DOI:10.16016/j.1000-5404.201911031

丁酸对缺氧血管内皮细胞一氧化氮分泌的影响及机制研究

杨诚忠[1,4,5],冯 岚[2,4,5],陈德伟[3,4,5],张 钢[4,5],高钰琪[2,4,5],谭小玲[1,4,5] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)高原军事医学系:高原生理学与病理学教研室[1],高原特需药品与器材研究室[2],病理生理学教研室[3],全军高原医学重点实验室[4],极端环境医学教育部重点实验室[5]

[**摘要**] **目的** 研究缺氧血管内皮细胞分泌一氧化氮(NO)下降的机制,探讨丁酸的干预作用。**方法** 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)分为常氧组(21%O_2, N)、缺氧组(1%O_2, H)、缺氧+溶剂对照组(H+D)、缺氧+丁酸组(H+B)、缺氧+干扰对照组(H+Ci)和缺氧+siRNA 干扰组(H+Si)。硝酸还原法检测 HUVECs 培养上清液 NO 水平;荧光定量 PCR 检测一氧化氮合酶(eNOS)的 mRNA 水平, Western blot 检测 eNOS 蛋白水平、乙酰化水平以及组蛋白去乙酰化酶 3(histone deacetylase 3, HDAC3)蛋白水平。免疫共沉淀技术检测 HDAC3 和 eNOS 的相互作用。**结果** 缺氧 6 h 后,HUVECs 培养上清中 NO 水平降低,与常氧组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$);缺氧组 HUVECs 中 eNOS 蛋白水平降低,但 eNOS 的 mRNA 水平没有明显变化。与常氧组相比,缺氧组 HUVECs 中,HDAC3 的蛋白表达没有变化,但 HDAC3 与 eNOS 的结合增加,eNOS 的乙酰化水平下降。与缺氧+干扰对照组相比,缺氧+siRNA 干扰组细胞中 eNOS 的蛋白水平显著升高。缺氧+丁酸(4 mmol/L)处理组 HUVECs 培养上清中 NO 水平升高,与缺氧+溶剂对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$);同时,缺氧+丁酸(4 mmol/L)处理组 HUVECs 细胞中 eNOS 蛋白水平升高。缺氧+丁酸(4 mmol/L)处理组 HUVECs 中 HDAC3 与 eNOS 的结合减少,eNOS 乙酰化水平降低。**结论** 缺氧促进 HDAC3 和 eNOS 结合,抑制 eNOS 的乙酰化,可能通过降低 eNOS 蛋白的稳定性,抑制 NO 分泌,而丁酸可以抑制这一过程。

[**关键词**] NO;eNOS;HDAC3;丁酸;缺氧

[**中图法分类号**] Q547; R322.12; R364.4 [**文献标志码**] A

Effect of butyrate on NO secretion from hypoxic human umbilical vein endothelial cells and its underlying mechanism

YANG Chengzhong[1,4,5], FENG Lan[2,4,5], CHEN Dewei[3,4,5], ZHANG Gang[4,5], GAO Yuqi[2,4,5], TAN Xiaoling[1,4,5]

[1]Department of High Altitude Physiology and Pathology, [2]Institute of Medicine and Equipment for High Altitude Region, [3]Department of Pathophysiology, [4]Key Laboratory of High Altitude Medicine of PLA, [5]Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education, Faculty of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the molecular mechanism of hypoxia-decreased NO secretion in vascular endothelial cells, and to explore the intervention role of butyrate (Bur) in the process. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into normoxia group (21% O_2), hypoxia group (1% O_2), hypoxia plus solvent control group, hypoxia plus Bur group (4 mmol/L Bur), hypoxia plus control siRNA group, and hypoxia plus HDAC3 siRNA group. The NO content in the supernatant was tested by NO Assay Kit. The mRNA expression of endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) was detected by RT-PCR, and its protein level and that of histone deacetylase 3 (HDAC3) were measured by Western blotting. The interaction of HDAC3 to eNOS was analyzed by co-immunoprecipitation. **Results** Compared with the

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81270108)

[**通信作者**] 谭小玲,E-maill:tanxl0511@163.com

normoxia group, hypoxia for 6 h resulted in significant decrease in the NO level in the supernatant ($P<0.05$), and reduced eNOS protein level though no change in its mRNA level. In the hypoxic HUVECs, HDAC3 protein level did not changed when compared with the normoxia group. Co-immunoprecipitation analysis showed that hypoxia induced the interaction of HDAC3 with eNOS, and suppressed the acetylation of eNOS protein. The level of eNOS protein was obviously increased in the hypoxia plus HDAC3 siRNA group than the hypoxia plus control siRNA group. Compared with the hypoxia plus solvent control group, the level of NO secretion and eNOS protein were increased significantly in hypoxia plus Bur group (both $P<0.05$), but the interaction between the HDAC3 and eNOS was decreased and acetylation of eNOS protein was increased. **Conclusion** Hypoxia induces HDAC3-eNOS binding and inhibits acetylation of eNOS protein, which might be due to its destruction in eNOS stability and suppression in NO secretion. While, Bur treatment can reverse above process in vascular endothelial cells.

[**Key words**] NO; endothelial nitric oxide synthetase; histone deacetylase 3; butyrate; hypoxia

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270108). Corresponding author: TAN Xiaoling, E-mail: tanxl0511@163.com

一氧化氮(NO)是体内重要的活性分子,能舒张血管、调节血管平滑肌细胞的增殖,是维持正常的血管压力和血管结构的重要分子。NO 由一氧化氮合酶(nitric oxide synthetase, NOS)催化合成,其中分布在血管内皮细胞中的一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthetase, eNOS)合成的 NO 是机体最主要的生理来源。机体内源性 NO 的生成减少,血浆 NO 水平降低,是心血管疾病发生、发展的重要促进因素[1]。缺氧是临床常见的病理过程,也是心血管疾病发生、发展的重要原因。缺氧导致 eNOS 基因转录及翻译水平降低是缺氧血管内皮细胞 NO 产生减少的重要机制[2]。但缺氧导致 eNOS 表达降低的机制尚不清楚。

丁酸(butyrate)是一种短链脂肪酸,既可作为结肠上皮细胞的能源物质,也是一类组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi),通过干预核 DNA 的转录活性调节基因的表达,发挥抗肿瘤、抗炎及抗氧化等功能[3-6]。研究表明,丁酸可以激活非血管内皮细胞中 eNOS 基因,使其开放表达[7];我们前期的研究也发现,丁酸促进启动缺氧肺血管平滑肌细胞中 eNOS 的表达,并使平滑肌细胞中 NO 的产生增多[8]。那么,丁酸对缺氧血管内皮细胞中 NO 的产生有何影响?机制是什么?本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells ,HUVECs)为细胞模型,在分析缺氧 HUVECs 分泌 NO 降低的机制的基础上,初步探讨丁酸的干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVECs 由陈德伟博士惠赠;市购材料:细胞培养基 DMEM(HyClone, SH30243.01);一氧化氮(NO)测试盒(碧云天, S0021);放线菌酮(cycloheximide, CHX, 北京华越洋, 04190);Opti-MEM 培养基(ThermoFisher, 31985062);Lip2000(索莱宝, L7800);Protein A+G Agarose(碧云天, P2055);兔 IgG(碧云天, A7016);抗 eNOS 抗体(Santa cruz, SC-654, 兔多克隆抗体);抗 HDAC3 抗体(Abcam, ab32369, 兔单克隆抗体);抗 Ac-lys 抗体(Abcam, ab80178, 兔多克隆抗体);抗 Actin 抗体(Sigma, A5316, 鼠单克隆抗体);辣根酶标山羊抗兔抗体(中杉金桥, ZB-2301);辣根酶标山羊抗鼠抗体(中杉金桥, ZB-2305);逆转录试剂盒(ThermoFisher, 18080051);荧光标记引物及 PCR 扩增试剂盒(ThermoFisher, 4370048), ECL 显色液(ThermoFisher, 34095)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及处理方法 实验分为 6 组,分别是:①常氧组(21% O_2, N)和缺氧组(1% O_2, H);②缺氧+溶剂对照组(H+D)和缺氧+丁酸组(H+B);③缺氧+干扰对照组(H+Ci)和缺氧+siRNA 干扰组(H+Si)。HUVECs 细胞采用含 10% 血清的 DMEM 培养基常规培养。缺氧处理采用三气培养箱(1% O_2, 94% N_2, 5% CO_2)培养,常氧组细胞在常规细胞培养箱(21% O_2, 5% CO_2)中培养,到相应时间点行后续实验;在三气培养箱(1% O_2, 94% N_2, 5% CO_2)中,缺氧+丁酸处理组细胞采用含 10% 血清以及丁酸(终浓度 4 mmol/L)的 DMEM 培养基培养 6 h,缺氧+溶剂对照组细胞的培养基中,不加入丁酸,加入等量的溶剂(不含血清的 DMEM 溶液)。siRNA 干扰处理方法参见 1.2.5。

1.2.2 硝酸还原法检测 NO 在实验处理后的相应时间点,收集细胞培养上清,按 NO 检测试剂盒说明书操作。收集各实验组的培养细胞,尿素裂解液提取细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。用培养上清液中 NO 的含量与细胞蛋白含量的比值代表各组 NO 的相对水平。

1.2.3　荧光定量 PCR 检测目的基因转录水平　　采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。取 1 μg 总 RNA,采用 Superscript Ⅲ Third-Strand Synthesis Kit (Invitrogen)进行逆转录获得 cDNA。取 cDNA 产物梯度稀释,采用实时荧光定量 PCR 试剂盒进行扩增,Step One Plus Real-time System 测定扩增产物荧光值,绘制标准曲线,以 β-actin 为内参,计算目的基因的 mRNA 相对水平。eNOS 的上游引物为 5′-TGGCAGCCCTAAGACCTATG-3′,下游引物为 5′-AGTCCGAAAATGTCCTCG-TG-3′;β-actin 的上游引物为 5′-TCATGAAGTGTGAC-GTTGA-CATCCGT-3′,下游引物为 5′-CCTAGAAGCAT-TTGCG-GTGCAGGATG-3′。反应程序:94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,重复 36 个循环。

1.2.4　蛋白半衰期检测　　实验前 1 d 接种细胞。细胞贴壁生长后,行常氧和缺氧处理。在实验处理后的相应时间点,分别加入放线菌酮(CHX,终浓度为 10 μmol/L),继续在相应处理条件下分别培养 1、2 h 和 4 h,收集细胞,提取总蛋白,同时收集未加入 CHX 的细胞,提取总蛋白冻存备用。采用免疫印迹技术检测 eNOS 蛋白水平(参见 1.2.6),以 β-actin 为内参照,计算不同时间点 eNOS 蛋白相对量,计算蛋白半衰期。

1.2.5　siRNA 干扰实验　　将 0.1 nmoL siRNA 加入 200 μL Opti-MEM 培养基,加入 5 μL Lip2000,轻柔混匀,室温静置 20 min。将 siRNA/Lip2000 复合物加入细胞密度约 80%的细胞培养皿,常氧培养 6 h 后更换为含 10%血清的 DMEM 培养基,常氧培养 24 h 后,更换培养基,置于三气培养箱(1% O_2,94% N_2,5% CO_2)中进行缺氧处理。其中转染无关 siRNA 的细胞分组为缺氧+干扰对照组,转染靶向 HDAC3 的 siRNA 的细胞分组为缺氧+siRNA 干扰组。缺氧 6 h 后检测 HDAC3 和 eNOS 的蛋白水平。

1.2.6　免疫印迹技术检测蛋白表达　　在实验处理后的相应时间点,低温收集各实验组的细胞,尿素裂解液提取细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μg 蛋白样品,加入蛋白上样缓冲液,100 ℃,5 min,离心收集上清,行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。采用湿转法转膜后,用含 5%脱脂牛奶的 TBST 溶液室温封闭 1 h。TBST 洗膜后,分别加入抗 eNOS 抗体(1∶500)、抗 HDAC3 抗体(1∶1 000)、抗 Ac-lys 抗体(1∶1 000)、抗 Actin 抗体(1∶2 000),4 ℃孵育过夜。TBST 洗涤 3 次后,加入辣根酶标山羊抗兔抗体(1∶2 000)或辣根酶标山羊抗鼠抗体(1∶2 000),室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,ECL 显色,Bio-Rad 凝胶成像仪显影照相。

1.2.7　免疫共沉淀技术(CO-IP)检测 HDAC3 和 eNOS 相互作用　　采用碧云天公司 IP 裂解液提取细胞总蛋白,按试剂盒说明操作。取 500 μL 细胞裂解液,加入 10 μL 普通兔 IgG 和 20 μL Protein A+G agarose,4 ℃混匀孵育 30 min,10 000 ×g 离心 5 min,取上清。加入 10 μL 抗 eNOS 或抗 HDAC3 抗体,4 ℃混匀孵育过夜,加入 40 μL 充分重悬的 Protein A+G agarose,4 ℃混匀孵育 2 h。10 000×g 离心 5 min,吸除上清,加入 500 μL 预冷 PBS 洗涤沉淀 3 次,加蛋白上样缓冲液重悬沉淀,100 ℃煮沸 10 min,10 000×g 离心 5 min,收集上清,行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,免疫印迹技术检测 HDAC3 蛋白、eNOS 蛋白、乙酰化赖氨酸的水平。

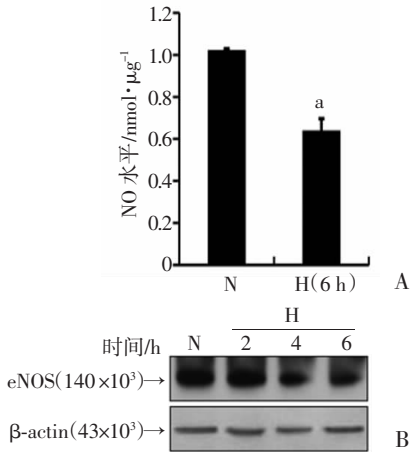
1.3　统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间采用独立样本 t 检验,检验水准:$\alpha=0.05$。

2　结果

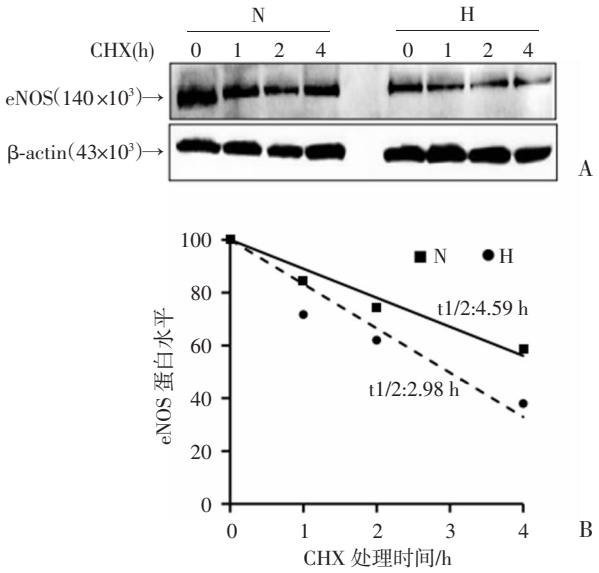
2.1　缺氧对 HUVECs 中 NO 分泌和 eNOS 表达的影响

缺氧(1% O_2,H)6 h 时,HUVECs 培养上清中 NO 水平降低,与常氧组(21% O_2,N)相比,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 1A)。与常氧组细胞相比,缺氧 HUVECs 中 eNOS 的 mRNA 水平没有显著变化[(0.46±0.035) *vs* (0.51±0.043),$P>0.05$],但 eNOS 的蛋白水平在缺氧 6 h 内持续降低(图 1B)。在缺氧处理 6 h 后,用放线菌酮(CHX)与 HUVECs 共培养,阻断细胞内蛋白翻译,用 Western blot 检测加入 CHX 不同时间点 eNOS 蛋白水平,作图并计算蛋白半衰期。结果显示,常氧组 eNOS 蛋白半衰期为 4.59 h,缺氧组半衰期为 2.98 h(图 2A、B)。



A:硝酸还原法检测培养上清 NO 水平　N 为常氧组;H 为缺氧组;a:$P<0.05$,与常氧组(N)比较;B:Western blot 检测 eNOS 蛋白水平　N 为常氧组(缺氧 0 h);H(2、4、6)分别为缺氧 2、4、6 h

图 1　缺氧对 HUVECs 中 NO 分泌、eNOS 蛋白表达的影响



A:Western blot 检测 eNOS 蛋白水平　N 为常氧组;H 为缺氧组;0~4 分别为放线菌酮(CHX)处理后的培养时间(h);B:半定量分析 eNOS 蛋白半衰期

图 2　缺氧对 HUVECs 中 eNOS 蛋白半衰期的影响

2.2　HDAC3 对缺氧 HUVECs 中 eNOS 蛋白表达的影响

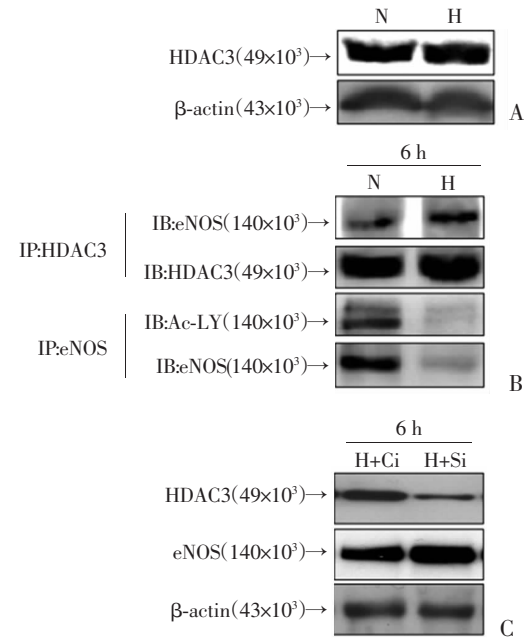
与常氧组(21% O_2,N)相比,缺氧(1% O_2,H)6 h 时,HUVECs 中 HDAC3 的蛋白水平没有变化(图 3A),而 CO-IP 的研究结果显示,缺氧 HUVECs 中,HDAC3 与 eNOS 的结合增加,乙酰化的 eNOS 水平下降,eNOS 蛋白水平下降(图 3B)。与缺氧+干扰对照组(H+Ci)相比,干扰 HDAC3 表达(H+Si)后,HUVECs 中 HDAC3 蛋白水平下降,eNOS 蛋白水平升高(P<0.05,图 3C)。

2.3　丁酸对缺氧 HUVECs 中 NO 分泌和 eNOS 蛋白表达的影响

缺氧+丁酸(Bur 4 mmol/L)组(H+B)细胞中,培养上清的 NO 水平显著升高,与缺氧+溶剂对照组(Bur 0 mmol/L,H+D)相比,差异具有统计学意义(P<0.05,图 4A);同时,缺氧+丁酸(Bur 4 mmol/L)组(H+B)HUVECs 中,eNOS 的蛋白水平升高(图 4B)。

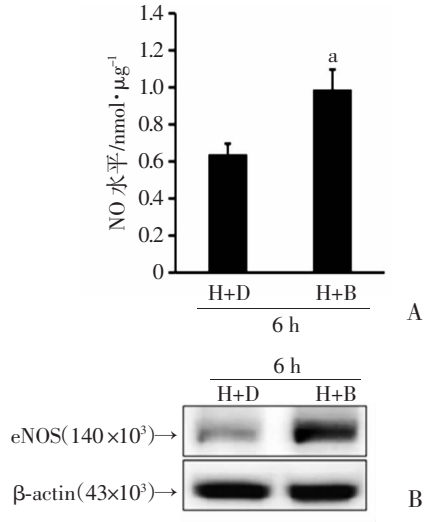
2.4　丁酸对缺氧 HUVECs 中 HDAC3 表达及其与 eNOS 结合的影响

与缺氧+溶剂对照组(Bur 0 mmol/L,H+D)相比,缺氧+丁酸(Bur, 4 mmol/L)处理组 HUVECs 中,HDAC3 的蛋白水平没有变化,但 eNOS 蛋白水平升高(图 5A);Co-IP 的实验结果显示,与缺氧+溶剂对照组(Bur 0 mmol/L,H+D)相比,缺氧+丁酸(Bur, 4 mmol/L)处理组 HUVECs 中,与 HDAC3 结合的 eNOS 蛋白水平下降,乙酰化 eNOS 蛋白水平升高(P<0.05,图 5B)。



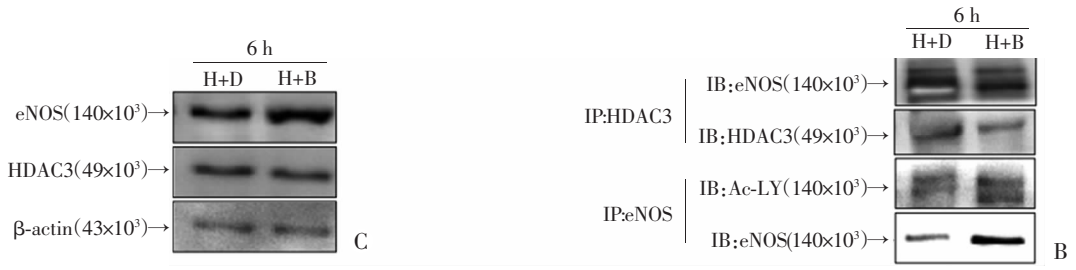
A:Western blot 检测 HDAC3 蛋白水平　N 为常氧组;H 为缺氧组;B:CO-IP 检测 HDAC3 和 eNOS 结合水平以及 eNOS 乙酰化水平　N 为常氧组;H 为缺氧组;C:Western blot 检测干扰 HDAC3 后 eNOS 的蛋白水平　H+Ci 为缺氧+干扰对照组;H+Si 为缺氧+siRNA 干扰组

图 3　HDAC3 对缺氧对 HUVECs 中 eNOS 蛋白表达的影响



A:硝酸还原法检测培养上清 NO 水平　H+D 为缺氧+溶剂对照组;H+B 为缺氧+丁酸组;a:P<0.05,与缺氧+溶剂对照组(H+D)比较;B:Western blot 检测 eNOS 蛋白水平　H+D 为缺氧+溶剂对照组;H+B 为缺氧+丁酸组

图 4　丁酸对缺氧 HUVECs 中 NO 分泌和 eNOS 蛋白表达的影响



A:Western blot 检测 HDAC3 和 eNOS 蛋白水平　H+D 为缺氧+溶剂对照组;H+B 为缺氧+丁酸组; B:CO-IP 检测 HDAC3 和 eNOS 结合水平以及 eNOS 乙酰化水平　H+D 为缺氧+溶剂对照组;H+B 为缺氧+丁酸组

图 5　丁酸对缺氧 HUVECs 中 HDAC3 表达及其与 eNOS 结合的影响

3　讨论

本研究发现, eNOS 蛋白水平降低是缺氧导致血管内皮细胞 NO 分泌下降的主要原因,而 HDAC3 与 eNOS 的结合增加, eNOS 蛋白的乙酰化修饰下降,稳定性降低,可能是缺氧导致 eNOS 蛋白水平下降的重要机制。丁酸可以抑制 HDAC3-eNOS 的结合,可能通过抑制 eNOS 的去乙酰化,增加缺氧条件下 eNOS 的乙酰化修饰水平,提高 eNOS 蛋白的稳定性,促进缺氧血管内皮细胞中 NO 的分泌。本研究从蛋白乙酰化修饰和蛋白稳定性调节的角度,提示缺氧抑制血管内皮细胞中 eNOS 蛋白表达的机制,同时也为丁酸防治缺氧引起的血管内皮细胞 NO 分泌失衡提供了理论依据。

血管内皮细胞位于血管壁的最内层,是机体感应微环境变化的第一道防线,通过合成和分泌多种活性物质、调节血管张力、参与免疫、炎症反应等,在维持血液循环、内环境稳定中发挥重要作用。血管内皮细胞对缺氧十分敏感,缺氧导致血管内皮细胞损伤和功能紊乱是诸多疾病的始动因素。NO 是血管内皮细胞产生的重要活性分子,通过扩张血管、抑制炎症、调节细胞增殖凋亡等,维持血管结构和功能的稳定。缺氧抑制血管内皮细胞中 NO 的分泌,引起血管收缩、血管炎症,是肺动脉高压、动脉粥样硬化的重要机制[9-11]。本研究证实缺氧导致 eNOS 蛋白稳定性降低是血管内皮细胞 NO 分泌下降的主要原因。以往的研究通过转染 eNOS 基因到干细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞中,可以激活 eNOS 表达,促进 NO 的分泌[12-15]。但本研究发现,缺氧并不影响 eNOS 的 mRNA 表达。基于血管内皮细胞功能紊乱和细胞损伤,如何维护缺氧条件下 eNOS 源性 NO 的分泌尚缺乏有效措施。本研究发现,提高 eNOS 蛋白水平可能是干预缺氧引起血管内皮细胞 NO 分泌减少的有效措施。因此,深入研究缺氧引起血管内皮细胞 eNOS 蛋白稳定性下降的机制,并探讨干预措施有重要的意义。

蛋白水平上的调节主要包括翻译合成的效率、蛋白降解的速度等。研究表明,eNOS 的乙酰化修饰能维持其蛋白稳定性和活性。一方面乙酰化修饰的赖氨酸(Lys)基团可保护蛋白质免于泛素化修饰,从而抑制蛋白的泛素化降解[16-17],另一方面,eNOS 的乙酰化可促进 eNOS 和钙调蛋白的结合,增加 eNOS 的酶活性。组蛋白去乙酰化酶 HDAC3 在 eNOS 蛋白的乙酰化与去乙酰化调控中发挥重要作用。本研究发现,缺氧并不影响 HDAC3 的表达,但抑制缺氧 HUVECs 中 HDAC3 的表达后,eNOS 的蛋白水平显著增加。同时,在缺氧 HUVECs 中,HDAC3 与 eNOS 结合增加,eNOS 的乙酰化修饰下降。以往研究证实,eNOS 的 610 位 Lys 乙酰化可促进 eNOS 与钙调蛋白结合,增加 eNOS 生物活性,而 HDAC3 可去除 610 位 Lys 乙酰化,抑制 eNOS 活性[18]。本研究进一步发现,缺氧可通过促进 HDAC3 与 eNOS 的相互作用,参与调节 eNOS 的乙酰化,同时也提示,HDAC3 介导的 eNOS 去乙酰化可能与 eNOS 稳定性下降有关。因此,从干预 HDAC3 与 eNOS 结合的角度,维持 eNOS 蛋白的稳定性,促进缺氧血管内皮细胞中 eNOS 源性 NO 的分泌,值得深入探讨。

丁酸是一种可由膳食纤维分解产生的短链脂肪酸。丁酸在线粒体中进行氧化生成乙酰 CoA,在参与提供能量物质和脂质合成的同时,也为蛋白乙酰化基团提供了重要来源[19]。以往的研究表明,丁酸可以通过组蛋白 H3 超乙酰化,活化 eNOS 基因,促进非内皮

细胞 eNOS 表达[7]。更为重要的是,丁酸能抑制 HDAC3 的去乙酰化酶活性[20]。那么,丁酸是否可以通过 HDAC3 影响缺氧 HUVECs 中 NO 的分泌呢?本研究发现,丁酸可上调缺氧 HUVECs 中 NO 的分泌,促进缺氧 HUVECs 中 eNOS 蛋白的表达。虽然丁酸不影响缺氧 HUVECs 中 HDAC3 的蛋白表达,但丁酸能抑制缺氧条件下 HDAC3 与 eNOS 的结合,增加乙酰化 eNOS 蛋白的水平。本研究结果为运用丁酸干预 HDAC3-eNOS 相互作用,提高缺氧 HUVECs 中 eNOS 蛋白稳定性提供了实验依据。

本研究发现,缺氧并不影响 eNOS 的 mRNA 表达。研究表明,非内皮细胞不表达 eNOS 是因为 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化,HDACs 被募集到与甲基化启动子结合的转录抑制子 MeCP2,导致基因转录被抑制,丁酸可使组蛋白 H3 超乙酰化而活化染色质,也可抑制 HDACs 募集到 eNOS 启动子上的构成性转录因子 Sp1,启动 eNOS 在非内皮细胞中的表达[7]。在内皮细胞中 eNOS 近端启动子 DNA 几乎不被甲基化,且组蛋白 H3 乙酰化水平高,因此 eNOS 在内皮细胞中表达。

综上,本研究初步阐述了丁酸促进缺氧血管内皮细胞 NO 分泌的分子机制,为丁酸用于调节缺氧血管内皮细胞 NO 分泌功能提供了实验依据,提示丁酸的应用可能成为预防和治疗缺氧相关的血管疾病的有效措施。

参考文献:

[1] GODO S, SHIMOKAWA H. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 109: 4-10. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.019.

[2] 史清海, 葛迪, 伏建峰. 缺氧与血管内皮 eNOS 基因转录调控的研究进展[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(9): 108-111, 116.
SHI Q H, GE D, FU J F. Hypoxia and regulation of eNOS gene transcription in vascular endothelium [J]. Med Pharm J Chin PLA, 2019, 31(9): 108-111, 116.

[3] WANG C C, WU H, LIN F H, *et al*. Sodium butyrate enhances intestinal integrity, inhibits mast cell activation, inflammatory mediator production and JNK signaling pathway in weaned pigs[J]. Innate Immun, 2018, 24(1): 40-46. DOI:10.1177/1753425917741970.

[4] MATHEW O P, RANGANNA K, MILTON S G. Involvement of the antioxidant effect and anti-inflammatory response in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2014, 7(11): 1008-1027. DOI:10.3390/ph7111008.

[5] FALKENBERG K J, JOHNSTONE R W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(9): 673-691. DOI:10.1038/nrd4360.

[6] 向仕权,谭小玲,冯岚,等. 丁酸钠抑制缺氧致人脐静脉内皮细胞通透性增加及机制[J]. 第三军医大学学报,2016, 38(14): 1609-1614. DOI: 10.16016/j.1000-5404.20151118.
XIANG S Q, TAN X L, FENG L, et al. Butyrate suppresses hypoxia-induced hyperpermeability in human umbelical vein endothelial cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2016, 38(14): 1609-1614. DOI:10.16016/j.1000-5404.20151118.

[7] GAN Y H, SHEN Y H, WANG J, *et al*. Role of histone deacetylation in cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase[J]. J Biol Chem, 2005, 280(16): 16467-16475. DOI:10.1074/jbc.M412960200.

[8] TAN X L, FENG L, HUANG X Y, *et al*. Histone deacetylase inhibitors promote Enos expression in vascular smooth muscle cells and suppress hypoxia-induced cell growth[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(9): 2022-2035. DOI:10.1111/jcmm.13122.

[9] MORAGA F A, MIRANDA G, LÓPEZ V, *et al*. Chronic intermittent hypobaric hypoxia (4600 M) attenuates pulmonary vasodilation induced by acetylcholine or sodium nitroprusside [J]. High Alt Med Biol, 2018, 19(2): 149-155. DOI:10.1089/ham.2017.0012.

[10] 冯恩志, 黄宁侠, 杨生岳, 等. 高原低氧性肺动脉高压与肺血管内皮功能的相关性研究[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2016, 9(3): 248-251. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2016.03.003.
FENG E Z, HUANG N X, YANG S Y, *et al*. Investigate the relationship between the hypoxia pulmonary artery hypertension and pulmonary vascular endothelial function at high altitude[J]. Chin J Lung Dis Electron Ed, 2016, 9(3): 248-251. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2016.03.003.

[11] ROTH L, VAN DER DONCKT C, EMINI VESELI B, *et al*. Nitric oxide donor molsidomine favors features of atherosclе-

rotic plaque stability and reduces myocardial infarction in mice[J]. Vascul Pharmacol, 2019, 118/119: 106561. DOI:10.1016/j.vph.2019.05.001.

[12] MCILHENNY S, ZHANG P, TULENKO T, *et al*. Enos transfection of adipose-derived stem cells yields bioactive nitric oxide production and improved results in vascular tissue engineering[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2015, 9(11): 1277-1285. DOI:10.1002/term.1645.

[13] D'SOUZA F M, SPARKS R L, CHEN H Y, *et al*. Mechanism of Enos gene transfer inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Am J Physiol , Cell Physiol, 2003, 284(1): C191-C199. DOI: 10.1152/ajpcell.00179.2002.

[14] KULLO I J, SCHWARTZ R S, POMPILI V J, *et al*. Expression and function of recombinant endothelial NO synthase in coronary artery smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(11): 2405-2412. DOI:10.1161/01.atv.17.11.2405.

[15] SATO J, NAIR K, HIDDINGA J, *et al*. Enos gene transfer to vascular smooth muscle cells inhibits cell proliferation via upregulation of p27 and p21 and not apoptosis[J]. Cardiovasc Res, 2000, 47(4): 697-706. DOI:10.1016/s0008-6363(00)00137-1.

[16] YANG F, ZHU B, LIU J, *et al*. The effect of acetylation on the protein stability of BmApoLp-Ⅲ in the silkworm, Bombyx mori[J]. Insect Mol Biol, 2020, 29(1): 104-111. DOI: 10.1111/imb.12613.

[17] GUO L, GUO Y Y, LI B Y, *et al*. Enhanced acetylation of ATP-citrate lyase promotes the progression of nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Biol Chem, 2019, 294(31): 11805-11816. DOI:10.1074/jbc.RA119.008708.

[18] HEISS E H, DIRSCH V M. Regulation of Enos enzyme activity by posttranslational modification[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(22): 3503-3513. DOI: 10.2174/1381612811319666074 5.

[19] GONÇALVES P, MARTEL F. Butyrate and colorectal cancer: the role of butyrate transport[J]. Curr Drug Metab, 2013, 14(9): 994-1008. DOI: 10.2174/1389200211314090006.

[20] STELIOU K, BOOSALIS M S, PERRINE S P, *et al*. Butyrate histone deacetylase inhibitors[J]. Biores Open Access, 2012, 1(4): 192-198. DOI:10.1089/biores.2012.0223.

(**收稿**:2019-11-15;**修回**:2020-01-02)

(编辑 黄 超)