

The Effect of HIPK2 on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice

Yanan Zhang, Wencheng Yu

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Email: zynz1994@163.com

Received: May 25th, 2020; accepted: Jun. 15th, 2020; published: Jun. 22nd, 2020

Abstract

Objective: To explore the effect of HIPK2 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods:** A mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis was successfully constructed, and a stable overexpressing HIPK2 adenovirus vector was constructed. 15 mice were divided into Mock group, Ad-Control group, and Ad-HIPK2 group. HE Masson staining was performed on the lung tissue. The expression of mRNA and protein of HIPK2 and α -SMA were used RT-PCR, Western Blot method. **Results:** The expression of HIPK2 in Bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse was down-regulated ($P < 0.05$), α -SMA expression up-regulated ($P < 0.05$), and the degree of fibrosis increased; overexpression of HIPK2 can inhibit fibroblast activation, down-regulate the expression of α -SMA ($P < 0.05$), and the degree of pulmonary fibrosis was reduced. **Conclusion:** HIPK2 deficiency plays an important role in the mechanism of pulmonary fibrosis. HIPK2 can inhibit the activation of fibroblasts and reduce pulmonary fibrosis.

Keywords

HIPK2, Pulmonary Fibrosis, Bleomycin, Mice

同源结构域相互作用蛋白激酶2 (HIPK2)对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的影响

张亚楠, 于文成

青岛大学附属医院呼吸与危重症医学科, 山东 青岛

Email: zynz1994@163.com

收稿日期: 2020年5月25日; 录用日期: 2020年6月15日; 发布日期: 2020年6月22日

摘要

目的: 探讨HIPK2对博来霉素诱导的肺纤维化小鼠的影响。**方法:** 成功构建博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型, 构建稳定过表达HIPK2腺病毒载体, 设为对照组、模型组和过表达HIPK2组, 每组各5只, 对肺组织进行HE和Masson染色, 并用RT-PCR、Western Blot法测定肺组织中HIPK2和 α -SMA含量。**结果:** 博来霉素诱导肺纤维化小鼠模型中HIPK2表达下调($P < 0.05$), α -SMA表达上调($P < 0.05$), 且纤维化程度加重; 过表达HIPK2可抑制成纤维细胞的激活, 使 α -SMA表达下调($P < 0.05$), 且肺纤维化程度减轻。**结论:** HIPK2缺乏在肺纤维化机制中具有重要作用, HIPK2可抑制成纤维细胞的激活, 减轻肺纤维化。

关键词

同源结构域相互作用蛋白激酶2, 肺纤维化, 博来霉素, 小鼠

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺纤维化是一种慢性、进行性、致死性的肺间质疾病, 其病因不明, 且发病率逐年增加[1], 该病更常见于男性及吸烟患者, 中位生存期平均 3~5 年, IPF 患者的治疗选择有限, 肺移植是唯一可以明显改善患者生存率的治疗方法[2]。因此, 探讨 IPF 的发病机制, 寻找新的治疗靶点及针对新的靶点的治疗药物, 是今后 IPF 研究的关键。同源结构域相互作用蛋白激酶-2 (HIPK2)是一种通过调节各种基因和信号分子, HIPK2 的缺乏在成纤维细胞行为和 IPF 发病机理中具有重要作用[3]。本实验建立博来霉素诱导肺纤维化小鼠模型, 观察上调 HIPK2 对小鼠肺纤维化程度及间质标志物 α -SMA 的影响。

2. 材料和方法

2.1. 材料

8 周龄的 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体重每只约 20 g (北京中国医学科学院实验动物研究所提供); anti-HIPK2、anti- α -SMA、anti-GAPDH (Abcam, 美国), 本次动物实验获得青岛大学动物实验伦理委员会许可。

2.2. 方法

2.2.1. 构建腺病毒载体

合成和测序目的基因, 对目的基因和载体进行连接, 热休克法转化感受态大肠杆菌, 取其中的单克隆菌落培养并提取质粒, 在酶切后对其进行测序, 成功构建 pAdTrack-CMV/HIPK2、pAdTrack-U6/sh-HIPK2。纯化质粒并将重组腺病毒载体转染 293A 细胞并且大量扩增, 建带有 GFP 示踪基因的 Ad-HIPK2 腺病毒载体, 鉴定正确后进行扩增、浓缩纯化, 并测定腺病毒的滴度, 用于实验。

2.2.2. 构建动物模型

将 15 只 C57 小鼠, 随机分 3 组, 每组 5 只, 具体分组情况如下: A: 对照组(Mock 组) B: 模型组(Ad-control 组) C: 模型组+HIPK2 过表达组(Ad-HIPK2 组)。将 70 μ L 博来霉素溶液(浓度为 1 mg/mL, 剂量约为 3.5

mg/kg)滴入小鼠气管进行肺纤维化造模, 对照组使用等体积无菌生理盐水, 常规 SPF 级动物房喂养。造模次日于小鼠尾静脉注射相应的腺病毒(5×10^9 PFU/只)。实验过程中观察小鼠饮食情况, 于第 7 天处死实验小鼠, 收集肺组织。

2.2.3. 模型纤维化评估

将固定 24 h 的肺组织常规脱水、透明、浸蜡、包埋, 制作 $5 \mu\text{m}$ 厚的连续切片, 每片相距 $30 \mu\text{m}$, 用苏木精 - 伊红(HE)染色进行结构观察, 用 Masson 染色检测胶原沉积, 高倍镜下拍照, $200\times$ 。于显微镜下观察肺组织纤维化程度。

2.2.4. RT-PCR 测定肺组织 HIPK2、 α -SMA 的含量

研磨肺组织、裂解、过滤并离心提取总 RNA, 并逆转录获得 cDNA。荧光定量 PCR 扩增待检测基因和内参 β -actin, 使用表 1 所示的引物进行 PCR 反应。循环温度为: 94°C 4 min, 94°C 30 s、 56°C 30 s、 72°C 30 s 40 个循环。

Table 1. Primer sequences used for PCR analysis

表 1. 用于 PCR 分析的引物序列

引物名称	正向引物	反向引物	产物长度(bp)
HIPK2	5'CAGCAACACCAGCCCCTA3'	5'GGACTTGAAGGAGGACGAA3'	214
α -SMA	5'GTACCCAGGCATTGCTGACA3'	5'GAGGCGCTGATCCACAAAAC3'	271

2.2.5. Western Blot 检测肺组织中 HIPK2、 α -SMA 的表达变化

RIPA 裂解液裂解肺组织, 收集总蛋白, BAC 法测定各样品蛋白质浓度, SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 膜转膜, 2%的 BSA 中封闭, 分别用 anti-HIPK2、anti- α -SMA、anti-GAPDH 孵育膜, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(天津赛尔, 中国)进行孵育, 洗涤后用化学发光法显色, 在暗室曝光并进行显影、定影处理, 用 Lab WorksTM 凝胶成像及分析系统扫描所有胶片, 分析各蛋白条带的亮度值, 计算校正后的目的蛋白相对表达量。

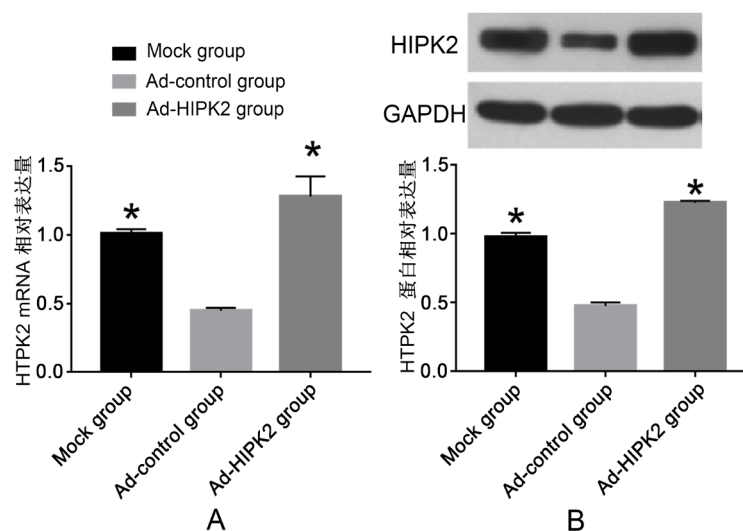


Figure 1. Expression of HIPK2 in mice of each group. A: The expression of HIPK2 mRNA was detected by qPCR. B: Western blot was used to detect the expression of HIPK2 protein. *: Compared with Ad-control group, $p < 0.05$, $n = 5$

图 1. HIPK2 在各组小鼠中的表达情况。A: 通过 qPCR 检测 HIPK2 mRNA 表达。B: Western blot 检测 HIPK2 蛋白表达。*: 与 Ad-control 组相比, $p < 0.05$, $n = 5$

2.2.6. 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件, 两组间均数的比较采用单因素方差分析的 Dunnett 事后比较, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. HIPK2 在肺纤维化小鼠体内低表达

RT-PCR 和 Western Blot 检测显示(图 1), 与 Mock 组相比, HIPK2 的 mRNA 和蛋白表达在博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型组中是低表达的; Ad-HIPK2 组可稳定过表达 HIPK2, $p < 0.05$, $n = 5$ 。

3.2. HIPK2 能减轻博来霉素诱导小鼠肺纤维化程度

HE 和 Masson 染色可见(图 2), 与 Mock 组相比, 模型组肺纤维化程度加重; 与模型组相比, HIPK2 过表达组纤维化程度减轻。

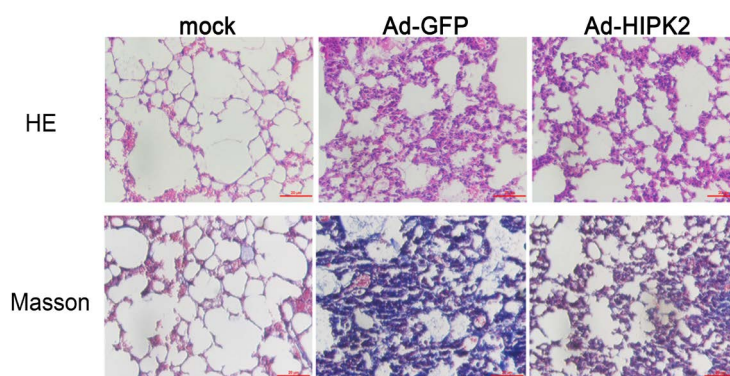


Figure 2. HE and Masson staining of mouse lung tissue in each group, 200×
图 2. 各组小鼠肺组织 HE 和 Masson 染色, 200×

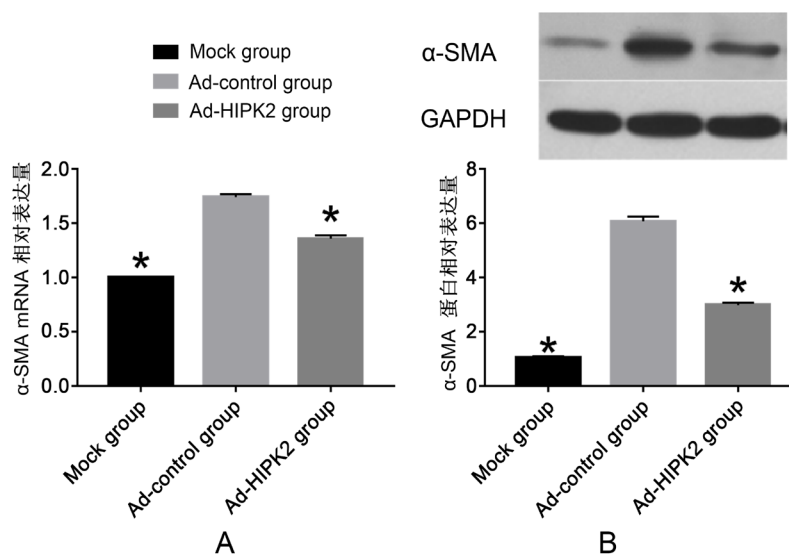


Figure 3. α -SMA expression in each group of mice. A: RT-PCR was used to detect α -SMA mRNA expression, and B: Western blot was used to detect α -SMA protein expression. *: Compared with Ad-control group, $p < 0.05$, $n = 5$

图 3. α -SMA 在各组小鼠中的表达情况。A: RT-PCR 检测 α -SMA mRNA 表达, B: Western blot 检测 α -SMA 蛋白表达。*: 与 Ad-control 组相比, $p < 0.05$, $n = 5$

3.3. HIPK2 能抑制成纤维细胞的活化

RT-PCR 和 Western Blot 检测显示(图 3), 与 Mock 组相比, 模型组中 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达增加; Ad-HIPK2 组较模型组减少, $p < 0.05$, $n = 5$ 。

4. 讨论

目前认为肺纤维化的病理学过程表现为在各种致纤维化因素作用下, 肺泡上皮细胞弥漫性损伤, 激活成纤维细胞, 大量分泌胶原纤维, 胶原纤维等细胞外基质的异常沉积引起组织收缩, 最终发展成为广泛的纤维化变化[4] [5]。

同源结构域相互作用蛋白激酶 2 (HIPK 2)是保守的丝氨酸/苏氨酸同源结构域相互作用激酶家族的一部分, 是一种重要的转录辅助调节蛋白[6] [7]。研究发现 HIPK 2 有多种功能, 包括转录因子的共同调节、生长、发育、形态发生和细胞死亡的调控、肿瘤抑制和 DNA 损伤反应的调节[8] [9]。HIPK 在癌症和慢性纤维化中已成为有希望的药物靶点[10]。研究发现, HIPK2 通过调节促凋亡、促纤维化和促炎症通路, 被认为是肾纤维化的重要驱动因素, 可能是抗纤维药物的潜在靶点[11]。尚有研究发现, HIPK2 参与 Sigma-1 受体在二氧化硅致纤维化中的调控作用[12]。对于 HIPK2 在博来霉素诱导的肺纤维化模型小鼠中研究较少。

我们构建了博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型, 证明 HIPK2 在纤维化肺组织中是低表达的; 同时构建稳定过表达 HIPK2 的腺病毒载体, 通过染色发现转染该载体的小鼠肺组织肺纤维化程度较模型组减轻, 且其间质标志物 α -SMA 表达下降, 说明过表达 HIPK2 能抑制成纤维细胞的活化。我们的研究与 Ricci 等人相符, 其证实 IPF 人成纤维细胞 HIPK2 表达降低, 认为肺成纤维细胞中 HIPK2 基因的缺失可能会抑制 P53 的活化, 从而促进了肺成纤维细胞的凋亡, 促进肺纤维化的发生[3]。我们从体内实验明确了 HIPK2 在纤维化肺组织内的表达情况, 并证实过表达 HIPK2 可减轻肺纤维化。下一步, 我们将设立体外实验进一步探究 HIPK2 减轻肺纤维化的具体机制, 为治疗提供更新的靶点。

参考文献

- [1] Hutchinson, J., et al. (2015) Global Incidence and Mortality of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Systematic Review. *European Respiratory Journal*, **46**, 795-806. <https://doi.org/10.1183/09031936.00185114>
- [2] Raghu, G., et al. (2018) Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **198**, e44-e68.
- [3] Ricci, A., et al. (2013) Homeodomain-Interacting Protein Kinase2 in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Cellular Physiology*, **228**, 235-241. <https://doi.org/10.1002/jcp.24129>
- [4] Wuyts, W.A., et al. (2013) The Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis: A Moving Target. *European Respiratory Journal*, **41**, 1207-1218. <https://doi.org/10.1183/09031936.00073012>
- [5] Parker, M.W., et al. (2014) Fibrotic Extracellular Matrix Activates a Profibrotic Positive Feedback Loop. *The Journal of Clinical Investigation*, **124**, 1622-1635. <https://doi.org/10.1172/JCI171386>
- [6] Lee, S., et al. (2016) Activation of HIPK2 Promotes ER Stress-Mediated Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron*, **91**, 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.021>
- [7] Hashimoto, K. and Tsuji, Y. (2017) Arsenic-Induced Activation of the Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2 (HIPK2) to cAMP-Response Element Binding Protein (CREB) Axis. *Journal of Molecular Biology*, **429**, 64-78. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.015>
- [8] Kuwano, Y., et al. (2016) Homeodomain-Interacting Protein Kinase-2: A Critical Regulator of the DNA Damage Response and the Epigenome. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, 1638. <https://doi.org/10.3390/ijms17101638>
- [9] Gatti, V., et al. (2020) An Alternative Splice Variant of HIPK2 with Intron Retention Contributes to Cytokinesis. *Cells*, **9**, 484. <https://doi.org/10.3390/cells9020484>
- [10] Agnew, C., et al. (2019) The Crystal Structure of the Protein Kinase HIPK2 Reveals a Unique Architecture of Its

- CMGC-Insert Region. *Journal of Biological Chemistry*, **294**, 13545-13559. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009725>
- [11] Xiong, C., *et al.* (2016) Pharmacological Targeting of BET Proteins Inhibits Renal Fibroblast Activation and Alleviates Renal Fibrosis. *Oncotarget*, **7**, 69291-69308. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12498>
- [12] Cao, Z., *et al.* (2017) CircHIPK2-Mediated σ -1R Promotes Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pulmonary Fibroblasts Exposed to Silica. *Cell Death & Disease*, **8**, Article No. 3212. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0017-4>