

微小 RNA-18a 靶向 *Notch2* 抑制 NIH-3T3 细胞外基质相关基因的表达

郝家祺^{a,b}, 文静^a, 刘春城^{a,b}, 蔡禄^{a,b}

内蒙古科技大学 a. 生命科学与技术学院 b. 内蒙古自治区功能基因组生物信息学重点实验室, 内蒙古 包头 014010



DOI 10.11836/JEOM21336

摘要:

[背景] 矽肺主要病理特征是肺部纤维化。矽肺发生发展过程中多种 miRNAs 具有调控作用。

[目的] 利用成纤维细胞系, 探究微小 RNA-18a(miR-18a) 对细胞外基质相关基因表达的影响, 并对其作用机制进行验证。

[方法] 在成纤维细胞系 NIH-3T3 细胞中转染 miR-18a 模拟物以及神经源性基因座 Notch 同源蛋白 2(*Notch2*) 基因的小干扰 RNA(siRNA)。通过应用实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)技术检测 *Acta2*、*Col1a1* 及 *Notch2* 基因 mRNA 表达变化, 通过蛋白质印迹技术检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)及 *Notch2* 蛋白的表达变化, 利用双荧光素酶报告载体在人胚肾细胞 HEK293T 细胞中验证 miR-18a 调控 *Notch2* 基因的直接作用位点。

[结果] qRT-PCR 检测结果表明, 在 NIH-3T3 细胞中, miR-18a 模拟物过表达 36 h 抑制了 *Col1a1* 以及 *Acta2* 的 mRNA 表达($P < 0.05$), 同时利用蛋白质印迹技术检测发现, miR-18a 模拟物过表达 48 h 后 α -SMA 蛋白表达丰度降低。通过 qRT-PCR 未检测到过表达 miR-18a 36 h 对于 *Notch2* 基因表达的影响, 通过蛋白质印迹技术检测发现过表达 miR-18a 模拟物 36 h 可以在蛋白水平上抑制 *Notch2* 的表达。双荧光素酶报告载体检测结果发现, 在 HEK293T 细胞中, 无论是过表达 miR-18a 模拟物或者抑制物 24 h 均证明了 *Notch2* 是 miR-18a 的直接靶基因。当 *Notch2* 被抑制 36 h 时, qRT-PCR 检测发现 *Acta2* 和 *Col1a1* 基因表达下调($P < 0.05$); 蛋白质印迹技术检测表明 α -SMA 在蛋白水平也受到抑制。

[结论] 本研究发现 miR-18a 可以通过直接作用于靶基因 *Notch2* 的 3'UTR 而抑制其表达, 从而抑制成纤维细胞系 NIH-3T3 细胞外基质相关基因的表达。

关键词: 矽肺; 微小 RNA-18a; 神经源性基因座 Notch 同源蛋白 2

Inhibiting effect of miR-18a on expression of extracellular matrix-related genes of NIH-3T3 by targeting *Notch2* HAO Jiaqi^{a,b}, WEN Jing^a, LIU Chunheng^{a,b}, CAI Lu^{a,b} (a. School of Life Science and Technology b. Inner Mongolia Key Laboratory of Functional Genome Bioinformatics, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract:

[Background] The main pathological feature of silicosis is pulmonary fibrosis. Multiple miRNAs regulate the development of silicosis.

[Objective] Using a fibroblast cell line, to explore the effect of miR-18a on the expression of extracellular matrix-related genes, and verify the mechanism.

[Methods] The fibroblast cell line NIH-3T3 cells were transfected with miR-18a mimics or neurogenic locus notch homolog protein 2 (*Notch2*) small interfering RNA (siRNA). The mRNA expression changes of *Acta2*, *Col1a1*, and *Notch2* were detected by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR), α -smooth muscle actin (α -SMA) and *Notch2* were also detected at the protein level by Western blotting. To verify whether miR-18a could directly act on the complementary sequences of the *Notch2* gene, human embryonic kidney HEK293T cells and the psiCHECKTM-2 vector were used.

[Results] The results of qRT-PCR showed that in NIH-3T3 cells, the over-expression of miR-18a mimics for 36 h inhibited the mRNA expression of *Col1a1* and *Acta2* ($P < 0.05$). The results of Western blotting showed that the protein expression abundance of α -SMA was decreased at

基金项目

国家自然科学基金(61671256, 62071259); 内蒙古科技大学创新基金项目(2019QDL-B43, 2019QDL-B44); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY20096)

作者简介

郝家祺(1995—), 女, 硕士生;
E-mail: 1821698959@qq.com

通信作者

蔡禄, E-mail: nmcailu@163.com
刘春城, E-mail: liuchuncheng.china@gmail.com

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-08-01

录用日期 2022-04-17

文章编号 2095-9982(2022)07-0786-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

► 引用

郝家祺, 文静, 刘春城, 等. 微小 RNA-18a 靶向 *Notch2* 抑制 NIH-3T3 细胞外基质相关基因的表达 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(7): 786-791.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21336

Funding

This study was funded.

Correspondence to

CAI Lu, E-mail: nmcailu@163.com
LIU Chunheng, E-mail: liuchuncheng.china@gmail.com

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2021-08-01

Accepted 2022-04-17

► To cite

HAO Jiaqi, WEN Jing, LIU Chunheng, et al. Inhibiting effect of miR-18a on expression of extracellular matrix-related genes of NIH-3T3 by targeting *Notch2*[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(7): 786-791.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21336

48 h of miR-18a mimics over-expression. The qRT-PCR results showed that the over-expression of miR-18a for 36 h had no significant effect on *Notch2* gene expression, but the Western blotting results showed that the over-expression of miR-18a mimics inhibited the expression of Notch2 at the protein level. The results of the dual luciferase reporter vector assay showed that in HEK293T cells, both over-expressed miR-18a mimics and inhibitors for 24 h demonstrated that *Notch2* is a direct target gene of miR-18a. When *Notch2* was inhibited for 36 h, the qRT-PCR results showed that *Acta2* and *Col1a1* were down-regulated ($P < 0.05$), and the results of Western blotting showed that α -SMA protein was also inhibited.

[Conclusion] The findings indicate that miR-18a could inhibit the expression of extracellular matrix-related genes of NIH-3T3 cells by directly acting on the 3'UTR of target gene *Notch2*.

Keywords: silicosis; microRNA-18a; neurogenic locus notch homolog protein 2

组织器官的损伤以及慢性炎症会引起纤维化,严重的纤维化会导致器官失去功能而影响人类健康甚至危及生命。矽肺是由于吸入游离的二氧化硅粉尘而引起的,其特征是活化的成纤维细胞产生的过度细胞外基质沉积而导致肺纤维化^[1]。二氧化硅导致肺纤维化的过程包括炎症、正常组织结构的破坏,以及组织修复、间充质细胞积聚和过度的细胞外基质产生^[2-3]。作为细胞外基质的主要成分,矽肺中胶原蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)高表达是关键特征^[4]。

微小 RNA(microRNA, miRNA, miR)可以通过抑制特定靶基因的翻译过程或直接降解靶基因 mRNA,从而抑制蛋白质合成,这一过程主要涉及 miRNA 与靶基因 mRNA 的 3'非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)结合。正是基于这种机制,miRNAs 参与调控多种生理病理过程,对组织器官纤维化及相关基因的表达具有重要的调节作用^[5]。已有研究表明在矽肺的发生发展过程中多种 miRNAs 具有调控作用^[6],同时更多的 miRNAs 在纤维化及矽肺病程中的功能有待研究。miR-18a 已被证明与矽肺密切相关,在动物矽肺模型中 miR-18a 表达上调^[7],而在转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)胁迫的成纤维细胞中 miR-18a 则表达下调^[8]。另有研究表明 miR-18a 可以调控纤维化相关基因而影响多种组织器官的纤维化进程。例如 miR-18a 可以通过抑制神经源性基因座 Notch 同源蛋白 2(neurogenic locus notch homolog protein 2, Notch2)信号通路而影响内皮-间充质转化及心脏纤维化^[9]。Notch 也与肺部纤维化密切相关,其在特发性肺纤维化患者体内会被激活;而 Notch 的上调会进一步激活 TGF- β 信号通路,从而介导肺泡上皮细胞中 α -SMA 的表达^[10]。鉴于此,对于 miR-18a 在纤维化过程中的功能研究可以为矽肺等疾病的防治提供治疗思路。

本研究通过在小鼠胚胎成纤维细胞中转染 miR-18a 模拟物以及在人胚肾细胞中共转染 miR-18a 模拟

物(或抑制物)以及双荧光素报告载体(psiCHECK™-2 载体),研究 miR-18a 的功能及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠胚胎成纤维细胞 NIH-3T3 细胞购买于中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。人胚肾细胞 HEK293T 细胞为实验室保存。

胎牛血清、链霉素和青霉素、DMEM 培养液(Gibco, 美国),总 RNA 提取试剂、SYBR Green PCR Mix(北京庄盟国际生物,中国),Lipo6000™转染试剂、 α -SMA 抗体、Notch2 抗体、化学发光试剂盒(碧云天,中国), β -actin 抗体(Cell Signaling Technology, 美国),psiCHECK™-2 载体、双荧光素酶测定系统(Promega, 美国),多功能酶标仪(香港基因有限公司,中国)。miR-18a 模拟物、miR-18a 抑制物、Notch2 小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)(锐博生物科技,中国)。miR-18a 模拟物及抑制物基于 mmu-miR-18a-5p 序列而设计,siRNA 针对的 Notch2 基因的靶序列为 5'-GGGAGAATATTGCCAACAT-3'。

1.2 细胞培养及转染

NIH-3T3 细胞培养于含有 10%(体积分数)胎牛血清以及 1%(体积分数)链霉素和青霉素的 DMEM 培养液中,培养箱温度为 37°C,CO₂ 体积分数为 5%。通过转染 miR-18a 模拟物实现 miR-18a 在相应细胞中的过表达。利用脂质体介导转染法进行转染,转染前 24 h,把 1.5×10^5 个 NIH-3T3 细胞均匀铺至 6 孔板中,从而保证转染时细胞汇合度在 50%~60%。根据 Lipo6000™转染试剂说明书,每孔用 250 μ L Opti-MEM 无血清培养液稀释 7.5 μ L 脂质体和 7.5 μ L 模拟物/siRNA ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)配制转染混合液。静置 20 min 后,将转染混合液分别加入每孔含 1 mL 培养液的 6 孔板中,37°C、5%(体积分数)CO₂ 继续培养 6 h 后更换为正常培养基,最终培养 36、48 h。

HEK293T 细胞具有较高的转染率, 因此 miR-18a 模拟物(或抑制物)与 psiCHECKTM-2 的共转染实验利用该细胞系作为实验对象。HEK293T 细胞培养于含有 10% (体积分数)胎牛血清以及 1% (体积分数)链霉素和青霉素的 DMEM 培养液中, 培养箱温度为 37°C, CO₂ 体积分数为 5%。利用脂质体介导转染法进行转染, 转染前 24 h, 把 0.4×10^5 个 HEK293T 细胞均匀铺至 24 孔板中, 从而保证转染时细胞汇合度在 50%~60%。

1.3 RNA 提取和反转录

NIH-3T3 细胞转染 36 h 后收集细胞, 对照组与实验组各包含 3 个独立样本。利用总 RNA 提取试剂提取细胞总 RNA, 通过 D_{260}/D_{280} 比值检测总 RNA 的纯度。根据光密度(D)将 RNA 浓度调整一致, 利用 M-MLV 逆转录酶(Promega, 美国), 参照说明书步骤将 RNA 反转录成 cDNA, 放置于 -20°C 冰箱中储存备用。

1.4 Acta2、Col1a1 和 Notch2 的 mRNA 相对表达量的检测

使用 Primer3web(version 4.1.0)设计相关引物, 所用引物相关信息见表 1。使用 SYBR Green PCR Mix 通过实时定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)分析 Acta2(α -SMA 蛋白的基因)、Col1a1(I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链的基因)和 Notch2 的相对表达量。3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参基因。配制 20 μ L PCR 反应体系, 反应条件: 94°C 3 min; 主循环 94°C 15 s, 60°C 40 s, 共 40 个循环。应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 Acta2、Col1a1 和 Notch2 基因的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物名称和序列

Table 1 Primer names and sequences for qRT-PCR

引物名称	正向(5'-3')	反向(5'-3')
Acta2	ACTACTGCCGAGCGTGAGAT	CCAATGAAAGATGGCTGGAA
Col1a1	GAGAGCATGACCGATGGATT	CCTTCTTGAGGTTGCCAGTC
Notch2	GGTCGCTGTTGTATCATCCTC	TGACACTTGACGGAGAGAT
GAPDH	GGCTGCCGAGAACATCAT	CGGACACATTGGGGGTAG

1.5 蛋白质印迹法检测 α -SMA 和 Notch2 蛋白表达量

对培养的细胞完成处理后, 用磷酸盐缓冲溶液洗涤细胞, 使用含有苯甲基磺酰氟的 RIPA 缓冲液裂解细胞, 使用 BCA 测定试剂盒(碧云天, 中国)检测蛋白浓度, 再将每组蛋白样品的浓度调整到一致。加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)上样缓冲液的样品在 99°C 处理 10 min 后立即置于冰上。在 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SDS-PAGE 凝胶中分离总蛋白(25 μ g)并

转移至聚偏氟乙烯膜上。随后, 在室温下用 $0.05 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脱脂奶粉封闭 1 h, 之后加入一抗 4°C 孵育过夜。其中 Notch2 抗体 1:1000 稀释, α -SMA 抗体 1:1000 稀释, β -actin 抗体 1:2000 稀释。使用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10000 稀释), 在室温下孵育 1 h。使用化学发光试剂进行显色, 使用 Image 600RGB 检测, Image 1.52a 软件分析。其中 miR-18a 模拟物 and 对照转染 36 h 收取的蛋白用于检测 Notch2 蛋白。miR-18a 模拟物 and 对照转染 48 h 收取的蛋白用于检测 α -SMA 蛋白。siRNA 和对照转染 36 h 收取的蛋白用于检测 Notch2 蛋白及 α -SMA 蛋白。

1.6 荧光素酶报告载体检测 miR-18a 对于 Notch2 基因 3'UTR 的作用位点

利用引物 γ -notch2 从小鼠 cDNA 中扩增 Notch2 基因的 3'UTR 片段(该片段包含 miR-18a 在 Notch2 基因的 3'UTR 中的结合位点), 将扩增片段克隆到 psiCHECKTM-2 载体的 Not I 和 Xho I 位点之间, 该载体命名为 psiCHECKTM-2-wt-Notch2 载体。利用引物 γ -notch2、TB-notch2 以及 Notch2 基因的 3'UTR 片段通过融合 PCR 扩增 Notch2 的 3'UTR 突变片段, 将突变片段克隆到 psiCHECKTM-2 载体中, 该载体命名为 psiCHECKTM-2-mut-Notch2。引物序列如表 2 所示。

表 2 荧光素酶报告载体引物名称和序列

Table 2 Primer names and sequences for luciferase reporter vector

引物名称	正向(5'-3')	反向(5'-3')
γ -notch2	CCGCTCGAGCCTGGCCTCTGA AGTATGCT	ATAAGAATGCGGCCGCGCTTCACA GTGGCAGTCAAT
TB-notch2	TTCTGAACCTGCACCTTAATT TCTCTCC	GGAGAGAAATTGCAAATAGGTTCA GAA

在 miR-18a 模拟物与 psiCHECKTM-2 载体的共转染实验中, 将 HEK293T 细胞使用 Lipo6000TM转染试剂与混合液 A(500 ng psiCHECKTM-2-wt-Notch2 和 20 pmol miR-18a 模拟物或对照)或混合液 B(500 ng psiCHECKTM-2-mut-Notch2 和 20 pmol miR-18a 模拟物或对照)转染, 转染后培养 24 h。在 miR-18a 抑制物与 psiCHECKTM-2 载体的共转染实验中, miR-18a 抑制物加入量为 40 pmol, 其余条件与模拟物共转染实验相同。根据检测要求, 使用双重荧光素酶测定系统和多功能酶标仪, 以萤火虫荧光素酶活性作为内参对照, 检测海肾荧光素酶的相对活性。

1.7 miRNA 靶基因预测

miRNA 主要通过与靶标基因的 3'UTR 结合从而

抑制目标基因的表达,因此利用 TargetScanMouse 7.1 (http://www.targetscan.org/mmu_71/) 对 miR-18a 可能作用的靶基因进行预测。

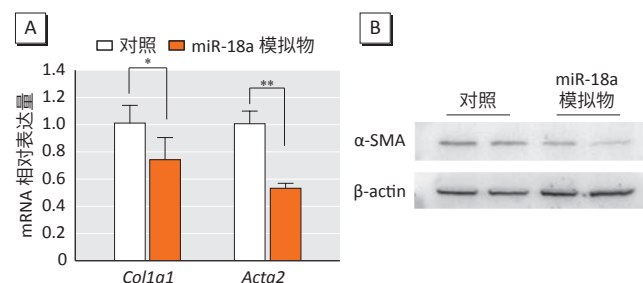
1.8 统计学分析

使用 SPSS 16.0 进行统计学分析。实验结果均以平均值±标准差来展示,并采用 *t* 检验分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-18a 抑制细胞外基质相关基因的表达

qRT-PCR 检测结果表明,在 NIH-3T3 细胞中,miR-18a 模拟物的过表达抑制了 *Col1a1* 以及 *Acta2* 的 mRNA 表达(图 1A)。同时利用蛋白质印迹技术检测发现,在 miR-18a 模拟物转染的 NIH-3T3 成纤维细胞中, α -SMA 蛋白表达丰度降低(图 1B)。以上结果表明,miR-18a 模拟物的过表达抑制了细胞外基质相关基因的表达。



[注] A: 通过 qRT-PCR 检测 miR-18a 模拟物和对照转染 36 h 后 NIH-3T3 细胞中 *Col1a1* 和 *Acta2* 的 mRNA 表达变化。GAPDH 作为内参,对照组与实验组各包含 3 个独立样本。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。B: 通过蛋白质印迹法检测转染 miR-18a 模拟物和对照 48 h 后 α -SMA 蛋白的表达变化。 β -actin 作为内参蛋白。

图 1 miR-18a 抑制 NIH-3T3 成纤维细胞中细胞外基质相关基因的表达

Figure 1 miR-18a inhibits the expression of extracellular matrix-related genes in NIH-3T3 fibroblasts

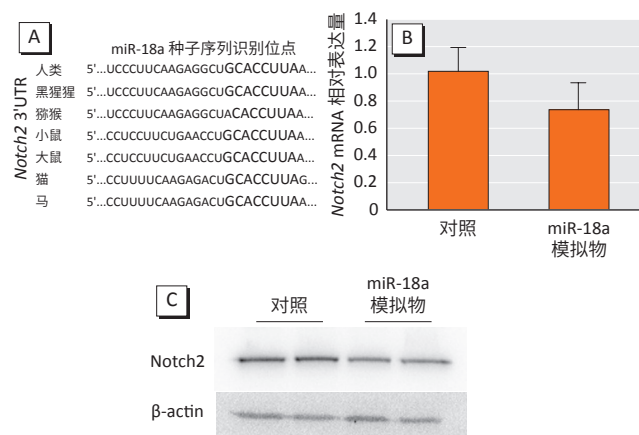
2.2 miR-18a 抑制 Notch2 蛋白的表达

靶基因预测结果表明在小鼠 *Notch2* 基因 3'UTR 中存在和 miR-18a 种子序列互补的位点,且该段序列在多种物种中是完全保守的(图 2A)。在转染 miR-18a 模拟物 36 h(图 2B)后,未检测到 miR-18a 对于 *Notch2* mRNA 表达的抑制具有统计学意义。但蛋白质印记法检测结果表明 miR-18a 模拟物的过表达可以抑制 *Notch2* 蛋白的表达(图 2C)。

2.3 Notch2 是 miR-18a 的直接靶基因(图 3)

荧光素酶报告载体及相应位点突变结果见图 3A、3B。如图 3C 所示,相对于共转染了对照与 psiCHECKTM-2-wt-Notch2 载体的 HEK293T 细胞,在共转染了 miR-18a

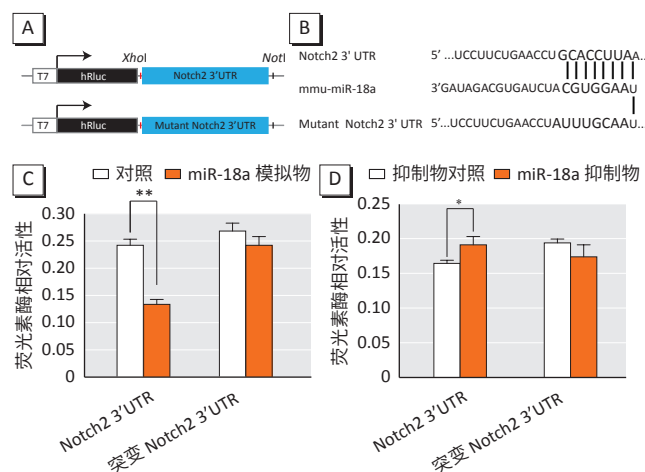
18a 模拟物和 psiCHECKTM-2-wt-Notch2 载体的细胞中,海肾荧光素酶的相对活性降低($P < 0.05$)。而共转染 miR-18a 模拟物和 psiCHECKTM-2-mut-Notch2 载体的细胞中,海肾荧光素酶的相对活性与转染了对照与 psiCHECKTM-2-mut-Notch2 载体的细胞并无差异。



[注] A: miR-18a 的种子区在 *Notch2* 基因 3'UTR 中的识别位点以粗体显示。B: 通过 qRT-PCR 检测 miR-18a 模拟物和对照转染 36 h 后 NIH-3T3 细胞中 *Notch2* 的 mRNA 表达变化。GAPDH 作为内参,对照组与实验组各包含 3 个独立样本。C: 通过蛋白质印迹法检测转染 miR-18a 模拟物和对照 36 h 后 *Notch2* 蛋白的表达变化。 β -actin 作为内参蛋白。

图 2 miR-18a 抑制 NIH-3T3 成纤维细胞中 Notch2 蛋白的表达

Figure 2 miR-18a inhibits the expression of Notch2 protein in NIH-3T3 fibroblasts



[注] A: psiCHECKTM-2-wt-Notch2 载体和 psiCHECKTM-2-mut-Notch2 载体构建示意图。B: 预测的 miR-18a 在小鼠 *Notch2* 基因 3'UTR 中的结合位点以及突变后的相应序列。C、D: 检测 miR-18a 模拟物或抑制物在 HEK293T 细胞中对于 psiCHECKTM-2-wt-Notch2 载体和 psiCHECKTM-2-mut-Notch2 载体的荧光素酶相对活性的影响。对照组与实验组各包含 3 个独立样本。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

图 3 Notch2 是 miR-18a 的直接靶基因

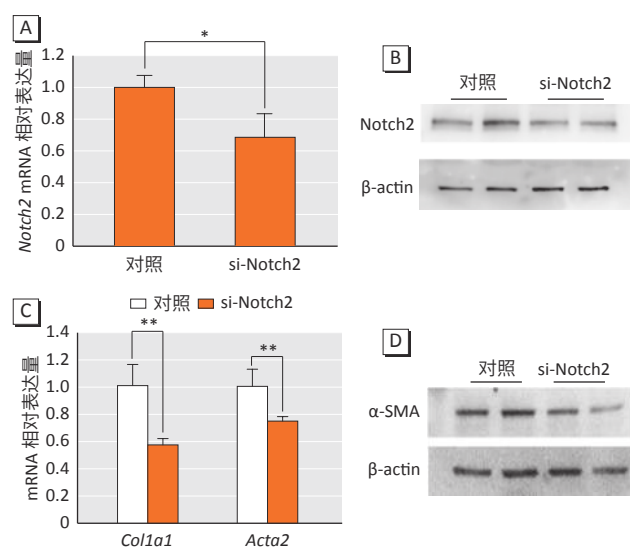
Figure 3 Notch2 is the direct target gene of miR-18a

相对于共转染了对照与 psiCHECKTM-2-wt-Notch2 载体的 HEK293T 细胞,在共转染了 miR-18a 抑制物和

psiCHECK™-2-wt-Notch2 载体的细胞中,海肾荧光素酶的相对活性升高($P < 0.05$)。而共转染 miR-18a 抑制物和 psiCHECK™-2-mut-Notch2 载体的细胞与抑制物对照转染细胞相比,海肾荧光素酶的相对活性差异并无统计学意义。见图 3D。以上结果表明,miR-18a 通过直接靶向 *Notch2* 的 3'UTR 来调节 *Notch2* 蛋白的表达。

2.4 Notch2 影响细胞外基质相关基因的表达

mRNA 以及蛋白水平的检测结果表明,利用 siRNA 可以有效抑制 *Notch2* 基因及相应蛋白的表达(图 4A、4B)。qRT-PCR 检测发现,当 *Notch2* 被抑制时,*Acta2* 和 *Col1a1* 的基因表达同样受到了抑制(图 4C);蛋白质印记法检测结果表明 α -SMA 蛋白表达量下调(图 4D)。



[注] A: 通过 qRT-PCR 检测在 siRNA 和对照转染 36 h 后 NIH-3T3 细胞中 *Notch2* 的 mRNA 表达变化。GAPDH 作为内参,对照组与实验组各包含 3 个独立样本,*: $P < 0.05$ 。B: 通过蛋白质印记法检测转染 siRNA 和对照 36 h 后 *Notch2* 的蛋白水平变化。 β -Actin 作为内参蛋白。C: 通过 qRT-PCR 检测在 *Notch2* 基因受抑制 36 h 后的 NIH-3T3 细胞中 *Col1a1* 和 *Acta2* 的 mRNA 表达变化。GAPDH 作为内参,对照组与实验组各包含 3 个独立样本。**: $P < 0.01$ 。D: 通过蛋白质印记法检测转染 siRNA 和对照 36 h 后 α -SMA 的蛋白表达变化。 β -actin 作为内参蛋白。

图 4 抑制 *Notch2* 影响细胞外基质相关基因的表达

Figure 4 Inhibition of *Notch2* affects the expression of extracellular matrix-related genes

3 讨论

细胞外基质相关蛋白的最主要来源是成纤维细胞^[11],本研究主要探索 miR-18a 对细胞外基质相关基因的调节作用,因此选用成纤维细胞 NIH-3T3 为研究对象。已有研究表明 *Acta2* 基因以及 *Col1a1* 基因所对应的蛋白 α -SMA、I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链分别是纤维蛋白和胶原蛋白的主要标志物^[12],而纤维蛋白和胶原蛋白

是细胞外基质相关蛋白的关键构成^[4]。因此本研究在成纤维细胞中过表达 miR-18a 模拟物,通过 qRT-PCR 检测 *Acta2* 和 *Col1a1* 的表达变化,并发现这两个基因的表达均受抑制。以上结果说明 miR-18a 参与细胞外基质相关基因的表达调控。

本研究发现 miR-18a 的调控模式是通过对于纤维化相关信号通路中的关键蛋白 *Notch2* 的抑制而影响成纤维细胞的细胞外基质相关基因的表达。该结果与在肺动脉平滑肌细胞以及主动脉瓣内皮细胞中 miR-18a 抑制 *Notch2* 基因表达的研究结果^[9,14]相互佐证,共同证明了 miR-18a 及 *Notch2* 在肺纤维化过程中的重要作用。

本研究的实验结果表明,miR-18a 模拟物的转染使 *Notch2* 基因的 mRNA 表达水平减少近 30%,但该结果不具有统计学意义;而蛋白水平的检测结果表明,miR-18a 可以抑制 *Notch2* 蛋白的表达。出现这种结果可能与研究过程中的样本量有限相关,尽管 miR-18a 模拟物的转染使 *Notch2* mRNA 表达明显下降,但标准偏差也不小,导致这一变化没有统计学意义。由此可见在特定实验中使用 5 个或更多的实验样本是必要的。基于目前的结果不能得出 miR-18a 模拟物的过表达主要是通过影响 *Notch2* 基因的翻译而实现的结论。鉴于 miRNA 可以作用于多个靶基因,miR-18a 对于 *Notch2* 基因的调控可能也受到其他基因表达量改变的影响。下一步工作需要重点关注并鉴定 miR-18a 除了 *Notch2* 基因之外的其他靶基因,以及进一步影响下游分子功能的机制。

综上所述,本研究发现 miR-18a 模拟物的过表达抑制了成纤维细胞系 NIH-3T3 的细胞外基质相关基因 *Col1a1* 以及 *Acta2* 的表达;其中,miR-18a 可以通过直接与 *Notch2* 基因相互作用,从而抑制基因 *Col1a1* 以及 *Acta2* 的表达;而 *Notch2* 在受到抑制时,会导致成纤维细胞内 *Col1a1* 以及 *Acta2* 的表达量下降。本研究结果对 miR-18a 诱导成纤维细胞的细胞外基质相关基因表达机制提供了新的认识。

参考文献

- [1] CASTRANOVA V, VALLYATHAN V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis[J]. Environ Health Perspect, 2000, 108(Suppl 4): 675-684.
- [2] MOSSMAN B T, CHURG A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(5 Pt 1): 1666-1680.
- [3] PERKINS T N, PEETERS P M, WOUTERS E F M, et al. Pathogenesis and Mechanisms of asbestosis and silicosis[M]//MCMANUS L M, MITCHELL R

- N. Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms. Amsterdam: Elsevier, 2014: 2654-2664.
 - [4] DELGADO L, PARRA E R, CAPELOZZI V L. Apoptosis and extracellular matrix remodelling in human silicosis[J]. *Histopathology*, 2006, 49(3): 283-289.
 - [5] GHAFOURI-FARD S, ABAK A, TALEBI S F, et al. Role of miRNA and lncRNAs in organ fibrosis and aging[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112132.
 - [6] LUO Y, QI X M, PANG J L, et al. Omics approaches for exploring pneumoconiosis: a review[J]. *Biomed Environ Sci*, 2021, 34(1): 71-82.
 - [7] YANG H, ZHANG Y, LI W, et al. Altered microRNA expression profiles in lung damage induced by nanosized SiO₂[J]. *Bioengineered*, 2017, 8(1): 45-54.
 - [8] YANG H, LI W, ZHANG Y, et al. Regulatory role of miR-18 a to CCN2 by TGF-β1 signaling pathway in pulmonary injury induced by nano-SiO₂[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(1): 867-876.
 - [9] GENG H, GUAN J. MIR-18 a-5 p inhibits endothelial-mesenchymal transition and cardiac fibrosis through the Notch2 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(2): 329-336.
 - [10] LI X, ZHANG X, LEATHERS R, et al. Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension[J]. *Nat Med*, 2009, 15(11): 1289-1297.
 - [11] PEYSER R, MACDONNELL S, GAO Y, et al. Defining the activated fibroblast population in lung fibrosis using single-cell sequencing[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(1): 74-85.
 - [12] 郭新, 漆正宇, 秦洁, 等. 不同基质蛋白对小鼠胚胎干细胞生殖细胞分化相关基因表达的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(11): 967-973.
 - [12] GUO X, QI Z Y, QIN J, et al. Extracellular matrix regulates expressions of germ cell differentiation associated genes in mouse embryonic stem cells[J]. *Nat J Androl*, 2009, 15(11): 967-973.
 - [13] MIAO R, LIU W, QI C, et al. MiR-18 a-5 p contributes to enhanced proliferation and migration of PSMCs via targeting Notch2 in pulmonary arterial hypertension[J]. *Life Sci*, 2020, 257: 117919.
- (英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)
-
- (上接第 785 页)
- [12] 张玉粮, 李雪, 刘继文. 石油工人付出-回报失衡与职业倦怠的关系研究[J]. *实用预防医学*, 2021, 28(7): 798-801.
 - [12] ZHANG Y L, LI X, LIU J W. Relationship between effort-reward imbalance and job burnout among oil workers[J]. *Pract Prev Med*, 2021, 28(7): 798-801.
 - [13] SIEGRIST J, STARKE D, CHANDOLA T, et al. The measurement of effort-reward imbalance at work: European comparisons[J]. *Soc Sci Med*, 2004, 58(8): 1483-1499.
 - [14] LI J, YANG W, CHENG Y, et al. Effort—reward imbalance at work and job dissatisfaction in Chinese healthcare workers: a validation study[J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2005, 78(3): 198-204.
 - [15] 李富业, 刘继文, 连玉龙, 等. 脑力劳动者职业倦怠测量工具的信度和效度分析[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2009, 27(3): 156-159.
 - [15] LI F Y, LIU J W, LIAN Y L, et al. Reliability and validity analysis of tools for measuring job burnout of mental workers[J]. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 2009, 27(3): 156-159.
 - [16] BUYSSE D J, REYNOLDS C F, MONK T H, et al. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research[J]. *Psychiat Res*, 1989, 28(2): 193-213.
 - [17] TSAI P S, WANG S Y, WANG M Y, et al. Psychometric evaluation of the Chinese version of the Pittsburgh sleep quality index (CPSQI) in primary insomnia and control subjects[J]. *Qual Life Res*, 2005, 14(8): 1943-1952.
 - [18] OLESEN J, GUSTAVSSON A, SVENSSON M, et al. The economic cost of brain disorders in Europe[J]. *Eur J Neurol*, 2012, 19(1): 155-162.
 - [19] LU C, LIAO B, NIE J, et al. The association between sleep duration and chronic diseases: a population-based cross-sectional study[J]. *Sleep Med*, 2020, 73: 217-222.
 - [20] 盛小添, 刘籽含, 张西超, 等. 睡眠与工作: 相互作用机制[J]. *心理科学进展*, 2018, 26(10): 1844-1856.
 - [20] SHENG X T, LIU Z H, ZHANG X C, et al. Sleep and work: the interactive mechanism[J]. *Adv Psychol Sci*, 2018, 26(10): 1844-1856.
 - [21] 滕增光, 孙佳捷, 石玉琴, 等. 武汉市某电子厂工人睡眠质量与抑郁情绪的流行特征及关系[J]. *环境与职业医学*, 2021, 38(2): 142-147.
 - [21] TENG Z G, SUN J J, SHI Y Q, et al. Epidemiological characteristics of sleep quality and depressive mood and their correlation among electronics factory workers in Wuhan[J]. *J Environ Occup Med*, 2021, 38(2): 142-147.
 - [22] 石磊, 李科, 姜晓同, 等. 特殊工作环境下军人睡眠质量与职业倦怠、职业压力的关系[J]. *环境与职业医学*, 2021, 38(5): 500-504.
 - [22] SHI L, LI K, LOU X T, et al. Relationship among sleep quality, burnout, and occupational stress of soldiers in special working environment[J]. *J Environ Occup Med*, 2021, 38(5): 500-504.
 - [23] 宁丽, 关素珍, 徐欢, 等. 新疆油田野外作业工人职业紧张与睡眠障碍调查[J]. *环境与职业医学*, 2017, 34(11): 978-982.
 - [23] NING L, GUAN S Z, XU H, et al. Investigation of occupational stress and sleep disorders among oilfield workers in Xinjiang[J]. *J Environ Occup Med*, 2017, 34(11): 978-982.
 - [24] 李新楠. 新疆煤矿工人职业倦怠流行病学调查及其基因易感性的交互作用研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.
 - [24] LI X N. Epidemiological survey of job burnout and interaction of gene susceptibility among coal miners in Xinjiang[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2019.
 - [25] LI X, GAO X, LIU J. Cross-sectional survey on the relationship between occupational stress, hormone levels, and the sleep quality of oilfield workers in Xinjiang, China[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(18): 3316.
 - [26] WEAVER M D, ROBBINS R, QUAN S F, et al. Association of sleep disorders with physician burnout[J]. *JAMA Netw Open*, 2020, 3(10): e2023256.
 - [27] LAMBERT E G, QURESHI H, KEENA L D, et al. Exploring the link between work-family conflict and job burnout among Indian police officers[J]. *Police J*, 2019, 92(1): 35-55.
 - [28] ZHANG Y, SHEN J, ZHOU Z, et al. Relationships among shift work, hair cortisol concentration and sleep disorders: a cross-sectional study in China[J]. *BMJ Open*, 2020, 10(11): e038786.
- (英文编辑: 汪源; 责任编辑: 丁瑾瑜)