

DNA 甲基转移酶与心脏纤维化的研究进展

谢青文 唐其柱

摘 要 心脏纤维化在心血管疾病的发生、发展中起到重要作用,长期的心脏纤维化可引起心肌僵硬、心功能障碍,预后不良。DNA 甲基转移酶是 DNA 甲基化过程中的关键酶,参与调控基因的转录过程。已有的研究发现部分基因的 DNA 异常高甲基化在心脏纤维化中发挥重要作用。本文主要对 DNA 甲基转移酶对心脏纤维化的影响以及 DNA 甲基转移酶作为治疗心脏纤维化的新靶点的有关研究进展进行归纳与讨论,希望能够加深对 DNA 甲基化与心脏纤维化发生、发展的有关机制的理解,并为发现心脏纤维化的新治疗靶点提供新的方向。

关键词 DNA 甲基转移酶 心脏纤维化 DNA 甲基转移酶抑制剂 心脏成纤维细胞

中图分类号 R541

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.01.033

心脏纤维化是各种心血管疾病不可避免的病理改变之一,主要是由于细胞外基质过度沉积,致使心脏收缩和舒张功能障碍,最终导致心律失常和心力衰竭。心脏纤维化的主要效应细胞成纤维细胞可被各种病理刺激激活,从而进行增殖,分化为肌成纤维细胞,并产生各种细胞因子和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白。目前还没有治疗心脏纤维化的方法,因此了解心脏纤维化的病理发生机制具有重要意义。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传机制,通常发生在对环境刺激的反应中,在调控基因表达中起关键作用。最近研究表明, DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)在心脏纤维化中起着重要作用,控制 DNA 甲基化可能成为抗纤维化治疗的新策略。本文就 DNA 甲基转移酶在心脏纤维化中的作用最新研究进展进行综述,寻找心脏纤维化治疗新靶点。

一、DNMTs 概述

DNA 甲基化是指 DNA 的特定碱基在 DNMTs 的作用下,共价结合一个甲基基团的化学修饰过程,可以发生在多个碱基基团上。在一般研究中,主要是指在胞嘧啶第 5 位碳原子上添加一个甲基,产生 5-甲基胞嘧啶(5-mC)的过程,通过基因启动子区域的 DNA 甲基化参与转录基因沉默。在真核生物中, DNA 甲基化主要发生在 CpG 岛,主要 DNMTs 和甲基结合蛋白调控。目前,哺乳动物中共发现了五种 DN-

MT 蛋白,但只有 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 具有甲基转移酶活性^[1]。在 DNA 复制过程中, DNMT1 将 DNA 甲基化从母链复制到新合成的子链。DNMT3A 和 DNMT3B 参与从头甲基化,在缺乏模板的情况下建立新的 DNA 甲基化模式。已有研究表明,在人类和小鼠心脏中表达的主要 DNA 甲基转移酶是 DNMT3B,而其他甲基转移酶, DNMT1 和 DNMT3A 几乎检测不到,而且 DNMT3B 敲除的心脏中存在着广泛的间质纤维化^[2]。另外有研究发现,在异丙肾上腺素诱导的大鼠心脏纤维化模型中,心脏成纤维细胞 DNMT3A 表达上调, miR-29a 及其 miR-26a-5p 通过下调 DNMT3A 而降低成纤维细胞的增殖和活化,从而改善心脏纤维化^[3,4]。这些结果说明, DNMTs 各亚型在心脏纤维化中的作用不同,还需更多研究去探索 DNMTs 参与心脏纤维化的作用机制。无论是心肌梗死引起的急性缺血性损伤,慢性高血压引起的压力超载,还是糖尿病引起的代谢功能障碍,均能使心脏细胞 DNA 甲基化机制功能失调,导致心脏纤维化。下面笔者将讨论 DNMTs 在缺血性心肌病、压力负荷诱导的心肌病以及糖尿病性心肌病等心脏纤维化病理机制中的作用。

二、DNMTs 与心脏纤维化发生的关系

1. 缺血性心肌病: DNA 甲基化在缺血性心肌病中发挥重要作用。实验证实转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 可抑制 DNMT1 蛋白的表达和活性,从而抑制 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)启动子甲基化,导致心肌梗死区 α -SMA 表达大幅增加。但是在该研究中, DNMT3A 和 DNMT3B 表达水平差异无统计学

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81530012)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科、代谢与相关慢病湖北省重点实验室

通信作者:唐其柱,教授,博士生导师,电子信箱:qztang@whu.edu.cn

意义^[5]。Jeong 等^[6]研究发现在心肌梗死中,DNMTs 抑制剂 5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5AZA)可显著改善心脏功能和纤维化,这与巨噬细胞中干扰素调节因子-1(interferon regulatory factor-1, IRF1)的 SUMO 化有关。内皮细胞通过内皮-间充质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT)获得纤维增殖表型,在新生内膜病变的形成中发挥关键作用。缺氧可通过低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF1 α)和 TGF/SMAD 信号通路通过 DNMT3A 介导的 Ras-Gap 样蛋白 1(Ras-Gap-like protein 1, RASAL1)启动子的高甲基化,诱导人冠状动脉内皮细胞 EndMT^[7]。

人冠状动脉内皮细胞暴露于高磷酸盐环境时也发生 EndMT。进一步研究证明,这种 EndMT 是通过组蛋白去乙酰化酶 2(histone deacetylase 2, HDAC2)将异常磷酸化的 DNMT1 募集到 RASAL1 CpG 岛启动子上,并激活常见的 EndMT 调控因子 Twist 和 Snail 而导致的^[8]。缺氧产生的自由基也可能激活 Snail,上调 DNMT1 和 DNMT3B,使 RASSF1A 蛋白合成显著减少,相关纤维化标志物增加。细胞外超氧化物歧化酶可以通过 Ras/ERK 途径显著降低 DNMT1 和 DNMT-3B 介导的 RASSF1A 基因甲基化,从而缓解缺氧诱导的心脏纤维化^[9]。在研究血管成形术诱导再狭窄机制时,发现猪冠状动脉 DNMT1 和 DNMT3A 对细胞因子信号的抑制基因(suppression of cytokine signaling 3, SOCS3)具有抑制作用,抑制 DNMT1 和 DNMT3A 对防止冠状动脉再狭窄可能具有重要临床意义^[10]。同时,该研究还发现抑制血管平滑肌细胞 DNMT1 可诱导 DNMT3A 表达。DNMT1 和 DNMT3A 之间存在一种相互调节的机制,在 DNMT1 缺失的情况下,诱导 DNMT3A 可补偿 DNMT1 功能的丧失。这些研究结果表明,在缺血性心肌病中,DNMTs 通过沉默基因表达发挥促纤维化或抗纤维化作用,但是 DNMTs 抑制剂治疗心脏纤维化却表现出积极作用。

2. 压力负荷诱导的心肌病:在压力负荷诱导的心肌病中,心脏纤维化是心肌重构的一个重要病理改变。微小 RNA 与 DNA 甲基化的相互作用可能是心脏纤维化疾病遗传因素缺失的原因。腹主动脉缩窄术后的鼠纤维化心脏及雷帕霉素诱导的心脏成纤维细胞自噬中,DNMT3A 表达水平平均上调。DNMT3A 通过调控 miR-200b 参与心脏成纤维细胞自噬^[11]。同样地,Tao 等^[12]研究发现,腹主动脉缩窄大鼠心脏

DNMT3A 及纤维化相关蛋白 α -SMA 和胶原蛋白 I 表达显著升高。心脏成纤维细胞转染 DNMT3A-siRNA 对 TGF- β 1 诱导的成纤维细胞增殖有明显抑制作用。miR-369-5p 介导的 Patched1 的 DNMT3A 表观遗传沉默是心肌纤维化中成纤维细胞增殖的机制。容量负荷诱导的心衰小鼠心脏中的 DNMT1 水平上调,TIMP4 表达下调,相应的,MMP9 的表达也上调,使 ECM 蛋白产生与降解失衡^[13]。低剂量 5-AZA 可以减轻压力负荷小鼠心脏纤维化,血管周围胶原蛋白含量显著降低,这种胶原沉积的减少反映在心脏胶原蛋白 I 和胶原蛋白 III mRNA 水平的减少,虽然射血分数无差异,但是心脏舒张功能得到明显改善^[14]。

虽然 5-AZA 已获监管部门批准用于血液系统恶性肿瘤的治疗,但其在临床肿瘤中的治疗与多种副作用有关。这些不良反应包括胃肠道不适、体重减轻和骨髓抑制等。另有一项研究发现 5-AZA 治疗的 4 例肿瘤病例(既往有心血管疾病史)出现射血分数改变和心衰症状,但是该研究并未确定所报道的心脏不良事件是由 5-AZA 治疗引起的还是与本身的疾病过程有关^[15]。因为低剂量 5-AZA 比骨髓增生异常综合征和急性髓系白血病患者临床给药剂量低 5 倍,5-AZA 对体重无影响,耐受性良好^[14]。自发性高血压大鼠经 5-AZA 治疗后,血管周围胶原蛋白水平也显著降低,5-AZA 处理的人心室心脏成纤维细胞胶原蛋白 I、胶原蛋白 III 和 α -SMA 表达减少^[16]。此外,DNMT 抑制剂 RG108 可以通过下调肌浆内质网 Ca^{2+} -ATP 酶 2 α (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 α , SERCA2 α)和 β 2-肾上腺素受体,减轻主动脉弓缩窄诱导的大鼠心肌纤维化^[17]。CRISPR/Cas9 介导的 DNMT3A 缺失小鼠在血管紧张素 II 刺激后心功能进一步下降,心肾纤维化程度更严重^[18]。在肺动脉高压中,右心室成纤维细胞 DNMT1 表达上调,DNMT3A 和 DNMT3B 无变化。右心室成纤维细胞通过 DNMT1-HIF1 α -丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase, PDK)促进胶原合成和右心室纤维化。这种表观遗传线粒体代谢途径也是一个潜在的抗纤维化治疗靶点^[19]。总之,上述研究结论并不一致,即使在压力负荷诱导的心脏纤维化中,DNMTs 各亚型的作用仍具有不确定性,而针对 DNMTs 的各种治疗方法也成为潜在的候选者。

3. 糖尿病性心肌病:糖尿病是心血管疾病一个危险因素,糖尿病心肌病后期也存在严重的心脏纤维

化。在一项糖尿病随访研究中,无论是糖尿病还是非糖尿病,心血管疾病的发生均与 DNA 甲基化有关,但两者 DNA 甲基化修饰存在差异^[20]。研究发现糖尿病心肌纤维化组织中 DNMT1 表达增加,然而 DNMT3A 和 DNMT3B 保持不变^[21]。Tao 等^[22]研究也发现 DNMT1 在高糖诱导的心脏成纤维细胞中的表达增加,而且 DNMT1 介导的 SOCS3 启动子高甲基化,导致 SOCS3 在糖尿病心肌纤维化中的表达下调,进而促进信号转导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)活化,促进心脏成纤维细胞活化和胶原沉积。基因或药理学失活的 DNMT1 逆转心脏成纤维细胞的激活表型。

在糖尿病心肌病患者心脏中,同样观察到 DNMT1 与 SOCS3 表达水平负相关, DNMT1 表达增加和 SOCS3 表达缺失。血清同型半胱氨酸浓度升高是糖尿病性心脏纤维化的危险因素,雄激素受体的 DNMT1 甲基化触发了同型半胱氨酸诱导的心脏成纤维细胞自噬损伤。然而,也有研究显示,在链脲佐菌素诱导的糖尿病中,尽管心脏各细胞基因表达发生了显著变化,但 DNA 甲基化仍保持稳定^[23]。心脏外的甲基化也有可能参与糖尿病心肌病的发生、发展过程,超氧化物歧化酶模拟物 B12 通过调节肝脏 DNMTs 及 SOCS 1/3 来激活肝脏胰岛素样生长因子 1(insulin like growth factor-1, IGF-1)的产生以及抑制氧化应激,减少心脏纤维化面积,增强心脏保护作用^[24]。以上研究说明,在糖尿病心肌病中,除了心脏的 DNMTs 直接参与心脏纤维化,其他器官的 DNA 甲基化也可能对心脏纤维化产生影响。

4. 其他心血管疾病:在脂多糖刺激下,心脏成纤维细胞焦亡相关蛋白 Caspase 1 和 NLRP3 以及 DNMT1 表达增加, lncRNA GAS5 的 DNMT1 甲基化通过 NLRP3 导致心脏成纤维细胞焦亡^[25]。阿霉素诱导的心脏损伤中, DNMT1 的表达上调,使用 CRISPR/cas9 技术特异性敲除心脏 DNMT1 可改善心脏纤维化。DNA 甲基化是生物衰老的强大决定因素,随着年龄的增长,成年大鼠心脏中 DNMT1 表达明显下调^[26]。但有研究显示,随着年龄增长小鼠心脏成纤维细胞的甲基化状态在 14 周龄之后没有明显变化,心脏成纤维细胞在增殖、胶原表达或 DNA 甲基化方面没有表现出年龄依赖性的增加^[27]。这说明年龄相关的心脏纤维化增加,不能直接归因于成纤维细胞增殖的改变或 ECM 基因表达的增加。DNMTs 参与各种心血管疾病的心脏纤维化,这为心脏纤维化的机制研究提供

了更多见解。

三、DNMTs 作为标志物及治疗靶点的研究进展

DNMTs 是心脏纤维化研究和治疗中的一个新领域。DNA 甲基化可用作疾病的生物学标志物。在一项全表观基因组关联研究中,729 例心脑血管病患者血液样本中存在特异性 DNA 甲基化改变。在急性心肌梗死患者的 211 个 CpG 位点上发现了不同的 DNA 甲基化,其中 42 例与心血管功能、心肌发育和缺血性损伤反应相关的基因有关^[28]。尽管 DNMTs 抑制剂已获批准用于不同器官的纤维化疾病,但将这些药物用于治疗心脏纤维化仍存在重大挑战。5-AZA 处理的小鼠 DNMT1 和 DNMT3B 基因表达显著下调,而 DNMT3A 水平差异无统计学意义,但是 5-AZA 导致 DNMT1 和 DNMT3B 表达降低的机制尚不明确^[14]。

胍苯哒嗪对心脏也具有保护作用,部分与抑制 DNMT1 活性有关, DNMT1 活性可降低 SERCA2a 启动子的甲基化程度,调节心肌细胞的钙稳态。此外,胍苯哒嗪还能诱导 TET3,促进 RASAL1 启动子去甲基化^[29]。因此,胍苯哒嗪可同时靶向 DNMT 和 TET3,有潜力成为治疗心肌纤维化的一种新的非核苷酸表观遗传药物。CRISPR/Cas9 是重要的基因编辑工具,在抗纤维化研究中,CRISPR/Cas9 可用于恢复 TET3 的表达,以 RASAL1 和 Klotho 甲基化的启动子为靶点减少纤维化^[30]。总之, DNMTs 不仅可作为心脏纤维化的生物学标志物,其抑制剂还可通过调控纤维化相关基因的甲基化发挥心脏保护作用。

四、展望

综上所述, DNMTs 在心脏纤维化过程中参与了成纤维细胞的增殖和分化,以及 ECM 蛋白的产生和降解,为心脏纤维化的诊断和治疗提供了新的策略。临床研究已发现 DNA 甲基化与心血管疾病具有相关性,提示 DNMTs 可能作为心脏纤维化的诊断和预后指标。心脏纤维化目前尚无有效的治疗方法, DNMTs 各亚型在心脏纤维化中发挥不同的作用,相关具体机制仍需进一步探索。虽然 DNMTs 同时具有促纤维化和抗纤维化作用,但是 DNMTs 抑制剂对心脏纤维化始终产生有益作用,其作用机制仍不明确,也许开发针对 DNMTs 亚型的特异性抑制剂是另一治疗心脏纤维化的有效方法。总而言之,以 DNA 甲基化过程尤其是 DNMTs 作为靶点在心脏纤维化及心血管疾病中具有巨大的潜力,相关领域的研究也越来越多,经过不断地探索研究,相信能够在理解心血管疾病发生机制及其治疗方法中,发挥重要作用。

参考文献

- 1 Chen Z, Zhang Y. Role of mammalian DNA methyltransferases in development[J]. *Annu Rev Biochem*, 2020, 89(1): 135 – 158
- 2 Robinson EL, Vujic A, Roderick HL, *et al.* Experimental heart failure modelled by the cardiomyocyte – specific loss of an epigenome modifier, DNMT3B[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 82(1): 174 – 183
- 3 Qin RH, Tao H, Ni SH, *et al.* microRNA – 29a inhibits cardiac fibrosis in Sprague – Dawley rats by downregulating the expression of DNMT3A[J]. *Anatol J Cardiol*, 2018, 20(4): 198 – 205
- 4 何涛, 丁安, 周文杰, 等. miR – 26a – 5p 下调 DNMT3A 表达抑制心肌成纤维细胞活化增殖的机制研究[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2020, 12(10): 1179 – 1184
- 5 He Y, Ling S, Sun Y, *et al.* DNA methylation regulates alpha – smooth muscle actin expression during cardiac fibroblast differentiation[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 7174 – 7185
- 6 Jeong HY, Wan SK, Hong MH, *et al.* 5 – Azacytidine modulates interferon regulatory factor 1 in macrophages to exert a cardioprotective effect[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 15768
- 7 Xu X, Tan X, Hulshoff MS, *et al.* Hypoxia – induced endothelial – mesenchymal transition is associated with RASAL1 promoter hypermethylation in human coronary endothelial cells[J]. *Febs Lett*, 2016, 590(8): 1222 – 1233
- 8 Tan X, Xu X, Zeisberg M, *et al.* DNMT1 and HDAC2 cooperate to facilitate aberrant promoter methylation in inorganic phosphate – induced endothelial – mesenchymal transition[J]. *Plos One*, 2016, 11(1): e0147816
- 9 Rajgarhia A, Ayyasola K, Zaghloul N, *et al.* Extracellular superoxide dismutase (EC – SOD) regulates gene methylation and cardiac fibrosis during chronic hypoxic stress[J]. *Front Cardiovasc M*, 2021, 8(1): 669975
- 10 Boosani CS, Gunasekar P, Block M, *et al.* Inhibition of DNA methyltransferase – 1 instigates the expression of DNA methyltransferase – 3a in angioplasty – induced restenosis[J]. *Can J Physiol Pharm*, 2018, 96(10): 1030 – 1039
- 11 Zhao XD, Qin RH, Yang JJ, *et al.* DNMT3A controls miR – 200b in cardiac fibroblast autophagy and cardiac fibrosis[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(8): 681 – 690
- 12 Tao H, Dai C, Ding JF, *et al.* Epigenetic aberrations of miR – 369 – 5p and DNMT3A control Patched1 signal pathway in cardiac fibrosis[J]. *Toxicology*, 2018, 410(1): 182 – 192
- 13 Chaturvedi P, Tyagi SC. Epigenetic silencing of TIMP4 in heart failure[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(11): 2089 – 2101
- 14 Russell – Hallinan A, Neary R, Watson CJ, *et al.* Repurposing from oncology to cardiology: low – dose 5 – azacytidine attenuates pathological cardiac remodeling in response to pressure overload injury[J]. *J Cardiovasc Pharm T*, 2021, 26(4): 375 – 385
- 15 Perino J, Mottal N, Bohbot Y, *et al.* Cardiac failure in patients treated with azacytidine, a pyrimidine analogue: case reports and disproportionality analyses in Vigibase[J]. *Brit J Clin Pharmacol*, 2020, 86(5): 991 – 998
- 16 Watson CJ, Horgan S, Neary R, *et al.* Epigenetic therapy for the treatment of hypertension – induced cardiac hypertrophy and fibrosis[J]. *J Cardiovasc Pharm T*, 2016, 21(1): 127 – 137
- 17 Stenzig J, Schneeberger Y, Loser A, *et al.* Pharmacological inhibition of DNA methylation attenuates pressure overload – induced cardiac hypertrophy in rats[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 120(1): 53 – 63
- 18 Sano S, Ohshima K, Ying W, *et al.* CRISPR – mediated gene editing to assess the roles of Tet2 and Dnmt3a in clonal hematopoiesis and cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2018, 123(3): 335 – 341
- 19 Tian L, Wu D, Dasgupta A, *et al.* Epigenetic metabolic reprogramming of right ventricular fibroblasts in pulmonary arterial hypertension: a pyruvate dehydrogenase kinase – dependent shift in mitochondrial metabolism promotes right ventricular fibrosis[J]. *Circ Res*, 2020, 126(12): 1723 – 1745
- 20 董潇男, 李文轲, 钱鑫, 等. 糖尿病心脏病患者外周血 DNA 组甲基化分析: 大庆糖尿病预防研究 23 年随访研究结果[J]. *中国循环杂志*, 2018, 33(S1): 14
- 21 Tao H, Shi P, Xuan HY, *et al.* DNA methyltransferase – 1 inactivation of androgen receptor axis triggers homocysteine induced cardiac fibroblast autophagy in diabetic cardiac fibrosis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 692(1): 108521
- 22 Tao H, Shi P, Zhao XD, *et al.* DNMT1 deregulation of SOCS3 axis drives cardiac fibroblast activation in diabetic cardiac fibrosis[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(5): 3481 – 3494
- 23 Lother A, Bondareva O, Saadatmand AR, *et al.* Diabetes changes gene expression but not DNA methylation in cardiac cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 151(1): 74 – 87
- 24 Kakoki M, Ramanathan PV, Hagaman JR, *et al.* Cyanocobalamin prevents cardiomyopathy in type 1 diabetes by modulating oxidative stress and DNMT – SOCS1/3 – IGF – 1 signaling[J]. *Comms Bio*, 2021, 4(1): 775
- 25 She Q, Shi P, Xu SS, *et al.* DNMT1 methylation of lncRNA GAS5 leads to cardiac fibroblast pyroptosis via affecting NLRP3 axis[J]. *Inflammation*, 2020, 43(3): 1065 – 1076
- 26 Wu TT, Ma YW, Zhang X, *et al.* Myocardial tissue – specific Dnmt1 knockout in rats protects against pathological injury induced by Adriamycin[J]. *Lab Invest*, 2020, 100(7): 974 – 985
- 27 Wu R, Ma F, Tosevska A, *et al.* Cardiac fibroblast proliferation rates and collagen expression mature early and are unaltered with advancing age[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(24): 14
- 28 Rask – Andersen M, Martinsson D, Ahsan M, *et al.* Epigenome – wide association study reveals differential DNA methylation in individuals with a history of myocardial infarction[J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(21): 4739 – 4748
- 29 Tampe B, Steinle U, Tampe D, *et al.* Low – dose hydralazine prevents fibrosis in a murine model of acute kidney injury – to – chronic kidney disease progression[J]. *Kidney Int*, 2017, 91(1): 157 – 176
- 30 Xu X, Tan X, Tampe B, *et al.* High – fidelity CRISPR/Cas9 – based gene – specific hydroxymethylation rescues gene expression and attenuates renal fibrosis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3509

(收稿日期: 2021 – 08 – 20)

(修回日期: 2021 – 08 – 23)