

心肌细胞肥大过程中组蛋白脱乙酰基酶 2 的表达

陆莹¹, 杨爽²

(哈尔滨医科大学附属第二医院 1 急诊科, 2 心血管内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086)

[关键词] 组蛋白脱乙酰基酶 2 血管紧张素 Ⅱ 心肌细胞肥大

[摘要] 目的 研究血管紧张素 Ⅱ致心肌细胞肥大过程中组蛋白脱乙酰基酶 2 的表达。方法 培养原代心肌细胞, 给予不同浓度的血管紧张素 Ⅱ刺激心肌细胞造成肥大, 取心肌细胞进行逆转录聚合酶链反应观察组蛋白脱乙酰基酶 2 和 β -肌球蛋白重链 mRNA 表达, 免疫组织化学法检测组蛋白脱乙酰基酶 2 和 c-fos 蛋白表达, 相差显微镜观察细胞面积变化。结果 经血管紧张素 Ⅱ刺激后在相差显微镜下可见心肌细胞面积变大, 而且随着血管紧张素 Ⅱ浓度的增加而增大。组蛋白脱乙酰基酶 2 和 β -肌球蛋白重链 mRNA 水平及组蛋白脱乙酰基酶 2 和 c-fos 蛋白表达随着血管紧张素 Ⅱ浓度的增加而增加。结论 血管紧张素 Ⅱ致心肌细胞肥大过程中伴有组蛋白脱乙酰基酶 2 表达增加, 后者有可能参与心肌细胞的肥大机制。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Expression of Histone Deacetylase 2 in Hypertrophic Cardiocytes

LU Ying and YANG Shuang

(1 Department of Emergency, 2 Department of Cardiovascular, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086 China)

[KEY WORDS] Histone Deacetylase 2 Angiotensin Ⅱ Hypertrophic Cardiocytes

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of histone deacetylase 2 (HDAC 2) in hypertrophic cardiocytes induced by angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ). **Methods** The cultured cardiocytes were treated with Ang Ⅱ of different concentrations to induce hypertrophy. The mRNA levels of HDAC 2 and β -myosin heavy chain (β -MHC) were examined by reverse transcription-polymerase chain reaction. The protein expressions of HDAC 2 and c-fos were examined by immunohistochemistry method. The morphologic changes of cardiocytes were observed under the contrast phase microscope. **Results** Myocytes were cultured successfully. After stimulated by Ang Ⅱ the myocytes were enlarged under the contrast phase microscope. With the increasing of Ang Ⅱ concentrations (2×10^{-6} mol/L, 2×10^{-7} mol/L and 2×10^{-8} mol/L), the mRNA levels of HDAC 2 and β -MHC increased. The immunohistochemistry results showed that the protein expressions of HDAC 2 and c-fos also increased in the hypertrophic cardiocytes. The areas of the myocytes increased with different Ang Ⅱ ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of HDAC 2 increased in hypertrophic cardiocytes stimulated by Ang Ⅱ. HDAC 2 may play a role in cardiocyte hypertrophy.

目前对于心肌细胞肥大的机制尚未研究清楚, 但有许多学者观察到组蛋白脱乙酰基酶 (histone deacetylase, HDAC) 在心肌细胞肥大的过程中发挥着一定的作用^[1]。哺乳动物的 HDAC 分为三类, HDAC2 属于第 IV 类 HDAC, 其结构与酵母 RPD3 蛋白相似。本研究利用不同浓度血管紧张素 Ⅱ (angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ) 刺激造成心肌细胞肥大, 观察这一过程中 HDAC 2 的表达, 以期对心肌细胞肥大的机制进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 心肌细胞培养

选取生后 2~3 天 Wistar 仔鼠 (哈尔滨医科大学实验动物中心提供), 取出心脏后, 放入一加入无血清 DMEM 培养液的平皿中。沿心脏长轴剪成 4~5 块, 2.5 g/L 胰酶反复消化、吸取上清, 将收集的上清液用 2000 r/min 离心 10 min, 弃去上清后加入含 10% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司) 的 DMEM (美国 Hyclone) 高糖培养液, 将细胞重悬, 细胞计数。分别按细胞数 10^9 /L 或 10^{10} /L 将细胞接种于培养板或培养瓶中。将心肌细胞分为四组: 对照组、低浓度组、中浓度组和高浓度组。96 h 后换无血清培养液。对照组加入等量培养液, 后三组分别加入 10^{-4} mol/L、 10^{-5} mol/L 及 10^{-6} mol/L Ang Ⅱ, 其终浓度分别为 2×10^{-6} mol/L、 2×10^{-7}

[收稿日期] 2008-11-11 [修回日期] 2009-03-02

[基金项目] 黑龙江省卫生厅课题 (2005-295)

[作者简介] 陆莹, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心肌病发病机制的研究, E-mail 为 lyholy@163.com。杨爽, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心肌病发病机制的研究。

mol/L 及 2×10^{-8} mol/L, 37℃、5% CO₂ 培养。各组样本数均为 10 例。

1.2 逆转录聚合酶链反应检测组蛋白脱乙酰基酶 2 和 β -肌球蛋白重链 mRNA 表达

在 6 孔培养板中, 加入 Ang^② 后 12 h 收集各组细胞, PBS 清洗。以 Trizol (Invitrogen 公司产品) 提取心肌组织中的总 RNA, 用紫外分光光度计测总 RNA 纯度和含量, 按照逆转录聚合酶链反应试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书进行操作。引物由北京奥科公司合成。HDAC 2 引物上游为 5'-GCT CGA TGT TGG ACG TAT GAG AC-3', 下游为 5'-ACC TCC TTC ACC TTC ATC CTC AG-3', 扩增片段长度为 364 bp。 β -肌球蛋白重链 (β -myosin heavy chain, β -MHC) 引物上游为 5'-ACC AAG CAG CCA CGC CAG TA-3', 下游为 5'-TGC TTT GCC TTT GCC CTT GT-3'。 β -actin 引物上游为 5'-TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG-3', 下游为 5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG-3', 扩增片段长度为 764 bp。 逆转录条件: 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min, 4℃ 保存。 PCR 反应条件: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 70 s 共进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。 PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳, 经紫外透射分析拍摄电泳条带。结果以 HDAC 2/ β -actin、 β -MHC/ β -actin 比值表示。

1.3 免疫组织化学法检测组蛋白脱乙酰基酶 2 蛋白和 c-fos 蛋白表达

于细胞接种前, 在 24 孔培养板中放置无菌细胞培养玻片, 在低浓度组、中浓度组和高浓度组加入 Ang^② 24 h 后与对照组同时取出玻片。冷丙酮固定 20 min, 置于 0.3% H₂O₂ 中 30 min 抑制内源性过氧化物酶。加入一抗 (兔多克隆抗体 HDAC 2 H-54 购自美国 Santa Cruz 公司), 4℃ 过夜。加入二抗, 室

温下 2 h。 DAB 显色。苏木素复染。乙醇脱水, 二甲苯脱乙醇, 封片。镜下观察, HDAC 2 以细胞核棕黄色为阳性, c-fos 以细胞质黄染为阳性。镜下随机选取 10 个视野, 分别计算 HDAC 2 和 c-fos 表达阳性心肌细胞百分数。

1.4 相差显微镜观察细胞形态变化

24 h 相差显微镜下观察细胞形态, 各组均随机选取 10 个视野, 每个视野随机选取 10 个心肌细胞, 在 1600 倍下应用 Motic Images 1.3 软件测量心肌细胞面积, 计算平均值。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS12.0 统计软件进行方差分析 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组蛋白脱乙酰基酶 2 和 β -肌球蛋白重链 mRNA 的表达

各组间 HDAC2/ β -actin 比值和 β -MHC/ β -actin 比值差异显著, 且随着 Ang^② 浓度的增加, HDAC2/ β -actin 比值和 β -MHC/ β -actin 比值亦逐渐增加 ($P < 0.05$ 表 1 和图 1)。

表 1 组蛋白脱乙酰基酶 2 和 β -肌球蛋白重链 mRNA 表达

分 组	HDAC2/ β -actin 比值	β -MHC/ β -actin 比值
对照组	0.1061 \pm 0.0056	0.1335 \pm 0.0070
低浓度组	0.4005 \pm 0.0109 ^a	0.2229 \pm 0.0062 ^a
中浓度组	0.4494 \pm 0.0094 ^{ab}	0.2649 \pm 0.0069 ^{ab}
高浓度组	0.5165 \pm 0.0091 ^{abc}	0.3113 \pm 0.0117 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与低浓度组比较; c 为 $P < 0.05$ 与中浓度组比较。

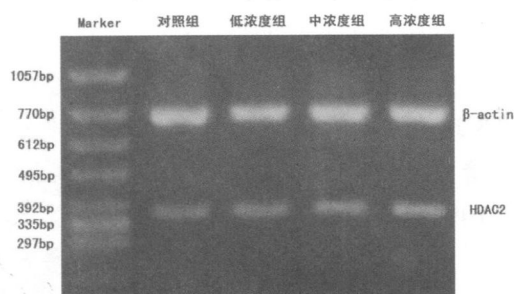
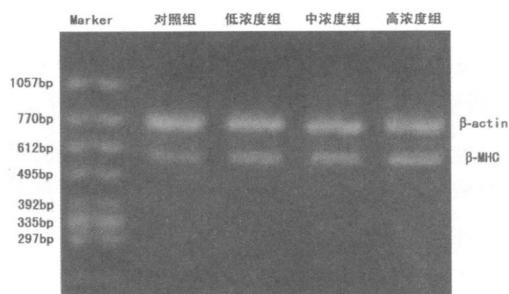


图 1 逆转录聚合酶链反应电泳图



2.2 组蛋白脱乙酰基酶 2 和 c-fos 阳性细胞百分比

各组间 HDAC 2 和 c-fos 阳性细胞百分比差异

显著, 且随着 Ang^② 浓度的增加, HDAC 2 和 c-fos 阳性细胞百分比亦逐渐增加 ($P < 0.05$ 表 2 和图 2)。

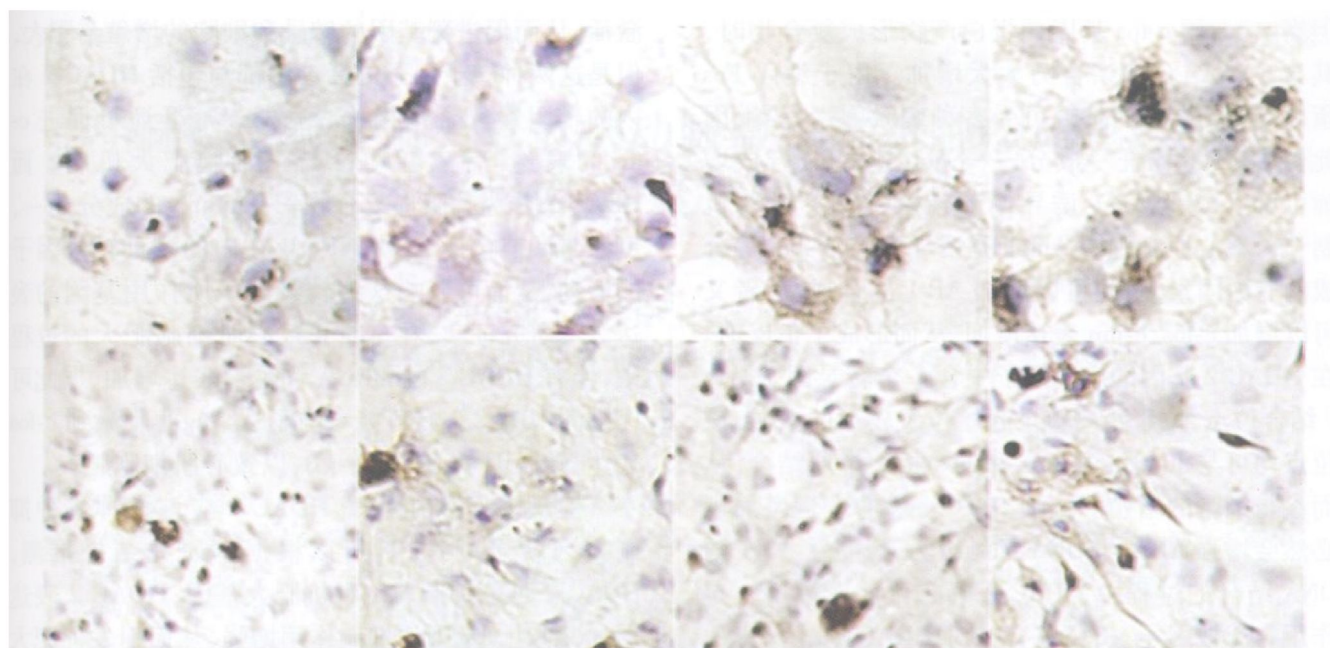


图 2 免疫组织化学染色 上图为组蛋白脱乙酰基酶 2 蛋白表达 ($\times 200$), 下图为 c-fos 蛋白表达 ($\times 150$); 从左至右为对照组、低浓度组、中浓度组和高浓度组。

表 2 组蛋白脱乙酰基酶 2 和 c-fos 阳性细胞百分比

分 组	HDAC2 阳性细胞百分比	c-fos 阳性细胞百分比
对照组	5.6% \pm 1.1%	10.8% \pm 1.2%
低浓度组	21.6% \pm 1.2% ^a	20.6% \pm 1.0% ^a
中浓度组	26.4% \pm 1.3% ^{ab}	24.4% \pm 1.1% ^{ab}
高浓度组	33.6% \pm 1.4% ^{abc}	32.4% \pm 1.4% ^{abc}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与低浓度组比较; c 为 $P < 0.05$ 与中浓度组比较。

2.3 心肌细胞面积比较

各组间心肌细胞面积差异显著, 且随着 AngⅡ浓度的增加心肌细胞面积亦逐渐增加 ($P < 0.05$ 表 3)。

表 3 心肌细胞面积比较

分 别	心肌细胞面积 (mm^2)
对照组	44.52 \pm 1.32
低浓度组	119.86 \pm 2.10 ^a
中浓度组	135.35 \pm 3.61 ^{ab}
高浓度组	153.18 \pm 3.75 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与低浓度组比较; c 为 $P < 0.05$ 与中浓度组比较。

3 讨论

在心肌细胞肥大的复杂过程中, 在细胞本身增大的同时通常伴有 β -MHC、ANP 等“心肌肥厚标志

性基因”表达的增加^[2]。近年来一些学者对于 HDAC 在心肌肥大过程中发挥的作用进行了相关研究, 结果表明Ⅱ类 HDAC 在心肌细胞肥大过程中发挥一定的抑制作用^[3,4], 但对于 iv 类 HDAC 研究甚少。本研究选择 HDAC 2 为代表, 研究 iv 类 HDAC 在心肌肥大中的作用。结果发现, 随着 AngⅡ浓度的增加, 心肌细胞面积逐渐增加, 同时伴有心肌细胞 HDAC 2 mRNA 和蛋白的表达增加。这说明 HDAC 2 也参与了心肌细胞肥大, 而且可能发挥着与Ⅱ类 HDAC 相反的作用, 即促进作用。这一结果与先前国外学者在大体动物实验中的研究结果是相符的^[5], 并从细胞水平进行了验证。

另外, 本研究发现在 AngⅡ致心肌细胞肥大过程中, 随着 HDAC 2 mRNA 和蛋白的表达增加, 亦伴有 β -MHC mRNA 表达和 c-fos 蛋白表达增加。Sadoshima 等^[6]在培养的乳鼠心肌细胞中发现, AngⅡ作用于心肌细胞后 15 min, c-fos 与 c-myc mRNA 即开始表达。这与本研究结果也是相符的。由此推测 HDAC 2 可能通过以下途径参与心肌细胞肥大过程: HDAC 2 与激活蛋白 1 (activator protein-1, AP-1) 的相互作用。AP-1 存在于多种细胞类型中, 许多基因的调节区域都存在着 AP-1 的结合位点。它是由 Fos (包括 c-fos, Fra-1, Fra-2 及 FosB) 和 Jun (包括 c-Jun, JunB 和 JunD) 组成的一种异二聚体, 可通过亮氨酸拉链与 DNA 结合, 具有很强的转录活化作用。AP-1 大部分由 c-jun 癌基因的蛋白产物组成,

但当 c-jun 同 c-fos 基因的蛋白产物形成复合物时, 其与 DNA 结合的亲和力大大增加。由于编码 Fos 蛋白和 Jun 蛋白的基因可受多种刺激因素诱导, 因此构成 AP-1 的任一成分——c-jun 或 c-fos 合成增加也可以成为 AP-1 诱导调节转录的一个重要机制^[7]。在心肌细胞中 Ang^②是诱导 c-fos、c-jun 等合成的有力因素, 因此可以增加 AP-1 的合成, 后者又可以增加 c-fos、c-jun 表达增加, 从而形成了正反馈。在 HDAC 2 基因的启动因子中含一个转录因子 AP-1 结合位点, 位于距离转录起始位置较远的上游, 该位点均可与 Jun、JunB、Fos 和 Fos 相关抗原结合, 从而参与细胞的增殖。本研究中 c-fos 的表达增加则必然会增强 AP-1 与 DNA 的结合力, 说明在 AP-1 与 DNA 结合的过程中 HDAC 2 确有可能发挥了一定作用。④核因子 κ B (NF- κ B) 对 HDAC 2 的募集作用。NF- κ B 由一组结构上相关联的蛋白质家族组成, 包括 p65 (RelA)、c-Rel、RelB、p50 (NF- κ B1) 以及 p52 (NF- κ B2)。NF- κ B 由两个属于 Rel 家族的亚单位组成, 以同源或异源二聚体形式存在。通常 NF- κ B 的活化形式是 P50 和 P65 组成的异二聚体。在未受刺激的细胞中, NF- κ B 在细胞质中与抑制性蛋白结合, DNA 结合运动也处于抑制状态; 细胞受到一些细胞因子的刺激后, 抑制性蛋白即释放出 NF- κ B, 后者迅速进入细胞核内、激活其目的基因。大量的研究证明, NF- κ B 与炎症反应和免疫反应的关系密切, 是一种具有多项调节作用的转录蛋白, 许多与炎症和免疫反应相关的细胞因子、黏附分子基因的启动部位都含有 NF- κ B 结合区域, NF- κ B 活化可以引起它们的表达。Ashburner 等^[8]发现在未受刺激的静止细胞中, HDAC 2 作为一种辅阻遏物 mSin3 的成分之一, 可参与对 NF- κ B 转录活动的调节。p65 对 HDAC2 有一种募集作用, 有可能参与 p65 的表达。Yu 等^[9]研究表明 HDAC 2 可被特异性募集至 NF- κ B, 并影响后者的乙酰化状态。在 Ang^②刺激下可诱导 NF- κ B 增加, 这一现象有可能与 Ang^②作用下 HDAC 2 表达增加相关, 但有待于进一步考证。④对于 HDAC 2 表达与心肌细胞肥大关系的推测。本研究结果表明了在 Ang^②致心肌细胞肥大过程中确实有 HDAC 2 表达变化, HDAC 2 本身在这一心肌肥大过程中可能发挥着什么样的作用呢? 转录因子 AP-1、NF- κ B 均可在 Ang^②作用下被

激活, 从而促进靶基因的转录和细胞的增殖与肥大, 但是这两种转录因子的活动中都与包括 HDAC 2 在内的辅阻遏复合物相关。另外, Ang^②还可促进 c-fos 的表达, 后三者均参与了细胞肥大机制。而 HDAC 2 作为辅阻遏复合物——mSin3 的成分之一, 可参与调节包括 AP-1、NF- κ B 在内的多种转录因子的活动, 从而可影响这些转录因子所作用基因的表达。本研究证实, 在 Ang^②致心肌细胞肥大的过程中, 伴有 HDAC 2 的 mRNA 和蛋白表达增加, 据此可以推测 HDAC 2 有可能参与了从 Ang^②刺激到 c-fos 表达、转录因子 AP1、NF- κ B, 以致心肌细胞肥大。

但是按照目前所知, HDAC 2 应该发挥一种抑制基因转录的作用, 所以根据本研究结果推测, HDAC 2 可能抑制着一种抗肥大基因; HDAC 2 表达增加, 则对该基因的抑制作用增强, 从而引发促肥大机制被激活, 并最终导致心肌细胞的肥大。具体机制尚有待于进一步考证。

[参考文献]

- [1] Kee H J, Sohn S, Nam K I, et al. Inhibition of histone deacetylation blocks cardiac hypertrophy induced by angiotensin ^② infusion and aortic banding [J]. *Circulation*, 2006 **113**: 51-59.
- [2] 许丹焰, 赵水平, 刘玲, 等. 可溶性环氧化物水解酶抑制剂对压力负荷增加所致小鼠心肌肥厚的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006 **14**: 405-408.
- [3] Kong Y, Tannous P, Lu G, et al. Suppression of class iv and ^② histone deacetylases blunts pressure-overload cardiac hypertrophy [J]. *Circulation*, 2006 **113**: 2579-588.
- [4] Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, et al. Class ^② histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy [J]. *Cell*, 2002 **110**: 479-488.
- [5] Kook H, Lepore JJ, Gitler AD, et al. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop [J]. *J Clin Invest*, 2003 **112**: 863-871.
- [6] Sadosh J, Izumo S. Signal transduction pathways of angiotensin ^②-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro: roles of phospholipid-derived second messengers [J]. *Circulation Research*, 1993 **73** (3): 424-438.
- [7] Brasier AR, Janahuddin M, Han Y, et al. Angiotensin ^② induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor [J]. *Mol Cell Biochem*, 2000 **212**: 155-169.
- [8] Ashburner BP, Westerbeide SD, Bakhtin AS JR. The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2001 **10**: 7065-077.
- [9] Yu Z, Zhang W, Kone CB. Histone deacetylases augment cytokine induction of the NOS gene [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002 **13**: 2009-017.

(此文编辑 文玉珊)