

DNMT3A 与 CTGF 在 AAC 致大鼠心肌纤维化中的表达及相关性研究

杨健康^{1,2}, 石开虎^{1,2}, 陶辉^{1,2}, 代晨^{1,2}, 秦润禾^{1,2}, 占红英^{1,2}

摘要 目的 探讨经腹主动脉缩窄(AAC)导致大鼠心肌纤维化中 DNA 甲基转移酶 3A (DNMT3A) 与结缔组织生长因子(CTGF)的表达及相关性。方法 将 60 只 8 周龄雄性 SD 大鼠随机分为模型组及对照组。模型组行 AAC 术,对照组行假手术,术后 2 周处死大鼠获取血液标本,并取心脏。同时测定心重指数,采用 ELISA 法测量 I 型胶原和 CTGF 在心肌组织匀浆中的含量,HE 和 Masson 染色法观察心肌组织病理学改变;Western blot 法测定 DNMT3A 和 CTGF 的表达。结果 与对照组比较,模型组大鼠的心重指数显著上升,且心肌组织中 I 型胶原和 CTGF 的含量明显增加;HE 和

Masson 染色显示,模型组心肌组织呈现明显的胶原沉积;Western blot 检测表明模型组 DNMT3A、CTGF 的含量水平明显高于对照组;DNMT3A 和 CTGF 在大鼠心肌纤维化组织中的表达呈正相关性($r=0.64, P<0.01$)。结论 DNMT3A 参与心肌纤维化的形成过程,并在其中起到一定的促进作用,可能与 CTGF 的升高有一定的相关性。

关键词 心肌纤维化;腹主动脉缩窄术;DNA 甲基转移酶 3A;结缔组织生长因子

中图分类号 R 542.23

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1302-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.010

2017-03-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81570295);安徽省科技攻关计划项目(编号:1501041148)

作者单位:¹ 安徽医科大学第二附属医院心胸外科,合肥 230601

² 安徽医科大学心血管病研究中心,合肥 230032

作者简介:杨健康,男,硕士研究生;

石开虎,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: shikaihu@gmail.com

心肌纤维化可由许多疾病引起如缺血/再灌注损伤、心房颤动等,也是心源性猝死的预测因素^[1]。心肌纤维化的特征是细胞外基质蛋白在细胞间质中堆积,并引起心脏收缩和舒张功能障碍,研究^[2]表明心脏中的纤维化改变是可逆的。因此,阐明心肌纤维化发生发展的潜在分子机制以针对抗心肌纤维

Effects of sitagliptin on proliferation and contents of 3-NT in Schwann cells under high glucose

Xu Dandan, Ren Mingshan, Wu Yuanbo, et al

(Dept of Neurosurgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effects of dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor sitagliptin on the proliferation, apoptosis and content of 3-nitrotyrosine (3-NT) in rat Schwann cells (RSC96) in high glucose. **Methods** Schwann cell model was established by culturing RSC96 under high glucose (100 mmol/L D-glucose). The model were treated with peroxynitrite anion (ONOO⁻) inhibitor uric acid (UA) (1 μmol/L) and sitagliptin (1 μmol/L) for 48 hours, the effects of UA and sitagliptin on the proliferation and apoptosis of RSC96 under high glucose were observed by CCK-8 and flow cytometry. The effects of UA and sitagliptin on the expression of 3-NT protein in RSC96 were detected by ELISA. **Results** Compared with normal control group, the hyperglycemia group inhibited cell proliferation, promoted cell apoptosis and expression of intracellular 3-NT protein ($P<0.05$); UA and sitagliptin could promote the proliferation of RSC96 under high glucose, inhibited apoptosis and intracellular 3-NT protein expression ($P<0.05$). **Conclusion** Sitagliptin can increase the proliferation activity of RSC96 under high glucose, inhibit apoptosis and reduce the damage of RSC96 cells induced by high concentration of glucose by inhibiting the nitrosylation stress of cells.

Key words Schwann cell; diabetic peripheral neuropathy; sitagliptin; 3-nitrotyrosine; nitrosative stress

化治疗模式是至关重要的。该实验组前期研究已显示 DNA 甲基转移酶 3A (DNA methyltransferase 3A, DNMT3A) 可能参与大鼠心肌纤维化的发生发展, 现进一步研究其在腹主动脉缩窄模型中表达及与心肌纤维化程度的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 8 周龄 SD 雄性大鼠 60 只, 200 ~ 260 g, 购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 药物和试剂 水合氯醛(天津市光复精细化工研究所); 青霉素钠(华北制药股份有限公司); I 型胶原和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF) ELISA 试剂盒(上海酶联生物有限公司); DNMT3A 和 CTGF 抗体(北京博奥森科技有限公司)。

1.3 主要仪器 EPS300 电泳仪(上海天能科技有限公司); 酶标仪 MK3(荷兰雷勃公司)。

1.4 动物分组及模型制备 60 只大鼠随机分为两组: 模型组($n = 35$)、对照组($n = 25$)。模型组大鼠常规麻醉剃毛消毒后, 开腹于右肾动脉上 0.5 cm 处游离腹主动脉, 平行放置 7 号针头(直径为 0.7 mm), 将针头与腹主动脉用 0 号手术缝线一并结扎后抽离针头, 造成约 70% 的管腔狭窄。对照组只挂线不予结扎, 其余处理与模型组一致。将腹腔脏器复位后予青霉素钠 20 万单位注射, 缝合肌肉及皮肤后给予保暖待完全苏醒后放回鼠笼, 术后抗生素维持 3 d。

1.5 标本采集及处理 两组大鼠均常规饲养 2 周后, 予 10% 水合氯醛麻醉后腹主动脉采血 5 ml 抗凝备用, 取心脏去除心包及大血管固定于 10% 甲醛溶液中, 经石蜡包埋后, 沿切面连续切片 5 张, 每张厚 4 μ m, 用 HE 染色和 Masson 染色观察心肌纤维化程度, 并以胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)作为心肌纤维化指标。剩余心肌组织装入冻存管于液氮罐中保存。

1.6 心重指数的测定 禁食不禁水 24 h, 大鼠称体重(body weight, BW)后麻醉开胸游离心脏, 减除大血管心包膜脂肪组织, 用生理盐水清洗吸干后称心重(heart weight, HW), 计算心重指数, 心重指数 = HW/BW。

1.7 HE 染色、Masson 染色及 CVF 测定 心肌组织切片烤热后于二甲苯和梯度乙醇溶液中脱蜡。苏木精染 5 min, 流水冲洗, 1% 盐酸乙醇迅速分化, 流水稍洗, 促蓝液返蓝数秒, 流水冲洗, 依次行 HE 染

色和 Masson 染色。每张 Masson 染色切片选取 3 个无血管视野(400 倍), 采用 Image Pro Plus 6.0 图像扫描软件进行图像分析, 计算心肌 CVF。CVF(%) = 胶原面积/全视野面积 \times 100%。

1.8 心肌组织中 I 型胶原和 CTGF 含量的检测 取备用心肌组织各 0.1 g, 充分匀浆化后 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 用酶标仪测定各孔光密度值并计算出相应的 I 型胶原和 CTGF 含量。

1.9 Western blot 法测定 DNMT3A、CTGF 的表达 心肌组织总蛋白提取: 称取心肌组织 0.1 g 放入匀浆器中, 尽量剪碎后加入 1 ml RIPA 裂解液(含 10 μ l PMSF), 匀浆化离心取上清液即得总蛋白提取液。配制蛋白: 80% 蛋白提取液 + 20% SDS 蛋白上样缓冲液置于 1.5 ml 离心管后, 于干燥机中 100 $^{\circ}$ C 5 min。蛋白电泳: 取 5 μ g 的每种蛋白分别进行 SDS-PAGE 后转移至 PVDF 膜, 再用 TBST 配置的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 将膜置于一抗稀释液中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在 TBST 中洗涤 4 次后, 将膜与二抗在室温下孵育 1 h。使用化学发光试剂显示信号。采用 Lab Works 4.5 图像获取和分析系统软件测定 DNMT3A、CTGF 蛋白条带的积分光密度(integrated optical density, IOD)值, 每个样品均同时检测 β -actin 蛋白条带的 IOD 值, 以 β -actin 作为内参照, 其相对表达量以 IOD_{DNMT3A}/IOD _{β -actin}、IOD_{CTGF}/IOD _{β -actin} 值表示。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采取两样本 t 检验, 相关分析采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 动物建模情况 模型组行腹主动脉缩窄术(abdominal aortic coarctation, AAC)的 SD 大鼠共 35 只, 两周后存活 26 只, 存活率 74.3%, 对照组行假手术的 SD 大鼠共 25 只, 两周后存活 24 只, 存活率 96%。模型组死亡 9 只, 术中死于腹主动脉撕裂 2 只, 心跳骤停 1 只, 术后 24 h 内死亡 5 只, 术后第 9 天死亡 1 只。对照组术后 24 h 死亡 1 只, 术后 2 周两组大鼠外观差异无统计学意义。

2.2 AAC 所致心肌纤维化对大鼠心重指数的影响 与对照组(3.30 ± 0.38 mg/g)比较, 模型组心重指数(4.81 ± 0.54 mg/g)明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 AAC 所致的心肌纤维化对大鼠心肌组织中 I

型胶原和 CTGF 的含量影响 模型组心肌组织匀浆中 I 型胶原含量 ($5.77 \pm 0.82 \mu\text{g/L}$) 明显高于对照组 ($3.31 \pm 0.57 \mu\text{g/L}$); 模型组心肌组织匀浆中 CTGF 含量 ($3.91 \pm 0.64 \mu\text{g/L}$) 明显高于对照组 ($1.69 \pm 0.51 \mu\text{g/L}$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 HE 染色、Masson 染色及胶原容积分数 HE 染色中细胞核染为蓝色, 胞质及胞外基质呈红色, 可以观察到模型组心肌细胞增生肥大排列紊乱, 胞外基质增多; 对照组心肌细胞排列规则, 整齐清晰, 见图 1。Masson 染色中心肌染红色, 心肌间质的胶原纤维染蓝色, 两组 CVF 比较: 模型组大鼠心肌组织胶原容积分数百分比 (12.47 ± 2.87) 明显高于对照组 (5.63 ± 1.50), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

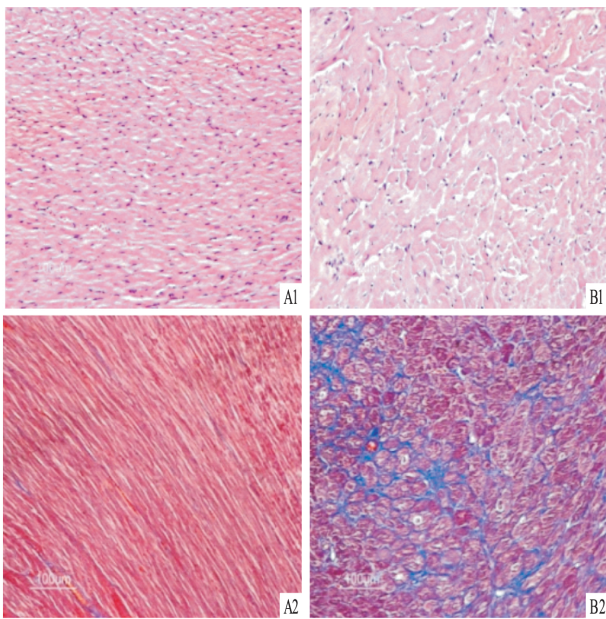


图 1 术后 2 周大鼠的心脏病理改变 $\times 400$
A: 对照组; B: 模型组; 1: HE 染色; 2: Masson 染色

2.5 AAC 所致的心肌纤维化大鼠 DNMT3A 和 CTGF 蛋白表达情况 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织 DNMT3A、CTGF 含量均显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.6 相关性分析 DNMT3A 的蛋白表达水平与 CTGF 的蛋白表达水平呈正相关性 ($r = 0.64, P < 0.01$)。

3 讨论

心肌纤维化是心脏损伤后常见的病理生理改变, 并且随病情进展可导致不可逆的终末期心脏病,

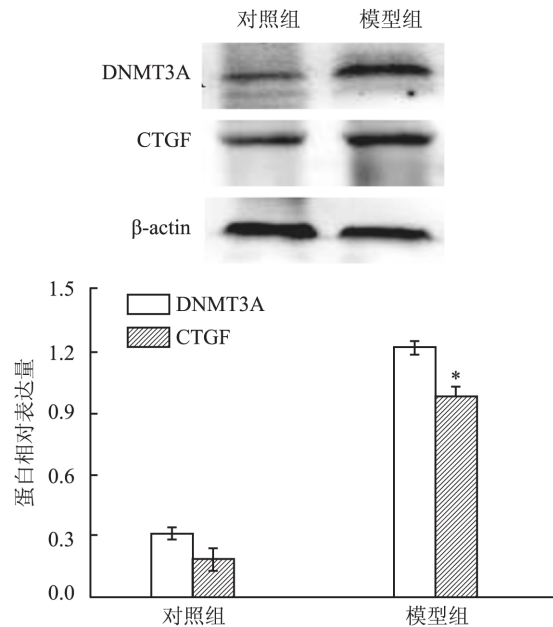


图 2 Western blot 检测 AAC 所致的心肌纤维化大鼠蛋白表达情况与对照组比较: * $P < 0.05$

其纤维化过程与心肌成纤维细胞的活化增殖紧密联系^[3]。大鼠经 ACC 术制备心肌纤维化模型是通过压力超负荷诱导心肌肥厚^[4], 病理学检测结果提示模型制备成功。

研究^[5]显示 DNA 甲基化参与心肌纤维化的发生发展, 其中 DNMT3A 作为 DNA 甲基化的催化酶, 其表达的变化对纤维化的进程有着重要的作用。在 cAMP 诱导小鼠心肌细胞肥大模型中, DNMT3A 的表达上调可导致心肌细胞基因组的过度甲基化^[6]。研究^[7]表明, 在肺纤维化中 TGF- β 可促进相关 DNA 片段的甲基化从而促进纤维细胞分化为成纤维细胞和胶原沉积。此外, CTGF 也参与纤维化中心肌成纤维细胞的活化增殖^[8]。CTGF 可由 TGF- β 诱导, 且两者可协同活化心肌成纤维细胞, 导致纤维化损伤^[8-9]。本实验进一步探究 AAC 诱导心肌纤维化模型中 DNMT3A、CTGF 表达及相关性。

本实验中, 术后 2 周模型组与对照组对比, 模型组大鼠体重指数的异常提示心脏结构可能有所改变。通过病理组织切片可以观察到模型组大鼠心肌组织中心肌细胞肥大排列紊乱、CVF 升高。ELISA 法检测结果显示模型组的心肌组织匀浆中 CTGF 和 I 型胶原的含量也明显高于对照组。Western blot 结果显示, 模型组 DNMT3A 和 CTGF 蛋白表达水平显著上升, 说明 AAC 诱导的大鼠心肌纤维化发生可能与 DNMT3A 和 CTGF 有关, 且 DNMT3A 和 CTGF 两者的表达呈正相关性。

综上所述,本研究结果表明 DNMT3A 表达的上调可能是通过引起 AAC 大鼠心肌细胞基因组的过度甲基化,对其转录表达过程产生影响,导致心肌成纤维细胞的活化增殖,从而引起心肌纤维化的发生,为防治心肌纤维化及逆转心脏重构提供新的靶点。

参考文献

- [1] van de Schoor F R, Aengevaeren V L, Hopman M T, et al. Myocardial fibrosis in athletes [J]. *Mayo Clin Proc* 2016, 91(11):1617-31.
- [2] Rai V, Sharma P, Agrawal S, et al. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 424(1-2):123-45.
- [3] 陈泽文,陶辉,周晓,等. 化学合成 microRNA-29a inhibitors 和 mimics 对 SD 大鼠心肌成纤维细胞活化增殖的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(4):493-6.
- [4] 刘丽,王文,孟宪敏,等. 高血压大鼠左室肥厚差异蛋白质组学研究 [J]. *中华高血压杂志* 2008, 16(6):516-22.
- [5] 汪裕琪,石开虎,吴君旭,等. DNMT3A 和 Hyp 在 ISO 诱导大鼠心肌纤维化中的表达及相关性研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2014, 49(5):606-9.
- [6] Fang X, Robinson J, Wang-Hu J, et al. cAMP induces hypertrophy and alters DNA methylation in HL-1 cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015, 309(6):C425-36.
- [7] Neveu W A, Mills S T, Staitieh B S, et al. TGF-beta1 epigenetically modifies Thy-1 expression in primary lung fibroblasts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 309(9):C616-26.
- [8] Kubota S, Takigawa M. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions [J]. *Clin Sci (Lond)* 2015, 128(3):181-96.
- [9] Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, et al. The CCN family: a new class of inflammation modulators [J]. *Biochimie*, 2011, 93(3):377-88.

Expression and correlation of DNMT3A and CTGF of abdominal aortic coarctation induced myocardial fibrosis in rats

Yang Jiankang^{1,2}, Shi Kaihu^{1,2}, Tao Hui^{1,2}, et al

(¹Dept of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230601;

²Cardiovascular Disease Research Center of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression and correlation of DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) and connective tissue growth factor (CTGF) of abdominal aortic coarctation (AAC) induced myocardial fibrosis in rats.

Methods 60 male SD rats were randomly divided into model group and control group. The model group underwent abdominal aortic coarctation, while the sham operation was performed in the control group. These rats were executed to collect the blood samples and cardiac tissue, then HW/BW were calculated. The contents of type I collagen and CTGF in myocardial homogenate were measured by ELISA. HE staining and Masson staining were used to observe the degree of myocardial fibrosis. The expressions of DNMT3A and CTGF were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the HW/BW of the model group increased significantly. The contents of type I collagen and CTGF in myocardial tissue homogenate of model group were significantly higher than those in the control group. HE staining and Masson staining showed that collagenous fibrosis was found in the myocardium of model group obviously. Western blot showed that the expression of DNMT3A and CTGF in model group was apparently higher than that in the control group. There was a positive correlation between the contents of DNMT3A and CTGF in myocardial fibrotic tissue. **Conclusion** Upregulation of DNMT3A plays an important role in the formation of myocardial fibrosis, which may be related to the elevation of CTGF.

Key words myocardial fibrosis; abdominal aortic coarctation; DNA methyltransferase 3A; connective tissue growth factor