

LncRNA SIL 对肺泡上皮细胞增殖和迁移的抑制作用研究

张万方¹, 潘鹏涛², 何金娇¹, 朱艳平¹, 王选年¹

摘要 目的 研究 lncRNA SIL 与肺纤维化过程中肺泡上皮细胞的增殖和迁移之间的关系。方法 利用 RNA fish 研究在转化生长因子(TGF- β 1)诱导肺泡上皮细胞向间质细胞转化的过程中 lncRNA SIL 的表达变化,构建 lncRNA SIL 真核表达载体,转染 A549 细胞后,通过 RT-PCR、MTT、Western blot、细胞损伤修复以及免疫荧光实验检测过表达 lncRNA SIL 对细胞 A549 增殖和迁移的作用以及对相关标志蛋白表达的影响。结果 当使用 TGF- β 1 诱导 48 h 后,细胞中 lncRNA SIL 的表达量与对照组相比降低;在 A549 细胞中过表达 lncRNA SIL 时,细胞增殖能力、迁移能力以及细胞增殖相关蛋白 PCNA 和 Ki67 的表达与对照组相比均降低;对细胞标志蛋白的表达分析结果显示,与对照组比,转染 lncRNA SIL 组,间质细胞标志蛋白 α -SMA 和 Collagen-1 表达降低,肺泡上皮细胞标志蛋白 E. cad 表达升高。结论 lncRNA SIL 可以通过抑制 A549 细胞的增殖和迁移达到抑制肺泡上皮细胞向间质细胞转化的作用。

关键词 lncRNA SIL; 特发性肺纤维化; 迁移; 增殖

中图分类号 Q 291

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0224-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.012

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是以肺部蜂窝状结构改变引起限制性通气障碍为主要特征的一种间质性肺部疾病。大量研究证明 lncRNA 与肺纤维化有重要的关系,例如, lncRNA PFAR^[1], lncRNA ZEB1-AS1^[2], lncRNA ITPF^[3], lncRNA PFRL^[4] 以及 lncRNA PFAL^[5] 等参与了肺纤维化的发生过程。转化生长因子(transforming growth factor, TGF- β 1)是诱导肺泡上皮细胞间质转化的关键因子^[6]。使用 TGF- β 1 诱导后,肺泡上皮细胞标志蛋白 E-Cadherin(E. cad)的表达量降低,间质细胞标志蛋白 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle ac-

tin, α -SMA) 和 Collagen-1 的表达量升高^[7]。lncRNA SIL 是突触极蛋白 2(SYNPO2)第四个内含子^[8],前期研究显示 lncRNA SIL 在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化组织中表达降低,推测 lncRNA SIL 可能是肺纤维化的潜在抑制因子。该文研究了 lncRNA SIL 在 TGF- β 1 诱导肺泡上皮细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)中的表达变化,并构建了 lncRNA SIL 真核表达载体,通过研究过表达 lncRNA SIL 后肺泡上皮细胞生长特性以及标志蛋白表达的变化,分析 lncRNA SIL 在肺纤维化发生过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 肺泡上皮细胞株(A549)购自上海生物科学研究所;鼠抗人抗体 PCNA、E. cad、 α -SMA 和 Collagen-1 购自美国 Abcam 公司;鼠抗人抗体 GAPDH 购自美国 Santa Cruz 公司;羊抗鼠二抗购自美国 Abcam 公司。荧光显微镜 80i 购自日本 Nikon 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 荧光原位杂交(RNA fish) 细胞 RNA fish 采用广州博锐生物科技有限公司 lncRNA FISH 试剂盒,按照说明书的要求进行原位杂交实验。具体步骤如下:细胞通过 4% 的多聚甲醛室温固定 10 min,每孔加入 1 ml 预冷的 0.5% Triton X-100 的 PBS,4 °C 静置 5 min;加入 1 × PBS 清洗细胞 3 次,每次 5 min,加入 RNA 探针 37 °C 孵育过夜,避光 42 °C,SSC 缓冲液清洗细胞 3 次,每次 5 min,清洗、避光,加入 DAPI 染色液,室温染色 10 min,使用荧光显微镜观察并拍照记录(80i, 日本 Nikon 公司)。

1.2.2 转染 合成的全长 lncRNA SIL 连接在 pCMV-sport6 载体上,使用 Lipo3000 将 lncRNA SIL 重组质粒转染到 A549 细胞中,pCMV-sport6 空载体做为阴性对照,在转染后 4 ~ 6 h 更换完全培养液,同时加入 TGF- β 1(5 μ mol/L)诱导,分别在诱导 24、48 h 取材作进一步检测。

1.2.3 RT-PCR 收集处理后的 A549 细胞,加入 TRIzol 消化,提取 RNA。使用 Nanodrop 2000 检测

2021-12-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81702074);河南省科技攻关项目(编号:182300410086);河南省高等学校重点科研项目(编号:20A180026)

作者单位:新乡学院¹ 生命科学与基础医学学院、² 医学院,新乡 453003

作者简介:张万方,女,讲师,责任作者,E-mail:94673366@qq.com

RNA 的纯度和浓度,并逆转录成 cDNA。以逆转录的 cDNA 为模板,加入引物、2 × qPCR MasterMix (SYBR Green) 和 ddH₂O,混匀后放入荧光定量 PCR 仪中,反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,40 个循环。根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,以 GAPDH 为内参进行定量分析。RT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列表

名称	序列
lncRNA SIL	F: TGCCCCGTCTAAAAGGAACAGG R: GGAAGGAGAGTTTGCTGCCATC
Ki67	F: TCCTTTGGTGGGCACCTAAGACCTG R: TGATGGTTGAGGCTGTTCCTTGATG
GAPDH	F: GAACGGGAAGCTCACTGG R: GTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1.2.4 细胞划痕实验 收集细胞、计数并以 5×10^5 个/L 的密度铺板,待细胞密度达到 70% 时转染,24 h 后使用无菌 20 μ l 枪头划线,随后 PBS 洗细胞 3 次,加入 0.5% 血清的 DMEM 培养基培养,分别于 0、24、48 h 采集细胞迁移图像,观察细胞伤口愈合情况并计算细胞的迁移率^[9]。

1.2.5 Western blot 取处理后的细胞,裂解细胞提取总蛋白。SDS-PAGE 电泳后,转膜,室温封闭 1 ~ 2 h,加入一抗 PCNA (1 : 1 000),E. cad (1 : 1 000), α -SMA (1 : 1 000),Collagen-1 (1 : 500),GAPDH (1 : 5 000),4 ℃ 孵育过夜,加入 HRP 标记的二抗 (1 : 5 000),室温孵育 1 h。加入 ECL 试剂进行显色。

1.2.6 免疫荧光实验 在 24 孔板中放入盖玻片,接种 A549 细胞,待细胞长到 70% ~ 80% 时转染,48 h 后,使用 4% 多聚甲醛固定细胞 5 min,PBST 洗涤 3 次,每次 5 min,加入含有 1% BSA 的封闭液室温封闭 1 h,加入 PBST 清洗 3 次,每次 5 min,加入一抗 (1 : 200),4 ℃ 封闭过夜,避光条件下加入 Cy3 标记的二抗 (1 : 500),室温孵育 1 h,加入 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min。避光加入 DAPI 室温孵育 10 min,固定到载玻片上,于荧光显微镜下观察拍摄照片^[10]。

1.3 统计学处理 所有的数据使用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验进行差异分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA SIL 在 TGF- β 1 诱导的肺泡上皮细胞间质转化中表达降低 在培养的肺泡上皮细胞 A549 中加入 TGF- β 1 诱导 EMT,并分别通过 RNA fish 与 RT-PCR 检测 lncRNA SIL 的表达情况。结果显示,TGF- β 1 诱导 48 h 后细胞中的 lncRNA SIL 的表达量与阴性对照组和转染 lncRNA 对照组相比荧光强度和数量均降低(图 1A)。RT-PCR 检测 TGF- β 1 诱导 24 h 和 48 h 后 lncRNA SIL 的表达情况,结果显示,lncRNA SIL 的表达量随着 TGF- β 1 的诱导时间的延长逐步降低,方差分析显示,3 组之间 lncRNA SIL 的表达量差异有统计学意义 ($F = 298.8$, $P < 0.01$),诱导 24 h 细胞 lncRNA SIL 的表达量低于未诱导组 ($F = 14.4$, $P < 0.05$),诱导 48 h 细胞 lncRNA SIL 的表达量低于与诱导 24 h ($F = 10.25$, $P < 0.01$)(图 1B)。

2.2 过表达 lncRNA SIL 抑制肺泡上皮细胞 A549 迁移 lncRNA SIL 基因序列全长为 1 914 nt,由上海生工生物工程有限公司合成,构建重组真核表达载体 pCMV-lncRNA SIL。将构建的重组质粒 pCMV-lncRNA SIL 转染到肺泡上皮细胞 A549 中,其中空载体 pCMV 为阴性对照。结果显示,与空载体 pCMV 对照组相比,转染 lncRNA SIL 后细胞的迁移能力降低,见图 2。

2.3 过表达 lncRNA SIL 抑制肺泡上皮细胞 A549 增殖 lncRNA SIL 对 A549 细胞增殖方面作用的研究结果显示:转染后,过表达 lncRNA SIL 组细胞的增殖能力低于对照组;细胞增殖相关蛋白 PCNA 和 Ki67 表达变化的研究显示,过表达 lncRNA SIL 后,PCNA 的表达量与对照组相比降低;Ki67 mRNA 表达水平也比对照组降低,免疫荧光结果图中可以看出过表达 lncRNA SIL 组细胞 Ki67 蛋白的荧光信号比对照组减少,见图 3。

2.4 过表达 lncRNA SIL 抑制间质细胞标志蛋白的表达 lncRNA SIL 在 TGF- β 1 诱导的 EMT 过程中对相关细胞标志蛋白表达变化的研究结果显示。当使用 TGF- β 1 对细胞进行诱导时,标志蛋白 α -SMA 和 Collagen-1 的表达量比未诱导组升高。当 TGF- β 1 诱导并同时转染 lncRNA SIL 后,标志蛋白 α -SMA 和 Collagen-1 的表达量与转染空载体 pCMV 相比降低,标志蛋白 E. cad 的表达量与转染空载体 pCMV 相比升高。由此说明 lncRNA SIL 能够抑制 TGF- β 1 诱导的 EMT,也揭示出 lncRNA SIL 很有可能

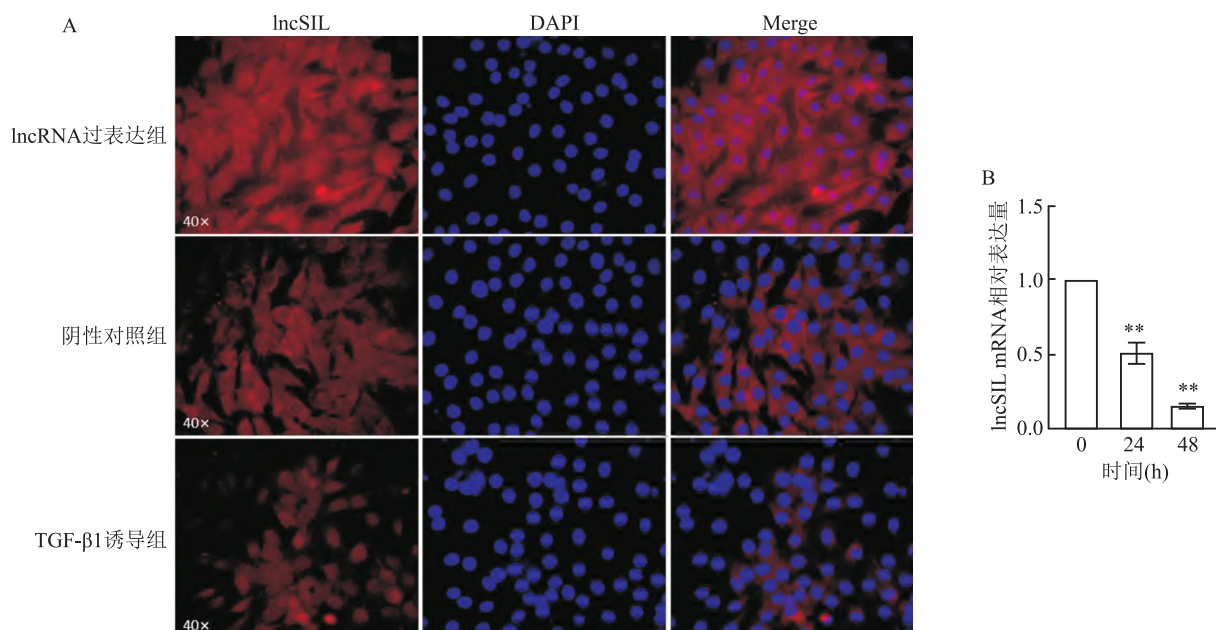


图1 LncRNA SIL在TGF-β1诱导的肺泡上皮细胞A549间质转化中表达降低 ×400

A: RNA fish 检测 TGF-β1 诱导 48 h 后 A549 细胞中 lncRNA SIL 的表达量; B: RT-PCR 检测 TGF-β1 诱导 24 h 与 48 h 后 A549 细胞中 lncRNA SIL 的表达; 与未诱导组比较: ** $P < 0.01$

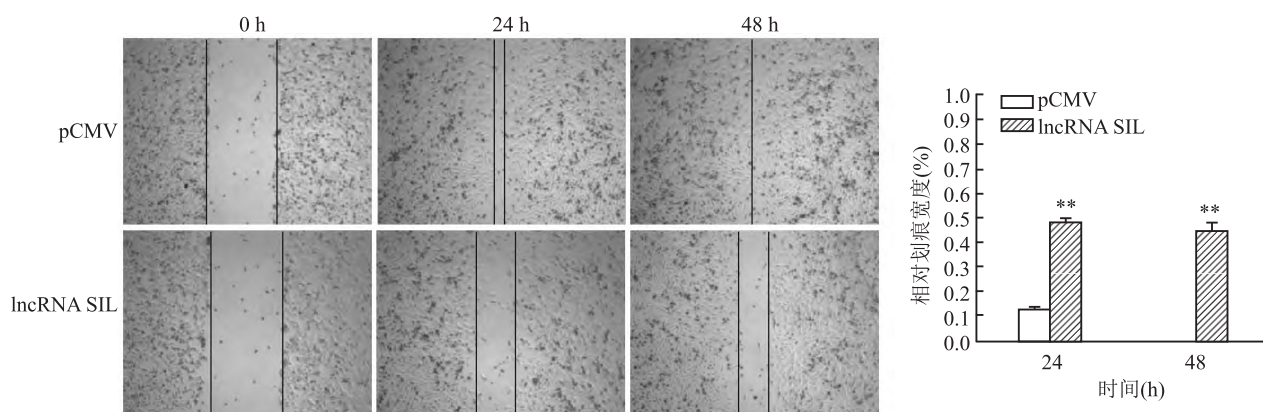


图2 过表达 lncRNA SIL 抑制肺泡上皮细胞 A549 迁移 ×40

与空载体 pCMV 组比较: ** $P < 0.01$

通过抑制 EMT 最终达到抑制肺纤维化的目的。

3 讨论

LPF 是一种慢性、进行性、不可逆性的肺间质组织异质性疾病,随着年龄增长显著增加,男性发病率更高,发病机制不清楚,致残率、病死率高,诊断后的平均生存期仅为 2~5 年^[11]。因此研究肺纤维化的发病机制对临床诊断和治疗具有重要的意义。

LncRNA 通常指一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA 转录本,虽然 lncRNA 不具有编码蛋白的功能,越来越多的研究^[12]发现,lncRNA 与细胞生

长、增殖、迁移、侵袭以及药物耐性等多种重要生命过程有重要的关系。近年有研究^[13]发现一些 lncRNA 参与到了肺纤维化发生的调控中,例如 lncRNA DNMT3OS 在 TGF-β 诱导的肺肌细胞激活中发挥重要作用;lncRNA sirt1 AS 能够抑制 TGF-β1 介导的 EMT^[4];lncRNA H19 在 IPF 患者以及博来霉素处理小鼠的肺组织中表达上调,缺失 lncRNA H19 可改善博来霉素诱导的肺纤维化^[14]等。LncRNA SIL 是近年来新发现的 lncRNA,本实验的前期研究结果显示 lncRNA SIL 在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中表达降低,因此推测其可能参与了肺纤

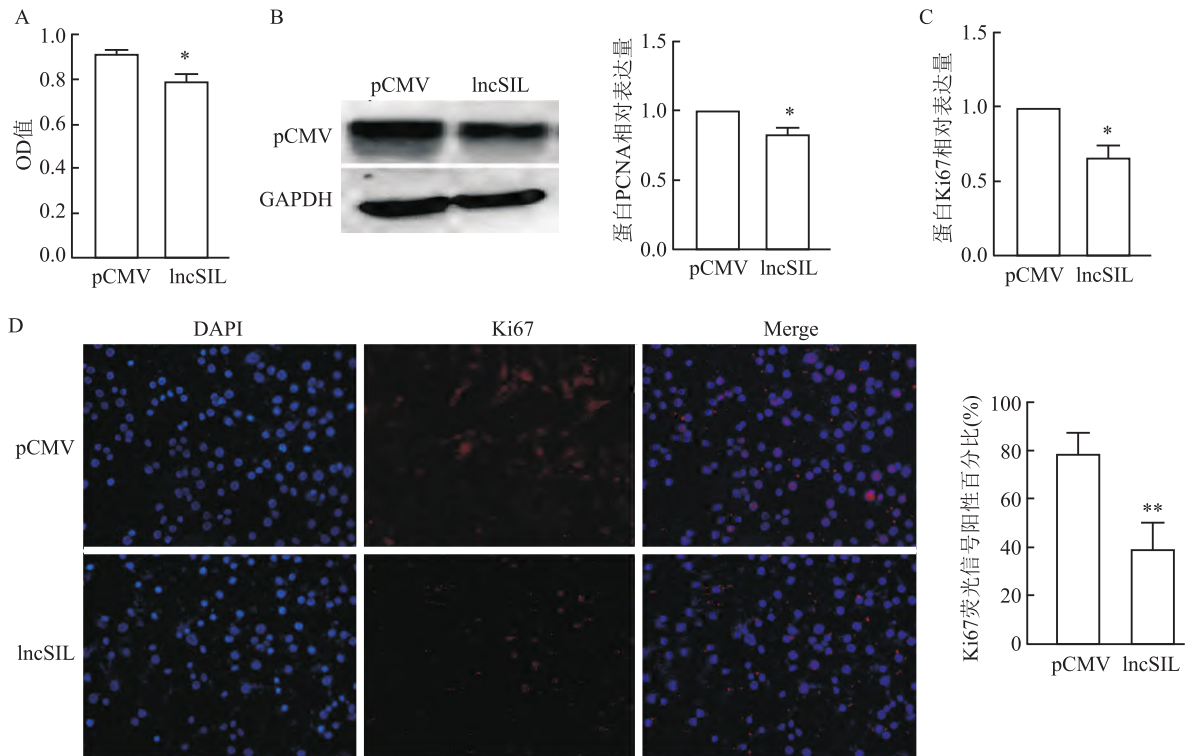


图3 过表达 lncRNA SIL 对 A549 细胞增殖能力的影响

A: MTT 检测转染后细胞的增殖能力; B: Western blot 检测蛋白 PCNA 在过表达 lncRNA SIL 组和空载体 pCMV 组的表达情况; C: 过表达 lncRNA SIL 组中蛋白 Ki67 相对表达量; D: 免疫荧光检测 Ki67 mRNA 在过表达 lncRNA SIL 组和空载体 pCMV 组的表达变化情况 $\times 200$; 与空载体 pCMV 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

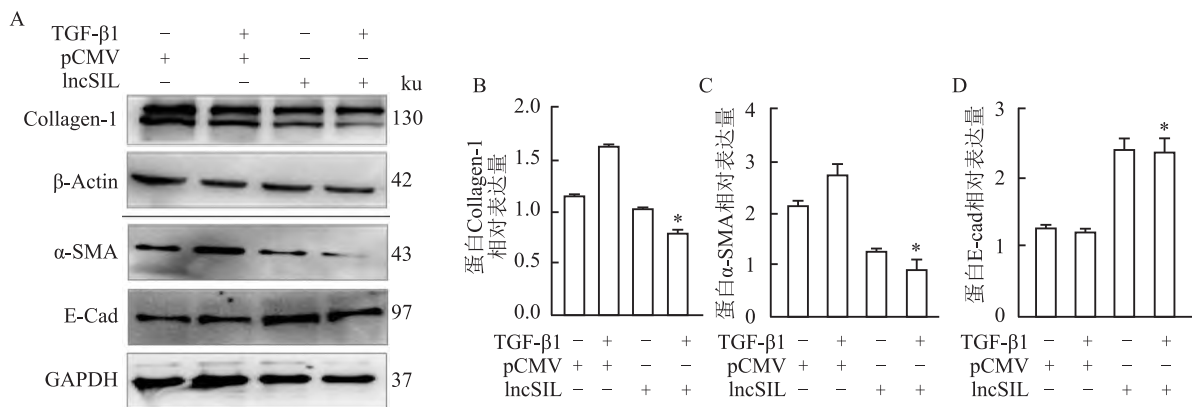


图4 过表达 lncRNA SIL 对抑制间质细胞标志蛋白的表达

与空载体组比较: * $P < 0.05$

维化的调控。本文为研究 lncRNA SIL 对 TGF-β1 诱导的 EMT 过程的影响,首先利用 TGF-β1 诱导 A549 细胞进行上皮间质转化,并检测诱导后 lncRNA SIL 的表达量的变化。结果显示, TGF-β1 诱导后细胞中 lncRNA SIL 表达量低于对照组,此结果与前期动物模型中的结果一致。为了进一步证明 lncRNA SIL 的作用,构建了 lncRNA SIL 真核表达载体,通过向

A549 细胞中转染 lncRNA SIL,分析过表达 lncRNA SIL 后对细胞的增殖与迁移能力的影响。结果显示,过表达 lncRNA SIL 后细胞的增殖与迁移能力均比对照组降低;对相关标志蛋白的研究结果从另一方面证明了 lncRNA SIL 的作用,结果显示,过表达 lncRNA SIL 后,与对照组相比间质细胞标志蛋白 α-SMA 和 Collagen-1 的表达降低,而肺泡上皮细胞标

志蛋白 E. cad 的表达升高。以上结果证明 lncRNA SIL 很可能是一种肺纤维化的抑制因子,其通过抑制肺泡上皮细胞的增殖、迁移和转化最终达到抑制肺纤维化的目的。

参考文献

- [1] Zhao X, Sun J, Chen Y, et al. lncRNA PFAR promotes lung fibroblast activation and fibrosis by targeting miR-138 to regulate the YAP1-Twist axis[J]. Mol Ther, 2018, 26(9): 2206–17.
- [2] Song X, Xu P, Meng C, et al. lncITPF promotes pulmonary fibrosis by targeting hnRNP-L depending on its host Gene ITGBL1[J]. Mol Ther, 2019, 27(2): 380–93.
- [3] Qian W, Cai X, Qian Q, et al. lncRNA ZEB1-AS1 promotes pulmonary fibrosis through ZEB1-mediated epithelial mesenchymal transition by competitively binding miR-141-3p[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 129.
- [4] Qian W, Cai X, Qian Q. Sirt1 antisense long non-coding RNA attenuates pulmonary fibrosis through sirt1-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(5): 4322–36.
- [5] Li X, Yu T, Shan H, et al. lncRNA PFAL promotes lung fibrosis through CTGF by competitively binding miR-18a[J]. FASEB J, 2018, 32(10): 5285–97.
- [7] Chen L, He X, Xie Y, et al. Up-regulated miR-133a orchestrates epithelial-mesenchymal transition of airway epithelial cells[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 15543.
- [8] Sakuma Y. Epithelial-to-mesenchymal transition and its role in EGFR-mutant lung adenocarcinoma and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Pathol Int, 2017, 67(8): 379–88.
- [9] 任鹏涛, 郝英豪, 阮红训. lnczc3h7a 对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响及其机制[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3): 391–5.
- [10] 李力, 郭祥翠, 王倩青, 等. 长链非编码 RNA PVT1 对宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3): 405–12.
- [11] Jin J, Lv W, Xia P, et al. Long noncoding RNA SYISL regulates myogenesis by interacting with polycomb repressive complex 2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(42): E9802–11.
- [12] 黄明华, 曾林祥. 非编码 RNA 与肺纤维化的相关研究进展[J]. 生命科学, 2019, 31(1): 55–60.
- [13] Savary G, Dewaeles E, Diazzi S, et al. The long noncoding RNA DN30S is a reservoir of FibromiRs with major functions in lung fibroblast response to TGF- β and pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 200(2): 184–98.
- [14] Wan X Y, Tian X B, Du J, et al. Long non-coding RNA H19 deficiency ameliorates bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis[J]. Respir Res, 2020, 21(1): 290.

Inhibitory effect of lncRNA SIL on proliferation and migration of alveolar epithelial cells

Zhang Wanfang¹, Pan Pengtao², He Jinjiao¹, Zhu Yanping¹, Wang Xuannian¹

(¹School of Life Science & Basic Medicine, ²Medical College of Xinxiang University, Xinxiang University, Xinxiang 453003)

Abstract Objective To study the relationship between lncRNA SIL and proliferation and migration of alveolar epithelial cell during pulmonary fibrosis. **Methods** The expression level of lncRNA SIL in A549 cells induced by transforming growth factor(TGF- β 1) was detected by RNA fish. The eukaryotic expression vector of lncRNA SIL was built and transfected into A549 cells, the proliferation and migration of the cells after overexpressing lncRNA SIL were studied by RT-PCR, MTT, Western blot, cell damage repair experiments and immunofluorescence. **Results** The migration and proliferation of A549 cells were significantly reduced compared with the control group after transfected by lncRNA SIL. When lncRNA SIL was overexpressed in A549 cells, cell proliferation, migration and expression of proliferation-related proteins PCNA and Ki67 were decreased compared with the control group. Analysis of the expression of cellular marker proteins showed that, the expression levels of interstitial cell marker proteins α -SMA and Collagen-1 were significantly reduced, while the expression level of alveolar epithelial marker protein E. cad significantly increased. **Conclusion** lncRNA SIL can inhibit the proliferation and migration of A549 cells, and also can inhibit EMT induced by TGF- β 1.

Key words lncRNA SIL; idiopathic pulmonary fibrosis; migration; proliferation