

· 论著 ·

来氟米特通过调节 miR-449a 在肺纤维化中的机制研究

刘冬¹, 赖伟男² (1. 陆军军医大学新桥医院药剂科, 重庆 400037; 2. 南方医科大学南方医院风湿免疫科, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的 探究来氟米特(leflunomide, LEF)通过调节微小RNA(microRNA, miR)-449a在肺纤维化中的机制研究。方法 将人肺成纤维细胞MRC-5分为6组,即对照组、LEF组、LEF+mimic组、mimic组、LEF+inhibitor组和inhibitor组。通过质粒转染miR-449a mimic或inhibitor来过表达或沉默miR-449a,在5 mg/L LEF的条件下培养48 h。分别通过CCK-8法、克隆形成实验和流式细胞术检测各组细胞活力、细胞增殖能力和凋亡率。使用免疫荧光染色检测 α 平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α -SMA)胶原蛋白I(collagen I, col I)。分别使用qPCR和Western blot检测miRNA和蛋白的水平。结果 mimic组miR-449a水平显著高于对照组($P<0.05$)。LEF组和inhibitor组的miR-449a水平显著低于对照组($P<0.05$)。LEF+mimic组的miR-449a的表达水平显著高于LEF组,LEF+inhibitor组的miR-449a水平显著低于LEF组($P<0.05$)。LEF组和inhibitor组的细胞活力和细胞增殖能力显著高于对照组($P<0.05$)。mimic组的细胞活力和细胞增殖能力显著低于对照组($P<0.05$)。LEF+mimic组的细胞活力和细胞增殖能力显著低于LEF组而LEF+inhibitor组的细胞活力显著高于LEF组($P<0.05$)。LEF组和inhibitor组的细胞凋亡率低于对照组($P<0.05$),mimic组的细胞凋亡率显著高于对照组($P<0.05$)。LEF+mimic组的细胞凋亡率显著高于LEF组而LEF+inhibitor组的凋亡率显著低于LEF组($P<0.05$)。LEF组和inhibitor组的 α -SMA和Col I蛋白的荧光强度显著高于对照组($P<0.05$),mimic组的相对荧光强度低于对照组($P<0.05$)。LEF+mimic组的 α -SMA和Col I蛋白相对荧光强度显著低于LEF组,LEF+inhibitor组的 α -SMA和Col I蛋白相对荧光强度显著高于LEF组($P<0.05$)。LEF组和inhibitor组的p-JNK/JNK水平高于对照组($P<0.05$),mimic组的p-JNK/JNK水平显著低于对照组($P<0.05$),LEF+mimic组中p-JNK/JNK水平显著低于LEF组而LEF+inhibitor组的p-JNK/JNK水平显著高于LEF组($P<0.05$)。结论 LEF可能通过抑制肺成纤维细胞中miR-449a的表达激活JNK途径,从而诱导成纤维细胞的活化和增殖,抑制其凋亡,从而引起肺纤维化。

[关键词] 来氟米特;肺纤维化;成纤维细胞; α 平滑肌肌动蛋白;微小RNA-449a;c-Jun氨基末端激酶

[中图分类号] R971+1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)04-0296-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.201910073

Mechanism of leflunomide in regulating pulmonary fibrosis by regulating miR-449a

LIU Dong¹, LAI Weinan² (1. Department of Pharmacy, Xinqiao Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of Rheumatology and Immunology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of leflunomide (LEF) in regulating pulmonary fibrosis by regulating microRNA (miR)-449a. **Methods** Human lung fibroblasts MRC-5 were divided into 6 groups: control group, LEF group, LEF+mimic group, mimic group, LEF+inhibitor group and inhibitor group. MiR-449a was overexpressed or silenced by plasmid transfection with miR-449a mimic or inhibitor and incubated for 48 h at 5 mg / L LEF. The cell viability, cell proliferation ability and apoptotic rate of each group were measured by CCK-8 method, clone formation experiment and flow cytometry. Immunofluorescent staining was used to detect α smooth muscle actin (α -SMA) and collagen I (col I). The levels of miRNA and protein were detected using qPCR and Western blot, respectively. **Results** The miR-449a level in the mimic group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). The level of miR-449a in LEF group and inhibitor group was significantly lower than that in control group ($P<0.05$). The expression level of miR-449a in LEF+mimic group was significantly higher than that in LEF group, and the level of miR-449a in LEF+inhibitor group was significantly lower than that in LEF group ($P<0.05$). The cell viability and cell proliferation ability of the LEF group and inhibitor group were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$). The

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目, 编号(2017A030313508)

[作者简介] 刘冬, 本科, 主管药师, 研究方向: 中药学与医院药学, Email: ldong647@sohu.com

cell viability and cell proliferation ability of the mimic group were significantly lower than those of the control group ($P<0.05$). The cell viability and cell proliferation ability of the LEF+mimic group were significantly lower than those of the LEF group, while the cell viability of the LEF+inhibitor group was significantly higher than that of the LEF group ($P<0.05$). The apoptosis rate of LEF group and inhibitor group was lower than that of control group ($P<0.05$). The apoptosis rate of mimic group was significantly higher than that of control group ($P<0.05$). The apoptosis rate of LEF+mimic group was significantly higher than that of LEF group, while the apoptosis rate of LEF+inhibitor group was significantly lower than that of LEF group ($P<0.05$). The fluorescence intensity of α -SMA and Col I proteins in LEF group and inhibitor group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). The relative fluorescence intensity of mimic group was lower than that of control group ($P<0.05$). The relative fluorescence intensities of α -SMA and Col I proteins in LEF+mimic group were significantly lower than those in LEF group, while the relative fluorescence intensities of α -SMA and Col I protein in LEF+inhibitor group were significantly higher than those in LEF group ($P<0.05$). The levels of p-JNK / JNK in LEF group and inhibitor group were higher than those in control group ($P<0.05$). The p-JNK / JNK level in the mimic group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). The level of p-JNK / JNK in LEF+mimic group was significantly lower than that in LEF group, while the level of p-JNK / JNK in LEF+inhibitor group was significantly higher than that in LEF group ($P<0.05$). **Conclusion** LEF may activate the JNK pathway by inhibiting the expression of miR-449a in lung fibroblasts, thereby inducing fibroblast activation and proliferation, inhibiting apoptosis, and causing pulmonary fibrosis.

[Key words] leflunomide; pulmonary fibrosis; fibroblasts; alpha smooth muscle actin; microRNA-449a; c-Jun N-terminal kinase

成纤维细胞的增殖和活化引起的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的累积是肺纤维化的主要病理基础^[1]。肺纤维化治疗难度大,且发展到晚期纤维化过程不可逆转,而一些药物的长期使用会提高肺纤维化的发生风险,对于这临床的一类并发症应格外重视。来氟米特 (leflunomide, LEF) 是治疗类风湿性关节炎的常用药物,但是有临床报道称,长期服用 LEF 可能提高肺纤维化的发生风险,但是也有研究认为 LEF 对肺纤维化影响不大^[2]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 长度约为 18~22 个核苷酸,虽然不具备编码功能,但是可通过识别和碱基配对的方式与靶基因信使 RNA (message RNA, mRNA) 的 3'非翻译区 (3'UTR) 结合,从而参与基因表达的调控^[3]。miR-449a 具有抑制肿瘤细胞的增殖并诱导凋亡的作用^[4],并且最新研究发现 miR-449a 可能与肺纤维化有关,在二氧化硅诱导的肺纤维化模型中,miR-449a 可通过调节自噬缓解纤维化^[5]。c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 是调节细胞增殖、凋亡和分化的重要蛋白,其磷酸化后可通过信号转导调控细胞生物学行为^[6]。本文发现了 miR-449a 的过表达会显著缓解由 LEF 引起的肺成纤维细胞的增殖,而沉默 miR-449a 对细胞的影响相反,这可能是 LEF 引起肺纤维化的机制之一,报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人肺成纤维细胞 MRC-5 购自美国 ATCC; LEF (苏州长征-欣凯制药有限公司,国药准字

H20000550); RPMI-1640 培养基以及血清购自美国 Gibco 公司; miR-449a mimic 和 inhibitor 质粒由 Genepharma 公司构建;

Lipofectamine™ 2000 (美国 Invitrogen 公司); 荧光显微镜 (Olympus BX51); Model 680 酶标仪 (Bio-Rad, 美国); 流式细胞仪 (BD FACScanto II, Becton Dickinson, 美国)。CCK-8 试剂盒 (武汉华美公司); 凋亡试剂盒 (美国 Thermo Fisher); PVDF 膜 (美国 Bio-Rad 公司); 抗体购自美国 Abcam 公司,逆转录试剂盒 TaKaRa 和 SYBR Prellix Ex Taq™ 实时 PCR 试剂盒购自 TaKaRa (日本)。

1.2 细胞分组和转染

MRC-5 细胞在 RPMI-1640 培养基中培养,温度为 37 °C, CO₂ 浓度为 5%。细胞被分为 6 组,即对照组、LEF 组、LEF+mimic 组、mimic 组、LEF+inhibitor 组和 inhibitor 组。其中 LEF+mimic 组和 mimic 组通过转染 miR-449a mimic 质粒过表达 miR-449a 的水平,LEF+inhibitor 组和 inhibitor 组通过转染 miR-449a inhibitor 质粒使 miR-449a 的水平降低。对照组转染空载质粒。LEF 组、LEF+mimic 组和 LEF+inhibitor 组分别在 5 mg/L LEF 的条件下培养 48 h。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 qPCR 检测 miR-449a

将细胞裂解后收集总 RNA 并检测纯度,通过逆转录试剂盒合成 cDNA,然后进行 PCR 反应,步骤如下: 95 °C 下 2 min, 95 °C 下 15 s, 60 °C 下 25 s

和 72 °C 下 60 s, 共进行 40 个循环。以 U6 作为内参, 使用 2^{-ΔΔCT} 法分析 miR-449a 水平。引物序列如下 (5'-3'), miR-449a 上游引物: TGCGGTGG-CAGTGTATTGTTAGC, 下游引物: CCAGTGCA-GGGTCCGAGGT; U6 上游引物: GGGCAGGAA-GAGGGCCTAT, 下游引物: TATGGCTAGCATG-ACTGGT。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞活力

将细胞调节至 2×10⁴ 个细胞/ml 的密度, 接种于 96 孔板中, 100 μl/孔。再培养 24、48 和 72 h 后将 10 μl 的 CCK-8 试剂加入至每孔中, 37 °C 下培养 2 h。在酶标仪上测量 450 nm 处的吸光度(A), 计算相对细胞活力。

1.3.3 克隆形成检测细胞增殖能力

分别将各组细胞 200 个细胞在 6 孔板中培养, 每 3 天补充一次培养基, 培养 2 周。用 PBS 洗涤细胞并加入甲醇固定 15 min, 加入使用结晶紫染色 30 min, 在显微镜下观察克隆形成的数目, ≥ 50 个细胞的集落为一个克隆形成。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将细胞洗涤后重悬于结合缓冲液中, 使细胞浓度为 2.5×10⁵ 个/ml。根据试剂盒说明书将试剂加入细胞中, 并通过流式细胞术分析细胞凋亡情况。

1.3.5 免疫荧光染色

通过免疫荧光染色检测 α 平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α-SMA)和胶原蛋白 I(collagen I, Col I)的表达情况分析细胞的表型和细胞外基质。然后将细胞在 4 °C 下使用 α-SMA 的抗体染色过夜, 用异硫氰酸四甲基罗丹明的山羊抗兔抗体染色 30 min。然后再于避光条件下利用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)对细胞核染色 10 min, 通过荧光显微镜观察。

1.3.6 Western blot 检测蛋白表达

通过 Western blot 检测 JNK 和磷酸化 JNK(p-JNK)蛋白的水平。将细胞裂解、离心收集总蛋白并检测蛋白浓度。使用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶用于电泳分离蛋白, 电泳后使用 PVDF 膜转膜并在室温下用 5% 无脂牛奶封闭 2 h。分别加入一抗(稀释 1:1 000)室温震荡 2 h, 后在 4 °C 孵育过夜, 加入二抗(稀释 1:5 000), 孵育 3 h。通过 Quantity One 软件分析条带的灰度值并以 GAPDH 为参照计算目标蛋白质的表达量。

1.4 统计学处理

实验数据采用 SPSS 19 软件进行处理, 实验结果以平均值±标准偏差(SD)表示, 组间比较采用单

因素方差分析和 *t* 检验, 统计学显著性表示为 *P*<0.05。

2 结果

2.1 各组细胞 miR-449a 表达水平

使用 qPCR 检测各组细胞中 miR-449a 表达水平。结果显示 mimic 组 miR-449a 水平显著高于对照组, inhibitor 组的 miR-449a 表达水平显著低于对照组(*P*<0.05), 说明转染实验成功。LEF 组的 miR-449a 水平显著低于对照组(*P*<0.05), 并且 LEF+mimic 组的 miR-449a 的表达水平显著高于 LEF 组, LEF+inhibitor 组的 miR-449a 显著低于 LEF 组(*P*<0.05)。表明 LEF 可抑制人成纤维细胞中 miR-449a 的表达, 见表 1。

表 1 各组 miR-449a 表达水平比较

组别	miR-449a
对照组	1.16±0.08
LEF组	0.58±0.05*
LEF+mimic组	2.04±0.16#
mimic组	6.32±0.63*
LEF+inhibitor组	0.41±0.06#
inhibitor组	0.77±0.07*

**P*<0.05, 与对照组比较; #*P*<0.05, 与LEF组比较

2.2 各组细胞的细胞活力比较

使用 CCK-8 法检测各组细胞的相对细胞活力。结果显示在第 48 小时和第 72 小时, LEF 组和 inhibitor 组的细胞活力显著高于对照组(*P*<0.05), 而 mimic 组的细胞活力显著低于对照组(*P*<0.05)。此外, LEF+mimic 组的细胞活力显著低于 LEF 组, LEF+inhibitor 组的细胞活力显著高于 LEF 组(*P*<0.05), 过表达 miR-449a 可部分逆转 LEF 对促进人成纤维细胞的细胞活力的作用, 而降低 miR-449a 的水平会进一步促进细胞活力, 见表 2。

表 2 各组细胞的相对细胞活力比较 (%)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	100.07±1.83	100.76±2.07	100.16±1.96
LEF组	103.67±2.06	110.83±2.15*	121.17±2.65*
LEF+mimic组	99.98±2.14	98.57±2.11#	97.37±2.01#
mimic组	97.54±1.97	91.79±2.35*	81.77±1.78*
LEF+inhibitor组	107.68±2.08	118.67±3.07#	132.84±2.07#
inhibitor组	104.31±1.79	111.38±2.67*	119.35±2.18*

**P*<0.05, 与对照组比较; #*P*<0.05, 与LEF组比较

2.3 各组细胞增殖和凋亡情况比较

LEF组和inhibitor组的克隆形成数目显著高于对照组而细胞凋亡率低于对照组($P<0.05$),mimic组的克隆形成数目显著低于对照组而细胞凋亡率显著高于对照组($P<0.05$)。此外,LEF+mimic组的克隆形成数目显著低于LEF组而细胞凋亡率显著高于LEF组($P<0.05$),LEF+inhibitor组的克隆形成数目在LEF的基础上进一步升高而细胞凋亡率进一步降低($P<0.05$)。过表达miR-449a可逆转LEF促进肺成纤维细胞增殖和抑制凋亡的作用,而低表达miR-449a会加剧LEF的作用,见表3。

表3 各组细胞增殖和凋亡情况比较

组别	克隆形成数目(个)	细胞凋亡率(%)
对照组	54.32±4.36	5.53±0.94
LEF组	87.66±7.24*	3.11±0.76*
LEF+mimic组	60.82±6.06 [#]	6.73±1.26 [#]
mimic组	31.12±3.78*	17.32±3.28*
LEF+inhibitor组	119.35±5.08 [#]	2.14±0.62 [#]
inhibitor组	92.71±7.89*	3.45±0.83*

* $P<0.05$,与对照组比较;[#] $P<0.05$,与LEF组比较

2.4 各组细胞中 α -SMA和Col I水平比较

本次研究通过免疫荧光技术检测了各组 α -SMA的水平来分析细胞向肌细胞转化情况,检测Col I的水平来分析ECM水平。其中蓝色荧光为细胞核,红色荧光为 α -SMA或Col I蛋白。LEF组和inhibitor组的荧光强度显著高于对照组($P<0.05$),而mimic组的相对荧光强度低于对照组($P<0.05$)。此外,LEF+mimic组的相对荧光强度显著低于LEF组($P<0.05$),LEF+inhibitor组的相对荧光强度显著高于LEF组($P<0.05$)。过表达miR-449a可部

分逆转LEF对促进人成纤维细胞 α -SMA和Col I表达的促进作用,见图1、图2和表4。

2.5 各组p-JNK/JNK水平比较

LEF组和inhibitor组的p-JNK/JNK水平高于对照组,mimic组的p-JNK/JNK水平显著低于对照组($P<0.05$),并且LEF+mimic组中p-JNK/JNK水平显著低于LEF组($P<0.05$),LEF+inhibitor组中p-JNK/JNK水平显著高于LEF组($P<0.05$)。过表达miR-449a可逆转LEF促进JNK蛋白磷酸化的作用,见表5。

3 讨论

肺纤维化是一种慢性进行性肺部疾病,但是临床上尚无治疗肺纤维化的特效方法和药物,目前用于进行性肺纤维化的唯一有效治疗方法是肺移植^[7],若患者未接受肺移植,通常在诊断后的3至5年内出现肺功能丧失导致呼吸衰竭和死亡。肺纤维化的病理特征包括纤维增生和ECM沉积过多,但是这个过程较为漫长,并且在早期症状不明显,也缺乏相应的诊断手段,在患者确诊为肺纤维化时再采取治疗效果有限。因此虽然LEF是否会引起肺纤维化尚无定论,但是由于肺纤维化的恶性预后和致死率,LEF治疗过程中的肺纤维化风险仍是临床重点关注的问题。研究LEF促进肺纤维化的机制是寻找诊断和治疗肺纤维化新方法的重要途径。

LEF是一种调节免疫的药物,其作用机制通过抑制二氢乳酸脱氢酶来抑制T淋巴细胞和其他类型细胞的细胞周期进程^[8]。LEF引起的肺纤维化并导致患者死亡的病例随着LEF使用时间的增加而升高^[9]。一项长期的调查随访报告指出,在5911例使用LEF治疗的患者中,共出现了80例间质性肺病,其中有27例患者死亡,并且结果判定其

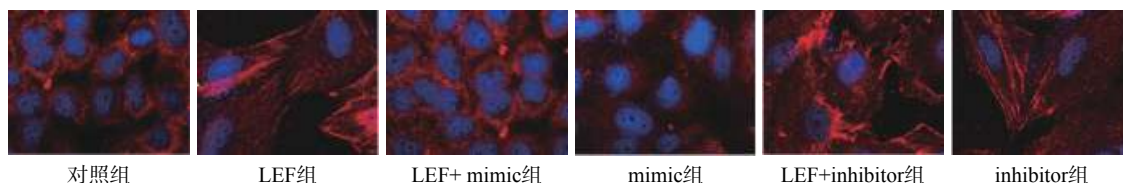


图1 免疫荧光检测各组细胞中 α -SMA的表达水平($\times 400$)

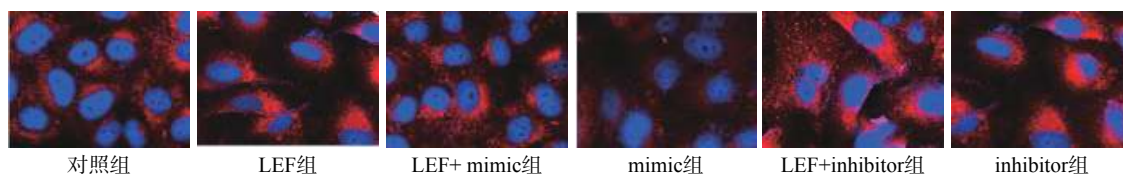


图2 免疫荧光检测各组细胞中Col I的表达水平($\times 400$)

表4 各组细胞 α -SMA 相对荧光强度比较

组别	α -SMA	Col I
对照组	1.02±0.11	1.24±0.14
LEF组	2.36±0.47*	2.57±0.38*
LEF+mimic组	1.53±0.34#	1.89±0.25#
mimic组	0.47±0.05*	0.45±0.06*
LEF+inhibitor组	3.25±0.18#	4.13±0.54#
inhibitor组	2.48±0.15*	3.11±0.39*

*P<0.05, 与对照组比较; #P<0.05, 与LEF组比较

表5 各组 p-JNK/JNK 相对水平比较

组别	p-JNK	JNK	p-JNK/JNK
对照组	2.04±0.18	2.16±0.16	0.94±0.09
LEF组	2.87±0.31	1.05±0.10	2.73±0.18*
LEF+mimic组	1.67±0.19	2.24±0.21	0.75±0.07#
mimic组	0.96±0.11	3.11±0.28	0.31±0.04*
LEF+inhibitor组	3.04±0.24	1.10±0.10	2.76±0.25#
inhibitor组	3.78±0.34	1.02±0.09	3.71±0.31*

*P<0.05, 与对照组比较; #P<0.05, 与LEF组比较

中有 18 例患者的死亡是由于 LEF 直接导致^[10-11]。在肺纤维化的过程中,成纤维细胞向成肌纤维细胞转化和 ECM 的累积是两大特点^[12]。因此本文主要分析了 LEF 对人肺成纤维细胞的影响,结果显示 LEF 可显著促进成纤维细胞的细胞活力和增殖,抑制其凋亡,并诱导细胞表达大量的 α -SMA 蛋白和 ECM 累积。 α -SMA 是上皮细胞向间质细胞转化的检测指标之一,也是体外研究肺纤维化的最常用指标,而 Col I 是 ECM 的主要成分^[13]。作者提示了 LEF 可通过活化成纤维细胞和促进其增殖参与肺纤维化。

为进一步分析 LEF 调节肺成纤维细胞增殖和表达 α -SMA 的机制,我们检测了 miR-449a 在其中的作用。miR-449a 是近年来新发现的一种 miRNA,研究已经证实了其可通过靶向并诱导靶基因 mRNA 降解,抑制肺癌细胞的增殖、上皮间充质转化^[14-15]。本次研究结果显示 LEF 可抑制 miR-449a 的表达水平,并且过表达 miR-449a 可抑制成纤维细胞的细胞活力、细胞增殖能力,抑制 α -SMA 和 Col I 蛋白的表达,并促进其凋亡。过表达 miR-449a 会逆转由 LEF 引起的细胞活化、增殖以及 α -SMA 和 Col I 蛋白的表达,而抑制 miR-449a 的水平会进一步加剧 LEF 的促纤维化作用。Zhang 等^[16]的研究结果也显示 miR-449a 具有调节 α -

SMA 蛋白表达的作用。通过进一步的研究我们还发现 LEF 可促进 JNK 的磷酸化,过表达 miR-449a 会抑制 JNK 磷酸化水平并显著逆转 LEF 促进 JNK 磷酸化的作用。JNK 的活化在促进肺癌发生和发展中的作用已经被广泛证实,此外, JNK 可活化可能通过活化肝星状细胞引起肝纤维化^[17]。Yang 等^[18]的研究结果显示阻断 JNK 途径可抑制成纤维细胞样滑膜细胞的活性,并抑制迁移和侵袭。Shingyochi 等^[19]的研究结果也显示了激活 JNK 通路会促进成纤维细胞的增殖和迁移。这提示 LEF 可能通过 miR-499a 促进 JNK 蛋白的磷酸化,从而促进肺成纤维细胞的活化和增殖,并促进细胞向肌纤维细胞转化和 ECM 的累积,进而引起肺纤维化。

综上所述, LEF 可能通过抑制肺成纤维细胞中 miR-449a 的表达激活 JNK 途径,促进 α -SMA 的表达和 ECM 的累积,从而诱导成纤维细胞的活化和增殖,抑制其凋亡,从而引起肺纤维化。但是,关于 LEF 调节 miR-449a 的机制和 miR-449a 在 JNK 途径中的作用仍需要进一步的研究。

【参考文献】

- [1] JOSHI S, SINGH A R, WONG S S, et al. Rac2 is required for alternative macrophage activation and bleomycin induced pulmonary fibrosis; a macrophage autonomous phenotype[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182851-e0182856.
- [2] REN L M, LI R, CHEN L N, et al. Efficacy and safety of weekly leflunomide for the treatment of early rheumatoid arthritis: a randomized, multi-center study[J]. *Int J Rheum Dis*, 2016, 19(7): 651-657.
- [3] BOCKHORN J, DALTON R, NWACHUKWU C, et al. MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 4(1): 1393-1398.
- [4] LI J, LU M J, JIN J, et al. MiR-449a suppresses tamoxifen resistance in human breast cancer cells by targeting ADAM22[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(1): 136-149.
- [5] HAN R H, JI X M, RONG R, et al. MiR-449a regulates autophagy to inhibit silica-induced pulmonary fibrosis through targeting Bcl2[J]. *J Mol Med*, 2016, 94(11): 1267-1279.
- [6] TANG Y N, GENG Q, CHEN D, et al. Germline proliferation is regulated by somatic endocytic genes via JNK and BMP signaling in *Drosophila*[J]. *Genetics*, 2017, 206(1): 189-197.
- [7] HUANG Y, MA S F, ESPINDOLA M S, et al. Microbes are associated with host innate immune response in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196(2): 208-219.