

# CCCTC 结合因子对翼状胬肉中 B 淋巴细胞瘤-2 基因表达的调控及其机制

殷秀琴 于莉 易璐 方家华

长沙市第一医院眼科,长沙 410005

通信作者:方家华,Email:nmhuman@163.com

**【摘要】** 目的 探讨转录因子 CCCTC 结合因子 (CTCF) 对翼状胬肉中 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (*Bcl-2*) 表达的调控及其分子机制。方法 纳入 2017 年 6 月至 2019 年 2 月在长沙市第一医院眼科行翼状胬肉切除联合自体角膜缘干细胞移植术治疗的原发性翼状胬肉患者 22 例,术中收集翼状胬肉组织作为翼状胬肉组;同期纳入因结膜裂伤、眼球破裂伤或眼球穿通伤就诊的眼外伤患者 20 例,取眼外伤修复手术过程中切取的少量正常结膜组织作为正常结膜组。分别采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测各组样本中 CTCF 及 *Bcl-2* 的表达水平;采用亚硫酸氢盐处理后测序法 (BSP) 检测各组样本中 *Bcl-2* 启动子 DNA 甲基化水平。分离并培养翼状胬肉成纤维细胞,使用波形蛋白抗体进行免疫组织化学鉴定成纤维细胞。将分离培养的细胞分成 2 个组,CTCF 干扰组转染 CTCF 干扰质粒,对照组转染对照质粒。采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测 CTCF、*Bcl-2* 表达水平;采用细胞计数试剂盒 8 检测各组培养 12、24 和 48 h 细胞增生活性;采用 BSP 检测各组样本中 *Bcl-2* 启动子 DNA 甲基化水平。比较各组各指标差异,采用 Pearson 线性相关分析探讨翼状胬肉组织中 *Bcl-2* mRNA 与 CTCF 蛋白及 *Bcl-2* 基因启动子甲基化水平的相关性。结果 翼状胬肉组 CTCF mRNA 及蛋白相对表达水平分别为  $7.23 \pm 3.34$  和  $0.92 \pm 0.21$ ,明显高于正常结膜组的  $1.10 \pm 0.44$  和  $0.28 \pm 0.07$ ,差异均有统计学意义 ( $t = -8.136, -13.025$ , 均  $P < 0.01$ )。翼状胬肉组 *Bcl-2* mRNA 及蛋白相对表达水平分别为  $10.27 \pm 4.64$  和  $0.95 \pm 0.27$ ,高于正常结膜组的  $1.10 \pm 0.41$  和  $0.32 \pm 0.14$ ,差异均有统计学意义 ( $t = -8.789, -10.782$ , 均  $P < 0.01$ )。翼状胬肉组 CTCF 蛋白相对表达量与 *Bcl-2* mRNA 相对表达量呈显著正相关 ( $r = 0.746, P < 0.01$ )。翼状胬肉组 *Bcl-2* 启动子区 DNA 甲基化水平为  $0.65 \pm 0.09$ ,低于正常结膜组的  $0.83 \pm 0.06$ ,差异有统计学意义 ( $t = 7.408, P < 0.01$ )。翼状胬肉组 *Bcl-2* 启动子 DNA 甲基化水平与 *Bcl-2* mRNA 相对表达量呈显著负相关 ( $r = -0.635, P < 0.01$ )。CTCF 干扰组 CTCF 及 *Bcl-2* mRNA 相对表达水平为  $0.37 \pm 0.03$  和  $0.53 \pm 0.06$ ,明显低于对照组的  $1.02 \pm 0.06$  和  $0.99 \pm 0.07$ ,差异均有统计学意义 ( $t = 20.035, 9.029$ , 均  $P < 0.01$ );CTCF 干扰组 CTCF 及 *Bcl-2* 蛋白相对表达水平为  $0.23 \pm 0.06$  和  $0.56 \pm 0.07$ ,低于对照组的  $0.52 \pm 0.05$  和  $0.92 \pm 0.12$ ,差异均有统计学意义 ( $t = 6.914, 4.719$ , 均  $P < 0.01$ )。CTCF 干扰组转染后 12、24 和 48 h 细胞活力分别为  $0.10 \pm 0.01, 0.17 \pm 0.01$  和  $0.38 \pm 0.04$ ,低于对应时间点对照组的  $0.12 \pm 0.01, 0.29 \pm 0.01$  和  $0.85 \pm 0.06$ ,差异均有统计学意义 ( $t = 3.718, 18.350, 15.621$ , 均  $P < 0.01$ )。CTCF 干扰组 *Bcl-2* 启动子 DNA 甲基化水平为  $0.75 \pm 0.04$ ,明显高于对照组的  $0.61 \pm 0.03$ ,差异有统计学意义 ( $t = -4.472, P < 0.05$ )。结论 翼状胬肉中 CTCF 高表达,其可能通过下调启动子 DNA 甲基化水平介导 *Bcl-2* 异常表达。

**【关键词】** 翼状胬肉; B 淋巴细胞瘤-2; CCCTC 结合因子; DNA 甲基化

**基金项目:** 湖南省临床医疗技术创新引导项目 (2021SK53104); 湖南省卫生健康委 2023 年度科研计划项目 (D202307026115)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20211108-00611

## Regulatory effect of CCCTC binding factor on *Bcl-2* gene in pterygium and its mechanism

Yin Xiuqin, Yu Li, Yi Lu, Fang Jiahua

Department of Ophthalmology, The First Hospital of Changsha, Changsha 410005, China

Corresponding author: Fang Jiahua, Email: nmhuman@163.com.

**[Abstract]** **Objective** To investigate the regulation of transcription factor CCCTC binding factor (CTCF) on the expression of B-cell lymphoma 2 (*Bcl-2*) gene in pterygium and its molecular mechanism. **Methods** Pterygium tissue samples from 22 primary pterygium patients who underwent pterygium excision combined with autologous limbal stem cell transplantation in The First Hospital of Changsha from June 2017 to February 2019 were collected during the operation as pterygium group. Normal conjunctival tissue from 20 patients with ocular trauma due to conjunctiva rupture, eyeball rupture or eyeball perforation in the same period were collected during the repair of ocular trauma as control group. Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression levels of CTCF

and Bcl-2 in the two groups. The DNA methylation level of the Bcl-2 promoter in the samples of the two groups was detected by bisulfite sequencing PCR (BSP). Pterygium fibroblasts were isolated and cultured. Fibroblasts were identified by immunohistochemistry using vimentin antibody. The cultured pterygium fibroblasts were divided into a CTCF interference group transfected with CTCF interference plasmid, and a control group transfected with control plasmid. The expression levels of CTCF and Bcl-2 in pterygium fibroblasts in CTCF interference and control groups were detected by real-time PCR and Western blot. The cell vitality was detected with cell counting kit-8 at 12, 24, and 48 hours after transfection. The DNA methylation level of the Bcl-2 promoter in the cells of the CTCF interference and control groups after transfection was determined by BSP. Differences of the indexes among groups were analyzed. Correlation between Bcl-2 mRNA and Bcl-2 gene promoter methylation level of CTCF protein in pterygium tissue was analyzed by Pearson linear correlation analysis. This study protocol was approved by the Ethics Committee of The First Hospital of Changsha (No. KL-2017021). Written informed consent was obtained from the patients from whom the specimens were collected.

**Results** The relative expression levels of CTCF mRNA and protein in pterygium group were  $7.23 \pm 3.34$  and  $0.92 \pm 0.21$ , respectively, which were significantly higher than  $1.10 \pm 0.44$  and  $0.28 \pm 0.07$  in normal conjunctiva group ( $t = -8.136, -13.025$ ; both at  $P < 0.01$ ). The relative expression levels of Bcl-2 mRNA and protein in pterygium group were  $10.27 \pm 4.64$  and  $0.95 \pm 0.27$ , which were higher than  $1.10 \pm 0.41$  and  $0.32 \pm 0.14$  in normal conjunctiva group, showing statistically significant differences ( $t = -8.789, -10.782$ ; both at  $P < 0.01$ ). The CTCF protein expression was significantly positively correlated with the Bcl-2 mRNA expression in pterygium group ( $r = 0.746, P < 0.01$ ). The DNA methylation level of the Bcl-2 promoter in pterygium group was  $0.65 \pm 0.09$ , which was lower than  $0.83 \pm 0.06$  in normal conjunctiva group, with a statistically significant difference ( $t = 7.408, P < 0.01$ ). The DNA methylation level was significantly negatively correlated with the Bcl-2 mRNA expression in pterygium group ( $r = -0.635, P < 0.01$ ). After the interference of CTCF expression in pterygium fibroblasts, the relative expression levels of CTCF and Bcl-2 mRNA in CTCF interference group were  $0.37 \pm 0.03$  and  $0.53 \pm 0.06$ , which were significantly lower than  $1.02 \pm 0.06$  and  $0.99 \pm 0.07$  in control group ( $t = 20.035, 9.029$ ; both at  $P < 0.01$ ). The relative expression levels of CTCF and Bcl-2 proteins in CTCF interference group were  $0.23 \pm 0.06$  and  $0.56 \pm 0.07$ , which were lower than  $0.52 \pm 0.05$  and  $0.92 \pm 0.12$  in control group, showing statistically significant differences ( $t = 6.914, 4.719$ ; both at  $P < 0.01$ ). The cell viability of pterygium fibroblasts in CTCF interference group was  $0.10 \pm 0.01, 0.17 \pm 0.01, 0.38 \pm 0.04$  at 12, 24, and 48 hours after interference, respectively, which were lower than  $0.12 \pm 0.01, 0.29 \pm 0.01$  and  $0.85 \pm 0.06$  in control group, and the differences were statistically significant ( $t = 3.718, 18.350, 15.621$ ; all at  $P < 0.01$ ). The DNA methylation level of Bcl-2 promoter in CTCF interference group was  $0.75 \pm 0.04$ , which was significantly higher than  $0.61 \pm 0.03$  in control group ( $t = -4.472, P < 0.05$ ).

**Conclusions** CTCF is excessively expressed in pterygium, which may mediate the overexpression of Bcl-2 through down-regulating DNA methylation level.

[Key words] Pterygium; Bcl-2; CCCTC-binding factor; DNA methylation

**Fund program:** Clinical Medical Technology Innovation Project of Hunan Province (2021SK53104); Scientific Research Project of Hunan Provincial Health Commission (D202307026115)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20211108-00611

翼状胬肉是一种良性增生性眼部疾病,向角膜表面进行性生长,导致眼部异物感、眼球运动障碍及视物遮挡<sup>[1-3]</sup>。病理学研究显示,翼状胬肉的主要成分是大量异常增生的成纤维细胞和新生血管,成纤维细胞的病理性增生是翼状胬肉形成和发展的主要因素<sup>[4-5]</sup>。因此探明翼状胬肉成纤维细胞病理性增生的分子机制是解析该病发病机制及靶向治疗的关键。B淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 是一种原癌基因,具有明显抑制细胞凋亡的作用<sup>[6-7]</sup>。已有研究证实,翼状胬肉组织中过度表达的 Bcl-2 通过抑制成纤维细胞及上皮细胞凋亡,导致其过度增生,是翼状胬肉形成的重要原因<sup>[8-10]</sup>。目前,Bcl-2 在翼状胬肉中过度表达的分子机制还不明确。Bcl-2 基因启动子

-483~-1 065 bp 区域包含多个 CCCTC 结合因子 (CCCTC binding factor, CTCF) 结合位点,而且该区域含有多个 CpG 岛,为 DNA 甲基化敏感区域。DNA 发生甲基化修饰后会导致 DNA 结构超螺旋,进而阻遏基因转录,引起基因转录沉默;而去甲基化则会使 DNA 结构松散,促进基因转录<sup>[11-12]</sup>。研究显示,CTCF 能介导靶基因 DNA 发生去甲基化,上调靶基因的表达<sup>[13-14]</sup>。CTCF 与 Bcl-2 的调控关系以及 CTCF 与翼状胬肉的关系目前均未见研究报道。本研究拟通过检测翼状胬肉中 CTCF 表达水平、Bcl-2 基因 DNA 甲基化水平,以及 CTCF 与 Bcl-2 基因 DNA 甲基化水平的关系,阐述翼状胬肉中 Bcl-2 异常表达的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源与采集** 收集 2017 年 6 月至 2019 年 2 月在长沙市第一医院眼科行翼状胬肉切除联合自体角膜缘干细胞移植术的 22 例原发性翼状胬肉患者翼状胬肉组织作为翼状胬肉组,其中男 12 例,女 10 例,平均年龄(50.4±9.1)岁;采集同期行修复手术的 20 例眼外伤患者少量正常结膜组织作为正常结膜组,其中男 13 例,女 7 例,平均年龄(48.3±10.9)岁。翼状胬肉组纳入标准:原发性翼状胬肉。排除标准:眼局部损伤引起的结膜异常增生;复发性翼状胬肉。正常结膜组纳入标准:结膜裂伤、眼球破裂伤或眼球穿通伤的眼外伤患者。排除标准:结膜炎、结膜肿物等结膜相关疾病患者。用生理盐水充分洗净术中切取的翼状胬肉组织和正常结膜组织表面血液,修剪组织后立即置于液氮中保存。2 个组患者年龄、性别等一般资料比较差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ )。本研究方案通过长沙市第一医院伦理委员会审批(批文号:KL-2017021),所有标本来源患者均签署知情同意书。

**1.1.2 主要试剂及仪器** Trizol、青霉素/链霉素混合双抗、II 型胶原酶、DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、Lipofectamine 3000(美国 Invitrogen 公司);PrimeScript™ 逆转录试剂盒、SYBR Green 荧光染料(日本 TaKaRa 公司);蛋白酶抑制剂、RIPA 细胞裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);PVDF 膜(美国 Millipore 公司);BCA 试剂盒(美国 Merck 公司);鼠抗人 CTCF 抗体、鼠抗人 Bcl-2 抗体、鼠抗人 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、羊抗鼠 IgG 抗体、鼠抗人波形蛋白抗体、ECL 化学发光法检测试剂盒、DAB 显色试剂盒(美国 Cell Signaling Technology 公司);基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);EpiTect Fast DNA Bisulfite 试剂盒(德国 Qiagen 公司);CTCF 干扰质粒 pRS-CTCF、对照质粒 pRS(美国 OriGene 公司);细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)(日本同仁化学公司)。Light Cycler96 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);微量电动组织匀浆器(美国 Kimble 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实时荧光定量 PCR 检测各组 CTCF、Bcl-2 的 mRNA 表达水平** 将翼状胬肉组和正常结膜组组织剪成小块,加入液氮迅速研磨粉碎并加入 1 ml Trizol,转

入离心管中,使用电动组织匀浆器充分匀浆;4 ℃ 条件下 12 000×g 离心 5 min,取上清,按每 1 ml 加入 200 μl 氯仿,常规 Trizol 法抽提总 RNA。使用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA,并以 cDNA 为模板采用 SYBR Green 荧光染料法进行实时荧光定量 PCR。反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火及延伸 35 s,共 40 个循环。基因引物序列见表 1,以 GAPDH 为内参照,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各目的基因的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列  
Table 1 PCR primer sequence

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
CTCF	正向:TCGGCATCGTCGTTACAAA	122
	反向:ACGGACGCTCTCCAGTATGA	
Bcl-2	正向:TGTGTGTGGAGAGCGTCAAC	186
	反向:TCTTCAGAGACAGCCAGGAGA	
GAPDH	正向:CCAAGGCTGTGGCAAGGT	239
	反向:GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT	

注:PCR:聚合酶链式反应;CTCF:CCCTC 结合因子;Bcl-2:B 淋巴瘤-2;GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶

Note:PCR:polymerase chain reaction;CTCF:CCCTC binding factor;Bcl-2:B-cell lymphoma-2;GAPDH:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

**1.2.2 Western blot 法检测各组 CTCF、Bcl-2 的蛋白表达水平** 取翼状胬肉组和正常结膜组样本尽量剪碎,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液,于冰上进行匀浆裂解 30 min,4 ℃、12 000×g 离心 5 min,收集上清即为总蛋白提取液,BCA 试剂盒测定浓度。每个样本约取 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并将蛋白质转印到 PVDF 膜,使用质量分数 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入抗 CTCF 抗体(1:300)、抗 Bcl-2 抗体(1:300)、抗 GAPDH 抗体(1:500),4 ℃ 孵育过夜;PBS 漂洗 3 次后加入羊抗鼠二抗(1:1 000)室温孵育 1 h,使用 ECL 化学发光法显影,以 GAPDH 为内参照,采用 ImageJ 分析软件计算各目的蛋白相对表达量。

**1.2.3 亚硫酸氢盐处理后测序检测各组 Bcl-2 启动子 DNA 甲基化水平** 通过 Meth-primer 在线分析 Bcl-2 启动子 DNA 序列,预测 CpG 岛并设计亚硫酸氢盐处理后测序法(bisulfite sequencing PCR, BSP)引物,共使用 2 对引物分别对 CpG 岛的不同区段(-465 ~ -729 bp, -746 ~ -1 073 bp)进行扩增,BSP 引物序列见表 2。取翼状胬肉组和正常结膜组样本尽量剪碎,加入液氮冷冻后研磨,使用基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。使用 EpiTect Fast DNA Bisulfite 试剂

盒处理和纯化基因组 DNA, 所得 DNA 用于后续 PCR 反应。PCR 扩增及克隆完成后进行测序, 分别统计各个样本的测序结果(每样本克隆数  $\geq 5$ ), 得出每个样本单个 CG 位点的甲基化百分比。每个样本所有位点甲基化百分比相加后除以位点数得到检测区域的平均甲基化水平。

表 2 Bcl-2 启动子 BSP 引物序列  
Table 2 BSP primer sequence of Bcl-2 promoter

扩增位置	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	产物长度(bp)
-465~-729 bp	TAGGTTTGAGTAGAAGGTTT	AAAACCCTCCTCTAAACCACC	264
-746~-1 073 bp	AGAGGATAGGTATTATAGTTT	TCCCCCTAAACCCCTCTT	327

注: Bcl-2; B 淋巴细胞瘤-2; BSP; 亚硫酸氢盐处理后测序法  
Note: Bcl-2; B-cell lymphoma-2; BSP; bisulfite sequencing PCR

**1.2.4 翼状胬肉成纤维细胞的分离培养及鉴定** 取 3 例翼状胬肉患者术中切除的翼状胬肉, 立即置入含无菌生理盐水的 EP 管内, 用预冷的含 100 U/ml(商品单位)青霉素和链霉素的 PBS 重复漂洗至溶液变澄清。将标本剪碎成约 1 mm<sup>3</sup> 的小块, 置于含 1 mg/ml II 型胶原酶的无血清 DMEM 培养基中 37 °C 消化 2 h, 直接加入质量分数 0.05% 胰蛋白酶消化 10 min, 200×g 离心 10 min 收集沉淀的细胞。将细胞重悬于含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml(商品单位)青霉素和链霉素的 DMEM 完全培养基中培养过夜。去除未贴壁的细胞, 贴壁细胞在 DMEM 完全培养基中继续培养, 传代 4 代后使用。无菌盖玻片经多聚赖氨酸处理后放入 6 孔板中, 将细胞悬液滴在盖玻片上, 于培养箱培养 24 h; 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 冲洗 3 次, 经双氧水和山羊血清处理后, 加入鼠抗人波形蛋白抗体(1:300), 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 4 °C 孵育过夜; PBS 漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(1:1 000), 室温孵育 1 h, DAB 显色剂显色后于光学显微镜下观察。

**1.2.5 翼状胬肉成纤维细胞的分组及转染** 将翼状胬肉成纤维细胞接种到 6 孔板分成 2 个组, 其中 CTCF 干扰组使用 Lipofectamine 3000 转染试剂转染 CTCF 干扰质粒 pRS-CTCF, 对照组转染空白质粒 pRS。转染后 48 h 收集细胞分别抽提总 RNA 及基因组 DNA, 采用实时荧光定量 PCR 检测 CTCF、Bcl-2 表达水平, 采用 BSP 法检测 Bcl-2 启动子 DNA 甲基化水平。

**1.2.6 CCK-8 法检测转染细胞的增生活性** 先分别将 CTCF 干扰质粒和空白质粒转染进翼状胬肉成纤维细胞, 每组转染细胞培养后 6 h 按  $4 \times 10^3$  个/孔的密度分别接种于 96 孔板, 每组设置 6 个复孔, 每组共接种

3 块板。分别于转染后 12、24 和 48 h 进行检测。检测前更换培养基后每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂, 37 °C 培养 2 h, 测量波长 450 nm 处吸光度(absorbance, A) 值。细胞活力抑制率=(对照组 A 值-CTCF 干扰组 A 值)/对照组 A 值  $\times 100\%$ 。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数经 Levene 检验证实方差齐。采用两水平研究设计, 翼状胬肉组与正常结膜组及 CTCF 干

扰组与对照组各指标表达水平差异比较采用独立样本 *t* 检验, 翼状胬肉组中 Bcl-2 mRNA 与 CTCF 蛋白及 Bcl-2 基因启动子 DNA 甲基化水平相关性分析采用 Pearson 线性相关分析。采用双尾检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 翼状胬肉组与正常结膜组中 CTCF 和 Bcl-2 mRNA 和蛋白相对表达量比较

翼状胬肉组 CTCF mRNA 和蛋白相对表达量分别为  $7.23 \pm 3.34$  和  $0.92 \pm 0.21$ , 明显高于正常结膜组的  $1.10 \pm 0.44$  和  $0.28 \pm 0.07$ , 差异均有统计学意义 ( $t = -8.136, -13.025$ , 均  $P < 0.01$ )。翼状胬肉组 Bcl-2 mRNA 和蛋白相对表达量分别为  $10.27 \pm 4.64$  和  $0.95 \pm 0.27$ , 明显高于正常结膜组的  $1.10 \pm 0.41$  和  $0.32 \pm 0.14$ , 差异均有统计学意义 ( $t = -8.789, -10.782$ , 均  $P < 0.01$ ) (图 1)。

### 2.2 翼状胬肉组与正常结膜组中 Bcl-2 启动子 DNA 甲基化水平比较

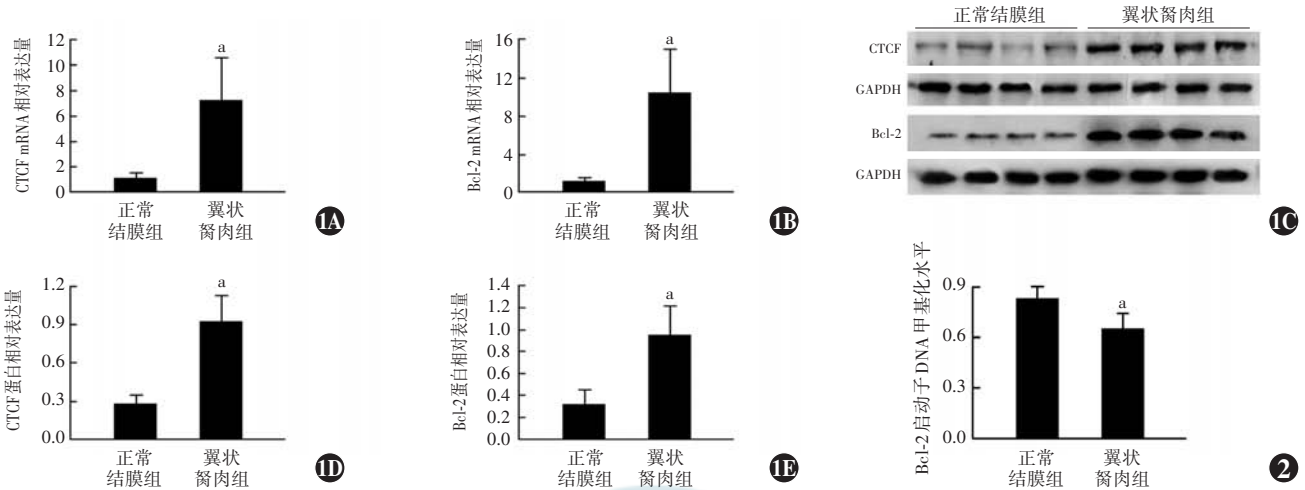
翼状胬肉组 Bcl-2 启动子 DNA 甲基化水平为  $0.65 \pm 0.09$ , 明显低于正常结膜组的  $0.83 \pm 0.06$ , 差异有统计学意义 ( $t = 7.408, P < 0.01$ ) (图 2)。

### 2.3 翼状胬肉组织中 Bcl-2 mRNA 与 CTCF 蛋白及 Bcl-2 启动子 DNA 甲基化的相关性

翼状胬肉组织中 CTCF 蛋白相对表达量与 Bcl-2 mRNA 相对表达量呈显著正相关 ( $r = 0.746, P < 0.01$ )。Bcl-2 启动子 DNA 甲基化水平与 Bcl-2 mRNA 表达水平呈显著负相关 ( $r = -0.635, P < 0.01$ ) (图 3)。

### 2.4 体外培养翼状胬肉成纤维细胞的鉴定

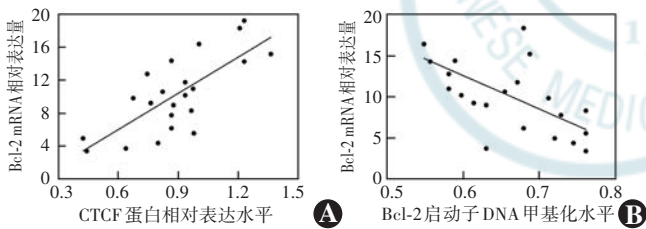
倒置显微镜下观察培养的细胞形态以长梭形为



**图1 正常结膜组与翼状胬肉组中CTCF和Bcl-2 mRNA及蛋白表达比较** (正常结膜组  $n=20$ , 翼状胬肉组  $n=22$ ) A、B: 各组CTCF和Bcl-2 mRNA相对表达量比较 与正常结膜组比较,  $^aP<0.01$  (独立样本  $t$  检验) C: 各组CTCF和Bcl-2蛋白表达电泳图 翼状胬肉组CTCF和Bcl-2蛋白条带灰度明显强于正常结膜组 D、E: 各组CTCF和Bcl-2蛋白相对表达量比较 与正常结膜组比较,  $^aP<0.01$  (独立样本  $t$  检验) Bcl-2: B淋巴细胞瘤-2; CTCF: CCCTC结合因子; GAPDH: 3-磷酸甘油醛脱氢酶 **图2 正常结膜组与翼状胬肉组中Bcl-2启动子DNA甲基化水平比较** 与正常结膜组比较,  $^aP<0.01$  (独立样本  $t$  检验, 正常结膜组  $n=20$ , 翼状胬肉组  $n=22$ ) Bcl-2: B淋巴细胞瘤-2

**Figure 1 Comparison of expression levels of CTCF and Bcl-2 mRNA between two groups** (normal conjunctiva group:  $n=20$ ; pterygium group:  $n=22$ ) A, B: Comparison of relative expression levels of CTCF and Bcl-2 mRNA Compared with normal conjunctiva group,  $^aP<0.01$  (Independent samples  $t$ -test) C: Electrophoretogram of CTCF and Bcl-2 proteins expressions The band intensity of CTCF and Bcl-2 proteins was stronger in pterygium group than in normal conjunctiva group D, E: Comparison of relative expression levels of CTCF and Bcl-2 proteins Compared with normal conjunctiva group,  $^aP<0.01$  (Independent samples  $t$ -test) Bcl-2: B-cell lymphoma-2; CTCF: CCCTC binding factor; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

**Figure 2 Comparison of DNA methylation level of Bcl-2 promoter between two groups** Compared with normal conjunctiva group,  $^aP<0.01$  (Independent samples  $t$ -test; normal conjunctiva group:  $n=20$ ; pterygium group:  $n=22$ ) Bcl-2: B-cell lymphoma-2

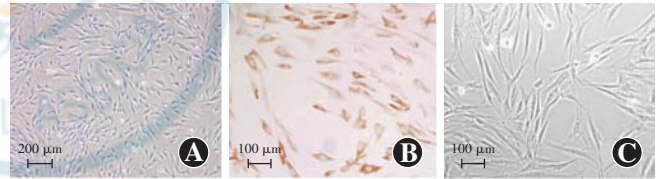


**图3 翼状胬肉组织中Bcl-2 mRNA与CTCF蛋白及Bcl-2启动子DNA甲基化水平相关性散点图** (Pearson线性相关分析,  $n=22$ )

A: Bcl-2 mRNA与CTCF蛋白表达水平呈显著正相关  $r=0.746$ ,  $P<0.01$  B: Bcl-2 mRNA表达水平与基因启动子甲基化水平呈明显负相关  $r=-0.635$ ,  $P<0.01$  Bcl-2: B淋巴细胞瘤-2; CTCF: CCCTC结合因子

**Figure 3 Scatter plot showing the correlation between Bcl-2 mRNA, CTCF protein and Bcl-2 promoter DNA methylation level in pterygium tissues** (Pearson linear correlation analysis,  $n=22$ )

A: There was a significant positive correlation between Bcl-2 mRNA and CTCF protein expression levels  $r=0.746$ ,  $P<0.01$  B: There was a significant negative correlation between Bcl-2 mRNA expression level and Bcl-2 promoter methylation level  $r=-0.635$ ,  $P<0.01$  Bcl-2: B-cell lymphoma-2; CTCF: CCCTC binding factor



**图4 体外培养翼状胬肉成纤维细胞鉴定** A: 倒置显微镜下观察培养的细胞 ( $\times 100$ , 标尺 =  $200 \mu\text{m}$ ) 细胞形态均一且多呈长梭形, 分布较均匀, 密度较高时呈鱼群状或放射状 B: 细胞爬片波形蛋白免疫组织化学染色 (DAB  $\times 200$ , 标尺 =  $100 \mu\text{m}$ ) 细胞质中波形蛋白染色呈棕黄色阳性染色 C: 细胞爬片波形蛋白免疫组织化学染色阴性对照 (DAB  $\times 200$ , 标尺 =  $100 \mu\text{m}$ ) 细胞无着色

**Figure 4 Identification of pterygium fibroblasts cultured in vitro**

A: Observation of cultured pterygium fibroblasts under an inverted microscope ( $\times 100$ , bar =  $200 \mu\text{m}$ ) The cell morphology was uniform and most of the cells were in the shape of long spindle. Cells were uniformly distributed, shoal-like or radial at higher densities

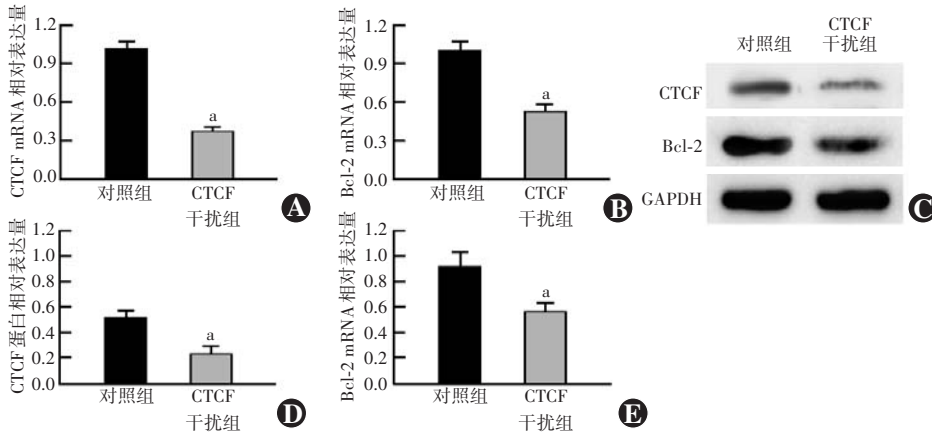
B: Immunohistochemical staining of vimentin expression (DAB  $\times 200$ , bar =  $100 \mu\text{m}$ ) Brown-yellow positive staining for vimentin expression was seen in the cytoplasm C: Negative control of vimentin immunohistochemistry (DAB  $\times 200$ , bar =  $100 \mu\text{m}$ ) No staining was observed

主, 分布均匀 (图4A)。免疫组织化学染色可见细胞质中波形蛋白染色呈棕黄色阳性染色, 而阴性对照细胞无着色 (图4B, C)。结合形态学及免疫组织化学的结果基本鉴定为成纤维细胞。

**2.5 各转染组细胞CTCF和Bcl-2 mRNA及蛋白表达比较**

CTCF干扰组CTCF和Bcl-2 mRNA相对表达量分

别为  $0.37 \pm 0.03$  和  $0.53 \pm 0.06$ , 均明显低于对照组的  $1.02 \pm 0.06$  和  $0.99 \pm 0.07$ , 差异均有统计学意义 ( $t=20.035, 9.029$ , 均  $P<0.01$ )。CTCF干扰组CTCF和Bcl-2蛋白相对表达量分别为  $0.23 \pm 0.06$  和  $0.56 \pm 0.07$ , 明显低于对照组的  $0.52 \pm 0.05$  和  $0.92 \pm 0.12$ , 差异均有统计学意义 ( $t=6.914, 4.719$ , 均  $P<0.01$ ) (图5)。



**图 5 CTCF 干扰组与对照组 CTCF 和 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达比较** A, B: 各组 CTCF 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量比较 与对照组比较,  $^aP < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) C: 各组 CTCF 和 Bcl-2 蛋白表达电泳图 CTCF 干扰组 CTCF 和 Bcl-2 蛋白条带灰度明显弱于对照组 D, E: 各组 CTCF 和 Bcl-2 蛋白相对表达量比较 与对照组比较,  $^aP < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) CTCF: CCCTC 结合因子; Bcl-2: B 淋巴细胞瘤-2; GAPDH: 3-磷酸甘油醛脱氢酶

**Figure 5 Comparison of mRNA and protein expression levels of CTCF and Bcl-2 between two groups** A, B: Comparison of relative expression levels of CTCF and Bcl-2 mRNA Compared with control group,  $^aP < 0.01$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) C: Electrophoretogram of CTCF and Bcl-2 proteins expressions The band intensity of CTCF and Bcl-2 proteins was weaker in CTCF interference group than in control group D, E: Comparison of relative expression levels of CTCF and Bcl-2 protein Compared with control group,  $^aP < 0.01$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) CTCF: CCCTC binding factor; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

### 3 讨论

CTCF 是一种高度保守的具有多锌指结构的多功能转录因子,调控基因的转录<sup>[15-16]</sup>。CTCF 对于不同基因发挥不同的调控作用,能结合到 MYC 原癌基因、*Bax*、*Homeobox A10* 等基因的启动子区,作为绝缘子阻碍相邻顺式元件对基因转录的启动<sup>[17-19]</sup>。然而,CTCF 也可以结合到淀粉样  $\beta$  前体蛋白 (amyloid beta precursor protein, APP) 启动子作为转录激活剂,上调 APP 的转录<sup>[20]</sup>。CTCF 的靶基因中有很多

与细胞凋亡和增生相关,异常表达的 CTCF 能介导众多肿瘤细胞抵抗凋亡,导致其恶性增生<sup>[19, 21-22]</sup>。大量研究证实成纤维细胞的异常增生与分化是翼状胬肉形成的关键因素<sup>[23-24]</sup>。Shen 等<sup>[9]</sup>研究发现,翼状胬肉组织中微小 RNA (micro RNA, miR)-15a 的表达显著低于正常结膜组织,miR-15a 的靶基因 *Bcl-2* 表达升高;在翼状胬肉上皮细胞中过表达 miR-15a 可以下调 *Bcl-2* 的表达,促进细胞凋亡。本研究结果显示,翼状胬肉组织中 CTCF、*Bcl-2* 的表达均较正常结膜组织明显升高,且二者的表达水平呈显著正相关;CTCF 干扰组细胞中 *Bcl-2* 表达水平显著下调,细胞活力明显下降。这一发现完善了翼状胬肉组织中 *Bcl-2* 过度表达的分子机制,证实 CTCF 是 *Bcl-2* 表达的重要促进因子,从而参与翼状胬肉的疾病进程。

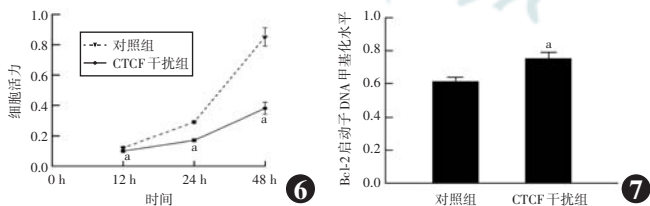
DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶作用下,将甲基转移到 CpG 二核苷酸的脱氧胞嘧啶第 5 位碳原子,形成 5mC 的过程<sup>[25]</sup>。DNA 去甲基化是在 TET (ten-eleven-translocation) 蛋白家族介导的羟甲基化作用下开始的,通过一系列氧化还原反应最终会去除 5mC,将甲基化胞嘧啶转化为未修饰的胞嘧啶<sup>[26]</sup>。Wiehle 等<sup>[27]</sup>研究发现,CTCF 可以与 TET 家族蛋白相互作用,介导胚胎干细胞发育相关基因的 DNA 去甲基化。在 B 细胞慢性淋巴细胞及结肠癌细胞等肿瘤细胞中,*Bcl-2* 基因 DNA 低甲基化导致 *Bcl-2* 过度表达,参与肿瘤细胞的恶性增生<sup>[28-29]</sup>。本研究发现翼状胬肉中 *Bcl-2* 启动子区 DNA 甲基化水平显著低于正常

### 2.6 各转染组细胞增生活性比较

CTCF 干扰组转染后 12、24 和 48 h 细胞活力分别为  $0.10 \pm 0.01$ 、 $0.17 \pm 0.01$  和  $0.38 \pm 0.04$ ,明显低于对照组的  $0.12 \pm 0.01$ 、 $0.29 \pm 0.01$  和  $0.85 \pm 0.06$ ,差异均有统计学意义 ( $t = 3.718, 18.350, 15.621$ , 均  $P < 0.01$ )。CTCF 干扰组转染后 12、24 和 48 h 细胞活力抑制率分别为  $(17.00 \pm 0.05)\%$ 、 $(41.00 \pm 0.05)\%$  和  $(55.00 \pm 0.07)\%$  (图 6)。

### 2.7 各转染组 Bcl-2 启动子 DNA 甲基化水平比较

CTCF 干扰组 *Bcl-2* 启动子 DNA 甲基化水平为  $0.75 \pm 0.04$ ,明显高于对照组的  $0.61 \pm 0.03$ ,差异有统计学意义 ( $t = -4.472, P < 0.01$ ) (图 7)。



**图 6 各转染组不同时间点细胞活力比较** 与同时间点对照组比较,CTCF 干扰组细胞活力明显下降,  $^aP < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) CTCF: CCCTC 结合因子 **图 7 各转染组 Bcl-2 启动子 DNA 甲基化水平比较** 与对照组比较,  $^aP < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) Bcl-2: B 淋巴细胞瘤-2; CTCF: CCCTC 结合因子

**Figure 6 Comparison of cell vitality at different time points between different transfection groups** The cell vitality of CTCF interference group was significantly decreased in comparison with control group at the same time point,  $^aP < 0.01$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) CTCF: CCCTC binding factor **Figure 7 Comparison of DNA methylation level of Bcl-2 promoter between different transfection groups** Compared with control group,  $^aP < 0.01$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) Bcl-2: B-cell lymphoma-2; CTCF: CCCTC binding factor

结膜组织,且 Bcl-2 DNA 甲基化水平与其 mRNA 水平呈显著负相关,说明 DNA 低甲基化是 Bcl-2 在翼状胬肉中异常表达的重要原因。此外,在翼状胬肉成纤维细胞中干扰 CTCF 表达后,Bcl-2 启动子 DNA 甲基化水平显著上调。因此推测过度表达的 CTCF 是 Bcl-2 启动子低甲基化的重要原因。

综上所述,过度表达的 CTCF 介导 Bcl-2 启动子低甲基化,导致 Bcl-2 异常高表达,引起翼状胬肉成纤维细胞凋亡/增生失衡,参与翼状胬肉的形成。这一发现不仅完善了翼状胬肉成纤维细胞凋亡及增生失衡的分子调节机制,更为翼状胬肉患者的治疗提供了有效的生物靶点。但本研究未探明 CTCF 与 DNA 甲基化/去甲基化相关修饰酶等调节 DNA 甲基化的直接效应分子之间的相互作用,在后续的研究中我们会进一步完善翼状胬肉中 CTCF 参与 Bcl-2 启动子 DNA 低甲基化的分子机制。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 殷秀琴:参与研究选题、研究实施、论文撰写;方家华:参与研究选题、实验指导、论文修改和定稿;于莉、易璐:参与研究实施、数据分析

## 参考文献

- [1] Young AL, Cao D, Chu WK, et al. The evolving story of pterygium[J]. *Cornea*, 2018, 37 Suppl 1 : S55-S57. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001744.
- [2] Rezvan F, Khabazkhoob M, Hooshmand E, et al. Prevalence and risk factors of pterygium: a systematic review and meta-analysis[J]. *Surv Ophthalmol*, 2018, 63 ( 5 ) : 719-735. DOI: 10.1016/j.survophthal.2018.03.001.
- [3] Threlfall TJ, English DR. Sun exposure and pterygium of the eye: a dose-response curve[J]. *Am J Ophthalmol*, 1999, 128 ( 3 ) : 280-287. DOI: 10.1016/s0002-9394(99)00161-0.
- [4] 吴迪,孙晓楠,杜林,等.雷帕霉素对体外培养人翼状胬肉成纤维细胞增生、移行和纤维化的抑制作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36 ( 12 ) : 902-907. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.12.002.  
Wu D, Sun XN, Du L, et al. Inhibitory effect of rapamycin on proliferation, migration and fibrosis of human pterygium fibroblasts *in vitro* [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36 ( 12 ) : 902-907. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.12.002
- [5] Li X, Dai Y, Xu J. MiR-21 promotes pterygium cell proliferation through the PTEN/AKT pathway[J]. *Mol Vis*, 2018, 24 : 485-494.
- [6] Youle RJ, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9 ( 1 ) : 47-59. DOI: 10.1038/nrm2308.
- [7] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 281 ( 5381 ) : 1322-1326. DOI: 10.1126/science.281.5381.1322.
- [8] Turan M, Turan G. Bcl-2, p53, and Ki-67 expression in pterygium and normal conjunctiva and their relationship with pterygium recurrence [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2020, 30 ( 6 ) : 1232-1237. DOI: 10.1177/1120672120945903.
- [9] Shen J, Li H, Chen Y, et al. MiR-15a participated in the pathogenesis of pterygium via targeting Bcl-2: an experimental research [J]. *Curr Eye Res*, 2022, 47 ( 1 ) : 32-40. DOI: 10.1080/02713683.2021.1952603.
- [10] Süren E, Nergiz D, Bilgin B, et al. The role of cyclin D1, Bcl-2, p53 and Ki-67 in epithelial cells in the etiopathogenesis of pterygium[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2021, 64 ( 2 ) : 238-242. DOI: 10.4103/IJPM.IJPM\_23\_20.
- [11] Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases [J]. *Genes Dis*, 2018, 5 ( 1 ) : 1-8. DOI: 10.1016/j.gendis.2018.01.002.
- [12] Luo C, Hajkova P, Ecker JR. Dynamic DNA methylation: in the right place at the right time [J]. *Science*, 2018, 361 ( 6409 ) : 1336-1340. DOI: 10.1126/science.aat6806.
- [13] Maurano MT, Wang H, John S, et al. Role of DNA methylation in modulating transcription factor occupancy [J]. *Cell Rep*, 2015, 12 ( 7 ) : 1184-1195. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.07.024.
- [14] Schübeler D. Function and information content of DNA methylation [J]. *Nature*, 2015, 517 ( 7534 ) : 321-326. DOI: 10.1038/nature14192.
- [15] Xiao T, Wongtrakongate P, Trainor C, et al. CTCF recruits centromeric protein CENP-E to the pericentromeric/centromeric regions of chromosomes through unusual CTCF-binding sites [J]. *Cell Rep*, 2015, 12 ( 10 ) : 1704-1714. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.08.005.
- [16] Hou C, Zhao H, Tanimoto K, et al. CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 ( 51 ) : 20398-20403 [2022-06-08]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074263>. DOI: 10.1073/pnas.0808506106.
- [17] Schuijers J, Manteiga JC, Weintraub AS, et al. Transcriptional dysregulation of MYC reveals common enhancer-docking mechanism [J]. *Cell Rep*, 2018, 23 ( 2 ) : 349-360. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.056.
- [18] Méndez-Catalá CF, Gretton S, Vostrov A, et al. A novel mechanism for CTCF in the epigenetic regulation of Bax in breast cancer cells [J]. *Neoplasia*, 2013, 15 ( 8 ) : 898-912. DOI: 10.1593/neo.121948.
- [19] Mustafa M, Lee JY, Kim MH. CTCF negatively regulates HOXA10 expression in breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467 ( 4 ) : 828-834. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.058.
- [20] Vostrov AA, Taheny MJ, Quitschke WW. A region to the N-terminal side of the CTCF zinc finger domain is essential for activating transcription from the amyloid precursor protein promoter [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 ( 2 ) : 1619-1627. DOI: 10.1074/jbc.M109748200.
- [21] Lai Q, Li Q, He C, et al. CTCF promotes colorectal cancer cell proliferation and chemotherapy resistance to 5-FU via the P53-Hedgehog axis [J/OL]. *Ageing ( Albany NY )*, 2020, 12 ( 16 ) : 16270-16293 [2022-06-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32688344>. DOI: 10.18632/aging.103648.
- [22] Docquier F, Farrar D, D'Arcy V, et al. Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 ( 12 ) : 5112-5122. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3498.
- [23] Kim SW, Kim HI, Thapa B, et al. Critical role of mTORC2-Akt signaling in TGF-β1-induced myofibroblast differentiation of human pterygium fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60 ( 1 ) : 82-92. DOI: 10.1167/iovs.18-25376.
- [24] Kim KW, Park SH, Kim JC. Fibroblast biology in pterygia [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 142 : 32-39. DOI: 10.1016/j.exer.2015.01.010.
- [25] Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38 ( 1 ) : 23-38. DOI: 10.1038/npp.2012.112.
- [26] Jeschke J, Collignon E, Fuks F. Portraits of TET-mediated DNA hydroxymethylation in cancer [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 36 : 16-26. DOI: 10.1016/j.gde.2016.01.004.
- [27] Wiehle L, Thorn GJ, Raddatz G, et al. DNA ( de ) methylation in embryonic stem cells controls CTCF-dependent chromatin boundaries [J]. *Genome Res*, 2019, 29 ( 5 ) : 750-761. DOI: 10.1101/gr.239707.118.
- [28] Hanada M, Delia D, Aiello A, et al. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 1993, 82 ( 6 ) : 1820-1828.
- [29] Babidge WJ, Butler LM, Burton MA, et al. Methylation of CpG sites in exon 2 of the Bcl-2 gene occurs in colorectal carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21 ( 4A ) : 2809-2814.

(收稿日期:2022-09-27 修回日期:2023-03-19)

(本文编辑:张宇 骆世平)

