

速效救心丸干预心脏间充质干细胞分泌的外泌体可降低体外培养的小鼠心肌细胞中 H3K27 去甲基化酶 UTX 的表达水平

Xiao-fen RUAN^{1, 3, #}, Yong-jun LI^{2, 3, #}, Cheng-wei JU^{2, 3}, Yan SHEN³, Wei LEI⁴, Can CHEN⁴, Yang LI³, Hong YU⁵, Yu-tao LIU³, Ilman KIM³, Xiao-long WANG^{1,*}, Neal L WEINTRAUB³, Yao-liang TANG^{3,*}

¹ 上海中医药大学曙光医院心血管内科，上海 201203；

² 东南大学医学院中大医院心内科，南京 210009；

³ 奥古斯塔大学佐治亚医学院，美国乔治亚州奥古斯塔市；

⁴ 广东医科大学心血管病研究室，广东湛江 524023；

⁵ 浙江大学医学院附属第二医院心内科，杭州 310009

翻译：韩晓静（天津中新药业研究中心 药理室）

缩略词表

缩写	释义
UTX	赖氨酸特异性去甲基酶 6A
SJP	速效救心丸
TMP	川芎嗪
BOR	龙脑
C-MSCs/C-MSC	心脏间充质干细胞
CMs/CM	心肌细胞
SJP-Exos	速效救心丸处理的 C-MSC 衍生的外泌体
TMP-Exos	川芎嗪处理的 C-MSC 衍生的外泌体
BOR-Exos	龙脑处理的 C-MSC 衍生的外泌体
HL-1	小鼠细胞系

缩写	释义
H3K27me3	组蛋白 H3 上的 Lys27 的三甲基化
EZH1, EZH2 和 EED	甲基化酶
JMJD3 和 UTX	去甲基化酶
PCNA	内源性细胞复制标志物
ACMs	成年心肌细胞
GATA4	一种早期心脏转录因子
Ctrl-Exos	对照处理的 C-MSC 衍生的外泌体

速效救心丸干预心脏间充质干细胞分泌的外泌体可降低体外培养的小鼠心肌细胞中 H3K27 去甲基化酶 UTX 的表达水平

Xiao-fen RUAN^{1, 3, #}, Yong-jun LI^{2, 3, #}, Cheng-wei JU^{2, 3}, Yan SHEN³, Wei LEI⁴, Can CHEN⁴, Yang LI³, Hong YU⁵, Yu-tao LIU³, Ilman KIM³, Xiao-long WANG^{1,*}, Neal L WEINTRAUB³, Yao-liang TANG^{3,*}

¹ 上海中医药大学曙光医院心血管内科, 上海 201203;

² 东南大学医学院中大医院心内科, 南京 210009;

³ 奥古斯塔大学佐治亚医学院, 美国乔治亚州奥古斯塔市;

⁴ 广东医科大学心血管病研究室, 广东湛江 524023;

⁵ 浙江大学医学院附属第二医院心内科, 杭州 310009

摘要

速效救心丸 (SJP) 是中国治疗急性冠脉综合征的一种传统中药, 主要成分为川芎嗪 (TMP) 和龙脑 (BOR)。然而, 迄今为止, SJP 对心脏微环境有益作用的具体分子机制尚不清楚。心脏间充质干细胞 (C-MSC) 通过释放囊泡 (外泌体) 与心肌细胞 (CM) 通信以恢复心脏内稳态并诱导修复, 部分通过表观遗传调控机制。在这项研究中, 我们检测了 SJP 处理是否改变了 C-MSC 衍生的外泌体 (SJP-Exos), 从而诱导受体心肌细胞中表观遗传染色质重构。从小鼠心脏中分离的 C-MSC 分别用 SJP (SJP-Exos), TMP (TMP-Exos) 或 BOR (BOR-Exos) 进行预处理。然后, 分别用不同来源的外泌体 (C-MSC (Ctrl-Exos), SJP-Exos, TMP-Exos 或 BOR-Exos) 处理小鼠心肌细胞系 HL-1 细胞。在 HL-1 细胞中, 以 SJP-Exos 干预可显著提高组蛋白 3 赖氨酸 27 三甲基化 (H3K27me3) 的蛋白水平, 该蛋白是心脏转录抑制的关键表观遗传染色质标志物。为了进一步探索 SJP-Exo 介导的 H3K27me3 的上调机制, 我们评价了外泌体处理的 HL-1 细胞中关键组蛋白甲基化酶 (EZH1, EZH2 和 EED) 和去甲基酶 (JMJD3 和 UTX) 的 mRNA 表达水平。SJP-Exo 处理能选择性抑制受体 HL-1 细胞中 UTX 的表达。此外, 在 SJP-Exo 处理的 HL-1 细胞中, PCNA (一种内源性细胞复制标志物) 显著高于 Ctrl-Exo (空白对照) 处理的 HL-1 细胞。这些结果表明, SJP-Exos 可以

促进心肌细胞增殖，SJP 可通过调控 C-MSC 衍生的外泌体而诱导受体心肌细胞中的表观遗传染色质重塑。因此，SJP-Exos 可能可以用于促进心肌细胞增殖。

关键词：中药；速效救心丸；川芎嗪；龙脑；心脏间充质干细胞；外泌体；表观遗传调控；H3K27 甲基化酶；H3K27 去甲基化酶；UTX

速效救心丸（SJP）是一种用于治疗急性缺血性心脏病的著名中药。SJP 的两个主要组分是川芎嗪（TMP）和冰片（BOR）^[1-3]。SJP 对氧化应激和血管反应性有显著影响，这些可能改善冠状动脉血流和缓解胸痛。然而，SJP 调控心脏微环境的分子机制尚不清楚。

心脏是末端分化，且增殖能力有限。因此，心肌梗塞后，凋亡心肌细胞主要被瘢痕组织替代；尽管有相应的指导性药物治疗方式，但这仍会导致许多患者出现左心室重构和心力衰竭。介入疗法，如冠状动脉搭桥手术或经皮血运重建，可改善缺血心肌的血液供应，但不能使心肌细胞再生。终末期心力衰竭患者的其他选择包括心脏移植和心室辅助装置，但这些选择受到成本和供体心脏有限的限制。Wang 等^[4]最近的一项研究表明，成熟的成年心肌细胞（ACMs）可以重新进入细胞周期，通过梗死边界区的去分化、增殖和再分化（DPR）过程生成新的心肌细胞。这一新理论为损伤心脏的修复提供了一种有希望的解决方法。

干细胞治疗可以改善心肌梗死动物模型的心功能，临床上可改善患者的缺血性心肌病。干细胞的有益效果，主要与它们产生的旁分泌介质有关，后者作用于邻近的心肌细胞和血管细胞以恢复微环境并促进功能恢复^[5]。心脏间充质干细胞（C-MSCs）是心脏来源的间充质干细胞，表达心脏特异性转录因子 GATA-4^[6]，具有分化成血管平滑肌细胞和内皮细胞的潜能^[6,8]。C-MSCs 在维持心脏稳态和通过旁分泌作用促进心脏修复方面起着关键作用，如诱导血管生成细胞因子^[9,10]。C-MSC 介导的心脏修复部分由外泌体介导，40-100 nm 的囊泡在细胞间信号通讯中发挥关键作用^[11-13]。外泌体对细胞间通讯至关重要，并且是干细胞介导的心脏修复的关键机制^[11-13]。外泌体含有许多生物活性成分，包括蛋白质，脂质和 microRNA；后者可通过细胞—细胞间相互作用从表观遗传上调控基因表达。然而，外泌体在调控表观遗传染色质重塑中扮演什么作用，以及常规处方药物治疗是否或者如何影响这一过程，在很大程度上是未知的；特别是 SJP 治疗对于通过 C-MSC 衍生的外泌体介导的心肌细胞调控的潜在影响尚不清楚。

通过组蛋白 H3 上的 Lys27 的三甲基化 (H3K27me3)，组蛋白依赖性染色质重塑对于调控干细胞和心肌细胞命运是至关重要的^[14]，包括再生^[15]，心脏重编程^[16]，细胞存活和增殖^[17]。EZH1 和 EZH2 是哺乳动物 Polycomb 抑制复合物 (PRC2) 的两个核心催化亚基，催化组蛋白 H3 在第 27 位赖氨酸上添加甲基，导致表观遗传学抑制^[18]。细胞中 H3K27me3 的动态水平也受到 UTX 和 JMJD3 的调控^[19]，它们通过从关键转录因子的启动子中去除 H3K27me3 来调控肌肉分化^[20]。

在本研究中，我们比较了经 C-MSC 衍生的外泌体处理后心肌细胞中 H3K27me3 的水平。与对照组 C-MSC 衍生的外泌体 (Ctrl-Exos) 相比，SJP 预处理后的外泌体 (SJP-Exos) 可以显著提高受体心肌细胞中的 H3K27me3 水平，并下调 UTX 基因表达，表明 SJP-Exos 可以调控心肌细胞中的 H3K27 去甲基化。重要的是，SJP-Exo 处理提高了受体心肌细胞中的 PCNA (内源性细胞增殖标志物) 表达。

材料和方法

C-MSC 分离和细胞培养

采用曾报道的两步流程，从 2 至 3 月龄的雄性 C57BL/6 小鼠 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) 的心脏中分离 C-MSC^[6,8]。简言之，步骤 1，将心室心脏组织切碎成 1mm³ 的小块，用含 0.1% 胶原酶 IV 和 1U/mL 分散酶的 DMEM/F-12 消化，并移植到纤连蛋白/明胶包被的孔中 (100 mL 0.1% 的明胶中含 0.5mg 纤连蛋白)。我们维持心脏外植体培养，直到从贴壁外植体上迁移出小而圆的有亮度差异的细胞并在成纤维细胞层上增殖。步骤 2，通过使用小鼠 hematopoietic lineage-depletion cocktail 试剂盒 (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) 从亮度差异的细胞中纯化出 Sca-1⁺ 细胞，然后按照制造商说明书使用 Sca-1 磁珠进行磁激活细胞分选 (MACS) (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA, USA)。分选的 Sca-1 细胞的培养，维持在完全培养基中 (DMEM/F12, 10% 胎牛血清 (FBS)，200 mmol/L 的 L-谷氨酰胺，55 nmol/L 的 β -巯基乙醇，和 1% MEM 非必需氨基酸)。

药物制备, C-MSC 预处理和外泌体纯化

速效救心丸的原料、药用复合材料和制作过程严格按照规范执行,产品质量符合 2015 版《中国药典》的要求^[21]。SJP 和 BOR 在细胞培养中的剂量选择基于临床治疗有效的血浆药物浓度^[22,23]; TMP 用于细胞培养的剂量基于之前的实验报告^[24]。SJP、TMP 和 BOR 分别以乙醇稀释至 62.5 mg/mL、25 mg/mL 和 15 mg/mL, 作为 1000× 储备溶液进行细胞培养实验。C-MSC 预处理试验, 在含有 10% 去外泌体胎牛血清的培养基中, 分别用 0.1% 乙醇 (对照组)、62.5 μg/mL SJP (速效组)、25 μg/mL TMP 或 15 μg/mL BOR 处理 C-MSCs 48 小时。按照文献报道的方法进行微调纯化 C-MSC 外泌体^[12,25,26]。简言之, 将上清液以 1000 转/分钟离心 10 分钟以分离出细胞, 然后将上清液用 0.22 μm 的滤膜过滤以除去所有细胞碎片。媒介中的外泌体以 5x 聚乙二醇 4000 (PEG4000, 终浓度 8.5%) 和 10x NaCl (终浓度 0.4 mol/L) 4°C 沉淀过夜; 然后将样品以 2100 g 离心 30 分钟, 沉淀重悬浮于 PBS 中, -80°C 储存直至使用。

电子显微镜和 Zeta 分析

透射电子显微镜 (TEM) 形态学评估试验, 将 3 μL 外泌体颗粒置于 formvar 碳包覆 200 目铜网格上, 室温 (RT) 温育 5 分钟, 然后进行标准醋酸双氧铀染色^[27]。用三等份的 PBS 洗涤网格, 室温下放置至半干, 以透射电子显微镜 (JEOL JEM 1230, Peabody, MA, USA) 观察。通过显微照片测量外泌体直径。利用纳米颗粒跟踪分析技术 (NTA), 使用 ZetaView PMX 110 (Particle Metrix, Meerbusch, Germany) 仪和相应的软件 ZetaView 8.02.28 测量外泌体尺寸。ZetaView 系统使用 100 nm 聚苯乙烯微球进行校准。

外泌体转移到 HL-1 细胞

将鼠心肌细胞细胞系 HL-1 (Claycomb 教授赠送) 培养于明胶/纤连蛋白包被的 6 孔板内, 培养基为补充了 10% 去外泌体 FBS、100 U/mL 青霉素、100 μg/ml 链霉素、0.1 mmol/L 去甲肾上腺素 (Sigma-Aldrich) 和 2 mmol/L L-谷氨酰胺 (Sigma-Aldrich) 的 Claycomb 培养基 (Sigma-Aldrich)。分别用 250 μg 的 Ctrl-Exos, SJP-Exos, TMP-Exos 或 BOR-Exos 处理每个 6 孔板中的 HL-1 细胞

24 小时；经外泌体处理后提取 RNA 和蛋白质。本研究中使用的外泌体剂量根据 System Biosciences (SBI) 的推荐，其建议使用 250 μg 外泌体处理 6 孔板式细胞。为了测定过氧化氢对细胞凋亡的影响，用 1 mmol/L 的 H_2O_2 (DMEM) 处理 HL-1 细胞 2 小时。

mRNA 的分离和定量

按照说明书的方法，使用 RNazol RT (Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, OH, USA) 提取 HL-1 细胞的总 RNA。使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (Thermo Scientific) 从总 RNA 合成 cDNA。合成的 cDNA 通过使用 PowerUp SYBR[®] Green 预混液 (ThermoFisher) 以 CFX96 Touch 实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad) 进行定量 PCR。用设计好的引物 (表 1) 进行扩增，反应条件为 50 $^{\circ}\text{C}$ ，2 分钟；95 $^{\circ}\text{C}$ ，2 分钟；95 $^{\circ}\text{C}$ ，15 秒 (40 个循环)；60 $^{\circ}\text{C}$ ，1 分钟。

Table 1. Prime list.

Gene list	Sequence (5'-3')
EZH1 FWD	AGCTTCCTCTTCAACCTCAAC
EZH1 REV	CACCATAACCACTTTGGCATAAC
EZH2 FWD	GGTTAATGGTGACCACAGGATAG
EZH2 REV	CGTTCGATGCCACATACTT
EED FWD	CTGTGGGAAGCAACAGAGTAA
EED REV	TAGGTCCATGCACAAGTGATAA
JMJD3 FWD	CACCCAAGAAGAGGAGAAGAAG
JMJD3 REV	AGAACAGAGGCCAACGATTT
UTX FWD	CAGCAACACCTTCTCCTAAGTC
UTX REV	GGGCTCTGAGATTCTCCATTC
GAPDH FWD	TGACATCAAGAAGGTGGTGAAG
GAPDH REV	AGTGGGAGTTGCTGTTGAAG

Western blotting

使用 BCA 蛋白测定试剂盒 (Pierce, Rockford, IL, USA) 测定纯化的外泌体或经外泌体处理的 HL-1 细胞的蛋白含量。蛋白在 10% 十二烷基磺酸钠 bis-tris 凝胶上分离并转移到 Odyssey[®] 硝酸纤维素膜 (LI-COR Biosciences) 上。使用 Odyssey 封闭液 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) 封闭膜，用兔 CD63 抗

体 (1:250, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA), 兔 CD81 抗体 (1:1000, Thermo Scientific), 小鼠 Tsg101 抗体 (1:1000, Thermo Scientific), 兔 H3K27me3 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology), 兔 UTX 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology), 兔 Cleaved PARP 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology), 兔 PCNA 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) 和小鼠 GAPDH 抗体 (1:5000, Millipore) 在 4°C 过夜。然后, 将膜在室温下与 1:10000 的 IRDye 680 山羊抗兔 IgG 或 1:10000 的 IRDye 800 山羊抗小鼠 IgG (LICOR Biosciences) 孵育 1 小时。使用奥德赛红外成像仪扫描探测到的印迹。

统计分析

所有值均以平均值±平均值的标准误差 (SEM) 表示。采用 Student's t-检验进行组间比较。采用单因素方差分析进行 3 组或更多组间的比较。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

结果

C-MSCs 的特征

通过使用我们之前报道的并加以优化的两步法^[28-30]分离 C-MSCs: 酶消化, 将切碎的成年小鼠心脏在纤连蛋白/明胶包被的平板中培养。两周后, 通过少量酶消化收集心脏来源的细胞, 用造血细胞系耗竭鸡尾酒耗尽造血细胞以富集 C-MSCs; 随后, 通过磁性细胞分选技术 (MACS) 富集 Sca-1⁺ 细胞 (图 1A)。免疫荧光染色表明 C-MSCs 表达 GATA4 (一种早期心脏转录因子), 证实了其源自于心脏组织 (图 1B)。流式细胞仪检测显示 C-MSCs 表达高水平的 MSC 特异性细胞表面标记物 Sca-1 和 CD105, 以及极低水平的造血干细胞标记物 CD45 (图 1C)。总之, 这些结果表明 C-MSCs 是一种心源性间充质干细胞亚群。

C-MSC 衍生的外泌体的特征

使用透射电子显微镜对来自 C-MSC 的微丸进行形态学分析, 证实存在外泌体 (图 2A)。对 C-MSC 衍生的外泌体的蛋白质印迹分析显示了典型的外泌体标志物 CD63, CD81 和 Tsg101 的存在 (图 2B)。使用 ZetaView® 的动态光散射 (DLS)

技术（一种用于测量流体动力学尺寸的纳米粒子追踪分析仪）测量了分离的外泌体/囊泡的尺寸。如图 2C 所示，纯化微粒的直径集中在 100 nm 附近。

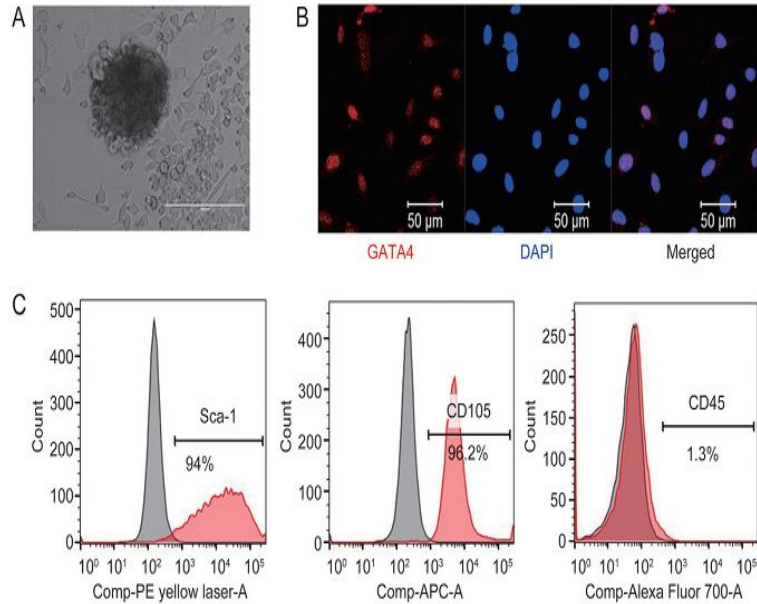


Figure 1. Phenotypic characterization of C-MSCs. (A) Cultured C-MSCs. (B) Immunofluorescent staining of C-MSCs for the expression of the cardiac transcription factor GATA4 (red); cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). (C) Flow cytometric analyses of C-MSCs for the expression of the cell surface markers Sca-1, CD105, and CD45.

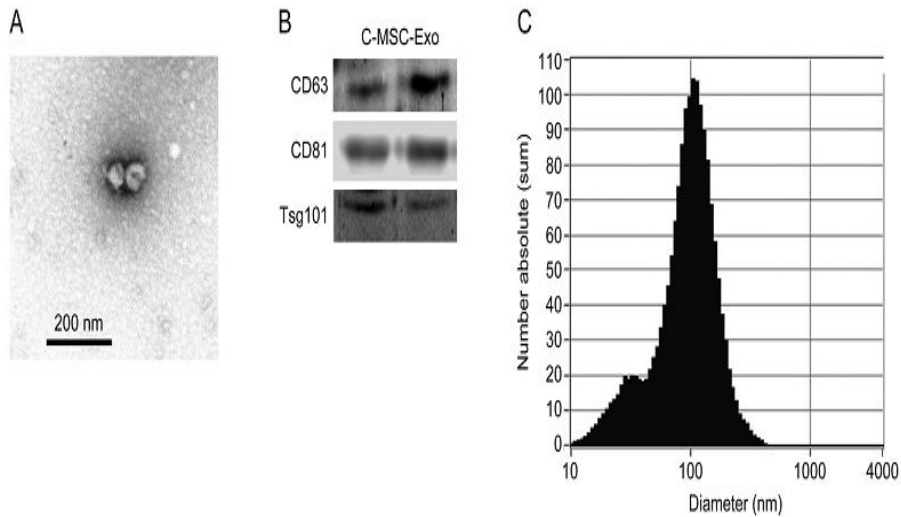


Figure 2. Characterization of C-MSC-derived exosomes. (A) Transmission electron microscopic morphological analysis of exosomes isolated from C-MSCs. Scale bar=200 nm. (B) Western blot results demonstrate the expression of CD63, CD81 and Tsg101 in exosomes derived from C-MSCs. (C) Particle size distribution in purified pellets measured by ZetaView® Particle Tracking Analyzer.

C-MSC 衍生的外泌体对心肌细胞 H3K27 三甲基化的影响

为了研究 SJP 预处理对 C-MSC 衍生的外泌体调控心肌细胞表观遗传染色质

重塑的能力，将来自对照细胞 (Ctrl-Exos) 或 SJP 处理的细胞 (SJP-Exos) 的 250 μg 外泌体加入到培养有 HL-1 细胞的 6 孔板中。与 Ctrl-Exos 相比，SJP-Exos 可提高 HL-1 细胞中 H3K27me3 的水平。为阐明 SJP 中的两个主要组分--TMP 和/或 BOR，是否对 HL-1 细胞具有与 SJP 相似的效果，我们比较了 SJP-、TMP-和 BOR-处理后收集的外泌体对 HL-1 细胞 H3K27me3 水平的影响，结果表明，对 HL-1 细胞 H3K27me3 水平的影响，TMP-Exos 和 BOR-Exos 的效果与 SJP-Exos 相似 (图 3)。有趣的是，与对照组相比，SJP, TMP 和 BOR 处理不直接提高 HL-1 细胞中 H3K27me3 的水平 (补充图 S1A, S1B) (翻译解释: 这种提高作用并非化合物直接作用的结果, 而是通过影响外泌体起作用)。

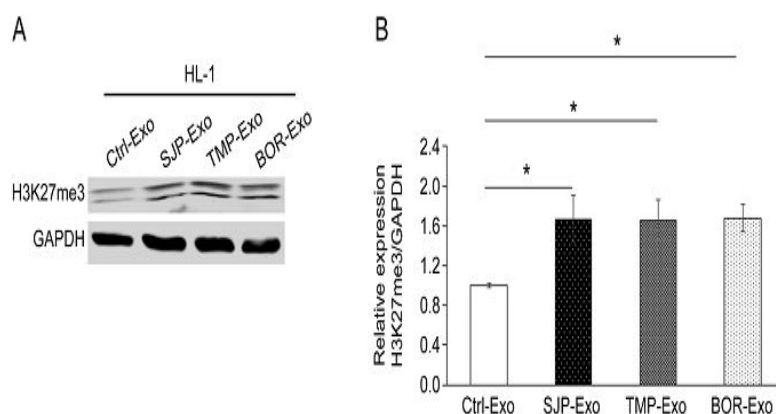


Figure 3. Trimethylation of H3K27 in HL-1 cells following the application of C-MSC-derived exosomes. Western blot analyses show a global increase in H3K27 trimethylation in HL-1 cells after the application of SJP-Exos, TMP-Exos or BOR-Exos in comparison with Ctrl-Exos ($^*P < 0.05$, $n=3$).

心肌细胞中 SJP-Exo 介导的 H3K27 三甲基化的潜在机制

组蛋白甲基化酶和组蛋白去甲基化酶均可以调控心肌细胞中 H3K27me3 的水平。为了确定 SJP-Exo 如何提高 HL-1 细胞中 H3K27me3 的水平，我们检测了 H3K27 甲基化相关基因 (EZH1, EZH2 和 EED) 和 H3K27 去甲基化相关基因 (JMJD3 和 UTX) 的表达。通过 qRT-PCR 分析，我们发现 SJP-Exo 对 HL-1 细胞中的三种 H3K27 甲基化相关基因 (图 4A-4C) 和去甲基化酶 JMJD3 (图 4D) 的表达影响都很小；但是，SJP-Exo 可以显著降低 H3K27 去甲基化酶 UTX 的表达 (约 60%) (图 4E)。与 qRT-PCR 数据一致，Western blots 显示 SJP-Exos 可以显著降低 HL-1 细胞中 UTX 的蛋白水平 (图 4F, 4G)。这一发现表明，SJP-Exos 是通过抑制组蛋白去甲基化酶 UTX 来提高 HL-1 细胞中 H3K27me3 的水平。此

外, 我们比较了 SJP-Exos 与 TMP-Exos、BOR-Exos 对 HL-1 细胞 UTX 表达的影响, 与 TMP-Exo 相比, SJP-Exos 可显著降低心肌细胞中 UTX 的水平 (图 4F, 4G)。我们进一步考察了 SJP-Exo 处理对 HL-1 细胞中 UTX 表达水平影响的剂量效应和时间效应。如附图 S2A 所示, 在 125 μg 剂量下, 经 Western blot 检测可观察到 SJP-Exo 介导的 UTX 减少, 且 250 μg 和 500 μg 剂量均可显著降低 HL-1 细胞中 UTX 的水平 ($P < 0.05$, $n=3$)。随后, 我们研究了 SJP-Exo 处理对 HL-1 细胞中 UTX 表达水平的时间效应, 与 12 小时相比, SJP-Exo 处理 24 小时可显著降低 HL-1 细胞中 UTX 的水平, 但时间延长至 48 h UTX 的水平没有进一步降低 (补充图 S2B)。

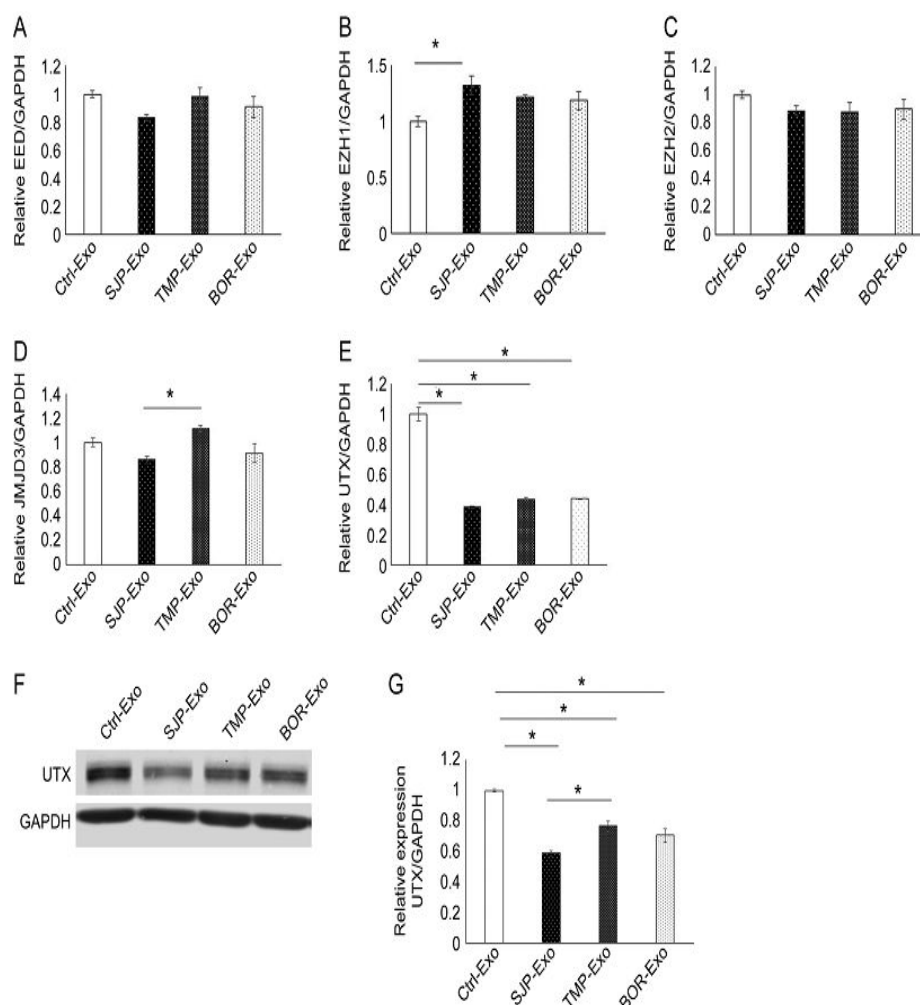


Figure 4. Expression of histone methylases and demethylases in HL-1 cells following exosome treatment. (A-E) Gene expression (qRT-PCR assay) of histone methylases (EED, EZH1 and EZH2) and histone demethylases (JMJD3 and UTX) in HL-1 cells following the application of Ctrl-Exos, SJP-Exos, TMP-Exos and BOR-Exos ($^*P < 0.05$, $n=3$); (F, G) Western blot results show the UTX protein levels in HL-1 cells following the application of Ctrl-Exos, SJP-Exos, TMP-Exos and BOR-Exos. Densitometric arbitrary units were normalized to GAPDH abundance and are expressed as the mean \pm SEM ($^*P < 0.05$, $n=3$).

SJP-Exo 处理对心肌细胞功能的影响

为了确定 SJP-Exos 对心肌细胞的作用，我们首先考察了 SJP-Exo 处理是否影响过氧化氢诱导的心肌细胞凋亡。为此，我们比较了心肌细胞在有/无氧化应激时的细胞凋亡情况。如图 5A 所示，与对照组相比，在基线水平或经 H₂O₂ 处理后，SJP-Exo 处理都不降低 cleaved-PARP（一种细胞凋亡标志物）的水平。接下来，通过检测 HL-1 细胞中 PCNA（细胞增殖的内源性标志物）的表达水平，进一步研究了 SJP-Exo 处理是否影响心肌细胞增殖。结果显示，与空白或对照组相比，SJP-Exo 处理可以显著提高 HL-1 细胞中 PCNA 的蛋白水平（图 5B），表明 SJP-Exo 处理可以促进心肌细胞增殖。

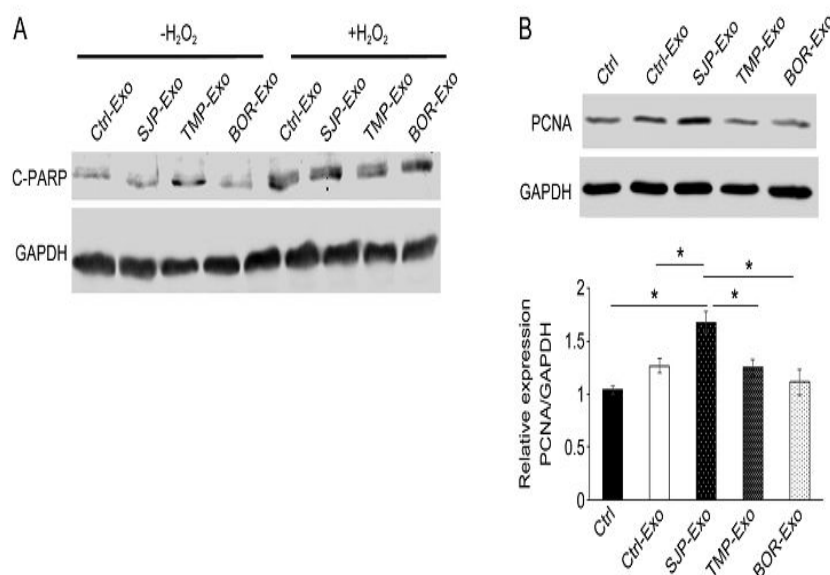


Figure 5. Effect of SJP-Exos on H₂O₂-induced apoptosis and proliferation in HL-1 cells. (A) Western blot of cleaved PARP (C-PARP) expression in HL-1 cells following overnight treatment with Ctrl-Exos, SJP-Exos, TMP-Exos and BOR-Exos and with/without 1 mmol/L H₂O₂ treatment for 2 h; (B) Western blot of the expression of the proliferation marker PCNA in HL-1 cells following the application of Ctrl, Ctrl-Exo, SJP-Exo, TMP-Exo and BOR-Exo ($^*P < 0.05$, $n=3$).

讨论

速效救心丸（补充图 S3）对血管功能有多种有益作用，广泛用于心脏病的治疗。本研究证实了 SJP 的新功能，SJP 可以通过调控心脏间充质干细胞衍生的外泌体，从而调控 HL-1 心肌细胞中 H3K27me3（一种心肌细胞转录抑制的关键表观遗传染色质标志物）的水平，进而促进心肌细胞增殖。这种作用的主要机制可能与去甲基化酶 UTX 表达的下调有关。速效救心丸中的两种主要成分 TMP

和 BOR 也具有这些作用。我们的研究结果有助于进一步阐明速效救心丸对心脏病患者疗效的作用机制。

组蛋白 3 第 27 位赖氨酸的三甲基化调控心肌细胞的增殖。H3K27me3 的水平通过 H3K27 甲基转移酶 (EZH1, EZH2, EED) 和去甲基化酶 (UTX 和 JMJD3) 的平衡进行调控。Zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 是 PRC2 蛋白复合物中的一个重要催化亚基, 通过抑制乙酰转移酶 (如 p300 和 CBP) 结合到其 PcG 靶基因上而起到 H3K27me3^[31] 和靶基因的转录抑制作用,^[32]。最近的研究表明, EZH2 介导的 H3K27me3 在心脏发育中起着关键作用, 特异性敲除 Nkx2.5 基因后, 心肌细胞增殖受到抑制而导致致命性先天性心脏缺陷^[33]。EZH2 过表达会提高 H3K27me3 水平并促进干细胞和祖细胞的增殖和迁移^[34]。UTX 是两种 H3K27me3 去甲基化酶之一, 可以移除 H3K27me3 的抑制标记。在本研究中, 我们发现 SJP 改变了由 C-MSC 产生的外泌体的功能, 当这些外泌体作用于 HL-1 心肌细胞时, 可以显著提高 H3K27me3 的蛋白水平 (图 6)。机理研究表明, SJP-Exos 对关键的组蛋白甲基转移酶 (EED, EZH1 和 EZH2) 或组蛋白去甲基化酶 JMJD3 的转录几乎没有影响。相反, SJP-Exos 可以显著降低组蛋白去甲基化酶 UTX 的表达, 从而可以解释为什么这些外泌体的使用提高了 HL-1 心肌细胞中 H3K27me3 的水平。这些外泌体调控 UTX 表达的具体机制尚不清楚。由于外泌体含有大量非编码 RNA, 包括 miRNAs, lncRNAs 和 circRNAs, 可能通过基因网络调控 UTX 的表达, 最终的结果可能来自于多种信号通路和非编码 RNAs 交叉对话的直接和间接效应^[35]。因此, 需要综合分析这些非编码 RNAs 来阐明它们的调控机制。

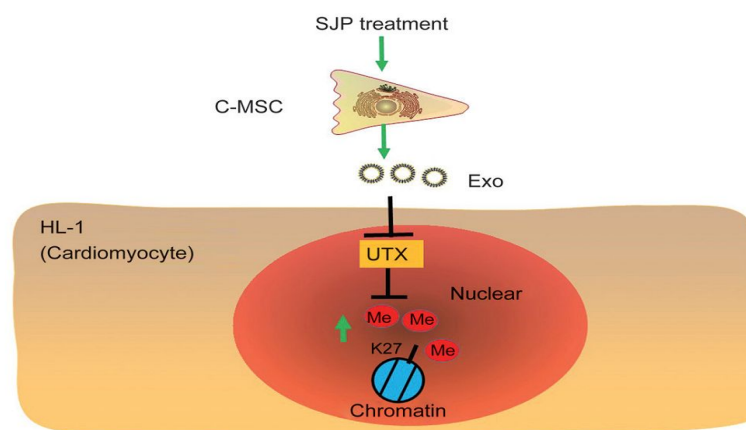


Figure 6. Schematic overview of SJP preconditioned C-MSC-derived exosomes in regulating H3K27me3 levels in recipient cardiomyocytes. Mechanistically, SJP-Exo application leads to decreased expression of the histone demethylase UTX in the recipient cardiomyocytes.

在本研究中,我们观察到对 HL-1 细胞中 H3K27me3 水平的影响, TMP-Exos 和 BOR-Exos 的效果与 SJP-Exo 相似。这些结果提示,速效救心丸中的主要成分在调控 C-MSC 衍生的外泌体的功能从而引起受体心肌细胞表观遗传染色质重塑方面的效果是相同的。我们还观察到,与 TMP-Exo 处理相比, SJP-Exos 可以显著降低心肌细胞中 UTX 的水平,提示在调控外泌体介导的表观遗传染色质重塑方面,中草药多组分化合物可能比单一成分更加有效。在中医理论上提出的“协同作用”是指多种中草药组分的协同效应,这种协同作用可以增强药理学效应。在中医药实践中,为心血管疾病患者开具由多种中药组成的处方就是基于中药的多靶点协同作用^[36]。

如我们的实验所示, SJP-Exo 处理不能保护由过氧化氢介导的氧化应激引起的心肌细胞凋亡;然而,它可以提高心肌细胞增殖标志物 PCNA 的表达水平,提示 SJP-Exos 可能可以用于刺激心脏细胞增殖。在未来的研究中,我们可能会尝试通过将 SJP-Exos 直接传递至心肌细胞来治疗心力衰竭。这种促进心肌细胞增殖的策略可能有助于改善心肌修复。

在本研究中,我们使用了之前报道的基于聚乙二醇(PEG)的方法纯化外泌体^[12]。与金标准差速离心和蔗糖密度梯度离心法相比,已经证明基于 PEG 的外泌体纯化法具有保留 RNA cargo,不抑制生物活性,并可富集高纯度外泌体的优点^[37]。通过 Western blot 分析证实我们富集的外泌体表达标记物 CD63, CD81 和 Tsg101 (图 2B);然而,基于 PEG 的方法不能将外泌体与微泡分离开来。

综上所述,我们阐明了速效救心丸可以调控 C-MSC 衍生的外泌体功能以下调去甲基化酶 UTX 的表达,从而提高受体心肌细胞中 H3K27me3 的水平。最重要的是, SJP-Exos 可以提高心肌细胞中 PCNA 的表达。这一发现拓宽了目前我们对于速效救心丸治疗缺血性心脏病分子机制的理解,并且首次强调了干细胞衍生的外泌体对受体细胞表观遗传染色质的重塑作用。

致谢

本研究由国家自然科学基金(No 81403352, 81573647 to Xiao-long WANG and Xiao-fen RUAN, and 81528002 to Yao-liang TANG),上海市中医临床重点实验室(No 14DZ2273200)资助;本研究部分由天津中新药业集团有限公司(中

国，天津）资助。

Il-man KIM, Neal L WEINTRAUB, and Yao-liang TANG 部分由美国心脏协会 GRNT31430008, NIH-AR070029, NIH-HL086555, NIHHL134354 和 NIH-HL12425 资助。

作者贡献

思路与设计: Xiao-long WANG, Yao-liang TANG; 数据收集: Xiao-fen RUAN, Yong-jun LI, Cheng-wei JU, Yan SHEN; 数据分析: Xiao-fen RUAN, Xiao-long WANG; 数据阐释: Xiao-fen RUAN, Wei LEI, Can CHEN, Xiao-long WANG, Yao-liang TANG; 文本撰写: Ilman KIM, Hong YU, Neal L WEINTRAUB, Yao-liang TANG。

补充信息

补充信息可在 Acta Pharmacologica Sinica 网站上查阅。