

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.04.022

论著·实验研究

组蛋白乙酰化/去乙酰化失衡对平面细胞极性途径关键基因影响的研究

段泓宇 张怡 周开宇 王川 邱大健 华益民

(四川大学华西第二医院儿科/四川大学华西第二医院心脏发育与早期干预实验室/
四川大学出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 观察组蛋白乙酰化/去乙酰化失衡对胎鼠心脏的致畸作用及对 H9C2 心肌细胞平面细胞极性(PCP)途径关键基因 Vangl2、Scrib、Rac1 表达的影响。**方法** 将40只 C57/B6 孕小鼠随机分为空白对照组($n=10$)、溶剂对照组($n=10$)和丙戊酸(VPA)组($n=20$)；应用组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂 VPA 单次剂量 700 mg/kg 腹腔注射妊娠第 10.5 天(E10.5 d) VPA 组孕鼠,溶剂对照组孕鼠腹腔注射等量生理盐水,空白对照组不做任何处理。于 E15.5 d 处死孕鼠,统计死胎率；取活胎鼠心脏行苏木精-伊红(HE)染色,观察 VPA 对胎鼠心脏的致畸作用。培养 H9C2 心肌细胞并将其分为空白对照组、溶剂对照组和 VPA 组,VPA 组以不同浓度(2.0、4.0、8.0 mmol/L)作用于 H9C2 心肌细胞,溶剂对照组加入等量生理盐水,空白对照组不进行任何处理。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 HDAC1~3 及 Vangl2、Scrib、Rac1 基因在 VPA 干预后 24、48、72 h mRNA 及其蛋白表达水平；比色法测定总 HDAC 活性变化。**结果** VPA 组胎鼠死亡率为 31.7%,心脏畸形发生率显著高于两对照组($P<0.05$)。与两对照组相比,不同浓度 VPA 干预后各时间点,HDAC1 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$),而蛋白表达水平于 48 h 及 72 h 显著降低($P<0.05$)；不同浓度 VPA 干预后,HDAC2 mRNA 仅在 24 h 表达显著下降($P<0.05$),而蛋白表达水平在各时间点均显著下调($P<0.05$)；HDAC3 mRNA 在 VPA (4.0 mmol/L、8.0 mmol/L)干预的各时间点均表达增高($P<0.05$),而蛋白表达水平在不同浓度 VPA 干预后各时间点均下调($P<0.05$)。与两对照组相比,不同浓度 VPA 干预后,Vangl2、Scrib mRNA 及其蛋白表达水平在 48 h、72 h 均显著下降($P<0.05$),Vangl2 蛋白表达仅在 72 h 降低($P<0.05$)。与两对照组相比,VPA (4.0 及 8.0 mmol/L)干预后 24 h,总 HDAC 活性显著降低($P<0.05$)；干预后 48 h、72 h,不同浓度 VPA 组总 HDAC 活性均明显降低($P<0.05$)。**结论** VPA 可能通过直接抑制 HDAC1~3 蛋白表达水平及总 HDAC 活性致乙酰化/去乙酰化失衡,从而导致 PCP 途径关键分子 Vangl2、Scrib mRNA 及蛋白表达水平下调,这可能是先天性心脏病发生的机制之一。

[中国当代儿科杂志, 2017, 19(4): 475-483]

[关键词] 组蛋白乙酰化/去乙酰化失衡；组蛋白去乙酰化酶；平面细胞极性；H9C2 心肌细胞；小鼠

Effect of histone acetylation/deacetylation imbalances on key gene of planar cell polarity pathway

DUAN Hong-Yu, ZHANG Yi, ZHOU Kai-Yu, WANG Chuan, QIU DA-Jian, HUA Yi-Min. Department of Pediatrics, West China Second Hospital of Sichuan University/Cardiac Development and Early Intervention Unit, West China Second Hospital of Sichuan University/Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education, Chengdu 610041, China (Hua Y-M, Email: Nathan_hua@163.com)

Abstract: Objective To investigate the effect of histone acetylation/deacetylation imbalances on embryonic hearts of mice and its effect on key genes of planar cell polarity (PCP) pathway-Vangl2, Scrib and Rac1 in H9C2 cells. **Methods** Forty pregnant C57/B6 mice were randomly assigned into three groups: blank group ($n=10$), vehicle group ($n=10$), and valproic acid (VPA)-treated group ($n=20$). In the VPA-treated group, VPA, a histone deacetylase (HDAC)

[收稿日期] 2016-12-01；[接受日期] 2017-02-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81602817)；四川省科技厅科技支撑项目(2016FZ0088)。

[作者简介] 段泓宇,男,硕士,主治医师。

[通信作者] 华益民,男,主任医师。

inhibitor, was administered to each individual dam intraperitoneally at a single dose of 700 mg/kg on embryonic day 10.5 (E10.5). The vehicle and blank groups received equivalent saline or no interventions, respectively. Dams were sacrificed on E15.5, and death rates of embryos were evaluated. Subsequently, embryonic hearts of survival fetus were removed to observe cardiac abnormalities by hematoxylin-eosin (HE) staining. H9C2 cells were cultured and allotted to the blank, vehicle, and VPA-treated groups: the VPA treated group received VPA exposure at concentrations of 2.0, 4.0 and 8.0 mmol/L; the vehicle and blank groups received equivalent saline or no interventions, respectively. HDAC1-3 as well as Vangl2, Scrib and Rac1 mRNA and protein expression levels were determined by quantitative real-time PCR and Western blot, respectively. The total HDAC activity was analyzed by colorimetric assay. **Results** The fetus mortality rate after VPA treatment was 31.7%, with a significantly higher rate of cardiac abnormalities in comparison with the controls ($P<0.05$). In comparison with the blank and vehicle groups, HDAC1 mRNA was significantly increased at various concentrations of VPA treatment at all time points of exposure ($P<0.05$), together with a reduction of protein level after 48 and 72 hours of exposure ($P<0.05$). The inhibition of HDAC2 mRNA after various concentrations of VPA incubation was pronounced at 24 hours of exposure ($P<0.05$), while the protein levels were reduced at all time points ($P<0.05$). HDAC3 mRNA was prominently induced by VPA (4.0 and 8.0 mmol/L) at all time points of treatment ($P<0.05$). In contrast, the protein level was inhibited after VPA treatment ($P<0.05$). In comparison with the blank and vehicle groups, Vangl2 mRNA as well as Scrib mRNA/protein expression levels were markedly reduced after 48 and 72 hours of VPA treatment ($P<0.05$), together with a reduction of protein level in Vangl2 at 72 hours ($P<0.05$). Compared with the blank and vehicle groups, a significant repression in the total HDAC activity was observed in the VPA-treated group at concentrations of 4.0 and 8.0 mmol/L after 24 hours of treatment ($P<0.05$), and the effect persisted up to 48 and 72 hours, exhibiting pronounced inhibition at all concentrations ($P<0.05$). **Conclusions** VPA might result in acetylation/deacetylation imbalances by inhibiting HDAC1-3 protein expression and total HDAC activity, leading to the down-regulation of mRNA and protein expression of Vangl2 and Scrib. This could be one of the mechanisms contributing to congenital heart disease. [Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(4): 475-483]

Key words: Histone acetylation/deacetylation imbalances; Histone deacetylase; Planar cell polarity; H9C2 cell; Mice

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 发病率为 6%~8%, 居出生缺陷首位, 是我国婴儿死亡的首要原因, 严重危害我国儿童身心健康。因此, CHD 发病机制的阐明对于其预防及早期干预具有重要的临床意义。心脏发育是一个极其复杂的过程, “心肌化”过程是保证胚胎心脏正常发育的关键环节。平面细胞极性 (planar cell polarity, PCP) 途径参与心肌细胞的黏附、运动和极化, 通过精确调控心肌细胞定向迁移保证 “心肌化”过程顺利完成。其中, Vangl2、Scrib 及 Rac1 是 PCP 途径的关键分子, 相关文献提示其表达缺失使心肌细胞迁移受到抑制, 导致心脏流出道、心室肌发育异常^[1]。

研究表明, 40%~80% CHD 的发生并非由于 DNA 序列的改变, 而与环境-遗传交互作用有关。不良环境暴露可通过表观遗传学修饰使特定基因沉默或过表达, 导致蛋白表型改变, 最终引起疾病的发生。其中, 组蛋白乙酰化/去乙酰化水平可通过改变染色质结构的疏密程度, 调控转录因子与 DNA 结合, 决定靶基因表型。该动态平衡如受干扰, 将使心肌细胞相关基因表达异常, 导致 CHD 发生^[2], 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase,

HDAC) 是参与这一调控的关键酶, 其表达水平异常与组蛋白乙酰化/去乙酰化失衡密切相关^[2]。然而, 组蛋白乙酰化/去乙酰化失衡是否可引起心肌细胞 PCP 关键分子的变化迄今尚未阐明。丙戊酸 (valproic acid, VPA) 为短链脂肪酸类 HDAC 抑制剂, 可抑制 HDAC 表达及活性, 导致组蛋白乙酰化水平升高, 进而干扰组蛋白乙酰化/去乙酰化的动态平衡, 且本团队前期研究提示 VPA 可抑制 C2C12 肌细胞肌相关蛋白表达下调, 抑制其成肌分化^[3]。因此, 本研究利用 VPA 干扰 H9C2 心肌细胞乙酰化/去乙酰化修饰的动态平衡, 评估 HDAC1~3 及 Vangl2、Scrib、Rac1 表达水平的变化, 探讨组蛋白乙酰化/去乙酰化失衡时 PCP 关键分子的变化, 从表观遗传学角度认识心脏早期发育的调控通路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞来源

6~8 周健康成年清洁级野生型 C57/B6 小鼠, 体重 20~25 g, 购自四川大学动物实验中心, H9C2 心肌细胞购自中国科学院武汉生物细胞库。

1.2 主要仪器及试剂

胎牛血清、MEM/F12培养基(美国Corning公司); VPA、蛋白酶抑制剂Cocktail(美国Sigma-Aldrich公司); RIPA裂解液(强)(北京索莱宝科技有限公司); TRIzol(美国Life Technology公司); RNA逆转录试剂盒(日本Takara公司); SsoFast EvaGreen PCR试剂盒(美国Bio-Rad公司); HDAC1~3及Vangl2一抗(美国Proteintech公司); Scrib、Rac1一抗(美国Santa Cruz公司); GAPDH(北京康为世纪生物科技有限公司); HDAC活性试剂盒(美国BioVision公司)。酶标仪(美国Thermo Scientific公司); 徕卡倒置相差显微镜DM2000(德国Leica微系统有限公司); 荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

1.3 H9C2心肌细胞培养

常规复苏H9C2心肌细胞,使用含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及100 μg/mL链霉素的MEM/F12培养基在37℃、5%CO₂饱和湿度下培养于T75培养瓶中,每隔2~3 d传代1次,当细胞数量达到实验所需时,将细胞用0.25%胰酶(美国GIBCO公司)消化后1200 r/min离心3 min,弃去上清液,加入MEM/F12培养基重悬细胞,调整细胞含量为2×10⁵/mL,每孔2 mL移入6孔板中,待细胞密度达70%~80%开始干预。

1.4 实验分组

将小鼠于25℃环境下饲养,自由饮食、饮水,相对湿度50%~60%,噪音80分贝以下,通风换气15~20次/h。随机选取发情期雌鼠与雄鼠以3:1合笼,查见阴栓者记为孕0.5 d(E0.5 d)。

本研究团队前期预实验结果显示^[4]:孕鼠能够耐受VPA的最大剂量为700 mg/kg,此时流产率约30%~50%,超过这一剂量,孕鼠流产率高达80%~100%,因此本研究选择最大剂量VPA 700 mg/kg处理孕鼠;小鼠胚胎心脏发育的关键时期为E11.5~E14.5 d,故选择于E10.5 d对孕鼠进行干预。随机分配上述健康清洁级野生型C57/B6孕鼠为空白对照组(*n*=10)、溶剂对照组(*n*=10)和VPA干预组(*n*=20)。VPA干预组孕鼠于

E10.5 d腹腔注射VPA 700 mg/kg(溶剂为生理盐水);溶剂对照组孕鼠腹腔注射等量生理盐水;空白对照组不做任何处理。

参考相关文献,VPA干预细胞的浓度范围为1.0~10.0 mmol/L^[5-7],结合本研究团队前期研究^[3],故选用2.0、4.0及8.0 mmol/L浓度梯度VPA对细胞进行干预。将细胞分为空白对照组、溶剂对照组及VPA干预组。空白对照组不进行任何处理,溶剂对照组加入等量生理盐水,VPA干预组予不同浓度梯度VPA处理细胞。所有样品同时置于5%CO₂的37℃培养箱中培养,按照细胞所要求的培养基种类每天更换培养基并进行相同的处理。分别于处理后24、48及72 h采集细胞行下一步检测。

1.5 胚胎心脏苏木精-伊红染色

于E10.5 d断颈处死孕鼠,打开腹腔、分离子宫,取出胚胎后于解剖显微镜下分离胎心。PBS清洗后于10%福尔马林固定2 h。60%、70%、80%、95%及100%梯度酒精脱水各1 h。二甲苯透明后石蜡包埋、心脏连续切片(主动脉弓顶部-心尖),行苏木精-伊红(HE)染色,观察胚胎心脏结构发育异常。

1.6 RNA提取及cDNA合成

每组平行设3个复孔,TRIzol裂解细胞,严格按照试剂盒说明书提取总RNA,采用Nanodrop_2000分光光度计对提取后的RNA进行浓度及纯度检测。采用RNA逆转录试剂盒严格按照说明书操作,将1 μg RNA逆转录为cDNA。

1.7 实时荧光定量PCR

本研究所有引物均经过扩增效率检测,扩增效率均>95%。使用SsoFast EvaGreen PCR试剂盒进行qRT-PCR。体系总量为10 μL: EvaGreen 5 μL,无核酸酶水3 μL,正反向引物各0.5 μL, cDNA 1 μL。PCR扩增条件为:95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 55℃ 10 s,共39个循环;而后65~95℃绘制熔解曲线,基因相对表达量以2^{-ΔΔCt}表示。各基因引物序列、片段长度及退火温度见表1。实验独立重复3次。

表 1 PCR 引物序列、长度及退火温度

| 引物名称 | 引物序列 | 片段长度 (bp) | 退火温度 (°C) |
|--------|------------------------------------|-----------|-----------|
| HDAC1 | 上游: 5'-CACAGCGAGACTACATCAAG-3' | 129 | 55 |
| | 下游: 5'-ACAGAAGCTCAAACAAGCCATCA-3' | | |
| HDAC2 | 上游: 5'-CAGTTGCCCTTGATTGTGAAAT-3' | 121 | 55 |
| | 下游: 5'-TCTGGAGTGTCTGGTTTGTCA-3' | | |
| HDAC3 | 上游: 5'-CGTCCGAAATGTTGC-3' | 74 | 55 |
| | 下游: 5'-GAAGTTCTCTACTAATGG-3' | | |
| Vangl2 | 上游: 5'-CGAAACAGCAGCCTTACCAC-3' | 170 | 55 |
| | 下游: 5'-CTCGCTCACCAATGTCCAC-3' | | |
| Scrib | 上游: 5'-ACCGCATCCTAGCAGTGAAT-3' | 107 | 55 |
| | 下游: 5'-CCTCCGTACAAGCAGACACA-3' | | |
| Rac1 | 上游: 5'-TGCTGTCAAATACCTGGAGTGTCT-3' | 217 | 55 |
| | 下游: 5'-TTGGCATCAGACGCGAAGACTC-3' | | |
| GAPDH | 上游: 5'-CAGGCTCGACCTTGCCACAGCCTT-3' | 187 | 55 |
| | 下游: 5'-GCCAAGGATATCCATGACAAC-3' | | |

1.8 Western blot 检测

每组平行设 3 个复孔, 用预冷 PBS 清洗细胞数次, 使用 RIPA (强) 与蛋白酶抑制剂 (1:25 混合) 裂解细胞, 冰上作用 20 min, 4°C 9661 r/min 离心 15 min, 留取上清液, BCA 法测定样品蛋白浓度。蛋白变性后, 采用 8% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶 (SDS-polyacrylamide gel, SDS-PAGE), 每孔加入 50 μg 总蛋白电泳, 通过 100 V 电转 2 h 将蛋白印迹至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶 (TBST 配置) 室温封闭 1 h, 加入封闭液稀释的一抗 HDAC1 (1:1000)、HDAC2 (1:1000)、HDAC3 (1:500)、Vangl2 (1:1000)、Scrib (1:500)、Rac1 (1:200)、GAPDH (1:500), 置于 4°C 冰箱孵育过夜。TBST 洗膜 10 min × 3 次, 加入相应二抗室温孵育 90 min, TBST 洗膜 10 min × 3 次后, 采用化学发光法进行显色, 最后采用 Bio-Rad 成像系统采集图像, 利用 Gelpro32 软件进行半定量分析。目的蛋白相对表达量采用其灰度值与相应内参 (GAPDH) 灰度值之比表示。实验独立重复 3 次。

1.9 总 HDAC 活性检测

利用比色法测定总 HDAC 活性, 具体实验步骤参照 HDAC 酶活性检测试剂盒说明书: (1) 裂解细胞提取蛋白并测定蛋白浓度, 在圆底 96 孔酶标板中每孔加入 100 μg 蛋白, 每组平行设 3 个复孔, 并加入无核酸酶水稀释至 85 μL; 加入 75 μL 无核酸酶水稀释 10 μL HeLa 细胞核提取液作为阳性对照; 83 μL 无核酸酶水中加入 2 μL 曲古抑素 A 作为阴性

对照。(2) 每孔加 10 μL 10× HDAC 分析缓冲液及 5 μL HDAC 发光底物充分混合, 37°C 孵育 1 h。

(3) 每孔加入 10 μL 赖氨酸显色剂, 充分混匀, 37°C 孵育 30 min。(4) 利用酶标仪测定 A405 nm 处的光密度值, 根据标准曲线计算出每个样品的总 HDAC 活性 [μmol/(L·μg)]。实验独立重复 3 次。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计学软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本均数比较采用方差分析, 采用 Tukey 法进行组间多重比较; 计数资料以百分率 (%) 表示, 多组间比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。计数资料组间两两比较采用卡方分割法, 调整 $P < 0.017$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VPA 干预孕鼠致胎鼠心脏畸形的发生情况

VPA 干预组胎鼠死亡率较空白及溶剂对照组显著增加 ($P < 0.05$); 胎鼠心脏 HE 染色观察心脏结构发育异常显示, 上述 3 组活胎鼠中心心脏畸形发生率分别为 16.1%、1.1%、1.3%, VPA 干预组心脏畸形发生率显著高于两对照组 ($P < 0.05$) (表 2); VPA 干预组心脏畸形主要表现为室间隔缺损 (VSD) (14/18)、心室壁变薄伴心肌致密化不全 (NVM) (4/18) (图 1), 而空白对照组和溶剂对照组均为 1 例房间隔缺损 (ASD)。

表 2 VPA 干预孕鼠致胎鼠心脏畸形发生率的比较

| 组别 | 孕鼠数 | 胚胎总数 | 死胎率 [n(%)] | 活胎总数 | 活胎中心脏畸形发生率 [n(%)] |
|------------|-----|------|-------------------------|------|-------------------------|
| 空白对照组 | 10 | 90 | 2(2.2) | 88 | 1(1.1) |
| 溶剂对照组 | 10 | 82 | 2(2.4) | 80 | 1(1.3) |
| VPA 干预组 | 20 | 164 | 52(31.7) ^{a,b} | 112 | 18(16.1) ^{a,b} |
| χ^2 值 | | | 52.18 | | 22.44 |
| P 值 | | | <0.001 | | <0.001 |

注：a 示与空白对照组比较， $P < 0.017$ ；b 示与溶剂对照组比较， $P < 0.017$ 。

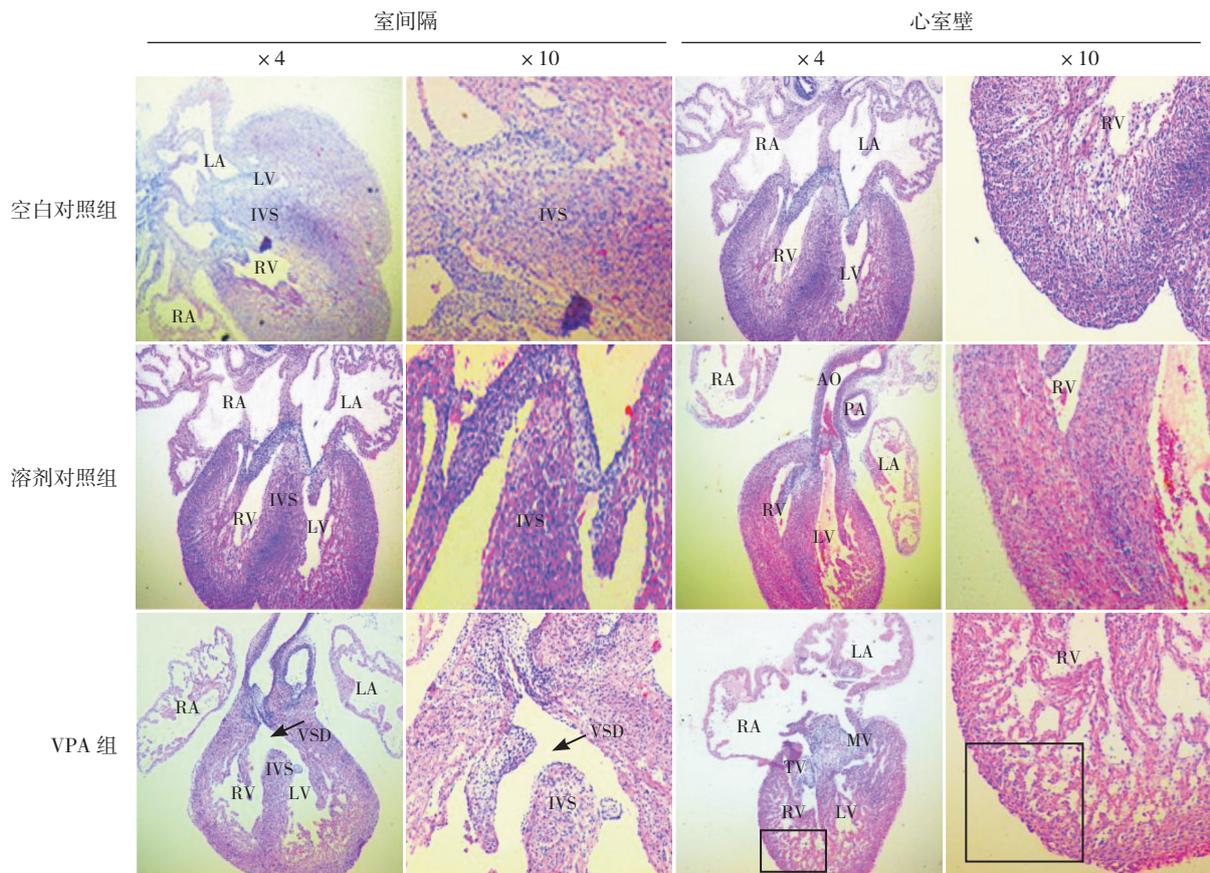


图 1 VPA 致胎鼠心脏发育异常 (苏木精-伊红染色) [LA] 左心房; [RA] 右心房; [LV] 左心室; [RV] 右心室; [IVS] 室间隔; [VSD] 室间隔缺损; [AO] 主动脉; [PA] 肺动脉; [TV] 三尖瓣; [MV] 二尖瓣。对照组室间隔发育完整, 心室壁致密、增厚; VPA 干预组室间隔见 VSD (箭头所示); 与空白及溶剂对照组相比, VPA 干预组心腔明显变小, 并见心室壁菲薄伴心肌致密化不全 (方框所示)。

2.2 VPA 对 H9C2 细胞 HDACs mRNA 及蛋白表达水平的影响

与空白及溶剂对照组比较, HDAC1 于 VPA 2.0、4.0 及 8.0 mmol/L 干预后 24、48、72 h mRNA 表达水平均明显上调 ($P < 0.05$); 而与 mRNA 变化相反, 蛋白表达水平于干预后 48 h 及 72 h 显著降低 ($P < 0.05$)。与空白及溶剂对照组比较, HDAC2 于 VPA 2.0、4.0 及 8.0 mmol/L 干预后, 仅

在 24 h 时 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$), 蛋白表达水平于干预后各时间点均显著下降 ($P < 0.05$)。与空白及溶剂对照组比较, HDAC3 mRNA 于 VPA 4.0 及 8.0 mmol/L 干预后各时间点表达均明显上调 ($P < 0.001$), 而蛋白表达水平于 VPA 2.0、4.0 及 8.0 mmol/L 干预后各时间点均显著降低 ($P < 0.01$)。不同浓度 VPA 干预组间, 于各时间点分别比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

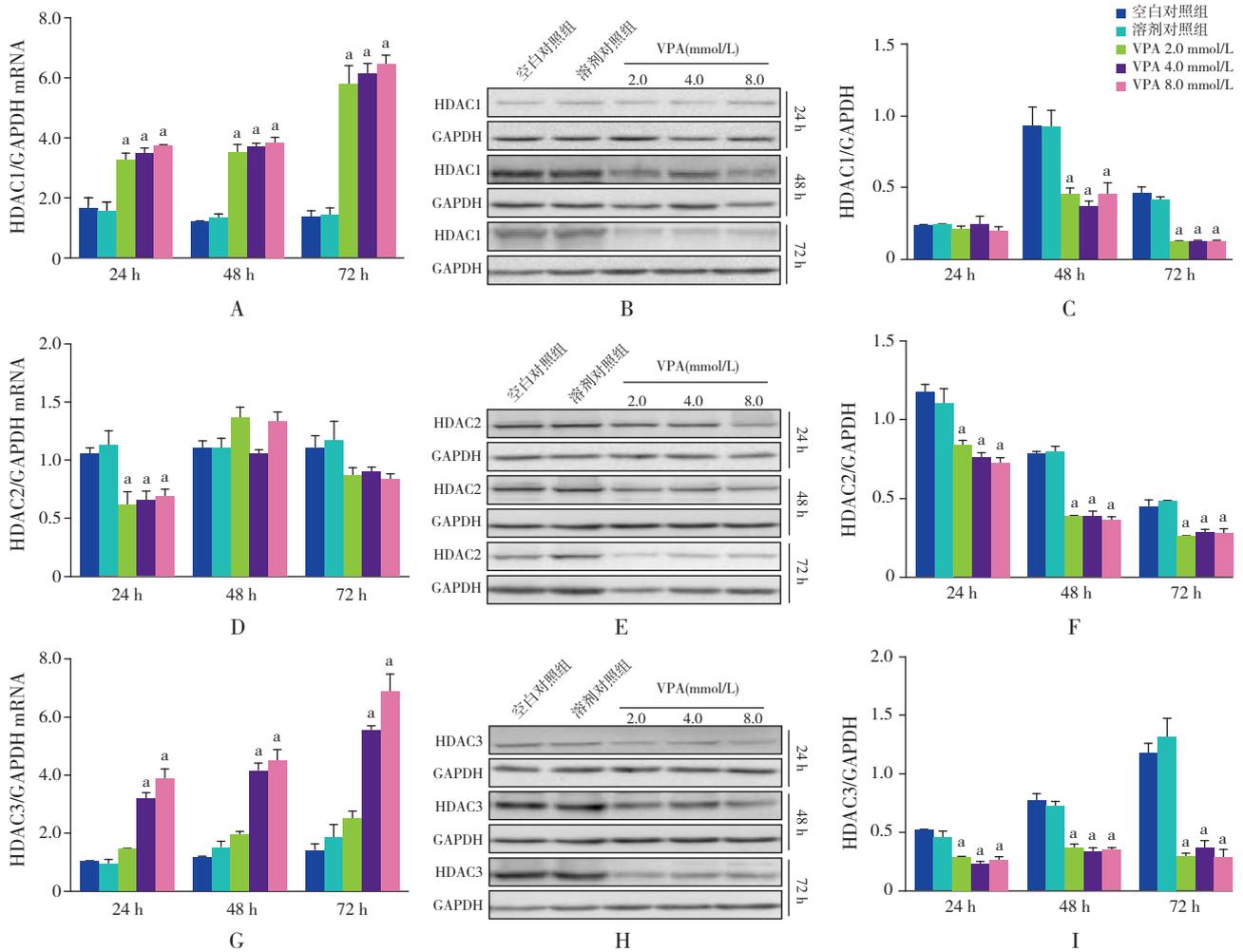


图2 各组 HDACs mRNA 及蛋白表达水平比较 ($n=3$) A~C: VPA 干预对 HDAC1 mRNA 及蛋白水平的影响; D~F: VPA 干预对 HDAC2 mRNA 及蛋白水平的影响; G~I: VPA 干预对 HDAC3 mRNA 及蛋白水平的影响。a 示与空白及溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。

2.3 VPA 对 H9C2 细胞 PCP 关键分子 mRNA 及蛋白表达水平的影响

与空白及溶剂对照组相比, Vangl2 及 Scrib mRNA 表达水平于不同浓度 VPA 干预后 48 h 及 72 h 均显著下降 ($P<0.05$); Vangl2 蛋白表达水平于干预后 72 h 显著下降 ($P<0.05$); Scrib 蛋白表达水平于干预后 48 h 及 72 h 均显著下调 ($P<0.05$)。Rac1 mRNA 及蛋白表达水平与空白及溶剂对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。不同浓度 VPA 干预组间, 于各时间点分别比较差异均无统

计学意义 ($P>0.05$)。见图 3。

2.4 VPA 对 H9C2 细胞总 HDAC 活性的影响

与空白及溶剂对照组比较, VPA 4.0、8.0 mmol/L 干预后 24 h, 总 HDAC 活性显著降低 ($P<0.05$), 而 2.0 mmol/L VPA 干预组较空白及溶剂对照组总 HDAC 活性无显著变化 ($P>0.05$); 干预后 48 h 及 72 h, 3 个剂量 VPA 干预组总 HDAC 活性均显著低于空白及溶剂对照组 ($P<0.05$)。不同浓度 VPA 干预组间, 于各时间点分别比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 4。

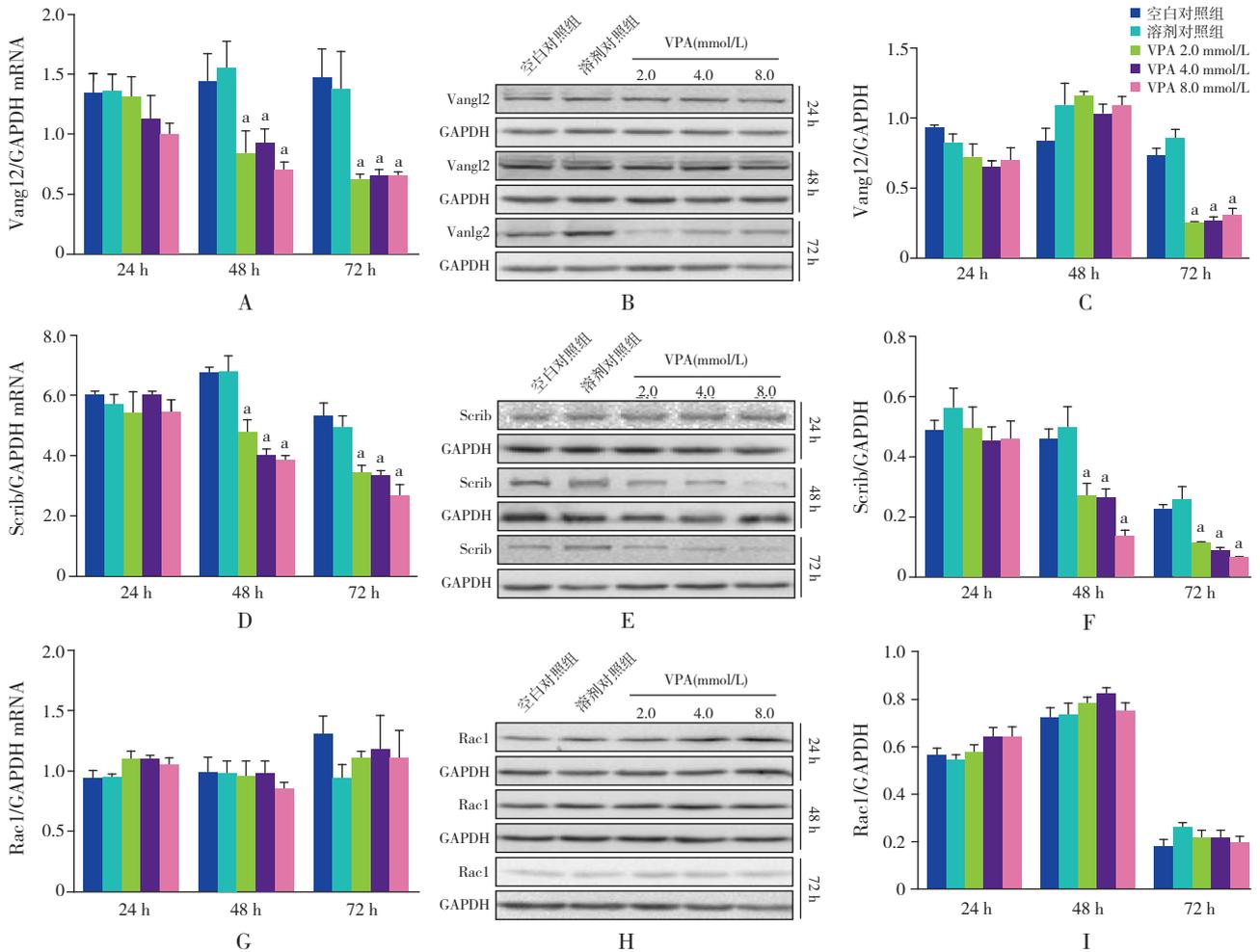


图3 各组PCP关键分子mRNA及蛋白表达水平比较($n=3$) A~C: VPA干预对Vangl2 mRNA及蛋白水平的影响; D~F: VPA干预对Scrib mRNA及蛋白水平的影响; G~I: VPA干预对Rac1 mRNA及蛋白水平的影响。a示与空白及溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。

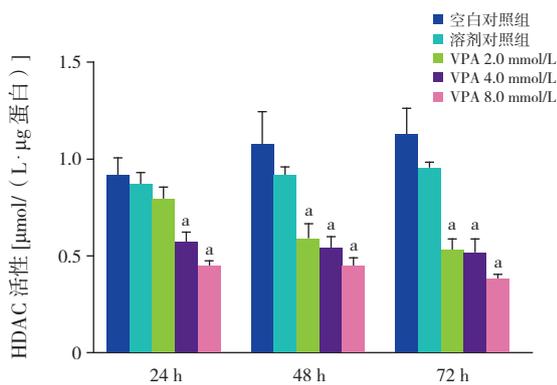


图4 各组总HDAC活性比较($n=3$) a示与空白及溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

胚胎心脏正常发育需要众多基因在不同时间和空间顺次精确表达, 如果这些关键基因表达

异常, 将不同程度干扰胚胎心脏的分子调控程序化进程, 最终导致CHD的发生。PCP途径中的Vangl2、Scrib及Rac1是与心脏早期发育密切相关的3种关键蛋白, 其表达缺失将干扰“心肌化”过程, 引起心脏发育异常: Vangl2参与心室肌与流出道的发育, 基因突变致胎鼠心肌细胞分化异常, 不能伸出板状和丝状伪足, 细胞极化、迁移受抑制^[8]; Scrib与心肌细胞间黏附有关, 表达缺失可致心脏祥化异常、VSD、心室壁变薄及心肌致密化不全^[9]; Rac1缺失可导致心肌细胞变为球形、心室小梁化异常、细胞凋亡增加^[10]。因此, 进一步研究PCP关键分子的表达及调控, 成为CHD病因探讨中的关键问题。

近年研究显示, 表观遗传学修饰调控着不同环境下基因的表达模式, 是外界环境改变致疾病发生、发展的关键机制。表观遗传学修饰所致的

组蛋白乙酰化状态改变是环境因素致畸的重要原因^[11-12]。其中, HDAC 是参与去乙酰化表观遗传学调控的关键酶: 可去除组蛋白赖氨酸残基的乙酰化基团, 使染色质结构致密, 阻碍转录因子与 DNA 结合, 抑制转录^[13]。其中, I 类 HDAC 中的 HDAC1~3 组织分布最为广泛, 参与心肌细胞分化、脂代谢, 在心脏早期发育过程中起着至关重要的作用, 其表达缺失可导致心肌细胞过度增生、造成扩张性心肌病、右心室肥厚与闭塞等多种先天性心脏发育异常^[14-16]。因此, HDAC 作为一种重要的表观遗传调控因子, 对转录具有“开-关”作用; 而 PCP 通路在“心肌化”过程中对心肌细胞极化、迁移起重要调控作用, 阐明两者之间的调控作用将有利于更深层次地从表观遗传学角度探寻环境因素所致 CHD 的分子生物学机制。

VPA 作为一种传统的抗惊厥药物被广泛应用于临床^[17]。同时, 它也是一种 HDAC 抑制剂, 主要可通过抑制 I 类 HDAC 活性, 发挥抗增殖、促凋亡等抗肿瘤作用^[13]。但是, VPA 具有潜在致畸作用, 妊娠期使用可致神经管、心血管、骨骼等多种畸形^[18]。本研究证实, VPA 可致胎鼠心脏结构发育异常, 主要表现为 VSD、心室壁变薄及心肌致密化不全, 这些病理改变与 PCP 关键分子表达缺失所致病理改变有诸多相似之处, 推测 VPA 可能通过干扰 PCP 途径导致胚胎心脏发育异常。因此, 本研究在细胞水平, 利用 VPA 干预大鼠胚胎心肌细胞 H9C2, 进一步探讨其对 HDAC 及 PCP 相关基因的影响。研究结果显示, VPA 可上调 HDAC1、3 mRNA 表达水平, 随 VPA 浓度增加, 表达水平逐渐升高, 而两者蛋白表达变化与 mRNA 变化恰好相反, mRNA 表达上调与蛋白表达下调相平行, 且均在干预后 48 h 及 72 h 最为显著; HDAC2 mRNA 及蛋白表达水平变化一致, 均为下降, 于干预后 24 h 最为明显, 提示 VPA 干预对 HDAC1、3 的作用机制有别于 HDAC2。国外相关文献亦报道, VPA 对不同 HDAC 的作用具有选择性、差异性及细胞特异性: Bradbury 等^[19]报道 VPA 可通过增加 H3K4 甲基化水平, 选择性上调 HL60 白血病细胞株中 HDAC11 mRNA 及蛋白表达水平, 而对人宫颈癌细胞株 HDAC11 表达没有影响; Kwiecińska 等^[5]研究结果亦显示, VPA 可选择性抑制人卵巢癌细胞 HDAC2、7 蛋白表达水

平, 而对其他 HDAC 无影响; Krämer 等^[20]利用 VPA 干预鼠畸胎瘤细胞和人肾胚胎瘤细胞发现, VPA 可选择性抑制 HDAC2 蛋白表达, 而其 mRNA 表达水平没有变化, 进一步实验证实 VPA 可通过泛素化酶 E2 激活蛋白酶体加速 HDAC2 蛋白降解而降低其蛋白表达水平。结合相关文献报道, 我们推测, 本研究中 VPA 干预后 HDAC1、3 mRNA 表达升高伴随蛋白表达下降的其中一种可能解释为: VPA 可选择性作用于 HDAC1、3, 参与转录后调控, 使其蛋白错误折叠、蛋白构象发生改变, 进而被从内质网清除, 由泛素-蛋白酶体系统降解^[21-22], 而蛋白水平下降导致 mRNA 代偿性升高^[23]。总 HDAC 活性测定证实了 VPA 对 HDAC 活性的抑制作用, 且也于干预后 48 h 及 72 h 最为显著, 与 HDAC1~3 的蛋白表达水平降低时间点一致, 表明 HDAC1~3 是 H9C2 中最主要的去乙酰化酶, 也提示其表达被抑制可能是导致乙酰化/去乙酰化失衡的重要原因。为明确 VPA 对 PCP 关键分子的影响, 本实验对 Vangl2、Scrib 及 Rac1 的表达水平进行检测, 结果显示 Vangl2、Scrib mRNA 及蛋白表达均被抑制, mRNA 表达下降于干预后 48 h 最为明显, 而蛋白表达则于 72 h 最为显著, mRNA 与蛋白变化的时序不一致性可能与蛋白的表达峰度及半衰期相关^[24-25]。

上述结果显示, HDAC 抑制剂 VPA 可抑制 HDAC1~3 蛋白表达及功能, HDAC 下调同时 Vangl2、Scrib mRNA 及蛋白表达水平亦下调, 提示 HDAC1~3 可能对 Vangl2、Scrib 存在正向调控作用, 而非组蛋白去乙酰化修饰发挥的负向调控作用。既往文献表明: 基因敲除小鼠胚胎干细胞中 HDAC1 表达后采用基因微阵列技术分析发现, 约 7% 的基因表达受影响, 其中 2/3 基因表达上调 (HDAC1 为靶基因的抑制因子), 而余 1/3 表达下调 (提示 HDAC1 为靶基因的激活因子), 提示 HDAC 对基因的调控作用远不仅局限于组蛋白去乙酰化修饰^[26]。除组蛋白外, HDAC 也可对非组蛋白进行翻译后修饰, 发挥正向调控作用。这种激活作用既可位于转录水平, 即 HDAC 作为转录激活因子 (如对 Gjal 的调控) 或与其他转录因子共同形成复合物 (如对糖皮质激素受体的调控) 直接参与转录激活, 也可位于转录后水平^[14,26-27]。

因此, 本研究结果证实 VPA 可直接抑制

HDAC1~3 蛋白表达水平及总 HDAC 活性, 导致乙酰化 / 去乙酰化失衡, 同时下调 PCP 途径关键分子 *Vangl2*、*Scrib* mRNA 及蛋白表达水平, 这可能是环境因素致 CHD 发生的机制之一。但是, VPA 对 I 类 HDAC 的作用机制以及 HDAC 是否与 *Vangl2*、*Scrib* 相结合共同参与胚胎心肌细胞“心肌化”过程尚待进一步明确。目前, 多种 HDAC 调控药物已应用于临床^[13], 一旦两者之间的调控网络被阐明, 将对 CHD 的一级预防及早期干预产生一定的临床实用价值。

[参 考 文 献]

- [1] Davis EE, Katsanis N. Cell polarization defects in early heart development[J]. *Circ Res*, 2007, 101(2): 122-124.
- [2] Gallinari P, Di Marco S, Jones P, et al. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics[J]. *Cell Res*, 2007, 17(3): 195-211.
- [3] 李一飞, 华益民, 方婕, 等. 组蛋白乙酰化 / 去乙酰化失衡对 C2C12 肌原细胞成肌分化的影响 [J]. *中华妇幼临床医学杂志*, 2014, 10(5): 36-41.
- [4] Wu G, Nan C, Rollo JC, et al. Sodium valproate-induced congenital cardiac abnormalities in mice are associated with the inhibition of histone deacetylase[J]. *J Biomed Sci*, 2010, 17: 16.
- [5] Kwiecińska P, Wróbel A, Taubøll E, et al. Valproic acid, but not levetiracetam, selectively decreases HDAC7 and HDAC2 expression in human ovarian cancer cells[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 224(2): 225-232.
- [6] Barbeti V, Gozzini A, Cheloni G, et al. Time- and residue-specific differences in histone acetylation induced by VPA and SAHA in AML1/ETO-positive leukemia cells[J]. *Epigenetics*, 2013, 8(2): 210-219.
- [7] Fedier A, Dedes KJ, Imesch P, et al. The histone deacetylase inhibitors suberoylanilide hydroxamic (Vorinostat) and valproic acid induce irreversible and MDR1-independent resistance in human colon cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(3): 633-641.
- [8] Ramsbottom SA, Sharma V, Rhee HJ, et al. *Vangl2*-regulated polarisation of second heart field-derived cells is required for outflow tract lengthening during cardiac development[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(12): e1004871.
- [9] Phillips HM, Rhee HJ, Murdoch JN, et al. Disruption of planar cell polarity signaling results in congenital heart defects and cardiomyopathy attributable to early cardiomyocyte disorganization[J]. *Circ Res*, 2007, 101(2): 137-145.
- [10] Leung C, Lu X, Liu M, et al. *Rac1* signaling is critical to cardiomyocyte polarity and embryonic heart development[J]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(5): e001271.
- [11] Sadowski SL. Congenital cardiac disease in the newborn infant: past, present, and future[J]. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 2009, 21(1): 37-48.
- [12] Huhta J, Linask KK. Environmental origins of congenital heart disease: The heart-placenta connection[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2013, 18(5): 245-250.
- [13] Abend A, Kehat I. Histone deacetylases as therapeutic targets—from cancer to cardiac disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 147: 55-62.
- [14] Eom GH, Kook H. Posttranslational modifications of histone deacetylases: implications for cardiovascular diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 143(2): 168-180.
- [15] Kim YS, Kim MJ, Koo TH, et al. Histone deacetylase is required for the activation of Wnt/ β -catenin signaling crucial for heart valve formation in zebrafish embryos[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423(1): 140-146.
- [16] Reller MD, Strickland MJ, Riehle-Colarusso T, et al. Prevalence of congenital heart defects in metropolitan Atlanta, 1998-2005[J]. *J Pediatr*, 2008, 153(6): 807-813.
- [17] Peterson GM, Naunton M. Valproate: a simple chemical with so much to offer[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2005, 30(5): 417-421.
- [18] Jentink J, Dolk H, Loane MA, et al. Intrauterine exposure to carbamazepine and specific congenital malformations: systematic review and case-control study[J]. *BMJ*, 2010, 341: c6581.
- [19] Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors[J]. *Leukemia*, 2005, 19(10): 1751-1759.
- [20] Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, et al. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2[J]. *EMBO J*, 2003, 22(13): 3411-3420.
- [21] Thapar R, Denmon AP. Signaling pathways that control mRNA turnover[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(8): 1699-1710.
- [22] Wakabayashi-Nakao K, Tamura A, Furukawa T, et al. Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: ubiquitination and proteasomal degradation[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(1): 66-72.
- [23] Koraichi F, Videmann B, Mazallon M, et al. Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 211(3): 246-256.
- [24] Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(4): 304-313.
- [25] Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, et al. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(10): 960-969.
- [26] Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, et al. Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(21): 7913-7928.
- [27] Cao Y, Lu L, Liu M, et al. Impact of epigenetics in the management of cardiovascular disease: a review[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(20): 3097-3104.

(本文编辑: 万静)