

HDAC8 在异丙肾上腺素诱导大鼠心肌纤维化中的作用

支敏^{1,2}, 陶辉^{1,2}, 陈泽文², 汪裕琪¹, 宣海洋¹, 占红英¹, 石开虎^{1,2}

摘要 目的 初步探讨组蛋白去乙酰化酶(HDAC8)在盐酸异丙肾上腺素(ISO)诱导的大鼠心肌纤维化中表达的机制。方法 将40只雄性SD大鼠随机均分为正常组和模型组。模型组给予ISO 1次/d(5 mg/kg),正常组予以等剂量生理盐水皮下注射,连续注射7 d后处死大鼠取血液标本,并取心肌组织。测定心脏质量指数;ELISA法检测血清中I型胶原和III型胶原的含量;HE和Masson染色法观察心肌纤维化程度;Western blot法测定HDAC8和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)蛋白表达情况;qRT-PCR法检测HDAC8 mRNA的表达。结果 与正常组比较,模型组心脏质量指数明显增加($P < 0.05$);HE和Masson染色显示模型组心肌组织出现明显的胶原纤维增生;模型组血清标本中I型胶原和III型胶原的含量较正常组明显增加($P < 0.05$);Western blot法检测显示模型组HDAC8、 α -SMA的蛋白表达明显高于正常组($P < 0.05$, $P < 0.01$);qRT-PCR检测模型组HDAC8 mRNA表达明显高于正常组($P < 0.05$)。结论 HDAC8在心肌纤维化中高表达,而在正常心肌组织中低表达,提示其在心肌纤维化的发生发展中可能发挥作用。

关键词 心肌纤维化; HDAC8; α -SMA

中图分类号 R 542

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0950-04

心肌纤维化是由各种损伤因素导致异常胶原纤维沉积于心肌细胞间质的病理过程^[1]。同时心肌纤维化也是心房颤动(atrial fibrillation, AF)的病理学基础,严重影响人类生命健康。AF是临床上最常见的心律失常之一,AF本身及其所引起的并发症(如心衰、血栓栓塞等)常给患者带来严重后果^[2]。但其发病机制目前仍不清楚。报道^[3]显示,组蛋白的修饰调节参与多种器官(如肾脏、肺脏及心脏组织)纤维化的形成。研究^[4]显示I类组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)在心血管疾病中广

泛表达,具有促心肌肥大作用。作为I类HDACs中的一员,HDAC8由于缺少保守的C-端结构域且主要在细胞质表达而被视为I类HDACs中一个特殊的亚型^[5]。而关于HDAC8在心肌纤维化中的作用鲜有报道。该研究将通过对心肌纤维化和HDAC8相关性分析来揭示心肌纤维化发生的分子生物学机制,为AF的防治提供新思路和研究途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠40只,8周龄,体重(200 ± 20)g,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 药品与试剂 盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)购自上海禾丰制药有限公司(批号:H31021344);大鼠I型、III型胶原ELISA试剂盒均购自北京北方生物技术研究所;一抗HDAC8购自美国Abcam公司; α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA), β -actin购自武汉博士德生物工程技术有限公司;二抗辣根酶标记山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;TRIzol Reagent购自美国Invitrogen公司;RT-PCR试剂盒、SYBR-Green qPCR Master Mix购自立陶宛MBI Fermentas公司;HDAC8、 α -SMA、 β -actin引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 将40只SD大鼠随机分为正常组和模型组各20只。自处理之日起,模型组大鼠背部皮下注射ISO溶液(5 mg/kg),1次/d,连续7 d,制备心肌纤维化大鼠模型;正常组大鼠背部皮下注射与模型组相同剂量的生理盐水。

1.2.2 标本采集及处理 两组大鼠常规饲养7 d后处死。留取血清待测,开胸取心脏组织快速进行心脏质量指数的测定后置于10%甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋后,沿切面连续切片5张,每张厚5 μ m,用HE染色和Masson染色观察,剩余心脏组织装入冻存管置于-80℃冰箱保存。

1.2.3 心脏质量指数的测定 末次给药后禁食不禁饮24 h,大鼠称体重(body weight, BW)后10%水

2015-04-14 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1308085MH117, 1408085MH175);安徽省高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2011A175, KJ2012Z164)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院心胸外科,²安徽医科大学心血管病研究中心,合肥 230601

作者简介:支敏,男,硕士研究生;

石开虎,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: shikaihu@gmail.com

合氯醛(0.3 ml/kg)腹腔注射麻醉后,开胸取出心脏,去除大血管、心外膜脂肪组织,先以20 ml生理盐水清洗,吸干后称全心重(heart weight, HW)和左心室重量(left ventricular weight, LVW),计算左心室重量指数(左心室重量/体重, LVW/BW)和心重指数(全心重/体重, HW/BW)。

1.2.4 病理学及胶原容积分数计算 心肌组织切片经烤片后在二甲苯中脱蜡5~10 min,换新鲜的二甲苯,再脱蜡5~10 min。经梯度乙醇溶液脱水后,流水冲洗。苏木精染色5 min左右,流水冲去多余的染色液;1%盐酸酒精迅速分化;流水稍洗;加入蓝液0.5%淡氨水返蓝数秒;流水冲洗数分钟,依次行HE染色和Masson染色。中性树脂胶封片,光镜下观察、摄片。每张Masson染色切片选取3个无血管视野($\times 400$)采用Image Proplus 6.0图像扫描软件进行图像分析,计算心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)。CVF(%) = 胶原面积/全视野面积 $\times 100\%$ 。

1.2.5 血清中I型及III型胶原含量的检测 大鼠取血后,分离血清;测定血清中I型和III型胶原的含量,具体步骤按照试剂盒操作说明书进行。

1.2.6 Western blot 法检测 HDAC8、 α -SMA 蛋白表达 心肌总蛋白提取:取0.1 g心肌组织块经匀浆后,移入Eppendorf管中,加入RIPA裂解液1 ml,冰上裂解30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心40 min,留取上清液即得总蛋白提取液,应用BCA法进行蛋白定量,变性后置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。蛋白电泳:采用12%分离胶及5%浓缩胶的SDS-PAGE系统。转膜:200 mA恒流电转印1 h。洗膜后放入含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h,摇床,洗膜,孵育一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。洗膜,孵育二抗,室温孵育1 h,洗膜,ECL发光法显影。成像结果采用Image J软件分析,以 β -actin作为内参,结果重复3次。

1.2.7 qRT-PCR 法检测 HDAC8、 α -SMA mRNA 表达 采用TRIzol提取心肌细胞总RNA,用紫外分光光度计测定RNA浓度和纯度,以吸光度(absorbance, A)值为计量,根据RNA的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 均在1.8~2.0,鉴定RNA的纯度。以2 μg 总RNA为模板,严格按照RT-PCR试剂盒操作说明合成cDNA。取2 μl cDNA在SYBR-Green qPCR Master Mix作用下,用ABI StepOne进行qRT-PCR扩增,以 β -actin作为内参。引物序列见表1。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采取两样本 t 检验。

表1 HDAC8、 α -SMA 和 β -actin 的引物序列

基因	序列(5'-3')
β -actin	F: ACCACAGCTGAGAGGAAATCG
	R: AGAGGTCTTTACGGATGCAACG
α -SMA	F: CGAAGCCGACAGCAAGAG
	R: CATGTCGTCCCAGTTGCTGAT
HDAC8	F: ACCAGTGGGAATTGGCAACTG
	R: AGCCGTGTTGGCAAGTTGTA

2 结果

2.1 心脏 LVW/BW 和 HW/BW 参数测定 ISO所致的心肌纤维化对大鼠心脏质量指数的影响,与正常组比较,模型组左心室重量指数和心重指数明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 模型组和正常组之间的心脏质量指数以及血清中I型胶原和III型胶原含量的比较($n = 20, \bar{x} \pm s$)

项目	模型组	正常组	t 值	P 值
LVW/BW(mg/g)	3.10 \pm 0.40	2.00 \pm 0.60	1.752	<0.05
HW/BW(mg/g)	5.20 \pm 0.60	3.40 \pm 0.50	1.824	<0.05
I型胶原($\mu\text{g/L}$)	5.81 \pm 0.96	3.53 \pm 0.63	1.865	<0.05
III型胶原($\mu\text{g/L}$)	4.23 \pm 0.52	1.84 \pm 0.78	1.923	<0.05

2.2 ISO所致的大鼠心肌纤维化血清中I型胶原和III型胶原的含量影响 模型组血清中I型胶原和III型胶原的含量明显高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.3 HE染色和Masson染色及心肌CVF HE染色及Masson染色显示,正常组心肌细胞形状基本一致,排列整齐,细胞核间距规整,无纤维化;模型组心肌组织间质成分增多且不规则,细胞核间距增宽,见较多纤维组织。模型组大鼠心肌组织CVF明显高于正常组($t = 2.019, P < 0.05$)。见图1、2。

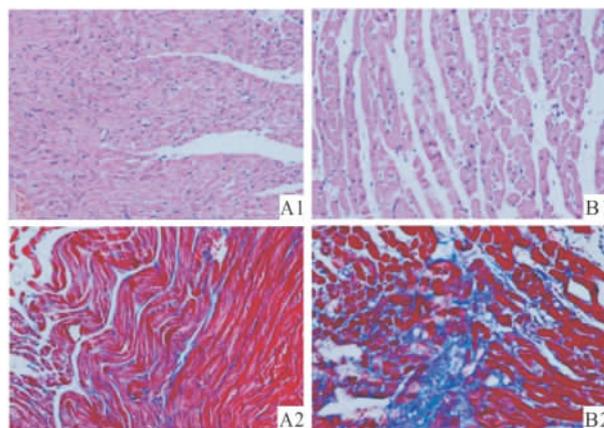


图1 正常组与模型组大鼠心肌HE染色及Masson染色 $\times 400$
A: 正常组; B: 模型组; 1: HE染色; 2: Masson染色

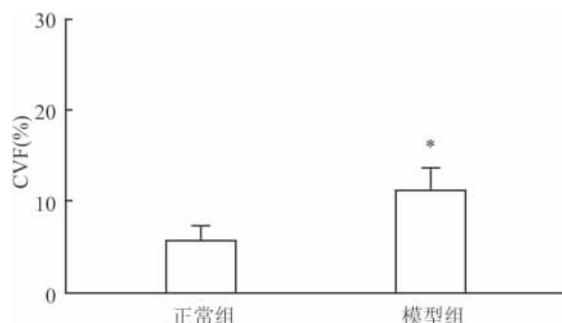


图2 正常组与模型组大鼠心肌 CVF 含量的比较
与正常组比较: * $P < 0.05$

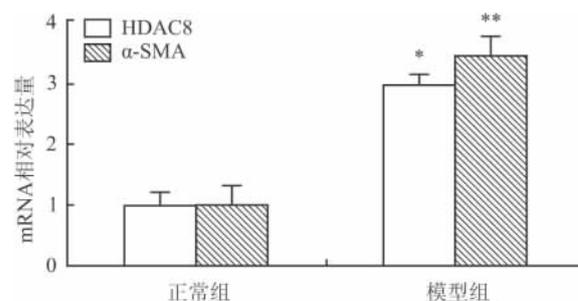


图4 qRT-PCR 法检测心肌纤维化组织中 HDAC8 和 α -SMA mRNA 表达
与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 Western blot 法检测 HDAC8、 α -SMA 蛋白表达 与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 HDAC8 含量显著升高,同时 α -SMA 含量显著升高(图3)。

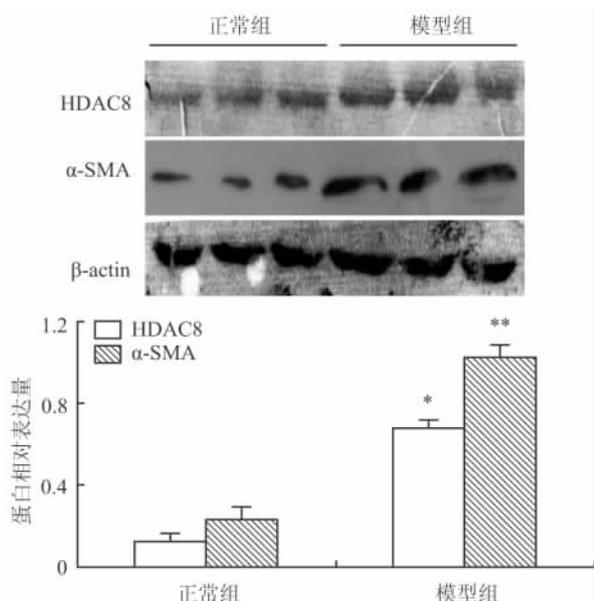


图3 Western blot 法检测心肌纤维化组织中 HDAC8 和 α -SMA 蛋白表达
与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 qRT-PCR 法检测 HDAC8 mRNA 的表达 采用相对定量法对心肌细胞内 HDAC8 基因相对于 β -actin 内参基因的表达变化。与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 HDAC8 mRNA 含量显著升高,同时 α -SMA mRNA 显著升高(图4)。

3 讨论

α -SMA 在心肌成纤维细胞活化过程中功用最为显著^[6],可将 α -SMA 作为评估心肌纤维化严重程度的指标。本实验通过皮下注射 ISO 制备心肌纤维化动物模型,结果显示模型组血清中 I 型胶原和 III

型胶原的含量明显高于正常组。HE 染色及 Masson 染色显示,模型组心肌组织间质呈现纤维化改变。说明大鼠心肌纤维化动物模型制备是成功的,实验结果证明模型组的表型与文献^[7]相一致。该法简单、经济、可靠。

组蛋白乙酰化修饰是表观遗传重要修饰方式之一,包括组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase, HAT)和 HDAC 两种酶,其动态平衡调控着染色质的结构及基因表达,HAT 使组蛋白乙酰化,促使 DNA 与组蛋白八聚体分离,激活基因的表达;而 HDAC 使组蛋白去乙酰化,与带负电荷的 DNA 紧密结合,基因的转录受到抑制^[8-9]。HDACs 是一类蛋白酶,并作为衔接因子直接影响染色质的结构和转录因子的活性,调节转录过程^[10]。目前,哺乳类动物 HDAC 共发现 18 种,根据不同 HDACs 的结构同源性分析,可将 HDACs 分为 4 类;其中 I 类 HDACs 与酵母 Rpd3 基因具有同源性,包括 HDAC1、2、3 和 8;研究^[11]显示 I 类 HDACs 能够通过成纤维细胞和循环纤维细胞调控心肌纤维化的发生发展。研究^[4]显示 HDAC1 和 HDAC2 在心肌细胞生长及心肌纤维化的形成中发挥重要调控作用。研究^[12]表明在转基因大鼠模型中,HDAC3 能够参与调控心肌细胞的增殖。不同亚型的 HDACs 可能发挥不同的功能,HDAC8 在大鼠心肌纤维化中是否也发挥作用,鲜有报道。

本研究表明,与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 HDAC8、 α -SMA HDAC8 mRNA、 α -SMA mRNA 含量显著升高。从转录和翻译水平说明心肌纤维化的发生与发展可能与组蛋白乙酰化有关。但单一的生物分子可能被多种表观遗传修饰所调控,同时一种修饰方式的发生也将影响另一种修饰的作用。由于缺乏针对单一亚型特定的 HDAC 抑制剂,无法特定抑制 HDAC8,这也是本实验的不足之处。初步探讨

组蛋白去乙酰化可能在调控心肌纤维化的形成过程中发挥作用,HDAC8 究竟在心肌纤维化形成过程中如何起作用,尚不明确,课题组将通过小干扰 RNA 技术靶向沉默 HDAC8,及其如何影响纤维化相关的信号转导过程进一步研究。

参考文献

- [1] Elnakish M T, Kuppasamy P, Khan M. Stem cell transplantation as a therapy for cardiac fibrosis [J]. *J Pathol*, 2013, 229(2): 347-54.
- [2] Camm A J, Savelieva I. "R" for "renal" and for "risk": refining risk stratification for stroke in atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 2013, 127(2): 169-71.
- [3] Xie M, Hill J A. HDAC-dependent ventricular remodeling [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2013, 23(6): 229-35.
- [4] 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.
- [5] Waltregny D, De Leval L, Glenisson W, et al. Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(2): 553-64.
- [6] Tao H, Shi K H, Yang J J, et al. Histone deacetylases in cardiac fibrosis: current perspectives for therapy [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(3): 521-7.
- [7] Borges J C, Silva J A, Gomes M A, et al. Tonin in rat heart with experimental hypertrophy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284(6): H2263-8.
- [8] Pang M, Zhuang S. Histone deacetylase: a potential therapeutic target for fibrotic disorders [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 335(2): 266-72.
- [9] Icardi L, De Bosscher K, Tavernier J. The HAT/HDAC interplay: multilevel control of STAT signaling [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2012, 23(6): 283-91.
- [10] McGee-Lawrence M E, Westendorf J J. Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance [J]. *Gene*, 2011, 474(1-2): 1-11.
- [11] Williams S M, Golden-Mason L, Ferguson B S, et al. Class I HDACs regulate angiotensin II-dependent cardiac fibrosis *via* fibroblasts and circulating fibrocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 67: 112-25.
- [12] 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.

The role of HDAC 8 in isoprenaline-induced myocardial fibrosis of rat

Zhi Min^{1,2}, Tao Hui^{1,2}, Chen Zewen², et al

(¹Dept of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, ²Cardiovascular Disease Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To preliminarily study the expression and the role of histone deacetylase 8 (HDAC8) of isoprenaline induced myocardial fibrosis in rats. **Methods** The 40 male SD rats were randomly divided into normal group and the experimental model group. The model group was treated subcutaneously with 5 mg/kg isoprenaline daily for 7 d; the normal group was given the same amount of normal saline at the same time. Rats were executed to obtain blood samples and myocardial tissue after 7 d. And HW/BW, LVW/BW were tested. ELISA was used to detect the content of type I collagen and type III collagen in serum. The degree of myocardial fibrosis was observed with HE and Masson staining method. The expressions of HDAC8 and α -SMA were tested by Western blot. The mRNA expressions of α -SMA and HDAC8 were examined by qRT-PCR. **Results** HW/BW and LVW/BW increased significantly in the model group compared with the normal group ($P < 0.05$). The content of type I collagen and type III collagen in serum increased significantly in the model group compared with the normal group ($P < 0.05$). HE and Masson staining showed myocardial tissue in the model group appeared obviously collagen fiber hyperplasia. The expressions of HDAC8 and α -SMA in the model group were higher than the normal group ($P < 0.05$). qRT-PCR detection of mRNA expression of HDAC8 model group was significantly higher than the normal group ($P < 0.05$). **Conclusion** The HDAC8 is highly expressed in myocardial fibrosis but lowly expressed in normal myocardium suggesting that it may play a role in the development of myocardial fibrosis.

Key words myocardial fibrosis; HDAC8; α -SMA