

lncSIL 通过 EZH2/P21/CDK6 信号通路负向调控 TGF- β 1 诱导的肺泡上皮细胞间质转化

张万方¹, 王琳², 潘鹏涛³, 李文昕², 康瑞丽¹, 朱子任¹, 陈浩勤²,
方新宇², 张星灿², 张雨昕², 姜依雯², 李欣妍², 袁本琪²

摘要 目的 研究在转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 诱导肺泡上皮细胞间质转化(EMT)进程中 lncSIL 的作用及其相关信号通路。方法 采用 Western blot 法研究沉默 lncSIL 后对 TGF- β 1 诱导 EMT 进程中细胞标志蛋白 E-钙黏蛋白(E-cad)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和 I 型胶原蛋白(Col I)表达的影响;通过 RNA pulldown 分析 lncSIL 相互作用蛋白,并检测过表达或沉默 lncSIL 后对其靶基因组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶(EZH2)以及下游因子 P21 蛋白(P21)和细胞周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6)表达的影响,并结合流式细胞术分析 lncSIL 对细胞周期进程的作用。结果 沉默 lncSIL 后,间质细胞标志蛋白 α -SMA 和 Col I 表达升高,肺泡上皮细胞标志蛋白 E-cad 表达下降;RNA pulldown 实验结果显示 EZH2 是与 lncSIL 相互作用的靶蛋白,并且沉默 lncSIL 后 EZH2 表达升高,其下游基因 P21 表达下调,CDK6 表达上调,同时 S 期细胞的数量显著升高;过表达 lncSIL 时,EZH2 与 CDK6 表达下调,P21 表达上调,同时 S 期细胞的数量明显降低。结论 lncSIL 通过负向调控 EZH2/P21/CDK6 信号通路抑制细胞周期进程进而抑制 TGF- β 1 诱导的肺泡上皮细胞向间质转化。

关键词 lncSIL;长链非编码 RNA;特发性肺纤维化;上皮细胞间质转化;转化生长因子 β 1;Zeste 同源物增强子 2;细胞标志蛋白

中图分类号 Q 23

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0600-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.007

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性、间质性肺病,其平均生存时间只有 2~4 年,被称为“类肿瘤”^[1]。研究^[2-3]显示 IPF 的主要特征是肺泡上皮细胞变异,后期肺组织异常修

复等病变。肺泡上皮细胞在转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的刺激下会逐渐失去上皮细胞的特性,转化为具有间充质细胞表型和特性,这一进程被称为肺泡上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[4]。研究表明 EMT 与 IPF 发病具有重要的关系。

近年的研究^[5-7]表明长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)在多种细胞进程中发挥重要的调控作用,如细胞迁移、侵袭、凋亡等。lncSIL (AK004418)是突触极蛋白 2(SYNPO2)基因的第 4 个内含子,具有抑制肌肉细胞发育的作用^[8],课题组前期研究结果表明 lncSIL 能够抑制肺泡上皮细胞的增殖和迁移^[9],并且发现 lncSIL 在 TGF- β 1 诱导的 EMT 进程中表达降低,过表达 lncSIL 能够抑制间质细胞标志蛋白 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)和 I 型胶原蛋白(collagen I, Col I)的表达,促进肺泡上皮细胞标志蛋白 E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)的表达^[10]。为了更深入地分析 lncSIL 在 TGF- β 1 诱导 EMT 进程中的作用及其相关信号通路,本研究通过分析沉默 lncSIL 后相关细胞标志蛋白的表达变化,进一步验证 lncSIL 的作用;并通过 RNA pulldown 检测 lncSIL 的靶蛋白,通过分析过表达或沉默 lncSIL 后其靶蛋白组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)及其下游基因 P21 和 CDK6 的表达变化,并结合细胞周期进程的变化情况探讨 lncSIL 在 TGF- β 1 诱导 EMT 进程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 A549 细胞株购自上海生物科学研究所细胞库,使用 DMEM/F12 (含 10% 小牛血清)的培养液,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,倒置显微镜观察细胞形态。

1.1.2 主要试剂 Lipofectamin™ 3000 转染试剂盒、TRIzol RNA 提取试剂盒、streptavidin-coupled

2024-02-29 接收

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(编号:23B180011);国家自然科学基金(编号:81702074)

作者单位:¹ 新乡学院生物工程学院生物技术教研室,新乡 453003

² 新乡学院国际教育学院生物技术教研室,新乡 453003

³ 新乡学院医学院基础医学教研室,新乡 453003

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

Dynabeads(美国 Invitrogen 公司),DMEM/F12 培养基(美国 Thermofisher 公司),小牛血清(批号:CA21,中国杭州四季青生物有限公司),引物由上海生工生物工程有限公司合成,siRNA 序列由广州锐博生物技术有限公司化学合成,抗体 Col I、 α -SMA、EZH2、E-cad、HRP 标记二抗(美国 Abcam 公司),抗体 P21、GAPDH(美国 Santa Cruz 公司),抗体 CDK6(美国 BOSTER 公司)。

1.1.3 主要仪器 细胞培养箱(HERAcell 150 i)、核酸蛋白分析仪(Nano Drop 2000)购自美国 Thermo 公司,微孔板化学发光仪(LB960 Centro)购自德国 Berthold 公司,荧光定量 PCR 仪(Light Cycler 480 II)购自瑞士 Roche 公司,高速冷冻离心机(Allegra X-30R)购自美国 Beckman 公司,垂直电泳仪(Power Pac HC)购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞转染 将 lncSIL 克隆到 pCMV-SPORT6 载体获得重组质粒,使用 Lipo3000 转染试剂盒将其转染到肺泡上皮细胞 A549 细胞中,同时设立空载体阴性对照,转染 4~6 h 后加入诱导剂 TGF- β 1 (5 μ mol/L),24、48 h 后收集细胞。设计并合成 lncSIL 的 siRNA (CAATTGTAATAGTCAATAA)。转染后加入诱导剂 TGF- β 1 (5 μ mol/L),24、48 h 后收集细胞。

1.3 实时荧光定量 PCR (real time-PCR, RT-PCR) 使用 TRIzol 试剂盒提取各组细胞总 RNA,根据逆转录试剂盒说明书的步骤要求合成 cDNA,使用荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR green-based PCR Master Mix 对目的基因进行定量分析。按照说明书步骤进行操作,采用两步法,每组设置 3 个复孔,样品重复检测 3 次。以 GAPDH 为内参,根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行定量分析。

1.4 Western blot 使用细胞裂解缓冲液裂解细胞样品获得细胞的总蛋白,使用 BCA 蛋白检测试剂盒

测定蛋白浓度。100 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后经过 12% SDS-PAGE 电泳分离,然后转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉的封闭液于室温封闭 1~2 h,随后加入一抗(Col I:1:1 000, α -SMA:1:1 000,EZH2:1:1 000,P21:1:500,E-cad:1:1 000,CDK6:1:500,GAPDH:1:5 000)4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,次日加入对应的二抗室温封闭 30 min,最后经 ECL 显色后分析结果。

1.5 RNA pulldown 生物素标记 lncSIL 与提取的细胞的总蛋白在室温下作用 1 h,然后加入链霉亲和素偶联的磁珠(streptavidin-coupled Dynabeads)室温孵育 1 h,使用洗脱液洗涤,最后对上样液(input)、洗脱液(lncSIL)和磁珠(beads)进行 Western blot 鉴定。

1.6 统计学处理 使用 SPSS19.0 软件对实验所有数据进行统计分析,组间差异比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沉默 lncSIL 对 TGF- β 1 诱导 EMT 进程的影响 在 TGF- β 1 诱导 EMT 的进程中,沉默 lncSIL 后,E-cad 表达下调, α -SMA 和 Col I 表达上调(图 1A);在未进行 TGF- β 1 诱导的对照组细胞中,沉默 lncSIL 后 3 种标志蛋白的表达变化与诱导组一致(图 1B)。说明 lncSIL 具有抑制 EMT 的作用。

2.2 lncSIL 对靶蛋白 EZH2 表达的影响 为进一步验证 EZH2 是否为 lncSIL 的蛋白伴侣,使用 lncSIL 为探针,进行 RNA pulldown 实验,并通过 Western blot 证明 EZH2 是 lncSIL 的结合蛋白(图 2A)。在此基础上,通过 Western blot 检测了在 TGF- β 1 诱导 EMT 进程中沉默或过表达 lncSIL 后 EZH2 蛋白的表达变化。结果显示:TGF- β 1 诱导组(NC + TGF)中 EZH2 的表达量与对照组(NC)相比明显升

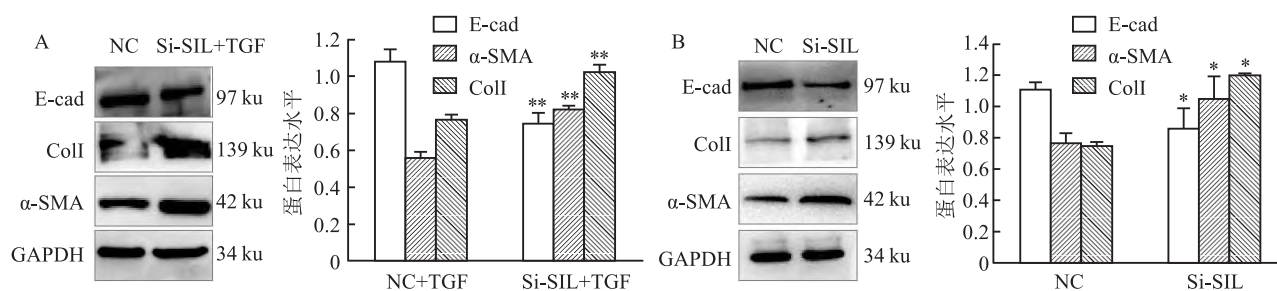


图1 沉默或过表达 lncSIL 后细胞中标志蛋白表达的变化

A:在 TGF- β 1 诱导 EMT 的进程中沉默 lncSIL 后细胞中标志蛋白表达的变化;B:未进行 TGF- β 1 诱导的细胞中沉默 lncSIL 后细胞中标志蛋白表达的变化;与对照组(NC + TGF)比较: ** $P < 0.01$;与对照组(NC)比较: * $P < 0.05$

高;当直接沉默 lncSIL 后,沉默组 (Si-SIL) 与对照组 (NC) 相比,EZH2 蛋白的表达量也明显升高,并且沉默组 (Si-SIL) 与 TGF- β 1 诱导组 (NC + TGF) 相比 EZH2 的表达水平相似;当 TGF- β 1 诱导的同时沉默 lncSIL 后,TGF- β 1 诱导 + 沉默组 (Si-SIL + TGF) 与 TGF- β 1 诱导组 (NC + TGF) 相比 EZH2 的表达量显著升高(图 2B)。说明 TGF- β 1 诱导能够促进 EZH2 蛋白的表达,沉默 lncSIL 表达也能够促进 EZH2 的表达,并且沉默 lncSIL 与 TGF- β 1 诱导同时进行具有加成作用。

当直接过表达 lncSIL 时,过表达组 (lncSIL) 与对照组 (NC) 相比 EZH2 的表达量明显降低;当 TGF- β 1 诱导的同时过表达 lncSIL 时,TGF- β 1 诱导 + 过表达组 (lncSIL + TGF) 与 TGF- β 1 诱导组 (NC + TGF) 相比 EZH2 的表达量明显降低;过表达组 (lncSIL) 与 TGF- β 1 诱导 + 过表达组 (lncSIL + TGF)

相比 EZH2 的表达量再次显著降低(图 2C)。说明过表达 lncSIL 抑制 EZH2 的表达,并且 lncSIL 的抑制作用能够抵消一部分 TGF- β 1 的诱导作用。RT-PCR 的结果显示 EZH2 mRNA 表达变化与上述结果一致(图 2D)。

2.3 lncSIL 对 EZH2/p21/CDK6 信号通路相关蛋白表达的影响 对 EZH2 调控的下游相关基因细胞周期抑制蛋白 P21 和细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK6 在沉默或过表达 lncSIL 后的表达分析结果显示,沉默 lncSIL 后,EZH2 和 CDK6 表达升高,P21 表达降低(图 3A);过表达 lncSIL 时,EZH2 和 CDK6 表达降低,P21 表达升高(图 3B)。以上结果说明,lncSIL 主要通过抑制 EZH2 蛋白表达,促使 P21 基因表达升高,进一步抑制 CDK6 的表达,导致细胞周期进程受到抑制,最终抑制 TGF- β 1 诱导的 EMT 进程。

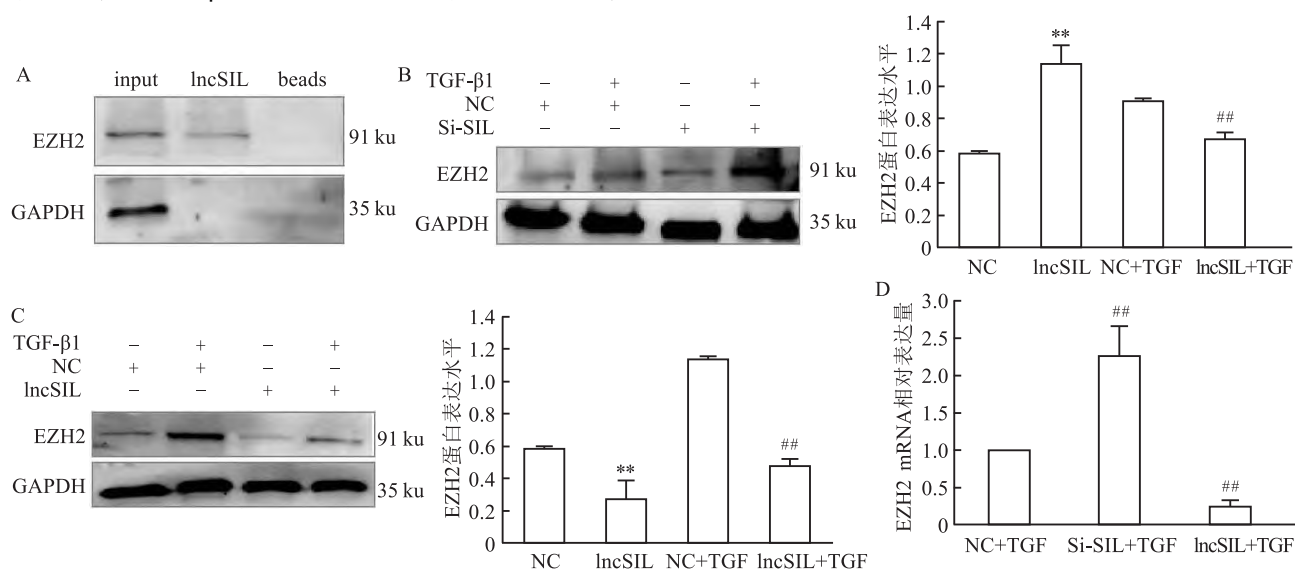


图 2 沉默或过表达 lncSIL 对 EZH2 蛋白表达的影响

A: RNA pull-down 实验检测 lncSIL 与 EZH2 的相互作用情况;B: Western blot 检测沉默 lncSIL 及 TGF- β 1 诱导对 EZH2 蛋白表达的影响;C: Western blot 检测过表达 lncSIL 及 TGF- β 1 诱导对 EZH2 蛋白表达的影响;D: RT-PCR 检测在 TGF- β 1 诱导 EMT 的进程中沉默或过表达 lncSIL 对 EZH2 蛋白表达的影响;与对照组 (NC) 比较: ** $P < 0.01$;与 TGF- β 1 诱导组 (NC + TGF) 比较: ## $P < 0.01$

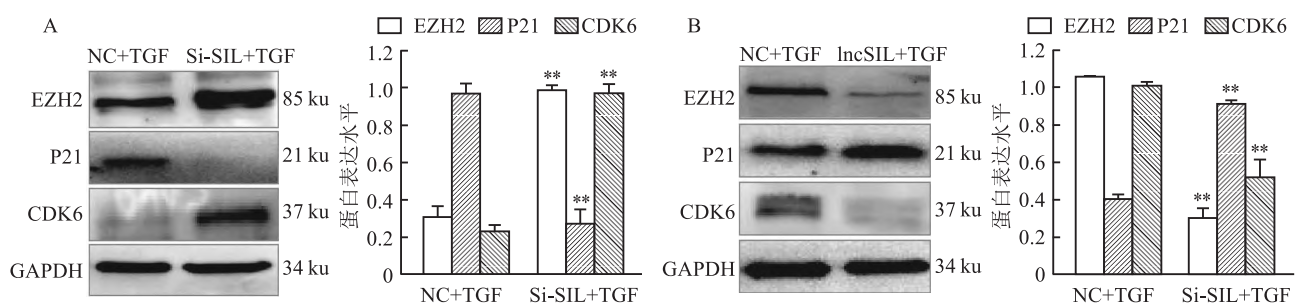


图 3 沉默或过表达 lncSIL 对 EZH2/p21/CDK6 信号通路相关蛋白表达的影响

A: 沉默 lncSIL 后对 EZH2、p21、CDK6 蛋白表达的影响;B: 过表达 lncSIL 后对 EZH2、p21、CDK6 蛋白表达的影响;与对照组 (NC + TGF) 比较: ** $P < 0.01$

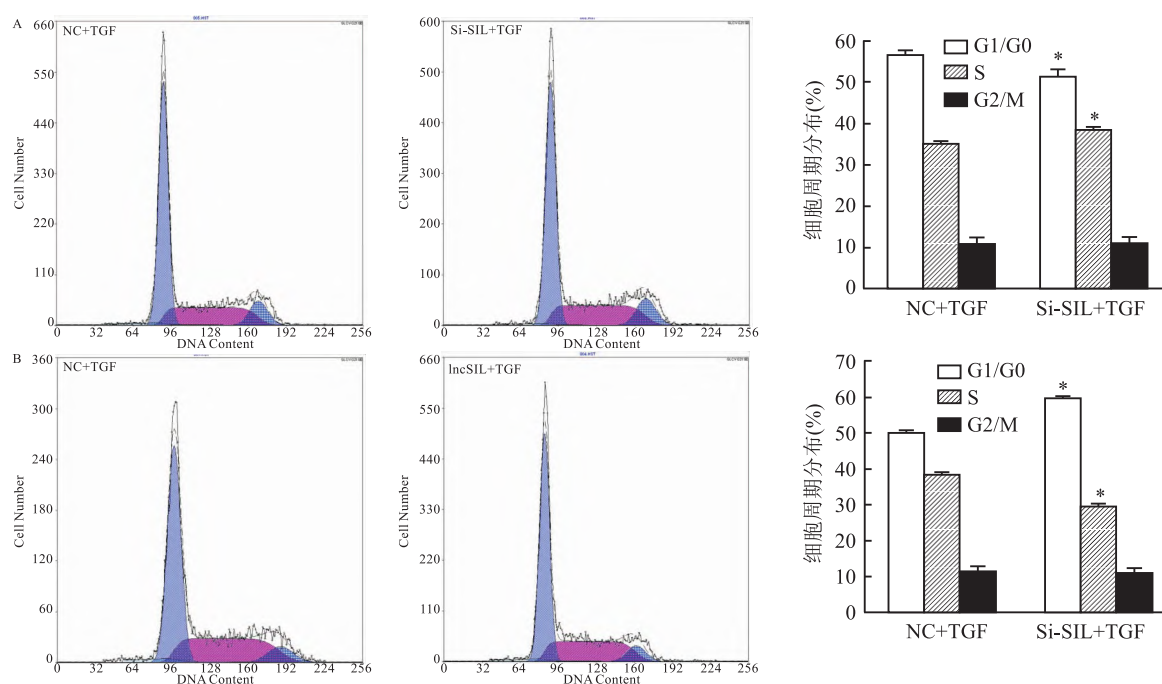


图4 沉默或过表达 lncSIL 对细胞周期进程的影响

A:沉默 lncSIL 后对细胞周期进程的影响及统计直方图;B:过表达 lncSIL 后对细胞周期进程的影响及统计直方图;与对照组 (NC + TGF) 比较: * $P < 0.05$

2.4 lncSIL 对细胞周期进程的作用 使用流式细胞术对 TGF- β 1 诱导 EMT 进程中沉默或过表达 lncSIL 后的细胞周期进程分析结果显示,过表达 lncSIL 时,与对照组 (NC + TGF) 相比,lncSIL + TGF 组 S 期细胞数量明显降低,G1/G0 期细胞数量明显升高 (图 4A);沉默 lncSIL 后,与对照组 (NC + TGF) 相比,Si-SIL + TGF 组 S 期细胞数量明显升高,G1/G0 期细胞数量明显降低 (图 4B)。结果说明 lncSIL 通过抑制细胞进入 S 期进一步抑制细胞周期进程。

3 讨论

近年来 lncRNA 在肺纤维化进程中的作用不断被揭示出来,例如,lncRNAs uc. 77 和 2700086A05Rik 通过上调 Zeb2 和 Hoxa3 基因的表达诱导 EMT,最终导致肺纤维化^[11];lncRNA MALAT1 通过 PI3K/AKT/mTOR/Snail 途径抑制 EMT 进一步影响肺纤维化等^[12]。根据前期研究^[9-10]结果,本研究首先通过在 TGF- β 1 诱导的 EMT 进程中沉默 lncSIL 后,检测细胞标志蛋白表达变化,结合前期实验结果进一步证明了 lncSIL 具有抑制 TGF- β 1 诱导 EMT 进程的作用。为了深入探讨 lncSIL 的分子机制,本研究通过 RNA pulldown 验证了 EZH2 为 lncSIL 的相互作用蛋白,并发现 lncSIL 负向调控 EZH2 表达。EZH2 是组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶,为多梳蛋白

复合体 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 的核心成分,具有 H3K27me3 的能力,当其被招募到靶基因的启动子上时,通过甲基转移酶的作用,使下游靶基因通过甲基化而实现表观沉默^[13]。P21 是一种重要的细胞周期蛋白的抑制基因,其作用是通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK6 的表达^[14],进一步抑制细胞周期进程。本研究结果显示 lncSIL 抑制 EZH2 的表达,促进 P21 的表达,说明 lncSIL 阻止了 EZH2 被招募到 P21 的启动子上,导致 P21 逃过了表观遗传沉默。P21 通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK6 引起细胞周期由 G1 期向 S 期的转变受阻,细胞无法进入 S 期。综合以上结果推测:lncSIL 抑制 TGF- β 1 诱导的 EMT 进程中的分子机制是通过负向调控 EZH2/P21/CDK6 通路,抑制细胞周期进程,从而抑制肺泡上皮细胞向间质细胞转化。本研究结果将对特发性肺纤维化发生机制的探究以及寻找诊断和治疗特发性肺纤维化的靶点具有重要意义。

参考文献

- [1] Otsubo K, Kishimoto J, Ando M, et al. Nintedanib plus chemotherapy for nonsmall cell lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis: a randomised phase 3 trial [J]. Eur Respir J, 2022, 60 (6):2200380.
- [2] Ikeda S, Sekine A, Baba T, et al. Hepatotoxicity of nintedanib in

- patients with idiopathic pulmonary fibrosis: A single-center experience[J]. *Respir Investig*, 2017, 55(1):51–4.
- [3] Amarpreet K, Susan K M, David A S. Genetics in idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis, prognosis, and treatment[J]. *Front Med*, 2017, 4:154–62.
- [4] Neveu W A, Mills S T, Staitieh B S, et al. TGF- β 1 epigenetically modifies Thy-1 expression in primary lung fibroblasts[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 309(9):C616–26.
- [5] Savary G, Dewaeles E, Diazi S, et al. The long noncoding RNA DNMT3OS 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, 200:184–98.
- [6] Cao L, Zhang P, Li J, et al. LAST, a c-Myc-inducible long noncoding RNA, cooperates with CNBP to promote CCND1 mRNA stability in human cells[J]. *eLife*, 2017, 6:e30433.
- [7] Wu D D, Chen X, Sun K X, et al. Role of the lncRNA ABHD11-AS1 in the tumorigenesis and progression of epithelial ovarian cancer through targeted regulation of RhoC[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):138.
- [8] Jin J, Lv W, Xia P, et al. Long noncoding RNA SYISL regulates myogenesis by interacting with polycomb repressive complex 2[J]. *PNAS*, 2018, 115(42):E9802–11.
- [9] 张万方, 潘鹏涛, 何金娇, 等. LncRNA SIL 对肺泡上皮细胞增殖和迁移的抑制作用研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(2):224–8.
- [10] 张万方, 何金娇, 朱艳平. LncRNA SIL 沉默促进 A549 细胞增殖和迁移[J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2021, 34(1):37–41.
- [11] Yan W, Wu Q, Yao W, et al. MiR-503 modulates epithelial-mesenchymal transition in silica-induced pulmonary fibrosis by targeting PI3K p85 and is sponged by lncRNA MALAT1[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:11313–28.
- [12] Qian W B, Cai X R, Qian Q H, 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):129–41.
- [13] Verma A, Singh A, Singh M P, et al. EZH2-H3K27me3 mediated KRT14 upregulation promotes TNBC peritoneal metastasis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):7344.
- [14] Sankaran D, Amjesh R, Paul A M, et al. Hyperactivation of p21-activated kinases in human cancer and therapeutic sensitivity[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(2):462.

The lncSIL molecule exerts a negative regulatory effect on the alveolar epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 through modulation of the EZH2/P21/CDK6 signaling pathway

Zhang Wanfang¹, Wang Lin², Pan Pengtao³, Li Wenxin², Kang Ruili¹, Zhu Ziren¹, Chen Haoqin², Fang Xinyu², Zhang Xingcan², Zhang Yuxin², Jiang Yiwen², Li Xinyan², Yuan Benqi²

(¹*School of Biological Engineering, Xinxiang University, Xinxiang 453003*; ²*School of International Education, Xinxiang University, Xinxiang 453003*; ³*Medical College of Xinxiang University, Xinxiang 453003*)

Abstract *Objective* To investigate the role of lncSIL in transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-induced alveolar epithelial interstitial transformation (EMT) and its related signaling pathways. *Methods* Western blot was used to detect the effect of lncSIL silencing on the expression of E-cadherin (E-cad), α -smooth muscle actin (α -SMA) and Collagen I (Col I) in the process of EMT induced by TGF- β 1. LncSIL interacting proteins were analyzed by RNA pulldown. Western blot was used to detect the effect of overexpression or silencing of lncSIL on the expression of its target gene enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) and its downstream factors P21 and cyclin-dependent kinase 6 (CDK6). Flow cytometry was used to analyze the effect of lncSIL on cell cycle progression. *Results* After lncSIL silencing, the expression of α -SMA and Col I increased, the expression of E-cad decreased. RNA pulldown assay showed that EZH2 was the target protein that interacted with lncSIL, and the expression of EZH2 increased after silencing lncSIL, the expression of EZH2 downstream gene P21 decreased, CDK6 increased. Flow cytometry showed that the number of cells in S phase significantly increased. When lncSIL was overexpressed, the expression of EZH2 and CDK6 was down-regulated, the expression of P21 was up-regulated, and the number of S phase cells significantly decreased. *Conclusion* LncSIL inhibits TGF- β 1-induced alveolar epithelial cell mesenchymal transition by negatively regulating EZH2/P21/CDK6 signaling pathway to inhibit cell cycle progression. **Key words** lncSIL; long noncoding RNA; idiopathic pulmonary fibrosis; epithelial-mesenchymal transition; transforming growth factor- β 1; enhancer of zeste homolog 2; cell marker proteins