原创精选
Selected article

lncRNA MRAK050699对二氧化硅粉尘诱导大鼠肺泡II型上皮细胞上皮-间质转换的影响

高芳瑜，刘煊，田娣，陈溪渊，田雪艳，焦子铭，侯朋邑，王发选

宁夏医科大学公共卫生与管理学院，宁夏 银川 750004

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20477

摘要：

[背景] 矽肺发病机制未明且没有特效治疗方法，长链非编码RNA（lncRNA）在矽肺纤维化进程中或可发挥作用。

[目的] 探讨lncRNA MRAK050699对SiO_2粉尘诱导大鼠肺泡II型上皮细胞（RLE-6TN细胞）发生上皮-间质转换（EMT）过程的影响。

[方法] 建立大鼠肺泡巨噬细胞（NR8383细胞）与RLE-6TN细胞共培养体外矽肺模型，分为正常组、模型组、敲减对照组、敲减组。采用CCK8法检测NR8383细胞在10、20、40、80、160、320 μg·cm^{-2} SiO_2粉尘刺激下的活力，酶联免疫吸附试验（ELISA）法检测在0、20、40、80 μg·cm^{-2}粉尘刺激下的转化生长因子-β（TGF-β）含量，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法检测MRAK050699敲减效率。取四个6孔板，在前两个6孔板中正常培养RLE-6TN细胞24 h，后两个6孔板分别培养转染阴性对照病毒的RLE-6TN细胞24 h，和转染敲减MRAK050699病毒的RLE-6TN细胞24 h；同时在另四个6孔板中，插入Transwell小室，正常培养NR8383细胞24 h。NR8383细胞与RLE-6TN细胞铺板比例为1∶2，之后将Transwell小室连同NR8383细胞一同转入RLE-6TN细胞的6孔板中，向后三组共培养体系的Transwell小室中加入40 μg·cm^{-2} SiO_2粉尘悬液150 μL后，四组同时继续培养24 h，取Transwell小室下室的RLE-6TN细胞置于显微镜下观察，使用Western blotting及RT-qPCR法检测*E-cadherin*、*N-cadherin*、*α-SMA*的mRNA和蛋白表达水平。

[结果] CCK8、ELISA法结果显示SiO_2剂量在40 μg·cm^{-2}时，细胞活力下降较为明显且可保证后续实验的有效进行，上清液中TGF-β表达水平是对照组的2.94倍，可用于后续实验；敲减组MRAK050699的表达水平相比敲减对照组明显下调，敲减效率约为50%（$P<0.05$）。显微镜下观察共培养后RLE-6TN细胞形态，正常组细胞呈现典型的上皮样特征，为多边形、卵圆形且紧密连接。模型组细胞呈现间质样细胞形态，表现为长梭形、纺锤形，并且细胞间隙变宽。敲减对照组与模型组类似，呈现间质细胞形态。而敲减组的细胞基本处于紧密连接状态。各组细胞中*E-cadherin*、*N-cadherin*、*α-SMA* mRNA和蛋白表达水平差异均有统计学意义（F=28.11、35.72、15.26，$P<0.05$；F=328.78、51.84、13.39，$P<0.05$）。与正常组相比，模型组*E-cadherin* mRNA和蛋白表达水平分别下降32%、67%，*N-cadherin* mRNA和蛋白表达水平分别上升至2.28、1.64倍，*α-SMA* mRNA和蛋白表达水平分别上升至2.74、1.66倍（均$P<0.05$）；敲减组相较于敲减对照组，*E-cadherin* mRNA和蛋白表达水平上升，而*N-cadherin*、*α-SMA*的mRNA和蛋白表达水平下降（$P<0.05$）；模型组与敲减对照组的各基因mRNA和蛋白表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。

[结论] MRAK050699在矽肺纤维化中发挥着重要的作用，可能参与了SiO_2诱导的肺泡II型上皮细胞EMT过程。

关键词：矽肺；纤维化；长链非编码RNA；肺泡II型上皮细胞；肺泡巨噬细胞；上皮-间质转换

Effect of lncRNA MRAK050699 on epithelial-mesenchymal transition in rat type II alveolar epithelial cells induced by SiO_2 dust GAO Fangyu, LIU Xuan, TIAN Di, CHEN Xiyuan, TIAN Xueyan, JIAO Ziming, HOU Pengyi, WANG Faxuan (School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

基金项目
国家自然科学基金项目（81660534）；宁夏高等教育科学研究项目（NGY2020035）；宁夏自然科学基金项目（2020AAC02019）

作者简介
高芳瑜（1993—），女，硕士生；
E-mail：gfy_439@163.com

通信作者
王发选，E-mail：faxuan203@163.com

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2020-10-16
录用日期 2020-12-25

文章编号 2095-9982(2021)03-0231-07
中图分类号 R11
文献标志码 A

▸引用
高芳瑜，刘煊，田娣，等. lncRNA MRAK050699对二氧化硅粉尘诱导大鼠肺泡II型上皮细胞上皮-间质转换的影响[J]. 环境与职业医学，2021，38（3）：231-237.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20477

Funding
This study was funded.

Correspondence to
WANG Faxuan, E-mail: faxuan203@163.com

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2020-10-16
Accepted 2020-12-25

▸To cite
GAO Fangyu, LIU Xuan, TIAN Di, et al. Effect of lncRNA MRAK050699 on epithelial-mesenchymal transition in rat type II alveolar epithelial cells induced by SiO_2 dust[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(3): 231-237.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20477

Abstract:

[Background] The pathogenesis of silicosis is unknown and there is no specific treatment for the disease. Long-chain non-coding RNA (lncRNA) may play a role in the process of silicosis fibrosis.

[Objective] This experiment aims to investigate the effect of lncRNA MRAK050699 on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in rat type II alveolar epithelial cells induced by SiO_2 dust.

[Methods] The rat alveolar macrophages (NR8383 cells) and RLE-6TN cells were co-cultured *in vitro* and divided into a normal group, a model group, a knockdown control group, and a knockdown group. The viabilities of NR8383 cells stimulated by 10, 20 ,40, 80, 160, and 320 μg·cm^{-2} SiO_2 dust were detected by CCK8 method, the levels of transforming growth factor-β (TGF-β) stimulated by 0, 20, 40, and 80 μg·cm^{-2} SiO_2 dust were detected by ELISA, and the knockdown efficiency was tested by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). RLE-6TN cells in two 6-well plates, RLE-6TN cells transfected with knockdown control virus in a plate, and RLE-6TN cells transfected with knockdown virus in a plate were cultured for 24 h. At the same time, the other four 6-well plates were inserted into the Transwell chamber, and NR8383 cells were cultured normally for 24 h. The ratio of NR8383 cells to RLE-6TN cells was 1∶2. Then the Transwell chamber together with NR8383 cells were transferred into the 6-well plates of RLE-6TN cells, and 40 μg·cm^{-2} SiO_2 dust suspension was added to the Transwell chamber of the latter three groups of co-culture system. After further 24 h, the RLE-6TN cells in the lower compartment of the Transwell chamber were observed under microscope. The mRNA and protein expression levels of *E-cadherin*, *N-cadherin*, and *α-SMA* were detected by Western blotting and RT-qPCR respectively.

[Results] CCK8 and ELISA results showed that the viability of NR8383 cells decreased significantly, and the survival rate was considered eligible when SiO_2 was 40 μg·cm^{-2}, as the level of TGF-β in supernatant was high enough for subsequent experiments; the knockdown efficiency of the knockdown group was about 50%, and the difference was statistically significant ($P<0.05$) comparing to the knockdown control group. After co-culture, the morphology of RLE-6TN cells was observed under microscope: The normal cells showed typical epithelioid characteristics of polygonal and oval appearance and tight junction; the cells in the model group showed interstitial-like cell morphology, including long fusiform and spindle shape, and the intercellular space became wider; the knockdown control group was similar to the model group, showing the morphology of interstitial cells; however, in the knockdown group, the cells were basically in a state of tight junction. The mRNA and protein expression levels of *E-cadherin*, *N-cadherin*, and *α-SMA* in each group were significantly different (F=28.11, 35.72, 15.26, $P<0.05$; F=328.78, 51.84, 13.39, $P<0.05$). Compared with the normal group, the mRNA and protein expression levels of *E-cadherin* in the model group decreased by 32% and 67%, while the levels of *N-cadherin* increased by 228% and 164%, and those of *α-SMA* increased by 274% and 166% ($P<0.05$). Compared with the knockdown control group, the mRNA and protein expression levels of *E-cadherin* in the knockdown group increased, while the levels of *N-cadherin* and *α-SMA* decreased ($P<0.05$). There were no significant differences in mRNA and protein expressions of selected genes between the model group and the knockdown control group ($P>0.05$).

[Conclusion] MRAK050699 plays an important role in silicotic fibrosis and may be involved in the EMT of type II alveolar epithelial cells induced by SiO_2.

Keywords: silicosis; fibrosis; long-chain non-coding RNA; type II alveolar epithelial cell; alveolar macrophage; epithelial-mesenchymal transition

矽肺是最严重的职业病之一，其发病机制尚未明确[1]。它是由于肺部遭受长期刺激导致肺间质炎症、成纤维细胞和肌成纤维细胞增生，进而产生纤维化所致[2]。越来越多的证据表明，有多种因素参与致纤维化的病理过程。非编码 RNA 表达异常与多种纤维化疾病有关，在肺纤维化中也已证实，这为探索新的矽肺治疗靶点提供了思路[3-4]。长链非编码 RNA（long non-coding RNA，lncRNA）是指长度超过 200 个核苷酸的一种 RNA 转录本，缺乏开放的阅读框架，曾经被认为是无意义的“转录噪音”。近年来的研究发现它们可能广泛参与各种细胞过程的调控，包括肺组织的纤维化[5-6]。有研究表明，游离的二氧化硅（silicon dioxide，SiO_2）可激活肺泡巨噬细胞，使其分泌出促纤维化的细胞因子，如转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）[7]。TGF-β 可诱导上皮-间质转换（epithelial-mesenchymal transition，EMT），使肺泡 II 型上皮细胞发生表型改变，肌成纤维细胞增多，细胞外基质（extracellular matrix，ECM）大量沉积[8-10]。在 EMT 过程中，多种相关因子会发生变化，如上皮标志物 E-钙黏蛋白（E-cadherin）转换为间充质标志物 N-钙黏蛋白（N-cadherin）[11]，增多的肌成纤维细胞大量表达 α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）[12-13]。lncRNA MRAK050699 是本课题组利用非暴露气管注入的方式建立矽肺大鼠模型后，使用 lncRNA 芯片筛选技术筛选出的 lncRNA。我们发现在其 lncRNA 表达谱中，矽肺模型组大鼠相较正常组 MRAK050699 的表达上调，说明 MRAK050699 可能参与了矽肺纤维化的过程。本次实验通过建立大鼠肺泡 II 型上皮细胞（RLE-6TN 细胞）与大鼠肺泡巨噬细胞（NR8383 细胞）共培养体系，模拟矽肺大鼠体外模型，

并转染敲减MRAK050699的慢病毒，检测相关因子的表达，探讨MRAK050699在矽肺体外模型中对大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞EMT的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

NR8383细胞、RLE-6TN细胞均购于上海名劲生物科技有限公司；游离SiO_2粉尘（美国Sigma公司），CCK-8细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒（上海贝博公司），TGF-β细胞因子酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测试剂盒（上海酶联生物公司），RPMI1640培养基（美国Gibco公司），Ham's F-12K营养培养基（上海源培生物公司），Transwell共培养小室（美国Corning公司），胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）（美国BI公司），青链霉素混合液（双抗）、胰酶（北京索莱宝科技有限公司），二甲基亚砜（dimethylsulfoxide，DMSO）（美国MP公司），磷酸盐缓冲液（phosphate buffered solution，PBS）（美国Hyclone公司），兔抗鼠E-cadherin、α-SMA抗体（美国Abcom公司），兔抗鼠N-cadherin抗体（美国Proteintech公司）、小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）单抗（北京中杉金桥公司）、MRAK050699敲减病毒以及阴性对照病毒、转染增强液HiTransG A、嘌呤霉素（上海吉凯公司），Trizol、聚偏氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜（美国Invitrogen公司），TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、TB Green™Premix Ex Taq™ Ⅱ（北京全式金公司），*MRAK050699*、*E-cadherin*、*N-cadherin*、*α-SMA*及*GAPDH*引物（上海生工生物公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RLE-6TN细胞传代培养，培养条件为含有青霉素（100 U·mL^{-1}）、链霉素（100 μg·mL^{-1}）以及10% FBS的Ham's F-12K营养培养基，当细胞融合至90%时，弃去旧培养基，消化并离心收集细胞。用完全培养基重悬细胞，分瓶培养，2 d换液一次。取3~8代细胞备用。

NR8383细胞传代培养，培养条件为含有青霉素（100 U·mL^{-1}）、链霉素（100 μg·mL^{-1}）以及15% FBS的Ham's F-12K营养培养基，当细胞增殖至90%时，分瓶培养。取3~8代细胞备用。

1.2.2 RLE-6TN细胞转染敲减病毒 转染前24 h，向6孔板中每孔接种5×10^{4}个RLE-6TN细胞，于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养过夜，将培养基替换为加入转染增强液HiTransG A及病毒（阴性对照慢病毒或敲减病毒）（感染复数=25）的培养基，孵育过夜后移除培养基并更替为完全培养基继续培养，感染约72 h时，替换培养基，加入浓度为2 μg·mL^{-1}的嘌呤霉素筛选单克隆细胞簇。将单克隆细胞簇扩大培养，冻存备用。将转染后的RLE-6TN细胞与NR8383细胞共培养。转染了阴性对照慢病毒的细胞系命名为敲减对照组，转染了敲减病毒的细胞系命名为敲减组。

1.2.3 实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，RT-qPCR）法检测lncRNA MRAK050699表达水平 为验证lncRNA MRAK050699是否敲减成功，将细胞分为三组：正常组、敲减对照组和敲减组，将三组细胞接种于6孔板中（接种密度为5×10^5），以第2天长满为最佳。次日弃去6孔板中的培养液，加入1 mL预冷的PBS清洗细胞，收集至1.5 mL离心管中，12 000×*g*，5 min进行离心，弃上清。每管加1 mL Trizol，震荡充分裂解细胞，静置5 min；参照反转录试剂盒说明书合成cDNA，并进行PCR扩增，引物序列见表1。反应条件为95℃预变性30 s；95℃变性5 s，60℃退火并延伸30 s，40个循环。以*GAPDH*为内参，计算基因相对表达。

1.2.4 共培养体系建立 实验分为四组培养体系，分别为正常组、模型组、敲减对照组以及敲减组。取四个6孔板，在前两个6孔板中正常培养RLE-6TN细胞24 h（接种密度为5×10^5），后两个6孔板分别培养转染阴性对照病毒的RLE-6TN细胞24 h，和转染敲减病毒的RLE-6TN细胞24 h，至细胞60%~70%融合；同时在另四个6孔板中，插入Transwell共培养小室，正常培养NR8383细胞24 h。NR8383细胞与RLE-6TN细胞铺板比例为1∶2，之后将Transwell共培养小室连同NR8383细胞一同转入RLE-6TN细胞的6孔板中，向后三组共培养体系的Transwell共培养小室中加入150 μL 40 μg·cm^{-2} SiO_2粉尘悬液后，四组同时继续培养24 h。

1.2.5 CCK8法检测NR8383在粉尘刺激下的细胞增殖活性 用15% FBS的Ham's F-12K营养培养基重悬NR8383，以每孔1.5×10^{4}个细胞（每孔100 μL）接种于96孔板，置于5% CO_2、37 ℃培养箱内培养24 h。加入10、20、40、80、160、320 μg·cm^{-2}的SiO_2粉尘悬液15 μL，继续培养24 h，加入CCK8溶液10 μL，37℃孵育4 h后测定各孔光密度值（*D*）。按照CCK8试剂盒说明书选取波长为450 nm进行测定，每组设6个复孔，以无细胞、

只加培养液的组为空白组，以只加培养液、不加粉尘干预的细胞为对照组，按下列公式计算细胞存活率：细胞存活率 = [($D_{实验组}-D_{空白组}$) / ($D_{对照组}-D_{空白组}$)] × 100%。

1.2.6 ELISA法检测经粉尘刺激后NR8383上清液中TGF-β含量 将经0、20、40、80 μg·cm^{-2} SiO_2粉尘处理24 h后的NR8383细胞的上清液收集，12 000×*g*，离心20 min，取上清待测。将试剂盒从冷藏环境中取出放在室温平衡1 h待用。严格按照试剂盒说明书进行操作。15 min内用酶标仪在450 nm处测光密度值（*D*）。以标准品为横坐标，*D*值为纵坐标，制作标准曲线。根据样品*D*值在该曲线图上查出相应样本中待测因子蛋白含量。

1.2.7 共培养后RLE-6TN的形态学观察 按照方法“1.2.4”，进行共培养24 h后，将Transwell共培养小室下室置于显微镜下，观察粉尘刺激后各组细胞的形态学变化。

1.2.8 RT-qPCR法检测RLE-6TN中*E-cadherin*、*N-cadherin*、*α-SMA*相对表达量 共培养24 h后，取下层6孔板进行RT-qPCR检测，方法同“1.2.4”。引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequence

基因名称 Gene name	引物 Primer	碱基序列（5′→3′） Base sequence (5′→3′)
MRAK050699	正向 Forward	AGCATTTAGGAGCAACGGCT
	反向 Reverse	ACCTAGGGGTTCTTCCCAGT
E-cadherin	正向 Forward	TTGAGAATGAGGTCGGTGCC
	反向 Reverse	CAGAATGCCCTCGTTGGTCT
N-cadherin	正向 Forward	CACCCGGCTTAAGGGTGATT
	反向 Reverse	CGATCCTGTCTACGTCGGTG
α-SMA	正向 Forward	TCGTCCTGGATTCAGGGGAT
	反向 Reverse	CAAGACGCATGATGGCATGG
GAPDH	正向 Forward	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
	反向 Reverse	GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT

1.2.9 蛋白免疫印记（Western blotting）法测定RLE-6TN细胞中各蛋白的相对表达 配制不同浓度SDS-PAGE凝胶。加入电泳液后，进行上样。80 V稳压电泳约30 min，待样品进入分离胶后，调整电压为120 V继续电泳。电泳结束后，在300 mA电流下转膜。使用5%脱脂奶粉封闭液，室温封闭1 h。按照1∶1 000稀释一抗，涂于PVDF膜表面，在4℃冰箱过夜。次日用TBST洗膜3次，每次10 min。加入1∶2 500稀释的二抗室温封闭1 h。再次用TBST洗膜，使用化学发光凝胶成像仪曝光。使用Image J 1.8.0软件对光密度值进行分析，蛋白相对表达量为目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.3 统计学分析

所有数据均以采用SPSS 22.0进行分析，使用Means±SD表示，组间统计学差异采用one-way ANOVA和LSD法检验，检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 转染后的RLE-6TN细胞中*MRAK050699*的mRNA表达水平

敲减组MRAK050699的表达水平相比敲减对照组明显下调，转染效率约为50%，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。与敲减对照组相比，正常组*MRAK050699*的mRNA表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.2 SiO_2粉尘对NR8383细胞活力的影响

不同剂量SiO_2粉尘刺激NR8383细胞，随着粉尘刺激剂量的增加，细胞的存活率出现不同程度降低，10、20、40、80、160、320 μg·cm^{-2}组细胞存活率分别为（91.2±0.25）%、（76.55±3.46）%、（59.00±1.61）%、（26.46±0.89）%、（24.37±3.20）%、（38.25±1.89）%。SiO_2粉尘剂量在40 μg·cm^{-2}时，细胞活力下降较为明显且可保证后续实验的有效进行。其他染尘组与40 μg·cm^{-2}组相比，差异均有统计学意义（$P<0.01$）。

2.3 NR8383细胞上清液中TGF-β含量

粉尘剂量在40 μg·cm^{-2}时，NR8383细胞上清中TGF-β蛋白的表达水平较高，是对照组0 μg·cm^{-2}的2.94倍，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

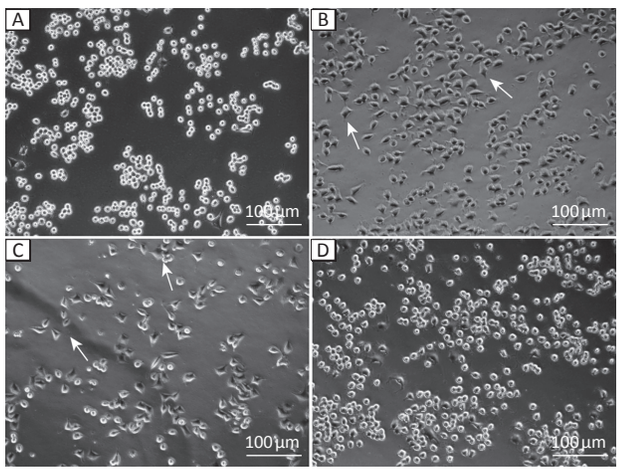
2.4 SiO_2粉尘刺激共培养体系后引起RLE-6TN细胞的形态变化

从图1中可以看出正常组的细胞呈现典型的上皮样特征，为多边形、卵圆形且紧密连接。模型组细胞呈现间质样细胞形态，表现为长梭形、纺锤形，并且细胞间隙变宽。敲减对照组与模型组类似，呈现间质细胞形态。而敲减组细胞基本处于紧密连接状态。

2.5 RLE-6TN细胞中*E-cadherin*、*N-cadherin*、*α-SMA*的mRNA表达水平

各组上述基因的表达差异均有统计学意义（F=28.11、35.72、15.26，$P<0.05$）。模型组的*E-cadherin*、*N-cadherin*、*α-SMA*的mRNA表达水平分别是正常组的32%，以及2.28、2.74倍，差异有统计学意义（$P<0.05$）。相较于敲减对照组，敲减组*E-cadherin* mRNA表达水平上升，而*N-cadherin*、*α-SMA*的mRNA表达水平下降，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。模型组与敲

减对照组的各基因mRNA表达水平差异无统计学意义（P>0.05）。见图2。

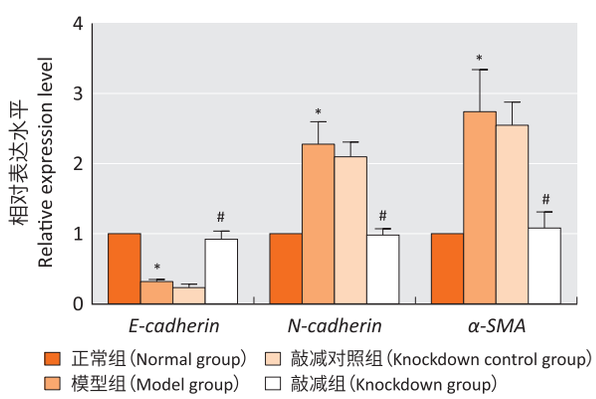


［注］A：正常组；B：模型组；C：敲减对照组；D：敲减组。白色箭头所指为典型的上皮细胞分化后的形态。

［Note］A: Normal group; B: Model group; C: Knockdown control group; D: Knockdown group. The white arrows indicate the typical morphology of epithelial cells after differentiation.

图1 40 μg·cm^{-2}的SiO_2粉尘刺激共培养体系后RLE-6TN细胞形态

Figure 1 Morphology of RLE-6TN cells after 40 μg·cm^{-2} SiO_2 dust stimulation



［注］*：与正常组相比，P<0.05；#：与敲减对照组相比，P<0.05。

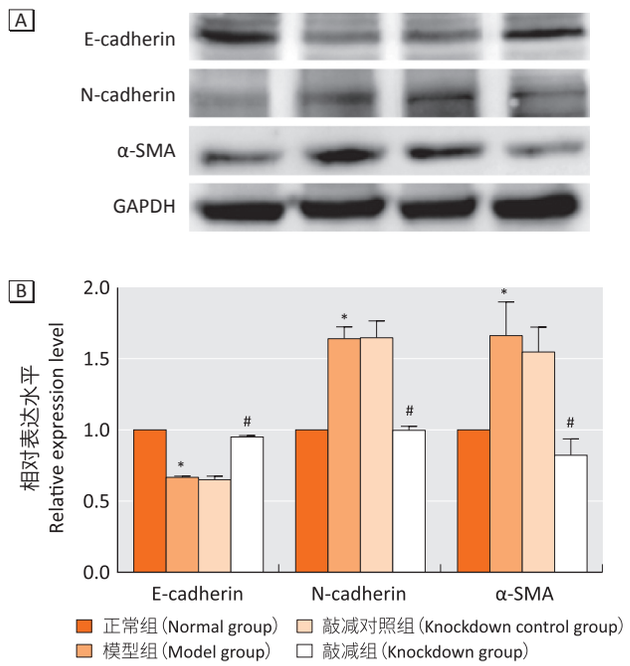
［Note］*: Compared with the normal group, P<0.05; #: Compared with the knockdown control group, P<0.05.

图2 40 μg·cm^{-2}的SiO_2粉尘刺激共培养体系后RLE-6TN细胞各组基因相对表达水平

Figure 2 Relative expression levels of selected genes in each group of RLE-6TN cells after 40 μg·cm^{-2} SiO_2 dust stimulation

2.6 RLE-6TN细胞中E-cadherin、N-cadherin、α-SMA的蛋白表达水平

各组上述蛋白的表达水平均有统计学意义（F=328.78、51.84、13.39，P<0.05）。模型组的E-cadherin、N-cadherin、α-SMA的蛋白表达水平分别是正常组的67%，以及1.64、1.66倍，差异有统计学意义（P<0.05）。敲减组相较于敲减对照组，E-cadherin蛋白表达水平上升，而N-cadherin、α-SMA的蛋白表达水平下降，差异均有统计学意义（P<0.05）。模型组与敲减对照组的各蛋白表达水平差异无统计学意义（P>0.05）。见图3。



［注］*：与正常组相比，P<0.05；#：与敲减对照组相比，P<0.05。

［Note］*: Compared with the normal group, P<0.05; #: Compared with the knockdown control group, P<0.05.

图3 40 μg·cm^{-2}的SiO_2粉尘刺激共培养体系后RLE-6TN细胞各组蛋白相对表达水平

Figure 3 Relative expression levels of selected proteins in each group of RLE-6TN cells after 40 μg·cm^{-2} SiO_2 dust stimulation

3 讨论

在矽肺的致病机制中，EMT过程占据重要地位。EMT是一种细胞生物学过程，在此过程中细胞失去上皮细胞特性而获得间充质细胞的特征[14]，肺泡Ⅱ型上皮细胞是肌成纤维细胞的重要来源[15]。有研究表明，SiO_2诱导的矽肺大鼠模型中有682个lncRNAs的表达谱发生改变[16]。lncRNA Loc103691771的异常表达与矽肺的发生发展有关[17]。Qian等[18]的研究发现lncRNAZEB1 ZEB1-AS1在大鼠肺纤维化组织和TGF-β1诱导的RLE-6TN细胞中表达上调。而据本课题组前期研究发现在矽肺模型组大鼠中确实存在大量差异表达的lncRNA，其中MRAK050699是明显上调的。那么上调的MRAK050699是否会在TGF-β诱导EMT过程中发挥作用？

肺泡巨噬细胞在维持肺内免疫稳态和宿主防御中起主要作用，粉尘进入呼吸道首先与巨噬细胞接触[19]。因此，建立肺泡巨噬细胞与肺泡Ⅱ型上皮细胞

共培养体系，可以更好地模拟矽肺体内细胞环境。同时对RLE-6TN细胞转染敲减的MRAK050699慢病毒，使MRAK050699在细胞中的表达降低，以此检测EMT的相关因子，验证MRAK050699在SiO_2粉尘诱导大鼠II型肺泡上皮细胞发生EMT过程中是否有影响。

据此次研究结果显示，NR8383细胞在40 μg·cm^{-2}时活力下降明显；同时TGF-β表达水平较高。将共培养模型中的RLE-6TN细胞置于显微镜下观察，结果显示正常组的细胞呈现典型的上皮样特征，模型组细胞与敲减对照组类似，失去了上皮表型获得了间充质细胞的表型特征，而敲减组细胞的间充质细胞表型特征不明显[20]。以上结果提示体外矽肺模型建立成功。与正常组相比，模型组*E-cadherin*基因及蛋白的表达水平均降低，*N-cadherin*、*α-SMA*基因及蛋白的表达水平均升高，提示RLE-6TN细胞发生了EMT过程。在转染了敲减MRAK050699的慢病毒后，相较于敲减对照组，敲减组*E-cadherin*基因及蛋白的表达水平均升高，*N-cadherin*、*α-SMA*基因及蛋白的表达水平均降低，提示低表达的MRAK050699可减缓TGF-β诱导RLE-6TN细胞的EMT过程。与模型组相比，转染了阴性对照病毒的敲减对照组中各因子的mRNA和蛋白表达水平均无差异，证明转染的阴性对照病毒未在RLE-6TN细胞发生EMT过程中造成影响。

以上结果显示，在粉尘刺激NR8383细胞后，NR8383细胞分泌出的致纤维化的因子会导致RLE-6TN细胞发生EMT过程，抑制E-cadherin，增强N-cadherin的表达，使上皮细胞转化为大量表达α-SMA阳性的肌成纤维细胞[21]。据前期芯片结果显示差异表达的MRAK050699是与TGF-β1型受体相关的lncRNA，前期结果也已验证lncRNA MRAK050699表达水平上调，介导了TGF-β1型受体的上调和TGF-β信号通路的激活。MRAK050699的敲减使得肺泡上皮细胞中TGF-β1型受体较敲减对照组减少，TGF-β作用于RLE-6TN时，由于受体减少，TGF-β与受体结合也相应减少，因此一定程度上减弱了TGF-β诱导EMT过程。但是矽肺的发病机制十分复杂，lncRNA在其间的作用网络至今未明确，本研究仅通过体外细胞实验验证了MRAK050699影响了EMT相关因子的表达。MRAK050699在矽肺发病机制网络中的具体作用机制还需更深入的研究。

参考文献

[1] LEUNG CC，YU IT，CHEN W. Silicosis [J]. Lancet，2012，379（9830）：2008-2018.

[2] HOO ZH，WHYTE MK. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Thorax，2012，67（8）：742-746.

[3] YANG Z，JIANG S，SHANG J，et al. LncRNA：shedding light on mechanisms and opportunities in fibrosis and aging [J]. Ageing Res Rev，2019，52：17-31.

[4] 孙林清，王发选，周倩文，等. 转化生长因子-β1对肺成纤维细胞中*lncRNA-ATB*和纤维化因子mRNA水平的影响[J]. 环境与职业医学，2019，36（3）：261-265.
SUN LQ，WANG FX，ZHOU QW，et al. Effects of transforming growth factor-β1 on mRNA expression levels of *lncRNA-ATB* and fibrosis factors in pulmonary fibroblasts [J]. J Environ Occup Med，2019，36（3）：261-265.

[5] WILUSZ JE，SUNWOO H，SPECTOR DL. Long noncoding RNAs：functional surprises from the RNA world [J]. Genes Dev，2009，23（13）：1494-1504.

[6] KEENAN CR，SCHULIGA MJ，STEWART AG. Pro-inflammatory mediators increase levels of the noncoding RNA GAS5 in airway smooth muscle and epithelial cells [J]. Can J Physiol Pharmacol，2015，93（3）：203-206.

[7] CHEN J，YAO Y，SU X，et al. Comparative RNA-Seq transcriptome analysis on silica induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice silicosis model [J]. J Appl Toxicol，2018，38（5）：773-782.

[8] 高芳瑜，周倩文，田娣，等. TGF-β受体阻断剂SB431542对SiO_2粉尘诱导矽肺纤维化大鼠相关转录因子表达的影响[J]. 环境与职业医学，2020，37（7）：706-711.
GAO FY，ZHOU QW，TIAN D，et al. Effect of TGF-β receptor blocker SB431542 on expression of related transcription factors in rats with silicosis induced by SiO_2 dust [J]. J Environ Occup Med，2020，37（7）：706-711.

[9] WILSON MM，WEINBERG RA，LEES JA，et al. Emerging mechanisms by which EMT programs control stemness [J]. Trends Cancer，2020，6（9）：775-780.

[10] XU X，DAI H，WANG C. Epithelium-dependent profibrotic milieu in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis：current status and future directions [J]. Clin Respir J，2016，10（2）：133-141.

[11] LOH CY，CHAI JY，TANG TF，et al. The E-Cadherin and N-Cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition：signaling，therapeutic implications，and challenges [J]. Cells，2019，8（10）：1118.

[12] ANGELINI A，TRIAL J，ORTIZ-URBINA J，et al. Mechanosensing dysregulation in the fibroblast：a hallmark of the aging heart [J]. Ageing Res Rev，2020，63：101150.

[13] YOSHIDA GJ. Regulation of heterogeneous cancer-associated fibroblasts：the molecular pathology of activated signaling pathways [J]. J Exp Clin Cancer Res，2020，39 (1)：112.

[14] BAKIR B，CHIARELLA A M，PITARRESI J R，et al. EMT，MET，plasticity，and tumor metastasis [J]. Trends Cell Biol，2020，30 (10)：764-776.

[15] 邓海静，李世峰，孙月，等. Ac-SDKP 在抑制人肺泡 II 型上皮细胞向肌成纤维细胞分化中的作用 [J]. 环境与职业医学，2015，32 (2)：113-117.
DENG HJ，LI SF，SUN Y，et al. Effects of Ac-SDKP on epithelial-mesenchymal transition of human type Ⅱ alveolar epithelial cells [J]. J Environ Occup Med，2015，32 (2)：113-117.

[16] SAI L，YU G，BO C，et al. Profiling long non-coding RNA changes in silica-induced pulmonary fibrosis in rat [J]. Toxicol Lett，2019，310：7-13.

[17] CAI W，XU H，ZHANG B，et al. Differential expression of lncRNAs during silicosis and the role of LOC103691771 in myofibroblast differentiation induced by TGF-β1 [J]. Biomed Pharmacother，2020，125：109980.

[18] 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.

[19] DU S，LI C，LU Y，et al. Dioscin alleviates crystalline silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis through promoting alveolar macrophage autophagy [J]. Theranostics，2019，9 (7)：1878-1892.

[20] WANG Y，LIANG D，ZHU Z，et al. Bone morphogenetic protein-7 prevented epithelial-mesenchymal transition in RLE-6TN cells [J]. Toxicol Res，2016，5 (3)：931-937.

[21] TA W. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. J Pathol，2008，214 (2)：199-210.

（**英文编辑**：汪源；**责任编辑**：王晓宇）

（上接第 230 页）

[44] PUGEAT M，NADER N，HOGEVEEN K，et al. Sex hormone-binding globulin gene expression in the liver：drugs and the metabolic syndrome [J]. Mol Cell Endocrinol，2010，316 (1)：53-59.

[45] KONG D，ZHANG J，HOU X，et al. Acetamiprid inhibits testosterone synthesis by affecting the mitochondrial function and cytoplasmic adenosine triphosphate production in rat Leydig cells [J]. Biol Reprod，2017，96 (1)：254-265.

[46] ZHANG JJ，WANG Y，XIANG H Y，et al. Oxidative stress：role in acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system [J]. Agric Sci China，2011，10 (5)：786-796.

[47] HAFEZ E M，ISSA S Y，Al-MAZROUA M K，et al. The neonicotinoid insecticide imidacloprid：a male reproductive system toxicity inducer-human and experimental study [J]. J Toxicol，2016，2 (1)：1-8.

[48] JOHANNSEN T H，MAIN K M，LJUBICIC M L，et al. Sex differences in reproductive hormones during mini-puberty in infants with normal and disordered sex development [J]. J Clin Endocrinol Metab，2018，103 (8)：3028-3037.

[49] AGIRBASLI M，AGAOGLU N B，ORAK N，et al. Sex hormones and metabolic syndrome in children and adolescents [J]. Metabolism，2009，58 (9)：1256-1562.

（**英文编辑**：汪源；**责任编辑**：陈姣）