

miR-130a-3p 通过靶向调节自噬相关蛋白 7 影响儿童支气管哮喘的 Th1/Th2 平衡和气道重塑

薛庆辉

摘要: **目的** 检测儿童支气管哮喘肺泡灌洗液(BALF)中 miR-130a-3p 与自噬相关蛋白 7(ATG7)的靶向调节关系,进一步探讨 miR-130a-3p 靶向调节 ATG7 对炎症因子和气道重塑相关因子的影响。**方法** 收集 2018 年 1 月—2021 年 8 月 145 例接受治疗的儿童支气管哮喘的临床资料,将患儿分为轻度哮喘组($n=45$)、中度哮喘组($n=58$)和重度及危重度哮喘组($n=42$),并收集同时期健康儿童 40 例为对照组。比较组间 miR-130a-3p、ATG7、炎症因子和气道重塑相关因子的水平。双荧光素酶报告基因实验预测 miR-130a-3p 与 ATG7 的靶向关系。采用转染技术敲低支气管上皮细胞 16HBE 中 ATG7 的水平,并检测其对炎症因子和气道重塑相关因子的影响。**结果** 重度及危重度哮喘组的 miR-130a-3p、干扰素- γ (IFN- γ)水平低于对照组、轻度哮喘组和中度哮喘组;重度及危重度哮喘组的 ATG7 mRNA、白细胞介素-4(IL-4)、免疫球蛋白 E(IgE)、IL-5 和 IL-13 水平高于对照组、轻度哮喘组和中度哮喘组,组间比较差别均有统计学意义($P<0.05$)。重度及危重度哮喘组的 I 型胶原蛋白 mRNA、内皮素-1(ET-1)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、MMP-9 和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)水平高于对照组、轻度哮喘组和中度哮喘组,组间比较差别均有统计学意义($P<0.05$)。miR-130a-3p 与 ATG7 存在靶向结合位点。敲低 ATG7 的表达后 IFN- γ 水平增加,ATG7、I 型胶原蛋白的 mRNA、IL-4、IgE、IL-5、IL-13、ET-1、MMP-2、MMP-9 和 TGF- β 1 的表达水平降低,组间比较差别均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 在儿童支气管哮喘中,miR-130a-3p 可能通过靶向调节 ATG7 的水平,调节辅助性 T 细胞 1/辅助性 T 细胞 2 平衡、减弱气道炎症反应和抑制气道重塑,为儿童支气管哮喘靶向治疗提供方向。

关键词: 哮喘; microRNA; 自噬相关蛋白 7; 炎症因子; 气道重塑

文献标志码: A **文章编号:** 1672-4194(2023)04-0252-06

哮喘是一种常见的慢性肺部炎症性疾病,其发病率和死亡率不断增加。全球哮喘患者约有 3 亿人,预计至 2025 年,哮喘患者将增加至 4 亿人,其中儿童支气管哮喘的发病率也逐渐增加^[1]。目前,治疗哮喘的药物有支气管扩张剂、皮质类固醇、白三烯受体拮抗剂和抗免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)。然而,支气管哮喘的预后仍不理想,治疗上存在化学药物潜在的毒副作用,故有必要探索治疗的分子标志物。microRNAs(miRNAs)是非编码小分子 RNA,通过与靶 mRNA 的 3' 非编码区完全互补导致 mRNA 降解,或不完全互补结合阻断 mRNA 翻译。miRNA 参与许多生物过程,包括宿主免疫细胞中的分化、发育、应激和炎症调节。目前已有研究^[2]显示,miRNA 在哮喘中发挥一定的调节作用。SHI 等^[3]发现,miR-130a-3p 参与哮喘的发病、肺巨噬细胞极化和气道重塑。自噬是一个对细胞存活很重要的细胞过程,受损的细胞器和蛋白质可被封闭在自噬体中并输送到溶酶体降解。最近的研究^[4]显示,自噬与哮喘的炎症和免疫反应有关,

有可能发展成为治疗哮喘的新途径。本研究拟通过检测支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 miR-130a-3p、自噬相关蛋白 7 (autophagy-related protein 7, ATG7)、炎症因子和气道重塑因子的表达,验证 miR-130a-3p 与 ATG7 的靶向调节关系,并进一步分析 miR-130a-3p 通过靶向调节 ATG7 对炎症因子和气道重塑相关因子的影响。

1 对象与方法

1.1 临床研究

1.1.1 对象 收集 2018 年 1 月—2021 年 8 月在南阳市第一人民医院接受治疗的支气管哮喘儿童 145 例,根据临床特点[气短、体位、讲话方式、精神意识、辅助呼吸肌活动及三凹征、哮鸣音、脉率、呼气流量峰值(peak expiratory flow, PEF)占正常预计值或本人最佳值的百分数和血氧饱和度],将患儿分为轻度哮喘组($n=45$)、中度哮喘组($n=58$)和重度及危重度哮喘组($n=42$)。轻度哮喘:1 周至少 2 d 出现日间症状,活动轻微受限,PEF% $>80\%$;中度哮喘:每天出现日间症状(非持续),活动部分受限,60% $<$ PEF% $\leq 80\%$;重度及危重度哮喘:每天持续

收稿日期: 2022-05-09

作者单位: 南阳市第一人民医院 儿三科, 南阳 473200

作者简介: 薛庆辉,女,副主任医师,医学学士。Email: qbeiyn@163.com

出现日间症状且活动严重受限,PEF%≤60%。支气管哮喘儿童纳入标准:(1)诊断符合“支气管哮喘防治指南(2016 年版)”^[5];(2)均为首次就诊,未接受治疗;(3)年龄≥6 岁。排除标准:(1)心源性哮喘;(2)合并肺间质疾病、肺结核;(3)15 d 内使用抗生素;(4)气道畸形或肺部发育不良。另随机纳入同期来院接受常规检查的健康儿童 40 例(无支气管哮喘、肺部感染及其他的肺部疾病,近期末使用抗生素)为对照组。本研究经笔者医院伦理委员会批准(伦理号:20180141),患者家属均知情同意。

1.1.2 检测 BALF 中 miR-130a-3p、ATG7 和 I 型

胶原蛋白 mRNA 水平 采用 RT-qPCR 法检测 mRNA 水平。按总 RNA 提取试剂盒说明,提取 BALF 中的总 RNA,按一步法 RT-PCR 试剂盒说明将总 RNA 反转录为 cDNA,反应条件:42 ℃ 孵育 40 min,85 ℃ 孵育 5 min。扩增反应条件为 94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min。设置 30 个循环。ATG7 和 I 型胶原蛋白以 GAPDH mRNA 水平作为内参照,miR-130a-3p 以管家基因 U6 mRNA 水平作为内参照。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得出 miR-130a-3p、ATG7 和 I 型胶原蛋白 mRNA 的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

基 因	正向(5'→3')	反向(5'→3')
miR-130a-3p	CAUAAGCCGUA CACCUUGAC	AGUAGUAUUGGCCGACCGUCA
ATG7	GCGGAGGCAUACCAGACAGAGAGCGGAU	UGCCAU GACAGCGCAUCCAUGAACUCCA
I 型胶原蛋白	CUGAU GUCCGUC AAGCCGUCGCGACCUU	AUCACUGACAGCUGACCGCUAC AGGAACA
GAPDH	AUAGCCGCACUGAAGGCCUG	UGUAGCGCAAGCAUGACAC
U6	AUCGUCCUGGCAG UACUUC AUAUG	AGCUACGCCUGACCAUCAAG

miR-130a-3p;微小 RNA-130a-3p;ATG7;自噬相关蛋白 7。

1.1.3 检测 BALF 中气道重塑相关因子水平 采用 ELISA 法检测患者 BALF 中气道重塑相关因子水平。根据 ELISA 试剂盒说明检测 BALF 中白细胞介素 4(interleukin 4, IL-4)、干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)、免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)、IL-5、IL-13、内皮素 1(endothelin 1, ET-1)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)和 MMP-9 的水平。以 IFN-γ 代表辅助性 T 细胞 1(T helper 1, Th1)型细胞,IL-4 代表辅助性 T 细胞 2(T helper 2, Th2)型细胞。

1.2 细胞实验

1.2.1 验证 miR-130a-3p 与 ATG7 的靶向调节关系 支气管上皮细胞 16HBE(上海拜力生物科技有限公司),PCR 扩增试剂盒[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],ATG7 野生型质粒(ATG7 WT)、ATG7 突变型质粒(ATG7 MUT)、miR-130a-3p 模拟物(miR-130a-3p mimic)(中国丰晖生物有限公司)。采用支气管上皮细胞 16HBE 和双荧光素酶报告基因实验进行验证。根据突变位点分别设计 ATG 野生型和突变型序列,以支气管上皮细胞 16HBE 的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增,获取野生型和突变型序列,连接到野生型 ATG7 3'UTR 和点突变型 ATG7 3'UTR。将 16HBE 细胞接种于 12 孔板中,随机分为 ATG7 WT 组、ATG7 WT+miR-130a-3p

mimic 组、ATG7 MUT 组、ATG7 MUT+miR-130a-3p mimic 组,进行常规培养。当细胞融合至 80% 时,将 lip2000 试剂与质粒稀释液混合,根据分组将混合液加入细胞培养皿中,继续培养 6 h,更换新鲜培养基再培养 24 h 后,收集各组细胞。按双荧光素酶活性检测试剂盒说明,检测各组荧光素酶活性。

1.2.2 敲低 16HBE 细胞 ATG7 的表达 采用转染实验敲低 16HBE 细胞 ATG7 的表达。收集对数期 16HBE 细胞,以每孔 40 万的密度接种至 6 孔板中,随机分为敲低 ATG7(si-ATG7)组和敲低对照组(si-NC 组),根据 lip2000 实验步骤分别向 si-NC 组和 si-ATG7 组转染 si-NC 质粒和 si-ATG7 质粒(由中国丰晖生物有限公司构建),培养 6 h 后更换新鲜培养液继续培养 24 h。20 μg/L 脂多糖处理转染后的细胞 8 h,采用 ELISA 法检测 si-NC 组和 si-ATG7 组细胞上清液中 IL-4、IFN-γ、IgE、IL-5、IL-13、ET-1、转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、MMP-2 和 MMP-9 的水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,2 组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组间 BALF 中 *miR-130a-3p*、*ATG7* 和炎症因子水平比较 与对照组比较,轻度哮喘组、中度哮喘组和重度及危重度哮喘组的 *miR-130a-3p*、*IFN-γ* 水平降低($P<0.05$),轻度哮喘组、中度哮喘组和重度及危重度哮喘组的 *ATG7* mRNA、IL-4、

IgE、IL-5 和 IL-13 水平增加($P<0.05$),重度及危重度哮喘组的 *miR-130a-3p*、*IFN-γ* 水平低于轻度哮喘组和中度哮喘组,重度及危重度哮喘组的 *ATG7* mRNA、IL-4、IgE、IL-5 和 IL-13 水平高于轻度哮喘组和中度哮喘组,组间比较差别均有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

表 2 不同组间 BALF 中 *miR-130a-3p*、*ATG7* 和炎症因子水平比较

Tab. 2 Levels of *miR-130a-3p*, *ATG7* and inflammatory factors in BALF between different groups

分组	<i>miR-130a-3p</i>	<i>ATG7</i> mRNA	$\rho_{IL-4} /$ (pg · mL ⁻¹)	$\rho_{IFN-\gamma} /$ (pg · mL ⁻¹)	$\rho_{IgE} /$ (pg · mL ⁻¹)	$\rho_{IL-5} /$ (pg · mL ⁻¹)	$\rho_{IL-13} /$ (pg · mL ⁻¹)
对照组	3.1±0.4	0.9±0.1	15.6±3.2	402.3±15.6	0.2±0.0	42.5±6.8	56.3±7.4
轻度哮喘组	2.1±0.2*	2.1±1.0*	25.8±2.2*	252.6±12.8*	1.5±0.3*	147.3±14.8*	215.6±10.8*
中度哮喘组	1.6±0.1*	2.5±0.8*	28.6±3.1*	248.3±10.8*	1.6±0.3*	151.2±16.2*	219.6±12.3*
重度及危重度哮喘组	0.3±0.1**△	4.3±0.1**△	43.6±5.6**△	185.2±12.4**△	2.4±0.1**△	185.3±21.1**△	241.6±15.7**△
<i>F</i>	5.201	8.210	9.032	15.201	3.201	5.632	12.302
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.041	<0.001	<0.001

miR-130a-3p:微小 RNA-130a-3p; *ATG7*:自噬相关蛋白 7; IL:白细胞介素; *IFN-γ*:干扰素-γ; IgE:免疫球蛋白 E。与对照组比较, *: $P<0.05$;与轻度哮喘组比较, #: $P<0.05$;与中度哮喘组比较, △: $P<0.05$ 。

2.2 不同组间 BALF 中与气道重塑相关因子的比较 与对照组比较,轻度哮喘组、中度哮喘组和重度及危重度哮喘组的 I 型胶原蛋白 mRNA 和 ET-1、

MMP-2、MMP-9、TGF-β1 水平增加,且重度及危重度哮喘组以上水平高于轻度哮喘组和中度哮喘组,组间比较差别均有统计学意义($P<0.05$,表 3)。

表 3 不同组间 BALF 中与气道重塑相关因子水平的比较

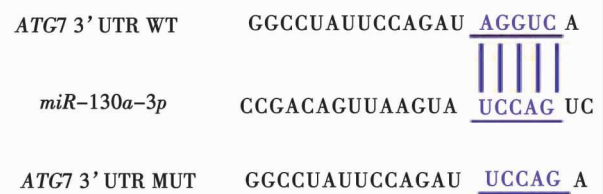
Tab. 3 Comparison of factors related to airway remodeling in BALF between different groups

分组	$\rho_{ET-1} /$ (ng · L ⁻¹)	$\rho_{MMP-2} /$ (μg · L ⁻¹)	$\rho_{MMP-9} /$ (μg · L ⁻¹)	I 型胶原蛋白 mRNA	$\rho_{TGF-\beta 1} /$ (μg · L ⁻¹)
对照组	3.2±0.5	5.3±0.8	4.2±0.5	1.5±0.3	53.2±5.9
轻度哮喘组	8.6±2.3*	14.4±3.2*	12.3±3.4*	3.2±0.5*	82.5±11.4*
中度哮喘组	9.8±2.1*	16.9±3.5*	14.9±4.0*	3.5±0.8*	89.6±14.0*
重度及危重度哮喘组	14.7±1.2**△	28.7±5.3**△	21.0±3.5**△	5.2±1.5**△	153.3±16.5**△
<i>F</i>	14.201	4.302	4.625	3.851	9.362
<i>P</i>	<0.001	0.008	0.002	0.012	<0.001

ET-1:内皮素 1; MMP:基质金属蛋白酶; TGF-β1:转化生长因子-β1。与对照组比较, *: $P<0.05$;与轻度哮喘组比较, #: $P<0.05$;与中度哮喘组比较, △: $P<0.05$ 。

2.3 *miR-130a-3p* 与 *ATG7* 靶向结合关系验证

miR-130a-3p 与 *ATG7* 存在靶向结合位点。 *ATG7* WT 组、*ATG7* WT+*miR-130a-3p* mimic 组、*ATG7* MUT 组和 *ATG7* MUT+*miR-130a-3p* mimic 组荧光素酶活性分别为(1.5±0.3)、(0.3±0.1)、(1.4±0.2)和(1.5±0.2),经单因素方差分析,4 组间比较差别有统计学意义($P<0.05$);组间两两比较显示, *ATG7* WT+*miR-130a-3p* mimic 组荧光素酶活性低于 *ATG7* WT 组、*ATG7* MUT 组和 *ATG7* MUT+*miR-130a-3p* mimic 组,差别有统计学意义($P<0.05$,图 1)。



miR-130a-3p:微小 RNA-130a-3p; *ATG7*:自噬相关蛋白 7。

图 1 *miR-130a-3p* 靶向结合 *ATG7* 的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of *miR-130a-3p* targeting *ATG7*

2.4 敲低 ATG7 后炎症因子和气道重塑相关因子的水平比较 敲低 ATG7 的表达水平后,IFN- γ 水平增加,ATG7、I 型胶原蛋白的 mRNA 和 IL-4、IgE、IL-5、IL-13、ET-1、MMP-2、MMP-9、TGF- β 1 的表达水平降低,差别均有统计学意义($P<0.05$,表 4)。

表 4 敲低 ATG7 后炎症因子和气道重塑相关因子的水平比较
Tab. 4 Comparison of inflammatory factors and airway remodeling-related factors after knocking down ATG7

分组	ATG7 mRNA	$\rho_{IL-4} /$ (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	$\rho_{IFN-\gamma} /$ (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	$\rho_{IgE} /$ (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	$\rho_{IL-5} /$ (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	$\rho_{IL-13} /$ (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)
si-NC	1.2 $\pm$ 0.2	12.8 $\pm$ 3.6	325.1 $\pm$ 14.7	0.5 $\pm$ 0.1	47.2 $\pm$ 5.8	62.5 $\pm$ 4.1
si-ATG7	0.4 $\pm$ 0.1	5.7 $\pm$ 2.1	482.6 $\pm$ 25.7	0.2 $\pm$ 0.0	25.7 $\pm$ 3.2	45.9 $\pm$ 6.3
<i>t</i>	3.215	6.821	15.142	3.065	8.215	7.021
<i>P</i>	0.032	<0.001	<0.001	0.036	<0.001	<0.001

分组	$\rho_{ET-1} /$ (ng $\cdot$ L $^{-1}$)	$\rho_{MMP-2} /$ (μ g $\cdot$ L $^{-1}$)	$\rho_{MMP-9} /$ (μ g $\cdot$ L $^{-1}$)	I 型胶原蛋白 mRNA	$\rho_{TGF-\beta 1} /$ (ng $\cdot$ L $^{-1}$)
si-NC	4.2 $\pm$ 1.4	6.5 $\pm$ 1.7	5.4 $\pm$ 1.3	2.1 $\pm$ 0.4	58.6 $\pm$ 11.0
si-ATG7	2.1 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.1	35.9 $\pm$ 5.1
<i>t</i>	3.434	4.251	2.965	3.008	7.051
<i>P</i>	0.025	0.008	0.041	0.039	<0.001

si-NC:对照组;ATG7:自噬相关蛋白 7;IL:白细胞介素;IFN- γ :干扰素- γ ;IgE:免疫球蛋白 E;ET-1:内皮素 1;MMP:基质金属蛋白酶;TGF- β 1:转化生长因子- β 1。

3 讨 论

支气管哮喘是一种儿童时期常见的慢性呼吸道疾病,其造成的肺功能不可逆损伤严重影响患儿的生长发育和身心健康。据统计,目前全世界有 3 亿多儿童患有哮喘,全球 6~7 岁儿童哮喘患病率高达 10%^[6]。目前,对哮喘的抗炎和支气管扩张剂治疗选择有限,且无法治愈该病。研发新药物靶点的第一步,需要更好地了解哮喘的发病机制。作为一种与免疫调节密切相关的气道炎症性疾病,越来越多的证据表明哮喘受多种 miRNA 的调控^[3]。

miR-146a 已被证明可抑制浸润炎症细胞,并抑制卵清蛋白诱导的哮喘小鼠中特异性 IgE 水平^[7]。IgE 的产生与小鼠哮喘模型中的过敏性气道炎症有关,刺激嗜酸性粒细胞和肥大细胞分泌细胞因子,包括 IL-4、IL-5 和 IL-13^[8]。本研究结果可见,重度及危重度哮喘组 IgE、IL-4、IL-5 和 IL-13 水平高于对照组、轻度哮喘组和中度哮喘组,而 IFN- γ 水平低于对照组、轻度哮喘组和中度哮喘组。IFN- γ 可代表 Th1 型细胞,IL-4 可代表 Th2 型细胞,说明重度及危重度哮喘组以 Th2 型细胞为主,破坏了 Th1/Th2 平衡。而 si-ATG7 组 IFN- γ 水平增加,IL-4 水平降低,说明 ATG7 水平降低可调节 Th1/Th2 的失衡。miR-192-5p 可靶向结合 ATG7,综合以上结果表明,miR-192-5p 可以减轻哮喘的炎症反应。细胞自噬是细胞利用溶酶体降解自身物质以适应生存

环境的过程,病毒感染会诱发树突状细胞自噬。自噬会影响树突状细胞的抗原提呈功能,而树突状细胞自噬功能的紊乱是哮喘重要的发病机制。本研究中,重度及危重度哮喘组 ATG7 水平明显高于对照组、轻度哮喘组和中度哮喘组,说明在重度及危重度哮喘组中存在严重的细胞自噬。

除了气道炎症,气道重塑也是哮喘的病理特征之一。哮喘患者的气道重塑是一个有害且复杂的过程,会导致许多形态学变化,包括血管生成增加、上皮纤维化、平滑肌细胞增多、黏液腺密度和气道壁厚度增加。气道平滑肌增生是气道重塑的一个关键因素,可导致气道狭窄相关的上皮纤维化。ET-1 是气道上皮细胞纤维化的重要介质之一,促进上皮细胞纤维化进展^[9]。本研究中,重度及危重度哮喘组 ET-1 水平明显增加,促进气道上皮细胞纤维化。研究^[10]表明,与健康对照者比较,哮喘患者气道平滑肌重量增加 3.4 倍;与哮喘患者比较,重症哮喘患者的增殖细胞核抗原阳性平滑肌细胞数增加了 5 倍。TGF- β 1 是一种由肺内嗜酸性粒细胞、成纤维细胞、巨噬细胞和上皮细胞产生的细胞因子,它是气道重塑过程的关键调节剂^[11]。MMP 作为细胞外蛋白酶家族,在气道重塑过程中与细胞外基质的降解有关^[12]。LIN 等^[13]的研究显示,OVA 小鼠 BALF 中 MMP-2 和 MMP-9 升高,参与哮喘气道重塑的发病机制。I 型胶原蛋白是沉积于纤维化病灶部位的细胞外基质的核心成分,I 型胶原蛋白聚集是纤维

化进展的特征^[14]。LOU 等^[15]的研究显示,*miR-192-5p* 可通过靶向调节 *ATG7* 水平影响哮喘患者的气道重塑和细胞自噬。经双荧光素酶报告基因实验显示,*miR-130a-3p* 可靶向调节 *ATG7*, 敲低 *ATG7* 的表达水平后可见 IgE、IL-4、IL-5 和 IL-13 水平降低、IFN- γ 水平增加,炎症因子水平降低,Th1/Th2 失衡有所缓解。另外,ET-1、MMP-2、MMP-9、I 型胶原蛋白 mRNA 和 TGF- β 1 水平降低,说明 *ATG7* 水平降低可抑制气道重塑。因此,*miR-130a-3p* 有望成为支气管哮喘的治疗靶点,且可有效减弱支气管哮喘患儿的炎症水平,抑制气道重塑,有利于改善患儿的临床表现及预后。

综上所述,在儿童支气管哮喘中 *miR-130a-3p* 可通过靶向调节 *ATG7* 减弱气道炎症反应、调节 Th1/Th2 平衡和抑制气道重塑,*miR-130a-3p* 可能成为治疗儿童哮喘的有效靶点。但本研究还存在一些不足之处,如纳入的研究对象较少、未进行多中心的研究,今后在后续的研究中将开展前瞻性多中心研究,以便进一步明确本研究的临床意义。

参考文献:

- [1] SHAMSHAD T, KHALIQUE N, SHAMEEM M, et al. Prevalence of bronchial asthma in school going children: A cross-sectional study from Uttar Pradesh [J]. Indian J Public Health, 2022, 66(Sup.): S22-S26.
- [2] WARDZYNSKA A, PAWELCZYK M, RYWANIAK J, et al. Circulating miRNA expression in asthmatics is age-related and associated with clinical asthma parameters, respiratory function and systemic inflammation[J]. Respir Res, 2021, 22(1): 177.
- [3] SHI J T, CHEN M, OUYANG L H, et al. *miR-142-5p* and *miR-130a-3p* regulate pulmonary macrophage polarization and asthma airway remodeling [J]. Immunol Cell Biol, 2020, 98(9): 715-725.
- [4] WANG S, WUNIQIEMU T, TANG W, et al. Luteolin inhibits autophagy in allergic asthma by activating PI3K/Akt/mTOR signaling and inhibiting Beclin-1-PI3KC3 complex[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 94: 107460.
- [5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2016 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(9): 675-697.
- [6] 中华儿科杂志编辑委员会, 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中国医师协会儿科医师分会儿童呼吸专业委员会. 儿童支气管哮喘规范化诊治建议(2020 年版)[J]. 中华儿科杂志, 2020, 58(9): 708-717.
- [7] HAN S G, MA C H, BAO L, et al. *miR-146a* mimics attenuate allergic airway inflammation by impacted group 2 innate lymphoid cells in an ovalbumin-induced asthma mouse model[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2018, 177(4): 302-310.
- [8] CHAN R, RUIWEN KUO C, LIPWORTH B. Pragmatic clinical perspective on biologics for severe refractory type 2 asthma[J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2020, 8(10): 3363-3370.
- [9] LABRAM B, NAMVAR S, HUSSELL T, et al. Endothelin-1 mediates *Aspergillus fumigatus*-induced airway inflammation and remodelling[J]. Clin Exp Allergy, 2019, 49(6): 861-873.
- [10] HASSAN M, JO T, RISSE P A, et al. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(5): 1037-1045.
- [11] FENG X J, YANG Y K, ZHENG Y W, et al. Effects of catalpol on asthma by airway remodeling via inhibiting TGF- β 1 and EGF in ovalbumin-induced asthmatic mice [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(7): 4084-4093.
- [12] PIFFERI M, BUSH A, CAMELLA D, et al. Matrix metalloproteinases and airway remodeling and function in primary ciliary dyskinesia[J]. Respir Med, 2017, 124: 49-56.
- [13] LIN S C, CHOU H C, CHIANG B L, et al. CTGF upregulation correlates with MMP-9 level in airway remodeling in a murine model of asthma [J]. Arch Med Sci, 2017, 13(3): 670-676.
- [14] TERASHIMA H, AONUMA M, TSUCHIDA H, et al. Attenuation of pulmonary fibrosis in type I collagen-targeted reporter mice with ALK-5 inhibitors[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2019, 54: 31-38.
- [15] LOU L L, TIAN M Y, CHANG J X, et al. MiRNA-192-5p attenuates airway remodeling and autophagy in asthma by targeting MMP-16 and ATG7 [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 122: 109692.

miR-130a-3p Affects T Helper 1/T Helper 2 Balance and Tracheal Remodeling in Children with Asthma Through Targeted Regulation of *ATG7*

XUE Qinghui

The Third Department of Pediatrics, Nanyang First People's Hospital, Nanyang 473200, China

ABSTRACT: **Objective** To detect the targeting regulation relationship between *miR-130a-3p* and autophagy-related protein 7 (*ATG7*) in children's bronchial asthma bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and to further explore the effect of *miR-130a-3p* on inflammatory factors and airway remodeling by targeting *ATG7* to regulate influence of related factors. **Methods** A collection of 145 children with bronchial

asthma from January 2018 to August 2021, and the children were divided into mild asthma group ($n=45$), moderate asthma group ($n=58$) and severe and critically severe asthma group ($n=42$), and collected 40 healthy children in the same period as the control group. The levels of *miR-130a-3p*, *ATG7*, inflammatory factors and airway remodeling-related factors between the groups were compared. The dual luciferase reporter gene experiment predicted the targeting relationship between *miR-130a-3p* and *ATG7*. The transfection technique knocked down the levels of *ATG7* in bronchial epithelial cells 16HBE, and detected the effects of inflammatory factors and airway remodeling related factors. **Results** The levels of *miR-130a-3p* and interferon- γ (IFN- γ) in the severe and critically severe asthma group were lower than those in the control group, mild asthma group and moderate asthma group; while the levels of *ATG7* mRNA, interleukin-4 (IL-4), immunoglobulin E (IgE), interleukin-5 (IL-5), and interleukin-13 (IL-13) in the severe and critically severe asthma group were higher than those in the control group, the mild asthma group and the moderate asthma group, the comparison between the groups was statistically significant ($P<0.05$). The levels of type I collagen mRNA, endothelin-1 (ET-1), matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), MMP-9 and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in the severe asthma group were higher than those in the control group, mild asthma group and moderate asthma group, and there were statistical differences between the groups ($P<0.05$). There was a targeted binding site between *miR-130a-3p* and *ATG7*. After knocking down the expression level of *ATG7*, the level of IFN- γ increased, and the levels of *ATG7* mRNA, type I collagen mRNA, IL-4, IgE, IL-5, IL-13, ET-1, MMP-2, MMP-9, and TGF- β 1 were decreased, and there were statistical differences between the groups ($P<0.05$). **Conclusion** In children with bronchial asthma, *miR-130a-3p* may target the level of *ATG7* to regulate T helper 1/T helper 2 cell balance, reduce airway inflammation, and inhibit airway remodeling, providing a direction for bronchial targeted therapy in children.

KEY WORDS: asthma; microRNA; autophagy-related protein 7; inflammatory factor; airway remodeling

(编辑:张慧茹)

(上接第251页)

control group, the expression of the related genes and proteins in the miR-181c-5p inhibitor group showed the opposite effect to that of the miR-181c-5p mimic group. Compared with the si H19 + Inhibitor control group, the *H19* expression was significantly increased, the expression of *miR-181c-5p* was significantly reduced, the mRNA and protein expression of *Creb1* and *HSD* were significantly increased in the si H19 + miR-181c-5p inhibitor group ($P<0.01$). **Conclusion** Low expression of *H19* can reduce the testosterone secretion ability of LCs by inhibiting cell proliferation and increased expression of *miR-181c-5p*, decreased expression of *Creb1* protein, and decreased 3β -HSD protein expression. The *STAT1/H19/miR-181c-5p/Creb1/3\beta-HSD pathway may play an important role in the regulation of LCs function.*

KEY WORDS: *H19*; Leydig cells; testosterone; cAMP response element binding protein 1; 3β -hydroxysteroid dehydrogenase; signal transduction and activator of transcription 1

(编辑:张慧茹)