

心血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001639

EGCG 预防老年小鼠心脏肌钙蛋白 I 表达下降及其机制研究

贾忠莉, 全珺珺, 潘 博, 刘玲娟, 田 杰

(重庆医科大学附属儿童医院心脏内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)能否预防老年小鼠心脏肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTn I) 表达下降, 并研究其机制。**方法:**随机选取 3、12、14、16 和 18 月龄小鼠各 5 只, 用 RT-PCR、Western blot 检测心脏中 cTn I mRNA 和蛋白质表达。12 月龄小鼠 32 只随机分为空白组、EGCG 低剂量组[EGCG-L, 50 mg/(kg·d)], EGCG 中剂量组[EGCG-M, 100 mg/(kg·d)]和 EGCG 高剂量组[EGCG-H, 200 mg/(kg·d)], 每组 8 只, 通过饮水摄入 EGCG 持续干预 6 个月, 3 月龄小鼠为青年组($n=8$)。RT-PCR 检测 cTn I 和 HDAC1 mRNA 表达, Western blot 检测 cTn I 蛋白质表达, CHIP-Q-PCR 检测 cTn I 启动子区 H3K9 乙酰化水平和 HDAC1、GATA4、Mef2c 结合水平。**结果:**小鼠衰老过程中, 与 12 月龄[(1.483 ± 0.226), (1.127 ± 0.074)]比较, cTn I mRNA 和蛋白质表达在 16 月龄[(0.913 ± 0.150), (0.683 ± 0.133)]时开始下降($P=0.002$, $P=0.003$)。EGCG 干预后, 与空白组[(1.924 ± 0.117), (0.963 ± 0.105)]比较, EGCG-H 组[(0.801 ± 0.037), (0.225 ± 0.153)]中 HDAC1 mRNA 表达和结合水平下降(均 $P=0.000$)。空白组中 cTn I 启动子区 H3K9 乙酰化, GATA4 和 Mef2C 的结合水平分别为(0.392 ± 0.138)、(0.404 ± 0.150)、(0.347 ± 0.093), EGCG-H 组中 H3K9 乙酰化(0.723 ± 0.208)和 GATA4(1.051 ± 0.239)、Mef2c(1.129 ± 0.187)的结合水平均升高($P=0.014$, $P=0.000$, $P=0.000$)。EGCG-H 组[(0.943 ± 0.114), (1.034 ± 0.058)]中 cTn I mRNA 和蛋白质与空白组[(0.093 ± 0.033), (0.619 ± 0.179)]比较表达升高($P=0.000$, $P=0.007$)。**结论:**高剂量 EGCG 通过抑制 HDAC1, 升高 H3K9 乙酰化预防老年小鼠心脏中 cTn I 表达下降。

【关键词】心脏舒张功能障碍; 心脏肌钙蛋白 I; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 组蛋白去乙酰化酶

【中图分类号】R285.5; R322.11

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-07-20

Prevention of epigallocatechin gallate on decreasing expression of cardiac troponin-I in aging mice hearts and its mechanism

Jia Zhongli, Quan Junjun, Pan Bo, Liu Lingjuan, Tian Jie

(Department of Cardiology, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Children's Development and Disorders Key Laboratory of Ministry of Education; International and National Science and Technology Cooperation Base of Children Development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics)

【Abstract】Objective: To investigate whether epigallocatechin gallate (EGCG) could prevent the declining expression of cardiac troponin I (cTn I) in aging mice hearts and to study its mechanism. **Methods:** Expression levels of cTn I mRNA and protein were detected by using RT-PCR and Western blot assays in each age group ($n=5$). A total of 32 C57 BL/6 female mice of 12 month old were randomly divided into the blank group, the EGCG low-dose group[EGCG-L, 50 mg/(kg·d)], the EGCG medium-dose group[EGCG-M, 100 mg/(kg·d)] and the EGCG high-dose group[EGCG-H, 200 mg/(kg·d)]. Mice from EGCG intervention groups were treated with EGCG by water for 6 months. The female mice at age of 3-month were chosen as the young group ($n=8$). The cTn I and HDAC1 mRNA expression were measured by RT-PCR. The protein level of cTn I was determined by Western blot. The binding level of acetylated lysine 9 on histone H3 (AcH3K9), HDAC1, transcription factors GATA4 and Mef2c near cTn I's promoter was identified by CHIP-Q-PCR. **Results:** During the aging process, both expressive levels of cTn I mRNA and protein of 16-month-old mice

作者介绍: 贾忠莉, Email: jiazhongli096@foxmail.com,

研究方向: 舒张性心力衰竭的发病机制及治疗。

通信作者: 田 杰, Email: jietian@cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81670212)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180412.1320.006.html>
(2018-04-12)

[(0.913 ± 0.150), (0.683 ± 0.133)] began decreasing ($P=0.002$, $P=0.003$) when compared with 12-month-old mice [(1.483 ± 0.226), (1.127 ± 0.074)]. After EGCG intervention, the HDAC1 expression and the binding level in cTn I's promoter region in the EGCG-H group [(0.801 ± 0.037), (0.225 ± 0.153)] were lower than those in the blank group [(1.924 ± 0.117), (0.963 ± 0.105)]

($P=0.000, P=0.000$). AcH3K9 levels in cTn I 's promoter region and binding levels of GATA4 and Mef2c were (0.392 ± 0.138), (0.404 ± 0.150), (0.347 ± 0.093), respectively. In the EGCG-H group, AcH3K9 levels (0.723 ± 0.208), GATA4 (1.051 ± 0.239) and Mef2c (1.129 ± 0.187) binding levels in the proximal promoter region of cTn I gene were increased ($P=0.014, P=0.000, P=0.000$). Expressive levels of cTn I mRNA and protein in the EGCG-H group [$(0.943 \pm 0.114), (1.034 \pm 0.058)$] were higher than those in the blank group [$(0.093 \pm 0.033), (0.619 \pm 0.179)$] ($P=0.000, P=0.007$). **Conclusion:** High dose EGCG can prevent the decline of cTn I in aging mice by inhibiting HDAC1 and elevating AcH3K9.

【Key words】cardiac diastolic dysfunction; cardiac troponin I; epigallocatechin gallate; histone deacetylase

老年化是心血管疾病的独立危险因素,随着年龄增加,心脏的结构和功能发生改变,如心室肥厚、心肌纤维化、心肌细胞凋亡等,心力衰竭的发生率也增加^[1-3]。心力衰竭分为收缩性心力衰竭和舒张性心力衰竭,老年人群以舒张性心力衰竭为主^[4]。有研究显示,心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTn I) 作为肌钙蛋白复合体里的抑制亚基,参与心脏收缩和舒张功能的调节^[5], cTn I 基因敲除或突变能使小鼠心脏舒张功能受损^[6-7]。同时,老年性舒张功能下降也与 cTn I 的表达降低有关,且 HDAC1 介导的组蛋白 H3K9 低乙酰化是 cTn I 表达降低的重要机制^[8]。组蛋白乙酰化修饰由组蛋白乙酰化酶(HAT)和组蛋白去乙酰化酶(HDAC)共同调节,通过影响染色质的结构来实现对基因的调控。绿茶中最主要的多酚类物质表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG),具有抗自由基、抗炎、抗血管生成和抗肿瘤等作用^[9]。研究发现 EGCG 可参与表观遗传的调控,在肿瘤细胞中 EGCG 可抑制 HDAC1 影响组蛋白乙酰化从而调控基因的表达^[10-12]。本课题组前期采用 EGCG 干预患有舒张功能障碍的老年小鼠,结果表明,EGCG 能明显上调老年小鼠心脏 cTn I 表达,有效改善老年小鼠心脏的舒张功能。但在小鼠心脏中 cTn I 还未下降时使用 EGCG 干预,能否有效预防衰老过程中 cTn I 表达下降是未知的。为验证这一假说,本研究给予 12 月龄小鼠不同剂量 EGCG 持续干预 6 个月,观察不同剂量 EGCG 干预后 cTn I 表达变化,筛选出 EGCG 最适预防剂量,并探讨其预防机制,为临床上预防老年相关舒张功能障碍的发生提供一定的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物选择和分组 所有的实验动物均由重庆医

科大学动物中心提供,为 SPF 级健康雌性 C57BL/6 小鼠。随机选取选取时间点为 3、12、14、16 和 18 月龄小鼠各 5 只,二氧化碳麻醉处死,取心脏组织 PBS 清洗后-80℃冰箱保存。32 只 12 月龄小鼠随机分为 4 组:空白组、EGCG-L 组[EGCG 50 mg/(kg·d)]、EGCG-M 组[EGCG 100 mg/(kg·d)]和 EGCG-H 组[EGCG 200 mg/(kg·d)],每组 8 只;3 月龄小鼠作为青年组($n=8$)。将 EGCG 溶解于饮水中,于每日 17:00 配置不同剂量的 EGCG 溶液并更换,空白组饮用不含干预剂的普通饮水。持续干预 6 个月后,如前方法收集并保存小鼠心脏组织备用。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂盒(BioTeke,北京),逆转录试剂盒(TaKaRa,日本),SYBR Green 试剂盒(KAPA,美国),全蛋白提取试剂盒(KeyGEN,南京),BCA 蛋白定量分析试剂盒(Thermo,美国),SDS-PAGE 配胶试剂盒(ATGene,重庆),EGCG(纯度 99%,美国),抗 cTn I 抗体、CHIP 级抗 HDAC1、抗 AcH3K9、抗 GATA4 和抗 Mef2c 抗体(Abcam,英国),抗 β -actin 抗体(山鹰,武汉),显影剂(Millipore,美国),染色质免疫共沉淀试剂盒(Abcam,英国)。

1.2 方法

1.2.1 Real time-PCR 剪取约 50 mg 左心室组织提取总 RNA 后测定浓度后将 1 000 ng RNA 逆转录为 cDNA。cTn I 基因引物序列:上游:5'-GCAGGTGAAGAAGGAGGACA-3',下游:5'-CGATATTCTTGCGCCAGTC-3';HDAC1 基因引物序列:上游:5'-ATGAGCTGCCCTACAACGAC-3',下游:5'-GACGCTGCTTGATCTTCTCC-3';内参基因 β -actin 的引物序列:上游:5'-CACACCCGCCACCAGTTCC-3',下游:5'-GT-CCTTCTGACCCATTCCACC-3'。RT-PCR 反应条件:95℃预变性 2 min,95℃变性 10 s,60℃退火 30 s,40 个循环。

1.2.2 Western blot 印迹检测 剪取约 70 mg 左心室组织提取全蛋白后用 BCA 法测定蛋白浓度,蛋白上样总量为 50 μ g,12% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白,转至 PVDF 后 5%脱脂牛奶封闭 1 h,抗 cTn I 抗体(1:1 000)和 β -actin 抗体(1:2 000)4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,显影剂 A、B 液 1:1 充分混匀后,运用 Bio-Rad 图像分析仪进行图像扫描。

1.2.3 染色质免疫共沉淀(CHIP)和 Real-time PCR 剪取 70 mg 左心室组织,充分剪碎后预冷 PBS 冲洗,1%甲醛室温

交联 20 min, 1.25 mol/L 甘氨酸终止交联, 超声破碎仪切割 DNA 为 200~1 000 bp 片段, 用 CHIP 级抗 HDAC1、AcH3K9、GATA4 及 Mef2c 抗体进行染色质免疫共沉淀。CHIP 纯化的 DNA 为模板, cTn I 基因启动子区的引物序列: 上游: 5'-CC-AACTGGAGCTTTGCACACG-3', 下游: 5'-GAGGACACTGA-GATAAGGGGCG-3'。反应条件: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 15 s, 68 °C 延伸 20 s, 40 个循环。

1.3 统计分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 数据结果采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单因素方差分析行多组间均数比较, 进一步组间两两比较采用 LSD-*t* 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 cTn I 在小鼠衰老过程中的时序性变化

RT-PCR 结果显示, 方差分析 5 组 cTn I mRNA 表达水平的差异具有统计学意义 ($F=14.202, P=0.000$)。两两比较结果显示 3 月龄和 12 月龄小鼠心脏中 cTn I mRNA 表达差异没有统计学意义; 14、16 及 18 月龄小鼠心脏 cTn I mRNA 表达明显下降, 且 18 月龄表达最低 ($P<0.01$)。如图 1 所示。

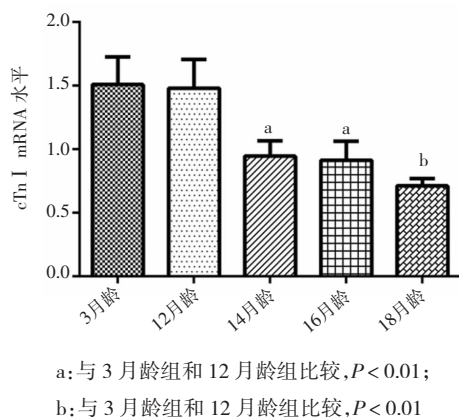


图 1 衰老过程中 cTn I mRNA 表达的时序性 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig.1 Time course of cTn I mRNA expression during the aging process ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Western blot 结果显示, 方差分析 5 组 cTn I 蛋白质表达水平的差异具有统计学意义 ($F=8.221, P=0.003$), 进一步两两比较发现与 3 月龄相比, 12 和 14 月龄小鼠心脏 cTn I 蛋白表达无明显下降, 16 和 18 月龄心脏中 cTn I 蛋白质表达下降 ($P=0.000$)。如图 2 所示。各组间 cTn I mRNA 和蛋白质表达相对量见表 1。

2.2 EGCG 防止老年小鼠心脏 cTn I 表达下降

EGCG 干预 6 个月后, RT-PCR 结果显示, 方差分析 5 组 cTn I mRNA 表达水平的差异, 差异具有统计学意义 ($F=69.337, P=0.000$)。进一步两两比较发现与青年组相比, 空白

组小鼠心脏中 cTn I mRNA 表达下降 ($P=0.000$)。EGCG 干预后, 中、高剂量的 EGCG 均能上调 cTn I mRNA 表达 ($P=0.000$)。其中, 高剂量 EGCG 能使老年小鼠心脏中 cTn I mRNA 表达维持在青年组水平 ($P=0.955$)。如图 3 所示。

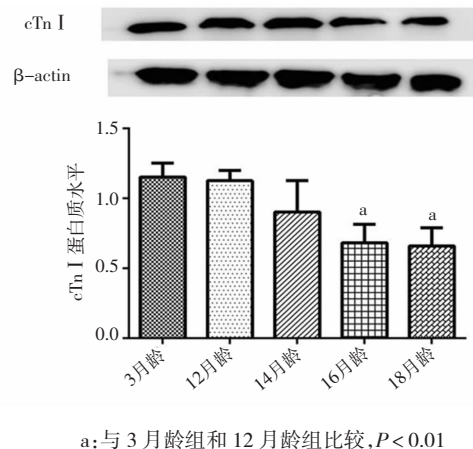


图 2 衰老过程中 cTn I 蛋白质表达的时序性 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig.2 Time course of cTn I protein expression during the aging process ($n=3, \bar{x} \pm s$)

表 1 衰老过程中心脏 cTn I mRNA 和蛋白质表达时序性 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Time course of cTn I mRNA and protein expression during the aging process ($n=3, \bar{x} \pm s$)

年龄	mRNA	蛋白质
3月龄	1.511 $\pm$ 0.215	1.153 $\pm$ 0.099
12月龄	1.483 $\pm$ 0.226 ^a	1.127 $\pm$ 0.074 ^a
14月龄	0.948 $\pm$ 0.120 ^b	0.903 $\pm$ 0.225 ^c
16月龄	0.913 $\pm$ 0.150 ^c	0.683 $\pm$ 0.133 ^e
18月龄	0.715 $\pm$ 0.055 ^d	0.660 $\pm$ 0.130 ^g
<i>F</i> 值	14.202	8.221
<i>P</i> 值	0.000	0.003

注: mRNA: 与 3 月龄组比较, a: $P=0.841$; b: $P=0.002$; c: $P=0.001$; d: $P=0.000$; 蛋白质: 与 3 月龄组比较, e: $P=0.822$; f: $P=0.056$; g: $P=0.002$

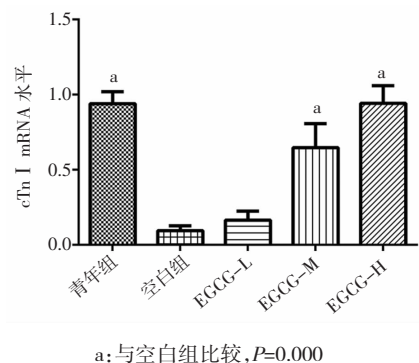


图 3 EGCG 干预对 cTn I mRNA 表达的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

Fig.3 Effects of EGCG intervention on the expression of cTn I mRNA ($n=4, \bar{x} \pm s$)

Western blot 结果显示,方差分析 5 组 cTn I 蛋白质表达水平的差异,差异具有统计学意义($F=5.137, P=0.008$)。进一步两两比较发现空白组 cTn I 蛋白质表达下降,与青年组比较,差异具有统计学意义($P=0.000$)。EGCG 干预后,高剂量 EGCG 能有效上调 cTn I 蛋白质表达($P<0.01$);且高剂量 EGCG 组中 cTn I 蛋白质表达与青年组相当($P=0.809$)。如图 4 所示。各组间 cTn I mRNA 和蛋白质相对表达量见表 2。

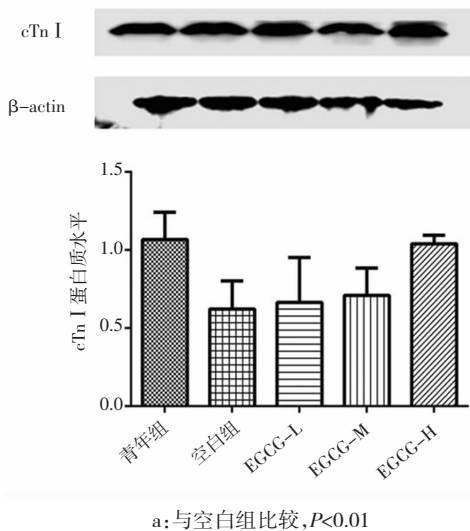


图 4 EGCG 干预对 cTn I 蛋白质表达的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)
Fig.4 Effect of EGCG intervention on the expression of cTn I protein ($n=4, \bar{x} \pm s$)

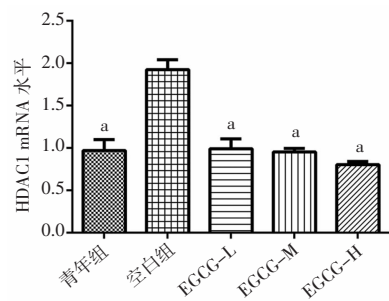
表 2 各组间 cTn I mRNA 和蛋白表达相对值 ($n=4, \bar{x} \pm s$)
Tab.2 Relative expression of cTn I mRNA and protein in various groups ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	mRNA	蛋白质
青年组	0.939 ± 0.079^a	1.067 ± 0.176^c
空白组	0.093 ± 0.033	0.619 ± 0.179
EGCG-L	0.166 ± 0.059^b	0.664 ± 0.289^d
EGCG-M	0.649 ± 0.157^a	0.708 ± 0.172^e
EGCG-H	0.943 ± 0.114^a	1.034 ± 0.058^f
F 值	69.337	5.137
P 值	0.000	0.008

注:mRNA,与空白组比较,a: $P=0.000$;b: $P=0.313$;蛋白质:与空白组比较,c: $P=0.004$;d: $P=0.742$;e: $P=0.515$;f: $P=0.007$

2.3 EGCG 抑制 HDAC1 mRNA 表达及其在 cTn I 启动子区的结合

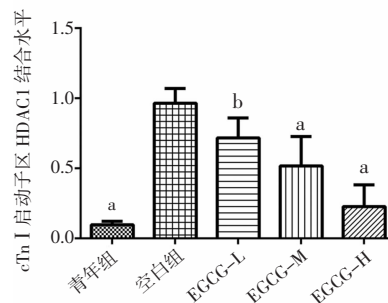
RT-PCR 结果显示,方差分析 5 组 HDAC1 mRNA 表达水平的差异具有统计学意义($F=85.813, P=0.000$)。两两比较发现空白组 HDAC1 mRNA 表达水平升高,与青年组比较,差异具有统计学意义($P=0.000$)。EGCG 干预后,3 个剂量的 EGCG 均能有效抑制 HDAC1 mRNA 的表达($P=0.000$)。如图 5 所示。



a:与空白组比较, $P<0.001$

图 5 EGCG 干预对 HDAC1 mRNA 表达的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)
Fig.5 Expression of HDAC1 mRNA after EGCG intervention ($n=4, \bar{x} \pm s$)

CHIP-Q-PCR 结果显示,方差分析 5 组 cTn I 启动子区 HDAC1 的结合水平的差异具有统计学意义($F=24.945, P=0.000$)。进一步两两比较发现与青年组相比,空白组 cTn I 启动子区 HDAC1 的结合水平升高($P=0.000$)。给予 EGCG 干预后,3 个剂量的 EGCG 均能抑制 HDAC1 在 cTn I 启动子区的结合($P=0.000$),且 HDAC1 的结合水平随 EGCG 剂量增加而下降。如图 6 所示。各组间 HDAC1 mRNA 和在 cTn I 启动子区结合水平见表 3。



a:与空白组比较, $P<0.001$;b:与空白组比较, $P<0.05$

图 6 EGCG 干预对 cTn I 启动子区 HDAC1 结合水平的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

Fig.6 Effect of EGCG intervention on binding levels of HDAC1 in cTn I promoter region ($n=4, \bar{x} \pm s$)

表 3 各组间 HDAC1 mRNA 和在 cTn I 启动子区结合水平 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 HDAC1 mRNA and binding level near cTn I promoter region in various group ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	mRNA	蛋白质
青年组	0.971 ± 0.130^a	0.096 ± 0.026^b
空白组	1.924 ± 0.117	0.963 ± 0.105
EGCG-L	0.989 ± 0.118^a	0.717 ± 0.141^c
EGCG-M	0.953 ± 0.040^a	0.517 ± 0.212^b
EGCG-H	0.801 ± 0.037^a	0.225 ± 0.153^b
F 值	85.813	24.945
P 值	0.000	0.000

注:HDAC1 mRNA:与空白组比较,a: $P=0.000$;HDAC1 结合水平:与空白组比较,b: $P=0.000$;c: $P=0.027$

2.4 EGCG 增加老年小鼠 cTn I 基因启动子区组蛋白 AcH3K9

CHIP-Q-PCR 结果显示,方差分析 5 组 cTn I 启动子区 AcH3K9 的差异具有统计学意义($F=10.436, P=0.000$)。进一步两两比较发现与青年组相比,空白组 cTn I 基因启动子区 AcH3K9 下降($P=0.000$)。中、高剂量 EGCG 明显提高了 AcH3K9 的水平,与空白组比较,差异具有统计学意义($P=0.000$)。如图 7 所示。各组间 cTn I 启动子区 AcH3K9 水平见表 4。

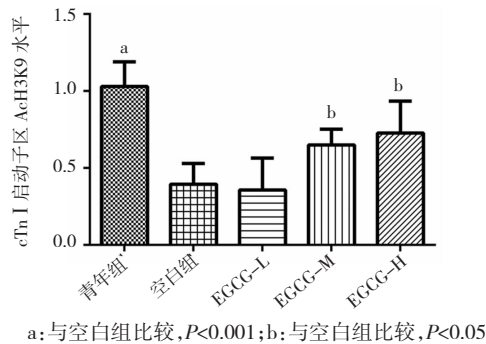


图 7 EGCG 干预对 cTn I 基因启动子区 AcH3K9 的影响
($n=4, \bar{x} \pm s$)

Fig.7 AcH3K9 levels in cTn I promoter region after EGCG intervention ($n=4, \bar{x} \pm s$)

表 4 各组间 cTn I 基因启动子区 acH3K9 水平及 GATA4 和 Mef2c 结合水平 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

Tab.4 Binding levels of AcH3K9, GATA4 and Mef2c in cTn I promoter region in various group ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	AcH3K9	GATA4	Mef2c
青年组	1.025 ± 0.161^a	1.193 ± 0.140^e	1.200 ± 0.202^h
空白组	0.392 ± 0.138	0.404 ± 0.150	0.347 ± 0.093
EGCG-L	0.358 ± 0.206^b	0.400 ± 0.068^f	0.425 ± 0.120^i
EGCG-M	0.646 ± 0.106^c	0.805 ± 0.170^g	0.666 ± 0.235^j
EGCG-H	0.723 ± 0.208^d	1.051 ± 0.239^e	1.129 ± 0.187^h
F 值	10.436	19.952	20.158
P 值	0.000	0.000	0.000

注: AcH3K9 结合水平: 与空白组比较, a: $P=0.000$; b: $P=0.779$; c: $P=0.049$; d: $P=0.014$; GATA4 结合水平: 与空白组比较, e: $P=0.000$; f: $P=0.974$; g: $P=0.003$; Mef2c 结合水平: 与空白组比较, h: $P=0.000$; i: $P=0.538$; j: $P=0.021$

2.5 EGCG 增加 GATA4 和 Mef2c 在 cTn I 基因启动子区结合

CHIP-Q-PCR 结果显示,方差分析 5 组 cTn I 启动子区转录因子 GATA4 和 Mef2c 结合水平的差异具有统计学意义($F=19.952, P=0.000$; $F=20.158, P=0.000$)。进一步两两比较发现与青年组相比,空白组 cTn I 基因启动子区 GATA4 结合水平降低($P=0.000$)。EGCG 干预后,与空白组比较,低剂量 EGCG 对 GATA4 结合水平无影响,而中、高剂量 EGCG 能增加 GATA4 结合水平($P=0.000$),且高剂量 EGCG 能使 GATA4 的结合维持在青年水平($P=0.237$)。如图 8 所示。

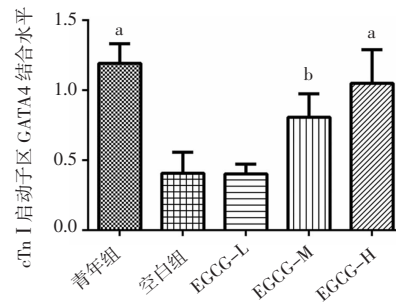


图 8 转录因子 GATA4 在 cTn I 基因启动子区结合水平
($n=4, \bar{x} \pm s$)

Fig.8 Binding levels of GATA4 in cTn I promoter region
($n=4, \bar{x} \pm s$)

与青年组比较,空白组中 Mef2c 在 cTn I 基因启动子区结合水平降低($P=0.000$)。中、高剂量 EGCG 明显上调 Mef2c 的结合水平,与空白组比较,差异具有统计学意义($P=0.000$),且高剂量 EGCG 使 Mef2c 结合维持在青年水平($P=0.579$)。如图 9 所示。各组间 GATA4 和 Mef2c 结合水平见表 4。

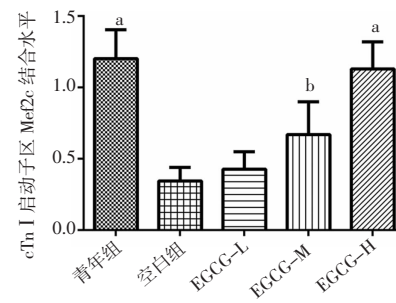


图 9 转录因子 Mef2c 在 cTn I 基因启动子区结合水平
($n=4, \bar{x} \pm s$)

Fig.9 Binding levels of Mef2c in cTn I promoter region ($n=4, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

心力衰竭(heart failure, HF)简称心衰,是指由于心脏收缩或舒张功能障碍导致心脏排出量下降,机体血供不足的一个症候群。可分为心室射血分数下降的收缩性心力衰竭(HF with a reduced ejection fraction, HFrEF)和射血分数正常而心室舒张期充盈能力下降的舒张性心力衰竭(HF symptoms have an EF that is preserved, HFpEF),老年人群以舒张性心力衰竭常见^[13]。随着年龄增加,舒张性心力衰竭的发生率增加^[14],目前对于舒张性心力衰竭的发生机制尚不清楚,治疗药物有限,舒张性心衰的治疗是临床上急需解决的医疗难题,因此,预防舒张性心衰的发生也是迫在眉睫^[15-16]。

EGCG 是绿茶中的主要活性成分,具有抗氧化、抗自由基、延缓衰老等作用,市场中作为保健品销售,毒副作用少见,长期使用可以减少癌症、心血管疾病以及神经退行性疾病发生的风险^[9]。有研究发现,EGCG 干预患有限制型心肌病小鼠后可以改善小鼠心脏的舒张功能^[17]。而在肿瘤研究中发现 EGCG 可通过抑制 HDAC1,升高基因组蛋白乙酰化修饰,从而上调相关肿瘤抑制基因如 P53、GSTP1 等表达^[10-11]。组蛋白的乙酰化修饰由组蛋白乙酰化酶 (HAT) 和组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 共同调节,组蛋白去乙酰化酶使乙酰化基团从组蛋白赖氨酸残基上去除,使染色质结构紧密,相应转录因子在启动子区结合减少,不利于基因的表达^[18]。cTn I 是心脏重要的功能蛋白,对心功能的维持和调节有重要作用。cTn I 基因启动子上 GATA 和 Mef2 元件与相应转录因子结合可调控 cTn I 基因表达^[19-20]。研究发现,老年小鼠心脏舒张功能下降与心脏中 cTn I 表达下降有关,且 HDAC1 介导的组蛋白 H3K9 低乙酰化是 cTn I 表达下降的关键机制之一^[8],该机制或可作为预防 cTn I 下降的干预靶点。在既往的研究中,药物干预多采用腹腔注射、灌胃等有创性操作进行,本研究结合 EGCG 的水溶性特点,将其溶解于饮水中进行干预,模拟人体口服药物的途径,无创,操作简便,更易被接受。

小鼠衰老过程中,在 16 月龄以后 cTn I 的表达明显下降,低于青年时期,本研究旨在小鼠心脏中 cTn I 表达未下降时给予 EGCG 预防性干预,观察不同剂量 EGCG 防止衰老过程 cTn I 表达下降的作用,选择在 12 月龄青壮年期开始干预。EGCG 干预持续 6 个月后,3 个剂量的 EGCG 均能有效抑制 HDAC1 的表达和结合水平;而 cTn I 启动子区 H3K9 乙酰化、转录因子 GATA4 和 Mef2c 结合以及 cTn I mRNA 和蛋白质表达升高水平与 EGCG 的剂量呈正相关,在 3 个剂量中,EGCG 高剂量使 cTn I mRNA、蛋白质维持在青年水平,提示高剂量的 EGCG 预防衰老过程中小鼠心脏中 cTn I 表达下降效果最佳。

EGCG 在治疗与预防肿瘤的研究中发现 EGCG 不仅可以抑制 HDAC1 的表达,对 HDAC1 的酶活性也有抑制作用^[11-12,21]。本研究中,3 个剂量的 EGCG 对 HDAC1 mRNA 表达的抑制作用类似,但 HDAC1 的结合水平随着 EGCG 剂量增加而下降,可能与不同剂量 EGCG 对 HDAC1 酶活性抑制作用不同有关,尚待进一步深入研究。

综上所述,小鼠心脏 cTn I 蛋白表达于 16 月龄

开始下降,高浓度 EGCG 可以有效预防老年小鼠心脏 cTn I 表达下降。其可能的机制是通过抑制 HDAC1 保持组蛋白的高乙酰化修饰以维持 cTn I 的表达,这为临床预防老年相关舒张功能障碍提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Dai DF, Chen T, Johnson SC, et al. Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(12): 1492-1526.
- [2] Crendal E, Dutheil F, Naughton G, et al. Increased myocardial dysfunction, dyssynchrony, and epicardial fat across the lifespan in healthy males[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014, 14: 95.
- [3] Abhayaratna WP, Marwick TH, Smith WT, et al. Characteristics of left ventricular diastolic dysfunction in the community: an echocardiographic survey[J]. *Heart*, 2006, 92(9): 1259-1264.
- [4] Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC Jr, et al. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic[J]. *JAMA*, 2003, 289(2): 194-202.
- [5] Tobacman LS. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction[J]. *Annu Rev Physiol*, 1996, 58: 447-481.
- [6] Huang X, Pi Y, Lee KJ, et al. Cardiac troponin I gene knockout: a mouse model of myocardial troponin I deficiency[J]. *Circ Res*, 1999, 84(1): 1-8.
- [7] Li Y, Zhang L, Jean-Charles PY, et al. Dose-dependent diastolic dysfunction and early death in a mouse model with cardiac troponin mutations[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 62: 227-236.
- [8] Pan B, Xu ZW, Xu Y, et al. Diastolic dysfunction and cardiac troponin I decrease in aging hearts[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 603: 20-28.
- [9] Chowdhury A, Sarkar J, Chakraborti T, et al. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: a perspective[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 78: 50-59.
- [10] Pandey M, Shukla S, Gupta S. Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(11): 2520-2533.
- [11] Nandakumar V, Vaid M, Katiyar SK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(4): 537-544.
- [12] Thakur VS, Gupta K, Gupta S. Green tea polyphenols increase p53 transcriptional activity and acetylation by suppressing class I histone deacetylases[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 353-361.
- [13] Borlaug BA, Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment[J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(6): 670-679.
- [14] Kane GC, Karon BL, Mahoney DW, et al. Progression of left ventricular diastolic dysfunction and risk of heart failure[J]. *JAMA*, 2011, 306(8): 856-863.