

TGF-β1 干预构建的人支气管上皮细胞上皮-间质转化模型中 lncRNA 和 miRNA 表达及其意义

陈华培 杨召川 李蕾 曲政海

(青岛大学附属医院儿科中心, 山东 青岛 266555)

[摘要] 目的 探讨人转化生长因子 β1 (TGF-β1) 干预构建的人支气管上皮细胞 16HBE 上皮-间质转化 (EMT) 模型中 lncRNA 和 miRNA 的表达情况。方法 体外培养 16HBE 细胞, 设立对照组和处理组。处理组以 TGF-β1 诱导细胞构建 EMT 细胞模型, 对照组加入等量 RPMI 基础培养液。分别于 TGF-β1 处理细胞后 24、48、72 h 使用倒置显微镜观察两组细胞形态及分布。当处理组细胞开始出现明显梭形改变时, 采用 RNA 分离、逆转录以及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法检测两组细胞中 lncRNA 和 miRNA 相对表达量。结果经 TGF-β1 处理细胞 48 h 后, 处理组细胞梭形改变明显, 细胞间隙增大, 显示 EMT 模型构建成功。同时在该时间点, 两组细胞中 *TBILA*、*NKILA*、*LNCRNA-ATB*、*HOTAIR*、*NEAT1*、*miR-125b-5p*、*miR-21-3p*、*miR-21-5p*、*miR-27a-3p*、*miR-27a-5p*、*miR-141-3p*、*miR-200c-3p*、*miR-17-5p*、*miR-34a-5p* 的相对表达量比较差异均具有显著意义 ($t = -16.353 \sim 6.460, P < 0.05$)。结论 TGF-β1 干预能够成功构建 EMT 细胞模型, 该细胞模型中的细胞与正常细胞相比, 多个 lncRNA 和 miRNA 表达具有显著差异。上述基因可能参与了 EMT 或气道重塑的形成和发展, 或许为这些疾病的防治提供分子理论支持。

[关键词] RNA, 长链非编码; 微 RNAs; 转化生长因子 β1; 上皮-间质转化; 上皮细胞; 气道重塑; 纤维化

[中图分类号] R329.25; R394 **[文献标志码]** A

EXPRESSION AND SIGNIFICANCE OF LONG NON-CODING RNAs AND MICRORNAs IN EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION MODEL OF HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS CONSTRUCTED BY TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA 1 INTERVENTION CHEN Huapei, YANG Zhaochuan, LI Lei, QU Zhenghai (Pediatric Center, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266555, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of long non-coding RNAs (lncRNAs) and microRNAs (miRNAs) in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) model of human bronchial epithelial cell line 16HBE induced by human transforming growth factor-β1 (TGF-β1). **Methods** 16HBE cells were cultured *in vitro*, and the experiment established control group and treatment group. The cells in the treatment group were induced by TGF-β1 to establish an EMT cell model, and those in the control group were added with an equal volume of RPMI basic culture medium. At 24, 48, and 72 h after TGF-β1 treatment, an inverted microscope was used to observe cell morphology and distribution. At the time point when the cells in the treatment group began to show obvious spindle-shaped changes, the methods of RNA separation, reverse transcription, and quantitative real-time PCR were used to measure the relative expression levels of lncRNAs and miRNAs in the two groups. **Results** After 48 h of TGF-β1 treatment, the cells in the treatment group showed obvious spindle-shaped changes and an increase in intercellular space, suggesting that the EMT model was successfully established. At this time point, there were significant differences between the two groups in the relative expression levels of *TBILA*, *NKILA*, *LNCRNA-ATB*, *HOTAIR*, *NEAT1*, *miR-125b-5p*, *miR-21-3p*, *miR-21-5p*, *miR-27a-3p*, *miR-27a-5p*, *miR-141-3p*, *miR-200c-3p*, *miR-17-5p*, *miR-34a-5p* ($t = -16.353 - 6.460, P < 0.05$). **Conclusion** TGF-β1 intervention can successfully establish the EMT cell model, and the differentially expressed lncRNAs and miRNAs between this cell model and normal cells may be involved in the formation and development of EMT or airway remodeling, which might provide a theoretical basis for the prevention and treatment of such diseases.

[KEY WORDS] RNA, long noncoding; MicroRNAs; Transforming growth factor beta1; Epithelial-mesenchymal transition; Epithelial cells; Airway remodeling; Fibrosis

上皮-间质转化 (EMT) 是一种不具有迁移能力的上皮细胞在各种原因诱发下, 失去上皮标志物、获得间质表型并转化为间质细胞, 致细胞形态呈长梭形改变, 并获得迁移能力的过程。其在组织发育、疾

病发生发展中发挥着重要作用^[1]。转化生长因子 β (TGF-β) 属于相关生长因子超家族一员, 相关信号通路在控制组织发育、增殖、分化、凋亡和稳态中发挥着关键性作用^[2]。本课题组前期研究发现, 经过 TGF-β1 处理后, 人支气管上皮细胞 (16HBE) 发生 EMT, 并参与哮喘气道重塑和纤维化的过程^[3-5]。

基因转录本不翻译成蛋白质, 但是可以直接作

[收稿日期] 2022-10-19; [修订日期] 2022-12-18
[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (81700029)
[通讯作者] 曲政海, Email: quzhenghai@163.com

为结构分子、调节分子或者催化分子发挥作用,此类 RNA 称为非编码 RNA(ncRNA)^[6]。ncRNA(例如 lncRNA 和 miRNA)在气道重塑和气道纤维化相关的 EMT 形成过程中作用的研究报道较少。本研究拟通过 TGF-β1 干预构建人 16HBE EMT 细胞模型,探讨 EMT 细胞模型中 lncRNA 和 miRNA 相对表达量的变化,为气道纤维化或气道重塑防治方面的研究提供分子理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

人 16HBE 细胞(源自中国医学科学院肿瘤细胞库),特级胎牛血清、RPMI1640 基础培养基、青霉素-链霉素溶液(双抗)(武汉普诺赛生命科技有限公司),TGF-β1 蛋白(MedChemexpress 生物科技公司,美国),RNA-easy Isolation Reagent(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒以及 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司),2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix(武汉赛维尔生物科技股份有限公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养和处理 16HBE 细胞复苏后,置于含体积分数 0.10 胎牛血清以及 10 g/L 青霉素-链霉素的 RPMI1640 生长培养基中,每 2~3 d 换液 1 次,待融合度达 80%~90% 时进行传代。将细胞接种于 6 孔板中,每孔约 30~50 万个细胞,每孔加入生长培养基 2 mL,分为对照组和处理组,每组设 3 个复孔。接种当天,处理组每孔中加入 TGF-β1,使其在培养基中浓度约为 10 μg/L,而对照组中加入与处理组 TGF-β1 等体积的 RPMI 基础培养基;分别于细胞处理 24、48、72 h 后使用倒置显微镜观察两组细胞形态及分布,当处理组细胞形态明显梭形改变、细胞间隙增大时,表明 EMT 细胞模型已构建成功,记录该时间点,以此作为后续实验处理时间。

1.2.2 RNA 分离、逆转录及 RT-qPCR 检测 根据 RNA-easy Isolation Reagent 说明书,当 EMT 细胞模型构建成功时,分别分离并提取上述两组细胞中总 RNA,紫外可见分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度。根据说明书,采用 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒和 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒对分离 RNA 行反转录,两种试剂反转录的 cDNA 分别进行下一步 lncRNA 或 miRNA 的 RT-qPCR 检测。除了 miRNA 的下游引物由湖南艾科瑞生物工

程有限公司提供以外,lncRNA 和 miRNA 的其他引物均由深圳华大基因股份有限公司进行合成(表 1)。其中 GAPDH 作为 lncRNA 的内参基因,U6(湖南艾科瑞生物工程有限公司)作为 miRNA 的内参基因。再使用 2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 对经反转录生成的 cDNA 进行 RT-qPCR,获得各组样本扩增 CT 值,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算各基因的相对表达量。

表 1 RT-qPCR 引物名称及其序列

引物名称	引物序列	引物长度(bp)
TBILA	F:5'-CCACGGATGGCAACTGCTA-3'	19
	R:5'-GTTCCCTTGACCCCTTCTCG-3'	20
NKILA	F:5'-AGAAAGACCAGGAGGCTTGT-3'	21
	R:5'-TCTCTCCCAAACAGAAGACG-3'	21
HOTAIR	F:5'-CAAGACCAGAAATGCCACGG-3'	20
	R:5'-AGCACTTCTCTCGCCAATGT-3'	20
LNCRNA-ATB	F:5'-TGGGATTTCGATCAACAGAGAGT-3'	22
	R:5'-GCCCTCCCGTTTGGTATTT-3'	20
NEAT1	F:5'-TCAACTGTCCATGCCAGCAG-3'	21
	R:5'-CCAGCCGAGCGAAAATTACA-3'	21
GAPDH	F:5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3'	20
	R:5'-GACTCCGACCTTCACCTTCC-3'	20
miR-125b-5p	F:5'-TCCTGAGACCCTAACTTGTGA-3'	22
miR-21-3p	F:5'-AACACCAGTCGATGGGCTGT-3'	20
miR-21-5p	F:5'-CAGTTATCAGACTGATGTTGAA-3'	23
miR-27a-3p	F:5'-CACAGTGGCTAAGTTCCGCAA-3'	21
miR-27a-5p	F:5'-GGCTTAGCTGCTTGTGAGCA-3'	20
miR-141-3p	F:5'-GCTATCACTGTCTGGTAAAGATGG-3'	24
miR-200c-3p	F:5'-TACTGCCGGTAATGATGGA-3'	20
miR-17-5p	F:5'-CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG-3'	23
miR-34a-5p	F:5'-GCAGTGCTTAGCTGGTTGTAA-3'	22

2 结果

2.1 经过 TGF-β1 处理后两组细胞不同时间点形态比较

倒置显微镜观察结果显示,对照组 16HBE 细胞第 24、48、72 小时均为鹅卵石样或铺路石样的单层细胞,细胞间连接紧密,聚集成团状或岛状。处理组细胞在第 24 小时形态和分布变化不明显;而第 48 和 72 小时呈长梭形,细胞与细胞间连接不紧密,间隙增大,细胞发生了 EMT(图 1)。第 48 小时 EMT 细胞模型已经构建成功。

2.2 两组细胞中各 lncRNA 和 miRNA 相对表达量比较

两组细胞处理 48 h 后进行 RT-qPCR 检测,处理组中各 lncRNA 和 miRNA 的相对表达量与对照组比较,差异均具有显著性($t = -16.353 \sim 6.460$,

$P < 0.05$)。见表 2。

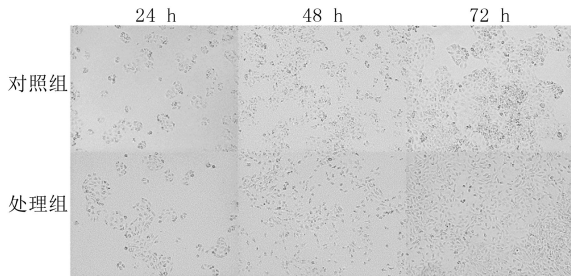


图 1 两组细胞不同时间点的细胞形态比较(10 倍)

3 讨 论

气道纤维化和气道重塑是不可逆的呼吸系统疾病,严重影响患者的生活质量,其预防和治疗仍然是目前世界范围内亟待解决的难题。ncRNA 在气道纤维化和气道重塑中发挥着重要作用,参与疾病的发生和发展,但相关研究报道较少。本研究通过构建 EMT 细胞模型,模拟气道纤维化,探讨细胞中 lncRNA 和 miRNA 的表达情况,为气道纤维化以及气道重塑的预防或治疗提供数据参考。

本研究中,TGF- β 1 处理 16HBE 细胞 48 h 后,细胞形态呈长梭形,细胞与细胞间连接不再紧密,间隙增大,提示细胞已经发生了 EMT,细胞模型构建成功。研究发现 TGF- β 对 EMT 有诱导或者促进作用,但相关机制研究较少。WANG 等^[7]体外研究发现,TGF- β 1 可通过刺激人肺癌细胞抑制 Src 同源物 2-b3 (SH2B3, 又称淋巴细胞接头蛋白)的表达,激活 JAK2/STAT3 和 SHP2/Grb2/PI3K/AKT 信号通路级联反应,促进人肺癌细胞 EMT 以及肺癌细胞扩散、转移。PEZONE 等^[8]体外培养人正常乳腺上皮细胞(MCF10A)并通过共聚焦显微镜和质谱记录分析发现,组蛋白溶酶特异性去甲基化酶 1 (LSD1) 与 TGF- β 1 诱导或抑制基因的启动子结合后,可引发一系列 DNA 氧化反应,调控 EMT 基因的转录或抑制。DAVID 等^[9]发现调控因子 Sox4 可以使 TGF- β 诱导的 EMT 的胰腺导管腺癌细胞发生凋亡,而胃肠道谱系主调控因子 Klf5 则具有拮抗 Sox4 凋亡作用,提示在胰腺导管腺癌细胞中 EMT

进程可能是受 Sox4 和 Klf5 同时调控。

本课题组前期实验发现 miR-448-5p 在哮喘小鼠肺组织和 TGF- β 1 干预后 16HBE 中的相对表达量均下调,同时在 TGF- β 1 干预后的 16HBE 中过表达 miR-448-5p 可以抑制 TGF- β 1 介导的 EMT 以及气道纤维化^[4],提示 ncRNA 在气道纤维化或气道重塑中发挥作用。

本研究结果显示,与对照组相比,处理组细胞中 TBILA 等 lncRNA 和 miR-125b-5p 等 miRNA 基因的相对表达量存在显著差异,这些差异均发现与 EMT 进程的调控或组织纤维化的形成发展密切相关。如 TBILA 在非小细胞肺癌(NSCLC)患者肿瘤组织中以及 TGF- β 1 处理的 A549 和 H226 细胞中表达上调,沉默或者过表达 TBILA 可以分别产生抑制或促进 A549 和 H226 细胞 EMT 作用^[10]。NKILA 在人肝癌组织和人肝癌细胞系中表达下调,在体外 NKILA 过表达则能够显著抑制肝癌细胞系细胞 EMT^[11]。体外研究结果显示,HOTAIR 在经过 TGF- β 1 处理后的结肠癌细胞株 HT-29 及 DLD1、乳腺上皮细胞 MCF10a 以及乳腺癌细胞株 HCC1954 中均表达上调,经 siRNA 干扰 HOTAIR 表达后,可改变 TGF- β 诱导的 EMT 进展过程^[12]。LNCRNA-ATB 在草酸钙刺激人近端肾小管上皮(HK-2)细胞的 EMT 模型中表达上调,miR-200 家族基因表达下调,干扰 lncRNA-ATB 表达或者转染 miR-200a 模拟物均可缓解 EMT 进程和肾损伤程度^[13]。在牛血清白蛋白(BSA)刺激的 HK-2 细胞和高脂饲料和链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠中 NEAT1 的表达均显著上调,通过干扰或者过表达 NEAT1 可分别抑制或者促进 BSA 诱导 HK-2 细胞的纤维化和 EMT^[14]。另外,miR-125b 在结直肠癌(CRC)原发灶和转移灶中表达上调,而体外培养的 CRC 细胞过表达 miR-125b 可增强 EMT 的迁移能力,敲低 miR-125b 表达后,可以降低 CRC 细胞 EMT 的迁移和侵袭能力^[15]。miR-21-5p、miR-34a-5p 的表达水平在人 CRC 组织中较正常组织高,而 miR-200c-3p 的表达水平则较低,这些 miRNA 均

表 2 两组细胞中各 lncRNA 和 miRNA 相对表达量比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组	TBILA	NKILA	LNCRNA-ATB	HOTAIR	NEAT1	miR-125b-5p	miR-21-3p
对照组	1.006 \pm 0.141	1.000 \pm 0.030	1.001 \pm 0.061	1.000 \pm 0.018	1.002 \pm 0.084	1.024 \pm 0.266	1.041 \pm 0.349
处理组	1.875 \pm 0.102	6.460 \pm 0.577	1.343 \pm 0.151	0.754 \pm 0.063	0.698 \pm 0.107	2.527 \pm 0.709	2.108 \pm 0.290
分组	miR-21-5p	miR-27a-3p	miR-27a-5p	miR-141-3p	miR-200c-3p	miR-17-5p	miR-34a-5p
对照组	1.046 \pm 0.380	1.003 \pm 0.098	1.012 \pm 0.184	1.004 \pm 0.102	1.010 \pm 0.168	1.008 \pm 0.151	1.002 \pm 0.071
处理组	3.557 \pm 0.300	1.454 \pm 0.092	1.562 \pm 0.275	1.738 \pm 0.118	1.565 \pm 0.069	0.595 \pm 0.176	0.501 \pm 0.147

与肿瘤组织的 EMT 相关^[16]。*miR-17-5p* 在有转移的原发性人 CRC 组织中的表达量低于无转移的原发性人 CRC 组织,过表达 *miR-17-5p* 后体外培养的 CRC 细胞 EMT 能力受到抑制,而抑制 *miR-17-5p* 的表达则增强了 CRC 细胞的 EMT 能力^[17]。

LncRNA、miRNA 及其下游基因之间还可互相调控,并形成复杂的调控网络,参与蛋白质翻译、合成的一系列过程,进而抑制或者促进细胞 EMT 以及组织纤维化。例如,lncRNA *BBOX1-AS1* 在人 NSCLC 组织中,以及体外培养并经转录因子 *KLF5* 诱导的 NSCLC 细胞中均为高表达,*BBOX1-AS1* 与 *miR-27a-5p* 竞争性结合,促进母体胚胎亮氨酸拉链激酶表达,激活黏着斑激酶磷酸化,促进 NSCLC 细胞的 EMT^[18]。

综上所述,本研究成功构建了 EMT 细胞模型,与正常细胞相比,该模型中多个 lncRNA 和 miRNA 表达具有显著差异。这些基因间可能存在复杂的调控网络,促进或抑制 16HBE 细胞 EMT 及其进程。后续应进行更深入的实验研究,进一步明确各基因调控机制以及他们之间的调控关系,为气道纤维化或气道重塑防治方面的研究提供分子理论支持。

作者声明:曲政海、杨召川、陈华培参与了研究设计;所有作者参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] XU J, LAMOUILLE S, DERYNCK R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cell Res*, 2009,19(2): 156-172.

[2] ITATANI Y, KAWADA K, SAKAI Y. Transforming growth factor- β signaling pathway in colorectal cancer and its tumor microenvironment[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23):5822.

[3] WANG W X, YANG Z C, LI M X, et al. Six1 promotes epithelial-mesenchymal transition in bronchial epithelial cells via the TGF β 1/smad signalling pathway[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2021,182(6): 479-488.

[4] YANG Z C, QU Z H, YI M J, et al. MiR-448-5p inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis by targeting Six1 in asthma[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6):8804-8814.

[5] YANG Z C, QU Z H, YI M J, et al. MiR-204-5p inhibits transforming growth factor- β 1-induced proliferation and extracellular matrix production of airway smooth muscle cells by regulating Six1 in asthma[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2020,181(4):239-248.

[6] SHABALINA S A, SPIRIDONOV N A. The mammalian

transcriptome and the function of non-coding DNA sequences [J]. *Genome Biol*, 2004,5(4):105.

[7] WANG L N, ZHANG Z T, WANG L, et al. TGF- β 1/SH2B3 axis regulates anoikis resistance and EMT of lung cancer cells by modulating JAK2/STAT3 and SHP2/Grb2 signaling pathways[J]. *Cell Death Dis*, 2022,13(5):472.

[8] PEZONE A, TADDEI M L, TRAMONTANO A, et al. Targeted DNA oxidation by LSD1-SMAD2/3 primes TGF- β 1/EMT genes for activation or repression[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020,48(16):8943-8958.

[9] DAVID C J, HUANG Y H, CHEN M, et al. TGF- β tumor suppression through a lethal EMT[J]. *Cell*, 2016,164(5): 1015-1030.

[10] LU Z L, LI Y, CHE Y, et al. The TGF β -induced lncRNA TBILA promotes non-small cell lung cancer progression in vitro and in vivo via cis-regulating HGAL and activating S100A7/JAB1 signaling[J]. *Cancer Lett*, 2018,432:156-168.

[11] CHEN R G, CHENG Q Y, OWUSU-ANSAH K G, et al. NKILA, a prognostic indicator, inhibits tumor metastasis by suppressing NF- κ B/Slug mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(3):495-503.

[12] ALVES C P, FONSECA A S, MUYS B R, et al. Brief report: The lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cell lines[J]. *Stem Cells*, 2013,31(12):2827-2832.

[13] LI Y H, DING T, HU H Y, et al. LncRNA-ATB participates in the regulation of calcium oxalate crystal-induced renal injury by sponging the miR-200 family[J]. *Mol Med*, 2021,27(1): 143.

[14] YANG Y L, XUE M, JIA Y J, et al. Long noncoding RNA NEAT1 is involved in the protective effect of Klotho on renal tubular epithelial cells in diabetic kidney disease through the ERK1/2 signaling pathway[J]. *Exp Mol Med*, 2020,52(2): 266-280.

[15] ZHANG X H, LI T Y, HAN Y N, et al. miR-125b promotes colorectal cancer migration and invasion by dual-targeting CFTR and CGN[J]. *Cancers (Basel)*, 2021,13(22):5710.

[16] KANG E, JUNG S C, NAM S K, et al. Tissue miR-200c-3p and circulating miR-1290 as potential prognostic biomarkers for colorectal cancer[J]. *Sci Rep*, 2022,12(1):2295.

[17] KIM T W, LEE Y S, YUN N H, et al. MicroRNA-17-5p regulates EMT by targeting vimentin in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2020,123(7):1123-1130.

[18] SHI J, YANG C, AN J L, et al. *KLF5*-induced *BBOX1-AS1* contributes to cell malignant phenotypes in non-small cell lung cancer via sponging *miR-27a-5p* to up-regulate *MELK* and activate *FAK* signaling pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1):148.