

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.12.002

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190306.0905.002.html(2019-03-07)

miRNA-138 靶向调控细胞周期蛋白 D3 及波形蛋白 影响肝癌细胞的增殖及迁移*

王保永,夏艳丽,肖鸿丽,闫一帆,赵巧飞,张瑜,陈宏伟[△]
(郑州大学附属洛阳中心医院消化内科,河南洛阳 471000)

[摘要] **目的** 研究肝癌细胞 miRNA-138(miR-138)通过调控细胞周期蛋白 D3(CCND3)、波形蛋白对肝癌细胞的影响。**方法** 利用 RT-PCR 对肝癌组织及癌旁组织(对照)、4 种肝癌细胞系(HepG2、HHCC、HUH7、BEL-7402)及正常肝细胞系 HL-7702(对照)的 miR-138 的 mRNA 表达进行检测;设计合成 miR-138 的模拟物(mimics)及抑制剂(inhibitor)。分别将空载体(对照)、miR-138 的模拟物及抑制剂转染至 HepG2 细胞,与相应对照相比,分析 miR-138 对 CCND3、波形蛋白表达及肝癌细胞活力的影响。应用 CCK-8 法、细胞创伤愈合试验和 Transwell 细胞迁移试验分别对转染空载体、miR-138 mimics 及 inhibitor 后的 HepG2 肝癌细胞增殖及迁移能力进行检测。Western blot 检测上调或下调 miR-138 后 miR-138 相关靶蛋白 CCND3 及波形蛋白的表达。**结果** 与相应对照相比,miR-138 的表达水平在肝癌组织及肝癌细胞系中明显降低($P<0.01$)。当 miR-138 mimics 转染肝癌细胞后,HepG2 细胞的活力降低,创伤愈合能力较弱,迁移能力明显降低($P<0.01$)。经 Western blot 检测,波形蛋白和 CCND3 的表达水平降低($P<0.01$)。转染 miR-138 inhibitor 后,HepG2 细胞的增殖能力升高,肝癌细胞的创伤愈合能力和迁移能力提升($P<0.01$),与此同时,波形蛋白和 CCND3 的表达水平升高($P<0.01$)。**结论** 通过调节波形蛋白和 CCND3 的表达,miR-138 在肝癌细胞的增殖活力、迁移能力的变化机制中发挥重要的作用。

[关键词] 微 RNAs;肝肿瘤;miR-138;细胞周期蛋白 D3;波形蛋白

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)12-1986-05

Regulation of miR-138 on cyclin D3 and vimentin and its effect on proliferation and migration of hepatoma carcinoma cells*

WANG Baoyong, XIA Yanli, XIAO Hongli, YAN Yifan, ZHAO Qiaofei, ZHANG Yu, CHEN Hongwei[△]

(Department of Gastroenterology, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang, Henan 471000, China)

[Abstract] **Objective** To study the influence of miR-138 on hepatocellular carcinoma(HCC) cells by regulating cyclin D3 (CCND3) and vimentin. **Methods** The expression of miR-138 in HCC tissues, adjacent liver tissues(control), four HCC cell lines (HepG2, HHCC, HUH7 and BEL-7402) and normal liver cell line HL-7702(control) was determined by RT-PCR. miR-138 mimics and miR-138 inhibitor were designed synthesis. Empty plasmid(control), miR-138 mimics and miR-138 inhibitor were transfected to HepG2 cells separately. The effects of miR-138 on cyclin D3, vimentin expression and HCC cell activity were analyzed compared with the corresponding controls. Cell viability was determined by CCK-8 and cell migration ability was detected by wound healing assay and Transwell cell migration assay after transfection. Western blot was used to detect the expressions of miR-138 related target protein cyclin D3 and vimentin after up-regulation or down-regulation of miR-138. **Results** Compared with the control group, the expression of miR-138 was significantly down-regulated in HCC tissues and HCC cell lines ($P<0.01$). miR-138 mimics transfection significantly reduced the viability of HepG2 cells ($P<0.01$). The expression levels of vimentin and CCND3 decreased by Western blot detection ($P<0.01$). On the other hand, miR-138 inhibitor transfection significantly enhanced the viability of HepG2 cells, the ability of wound healing and migration of HCC cells obviously ($P<0.01$). At the same time, the expressions of vimentin and CCND3 increased ($P<0.01$). **Conclusion** miR-138 regulates vimentin and CCND3 expressions and then plays an important role in the proliferation and migration of HCC cells.

[Key words] microRNAs; liver neoplasms; miR-138; Cyclin D3; CCND3; vimentin

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划(2018020891)。 作者简介:王保永(1983-),主治医师,博士,主要从事消化肝病方面的研究。

[△] 通信作者,E-mail:chhw.happy@163.com.

miRNA 是一类短的(18~25 核苷酸)非编码 RNA,可结合到靶基因并导致目标 mRNA 降解或翻译抑制使靶蛋白的表达水平降低^[1-2]。miR-138 在胆囊癌^[3]、食道癌^[4]等肿瘤中发挥抑癌作用。肝癌细胞中 miR-138 被证实可直接靶向波形蛋白 mRNA 上或下调细胞周期蛋白 D3(CCND3)及波形蛋白^[5-6],提示其在肝癌发生和发展中可能起着重要作用,但 miR-138 如何影响肝癌细胞的迁移及入侵尚未明确。本试验旨在研究 miR-138 如何通过波形蛋白和 CCND3 对肝癌细胞的迁移及增殖发挥作用,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 研究材料 选取 22 例肝癌组织和癌旁组织作为研究材料,包括 11 例组织病理学确诊的肝癌组织及 11 例相应的癌旁组织。其中,男 7 例,女 5 例,平均年龄 57.3 岁。标本保存于-80℃待用。所有患者术前未进行过放、化疗等抗肿瘤治疗,并签署知情同意书。本研究已经通过了本院医学伦理委员会的审批。肝癌细胞系 HepG2、HHCC、HUH7、BEL-7402 及正常肝细胞系 HL-7702 均从美国菌种保藏中心(ATCC)购买。

1.1.2 试验试剂及器材 研究中所使用的 miR-138 RT-PCR 引物委托上海生工生物有限公司进行合成。引物序列如下,miR-138:上游引物 5'-ACACTCCAGCTGGGAGCTGGTGTGTTGAATCA-3',下游引物 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGGCTG-3'。靶向 miR-138 的模拟物和抑制剂:委托广州锐博生物公司进行设计并合成。序列如下,miR-138 模拟物(mimics):5'-AGCTGGTGTGTTGTAATCAGGCCG-3';miR-138 抑制剂(inhibitor):5'-CGCCUGAUUCA-C AACACCAGCU-3'。

主要试剂:SYBR Premix Ex Taq™ II 购自大连宝生物公司;RNeasy Plus Micro Kit 购自美国 QIAGEN 公司;SuperScript® IV 试剂盒、脂质体 2000 购自美国 Invitrogen 公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自德国 Millipore 公司;抗 CCND3 一抗、抗波形蛋白一抗及 goat anti-rabbit 免疫球蛋白 G(IgG)-辣根过氧化物酶(HRP)二抗购自美国 Abcam 公司;ECL 化学发光剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Dulbecco's Modified Eagle 细胞培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 正常肝细胞系 HL-7702 及肝癌细胞系 HepG2、HHCC、HUH7 和 BEL-7402 均采用 DMEM 培养基培养,在培养基中添加 10% FBS,100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素,并将细胞置于含 5%CO₂,湿度为 95%的细胞培养箱于 37

℃条件下培养。行转染操作前 24 h,将细胞覆盖在不含抗生素的 500 μL 生长培养基上,从而使得细胞在进行转染操作时达到 30%~50%的融合;按照 Lipofectamine™ 2000 的说明书所述步骤进行操作。分别将空脂质体(作为对照)、模拟物及抑制剂转染至 HepG2 肝癌细胞。

1.2.2 RT-PCR 试验应用 RNeasy Plus Micro Kit 试剂盒对癌旁肝组织、肝癌组织及细胞的总 RNA 进行提取。应用 SuperScript® IV 试剂盒将 RNA 进行反转录。反应条件:65℃ 5 min,50℃ 10 min,80℃ 10 min。1 μL RNA 酶,37℃ 20 min 孵育后,去除 RNA。产物用于下一步 PCR 反应。采用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒行 RT-PCR 检测 miR-138 的表达。反应条件:95℃ 5 min,95℃ 5 s,60℃ 60 s,4℃ 保温,共进行 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt}法分析各基因 miR-138 表达,反应设置 3 个无模板的阴性对照,计算循环阈值(Ct),并以 U6 为内参计算标准化 Ct 值,即 ΔCt=Ct_{miR-138}-Ct_{U6}。为了方便计算,miR-138 的表达水平以 2^{-ΔΔCt}计算。

1.2.3 Western blot 采用 Western blot 的方法检测波形蛋白和 CCND3 的表达。离心收集细胞,在细胞中加入 RIPA buffer 细胞裂解液,反复离心收集上清液。利用牛血清清蛋白(BCA)试剂盒对所得上清液中总蛋白水平进行测定。行 BSA 蛋白标准曲线构建及样品蛋白浓度测定;通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离蛋白后转移至硝酸纤维素膜上,转膜及抗体孵育后,按照 ECL 化学发光试剂盒说明书对 PVDF 膜进行发光显色。

1.2.4 细胞增殖活性检测 向 96 孔反应板中注入细胞悬浮液(每孔 100 μL)。将孔板置入潮湿环境中(37℃,5%CO₂)进行预培养。孔板中各孔添加 10 μL CCK-8 溶液并孵育 1~4 h。使用酶标仪测定各样品的光密度值(OD 值,450 nm)。利用 EdU 试剂盒对细胞活力进行测定。种适当数量细胞,用 DMEM 完全细胞培养基培养过夜,并用 DMEM 细胞培养液稀释 EdU 溶液(1:1 000)。按照试剂盒说明书测试并行荧光显微镜观察。

1.2.5 细胞创伤愈合试验 将一定密度的细胞接种至 24 孔细胞培养板并培养 24 h 直至达到 70%~80%融合度,运用灭菌的 200 μL 移液枪枪头在培养基表面划痕。冲洗脱落细胞,孔板添加新鲜培养基并培养细胞 48 h。磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞 2 次,固定后显微镜观察不同视野的单层细胞,拍照后划痕距离应用 ImageJ 软件进行测量并计算均值及方差。

1.2.6 细胞迁移试验 将传代 2~3 次且 80%融合的细胞在适宜的无血浆培养基中培养 18~24 h,使用无菌 PBS 清洗细胞 2 次。进行离心操作并获得细胞沉淀(1 500 r/min,10 min)。重悬细胞并进行细胞计数,使得细胞数量为(0.5~1.0)×10⁶/mL。用钳子夹

取 Transwell 小室,往 Transwell 小室中添加 300 mL 上述细胞悬浮液,下室中则加入 500 mL 不含血浆的培养基,37 °C 条件下在 5%CO₂ 培养室培养 24 h。用移液枪从上室中剩余的细胞悬浮液吸出,将 Transwell 小室移入含 400 μL 细胞染色液的洁净孔板内,室温培养 20 min,多次漂洗 Transwell 小室,用 1 根棉签拭子将 Transwell 小室里侧的非渗移性细胞层轻轻擦除。将染色的 Transwell 小室转入内含 200 μL 提取缓冲液的清洁孔板内,轻轻摇晃倾斜 Transwell 小室,重复 10 次,尽量将染色的细胞从其底部取出,并将 Transwell 小室从孔板内移出。100 μL 细胞悬液转入适于比色测定的 96 孔微量滴定板中,在显微镜的明亮视野中对阳性细胞进行观察计数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件对数据进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-138 mRNA 在肝癌组织及癌旁组织中的表达 RT-PCR 检测肝癌组织及癌旁组织中 miR-138 表达显示,与癌旁组织相比,miR-138 的 mRNA 在肝癌组织中的表达水平明显降低(*P* < 0.01),见图 1。

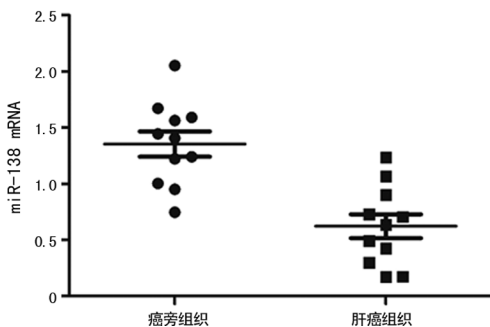


图 1 肝癌组织及癌旁组织中 miR-138 mRNA 的表达

2.2 miR-138 mRNA 在正常肝细胞系及肝癌细胞系中的表达 与正常肝细胞系 HL-7702 相比,miR-138 的 mRNA 表达水平在肝癌细胞系 HepG2、HUH7、HHCC 及 BEL-7402 中均明显降低(*P* < 0.01),见图 2。

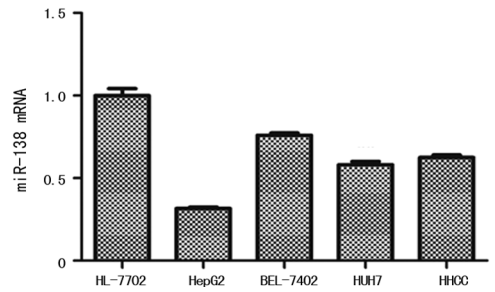


图 2 正常肝细胞系及肝癌细胞系中的 miR-138 mRNA 表达水平

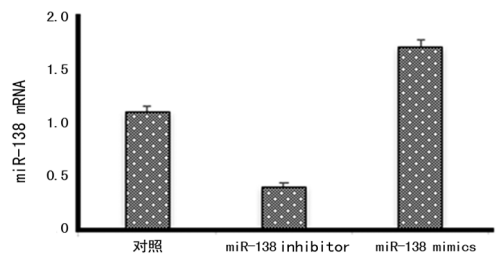


图 3 miR-138 mimics 和 inhibitor 干扰后 miR-138 的表达水平

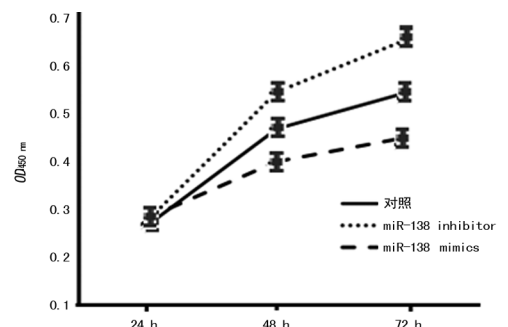


图 4 CCK-8 法检测干扰 miR-138 后的肝癌细胞活力

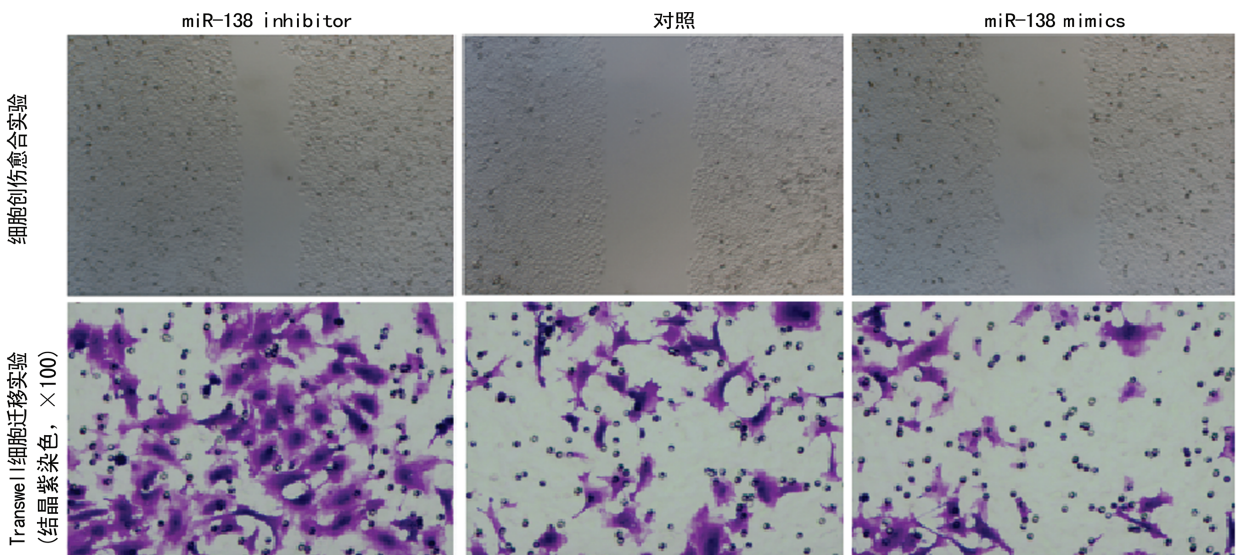
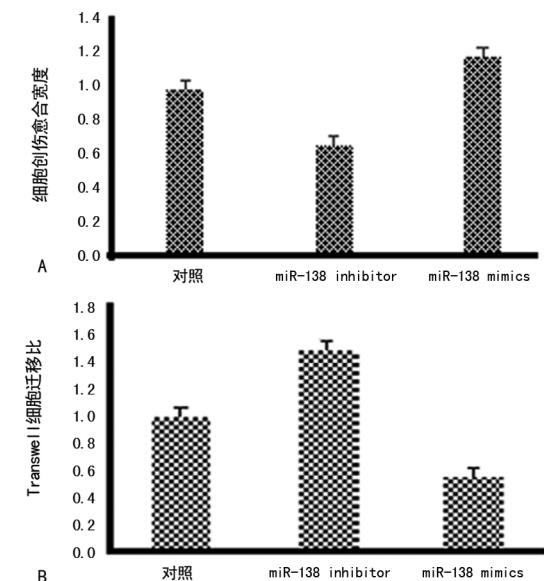


图 5 干扰 miR-138 后肝癌细胞迁移和创伤愈合

2.3 miR-138 mimics 及 inhibitor 对肝癌细胞系 miR-138 的表达的影响 与对照相比,当转染 miR-138 inhibitor,miR-138 的表达显著降低($P<0.01$);转染 miR-138 mimics 时 miR-138 的表达显著升高($P<0.01$),见图 3。



A:各组细胞创伤愈合能力比较;B:各组细胞迁移能力比较

图 6 干扰 miR-138 的肝癌细胞迁的柱状图

的增殖能力降低($P<0.01$);当 miR-138 inhibitor 转染 72 h 后,HepG2 细胞的增殖能力升高($P<0.01$),见图 4。

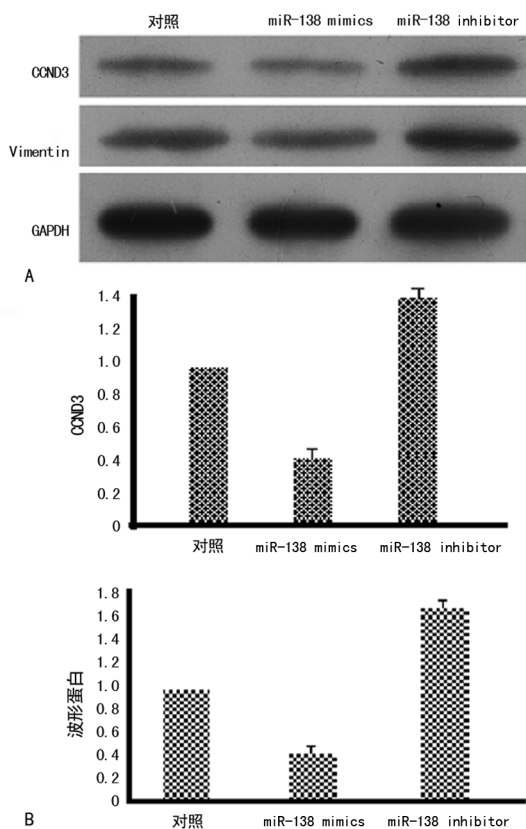
2.5 干扰 miR-138 对肝癌细胞迁移的影响 当 miR-138 mimics 转染 HepG2 细胞,相较于对照,HepG2 细胞的创伤愈合能力较弱,迁移能力明显降低($P<0.01$);当 miR-138 inhibitor 转染 HepG2 细胞,相较于对照,HepG2 细胞的创伤愈合能力增强,迁移能力明显升高($P<0.01$),见图 5、6。

2.6 干扰 miR-138 的 miR-138 相关靶蛋白的表达水平比较 Western blot 结果表明,当 miR-138 mimics 转染 HepG2 细胞,相较于对照,波形蛋白和 CCND3 的表达水平降低($P<0.01$);当 miR-138 inhibitor 转染时,波形蛋白和 CCND3 的表达水平升高($P<0.01$),见图 7。

3 讨论

miRNA 是具有内源性、进化保守性,天然大量存在且相对稳定的短链(约 22 个核苷酸)非编码 RNA 分子,在多数生物学及病理学过程中的后转录阶段发挥了基因调控的作用^[7]。研究表明,大约 30% 的蛋白质的编码基因受 miRNA 的调控,通过碱基互补原则结合到目的 mRNA 上或通过结合到 5' 端非翻译区(3'UTR)的非互补位点上并进行进一步的调控,从而在翻译水平上控制基因的表达^[7]。据统计,超过 45 000 个 miRNA 结合位点存在于人类的 3'UTR,并且超过 60% 的人类蛋白质编码基因可能受多个 miRNA 调控^[8]。miRNA 在细胞核中被 RNA 聚合酶 II 或 III 转录成为长链的、加帽的聚腺苷酸前体,被称之为初级微小 RNA (pri-miRNA)。核输出受体输出蛋白 5/Ran GTP 将 miRNA 前体运输到细胞质中^[9],然后被 RNase III 内切酶 Dicer 沿着转录活性相应的 RNA 结合蛋白(TRBP)进行进一步加工,成为 22 个核苷酸双链 RNA 结构^[9]。这个 miRNA 复合体被解离为成熟的单链形式,结合到 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)上,该复合体可引导与目的 mRNA 的互补 3'UTR 端结合而发挥作用。

miR-138 作为 miRNA 前体家族之一,可在多种癌症中起抑瘤作用,比如喉癌^[10]、口腔细胞癌^[11]、结肠癌^[12]、非小细胞肺癌^[13]等。研究表明,在肝癌中 miR-138 表达下调并作用于 CCND3,可诱导细胞周期停滞^[5],但其详细的生物学机制尚未被完全阐明,miR-138 影响肝细胞肝癌增殖、迁移和入侵机制仍需继续探索。本试验结果提示,与癌旁组织及正常肝细胞系相比,miR-138 表达在肝癌中和肝癌细胞系中明显降低。当 miR-138 mimics 转染肝癌细胞后,HepG2 细胞的活力降低,创伤愈合能力较弱,迁移能力明显降低,经 Western blot 检测,波形蛋白和 CC-



A:Western blot 蛋白图;B:各组波形蛋白和 CCND3 的蛋白表达量柱状图

图 7 Western blot 检测结果

2.4 CCK-8 法检测干扰 miR-138 的肝癌细胞活力 当类似物转染 72 h 后,相较于对照,HepG2 细胞

ND3 的表达水平降低。转染 miR-138 inhibitor 后, HepG2 细胞的增殖升高, 肝癌细胞的创伤愈合能力和迁移能力提升, 与此同时, 波形蛋白和 CCND3 的表达水平升高。本试验证实了通过调控 miR-138 在 HepG2 细胞中的表达可以调控肝癌细胞的增殖、迁移能力及创伤愈合能力, 并进一步调节 miR-138 介导的信号通路, 即 miR-138 通过调节其相关靶蛋白波形蛋白和 CCND3 的表达来达到调控肝癌细胞的增殖及迁移能力的目的。

波形蛋白是细胞骨架的主要组成成分, 甚至被视为癌变过程中进行上皮间质转化细胞的标记。在波形蛋白 mRNA 序列中可鉴定出 3 段 miR-138 的靶向序列。有研究表明, 应用荧光素酶报告基因试验证实了 miR-138 可直接靶向波形蛋白 mRNA 上^[6]。细胞周期受细胞周期素依赖性激酶(CDK)家族和其活性分子(细胞周期素)的调控。细胞从 G₁ 到 S 期的相变最初受细胞周期素 D 家族成员(CCND1, CCND2 和 CCND3)与 CDK4/CDK6 复合体和细胞周期素 E 家族成员(CCNE1 和 CCNE2)与 CDK2 复合体的调控。已有两项研究发现在鼻咽癌和 HCC 中 miR-138 可分别靶向 CCND1 及 CCND3^[5,14], 且发现在鼻咽癌和肝癌中 miR-138 的表达频繁下调, CCND1 和 CCND3 的表达与 miR-138 的表达成反比, 并在进一步的试验中证实了 miR-138 可直接特异靶向结合 CCND3 mRNA^[5], 以上研究均提示波形蛋白和 CCND3 在肿瘤细胞增殖中发挥重要的作用。本试验证实, 通过调节 miR-138 的表达, 可调节波形蛋白和 CCND3 的表达, 而波形蛋白与 CCND3 在细胞增殖活性发挥重要的作用, 推测 miR-138 通过波形蛋白及 CCND3 进一步调节肝癌的进展。本试验结果也证实了在调节 miR-138 表达后, 肝癌细胞的增殖活性、细胞迁移能力发生了改变, 该结果与推测一致, 提示 miR-138 通过其靶基因波形蛋白和 CCND3, 可调节 HepG2 细胞的增殖活力及迁移能力。也有类似的研究表明 DBH-AS1 经由细胞内黏着斑激酶(FAK)/Src/细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)途径靶向 miR-138 促进肝癌的发生^[15]。miR-138 同时也可在学习记忆、心肌保护及骨生长等机制中发挥重要的作用^[16-18]。

综上所述, 本研究证实了 miR-138 是通过何种靶基因来达到对肝癌细胞的增殖、迁移、入侵的影响, 结果提示 miR-138 可能是一个多功能的调节子, 在 HCC 发展中起主要作用。因此, miR-138 可能成为治疗肝癌的靶基因位点, 可抑制肝癌的侵袭。

参考文献

- [1] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [2] SHUKLA G C, SINGH J, BARIK S. MicroRNAs: processing, maturation, target recognition and regulatory functions[J]. *Mol Cell Pharmacol*, 2011, 3(3): 83-92.
- [3] MA F, ZHANG M, GONG W, et al. MiR-138 suppresses cell proliferation by targeting Bag-1 in gallbladder carcinoma[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126499.
- [4] GONG H, SONG L B, LIN C Y, et al. Downregulation of miR-138 sustains NF- κ B activation and promotes lipid raft formation in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(5): 1083-1093.
- [5] WANG W, ZHAO L J, TAN Y X, et al. MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(5): 1113-1120.
- [6] LIU X I, WANG C, CHEN Z J, et al. MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Biochem J*, 2011, 440(1): 23-31.
- [7] YANG N N, EKANEM N R, SAKYI C A, et al. Hepatocellular carcinoma and microRNA: new perspectives on therapeutics and diagnostics [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 81(1): 62-74.
- [8] FRIEDMAN R C, FARH K K, BURGE C B, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. *Genome Res*, 2009, 19(1): 92-105.
- [9] LUND E, GTTINGER S, CALADO A, et al. Nuclear export of microRNA precursors [J]. *Science*, 2004, 303(5654): 95-98.
- [10] GAO S, WANG J, XIE J, et al. Role of miR-138 in the regulation of larynx carcinoma cell metastases[J]. *Tumour Biol*, 2015, 37(12): 15601-15606.
- [11] XU R, ZENG G, GAO J, et al. miR-138 suppresses the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by targeting yes-associated protein 1 [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(4): 2171-2178.
- [12] CRISTÓBAL I, TORREJÓN B, GONZÓLEZ-ALONSO P, et al. Downregulation of miR-138 as a contributing mechanism to Lcn-2 overexpression in colorectal cancer with liver metastasis [J]. *World J Surg*, 2016, 40(4): 1021-1022.
- [13] LI J F, WANG Q R, WEN R L, et al. MiR-138 inhibits cell proliferation and reverses epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells by targeting GIT1 and SEMA4C [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(12): 2793-2805.
- [14] LIU X, LV X B, WANG X P, et al. MiR-138 suppressed nasopharyngeal carcinoma growth and tumorigenesis by targeting the CCND1 oncogene [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(13): 2495-2506.
- [15] BAO J, CHEN X Q, HOU Y G, et al. LncRNA DBH-AS1 facilitates the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma by targeting miR-138 via FAK/Src/ERK pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018(107): 824-833. (下转第 1995 页)

减少肺部功能性和炎性改变^[14]。本研究发现,高氧暴露可导致仔鼠肺组织中 RAC 降低,W/D 值与胶原纤维含量增加,而咖啡因干预后可明显抑制这些现象,这充分说明高氧暴露可增加早产仔鼠肺部炎性反应和肺组织纤维化,使肺发育受阻,咖啡因干预后炎性反应和肺组织纤维化程度减轻。

MAPKs 是信号转导途径中重要的中间体,包括 ERK、c-Jun、P38 和 ERK5 4 种不同级联反应,ERK 作为其重要成员广泛参与细胞生长、增殖、分化、应激反应和细胞凋亡。高氧刺激可以激活 ERK,这种现象通常归因于细胞活性氧(ROS)生成^[15]。LI 等^[16]利用吉非替尼抑制 ERK 激酶磷酸化拮抗博莱霉素诱导的肺纤维化,说明 ERK 信号通路激活可以使肺组织纤维化。因此,能否抑制 ERK 信号通路的激活成为拮抗高氧诱导肺损伤的关键因素。本实验通过免疫组织化学和 Western blot 检测发现,高氧暴露后 p-ERK 水平明显升高,咖啡因干预使 p-ERK 水平降低,说明高氧暴露使 ERK 信号通路激活,而咖啡因可以抑制这一现象。综合病理切片、RAC、W/D 值和胶原纤维含量结果,本研究认为高氧暴露后,ERK 信号通路被激活,导致肺组织出现炎性反应,肺纤维化程度增加;咖啡因干预后,通过降低 p-ERK 水平,抑制 ERK 信号通路激活,从而抑制肺组织纤维化来行使在早产仔鼠高氧肺损伤时的保护作用。

本研究虽然明确了咖啡因可通过抑制 ERK 信号通路的激活以起到在高氧肺损伤中的保护作用,但并未探讨咖啡因是通过何种途径对 p-ERK 水平产生影响。在今后的工作中,本课题组将着重探讨咖啡因影响 ERK 信号通路行使保护作用的具体机制,为临床防治 BPD 提供更多理论依据。

参考文献

- [1] SAUGSTAD O D. Oxygen and oxidative stress in bronchopulmonary dysplasia[J]. *J Perinat Med*, 2010, 38(6): 571-577.
- [2] PORZIONATO A, SFRISO M M, MAZZATENTA A, et al. Effects of hyperoxic exposure on signal transduction pathways in the lung[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2015 (209): 106-114.
- [3] JIANG J S, LANG Y D, CHOU H C, et al. Activation of the renin-angiotensin system in hyperoxia-induced lung fibrosis in neonatal rats[J]. *Neonatology*, 2012, 101(1): 47-54.
- [4] MENON R T, SHRESTHA A K, BARRIOS R, et al. Hypoxia disrupts extracellular signal-regulated kinases 1/2-Induced angiogenesis in the developing lungs[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): E1525.
- [5] CARNESECCHI S, DEFFERT C, PAGANO A, et al. NADPH oxidase-1 plays a crucial role in hyperoxia-induced acute lung injury in mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(10): 972-981.
- [6] ARANDA J V, BEHARRY K, VALENCIA G B, et al. Caffeine impact on neonatal morbidities[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2010, 23 Suppl 3: S20-23.
- [7] KASSIM Z, GREENOUGH A, RAFFERTY G F. Effect of caffeine on respiratory muscle strength and lung function in prematurely born, ventilated infants[J]. *Eur J Pediatr*, 2009, 168(12): 1491-1495.
- [8] LODHA A, SESHIA M, MCMILLAN D D, et al. Association of early caffeine administration and neonatal outcomes in very preterm neonates[J]. *JAMA Pediatr*, 2015, 169(1): 33-38.
- [9] O'REILLY M, THÖBAUD B. Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term rat models[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(12): L948-958.
- [10] 谭利平, 许峰, 匡凤梧. MAPKs 通路在高氧肺损伤发病机制中的作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(11): 1613-1618.
- [11] BARBARA S S. Caffeine therapy for apnea of prematurity[J]. *N Engl J Med*, 2006(354): 2112-2121.
- [12] SCHMIDT B, ANDERSON P, DOYLE L, et al. The caffeine for apnea of prematurity (cap) trial: preliminary outcomes at 5 years[J]. *Pediatr Res*, 2011, 70(5): 24.
- [13] JING X, HUANG Y W, JARZEMBOWSKI J, et al. Caffeine ameliorates hyperoxia-induced lung injury by protecting GCH1 function in neonatal rat pups[J]. *Pediatr Res*, 2017, 82(3): 483-489.
- [14] NAGATOMO T, JIMENEZ J, RICHTER J, et al. Caffeine prevents hyperoxia-induced functional and structural lung damage in preterm rabbits[J]. *Neonatology*, 2016, 109(4): 274-281.
- [15] KIM M N, LEE K E, HONG J Y, et al. Involvement of the MAPK and PI3K pathways in chitinase 3-like 1-regulated hyperoxia-induced airway epithelial cell death[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421(4): 790-796.
- [16] LI L, CAI L, ZHENG L X, et al. Gefitinib inhibits Bleomycin-induced pulmonary fibrosis via alleviating the oxidative damage in mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018: 8249693.

(收稿日期: 2018-11-20 修回日期: 2019-02-25)

(上接第 1990 页)

- [16] TIAN F, YUAN C, YUE H. MiR-138/SIRT1 axis is implicated in impaired learning and memory abilities of cerebral ischemia/reperfusion injured rats[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 367(2): 232-240.
- [17] ZHU H, XUE H, JIN Q H, et al. MiR-138 protects cardiac cells against hypoxia through modulation of glucose metabolism by targeting pyruvate dehydrogenase kinase 1

(PK1)[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(6): BSR20170296.

- [18] SUN X K, ZHOU J, ZHANG L, et al. Down-regulation of Noggin and miR-138 coordinately promote osteogenesis of mesenchymal stem cells[J]. *J Mol Histol*, 2017, 48(5/6): 427-436.

(收稿日期: 2018-12-18 修回日期: 2019-03-23)