

◇ 基础医学研究 ◇

SIRT2 对 Ang II 诱导的小鼠心肌成纤维细胞增殖与迁移影响的研究

林丽婵¹, 刘芷言¹, 刘震宇¹, 刘 鹏¹, 毛 遂¹, 张云森¹, 胡宪文¹, 李 锐¹, 陶 辉^{1,2}
(安徽医科大学第二附属医院¹ 麻醉科、² 心胸外科, 合肥 230601)

摘要 **目的** 探讨去乙酰化酶 2(SIRT2)在血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)刺激下对小鼠心肌成纤维细胞(CFs)增殖与迁移的作用。**方法** 对 1~2 d 内的 C57BL/6 乳鼠心脏进行无菌摘取, 碎化为组织匀浆、消化、过滤后提取分离的 CFs。CFs 贴壁生长至 70%~80% 汇合度后, 加入 Ang II 诱导构建体外 CFs 活化增殖模型, Ang II 刺激 24 h 后分别向各组 CFs 转染空载质粒及 SIRT2 过表达质粒, 后继续培养 1~2 d。应用 RT-qPCR 方法检测 SIRT2、增殖细胞核抗原(PCNA)、骨膜素(POSTN)和 I 型胶原 A1(Col1A1)的 mRNA 相对表达量; Western blot 方法探测 SIRT2、PCNA、POSTN 和 Col1A1 的蛋白相对表达量; CCK-8 法与 EdU 法探测 CFs 增殖活力; Transwell 实验检测 CFs 迁移能力。**结果** 与 CFs 空白对照组相比, Ang II 导致 CFs 的 SIRT2 表达量减少与细胞外基质蛋白表达增多, 同时 CFs 的活化增殖明显增高。使用质粒过表达 SIRT2 上调 Ang II 诱导环境下 CFs SIRT2 表达后, 与空载组相比, 过表达组 SIRT2 表达上调, 胶原纤维蛋白表达量降低, 同时 CFs 的增殖与活化明显减少。**结论** 过表达 SIRT2 能抑制 Ang II 诱导的胶原纤维沉积与 CFs 活化增殖, SIRT2 通过调节 Ang II 诱导环境下 CFs 活化与增殖, 也为心肌纤维化的干预与治疗提供了新的思路。

关键词 SIRT2; 心肌成纤维细胞; Ang II; 增殖; 迁移; 心肌纤维化

中图分类号 R 782.05+4; R 541.9; R 714.252

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0589-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.001

心肌纤维化是各种心肌损伤因素所导致的心脏病理性改变^[1], 可引起心室壁顺应性减少, 心室重构, 心脏泵血功能降低等心脏病理生理性改变^[2]。心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)是心肌纤维化起始和恶化中的关键作用细胞。CFs 的异常活化与过度增殖和细胞外基质蛋白的异常沉积是心肌纤维化的标志性事件^[3]。目前关于 CFs 的活化增殖的分子机制仍未完全研究透彻, 对 CFs 活化增殖的分子机制深入研究可为临床干预与治疗心肌纤维化提供诊治依据。去乙酰化酶(sirtuin 2, SIRT2)是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)依赖性蛋白脱乙酰酶^[4], 可以催化组蛋白去乙酰化并参与调控基因启动子区域的组蛋白乙酰化修饰, 通过催化组蛋白去乙酰化使组蛋白乙酰化修饰减少, 从而抑制启动子下游基因的

转录与表达^[5]。研究^[6]表明, SIRT2 可以调控组蛋白去乙酰化修饰从而抑制神经母细胞瘤细胞的活化增殖和侵袭功能。文献^[7]报道 SIRT2 能抑制结直肠癌细胞的增殖。现有的文献提示 SIRT2 可影响细胞活化增殖过程, 但是 SIRT2 是否在 CFs 活化与增殖中发挥作用尚不清楚。该研究通过利用血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)刺激构建 CFs 活化增殖体外模型, 质粒转染 CFs 过表达 SIRT2 后, 检测 CFs 活化增殖分子标志物表达变化以及增殖与迁移功能变化, 探讨 SIRT2 在 Ang II 诱导 CFs 增殖与迁移中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 所提取与培养小鼠原代 CFs 来源于 1~2 d 内的 SPF 级 C57BL/6 乳鼠, 由安徽医科大学动物实验中心提供, 动物许可证号: SCXK(皖)2017-006, 相关实验操作通过安徽医科大学伦理审批, 伦理编号为 LLSC20232157。

1.1.2 实验试剂 胎牛血清(10100)、Ang II(GP10023)(美国 Gibco 公司)、高糖 DMEM 培养基

2024-12-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 82170236); 安徽省重点研究与开发计划项目(编号: 202104j07020037)

作者简介: 林丽婵, 女, 硕士研究生;

陶 辉, 男, 副教授, 副研究员, 博士生导师, 通信作者, E-mail: taohui@ahmu.edu.cn

(SH30243.01B)(美国 HyClone 公司)、GAPDH 一抗(10494-1-AP)、SIRT2 一抗(19655-1-AP)、骨膜素(periosstin, POSTN)一抗(19899-1-AP)、I 型胶原(Collagen I)一抗(67288-1-Ig)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)一抗(24036-1-AP)(武汉 Proteintech 公司)、细胞裂解液(P0013)、BCA 试剂盒(P0012S)、蛋白酶抑制剂混合物(P1005)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)(P0015)、胰蛋白酶(P4205)、Lipo8000™ 转染试剂(C0526)、4% 多聚甲醛固定液(4% PFA)(P0099)、Triton X-100/曲拉通 X-100(ST1723)、DAPI 染色液(C1005)、抗荧光淬灭封片液(P0126)(上海碧云天生物技术有限公司)、TRIzol 试剂(15596-026)(美国 Invitrogen 公司)、逆转录和 RT-qPCR 试剂盒(长沙艾克瑞公司; AG11721)、GAPDH、SIRT2、POSTN、Collagen I、PCNA 引物序列(上海生工公司)、CCK-8 试剂盒(BS350A)(合肥白鲨公司)、EdU 细胞增殖检测试剂盒(C10310-1)(广州锐博公司)、Transwell 小室(3422)(美国 Corning 公司)、0.1% 结晶紫水溶液(0.1% CVS)(548-62-9)(上海联迈公司)。

1.1.3 主要仪器 细胞超净工作台(苏州净化公司)、细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、高速离心机(德国艾本德公司)、Varioskan LUX 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞的提取与培养 用酒精消毒 1~2 d 的 C57BL/6 乳鼠体表后,用已高温灭菌的器械在细胞超净操作台中解剖出整个乳鼠心脏。用预冷无菌 PBS 洗除残余血液,再将心脏剪为组织匀浆,后加入以 2:1 配置的胰蛋白酶和 II 型胶原酶混合液。用水浴锅 37℃ 恒温摇晃消化组织悬液 30~40 min,用细胞滤网过滤收集被消化分离的细胞悬液,向收集滤液中加入等体积的完全培养基中和残余消化酶。反复消化心肌组织 2~4 次,以 1 000 r/min 离心过滤收集的细胞悬液 6 min,吸除上层液体。往离心管底部加 10% FBS 的 DMEM,轻轻吹打并转移积聚细胞到培养瓶,放到原代细胞专用培养箱 37℃ 静置培养 6 h。之后更换培养瓶 DMEM,倒弃未贴壁的细胞与组织碎片,所获贴壁的细胞即为 CFs。光镜下观察 CFs 状态,培养原代 CFs 至汇合度约 80%~90% 时传代,第 2~3 代 CFs 用于后续实验。荧光显微镜下,细胞中 POSTN 荧光染色阳性,确定为 CFs。

1.2.2 Ang II 诱导 CFs 细胞活化 用枸橼酸盐缓冲液配浓度为 10 mmol/L 的 Ang II 工作液,以最终浓度为 100 nmol/L 的 Ang II 处理对数生长期的 CFs 24 h。

1.2.3 原代 CFs 细胞转染 传代后 CFs 培养汇合度约 70%~80% 时,用 Ang II 诱导 24 h。后重悬,计数并等量接种至 6 孔板。当 CFs 生长至汇合度 60%~70% 左右时,进行质粒转染。CFs 质粒转染 24 h 后再换成含 10% FBS 的 DMEM,再加 Ang II 处理继续培养。2 d 后,用 RT-qPCR 和 Western blot 检测各组 CFs 的 SIRT2 过表达效率。

1.2.4 实验分组 ① CFs 空白对照组(Control 组):不做处理;② CFs 加 Ang II 刺激纤维化实验组(Ang II 组):Ang II 刺激 CFs 24 h;③ CFs 质粒空载加 Ang II 刺激对照组(Ang II + OE-Vector 组):CFs 转染空载质粒后加 Ang II 刺激 24 h;④ CFs 质粒过表达 SIRT2 后加 Ang II 刺激实验组(Ang II + OE-SIRT2 组):CFs 转染过表达 SIRT2 质粒后 Ang II 刺激 24 h;⑤ CFs 阴性 siRNA 处理加 Ang II 刺激对照组(Ang II + NC-siRNA 组):CFs 转染阴性 siRNA 后加 Ang II 刺激 24 h;⑥ CFs siRNA 敲低 SIRT2 后加 Ang II 刺激实验组(Ang II + SIRT2-siRNA 组):CFs 转染 SIRT2-siRNA 后 Ang II 刺激 24 h。

1.2.5 总 RNA 的提取及逆转录 用 TRIzol 法抽提各组 CFs 的总 RNA。以 37℃、15 min、85℃、1 min、4℃ 的逆转录条件将 RNA 逆转录为 cDNA。

1.2.6 RT-qPCR 检测各组 CFs 中 SIRT2、POSTN、Collagen I 及 PCNA mRNA 的表达水平依据试剂商说明,取逆转录后 cDNA 配置 qPCR 反应体系,设置 95℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min 的反应条件进行扩增。以 GAPDH 作为内参,2^{-ΔΔC_T} 法计算各组 CFs 的 mRNA 相对表达量。所用基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Gene name	Primer sequences(5'-3')
SIRT2	F: CTTCTTACCCAGAGGCCATC
	R: TCAGCAGCGCGATGAAGTAGT
POSTN	F: CTTTCGAGAACTGCCACGAG
	R: CCTTCCATGGTCTCAAACACG
Collagen I	F: GCAAGAGGCGAGAGAGGTTT
	R: GACCACGGGCACCATCTTTA
PCNA	F: TGGAATCCCAGAACAGGAG
	R: TCAGAGCAAACGTTAGGTC
GAPDH	F: TCAAGGCTGAGAACGGGAAC
	R: GGACTCCACGACGTACTCAG

1.2.7 Western blot 检测各组 CFs 中 SIRT2、POSTN、Collagen I 及 PCNA 蛋白的表达水平 Ang II 诱导或者质粒转染后,用细胞裂解液裂解并提取各组的总蛋白后,用 BCA 试剂盒测定各组 CFs 蛋白浓度并统一定量为 $2.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。成比例添加 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液($5\times$),吹打均匀,后 100°C 加热 10 min 。各孔以 $10 \mu\text{g}$ 的蛋白量进行上样,电泳,转膜。再用 5% 脱脂牛奶封膜并在室温慢摇 2 h ,TBST 洗膜 3 遍,每遍 10 min ,再用 SIRT2、POSTN、Collagen I、PCNA 及 GAPDH 的一抗孵育, 4°C 慢摇过夜。孵育过夜后,TBST 洗膜,再孵相应的鼠和兔二抗,常温慢摇 1 h 后再用 TBST 洗膜并显影。用 Image J 软件分析蛋白灰度值,以 GAPDH 作为内参,计算各组 CFs 蛋白的相对表达水平。

1.2.8 CCK-8 法检测 用胰蛋白酶消化分离对数生长期的各个分组的 CFs,加入 DMEM 重悬并计数,铺于 96 孔板。每孔接种 2×10^4 个 CFs,每个实验组设置 3 个复孔,放到细胞培养箱中 37°C 静置培养。培养 CFs 到对数生长期,往各孔滴 $15 \mu\text{l}$ CCK-8 试剂,培养箱内静置 2.5 h ,用酶标仪检测各孔的吸光度。各个分组做 3 次重复实验。

1.2.9 EdU 染色检测 CFs 增殖活性 24 孔板中爬片并将 CFs 均匀铺片, 1.5×10^4 个/孔, 12 h 后滴添 $500 \mu\text{l}$ EdU 标记反应液,放到细胞培养箱 37°C 静置培养。 2 h 后吸弃液体,室温下用 4% PFA 固定 30 min ,再用甘氨酸中和并清洗 CFs。后用 0.5% Triton X-100 室温渗透 CFs 10 min ,再加 $500 \mu\text{l}$ EdU 染色反应液,避光放在摇床,室温慢摇孵育 1 h ,吸弃 EdU 染色反应液,DAPI 染核,取片后用抗荧光淬灭剂封闭,激光共聚焦显微镜下观察,各孔挑选 5 块不重合的区域,拍照并用 Image J 软件分析。

1.2.10 Transwell 实验检测 CFs 的迁移能力 将 Transwell 小室放置在 24 孔板内,用无血清完全培养基湿化室膜,放在 37°C 细胞培养箱中静置 30 min 。胰酶消化,用无血清 DMEM 重悬后的各组 CFs 并计数,将细胞悬液稀释为 2×10^5 个 CFs/ml。在 24 孔板孔内加 $650 \mu\text{l}$ 含 20% FBS 的 DMEM,放置湿化的 Transwell 小室,往小室内滴加 $100 \mu\text{l}$ 定数后的 CFs 悬液,再放回 37°C 细胞培养箱。 24 h 后夹取小室,吸弃室内液体,室温下用 4% PFA 固定 30 min ,PBS 清洗,用 0.1% CVS 室温染色 20 min 。擦除留置在室膜上壁表面的 CFs,放 PBS 内清洗 3 遍,显微镜明场下观察并拍照。每个实验组设置 3 个复孔,各室膜随意挑选 5 块不重复的区域,拍照后用

Image J 计数。

1.3 统计学处理 所有实验数据重复 3 次。IBM SPSS Statistics 26.0 统计分析,GraphPad Prism 9.0 作图。采用单因素方差分析进行组间数据分析,之后进行 Tukey 事后检验分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C57BL/6 乳鼠原代 CFs 提取后培养 如图 1 所示,倒置相差显微镜下,可见 CFs 的形态特点,CFs 呈扁平状,长梭形,多突触。CFs 生长状态良好,汇合度高,呈网状分布。在荧光显微镜下,乳鼠原代 CFs 分离后 CFs 标志蛋白 POSTN 染色阳性。

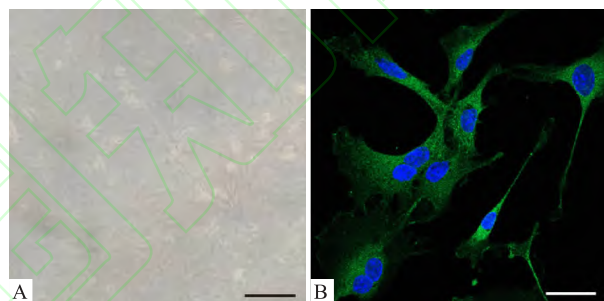


图 1 CFs 在显微镜下的观察与鉴定

Fig. 1 Observation and identification of CFs under microscope

A: Phase contrast microscope $\times 100$; B: Fluorescence microscope $\times 2500$.

2.2 SIRT2 过表达质粒和 SIRT2 siRNA 处理对 SIRT2 mRNA 表达的影响 如图 2 所示,与 Control 组比,Ang II 诱导的 CFs 中 SIRT2 mRNA 表达量明显减少($t = 4.820, P < 0.01$; $t = 5.333, P < 0.01$)。OE-SIRT2 质粒转染处理后,与 OE-Vector 组相比,OE-SIRT2 组的 CFs 中 SIRT2 mRNA 表达量明显增多($t = 5.609, P < 0.01$)。SIRT2 siRNA 转染处理后,与 NC-siRNA 组相比,SIRT2-siRNA 组的 CFs 中 SIRT2 mRNA 表达量明显减少($t = 5.465, P < 0.01$)。表明 SIRT2 过表达质粒和 SIRT2 siRNA 转染 CFs 细胞成功。所有数据通过单因素方差分析随后进行 Tukey 事后检验进行分析($\bar{x} \pm s, n = 3$)。

2.3 SIRT2 对 Ang II 诱导的 Col1A1、POSTN、PCNA mRNA 表达水平的影响 如图 3 所示,Ang II 组 CFs 中,SIRT2 mRNA 水平相对于对照组降低($t = 6.833, P < 0.01$; $t = 5.300, P < 0.01$), Col1A1 ($t = 6.708, P < 0.01$; $t = 7.676, P < 0.01$)、POSTN ($t = 8.387, P < 0.01$; $t = 6.977, P < 0.01$)、PCNA ($t =$

=7.612, $P < 0.01$; $t = 7.647$, $P < 0.01$) mRNA 水平相对于对照组升高。SIRT2 过表达组 CFs 中, SIRT2 mRNA 水平相对于空载对照组升高($t = 7.077$, $P < 0.01$)、Col1A1($t = 5.666$, $P < 0.01$)、POSTN($t = 5.168$, $P < 0.01$)、PCNA($t = 5.627$, $P < 0.01$) mRNA 水平与空载对照组相比降低。SIRT2 siRNA 组 CFs 中, SIRT2 mRNA 水平相对于阴性对照组降低($t = 6.204$, $P < 0.01$)、Col1A1($t = 6.613$, $P < 0.01$)、POSTN($t = 4.803$, $P < 0.01$)、PCNA($t = 4.734$, $P < 0.01$) mRNA 水平与阴性对照组相比升高。结果显示, SIRT2 过表达可以抑制 Ang II 诱导 CFs 的 Col1A1、POSTN、PCNA mRNA 水平, 而 SIRT2 敲低则增强 Ang II 诱导 CFs 的 Col1A1、POSTN、PCNA mRNA 水平。所有数据通过单因素方差分析随后进行 Tukey 事后检验进行分析($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)。

2.4 SIRT2 对 Ang II 诱导的 Col1A1、POSTN、

PCNA 蛋白表达水平的影响 如图 4 所示, Western blot 方法检测各组 CFs 中 SIRT2 蛋白的表达量变化, Ang II 组 CFs 中, SIRT2 蛋白表达量与对照组相比降低($t = 7.835$, $P < 0.01$; $t = 6.055$, $P < 0.01$)、Col1A1($t = 6.179$, $P < 0.01$; $t = 7.354$, $P < 0.01$)、POSTN($t = 7.725$, $P < 0.01$; $t = 8.382$, $P < 0.01$)、PCNA($t = 6.731$, $P < 0.01$; $t = 7.579$, $P < 0.01$) 蛋白表达与对照组相比升高。SIRT2 过表达组 CFs 中, SIRT2 蛋白表达量与空载对照组相比升高($t = 7.846$, $P < 0.01$)、Col1A1($t = 7.934$, $P < 0.01$)、POSTN($t = 5.332$, $P < 0.01$)、PCNA($t = 5.775$, $P < 0.01$) 蛋白表达与空载对照组相比降低。SIRT2 siRNA 组 CFs 中, SIRT2 蛋白表达量与阴性对照组相比降低($t = 8.594$, $P < 0.01$)、Col1A1($t = 5.154$, $P < 0.01$)、POSTN($t = 5.074$, $P < 0.01$)、PCNA($t = 4.842$, $P < 0.01$) 蛋白表达与阴性对照组相比升高

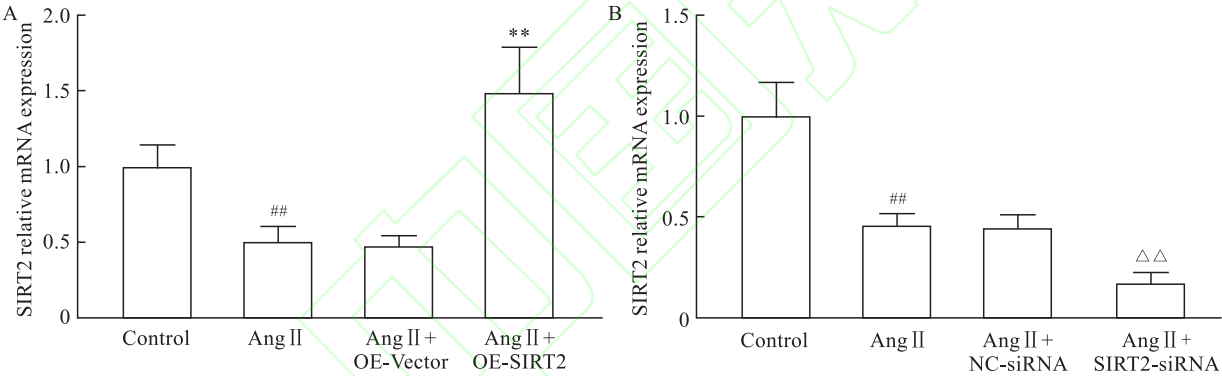


图2 在 CFs 中转染 48 h 后的 RT-qPCR 分析和相对 SIRT2 mRNA 表达

Fig. 2 RT-qPCR analysis and relative SIRT2 mRNA expression after transfection in CFs for 48 h

A: After OE-SIRT2 transfection in CFs for 48 h; B: After SIRT2 siRNA transfection in CFs for 48 h; ## $P < 0.01$ vs Control group; * $P < 0.01$ vs Ang II + OE-Vector group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Ang II + NC- siRNA group.

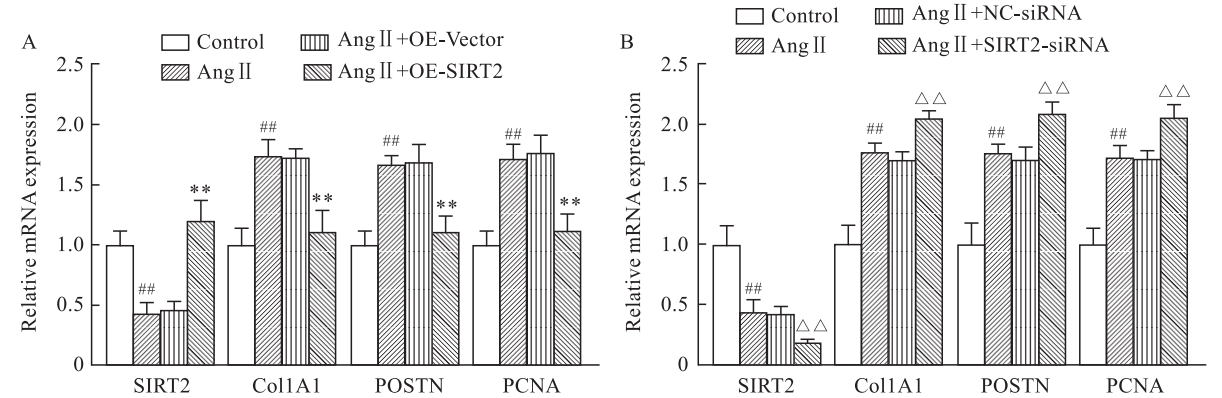


图3 RT-qPCR 分析 CFs 中 SIRT2、Col1A1、POSTN 和 PCNA mRNA 的相对表达量

Fig. 3 RT-qPCR analysis and relative mRNA expression of SIRT2, Col1A1, POSTN and PCNA in CFs

A: After OE-SIRT2 transfection in CFs for 48 h; B: After SIRT2 siRNA transfection in CFs for 48 h; ## $P < 0.01$ vs Control group; * $P < 0.01$ vs Ang II + OE-Vector group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Ang II + NC- siRNA group.

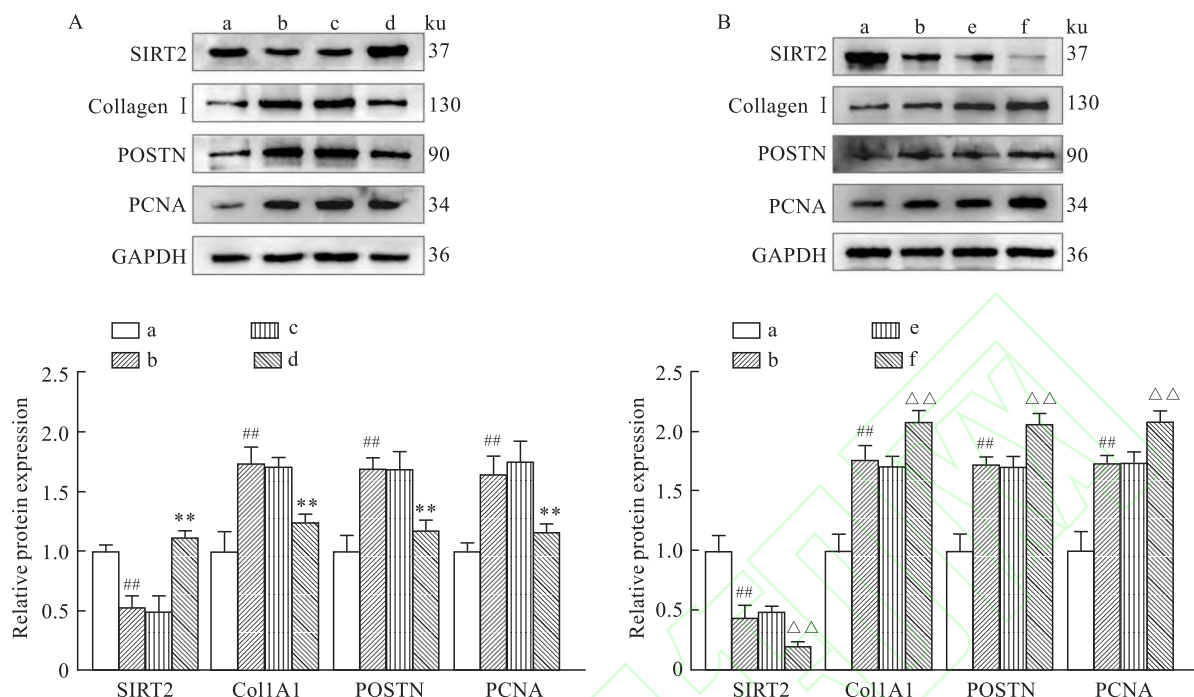


图4 Western blot 分析 CFs 中 SIRT2、Col1A1、POSTN 和 PCNA 的相关蛋白表达量

Fig. 4 Western blot analysis and relative protein expression of SIRT2, Col1A1, POSTN and PCNA in CFs

A: After OE-SIRT2 transfection in CFs for 48 h; B: After SIRT2 siRNA transfection in CFs for 48 h; a: Control group; b: Ang II group; c: Ang II + OE-Vector group; d: Ang II + OE-SIRT2 group; e: Ang II + NC-siRNA group; f: Ang II + SIRT2-siRNA group; ## $P < 0.01$ vs Control group; * $P < 0.01$ vs Ang II + OE-Vector group; ^ $P < 0.01$ vs Ang II + NC-siRNA group.

($P < 0.01$)。结果显示, SIRT2 过表达能够抑制 Ang II 诱导 CFs 的 Col1A1、POSTN、PCNA 蛋白水平, SIRT2 敲低能够增强 Ang II 诱导 CFs 的 Col1A1、POSTN、PCNA 蛋白水平。所有数据通过单因素方差分析随后进行 Tukey 事后检验进行分析($\bar{x} \pm s, n = 3$)。

2.5 SIRT2 对 Ang II 诱导的 CFs 增殖能力的影响 如图 5 所示, Ang II 组 CFs 细胞活性与对照组相比升高($t = 8.993, P < 0.001$; $t = 10.54, P < 0.001$; $t = 7.132, P < 0.01$; $t = 7.330, P < 0.01$)。SIRT2 的过表达后, Ang II + OE-SIRT2 组 CFs 细胞活性与空载对照组相比明显降低($t = 8.934, P < 0.001$; $t = 7.862, P < 0.01$)。SIRT2 敲低后, Ang II + SIRT2 siRNA 组 CFs 细胞活性与阴性对照组相比明显升高($t = 5.025, P < 0.01$; $t = 4.823, P < 0.01$)。结果显示, SIRT2 过表达能够抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖活性, SIRT2 敲低则增高 Ang II 诱导的 CFs 增殖活性。所有数据通过单因素方差分析随后进行 Tukey 事后检验进行分析($\bar{x} \pm s, n = 3$)。

2.6 SIRT2 对 Ang II 诱导的 CFs 迁移能力的影响

如图 6 所示, Transwell 实验表明, Ang II 组 CFs 的迁移能力与空白对照组相比明显增强($t = 6.515,$

$P < 0.01$; $t = 7.228, P < 0.01$)。SIRT2 过表达后, Ang II + OE-SIRT2 组 CFs 迁移能力与空载对照组相比明显降低($t = 8.227, P < 0.01$)。SIRT2 敲低后, Ang II + SIRT2-siRNA 组 CFs 迁移能力与阴性对照组相比明显升高($t = 4.670, P < 0.01$)。提示 SIRT2 过表达能够抑制 Ang II 诱导的 CFs 迁移能力, SIRT2 敲低则增强 Ang II 诱导的 CFs 迁移能力。所有数据通过单因素方差分析随后进行 Tukey 事后检验进行分析($\bar{x} \pm s, n = 3$)。

3 讨论

心肌纤维化是各种心脏疾病患者的共同发展结果, 表现形式包含室壁僵硬、心室重塑、心律失常、收缩与舒张功能障碍等病理生理过程, 最终可导致心力衰竭^[8]。CFs 的激活的分子标志物 POSTN 与细胞外基质蛋白如 Col1A1 的异常积累被认为是心肌纤维化致病过程中的关键事件^[9-10]。文献^[11-12]报道, 心肌纤维化与 CFs 的组蛋白乙酰化相关。组蛋白的乙酰化修饰是重要的基因化学修饰形式之一, 并参与基因的表现遗传调控, 经常发生在启动子区域并促进下游基因的转录和表达^[13], 在代谢性疾病、纤维化等疾病中发挥作用^[14]。SIRT2 是一种催

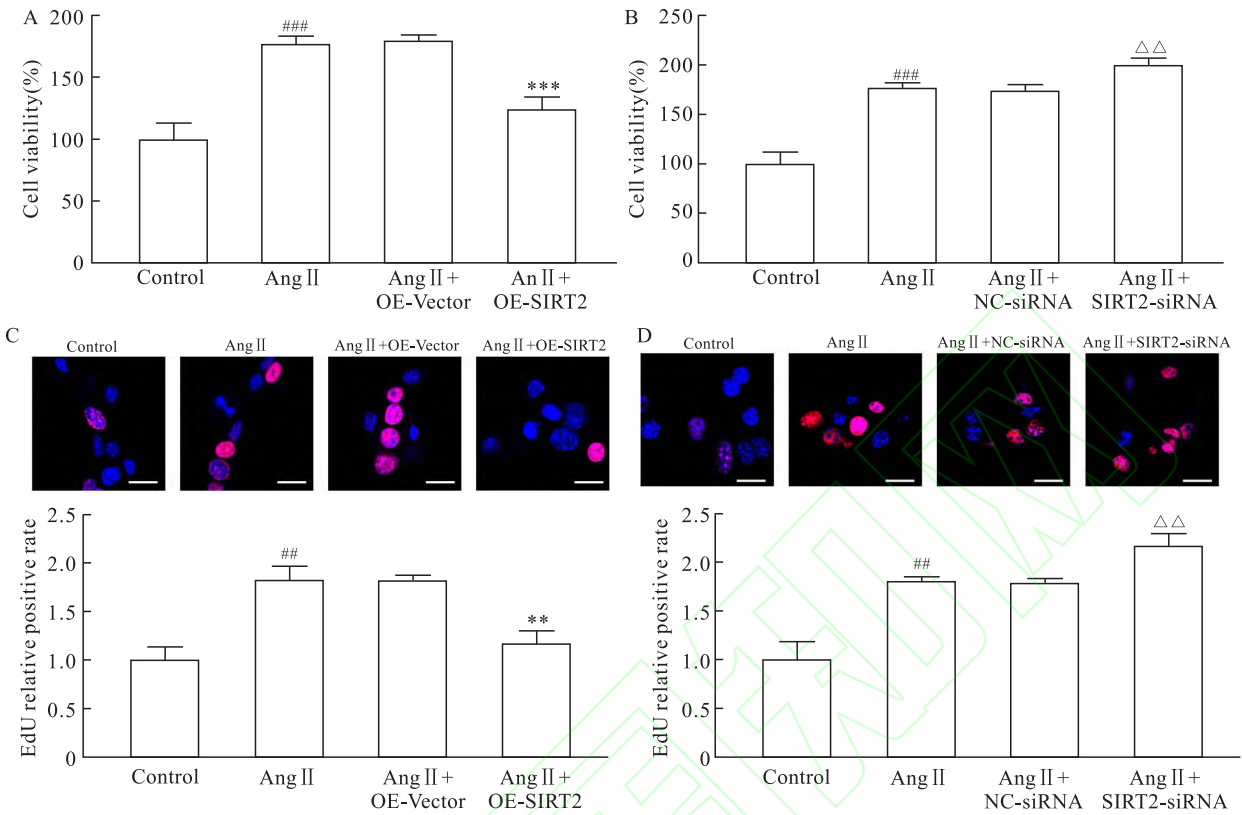


图 5 CFs 的存活率和增殖率百分比

Fig. 5 Survival rate and proliferation rate percentage of CFs

A,B;CCK-8 method for detecting the survival rate of CFs; C,D;EdU method for detecting the proliferation ability of CFs $\times 2\ 500$; ### $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Control group; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs Ang II + OE-Vector group; ΔΔ $P < 0.01$ vs Ang II + NC- siRNA group.

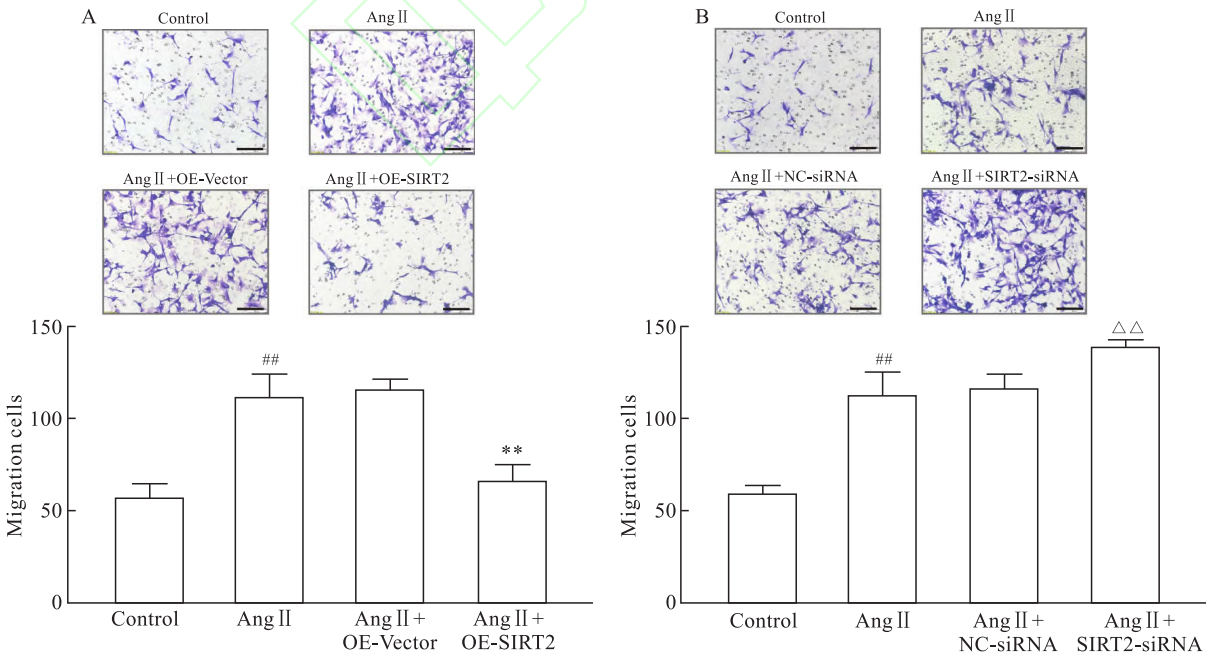


图 6 Transwell 测定法检测到 CFs 的迁移能力 $\times 100$

Fig. 6 Migration ability of CFs detected by Transwell assay $\times 100$

A;After OE-SIRT2 transfection in CFs for 48 h;B;After SIRT2 siRNA transfection in CFs for 48 h;## $P < 0.01$ vs Control group; ** $P < 0.01$ vs Ang II + OE-Vector group; ΔΔ $P < 0.01$ vs Ang II + NC- siRNA group.

化组蛋白去乙酰化的关键酶,已有研究^[15]表明,SIRT2 可通过调控成纤维细胞的活化和增殖参与器官纤维化的致病过程。然而 SIRT2 调控 CFs 增殖在心肌纤维化中的具体分子机制目前还未研究透彻。该课题组通过建立 Ang II 诱导 CFs 模型,探究 SIRT2 在心肌纤维化中的作用和分子机制。RT-qPCR 与 Western blot 分析显示,Ang II 刺激使 CFs 中 SIRT2 的表达水平降低和 POSTN、Col1A1、PCNA 的表达水平升高,而 SIRT2 的过表达可以削弱 Ang II 刺激引起的以上改变。在 CFs 中转染 OE-SIRT2 质粒后 2 d,CFs 的增殖与迁移能力与 Ang II 组和空载对照组相比明显减弱。

综上所述,Ang II 诱导的小鼠 CFs SIRT2 表达降低,同时细胞增殖与迁移能力明显增强,过表达 SIRT2 可削弱 Ang II 诱导的 CFs 的增殖与迁移,表明 SIRT2 的表达降低是促进 Ang II 诱导的小鼠 CFs 活化增殖的重要表观调控分子;SIRT2 的表达降低可能是心肌纤维化中 CFs 激活与细胞外基质蛋白过度积累的重要原因之一,SIRT2 可能通过靶向调控下游基因的表达变化,参与 CFs 活化、增殖与迁移。该研究为 SIRT2 作用的分子机制提供了研究基础,也为心肌纤维化的干预与治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] Frangogiannis N G. Cardiac fibrosis[J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(6): 1450–88. doi:10.1093/cvr/cvaa324.
- [2] Frangogiannis N G. The extracellular matrix in ischemic and nonischemic heart failure[J]. Circ Res, 2019, 125(1): 117–46. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.311148.
- [3] Frangogiannis N G. Fibroblasts and the extracellular matrix in right ventricular disease[J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(12): 1453–64. doi:10.1093/cvr/cvx146.
- [4] Taneja A, Ravi V, Hong J Y, et al. Emerging roles of sirtuin 2 in cardiovascular diseases[J]. FASEB J, 2021, 35(10): e21841. doi:10.1096/fj.202100490R.
- [5] Piracha Z Z, Saeed U, Piracha I E, et al. Decoding the multifaceted interventions between human sirtuin 2 and dynamic hepatitis B viral proteins to confirm their roles in HBV replication[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024, 13: 1234903. doi:10.3389/fcimb.2023.1234903.
- [6] Zu H, Li C, Dai C, et al. SIRT2 functions as a histone deacetylase and inhibits the proliferation and migration of neuroblastoma cells[J]. Cell Discov, 2022, 8(1): 54. doi:10.1038/s41421-022-00398-y.
- [7] Wang B, Ye Y, Yang X, et al. SIRT2-dependent IDH1 deacetylation inhibits colorectal cancer and liver metastases[J]. EMBO Rep, 2020, 21(4): e48183. doi:10.15252/embr.201948183.
- [8] Liu M, López de Juan Abad B, Cheng K. Cardiac fibrosis: myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 173: 504–19. doi:10.1016/j.addr.2021.03.021.
- [9] Qiao B, Liu X, Wang B, et al. The role of periostin in cardiac fibrosis[J]. Heart Fail Rev, 2024, 29(1): 191–206. doi:10.1007/s10741-023-10361-y.
- [10] Zhao J, Lv T, Quan J, et al. Identification of target genes in cardiomyopathy with fibrosis and cardiac remodeling[J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 63. doi:10.1186/s12929-018-0459-8.
- [11] Tang X, Chen X F, Wang N Y, et al. SIRT2 acts as a cardioprotective deacetylase in pathological cardiac hypertrophy[J]. Circulation, 2017, 136(21): 2051–67. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028728.
- [12] Palomer X, Silvia Román-Azcona M, Pizarro-Delgado J, et al. SIRT3-mediated inhibition of FOS through histone H3 deacetylation prevents cardiac fibrosis and inflammation[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 14. doi:10.1038/s41392-020-0114-1.
- [13] Shen Y, Wei W, Zhou D X. Histone acetylation enzymes coordinate metabolism and gene expression[J]. Trends Plant Sci, 2015, 20(10): 614–21. doi:10.1016/j.tplants.2015.07.005.
- [14] Bagchi R A, Weeks K L. Histone deacetylases in cardiovascular and metabolic diseases[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 130: 151–9. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.04.003.
- [15] Gong H, Zheng C, Lyu X, et al. Inhibition of Sirt2 alleviates fibroblasts activation and pulmonary fibrosis via Smad2/3 pathway[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 756131. doi:10.3389/fphar.2021.756131.

Effects of SIRT2 regulation on migration and proliferation of cardiac fibroblasts in Ang II -induced mice

Lin Lichan¹, Liu Zhiyan¹, Liu Zhenyu¹, Liu Peng¹, Mao Sui¹, Zhang Yunsen¹, Hu Xianwen¹, Li Rui¹, Tao Hui^{1,2}

(¹Dept of Anesthesiology, ²Dept of Cardiothoracic Surgery,

The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of Sirtuin 2 (SIRT2) on the proliferation and migration of cardiac (下转第 603 页)

forty SPF healthy male C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: normal diet group (ND group), high fat diet induced obesity group (DIO group), DIO supplemented with the control virus group (DIO + Scramble group) and DIO supplemented with the interfering virus group (DIO + shPTGES3 group). The Morris water maze test was conducted to evaluate the cognitive behavior changes of the four groups of mice. The immunofluorescence staining was performed to detect the expression of PTGES3 and HSP90 in the medial prefrontal cortex and the activation of ionized calcium binding adapter molecule 1 (IBA1)-labeled microglia. **Results** In the case-control study, the cognitive function of obese patients significantly decreased, and the expression of PTGES3 in peripheral blood significantly increased, while the level of PTGES3 was negatively correlated with cognitive function. In animal experiments, compared with ND group, DIO group had significantly prolonged time reaching the target platform, otherwise, the residence time in the target quadrant was shortened in the Morris water maze test. Simultaneously, there were significant increase in the expression of PTGES3 and HSP90, and the activation of IBA1 in the medial prefrontal cortex. Compared with DIO + Scramble group, mice in the DIO + shPTGES3 group spent less time reaching the target platform, and stayed longer in the target quadrant. The expression and co-localization levels of PTGES3 and HSP90 in medial prefrontal cortex significantly decreased. The activation level of microglia cells was also attenuated by PTGES3 interference. **Conclusion** Obesity-related cognitive dysfunction may be attributed to PTGES3/HSP90 in the medial prefrontal cortex by mediating neural inflammation.

Key words PTGES3; HSP90; obesity; cognition disfunction; neuroinflammation

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82300945); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2022zhxy-C53); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2022xkj040); Incubation Program of National Natural Science Foundation of China (No. 2022GQFY07)

Corresponding author Xue Qi, E-mail: xueqi@ahmu.edu.cn

(上接第 595 页)

fibroblasts (CFs) in C57BL/6 mice under angiotensin II (Ang II) stimulation. **Methods** The hearts were taken from 1 to 2 days C57BL/6 milk mice. After cutting and digesting, CFs were extracted by different adhesion centrifugation. After CFs attachment, the cells were cultured under control medium and Ang II (100 nmol/L) medium and treated using OE-SIRT2 plasmid to overexpression the SIRT2 gene. RT-qPCR was used to detect mRNA expression of SIRT2 proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Periostin (POSTN) and type I collagen procollagen A1 (Col1A1), Western blot assay was used to measure the protein expression levels of SIRT2, PCNA, POSTN and Col1A1, CCK-8 assay and EdU assay were used to evaluate CFs proliferation rate, Transwell experiment was used to assess CFs migration activity. **Results** Compared with control group, Ang II stimulation led to down-regulation of SIRT2 expression in CFs, increased collagen expression, and promoted CFs proliferation and migration. The expression of SIRT2 was up regulated in CFs treated with OE-SIRT2 plasmid under Ang II stimulation, Col1A1, POSTN and PCNA expression was down regulated, and CFs proliferation and migration ability decreased. **Conclusion** Overexpression of SIRT2 can inhibit the proliferation and migration of CFs under Ang II stimulation, indicating that SIRT2 may be a key regulatory point in the onset and progression of cardiac fibrosis.

Key words SIRT2; cardiac fibroblasts; Ang II; proliferation; migration; cardiac fibrosis

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82170236); Key Research and Development Program of Anhui Province (No. 202104j07020037)

Corresponding author Tao Hui, E-mail: taohui@ahmu.edu.cn