

接触抑制对转化生长因子 β 诱导基因 22 (TSC-22) 在心脏成纤维细胞中表达的影响

史 强 魏英杰 崔传珏 李 君 刘晓艳 白媛媛

摘 要 **目的** 通过建立体外原代培养的新生大鼠心脏成纤维细胞模型,研究接触抑制对 TSC-22 表达的影响,并为进一步阐明 TSC-22 在心脏成纤维细胞中的确切功能奠定基础。**方法** 采用差速贴壁法原代分离培养 Sprague-Dawley 大鼠心脏成纤维细胞,分别进行下述实验:①以不同初始密度接种细胞,分为两组:A 组为 50% 融合组;以 1.0×10^5 /ml 密度接种细胞于 T25 细胞培养瓶中,培养 24h;B 组为 100% 融合组;以 2.0×10^5 /ml 密度接种细胞于 T25 细胞培养瓶中,培养 24h;②均以 2.0×10^5 /ml 的初始密度接种细胞于 T25 细胞培养瓶中,分为 4 组:A 组为未融合组;接种后培养 6h(至贴壁未融合状态);B 组为融合组;接种后培养 24h(至 100% 融合状态);C 组为胰酶消化打破融合组;接种后培养至 100% 融合后,0.25% 胰酶消化,离心混悬后重新贴壁,继续培养 6h(此时细胞重新贴壁但未融合);D 组为胰酶消化重新达融合组;接种后培养至 100% 融合后,0.25% 胰酶消化,离心混悬后重新贴壁,继续培养 24h(此时细胞重新达到 100% 融合)。以上各组分别提取 mRNA 和蛋白,应用实时定量 PCR(real-time PCR)、蛋白印记(Western blotting)法分别检测 TSC-22 mRNA、蛋白表达的变化。**结果** 实时定量 RT-PCR 和蛋白印记结果表明:①心脏成纤维细胞融合度达到 100%,即发生接触抑制时,与 50% 融合度组相比,TSC-22 的 mRNA 和蛋白水平平均显著升高($P < 0.05$);②融合组心脏成纤维细胞与未融合组相比,TSC-22 的 mRNA 和蛋白水平均显著升高;胰酶消化打破融合组心脏成纤维细胞与融合组相比,TSC-22 的 mRNA 和蛋白水平均显著下降;胰酶消化重新达融合组成纤维细胞与胰酶消化打破融合组相比,TSC-22 的 mRNA 和蛋白水平均显著升高(P 均 < 0.05)。**结论** 本实验结果明确表明,在体外培养的心脏成纤维细胞中,接触抑制是诱导 TSC-22 表达升高的重要因素。当心脏成纤维细胞发生接触抑制时,TSC-22 可能通过行使其转录因子的生物学功能,在接触抑制后所触发的信号通路中发挥重要调控作用。对 TSC-22 确切功能的深入研究,将有助于进一步理解和阐明心脏重构机制。

关键词 接触抑制 TSC-22 心脏成纤维细胞

Effects of Contact-inhibition on the Expression of TGF- β Stimulated Clone-22 in Cardiac Fibroblasts. Shi Qiang, Wei Yingjie, Cui Chuanjue, Li Jun, Liu Xiaoyan, Bai Yuanyuan. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, National Center for Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100037, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of contact-inhibition on the expression of transforming growth factor- β stimulated clone-22 (TSC-22) in the primary cultured neonatal rat cardiac fibroblasts, and to lay a foundation for the further study of the exact function of TSC-22 in cardiac fibroblasts. **Methods** Cardiac fibroblasts were obtained from Sprague-Dawley rats by using trypsin digestion solution and selective plating technique. Cultured cardiac fibroblasts were divided into the following groups: ① two groups in which cells were plated at different original densities; A. 50% confluent group; cells were plated in T25 flasks at the density of 1.0×10^5 /ml, cultured for 24h; B. 100% confluent group; cells were plated in T25 flasks at the density of 2.0×10^5 /ml. ② four groups in which cells were plated at the same original density of 1.0×10^5 /ml; A. subconfluent group; cells were cultured 6 h after plating to a condition that were adherent but not totally confluent; B. confluent group; cells were cultured 24 h after plating to a condition of 100% confluent; C. confluent disrupted group; when cultured cells became 100% confluent, they were exposed to 0.25% trypsin to disrupt the cell-cell contacts, then cells were replated and cultured for 6 h to a condition that were adherent but not totally confluent; D. reconfliunet group; when cultured cells became 100% confluent, they were exposed to 0.25% trypsin to disrupt the cell-cell contacts, then cells were replated and cultured for 24 h until that the cell-cell contacts were reformed and cells were 100% confluent. The relative expression of TSC-22 mRNA and protein were determined by real-time PCR and western blots respectively. **Results** Real-time PCR and Western blot-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170206);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20091106110018)

作者单位:100037 北京协和医学院/中国医学科学院阜外心血管病医院、国家心血管病中心、心血管疾病国家重点实验室

通讯作者:魏英杰,电子信箱:weiyjingjie@yahoo.com

ting results showed that:① in the 100% confluent group, the mRNA and protein expression levels of TSC-22 were significantly higher versus that in the 50% confluent group ($P < 0.05$). ② in the confluent group, the mRNA and protein expression levels of TSC-22 were significantly higher versus that in the subconfluent group; in the confluent disrupted group, and the mRNA and protein expression levels of TSC-22 were significantly lower versus that in the confluent group; and in the re confluent group, the mRNA and protein expression levels of TSC-22 were significantly higher versus that in the confluent disrupted group ($P < 0.05$). **Conclusion** Results of this study showed that in the cultured cardiac fibroblasts, contact-inhibition played an important role in inducing the expression of TSC-22. When contact-inhibition happened, cardiac fibroblasts which reached to a critical cell density and formed a confluent monolayer stopped proliferation. It was possible that TSC-22 functions as a transcription regulator and played an important role in the signalling pathways that were triggered after the contact-inhibition. Further study on the exact function of TSC-22 may be meaningful to the understanding of the mechanism of cardiac remodeling.

Key words Contact-inhibition; Transforming growth factor- β stimulated clone-22; Cardiac fibroblasts

未发生恶性转化的细胞在培养过程中,其增殖受到细胞之间接触程度的调节和影响,当细胞密度达到一个临界点,细胞之间相互汇合接触,形成完全融合的单层细胞层时,细胞增殖能力丧失,生长停滞,这种现象被称为接触抑制。转化生长因子 β 诱导基因22(TGF- β stimulated clone-22, TSC-22)是近年来发现的一个在多种心脏病模型中表达明显升高的基因,可能在心脏重构过程中发挥重要作用。近年有文献报道,在发生了接触抑制的NIH3T3细胞系中TSC-22表达显著升高,提示其可能参与调控该细胞系接触抑制发生后的相关生物学过程^[1]。而在心脏成纤维细胞中,接触抑制对TSC-22的表达有何影响,迄今尚未见诸报道。

材料与方法

1. 细胞培养和分组:选用新生1~3天SPF级Sprague-Dawley大鼠,无菌条件下开胸取其心脏,用眼科剪剪成均匀的组织块,37℃水浴条件下用0.08%胰蛋白酶反复消化数次至组织块完全消化,收集消化液,离心弃上清,用含10%血清的DMEM培养液重悬细胞,200目滤网过滤后,接种于T25培养瓶中。采用差速贴壁法获得心脏成纤维细胞,分离得到的成纤维细胞进行传代培养,第2代细胞用于实验。细胞达到80%~90%融合后,无血清处理24h,胰酶消化混悬后,以下述不同的浓度接种并分组,进行后续实验:(1)以不同初始密度接种细胞,分为两组:①50%融合组:以 1.0×10^5 /ml密度接种细胞于T25细胞培养瓶中,培养24h;②100%融合组:以 2.0×10^5 /ml密度接种细胞于T25细胞培养瓶中,培养24h。(2)均以 2.0×10^5 /ml的初始密度接种细胞于T25细胞培养瓶中,分为4组:①未融合组:接种后培养6h(至贴壁未融合状态);②融合组:接种后培养24h(至100%融合状态);③胰酶消化打破融合组:接种后培养至100%融合后,0.25%胰酶消化,离心混悬后重新贴壁,继续培养6h(此时细胞重新贴壁但未融合);④胰酶消化重新达融合组:接种后培养至100%融合后,0.25%胰酶消化,离心混悬后重新贴壁,继续培养24h,(此时细胞重新达到100%

融合)。

2. RNA提取 real-time PCR(RT-PCR)检测:按照Trizol试剂(美国Invitrogen公司)说明书所提供的方法提取细胞总RNA,反转录按照反转录试剂盒(美国Promega公司)说明书进行。Real-time PCR反应采用GAPDH作为内参,TSC-22及GAPDH引物合成由大连宝生物公司完成,序列分别为:5'-TSC-22 CGAGTCGGATTGAGCTGCTG-3'(上游),5'-GCAGCCTGTTCAAAGTAAAG-3'(下游);5'-GAPDH GGCACATCAAGGCTGAGAATG-3'(上游),5'-ATGCTGGTGAAGACGCCAGTA-3'(下游);反应体系10 μ l:cDNA4 μ l,上下游引物各1 μ l,Power SYBR Green PCR Master Mix(美国ABI公司)4 μ l。使用Applied Biosystems 7300实时荧光定量聚合酶链反应仪检测,数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。

3. 蛋白提取及Western blotting检测:胰酶消化法收集各组细胞,弃上清,PBS洗3遍,加入细胞裂解液后,于4℃裂解20min,12000r/min,4℃离心后,收集上清,BCA法测定提取液的总蛋白浓度。50 μ g蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭1h,洗膜后加一抗:抗TSC-22抗体(美国Novus公司),稀释度为1:500,或抗 β -tubulin抗体,稀释度为1:3000,4℃孵育过夜,洗膜,加HRP标记二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),室温孵育1h,洗膜,ECL法显色。用Quantity One软件(美国Bio Rad公司)扫描条带并分析灰度值。

4. 统计学方法:所有结果均表示为均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),应用SPSS 13.0软件进行统计学分析,结果采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

细胞接种培养一定时间后,随着细胞数目的增长,细胞之间互相紧密接触,形成完全融合的单层细胞层,镜下观察培养瓶底部平面全部被细胞所覆盖,即为达到100%融合,见图1。以不同密度接种细胞,培养24h后,100%融合组与50%融合组相比,TSC-22 mRNA水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图2。

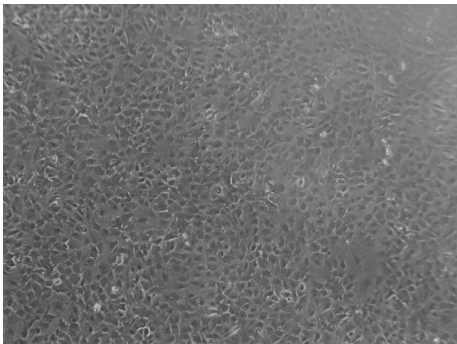


图 1 倒置显微镜下达到 100% 融合后的
心脏成纤维细胞 (×100)

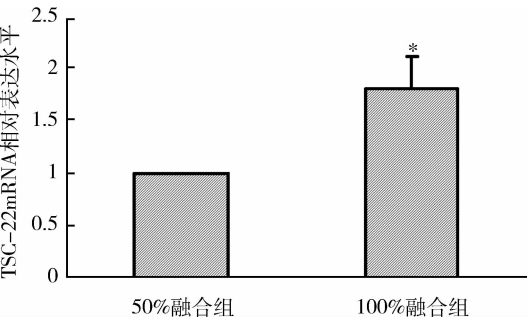


图 2 以不同密度接种细胞,达到不同融合度后,
TSC-22 的 mRNA 表达水平
与 50% 融合组相比, * $P < 0.05$

如图 3 所示,以不同密度接种细胞,培养 24 h 后,100% 融合组与 50% 融合组相比,TSC-22 蛋白水平显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

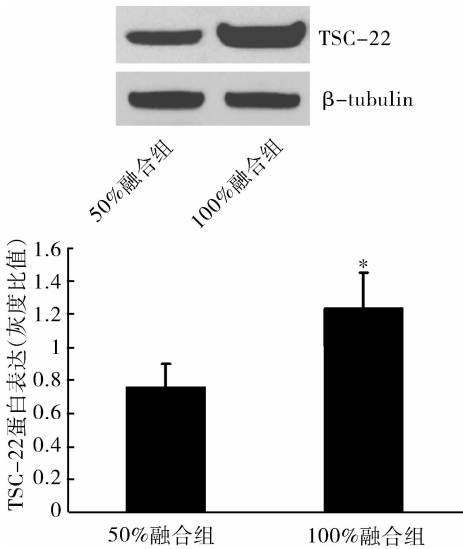


图 3 以不同密度接种细胞,达到不同融合度后,
TSC-22 的蛋白表达水平
与 50% 融合组相比, * $P < 0.05$

如图 4 所示,以同一密度接种细胞,培养 24h 达到 100% 融合后,与培养 6h 贴壁未融合组相比,TSC-22 mRNA 水平显著升高;胰酶消化打破融合,培养 6h 后,与培养 24h 达到 100% 融合组相比,TSC-22 mRNA 水平显著下降;胰酶消化后培养 24h,重新达到 100% 融合后,与胰酶消化后培养 6h 贴壁未融合组相比,TSC-22 mRNA 水平显著升高。差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

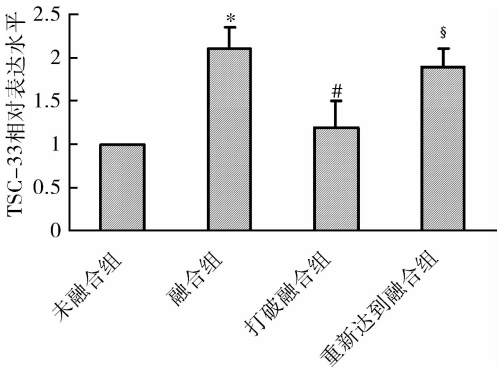


图 4 以相同密度接种细胞,达到不同融合度及
经胰酶消化处理后,TSC-22 的 mRNA 表达水平
与未融合组相比, * $P < 0.05$;与融合组相比,
$P < 0.05$;与打破融合组相比, \$ $P < 0.05$

如图 5 所示,以同一密度接种细胞,培养 24h 达到 100% 融合后,与培养 6h 贴壁未融合组相比,TSC-22 蛋白水平显著升高;胰酶消化打破融合,培养 6h

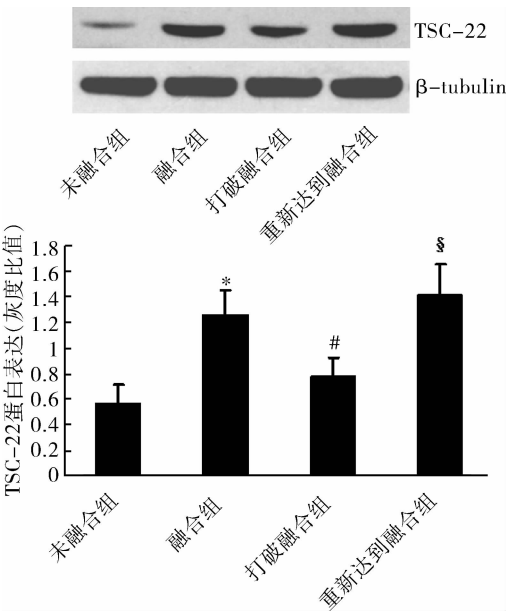


图 5 以相同密度接种细胞,达到不同融合度及
经胰酶消化处理后,TSC-22 的蛋白表达水平
与未融合组相比, * $P < 0.05$;与融合组相比,
$P < 0.05$;与打破融合组相比, \$ $P < 0.05$

后,与培养 24h 达到 100% 融合组相比,TSC-22 蛋白水平显著下降;胰酶消化后培养 24h,重新达到 100% 融合后,与胰酶消化后培养 6h 贴壁未融合组相比,TSC-22 蛋白水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

TSC-22 是最早由 Shibnuma 等^[2]于 1992 年在小鼠成骨细胞 MC3T3E1 中鉴定的,受转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)诱导高表达的基因。TSC-22 基因在物种间高度保守,属于 TSC-22/DIP/Bun 转录因子家族,该家族蛋白分子内均含有一段亮氨酸拉链样结构^[3, 4]。已有文献报道 TSC-22 在多种心脏病模型中表达明显升高,提示其可能参与心脏病理重构过程,但调控其表达的机制及具体的生物学功能尚不明确。Stanton 等^[5]对大鼠心肌梗死模型心脏左室及室间隔心脏组织中表达发生变化的基因进行芯片筛选,发现心脏左室及室间隔组织中 TSC-22 mRNA 水平在心肌梗死后 2~16 周均显著升高,提示其参与心肌梗死后的转录调控过程。Rysa 等^[6]对自发性高血压大鼠心肌肥厚到心力衰竭过程中表达上调的基因进行芯片筛选,结果发现心力衰竭心脏的左室心肌组织中 TSC-22 转录水平明显升高,提示其参与了心脏重构过程中的转录调控。Chen 等^[7]对快速起搏诱导的猪心房纤颤模型的心耳组织中表达发生变化的基因进行芯片筛选,亦发现 TSC-22 mRNA 水平的升高,同时伴随转化生长因子 β mRNA 表达的上调,提示 TSC-22 可能在心房纤颤伴随的心肌纤维化及成纤维细胞增殖过程中发挥重要作用。

Kuppers 等^[1]报道,在发生了接触抑制的 NIH3T3 细胞系中 TSC-22 mRNA 和蛋白表达均显著升高。本研究组之前的结果表明,在大鼠心肌梗死心脏组织中,TSC-22 蛋白水平在发生心肌梗死 1 天~2 周时与假手术对照组相比均呈升高趋势^[8]。在心肌梗死后的这一时相中,心梗部位的成纤维细胞大量增殖,并在过度增殖的部位存在一定程度的接触抑制现象,在这些部位发生的接触抑制可能是导致 TSC-22 表达上调的重要原因^[9, 10]。本研究中,我们通过以不同的密度接种心脏成纤维细胞,检测接触抑制对 TSC-22 表达的影响,结果表明,以不同密度接种心脏成纤维细胞,培养一定时间,高密度组细胞达到完全融合后,TSC-22 的 mRNA 和蛋白表达水平均较低密度未完全融合组细胞中显著升高。另外,以相

同密度接种心脏成纤维细胞,随着培养时间的延长,当达到完全融合后,TSC-22 的 mRNA 和蛋白表达水平均较未达到完全融合的组别显著升高,进一步地,用胰酶打破完全融合细胞组的接触后,TSC-22 的 mRNA 和蛋白表达水平较完全融合细胞组显著下降,继续培养一段时间,当打破融合的细胞组重新达到完全融合后,TSC-22 的 mRNA 和蛋白表达水平较融合打破组又显著升高。这些结果均明确表明,接触抑制是调控 TSC-22 的重要因素。

已有研究结果显示,TSC-22 在某些种类的癌细胞系中具有调控细胞周期、抑制细胞增殖、诱导凋亡发生等生物学功能^[3, 11, 12]。接触抑制是调控细胞生长增殖的一个重要的生物学机制,目前的研究观点认为,未转化的细胞达到完全融合后的接触抑制现象是一个主动有序发生的生物学过程,在该过程中,一系列与细胞周期调控相关的基因表达发生变化,形成一个级联信号网络^[1]。本研究发现,TSC-22 是心脏成纤维细胞接触抑制发生时表达明确上调的一个新基因,这提示在心脏成纤维细胞在接触抑制发生时,TSC-22 可能通过行使其作为转录因子的特定功能,在接触抑制所触发的信号通路中发挥重要作用。对 TSC-22 确切生物学功能及其作用机制的深入研究,将有助于对心脏重构机制的进一步理解和阐明,并可能作为一个新的生物标志物或治疗靶标应用于心脏病的临床诊断及治疗。

参考文献

- 1 Kuppers M, Ittrich C, Faust D, *et al.* The transcriptional programme of contact-inhibition[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(5):1234-1243
- 2 Shibnuma M, Kuroki T, Nose K. Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor beta 1 and other growth factors[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(15):10219-10224
- 3 Hashiguchi A, Hitachi K, Inui M, *et al.* TSC-box is essential for the nuclear localization and antiproliferative effect of XTSC-22[J]. *Dev Growth Differ*, 2007, 49(3):197-204
- 4 Wu X, Yamada-Mabuchi M, Morris EJ, *et al.* The Drosophila homolog of human tumor suppressor TSC-22 promotes cellular growth, proliferation, and survival[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(14):5414-5419
- 5 Stanton LW, Garrard LJ, Damm D, *et al.* Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2000, 86(9):939-945
- 6 Rysa J, Leskinen H, Ilves M, *et al.* Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure[J]. *Hypertension*, 2005, 45(5):927-933

- 7 Chen CL, Lin JL, Lai LP, *et al.* Altered expression of FHL1, CARP, TSC - 22 and P311 provide insights into complex transcriptional regulation in pacing - induced atrial fibrillation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(3):317 - 329
- 8 史强,魏英杰,张秀芳,等.大鼠心肌梗死后心肌中转化生长因子 β 诱导基因-22蛋白表达的变化规律及白细胞介素-6对其表达的诱导作用[J].*中国循环杂志*,2011,26(3):227 - 230
- 9 Camelliti P, Devlin GP, Matthews KG, *et al.* Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep ventricular infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2):415 - 425
- 10 Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? [J]. *Circulation*, 2003, 108(11):1395 - 1403
- 11 Nakashiro K, Kawamata H, Hino S, *et al.* Down - regulation of TSC - 22 (transforming growth factor beta - stimulated clone 22) markedly enhances the growth of a human salivary gland cancer cell line *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(3):549 - 555
- 12 Yu J, Ershler M, Yu L, *et al.* TSC - 22 contributes to hematopoietic precursor cell proliferation and repopulation and is epigenetically silenced in large granular lymphocyte leukemia[J]. *Blood*, 2009, 113(22):5558 - 5567

(收稿:2012-02-20)

(修回:2012-02-21)

JMJD6 参与调节肿瘤抑制因子 p53 的转录活性

张艳君 程谟斌 代 辉 沈翊琲 张 业

摘 要 目的 确定 JMJD6 与转录因子 p53 的相互作用,研究 JMJD6 对 p53 转录活性的影响,并通过鉴定 JMJD6 的赖氨酸羟化酶活性探讨其可能的作用机制。方法 免疫共沉淀技术和 GST pull - down 实验分析 JMJD6 和 p53 的相互作用及其作用区域;荧光素酶双报告基因系统检测 JMJD6 对 p53 靶基因启动子活性的影响;体外羟基化实验和质谱鉴定 JMJD6 的羟化酶活性。结果 JMJD6 与 p53 相互作用,并由 p53 的 C 端结构域介导;JMJD6 参与激活 p53 的转录活性;JMJD6 具有赖氨酸羟化酶活性,可以催化组蛋白 H4 发生羟基化。结论 赖氨酸羟化酶 JMJD6 可以结合肿瘤抑制因子 p53 并参与调节其转录活性。

关键词 p53; JMJD6; 赖氨酸羟基化

JMJD6 Regulates the Transcriptional Activity of p53. Zhang Yanjun, Cheng Mobin, Dai Hui, Shen Yufei, Zhang Ye. National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Abstract Objective To verify the interaction between JMJD6 and p53. To detect the effect of JMJD6 on transcriptional activity of p53. To identify the lysyl - hydroxylase activity of JMJD6. **Methods** The interaction between JMJD6 and p53 was examined by co - immunoprecipitation and GST pull - down assay. The effect of JMJD6 on p53 target gene promoter activity was detected by dual - luciferase reporter system. The lysyl - hydroxylase activity of JMJD6 was identified by hydroxylation assay *in vitro* and LC - MS analysis. **Results** JMJD6 interacted with p53 by p53 C terminal fragment. JMJD6 promoted the transcriptional activity of p53. JMJD6 was a lysyl - hydroxylase catalyzing hydroxylation of histone H4. **Conclusion** The lysyl - hydroxylase JMJD6 interacts with p53 and regulates its transcriptional activity.

Key words p53; JMJD6; Lysyl - hydroxylation

p53 蛋白作为一个重要的转录因子,可以调控多种基因的表达,它也是最早发现的肿瘤抑制因子之

一^[1]。有研究表明,在大约 50% 人类癌症中,p53 基因发生了突变。p53 作为一个转录因子,当细胞处于应激状态时,会以四聚体的形式紧密结合 DNA,通过激活一系列下游靶基因,发挥其调控 DNA 修复、调节细胞周期和细胞凋亡的功能^[2,3]。很多研究显示 p53 蛋白的激活是一个多级多因子参与的复杂调控机制,这其中 p53 的翻译后修饰发挥着至关重要的作用^[4]。对 p53 的去乙酰化、磷酸化、泛素化、sumo 化和甲基化、去甲基化修饰的研究也有众多报道。

JMJD6 是 JMJC 结构域家族成员。现已发现具有

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171239);教育部博士点基金项目资助(20111106110024)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系、医学分子生物学国家重点实验室(注:张艳君、程谟斌为并列第一作者)

通讯作者:代辉,电子信箱:daihui15@tom.com;沈翊琲,电子信箱:yfshen@pumc.edu.cn;张业,电子信箱:yezhang@pumc.edu.cn