

ALKBH5 调控大鼠心肌成纤维细胞活化增殖的作用研究

周洋¹ 涂彬¹ 宋凯¹ 王娟² 孙赫¹ 孙峰² 沙纪名¹ 李锐³ 张野³ 陶辉^{1,3}

摘要 目的 探讨 6-甲基腺嘌呤(m^6A) 去甲基化酶 ALKBH5 在大鼠心肌成纤维细胞(CFs)活化增殖中的作用。方法 取 1~3 d 新生 SD 乳鼠心脏,剪碎消化后进行 CFs 原代培养,并在显微镜下观察细胞形态。细胞贴壁生长后加入 TGF- β 1 诱导构建 CFs 活化增殖模型,模型构建成功后分别向各组细胞转染 ALKBH5(慢病毒过表达 ALKBH5)及慢病毒空载体 24~48 h。运用 RT-qPCR 方法检测 ALKBH5、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I 型胶原(Collagen I)和增殖细胞核抗原(PCNA) mRNA 的表达;Western blot 检测 ALKBH5、 α -SMA、Collagen I 及 PCNA 蛋白的表达;CCK-8 法和 EdU 染色检测细胞增殖活性变化。结果 在 CFs 活化增殖模型中,与对照组 CFs 相比,模型组 CFs 中 ALKBH5 蛋白和 mRNA 的表达降低,而与活化增殖相关蛋白 PCNA、 α -SMA 及 Collagen I 的表达增加。此外,在慢病毒转染 ALKBH5 过表达组的 CFs 中, α -SMA、Collagen I 和 PCNA 蛋白和 mRNA 同 ALKBH5 病毒空载体组相比表达下降。CCK-8 与 EdU 染色实验表明,与空载体组相比,ALKBH5 过表达组 CFs 增殖活性受到抑制。结论 过表达 ALKBH5 明显抑制 CFs 的增殖活性,提示 ALKBH5 可能是参与调控 CFs 活化增殖的关键因子。**关键词** ALKBH5; 心肌成纤维细胞; 心肌纤维化; 活化; 增殖

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1870-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.004

心肌纤维化是一种病理生理过程,也是心室重构的主要表现之一,可引起心肌收缩力下降,僵硬增加等心脏功能改变^[1]。同时与多种心血管疾病

有密切联系,如心力衰竭、心肌梗死等^[2]。在心肌纤维化发生发展中的核心效应细胞是心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs),具体表现为 CFs 活化增殖和胞外基质的过度沉积^[3]。但 CFs 的活化增殖的分子机制目前尚不清楚,深入研究 CFs 活化增殖的分子机制是发现干预心肌纤维化进展的重要环节。

6-甲基腺嘌呤(N-methyladenosine, m^6A) 去甲基酶中的 alkB 同源蛋白 5(alkB homologue 5, ALKBH5)通过影响 mRNA 的 m^6A 去甲基化修饰来调控 mRNA 的出核、合成、剪切,同时 m^6A 修饰的异常变化可引起下游基因表达的失调^[4-5]。研究^[6]表明,ALKBH5 可以通过调控 m^6A 影响细胞的活化增殖及侵袭功能。有文献^[7]报道 ALKBH5 能促进恶性胶质瘤干细胞的增殖。目前研究提示 ALKBH5 在细胞活化增殖中发挥重要调节作用,然而关于 ALKBH5 是否影响 CFs 增殖活性目前尚不清楚。该研究通过利用 TGF- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导构建 CFs 活化增殖模型,慢病毒感染 CFs 过表达 ALKBH5 后,检测 CFs 活化增殖功能以及活化增殖分子标志物水平变化,探讨 ALKBH5 在 CFs 活化增殖中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 安徽医科大学动物实验中心提供 1~3 d 左右的 SPF 级 SD 乳鼠用于心肌成纤维细胞的原代提取及培养,动物许可证号: scxk(皖)2017-001。

1.1.2 主要试剂 高糖 DMEM 培养基(美国 HyClone 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);转化生长因子- β 1(美国 Peprotech 公司);TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司);CCK-8 试剂盒(合肥白鲨公司);逆转录和 RT-qPCR 试剂盒(长沙艾克瑞生物公司); β -actin(20536-1-AP)、ALKBH5(16837-1-AP)、 α -平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin, α -SMA)(23081-1-AP)、I 型胶原(Collagen I)(14695-1-AP)、活化增殖相关蛋白(proliferating cell nuclear antigen, PC-

2022-08-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82170236);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202104j07020037);安徽省转化医学研究院科研基金(编号:2021zhyx-C61);安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金面上项目(编号:2020GMFY02);安徽省教育厅高校科学研究项目(编号:YJS20210312)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院¹ 心胸外科、³ 麻醉科,合肥 230601

²安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:周洋,男,硕士研究生;

陶辉,男,副研究员,硕士生导师,责任作者, E-mail: tao-hui@ahmu.edu.cn

NA) (24036-1-AP) 一抗抗体(武汉 Proteintech 公司);胰蛋白酶、蛋白酶抑制剂、细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);GAPDH、ALKBH5、 α -SMA、Collagen I、PCNA 引物序列(上海生工公司);5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 细胞增殖检测试剂盒(广州锐博公司)。

1.1.3 主要仪器 细胞操作台、细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司),实时荧光定量 PCR 仪(RT-qPCR)(美国 Bio-Rad 公司),Varioskan LUX 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),恒温金属浴(杭州米欧仪器公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞的提取与培养 在细胞操作台中使用碘伏消毒 1~3 d 的乳鼠体表后,用无菌器械解剖出乳鼠的心脏。PBS 清洗心脏中残留血液,并用眼科剪将心脏剪碎后加入混合消化液(胰蛋白酶:II 型胶原酶=2:1)。在 37℃ 恒温水浴中消化并筛网过滤,向滤液中加入等体积培养基终止消化。重复消化数次以获得尽可能多的细胞,收集滤液后 1 000 r/min 离心 7 min。离心后弃上清液并向离心管中加入适量体积的培养基中和残留的消化液并重悬细胞,最后移至培养瓶中培养。通过换液弃去培养 2 h 仍未贴壁的细胞,培养瓶底部贴壁的细胞即为 CFs。显微镜下观察 CFs 细胞形态,原代培养至汇合度 80% 左右时传代 2~3 代细胞均符合实验要求。 α -SMA 的荧光染色可见细胞中有大量的平滑肌肌动蛋白,确定为 CFs。

1.2.2 TGF- β 1 诱导 CFs 细胞活化 TGF- β 1 实验前先用枸橼酸盐缓冲液(10 nmol/L, pH=3.0)配成浓度为 0.1 g/L 的储备液,置于 -20℃ 冰箱保存;使用前稀释成浓度为 2 μ g/L 的工作液使用。以最终浓度为 5 ng/ml 的 TGF- β 1 处理对数生长期的 CFs 24 h。

1.2.3 原代 CFs 细胞转染 取 TGF- β 1 刺激 24 h 后的 CFs 细胞,消化后计数,等量接种于 6 孔板中,细胞汇合度在 60%~70% 左右进行慢病毒感染,病毒空载体组进行相应阴性对照处理。24 h 后更换 10% 血清完全培养基正常培养 CFs。2 d 后进行细胞总 RNA 或蛋白的提取并通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测过表达效率。

1.2.4 实验分组 TGF- β 1 诱导 CFs 活化增殖模型分组,空白对照组(Control 组):不做任何处理组;活化增殖模型组(Model 组):TGF- β 1 刺激 CFs 24 h。

慢病毒过表达 CFs 分组,对照组(Control):TGF- β 1 刺激 CFs 24 h;慢病毒空载体组(negative control, LV-NC):TGF- β 1 刺激 CFs 24 h 后转染空载慢病毒;慢病毒过表达组(LV-ALKBH5):TGF- β 1 刺激 CFs 24 h 后转染过表达 ALKBH5 慢病毒。

1.2.5 总 RNA 的提取及逆转录 利用 TRIzol 抽提各个分组的总 RNA。检测 RNA 的纯度和浓度后逆转录为 cDNA。逆转录的反应条件为:37℃、15 min、85℃、5 s、4℃。所得 cDNA 置于 -20℃ 保存。

1.2.6 RT-qPCR 检测各组 ALKBH5 及增殖标志蛋白的表达 各个分组的 cDNA 依据试剂盒建议的反应体系使用 RT-qPCR 进行扩增。设置反应条件:95℃ 30 s、95℃ 5 s、60℃ 30 s。上述反应条件进行 40 个循环后进行熔解曲线反应。使用 GAPDH 作为内参, mRNA 相对表达量应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。相关引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
ALKBH5	F: TTCTTTAGCGACTCGGCACCTTT R: CCTTGGCGTGGGACCTTTT
Collagen I	F: GCAATGCTGAATCGTCCCAC R: CAGCACAGGCCCTCAAAAAC
α -SMA	F: GGCATCCACGAAACCACCTA R: GTATGCGTGTGACGGCTCTA
PCNA	F: CTGCTGGGACATCAGTTCCG R: GATCGCAGCGGTATGTGTCG
GAPDH	F: CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG R: GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT

1.2.7 Western blot 检测 CFs 中 ALKBH5、 α -SMA、Collagen I 及 PCNA 蛋白的表达量 TGF- β 1 处理或者慢病毒过表达后,分别提取各个分组的总蛋白后测定蛋白浓度,并将浓度定量于 1.5~2.0 μ g/ μ l。按比例加入蛋白上样缓冲充分混匀后利用金属浴加热使蛋白变性。变性后的蛋白置于 -20℃ 冰箱保存,用于后续蛋白电泳。依据目的蛋白的分子量的大小调整相应的转膜时间,转膜完成后用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次后孵育 ALKBH5、 α -SMA、Collagen I 及 PCNA 的一抗,同时 4℃ 慢摇过夜。结束一抗孵育后,再次 TBST 洗膜 3 次,并于常温孵育相对应的二抗 1 h,完成后再次洗膜显影。显影结果使用 Image J 软件分析并计算蛋白的表达水平。

1.2.8 CCK-8 法检测 CFs 过表达 ALKBH5 后的增殖情况 分组:空白组、TGF- β 1 模型组、慢病毒空载

体组、ALKBH5 过表达组, 每组设 6 个复孔。消化对数生长期的各组细胞后, 加入培养基重悬并计数。以每孔体积 100 μl , 细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 铺于 96 孔板后置于培养箱中培养。生长至对数期后每孔滴加 10 μl CCK-8 试剂孵育 3 h 后检测吸光度。实验重复 3 次。

1.2.9 EdU 染色检测 CFs 过表达 ALKBH5 后的细胞增殖活性 种适量细胞于 24 孔板中爬片, 加入 EdU 孵育 2 h 后 PBS 清洗细胞。随后 4% 多聚甲醛固定 30 min, 每孔加入甘氨酸中和后清洗细胞。渗透剂通透细胞后补入 300 μl EdU 染色反应液于室温避光摇床孵育弃去, DAPI 染核后封片, 并于荧光显微镜下观察阳性细胞并拍照记录。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。采用 t 检验和单因素方差分析比较组间数据 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验数据重复 3 次。

2 结果

2.1 SD 大鼠原代 CFs 分离培养 如图 1 所示, 倒置相差显微镜下观察 CFs 的生长状况, 细胞呈不规则形, 无搏动, 有多突触向外延展, 胞质透明, 汇合度较高。细胞活性良好可见细胞逐渐汇成网状交织, 符合 CFs 形态特征。

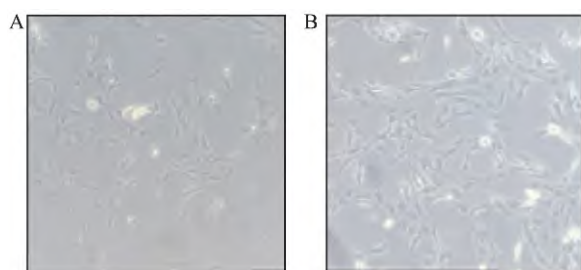


图 1 显微镜下观察 CFs 形态 $\times 100$
A: CFs 培养 3 h 后形态; B: CFs 培养 3 d 后形态

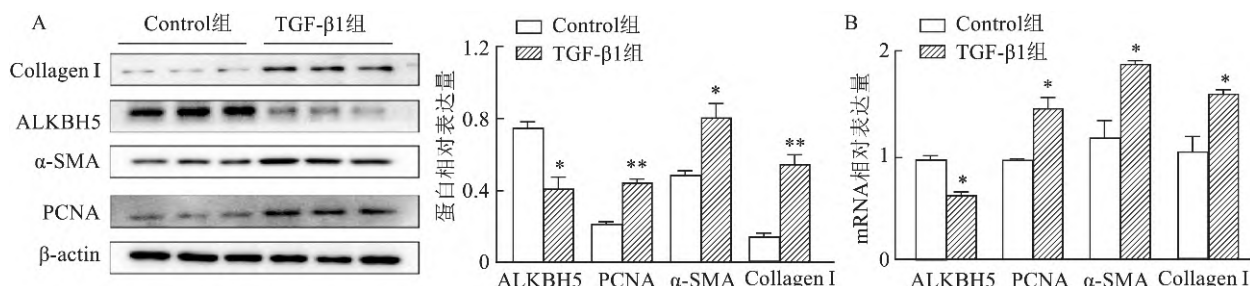


图 2 在 TGF- β 1 刺激后 ALKBH5、 α -SMA、Collagen I 在 CFs 中的表达变化

A: Western blot 检测蛋白表达水平; B: RT-qPCR 检测 mRNA 水平; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 TGF- β 1 诱导 CFs 构建活化模型 在 TGF- β 1 刺激 CFs 24 h 后, Western blot 检测活化增殖相关蛋白 PCNA、 α -SMA 及 Collagen I 含量变化显示, 同对照组相比, 模型组中增殖相关蛋白含量升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 检测显示 PCNA、 α -SMA 及 Collagen I 的 mRNA 含量比对照组增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, 与对照组相比, 模型组中 ALKBH5 的 mRNA 及蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 CCK-8 检测 CFs 增殖模型活性 如图 3 所示, 在 TGF- β 1 诱导 CFs 后, 模型组细胞活力相比于对照组上升, 差异有统计学意义 ($t = 7.25$, $P < 0.01$)。

2.4 过表达 ALKBH5 后 CFs 的增殖分子标志物变化 如图 4A 所示, 在慢病毒过表达 ALKBH5 后, CFs 中 ALKBH5 蛋白的表达量相比于空载体组增高, 表明 ALKBH5 转染成功。检测增殖相关蛋白 PCNA 和纤维化标志物 α -SMA、Collagen I 则被抑制, 差异有统计学意义 ($F = 0.74$, $P < 0.05$)。如图 4B 所示, 在慢病毒过表达 ALKBH5 后, CFs 中 ALKBH5 mRNA 的表达量相比于空载体组增高, PCNA、 α -SMA 和 Collagen I 的 mRNA 则被抑制, 差异有统计学意义 ($F = 1.11$, $P < 0.05$)。对照组与空载体组差异无统计学意义。

2.5 过表达 ALKBH5 后 CFs 的增殖能力改变 图 5A 所示, CCK-8 检测结果显示 CFs 在慢病毒过表达 ALKBH5 后, 细胞增殖活力相比于空载体组下降, 差异有统计学意义 ($F = 0.69$, $P < 0.01$)。病毒空载体组与对照组比较差异无统计学意义。如图 5B 所示, EdU 染色实验表明与空载体组相比, 慢病毒转染组的细胞增殖活性降低, 差异有统计学意义 ($F = 1.00$, $P < 0.05$)。病毒空载体组与对照组比较差异无统计学意义。

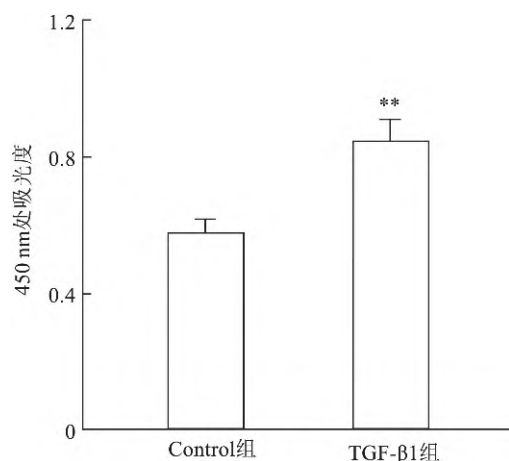


图3 CCK-8 检测在 TGF- β 1 刺激后 CFs 的增殖活性
与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

心肌纤维化是多种心血管疾病的共同病理过程及表现,同时心肌纤维化的治疗仍然没有有效的干预措施。CFs 的活化增殖在心肌纤维化的过程中起关键作用,因此,研究 CFs 相关的表观遗传调控机制对指导心肌纤维化的治疗有重要的指导意义。其中 m^6A 甲基化修饰是一种动态、可逆的转录后调控方式^[8],去甲基酶 ALKBH5 可通过去甲基化作用降低

靶基因的 m^6A 水平,调控基因表达参与细胞生命活动及功能调节^[9]。在胰腺癌^[10]和肝癌^[11]等肿瘤研究中已报道 ALKBH5 的低表达与肿瘤预后相关,过表达 ALKBH5 后对肿瘤增殖有明显抑制。此外,ALKBH5 也参与调控心肌细胞的低氧复氧损伤^[12]。但是 ALKBH5 对 CFs 是否具有调控增殖的作用尚不清楚,故该研究主要探索 ALKBH5 对 CFs 的增殖的影响。

该研究通过 TGF- β 1 诱导 CFs 的增殖模型,进行体外实验模拟 CFs 在心肌纤维化过程中可能存在的病理过程。研究结果显示,与对照组相比,模型组中与纤维化相关的标志性蛋白 α -SMA、Collagen I 明显升高,而 ALKBH5 明显下调,表明 ALKBH5 有可能参与心肌纤维化的发生发展过程。该结果与 ALKBH5 在肿瘤细胞中低表达具有相似性。为了进一步研究 ALKBH5 的作用,该研究使用慢病毒转染 CFs 过表达 ALKBH5 后观察增殖相关蛋白及细胞增殖功能的变化。在过表达 ALKBH5 后,增殖和纤维化相关的分子标志物的 mRNA 和蛋白水平的表达都明显下调,同时 CCK-8 和 EdU 染色实验也表明 CFs 的增殖能力明显抑制。以上实验结果表明 ALKBH5 参与 CFs 的增殖过程,可能是关键影响因素之一,并且该实验结果同目前在肿瘤研究中的相关结果具有一致性。在潜在机制方面,RNA 的 m^6A

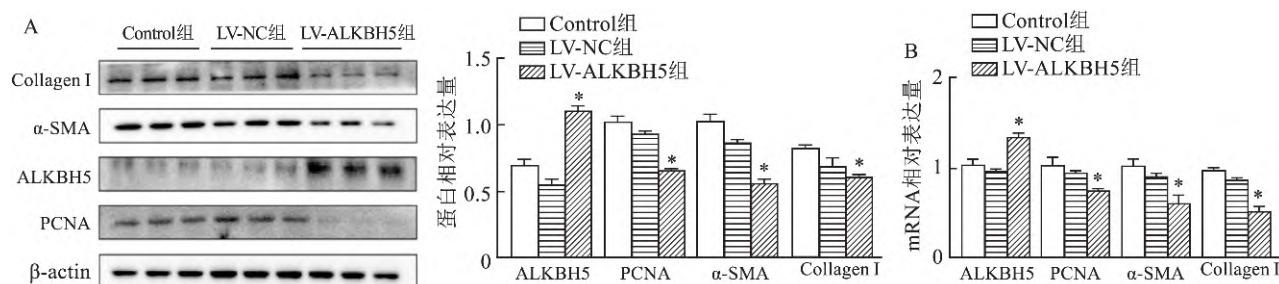


图4 慢病毒过表达 ALKBH5 后对 CFs 的增殖影响

A: Western blot 检测蛋白表达变化; B: RT-qPCR 检测 mRNA 水平改变; 与 LV-NC 组比较: * $P < 0.05$

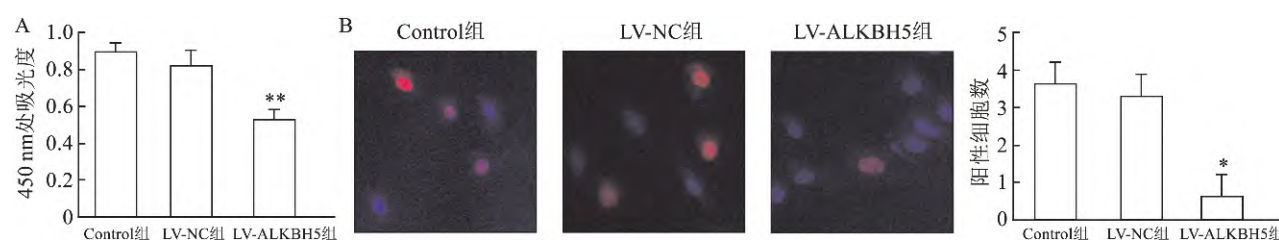


图5 慢病毒过表达 ALKBH5 后对 CFs 的增殖功能变化

A: CCK-8 检测过表达 ALKBH5 后 CFs 的增殖活性; B: EdU 染色定性检测过表达 ALKBH5 后 CFs 增殖能力的改变 $\times 200$; 与 LV-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

甲基化修饰是 mRNA 最常见的一种修饰方式,与细胞的各种功能调节相关。该研究验证了这种修饰方式在 CFs 中同样存在,并且 ALKBH5 参与 CFs 的增殖调控。结合相关研究可以推测 ALKBH5 对不同细胞可能有着相似的细胞功能调节作用,并可能是心肌纤维化治疗的突破口之一。

参考文献

- [1] Ma Z G, Yuan Y P, Wu H M, et al. Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(12): 1645–57.
- [2] Tallquist M D, Molkentin J D. Redefining the identity of cardiac fibroblasts [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(8): 484–91.
- [3] 施鹏, 陶辉, 张家贵, 等. 靶向沉默 SIRT1 对乳鼠心肌成纤维细胞增殖的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(4): 471–5.
- [4] Zaccara S, Ries R J, Jaffrey S R. Reading, writing and erasing mRNA methylation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 608–24.
- [5] Lan Q, Liu P Y, Bell J L, et al. The emerging roles of RNA m⁶A methylation and demethylation as critical regulators of tumorigenesis, drug sensitivity, and resistance [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(13): 3431–40.
- [6] Hu X, Peng W X, Zhou H, et al. IGF2BP2 regulates DANCER by serving as an N⁶-methyladenosine reader [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(6): 1782–94.
- [7] Zhang S, Zhao B S, Zhou A, et al. m⁶A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program [J]. *Cancer cell*, 2017, 31(4): 591–606.
- [8] Shi H, Wei J, He C. Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 640–50.
- [9] Han Z, Wang X, Xu Z, et al. ALKBH5 regulates cardiomyocyte proliferation and heart regeneration by demethylating the mRNA of YTHDF1 [J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 3000–16.
- [10] He Y, Yue H, Cheng Y, et al. ALKBH5-mediated m⁶A demethylation of KCNK15-AS1 inhibits pancreatic cancer progression via regulating KCNK15 and PTEN/AKT signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(12): 1121.
- [11] Qiu X, Yang S, Wang S, et al. m⁶A demethylase ALKBH5 regulates PD-L1 expression and tumor immunoenvironment in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(18): 4778–93.
- [12] Song H, Feng X, Zhang H, et al. METTL3 and ALKBH5 oppositely regulate m⁶A modification of TFEB mRNA, which dictates the fate of hypoxia/reoxygenation-treated cardiomyocytes [J]. *Autophagy*, 2019, 15(8): 1419–37.

Effects of ALKBH5 regulation on proliferation of cardiac fibroblasts in rats

Zhou Yang¹, Tu Bin¹, Song Kai¹, Wang Juan², Sun He¹, Sun Feng², Sha Jiming¹, Li Rui³, Zhang Ye³, Tao Hui^{1,3}

(¹Dept of Cardiothoracic Surgery, ²Dept of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230601; ³School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the role of N-methyladenosine(m⁶A) demethylase ALKBH5 in the proliferation and activation of cardiac fibroblasts(CFs) in rats. **Methods** The CFs taken from SD rats in 1 to 3 days were isolated by differential adhesion and observed under microscope. After cells were adherently grown to appropriate density, the cells were induced by TGF-β1 for modeling. The model cells were divided into the overexpression of ALKBH5 group infected by lentivirus and the negative control group for 24–48 hours. RT-qPCR was used to detect mRNA expression of ALKBH5, α-smooth muscle actin(α-SMA), type I collagen(Collagen I) and proliferating cell nuclear antigen(PCNA). The expression of ALKBH5, α-SMA, Collagen I and PCNA were assayed by Western blot. The cell proliferation activity was tested by CCK-8 assay and EdU. **Results** Compared with the control group, the protein and mRNA of ALKBH5 were reduced in the model group active by TGF-β1. Meanwhile, the biomarkers of activation, such as PCNA, α-SMA and Collagen I, increased significantly. Besides, the protein and mRNA of PCNA, α-SMA and Collagen I were lower in overexpression of ALKBH5 group than those of the negative control group. CCK-8 assay and EdU suggested that the proliferation viability of CFs was reduced evidently in overexpression of ALKBH5 group, compared with the negative control group. **Conclusion** Overexpression of ALKBH5 can inhibit the proliferation of CFs, suggesting that ALKBH5 may be a key regulatory point in the development of myocardial fibrosis.

Key words ALKBH5; cardiac fibroblasts; myocardial fibrosis; activation; proliferation