

# FTO 诱导 TSG-6 mRNA 去甲基化对瘢痕疙瘩的影响

梁书宝,李心怡,丁以春,李小静

**摘要** 目的 探讨去甲基化酶肥胖相关蛋白(FTO)调控肿瘤坏死因子- $\alpha$ 刺激基因-6(TSG-6) mRNA 去甲基化在瘢痕疙瘩组织中的表达及其在瘢痕形成中的作用。方法 选取新鲜瘢痕疙瘩组织(实验组)和正常皮肤组织(对照组),应用细胞免疫荧光方法检测 TSG-6 在实验组和对照组中的表达水平;构建表达 TSG-6 mRNA 正义和反义链探针用于 RNA pulldown,随后用 N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤(m<sup>6</sup>A)抗体对各组样本进行 Western blot 检测;应用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(qPCR)和 Western blot 检测实验组和对照组中 TSG-6 mRNA 去甲基化酶和甲基化酶的表达;应用细胞免疫荧光方法检测 FTO 在实验组和对照组的表达水平。结果 细胞免疫荧光结果显示,实验组中 TSG-6 表达水平低于对照组( $P < 0.01$ );生物素标记 TSG-6 RNA pulldown 实验结果显示,实验组中 TSG-6 mRNA 的 m<sup>6</sup>A 表达水平低于对照组( $P < 0.01$ );qPCR 实验结果显示实验组中 FTO mRNA 表达水平高于对照组( $P < 0.01$ );Western blot 实验结果显示实验组中 FTO 蛋白表达水平高于对照组( $P < 0.001$ );细胞免疫荧光结果显示实验组 FTO 表达水平高于对照组( $P < 0.001$ )。结论 去甲基化酶 FTO 催化 TSG-6 mRNA 去甲基化,进而促进瘢痕疙瘩的形成,这可能为瘢痕疙瘩的临床治疗提供新的思路 and 方向。

**关键词** FTO;TSG-6 mRNA;病理性瘢痕;瘢痕疙瘩

**中图分类号** R 619.6

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)05-0776-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.019

基于瘢痕疙瘩浸润性生长的特性,故有提出瘢痕疙瘩肿瘤源性学说<sup>[1]</sup>;肿瘤坏死因子- $\alpha$ 刺激基因-6(tumor necrosis factor alpha stimulated gene-6, TSG-6)在瘢痕疙瘩中参与多种炎症反应的抗炎基因调节,能够抑制人病理性瘢痕成纤维细胞的增殖并促进其凋亡<sup>[2-3]</sup>,但其上游调控机制尚不明确;N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤(N<sup>6</sup>-methyadenosine, m<sup>6</sup>A) RNA 甲基化是指发生在 mRNA 腺嘌呤(A)第 6 位 N 原子

上的一种转录后修饰方式,而 m<sup>6</sup>A 甲基化过程是可逆性的;去甲基化酶的作用是催化 m<sup>6</sup>A 去除甲基,包括去甲基化酶肥胖相关蛋白(fat mass and obesity associated, FTO)和  $\alpha$ -酮戊二酸依赖型双加氧酶 alkB 同源物 5( $\alpha$ -ketoglutarate dependent dioxygenase alkB homolog 5, ALKBH5);甲基化酶的作用为促进 m<sup>6</sup>A 甲基化,包括甲基转移酶样蛋白 3(methyltransferase like 3, METTL3)、甲基转移酶样蛋白 14(methyltransferase like 14, METTL14)和肾母细胞瘤 1-结合蛋白(Wilms' tumor 1-associating protein, WTAP)<sup>[4-6]</sup>。但是目前基于 TSG-6 mRNA 的 m<sup>6</sup>A RNA 甲基化调控机制在瘢痕疙瘩中的作用及其机制研究在国内外均未见报道。该研究通过对瘢痕疙瘩组织和正常皮肤组织中 TSG-6 mRNA 甲基化水平及 FTO 表达水平的检测,为瘢痕疙瘩的发病机制研究和防治提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 材料来源** 瘢痕疙瘩组织及正常皮肤组织均来自于安徽医科大学第一附属医院门诊及病房患者术中切除,随机选取新鲜切除组织分为实验组(瘢痕疙瘩组织)和对照组(瘢痕疙瘩患者植皮手术供区或瘢痕疙瘩周围修剪的正常皮肤);所取标本均已获得患者同意并签字确认,所有标本均无感染及溃疡且未接受过任何药物及放射治疗。

**1.2 主要试剂** DMEM 高糖培养基购自美国 HyClone 公司;Triton X-100 购自北京索莱宝公司;Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG、Alexa Fluor 555 标记驴抗兔 IgG 购自上海碧云天生物技术公司;总 RNA 提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司;m<sup>6</sup>A 抗体购自德国 Synaptic Systems 公司;生物素 RNA 标记混合液购自瑞士 Roche 公司;羊抗兔 HRP 标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;链霉亲和素磁珠、荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 免疫荧光染色** 分别收集人瘢痕疙瘩组织与正常皮肤组织,采用组织块贴壁法提取并培养瘢痕疙瘩成纤维细胞和正常皮肤成纤维细胞;成纤维

2022-03-18 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:9021548201)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

作者简介:梁书宝,男,硕士研究生;

李小静,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: lixiaojing5@163.com

细胞用 PBS 清洗后用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.5% Triton X-100 透化处理 10 min, 滴加 1% 牛血清白蛋白封闭液封闭 1 h; 加 FTO (1 : 100) 和 TSG-6 (1 : 100) 抗体放在湿盒里, 放置 4 ℃ 过夜; 将细胞与 Alexa Fluor 555 标记驴抗兔 (1 : 500) 和 Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 (1 : 500) 在室温下避光孵育 1 h。防淬灭封片剂与 DAPI 1 : 500 稀释封片, -20 ℃ 冰箱保存, 荧光显微镜拍片。使用 Image J 软件分析平均荧光强度。

### 1.3.2 生物素标记 TSG-6 RNA pulldown 实验

**1.3.2.1 TSG-6 RNA 生物素标记** 将 TSG-6 cDNA 构建到 pSPT19 载体上; 将含有 pSPT19-TSG6 的质粒经 XbaI 内切酶作用后作为 TSG-6 正义链, 将含有 pSPT19-TSG6 的质粒经 EcoRI 内切酶作用后作为 TSG-6 反义链, 然后去除未整合的核苷酸; 在 RNA 聚合反应中加入 2 μl 生物素 RNA 标记物以形成 TSG-6 RNA 生物素标记, 最后获得的 TSG-6 RNA 用 RNeasy 迷你包纯化。

**1.3.2.2 组织蛋白样品制备** 取适量组织加入 1 ml RIPA 裂解液和 10 μl 蛋白酶抑制剂, 制备组织蛋白样品。

**1.3.2.3 生物素 RNA 预处理** 取 3 μg 标记的 RNA 至 PCR 管, PCR 仪加热 90 ℃、2 min, 然后置冰上 2 min, 最后加 4 μl RNA 凝胶加样缓冲液 (5 ×) 室温静置 20 min。

**1.3.2.4 RNA pulldown** 取 1 mg 蛋白液及预处理的生物素 RNA 加入 EP 管, 4 ℃ 下摇床作用 1 h; 取 30 μl 链霉亲和素磁珠混悬液放入经 DEPC 处理过的新 EP 管中并置于磁力架上, 用 RIPA 裂解液洗涤 2 次。将 RNA-蛋白混合液加入有磁珠的 EP 管中, 室温孵育 1 h; 使用磁力架吸附磁珠, 洗涤磁珠 3 次, 去除非特异结合蛋白。样品用 10% 胶进行 SDS-PAGE 电泳, 随后进行转膜, 使用 m<sup>6</sup>A 抗体进行 Western blot 检测。使用 Image J 软件分析灰度值。

**1.3.3 qPCR 检测瘢痕疙瘩及正常皮肤组织中去甲基化酶和甲基化酶 mRNA 表达水平** 分别收集人瘢痕疙瘩组织与正常皮肤组织, 提取其总 RNA, 逆转录得 cDNA; 引物根据 GenBank 中 FTO、ALKBH5、MEITL3、METTL4、WTAP 基因序列设计 (表 1), 反应参数设置为: PCR 扩增为 95 ℃、10 min; 95 ℃、15 s, 60 ℃、45 s, 40 个循环。熔解曲线: 95 ℃、15 s, 60 ℃、1 min, 95 ℃、15 s, 60 ℃、15 s。数据采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software 进行分析。

**1.3.4 Western blot 法检测瘢痕疙瘩及正常皮肤组**

织中去甲基化酶和甲基化酶蛋白表达水平 分别收集人瘢痕疙瘩组织与正常皮肤组织, 裂解提取总蛋白, 以 BCA 法蛋白定量。制备好的蛋白样品用 12% 的胶进行 SDS-PAGE 电泳后, 转移至硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶粉 37 ℃ 封闭 1 h, 按 METTL3 1 : 1 000、FTO 1 : 1 000、β-actin 1 : 1 000 稀释抗体, 4 ℃ 孵育过夜; TBST 洗膜后加入 1 : 10 000 稀释的羊抗兔二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜后与化学发光底物孵育 5 min, 曝光、显影、定影。用 β-actin 作内参验证蛋白含量。使用 Image J 软件分析灰度值。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件对统计数据进行分析, 样本间差异比较采用 *t* 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 RT-PCR 基因序列设计 (5'-3')

| 引物名称   | 上游引物                   | 下游引物                    |
|--------|------------------------|-------------------------|
| FTO    | ACTTGGCTCCCTTATCTGACC  | TCTGCAGTGTGAGAAAGCCTT   |
| ALKBH5 | CGCGGAAGGCTACACTTACG   | CCACCAGCTTTTGGATCACCA   |
| MEITL3 | TTGTCTCCAACCTTCCGTAGT  | CCAGATCAGAGAGGTGCTGTAG  |
| METTL4 | AGTGGCCGACAGCATTGGTG   | GGAGCAGAGGTATCATAGGAAGC |
| WTAP   | CTTCCCAAGAAGCTTCGATTGA | TCAGACTCTCTTAGCCAGTTAC  |

## 2 结果

**2.1 细胞免疫荧光染色结果** 对 TSG-6 和 FTO 进行免疫荧光染色, 结果显示, 与对照组相比, 实验组 TSG-6 (红色) 染色强度较低, 而 FTO (绿色) 染色强度较高; 比较平均荧光强度, 实验组 TSG-6 的表达水平低于对照组 (*t* = 6.360, *P* = 0.003 1), 而 FTO 的表达水平高于对照组 (*t* = 9.979, *P* = 0.000 6), 差异有统计学意义。见图 1。

### 2.2 TSG-6 mRNA 的 m<sup>6</sup>A 修饰水平检测结果

对 RNA pulldown 试验得到的蛋白进行 Western blot 检测, 将从组织直接提取的蛋白样品作为阳性对照, 用 TSG-6 正义链探针 pulldown 得到的结果作为阴性对照; 用 TSG-6 反义链探针 pulldown 得到的蛋白检测结果为阳性, 并对得到的样本蛋白进行 RNA 酶处理, 降解 mRNA 得到目标蛋白; 用 m<sup>6</sup>A 抗体对各组样本进行 Western blot 检测, 通过读取条带灰度值分析相对表达水平, 实验组 TSG-6 mRNA 的 m<sup>6</sup>A 甲基化水平低于对照组 (*t* = 8.101, *P* = 0.001 3), 差异有统计学意义。见图 2。

**2.3 qPCR 及 Western blot 法检测瘢痕疙瘩及正常皮肤组织中甲基化酶和去甲基化酶结果** qPCR 检测实验组和对照组中 m<sup>6</sup>A RNA 的甲基化酶

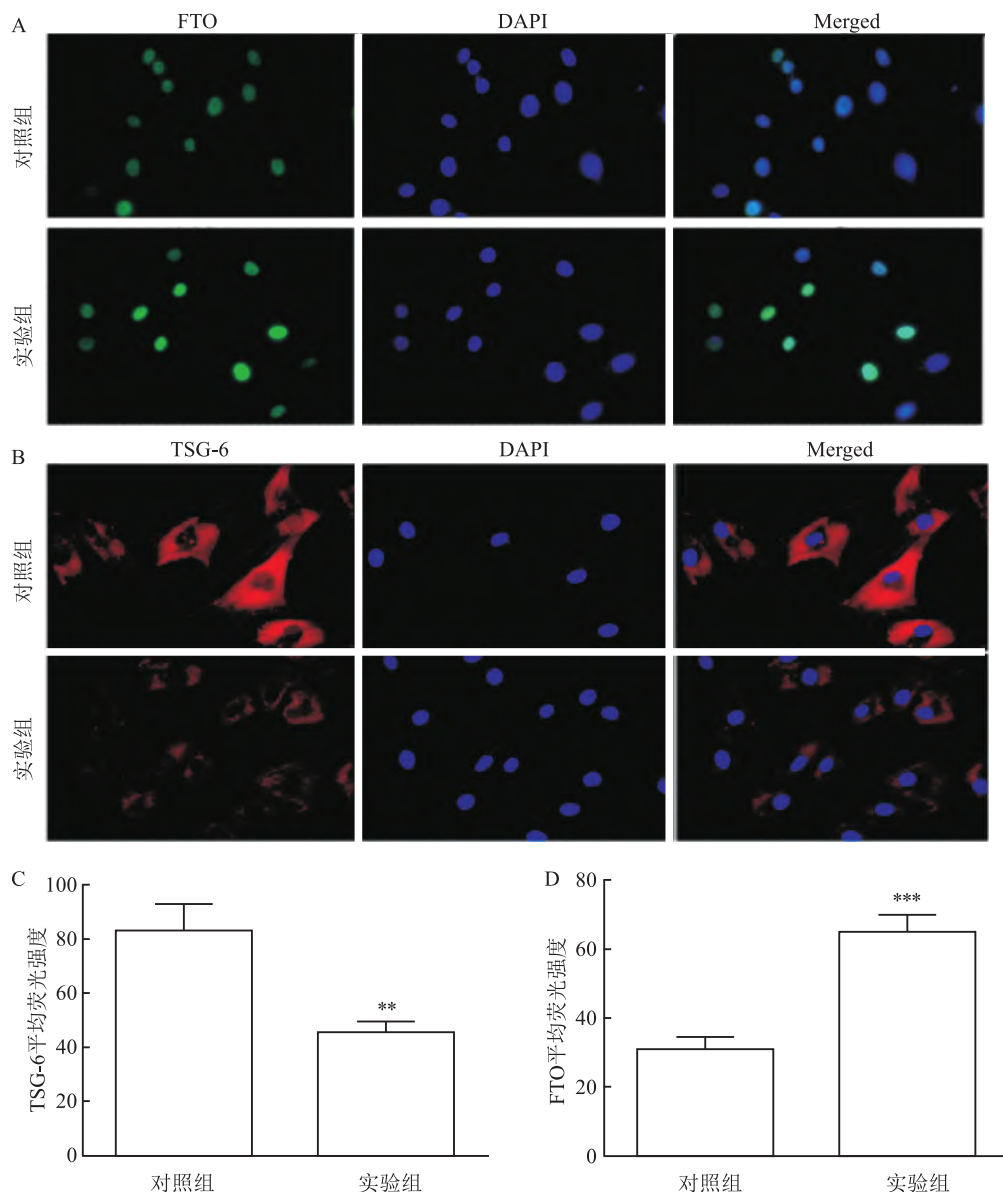


图1 免疫荧光实验检测 TSG-6 和 FTO 的表达

A:FTO 荧光染色  $\times 400$ ;B:TSG-6 荧光染色  $\times 400$ ;C:TSG-6 平均荧光强度;D:FTO 平均荧光强度;与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

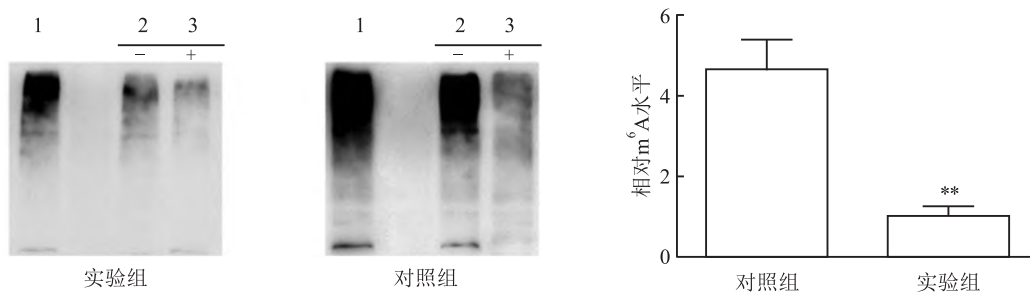


图2 Western blot 实验检测 TSG-6 mRNA 中  $m^6A$  的表达

1:阳性对照;2:阴性对照;3:TSG-6 反义链探针 pull-down 得到的  $m^6A$  蛋白;-:未加 RNA 酶;+:添加 RNA 酶;与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

(METTL3、METTL14、WTAP)、去甲基化酶 (FTO、ALKBH5) 和甲基化结合蛋白 (YTHDF1、YTHDF2) 的表达水平,结果显示,实验组中 FTO mRNA 表达

水平高于对照组 ( $t = 19.32, P = 0.0027$ ),差异有统计学意义 (图3);Western blot 检测结果显示,实验组中 FTO 蛋白表达水平高于对照组 ( $t = 10.90, P =$



0.000 4), 差异有统计学意义; 而 METTL3 蛋白表达水平较对照组的差异不明显 ( $t = 0.069$ ,  $P = 0.948 3$ ), 差异无统计学意义(图4)。

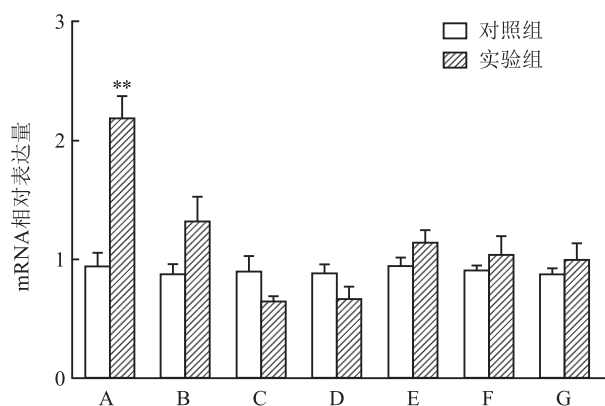


图3 qPCR 实验检测 RNA m<sup>6</sup>A 相关酶的表达

A: FTO; B: METT14; C: WTAP; D: METTL3; E: ALKBH5; F: YTHDF1; G: YTHDF2; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

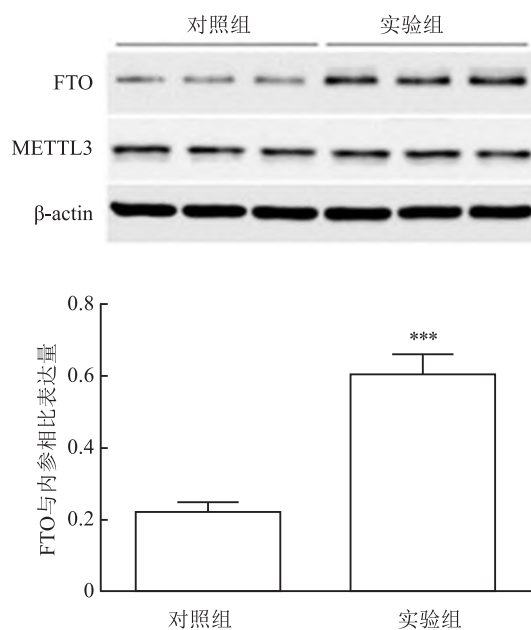


图4 Western blot 实验检测 FTO 和 METTL3 的表达

与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

### 3 讨论

瘢痕疙瘩是由于皮肤外伤等原因造成的良性纤维过度增生性疾病, 瘢痕疙瘩不仅影响美容, 且会导致一系列并发症, 包括疼痛、瘙痒、触觉异常、功能障碍等。有文献<sup>[7]</sup>报道, 相关肿瘤靶向治疗方法在瘢痕疙瘩的治疗中已取得不错的效果, 如热休克蛋白 90 等。瘢痕疙瘩发病机制与良性肿瘤发病机制具有相似之处, 因此, 借鉴肿瘤浸润性生长分子生物

学、遗传生物学和细胞生物学的特性, 探讨并揭示瘢痕疙瘩浸润性生长的机制, 可为瘢痕疙瘩的临床治疗提供新的思路 and 方向。

TSG-6 基因位于人染色体 2q23.3, 其编码蛋白由 277 个氨基酸组成, 可以减轻炎症反应, 降低炎症对机体的损伤<sup>[8]</sup>。2011 年 Tan et al<sup>[9]</sup> 首次证明瘢痕疙瘩组织中的 TSG-6 表达水平低于无瘢痕修复皮肤组织。Li et al<sup>[10]</sup> 研究表明 TSG-6 可导致 *p21*、*cyclin D1*、*NF-κB*、*Bcl-2*、*Bax*、*caspase-3* 等相关基因表达的改变, 抑制 TGF-β/smad 等炎症反应相关信号通路, 促进 Fas/FasL 凋亡通路, 进一步说明 TSG-6 对瘢痕疙瘩的形成具有抑制作用。m<sup>6</sup>A RNA 甲基化是真核生物 mRNA 中最丰富的表观遗传修饰, 可以影响 RNA 代谢, 如 mRNA 的稳定性和剪接、翻译效率以及微小 RNA 加工等, 在多种肿瘤发生发展中起着调节作用<sup>[11-13]</sup>。目前有研究<sup>[14]</sup> 报道提出 m<sup>6</sup>A RNA 甲基化会影响胚胎时期皮肤的发生发展, 在皮肤形态发生过程中, 通过 METTL3 使得 mRNA 甲基化影响胚胎皮肤形态的选择, 同时有报道揭示了 METTL3 在皮肤鳞状细胞癌样本中的表达上调<sup>[15]</sup>。但是目前尚未见 m<sup>6</sup>A 在瘢痕疙瘩中的作用及其机制研究。

本研究首先对实验组和对照组中 TSG-6 的表达进行检测, 结果表明实验组中的 TSG-6 蛋白表达水平低于对照组; 进一步对实验组和对照组中的 TSG-6 mRNA 甲基化水平进行检测, 结果表明实验组中 TSG-6 mRNA 的 m<sup>6</sup>A 修饰水平低于对照组; 这一结果证实了 m<sup>6</sup>A RNA 甲基化参与 TSG-6 的表达, 影响了瘢痕疙瘩的发生发展。而 m<sup>6</sup>A RNA 甲基化过程可由去甲基化酶和甲基化酶调控, 本研究在实验组和对照组中进行相关酶的检测, 结果表明在实验组中 FTO mRNA 表达水平和 FTO 蛋白表达水平均高于对照组; 细胞免疫荧光亦提示实验组中的 FTO 蛋白表达水平高于对照组; 上述实验结果表明, 在瘢痕疙瘩组织中, 由于 FTO 的表达水平升高引起 TSG-6 mRNA 的 m<sup>6</sup>A 去甲基化水平升高, 导致 TSG-6 表达水平下降, 进而削弱了对瘢痕疙瘩的抑制作用。

### 参考文献

- [1] Verhaegen P D H M, van Zuijlen P P, Pennings N M, et al. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: an objective histopathological analysis[J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(5): 649-56.
- [2] 王佳妮, 李小静, 李 涛, 等. TSG-6 促进瘢痕疙瘩成纤维细胞

- 凋亡及其 NF- $\kappa$ B 信号通路影响的实验研究[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(9): 1266–70.
- [3] 田小雨, 李小静, 李心怡, 等. TSG-6 调控 PI3K/Akt-Bcl-2 通路影响人瘢痕疙瘩凋亡机制的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(4): 563–7.
- [4] Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability [J]. *Nature*, 2014, 505(7481): 117–20.
- [5] Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885–7.
- [6] Zhou S, Bai Z L, Xia D, et al. FTO regulates the chemo-radiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting beta-catenin through mRNA demethylation[J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(5): 590–7.
- [7] Lee W J, Lee J H, Ahn H M, et al. Heat shock protein 90 inhibitor decreases collagen synthesis of keloid fibroblasts and attenuates the extracellular matrix on the keloid spheroid model[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2015, 136(3): 328e–37e.
- [8] Lee R H, Pulin A A, Seo M J, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the antiinflammatory protein TSG-6[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 54–63.
- [9] Tan K T, McGrouther D A, Day A J, et al. Characterization of hyaluronan and TSG-6 in skin scarring: differential distribution in keloid scars, normal scars and unscarred skin[J]. *J Eur Acad Dermatol Venerol*, 2011, 25(3): 317–27.
- [10] Li X Y, Chen Z, Li X J, et al. *In vitro* analysis of the role of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 in keloid[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 919–26.
- [11] Zhao X, Chen Y, Mao Q, et al. Overexpression of YTHDF1 is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 21(4): 859–68.
- [12] Li B Q, Huang S, Shao Q Q, et al. WT1 – associated protein is a novel prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2531–8.
- [13] Liu J, Eckert M A, Harada B T, et al. m<sup>6</sup>A mRNA methylation regulates AKT activity to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(9): 1074–83.
- [14] Zhang H, Shi X, Huang T, et al. Dynamic landscape and evolution of m<sup>6</sup>A methylation in human[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(11): 6251–64.
- [15] Zhou R, Gao Y, Lv D, et al. METTL3 mediated m(6)A modification plays an oncogenic role in cutaneous squamous cell carcinoma by regulating deltaNp63[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(2): 310–7.

## Effect of TSG-6 mRNA demethylation induced by FTO on keloid

Liang Shubao, Li Xinyi, Ding Yichun, Li Xiaojing

(Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the effect of demethylase obesity-associated protein (FTO) on the expression of tumor necrosis factor  $\alpha$ -stimulating gene-6 (TSG-6) mRNA demethylation in keloid tissue and its role in scar formation. **Methods** Fresh keloid tissue (experimental group) and normal skin tissue (control group) were randomly selected, and the expression level of TSG-6 in the experimental group and control group was detected by immunofluorescence method. A probe expressing TSG-6 mRNA sense and antisense chain were constructed for RNA pulldown, followed by Western blot detection of samples in each group with N<sup>6</sup>-methyladenine (m<sup>6</sup>A) antibody. Real-time fluorescence quantitative polynucleotide chain reaction (qPCR) and Western blot were used to detect the expression of TSG-6 mRNA demethylase and methylase in the experimental group and control group. The expression levels of FTO in experimental group and control group were detected by immunofluorescence assay. **Results** Immunofluorescence results showed that the expression level of TSG-6 in the experimental group was lower than that in the control group ( $P < 0.01$ ). Pulldown test results of biotin-labeled TSG-6 RNA showed that the m<sup>6</sup>A expression level of TSG-6 mRNA in the experimental group was lower than that in the control group ( $P < 0.01$ ). The results of qPCR showed that the expression level of FTO mRNA in the experimental group was higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ). Western blot analysis showed that FTO protein expression in the experimental group was higher than that in the control group ( $P < 0.001$ ). Immunofluorescence results showed that the expression level of FTO in experimental group was higher than that in control group ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The demethylase FTO catalyzes the demethylation of TSG-6 mRNA and promotes the formation of keloid, which may provide a new idea and direction for clinical treatment of keloid.

**Key words** FTO; TSG-6 mRNA; pathological scar; keloid