

网络出版时间: 2021-8-19 13:49 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210819.1123.013.html>

HDAC3 负性调控 mTOR 促进低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬

王月涵¹, 黄颖²

摘要 目的 研究组蛋白去乙酰化酶 3 (HDAC3) 调控低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬的功能和机制。方法 体外建立 H9C2 心肌细胞低氧模型, 采用 Western blot 和免疫荧光染色技术检测自噬相关蛋白 LC3B-II 、 Beclin-1 和 P62 的表达变化以及荧光活性。分别转染 HDAC3 过表达质粒和干扰 RNA 后, 检测自噬调节分子 mTOR 和 LC3B 的蛋白表达和荧光活性变化。结果 与对照组比较, 低氧 1 、 6 、 12 h 后, H9C2 心肌细胞中 LC3B-II 和 Beclin-1 表达显著增加 ($P < 0.05$) ; P62 蛋白表达先增高 (1 h) 后降低 (6 h) ($P < 0.05$) 。低氧 1 h 和 6 h 后, HDAC3 和 mTOR 蛋白表达明显增高 ($P < 0.05$) ; 低氧 12 h 后 HDAC3 和 mTOR 蛋白表达显著减少。过表达 HDAC3 能够降低 mTOR 蛋白表达和荧光活性, 增加 LC3B 的蛋白表达和荧光活性 ($P < 0.05$) ; 下调 HDAC3 蛋白表达能够升高 mTOR 蛋白水平和荧光活性, 减少了 LC3B 蛋白表达和荧光活性 ($P < 0.05$) 。结论 HDAC3 负性调节 mTOR 蛋白, 促进了低氧诱导的 H9C2 心肌细胞自噬。

关键词 自噬; 组蛋白去乙酰化酶 3; H9C2 心肌细胞

中图分类号 R 542.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1575-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.013

细胞自噬是指在生理或病理条件下, 溶酶体降解自身的细胞器或者分子物质的过程^[1]。心肌细胞自噬能够促进心室重构, 是导致心力衰竭的重要原因之一^[2]。但迄今为止, 导致心肌细胞自噬的机

2021-07-16 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1608085QH196)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 心电功能科、² 心血管内科, 合肥 230022

作者简介: 王月涵, 女, 硕士研究生;

黄颖, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:
ayfyhy@126.com

制尚不明确。组蛋白去乙酰化酶 3 (histone deacetylase 3 , HDAC3) 是表观遗传学调控的重要分子。研究^[3-4]表明 HDAC3 能够促进心肌细胞肥厚, 诱导心功能不全, 并和先天性心脏病有着密切关系。因此, 该研究探讨 HDAC3 调控低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬的功能和分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 本实验所用大鼠 H9C2 心肌细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 兔抗 LC3B 单克隆抗体、兔抗 P62 单克隆抗体、兔抗 Beclin-1 单克隆抗体、兔抗 HDAC3 单克隆抗体、兔抗 mTOR 单克隆抗体、兔抗 GAPDH 单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术公司; 细胞培养试剂购自美国 Gibco 公司。HDAC3 引物序列 F: 5'-GATGACCAGAGTTACAAG-CACC-3'; R: 5'-TTGAAGCAGCCTAATCGATCAC-3'; siRNA 引物序列: 5'-CTGCATTATGGTCTCTATATT-3'。

1.1.3 实验仪器 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司; 低氧小室购自加拿大 Stem Cell 公司; 蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; GE Amersham Imager 600 自动化学发光凝胶成像分析系统购自美国 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞低氧实验 大鼠 H9C2 心肌细胞用 DMEM + 10% FBS 培养基培养, 将 H9C2 细胞分

the fibrosis improvement degree of rectus femoris in the EST group was higher than that of the NR group ($P < 0.01$) . In addition, the expression levels of TGF- β 1 and α -SMA in the rectus femoris of EST group were lower than those in the NR group ($P < 0.05$) . The expression differences of TGF- β 1 and α -SMA in joint capsule of the EST group were not statistically significant compared with those in the NR group ($P > 0.05$) . **Conclusion** Early low-frequency electrical stimulation can improve extension contracture of the knee via reducing the level of skeletal muscle fibrosis. The inhibition of skeletal muscle fibrosis is greater than that of joint capsule fibrosis.

Key words fibrosis; low frequency electrical stimulation; knee extension contracture; skeletal muscle; joint capsule

为4组,对照组进行常氧培养,低氧组分为3组,分别是低氧1 h(1 h组)、低氧6 h(6 h组)、低氧12 h(12 h组),然后将4组细胞放入正常恒温孵箱中培养。

1.2.2 免疫荧光检测 爬满细胞的玻片以多聚甲醛固定清洗后,加入0.1% Triton X-100室温处理,然后加入牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA),室温下封闭细胞1 h。孵育一抗,放入湿盒4℃冰箱过夜。避光条件下孵二抗1 h。DAPI染色10 min,用细胞仪检测细胞自噬的变化。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达水平 收集心肌细胞裂解液,上样前先将样品置于沸水5 min变性,然后进行SDS-PAGE电泳并转膜至硝酸纤维素膜上。脱脂奶粉封闭1 h后,分别加入适当稀释比的一抗室温下孵育12 h,洗膜后加二抗室温孵育2 h。经化学发光法曝光后观察结果,检测自噬相关蛋白LC3B-II、Beclin-1和P62的表达变化^[5-7],实验中以GAPDH为内参照。

1.2.4 细胞转染实验 H9C2心肌细胞分组后,先后加入Opti-MEM和Lipofectamine 3000处理,分别转染HDAC3过表达质粒和siRNA 8 h。此时,将H9C2心肌细胞分为5组,分别为对照组(H9C2组)、siRNA空载质粒组(H9C2+siRNA NC组)、HDAC3敲减组(H9C2+siRNA组)、过表达空载质粒组(H9C2+OE NC组)、HDAC3过表达组(H9C2+OE组)。再次更换培养基,置于37℃、CO₂培养箱中培养48 h。

1.3 统计学处理 采用SPSS 21.0软件包进行数据分析。两组间比较采用独立样本t检验,多组间差异分析采用单因素方差分析;计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧诱导H9C2心肌细胞自噬 为了验证低氧诱导H9C2心肌细胞的自噬,分别检测自噬相关蛋白LC3B-II、Beclin-1和P62的表达变化。与对照组比较,在低氧后1 h,H9C2心肌细胞中LC3B-II、Beclin-1和P62蛋白表达均增加($P < 0.05$);在低氧6 h后LC3B-II、Beclin-1增加最为显著($P < 0.05$),而P62蛋白表达下降($P < 0.05$);在低氧12 h后,LC3B-II和P62蛋白表达水平虽有降低,但仍较对照组增高($P < 0.05$),Beclin-1蛋白表达较对照组减少($P < 0.05$) (图1)。以上结果表明低氧可以诱导H9C2心肌细胞的自噬,在低氧后6 h最为明显。

2.2 H9C2心肌细胞自噬过程中HDAC3蛋白表达增高 与对照组相比,低氧1 h和6 h后,H9C2心肌细胞中HDAC3蛋白表达显著升高($P < 0.05$);而在低氧12 h后,HDAC3蛋白表达明显下降($P < 0.05$) (图2)。以上结果表明低氧可诱导H9C2心肌细胞自噬过程中HDAC3蛋白表达增高($F = 353.60$, $P < 0.05$)。

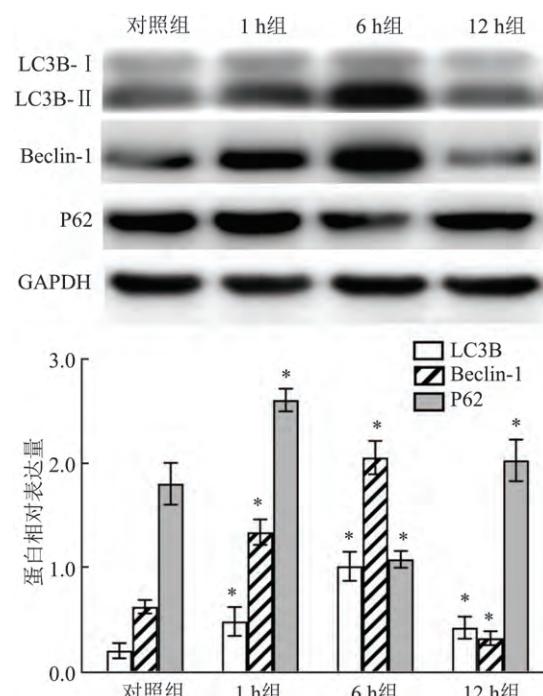


图1 低氧诱导H9C2心肌细胞自噬相关蛋白LC3B、Beclin-1和P62表达变化
与对照组比较: * $P < 0.05$

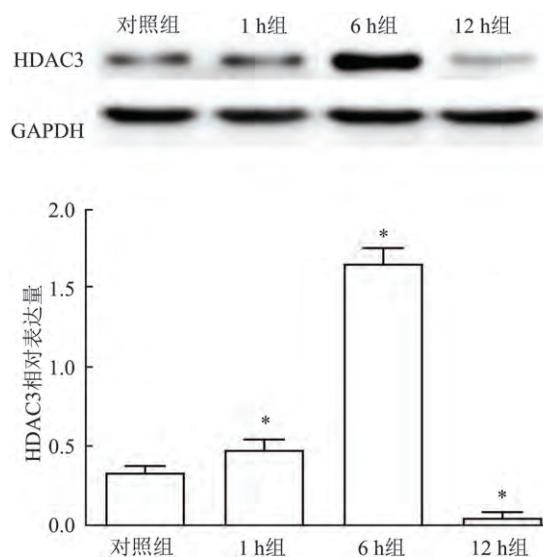


图2 低氧诱导H9C2心肌细胞HDAC3蛋白表达变化
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 HDAC3促进了H9C2心肌细胞自噬 为了

验证 HDAC3 调控 H9C2 心肌细胞自噬的功能,通过细胞转染 HDAC3 干扰 RNA (H9C2 + siRNA) 下调 HDAC3 蛋白表达后,LC3B 蛋白表达较对照组明显降低($P < 0.05$);而转染 HDAC3 过表达质粒 (H9C2 + OE) 上调 HDAC3 后,LC3B 蛋白表达较对照组显著增高($P < 0.05$) (图 3A)。免疫荧光检测发现,与对照组比较,下调的 HDAC3 降低了 LC3B 的荧光活性($P < 0.05$),上调 HDAC3 增加了 LC3B 的荧光活性($P < 0.05$) (图 3B、3C)。以上结果表明 HDAC3 促进了低氧条件下 H9C2 心肌细胞自噬。

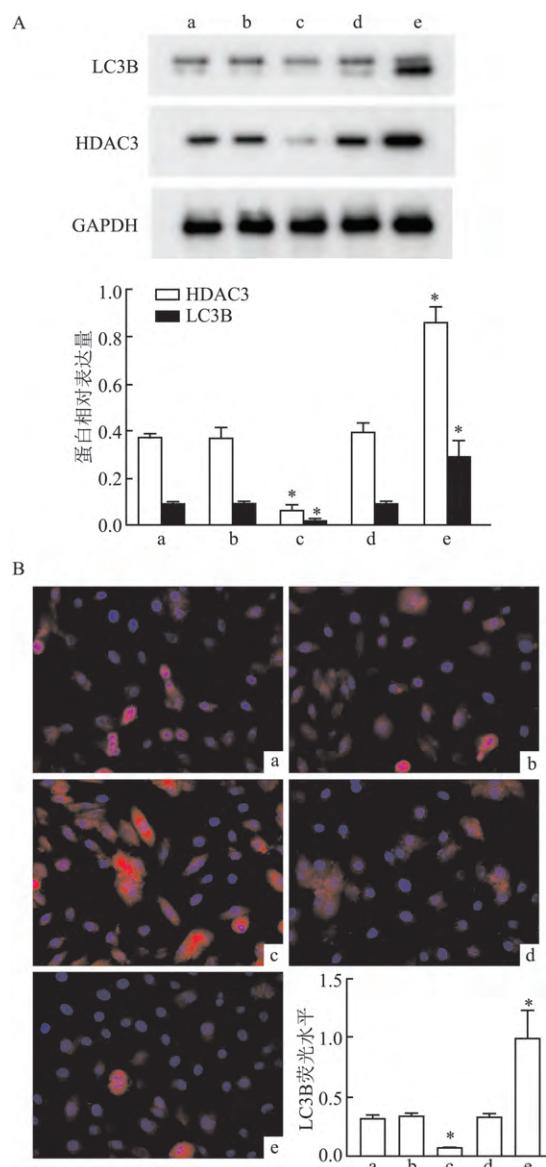


图 3 HDAC3 促进 H9C2 心肌细胞 LC3B 的蛋白表达和荧光活性变化

A: LC3B 与 HDAC3 蛋白相对表达量; B: LC3B 荧光活性变化; a: H9C2 组; b: H9C2 + siRNA NC 组; c: H9C2 + siRNA 组; d: H9C2 + OE NC 组; e: H9C2 + OE 组; 与 H9C2 组比较: * $P < 0.05$

2.4 HDAC3 负性调控 mTOR 分子表达 为了探讨 HDAC3 促进 H9C2 心肌细胞自噬的分子机制,本课题研究调控细胞自噬的重要分子雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的表达变化。与对照组比较,低氧后 1 h 和 6 h 时 mTOR 蛋白表达逐渐增高,在 12 h 后表达降低($P < 0.05$) (图 4A)。下调 HDAC3 蛋白表达 (H9C2 + siRNA) 后,mTOR 蛋白水平和荧光活性明显增高($P < 0.05$);而上调 HDAC3 蛋白表达 (H9C2 + OE) 后,mTOR 的蛋白水平和荧光活性显著降低($P < 0.05$) (图 4B–4C)。以上结果提示 HDAC3 可以负性调控 mTOR 蛋白表达。

3 讨论

自噬是细胞内蛋白质和亚细胞结构通过溶酶体降解的过程,是生理情况下细胞为适应各种刺激而维持其代谢的需要。应激状态下异常自噬影响了细胞自身正常的形态和功能,导致多种疾病的发生发展^[8],过度应激可导致自噬增强,自噬体累积,并且产生过度自噬而引发细胞自我消化死亡^[9]。心肌细胞自噬是心室重构的重要原因之一,研究^[10–11]心肌细胞自噬的分子机制对逆转心室重构,以及对防治心力衰竭均有重要的意义。目前已有很多研究和实验证明了心肌缺血再灌注时的心肌细胞自噬作用,这些研究结果提示缺血再灌注诱导的心肌细胞自噬进一步增加,而心肌细胞的自噬在心肌缺血初期是起到保护作用的,在再灌注期间才产生了恶化作用^[12]。

本课题首先体外建立低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬模型,研究自噬相关蛋白的 LC3B-II、Beclin-1 和 P62 表达变化。在细胞自噬过程中,LC3B-II 蛋白的高表达提示自噬水平的增高,是重要的自噬分子标志物。在低氧后 1、6、12 h,LC3B-II 蛋白表达均增高($P < 0.05$)。Beclin-1 是自噬过程中核心蛋白之一,影响自噬体的形成,并能诱导细胞的凋亡。在低氧后 1 h 和 6 h 表达均较正常对照组增高,12 h 后降低($P < 0.05$)。P62 是一种多功能癌基因蛋白,通过不同的蛋白作用域参与细胞选择性自噬过程。在低氧后 1 h,P62 蛋白表达增高,6 h 后蛋白表达降低($P < 0.05$),P62 蛋白的这一变化和其他自噬研究^[13]结果相似。通过以上蛋白的检测,验证低氧诱导心肌细胞自噬成功。其中,在低氧后 6 h,自噬水平最为显著,因此选取低氧 6 h 作为后续实验的时间点。

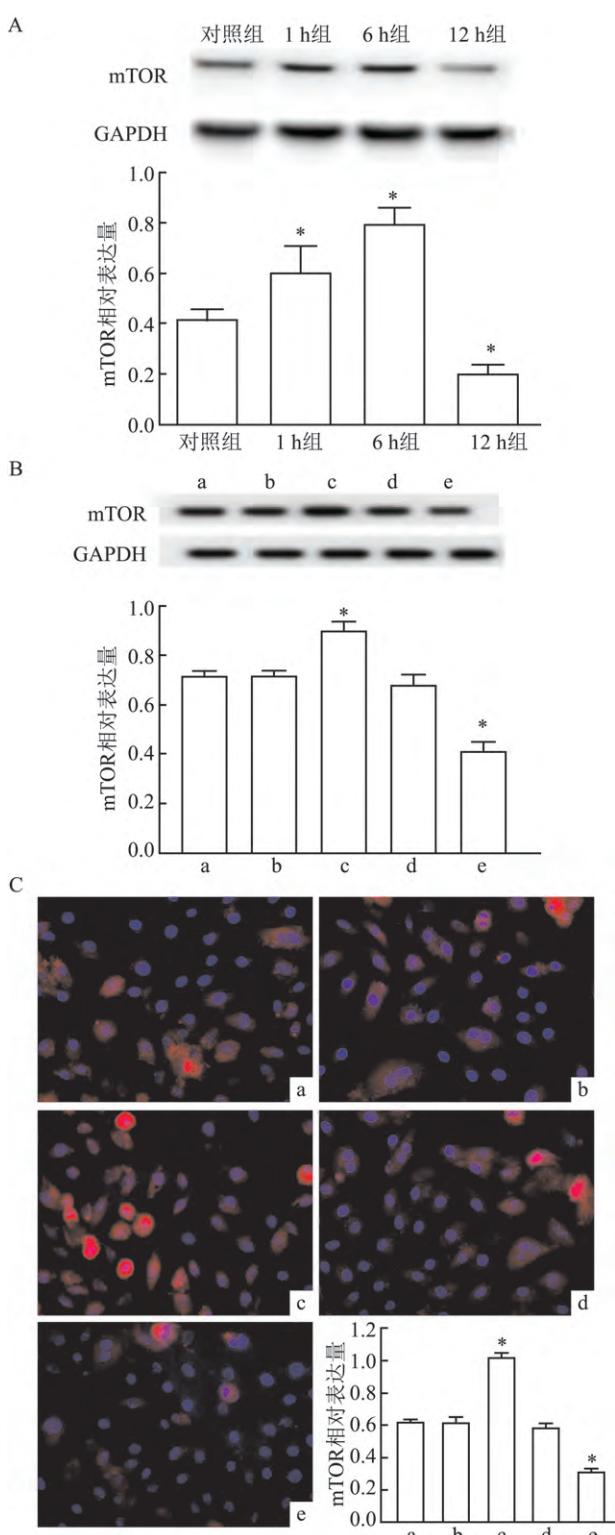


图 4 mTOR 蛋白相对表达量及免疫荧光水平

A: 低氧诱导 H9C2 心肌细胞 mTOR 蛋白表达增高; B: HDAC3 负性调控 mTOR 蛋白表达; C: HDAC3 负性调控 mTOR 荧光活性; a: H9C2 组; b: H9C2 + siRNA NC 组; c: H9C2 + siRNA 组; d: H9C2 + OE NC 组; e: H9C2 + OE 组; 与 H9C2 组比较: * P < 0.05

HDAC3 是表观遗传学调控的重要分子, 在机体

内广泛分布 和心肌细胞肥厚和凋亡以及心肌纤维化和先天性心脏病的发生发展均有密切联系。研究^[14]显示, HDAC3 参与了低氧复氧条件下肾小管上皮细胞的自噬。但是, HDAC3 在心肌细胞自噬过程的功能和机制尚不明确。本研究发现, 在低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬的过程中, HDAC3 的蛋白表达增加, 低氧 6 h 时最为显著。12 h 后 H9C2 心肌细胞出现明显的死亡现象, HDAC3 的表达有所降低。为了研究 HDAC3 调控 H9C2 心肌细胞自噬的功能, 体外分别转染 HDAC3 过表达质粒和干扰 RNA。研究发现细胞转染过表达质粒能够明显上调 H9C2 细胞中 HDAC3 蛋白表达, 而干扰 RNA 能够明显降低 HDAC3 蛋白表达。进一步研究发现, 上调 HDAC3 后 LC3B 蛋白表达增加和荧光活性增高, 而下调 HDAC3 后 LC3B 蛋白表达降低和荧光活性减少。这些结果表明在低氧情况下, HDAC3 促进了 H9C2 心肌细胞自噬。mTOR 是能够参与多种信号通路的调节分子, 在细胞凋亡和自噬过程中具有重要的作用^[15]。在 H9C2 心肌细胞自噬的过程中, mTOR 蛋白表达增加, 但 HDAC3 是否通过调控 mTOR 来实现促进心肌细胞自噬的机制并不清楚。本研究发现, 上调 HDAC3 后 mTOR 蛋白表达降低和荧光活性减少, 而下调 HDAC3 后 mTOR 蛋白表达升高和荧光活性增加, 提示了在 H9C2 心肌细胞自噬的过程中, HDAC3 负性调控 mTOR 的表达。

低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬和 HDAC3 的表达具有时间特异性。HDAC3 负性调节 mTOR 蛋白, 促进了低氧诱导的 H9C2 心肌细胞自噬。本研究阐述了心肌细胞自噬的可能分子机制, 为预防心室重构和心力衰竭提供了新的思路和治疗靶点。

参考文献

- Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: A disease perspective [J]. Cell, 2019, 176(1-2): 11-42.
- Dong Y, Chen H, Gao J, et al. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease [J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 136: 27-41.
- Yang J, He J, Ismail M, et al. HDAC inhibition induces autophagy and mitochondrial biogenesis to maintain mitochondrial homeostasis during cardiac ischemia/reperfusion injury [J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 130: 36-48.
- van der Harst P, de Windt L J, Chambers J C. Translational perspective on epigenetics in cardiovascular disease [J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70: 590-606.
- Quäschling T, Friedrich D, Deepe G S Jr, et al. Crosstalk between autophagy and hypoxia-inducible factor-1 alpha in antifungal

- immunity [J]. Cells ,2020 ,9:2150.
- [6] Sun D ,Wu R ,Zheng J ,et al. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation [J]. Cell Res ,2018 ,28:405 – 15.
- [7] Wang X ,de Carvalho Ribeiro M ,Iracheta-Vellve A ,et al. Macrophage-specific hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to impaired autophagic flux in nonalcoholic steatohepatitis [J]. Hepatology ,2019 ,69:545 – 63.
- [8] Mizushima N ,Levine B. Autophagy in human diseases [J]. N Engl J Med ,2020 ,383:1564 – 76.
- [9] 胡景春,唐虹,薛威,等. 牡荆素调节自噬与自噬流介导缺氧复氧大鼠原代心肌细胞的保护作用 [J]. 安徽医科大学学报 ,2020 ,55(8):1174 – 9.
- [10] Kaludercic N ,Maiuri M C ,Kaushik S ,et al. Comprehensive autophagy evaluation in cardiac disease models [J]. Cardiovasc Res ,2020 ,116(3):483 – 504.
- [11] Sciarretta S ,Yee D ,Nagarajan N ,et al. Trehalose-induced activation of autophagy improves cardiac remodeling after myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol ,2018 ,71:1999 – 2010.
- [12] 池瑞芳,田晶,李保,秦富忠. 心肌细胞自噬在心室重构中的作用 [J]. 中华心血管病杂志 ,2015 ,43(3):285 – 8.
- [13] Qureshi-Baig K ,Kuhn D ,Viry E ,et al. Hypoxia-induced autophagy drives colorectal cancer initiation and progression by activating the PRKC/PKC-EZR (ezrin) pathway [J]. Autophagy ,2020 ,16:1436 – 52.
- [14] 明浩,邱珍,夏中元. 组蛋白去乙酰化酶3在HK?2细胞高糖缺氧复氧损伤中的作用及机制 [J]. 武汉大学学报 ,2020 ,41(2):178 – 82.
- [15] Cosin-Roger J ,Simmen S ,Melhem H ,et al. Hypoxia ameliorates intestinal inflammation through NLRP3/mTOR downregulation and autophagy activation [J]. Nat Commun ,2017 ,8:98.

HDAC3 promotes hypoxia – induced autophagy in H9C2 cardiac cells through negatively regulating mTOR protein

Wang Yuehan¹, Huang Ying²

(¹Dept of Electrocardiographic and Cardiac Function, ²Dept of Cardiology,
The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the function and mechanism of histone deacetylase 3 (HDAC3) in modulating hypoxia-induced autophagy in H9C2 cardiac cells. **Methods** The hypoxia model of H9C2 was established *in vitro*. The expression and fluorescence activity of autophagy-related proteins LC3B-II ,Beclin-1 ,and P62 were detected by Western blot and immunofluorescence staining. After the transfection of HDAC3 plasmid or interfering RNA ,the expression and fluorescence activity of autophagy regulatory molecule mTOR and autophagy-related protein LC3B were detected. **Results** Compared with the control group ,the protein level of LC3B-II and Beclin-1 were augmented after hypoxia for 1 h ,6 h ,and 12 h in H9C2 cardiac cells($P < 0.05$) ,and the expression of p62 protein also increased first at 1 h and then decreased at 6 h ($P < 0.05$). After hypoxia for 1 h and 6 h ,the protein expression of HDAC3 and mTOR were amplified ,while both of them declined at hypoxia for 12 h ($P < 0.05$). The protein level and fluorescence activity of mTOR decreased ,but the protein level and fluorescence activity of LC3B increased after overexpression of HDAC3 ($P < 0.05$). Downregulation of HDAC3 ,the expression and fluorescence activity of mTOR enhanced ,while the protein level and fluorescence activity of LC3B reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** HDAC3 negatively regulates mTOR protein and promotes hypoxia-induced autophagy in H9C2 cardiac cells.

Key words autophagy; histone deacetylase 3; H9C2 cardiac cell