

尘肺患者外周血胸腺细胞分化抗原-1 DNA 甲基化的改变及意义

王宇欣, 周慈, 王和静, 王凯, 张娜, 车双双, 刘科良, 蔺文轩, 李思睿, 刘志宏

宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 宁夏 银川 750004

摘要:

[目的] 尘肺是严重影响我国职业人群健康的一种发病率较高的职业病。通过检测尘肺患者外周血胸腺细胞分化抗原-1 (*Thy-1*) DNA 甲基化水平, 旨在探讨其与尘肺发病的关系。

[方法] 对 84 例确诊为尘肺病的男性患者以及具有相同接尘史且同地点工作的 75 例健康男性工人进行调查。尘肺患者分为煤工尘肺组 (40 人) 和矽肺组 (44 人), 健康工人作为对照组。在知情同意的情况下收集血液样本进行研究。采用 ELISA 法检测人胶原蛋白 I (COL-I)、胶原蛋白 III (COL-III)、Smad 蛋白 2/3 (Smad2/3)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 蛋白的表达, qRT-PCR 法检测 DNA 甲基转移酶 1 (*DNMT1*)、DNA 甲基转移酶 3A (*DNMT3A*)、DNA 甲基转移酶 3B (*DNMT3B*) 及甲基结合蛋白-2 (*MeCP2*) 基因 mRNA 的表达, 巢式降落式甲基化特异性 PCR 法检测 *Thy-1* DNA 甲基化水平。

[结果] 矽肺组工人 COL-I、COL-III 蛋白表达水平高于煤工尘肺组和对照组 ($P < 0.05$), 后两者间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。矽肺组工人 Smad2/3、TGF- β 1、TNF- α , 煤工尘肺组工人 TGF- β 1、TNF- α 蛋白表达水平均较对照组提高 ($P < 0.05$), 且矽肺组 Smad2/3、TGF- β 1 蛋白表达水平也高于煤工尘肺组 ($P < 0.05$)。甲基转移酶中: *DNMT1*、*DNMT3A* 基因 mRNA 表达水平 3 组间未呈现差异 ($P > 0.05$), 但煤工尘肺组、矽肺组 *DNMT3B* 基因 mRNA 表达较对照组升高 ($P < 0.05$)。矽肺组 *MeCP2* 基因的 mRNA 表达也较对照组升高 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 煤工尘肺组、矽肺组工人 *Thy-1* DNA 甲基化水平均升高 ($P < 0.05$)。 *Thy-1* DNA 甲基化水平与 TGF- β 1、Smad2/3、TNF- α 蛋白表达呈正相关关系 ($r = 0.25$ 、 0.17 、 0.31 , 均 $P < 0.05$)。

[结论] 基于尘肺患者 *Thy-1* DNA 甲基化的表达检测, 本研究认为 *Thy-1* DNA 甲基化水平发生变化, 可能是调控尘肺病发展进程中表观遗传学机制之一。

关键词: 尘肺; 胸腺细胞分化抗原-1; DNA 甲基化; 肺纤维化

Change and significance of thymocyte differentiation antigen-1 DNA methylation in peripheral blood of patients with pneumoconiosis WANG Yu-xin, ZHOU Ci, WANG He-jing, WANG Kai, ZHANG Na, CHE Shuang-shuang, LIU Ke-liang, LIN Wen-xuan, LI Si-rui, LIU Zhi-hong (School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia, 750004, China)

Abstract:

[Objective] Pneumoconiosis seriously affects the occupational health of Chinese occupational population with a high incidence rate. By detecting the DNA methylation level of peripheral blood thymocyte differentiation antigen 1 (*Thy-1*) in pneumoconiosis patients, this study explores its relationship with pneumoconiosis.

[Methods] Male patients diagnosed with pneumoconiosis were selected as a coal worker's pneumoconiosis group (40 cases) and a silicosis group (44 cases), and another 75 healthy male coal miners working in the same place with similar dust exposure history were selected as the control group. The protein expressions of collagen I (COL-I), collagen III (COL-III), Smad2/3, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), tumor necrosis factor α (TNF- α) were detected by ELISA; the mRNA expressions of DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*), DNA methyltransferase 3A (*DNMT3A*), DNA methyltransferase 3B (*DNMT3B*), and methyl CpG binding protein 2 (*MeCP2*) were detected by qRT-PCR; the methylation level of *Thy-1* was detected by nested methylation specific PCR (nM-PCR).

[Results] The expression levels of COL-I and COL-III protein in the silicosis group were higher than those in the coal workers' pneumoconiosis group and the control group ($P < 0.05$), but the protein

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18378

基金项目

宁夏高等教育科学研究项目 (NGY2015086)

作者简介

王宇欣 (1993—), 女, 硕士生;
E-mail: wyx_kikyo@163.com

通信作者

刘志宏, E-mail: jwclzh@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-06-04

录用日期 2018-12-06

文章编号 2095-9982(2019)03-0242-06

中图分类号 R135.2

文献标志码 A

►引用

王宇欣, 周慈, 王和静, 等. 尘肺患者外周血胸腺细胞分化抗原-1 DNA 甲基化的改变及意义 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (3): 242-247.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18378

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIU Zhi-hong, E-mail: jwclzh@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2018-06-04

Accepted 2018-12-06

►To cite

WANG Yu-xin, ZHOU Ci, WANG He-jing, et al. Change and significance of thymocyte differentiation antigen-1 DNA methylation in peripheral blood of patients with pneumoconiosis [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(3): 242-247.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18378

expression levels were not different between the coal workers' pneumoconiosis group and the control group ($P > 0.05$). The silicosis group showed higher levels of Smad2/3, TGF- β 1, and TNF- α and the coal workers' pneumoconiosis group showed higher levels of TGF- β 1 and TNF- α than the control group ($P < 0.05$); the silicosis group also showed higher levels of Smad2/3 and TGF- β 1 than the coal workers' pneumoconiosis group ($P < 0.05$). No differences in the mRNA expression levels of *DNMT1* and *DNMT3A* were found among the three groups ($P > 0.05$), but the *DNMT3A* mRNA expression levels were higher in the coal workers' pneumoconiosis group and the silicosis group than in the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the silicosis group showed a higher *MeCP2* mRNA expression level ($P < 0.05$), and both the coal workers' pneumoconiosis group and the silicosis group showed a higher level of *Thy-1* methylation level ($P < 0.05$). *Thy-1* methylation level was positively correlated with TGF- β 1, Smad2/3, and TNF- α protein expression levels ($r = 0.25, 0.17$, and 0.31 , respectively, $P < 0.05$).

[Conclusion] Altered *Thy-1* DNA methylation level in peripheral blood of patients with pneumoconiosis might be an important epigenetic mechanism during the development of pneumoconiosis.

Keywords: pneumoconiosis; thymocyte differentiation antigen 1; DNA methylation; pulmonary fibrosis

尘肺是由职业性吸入粉尘引起的一种进展性、不可逆性的肺部疾病。在我国，尘肺病是发病率最高且最常见的职业健康问题^[1]。肺纤维化是在某些细胞因子以及生物活性物质的作用下，巨噬细胞与淋巴细胞聚集并大量分泌促炎、促纤维化细胞因子及趋化因子引起的胶原代谢紊乱、细胞外基质产生过多所导致的一大类肺部疾病的终末期改变。以胶原蛋白 I (collagen I, COL-I) 和胶原蛋白 III (collagen III, COL-III) 为主的胶原蛋白过度表达是肺纤维化的标志之一，在此过程中，胶原生成与降解的稳态失衡。

在哺乳动物中，转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 已被证实是引起纤维化最重要的细胞因子^[2]。Smad 蛋白 (drosophila mothers against decapentaplegic protein 2/3, Samd2/3) 是一类参与细胞内 TGF- β 1 信号传导的重要信号蛋白。由两者形成的信号传导途径激活促纤维化因子并影响肺成纤维细胞的发育^[3]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 被广泛认为是一种促炎细胞因子，其过表达可引起小鼠的肺气肿及肺纤维化^[4]。最近的研究表明，DNA 甲基化可以促进成纤维细胞活化/分化，从而影响成纤维细胞的表型，促进器官纤维化的发生和进展^[5]。胸腺细胞分化抗原-1 (thymocyte differentiation antigen 1, Thy-1)，又称 CD90，是一种糖磷脂酰肌醇锚定蛋白，它在诸如间充质干细胞和成纤维细胞的表面上表达^[6]。可能与细胞凋亡、黏附、转移、炎症、肌成纤维细胞分化等有关^[7]。研究发现在正常人肺组织中，Thy-1 可以表达于成纤维细胞中，且通过表观遗传调控可导致肺纤维化成纤维细胞中 Thy-1 表达减少^[8]。

本研究从表观遗传学角度，初步探求尘肺人群中 *Thy-1* DNA 甲基化的变化特征，以期对尘肺病的治疗

提供依据。

1 对象与方法

1.1 对象

选取由宁夏石嘴山市某职业病防治所尘肺诊断组根据 GBZ 70—2009《尘肺病诊断标准》确诊的 84 例男性尘肺病患者作为研究对象，年龄为 (48.30 ± 5.05) 岁，其中煤工尘肺 40 例，矽肺 44 例。选择具有相同接尘史且同地点工作的 75 例健康男性工人作为对照组，年龄为 (43.80 ± 6.63) 岁。研究对象纳入标准：无呼吸系统相关疾病（如肺炎、肺癌、支气管哮喘、活动性肺结核等）、自发性气胸、呼吸衰竭、严重的心肺疾病，无其他器官纤维化及免疫系统疾病。所有纳入的研究对象均填写知情同意书，本研究通过宁夏医科大学伦理审查委员会批准（宁医大伦理第 2018-235 号）。

1.2 仪器和试剂

普通聚合酶链式反应仪、电泳仪、凝胶成像仪（美国 Bio-Rad），FTC-3000 实时荧光定量扩增仪（加拿大 Funglyn Biotech），Epoch 酶联免疫分析仪（美国 BioTek）。Genomic DNA 提取试剂盒、总 RNA 提取试剂盒（中国天根生化科技有限公司），DNA 甲基化修饰试剂盒（美国 Zymo Epigentek），引物合成（中国上海生工生物工程股份有限公司），逆转录试剂盒（美国 Thermo），荧光 Mix 试剂盒（德国 DBI），酶联免疫吸附测定（Enzyme-linked Immunoassay, ELISA）试剂盒（上海宝曼生物有限公司）。

1.3 方法

1.3.1 血样采集 使用肝素锂抗凝真空采血管收集每个受试者 2 管周围静脉血 3 mL：1 管储存在 -20°C 的冰箱中；另 1 管在室温下静置 4 h，以 $1007.1 \times g$ 离心 10 min，分离血清并储存在 -80°C 的冰箱中。

1.3.2 ELISA 法检测人 COL-I、COL-III、Smad 蛋白及 TGF- β 1、TNF- α 的表达 取研究对象血清, 1007.1 $\times$ g 离心 10 min, ELISA 试剂盒室温平衡 30 min 后, 依照试剂盒进行操作, 应用酶标分析仪, 在 450 nm 波长测定各孔光密度 (D) 值, 按曲线方程计算样本浓度。

1.3.3 qRT-PCR 法检测 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 1、DNMT3A、DNMT3B 及甲基结合蛋白-2 (methyl CpG binding protein 2, MeCP2) 基因 mRNA 表达 根据总 RNA 提取试剂盒说明, 从研究对象中提取总 RNA; 依照逆转录试剂盒说明, 将总 RNA 逆转录为 cDNA。PCR 反应体系: 模板 cDNA 2 μ L, 正向引物 0.8 μ L, 反向引物 0.8 μ L, 去核酸酶水 6.4 μ L, Bestar SybrGreen qPCR Master Mix 10 μ L, 总体积 20 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C、5 min; 95 $^{\circ}$ C、10 s, 56 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 共 45 个循环。目的基因表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 式中 Ct 是每个反应管内的荧光信号到达设定域值时所经历的循环数, $\Delta\Delta Ct = [(Ct_{\text{实验目的}} - Ct_{\text{实验内参}}) - (Ct_{\text{对照目的}} - Ct_{\text{对照内参}})]$ 。引物见表 1。

1.3.4 巢式降落式甲基化特异性 PCR 法检测 Thy-1 DNA 甲基化状态 根据基因组 DNA 提取试剂盒, 提取研究对象的全基因组 DNA, 并根据 DNA 甲基化修饰试剂盒的说明修饰研究对象的 DNA。修饰条件: 98 $^{\circ}$ C、10 min, 64 $^{\circ}$ C、2.5 h。DNA 修饰后, 进行外引物扩增。扩增体系: DNA 修饰产物 3 μ L, 外引物正向 1 μ L, 外引物反向 1 μ L, 2 $\times$ Power Tap PCR Master Mix 12.5 μ L, 去核酸酶水 7.5 μ L, 总体积 25 μ L; 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C、5 min; 95 $^{\circ}$ C、30 s, 63.8 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 共 20 个循环, 每个循环降 0.5 $^{\circ}$ C 至 54 $^{\circ}$ C; 72 $^{\circ}$ C、7 min。以外引物的 PCR 产物为模板进行甲基化与非甲基化引物扩增, 反应体系同外产物扩增, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C、5 min; 95 $^{\circ}$ C、30 s, 65 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 共 20 个循环, 每个循环降 0.5 $^{\circ}$ C 至 56 $^{\circ}$ C; 72 $^{\circ}$ C、7 min。制备质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶, 取 PCR 产物 5 μ L, 110 V, 电泳 18 min, 用凝胶成像仪曝光图像及分析电泳条带的 D 值。甲基化水平按公式计算: 甲基化比值 = 甲基化 D 值 / (甲基化 D 值 + 非甲基化 D 值)。引物见表 1。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料统计描述以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数及第 25、75 百分位数 $M (P_{25}, P_{75})$ 表示; 两样本间均数比较采用协方差分析或非参数检验: LSD- t 方法用于组间比较, 相关分析采用 Spearman 等级相关。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

表 1 基因引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
外引物	正向: GGGGTTTAGAAGGGATTTC	
	反向: ATAACATTCCAATCCACCTCTATTC	263
Thy-1 甲基化引物	正向: GTTGGGTCGGTAGAGTTATATTC	
	反向: TCCTCCACGTAATTCTCTATATATCG	146
Thy-1 非甲基化引物	正向: GTTGGGTTGGTAGAGTTATATTC	
	反向: TTCTCCACATAATTCTCTATATATCA	148
DNMT1	正向: GGAGGGCTACCTGGCTAAAG	
	反向: TACGGGCTTCACTTCTTGCT	131
DNMT3A	正向: AGCCCAAGGTCAAGGAGATT	
	反向: CTCCACAGGAGATGCAGAT	106
DNMT3B	正向: CAGCCACCTCTGACTACTGC	
	反向: TTCCTGCCACAAGACAAACA	163
MeCP2	正向: CACGATTCCTGCTTTGATG	
	反向: TTCTTCCCTGAGCCCTAACA	156

2 结果

2.1 COL-I、COL-III 蛋白表达水平

调查结果显示, 矽肺组工人 COL-I、COL-III 蛋白表达水平高于对照组及煤工尘肺组 (均 $P<0.05$), 后两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 不同组作业工人 COL-I、COL-III 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	COL-I	COL-III
对照组	75	21.61 $\pm$ 10.81	28.00 $\pm$ 10.74
煤工尘肺组	40	24.12 $\pm$ 9.21	30.49 $\pm$ 12.83
矽肺组	44	30.09 $\pm$ 14.23**	35.15 $\pm$ 5.54**

[注]: * 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与煤工尘肺组比较, $P<0.05$ 。

2.2 Smad2/3、TGF- β 1、TNF- α 蛋白表达水平

矽肺组工人 Smad2/3、TGF- β 1 蛋白表达水平较煤工尘肺组、对照组均升高 ($P<0.05$)。煤工尘肺组 TGF- β 1、TNF- α 蛋白表达水平较对照组也升高 (均 $P<0.05$)。矽肺组工人 TNF- α 蛋白表达水平仅较对照组升高 ($P<0.05$), 而与煤工尘肺组无差异 ($P>0.05$)。见表 3。

表 3 不同组作业工人 Smad2/3、TGF- β 1、TNF- α 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Smad2/3	TGF- β 1	TNF- α
对照组	75	47.29 $\pm$ 8.49	35.24 $\pm$ 20.19	33.70 $\pm$ 20.05
煤工尘肺组	40	52.11 $\pm$ 14.70	99.28 $\pm$ 20.64*	99.63 $\pm$ 16.83*
矽肺组	44	59.87 $\pm$ 10.49**	115.94 $\pm$ 20.58**	107.59 $\pm$ 22.89*

[注]: * 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与煤工尘肺组比较, $P<0.05$ 。

2.3 甲基转移酶 mRNA 表达水平

对甲基转移酶表达变化的分析结果显示: DNMT1、DNMT3A 基因 mRNA 的表达在 3 组间未呈现差异 ($P>0.05$); 矽肺组工人 DNMT3B、MeCP2 与煤工尘肺组工人 DNMT3B 基因 mRNA 的表达高于对照

组 ($P < 0.05$), 该两组 *DNMT3B*、*MeCP2* 基因 mRNA 的表达未呈现差异。见表 4。

表 4 不同组作业工人甲基转移酶 mRNA 表达水平比较
[$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>MeCP2</i>
对照组	75	0.46 (0.22, 0.93)	1.39 (0.79, 1.95)	0.53 (0.36, 0.72)	0.25 (0.13, 0.43)
煤工尘肺组	40	0.83 (0.22, 1.46)	0.97 (0.69, 1.63)	0.62 (0.25, 1.22)*	0.33 (0.19, 0.75)
矽肺组	44	0.46 (0.20, 1.20)	1.14 (0.63, 1.96)	0.97 (0.77, 1.77)*	0.49 (0.23, 0.93)*

[注] *: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

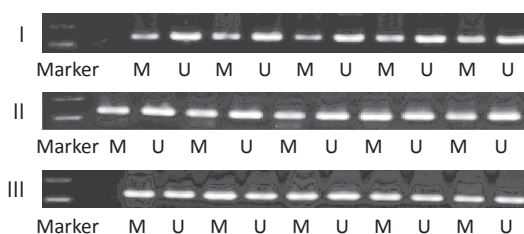
2.4 *Thy-1* DNA 甲基化水平

分析结果显示: 煤工尘肺组及矽肺组工人 *Thy-1* DNA 甲基化水平未呈现差异, 但均高于对照组 (均 $P < 0.05$)。见表 5, 图 1。

表 5 不同组作业工人 *Thy-1* DNA 甲基化水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	<i>Thy-1</i>
对照组	75	0.42±0.06
煤工尘肺组	40	0.47±0.07*
矽肺组	44	0.48±0.08*

[注] *: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。



[注] I: 对照组; II: 煤工尘肺组; III: 矽肺组; M: 甲基化; U: 非甲基化。

图 1 不同个体 *Thy-1* DNA 甲基化电泳图

2.5 *Thy-1* DNA 甲基化与各指标相关性

分析 *Thy-1* DNA 甲基化水平与各指标的相关性, 结果显示: *Thy-1* DNA 甲基化水平与 TGF- β 1、Smad2/3、TNF- α 蛋白表达呈正相关关系 (均 $P < 0.05$), 与 COL-I、COL-III、水平未呈现相关关系 ($P > 0.05$)。见表 6。

表 6 *Thy-1* DNA 甲基化与各指标相关性分析

指标	r	P
COL-I	0.07	0.41
COL-III	0.09	0.33
TGF- β 1	0.25	0.01
Smad2/3	0.17	0.04
TNF- α	0.31	0.01

3 讨论

尘肺是一种进行性肺纤维化疾病, 由职业接触

矿物粉尘和纤维所引起, 其发病率居我国职业病首位^[9]。我国大约有 550 万的煤矿工人^[10], 其中男性是煤矿工作的主要劳动力, 是受尘肺侵害的主要对象, 故本研究的研究对象均为男性患者。肺纤维化是尘肺的一种典型的病理改变, 由于胶原合成和降解之间的不平衡, 导致胶原过度积累, 是一种以炎症组织损害和呼吸功能损害为特征的进行性慢性致死性肺疾病^[11]。研究发现 *Thy-1* 启动子甲基化与肌成纤维细胞表型有关, 且 *Thy-1* 的表达抑制伴随着肌成纤维细胞表达的 α -平滑肌激动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、COL-I 和 COL-III 表达的增加^[12]。本研究显示, 矽肺工人 COL-I、COL-III 的表达水平明显升高, 提示发生了细胞外基质的沉积, 发生了进行性纤维化病变, 且研究数据提示矽肺纤维化程度高于煤工尘肺。

TGF- β 1 是一种在肺损伤过程中产生的促纤维生长因子, 对血管平滑肌细胞、内皮细胞、成纤维细胞的分化、增殖和稳态功能有一定的促进作用。成纤维细胞在 TGF- β 1 的刺激下, 通过细胞骨架、收缩蛋白以及胶原等细胞外基质成分的重新表达, 其基因表达谱发生改变, 使其分化为肌成纤维细胞, 促使胶原过度沉积导致肺纤维化^[13]。大量研究表明, TGF- β 1 直接激活 Smad 信号通路, 触发促纤维化基因的过度表达^[14]。TGF- β 1/Smad 通路调控异常可能是肺纤维化的重要致病机制。

研究证实, 纤维细胞可释放多种细胞因子, 包括白介素-13、TGF- β 、和 TNF- α , 可以促进局部成纤维细胞的增殖、迁移, 胶原沉积, 致使纤维化的形成^[15]。二氧化硅诱导的小鼠肺纤维化中, 巨噬细胞可产生 TNF- α , 持续输注重组 TNF- α 可显著增加胶原沉积, 但抗 TNF- α 抗体可抑制二氧化硅诱导的胶原沉积, 从而调控肺纤维化的进程^[16]。本研究显示煤工尘肺组及矽肺组工人 TGF- β 1、TNF- α 蛋白表达水平均明显升高, 且矽肺组 Smad2/3 蛋白表达水平高于对照组。提示尘肺患者均出现了血清中 TGF- β 1、Smad2/3、TNF- α 蛋白表达升高的现象。

表观遗传学与多种疾病的发生密切相关, 在肺纤维化过程中也发挥重要作用^[17]。DNA 甲基化是一种维持基因组功能和稳定性的最常见的表观遗传标记。通过抑制转录因子与基因启动子的结合, 控制基因的表达; 在多种发育事件中, 如 X 染色体失活和基因组稳定性等方面起重要作用^[18], 被认为是早期诊断干预的理想目标。在活化的成纤维细胞中, *Thy-1* 与整合

素 $\alpha\beta_5$ 的相互作用, 可以抑制 Smad 2/3 和 TGF- β_1 的激活从而介导抗纤维化反应, 且 Thy-1 是调节细胞内信号通路的重要因子, 可在多种细胞上表达, 其在肺成纤维细胞中的差异表达会影响成纤维细胞表型, 影响纤维化进程^[19]。研究证明 TGF- β_1 调节成纤维细胞表型的机制之一是通过 Thy-1 启动子的 DNA 甲基化, 导致 Thy-1 表达降低, 干预肺纤维化疾病的发生和发展^[20]。本研究结果显示, Thy-1 DNA 甲基化水平在煤工尘肺组及矽肺组均呈现升高趋势, DNMT3B 及 MeCP2 mRNA 表达水平也升高, 可能揭示在 DNMT3B 及 MeCP2 的作用下, Thy-1 DNA 发生高甲基化。Thy-1 DNA 甲基化可能在尘肺发生过程中发挥重要作用。

肺肌成纤维细胞 Thy-1 表达下调是促进细胞增殖、分化和胶原沉积的关键^[21]。抑制 Thy-1 表达可促进 α -SMA、COL-I 和 COL-III 的表达^[22]。Thy-1 启动子含有较高频率的 CpG 二核苷酸, 这一区域的甲基化已被证实可控制基因的表达。其已被报道可在肺纤维化患者组织纤维样病灶的成纤维细胞中甲基化, 进而调控肺纤维化的进程^[23]。有研究证明 Thy-1 表面蛋白的丢失能增加潜在的 TGF- β_1 的表达, 但 Thy-1 的激活下调了 α -SMA 表达^[22]。

本研究结果还显示: Thy-1 DNA 甲基化水平与 TGF- β_1 、Smad2/3、TNF- α 蛋白表达呈正相关关系, 说明 TGF- β_1 、Smad2/3、TNF- α 蛋白表达的改变与 Thy-1 DNA 甲基化可能密切相关。有研究发现缺乏 Thy-1 表达的大鼠肺成纤维细胞通过增加 TGF- β_1 活性、Smad 3 磷酸化以及 α -SMA 和纤维连接蛋白的表达而对不同的刺激反应, 而 Thy-1 正常表达的肺成纤维细胞则抵抗刺激。同样, Thy-1 缺乏的小鼠表现出更严重的肺纤维化^[24]。然而, 我们对人肺成纤维细胞的研究很有限。因此, Thy-1 DNA 甲基化具体对尘肺患者肺纤维化发展进程还有待研究。

综上, 本研究讨论了 Thy-1 DNA 甲基化在尘肺纤维化进程中的潜在意义, 了解这一过程中的机制和影响基因可能为今后的治疗提供新的靶点。因本研究样本量相对较少, 且未设立未接尘健康人群作为对照组, 所以本研究仅初步讨论尘肺患者 Thy-1 DNA 甲基化对相关纤维化指标的表达规律。进一步研究 Thy-1 DNA 甲基化调节尘肺患者肺纤维化的分子机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] WANG M F, LI R Z, LI Y, et al. Clinical statistics analysis on the characteristics of pneumoconiosis of Chinese miner population [J]. J Thorac Dis, 2016, 8 (8) : 2203.
- [2] XU L, XIONG S, GUO R, et al. Transforming growth factor β_3 attenuates the development of radiation-induced pulmonary fibrosis in mice by decreasing fibrocyte recruitment and regulating IFN- γ /IL-4 balance [J]. Immunol Lett, 2014, 162 (1) : 27-33.
- [3] 高洁, 刘培庆. 结缔组织生长因子及其在心血管疾病中的作用 [J]. 医学综述, 2006, 12 (20) : 1219-1222.
- [4] LUNDBLAD L K, THOMPSON-FIGUEROA J, LECLAIR T, et al. Tumor necrosis factor- α overexpression in lung disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171 (12) : 1363-1370.
- [5] ZHANG X, HU M, LYU X, et al. DNA methylation regulated gene expression in organ fibrosis [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863 (9) : 2389-2397.
- [6] YOUSEFI-RAD N, SHOKRGOZAR M A, BEHDANI M, et al. Antigenic assessment of a recombinant human CD90 protein expressed in prokaryotic expression system [J]. Protein Expr Purif, 2015, 116 : 139-143.
- [7] REGE T A, HAGOOD J S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis [J]. FASEB J, 2006, 20 (8) : 1045-1054.
- [8] HAGOOD J S, PRABHAKARAN P, KUMBLA P, et al. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. [J]. Am J Pathol, 2005, 167 (2) : 365-379.
- [9] 中华预防医学会劳动卫生与职业病分会职业性肺部疾病学组. 尘肺病治疗中国专家共识 (2018 年版) [J]. 环境与职业医学, 2018, 35 (8) : 677-689.
- [10] CHEN H, FENG Q, LONG R, et al. Focusing on coal miners' occupational disease issues: A comparative analysis between China and the United States [J]. Saf Sci, 2013, 51 (1) : 217-222.
- [11] HUANG R, YU T, LI Y, et al. Upregulated has-miR-4516 as a potential biomarker for early diagnosis of dust-induced pulmonary fibrosis in patients with pneumoconiosis [J]. Toxicol Res, 2018, 7 (3) : 415-422.
- [12] ROBINSON C M, NEARY R, LEVENDALE A, et al. Hypoxia-induced DNA hypermethylation in human pulmonary fibroblasts is associated with Thy-1 promoter methylation and the development of a pro-fibrotic phenotype [J]. Respir Res, 2012, 13 : 74.

- [13] NIGDELIOGLU R, HAMANAKA RB, MELITON AY, et al. Transforming growth factor (TGF)- β promotes de novo serine synthesis for collagen production [J]. J Biol Chem, 2016, 291 (53) : 27239-27251.
- [14] HU HH, CHEN DQ, WANG YN, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis [J]. Chem Biol Int, 2018, 292 : 76-83.
- [15] PILLING D, VAKIL V, COX N, et al. TNF- α -stimulated fibroblasts secrete lumican to promote fibrocyte differentiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112 (38) : 11929-11934.
- [16] PIGUET PF, COLLART MA, GRAU GE, et al. Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis [J]. Nature, 1990, 344 (6263) : 245-247.
- [17] HELLING BA, YANG IV. Epigenetics in lung fibrosis : From pathobiology to treatment perspective [J]. Curr Opin Pulm Med, 2015, 21 (5) : 454-462.
- [18] YE X, ZHANG L, CHEN B, et al. A quantitative method for detecting DNA methylation over targeted genomic regions using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2017, 169 : 136-140.
- [19] SANDERS YY, PARDO A, SELMAN M, et al. Thy-1 promoter hypermethylation : A novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39 (5) : 610-618.
- [20] NEVEU WA, MILLS ST, STAITIEH BS, et al. TGF- β 1 epigenetically modifies Thy-1 expression in primary lung fibroblasts [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2015, 309 (9) : C616-C626.
- [21] KUHN C, MCDONALD JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis [J]. Am J Pathol, 1991, 138 (5) : 1257-1265.
- [22] ZHOU Y, HAGOOD JS, LU B, et al. Thy-1-Integrin $\alpha\beta$ 5 interactions inhibit lung fibroblast contraction-induced latent transforming growth factor- β 1 activation and myofibroblast differentiation [J]. J Biol Chem, 2010, 285 (29) : 22382-22393.
- [23] COHEN PY, BREUER R, WALLACH-DAYAN SB. A profibrotic phenotype in naïve and in fibrotic lung myofibroblasts is governed by modulations in Thy-1 expression and activation [J]. Med Inflam, 2018, 2018 : 4638437.
- [24] TIAN YC, CHEN TC, CHANG CT, et al. Epidermal growth factor and transforming growth factor- β 1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway [J]. Exp Cell Res, 2007, 313 (11) : 2367-2377.

(英文编辑：汪源；编辑：王晓宇；校对：邱丹萍)

· 告知栏 ·

欢迎关注《环境与职业医学》杂志微信公众号

《环境与职业医学》杂志微信公众号已正式上线，该平台包括“读者”“作者”和“我们”三个主菜单，主要提供稿件状态查询、当期最新内容及稿件撰写要求等内容，同时也发布国内外最新研究动态及发展前沿等资讯，满足读者网络时代碎片化阅读的需求。本平台旨在为编者、作者、读者之间搭建一个分享、学习、互动的平台，以此推动《环境与职业医学》杂志的健康发展。

请直接扫描右侧二维码或在公众号中搜索“环境与职业医学”（微信号：JEOM），即可关注本刊微信公众号。

