

分类号： R595.4

单位代码： 10159

密 级： 公开

学 号： 2017120814



中国医科大学

硕 士 学 位 论 文

中文题目： ITGA11 在百草枯致肺上皮间质转化中作为 ceRNA 调控
MMP2 的作用研究

英文题目： ITGA11 functions as ceRNA to regulate MMP2 in paraquat
induced epithelial-mesenchymal transition

论文作者： 贾茹琚

指导教师： 李铁刚 教授

学科专业： 急诊医学

完成时间： 2020 年 3 月

中国医科大学硕士学位论文

ITGA11 在百草枯致肺上皮间质转化中作为 ceRNA

调控 MMP2 的作用研究

ITGA11 functions as ceRNA to regulate MMP2 in paraquat

induced epithelial-mesenchymal transition

论文作者 贾茹琨 指导教师 李铁刚 教授

申请学位 医学硕士 培养单位 第二临床学院

一级学科 临床医学 二级学科 急诊医学

研究方向 中毒与急危重症

论文起止时间 2018 年 12 月—2020 年 3 月

论文完成时间 2020 年 3 月

中国医科大学（辽宁）

2020 年 3 月

中国医科大学学位论文独创性声明

本人郑重声明：本论文是我个人在导师指导下独立进行的研究工作及取得的研究成果，论文中除加以标注的内容外，不包含其他人或机构已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得其他学位而使用过的成果。对本研究提供贡献的其他个人和集体均已在文中进行了明确的说明并表示谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名：贾茹诺

日期：2020年5月29日

中国医科大学学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的原件、复印件和电子版，允许学位论文被查阅和借阅。本人授权中国医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。

保密（ ），在____年后解密适用本授权书。（保密：请在括号内划“√”）

论文作者签名：贾茹诺

指导教师签名：李艳刚

日期：2020年5月29日

日期：2020年5月29日

摘要

背景: 百草枯 (Paraquat, PQ) 是临床上最普遍的中毒物质之一, 临床急救病例中, 因意外或故意摄入除草剂农药 PQ 造成的致死率大于 90%。在任何暴露途径下 PQ 中毒都主要积聚于患者肺部, 其导致的不可逆的和广泛的肺纤维化是造成患者死亡的主要原因。上皮-间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 参与百草枯中毒所致的肺间质纤维化的过程。在此过程中, 细胞上皮标志物如 E-钙粘附蛋白 (Epithelia cadherin, E-cadherin) 的表达下调, 而间质标记物如 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA), 波形蛋白 (Vimentin) 等表达上升, 细胞连接减弱或消失, 细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 蛋白沉积, 并获得了迁徙侵袭能力等。目前对于百草枯中毒所致的肺间质纤维化尚无有效治疗手段, 因此, 寻找新的治疗靶点具有非常重要的意义。

近年来, 非编码 RNA (Non-protein-coding RNA, ncRNA) 对细胞病理生理功能的调控作用得到越来越多的关注。非编码 RNA 包括 miRNA, LncRNA, siRNA, piRNA 等。它们可以通过多种信号通路调节细胞进程, 这些信号通路很多都参与炎症、EMT 等的发生。竞争性内源 RNA (Competing endogenous RNA, ceRNA) 调控网络是指一些具有相同 miRNA 应答元件 (miRNA response element, MRE) 的 RNA 可以竞争性结合同一 miRNA 结合位点来降低 miRNA 对其他靶基因的抑制作用, 进而影响生物学行为。有研究证明: 基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinase, MMP) 家族的成员 MMP2 在百草枯致肺纤维化时参与组织的异常重构。整合素 α (Integrin alpha) 的亚单位整合素 $\alpha 11$ (Integrin alpha 11, ITGA11) 可参与肺纤维化的过程, miR-17-5p 在特发性肺纤维化 (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 的肺组织和成纤维细胞中低表达。ENCORI 网站预测 ITGA11 可以作为 ceRNA 和 MMP2 竞争性结合 miR-17-5p, 该预测的 ceRNA 调控网络是否参与百草枯所致肺 EMT, 目前尚无文献报导。

目的: 揭示 PQ 中毒所致的肺 EMT 中的潜在 ceRNA 调控网络, 为 PQ 中毒所致 EMT 提供潜在治疗靶点。

研究方法: 1、构建 PQ 中毒致肺上皮间质转化的体内模型, 选用雄性 C57/BL6 小鼠, 30mg/kg 腹腔注射单次给药, 用 HE 染色、Masson 染色从组织病理水平观察小鼠是否发生肺纤维化, 采用 q RT-PCR 的方法从基因水平检测实验组 E-

cadherin 及 α -SMA 的相对表达情况, 验证其 EMT 情况。2、采用 qRT-PCR 的方法从基因水平验证动物模型中 ITGA11 及 MMP2 的表达情况。3、初步摸索 A549 细胞 PQ 慢性中毒的适宜染毒暴露浓度, 构建 PQ 中毒致肺上皮间质转化的细胞模型。提取细胞 RNA 及蛋白质, 采用 qRT-PCR 和 Western-blot 的方法分别从基因水平和蛋白水平验证实验组 E-cadherin、 α -SMA 及 MMP2 的相对表达情况; 采用划痕实验和 Transwell 实验验证百草枯染毒组细胞迁移能力的改变; 采用免疫荧光从蛋白水平进一步检测 E-cadherin、 α -SMA 在模型中表达趋势的改变。4、在细胞模型中, 采用 qRT-PCR 的方法从基因水平验证 ITGA11、miR-17-5p 的变化。5、采用特异性 siRNA 干扰 ITGA11 的表达, 采用 qRT-PCR 的方法检测 siRNA 干扰序列下调 ITGA11 的效能, 并检测下调 ITGA11 后 MMP2 的表达情况; 采用 western-blot 检测 PQ 染毒后下调 ITGA11 对 MMP2 及上皮标志物 E-cadherin 的影响; 以免疫荧光的方法进一步验证 PQ 染毒后下调 ITGA11 对 MMP2 表达的影响。6、转染 miR-17-5p 的类似物(mimic)或抑制剂(inhibitor)人为上调或下调 miR-17-5p 的表达, 采用 qRT-PCR 从基因水平检验上调或下调 miR-17-5p 对 ITGA11 和 MMP2 表达的影响; 采用免疫荧光进一步验证 PQ 染毒后 miR-17-5p 对 ITGA11 和 MMP2 表达的调控作用。7、进行双荧光素酶报告基因实验, 构建 ITGA11 野生型(WT)及突变型(MUT)的 pSI-CHECK2 双荧光素酶载体, 与 miR-17-5p 的 mimic 及 mimic NC 共转染后验证 ITGA11 是否为 miR-17-5p 的靶基因。

结果: 1、PQ 染毒组小鼠肺组织的 HE 染色结果显示: PQ 染毒后小鼠肺组织结构明显破坏, 肺泡破裂融合, 肺泡间隔增粗, Masson 染色结果显示: 与对照组相比, PQ 染毒后肺组织中胶原蛋白沉积明显增多, 即病理结果提示 PQ 处理后小鼠肺组织发生了明显的纤维化; qRT-PCR 结果显示: PQ 染毒组肺组织中 E-cadherin 表达下调($P < 0.05$), α -SMA 表达上调($P < 0.05$), 组织发生了 EMT。2、qRT-PCR 结果显示: PQ 染毒组肺组织中 ITGA11 和 MMP2 的表达上调($P < 0.05$)。3、60 μ mol/L 的 PQ 染毒组细胞存活率尚可, qRT-PCR 结果显示: PQ 染毒组细胞中 E-cadherin 的表达下调($P < 0.05$), 而 α -SMA 和 MMP2 的表达上调($P < 0.05$); Western-blot 结果显示: PQ 染毒组细胞中 E-cadherin 的表达下调($P < 0.05$), 而 α -SMA 和 MMP2 的表达上调($P < 0.05$); 免疫荧光结果中 E-cadherin 和 α -SMA 的表达情况与 Western-blot 结果一致; 划痕实验和 Transwell 实验表明 PQ 染毒组细胞的迁移能力增强($P < 0.05$)。4、PQ 染毒组 A549 细胞中 ITGA11 的表达上调($P < 0.05$)、而 miR-17-5p 的表达下调($P < 0.05$)。5、qRT-PCR 结果显示: 转染 siITGA11 可明显

下调 ITGA11 的表达 ($P < 0.05$), 且下调 ITGA11 后 MMP2 的表达也下调 ($P < 0.05$); Western-blot 结果显示: PQ 染毒后, 下调 ITGA11 后 MMP2 的表达也下调 ($P < 0.05$), 且上皮表达标志物 E-cadherin 表达上调 ($P < 0.05$); 免疫荧光结果显示: 在无 PQ 处理的对照组和 PQ 染毒组, 下调 ITGA11 后 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度都减弱, 且 PQ 染毒组的 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度要强于无 PQ 处理的对照组。6、qRT-PCR 结果显示: 转染 miR-17-5p 类似物可明显上调 miR-17-5p 的表达 ($P < 0.05$), 且 ITGA11 及 MMP2 的表达同时下调 ($P < 0.05$), 而加入 miR-17-5p 抑制剂后可下调 miR-17-5p 的表达 ($P < 0.05$), 且 ITGA11 及 MMP2 的表达同时上调 ($P < 0.05$); 免疫荧光结果显示: 在无 PQ 染毒组和 PQ 染毒组, 上调 miR-17-5p 可减弱 ITGA11 及 MMP2 的荧光强度, 下调 miR-17-5p 可增强 ITGA11 及 MMP2 的荧光强度, 且 PQ 染毒后 ITGA11 及 MMP2 的荧光强度增强。7、双荧光素酶报告基因实验结果提示: pSI-Check2 - ITGA11 - WT+mimic 组的荧光素酶活性要低于 pSI-Check2 - ITGA11 - WT+mimic NC 组 ($P < 0.05$), 而 pSI-Check2 - ITGA11 - MUT+mimic 组的荧光素酶活性与 pSI-Check2 - ITGA11 - MUT+mimic NC 组无差异 ($P > 0.05$), 即 ITGA11 是 miR-17-5p 的靶基因。

结论: ITGA11 在 PQ 致肺 EMT 过程中作为 ceRNA 结合 miR-17-5p, 从而调控 MMP2 的表达。

关键词: 百草枯; 肺纤维化; 上皮间质转化; miR-17-5p; MMP2; ITGA11

课题资助: 国家自然科学基金 (No. 81772056)

Abstract

Background: Paraquat (PQ) is one of the most common poisons in clinical practice. In clinical emergency cases, the fatality rate caused by accidental or intentional ingestion of PQ is extremely high. PQ intoxication in any exposure pathway is mainly concentrated in the lung. The irreversible and extensive pulmonary fibrosis is the leading cause of death. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is involved in pulmonary interstitial fibrosis induced by PQ poisoning. During this process, the expression of epithelial markers such as epithelia cadherin (E-cadherin) are down-regulated, while the expression of mesenchymal markers such as α -smooth muscle actin (α -SMA) and Vimentin are increased, cells connections are weakened or disappeared, extracellular matrix (ECM) is accumulated and the abilities to migrate and invade are acquired. At present, there is no effective treatment for pulmonary interstitial fibrosis caused by PQ poisoning, so it is of great significance to find new therapeutic targets.

In recent years, more and more attention has been paid to the functions of non-protein-coding RNA (ncRNA) in cellular pathophysiological regulation. Non-coding RNA can be divided into housekeeping RNA and regulatory RNA, and regulatory non-coding RNA includes miRNA, LncRNA, siRNA, piRNA and so on. Non-coding RNA can regulate cellular processes through a variety of signaling pathways, many of which are involved in inflammation, EMT, etc. The competing endogenous RNA (ceRNA) network refers to that some RNAs with the same miRNA response element (MRE) can competitively bind to the same miRNA locus to reduce the inhibition of miRNA on other target, thus influencing biological behavior. Studies have proven that MMP2, a member of the Matrix metalloproteinase (MMP) family, is involved in abnormal tissue remodeling during PQ induced pulmonary fibrosis. The Integrin alpha 11 (ITGA11) may be involved in the process of pulmonary fibrosis and the miR-17-5p is decreased in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) lung tissues and fibroblasts. The ENCORI website has predicted that ITGA11 could competitively combine miR-17-5p as an ceRNA of MMP2. However, whether this predicted ceRNA network is involved in pulmonary EMT caused by PQ poisoning has not been reported so far.

Objective: To reveal the potential ceRNA regulatory network in pulmonary EMT induced by PQ poisoning and provide potential therapeutic targets for EMT induced by PQ poisoning.

Methods: 1. We used C57/BL6 mice to constructed in vivo model of PQ induced EMT by intraperitoneally injecting with 30mg/kg PQ. HE staining and Masson staining were used to observe whether the mice developed pulmonary fibrosis at the histopathological level. qRT-PCR was used to check the relative expressions of E-cadherin and α -SMA to verify whether mice underwent EMT in this model. 2. qRT-PCR was used to verify the relative expressions of ITGA11 and MMP2 in the lung tissues after PQ exposure at the mRNA level. 3. Explored the appropriate dose of chronic PQ poisoning in A549 cells and constructed the cell model of pulmonary EMT induced by PQ poisoning. qRT-PCR was used to verify the relative expressions of E-cadherin, α -SMA and MMP2 in the experimental group at the mRNA level, and western-blot was used to verify the relative expressions of E-cadherin, α -SMA and MMP2 in the experimental group at the protein level. The changes of cell migration ability in PQ group was verified by wound healing assay and transwell assay. Immunofluorescence was used to further detect the changes of E-cadherin and α -SMA expression in the cell model. 4. The expression changes of ITGA11 and miR-17-5p in the cell model were verified by qRT-PCR from the gene level. 5. Used specific siRNA to down-regulate the expression of ITGA11, qRT-PCR was used to detect of effect of siRNA sequence and to detect the expression of MMP2 after down-regulation of ITGA11, western-blot was used to explore the influence of down-regulated ITGA11 on MMP2 and E-cadherin after PQ exposure. The effect of down-regulated ITGA11 on MMP2 expression after PQ exposure was further verified by immunofluorescence. 6. The expression of miR-17-5p was artificially up-regulated or down-regulated by mimic or inhibitor of miR-17-5p to test the effect of miR-17-5p on ITGA11 and MMP2. qRT-PCR was used to verify the effect at the gene level. Immunofluorescence was used for further verification after PQ exposure. 7. Luciferase reporter assay was used to detect whether ITGA11 was the target of miR-17-5p. We constructed the wide type (WT) or mutated (MUT) pSI-Check2 dual-luciferase reporter vector and co-transfected with the mimic or mimic NC of miR-17-5p. Then compared the relative luciferase activities between different groups.

Results: 1. The HE staining results revealed that the PQ treated group showed obvious destruction of pulmonary structure, alveolar ruptured and fused and thickened inter-alveolar septum. The Masson staining results showed significant increase in deposition of collagen fibres in PQ group than normal control group. qRT-PCR results showed that the expression of E-cadherin was down-regulated ($P<0.05$) and expression of α -SMA was up-regulated in mice model of PQ poisoning ($P<0.05$). 2. qRT-PCR results showed that the expression of ITGA11 and MMP2 was up-regulated in mice model of PQ poisoning ($P<0.05$). 3. The survival rate of A549 cells was still better when the PQ concentration reached $60\mu\text{mol/L}$. qRT-PCR results showed that the expression of E-cadherin was down-regulated ($P<0.05$) and expression of α -SMA and MMP2 was up-regulated ($P<0.05$) in PQ treated cells. Western-blot results showed that the expression of E-cadherin was down-regulated ($P<0.05$) and expression of α -SMA and MMP2 was up-regulated ($P<0.05$) in PQ treated cells. The immunofluorescence results were consistent with western blot results. The wound healing assay and transwell assay showed that the migration ability of PQ treated cells was enhanced ($P<0.05$). 4. The expression of ITGA11 was up-regulated ($P<0.05$) and the expression of miR-17-5p was down-regulated ($P<0.05$) in PQ treated cells. 5. qRT-PCR results showed that the siRNA sequence of ITGA11 could down-regulate the expression of ITGA11 ($P<0.05$) and MMP2 was down-regulated after the down-regulation of ITGA11 ($P<0.05$). The western-blot results showed that the expression of MMP2 was decreased and the expression of E-cadherin was increased in PQ treated group after the down-regulation of ITGA11 ($P<0.05$). Immunofluorescence results showed that the expression of MMP2 was also down-regulated after ITGA11 down-regulated by siRNA in both non-PQ treated and PQ treated group, and the fluorescence intensity of ITGA11 and MMP2 was increased after PQ exposure. 6. qRT-PCR results showed that the mimic could significantly increase the expression of miR-17-5p ($P<0.05$) and the expression of ITGA11 and MMP2 was down-regulated simultaneously with the up-regulation of miR-17-5p by transfection of its mimic ($P<0.05$), while the inhibitor could decrease the expression of miR-17-5p ($P<0.05$) and expression of ITGA11 and MMP2 was up-regulated simultaneously with the down-regulation of miR-17-5p by transfection of its inhibitor ($P<0.05$). The immunofluorescence results in both non-PQ treated group

and PQ group were consistent with qRT-PCR results and the fluorescence intensity of ITGA11 and MMP2 was increased after PQ exposure. 7. The luciferase activity of pSI-Check2-ITGA11-WT+mimic was lower than that of pSI-Check2-ITGA11-WT+mimic NC ($P < 0.05$). And the luciferase activity of pSI-Check2-ITGA11-MUT+mimic had no difference with that of pSI-Check2-ITGA11-MUT+mimic NC ($P > 0.05$). In other word, the ITGA11 was the target of miR-17-5p.

Conclusion: ITGA11 functions as ceRNA to regulate MMP2 in PQ induced pulmonary EMT.

Key words: Paraquat; pulmonary fibrosis; Epithelial-mesenchymal transition; miR-17-5p; MMP2; ITGA11

英文缩略语

英文缩写	英文全称	中文全称
PQ	Paraquat	百草枯
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	上皮间质转化
E-cadherin	Epithelia cadherin	E-钙粘附蛋白
α -SMA	α -smooth muscle actin	α 平滑肌肌动蛋白
MMP	Matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟化物
qRT-PCR	Quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction	实时荧光定量多聚酶链反应
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基硫酸钠
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20	含吐温 20 的三羟甲基氨基甲 烷缓冲液
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
WB	Western-blot	蛋白免疫印迹法
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
APS	Ammonium persulfate	过硫酸铵
ncRNA	non-protein-coding RNA	非编码 RNA
miRNA	microRNA	微小 RNA
LncRNA	Long non-coding RNA	长链非编码 RNA
ceRNA	Competing endogenous RNA	竞争性内源 RNA
MRE	miRNA response element	miRNA 应答元件
3'UTR	3-untranslated region	3'端非翻译区
ITGA11	Integrin alpha 11	整合素 α 11

目 录

摘要.....	III
Abstract.....	VI
英文缩略语.....	X
第一部分 百草枯中毒致肺 EMT 的研究	
1 前言.....	1
2 材料与方法.....	2
2.1 主要试剂和仪器.....	2
2.1.1 实验小鼠.....	2
2.1.2 细胞系.....	2
2.1.3 主要试剂.....	2
2.1.4 主要仪器.....	3
2.2 动物模型的构建.....	4
2.3 肺组织取材.....	4
2.4 HE 染色.....	4
2.5 Masson 三色染色.....	5
2.6 细胞培养.....	5
2.7 PQ 染毒给药浓度摸索.....	6
2.8 Quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction.....	6
2.9 Western-blot.....	8
2.10 免疫荧光.....	9
2.11 细胞划痕实验.....	10
2.12 Transwell 实验.....	10
2.13 统计分析.....	10
3 实验结果.....	11
3.1 PQ 诱导小鼠肺组织发生纤维化.....	11
3.2 EMT 参与 PQ 诱导的小鼠肺组织纤维化.....	11
3.3 PQ 染毒细胞给药浓度初步摸索.....	12

3.4 PQ 介导的 A549 细胞 EMT 过程.....	12
3.5 PQ 染毒后 A549 细胞迁移能力增强.....	14
4 讨论.....	16
第二部分 ceRNA 调控网络与 PQ 致 EMT 的相关研究	
5 前言.....	17
6 材料与方法.....	19
6.1 主要试剂和仪器.....	19
6.1.1 主要试剂.....	19
6.1.2 主要仪器.....	20
6.2 细胞培养.....	20
6.3 qRT-PCR.....	20
6.4 Western-blot.....	20
6.5 免疫荧光.....	20
6.6 干扰 RNA 的转染.....	20
6.7 转染 miR-17-5p 的 mimic 或 inhibitor.....	21
6.8 双荧光素酶报告基因.....	21
6.9 统计分析.....	22
7 实验结果.....	22
7.1 ITGA11 在 PQ 染毒组中表达升高.....	22
7.2 ITGA11 对 MMP2 表达的影响.....	23
7.3 miR-17-5p 在 PQ 染毒组中表达降低.....	25
7.4 miR-17-5p 对 ITGA11 和 MMP2 的影响.....	26
8 讨论.....	29
本研究创新性的自我评价.....	31
参考文献.....	32
综述.....	36
攻读学位期间取得的研究成果.....	46
致谢.....	47
个人简介.....	48

第一部分：百草枯中毒致肺 EMT 的研究

1 前言

百草枯 (Paraquat, PQ) 的化学名称为 1-1-二甲基-4-4-联吡啶阳离子盐, 是具有较强毒性的有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂, 是临床上最普遍的中毒物质之一^[1]。在亚洲、太平洋国家和美洲的许多地方, PQ 摄入是致死性中毒的重要原因^[2]。PQ 是剧毒物质, 而临床上并没有特效药物来阻断其毒性作用, 意外或故意摄入的致死率极高^[3], 临床中毒患者的病死率常常 > 90%, 尤其是在中国, 过去的 20 年里, PQ 中毒的发病率急剧上升^[4]。口服是 PQ 中毒的主要途径, 成人致死量为 20% PQ 水溶液 5~15 mL (20~40 mg/kg)。最容易被影响的器官是那些有丰富血流、高氧分压和高能量需求的器官, 尤其是肺、心脏、肾脏和肝脏^[5]。PQ 被亚精胺/腐胺和其他细胞膜转运蛋白主动摄取, 从而导致肺、肾脏、肝脏和肌肉组织中浓度相对较高^[6]。PQ 可在多种器官内分布, 但具有明显的肺毒性, 在任何暴露途径下都主要积聚于肺泡上皮细胞中, PQ 在肺内的聚积呈时间依赖性增加, 破坏肺组织, 使肺组织过度修复, 其导致的不可逆的和广泛的肺纤维化是 PQ 中毒的主要死因^[1, 5]。

上皮-间质的转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是指在一定的病理生理条件下上皮细胞表型发生改变, 转化为间质细胞表型的过程^[7]。在此过程中, 上皮细胞下调了包括 E-钙粘附蛋白 (Epithelia cadherin, E-cadherin) 在内的细胞黏附分子的表达、细胞连接减弱或消失、失去顶端-基底端的极性、细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 蛋白沉积、获得了迁徙侵袭能力。上皮表达标志物如 E-cadherin、紧密连接蛋白-1、细胞角蛋白表达下降^[8], 而间质表达标记物如 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、波形蛋白 (Vimentin)、N-钙粘附蛋白 (N-cadherin) 等表达上升^[9-11]。EMT 常见于肿瘤和纤维化过程^[12, 13], EMT 也可参与肺间质纤维化的过程^[14], 肺泡 II 型上皮细胞可通过 EMT 获得成纤维细胞样表型, 促进胶原沉积及肺纤维化的发生^[15, 16]。有研究证实 EMT 参与 PQ 中毒所致的肺间质纤维化的过程^[17, 18]。

细胞发生 EMT 后, 其分泌基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 的能力会增强^[19], MMP 的重要家族成员包括 MMP2 和 MMP9, 这些成员能裂解大部分细胞

外基质中的蛋白质成分,包括胶原蛋白、蛋白多糖、层合蛋白、纤维连接蛋白和弹性蛋白等。MMP 是调节 ECM 降解破坏的重要蛋白水解酶,ECM 合成和降解失衡会引起 ECM 积聚,是导致肺间质纤维化的重要病理生理因素。在慢性损伤过程中,MMP 可能会破坏肺泡 ECM 支架,以致破坏正常修复所需的结构模板^[20,21]。目前关于 MMP2 在肺纤维化中的作用主要集中于二氧化硅(Silica)和博来霉素诱导的肺纤维化中^[22-24]。有关 MMP2 在 PQ 诱导的肺纤维化中的研究极少。在 PQ 诱导的肺损伤中,MMP9 主要参与 PQ 诱导的 ALI 的早期炎症阶段,而 MMP2 可能主要参与晚期的肺组织损伤修复和纤维化过程^[25],进一步深入研究 MMP2 参与的 PQ 中毒所致的肺 EMT 过程具有重要而深远的意义。

2 材料与方法

2.1 主要试剂和仪器

2.1.1 实验小鼠

C57/BL6 小鼠(雄性,6-8 周龄)由北京华阜康生物科技有限公司提供。

2.1.2 细胞系

人类肺腺癌肺泡基底上皮细胞 A549 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

2.1.3 主要试剂

RPMI 1640 细胞培养基 (Hyclone 公司)

胎牛血清(FBS) (Hyclone 公司)

青霉素链霉素溶液 (Hyclone 公司)

胰蛋白酶 (Hyclone 公司)

二氯百草枯 (美国 sigma 公司)

改良 HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技公司)

Masson 三色染色液 (珠海贝索生物技术有限公司)

RIPA 裂解液(中) (江苏碧云天生物技术有限公司)

BCA 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪公司)

5×蛋白示踪上样缓冲液 (深圳达科为生物技术有限公司)

Acrylamide Kit (12%) (美国 BIO-RAD)
TEMED (上海生工生物股份有限公司)
APS (美国 sigma 公司)
彩虹 180 广谱蛋白 Marker (北京索莱宝科技公司)
PVDF(0.45 μm)膜 (默克密理博公司)
Tween-20 (上海生工生物工程有限公司)
超敏型 ECL 化学发光液 (北京博奥龙免疫技术有限公司)
脱脂奶粉 (OXOID, UK)
RNAiso plus (TAKARA, Japan)
反转录试剂盒 (TAKARA, Japan)
qRT-PCR 引物 (上海生工生物股份有限公司)
抗 E-cadherin 抗体 (美国 Abcam)
抗 α -SMA 抗体 (美国 Abcam)
抗 MMP2 抗体 (美国 Abcam)
抗 GAPDH 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司)
0.1%结晶紫染色液 (北京索莱宝科技公司)
4%组织细胞固定液 (北京索莱宝科技公司)
Triton X-100 (北京索莱宝科技公司)
封闭血清 (北京索莱宝科技公司)
DAPI 溶液 (北京索莱宝科技公司)
抗荧光衰减封片剂 (博士德生物工程有限公司)
免疫荧光二抗 (美国 Abbkine 公司)

2.1.4 主要仪器

CO₂ 细胞培养箱 (HERAcell 150i, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)
超净工作台 (GLC 型, 中国哈尔滨市东联公司)
恒温水浴锅 (天津恒奥科技发展有限公司)
冷冻离心机 (5804R 型, 德国 Eppendorf 公司)
电子分析天平 (AL204 型, 上海梅特勒-托利多公司)
紫外凝胶成像系统 (FluorchemHD 2 型, 美国 Alpha 公司)
蛋白质电泳仪 (Mini Protean 3 Cell 型, 美国 BIO-RAD 公司)
-80°C低温冰箱 (Kelvinator 100 型, 美国 Commercial products 公司)

酶标仪 (Fluostar omega, 美国 BMG 公司)
倒置显微镜 (IM 型, 日本 Olympus 公司)
倒置荧光显微镜 (OM2300B, leica 公司)
Milli Q 纯水仪 (PL5124PALL 型, 英国 ELGA 公司)
转膜仪 (Mimi Trans-Blot 型, 美国伯乐公司)
多功能热循环仪 PCR 仪 (PTC-200 型, 美国 BIO-RAD 公司)
NanoDrop-ND2000 (美国 Thermo 公司)
实时荧光定量 PCR 仪器 (LightCycler 96 型, 上海 Roche Molecular Systems, Inc. 公司)
全光谱激光共聚焦显微镜 (C1Si, 日本 Nikon)

2.2 动物模型的构建

(1)动物分组: 13 只 C57/BL6 小鼠随机分为两组: 对照组 (3 只) 和 PQ 处理组 (10 只)。小鼠饲养于 SPF 级实验室(12h 光照、12h 黑夜交替循环, 温度控制在 22.2°C), 常规饲料饲养, 小鼠可以随意摄取水和食物。

(2)PQ 溶液的配制: 称取 PQ 粉末溶解于生理盐水中配制 0.3%的 PQ 溶液。

(3)给药: PQ 处理组的小鼠一次性腹腔注射 30mg/kg 的 PQ 溶液, 对照组注射等量的生理盐水, 21 天后取材。

2.3 肺组织取材

(1)麻醉: 腹腔注射 10%的 300mg/kg 水合氯醛, 麻醉小鼠, 麻醉后将小鼠于仰卧位固定好, 准备取材。

(2)灌注肺循环: 常规消毒, 打开小鼠的胸腔, 充分暴露小鼠的肺组织和心脏, 剪掉左心耳, 从小鼠的右心室进针, 用预冷的生理盐水冲洗掉肺循环中的血液。

(3)取材: 迅速摘取小鼠的肺组织, 在生理盐水中稍加润洗, 左肺组织于 4%组织细胞固定液中固定, 用于病理切片的制备, 右肺组织经液氮速冻后迅速冻于-80°C冰箱备用。

2.4 HE 染色

(1)石蜡包埋: 组织固定后常规石蜡包埋, 切片备用。

(2)脱蜡水化: 采用二甲苯I、二甲苯II、二甲苯III各脱蜡 10min, 无水乙醇、95%

乙醇、80%乙醇、70%乙醇顺序水化。

(3)苏木素染色液染色：染色 3min,自来水冲洗 5s；分化液 5s，自来水冲洗 20s；返蓝液返蓝 10s，自来水冲洗 20s。

(4)伊红染色液染色：染色 1min,自来水冲洗 5s。

(5)脱水透明封片：80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇各顺序脱水 5min，二甲苯I、二甲苯II各透明 1min，中性树脂封片后镜下观察。

2.5 Masson 三色染色

(1)石蜡包埋、脱蜡、水化同 HE 染色

(2)Weigert 铁苏木素染色：Weigert 铁苏木素 A 液、B 液等比例混合，染色 5min，流水稍洗。

(3)1%盐酸酒精分化，流水冲洗。

(4)丽春红酸性品红染色：染色 5min,蒸馏水冲洗 5s。

(5)磷钼酸溶液处理约 5min，直接用苯胺蓝染液复染 5min。

(6)1%冰醋酸处理 1min。

(7)脱水透明封片同 HE 染色。

2.6 细胞培养

(1)A549 细胞培养环境：95%空气，37°C，5%CO₂。培养基：含 10%胎牛血清（FBS）和 1%双抗(10000 U / mL 青霉素，10000μg / mL 链霉素)的 RPMI 1640 细胞培养基。

(2)换液：每 24h 在观察一次细胞状态，包括肉眼观察培养基是否浑浊、显微镜下观察细胞整体状态及密度，并更换培养基。弃去原培养基并用 PBS 溶液轻轻冲洗细胞 3 次，加入适量培养基，放回培养箱。

(3)传代：当细胞长至 80%-90%时进行传代。弃去原培养基，使用无血清培养基冲洗 2 次，吸净培养基，加入 500μL-1mL 胰酶，保证胰酶完全覆盖住贴壁细胞，置于 37°C培养箱消化 3-5min，显微镜下观察细胞形态，如细胞形态已皱缩有即将脱落的趋势，立即加入双倍胰酶体积的含 10%FBS 的培养基终止消化，吹打 2-3 次至细胞从培养皿脱落，收集细胞消化液于离心管中离心(1000rpm/min,5min),弃上清，取 1mL 含 10%FBS 的培养基重悬细胞，加入已加好培养基的培养皿混匀细胞，继续培养。

(4)冻存: 将生长状态良好的对数生长期的细胞消化下来, 消化方法同前, 用 1mL 冻存液(含 20%FBS、10%DMSO 的 RPMI 1640 培养基)重悬细胞, 收集细胞悬液至冻存管中并放于程序降温盒中, 于 -80°C 低温冰箱过夜, 再转移至液氮罐中。

(5)复苏: 将冻存管置于 37°C 水浴锅中迅速解冻 1min, 使细胞液融化, 离心 5min, 1000rpm/min, 弃上清, 加 1mL 含 10%FBS 的培养基重悬细胞, 加入已加好适量培养基的培养皿中, 混匀细胞, 放至 37°C 培养箱培养。

2.7 PQ 染毒细胞给药浓度初步摸索

(1)将生长状态良好的对数生长期的 A549 细胞接种于培养皿中, 稳定 12h。

(2)称取 12.858mg 的二氯百草枯粉末, 加入 5mL 的 PBS, 充分混匀配制成 10⁴μmol/L 高浓度储备液, 在超净台用 0.22μm 的无菌滤头过滤后备用。

(3)用不含血清的 RPMI 1640 培养基稀释高浓度储备液, 使得加入培养皿中的 PQ 终浓度依次稀释为 15μmol/L、30μmol/L、60μmol/L、120μmol/L、240μmol/L。

(4)培养 6 天, 每两天换液一次, 每天在显微镜下观察细胞状态。

2.8 Quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction

(1)总 RNA 的提取

1)肺组织和细胞完成造模后进行总 RNA 的提取: 从 -80°C 冰箱取出肺组织, 称取 30mg 左右的组织, 迅速转移至用液氮预冷的研钵中, 用研杵研磨组织, 其间不断加入液氮, 直至研磨成粉末状, 加 1mL 的 RNAisoplus, 室温静置 5min, 12000g, 4°C, 离心 5min, 将上清移至新的无 RNA 酶的离心管中; A549 细胞弃去培养基, 加 1mL PBS 清洗一次, 向细胞培养皿中加 1mL RNAisoplus, 充分混匀使 RNAisoplus 分布均匀, 室温静置 5min, 将其转移至无 RNA 酶的离心管中;

2)加入 200μL 的氯仿振荡混匀, 室温静置 5min, 12000g, 4°C, 离心 15min;

3)小心吸取上清, 并加入与上清等体积的异丙醇, 室温静置 10min, 4°C, 离心 10min;

4)弃上清, 加入 1mL 用 DEPC 水稀释的 75% 的乙醇洗涤, 7500g, 4°C, 离心 5min;

5)弃上清, 干燥, 将沉淀溶解于 DEPC 水中, 用 NanoDrop 2000 测 RNA 的浓度及纯度。

(2)细胞总 RNA 反转录

混合体系均在冰上配制

1)去除基因组 DNA

取 500ng 的 RNA 进行反转录，配制去除基因组 DNA 混合体系

表 2.1 去除基因组 DNA 体系

试剂	使用量
gDNA Eraser Buffer (5×)	2.0 μL
gDNA Eraser	1.0 μL
Total RNA	20 μL 反应体系总 RNA 为 500 ng (根据浓度换算体积)
Rnase-Free dH ₂ O	Up to 10 μL

PCR 仪运行程序：42℃，2min；4℃

2)反转录反应

表 2.2 反转录混合体系

试剂	使用量
上一步的反应液	10 μL
PrimeScript® Buffer 2 (5×)	4.0 μL
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	1.0 μL
RT Primer Mix	1.0 μL
Rnase-Free dH ₂ O	Up to 20 μL

PCR 仪运行程序：37℃，15min；85℃，5sec；4℃

(4) qRT-PCR: 冰上配置 20μL 的 qRT-PCR 反应体系, 包含 10 μL 的 SYBR Premix Ex Taq II (2×), Forward Primer (10 pmol/μL)和 Reverse Primer (10 pmol/μL)各 0.8 μL, 1μL 的 DNA 模板, 7.4 μL 的 Rnase-Free dH₂O。

1)扩增程序: Preincubation: 95 °C,30 sec, 1 cycle;

3 Step Amplification: 95 °C 10 sec,

60 °C(依据退火温度调整) 45 sec,

72 °C 45 sec, 40 cycles;

Melting: 95°C 10sec, 65°C 60sec, 97°C 1sec, 1 cycle

Cooling: 37°C 30sec

2)相关基因引物序列:

表 2.3 qRT-PCR 引物序列

基因名称	primer (5' to 3')	序列
Mus-GAPDH	Forward	AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC
	Reverse	CAACAATCTCCACTTTGCCACTG
Mus-E-cadherin	Forward	CAGTTCCGAGGTCTACACCTT
	Reverse	TGAATCGGGAGTCTTCCGAAAA
Mus- α -SMA	Forward	CCCAGACATCAGGGAGTAATGG
	Reverse	TCTATCGGATACTTCAGCGTCA
Mus-MMP2	Forward	ACCTGAACACTTTCTATGGCTG
	Reverse	CTTCCGCATGGTCTCGATG
has-GAPDH	Forward	CACCCATGGCAAATTCATGGC
	Reverse	GCATTGCTGATGATCTTGAGGCT
has-E-cadherin	Forward	CGTAGCAGTGACGAATGTGGTAC
	Reverse	AACTGGAGAACCATTGTCTGTAGC
hsa- α -SMA	Forward	GGCTGTTTTCCCATCCATTGT
	Reverse	TCTTTTGCTCTGTGCTTCGT
has-MMP2	Forward	TTCCATTCCGCTTCCAGGGCAC
	Reverse	TCGCACACCACATCTTTCCGTCCT

2.9 Western -blot

(1)细胞蛋白样品准备

- 1)将造模完成的细胞从培养箱取出, 将培养基吸至离心管, 2000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 回收其中的漂浮细胞;
- 2)向培养皿中加入 1mL 的 PBS, 用细胞刮将贴壁细胞刮干净, 回收至之前的离心管中, 2 000 rpm 离心 5 min;

- 3)根据离心沉淀量加 70-80 μ L 的 RIPA 进行细胞裂解,充分吹打混匀,12000 rpm 离心 5min;
- 4)收集上清,取少量上清进行蛋白浓度定量,方法参见 BCA 蛋白定量试剂盒;
- 5)将蛋白调成相同浓度,以 4:1 的比例加入 5 \times loading buffer 充分混匀,100 $^{\circ}$ C 变性 5 min。

(2) SDS-PAGE: 配制 10%的 APS 溶液,依据 Acrylamide Kit 说明书向其中加入 APS 溶液及 TEMED,凝胶 30min。配制电泳缓冲液: Glycine 18.8 g、Tris 3.02 g、SDS 1.0 g,去离子水定容至 1 L。将参齐浓度的蛋白样品上样,每孔上样量为 30 μ g,250 V,电泳 30 min。

(3) 转膜: 提前配制好(10 \times)电转液: Tris 29 g, Glycine 145 g, 去离子水定容至 1 L, 将其按去离子水: 甲醇: 电转液(10 \times) = 7:2:1 的比例稀释成 1 \times 电转液 4 $^{\circ}$ C 预冷,电泳结束后采用湿转法转膜。电转槽用去离子水淋洗晾干,加入 1000mL 电转液。将海绵完全浸湿,不留气泡。将滤纸和胶平铺于海绵上,铺上甲醇浸泡过的 PVDF 膜,再在膜上铺滤纸和海绵,各层之间均不可有气泡,封紧后放入电转槽,注意膜在正极一侧。降温,将电转槽置于冰水混合物中。恒流 300 mA, 90 min。

(4) 封闭: 提前配制 TBS 缓冲液配制(10 \times): Tris-base 30 g, NaCl 80 g 调 pH 为 7.6, 去离子水定容至 1 L。配制 1 \times TBST 溶液 1L(10 \times : 去离子水=1:9,再加入 1mL Tween20)用 TBST 配制 5%脱脂奶粉。将膜从电转槽中取出,去离子水 TBST 洗涤一次,浸没于 5%脱脂奶粉中缓慢摇荡 1 h。

(5) 孵育一抗: 用 TBST 稀释一抗(比例参见说明书),将膜浸没于一抗稀释液的抗体孵育盒里,4 $^{\circ}$ C 静置过夜。

(6) 洗涤: 一抗孵育结束后,用 TBST 漂洗膜后再浸洗三次,每次 5 min。

(7) 孵育二抗: 根据一抗来源选择合适的二抗,用 TBST 按相应比例适当稀释,室温缓慢摇晃 1h。

(8) 洗涤: 二抗孵育结束后,用 TBST 漂洗膜后再浸洗三次,每次 5 min。并用去离子水再漂洗一次。

(9) 显色: 按超敏型 ECL 化学发光液说明书配制显色液,并发光成像。

2.10 免疫荧光

(1)用 75%酒精浸泡盖玻片 2h,晾干后进行细胞爬片,要求所铺细胞数在

准备进行免疫荧光时长至 70%左右。

(2)固定: 弃去培养基, PBS 轻轻润洗三次, 避免冲洗对细胞形态的影响, 4%组织细胞固定液固定 30min, PBS 轻轻洗涤三次, 每次 5min。

(3)透化: 0.2% Triton X-100 冰上静置 5min, PBS 轻轻洗涤三次, 每次 5min。

(4)封闭: 吸净 PBS, 加入 5%封闭血清室温封闭 1h, PBS 洗涤三次, 每次 5min。

(5)一抗结合: 用封闭液按适当比例稀释一抗, 孵育 4°C过夜。

(6)复温: 复温 30min, PBS 稍加洗涤三次, 每次 5min。

(7)二抗结合: 避光稀释二抗, 孵育对应的二抗 1.5h, 此步骤开始所有操作均在避光条件下进行。

(8)洗涤: PBS 洗涤三次, 每次 5min。

(9)染核: 加 DAPI 溶液, 避光孵育 5-10min。

(10)洗涤: PBS 洗涤三次, 每次 5min。

(11)封片: 滴加防荧光淬灭封片剂, 镜下观察。

2.11 细胞划痕实验

(1)用 marker 笔在 6 孔板背面画平行的横线(每隔 0.5cm 画一条), 向 6 孔板均匀接种适量细胞, 当单层细胞融合铺满 6 孔板时, 用 PBS 溶液冲洗三次。

(2)用 10 μ L 枪头垂直划痕, 各孔用同一个枪头划线, 尽量保证划痕宽度一致再用 PBS 冲洗三次, 洗净漂浮细胞及细胞碎片。

(3)加入含 2% 血清的 RPMI 1640 培养基继续培养, 随机选取三个固定视野, 不同时间点观察相同位置的划痕并拍照分析。

2.12 Transwell 实验

(1)用无血清的 RPMI 1640 培养基饥饿细胞 12h。

(2)上室中加入 100 μ L 细胞悬液, 每个孔铺 1×10^5 个细胞。

(3)下室加入含 20% 血清的 RPMI 1640 培养基 600 μ L, 放入培养箱培养 48h。

(4)取出培养的细胞, 用 4%组织细胞固定液固定 20min, 用 PBS 洗涤两次。

(5)用 0.1%结晶紫染色 20min,用 PBS 洗涤两次。

(6)用棉签擦干净内室内膜的细胞, 镜下观察并拍照。

2.13 统计分析

计量资料实验结果表示为：平均值 \pm 标准误差(Mean \pm SD)，实验结果采用 GrahPad Prism5.0 软件进行统计分析， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 PQ 诱导小鼠肺组织发生纤维化

小鼠肺组织进行 HE 染色和 Masson 三色染色，从病理水平观察小鼠肺组织结构的变化。HE 染色结果显示：对照组小鼠肺组织结构正常，肺泡间隔厚度正常(图 1.1A)，而 PQ 染毒组的肺组织结构破坏，肺泡破裂融合，肺泡间隔明显增粗(图 1.1B)。Masson 三色染色法结果显示：与对照组(图 1.1C)相比，PQ 染毒组小鼠肺组织胶原蛋白沉积增加(图 1.1D)。即病理染色结果提示 PQ 染毒后小鼠肺组织发生了纤维化改变。

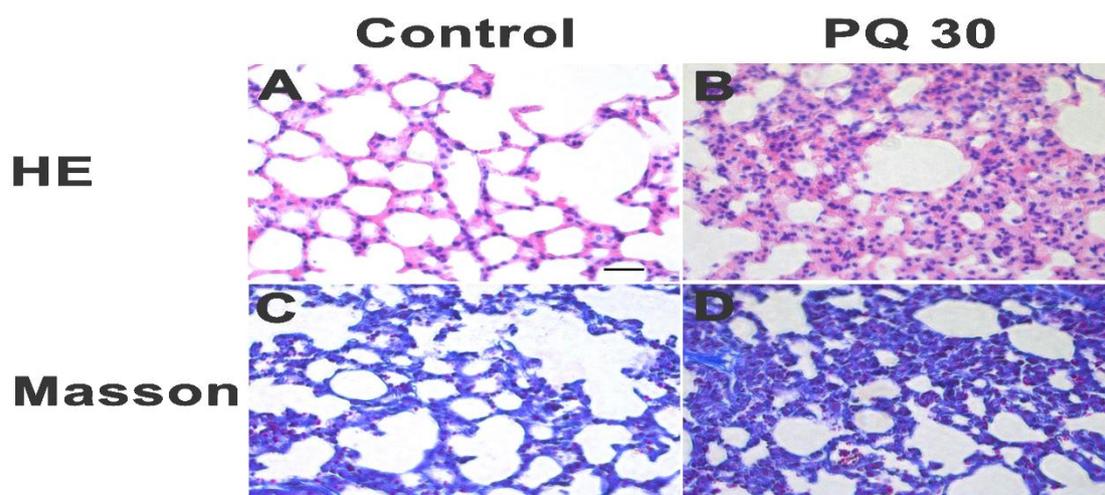


图 1.1 PQ 染毒后小鼠肺组织病理改变 ($\times 400$)

A: 对照组 HE 染色结果; B: 30mg/kg PQ 处理组 HE 染色结果; C: 对照组 Masson 三色染色结果; D: 30mg/kg PQ 处理组 Masson 三色染色结果。

3.2 EMT 参与 PQ 诱导的小鼠肺组织纤维化

通过 qRT-PCR 检测小鼠肺组织上皮表达标志物 E-cadherin 及间质表达标志物 α -SMA 的表达情况，结果显示：PQ 染毒组与对照组相比，E-cadherin 表达下调 ($P < 0.05$)，而 α -SMA 表达上调 ($P < 0.05$)，提示肺组织发生了 EMT，且在该模型中 MMP2 的表达上调 ($P < 0.05$) (图 1.2)。

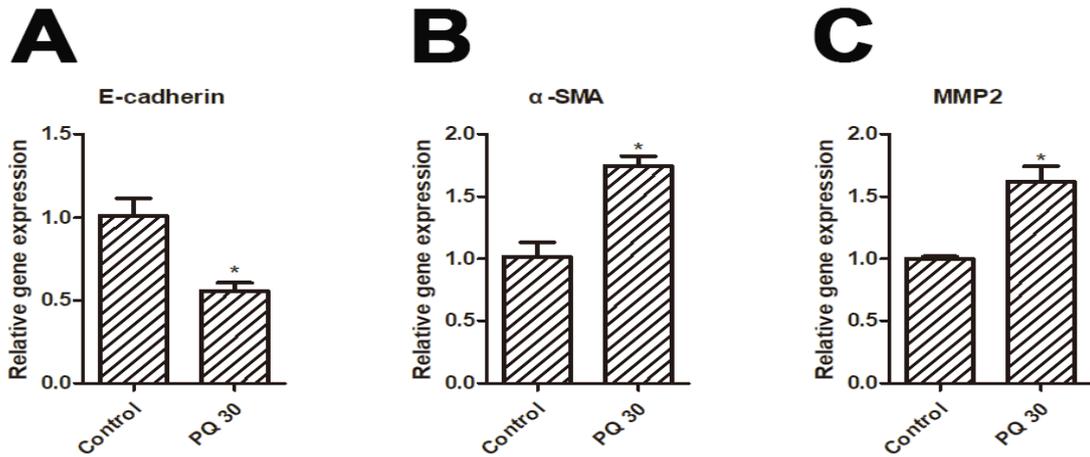


图 1.2 30mg/kg 的 PQ 染毒后小鼠 EMT 相关基因表达水平改变

A: PQ 染毒后 E-cadherin 表达下调 ($P < 0.05$); B: PQ 染毒后 α -SMA 表达上调 ($P < 0.05$); C: PQ 染毒后 MMP2 表达上调 ($P < 0.05$); (*表示 $P < 0.05$)。

3.3 A549 细胞 PQ 染毒细胞给药浓度初步摸索

设置一定范围的 PQ 染毒暴露浓度梯度, 以确定可致细胞明显出现 EMT 的最小染毒暴露浓度, 使细胞在该浓度下依然可以保持一定存活率以便于后续分析。实验结果显示, 细胞加入 PQ 6 天后, 15 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组的细胞存活率较好, 当浓度达到 120 $\mu\text{mol/L}$ 和 240 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞基本全部死亡, 而无法满足后续实验要求(图 1.3)。

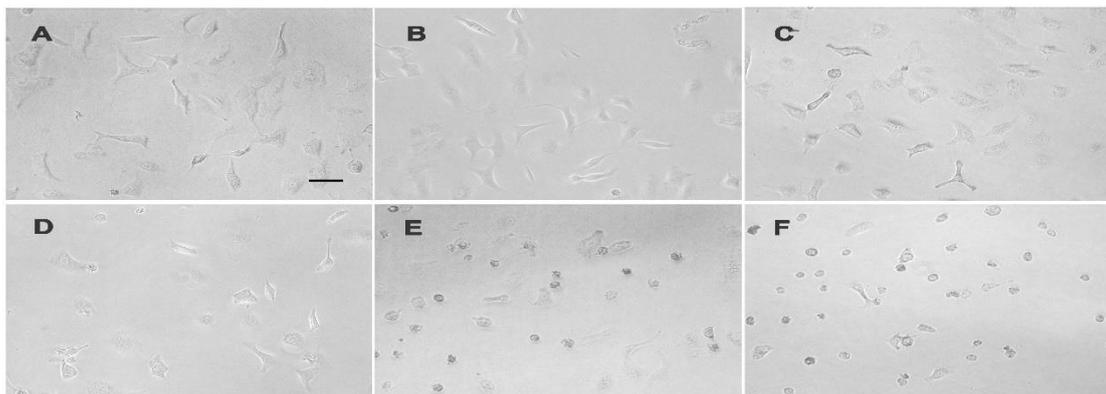


图 1.3 PQ 染毒 6 天后 A549 细胞生长状态 ($\times 400$)

A: 对照组; B: 15 $\mu\text{mol/L}$ PQ 处理组; C: 30 $\mu\text{mol/L}$ PQ 处理组; D: 60 $\mu\text{mol/L}$ PQ 处理组; E: 120 $\mu\text{mol/L}$ PQ 处理组; F: 240 $\mu\text{mol/L}$ PQ 处理组。

3.4 PQ 介导的 A549 细胞 EMT 过程

选取 15 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$ 三个浓度对 A549 细胞进行染毒，培养 6 天后，提取 RNA 从 mRNA 水平验证 EMT 相关基因表达变化情况，如图，PQ 染毒组与对照组相比，研究发现，30 $\mu\text{mol/L}$ 和 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 染毒组基因表达变化的差异有统计学意义，其中，上皮表达标志物 E-cadherin 表达下调($P<0.05$)，而 α -SMA 和 MMP2 的表达上调($P<0.05$) (图 1.4)。提取细胞蛋白质从蛋白水平检测 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 染毒组细胞 E-cadherin、 α -SMA 及 MMP2 表达的变化情况，研究发现，60 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 染毒组蛋白变化与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$) (图 1.5)，仍说明在 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 浓度处理下，A549 细胞出现明显 EMT 改变。用免疫荧光双染法进一步验证 60 $\mu\text{mol/L}$ PQ 作用时，E-cadherin、 α -SMA 的表达情况，其中用 DAPI 染细胞核 (蓝光)，E-cadherin 染绿色荧光、 α -SMA 染红色荧光：60 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 处理组的 E-cadherin 荧光强度减弱，而 α -SMA 的荧光强度增强(图 1.6)。

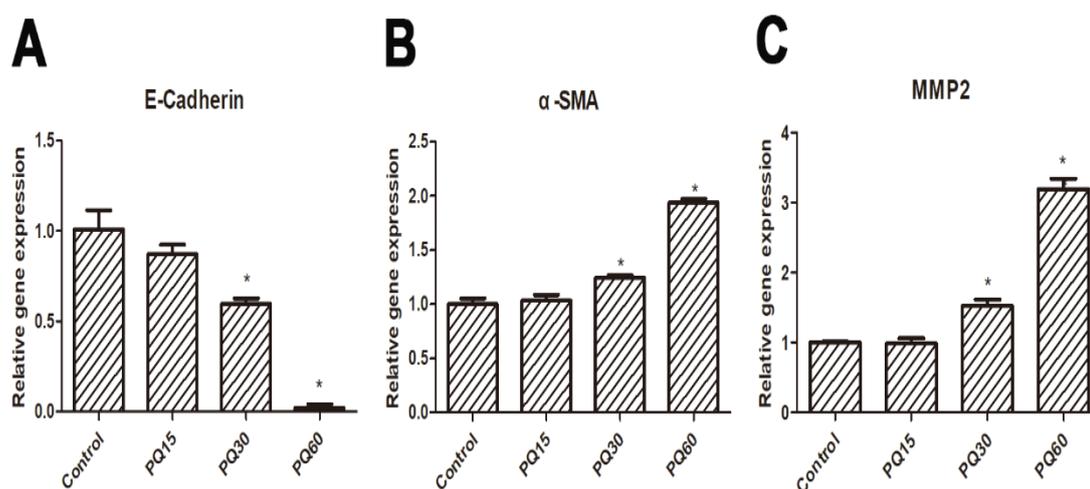


图 1.4 PQ 诱导 A549 细胞 EMT 的基因水平变化

采用 qRT-PCR 检测各基因 mRNA 水平的改变情况，PQ15 表示 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 处理组，PQ30 表示 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 处理组，PQ60 表示 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 处理组，A: E-cadherin 表达的改变情况；B: α -SMA 表达的改变情况；C: MMP2 表达的改变情况。结果显示：30 $\mu\text{mol/L}$ 和 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 处理组的 E-cadherin 表达下调、 α -SMA 及 MMP2 表达上调 ($P<0.05$)，(* 表示 $P<0.05$)。

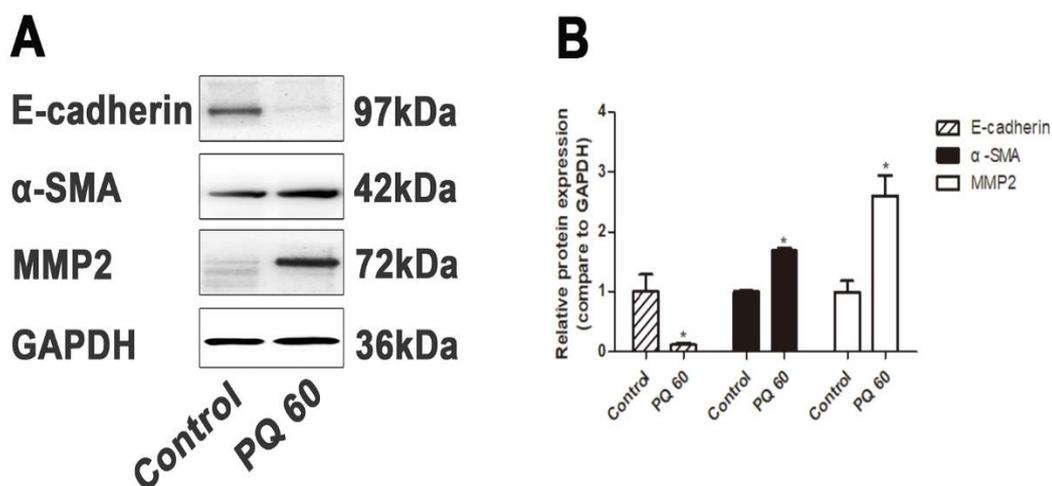
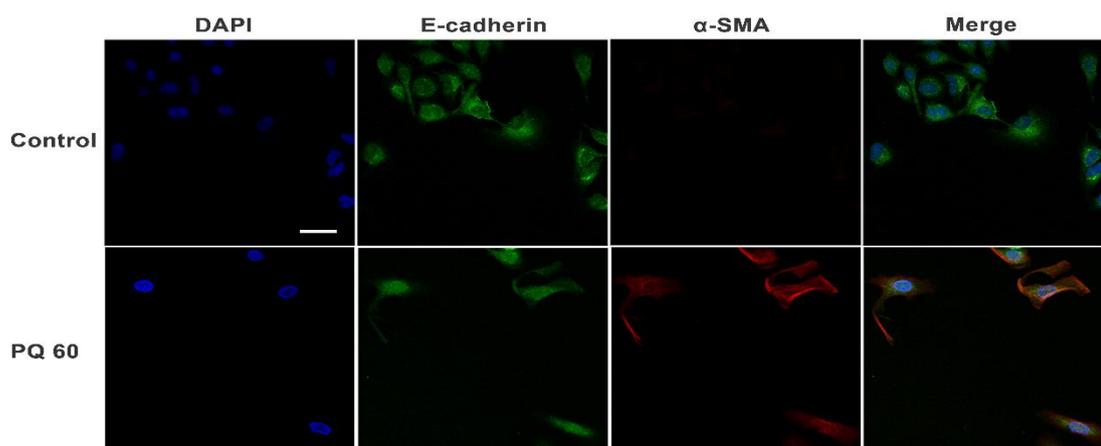


图 1.5 PQ 诱导 A549 细胞 EMT 的蛋白水平变化

A: Western-blot 显示 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 浓度作用下 E-cadherin、 α -SMA 及 MMP2 表达变化情况; B: western-blot 条带灰度分析统计图, 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 处理组的 E-cadherin 表达下调, α -SMA 及 MMP2 表达上调 ($P < 0.05$), (*表示 $P < 0.05$)。

图 1.6 PQ 诱导 A549 细胞 EMT 的蛋白荧光染色情况 ($\times 400$)

用 DAPI 染细胞核 (蓝光), E-cadherin 染绿色荧光, α -SMA 染红色荧光, 结果显示: 60 $\mu\text{mol/L}$ PQ 处理组, E-cadherin 荧光强度减弱, α -SMA 荧光强度增强。

3.5 PQ 染毒后 A549 细胞的迁移能力增强

细胞划痕实验结果显示, 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQ 处理细胞 96h 后, 其划痕面积明显小于对照组, 即 PQ 染毒组 A549 细胞划痕的伤口愈合能力要明显强于相应的对照组 ($P < 0.05$), 说明 PQ 染毒后可增强细胞的迁移能力(图 1.7)。采用 Transwell 实验进一步检测细胞的迁移能力的变化, 与对照组相比, PQ 处理后从上室内侧迁移过来的细胞数量明显增加 ($P < 0.05$) (图 1.8), 进一步说明 PQ 处理后迁移能力增强。

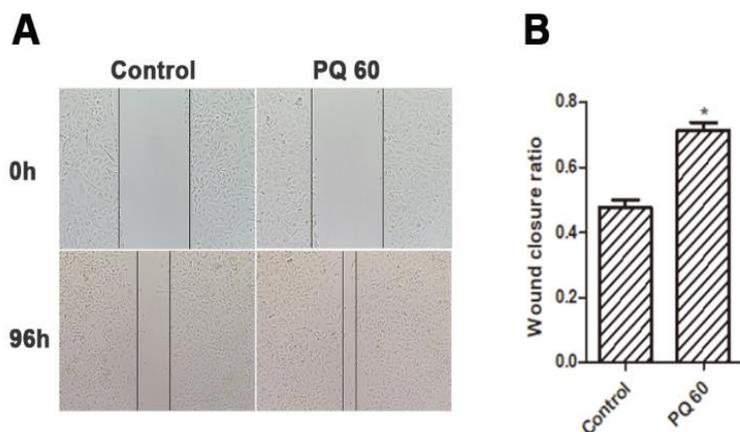


图 1.7 划痕实验检测 PQ 染毒后细胞迁移能力的变化

A: 划痕实验检测 PQ 处理后细胞迁移能力的变化, $60 \mu\text{mol/L}$ 的 PQ 处理后细胞划痕的伤口愈合能力增强; B: 实验组与对照组划痕伤口愈合率改变情况, PQ 处理后迁移能力明显增强 ($P < 0.05$), (*表示 $P < 0.05$)。

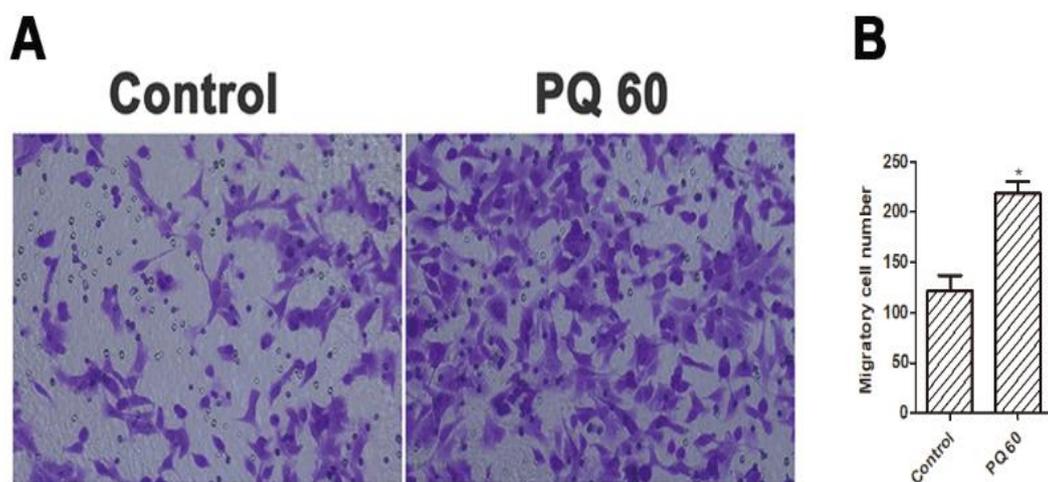


图 1.8 Tranwell 实验检测 PQ 染毒后细胞迁移能力的变化

A: PQ 处理后从上室内侧迁移至外侧的细胞数量明显逐渐增多; B: $60 \mu\text{mol/L}$ 的 PQ 处理组发生迁移的细胞数量明显多于对照组 ($P < 0.05$), (*表示 $P < 0.05$)。

4 讨论

PQ 是目前世界范围内广泛使用的除草剂,其毒性强、中毒剂量小、预后极差。目前尚无针对 PQ 的特效解毒药, PQ 中毒机制的研究具有重要的临床意义。PQ 中毒后主要靶器官是肺,肺组织中毒损伤后过度修复会引起间质组织异常沉积,导致慢性进行性肺纤维化,最终患者常死于呼吸衰竭。EMT 常见于纤维化、肿瘤等慢性疾病中,在此过程中,上皮细胞会下调细胞粘附分子的表达,使细胞之间的连接作用减弱甚至消失,而间质表达标志物会上调,增强细胞的迁移能力,EMT 参与肺纤维化的病理生理过程,深入探讨 EMT 在 PQ 所致肺 EMT 中的作用机制具有重要临床意义。

首先本实验通过体内实验验证了 PQ 中毒后会引发肺组织的纤维化,肺组织结构明显被破坏,肺泡破裂融合,且胶原蛋白沉积明显增加,进一步通过 qRT-PCR 检测该纤维化模型中上皮表达标志物及间质表达标志物的改变情况,qRT-PCR 结果显示上皮表达标志物 E-cadherin 表达下调,而间质表达标志物 α -SMA 表达上调,即提示 EMT 过程参与了 PQ 中毒后引起的肺纤维化。其次,我们通过外实验验证 PQ 中毒后是否可引起肺泡上皮细胞 A549 的 EMT。我们发现随着 PQ 作用浓度的升高,细胞数量明显减少,其一这可能与 PQ 对细胞的毒性作用有关,其二,可能与 PQ 作用后细胞周期进程瞬时衰减有关^[26, 27]。在本研究中我们发现 PQ 中毒可以引起肺泡上皮细胞 A549 的 EMT 改变,qRT-PCR、western-blot 和免疫荧光结果一致提示:PQ 染毒后,A549 细胞会下调上皮表达标志物 E-cadherin 的表达,而上调间质标志物 α -SMA 的表达,而划痕实验和 Transwell 实验共同证实了 PQ 可增强 A549 细胞的迁移能力,即上皮细胞发生间质化后上皮细胞之间的连接减弱,更容易发生迁移,这进一步验证了 PQ 的促肺泡上皮细胞的 EMT 作用。

明胶酶 MMP2 是一种与迁移能力密切相关的蛋白水解酶,MMP2 在肺组织的多种细胞类型中都有表达,如细支气管上皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等,MMP2 可以降解基膜的层粘连蛋白和 IV 型胶原蛋白,破坏其完整性。同时这种破坏会进一步加重组织损伤修复,使肺纤维化进行性恶化加重^[28]。除了降解基质成分外,MMP2 可以调节趋化因子和细胞因子,在炎症调节过程中可促进它们迁移到炎症部位,是和细胞迁移能力增强有关的重要分子^[29]。已有研究表明 MMP2 的表达异常与肺纤维化密切相关^[30]。在肺纤维化的发展过程中,MMP2 的异常调节影响疾病的病理过程,MMP2 可特异性地降解 ECM 的重要成分,如明胶和胶原蛋白,从而破坏

肺泡壁的结构^[22]。我们通过体内实验检测 PQ 染毒后发生 EMT 的肺组织中 MMP2 表达情况的改变, qRT-PCR 结果提示 MMP2 在 PQ 致肺 EMT 的小鼠模型中表达上调, 上调的 MMP2 会破坏肺组织结构的完整性, 引起组织过度的损伤修复, 使肺组织发生进行性加重的肺纤维化。同时, 体外实验也证实了 PQ 染毒后发生 EMT 的 A549 细胞中 MMP2 的表达上调。体内体外实验都证实了 MMP2 在 PQ 所致的肺 EMT 中高表达, 那么, 进一步验证 MMP2 在 PQ 中毒引起的肺 EMT 中的具体作用机制具有重要而深远的意义。

结论

- 1、30mg/kg 的 PQ 作用 21 天可使 C57/BL6 小鼠的肺组织发生纤维化, 且 EMT 参与其纤维化的发生发展, 肺组织上皮表达标志物 E-cadherin 表达下调, 间质表达标志物 α -SMA 表达上调。
- 2、在 A549 细胞经 30 μ mol/L 和 60 μ mol/L 的 PQ 作用 6 天可以诱导出 EMT, 细胞的上皮表达标志物 E-cadherin 表达下调, 间质表达标志物 α -SMA 表达上调, 细胞的迁移能力增强。
- 3、MMP2 在 PQ 诱导的小鼠肺组织及 A549 细胞的 EMT 中表达上调。

第二部分: ceRNA 调控网络与 PQ 致 EMT 的相关研究

5 前言

PQ 中毒的死亡率居高不下, 中毒后的患者晚期可出现慢性进行性恶化的肺纤维化最终可导致呼吸衰竭而亡。肺纤维化发病率高, 预后差, 其发病机制复杂, 是多种信号通路和细胞因子共同作用的结果。肺纤维化的发病机理目前尚不明确, 这与患者的高死亡率密切相关。近年来, 基因芯片和高通量测序等技术的飞速发展彻底改变了我们对呼吸系统疾病的认识, 除了为人们熟知的编码蛋白的 mRNA, 细胞内还存在大量不能编码蛋白的 RNA 即非编码 RNA (non-protein-coding RNA, ncRNA), ncRNA 分为管家性和具有调控功能的 RNA, 其中调控型非编码 RNA (non-protein-coding RNA, ncRNA) 包括: 微小 RNA (microRNA, miRNA) 和长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNA) 等, 它们通过调节 mRNA 的转录或翻译来影响生物反应^[31]。ceRNA 调控网络是指一些具有相同 miRNA 应答元件 (miRNA response

element, MRE) 的 RNA 竞争性结合同一个 miRNA 而减弱 miRNA 对另一个靶 RNA 的抑制作用, 称为“海绵作用” [32]。ceRNA 调控网络作为一种全新的基因表达调控模式, 揭示的是整个调控网络(而不是单个转录本)如何影响转录后调控。全转录组测序和生物信息的预测可揭露许多 ceRNA 调控网络。在动物细胞中大多数 miRNA 与其靶基因并不完全互补, miRNA 的种子区序列(seed region)通过和靶基因的 3' 端非翻译区(3-untranslated region, 3' UTR)互补进而阻止转录后的翻译, 起到调节基因表达的作用 [33]。ceRNA 调控网络参与多种疾病的发生发展, 而尚无研究探讨 ceRNA 调控网络在 PQ 所致的肺 EMT 中的调控作用, 本研究旨在重点讨论 PQ 致 EMT 相关的 ceRNA 机理, 为 PQ 所致 EMT 提供潜在的诊治靶点。

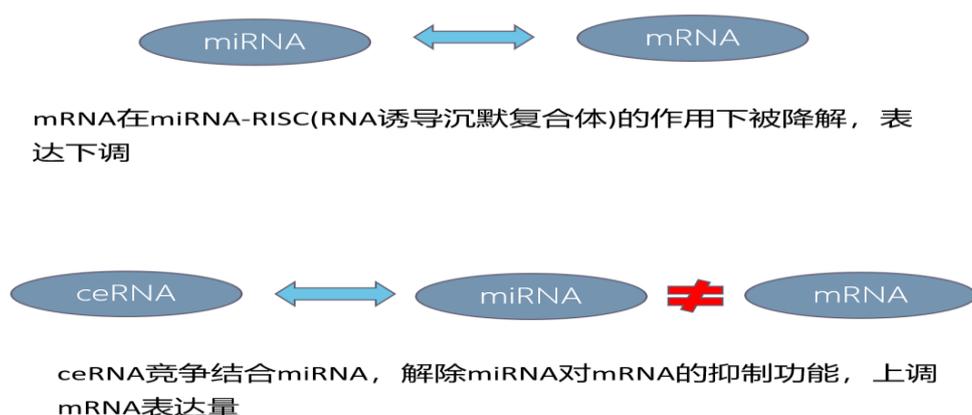


图 5.1 ceRNA 调控网络作用机理

miRNA 对靶基因(以 mRNA 为例)有抑制作用, ceRNA 可以与 miRNA 的靶基因竞争结合 miRNA, 从而降低 miRNA 对靶基因的抑制作用。

长度小于 200 个核苷酸的为小非编码 RNA (small or short non-coding RNA), miRNA 是长度为 22~28nt 的单链 RNA, 由一段具有发夹环状结构的 miRNA 前体依次经两个核糖核酸酶 III 内切酶 (RNase III endonucleases): Drosha 和 Dicer 作用后形成, 它在进化方面具有保守性, 其表达具有组织和阶段特异性, 是不同细胞的生理及病理机制的重要元件, 可影响靶基因的稳定性并抑制靶基因蛋白水平的表达。在人类基因组中约有 1000 个 miRNA 被鉴定出来, 其中约有 30% 的基因都受其调控 [34]。成熟的 miRNA 与 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 结合, 再特异性地与靶 RNA 结合致其降解。miRNA 是 ceRNA 调控网络的核心。miR-17~92 家族包括七种亚型: miR-17-5p, miR-17-3p, miR-20a, miR-19a, miR-19b, miR-92a 和 miR-18a, 在特发性肺间质纤维化 (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 中, 80% 的 miR-17~92 启动子位于胞嘧啶-鸟嘌呤 (cytosine polyguanine, CPG) 区, 相

比正常肺组织表现为过甲基化,miR-17~92 可通过直接调节 DNA 转甲基酶-1(DNA methyltransferase-1, DNMT-1)减少 IPF,使肺成纤维细胞中纤维化基因 CTGF、COL1A1、COL13A1 表达下降,即 miR-17-5p 在 IPF 的肺组织和成纤维细胞中低表达^[35]。TargetscanHuman 7.2 网站预测 MMP2 是 miR-17-5p 的靶基因。目前对 miR-17-5p 在 PQ 中毒中的作用研究仅仅局限于神经毒性的研究,尚无人探讨其在 PQ 致肺 EMT 中的作用。

在组织发生纤维化时,肌成纤维细胞是产生 ECM 的主要细胞,肌成纤维细胞依据病因可来源于各种细胞类型^[36],在 EMT 时肌成纤维细胞可来源于上皮细胞^[37]。肌成纤维细胞是纤维化的主要靶细胞,除了产生和重构 ECM 外,肌成纤维细胞所具有的收缩功能会增加组织的硬度,并以细胞因子和生长因子的形式诱发促血管生成和促炎症信号。整合素(Integrin)是参与肌成纤维细胞分化的关键分子,其介导的 ECM 和细胞骨架之间的相互作用可促进肌成纤维细胞的分化^[38],整合素可调节细胞骨架动力学,可影响细胞的粘附、迁移和分化等细胞进程^[39],认识整合素的调节机制可以更好的开发抗纤维化的治疗。整合素 α (Integrin alpha)的亚单位整合素 $\alpha 11$ (Integrin alpha 11, ITGA11)在包括肺纤维化的组织纤维化时可选择性的与 I 型胶原蛋白结合。ITGA11 在 IPF 患者的肺组织中表达明显上调,且 ITGA11 和 α -SMA 表达阳性的肌成纤维细胞共表达^[40]。目前尚无研究探讨 ITGA11 在 PQ 所致的肺纤维化中的作用。ENCORI 网站(<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)预测 ITGA11 可以和 MMP2 竞争结合 miR-17-5p。

本部分接着前期研究结果进一步探讨 MMP2、ITGA11 与 miR-17-5p 在 PQ 致 A549 细胞 EMT 中的相互作用关系。

6 材料与方法

6.1 主要试剂和仪器

6.1.1 主要试剂

miR-17-5p 及 U6 的 qRT-PCR 引物 (广州锐博生物技术有限公司)

miR-17-5p 的 mimic 和 inhibitor (广州锐博生物技术有限公司)

干扰 RNA 序列 (苏州吉玛基因股份有限公司)

siRNA-MateTM 转染试剂 (苏州吉玛基因股份有限公司)

抗 ITGA11 抗体（美国 Santa Cruz Biotechnology 公司）

pSI-Check2-ITGA11-WT 双荧光素酶报告载体（上海汉恒生物科技有限公司）

pSI-Check2-ITGA11-MUT 双荧光素酶报告载体（上海汉恒生物科技有限公司）

Dual-Luciferase 报告基因检测系统试剂盒（美国 Promega）

其他试剂参见 2.1.3

6.1.2 主要仪器

仪器参见 2.1.4

6.2 细胞培养

方法参见 2.6

6.3 qRT-PCR

miR-17-5p 及 U6 在进行反转录反应时使用锐博生物提供的特异性 RT Primer 且 PCR 仪运行程序：42°C，15min；85°C，5sec；4°C；其余方法参见 2.8。

表 6.1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	primer (5' to 3')	序列
Mus-ITGA11	Forward	GAAGATGCCGTCCATGAGTTC
	Reverse	CTCCGAGCGTGCAAATTC AAT
hsa -ITGA11	Forward	CAGCTCGCTGGAGAGATACG
	Reverse	TTACAGGACGTGTTCGCCTC

6.4 Western -blot

方法参见 2.9

6.5 免疫荧光

方法参见 2.10

6.6 干扰 RNA 的转染

(1)将生长旺盛处于对数生长期的细胞接种于 60mm 培养皿中，稳定 24h 左右，使细胞量达到 60%左右。

(2)将 200 μ L 无血清的 1640 培养基加入无菌离心管中，向其中加入 40pmol 的 ITGA11 siRNA 或空白对照 negative control (NC) siRNA 充分混匀，再加入 20 μ L siRNA-Mate，快速涡旋 10sec 使其完全混匀；室温孵育 20 min，以便形成稳定的转染复合物。

(3)在转染复合物静置期间给细胞更换培养基,将静置完毕的复合物加入其中,37°C培养 72h 收集细胞进行检测。

表 6.2 siRNA 序列

基因名称	(5' to 3')	序列
siITGA11	sense	CCCAGUGGUUCAGAUCAAUTT
	antisense	AUUGAUCUGAACCACUGGGTT
NC	sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

6.7 转染 miR-17-5p 的 mimic 或 inhibitor

(1)将生长状态良好的细胞均匀接种于 60mm 培养皿中,稳定 24h 左右,使细胞量达到 50%左右。

(2)参照锐博生物 miRNA 产品说明书稀释 mimic 或 inhibitor 及其各自的阴性对照,并制备转染混合液。

(3)将混合液加入到完全无双抗培养基中并进行加药处理,37°C培养 96h 收集细胞检测。

6.8 双荧光素酶报告基因

(1)细胞转染:

- 1)将细胞接种于 96 孔板中,当细胞密度达到 70%左右时准备转染;
- 2)将 10 μ L 的 1640 培养基与 0.16 μ g 的 ITGA11 双荧光报告载体及 5pmol 的 miR-17-5p mimic 或 mimic NC 充分混匀后室温静置(溶液 A),之后将 10 μ L 的 1640 培养基与 0.3 μ L 的转染试剂(0.8mg/mL)充分混匀(溶液 B),室温放置 5min;
- 3)将溶液 A 与溶液 B 充分混匀,室温放置 20min;
- 4)给细胞更换新鲜培养基,将转染混合物加入混匀,37°C,5% CO₂ 培养,转染 6h 后更换新鲜培养基,转染 48h 后收集细胞检测。

(2)双荧光素酶系统检测:

- 1)将 5 \times PLB(Passive Lysis Buffer)用蒸馏水稀释成 1 \times PLB,以 96 孔板每孔 100 μ L 的量加入,用移液枪吹打打散细胞,室温置于摇床上缓慢摇 15min,将细胞裂解液吸至 1.5mL 离心管,4°C,12000rpm 离心 10min,取上清移入新的管子;

- 2)96 孔板中加入 Luciferase Assay Reagent II (LAR II)工作液 100 μ L;
- 3)加入 20 μ L 细胞裂解液, 移液枪吹打混匀 3 次, 测定记录 Firefly luciferase 值, 此值为内参值;
- 4)加入 100 μ L 的 Stop & Glo[®] Reagent, 吹打混匀, 测定记录 Renilla luciferase 值, 此即为报告基因发光值。

6.9 统计分析

方法参见 2.13

7 结果

7.1 ITGA11 在 PQ 染毒组中表达升高

从 mRNA 水平检测 PQ 处理后 ITGA11 相对表达量的变化情况, 结果发现, 与对照组相比, PQ 处理过的肺组织和 A549 细胞中的 ITGA11 的表达量明显增加 ($P<0.05$), 说明 ITGA11 在 PQ 所致的肺 EMT 中表达上调(图 7.1)。

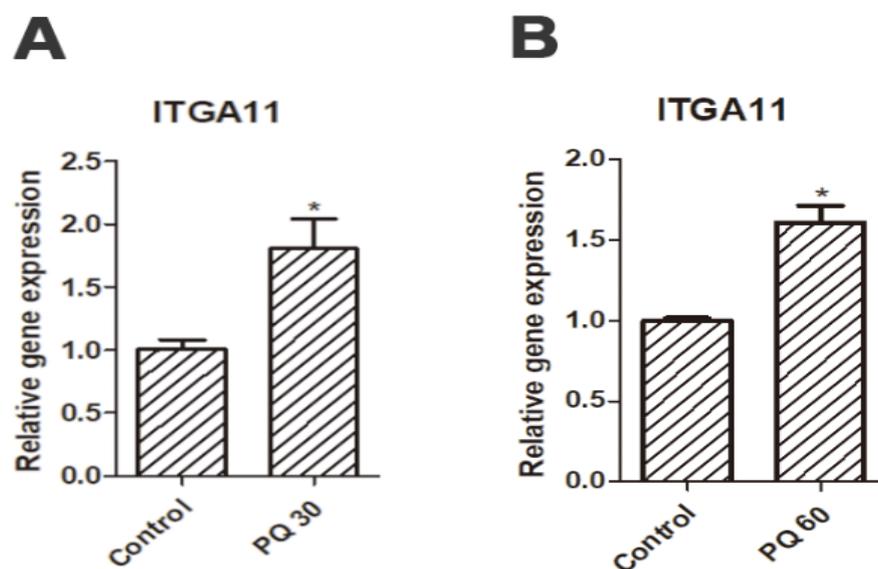


图 7.1 C57/BL6 小鼠肺组织和 A549 细胞 PQ 中毒后 ITGA11 基因水平变化

采用 qRT-PCR 检测 PQ 处理后 ITGA11 表达量的相对变化情况, A: 与对照组相比 30mg/kg 的 PQ 作用于 C57/BL6 小鼠后, 肺组织中的 ITGA11 表达上调 ($P<0.05$), (*表示 $P<0.05$); B: 与对照组相比, 60 μ mol/L 的 PQ 处理 A549 细胞后, ITGA11 的表达也明显上调 ($P<0.05$), (*表示 $P<0.05$)。

7.2 ITGA11 对 MMP2 表达的影响

本研究通过给 A549 细胞转染特异性 siRNA 序列来研究 ITGA11 对 MMP2 表达的影响。转染 siITGA11 人为降低 ITGA11 的表达, 首先采用 qRT-PCR 检验 siITGA11 干扰序列对 ITGA11 的干扰效果, 结果显示, siITGA11 干扰序列可以下调 ITGA11 的表达 ($P < 0.05$) (图 7.2)。我们进一步通过 qRT-PCR 检测下调 ITGA11 后 MMP2 的表达情况, 结果显示, siITGA11 处理后, MMP2 的表达也下调 ($P < 0.05$) (图 7.3)。采用 Western-blot 检测经 PQ 处理后, A549 细胞中的 MMP2 以及上皮表达标志物 E-cadherin 的表达情况, 结果显示, 转染 siITGA11 可下调 MMP2 的表达 ($P < 0.05$), 而上调 E-cadherin 的表达 ($P < 0.05$) (图 7.4), 说明 ITGA11 对 MMP2 的调控作用可以影响 PQ 所致的 EMT。下调 ITGA11 后, 通过双染免疫荧光检测 ITGA11 和 MMP2 表达的变化情况, 用 DAPI 染细胞核 (蓝光), ITGA11 染绿色荧光, MMP2 染红色荧光, 结果显示, 在无 PQ 处理的对照组和 PQ 处理组, 转染 siITGA11 后, ITGA11 和 MMP2 的荧光强度都明显减弱, 即 MMP2 随着 ITGA11 表达的下调而下调, 且 PQ 处理组的 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度要强于相应的对照组(图 7.5)。

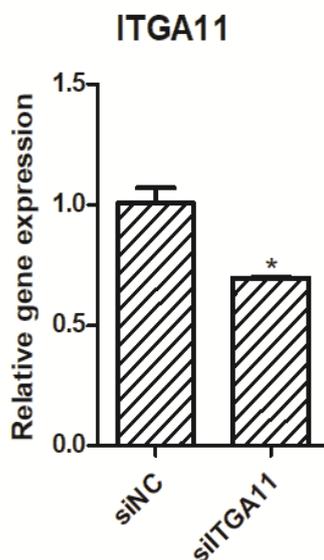


图 7.2 ITGA11 干扰序列干扰效果验证

采用 qRT-PCR 检测转染 siITGA11 干扰序列后 ITGA11 表达量的相对变化情况, 转染干扰序列 siITGA11 可成功下调 ITGA11 的表达 ($P < 0.05$), (*表示 $P < 0.05$)。

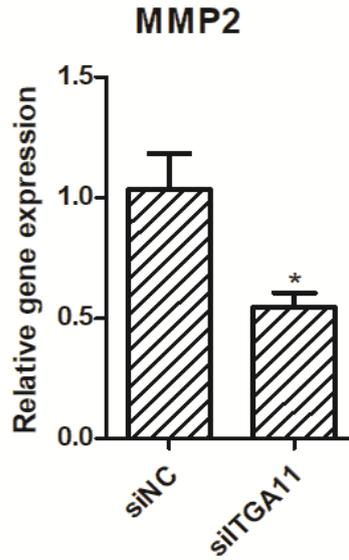


图 7.3 下调 ITGA11 后 MMP2 的表达情况

采用 qRT-PCR 检测转染 siITGA11 干扰序列后 MMP2 表达量的相对变化情况，下调 ITGA11 后 MMP2 的表达也下调 ($P < 0.05$)，(*表示 $P < 0.05$)。

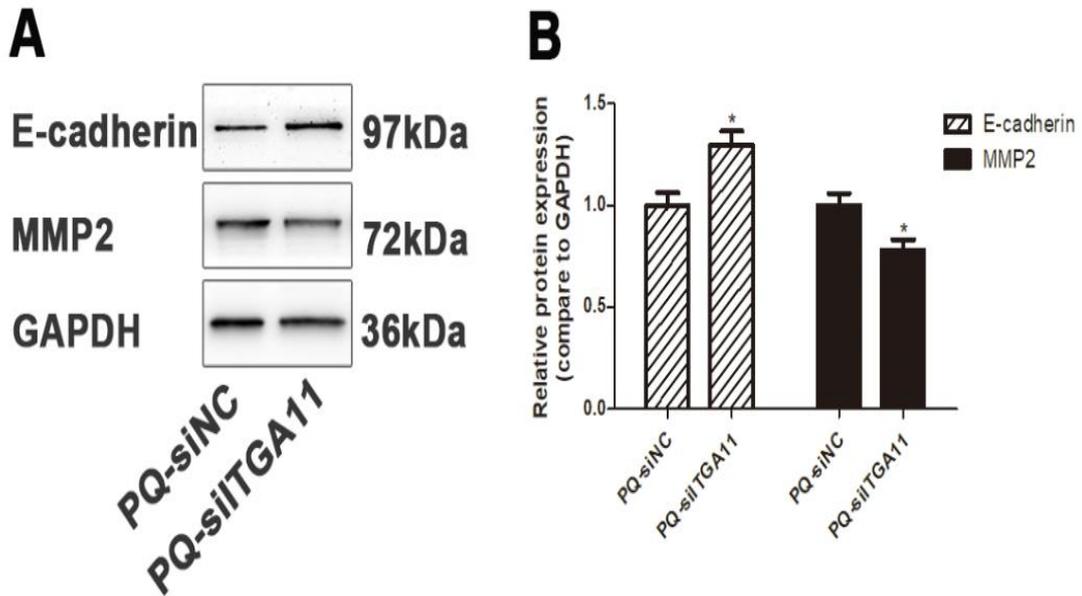
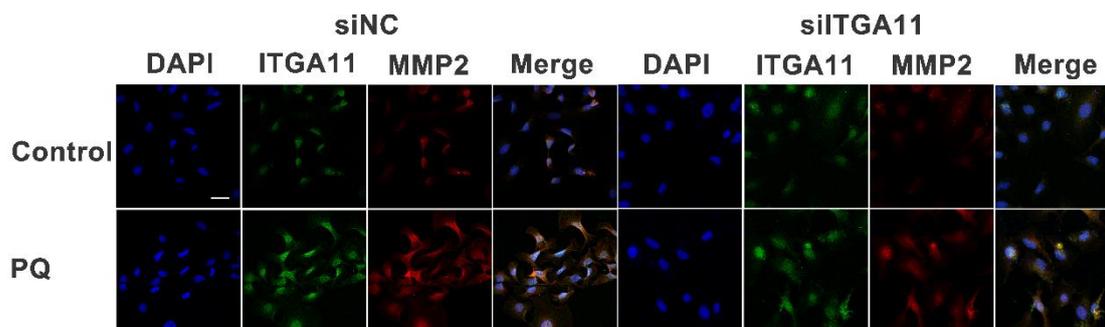


图 7.4 PQ 处理后下调 ITGA11 后 E-cadherin 和 MMP2 的表达情况

采用 Western-blot 检测 A549 细胞经 PQ 处理后转染 siITGA11 干扰序列后 E-cadherin 和 MMP2 表达量的相对变化情况，A: Western-blot 条带；B: Western-blot 条带灰度分析统计图，经 PQ 染毒后，A549 细胞转染 siITGA11 可使 E-cadherin 表达上调 ($P < 0.05$)，而 MMP2 的表达下调 ($P < 0.05$)，(*表示 $P < 0.05$)。

图 7.5 下调 ITGA11 对 MMP2 的影响 ($\times 400$)

A549 细胞转染 siITGA11 后, 采用免疫荧光双染法检测 ITGA11 和 MMP2 相对表达量的变化情况, 用 DAPI 染细胞核 (蓝光), ITGA11 染绿色荧光, MMP2 染红色荧光, 结果显示, 在无 PQ 处理的对照组及 PQ 处理组, siITGA11 下调 ITGA11 表达的同时都可下调 MMP2 的表达, 且 PQ 处理组的 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度要强于相应的对照组。

7.3 miR-17-5p 在 PQ 染毒组中表达降低

从 RNA 水平检测 PQ 染毒后 miR-17-5p 相对表达量的变化, 与对照组相比, 60 $\mu\text{mol/L}$ PQ 处理组 A549 细胞的 miR-17-5p 的表达明显下调 ($P < 0.05$), 说明 miR-17-5p 在 PQ 中毒所致的肺 EMT 中低表达。(图 7.6)

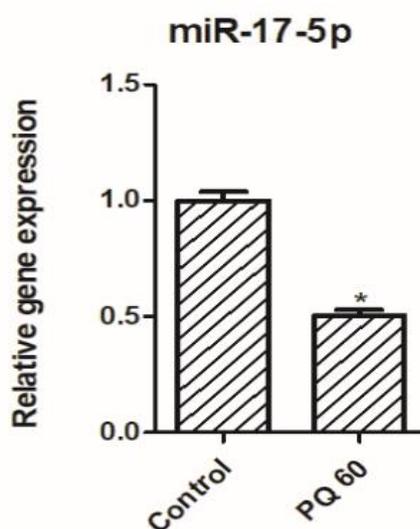


图 7.6 PQ 中毒 A549 细胞 miR-17-5p 基因水平变化

采用 qRT-PCR 检测 PQ 处理组的 miR-17-5p 表达的相对变化情况, PQ 处理组与对照组相比, miR-17-5p 表达明显下调 ($P < 0.05$), (*表示 $P < 0.05$)。

7.4 miR-17-5p 对 ITGA11 和 MMP2 的影响

本研究通过转染 miR-17-5p 的 mimic(化学合成的成熟 miRNA 双链)和 inhibitor(化学修饰的成熟 miRNA 互补单链)来上调或下调 miR-17-5p 的表达, 首先通过 qRT-PCR 验证 mimic 和 inhibitor 的转染效能, 如图所示, 转染 mimic 后细胞中 miR-17-5p 表达明显上调 ($P<0.05$), 检测转染 mimic 后 ITGA11 和 MMP2 表达的改变情况, 发现转染 mimic 后 ITGA11 和 MMP2 的表达都下调($P<0.05$)(图 7.7A); 转染 inhibitor 后细胞中 miR-17-5p 表达下调($P<0.05$), 检测转染 inhibitor 后 ITGA11 和 MMP2 表达的变化, 发现转染 inhibitor 后 ITGA11 和 MMP2 的表达都上调($P<0.05$)(图 7.7B)。进一步通过免疫荧光进行验证, 在无 PQ 处理的对照组和 PQ 处理组, 转染 mimic 后 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度都明显减弱, 且 PQ 处理组 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度要强于相应的对照组(图 7.8)。在无 PQ 处理的对照组和 PQ 处理组, 转染 inhibitor 后 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度都增强, 且 PQ 处理组 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度要强于相应的对照组(图 7.9)。mimic 对 ITGA11 和 MMP2 的影响更明显应该和 mimic 本身的转染效能有关, 从 qRT-PCR 结果可以看出, 转染 mimic 后 miR-17-5p 的表达可上调将近 50 倍, 而转染 inhibitor 后 miR-17-5p 的表达仅下调 5 倍左右。综合 qRT-PCR 和免疫荧光的的结果, 可说明上调 miR-17-5p 的表达可抑制 ITGA11 和 MMP2 的表达, 而抑制 miR-17-5p 的表达可上调 ITGA11 和 MMP2 的表达, 提示 ITGA11 和 MMP2 是 miR-17-5p 的靶基因, 受到 miR-17-5p 的负向调控。ITGA11 和 miR-17-5p 之间结合位点示意图(图 7.10A), 双荧光素酶报告基因结果显示: 与 mimic NC 相比, mimic 可显著下调 pSI-Check2-ITGA11-WT 的 luciferase 的活性, 说明两者之间存在结合位点 ($P<0.05$); 而 pSI-Check2-ITGA11-MUT 合并转染 mimic NC 和 mimic 时, luciferase 的表达无差异 ($P>0.05$), 即突变成功, 总的来说, ITGA11 和 miR-17-5p 之间存在结合位点, ITGA11 作为其靶基因受其调控(图 7.10B)。

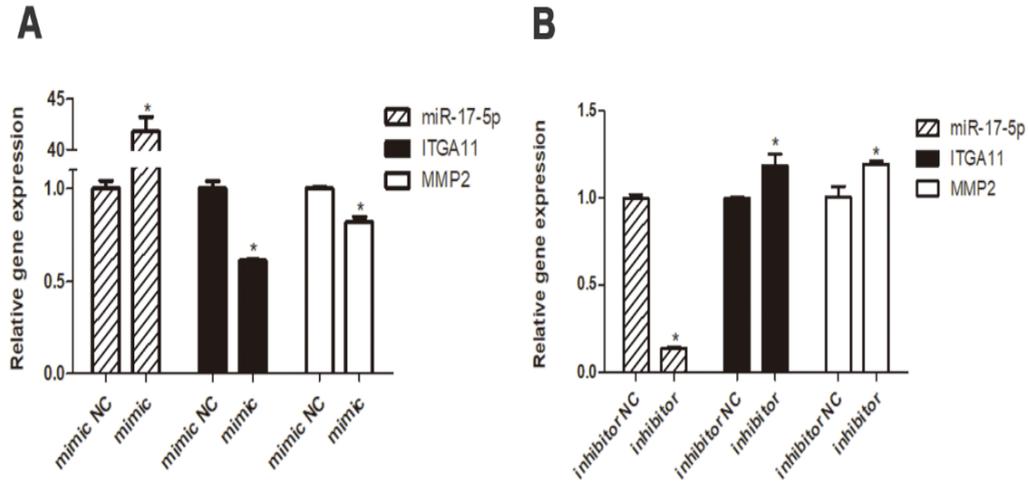


图 7.7 miR-17-5p 对 ITGA11 和 MMP2 的 mRNA 表达的影响

A: 细胞转染 miR-17-5p 的 mimic 后, 用 qRT-PCR 检测 mimic 的转染效果, 发现 mimic 可明显上调 miR-17-5p 的表达 ($P < 0.05$), 且转染 mimic 后 ITGA11 和 MMP2 的表达量相对降低 ($P < 0.05$), (*表示 $P < 0.05$); B: 细胞转染 miR-17-5p 的 inhibitor 后, 用 qRT-PCR 检测 inhibitor 的转染效果, 发现 inhibitor 可明显下调 miR-17-5p 的表达 ($P < 0.05$), 且转染 inhibitor 后 ITGA11 和 MMP2 的表达量相对增高 ($P < 0.05$), (*表示 $P < 0.05$)。

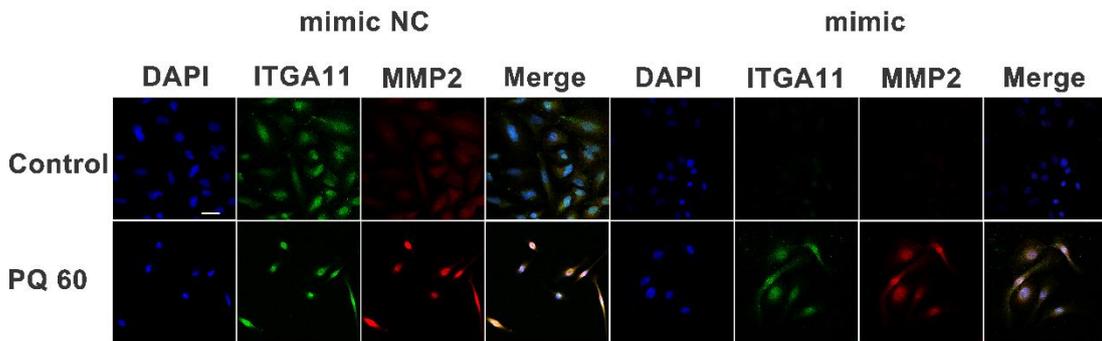


图 7.8 上调 miR-17-5p 对 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度的影响 ($\times 400$)

细胞分别转染 miR-17-5p 的 mimic NC、mimic 后采用免疫荧光检测 ITGA11、MMP2 的荧光强度改变情况, 用 DAPI 染细胞核 (蓝光), ITGA11 染绿色荧光, MMP2 染红色荧光, 在无 PQ 处理的对照组和 PQ 处理组, 转染 mimic 后 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度都明显弱于相应的 mimic NC 组, 且 PQ 处理组的 ITGA11 和 MMP2 荧光强度强于相应的对照组。

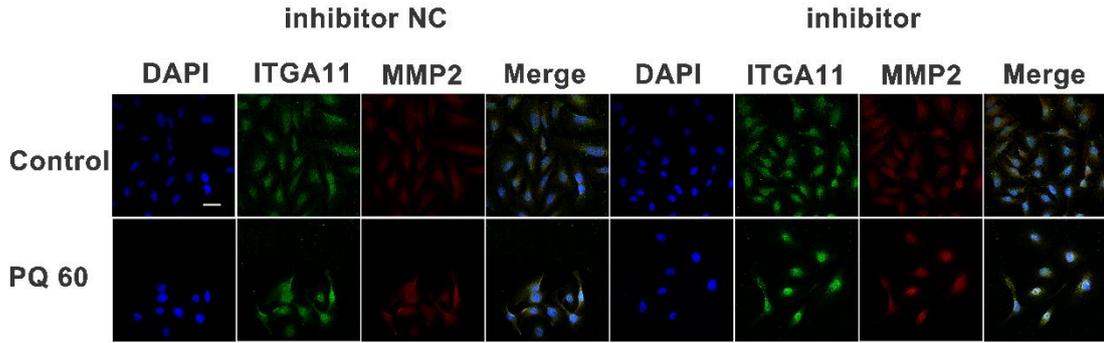


图 7.9 下调 miR-17-5p 对 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度的影响 (×400)

细胞分别转染 miR-17-5p 的 inhibitor NC、inhibitor 后采用免疫荧光检测 ITGA11、MMP2 的荧光强度变化情况, 用 DAPI 染细胞核 (蓝光), ITGA11 染绿色荧光, MMP2 染红色荧光, 在无 PQ 处理的对照组和 PQ 处理组, 转染 inhibitor 后 ITGA11 和 MMP2 的荧光强度都明显强于相应的 inhibitor NC 组, PQ 处理组的 ITGA11 和 MMP2 荧光强度强于相应的对照组。

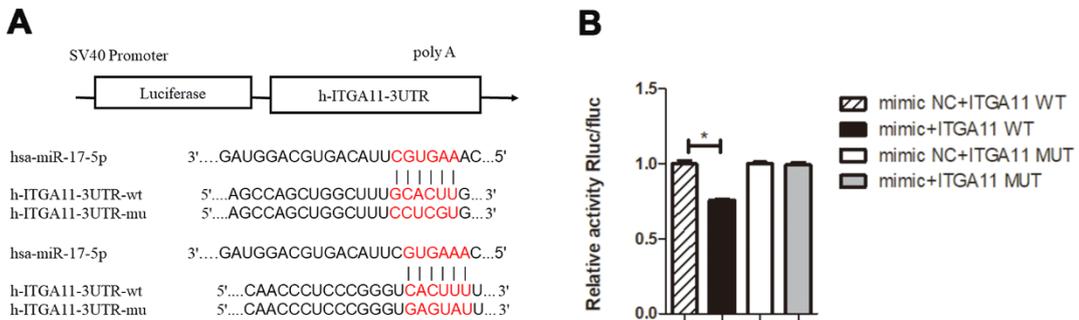


图 7.10 ITGA11 和 miR-17-5p 双荧光素酶报告基因实验

A: ITGA11 和 miR-17-5p 的结合位点; B: mimic 可以下调 ITGA11-WT 的荧光素酶活性 ($P < 0.05$), (*表示 $P < 0.05$), 而不会改变 ITGA11-MUT 的荧光素酶活性 ($P > 0.05$)。

8 讨论

ceRNA 调控网络已成为肺纤维化疾病在内的关键调控网络,参与肺纤维化的发生发展^[41, 42], 众多研究发现 ceRNA 调控网络在博来霉素和二氧化硅等诱导的肺纤维化中发挥重要的调控作用^[43, 44], 本研究主要探讨 ceRNA 调控网络在 PQ 致肺 EMT 中的作用, 前一部分的研究表明 PQ 中毒可以引起小鼠肺组织和 A549 细胞的 EMT, 同时, MMP2 在该模型中表达上调, 该部分进一步探讨 MMP2 在 PQ 致 EMT 模型中的作用机制。miRNA 是 ceRNA 调控网络的关键成员, 它通过和靶基因的 3'UTR 部分互补结合来抑制靶基因的表达^[33]。circRNA, 假基因源性 RNA, LncRNA, 病毒性 ncRNA, mRNA 等只要表达 3'UTR 的 RNA 就可以参与 ceRNA 调控网络。miR-17-5p 是 miR-17~92 家族的成员, 在 IPF 的肺组织和成纤维细胞中表达下调^[35], 且经 TargetscanHuman 7.2 网站 (www.targetscan.org/vert_72/) 预测, miR-17-5p 和 MMP2 存在结合位点。ITGA11 和 α -SMA 表达阳性的肌成纤维细胞共表达, 基因敲除 ITGA11 可显著改变肌成纤维细胞的表型, 可使肌成纤维细胞的突起消失、黏附和迁移能力减弱以及 I 型胶原基质的收缩能力受损^[40]。ENCORI 网站预测 ITGA11 可以作为 ceRNA 和 MMP2 竞争结合 miR-17-5p。我们主要研究在 PQ 致肺 EMT 细胞模型中, ITGA11 和 MMP2 之间是否存在竞争结合 miR-17-5p 的关系。

前面我们已经证明 MMP2 在 PQ 致肺 EMT 中高表达, 在此基础上, 本研究首先探讨 ITGA11 在 PQ 致肺 EMT 模型中的表达情况, 研究表明 ITGA11 在该模型中表达上调, 揭示了 ITGA11 在 PQ 致肺 EMT 中的重要作用。那么上调的 ITGA11 和 MMP2 之间是否存在相互作用关系呢? 我们人为下调 ITGA11 的表达, 检测到 MMP2 会随着 ITGA11 表达的下调而下调, 该结果提示, MMP2 受到 ITGA11 的调控, 进一步在 PQ 染毒后检测 ITGA11 对 MMP2 表达的影响, 结果表明, PQ 处理后, 下调 ITGA11 仍然可以降低 MMP2 的表达, 且上皮表达标志物 E-cadherin 的表达上调, 该结果进一步说明了 ITGA11 对 MMP2 存在调控作用, 且该调控作用可以影响 PQ 中毒所致的肺 EMT 的过程。那么 ITGA11 是如何调控 MMP2 并影响 PQ 中毒所致的肺 EMT 的呢? 进一步明确 MMP2 和 ITGA11 之间的相互作用机制十分重要。

我们检测 miR-17-5p 在 PQ 致 EMT 模型中的表达情况, 发现 miR-17-5p 在该模型中是低表达的。那么, ITGA11 是否可以作为 ceRNA 吸附 miR-17-5p 来影响 MMP2 的表达呢? miRNA 通过和靶基因 3'UTR 部分互补结合可抑制靶基因的表达^[33]。体

外研究表明, 在无 PQ 处理的对照组和 PQ 处理组, 增加 miR-17-5p 的表达量可使 MMP2 和 ITGA11 的表达都下调, 相反, 降低 miR-17-5p 的表达量可使 MMP2 和 ITGA11 的表达都上调, 该结果提示 MMP2 和 ITGA11 都是 miR-17-5p 的下游靶基因, 它们的表达都受到了 miR-17-5p 的抑制。我们进行了双荧光素酶实验, 我们把 ITGA11 可以和 miR-17-5p 结合的序列克隆到 pSI-Check2 双荧光素酶的报告载体上, 构建出野生型 (WT) 的 ITGA11 双荧光素酶报告基因, 同时, 我们把不能与 miR-17-5p 结合的突变序列也克隆到 pSI-Check2 双荧光素酶的报告载体上, 构建出突变型 (MUT) 的 ITGA11 双荧光素酶报告基因, 转染 miR-17-5p 的 mimic NC 或 mimic 后, 我们发现, 野生型加 mimic 组的相对荧光素酶活性要弱于 mimic NC 组, 提示 ITGA11 可以直接和 miR-17-5p 结合, 是 miR-17-5p 的靶基因; 而突变型加 mimic 组的荧光素酶活性与相应的 mimic NC 组的差异无统计学意义, 说明突变成功, 即双荧光素酶报告基因实验证明了 ITGA11 和 miR-17-5p 之间存在直接结合关系。

综上所述, 在 PQ 致肺 EMT 的模型中, MMP2 的高表达和 ITGA11 有关: ITGA11 高表达, 通过“海绵吸附”效应降低了 miR-17-5p 对 MMP2 的抑制作用而上调 MMP2 的表达。本研究初步揭示了 PQ 致肺 EMT 中的“ITGA11-miR-17-5p-MMP2”ceRNA 调控网络, 为 PQ 致肺 EMT 的诊断和治疗提供理论依据和新的治疗靶点。

结论

- 1、miR-17-5p 在 PQ 致肺 EMT 中低表达。
- 2、ITGA11 在 PQ 致肺 EMT 中高表达。
- 3、ITGA11 可以通过结合 miR-17-5p 来影响 MMP2 的表达。

本研究创新性的自我评价

本研究通过体内和体外实验构建 PQ 中毒致肺 EMT 的模型，通过检测模型中 MMP2、ITGA11、miR-17-5p 的表达情况，首次揭示 PQ 致肺 EMT 模型中 miR-17-5p、ITGA11 的表达情况，发现 MMP2 在 PQ 所致肺 EMT 中的新作用机制，首次探讨 ITGA11-miR-17-5p-MMP2 这一 ceRNA 调控网络在 PQ 致肺 EMT 中的作用，为 PQ 所致肺 EMT 的诊治提供新的研究靶点。

参考文献

- [1] Dinis-Oliveira R J, Duarte J A, Sánchez-Navarro A, et al. Paraquat Poisonings: Mechanisms of Lung Toxicity, Clinical Features, and Treatment [J]. *Critical reviews in toxicology*, 2008, 38(1): 13-71.
- [2] Gunnell D, Eddleston M, Phillips M R, et al. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review [J]. *BMC Public Health*, 2007, 7: 357.
- [3] Senarathna L, Eddleston M, Wilks M F, et al. Prediction of outcome after paraquat poisoning by measurement of the plasma paraquat concentration [J]. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 2009, 102(4): 251-259.
- [4] Xu L, Xu J, Wang Z. Molecular mechanisms of paraquat-induced acute lung injury: a current review [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2014, 37(2): 130-134.
- [5] Gawarammana I B, Buckley N A. Medical management of paraquat ingestion [J]. *British journal of clinical pharmacology*, 2011, 72(5): 745-757.
- [6] Houzé P, Baud F J, Mouy R, et al. Toxicokinetics of paraquat in humans [J]. *Human & experimental toxicology*, 1990, 9(1):
- [7] Thiery J P, Sleeman J P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2): 131-142.
- [8] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(6): 415-428.
- [9] Ding Y, Gelfenbeyn K, Freire-De-Lima L, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition with O-glycosylated oncofetal fibronectin [J]. *FEBS letters*, 2012, 586(13): 1813-1820.
- [10] Shan T, Chen S, Chen X, et al. Prometastatic mechanisms of CAF-mediated EMT regulation in pancreatic cancer cells [J]. *International journal of oncology*, 2017, 50(1): 121-128.
- [11] Sarkar T R, Battula V L, Werden S J, et al. GD3 synthase regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 34(23): 2958-2967.
- [12] Acloque H, Adams M S, Fishwick K, et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1438-1449.
- [13] Kalluri R, Weinberg R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Clin Invest*,

- 2009, 119(6): 1420-1428.
- [14] Horowitz J C, Thannickal V J. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2006, 27(6): 600-612.
- [15] Kim K K, Kugler M C, Wolters P J, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35): 13180-13185.
- [16] Willis B C, Liebler J M, Luby-Phelps K, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *The American journal of pathology*, 2005, 166(5): 1321-1332.
- [17] Zhu Y, Tan J, Xie H, et al. HIF-1 α regulates EMT via the Snail and β -catenin pathways in paraquat poisoning-induced early pulmonary fibrosis [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2016, 20(4): 688-697.
- [18] Sun H, Chen J, Qian W, et al. Integrated long non-coding RNA analyses identify novel regulators of epithelial-mesenchymal transition in the mouse model of pulmonary fibrosis [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2016, 20(7): 1234-1246.
- [19] Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(1-2): 15-33.
- [20] O'connor C M, Fitzgerald M X. Matrix metalloproteases and lung disease [J]. *Thorax*, 1994, 49(6): 602-609.
- [21] Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, 3(4): 383-388.
- [22] Wang X, Dai W, Wang Y, et al. Blocking the Wnt/ β -Catenin Pathway by Lentivirus-Mediated Short Hairpin RNA Targeting β -Catenin Gene Suppresses Silica-Induced Lung Fibrosis in Mice [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 12(9): 10739-10754.
- [23] 安钟健, 金燕, 延光海, et al. Pyn 重组蛋白对肺纤维化大鼠 VEGF/VEGFR2/MMP-9 信号通路的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(2): 234-238.
- [24] Li L, Li Q, Wei L, et al. Dexamethasone combined with berberine is an effective therapy for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(4): 2385-2392.
- [25] Zhang F, Hu L, Wu Y-X, et al. Doxycycline alleviates paraquat-induced acute lung injury by inhibiting neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 [J]. *International immunopharmacology*, 2019, 72(243-251).

- [26] Vega S, Morales A V, Ocaña O H, et al. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(10): 1131-1143.
- [27] Mejlvang J, Kriajevska M, Vandewalle C, et al. Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition [J]. *Molecular biology of the cell*, 2007, 18(11): 4615-4624.
- [28] 王晔, 郝丽, 王南, et al. TGF- β 和 MMP-2/MMP-9mRNA 在 PQ 中毒肺中的表达及 Ac-SDKP 保护作用 [J]. *昆明医科大学学报*, 2019, 40(11): 34-38.
- [29] 汤国辉, 谢远杰, 刘丽兵, et al. ERK1/2 与 MMP2 在结肠癌中的表达及意义 [J]. *诊断病理学杂志*, 2016, 23(10): 784-788.
- [30] 左万里, 黄积雄, 邓同睿, et al. 脐血间充质干细胞对肺纤维化大鼠 MMP2/TIMP-1 的影响 [J]. *黑龙江医学*, 2017, 41(10): 10-12.
- [31] Booton R, Lindsay M A. Emerging role of MicroRNAs and long noncoding RNAs in respiratory disease [J]. *Chest*, 2014, 146(1): 193-204.
- [32] Thomson D W, Dinger M E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy [J]. *Nature reviews Genetics*, 2016, 17(5): 272-283.
- [33] Djuranovic S, Nahvi A, Green R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs [J]. *Science*, 2011, 331(6017): 550-553.
- [34] Osman A. MicroRNAs in Health and Disease - Basic Science and Clinical Applications [J]. *Clin Lab*, 2012, 58(5-6): 393-402.
- [35] Dakhllallah D, Batte K, Wang Y, et al. Epigenetic Regulation of miR-17~92 Contributes to the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(4): 397-405.
- [36] Hinz B, Phan S H, Thannickal V J, et al. The myofibroblast: one function, multiple origins [J]. *The American journal of pathology*, 2007, 170(6): 1807-1816.
- [37] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y J, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- [38] Agarwal S K. Integrins and cadherins as therapeutic targets in fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5(131).
- [39] Hynes R O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines [J]. *Cell*, 2002, 110(6): 673-687.
- [40] Bansal R, Nakagawa S, Yazdani S, et al. Integrin alpha 11 in the regulation of the

- myofibroblast phenotype: implications for fibrotic diseases [J]. *Experimental & molecular medicine*, 2017, 49(11): e396.
- [41] Lu G, Zhang J, Liu X, et al. Regulatory network of two circRNAs and an miRNA with their targeted genes under astilbin treatment in pulmonary fibrosis [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2019, 23(10): 6720-6729.
- [42] 陈梦晴, 王文军. ceRNA 网络研究进展及在呼吸系统疾病中的相关研究 [J]. *现代医药卫生*, 2017, 33(3): 399-401.
- [43] Yao W, Li Y, Han L, et al. The CDR1as/miR-7/TGFBR2 Axis Modulates EMT in Silica-Induced Pulmonary Fibrosis [J]. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 2018, 166(2): 465-478.
- [44] 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]. *Molecular therapy* 2018, 26(9): 2206-2217.

综述

非编码 RNA 及 ceRNA 调控网络在肺纤维化中的研究进展

肺纤维化是一种进行性恶化的肺间质慢性疾病,其发病率有逐年增加的趋势,肺纤维化的预后极差,患病后治愈率极低,约有一半的患者在诊断为肺纤维化的3-5年内死亡^[1]。常见的可引起肺纤维化的因素有百草枯(Paraquat,PQ)^[2]、博来霉素^[3]、二氧化硅(silicon dioxide, SiO₂)^[4]等,肺纤维化主要临床表现为进行性加重的呼吸困难及低氧血症,最终常进展为呼吸衰竭而导致患者死亡。在疾病的早期,各种致病因素导致肺泡上皮细胞广泛损伤,引起肺泡的炎症,机体应对这种损伤时过度修复,进而引起成纤维细胞(fibroblasts,FBs)大量增生聚集,细胞外基质(extracellular matrix,ECM)大量异常沉积,正常肺组织受到破坏,肺组织异常重构,功能受损,无法满足机体的正常呼吸,最终可导致呼吸衰竭^[5]。目前肺纤维化的发病机制尚不明确,肺纤维化的机制研究十分重要。非编码 RNA(Non-protein-coding RNA, ncRNA)和竞争性内源 RNA(Competing endogenous RNA, ceRNA)调控网络是近年来的研究热点,它们在肺纤维化的发生发展中起到一定的作用^[6],本综述对 ncRNA 及 ceRNA 调控网络在肺纤维化中研究进展进行概述,为肺纤维化的诊治提供新的思路与研究方向。

1. 非编码 RNA 概述

随着 RNA 分析和研究技术的不断改进, RNA 的种类也在不断增多,这使得人们越来越重视 RNA 所扮演的生物学角色,并将其功能的重要性与蛋白质相提并论。在人类基因组中,除了为人们所熟知的可编码蛋白的 mRNA,细胞内还存在大量不能编码蛋白的 RNA 即 ncRNA,在人类基因组中约有超过 90%的 DNA 序列被转录为 RNA,其中仅有 2%的核酸序列可编码蛋白质,其余被转录为 ncRNA^[7,8]。ncRNA 不携带编码蛋白质的信息,能从基因组中转录而来但不能产生功能蛋白质产物,分为管家性和具有调控功能的 ncRNA,其中,管家性 ncRNA 包括核糖体 RNA(ribosomal RNA, rRNA),转运 RNA(transfer RNA, tRNA),核仁小 RNA(small nucleolar RNA, snoRNA),核内小 RNA(small nuclear RNA, snRNA);具有调控功能的 ncRNA 主要包括微小 RNA(microRNA, miRNA),PIWI 相互作用 RNA(PIWI interacting RNA, piRNA),长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA),环状 RNA(circular RNA, circRNA)等。RNA 的功能也不仅仅是基因和蛋白质之间的信使,ncRNA 并不是所谓的“垃圾产物”,相反,ncRNA 能从 RNA 水平上发挥重要的调控功能。是否所有的转录本全部具有功

能目前尚存在争议,但是可以确定的是有大量的 ncRNA 具有功能,它们对细胞正常功能的维持和异常生物学功能的发生发展都具有重要意义,它们可以调控表观遗传、转录及转录后的多种生物学过程,在细胞进程中参与多种信号通路的调节,是重要的疾病诊断标志物^[9,10]。

长度大于 200 个核苷酸且缺少开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)和编码具有功能的多肽或蛋白质能力的 RNA 为 LncRNA,其比例超过 80%^[11],是广泛存在于细胞中的一种不编码蛋白质的线性 RNA。LncRNA 根据其序列特征和与相应编码蛋白基因的位置关系分为:反义 LncRNA(antisense lncRNA),假基因源性 LncRNA(pseudogenes lncRNA),基因内 LncRNA(intronic lncRNA)和基因间 LncRNA(intergenic lncRNA)。LncRNA 普遍表达于各种组织中,其功能是多种多样的,一些在细胞核中起作用,另一些在细胞质中起作用,还有一些支持细胞结构,LncRNA 在染色质修饰、剂量补偿效应、表观遗传、细胞周期、细胞分化和转录及转录后水平调控等众多生命活动中发挥重要作用^[12]。LncRNA 是基因活动的重要的顺式或反式调控因子,且大部分表达都是顺式作用,它们的表达常常反映了其相邻基因的表达情况,其表达和作用具有组织和时空特异性,它们在分化和表达上的特异性使其具有关键的调控作用^[13]。

长度小于 200 个核苷酸的为小非编码 RNA(small or short non-coding RNAs),miRNA 是长度为 22~28nt 的单链 RNA,由一段具有发夹环状结构的 miRNA 前体依次经两个核糖核酸酶 III 内切酶(RNase III endonucleases): Drosha 和 Dicer 作用后形成,在进化方面具有保守性,其表达具有组织和阶段特异性,是不同细胞的生理及病理机制的重要元件,影响靶基因的稳定性并抑制靶基因蛋白水平的表达^[14]。在人类基因组中约有 1000 个 miRNA 被鉴定出来,其中约有 30%的基因都受其调控^[15]。miRNA 在非分化细胞的发育调节和维持分化细胞内的稳态方面具有双重作用^[16]。成熟的 miRNA 与 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex,RISC)结合,再特异性地与靶 RNA 结合致其降解。在动物细胞中大多数 miRNA 与其靶基因并不完全互补,miRNA 的种子区序列(seed region)通过和靶基因的 3'端非翻译区(3-untranslated region, 3'UTR)互补进而阻止转录或转录后的翻译,起到调节基因表达的作用^[17]。

circRNA 广泛存在于真核细胞中,其 3'端和 5'端共价结合形成闭环,大多来源于外显子,少部分由内含子直接环化形成,其序列高度保守,环状结构使其容易对抗核酸外切酶的降解作用,结构比较稳定且表达丰富,参与基因转录或转录后调控^[18, 19]。

circRNA 的表达具有组织特异性, 种类十分丰富^[20]。

2. ceRNA 调控网络

2.1 ceRNA 调控网络概述

ceRNA 调控网络是指一些具有相同 miRNA 应答元件(miRNA response element,MRE)的 RNA 竞争性结合同一个 miRNA 而减弱 miRNA 对另一个靶 RNA 的抑制作用,称为“海绵作用”^[21, 22]。ceRNA 调控网络作为一种全新的基因表达调控模式,揭示的是整个调控网络(而不是单个转录本)如何影响转录后调控。全转录组测序和生物信息的预测可揭露许多 ceRNA 调控网络。circRNA,假基因源性 RNA,LncRNA,病毒性 ncRNA,mRNA 等表达 3'UTRs 的 RNA 可以参与这一调控网络。circRNA 自身结构比较稳定更有可能作为 ceRNA。假基因源性 RNA 是基因的一种坏副本,分为复制型(duplicated pseudogenes)和返座型(processed pseudogenes),假基因表达虽不如其同源基因稳定,但假基因和其同源基因有多个共同的 MREs,可有效提高靶点量。LncRNA 根据起源可以分为假基因源性、基因间、基因内起源性,可作为 ceRNA 发挥调控功能。单独表达 3'UTR 就可以使 RNA 具有 ceRNA 功能,如单独表达假基因 PTENP1 的 3'UTR 可引起其对应的 PTEN 表达的增加。病毒产生的 ceRNA 与其他 ceRNA 作用机制不同的是:丙型肝炎病毒 RNA 与 miRNA 结合后表达不仅不受抑制,反而可表达稳定,且为病毒复制所需。

2.2 ceRNA 调控网络中的 LncRNA、miRNA 和 circRNA

LncRNA 在不同条件下发挥作用的机制不同,LncRNA 和 miRNA 之间的相互作用在多种疾病中起着重要作用。LncRNA 的数量多于 mRNA,比 mRNA 更具有细胞特异性, LncRNA 除直接参与调控疾病的发生发展外,还可与 DNA、RNA 和蛋白质等其他大分子物质相互作用来共同参与疾病发生发展的调控。除了蛋白质支架和基因相互作用机制外,ceRNA 已作为 LncRNA 的一种作用新机制被提出^[23]。以往的研究表明,多数 LncRNA 可通过 ceRNA 的方式来影响疾病的发生发展,如 LncRNA H19 通过与 miR-29b 的相互作用可促进博来霉素诱导的肺纤维化^[24]。

自 miRNA 首次被揭露后,人类对其功能的研究越来越深入成熟,其调节机制从单纯的 miRNA-RNA 相互作用引申为 RNA-miRNA-RNA 三者的相互作用,这种作用机制参与各种功能的调节^[25]。

具有 miRNA 结合位点的 circRNA 可以作为 ceRNA 发挥作用, circRNA 通过结合 RNA 结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs)或 miRNA 与其他 RNA 进行竞争, circRNA 序列在保守的核苷酸中显著富集,自身具有抵抗核酸外切酶降解的作用,

非常丰富的内源性 circRNA 分子可以作为有效的 miRNA“海绵”，丰富了基因表达的调控功能^[18]。

3. LncRNA、miRNA、circRNA 与肺纤维化

LncRNA 参与多种器官的纤维化的发生发展^[26]。LncRNA H19 在胚胎外组织、胚胎本身和大多数胎儿组织中均有较高水平的表达，但 LncRNA H19 在出生后表达明显下降，它在细胞增殖、细胞周期、凋亡、分化和侵袭等多种生物学过程中发挥着重要作用,和多种疾病有关,其中包括纤维化。已有研究表明,H19 参与肺纤维化过程^[24]。LncRNA PCF 可促进依赖于 miR-344a-5p 的上皮细胞的活化和增殖，加速肺纤维化的发生，可能是 IPF 的潜在治疗靶点^[27]。LncRNA ATB 在 SiO₂ 所致的肺纤维化中促进上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)的发生^[28]。uc.77 和 2700086A05Rik 在百草枯中毒所致的肺 EMT 中表达上调^[29]。

miRNA 在肺细胞中起重要作用,可影响细胞的增殖、凋亡、分化、病理和纤维化进程^[30]。有多种 miRNA 参与肺纤维化的发生发展, let-7d 在特发性肺纤维化 (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)中下调，这种在体内和体外的促纤维化中的下调表明 let-7d 在预防肺纤维化时会起到重要调控作用^[31]。在转化生长因子(transforming growth factor-beta ,TGF-beta)介导的肺纤维化中 miR-29 缺失^[32],下调 miR-21 可有效逆转博来霉素所致的肺上皮间质转化^[33]。IPF 中,80%的 miR-17~92 启动子位于胞嘧啶-鸟嘌呤(cytosine polyguanine,CPG)区,相比正常肺组织表现为过甲基化,miR-17~92 可通过直接调节 DNA 转甲基酶-1(DNA methyltransferase-1,DNMT-1)减少 IPF,使肺成纤维细胞中纤维化基因 CTGF、COL1A1、COL13A1 表达下降,即 miR-17-5p 在 IPF 肺组织和成纤维细胞中低表达^[34]。在肺纤维化组织中，miR-26a 的下调可消除转录后结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)受到的抑制作用，并诱导胶原蛋白的产生^[35]。miR-34a 在纤维化肺组织和肺肌成纤维细胞(myofibroblasts)中表达上调^[36]。miR-708-3p 的表达水平在纤维化过程中下降，并与 IPF 呈负相关^[37]。参与肺纤维化的 miRNA 还有 miR-200 家族^[38],miR-154^[39],miR-145^[40]等。miR-200 家族在小鼠肺纤维化及人 IPF 肺组织中表达明显下调，miR-200 家族在肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AECs)中的表达水平要高于 FBs,在肺纤维化小鼠的 AECs 中 miR-200 表达下调，miR-200 家族可抑制 TGF-beta 诱导的 AECs 的 EMT 进而逆转肺纤维化^[38]。IPF 的 FBs 中 miR-154 表达增加，而正常人肺成纤维细胞(normal human lung fibroblasts, NHLF)转染 miR-154 后细胞增殖和迁移能力明显增加^[39]。在 TGF-beta 处理过的 FBs 中 miR-145 表达上调，与正常人肺组织相比，IPF 患者肺组织中

miR-145 的表达也增加,过表达 miR-145 可以增加 α 平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin- α , α -SMA)的表达,进而促进纤维粘连^[40]。

circRNA 是肺纤维化机制研究的新兴领域,研究表明, SiO₂ 可以促进细胞的增殖、迁移,在增加 circHECTD1 表达的同时,抑制 HECTD1 蛋白的表达,使用 siRNA 下调 circHECTD1 的表达或过表达 HECTD1 可逆转 SiO₂ 诱导的细胞增殖迁移能力的增强,进一步验证了 circHECTD1 在 SiO₂ 诱导的肺纤维化中促进内皮细胞的迁移和活化的能力^[41]。PPP1R13B 是 p53 家族促凋亡蛋白的主要成员, SiO₂ 可下调肺 FBs 中 circRNA-012091 (circ-012091)的表达并诱导下游 PPP1R13B 表达上调, circRNA-012091 调控的 PPP1R13B 通过内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)和自噬促进肺 FBs 的增殖和迁移^[42]。对 IPF 患者的血浆进行基因芯片检测发现: circRNA_100906、circRNA_102100 和 circRNA_102348 的表达明显上调, circRNA_101225、circRNA_104780 和 circRNA_101242 的表达明显下调^[43]。

4. ceRNA 调控网络与肺纤维化

研究发现,有多个 ceRNA 调控网络参与肺纤维化。H19 作为 miRNA-196a 的直接靶基因在 TGF-beta 和博来霉素诱导的肺纤维化中表达上调,可增加对 miRNA-196a 的吸附来上调 COL1A1 的表达,进而促进肺纤维化的发生^[44]。circRNA-662 和 949 可吸附 miR-29b 并分别调节 Gli2 和 STAT3 的表达^[45]。miR-7 可以抑制肺上皮细胞的 EMT 过程,上调 miR-7 可以缓解肺纤维化, TGFBR2 是 miR-7 的下游靶基因, circRNA CDR1as 可以逆转 miR-7 对 TGFBR2 的抑制作用进而上调 TGFBR2 的表达, circRNA CDR1as/miR-7/TGFBR2 这一作用轴可调节 SiO₂ 所致的肺纤维化^[46]。ZEB1 (Zinc-finger Ebox Binding Homeobox 1) 是 EMT 的主要调控因子, LncRNA ZEB1 反义 RNA 1(ZEB1 antisense RNA 1,ZEB1-AS1)在博来霉素诱导的大鼠肺纤维化组织及 TGF-beta 诱导的 RLE-6TN 细胞纤维化中明显上调, ZEB1-AS1 的表达与 ZEB1 呈正相关,体内实验证明,敲低 ZEB1-AS1 可通过抑制 EMT 来缓解博来霉素诱导的肺纤维化,ZEB1-AS1 可以吸附 miR-141-3p,过表达 ZEB1-AS1 可以减少 miR-141-3p 的表达并活化 ZEB1,因此 ZEB1-AS1 可通过调节 miR-141-3p/ZEB1 轴来促进博来霉素所致的肺纤维化^[47]。LncRNA NONMMUT065582 被指定为肺纤维化相关 RNA (pulmonary fibrosis-associated RNA, PFAR),它在小鼠肺组织及纤维化的肺 FBs 中表达上调,过表达 PFAR 可以通过调控 miR-138 来促进纤维化的发生,而敲低 PFAR 可以缓解 TGF-beta 诱导的 FBs 中的纤维化的发生发展,另外下调 miR-138 可以通过调控 yes-相关蛋白 1(yes-associated protein 1, YAP1)来促使纤维化的发

生,且过表达 miR-138 可以减缓纤维化程度,过表达 PFAR 可以减少 miR-138 并减弱其对 YAP1 的抑制作用进而加重纤维化程度,即在肺纤维化过程中,PFAR 可以通过 miR-138 发挥“海绵吸附”效应来影响 YAP1 的表达,更重要的是,敲低 PFAR 可以缓解博来霉素诱导的小鼠肺纤维化,提示 PFAR 可能成为肺纤维化的潜在治疗靶点^[48]。LncRNA NONMMUT021928 被指定为肺纤维化相关 LncRNA (pulmonary fibrosis-associated lncRNA, PFAL),它在小鼠肺纤维化组织及 TGF-beta1 诱导的 FBs 的纤维化中表达增高,过表达 PFAL 可以促进促进细胞增殖、迁移以及 FBs 转化为肌成纤维细胞,导致 ECM 的沉积及纤维化的发生,miR-18a 在体内体外实验及 IPF 患者的肺纤维化中表达下调,在博来霉素诱导的肺纤维化中,PFAL 与 CTGF 竞争性结合 miR-18a,下调 PFAL 可能为肺纤维化提供新的治疗策略^[49]。

随着空气污染的日益加重,各种肺部疾病及慢性肺纤维化的发病率增加。肺纤维化的发病机制十分复杂,是多种多样的致病因素导致的具有相同结局的一类疾病,不同致病因素导致的肺纤维化可能具有相同或相似的发病机制,但也可能具有不同的发病机制,对肺纤维化发病机制的研究是疾病诊治的基础。ncRNA 和 ceRNA 调控网络的研究为明确肺纤维化机制奠定了基础,有望为肺纤维化的诊治提供新的靶点。

参考文献

- [1] Fernandez I E, Eickelberg O. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2012, 380(9842): 680-688.
- [2] 符红娜, 聂时南. 百草枯致肺纤维化的上皮-间质转化的机制研究进展 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2019, 28(6): 803-805.
- [3] 宋桂芹, 马立飞, 赵铁军, et al. 中和白细胞介素 17 对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的干预作用 [J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(03): 7-13.
- [4] 刘婷, 赵珂, 高瑞, et al. 2-吡啶酮衍生物对二氧化硅致小鼠肺纤维化的预防作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(03): 183-191.
- [5] B. Moore B, Lawson W E, Oury T D, et al. Animal Models of Fibrotic Lung Disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(2): 167-179.
- [6] Booton R, Lindsay M A. Emerging Role of MicroRNAs and Long Noncoding RNAs in Respiratory Disease [J]. *Chest*, 2014, 146(1): 193-204.
- [7] Sarah D, Davis C A, Angelika M, et al. Landscape of transcription in human cells [J]. *Nature*,

- 2012, 489(7414): 101-108.
- [8] Martens-Uzunova E S, Böttcher R, Croce C M, et al. Long Noncoding RNA in Prostate, Bladder, and Kidney Cancer [J]. *Eur Urol*, 2014, 65(6): 1140-1151.
- [9] Wang Y, He L, Du Y, et al. The Long Noncoding RNA IncTCF7 Promotes Self-Renewal of Human Liver Cancer Stem Cells through Activation of Wnt Signaling [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(4): 413-425.
- [10] 谭璐媛, 王妍, 钟文静, et al. 非编码 RNA 作为疾病诊断标志物 [J]. *生命科学*, 2018, 30(2): 204-212.
- [11] Guttman M, Rinn J L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs [J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 339-346.
- [12] 王超群, 马盼飞, 麻勇. 长链非编码 RNA 作用机制的研究进展 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(3): 278-281.
- [13] Delás M J, Hannon G J. lncRNAs in development and disease: from functions to mechanisms [J]. *Open Biology*, 2017, 7(7): 170121.
- [14] 姚国栋, 连源, 陈鹏, et al. MicroRNA 在肿瘤中的研究进展 [J]. *河北医药*, 2019, 41(5): 771-775.
- [15] Osman A. MicroRNAs in Health and Disease - Basic Science and Clinical Applications [J]. *Clin Lab*, 2012, 58(5-6): 393-402.
- [16] Sun K, Lai E C. Adult-specific functions of animal microRNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(8): 535-548.
- [17] Djuranovic S, Nahvi A, Green R. A Parsimonious Model for Gene Regulation by miRNAs [J]. *Science*, 2011, 331(6017): 550-553.
- [18] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.
- [19] 朱晓华, 李冬, 李友平, et al. circRNA 与疾病研究进展 [J]. *环境与职业医学*, 2017, 34(10): 938-942.
- [20] Xia S, Feng J, Lei L, et al. Comprehensive characterization of tissue-specific circular RNAs in the human and mouse genomes [J]. *Brief Bioinform*, 2017, 18(6): 984-992.
- [21] Thomson D W, Dinger M E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(5): 272-283.
- [22] 李敏, 刘德伍, 雷弯. 竞争性内源 RNA 及其调控网络在皮肤病理性瘢痕中的作用研究

- 进展 [J]. 中华烧伤杂志, 2019, 35(9): 701-704.
- [23] Schmitt A M, Chang H Y. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways [J]. *Cancer cell*, 2016, 29(4): 452-463.
- [24] Tang Y, He R, An J, et al. The effect of H19-miR-29b interaction on bleomycin-induced mouse model of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(3): 417-423.
- [25] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358.
- [26] Qu X, Song X, Yuan W, et al. Expression signature of lncRNAs and their potential roles in cardiac fibrosis of post-infarct mice [J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(3): e00337.
- [27] Liu H, Wang B, Zhang J, et al. A novel lnc-PCF promotes the proliferation of TGF- β 1-activated epithelial cells by targeting miR-344a-5p to regulate map3k11 in pulmonary fibrosis [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3137.
- [28] Liu Y, Li Y, Xu Q, et al. Long non-coding RNA-ATB promotes EMT during silica-induced pulmonary fibrosis by competitively binding miR-200c [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(2): 420-431.
- [29] Sun H, Chen J, Qian W, et al. Integrated long non-coding RNA analyses identify novel regulators of epithelial-mesenchymal transition in the mouse model of pulmonary fibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(7): 1234-1246.
- [30] Mizuno K, Mataka H, Seki N, et al. MicroRNAs in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Hum Genet*, 2016, 62(1): 57-65.
- [31] Pandit K v, Corcoran D, Yousef H, et al. Inhibition and Role of let-7d in Idiopathic Pulmonary Fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(2): 220-229.
- [32] Xiao J, Meng X-M, Huang X R, et al. miR-29 Inhibits Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(6): 1251-1260.
- [33] Zhou X, Li Y-J, Gao S-Y, et al. Sulindac has strong antifibrotic effects by suppressing STAT3-related miR-21 [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(5): 1103-1113.
- [34] Dakhllallah D, Batte K, Wang Y, et al. Epigenetic Regulation of miR-17~92 Contributes to the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(4): 397-405.
- [35] Liang H, Xu C, Pan Z, et al. The antifibrotic effects and mechanisms of microRNA-26a action in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(6): 1122-1133.

- [36] Cui H, Ge J, Xie N, et al. miR-34a Inhibits Lung Fibrosis by Inducing Lung Fibroblast Senescence [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(2): 168-178.
- [37] Liu B, Li R, Zhang J, et al. MicroRNA-708-3p as a potential therapeutic target via the ADAM17-GATA/STAT3 axis in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(3): e465.
- [38] Yang S, Banerjee S, Freitas A D, et al. Participation of miR-200 in Pulmonary Fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2011, 180(2): 484-493.
- [39] Milosevic J, Pandit K, Magister M, et al. Profibrotic Role of miR-154 in Pulmonary Fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(6): 879-887.
- [40] Yang S, Cui H, Xie N, et al. miR-145 regulates myofibroblast differentiation and lung fibrosis [J]. *FASEB J*, 2013, 27(6): 2382-2391.
- [41] Fang S, Guo H, Cheng Y, et al. circHECTD1 promotes the silica-induced pulmonary endothelial-mesenchymal transition via HECTD1 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 396.
- [42] Cheng Yusi, Luo Wei, Li Zhuang, et al. CircRNA-012091_PPP1R13B-mediated Lung Fibrotic Response in Silicosis via Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(3): 380-391.
- [43] Li R, Wang Y, Song X, et al. Potential regulatory role of circular RNA in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *International journal of molecular medicine*, 2018, 42(6): 3256-3268.
- [44] Lu Q, Guo Z, Xie W, et al. The lncRNA H19 Mediates Pulmonary Fibrosis by Regulating the miR-196a/COL1A1 Axis [J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 896-903.
- [45] Lu G, Zhang J, Liu X, et al. Regulatory network of two circRNAs and an miRNA with their targeted genes under astilbin treatment in pulmonary fibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(10): 6720-6729.
- [46] Yao W, Li Y, Han L, et al. The CDR1as/miR-7/TGFBR2 Axis Modulates EMT in Silica-Induced Pulmonary Fibrosis [J]. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 2018, 166(2): 465-478.
- [47] 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.
- [48] Zhao X, Jian S, Yingzhun C, 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):

2206-2217.

- [49] Xuelian L, Tong Y, Huitong S, et al. lncRNA PFAL promotes lung fibrosis through CTGF by competitively binding miR-18a [J]. *FASEB J*, 2018, 32(10): 5285-5297.

攻读硕士期间取得的研究成果

一、 发表论文

1. 贾茹珺, 李铁刚. 非编码 RNA 及 ceRNA 调控网络在肺纤维化中的研究进展[J].实用药物与临床 (已录用)
2. 贾茹珺, 李铁刚. miR-17-5p 和 MMP2 在百草枯致肺上皮间质转化中的机制研究[J].实用药物与临床 (已录用)
3. **Rujun Jia**, Nana Wang, Tiegang Li. Long noncoding RNA HOTAIR functions as ceRNA to regulate MMP2 in paraquat induced epithelial-mesenchymal transition [J] International Journal of Molecular Sciences (Pending Review)

致谢

在中国医科大学三年的硕士学习生活即将结束，感恩这三年来的点点滴滴，有欢乐和收获，也有挫折和磨炼。

感谢我的导师李铁刚教授对我付出过的所有努力，特别感谢您对我的认可和鼓励，激励我成为一个更好的人。三年时间很快，开学报到仿佛还在昨天，感谢您在学习及生活上的耐心指导和关心。感谢您这三年来对我的历练，让我参与多个课题的书写和策划，提升了我的科研能力。您学识渊博，待人谦逊，一直是我学习的榜样！感谢内分泌科王娜娜老师对我科研的指导，您敏锐的思维、严谨的科研态度和乐观开朗的性格一直影响着我，并使我终身受益。

感谢急诊科赵敏主任，您是我心目中完美的女强人，您的光辉一直激励我前进。感谢急诊科王煜、赵宏宇、张立春、刘振宁、沈海涛、张红雷等各位老师开题和答辩时对我的指导和帮助。

感谢沈阳应用生态研究所徐明恺研究员，亦师亦友亦亲人，感谢您对我科研道路和人生道路上的指导，一直以来没少让您费心！感谢生态所 306 这个大家庭，感谢各位老师和各位师兄姐妹给予我的无私的帮助，你们是最可爱的人，实验生活因为有你们才开心美好！

感谢我的同门师兄姐妹平时对我的各种帮助，我们有缘同在李老师这个大家庭，亲如兄弟姐妹。感谢我的闺蜜这么多年每一天的陪伴、关心、支持。

感谢中国医科大学附属盛京医院本溪培训基地的赵桂峰、赵欣、高琳琳、吕耀中等各位老师的在动物造模方面的帮助和指导。感谢在本溪培训基地结识的各位好友的在实验方面的无私帮助和指导。

感谢我的家人，感谢你们对我的毫无怨言、毫无保留的付出和教导！

最后我还要真诚的感谢各位评委老师、专家教授，在百忙之中抽出宝贵的时间对我的毕业论文进行修正指导！

所有的感谢和感恩都留在心里，希望大家一切都好！

贾茹珺

2020年3月

个人简历

姓名：贾茹琚

性别：女

民族：汉

学习经历：

2011年9月-2016年6月 长治医学院 临床医学 本科

2017年9月-至今 中国医科大学 第二临床学院 急诊医学 硕士研究生