

LPA 在小鼠矽肺模型的表达及其对小鼠肺上皮细胞 EMT 影响

李欣颖¹,郝小惠^{1,2},张劲松¹,吴慧¹,崔洁¹,郭灵丽^{1,2},王宏丽^{1,2},刘和亮^{1,2}

摘要 目的 探究溶血磷脂酸(LPA)在小鼠矽肺模型中的表达及其对小鼠肺上皮(MLE-12)细胞上皮-间质转化(EMT)的影响。方法 20只C57BL/6雄性小鼠随机分为对照组和模型组,对照组每天给予0.9%氯化钠溶液,模型组采用鼻腔滴注100 mg/L二氧化硅(SiO₂)悬浊液50 μl,连续7 d,在第28天处死,取部分肺组织,免疫组化观察溶血磷脂酸1型受体(LPAR1)的表达,Western blot检测平滑肌蛋白α(α-SMA)、I型胶原(COL I)和LPAR1的蛋白表达;细胞增殖实验检测SiO₂对MLE-12细胞的增殖能力;细胞划痕实验检测SiO₂对MLE-12细胞的迁移能力;将MLE-12细胞分为对照组、SiO₂刺激组和抑制剂组,Western blot检测LPAR1和EMT相关蛋白的表达水平。结果 Western blot检测显示模型组小鼠肺组织内α-SMA和COL I表达增高,模型建立成功;免疫组化显示在模型组小鼠气管支气管周围上皮细胞内LPAR1表达阳性,呈现亮棕色;Western blot检测显示模型组小鼠肺组织内LPAR1的蛋白含量表达高于对照组($P < 0.05$);细胞增殖实验和划痕实验检测显示SiO₂能够促进MLE-12细胞的增殖和迁移;Western blot检测显示SiO₂刺激组LPAR1和间质标志物Vimentin蛋白表达增高($P < 0.05$),而上皮标志物E-cadherin蛋白表达降低($P < 0.05$),且与对照组和抑制剂组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 LPA在小鼠矽肺模型中表达增高,并通过调控MLE-12细胞EMT过程促进其增殖、迁移,加速疾病的进展。

关键词 矽肺;溶血磷脂酸;小鼠肺上皮细胞;增殖;迁移;上皮-间质转化

中图分类号 R 135.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)05-0771-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.018

矽肺是由于吸入大量的游离二氧化硅(silicon dioxide, SiO₂)粉尘所引起的以矽结节形成和肺部间质纤维化为主的职业病。溶血磷脂酸(lysophospha-

tidic acid, LPA)作为一种天然的小分子磷脂,通过G蛋白偶联受体(G protein coupled receptors, GPCRs)介导的多种信号通路发挥广泛的生物学作用^[1],可引起多种细胞的增殖和转移,促进疾病的发展^[2-5]。而上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,此过程中细胞具有迁移、增殖和侵袭等能力^[6]。研究^[7]证实LPA可促进结肠癌细胞的EMT。但是LPA在小鼠矽肺模型中的表达及其对小鼠肺上皮(mouse lung epithelial, MLE-12)细胞增殖和迁移的作用尚不明确,因此该研究主要探讨LPA在小鼠矽肺模型中表达情况以及对MLE-12细胞的增殖和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 C57BL/6小鼠(北京华阜康生物科技股份有限公司);MLE-12细胞(上海康朗生物科技股份有限公司)。F12K/DMEM培养基、胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司);细胞培养添加剂ITS(上海道鹏生物科技股份有限公司),SiO₂(粒径0.5~10 μm)(美国Sigma公司),AM095(上海羽朵生物有限公司);细胞增殖试剂盒(美国Promega公司);兔多克隆抗体Vimentin(美国Proteintech公司);兔多克隆抗体E钙黏蛋白(E-cadherin,美国Cell Signal Technology公司);兔多克隆抗体α肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、兔多克隆抗体I型胶原(type I collagen, COL I)、兔多克隆抗体溶血磷脂酸受体1(lysophosphatidic acid receptor 1, LPAR1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(美国Affinity Biosciences公司);HRP标记羊抗小鼠IgG二抗、β-肌动蛋白(β-actin)抗体(英国Abcam公司);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(江苏碧云天生物技术研究所);RIPA裂解液(上海碧云天生物技术研究所);多聚甲醛溶液(北京雷根生物技术有限公司);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法蛋白定量试剂盒(杭州联科生物技术有限公司);LPA抑制剂ki16189购于南京安培化工科技有限公司。

2022-03-21 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81673119);河北省自然科学基金(编号:H2018209337)

作者单位:¹华北理工大学公共卫生学院,唐山 063210

²河北省器官纤维化重点实验室,唐山 063210

作者简介:李欣颖,女,硕士研究生;

刘和亮,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: tsruoshui@163.com

1.2 方法

1.2.1 SiO₂ 悬浊液配置 将 SiO₂ 连续研磨 3 h 后,高压灭菌,溶于 0.9% 氯化钠溶液/培养基中,充分吹打均匀,于超声机内超声 30 min,备用。

1.2.2 动物模型建立 20 只 C57BL/6 雄性小鼠,体质量为(20 ± 5) g,随机分为对照组(10 只)和模型组(10 只),对照组每天给予 0.9% 氯化钠溶液,模型组每天采用鼻腔滴注 100 mg/L SiO₂ 悬浊液 50 μl,连续 7 d,在第 28 天处死,取肺组织。

1.2.3 动物样本获取和处理 使用水合氯醛 100 g/L 腹腔注射麻醉小鼠,取小鼠右下肺叶,置于 10% 多聚甲醛中固定 24 h,进行常规石蜡包埋,组织切片。其余肺组织 -80 °C 保存备用。

1.2.4 免疫组织化学法测定 LPAR1 的表达情况 对切片进行常规处理以后,采用 pH 6.0 的枸橼酸缓冲液进行抗原修复,3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,山羊血清封闭后分别滴加 LPAR1 的一抗,4 °C 暗盒过夜后滴加二抗,DAB 显色,苏木精染色 30 s,脱水处理,二甲苯封片后,显微镜下观察 LPAR1 的表达情况。

1.2.5 Western blot 检测小鼠肺组织 α-SMA、COL I 和 LPAR1 蛋白表达 肺组织冰上研磨匀浆后,离心提取蛋白,聚丙烯酰胺凝胶电泳检测小鼠肺组织中 α-SMA、COL I 和 LPAR1 的表达。

1.2.6 细胞增殖实验 将密度为 1 × 10⁴ 个/孔 MLE-12 细胞接种于 96 孔板中,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中采用含 2% FBS 培养基培养 24 h 后,分别加入终浓度为 0 (对照,完全培养基)、25、50、100 和 200 mg/L 的 SiO₂ 悬液培养 24 h,选出 SiO₂ 最佳刺激浓度为 50 mg/L;进一步将细胞分为对照组、SiO₂ 刺激组、抑制剂组(SiO₂ 50 mg/L + LPA 抑制剂),检测 0、6、12、18 和 24 h 时间点的细胞增殖能力。在避光环境下,每孔加入 20 μl 的 MTS,4 h 后用波长为 490 nm 的酶标仪检测吸光度(A)值,并计算细胞活力值(每组设 3 个平行孔),公式如下:

$$\text{细胞活力值} = (\text{实验组 } A \text{ 值} - \text{空白组 } A \text{ 值}) / (\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{空白组 } A \text{ 值})$$

1.2.7 MLE-12 细胞迁移能力检测 细胞以(4 × 10⁵ ~ 5 × 10⁵) 个/孔接种于 6 孔板,分组同 1.2.6 项,待细胞完全融合后,立即使用 1 000 μl 移液器吸头垂直于孔板划痕。PBS 缓慢冲洗 3 次,洗净划下的碎细胞,含 2% FBS 培养基培养 24 h 后,于倒置显微镜下针对划痕区域选取 5 个随机视野(×4),通过计算细胞覆盖面积比(%)分析迁移能力。

1.2.8 Western blot 检测 MLE-12 细胞内 LPAR1 和 EMT 相关蛋白表达 将细胞分组同 1.2.6 项,培养 24 h 后,用 RIPA 细胞裂解液将细胞置于冰上裂解后收集上清液,BCA 法进行总蛋白定量后,Western blot 法检测 LPAR1、Vimentin 和 E-cadherin 等相关蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间的比较采用方差齐性检验和单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺组织内 α-SMA 和 COL I 蛋白表达

如图 1 所示,小鼠模型组内肺组织中 α-SMA 和 COL I 蛋白含量较对照组明显增高,且差异有统计学意义($F = 46.959、147.551, P < 0.05$),说明小鼠肺内发生了纤维化改变,模型建立成功。见图 1。

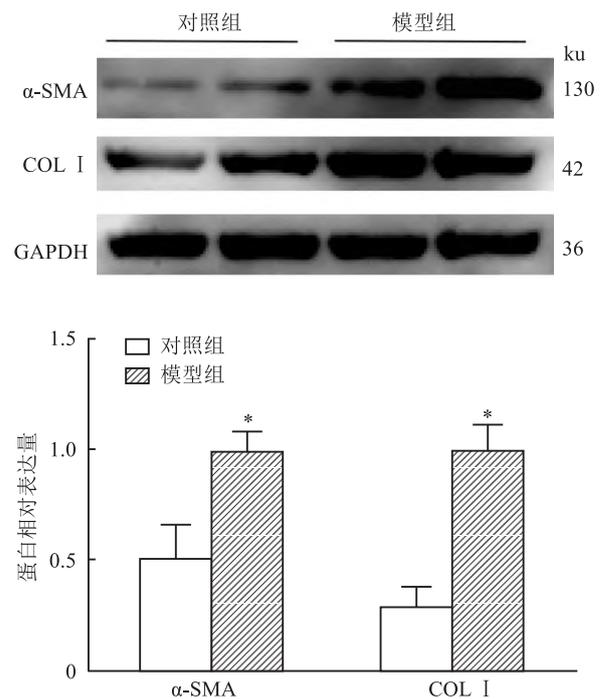


图 1 小鼠肺组织内 α-SMA、COL I 的蛋白表达
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 LPAR1 在小鼠肺组织内的表达 免疫组织化学结果显示,模型组比对照组 LPAR1 表达明显增高,呈亮棕黄色。Western blot 结果显示,模型组小鼠肺组织内 LPAR1 蛋白含量明显高于对照组,且差异有统计学意义($F = 16.00, P < 0.05$)。见图 2、3。

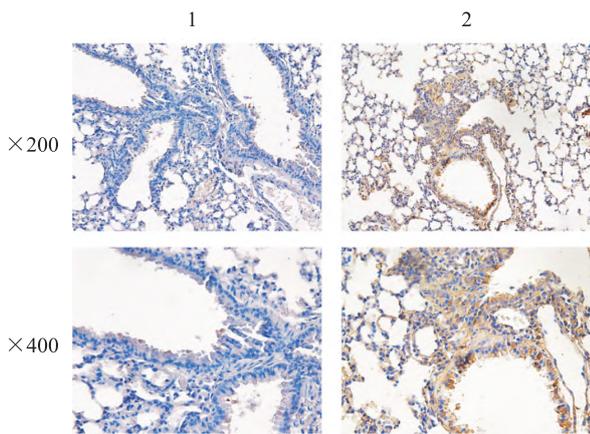


图2 LPAR1 在小鼠肺组织内的表达结果

1: LPAR1 在小鼠正常肺组中的表达; 2: LPAR1 在小鼠矽肺模型组中的表达

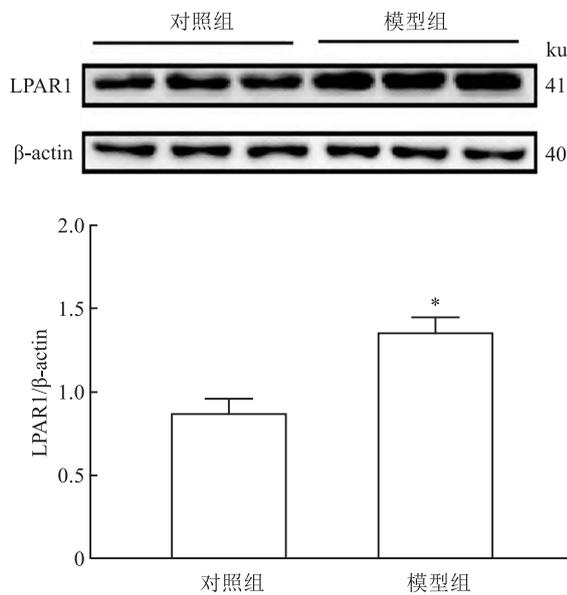


图3 小鼠肺组织内 LPAR1 的蛋白表达
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 SiO₂ 对细胞存活率的影响 与对照组(0 mg/L)相比,随着 SiO₂ 浓度增高,细胞存活率呈现递增趋势,在 50 mg/L 时细胞存活率达到最大 (1.435% ± 0.185%), 差异有统计学意义 ($F = 204.9, P < 0.05$); 随后开始下降。因此,后续实验 SiO₂ 浓度均采用 50 mg/L。见图 4。

2.4 SiO₂ 对 MLE-12 细胞增殖能力的影响 如图 5 所示,50 mg/L 的 SiO₂ 培养 MLE-12 细胞 0、6、12、18、24 h 后,与对照组相比,SiO₂ 刺激组均可显著增强 MLE-12 细胞的增殖能力,且随时间的增加,细胞增殖能力增强;给予抑制剂后,细胞增殖能力减弱。

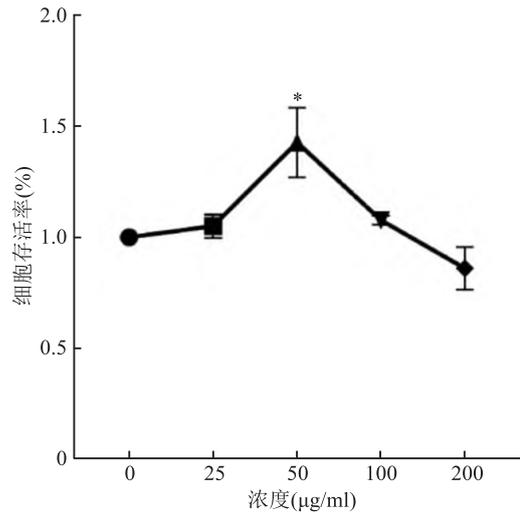


图4 SiO₂ 浓度对细胞存活率的影响
与 0 mg/L 组比较: * $P < 0.05$

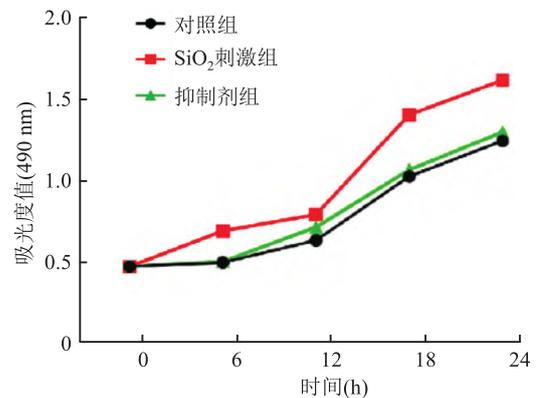


图5 不同时间 SiO₂ 刺激对细胞增殖能力的影响

2.5 SiO₂ 对细胞迁移能力的影响 划痕实验结果显示,与对照组(5.70% ± 3.08%)相比,50 mg/L 的 SiO₂ 刺激组覆盖面积比(44.35% ± 2.88%)增加,而抑制剂组(15.36% ± 4.61%)较 SiO₂ 刺激组减小,差异有统计学意义 ($F = 93.01, P < 0.05$)。见图 6。

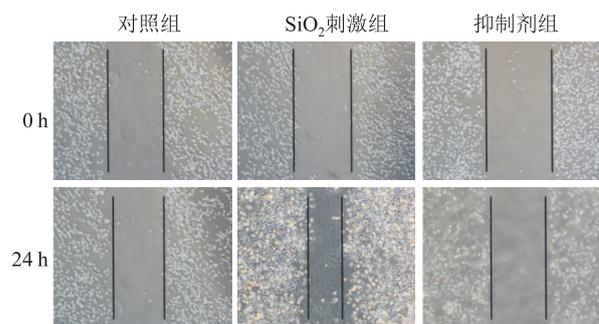


图6 LPA 处理 MLE-12 迁移能力的影响 ×40

2.6 SiO₂ 刺激 MLE-12 细胞后 LPAR1 和 EMT 相关蛋白表达情况 Western blot 结果(图 7)显示, SiO₂ 处理 MLE-12 细胞 24 h 后, LPAR1 表达增高($P < 0.05$), 间质标志物 Vimentin 表达增高($P < 0.05$) 而上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达降低($P < 0.05$); 给予抑制剂后 LPAR1 表达降低($P < 0.05$), 间质标志物 Vimentin 表达降低($P < 0.05$), 上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达增高($P < 0.05$)。说明 SiO₂ 可以导致 MLE-12 细胞 LPAR1 蛋白表达增高, 促进 EMT, 且差异有统计学意义。

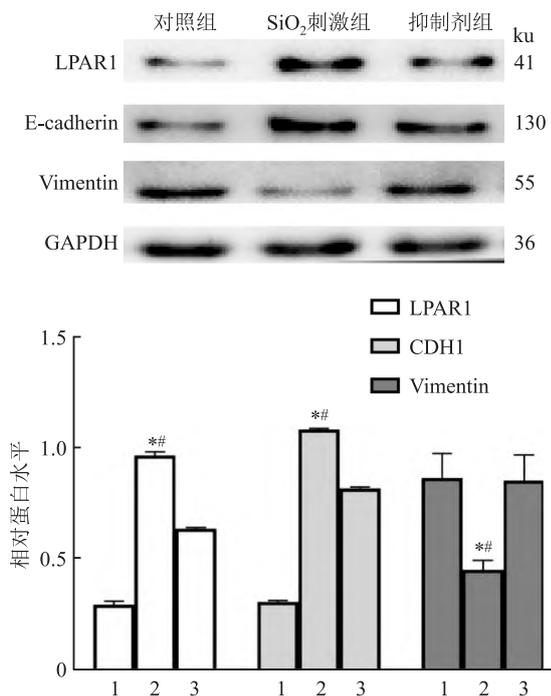


图7 MLE-12 细胞内 LPAR1 和 EMT 相关蛋白表达

1: 对照组; 2: SiO₂ 刺激组; 3: 抑制剂组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与抑制剂组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

矽肺发生发展是受多种因素交互影响的, 其发病机理尚未完全阐明, 且缺乏行之有效的临床治疗措施, 是职业病临床研究的难点^[8]。LPA 是哺乳动物肺组织、血浆、唾液、支气管肺泡灌洗液和氧化低密度脂蛋白等的天然组成部分, 与呼吸系统等多种疾病息息相关, 在维持机体正常的生理功能, 介导组织纤维化及细胞增殖、迁移等基本过程发挥着重要作用^[2], 其中, 其受体 LPAR1 在纤维化中较其它受体表达增高明显。因此, LPAR1 的表达也可以反映 LPA 在纤维化过程中的作用。EMT 是上皮细胞在特定的生理和病理情况下转化成有迁移能力的间质

细胞的现象^[9], 细胞在发生 EMT 的同时可以刺激细胞的增殖和迁移, 广泛参与组织愈合, 纤维化和癌症发生等过程^[10]。已有人^[11-12]发现, LPA 在胃癌细胞中表达增高, 进一步促进胃癌细胞的增殖和迁移, 加速疾病的进程。但目前 LPA 在矽肺发展过程对促进细胞的增殖迁移作用尚不明确。因此, 本实验主要探究 LPA 的表达及其对 MLE-12 细胞 EMT 能力的影响。

本研究首先采用 Western blot 验证小鼠矽肺模型建立成功, 并进一步检测 LPAR1 在小鼠矽肺模型中的表达情况。免疫组织化学染色结果显示在模型组气管周围 LPAR1 表达明显呈亮棕色, LPAR1 含量增多; Western blot 结果显示小鼠肺组织中有 LPAR1 的表达, 模型组较对照组升高, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明在小鼠矽肺模型中 LPAR1 可显著增高。进一步采用 SiO₂ 刺激 MLE-12 细胞观察细胞的增殖情况, 结果显示 SiO₂ 刺激组细胞的增殖和迁移能力较对照组明显增强, 给予抑制剂后增殖和迁移能力减弱且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 检测 SiO₂ 刺激 MLE-12 细胞后 LPAR1 及 EMT 相关指标显示, LPAR1 和间质标志物 Vimentin 表达增高而上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达降低, 给予抑制剂后间质标志物表达降低, 上皮标志物表达增高, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这些结果表明 LPAR1 在小鼠矽肺模型中显著表达, 并促进 MLE-12 细胞的增殖、迁移, 参与 EMT 过程, 加速疾病的发展, 这与 Ray et al^[13] 在肺癌中的研究结果一致。

综上所述, SiO₂ 诱导的小鼠矽肺模型中 LPA 的增高可促进 MLE-12 细胞的增殖和迁移, 导致细胞发生 EMT, 加速矽肺疾病的进展。

参考文献

[1] Xiang H, Lu Y, Shao M, et al. Lysophosphatidic acid receptors: biochemical and clinical implications in different diseases [J]. J Cancer, 2020, 11(12): 3519-35.

[2] Ray R, Rai V. Lysophosphatidic acid converts monocytes into macrophages in both mice and humans [J]. Blood, 2017, 129(9): 1177-83.

[3] Bernacchioni C, Cencetti F, Ouro A, et al. Lysophosphatidic acid signaling axis mediates ceramide 1-phosphate-induced proliferation of C2C12 myoblasts [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): 139.

[4] Comelia O C, Perry K J, Marty S, et al. Ectomesoderm and epithelial-mesenchymal transition - related genes in spiralian development [J]. Dev Dyn, 2018, 247(10): 1097-120.

[5] Shea B S, Tager A M. Role of the lysophospholipid mediators ly-

- sophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in lung fibrosis [J]. Proc Am Thorac Soc, 2012, 9(3):102-10.
- [6] Benesch M G K, Yang Z, Tang X, et al. Lysophosphatidate signaling: the tumor microenvironment's new nemesis [J]. Trends Cancer, 2017, 3(11):748-52.
- [7] 安锦慧, 孙治平, 李云涛, 等. 我国结直肠癌筛查的影响因素文献分析及思考[J]. 中国全科医学, 2020, 23(23): 2877-82.
- [8] Barber C M, Fishwick D, Carder M, et al. Epidemiology of silicosis: reports from the SWORD scheme in the UK from 1996 to 2017 [J]. Occup Environ Med, 2019, 76(1):17-21.
- [9] 吕文姣, 周京旭. 上皮-间质转化与肿瘤侵袭转移关系的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(6): 508-11.
- [10] Suzuki H I, Masafumi H, Hajime M, et al. Molecular analysis of endothelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β signaling[J]. J Vis Exp, 2018(138): 57577.
- [11] Yang D, Yang W, Zhang Q, et al. Migration of gastric cancer cells in response to lysophosphatidic acid is mediated by LPA receptor 2[J]. Oncol Lett, 2013, 5(3): 1048-52.
- [12] Craene B D, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2):97-110.
- [13] Ray R, Jangde N, Singh S K, et al. Lysophosphatidic acid-RAGE axis promotes lung and mammary oncogenesis via protein kinase B and regulating tumor microenvironment[J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1):170.

Expression of LPA in murine silicosis model and its effect on EMT of MLE-12 cells

Li Xinying¹, Hao Xiaohui^{1,2}, Zhang Jingsong¹, Wu Hui¹, Cui Jie¹, Guo Lingli^{1,2}, Wang Hongli^{1,2}, Liu Heliang^{1,2}

(¹School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210;

²Hebei Key Laboratory of Organ Fibrosis, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210)

Abstract Objective To investigate the expression of lysophosphatidic acid (LPA) in mouse silicosis model and its effect on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of mouse lung epithelial (MLE-12) cells. **Methods** 20 C57BL/6 male mice were randomly divided into the control group and the model group. The control group was given normal saline, and the model group was given nasal drip of 50 μ l silicon dioxide (SiO₂) suspension with 100 mg/L every day for 7 consecutive days. They were killed on the 28th day. Partial lung tissues were taken. Immunohistochemistry was used to observe the expression of lysophosphatidic acid receptor 1 (LPAR1), and Western blot was used to detect the protein expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), Type I collagen (COL I) and LPAR1; the proliferation of MLE-12 was detected by solution cell proliferation assay; scratch test was used to detect the migration ability of SiO₂ on MLE-12 cells. MLE-12 cells were divided into control group, SiO₂ stimulation group and inhibitor group, and the expression levels of LPAR1 and EMT related proteins were detected by Western blot. **Results** Western blot detection showed that the expression of α -SMA and COL I in the lung tissue of mice from the model group increased, and the model was established successfully; immunohistochemistry showed that the expression of LPAR1 was positive in the epithelial cells around the trachea and bronchus of the model group mice, showing bright brown; Western blot detection found that the expression of LPAR1 protein in the lung tissue of mice from the model group was higher than that from the control group ($P < 0.05$); cell proliferation assay and scratch test showed that SiO₂ could significantly promote the proliferation and migration of MLE-12 cells; Western blot showed that the expression of LPAR1 and interstitial marker Vimentin protein increased in SiO₂ stimulation group ($P < 0.05$), while the expression of epithelial marker E-cadherin protein decreased ($P < 0.05$), and the difference was statistically significant compared with the control group and the inhibitor group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of LPA increased in mouse silicosis model, which can promote the proliferation and migration of MLE-12 cells by regulating EMT process and exacerbates the process of silicosis in mice.

Key words silicosis; lysophosphatidic acid; mouse lung epithelial cells; proliferation; migration; epithelial-mesenchymal transition