

# 间充质干细胞来源的外泌体通过TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 信号通路抑制高糖诱导的成纤维细胞转分化

兰蓓蓓<sup>1</sup> 王娟娟<sup>1</sup> 邵联波<sup>1</sup> 张瑜<sup>1</sup> 周进<sup>2</sup> 孟庆友<sup>2</sup> 韩超珊<sup>1</sup>  
朱宝<sup>1</sup> 张鲁鲁<sup>1</sup> 王燕丽<sup>1</sup> 张雨晴<sup>1</sup> 李杨欣<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>苏州大学心血管病研究所, 苏州 215123; <sup>2</sup>苏州大学附属第一医院, 苏州 215123)

**摘要** 心脏纤维化是糖尿病患者心肌功能障碍的主要原因。成纤维细胞转分化为成肌纤维细胞是心脏纤维化过程中的一个关键性事件。该研究的目的是探究高糖诱导成纤维细胞转分化的分子机制, 并找寻抑制成纤维细胞转分化的方法。结果显示, 经高糖处理的BJ细胞(人皮肤成纤维细胞系)与正常BJ细胞相比,  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的表达明显上调。通过使用SB525334或转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)siRNA抑制TGF- $\beta$ 1/Smad2/3信号通路的活化, 发现 $\alpha$ -SMA和胶原I的蛋白质水平及Smad2/3的磷酸化水平均降低。同时, SB525334也抑制了高糖诱导的BJ细胞增殖。大鼠骨髓间充质干细胞来源的外泌体(mesenchymal stem cell-derived exosome, MSC-Exo)通过降低Smad2/3磷酸化水平, 抑制高糖诱导的 $\alpha$ -SMA表达。综上所述, 高糖通过激活TGF- $\beta$ 1信号通路导致BJ细胞的转分化, 而MSC-Exo通过抑制该通路防止BJ细胞的转分化。

**关键词** 成纤维细胞; 纤维化; TGF- $\beta$ 1; 高糖; Smad2/3; 外泌体

## Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Inhibits High Glucose-Induced Fibroblasts Transdifferentiation Via TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 Signaling Pathway

Lan Beibei<sup>1</sup>, Wang Juanjuan<sup>1</sup>, Shao Lianbo<sup>1</sup>, Zhang Yu<sup>1</sup>, Zhou Jin<sup>2</sup>, Meng Qingyou<sup>2</sup>, Han Chaoshan<sup>1</sup>,  
Zhu Bao<sup>1</sup>, Zhang Lulu<sup>1</sup>, Wang Yanli<sup>1</sup>, Zhang Yuqing<sup>1</sup>, Li Yangxin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute for Cardiovascular Science, Soochow University, Suzhou 215123, China;

<sup>2</sup>The First Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract** Cardiac fibrosis is the leading cause of myocardial dysfunction in patients with diabetes. Fibroblasts transdifferentiation into myofibroblasts is a key event in cardiac fibrosis. The purpose of this study was to investigate the mechanism of high glucose-induced fibroblasts transdifferentiation and to find a way to inhibit the transdifferentiation. Our results showed that the level of  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) was significantly up-regulated in BJ cells (human dermal fibroblasts) treated with high glucose compared with the normal BJ cells. We found that  $\alpha$ -SMA and collagen I protein levels, and the phosphorylation level of Smad2/3 were decreased by SB525334, an

收稿日期: 2017-03-26 接受日期: 2017-04-17

江苏省重点研发计划项目(批准号: BE2016669)、苏州市科技计划项目(批准号: SS201665)、江苏高校优势学科(批准号: PAPD)和江苏省医学重点学科(批准号: XK201118)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0512-67781962, E-mail: yangxin\_li@yahoo.com

Received: March 26, 2017 Accepted: April 17, 2017

This work was supported by Jiangsu Province Key Scientific and Technological Project (Grant No.BE2016669), Suzhou Science and Technology Project (Grant No.SS201665), Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (Grant No.PAPD) and Jiangsu Province's Key Discipline/Laboratory of Medicine (Grant No.XK201118)

\*Corresponding author. Tel: +86-512-67781962, E-mail: yangxin\_li@yahoo.com

网络出版时间: 2017-05-27 15:21:02 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170527.1521.002.html>

inhibitor of TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1) pathway, or TGF- $\beta$ 1 siRNA to inhibit the activation of TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling pathway. SB525334 also inhibited the high glucose-induced BJ cells proliferation. Rat bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome (MSC-Exo) inhibited the high glucose-induced expression of  $\alpha$ -SMA by decreasing the phosphorylation of Smad2/3. In summary, high glucose-induced fibroblasts transdifferentiation is mediated by TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling pathway, which can be inhibited by MSC-Exo.

**Keywords** fibroblast; fibrosis; TGF- $\beta$ 1; high glucose; Smad2/3; exosome

糖尿病是一种由于胰岛素分泌不足或胰岛素效力下降而导致的以高血糖为特征的代谢性疾病。国际糖尿病联合会预计到2030年, 由于肥胖或缺少锻炼而成为糖尿病患者的人数将增加到5.52亿<sup>[1]</sup>。临床研究表明, 糖尿病与心脏纤维化及其导致的心肌病有密切联系<sup>[2]</sup>, 并且1型和2型糖尿病的动物模型也为糖尿病心肌病的发生提供了重要的依据<sup>[3-4]</sup>。

心脏纤维化的特征在于细胞外基质的过度沉积, 如胶原I(collagen I)、胶原III以及纤连蛋白(fibronectin)等<sup>[5]</sup>。心脏间质包含了几种类型的细胞, 其中成纤维细胞是最丰富的间质细胞。作为心肌中细胞外基质的主要来源<sup>[6]</sup>, 成纤维细胞在保护心脏间质网络的完整性方面发挥着重要作用。成纤维细胞转分化为成肌纤维细胞是纤维化应答过程中的关键性事件。成肌纤维细胞的特征介于成纤维细胞和平滑肌细胞之间, 其表达 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的能力要明显高于成纤维细胞, 这是判断成纤维细胞转分化的一个标志。此外, 成肌纤维细胞合成细胞外基质(如胶原I)的能力要远远大于成纤维细胞, 进而使心肌中细胞外基质的沉积异常增多, 加剧了心脏纤维化的程度。

转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)是纤维化过程中一个关键的调节因子, 能够诱导成纤维细胞向成肌纤维细胞转分化<sup>[7]</sup>。研究表明, 在多种成纤维细胞的体外转分化过程中, TGF- $\beta$ 1/Smad2/3信号通路起着关键的调控作用。在正常心脏中, TGF- $\beta$ 1以一种沉默复合体的形式存在, 并不能与它的受体结合, 一旦心脏受到损伤, 无活性的TGF- $\beta$ 1就转换成有活性的TGF- $\beta$ 1, 并且少量活化TGF- $\beta$ 1就可以诱导最大程度的细胞内应答<sup>[8]</sup>。许多蛋白酶, 如纤溶酶、基质金属蛋白酶-2(matrix-metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9都可以作为TGF- $\beta$ 1的“活化剂”<sup>[8-10]</sup>。活化后的TGF- $\beta$ 1与其II型受体(TGF- $\beta$  receptor II, TGF $\beta$  RII)结合, 进而TGF $\beta$

RII被活化。活化后的TGF $\beta$  RII募集并结合其I型受体(TGF- $\beta$  receptor I, TGF $\beta$  RI), 然后TGF $\beta$  RI磷酸化效应蛋白Smad2和Smad3, 将信号转移至细胞核内<sup>[11]</sup>, 调节靶基因的表达。已有实验表明, 抑制TGF- $\beta$ 1/Smad2/3信号通路能够减缓高血压诱导的心脏纤维化<sup>[12]</sup>, 但是目前高糖诱导的心脏纤维化的机制仍不明确。

外泌体(exosome)是一种可由多种细胞分泌的纳米量级的膜性小囊泡, 直径约为30~100 nm。外泌体中含有功能性的蛋白质、mRNA、microRNAs<sup>[13]</sup>以及tRNA<sup>[14]</sup>等, 在介导细胞间的通讯方面起着重要的作用<sup>[15-16]</sup>。本实验室先前的研究发现, 大鼠骨髓间充质干细胞来源的外泌体(mesenchymal stem cell-derived exosome, MSC-Exo)可以抑制TGF- $\beta$ 1诱导的成纤维细胞的转分化<sup>[17]</sup>, 但是MSC-Exo是否可以抑制高糖诱导的成纤维细胞的转分化及其作用机制仍不明确。

本文主要探究高糖诱导成纤维细胞转分化的相关机制, 并提出抑制成纤维细胞转分化的新方法。结果表明, MSC-Exo通过抑制TGF- $\beta$ 1/Smad2/3信号通路防止了高糖诱导的成纤维细胞的转分化。此外, 高糖能通过TGF- $\beta$ 1/Smad2/3信号通路促进成纤维细胞增殖, 加速纤维化进程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

BJ细胞(人皮肤成纤维细胞系)购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC), 骨髓间充质干细胞(MSC)是从雄性SD大鼠体内分离得到。1 $\times$ MEM基础培养基购自Gibco公司。DMEM-F12基础培养基购自Hyclone公司。优级胎牛血清(FBS)购自BI公司。D-(+)-Glucose(45%)和DAPI购自Sigma公司。重组小鼠的TGF- $\beta$ 1购自Cell Signaling Technology公司。RNA抽提用的Trizol试剂、逆转录试剂盒和qRT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

人肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA试剂盒购自Abcam公司。TGF- $\beta$ 1 siRNA和EdU细胞增殖试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司。SB525334(TGF $\beta$  RI抑制剂)购自Selleck公司。Lipofectamine 2000(Lipo 2000)购自Thermo公司。外泌体提取试剂盒购自Life Technology公司。aldehyde/sulfate latex beads(4  $\mu$ m分子探针)购自Invitrogen公司。 $\alpha$ -SMA、胶原I、CD63及FITC标记的CD63抗体购自Abcam公司。Smad2/3和p-Smad2/3抗体购自Cell Signaling Technology公司。GAPDH抗体购自上海联科生物科技有限公司。HRP标记的马抗小鼠二抗购自Cell Signaling Technology公司。羊抗兔二抗购自上海联科生物科技有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** BJ细胞培养于1 $\times$ MEM培养基中(包含10% FBS、100 U/mL青霉素溶液、0.1 mg/mL链霉素溶液、2 mmol/L L-谷氨酰胺)。MSC培养于DMEM-F12基础培养基中,其他成分与BJ细胞培养基成分一致。在37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中进行细胞培养。大鼠MSC细胞的分离方法见本实验室已发表的文献<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 成纤维细胞的转分化** 将生长状态良好的BJ细胞接种于6孔板中,每孔细胞数为 $1.0\times 10^5\sim 1.2\times 10^5$ 。待细胞贴壁后,将细胞分为对照组、TGF- $\beta$ 1处理组(10 ng/mL)和高糖处理组(25 mmol/L)。培养24 h和48 h后,对3组细胞进行RNA和蛋白的提取,检测 $\alpha$ -SMA的表达情况。

**1.2.3 MSC-Exo的分离与鉴定** 第4代MSC经100 000  $\times$ g超速离心8 h后,用含10% FBS的DMEM-F12培养液置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中进行培养。待细胞生长状态良好且密度达到 $1\times 10^6\sim 1\times 10^7$ 细胞时,收集细胞培养上清液并提取外泌体,具体方法见本实验室已发表的文献<sup>[7]</sup>。经100 000  $\times$ g离心1.5 h获得外泌体沉淀后,PBS缓冲液重悬沉淀,用BCA蛋白质定量试剂盒对外泌体中的蛋白质进行定量,冻存于-80  $^{\circ}$ C。CD63是外泌体的一个特异性标志物(marker),用流式细胞术和Western blot对外泌体进行鉴定。由于外泌体太小以至于不能被流式细胞仪捕获,所以在检测前,需将MSC-Exo预结合到aldehyde/sulfate latex beads以扩增通道信号,用FITC标记的CD63抗体对外泌体进行流式鉴定。此外,CD63蛋白质也用Western blot进行进一步检测。

**1.2.4 qRT-PCR检测mRNA水平** 根据甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1基因的序列设计PCR引物。GAPDH基因上游引物序列(F)为:5'-GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA-3',下游引物序列(R)为:5'-GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT-3',扩增产物长度为126 bp。 $\alpha$ -SMA基因上游引物序列(F)为:5'-AAA AGA CAG CTA CGT GGG TGA-3',下游引物序列(R)为:5'-GCC ATG TTC TAT CGG GTA CTT C-3',扩增产物长度为75 bp。TGF- $\beta$ 1基因上游引物序列(F)为:5'-GGC GAT ACC TCA GCA ACC G-3',下游引物序列(R)为:5'-CTA AGG CGA AAG CCC TCA AT-3',扩增产物长度为123 bp。

收集经过处理的细胞,使用Trizol试剂盒提取细胞总RNA,并按照逆转录反应试剂盒说明书合成cDNA。以逆转录合成的cDNA为模板,GAPDH为内参,进行qRT-PCR检测。每组实验设有3个重复,得到的数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算细胞中 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 mRNA的相对表达量。

**1.2.5 Western blot检测蛋白质水平** 收集经过处理的细胞,用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶(12%)电泳。然后将蛋白质转移至PVDF膜上。使用5%脱脂奶粉室温封闭1.5 h,一抗(1:1 000)4  $^{\circ}$ C孵育过夜。次日用PBST洗膜,二抗(1:3 000)室温孵育2 h,用PBST漂洗后,ECL底物孵育、曝光、显影及结果分析。每组实验均做3次重复。

**1.2.6 细胞内源性TGF- $\beta$ 1沉默** 用TGF- $\beta$ 1 siRNA(siTGF- $\beta$ 1)对细胞内源性的TGF- $\beta$ 1进行沉默,siTGF- $\beta$ 1序列是5'-GGA CUA UCC ACC UGC AAG AdTdT-3'。Scrambled siRNA(siNC)不降解任何已知的细胞mRNA,用作阴性对照。用Lipo 2000对BJ细胞进行转染。将细胞接种至6孔板中,每孔细胞数为 $1.0\times 10^5\sim 1.2\times 10^5$ ,分为siNC组和siTGF- $\beta$ 1组。待细胞贴壁后,使用Lipo 2000进行siRNA的转染,转染时siRNA的终浓度为100 nmol/L。转染48 h后,对细胞进行RNA和蛋白质的提取,检测TGF- $\beta$ 1 siRNA的沉默效果。

**1.2.7 用ELISA试剂盒检测TNF- $\alpha$ 含量** 细胞培养液中TNF- $\alpha$ 的含量用ELISA试剂盒进行检测。收集处理过的BJ细胞培养液,2 000  $\times$ g离心10 min,去除细胞及细胞碎片。把待测样品加入检测板的样品孔

中, 加入相应的抗体, 经过孵育、漂洗后, 加入TMB底物, 最后加入终止液终止反应。用酶标仪测定450 nm处的吸光度值。

**1.2.8 EdU增殖试剂盒检测细胞增殖** 将BJ细胞接种于48孔板中, 接种时的细胞密度为50%~60%。经高糖处理48 h后, 用EdU增殖试剂盒检测细胞增殖情况。每孔加入适量的EdU溶液(终浓度为20  $\mu$ mol/L)孵育2 h。用4%多聚甲醛和0.05% Triton X-100溶液分别对细胞进行固定和通透, 然后根据说明书进行Apollo染色。细胞核用200 ng/mL的DAPI进行染色。最后在荧光显微镜下观察细胞的增殖情况。

### 1.3 统计学分析

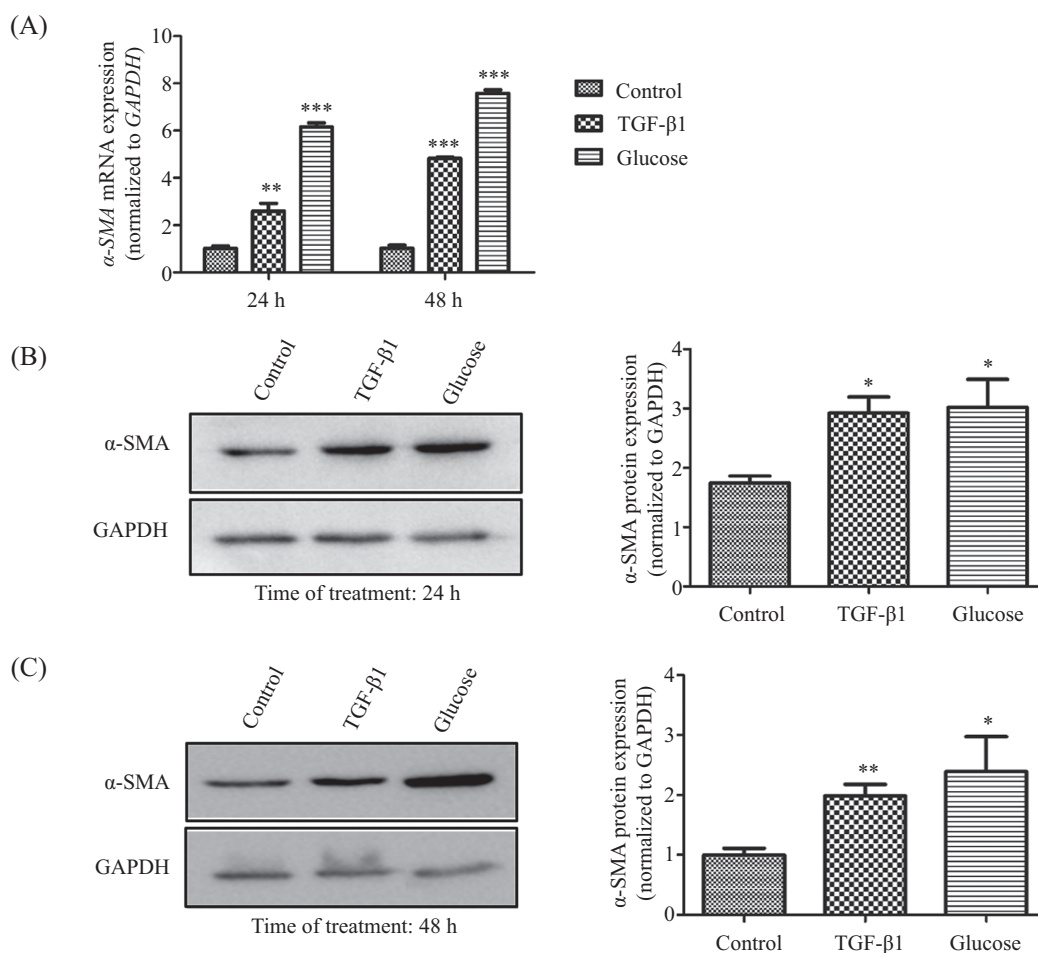
所得实验数据均用mean $\pm$ S.E.M.表示, 用Graphpad Prism 5软件进行差异性分析。两组之间的比较采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

每组实验至少重复3次。

## 2 结果

### 2.1 高糖诱导BJ细胞转分化模型的建立

大量的实验数据表明, TGF- $\beta$ 1能够在体外诱导多种成纤维细胞转分化为成肌纤维细胞, 因此采用TGF- $\beta$ 1处理作为阳性对照来研究高糖是否能诱导BJ细胞的转分化。实验分为3组: 对照组、TGF- $\beta$ 1(10 ng/mL)处理组、高糖(25 mmol/L)处理组。处理24 h和48 h后, 对细胞进行RNA和蛋白质的提取。用qRT-PCR检测 $\alpha$ -SMA的mRNA的表达情况(图1A), 用Western blot检测 $\alpha$ -SMA的蛋白表达情况(图1B和图1C)。结果显示, TGF- $\beta$ 1处理组及高糖处理组与对照组相比,  $\alpha$ -SMA的mRNA和蛋白质水平均出现明显上调(图1), 说明成功构建高糖诱导的BJ细胞的



A: qRT-PCR检测 $\alpha$ -SMA的mRNA水平; B: Western blot检测高糖诱导24 h的 $\alpha$ -SMA的蛋白质水平; C: Western blot检测高糖诱导48 h的 $\alpha$ -SMA蛋白质水平; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组比较。

A: the levels of  $\alpha$ -SMA mRNA were detected by qRT-PCR; B: the levels of  $\alpha$ -SMA protein were detected by Western blot after high glucose treatment for 24 h; C: the levels of  $\alpha$ -SMA protein were detected by Western blot after high glucose treatment for 48 h; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图1 高糖诱导BJ细胞转分化模型的建立

Fig.1 Establishing the model of high glucose-induced BJ cells transdifferentiation

转分化模型。

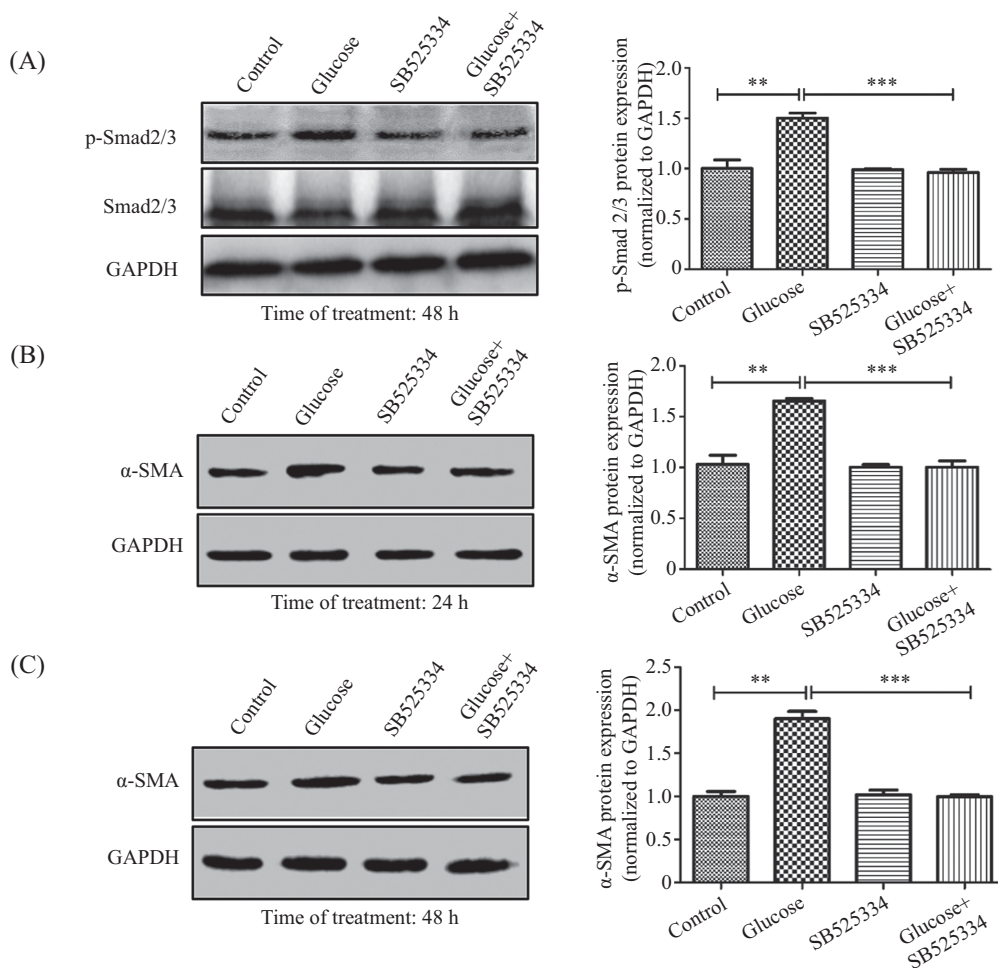
## 2.2 高糖对Smad2/3信号通路介导BJ细胞转分化的影响

在多种成纤维细胞的转分化过程中, TGF- $\beta$ 1/Smad2/3信号通路都起到至关重要的作用。因此我们推测, 在高糖诱导的BJ细胞向成肌纤维细胞转分化的过程中, 该信号通路也参与了相关的调控作用。为了验证我们的推测, 首先我们检测了高糖刺激对p-Smad2/3水平的影响。结果显示, 高糖处理增加了BJ细胞中p-Smad2/3水平; 在高糖刺激的基础上, 用TGF $\beta$  RI抑制剂SB525334(10  $\mu$ mol/L)预处理30 min, 发现p-Smad2/3水平明显降低(图2A)。为进一步验证高糖诱导的BJ细胞的转分化是否与TGF- $\beta$ 1/Smad2/3信号通路有关, 我们将实验分为4组: 对照组、高糖处理组、SB525334处理组和高糖+SB525334处理组。

分别处理24 h和48 h后, 提取各组细胞蛋白质, 检测 $\alpha$ -SMA蛋白质水平。结果发现, 高糖处理组和对照组相比 $\alpha$ -SMA水平明显增加, 但是高糖+ SB525334处理组与高糖处理组相比 $\alpha$ -SMA水平出现了明显的降低(图2B和图2C)。此结果说明, 高糖诱导的BJ细胞转分化依赖于TGF- $\beta$ 1/Smad2/3信号通路的活化。

## 2.3 SB525334对高糖诱导的BJ细胞中胶原I水平的影响

在成纤维细胞转分化为成肌纤维细胞后, 其分泌细胞外基质的能力大大增强。因此, 我们也在高糖诱导BJ细胞转分化后, 对细胞中胶原I水平进行检测。结果显示, 在高糖刺激48 h后, 与对照组相比, 胶原I水平明显增加; 在加入SB525334预处理后, 胶原I水平呈降低的趋势(图3)。此结果说明, SB525334



A: Western blot检测p-Smad2/3水平; B: Western blot检测高糖处理24 h的 $\alpha$ -SMA水平; C: Western blot检测高糖处理48 h的 $\alpha$ -SMA水平; \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001。

A: the levels of p-Smad2/3 protein were detected by Western blot; B: the levels of  $\alpha$ -SMA protein were detected by Western blot after high glucose treatment for 24 h; C: the levels of  $\alpha$ -SMA protein were detected by Western blot after high glucose treatment for 48 h; \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001.

图2 SB525334预处理对高糖诱导的BJ细胞转分化的影响

Fig.2 Effect of SB525334 pretreatment on high glucose-induced BJ cells transdifferentiation

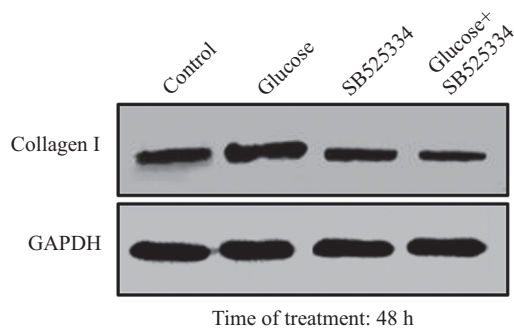
抑制了高糖诱导的胶原I水平的增加。

### 2.4 高糖通过TGF-β1/Smad2/3信号通路诱导BJ细胞的增殖

为研究高糖处理对BJ细胞增殖的影响及其作用机制, 我们采用EdU细胞增殖试剂盒进行测定。将BJ细胞接种于48孔板中, 分为对照组、高糖处理组、SB525334处理组和高糖+SB525334处理组。处理48 h后, 对细胞的增殖情况进行检测。结果显示, 高糖通过TGF-β1/Smad2/3信号通路促进了细胞的增殖(图4)。

### 2.5 沉默内源性TGF-β1对BJ细胞转分化的影响

为进一步证实TGF-β1/Smad2/3信号通路在高糖诱导的BJ细胞转分化过程中的作用, 我们用siRNA对细胞内源性TGF-β1进行沉默。首先对siTGF-β1的沉默效率进行检测, 分为2组: siNC组和siTGF-β1组。用Lipo 2000对BJ细胞进行siRNA的转染, 转染48 h后, 提取细胞RNA和蛋白质, 检测TGF-β1的表达水平。结果显示, siTGF-β1组与siNC组相比, TGF-β1的mRNA水平下降约80%(图5A), 其蛋白质水平也出现明显降低(图5B), 说明siTGF-β1有较



\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

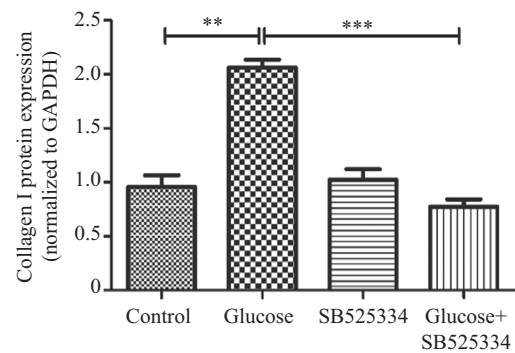
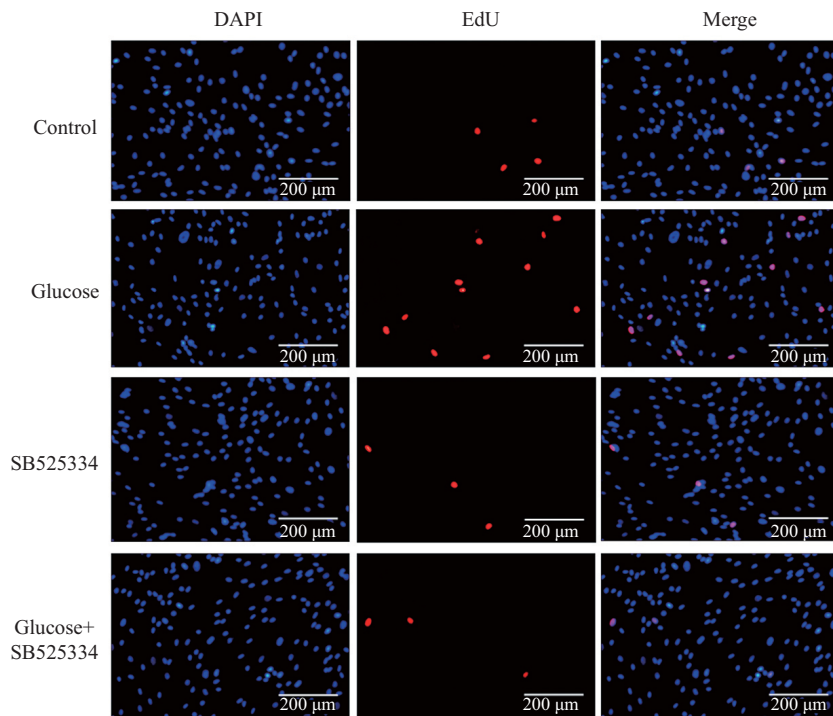


图3 高糖处理对胶原I水平的影响

Fig.3 Effect of high glucose on the level of collagen I



\* $P < 0.05$ .

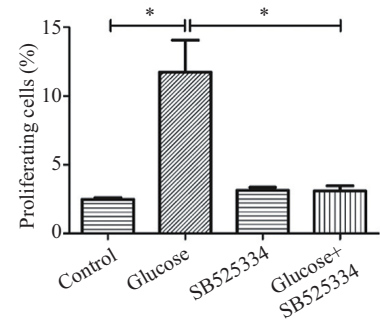
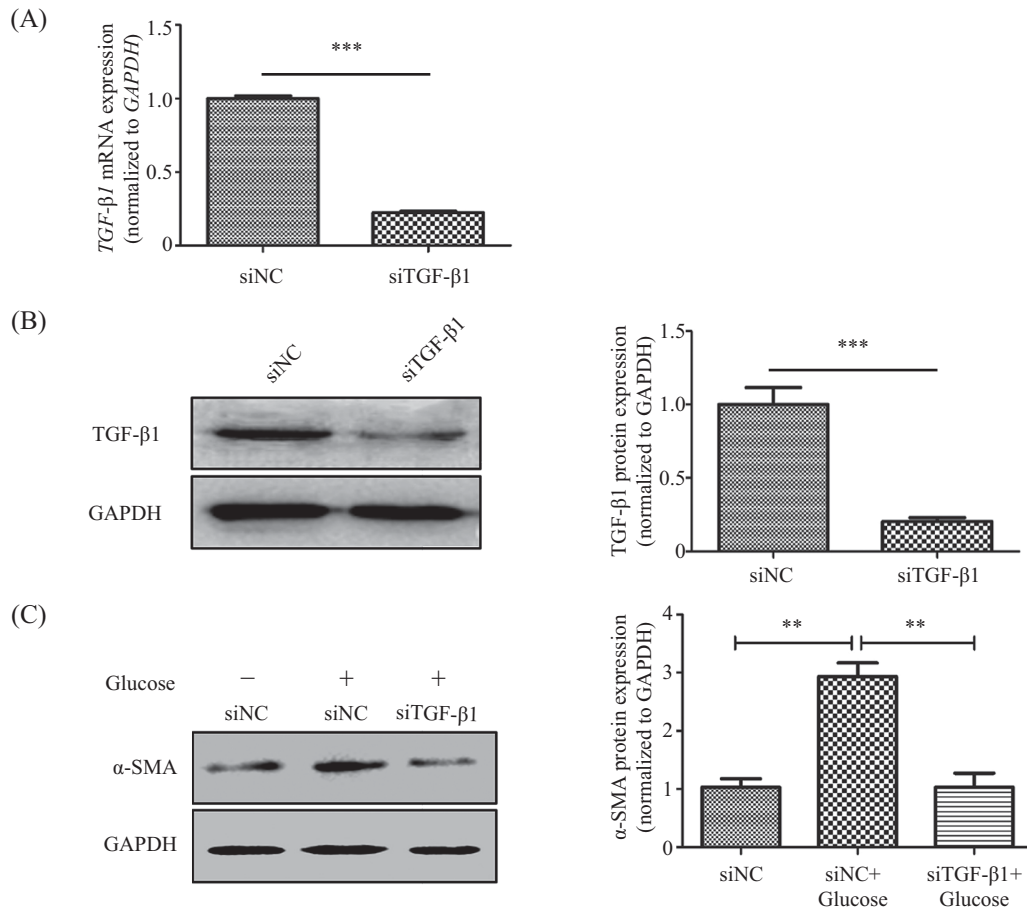


图4 高糖对BJ细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of high glucose on the BJ cells proliferation



A: qRT-PCR检测*TGF-β1* mRNA水平; B: Western blot检测TGF-β1蛋白质水平; C: 转染48 h后, Western blot检测α-SMA蛋白质水平; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: the levels of *TGF-β1* mRNA were detected by qRT-PCR; B: transfected for 48 h, the levels of TGF-β1 protein were detected by Western blot; C: after glucose treated for 48 h, the levels of α-SMA protein were detected by Western blot; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图5 内源性*TGF-β1*沉默对BJ细胞转分化的影响

Fig.5 Effect of endogenous *TGF-β1* silencing on BJ cells transdifferentiation

好的沉默效果,可以用于后续实验。

为验证细胞内源性的TGF-β1沉默是否影响高糖诱导的BJ细胞转分化过程,我们将实验分为3组: siNC组、siNC+高糖处理组和siTGF-β1+高糖处理组。处理48 h后,检测α-SMA蛋白质水平。结果显示,与siNC组相比,siNC+高糖组α-SMA的表达有明显的上升,但是siTGF-β1+高糖处理组与siNC+高糖处理组相比,α-SMA水平有明显的降低(图5C)。即沉默细胞内源性的*TGF-β1*抑制了高糖诱导的BJ细胞向成肌纤维细胞的转分化。

## 2.6 MSC-Exo对高糖诱导的BJ细胞转分化的影响

以上实验结果表明,高糖通过TGF-β1/Smad2/3信号通路诱导BJ细胞的转分化,我们进一步研究MSC-Exo是否可以抑制高糖诱导的BJ细胞转分化过程。首先,用流式细胞术(图6A)和Western blot(图6B)检测CD63水平,对MSC-Exo进行鉴定。将BJ

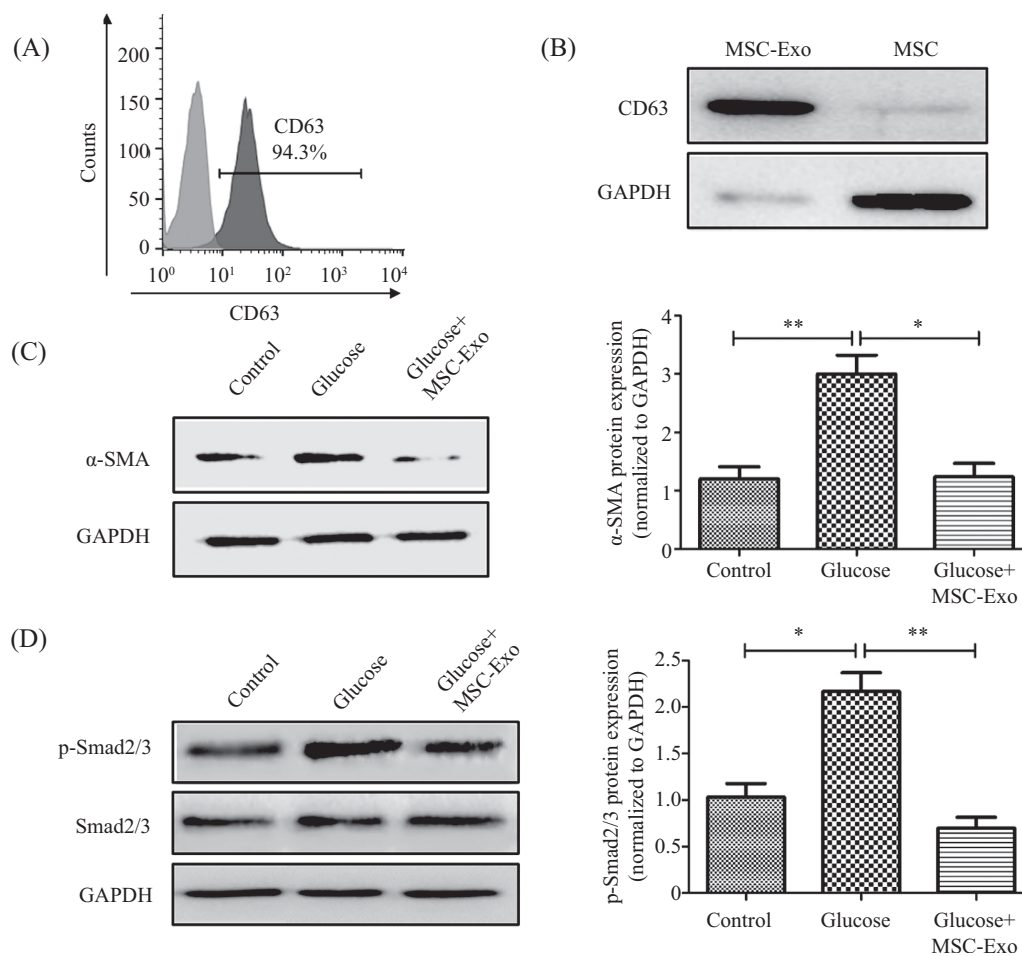
细胞分为3组:对照组、高糖处理组和高糖+MSC-Exo(200 μg/mL)处理组。结果显示,高糖+MSC-Exo处理组与高糖处理组相比,α-SMA水平(图6C)和Smad2/3(图6D)的磷酸化水平都有明显的下降。此结果提示,MSC-Exo通过Smad2/3信号通路抑制高糖诱导的成纤维细胞向成肌纤维细胞的转分化。

## 2.7 高糖处理对培养液中TNF-α含量的影响

TNF-α是一种重要的炎症因子,在各种组织的纤维化过程中发挥着重要作用。然而,TNF-α在高糖诱导的BJ细胞转分化中的作用尚未见报道。用TNF-α ELISA试剂盒检测高糖处理的BJ细胞培养液中TNF-α的含量,发现高糖处理并没有改变TNF-α含量(图7),即高糖处理并没有诱导TNF-α表达的增加。

## 3 讨论

本研究发现,高糖通过TGF-β1/Smad2/3信号通



A: 用流式细胞术检测CD63水平; B: Western blot检测CD63水平; C: 转染48 h后, Western blot检测α-SMA水平; D: Western blot检测p-Smad2/3水平; \**P*<0.05, \*\**P*<0.01。

A: the level of CD63 was detected by flowcytometry; B: CD63 level was detected by Western blot; C: the levels of α-SMA protein were detected by Western blot, transfected for 48 h; D: the levels of p-Smad2/3 were detected by Western blot; \**P*<0.05, \*\**P*<0.01.

图6 MSC-Exo对高糖诱导的BJ细胞转分化的影响

Fig.6 Effect of MSC-Exo on high glucose-induced BJ cells transdifferentiation

路诱导BJ细胞向成肌纤维细胞的转分化, MSC-Exo通过抑制Smad2/3的磷酸化, 阻碍了高糖诱导的BJ细胞的转分化。同时还发现, 高糖能够通过TGF-β1/Smad2/3信号促进BJ细胞增殖, 加速纤维化进程。心脏纤维化是一种严重的糖尿病并发症<sup>[18]</sup>。纤维化的进程开始于成纤维细胞的转分化以及后续的细胞外基质(如胶原I)的大量集聚<sup>[11]</sup>。本研究发现, 高糖能够诱导BJ细胞的转分化, 增加胶原I水平。

已有研究证明, TGF-β1能够在体外诱导成纤维细胞转分化为成肌纤维细胞<sup>[19-21]</sup>, 而且细胞外基质(如胶原I等)也会因TGF-β1/Smad2/3信号通路的活化而上调<sup>[22]</sup>。近期的一项研究表明, miR-9通过下调TGFβ RII来抑制高糖诱导的人心脏成纤维细胞系的转分化以及胶原沉积<sup>[23]</sup>。此外, 也有研究发现, neferine通过抑制TGF-β1信号通路的活化, 进而抑制

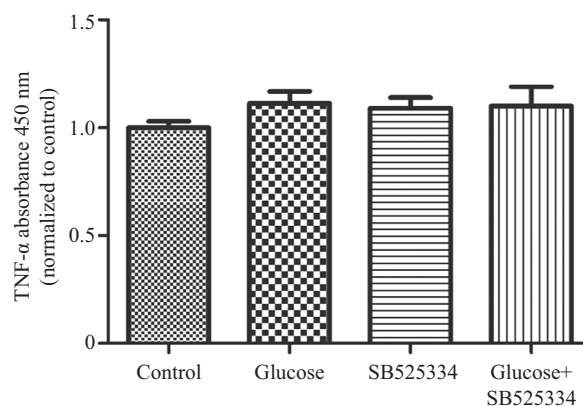


图7 高糖处理对培养液中TNF-α含量的影响

Fig.7 Effect of high glucose on the TNF-α content in media

了高糖诱导的成纤维细胞的转分化<sup>[24]</sup>。这些研究均证明, 在成纤维细胞的转分化过程中, TGF-β1信号通路均起着关键性的作用。同样, 本文结果也证实,

高糖通过TGF- $\beta$ 1/Smad2/3信号通路诱导成纤维细胞的转分化,这一结果同先前报道的研究结果一致。

研究表明,不同来源的MSC在心血管疾病的动物模型中均具有心肌再生的作用。许多研究成果已经应用于I期和II期临床试验<sup>[25]</sup>,用来治疗下肢缺血、心力衰竭以及急性心肌梗死。目前, MSC治疗的有效性越来越多地被认为是由于细胞的旁分泌作用而不是细胞的分化作用<sup>[26]</sup>。近来的几项研究发现, MSC治疗的有效性基于其形成的外泌体<sup>[27-28]</sup>。相对于细胞治疗来说,外泌体治疗具有较低的免疫排斥率,更适用于异体移植。Li等<sup>[29]</sup>的研究表明,人脐带间充质干细胞来源的外泌体能够减缓肝脏的纤维化。心肌梗死能导致大量心肌细胞死亡,并伴随着心脏纤维化的形成。Zhao等<sup>[30]</sup>的研究表明,人脐带间充质干细胞来源的外泌体能够减轻急性心肌梗死损伤,揭示外泌体对于治疗心脏纤维化起着一定的作用。最近有报道显示,从小鼠尾静脉注射外泌体能够缓解阿霉素诱导的心肌病,该研究为外泌体治疗心脏纤维化提供了理论依据。我们可以预测,在不久的将来,外泌体像其他药物一样可经静脉注射给药。外泌体分离方法简单,可以冻存,必要时可以重复注射以增强疗效,更重要的是,由于外泌体体积小,很容易通过循环系统到达心脏而发挥作用,这是细胞治疗无法相比的<sup>[31]</sup>。本实验室去年的研究结果表明,注射MSC-Exo至大鼠的心肌梗死区域,能够明显改善心脏功能,减少心脏的纤维面积<sup>[17]</sup>。本研究证实, MSC-Exo能够通过TGF- $\beta$ 1/Smad2/3信号通路抑制高糖诱导的成纤维细胞的转分化,进而抑制纤维化的进程。

血管紧张素II是一种重要的细胞因子,加速高血压导致的心脏纤维化<sup>[32]</sup>。Davis等<sup>[33]</sup>研究证明,血管紧张素II通过促进TGF- $\beta$ 1的表达或者直接活化MAPK-SRF(mitogen-activated protein kinase-serum response factor)信号通路,诱导了高血压心脏纤维化。在高血压心脏纤维化中, TNF- $\alpha$ 是一个重要的炎症因子。血管紧张素II使心肌细胞转分化为成纤维细胞需要TNF- $\alpha$ 的参与,并且TNF- $\alpha$ 受体敲除的小鼠能够抵抗血管紧张素II诱导的心脏纤维化<sup>[34]</sup>。但是, TNF- $\alpha$ 是否能够促进成纤维细胞转分化为成肌纤维细胞目前尚不明确。我们的研究表明,高糖刺激并没有改变TNF- $\alpha$ 的表达,提示TNF- $\alpha$ 可能没有参与糖尿病导致的心脏纤维化。

综上所述,本研究首次发现了MSC-Exo通过Smad2/3信号通路抑制高糖诱导的成纤维细胞的转分化,为临床治疗糖尿病心肌病提供了新的治疗策略。鉴于外泌体具有较低的免疫排斥性,对于临床治疗将会有很好的应用前景。

### 参考文献 (References)

- Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 94(3): 311-21.
- Russo I, Frangogiannis NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 90: 84-93.
- Huynh K, Kiriazis H, Du XJ, Love JE, Jandeleit-Dahm KA, Forbes JM, *et al.* Coenzyme Q10 attenuates diastolic dysfunction, cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis in the db/db mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2012; 55(5): 1544-53.
- Li J, Zhu H, Shen E, Wan L, Arnold JM, Peng T. Deficiency of rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetes* 2010; 59(8): 2033-42.
- Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 568-75.
- Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, *et al.* Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21(1): 103-13.
- Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab* 2000; 71(1/2): 418-35.
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 2): 217-24.
- Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261(9): 4337-45.
- Rifkin DB, Mazziere R, Munger JS, Noguera I, Sung J. Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 1999; 107(1): 80-5.
- Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, *et al.* Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation* 2007; 116(19): 2127-38.
- Zhao M, Zheng S, Yang J, Wu Y, Ren Y, Kong X, *et al.* Suppression of TGF-beta1/Smad signaling pathway by sesamin contributes to the attenuation of myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One* 2015; 10(3): e0121312.
- Cervio E, Barile L, Moccetti T, Vassalli G. Exosomes for intramyocardial intercellular communication. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 482171.
- Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Perez Lanzon M, Zini N, *et al.* Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive

- miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6: 127.
- 15 Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, *et al.* Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res* 2010; 51(8): 2105-20.
- 16 They C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(8): 581-93.
- 17 Shao L, Zhang Y, Lan B, Wang J, Zhang Z, Zhang L, *et al.* MiRNA-sequence indicates that mesenchymal stem cells and exosomes have similar mechanism to enhance cardiac repair. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 4150705.
- 18 Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia* 2014; 57(4): 660-71.
- 19 Luo F, Zhuang Y, Sides MD, Sanchez CG, Shan B, White ES, *et al.* Arsenic trioxide inhibits transforming growth factor-beta1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation *in vitro* and bleomycin induced lung fibrosis *in vivo*. *Reso Res* 2014; 15: 51.
- 20 Luo YH, Ouyang PB, Tian J, Guo XJ, Duan XC. Rosiglitazone inhibits TGF-beta 1 induced activation of human Tenon fibroblasts via p38 signal pathway. *PloS one* 2014; 9(8): e105796.
- 21 Yi X, Li X, Zhou Y, Ren S, Wan W, Feng G, *et al.* Hepatocyte growth factor regulates the TGF-beta1-induced proliferation, differentiation and secretory function of cardiac fibroblasts. *Int J Mol Med* 2014; 34(2): 381-90.
- 22 Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 2001; 276(20): 17058-62.
- 23 Li J, Dai Y, Su Z, Wei G. MicroRNA-9 inhibits high glucose-induced proliferation, differentiation and collagen accumulation of cardiac fibroblasts by down-regulation of TGFBR2. *Biosci Rep* 2016; 36(6): e00417.
- 24 Liu X, Song X, Lu J, Chen X, Liang E, Zhang M, *et al.* Neferine inhibits proliferation and collagen synthesis induced by high glucose in cardiac fibroblasts and reduces cardiac fibrosis in diabetic mice. *Oncotarget* 2016; 7(38): 61703-15.
- 25 Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, *et al.* Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94(1): 92-5.
- 26 Tsao CR, Liao MF, Wang MH, Cheng CM, Chen CH. Mesenchymal stem cell derived exosomes: A new hope for the treatment of cardiovascular disease? *Acta Cardiol Sin* 2014; 30(5): 395-400.
- 27 Akyurekli C, Le Y, Richardson RB, Fergusson D, Tay J, Allan DS. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev* 2015; 11(1): 150-60.
- 28 Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci* 2014; 15(3): 4142-57.
- 29 Li T, Yan Y, Wang B, Qian H, Zhang X, Shen L, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cell Rev* 2013; 22(6): 845-54.
- 30 Zhao Y, Sun X, Cao W, Ma J, Sun L, Qian H, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells relieve acute myocardial ischemic injury. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 761643.
- 31 Vandergriff AC, de Andrade JB, Tang J, Hensley MT, Piedrahita JA, Caranasos TG, *et al.* Intravenous cardiac stem cell-derived exosomes ameliorate cardiac dysfunction in doxorubicin induced dilated cardiomyopathy. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 960926.
- 32 Leask A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 2007; 74(2): 207-12.
- 33 Zymek P, Nah DY, Bujak M, Ren G, Koerting A, Leucker T, *et al.* Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling. *Cardiovasc Res* 2007; 74(2): 313-22.
- 34 Duerrschmid C, Crawford JR, Reineke E, Taffet GE, Trial J, Entman ML, *et al.* TNF receptor 1 signaling is critically involved in mediating angiotensin-II-induced cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 57: 59-67.