

# DNMT3A 和 Hyp 在 ISO 诱导大鼠心肌纤维化中的表达及相关性研究

汪裕琪<sup>1,2</sup>, 石开虎<sup>1,2</sup>, 吴君旭<sup>1,2</sup>, 徐盛松<sup>1,2</sup>, 陶辉<sup>1,2</sup>, 宣海洋<sup>1,2</sup>, 曹炜<sup>1,2</sup>, 沙纪名<sup>1,2</sup>, 占红英<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨 DNA 甲基转移酶 3A (DNMT3A) 和羟脯氨酸 (Hyp) 在盐酸异丙肾上腺素 (ISO) 诱导的大鼠心肌纤维化中的表达及相关性研究。方法 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组和模型组。模型组给予 ISO [5 mg/kg · d] 正常对照组皮下注射给予等量生理盐水, 连续 7 d 后处死大鼠获取血液标本, 并取心肌组织。同时, 测定心重指数 (HW/BW)、左心室质量指数 (LVW/BW); 采用 ELISA 法检测血清中 I 型胶原和 III 型胶原的含量; HE 染色和 Masson 染色法观察心肌纤维化程度; Western blot 法测定 DNMT3A 和  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 的表达; 紫外分光光度法测定心肌组织中 Hyp 的含量。结果 与正常对照组比较, 模型组 HW/BW、LVW/BW 明显增加; 模型组血清标本中 I 型胶原和 III 型胶原的含量较正常对照组明显增加; HE 染色和 Masson 染色显示模型组心肌组织出现明显的胶原纤维增生; Western blot 法检测显示模型组 DNMT3A 和  $\alpha$ -SMA 的表达明显高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 同时, 紫外分光光度法检测显示模型组心肌组织中 Hyp 含量明显增高 ( $P < 0.05$ ); DNMT3A 和 Hyp 在大鼠心肌纤维化组织中的表达呈正相关 ( $r = 0.675$ ,  $P < 0.05$ )。结论 DNMT3A 表达上调在心肌纤维化的形成过程中起重要促进作用, 可能与 Hyp 升高有一定的相关性。

**关键词** 心肌纤维化; DNMT3A; Hyp; 胶原

中图分类号 R 542.23

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0606-04

2013-12-12 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (编号: 1308085MH117); 安徽省高等学样省级自然科学研究重点项目 (编号: KJ2011A175)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院心胸外科, 合肥 230601

<sup>2</sup>安徽医科大学心血管病研究中心, 合肥 230032

作者简介: 汪裕琪, 男, 硕士研究生;

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

心肌纤维化是指细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度增生, 主要表现为在心肌组织的间质中胶原纤维过量积聚, 胶原含量显著升高或者各型的胶原比例失调等。心肌纤维化广泛存在于多种心血管疾病中, 与心律失常、心脏重构、心功能衰竭以及心源性猝死等密切相关。特别是对于临床上最常见的心律失常 - 心房颤动, 心肌纤维化的研究具有重要意义。心肌纤维化作为心房颤动维持的重要基质之一, 对于心房颤动的发展产生了重要影响<sup>[1]</sup>。但是心肌纤维化产生的确切机制以及相关通路尚不十分清楚。该课题通过对心房纤维化和 DNA 甲基转移酶 3A (DNA methyltransferase 3A, DNMT3A) 进行相关性分析探讨心房纤维化发生的分子生物学机制, 为心房颤动的防治提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, (180 ± 20) g, 6~8 周龄, 购自安徽医科大学实验动物中心。

**1.2 动物分组及模型建立** 40 只大鼠随机均分成两组: 正常对照组、模型组。模型组大鼠按 5 mg/kg 体重背部皮下注射盐酸异丙肾上腺素 (isoprenaline, ISO) (购自上海禾丰制药有限公司), 1 次/d。正常对照组大鼠背部皮下注射与模型组等剂量的生理盐水。

**1.3 标本采集及处理** 两组大鼠常规饲养 7 d 后颈椎脱臼处死。腹主动脉采血 5 ml 抗凝备用, 沿心脏冠状面最大横径剪开大鼠心脏, 取心房组织置于 10% 甲醛溶液中固定, 经石蜡包埋后, 沿切面连续切

enzymatic indicators examination also showed that the MPO, MDA levels of exogenous Leptin pretreatment had significantly decreased ( $P < 0.05$ ) compared with ischemia-reperfusion group ( $P < 0.05$ ). Histological study showed relatively mild inflammation, edema and bleeding in exogenous Leptin treatment group with alveolar structure intact compared with ischemia-reperfusion injury group. **Conclusion** Lung ischemia-reperfusion injury was significantly alleviated after application of exogenous Leptin. The exogenous Leptin may play a protective role in lung ischemia-reperfusion injury through reducing lipid peroxidation and inflammatory cell infiltration.

**Key words** Leptin; lung injury; lung protection; ischemia-reperfusion

片5张,每张厚4  $\mu\text{m}$ ,用HE染色和Masson染色观察心房纤维化程度,并以胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)作为心房纤维化指标。剩余心肌组织装入冻存管于液氮罐中保存。

**1.4 心脏质量参数的测定** 末次给药后禁食不禁饮24 h,大鼠称体重(body weight, BW)后用10%水合氯醛(0.3 ml/kg)麻醉,腹主动脉取血,取血清备用,开胸取出心脏,去除大血管、心外膜脂肪组织,用生理盐水清洗,吸干后称全心重(heart weight, HW)和左心室重量(left ventricle weight, LVW),计算心重指数(HW/BW)和左心室重指数(LVW/BW)。

**1.5 HE染色、Masson染色及CVF计算** 心肌组织切片烤热后于二甲苯和梯度乙醇溶液中脱蜡至水。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。光镜下观察、摄片。每张Masson染色切片选取3个无血管视野( $\times 400$ ),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  $\times 100\%$ 。

**1.6 血清中I型和III型胶原含量的检测** 取血清,按照ELISA试剂盒实验说明,用酶标仪测定血清中I型和III型胶原的含量。

**1.7 心肌组织羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)含量的测定** 取大鼠的左室心肌组织约200 mg,加入2 ml生理盐水在冰浴环境中快速匀浆,3 500 r/min离心10 min,取上清液200  $\mu\text{l}$ 加生理盐水800  $\mu\text{l}$ 制成2%的组织匀浆,按Hyp试剂盒说明书操作测定Hyp含量,同时进行蛋白测定。结果以每毫克蛋白中Hyp的含量表示。

**1.8 Western blot法测定DNMT3A和 $\alpha$ -平滑肌肌头蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的表达** 心肌总蛋白提取:取心肌组织块1 g,加入总蛋白提取液1 ml,匀浆、裂解、离心,即得总蛋白提取液,测蛋白浓度,变性后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。蛋白电泳:采用8%分离胶及5%浓缩胶的SDS-PAGE系统。免疫印迹杂交:200 mA恒流电转印1 h。PVDF膜放入含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h,一抗工作液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。洗膜,二抗工作液 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,洗膜。显影:将A和B发光液按等体积混合滴于PVDF膜上,压片,曝光,定影。采用Lab Works4.5图像获取和分析系统软件测定DNMT3A(102 ku)和 $\alpha$ -SMA(42 ku)蛋白条带的积分光密度

(IOD)值,每个样品均同时检测GAPDH蛋白条带的IOD值,以GAPDH作为内参照, DNMT3A、 $\alpha$ -SMA的相对表达量以 $\text{IOD}_{\text{DNMT3A}}/\text{IOD}_{\text{GAPDH}}$ 、 $\text{IOD}_{\alpha\text{-SMA}}/\text{IOD}_{\text{GAPDH}}$ 值表示。

**1.9 统计学处理** 采用SPSS 10.0统计软件分析,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 ISO所致的心肌纤维化对大鼠心脏质量参数的影响** 与正常对照组比较,模型组HW/BW和LVW/BW明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

**2.2 ISO所致的心肌纤维化大鼠血清中I型胶原和III型胶原的含量影响** 模型组血清中I型胶原和III型胶原的含量明显高于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 两组HW/BW、LVW/BW  
以及血清中I、III型胶原含量的比较( $n=20, \bar{x} \pm s$ )

组别	HW/BW (mg/g)	LVW/BW (mg/g)	I型胶原 ( $\mu\text{g/L}$ )	III型胶原 ( $\mu\text{g/L}$ )
正常对照	$3.4 \pm 0.5^*$	$2.0 \pm 0.6^*$	$3.53 \pm 0.63^*$	$1.84 \pm 0.78^*$
模型	$5.2 \pm 0.6$	$3.1 \pm 0.4$	$5.81 \pm 0.96$	$4.23 \pm 0.52$

与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.3 HE染色、Masson染色及胶原容积分数** 计算经Masson染色,心肌染红色,细胞核染蓝色,胶原纤维染绿色。见图1。两组CVF比较:正常对照组大鼠心肌组织胶原容积分数明显高于模型组( $P < 0.05$ )。见表2。

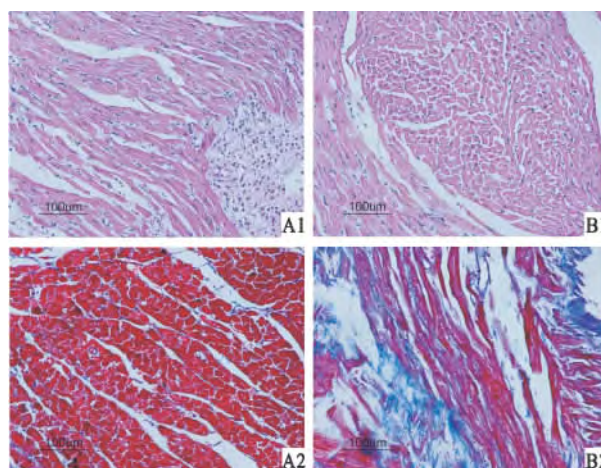


图1 大鼠心肌组织HE染色和Masson染色  $\times 400$   
A:模型组;B:正常对照组;1:HE染色;2:Masson染色

2.4 ISO 对大鼠心肌组织中 Hyp 含量的影响 与正常对照组比较,模型组 Hyp 含量显著增加 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 两组大鼠心肌组织 CVF 及 Hyp 含量比较 ( $n = 20, \bar{x} \pm s$ )

组别	CVF (%)	Hyp ( $\mu\text{g/g}$ )
正常对照	5.80 $\pm$ 1.62	365.23 $\pm$ 98.34
模型	11.32 $\pm$ 2.50*	659.68 $\pm$ 135.23**

与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

2.5 DNMT3A 和  $\alpha$ -SMA 的表达情况 与正常对照组比较,模型组大鼠心肌组织 DNMT3A、 $\alpha$ -SMA 含量均显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2。

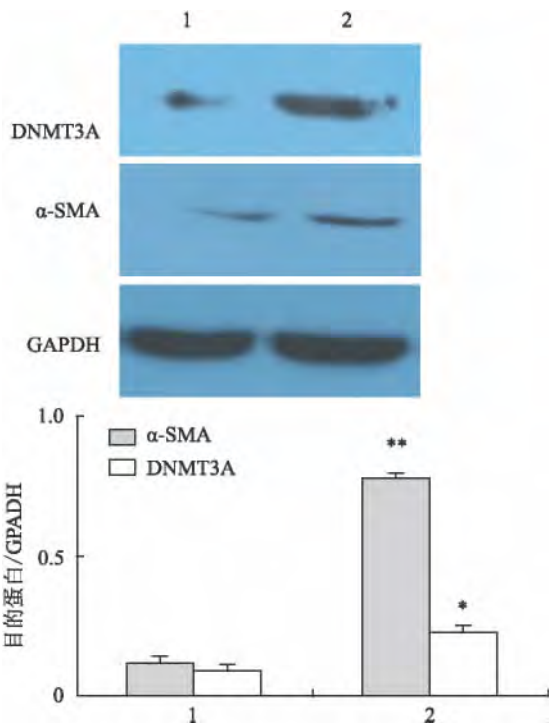


图 2 各组的 DNMT3A 和  $\alpha$ -SMA 的表达情况

1: 正常对照组; 2: 模型组, 与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

2.6 相关性分析 结果显示: DNMT3A 蛋白水平与 Hyp 蛋白水平呈正相关 ( $r = 0.675$ ,  $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

据文献<sup>[2-4]</sup>报道, DNA 甲基化与肝纤维化和肺纤维化以及骨髓纤维化之间有着密切的关系, 通过甲基化的过程来调控纤维化的发生以及发展, 而器官纤维化的主要过程就是 ECM 以及胶原的增生, 心肌纤维化亦不除外<sup>[5]</sup>。因此, 该研究旨在探寻心肌

纤维化与 DNA 甲基化之间是否存在内在联系。

DNA 甲基化是表观遗传学的重要组成部分, 同组蛋白修饰相互作用, 通过改变染色质结构, 调控基因表达<sup>[6-7]</sup>。在哺乳类细胞或人体细胞中, DNA 甲基化与细胞的增殖、衰老、癌变等生命现象有着密切关系<sup>[8]</sup>。催化 DNA 甲基化的 DNMT 的研究可以揭示 DNA 甲基化对基因表达调控的机制, 从而研究与之相关的重要生命活动。哺乳动物的 DNMT 有 3 种, 主要分为 2 个家族: DNMT1 和 DNMT3 (另有一种 DNMT2, 主要为 tRNA 的甲基转移酶), DNMT1 家族在 DNA 复制和修复中维持其甲基化; 而 DNMT3 家族则催化 CpG 从头甲基化。DNMT3 包括了 2 个从头甲基转移酶 DNMT3A、DNMT3B 和 1 个调节蛋白 DNMT3L<sup>[9-10]</sup>。 $\alpha$ -SMA 是心肌成纤维细胞的活化标志, 心肌成纤维细胞是具有活跃的增殖和分泌胶原的能力, 是 ECM 沉积增多的主要来源, 进而导致心肌纤维化的发生发展。因此,  $\alpha$ -SMA 指标是判断心肌纤维化严重程度的代表性指标。

动物模型的稳定性、高仿性和易操作性是心血管疾病动物实验研究的首要考虑因素。该研究采用皮下注射 ISO 是心肌纤维化模型方法中较为成熟的一种, 具有可操作性强、时间短、见效快、性价比高的特点。

该研究表明皮下注射 ISO 制作心肌纤维化的动物模型是可行的, 且成功率较高。模型组血清中 I 型胶原和 III 型胶原的含量以及心肌组织中 Hyp 含量均明显高于正常对照组, 通过分子生物学实验, 对心肌组织中的 DNMT3A 以及  $\alpha$ -SMA 含量进行检测, 发现模型组心肌组织中的 DNMT3A 的表达量明显增高, 说明心肌纤维化的发生与发展可能与 DNA 甲基化有关, Hyp 蛋白是反映心肌发生纤维化严重程度的重要指标之一, 且 DNMT3A 和 Hyp 在大鼠心肌纤维化组织中的表达呈正相关。故通过研究 DNMT3A 与 Hyp 蛋白表达的相互关系, 进而初步探究 DNMT3A 在心肌纤维化中的作用, 心肌纤维化的发生与发展可能与 DNA 甲基化有关, 这为研究心肌纤维化的发生和发展提供了另一个思路, 但同时对于 DNMT3A 究竟在心肌纤维化中起何种作用, 尚不明确, 有待于进一步深入研究。

综上所述, 该实验结果表明心肌组织中 DNMT3A 含量升高可能参与心肌纤维化的形成, 其机制可能是通过影响基因甲基化水平, 进而影响基因的表达, 最终导致心肌纤维化的发生发展, 以期为中心

肌纤维化的预防以及治疗药物的研发提供新思路。

### 参考文献

- [1] Velagapudi P, Turagam M K, Leal M A, et al. Atrial fibrosis: a risk stratifier for atrial fibrillation [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2013, 11(2): 155-60.
- [2] Zhao Q, Qin C Y, Zhao Z H, et al. Epigenetic modifications in hepatic stellate cells contribute to liver fibrosis [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2013, 229(1): 35-43.
- [3] Yang J J, Tao H, Huang C, et al. DNA methylation and MeCP2 regulation of PTCH1 expression during rats hepatic fibrosis [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5): 1202-11.
- [4] Huang S K, Scruggs A M, Donaghy J, et al. Histone modifications are responsible for decreased Fas expression and apoptosis resistance in fibrotic lung fibroblasts [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e621.
- [5] Dakhllallah D, Batte K, Wang Y, et al. Epigenetic regulation of miR-17~92 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(4): 397-405.
- [6] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development [J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1089-93.
- [7] Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(19-20): 2571-87.
- [8] Jeltsch A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 301: 203-25.
- [9] Chedin F. The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011, 101: 255-85.
- [10] Walsh C P, Xu G L. Cytosine methylation and DNA repair [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 301: 283-315.

## Expression and correlation of DNMT3A and Hyp of isoprenaline induced myocardial fibrosis in rats

Wang Yuqi<sup>1,2</sup>, Shi Kaihu<sup>1,2</sup>, Wu Junxu<sup>1,2</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230601;

<sup>2</sup>Cardiovascular Disease Research Center of Anhui Medical University, Hefei 230032

**Abstract Objective** To investigate the expression and correlation of DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) and Hyp of isoprenaline (ISO) induced myocardial fibrosis in rats. **Methods** 40 male SD rats were randomly divided into normal control group and model group. The model group was treated subcutaneously with 5 mg/(kg·d) isoprenaline daily for 7 days, but the normal control group was given the same amount of normal saline at the same time. Rats were executed to obtain blood samples and myocardial tissue. And HW/BW, LVW/BW were tested. ELISA was used to detect the content of type I collagen and type III collagen in serum. The degree of myocardial fibrosis was observed with HE staining and Masson staining method. The expression of DNMT3A and  $\alpha$ -SMA was tested by Western blot. The content of hydroxyproline in myocardial tissue was measured by UV spectrophotometry. **Results** HW/BW and LVW/BW increased significantly in the model group compared with the normal control group. The content of type I collagen and type III collagen in serum increased significantly in the model group compared with the normal control group. HE and Masson staining showed myocardial tissue in model group appeared obviously collagen fiber hyperplasia. The expression of DNMT3A and  $\alpha$ -SMA in the model group was higher than the normal control group. UV spectrophotometric detection showed the content of Hyp in myocardial tissue in the model group increased obviously. The expression of DNMT3A and  $\alpha$ -SMA in myocardial fibrosis tissue was positively correlated ( $r=0.675$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** DNMT3A upregulation plays an important role in the myocardial fibrosis, and Hyp may increase a certain correlation.

**Key words** myocardial fibrosis; DNMT3A; Hyp; collagen