

环状 RNA *hsa_circUCK2* 参与调控二氧化硅致肺纤维化进程

张聪^{a,b}, 罗薇^b, 王莎^b, 巢杰^{a,b}

东南大学 a. 公共卫生学院, 环境医学工程教育部重点实验室 b. 医学院医学生理系, 江苏 南京 210009

摘要:

[背景] 肺纤维化疾病目前早期缺少筛查诊断方法, 后期缺乏特效治疗措施, 因此急需探究其机制并开发针对性的治疗方法。

[目的] 筛选病理条件下差异表达的环状 RNA (circRNA) *hsa_circUCK2* 的表达情况, 探究其对肺纤维化的影响。

[方法] 在细胞实验中, 使用小干扰 RNA (siRNA) 敲除 HPF-a 细胞中 *hsa_circUCK2*, TGF- β 1 刺激 HPF-a 细胞, 设立 si-NC 组、si-circUCK2 组、si-NC+TGF- β 1 处理组、si-circUCK2+TGF- β 1 处理组 4 组, Western blot 法检测 4 组 HPF-a 细胞中纤连蛋白 (FN1) 表达情况, 划痕实验检测 HPF-a 细胞迁移能力, CCK-8 实验检测 TGF- β 1 刺激的 2 组 (si-NC+TGF- β 1 处理组和 si-circUCK2+TGF- β 1 处理组) HPF-a 细胞活性。在动物实验中, 健康 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 48 只, 随机分为生理盐水+si-con 组, 生理盐水+si-circ_0000115 组, SiO₂+si-con 组, SiO₂+si-circ_0000115 组 4 组。 *mmu_circ_0000115* 是 *hsa_circUCK2* 的小鼠同源基因, 气管滴注 siRNA 敲除小鼠肺 circRNA *mmu_circ_0000115*, 48 h 后通过气管滴注 SiO₂ 悬液 (0.2 g·kg⁻¹, 50 mg·mL⁻¹) 构建小鼠肺纤维化模型, 实时荧光定量 PCR 检测小鼠各脏器中敲除效率, Western blot 检测肺组织中 I 型胶原 α 2 蛋白 (COL1A2) 表达情况, 天狼星红检测肺组织中胶原合成情况。

[结果] 在细胞实验中, Western blot 结果显示, 敲除 *hsa_circUCK2* 可下调 TGF- β 1 刺激的 HPF-a 细胞中 FN1 的表达水平 ($P < 0.05$); CCK-8 实验和细胞划痕实验结果显示, *hsa_circUCK2* 基因的下调可以抑制 HPF-a 细胞的增殖和迁移 ($P < 0.01$)。在动物实验中, 实时荧光定量 PCR 结果显示, 在各脏器中只有肺组织中被显著敲除 *mmu_circ_0000115* ($P < 0.0001$); Western blot 结果表明, 与 SiO₂+si-con 组相比, 敲低 *mmu_circ_0000115* 可以降低 COL1A2 蛋白表达水平 ($P < 0.0001$); 天狼星红结果显示, 敲低 *mmu_circ_0000115* 后, 模型组小鼠肺组织中胶原的产生和沉积减少。

[结论] 敲低 *hsa_circUCK2* 抑制成纤维细胞活化和减少肺纤维化模型小鼠中胶原沉积。提示 *hsa_circUCK2* 参与肺纤维化进程, 可能是肺纤维化的潜在治疗靶点。

关键词: 环状 RNA; 转录组芯片; *hsa_circUCK2*; 肺纤维化; 人肺成纤维-成人细胞

Circular RNA *hsa_circUCK2* involved in regulation of pulmonary fibrosis induced by silicon dioxide ZHANG Cong^{a,b}, LUO Wei^b, WANG Sha^b, CHAO Jie^{a,b} (a. Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education/School of Public Health b. Department of Physiology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract:

[Background] Pulmonary fibrosis currently lacks screening and diagnostic methods in the early stages and effective treatments in the later stages, so there is an urgent need to explore the mechanisms and develop targeted treatments.

[Objective] To screen the expression of differentially expressed circular RNA (circRNA) *hsa_circUCK2* under pathological conditions and to explore its effect on pulmonary fibrosis.

[Methods] In the cell-based experiments, *hsa_circUCK2* was knocked down in HPF-a cells using small interfering RNA (siRNA), and HPF-a cells were stimulated by TGF- β 1. Four groups were set up: si-NC group, si-circUCK2 group, si-NC+TGF- β 1-treated group, and si-circUCK2+TGF- β 1-treated group. Western blot assay was used to detect the expression of fibronectin (FN1) in HPF-a cells of the four groups, scratch assay was used to detect the migration ability of HPF-a cells, and CCK-8



DOI 10.11836/JEOM23299

基金项目

国家自然科学基金项目(81972987)

作者简介

张聪(1998—), 女, 硕士生;

E-mail: zhangcong2012@163.com

通信作者

巢杰, E-mail: chaojie@seu.edu.cn

作者中包含编委会成员 无

伦理审批 已获得

利益冲突 无申报

收稿日期 2023-08-27

录用日期 2024-01-10

文章编号 2095-9982(2024)04-0362-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

张聪, 罗薇, 王莎, 等. 环状 RNA *hsa_circUCK2* 参与调控二氧化硅致肺纤维化进程 [J]. 环境与职业医学, 2024, 41(4): 362-366, 374.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM23299

Funding

This study was funded.

Correspondence to

CHAO Jie, E-mail: chaojie@seu.edu.cn

Editorial Board Members' authorship No

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2023-08-27

Accepted 2024-01-10

To cite

ZHANG Cong, LUO Wei, WANG Sha, et al. Circular RNA *hsa_circUCK2* involved in regulation of pulmonary fibrosis induced by silicon dioxide [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2024, 41(4): 362-366, 374.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM23299

assay was used to detect the proliferation ability of HPF-a cells in the two groups with TGF- β 1 stimulation, the si-NC+TGF- β 1-treated group and the si-circUCK2+TGF- β 1-treated group. In the animal experiments, forty-eight healthy SPF-grade male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: saline+si-con group, saline+si-circ_0000115 group, SiO₂+si-con group, and SiO₂+si-circ_0000115 group. Mouse lung circRNA *mmu_circ_0000115* (mouse homolog of *hsa_circUCK2*) was knocked down by tracheal drip injection of siRNA, and a mouse lung fibrosis model was constructed by tracheal drip injection of SiO₂ suspension (0.2 g·kg⁻¹, 50 mg·mL⁻¹) after 48 h. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the knockout efficiency in each organ of the mouse, Western blot was applied to detect the expression of type I collagen α 2 (COL1A2) in the lung tissues, and Sirius red was used to detect collagen synthesis in the lung tissues.

[Results] In the cell-based experiments, after the knockdown of *hsa_circUCK2*, the Western blot results showed that the expression level of the FN1 protein in TGF- β 1-stimulated HPF-a cells was significantly down-regulated ($P < 0.05$); the CCK-8 assay and cell scratch assay showed that the down-regulation of *hsa_circUCK2* gene significantly inhibited the proliferation and migration of HPF-a cells ($P < 0.01$). In the animal experiments, the real-time fluorescence quantitative PCR results showed that among the detected organs, *mmu_circ_0000115* was significantly knocked down only in the lung tissues ($P < 0.0001$); the Western blot results showed that knocking down *mmu_circ_0000115* significantly reduced the COL1A2 protein expression level when compared with the SiO₂+si-con group ($P < 0.0001$); the Sirius red results showed that knocking down *mmu_circ_0000115* significantly reduced collagen production and deposition in lung tissues of mice in the model group.

[Conclusion] Knockdown of *hsa_circUCK2* inhibits fibroblast activation and reduces collagen deposition in lung fibrosis model mice. It is suggested that the *hsa_circUCK2* is involved in the process of pulmonary fibrosis and may be a potential therapeutic target for pulmonary fibrosis.

Keywords: circular RNA; transcriptome microarray; *hsa_circUCK2*; pulmonary fibrosis; human pulmonary fibroblast-adult

肺纤维化(pulmonary fibrosis)是一种慢性进行性肺部疾病,其特征是成纤维细胞的活化和结缔组织基质的不可逆沉积,导致肺结构和生理的改变^[1]。现有研究表明,多种外因可导致肺成纤维细胞过度活化,引起肺纤维结构异常,肺泡毛细血管间隙增厚,气体交换受阻,导致患者肺功能异常^[2]。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β , TGF- β 1)在肺纤维化的发展中发挥着核心作用^[3]。用 TGF- β 1 刺激成纤维细胞会导致 Smad 转录因子的磷酸化和活化,从而激活或抑制下游基因的表达,包括 α -平滑肌肌动蛋白、结缔组织生长因子和胶原蛋白等分化标志基因^[4]。

环状 RNA(circRNA)是一种广泛表达的非编码 RNA,是由真核生物中数千个基因外显子的前体 mRNA 反向剪接产生的。circRNA 结构稳定且常表现出细胞特异性和组织特异性^[5-6]。研究表明, circRNA 具有多种生物学功能,如调节转录、作为微小 RNA(miRNA)海绵调节细胞增殖/上皮间质转化、参与癌症/细胞免疫等多种疾病过程,可以作为疾病治疗的靶点^[7-8]。研究发现,在肺纤维化小鼠模型中, circRNA *TADA2A* 通过抑制成纤维细胞增殖和激活减轻特发性肺纤维化^[9]。实验室前期研究发现 circRNA 广泛参与矽肺纤维化过程,可能是肺纤维化治疗的潜在靶点^[10]。因此,筛选具有调控肺纤维化生物学功能的 circRNA,可以为开发治疗肺纤维化药物提供重要的理论基础。因此,本研究识别小鼠矽肺模型组和对照组中差异表达的 circRNA,探究其对肺纤维化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验设计

在前期的实验中,通过构建小鼠肺纤维化模型,分离小鼠肺组织,进行 circRNA 转录组芯片分析^[11],结合同源性分析及 circRNA 变化倍数,筛选确定 *hsa_circUCK2* 为研究靶标。

随后进行细胞实验,结合小干扰 RNA(siRNA)敲除人肺成纤维-成人细胞(HPF-a 细胞) *hsa_circUCK2*,在离体水平通过 Western blot、CCK-8 和划痕实验研究 *hsa_circUCK2* 的功能。设立 si-NC 组、si-circUCK2 组、si-NC+TGF- β 1 处理组、si-circUCK2+TGF- β 1 处理组 4 组,进行 Western blot 和划痕实验;设立 si-NC+TGF- β 1 处理组、si-circUCK2+TGF- β 1 处理组 2 组,进行 CCK-8 实验。

最后进行动物实验,在整体水平通过 Western blot 和天狼星红实验来探究 *circUCK2* 在肺纤维化中的功能。使用 C57BL/6 小鼠,随机分为生理盐水+si-con 组、生理盐水+si-circ_0000115 组、SiO₂+si-con 组、SiO₂+si-circ_0000115 组 4 组,每组 12 只。气管滴注 siRNA 敲减小鼠肺 circRNA *mmu_circ_0000115*,48 h 后通过气管滴注 SiO₂ 悬液构建小鼠肺纤维模型。*mmu_circ_0000115* 是 *hsa_circUCK2* 的小鼠同源基因。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞的培养 HPF-a 细胞使用含 100 mL·L⁻¹ 胎牛血清的完全培养基,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱(新加坡 ESCO)常规传代培养。在显微镜下观察细胞生长

情况,细胞汇合度至90%以上予以传代,选对数生长期细胞进行相关实验。

1.2.2 细胞转染 将细胞接种到24孔板中,每孔铺入 5×10^4 个细胞,待细胞增殖至70%~80%时,用Lipofectamine™3000分别转染si-NC和si-circUCK2,si-NC为对照,si-circUCK2分为si-circUCK2-1组和si-circUCK2-2组,转染24 h后提取RNA进行实时荧光定量PCR,筛选出敲除效率更高的一条。筛选结束后,将si-NC和筛选出的si-circUCK2转染24 h后,2个TGF- β 1处理组加入 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的TGF- β 1诱导24 h,si-NC组和si-circUCK2组加入 $5 \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)处理24 h。Western blot和划痕实验设立4组:si-NC组、si-circUCK2组、si-NC+TGF- β 1处理组、si-circUCK2+TGF- β 1处理组。CCK-8实验设立2个TGF- β 1处理组:si-NC+TGF- β 1处理组、si-circUCK2+TGF- β 1处理组。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测circRNA *hsa_circUCK2*水平 使用TRIzol法提取HPF-a细胞中总RNA。采用HiScript®两步法实时荧光定量PCR试剂盒将总RNA反转录为cDNA;随后PCR体系QuantiNova™SYBR®Green PCR Kit法检测*hsa_circUCK2*的表达。反应体系包括 $7.2 \mu\text{L}$ 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水, $10 \mu\text{L}$ 协同结合试剂(synergetic binding reagent, SYBR)染料, $0.4 \mu\text{L}$ 上游引物, $0.4 \mu\text{L}$ 下游引物, $2 \mu\text{L}$ cDNA,共 $20 \mu\text{L}$ 。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因(*gapdh*)为内参。结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量数据分析。引物序列如下。*hsa_circUCK2*:正向引物(5'-3'),TGGATACAGATGCGGACACC;反向引物(5'-3'),CTGCTCCGAGGTAAGGACAC。*gapdh*:正向引物(5'-3'),ACCATCTTCCAGGAGCGAGAT;反向引物(5'-3'),GGGCAGAGATGATGACCCTTT。

1.2.4 Western blot检测纤连蛋白(FN1)表达 提取4组的细胞总蛋白后进行BCA定量,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白,随后转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。5%的脱脂牛奶封闭1 h后,加入一抗温育过夜,第2天加入二抗温育1 h,检测各组纤连蛋白(FN1)的表达,以GAPDH为内参。

1.2.5 CCK-8法检测HPF-a细胞活性 将分别转染好的细胞重悬,以每孔4000个细胞接种到96孔板中,每组各设置5个复孔,7个96孔板。恒温培养箱中过

夜,取6个96孔板,每孔加入 $1 \mu\text{L}$ $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的TGF- β 1;取1个96孔板,每孔加入 $10 \mu\text{L}$ 的CCK-8溶液。避光温育40 min后,酶标仪450 nm检测光密度,记录为0 h数据。分别在12、24、36、48、72、96 h各取1个96孔板,加入CCK-8溶液,检测光密度。

1.2.6 划痕实验检测HPF-a细胞迁移能力 细胞实验中,当分别转染的细胞汇合率达到90%时,用 $200 \mu\text{L}$ 枪头垂直于培养板轻划一条直线。用PBS冲洗细胞残渣3次,每孔加入 $5 \mu\text{L}$ $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的TGF- β 1,分别于0、24、48 h在显微镜下观察细胞划痕愈合情况。

1.3 动物实验

1.3.1 实验动物模型的建立及处理 健康SPF级雄性C57BL/6小鼠48只,5~7周龄,18~23 g,动物饲养温度为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$,湿度为 $55\% \pm 3\%$,昼夜节律,小鼠自由进食和饮水,适应性正常饲养1周。本次实验经东南大学实验伦理委员会批准(审批号:20190121002)。随机分为4组:生理盐水+si-con组、生理盐水+si-circ_0000115组、 SiO_2 +si-con组和 SiO_2 +si-circ_0000115组,每组12只。选择*mmu_circ_0000115*基因作为靶基因,合成siRNA(5'-UCUCGCCGAGUCUCCGUUTT-AACGGAAGACUCGCGGAGATT-3'),以及阴性对照(NC)序列,由上海吉玛制药技术有限公司合成。分别将si-circ_0000115和si-NC使用气管滴注法注入。术后48 h,通过气管滴注 SiO_2 悬液($0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)构建小鼠肺纤维化模型。28 d后,使用1%戊巴比妥钠溶液($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉小鼠,然后进行灌流,并收集肺组织和脏器。肺组织用30%蔗糖溶液脱水,4%多聚甲醛固定,储存于 -80°C 冰箱。

1.3.2 实时荧光定量PCR检测circRNA *hsa_circUCK2*水平 将小鼠肺组织、心脏和肾脏研磨,并使用TRIzol法提小鼠各脏器中总RNA。接着进行实时荧光定量PCR,方法同“1.2.3”。以 β -肌动蛋白(β -ACTIN)基因(*β -actin*)为内参。结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量数据分析。引物序列如下。引物序列如下。*mmu_circ_0000115*:正向引物(5'-3'),GGACACAGATGCGGATACCC;反向引物(5'-3'),CTCTGAGGTGAGGACTCGGT。 *β -actin*:正向引物(5'-3'),AGAGGGAAATCGTGCGTGA;反向引物(5'-3'),GGTCTTTACGGATGTCAACGTC。

1.3.3 Western blot检测I型胶原 α 2蛋白(COL1A2)表达 研磨小鼠肺组织,提取总蛋白后,检测各组COL1A2的表达。方法同“1.2.4”。以 β -ACTIN为内参。

1.3.4 天狼星红染色检测肺组织胶原沉积 将固定后的肺组织冰冻切片,使用PBS冲洗后,天狼星红(Picro

Sirius Red) 温育 1 h, 之后用乙酸快速冲洗 2 遍, 纯乙醇冲洗 1 遍, 再用纯乙醇脱水 2 遍, 最后用中性树脂封片, 在显微镜下进行拍照或者 4 °C 储存。

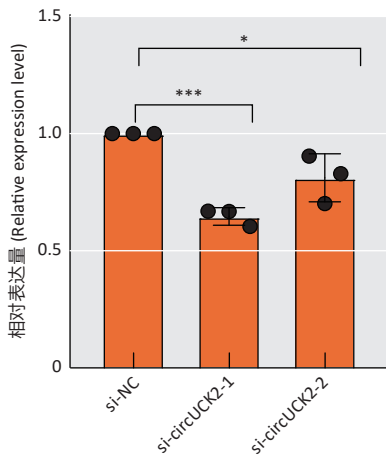
1.4 统计学分析

实验数据分析和图表绘制使用 GraphPad Prism 8 软件。计量资料实验结果均以表示, 两组间的差异使用两样本 *t* 检验方法分析, 多组间的差异使用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 敲除效率

实时荧光定量 PCR 实验检测 siRNA si-circUCK2 敲除效率, 发现与对照组相比, si-circUCK2 可敲低 HPF-a 细胞中 *hsa_circUCK2* (*P* < 0.01) (图 1)。



[注 (Note)] *: *P* < 0.05; ****: *P* < 0.0001。

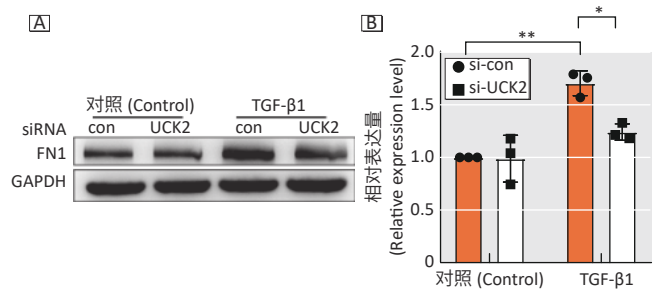
图 1 实时荧光定量 PCR 检测用 siRNA 转染的 HPF-a 细胞 *hsa_circUCK2* mRNA 的表达情况

Figure 1 Expression of *hsa_circUCK2* mRNA in HPF-a cells transfected with siRNA by real-time fluorescence quantitative PCR

2.2 细胞实验

2.2.1 特异性 si-circUCK2 转染可敲低 HPF-a 细胞中纤维化相关蛋白表达 Western blot 结果表明, 与 si-NC 组相比, si-NC+TGF-β1 处理组 FN1 蛋白表达水平升高 (*P* < 0.01)。si-circUCK2+TGF-β1 处理组与 si-NC+TGF-β1 处理组相比, FN1 蛋白表达水平降低 (*P* < 0.05) (图 2)。

2.2.2 *hsa_circUCK2* 基因下调可抑制 TGF-β1 诱导的 HPF-a 细胞增殖和迁移 CCK-8 法检测细胞增殖实验结果显示, 与 si-NC+TGF-β1 处理组 HPF-a 细胞的光密度值相比, si-circUCK2+TGF-β1 处理组光密度降低, 即细胞数量明显低于 si-NC 组 (*P* < 0.01, 图 3)。细胞划痕实验结果显示, 与 si-NC+TGF-β1 处理组相比, si-circUCK2+TGF-β1 处理组细胞的迁移能力降低 (图 4)。

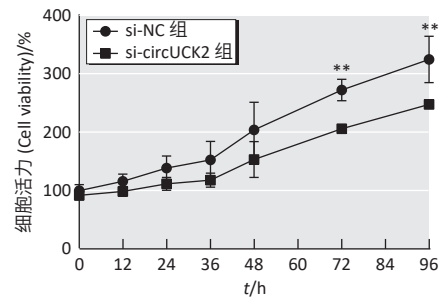


[注] A: FN1 蛋白表达水平; B: FN1 蛋白表达相对灰度值的量化分析。*: *P* < 0.05; **: *P* < 0.01。

[Note] A: FN1 protein expression levels; B: Quantitative analysis of the relative grayscale values of FN1 protein expression. *: *P* < 0.05; **: *P* < 0.01.

图 2 Western blot 检测 TGF-β1 刺激 HPF-a 细胞纤维化相关蛋白表达情况

Figure 2 Expression of fibrosis-related protein in HPF-a cells with TGF-β1 stimulation by Western blot



[注] **: 与 0 h 比, *P* < 0.01。

[Note] **: Compared with 0 h, *P* < 0.01.

图 3 CCK-8 实验检测 TGF-β1 刺激 HPF-a 细胞的增殖能力

Figure 3 Proliferation ability of HPF-a cells detected by CCK-8 assay

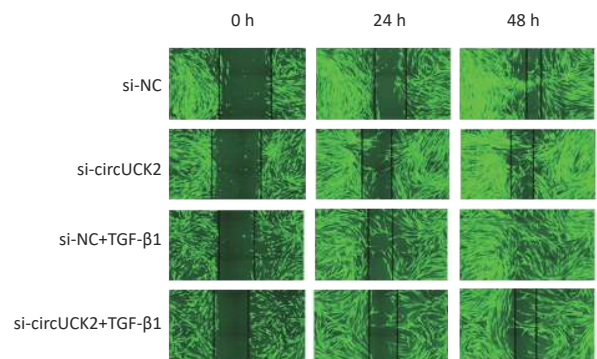
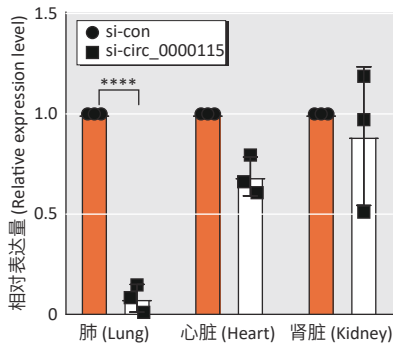


图 4 细胞划痕实验检测 TGF-β1 刺激 HPF-a 细胞的迁移能力

Figure 4 Migration ability of HPF-a cells detected by cell scratch assay

2.3 动物实验

2.3.1 特异性 si-circ_0000115 转染可敲低矽肺小鼠中相关纤维化蛋白表达 实时荧光定量 PCR 实验检测小鼠中各个脏器的敲除效率, 发现 si-circ_0000115 可有效敲低小鼠肺组织中 *mmu_circ_0000115* (图 5)。

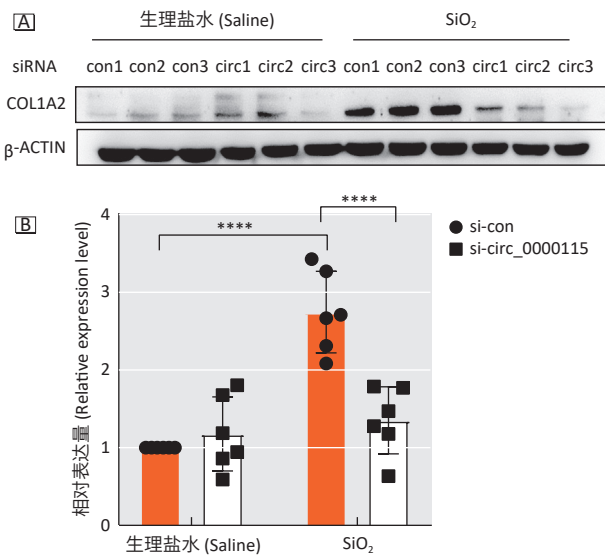


[注 (Note)] ****: $P < 0.0001$ 。

图5 实时荧光定量 PCR 检测用 siRNA 敲除的小鼠各个脏器 *mmu_circ_0000115* mRNA 的表达情况

Figure 5 *mmu_circ_0000115* mRNA expression in various organs of siRNA knockout mice by real-time fluorescence quantitative PCR

Western blot 结果表明,与生理盐水+si-con 组相比, SiO_2 +si-con 组 COL1A2 蛋白表达水平升高;在敲除 *mmu_circ_0000115* 后,与 SiO_2 +si-con 组相比, SiO_2 +si-circ_0000115 组 COL1A2 蛋白表达水平降低($P < 0.0001$) (图 6)。



[注] A: COL1A2 蛋白表达水平; B: COL1A2 蛋白表达相对灰度值的量化分析。****: $P < 0.0001$ 。

[Note] A: COL1A2 protein expression levels; B: Quantitative analysis of the relative grayscale values of COL1A2 protein expression. ****: $P < 0.0001$ 。

图6 Western blot 检测 siRNA 敲除的小鼠肺组织纤维化相关蛋白表达情况

Figure 6 Expression of fibrosis-related protein in siRNA knockout mice by Western blot

2.3.2 小鼠中特异性敲除 *mmu_circ_0000115* 对肺纤维化的影响 天狼星红染色结果显示,与生理盐水+si-con 组相比, SiO_2 +si-con 组胶原沉积明显增加,在敲除 *mmu_circ_0000115* 后, SiO_2 +si-circ_0000115 组胶原产生和沉积减轻(图 7)。

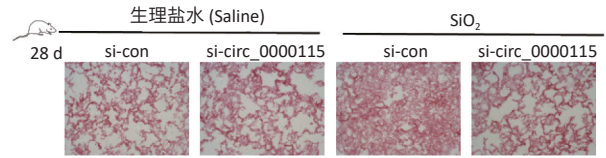


图7 敲低 *mmu_circ_0000115* 后 SiO_2 处理 28 d 小鼠肺组织天狼星红染色

Figure 7 Mouse lung tissues after knockdown of *mmu_circ_0000115* followed by SiO_2 treatment for 28 d by Sirius red staining

3 讨论

本研究结合芯片检测结果、同源性分析、处理时间与环状表达量变化趋势,最终选择 *hsa_circUCK2* 为进一步研究目标。HPF-a 细胞在 TGF- β 1 刺激条件下敲除 *hsa_circUCK2*, FN1 的合成量减少,且敲除 *hsa_circUCK2* 后细胞增殖和迁移能力明显降低,表明 circRNA *hsa_circUCK2* 具有活化成纤维细胞的功能。最后在小鼠体内进行验证,结果发现敲除 *mmu_circ_0000115* 后,缓解了由 SiO_2 诱导的肺纤维化。

肺纤维化的特点是肺部出现弥漫性实质异常,导致患者呼吸困难、咳嗽、低氧血症和气体交换受损,最终导致呼吸衰竭^[12]。急性肺损伤和某些疾病引起的肺纤维化在治疗下似乎是可逆的,但特发性肺纤维化即使在治疗后也是持续存在且不可逆的^[13]。在全球范围内,肺纤维化的发病率正在上升,且伴随着高发病率、高死亡率和经济医疗保健负担^[14]。因此对肺纤维化的病理生理及发病机制的研究意义重大。

circRNA 是具有环状封闭且稳定构型的转录本,可以调节一系列生物学过程,如 RNA 转录和剪接,细胞质 mRNA 的稳定性和翻译,并可干扰信号通路,作为蛋白翻译的模板^[15]。实验室前期研究发现 circ-012091 诱导下游 PPP1R13B 的蛋白表达,通过内质网应激和自噬促进肺纤维化^[16]。circRNA *ZC3H4* 调控巨噬细胞激活,靶向 *ZC3H4* 促进矽肺纤维化^[17]。因此研究 circRNA 在肺纤维化中的作用十分有意义。

但本研究仍具有一定的局限性。首先是通过小鼠肺组织进行 circRNA 转录组芯片分析,找到人鼠同源的 circRNA,但是由于小鼠与人类之间的种属差异,导致结果外推具有一定的不确定性。后续可以收集矽肺患者和正常组的肺组织样本进行测序和分析。其次本研究设计仅完成了表型研究,具体的调控机制尚未完成,以及在后续的治疗方面需要进一步研究。关于本研究中的 circRNA *hsa_circUCK2* 调节肺纤维化的机制,有以下两种猜想:一是作为 miRNA 的海绵,利用生物

(下转第 374 页)

- [11] HOY RF, CHAMBERS DC. Silica-related diseases in the modern world[J]. *Allergy*, 2020, 75(11): 2805-2817.
- [12] GANJU A, KHAN S, HAFEEZ BB, et al. miRNA nanotherapeutics for cancer[J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(2): 424-432.
- [13] BARWARI T, JOSHI A, MAYR M. MicroRNAs in cardiovascular disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(23): 2577-2584.
- [14] LIAO Z, ZHENG R, SHAO G. Mechanisms and application strategies of miRNA-146a regulating inflammation and fibrosis at molecular and cellular levels (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2023, 51(1): 7.
- [15] XU T, YAN W, WU Q, et al. MiR-326 inhibits inflammation and promotes autophagy in silica-induced pulmonary fibrosis through targeting TNFSF14 and PTBP1[J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32(11): 2192-2203.
- [16] SUN J, LI Q, LIAN X, et al. MicroRNA-29b mediates lung mesenchymal-epithelial transition and prevents lung fibrosis in the silicosis model[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 20-31.
- [17] QI Y, ZHAO A, YANG P, et al. miR-34a-5p Attenuates EMT through targeting SMAD4 in silica-induced pulmonary fibrosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(20): 12219-12224.
- [18] YANG S, LIU T, SUN Y, et al. The long noncoding RNA LINC00483 promotes lung adenocarcinoma progression by sponging miR-204-3p[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24(1): 70.
- [19] SU J H, HONG Y, HAN C C, et al. Dual action of macrophage miR-204 confines cyclosporine A-induced atherosclerosis[J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 181(5): 640-658.
- [20] RICHELDI L, COLLARD HR, JONES MG. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Lancet*, 2017, 389(10082): 1941-1952.
- [21] LI S, LI C, ZHANG Y, et al. Targeting mechanics-induced fibroblast activation through CD44-RhoA-YAP pathway ameliorates crystalline silica-induced silicosis[J]. *Theranostics*, 2019, 9(17): 4993-5008.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 张晨晨、王晓宇)

(上接第 366 页)

信息学数据库可以找到有潜在结合位点的 miRNA, 接着通过荧光原位杂交, 荧光素酶报告检测等实验进行验证; 二是实验室已有研究发现 circRNA 的 N6-腺苷酸甲基化修饰(m⁶A)与矽肺存在关联性, 所以可以研究在肺纤维化中 circRNA *hsa_circUCK2* 是否具有 m⁶A 修饰差异, 以及是否 m⁶A 修饰通过调节 circRNA *hsa_circUCK2* 进而发生肺纤维化。

综上, *hsa_circUCK2* 的下调抑制成纤维细胞活化和肺纤维化模型小鼠中胶原沉积。这提示 *hsa_circUCK2* 参与肺纤维化进程, 可能是肺纤维化的潜在治疗靶点。

参考文献

- [1] ROQUE W, BONI A, MARTINEZ-MANZANO J, et al. A tale of two proteolytic machines: matrix metalloproteinases and the ubiquitin-proteasome system in pulmonary fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3878.
- [2] WIJSENBEK M, COTTIN V. Spectrum of fibrotic lung diseases[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(10): 958-968.
- [3] YE Z, HU Y. TGF- β 1: gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(1): 132.
- [4] FERNANDEZ IE, EICKELBERG O. The impact of TGF- β on lung fibrosis[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2012, 9(3): 111-116.
- [5] LI X, YANG L, CHEN LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs[J]. *Mol Cell*, 2018, 71(3): 428-442.
- [6] CHEN LL. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8): 475-490.
- [7] HOLDT LM, KOHLMAIER A, TEUPSER D. Molecular roles and function of circular RNAs in eukaryotic cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(6): 1071-1098.
- [8] KRISTENSEN LS, ANDERSEN MS, STAGSTED LV W, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675-691.
- [9] LI J, LI P, ZHANG G, et al. CircRNA TADA2A relieves idiopathic pulmonary fibrosis by inhibiting proliferation and activation of fibroblasts[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 553.
- [10] WANG S, LUO W, HUANG J, et al. The combined effects of circular RNA methylation promote pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, 66(5): 510-523.
- [11] CHU H, WANG W, LUO W, et al. CircHECTD1 mediates pulmonary fibroblast activation via HECTD1[J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2019, 10: 1-18.
- [12] MATHAI SK, SCHWARTZ DA. Translational research in pulmonary fibrosis[J]. *Transl Res*, 2019, 209: 1-13.
- [13] YU QY, TANG XX. Irreversibility of pulmonary fibrosis[J]. *Aging Dis*, 2022, 13(1): 73-86.
- [14] MEYER KC. Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11(5): 343-359.
- [15] LIU CX, CHEN LL. Circular RNAs: characterization, cellular roles, and applications[J]. *Cell*, 2022, 185(13): 2390.
- [16] CHENG Y, LUO W, LI Z, et al. CircRNA-012091/PPP1R13B-mediated lung fibrotic response in silicosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(3): 380-391.
- [17] YANG X, WANG J, ZHOU Z, et al. Silica-induced initiation of circular *ZC3H4RNA/ZC3H4* pathway promotes the pulmonary macrophage activation[J]. *FASEB J*, 2018, 32(6): 3264-3277.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)