

网络出版时间: 2019-1-3 17:25 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20181230.1809.001.html>

◇基础医学研究◇

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 对间歇性低氧引起的小鼠心肌损伤的保护作用

沈帆 程文慧 范一菲 沈兵 钟明奎

摘要 目的 探讨去乙酰化酶抑制剂 SAHA 对间歇性低氧引起小鼠心肌损伤的保护作用及机制。方法 将雄性昆明小鼠分为正常氧(Sham)组、间歇性低氧(IH)组、正常氧 SAHA 干预(Sham + SAHA)组及间歇性低氧 SAHA 干预(IH + SAHA)组。IH 组和 IH + SAHA 组的造模方案是将利用低氧舱将小鼠放到其内,然后进行每天 8h 的间歇性低氧处理,造模时间一共 4 周。并在间歇性低氧进行处理最后 2 周,每日造模前给予腹腔注射 SAHA 50 mg/(kg·d)。实验第 4 周末处死小鼠,计算小鼠心脏重量/体质量和心脏重量/胫骨长度比值,HE 染色和 VG 染色观察心脏病理形态学改变, DHE 染色观察小鼠心肌中活性氧(ROS)含量。结果 与 Sham 组相比, IH 组小鼠心脏重量/体质量和心脏重量/胫骨长度比值、心肌细胞横截面积、心肌纤维化和心肌中 ROS 含量显著增加;组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 干预可明显改善间歇性低氧引起的心肌损伤及 ROS 增加。结论 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 通过抑制氧化应激改善间歇性低氧小鼠的心肌损伤。

关键词 间歇性低氧;组蛋白去乙酰化酶抑制剂;心肌损伤;氧化应激

中图分类号 R 331.36

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)01-0001-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.001

阻塞性睡眠呼吸暂停(obstructive sleep apnea, OSA)产生原因是睡眠时上气道塌陷阻塞,从而导致呼吸暂停与通气不足,进而引起打鼾、睡眠结构紊乱、血氧饱和度下降频发和白天嗜睡等一些症状,是多种心血管疾病的独立危险因素,是造成患者致残和死亡的主要原因。OSA 可产生多种危害,如间歇性低氧(intermittent hypoxia, IH)、高碳酸血症、胸内

负压剧烈波动、睡眠中断和结构紊乱,其中 IH 是 OSA 的主要病理生理学特点和损伤机制,被认为是引起心血管疾病的最为重要的因素^[1]。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC)将乙酰基团从组蛋白或者非组蛋白上的 ϵ -N-乙酰赖氨酸中去除掉,进而调节蛋白质活性水平的一类酶家族。HDAC 是表观遗传调控子,调控了组蛋白乙酰化及去乙酰化的水平高低、核染色质的构象变化、组蛋白和 DNA 之间相互作用、转录和转录后修饰等。研究^[2]表明 HDAC 在心血管疾病的发展中发挥着重要的调控作用,保护心血管的重要途径之一便是抑制 HDAC,所以抑制 HDAC 可能对心血管疾病的诊断以及治疗是一种全新的方案^[3]。该研究将探讨间歇性低氧引起的小鼠心肌损伤是否可以通过 HDAC 抑制剂 SAHA 予以保护及其作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物 清洁级雄性昆明小鼠,18~23 g,购自安徽医科大学实验动物中心。动物分笼饲养,自由摄食和饮水,通风良好,室温 18~25 °C。

1.2 仪器和试剂 测氧仪(CYS-1 型,南京新飞分析仪器制造有限公司);医用压缩氧气(浓度 > 99.9%)、压缩氮气(浓度 > 99.99%)由合肥众益化工产品有限公司充装;Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)购自美国 Selleck 公司,用溶媒将 SAHA 配制成 5 mg/ml,配置好后立即使用,溶媒的配比方案为 ddH₂O + 30% PEG300 + 5% Tween 80 + 2% DMSO;Dihydroethidium (DHE) (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 间歇性低氧模型的制备和分组 小鼠在适应性饲养 1 周后进行实验,随机分成正常氧组(Sham 组)、间歇性低氧组(IH 组)、正常氧 SAHA 干预组(Sham + SAHA 组)及间歇性低氧 SAHA 干预组(IH + SAHA 组),每组 7 只。根据本实验室之

2018-07-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81070066);安徽省教育厅自然科学重点科研项目(编号:KJ2018A0174、KJ2010A176);安徽医科大学博士科研基金(编号:XJ201221)

作者单位:安徽医科大学生理学教研室,合肥 230032

作者简介:沈帆,男,硕士研究生;

钟明奎,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: mingkuizhong@ahmu.edu.cn

前研究出的方案,使用氮气不断充入间歇性低氧箱内,稀释低氧箱内氧气^[4],将IH组以及IH+SAHA组小鼠放进低氧仓内,进行每天8h的间歇性低氧处理,处理时间一共连续4周。Sham组和Sham+SAHA组除不充入氮气和氧气外,其余均与IH组相同处理。在间歇性低氧处理2周之后,Sham+SAHA组以及IH+SAHA组连续2周每天使用SAHA 50 mg/(kg·d)给予腹腔注射,而Sham组和IH组腹腔则注射相同体积溶媒。实验第4周末,处死小鼠,计算小鼠心脏指数,HE染色和VG染色观察心脏病理形态学改变,DHE染色观察小鼠心肌中活性氧物(reactive oxygen species,ROS)含量。

1.3.2 心脏重量指标测定 实验模型制备完成后首先给小鼠测量体重。再使用10%水合氯醛用腹腔注射的方法麻醉小鼠,注射剂量是0.05 ml/10 g,再使用眼球摘除取血的方法,获取各组小鼠的血液。取血之后,在迅速使用粗剪刀剖开小鼠的胸腔,剪下小鼠心脏与胸主动脉。心脏剪下之后,去除附着的结缔组织,并且将粘在心脏上的细小脂肪以及残留的血液在生理盐水中轻轻摆动去除,并将心脏用滤纸完全吸干之后再称量重量,并且用直尺测得小鼠的胫骨长度,计算得出心脏重量/体质量(mg/g)以及心脏重量/胫骨长度(mg/cm)的比值。

1.3.3 心脏组织学观察 小鼠的心脏被洗净吸干水后,首先使用10%多聚甲醛对其进行灌流,之后放在多聚甲醛溶液中固定,在经脱水机脱水之后,用石蜡包埋机包埋成蜡块。使用石蜡切片机将心脏蜡块标本切成4 μm薄片,用毛笔蘸到温水中展开,之后使用载玻片捞出,之后将其用90℃烤20 min进行脱蜡,再分别使用HE和VG胶原染色,最后使用树脂封片,并用显微镜进行观察和拍摄。拍摄所得图像使用Image J软件计算心肌细胞的横截面积。

1.3.4 心脏中ROS的测定 将新鲜心脏取出,OTC包埋液氮冷冻后置-80℃冰箱保存。用冰冻切片机(Leica,德国)将冷冻后的标本切成5 μm的切片,用PBS洗涤,将配好的ROS探针DHE(5 μmol/L)在37℃烘箱内与标本在避光湿盒内反应30 min。DHE在超氧化物生成处被氧化成为溴化乙锭,与DNA相结合之后,激发出红色的荧光,可以通过观察荧光的强度检测ROS含量。

1.4 统计学处理 用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAHA对间歇性低氧小鼠心脏肥大的影响

使用小鼠的心脏重量/体质量、心脏重量/胫骨长度的比值和心肌细胞横截面积对心肌肥大进行评价。四组小鼠心脏重量/体质量比值 [$F(3, 24) = 58.52, P < 0.001$]、心脏重量/胫骨长度比值 [$F(3, 24) = 14.35, P < 0.001$]存在明显差异。和Sham组相比,IH组小鼠心脏重量/体质量比值与心脏重量/胫骨长度比值显著增加($P < 0.001$),出现了心脏肥大。使用SAHA处理1周后,和IH组相比,IH+SAHA组的小鼠心脏重量/体质量比值与心脏重量/胫骨长度比值下降明显($P < 0.01$),提示IH小鼠心肌肥大可被SAHA抑制;SAHA对Sham组小鼠心脏重量/体质量和心脏重量/胫骨长度比值没有影响(图1)。

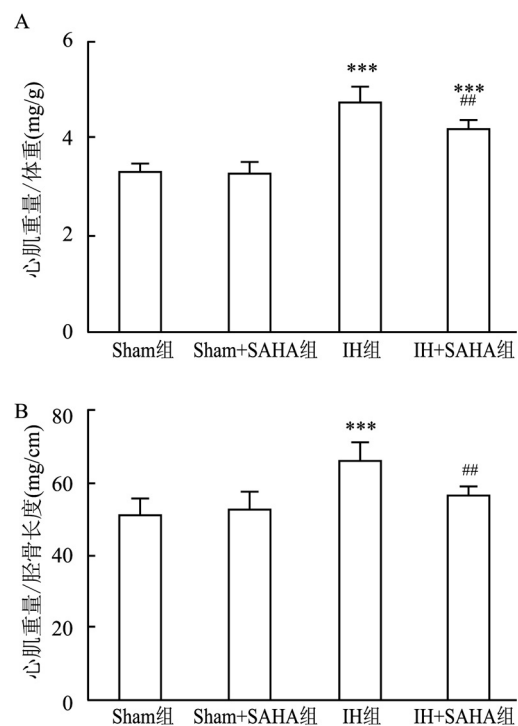


图1 SAHA对间歇性低氧小鼠心脏重量的影响

A: 心脏重量/体质量比值; B: 心脏重量/胫骨长度比值; 与Sham组比较: *** $P < 0.001$; 与IH组比较: ## $P < 0.01$

HE染色结果显示,四组小鼠心肌横截面积存在明显差异 [$F(3, 186) = 55.58, P < 0.001$]。与Sham组相比,IH组小鼠心脏的心肌细胞横截面积显著增加($P < 0.001$);SAHA可降低间歇性低氧引起心肌细胞横截面积的增加($P < 0.01$),但Sham组小鼠没有影响(图2)。

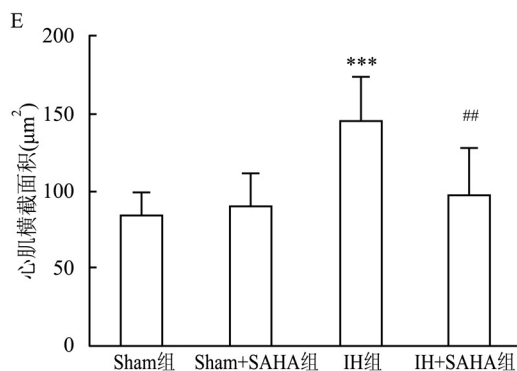
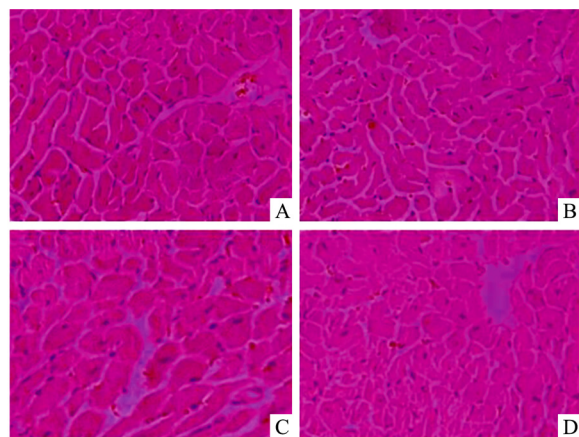


图2 SAHA对间歇性低氧小鼠心肌细胞横截面积的影响 ×400

A: Sham组; B: Sham + SAHA组; C: IH组; D: IH + SAHA组; E: 心肌横截面积半定量分析的结果统计图; 与Sham组比较: *** $P < 0.001$; 与IH组比较: ## $P < 0.01$

2.2 SAHA对间歇性低氧小鼠心肌纤维化的影响 VG染色结果显示:与Sham组相比,IH组小鼠心肌胶原纤维明显增多(棕黄色细胞),SAHA治疗显著改善了IH组小鼠心脏纤维化;Sham小鼠无论是否应用SAHA,心肌均未出现纤维化(图3)。

2.3 SAHA对间歇性低氧小鼠心肌中ROS的影响 DHE荧光染色结果显示:与Sham组相比,IH组小鼠心肌中活性氧明显增加,SAHA治疗可显著抑制IH小鼠ROS水平;SAHA对Sham组小鼠心肌ROS水平没有影响(图4)。

3 讨论

本研究显示间歇性低氧4周后,小鼠心脏重量/体质量和心脏重量/胫骨长度比值、心肌细胞横截面积、心肌胶原纤维沉积及心肌ROS显著增加,提示间歇性低氧可引起心肌重构及氧化应激;应用组蛋白去乙酰化酶抑制剂SAHA干预可明显改善间歇性低氧引起的心肌损伤及ROS增加。本研究结果表

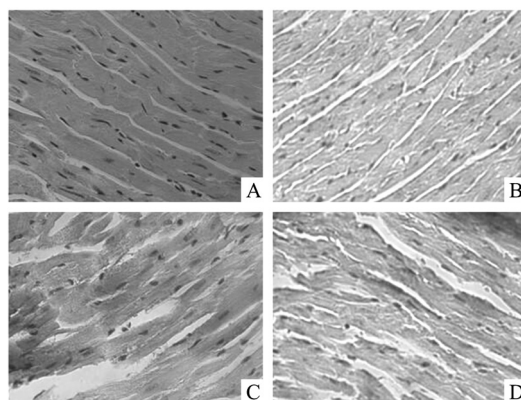


图3 SAHA对间歇性低氧小鼠心肌细胞纤维化的影响 ×400
A: Sham组; B: Sham + SAHA组; C: IH组; D: IH + SAHA组

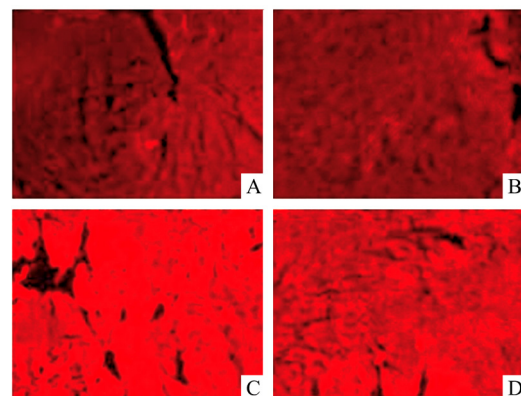


图4 SAHA对间歇性低氧小鼠心肌细胞ROS的影响 ×400
A: Sham组; B: Sham + SAHA组; C: IH组; D: IH + SAHA组

明组蛋白去乙酰化酶抑制剂SAHA可以改善间歇性低氧小鼠的心肌损伤状况,其可能机制是抑制了细胞内的氧化应激反应。

心脏重构是心脏对各种心血管疾病中出现的有害刺激的适应性反应,但长期重塑常导致慢性心力衰竭或心源性猝死。因此,控制心肌重构的进程十分重要。许多研究发现染色质重塑,特别是HDAC在心脏基因表达调控中起着重要作用。目前已有18种进化保守的哺乳动物HDAC被鉴别出来,并且可分成四类(I、II、III和IV),依据是系统发育的保守性。此外,已发现多达1750个HDAC的非组蛋白靶蛋白,一些很重要的细胞生理过程则通过此类非组蛋白的乙酰化和去乙酰化进行调节,比如细胞周期、细胞骨架重组、内吞作用与囊泡运输^[5]。由于HDAC活性在生理和病理过程中至关重要,HDAC抑制剂已被开发为多种疾病的治疗选择,如癌症、情感障碍和艾滋病等^[6]。HDAC抑制剂按结

构可分为四类:短链脂肪酸(丁酸盐、丁酸苯酯和丙戊酸)、异羟肟酸盐(SAHA和TSA)、氨基苯甲酰胺(FK-228)和环肽。SAHA是光谱HDAC抑制剂,可抑制I类和II类HDAC活性,是首个被美国FDA批准作为HDAC抑制剂的临床用药,用于治疗皮肤T细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤^[6]。近些年有研究报道,SAHA、TSA以及丙戊酸等等一类HDAC抑制剂可以防止由几类不同因素导致的心脏肥大^[7-9],有望成为治疗心脏肥厚和与之有关疾病的新药物方案。

反复间歇性低氧可能导致氧化应激反应加剧与活性氧物质增加,与OSA导致的并发症紧密有关^[10]。在心肌重构的过程中ROS依赖性途径有很重要的影响^[11]。ROS引起生物作用主要是通过导致DNA、蛋白质、脂质非特异性的氧化损伤或者影响特定的细胞信号传导通路来实现。ROS细胞内主要来自线粒体电子传递链与氧化酶,与ROS代谢相关的酶主要包含NAD(P)H氧化酶、黄嘌呤氧化酶与一氧化氮合酶(NOS)、超氧化物歧化酶(SOD)以及过氧化氢酶(CAT)等,其中NADPH氧化酶在心脏重构病理过程中起到相当关键的作用^[11]。此次研究使用SAHA抑制了间歇性低氧小鼠心脏ROS的增加与心肌重构,其原因是否与NADPH氧化酶相关需要下一步的研究。

参考文献

[1] Beaudin A E, Waltz X, Hanly P J, et al. Impact of obstructive sleep apnoea and intermittent hypoxia on cardiovascular and cere-

- brovascular regulation[J]. *Exp Physiol*, 2017, 102(7): 743-63.
- [2] Yiew K H, Chatterjee T K, Hui D Y, et al. Histone deacetylases and cardiometabolic diseases[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(9): 1914-19.
- [3] Yoon S, Eom G H. Hdac and hdac inhibitor: From cancer to cardiovascular diseases[J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52(1): 1-11.
- [4] 唐志强, 范一菲, 汪金丽, 等. 室旁核中血管紧张素II通过活性氧介导慢性间歇性低氧大鼠的升压作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(4): 472-6.
- [5] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions[J]. *Science*, 2009, 325(5942): 834-40.
- [6] Dokmanovic M, Clarke C, Marks P A. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives[J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(10): 981-9.
- [7] Cao D J, Wang Z V, Battiprolu P K, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors attenuate cardiac hypertrophy by suppressing autophagy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(10): 4123-8.
- [8] Chen Y, Du J, Zhao Y T, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibition improves myocardial function and prevents cardiac remodeling in diabetic mice[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2015, 14(99): 1-13.
- [9] Ooi J Y, Tuano N K, Rafehi H, et al. HDAC inhibition attenuates cardiac hypertrophy by acetylation and deacetylation of target genes[J]. *Epigenetics*, 2015, 10(5): 418-30.
- [10] Eisele H J, Markart P, Schulz R. Obstructive sleep apnea, oxidative stress, and cardiovascular disease: Evidence from human studies. *Oxidative medicine and cellular longevity* [J]. 2015, 2015(608438): 1-9.
- [11] Nabeebaccus A, Zhang M, Shah A M. NADPH oxidases and cardiac remodeling[J]. *Heart Fail Rev*, 2011, 16(1): 5-12.

Protective effect of histone deacetylase inhibitor SAHA on intermittent hypoxia-induced myocardial injury in mice

Shen Fan, Cheng Wenhui, Fan Yifei, et al

(Dept of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the protective effect and mechanism of suberoylanilide hydroxamic acid(SAHA), a histone deacetylase inhibitor, on intermittent hypoxia-induced myocardial injury in mice. **Methods** Male Kunming mice were randomly divided into normal oxygen (Sham) group, intermittent hypoxia(IH) group, Sham + SAHA group and IH + SAHA group. The mice in IH group and IH + SAHA group were exposed to 4-weeks intermittent hypoxia, 8 h daily. Intraperitoneal injection of SAHA [50 mg/(kg·d)] was given daily in the last 2 weeks of intermittent hypoxia. At the end of the fourth week of the experiment, the mice were sacrificed and the ratio of heart weight/body weight and heart weight/tibia length was calculated. The pathological changes of the heart were observed by HE staining and VG staining. The content of reactive oxygen species (ROS) in the myocardium was detected by DHE staining. **Results** Compared with Sham group, the ratio of heart weight / body weight and

网络出版时间: 2019-1-3 17:25 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20181230.1809.002.html>

胃癌脂代谢通路基因表达的转录组学高通量分析

向丽娟¹, 汪圣毅², 包楚阳¹, 张焱³, 韩坤³, 刘虎^{1,4}

摘要 目的 探讨胃癌(GC)脂代谢(LM)通路的基因表达情况。方法 转录组测序筛选8例GC及4例癌旁组织之间的差异表达基因,京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析GC脂代谢相关通路中的关键基因(KGS)。结果 高通量测序获得3 198个长度大于200 bp的差异表达基因。KEGG富集分析发现6个显著富集代谢通路,其中脂肪消化与吸收代谢通路有9个基因(MOGAT3、FABP2、FABP1、APOA4、NPC1L1、PLA2G2A、ABCG5、PLA2G4A、PLA2G12B)显著上调,2个基因(LIPF、PLA2G1B)显著下调。结论 GC脂代谢关键基因表达的异常状态为寻求胃癌诊断标志物提供了线索。

关键词 胃肿瘤; 转录组测序; 脂代谢; 关键基因

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)01-0005-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.002

胃癌(gastric cancer, GC)是世界第五大恶性肿瘤和第三大常见癌症死亡原因^[1]。GC作为消化道肿瘤与营养代谢密切相关。随着脂质组学分析在癌症研究中取得的重要进展,脂代谢(lipid metabolism, LM)异常与癌症关系的研究日益受到关注^[2-5]。转录组是连接基因组遗传信息与生物功能的纽带,是揭示疾病基因突变规律、疾病发生发展重要机制以及发现致病基因调控关键靶点等领域的最

佳研究手段。该研究利用高通量测序对GC及癌旁组织的差异表达谱进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析,以期探索GC中LM相关通路的关键基因(key genes, KGS),为GC诊断与治疗从转录组学和代谢组学上寻找新的线索。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院2017年4月7日~19日住院GC患者术后GC组织标本8例及相应癌旁正常组织标本4例,均经病理学诊断证实。其中男3例,女5例,年龄25~77(60.1±15.3)岁。病理显示均为中-低分化腺癌,其中6例有淋巴结转移,但无远处脏器转移。TNM I B~II B期4例,III A~III C期4例。患者术前均未接受过化疗、放疗或生物治疗等干预措施,无其他肿瘤病史,无糖尿病、高血压、肾病、免疫系统疾病及上呼吸道感染等合并症。癌及癌旁两组性别、年龄差异均无统计学意义。标本于术后0.5 h内放入RN-Alater(美国Invitrogen公司)保存液中,-20℃保存,正常对照来自手术边界5 cm以上。所有患者签署知情同意书。该实验经安徽医科大学伦理委员会批准(伦理批准号:20140141)。

1.2 主要仪器与试剂 琼脂糖凝胶电泳系统购自美国Nanodrop公司; NanoPhotometer[®]分光光度计购自德国Implen公司;安捷伦2100生物分析仪购自美国Agilent公司; HiSeq Xten、TruSeq PE簇生成试剂盒v3-eBot-HS购自美国Illumina公司; NEBNext[®] Ultra[™] RNA文库制备试剂盒及Oligo d(T) 25磁珠购自美国NEB公司; Qubit[®] 2.0荧光计、Superscript II逆转录试剂盒及TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司; 核酸纯化试剂盒AMPure XP购自美国Beck-

2018-09-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81472750); 安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH171)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 肿瘤内科、² 普外科, 合肥 230022

³ 北京诺禾致源科技股份有限公司, 北京 100080

⁴ 中国科学技术大学附属第一医院西区(安徽省肿瘤医院), 合肥 230031

作者简介: 向丽娟, 女, 硕士研究生;

刘虎, 男, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: drliuhu@yahoo.com

heart weight/tibia length, myocardial cell cross-sectional area, myocardial fibrosis and ROS in myocardium were significantly increased in IH group. Intervention with SAHA could significantly improve myocardial injury induced by intermittent hypoxia and ROS increase. **Conclusion** SAHA, a histone deacetylase inhibitor, can improve intermittent hypoxia-induced myocardial injury in mice by inhibiting oxidative stress.

Key words intermittent hypoxia; histone deacetylase inhibitor; myocardial injury; oxidative stress