

TLR4/MyD88 信号通路在 COPD 支气管上皮损伤中的调控作用

张艺

(咸宁市中心医院 湖北科技学院附属第一医院 湖北咸宁 437000)

【摘要】基于COPD气道上皮损伤与炎症放大的病理特征,对CSE诱导巨噬细胞外泌体miR-448的表达变化及其对TLR4/MyD88信号通路的调控作用进行了研究,阐述了miR-448下调导致通路激活并引发IL-6、TNF- α 水平升高的机制,介绍了si-TLR4、si-MyD88及miR-448 mimic干预对炎症反应和细胞功能学损伤的逆转效应。研究结果表明,外泌体miR-448通过调控TLR4/MyD88轴在支气管上皮损伤中发挥关键作用,为探索分子靶点干预提供了实验依据。

【关键词】 COPD; 支气管上皮损伤; 外泌体; miR-448

The regulatory role of TLR4/MyD88 signaling pathway in COPD bronchial epithelial injury
Zhang Yi

(Xianning Central Hospital, Hubei University of Science and Technology Affiliated First Hospital Xianning, Hubei 437000)

[Abstract] Based on the pathological characteristics of COPD airway epithelial injury and inflammation amplification, the expression changes of miR-448 in macrophage exosomes induced by CSE and its regulatory effect on TLR4/MyD88 signaling pathway were studied. The mechanism of miR-448 downregulation leading to pathway activation and elevation of IL-6 and TNF- α levels was elucidated, and the reversal effects of si-TLR4, si-MyD88, and miR-448 mimetic interventions on inflammatory response and cellular functional damage were introduced. The research results indicate that extracellular vesicle miR-448 plays a key role in bronchial epithelial injury by regulating the TLR4/MyD88 axis, providing experimental evidence for exploring molecular target interventions.

[Key words] COPD; Bronchial epithelial injury; Extracellular vesicles; miR-448

引言

慢性阻塞性肺疾病的持续进展与支气管上皮屏障损伤密切相关,其中TLR4/MyD88信号通路在炎症级联放大中的作用受到高度关注。吸烟相关刺激可诱导巨噬细胞外泌体miRNA异常,进而影响上皮细胞功能表型。本研究旨在揭示miR-448介导的TLR4/MyD88信号调控机制,构建细胞与外泌体模型,通过分子与功能学实验验证其作用,为阐明支气管上皮损伤的分子基础及潜在干预靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与处理条件

选取人支气管上皮细胞 BEAS-2B 与人肺泡巨噬细胞系 THP-1, 经 PMA 诱导, THP-1 分化成巨噬细胞, 而后暴露于不同浓度的香烟烟雾提取液 (CSE, 0.25%、0.5%、1.0%、2.0%) 以 6h、12h、24h 计, 探究 M1 极化的恰当条件^[1]。对照组在 RPMI-1640 混合 10% FBS 的培养液中培养, BEAS-2B 跟不同来源外泌体共培养, 或者对其进行 miR-448 mimics/inhibitors 的转染, 检测增殖、细胞迁移及炎症相关参数。实验均设平行三复孔并含阴性对照, 以确保数据可靠性。

1.2 外泌体分离与鉴定

收集 CSE 处理与对照巨噬细胞上清, 依次经 300 \times g、2, 000 \times g、10, 000 \times g 离心去除杂质后, 在 100, 000 \times g 超速离心 70min 沉淀外泌体, 重悬于 PBS 并经 0.22 μ m 滤膜过滤。外泌体采用透射电镜观察形态, 纳米颗粒跟踪分析测定粒径, Western blot 检测 CD9、CD63、TSG101 及 Calnexin。提取 RNA 检测 miR-448 表达, 并与供体巨噬细胞进行对比。

1.3 分子与蛋白检测方法

采用 Trizol 来提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA 之后, 采用 qPCR 方法检测 miR-448、TLR4、MyD88、NF- κ B、IRF8 及炎症因子 mRNA 水平, 蛋白检测经 SDS-PAGE 分离、转膜这两步后, 用特异性抗体做分析, 把 β -actin 当作内参, 功能实验含有 CCK-8 检测细胞的活力、克隆形成评估细胞的增殖、Transwell 检测细胞的迁移^[2]。CCK-8 结果计算公式为:

$$R = -\frac{OD_{exp} - OD_{blank}}{OD_{ctrl} - OD_{blank}} \times 100\%$$

其中 R 为细胞相对活力百分比, OD_{exp} 为实验组在 450nm 的吸光度, OD_{ctrl} 为对照组吸光度, OD_{blank} 为空白孔吸光度。

1.4 数据统计与分析

所有实验均独立重复至少 3 次, 数据采用均值 \pm 标准差进行表示, 两组对比用双尾 t 检验, 对多组比较时采用单因素方差分析, 把显著性水平设成 $P < 0.05$, qPCR 结果以 U6

或 β -actin 作为内参去算出相对表达量, ELISA 结果借助标准曲线完成浓度换算, 采用 GraphPad Prism 9.0 进行统计分析, 保证结果精准可靠^[9]。

2 结果分析

2.1 TLR4/MyD88 信号通路的激活作用

表1 CSE 处理对 TLR4/MyD88 信号通路及下游因子的影响

组别	TLR4 mRNA (相对表达量)	MyD88 mRNA (相对表达量)	TLR4 蛋白 (相对灰度值)	MyD88 蛋白 (相对灰度值)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
对照组	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.09	52.3 \pm 6.4	48.7 \pm 5.8
CSE 0.5%	1.84 \pm 0.21*	1.67 \pm 0.19*	1.72 \pm 0.15*	1.55 \pm 0.13*	113.5 \pm 10.2*	102.4 \pm 9.6*
CSE 1.0%	2.65 \pm 0.25**	2.38 \pm 0.22**	2.41 \pm 0.19**	2.28 \pm 0.17**	182.6 \pm 15.4**	165.8 \pm 14.7**

*P<0.05, **P<0.01 vs 对照组

由表1可见, 随着 CSE 浓度增加, TLR4 与 MyD88 在转录与蛋白水平均呈剂量依赖性上调, IL-6 及 TNF- α 释放同步增强, 表明信号通路被显著激活。该结果提示 CSE 通过 TLR4/MyD88 轴驱动炎症级联反应, 是导致支气管上皮损伤的重要分子机制。

2.2 miR-448 与外泌体在支气管上皮损伤中的作用

为明确 miR-448 及巨噬细胞来源外泌体在支气管上皮细胞损伤中的作用, 分别检测 CSE 诱导巨噬细胞外泌体中

为验证 CSE 诱导条件下 TLR4/MyD88 信号通路是否被激活, 分别检测不同处理组 BEAS-2B 细胞及巨噬细胞的相关基因与蛋白水平。qPCR 结果显示, TLR4 与 MyD88 mRNA 在 CSE 处理组显著升高, 同时 Western blot 验证其蛋白表达趋势一致。ELISA 进一步提示下游炎症因子 IL-6、TNF- α 水平明显高于对照组。数据见表1。

miR-448 水平, 并与 BEAS-2B 功能学指标进行关联分析。结果显示, CSE 处理组外泌体 miR-448 表达显著下调, 与此同时 BEAS-2B 细胞的增殖与迁移能力受抑制, 炎症因子释放水平升高。数据见表2。

此外, CCK-8 检测绘制的增殖曲线进一步表明, CSE 外泌体组细胞活力自第 24h 起明显低于对照组, 差异随时间延长逐渐扩大, 而在外泌体中补偿性转染 miR-448 后, 细胞活力恢复接近对照水平, 见图1。

表2 miR-448 与外泌体对 BEAS-2B 细胞功能及炎症因子的影响

组别	外泌体 miR-448 (相对表达量)	BEAS-2B 相对活力 (%)	克隆形成率 (%)	迁移细胞数 (个/视野)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
对照组	1.00 \pm 0.08	100.0 \pm 4.2	36.4 \pm 3.5	124 \pm 11	55.7 \pm 6.1	49.2 \pm 5.3
CSE 外泌体组	0.46 \pm 0.05**	68.5 \pm 5.7**	18.2 \pm 2.9**	73 \pm 8**	148.3 \pm 12.4**	136.7 \pm 11.6**
CSE 外泌体+miR-448 mimic	0.92 \pm 0.09	92.6 \pm 6.1*	30.1 \pm 3.2*	109 \pm 10*	83.4 \pm 7.6*	76.9 \pm 6.9*

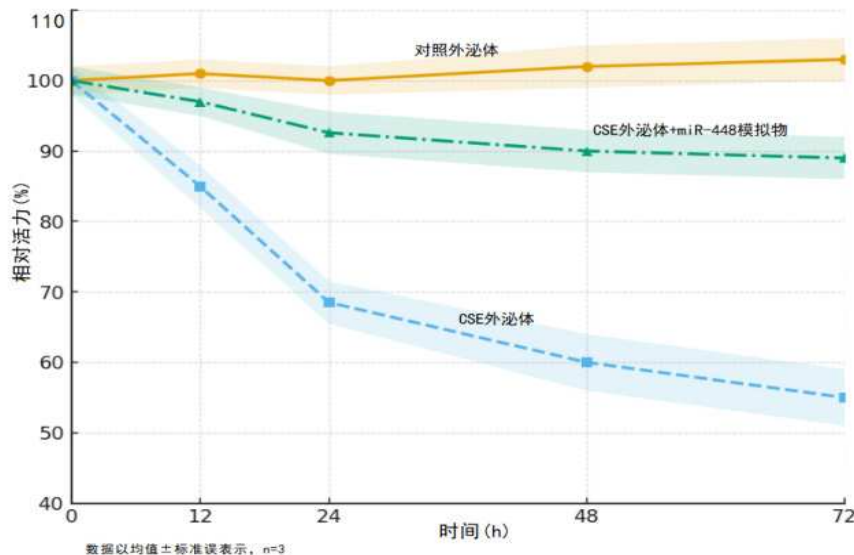


图1 CCK-8 检测不同处理组 BEAS-2B 细胞相对活力曲线图

2.3 信号通路干预的作用

为验证 TLR4/MyD88 通路在 COPD 支气管上皮损伤中的因果性作用,对 BEAS-2B 细胞分别进行 si-TLR4、si-MyD88 干预及 miR-448 mimic 转染处理,并与 CSE 外泌体组比较,检测炎症因子分泌及细胞功能学指标。qPCR 与 ELISA 结果显示,通路干预后 IL-6、TNF- α 水平明显下降,提示炎症

反应被抑制。相关数据见表 3。

进一步通过细胞功能学实验评估不同干预组对 BEAS-2B 增殖与迁移的调控效应。结果显示,CSE 外泌体组细胞相对活力与迁移能力显著下降,而在 si-TLR4、si-MyD88 及 miR-448 mimic 干预后均部分恢复,其中 miR-448 mimic 组恢复程度最接近对照组。相关数据见表 4。

表 3 TLR4/MyD88 干预对炎症因子水平的影响

组别	TLR4 mRNA (相对表达量)	MyD88 mRNA (相对表达量)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
对照组	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.08	52.6 \pm 5.4	48.9 \pm 5.2
CSE 外泌体组	2.53 \pm 0.22**	2.18 \pm 0.19**	179.4 \pm 14.6**	161.2 \pm 13.7**
CSE 外泌体+si-TLR4	1.21 \pm 0.11*	2.09 \pm 0.17**	94.5 \pm 8.3*	87.6 \pm 7.9*
CSE 外泌体+si-MyD88	2.39 \pm 0.20**	1.12 \pm 0.10*	102.3 \pm 9.1*	96.4 \pm 8.7*

表 4 TLR4/MyD88 及 miR-448 干预对细胞功能学指标的影响

组别	相对活力 (%)	克隆形成率 (%)	迁移细胞数 (个/视野)
对照组	100.0 \pm 4.2	36.8 \pm 3.4	126 \pm 11
CSE 外泌体组	66.7 \pm 5.9**	17.9 \pm 2.7**	74 \pm 8**
CSE 外泌体+si-TLR4	83.4 \pm 6.2*	27.6 \pm 3.0*	101 \pm 9*
CSE 外泌体+si-MyD88	80.5 \pm 5.8*	25.9 \pm 2.8*	96 \pm 8*
CSE 外泌体+miR-448 mimic	91.8 \pm 6.0*	31.4 \pm 3.3*	112 \pm 10*

由表 3 与表 4 可见,CSE 外泌体显著激活 TLR4/MyD88 通路并加剧炎症释放,导致上皮细胞功能受损。通过特异性抑制 TLR4 或 MyD88,炎症因子释放水平下降且功能学指标改善;同时 miR-448 mimic 补偿可进一步缓解损伤并增强修复趋势,提示 miR-448 可能通过抑制 TLR4/MyD88 轴发挥保护作用。综合结果表明,TLR4/MyD88 通路在 COPD 支气管上皮损伤中处于核心调控地位,且可通过分子干预实现部分逆转。

3. 结语

研究结果表明,CSE 诱导的巨噬细胞外泌体通过下调 miR-448 激活 TLR4/MyD88 信号通路,驱动炎症因子释放并加重支气管上皮损伤,而 siRNA 或 miR-448 补偿干预能够部分逆转这一不良表型,证实了该通路在病理过程中具有核心调控地位;未来有必要在动物模型及临床标本中进一步验证外泌体 miR-448 与 TLR4/MyD88 轴的因果关系,并探索其作为早期诊断标志物及靶向治疗策略的可行性与应用价值。

参考文献:

- [1]吴静,梁大毅,张迪,等.鸡血藤通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号抑制小胶质细胞活化干预神经病理性疼痛的作用机制[J/OL].中国中药杂志, 1-12[2025-09-01].
 - [2]毛琳琪,姚步月,张同庆,等.舒肝祛脂胶囊对非酒精性脂肪肝患者 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路及血脂的影响[J].医学创新, 2025, 22(24): 1-5.
 - [3]覃倩,吕超,刘莉,等.基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨瑶医水莲风亏方对盆腔炎症性疾病后遗症大鼠的改善作用[J/OL].世界科学技术-中医药现代化, 1-10[2025-09-01].
- 项目名称: miR-448 通过 TLR4/MyD88 信号通路调控 COPD 支气管上皮细胞微环境的机制研究。