

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.09.004
文章编号: 1005-8982 (2024) 09-0022-08

实验研究·论著

LncRNA FEZF1-AS1 调控特发性肺间质纤维化的机制研究*

满君¹, 宋龙飞², 刘永全¹

(潍坊医学院附属医院 1.呼吸内科, 2.康复医学科, 山东 潍坊 261035)

摘要: **目的** 探讨FEZ家族锌指1-反义RNA 1(LncRNA FEZF1-AS1)对肺间质纤维化细胞增殖、迁移、侵袭能力及上皮-间充质相互作用(EMT)的影响及其作用机制。**方法** 将转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)作用于A549细胞,诱导肺间质纤维化细胞模型,将其分为空白对照组(A549细胞组)和模型组。Western blotting检测细胞E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)及波形蛋白(Vimentin)表达,观察模型复制是否成功;实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞LncRNA FEZF1-AS1和miR-200c-3p基因表达。根据实验目的和转染质粒不同,将A549细胞分为空白对照组(Blank组)、TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 NC组、TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1组。CCK-8法检测细胞增殖能力;细胞划痕实验检测细胞迁移能力;Transwell检测细胞侵袭能力。Western blotting检测细胞E-cadherin、N-cadherin及Vimentin蛋白表达;qRT-PCR检测细胞LncRNA FEZF1-AS1和miR-200c-3p基因表达。**结果** 模型组E-cadherin蛋白相对表达量较空白对照组降低($P < 0.05$),N-cadherin及Vimentin蛋白相对表达量较空白对照组升高($P < 0.05$);模型组LncRNA FEZF1-AS1基因相对表达量较空白对照组升高($P < 0.05$),miR-200c-3p基因相对表达量较空白对照组降低($P < 0.05$)。与Blank组比较,TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 NC组细胞增殖、迁移、侵袭能力升高($P < 0.05$);与TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 NC组比较,TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1组细胞增殖、迁移、侵袭能力降低($P < 0.05$)。与TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 NC组比较,TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1组LncRNA FEZF1-AS1基因相对表达量及N-cadherin、Vimentin蛋白相对表达量降低($P < 0.05$),E-cadherin蛋白相对表达量升高($P < 0.05$);与TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 NC组比较,TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1组和Blank组miR-200c-3p基因相对表达量升高($P < 0.05$)。**结论** LncRNA FEZF1-AS1通过抑制miR-200c-3p促进肺间质纤维化细胞增殖、迁移、侵袭及EMT过程。

关键词: 特发性肺间质纤维化;LncRNA FEZF1-AS1;miR-200c-3p;上皮-间充质相互作用
中图分类号: R563 **文献标识码:** A

Mechanism of LncRNA FEZF1-AS1 regulating idiopathic pulmonary fibrosis*

Man Jun¹, Song Long-fei², Liu Yong-quan¹

(1. Department of Respiratory Medicine, 2. Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261035, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of the long non-coding RNA FEZF1-AS1 (LncRNA FEZF1-AS1) on the proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cells in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and its underlying mechanisms. **Methods** A549 cells were treated with Transforming

收稿日期: 2023-11-16

* 基金项目: 国家自然科学基金(No.:82205079);山东省中医药科技面上项目(No.:M-2023030)

[通信作者] 刘永全, E-mail: xuanuanlyq@163.com

growth factor- β_1 (TGF- β_1) to induce a pulmonary fibrosis cell model, dividing them into a blank control group (A549 cell group) and a model group. Western blotting was used to measure the expression of E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin to verify the model's success. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed to measure the expression of LncRNA FEZF1-AS1 and microRNA-200c-3p (miR-200c-3p). Based on experimental goals and different transfection plasmids, A549 cells were divided into three groups: Blank, TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC, and TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1. Cell proliferation was evaluated using the CCK-8 assay, migration was assessed with wound healing assays, and invasion capabilities were measured using Transwell assays. Western blotting and qRT-PCR were repeated to assess protein and gene expression changes.

Results In the model group, the relative expression of E-cadherin decreased, while N-cadherin and Vimentin increased compared to the blank control ($P < 0.05$). LncRNA FEZF1-AS1 was upregulated, and miR-200c-3p was downregulated in the model group compared to the control ($P < 0.05$). Compared to the Blank group, cell proliferation, migration, and invasion were increased in the TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC group ($P < 0.05$). In contrast, these parameters were reduced in the TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 group compared to the NC group ($P < 0.05$). Also, this group showed decreased expression of LncRNA FEZF1-AS1, N-cadherin, Vimentin, and increased E-cadherin compared to the NC group ($P < 0.05$). The expression of miR-200c-3p was higher in the TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 and Blank groups compared to the NC group ($P < 0.05$).

Conclusions LncRNA FEZF1-AS1 promotes the proliferation, migration, invasion, and EMT processes in pulmonary fibrosis cells by inhibiting miR-200c-3p.

Keywords: idiopathic pulmonary fibrosis; LncRNA FEZF1-AS1; miR-200c-3p; epithelial-mesenchymal transition

特发性肺间质纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是指慢性、进行性、纤维化性及原因不明的肺间质性病变, 表现弥漫性肺泡炎、肺泡结构紊乱、上皮-间充质相互作用 (epithelial interstitial transition, EMT)、成纤维细胞过度增生及细胞基质过度沉积, 最终导致弥漫性间质纤维化^[1]。IPF 是肺系疑难重症疾病, 确诊后平均生存期为 3 年左右, 5 年生存率为 30% ~ 50%。近年来国内外学者认为, IPF 发病机制主要与 EMT 有关, EMT 指上皮细胞在形态学上发生成纤维细胞或间充质细胞表型转变、细胞极性消失、迁移运动能力提高的现象^[2-3]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一类转录本长度 >200 nt、不编码蛋白的 RNA, 其大量存在于真核生物和哺乳动物细胞中, 广泛参与生物体内各种重要的生理过程^[4]。研究发现, FEZ 家族锌指 1-反义 RNA 1 (LncRNA FEZF1-AS1) 在多种肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及 EMT 中发挥重要作用, 调控肿瘤细胞 EMT 过程相关的多种关键分子和信号通路。MicroRNA (miRNA) 是一种重要的非编码小 RNA, 广泛参与多种生物学功能的调控。MicroRNA-200c-3p (miR-200c-3p) 在多种疾病 EMT 过程中的作用逐渐被揭示, 研究发现, miR-200c-3p 在心肌梗死及乳腺癌、胃癌、胆囊癌等 EMT 转化过程中发挥重要作用^[5-7]。然而, LncRNA FEZF1-AS1

在 IPF 中的作用尚无研究, 且 LncRNA FEZF1-AS1 是否通过 miR-200c-3p 发挥作用尚不清楚。本研究分析 LncRNA FEZF1-AS1 在 IPF 中的表达模式和生物学功能, 探讨 IPF 的发病机制, 为寻找 IPF 有价值的治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养

A549 细胞购自上海富衡生物科技有限公司, A549 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 u/mL 青霉素、100 u/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养基中, 在恒温培养箱中以 5% CO₂、37 °C 及饱和湿度条件下松盖培养, 当细胞长至 80% 铺满时再进行后续实验。

1.2 主要试剂及仪器

转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) (上海近岸生物科技有限公司), DMEM/F12 液体培养基 (美国 HyClone 公司), 胎牛血清 (美国 GIBCO 公司), CCK-8 检测试剂盒 (日本 DoJinDo 公司); Transwell 嵌套小室 (美国 Corning 公司), TRIzol (北京全式金生物技术有限公司), 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司), 引物合成 (上海捷瑞生物工程有限公

司), FastKing cDNA 第一链合成试剂盒、Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 试剂盒(苏州锐博生物科技有限公司), Lipofectamine 6000™ 转染试剂(上海碧云天生物技术有限公司), Si LncRNA FEZF1-AS1 转染质粒(广州市锐博生物科技有限公司), Si LncRNA FEZF1-AS1 NC(对照)转染质粒(广州市锐博生物科技有限公司), miR-200c-3p 引物序列(广州市锐博生物科技有限公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司), E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)及 GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司), 辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗(上海碧云天生物技术有限公司)。二氧化碳培养箱(日本 SANYO), 酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染及分组 将原始浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 TGF- β_1 稀释 500 倍后建立 TGF- β_1 (20 ng/mL) 作用于 A549 细胞 48 h 诱导肺间质纤维化细胞模型, 将细胞分为空白对照组和模型组。细胞接种于 6 孔板内进行培养, 当细胞生长至融合度达到 70% ~ 90% 时进行转染, 构建 LncRNA FEZF1-AS1 突变质粒及空白质粒, 依据 Lipofectamine 6000™ 试剂盒说明书进行转染, 将模型组细胞分为 TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 组(转染质粒)及 TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组(转染空白质粒), Blank 组(不做任何处理的 A549 细胞)。A549 细胞转染 48 h 后采用 qRT-PCR 检测细胞转染效率, 用于后续实验。将 A549 细胞分组为 Blank 组、Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组、Si LncRNA FEZF1-AS1 组。为保证结果的准确性, 本研究又将 Si LncRNA FEZF1-AS1 组设置 3 组重复实验, 即 Si LncRNA FEZF1-AS1-1 组、Si LncRNA FEZF1-AS1-2 组、Si LncRNA FEZF1-AS1-3 组, 共分为 5 组观察转染效率。

1.3.2 qRT-PCR 检测 LncRNA FEZF1-AS1 和 miR-200c-3p 表达 采用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA, 分别应用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒及 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒说明书操作逆转录成 cDNA, 根据 PCR 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 反应, 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。记录 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行相对定量分析, 分别以 GAPDH 和

U6 作为内参计算 LncRNA FEZF1-AS1 mRNA 和 miR-200c-3p mRNA 相对表达量, 实验重复 3 次。引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度/ bp
LncRNA FEZF1-AS1	正向: 5'-TTAGGAGGCTTGTCTGTGT-3' 反向: 5'-GCCGAGGTACTTAAGAAAGA-3'	239
GAPDH	正向: 5'-GCCTTCCGTGTCCCACTGC-3' 反向: 5'-GGCTGGTGTCCAGGGTCT-3'	216
miR-200c-3p	正向: 5'-UAAUACUGCCGGUAAUGAUG GA-3 反向: 5'-UCCAUCAUUACCCGGCAGUAU UA-3	70
U6	正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' 反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	65

1.3.3 CCK-8 法检测细胞增殖 将细胞分组为 Blank 组、TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 组及 TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组。A549 细胞转染 24 h 后, 胰酶消化细胞数调整至 4×10^4 个/mL, 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 接种于 96 孔板同时加入 TGF- β_1 20 ng/mL, 分别在培养 0、24 和 48 h 时每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 4 h 后使用酶标仪测定 450 nm 波长处各孔吸光度(OD 值)。

1.3.4 细胞划痕检测细胞迁移实验 将细胞分组为 Blank 组、TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 组及 TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组。A549 细胞转染 24 h 后, 将细胞悬液接种到 6 孔板中, 加入 TGF- β_1 20 ng/mL, 细胞生长至铺满孔底后, 用 10 μL 的无菌微量移液器吸头垂直在消毒后在细胞板上划痕, 并将细胞洗涤 3 遍, 加入无血清培养基, 二氧化碳培养箱中继续培养。倒置显微镜下观察 0、48 h 各组细胞的变化。划痕愈合率(%) = (0 h 划痕面积 - 48 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积。

1.3.5 Transwell 实验检测细胞迁移 将细胞浓度调整为 2×10^5 个/mL, 每组细胞数量为 1×10^5 个/孔。配制 Transwell 上室液和下室液: 上室加无血清培养基, 下室是 TGF- β_1 20 ng/mL 含血清完全培养基, 上室液每孔 200 μL , 下室液每孔 800 μL 。将上层小室放入下层小室, 细胞计数后将细胞铺在上层小室中。在细胞培养箱中培养 48 h 后, 取出上室, 用棉

签擦去上室底部膜表面上的细胞,800 μ L 甲醇中固定 10 min,采用吉姆萨染色液染色细胞,荧光倒置显微镜下计数、拍照。

1.3.6 Western blotting 检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白相对表达量 细胞分组后,采用裂解液裂解每组细胞,裂解完后,于 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 15 min,提取各组细胞蛋白,采 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离后,采用湿转法转到 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(封闭液)浸泡 PVDF 膜,室温摇床封闭 2 h,加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 充分洗涤 PVDF 膜后加入二抗 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h。TBST 洗涤后加入 ECL 显影,采用 Image J 软件进行灰度值分析, GAPDH 作为内参蛋白,计算目的蛋白相对表达量。目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用 *t* 检验或单因素方差分析或析因设计的方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 空白对照组与模型组细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达的比较

Western blotting 检测结果显示,空白对照组与模型组细胞 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达量比较,经 *t* 检验,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。模型组细胞 N-cadherin、Vimentin 蛋白相对表达量高于空白对照组 (*P* < 0.05);模型组细胞 E-cadherin 蛋白相对表达量低于空白对照组 (*P* < 0.05)。见表 2 和图 1。

表 2 空白对照组与模型组细胞 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白	Vimentin 蛋白
空白对照组	0.66 \pm 0.01	0.44 \pm 0.04	0.61 \pm 0.009
模型组	0.46 \pm 0.09	0.72 \pm 0.02	0.79 \pm 0.02
<i>t</i> 值	3.638	6.688	10.020
<i>P</i> 值	0.020	0.003	0.001

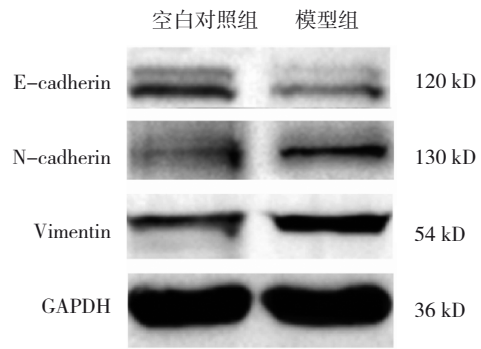


图 1 空白对照组与模型组细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达

2.2 空白对照组与模型组细胞 LncRNA FEZF1-AS1、miR-200c-3p 基因表达的比较

qRT-PCR 实验结果显示,空白对照组与模型组细胞 LncRNA FEZF1-AS1 和 miR-200c-3p mRNA 相对表达量比较,经 *t* 检验,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。模型组细胞 LncRNA FEZF1-AS1 mRNA 相对表达量高于空白对照组 (*P* < 0.05);模型组细胞 miR-200c-3p mRNA 相对表达量低于空白对照组 (*P* < 0.05)。见表 3。

表 3 空白对照组与模型组细胞 LncRNA FEZF1-AS1、miR-200c-3p mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LncRNA FEZF1-AS1 mRNA	miR-200c-3p mRNA
空白对照组	1.35 \pm 0.09	1.08 \pm 0.003
模型组	1.73 \pm 0.03	0.20 \pm 0.01
<i>t</i> 值	4.269	119.000
<i>P</i> 值	0.013	0.000

2.3 各组 LncRNA FEZF1-AS1 转染效率的比较

5 组转染效率比较,经方差分析,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。两两比较结果示, Si LncRNA FEZF1-AS1-1 组、Si LncRNA FEZF1-AS1-2 组、Si LncRNA FEZF1-AS1-3 组的 LncRNA FEZF1-AS1 mRNA 相对表达量低于 Blank 组 (*P* < 0.05);且 Si LncRNA FEZF1-AS1-1 组、Si LncRNA FEZF1-AS1-2 组、Si LncRNA FEZF1-AS1-3 组的 LncRNA FEZF1-AS1 mRNA 相对表达量也低于 Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组 (*P* < 0.05)。见表 4

2.4 沉默 LncRNA FEZF1-AS1 对细胞增殖的影响

CCK-8 实验结果显示,经析因设计的方差分析,结果显示,Blank 组不同时间点细胞增殖数

表 4 各组细胞 LncRNA FEZF1-AS1 mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LncRNA FEZF1-AS1 mRNA
Blank 组	1.00 ± 0.02
Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组	1.08 ± 0.02
Si LncRNA FEZF1-AS1-1 组	0.61 ± 0.03 ^{①②}
Si LncRNA FEZF1-AS1-2 组	0.51 ± 0.03 ^{①②}
Si LncRNA FEZF1-AS1-3 组	0.30 ± 0.02 ^{①②}
F 值	183.100
P 值	0.000

注：①与 Blank 组比较, $P < 0.05$; ②与 Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组比较, $P < 0.05$ 。

(OD_{450}) 值比较, 差异有统计学意义 ($F = 1\ 733.000$, $P = 0.000$); TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组不同时间点 OD_{450} 值比较, 差异有统计学意义 ($F = 895.400$, $P = 0.000$); TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 组不同时间点 OD_{450} 值比较, 差异有统计学意义 ($F = 1\ 383.000$, $P = 0.000$)。Blank 组、TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组及 TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 组随时间的变化趋势有差别 ($F = 221.250$, $P = 0.000$)。见表 5。

表 5 各组不同时间点细胞增殖的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	F 值	P 值
Blank 组	0.24 ± 0.01	0.62 ± 0.007 ^①	1.09 ± 0.01 ^{①②}	1 733.000	0.000
TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组	0.25 ± 0.008	0.97 ± 0.03 ^{①③}	1.54 ± 0.02 ^{①②③}	895.400	0.000
TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 组	0.25 ± 0.005	0.75 ± 0.02 ^{①③④}	1.27 ± 0.02 ^{①②③④}	1 383.000	0.000
F 值	0.932	81.100	168.700		
P 值	0.444	0.000	0.000		

注：①与 0 h 比较, $P < 0.05$; ②与 24 h 比较, $P < 0.05$; ③与 Blank 组比较, $P < 0.05$; ④与 TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 沉默 LncRNA FEZF1-AS1 对细胞迁移的影响

细胞迁移实验结果显示, Blank 组、TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组和 TGF- β_1 +Si LncRNA FEZF1-AS1 组细胞划痕愈合率分别为 $(27.06 \pm 1.64)\%$ 、 $(48.09 \pm 1.36)\%$ 、 $(34.31 \pm 0.65)\%$, 经方差分

析, 差异有统计学意义 ($F = 69.110$, $P = 0.000$)。两两比较结果显示, 与 Blank 组比较, TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组细胞划痕愈合率升高 ($P < 0.05$); 与 TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组比较, TGF- β_1 + Si LncRNA FEZF1-AS1 组中细胞划痕愈合率降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

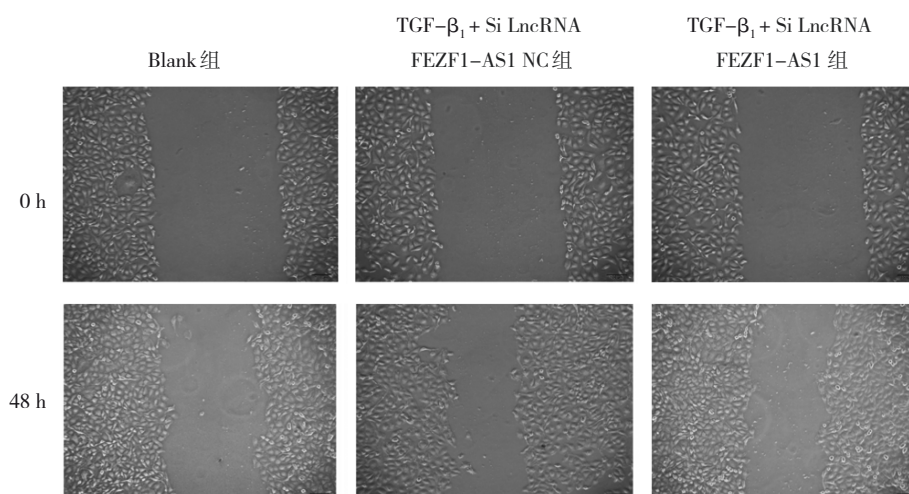


图 2 各组细胞划痕愈合的检测 ($\times 100$)

2.6 沉默 LncRNA FEZF1-AS1 对细胞迁移的影响

Transwell 实验结果显示,Blank 组、TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组和 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组迁移细胞数分别为(223.00 ± 3.06)、(325.30 ± 2.91)、(272.70 ± 5.78)个,经方差分析,差

异有统计学意义($F = 153.400, P = 0.000$)。两两比较结果示,TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组迁移细胞数大于 Blank 组($P < 0.05$);TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组迁移细胞数小于 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组($P < 0.05$)。见图 3。

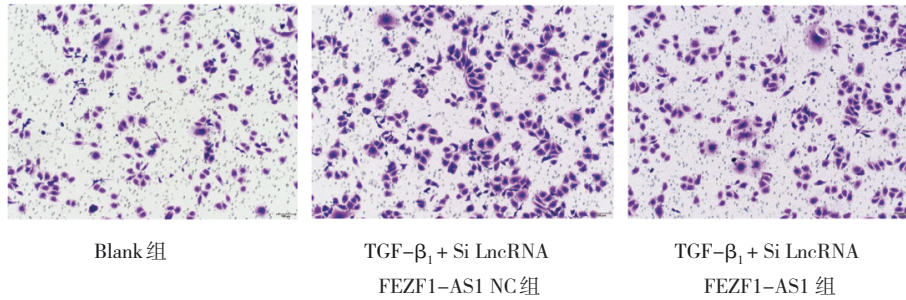


图3 各组细胞迁移的检测 (×100)

2.7 LncRNA FEZF1-AS1 基因抑制 miR-200c-3p 的表达

qRT-PCR 实验结果显示,Blank 组、TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组和 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组细胞 LncRNA FEZF1-AS1 mRNA 与 miR-200c-3p mRNA 相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组 LncRNA FEZF1-AS1 mRNA 相对表达量低于 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组($P < 0.05$);而 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组 miR-200c-3p mRNA 相对表达量低于 Blank 组($P < 0.05$);TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组 miR-200c-3p mRNA 相对表达量高于 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 各组细胞 LncRNA FEZF1-AS1 mRNA、miR-200c-3p mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

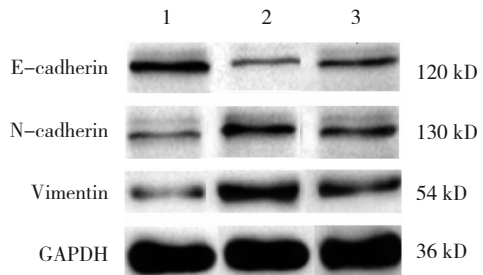
组别	LncRNA FEZF1-AS1 mRNA	miR-200c-3p mRNA
Blank 组	1.29 ± 0.06	1.10 ± 0.03
TGF-β ₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组	5.09 ± 0.12 ^①	0.15 ± 0.006 ^①
TGF-β ₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组	2.83 ± 0.11 ^{①②}	0.40 ± 0.003 ^{①②}
F 值	365.900	1076.000
P 值	0.000	0.000

注:①与 Blank 组比较, $P < 0.05$;②与 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组比较, $P < 0.05$ 。

2.8 LncRNA FEZF1-AS1 促进肺间质纤维化相关蛋白的表达

Western blotting 检测结果显示,Blank 组、TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组和 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组 E-cadherin 蛋白相对表达量高于 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组($P < 0.05$);TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组 N-cadherin 蛋白相对表达量低于 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组($P < 0.05$);TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组

Vimentin 蛋白相对表达量低于 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组($P < 0.05$)。见图 4 和表 7。



1:Blank 组; 2:TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组; 3:TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组。

图4 LncRNA FEZF1-AS1 促进肺间质纤维化相关蛋白的表达

表 7 各组细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白	Vimentin 蛋白
Blank 组	0.87 ± 0.02	0.48 ± 0.01	0.38 ± 0.02
TGF-β ₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组	0.40 ± 0.01 ^①	0.87 ± 0.01 ^①	0.87 ± 0.01 ^①
TGF-β ₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 组	0.71 ± 0.02 ^{①②}	0.71 ± 0.01 ^{①②}	0.63 ± 0.03 ^{①②}
F 值	176.600	266.100	112.600
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与 Blank 组比较， $P < 0.05$ ；②与 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

目前国内外研究认为 IPF 发病机制主要与 EMT 有关，认为肺泡上皮细胞间质转化机制，肺成纤维细胞的活化及胶原沉积等在 IPF 发病中具有关键的作用^[8]。TGF-β₁ 诱导因子可通过多种不同的信号通路调节 EMT，是目前 IPF 细胞模型复制中较为成熟的方法。LncRNA 作为人类基因组中重要调节因子，在表观遗传、转录及转录后水平、翻译或翻译后水平调控基因表达，与人类疾病的发生、发展密切相关^[4]。研究发现，LncRNA FEZF1-AS1 不仅在各种肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及 Warburg 效应中起着至关重要的作用，还参与调节 EMT^[9]。研究表明抑制 LncRNA FEZF1-AS1 可抑制前列腺癌细胞的增殖、侵袭、转移和 EMT，发现 LncRNA FEZF1-AS1 通过调控前列腺癌中的 miR-25-3p/ITGB8 轴促进自噬和 EMT^[10]。沉默 LncRNA FEZF1-AS1 还可抑制非小细胞肺癌 NSCLC 的细胞增殖和侵袭，LncRNA FEZF1-AS1 可通过增加 E-cadherin 的表达，降低 Slug、Twist 和 Vimentin 的表达，抑制 NSCLC 细胞 EMT^[11]。研究显示，LncRNA FEZF1-AS1 是肝癌发生、发展中的关键调控因子，沉默 LncRNA FEZF1-AS1 基因可通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路抑制 EMT，从而抑制肝癌细胞的侵袭、转移^[12]。故目前研究发现 LncRNA FEZF1-AS1 在多种肿瘤的 EMT 过程中均起着关键作用，但 LncRNA FEZF1-AS1 在特发性肺间质纤维化中的作用尚未有报道。本研究首次证实，LncRNA FEZF1-AS1 在特发性肺间质纤维化中明显高表达，LncRNA FEZF1-AS1 在 IPF 中促进细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 过程，且进一步证实 IPF 中 LncRNA FEZF1-AS1 可靶向抑制 miR-200c-3p 的表达。

本研究 EMT 过程中的关键分子选用 E-

cadherin、N-cadherin 和 Vimentin，E-cadherin 是一种 Ca²⁺ 依赖的、与细胞间黏附密切相关的跨膜糖蛋白，是典型的上皮细胞标志物，E-cadherin 是介导细胞与细胞间黏附的最重要的分子之一，当 E-cadherin 的表达减少时，细胞间的黏附作用减弱，细胞极性发生改变，导致上皮样细胞进一步向间质样细胞转化。本研究结果也显示，IPF 模型组细胞 E-cadherin 明显低于对照组细胞，且沉默 LncRNA FEZF1-AS1 可促进 E-cadherin 的表达。而 N-cadherin 和 Vimentin 是间质细胞的重要标志物，N-cadherin 和 Vimentin 对维持细胞形态稳定，促进细胞黏附、浸润转移及信号传导均发挥重要作用。本研究结果证实，模型组细胞 N-cadherin、Vimentin 表达明显高于空白对照组细胞，敲除 LncRNA FEZF1-AS1 基因可抑制 N-cadherin、Vimentin 的表达，因此本研究证实 LncRNA FEZF1-AS1 在 IPF 中促进 EMT 的发生。

miR-200c-3p 是目前研究已证实的在 IPF 的 EMT 发病机制中发挥重要作用调控因子，研究发现 miR-200c-3p 在肺间质纤维化患者及动物模型中均显著下调，miR-200c-3p 可抑制肺间质纤维化 EMT 转化，逆转肺成纤维细胞的纤维原活性^[13]。miR-200c-3p 抑制肺泡 II 型上皮细胞异常的 EMT，抑制肺泡 II 型上皮细胞向肺泡 I 型细胞的转化，进而抑制肺间质纤维化的发生^[14]。本研究结果也显示，肺间质纤维化细胞模型中 miR-200c-3p 的表达明显低于空白对照组细胞。沉默 LncRNA FEZF1-AS1 组细胞中 miR-200c-3p 的表达明显高于 TGF-β₁ + Si LncRNA FEZF1-AS1 NC 组细胞，表明肺间质纤维化中 LncRNA FEZF1-AS1 通过靶向抑制 miR-200c-3p 途径介导疾病 EMT 的发生与进展。这也是本研究的创新之处，首次发现 IPF 发病机制中 LncRNA FEZF1-AS1 对 miR-200c-3p 的靶向作用关系。

综上所述，本研究证明 LncRNA FEZF1-AS1 通

过靶向抑制 miR-200c-3p 促进肺间质纤维化细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 过程,从而促进肺间质纤维化的发生与进展。本研究对 IPF 进展的分子机制有了新的认识,为其治疗提供了潜在的靶点。

参 考 文 献 :

- [1] SPAGNOLO P, KROPSKI J A, JONES M G, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: disease mechanisms and drug development[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107798.
- [2] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [3] BISCHOFF J. Endothelial-to-mesenchymal transition[J]. *Circ Res*, 2019, 124(8): 1163-1165.
- [4] BRIDGES M C, DAULAGALA A C, KOURTIDIS A. LNCcation: lncRNA localization and function[J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(2): e202009045.
- [5] PONTEMEZZO E, FOGGIO E, VERNUCCI E, et al. miR-200c-3p regulates epithelial-to-mesenchymal transition in epicardial mesothelial cells by targeting epicardial follistatin-related protein 1[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4971.
- [6] LIU Z H, ZHOU Y, LIANG G H, et al. Circular RNA hsa_circ_001783 regulates breast cancer progression via sponging miR-200c-3p[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 55.
- [7] WANG Y, LU K J, LI W B, et al. MiR-200c-3p aggravates gastric cell carcinoma via KLF6[J]. *Genes Genomics*, 2021, 43(11): 1307-1316.
- [8] KINOSHITA T, GOTO T. Molecular mechanisms of pulmonary fibrogenesis and its progression to lung cancer: a review[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1461.
- [9] CHENG Y Z. FEZF1-AS1 is a key regulator of cell cycle, epithelial-mesenchymal transition and Wnt/ β -catenin signaling in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(1): BSR20180906.
- [10] WANG Z H, WANG J H, WANG K Q, et al. LncRNA FEZF1-AS1 promoted chemoresistance, autophagy and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through regulation of miR-25-3p/ITGB8 axis in prostate cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(5): 2281-2293.
- [11] HE R, ZHANG F H, SHEN N. LncRNA FEZF1-AS1 enhances epithelial-mesenchymal transition (EMT) through suppressing E-cadherin and regulating WNT pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 331-338.
- [12] WANG Y D, SUN X J, YIN J J, et al. Long non-coding RNA FEZF1-AS1 promotes cell invasion and epithelial-mesenchymal transition through JAK2/STAT3 signaling pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 134-141.
- [13] YANG S Z, BANERJEE S, de FREITAS A, et al. Participation of miR-200 in pulmonary fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(2): 484-493.
- [14] MOIMAS S, SALTON F, KOSMIDER B, et al. miR-200 family members reduce senescence and restore idiopathic pulmonary fibrosis type II alveolar epithelial cell transdifferentiation[J]. *ERJ Open Res*, 2019, 5(4): 00138-2019.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 满君, 宋龙飞, 刘永全. LncRNA FEZF1-AS1 调控特发性肺间质纤维化的机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(9): 22-29.

Cite this article as: MAN J, SONG L F, LIU Y Q. Mechanism of LncRNA FEZF1-AS1 regulating idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(9): 22-29.