

BMSC共培养对人瘢痕疙瘩成纤维细胞 DNMT1的影响

薛碧宇 薛斌*

(重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科, 重庆 400016)

摘要 该实验探究人骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSC)能否通过旁分泌作用影响人瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblast, KF)中DNA甲基转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)的表达, 从而影响TGF- β /Smad信号通路。培养BMSC、KF及正常人皮肤成纤维细胞(normal human skin fibroblast, NHDF), 使用0.4 μm 微孔孔径的悬挂式细胞培养皿构建BMSC与成纤维细胞之间非接触的细胞间接共培养模型。通过免疫荧光和激光共聚焦技术, Western blot和qPCR检测各组细胞内DNMT1的表达情况。Western blot和qPCR检测TGF- β /Smad信号通路相关分子TGF- β 1、Smad7的表达。在成功构建共培养模型后, 利用细胞免疫荧光和激光共聚焦技术, Western blot及qPCR检测各组细胞内DNMT1的表达情况, 结果显示, DNMT1在KF中高表达而在NHDF中呈低表达, 共培养组KF较非共培养组DNMT1的蛋白和mRNA水平表达明显降低($P < 0.01$)。利用Western blot, qPCR检测TGF- β /Smad信号通路相关分子的表达, 结果显示较非共培养组, 共培养组KF中TGF- β 1在蛋白水平表达显著降低($P < 0.01$), 抑制性蛋白Smad7在mRNA水平表达增高($P < 0.05$)。研究证实, 人BMSC可能通过旁分泌作用抑制了瘢痕疙瘩成纤维细胞中DNMT1的表达, 从而抑制TGF- β /Smad信号通路, 使瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖趋于正常。

关键词 骨髓间充质干细胞; 瘢痕疙瘩成纤维细胞; 共培养; DNMT1; TGF- β 1

The Effects of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells on the Expression of DNA Methyltransferase 1 in Keloid Fibroblasts

Xue Biyu, Xue Bin*

(Department of Burn and Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This article investigated the effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSC) on the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and related factor expression changes of TGF- β /Smad signal transduction pathways in keloid fibroblasts (KF). BMSC and fibroblasts were cultured, the indirect co-culture system using Transwell chamber with BMSC was established. The expression changes of DNMT1 were detected by immunofluorescence, Western blot and qPCR. Western blot assay was used to detect the protein expression of TGF- β 1. qPCR was used to detect the expression of *Smad7*. Immunohistochemistry experiments showed that DNMT1 showed high expression in KF. Western blot and qPCR results showed that the expression of

收稿日期: 2019-03-25 接受日期: 2019-05-20

重庆市卫生局重点课题(批准号: 2013-1-014)、重庆市基础与前沿研究计划(批准号: CSTC2013jcyj10062)资助的课题

通讯作者: Tel: 13101249031, E-mail: cqxuebin@126.com

Received: March 25, 2019 Accepted: May 20, 2019

This work was supported by the Major Project of the Health Bureau of Chongqing (Grant No.2013-1-014) and the Basic and Frontier Project of Chongqing (Grant No.CSTC2013jcyj10062)

Corresponding author: Tel: +86-13101249031, E-mail: cqxuebin@126.com

网络出版时间: 2019-09-12 14:56:46 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190912.1456.030.html>

DNMT1 in co-cultured KF group was significantly reduced than that in the control group ($P < 0.01$). The protein expression of TGF- β 1 in co-cultured KF group was significantly reduced than that in the control group ($P < 0.01$). Smad7 mRNA expression of co-culture KF group was significantly increased than the KF group ($P < 0.05$). BMSC microenvironment could inhibit the expression of DNMT1 in co-cultured KF, thus inhibiting the KF by regulating TGF- β /Smad signal transduction pathway.

Keywords BMSC; keloid fibroblast; co-culture; DNMT1; TGF- β 1

瘢痕疙瘩是一种良性纤维增生性肿瘤,其起源于皮肤的创伤。瘢痕疙瘩组织的特征是真皮和皮下组织中的细胞外基质成分,尤其是胶原蛋白的过度积累并延伸超出原始伤口部位的范围。且瘢痕疙瘩会持续增长,很少会自然消退^[1-3]。瘢痕疙瘩会导致瘙痒、疼痛,严重的情况下,会导致关节运动受限,影响患者生活质量。由于瘢痕疙瘩形成原因尚未明确,故在临床治疗上显得颇为棘手。虽然目前临床上治疗瘢痕疙瘩的方法较多,但均有利有弊,且单一方法治疗效果差,复发率高,不能令医生及患者满意。

有研究发现,在人瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblasts, KF)中存在DNA甲基化现象,DNA甲基转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)表达呈明显增高,说明DNMT1在瘢痕疙瘩生长过程中起着重要的作用^[4],且通过DNMT1的抑制剂可以调节KF中TGF- β /Smad这一重要的信号通路^[5]。

骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSC)在皮肤瘢痕的防治中已取得较好成效^[6-9]。有研究发现,人BMSC条件培养基抑制KF的增殖、迁移,抑制KF中TGF- β 的分泌及胶原的合成^[10-11],但产生影响的具体机制尚不明确。我们发现,BMSC培养液及DNMT1的抑制剂均可使瘢痕疙瘩成纤维细胞中TGF- β 1的表达降低,故猜想BMSC是否可以通过影响瘢痕疙瘩成纤维细胞DNA的甲基化而对TGF- β /Smad信号通路产生影响,进而影响KF的增殖及胶原合成。本实验通过Transwell小室构建间接细胞共培养体系,并比较共培养体系和非共培养体系中成纤维细胞内TGF- β 1、Smad7以及DNMT1的表达,探究骨髓间充质干细胞产生抗瘢痕作用的部分机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人BMSC、人正常皮肤成纤维细胞(NHDF)购于重庆莱博斯生物技术有限公司;人KF

购于上海信裕生物科技有限公司。

1.1.2 引物 所用引物设计和合成均由TaKaRa公司完成。*Dnmt1*,上游引物5'-CAG GCA GTT CAA CAC CCT CAT C-3',下游引物5'-GCT GAA GAA GCC GTC CCA CT-3',扩增产物长度106 bp。*Smad7*,上游引物5'-CCG CAG CAG TTA CCC CAT CT-3',下游引物5'-CGA AAG CCT TGA TGG AGA AAC C-3',扩增产物长度106 bp。 *β -actin*,上游引物5'-CCA CGA AAC TAC CTT CAC CTC C-3',下游引物5'-GAT ATC TCC TTC TGC ATC CTG T-3',扩增产物长度132 bp。

1.1.3 主要实验试剂 DMEM/High Glucose培养基购于Gibco公司;胎牛血清购于PAN公司;SYBRGreen PCR试剂盒、逆转录试剂盒购于TaKaRa公司;蛋白预染marker购于Thermo公司;兔抗人DNMT1抗体、荧光二抗购于Abcam公司;兔抗人TGF- β 1抗体购于Proteintech公司;山羊抗兔二抗、B-actin单克隆抗体购于博士德生物公司;RIPA裂解液、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5 \times)、BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶电泳试剂盒购自碧云天生物技术公司。

1.2 实验方法

1.2.1 建立共培养体系 使用0.4 μ m微孔孔径的悬挂式细胞培养皿构建BMSC与成纤维细胞之间非接触的细胞接共培养模型。选取培养第3~5代KF和NHDF,用0.25%胰蛋白酶加0.02% EDTA溶液行消化,使细胞从瓶底松动并脱落并做细胞计数,用PBS将细胞悬液密度调至 2×10^5 细胞/mL,然后接种于2个6孔板上。其中KF和NHDF各占6孔。根据成纤维细胞类型及共培养情况将细胞分为4组,A:KF组;B:KF共培养组;C:NHDF组;D:NHDF共培养组,每组3个孔,每孔放入2 mL成纤维细胞悬液。取传代第3代生长状态良好的BMSC,用0.25%胰蛋白酶加0.02% EDTA溶液消化,待细胞从瓶底松动并脱落后,做细胞计数,将细胞悬液密度调至 2×10^5 细胞/mL,将BMSC接种于悬挂式细胞培养皿底面。将悬挂式

胞培养皿置于接种了成纤维细胞的培养板中,其中2组不置入悬挂式细胞培养皿作为对照。将培养瓶放入37 °C、5% CO₂培养箱中培养。48 h后在显微镜下观察各组成纤维细胞生长状态并进行电子拍照。

1.2.2 细胞免疫荧光检测DNMT1表达 各组细胞接种于24孔板中细胞爬片上,每组4个复孔,连续培养48 h。取出细胞爬片,4%多聚甲醛固定15 min,5% BSA/PBS封闭,加入兔抗人DNMT1抗体(1:900),4 °C孵育过夜。再分别用荧光标记的二抗37 °C孵育1.5 h,DAPI核染色,在激光共聚焦显微镜各条件设定不变的情况下对各组细胞观察、拍照。

1.2.3 Western blot检测 各组细胞连续培养48 h,按照蛋白提取试剂盒提取蛋白,BCA法测定蛋白浓度,依次配制分离胶和浓缩胶,按照30 μg蛋白/孔上样,然后电转至PVDF膜上,用Western blot专用快速封闭液封闭15 min,分别加入兔抗人DNMT1抗体(1:900)、兔抗人TGF-β1抗体(1:500),4 °C孵育过夜,TBST漂洗后加入相应二抗(1:2 000),37 °C孵育1 h,增强化学发光试剂显影,获取图像,Fusion FX7凝胶成像分析系统进行灰度分析。

1.2.4 qPCR检测 Trizol法分别提取各组细胞中总RNA,β-actin为内参。待RNA基本透明时,加入20 μL DEPC水,至完全溶解,紫外分光光度计分析测定所提RNA的浓度,逆转录制备cDNA,浓度测量方法同前。PCR反应体系:2.0 μL cDNA、0.6 mL引物、10 μL 2×SYBRGreen和7.4 μL无菌水,总体积20 μL。PCR程序

为两步法RT-PCR:95 °C预变性5 s;之后每一步95 °C变性5 s,60 °C退火延伸30 s,共进行45个循环。每个样本设3个复孔,重复3次,取吸光值均数作为结果,结果分析采用相对定量2^{-ΔΔCt}法。

1.2.5 统计学分析 应用SPSS 22.0软件进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,两组之间采用Student's *t*-test 检验,多组细胞比较采用One-Way ANOVA。

2 结果

2.1 成纤维细胞与BMSC间接共培养

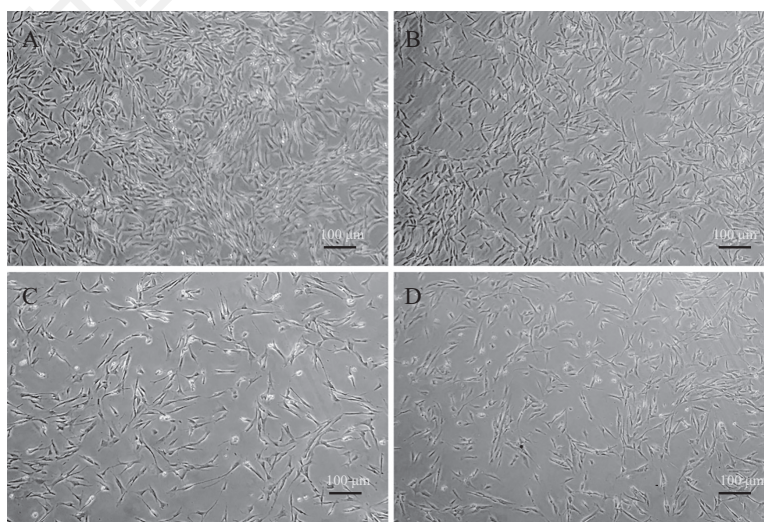
建立共培养体系48 h后于倒置显微镜下观察,发现共培养体系中NHDF数目比非共培养体系相比有所增加,而KF数目明显减少(图1)。

2.2 细胞免疫荧光检测DNMT1蛋白的表达

细胞免疫荧光检测结果显示, DNMT1蛋白主要集中在细胞核表达,在KF组中明显呈高表达状态, KF共培养组较KF组的表达明显降低,在NHDF组和NHDF共培养组中表达较低,且这两组表达无明显差异(图2)。这表明,通过与BMSC共培养, KF中DNMT1的表达受到抑制,而NHDF中DNMT1的表达无明显改变。

2.3 Western blot及qPCR检测DNMT1的表达

Western blot检测各组细胞中DNMT1蛋白的表达情况, KF共培养组较KF组有明显减弱($P < 0.01$),而NHDF组与NHDF共培养组表达无明显差异(图3)。

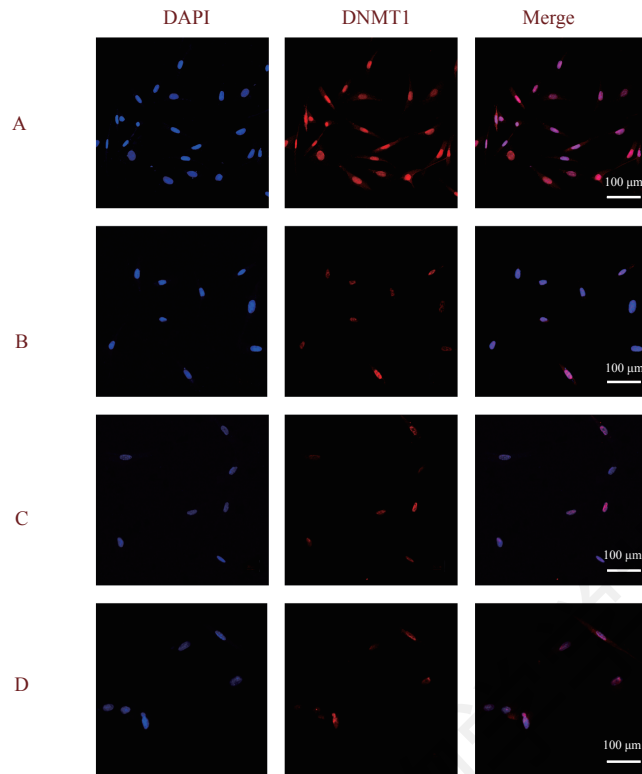


A: KF组; B: KF共培养组; C: NHDF组; D: NHDF共培养组。

A: KF group; B: co-cultured KF group; C: NHDF group; D: co-cultured NHDF group.

图1 成纤维细胞与BMSC间接共培养

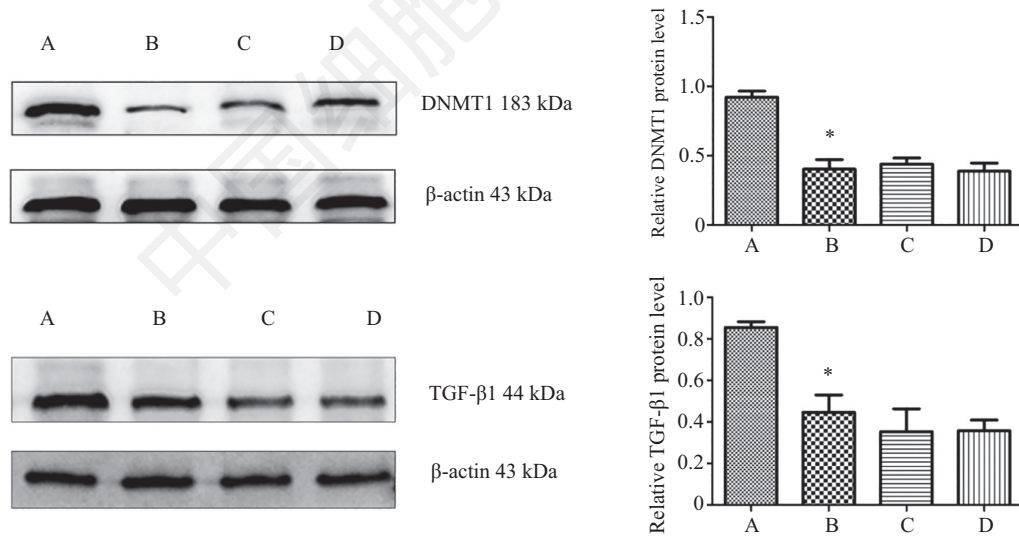
Fig.1 Undirected co-culturing of fibroblasts and BMSC



A: KF组; B: KF共培养组; C: NHDF组; D: NHDF共培养组。
A: KF group; B: co-cultured KF group; C: NHDF group; D: co-cultured NHDF group.

图2 免疫荧光检测DNMT1蛋白的表达

Fig.2 Expression of DNMT1 protein by immunofluorescence



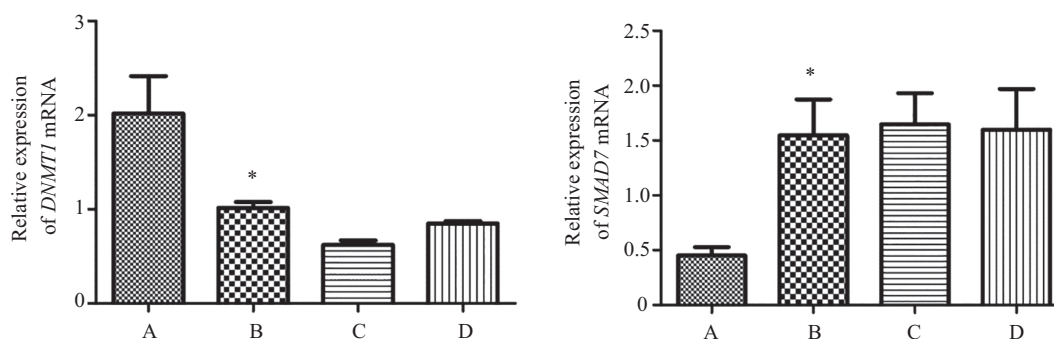
A: KF组; B: KF共培养组; C: NHDF组; D: NHDF共培养组。* $P < 0.01$, 与KF组比较。
A: KF group; B: co-cultured KF group; C: NHDF group; D: co-cultured NHDF group. * $P < 0.01$ vs KF group.

图3 Western blot检测TGF-β1和DNMT1的蛋白相对表达量

Fig.3 Relative protein expression of TGF-β1 and DNMT1 by Western blot

我们进一步用qPCR验证各组细胞中DNMT1 mRNA相对表达量的差异, KF共培养组较KF组有明显减弱 ($P < 0.01$); NHDF组与NHDF共培养组表达无明显差

异(图4)。综上所述表明, BMSC通过共培养对KF中DNMT1的表达起到抑制作用, 对NHDF中DNMT1的表达无明显作用。



A: KF组; B: KF共培养组; C: NHDF组; D: NHDF共培养组。* $P < 0.01$, 与KF组比较。

A: KF group; B: co-cultured KF group; C: NHDF group; D: co-cultured NHDF group. * $P < 0.01$ vs KF group.

图4 qPCR检测DNMT1和TGF-β1的mRNA的相对表达

Fig.4 Relative mRNA expression of DNMT1 and TGF-β1 by qPCR

2.4 Western blot及qPCR检测TGF-β/Smad信号通路相关因子表达结果

Western blot检测各组细胞中TGF-β1蛋白的表达情况(图3), KF共培养组较KF组有明显减弱($P < 0.01$), 而在NHDF组与NHDF共培养组中表达无明显差异, 蛋白免疫印迹实验结果表明, BMSC通过旁分泌作用能有效抑制KF中TGF-β1的表达, 而对NHDF中TGF-β1的表达无明显作用。我们进一步用qPCR验证各组细胞中TGF-β/Smad信号通路中关键抑制性蛋白Smad7 mRNA相对表达量的差异, KF共培养组较KF组有明显增多($P < 0.05$); NHDF组与NHDF共培养组表达无明显差异(图4)。综上所述结果表明, BMSC通过旁分泌作用可以影响KF中TGF-β/Smad信号通路, 对KF产生抑制作用。

3 讨论

DNA甲基化普遍存在于生物体内, 参与生物的胚胎发育、衰老以及肿瘤的发生^[12-13], 且DNA甲基化酶的异常表达常常提示DNA的异常甲基化^[14]。很多肿瘤细胞中DNMT1的表达较正常的高4~12倍^[15]。有研究发现, KF中DNMT1呈高表达状态, 且通过DNMT1的抑制剂可以使KF中TGF-β1、Coll-I蛋白质表达下降, 抑制型Smad7蛋白表达回升^[4]。而大量研究发现, TGF-β/Smad信号通路与瘢痕疙瘩的形成及发展具有重要关联, TGF-β1的过表达是导致瘢痕过度增生、纤维化的一个重要原因, 表明针对性的降低增生性瘢痕和瘢痕疙瘩内TGF-β1的表达可抑制瘢痕的增生, 达到临床治疗的效果^[12-13, 16-17]。

间充质干细胞通过旁分泌发挥免疫调节和抗纤维化作用, 对纤维化疾病如心肌梗塞, 肾纤维化

或肝硬化等纤维化疾病有明显抑制作用, 并成功在皮肤瘢痕防治中, 取得肯定、良好的效果^[6, 18-19]。有研究发现, 人骨髓间充质干细胞条件培养基抑制瘢痕成纤维细胞增殖、迁移, 抑制促纤维化表型相关基因和蛋白、I型胶原和纤连蛋白的表达, 并且促进其抗纤维化表型相关基因和蛋白表达^[10-11]。这表明, BMSC可能通过旁分泌的方式发挥抗瘢痕作用, 然而其是否可以通过抑制KF中DNMT1的表达, 从而影响TGF-β/Smad信号通路仍待探究。

本研究中, 我们使用0.4 μm微孔孔径的悬挂式细胞培养皿构建BMSC与成纤维细胞之间非接触的细胞间接共培养模型, 培养48 h后检测各组细胞内DNMT1的表达情况, 发现DNMT1在KF中高表达而在NHDF中低表达, 共培养组KF较非共培养组DNMT1的蛋白和mRNA水平表达明显降低($P < 0.01$)。这表明, BMSC可以通过旁分泌作用抑制KF中DNMT1的表达。检测TGF-β/Smad信号通路相关分子的表达, 发现共培养组KF中TGF-β1在蛋白水平表达显著降低($P < 0.01$), 抑制性蛋白Smad7 mRNA水平表达增高($P < 0.05$)。这证实, BMSC可能是通过抑制KF中DNMT1的表达, 从而影响TGF-β/Smad信号通路, 进而产生抑制瘢痕疙瘩的作用, 为临床上使用BMSC对瘢痕疙瘩进行治疗提供新的依据。但目前对BMSC产生抗瘢痕作用机制的研究尚处于起始阶段, 其是否对与瘢痕疙瘩形成有关的其他信号通路产生作用, 以及是何种旁分泌因子产生这种作用仍需进行大量基础研究进一步验证。

4 结论

人BMSC可能是通过旁分泌作用抑制了瘢痕疙

瘡成纤维细胞中DNMT1的表达, 从而抑制TGF- β /Smad信号通路, 影响瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖。

参考文献 (References)

- 1 朱莲花, 李美玲, 李周娜, 金哲虎. 瘢痕疙瘩发病机制的研究. 中国皮肤性病学杂志 (Zhu Lianhua, Li Meiling, Li Zhouna, Jin Zhehu. The pathogenesis of keloid. The Chinese Journal of Dermatovenereology) 2017; 31(5): 560-2.
- 2 张大维, 吴波. 瘢痕疙瘩发病机制的研究进展. 四川医学 (Zhang Dawei, Wu Bo. The research progress of pathogenesis of keloid. Sichuan Medical Journal) 2017; 38(6): 713-6.
- 3 刘青武, 王思丹, 陈静, 罗莎, 冯放, 王爱娟, 杨顶权. 瘢痕疙瘩治疗的研究进展. 实用皮肤病学杂志 (Liu Qingwu, Wang Sidan, Chen Jing, Luo Sha, Feng Fang, Wang Aijuan, Yang Dingquan. The research progress of keloid therapy. Journal of Practical Dermatology) 2018; 11(2): 101-6.
- 4 Yang E, Zou QP, Zhang HS. Expression and significance of DNMT1 in human keloid fibroblast. Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi 2013; 29(2): 117-20.
- 5 E Y, Qipa Z, Hengshu Z. The expression of DNMT1 in pathologic scar fibroblasts and the effect of 5-aza-2-deoxycytidine on cytokines of pathologic scar fibroblasts. Wounds 2014; 26(5): 139-46.
- 6 Li Q, Zhang C, Fu X. Will stem cells bring hope to pathological skin scar treatment?. Cytotherapy 2016; 18(8): 943-56.
- 7 江兰, 刘世宇, 李海建, 余春艳, 金岩. 人羊膜上皮干细胞对皮肤增生性瘢痕形成的作用. 中国皮肤性病学杂志 (Jiang Lan, Liu Shiyu, Li Haijian, Yu Chunyan, Jin Yan. Effect of human amniotic epithelial stem cells on skin hypertrophic scar formation. The Chinese Journal of Dermatovenereology) 2011; 25(10): 747-50, 782.
- 8 邱林, 金先庆, Paul A Kingston, 罗小辑, 丁幸坡. 基因修饰BMSC抑制增生性瘢痕的实验研究. 中国修复重建外科杂志 (Qiu Lin, Jin Xianqing, Paul A Kingston, Luo Xiaoji, Ding Xingpo. Experimental study on inhibition of hypertrophic scar by genetic modification of BMSC. Chinese Journal of Tissue Engineering Research) 2008; 22(2): 212-6.
- 9 武艳, 杨岚, 陈志会, 李厚忠, 王莹, 袁晓环, 等. 骨髓间充质干细胞抑制皮肤瘢痕形成的机制研究. 医学研究杂志 (Wu Yan, Yang Lan, Chen Zhihui, Li Houzhong, Wang Ying, Yuan Xiaohuan, *et al.* Study on the mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells inhibiting skin scar formation. Journal of Medical Research) 2016; 45(5): 81-5.
- 10 Fang F, Huang RL, Zheng Y, Liu M, Huo R. Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit the proliferative and profibrotic phenotype of hypertrophic scar fibroblasts and keloid fibroblasts through paracrine signaling. J Dermatol Sci 2016; 83(2): 95-105.
- 11 武艳, 袁晓环, 杨岚, 赵孝金, 李厚忠, 王莹, 等. 间充质干细胞条件培养液对正常成纤维细胞及瘢痕成纤维细胞转化生长因子 β 产生和信号通路的影响. 中国组织工程研究 (Wu Yan, Yuan Xiaohuan, Yang Lan, Zhao Xiaojin, Li Houzhong, Wang Ying, *et al.* Effects of conditioned medium of mesenchymal stem cells on the production and signalin gpathways of transforming growth factor beta in normal and scar fibroblasts. Chinese Journal of Tissue Engineering Research) 2016; 20(29): 4349-54.
- 12 Mukhopadhyay A, Wong MY, Chan SY, Do DV, Khoo A, Ong CT, *et al.* Syndecan-2 and decorin: proteoglycans with a difference-implications in eloid pathogenesis. J Trauma 2010; 68: 999-1008.
- 13 Honardous D, Varkey M, Hori K, Ding J, Shankowsky HA, Tredget EE. Small leucine-rich proteoglycans, decorin and fibromodulin, are reduced in postburn hypertrophic scar. Wound Repair Regen 2011; 19: 368-78.
- 14 Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, *et al.* Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Res 1982; 10(8): 2709-21.
- 15 Vertino PM, Sekowski JA, Coll JM, Applegren N, Han S, Hickey RJ, *et al.* DNMT1 is a component of a multiprotein DNA replication complex. Cell Cycle 2002; 1(6): 416-23.
- 16 Kiritsi D, Nystrom A. The role of TGF- β in wound healing pathologies. Mech Ageing Dev 2016; 172: 51-8.
- 17 李婉迪. 免疫反应及TGF- β /Smads信号通路在瘢痕形成中的研究进展. 北京协和医学院(硕士论文), 2017.
- 18 Akita S, Yoshimoto H, Akino K, Ohtsuru A, Hayashida K, Hirano A, *et al.* Early experiences with stem cells in treating chronic wounds. Clin Plast Surg 2012; 39(3): 281-92.
- 19 Zhang J, Li Y, Bai X, Li Y, Shi J, Hu D. Recent advances in hypertrophic scar. Histol Histopathol 2018; 33(1): 27-39.