

SIRT6-shRNA 预处理对缺氧/复氧诱导的 H9C2 心肌细胞损伤的影响及其机制

万为国 李君 叶天新 陈修寰 杨波 张翠

[摘要] **目的** 探讨通过 RNA 干扰技术抑制 H9C2 心肌细胞内的 SIRT6 基因表达对缺氧/复氧(A/R)诱导的细胞损伤的影响和机制。**方法** 将 H9C2 心肌细胞随机分为正常对照组(Con 组)、A/R 组、阴性对照 SIRT6-shRNA 质粒处理组(NC 组)和 SIRT6-shRNA 质粒处理组(shRNA 组)。检测 4 组 H9C2 心肌细胞的存活率、凋亡率、Caspase-3 活性及 SIRT6、核因子(NF)- κ Bp65、I- κ B α 表达水平及细胞培养液中白细胞介素(IL)-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平并进行比较。**结果** 与 Con 组相比,A/R 组 H9C2 心肌细胞存活率和细胞浆中 I- κ B α 蛋白表达水平明显降低,凋亡率、细胞 SIRT6 mRNA 和蛋白、细胞核中 NF- κ Bp65 蛋白表达水平、细胞培养液中 IL-6 和 TNF- α 水平及 Caspase-3 活性明显升高($P < 0.05$)。与 A/R 组比较,shRNA 组 H9C2 心肌细胞存活率、细胞 SIRT6 mRNA 和蛋白及细胞浆中 I- κ B α 蛋白表达水平明显降低,细胞凋亡率、细胞核中 NF- κ Bp65 蛋白、细胞培养液中 IL-6 和 TNF- α 水平及 Caspase-3 活性明显升高($P < 0.05$)。**结论** 抑制 H9C2 心肌细胞内 SIRT6 基因表达能促进炎症因子的分泌,激活 NF- κ B 信号通路,诱导细胞凋亡,加重 A/R 诱导的心肌细胞损伤。

[关键词] SIRT6; 缺氧/复氧; 凋亡; 心肌细胞; RNA 干扰

Effect of pretreatment of SIRT6-shRNA on H9C2 cardiomyocytes injure induced by anoxia/reoxygenation and its mechanism Wan Weiguo, Li Jun, Ye Tianxin, Chen Xiuhuan, Yang Bo, Zhang Cui. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of inhibiting intracellular SIRT6 gene expression in H9C2 cardiomyocytes by RNA interference technology on cell injure induced by anoxia/reoxygenation (A/R) and its mechanism. **Methods** H9C2 cardiomyocytes were randomly divided into control (Con) group, A/R group, negative control (NC) group and SIRT6-shRNA plasmid-treated group (shRNA group). Survival rate, apoptotic rate, Caspase-3 activity, expression levels of SIRT6, nuclear factor (NF)- κ Bp65, I- κ B α and interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α in culture medium of H9C2 cardiomyocytes in four groups were assessed and compared. **Results** Compared with Con group, survival rate of H9C2 cardiomyocytes and the expression level of I- κ B α protein in cytoplasm decreased significantly in A/R group, apoptotic rate of H9C2 cardiomyocytes, expression levels of SIRT6 mRNA and protein, NF- κ Bp65 protein in nucleus, IL-6, TNF- α in culture medium and Caspase-3 activity increased significantly in A/R group ($P < 0.05$). Compared with A/R group, survival rate of H9C2 cardiomyocytes, expression levels of SIRT6 mRNA and protein and I- κ B α protein in cytoplasm decreased significantly in shRNA group, while apoptotic rate of H9C2 cardiomyocytes, expression levels of NF- κ Bp65 protein in nucleus, IL-6, TNF- α in culture medium and Caspase-3 activity increased significantly in shRNA group ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of intracellular SIRT6 gene expression in H9C2 cardiomyocytes can promote the secretion of inflammatory cytokines, activate NF- κ B signaling pathway, induce cell apoptosis and aggravate cardiomyocytes injury induced by A/R.

[Key words] SIRT6; Anoxia/reoxygenation; Apoptosis; Cardiomyocytes; RNA interference

急性心肌梗死(AMI)是一种严重的心血管疾病,其并发症和死亡率均较高^[1-2]。在我国,早期血运重建已广泛应用于治疗 AMI。虽然恢复冠状动脉血流能改善心肌梗死后心室重构和降低心肌梗死面积,但再灌注治

疗也会引起心肌缺血再灌注(I/R)损伤,导致心律失常和心脏收缩功能障碍^[3]。Sirtuins (SIRT1 ~ SIRT7) 蛋白家族是一类 NAD⁺ 依赖的组蛋白去乙酰化酶和 ADP 核糖基转移酶,参与机体的多种生理和病理过程。既往研究提示,SIRT6 可能成为治疗心血管疾病的重要靶点^[4-5]。本研究采用 RNA 干扰(RNAi)技术抑制 H9C2 心肌细胞内 SIRT6 基因表达,探讨其对缺氧/复氧(A/R)诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡的影响。

材料与方法

1. 材料:大鼠 H9C2 心肌细胞购自上海基免生物科技有限公司;SIRT6-shRNA 质粒购自上海吉凯基因化学技术有限公司;膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Biovision 公司;阳离子脂质体 2000、Trizol 试剂盒、逆转录试剂盒和 SYBR Greenmix 均购自美国 Invitrogen 公司;兔抗大鼠 SIRT6 抗体、兔抗大鼠核因子(NF)- κ Bp65 抗体、兔抗大鼠 I- κ B α 抗体和兔抗大鼠 β -actin 抗体等均购自美国 Santa Cruz 公司;大鼠白细胞介素(IL)-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2. 方法

(1)H9C2 心肌细胞培养:大鼠 H9C2 心肌细胞按正常方式(37℃含 95% O₂ 和 5% CO₂ 的恒温箱中含 10% 胎牛血清的培养基)培养,选择生长良好、传 3~5 代的细胞。

(2)细胞转染:将 2 ml 含有 2×10^5 个大鼠 H9C2 心肌细胞和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基加入 6 孔板,在正常条件下培养过夜。按说明书用脂质体法进行转染,4 h 后更换培养基,2 d 后在荧光显微镜下观察转染效果,用流式细胞仪测定转染率。SIRT6-shRNA 质粒在细胞内可以表达绿色荧光蛋白,转染成功的细胞在荧光显微镜下呈绿色。

(3)心肌细胞的体外模拟 I/R 模型即心肌细胞的 A/R 模型:模拟缺氧是用缺氧的 Tyrode's 液置换正常的心肌细胞培养液后,将培养板放入自制的有进出气孔的密闭盒中,于 37℃恒温箱内持续通入含 95% N₂ 和 5% CO₂ 的混合气体孵育心肌细胞;模拟复氧是用正常的 Tyrode's 液置换缺氧的 Tyrode's 液后,将培养板置于 37℃含 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体的恒温箱中孵育心肌细胞 2 h。其中正常的 Tyrode's 液包含 NaCl 129.5 mmol/L、KCl 10.0 mmol/L、NaH₂PO₄ 0.9 mmol/L、NaHCO₃ 20 mmol/L、CaCl₂ 1.8 mmol/L、MgSO₄ 1.2 mmol/L、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)20 mmol/L、葡萄糖 55 mmol/L,pH=7.4,预先用含 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体饱和 1 h。缺氧的 Tyrode's 液包含 NaCl 98.5 mmol/L、KCl 10.0 mmol/L、NaH₂PO₄ 0.9 mmol/L、NaHCO₃ 6.0 mmol/L、CaCl₂ 1.8 mmol/L、MgSO₄ 1.2 mmol/L、乳酸钠 40 mmol/L、HEPES 20 mmol/L,pH=6.8,预先用含 95% N₂ 和 5% CO₂ 的混合气体饱和 1 h。

(4)分组:将 H9C2 心肌细胞随机分为以下 4 组:正常对照组(Con 组):将 DMEM 培养基更换为正常的 Tyrode's 液按正常方式培养;A/R 组:H9C2 心肌细胞

缺氧 3 h 再复氧 2 h;阴性对照组(NC 组):H9C2 心肌细胞转染阴性对照 SIRT6-shRNA 质粒后缺氧 3 h 再复氧 2 h;SIRT6-shRNA 组(shRNA 组):H9C2 心肌细胞转染 SIRT6-shRNA 质粒后缺氧 3 h 再复氧 2 h。

(5)H9C2 心肌细胞存活率测定:按说明书采用 CCK-8 法测定 H9C2 心肌细胞存活率。测得吸光度(OD)值的大小可间接反映 H9C2 心肌细胞活力,细胞存活率(%)=(干预组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%。

(6)流式细胞仪检测各组 H9C2 心肌细胞凋亡率:根据 AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书,将收集的心肌细胞用 AnnexinV-FITC 和碘化丙啶(PI)进行标记,然后采用流式细胞仪检测各组 H9C2 心肌细胞凋亡率。总凋亡率(%)=早期凋亡率(%) + 晚期凋亡率(%)。

(7)ELISA 法检测心肌细胞培养液中 IL-6 和 TNF- α 水平:根据 IL-6 和 TNF- α ELISA 试剂盒说明书检测正常 Tyrode's 液中 IL-6 和 TNF- α 浓度。

(8)半胱天冬酶-3(Caspase-3)活性检测:根据 Caspase-3 试剂盒说明书测量心肌细胞中 Caspase-3 的活性,最终用酶标仪读取 405 nm 波长处的 OD 值。Caspase-3 的活性=样品孔 OD 值/空白对照孔 OD 值。

(9)实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(Real-time RT-PCR):采用常规方法提取各实验组心肌细胞总 RNA 后,通过逆转录生成 cDNA 片段,然后根据 SYBR Green 试剂盒的说明书扩增这些 DNA。SIRT6(GenBank Accession No NM181586)的引物序列:上游引物为 5'-GGCCTTTGTTTACCCCTTCT-3',下游引物为 5'-TCCTCCCCCTTAGCCCCAT-3'。GAPDH(GenBank Accession No NM017008)的引物序列:上游引物为 5'-GACAACCTTTGGCTCGTGGA-3',下游引物为 5'-ATGCAGGGCTTCTGG-3'。

(10)蛋白质印迹法(Western blot)检测 SIRT6、NF- κ Bp65 及 I- κ B α 蛋白表达:提取细胞内的蛋白质并测定其浓度,用等量的蛋白样品进行十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳、转膜、洗膜、封闭、杂交,然后进行化学发光及显影、定影。采用 Leica 软件分析结果。一抗的稀释倍数为 SIRT6:1:500;NF- κ Bp65:1:500;I- κ B α :1:500; β -actin:1:1 000。

3. 统计学处理:应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. H9C2 心肌细胞的转染率:SIRT6-shRNA 质粒在

H9C2 心肌细胞内可以表达绿色荧光蛋白,转染成功的细胞在荧光显微镜下呈绿色,质粒转染 H9C2 心肌细胞 48h 后的转染率为(77.6±4.9)%,见图 1。

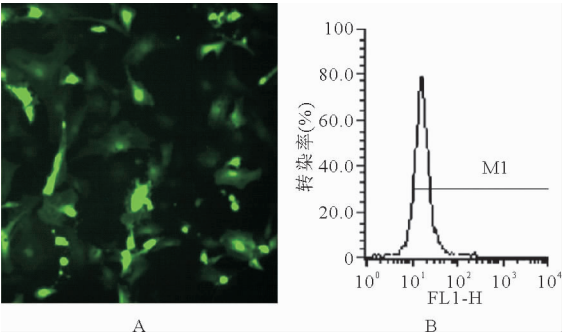


图 1 质粒转染 H9C2 心肌细胞 48 h 后的效果 [A: 荧光显微镜下,转染的 H9C2 心肌细胞显示为绿色荧光(×200); B: 流式细胞仪检测转染率]

2. 4 组 H9C2 心肌细胞的存活率和凋亡率比较: 在 A/R 前,4 组 H9C2 心肌细胞的存活率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。在 A/R 后,A/R 组 H9C2 心肌细胞的存活率明显低于 Con 组($P<0.05$);shRNA 组 H9C2 心肌细胞的存活率明显低于 A/R 组($P<0.05$);A/R 组和 NC 组 H9C2 心肌细胞的存活率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与 Con 组比较,A/R 诱导 H9C2 心肌细胞的凋亡率明显升高($P<0.05$);与 A/R 组比较,shRNA 组 H9C2 心肌细胞的凋亡率明显升高($P<0.05$);A/R 组和 NC 组 H9C2 心肌细胞的凋亡率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2 和表 1。

3. 4 组 H9C2 心肌细胞 SIRT6、NF-κBp65 及 I-κBα 表达水平比较:与 Con 组比较,A/R 组心肌细胞 SIRT6 mRNA 和蛋白及细胞核中 NF-κBp65 蛋白表达水平明显增加,H9C2 心肌细胞浆中 I-κBα 蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$);与 A/R 组比较,shRNA 组 H9C2 心肌细胞 SIRT6 mRNA 和蛋白及 H9C2 心肌细胞浆中 I-κBα 蛋白表达水平均明显降低,H9C2 心肌细胞核中 NF-κBp65 蛋白表达水平明显增加($P<0.05$);A/R 组和 NC 组 H9C2 心肌细胞 SIRT6 mRNA 和蛋白及 NF-κB、

表 1 4 组 H9C2 心肌细胞的存活率和凋亡率比较
($n=8, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	存活率		凋亡率
	A/R 之前	A/R 之后	
Con 组	100.00±0.00	100.00±0.00	3.46±0.45
A/R 组	99.19±4.03	45.23±6.12 ^a	40.11±5.23 ^a
NC 组	98.47±5.76	45.46±5.99	39.09±4.12
shRNA 组	99.33±6.54	39.29±3.15 ^b	45.72±3.99 ^b

注:与 Con 组比较,^a $P<0.05$;与 A/R 组比较,^b $P<0.05$

I-κBα 蛋白表达水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图 3 和表 2。

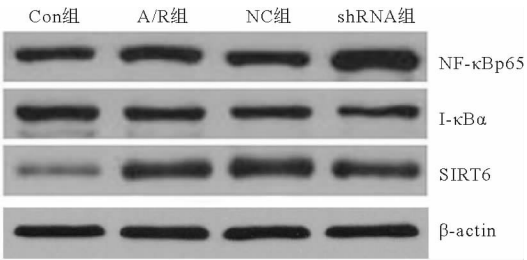


图 3 4 组 H9C2 心肌细胞 SIRT6、NF-κBp65 及 I-κBα 蛋白表达水平

表 2 4 组 H9C2 心肌细胞 SIRT6、NF-κBp65 及 I-κBα 表达水平比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	SIRT6 mRNA	SIRT6 蛋白	NF-κBp65 蛋白	I-κBα 蛋白
Con 组	1.00±0.00	0.17±0.01	0.623±0.059	0.870±0.069
A/R 组	2.67±0.17 ^a	2.12±0.19 ^a	2.072±0.115 ^a	0.534±0.043 ^a
NC 组	2.77±0.15	2.20±0.18	1.990±0.103	0.512±0.062
shRNA 组	1.89±0.11 ^b	1.45±0.13 ^b	2.513±0.174 ^b	0.391±0.028 ^b

注:与 Con 组比较,^a $P<0.05$;与 A/R 组比较,^b $P<0.05$

4. 4 组 H9C2 心肌细胞培养液中 IL-6 和 TNF-α 水平比较:与 Con 组比较,A/R 组 H9C2 心肌细胞培养液中 IL-6 和 TNF-α 水平明显增加($P<0.05$);与 shRNA 组比较,A/R 组 H9C2 心肌细胞培养液中 IL-6 和 TNF-α 水平明显降低($P<0.05$);A/R 组和 NC 组 H9C2 心肌细胞培养液中 IL-6 和 TNF-α 水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

5. 4 组 H9C2 心肌细胞 Caspase-3 活性比较:Con 组、A/R 组、NC 组及 shRNA 组 H9C2 心肌细胞 Caspase-3

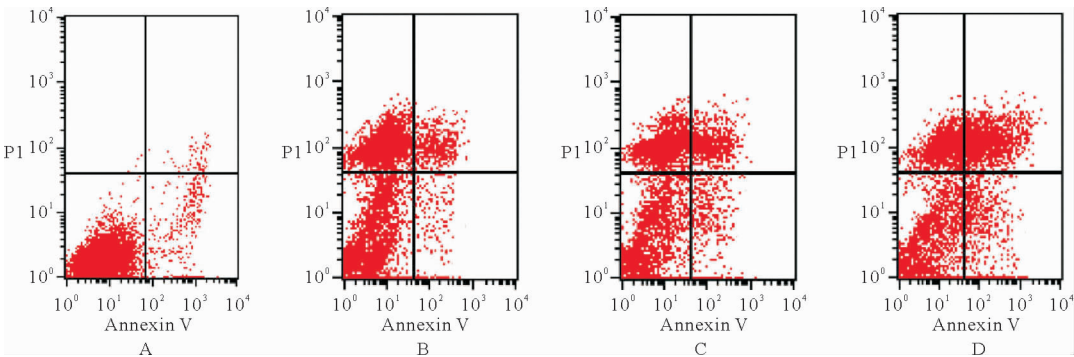


图 2 4 组 H9C2 心肌细胞的凋亡水平(A:Con 组;B:A/R 组;C:NC 组;D:shRNA 组)

表 3 4 组 H9C2 心肌细胞培养液中 IL-6 和 TNF- α 水平比较 ($n=8$, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	TNF- α
Con 组	35.31 \pm 3.45	16.34 \pm 2.01
A/R 组	150.40 \pm 16.55 ^a	92.11 \pm 7.34 ^a
NC 组	147.32 \pm 15.17	89.38 \pm 8.77
shRNA 组	181.33 \pm 16.60 ^b	121.09 \pm 10.12 ^b

注:与 Con 组比较,^a $P<0.05$;与 A/R 组比较,^b $P<0.05$

的活性分别为 0.11 ± 0.02 、 0.43 ± 0.04 、 0.41 ± 0.04 、 0.52 ± 0.05 ,其中 A/R 组明显高于 Con 组,shRNA 组明显高于 A/R 组($P<0.05$);而 A/R 组和 NC 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

讨 论

SIRT6 属于沉默信息调节因子 2(Sir2)蛋白家族的一员,主要具有 NAD⁺ 依赖的组蛋白去乙酰化酶和单 ADP 核糖基转移酶两种功能^[6]。有研究发现,很多组织均可表达 SIRT6,而心肌内 SIRT6 表达水平较高^[7]。SIRT6 在动脉粥样硬化、心肌梗死及 I/R 损伤、病理性心肌肥大、心力衰竭等心血管疾病中发挥重要作用^[5-6]。SIRT6 能通过调节胰岛素样生长因子-Akt 信号通路,抑制心肌细胞纤维化,发挥抗心肌肥大作用^[8];血管紧张素 II 刺激大鼠心肌细胞后,SIRT6 表达升高,且 SIRT6 通过抑制 NF- κ B 转录活性,减少心钠素、脑钠肽和肌球蛋白重链表达,从而抑制心肌细胞肥大^[9-10]。另有研究表明,内皮细胞中 SIRT6 通过抑制 NF- κ B 转录活性,调控下游炎症因子表达,从而影响血管内皮的功能^[11]。本研究发现,A/R 在引起心肌细胞凋亡率增加和存活率下降过程中,心肌细胞 SIRT6 表达水平升高,而抑制心肌细胞 SIRT6 表达加重 A/R 诱导的心肌细胞损伤,提示 SIRT6 表达水平下降可导致 A/R 引起的心肌细胞损伤加重。

心肌梗死后不久心肌细胞开始凋亡,而再灌注会加重心肌细胞凋亡。细胞外刺激通过死亡受体和线粒体途径诱导细胞凋亡。研究表明 Caspase 家族与细胞凋亡的关系非常密切,其中 Caspase-3 为关键执行分子。在 I/R 损伤中,Caspase-3 活性明显增加。本研究也发现,A/R 可诱导 H9C2 心肌细胞凋亡和 Caspase-3 活性明显增加,而通过 RNAi 降低 SIRT6 基因表达加重了 A/R 诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡和 Caspase-3 活性升高,提示 SIRT6 在 A/R 诱导的心肌细胞凋亡中发挥重要作用,降低细胞内 SIRT6 基因表达能诱导细胞凋亡进而加重 A/R 诱导的心肌细胞损伤。

另外,心肌 I/R 时有大量炎性细胞浸润,因此,在 I/R 引起的损伤中,炎性反应起重要作用^[12]。本研究

中,在心肌细胞遭受 A/R 后,培养液中促炎因子(TNF- α 和 IL-6)水平明显升高,且在 A/R 前 48h 用 SIRT6-shRNA 质粒转染 H9C2 心肌细胞能明显增加培养液中 TNF- α 和 IL-6 水平,提示抑制细胞内 SIRT6 基因表达能通过促进炎症反应进而加重心肌细胞 A/R 损伤。

既往研究显示,SIRT6/NF- κ B 信号通路与多种疾病的发生发展密切相关^[4]。本研究发现,A/R 可诱导心肌细胞核中 NF- κ B 表达增加,而细胞浆中 NF- κ B 的抑制物 I- κ B α 表达减少,增强心肌细胞的凋亡程度、Caspase-3 活性及促炎因子 TNF- α 、IL-6 的产生。在 A/R 前 48 h 用 SIRT6-shRNA 质粒转染 H9C2 心肌细胞可明显促进心肌细胞核中 NF- κ B 表达增加,而细胞浆中 I- κ B α 表达减少,进一步加重细胞凋亡和炎症反应。上述结果提示沉默细胞内的 SIRT6 基因能通过激活 NF- κ B 信号通路进而加重心肌细胞 A/R 损伤。

总之,抑制心肌细胞内 SIRT6 基因表达能促进炎症因子的分泌,激活 NF- κ B 信号通路,诱导细胞凋亡,加重 A/R 诱导的心肌细胞损伤。未来需要进一步探讨增加 SIRT6 表达能否减轻 A/R 诱导的心肌细胞损伤。SIRT6 基因可能成为治疗 I/R 引起的心肌细胞损伤的新靶点。

参 考 文 献

- [1] 代冰冰,何学明.急性心肌梗死患者院内死亡危险因素分析[J].临床内科杂志,2017,34(4):247-250.
- [2] 魏小红,刘文娟,陈立颖.等.急性心肌梗死患者中 ACEF 评分预测院内死亡的价值[J].中国医药,2018,13(11):1601-1604.
- [3] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury[J]. N Engl J Med, 2007, 357(11):1121-1135.
- [4] Winnik S, Auwerx J, Sinclair DA, et al. Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: from bench to bedside[J]. Eur Heart J, 2015, 36(48):3404-3412.
- [5] Balestrieri ML, Rizzo MR, Barbieri M, et al. Sirtuin 6 expression and inflammatory activity in diabetic atherosclerotic plaques: effects of incretin treatment[J]. Diabetes, 2015, 64(4):1395-1406.
- [6] Matsushima S, Sadoshima J. The role of sirtuins in cardiac disease[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(9):H1375-H1389.
- [7] Liszt G, Ford E, Kurtev M, et al. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase[J]. J Biol Chem, 2005, 280(22):21313-21320.
- [8] Sundaresan NR, Vasudevan P, Zhong L, et al. The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun[J]. Nat Med, 2012, 18(11):1643-1650.
- [9] Ma TK, Kam KK, Yan BP, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status[J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(6):1273-1292.
- [10] Yu SS, Cai Y, Ye JT, et al. Sirtuin 6 protects cardiomyocytes from hypertrophy in vitro via inhibition of NF-kappaB-dependent transcriptional activity[J]. Br J Pharmacol, 2013, 168(1):117-128.
- [11] Zhong L, D'Urso A, Toiber D, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha[J]. Cell, 2010, 140(2):280-293.
- [12] Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, et al. Myocardial no-reflow in humans[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(4):281-292.

(收稿日期:2019-06-24)

(本文编辑:周三凤)