

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.14.006

IRX1 甲基化激活 CXCL14/NF- κ B 信号通路并改善心力衰竭*

闫莉 刁佳宇 邓纪钊 梁健 杨光[△]

(陕西省人民医院心血管内二科 陕西 西安 710068)

摘要 目的:探讨 IRX1 甲基化在心力衰竭(HF)大鼠中的作用机制。**方法:**通过生物信息学分析选择 HF 大鼠心肌细胞中的靶基因;通过 TAC 手术构建 HF 实验大鼠模型,并分组为假手术组(Sham 组)、TAC 组、Sham+5-Aza 组和 TAC+5-Aza 组。通过心脏超声检测大鼠心脏功能,免疫组织化学染色评价心脏损伤程度;GSEA 分析功能基因的相对丰富度。通过免疫荧光分析、Western blotting 和 qRT-PCR 检测 DNA 甲基化和表达水平。**结果:**与正常人的基因组相比,HF 患者基因组中甲基化程度显著提高,生物信息学分析确定 IRX1 为靶基因,IRX1 表达与 CXCL14/NF- κ B 之间存在显著相关性。超声心动图评估 HF 大鼠心脏功能的结果显示,与 TAC 组相比,TAC+5-Aza 组的左心室与体重的比率显著降低,而 LVDP、dp/dtmax 和 EF 显著增加($P<0.01$)。免疫染色结果显示,与 TAC 组相比,TAC+5-Aza 组心肌细胞排列紊乱的情况得到有效缓解并恢复正常心肌细胞状态。qRT-PCR 及 Western blotting 结果显示,与 TAC 组相比,TAC+5-Aza 组大鼠的基因组 DNA 甲基化、IRX1 甲基化、左心室 ANP、BNP 基因和 β -MHC mRNA 的表达水平显著降低($P<0.01$), α -MHC mRNA 的表达水平、IRX1 和 CXCL14 的 mRNA 和蛋白表达水平以及 MMP9 和 C-FLIP 蛋白表达水平显著增加($P<0.01$)。心肌纤维化和心肌细胞凋亡实验结果显示,与 TAC 组相比,TAC+5-Aza 组大鼠心肌纤维化和心肌细胞凋亡阳性率显著降低($P<0.01$)。**结论:**HF 模型大鼠的 IRX1 甲基化水平提高可能激活 CXCL14/NF- κ B 表达,以改善 TAC 诱导的心肌纤维化和细胞凋亡情况。

关键词:心力衰竭;IRX1;CXCL14/NF- κ B

中图分类号:R-33;R541.61 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)14-2626-07

Methylation of IRX1 Activates CXCL14/NF- κ B Signaling Pathway and Improves Heart Failure*

YAN Li, DIAO Jia-yu, DENG Ji-zhao, LIANG Jian, YANG Guang[△]

(2nd Department of Cardiovascular Medicine, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of IRX1 methylation in heart failure (HF) rats. **Methods:** Selection of target genes in HF rat cardiomyocytes by bioinformatics analysis, and HF experimental rat models were established by TAC operation, and the experiment was divided into four groups (Sham operation group (Sham group), TAC group, Sham+5-Aza group and TAC+5-Aza group). Cardiac function was detected by echocardiography, and the degree of cardiac injury was evaluated by immunohistochemistry. The relative abundance of functional genes was analyzed by GSEA. DNA methylation and expression were detected by immunofluorescence, Western blotting and qRT-PCR. **Results:** Compared with normal human genome, the methylation level of HF heart failure genome was significantly increased. Bioinformatics analysis confirmed that IRX1 was the target gene, and there was a significant correlation between IRX1 expression and CXCL14/NF- κ B. Compared with TAC group, the ratio of left ventricle to body weight in TAC+5-Aza group was significantly lower, while LVDP, DP/dtmax and EF were significantly increased ($P<0.01$). Compared with TAC group, the disorder of cardiomyocyte arrangement was effectively alleviated and normal cardiomyocyte state was restored in TAC+5-Aza group. The results of qRT-PCR and Western blotting showed that compared with TAC group, DNA methylation, IRX1 methylation, ANP, BNP gene and β -MHC mRNA expression levels of rats in TAC+5-Aza group were significantly lower than those in TAC group ($P<0.01$); and compared with TAC group, α -MHC mRNA expression level, IRX1 and CXCL14 mRNA and protein expression levels, MMP9 and c-FLIP protein expression levels were significantly increased ($P<0.01$). Then, compared with TAC group, the positive rates of myocardial fibrosis and cardiomyocyte apoptosis in TAC+5-Aza group were significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion:** The increased level of IRX1 methylation in HF model rats may activate the expression of CXCL14/NF- κ B to protect myocardial fibrosis and apoptosis induced by TAC.

Key words: Heart failure (HF); IRX1; CXCL14/NF- κ B

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R541.61 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2021)14-2626-07

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2020JM-665)

作者简介:闫莉(1986-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:心力衰竭,电话:18629355866,E-mail:y_l_200913273@163.com

[△] 通讯作者:杨光(1981-),男,博士,主治医师,主要研究方向:心肌病心衰发病机制,电话:18691885667,E-mail:WGD1317610299@126.com

(收稿日期:2021-01-07 接受日期:2021-01-30)

前言

目前治疗心力衰竭(heart failure, HF)的方法主要是药物治疗^[1],但大多数药物主要针对神经内分泌机制。虽然目前的临床治疗上存在多种策略,但仍未能有效降低心力衰竭的发病率,这迫切需要新的药物分子靶点。心力衰竭的发生和发展离不开表观遗传学变化^[2],与遗传改变不同,染色体成分修饰的潜在可逆性和遗传性使表观遗传机制成为治疗干预的诱人和有前途的目标^[3]。表观遗传学机制,如 microRNA 和 DNA 甲基化,已被认为与心力衰竭的异常基因表达有关^[4]。此外,一些研究表明,DNA 甲基化可以沉默或激活驱动心血管疾病过程的基因表达模式,包括左心室肥大和心肌纤维化^[5]。然而,DNA 甲基化在心力衰竭中的具体机制和潜在的临床应用还需要进一步分析。

Iroquois homeobox 1 (IRX1)是一种转录因子,在胚胎发育过程中起着至关重要的作用。最近,IRX1 已成为类风湿性关节炎、先天性心脏病以及胃癌和骨肉瘤等肿瘤的潜在抑制基因^[6,7]。研究表明,IRX1 中异常的非同义突变与心脏功能异常相关,并且在先天性心脏病中检测到 IRX1 甲基化水平过高^[8]。这些发现表明 IRX1 可能在心力衰竭的确切分子机制中发挥作用。趋化因子是一个小的趋化细胞因子超家族,趋化因子配体 14 (chemokine CXC ligand 14, CXCL14)是 Brak 超家族的成员^[9];已有研究报道 CXC 趋化因子超家族在炎症、自身免疫和肿瘤发生中发挥重要作用^[10]。CXCL14 通常被认为是一种肿瘤抑制因子^[11],但最近的几项研究报道了相反的结果。例如,胰腺癌中 CXCL14 的上调促进了肿瘤细胞的侵袭^[12]。故我们推测,IRX1 和 CXCL14 之间是否存在某种联系,可能会影响心脏的功能,从而为治疗心力衰竭提供了一种新的途径。本研究旨在通过基因组、细胞和动物水平探究 IRX1 的甲基化在心力衰竭中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

6 月龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠(体重为 225-250 g)来源于陕西省人民医院[SYXK(陕)2016-006],饲养环境为 25℃,每 12h 进行光暗循环培养,给予足够的食物和水源,并允许动物能自由活动。5-Aza、DAPI 购于 Sigma 公司;Rapid Chrome 苏木精和曙红染色试剂盒、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒、DNAzol 试剂购于 Thermo 公司;Liberase 酶溶液购于 Roche 公司;PVDF 膜购于 Millipore 公司;IRX1 抗体(ab98343)、CXCL14 抗体(ab36622)、GAPDH 抗体(ab181602)和二抗购于 Abcam 公司;BSA 蛋白检测试剂盒、RAPI 裂解缓冲液购于碧云天生物技术有限公司;QuantiTect SYBR Green 实时 PCR 试剂盒、Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司;RNeasy Mini 试剂盒、亚硫酸氢盐试剂盒、QIAquick 凝胶提取试剂盒、EpiTect MSP 试剂盒购于 Qiagen 公司;Dako EnVision 试剂盒购于 Dako 公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 基于 NCBI GEO 数据集数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),使用 ChIP 分析甲基化管道(ChAMP)软件包,limma 软件包的差异分析和基因集富集分析(GSEA)HF 与正常人基因组之间的显著差异。通过

根据筛选条件(| 倍数变化 |>2 和 P<0.05),将每个样品的读数与基因组进行;然后确定 HF 与正常人之间的差异基因表达。GSEA 预测并分析了上调的信号通路,然后与差异表达的基因相关^[13]。对于 IRX1 靶向基因和差异表达基因的 GO 功能注释分析,应用 R 包 Metascape (<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)GO 图用于分析可视化。

1.2.2 TAC 手术 对大鼠进行 TAC 手术时,所有动物均用 2.5%异氟烷进行麻醉,主动脉弓在头臂和左普通动脉之间用 4/0 丝线缝合,并用 20 号针头覆盖。结扎后,迅速拔出针头,并闭合皮肤。假手术组的操作同上,不同之处在于该丝线不绑扎^[14]。依据 Rockman 建立的 TAC 模型方法^[15],TAC 诱发大鼠心力衰竭总共持续 4 周。在第 2 周腹腔内注射 5-Aza(10 μM,胞苷核苷类似物 5-Aza 是一种广泛的 DNA 甲基转移酶抑制剂)。本研究将 28 只大鼠随机分为 4 组:假手术组(Sham 组)、TAC 组、Sham+5-Aza 组和 TAC+5-Aza 组,其中 Sham+5-Aza 组大鼠为假手术组大鼠基础上在第 2 周腹腔内注射 5-Aza(10 μM),TAC+5-Aza 组大鼠为 TAC 模型组大鼠基础上在第 2 周腹腔内注射 5-Aza(10 μM)。动物实验按照陕西省人民医院临床实验中心动物实验指南进行操作。

1.2.3 超声心电图检查 使用 VIVO 2100 系统(加拿大 Visual Sonics)进行超声心动图检查以评估心脏功能。在该过程中,将动物进行吸入麻醉(异氟醚 2.5%),并使用加热垫保持体温。使用 Cine 环分析左心室舒张压力(left ventricular diastolic pressure, LVDP)、射血分数(ejection fraction, EF)和左心室压力的最大增加率(dp/dtmax)。

1.2.4 心肌细胞的分离和培养 通过肌肉注射 80 mg/kg 氯胺酮和 5 mg/kg 甲苯噻嗪对各组大鼠进行充分麻醉,并严密监测大鼠的呼吸速率,以测定麻醉程度。然后,小心取出心脏并放置于无菌 PBS 缓冲液中(操作环境尽量保证无菌操作)。使用 0.3 mg/mL 的 Liberase 酶溶液进行 Langendorff 灌注,以获得心肌细胞。然后,将心肌细胞置于如文献所述^[16]的 DMEM 培养中进行培养(80 mg/mL 青霉素/链霉素,谷氨酰胺,10%马血清,5%胎牛血清,1.68% M199);4 h 后,转移至含有 0.1%胰岛素/转铁蛋白/亚硒酸钠补充剂的 DMEM 中继续培养,培养环境为 37℃、5% CO₂。

1.2.5 免疫组织化学染色及荧光染色 对实验组及对照组的大鼠进行充分麻醉,然后处死,于老鼠胸腔左侧处小心取出心脏。然后进行石蜡包埋,5 μm 厚度进行切片,然后切片在二甲苯中脱蜡,分级醇中再水化。用 4%过氧化氢孵育 5 min,抑制内源性过氧化物酶活性。切片用抗 IRX1(1:200)和 CXCL14(1:200)的抗体在 4℃下培养过夜。对于免疫组化,根据 Dako EnVision 试剂盒检测主要抗体。染色程度如文献所述^[17]进行评分:0 分:0%的细胞染色,1 分:<5%的细胞染色,2 分:5-50%的细胞染色,3 分:>50%的细胞染色。染色强度分为 0 分:阴性,1 分:弱,2 分:中等和 3 分:强。最后的染色得分被定义为程度和强度得分的总和,分为低表达(0 分和 2 分)或高表达(3-6 分)。

免疫荧光染色:将分离的心肌细胞用 IRX1(1:100)或 CXCL14(1:100)抗体孵育。使用驴抗山羊 IgG 和山羊抗兔 IgG 二级抗体,并用 DAPI 复染细胞核。免疫荧光检测采用 BX51WI 固定台式显微镜(Olympus)。

1.2.6 基因组 DNA 甲基化测量 对已分离的心脏通过动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。将提取的基因组 DNA 与磷酸二酯 I、苯甲酰酶核酸酶和虾碱性磷酸酶的混合物一起于 37℃ 孵育 2 h。然后,如文献所述^[18],结合 HPLC 和串联质谱法 (high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, HPLC-MS) 在多个反应监测模式下对甲基胞嘧啶 (Cm) 和胞嘧啶 (C) 进行定量分析。结果表示为 Cm/C 比值。

1.2.7 心肌纤维化和细胞凋亡分析 如上述实验中描述,取得大鼠心脏的切片,然后 HE 染色以进行心肌纤维化分析。使用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记凋亡小体,然后对染色图像中的 TUNEL 阳性细胞进行计数。按照试剂盒说明书,收集心肌细胞,并使用 PBS 洗涤 2 次,使用含 4% 多聚甲醛放置于摇床中 60~70 rpm/min,并于室温中固定 30 min。然后再次用 PBS 洗涤 2 次,用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 重悬细胞,室温孵育 5 min。离心收集细胞沉淀,并加入 TUNEL 反应液 50 μ L,于 37℃ 避光反应 1 h;再次使用 PBS 洗涤 2 次,选用 PI 或 DAPI 染色液进行复染,最后荧光显微镜观察记录。

1.2.8 qRT-PCR 和甲基化定量 PCR 使用 RNeasy Mini 试剂盒从各组分离的心肌细胞中提取总 RNA,并根据说明书使用 First Strand cDNA Synthesis Kit 合成第一链 cDNA。实时 RT-PCR 使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR 试剂盒通过 Bio-Rad iQ PCR 仪进行实时检测转录物水平。GAPDH 作为内部对照来计算 mRNA 的相对丰度。PCR 引物如表 1 所示,PCR 循环条件:94℃ 10 s,57℃ 15 s,72℃ 5 s,进行 37 个循环。

甲基化定量 PCR 的方法: 使用 DNAzol 试剂从各组分离的心肌细胞中提取总 DNA;然后在 55℃ 下用亚硫酸氢钠处理 16 h。按照说明书,使用亚硫酸氢盐试剂盒将分离的 DNA 转化并纯化。经亚硫酸氢钠处理后的 DNA 用作实时荧光甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 的模板,PCR 引物扩增经修饰的 IRX1 启动子 (-521 到 -679)。扩增的 PCR 产物用 QIAquick 凝胶提取试剂盒纯化,克隆到 pMD19-T 载体中进行测序分析。根据说明书,使用 EpiTect MSP 试剂盒进行甲基化特异性 PCR (表 1)。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上分离,在紫外光照射下直接可见。完全甲基化和非甲基化的 DNA 片段分别作为阳性和阴性对照。

1.2.9 蛋白质印迹检测 通过 RAPI 裂解液对分离的心肌细胞进行裂解,然后通过 BSA 蛋白检测试剂盒对蛋白进行定量分析;使用 10% 蛋白分离胶进行 SDS-PAGE (蛋白上样量为 30 μ g),待电泳结束后,转移至 0.22 μ M PVDF 膜。随后,将膜与一抗 IRX1 (1:1000)、CXCL14 (1:1000) 和 GAPDH (1:2000) 于 4℃ 过夜孵育。第二天,先使用 TBST 清洗膜 3 次,每次 10 min;然后将膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗在室温下孵育 2 h;再次使用 TBST 清洗膜 3 次,每次 10 min 后,通过增强化学发光检测系统并使用 GE Image Quant 25 LAS4000 mini 进行可视化蛋白带分析。

1.3 数据统计分析

使用 SPSS 软件 16.0 版 (SPSS Inc.) 进行统计学分析,数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差,两组间采用 Student t 检验进行统计学分析,多组间经方差分析后,并采用 LSD 多重比较分析,

$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表 1 PCR 所用引物序列

Table 1 Sequence of primers in PCR

Gene	Sequence
GAPDH	F: 5'-AACGACCCCTTCATTGACCT-3'
	R: 5'-CCCCATTTGATGTTAGCGGG-3'
CXCL14	F: 5'-CAGGGCAATTGGAACAA-3'
	R: 5'-GGTGCAGGGTCATCCTAA-3'
IRX1	F: 5'-AAATCCTGGGCACAGTCC-3'
	R: 5'-ACAGTGTTTGTCTCGGT-3'
ANP	F: 5'-CGGTACCGAAGATAACAG-3'
	R: 5'-CGGTACCGAAGATAACAG-3'
BNP	F: 5'-TGGAAGTCCTAGCCAGTCTC-3'
	R: 5'-CGACTGACTGCGCCGATCCGG-3'
α -MHC	F: 5'-CAGAGTGCTTCGTGCCTGA-3'
	R: 5'-GAATTCGAGGGTTCTG-3'
β -MHC	F: 5'-CTACCCAACCCTAAGGATG-3'
	R: 5'-CTGCCTAAGGTGCTGTTTC-3'

2 结果

2.1 HF 患者中 CpG 位点甲基化异常

GSEA 分析结果表明, HF 患者和正常人基因组具有多个可变位置,并提示它们之间具有显著性差异。通过可变 CpG 的热图,可进一步发现,与正常人的基因组相比, HF 患者基因组中甲基化程度显著提高。见图 1。

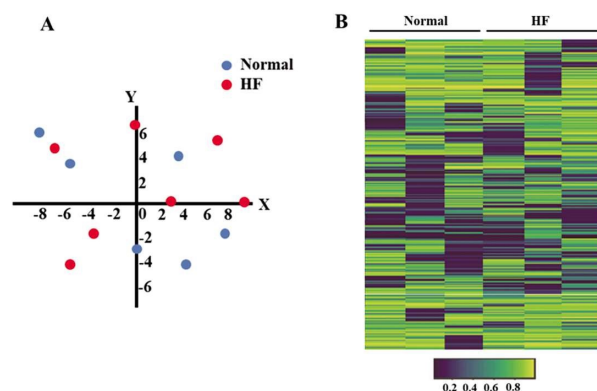


图 1 HF/Normal 基因组对甲基化概况

A: MDS 图显示正常人基因组 (Normal) 和 HF 患者基因组 (HF) 的分布; B: 不同甲基化 CpG 位点的热图

Fig.1 Methylation profile of HF/Normal genome

Note: A: MDS map shows the distribution of normal and HF heart failure genomes; B: thermogram of different methylated CpG sites.

2.2 HF 患者中 IRX1 表达与 CXCL14/NF- κ B 存在相关性

从 NCBI GEO 数据库中,经 GSEA 分析后,筛选了前 10 种不同甲基化基因的热图。与正常人基因组中的多个基因 (SOX1、IRX1、GRIK5、CHL1、PTRF 和 GREB1L) 的甲基化程度相比, HF 患者基因组相应基因的甲基化程度显著提高;其中, IRX1 在 HF 中显示出高于正常水平的甲基化水平,并将 IRX1 选为以后研究的目标基因。根据 GSEA 在基因排名列表中的位

置分析,IRX1 表达与 CXCL14/NF- κ B 之间存在显著相关性。见图 2。

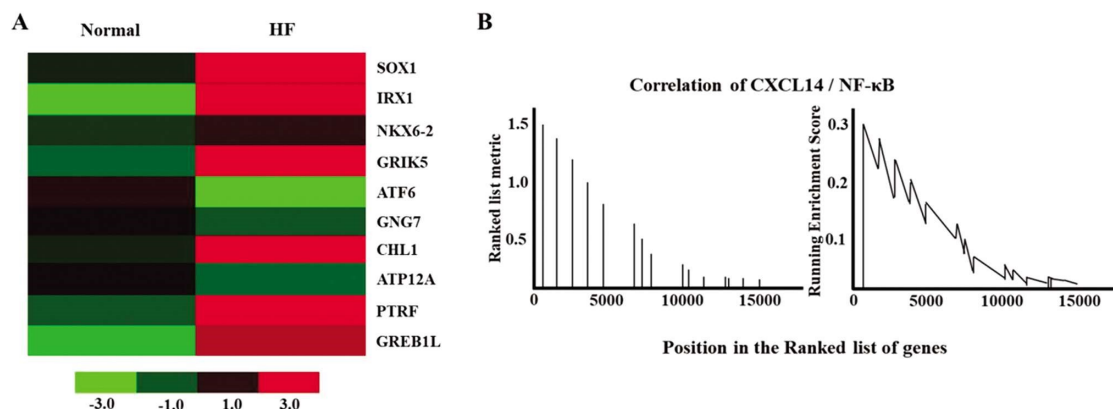


图 2 HF 和正常人基因组中甲基化水平和途径的热图

注:A:前 10 个差异表达基因的热图;B:GO 鉴定 CXCL14/NF- κ B 的相关性

Fig.2 Thermograms of methylation levels and pathways in HF and normal human genomes

Note: A: thermogram of the first 10 differentially expressed genes; B: GO identification of the correlation between CXCL14/NF- κ B.

2.3 5-Aza 影响 HF 大鼠心脏功能

超声心动图评估 HF 大鼠心功能的结果显示,与 Sham 组相比,TAC 组大鼠的左心室与体重的比率显著增加,而 LVDP、dP/dtmax 和 EF 均显著降低 ($P<0.01$);与 TAC 组相比,TAC+5-Aza 组大鼠的左心室与体重的比率显著降低,而

LVDP、dP/dtmax 和 EF 显著增加($P<0.01$)。免疫染色结果显示,与 Sham 组相比,TAC 组大鼠的心肌细胞排列紊乱;与 TAC 组相比,TAC+5-Aza 组大鼠的心肌细胞得到有效缓解,恢复正常。见图 3。

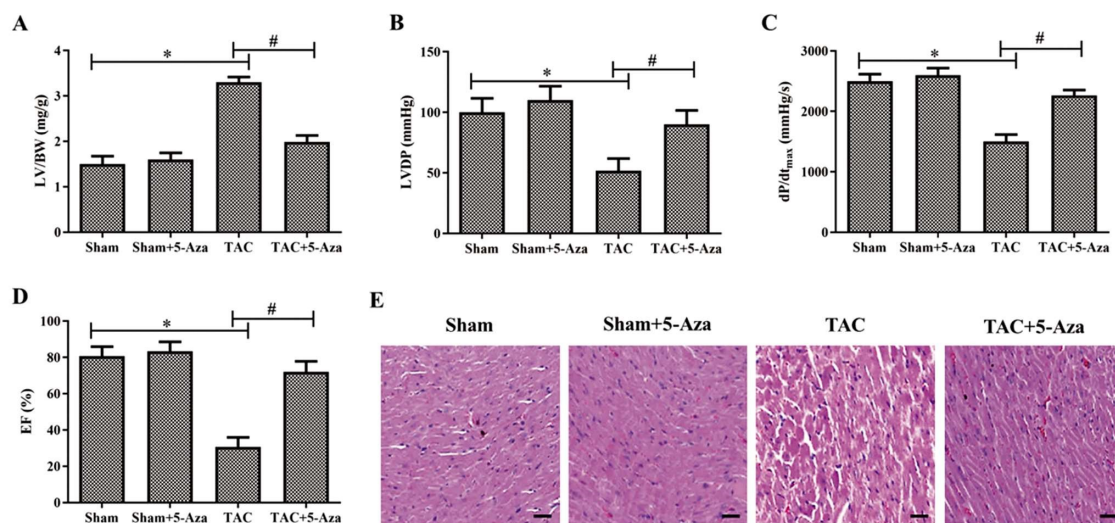


图 3 5-Aza 影响 HF 大鼠心脏功能

注:A:测定 LV/BW 指标;B:测定 LVDP 指标;C:测定左心室压增高的最大速率(dp/dtmax);

D:测定射血分数(%);E:大鼠心脏组织的 HE 染色(50 μ m);与 Sham 组相比,* $P<0.01$;与 TAC 组相比,# $P<0.01$

Fig.3 5-Aza affects cardiac function in HF rats

Note: A: LV/BW index; B: LVDP index; C: maximum rate of left ventricular pressure increase (dp/dtmax); D: Determination of ejection fraction (%);

E: HE staining of rat heart tissue (50 μ m); compared with Sham group, * $P<0.01$; compared with TAC group, # $P<0.01$.

2.4 5-Aza 抑制 HF 大鼠 IRX1 甲基化并影响基因表达

与 Sham 组相比,TAC 组大鼠的基因组 DNA 甲基化和 IRX1 甲基化显著增强($P<0.01$),IRX1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低;与 TAC 组相比,TAC+5-Aza 组大鼠的基因组 DNA 甲基化和 IRX1 甲基化显著降低,IRX1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。与 Sham 组相比,TAC 组大鼠的左心室 ANP 与 BNP 基因(心力衰竭的标志基因)和 β -MHC

(病理性心肌肥大的标志物)的 mRNA 表达水平显著升高, α -MHC (病理性心肌肥大的标志物)mRNA 的表达显著降低($P<0.01$);与 TAC 组相比,TAC+5-Aza 组大鼠的左心室 ANP、BNP 基和 β -MHC 的 mRNA 表达水平显著降低, α -MHC 的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$)。以上结果均表明 5-Aza 能抑制 HF 大鼠 IRX1 甲基化和基因表达。见图 4。

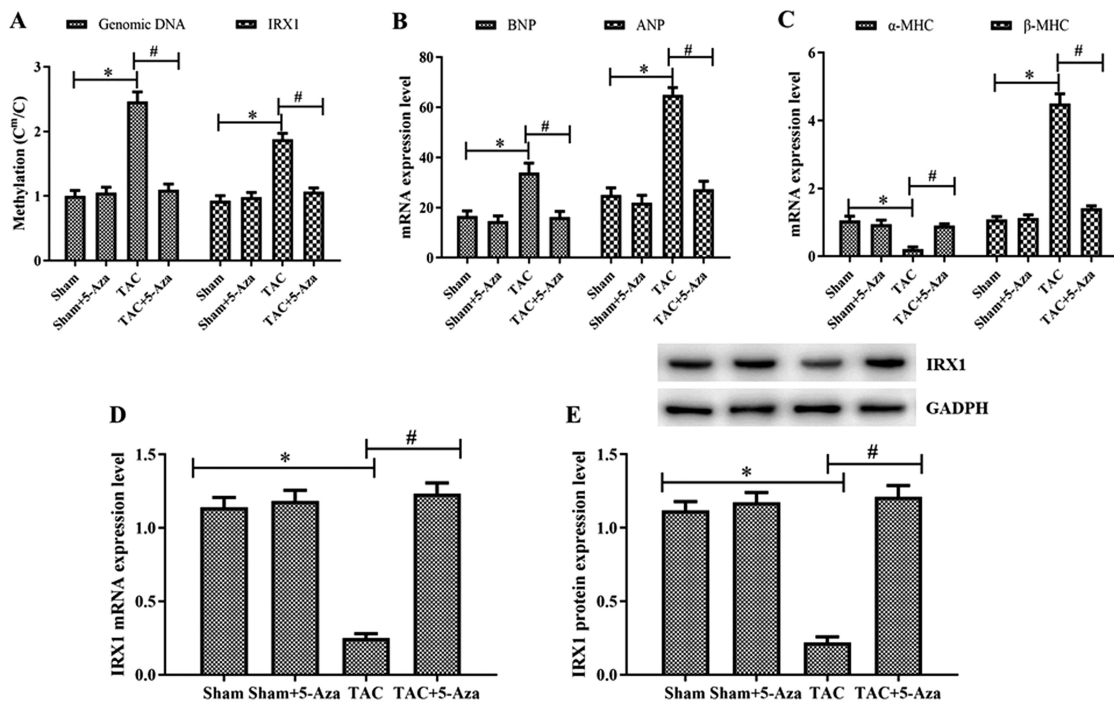


图4 5-Aza 影响 HF 大鼠的基因表达和甲基化

注:A:检测基因组 DNA 和 IIRX1 甲基化;B:检测 ANP 和 BNP mRNA 的表达水平;C:检测 α-MHC 和 β-MHC mRNA 的表达水平;D:检测 IIRX1 mRNA 表达水平;E:检测 IIRX1 蛋白表达水平;与 Sham 组相比,* $P<0.01$;与 TAC 组相比,# $P<0.01$

Fig.4 5-Aza affects gene expression and methylation in HF rats

Note: A: detection of genomic DNA and IIRX1 methylation; B: detection of ANP and BNP mRNA expression level; C: detection of α-MHC and β-MHC mRNA expression level; D: detection of IIRX1 mRNA expression level; E: detection of IIRX1 protein expression level; compared with Sham group, * $P<0.01$; compared with TAC group, # $P<0.01$.

2.5 5-Aza 可能通过上调 CXCL14 表达并抑制 HF 心肌纤维化和细胞凋亡

心肌纤维化和心肌细胞凋亡实验结果显示,与 Sham 组相比,TAC 组大鼠心肌纤维化和心肌细胞凋亡阳性率显著增强;与 TAC 组相比,TAC+5-Aza 组大鼠心肌纤维化和和心肌细胞凋亡阳性率显著降低($P<0.01$)。这表明 5-Aza 可显著消除 TAC 诱发的心力衰竭的纤维化反应。qRT-PCR 和 Western blotting 实验结果显示,与 Sham 组相比,TAC 组大鼠 CXCL14 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低,MMP9 和 C-FLIP NF-κB 信号通路中关键蛋白的表达水平显著降低($P<0.01$);与 TAC 组相比,TAC+5-Aza 组大鼠 CXCL14 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高,MMP9 和 C-FLIP 的蛋白表达水平显著增加($P<0.01$)。以上结果表明 IIRX1 可能激活 CXCL14/NF-κB 表达,以保护 TAC 诱导的心肌纤维化和细胞凋亡。见图 5。

3 讨论

大量实验证据表明,由于表观遗传的调节,DNA 甲基化在疾病的发生和进展中起着至关重要的作用^[19]。基于高通量测序或微阵列等研究手段,使基因组范围内的甲基化标记分析成为可能^[20]。最近的研究表明,DNA 甲基化在心肌细胞增殖或凋亡以及心室重塑过程中发生了改变^[21]。5-Aza 能与 DNA 甲基转移酶结合,通过形成共价键来降低 DNA 甲基转移酶的生物活性,进而降低甲基化水平并调节基因表达^[22];故 5-Aza 常被用于治疗由于启动子甲基化而导致基因表达降低或缺失而引起的疾

病^[23,24]。在本研究中,IIRX1 被鉴定为高甲基化激活基因,在心力衰竭大鼠模型中抑制 IIRX1 会降低 CXCL14 表达水平。结果表明,5-Aza 增强了 IIRX1 的表达并抑制了 HF 的发生;生物信息学分析的结果表明,HF 组织中基因的 DNA 甲基化水平与正常组织中的显著不同。这暗示 IIRX1 可能成为 HF 的分子靶标,因此,IIRX1 通路的治疗靶向将是抑制心力衰竭的可预测策略。

IIRX1 在许多后生动物发育过程中扮演多重角色,并在疾病调查和基于细胞的疗法中发挥着多种作用^[25]。IIRX4 和 IIRX5 之间的相互作用控制了心脏钾通道 Kv4.2 基因的转录^[26]。重要的是,IIRX1 基因的变异导致冠心病易感性增加^[27]。因此,针对 IIRX1 信号的治疗策略必须考虑其各种作用,以避免增加其他疾病的风险^[28]。本研究表明,IIRX1 在 HF 大鼠的心肌细胞中低水平表达,并且该蛋白起控制基因的作用,这表明 IIRX1 可能在心脏发育中发挥特定作用。

最近的研究表明,心肌纤维化是导致发展为心力衰竭的各种心血管疾病的重要原因^[29]。值得注意的是,了解心脏纤维化的分子机制可作为预防或管理心力衰竭的新方法。心脏细胞分泌到细胞外和间质空间的成纤维细胞生长因子促进并维持心脏纤维化^[30]。本研究的免疫化学染色结果显示,心力衰竭组的心肌纤维化程度高于正常组。我们的数据还表明,CXCL14 与 IIRX1 还可能发生协同作用,以减轻心肌纤维化和心肌细胞凋亡。因此,我们猜测 IIRX1 可以抑制纤维化形成,从而改善心脏功能。这项研究表明,IIRX1 的可逆调节在心力衰竭的发展过程中至关重要。IIRX1 甲基化程度降低 CXCL14 的表达并增加

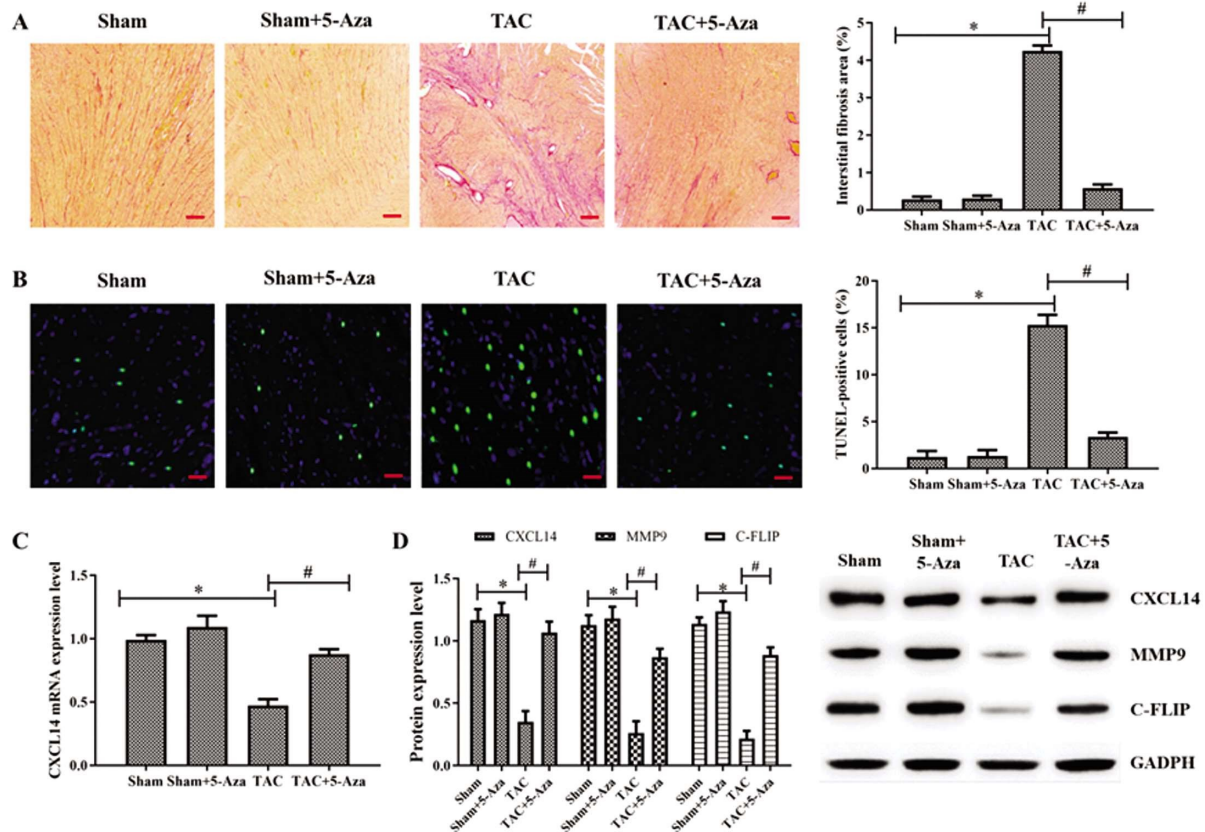


图5 5-Aza影响CXCL14表达并抑制HF心肌纤维化和细胞凋亡

注:A:免疫染色分析 HF 心肌纤维化(50 μ m);B:TUNEL 染色分析 HF 心肌细胞凋亡阳性率(50 μ m);C:qRT-PCR 测定心肌细胞中 CXCL14 mRNA 的表达;D:Western blotting 分析心肌细胞中 IRX1、MMP9 和 C-FLIP 蛋白表达水平;与 Sham 组相比,* $P<0.01$;与 TAC 组相比,# $P<0.01$

Fig.5 5-Aza affects the expression of CXCL14 and inhibits myocardial fibrosis and apoptosis in HF

Note: A: immuno staining was used to analyze HF myocardial fibrosis (50 μ m); B: TUNEL staining was used to analyze the positive rate of apoptosis (50 μ m); C: qRT-PCR was used to detect the expression of IRX1 mRNA; D: Western blotting was used to analyze the expression levels of IRX1, MMP9 and c-FLIP protein in cardiomyocytes; compared with Sham group, * $P<0.01$; compared with TAC group, # $P<0.01$.

纤维化形成,从而严重损害心脏功能。但是,IRX1 沉默的确切调控机制以及 IRX1 和 CXCL14 在心力衰竭中如何协同工作仍然难以捉摸。CXCL14 是一个相对较新的趋化因子,其受体未知,功能不明,因此很难确定 CXCL14 如何调节心力衰竭。鉴于 CXCL14 属于参与炎症过程的趋化因子家族^[31],并且 NF- κ B 信号在炎症反应的控制中起着重要作用^[32],CXCL14 可能激活 NF- κ B 途径似乎是合理的。事实上,最近研究表明,CXCL14 可以提高核 NF- κ B p65 水平,促进胰腺癌细胞的侵袭性^[33]。文献表明,MMP9 和 c-FLIP 表达的变化与高脂饮食大鼠的炎症,心肌纤维化和细胞凋亡相关,通过抑制心肌细胞中 P2X7R 的表达来逆转心脏重塑。本研究发现 IRX1/CXCL14 信号可激活 NF- κ B 通路,增加 MMP9 和 c-FLIP (NF- κ B 通路中标志性蛋白)的表达,从而保护 TAC 诱导的心肌纤维化和细胞凋亡。综合本研究结果,我们推测 IRX1 过表达可能上调 CXCL14 mRNA 和蛋白质水平。IRX1 和 CXCL14 之间可能存在正向调控关系。因此,HF 模型大鼠中 IRX1 甲基化水平的升高可能激活 CXCL14/NF- κ B 的表达,以保护 TAC 诱导的心肌纤维化和细胞凋亡。

参考文献(References)

- [1] 张晓华. 不同给药方式重组人脑利钠肽治疗慢性心力衰竭急性失代偿性重症患者的效果 [J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(6): 68-70
- [2] Liu CF, Tang W, Hu W. Epigenetics in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. JACC Basic Transl ence, 2019, 4(8): 976-993
- [3] Thorup L, Simonsen U, Grimm D, et al. Ivabradine: current and future treatment of heart failure[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2017, 121 (2): 89-97
- [4] Li B, Ping Y. GW29-e0420 the blood genome-wide DNA methylation analysis reveals novel epigenetic changes in human heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(16): C16
- [5] 王群, 林文华. 药物基因组学在心血管疾病治疗中的研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10(8): 122-124
- [6] Julià A, Blanco F, Fernández-Gutierrez B, et al. Identification of IRX1 as a risk locus for rheumatoid factor positivity in rheumatoid arthritis in a genome-wide association study [J]. Arth Rheumat, 2016, 68(6): 1384-1391
- [7] Wu D, Li Z, Zhao S, et al. Downregulated microRNA-150 upregulates IRX1 to depress proliferation, migration, and invasion, but boost apoptosis of gastric cancer cells [J]. IUBMB Life, 2020, 72 (3): 476-491
- [8] Guo C, Wang Q, Wang Y, et al. Exome sequencing reveals novel IRX1

[1] 张晓华. 不同给药方式重组人脑利钠肽治疗慢性心力衰竭急性失

- mutation in congenital heart disease [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 3193-3197
- [9] 童玮琳. CXCL14 在动脉粥样硬化发生发展中的正反馈调节作用 [D]. 华中科技大学, 2019
- [10] 杨丽红. 趋化因子 CXCL13 及其受体 CXCR5 在疾病中的研究进展[J]. *国际生物制品学杂志*, 2019, 42(6): 299-303
- [11] Ji X, Shen Z, Zhao B, et al. CXCL14 and NOS1 expression in specimens from patients with stage I-IIIa nonsmall cell lung cancer after curative resection[J]. *Medicine*, 2018, 97(10): e0101
- [12] Zhang J, Liu C, Mo X, et al. Mechanisms by which CXCR4/CXCL12 cause metastatic behavior in pancreatic cancer [J]. *Oncology Letters*, 2018, 15(2): 1771-1776
- [13] Tian Y, Morris T J, Webster A P, et al. ChAMP: updated methylation analysis pipeline for Illumina Bead Chips [J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(24): 3982-3984
- [14] Zhou Y, Shiok T C, Richards A M, et al. MicroRNA-101a suppresses fibrotic programming in isolated cardiac fibroblasts and in vivo fibrosis following trans-aortic constriction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121: 266-276
- [15] Rockman H A, Ross R S, Harris A N, et al. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy [J]. *Proceed Nation Acade Sci*, 1991, 88(18): 8277-8281
- [16] Hromas R. Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells [J]. *BBRC*, 1999, 255(3): 703-706
- [17] Xiao D, Dasgupta C, Chen M, et al. Inhibition of DNA methylation reverses norepinephrine-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 101(3): 373-382
- [18] Mayer S C, Gilsbach R, Preissl S, et al. Adrenergic repression of the epigenetic reader MeCP2 facilitates cardiac adaptation in chronic heart failure[J]. *Circ Res*, 2015, 117(7): 622-633
- [19] 白丛霞, 陈敬洲. DNA 甲基化在高血压病中的研究进展[J]. *中国循环杂志*, 2018, 33(5): 514-517
- [20] 张巧生. 基于组学数据的癌症生物学通路分析方法研究[D]. 哈尔滨工业大学, 2019
- [21] Reuter J A, Spacek D V, Snyder M P. High-throughput sequencing technologies[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 586-597
- [22] 张晓康, 郑芳. 特定基因甲基化在动脉粥样硬化性心血管疾病中的研究进展[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2020, 41(3): 169-173
- [23] Ghoshal K, Datta J, Majumder S, et al. 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(11): 4727-4741
- [24] Liu R, Zhang X H, Zhang K, et al. 5-Aza-2-deoxycytidine inhibits retinoblastoma cell by reactivating epigenetically silenced RASSF1A gene[J]. *Int J Ophthalmol*, 2014, 7(1): 51-56
- [25] 李丹丹, 汪俊军. DNA 甲基化及 miRNAs 在动脉粥样硬化性心血管疾病中的研究进展[J]. *临床检验杂志*, 2018, 36(5): 50-52
- [26] Guo X, Liu W, Pan Y, et al. Homeobox gene IRX1 is a tumor suppressor gene in gastric carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 29(27): 3908-3920
- [27] Jung I H, Jung D E, Chung Y Y, et al. Iroquois homeobox 1 acts as a true tumor suppressor in multiple organs by regulating cell cycle progression[J]. *Neoplasia*, 2019, 21(10): 1003-1014
- [28] Schaefer A, Schneeberger Y, Stenzig J, et al. A new animal model for investigation of mechanical unloading in hypertrophic and failing hearts: combination of transverse aortic constriction and heterotopic heart transplantation[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148259
- [29] Blenck C L, Harvey P A, Reckelhoff J F, et al. The importance of biological sex and estrogen in rodent models of cardiovascular health and disease[J]. *Circ Res*, 2016, 118(8): 1294-1312
- [30] 周华生, 周宇, 吴巍芸. CXC 趋化因子配体 14 在炎症性疾病中作用的研究进展[J]. *山东医药*, 2020, 60(1183): 100-103
- [31] 吴海峰. IKIP 在 NF- κ B 介导的炎症反应中的作用及机制[D]. 山东大学, 2020
- [32] Wente M N, Mayer C, Gaida M M, et al. CXCL14 expression and potential function in pancreatic cancer [J]. *Cancer Letters*, 2008, 259(2): 209-217
- [33] Chen X, Li H, Wang K, et al. Aerobic Exercise Ameliorates Myocardial Inflammation, Fibrosis and Apoptosis in High-Fat-Diet Rats by Inhibiting P2X7 Purinergic Receptors[J]. *Front Physiol*, 2019, 10(1): 1286-1300

(上接第 2625 页)

- [27] Wei H, Qiu YQ, Zeng QS, et al. LncRNA UCA1 regulates proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells by targeting miR-145[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7): 3555-3564
- [28] Zhang X, Wang Y, Zhao A, et al. Long Non-Coding RNA LINC00511 Accelerates Proliferation and Invasion in Cervical Cancer Through Targeting miR-324-5p/DRAM1 Axis[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13(9): 10245-10256
- [29] Xie Y, Wang L, Xu T, et al. LncRNA GATA6-AS inhibits cancer cell proliferation and promotes cancer cell apoptosis in cervical cancer by down-regulating miR-205[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 20(1): e247
- [30] Xu J, Zhang J. LncRNA TP73-AS1 is a novel regulator in cervical cancer via miR-329-3p/ARF1 axis [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1): 344-352
- [31] Xu L, Wang L. LINC00958 facilitates cervical cancer cell proliferation and metastasis by sponging miR-625-5p to upregulate LRRC8E expression[J]. *Cell Prolif*, 2020, 121(3): 2500-2509
- [32] Dong H, Wang W, Mo S, et al. Long non-coding RNA SNHG14 induces trastuzumab resistance of breast cancer via regulating PABPC1 expression through H3K27 acetylation [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(10): 4935-4947
- [33] Liu Z, Yan Y, Cao S, et al. Long non-coding RNA SNHG14 contributes to gastric cancer development through targeting miR-145/SOX9 axis[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(8): 6905-6913