

# MiR-155-5p 介导 Treg/Th17 免疫失衡致变应性鼻炎机制研究

唐桥斐, 张爽, 王岫, 李赛楠, 徐智, 闫智永

(沈阳医学院附属第二医院, 沈阳 110001)

**摘要:**为探讨 miR-155-5p 异常表达对变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)小鼠 Th17/Treg 免疫平衡的影响及机制, 将 6 周龄 BALB/c 小鼠随机平均分成 6 组:A. 对照组(Control)、B. 模型组(AR)、C. miR-155-5p 空载对照组(AR+Vector)、D. miR-155-5p 过表达组(AR+miR-155-5p)、E. miR-155-5p 阴性对照组(AR+NC)、F. miR-155-5p 沉默组(AR+抗 miR-155-5p 抗体)。采用卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导建立 AR 小鼠模型, 鼻腔内给予 miR-155-5p 过表达或沉默慢病毒进行干预。实验末对各组小鼠过敏症状进行评分, HE 染色观察鼻黏膜组织病理学变化, real-time PCR、Western blotting 检测鼻黏膜组织中 miR-155-5p、Foxp3、ROR $\gamma$ t 的表达水平, ELISA 检测血清中 IgE 及炎性因子 TGF- $\beta$ 1、IL-10、IL-17A、IL-6 表达, 流式细胞术检测外周血 Treg 和 Th17 百分比。结果发现, 与对照组比较, 模型组小鼠鼻炎症状评分明显增加, Foxp3、ROR $\gamma$ t mRNA 及蛋白表达水平明显升高, 血清 IgE、IL-17A、IL-6 及 Th17 百分比显著上升, TGF- $\beta$ 1、IL-10 及 Treg 百分比明显降低。MiR-155-5p 过表达加重模型组小鼠鼻炎症状, 同时促进 IgE 及 Th17 相关细胞因子的表达, 抑制 Treg 相关细胞因子的表达, 而 miR-155-5p 沉默后 Treg/Th17 免疫失衡得到缓解, 小鼠鼻炎症状评分显著下降。MiR-155-5p 可以显著加重 AR 小鼠的鼻炎症状, 可能与影响 Foxp3、ROR $\gamma$ t 表达, 调节 Treg/Th17 免疫平衡有关。

**关键词:**miR-155-5p; 变应性鼻炎; 辅助性 T 细胞 17; 调节性 T 细胞

**中图分类号:**R392.3

**文献标志码:**A

**文章编号:**1001-2478(2019)02-0126-07

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)为常见的过敏性疾病之一, 主要症状有鼻塞、鼻痒、鼻分泌物增多和打喷嚏等, 是导致支气管哮喘的危险因素之一<sup>[1-2]</sup>, 严重影响患者的生活质量和工作效率。随着社会发展、空气污染加重, 我国罹患 AR 的患者数正逐年攀升<sup>[3]</sup>, 目前尚无有效的根治手段。深入探讨 AR 发病机制, 寻求更为有效的治疗方法已成为业内热点。

近年来 Treg 和 Th17 亚群的发现丰富了经典的 Th1/Th2 免疫模式内涵, 加深了研究者对 AR 发病机制的理解<sup>[4]</sup>。资料显示, 在 AR 伴随支气管哮喘的患者中, ROR $\gamma$ t mRNA 及血清 IL-17A 水平明显增加, TGF- $\beta$ 1 的表达显著减少<sup>[5]</sup>。IL-9 单克隆抗体通过减少 IL-17A、ROR $\gamma$ t 表达抑制 Th17 反应, 同时增加 Foxp3 表达诱导 Treg 反应, 从而发挥对 AR 的治疗作用<sup>[6]</sup>。这说明 Treg/Th17 免疫失衡参与 AR 的发生和进展, 很可能是 AR 免疫治疗的新靶点。因此, 研究拟通过动物实验探讨

miR-155-5p 异常表达对 AR 小鼠 Th17/Treg 免疫平衡的影响及机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 6 周龄 BALB/c 小鼠, 体质量 18~25 g, 由中国医科大学实验动物中心提供。小鼠于空调动物房饲养, 自由进食和饮水, 适应性喂养 1 周。

**1.2 试剂** 卵清蛋白(ovalbumin, OVA), 购自 Sigma-Aldrich 公司; 抗 Foxp3-PE 抗体, 购自万类生物科技有限公司; 抗 ROR $\gamma$ t 抗体, 购自 Abcam 公司; 抗 CD4-FITC、IL-17A-APC 抗体, 购自 Thermo Fisher 公司; 小鼠 IgE、IL-10、IL-17A、IL-6、TGF- $\beta$ 1 ELISA 试剂盒, 购自杭州联科生物技术有限公司。

**1.3 主要仪器** DW HL-668 型 -70 °C 超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司); RM2235 型石蜡切片机(Leica 公司); QH01-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); DP73 型显微镜拍照系统(OLYMPUS 公司); Exicycler 96 型荧光定量 PCR 仪(BIONEER 公司); NANO 2000 型紫外分光光度计(Thermo Fisher 公司); DYCZ-24DN 双垂直蛋白电泳仪、DYCZ-40D 型转移槽、WD-9413B 型凝胶成像系统(北京市六一

收稿日期:2018-09-30

基金项目:沈阳市科技计划项目(17-230-9-29)

作者简介:唐桥斐(1978—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事变应性鼻炎发病机制的研究

通信作者:闫智永(E-mail: javawriter@163.com)

仪器厂); ELX-800 型酶标仪(BioTek 公司); C6 型流式细胞仪(BD 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 AR 模型的建立 BALB/c 小鼠适应性喂养 1 周后进行基础致敏:20  $\mu\text{g}$  OVA + 2 mg Al(OH)<sub>3</sub> (液体总量为 1 mL), 分别于第 1、7 和 14 天给予腹腔注射; 加强致敏:采用含 6 % OVA 的生理盐水进行鼻内攻击, 40  $\mu\text{L}$ /鼻孔, 1 次/d, 持续 7 d, 待完全吸入后归笼饲养; 正常对照组给予等体积生理盐水。

1.4.2 病毒干预及实验分组 将 BALB/c 小鼠随机平均分为 6 组, 即 A. 对照组(Control)、B. 模型组(AR)、C. miR-155-5p 空载对照组(AR + Vec-

tor)、D. miR-155-5p 过表达组(AR + miR-155-5p)、E. miR-155-5p 阴性对照组(AR + NC)、F. miR-155-5p 沉默组(AR + 抗 miR-155-5p 抗体), 每组 6 只。C、D、E、F 慢病毒颗粒干预组于第 18 天向每只小鼠鼻腔滴入  $1 \times 10^9$  TU/mL 慢病毒颗粒(10  $\mu\text{L}$ /鼻孔), 对照组和模型组给予等体积生理盐水。MiR-155-5p 过表达及沉默慢病毒由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.4.3 症状学评分<sup>[7]</sup> 在末次激发致敏 15 min 内, 对小鼠的喷嚏个数、搔鼻次数和鼻分泌物量进行统计并计算总分, 评估造模情况。总分 > 5 代表建模成功。AR 小鼠症状评分标准见表 1。

表 1 小鼠 AR 症状评分标准

分级积分	喷嚏(个)	鼻分泌物量	搔鼻次数
0	0	无	无
1	1~3	前鼻孔有鼻分泌物	轻微搔鼻几次
2	4~10	鼻分泌物超过前鼻孔	双爪反复搔鼻
3	>11	面部布满鼻分泌物	搔鼻面部不止、四处摩擦

1.4.4 HE 染色观察鼻黏膜组织病理学变化 取小鼠整个鼻腔, 10 %多聚甲醛固定 24 h, 脱钙、梯度乙醇脱水, 对组织进行常规透蜡、包埋和切片, 切片厚度约 5  $\mu\text{m}$ 。脱水后依次放入 HE 染色液中, 分别浸泡 5 min 和 3 min; 再次对组织进行脱水处理; 最后滴加中性树胶封片, 自然风干后置于 400 倍显微镜下观察, 拍照记录。

1.4.5 Real-time PCR 检测 miR-155-5p、Foxp3、ROR $\gamma$ t mRNA 的表达 登录 NCBI 网站查询 miR-

155-5p、Foxp3、ROR $\gamma$ t 的 mRNA 序列并设计引物(具体序列见表 2), 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。用试剂盒提取小鼠鼻黏膜组织总 RNA, 反转录生成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 40 个循环。得出 Ct 值后采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算基因相对表达量。

表 2 Real-time PCR 分析引物序列

基因名称	前向引物	反向引物	产物长度(bp)
miR-155-5p	CCGCGCTTAATGCTAATTG	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC	63
Foxp3	TCACCTATGCCACCCTTATCC	TGCGAAACTCAAATTCATCTACG	225
ROR $\gamma$ t	AGCAGGAGCAATGGAAGTCG	TGAGAACCAGGGCCGTGTAG	215
$\beta$ actin	CTGTGCCCATCTACGAGGGCTAT	TTTGATGTCACGCACGATTTC	155
U6	CGCAAGGATGACACGCAAAT	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC	76

1.4.6 Western blotting 检测 Foxp3、ROR $\gamma$ t 蛋白的表达 取小鼠鼻黏膜组织样本, 常规方法提取总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白质浓度, 煮沸制作样品上样液。取 20  $\mu\text{L}$  上样(约含 40  $\mu\text{g}$  蛋白质), SDS-PAGE 恒压电泳 2.5 h 分离蛋白质, 然后转印到 PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭。一抗(1 : 500 稀释)4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 二抗(1 : 5 000 稀释)37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 45

min, ECL 底物发光, 扫描胶片。凝胶成像系统分析目的条带, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 计算 Foxp3、ROR $\gamma$ t 蛋白的相对表达量。

1.4.7 ELISA 检测血清 IgE 及细胞因子的表达 末次激发 2 h 后自小鼠眼窝静脉丛采血, 静置 20 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 2 min, 收集血清, 冷冻保存。使用 ELISA 试剂盒检测血清中 IgE、

TGF- $\beta$ 1、IL-10、IL-17A、IL-6 的含量。

1.4.8 流式细胞术检测 Treg 和 Th17 百分比 常规方法分离 PBMC, 磁珠分选 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞, PBS 清洗 2 次, 小心去除上清, 再加入 PBS 重悬细胞。按照检测目的分别加入 0.25  $\mu$ g 抗 CD4-FITC 抗体、1  $\mu$ g 抗 Foxp3-PE 抗体、0.125  $\mu$ g 抗 IL-17A-APC 抗体, 室温避光孵育 30 min。310 $\times$ g 离心 5 min, PBS 清洗细胞 2 次, 向每管细胞样本中加入 500  $\mu$ L 染色缓冲液, 轻轻混匀并避光保存, 用流式细胞术检测并分析数据。

1.5 统计学处理 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 组间差异比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 小鼠症状评分 与 Control 组比较, AR 组小鼠打喷嚏、搔鼻次数及鼻分泌物量明显增多 ( $P < 0.01$ ), 后者评分均值为  $6.67 \pm 1.03$  分; 采用 miR-155-5p 过表达慢病毒干预后, 小鼠症状评分均值为  $8.33 \pm 1.21$  分, 较 AR 组显著升高 ( $P < 0.05$ ); 采用 miR-155-5p 沉默慢病毒干预后, 小鼠鼻分泌物量、搔鼻和打喷嚏次数较 AR 组显著减少, 评分均值为  $4.67 \pm 1.21$  分, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而 AR+Vector 组和 AR+NC 组

中小鼠的症状评分较 AR 组未发生明显变化。以上结果说明 miR-155-5p 影响 AR 小鼠的鼻炎症状严重程度, 参与 AR 的发生和进展。(表 3)

表 3 各组小鼠症状评分结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数( <i>n</i> )	评分
Control 组	6	$0.83 \pm 0.98$
AR 组	6	$6.67 \pm 1.03^{**}$
AR+Vector 组	6	$6.83 \pm 1.47$
AR+miR-155-5p 组	6	$8.33 \pm 1.21^{\#}$
AR+NC 组	6	$6.67 \pm 1.21$
AR+抗 miR-155-5p 抗体组	6	$4.67 \pm 1.21^{\#}$

注:与 Control 组比较,  $^{**}P < 0.01$ ; 与 AR 组比较,  $^{\#}P < 0.05$

2.2 鼻黏膜组织病理学变化 Control 组小鼠鼻黏膜组织结构完整, 上皮细胞排列整齐, 未见炎症细胞浸润; AR 组小鼠鼻黏膜组织结构紊乱, 间质出现明显增生和充血, 可见炎症细胞浸润; 采用 miR-155-5p 过表达慢病毒干预后, 炎症细胞浸润明显, 间质增生和充血情况加重; 而采用 miR-155-5p 沉默慢病毒干预后鼻黏膜炎症细胞浸润减少, 上皮细胞排列较为整齐, 但间质仍有少许充血。这说明 miR-155-5p 可以加重小鼠鼻黏膜组织病理学变化。(图 1)

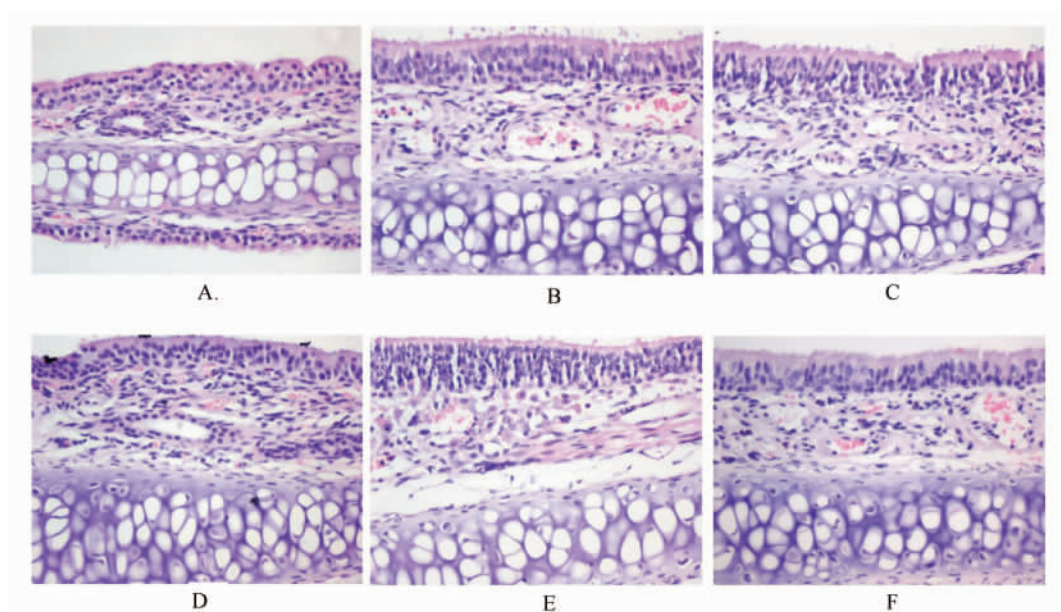


图 1 各组小鼠鼻黏膜组织病理学改变 (400 $\times$ )

注: A. Control 组; B. AR 组; C. AR+Vector 组; D. AR+miR-155-5p 组; E. AR+NC 组; F. AR+抗 miR-155-5p 抗体组

### 2.3 MiR-155-5p 及 Foxp3、ROR $\gamma$ t mRNA 的表达

实验结果显示, miR-155-5p 在 AR 组中的表达

较 Control 组明显增加 ( $P < 0.01$ ), 说明 *miR-155-5p* 参与 AR 发病; 同 AR 组比较, *miR-155-5p* 在 AR+*miR-155-5p* 组中的表达量明显升高 ( $P < 0.01$ ), 在 AR+抗 *miR-155-5p* 抗体组的表达下降 ( $P < 0.01$ ), 说明 *miR-155-5p* 沉默及过表达慢病毒载体构建成功。(图 2)

*Foxp3*、*RORγt* 分别是 Treg 和 Th17 的特异性转录因子, 2 个指标的表达水平在一定程度上可反映 2 种细胞的活跃程度。实验结果显示, AR 组中 *Foxp3* mRNA 的表达量较 Control 组显著减少 ( $P < 0.01$ ), *RORγt* mRNA 的表达量显著增加 ( $P < 0.01$ ); *miR-155-5p* 过表达后 *Foxp3* mRNA 的表达量较 AR 组明显减少 ( $P < 0.01$ ), *RORγt* mRNA 的表达量明显增加 ( $P < 0.01$ ); 而沉默 *miR-155-5p* 后, *Foxp3* mRNA 的表达量显著上升 ( $P < 0.01$ ), *RORγt* mRNA 的表达量显著降低 ( $P < 0.01$ )。这说明 *miR-155-5p* 可以影响 *Foxp3* 和 *RORγt* mRNA 的表达量, 调节 AR 小鼠体内 Treg/Th17 免疫平衡。(图 2)

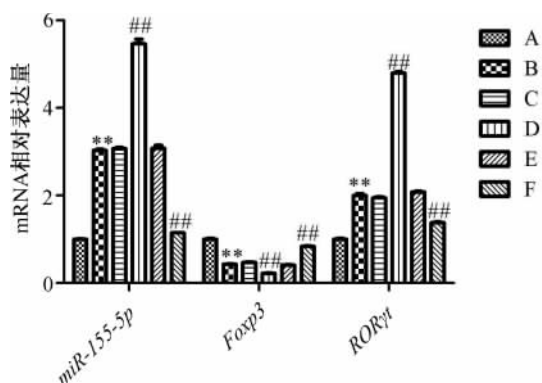


图2 小鼠鼻黏膜 *miR-155-5p*、*Foxp3*、*RORγt* mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

注: A. Control 组; B. AR 组; C. AR+Vector 组; D. AR+*miR-155-5p* 组; E. AR+NC 组; F. AR+抗 *miR-155-5p* 抗体组。与 Control 组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 AR 组比较, ## $P < 0.01$

**2.4 Foxp3、RORγt 蛋白的表达** 为进一步证明 *miR-155-5p* 对 *Foxp3*、*RORγt* 表达的影响, 研究采用 Western blotting 检测 *Foxp3*、*RORγt* 蛋白的变化。实验结果显示, 同 Control 组比较, *Foxp3* 蛋白在 AR 组中的表达量显著减少 ( $P < 0.01$ ), *RORγt* 蛋白的表达量显著增加 ( $P < 0.01$ ); 而 *miR-155-5p* 过表达慢病毒可以显著提高 *RORγt* 蛋白的表达量 ( $P < 0.01$ ), 降低 *Foxp3* 蛋白的表达

量 ( $P < 0.01$ ); 将 *miR-155-5p* 沉默后, *Foxp3* 蛋白的表达量较 AR 组明显增加 ( $P < 0.01$ ), *RORγt* 蛋白的表达量明显减少 ( $P < 0.01$ )。这进一步证实 *miR-155-5p* 影响 *Foxp3*、*RORγt* 的表达。(图 3)

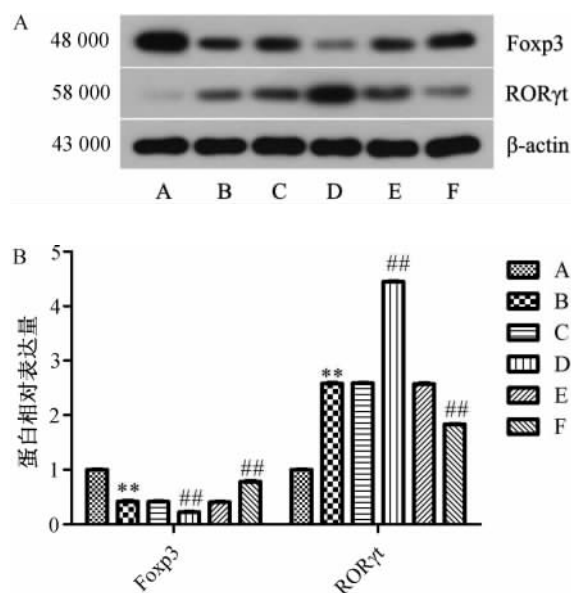


图3 Western blotting 检测 *Foxp3*、*RORγt* 蛋白的表达

注: A. Control 组; B. AR 组; C. AR+Vector 组; D. AR+*miR-155-5p* 组; E. AR+NC 组; F. AR+抗 *miR-155-5p* 抗体组。与 Control 组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 AR 组比较, ## $P < 0.01$

**2.5 IgE 及 Treg 和 Th17 相关细胞因子的表达** 实验结果显示, *miR-155-5p* 过表达后, 小鼠血清 IgE 水平较 AR 组显著升高 ( $P < 0.05$ ), *miR-155-5p* 沉默后, 血清 IgE 水平显著下降 ( $P < 0.05$ )。(表 4)

与 Control 组比较, AR 组中 Treg 相关细胞因子 TGF-β1、IL-10 的表达量明显减少, Th17 相关细胞因子 IL-17A、IL-6 的表达量明显增加 ( $P < 0.01$ ); *miR-155-5p* 过表达后 TGF-β1、IL-10 的表达水平较 AR 组更低, IL-17A、IL-6 的表达水平更高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 而沉默 *miR-155-5p* 后, TGF-β1、IL-10 的表达量较 AR 组显著上升, IL-17A、IL-6 的表达量显著下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。这表明 *miR-155-5p* 通过影响 Treg/Th17 免疫平衡参与 AR 进展。(表 4)

**2.6 Treg/Th17 百分比** 与 Control 组比较, AR 组 Treg 百分比明显下降, Th17 百分比明显上升 ( $P < 0.01$ ); *miR-155-5p* 过表达后 Treg 百分比较 AR 组显著减少, Th17 百分比显著增加 ( $P < 0.01$ )。

0.01); 而沉默 miR-155-5p 后 Treg 的百分比比较 0.01)。这进一步证明 miR-155-5p 通过影响 Treg/AR 组明显上升, Th17 百分比明显下降 ( $P < 0.01$ )。这进一步证明 miR-155-5p 通过影响 Treg/Th17 免疫平衡参与 AR 进展。(表 5、图 4、图 5)

表 4 血清 IgE 及 Treg、Th17 细胞因子检测( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	IgE(ng/mL)	TGF- $\beta$ 1(pg/mL)	IL-10(pg/mL)	IL-17A(pg/mL)	IL-6(pg/mL)
Control 组	307.1 $\pm$ 35.5	95.5 $\pm$ 9.0	157.9 $\pm$ 20.4	18.4 $\pm$ 3.6	25.9 $\pm$ 2.6
AR 组	938.3 $\pm$ 110.1**	38.8 $\pm$ 6.3**	72.3 $\pm$ 15.0**	57.9 $\pm$ 6.1**	85.7 $\pm$ 12.4**
AR+Vector 组	919.6 $\pm$ 79.1	39.2 $\pm$ 7.0	71.2 $\pm$ 17.1	53.7 $\pm$ 8.8	83.1 $\pm$ 13.2
AR+miR-155-5p 组	1 563.3 $\pm$ 210.7 <sup>#</sup>	19.6 $\pm$ 2.9 <sup>#</sup>	44.6 $\pm$ 6.9 <sup>#</sup>	93.4 $\pm$ 11.0 <sup>#</sup>	122.2 $\pm$ 8.3 <sup>#</sup>
AR+NC 组	980.0 $\pm$ 154.9	40.0 $\pm$ 7.5	73.4 $\pm$ 14.5	53.4 $\pm$ 10.0	84.5 $\pm$ 10.8
AR+抗 miR-155-5p 抗体组	390.4 $\pm$ 45.1 <sup>#</sup>	78.4 $\pm$ 8.9 <sup>#</sup>	127.9 $\pm$ 22.2 <sup>#</sup>	30.6 $\pm$ 3.9 <sup>#</sup>	36.1 $\pm$ 5.4 <sup>#</sup>

注:与 Control 组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 AR 组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

表 5 各组 Treg 及 Th17 百分比( $\bar{x} \pm s, n=6, \%$ )

组别	CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Treg	CD4 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup> Th17
Control 组	12.37 $\pm$ 0.23	6.60 $\pm$ 0.10
AR 组	8.65 $\pm$ 0.06**	10.73 $\pm$ 0.15**
AR+Vector 组	8.50 $\pm$ 0.09	9.10 $\pm$ 0.20
AR+miR-155-5p 组	4.62 $\pm$ 0.08 <sup>##</sup>	12.33 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>
AR+NC 组	8.82 $\pm$ 0.04	10.80 $\pm$ 0.10
AR+抗 miR-155-5p 抗体组	10.41 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>	7.53 $\pm$ 0.25 <sup>#</sup>

注:与 Control 组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 AR 组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$

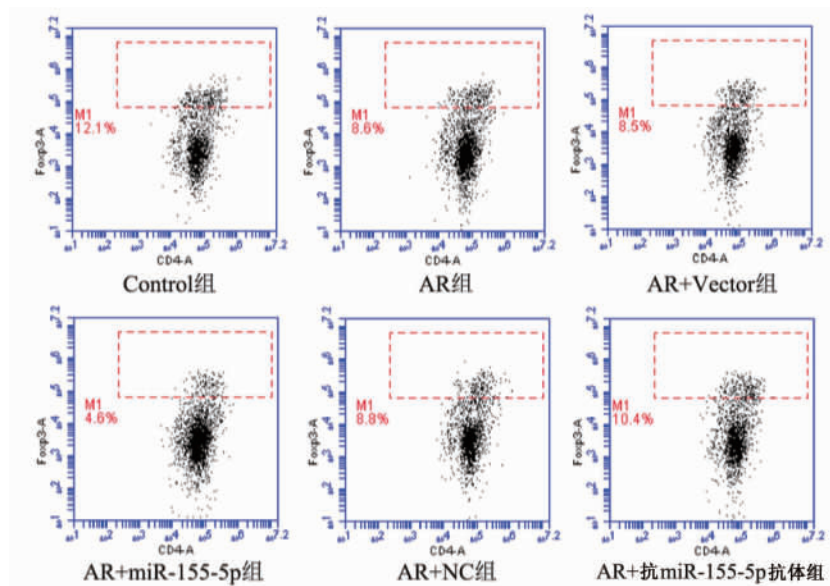


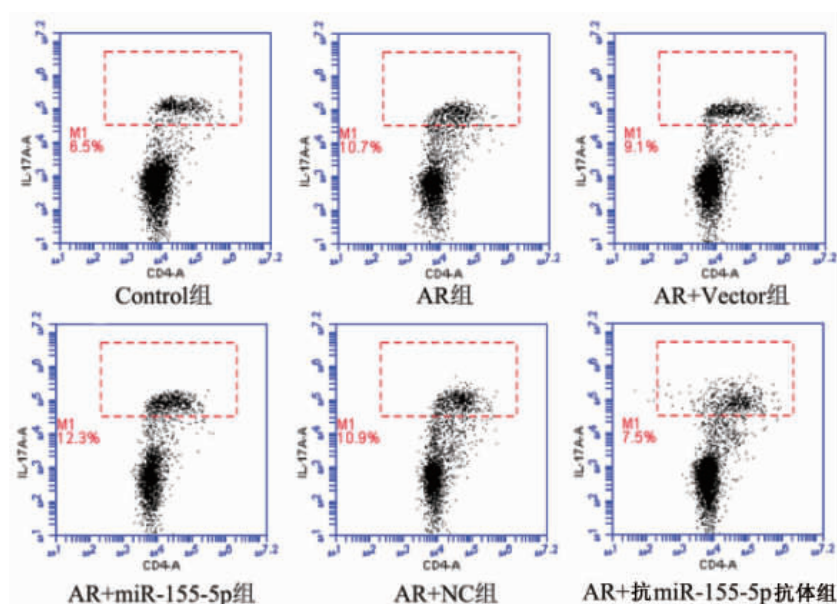
图 4 各组 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 流式分析结果

### 3 讨论

Th1/Th2 免疫是经典的免疫学说, 以 Th2 为优势引起的免疫失衡被认为是诱发 AR 的主要机制<sup>[8]</sup>。随着研究的不断深入, 单纯的 Th1/Th2 失衡理论已经不足以解释 AR 的发病机制。有研究发

现在 AR 患者和 AR 模型小鼠体内存在 Th17/Treg 免疫失衡<sup>[5, 9]</sup>; 亦有研究证实, 在 OVA 诱导的小鼠 AR 模型中, IL-17A 单克隆抗体能够减轻其变应性症状, 抑制嗜酸性粒细胞浸润, 减少 Th2 和 Th17 反应, 增加 Treg 反应<sup>[10]</sup>。这说明 Th17/Treg 免疫失衡很可能是 AR 的发病机制之一。



图5 各组 CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> Th17 流式分析结果

因此,研究通过OVA诱导建立AR小鼠模型,检测血清及鼻黏膜组织中Th17/Treg相关细胞因子变化。结果显示,在AR小鼠外周血中Th17型细胞因子IL-17A、IL-6的表达量及Th17百分比明显增加;Treg型细胞因子TGF- $\beta$ 1、IL-10的表达量及Treg百分比明显减少。此外,Th17特异性转录因子ROR $\gamma$ t mRNA及蛋白的表达量较对照组显著升高,Treg特异性转录因子Foxp3的表达量显著降低。这说明AR小鼠体内存在Th17/Treg免疫失衡,这同前人研究结果一致,但具体调控机制仍需深入探索。

MiRNA被报道在多个炎症反应中异常表达,参与调控过敏性炎症反应的发生和进展<sup>[11]</sup>。既往研究发现,miR-155-5p在AR患者中的表达显著增加<sup>[12]</sup>;此外,miR-155-5p在T淋巴细胞中的表达水平与Treg分化特异性转录因子Foxp3表达水平呈负相关<sup>[13]</sup>;亦有研究证实,miR-155-5p在糖尿病患者中的高表达与Treg细胞数、TGF- $\beta$ 2的表达水平负相关<sup>[14]</sup>。这提示miR-155-5p参与AR的发生和进展,作用机制很可能同Treg反应存在相关性。

因此,研究应用real-time PCR检测小鼠鼻黏膜组织中miR-155-5p的表达,并采用miR-155-5p过表达及沉默慢病毒干预AR小鼠。结果表明,同Control组比较,miR-155-5p在AR组小鼠鼻黏膜组织中的表达量显著升高,将其过表达后可提高小鼠鼻炎症状评分,加重鼻黏膜组织中炎症细胞浸润

和间质增生,显著诱导IgE、IL-17A、IL-6及ROR $\gamma$ t表达,抑制TGF- $\beta$ 1、IL-10及Foxp3表达,小鼠体内发生Th17/Treg免疫失衡。经miR-155-5p沉默慢病毒干预后,IgE、IL-17A、IL-6及ROR $\gamma$ t的表达量降低,Th17百分比明显减少,TGF- $\beta$ 1、IL-10及Foxp3的表达量增加,Treg百分比明显增加,小鼠体内Th17/Treg平衡得以恢复,小鼠鼻分泌物量、搔鼻及打喷嚏次数减少,AR症状得到显著改善。

综上,本研究结果证实miR-155-5p参与AR发生及进展的作用机制可能与Th17/Treg免疫失衡及抑炎作用有关。但研究仅通过部分指标评估Th17/Treg失衡,而Th17和Treg的相互作用极其复杂,后续研究会进一步深入探索miR-155-5p与这2种细胞上下游分子的作用机制。

## 参考文献

- [1] Montefort S, Holgate ST, Howarth PH. Leucocyte-endothelial adhesion molecules and their role in bronchial asthma and allergic rhinitis[J]. Eur Respir J, 1993, 6(7): 1044-1054.
- [2] Saranz RJ, Lozano A, Lozano NA, et al. Subclinical lower airways correlates of chronic allergic and non-allergic rhinitis[J]. Clin Exp Allergy, 2017, 47(8): 988-997.
- [3] Brozek JL, Bousquet J, Agache I, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) guidelines-2016 revision [J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 140(4): 950-958.
- [4] Wang SB, Deng YQ, Ren J, et al. Exogenous interleukin-10 alleviates allergic inflammation but inhibits local inter-

- leukin-10 expression in a mouse allergic rhinitis model[J]. BMC Immunol, 2014, 15: 9.
- [5] Tao B, Ruan G, Wang D, *et al.* Imbalance of peripheral Th17 and regulatory T cells in children with allergic rhinitis and bronchial asthma[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2015, 14(3): 273-279.
- [6] Gu ZW, Wang YX, Cao ZW. Neutralization of interleukin-9 ameliorates symptoms of allergic rhinitis by reducing Th2, Th9, and Th17 responses and increasing the Treg response in a murine model[J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 14314-14324.
- [7] Chen BW, Qu SH, Li M, *et al.* Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in an ovalbumin-induced allergic rhinitis model[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 47: 182-189.
- [8] Yu S, Han B, Liu S, *et al.* Derp1-modified dendritic cells attenuate allergic inflammation by regulating the development of T helper type1(Th1)/Th2 cells and regulatory T cells in a murine model of allergic rhinitis[J]. Mol Immunol, 2017, 90: 172-181.
- [9] 闫亚杰, 阮岩, 潘增烽, 等. 儿茶素对变应性鼻炎小鼠 Th17/Treg 表达的影响[J]. 中华中医药学会耳鼻喉科分会第二十三次学术年会、世界中联耳鼻喉口腔专业委员会第九次学术年会论文集, 2017.
- [10] Gu ZW, Wang YX, Cao ZW. Neutralization of interleukin-17 suppresses allergic rhinitis symptoms by downregulating Th2 and Th17 responses and upregulating the Treg response[J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 22361-22369.
- [11] Dissanayake E, Inoue Y. MicroRNAs in allergic disease[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2016, 16(9): 67.
- [12] Suojalehto H, Toskala E, Kilpelainen M, *et al.* MicroRNA profiles in nasal mucosa of patients with allergic and non-allergic rhinitis and asthma[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2013, 3(8): 612-620.
- [13] Corral-Fernandez NE, Cortez-Espinosa N, Salgado-Bustamante M, *et al.* Induction of transcription factors, miRNAs and cytokines involved in T lymphocyte differentiation in BCG-vaccinated subjects[J]. Mol Immunol, 2016, 77: 44-51.
- [14] Yang TT, Song SJ, Xue HB, *et al.* Regulatory T cells in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus retinopathy by miR-155[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(11): 2010-2015.

## The study on the mechanism of allergic rhinitis induced by miR-155-5p-mediated Treg/Th17 imbalance

TANG Qiao-fei, ZHANG Shuang, WANG Di, LI Sai-nan, XU Zhi, YAN Zhi-yong (*The Second Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110001, China*)

**Abstract:** To investigate the effect and mechanism of abnormal expression of miR-155-5p on the immune balance of Th17/Treg in allergic rhinitis (AR) mice, BALB/c mice were randomly divided into normal control group, model group, AR + Vector group, AR + miR-155-5p group, AR + NC group and AR + anti-miR-155-5p group. The model of allergic rhinitis mice was established by sensitization and stimulation with ovalbumin, and intranasal administration of miR-155-5p over-expression or silencing lentivirus. The allergic symptoms of mice in each group were evaluated, the pathological changes of nasal mucosa were observed by HE staining, the expressions of miR-155-5p, Foxp3, RORγt were measured by real-time PCR and Western blotting, and the concentrations of IgE, inflammatory factors including TGF-β1, IL-10, IL-17A and IL-6 in serum were detected by ELISA. The percentages of peripheral blood Treg and Th17 were analyzed by flow cytometry. The results showed that, compared with control group, the rhinitis symptom score of mice in the AR group was significantly increased, the expressions of Foxp3, RORγt at both mRNA and protein levels were significantly increased, the levels of serum IgE, IL-17A, IL-6 and Th17 percentage were significantly increased, the levels of TGF-β1, IL-10 and Treg percentage were significantly decreased. MiR-155-5p over-expression increased the rhinitis symptoms of mice in AR group, promoted the expression of IgE and Th17 related cytokines, and inhibited the expression of Treg related cytokines. We found that the Treg/Th17 immune imbalance was relieved after silencing of miR-155-5p, and the rhinitis symptom score of mice significantly decreased. Therefore, miR-155-5p could effectively exacerbate inflammatory symptoms of nasal mucosa in allergic rhinitis mice, which may be attributed to its effect on Foxp3 and RORγt expression and regulation of Treg/Th17 immune balance.

**Key words:** miR-155-5p; allergic rhinitis; T helper cell 17; regulatory T cell