

· 基础医学 ·

DNA 甲基化调控 p16 表达在替格瑞洛改善血管内皮功能中的作用及机制

朱伯谦,宋兵战,陈 凯,姜 旭*,王振兴*

南京中医药大学附属医院心内科,江苏 南京 210029

[摘 要] **目的:**探讨替格瑞洛对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)诱导内皮损伤的影响及机制。**方法:**采用 ELISA 法检测人血清内皮素-1、一氧化氮含量,CCK-8 法、EdU 法、Transwell 法检测细胞活力、增殖及迁移能力,流式细胞术检测细胞凋亡,real-time PCR 法、Western blot 法检测 DNA 甲基化转移酶 1(DNA Methyltransferase 1, DNMT1)、p16 表达,慢病毒过表达载体构建 p16 的过表达系统,慢病毒敲除载体构建 DNMT1 和 p16 的敲除系统,甲基化特异性 PCR 法测定 p16 启动子区甲基化水平。**结果:**替格瑞洛促进 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical endothelial cell, HUVEC)活力、增殖及迁移能力,并显著抑制 ox-LDL 诱导的细胞凋亡;替格瑞洛抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 p16 表达,而过表达 p16 可逆转替格瑞洛对 ox-LDL 诱导 HUVEC 损伤的保护作用;DNMT1 通过影响 p16 启动子区的甲基化水平抑制 p16 表达。**结论:**替格瑞洛可通过 DNMT1 介导的 DNA 甲基化调控 p16 表达,进而减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤,改善血管内皮功能。

[关键词] 替格瑞洛;氧化型低密度脂蛋白;人脐静脉内皮细胞;p16;DNA 甲基化转移酶 1

[中图分类号] R329.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)02-169-10

doi:10.7655/NYDXBNS20230204

The role and mechanism of ticagrelor on the vascular endothelial function through DNMT1/p16 signaling pathway

ZHU Boqian, SONG Bingzhan, CHEN Kai, JIANG Xu*, WANG Zhenxing*

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of ticagrelor on endothelial injury induced by ox-LDL. **Methods:** ELISA method was used to detect the serum ET-1 and NO contents. Cell viability, proliferation and migration ability were determined by CCK-8, EdU kit and Transwell assay respectively. Annexin V-PI assay was used to detect cell apoptosis. The levels of DNMT1 and p16 were detected by Real-time PCR and Western blot. The lentiviral overexpression vector pLVX-puro-EGFP was used to construct the p16 overexpression system. The lentiviral knockout vector pLKO.1 was used to construct the DNMT1 and p16 knockout system. The methylation status of p16 promoter region was determined by the methylation-specific PCR method. **Results:** Ticagrelor promoted the viability, proliferation and migration ability of human umbilical endothelial cell (HUVEC) treated with ox-LDL, and significantly inhibited ox-LDL-induced apoptosis. Ticagrelor down-regulated the expression of p16 in HUVECs induced by ox-LDL, and overexpressed p16 could reverse the protective effect of ticagrelor on HUVECs induced by ox-LDL. DNMT1 inhibited the expression of p16 by affecting the methylation level of p16 promoter region. **Conclusion:** Ticagrelor could reduce the injury of HUVECs induced by ox-LDL and improve endothelial function. The mechanism might be related to the regulation of DNMT1/p16 signaling pathway.

[Key words] ticagrelor; ox-LDL; human umbilical vein endothelial cells; p16; DNMT1

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(02): 169-178]

[基金项目] 白求恩·医学科学研究基金项目(AX084ES);国家自然科学基金青年项目(81900237);江苏省自然科学基金青年项目(BK20191093)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 15996225138@163.com; zxwang518@sina.com

替格瑞洛是一种新型抗血小板聚集药物,无需通过肝脏代谢活化,可直接抑制血小板 P2Y₁₂受体,减少ADP的结合位点^[1]。大量研究表明,与氯吡格雷相比,替格瑞洛能显著降低急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者的病死率^[2]。因此,替格瑞洛目前已成为指南推荐的ACS抗血小板聚集首选药物^[3]。

有研究者认为替格瑞洛改善ACS患者预后不单纯依赖其强效的抗血小板聚集作用^[4]。血管内皮功能障碍在冠心病的发生发展中起着重要的作用,有研究发现替格瑞洛可能还具有改善血管内皮功能的作用,但具体机制尚未明确^[5-6]。p16基因是一种调控细胞周期的重要基因,其编码产物p16蛋白直接调控细胞周期G1~S转换,负调节细胞增殖及分裂,并促进细胞凋亡和衰老^[7]。

本文研究替格瑞洛对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)诱导血管内皮细胞损伤的保护作用,并探讨p16基因在替格瑞洛保护内皮功能中的作用及潜在机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人内皮素1(endothelin-1, ET-1)elisa试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司);一氧化氮(nitric oxide, NO)含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);替格瑞洛(阿拉丁公司,中国);人脐静脉内皮细胞(human umbilical endothelial cell, HUVEC)、EdU检测试剂盒、RIPA细胞裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、ECL底物发光液、无血清冻存液、内皮细胞培养液(苏州君欣生物科技有限公司);细胞凋亡检测试剂盒(Roche公司,美国);Transwell迁移小室(Corning公司,美国);TRIzol RNA提取试剂、逆转录试剂和Real-time PCR试剂(江苏康为世纪生物科技有限公司);抗DNMT1、p16和 β -Actin抗体(Abcam抗体,美国);CCK-8检测试剂盒、基因组DNA提取试剂盒、Taq DNA聚合酶、琼脂糖胶(北京天根生化科技有限公司);EZ DNA Methylation-Gold Kit甲基化试剂盒(Zymo Research公司,美国);Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国);胰酶和青霉素/链霉素(Sigma-Aldrich公司,美国);多功能酶标仪、细胞培养箱(Thermo公司,美国);生物安全柜(江苏苏净集团有限公司);倒置显微镜(Olympus公司,日本);超高速低温离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);超低温冰箱(安徽中科都菱家用电器股份有限公

司);流式细胞仪(Millipore公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 血清ET-1、NO含量测定

采集ACS患者双联(阿司匹林+替格瑞洛或阿司匹林+氯吡格雷)治疗前及治疗后1个月的外周静脉血5 mL,常温下3 000 r/min离心10 min,收集上清液,-80℃冰箱保存。采用ELISA试剂盒检测血清ET-1的含量,按照NO检测试剂盒的说明书检测NO的含量。研究经南京中医药大学附属医院伦理委员会批准且研究对象知情同意(伦理批准文号:2021NL-130-02)。

1.2.2 HUVEC培养

HUVEC细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/mL的青霉素和链霉素的内皮细胞专用培养基,置于含5% CO₂的37℃细胞培养箱中。隔天换液,于细胞密度80%左右时,胰酶消化传代、种植细胞。

1.2.3 基因过表达、敲除与细胞转染

p16过表达构建于慢病毒载体pcDNA-EGFP。p16 DNA片段从HEK293的cDNA中通过PCR扩增获取。PCR的反应体系如下:2 μ L cDNA;10 μ L 2 \times qPCR mixture;1 μ L上下游引物(10 μ mol/L);6 μ L 无菌蒸馏水。real-time PCR的反应程序如下:预变性,95℃,5 min;变性,95℃,5 s;退火,56℃,30 s;延伸,72℃,30 s;40个循环。PCR引物采购于上海捷瑞生物工程有限公司。p16:正义5'-CCG-GAATTCATGGGTTCGCAGTTCTTGG-3',反义5'-CGCGGATCC-CTATGCCCCGTCGGTCTGG-3'。PCR产物连接到带有EcoR I和BamH I位点的pcDNA-EGFP载体中。

针对DNMT1和p16的特定短发夹RNA(shDNMT1和shp16)与对照短发夹RNA(shNC)由上海GenePharma设计和合成。将短发夹RNA连接到慢病毒载体pLKO.1中Age I/EcoR I位点。shDNMT1-1:5'-GGATGAGTCCATCAAGGAAGA-3';shDNMT1-2:5'-GCACCTCATTTGCCGAATACA-3';shDNMT1-3:5'-GGGCAAGCCCAAGTCCCAAGC-3';shp16-1:5'-GGGAGCAGCATGGAGCCTTCG-3';shp16-2:5'-GCTGCCCAACGCACCGAATAG-3';shp16-3:5'-GCAGTAACCATGCCCCGCATAG-3'。

用Lipofectamine-2 000将病毒质粒转染进293T细胞中,72 h后收获病毒并感染HUVEC,感染72 h后进行后续实验。

1.2.4 CCK-8法检测细胞活力

HUVEC以1 \times 10⁴/孔种植于96孔细胞培养板,每

孔加入 10 μ L CCK8 试剂,培养箱中继续培养 2 h,弃去培养液,每孔加入 200 μ L DMSO,室温振荡 15 min,在酶联免疫检测仪上振荡 10 s,检测 450 nm 波长处的吸光值(OD 值)。统计、分析各组细胞的活力。

1.2.5 EdU 法检测细胞增殖

HUVEC 以 5×10^4 /孔种植于 48 孔细胞培养板,加入 EdU,培养箱中继续培养 2 h。弃去 EdU,4%多聚甲醛固定 30 min,0.5% Triton X-100 穿透 15 min,并加入染色反应液避光孵育 30 min,Hoechst 染核。随机观察 5 个高倍视野,计数阳性染色细胞数,取平均值。统计、分析各组细胞的增殖情况。

1.2.6 Transwell 法检测细胞迁移

将 Transwell 小室装置放置于 24 孔细胞培养板中,HUVEC 干预后经消化并重悬于含 1% 血清的培养基中,按照 5×10^4 /孔种植于 Transwell 小室中,下室加入含 10% 血清培养基;细胞培养箱培养过夜后取出 Transwell 小室,棉棒擦除上室滤膜上层细胞,下层细胞经 4% 多聚甲醛室温固定 15 min,室温晾干后予以 0.1% 结晶紫室温染色 30 min,移行细胞呈蓝紫色,随机观察 5 个高倍视野,计数移行细胞数,取平均值。统计、分析各组细胞的迁移情况。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

HUVEC 干预后经胰酶消化并重悬,离心后用预冷的标记缓冲液重悬细胞,调整细胞密度为 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$ /mL,依次加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色液,避光孵育 20 min,再加入 400 μ L 标记缓冲液,用流式细胞仪对细胞凋亡进行分析。统计、分析各组细胞的凋亡情况。

1.2.8 荧光定量 PCR 法测定 DNMT1、DNMT3 α 、DNMT3 β 、p16 基因表达

TRIzol 试剂提取各组细胞的总 RNA,逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA。real-time PCR 法检测 DNMT1、DNMT3 α 、DNMT3 β 、p16 基因的表达。内参基因为 β -actin。基因的相对表达量通过公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算。real-time PCR 引物采购于上海捷瑞生物工程有限公司。DNMT1:正义 5'-GTCTGCTCCTGCGTGGAAG-3',反义 5'-CTGAAGAAGCCGTCCCACTC-3'。p16:正义 5'-CTTGGTGACCCTCCGGATTTC-3',反义 5'-TCAGTAGCATCAGCAGGAGG-3'。 β -actin:正义 5'-TCTGGCACCACACCTTCTA-3',反义 5'-AGGCATACAGGGACAGCAC-3'。

1.2.9 Western blot 法测定 DNMT1、p16 蛋白表达

RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白,BCA 蛋白定

量试剂盒检测蛋白浓度。采用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳,电泳条件:浓缩胶为恒压 100 V,30 min;分离胶为恒压 120 V,1 h。将蛋白条带转印至 PVDF 膜,转膜条件:恒压 100 V,1 h。采用 5% 的脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h。将膜与一抗(抗 DNMT1、p16 和 β -actin 抗体)孵育,4 $^{\circ}$ C,过夜。TBST 溶液洗膜,室温,5 min,3 次。将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育,室温,1 h。ECL 底物发光液检测蛋白质条带。内参基因为 β -actin。Image J 软件分析蛋白质条带信号强度。

1.2.10 甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 法测定 p16 基因启动子区甲基化水平

DNA 提取试剂盒提取细胞的基因组 DNA,甲基化试剂盒进行基因组 DNA 甲基化转化。Taq DNA 聚合酶进行 PCR 实验,PCR 的反应体系如下:2 μ L cDNA;10 μ L 2 \times PCR mixture;1 μ L 上下游引物(10 μ mol/L);36 μ L 无菌蒸馏水。real-time PCR 的反应程序如下:预变性:95 $^{\circ}$ C,5 min;变性:95 $^{\circ}$ C,5 s;退火:56 $^{\circ}$ C,30 s;延伸:72 $^{\circ}$ C,30 s;40 个循环。PCR 产物采用 1% 的琼脂糖胶进行电泳,电泳条件:100 V,30 min。手持式紫外灯照射后拍照记录结果。引物采购于上海捷瑞生物工程有限公司。甲基化引物:正义 5'-TTTAGAATGTTGGGATTATAGACGT-3',反义 5'-AAAAAACTAAAAACAAAAAATCGCT-3'。未甲基化引物:正义 5'-TTTAGAATGTTGGGATTATAGATGT-3',反义 5'-AAAAAACTAAAAACAAAAAATCACT-3'。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。所有实验均重复 3 次。两两比较用双尾 Student's *t*-test 进行分析;多组比较采用 Prism 软件中的方差分析及多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后人血清 ET-1、NO 水平比较

为研究替格瑞洛的治疗作用,通过 ELISA 实验检测替格瑞洛治疗前后人血清 ET-1 和 NO 含量,发现两组患者治疗前 ET-1 和 NO 含量均无显著性差异($P > 0.05$,表 1);治疗 1 个月后,替格瑞洛组 ET-1 含量显著低于氯吡格雷组,而血清 NO 含量则显著高于氯吡格雷组($P < 0.05$,表 1),结果表明替格瑞洛对血管内皮功能有保护作用。

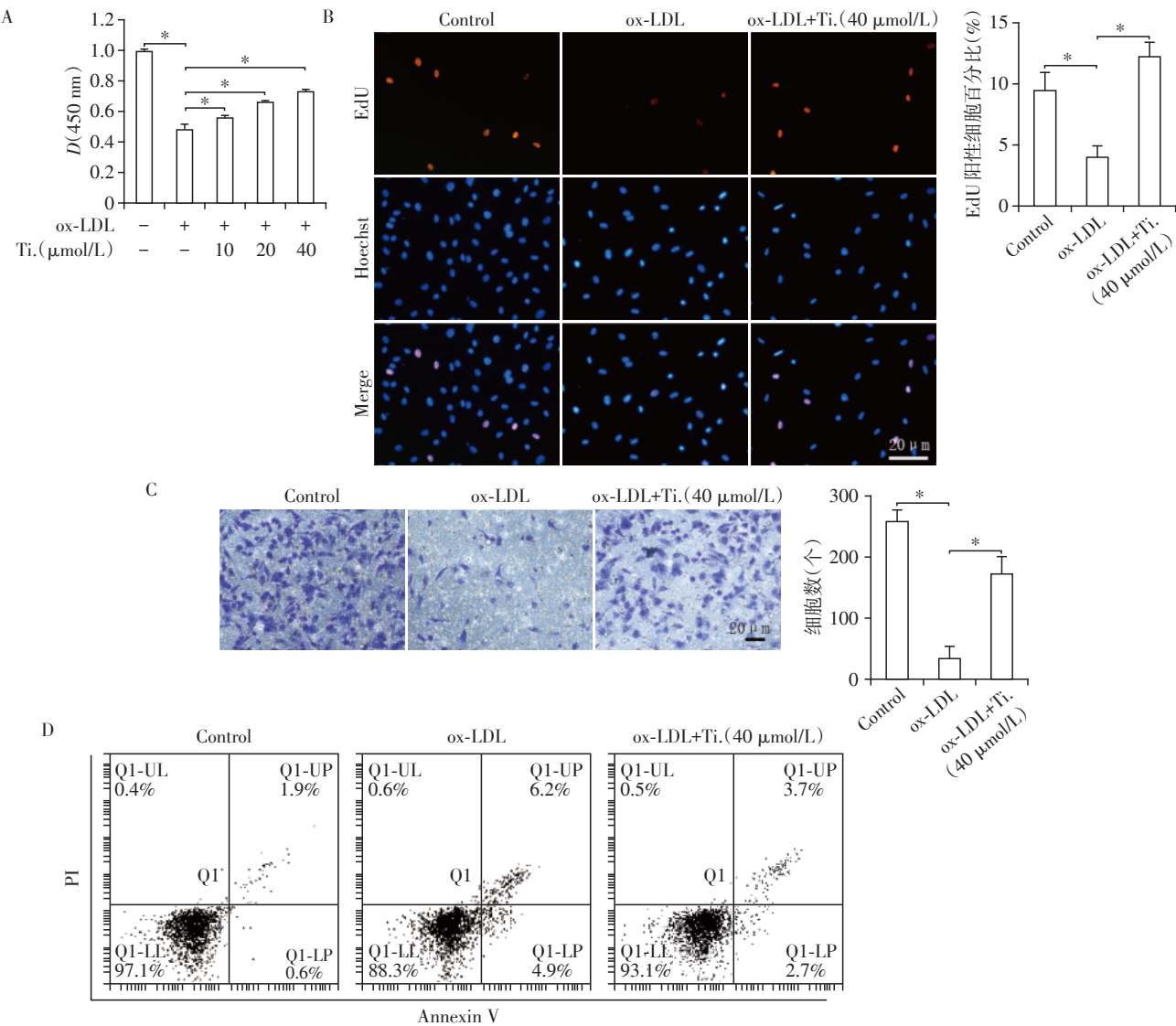
2.2 替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤的影响

为研究替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤

的影响,通过CCK8、EdU、Transwell等实验分别检测HUVEC活力、增殖与迁移能力变化,发现 ox-LDL可使HUVEC活力、增殖能力及迁移能力显著降低($P < 0.01$,图1A~C),而替格瑞洛干预后,细胞活力、增殖能力及迁移能力明显增加($P < 0.01$,图1A~C)。Annexin V/PI 流式凋亡实验结果显示 ox-LDL可使HUVEC凋亡率明显增加,而替格瑞洛干预后,ox-LDL诱导的细胞凋亡显著减轻(图1D)。以上结果表明,替格瑞洛可以减轻 ox-LDL 诱导的HUVEC损伤。

表1 两组治疗前后血清ET-1和NO水平比较

Table 1 Comparison of serum ET-1 and NO levels before and after the treatment						$(\bar{x} \pm s)$	
组别	<i>n</i>	ET-1(pg/mL)		NO(μ mol/L)		术前	术后1个月
		术前	术后1个月	术前	术后1个月		
替格瑞洛	10	71.38 \pm 21.15	44.64 \pm 19.18	50.78 \pm 8.24	71.39 \pm 8.84		
氯吡格雷	10	70.68 \pm 20.36	59.56 \pm 19.63	51.16 \pm 8.43	62.49 \pm 9.13		
<i>P</i> 值		0.927	0.044	0.901	0.011		



A: CCK8实验检测细胞活力;B:EdU实验检测细胞增殖能力($\times 200$)及计量统计,红色代表EdU阳性细胞,Hoechst代表所有细胞的细胞核,粉色代表EdU阳性细胞与Hoechst标记的细胞的重合;C:小室迁移实验检测细胞迁移能力($\times 200$)及计量统计,蓝紫色代表迁移到小室外膜的细胞;D:流式凋亡实验检测细胞凋亡情况。两组比较, $P < 0.01$ ($n=3$)。

图1 替格瑞洛对ox-LDL诱导的HUVECs活力、增殖、迁移及凋亡的影响

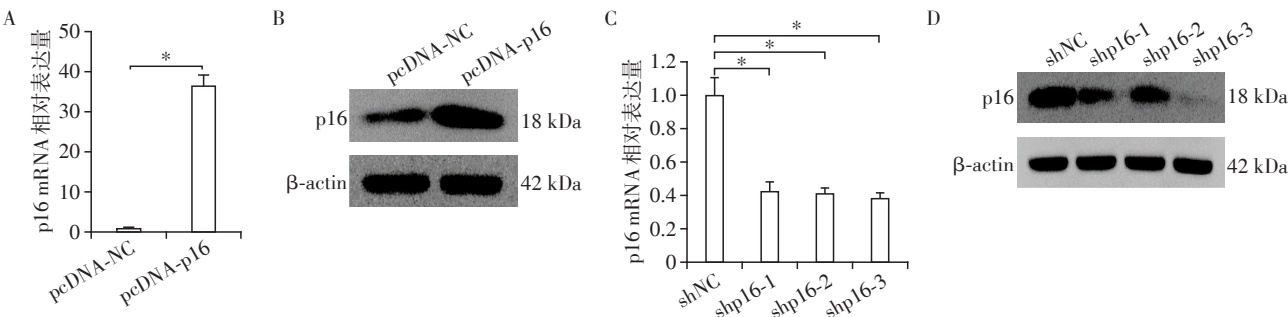
Figure 1 The effect of ticagrelor on the cell viability, proliferation, migration and apoptosis of the HUVEC treated with ox-LDL

2.3 替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVEC p16 表达的影响

为研究替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVEC p16 表达的影响,通过 real-time PCR 和 Western blot 实验分别检测 p16 表达情况,发现 ox-LDL 可使 HUVEC 中 p16 mRNA 及蛋白表达上调($P < 0.01$,图 2A、B),而替格瑞洛干预后,ox-LDL 诱导的 HUVEC p16 mRNA 及蛋白表达显著降低($P < 0.01$,图 2A、B)。以上结果显示,替格瑞洛可抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 p16 的表达。

2.4 p16 过表达与敲除系统的构建

为研究 p16 过表达与敲除系统的有效性,通过 real-time PCR 和 Western blot 实验分别检测 p16 表达情况,发现与对照组相比,p16 过表达显著升高 HUVEC 中 p16 mRNA 及蛋白的表达($P < 0.01$,图 3A、B);p16 敲除显著抑制 HUVECs 中 p16 mRNA 及蛋白的表达($P < 0.01$,图 3C、D)。以上结果表明成功构建了 p16 过表达与敲除系统。

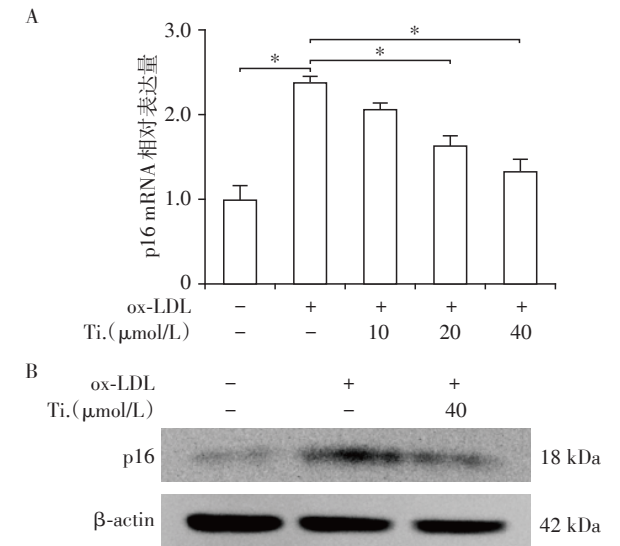


A:qPCR实验检测p16的mRNA丰度;B:蛋白免疫印迹实验检测p16的蛋白量;C:qPCR实验检测p16的mRNA丰度;D:蛋白免疫印迹实验检测p16的蛋白量。A、B:细胞分别转染pcDNA-NC和pcDNA-p16,48 h后细胞进行后续处理;C、D:细胞分别转染shNC和shp16s,48 h后细胞进行后续处理。β-actin为内参。两组比较, $P < 0.01$ ($n=3$)。

图3 构建p16过表达与敲除系统
Figure 3 Construction of the p16 overexpression and knockout system

2.5 p16 过表达抑制替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤的影响

为研究 p16 对替格瑞洛功能的影响,通过 CCK8、EdU、Transwell 等实验分别检测 HUVEC 活力、增殖与迁移能力变化,发现过表达 p16 抑制了替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 活力、增殖能力及迁移能力的影响($P < 0.01$,图 4A~C)。Annexin V/PI 流式凋亡迁移实验结果显示过表达 p16 抑制了替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡的影响,即流式凋亡象限图右下角的早期凋亡以及右上角的晚期凋亡细胞比例下降(图 4D)。以上结果表明,过表达 p16 抑制了替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤的影响。



A:qPCR实验检测p16 mRNA丰度;B:蛋白免疫印迹实验检测p16的蛋白量。β-actin为内参。两组比较, $P < 0.01$ ($n=3$)。

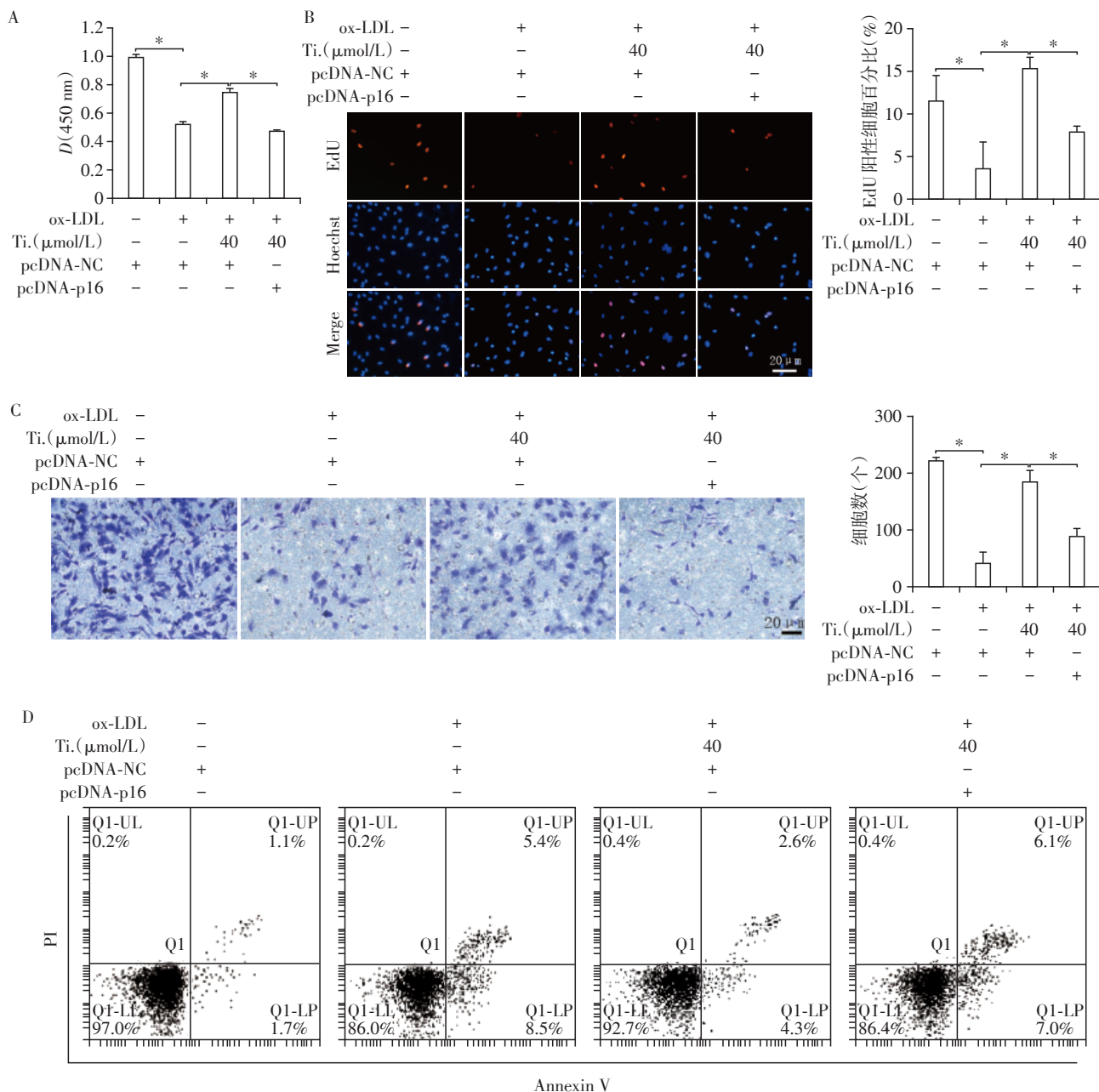
图2 替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVEC p16 表达的影响
Figure 2 The effect of ticagrelor on the p16 expression of the HUVEC treated with ox-LDL

2.6 DNMT1 抑制 p16 的表达

为研究 DNMT1 过表达与敲除系统的有效性,通过 Real-time PCR 和 Western blot 实验分别检测 DNMT1 表达情况,发现本研究在 HUVEC 中成功构建了 DNMT1 敲除与过表达系统($P < 0.01$,图 5A~C)。

为研究 DNMT1 对 p16 表达的调控,通过 real-time PCR 和 Western blot 实验分别检测 p16 表达情况,发现了 DNMT1 敲除可以有效促进 HUVEC 中 p16 mRNA 及蛋白的表达;而 DNMT1 过表达则抑制 p16 mRNA 及蛋白的表达($P < 0.01$,图 5D、E)。

为研究 DNMT1 调控 p16 表达的机制,先通过 MethPrimer 预测 p16 启动子甲基化富集区(图 5F),然后采用 MSP 实验检测 p16 启动子甲基化水平,发



细胞分别转染 pcDNA-NC 和 pcDNA-p16, 转染 6 h 后换液, 分别给予替格瑞洛和 ox-LDL 处理。48 h 后, 细胞进行后续处理。A: CCK8 实验检测细胞活力; B: EdU 实验检测细胞增殖能力 (×200) 及计量统计, 红色代表 EdU 阳性细胞, Hoechst 代表所有细胞的细胞核, 粉色代表 EdU 阳性细胞与 Hoechst 标记的细胞的重叠; C: 小室迁移实验检测细胞迁移能力 (×200) 及计量统计, 蓝紫色代表迁移到小室外膜的细胞; D: 流式凋亡实验检测细胞凋亡情况。两组比较, * $P < 0.01$ 。

图4 p16过表达抑制替格瑞洛对HUVECs活力、增殖、迁移及凋亡的影响

Figure 4 Overexpression of p16 inhibited the role of ticagrelor on the vitality, proliferation, migration and apoptosis of the HUVEC

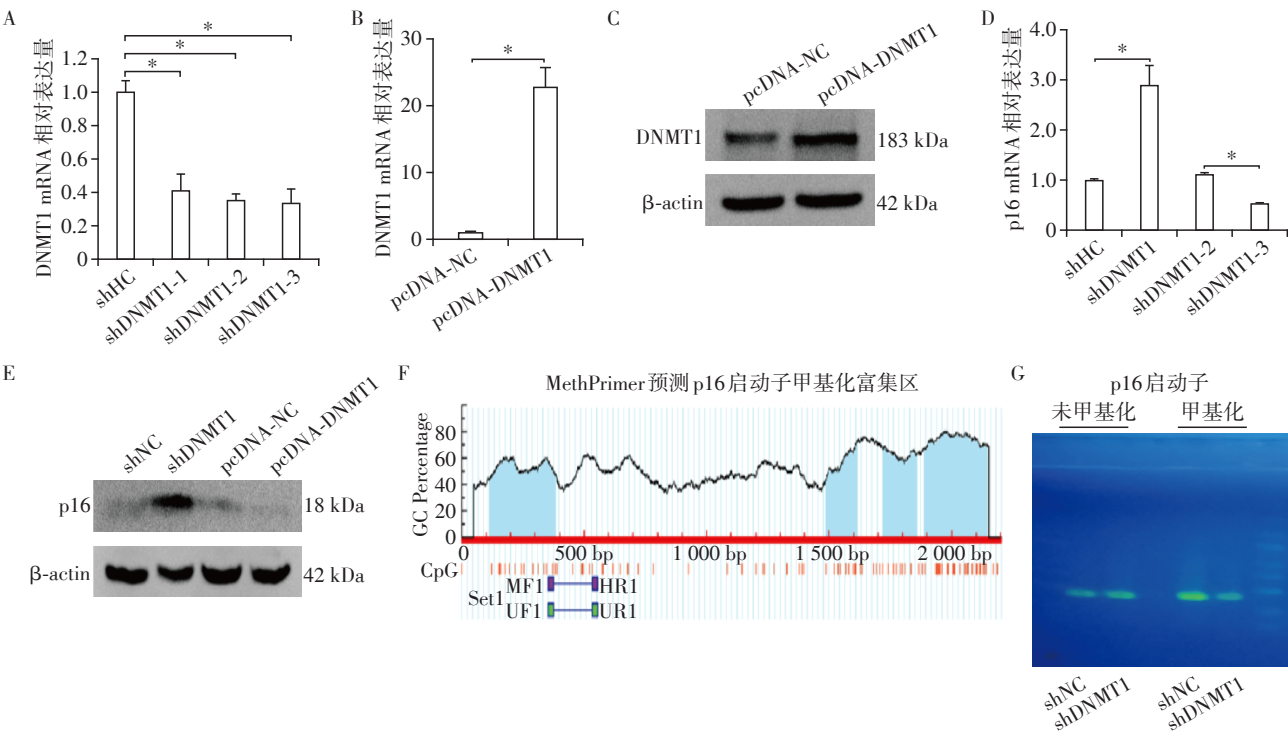
现与对照组相比, DNMT1 敲除可以有效降低 p16 启动子区的甲基化水平 (图 5G)。综上所述, DNMT1 可抑制 HUVEC 中 p16 的表达。

2.7 替格瑞洛通过调控 DNMT1/p16 信号通路影响 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤

为研究替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中

DNMT1/p16 信号通路的影响, 通过 Real-time PCR 和 Western blot 实验分别检测 p16 表达情况, 发现 shDNMT1 可以部分逆转替格瑞洛对 ox-LDL 诱导的 HUVEC p16 表达的抑制 ($P < 0.01$, 图 6A、B)。

为研究 DNMT1/p16 信号通路对替格瑞洛功能的影响, 通过 CCK8、EdU、Transwell 等实验分别检测



A:细胞分别转染shNC和shDNMT1,48 h后qPCR实验检测DNMT1的mRNA丰度;B、C:细胞分别转染pcDNA-NC和pcDNA-DNMT1,48 h后,qPCR实验检测DNMT1的mRNA丰度,蛋白免疫印迹实验检测DNMT1的蛋白量;D、E:qPCR实验检测p16的mRNA丰度,蛋白免疫印迹实验检测p16的蛋白量;F:MethPrimer预测p16启动子甲基化富集区;G:MSP实验检测p16启动子区的甲基化水平。β-actin为内参。两组比较,* $P < 0.01$ 。

图5 DNMT1对p16表达的调控
Figure 5 Regulation of the p16 expression by DNMT1

HUVEC活力、增殖与迁移能力变化,发现shp16可以部分逆转shDNMT1对替格瑞洛促进ox-LDL诱导的HUVEC活力、增殖及迁移能力的影响($P < 0.01$,图6C~E)。Annexin V/PI流式凋亡迁移实验结果显示shp16可以部分逆转shDNMT1对替格瑞洛抑制ox-LDL诱导的HUVEC凋亡的影响,即流式凋亡象限图右下角的早期凋亡以及右上角的晚期凋亡细胞比例下降(图6F)。

综上所述,替格瑞洛可通过调控DNMT1/p16信号通路影响ox-LDL诱导的HUVEC损伤。

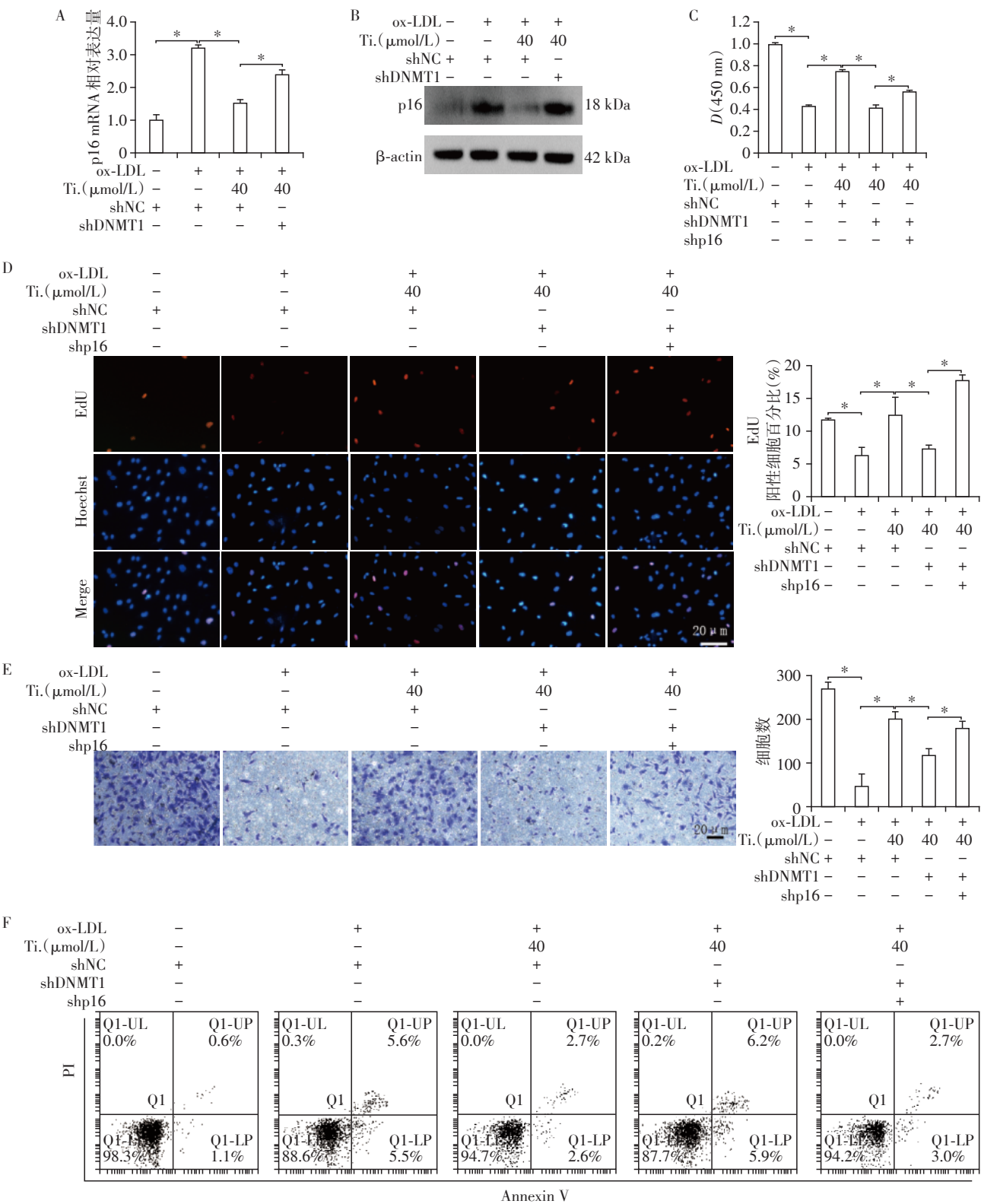
3 讨论

血管内皮细胞损伤和功能障碍是动脉粥样硬化发生发展的始动环节,而ox-LDL是目前公认的内皮损伤的主要危险因素,可降低内皮细胞活力、诱导细胞凋亡并促进炎症因子激活,进而导致炎症细胞浸润、斑块破裂等^[8]。因此,改善内皮功能被认为是冠心病防治的重要措施。本研究发现替格瑞洛可改善ACS患者血管内皮功能;同时在ox-LDL诱导HUVEC损伤模型上观察到,替格瑞洛可明显促进HUVEC的活力、增殖及迁移能力,并显著抑制ox-

LDL诱导的细胞凋亡;此外,研究发现替格瑞洛改善内皮功能的机制可能与DNMT1/p16调控通路有关。

替格瑞洛是新一代的P2Y₁₂受体抑制剂,与氯吡格雷相比,其抗血小板聚集作用起效快、可逆且不易耐药^[9]。2020年ESC/STEMI指南对双联抗血小板治疗推荐做了更新,首选替格瑞洛或普拉格雷。既往动物研究发现替格瑞洛能增加内皮依赖性NO合成^[10];一项纳入127例ACS患者的临床研究也发现替格瑞洛与氯吡格雷、普拉格雷相比,能明显改善外周血管内皮功能^[11];另一项随机对照研究中,与氯吡格雷比较,ACS患者服用替格瑞洛1个月后循环祖细胞CD34水平明显升高,间接改善脉管系统的内皮功能,这种作用独立于抗血小板活性^[12]。本研究结果显示,替格瑞洛可降低ACS患者血清ET-1含量并升高NO含量,这与既往研究结果相符^[13]。目前,替格瑞洛对内皮功能的影响仍存在争议,但大部分研究均支持替格瑞洛对于高危、原有内皮功能障碍的冠心病患者是具有内皮保护作用的^[14]。

p16基因又称p16INK4a基因、CDKN2A基因,是1994年Kamb等^[15]在人类染色体9p21上发现的新抑癌基因,可调控细胞生长、增殖、衰老及凋亡等^[16]。既



细胞分别转染 shDNMT1、shp16 以及相关对照, 转染 6 h 后换液, 分别给予替格瑞洛和 ox-LDL 处理。48 h 后, 细胞进行后续处理。A: qPCR 实验检测 p16 的 mRNA 丰度; B: 蛋白免疫印迹实验检测 p16 的蛋白量; C: CCK8 实验检测细胞活力; D: EdU 实验检测细胞增殖能力 (×200) 及计量统计, 红色代表 EdU 阳性细胞, Hoechst 代表所有细胞的细胞核, 粉色代表 EdU 阳性细胞与 Hoechst 标记的细胞的重合; E: 小室迁移实验检测细胞迁移能力 (×200) 及计量统计, 蓝紫色代表迁移到小室外膜的细胞; F: 流式凋亡实验检测细胞凋亡情况。β-actin 为内参。两组比较, $P < 0.01$ 。

图6 DNMT1/p16 通路调控 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤

Figure 6 DNMT1/p16 pathway regulated the damage of HUVECs induced by ox-LDL

往p16研究主要集中在肿瘤领域,p16蛋白表达水平可作为多种恶性肿瘤预后的预测指标^[17]。近年来,p16在动脉粥样硬化领域也逐渐受到重视,p16在动脉粥样硬化斑块中异常表达,且与斑块稳定性密切相关^[18]。既往研究也发现p16表达在过氧化氢诱导的HUVEC衰老中也发挥重要作用^[19]。本研究中,替格瑞洛干预HUVEC后p16表达显著降低,而过表达p16可逆转替格瑞洛对ox-LDL诱导的HUVEC增殖迁移、凋亡的影响,提示p16基因在替格瑞洛调控内皮细胞功能中同样发挥重要作用。

目前认为p16表达异常主要与p16基因的缺失、突变和DNA甲基化有关。DNA甲基化是基因组DNA一种主要表观遗传修饰方式,能在不改变DNA序列的前提下改变遗传性状,是调控基因组功能状态的重要手段^[19]。在哺乳动物中,DNA甲基化由3种DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)催化:DNMT1, DNMT3A和DNMT3B^[21]。DNMT1是主要的维持性DNA甲基化转移酶, DNMT3A和DNMT3B是从头合成性DNA甲基化转移酶^[22]。DNA甲基化调控基因表达,影响DNA修复、细胞生长、分化、增殖以及肿瘤发生等过程^[21]。我们既往研究证实p16基因表达受DNMT1介导DNA甲基化调控^[23]。本研究发现在ox-LDL诱导的HUVEC中, DNMT1可调控p16启动子区的甲基化水平并影响其表达,而替格瑞洛可通过DNMT1/p16信号通路发挥保护内皮功能的作用。

综上所述,本研究证明替格瑞洛可通过DNMT1介导的DNA甲基化调控p16表达,进而减轻ox-LDL诱导的HUVEC损伤,改善血管内皮功能。

[参考文献]

- [1] WERNLY B, ERLINGE D, PERNOW J, et al. Ticagrelor: a cardiometabolic drug targeting erythrocyte-mediated purinergic signaling? [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2021, 320(1): H90-H94
- [2] WALLENTIN L, BECKER R C, BUDAJ A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(11): 1045-1057
- [3] COLLET J P, THIELE H, BARBATO E, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42 (14) : 1289-1367
- [4] LANDZBERG D R, ENGLISH S, FRANKEL M, et al. Stroke thrombolysis in patients taking ticagrelor -two successful cases and a review of the literature [J]. *J Stroke*

- Cerebrovasc Dis*, 2021, 30(2) : 105520
- [5] ZHOU Z. Purinergic interplay between erythrocytes and platelets in diabetes-associated vascular dysfunction [J]. *Purinergic Signal*, 2021, 17(4) : 705-712
- [6] GUNAWARDENA T, MERINOPOULOS I, WICKRAMARACHCHI U, et al. Endothelial dysfunction and coronary vasoreactivity - a review of the history, physiology, diagnostic techniques, and clinical relevance [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2021, 17(1) : 85-100
- [7] LEON K E, TANGUDU N K, AIRD K M, et al. Loss of p16: A bouncer of the immunological surveillance? [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(4) : 309
- [8] PIRILLO A, NORATA G D, CATAPANO A L. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 152786
- [9] AL-ABDOUH A, BARBARAWI M, ABUSNINA W, et al. Prasugrel vs ticagrelor for DAPT in patients with ACS undergoing PCI: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2020, 21(12) : 1613-1618
- [10] KANG M, SHAO S, ZHANG Y, et al. Beneficial effects of ticagrelor on oxidized low-density lipoprotein (ox-Ldl)-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 9811-9819
- [11] TORNGREN K, OHMAN J, SALMI H, et al. Ticagrelor improves peripheral arterial function in patients with a previous acute coronary syndrome [J]. *Cardiology*, 2013, 124(4) : 252-258
- [12] BONELLO L, FRERE C, COINTE S, et al. Ticagrelor increases endothelial progenitor cell level compared to clopidogrel in acute coronary syndromes: a prospective randomized study [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 187: 502-507
- [13] 谭晓晖, 刘杰强, 梁转合, 等. 替格瑞洛对急性冠状动脉综合征患者外周血管内皮功能的影响 [J]. *临床心血管病杂志*. 2015, 31(7) : 728-732
- [14] MOULIAS A, XANTHOPOULOU I, ALEXOPOULOS D. Does ticagrelor improve endothelial function? [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2019, 24(1) : 11-17
- [15] KAMB A, GRUIS N A, WEAVER-FELDHAUS J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [J]. *Science*, 1994, 264 (5157) : 436-440
- [16] PEZZUTO A, D'ASCANIO M, RICCI A, et al. Expression and role of p16 and GLUT1 in malignant diseases and lung cancer: a review [J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(11) : 3060-3070
- [17] ZHAO R, CHOI B Y, LEE M H, et al. Implications of genetic and epigenetic alterations of CDKN2A (p16 (INK4a)) in cancer [J]. *EBioMedicine* 2016, 8: 30-39

- [18] BONIEWSKA - BERNACKA E, PANCZYSZYN A, KLINGER M. Telomeres and telomerase in risk assessment of cardiovascular diseases[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 397(2):112361
- [19] ZHU N, LIU X, XU M, et al. Dietary nucleotides retard oxidative stress - induced senescence of human umbilical vein endothelial cells[J]. *Nutrients*, 2021, 13(9):3279
- [20] KOHLER F, RODRIGUEZ-PAREDES M. DNA methylation in epidermal differentiation, aging, and cancer[J]. *J Invest Dermatol*, 2020, 140(1):38-47
- [21] LI S, TOLLEFSBOL T O. DNA methylation methods: global DNA methylation and methylomic analyses[J]. *Methods*, 2021, 187:28-43
- [22] BESTOR T H. The DNA methyltransferases of mammals[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(16):2395-2402
- [23] ZHU B, GONG Y, YAN G, et al. Atorvastatin treatment modulates p16 promoter methylation to regulate p16 expression[J]. *FEBS J*, 2017, 284(12):1868-1881
- [收稿日期] 2022-04-30
(本文编辑:唐 震)

(上接第155页)

- [21] WEISBERG S P, MCCANN D, DESAI M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12):1796-808
- [22] WANG Y, SMITH W, HAO D, et al. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70:459-66
- [23] LI C, SPALLANZANI R G, MATHIS D. Visceral adipose tissue Tregs and the cells that nurture them[J]. *Immunol Rev*, 2020, 295(1):114-125
- [24] MARTINEZ-SANCHEZ M E, HIRIART M, ALVAREZ-BUYLLA E R. The CD4+ T cell regulatory network mediates inflammatory responses during acute hyperinsulinemia: a simulation study[J]. *BMC Syst Biol*, 2017, 11(1):64
- [25] ZHAO X Y, ZHOU L, CHEN Z, et al. The obesity - induced adipokine sST2 exacerbates adipose T and ILC2 depletion and promotes insulin resistance[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(20):eaay6191
- [26] TAO L, LIU H, GONG Y. Role and mechanism of the Th17/Treg cell balance in the development and progression of insulin resistance[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 459(1-2):183-188
- [27] CORTESI F, DELFANTI G, CASORATI G, et al. The pathophysiological relevance of the iNKT Cell/Mononuclear phagocyte crosstalk in tissues[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2375
- [28] LEE B-C, KIM M-S, PAE M, et al. Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(4):685-698
- [29] LAUMONNIER Y, KARSTEN C M, KöHL J. Novel insights into the expression pattern of anaphylatoxin receptors in mice and men[J]. *Mol Immunol*, 2017, 89:44-58
- [30] ZAAL A, DIEKER M, OUDENAMPSEN M, et al. Anaphylatoxin C5a regulates 6-Sulfo-LacNAc dendritic cell function in human through crosstalk with toll-Like receptor-induced CREB signaling[J]. *Front Immunol*, 2017, 8:818
- [31] ZAAL A, VAN HAM S M, TEN BRINKE A. Differential effects of anaphylatoxin C5a on antigen presenting cells, roles for C5aR1 and C5aR2[J]. *Immunol Lett*, 2019, 209:45-52
- [32] PHIELER J, CHUNG K J, CHATZIGEORGIOU A, et al. The complement anaphylatoxin C5a receptor contributes to obese adipose tissue inflammation and insulin resistance[J]. *J Immunol*, 2013, 191(8):4367-4374
- [33] POURSHARIFI P, LAPOINTE M, FISETTE A, et al. C5aR and C5L2 act in concert to balance immunometabolism in adipose tissue[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1):325-333
- [34] ROY C, GUPTA A, FISETTE A, et al. C5a receptor deficiency alters energy utilization and fat storage[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e62531
- [35] MISSELWITZ B, WYSS A, RASELLI T, et al. The oxysterol receptor GPR183 in inflammatory bowel diseases[J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(16):3140-3156
- [36] COPPERI F, SCHLEIS I, ROUMAIN M, et al. EBI2 is a negative modulator of brown adipose tissue energy expenditure in mice and human brown adipocytes[J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1):280
- [收稿日期] 2022-10-27
(本文编辑:唐 震)