

靶向沉默 DNMT3A 对小鼠肺成纤维细胞胶原沉积、增殖及迁移活性的影响

汪先晨¹, 尤峻柏¹, 凌辉¹, 范家好¹, 陈齐², 陶辉², 沙纪名¹
(安徽医科大学第二附属医院¹ 胸外科、² 麻醉与围手术期医学科, 合肥 230601)

摘要 目的 探讨靶向沉默 DNA 甲基化转移酶 3A (DNMT3A) 对小鼠肺成纤维细胞 (PFs) 胶原沉积、增殖与迁移活性的作用。方法 为保证原代成纤维细胞的增殖迁移活性取新生 C57 乳鼠肺组织, 剪碎后提取 PFs, 在显微镜下观察并鉴定形态。细胞贴壁后使用 5 ng/ml TGF- β_1 作用 24 h 诱导 PFs 细胞活化, 并用小干扰 RNA 构建 DNMT3A 沉默模型; 实验分为 Control 组、TGF- β_1 组、TGF- β_1 + siRNA-NC 组和 TGF- β_1 + siRNA-DNMT3A 组。应用 Western blot 方法检测 DNMT3A、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和 I 型胶原 (Collagen I) 的蛋白表达变化; 应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (RT-qPCR) 方法检测 DNMT3A、 α -SMA、Collagen I 的 mRNA 表达变化; CCK-8 与 EdU 染色检测 PFs 增殖能力; 划痕实验与 Transwell 迁移实验检测 PFs 迁移能力。结果 与 Control 组相比, TGF- β_1 诱导活化的 PFs 细胞组中 DNMT3A 升高 ($P < 0.01$), 纤维化与增殖相关指标 α -SMA、Collagen I 的蛋白及 mRNA 水平也升高 (均 $P < 0.05$), 同时 PFs 的增殖与迁移能力升高 (均 $P < 0.0001$)。而与 siRNA-NC 组相比, 在 DNMT3A 沉默组中通过 Western blot 法检测 DNMT3A ($P < 0.0001$) 及相关指标 α -SMA ($P < 0.01$)、Collagen I ($P < 0.01$) 的蛋白表达水平均降低, 同时通过 RT-qPCR 法检测 DNMT3A、 α -SMA 及 Collagen I 的 mRNA 水平也均降低 ($P < 0.001$), 并且 PFs 细胞的增殖 ($P < 0.01$) 和迁移能力 ($P < 0.05$) 较对照组下降。结论 沉默 DNMT3A 能够抑制胶原的沉积及 PFs 的增殖, DNMT3A 可以促进 PFs 的增殖和迁移能力, 进而促进 PFs 的活化以及肺纤维化的发展, 这一过程可能受到 DNA 甲基化修饰的调控。

关键词 DNMT3A; DNA 甲基化; 肺成纤维细胞; 增殖; 迁移; 肺纤维化

中图分类号 R 332.2; R 332.3; R 563.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0066-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.009

肺纤维化是一种慢性进行性纤维化疾病, 其特征为成(肌)纤维细胞灶的形成以及细胞外基质的过度沉积, 由瘢痕形成引起的肺部组织结构的进行性和不可逆的破坏, 最终导致肺功能衰竭、气体交换受阻和呼吸衰竭直至死亡^[1]。肺成纤维细胞 (pulmonary fibroblasts, PFs) 过度增殖和细胞外基质沉积是肺纤维化形成的重要因素, 但具体的形成机制尚未完全明确^[2]。

DNA 甲基化作为表观遗传学的重要修饰方式之一, 其参与肺纤维化发生发展已被诸多研究^[3]证明, 在成纤维细胞的异常增殖、细胞外基质的过度沉积、瘢痕组织形成和组织结构重塑等组织及器官纤维化的特征性病理过程中发挥着重要的作用。而作为 DNA 甲基化的关键酶, DNA 甲基转移酶 3A

(DNA methyltransferase 3A, DNMT3A) 和 DNA 甲基转移酶 3B (DNA methyltransferase 3B, DNMT3B) 属于从头合成甲基转移酶^[4]。在 DNMT3 家族蛋白中, 其结构域催化上游存在富含半胱氨酸且保守表达的结构域, 该结构域与其他基因相似结构域具有同源性, 推测该结构域可能介导蛋白质-蛋白质或蛋白质-DNA 相互作用。并且在组织中, 对于 DNMT3A 和 DNMT3B 进行含量测定, 发现 DNMT3B 在大多数组织中表达都远低于 DNMT3A, 但在睾丸、甲状腺和骨髓中很容易检测到^[5]。虽然很多研究^[6-7]证明 DNMT3A 在肺纤维化中发挥重要作用, 但其在 PFs 中的增殖活化作用并不明确。该文以小鼠 PFs 为研究对象, 重点探讨在小鼠 PFs 中 DNMT3A 对其活化增殖及迁移能力的影响, 以此为科学研究及临床防治提供新的思路及理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验用 40 只日龄为 1~3 d 雄

2024-11-03 接收

基金项目: 安徽省高校自然科学基金项目 (编号: 2023AH040376)

作者简介: 汪先晨, 男, 硕士研究生;

沙纪名, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: shajiming@vip.163.com

性 SPF 级 C57BL/6 乳鼠均购自安徽医科大学实验动物中心,饲养于安徽医科大学第二附属医院科研实验中心,用于后续原代细胞的提取与培养。本实验由安徽医科大学实验动物伦理委员会批准(编号: LLSC20231701)。

1.1.2 试剂 Hams' F-12K 培养基、TRIzol 试剂购自美国 ThermoFisherScientific 公司; 胎牛血清美国 Gibco 公司; II 型胶原酶购自广州 Biofrox 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; PBS 试剂、细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒, 购自合肥 Biosharp 公司; Western blot 试剂盒、BCA 试剂盒、EdU 试剂盒、RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、胰蛋白酶均购自上海碧云天公司; 逆转录和实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 试剂盒购自湖南艾克瑞生物公司; TGF- β_1 购自苏州近岸蛋白; DNMT3A 小干扰 RNA 购自上海吉玛基因; β -actin 一抗 (货号: 66009-1-Ig), I 型胶原 (Collagen I) 一抗 (货号: 14695-1-AP)、 α -SMA 一抗 (货号: 55135-1-AP), DNMT3A 一抗 (货号: 20954-1-AP) 均购自武汉 Proteintech 公司、兔源鼠源二抗均购自美国 Abcam 公司, qPCR 引物由上海生工公司合成 (表 1)。

1.1.3 仪器 细胞培养超净工作台 (型号: SW-CJ-1B) 购于江苏苏州净化有限公司; 倒置荧光显微镜 (型号: IX71) 购于日本 Olympus Corporation 公司; CO₂ 培养箱 (型号: HCP-80) 购于上海海尔公司; 凝胶成像仪 (型号: G: BOX-CHEMI HR) 购于英国 Syn-gene 公司; 实时荧光定量 PCR 系统 (型号: CFXMaestrol) 购于美国 Bio-RAD 公司; 酶标仪 (型号: VariokanLUX) 购于美国 ThermoFisherScientific 公司; 低温离心机 (型号: Centrifuge 5430R) 购于德国 Eppendorf 公司。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Genes	Primer sequences (5'-3')
β -actin	F: CACTGTCGACTCGCGTCC
	R: TCATCCATGGCGAACTGGTG
α -SMA	F: TGGCCACTGCTGCTTCCTCTTCTT
	R: GGGGCCAGCTTCGTCATACTCCT
Collagen I	F: TAACTCTGGAATTGCACTTTTGG
	R: GTCCAGCCCTCATCCTGGCC
DNMT3A	F: GGCCATTTCGATCTGGTGA
	R: CTTGGCTATTCTGCCGTGTC

1.2 方法

1.2.1 PFs 的提取与培养 取 1~3 d 新生的乳鼠, 用 75% 乙醇浸泡乳鼠 30 s 置于细胞超净台内, 暴露胸腔, 右心室注入预冷的 PBS 灌流肺组织; 取出肺组织, 剪碎成直径约 1 mm 的组织块 PBS 洗涤 3 次, 将组织糜加入离心管中, 配置的消化液 (0.25% 胰蛋白酶: 0.2% II 型胶原酶: 台式液 = 2: 2: 1) 5 ml 加入离心管中, 37 °C 恒温水浴消化 30 min; 随后加入 3 ml 完全培养基终止消化, 低温离心机 1 200 r/min 离心 6 min, 将上清液转移至另一离心管; 组织糜过滤后重复上述消化步骤 2 次, 完成后将上清液混合; 上述参数离心后弃上清液, 用 1 ml 培养基重悬细胞后将培养基补至 4 ml。在培养箱中培养 5 h 后换液。根据不同细胞离心速度差异及贴壁速度不同的原理, 通过细胞形态学等观察所提取细胞即为 PFs。

1.2.2 PFs 活化 取对数生长期的 PFs 细胞, 将培养瓶中细胞接种于培养皿中 (约 40%~50% 密度), 放入 37 °C 培养箱中培养待细胞贴壁后使用无血清 Hams' F-12K 培养基饥饿细胞 12 h, 后使用含有 5 ng/ml TGF- β_1 的无血清 Hams' F-12K 培养基替代培养 24 h。

1.2.3 siRNA-DNMT3A 转染 对培养瓶中处于对数生长期的 PFs 使用胰酶消化, 将消化后的细胞 (汇合度约 80%) 接种于 6 孔板中, 每孔 2 ml, 贴壁后用 5 ng/ml TGF- β_1 刺激 24 h 活化。次日按吉玛基因说明指南将转染试剂与 siRNA-DNMT3A 混合加入实验孔中, 同时以相同比例加入阴性对照 siRNA 构建阴性对照组, 于 37 °C 培养箱中培养 4~5 h 后更换新鲜培养基, 然后在 37 °C 培养箱中培养, 等待后续实验。

1.2.4 实验分组 TGF- β_1 刺激 PFs 活化增殖, 对照组 (Control 组) 不进行任何处理, 实验组 (TGF- β_1 组): 按上述 1.2.2 项中步骤, 使用 TGF- β_1 刺激 24 h; 应用小干扰 RNA 转染构建 DNMT3A 沉默组, 按上述 1.2.3 项中实验步骤, 通过转染阴性对照 siRNA 构建阴性对照组 (siRNA-NC 组) 及转染 DNMT3A siRNA 构建 DNMT3A 沉默组 (siRNA-DNMT3A)。

1.2.5 Western blot 将 PFs 细胞分组处理后加入 RIPA + PMSF 裂解液 (每瓶 150 μ l, 每孔 100 μ l) 于 4 °C 慢摇 30 min 裂解细胞收集于离心管中, 低温离心机离心重悬细胞, BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 蛋白电泳, 电泳后将凝胶转移至 PVDF 膜上

按 200 mA, 每分子量 1 min 转膜。转膜后使用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 4 °C 冰箱与相应一抗慢摇床孵育过夜, 12 ~ 14 h 后取出 TBST 洗膜 3 次, 室温慢摇床孵育二抗 1.5 h, 孵育完成后 TBST 洗膜 3 次, 于凝胶成像仪显影。结果采用 Image J 软件进行灰度值分析, 以 β -actin 作为内参, 实验重复 3 次。

1.2.6 提取总 RNA 及逆转录 按上述实验步骤培养不同组别的细胞, 弃去培养液, 加入 PBS 清洗 2 次, 采用 TRIzol 法慢提 RNA。用分光光度仪检测其浓度后按照试剂盒说明书步骤进行逆转录。

1.2.7 RT-qPCR 按 1.2.5 操作步骤取逆转录后 cDNA, 用 Bio-Rad CFX Maestrol 1.0 Real-time 系统对目的基因进行荧光定量检测。以 β -actin 作为内参, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

1.2.8 CCK-8 用胰蛋白酶消化对数生长期细胞, 将消化后的细胞计数, 稀释至约 2 000 个细胞/100 μ l, 将稀释后的细胞接种于 96 孔板中, 每孔约 100 μ l, 将培养板放入 37 °C 细胞培养箱中预培养 24 h 后, 按 1.2.4 操作步骤设置不同组别, 每组设置 6 个复孔, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 轻轻晃动以混匀, 将培养板放入 37 °C 细胞培养箱中培养 2 h, 使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。

1.2.9 EdU 染色 用胰蛋白酶消化对数生长期细胞, 将消化后的细胞接种于 24 孔版中每孔约 4 000 个细胞, 按分组处理。每孔加入 500 μ l 完全培养基稀释后的 EdU 培养基, 37 °C 孵育 2 h。PBS 清洗 2 ~ 3 次, 每孔加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 去除固定液, PBS 清洗 2 ~ 3 次, 再用 0.5% Triton X-100 室温下通透 10 ~ 15 min, 去除通透液, PBS 清洗 3 次, 按试剂盒说明书配置反应液, 每孔加入 300 μ l 反应液室温下避光孵育 30 min 进行 EdU 染色, 去除反应液后再次 PBS 清洗 3 次, 配置 Hoechst33342 染色细胞核。染色完成后, 立即使用荧光显微镜观测荧光差异。

1.2.10 细胞划痕实验 于 6 孔板底部沿直尺标记 3 条平行标记线, 按上述步骤将分组后的细胞接种在 6 孔板中, 待细胞长满后, 用 200 μ l 枪头垂直于孔板和标记线划 3 条垂直线, 弃去旧培养基, 用 PBS 轻轻润洗 2 ~ 3 次, 加入无血清培养基, 置于 37 °C 的 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 并用倒置显微镜分别于 0 h 和 24 h 观察同一划痕的宽度的变化情况, 并使用 Image J 对划痕面积进行统计。

1.2.11 Transwell 细胞迁移实验 将 Transwell 小室放入 24 孔板中在上室加入 500 μ l 无血清培养基, 放入 37 °C 培养箱活化小室 30 min, 用胰蛋白酶消化对数生长期细胞, 并用无血清 Hams' F-12K 培养基重悬细胞, 计数细胞数, 按分组情况, 向上室每孔接种约 20 000 个细胞, 每组设置 2 ~ 3 个复孔, 并在下室加入含 30% FBS 的 Hams' F-12K 培养基 500 μ l。37 °C 培养箱孵育 24 h, 次日用 PBS 洗涤 2 次, 下室中加入 500 μ l 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 清洗后, 再加入 0.1% 结晶紫溶液室温下染色 20 min, 取出小室轻轻洗涤后在倒置显微镜下观察结果, 每孔任意选择 3 ~ 5 个视野进行拍照, 用 Image J 计数取平均值进行定量研究。

1.3 统计学处理 所有数据采用 GraphPad Prism 8.0 进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 *t* 检验以及单因素方差分析, 所有实验均重复 3 次以上。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNMT3A 在 PFs 细胞中的表达改变 与对照组相比, TGF- β_1 组 DNMT3A 的蛋白表达水平 ($F = 1.530, P < 0.01$) 及 mRNA ($F = 7.225, P < 0.01$) 水平均升高。与 si-NC 组相比, siRNA-DNMT3A 组中 DNMT3A 蛋白表达水平 ($F = 7.249, P < 0.0001$) 及 mRNA ($F = 456.1, P < 0.0001$) 水平降低, 提示 siRNA 转染成功, DNMT3A 被沉默。见图 1。

2.2 DNMT3A 调控 Collagen I、 α -SMA 的蛋白表达情况 用 Western blot 检测 PFs 中的蛋白表达水平, 与对照组相比, TGF- β_1 组 Collagen I、 α -SMA 蛋白表达水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 DNMT3A 沉默组 PFs 中 Collagen I、 α -SMA 的蛋白表达水平相较于 siRNA-NC 组表达明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。提示沉默 DNMT3A 可下调 Collagen I、 α -SMA 的蛋白表达水平。见图 2。

2.3 沉默 DNMT3A 抑制 Collagen I、 α -SMA mRNA 的表达 如图 3 显示, 用 RT-qPCR 检测 PFs 中的 mRNA 表达水平, 与对照组相比, TGF- β_1 组中 Collagen I、 α -SMA mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$)。相较于 siRNA-NC 组, DNMT3A 沉默组的 PFs 中 Collagen I、 α -SMA 的 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$), 提示沉默 DNMT3A 可下调 Collagen I、 α -SMA 的 mRNA 表达水平。

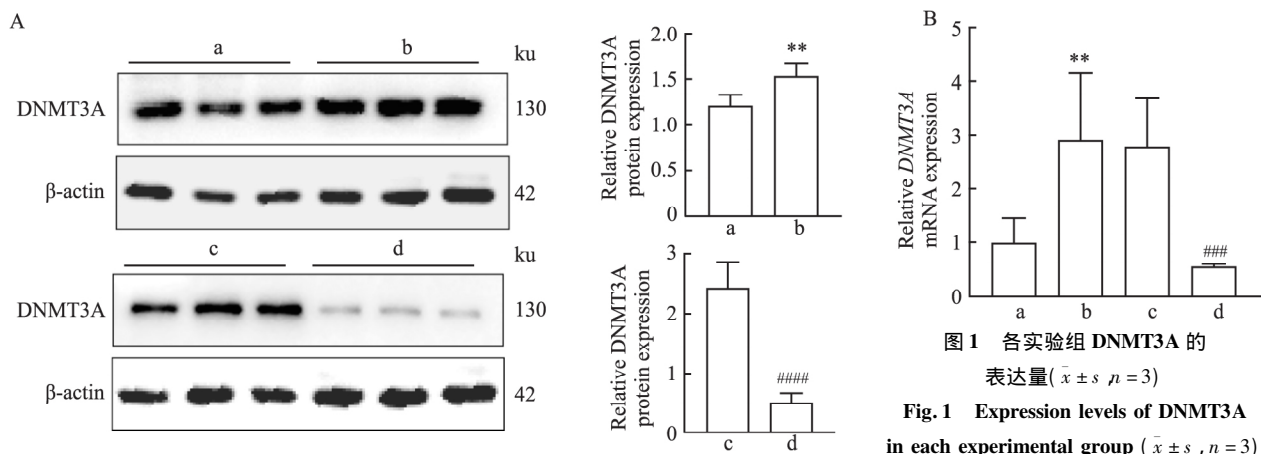


图1 各实验组 DNMT3A 的表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Expression levels of DNMT3A in each experimental group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: The protein expression level of DNMT3A was detected by Western blot; B: The expression of DNMT3A mRNA was detected by qRT-PCR; a: Control group; b: TGF-β₁ group; c: siRNA-NC group; d: siRNA-DNMT3A group; ** $P < 0.01$ vs Control group; ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs siRNA-NC group.

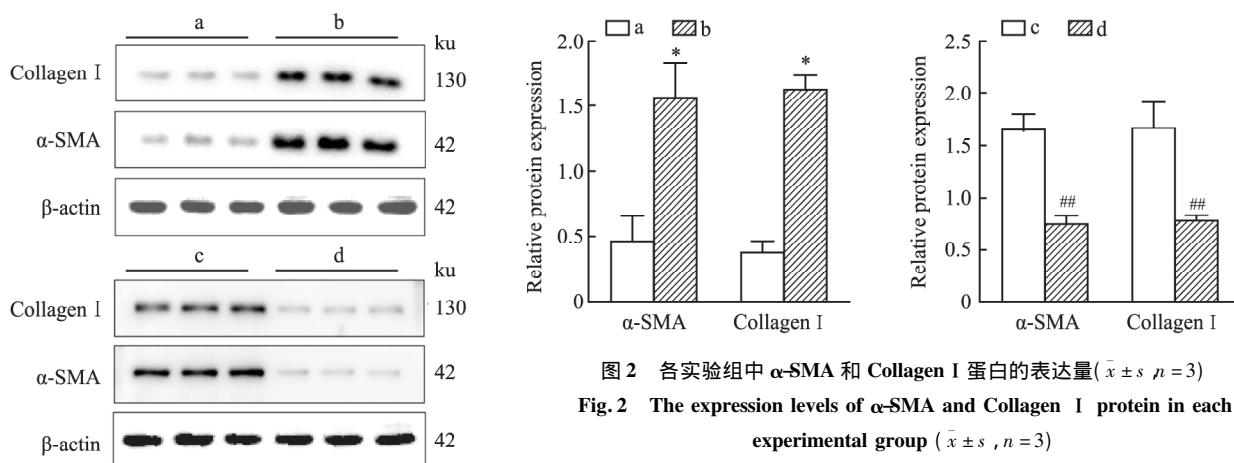


图2 各实验组中 α-SMA 和 Collagen I 蛋白的表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 The expression levels of α-SMA and Collagen I protein in each experimental group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

a: Control group; b: TGF-β₁ group; c: siRNA-NC group; d: siRNA-DNMT3A group; * $P < 0.05$ vs Control group; ## $P < 0.01$ vs siRNA-NC group.

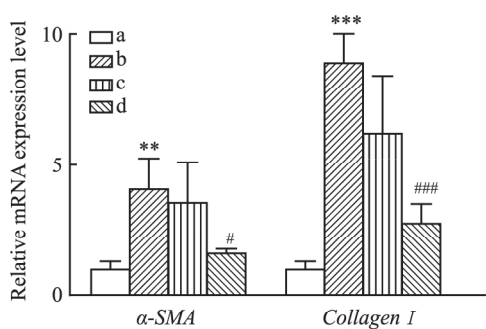


图3 沉默 DNMT3A 对 α-SMA 和 Collagen I mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 The effect of silencing DNMT3A on the mRNA expression levels α-SMA and Collagen I ($\bar{x} \pm s, n=3$)

a: Control group; b: TGF-β₁ group; c: siRNA-NC group; d: siRNA-DNMT3A group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs siRNA-NC group.

2.4 沉默 DNMT3A 对 PFs 增殖能力的影响 用

CCK-8 实验检测靶向沉默 DNMT3A 后各组 PFs 增殖活性的变化, TGF-β₁ 组 PFs 与正常组相比增殖活性升高 ($F = 4.110, P < 0.0001$), 见图 4A。而与 siRNA-NC 组相比, DNMT3A 沉默组中 PFs 增殖活性被抑制 ($F = 1.174, P < 0.01$)。用 EdU 实验检测靶向沉默 DNMT3A 后各组 PFs 增殖活性的变化结果同样验证了上述观点, 见图 4B。证明靶向沉默 DNMT3A 会抑制 PFs 的增殖活性。

2.5 沉默 DNMT3A 对 PFs 迁移能力的影响 如图 5 所示, 用细胞划痕实验检测靶向沉默 DNMT3A 后各组 PFs 迁移能力的变化, TGF-β₁ 处理的 PFs 细胞的愈合速度明显快于对照组 ($F = 1.337, P < 0.0001$)。使用 si-DNMT3A 转染后的 PFs 细胞与 siRNA-NC 组相比愈合速度明显降低 ($F = 1.329, P < 0.05$)。同样, 在 Transwell 实验中也证实了上述结论 ($F = 3.432, P < 0.001; F = 1.209, P < 0.05$)。

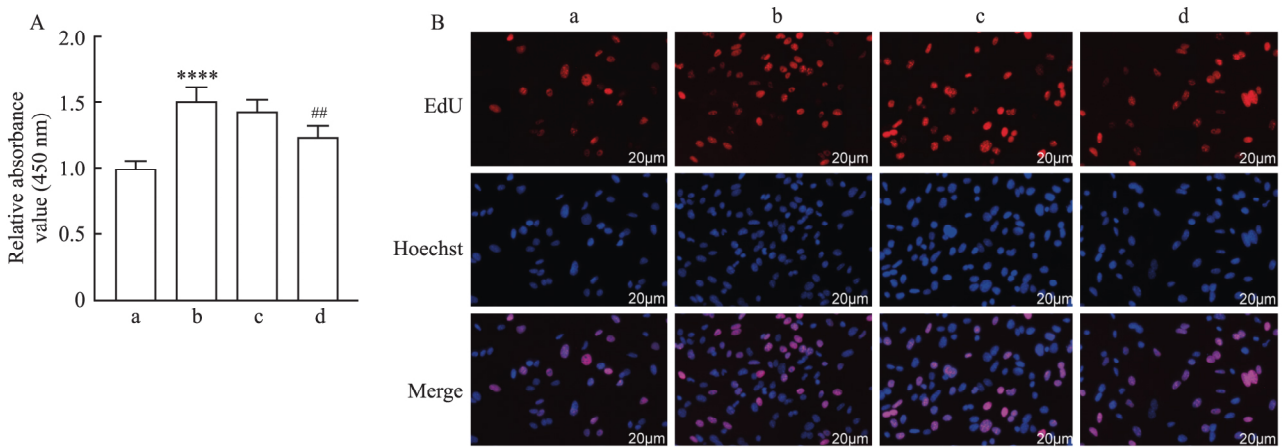


图4 靶向沉默 DNMT3A 对 PFs 增殖活性的影响

Fig. 4 The effect of targeted silencing of DNMT3A on the proliferation activity of lung fibroblasts

A: CCK-8 experiment; B: Edu experiment ×200; a: Control group; b: TGF-β₁ group; c: siRNA-NC group; d: siRNA-DNMT3A group; **** *P* < 0.0001 vs Control group; ## *P* < 0.01 vs siRNA-NC group.

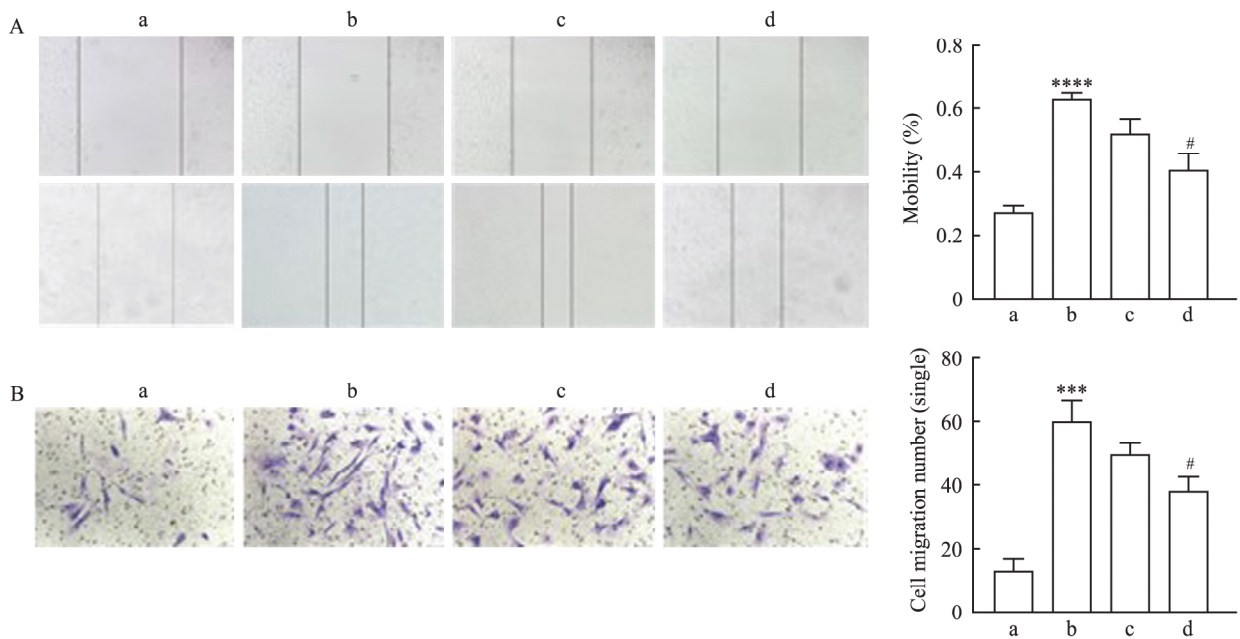


图5 靶向沉默 DNMT3A 对 PFs 迁移能力的影响

Fig. 5 The effect of targeted silencing of DNMT3A on the migration ability of lung fibroblasts

A: Cell scratch test ×200; B: Transwell experiment ×200; a: Control group; b: TGF-β₁ group; c: siRNA-NC group; d: siRNA-DNMT3A group; *** *P* < 0.001, **** *P* < 0.0001 vs Control group; # *P* < 0.05 vs siRNA-NC group.

提示沉默 DNMT3A 会抑制 PFs 细胞的迁移能力。

3 讨论

肺纤维化作为一种不可逆的慢性进行性纤维化疾病,其特征是肺组织结构的进行性损伤,导致气体交换、通气受损。目前对于肺纤维化的治疗有限,病

死率极高,中位生存期一般为3~5年^[8]。近年来,新型冠状病毒肺炎已成为全球公共卫生挑战,肺纤维化作为一种严重的并发症,在预期的未来几年仍将继续威胁着预后以及危重病人的生存^[9]。因此阐明肺纤维化的发病机制和积极寻找治疗方法是十分必要的。目前普遍认为肺泡上皮细胞的损伤,氧

化应激、炎症、细胞凋亡等级联反应刺激了 PFs 的增殖和活化,导致 PFs 灶的形成、胶原蛋白的沉积、细胞外基质如 α -SMA 等的合成聚集是最终导致肺纤维化的主要机制^[10-11]。

DNA 甲基化是一种表观遗传机制,是转移 S-腺苷甲硫氨酸的过程,主要在 DNA 甲基转移酶催化的作用下在基因启动子的 CpG 岛和转录开始位点,使胞嘧啶转化为 5-甲基胞嘧啶的过程^[12-13]。DNMT3A 作为 DNA 甲基转移酶家族的一员,是介导 DNA 从头甲基化的关键酶之一,其在正常发育和疾病的发生发展中起着关键作用^[14]。已有文献^[15-17]报道,DNA 甲基化在肺纤维化的发病机制中起关键作用。然而 DNMT3A 对于 PFs 调控的机制在国内国外少有报道。

本课题组通过 Western blot 和 RT-qPCR 检测纤维化相关指标,结果提示 TGF- β_1 刺激 PFs 后,Collagen I、 α -SMA 表达水平升高;而在 si-DNMT3A 转染的 DNMT3A 沉默组中 Collagen I、 α -SMA 表达水平降低。同样,CCK-8、Transwell 等实验证明了 TGF- β_1 刺激的 PFs 细胞增殖活化及迁移能力增强,而沉默 DNMT3A 后抑制了这种效应,提示靶向沉默 DNMT3A 影响小鼠 PFs 的胶原沉积、增殖及迁移活性。本课题创新性地建立小鼠肺原代成纤维细胞模型,通过 TGF- β_1 诱导建立 PFs 活化模型,从细胞层面验证 DNMT3A 对成纤维细胞的调控作用,为未来进一步探索 DNMT3A 调控肺纤维化的相关机制,构建了可靠的体外模型。

该研究表明, DNMT3A 在 PFs 异常增殖和活化过程中发挥了关键调控作用。因此,推测 DNMT3A 可能通过调节特定的下游靶点,促进 PFs 的活化和肺纤维化的进展。后续研究可继续聚焦于这一调控机制,进一步探讨 DNMT3A 在肺纤维化中的具体作用,以为肺纤维化的临床治疗提供新的理论依据和潜在的治疗靶点。

参考文献

- [1] Chanda D, Otoupalova E, Smith S R, et al. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 56-69. doi: 10.1016/j.mam.2018.08.004.
- [2] Sakai N, Tager A M. Fibrosis of two: epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2013, 1832(7): 911-21. doi: 10.1016/j.bba-dis.2013.03.001.
- [3] Duan J, Zhong B, Fan Z, et al. DNA methylation in pulmonary fibrosis and lung cancer[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2022, 16(5): 519-28. doi: 10.1080/17476348.2022.2085091.
- [4] Robertson K D. DNA methylation and chromatin-unraveling the tangled web[J]. *Oncogene*, 2002, 21(35): 5361-79. doi: 10.1038/sj.onc.1205609.
- [5] Xie S, Wang Z, Okano M, et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family[J]. *Gene*, 1999, 236(1): 87-95. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00252-8.
- [6] Wei A, Gao Q, Chen F, et al. Inhibition of DNA methylation derepresses peroxisome proliferator-activated receptor- γ and attenuates pulmonary fibrosis[J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(7): 1304-18. doi: 10.1111/bph.15655.
- [7] Liang Q, Cai W, Zhao Y, et al. Lycorine ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104884. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104884.
- [8] Sgalla G, Iovene B, Calvello M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 32. doi: 10.1186/s12931-018-0730-2.
- [9] Rumende C M. Pulmonary fibrosis caused by severe COVID-19 infection: Discharge may not be the end of treatment[J]. *Acta Med Indones*, 2021, 53(2): 141-2.
- [10] Ma H, Wu X, Li Y, et al. Research progress in the molecular mechanisms, therapeutic targets, and drug development of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 963054. doi: 10.3389/fphar.2022.963054.
- [11] 郭春玉,张诗晨,方军. 特发性肺纤维化中氧化应激调控机制的研究进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(6): 999-1002. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.033.
- [11] Guo C Y, Zhang S C, Fang J. Research progress on the regulation mechanism of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2021, 56(6): 999-1002. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.033.
- [12] Schübeler D. Function and information content of DNA methylation[J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 321-6. doi: 10.1038/nature14192.
- [13] Moore L D, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1): 23-38. doi: 10.1038/npp.2012.112.
- [14] Okano M, Bell D W, Haber D A, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development[J]. *Cell*, 1999, 99(3): 247-57. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81656-6.
- [15] Konigsberg I R, Borie R, Walts A D, et al. Molecular signatures of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 65(4): 430-41. doi: 10.1165/rcmb.2020-0546oc.
- [16] Wang Y, Zhang L, Huang T, et al. The methyl-CpG-binding domain 2 facilitates pulmonary fibrosis by orchestrating fibroblast to myofibroblast differentiation[J]. *Eur Respir J*, 2022, 60(3): 2003697. doi: 10.1183/13993003.03697-2020.
- [17] Sha J M, Zhang R Q, Wang X C, et al. Epigenetic reader MeCP2 repressed WIF1 boosts lung fibroblast proliferation, migration and

Effect of targeted silencing of DNMT3A on collagen deposition , proliferation and migration activity of mouse lung fibroblasts

Wang Xianchen¹ ,You Junbo¹ ,Ling Hui¹ ,Fan Jiahao¹ ,Chen Qi² ,Tao Hui² ,Sha Jiming¹

(¹Dept of Thoracic Surgery ,²Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine ,

The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of targeted silencing of DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) on collagen deposition , proliferation and migration activity of mouse lung fibroblasts (PFs) . **Methods** In order to ensure the proliferation and migration activity of primary fibroblasts , the lung tissues of neonatal C57 suckling mice were taken , PFs were extracted after being sheared , and the morphology was observed and identified under the microscope. PFs cells were activated by 5 ng/ml TGF- β_1 for 24 h after cell attachment , and DNMT3A silencing model was constructed by small interfering RNA; The experiment was divided into control group , TGF- β_1 group , TGF- β_1 + siRNA-NC group and TGF- β_1 + siRNA-DNMT3A group. The protein expressions of DNMT3A , α -smooth muscle actin (α -SMA) and Collagen I were detected by Western blot; Real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expression changes of *DNMT3A* , α -SMA and *Collagen I* . The proliferation ability of PFs was detected by CCK-8 and EdU staining; the migration ability of PFs was detected by scratch test and Transwell migration test. **Results** Compared with the control group , TGF- β_1 induced the increase of DNMT3A in the activated PFs cell group ($P < 0.01$) , the protein and mRNA levels of fibrosis and proliferation related indicators α -SMA and Collagen I also increased (all $P < 0.05$) , and the proliferation and migration ability of PFs increased (all $P < 0.0001$) . Compared with the siRNA-NC group , the protein expression levels of DNMT3A ($P < 0.0001$) and related indicators α -SMA ($P < 0.01$) and Collagen I ($P < 0.01$) significantly decreased in the DNMT3A silencing group by Western blot , and the mRNA levels of *DNMT3A* , α -SMA and *Collagen I* by RT-qPCR also decreased (all $P < 0.001$) , and the proliferation ($P < 0.01$) and migration ability ($P < 0.05$) of PFs cells decreased compared with the control group. **Conclusion** Silencing DNMT3A can inhibit the deposition of collagen and the proliferation of PFs. DNMT3A can promote the proliferation and migration of PFs , and then promote the activation of PFs and the development of pulmonary fibrosis. This process may be regulated by DNA methylation modification.

Key words DNMT3A; DNA methylation; lung fibroblasts; proliferation; migration; pulmonary fibrosis

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH040376)

Corresponding author Sha Jiming , E-mail: shajiming@vip.163.com