

蔡文臣,张诗汇,高一冰,等. Ac-SDKP 抑制 YEATS4 拮抗实验性矽肺的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 22-27.  
Cai WC, Zhang SH, Gao YB, et al. N-acetyl-seranyl-aspartate-lysyl-proline Attenuates Silicosis by Inhibiting YEATS4 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 22-27.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.05.004

## Ac-SDKP 抑制 YEATS4 拮抗实验性矽肺的机制

蔡文臣<sup>1</sup>, 张诗汇<sup>2</sup>, 高一冰<sup>1</sup>, 牛婉丽<sup>1</sup>, 徐 洪<sup>1,3</sup>, 杨 方<sup>1\*</sup>

(1. 华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063210; 2. 华北理工大学临床医学院, 河北 唐山 063210;  
3. 河北省器官纤维化重点实验室, 河北 唐山 063210)

**【摘要】 目的** 研究 N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸 (N-acetyl-seranyl-aspartate-lysyl-proline, Ac-SDKP) 通过调节含 YEATS 结构域蛋白 4 (YEATS domain containing protein 4, YEATS4) 从而抑制矽肺纤维化的作用及其机制。**方法** RAW264.7 细胞分为 siRNA 阴性对照组 (siRNA-Control, siC)、siRNA-YEATS4 组 (siY)、SiO<sub>2</sub> + siRNA 阴性对照组 (S+siC) 和 SiO<sub>2</sub> + siRNA-YEATS4 组 (S+siY); 以及对照组 (Control, C)、SiO<sub>2</sub> 诱导组 (SiO<sub>2</sub>, S)、SiO<sub>2</sub> + Ac-SDKP 处理组 (SiO<sub>2</sub> + Ac-SDKP, S+Ac) 和 Ac-SDKP 处理组 (Ac)。Wistar 大鼠分为对照 24 周组 (Control 24 week, C24)、矽肺 24 周组 (Silicosis 24 week, S24) 和 Ac-SDKP 治疗组 (Ac-SDKP treatment 24 week, Ac24)。免疫印迹法 (Western blot) 检测 I 型胶原 (Collagen type I, COL I)、巨噬细胞趋化蛋白-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、精氨酸酶-1 (Arginase-1) 和 YEATS4 的表达。免疫组织化学染色法 (Immunohistochemical staining, IHC) 检测 YEATS4 在肺组织中的定位及表达。**结果** Western blot 结果显示, 在 RAW264.7 细胞中, 分别与 siC、S+siC 组比较, siY 组、S+siY 组 COL I、MCP-1、Arginase-1 表达均明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 C 组比较, S 组 COL I、MCP-1、Arginase-1 和 YEATS4 高表达; 与 S 组比较, S+Ac 组中 COL I、MCP-1、Arginase-1 和 YEATS4 表达降低 ( $P < 0.05$ )。IHC 及 Western blot 结果显示, 与 C24 组大鼠比较, S24 组中 COL I、MCP-1、Arginase-1 和 YEATS4 表达上调; 与 S24 组比较, Ac24 组中 COL I、MCP-1、Arginase-1 和 YEATS4 表达降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** Ac-SDKP 可能通过抑制 YEATS4 发挥抗矽肺纤维化的作用。

**【关键词】** 矽肺纤维化; 含 YEATS 结构域蛋白 4; RAW264.7 细胞; N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 05-0022-06

## N-acetyl-seranyl-aspartate-lysyl-proline Attenuates Silicosis by Inhibiting YEATS4

CAI Wenchen<sup>1</sup>, ZHANG Shihui<sup>2</sup>, GAO Yibing<sup>1</sup>, NIU Wanli<sup>1</sup>, XU Hong<sup>1,3</sup>, YANG Fang<sup>1\*</sup>

(1. School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China.

2. School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210.

3. the Hebei Key Laboratory for Organ Fibrosis, Tangshan 063210)

**【Abstract】 Objective** To investigate the anti-effects of N-acetyl-seranyl-aspartate-lysyl-proline (Ac-SDKP) on experimental silicosis by regulating YEATS domain-containing protein 4 (YEATS4). **Methods** RAW264.7 cells were

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81972988); 河北省自然科学基金资助项目 (H2020209052); 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2019077)。

[作者简介] 蔡文臣 (1991—), 女, 博士研究生, 主要研究领域为器官纤维化。E-mail: chenwencai1991@163.com

[通信作者] 杨方 (1955—), 男, 教授, 主要研究领域为器官纤维化。E-mail: fangyang@ncst.edu.cn

divided into a siRNA-negative control (NC) group (siC), siRNA-YEATS4 group (siY), silicon dioxide ( $\text{SiO}_2$ ) + siRNA-NC group (S+siC), and  $\text{SiO}_2$  + siRNA-YEATS4 group (S+siY). In addition, there was a control group (C),  $\text{SiO}_2$ -induced group (S),  $\text{SiO}_2$  + Ac-SDKP treatment group (S+Ac), and Ac-SDKP treatment group (Ac). Wistar rats were randomly divided into a control 24-week group (C24), silicosis 24-week group (S24), and Ac-SDKP treatment 24-week group (Ac24). Expression of collagen type I (COL I), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), arginase 1, and YEATS4 were measured by western blotting in lung tissue and RAW264.7 cells. Immunohistochemical staining was used to detect YEATS4 expression and localization in lung tissue and RAW264.7 cells. **Results** Western blot showed down-regulated protein expression levels of COL I, MCP-1, and arginase 1 in the siY and S+siY groups compared with the siC and S+siC groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the C group, the levels of COL I, MCP-1, arginase, and YEATS4 were increased in the S group. In addition, the levels of COL I, MCP-1, arginase 1, and YEATS4 were reduced in the S+Ac group compared with the S group in RAW264.7 cells ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry and Western blot showed that expression of COL I, MCP-1, arginase-1, and YEATS4 was up-regulated in the S24 group compared with the C24 group. Expression of COL I, MCP-1, arginase-1, and YEATS4 in the Ac24 group was decreased compared with S24 silicosis rats ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Ac-SDKP may play a suppressing role in silicosis by inhibiting YEATS4.

**[Keywords]** silicosis; YEATS4; RAW264.7; Ac-SDKP

矽肺纤维化主要是由于长期吸入游离二氧化硅( $\text{SiO}_2$ )粉尘引起的,以矽结节形成和弥漫性肺间质纤维化为主要病理变化的一种职业性肺病,发生机制尚未完全阐明<sup>[1]</sup>。课题组前期通过高通量转录组测序技术,发现含 YEATS (Yaf9、ENL、AF9、SAS5、TAF14) 结构域蛋白 4 (YEATS domain containing protein 4, YEATS4) 可能是实验性矽肺模型进展的重要靶基因<sup>[2]</sup>。YEATS4 是一种高度保守的,具有 YEATS 家族结构域的核蛋白<sup>[3]</sup>。作为转录激活因子, YEATS4 参与了多种肿瘤的发生发展<sup>[4-5]</sup>。课题组多年来对 N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸 (N-acetyl-seranyl-aspartate-lysyl-proline, Ac-SDKP) 的抗矽肺纤维化作用机制进行了系列研究<sup>[6-7]</sup>。因此,本研究拟观察 Ac-SDKP 能否通过对 YEATS4 的调节,从而抑制巨噬细胞活化,发挥拮抗矽肺纤维化的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 3 周龄 30 只雄性 Wistar 大鼠 ( $180 \pm 10$ ) g 购自北京维通利华动物技术有限公司 [SCXY (京) 2016-0008]。于华北理工大学医学实验中心洁净级动物房饲养 [SYXK (冀) 2020-0007], 室温 ( $22 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 40%~60%, 自由饮水、进食, 分笼喂养。所有操作均符合实验动物伦理学要求 (LX2019035), 并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

#### 1.1.2 实验细胞

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 (中国科学院上海细胞库)。

### 1.2 主要试剂与仪器

动式染尘控制系统 (天津开发区合普工贸有限公司); 兔抗 I 型胶原 (Collagen type I, COLI) (美国 Abcam 公司); 鼠抗 YEATS4 (美国 Santa Cruz); 鼠抗精氨酸酶-1 (Arginase-1) (美国 BD 公司); 兔抗单核细胞趋化蛋白-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) (美国 Affinity 公司);  $\alpha$ -微管蛋白 (Tubulin alpha, Tublin  $\alpha$ ) (美国 Affinity 公司); 二氧化硅 (silicon dioxide,  $\text{SiO}_2$ ) (美国 Sigma 公司); DMEM 培养基 (以色列 BI 公司); Ac-SDKP (瑞士 Bachem AG 公司); PV6000 通用型两步法免疫组化试剂 (北京中杉公司); 二抗山羊抗兔, 抗鼠 IgG (美国 KPL 公司); ECL 显色试剂盒 (美国 GE 公司); 苏木精染色液 (珠海贝索公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组

采用 HOPE-MED8050 动式染尘控制系统制备矽肺大鼠模型<sup>[2]</sup>。实验动物分组: ①对照 24 周组 (Control 24 week, C24): 吸入纯净气至 16 周后, 腹腔埋入含有生理盐水的微量缓释胶囊; ②矽肺 24 周组 (silicosis 24 week, S24): 动式染尘以 ( $50 \pm 10$ )  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  的浓度 h/d, 染尘至 16 周后, 腹腔内埋入含有生理盐水的微量缓释胶囊; ③ Ac-SDKP 治疗组 (Ac-SDKP treatment 24 week, Ac24): 动式染尘至 16 周后, 在大鼠腹腔内埋入含有 Ac-SDKP [ $800 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ] 的微量缓释胶囊, 均于 24 周处理动物。取右肺下叶组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 常规石蜡

包埋,4  $\mu\text{m}$  连续切片。取左肺下叶组织于液氮中速冻后保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ ,用于 Western blot 测定。

### 1.3.2 细胞培养和处理

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 在  $37^{\circ}\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中用 Ham's F-12 K 营养培养基培养,实验分组 1 为:①对照组(Control, C):无血清培养基培养;② $\text{SiO}_2$  诱导组( $\text{SiO}_2$ , S):无血清培养条件下,给予含 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{SiO}_2$  的培养基诱导 24 h。③ $\text{SiO}_2$ +Ac-SDKP 处理组(S+Ac):无血清培养条件下,给予  $10^{-8}$  mol/L Ac-SDKP 诱导 1 h,再加入终浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{SiO}_2$  的培养基诱导 24 h。实验分组 2 为:① siRNA 阴性对照组(siRNA control, siC):无血清培养条件下,先转染 50 nmol siC 5 h,再更换培养基培养 24 h;② siRNA-YEATS4 组(siY):无血清培养条件下,先转染 50 nmol siY,再更换培养基培养 24 h;③ $\text{SiO}_2$ + siRNA-NC 组(S+siC):无血清培养条件下,先转染 50 nmol siC 5 h,再更换为终浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{SiO}_2$  培养基培养 24 h;④ $\text{SiO}_2$ + siRNA-YEATS4 组(S+siY):无血清培养条件下,先转染 50 nmol siY 5 h,再更换为终浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{SiO}_2$  培养基培养 24 h。沉默序列如下,siY-1:5'-CGATGAAATGATATTTCAA-3'; siY-2:5'-CGTTAAGAGTCGTCCTAA-3'; siY-3:5'-CAGTTTAAGTTACATGAAA-3'。

### 1.2.3 免疫组织(细胞)化学染色(Immunohistochemical staining, IHC)

常规脱蜡至水,高压修复,3%的  $\text{H}_2\text{O}_2$  封闭内源性过氧化物酶。孵育抗体 YEATS4 于  $4^{\circ}\text{C}$  过夜。次日,用二抗  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, DAB 显色,镜下控制,常规复染,脱水透明,中性树脂封片,显微镜扫描<sup>[8]</sup>。

### 1.2.4 Western blot

提取蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,取 10~20  $\mu\text{g}$  蛋白于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转至 PVDF 膜上,与一抗 COL I、MCP-1、Arginase-1 和 YEATS4 在  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,用山羊抗兔或抗小鼠二抗(1:5000, KPL)孵育 30 min。使用 ECL 发光试剂于 ECL<sup>TM</sup> 蛋白检测系统检测信号,使用 Image Pro Plus 6.0 软件测量平均光密度(OD)。Tubulin  $\alpha$  表达水平作为内参照。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。数据以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用独立样本  $t$  检验或单因素方差分析评估组间差异,进一步两两比较采用 SNK- $q$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 沉默 YEATS4 可抑制 $\text{SiO}_2$ 诱导的 RAW264.7 活化

如图 1、表 1 所示,Western blot 结果显示,与 siC 组比较,siY-3 明显减弱了 YEATS4 的表达( $P < 0.05$ )。如图 2、表 2 所示,与 siC 组比较,沉默 YEATS4 后,COL I、MCP-1、Arginase-1 表达明显降低,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。给予  $\text{SiO}_2$  刺激的同时沉默 YEATS4 后,COL I、MCP-1、Arginase-1 表达也明显降低(表 3),差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 Ac-SDKP 对 $\text{SiO}_2$ 诱导的 RAW264.7 细胞中 YEATS4 表达的调节作用

免疫细胞化学染色结果显示,与对照组比较, $\text{SiO}_2$  刺激组中 YEATS4 高表达;与  $\text{SiO}_2$  刺激组比较,Ac-SDKP 处理组中,YEATS4 阳性表达明显降低(图 3)。如图 4、表 4 所示,与对照组比较, $\text{SiO}_2$  刺激组中 COL I、MCP-1、Arginase-1 和 YEATS4 蛋白表达均升高,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );与  $\text{SiO}_2$  刺激组比较,Ac-SDKP 处理组中,COL I、MCP-1、Arginase-1 和 YEATS4 蛋白表达均降低,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

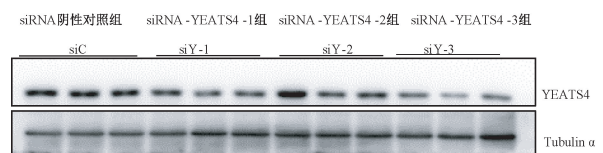


图 1 YEATS4 沉默序列筛选

Figure 1 YEATS4 silencing sequence screening

表 1 YEATS4 沉默序列筛选  
Table 1 YEATS4 silencing sequence screening

| 组别<br>Groups                 | 含 YEATS 结构域蛋白 4<br>YEATS4    |
|------------------------------|------------------------------|
| siRNA 阴性对照组<br>siC           | 0.66 $\pm$ 0.06              |
| siRNA-YEATS4-1 组<br>siY-1    | 0.42 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup> |
| siRNA-YEATS4-2 组<br>siY-2    | 0.49 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> |
| siRNA-YEATS4-3 组<br>siY-3    | 0.28 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup> |
| <i>F</i> 值<br><i>F</i> value | 10.03                        |

注:与 siC 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with siC group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ .



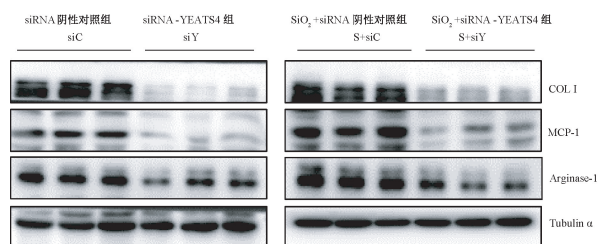


图 2 COL I、MCP-1、Arginase-1 蛋白在沉默 YEATS4 的 RAW264.7 中的表达

Figure 2 The levels of COL I, MCP-1 and Arginase-1 in RAW264.7 regulated by silencing YEATS4

表 2 COL I、MCP-1、Arginase-1 蛋白在沉默 YEATS4 的 RAW264.7 中的表达

Table 2 The levels of COL I, MCP-1 and Arginase-1 in RAW264.7 regulated by silencing YEATS4

| 组别<br>Groups              | I 型胶原<br>COL I         | 巨噬细胞趋化<br>蛋白-1<br>MCP-1 | 精氨酸酶-1<br>Arginase-1   |
|---------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| siRNA 阴性对照组 siC           | 0.52±0.04              | 0.59±0.03               | 0.58±0.01              |
| siRNA-YEATS4 组 siY        | 0.08±0.04 <sup>a</sup> | 0.20±0.06 <sup>a</sup>  | 0.45±0.06 <sup>a</sup> |
| <i>T</i> 值 <i>T</i> value | 13.05                  | 9.50                    | 3.37                   |

注:与 siRNA-NC 比较,<sup>a</sup>*P*<0.05。

Note. Compared with siRNA-NC group, <sup>a</sup>*P*<0.05.

表 3 COL I、MCP-1、Arginase-1 蛋白在 SiO<sub>2</sub> 诱导的沉默 YEATS4 的 RAW264.7 中的表达

Table 3 The levels of COL I, MCP-1 and Arginase-1 in silica-treated RAW264.7 regulated by siRNA-YEATS4

| 组别<br>Groups                               | I 型胶原<br>COL I         | 巨噬细胞趋化<br>蛋白-1<br>MCP-1 | 精氨酸酶-1<br>Arginase-1   |
|--------------------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| SiO <sub>2</sub> +siRNA 阴性<br>对照组 S+siC    | 0.61±0.06              | 0.71±0.05               | 0.63±0.05              |
| SiO <sub>2</sub> +siRNA-<br>YEATS4 组 S+siY | 0.22±0.00 <sup>a</sup> | 0.36±0.06 <sup>a</sup>  | 0.41±0.06 <sup>a</sup> |
| <i>T</i> 值 <i>T</i> value                  | 11.64                  | 8.18                    | 5.19                   |

注:与 S+siC 组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05。

Note. Compared with S+siC group, <sup>a</sup>*P*<0.05.

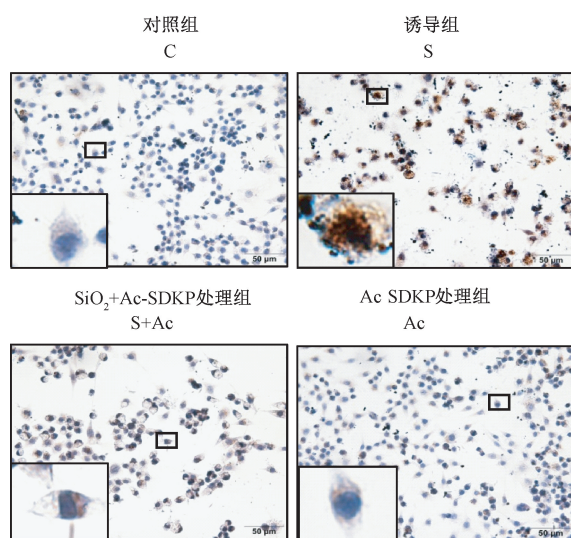


图 3 Ac-SDKP 对 SiO<sub>2</sub> 诱导的 RAW264.7 细胞中 YEATS4 表达的调节作用

Figure 3 Ac-SDKP inhibits the high-expression of YEATS4 in RAW264.7 cells induced by silica

## 2.3 Ac-SDKP 对实验性矽肺大鼠肺组织中 YEATS4 的表达的调节作用

IHC 结果显示,与 C24 周组比较,S24 周组中 YEATS4 阳性表达主要定位于矽结节中的巨噬细胞;与 S24 周组比较,Ac-SDKP 处理组中 YEATS4 阳性表达细胞数量减少(图 5)。如图 6、表 5 所示,与 C24 周组比较,S24 周组中 COL I、MCP-1、Arginase-1 和 YEATS4 表达均升高,差异均具有统计学意义(*P*<0.05)。与 S24 周组比较,Ac24 周组中,COL I、MCP-1、Arginase-1 和 YEATS4 蛋白表达明显降低,差异均具有统计学意义(*P*<0.05)。

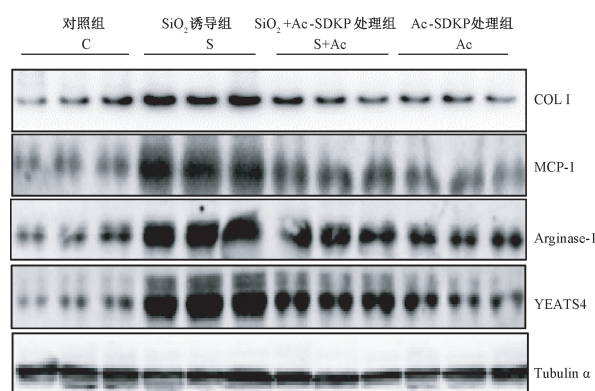


图 4 Ac-SDKP 对 SiO<sub>2</sub> 诱导的 RAW264.7 细胞中 YEATS4 表达的调节作用

Figure 4 Ac-SDKP inhibits the high-expression of YEATS4 in RAW264.7 cells induced by silica

表 4 Ac-SDKP 对 SiO<sub>2</sub> 诱导的 RAW264.7 细胞中 YEATS4 表达的调节作用

Table 4 Ac-SDKP inhibits the high-expression of YEATS4 in RAW264.7 cells induced by silica

| 组别<br>Groups                           | I 型胶原<br>COL I         | 巨噬细胞趋化<br>蛋白-1<br>MCP-1 | 精氨酸酶-1<br>Arginase-1   | 含 YEATS<br>结构域<br>蛋白 4<br>YEATS4 |
|----------------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------------|
| 对照组 C                                  | 0.29±0.15              | 0.36±0.03               | 0.54±0.18              | 0.70±0.13                        |
| SiO <sub>2</sub> 诱导组 S                 | 0.64±0.10 <sup>a</sup> | 0.91±0.14 <sup>a</sup>  | 1.27±0.12 <sup>a</sup> | 1.27±0.17 <sup>a</sup>           |
| SiO <sub>2</sub> +Ac-<br>SDKP 处理组 S+Ac | 0.40±0.06 <sup>b</sup> | 0.62±0.04 <sup>b</sup>  | 0.98±0.10 <sup>b</sup> | 0.99±0.07 <sup>b</sup>           |
| Ac-SDKP<br>处理组 Ac                      | 0.33±0.11              | 0.46±0.13               | 0.90±0.10              | 0.91±0.19                        |
| <i>F</i> 值 <i>F</i> value              | 5.81                   | 16.82                   | 15.895                 | 8.13                             |

注:与 C 组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与 S 诱导组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05。

Note. Compared with C group, <sup>a</sup>*P*<0.05. Compared with S group, <sup>b</sup>*P*<0.05.



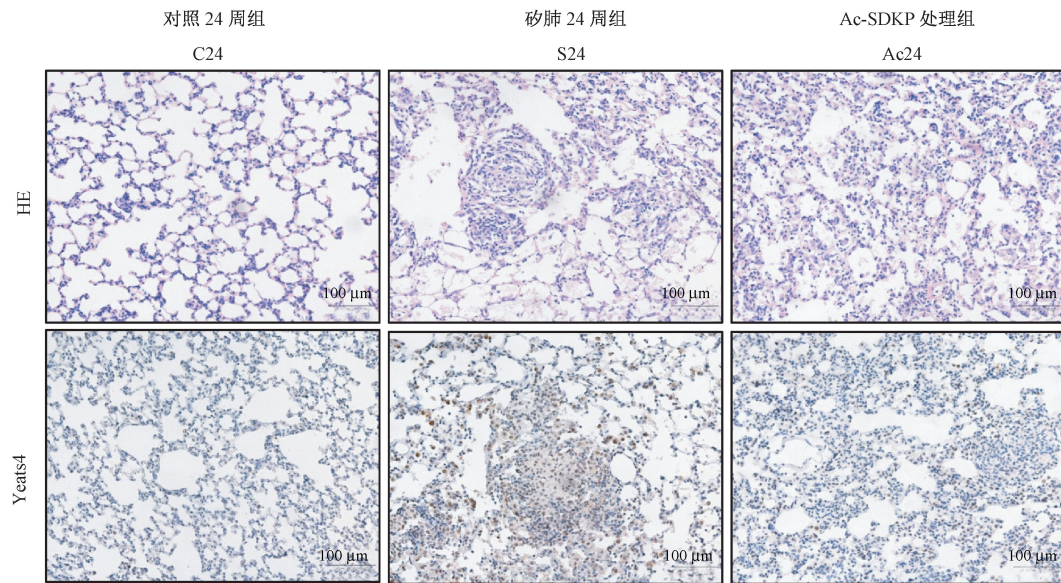


图 5 Ac-SDKP 抑制染尘大鼠肺组织中 YEATS4 的高表达

Figure 5 Ac-SDKP inhibits the increasing level of YEATS4 in rats exposed to silica

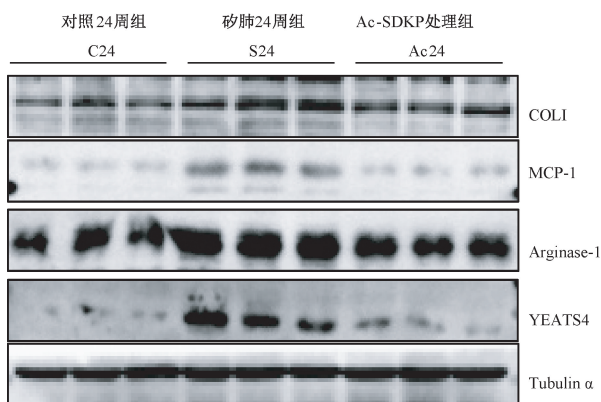


图 6 Ac-SDKP 抑制染尘大鼠肺组织中 YEATS4 的高表达

Figure 6 Ac-SDKP inhibits the increasing level of YEATS4 in rats exposed to silica

表 5 Ac-SDKP 抑制染尘大鼠肺组织中 YEATS4 的高表达

Table 5 Ac-SDKP inhibits the increasing level of YEATS4 in rats exposed to silica

| 组别<br>Groups         | I 型胶原<br>COL1          | 巨噬细胞趋<br>化蛋白-1<br>MCP-1 | 精氨酸酶-1<br>Arginase-1   | 含 YEATS<br>结构域蛋白 4<br>YEATS4 |
|----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------------|
| 对照 24 周<br>组 C24     | 0.53±0.06              | 0.12±0.00               | 1.25±0.13              | 0.83±0.07                    |
| 矽肺 24 周<br>组 S24     | 0.77±0.05 <sup>a</sup> | 0.44±0.05 <sup>a</sup>  | 1.69±0.02 <sup>a</sup> | 1.69±0.09 <sup>a</sup>       |
| Ac-SDKP 处<br>理组 Ac24 | 0.58±0.02 <sup>b</sup> | 0.14±0.03 <sup>b</sup>  | 1.41±0.06 <sup>b</sup> | 1.02±0.16 <sup>b</sup>       |
| F 值<br>F value       | 24.48                  | 97.289                  | 21.04                  | 46.86                        |

注:与 C24 周组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 S24 周组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with C24 group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with S24 group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

### 3 讨论

课题组前期通过高通量测序技术,在实验性矽肺大鼠模型中筛选了与矽肺纤维化发生、发展有关的长链非编码 RNA,而 YEATS4 是其重要的靶基因之一<sup>[2]</sup>。研究表明, YEATS 家族成员能够选择性识别组蛋白赖氨酸乙酰化位点,可促进赖氨酸巴豆酰化,在转录后修饰方面起到了重要的调节作用,主要参与染色质修饰、转录调控和 DNA 修复<sup>[9-13]</sup>。在本研究中,以实验性矽肺大鼠模型和体外 SiO<sub>2</sub> 诱导的 RAW264.7 细胞作为研究对象,发现了 YEATS4 主要定位于巨噬细胞,且其高表达伴随着巨噬细胞活化指标 Arginase-1、MCP-1 和纤维化指标 COL1 表达的上调,提示 YEATS4 可能参与了实验性矽肺进程,其主要作用可能与矽尘导致的巨噬细胞活化有关。

诸多研究显示, YEATS4 作为一种致癌基因,在肿瘤发生、发展中起到了重要的调节作用。在非小细胞肺癌中, YEATS4 能够激活 P53 信号通路促进肿瘤细胞的增殖和迁移,采用基因沉默技术则能够抑制该变化<sup>[14]</sup>。其还可通过激活 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号促进胰腺癌和胃癌细胞迁移、增殖和侵袭<sup>[5,15]</sup>。另有研究显示, YEATS4 在固有淋巴细胞及其祖细胞中高表达,并促进向辅助固有淋巴祖细胞分化,敲除 YEATS4 小鼠肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞浸润显著减少<sup>[16]</sup>。在本研究中,采用基因沉默技术,下调 YEATS4 后,在基础水平和 SiO<sub>2</sub> 诱导水平均显著

下调了 Arginase-1、MCP-1 和 COL I 的表达水平,进一步提示沉默 YEATS 能够抑制巨噬细胞的活化。课题组前期研究表明,Ac-SDKP 可通过抑制巨噬细胞活化、肌成纤维细胞分化和上皮间质转化进程,从而发挥拮抗矽肺纤维化的作用<sup>[17-18]</sup>。体内外实验结果显示,予以 Ac-SDKP 能够抑制矽肺大鼠和 RAW264.7 细胞中 YEATS4 的表达,同时下调 Arginase-1、MCP-1 和 COL I 的表达水平,提示 Ac-SDKP 可能通过对 YEATS4 的阻断,从而发挥拮抗矽肺纤维化的作用。

总之,本研究发现 YEATS4 可在 SiO<sub>2</sub> 诱导的巨噬细胞活化中起到了重要调节作用,其可能是矽肺纤维化进展的重要环节,采用基因沉默技术或给予 Ac-SDKP,均能够抑制 YEATS4 表达的上调,提示其可作为抗矽肺纤维化进展的一个有效靶点。在今后的研究工作中,将深入研究矽肺纤维化进展中 YEATS4 参与组蛋白乙酰化/巴豆酰化的具体机制,为明确其功能提供进一步的理论和实验依据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Li J, Yao W, Hou JY, et al. Crystalline silica promotes rat fibrocyte differentiation *in vitro*, and fibrocytes participate in silicosis *in vivo* [J]. Biomed Environ Sci, 2017, 30(9): 649-660.
- [ 2 ] Cai W, Xu H, Zhang B, et al. Differential expression of lncRNAs during silicosis and the role of LOC103691771 in myofibroblast differentiation induced by TGF- $\beta$ 1 [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109980.
- [ 3 ] Fischer U, Heckel D, Michel A, et al. Cloning of a novel transcription factor-like gene amplified in human glioma including astrocytoma grade I [J]. Hum Mol Genet, 1997, 6: 1817-1822.
- [ 4 ] Fu Q, Cheng J, Zhang J, et al. Downregulation of YEATS4 by miR-218 sensitizes colorectal cancer cells to L-OHP-induced cell apoptosis by inhibiting cytoprotective autophagy [J]. Oncol Rep, 2016, 36(6): 3682-3690.
- [ 5 ] Ji S, Zhang Y, Yang B. YEATS domain containing 4 promotes gastric cancer cell proliferation and mediates tumor progression via activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. Oncol Res, 2017, 25(9): 1633-1641.
- [ 6 ] 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.
- [ 7 ] Zhang L, Xu D, Li Q, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP) attenuates silicotic fibrosis by suppressing apoptosis of alveolar type II epithelial cells via mediation of endoplasmic reticulum stress [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 350: 1-10.
- [ 8 ] 李树民, 徐洪, 杨奕, 等. 血管紧张素转换酶 2 调节肺肾素血管紧张素系统减轻肢体缺血再灌注诱导的急性肺损伤 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 618-626.
- [ 9 ] Zhao D, Li Y, Xiong X, Chen Z, Li H. YEATS Domain-A histone acylation reader in health and disease [J]. J Mol Biol, 2017, 429(13): 1994-2002.
- [ 10 ] Barretina J, Taylor BS, Banerji S, et al. Subtypespecific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy [J]. Nat Genet, 2010, 42(8): 715-721.
- [ 11 ] Zimmermann K, Ahrens K, Matthes S, et al. Targeted disruption of the GAS41 gene encoding a putative transcription factor indicates that GAS41 is essential for cell viability [J]. J Biol Chem, 2002, 277(21): 18626-18631.
- [ 12 ] Schulze JM, Wang AY, Kobor MS. YEATS domain proteins: a diverse family with many links to chromatin modification and transcription [J]. Biochem Cell Biol, 2009, 87(1): 65-75.
- [ 13 ] Hsu CC, Shi J, Yuan C, et al. Recognition of histone acetylation by the GAS41 YEATS domain promotes H2A.Z deposition in non-small cell lung cancer [J]. Genes Dev, 2018, 32(1): 58-69.
- [ 14 ] Pikor LA, Lockwood WW, Thu KL, et al. YEATS4 is a novel oncogene amplified in non-small cell lung cancer that regulates the p53 pathway [J]. Cancer Res, 2013, 73(24): 7301-7312.
- [ 15 ] Jixiang C, Shengchun D, Jianguo Q, et al. YEATS4 promotes the tumorigenesis of pancreatic cancer by activating beta-catenin/TCF signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8(15): 25200-25210.
- [ 16 ] Liu B, Yang L, Zhu X, et al. YEATS4 drives ILC lineage commitment via activation of Lmo4 transcription [J]. J Exp Med, 2019, 216(11): 2653-2668.
- [ 17 ] Shifeng L, Hong X, Xue Y, et al. Ac-SDKP increases alpha-TAT 1 and promotes the apoptosis in lung fibroblasts and epithelial cells double-stimulated with TGF-beta1 and silica [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 369: 17-29.
- [ 18 ] Chen Y, Xu D, Yao J, et al. Inhibition of miR-155-5p Exerts Anti-Fibrotic Effects in Silicotic Mice by Regulating Meprin alpha [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19: 350-360.

[ 收稿日期 ] 2020-09-21