

SIRT6 通过调节 eNOS 抑制心肌肥大的机制研究

黄小阳¹, 李卓明^{1,2}, 刘志平¹, 刘培庆^{1,2*}

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006; 2. 新药成药性评估及评价国家地方联合工程实验室, 广东 广州 510006)

摘要:【目的】探讨 SIRT6 通过调节内皮一氧化氮合酶(eNOS)抑制苯肾上腺素(PE)诱导的新生大鼠心肌细胞肥大的作用及机制。【方法】在 PE 诱导的心肌细胞肥大模型中采用 si-RNA 干扰或腺病毒过表达的方法改变心肌细胞中 SIRT6 表达水平,并通过实时定量 RT-PCR(real time PCR)、Western Blotting 等方法检测心肌肥大基因钠素(ANF)、脑尿钠肽(BNP)的表达、心肌细胞表面积,以及 eNOS 的表达及 NO 的生成。【结果】与 PE 刺激组相比,腺病毒过表达 SIRT6 能显著抑制 PE 诱导的心肌细胞 ANF、BNP mRNA 水平及心肌细胞表面积的增加($P < 0.05$);与对照组相比,基因沉默 SIRT6 诱导心肌细胞 ANF、BNP mRNA 水平显著上调($P < 0.05$),说明 SIRT6 对心肌细胞肥大的抑制作用。SIRT6 过表达能明显逆转 PE 引起的 NO 生成水平下降($P < 0.05$),并部分抑制 PE 诱导的 eNOS 蛋白水平下调;SIRT6 siRNA 干扰明显降低 eNOS 蛋白表达及 NO 生成水平($P < 0.05$)。eNOS 抑制剂 N ω 硝基左旋精氨酸甲酯(L-NAME)能阻断 SIRT6 对心肌细胞的保护作用($P < 0.05$),表明 SIRT6 对 eNOS 的表达和酶活性有明显的调控作用。【结论】SIRT6 可能通过调节 eNOS 而发挥抗心肌肥大的作用。

关键词: SIRT6; eNOS; 心肌肥大

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2015)03-0338-08

SIRT6 Prevents Phenylephrine-induced Cardiomyocyte Hypertrophy via eNOS

HUANG Xiao-yang¹, LI Zhuo-ming^{1,2}, LIU Zhi-ping¹, LIU Pei-qing^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, SunYat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2. National and Local United Engineering Lab of Druggability and New Drugs Evaluation, SunYat-senUniversity, Guangzhou 510006, China)

Corresponding to: LIU Pei-qing, E-mail: liupq@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To investigate whether or not SIRT6 prevents phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy via eNOS.【Methods】 SIRT6 was overexpressed by adenovirus infection, or was knocked down by RNA interference in primary culture of neonatal rat cardiomyocytes. The mRNA expressions of hypertrophic markers ANF and BNP, the cell surface area, the protein expression of eNOS and production of NO were investigated. 【Results】 SIRT6 overexpression inhibited the increase of ANF and BNP mRNA expressions, and the increase of cell surface area induced by PE ($P < 0.05$); SIRT6 silencing triggered the expressions of ANF and BNP as compared to the control ($P < 0.05$), indicating that SIRT6 prevented PE-induced cardiomyocyte hypertrophy. In addition, SIRT6 overexpression reversed PE-induced down-regulation of NO production and partially inhibited the decrease of eNOS ($P < 0.05$), while SIRT6 siRNA suppressed the expression of eNOS and NO production ($P < 0.05$), suggesting that SIRT6 regulated the expression and activity of eNOS. Furthermore, the eNOS inhibitor L-NAME blocked the protective effects of SIRT6 on cardiomyocytes hypertrophy ($P < 0.05$). 【Conclusions】 SIRT6 prevents cardiomyocyte hypertrophy through regulating eNOS.

Key words: SIRT6; eNOS; cardiomyocytes hypertrophy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(3):338-345]

心肌肥大主要表现为心肌细胞蛋白合成增加和心室壁厚度的增加,多发生在患有高血压、先天

性心脏病等心脏疾病患者中,被认为是对持续增加的心脏负荷的一种代偿性反应^[1]。心肌肥大主

收稿日期: 2015-03-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473205, 81273499); 广东省科技计划重点项目(2013B090700010); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81400359)

作者简介: 黄小阳, 硕士, 硕士研究生, 研究方向: 心血管药理学; E-mail: 1061997797@qq.com; 通信作者: 刘培庆, 教授, 博士生导师, E-mail: liupq@mail.sysu.edu.cn

要由机械应激反应及神经体液因素刺激引起,是一种由多种信号通路参与调节的复杂病理生理过程^[2]。近年来关于第三类组蛋白去乙酰化酶 Sirtuins 在心血管疾病中的作用已经成为众多研究的焦点。SIRT6 作为 Sirtuins 家族的成员之一,具有 NAD⁺依赖性去乙酰化酶活性和 APD-核糖基转移酶活性。早期研究认为 SIRT6 是一个长寿蛋白,具有 DNA 修复功能,后陆续有报道其参与了糖脂代谢的调控,可影响肥胖、胰岛素抵抗等多种代谢性疾病的进程^[3]。本课题组前期研究结果提示,SIRT6 参与了病理性心肌肥大病理过程,主要表现为一定的抗心肌肥大作用^[4]。后来,美国芝加哥大学的课题组进一步利用 SIRT6 基因敲除和过表达小鼠证实了 SIRT6 对心肌肥大的负性调控作用,肯定了本课题组的发现^[5]。目前,已证实 SIRT6 抗心肌肥大的作用与其对 NF- κ B^[4]、IGF-Akt^[5]等信号通路的抑制作用相关,具体的作用机制仍有待进一步研究。

一氧化氮合酶(Nitric oxide synthases, NOS)是一类利用左旋精氨酸合成 NO 的同工酶。其中内皮一氧化氮合酶 (endothelial Nitric oxide synthase, eNOS)主要存在于血管内皮细胞、心肌细胞中,在调节血管舒缩和维持心血管系统稳态等方面发挥着重要的作用^[6]。众多研究表明,eNOS 或 eNOS 来源的 NO 的缺失可能会导致心肌肥大^[7-9],而恢复 eNOS 活性则能纠正或减轻心肌肥大症状^[10-11]。有研究表明,eNOS 与 Sirtuins 家族存在相互作用。SIRT1 及其激动剂白藜芦醇均能促进 eNOS 活化和 NO 生成,从而促进血管舒张、抑制血管平滑肌细胞增生^[12-14],并参与调节动脉粥样硬化等心血管疾病^[15]。

鉴于 eNOS 在心肌肥大中的重要性以及其与 Sirtuins 家族成员之间的相互作用,我们提出假设:SIRT6 是否能通过调节 eNOS 从而实现其抗心肌肥大的作用呢?本文主要探讨 SIRT6 对 eNOS 的调控作用以及该作用对心肌肥大的影响,为进一步研究 SIRT6 参与心肌肥大的分子机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 DMEM 培养基(美国 Gibco);Lipofectamine 2000、Opti-MEM 培养基、DAPI (美国

Invitrogen);类胎牛血清(美国 Hyclone);RNAiso Plus 试剂(日本 Takara);逆转录试剂盒、SYBR PremixEXTaq 试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、鼠二抗(美国 Thermo);胰蛋白酶、BrdU、SIRT6 抗体、 α -tubulin 抗体(美国 Sigma);兔二抗(美国 Promega);PE(英国 Tocris);eNOS 抗体(美国 Santacruz);Ad-SIRT6 腺病毒(上海汉恒);L-NAME(上海碧云天)。

1.1.2 实验动物 2~3 d 的新生 SD 大鼠,雌雄不限,购自中山大学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2004-0011。

1.2 方法

1.2.1 新生 SD 大鼠心肌细胞原代培养 取 1~3 d 新生 SD 大鼠心脏于预冷的 PBS 中,去除多余的结缔组织后将心脏剪成 1 mm³ 大小的组织块。将组织块转移至 12~15 mL 0.8 g/L 的胰蛋白酶中并于冰上冷消化 20 min。转移至加热磁力搅拌器中 37 °C 恒温水浴消化,4 min 后收集消化上清液于含类胎牛血清 100 mL/L 的 DMEM 培养基的 15 mL 离心管中,1600 r/min($r = 8$ cm)离心 6 min,细胞沉淀用 1~2 mL 含类胎牛血清 100 mL/L 的 DMEM 培养基重悬。未消化完全的组织块则继续使用 0.8 g/L 的胰蛋白酶消化并收集细胞,重复此操作 12~15 次直至组织块消化完全。将各次消化收集的细胞 1600 r/min($r = 8$ cm)离心 8 min 后弃上清,6~8 mL 含类胎牛血清 100 mL/L 的 DMEM 培养基重悬细胞沉淀并接种于培养瓶中。置于细胞培养箱中培养 1 h,差速去除成纤维细胞。收集培养瓶中富集心肌细胞的上清培养液,加入 0.1 mmol/L BrdU 以抑制心肌成纤维细胞生长。将细胞接种于 6 孔板或 48 孔板中,细胞培养箱中培养。后续实验进行前,细胞用含类胎牛血清 10 mL/L 的 DMEM 培养基处理 16~18 h。实验分为正常对照组(control)、PE 组、Ad-GFP 组、Ad-SIRT6 组、Ad-SIRT6+PE 组及 si-NC 组和 si-SIRT6 组。其中,Ad-SIRT6 或 Ad-GFP 以 25 倍感染复数(MOI = 25)感染心肌细胞 48 h;si-SIRT6 或 si-NC 以 100 pmol 浓度转染心肌细胞 72 h;PE 以 100 μ mol/L 给药,进行 Real Time PCR 或 NO 检测时处理 12 h,进行 Western Blotting 分析时处理 24 h。

1.2.2 Real Time PCR 按照 RNAiso Plus 说明书步骤提取细胞总 RNA,利用 NanoDrop 2000 超微

量分光光度计测定 RNA 纯度和浓度。用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 c-DNA, 采用 SYBR PremixEXTaq 试剂盒进行 Real time PCR 反应, 每组样品设 3 个复孔, 以保证实验数据的有效性。以 β -actin 为内参, 以空白组为对照。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算方法分析数据。Real time PCR 引物由上海生工设计合成, 见表 1。

表 1 实时定量 RT-PCR 引物

Table 1 Primers for Real Time PCR analysis

Gene	Primer sequences
ANF	Forward: GGAAGTCAACCCGTCTCA
	Reverse: AGCCCTCAGTTTGCTTTT
BNP	Forward: TTTGGGCAGAAGATAGACCCG
	Reverse: AGAAGAGCCGACGGCAGAG
β -actin	Forward: TCGTGCGTGACATTAAGAG
	Reverse: ATTGCCGATAGTGATGACCT
SIRT6	Forward: TGCCTCTCCACCAATCACAC
	Reverse: GTGGGCCCTTGTCTCTCCTA

1.2.3 Western Blot 定量分析 用含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞提取细胞总蛋白, 并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。各组蛋白样品上样量均为 30 μ g, SDS-PAGE 电泳分离样品, 230 mA 恒流冰上电转 90 min, 将 PVDF 膜置于 50 g/L 脱脂牛奶封闭液中室温封闭 1 h。eNOS (1:500) 或 SIRT6 (1:1000) 兔多抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。室温孵育二抗 1 h, ECL 发光法显影, 以 α -tubulin 为内参, 显影条带用 Quantity One 软件进行灰度分析。

1.2.4 RNA 干扰 按照 lipofectamine 2000 说明书步骤将 100 pmol si-SIRT6 干扰序列或阴性对照序列 (si-NC) 转染于 6 孔板中原代心肌细胞 72 h。提取总 RNA 或总蛋白进行后续实验。大鼠 SIRT6 基因干扰序列及阴性对照序列由苏州吉玛公司设计合成, 见表 2。

表 2 siRNA 干扰序列

Table 2 si-RNA sequence for RNA interference

Gene	si-RNA sequences
SIRT6	Sense: GCCGUCUGGUCAUUGUCAATT
	Antisense: UUGACAAUGACCAGACGGCTT
NC	Sense: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	Antisense: ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2.5 SIRT6 过表达 Ad-SIRT6 腺病毒感染心肌细胞 48 h 过表达 SIRT6, 病毒感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 为 25。

1.2.6 心肌细胞表面积测定 将 48 孔板中细胞用 40 g/L 多聚甲醛溶液室温固定 10 min, 10 mL/L Triton-100 破膜 10 min。1 mL/L 罗丹明-鬼笔环肽避光孵育 30 min, PBS 5 min/次清洗 3 次。DAPI 室温避光染核 5 min。各组细胞平均表面积用高内涵系统每孔随机取 40 个视野进行检测分析。

1.2.7 NO 生成测定 收集不同分组细胞培养上清液, 按照碧云天公司的 Griess 试剂盒检测步骤检测样品中的 NO 水平。

1.2.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件, 所有数据均以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

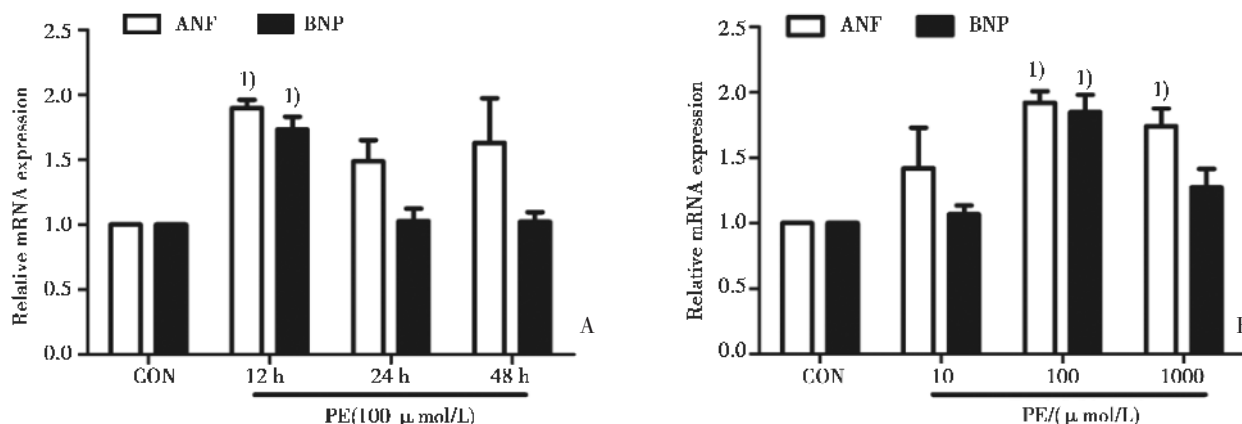
2 结果

2.1 PE 诱导的心肌细胞肥大模型的建立

为确立苯肾上腺素 (Phenylephrine, PE) 诱导的心肌细胞肥大模型条件, 我们对 PE 的作用时间和作用浓度进行考察, 以肥大标志基因心钠素 (atrial natriuretic factor, ANF) 和脑尿钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 的 mRNA 水平变化作为心肌细胞肥大的指标。如图 1A 所示, 与正常对照组 (control) 相比, 100 μ mol/L PE 刺激心肌细胞 12 h, 可明显增加 ANF 和 BNP 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 提示 12 h 为 PE 的最佳作用时间。不同浓度的 PE (10、100、1000 μ mol/L) 分别刺激心肌细胞 12 h, 在 100 μ mol/L 浓度下, PE 能引起 ANF 和 BNP mRNA 表达的显著增加 ($P < 0.05$, 图 1B)。该结果提示 100 μ mol/L PE 作用 12 h 能成功诱导心肌细胞肥大。

2.2 SIRT6 对 PE 诱导的心肌肥大的抑制作用

为验证 SIRT6 对 PE 诱导的心肌细胞肥大的作用, 我们利用携带 SIRT6 基因的腺病毒对心肌细胞过表达 SIRT6。腺病毒感染细胞 48 h 后, SIRT6 的 mRNA 水平显著增加 ($P < 0.05$, 图 2A), 提示 SIRT6 已被成功过表达。与正常对照组相比, PE 刺激 12 h 后心肌细胞 ANF、BNP mRNA 水平及心肌细胞表面积明显增加 (分别相当于 control 的 2.12 ± 0.27 、 2.3 ± 0.4 和 2.2 ± 0.4 倍, $P < 0.05$); 过表达 SIRT6 不影响心肌细胞中 ANF、BNP 的表达



A: Relative mRNA expression of ANF and BNP was detected by RT-PCR in cardiomyocytes with PE treatment (100 μmol/L) for different time (12 h, 24 h, 48 h); B: Relative mRNA expression of ANF and BNP in cardiomyocytes with PE treatment at different dosage for 12h. One-way ANOVA (and nonparametric), compared with control (CON), 1) $P < 0.05$.

图1 PE 诱导的心肌细胞肥大模型的建立

Fig.1 The foundation of cardiomyocyte hypertrophy model induced by PE

以及心肌细胞表面积,但能明显逆转 PE 引起的 ANF、BNP mRNA 的上调和细胞表面积的增加 (Ad-SIRT6+PE 组中分别为 1.51 ± 0.21 、 1.33 ± 0.18 和 1.41 ± 0.15 倍, $P < 0.05$ vs. PE 组),提示过表达 SIRT6 能抑制 PE 引起的心肌肥大。再者,我们通过 RNA 干扰降低 SIRT6 表达,考察了内源性 SIRT6 对心肌肥大的作用。siRNA 干扰后,心肌细胞中 SIRT6 的 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.05$, 图 2D),而 ANF、BNP 的 mRNA 水平显著上调 (分别相当于 control 的 2.12 ± 0.17 和 2.0 ± 0.4 倍, $P < 0.05$, 图 2E),与 PE 诱导的 ANF、BNP 上调的水平相仿,提示内源性 SIRT6 的缺失可诱发心肌肥大。

2.3 SIRT6 对 eNOS 的调控作用

100 μmol/L PE 刺激心肌细胞 12 h 或 24 h, eNOS 的蛋白表达水平显著下降 (分别相当于 control 的 0.86 ± 0.04 和 0.62 ± 0.07 倍, $P < 0.05$, 图 3), NO 生成量也明显下降 (相当于 control 的 $(64 \pm 12)\%$, $P < 0.05$, 图 4C),提示心肌肥大对 eNOS 的抑制作用。为明确 SIRT6 对抗心肌肥大的作用与 eNOS 的相关性,我们考察了过表达或 RNA 干扰 SIRT6 对 eNOS 的表达和 NO 生成量的影响。如图 4A 所示,腺病毒过表达 SIRT6 并不影响 eNOS 的蛋白表达水平,但能部分恢复 PE 引起的 eNOS 表达下调。过表达 SIRT6 可显著提高心肌细胞中 NO 的产量,并可逆转 PE 引起的 NO 产量下降 (PE 组和 Ad-SIRT6 组 NO 生成量分别为

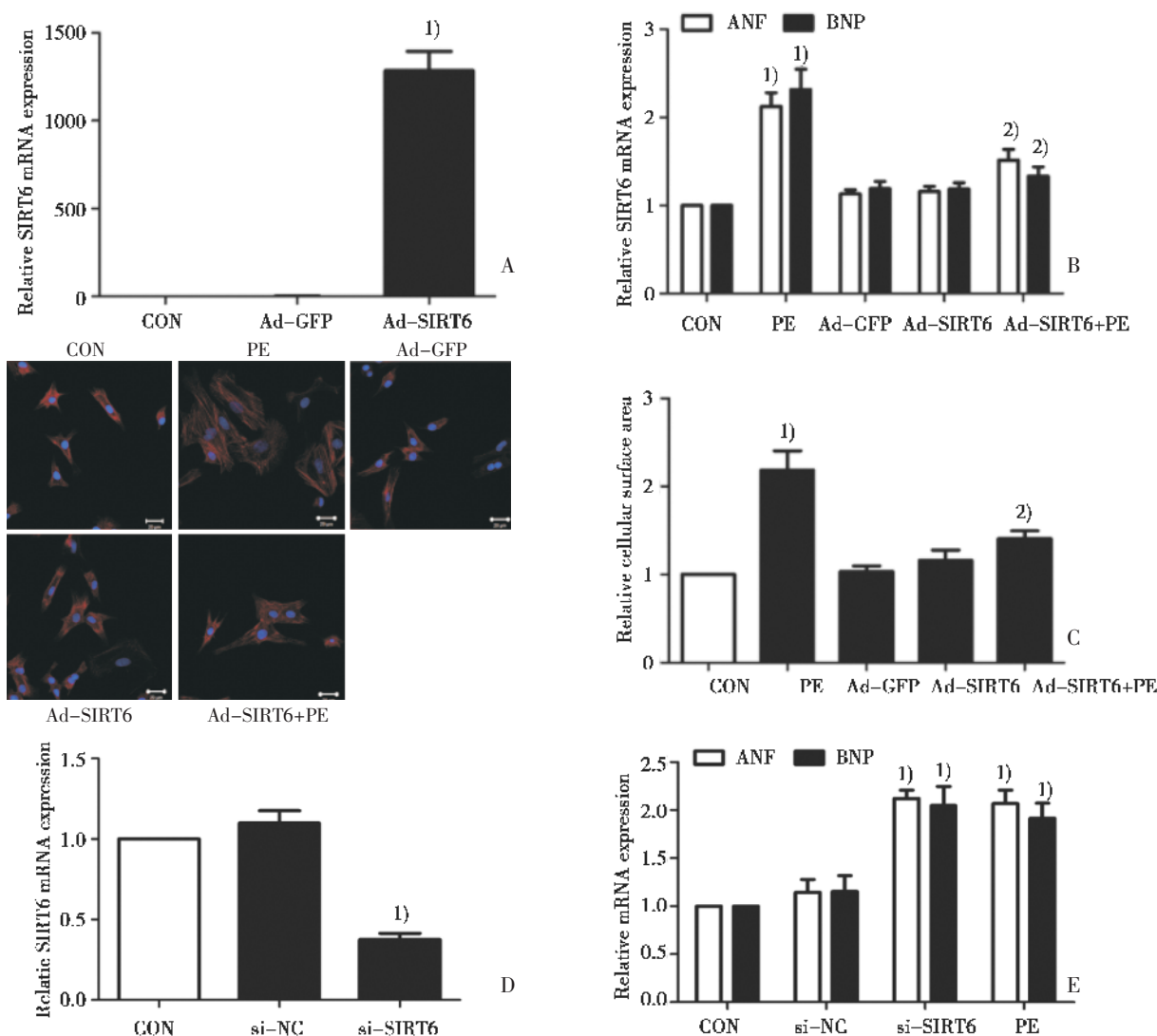
control 的 $(64 \pm 12)\%$ 和 $(186 \pm 18)\%$, $P < 0.05$ vs. control; Ad-SIRT6+PE 组为 $(117 \pm 15)\%$, $P < 0.05$ vs. PE, 图 4C)。相反, siRNA 干扰 SIRT6 可抑制 eNOS 的表达和 NO 的生成 (eNOS 蛋白和 NO 生成分别下降为 control 的 (0.42 ± 0.06) 倍和 $(74 \pm 8)\%$, $P < 0.05$ vs. control, 图 4B&D)。以上结果提示 SIRT6 对 eNOS 的表达和活性有确切的调控作用。

2.4 SIRT6 通过对 eNOS 的调节对抗 PE 诱导的心肌肥大

为了进一步确证 SIRT6 对 eNOS 的调控作用是其抗心肌肥大作用的机制之一,我们考察了 eNOS 抑制剂 L-NAME 对 SIRT6 抗心肌肥大作用的影响。如图 5 所示,尽管 SIRT6 过表达可显著抑制 PE 诱导的 ANF、BNP mRNA 的上调和细胞表面积的增加,但在 50 μmol/L L-NAME 预处理 1 h 的情况下, SIRT6 对 PE 的抑制作用被阻断 (L-NAME+Ad-SIRT6+PE 组 ANF、BNP mRNA 水平和心肌细胞表面积分别为 control 的 3.04 ± 0.28 、 3.3 ± 0.6 和 2.33 ± 0.25 倍, $P < 0.05$ vs. PE),表明 L-NAME 能阻断 SIRT6 过表达时的抗心肌肥大作用。

3 讨论

作为对心脏长期超负荷的一种慢性代偿反应,心肌细胞早期适当肥大有利于维持正常的心



A: SIRT6 mRNA were overexpressed in cardiomyocytes when infected with Ad-SIRT6 for 48 h, detected by RT-PCR; B-C: SIRT6 overexpression inhibited the increase of ANF and BNP mRNA expressions ($F = 22.96$, $P < 0.001$ for ANF; $F = 17.73$, $P < 0.001$ for BNP), and the increase of cell surface area induced by PE ($F = 15.78$, $P < 0.001$, $40 \times$ objectives, scale = $20 \mu\text{m}$); D: RT-PCR analysis for relative SIRT6 mRNA expression in cardiomyocytes transfected with si-RNA for 72 h; E: SIRT6 silencing triggered the expressions of ANF and BNP as compared to the control ($F = 30.41$, $P < 0.001$ for ANF; $F = 12.17$, $P < 0.01$ for BNP). One-way ANOVA (and nonparametric), 1) $P < 0.05$ vs. control, 2) $P < 0.05$ vs. PE treatment.

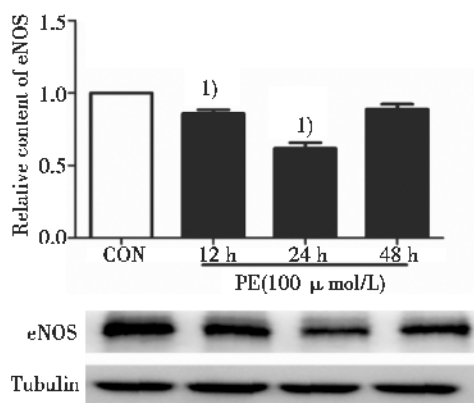
图 2 SIRT6 对 PE 诱导的心肌肥大的抑制作用

Fig.2 SIRT6 prevents phenylephrine-induced hypertrophy in cardiomyocytes

输出量,以保证对重要器官的血流灌注,但是持续的病理性刺激导致心肌重构,表现为心肌细胞肥大但收缩功能下降、间质纤维化而降低心肌顺应性,心肌舒缩功皆下降且心肌耗氧量增加,最终将会导致心衰发生。因此,半个世纪以来,人们已从多个水平对心肌肥大展开了广泛的研究,也成功建立了多种比较公认的心肌肥大的研究模型及评价指标体系。而其中利用介导心肌肥大的神经体液刺激因子(如 Ang II、内皮素、肾上腺素能受体

激动剂等)建立的心肌细胞肥大模型也成为比较公认、常用的心肌肥大体外模型。本实验利用 PE 诱导新生大鼠心肌细胞肥大,并以肥大基因 ANF、BNP 的 mRNA 水平及心肌细胞表面积作为评价心肌细胞肥大的指标。实验结果表明,给予心肌细胞 $100 \mu\text{mol/L}$ PE 处理 12 h 后,肥大基因的 mRNA 水平明显升高,心肌细胞表面积明显增加,表明该条件能够成功诱导心肌细胞肥大。

Sirtuins 是一类从古细菌到复杂真核生物中广

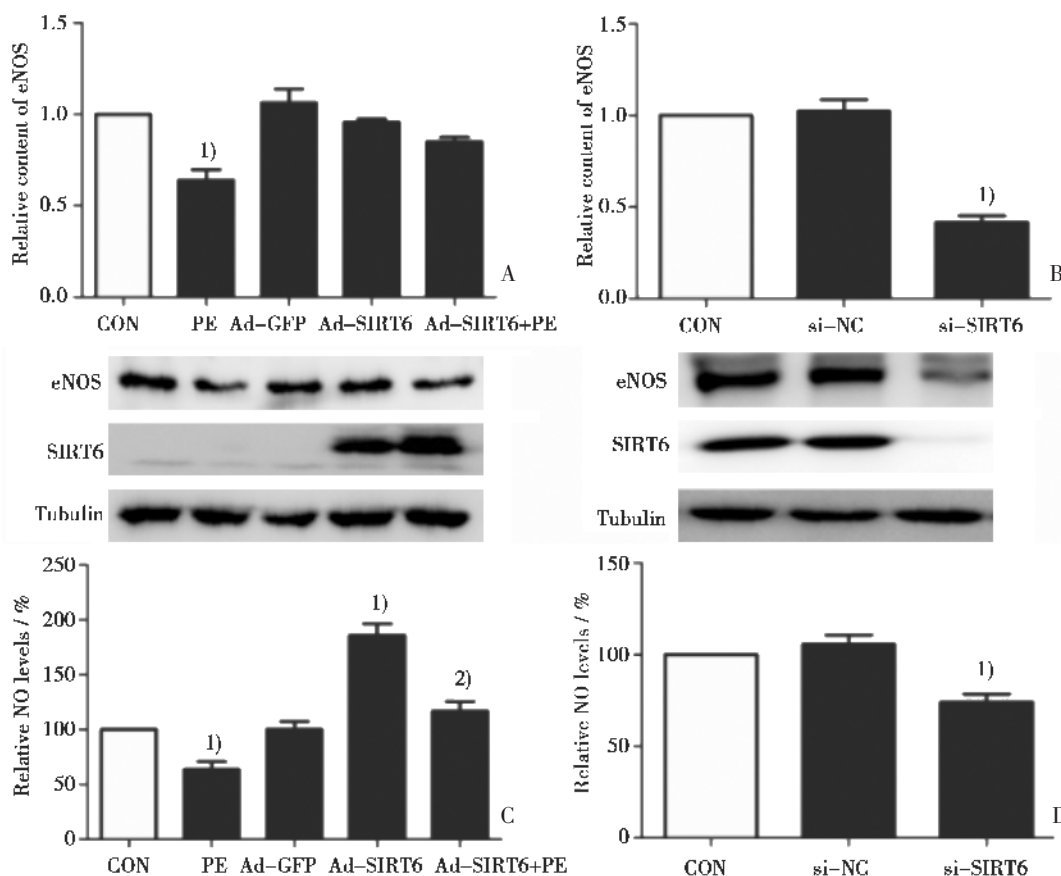


Western blotting analysis for protein expression of eNOS in cardiomyocytes treated with PE (100 μmol/L) for different time. Bar graphs showing the expression level, presented as percentage of α-tubulin expression. PE stimulation declined the eNOS protein expression, especially treated for 24 h ($F = 30.71, P < 0.001$). One-way ANOVA (and nonparametric), 1) $P < 0.05$ vs. control.

图 3 PE 刺激对 eNOS 蛋白表达水平的影响

Fig.3 The effect of PE on eNOS protein expression

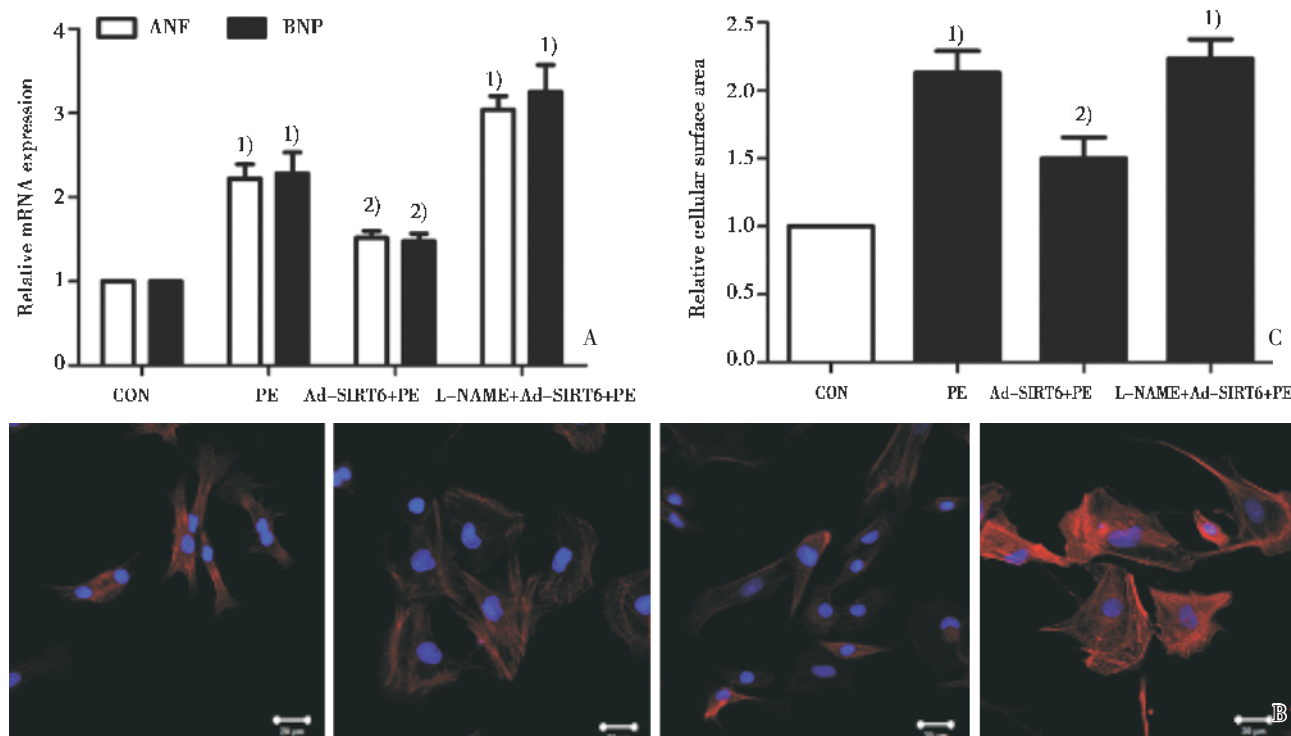
泛存在的进化高度保守的蛋白家族,在酵母、线虫和果蝇等低等生物中,沉默信息调节因子 2 (silent information regulator 2, Sir2) 是调节寿命的关键因子,哺乳动物的 Sirtuins 基因家族与酵母 Sir2 基因高度同源^[16-17]。Sirtuins 家族是 NAD⁺依赖的 III 类组蛋白去乙酰化酶,通过对组蛋白、转录因子及其它蛋白修饰的赖氨酸残基进行去乙酰化修饰来调节基因的表达及蛋白的功能。近年来,关于 Sirtuins 家族与心血管疾病之间的关系引起人们广泛关注。本课题组前期研究揭示,SIRT6 在 Ang II 诱导的心肌细胞肥大模型和大鼠压力超负荷性心肌肥大模型中都呈现出 mRNA 表达上调、去乙酰化酶活性下调的特点^[4]。SIRT6 过表达可对抗 Ang II 诱导的心肌细胞肥大^[4],而基因敲除或干扰 SIRT6 会导致心肌肥大的发生^[4-5]。在该研究基础上,本文探讨了 SIRT6 对另一种神经体液刺激因子 PE 诱



A: eNOS protein expression was detected by Western blotting in cardiomyocytes treated with PE in the presence or absence of Ad-SIRT6; B: Silencing SIRT6 lead to a significantly decrease of eNOS protein expression ($F = 52.76, P < 0.001$); C: SIRT6 overexpression reversed the decline of NO levels induced by PE ($F = 34.77, P < 0.001$); D: Knockdown of SIRT6 decreased the production of NO ($F = 19.12, P < 0.01$). One-way ANOVA (and nonparametric), 1) $P < 0.05$ vs. control, 2) $P < 0.05$ vs. PE treatment.

图 4 SIRT6 对 eNOS 蛋白表达水平和 NO 的调控作用

Fig.4 The effect of SIRT6 on eNOS protein expression and NO levels



A: Analysis for relative mRNA expression of ANF, BNP. B: Cell surface area in PE-induced cardiomyocyte hypertrophy with or without L-NAME. C: L-NAME reversed the protective effect of Ad-SIRT6 ($F = 50.47$, $P < 0.001$ for ANF; $F = 22.29$, $P < 0.001$ for BNP; $F = 19.08$, $P < 0.001$ for cell surface area). $40\times$ objectives, scale = $20\ \mu\text{m}$. One-way ANOVA (and nonparametric), 1) $P < 0.05$ vs. control, 2) $P < 0.05$ vs. PE treatment.

图 5 SIRT6 通过对 eNOS 的调节对抗 PE 诱导的心肌肥大

Fig.5 SIRT6 prevents phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy via eNOS

导的心肌细胞肥大模型的作用及初步机制。发现利用携带 SIRT6 基因的腺病毒感染心肌细胞过表达 SIRT6, 可显著逆转 PE 引起的肥大基因 ANF、BNP 的表达上调和细胞表面积的增加, 而 siRNA 干扰内源性 SIRT6 可诱导以上肥大基因表达, 提示 SIRT6 主要表现为对心肌肥大的抑制作用, 与之前报道的研究结果相一致。

eNOS 因其在血管舒张、血管生成及维持血管功能稳态方面的重要作用而被人们所熟知。众多研究亦表明 eNOS 也参与了心脏的发育过程, eNOS 缺失会引起心脏发育缺陷和心肌肥大等心脏疾病^[18]。Flaherty 等^[9,19]指出持久性的抑制 eNOS 活性或纯合子 eNOS 基因敲除都会引起实验鼠心肌肥大, 而外源性转染 eNOS 基因能显著改善心梗诱导的心肌肥大症状^[16]。在 PE 诱导的心肌细胞肥大模型中, 我们发现 eNOS 的蛋白表达存在下调的趋势, 并且生成的 NO 量下降, 提示 eNOS 酶活性也受到抑制。该结果表明, 在心肌肥大中 eNOS 的表达和酶活性的下调可能为心肌肥大的重要机制

之一。为探讨 SIRT6 抗心肌肥大作用是否与调节 eNOS 相关, 我们重点研究了 SIRT6 对 eNOS 的调控作用。SIRT6 过表达可部分恢复 PE 诱导的 eNOS 表达下调, 并提高 NO 产量, 而 RNA 干扰 SIRT6 则显著下调 eNOS 蛋白水平和 NO 的生成。利用 eNOS 抑制剂 L-NAME 阻断 eNOS 的活性后, SIRT6 抑制 PE 诱导的心肌肥大的作用被阻断, 表明 SIRT6 的抗心肌肥大作用可能部分通过调节 eNOS 来实现。

虽然我们的研究首先发现 SIRT6 可能通过调节 eNOS 抑制 PE 诱导的心肌肥大, 但其对 eNOS 的具体调控机制仍有待进一步阐明。eNOS 的活性可受多种因素的影响, 翻译后修饰是其中一种重要的形式。关键位点的磷酸化、乙酰化、豆蔻酰化等修饰均对 eNOS 的活性有重要的影响。作为重要的去乙酰化酶, SIRT6 是通过组蛋白的去乙酰化修饰影响 eNOS 或相关基因的转录还是对 eNOS 的关键位点直接去乙酰化从而调节其活性, 有待深入探讨。

对心肌肥大发病机制及新治疗靶点的探索一直是心血管领域广泛关注的课题。本研究揭示了 SIRT6 对 eNOS 的调控作用,探讨了 SIRT6 抗心肌肥大可能的新途径,为日后深入研究 SIRT6 参与心肌肥大进程的机制、寻找新的治疗方法提供了实验基础和新的研究思路。

参考文献

- [1] Osterholt M, Nguyen T, Schwarzer M, et al. Alterations in mitochondrial function in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. *Heart Fail Rev*, 2013, 18(5): 645–656.
- [2] Rohini A, Agrawal N, Koyani C, et al. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61(4): 269–280.
- [3] Kugel S, Mostoslavsky R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6 [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(2): 72–81.
- [4] Yu S, Cai Y, Ye J, et al. Sirtuin 6 protects cardiomyocytes from hypertrophy in vitro via inhibition of NF- κ B-dependent transcriptional activity[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(1): 117–128.
- [5] Sundaresan N, Vasudevan P, Zhong L, et al. The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiomyocytes hypertrophy by targeting c-Jun [J]. *Nat Med*, 2012, 18(11): 1643–1650.
- [6] Llorens S, Jordan J, Nava E. The nitric oxide pathway in the cardiovascular system [J]. *J Physiol Biochem*, 2002, 58(3): 179–188.
- [7] Bubikat A, De Windt L, Zetsche B, et al. Local atrial natriuretic peptide signaling prevents hypertensive cardiac hypertrophy in endothelial nitric-oxide synthase-deficient mice [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22): 21594–21599.
- [8] Wenzel S, Rohde C, Wingerning S, et al. Lack of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide formation favors hypertrophy in adult ventricular cardiomyocytes[J]. *Hypertension*, 2007, 49(1): 193–200.
- [9] Flaherty M, Brown M, Grupp I, et al. eNOS deficient mice develop progressive cardiomyocytes hypertrophy with altered cytokine and calcium handling protein expression[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2007, 7(3): 165–177.
- [10] Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiomyocytes hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion[J]. *Circ J*, 2002, 66(9): 851–856.
- [11] Janssens S, Pokreisz P, Schoonjams L, et al. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2004, 94(9): 1256–1262.
- [12] Mattagajasingh I, Kim C, Naqvi A, et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(37): 14855–14860.
- [13] Bhatt S, Lokhandwala M, Banday A. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 667(1–3): 258–264.
- [14] Ekshyyan V, Hebert V, Khandelwal A, et al. Resveratrol inhibits rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation via estrogen receptor dependent nitric oxide production[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50(1): 83–93.
- [15] Ota H, Eto M, Ogawa S, et al. SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17(5): 431–435.
- [16] Smith R, Agata J, Xia C, et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiomyocytes remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction[J]. *Life Sci*, 2005, 76(21): 2457–2471.
- [17] Frye R. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260(1): 273–279.
- [18] Liu Y, Feng Q. NOing the heart: role of nitric oxide synthase-3 in heart development [J]. *Differentiation*, 2012, 84(1): 54–61.
- [19] Balakumar P, Kathuria S, Taneja G, et al. Is targeting eNOS a key mechanistic insight of cardiovascular defensive potentials of statins [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(1): 83–92.

(编辑 孙慧兰)