

EZH2 对抗结核药物性肝损伤小鼠 Nrf2-ARE 通路的影响

贾云鹏¹, 徐杰¹, 马玉¹, 张咪¹, 吴冬雪¹, 王雪¹, 朱晗瑀¹, 冯福民^{1,2}

摘要 目的 探讨抗结核药物性肝损伤(ADLI)中果蝇 zeste 基因增强子人类同源物 2(EZH2)对 Nrf2-ARE 氧化还原通路的调控机制。方法 32 只昆明小鼠随机分 4 组:空白对照组、模型组、实验组和阴性对照组,第 5 天处死并收集标本。微孔板法检测血清中肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平;HE 染色法观察肝组织病理学改变;实时荧光定量 PCR 法、ELISA 法和 Western blot 法分别检测 EZH2、Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 和蛋白水平。结果 模型组小鼠血清 ALT、AST 水平较空白对照组上升($P < 0.05$),实验组较模型组下降($P < 0.05$);与空白对照组比较,模型组小鼠肝组织病理学结果发生肝损伤,而实验组小鼠肝损伤有所缓解;与空白对照组比较,模型组小鼠 EZH2 mRNA 和蛋白水平下降($P < 0.05$),实验组进一步降低($P < 0.05$);与空白对照组比较,模型组小鼠 Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 和蛋白水平上升($P < 0.05$),实验组进一步上升($P < 0.05$);Chip 结果显示模型组 H3K27me3 水平较空白对照组降低($P < 0.05$),实验组进一步降低($P < 0.05$)。结论 ADLI 中 EZH2 表达下调,抑制 EZH2 表达可缓解肝损伤程度,EZH2 对 ADLI 的影响可能是通过在 Nrf2 启动子区进行 H3K27me3 修饰,进而通过调控 Nrf2-ARE 抗氧化应激通路来实现的。

关键词 抗结核药物性肝损伤; EZH2; Nrf2-ARE 通路; H3K27me3

中图分类号 R 183.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0233-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.012

2018 年全球约有 1 000 万新发结核病患者,124 万死亡病例^[1]。异烟肼、利福平和吡嗪酰胺为 WHO 推荐的结核病治疗药物,但治疗过程中会产生副作用^[2],其中以抗结核药物性肝损伤(anti-tuberculosis drug-induced liver injury, ADLI)最为突出^[3]。近来表观遗传学发展迅速,为各类肝脏疾病的治疗提供

了理论基础^[4-5]。

组蛋白甲基化是表观遗传学的重要组成部分,果蝇 zeste 基因增强子人类同源物 2(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)为特异性组蛋白甲基转移酶,可对组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸进行三甲基化修饰(histone 3 lysine 27 trimethylation, H3K27me3),进而调节染色体结构,导致基因的沉默^[6],例如 EZH2 可通过 H3K27me3 修饰调节肺癌中氧化水平^[7]。Nrf2-ARE 通路是调节体内氧化还原水平的重要通路,该课题组前期研究发现^[8],ADLI 小鼠模型中 Nrf2-ARE 通路被激活,小鼠肝脏 II 相药物代谢能力和抗氧化能力增强。该研究试图在 ADLI 小鼠中探讨 EZH2 对 Nrf2-ARE 抗氧化应激通路的调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器 昆明小鼠购自北京维通利华实验动物技术公司,异烟肼、利福平和吡嗪酰胺购自沈阳红旗制药公司,siRNA oligo 购自上海市吉玛公司,丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,PrimeScript™ RT reagent Kit,SYBR® Premix Ex Taq™ II 购自日本 TaKaRa 公司,ELISA 试剂盒购自北京安迪华泰公司,酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司,扩增仪购自美国 BIO-RAD 公司,荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 小鼠分组与处理 6 周龄 SPF 级昆明小鼠共 32 只,雌雄各半,体质量 18~22 g,饲养于华北理工大学动物实验中心清洁动物房,小鼠自由进食与饮水,交替照明各 12 h,温度控制在 24℃左右,相对湿度 60%~80%。实验设施合格证编号:SYXK(冀)2015-0038,动物实验获得华北理工大学动物伦理委员会的同意。适应性饲养 1 周后将小鼠随机分为以下 4 组。空白对照组:与模型组相同体积生理盐水灌胃;模型组:异烟肼 + 利福平 + 吡嗪酰胺 [90 mg/(kg·d) + 135 mg/(kg·d) + 315 mg/(kg·d)] 剂量灌胃(剂量按照临床成人正常用药剂量的 9 倍计算所得);实验组:在模型组基础上按照 200 nmol/kg

2020-08-13 接收

基金项目:河北省自然科学基金(编号:H2016209300)

作者单位:华北理工大学¹ 公共卫生学院、² 生命科学学院,唐山 063210

作者简介:贾云鹏,男,硕士研究生;

冯福民,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: fm_feng@sina.com

剂量第3天对小鼠尾静脉注射 EZH2-siRNA; 阴性对照组: 在空白对照组基础上按照 200 nmol/kg 剂量第3天对小鼠尾静脉注射 EZH2-NC-siRNA。连续灌胃4d, 末次灌胃24h后(即第5天)处死小鼠并收集血清和肝组织。

1.3 血清中 ALT、AST 检测 采用微孔板法检测, 严格按照试剂盒说明书操作。酶标仪测定各孔 OD 值, 绝对 OD 值等于测定孔 OD 值减对照孔 OD 值, 然后制作标准曲线, 根据标准曲线计算每个样本的 ALT(或 AST) 表达水平。

1.4 肝组织病理学观察 小鼠肝组织标本收集后用 10% 甲醛溶液固定, 经切片、脱蜡、样本水化、苏木精染色、分化与反蓝、伊红染色与脱水、风干封片等步骤后将切片置于光学显微镜下, 200 倍视野采集图片, 采用 DILI-PSS 肝损伤病理评分系统^[9] 进行评分, 评分等级分别为: 不可能(1~2)、可能(3~4)、很可能(5~6)、极可能(7~8)和明确(9~10)。

1.5 肝组织 EZH2、Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 水平检测 Trizol 法提取总 RNA, 选择酶标仪检测的 OD 值在 1.8~2.0 之间的 RNA 样本。反转录体系总体积为 20 μl, 其中 Mix 4 μl, RNA 质量为 1 000 ng, 则 RNA 体积为 1 000/RNA 浓度, 剩余体系用 DEPC 水补充至 20 μl。

qPCR 法检测 mRNA, 反应体系为 20 μl, Rox 0.4 μl, 上下游引物各 0.4 μl, dH₂O 6.8 μl, cDNA 2 μl。条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 50 个循环。2^{-ΔΔCt} 计算 mRNA 表达水平。引物序列如下, GAPDH: 上游 5'-TTG GTA TCG TGG AAG GAC-3', 下游 5'-TCA AAG GTG GAG GAG TGG-3'; EZH2: 上游 5'-GGA CCA CAG TGT TAC CAG CAT-3', 下游 5'-GTG GGG TCT TTA TCC GCT CAG-3'; Nrf2: 上游 5'-CAG TGC TCC TAT GCG TGA A-3', 下游 5'-TCT GGG CGG CGA CTT TAT-3'; NQO1: 上游 5'-GAA GAC ATC ATT CAA CTA CGC C-3', 下游 5'-GAG ATG ACT CGG AAG GAT ACT G-3'; HO-1: 上游 5'-TCC TTG TAC CAT ATC TAC ACG G-3', 下游 5'-GAG ACG CTT TAC ATA GTG CTG T-3'。

1.6 Western blot 法检测肝组织中 EZH2、Nrf2 蛋白水平 用 RIPA 裂解液和 PMSF 提取蛋白。蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移到聚偏二氟乙烯膜上。膜置于 5% 脱脂奶粉摇床室温封闭, 洗涤, 分别用 EZH2(1:2 000) 和 Nrf2(1:2 000) 一抗 4 °C 摇床上孵育过夜, 次日膜经洗涤过后于摇床上室温孵育二抗(1:5 000), 采用 ECL 显色试剂在凝胶成像

系统显影并定量。

1.7 ELISA 法检测肝组织中 NQO1、HO-1 蛋白水平 采用 ELISA 试剂盒检测, 严格按照试剂盒说明书操作, 酶标仪上以 450 nm 波长测量各孔 OD 值。以标准品浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线后将各组样品 OD 值带入, 计算得到样品实际浓度。

1.8 肝组织中 Nrf2 启动子区 H3K27me3 水平检测 Nrf2 启动子区 H3K27me3 水平检测采用染色质免疫共沉淀法^[10]。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 方法分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠血清中 ALT、AST 水平变化 与空白对照组比较, 模型组 ALT、AST 水平升高(P < 0.05), 阴性对照组未见改变, 差异无统计学意义(P > 0.05); 与模型组比较, 实验组水平有所降低, 但仍高于空白对照组(P < 0.05)。见表 1。

表 1 各组小鼠血清中 ALT、AST 水平比较(U/L, $\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	ALT	AST
空白对照	30.34 ± 6.36	90.61 ± 12.63
模型	104.33 ± 39.46 [#]	207.84 ± 30.97 [#]
实验	71.92 ± 15.89 [*]	160.17 ± 16.08 [*]
阴性对照	31.42 ± 6.54	92.39 ± 16.40
F 值	18.75	54.96

与空白对照组比较: [#]P < 0.05; 与模型组比较: ^{*}P < 0.05

2.2 小鼠肝组织病理学结果与评价 经 DILI-PSS 病理评分系统计算, 空白对照组、模型组、实验组和阴性对照组肝损伤等级分别为 1、8、6、1, 证明模型组发生肝损伤, 而实验组与模型组比较肝损伤程度较轻。HE 染色结果见图 1, 空白对照组与阴性对照组肝细胞形态正常, 肝小叶结构完整, 细胞间界限清晰, 未见病理学改变。模型组可见肝细胞排列紊乱, 肝小叶结构破坏且部分细胞核染色变深, 而实验组与模型组相比有所缓解。

2.3 小鼠肝组织中 EZH2 和 Nrf2-ARE 通路相关基因 mRNA 水平 与空白对照组比较, 模型组 EZH2 水平降低(P < 0.05), 实验组进一步降低(P < 0.05)。与空白对照组比较, 模型组 Nrf2、NQO1 和 HO-1 水平升高(均 P < 0.05)。另外, 实验组小

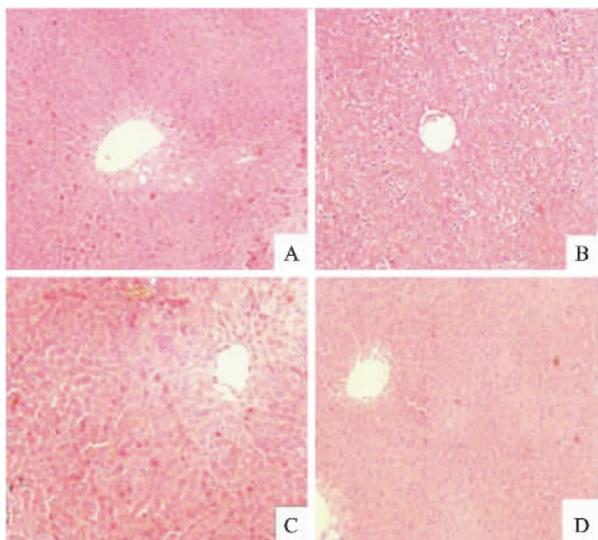


图1 各组小鼠肝组织病理学变化 HE ×200
A: 空白对照组; B: 模型组; C: 实验组; D: 阴性对照组

鼠体内 EZH2 水平被抑制后,与模型组比较,实验组小鼠 Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 水平进一步升高 (均 $P < 0.05$),且阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义。见图 2。

2.4 肝组织中 EZH2 和 Nrf2-ARE 通路相关蛋白水平 EZH2 和 Nrf2-ARE 通路相关蛋白结果见图 3,蛋白表达趋势与 mRNA 趋势一致。

2.5 肝组织中 Nrf2 启动子区 H3K27me3 水平

继续对各组小鼠肝组织 Nrf2 启动子区 H3K27me3 的水平进行检测。与空白对照组比较,模型组 Nrf2 启动子区 H3K27me3 的水平降低 ($P < 0.05$)。而实验组在抑制 EZH2 后,与模型组比较,实验组 Nrf2 启动子区 H3K27me3 的水平进一步降低 ($P < 0.05$),且阴性对照组与空白对照组相比差异无统计学意义。见图 4。

3 讨论

近年来,在结核病的研究中也开始涉及到各类表观遗传机制,因此,本研究从表观遗传学角度探讨 ADLI 过程中的相关机制。首先采用临床常用的异烟肼 + 利福平 + 吡嗪酰胺的用药方案对小鼠进行灌胃处理,结果显示模型组小鼠血清中肝功能指标 ALT 和 AST 均出现上升,且 HE 染色结果显示肝组织出现细胞坏死及凋亡,提示造模成功。

EZH2 作为多梳抑制复合物 2 的催化亚基,是一种高度保守的特异性组蛋白甲基转移酶,通过对靶基因进行三甲基化修饰,从而实现目标基因抑制或者沉默的作用^[11]。EZH2 在各类疾病中存在差异表达,例如感染急性期严重登革热患者较非严重登革热患者外周血中 EZH2 的表达下调,在疾病早期可作为反映疾病严重程度的生物标志物^[12]。在非酒精性脂肪肝肝病中,同样发现 EZH2 蛋白出现下

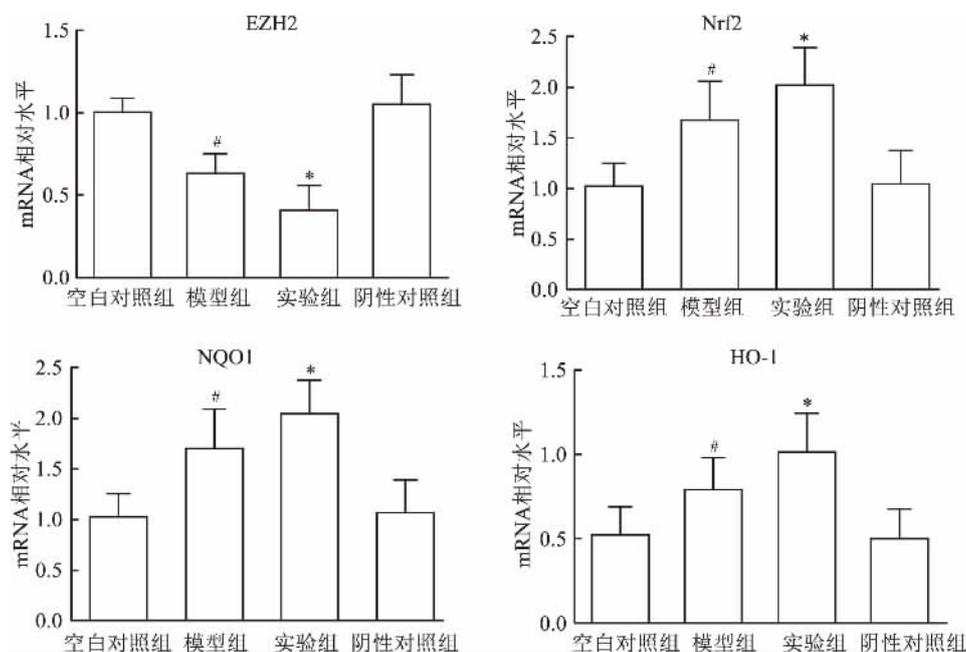


图2 各组小鼠肝组织相关指标 mRNA 水平
与空白对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

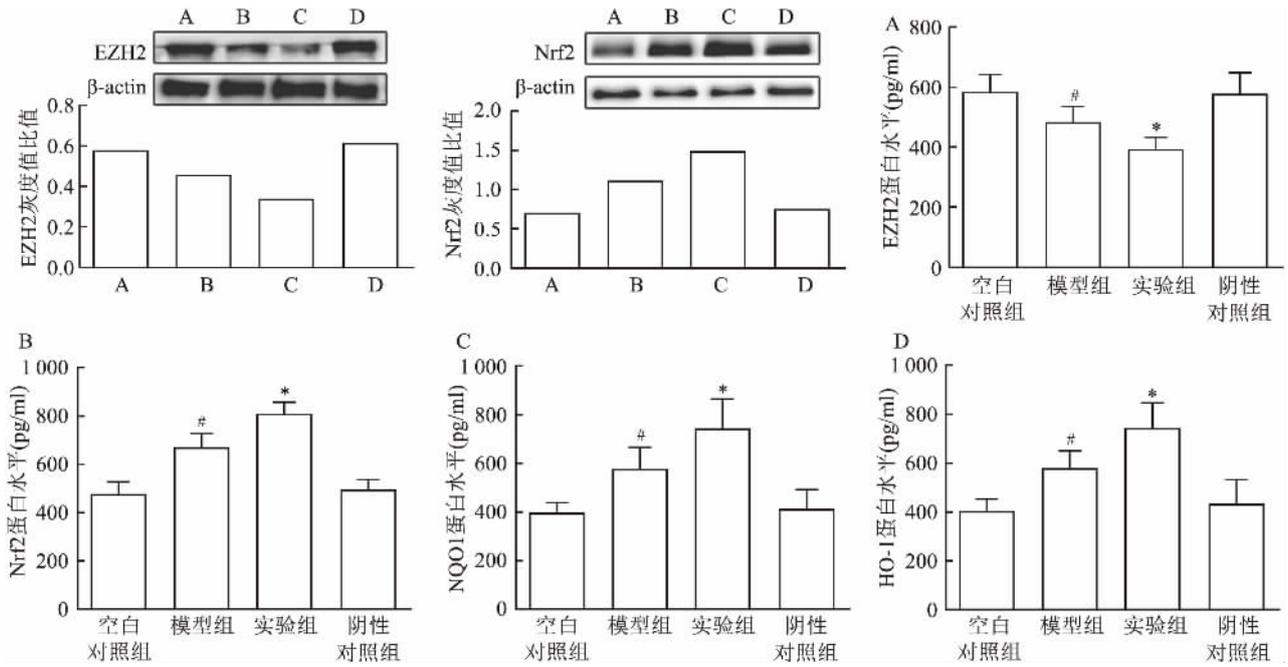


图3 各组小鼠肝组织相关指标蛋白水平

A: 空白对照组; B: 模型组; C: 实验组; D: 阴性对照组; 与空白对照组比较: #P < 0.05; 与模型组比较: * P < 0.05

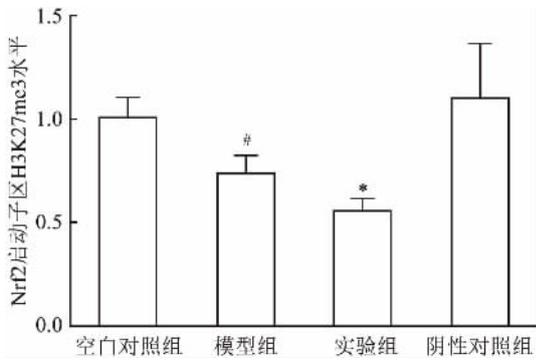


图4 各组小鼠肝组织 Nrf2 启动子区 H3K27me3 水平
与空白对照组比较: #P < 0.05; 与模型组比较: * P < 0.05

调,并证明 EZH2 可促进脂肪变性,下调炎症基因和特异性 microRNAs 的表达,从而加快非酒精性脂肪肝病的发展^[13]。本研究结果发现模型组小鼠 EZH2 在 mRNA 和蛋白水平均出现表达下调,可见一线抗结核药物联用引起了相关表观遗传学改变,导致甲基转移酶 EZH2 表达水平降低,这说明 EZH2 可能参与 ADLI 过程中,并与肝损伤的程度有密切的联系。

正常情况下,Nrf2 与 Keap1 蛋白结合在细胞质中,Nrf2 的功能暂时受到抑制,当机体受到亲电子物质或者氧化应激因子刺激后,Nrf2 与 Keap1 蛋白解离由胞质跨膜进入细胞核中,从而与 ARE 蛋白识别并结合,启动下游抗氧化应激因子如 NQO1 和 HO-1

等的转录,最终增强机体对抗有害化学物质带来的毒性,并提高机体抗氧化还原的能力^[14],因此 Nrf2-ARE 通路可能是治疗 ADLI 的潜在靶点。研究发现,姜黄素衍生物 F10 处理前列腺癌细胞后可使得 Nrf2 和相关的 II 期解毒基因表达水平增加,因为 F10 有效地减少了 H3K27me3 在 Nrf2 启动子上的水平,激活了 Nrf2-ARE 通路^[15]。同样在前列腺癌中,Yang et al^[16] 利用珊瑚醇酸对前列腺癌细胞进行处理后,发现降低了 H3K27me3 在 Nrf2 启动子区域的三甲基化,并诱导了 Nrf2、NQO1 和 HO-1 的表达水平的升高,而在 Nrf2 基因敲除的前列腺癌细胞中并没有相同的现象。为此,本研究对实验组小鼠进行了特异性小干扰 RNA 转染,抑制 EZH2 的表达水平,进而观察 EZH2 下调对 Nrf2-ARE 通路的影响。结果显示,模型组小鼠体内 Nrf2-ARE 通路水平上升,实验组小鼠在抑制 EZH2 后,其 Nrf2-ARE 通路表达水平进一步上升,且小鼠肝损伤程度有所缓解。提示 EZH2 对 Nrf2-ARE 通路具有一定抑制作用,通过抑制小鼠体内 EZH2 表达水平可上调 Nrf2-ARE 通路,提高机体抗氧化还原能力,进而改善 ADLI。

最后本研究对各组小鼠肝组织中 Nrf2 启动子区 H3K27me3 水平进行检测,结果发现模型组较空白对照组有所降低,在对实验组进行转染抑制后 H3K27me3 水平进一步降低。结果提示 EZH2 可能是通过在 Nrf2 启动子区募集 H3K27me3 来调控

Nrf2-ARE 通路,进而影响肝损伤过程。

综上所述,以上研究结果证明了 EZH2 在 ADLI 中存在表达下调,通过抑制 EZH2 表达可改善肝损伤程度,EZH2 对 ADLI 的影响可能是通过在 Nrf2 启动子区进行 H3K27me3 修饰,进而通过调控 Nrf2-ARE 抗氧化应激通路来实现的,本研究为结核病的预防与治疗提供了理论基础,具有一定的临床意义。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2019 [R]. Geneva: WHO,2019.
- [2] Verma A K, Yadav A, Singh S V, et al. Isoniazid induces apoptosis: role of oxidative stress and inhibition of nuclear translocation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) [J]. *Life Sci*, 2018, 199: 23-33.
- [3] Nahid P, Dorman S E, Alipanah N, et al. Official american thoracic society/centers for disease control and prevention/infectious diseases society of america clinical practice guidelines: treatment of drug-susceptible tuberculosis [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63: e147-95.
- [4] Hardy T, Mann D A. Epigenetics in liver disease: from biology to therapeutics [J]. *Gut*, 2016, 65: 1895-905.
- [5] Page A, Paoli P, Moran S E, et al. Hepatic stellate cell transdifferentiation involves genome-wide remodeling of the DNA methylation landscape [J]. *J Hepatol*, 2016, 64: 661-73.
- [6] Kaundal B, Srivastava A K, Dev A, et al. Nanoformulation of EPZ011989 attenuates EZH2-c-Myb epigenetic interaction by proteasomal degradation in acute myeloid leukemia [J]. *Mol Pharm*, 2020, 17: 604-21.
- [7] Li Z, Xu L, Tang N, et al. The polycomb group protein EZH2 inhibits lung cancer cell growth by repressing the transcription factor Nrf2 [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588: 3000-7.
- [8] 朱凌妍. 组蛋白乙酰化在异烟肼致大鼠肝损伤中的作用研究 [D]. 唐山: 华北理工大学, 2016.
- [9] 胡锡琪. 药物性肝损伤组织病理学评分再探讨 [J]. *肝脏*, 2014, 19(8): 577-9.
- [10] Frapporti A, Miró P C, Armaiz O, et al. The polycomb protein ezh1 mediates H3K9 and H3K27 methylation to repress transposable elements in paramecium [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 2710.
- [11] 张梓, 夏莎莎, 夏瑞祥. EZH2 抑制剂 DZNep 对 NK/T 淋巴瘤细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(6): 851-5.
- [12] Hapugaswatta H, Amarasena P, Premaratna R, et al. Differential expression of microRNA, miR-150 and enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in peripheral blood cells as early prognostic markers of severe forms of dengue [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27: 25.
- [13] Vella S, Gnani D, Crudele A, et al. EZH2 down-regulation exacerbates lipid accumulation and inflammation *in vitro* and *in vivo* NAFLD [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 24154-68.
- [14] Wheeler M A, Clark I C, Tjon E C, et al. MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation [J]. *Nature*, 2020, 578: 593-9.
- [15] Li W J, Su Z Y, Guo Y, et al. Curcumin derivative epigenetically reactivates Nrf2 antioxidative stress signaling in mouse prostate cancer TRAMP C1 cells [J]. *Chem Res Toxicol*, 2018, 31: 88-96.
- [16] Yang J, Wu R Y, Li W J, et al. The triterpenoid corosolic acid blocks transformation and epigenetically reactivates Nrf2 in TRAMP-C1 prostate cells [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57: 512-21.

Effects of EZH2 on Nrf2-are antioxidant reduction pathway in mice with anti-tuberculous drug-induced liver injury

Jia Yunpeng, Xu Jie, Ma Yu, et al

(School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210)

Abstract Objective To investigate the regulatory mechanism of zeste gene enhancer human homologue 2 (EZH2) on nrf2-are REDOX pathway in drosophila melanogaster in anti-tuberculous drug-induced liver injury (ADLI). **Methods** 32 kunming mice were randomly divided into four groups: blank control group, model group, experimental group and negative control group. The levels of ALT and AST in serum liver function indexes were detected by microporous plate method. Histopathological changes of liver were observed by HE staining. MRNA and protein levels of EZH2, nuclear factor e2-related factor 2 (Nrf2), NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and heme oxygenase 1 (HO-1) were detected by real-time quantitative fluorescence PCR, ELISA and Western blot, respectively. **Results** The serum ALT and AST levels of mice in the model group were higher than those in the blank control group (all $P < 0.05$), while those in the experimental group were lower than those in the model group (all $P < 0.05$). Compared with the blank control group, the liver histopathological results of mice in the model group showed obvious injury, while the liver injury of mice in the experimental group was alleviated. Compared with the

多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷ 抑制心肌分化的细胞实验研究

许 耿^{1,2}, 朱金改¹, 喻博识¹, 韩树萍¹, 顾海涛², 余章斌¹

摘要 目的 前期发现多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷可在动物水平显著抑制胚胎期心脏发育。该研究拟进一步在 P19 细胞系水平探究³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷抑制心肌分化的作用和机制。**方法** 利用 PepDraw Tool、Uniprot 和 ProtParam 在线生物信息学分析网站,对多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷的结构、保守性和理化性质进行生物信息学分析。在荧光显微镜下观察 FITC 标记的多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷进入 P19 细胞的情况。通过倒置显微镜观察多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷对 P19 细胞分化的影响。实时定量 PCR 及蛋白质免疫印迹法检测多肽对心肌分化标志基因肌钙蛋白 cTnT 和转录因子 GATA4 表达的影响。实时定量 PCR 检测多肽对 Notch1 信号通路关键分子 Notch1 和下游 Hey1 及 Hey2 的影响。**结果** 生物信息学分析结果显示多肽位于其前体蛋白 Talin 的 301~307 氨基酸位点,其分子量小、结构稳定、亲脂性高,且前体蛋白保守性高。荧光显微镜下可见 FITC 标记的多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷可以穿过细胞膜进入 P19 细胞内。与对照组比较,多肽组细胞部分坏死,生长形态紊乱,细胞厚薄不一。实时定量 PCR 与蛋白质免疫印迹法检测显示,与对照组比较,多肽组的分化相关基因 GATA4 及 cTnT 的 mRNA 及蛋白表达量均有不同程度下降。实时定量 PCR 检测显示,与对照组比较,多肽组 Notch1 通路的相关

基因 Notch1、Hey1 及 Hey2 的 mRNA 表达均有不同程度下降。**结论** 多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷可能是通过抑制 Notch1 通路关键因子的表达发挥抑制心肌分化的生物功能。

关键词 法洛四联症; 心肌分化; 内源性多肽; Notch1 信号通路; P19 细胞系

中图分类号 R 331.3+6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0238-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.013

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)由各种因素导致的胚胎时期心脏和血管发育障碍,造成心脏形态、功能及病理生理异常^[1-2]。心脏发育是一个时空调控的过程,包括对基因表达和信号通路的精确控制,如 Notch 信号通路,以及一系列重要的形态变化,而心肌分化是心脏发育的一个重要组成部分,心肌分化的异常往往是导致 CHD 发生的关键^[3]。多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷是从法洛四联症流产胎儿心肌组织中发现的一条生物学活性肽^[4]。前期的研究揭示该多肽可以抑制斑马鱼的心脏发育,导致斑马鱼胚胎期心脏的发育及功能异常^[5],但其在细胞水平抑制心肌分化的影响及机制尚无报道。P19 细胞是来源于小鼠畸胎瘤中的多功能干细胞,具有自我复制能力和分化潜能,是研究胚胎期心肌分化的良好的细胞模型^[6-7]。因此,该研究拟在 P19 细胞水平检测多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷对心肌细胞分化的影响,并初步探究其发挥功能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

2020-08-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81870240); 南京市卫生科技发展专项资金杰出青年项目(编号: JQX18010)

作者单位: ¹ 南京医科大学附属妇产医院(南京市妇幼保健院) 儿科, 南京 210004

² 南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院) 小儿心胸外科, 南京 210029

作者简介: 许 耿,男,硕士研究生;

余章斌,男,副主任医师,研究生导师,责任作者, E-mail: zhangbinyu@njmu.edu.cn

blank control group, the mRNA and protein levels of EZH2 decreased in the model group ($P < 0.05$), and further decreased in the experimental group ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the mRNA and protein levels of Nrf2, NQO1 and HO-1 increased in the model group ($P < 0.05$), and further increased in the experimental group ($P < 0.05$). Chip results showed that the level of H3K27me3 in the model group was lower than that in the blank control group ($P < 0.05$), and further decreased in the experimental group ($P < 0.05$). **Conclusion** The down-regulation of EZH2 expression in ADLI and the inhibition of EZH2 expression can alleviate the degree of liver injury. The effect of EZH2 on ADLI may be realized through the modification of H3K27me3 in the Nrf2 promoter region, and then through the regulation of Nrf2-ARE antioxidant stress pathway.

Key words anti-tuberculosis drug liver injury; EZH2; Nrf2-ARE pathways; H3K27me3