

心脏成纤维细胞分化可能与 DNA 甲基化修饰调控有关

潘啸东*,何砚如,陈中璞,刘 玉,马根山

(东南大学附属中大医院心血管科,江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:以转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1,TGF- β 1)体外诱导心脏成纤维细胞分化,探讨其中DNA 甲基化的调控作用。方法:分离培养 SD 大鼠心脏成纤维细胞并行免疫细胞化学鉴定。取 P1 代细胞,分别以 TGF- β 1、DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT) 抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC) 及 TGF- β 中和抗体进行干预。Western blot 及细胞免疫荧光检测 α 平滑肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA) 的表达,实时定量 PCR 检测 α -SMA 以及 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 的基因表达,并进行 DNMT 活性测定。结果:与对照组相比,TGF- β 1 与 5-aza-dC 一样均可诱导心脏成纤维细胞表达 α -SMA,且 TGF- β 1 可显著抑制总 DNMT 的活性($P < 0.05$),并可抑制 DNMT1 及 DNMT3a 的表达($P < 0.01$),但对 DNMT3b 的表达无明显影响($P > 0.05$)。结论:心脏成纤维细胞分化可能与 DNA 甲基化修饰调控有关,本研究从表观遗传学角度为心肌纤维化防治研究提供了新的治疗靶点。

[关键词] 转化生长因子- β 1;心脏成纤维细胞分化;DNA 甲基化;DNA 甲基转移酶

[中图分类号] R542

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)09-1052-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160906

Modification of cardiac fibroblast differentiation by DNA methylation

Pan Xiaodong*, He Yanru, Chen Zhongru, Liu Yu, Ma Gengshan

(Department of cardiology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the regulation function of transforming growth factor β (TGF- β 1)-induced cardiac fibroblast differentiation by DNA methylation. **Methods:** Cardiac fibroblasts isolated from neonatal Sprague-Dawley rats were cultured and characterized using immunocytochemistry. First-passage cardiac fibroblasts were used throughout the experiment and stimulated with TGF- β 1, DNA methyltransferases (DNMT), 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) and TGF- β -neutralizing antibody, respectively. The protein level of α -smooth muscle actin (α -SMA) was determined by Western blot assay and immunofluorescence method. The mRNA levels of α -SMA, DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b were determined by quantitative polymerase chain reaction, and the global DNMT activity was measured. **Results:** TGF- β 1 and 5-aza-dC both significantly upregulated the expression of α -SMA in cardiac fibroblasts. DNMT1 and DNMT3a expressions were significantly down-regulated and the global DNMT activity was inhibited when treated with TGF- β 1. **Conclusion:** Cardiac fibroblasts differentiation may be associated with the DNA methylation. Our research provides new insights in cardiac fibrosis from the perspective of epigenetics.

[Key words] transforming growth factor- β 1; cardiac fibroblasts differentiation; DNA methylation; DNA methyltransferases

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(09): 1052-1056, 1062]

心肌纤维化是多种心脏疾病发展到一定阶段的共同病理改变,其中心脏成纤维细胞分化表达

α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)是心肌纤维化进程中的关键环节^[1]。已有研究表明 DNA 甲基化修饰可影响基因表达,与肿瘤、组织纤维化等密切相关^[2-3],然而在心脏成纤维细胞分化过程中的调控作用尚不明确。我们的前期研究工作发现转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)能通过抑制 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)进而上调心脏成

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81500204);江苏省自然科学基金青年项目(BK20150648);东南大学基础科研扶持项目(3290005401)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:panxiaodongseu@163.com

纤维细胞 I 型胶原基因表达^[4],因此 DNMT 介导的 DNA 甲基化修饰方式很可能是心脏成纤维细胞分化的另一重要机制。本研究通过 TGF- β 1 体外诱导心脏成纤维细胞分化表达 α -SMA,观察心脏成纤维细胞 DNMT 的表达及活性改变,初步探讨 DNA 甲基化在心脏成纤维细胞分化中的调控作用,从表观遗传学角度为心脏成纤维细胞分化机制提供新的认识。

1 材料和方法

1.1 材料

健康 Sprague-Dawley 大鼠,出生 1~3 d,雌雄不拘,清洁级。购自扬州大学实验动物中心,所有实验均经由东南大学实验动物委员会批准。重组人 TGF- β 1(PeproTech 公司,美国), α -SMA 抗体(Abcam 公司,英国),DNMT 抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine,5-aza-dC)(Sigma 公司,美国),抗 Vimentin、抗 Desmin、抗 Factor VII(武汉博士德公司),SP 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物公司),FITC 荧光抗体(Santa Cruz 公司,美国),核蛋白提取试剂盒(南京凯基生物公司),DNMT 活性检测试剂盒(Genmed Scientifics 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心脏成纤维细胞分离培养

SD 大鼠麻醉后段颈处死、消毒,剪下心脏后洗

净,剪碎。以预热 0.08%胰酶+0.1% II 型胶原酶 37℃ 水浴消化 8 min,重复消化过程直至心肌组织块完全被消化,将所有收集的上清液离心,用完全培养基重悬后差速贴壁 60 min,后换液弃去未贴壁细胞,置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中继续培养,生长近融合时以 1:3 传代,取 P1 代细胞用于实验。

1.2.2 实验分组

同步化培养的 P1 代心脏成纤维细胞随机分为 4 组:对照组、TGF- β 1(10 ng/mL)组、TGF- β 中和抗体(30 μ g/mL)组以及 5-aza-dC(5 μ mol/L)组。

1.2.3 实时 RT-PCR 基因测定 mRNA 表达

利用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA,各组分别取 1 μ g 总 RNA 经逆转录反应生成 cDNA,以 2 μ L(约 2 μ g)cDNA 为模板进行 PCR 反应,总体积为 25 μ L。扩增条件为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 1 min,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,扩增 32 个循环;然后 72℃ 延伸 10 min,由荧光定量 PCR 分析软件进行统计和计算 Ct 值,其中 $\Delta\Delta$ Ct=(实验组 Ct_{目的基因}-实验组 Ct_{管家基因})-(对照组 Ct_{目的基因}-对照组 Ct_{管家基因})。以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法表示目的基因表达量。其中 RT-PCR 引物序列见表 1。

1.2.4 Western blot 测定蛋白表达

各组细胞及心肌组织用裂解缓冲液提取总蛋白,等量蛋白质分别采用 12% SDS 或 5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离,然后转至醋酸纤维

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Quantitative real-time PCR primers

基因名称	引物序列(5'→3')	长度(bp)
α -SMA(Gene ID: 81633)	F:GCTGTTTTCCCATCCATCGT R:TTCTCCCGGTTGGCCTTAG	269
DNMT1(Gene ID: 84350)	F:ACCACGCCGACATCAACCT R:TCCTCCACAGCCAGAAAAACAC	347
DNMT3a(Gene ID: 444984)	F:GGCCCATTCGATCTGGTGA R:CTTGGCTATTCTGCCGTGTTTC	384
DNMT3b(Gene ID: 444985)	F:GGTCCGTCGTTTCAGGCAGT R:TCCTCATCTTCCCCTCGGTC	159
Actin(Gene ID: 81822)	F:CCCATCTATGAGGGTTACGC R:TTTAATGTACAGCAGGATTTC	150

滤膜上,室温下摇动封闭(TBST+5%脱脂奶粉)1 h,经洗膜后,加入一抗(1:200 稀释),4℃ 过夜,室温下洗膜后加入二抗(1:500 稀释),最后用化学发光底物进行发光显迹。均以 GAPDH 为内参,在自动电泳凝胶扫描仪上分析结果。

1.2.5 细胞免疫荧光检测 α -SMA 蛋白表达

胰蛋白酶消化收集细胞,制成细胞悬液均匀

滴片于多聚赖氨酸包被的玻璃片上。细胞用 4℃ 预冷丙酮固定 8 min,自然风干。Triton X-100 通透、羊封闭血清或 1% BSA 室温封闭。滴加一抗孵育(抗 α -SMA 等,1:100 稀释),4℃ 湿盒过夜;复温后吸去,PBS 清洗。滴加荧光二抗(FITC,1:100 稀释),室温孵育 1 h,PBS 清洗,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.6 DNMT 活性测定

提取心脏成纤维细胞核蛋白,按 GENMED DNMT 活性检测试剂盒操作说明,取 5 μg 进行总 DNMT 活性测定,其中 DNMT 活性 = [(样品读数-背景读数) \times 样品稀释倍数 $\times 0.125$ (体系容量:mL)] / [0.005 (样品容量:mL) $\times 6.58$ (毫摩尔吸光系数) $\times 0.6$ (cm) $\times 15$ (min)],其中活性单位: $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,所有服从近似正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组独立样本比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

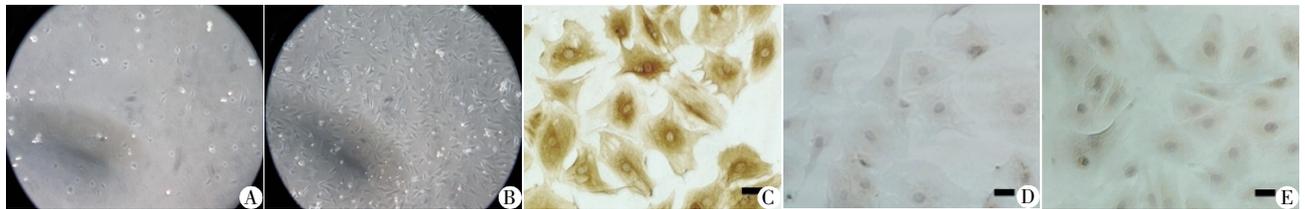


图1 大鼠心脏成纤维细胞培养及鉴定
A:倒置相差显微镜下差速贴壁1 h后的心脏成纤维细胞($\times 100$);B:贴壁培养3 d后,心脏成纤维细胞逐渐伸展成梭形或不规则三角形,无自发性搏动,呈典型的成纤维细胞形态($\times 100$);C-E:P1代的心脏成纤维细胞行免疫细胞化学鉴定,波形蛋白(Vimentin)阳性(C),结蛋白(Desmin)阴性(D),凝血因子VIII阴性(E)。图中标尺=20 μm 。

图1 大鼠心脏成纤维细胞培养及鉴定

Figure 1 Characterization of cultured cardiac fibroblasts

胞形态,认为培养所得即为本研究所需的心脏成纤维细胞。

2.2 TGF- β 1 及 DNMT 抑制剂对心脏成纤维细胞分化表达 α -SMA 的影响

首先以 TGF- β 1 诱导心脏成纤维细胞分化表达 α -SMA,在免疫荧光实验中,带蓝光的 DAPI 标记了细胞核,带绿光的 FITC 标记了 α -SMA,如图 2A 所示,TGF- β 1 干预后分化表达 α -SMA 的心脏成纤维细胞比例明显增加 [(87.3 \pm 6.6)% vs. (64.6% \pm 5.1)%, $P < 0.01$,图 2B],且绿色荧光强度增加,提示 TGF- β 1 可诱导心脏成纤维细胞 α -SMA 的表达。为研究 TGF- β 1 诱导 α -SMA 表达的 DNA 甲基化改变情况,同时比较了 TGF- β 1 及 5-aza-dC 分别对 α -SMA 表达的影响。qPCR 检测结果显示,TGF- β 1 组的 α -SMA mRNA 表达明显升高,约为对照组的 2 倍 (1.934 \pm 0.092, $P < 0.01$),5-aza-dC 组亦显著上调 α -SMA mRNA 表达 (1.333 \pm 0.077, $P < 0.01$),而经 TGF- β 中和抗体干预后,心脏成纤维细胞的 α -SMA 基因表达降低 (0.823 \pm 0.024,与对照组比较, $P < 0.01$,图 2C)。Western blot 检测结果提示,与对照组相比,TGF- β 1 及 5-aza-dC 均可显著上调心脏成纤

2 结果

2.1 心脏成纤维细胞的培养及鉴定

倒置显微镜下观察,经差速贴壁 60 min 后,可见散在分布的单个纺锤样、梭形的细胞,折光度强(图 1A),继续培养后细胞逐渐伸展成为梭形或不规则三角形,细胞排列呈放射状,无自发性搏动(图 1B)。取 P1 代的细胞行免疫细胞化学鉴定,结果提示波形蛋白(Vimentin)呈强阳性反应(图 1C);结蛋白(Desmin)及凝血因子 VIII 呈阴性反应(图 1D、图 1E)。其中波形蛋白阳性表明细胞来源于间充质,结蛋白阴性可排除血管平滑肌细胞,凝血因子 VIII 阴性可排除内皮细胞,结合光镜下较为典型的成纤维细

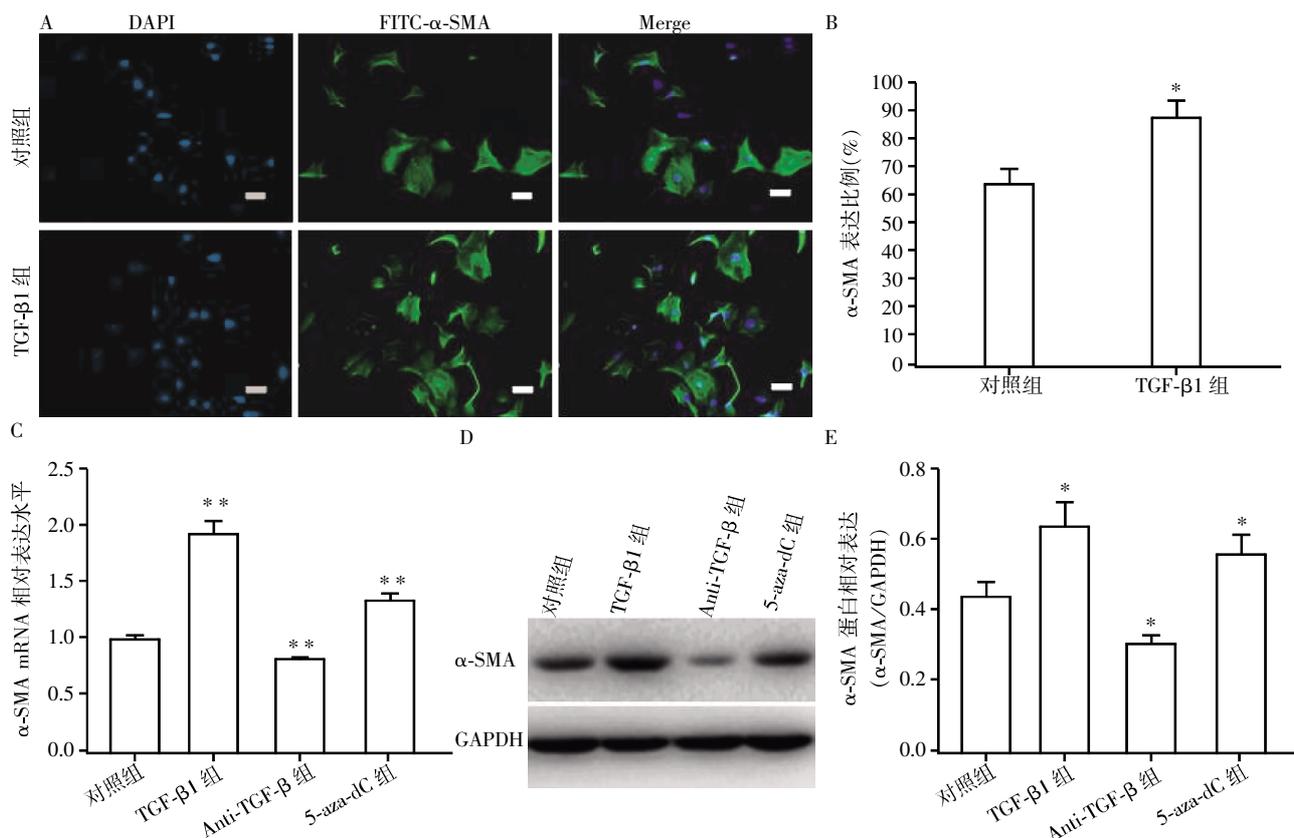
维细胞 α -SMA 蛋白的表达 ($P < 0.05$);而 TGF- β 中和抗体作用后,心脏成纤维细胞 α -SMA 蛋白的表达下降(与对照组比较, $P < 0.05$,图 2D、E)。

2.3 TGF- β 1 对心脏成纤维细胞 DNMT 表达及活性的影响

P1 代的心脏成纤维细胞随机分为对照组及 TGF- β 1 组(干预 48 h,10 ng/mL),以实时定量 PCR 检测 3 种类型 DNMT 的基因表达。如图 3A 所示,与对照组比较,TGF- β 1 可显著抑制 DNMT1 及 DNMT3a 的表达 ($P < 0.05$),而对 DNMT3b 的表达无明显影响 ($P > 0.05$)。基于 TGF- β 1 可显著抑制相关 DNMT 基因的表达,我们进一步对 DNMT 的活性进行检测,如图 3B 所示,与对照组相比,TGF- β 1 亦可显著抑制总 DNMT 的活性 [(0.279 \pm 0.051) $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ vs. (0.439 \pm 0.039) $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$, $P < 0.05$]。

3 讨论

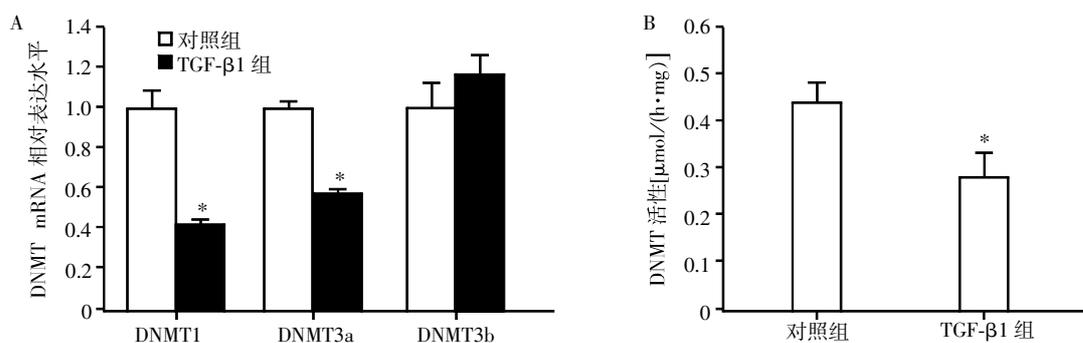
心脏成纤维细胞是心肌组织中非心肌细胞最主要的细胞类型,起源于间质,可合成胶原、纤维连接蛋白等成分,在心肌纤维化进程中起重要作用。正常心肌内,心脏成纤维细胞处于静息状态,是一类低代



A: 免疫荧光检测; 其中带蓝光的 DAPI 标记了细胞核, 带绿光的 FITC 标记了 α -SMA, 图中标尺=20 μ m; B: 两组细胞 α -SMA 表达比例; C: 实时定量 PCR 检测各组 α -SMA 的 mRNA 表达; D, E: Western blot 检测各组 α -SMA 的蛋白表达。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=3$ 。

图 2 TGF- β 1 及 DNMT 抑制剂对 α -SMA 的影响

Figure 2 Effect of TGF- β 1 and DNA methyltransferases inhibitor on the expression of α -SMA



A: 实时定量 PCR 分别检测 3 种亚型 DNMT 的 mRNA 表达; B: 总 DNMT 活力测定。与对照组比较, * $P < 0.01$, $n = 6$ 。

图 3 TGF- β 1 对 3 种亚型 DNMT 的表达及活性的影响

Figure 3 Effect of TGF- β 1 on the expression and activity of DNMT

谢、非激活状态的细胞。当心脏受到局部缺血、缺氧、炎症等多种因素刺激后, 在各种促纤维化因子如 TGF- β 的作用下, 心脏成纤维细胞可活化发生功能和表型的改变, 分化为肌纤维母细胞并表达 α -SMA, 具有更强的分泌胶原和各种细胞因子的能力, 介导心肌纤维化的进程^[5]。TGF- β 是目前已知最重要的致纤维化细胞因子, 在心肌纤维化进程中与细胞增殖、分化、迁移、凋亡和细胞外基质合成降解密切相关。

本研究正是以 TGF- β 1 体外诱导大鼠心脏成纤维细胞表达 α -SMA, 探讨其分化机制。

TGF- β 可激活多个信号通路诱导心脏成纤维细胞分化表达 α -SMA, 介导心肌纤维化进程, 其中 Smads 通路被认为是其主要的细胞内信号转导途径^[6], TGF- β 还可通过其他非经典的信号途径如 ras/MEK/ERK、JNK、p38MARK 及 Rho/ROCK 等介导纤维化进程^[7-9]。然而心肌纤维化进程的机制十分

复杂且不明确,这也是目前心肌纤维化尚无有效防治手段的主要原因。我们前期研究发现,TGF- β 1 和 DNMT 抑制剂 5-aza-dC 均可显著上调心脏成纤维细胞 I 型胶原基因 COL1A1 的表达^[4],因此我们认为在心脏成纤维细胞分化过程中可能存在与 DNA 甲基化有关的表观遗传修饰现象。

DNA 甲基化是目前研究的最清楚、也是最重要的表观遗传修饰形式^[10]。正常的 DNA 甲基化在细胞分化、胚胎发育以及机体免疫和防御过程中起重要作用,而异常的 DNA 甲基化修饰又与疾病的发生发展有关,例如肿瘤、自身免疫性疾病、糖尿病等。DNA 甲基化是由 DNMT 催化完成的,在真核生物中起主要作用的 DNMT 主要有 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 3 种,其中 DNMT1 主要参与甲基化状态的维持,并与甲基化状态的延伸有关,而 DNMT3a 和 DNMT3b 是主要的从头甲基化酶,具有使未甲基化的 DNA 重新甲基化的作用^[11-12]。

异常的 DNA 甲基化修饰与组织纤维化的发生发展密切相关,其主要作用可能是通过调控成纤维细胞分化及细胞外基质相关基因的表达实现的。然而 DNA 甲基化修饰在心血管领域的研究还处在起步阶段,其研究范围及深度都十分有限,且对心脏成纤维细胞分化的调控研究尚处于探索阶段,鲜有文献报道。

本研究发现 TGF- β 1 与 DNMT 抑制剂 5-aza-dC 均可在体外诱导心脏成纤维细胞分化表达 α -SMA,且 TGF- β 1 可下调 DNMT1 和 DNMT3a 的基因表达并抑制总 DNMT 活性,提示 TGF- β 1 诱导的心脏成纤维细胞分化与 DNA 甲基化有关。然而 TGF- β 1 调控 DNMT 表达的分子机制目前仍然不清楚,有研究认为,TGF- β 可通过 Smads 途径抑制 DNMT1 和 DNMT3b 的表达^[13];在胚胎干细胞中,磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)信号途径可抑制 DNMT 的表达进而影响糖原合酶激酶-3 的 DNA 甲基化水平^[14];TGF- β 可通过抑制 ERK 通路的激活进而抑制 DNMT 的表达,最终上调 T 细胞 Foxp3 基因的表达^[15]。目前有关 TGF- β 对 ERK 信号通路激活的作用尚有争议^[16-17],例如 Zhang 等^[18]在侵袭性前列腺癌的研究中发现,TGF- β 激活 ERK 信号通路后上调 DNMT 的表达。我们的研究结果提示 TGF- β 1 对 DNMT 的作用主要是抑制性的,这与大部分的文献报道一致,造成 TGF- β 对 DNMT 表达作用差异的原因目前尚不清楚,可能与各个实验中研究细胞以及实验条件不同有关^[4]。

在心脏成纤维细胞分化过程中,TGF- β 1 是如何

具体调控 DNMT 表达进而通过 DNA 甲基化修饰方式调控 α -SMA 基因表达的机制尚不完全清楚,仍有待进一步深入研究。本研究初步探讨了 DNA 甲基化修饰在心脏成纤维细胞分化表达 α -SMA 过程中的调控作用,发现 TGF- β 1 诱导下 DNMT 介导的 DNA 甲基化修饰方式很可能是心脏成纤维细胞分化的一个新靶点,从表观遗传学角度为心肌纤维化的防治研究提供了新思路。

[参考文献]

- [1] Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the Renaissance cell[J]. *Circ Res*, 2009, 105(12): 1164-1176
- [2] Hu B, Gharaee-Kermani M, Wu Z, et al. Epigenetic regulation of myofibroblast differentiation by DNA methylation[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(1): 21-28
- [3] Sun G, Reddy MA, Yuan H, et al. Epigenetic histone methylation modulates fibrotic gene expression[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(12): 2069-2080
- [4] Pan X, Chen Z, Huang R, et al. Transforming growth factor β 1 induces the expression of collagen type I by DNA methylation in cardiac fibroblasts[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60335
- [5] Walker GA, Masters KS, Shah DN, et al. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease[J]. *Circ Res*, 2004, 95(3): 253-260
- [6] Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response[J]. *FASEB*, 2004, 18(7): 816-827
- [7] Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation[J]. *Circ Res*, 2010, 106(11): 1675-1680
- [8] Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(4): 600-606
- [9] Small EM, Thatcher JE, Sutherland LB, et al. Myocardium-related transcription factor- α controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2010, 107(2): 294-304
- [10] Sulewska A, Niklinska W, Kozlowski M, et al. DNA methylation in states of cell physiology and pathology[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2007, 45(3): 149-158
- [11] Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, et al. Increased DNA methyltransferase 1(DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric

(下转第 1062 页)