

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.002.html

靶向沉默 SIRT1 对乳鼠心肌成纤维细胞增殖的影响

施 鹏^{1,2} 陶 辉^{1,2} 张家贵^{1,2} 曹 炜^{1,2} 钱 鹏^{1,2} 占红英^{1,2} 石开虎^{1,2}

摘要 目的 探究沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 对乳鼠心肌成纤维细胞增殖的影响作用。方法 应用转化生长因子- β 1 处理乳鼠原代心肌成纤维细胞,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测 SIRT1、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的 mRNA 表达水平;Western blot 法检测 SIRT1、 α -SMA 的蛋白表达水平;MTT 法检测心肌成纤维细胞的细胞增殖活性;使用 LipofectamineTM 2000 Reagent 向乳鼠原代心肌成纤维细胞中转染 siRNA-SIRT1。结果 转染 siRNA-SIRT1 的心肌成纤维细胞 SIRT1 蛋白和 mRNA 表达下降,同时 α -SMA 蛋白和 mRNA 表达下降;转染 siRNA-SIRT1 明显抑制心肌成纤维细胞的增殖活性。结论 siRNA-SIRT1 对心肌成纤维细胞增殖活性有明显抑制作用,SIRT1 可能成为心脏结构重构防治的新靶点,其调控剂的应用将为心肌纤维化的防治提供新的思路和方案。

关键词 SIRT1; 心肌成纤维细胞; α -SMA

中图分类号 R 542.23

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0471-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.002

心肌纤维化是许多常见心血管疾病的最后阶段,其主要特点为细胞外基质蛋白呈网状沉积^[1],心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)是哺乳动物心脏中最丰富的细胞类型,CFs 的活化增殖是心肌纤维化发生发展及心室重构的关键^[2]。研究^[3]显示,组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)可以影响心肌纤维化的发生与发展。沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)是 III 类组蛋白去乙酰化酶家族中的重要成员,参与调节细胞多种生物进程^[4]。关于 SIRT1 在影响心肌纤维化的方面鲜有报道,具体调控机制也有待进一步研究。该实验以 CFs 为研究对象,通过

观察转染 siRNA-SIRT1 处理 CFs 后的增殖情况,SIRT1、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达变化,探讨 SIRT1 影响心肌成纤维细胞活化增殖的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 SD 乳鼠 50 只,雌雄各半,7~8 d,体重(20±5)g,购自安徽医科大学实验动物中心,实验过程对动物处置符合动物伦理学标准。

1.1.2 主要试剂 胰蛋白酶(加拿大 WISSENT 公司); siRNA-SIRT1、阴性对照(上海吉玛基因股份有限公司);转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)(美国 Peptrotech 公司);DMEM 培养基、Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);MTT 相关试剂(美国 Sigma 公司);LipofectamineTM 2000 Reagent、TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司);新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);PrimeScriptTM RT Master Mix(日本 TaKaRa 公司);一抗 SIRT1(美国 Cell Signaling Technology 公司); α -SMA、 β -actin(北京博奥森生物技术有限公司);二抗辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);SIRT1、 α -SMA、 β -actin 引物(上海生工生物工程股份有限公司)。

1.1.3 主要仪器 SW-9800 型超净工作台(苏州泰安空气技术有限公司);NAPCO-8800 型恒温细胞培养箱(美国 SHELLAB 公司);Applied Biosystems Gene Amp StepOneTM Real-Time qPCR System(美国 ABI 公司);Mastercycle eppgradient Eppendorf PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司);Sigma3-18K 高速低温离心机(美国 Sigma 公司);MK3 酶标仪(荷兰雷勃公司);Western blot 相关仪器设备(美国 Biorad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CFs 的提取分离与培养 将 SD 乳鼠放入 75% 乙醇中浸泡消毒 40~60 s,在无菌操作台中剪开胸骨,完整取出心脏,去除心脏周围结缔组织,

2016-12-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81570295);安徽省科技攻关计划项目(编号:1501041148);安徽省高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2015A320)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院心胸外科,合肥 230601

²安徽医科大学心血管病研究中心,合肥 230601

作者简介:施 鹏,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

4 °C PBS 清洗后,放入无菌的 EP 管中,用眼科剪刀剪碎并加入 0.25% 胰蛋白酶与 II 型胶原酶的混合酶对组织块进行消化处理,放置于 37 °C 恒温水浴锅中轻轻震荡,15 min 后,吸取上清液,等体积 DMEM 培养基中和混合酶消化,900 r/min 离心 9 min,将所得的全部细胞接种于 25 cm² 培养瓶中,10% 血清 DMEM 培养基进行培养,置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中,采用差速贴壁的方法去除心肌细胞 90 min 后,将培养基倾倒入,余下贴壁的细胞为 CFs,传代培养 2~3 代后用于实验,将细胞培养至融合状态,采用倒置显微镜、免疫组织化学方法进行鉴定。

1.2.2 实验分组 实验组:加入 TGF-β1 处理后的 CFs;空白对照组:加入等量 PBS 处理的 CFs;转染实验组:瞬时转染 siRNA-SIRT1 的 CFs;阴性对照组:瞬时转染阴性对照的 CFs。

1.2.3 TGF-β1 处理 CFs 取处于对数生长期的 CFs 进行处理。将 TGF-β1 用 DMSO 稀释成 20 mmol/L 的溶液,将配制好的 TGF-β1 溶液加入到培养瓶当中,采用终浓度为 10 μmol/L 的 TGF-β1 溶液处理 CFs,时间为 48 h,将等量的 DMSO 和生理盐水加入到对应的分组当中。

1.2.4 瞬时转染 siRNA-SIRT1 取对数生长期的 CFs 进行转染处理。转染前 1 天,更换为无血清无抗体 DMEM 培养基。siRNA-SIRT1 以及阴性对照均由吉玛基因股份有限公司设计并合成 siRNA-SIRT1 序列:5'-GAGACUGCGAUGUCAUAAUTTAUUAUGA-CAUCGCAGUCUCTT-3';阴性对照序列:有义链:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3';反义链:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。按照 LipofectamineTM 2000 Reagent 说明书进行细胞转染操作,LipofectamineTM 2000 Reagent 预先置于室温环境 5 min,然后将 siRNA-SIRT1 以及阴性对照与 LipofectamineTM 2000 Reagent 混合均匀,室温下静置 20 min 后,按照分组加入相应的细胞中,放入 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中,转染 6 h 后,更换为浓度为 10% 血清的 DMEM 培养基,继续培养 48 h 后提取总 RNA。

1.2.5 细胞总 RNA 提取及逆转录 根据 TRIzol 说明书介绍,使用 TRIzol 试剂将细胞进行裂解并提取细胞总 RNA,通过紫外分光光度仪测定并分析所提取总 RNA 的浓度以及纯度,选择 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.7~1.9 的总 RNA 样本进行逆转录实验。各组总 RNA 均使用 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒并且按照说明书进行操作,逆转录为 cDNA,然后进行

qRT-PCR 检测。

1.2.6 qRT-PCR 法检测 SIRT1、α-SMA mRNA 表达

从 GenBank 数据库中查找引物序列,由上海生工生物工程股份有限公司合成相应引物。SIRT1 引物序列:上游引物:5'-TTTTGAGGTAGGGTCCCCGT-3',下游引物:5'-CCCAGAAAGGCATAGACCCA-3';α-SMA 引物序列:上游引物:5'-TGGCCACTGCTGCT-TCCTCTTCTT-3',下游引物:5'-GGGGCCAGCTTCGT-CATACTCCT-3';β-actin 引物序列:上游引物:5'-TG-GAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3',下游引物:5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'。反应条件:50 °C 预热 2 min;95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 20 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环;条件 95 °C、15 s,60 °C、1 min,95 °C、15 s 为溶解曲线阶段,以 β-actin 作为内参照,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因的相对表达水平。

1.2.7 Western blot 法检测 SIRT1、α-SMA 蛋白表达

细胞总蛋白提取:向每个细胞培养瓶中加入 1 ml RIPA 裂解液和 10 μl PMSF 吹打均匀,与细胞充分接触,放置在冰上,裂解时间为 30 min,收集裂解液,放入 EP 管中,4 °C、13 000 r/min 离心 30 min 后,将上层总蛋白提取液吸出,进行定量、变性。SDS-PAGE 蛋白电泳:采用 7.5% 的分离胶以及 5% 浓缩胶进行蛋白电泳分离。转膜:分离的蛋白转移至 PVDF 膜上,200 mA 恒流 2 h。洗膜,浓度 5% 脱脂牛奶的 Tris 缓冲盐与 Tween 20 混合液(TBST)封闭 1.5 h,洗膜,分别进行 SIRT1、α-SMA 和 β-actin 一抗孵育,4 °C 摇床过夜,洗膜,进行 SIRT1、α-SMA 和 β-actin 二抗孵育,室温摇床 1.5 h,洗膜,ECL 法显影,结果采用 Quantity One V 4.6 软件分析,测定主带的吸光度值以计算 SIRT1、α-SMA 的蛋白表达水平。

1.2.8 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞,0.25% 胰蛋白酶对进行细胞消化,用细胞计数板对细胞进行计数,将细胞接种于 96 孔板当中,每孔细胞的数目为 5 000 个,每个处理组设置复孔 5 个,每孔 100 μl,总共铺设 5 个 96 孔板,连续观察 5 d。放置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中进行培养。培养 24 h 使细胞贴壁,终止细胞培养前 4 h,每个孔中加入 10 μl 5 g/L 的 MTT,4 h 后,吸出培养基,每个孔中加入 100 μl 的 DMSO 使反应终止,震荡 5 min,使结晶溶解,酶标仪波长调至 490 nm 处,进行光密度(optical density,OD)值测定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用 *t* 检验。所有实验数据分析至少重复 3 次。

2 结果

2.1 TGF- β 1 处理 CFs 对 SIRT1、 α -SMA mRNA 表达的影响 TGF- β 1 处理 CFs 48 h 以后, 实验组 SIRT1 mRNA(1.78 \pm 0.10) 表达明显高于空白对照组(1.00 \pm 0.12) (*t* = 4.876 *P* < 0.05), 同时 α -SMA mRNA(2.11 \pm 0.14) 表达明显高于空白对照组(1.00 \pm 0.11) (*t* = 5.132 *P* < 0.05)。见图 1。

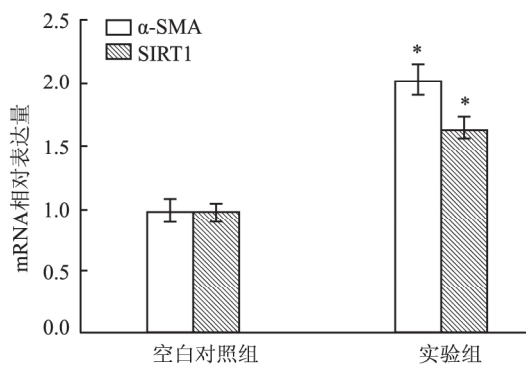


图 1 qRT-PCR 法检测 SIRT1 和 α -SMA mRNA 的表达与空白对照组比较: * *P* < 0.05

2.2 TGF- β 1 处理 CFs 对 SIRT1、 α -SMA 蛋白表达的影响 TGF- β 1 处理 CFs 48 h 以后, 实验组 SIRT1 蛋白表达明显高于空白对照组(*t* = 5.751, *P* < 0.05), 同时 α -SMA 蛋白表达明显高于空白对照组(*t* = 6.242, *P* < 0.05)。见图 2。

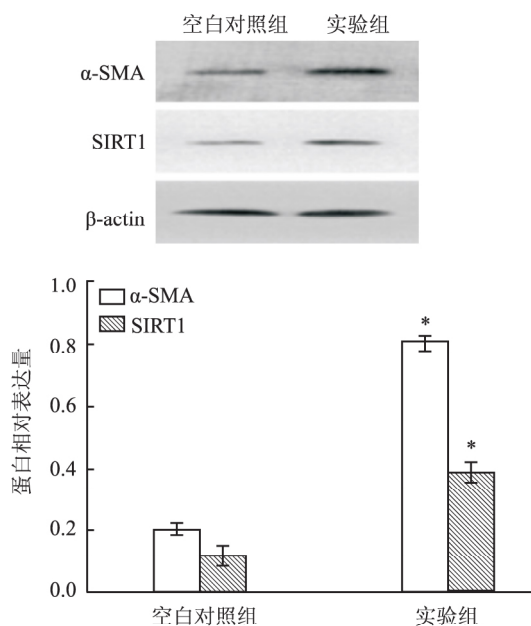


图 2 Western blot 法检测 SIRT1 和 α -SMA 蛋白的表达与空白对照组比较: * *P* < 0.05

2.3 瞬时转染 CFs siRNA-SIRT1 对 SIRT1、 α -SMA mRNA 表达的影响 CFs 瞬时转染 siRNA-SIRT1 48 h 后, 实验组 SIRT1 mRNA(0.53 \pm 0.06) 表达明显低于阴性对照组(1.00 \pm 0.10) 和空白对照组(1.00 \pm 0.09) (*F* = 13.72, *P* < 0.05), α -SMA mRNA(0.45 \pm 0.04) 表达明显低于阴性对照组(1.00 \pm 0.11) 和空白对照组(1.00 \pm 0.09) (*F* = 14.84, *P* < 0.05)。见图 3。

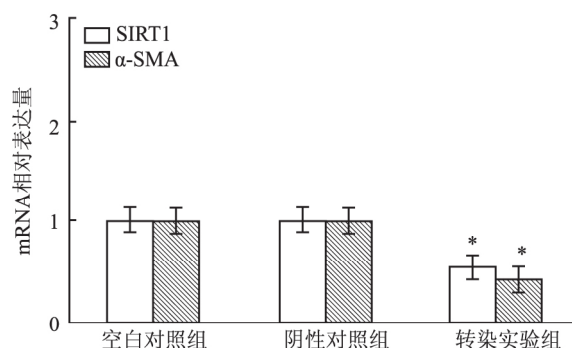


图 3 qRT-PCR 法检测 SIRT1 和 α -SMA mRNA 的表达与阴性对照组比较: * *P* < 0.05

2.4 瞬时转染 CFs siRNA-SIRT1 对 SIRT1、 α -SMA 蛋白表达的影响 CFs 瞬时转染 siRNA-SIRT1 48 h 后, 实验组 SIRT1 蛋白表达明显低于阴性对照组和空白对照组(*F* = 15.12, *P* < 0.05), α -SMA 蛋白表达明显低于阴性对照组和空白对照组(*F* = 16.77, *P* < 0.05)。见图 4。

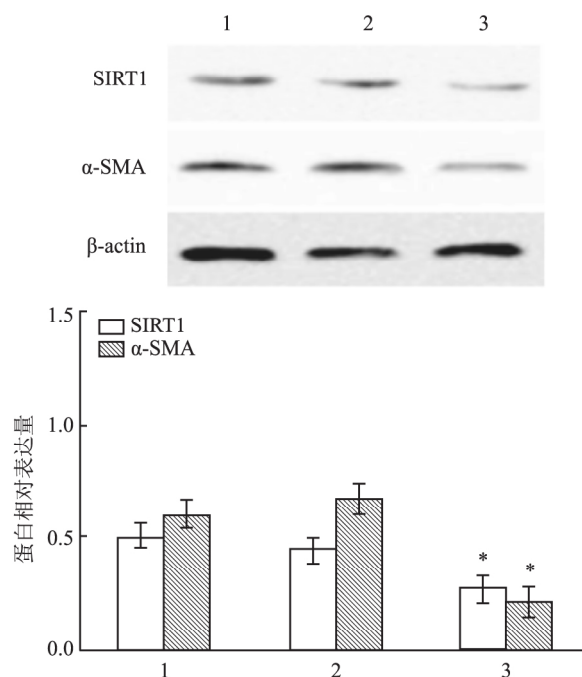


图 4 Western blot 法检测 SIRT1 和 α -SMA 蛋白的表达
1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 转染实验组; 与阴性对照组比较: * *P* < 0.05

2.5 瞬时转染 siRNA-SIRT1 对 CFs 细胞活性的影响 MTT 法实验结果表明,瞬时转染 siRNA-SIRT1 处理后的 CFs 的细胞活性,实验组细胞活性明显低于空白对照组和阴性对照组($F = 17.63, P < 0.05$)。见图 5。

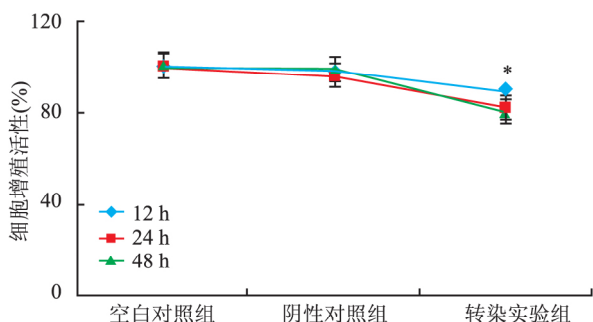


图 5 MTT 实验检测转染 CFs 细胞 12、24、48 h 后细胞增殖活性变化与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

心肌纤维化是急慢性心脏疾病的病理基础, CFs 是心肌细胞群当中一个非常重要成员, CFs 的活化增殖在心肌纤维化发生发展过程中扮演了关键的角色,是心肌纤维化的效应细胞,活化的 CFs 分泌许多细胞因子和细胞外基质,进而对心肌纤维化起到诱导和调节的作用,其中, TGF- β 1 在心肌纤维化过程中发挥关键作用,与成纤维细胞的增殖、活化密切相关^[5], α -SMA 为最常用的成纤维细胞激活的标志^[6-7]。由此可见,心肌纤维化是通过 CFs 的增殖活化后,分泌大量的 α -SMA, 胶原纤维的量过度增加, 胶原含量过度增高, 导致纤维化的形成与不断发展。

SIRT1 是一类保守的依赖 NAD⁺ 的组蛋白去乙酰化酶, 并且在多种生物过程中发挥作用, 例如, 在基因沉默、DNA 修复等方面^[8]。研究^[9]表明, 组蛋白去乙酰化酶在心肌纤维化发生发展过程中发挥重要作用^[10]。研究^[11]显示, SIRT1 作为肾保护因子, 在单侧输尿管梗阻模型中, 通过抑制表皮生长因子受体、血小板源生长因子受体以及信号传导和转录激活因子 3 磷酸化, 可以阻止肾纤维化的发生; 研究^[12]表明, 在肺纤维化疾病中, Smad3 蛋白通过调节 SIRT1 的表达来影响肺纤维化的进程。进而推测 SIRT1 能够影响心肌成纤维细胞增殖以及心肌纤维化, 并且探究其具体的作用机制。该实验通过

转染 siRNA-SIRT1 的方法处理体外培养的新生乳鼠 CFs, 对 SIRT1 的表达产生影响, 分别检测处理过后 CFs 的活性改变以及 SIRT1、 α -SMA 的表达水平。结果显示, SIRT1 表达下降可明显抑制 CFs 增殖活性, 降低了 α -SMA 的表达水平。

综上所述, 从转录水平以及翻译水平可以初步看出, 沉默 SIRT1 能够发挥抑制心肌成纤维细胞增殖的作用, 表明 SIRT1 可以作为抑制 CFs 的潜在靶向调控因子。因此, 通过靶向对 SIRT1 进行调控或许能够对心肌纤维化的进展起到有效的干预作用。

参考文献

- [1] 张 猛, 陶 辉, 陈泽文, 等. 化学合成 microRNA-21 inhibitors 对大鼠心肌成纤维细胞活化增殖的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(5): 577-81.
- [2] Tao H, Yang J J, Shi K H. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic mechanism regulation of cardiac fibrosis[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(5): 707-16.
- [3] 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(1): 1-13.
- [4] Rizk S M, Elmaraghy S A, Nassar N N. A novel role for SIRT1 in L-arginine protection against STZ induced myocardial fibrosis in rats. [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114560.
- [5] 张丽梅, 杨 竞, 李意奇, 等. 淫羊藿苷抑制 TGF- β 1/Smad2 信号通路改善压力超负荷所致的大鼠心肌纤维化[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(10): 1422-5.
- [6] Moore-Morris T, Cattaneo P, Puceat M, et al. Origins of cardiac fibroblasts[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 91: 1-5.
- [7] Tao H, Yang J J, Shi K H, et al. Wnt signaling pathway in cardiac fibrosis: new insights and directions[J]. *Metabolism*, 2016, 65(2): 30-40.
- [8] Xiao J, Sheng X, Zhang X, et al. Curcumin protects against myocardial infarction-induced cardiac fibrosis via SIRT1 activation *in vivo* and *in vitro* [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 1267-77.
- [9] 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.
- [10] Xie M, Hill J A. HDAC-dependent ventricular remodeling [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2013, 23(6): 229-35.
- [11] Wakino S, Hasegawa K, Itoh H. Sirtuin and metabolic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2015, 88(4): 691-8.
- [12] Warburton D, Shi W, Xu B. TGF- β -Smad3 signaling in emphysema and pulmonary fibrosis: an epigenetic aberration of normal development? [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 304(2): L83-5.

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.003.html>

糖氧剥夺/再灌注损伤对人正常肝 L02 细胞自噬水平的影响

马秀雅, 李元海

摘要 目的 探讨糖氧剥夺/再灌注损伤(OGD/R)对人正常肝 L02 细胞自噬水平的影响。方法 体外培养人正常肝 L02 细胞,制备 OGD/R 模型,模拟临床的肝脏缺血再灌注损伤。分为 5 组:正常对照组、OGD 6 h/R 1、3、6、12 h 组。随后在倒置显微镜下观察 L02 细胞形态;采用 MTT 比色法检测 L02 细胞的相对增殖情况;Western blot 法检测自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1 和 p62 的表达变化。结果 与正常对照组相比,随着再灌注时间的延长,OGD/R 组处理 L02 细胞的形态损伤逐渐加剧,增殖活性逐渐降低,呈时间依赖性。自噬相关蛋白 LC3 和 Beclin-1 在 OGD 6 h/R 1 h 即有所增高,随着再灌注时间的延长,LC3 的表达量逐渐增高并于再灌注 6 h 时大量增加,于再灌注 12 h 时达到最大值($P < 0.01$);Beclin-1 蛋白的表达量随再灌注时间的延长逐渐增加于 6 h

和 12 h 急剧增加($P < 0.01$);p62 蛋白于 OGD 6 h/R 1 h 时和 3 h 无明显变化,而在再灌注 6 h 时开始急剧增加,于 12 h 达到最大值($P < 0.01$)。结论 OGD/R 可诱导人正常肝 L02 细胞自噬水平上调,并且导致细胞的自噬性死亡。

关键词 自噬;糖氧剥夺;再灌注;L02 细胞

中图分类号 R 614.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0475-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.003

肝脏缺血再灌注损伤(hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI)是外科常见的病理生理过程,血液灌流量的减少使肝脏组织发生缺血性损伤,恢复血液灌流后,肝细胞功能代谢及结构破坏反而加重。肝脏缺血再灌注后细胞损伤的机制主要有:氧自由基的产生、钙超载、Kupffer 细胞激活及中性粒细胞的聚集、微循环功能障碍等^[1]。近年来研究^[2]表明,其还可能与凋亡和自噬有关。自噬可利用溶酶体来降解损伤蛋白及细胞器,生理情况下,低水平自噬可作为保护机制,及时地清除有害物质,恢复细胞

2017-02-05 接收

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20133420110009)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院麻醉科,合肥 230022

作者简介:马秀雅,女,硕士研究生;

李元海,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:liyuanhai-1@163.com

Effect of targeting SIRT1 silence on proliferation of cardiac fibroblasts in neonatal rat

Shi Peng^{1,2}, Tao Hui^{1,2}, Zhang Jia Gui^{1,2}, et al

(¹Dept of Cardio-Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Cardiovascular Disease Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract **Objective** To investigate the effect of silent information regulator 1 (SIRT1) on the proliferation of cardiac fibroblasts in neonatal rat. **Methods** The original generation of rats cardiac fibroblasts were delt with TGF- β 1. qRT-PCR was applied to assess the mRNA expression levels of SIRT1 and α -SMA. The protein expression levels of SIRT1 and α -SMA were detected by Western blot. MTT assay was used to determine the cytoactive of cardiac fibroblasts. LipofectamineTM 2000 Reagent was used to transfected cardiac fibroblasts with siRNA-SIRT1. **Results** The expression of SIRT1 protein and mRNA was down-regulated in the cardiac fibroblasts transfected with siRNA-SIRT1, as well as the α -SMA protein and mRNA expression. The activity of cardiac fibroblasts was restrained after transfected with siRNA-SIRT1. **Conclusion** siRNA-SIRT1 can suppress proliferative activity of cardiac fibroblasts obviously. SIRT1 could be a new therapeutic target of preventing cardiac remodeling. The application of its regulator will provide the new idea and method for the prevention and treatment programs of myocardial fibrosis.

Key words SIRT1; cardiac fibroblasts; α -SMA