

靶向沉默 HDAC6 对乳鼠心房肌成纤维细胞活化增殖的作用

曹 炜, 石开虎, 陶 辉, 施 鹏, 吴 超, 宣海洋, 沙纪名, 占红英

摘要 目的 探究组蛋白去乙酰化酶(HDAC6)对乳鼠心房肌成纤维细胞活化增殖的影响作用。方法 将50只乳鼠(雄性)分别提取心房肌成纤维细胞,应用Western blot法测定HDAC6和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达情况;运用qRT-PCR技术检测HDAC6和 α -SMA mRNA的表达情况;MTT法检测心房肌成纤维细胞的细胞增殖活性;使用Lipofectamine™ 2000 Reagent向心房肌成纤维细胞中转染小干扰RNA HDAC6(siRNA-HDAC6)后观察对心房肌成纤维细胞增殖的影响。结果 转染心房肌成纤维细胞 siRNA-HDAC6组HDAC6和 α -SMA的蛋白表达明显下降;qRT-PCR技术检测siRNA-HDAC6组中HDAC6和 α -SMA的mRNA表达明显下降;转染siRNA-HDAC6明显抑制心房肌成纤维细胞的增殖活性。结论 靶向沉默HDAC6可抑制心房肌成纤维细胞活化增殖,提示其在心房纤维化中可能发挥调控作用。

关键词 心房肌成纤维细胞; HDAC6; α -SMA

中图分类号 R 541

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0356-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.011

心房肌成纤维细胞增殖和以胶原纤维为主的细胞外基质增多,继而导致心房纤维化的发生^[1]。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)在心房纤维化发生发展过程中的重要作用已成为临床研究热点问题。研究^[2]表明HDACs在心血管方面的

疾病中有着广泛表达,具有促进心肌肥大作用。而该实验研究的组蛋白去乙酰化酶6(histone deacetylase 6, HDAC6)作为II型组蛋白去乙酰化酶家族中的一员,在纤维化疾病的发生发展中发挥重要作用^[3]。然而有关HDAC6对心房肌成纤维细胞中的作用鲜有报道。该研究将通过转染siRNA-HDAC6对乳鼠心房肌细胞增殖活性的影响,探索心房纤维化发生的分子机制,为房颤心房纤维化的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级SD乳鼠(雄性)50只,1周龄,(20±5)g,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 药品与试剂 MTT相关试剂(美国Sigma公司);脂质体2000、TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);新生牛血清(杭州四季青公司);PrimeScript™ RT Master Mix(日本TaKaRa公司);HDAC6抗体(美国Abcam公司); α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、 β -actin(武汉博士德公司);二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);逆转录试剂盒、SYBR-Green试剂(立陶宛Fermentas公司);上海生工合成引物 α -SMA、HDAC6和 β -actin。

1.2 方法

1.2.1 取材 用75%乙醇溶液浸泡乳鼠15s,用眼科剪取出心脏,置于预冷PBS中。用预冷PBS(含双抗)清洗3次,去除血污。将心脏组织剪成约1mm×1mm×1mm的组织块,备用。

1.2.2 组织消化 用胶原酶(II型)和胰蛋白酶(体积比1:1)联合消化心肌组织,37℃水浴,消化

2016-12-23 接收

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

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:曹 炜,男,副主任医师,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: shikaihu@gmail.com

point($P < 0.05$), and the expression of β -catenin protein gradually decreased with the extension of the time in the two groups. Neurons expressed an increasing trend from 3 d to 14 d, while the number of neuron in the experimental group expressed better than that in the control group, and cell morphology was more regular. **Conclusion** Oscillating field stimulation can improve the expression of β -catenin protein and neurons regeneration in the injured spinal cord, which would contribute to neurological improvement after spinal cord injury.

Key words spinal cord injury; oscillating field stimulation; rat; β -catenin protein; neuron

20 min 后,吹打组织约 3 min,分散细胞,然后终止消化加入培养基,离心收集细胞;按以上步骤消化 4 次,收集细胞悬液,过滤网,置培养瓶中培养。

1.2.3 细胞培养 将细胞悬液离心 5 min,上清液弃去,加入培养基混匀后,置培养皿中,在培养箱 5% CO₂、37 °C 中培养,放置 90 min,根据差速贴壁,最先贴壁为心肌成纤维细胞,培养传代 3 代,用于后续研究。同时,使用 5 ng/ml 转化生长因子-β1 (transformins growth factor-β1, TGF-β1) 刺激处理心肌成纤维细胞 48 h,使细胞活化。

1.2.4 瞬时转染 siRNA-HDAC6 取对数生长的细胞,转染前 1 d,将各组的细胞计数后,接种 24 孔板,用无血清不含抗生素的 DMEM 培养液稀释待转染。siRNA-HDAC6 的引物序列:将 siRNA-HDAC6 及其阴性序列分别与脂质体 2 000 混匀,静置 20 min,室温,加入相应各孔细胞中,37 °C、5% CO₂ 保温箱孵育 4~6 h,更换培养基,加入 TGF-β1 刺激细胞生长,分为 TGF-β1 组与对照组,48 h 后提取转染后细胞的总 RNA 和蛋白。

1.2.5 qRT-PCR 检测 HDAC6、α-SMA mRNA 表达

提取细胞总 RNA,用紫外分光光度计鉴定 RNA 浓度和纯度, A_{260 nm}/A_{280 nm} 比值在 1.8~2.0。以 2 μg 总 RNA 为模板,合成 cDNA。取 2 μl cDNA 在荧光试剂作用下,用 ABI 仪器进行 PCR 扩增,以 β-actin 作为内参照。HDAC6 上游引物序列: 5'-GGGCGTCAGTGGCTCACTCC; 下游引物序列: 5'-TCTGGGCGCTTGCACAAGGT-3', β-actin 上游引物序列: 5'-TGAGCTGCGTGTGGCCCTGAG-3'; 下游引物序列: 5'-GGGCATCGGAACCGCTCATTG-3', α-SMA 上游引物序列: 5'-TGGCCACTGCTGCTTCCTCTTCTT-3'; 下游引物序列: 5'-GGGGCCAGCTTCGTCATACTCTCT-3'。

1.2.6 HDAC6、α-SMA 蛋白表达检测 提取细胞总蛋白,蛋白分离用 SDS-PAGE 系统。经过转膜、封闭、洗膜,孵育一抗(1:300),4 °C 摇床过夜。二抗(1:5 000)孵育,洗膜,ECL 发光法显影。结果采用 Image J 软件分析,以 β-actin 作为内参,结果重复 3 次。

1.2.7 MTT 法检测细胞增殖情况 将对数生长期细胞用胰酶消化后,细胞重悬并计数。铺于 96 孔板中,每孔 100 μl,设 5 个复孔,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。培养终止前 4 h,每孔加入 MTT 试剂 10 μl(5 g/L),弃培养液,最后加入 DMSO 100 μl 终止反应,震荡 6 min 充分溶解结晶,使用酶标仪测定

490 nm 处 A 值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采取两样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HDAC6、α-SMA mRNA 在 TGF-β1 诱导心房肌成纤维细胞活化中的表达 使用 5 ng/ml TGF-β1 处理 48 h 以后,qRT-PCR 检测结果显示,TGF-β1 组 HDAC6 mRNA 表达明显高于对照组(*t* = 5.83, *P* < 0.05),同时 α-SMA mRNA 表达明显高于对照组(*t* = 7.08, *P* < 0.05)。见图 1。

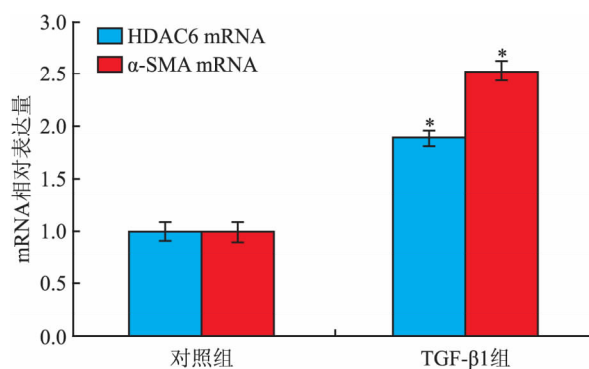


图 1 qRT-PCR 检测 HDAC6 和 α-SMA mRNA 的表达情况
与对照组比较: * *P* < 0.05

2.2 HDAC6、α-SMA 蛋白在 TGF-β1 诱导心房肌成纤维细胞活化中的表达 TGF-β1 处理 48 h 以后,Western blot 检测结果显示,TGF-β1 组 HDAC6 蛋白表达明显高于对照组(*t* = 7.59, *P* < 0.05),同时 α-SMA 蛋白表达明显高于对照组(*t* = 8.12, *P* < 0.05)。见图 2。

2.3 瞬时转染心房肌成纤维细胞 siRNA-HDAC6 对 HDAC6、α-SMA mRNA 表达的影响 瞬时转染 siRNA-HDAC6 48 h 后,qRT-PCR 检测结果显示,siRNA-HDAC6 组 HDAC6 mRNA 表达明显低于阴性对照组(无特殊设计的小 RNA 片段)(*t* = 4.43, *P* < 0.05),α-SMA mRNA 表达明显低于阴性对照组(*t* = 4.12, *P* < 0.05)。见图 3。

2.4 瞬时转染心房肌成纤维细胞 siRNA-HDAC6 对 HDAC6、α-SMA 蛋白表达的影响 瞬时转染 siRNA-HDAC6 48 h 后,Western blot 检测结果显示,siRNA-HDAC6 组 HDAC6 蛋白表达明显低于阴性对照组(*t* = 6.71, *P* < 0.05),α-SMA 蛋白表达明显低于阴性对照组(*t* = 6.02, *P* < 0.05)。见图 4。

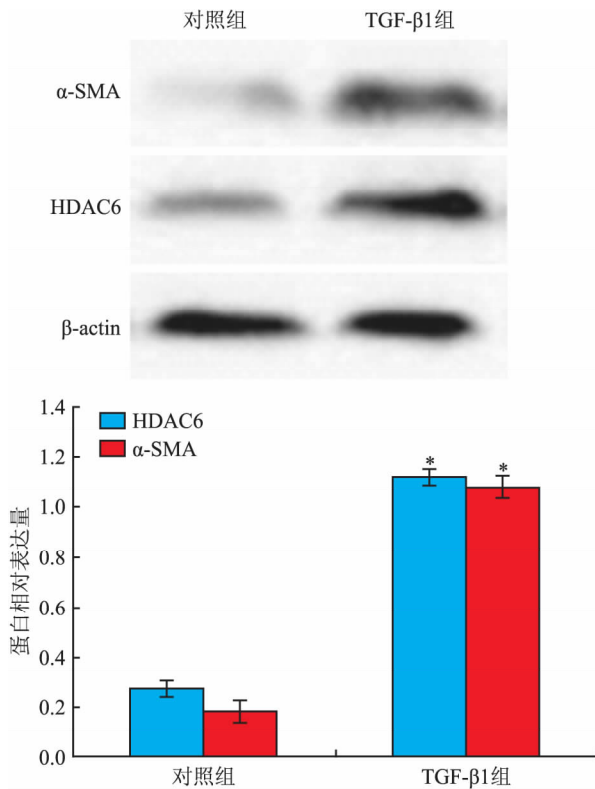


图2 Western blot 检测 HDAC6 和 α -SMA 蛋白的表达情况
与对照组比较: * $P < 0.05$

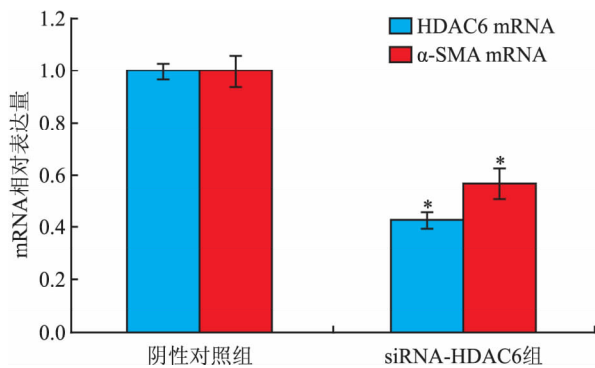


图3 qRT-PCR 检测 HDAC6 和 α -SMA mRNA 的表达变化
与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 瞬时转染 siRNA-HDAC6 对心房肌成纤维细胞活性的影响 MTT 法实验结果表明,瞬时转染 siRNA-HDAC6 处理后的细胞增殖活性, siRNA-HDAC6 组 24 h ($t = 3.72, P < 0.05$)、48 h ($t = 4.57, P < 0.05$) 细胞活性明显低于阴性对照组。见图 5。

3 讨论

房颤心房纤维化是由于细胞外的基质过度沉积的异常病理过程,是各种复杂的心血管疾病发生发

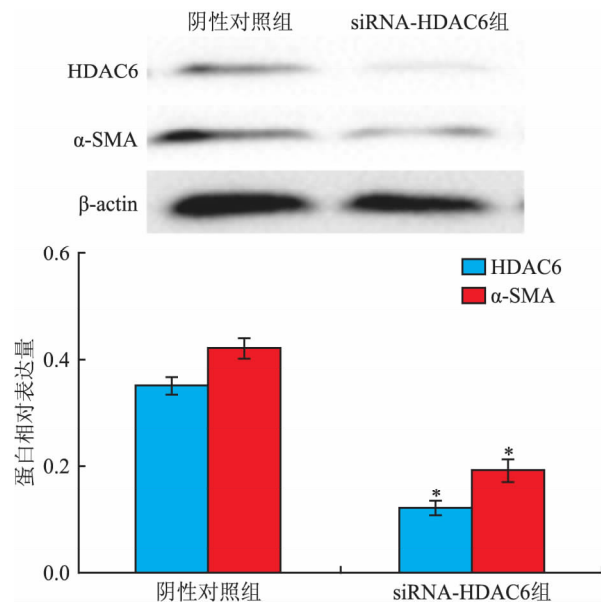


图4 Western blot 检测 HDAC6 和 α -SMA 蛋白的表达变化
与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

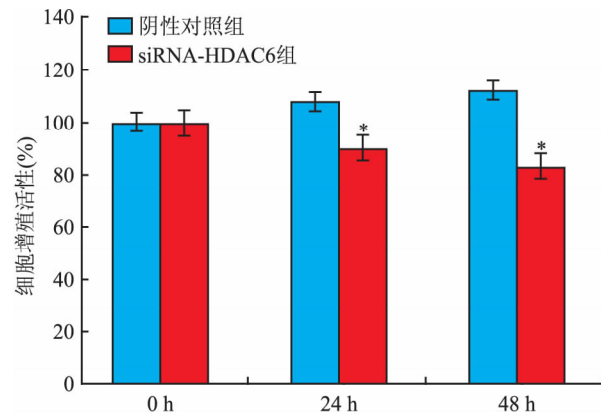


图5 MTT 法检测转染心房肌成纤维细胞
0、24、48 h 后细胞增殖活性变化
与同一时间阴性对照组比较: * $P < 0.05$

展的共同病理过程^[4]。心房肌成纤维细胞的活化增殖是心肌纤维化发生发展及心室重构的中心事件。研究^[5]显示 α -SMA 蛋白表达在心房肌成纤维细胞活化过程中改变最为显著。因此,用 α -SMA 作为评估心房肌成纤维细胞活化程度的一个重要指标。

乙酰化是翻译后修饰的一种表观遗传学修饰方式,通过组蛋白乙酰转移酶和组蛋白去乙酰化酶发挥作用。组蛋白乙酰化可激活基因促进表达,组蛋白去乙酰化则反之。因此,两者之间的相互动态平衡参与调控基因表达及疾病的发生发展。组蛋白 HDAC6 在 18 种 HDAC 家族成员中,HDAC6 具有两

个功能性去乙酰化结构域和一个锌指基序,这两个是 HDAC6 发挥生物学活性所必需的功能性的催化结构域^[6]。文献^[7]报道,下调 HDAC6 能抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖活性,并诱导细胞 G0/G1 期阻滞。鉴于不同亚型的 HDACs 发挥不同的功能,那么 HDAC6 在心房肌成纤维细胞活化过程中是否也发挥类似作用。

本实验通过转染 HDAC6 小干扰 RNA 处理体外培养的心房肌成纤维细胞,靶向沉默 HDAC6 的表达,分别检测处理过后细胞的活性改变以及 HDAC6、 α -SMA 的表达水平。结果显示 HDAC6 表达下降可明显抑制心房肌成纤维细胞增殖活性,降低了 α -SMA 的表达水平。

综上所述,靶向沉默 HDAC6 能够发挥抑制心房肌成纤维细胞增殖的作用,表明 HDAC6 可以作为抑制心房肌成纤维细胞的调节因子。因此,有目的的对 HDAC6 进行表达干预能够对房颤心房纤维化的发生发展起到干预作用。

参考文献

[1] Begg G A, Holden A V, Lip G Y, et al. Assessment of atrial fibro-

sis for the rhythm control of atrial fibrillation [J]. Int J Cardiol, 2016, 220: 155 - 61.

[2] Seki M, LaCanna R, Powers J C, et al. Class I histone deacetylase inhibition for the treatment of sustained atrial fibrillation [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2016, 358(3): 441 - 9.

[3] Choi S Y, Ryu Y, Kee H J, et al. Tubastatin A suppresses renal fibrosis via regulation of epigenetic histone modification and Smad3-dependent fibrotic genes [J]. Vascul Pharmacol, 2015, 72: 130 - 40.

[4] Yang P S, Lee S H, Park J, et al. Atrial tissue expression of receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and atrial fibrosis in patients with mitral valve disease [J]. Int J Cardiol, 2016, 220: 1 - 6.

[5] Shin S Y, Jo W M, Min T J, et al. Gap junction remodelling by chronic pressure overload is related to the increased susceptibility to atrial fibrillation in rat heart [J]. Europace, 2015, 17(4): 655 - 63.

[6] Hai Y, Christianson D W. Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition [J]. Nat Chem Biol, 2016, 12(9): 741 - 7.

[7] Asthana J, Kapoor S, Mohan R, et al. Inhibition of HDAC6 deacetylase activity increases its binding with microtubules and suppresses microtubule dynamic instability in MCF-7 cells [J]. J Biol Chem, 2013, 288(31): 22516 - 26.

The effect of HDAC6 silencing on proliferation in neonatal rat atrial fibroblasts

Cao Wei, Shi Kaihu, Tao Hui, et al

(Dept of Cardio-Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University,

Dept of Cardiovascular Disease Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore influence of histone deacetylase 6 (HDAC6) on neonatal rat atrial fibroblasts activation and proliferation. **Methods** Atrial fibroblasts were treated with transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) for 48 hours. qRT-PCR was applied to assess the expression of HDAC6 and α -smooth muscle actin (α -SMA) mRNA levels. The protein expression levels of HDAC6 and α -SMA were detected by Western blot. MTT assay was used to determine the proliferation of atrial fibroblasts. LipofectamineTM 2000 Reagent was used to transfected atrial fibroblasts with siRNA-HDAC6. **Results** After cardiac fibroblasts transfected with siRNA-HDAC6, HDAC6 expression was declined and α -SMA expression was decreased. The atrial fibroblasts treated with TGF- β 1 that HDAC6 expression was increased and α -SMA expression was increased. The activity of cardiac fibroblasts was decreased after transfected with siRNA-HDAC6. **Conclusion** HDAC6 can suppress proliferative activity of atrial fibroblasts markedly and could be a new therapeutic target of preventing atrial remodeling. The application of its regulator will provide the new idea and method for the prevention and cure of atrial fibrosis.

Key words atrial fibroblasts; histone deacetylase 6; α -smooth muscle actin