

耿菲,陈莹莹,姚婧昕,等. 沉默 Rho GDI α 抑制矽肺上皮间质转化及其作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 10-15.

Geng F, Chen YY, Yao JX, et al. The effect of Rho GDI α knockdown on the suppression of epithelial-mesenchymal transition in silicosis [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 10-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 12. 002

沉默 Rho GDI α 抑制矽肺上皮间质转化及其作用机制

耿菲¹,陈莹莹²,姚婧昕²,李世峰²,高学敏²,徐丁洁³,魏中秋¹,杨方²,徐洪^{2*}

(1.华北理工大学基础医学院,河北唐山 063000; 2.华北理工大学医学实验研究中心,河北唐山 063000;
3.华北理工大学中医学院,河北唐山 063000)

【摘要】 目的 探讨沉默 Rho GDP 解离抑制因子 α (Rho GDP dissociation inhibitor α , Rho GDI α)对矽肺上皮间质转化的作用及机制。**方法** 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导人肺泡 II 型上皮细胞株 A549,分为空载体慢病毒组 (LEV)、沉默 Rho GDI α 慢病毒感染组 (Lv-Rho GDI α -inhibition)、TGF- β 1 诱导 LEV 组 (LEV+TGF- β 1)、TGF- β 1 诱导 Lv-Rho GDI α -inhibition 组 (Lv-Rho GDI α -inhibition+TGF- β 1)。采用 Western blot 法、免疫细胞化学染色检测 Rho GDI α 、RhoA、Rho 激酶 (Rho kinase, ROCK)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和 I 型胶原 (collagen-I) 蛋白表达,采用 Western blot 法及 CCK-8 检测细胞增殖能力。**结果** Western blot 法及免疫细胞化学染色结果显示,与 LEV 对照组相比,Lv-Rho GDI α -inhibition 组 Rho GDI α 、RhoA、ROCK 蛋白表达下降,E-cad 蛋白表达上调, α -SMA 和 collagen-I 蛋白表达下降;LEV+TGF- β 1 组 Rho GDI α 、RhoA、ROCK 蛋白表达上升,E-cad 蛋白表达下调, α -SMA 和 collagen-I 蛋白表达上升。与 LEV+TGF- β 1 组相比,Lv-Rho GDI α -inhibition+TGF- β 1 组 Rho GDI α 、RhoA、ROCK 蛋白表达下降,E-cad 蛋白表达上调, α -SMA 和 collagen-I 蛋白表达下降。CCK-8 及 cyclin D1 蛋白检测结果显示,与 LEV 对照组相比,Lv-Rho GDI α -inhibition 组细胞增殖受到抑制,LEV+TGF- β 1 组细胞增殖增强,与 LEV+TGF- β 1 组相比,Lv-Rho GDI α -inhibition+TGF- β 1 组细胞增殖受到抑制。**结论** 沉默 Rho GDI α 可通过调控 RhoA/ROCK 信号通路抑制上皮间质转化发挥抗矽肺纤维化作用。

【关键词】 Rho GDP 解离抑制因子 α ;上皮间质转化;矽肺

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 12-0010-06

Suppressive effect of Rho GDI α knockdown on epithelial-mesenchymal transition in silicosis and its mechanism

GENG Fei¹, CHEN Yingying², YAO Jingxin², LI Shifeng², GAO Xuemin²,
XU Dingjie³, WEI Zhongqiu¹, YANG Fang², XU Hong^{2*}

(1. Basic Medical College, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China.
2. Medical Research Center, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000.
3. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of Rho GDP dissociation inhibitor α (Rho GDI α) knockdown on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in silicosis. **Methods** The alveolar type II epithelial cell line

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81472953);唐山市科技计划项目 (18130216a);河北省卫生计生委员会医学科学研究课题计划项目 (20191107);华北理工大学大学生创新训练计划项目 (2018201)。

[作者简介] 耿菲 (1981—),男,硕士,研究方向:器官纤维化发病机制研究。E-mail:15526192@qq.com

[通信作者] 徐洪 (1980—),男,博士,研究方向:器官纤维化发病机制研究。E-mail:603635660@qq.com

A549 was induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) for EMT. The cells were divided into four groups: lentivirus empty vector (LEV) group, RhoGDI α depletion lentiviral vector (Lv-Rho GDI α -inhibition) group, LEV-transfected cells induced by TGF- β 1 (LEV+TGF- β 1) group, and Lv-Rho GDI α -inhibition transfected cells induced by TGF- β 1 (Lv-Rho GDI α -inhibition+TGF- β 1) group. Western blotting and immunocytochemical staining were used to examine the protein expression of Rho GDI α , RhoA, Rho kinase (ROCK), E-cadherin (E-cad), α -smooth muscle actin (α -SMA) and collagen-I. **Results** Compared with the LEV control group, Rho GDI α , RhoA, ROCK, α -SMA and collagen-I showed upregulated expression, while E-cad showed downregulated expression in the Lv-Rho GDI α -inhibition group. Compared with the LEV + TGF- β 1 group, Rho GDI α , RhoA, ROCK, α -SMA and collagen-I were all upregulated, and E-cad was downregulated in the Lv-Rho GDI α -inhibition+TGF- β 1 group. Western blotting and Cell Counting Kit-8 result showed that silencing of Rho GDI α inhibited cell proliferation. **Conclusions** Rho GDI α knockdown may lead to the inhibition of epithelial-mesenchymal transformation by regulating the RhoA/ROCK signaling pathway, and plays an anti-silicosis effect.

[Keywords] Rho GDP dissociation inhibitor α ; epithelial mesenchymal transition; silicosis

矽肺 (silicosis) 是长期吸入大量含有游离的二氧化硅 (silicon dioxide, SiO₂) 粉尘而引起以矽结节和弥漫性肺间质纤维化为主要病变的慢性进行性尘肺病^[1], 矽肺的发病机制复杂, 涉及多层面、多阶段、多种细胞的参与, 特征性表达 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的肌成纤维细胞被认为是器官纤维化形成过程中产生过量细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的最主要和最重要的细胞^[2-3], 而上皮细胞可以通过上皮-间质转化 (epithelial mesenchymal transitions, EMT) 转化为成纤维细胞/肌成纤维细胞^[4-6]。Rho GDP 解离抑制因子 α (Rho GDP dissociation inhibitor α , Rho GDI α) 是本课题组应用双向凝胶电泳技术在 TGF- β 1 诱导的大鼠原代肺成纤维细胞中筛选出来的一个差异性蛋白, Rho GDI α 作为蛋白伴侣, 是 Rho GTP 酶生物活性调节的关键因子, 在细胞分化、骨架调控等方面起重要作用, 并与细胞增殖、凋亡等生命活动密切相关^[7]。然而, Rho GDI α 能够通过调节 EMT 从而调控矽肺纤维化的发生与发展尚无文献报道。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人肺泡 II 型上皮细胞株 A549 购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂

人重组 TGF- β 1 (240-B) 购置于美国 R&D 公司; Rho GDI α 抗体 (A1214) 购置于武汉 ABclonal 公司; RhoA 抗体 (ab32046) 购置于美国 Epiyomics 公司; ROCK 抗体 (ab4517) 购置于美国 Abcam 公司; α -SMA 抗体 (1184-1) 购置于美国 Epiyomics 公司; E-cad 抗体 (ab76055) 购置于美国 Abcam 公司;

Collagen-I 抗体 (AF0134) 购置于美国 Affinity 公司; Tubulin- α 抗体 (AF7010) 购置于美国 Affinity 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 人肺泡 II 型上皮细胞株 A549 培养及分组

人肺泡 II 型上皮细胞株 A549 常规培养, 分为: 1) 空载体慢病毒组 (Lentivirus empty vector, LEV): 感染空载体慢病毒; 2) 沉默 Rho GDI α 慢病毒感染组 (Lv-Rho GDI α -inhibition): 感染沉默 Rho GDI α 的慢病毒; 3) TGF- β 1 诱导 LEV 组 (LEV+TGF- β 1): 感染空载体慢病毒的稳定细胞株给予 TGF- β 1 (5 ng/mL) 孵育 24 h; 4) TGF- β 1 诱导 Lv-Rho GDI α -inhibition 组 (Lv-Rho GDI α -inhibition+TGF- β 1): 感染沉默 Rho GDI α 的稳定细胞株给予 TGF- β 1 (5 ng/mL) 孵育 24 h。

1.3.2 Western blot 法检测 Rho GDI α 、RhoA、ROCK、E-cad、 α -SMA 及 collagen-I 蛋白的表达

提取 A549 细胞蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至 PVDF 膜, 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 一抗 Rho GDI α 、RhoA、ROCK、E-cad、 α -SMA 及 collagen-I (1:500)、Tubulin- α (1:1000) 4℃ 孵育过夜, 二抗 (1:5000) 37℃ 孵育 30 min。电化学发光显影 (美国伯乐公司), 用 Image Lab 软件测定条带 OD 值, 以目标蛋白与内参蛋白的比值作为蛋白的相对表达量。

1.3.3 免疫细胞化学染色法检测 α -SMA 的表达

每孔 6×10^3 个细胞密度制备细胞爬片, 按实验设计刺激细胞, 用 4% 多聚甲醛固定 40 min, 脱中性树胶染色。孵育一抗 α -SMA (1:100) 4℃ 过夜, 二抗 37℃ 1 h, DAB 显色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.3.4 CCK-8 法检测细胞增殖情况

细胞接种到 96 孔板中, 每孔细胞浓度约为 $5 \times$

10⁴,约 100 μL 细胞悬液。在培养基中加 10 μL CCK-8 试剂,加完试剂后轻慢敲击培养板帮助混匀。按实验设计培养相应的时间,酶标仪检测各组细胞在 450 nm 处的吸光度(OD),以 OD 值作为判断细胞增殖能力的指标。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 Levene 法行方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沉默 Rho GDIα 对 TGF-β1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞的 Rho GDIα、RhoA、ROCK 蛋白表达的调节作用

Western blot 方法检测 Rho GDIα、RhoA、ROCK 蛋白表达水平(图 1,表 1),Lv-Rho GDIα-inhibition 组细胞中 Rho GDIα、RhoA、ROCK 蛋白表达水平明显低于 LEV 对照组,是 LEV 对照组的 19.99%、35.89%、

36.60% ($P<0.05$);LEV + TGF-β1 组细胞中 Rho GDIα、RhoA、ROCK 蛋白表达水平明显高于 LEV 对照组,是 LEV 对照组的 3.33 倍、3.99 倍、3.06 倍($P<0.05$);Lv-Rho GDIα-inhibition+TGF-β1 组细胞中 Rho GDIα、RhoA、ROCK 蛋白表达水平低于 LEV+TGF-β1 组,是 LEV+TGF-β1 组的 65.19%、53.69%、71.31% ($P<0.05$),差异均具有统计学意义。

2.2 沉默 Rho GDIα 对 TGF-β1 诱导的人肺泡 II 型上皮细胞的上皮标志蛋白 E-cad 和间质标志蛋白 α-SMA 表达的调节作用

Western blot 方法检测上皮标志蛋白 E-cad 表达水平(图 2,表 2),统计结果提示,Lv-Rho GDIα-inhibition 组细胞中 E-cad 蛋白表达水平明显高于 LEV 对照组,是 LEV 对照组的 1.58 倍($P<0.05$);LEV+TGF-β1 组细胞中 E-cad 蛋白表达水平明显低于 LEV 对照组,是 LEV 对照组的 6.26% ($P<0.05$);Lv-Rho GDIα-inhibition+TGF-β1 组细胞中 E-cad 蛋白表达水平高于 LEV+TGF-β1 组,是 LEV+TGF-β1 组的 7.48 倍($P<0.05$),差异均具有统计学意义。

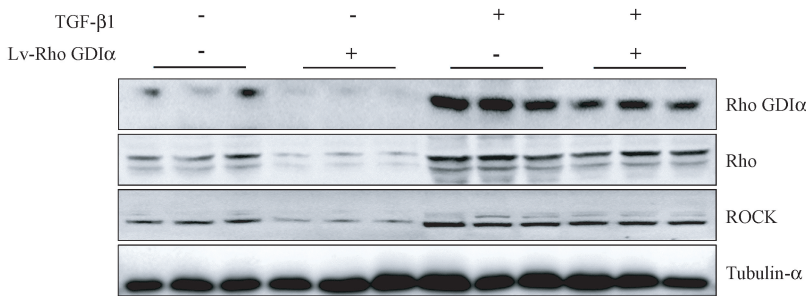


图 1 沉默 Rho GDIα 对 TGF-β1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞的 Rho GDIα、RhoA、ROCK 蛋白表达的调节作用
Figure 1 Regulating effect of Rho GDIα knockdown on the expression of Rho GDIα, RhoA and ROCK in A549 cells induced by TGF-β1

表 1 沉默 Rho GDIα 对 TGF-β1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞的 Rho GDIα、RhoA、ROCK 蛋白表达的调节作用($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Regulating effect of Rho GDIα knockdown on the expression of Rho GDIα, RhoA and ROCK in A549 cells induced by TGF-β1

组别 Groups	Rho GDIα	RhoA	ROCK
空载体慢病毒组 LEV group	0.35±0.04	0.17±0.01	0.40±0.02
沉默 Rho GDIα 慢病毒感染组 Lv-Rho GDIα-inhibition group	0.07±0.01 *	0.06±0.01 *	0.14±0.00 *
TGF-β1 诱导 LEV 组 LEV+TGF-β1 group	1.15±0.24 *	0.68±0.09 *	1.21±0.06 *
TGF-β1 诱导 Lv-Rho GDIα-inhibition 组 Lv-Rho GDIα-inhibition+TGF-β1 group	0.75±0.14 **	0.37±0.05 **	0.86±0.01 **
F 值 F value	34.49	87.41	631.80

注:与空载体慢病毒组比较, * $P<0.05$;与 TGF-β1 诱导 LEV 组比较, ** $P<0.05$ 。
Note. Compared with the LEV group, * $P<0.05$. Compared with the LEV+TGF-β1 group, ** $P<0.05$.

Western blot 方法检测间质标志蛋白 α -SMA 表达水平(图 2,表 2),统计结果提示,Lv-Rho GDI α -inhibition 组细胞中 α -SMA 蛋白表达水平明显低于 LEV 对照组,是 LEV 对照组的 56.97% ($P<0.05$);LEV+TGF- β 1 组细胞中 α -SMA 蛋白表达水平明显高于 LEV 对照组,是 LEV 对照组的 2.37 倍($P<0.05$);Lv-Rho GDI α -inhibition+TGF- β 1 组细胞中 α -SMA 蛋白表达水平低于 LEV+TGF- β 1 组,是 LEV+TGF- β 1 组的 78.54% ($P<0.05$),差异均具有统计学意义。

免疫细胞化学染色结果显示(图 3),LEV+TGF- β 1 组细胞胞浆中有较多的棕黄色肌丝样 α -SMA 阳性表达,而 Lv-Rho GDI α -inhibition+TGF- β 1 组中 α -

SMA 阳性表达细胞数量明显减少。

2.3 沉默 Rho GDI α 对 TGF- β 1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞的 collagen-I 蛋白表达的调节作用

Western blot 方法检测 collagen-I 蛋白表达水平(图 2,表 2),Lv-Rho GDI α -inhibition 组细胞中 collagen-I 蛋白表达水平明显低于 LEV 对照组,是 LEV 对照组的 22.48% ($P<0.05$);LEV+TGF- β 1 组细胞中 collagen-I 蛋白表达水平明显高于 LEV 对照组,是 LEV 对照组的 4.44 倍 ($P<0.05$);Lv-Rho GDI α -inhibition+TGF- β 1 组细胞中 collagen-I 蛋白表达水平低于 LEV+TGF- β 1 组,是 LEV+TGF- β 1 组的 90.81% ($P<0.05$),差异均具有统计学意义。

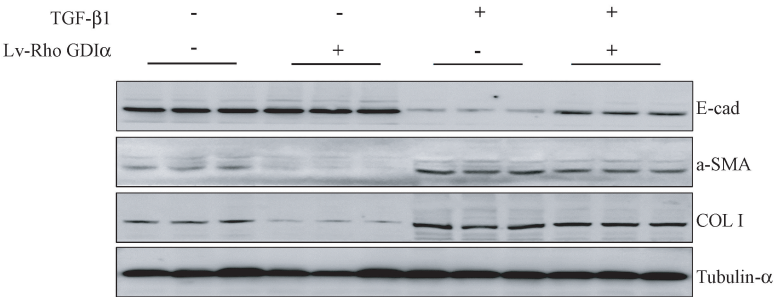


图 2 沉默 Rho GDI α 对 TGF- β 1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞的 E-cad、 α -SMA、collagen-I 蛋白表达的调节作用

Figure 2 Regulating effect of Rho GDI α knockdown on the expression of E-cad, α -SMA and collagen-I in A549 cells induced by TGF- β 1

表 2 沉默 Rho GDI α 对 TGF- β 1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞的 E-cad、 α -SMA、collagen-I 蛋白表达的调节作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Regulating effect of Rho GDI α knockdown on the expression of E-cad, α -SMA and collagen-I in A549 cells induced by TGF- β 1

组别 Groups	E-cad	α -SMA	Collagen-I
空载体慢病毒组 LEV group	0.53 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.01
沉默 Rho GDI α 慢病毒感染组 Lv-Rho GDI α -inhibition group	0.83 $\pm$ 0.22 *	0.22 $\pm$ 0.07 *	0.03 $\pm$ 0.01 *
TGF- β 1 诱导 LEV 组 LEV+TGF- β 1 group	0.03 $\pm$ 0.00 *	0.92 $\pm$ 0.10 *	0.54 $\pm$ 0.04 *
TGF- β 1 诱导 Lv-Rho GDI α -inhibition 组 Lv-Rho GDI α -inhibition+TGF- β 1 group	0.25 $\pm$ 0.02 **	0.72 $\pm$ 0.10 **	0.49 $\pm$ 0.03 **
F 值 F value	28.52	43.12	284.56

注:与空载体慢病毒组比较,* $P<0.05$;与 TGF- β 1 诱导 LEV 组比较,** $P<0.05$ 。

Note. Compared with the LEV group, * $P<0.05$. Compared with the LEV+TGF- β 1 group, ** $P<0.05$.

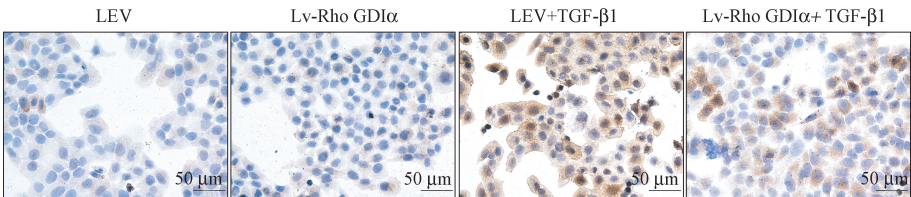


图 3 沉默 Rho GDI α 对 A549 细胞 α -SMA 蛋白表达的影响(免疫细胞化学染色)

Figure 3 The effect of Rho GDI α knockdown on the expression of α -SMA in A549 cells(Immunocytochemical staining)

2.4 沉默 Rho GDIα 对 TGF-β1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞的增殖能力的影响

CCK-8 法检测细胞增殖能力,结果显示(表 3),与 LEV 对照组相比,Lv-Rho GDIα-inhibition 组细胞生长明显受抑制,24 h、48 h、72 h Lv-Rho GDIα-inhibition 组 OD 值分别是 LEV 对照组的 75.88%、61.37%、72.37% ($P<0.05$);与 LEV 对照组相比,LEV+TGF-β1 组细胞生长增强,12 h、24 h、48 h、72 h LEV+TGF-β1 组 OD 值分别是 LEV 对照组的 1.52 倍、1.77 倍、1.60 倍、1.73 倍 ($P<0.05$);与 LEV+TGF-β1 组相比,Lv-RhoGDIα-inhibition+TGF-β1 组细胞生长受抑制,12 h、24 h、48 h、72 hLv-Rho GDIα-

inhibition+TGF-β1 组 OD 值是 LEV+TGF-β1 组的 72.09%、65.35%、60.38%、54.45% ($P<0.05$),差异均具有统计学意义。

Western blot 方法检测细胞周期蛋白(cyclin)D1 蛋白表达水平(图 4,表 4),Lv-Rho GDIα-inhibition 组细胞中 cyclin D1 蛋白表达水平明显低于 LEV 对照组,是 LEV 对照组的 29.21% ($P<0.05$);LEV+TGF-β1 组细胞中 cyclin D1 蛋白表达水平明显高于 LEV 对照组,是 LEV 对照组的 3.25 倍 ($P<0.05$);Lv-Rho GDIα-inhibition+TGF-β1 组细胞中 cyclin D1 蛋白表达水平低于 LEV+TGF-β1 组,是 LEV+TGF-β1 组的 70.69% ($P<0.05$),差异均具有显著性。

表 3 CCK-8 实验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Results of CCK-8 assay

组别 Groups	OD				
	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
空载体慢病毒组 LEV group	1.66±0.31	2.28±0.07	2.29±0.42	2.80±0.35	3.60±0.24
沉默 Rho GDIα 慢病毒感染组 Lv-Rho GDIα-inhibition group	1.73±0.03	2.04±0.29	2.15±0.49	2.12±0.14 *	2.21±0.03 *
TGF-β1 诱导 LEV 组 LEV+TGF-β1 group	1.70±0.21	2.50±0.40	3.48±0.29 *	4.94±0.09 *	5.76±0.34 *
TGF-β1 诱导 Lv-Rho GDIα-inhibition 组 Lv-Rho GDIα-inhibition+TGF-β1 group	1.69±0.28	2.48±0.21	2.51±0.35 **	3.23±0.17 **	3.48±0.40 **
F 值 F value	0.05	1.84	7.07	99.77	77.62

注:与空载体慢病毒组比较, * $P<0.05$;与 TGF-β1 诱导 LEV 组比较, ** $P<0.05$ 。
Note. Compared with LEV group, * $P<0.05$. Compared with the LEV+TGF-β1 group, ** $P<0.05$.

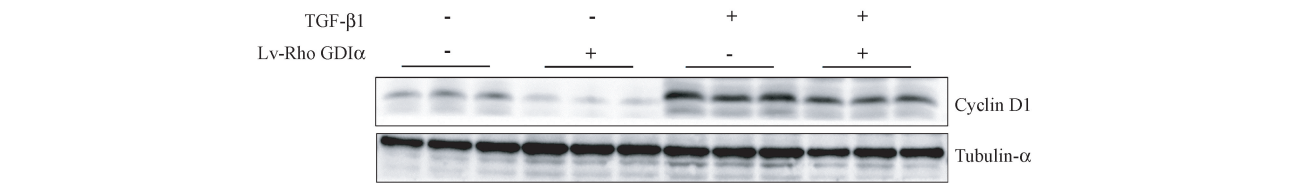


图 4 沉默 Rho GDIα 对 TGF-β1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞的 cyclin D1 蛋白表达的调节作用

Figure 4 Regulating effect of Rho GDIα knockdown on the expression of cyclin D1 in A549 cells induced by TGF-β1

表 4 沉默 Rho GDIα 对 TGF-β1 诱导的肺泡 II 型上皮细胞的 cyclin D1 蛋白表达的调节作用($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 4 Regulating effect of Rho GDIα knockdown on the expression of cyclin D1 in A549 cells induced by TGF-β1

组别 Groups	Cyclin D1
空载体慢病毒组 LEV group	0.07±0.01
沉默 Rho GDIα 慢病毒感染组 Lv-Rho GDIα-inhibition group	0.02±0.00 *
TGF-β1 诱导 LEV 组 LEV+TGF-β1 group	0.24±0.04 *
TGF-β1 诱导 Lv-Rho GDIα-inhibition 组 Lv-Rho GDIα-inhibition+TGF-β1 group	0.17±0.03 **
F 值 F value	40.76

注:与空载体慢病毒组比较, * $P<0.05$;与 TGF-β1 诱导 LEV 组比较, ** $P<0.05$ 。
Note. Compared with LEV group, * $P<0.05$. Compared with the LEV+TGF-β1 group, ** $P<0.05$.

3 讨论

Rho GDP 解离抑制因子(Rho GDP dissociation inhibitor, Rho GDI)家族包括 Rho GDI α 、Rho GDI β 和 Rho GDI γ 三个亚型,其中 Rho GDI α 是表达最广泛、研究最深入的亚型^[8]。目前发现 Rho GDI α 在肝癌中表达上升,且与肿瘤的浸润、转移及预后相关^[9];另外一些研究也发现 Rho GDI α 在胶质瘤、前列腺癌等恶性肿瘤中表达下降,且高表达者多分化好、不易转移、侵袭能力弱及预后较好^[10-11]。但 Rho GDI α 在同一肿瘤中的表达水平也并不一致, Song 等发现 Rho GDI α 是肺腺癌的转移抑制因子^[12],韩昱晨等则表明 Rho GDI α 在肺癌高转移亚型中表达上调^[13]。目前尚不清楚造成这一差异的确切原因,可能与肿瘤亚型、研究方法或是样本数量有关。本实验研究发现,用 TGF- β 1 诱导 A549 细胞后, Rho GDI α 、RhoA、ROCK 蛋白表达明显上调,伴随上皮标记蛋白 E-cad 的减弱与下调,间质标记蛋白 α -SMA 和 collagen-I 蛋白的表达增强和上调,而慢病毒感染沉默 Rho GDI α 后,可下调 Rho GDI α 、RhoA、ROCK 蛋白表达,降低 α -SMA 和 collagen-I 蛋白的表达,逆转上皮细胞向肌成纤维细胞转化,提示 TGF- β 1 诱导 A549 细胞后, Rho GDI α /RhoA/ROCK 信号通路参与了肺泡 II 型上皮细胞向肌成纤维细胞转化的调节过程。

近年来研究发现作为蛋白伴侣的 Rho GDI α 是 Rho GTP 酶生物活性调节的关键因子,在细胞分化、骨架调控等方面起重要作用,并与细胞增殖、凋亡等生命活动密切相关^[14]。Rho GTP 酶是重要的细胞内信号分子,参与许多细胞生理进程包括调控细胞形态改变、细胞骨架重组、细胞粘附、细胞周期、细胞凋亡、基因转录等^[15]。研究发现, RhoA/ROCK 信号转导通路参与多种器官纤维发生、发展过程,通过激活 RhoA/ROCK 信号转导通路,上调靶细胞 α -SMA 蛋白的表达,可促进间质细胞和上皮细胞向肌成纤维细胞的转化^[16-18]。而 Rho GDI α 通过调控 RhoA/ROCK 信号转导通路,如何调节上皮细胞向肌成纤维细胞的转化呢? 本实验 Western blot 和 CCK-8 结果显示, TGF- β 1 诱导 A549 细胞后, cyclin D1 蛋白表达上升,细胞增殖能力增强,而沉默 Rho GDI α 后, cyclin D1 蛋白表达下降,细胞增殖能力减弱,提示 TGF- β 1 诱导 A549 细胞后,上皮细胞数量增多,向肌成纤维细胞转化增强,沉默 Rho GDI α 后,抑制 RhoA/ROCK 信号转导通路,上皮细胞数量减少,向肌成纤维细胞转化减弱。

参考文献:

[1] Steenland K, Ward E. Silica: a lung carcinogen [J]. CA Cancer

J Clin, 2014, 64(1): 63-69.

- [2] Liu Y, Xu H, Geng Y, et al. Dibutyl-*c*-AMP attenuates pulmonary fibrosis by blocking myofibroblast differentiation via PKA/CREB/CBP signaling in rats with silicosis [J]. Respir Res, 2017, 18(1): 38.
- [3] Xu H, Yang F, Sun Y, et al. A new antifibrotic target of Ac-SDKP: Inhibition of myofibroblast differentiation in rat lung with silicosis [J]. Plos One, 2012, 7(7): e40301.
- [4] Deng HJ, Gao XM, Peng HB, et al. Effect of liposomemediated HSP27 transfection on collagen synthesis in alveolar type II epithelial cells [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 7319-7324.
- [5] Deng H, Xu H, Zhang X, et al. Protective effect of Ac-SDKP on alveolar epithelial cells through inhibition of EMT via TGF- β 1/ROCK1 pathway in silicosis in rat [J]. Toxicol App Pharmacol, 2016, 294: 1-10.
- [6] Deng H, Yang F, Xu H, et al. Ac-SDKP suppresses epithelial-mesenchymal transition in A549 cells via HSP27 signaling [J]. Exp Mol Pathol, 2014, 97(1): 176-183.
- [7] Wang H, Wang B, Liao Q, et al. Overexpression of RhoGDI, a novel predictor of distant metastasis, promotes cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma [J]. FEBS Lett, 2014, 588(3): 503-508.
- [8] DerMardirossian C, Bokoch GM. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation [J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(7): 356-363.
- [9] Li W, Wang H, Jin X, et al. Loss of RhoGDI is a novel independent prognostic factor in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(11): 2535-2541.
- [10] Wu F, Hu P, Li D, et al. RhoGDI α suppresses self-renewal and tumorigenesis of glioma stem cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(38): 61619-61629.
- [11] Zhu Y, Liu C, Tummala R, et al. RhoGDI α downregulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells [J]. Prostate, 2013, 73(15): 1614-1622.
- [12] Song Q, Xu Y, Yang C, et al. miR-483-5p Promotes invasion and metastasis of lung adenocarcinoma by targeting RhoGDI1 and ALCAM [J]. Cancer Res, 2014, 74(11): 3031-3042.
- [13] 韩昱晨, 吴燕妮, 高爽, 等. RhoC 及其调节因子 RhoGDI α 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义 [J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11(3): 391-397.
- [14] Pajic M, Herrmann D, Vennin C, et al. The dynamics of Rho GTPase signaling and implications for targeting cancer and the tumor microenvironment [J]. Small GTPases, 2015, 6(2): 123-133.
- [15] Ota T, Maeda M, Okamoto M, et al. Positive regulation of Rho GTPase activity by RhoGDIs as a result of their direct interaction with GAPs [J]. BMC Syst Biol, 2015, 9(1): 1-9.
- [16] Korol A, Taiyab A, West-Mays JA. RhoA/ROCK signaling regulates TGF β -Induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells through MRTF-A [J]. Mol Med, 2016, 22(1): 713-723.
- [17] Gu L, Gao Q, Ni L, et al. Fasudil inhibits epithelial-myofibroblast transdifferentiation of human renal tubular epithelial HK-2 cells induced by high glucose [J]. Chem Pharm Bull, 2013, 61(7): 688-694.
- [18] Zhang H, Liu X, Liu Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition of rat peritoneal mesothelial cells via RhoA/Rock pathway [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2011, 47(2): 165-172.

[收稿日期]2019-07-08