

HDAC3 在 H9C2 细胞缺血再灌注损伤中的表达及干预机制

占红英, 陶辉, 徐盛松, 曹炜, 汪裕琪, 施鹏, 石开虎

摘要 目的 探讨组蛋白去乙酰化酶 3 (HDAC3) 在大鼠 H9C2 心肌细胞缺血再灌注损伤中的表达及其部分机制研究。方法 将 H9C2 细胞分为以下 3 组: 正常对照组、缺血/再灌注 (I/R) 组、I/R + 曲古霉素 (TSA) 组。MTT 法检测细胞增殖活力; 检测培养液中乳酸脱氢酶 (LDH) 水平; Western blot 法测定细胞内 HDAC3 蛋白表达水平; 实时荧光定量 PCR 检测 HDAC3 mRNA 表达情况。结果 MTT 法检测结果显示: 与正常对照组比较, I/R 组、I/R + TSA 组抑制率均显著提高, 并且 I/R 组显著高于 I/R + TSA 组; I/R 组 LDH 活性明显高于正常对照组, I/R + TSA 组显著低于 I/R 组; Western blot 检测显示: I/R 组、I/R + TSA 组 HDAC3 的表达明显高于正常对照组, I/R + TSA 组显著低于 I/R 组; 实时荧光定量 PCR 检测 I/R 组、I/R + TSA 组 HDAC3 的 mRNA 表达明显高于正常对照组, I/R + TSA 组显著低于 I/R 组。结论 HDAC3 表达上调可能在 H9C2 细胞缺血再灌注损伤中起到重要作用。

关键词 缺血再灌注损伤; 组蛋白去乙酰化酶 3; H9C2 细胞中图分类号 R 541

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0674-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.011

心肌缺血/再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 是心肌组织在缺血一定时间的基础上又恢复灌注后, 心肌损伤较缺血时更严重, 心功能进一步恶化的现象^[1], 其临床治疗成果很难达到预期效果。表观遗传学是目前遗传学研究的热点^[2], 表观遗传修饰中组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 可调控染色质结构和基因表达, 使组蛋白去乙酰化, 与带负电荷的 DNA 紧密结合, 染色质致密卷曲, 基因的转录受到抑制。组蛋

白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitor, HDACi) 通过控制 DNA 缠绕于组蛋白的松紧程度来发挥作用。曲古霉素 (trichostatin A, TSA) 是被发现的第 1 个能抑制 HDAC 活性的化合物。近来有研究^[3] 显示组蛋白修饰及 TSA 干预调节参与多种器官如肾脏、肺脏及心脏组织纤维化形成。HDACs 是一类蛋白酶, 对染色体的结构修饰和基因表达调控发挥重要作用。该研究通过 HDAC3 在大鼠 H9C2 心肌细胞缺血再灌注损伤中的表达分析来揭示 MIRI 发生的分子机制, 为临床治疗提供新的思路和研究途径。

1 材料与方法

1.1 细胞 实验细胞: H9C2 细胞株 (SD 大鼠), 购自美国 ATCC 细胞库。

1.2 药品与试剂 DMEM 培养液和新生牛血清 (美国 Gibco BRL 公司); 一抗 HDAC3 (英国 Abcam 公司); β -actin (武汉博士德生物工程有限公司); 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒、DMSO、噻唑蓝 MTT (美国 Sigma 公司); 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); Taq 酶、Primer Script RT 逆转试剂盒、SYBR-Green I 酶 (日本 Takara 公司); HDAC3、 β -actin 引物 (上海生工生物工程股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞分组及模型建立 将 H9C2 细胞株置于正常培养箱中培养, 选择对数生长期细胞, 用胰酶细胞消化液制成细胞悬液, 后将细胞接种到 96 孔板中, 分为以下 3 组: 正常对照组、缺血/再灌注 (I/R) 组、I/R + TSA 组; 参阅相关文献^[4], 模拟心肌细胞缺血/再灌注过程, 进行以下实验。

1.3.2 MTT 法测定细胞增殖活性 根据以上分组, 每组各设 6 个复孔。将 H9C2 心肌细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板, 待细胞贴壁 3 h 后吸出培养液, 正常对照组、I/R 组、I/R + TSA 组每孔各加入 200 μ l DMEM 细胞培养液, 各组细胞经处理后

2017-02-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 81570295); 安徽省科技攻关项目 (编号: 1501041148); 安徽省高校自然科学基金项目 (编号: KJ2015A320)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院心胸外科、安徽医科大学心血管病研究中心, 合肥 230601

作者简介: 占红英, 女, 硕士研究生;

石开虎, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: aytcs@vip.163.com

继续培养。于 12、24 和 48 h 后,每孔加入 20 μ l MTT(5 g/L),继续培养 4 h,吸取培养上清液,每孔加入 200 μ l DMSO 振荡 10 min,使蓝紫色结晶充分溶解,在酶标仪上测定各孔波长 490 nm 处吸光度值。

1.3.3 LDH 检测 实验时需无细胞的培养液孔(背景空白对照孔)进行对照,余按照上述处理后,请提前配置好所有试剂,试剂或样品稀释时,均需混匀,按照试剂盒步骤加入试剂后反复吹打数次混匀,使 LDH 释放试剂与细胞充分混匀,然后继续在培养箱中孵育至预测定时间。到达预定时间后,将细胞培养板置入多孔板离心机离心后,分别取各孔的上清液 120 μ l 加入到一新的 96 孔板中用多功能微孔板检测系统检测吸光度值。

1.3.4 Western blot 法测定 HDAC3 蛋白表达水平

心肌总蛋白提取:取心肌组织匀浆、裂解、离心,即得总蛋白提取液,应用 BCA 法进行蛋白定量,变性后 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。采用 SDS-PAGE 电泳、转膜、PVDF 膜封闭,一抗工作液 HDAC3(1:500) 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。洗膜,二抗工作液 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗膜 ECL 发光法显色。以 GAPDH 作为内参照,实验重复 3 次。

1.3.5 qRT-PCR 检测 HDAC3 mRNA 表达 取心肌组织加入 1 ml TRIzol,按照操作说明提取细胞总 RNA,并测定 RNA 浓度。以 1 μ g RNA 为模板,按照逆转试剂盒操作说明合成 cDNA。取 2 μ l cDNA 在 SYBR-Green I 酶作用下进行 PCR 反应。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 退火 5 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环。引物序列如下:HDAC3 上游:5'-CCTG-GCATTGACTCATAG-3',下游:5'-ATTAAGGCTCTG-GTGAAA-3'; β -actin 上游:5'-GGAGATTACTGCCCT-GGCTCCTA-3',下游:5'-GACTCATCGTAC TCCT-GCTTGCTG-3'。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采取两样本 t 检验,多组均数比较应采用方差分析,检验水准 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 结果显示 与正常对照组相比,I/R 组细胞增殖活性明显降低($t = 4.38, P < 0.05$),I/R + TSA 组增殖活性明显低于正常对照组($t = 3.84, P <$

0.05),但高于 I/R 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 LDH 含量检测 与正常对照组(24.52 \pm 2.34)相比,I/R 组(75.13 \pm 5.22)细胞培养液 LDH 含量明显增高($t = 6.35, P < 0.05$),I/R + TSA 组明显低于 I/R 组(53.23 \pm 3.86)($t = 3.76, P < 0.05$),差异有统计学意义。见图 2。

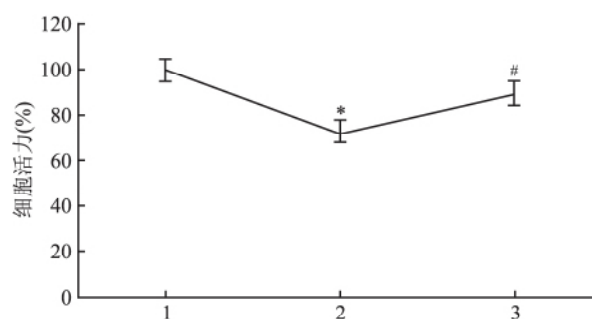


图1 MTT法检测细胞活性

1: 正常对照组; 2: I/R 组; 3: I/R + TSA 组; 与正常对照组: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$

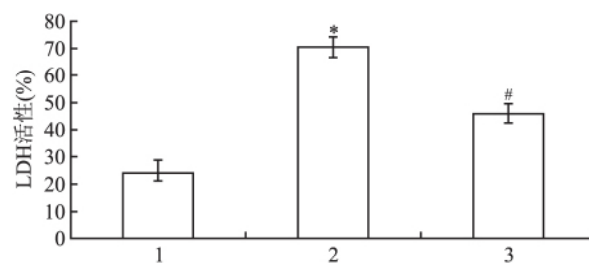


图2 细胞 LDH 活性检测

1: 正常对照组; 2: I/R 组; 3: I/R + TSA 组; 与正常对照组: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$

2.3 Western blot 检测结果 与正常对照组相比,I/R 组细胞 HDAC3 蛋白表达显著升高($t = 6.23, P < 0.05$),I/R + TSA 组明显低于 I/R 组($t = 5.06, P < 0.05$),差异有统计学意义。见图 3。

2.4 qRT-PCR 检测 HDAC3 mRNA 的表达 与正常对照组比较,I/R 组中 HDAC3 mRNA 表达明显增加($t = 10.13, P < 0.05$),而 I/R 组中 HDAC3 蛋白表达高于 I/R + TSA 组($t = 7.85, P < 0.05$),差异有统计学意义。见图 4。

3 讨论

本研究通过检测心肌细胞增殖活性、细胞外 LDH 含量证实了缺血再灌注对心肌细胞活力的影响。结果显示 I/R 组、I/R + TSA 组细胞增殖活力明

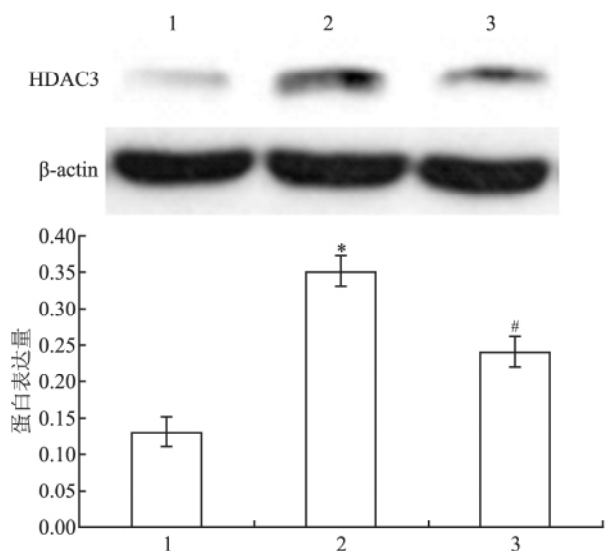


图3 Western blot 检测 HDAC3 蛋白表达

1: 正常对照组; 2: I/R 组; 3: I/R + TSA 组; 与正常对照组: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$

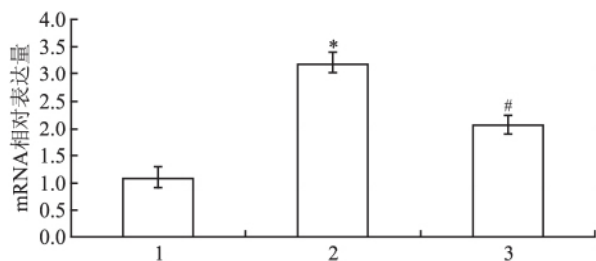


图4 qRT-PCR 检测 HDAC3 mRNA 表达

1: 正常对照组; 2: I/R 组; 3: I/R + TSA 组; 与正常对照组: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$

显低于正常对照组,但 I/R + TSA 组仍高于 I/R 组,说明抑制 HDACs 后,可以减轻缺血再灌注对心肌细胞的损伤。

HDACs 是一类蛋白酶,对染色体的结构修饰和基因表达调控发挥重要的作用,HDAC3 属于 I 类 HDACs,其在心脏疾病中广泛表达。乙酰化是最常见的翻译后修饰,蛋白的乙酰化和去乙酰化的实现是通过组蛋白乙酰转移酶和 HDACs 发挥作用^[5]。组蛋白乙酰化可将基因的表达激活,去乙酰化则在转录阻遏过程中起作用,因此,两者之间的相互动态平衡直接参与到调控基因表达的过程中,影响染色体的结构,其功能紊乱会导致各种疾病的发生。目前研究^[6]中,已经显示 18 种 HDACs 的亚型,根据细胞定位以及同源性分析等,将其分为 5 大类,其中 I 类 HDACs 存在于细胞核,包括 HDAC1、2、3 和 8,而且需要 Zn^{2+} 参与活化过程,属于经典分型的一种。

根据研究^[7]表明,在大鼠肝脏缺血再灌注模型中,可以通过调节 HDACs 改变损伤的程度,研究^[8]显示 HDAC1 和 HDAC2 在心肌细胞生长及心肌纤维化的形成过程中发挥重要的调控作用。研究^[9]表明,在转基因的大鼠模型当中,HDAC3 在心肌细胞增殖的过程中起到调控作用,不同种亚型的 HDACs 发挥不同的功能作用,HDAC3 在缺血再灌注损伤中是否发挥作用,目前鲜有报道。

本试验表明,与正常对照组比较,I/R 组、I/R + TSA 组中 HDAC3 mRNA 以及蛋白表达明显增加。从转录以及翻译水平可以看出,心肌细胞缺血再灌注损伤可能与组蛋白去乙酰化有关。初步探讨组蛋白去乙酰化可能在心肌细胞缺血再灌注损伤过程中发挥作用,但是,HDAC3 在心肌细胞缺血再灌注损伤过程中如何具体发挥作用,机制尚不明确,有待于进一步探究。

参考文献

- [1] 陈伟,王海英,徐鹏,等. Nrf2-ARE 通路在心肌缺血后处理和吡那地尔后处理中的心肌保护作用机制[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2015, 31(9): 556-60.
- [2] 周文杰,张锦前,贺轲,等. 表观遗传学药物对肝内胆管癌的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(3): 662-5.
- [3] Xie M, Hill J A. HDAC-dependent ventricular remodeling [J]. Trends Cardiovasc Med, 2013, 23(6): 229-35.
- [4] 张萍,王雄,孙姣卓. 特布他林对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(5): 491-4.
- [5] Robert C, Nagaria P K, Pawar N, et al. Histone deacetylase inhibitors decrease NHEJ both by acetylation of repair factors and trapping of PARP1 at DNA double-strand breaks in chromatin [J]. Leuk Res 2016, 45: 14-23.
- [6] Manal M, Chandrasekar M J, Gomathi Priya J, et al. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: a critical review [J]. Bioorg Chem, 2016, 67: 18-42.
- [7] Sun J, Wu Q, Sun H, et al. Inhibition of histone deacetylase by butyrate protects rat liver from ischemic reperfusion injury [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 21069-79.
- [8] Montgomery R L, Davis C A, Potthoff M J, et al. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility [J]. Genes Dev, 2007, 21(14): 1790-802.
- [9] Trivedi C M, Lu M M, Wang Q, et al. Transgenic overexpression of Hdac3 in the heart produces increased postnatal cardiac myocyte proliferation but does not induce hypertrophy [J]. J Biol Chem, 2008, 283(39): 26484-9.

网络出版时间: 2017-4-10 14:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170410.1440.012.html>

他莫昔芬与辛伐他汀 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的协同效应及机制

金伟¹ 袁媛² 汤继春¹ 彭佳³ 沈园园¹ 潘跃银¹

摘要 目的 探究他莫昔芬(TAM)与辛伐他汀(SIV)对人乳腺癌细胞株(MCF-7)的增殖抑制作用及其潜在的作用机制。方法 MTT检测TAM、SIV单独以及联合使用对MCF-7细胞株的增殖抑制作用,计算TAM与SIV单独作用时 IC_{50} 值以及联合使用时对细胞作用的联合指数(CI),评价两药之间的相互作用。荧光显微镜下观察并拍摄各组中的细胞凋亡形态学变化。流式细胞术检测TAM组、SIV组、TAM+SIV组药物处理后的MCF-7细胞凋亡情况。Western blot法检测各组细胞Bcl-2、Bax的表达情况。结果 MTT法表明,

TAM与SIV单药对MCF-7有增殖抑制作用,联合作用时抑制更为明显,且呈协同作用;荧光显微镜及流式细胞术显示TAM与SIV单药对MCF-7有诱导凋亡作用,联合时作用增强;Western blot法表明TAM+SIV组中Bcl-2表达量较细胞对照组及TAM组、SIV组下降而Bax表达量增加且更加明显。结论 TAM与SIV联合使用时可显著抑制MCF-7细胞株的增殖,同时可明显诱导MCF-7细胞株凋亡,提示两药联合使用时,乳腺癌患者可能有更好的获益。

关键词 他莫昔芬;辛伐他汀;协同;乳腺癌

中图分类号 R 737.9; R 979.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)05-0677-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.012

2017-01-13 接收

基金项目: 安徽省科技攻关项目(编号:1301042214);安徽高校省级自然科学基金重点项目(编号:KJ2012A157);安徽省卫生计生委中医药科研课题(编号:2016zy29)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院肿瘤科,合肥 230022
²合肥市滨湖医院² 中心实验室、³ 干部病房,合肥 230061

作者简介: 金伟,男,硕士研究生;
潘跃银,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: yueyinpan@gmail.com

在美国女性恶性肿瘤诊断中,乳腺癌占据比例最大,且预后不佳^[1],目前中国女性乳腺癌发病率与欧美类似,在各种恶性肿瘤中位居第一。雌激素受体与乳腺癌密切相关,有文献^[2]指出有雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达的乳腺癌患者约占乳

Role of HDAC3 in H9C2 cell ischemia-reperfusion injury and intervention mechanism

Zhan Hongying, Tao Hui, Xu Shengsong, et al

(Dept of Cardio-Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Cardiovascular Disease Research Center of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the expression and the role of histone deacetylase 3 (HDAC3) on H9C2 cell ischemia reperfusion injury. **Methods** H9C2 myocardial cells were divided into 3 groups randomly: control group, I/R group, I/R + TSA group. The cell viability was detected by MTT. Lactate dehydrogenase (LDH) level was detected in culture. The protein expression of HDAC3 was tested by Western blot. The mRNA expression of HDAC3 was examined by qRT-PCR. **Results** MTT assay showed that cell viability decreased significantly in I/R group compared with the control group, increased significantly in I/R + TSA group compared with I/R group. The content of LDH in cell activity increased significantly in I/R group compared with the control group, decreased significantly in I/R + TSA group compared with I/R group. Western blot indicated that the protein expression of HDAC3 in I/R group was higher than the control group, the expression of HDAC3 in I/R + TSA group was lower than I/R group. qRT-PCR indicated that the mRNA expression of HDAC3 in I/R group was higher than the control group, the expression of HDAC3 in I/R + TSA group was lower than that in I/R group. **Conclusion** Upregulated HDAC3 plays an important role in H9C2 cell ischemia reperfusion injury.

Key words ischemia reperfusion injury; HDAC3; myocardial cell