

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.10.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 10-0018-08

细胞外超氧化物歧化酶 DNA 甲基化对动脉粥样硬化的诱导作用及作用靶点

陈佳¹, 杨晓龙², 张旭峰³

(上海中医药大学附属曙光医院 1. 急诊科, 2. 重症医学科, 3. 检验科, 上海 201203)

摘要: **目的** 探讨细胞外超氧化物歧化酶 DNA (EC-DNA) 甲基化水平改变在动脉粥样硬化发病中的作用。**方法** 16 只 ApoE^{-/-} 小鼠 (ApoE^{-/-} 组) 给予高脂饲料喂养, 16 只 C57BL/6 小鼠 (WT 组) 给予不含任何高脂成分的普通饲料喂养, 分别于喂养第 8、12、16 和 20 周检测小鼠血脂、主动脉组织形态及丙二醛 (MDA)、活性氧 (ROS) 含量, 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测主动脉组织细胞外超氧化物歧化酶 (EC-SOD)、DNMT1 mRNA 水平, 巢式甲基化特异性聚合酶链反应检测主动脉组织 EC-SOD DNA 甲基化程度。将 THP-1 诱导为巨噬细胞, 分为 3 组: 空白对照组 (NC 组)、空白质粒组 (pEGFP-N1 组) 和重组质粒组 (pEGFP-N1-DNMT1 组), NC 组用不做任何处理, 继续培养, pEGFP-N1 组加入 10 μl 脂质体 Lipofectamine 和 20 μg 空质粒载体 pEGFP-N1, pEGFP-N1-DNMT1 组加入 10 μl 脂质体 Lipofectamine 和 20 μg pEGFP-N1-DNMT1 重组质粒载体, 培养 24 h 后检测细胞 EC-SOD、DNMT1 蛋白表达和 EC-SOD DNA 甲基化程度。**结果** 第 8、12、16 和 20 周, ApoE^{-/-} 组 TC、LDL、TG 呈升高趋势, HDL 无明显变化; 各时段 ApoE^{-/-} 组 TC、LDL、TG、HDL 与 WT 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TC、LDL、TG 高于 WT 组, HDL 低于 WT 组。第 16 和 20 周, WT 组动脉组织内皮细胞结构规则有序, ApoE^{-/-} 组主动脉内膜明显增厚并伴炎症浸润。第 8、12、16 及 20 周, ApoE^{-/-} 组 MDA、ROS 呈升高趋势, 各时段 ApoE^{-/-} 组 MDA、ROS 高于 WT 组。ApoE^{-/-} 组 EC-SOD mRNA 表达水平、DNMT1 mRNA 表达水平和 EC-SOD 甲基化水平与 WT 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), EC-SOD mRNA 表达水平低于 WT 组, DNMT1 mRNA 表达水平和 EC-SOD 甲基化水平高于 WT 组。pEGFP-N1-DNMT1 组 DNMT1 蛋白表达、EC-SOD 甲基化水平及 EC-SOD 蛋白表达水平与 pEGFP-N1 组和 NC 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), pEGFP-N1-DNMT1 组 DNMT1 蛋白表达、EC-SOD 甲基化水平高于 pEGFP-N1 组和 NC 组, EC-SOD 蛋白表达水平低于 pEGFP-N1 组和 NC 组, pEGFP-N1 组和 NC 组 EC-SOD、DNMT1 蛋白及 EC-SOD 甲基化水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** EC-SOD 甲基化程度升高, 导致 EC-SOD 表达降低, 机体抵抗氧化应激反应能力减弱, 最终发展成动脉粥样硬化。

关键词: 细胞外超氧化物歧化酶; DNA 甲基化; DNA 甲基转移酶; 动脉粥样硬化; 氧化应激损伤

中图分类号: R-332; R363

文献标识码: A

Role of extracellular superoxide dismutase methylation in atherosclerosis

Jia Chen¹, Xiao-long Yang², Xun-feng Zhang³

(1. Emergency Department, 2. ICU, 3. Clinical Laboratory, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) DNA methylation changes in atherosclerosis. **Methods** Sixteen ApoE^{-/-} mice (ApoE^{-/-} group) were fed with high-fat diet,

收稿日期: 2017-05-03

[通信作者] 张旭峰, E-mail: zhangxufeng1977@163.com

and 16 C57BL/6 mice (WT group) were fed with ordinary diet without any high-fat component. The serum lipid level, aortic morphology and tissue MDA and ROS content were detected in the 8th, 12th, 16th and 20th weeks after feeding respectively. The EC-SOD and DNA methyltransferase 1 (DNMT1) mRNA levels in the aortic tissues were detected by RT-PCR. EC-SOD DNA methylation level was detected by nested methylation specific PCR. THP-1 was induced into macrophages and divided into three groups: NC group (without any treatment, continue to cultivate), pEGFP-N1 group (added with 10 μ l liposome Lipofectamine and 20 μ g of empty plasmid vector pEGFP-N1), pEGFP-N1-DNMT1 group (added with 10 μ l liposome Lipofectamine and 20 μ g recombinant plasmid vector pEGFP-N1-DNMT1). The EC-SOD and DNMT1 protein expressions and EC-SOD DNA methylation level were detected after culture for 24 h. **Results** In the 8th, 12th, 16th and 20th weeks, TC, LDL and TG of the ApoE^{-/-} group were in increasing trends, and HDL had no significant change, the TC, LDL and TG of the ApoE^{-/-} group were significantly higher than those of the WT group, HDL was significantly lower than that of the WT group ($P < 0.05$). In the 16th and 20th weeks, the endothelial cells of artery tissue were regularly and orderly arranged in the WT group, while in the ApoE^{-/-} group aortic intima was obviously thickened with inflammatory infiltration. In the 8th, 12th, 16th and 20th weeks, MDA and ROS of the ApoE^{-/-} group were in increasing trends, the MDA and ROS content of the ApoE^{-/-} group was significantly higher than that of the WT group ($P < 0.05$). EC-SOD mRNA expression level of the ApoE^{-/-} group was significantly lower than that of the WT group, DNMT1 mRNA level and EC-SOD methylation level were significantly higher than those of the WT group ($P < 0.05$). DNMT1 protein expression and EC-SOD methylation level of the pEGFP-N1-DNMT1 group were significantly higher than those of the pEGFP-N1 group and the NC group, EC-SOD protein level was significantly lower than that of the pEGFP-N1 group and the NC group ($P < 0.05$). EC-SOD and DNMT1 protein levels and EC-SOD methylation level had no statistically differences between the pEGFP-N1 group and the NC group ($P > 0.05$). **Conclusions** Increase of EC-SOD methylation can lead to decrease of EC-SOD expression and weakening of body resistance to oxidative stress reaction, and ultimately results in development of atherosclerosis.

Keywords: extracellular superoxide dismutase; DNA methylation; DNA methyltransferase 1; atherosclerosis; oxidative stress damage

动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 是导致心肌梗死、心绞痛、冠状动脉粥样硬化性心脏病 (冠心病)、脑梗死等心脑血管疾病的主要原因^[1-3]。目前研究已证实氧化应激诱导血管炎症改变, 引起的局部血管炎症反应和细胞过度增殖参与了 AS 的发生和进展。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 是机体抵抗氧自由基损伤的主要防御体系, 其中细胞外 SOD (extracellular superoxide dismutase, EC-SOD) 是唯一在细胞外分布并发挥抗氧化功能的酶^[4-6], 也是血管壁抗氧化酶的主要来源。DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传修饰方式, 参与了 AS 的发病和局部炎症反应。尽管如此, 目前依然无法确定长期持续性血脂异常所诱导的表观遗传改变, 特别是 EC-SOD 甲基化, 是否与 AS 的发病有关。鉴于此, 本研究通过复制高脂饮食纯合子载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E-knockout, ApoE^{-/-}) 小鼠模型和 THP-1 单核细胞源性巨噬细胞, 观察 EC-SOD 甲基化与 AS 的关系及可能作用靶点, 旨在为 AS 的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与抗体

RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司, 胰蛋白酶、二甲基亚砷、胎牛血清、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自广州碧云天生物技术研究, Trizol 试剂、逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒、脂质体 LipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司, pEGFP-N1-DNMT1 重组质粒委托上海捷瑞生物工程有限公司合成, DNA 提取试剂盒、MLLV 逆转录酶、dNTP、Taq DNA 聚合酶、琼脂糖购自美国 Promega 公司, THP-1 单核细胞株、大肠杆菌 DH5 α 购自上海抚生实业有限公司, 基因引物由上海生工公司合成, 丙烯酰胺、PVDF 膜、十二烷基硫酸钠购自美国 Sigma 公司。DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1)、SOD3 抗体、 β -actin 小鼠单克隆抗体、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的羊抗兔子 IgG 二抗购自美国 Santa Cruz 公司, 丙二醛 (Malonaldehyde, MDA)、活性氧 (reactive oxygen

species, ROS) 检测试剂盒均购自上海心语生物科技有限公司。

1.2 动物分组与处理

16 只雄性 ApoE^{-/-} 实验小鼠 (ApoE^{-/-} 组) 和 16 只 C57BL/6 小鼠 (WT 组) 购自北京大学实验动物中心 [许可证号: SYXK (京) 2016-0028], 8 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 标准化饲养房饲养 [SPF 级动物房, 12 h 光照与 12 h 黑暗循环, 相对湿度 40% ~ 70%, 温度 (22 ± 2) °C]。普通饲料配方: 麸皮 25%, 玉米 25%, 豆饼 13%, 大麦 20%, 鱼粉 6%, 其他辅料 11%; 高脂饲料配方: 在普通饲料中加入 5% 脂肪、1.5% 胆固醇、5% 蛋黄粉和 0.2% 胆酸钠。WT 组给予不含任何高脂成分的普通饲料喂养, ApoE^{-/-} 组给予高脂饲料喂养, 小鼠自由摄食和饮水 20 周后, 进行后续实验。

1.3 细胞培养、分组与处理

THP-1 单核细胞株接种于 RPMI-1640 培养基, 于 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱中培养, 光学显微镜下观察细胞形态, 当细胞贴壁生长、且出现伪足时, 提示已经分化为巨噬细胞。将细胞分为 3 组: 空白对照组 (NC 组)、空白质粒组 (pEGFP-N1 组) 和重组质粒组 (pEGFP-N1-DNMT1 组); 取分化为巨噬细胞的 THP-1 细胞株, NC 组用含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基继续培养, pEGFP-N1 组加入 10 μl 脂质体 Lipofectamine 和 20 μg 空质粒载体 pEGFP-N1, pEGFP-N1-DNMT1 组加入 10 μl 脂质体 Lipofectamine 和 20 μg pEGFP-N1-DNMT1 重组质粒载体, 于 37 °C、5%CO₂ 下培养, 每 6 h 更换 1 次培养液, 各组细胞继续培养 24 h 后, 进行后续实验。

1.4 动物处理与取样

两组于喂养第 8、12、16、20 周时, 每次每组取 4 只小鼠, 腹腔注射 2 ml/100 g 麻醉, 置于动物手术台上, 摘除眼球, 取眼眶静脉血 3 ml, 静置 20 min, 5 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 置于 -20 °C 冰箱保存待检。再将小鼠处死, 开腹取出主动脉, 生理盐水冲洗干净, 切取距主动脉弓 0.5 cm 处的主动脉, 分为 2 部分, 一部分采用 4% 多聚甲醛固定, 其余部分于液氮中保存。

1.5 检测指标

1.5.1 血脂检测 采用全自动生化分析仪检测小鼠低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL)、三酰甘油

(Triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 等血脂水平, 其中 LDL、HDL 采用常规酶法, TG、TC 采用终点法。

1.5.2 组织形态学观察 取 4% 多聚甲醛固定的主动脉组织, 石蜡包埋, 制成 4 μm 的连续切片, 采用苏木素-伊红染色, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察组织形态学特征。

1.5.3 氧化应激指标检测 取 4 μg 组织样本, 匀浆器中打成匀浆, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液待测。采用分光光度比色法检测主动脉组织 MDA、ROS 含量, 所有样本均于酶标仪上检测 560 nm 处吸光度值, 采用标准曲线计算出待测样品蛋白的浓度。

1.5.4 RT-PCR 检测主动脉组织 EC-SOD、DNMT1 mRNA 水平 液氮中取出主动脉组织, 自然解冻, Trizol RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA, 紫外分光光度法检测总 RNA 浓度。将 1 μg 总 RNA 按照 GeneAmp PCR 试剂盒说明书逆转录成 cDNA; 合成体系: 逆转录缓冲液 3 μl, RNA 逆转录模板 1 μl, 逆转录酶 2 μl, 正向、反向引物各 1 μl, 加入双蒸水补充至总反应体系为 20 μl, 37 °C 金属浴反应 50 min 合成 cDNA。将 cDNA 置于 PCR 反应体系中进行扩增 (引物序列见附表)。PCR 反应体系: PCR 试剂混合液 12.5 μl, DEPC 8 μl, cDNA 2.5 μl, 正反向引物 1 μl, 总反应体系 25 μl; 反应条件: 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环后 72 °C 5 min, 溶解曲线条件为 55 °C ~ 95 °C, 将 PCR 产物置于琼脂糖凝胶电泳分离扩增片段, 检测基因荧光信号强度值 (Ct), 计算基因表达量 (2^{-ΔΔCt}), 以 β-actin 作为内参照进行校正, 分析目的基因相对表达量。

附表 引物序列及扩增片段长度

| 引物 | 长度 /bp |
|-------------------------------|--------|
| EC-SOD | |
| 正向: 5' -TGGATGCTGGCCAGATCG-3' | 180 |
| 反向: 5' -TGGATGCCAGCGTTGGAG-3' | |
| DNMT1 | |
| 正向: 5' -GGAGCCGAGCAAAGAGTA-3' | 215 |
| 反向: 5' -GGGAGAGACCAGCCAAAT-3' | |
| β-actin | |
| 正向: 5' -AAAGTGGACATTGTT-3' | 179 |
| 反向: 5' -ATTTGATGTTAGTCG-3' | |

1.5.5 巢式甲基化特异性 PCR 检测主动脉组织 EC-SOD DNA 甲基化程度 DNA 提取试剂盒提取组织总 RNA, 4% 琼脂糖凝胶检测基因组 DNA 浓度和纯度。PCR 反应体系: Power SYBR Green PCR Master Mix $10\mu\text{l}$, 引物 $1\mu\text{l}$, DNA 模板 $2.5\mu\text{l}$, ddH₂O $15\mu\text{l}$ 。第 1 轮 PCR 采用外侧引物, 反应条件: 95°C 预变性 5 min, 97°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 总计 35 个循环。将第 1 轮 PCR 产物稀释 50 倍, 取 $1\mu\text{l}$ 进行第 2 轮 PCR 反应, 95°C 预变性 5 min, 97°C 变性 30 s, 62°C 退火 15 s, 总计 35 个循环。阴性对照为人外周血淋巴细胞, 将 PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果, 甲基化 % = 甲基化光密度值 / (甲基化光密度值 + 非甲基化光密度值) $\times 100\%$ 。

1.5.6 Western blot 检测 EC-SOD、DNMT1 蛋白水平和 EC-SOD DNA 甲基化程度 取出对数生长期细胞, 弃去培养液, PBS 冲洗, 加入离心管中, 再加入 1 ml 细胞裂解液置于冰浴上裂解 30 min, 4°C 条件下离心 15 min, 采用 Western blot 检测 EC-SOD、DNMT1 蛋白水平, 将 $20\mu\text{g}$ 蛋白提取液置于 10% SDS-PAGE 电泳分离, 常规湿法转膜, 加入 5% 脱脂牛奶孵育封

闭 2 h。加入鼠抗人 EC-SOD 单克隆抗体、兔抗人 DNMT1 单克隆抗体, 4°C 孵育 24 h。再滴加 FITC 标记的二抗 37°C 孵育 2 h。PBS 冲洗 3 次, 按照 ECL 化学发光显影试剂盒显影, 以 β -actin 作为内参照, 分析目的条带相对表达量。各组细胞 EC-SOD DNA 甲基化程度方法同上。

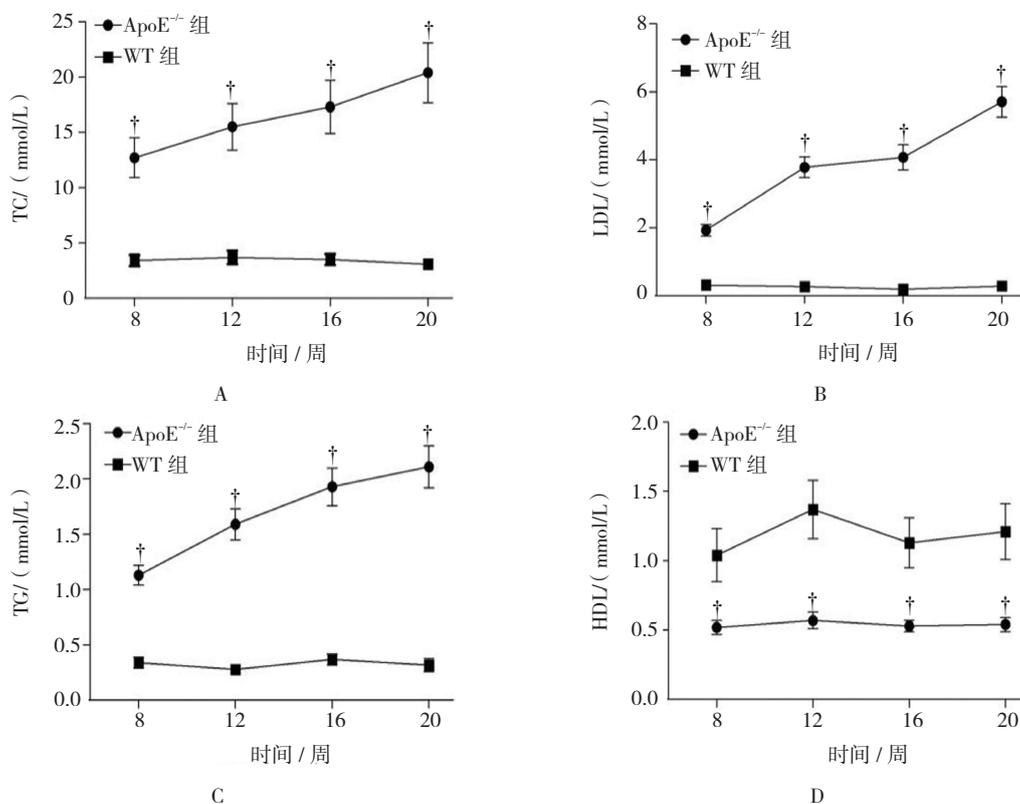
1.6 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行数据处理, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂水平变化

第 8、12、16、20 周, ApoE^{-/-} 组 TC (见图 1A)、LDL (见图 1B)、TG (见图 1C) 呈升高趋势 ($F = 3.140$ 、 4.183 和 4.920 , $P = 0.041$ 、 0.033 和 0.029), HDL (见图 1D) 无明显变化 ($F = 0.735$, $P = 0.955$); 各时段 ApoE^{-/-} 组 TC、LDL、TG 高于 WT 组, HDL 低于 WT 组 ($P < 0.05$)。



† 与 WT 组比较, $P < 0.05$

图 1 两组血脂比较

2.2 主动脉病理形态变化

第 16、20 周, WT 组动脉组织内皮细胞结构规则有序, 平滑肌细胞排列整齐, 内皮下无炎症细胞或脂质沉积; ApoE^{-/-} 组主动脉内膜明显增厚, 血管壁伴有弥漫性隆起, 平滑肌细胞排列无序, 内皮下伴有炎症浸润和脂质沉积。见图 2。

2.3 氧化应激指标变化

第 8、12、16、20 周, ApoE^{-/-} 组 MDA (见图 3A)、ROS (见图 3B) 呈升高趋势 ($F=8.143$ 和 9.224 , $P=0.021$ 和 0.019), 各时段 ApoE^{-/-} 组 MDA、ROS 高于 WT 组 ($P<0.05$)。

2.4 EC-SOD、DNMT1 mRNA 及 EC-SOD 甲基化水平变化

第 8、12、16、20 周, ApoE^{-/-} 组 EC-SOD mRNA (见

图 4A) 表达水平低于 WT 组 ($F=17.320$, $P=0.000$), DNMT1 mRNA 表达水平 (见图 4B) 和 EC-SOD 甲基化水平 (见图 4C) 高于 WT 组 ($F=16.477$ 和 4.965 , $P=0.001$ 和 0.024)。

2.5 pEGFP-N1-DNMT1 转染后 EC-SOD、DNMT1 蛋白及 EC-SOD 甲基化水平变化

pEGFP-N1-DNMT1 组 DNMT1 蛋白表达 (见图 5A) 及 EC-SOD 甲基化水平 (见图 5C) 高于 pEGFP-N1 组 ($F=7.884$ 和 6.329 , $P=0.028$ 和 0.037) 和 NC 组 ($F=7.955$ 和 6.059 , $P=0.004$ 和 0.019), EC-SOD 蛋白表达水平 (见图 5B) 低于 pEGFP-N1 组 ($F=15.365$, $P=0.000$) 和 NC 组 ($F=6.331$, $P=0.037$), pEGFP-N1 组和 NC 组 EC-SOD、DNMT1 蛋白表达水平及 EC-SOD 甲基化水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

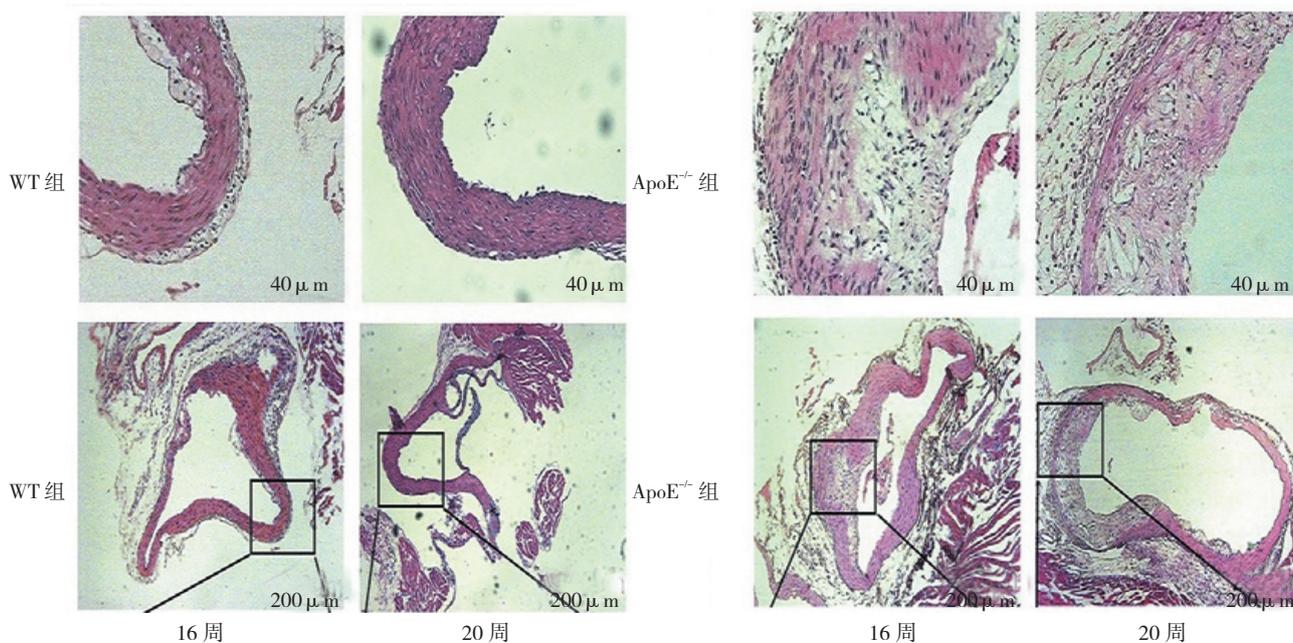
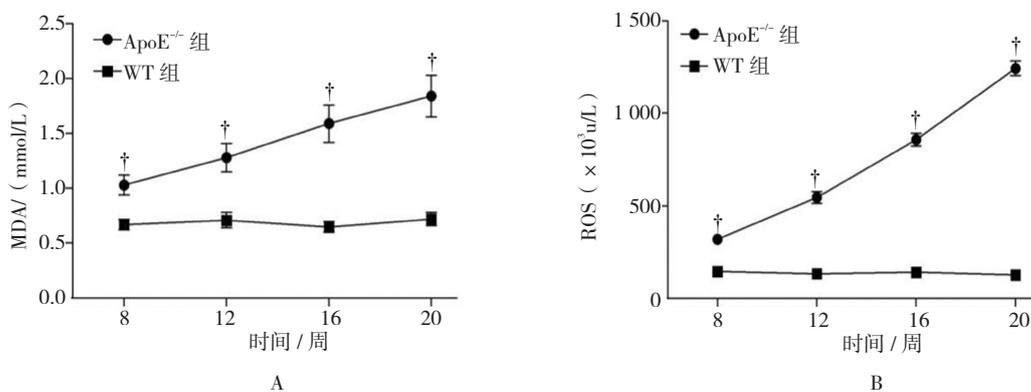


图 2 两组主动脉病理形态变化



† 与 WT 组比较, $P<0.05$

图 3 两组氧化应激指标比较

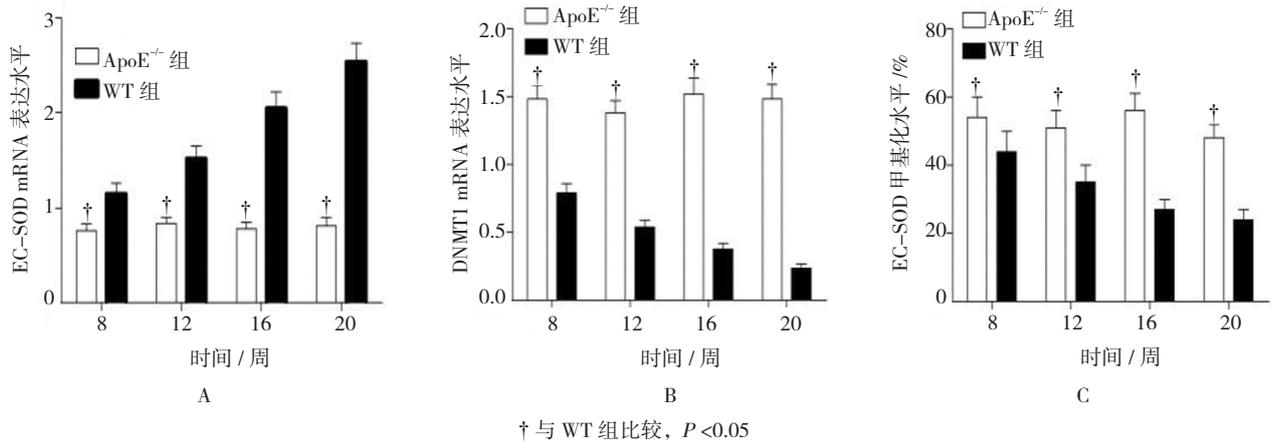
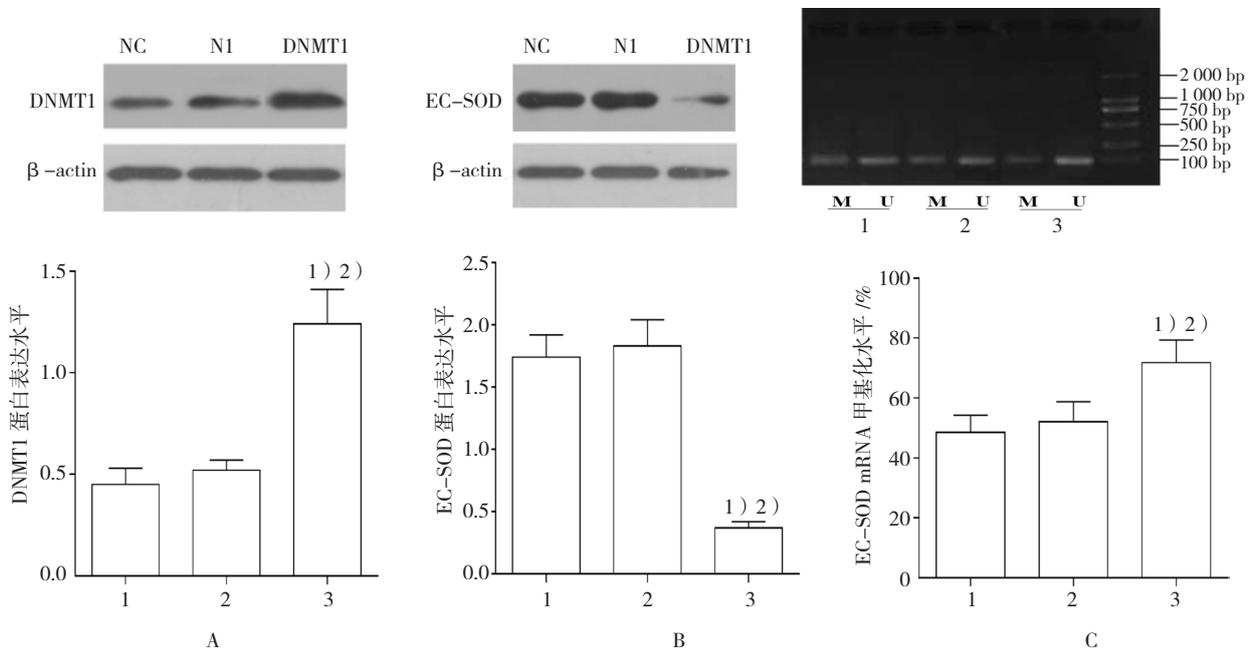


图 4 两组 EC-SOD、DNMT1 mRNA 及 EC-SOD 甲基化水平比较



1: NC 组; 2: pEGFP-N1 组; 3: pEGFP-N1-DNMT1 组。1) 与 pEGFP-N1 组比较, P < 0.05; 2) 与 NC 组比较, P < 0.05。M: 甲基化, U: 非甲基化

图 5 pEGFP-N1-DNMT1 转染后 EC-SOD、DNMT1 蛋白表达及 EC-SOD 甲基化水平比较

3 讨论

正常情况下, 机体处于氧化和抗氧化动态平衡, 当平衡被打破后就会导致氧自由基生成、清除失衡, 引起 ROS 蓄积, 最终引起氧化应激损伤^[7-9]。目前已证实氧化应激损伤与 AS 的发生和进展密切相关, 氧化应激能通过诱导氧化作用, 引起局部炎症反应和细胞增殖, 因此针对性的抗氧化治疗成为 AS 防治的主要手段。ApoE^{-/-} 实验小鼠是复制 AS 模型常用的动物, 本研究利用高脂饲料喂养 ApoE^{-/-} 小鼠, 结果显示 ApoE^{-/-} 组 TC、LDL、TG 高于 WT 组, HDL 低于 WT 组;

主动脉根部切片染色显示 ApoE^{-/-} 组主动脉内膜明显增厚, WT 组动脉组织内皮细胞结构规则有序, 证实 AS 小鼠模型复制成功。进一步分析两组小鼠的氧化应激指标, 结果显示 ApoE^{-/-} 组 MDA、ROS 呈升高趋势, 各时段 ApoE^{-/-} 组 MDA、ROS 高于 WT 组, 说明 AS 与氧化应激损伤密切相关。NOMIYA 等^[10] 报道称氧化应激能损伤血管内皮细胞, 进而诱发粥样斑块形成和脂质沉积, 这一过程亦是 AS 的始动因素。PEREIRA 等^[11] 也证实高脂喂养的 ApoE^{-/-} 小鼠血脂异常升高, ROS 水平增加, 证实高脂血症也会诱导氧化应激反应。

机体发生氧化应激时,能够启动自身的抗氧化防御体系,其中 EC-SOD 唯一分布于细胞外的抗氧化酶,其通过与硫酸乙酰肝素结合,将氧自由基歧化为 H_2O_2 ,保护组织避免发生自由基损伤,预防 AS 发生^[12-13]。最新研究发现^[14],EC-SOD 还具有调节内源性 NO 的作用,所产生的 NO 能够扩张血管平滑肌、抑制血小板聚集,进而抑制 AS 发生和进展。本研究发现 ApoE^{-/-} 组 EC-SOD mRNA 表达水平低于 WT 组,说明 EC-SOD 含量偏低引起的抗氧化防御体系功能减弱是导致 AS 的诱因之一。TEOH-FITZGERALD 等^[15]报道称细胞外高浓度 EC-SOD 能够有效清除氧自由基,减少超氧化亚硝基阴离子形成,进而保护细胞避免氧自由基损害,抑制 AS 的进程。BREAK 等^[16]也证实 EC-SOD 能够抑制还原型辅酶 II (NADPH) 和 ROS 增多而产生的氧自由基,将小鼠 EC-SOD 基因敲除后,小鼠发生 AS 的风险升高。

目前已经明确 EC-SOD 是抗氧化的主要酶系,但是其在粥样硬化过程中的作用机制仍存在一定争议。随着分子生物学的研究深入,人们逐渐认识到表观遗传在心血管疾病发病中的作用。作为表观遗传的典型标记,DNA 甲基化在多种生物学功能中发挥着重要作用^[17-18]。杨程等^[19]对 40 例确诊为 AS 的患者外周血基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 (TIMP-1) 进行检测,结果发现 AS 患者外周血 TIMP-1 含量低于正常对照组,进一步发现其降低的机制与 TIMP-1 基因启动子区的高甲基化密切相关,提示基因 DNA 甲基化也是导致 AS 形成的原因之一。本研究 ApoE^{-/-} 组 EC-SOD 甲基化水平高于 WT 组,说明 AS 发病可能与 EC-SOD 甲基化水平增加,进而导致 EC-SOD 表达下调有关。DNMT1 是维持基因 DNA 甲基化修饰状态的主要酶系,也是调节基因 DNA 甲基化水平的关键^[20];DNMT1 表达与 DNA 甲基化程度正相关,与基因表达负相关^[21]。本研究证实 ApoE^{-/-} 组 DNMT1 表达水平高于 WT 组,成功转染 DNMT1 的巨噬细胞 DNMT1 蛋白表达及 EC-SOD 甲基化升高,EC-SOD 蛋白表达降低,说明 DNMT1 催化 EC-SOD 转甲基反应,导致 EC-SOD 水平降低,进而加重氧化应激损伤,最终形成 AS。这一结果也提示 DNMT1 可以作为 AS 靶向治疗的 1 个潜在作用靶点。

综上所述,EC-SOD 甲基化程度升高,导致 EC-SOD 表达降低,机体抵抗氧化应激反应能力减弱,最终发展成 AS。

参 考 文 献:

- [1] PFENNIGER A, CHANSON M, KWAK B R. Connexins in atherosclerosis[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2013, 1828(1): 157-166.
- [2] JR Y A, OHMI T, MONMA R, et al. Correlation between the characteristics of acceleration and visco elasticity of artery wall under pulsatile flow conditions (physical meaning of I* as a parameter of progressive behaviors of atherosclerosis and arteriosclerosis)[J]. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2013, 23(1-2): 75-91.
- [3] PEIFFER V, BHARATH A A, SHERWIN S J, et al. A novel method for quantifying spatial correlations between patterns of atherosclerosis and hemodynamic factors[J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2013, 135(2): 124-130.
- [4] SCAVENIUS C, PETERSEN J S, THOMSEN L R, et al. Murine extracellular superoxide dismutase is converted into the inactive fold by the Ser195Cys mutation[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(19): 3369-3375.
- [5] SONNI S, LIOUTAS V A, SELIM M H. Epigenetic regulation of extracellular-superoxide dismutase in human monocytes[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2013, 61(1): 197-205.
- [6] BRESSLER J, SHIMMIN L C, BOERWINKLE E, et al. Global DNA methylation and risk of subclinical atherosclerosis in young adults: the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY) study[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(2): 958-962.
- [7] TSUCHIYA K, WESTERTERP M, MURPHY A J, et al. Expanded granulocyte/monocyte compartment in myeloid-specific foxo knockout increases oxidative stress and accelerates atherosclerosis in mice[J]. *Circulation Research*, 2013, 112(7): 992-1003.
- [8] DELGADO-ROCHE L, ACOSTA E, SOTO Y, et al. The treatment with an anti-glycosaminoglycan antibody reduces aortic oxidative stress in a rabbit model of atherosclerosis[J]. *Free Radical Research*, 2013, 47(4): 309-315.
- [9] NYSSÖNEN K, KURL S, KARPPI J, et al. LDL oxidative modification and carotid atherosclerosis: results of a multicenter study[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 225(1): 231-236.
- [10] NOMIYA M, SAGAWA K, YAZAKI J, et al. Increased bladder activity is associated with elevated oxidative stress markers and proinflammatory cytokines in a rat model of atherosclerosis-induced chronic bladder ischemia[J]. *Neurourology and Urodynamics*, 2012, 31(1): 185-189.
- [11] PEREIRA S S, TEIXEIRA L G, AGUILAR E C, et al. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice fed high fat diet[J]. *Animal Science Journal*, 2012, 83(7): 549-555.
- [12] DIVYYA S, NAUSHAD S M, MURTHY P V, et al. GCPII, modulates oxidative stress and prostate cancer susceptibility through changes in methylation of RASSF1, BNIP3, GSTP1, and Ec - SOD[J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(10): 5541-5550.

- [13] MAKINO J, KAMIYA T, HARA H, et al. TPA induces the expression of EC-SOD in human monocytic THP-1 cells: involvement of PKC, MEK/ERK and NOX-derived ROS[J]. *Free Radical Research*, 2012, 46(5): 637-644.
- [14] AHMED M N, CODIPILLY C, HOGG N, et al. The protective effect of overexpression of extracellular superoxide dismutase on nitric oxide bioavailability in the lung after exposure to hyperoxia stress[J]. *Experimental Lung Research*, 2011, 37(1): 10-17.
- [15] TEOH-FITZGERALD M L, FITZGERALD M P, JENSEN T J, et al. Genetic and epigenetic inactivation of extracellular superoxide dismutase promotes an invasive phenotype in human lung cancer by disrupting ECM homeostasis[J]. *Molecular Cancer Research*, 2012, 10(1): 40-51.
- [16] BREAK T J, JUN S, INDRAMOHAN M, et al. Extracellular superoxide dismutase inhibits innate immune responses and clearance of an intracellular bacterial infection[J]. *Journal of Immunology*, 2012, 188(7): 3342-3350.
- [17] CHEN C, LI B. Chemiluminescence resonance energy transfer biosensing platform for site-specific determination of DNA methylation and assay of DNA methyltransferase activity using exonuclease III-assisted target recycling amplification[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 54(8): 48-54.
- [18] WEINER S A, GALBRAITH D A, ADAMS D C, et al. A survey of DNA methylation across social insect species, life stages, and castes reveals abundant and caste-associated methylation in a primitively social wasp[J]. *The Science of Nature*, 2013, 100(8): 795-799.
- [19] 杨程, 田珏, 蔡欣, 等. 动脉粥样硬化患者基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 基因 DNA 高甲基化的研究 [J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(21): 3530-3532.
- [20] ZAMPIERI M, GUASTAFIERRO T, CALABRESE R, et al. ADP-ribose polymers localized on Ctf-Parp1-DNMT1 complex prevent methylation of Ctf target sites[J]. *Biochemical Journal*, 2012, 441(2): 645-652.
- [21] TAKESHITA K, SUETAKE I, YAMASHITA E, et al. Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (DNMT1)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(22): 9055-9059.

(张蕾 编辑)