基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003766

慢性烟曲霉暴露对支气管哮喘大鼠气道Toll样受体4表达的影响

张令轩[1],李 萌[1],宋 歌[1],高福生[2]
（1.山东第二医科大学临床医学院,潍坊 261000;2.山东第二医科大学附属医院呼吸与危重症医学科,潍坊 261000）

【摘 要】目的:探讨慢性烟曲霉暴露对支气管哮喘大鼠气道Toll样受体4(Toll-like receptor 4,TLR4)表达的影响。**方法:**40只雄性Wistar大鼠随机分为5组(每组8只)。对照组(A组):给予卵清蛋白(ovalbumin,OVA)致敏和生理盐水激发。支气管哮喘组(B组):使用OVA诱导致敏和激发的方式构建大鼠哮喘模型。支气管哮喘+烟曲霉孢子吸入1周组(C组)、2周组(D组)和3周组(E组):哮喘大鼠每周给予2次通过鼻腔吸入烟曲霉孢子的处理,分别吸入1周、2周和3周。测定血清总IgE水平及肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中炎症细胞总数及分类计数、白细胞介素-5(interleukin-5,IL-5)、白细胞介素-13(interleukin-13,IL-13)、γ-干扰素(interferon-γ,IFN-γ)和转化生长因子β(transforming growth factor-β,TGF-β)水平;肺组织切片行苏木素-伊红(hematoxylin and eosin,HE)、过碘酸雪夫(periodic acid schiff,PAS)和Masson三色染色,并行病理图像形态学测定和分析;免疫组化、逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR,RT-PCR)及蛋白质免疫印迹(Western blot,WB)检测大鼠气道TLR4的表达。**结果:**支气管哮喘大鼠吸入烟曲霉孢子3周后血清总免疫球蛋白E(immunoglobulin E,IgE)[(109.76±18.11) ng/mL]、BALF中炎症细胞总数[(5.88±1.04)×10⁶]及淋巴细胞[(2.27±0.37)×10⁶]、嗜酸性粒细胞计数[(1.49±0.43)×10⁶]、[IL-5(28.79±6.67) ng/mL]、IL-13[(118.63±20.51) ng/mL]及TGF-β[(105.00±15.73) ng/mL]、气道炎性细胞数(76.11±9.10)、上皮细胞损伤脱落百分比[(18.78±3.11)%]、杯状细胞增生程度[(19.98±2.42)%]及上皮下纤维化程度[(30.44±5.56)%]较吸入前差异有统计学意义($P<0.05$)。各组大鼠的TLR4/β-actin值与气道上皮损伤脱落程度呈正相关($r=0.960$,$P<0.001$),与气道杯状细胞增生程度呈正相关($r=0.944$,$P<0.001$),与气道上皮下纤维化程度呈正相关($r=0.856$,$P<0.001$)。**结论:**慢性烟曲霉暴露可剂量依赖性上调支气管哮喘大鼠气道TLR4表达,进而加剧气道炎症和气道重构。

【关键词】烟曲霉;支气管哮喘;Toll样受体4;气道炎症;气道重构
【中图分类号】R562.2+5 **【文献标志码】**A

Effect of chronic *Aspergillus fumigatus* exposure on the expression of Toll-like receptor 4 in the airway of rats with bronchial asthma

Zhang Lingxuan[1], Li Meng[1], Song Ge[1], Gao Fusheng[2]
(1. School of Clinical Medicine, Shandong Second Medical University; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The Affiliated Hospital of Shandong Second Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of chronic *Aspergillus fumigatus* (AF) exposure on the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in the airway of rats with bronchial asthma. ***Methods*:** A total of 40 male Wistar rats were randomly divided into control group (group A), bronchial asthma group (group B), bronchial asthma+1-week AF spore inhalation group (group C), bronchial asthma+2-week AF spore inhalation group (group D), and bronchial asthma+3-week AF spore inhalation group (group E), with 8 rats in each group. The rats in group A were sensitized with ovalbumin (OVA) and challenged with normal saline, and those in group B were sensitized and challenged with OVA to establish a rat model of asthma; the rats in groups C, D, and E were given nasal inhalation of AF spores twice a week for 1, 2, and 3 weeks, respectively. The serum level of total IgE was measured, as well as the total and differential counts of inflammatory cells and the levels of interleukin-5 (IL-5), interleukin-13 (IL-13), interferon-γ (IFN-γ), and transforming growth factor-β (TGF-β) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF); lung tissue sections were used for HE, PAS, and Masson staining, and pathomorphological measurement and analysis were performed; immunohistochemistry, RT-PCR, and Western blot were used to measure the expression of TLR4 in the airway of rats. ***Results*:** After the inhalation of AF spores for 3 months in rats with bronchial asthma, there were significant increases in the serum level of total IgE [(109.76±18.11) ng/mL], the total number of inflammatory cells [(5.88±1.04)×10⁶] and the counts of lymphocytes [(2.27±0.37)×10⁶] and eosinophils [(1.49±0.43)×10⁶] in BALF, the levels of IL-5 [(28.79±6.67) ng/mL], IL-13 [(118.63±20.51) ng/mL],

作者介绍:张令轩,Email:zlxtt100@163.com,研究方向:呼吸系统病学。
通信作者:高福生,Email:gaofs888@163.com。
优先出版:https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250220.1634.003 2025-02-21

and TGF-β[(105.00 ± 15.73) ng/mL] in BALF, the number of inflammatory cells in the airway (76.11 ± 9.10), the percentage of epithelial cell detachment[(18.78 ± 3.11)%], the degree of goblet cell hyperplasia[(19.98 ± 2.42)%], and the degree of subepithelial fibrosis[(30.44 ± 5.56)%] (P<0.05). The TLR4/β-actin value was positively correlated with the degree of epithelial cell detachment (r=0.960, P<0.001), goblet cell hyperplasia (r=0.944, P<0.001), and subepithelial fibrosis (r=0.856, P<0.001) in the airway of rats with asthma. ***Conclusion***: Chronic AF exposure can upregulate the expression of TLR4 in the airway of rats with bronchial asthma in a dose-dependent manner, thereby aggravating airway inflammation and airway remodeling.

【Key words】*Aspergillus fumigatus*; bronchial asthma; Toll-like receptor 4; airway inflammation; airway remodeling

支气管哮喘（简称哮喘）是严重影响人们健康的常见病、多发病。目前对哮喘的病因还没有完全清楚的认识，但可以确定的是患者的变应性体质以及外界环境因素是发病的危险因素。过敏原暴露是支气管哮喘发生和发展的危险因素。在室内外环境中有多种过敏原如尘螨、花粉、蟑螂、豚草等可以引发和加重哮喘。近年来，真菌暴露与哮喘病情加重之间的关系引起人们的兴趣。大量流行病学数据表明[1-2]，周围环境中真菌孢子的浓度升高与支气管哮喘加重密切相关，严重者肺部可能发生曲霉菌的定植，进而发展为变应性支气管肺曲霉病。

Toll样受体（Toll-like receptors，TLR）是一种模式识别受体，是固有免疫的重要组成部分。国内外研究表明TLR4在过敏性哮喘的发生和发展中起重要作用。霉菌、花粉、尘螨等过敏原进入气道以后，其表面的病原相关分子模式与TLR结合，可激活抗原提呈细胞释放白细胞介素-4（interleukin-4，IL-4），促使幼稚T细胞向辅助型T细胞2（T helper 2 cell，TH2）分化，TH2细胞分泌TH2型细胞因子如IL-4、白细胞介素-5（interleukin-5，IL-5）、白细胞介素-13（interleukin-13，IL-13）等激活炎症反应。

本课题组早期研究发现，长期烟曲霉暴露会加剧哮喘大鼠的气道炎症和气道上皮损伤，并导致杯状细胞数量增加和粘液过度分泌，从而加重气道上皮纤维化[3]。然而，烟曲霉暴露是否通过上调TLR4来加重哮喘大鼠的气道炎症和气道重构尚不清楚。为此，本课题组进行了一系列研究探讨此问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性Wistar大鼠（购自济南朋悦实验动物繁育有限公司），清洁级，4~5周龄，体质量180~200 g，生产许可证：SCXK（鲁）2022 0006。大鼠在开始实验之前先在临床医学研究中心动物房进行适应性饲养，持续1周，环境恒温（25 ℃），提供标准饲料和自由取水，12 h昼夜。

1.1.2 烟曲霉菌株 烟曲霉菌株来源于院内肺部烟曲霉菌感染者的痰液标本，经分离并鉴定后保存。

1.1.3 主要试剂 卵清蛋白干粉（上海麦克林生化科技有限公司）、氢氧化铝（西陇科学股份有限公司）、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物（P1045，上海碧云天生物技术有限公司）、彩色预染蛋白（P0075，上海碧云天生物技术有限公司）、BCA试剂盒（P1511，北京普利莱基因技术有限公司）、TRIzol（VICMED）、1-溴-3-氯丙烷（上海麦克林生化科技有限公司）。

1.1.4 主要仪器 高速低温离心机（赛默飞世尔科技有限公司）、普通光学显微镜（广州市明美光电技术有限公司）、雾化器（德国Pari公司）、雾化箱（自制）、包埋机（武汉俊杰电子有限公司）、病理切片机（德国Leica公司）、全钢通风柜（河北杰信实验设备有限公司）、酶标仪（南京德铁实验设备有限公司）、PCR扩增仪（美国BIORAD公司）。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 共40只健康的雄性Wistar大鼠随机分配到5组中（每组8只）。对照组（A组）：大鼠使用OVA致敏处理，后续使用生理盐水进行激发。哮喘组（B组）：使用OVA诱导致敏和激发的方式构建大鼠哮喘模型。支气管哮喘+烟曲霉孢子吸入1周、2周、3周组（C、D、E组）：哮喘大鼠每周给予2次通过鼻腔吸入烟曲霉孢子的处理，分别吸入1周、2周和3周。每组大鼠经最后1次激发或吸入后24 h内处死以进行后续研究。

1.2.2 建立大鼠支气管哮喘模型 参考之前使用的方法[3]，现用现配制备致敏液[1 mg卵清蛋白（ovalbumin，OVA）+100 mg氢氧化铝+1 mL生理盐水混悬液]和激发液（1%OVA生理盐水溶液）。于实验的第1天和第8天，向每只大鼠的腹腔内注射1 mL灭活百日咳杆菌菌苗。每只大鼠两侧腹股沟、腹部和前足趾的每个点位分别注射200 μL致敏液，并通过腹腔注射200 μL。从第15天起将大鼠放置在自制的密闭雾化箱（50 cm×30 cm×30 cm）内。A组大鼠吸入生理盐水，而B至E组大鼠吸入激发液。雾化过程每周进行3次，每次30 min，持续3周。

1.2.3 制备烟曲霉孢子悬液 借鉴之前采用的方法[3]。将烟曲霉菌株接种在沙氏琼脂培养基上，在37℃的恒温环境中培育7 d。随后使用10 mL浓度为0.1%的吐温80溶液轻柔

冲洗培养基表面，收集冲洗液。使用无菌纱布过滤去除菌丝。将滤液离心 10 min，转速设定为 1 000 r/min。弃去上清液，将孢子重新悬浮在生理盐水中，并调整孢子浓度至 1×10^5 cfu/mL。操作过程中严格无菌操作。取少许孢子悬液接种于琼脂培养基，观察无细菌菌落形成，以排除细菌污染。经鲎试验测定孢子悬液内毒素水平<1 EU/mL。将孢子悬液接种于经环磷酰胺处理后的大鼠可致侵袭性肺部感染，证明上述制备过程未改变烟曲霉的毒力。

1.2.4 大鼠吸入烟曲霉孢子悬液 C~E 组大鼠自第 43 天起[4]，经鼻吸入烟曲霉孢子悬液。参考 Denis O 等[4]的方法，每次吸入前使用 20% 乌拉坦（5 mL/kg）对大鼠进行全身麻醉。待大鼠完全麻醉后，将其垂直放置，使用移液枪从双侧鼻孔各滴入 50 μL 烟曲霉菌孢子悬液（含 5×10^3 孢子），保持垂直体位 10 min。每周 2 次，C~E 组分别吸入 1、2、3 周。

1.2.5 手术和取材 各组大鼠于末次激发或吸入烟曲霉孢子 24 h 后，固定大鼠，气管插管处插入改良的静脉留置针，迅速开胸心脏穿刺取血，置于 1.5 mL Eppendorf 管中，室温放置 2 h 后，12 000 r/min 离心 20 min，取血清置于−80 ℃冰箱保存；靠近右肺门处结扎右主支气管，取右肺上叶保存在液氮中待用，右肺下叶放置于 10% 甲醛中固定 72 h、脱水、石蜡包埋，制成 5 μm 厚切片，进行苏木素−伊红（hematoxylin and eosin，HE）、过碘酸雪肤（periodic acid schiff，PAS）和 Masson 三色染色。气管插管经 3 次注入 PBS 液（共 10 mL），进行左肺支气管肺泡灌洗，回收肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）转速 1 000 r/min，离心 10 min，上清液置于−80 ℃冰箱保存。

1.2.6 BALF 白细胞总数和细胞分类计数 将细胞沉淀重悬于 1 mL Hanks 液，取 0.1mL 于血细胞计数台上计数细胞总数，取 0.1 mL 涂片，GMS 染色后于光镜下计数 300 个细胞，作细胞分类计数。

1.2.7 ELISA 法定量检测血清中总免疫球蛋白 E（Immunoglobulin E，IgE）含量及 BALF 上清中 IL−5、IL−13、TGF−β、及 IFN−γ 的浓度，按试剂盒说明书操作。

1.2.8 肺组织病理检查及肺组织病理图像的形态学测量及分析 将右肺下叶切片进行 HE、PAS、Masson 三色染色，制备肺组织病理切片。随机在各组中各选取 5 张不同大鼠的肺组织切片，在显微镜下观察并采集图像。使用 Image Pro Plus 软件对选取的图像进行形态学测量和分析。选取所有直径在 200~2 000 μm 范围内且管腔最短径/最长径≥0.6 的支气管。选取 HE 染色切片，计数黏膜固有层的炎症细胞数，并用上皮基底膜长度进行校正。炎症浸润的程度用每 100 μm 上皮基底膜上炎细胞的平均数来表示。使用油镜对每毫米上皮基底膜中嗜酸性粒细胞的数量进行计数，以反映嗜酸性粒细胞的浸润程度。测量受损上皮和总上皮的长度，以了解上皮细胞脱落的程度，并使用受损上皮长度与总上皮长度的百分比表示。选取 PAS 染色切片，并测量玫瑰红色区域的面积以及基底膜至气道上皮间区域的总面积，以评估杯状细胞的增生程度，并使用染色区域的面积与总面积的百分比表示。选取 Masson 三色染色切片，测量上皮基底膜下 20 μm 区域内阳性染色部分的面积以及此区域的总面积，胶原纤维沉积程度用阳性染色的面积与总面积的比率表示。

1.2.9 大鼠肺组织切片 TLR4 免疫组织化学染色 选取 5 张切片进行预实验筛选出合适的实验条件后，再进行正式实验。首先将切片在 62 ℃烤箱中烘烤 1.5 h，使用下行浓度梯度乙醇进行脱蜡和水化，PBS 冲洗。将切片置于 95 ℃枸橼酸钠抗原修复液中修复 20 min。PBS 冲洗后加入 3% 的过氧化氢孵育 15 min，使用 BSA 于 37 ℃孵育 30 min，加入一抗孵育液 4 ℃下过夜。PBS 冲洗后加入反应增强液，20 min 后孵育二抗。按照 1∶1 000 制备 DAB 显色液进行显色，使用苏木素复染。最后使用上行浓度乙醇进行脱水，二甲苯脱蜡，中性树脂封片。阴性对照：用 PBS 代替一抗，确定有无特异结合。于显微镜下观察到气道上皮细胞胞质内有染成棕黄色的颗粒，表示呈阳性反应。使用显微镜放大 200 倍采集图像，随机选取 5 个视野进行测量。使用 Image J 软件测量阳性信号的累积光密度（integrated optical density，IOD）。

1.2.10 大鼠肺组织 TLR4 mRNA 检测 将大鼠肺组织在液氮中充分研磨后加入 Trizol 提取 mRNA，经分离提纯后测定 mRNA 浓度，确定 mRNA 未被降解，经逆转录合成 cDNA，放入−20 ℃冰箱备用。使用 RT−PCR 法检测 TLR4mRNA 表达情况，内参使用 GADPH，设计并合成引物序列，TLR4 上游引物 5′−TGGTCAGTGTGCTTGTGGTA−3′，下游引物 5′−AGCTCGTTTCTCACCCAGTC−3′，GADPH 上游引物 5′−TTGGGTCAACTTCTCAGCACG−3′，下游引物 5′−AGGACAGGGGCTCCATTTAGAC−3′。扩增片段 293 bp。按照说明书配置上样体系，并进行扩增。扩增结束后得出 Ct 值，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 TLR4 mRNA 表达水平。

1.2.11 大鼠肺组织 TLR4 Western blot 检测 使用按照 BCA 法提取大鼠肺组织蛋白，按照蛋白标准曲线校正样本吸光值，计算待测蛋白浓度，调定蛋白浓度至 4 mg/mL 备用。制备 10% 浓缩胶使用彩色预染蛋白作为标志物将每组蛋白等体积上样到凝胶上。经过电泳和转膜再将蛋白质转移到硝酸纤维膜上，使用 5% 脱脂牛奶进行封闭 1 h，接下来加入小鼠来源 TLR4 一抗（Proteintech）在 4 ℃下孵育过夜，使用 TBST 洗涤 3 次，加入兔抗小鼠二抗在室温下孵育 2 h，使用显影液在曝光仪下显影。之后使用 Image J 软件对图像进行处理，将图像灰度调整至 8 bit，校正曲线，调整亮度、对比度并分析目标条带的分子量和相对灰度值。

1.3 统计学方法

统计分析使用 SPSS27 程序，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）的形式表示。使用 Graphpad Prism 软件对数据作图，采用 Photoshop 软件进行图片编辑与排版。多组间比较采用单因素方差分析进行统计学分析，组间两两比较采用 S−N−K 检验，相关性分析采用 Pearson 分析，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 各组大鼠BALF中炎症细胞计数及分类计数

C、D、E组大鼠BALF中细胞总数及淋巴细胞、嗜酸性粒细胞计数进行性增高，其中E组均较B组明显增多，差异有统计学意义（均P<0.001）。见表1。

表1 各组大鼠BALF中细胞总数、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞计数（$\times10^6$，$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	总数	淋巴细胞	嗜酸性粒细胞
A组	1.64 ± 0.32^{ab}	0.44 ± 0.17^{ab}	0.01 ± 0.01^{b}
B组	2.46 ± 0.42^{b}	0.88 ± 0.40^{b}	0.17 ± 0.06^{b}
C组	3.50 ± 0.55^{ab}	1.37 ± 0.49^{ab}	0.40 ± 0.09^{b}
D组	4.43 ± 0.72^{ab}	1.83 ± 0.33^{ab}	0.97 ± 0.12^{ab}
E组	5.88 ± 1.04^{a}	2.27 ± 0.37^{a}	1.49 ± 0.43^{a}
F值	38.011	24.137	52.265
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与B组比较，P<0.05；b，与E组比较，P<0.05

2.2 各组大鼠血清中总IgE水平

C、D、E组大鼠血清中总IgE水平进行性升高，其中E组IgE水平明显高于B组，差异有统计学意义（P<0.001）。见表2。

表2 各组大鼠血清总IgE水平（ng/mL，$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	血清总IgE水平
A组	13.57 ± 3.67^{ab}
B组	26.54 ± 3.14^{b}
C组	46.24 ± 5.68^{ab}
D组	74.98 ± 9.93^{ab}
E组	109.76 ± 18.11^{a}
F值	77.750
P值	<0.001

注：a，与B组比较，P<0.05；b，与E组比较，P<0.05

2.3 各组大鼠BALF上清细胞因子水平

哮喘大鼠吸入烟曲霉孢子3周后，BALF上清中IL-5、IL-13、TGF-β水平明显增加，差异有统计学意义（均P<0.001），而IFN-γ水平自吸入烟曲霉后差异无统计学意义（P=0.654）。见表3。

2.4 肺组织病理学图像形态学测量分析

2.4.1 大鼠气道炎症浸润和上皮细胞脱落程度 C、D、E组大鼠支气管周围明显可见大量嗜酸性粒细胞和炎症细胞浸润，气道上皮损伤脱落。E组气道嗜酸性粒细胞和炎症细胞数量明显升高，气道上皮损伤情况最重，差异有统计学意义（均P<0.001）。见表4，图1。

2.4.2 各组大鼠气道上皮杯状细胞增生程度 在B组大鼠的PAS染色面积大于A组，哮喘大鼠暴露于烟曲霉孢子后，气道上皮中PAS染色面积进行性增大，E组染色范围最广（P<0.001）。见图2，表5。

2.4.3 各组大鼠气道上皮胶原纤维沉积程度 C、D、E组大鼠气道上皮Masson染色面积进行性增大，且E组染色面积最大，差异有统计学意义（P<0.001）。见图3，表5。

表3 各组大鼠BALF上清IL-5、IL-13、TGF-β、IFN-γ水平（ng/mL，$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	IL-5	IL-13	TGF-β	IFN-γ
A组	9.81 ± 2.98^{ab}	16.08 ± 3.55^{b}	23.49 ± 2.99^{ab}	22.05 ± 6.57^{ab}
B组	18.05 ± 4.75^{b}	30.24 ± 6.55^{b}	35.25 ± 6.63^{b}	34.91 ± 7.84
C组	28.79 ± 6.67^{ab}	46.81 ± 8.04^{ab}	54.07 ± 4.87^{ab}	34.09 ± 5.23
D组	40.30 ± 5.97^{ab}	74.92 ± 13.54^{ab}	79.85 ± 9.92^{ab}	37.39 ± 6.88
E组	54.08 ± 9.26^{a}	118.63 ± 20.51^{a}	105.00 ± 15.73^{a}	36.72 ± 7.68
F值	47.006	68.507	78.072	4.963
P值	<0.001	<0.001	<0.001	0.003

注：a，与B组比较，P<0.05；b，与E组比较，P<0.05

表4 各组大鼠气道炎症细胞及嗜酸性粒细胞浸润和脱落上皮长度比值（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	炎症细胞（每100 μm基底膜）	嗜酸性粒细胞（每mm基底膜）	脱落上皮长度/上皮内径（%）
A组	10.75 ± 3.42^{ab}	0.02 ± 0.01^{ab}	0.00 ± 0.00^{ab}
B组	20.95 ± 5.31^{b}	0.56 ± 0.15^{b}	2.24 ± 0.40^{b}
C组	29.88 ± 6.86^{b}	1.07 ± 0.47^{b}	5.55 ± 1.53^{ab}
D组	52.11 ± 11.61^{ab}	2.22 ± 0.64^{ab}	10.63 ± 2.31^{ab}
E组	76.11 ± 9.10^{a}	3.75 ± 0.63^{a}	18.78 ± 3.11^{a}
F值	67.773	63.364	96.223
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与B组比较，P<0.05；b，与E组比较，P<0.05

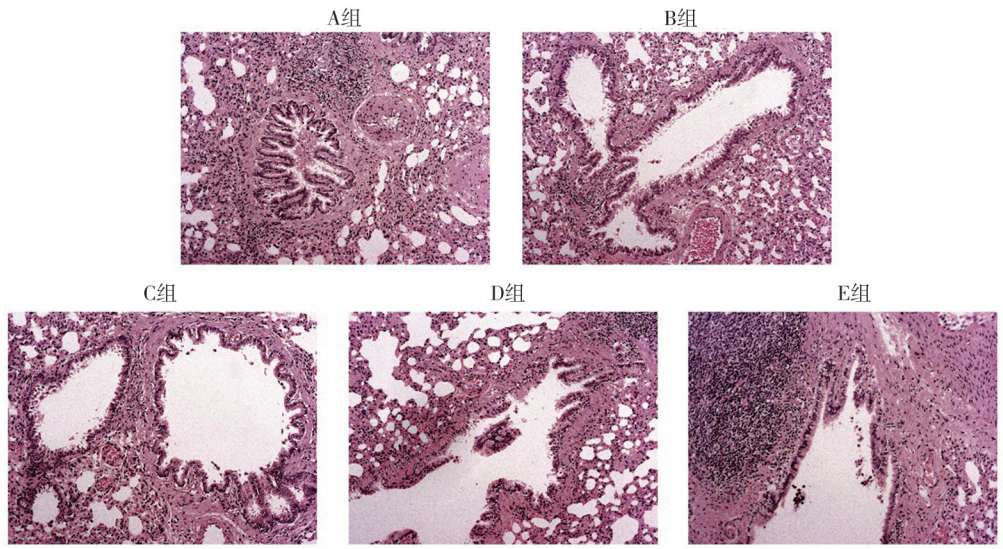


图1　大鼠气道炎症浸润和上皮细胞脱落（200×，HE染色）

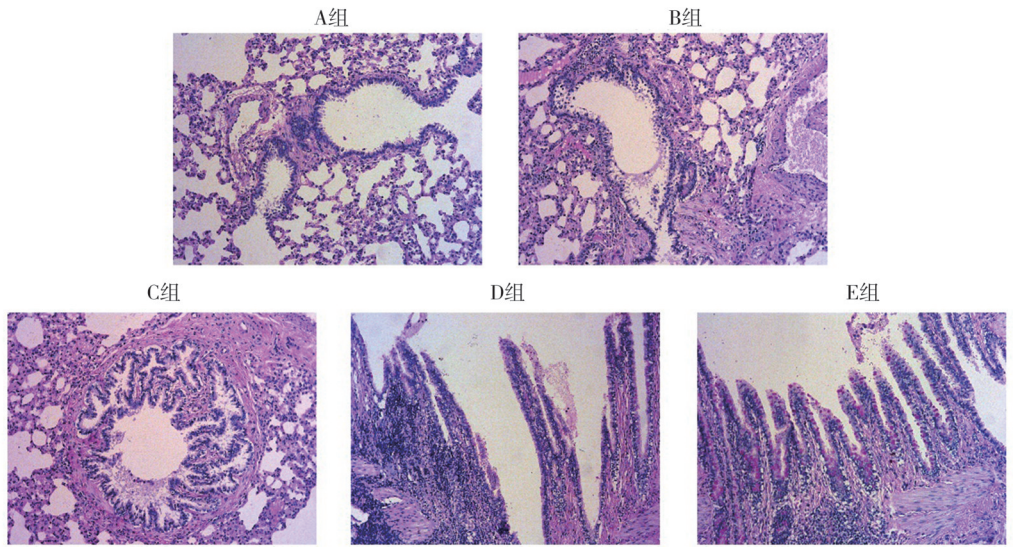


图2　大鼠气道上皮杯状细胞增生程度（200×，PAS染色）

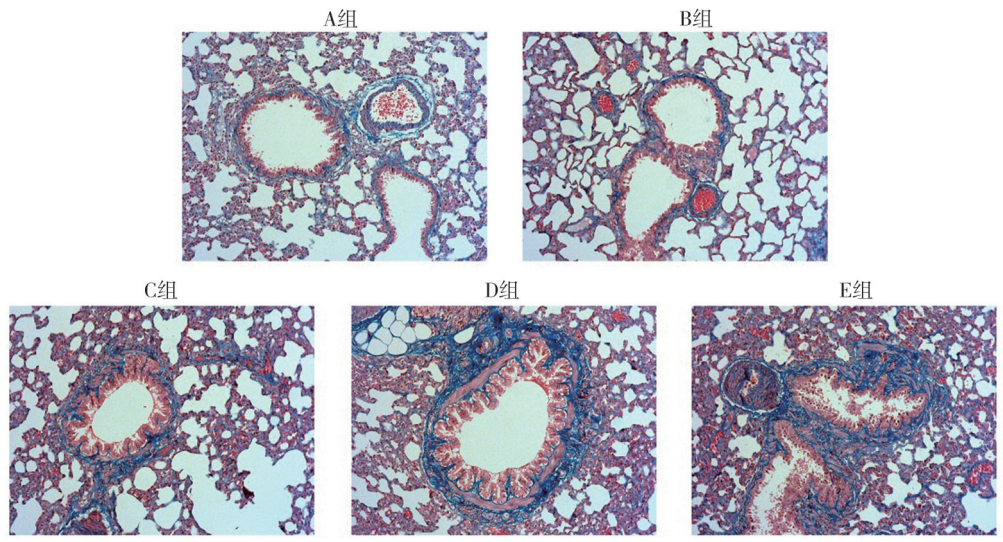


图3　大鼠气道上皮胶原纤维沉积（200×，Masson染色）

表5　各组大鼠的气道上皮PAS染色面积比值和Masson染色阳性面积比值（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	PAS染色面积/上皮细胞面积（%）	Masson染色阳性面积/基底膜下20 μm区域面积
A组	4.39 ± 0.92^{ab}	3.30 ± 0.61^{ab}
B组	8.22 ± 1.17^{b}	10.78 ± 2.57^{b}
C组	11.60 ± 3.06^{ab}	17.87 ± 3.13^{ab}
D组	14.20 ± 3.05^{ab}	22.60 ± 3.89^{ab}
E组	19.98 ± 2.42^{a}	30.44 ± 5.56^{a}
F值	39.368	52.383
P值	<0.001	<0.001

注：a，与B组比较，P<0.05；b，与E组比较，P<0.05

2.5　各组大鼠肺组织TLR4 mRNA的表达

Real-time PCR结果显示，烟曲霉能够剂量依赖性提高哮喘大鼠TLR4 mRNA的表达。吸入3周时尤其明显（P<0.001）。见图4。

2.6　各组大鼠气道上皮TLR4的表达

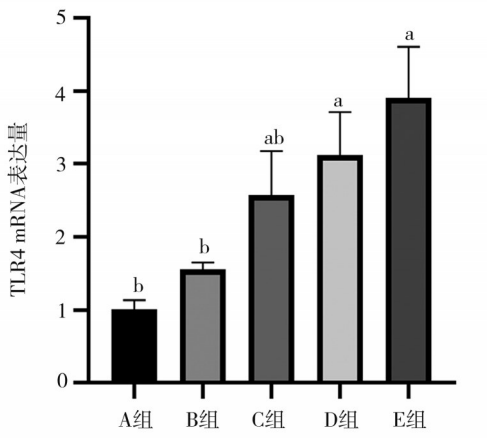
免疫组化结果显示，B组大鼠的气道上皮中散布着TLR4表达，而A组大鼠的气道上皮中未发现明显TLR4表达；哮喘大鼠经过1、2、3周烟曲霉暴露后，TLR4的表达呈现剂量依赖性增加，E组与A组相比差异有统计学意义（P<0.001）。见图5。

2.7　各组大鼠气道上皮TLR4表达

Western blot检测显示吸入烟曲霉后TLR4表达量开始增高，烟曲霉暴露2周后TLR4表达量明显升高，暴露3周后表达量更高（P<0.001）。见图6，表6。

2.8　指标间的相关性

各组大鼠的TLR4/β-actin值与气道上皮损伤脱落程度呈正相关（r=0.960，P<0.001），与气道PAS染色面积百分比正相关（r=0.944，P<0.001），与气道Masson染色阳性面积百分比正相关（r=0.856，P<0.001）。各组大鼠TLR4 Area%值与气道上皮损伤脱落程度呈正相关（r=0.696，P<0.001），与气道PAS染色面积百分比正相关（r=0.772，P<0.001），与气道Masson染色阳性面积百分比正相关（r=0.796，P<0.001）。



注：a，与B组比较，P<0.05；b，与E组比较，P<0.05

图4　各组大鼠肺组织TLR4 mRNA的表达

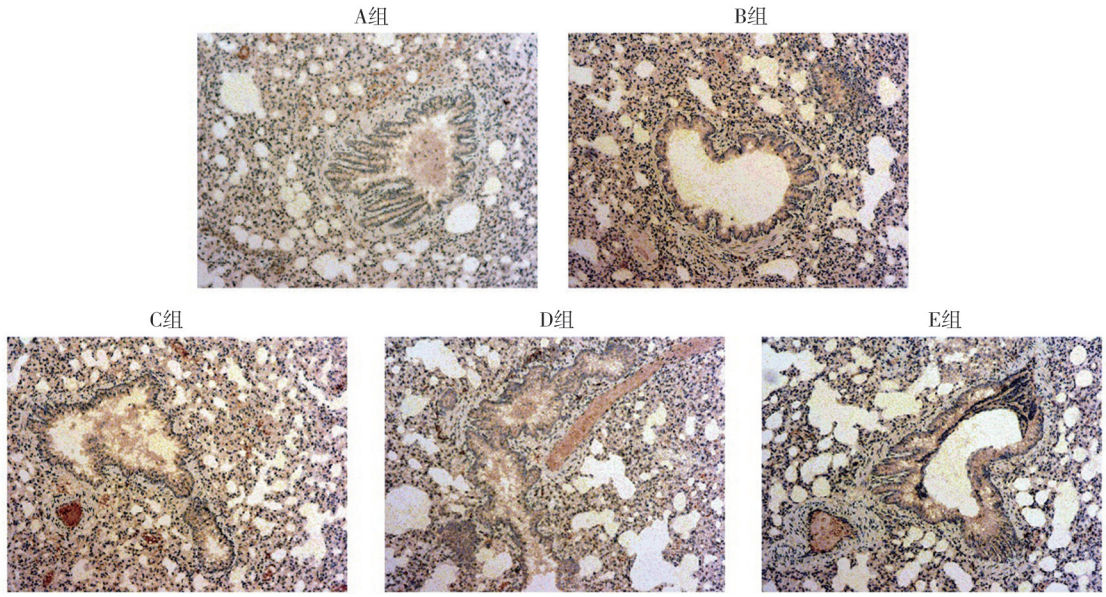
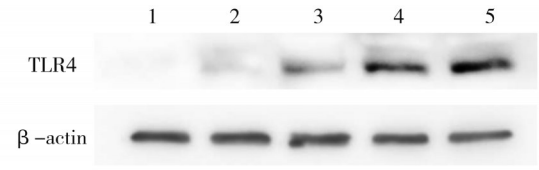


图5　各组大鼠气道上皮TLR4表达（200×，IHC染色）



注：1~5泳道分别为A组、B组、C组、D组、E组

图6 Western blot检测各组大鼠肺组织TLR4的表达

表6 Western blot检测各组大鼠气道上皮细胞TLR4表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	TLR4/β-actin
A组	0.04 ± 0.02^{ab}
B组	0.18 ± 0.06^{b}
C组	0.37 ± 0.02^{ab}
D组	0.74 ± 0.11^{ab}
E组	1.06 ± 0.03^{a}
F值	110.544
P值	<0.001

注：a，与B组比较，P<0.05；b，与E组比较，P<0.05

3 讨 论

支气管哮喘是一种常见的慢性呼吸道疾病，其发病率正处于逐年上升的趋势。哮喘的病因及发病机制尚不明确，但患者的变应性体质和过敏原暴露是引发及加剧哮喘的重要危险因素。无论是室内还是室外环境，都有多种过敏原，例如尘螨、花粉等，都可能导致哮喘。近年来，人们对真菌暴露与哮喘恶化之间的关系产生了浓厚的兴趣。许多流行病学资料显示，环境中真菌孢子浓度的增加与支气管哮喘的加重密切相关[5-6]。

空气中的许多真菌能够作为过敏原引发哮喘，常见的有枝孢霉、链格孢霉和烟曲霉等[6]。烟曲霉是一种常见的寄生于腐物上的真菌，广泛分布于室内和室外环境中，其分生孢子直径只有2~3 μm，能够长时间在空气中悬浮，易被吸入到下呼吸道[7]。另外，烟曲霉强烈的致敏能力是促使哮喘恶化的关键。但与花粉、尘螨等致敏原相比，烟曲霉除了具备致敏能力，在合适的条件下能够在呼吸道内定植并引发侵袭性感染。因此烟曲霉对宿主免疫反应的刺激更强，能够引发更持久更严重的气道炎症并造成气道结构的改变。流行病学资料提示，对烟曲霉过敏是诱导哮喘加重的危险因素，而持续的烟曲霉暴露可能是哮喘进展的驱动因素[5]。

TLR家族是一种包含TLR1~TLR10共10个成员的模式识别受体，其特征是识别病原微生物上的病原相关分子模式，其中TLR1、2、4、5、6、10主要位于细胞膜上，其余4种主要位于核受体上。TLR4主要位于单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等细胞的细胞膜上，通常与固有免疫和获得性免疫相关。这种模式识别受体是一种Ⅰ型跨膜蛋白，其胞外结构域上含有丰富的亮氨酸序列，从而可以直接识别并结合病原体上的病原相关分子模式，引发一系列信号转导[8]。研究发现，革兰阴性细菌细胞壁上的脂多糖可以激活TLR4[9]，而抑制TLR4及其下游信号因子能够有效抑制炎症反应。Li M等[10]使用TLR4的拮抗剂TAK242干预屋尘螨诱导的慢性哮喘小鼠，发现TH_1/TH_2失衡得到恢复，哮喘小鼠的气道炎症也减轻。Chen SN等[11]使用脂多糖刺激TLR4基因敲除小鼠发现其全身炎症反应较对照组明显降低。上述研究的结果提示TLR4在哮喘的气道炎症的发生和发展中起重要作用。

本课题组之前的研究发现，暴露在烟曲霉中的哮喘大鼠气道炎症加剧，且气道上皮的损伤程度增加，EGFR和MUC5AC的表达有所上升，引起杯状细胞增生和粘液过度分泌，加剧气道上皮下纤维化，气道反应性增加。上述反应呈明显的剂量依赖性[3,12-13]。然而，烟曲霉暴露是否通过上调TLR4的表达加重哮喘的气道炎症和气道重构，目前仍不明确。本研究通过采用OVA致敏并反复激发的方法构建大鼠哮喘模型，并进行反复烟曲霉孢子吸入，模拟哮喘患者接触烟曲霉孢子的情况。旨在探讨慢性烟曲霉暴露对哮喘大鼠气道TLR4表达的影响和TLR4在烟曲霉暴露加重哮喘中的作用。本研究发现，经鼻吸入烟曲霉孢子1周后哮喘大鼠气道TLR4表达上调，吸入2周和3周后TLR4表达上调更加明显，提示烟曲霉可以剂量依赖性上调大鼠肺组织TLR4的表达；TLR4表达水平与气道炎症及重构的程度正相关，提示烟曲霉暴露可能通过促进TLR4的表达加重哮喘。另外，TLR4的过度激活能够促进多种炎症因子产生，进而促进哮喘大鼠的TH_2型炎症反应。本研究发现TLR4与烟曲霉致敏哮喘的炎症严重程度密切相关，抑制TLR4的表达或抑制TLR4功能可能是防治烟曲霉暴露加重哮喘的一个新的靶点。

TLR家族的信号转导主要依赖4种接头蛋白，分别是TRAM、TRIF、TRIAP和MyD88。根据各种接头蛋白的性质激活不同的激酶和泛素连接酶。TLR4的胞内结构域TIR的二聚化导致MyD88和TIRAP适配器蛋白募集并进行信号传递[14]，这种信

号传递途径为MyD88依赖途径。MyD88通过死亡结构域招募IRAK4并与之结合，使IRAK4磷酸化[15]，磷酸化的IRAK4招募IRAK1、IRAK2、TRAF6形成复合体，继而激活TRAF6。TRAF6通过激活TAK1、TAB1/2复合体继续进行信号传导，TAB2可以作为TRAF6和NEMO上多泛素链的受体使这些蛋白结合在一起。TAK1激活包含NEMO、IκKα、IκKβ三部分的κB抑制因子激酶（inhibitor of kappa B kinase，IκK）复合体。静息状态下NF-κB被IκBα遮盖而处于抑制状态，IκK复合体刺激IκBα磷酸化，磷酸化的IκBα被E3泛素连接酶复合物识别并与多个泛素分子共价结合发生泛素化而被蛋白酶体识别降解，此时NF-κB的抑制状态得以解除，之后转位进入细胞核并与靶基因启动子结构域上的特定位点相结合促进转录并诱导炎症因子的表达[16]。TAK1除了能够激活IκK，也可以激活P38 MAPK和JNK MAPK通路。TLR4也可以通过MyD88非依赖途径进行信号传递。TRAM和TRIF激活TRAF3，进而激活TBK1和IκKε，使IRF3磷酸化并入核发挥作用，也可以解除NF-κB的抑制状态，并转位入核[17-18]。在TLR4的激活过程中，MD2是一种不可缺少的辅助蛋白，因此目前抑制TLR4的方式主要包括下调TLR4的表达，直接与TLR4或TLR4/MD2复合体结合抑制其活性，直接与MD2结合防止TLR4激活等。研究发现，下调TLR4的表达或抑制TLR4活化，可以减轻脓毒性休克患者的症状和全身炎症反应[19-20]，而TLR4在烟曲霉暴露加重哮喘中的作用有待进一步的研究。

总之，本研究的结果表明，烟曲霉暴露能够剂量依赖性上调哮喘大鼠气道TLR4的表达，加重气道炎症和气道重构。提示下调TLR4的表达或抑制TLR4功能可能是防治烟曲霉暴露加重哮喘的一个新的靶点。

参 考 文 献

[1] Tiwary M，Samarasinghe AE. Initiation and pathogenesis of severe asthma with fungal sensitization[J]. Cells，2021，10(4)：913.

[2] Agarwal R，Muthu V，Sehgal IS. Relationship between *Aspergillus* and asthma[J]. Allergol Int，2023，72(4)：507-520.

[3] Gao FS，Qiao JO，Zhang Y，et al. Chronic intranasal administration of *Aspergillus fumigatus* spores leads to aggravation of airway inflammation and remodelling in asthmatic rats[J]. Respirology，2009，14(3)：360-370.

[4] Denis O，van den Brûle S，Heymans J，et al. Chronic intranasal administration of mould spores or extracts to unsensitized mice leads to lung allergic inflammation，hyper-reactivity and remodelling[J]. Immunology，2007，122(2)：268-278.

[5] Pashley CH，Wardlaw AJ. Allergic fungal airways disease(AFAD)：an under-recognised asthma endotype[J]. Mycopathologia，2021，186(5)：609-622.

[6] Wardlaw AJ，Rick EM，Pur Ozyigit L，et al. New perspectives in the diagnosis and management of allergic fungal airway disease[J]. J Asthma Allergy，2021，14：557-573.

[7] Latgé JP，Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019[J]. Clin Microbiol Rev，2019，33(1)：e00140-18.

[8] Kawai T，Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity：update on Toll-like receptors[J]. Nat Immunol，2010，11(5)：373-384.

[9] Kirtland ME，Tsitoura DC，Durham SR，et al. Toll-like receptor agonists as adjuvants for allergen immunotherapy[J]. Front Immunol，2020，11：599083.

[10] Li M，Wang ZN，Yang LF，et al. TLR4 antagonist suppresses airway remodeling in asthma by inhibiting the T-helper 2 response[J]. Exp Ther Med，2017，14(4)：2911-2916.

[11] Chen SN，Tan Y，Xiao XC，et al. Deletion of TLR4 attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis[J]. Acta Pharmacol Sin，2021，42(10)：1610-1619.

[12] Gao FS，Cao TM，Gao YY，et al. Effects of chronic exposure to *Aspergillus fumigatus* on epidermal growth factor receptor expression in the airway epithelial cells of asthmatic rats[J]. Exp Lung Res，2014，40(6)：298-307.

[13] Gao FS，Gao YY，Liu MJ，et al. Chronic *Aspergillus fumigatus* exposure upregulates the expression of mucin 5AC in the airways of asthmatic rats[J]. Exp Lung Res，2012，38(5)：256-265.

[14] Kim HJ，Kim H，Lee JH，et al. Toll-like receptor 4(TLR4)：new insight immune and aging[J]. Immun Ageing，2023，20(1)：67.

[15] Kfoury A，Virard F，Renno T，et al. Dual function of MyD88 in inflammation and oncogenesis：implications for therapeutic intervention[J]. Curr Opin Oncol，2014，26(1)：86-91.

[16] Hoesel B，Schmid JA. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer[J]. Mol Cancer，2013，12：86.

[17] Figueroa-Hall LK，Paulus MP，Savitz J. Toll-like receptor signaling in depression[J]. Psychoneuroendocrinology，2020，121：104843.

[18] Lim KH，Staudt LM. Toll-like receptor signaling[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol，2013，5(1)：a011247.

[19] Zhang YS，Liang XJ，Bao XF，et al. Toll-like receptor 4(TLR4) inhibitors：current research and prospective[J]. Eur J Med Chem，2022，235：114291.

[20] Bai Y，Min R，Chen PC，et al. Disulfiram blocks inflammatory TLR4 signaling by targeting MD-2[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2023，120(31)：e2306399120.

（收稿：2024-05-27；修回：2024-07-13；录用：2024-09-02）

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：

张令轩，李 萌，宋 歌，等. 慢性烟曲霉暴露对支气管哮喘大鼠气道Toll样受体4表达的影响[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(12)：1702-1709.