

过表达 miR-370 调控哮喘小鼠肺损伤及其机制

任彦红¹,张凌云²,赵少聪¹,张广超¹,孙晓敏¹

摘要 目的 探讨过表达 miR-370 对卵清蛋白(OVA)诱导的哮喘小鼠免疫损伤及其机制。方法 40 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为对照组(Control 组)、模型组(OVA 组)、阴性对照组(OVA + miR-NC 组)和 miR-370 过表达组(OVA + miR-370 组)。除对照组外,其余各组均采用致敏加激发法建立哮喘小鼠模型。造模成功后,OVA + miR-NC 组和 OVA + miR-370 组分别尾静脉注射 miR-NC 腺病毒和 miR-370 过表达腺病毒。RT-PCR 检测 miR-370 表达水平;收集各组小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF),瑞氏-吉姆萨染色统计 BALF 中炎症细胞数;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中免疫球蛋白 E(IgE)和免疫调节因子蛋白表达水平;苏木精-伊红(HE)染色和末端标记法(TUNEL)观测肺组织病理损伤程度及细胞凋亡情况;Western blot 检测 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)/B 细胞淋巴瘤蛋白 2(Bcl-2)和活化胱天蛋白酶 3(cleaved cas3)/cas3 蛋白表达水平。结果 与对照组相比,OVA 组小鼠低表达 miR-370 ($P < 0.05$),白细胞数增多($P < 0.05$),IgE 水平升高($P < 0.05$),免疫调节因子 γ -干扰素(INF- γ)、白介素(IL)-13、IL-12、IL-4 水平上调($P < 0.05$),肺组织损伤严重($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 和 cleaved cas3/cas3 蛋白表达水平上调($P < 0.05$)。与 OVA 组相比,OVA + miR-NC 组上述各项指标均无差异,过表达 miR-370 上调小鼠肺组织中 miR-370 表达水平($P < 0.05$),减少白细胞数($P < 0.05$),降低 IgE 水平($P < 0.05$),下调免疫调节因子 INF- γ 、IL-12($P < 0.05$),上调 IL-13、IL-4($P < 0.05$),改善了肺组织病理损伤,减少了细胞凋亡,并降低 Bax/Bcl-2 和 cleaved cas3/cas3 蛋白表达比值($P < 0.05$)。结论 过表达 miR-370 抑制 OVA 诱导的哮喘小鼠 BALF 炎性细胞生成,缓解小鼠肺损伤。

关键词 支气管哮喘;miR-370;免疫损伤;肺损伤

中图分类号 R 562.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)01-0053-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.011

2021-09-01 接收

基金项目:2019 年河南省医学科技攻关计划联合共建项目(编号:LHGJ20190921)

作者单位:郑州大学附属儿童医院¹ 普通内科、² 急诊科,郑州 450000

作者简介:任彦红,女,硕士,主治医师;

孙晓敏,女,硕士,主任医师,责任作者,E-mail:13513892805@163.com

支气管哮喘是由多种细胞(如 T 淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞等)和细胞组分参与的异质性疾病,一般症状为喘息、气促、胸闷和咳嗽等,若治疗不及时会严重威胁患者生命安全。研究^[1-2]表明,支气管哮喘发病机制是体液中辅助性 T 细胞(Th 细胞)失衡,Th2 激活 B 细胞并产生免疫球蛋白(immunoglobulins,Ig)E,IgE 介导嗜酸性粒细胞和肥大细胞等诱发气道炎症。miR-370 是一类由人胚胎干细胞中被克隆的 microRNA,位于人类 4 号染色体上,长度约 75 个碱基。研究^[3]表明,miR-370 在炎症性疾病中表达严重下调,且在多种肿瘤及炎症性疾病中发挥调节作用,如 miR-370 通过靶向 SIRT6 和调节核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element,ARE)信号通路来加速脑缺血再灌注损伤^[4],通过抑制性别决定域 Y 框 12(sex determining region Y,SOX12)在膀胱癌中充当肿瘤抑制因子^[5],通过靶向 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4,TLR4)抑制由氧化的低密度脂蛋白触发的血管炎症和氧化应激^[6],通过靶向叉形头转录因子 1(forkhead box O1,FOXO1)抑制过氧化氢诱导的心肌细胞氧化应激和凋亡^[7]等。但 miR-370 在支气管哮喘中的作用研究鲜见报道。该研究通过建立卵清蛋白(ovalbumin,OVA)诱导的哮喘小鼠模型,观测过表达 miR-370 对 OVA 诱导的哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)和肺组织中炎症因子、免疫调节因子及凋亡蛋白表达水平的影响,初步探索过表达 miR-370 在哮喘小鼠肺损伤中的保护作用,为支气管哮喘的诊断和治疗提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 40 只雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2016-0011,使用许可证号:SYXK(京)2017-0033,实验动物使用过程中严格遵守 3R 原则,并通过医学伦理委员会批准,伦理审批号 IACUC:LYZYJSXYXY-20190201,实验前在恒温 25 °C 的环

境中采用标准的饲料进行喂养,自由取水。OVA 购自美国 Sigma 公司;miR-NC 和 miR-37 过表达腺病毒购自美国 Ambion 公司;RT-PCR 试剂盒、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒均购自美国 Sigma 公司;末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色试剂盒购自美国 Roche 公司;Bcl-2 相关的 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、B 细胞淋巴瘤蛋白 2(B-cell lymphoma protein 2, Bcl-2)和胱天蛋白酶 3(caspase-3, cas-3)抗体购自美国 Abcam 公司。miR-370、IL-12 和 IL-4 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。miR-370, 上游序列:5'-TAGCGGGTTTTGCTAGGGC-3', 下游序列:5'-TAGCGCCTAGGGCATCGATC-3'; IL-4 上游序列:5'-TACAGCCACCATGAGAAGGAC-3', 下游序列:5'-TGATCGTCTTTAGCCTTTCCA-3'; IL-12, 上游序列:5'-GACCATCACTGTCAAAGAGTTCTAGAT-3', 下游序列:5'-AGGAAAGTCTTGTTTTTGAAATTTTTTAA-3'; GADPH, 上游序列:5'-CTAGAGCTGACAGTGGG-TAT-3', 下游序列:5'-AGACGACCAATGCGTCCAAA-3'。

1.2 动物分组、建模及转染 将 40 只雌性 BALB/c 小鼠(6~8 周龄,体质量 15~20 g)随机分为 4 组($n=10$):对照组(Control 组)、模型组(OVA 组)、阴性对照组(OVA + miR-NC 组)、miR-370 过表达组(OVA + miR-370 组)。对照组常规饲养,不予任何处理,其余各组均采用致敏加激发法建立哮喘小鼠模型。致敏激发:小鼠于第 1~7 天腹腔注射致敏液 0.1 ml/只(0.1 ml 致敏液含 OVA 0.1 mg,氢氧化铝 0.02 mg);第 14 天将小鼠置于自制透明雾化玻璃箱中,3% OVA 溶液 10 ml 超声雾化吸入,30 min/d,持续 6 d。当小鼠出现躁动不安、呼吸急促、频繁点头动作、腹部抽动加剧、频繁揉鼻等症状时表示造模成功。造模成功后,OVA + miR-NC 组尾静脉注射 30 μ l miR-NC 腺病毒,OVA + miR-370 组尾静脉注射 30 μ l miR-370 过表达腺病毒,1 次/d,持续 2 d。确定干扰成功后 24 h 处死小鼠,收集肺组织并分离气管,结扎左主支气管,将气管上部剪出一个斜切面,以 0.1 mol/L PBS 缓冲液反复抽吸 2~3 次,每次吸取 0.5 ml。得到支气管肺泡灌洗液(BALF)。4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min 条件下离心 10 min,收集上清液并置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存,剩余 BALF 中的细胞用红细胞裂解缓冲液处理,然后用细胞计数器通过显微镜统计细胞总数。然后将细胞涂在载玻片上,干燥,并使

用瑞氏-吉姆萨染色剂染色,在高倍镜下进行炎症细胞分类计数。

1.3 RT-PCR 取小鼠肺组织约 70 mg,超声研磨匀浆,于 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 条件下离心 15 min,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,测定 RNA 的浓度和纯度并根据逆转录试剂盒操作说明进行逆转录。PCR 反应条件,95 $^{\circ}$ C、10 min,95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、1 min(40 个循环),熔解曲线 60 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C,每 15 s 升 0.3 $^{\circ}$ C。以目的基因和 GADPH 比值表示 mRNA 表达水平,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析结果,独立重复实验 3 次,取平均值。

1.4 ELISA 严格按照 ELISA 试剂盒操作说明书进行操作。ELISA 检测支气管肺泡灌洗液中白细胞数、IgE 水平、INF- γ 和 IL-13 蛋白表达水平。

1.5 HE 染色 将固定的肺组织进行脱水、石蜡包埋等处理,按试剂盒操作说明行 HE 染色,显微镜下观察组织切片病理形态变化。

1.6 TUNEL 染色 取肺组织于 4% 多聚甲醛溶液中充分固定,48 h 后脱水、浸蜡、石蜡包埋。按照 TUNEL 染色试剂盒说明书进行染色,凋亡细胞即阳性细胞,在光镜下呈棕黄色或棕褐色,非凋亡细胞即阴性细胞,呈蓝色。

1.7 Western blot 实验 使用胰酶消化细胞,用 RIPA 蛋白裂解液于冰上提取总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳、转膜、脱脂奶粉封闭,加入一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育摇床过夜。回收一抗,加入按比例稀释 HRP 标记的对应二抗(1:4 000),室温孵育 120 min。采用 ECL 进行化学发光法于暗室下曝光显影(GADPH 作内参)。将胶片进行扫描存档,Photoshop 整理去色,Alpha 软件分析吸光度,独立实验重复 3 次,取平均值。

1.8 统计学处理 使用 SPSS 17.0 软件分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-370 过表达 与 Control 组相比,OVA 组小鼠 miR-370 表达水平极低($F = 68.25, P = 0.036$);与 OVA 组相比,OVA + miR-NC 组 miR-370 表达水平差异无统计学意义,OVA + miR-370 组 miR-370 表达水平上调($F = 57.41, P = 0.042$)。见图 1。

2.2 各组小鼠 BALF 中炎症细胞数目比较 与 Control 组相比,OVA 组小鼠 BALF 中白细胞总数目

增多($F = 74.19, P = 0.026$);与 OVA 组相比, OVA + miR-NC 组炎症细胞总数目差异无统计学意义, OVA + miR-370 组炎症细胞总数目减少($F = 69.57, P = 0.031$)。见图 2。

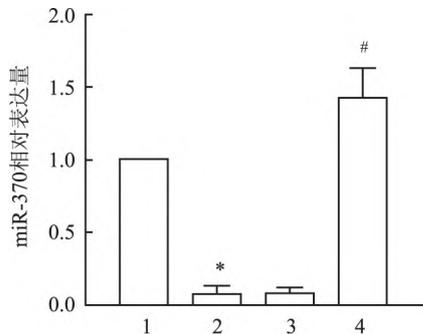


图1 RT-PCR 检测各组小鼠 miR-370 表达水平

1: Control 组; 2: OVA 组; 3: OVA + miR-NC 组; 4: OVA + miR-370 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 OVA 组比较: # $P < 0.05$

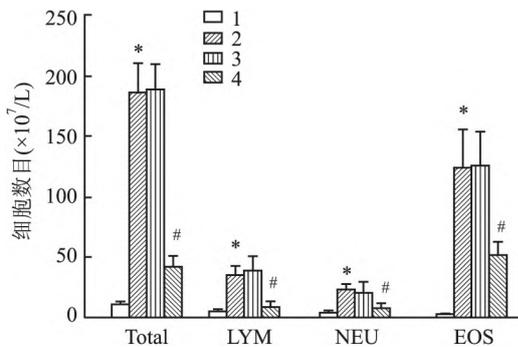


图2 各组小鼠 BALF 中炎症细胞计数

1: Control 组; 2: OVA 组; 3: OVA + miR-NC 组; 4: OVA + miR-370 组; Total: 白细胞总数; LYM: 淋巴细胞; NEU: 中性粒细胞; EOS: 嗜酸性粒细胞; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 OVA 组比较: # $P < 0.05$

2.3 各组哮喘小鼠 BALF IgE 水平比较 与 Control 组相比, OVA 组小鼠 BALF 中总 IgE 水平和 OVA 特异性 IgE 水平均升高($F = 81.42, 76.33, P = 0.014, 0.018$);与 OVA 组相比, OVA + miR-NC 组总 IgE 水平和 OVA 特异性 IgE 水平均差异无统计学意义, OVA + miR-370 组总 IgE 和 OVA 特异性 IgE 水平均降低($F = 65.27, 61.98, P = 0.039, 0.041$)。见图 3。

2.4 各组哮喘小鼠 BALF 中免疫调节因子蛋白含量比较 与 Control 组相比,模型组高表达 IFN- γ 和 IL-13($F = 69.15, 61.22, P = 0.031, 0.037$);与 OVA 组相比, OVA + miR-NC 组 IFN- γ 和 IL-13 含量差异无统计学意义, OVA + miR-370 组 IFN- γ 水平下调($F = 58.35, P = 0.042$), IL-13 含量上调($F = 61.42, P = 0.044$)。RT-PCR 检测 BALF 中 IL-12 和 IL-4 mRNA 表达水平,结果如图 4B 所示,与 Control 组相比, OVA 组 IL-12 和 IL-4 均高表达($F = 58.11,$

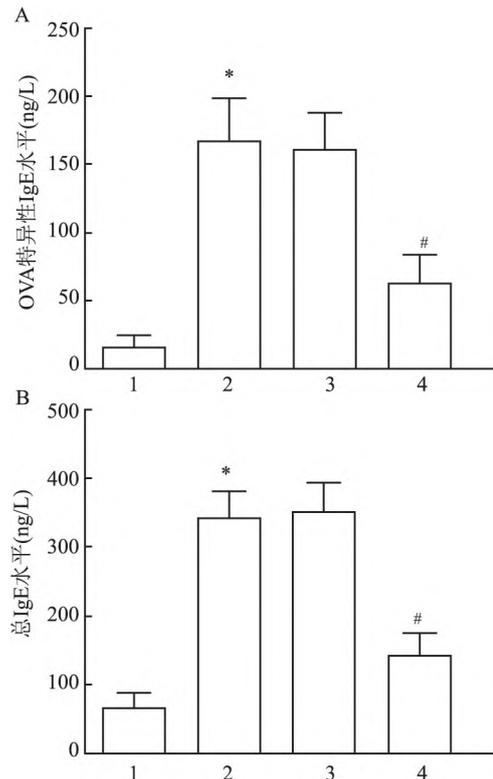


图3 ELISA 检测各组小鼠 BALF 中 IgE 含量

A: OVA 特异性 IgE 水平; B: 各组小鼠 BALF 中总 IgE 水平; 1: Control 组; 2: OVA 组; 3: OVA + miR-NC 组; 4: OVA + miR-370 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 OVA 组比较: # $P < 0.05$

62.47, $P = 0.043, 0.035$);与 OVA 组相比, OVA + miR-NC 组 IL-12 和 IL-4 表达水平差异无统计学意义, OVA + miR-370 组 IL-12 表达下调($F = 64.33, P = 0.030$), IL-4 mRNA 表达上调($F = 60.02, P = 0.036$)。见图 4。

2.5 各组哮喘小鼠肺组织病理损伤和细胞凋亡比较 HE 染色和 TUNEL 染色观察小鼠肺组织形态和凋亡水平变化,如图 5 所示, Control 组小鼠肺泡壁结构完整,肺泡大小无差异,黏膜和管周未见炎性细胞浸润,凋亡细胞极少(棕褐色);与 Control 组相比, OVA 组小鼠无完整的肺泡结构,支气管上皮损伤严重,支气管黏膜和管周可见大量的淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞浸润,管腔内出现大量分泌物,凋亡细胞明显增多;与 OVA 组相比, OVA + miR-370 组小鼠肺泡结构形态、炎性细胞浸润和凋亡细胞数减少。

2.6 各组哮喘小鼠肺组织炎症水平比较 采用 5 分制对肺组织 10 个视野下的 HE 染色病理图进行炎症评分,评分标准:支气管周围无炎性细胞计为 0 分,出现少量的炎性细胞计为 1 分;在支气管周围环绕细胞层厚度炎性细胞 1 个计为 2 分, 2 ~ 4 个计为

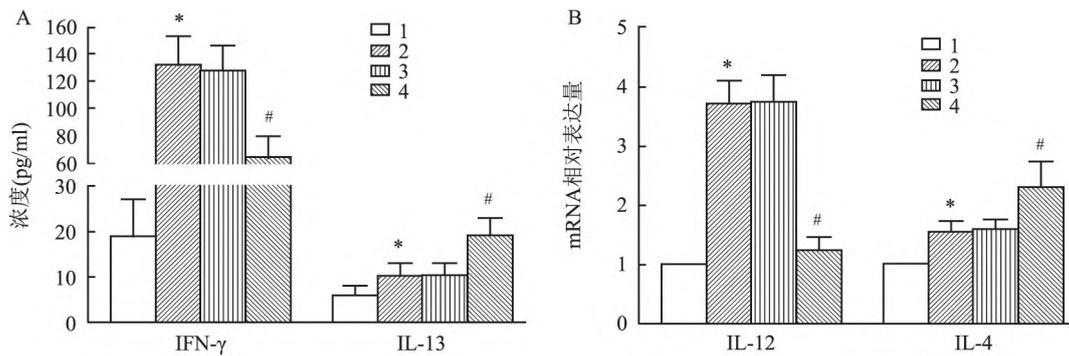


图4 ELISA 检测各组小鼠 BALF 中免疫调节因子蛋白含量

A: Th1 细胞因子 IFN- γ 和 Th2 细胞因子 IL-13 浓度; B: IL-12 和 IL-4 mRNA 表达水平; 1: Control 组; 2: OVA 组; 3: OVA + miR-NC 组; 4: OVA + miR-370 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 OVA 组比较: # $P < 0.05$

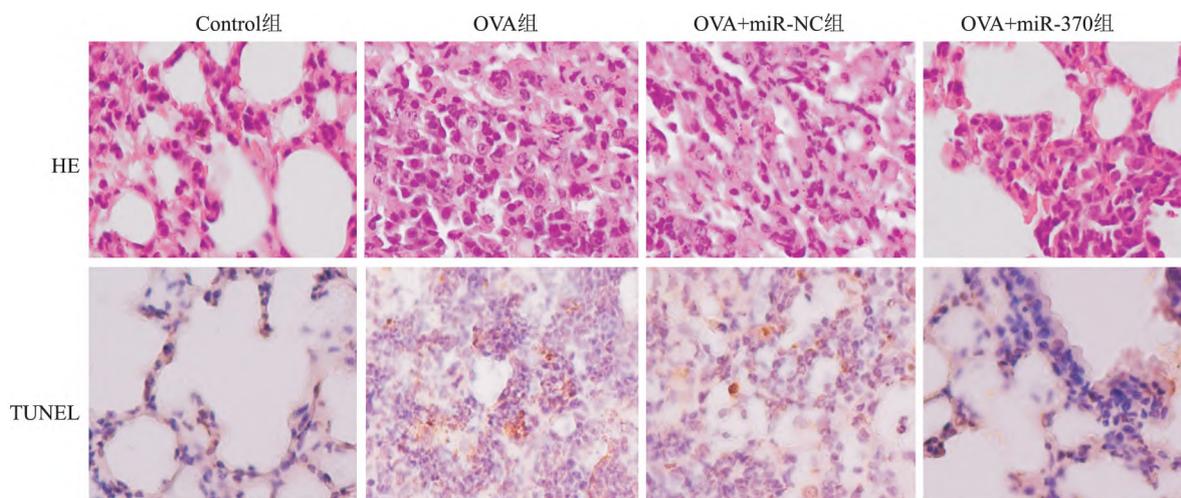


图5 HE 和 TUNEL 染色检测各组小鼠肺组织病理损伤和凋亡情况 ×400

3分, ≥ 4 个计为4分。与 Control 组相比, OVA 组小鼠肺组织炎症评分升高 ($F = 81.53, P = 0.011$); 与 OVA 组相比, OVA + miR-370 组小鼠肺组织炎症评分降低 ($F = 78.34, P = 0.027$)。见图6。

2.7 各组哮喘小鼠肺组织中凋亡蛋白表达水平比较 与 Control 组相比, OVA 组小鼠肺组织中 Bax/Bcl-2 和 cleaved cas3/cas3 蛋白表达水平上调 ($F = 65.53, 63.12, P = 0.030, 0.032$); 与 OVA 组相比, OVA + miR-NC 组 Bax/Bcl-2 和 cleaved cas-3/cas3 表达水平无差异, OVA + miR-370 组 Bax/Bcl-2 和 cleaved cas3/cas3 蛋白表达水平下调 ($F = 68.33, 70.22, P = 0.028, 0.024$)。见图7。

3 讨论

支气管哮喘常伴随呼吸困难、发作性咳嗽、胸闷等症状, 是一种发病机制极其复杂的慢性呼吸道疾病, 以气道炎症和气道重塑为主要特征^[8]。研究^[9]

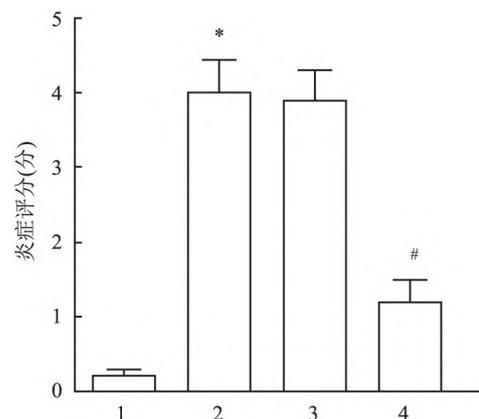


图6 小鼠肺组织炎症评分

1: Control 组; 2: OVA 组; 3: OVA + miR-NC 组; 4: OVA + miR-370 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 OVA 组比较: # $P < 0.05$

表明, 肺组织炎症、免疫系统紊乱、组织细胞凋亡是导致支气管哮喘的主要病理生理因素。该研究通过建立 OVA 诱导的哮喘小鼠模型, 探索过表达

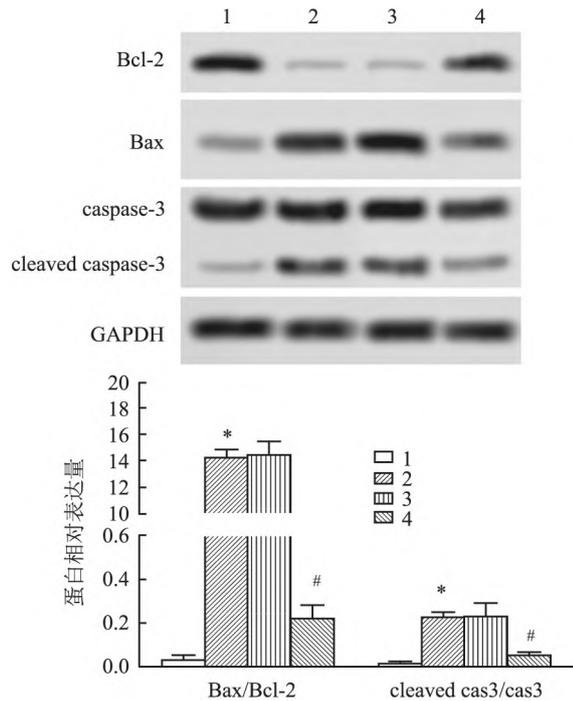


图7 各组小鼠肺组织中 Bax/Bcl-2 和 cleaved cas3/cas3 蛋白表达水平

1: Control 组; 2: OVA 组; 3: OVA + miR-NC 组; 4: OVA + miR-370 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 OVA 组比较: # $P < 0.05$

miR-370在哮喘小鼠 BALF 和肺组织炎症反应、免疫应答及凋亡中的调节作用。

炎症细胞是一类参与炎症反应的细胞,包括肥大细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞等。在支气管哮喘发生时,炎症细胞大量分泌,加剧支气管气道炎症反应,促使支气管哮喘与炎症反应双向作用,并最终诱发重症哮喘^[10]。嗜酸性粒细胞的浸润情况与哮喘气道炎症严重程度密切相关,嗜酸性粒细胞被激活后,一方面合成并释放嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)、碱基蛋白和神经毒素等损伤气道上皮;另一方面,不断分泌 TGF- β 1 作用于成纤维细胞上,使气道结构重塑,继而诱发病道炎症反应^[11]。Th1/Th2 在哮喘中起调控作用,Th1/Th2 失衡或 Th2 细胞因子异常升高会诱导哮喘发生,IFN- γ 、IL-12、IL-4 和 IL-13 是 Th1 和 Th2 细胞分泌的炎症调控因子^[12]。IL-4 诱导 Th 细胞向 Th2 细胞分化,促进免疫球蛋白 E (IgE) 的合成,同时引起嗜酸性粒细胞在炎症部位聚集诱发哮喘^[13]。IL12 和 IFN- γ 则与之相反,IL-12 诱导 Th 细胞向 Th1 细胞分化,抑制 IgE 的合成,IFN- γ 则抑制 IL-4 诱导的 IgE 合成,阻断 IgE 介导的哮喘发生^[14]。

凋亡蛋白 Bax、Bcl-2、cas-3 和 cas-9 是凋亡发生

过程中的重要调控蛋白,凋亡发生时,上游细胞凋亡起始蛋白 cas-9 与细胞色素 C 结合形成凋亡小体,cas-9 被活化后诱导并激活下游细胞凋亡执行蛋白 cas-3,凋亡蛋白 cas-9 和 cas-3 被异常激活,使得大脑组织产生大量的 cleaved cas-3 和 cleaved cas-9,并进一步执行 DNA 裂解及细胞凋亡过程,加重肺组织损伤。Bcl-2 则抑制细胞色素 c 与 cas-9 结合,从而发挥抗细胞凋亡作用^[15]。

该研究结果显示,OVA 组小鼠 BALF 中出现大量淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞,IgE 和 OVA 特异性 IgE 在哮喘小鼠 BALF 中异常升高。而过表达 miR-370 抑制哮喘小鼠 BALF 中炎症细胞和 IgE 水平,同时,降低 INF- γ 、IL-12 水平,升高 IL-13、IL-4 水平。因此,过表达 miR-370 通过降低哮喘小鼠炎症水平缓解肺组织损伤。为进一步明确过表达 miR-370 在哮喘小鼠肺组织中的保护作用,该研究通过检测哮喘小鼠肺组织病理损伤程度及凋亡情况,结果显示,过表达 miR-370 改善哮喘小鼠肺组织损伤程度,抑制肺组织凋亡。

综上所述,过表达 miR-370 通过调控哮喘小鼠肺组织中炎症水平、免疫应答和细胞凋亡在哮喘小鼠肺损伤中发挥保护作用。该研究通过动物模型初步探索了过表达 miR-370 在哮喘小鼠肺损伤中的调控作用,但具体的作用机制有待进一步的研究。后续实验可对过表达 miR-370 调节哮喘小鼠肺组织炎症、免疫应答和凋亡的作用机制进行研究,为哮喘的诊断和治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 高 阳, 杨 帆. 支气管哮喘患者外周血 Th1、Th2 与 Th17 细胞表达水平及临床意义[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(1): 76-9.
- [2] Zou X L, Chen Z G, Zhang T T, et al. Th17/Treg homeostasis, but not Th1/Th2 homeostasis, is implicated in exacerbation of human bronchial asthma[J]. Ther Clin Risk Manag, 2018, 14: 1627-36.
- [3] 兰 敏. miR-370 在肿瘤中的作用及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(2): 291-6.
- [4] Ruan Z F, Xie M, Gui S J, et al. MiR-370 accelerated cerebral ischemia reperfusion injury via targeting SIRT6 and regulating Nr2f2/ARE signal pathway[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2020, 36(9): 741-49.
- [5] Wang Y, Ma D L, Yu C H, et al. MicroRNA-370 suppresses SOX12 transcription and acts as a tumor suppressor in bladder cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(5): 2303-12.
- [6] Zhang Y, Zhu Y, Gao G, et al. Knockdown XIST alleviates LPS-

- induced WI-38 cell apoptosis and inflammation injury *via* targeting miR-370-3p/TLR4 in acute pneumonia[J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(5):348–58.
- [7] Qiu Z, Wang L, Mao H, et al. MiR-370 inhibits the oxidative stress and apoptosis of cardiac myocytes induced by hydrogen peroxide by targeting FOXO1[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(4):3025–31.
- [8] 王定荣,王亚亭,华山,等. 五味子乙素对哮喘小鼠肺部炎症的影响及其机制研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(5):735–40.
- [9] Yuan C, Subramanian S. MicroRNA-mediated tumor-microbiota metabolic interactions in colorectal cancer[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(4):281–5.
- [10] Wang M. Epigenetic control of inflammatory cells[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(6):316.
- [11] Yan Y, Bao H P, Li C L, et al. Wentong decoction cures allergic bronchial asthma by regulating the apoptosis imbalance of EOS[J]. *Chinese Med*, 2018, 13:21.
- [12] 黄俊凯,王艳,杨奉天,等. 炎症和非炎症环境下肝干细胞细胞学特性观察[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(3):373–8.
- [13] Lambrecht B N, Hammad H, Fahy J V. The cytokines of asthma[J]. *Immunity*, 2019, 50(4):975–91.
- [14] Kozlik P, Zuk J, Bartyzel S, et al. The relationship of airway structural changes to blood and bronchoalveolar lavage biomarkers, and lung function abnormalities in asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2020, 50(1):15–28.
- [15] Zhang N, Lu H T, Zhang R J, et al. Protective effects of methane-rich saline on mice with allergic asthma by inhibiting inflammatory response, oxidative stress and apoptosis[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019, 20(10):828–37.

Over-expression of miR-370 regulates lung injury in asthmatic mice and its mechanism

Ren Yanhong¹, Zhang Lingyun², Zhao Shaocong¹, Zhang Guangchao¹, Sun Xiaomin¹

(¹Dept of General Internal Medicine, ²Dept of Emergency, Affiliated Children's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of overexpression of miR-370 on immune injury in asthmatic mice induced by ovalbumin (OVA). **Methods** 40 female BALB/c mice were divided into control group, model group (OVA), negative control group (OVA + miR-NC) and miR-370 overexpression group (OVA + miR-370). Except for the control group, the other groups were sensitized and stimulated to establish the asthma mouse model. After successful modeling, the OVA + miR-NC group and the OVA + miR-370 group were injected with miR-NC adenovirus and miR-370 overexpression adenovirus respectively by caudal vein. RT-PCR was recommended to detect the expression level of miR-370, the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected, and Wright – Giemsa staining was used to determine the BALF number of leukocytes. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to detect the expression levels of immunoglobulin E (IgE) and immunomodulatory factor protein in BALF of asthmatic mice; hematoxylin-eosin (HE) staining and terminal labeling method (TUNEL) were used to observe the degree of lung tissue pathological damage and cell apoptosis; Western blot was used to detect the protein expression levels of Bax/Bcl-2 and cleaved cas3/cas3. **Results** Compared with the control group, mice in the OVA group expressed low miR-370 ($P < 0.05$), the number of leukocytes increased ($P < 0.05$), the level of IgE increased ($P < 0.05$), the levels of immunomodulatory factor γ -Interferon (INF- γ), interleukin-13 (IL-13), interleukin-12 (IL-12) and interleukin 4 (IL-4) were up-regulated ($P < 0.05$), and lung tissue was severely damaged ($P < 0.05$), the expression ratio of Bax/Bcl-2 and cleaved cas3/cas3 increased ($P < 0.05$); Compared with the OVA group, there was no difference in the indicators of the OVA + miR-NC group. Over-expression of miR-370 up-regulated the expression of miR-370 ($P < 0.05$), decreased the number of leukocytes ($P < 0.05$) and the level of IgE ($P < 0.05$), down-regulated immunoregulatory factors INF- γ and IL-12 ($P < 0.05$), up-regulated IL-13 and IL-4 ($P < 0.05$), and improved lung tissue damage, decreased cell apoptosis, and reduced the expression ratio of Bax/Bcl-2 and cleaved cas3/cas3 ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-370 inhibits the production of BALF inflammatory cells in OVA-induced asthmatic mice and relieves lung injury in mice.

Key words bronchial asthma; miR-370; immune injury; lung injury