

5-氮杂胞苷抑制血管紧张素 II 诱导心肌肥大的作用研究

陈美婷 张戈 江慧琳 林佩仪 陈晓辉

【摘要】目的 探讨甲基化抑制剂 5-氮杂胞苷 (5-AZA-2'-dC) 在血管紧张素 II (Ang II) 诱导的心肌肥大细胞的对肌浆网 Ca^{2+} -ATP 泵 (SERCA2a) 表达等的影响。**方法** 培养 SD 大鼠乳鼠原代心肌细胞, 根据处理方法, 分为 5 组, 分别为对照组、血管紧张素 II 组、5-氮杂胞苷组、血管紧张素 II 与 5-氮杂胞苷同时处理组和 5-氮杂胞苷预处理组; 按照分组处理 48 h 后分别测定心肌细胞 A 型利钠肽 (ANP) mRNA 及蛋白表达、细胞面积等心肌细胞肥大的指标; Western blot 检测心肌细胞肌浆网 Ca^{2+} -ATP 泵 (SERCA2a)、钙调蛋白激酶 II (CaMK II)、磷酸化钙调蛋白激酶 II (p-CaMK II) 的蛋白质表达的水平; 激光共聚焦检测胞内钙变化情况。**结果** 血管紧张素 II (10^{-6} mol/L) 处理心肌细胞 48 h, 可使 ANP mRNA 及蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 血管紧张素 II 组心肌细胞 ANP、p-CaMK II 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$); 而 5-氮杂胞苷 (10^{-6} mol/L) 同时加药组及预处理组较之血管紧张素 II 组则下降 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 血管紧张素 II 组心肌细胞的 SERCA2a 蛋白质表达下降 ($P < 0.01$), 而 5-氮杂胞苷同时加药组及预处理组较血管紧张素 II 组的上升 ($P < 0.01$)。钙离子变化情况, 与对照组相比, 血管紧张素 II 组胞内钙离子峰值上升时间和下降时间均延长 ($P < 0.05$), 而 5-氮杂胞苷同时加药组及预处理组较之血管紧张素 II 组则稍缩短 ($P < 0.05$)。**结论** 5-氮杂胞苷可抑制血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大, 其机制可能通过促进 SERCA2a 表达有关; SERCA2a 表达的增加, 缩短胞浆钙再摄取入肌浆网的时间, 有利于维持胞内钙稳态。

【关键词】 心肌肥大; 甲基化抑制剂; 5-氮杂胞苷; 血管紧张素 II; 肌浆网 Ca^{2+} -ATP 泵

Effect of 5-AZA-2'-dC on angiotensin II -induced cardiomyocyte hypertrophy Chen Meiting, Zhang Yi, Jiang Huilin, Lin Peiyi, Chen Xiaohui

Department of Emergency Medicine, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

Corresponding author: Chen Xiaohui, Email: cxhg168@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of 5-AZA-2'-dC on Angiotensin II (Ang II)-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Methods** Cultured cells derived from neonatal heart of rat were divided into 5 groups: normal control, hypertrophic group, 5-AZA-2'-dC treatment group, and 5-AZA-2'-dC pretreatment group. Neonatal rat cardiomyocyte hypertrophic response was assayed by the size of cardiomyocytes and atrial natriuretic polypeptide (ANP) expressive level. The level of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a), total calmodulin kinase II (CaMK II) and phospho-CaMK II (p-CaMK II) detected by Western blot. The intracellular calcium changes of cardiomyocytes were imaged by confocal fluorescent microscopy. **Results** Cells treated with Ang II at 10^{-6} mol/L for 48 h were chosen as hypertrophic cardiomyocyte model. The mRNA expression and protein level of ANP were significantly decreased in the treatment and pretreatment groups compared with hypertrophic group. The protein level of SERCA2a was significantly decreased in the hypertrophic group, and increased in the

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.03.014

基金项目: 广东省自然科学基金自由申请项目 (S2013010011770); 广州市医学重点学科建设项目 (2017-2019)

作者单位: 510260 广州, 广州医科大学附属第二医院急诊科

通信作者: 陈晓辉, Email: cxhg168@126.com

treatment and pretreatment group compared with hypertrophic group. The protein level of SERCA2a was significantly decreased in the hypertrophic group, and increased in the treatment and pretreatment group compared with hypertrophic group, whereas phospho-CaMK II showed an opposite change tendency. The time required for increasing and declining to half of the intracellular calcium peak value were both delayed in hypertrophic group, as the treatment and pretreatment groups showed shorter time required compared with hypertrophic group. **Conclusion** 5-AZA-2'-dC could inhibit Ang II -induced cardiomyocyte hypertrophy which might be related to regulate SERCA2a expression. Increased SERCA2a expression may maintain the calcium homeostasis through shortening the time of transfer Ca^{2+} from the cytosol of the cell to the lumen of the sarcoplasmic reticulum.

【Key words】 Cardiomyocyte hypertrophy; Methylation inhibitor; 5-AZA-2'-dC; Angiotensin II; Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase

心肌肥大是各种心脏疾病的重要表现之一, 肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 中的血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 通过不同的信号转导途径诱导心肌肥大。在肥大刺激信号作用下, 心肌细胞钙流入增加可提高收缩力, 同时也可导致持续小量的胞内游离钙含量增加及钙信号的动力学特征改变, 从而破坏钙的动态平稳, 可通过钙敏感的信号传导途径, 引起心肌肥大。在钙依赖的信号通路中, 心肌细胞内 Ca^{2+} 水平升高, 激活钙调神经磷酸酶 (CaN) 和钙调蛋白激酶 II (CaMK II), 促进心肌肥厚的发生^[1]。在心肌肥大、心力衰竭中, 肌浆网 Ca^{2+} -ATP 泵 (SERCA2a) 在 mRNA 水平及蛋白水平有表达的下调^[2-3], 导致胞浆钙的吸收与再摄取减慢, 影响心肌收缩与舒张能力, 并且激活钙相关通路, 促进心肌肥大的发生。所以, 心肌肥大时, 细胞内钙及钙调控系统出现不同程度的异常, 维持胞浆钙的稳态尤为重要, 尤以 SERCA2a 在舒张期钙离子的再摄取、储存最为有效^[4]。笔者前期研究通过甲基化芯片的检测发现, 在心血管疾病发生时, 发现钙调控相关基因 SERCA2a、钠-钙交换体 (sodium-calcium exchanger, NCX)、三磷酸肌醇受体 (IP3R)、CaN 和 CaMKs 钙敏感途径上存在着甲基化调控位点 CpG 岛^[5]; 另有研究发现, 胍苯哒嗪可抑制因心力衰竭所致 SERCA2a 启动子区甲基化异常, 减低甲基化程度, 从而使 SERCA2a 基因表达增加, 可保持心肌细胞的钙动态平衡, 抑制心力衰竭的发生^[6]。甲基化抑制剂可能抑制 SERCA2a 启动子甲基化, 促进 SERCA2a 的表达, 而 5-氮杂胞苷 (5-AZA-2'-dC) 是已知较强的甲基化抑制剂, 可能对 SERCA2a 有促进其表达的作用, 抑制心肌肥大的发生。

本研究通过建立 SD 大鼠乳鼠原代心肌细胞肥大模型, 采用不同时间加入 5-氮杂胞苷进行干预, 观察 5-氮杂胞苷在血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大中的影响作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生 1~3 d SD 大鼠乳鼠 (购自广东省实验动物中心)。

1.2 试剂

5-氮杂胞苷、血管紧张素 II (Sigma 公司, 美国), 心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 单克隆抗体 (CST 公司, 美国)、Cy3 标记羊抗兔 IgG (Jackson 公司, 美国); Reverse Transcript PCR Master Mix、SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO 公司, 日本), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Thermo Fisher 公司, 美国), 一抗 SERCA2a 抗体 (abcam 公司, 美国)、CaMK II 抗体、磷酸化 CaMK II (p-CaMK II) 抗体 (CST 公司, 美国)、A 型利钠肽 (ANP) 抗体 (Bioworld, 中国)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体, 二抗兔抗鼠 IgG (CST 公司, 美国); Fluo-3 AM 钙离子探针 (碧云天, 中国), 激光共聚焦专用培养皿 (NEST 公司, 美国)。

1.3 实验方法

心肌细胞培养: 取 1~3 d SD 大鼠乳鼠心室肌, 用 0.25% 胰蛋白酶、0.1% II 型胶原酶分次消化后, 差速贴壁约 1.5 h, 使用含 20% 胎牛血清、青霉素、链霉素的 DMEM 培养液稀释、重悬心肌细胞, 并加入 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 0.1 mmol/L 抑制非心肌细胞增殖, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 换用无血清培养基培养 24 h。倒置相差显微镜下观察, 24 h 后 90% 的细胞都自发性搏动, 频率一致,

约 120~200 次/min, 再培养 24 h 后, 采用肌钙蛋白(cTnI)单克隆抗体及 Cy3 标记荧光二抗进行免疫荧光染色, 90%以上的细胞呈阳性染色, 则继续后续实验。

1.4 实验分组

原代心肌细胞有血清培养稳定后换无血清培养液培养 24 h; 5-氮杂胞苷及血管紧张素 II 均配制后使用无菌过滤器, 过滤除菌后按照不同分组处理加入心肌细胞再培养 48 h。实验分组如下: 对照组(N组): 原代心肌细胞不加入任何干预因素; 血管紧张素 II 组(A组): 心肌细胞给予血管紧张素 II 1 $\mu\text{mol/L}$, 刺激心肌细胞肥大; 5-氮杂胞苷组(D组): 心肌细胞给予 5-氮杂胞苷 1 $\mu\text{mol/L}$; 血管紧张素 II +5-氮杂胞苷组(A+D组): 心肌细胞给予血管紧张素 II 1 $\mu\text{mol/L}$, 同时加入 5-氮杂胞苷 1 $\mu\text{mol/L}$; 5-氮杂胞苷预处理 4 h 组(D4h+A组): 心肌细胞给予 5-氮杂胞苷 1 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 4 h 后, 再加入血管紧张素 II 1 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.5 观测指标

1.5.1 心肌细胞肥大基因测定 各组心肌细胞逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测 ANP 的 mRNA 表达。加药处理 48 h 后终止细胞培养, 洗涤后用 Trizol 提取总 RNA。加入 Oligo-(dT) 1 μL , 逆转录条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存, 逆转录合成 cDNA。通过实时荧光定量 PCR 扩增目的基因。引物由上海生工设计合成 GAPDH 上游引物 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3', 下游引物 5'-AGATCCACAACGGATACAT-3'; ANP 上游引物 5'-GGGGGTAGGATTGACAGGAT-3', 下游引物 5'-CTCCAGGAGGGTATTCACCA-3'。其 PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 延伸, 40 次循环, 扩增曲线、融解曲线分析。

1.5.2 心肌细胞表面积测定 加药处理 48 h 后, 每组随机选择 5 个视野摄片, 每个视野再任取 20 个细胞, 用美国 ImagePro Plus 专业图像分析软件测定细胞表面积, 取其平均数。

1.5.3 心肌细胞蛋白的提取和总蛋白含量的测定 加药处理 48 h 后, 加入 RIPA 细胞裂解液 100 μL 和苯甲基磺酰氟(PMSF) 10 μL , 冰上裂解。BCA 法测定心肌细胞样品总蛋白含量并调整浓度。免疫印迹法测 ANP、SERCA2a、CaMK II、p-CaMK II 蛋白表达: SDS-PAGE 电泳分离, 转移到硝酸纤维素

膜(PVDF膜)上, 封闭后加入一抗(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 再与辣根过氧化物酶标记抗体(1:2 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。常规洗膜, ECL 显色系统(Thermo Fisher, 美国)检测后扫描, Image J 图像分析系统定量各蛋白条带的总灰度值。

1.5.4 心肌细胞细胞内钙测定 各组心肌细胞于激光共聚焦培养皿中培养并处理后, Fluo-3 AM 以 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度负载, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养基洗涤后, 加入培养基, 使用激光共聚焦显微镜, 以面扫描方式测定胞内钙变化情况, 以 $t_{1/2\alpha}$ (上升至峰值一半时所需的时间)、 $t_{1/2\beta}$ (下降至峰值一半时所需的时间) 表示胞内钙变化情况。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据的分析处理。所有计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间两两比较使用 LSD- t 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心肌肥大 mRNA、蛋白表达

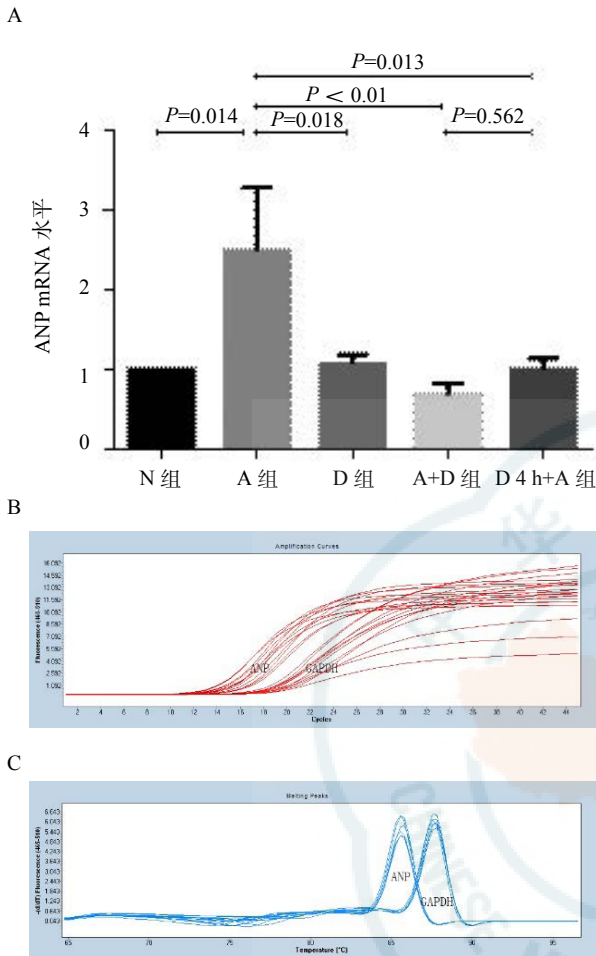
各组细胞中 ANP mRNA 表达统计(图 1)示, 与空白对照组相比, 血管紧张素 II 组 ANP mRNA 表达升高, 为对照组的 2.68 倍($P < 0.05$); 5-氮杂胞苷组、5-氮杂胞苷 + 血管紧张素 II 同时处理组、5-氮杂胞苷预处理 4 h 组与对照组相比, ANP 表达无明显差异, 而与血管紧张素 II 组相比, ANP 表达量减少($P < 0.05$)。各组细胞中 ANP 蛋白表达量(图 3), 血管紧张素 II 组与对照组相比, ANP 表达量增多($P < 0.01$), 而其他组别与血管紧张素 II 组相比, ANP 表达量相对减少($P < 0.01$), 差异有统计学意义。

2.2 各组心肌细胞面积

各组心肌细胞面积统计(图 2)示, 与空白对照组相比, 血管紧张素 II 组细胞镜下面积增大($P < 0.01$); 5-氮杂胞苷组、血管紧张素 II +5-氮杂胞苷同时处理组、5-氮杂胞苷预处理 4 h 组与对照组相比, 细胞面积大小无明显差异, 而与血管紧张素 II 组相比, 细胞面积相对较小($P < 0.01$)。

2.3 心肌细胞 SERCA2a、CaMK II、p-CaMK II 的表达

各组心肌细胞中, GAPDH、SERCA2a、p-CaMK II 及 total CaMK II 的表达情况。与对照组



N 组为对照组;A 组为血管紧张素 II 组;D 组为 5- 氮杂胞苷组; A+D 组为血管紧张素 II +5- 氮杂胞苷组; D4 h+A 组为 5- 氮杂胞苷预处理 4 h 组;A : 各组 ANP mRNA 表达情况; B : 前者为 ANP 扩增曲线, 后者为 GAPDH 扩增曲线; C: 前者为 ANP 扩增产物溶解曲线, 后者为 GAPDH 扩增产物溶解曲线, 两者均呈单一溶解峰, 扩增产物具有特异性

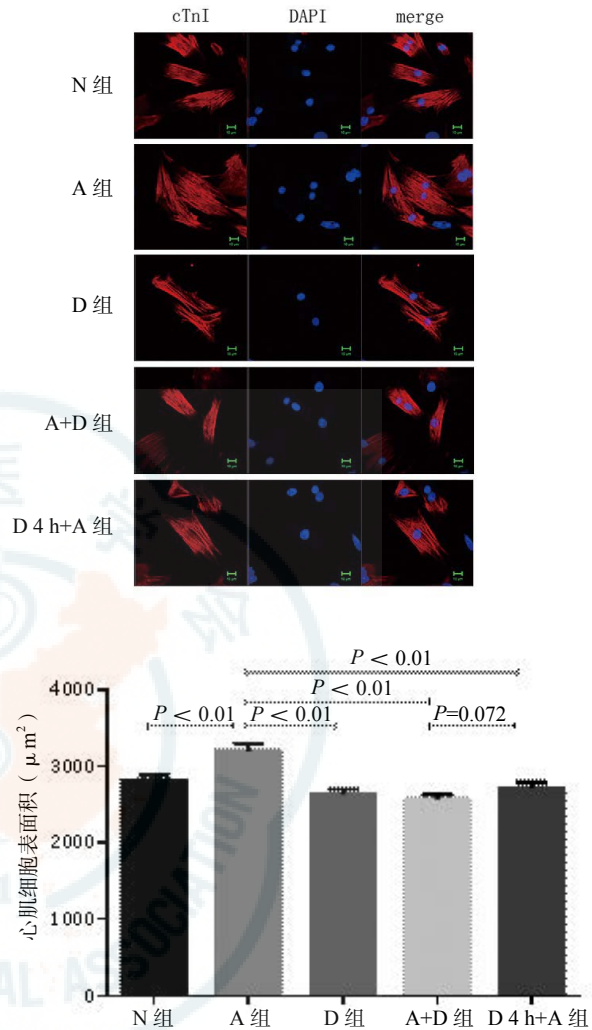
图 1 ANP mRNA 荧光定量 PCR 结果

Fig 1 Real-time PCR quantitative detection of ANP mRNA

比较, SERCA2a 在血管紧张素 II 组中表达下降低 ($P<0.05$), 与血管紧张素 II 组比较, 5- 氮杂胞苷组、同时加药组及预处理 4 h 组 SERCA2a 表达相对增加 ($P<0.05$), 而预处理 4 h 组 SERCA2a 较同时处理组增加较明显 ($P<0.01$)。与对照组相比, p-CaMK II 在血管紧张素 II 组中, 与其他组别相比表达增多较明显, 5- 氮杂胞苷组、同时加药组及预处理 4 h 组组间则差异无统计学。

2.4 胞内钙变化情况

各组心肌细胞间荧光强度变化时间统计 (图 4) 示, 血管紧张素 II 组峰值 $t_{1/2\alpha}$ 及 $t_{1/2\beta}$ 较其他组别延长 ($P<0.05$), 加入 5- 氮杂胞苷干预的组别与血管及张素 II 组比较, 荧光强度上升及下降时间相



N 组为对照组;A 组为血管紧张素 II 组;D 组为 5- 氮杂胞苷组; A+D 组为血管紧张素 II +5- 氮杂胞苷组; D4 h+A 组为 5- 氮杂胞苷预处理 4 h 组

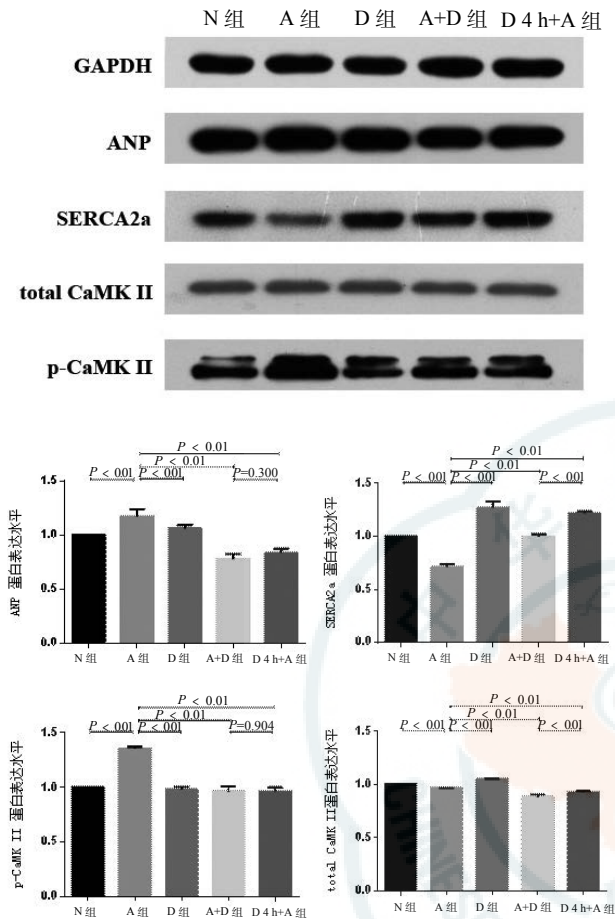
图 2 心肌细胞免疫荧光及表面积统计分析

Fig 2 Immunofluorescence of cardiomyocytes and surface area analysis

对缩短 ($P<0.05$); 而 5- 氮杂胞苷同时加药组与预处理 4 h 组之间差异无统计学意义。

3 讨论

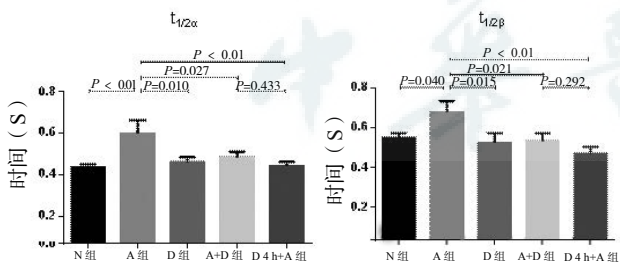
心肌肥大是心肌细胞在不同病理刺激下产生的适应性结构重塑, 是多种心血管疾病共同的病理生理表现, 其表现为: 首先是肥大相关基因如早期基因表达; 继而心脏胚胎期基因心房利钠肽等的再表达; 最终表现为细胞体积增大。而心肌肥大病理生理中, 钙稳态的失衡促进了这一过程的发生。钙离子浓度的增加则可以启动相关的钙敏感的信号途径参与心肌肥大, 如丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族、蛋白激酶 C、钙调素 (CaM) 依赖的钙调神



N 组为对照组; A 组为血管紧张素 II 组; D 组为 5- 氮杂胞苷组; A+D 组为血管紧张素 II +5- 氮杂胞苷组; D4 h+A 组为 5- 氮杂胞苷预处理 4 h 组

图 3 ANP、SERCA2a、total CaMK II、p-CaMK II 蛋白表达情况及条带灰度分析

Fig 3 Western Blot quantification of ANP, SERCA2a, total CaMK II, p-CaMK II protein expression



N 组为对照组; A 组为血管紧张素 II 组; D 组为 5- 氮杂胞苷组; A+D 组为血管紧张素 II +5- 氮杂胞苷组; D4 h+A 组为 5- 氮杂胞苷预处理 4 h 组; $t_{1/2\alpha}$ 为胞内钙离子浓度上升到一半峰值时所需要的时间, $t_{1/2\beta}$ 为胞内钙离子浓度下降到一半峰值时所需要的时间

图 4 Fluo-3 标记细胞内钙上升与下降时间变化情况

Fig 4 The rising and falling time of the calcium concentration labeling by Fluo-3

经磷酸酶 - 活化 T 细胞核因子 3 (CaN-NFAT3) 途径和 Ca^{2+} /CaM 依赖的钙调蛋白激酶 - 肌细胞增强因子 2 (CaMKs-MEF2) 等途径^[1]。血管紧张素 II

是对心肌细胞的一种促肥大因子。本研究结果中, 血管紧张素 II 处理后, 可引起 ANP、p-CaMK II 表达的增加, 细胞表面积增大, 与心肌肥大趋势相一致。

在心肌细胞舒张期, SERCA2a 可逆浓度梯度将 70% 胞浆内钙转移入肌浆网内储存, 以便下一次的释放^[8], 当 SERCA2a 表达下调时, 可引起胞浆钙再摄取时间延长, 持续小量的胞浆游离钙含量增加及钙信号的动力学特征改变, 从而破坏钙的动态平稳; 在心肌肥大时, NCX、RyR、SERCA2a 表达显著异常, 导致钙超载, 激活下游相关通路^[9-10]。笔者前期研究发现 SERCA2a 在心脏疾病中存在甲基化调控位点^[5]; 另有研究表明, 胍苯哒嗪可抑制因心力衰竭所致 SERCA2a 启动子区甲基化异常, 从而使 SERCA2a 基因表达增加; 在后负荷诱导或苯丙肾上腺素诱导的人工心脏组织心肌肥大模型中, 通过去甲基化抑制剂干预基因启动子甲基化, 发现后负荷诱导心肌肥大组细胞的 SERCA2a 启动子甲基化率明显较其他组别升高, 加入甲基化抑制剂组 SERCA2a 启动子甲基化率较其他组别下降^[6, 11]。本研究结果中, 血管紧张素 II 组 SERCA2a 表达减少, 并且 $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 相对延长, 胞浆钙的释放和再摄取延缓, 可能导致胞浆内钙浓度维持相对较高水平, 导致钙超载, 促进心肌肥大的发生; 而加入 5- 氮杂胞苷的预处理组与同时加药组, 在 SERCA2a 表达、胞内钙变化情况, 与下血管紧张素 II 组比较差异有统计学意义, 此两组中心肌细胞 SERCA2a 蛋白水平的表达上升, $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 与血管紧张素 II 组比较则较为缩短, SERCA2a 表达增加有利于胞浆钙的释放与再摄取, 抑制血管紧张素 II 促心肌肥大的作用。Luo 等^[12]的研究, 同样得出相似结论, 肥大刺激组 SERCA2a 表达下降明显, SERCA2a 与胞内钙的释放、再摄取时间呈负性相关。因此, 通过甲基化抑制剂 5- 氮杂胞苷可促进 SERCA2a 的表达, 增强对胞内 Ca^{2+} 的调节作用, 有助于舒张期胞浆钙的再摄取, 保持胞内钙的稳态, 保证心肌收缩能力, 抑制心肌肥大。结果中显示, 在 SERCA2a 蛋白表达上, 预处理组的 SERCA2a 表达量较同时加药组增多, 可能由于预处理组 5- 氮杂胞苷在更充足的时间起效, 促使 SERCA2a 表达更佳; 但在钙离子时间的变化上, 两组无明显差异, SERCA2a 的活性, 还受磷酸接纳蛋白 (PLB) 等的调节, 5- 氮杂胞苷可能

未进一步影响到 SERCA2a 活性调节的相关因子。

综上所述,本研究进一步证明 SERCA2a 表达的增加有利于胞内钙的再摄取和释放;5-氮杂胞苷可抑制血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大,促进 SERCA2a 的表达,其机制可能通过直接抑制 SERCA2a 启动子甲基化。近年来,心血管疾病可通过表观遗传靶向治疗而达到防治的目的^[13],其中 DNA 去甲基化在多种疾病中已屡见报道,在心血管疾病当中也成为近年来的研究热点;而 SERCA2a 更被认为是治疗心肌肥厚、心力衰竭的靶基因治疗位点之一^[14-15],除了与钙相关通路有关之外,还与细胞增殖与凋亡通路相关^[16-17]。对于 SERCA2a 甚至其他肥大相关蛋白、因子的启动子甲基化调控相关研究仍有较多未阐述之处,可行下一步的研究探索,了解 5-氮杂胞苷是否有直接通过对 SERCA2a 启动子去甲基化的作用及相关信号通路机制,明确甲基化抑制剂抑制心肌肥大的具体机制。

参 考 文 献

- [1] Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, et al. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase a differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in human cardiac pathology [J]. *Circulation*, 2013, 128(9): 970-981. DOI: 10.1161/circulationaha.113.001746.
- [2] Andersson KB, Birkeland JA, Finsen AV, et al. Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the Serca2 gene [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009,47(2):180-187. DOI:10.1016/j.yjmcc.2009.03.013.
- [3] Kho C, Lee A, Jeong D, et al. SUMO1-dependent modulation of SERCA2a in heart failure [J]. *Nature*, 2011, 477(7366):601-605. DOI:10.1038/nature10407.
- [4] Periasamy M, Huke S. SERCA pump level is a critical determinant of Ca^{2+} homeostasis and cardiac contractility [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(6):1053-1063. DOI:10.1006/jmcc.2001.1366.
- [5] 林珮仪,莫均荣,茅海锋,等.急性 ST 段抬高型心肌梗死甲基化谱的研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24(12): 1449-1454. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.12.027.
- [6] Kao YH, Cheng CC, Chen YC, et al. Hydralazine-induced promoter demethylation enhances sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and calcium homeostasis in cardiac myocytes [J]. *Lab Invest*, 2011, 91(9):1291-1297. DOI: 10.1038/labinvest.2011.92.
- [7] Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2006, 7(8): 589-600. DOI: 10.1038/nrm1983.
- [8] Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms.[J]. *J Physiol*, 1994, 476(2):279-293.
- [9] Bers DM, Despa S. Cardiac myocytes Ca^{2+} and Na^{+} regulation in normal and failing hearts [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100(5): 315-322. DOI: 10.1254/jphs.CPJ06001X.
- [10] Priori SG, Napolitano C. Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular Ca^{2+} release channels [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(8):2033-2038. DOI: 10.1172/JCI25664.
- [11] Nascimento AM, Lima EM, Brasil GA, et al. Serca2a and Na^{+}/Ca^{2+} exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2016, 301:22-30. DOI: 10.1016/j.taap.2016.04.001.
- [12] Luo J, Zhang WD, Du YM. Early administration of nifedipine protects against angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through regulating CaMK II-SERCA2a pathway and apoptosis in rat cardiomyocytes[J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(3):181-187. DOI: 10.1002/cbf.3177.
- [13] Schiano C, Vietri MT, Grimaldi V, et al. Epigenetic-related therapeutic challenges in cardiovascular disease [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(4):226-235. DOI: 10.1016/j.tips.2015.02.005.
- [14] Shareef MA, Anwer LA, Poizat C. Cardiac SERCA2A/B: therapeutic targets for heart failure [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 724(1):1-8. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.12.018.
- [15] Sikkil MB, Hayward C, MacLeod KT, et al. SERCA2a gene therapy in heart failure: an anti-arrhythmic positive inotrope [J]. *Brit J Pharmacol*, 2014, 171(1):38-54. DOI: 10.1111/bph.12472.
- [16] Huang H, Joseph LC, Gurin MI, et al. Extracellular signal-regulated kinase activation during cardiac hypertrophy reduces sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) transcription [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 75(5):58-63. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.06.018.
- [17] Kaikkonen L, Magga J, Ronkainen VP, et al. p38 α regulates SERCA2a function[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 67:86-93. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.12.005.

(收稿日期: 2017-09-13)

(本文编辑: 郑辛甜)