实验研究
Experiment

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

孙林清，王发选，周倩文，李玲

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.2019.18591

摘要：

[目的] 研究转化生长因子（TGF）-β1刺激肺成纤维细胞MRC-5后被TGF-β活化的长链非编码RNA（*lncRNA-ATB*）和Ⅰ型胶原蛋白（*Col Ⅰ*）、Ⅲ型胶原蛋白（*Col Ⅲ*）以及纤连蛋白（*FN*）等纤维化因子基因mRNA水平的变化及其相关性。

[方法] 将成纤维细胞株MRC-5以5×10^{3}个/孔的密度种于96孔板中，分别经浓度为0、2.5、5.0、10.0 ng/mL的TGF-β1刺激24 h后，通过MTT法测定细胞增殖活性，采用实时荧光定量PCR法检测MRC-5细胞中*lncRNA-ATB*、*Col Ⅰ*、*Col Ⅲ*、*FN*的mRNA相对水平。采用Spearman秩相关检验分析*lncRNA-ATB*与*Col Ⅰ*、*Col Ⅲ*、*FN* 3个基因mRNA相对水平之间的相关性。

[结果] 随着TGF-β1刺激浓度的增加，MRC-5细胞增殖活性增高，5.0、10.0 ng/mL组的细胞增殖活性分别是0 ng/mL组的1.07倍和1.12倍（$P<0.05$）。随TGF-β1浓度的增加，2.5、5.0、10.0 ng/mL组中*FN*的mRNA水平分别是0 ng/mL组的2.11倍（$P=0.018$）、3.58倍（$P=0.03$）和6.51倍（$P<0.01$）；2.5、5.0、10.0 ng/mL组中*Col Ⅰ*的mRNA水平分别是0 ng/mL组的1.28倍（$P=0.324$）、4.64倍（$P<0.01$）和3.97倍（$P<0.01$）；2.5、5.0、10.0 ng/mL组中*Col Ⅲ*的mRNA水平分别是0 ng/mL组的1.21倍（$P=0.400$）、1.42倍（$P=0.120$）和4.23倍（$P<0.01$）。2.5、5.0、10.0 ng/mL组中*lncRNA-ATB*的mRNA水平分别是0 ng/mL组的1.80倍（$P=0.073$）、3.57倍（$P<0.01$）和4.55倍（$P<0.01$）。此外，相关性分析结果显示，*lncRNA-ATB*与*FN*（$r=0.86$）、*Col Ⅰ*（$r=0.85$）和*Col Ⅲ*（$r=0.82$）的mRNA相对水平呈正相关关系（均$P<0.05$）。

[结论] TGF-β1可刺激成纤维细胞增殖，升高*lncRNA-ATB*、*Col Ⅰ*、*Col Ⅲ*、*FN*的mRNA相对水平。*lncRNA-ATB*与纤维化因子的表达呈正相关，提示其可能与肺纤维化的发生有关。

关键词：长链非编码RNA；转化生长因子-β1；纤维化；Ⅰ型胶原蛋白；Ⅲ型胶原蛋白；纤连蛋白

Effects of transforming growth factor-β1 on mRNA expression levels of *lncRNA-ATB* and fibrosis factors in pulmonary fibroblasts

SUN Lin-qing, WANG Fa-xuan, ZHOU Qian-wen, LI Ling (*School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia* 750004, *China*)

Abstract:

[Objective] To study the changes of mRNA expression levels of long non-coding RNA activated by transforming growth factor β (*lncRNA-ATB*), collagen type Ⅰ (*Col Ⅰ*), collagen type Ⅲ (*Col Ⅲ*) and fibronectin (*FN*) in lung fibroblasts MRC-5 stimulated by transforming growth factor (TGF)-β1.

[Methods] The fibroblast cell line MRC-5 was seeded in a 96-well plate at a density of 5×10^3 cells/well, and stimulated by TGF-β1 at concentrations of 0, 2.5, 5.0, and 10.0 ng/mL for 24 h. The proliferation activity was measured by MTT method, and the relative mRNA levels of *lncRNA-ATB*, *Col Ⅰ*, *Col Ⅲ*, and *FN* in stimulated MRC-5 cells were detected by real-time quantitative PCR. Spearman rank correlation test was used to assess the correlations of *lncRNA-ATB* mRNA levels with *Col Ⅰ*, *Col Ⅲ*, and *FN* mRNA levels.

[Results] With the increasing of TGF-β1 dose, the proliferation activity of MRC-5 cells increased, and the cell proliferation activities of the 5.0 and 10.0 ng/mL groups were 1.07 and 1.12 times of the 0 ng/mL group ($P<0.05$). With the increasing of TGF-β1 dose, the mRNA levels of *FN* in the 2.5, 5.0, and 10.0 ng/mL groups were 2.11 ($P=0.018$), 3.58 ($P=0.03$), and 6.51 ($P<0.01$) times of the 0 ng/mL group, respectively; the mRNA levels of *Col Ⅰ* in the 2.5, 5.0, and 10.0 ng/mL groups were 1.28 ($P=0.324$), 4.64 ($P<0.01$), and 3.97 ($P<0.01$) times of the 0 ng/mL group, respectively; the mRNA levels of *Col Ⅲ* in the 2.5, 5.0, and 10.0 ng/mL groups were 1.21 ($P=0.400$), 1.42 ($P=0.120$),

基金项目
国家自然科学基金项目（81660534）

作者简介
孙林清（1992—），女，硕士生；
E-mail：sunlinq407@163.com

通信作者
李玲，E-mail：zhuoran1126@163.com

利益冲突 无申报
收稿日期 2018-09-14
录用日期 2018-12-31

文章编号 2095-9982(2019)03-0261-05
中图分类号 R135
文献标志码 A

▸引用
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.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18591

Funding
This study was funded.

Correspondence to
LI Ling, E-mail: zhuoran1126@163.com

Competing interests None declared
Received 2018-09-14
Accepted 2018-12-31

▸To cite
SUN Lin-qing, WANG Fa-xuan, ZHOU Qian-wen, et al. Effects of transforming growth factor-β1 on mRNA expression levels of *lncRNA-ATB* and fibrosis factors in pulmonary fibroblasts[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(3): 261-265.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18591

and 4.23 ($P<0.01$) times of the 0 ng/mL group, respectively; the mRNA levels of *lncRNA-ATB* in the 2.5, 5.0, 10.0 ng/mL groups were 1.80 ($P=0.073$), 3.57 ($P<0.01$), and 4.55 ($P<0.01$) times of the 0 ng/mL group, respectively. The results of correlation analysis showed that the mRNA level of *lncRNA-ATB* was positively correlated with the mRNA levels of *FN* ($r=0.86$), *Col I* ($r=0.85$) and *Col III* ($r=0.82$) ($Ps<0.05$).

[Conclusion] TGF-β1 could stimulate cell proliferation of fibroblasts, and increase the relative mRNA levels of *lncRNA-ATB*, *Col I*, *Col III*, and *FN*. *LncRNA-ATB* is positively correlated with *Col I*, *Col III*, and *FN*, suggesting that it may be related to the occurrence of pulmonary fibrosis.

Keywords: long non-coding RNA; transforming growth factor β1; fibrosis; collagen type I; collagen type III; fibronectin

肺纤维化是一类以肺间质慢性非特异性炎症、细胞外基质沉积、肺组织结构破坏以及异常重塑为主要病理特征的不可逆性疾病[1-3]，是多种肺部疾病的共同结局。目前肺纤维化的病因及发病机制均不明确，多认为与吸烟、大气中各种粉尘（如游离二氧化硅粉尘）、农药（如百草枯）暴露，以及一些药物如博来霉素的使用有关。肺纤维化患者的生存期中位数仅2~5年，5年生存率仅有20%[4]。肺移植是肺纤维化终末期患者治疗的唯一办法。因此，深入开展肺纤维化机制研究，对于提高肺纤维化的诊治水平具有重要意义。

多年来人们对肺纤维化机制进行了深入研究，发现多种细胞因子参与了肺纤维化过程。转化生长因子（transforming growth factor，TGF）-β是肺纤维化中公认的主要的促纤维化细胞因子之一，活化的TGF-β所介导的促纤维化作用包括上皮细胞凋亡、上皮-间质转化、细胞外基质产生和成纤维细胞分化为肌成纤维细胞[4]。I型胶原蛋白（collagen I，Col I）和III型胶原蛋白（collagen III，Col III）是细胞外基质的主要成分[5]，上皮-间质转化会造成纤连蛋白（fibronectin，FN）增多[6]，在纤维化研究中常把这3种纤维化因子作为纤维化的指标。在TGF-β亚型中，TGF-β1致纤维化能力最强[7]。TGF-β1能介导纤维化因子增加，若抑制这一过程，可能对肺纤维化过程有一定的抑制作用。

随着转录组学的发展，人们越来关注非编码RNA在基因转录和蛋白合成调控中的作用研究，非编码RNA是指不编码蛋白质的RNA。研究比较多的有微小RNA、环状RNA和长链非编码RNA（long non-coding RNA，lncRNA）等。其中，lncRNA种类繁多且生物学功能复杂，能与不同的分子相互作用，参与细胞核染色质结构的调控、mRNA的转录及转录后的加工运输、蛋白质的翻译等过程。已有研究证实lncRNA在肺纤维化中发挥着重要作用[8]。Ma等[9]研究中发现被TGF-β活化的长链非编码RNA（long non-coding RNA activated by transforming growth factor β，lncRNA-ATB）的表达在煤工尘肺患者血液中上调，并与煤工尘肺患者中的TGF-β1量呈正相关。lncRNA-ATB是否在肺纤维中发挥着作用，值得关注。

本研究用不同浓度的TGF-β1刺激肺成纤维细胞，观察细胞中*lncRNA-ATB*及*Col I*、*Col III*以及*FN*的mRNA水平的变化，及*lncRNA-ATB*与*Col I*、*Col III*和*FN*的mRNA水平之间的关系，探讨TGF-β1在肺纤维化中发挥的作用以及lncRNA-ATB与肺纤维化之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肺成纤维细胞株MRC-5（中国科学院上海细胞库），高糖DMEM、胰酶（美国GIBCO公司），胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）（美国BI公司），TGF-β1（美国R&D公司），MTT试剂盒（南京凯基生物科技发展有限公司），OMEGA Total RNA提取试剂盒（上海索莱宝公司），PrimeScript™ RT Reagent Kit反转录试剂盒（美国Takara公司）和SYBR Premix EX Taq实时荧光定量试剂盒（大连宝生物公司），CFx connect Dptic Module荧光定量PCR仪（美国Bio-Rad公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和形态观察 用含10% FBS和1%双抗的高糖DMEM培养基，于37°C、5%（体积分数）CO_2细胞培养箱中培养MRC-5细胞，用0.25%的胰酶进行细胞传代。采用荧光倒置显微镜观察细胞形态。

1.2.2 MTT法检测细胞增殖活性 取生长状态良好的对数生长期细胞，加入培养基制成均匀细胞悬液，以5×10^3个/孔的密度种入96孔板中，每组设6个复孔，培养24 h后改换无血清的培养基处理12 h，用不同浓度的TGF-β1处理，根据MTT检测试剂盒说明书对细胞活性进行检测，最终以终浓度分别为0、2.5、5.0、10.0 ng/mL的TGF-β1（溶剂为高糖DMEM培养基）刺激细胞，培养24 h。每孔加入20 μL浓度为5 mg/mL的MTT，培养4 h后每孔加入150 μL二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO），用酶标仪测定490 nm处的光密度

（*D*）。通过下式计算细胞增殖活性：细胞增殖活性=[（$D_{实验组}-D_{空白组}$）/（$D_{对照组}-D_{空白组}$）]×100%。

1.2.3 总RNA提取 严格按照OMEGA Total RNA提取试剂盒说明书提取总RNA。

1.2.4 逆转录反应合成cDNA 严格按照PrimeScript™ RT Reagent Kit说明书合成cDNA模板。按照试剂盒说明书在冰上配制反应体系，终体系为10 μL。混匀后，放入PCR仪中37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s。所得各组cDNA样本于-80 ℃保存。

1.2.5 实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative real-time PCR，qPCR） 取上述已合成cDNA进行荧光定量PCR反应。扩增程序为：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火、延伸30 s，40个循环；95 ℃ 10 s，65 ℃ 5 s，95 ℃ 5 s，测定熔解曲线。以*β-actin*作为内参，目的基因的相对含量用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。引物序列见表1。

表1 目的基因及内参基因的引物序列

基因名称	正向引物（5′-3′）	反向引物（5′-3′）
β-actin	GACTACCTCATGAAGATCCTCACC	TCTCCTTAATGTCACGCACGATT
lncRNA-ATB	CTTCACCAGCACCCAGAGA	AAGACAGAAAAACAGTTCCGAGTC
Col I	CCCTGGAATGAAGGGACACA	CACCATTTCCACGAGCA
Col III	CCTTCGACTTCTCTCCAGCC	TTTCGTGCAACCATCCTCCA
FN	TTACCGTGGGCAACTCTGTC	GTGTAGGGGTCAAAGCACGA

1.3 统计学方法

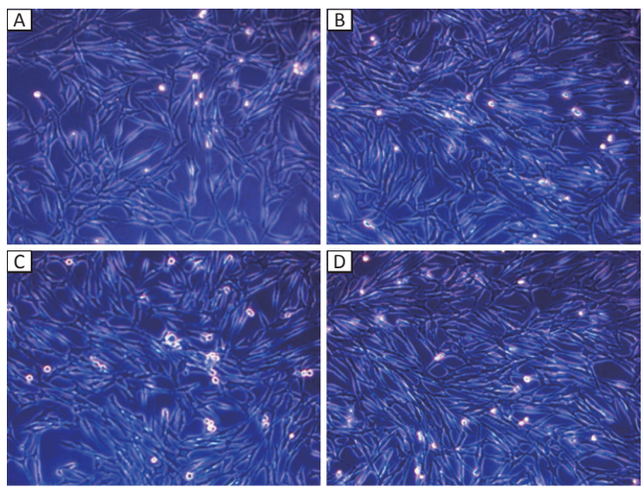
数据分析采用SPSS 22.0统计软件，作图采用Graphpad 7.0软件，数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，各组间细胞增殖活性和mRNA相对水平的比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK法。相关性分析采用Spearman秩相关检验。检验水准为α=0.05。

2 结果

2.1 细胞增殖

图1为MRC-5细胞经不同浓度TGF-β1刺激24 h后的细胞形态学变化。随着TGF-β1浓度的增加，细胞呈梭形且细胞间连接逐渐紧密，单位面积内细胞数目也有增加，细胞增殖明显。

图2显示，0 ng/mL组细胞相对增殖活性为0.95±0.06，与2.5 ng/mL组（0.95±0.05）相比并无明显差异，而5.0 ng/mL组和10.0 ng/mL组的相对增殖活性是0 ng/mL组的1.07倍（*P*=0.046）和1.12倍（*P*=0.002）；且随着刺激剂量的增加，细胞增殖活性呈上升趋势（*r*=0.95，*P*=0.047）。



[注] A：0 ng/mL；B：2.5 ng/mL；C：5.0 ng/mL；D：10.0 ng/mL。

图1 不同浓度TGF-β1对MRC-5细胞形态影响（×200）

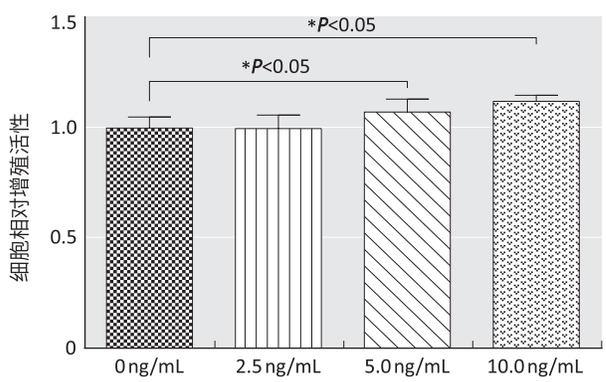
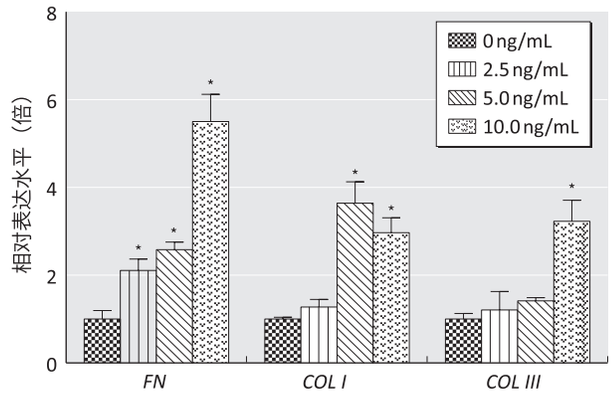


图2 不同浓度TGF-β1对MRC-5细胞增殖的影响

2.2 *lncRNA-ATB*、*FN*、*Col I*和*Col III*的mRNA水平

不同浓度TGF-β1刺激24 h后，MRC-5细胞中*lncRNA-ATB*的mRNA相对水平差异具有统计学意义（*F*=6.89，*P*=0.01）。其中2.5、5.0、10.0 ng/mL组的*lncRNA-ATB* mRNA相对水平分别是0 ng/mL组的1.80倍（*P*=0.073）、3.57倍（*P*<0.01）和4.55倍（*P*<0.01）。

图3为不同浓度TGF-β1刺激对MRC-5细胞中*FN*、*Col I*和*Col III*的mRNA相对水平的影响结果，不同剂量TGF-β1刺激后细胞中*FN*、*Col I*和*Col III* mRNA相对水平均有所改变（*F*=52.48、47.94、36.55，均有*P*<0.05）。对于*FN*，2.5、5.0、10.0 ng/mL组是0 ng/mL组的2.11倍（*P*=0.018）、3.58倍（*P*=0.003）和6.51倍（*P*<0.01）；对于*Col I*，2.5、5.0、10.0 ng/mL组是0 ng/mL组的1.28倍（*P*=0.324）、4.64倍（*P*<0.01）和3.97倍（*P*<0.01）；对于*Col III*，2.5、5.0、10.0 ng/mL组是0 ng/mL组的1.21倍（*P*=0.400）、1.42倍（*P*=0.120）和4.23倍（*P*<0.01）。



［注］*：与对照组（0 ng/mL）相比，$P<0.05$。

图3　不同剂量TGF-β1刺激对MRC-5细胞中*FN*、*Col I*和*Col III* mRNA相对水平的影响

2.3　*lncRNA-ATB*与*FN*、*Col I*和*COL III*的mRNA水平的相关性分析

Spearman秩相关检验结果显示，*lncRNA-ATB*的mRNA相对水平与*FN*（r=0.86，P=0.000）、*Col I*（r=0.85，P=0.001）、*Col III*（r=0.82，P=0.001）的mRNA相对水平均呈正相关。

3　讨论

目前有关肺纤维化的发病机制，普遍认为与肺泡上皮细胞受损后的异常修复反应有关。TGF-β1作为重要的致纤维化因子[10]，可促进成纤维细胞迁移和增殖，加速*FN*、胶原蛋白等细胞外基质的过度分泌[11]，正常肺组织逐渐被细胞外基质取代，进而导致肺实变，目前尚无任何有效的治疗手段。

本研究中，采用不同浓度TGF-β1刺激成纤维细胞，实时荧光定量PCR技术检测细胞中*FN*、*Col I*和*Col III*的mRNA相对水平。结果发现TGF-β1刺激后，MRC-5细胞中*Col I*、*Col III*和*FN*的mRNA相对水平随着TGF-β1浓度的增高逐步增高，这与文献报道一致[12]。本研究结果表明，TGF-β1刺激后*FN*、*Col I*和*Col III*的mRNA水平增高，提示TGF-β1在肺纤维化发生发展中发挥重要作用。

如何利用分子生物学手段干预这些致纤维化因子，进而干预肺纤维化进程，成为目前肺纤维化研究的重大挑战。随着转录组学研究的不断深入，lncRNA逐渐进入人们的视野，lncRNA是指长度大于200nt的长链非编码RNA，本身不编码蛋白质，以RNA的形式调控基因的表达[13]。研究表明，lncRNA可参与表观遗传调控、转录调控和转录后调控，在多种疾病发生发展中发挥着重要的作用[14]。lncRNA在肺纤维化过程中可以发挥一定的调节作用，例如沉默lncRNA cd99p1能够抑制肺成纤维细胞的增殖，而敲除lncRNA n341773可以增加肺成纤维细胞胶原的表达[15]。lncRNA-ATB是被TGF-β激活的lncRNA[16]，是TGF-β信号通路中的关键调节因子，与多种疾病密切相关。研究表明丙型肝炎病毒相关肝纤维化患者肝组织和血浆样本中的lncRNA-ATB高表达，同时血浆lncRNA-ATB水平与肝纤维化分期显著相关[17]。Yuan等[16]研究表明lncRNA-ATB在肝细胞癌的TGF-β信号传导中发挥重要作用，Ke等[18]研究结果显示lncRNA-ATB在肺癌组织中表达增高，且lncRNA-ATB表达上调能促进细胞凋亡、分化、迁移和侵袭。因此考虑lncRNA-ATB在肺成纤维细胞中是否具有相似的作用，从而影响肺纤维化的过程。

在此次研究中，用不同浓度的TGF-β1刺激MRC-5细胞，采用实时荧光定量PCR技术测定细胞中*lncRNA-ATB*的mRNA相对水平。研究结果表明，不同浓度TGF-β1刺激后，MRC-5细胞中的*lncRNA-ATB*的mRNA相对水平随剂量的增加而增加。而且，通过相关性分析发现，*lncRNA-ATB*分别与*FN*、*Col I*和*Col III*的mRNA相对水平有正相关关系。综上所述，本研究结果表明，TGF-β1刺激后*lncRNA-ATB*的表达上调，同时*FN*、*Col I*和*Col III*的表达升高，可能造成细胞外基质的过度沉积，提示*lncRNA-ATB*在促进细胞纤维化过程中发挥作用。

由于lncRNA在体内调控方式多样，机制复杂，很难明确lncRNA到底通过何种方式在体内发挥重要作用。本次研究并未涉及更深层次的机制研究，到底lncRNA-ATB在成纤维细胞中如何引起*FN*、*Col I*和*Col III* mRNA相对水平升高，参与肺纤维化过程，需要通过进一步的实验进行验证探索。

参考文献

［1］PRASSE A. Idiopathic pulmonary fibrosis［J］. Pneumologie，2015，69（10）：608-614.

［2］FRASER E，HOYLES R K. Therapeutic advances in idiopathic pulmonary fibrosis［J］. Clin Med，2016，16（1）：42-51.

［3］ELMUFDI F，HENKE C A，PERLMAN D M，et al. Novel mechanisms and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis［J］. Discov Med，2015，20（109）：145-153.

［4］SCOTTON C J，CHAMBERS R C. Molecular targets in pulmonary fibrosis：the myofibroblast in focus［J］. Chest，2007，132（4）：1311-1321.

[5] 刘理静，于小华，张平. 白藜芦醇通过TGF-β1/ADAMTS-1信号通路抑制肺纤维化 [J]. 中国药理学通报，2013，29（3）：425-431.

[6] HAN Q，LIN L，ZHAO B，et al. Inhibition of mTOR ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating epithelial-mesenchymal transition [J]. Biochem Biophys Res Commun，2018，500（4）：839-845.

[7] NAKAMUTA M，KOTOH K M，ENJOJI M，et al. Effects of fibril- or fixed-collagen on matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 production in the human hepatocyte cell line HLE [J]. World J Gastroenterol，2005，11（15）：2264-2268.

[8] 郭慧，郝小燕，刘学军. 长链非编码RNA在特发性肺纤维化中的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18（34）：50-49，52.

[9] MA J，CUI X，YI R，et al. Plasma LncRNA-ATB，a Potential biomarker for diagnosis of patients with coal workers' pneumoconiosis：a case-control study [J]. Int J Mol Sci，2016，17（8）：1367.

[10] 屈艳，张崇，贾岩龙，等. 大黄酸通过抑制miR-21而干预TGF-β1/Smad通路并减轻博莱霉素所致大鼠肺纤维化 [J]. 中国病理生理杂志，2017，33（1）：149-153.

[11] 刘成城，曾林祥. 细胞外基质在肺纤维化中作用的研究进展 [J]. 基础医学与临床，2018，38（5）：116-120.

[12] 王凯，刘志宏，王和静，等. 氧化铍致大鼠肺纤维化及相关指标的动态变化 [J]. 环境与职业医学，2016，33（7）：644-649.

[13] CALEY D P，PINK R C，TRUJILLANO D，et al. Long noncoding RNAs，chromatin，and development [J]. Sci World J，2014，10：90-102.

[14] SPIZZO R，ALMEIDA M I，COLOMBATTI A，et al. Long non-coding RNAs and cancer：a new frontier of translational research? [J]. Oncogene，2012，31（43）：4577-4587.

[15] HUANG C，YANG Y，LIU L. Interaction of long noncoding RNAs and microRNAs in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Physiol Genomics，2015，47（10）：463-469.

[16] YUAN J，YANG F，WANG F，et al. A long noncoding RNA activated by TGF-β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell，2014，25（5）：666-681.

[17] FU N，NIU X，WANG Y，et al. Role of LncRNA-activated by transforming growth factor beta in the progression of hepatitis C virus-related liver fibrosis [J]. Discov Med，2014，22（119）：29-42.

[18] KE L，XU S B，WANG J，et al. High expression of long non-coding RNA ATB indicates a poor prognosis and regulates cell proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer [J]. Clin Translat Oncol，2017，19（5）：599-605.

（**英文编辑**：汪源；**编辑**：陈姣；**校对**：童玲）