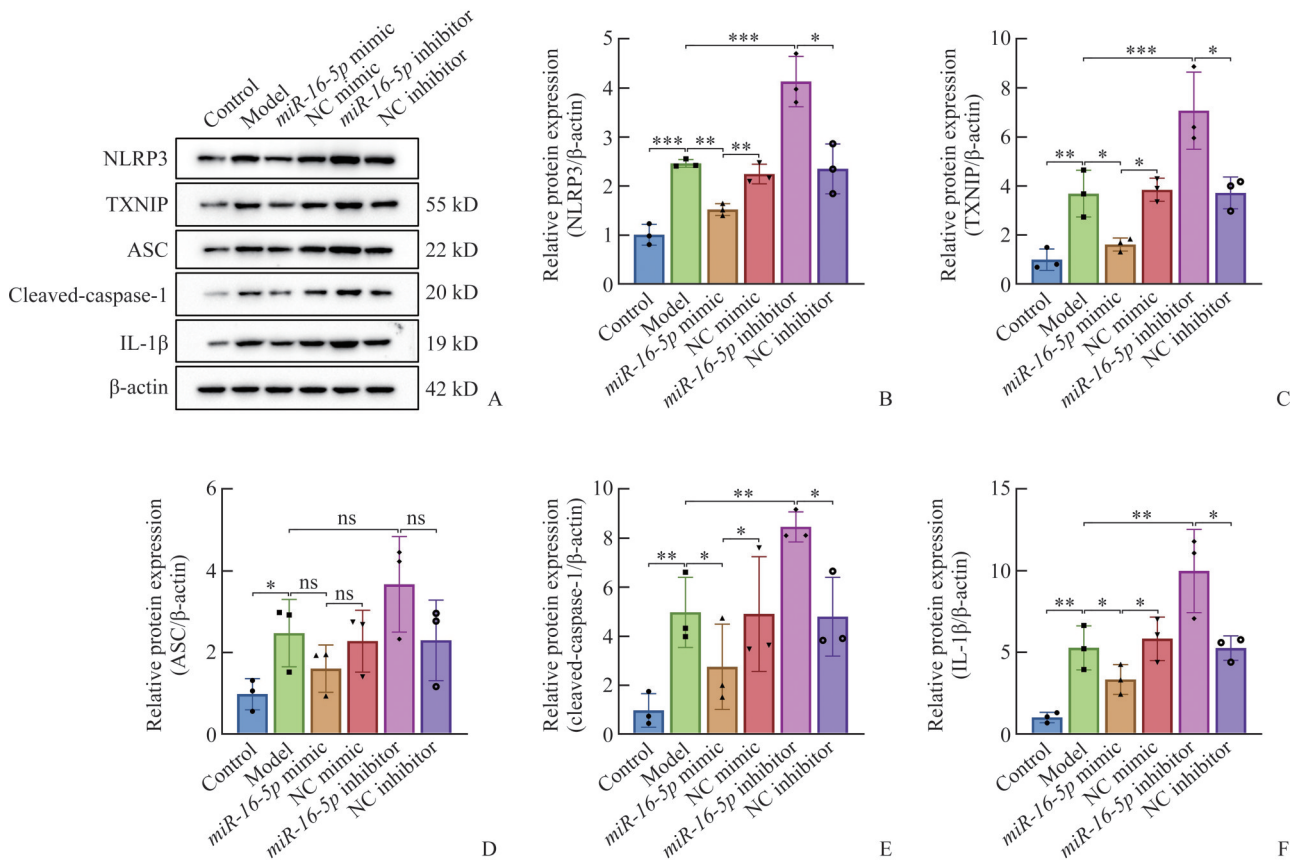


图8 *miR-16-5p*对哮喘大鼠肺组织TXNIP、NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1和IL-1β蛋白表达的影响

Figure 8 Effect of *miR-16-5p* on the expression of TXNIP, NLRP3, ASC, cleaved-caspase-1, and IL-1β protein in lung tissue of asthmatic rats

A: Representative images of Western blotting. B: NLRP3 relative protein expression ($n=3$). C: TXNIP relative protein expression ($n=3$). D: ASC relative protein expression ($n=3$). E: Cleaved-caspase-1 relative protein expression ($n=3$). F: IL-1β relative protein expression ($n=3$). Data are represented as $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD.

3 讨论

哮喘的发病机制涉及多种炎症细胞的共同参与,大部分气道重塑的特征是由气道炎症引起的^[17-18]。本研究通过OVA诱导哮喘大鼠模型,探究了过表达*miR-16-5p*和抑制*miR-16-5p*对哮喘大鼠气道炎症的影响。正如本研究预期的那样,哮喘大鼠肺组织受损,黏膜上皮细胞脱落,气道壁增厚,平滑肌增生,胶原大量沉积;BALF中炎症细胞的数量显著增加,IL-1β、IL-6、TNF-α和MCP-1水平升高,表明哮喘大鼠模型建立成功^[19-20]。过表达*miR-16-5p*后哮喘大鼠的肺组织病理损伤评分有所降低,胶原沉积减少,炎症细胞数量减少,BALF中细胞因子IL-1β、IL-6、TNF-α和MCP-1水平均显著降低,而抑制*miR-16-5p*进一步加重了哮喘大鼠的气道炎症反应。

*miR-16-5p*参与多种肿瘤细胞的增殖、凋亡和炎

症反应的调节过程,但其在哮喘气道炎症中的作用机制尚不明确^[21-23]。本研究通过TargetScan预测了TXNIP和*miR-16-5p*的结合位点,采用双荧光素酶报告实验进一步证实了TXNIP和*miR-16-5p*的靶向结合关系。此外,本研究采用免疫组织化学染色和蛋白质印迹法分析哮喘大鼠模型肺组织中TXNIP和NLRP3的表达水平,结果发现哮喘大鼠TXNIP和NLRP3表达升高,而过表达*miR-16-5p*可能通过负调控TXNIP,进而抑制NLRP3炎症小体活化,从而缓解哮喘大鼠气道炎症;提示可以通过靶向抑制TXNIP和NLRP3,从而改善哮喘大鼠的气道炎症。

研究^[24]发现, TXNIP可以结合并激活NLRP3炎症小体,在炎症反应中发挥重要作用。NLRP3活化可使caspase-1裂解,促进IL-1β的剪切成熟,参与炎症级联反应^[25,26]。本研究采用蛋白质印迹法检测TXNIP、NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1和IL-1β蛋

白的表达水平。结果显示,模型组哮喘大鼠肺组织中 TXNIP、NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平均明显高于正常大鼠, *miR-16-5p* mimic 处理后大鼠肺组织炎症损伤得到缓解,肺组织中 TXNIP、NLRP3、cleaved-caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平均显著降低, *miR-16-5p* inhibitor 处理后 TXNIP、NLRP3、cleaved-caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平均显著增加;提示模型组大鼠 TXNIP/NLRP3 炎症小体被激活,过表达 *miR-16-5p* 可抑制该通路的活化,而 *miR-16-5p* 被抑制后进一步激活了 TXNIP/NLRP3 炎症小体,提示 *miR-16-5p* 缓解哮喘大鼠气道炎症的作用机制可能与 TXNIP/NLRP3 通路有关。值得注意的是,ASC 蛋白在各组间的表达水平未发生显著变化。ASC 是 NLRP3 炎症小体组装的核心衔接蛋白,在 NLRP3 炎症小体激活过程中,ASC 通过其 PYD 结构域与 NLRP3 结合,并通过 CARD 结构域招募 pro-caspase-1,这一过程主要依赖 ASC 的构象变化和寡聚化^[27],而 ASC 本身的表达水平在炎症刺激下可能保持相对稳定。该结果提示, *miR-16-5p* 可能主要通过影响 TXNIP 和 NLRP3 的表达水平来调控 NLRP3 炎症小体的组装效率,而 ASC 作为组成型表达的衔接蛋白,其表达水平可能不是该调控路径的关键节点。

本研究存在一定的局限性,如 TXNIP 参与调控氧化应激和细胞凋亡,但 *miR-16-5p* 是否调控 TXNIP 的氧化还原和细胞凋亡能力尚不清楚。此外, NLRP3 炎症小体和 caspase-1 在细胞炎症反应中发挥重要作用, GSDMD(gasdermin D)被认为是该通路下游的关键执行分子^[28], *miR-16-5p* 调控 NLRP3 炎症小体相关通路的具体机制有待进一步研究。值得注意的是, TXNIP 并非 *miR-16-5p* 的唯一潜在靶点,且本研究未在动物层面进行回复实验。因此,虽然数据支持 TXNIP/NLRP3 通路介导了 *miR-16-5p* 的部分抗炎效应,但尚不能排除其他信号分子的参与,具体的分子调控网络仍需深入研究。

综上,本研究证实 *miR-16-5p* 可能通过负调控 TXNIP,进而抑制 NLRP3 炎症小体活化,从而缓解哮喘大鼠气道炎症,为诊治哮喘提供了新的靶点和科学依据。

作者贡献声明: 余巍巍 研究构思、设计及实施, 论文撰写; 余明德 数据收集与整理; 孙天寿 图表绘制; 陈旭、李燕枚 实验操作; 王明东 数据验证; 张饶议、方欢欢 动物模型制作; 陈美宇 数据分析, 论文修订与审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

参考文献

- [1] She W, Mei Z, Zhao H, et al. Nebulized inhalation of anti-nerve growth factor microspheres inhibits airway remodeling in an ovalbumin-induced rat asthma model[J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2019, 32(2): 70-77. <https://doi.org/10.1089/jamp.2018.1453>.
- [2] Davis JS, Sun M, Kho AT, et al. Circulating microRNAs and association with methacholine PC20 in the Childhood Asthma Management Program (CAMP) cohort[J/OL]. PLoS One, 2017, 12(7): e0180329[2025-10-01]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180329>.
- [3] Date S, Bhatt LK. Exploring thioredoxin-interacting protein (TXNIP) as a therapeutic target for cardiovascular diseases [J/OL]. Arch Pharm, 2025, 358(8): e70082[2025-09-30]. <https://doi.org/10.1002/ardp.70082>.
- [4] Wang H, Lin X, Huang G, et al. Atranorin inhibits NLRP3 inflammasome activation by targeting ASC and protects NLRP3 inflammasome-driven diseases[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(8): 1687-1700. <https://doi.org/10.1038/s41401-023-01054-1>.
- [5] 郭皓晨, 陈勇军, 徐易尘, 等. Caspase-1 在炎症及程序性细胞死亡过程中的作用[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(2): 182-189. <https://doi.org/10.11844/cjcb.2011.02.0182>.
WU Haochen, CHEN Yongjun, XU Yichen, et al. The role of caspase-1 played in the process of inflammation and programmed cell death[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2011, 33(2): 182-189. <https://doi.org/10.11844/cjcb.2011.02.0182>.
- [6] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes[J]. Cell, 2010, 140(6): 821-832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>.
- [7] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? [J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(3): 210-215. <https://doi.org/10.1038/nri2725>.
- [8] Theofani E, Semitekolou M, Morianos I, et al. Targeting NLRP3 inflammasome activation in severe asthma[J]. J Clin Med, 2019, 8(10): 1615. <https://doi.org/10.3390/jcm8101615>.
- [9] Wang J, Gao Y, Li J, et al. KIF1B regulates NLRP3-mediated pyroptosis in asthma progression[J/OL]. J Cell Mol Med, 2025, 29(23): e70975[2025-10-02]. <https://doi.org/10.1111/jcmm.70975>.
- [10] Almarzouq D, Al-Maghrebi M. NADPH oxidase-mediated testicular oxidative imbalance regulates the TXNIP/NLRP3 inflammasome axis activation after ischemia reperfusion injury [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(1): 145. <https://doi.org/10.3390/antiox12010145>.
- [11] Huang J, Ruan XY, Tian T, et al. miR-20b attenuates airway inflammation by regulating TXNIP and NLRP3 inflammasome in ovalbumin-induced asthmatic mice[J]. J Asthma, 2023, 60(11): 2040-2051. <https://doi.org/10.1080/02770903.2023.2213332>.
- [12] 龚佳佳, 陈放, 张优雅, 等. 基于 ROS/TXNIP/NLRP3 通路探

- 讨“邵氏五针法”预处理对哮喘大鼠气道炎症反应的影响[J]. 中国针灸, 2023, 43(11): 1287-1292. <https://doi.org/10.13703/j.0255-2930.20221230-k0002>.
- GONG Jiajia, CHEN Fang, ZHANG Youya, et al. Effect of Shao's five-needle therapy pretreatment on airway inflammatory response in asthmatic rats based on ROS/TXNIP/NLRP3 pathway[J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2023, 43(11): 1287-1292. <https://doi.org/10.13703/j.0255-2930.20221230-k0002>.
- [13] Li B, Zhang Z, Fu Y. Anti-inflammatory effects of artesunate on atherosclerosis via *miR-16-5p* and TXNIP regulation of the NLRP3 inflammasome[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(20): 1558. <https://doi.org/10.21037/atm-21-4939>.
- [14] She W, Sun T, Long C, et al. Linc00511 knockdown inhibited TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of bronchial epithelial cells by targeting *miR-16-5p*/Smad3[J]. Am J Rhinol Allergy, 2023, 37(3): 313-323. <https://doi.org/10.1177/19458924221144853>.
- [15] She W, Sun T, Long C, et al. *miR-16-5p* attenuated airway inflammation and pulmonary fibrosis of asthma rats by regulating the TGF- β 1/Smad3 signaling[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2026: 73(3): 1523-1532. <https://doi.org/10.1002/bab.70115>.
- [16] Wang X, Lu X, Ma C, et al. Combination of TLR agonist and *miR146a* mimics attenuates ovalbumin-induced asthma[J]. Mol Med, 2020, 26(1): 65. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00191-1>.
- [17] Britt RD, Ruwanpathirana A, Ford ML, et al. Macrophages orchestrate airway inflammation, remodeling, and resolution in asthma[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(13): 10451. <https://doi.org/10.3390/ijms241310451>.
- [18] Habib N, Pasha MA, Tang DD. Current understanding of asthma pathogenesis and biomarkers[J]. Cells, 2022, 11(17): 2764. <https://doi.org/10.3390/cells11172764>.
- [19] 余巍巍, 孙天寿, 吴娟, 等. 肺内靶向吸入 NGF 抗体抑制小鼠体内 NGF 及 TGF- β 1 改善哮喘气道重塑的作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(5): 1063-1067. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-9202.2021.05.048>
- SHE Weiwei, SUN Tianshou, WU Juan, et al. Mechanism of targeted inhalation of NGF antibody in lung to inhibit NGF and TGF- β 1 in mice and improve airway remodeling in asthma[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2021, 41(5): 1063-1067. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-9202.2021.05.048>
- [20] 余巍巍, 孙天寿, 龙成凤, 等. lncRNA MRAK088388 敲除的哮喘小鼠 M2 巨噬细胞极化受阻且小鼠气道炎症减轻[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2023, 39(9): 777-786. <https://doi.org/10.13423/j.cnki.cjcmi.009638>.
- SHE Weiwei, SUN Tianshou, LONG Chengfeng, et al. Inhibition of M2 macrophage polarization and reduction of airway inflammation in asthmatic mice with lncRNA MRAK088388 knockout[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2023, 39(9): 777-786. <https://doi.org/10.13423/j.cnki.cjcmi.009638>.
- [21] 詹东昂, 柯峰, 杨超, 等. *miR-16-5p* 通过调控 PD-L1 表达影响肝星状细胞炎症反应的研究[J]. 浙江医学, 2022, 44(19): 2049-2055. <https://doi.org/10.12056/j.issn.1006-2785.2022.44.19.2022-999>.
- ZHAN Dongang, KE Feng, YANG Chao, et al. *miR-16-5p* inhibits inflammatory response of hepatic stellate cells by regulating PD-L1 expression[J]. Zhejiang Medical Journal, 2022, 44(19): 2049-2055. <https://doi.org/10.12056/j.issn.1006-2785.2022.44.19.2022-999>.
- [22] 陈民彪, 蔡仁中, 黄明芳, 等. *miR-16-5p* 靶向 PTEN/PI3K/AKT 信号通路对非小细胞肺癌细胞活性和迁移能力的影响[J]. 西部医学, 2022, 34(1): 16-20. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-3511.2022.01.004>.
- CHEN Minbiao, CAI Renzhong, HUANG Mingfang, et al. Effects of *miR-16-5p* targeting PTEN/PI3K/AKT signaling pathway on cell viability and migration of non-small cell lung cancer cells[J]. Medical Journal of West China, 2022, 34(1): 16-20. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-3511.2022.01.004>.
- [23] Arora S, Singh P, Tabassum G, et al. *miR-16-5p* regulates aerobic glycolysis and tumorigenesis of NSCLC cells via LDH-A/lactate/NF- κ B signaling[J]. Life Sci, 2022, 304: 120722. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120722>.
- [24] Yang C, Li X, Feng X, et al. Activation of LRP1 ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury and cognitive decline by suppressing neuroinflammation and oxidative stress through TXNIP/NLRP3 signaling pathway in mice[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8729398. <https://doi.org/10.1155/2022/8729398>.
- [25] Ding P, Song Y, Yang Y, et al. NLRP3 inflammasome and pyroptosis in cardiovascular diseases and exercise intervention[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1368835. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1368835>.
- [26] Chen Y, Chen R, Ji X, et al. NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in diabetic nephropathy: pathogenic mechanisms and therapeutic targets[J]. J Inflamm Res, 2025, 18: 8399-8418. <https://doi.org/10.2147/JIR.S524246>.
- [27] Dick MS, Sborgi L, Rühl S, et al. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes[J]. Nat Commun, 2016, 7: 11929. <https://doi.org/10.1038/ncomms11929>.
- [28] Li Y, Guo B. GSDMD-mediated pyroptosis: molecular mechanisms, diseases and therapeutic targets[J]. Mol Biomed, 2025, 6(1): 11. <https://doi.org/10.1186/s43556-025-00249-8>.

(责任编辑 彭敏宁)