

探究 LMO7 对成纤维细胞迁移能力的调控作用

李怡萱

领科教育上海校区

DOI:10.12238/bmtr.v4i5.5645

[摘要] 特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis,IPF)是因肺成纤维细胞在组织损伤-修复过程中功能失调而引发的慢性渐进性肺部疾病。肺成纤维细胞通过肺成纤维细胞-肌成纤维细胞转化(fibroblast-myofibroblast transition,FMT)过程,转化为增殖、迁移、细胞外基质分泌功能更强的肌成纤维细胞。过多的肌成纤维细胞通过分泌大量细胞外基质导致慢性渐进性肺呼吸功能降低。

[关键词] 特发性肺纤维化; 成纤维细胞; 细胞迁移

中图分类号: R542.2+3 **文献标识码:** A

Exploration on the Regulatory Effect of LMO7 on the Migration Ability of Fibroblasts

Yixuan Li

Ulink College of Shanghai

[Abstract] Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and progressive lung disease caused by the dysfunction of lung fibroblasts during tissue injury and repair. Lung fibroblasts are transformed into myofibroblasts with stronger proliferation, migration, and extracellular matrix secretion function through the fibroblast-myofibroblast transition (FMT) process. Excessive myofibroblasts cause reduced chronic progressive lung respiratory function by having secreted large amounts of extracellular matrix.

[Key words] idiopathic pulmonary fibrosis (IPF); fibroblasts; cell migration

前言

已知TGF- β 这类多功能蛋白可以诱导包括成纤维细胞在内的多种细胞的增殖和迁移,同时有研究团队发现LMO7蛋白参与到特发性肺纤维化的疾病进程过程,并起到调控细胞迁移能力等作用,本课题通过Wound healing和免疫荧光两种实验方法针对LMO7在TGF- β 诱导下对成纤维细胞的迁移能力及功能影响展开研究。实验结果印证LMO7参与促进了成纤维细胞的迁移功能,在LMO7缺失的情况下,成纤维细胞的迁移能力明显抑制,同时通过免疫荧光共定位证实了这个结论。

1 研究背景介绍

1.1 研究概述

IPF是一种慢性渐进性肺部疾病^[1,2],其特点为进行性肺部纤维化和肺间质炎症,严重威胁人类健康^[3]。IPF的全球的发病率约为10-60/10万人,患者诊断后的平均存活时间仅为2-3年^[4,5]。由于IPF的具体发病机制尚未明确,针对IPF的治疗手段和治疗药物十分匮乏^[6],因此,阐明IPF的发病机制和发现IPF的治疗药物具有十分重要的科学意义。

本人参与实习的分子药理学课题组通过生物信息学分析比对发现LMO7在健康人群以及IPF患者的组织样本中存在差异表达,其中在细胞迁移功能上LMO7具有明显促进成纤维细胞迁移

的作用。故设计实验验证LMO7对成纤维细胞迁移能力的影响,通过划痕实验对比野生型小鼠肺成纤维细胞与LMO7-/-小鼠肺成纤维细胞在同一浓度TGF- β 刺激下,迁移距离的变化,以及通过免疫荧光观察细胞结构的改变,来探究LMO7对于成纤维细胞功能的影响,希望该实验能够为证实LMO7对成纤维细胞迁移能力的调控作用尽绵薄之力。

1.2 背景信息

1.2.1 细胞的迁移与特发型肺纤维化

细胞迁移是生命体最基本的功能之一,细胞迁移是指在外界迁移信号或趋化物刺激下引发的细胞移动,细胞迁移运动不仅是细胞进行很多重要生理活动的基础,也是炎症反应和肿瘤发生等病理过程中的重要步骤和关键环节。细胞迁移是正常细胞的基本功能之一,是机体正常生长发育的生理过程,也是活细胞普遍存在的一种运动形式。包括:胚胎发育、血管生成、伤口愈合、炎症反应、肿瘤细胞转移浸润等过程都与细胞迁移相关。

1.2.2 TGF- β 与IPF

TGF- β 是在组织损伤修复过程中发挥重要作用的多功能蛋白,作为参与IPF进程的重要效应分子,还可以诱导包括成纤维细胞在内的多种细胞的增殖和迁移。TGF- β 几乎表达于所有组

织中,但在骨、肺组织、肾和胎盘中的含量最高。TGF- β 调节包括巨噬细胞、嗜中性粒细胞、活化的T细胞和B细胞、未成熟的造血细胞和树突状细胞在内的免疫细胞的增殖、凋亡、分化、粘附和迁移功能。TGF- β /SMAD是调控肺成纤维细胞胶原分泌的重要信号通路。TGF- β 与TGF- β 受体结合激活TGF- β /SMAD信号通路,诱导SMAD2/3磷酸化,后者入核介导细胞外基质相关基因转录、表达和分泌。负调控因子SMAD7则通过抑制SMAD2/3和TGF- β 受体功能,反馈性抑制TGF- β /SMAD信号通路。

1.2.3 LM07与IPF

LM07 (LIM domain only7) 是含有LIM结构域的哺乳动物蛋白,具有调节细胞粘附、参与肌肉发育、介导肿瘤迁移等生物学功能,同时参与细胞间连接和相关信号通路调节,有文献报道LM07缺失引起F-actin功能失调,但尚未有报道LM07在IPF中的作用机制。

2 实验材料及方法

2.1 实验材料

| 名称 | 生产公司 |
|------------|--------------------|
| 胎牛血清 | 美国 Life Technology |
| 无水乙醇 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| DAPI | 碧云天生物 |
| 荧光二抗(免疫荧光) | 美国 Thermo Fisher |
| DMEM 培养基 | 美国 Life Technology |
| 青/链霉素 | 美国 Life Technology |

2.2 实验方法

2.2.1 细胞复苏

(1) 将储存于液氮中装有细胞的冻存管在37℃的水浴锅中快速晃动。

(2) 在细胞融化后快速转移到加入9mLDMEM培养基的无菌离心管中,离心管配平后1,700rpm离心5min。

(3) 弃去上清液并用含有10%FBS的DMEM培养基重悬。

(4) 将细胞转移到10cm直径的培养皿中并在含有5%二氧化碳的37℃的恒温细胞培养箱中进行培养。

2.2.2 细胞传代

(1) 将处于对数生长期细胞用0.25%胰蛋白酶(1mL)进行消化。

(2) 37℃孵育数分钟,直到大部分细胞松动,细胞间出现明显缝隙。

(3) 用含10%血清的DMEM培养基进行中和并将细胞转移到无菌离心管中。

(4) 细胞在1,700rpm离心5min后弃去上清。

(5) 用含10%FBS的DMEM培养基重悬,将细胞转移到10cm培养皿中。

(6) 用含10%血清的DMEM培养基补至10 mL/皿,放置于37℃培养箱。

2.2.3 划痕实验

(1) 在六孔板每孔中加入约 5×10^5 个肺成纤维细胞。

(2) 待细胞铺满六孔板后,用200 μ L枪头垂直于细胞平面,沿着直尺在细胞层上进行十字划痕。

(3) 划痕完成后,弃去培养基,并使用冰PBS润洗以洗去划下的细胞碎片,润洗3次后显微镜下观察划痕位置是否还有细胞碎片,若有则继续润洗,若无则沿侧壁向孔中加入不含血清的新鲜DMEM培养基,将细胞放入37℃、5%CO₂培养箱培养。

(4) 使用封口膜将孔板封好后,置于倒置显微镜下选择合适的划痕位置进行拍照,记为0h时间点。

(5) 而后在稳定刺激条件下培养24h,对与0 h时的相同位置进行拍照。

(6) 使用ImageJ计算不同时间点的划痕面积,并计算迁移率。

2.2.4 细胞F-actin染色

F-actin是细胞迁移相关蛋白,该实验原理是用荧光素偶联的鬼笔环肽特异性标记F-actin蛋白,测定细胞荧光强度间接反应细胞迁移功能。

(1) 细胞进行F-actin染色前需要在细胞爬片上进行培养。

(2) 在细胞生长至适宜密度后用PBS清洗2次。

(3) 细胞用4%多聚甲醛固定15min并用PBS清洗2次。

(4) Triton100-X孵育15min后用PBS清洗2次。

(5) 用鬼笔环肽: PBS=1:1,000的稀释溶液对细胞进行室温避光孵育30min。

(6) PBS清洗细胞2次后进行DAPI细胞核染色(室温染色3min)。

(7) PBS清洗细胞3次后将细胞爬片取出并盖在提前滴加防淬灭封片剂的载玻片上。

(8) 封片后的细胞用confocal (Leica) 荧光显微镜拍摄。

2.2.5 SDS-PAGE凝胶电泳

① 上样

(1) 将上样样品从-20℃箱中取出并在室温融化。

(2) 将SDS-PAGE胶放入装满电泳液的电泳槽中,根据每孔20mg的总蛋白量将一定体积的样品加入SDS-PAGE胶中(最多15mL)。

(3) 空白孔用1 \times 蛋白上样缓冲液补齐。

② 电泳

80V恒压电泳30min,120V恒压电泳60min。

转膜

(1) 提前将转膜液放在-20℃冰箱中预冷2h。

(2) 将SDS胶切割后按照负极、纤维、滤纸、SDS胶、NC膜、滤纸、纤维、正极的顺序进行摆放。

(3) 将转膜液放入转膜槽中,恒压110V冰上转膜90min。

③ 封闭

(1) 去离子水和脱脂奶粉配制5%牛奶封闭液。

(2) 将转印后的NC膜取出并在水平摇床室温封闭1h。

④一抗孵育

封闭后的NC膜转移到提前配制好的一抗中并在摇床4℃孵育过夜。

⑤二抗孵育

(1) 取出一抗孵育后的NC膜并用TNET洗膜液清洗(5min, 3次)。

(2) 根据一抗种属配制二抗(HRP偶联二抗)并在室温孵育1h。

(3) NC膜二抗孵育完成后用TNET洗膜液清洗(5min, 3次)。

⑥ChemiDoc显影仪显影：

(1) 提前配制ECL反应底物。

(2) 将NC膜放置到显影仪中并加入ECL底物。

(3) 设置参数后进行显影。

3 实验结果：LMO7缺失减弱TGF-β 1刺激后小鼠

的肺成纤维细胞迁移能力

3.1 划痕实验检测细胞迁移能力

TGF-β 参与细胞增殖、迁移和成纤维细胞的激活。同时，TGF-β 在IPF过程中发挥重要作用。为了进一步探究LMO7对TGF-β 刺激后肺成纤维细胞功能的影响，检测了Lmo7的缺失对TGF-β 1刺激后肺成纤维细胞迁移功能的影响，通过细胞划痕实验检测TGF-β 1刺激后肺成纤维细胞的迁移功能是否发生改变。细胞划痕实验结果表明如图1：TGF-β 1刺激后，小鼠肺成纤维细胞迁移能力明显增强，而缺乏LMO7的成纤维细胞迁移能力明显减弱。

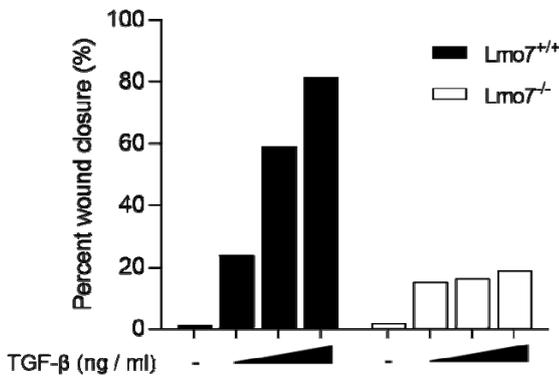


图1

3.2 免疫荧光检测细胞迁移能力

肌动蛋白是两种细胞内丝状结构的构成单体：微丝(三种主要的细胞骨架成分之一)，以及细肌丝(是肌肉细胞收缩复合物的一部分)。因此，肌动蛋白参与很多重要的细胞功能，包括肌肉收缩，细胞移动，细胞分裂等。用荧光标记的鬼笔环肽染色可以清晰显示细胞中微丝的分布，是用于观察F-actin分布的方法。F-actin染色实验结果表明如图2，TGF-β 1刺激后，肺组织成纤维细胞表面微丝蛋白表达量增加，而缺乏LMO7的肺组织成纤维细胞在TGF-β 1刺激后微丝蛋白表达量明显减少。说明LMO7参与了TGF-β 1调控的细胞迁移过程。

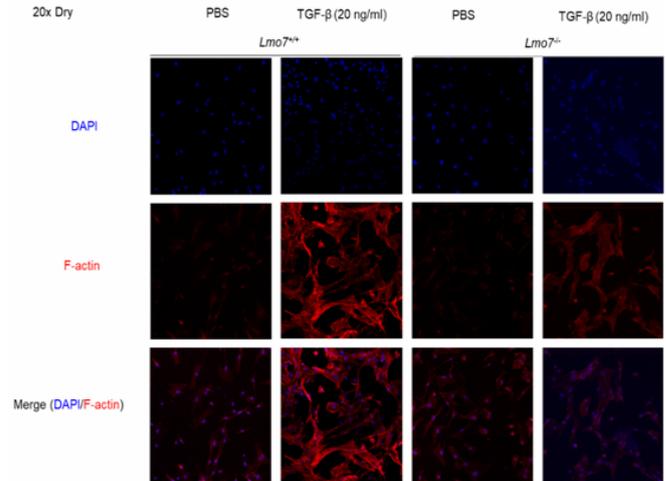


图2 细胞中微丝的分布

3.3 Western Blot检测纤维化相关蛋白表达

分离小鼠的肺成纤维细胞并检测在体外用不同浓度的TGF-β 刺激对是否敲除Lmo7的肺成纤维细胞功能的影响。免疫印迹迹如图3所示：在TGF-β 刺激剂浓度相同的情况下，Lmo7蛋白敲除后受到TGF-β 刺激的小鼠肺成纤维细胞中Fibronectin、Collagen1A1和α-SMA的表达明显低于Lmo7未敲除后受到TGF-β 刺激的小鼠肺成纤维细胞，可见敲除LMO7会明显抑制TGF-β 对于成纤维细胞迁移能力促进作用。

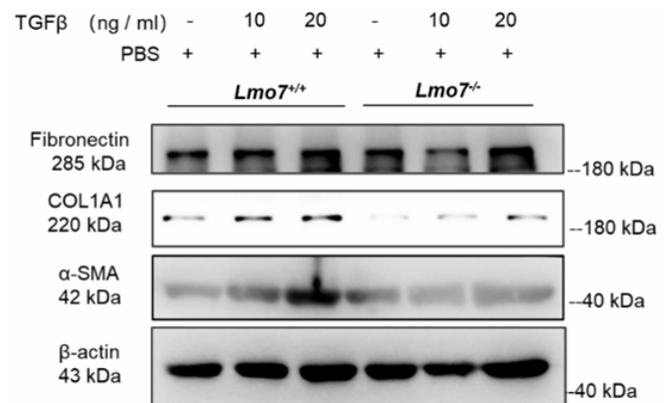


图3 免疫印迹结

4 总结与展望

IPF是一种以渐进性炎症反应、肺间质纤维化和成纤维细胞激活为主要特点的致死性肺部疾病。作为一种致死性呼吸系统疾病，IPF的发病机制尚未明确。同时，针对特IPF的治疗手段十分有限。现有的治疗药物仅限于减缓IPF的进程且对IPF进程的减缓效果病不明显。因此，对于IPF机制的探究和针对IPF治疗的靶标的发现对IPF临床治疗以及IPF治疗药物的开发有重要意义。

在本人参与实习的课题组成员发现LMO7参与IPF疾病进程的调控这一重大研究突破的基础上，验证了LMO7促进成纤维细胞迁移功能的影响，通过独立设计经典的用于考察细胞迁移能力的划痕实验与免疫荧光实验，探究了TGF-β 对细胞迁移能力

的影响,实验结果明确表明,LOM7敲除后会明显抑制TGF- β 对于成纤维细胞迁移能力促进作用,同时免疫荧光的结果表明,在缺失LOM7的情况下,与细胞迁移相关的微丝蛋白表达也是明显减少。

IPF作为罕见病,其治疗手段极其有限,并且药物干预仅能作为缓解手段,无法达到根治疾病的目的,同时IPF的发病机制及潜在治疗靶标也是目前全球医药领域的一大热门研究重点,因此如果能探究出更多的疾病治疗可能性,寻找到有确切作用疗效的治疗靶点,将会成为推动人类健康事业发展的一大步。在探究IPF发病机制及相关潜在治疗靶标方面,作为一名普通的高中生,短时间内运用有限的知识去探究这个课题是具有极大挑战性的,虽然目前只是从细胞迁移能力的简单宏观层面进行课题探究,但是相信随着知识水平的不断提升与完善,不久的将来也能为IPF疾病的机制发现与治疗尽一份绵薄之力。

[参考文献]

- [1]Richehdi, L., H.R. Collard, and M.G. Jones, Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*,2017.389(10082):1941-1952.
- [2]Tzouveleki,A.,et al.,Common Pathogenic Mechanisms

Between Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer. *Chest*,2019.156(2):383-391.

[3]Levick, S.P. and A. Widiapradja, The Diabetic Cardiac Fibroblast: Mechanisms Underlying Phenotype and Function. *Int J Mol Sci*,2020.21(3).

[4]Kreuter, M., et al., Health-related quality of life and symptoms in patients with IPF treated with nintedanib: analyses of patient-reported outcomes from the INPULSIS(R) trials. *Respir Res*, 2020.21(1):36.

[5]Maher,T.M., et al., Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*, 2021.22(1):197.

[6]Bringardner, B.D., et al., The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*,2008.10(2):287-301.

作者简介:

李怡萱(2004--),女,回族,山东省济南市人,高中在读,研究方向:生物学。