

网络出版时间:2016-3-8 8:29:01 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160308.0829.008.html

组蛋白去乙酰化酶在酒精致小鼠肝细胞损伤中表达的实验研究

李 星^{1,2,3}, 黄 成^{1,2,3}, 孟晓明^{1,2,3}, 李 俊^{1,2,3}

摘要 目的 研究组蛋白去乙酰化酶(HDACs)在酒精致小鼠肝细胞损伤中的表达情况。方法 以体外培养的小鼠正常肝细胞株 AML12 为研究对象, MTT 法测定不同浓度和时间点酒精对 AML12 细胞的抑制作用; 流式细胞术检测酒精对 AML12 细胞凋亡的影响; 实时定量 PCR 法检测酒精致 AML12 细胞损伤中 HDACs 的 mRNA 表达水平。结果 酒精浓度 100 mmol/L 刺激 24 h, AML12 细胞的存活率为 84%, 可以明显抑制小鼠正常肝细胞 AML12 的增殖 ($P < 0.05$); 酒精浓度 100 mmol/L 刺激 24 h, AML12 细胞的死亡率为 16%, 可以增加 AML12 细胞的凋亡 ($P < 0.05$)。在酒精致 AML12 细胞损伤中, HDAC1、2、3、4、5、6、7、8 的 mRNA 表达水平均下降 ($P < 0.05$), HDAC9 的 mRNA 表达水平上升 ($P < 0.05$), HDAC10 的 mRNA 表达变化差异无统计学意义。结论 在酒精致肝细胞损伤中, HDACs 的表达水平发生不同程度的变化, 提示和 HDACs 相关的表观修饰可能参与酒精性肝损伤的发生发展。

关键词 组蛋白去乙酰化酶; 酒精性肝损伤; 表观修饰

中图分类号 R 96

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0477-04

过量饮酒尤其是短期内大量酗酒可导致酒精在肝内蓄积, 使肝细胞发生不同程度的损伤和凋亡, 最终导致酒精性肝病的发生发展^[1-2]。文献^[3]显示, 酒精可以改变包括组蛋白和 DNA 变化的染色质修饰以及转录后变化的表观修饰内容, 提示表观遗传学在酒精性肝损伤的发生发展中充当了十分重要的角色。组蛋白乙酰化是重要的表观修饰形式, 由组蛋白乙酰化酶 (histone acetyltransferases, HATs) 和组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 这两个功能相互拮抗的蛋白酶家族共同调节。其中, HDACs 有 4 大类^[4], 分别是 Class I HDACs (HDAC1、

2、3、8), Class II HDACs (HDAC 4、5、6、7、9、10), Class III HDACs (SIRT 1 ~ 7), Class IV HDACs (HDAC11), 目前实验研究大多集中在第一和第二家族。该研究旨在探索 HDACs 第一和第二家族在酒精致小鼠肝细胞 (AML12) 损伤中的 mRNA 表达情况, 为后续研究提供思路。

1 材料与方 法

1.1 材料 小鼠正常肝细胞来源的 AML12 细胞系购自美国 ATCC 细胞库; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 无水乙醇 (分析纯) 购自上海苏懿化学试剂公司; MTT 粉、DMSO 均购自美国 Sigma 公司; 凋亡试剂盒购自上海贝博生物; TRIzol、寡核苷酸引物购自美国 Invitrogen 公司; SYBR Green Real-time PCR Master Mix 购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 仪器 NAPCO-6100 型细胞培养箱 (美国杜邦公司); MK3 型酶标仪 (荷兰雷勃公司); Coulter epics XL-MCL 型流式细胞仪 (美国 Beckman Counter 公司); ND2000 超微量核酸蛋白测定仪、实时定量 PCR 仪 (美国 Thermo Scientific 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养 小鼠正常肝细胞株 AML12, 由 DMEM/F-12 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素) 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养, 2 d 换液 1 次。实验中所用细胞均处于对数生长期。

1.3.2 MTT 法检测 AML12 细胞存活率, 选择损伤 AML12 细胞的乙醇浓度 取对数生长期 AML12 细胞, 经胰酶消化后, 用 DMEM/F-12 培养基吹打配成 1×10^5 /ml 单细胞悬液, 加入 96 孔培养板, 每孔 100 μl。待细胞完全贴壁后, 实验孔分别加入 100 μl 含乙醇的完全 DMEM 培养液, 致乙醇终浓度分别为 50、100、200、300、400、500 mmol/L, 正常对照孔则加入 100 μl 不含乙醇的完全 DMEM 培养液, 空白对照孔 (不含细胞) 加入由 100 μl DMEM/F-12 培养基和 100 μl 完全 DMEM 培养液组成的复合液, 用于 MTT 测定调零。每组设置至少 5 个复孔。培养箱中分别孵育 12、24、48 h 后, 加入 20 μl MTT (5 g/L), 继续

2015-12-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81473268、81273526); 安徽省科技攻关计划项目 (编号: 1301042212); 安徽省自然科学基金 (编号: 1308085MH145)

作者单位: 安徽医科大学¹ 药学院、² 肝病研究所, 合肥 230032

³ 安徽省创新药物产业共性研究院, 合肥 230032

作者简介: 李 星, 女, 硕士研究生;

李 俊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

培养4 h后,去上清液,加入 150 μl DMSO,在摇床上振动摇匀,在酶标仪 490 nm 波长下测定各孔的吸光度(absorbance, A)值。实验重复 3 次。按下式计算肝细胞的存活率:存活率(%) = (实验组 $A_{490\text{ nm}}$ - 空白对照组 $A_{490\text{ nm}}$) / (对照组 $A_{490\text{ nm}}$ - 空白对照组 $A_{490\text{ nm}}$) × 100%。以此来确定损伤 AML12 细胞的乙醇浓度。

1.3.3 流式细胞术检测酒精对小鼠正常肝细胞 AML12 凋亡的影响 对处于对数生长期的 AML12 细胞,实验组给予 100 mmol/L 酒精刺激 24 h,对照组则不加任何刺激,24 h 后,用胰酶消化细胞,并离心收集细胞(2 ~ 8 °C, 2 000 r/min 离心 5 min),用冷 PBS 洗涤细胞两次(2 ~ 8 °C, 2 000 r/min 离心 5 min),最后一次洗涤应将 PBS 尽量吸干。用 400 μl 1 × Annexin V 结合液悬浮细胞,在细胞悬浮液中加入 5 μl Annexin V - FITC 染色液,轻轻混匀后于 2 ~ 8 °C 避光条件下孵育 15 min。15 min 后加入 10 μl PI 染色液后轻轻混匀于 2 ~ 8 °C 避光条件下孵育 5 min。立即用流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测 HDACs 第一和第二家族目的基因 mRNA 的表达 在上述筛选出的浓度点和时间点下,用乙醇刺激 AML12 细胞,分别称为对照组和实验组,TRIzol 一步法抽提上述各组细胞总 RNA,采用 ND2000 超微量核酸测定仪测定 RNA 260 nm 及 280 nm 处 A 值,以检测所提取 RNA 样品的纯度和浓度。将提取的总 RNA 按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA,产物于 - 20 °C 保存。采用荧光定量 PCR 仪,以 β-actin 为内参进行 PCR 扩增,各基因引物序列见表 1。反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,60 °C 延伸 30 s,40 个循环,60 °C 延伸 10 min。利用计算机软件(PikoReal Software 2.2)分析各反应的荧光强度。目的基因 mRNA 相对表达量 = 目的基因相对定量 / 内参相对定量,实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 所有结果以误差线表示,采用 SPSS 17.0 软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 乙醇对小鼠正常肝细胞 AML12 增殖的影响

取对数生长期的 AML12 细胞,分别于不同的时间点加入不同浓度的乙醇,以空白对照孔为调零孔,MTT 法测定 $A_{490\text{ nm}}$ 值。当乙醇浓度较低 (< 50 mmol/L),作用时间 12、24、48 h 时对 AML12 细胞均

表 1 实时定量 PCR mRNA 引物序列

名称	引物序列(5' - 3')
HDAC1	F: TGATGCTGGGAGGAGCTG R: GTTGAAGGGCTGATGTG
HDAC2	F: TGACAAACCAGAACACTCCAGAATA R: GAATAGCTTGCATTTCACACCAG
HDAC3	F: AGCCTTAATGCCTTCAACGCTGG R: TCATTGACATAGCAGAAGCCAGAGG
HDAC4	F: GCGAGCACAGAGCGTGAAGATGAAG R: AGACGGGTGCTTGTAGGAGG
HDAC5	F: GAGCATGAAGCCCCACAGAC R: TCACACTTCCGAGCAGACCAG
HDAC6	F: TGGTGTATGTCTGTCTAGGCTTA R: GCACTGTGCTCTGGGATTTAGT
HDAC7	F: TCCAGAACCCTCTTCCCCA R: GCATCACCGAGCTCATACCAGC
HDAC8	F: CTGATTGACGGGAAGTGTAAAGTAG R: CAGCATCATTGAGATAACAGAAACC
HDAC9	F: TCCATTACACCCTCAGTCTCCTTTG R: GCTGCTGGTATGTTTCTGCTTCTC
HDAC10	F: TTGTGAGGCATCAGAGGAAGAGTTG R: GTGAAAGTGTCCGGGTGAAAGT
β-actin	F: TGACAGGGAATCGTGCCTGAC R: GCTCGTTGCCAATAGTATGACC

不表现出明显的抑制作用;随着浓度的升高和作用时间的不断延长,酒精对 AML12 细胞表现出明显的抑制作用 ($F_{12\text{ h}} = 113.165$ 、 $F_{24\text{ h}} = 137.203$ 、 $F_{48\text{ h}} = 266.997$, $P < 0.05$),在酒精浓度为 100 mmol/L,刺激时间为 24 h 时,AML12 细胞的存活率为 84%。见图 1。

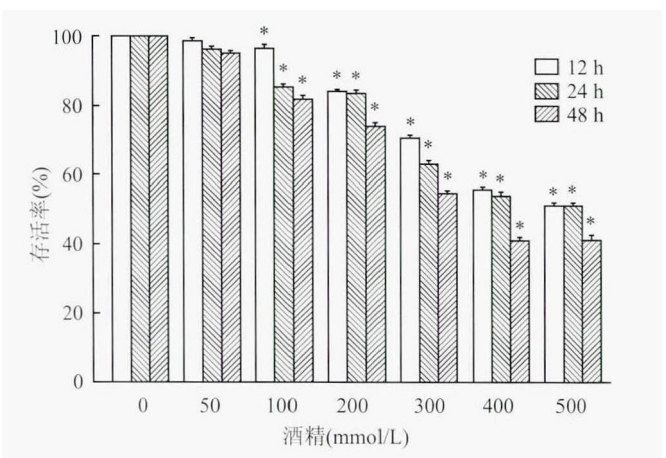


图 1 乙醇对小鼠正常肝细胞 AML12 增殖的影响
与 0 mmol/L 比较: * $P < 0.05$

2.2 乙醇对小鼠正常肝细胞 AML12 凋亡的影响

取对数生长期的 AML12 细胞,实验组给予酒精(100 mmol/L, 24 h)刺激,对照组不加任何刺激。与对照组比较,实验组 AML12 细胞的凋亡率明显大于

对照组,因此,本研究采用乙醇 100 mmol/L、刺激时间 24 h 来模拟体外损伤 AML12 细胞模型 ($P < 0.05$),见图 2。

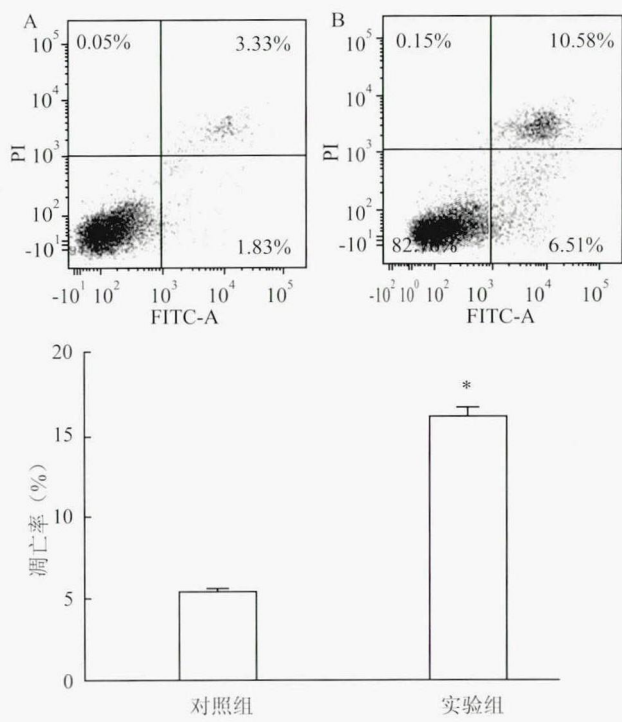


图 2 乙醇对小鼠正常肝细胞 AML12 凋亡的影响
A: 对照组; B: 实验组; *与对照组比较: $P < 0.05$

2.3 酒精性肝损伤细胞模型中 HDACs 目的基因 mRNA 的表达水平变化 在酒精性肝损伤细胞模型中, HDAC1、2、3、4、5、6、7、8 的 mRNA 表达水平均下降 ($P < 0.05$), HDAC9 的 mRNA 表达水平上升 ($P < 0.05$), HDAC10 的 mRNA 表达与对照组比较无明显变化,见图 3。

3 讨论

肝脏是乙醇代谢最主要的器官,大量的乙醇摄入可导致肝脏脂质过氧化增加,进而导致肝细胞损伤。同时,乙醇进入机体后,被乙醇脱氢酶等酶类进一步氧化代谢为乙醛和乙酸盐,进而导致三羧酸循环障碍和脂肪酸氧化减弱而影响脂肪代谢,最终可导致肝细胞空泡变形^[5]。此外,进入机体的乙醇可间接激活枯否细胞,使其分泌大量细胞因子,如肿瘤坏死因子- α 、白介素-1 和白介素-6 等。这些细胞因子的产生也对酒精性肝损伤的形成有重要的意义,可引起肝细胞进一步凋亡、坏死和炎症加重^[6]。

对于含有组蛋白或不含组蛋白的基因可逆的乙酰化作用是表观修饰中的一种,对于基因表达的

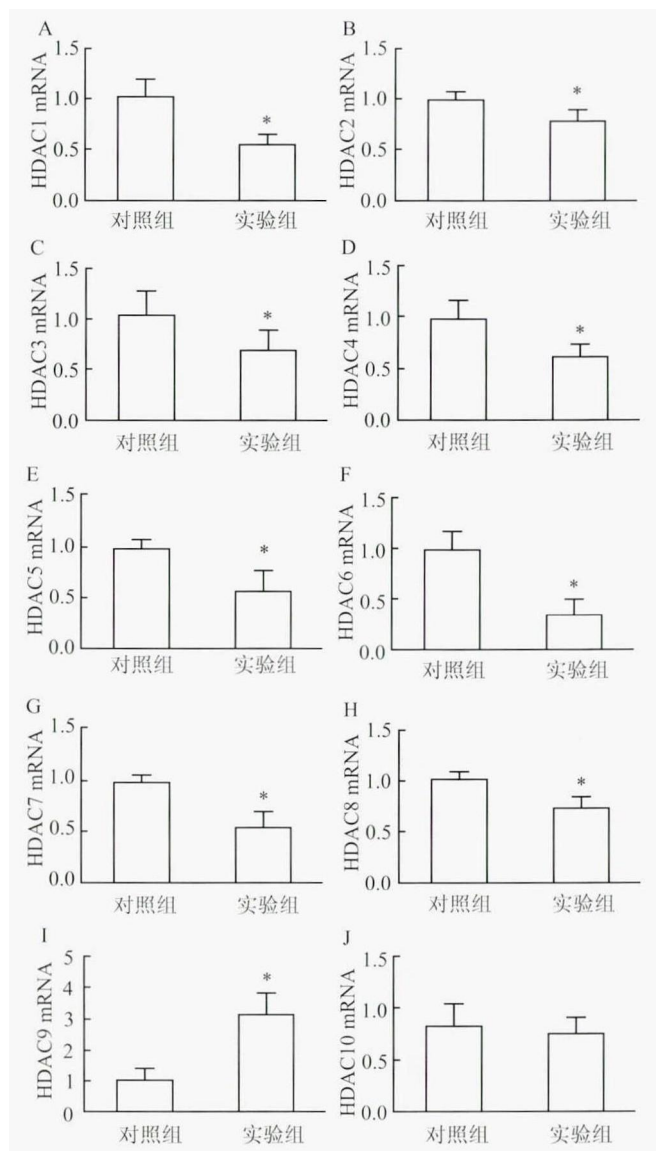


图 3 酒精性肝损伤细胞模型中 HDACs 目的基因 mRNA 表达水平变化

A~J: HDAC1、2、3、4、5、6、7、8、9、10; 与对照组比较: $P < 0.05$

调控有十分重要的作用。而这一过程是在 HATs 和 HDACs 的共同调节下完成。在近些年的研究^[7]中, HDACs 对酒精引起的肝损伤以及酒精性肝病的影响越来越瞩目。研究^[8-10]表明,酒精的摄入可引起众多肝核和非肝核蛋白的高乙酰化,提示和组蛋白乙酰化相关的表观修饰可能参与了酒精性肝损伤的发生发展。本研究通过构建体外酒精性肝损伤模型,运用实时荧光定量 PCR 法检测酒精性肝损伤细胞模型中 HDACs 的 mRNA 表达情况。实验结果显示,乙醇的摄入可导致 HDAC Class I (HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8), HDAC Class II (HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7) 的 mRNA 表达抑制, HDAC Class II (HDAC9) 的 mRNA 表达增加,提示酒

精可扰乱肝内 HDACs 的正常调节机制。这一过程可能是由于酒精代谢引起的肝脏炎症和氧化应激从而导致“转录机器复合物”的结合改变以及不正常的基因表达。

综上所述,在酒精致肝细胞损伤中,HDACs 的表达水平发生不同程度的变化,提示 HDACs 的调节失衡可能参与酒精性肝损伤的发生发展,但具体机制仍不清楚。进一步研究针对各个 HDACs 的具体功能和特定靶点,而选择性基因敲除小鼠的运用将对于鉴别各个 HDACs 的功能有很大益处。

参考文献

- [1] 肖凤霞,林 励,马艳艳,等. 毛橘红总黄酮对酒精性肝损伤大鼠炎症细胞因子的影响[J]. 广州中医药大学学报,2011,28(4): 396 - 401.
- [2] Zhang Y, Venugopal S K, He S, et al. Ethanol induces apoptosis in hepatocytes by a pathway involving novel protein kinase C isoforms[J]. Cell Signal, 2007, 19(11): 2339 - 50.
- [3] Mandrekar P. Epigenetic regulation in alcoholic liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(20): 2456 - 64.
- [4] Martin T A, Jayanthi S, McCoy M T, et al. Methamphetamine causes differential alterations in gene expression and patterns of histone acetylation/hypoacetylation in the rat nucleus accumbens [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34236.
- [5] Choi J S, Yoon T J, Kang K R, et al. Glycoprotein isolated from Acanthopanax senticosus protects against hepatotoxicity induced by acute and chronic alcohol treatment[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(2): 306 - 14.
- [6] 陈 震,吕雄文,李 俊,等. 咖啡因对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报,2009,44(3): 359 - 62.
- [7] Kirpich I, Ghare S, Zhang J, et al. Binge alcohol-induced microvesicular liver steatosis and injury are associated with down-regulation of hepatic Hdac 1, 7, 9, 10, 11 and up-regulation of Hdac 3[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2012, 36(9): 1578 - 86.
- [8] Shepard B D, Tuma P L. Alcohol-induced protein hyperacetylation: mechanisms and consequences[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(10): 1219 - 30.
- [9] Kim J S, Shukla S D. Acute *in vivo* effect of ethanol (binge drinking) on histone H3 modifications in rat tissues[J]. Alcohol Alcohol, 2006, 41(2): 126 - 32.
- [10] Park P H, Miller R, Shukla S D. Acetylation of histone H3 at lysine 9 by ethanol in rat hepatocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306(2): 501 - 4.

Experimental study of histone deacetylases in alcohol-induced liver cell injury in mice

Li Xing^{1,2,3}, Huang Cheng^{1,2,3}, Meng Xiaoming^{1,2,3}, et al

(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, ²Anhui Medical University Institute of Liver Disease,

³Anhui Institute of Innovative Drugs, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression changes of histone deacetylases (HDACs) levels in alcohol-induced liver cell injury in mice. **Methods** Mice liver cell line (AML12) was used as the research object *in vitro*, to determine alcohol inhibitory effect on AML12 cells at different concentrations and time points by using MTT method; flow cytometry analysis was used to determine alcohol induced apoptosis effect on AML12 cells. Real-time quantitative PCR analysis was used to detect mRNA expression levels of HDACs in alcohol-induced liver cell injury model. **Results** Upon the stimulation of alcohol concentration at 100 mmol/L for 24 h, the survival rate of AML12 cell was 84%, indicating its significant role in inhibiting the proliferation of liver cell line (AML12) ($P < 0.05$); furthermore, the apoptosis rate of AML12 cells was 16%, showing it could increase the AML12 cell apoptosis ($P < 0.05$). Binge alcohol exposure induced liver cell injury and eventually resulted in deregulation of hepatic HDACs mRNA expressions. It could be observed visually that HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mRNA expressions were significantly down-regulated and HDAC9 mRNA expression was up-regulated ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in HDAC10 mRNA expression than control. **Conclusion** In alcohol-induced liver cell injury model, alcohol consumption affects HDACs mRNA levels and therefore, we speculate that histone deacetylases-mediated epigenetic modifications may play an important role in the pathogenesis of alcohol-induced hepatic injury.

Key words histone deacetylases; alcohol-induced liver injury; epigenetic modification