文章编号:1000-5404(2010)14-1491-04

论著

乙醇及其代谢产物对心肌祖细胞的毒性及H3K9表突变作用

钟立霖[1],朱 静[2],吴晓芸[1],陈国珍[1],孙慧超[1],杨雪芳[1],田 杰[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:心脏中心[1],儿科研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨乙醇及其代谢产物对心肌祖细胞的毒性作用及H3K9表突变作用。**方法** 以心肌祖细胞株为研究对象,分别用不同剂量乙醇(200、100、50 mmol/L)、乙醛(16、12、8、4 mmol/L)和乙酸(16、12、8、4 mmol/L)处理。应用MTT实验筛选出乙醇及其代谢产物的干预浓度,Western blot检测组蛋白H3K9乙酰化作用,实时定量PCR检测心脏发育相关基因GATA4、Mef2c、Tbx5 mRNA表达量的变化。**结果** MTT结果显示低浓度组50 mmol/L乙醇、4 mmol/L乙醛、4 mmol/L乙酸的细胞活力与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),不影响心肌祖细胞增殖;高浓度组200 mmol/L乙醇、12 mmol/L乙醛、16 mmol/L乙酸对心肌祖细胞抑制率分别为31.5%、36.0%、32.1%,抑制细胞增殖($P<0.05$)。低浓度组乙醇、乙酸分别使组蛋白H3K9乙酰化水平升高2.4、2.2倍($P<0.05$)。心脏发育相关基因表达无明显变化($P>0.05$);高浓度组乙醇、乙酸分别使组蛋白H3K9乙酰化水平升高5.3、5.6倍,同时心脏发育相关基因GATA4、Mef2c表达均增加,与对照组及相应低浓度组比较均有统计学差异($P<0.05$);乙醛则无论低浓度还是高浓度对组蛋白H3K9乙酰化水平及基因表达均无明显影响($P>0.05$)。**结论** 高浓度的乙醇及其代谢产物对心肌祖细胞均有毒性作用,而乙醇及乙酸具有组蛋白H3K9表突变作用,可能为酒精致先心病发病机制之一。

[关键词] 心肌祖细胞;乙醇;代谢产物;H3K9;表突变;乙酰化;心脏发育相关基因
[中图法分类号] R322.11;R595.6;R394.3 **[文献标志码]** A

Ethanol and its metabolites induce cytotoxicity and H3K9 epimutation in cardiac progenitor cells

Zhong Lilin[1], Zhu Jing[2], Wu Xiaoyun[1], Chen Guozhen[1], Sun Huichao[1], Yang Xuefang[1], Tian Jie[1] ([1]Department of Cardiology, [2]Pediatric Research Institute, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the cytotoxicity and H3K9 epimutation induced by ethanol and its metabolites to cardiac progenitor cells. **Methods** Cardiac progenitor cells (1×10^5) were treated with ethanol at 200, 100 or 50 mmol/L respectively, and acetaldehyde or acetic acid at 16, 12, 8 or 4 mmol/L respectively for 24 h. MTT assay was used to select the intervention concentrations, Western blot analysis to detect the acetylation of histone H3K9, and real-time PCR to measure the expressions of heart development-related genes GATA4, Mef2c and Tbx5. **Results** MTT assay showed that low concentration groups [50 mmol/L ethanol (0.368 ± 0.028), 4 mmol/L acetaldehyde (0.336 ± 0.040) and 4 mmol/L acetic acid (0.359 ± 0.014)] had no effect on the proliferation of cells compared with control (0.358 ± 0.066, $P>0.05$), but high concentration groups [200 mmol/L ethanol (0.245 ± 0.042), 12 mmol/L acetaldehyde (0.220 ± 0.017) and 16 mmol/L acetic acid (0.243 ± 0.024)] were greatly affected in the cell proliferation by 30% ($P<0.05$). Low concentration groups of ethanol and acetic acid increased the acetylation of H3K9 by 2.4- and 2.2-fold respectively ($P<0.05$), but had no effect on the expressions of heart development-related genes ($P>0.05$). High concentration groups of ethanol and acetic acid showed a 5.3- and 5.6-fold elevation in the acetylation of H3K9, and the expression of GATA4 was increased to 1.767 ± 0.173 and 1.518 ± 0.133 respectively, that of Mef2c increased to 3.301 ± 0.465 and 1.875 ± 0.587 as compared with control or the corresponding low concentration groups ($P<0.05$). Both 4 or 12 mmol/L acetaldehyde had no obvious effect on the acetylation of H3K9 and the expressions of heart development-related genes ($P>0.05$). **Conclusion** High concentrations of ethanol and its metabolites have a cytotoxicity effect on cardiac progenitor cells. Ethanol and acetic acid in-

[基金项目] 国家自然科学基金(30672266);教育部高校博士点基金(20060631004)
[通信作者] 田 杰,电话:(023)68486767,E-mail:jietian@cqmu.edu.cn

duce H3K9 epimutation, which may be one of the pathogenesis of congenital heart diseases caused by alcohol.

[Key words] cardiac progenitor cells; ethanol; metabolite; H3K9; epimutation; acetylation; heart development-related genes

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30672266) and the Research Fund for Doctoral Program of Colleges and Universities of Ministry of Education(20060631004). Corresponding author: Tian Jie, Tel:86-23-68486767, E-mail: jietian@cqmu.edu.cn

酒精是生活中常见的致畸剂之一，孕期过量饮酒将导致包括先天性心脏病(congenital heart disease，简称先心病)在内的各种先天畸形[1,2]，但酒精致先心病的发病机制目前仍不清楚。我们前期通过研究干细胞向心肌细胞分化过程与组蛋白乙酰化修饰染色质重塑的内在联系，发现组蛋白乙酰化修饰失衡可影响心脏发育相关基因表达，从而引起间充质干细胞向心肌细胞分化障碍[3]。提示组蛋白乙酰化修饰失衡可能与先心病发生有关。有研究显示酒精具有明确的表观遗传效应，选择性引起肝脏细胞中组蛋白H3第9位赖氨酸(H3K9)乙酰化修饰失衡[4,5]。那么酒精导致的先心病是否与其引起的H3K9乙酰化修饰失衡进而影响心脏发育相关基因表达有关？最近研究显示心肌祖细胞能在人类胎儿中存在数周，这说明它在人类心脏形成过程中发挥着重要作用[6]。本实验拟通过酒精及其代谢产物对心肌祖细胞的研究，将有助于揭示先心病的发病机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

DMEM高糖培养基(Thermo公司，美国)；胎牛血清(PAA公司，澳大利亚)；抗H3K9鼠多克隆抗体(abcam，ab61231，英国)；工作浓度1∶1 000；抗β-actin鼠单克隆抗体(abcam，ab6276，英国)；工作浓度1∶2 000；山羊抗兔及山羊抗小鼠带HRP标记的IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)；核蛋白提取试剂盒(ActiveMotif公司，美国)，BCA蛋白测定试剂盒(Pierce公司，美国)，RNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)；逆转录试剂盒(TaKaRa，日本)，实时定量PCR试剂盒(天根生化科技有限公司)；MTT(Ameresco公司，美国)；无水乙醇，40%乙醛，冰醋酸均为分析醇(成都市科龙化工试剂厂)；酶标仪(Thermo公司，美国)。

心肌祖细胞株由美国芝加哥大学骨肿瘤分子生物学实验室惠赠。

1.2 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色实验

将心肌祖细胞悬液密度调整为1×10^5/ml，每孔200 μl接种于96孔板，24 h后更换分别含乙醇、乙醛或乙酸的培养液，每个浓度组4个复孔，乙醇的剂量设计为200、100、50 mmol/L，乙醛及乙酸的剂量均设计为16、12、8、4 mmol/L，对照组为不加药的10%胎牛血清的DMEM高糖培养基，继续培养24 h，在最后4 h每孔加入20 μl MTT(5 mg/ml)，37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育4 h，弃上层液体，每孔滴加150 μl二甲亚砜，振荡10 min后，用酶标仪测定490 nm的光密度值[$D(490)$]。采用公式计算抑制率。

抑制率=[$D(490)_{对照组}-D(490)_{实验组}$]/$D(490)_{对照组}\times100\%$

1.3 心肌祖细胞培养及处理

心肌祖细胞用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养，待细胞已贴满瓶底80%左右，以1∶3比例传代。根据我们细胞毒性实验结果，以不影响心肌祖细胞增殖的50 mmol/L乙醇、4 mmol/L乙醛、4 mmol/L乙酸为低浓度组，以对心肌祖细胞抑制率为30%左右的200 mmol/L乙醇、12 mmol/L乙醛、16 mmol/L乙酸为高浓度组，干预心肌祖细胞24 h，对照组为不加药的含10%胎牛血清的培养基培养24 h。

1.4 Western blot检测

心肌祖细胞经上述处理24 h后提取核蛋白，BCA蛋白浓度测定后调整上样量为100 μg，经15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至PVDF膜上，一抗(1∶1 000稀释)封闭后4 ℃过夜，二抗(1∶2 000稀释)室温孵育90 min后化学发光成像，以乙酰化H3K9/β-actin(灰度值)作为蛋白的相对表达量。

1.5 实时定量PCR检测

心肌祖细胞经上述处理24 h后迅速提取RNA，常规逆转录得到cDNA作为模板进行实时定量PCR，心脏发育相关基因引物系列为：GATA4上游：5′-CCCTCCCGCACGATTTCT-3′，下游：5′-AGAGGCCCAACTCGCTCAA-3′，产物长度为133 bp，Mef2c上游：5′-GCGCAGGGAATGGATACGG-3′，下游：5′-TGCCAGGTGGGATAAGACG-3′，产物长度为156 bp，Tbx5上游：5′-CCAAAGACAGGTCTTGCGATTCG-3′，下游：5′-TTCTCCTCCCTGCCTTGGTGAT-3′，产物长度为192 bp，β-actin上游：5′-CACACCCGCCACCAGTTCG-3′，下游：5′-GTCCTTCTG ACCCATTCCCACC-3′，产物长度为174 bp。以上基因的扩增条件均为95 ℃ 2 min后，变性95 ℃ 10 s，退火60 ℃ 15 s，延伸68 ℃ 20 s，共40个循环65 ℃ 5 s 95 ℃熔解。以$2^{-\triangle\triangle Ct}$作为RNA量化数值，其中$\triangle\triangle Ct=\triangle Ct_{实验组}-\triangle Ct_{对照组}$，$\triangle Ct=Ct_{目的基因}-Ct_{\beta\text{-actin}}$。

1.6 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件进行统计学分析，数据以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用Dunnett t法。

2 结果

2.1 乙醇及其代谢产物对心肌祖细胞增殖的影响

以$D(490)$表示细胞活力，乙醇200、100 mmol/L组抑制细胞增殖($P<0.01$)，其中200 mmol/L时抑制率为31.5%，50 mmol/L组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。乙醛浓度在16、12、8 mmol/L时抑制细胞增殖($P<0.01$)，12 mmol/L时对细胞的抑制率为36.0%，4 mmol/L浓度时对细胞增殖无明显影响($P>0.05$)。乙酸浓度在16、12、8 mmol/L时抑制细胞增殖($P<0.05$)，4 mmol/L时对细胞增殖无明显影响($P>0.05$)，

其中 16 mmol/L 时对细胞的抑制率为 32.1%。具体见表 1。

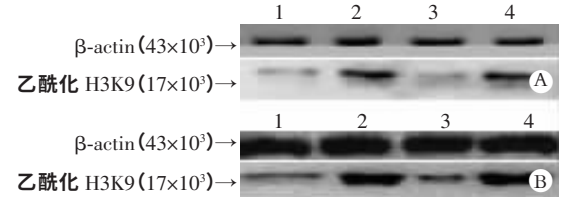
表 1　乙醇及其代谢产物各浓度组细胞光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	D(490)值
对照组	0.358 ± 0.066
乙醇处理组	
200 mmol/L	0.245 ± 0.042[a]
100 mmol/L	0.271 ± 0.023[a]
50 mmol/L	0.368 ± 0.028
乙醛处理组	
16 mmol/L	0.138 ± 0.036[a]
12 mmol/L	0.220 ± 0.017[a]
8 mmol/L	0.276 ± 0.030[a]
4 mmol/L	0.336 ± 0.040
乙酸处理组	
16 mmol/L	0.243 ± 0.024[a]
12 mmol/L	0.286 ± 0.019[a]
8 mmol/L	0.307 ± 0.019[b]
4 mmol/L	0.359 ± 0.014

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$,与对照组比较

2.2　组蛋白乙酰化水平的变化

低浓度组 50 mmol/L 乙醇和 4 mmol/L 乙酸分别使心肌祖细胞组蛋白 H3K9 乙酰化水平升高 2.4 倍和 2.2 倍($P<0.05$);4 mmol/L 乙醛则不引起 H3K9 乙酰化水平改变,与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1A。高浓度组 200 mmol/L 乙醇和 16 mmol/L 乙酸分别使心肌祖细胞组蛋白 H3K9 乙酰化水平升高 5.3 倍和 5.6 倍($P<0.05$);12 mmol/L 乙醛则不引起组蛋白 H3K9 乙酰化水平改变,与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1B。



A: 低浓度组　1:对照组; 2: 50 mmol/L 乙醇; 3: 4 mmol/L 乙醛; 4: 4 mol/L 乙酸; B: 高浓度组　1:对照组; 2: 200 mmol/L 乙醇; 3: 12 mmol/L 乙醛; 4: 16 mol/L 乙酸

图 1　Western blot 检测乙醇及其代谢产物对心肌祖细胞 H3K9 乙酰化水平的影响

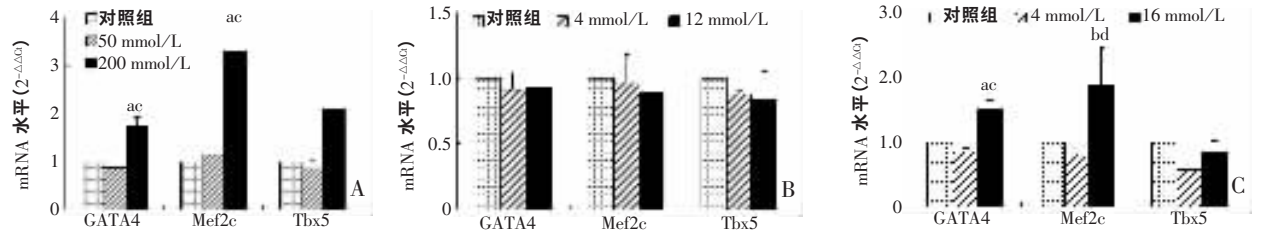
2.3　心脏发育相关基因 GATA4、Mef2c、Tbx5 mRNA 的表达

50 mmol/L 乙醇对心脏发育相关基因 GATA4、Mef2c、Tbx5 mRNA 表达均无明显影响($P>0.05$),但 200 mmol/L 乙醇使 GATA4(1.767 ± 0.173)、Mef2c(3.301 ± 0.465)、Tbx5(2.123 ± 0.492) mRNA 水平升高($P<0.01$),见图 2A;4 mmol/L 及 12 mmol/L 乙醛均对心脏发育相关基因 GATA4、Mef2c 、Tbx5 无明显影响($P>0.05$),见图 2B;4 mmol/L 乙酸对 Tbx5(0.576 ± 0.102)起抑制作用($P<0.01$),但对 GATA4(0.848 ± 0.050)、Mef2c(0.777 ± 0.049)无明显影响($P>0.05$),16 mmol/L 乙酸对 Tbx5(0.846 ± 0.181)无明显影响($P>0.05$),但使 GATA4(1.518 ± 0.133)、Mef2c(1.875 ± 0.587) mRNA 水平升高($P<0.05$),见图 2C。

3　讨论

胚胎发育所需特异基因精确时序激活,是胚胎正常发育的保证,不恰当的基因表达和抑制将改变胚胎发育的轨道,并最终导致发育畸形[7]。基因的表达激活或抑制则决定于染色体状态,而染色质状态主要受表观遗传修饰调控。大量研究表明,表观遗传机制包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰等,受周围环境因素的影响[8,9]。因此,表观遗传机制在环境因素和基因表达异常之间提供了一种联系。环境因素可通过建立错误的表观遗传程序改变基因的表达,即表突变(epimutation),进而导致多种人类疾病如肿瘤、衰老、印记综合征、免疫疾病及发育紊乱等[7]。

目前研究表明乙醇能引起多种细胞及组织中组蛋白 H3K9 的乙酰化水平升高,如体外培养的大鼠肝脏细胞[10]及肝脏星形细胞[11],体内大鼠肝脏组织[12]及脑内杏仁核组织[13]等,但是否引起心脏相关细胞的组蛋白 H3K9 乙酰化水平升高及进一步影响基因的表达仍不清楚。本实验结果显示 50 mmol/L 乙醇将使心肌祖细胞中 H3K9 乙酰化水平升高 2.4 倍,200 mmol/L 乙醇使乙酰化水平进一步升高到 5.3 倍,其代谢产物乙酸也有类似改变,提示乙醇及乙酸引起的组蛋白乙酰化水平升高具有剂量依赖关系,而乙醇的另一代谢



A:乙醇; B:乙醛; C:乙酸

a:$P<0.01$; b: $P<0.05$, 与对照组比较; c: $P<0.01$, d: $P<0.05$,与对应低浓度组比较

图 2　不同浓度乙醇、乙醛和乙酸对心脏发育相关基因 GATA4、Mef2c、Tbx5 表达量的影响

产物乙醛无论是低浓度还是高浓度均对心肌祖细胞无乙酰化升高作用,提示乙醇的代谢产物乙醛在其引起的组蛋白H3K9乙酰化水平升高中并不发挥作用,而其进一步代谢产物乙酸可能起重要作用。

研究表明核心组蛋白的乙酰化将疏松染色质的结构,从而使基因转录激活[14],尤其组蛋白H3K9的乙酰化被认为是基因活化的一个标志[15]。本研究发现低浓度的乙醇引起组蛋白H3K9乙酰化水平升高,但心脏发育相关基因GATA4、Mef2c、Tbx5表达水平并未发生改变,当乙醇浓度增加到200 mmol/L时,进一步升高组蛋白乙酰化水平,同时心脏发育相关基因GATA4、Mef2c、Tbx5表达水平增加。其代谢产物乙酸也有同样类似变化。乙醇的另一代谢产物乙醛无论是低浓度还是高浓度均对心肌祖细胞的乙酰化水平及心脏发育相关基因GATA4、Mef2c、Tbx5的表达无明显影响。从本实验结果中可以看出乙醇及其代谢产物对心肌祖细胞组蛋白乙酰化水平的影响与其对心脏发育相关基因的变化是一致的,因此我们推测乙醇及其代谢产物可引起心肌祖细胞组蛋白H3K9乙酰化水平增加,进而可能使心脏发育相关基因表达发生改变,即引起H3K9表突变作用。且这种作用具有一定的剂量依赖性,当乙醇及其代谢产物乙酸剂量达到一定程度时,使乙酰化水平增加到一定程度后,对心脏发育相关基因表达才有影响。

心脏发育是一个极其复杂的过程,它涉及胚胎发育过程中众多基因在不同时间和空间上的顺次精确表达,其中任何一个基因的异常都可能导致先心病的发生。各个发育特定时间点心脏发育相关基因的顺序激活与表达是建造完美心脏的发育生物学基础[16]。GATA4、Mef2c、Tbx5是心脏早期发育中最重要的3个转录因子,三者质或量的异常均会导致心脏畸形。大量研究提示[17],三者存在着复杂的相互作用,且位于许多基因的上游,可能以复合体的形式调控着心脏中许多转录因子的正确表达。在心脏发育过程中GATA4、Mef2c、Tbx5表达发生改变,可能会影响受它们调控的下游基因的表达模式发生改变,从而打乱心脏发育过程中基因的顺次精确表达,最终可能导致先心病的发生。

高浓度的乙醇及其代谢产物抑制心肌祖细胞生长,表现出细胞毒性作用,我们推测可能与其高浓度时诱导细胞凋亡有关[18],而凋亡基因的表达增高是否与其引起的组蛋白H3K9乙酰化水平增高有关?尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Burd L, Deal E, Rios R, *et al*. Congenital heart defects and fetal alcohol spectrum disorders[J]. Congenit Heart Dis, 2007, 2(4): 250-255.

[2] Webster W S, Germain M A, Lipson A, *et al*. Alcohol and congenital heart defects: an experimental study in mice[J]. Cardiovasc Res, 1984, 18(6): 335-338.

[3] 朱静, 冯川, 李莉, 等. 干扰组蛋白乙酰化引发间充质干细胞心肌定向分化特定蛋白的异常表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(4): 303-306.

[4] Shukla S D, Velazquez J, French S W, *et al*. Emerging role of epigenetics in the actions of alcohol[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2008, 32(9): 1525-1534.

[5] Haycock P C. Fetal alcohol spectrum disorders: the epigenetic perspective[J]. Biol Reprod, 2009, 81(4): 607-617.

[6] Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, *et al*. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages[J]. Nature, 2009, 460(7251): 113-117.

[7] Horsthemke B. Epimutations in human disease[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 310: 45-59.

[8] Jirtle R L, Skinner M K. Environmental epigenomics and disease susceptibility[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(4): 253-262.

[9] Dolinoy D C, Jirtle R L. Environmental epigenomics in human health and disease[J]. Environ Mol Mutagen, 2008, 49(1): 4-8.

[10] Choudhury M, Shukla S D. Surrogate alcohols and their metabolites modify histone H3 acetylation: involvement of histone acetyl transferase and histone deacetylase[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2008, 32(5): 829-839.

[11] Kim J S, Shukla S D. Histone H3 modifications in rat hepatic stellate cells by ethanol[J]. Alcohol Alcohol, 2005, 40(5): 367-372.

[12] Park P H, Lim R W, Shukla S D. Involvement of histone acetyltransferase (HAT) in ethanol-induced acetylation of histone H3 in hepatocytes: potential mechanism for gene expression[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(6): G1124-G1136.

[13] Pandey S C, Ugale R, Zhang H, *et al*. Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism[J]. J Neurosci, 2008, 28(14): 3729-3737.

[14] Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription[J]. Nature, 1997, 389(6649): 349-352.

[15] Morinobu A, Kanno Y, O'Shea J J. Discrete roles for histone acetylation in human T helper 1 cell-specific gene expression[J]. J Biol Chem, 2004, 279(39): 40640-40646.

[16] Karamboulas C, Swedani A, Ward C, *et al*. HDAC activity regulates entry of mesoderm cells into the cardiac muscle lineage[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 20): 4305-4314.

[17] Gruber P J. Cardiac development: new concepts[J]. Clin Perinatol, 2005, 32(4): 845-855, vii.

[18] Nakahara T, Hashimoto K, Hirano M, *et al*. Acute and chronic effects of alcohol exposure on skeletal muscle c-myc, p53, and Bcl-2 mRNA expression[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 285(6): E1273-E1281.

(**收稿**:2009-12-16;**修回**:2010-01-18)

(编辑 王小宾)