DOI:10.16016/j.1000-5404.201609074

表没食子儿茶素没食子酸酯参与老年小鼠心脏 SERCA2a 的调控及其机制

全珺珺,潘 博,贾忠莉,刘玲娟,田 杰 (400014 重庆,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)

[**摘要**] **目的** 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallo-catechin-3-gallate,EGCG]能否通过抑制组蛋白去乙酰化酶 1(histone deacetylase 1,HDAC1)参与老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达。**方法** 24 只 16 月龄雄性 C57 BL/6 老年小鼠随机数字表法分为 EGCG + 老年组[腹腔注射 50 mg/(kg·d)的 EGCG]、DMSO + 老年组(腹腔注射与溶解 EGCG 同剂量的二甲基亚砜)以及未处理老年组,每组 8 只;3 月龄雄性 C57 BL/6 成年小鼠作为青年组($n=8$)。干预 8 周,收集心脏组织。RT-PCR 检测 Atp2a2 及 HDAC1 的 mRNA 表达量,Western blot 检测 SERCA2a 的表达量。ChIP-Q-PCR 检测 Atp2a2 启动子区组蛋白 AcH3K9 水平及 HDAC1、GATA4、Mef2c 的结合量。**结果** RT-PCR 及 Western blot 结果表明,老年小鼠心脏 SERCA2a 在 mRNA 及蛋白水平的表达降低($P<0.05$),HDAC1 在 mRNA 水平表达升高($P<0.05$)。ChIP-Q-PCR 结果表明,老年小鼠心脏 Atp2a2 启动子区 HDAC1 结合量升高,组蛋白 AcH3K9 水平降低,GATA4、Mef2c 的结合量降低($P<0.05$)。EGCG 干预 8 周后,老年小鼠心脏 HDAC1 的表达量及其在 Atp2a2 启动子区的结合量降低,组蛋白 AcH3K9 水平升高,GATA4、Mef2c 的结合量增加($P<0.05$),EGCG 在 mRNA 及蛋白水平升高了老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达($P<0.05$)。**结论** 由 HDAC1 介导的组蛋白 H3K9 低乙酰化可能是老年小鼠心脏 SERCA2a 表达降低的关键机制之一,EGCG 通过抑制这一过程升高老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达。

[**关键词**] 心脏舒张功能障碍;EGCG;组蛋白去乙酰化酶;SERCA2a
[**中图法分类号**] R282.71; R285.5; R322.11 [**文献标志码**] A

EGCG is involved in regulation of SERCA2a in aging mice hearts

Quan Junjun, Pan Bo, Jia Zhongli, Liu Lingjuan, Tian Jie (Department of Cardiology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether (-)-epigallo-catechin-3-gallate (EGCG) could regulate the expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a) by inhibiting histone deacetylase 1 (HDAC1) in aging mice hearts. **Methods** A total of 24 16-month-old C57 BL/6 male aging mice were randomly divided into EGCG group [50 mg/(kg·d) EGCG], DMSO group and untreated old group ($n=8$ for each group), and another 8 3-month-old male mice were assigned as young group. The mice from the EGCG group and DMSO group were treated with EGCG and DMSO by intraperitoneal injection for 8 weeks, respectively. Then all the mice were sacrificed and the heart tissues were harvested from each group. RT-PCR was used to measure the mRNA expression level of Atp2a2 and HDAC1. Meanwhile, the protein level of SERCA2a was detected by Western blotting. The binding levels of HDAC1, acetylated lysine 9 on histone H3 (AcH3K9) and transcription factors GATA4 and Mef2c near the proximal promoter region of Atp2a2 gene were determined by ChIP-Q-PCR. **Results** The results of RT-PCR and Western blotting showed a significant

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81670212)
[**通信作者**] 田 杰,E-mail:jietian@cqmu.edu.cn
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161209.1608.014.html

decrease of SERCA2a in the aging hearts at both mRNA and protein levels ($P<0.05$), but the expression of HDAC1 was increased at mRNA level in aging hearts ($P<0.05$). ChIP-Q-PCR demonstrated that the amount of HDAC1 binding to proximal promoter region of Atp2a2 gene was significantly increased, but the binding levels of AcH3K9, GATA4 and Mef2c were reduced in aging hearts ($P<0.05$). After intervention by EGCG for 8 weeks, there were decreases in the expression and binding amount of HDAC1, and rises in AcH3K9, GATA4 and Mef2c binding levels near the proximal promoter region of Atp2a2 gene in aging hearts. EGCG also increased the expression of Atp2a2 gene at both mRNA and protein levels in aging hearts ($P<0.05$). **Conclusion** Hypoacetylation of AcH3K9 mediated by HDAC1 may play a critical role in low expression of SERCA2a in aging hearts, and EGCG could inhibit the process and increase the expression of SERCA2a.

[**Key words**] cardiac diastolic dysfunction; (−)-epigallo-catechin-3-gallate; histone deacetylase; SERCA2a

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81670212). Corresponding author: Tian Jie, E-mail: jietian@cqmu.edu.cn

心脏舒张功能障碍是一种老年人群中常见的心血管疾病。研究表明,心脏舒张功能障碍的发生率随着年龄的增长而增加,约有40%的人口(45岁或以上)有不同程度的舒张功能[1-3]。有研究显示,心肌肌浆网 Ca^{2+}-ATP 酶(sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA2a)在老年心脏中表达降低,其与心脏功能的下降关系密切[4-5],而组蛋白修饰参与了编码 SERCA2a 的 Atp2a2 基因的表达调控[6]。表没食子儿茶素没食子酸酯[(−)-epigallo-catechin-3-gallate, EGCG]是一种源于绿茶和一些钩藤类植物提取物的多酚类物质,作为儿茶素中生物活性最强的成分,具有抗氧化、抗自由基、诱导细胞凋亡等作用[7];同时,有研究发现 EGCG 可直接作用于心肌肌丝系统,有效改善患有舒张功能障碍的限制型心肌病小鼠的舒张功能[8]。有研究报道,EGCG 具有表观遗传调控作用,如抑制 DNA 甲基化转移酶,并且可以通过抑制Ⅰ类组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)参与基因的表达和调控[9-10];我们前期研究发现,老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达下降,其基因启动子区组蛋白 AcH3K9 水平降低,而 HDAC1 表达和结合水平升高,提示由 HDAC1 介导的组蛋白 H3K9 低乙酰化可能参与了老年小鼠心脏 SERCA2a 的低表达;为验证这一科学假说,本研究利用 EGCG 可以抑制Ⅰ类组蛋白去乙酰化酶这一作用来干预老年小鼠,以期证实 EGCG 可以通过抑制 HDAC1 参与与舒张功能障碍关系密切的老年心脏 SERCA2a 的表达;通过探讨其具体作用机制,为老年相关的心脏舒张功能障碍的改善提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物的选择及分组 8只3月龄的健康 SPF 级雄性 C57 BL/6 小鼠及 24 只 16 月龄健康 SPF 级雄性 C57 BL/6 小鼠,体质量(21±2)g,均购于重庆医科大学实验动物中心。24 只 16 月龄老年小鼠随机数字表法分成 EGCG + 老年组、DMSO + 老年组以及未处理的老年组,每组 8 只;EGCG + 老年组给予 EGCG[50 mg/(kg·d)]腹腔注射,老年 + DMSO 组给予 DMSO(与溶解 EGCG 剂量一致)腹腔注射,未处理的老年组不给予任何干预;并以 3 月龄成年小鼠作为青年组($n=8$)。干预 8 周后,二氧化碳麻醉处死小鼠,分离各组小鼠心脏,预冷 PBS 清洗后置于 −80 ℃保存备用。

1.1.2 主要试剂及仪器 EGCG(纯度 99%, Selleck,美国),抗 SERCA2a 抗体(Abcam,英国),β-actin 抗体(中杉金桥,北京),染色质免疫共沉淀(ChIP)试剂盒(Abcam,英国),ChIP 级抗 HDAC1 抗体、抗 AcH3K9 抗体、抗 GATA4 抗体、抗 Mef 2c 抗体(Abcam,英国),SYBR Green 试剂盒(KAPA,美国),高纯度总 RNA 提取试剂盒(BioTeke,北京),逆转录试剂盒(Takara,日本),全蛋白提取试剂盒(KeyGEN,南京),SDS-PAGE 配胶试剂盒(Beyotime,上海),超声破碎仪(Diagenode,比利时),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 RT-PCR 提取左心室心肌组织总 RNA,采用核酸蛋白测定仪测定 $D(260)/D(280)$ 比值确定总 RNA 浓度,以 800 ng RNA 按照 Takara 逆转录试剂盒操作说明将 RNA 逆转录为 cDNA,并于 −20 ℃保存。运用 Primer Premier 5.0 软件针对 Atp2a2 及 HDAC1 基因 CDS 核心编码区设计特异性引物,由上海生工生物工程股份有限公司合成。Atp2a2 基因引物序列:上游 5′-TCGACCAGTCAATTCTTACAGG-3′,下游 5′-CAGGGACAGGGTCAGTATGC-3′,内参基因 β-actin 引物序列:上游 5′-CACACCCGC-

CACCAGTTCG-3′，下游 5′-GTCCTTCTGACCCATTC-CCACC-3′。HDAC1 基因引物序列：上游 5′-ATGAGCTGCCCTACAACGAC-3′，下游 5′-GACGCTGCTTGATCTTCTCC-3′。反应条件：95 ℃预变性 2 min，95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 30 s，40 个循环。所得的实验数据采用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪自带的基于 pfaffl 原理的相对定量数据分析软件进行分析。

1.2.2 Western blot 提取左心室心肌组织全蛋白，10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白，PVDF 膜转膜后，5% 脱脂牛奶封闭 1 h，分别加入抗 SERCA2a 抗体(1∶1 000)及内参蛋白抗 β-actin 抗体(1∶2 000)，4 ℃孵育 14～16 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min；然后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(1∶5 000)，在脱色摇床上室温孵育2 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。加入显色剂后，运用 Bio-Rad 图像分析仪进行图像扫描，采用 Quantity One4.4 软件进行灰度值分析，以 SERCA2a 与 β-actin 灰度值之比表示 SERCA2a 的相对表达量。

1.2.3 染色质免疫共沉淀(ChIP) 取左心室心肌组织，眼科剪剪碎，用预冷 PBS 清洗 3 次后加入终浓度 1% 的甲醛交联。用超声破碎仪切割 DNA，使 DNA 片段长度在 200～1 000 bp 之间。分别用 ChIP 级抗 HDAC1 抗体、抗 AcH3K9 抗体、抗 GATA4 抗体、抗 MEF2c 抗体进行染色质免疫共沉淀，收集并纯化 DNA 后，冻存于 -20℃备用。

1.2.4 ChIP-Q-PCR 选取 Atp2a2 基因外显子 5′端前 1 000 bp 序列，运用 Primer Premier5.0 软件，针对该序列设计特异性引物，由上海生工生物工程股份有限公司合成。Atp2a2 基因启动子区引物序列：上游 5′-AGCCAAGGACACCAGTGC-3′，下游 5′-GGGATAGAGCGCGGAGTT-3′。反应条件：95 ℃预变性 2 min，95 ℃变性 10 s，63 ℃退火 15 s，68 ℃延伸 20 s，45 个循环。所得的实验数据采用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪自带的基于 pfaffl 原理的相对定量数据分析软件分析。

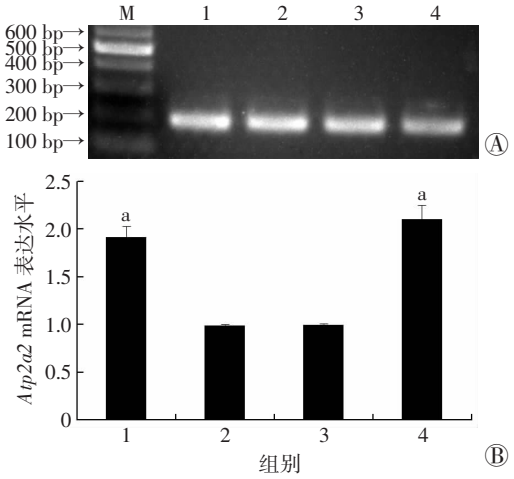
1.3 统计学分析

所有的实验数据均采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 EGCG 升高老年小鼠心脏 Atp2a2 基因 mRNA 的表达

RT-PCR 结果显示，老年小鼠心脏 Atp2a2 基因在 mRNA 水平的表达降低，与青年组比较，差异具有统计学意义($P<0.05$)；EGCG 升高了老年小鼠心脏 Atp2a2 基因在 mRNA 水平的表达($P<0.05$)。EGCG +老年组与青年组比较，差异无统计学意义。见图 1。



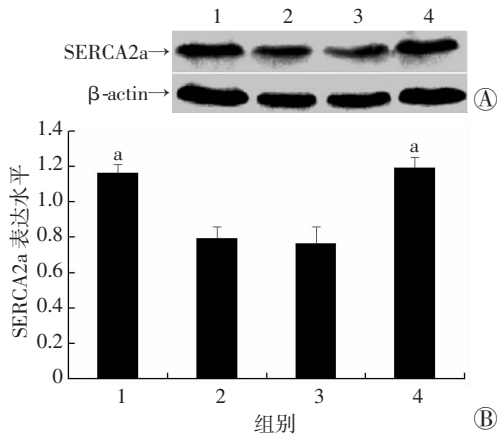
M：Marker 标准；1：青年组；2：老年组；3：DMSO + 老年组；4：EGCG +老年组

A：RT-PCR 结果；B ：定量分析结果 a：$P<0.05$，与老年组比较($n=8$，$\bar{x} \pm s$)

图 1 RT-PCR 检测心肌组织 Atp2a2 基因 mRNA 的表达水平

2.2 EGCG 升高老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达

Western blot 结果表明，老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达下降，与青年组相比，差异具有显著性($P<0.05$)；EGCG 上调并逆转了老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达($P<0.05$)。EGCG +老年组与青年组比较，无显著性差异。见图 2。



1：青年组；2：老年组；3：DMSO + 老年组；4：EGCG +老年组

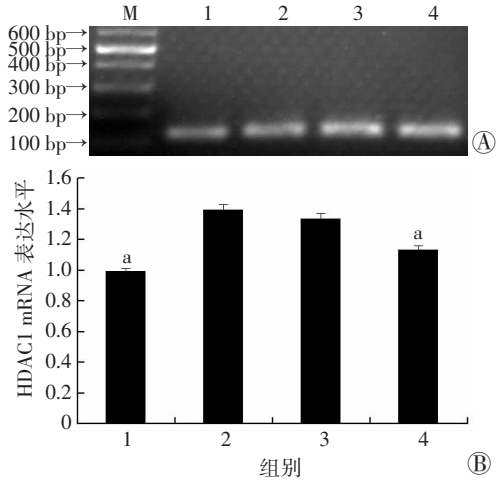
A：Western blot 结果；B：定量分析结果 a：$P<0.05$，与老年组比较($n=8$，$\bar{x} \pm s$)

图 2 Western blot 检测心肌组织 SERCA2a 的表达水平

2.3 EGCG 抑制组蛋白去乙酰化酶 HDAC1 的 mRNA 表达及在 Atp2a2 基因启动子区的结合

经 RT-PCR 检测，老年小鼠心脏 HDAC1 的 mRNA

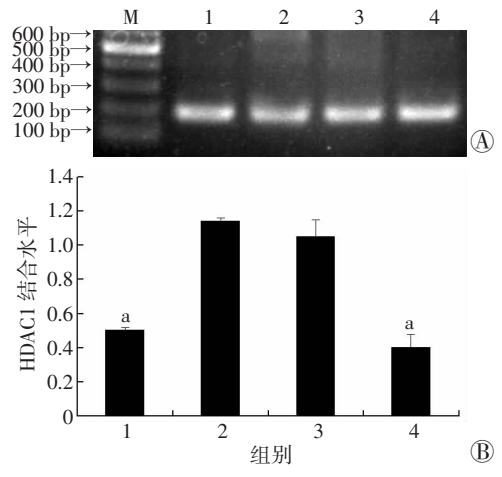
表达水平升高($P<0.05$);ChIP-Q-PCR 结果表明,老年小鼠心脏 Atp2a2 基因启动子区 HDAC1 的结合量升高($P<0.05$),EGCG 干预后,老年小鼠心脏 HDAC1 mRNA 的表达及其在 Atp2a2 基因启动子区的结合下降($P<0.05$)。见图 3,4。



M:Marker 标准;1:青年组;2:老年组;3:DMSO + 老年组;4:EGCG + 老年组

A:RT-PCR 结果;B:定量分析结果 a:$P<0.05$,与老年组比较($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

图 3 RT-PCR 检测心肌组织 HDAC1 基因 mRNA 的表达水平



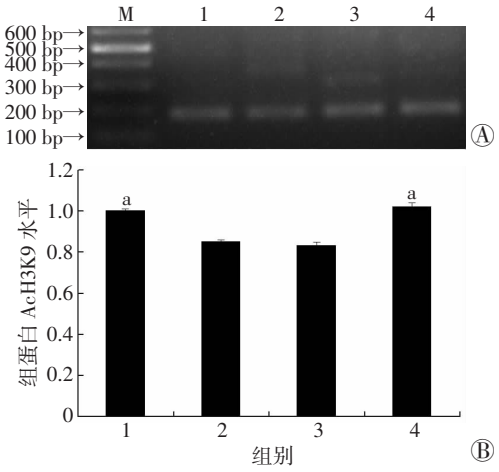
M:Marker 标准;1:青年组;2:老年组;3:DMSO + 老年组;4:EGCG + 老年组

A:琼脂糖电泳结果;B:定量分析结果 a:$P<0.05$,与老年组比较($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

图 4 ChIP-Q-PCR 检测心肌组织 Atp2a2 基因启动子区 HDAC1 的结合水平

2.4 EGCG 升高老年小鼠心脏 Atp2a2 基因启动子区组蛋白 AcH3K9 水平

ChIP-Q-PCR 结果显示,老年小鼠心脏 Atp2a2 基因启动子区组蛋白 AcH3K9 水平明显降低($P<0.05$),EGCG 升高了老年小鼠心脏 Atp2a2 基因启动子区组蛋白 AcH3K9 水平($P<0.05$)。见图 5。



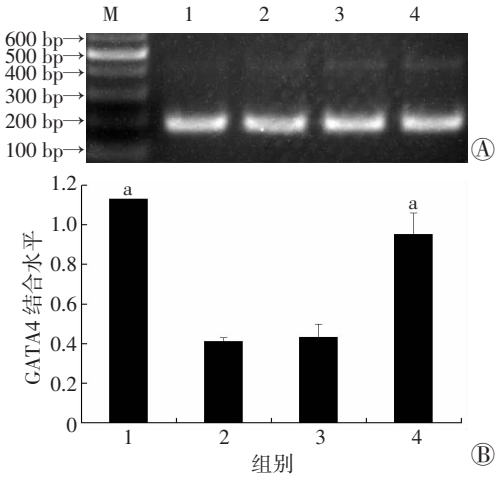
M:Marker 标准;1:青年组;2:老年组;3:DMSO + 老年组;4:EGCG + 老年组

A:琼脂糖电泳结果;B:定量分析结果 a:$P<0.05$,与老年组比较($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

图 5 ChIP-Q-PCR 检测心肌组织 Atp2a2 基因启动子区组蛋白 AcH3K9 水平

2.5 EGCG 增加核心转录因子 GATA4、Mef2c 在 Atp2a2 基因启动子区的结合

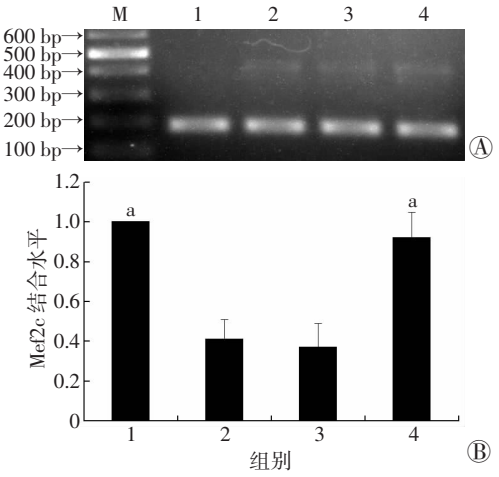
ChIP-Q-PCR 结果显示,老年小鼠心脏 Atp2a2 基因启动子区 GATA4、Mef2c 的结合量降低(均 $P<0.05$),EGCG 增加了 GATA4、Mef2c 在老年小鼠心脏 Atp2a2 基因启动子区的结合量(均 $P<0.05$)。见图 6,7。



M:Marker 标准;1:青年组;2:老年组;3:DMSO + 老年组;4:EGCG + 老年组

A:琼脂糖电泳结果;B:定量分析结果 a:$P<0.05$,与老年组比较($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

图 6 ChIP-Q-PCR 检测心肌组织 Atp2a2 基因启动子区 GATA4 的结合水平



M:Marker 标准;1:青年组;2:老年组;3:DMSO + 老年组;4:EGCG +老年组

A:琼脂糖电泳结果;B :定量分析结果 a: $P<0.05$,与老年组比较($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

图 7 ChIP-Q-PCR 检测心肌组织 Atp2a2 基因启动子区 Mef2c 的结合水平

3 讨论

心力衰竭目前已成为一个全球性的公共卫生健康问题,其主要分为心室射血功能下降的收缩性心力衰竭以及心室舒张期充盈能力下降而射血分数正常的舒张性心力衰竭;然而老年相关的心脏衰老通常与舒张性心力衰竭有关[11],这种心力衰竭又称为保留射血分数的心力衰竭(heart failure with preserved ejection fraction,HFpEF)[12]。据有关报道,美国约 500 万例心力衰竭患者中,约有一半的患者被诊断患有 HFpEF,且超过 90% 的 HFpEF 患者年龄超过 60 岁[13-14]。大量的临床药物试验表明,治疗收缩性心力衰竭的标准化治疗方案对于舒张性心力衰竭的疗效欠佳[15-16]。目前有关老年相关的舒张功能障碍的发生机制尚不清楚,更好地认识其发生的分子基础,可以为开发新的治疗措施提供新的思路。

EGCG 作为儿茶素中生物活性最强的物质,具有抗氧化、抗自由基、诱导细胞凋亡等作用[7];同时,有研究发现,EGCG 可以有效改善患有舒张功能障碍的限制型心肌病小鼠的舒张功能[8]。有研究报道,EGCG 具有表观遗传调控作用,如抑制 DNA 甲基化转移酶,并且可以通过抑制Ⅰ类组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)参与基因的表达和调控[9-10]。组蛋白乙酰化修饰作为表观遗传的主要调控方式,由动态平衡的组蛋白去乙酰化酶和乙酰化酶共同介导,组蛋白去乙酰化酶可使染色质的空间结构变得紧密,不利于基因表达[17],如Ⅰ类组蛋白去乙酰化酶可以抑制抗肥厚基因 Inpp5f,KLF4 的表达[18],同时,心脏转录因子 GATA4 及 Mef2c 也在基因表达调控中起着重要作用[19]。因此,降低组蛋白去乙酰化酶的水平可能有助于基因的转录和翻译。心肌肌浆网 Ca^{2+}-ATP 酶 SERCA2a 是心脏重要的功能蛋白,在心功能的维持和调节中起着重要作用。研究表明,老年心脏的功能下降与 SERCA2a 在老年心脏中的表达下降有密切关系[4-5]。我们前期研究发现,老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达下降,编码 SERCA2a 的 Atp2a2 基因启动子区存在组蛋白乙酰化修饰作用,提示组蛋白乙酰化修饰可能参与了老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达调控。本研究发现,老年小鼠心脏 HDAC1 的 mRNA 表达水平升高;同时,ChIP-Q-PCR 结果表明,HDAC1 在老年小鼠心脏 Atp2a2 基因启动子区的结合水平也升高,组蛋白 AcH3K9 水平降低,GATA4 以及 Mef2c 的结合水平降低;通过 RT-PCR 和 Western blot 检测,老年小鼠心脏 SERCA2a 在 mRNA 和蛋白水平表达同时降低,这表明由 HDAC1 介导的基因启动子区低乙酰化修饰状态可能在老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达降低中起着关键性作用。EGCG 干预结果表明,EGCG 可以抑制 HDAC1 mRNA 的表达及其在 Atp2a2 基因启动子区的结合,提高组蛋白 AcH3K9 水平,同时增加 GATA4 和 Mef2c 的结合量,进而升高并逆转 SERCA2a 在 mRNA 和蛋白水平的表达,参与 SERCA2a 的调控。由此可见,老年小鼠心脏 SERCA2a 表达降低可能是由 HDAC1 介导的基因启动子区组蛋白 H3K9 低乙酰化水平引起的,而 EGCG 可以通过抑制 HDAC1 的表达和结合,上调基因启动子区的组蛋白 AcH3K9 水平升高并参与老年小鼠心脏 SERCA2a 的表达。

综上所述,由 HDAC1 介导的组蛋白 H3K9 低乙酰化可能是老年心脏 SERCA2a 表达降低的关键机制之一,而过去的研究主要是通过基因治疗的方式来提高 SERCA2a 的表达量,具有一定的难度和风险性;本研究首次通过绿茶提取物活性成分 EGCG 作为干预方式通过组蛋白乙酰化修饰作用改善老年相关的 SERCA2a 的表达,为老年相关的舒张功能障碍的治疗提供了新的治疗靶点。

参考文献:

[1] Redfield M M, Jacobsen S J, Jr J C B, *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.

[2] Kane G C, Karon B L, Mahoney D W, *et al*. Progression of Left Ventricular Diastolic Dysfunction and Risk of Heart Failure[J]. Jama, 2011, 306(8): 856 – 863. DOI: 10.1001/jama.2011.1201

[3] Roger V L, Weston S A, Redfield M M, *et al*. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population.[J]. JAMA, 2004, 292(3): 344 – 50. DOI: 10.1001/jama.292.3.344

[4] Jiao Q, Takeshima H, Ishikawa Y, *et al*. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity[J]. Cell Calcium, 2012, 51(1): 31 – 39. DOI: 10.1016/j.ceca.2011.10.003

[5] Qin F, Siwik D A, Lancel S, *et al*. Hydrogen peroxide-mediated SERCA cysteine 674 oxidation contributes to impaired cardiac myocyte relaxation in senescent mouse heart[J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(4): e000184. DOI: 10.1161/JAHA.113.000184

[6] Angrisano T, Schiattarella GG, Keller S, *et al*. Epigenetic switch at atp2a2 and myh7 gene promoters in pressure overload-induced heart failure[J]. PLoS ONE, 2014, 9(9): e106024. DOI: 10.1371/journal.pone.0106024

[7] Yang C S, Landau J M, Huang M T, *et al*. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds[J]. Annu Rev Nutr, 2001, 21: 381 – 406. DOI: 10.1146/annurev.nutr.21.1.381

[8] Gupta S. Green tea polyphenols increase p53 transcriptional activity and acetylation by suppressing class Ⅰ histone deacetylases[J]. International Journal of Oncology, 2012. DOI: 10.3892/ijo.2012.1449

[9] 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. DOI: 10.1093/carcin/bgq285

[10] Zhang L, Nan C, Chen Y, *et al*. Calcium desensitizer catechin reverses diastolic dysfunction in mice with restrictive cardiomyopathy[J]. Arch Biochem Biophys, 2015, 573: 69 – 76. DOI: 10.1016/j.abb.2015.03.015

[11] 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. DOI: 10.1186/1471-2261-14-95

[12] Sharma K, Kass DA. Heart failure with preserved ejection fraction: mechanisms, clinical features, and therapies[J]. Circ Res, 2014, 115(1): 79 – 96. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.302922

[13] Borlaug B A, Paulus W J. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment[J]. Eur Heart J, 2011, 32(6): 670 – 679. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq426

[14] Scantlebury D C, Borlaug B A. Why are women more likely than men to develop heart failure with preserved ejection fraction[J]. Curr Opin Cardiol, 2011, 26(6): 562 – 568. DOI: 10.1097/HCO.0b013e32834b7faf

[15] Bhatia R S, Tu J V, Lee D S, *et al*. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study[J]. N Engl J Med, 2006, 355(3): 260 – 269. DOI: 10.1056/NEJMoa051530

[16] Pitt B, Pfeffer M A, Assmann S F, *et al*. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction[J]. N Engl J Med, 2014, 370(15): 1383 – 1392. DOI: 10.1056/NEJMoa1313731

[17] Pan B, Zhu J, Lv T, *et al*. Alcohol consumption during gestation causes histone3 lysine9 hyperacetylation and an alternation of expression of heart development-related genes in mice[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2014, 38(9): 2396 – 2402. DOI: 10.1111/acer.12518

[18] Di Lisi R, Millino C, Calabria E, *et al*. Combinatorial cis-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene in vitro and in vivo[J]. J Biol Chem, 1998, 273(39): 25371 – 25380. DOI: 10.1074/jbc.273.39.25371

[19] Papait R, Condorelli G. Epigenetics in heart failure[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1188: 159 – 164. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05096.x

(收稿:2016-09-15;修回:2016-11-23)

(编辑 栾 嘉)