

网络出版时间: 2020-4-7 16:48 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200403.1821.018.html>

miR-486 在低氧诱导肺间质纤维化中的调控作用及机制

石雪峰¹, 王楷博², 张红卫¹, 闫晓洁¹, 解友邦³, 顾玉海¹

摘要 目的 探索低氧对人胚肺成纤维细胞(MRC5 细胞) miR-486 表达的调控作用,明确 miR-486 在低氧相关肺间质纤维化的发病中的调控作用及机制。方法 将 MRC5 细胞进行低氧处理,利用 qRT-PCR 法检测 miR-486、纤维连接蛋白(FN)及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达情况,用 Western blot 检测 p-SMAD2 及内参 GAPDH 蛋白的表达。用慢病毒技术将 miR-486 过表达或沉默后用 qRT-PCR 检测 FN、 α -SMA、胶原蛋白 I 型(Collagen I)及 Collagen III 的表达情况,用 Western blot 检测 p-SMAD2 及 GAPDH 蛋白的表达。结果 低氧可抑制 MRC5 细胞中 miR-486 的表达,而促进 FN、 α -SMA 及 p-SMAD2 的表达;过表达 miR-486 促进 MRC5 细胞 miR-486 的表达,而下调 FN、 α -SMA、Collagen I、Collagen III 及 p-SMAD2 的表达;与之相反,沉默 miR-486 可以抑制 MRC5 细胞 miR-486 的表达,促进 FN、 α -SMA、Collagen I、Collagen III 及 p-SMAD2 的表达。结论 低氧可能通过调控 miR-486 影响 p-SMAD2 的表达,参与肺间质纤维化发病过程。

关键词 低氧;肺间质纤维化;miR-486;p-SMAD2

中图分类号 R 563.1+3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)04-0578-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.018

肺间质纤维化(pulmonary fibrosis, PF)病因不明,早期或类型比较明确的,可以给予激素、抗炎等治疗延缓疾病发展进程。若疾病进展至晚期,除了肺移植外,尚无其他有效治疗药物。因此,对 PF 发病机制进行深入研究并探索防治新策略迫在眉睫。

有研究^[1]表明低氧参与了诱导肺纤维化发病过程,而既往研究^[2]发现 miR-486 是一种低氧相关 miRNA。且有研究^[3]显示 miR-486 参与了博来霉素诱导的肺组织损伤过程,故现通过对人胚肺成纤维细胞(medical research council cell strain 5, MRC5)分别进行低氧处理及慢病毒转染,探索在低氧相关 PF 发病过程中 miR-486 的调控作用及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 MRC5 细胞购自协和细胞库。细胞常氧培养用 CO₂ 培养箱,根据实验室前期实验基础,细胞低氧处理培养箱条件设置为:37 °C、1% O₂、94% N₂、5% CO₂,低氧培养时间分别选择 0、6、12、24 和 48 h。MRC5 细胞 miR-486 的过表达及沉默利用慢病毒转染技术。

1.2 试剂与仪器 胎牛血清购自美国 Applied Stem Cell 公司;细胞培养液为含 10% 血清的新鲜 DMEM 培养基,慢病毒载体的构建和病毒的包装自行完成;

2019-11-19 接收

基金项目: 青海省自然科学基金(编号: 2017-ZJ-954Q); 国家自然科学基金(编号: 81960020)

作者单位: 青海省人民医院¹ 呼吸与危重症医学科、³ 血液风湿科, 西宁 810007

² 青海省医疗集团有限公司, 西宁 810007

作者简介: 石雪峰,女,博士,副主任医师,硕士生导师;

解友邦,男,博士,主任医师,责任作者, E-mail: jieyoubang@163.com;

顾玉海,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: qhguyuhai@163.com

Western blot was used to detect the protein expression of P-Lck and CD40L on CD4⁺T cells and the protein expression of CD40 on CD19⁺B cells. CCK-8 method was used to detect the effect of IgD-stimulated T cells on B cell activation. **Results** IgD significantly up-regulated the co-expression of Lck and IgDR proteins and the expression of P-Lck protein on CD4⁺T cells of healthy control. Both in healthy controls and RA patients, IgD-stimulated T cells could induce B cell activation. IgD could significantly up-regulate the expression of CD40L protein on CD4⁺T cells and the expression of CD40 protein on CD19⁺B cells. **Conclusion** IgD could activate T cells via the IgDR-Lck signaling and stimulate B cell activation by up-regulating protein expression of T-B co-stimulatory molecules CD40L and CD40.

Key words immunoglobulin D; CD4⁺T cells; CD19⁺B cells; co-culture; rheumatoid arthritis

TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; miR-486 引物、反转录及 qRT-PCR 检测试剂盒购自美国 ABI 公司; 普通反转录试剂盒自购日本 TaKaRa 公司; 紫外分光光度仪、PCR 仪、7500 FAST qPCR 仪分别购自美国 Thermo 公司、伯乐公司、ABI 公司。

1.3 qRT-PCR 检测 MiR-486、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、 α -平滑肌肌动蛋白 (alpha smooth muscle actin, α -SMA)、胶原蛋白 I 型 (Collagen I) 及 Collagen III mRNA 的表达 收集低氧处理、过表达 miR-486 及沉默 miR-486 的 MRC5 细胞, 加入 TRIzol, 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取组织总 RNA, 并用分光光度计检测提取到的 RNA 的浓度及纯度。以 β -actin 为内参, 按照日本 TaKaRa 公司反转录试剂盒说明书进行反转录获得 cDNA, 通过 SYBR 法检测肺间质纤维化相关基因 (FN、 α -SMA、Collagen I 及 III) 的表达, 循环数设置为 40 个循环, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。以 U6 为内参, 按照 ABI 公司 Taqman MicroRNA 反转录试剂盒说明书及特定引物进行 miRNA 特异性反转录获得的 U6 及 miR-486 cDNA 模板, 通过探针法检测 miR-486 的表达情况, 循环数为 40 个循环, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。

1.4 Western blot 检测 p-SMAD2 及 GAPDH 的表达 分别收集低氧 0、24、48 h 及过表达 miR-486、沉默 miR-486 MRC5 细胞, 用含蛋白酶抑制剂、苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 及二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DDT) 的 RIPA 裂解液裂解细胞后收集蛋白进行蛋白的表达检测^[1-2], 简要步骤为提取蛋白后按照说明书用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, 加入 SDS 凝胶加样缓冲液后煮沸 10 min 变性, 然后进行跑胶、转膜、封闭及加 1:1 000 稀释的一抗 (p-SMAD2、GAPDH, 美国 Cell Signaling Technology) 4 °C 慢摇过夜, 第 2 天进行洗膜 3 次、加辣根过氧化物酶标记二抗 (羊抗兔/羊抗鼠, 1:2 000 稀释) 室温慢摇 1 h、洗膜 3 次, 最后加发光液检测蛋白表达水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件统计数据并分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据统计分析采用独立样本 *t* 检验, 检验水准为 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧环境对 MRC5 细胞 miR-486、PF 相关基

因及 p-SMAD2 表达的调控作用 分别收集低氧培养 0、6、12、24 和 48 h 后的 MRC5 细胞提取 RNA, 进行反转录后分别检测了 miR-486 及肺间质纤维化相关基因 (α -SMA、FN) 的表达。如图 1A 所示, 低氧培养 6 h ($0.485 \pm 0.013, P = 0.002$)、12 h ($0.507 \pm 0.003, P = 0.004$)、24 h ($0.484 \pm 0.019, P = 0.006$) 和 48 h ($0.071 \pm 0.001, P = 0.001$) miR-486 的表达均低于与低氧培养 0 h MRC5 细胞 miR-486 的表达 (1.000 ± 0.044), 差异均有统计学意义。研究还显示低氧可以促进 MRC5 细胞 PF 相关基因 α -SMA 和 FN 的表达, α -SMA 和 FN 的表达在低氧培养 24 和 48 h 均明显高于低氧培养 0 h MRC5 细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1B、C。

分别收集低氧培养 0、24 和 48 h MRC5 细胞提取蛋白, 蛋白提取后分别检测 p-SMAD2 及 GAPDH 的表达, 结果显示, 与常氧培养 MRC5 细胞比较, 低氧培养 24 及 48 h MRC5 细胞 p-SMAD2 表达升高 (图 1D)。

2.2 过表达或沉默 miR-486 对 MRC5 细胞 miR-486 的调控作用 对 MRC5 细胞分别用慢病毒技术过表达及沉默 miR-486, 如图 2A 所示, 过表达 miR-486 MRC5 细胞中 miR-486 的表达水平明显升高, 而沉默 miR-486 MRC5 细胞中 miR-486 的表达水平明显降低, 差异有统计学意义。见图 2B。

2.3 MiR-486 对 MRC5 细胞 α -SMA、FN、Collagen I 和 Collagen III 的调控作用 用慢病毒技术分别对 MRC5 细胞进行过表达及沉默 miR-486, 检测 PF 相关基因的表达情况。如图 3A 所示, 与转染对照病毒 MRC5 细胞 PF 相关基因 α -SMA (1.000 ± 0.077)、FN (1.000 ± 0.011)、Collagen I (1.000 ± 0.041) 和 Collagen III (1.000 ± 0.032) 的表达比较, 过表达 miR-486 MRC5 细胞 α -SMA ($0.066 \pm 0.009, P = 0.004$)、FN ($0.032 \pm 0.015, P = 0.000$)、Collagen I ($0.714 \pm 0.012, P = 0.006$) 和 Collagen III ($0.317 \pm 0.092, P = 0.011$) 的表达均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而与转染对照病毒 MRC5 细胞 PF 相关基因 α -SMA (1.000 ± 0.170)、FN (1.000 ± 0.140)、Collagen I (1.000 ± 0.153) 和 Collagen III (1.000 ± 0.004) 的表达比较, 沉默 miR-486 MRC5 细胞 α -SMA ($17.129 \pm 1.150, P = 0.002$)、FN ($3.416 \pm 0.221, P = 0.006$)、Collagen I ($6.694 \pm 0.247, P = 0.000$) 和 Collagen III (3.526 ± 0.119 ,

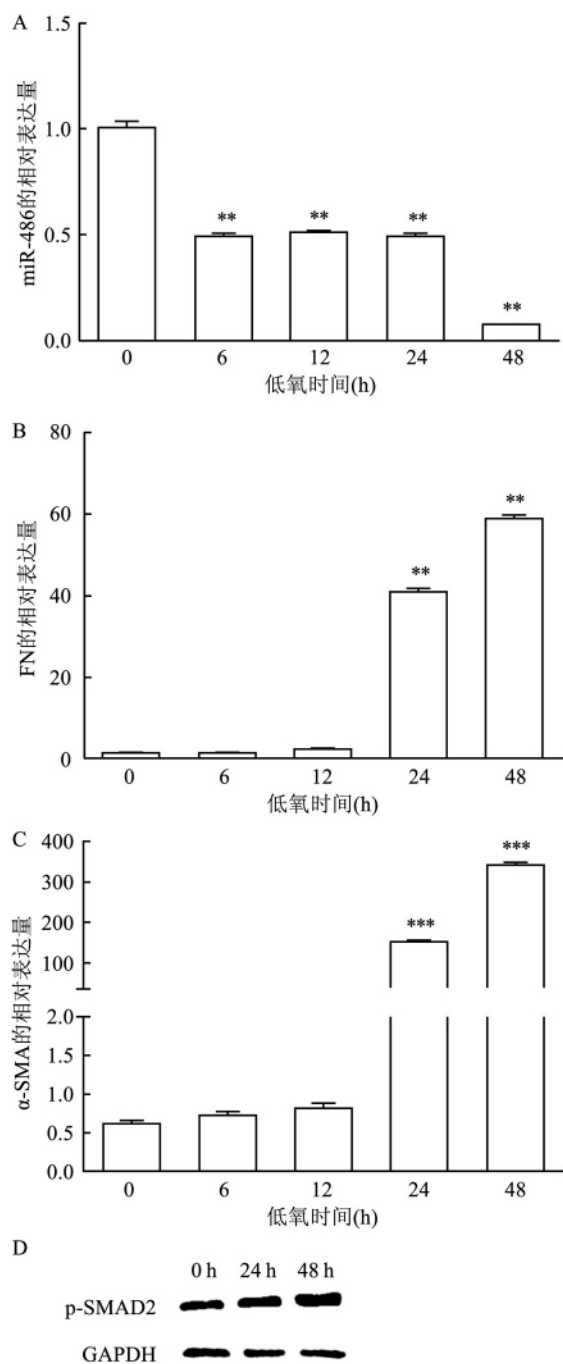


图1 低氧条件下 MRC5 细胞 miR-486、FN 与 α-SMA 的表达

A: miR-486 的表达; B: FN 的表达; C: α-SMA 的表达; D: p-SMAD2 的表达; 与常氧培养 MRC5 细胞(0 h)比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

$P = 0.000$) 表达均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3B。

2.4 MiR-486 调控 MRC5 细胞中 p-SMAD2 的表达 用慢病毒技术分别对 MRC5 细胞进行过表达及沉默 miR-486,检测 MRC5 细胞 p-SMAD2 蛋白的表达情况。如图 4 所示,过表达 miR-486 可以抑制

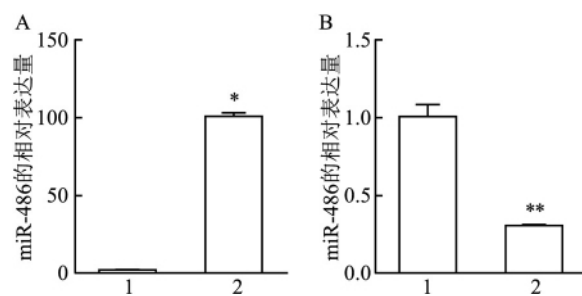


图2 MRC5 细胞转染过表达及沉默 miR-486

慢病毒后 miR-486 的表达

A: MRC5 细胞转染过表达 miR-486 慢病毒及对照病毒后 miR-486 的表达(1: 对照组; 2: miR-486 过表达组); B: MRC5 细胞转染沉默 miR-486 慢病毒及对照病毒后 miR-486 的表达(1: 对照组; 2: miR-486 沉默组); 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

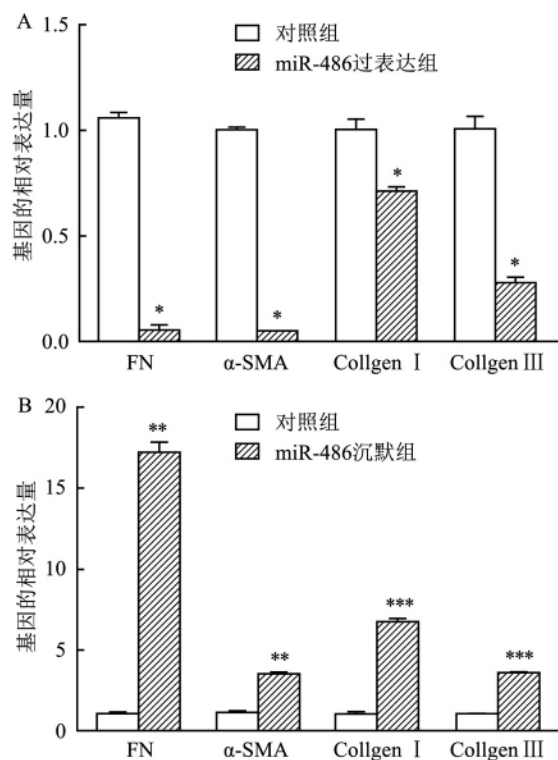


图3 过表达或沉默 miR-486 MRC5 细胞 FN、α-SMA、Collagen I 与 Collagen III 的表达

A: 转染过表达 miR-486 慢病毒及对照病毒 MRC5 细胞 FN、α-SMA、Collagen I 及 Collagen III 的表达; B: 转染沉默 miR-486 慢病毒及对照病毒 MRC5 细胞 FN、α-SMA、Collagen I 及 Collagen III 的表达; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

p-SMAD2 的表达,而沉默 miR-486 促进 p-SMAD2 的表达。

3 讨论

PF是一系列疾病的共同结局,预后极差,其病



图4 过表达或沉默 miR-486 MRC5 细胞 p-SMAD2 的表达

A: 转染过表达 miR-486 慢病毒及对照病毒 MRC5 细胞 p-SMAD2 的表达; B: 转染沉默 miR-486 慢病毒及对照病毒 MRC5 细胞 p-SMAD2 的表达

变主要累及肺间质,也可累及肺血管及肺泡上皮细胞^[4-5],研究^[6]表明 PF 患者肺组织主要表现为过度肌成纤维细胞聚集、细胞外基质蛋白尤其是胶原蛋白沉积。目前认为病灶中的成纤维细胞尤其是肌成纤维细胞是分泌细胞外基质的主要细胞^[7]。因此,本研究以 MRC5 细胞为研究对象,探索低氧诱导的 PF 发病机制。

关于 PF 的发病机制目前尚不十分明确,细胞外基质的过度沉积被认为是纤维化的主要原因,其中胶原蛋白 I、III、IV 以及纤连蛋白等是细胞外基质的主要成分。研究^[8-9]表明低氧是一种潜在的促纤维化因素,其可能通过促进低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible 1 α , HIF-1 α) 等的表达,同时发生肺泡上皮-间充质转化导致 PF 发生^[10],或通过促进细胞外基质的过度沉积及纤维化因子的高表达^[11]等病理改变,最终导致广泛纤维化。本研究显示低氧可以促进 FN 及 α -SMA 的表达,这与前人研究一致^[12],并且研究还表明随低氧处理时间的延长 FN 及 α -SMA 的表达逐渐升高,提示随低氧时间延长 PF 将呈进行性进展,这进一步明确了低氧参与了 PF 发病过程^[12-13]。

低氧可以广泛调节多种 miRNAs 的表达,这一类 miRNAs 被称为低氧相关 miRNAs^[14],其通过调控下游靶基因调控相应信号通路,参与调节低氧相关的细胞代谢等生物学进程。本研究涉及的 miR-486 基因位于 Ank1 基因,其在哺乳动物中高度保守,既往实验^[15]显示其同样为一种低氧相关的 miRNA。因此本研究分别用慢病毒技术过表达或沉默技术对 MRC5 细胞进行过表达或沉默,结果表明用慢病毒技术过表达 miR-486 可以明显提高细胞 MRC5 miR-486 的表达,而沉默 miR-486 MRC5 细胞其 miR-486 的表达明显降低,表明慢病毒技术可以良好的增加

或者抑制 MRC5 细胞 miR-486 的表达。为明确 miR-486 在 PF 发病中的作用,本研究对 MRC5 细胞进行过表达或沉默 miR-486 后进行了 PF 相关基因的检测,结果显示将 MRC5 细胞进行过表达 miR-486 后 MRC5 细胞 PF 相关基因 FN、 α -SMA、Collagen III 和 Collagen I 表达降低,与之相反,沉默 miR-486 后 MRC5 细胞 FN、 α -SMA、Collagen III 和 Collagen I 表达升高,表明 miR-486 参与了调控 PF 发病的病理生理学过程。

SMAD2 是纤维化疾病发病过程中的重要调节中介,包括调节细胞的增殖、迁移、侵袭以及分化为肌成纤维细胞等病理生理学过程。有研究^[14]表明,转化生长因子- β (Transforming growth factor beta, TGF- β) 可以通过调控 SMAD2/SMAD3 的磷酸化,与 SMAD4 形成异聚体复合物,该复合物转位到细胞核与 DNA、转录因子等相互作用参与纤维化发病过程。因此,SMAD2 在 TGF- β 信号通路中是关键信号转导分子及转录因子。此外,研究^[15]表明 SMAD2 在小鼠胚肺成纤维细胞 NIH/3T3 细胞中为 miR-486 的靶基因,通过 TargetScan 靶基因预测同样显示 SMAD2 为 miR-486 的靶基因。本研究显示低氧可促进 p-SMAD2 的表达,并且随低氧时间延长其表达呈逐渐增高趋势。结果还显示在 MRC5 细胞中过表达 miR-486 可以抑制 p-SMAD2 的表达,而沉默 miR-486 可以促进 p-SMAD2 的表达。这表明在 MRC5 细胞中低氧可以通过调控 miR-486 进而调控 p-SMAD2 的表达参与 PF 发病病理生理学过程。

综上所述,本研究明确了低氧参与了 PF 的发病过程,并且发现低氧可通过抑制 miR-486 的表达激活 SMAD2 信号通路,加重 PF 进展的病理生理过程,但本研究缺乏体内实验模型依据,下一步可通过体内实验明确过表达 miR-486 基因是否能达到缓解 PF 进展的作用。

参考文献

- [1] Philip K, Mills T W, Davies J, et al. HIF1A up-regulates the ADORA2B receptor on alternatively activated macrophages and contributes to pulmonary fibrosis [J]. FASEB J, 2017, 31(11): 4745-58.
- [2] Shi X F, Wang H, Kong F X, et al. Exosomal miR-486 regulates hypoxia-induced erythroid differentiation of erythroleukemia cells through targeting Sirt1 [J]. Exp Cell Res, 2017, 351(1): 74-81.
- [3] Ji X, Wu B, Fan J, et al. The anti-fibrotic effects and mechanisms

- of microRNA-486-5p in pulmonary fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14131.
- [4] Nathan S D, Meyer K C. IPF clinical trial design and endpoints [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2014, 20(5): 463–71.
- [5] Meyer K C. Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11(5): 343–59.
- [6] Thannickal V J, Toews G B, White E S, et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Med*, 2004, 55: 395–417.
- [7] El Agha E, Moiseenko A, Kheirollahi V, et al. Two-Way conversion between lipogenic and myogenic fibroblastic phenotypes marks the progression and resolution of lung fibrosis [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(2): 261–73.
- [8] Liu M, Ning X, Li R, et al. Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(7): 1248–59.
- [9] Li X, Li J, Wang L, et al. The role of metformin and resveratrol in the prevention of hypoxia-inducible factor 1 α accumulation and fibrosis in hypoxic adipose tissue [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(12): 2001–15.
- [10] Lokmic Z, Musyoka J, Hewitson T D, et al. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 296: 139–85.
- [11] Delbrel E, Soumare A, Naguez A, et al. HIF-1 α triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17939.
- [12] Zaza G, Masola V, Granata S, et al. Sulodexide alone or in combination with low doses of everolimus inhibits the hypoxia-mediated epithelial to mesenchymal transition in human renal proximal tubular cells [J]. *J Nephrol*, 2015, 28(4): 431–40.
- [13] Ogoshi T, Tsutsui M, Kido T, et al. Protective role of myelocytic nitric oxide synthases against hypoxic pulmonary hypertension in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198(2): 232–44.
- [14] Jiang Y, Zhou X, Hu R, et al. TGF- β 1-induced SMAD2/3/4 activation promotes RELM- β transcription to modulate the endothelium-mesenchymal transition in human endothelial cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 105: 52–60.

The effect and mechanism of MiR-486 in pulmonary fibrosis induced by hypoxia

Shi Xuefeng¹, Wang Kaibo², Zhang Hongwei¹, et al

(¹Dept of Respiratory and Critical Care Medicine, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007;

²Qinghai Medical Group Corporation, Xining 810007)

Abstract Objective To investigate the effect of hypoxia on miR-486 expression in human embryonic lung fibroblast MRC5 cells and identify mechanism of miR-486 in pulmonary fibrosis induced by hypoxia. **Methods** MRC5 cells were treated with hypoxia. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was applied to detect the expression of miR-486, fibronectin (FN) and α smooth muscle actin (α -SMA), and Western blot was used to measure the expression of p-SMAD2 and GAPDH in MRC5. Lentivirus was used to mediate the overexpression or inhibition of miR-486 in MRC5 cells. Then, qRT-PCR was used to detect the expression of miR-486, FN, α -SMA, Collagen I and Collagen III, and Western blot was used to measure the p-SMAD2 and GAPDH expression. **Results** Hypoxia inhibited the expression of miR-486 and promoted the FN, α -SMA and p-SMAD2 expression. MiR-486 overexpression successfully increased miR-486 expression and inhibited FN, α -SMA, Collagen I, Collagen III and p-SMAD2 expressions. MiR-486 knockdown upregulated the expressions of FN, α -SMA, Collagen I, Collagen III and p-SMAD2. **Conclusion** MiR-486 may regulate the pathogenesis of pulmonary fibrosis induced by hypoxia through targeting SMAD2.

Key words hypoxia; pulmonary fibrosis; miR-486; p-SMAD2