基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0008-03

组蛋白去乙酰酶抑制剂下调脓毒症小鼠肝内粘附分子表达

王 彬[1],张 力[2],万敬员[3],姜 蓉[2],闵 苏[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院麻醉科;2. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室;3. 重庆医科大学药学院药理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂对脓毒症小鼠肝内粘附分子表达及炎症细胞浸润的影响。方法:小鼠经腹腔注射组蛋白去乙酰化酶抑制剂(Trichostatin A 或丁酸钠)后,行盲肠结扎穿孔术以诱导小鼠脓毒症。18 h 后处死小鼠并收集血清和肝组织,检测血清转氨酶活性及肝组织匀浆髓过氧化物酶活性;常规石蜡切片 HE 染色观察组织病理学改变;免疫组织化学法检测肝组织内粘附分子(细胞间粘附分子 -1 及 E- 选择素)的表达水平。结果:2 种结构不相关的组蛋白去乙酰化酶抑制剂均可下调脓毒症小鼠肝组织内粘附分子的表达,而肝组织 HE 染色切片上也观察到组蛋白去乙酰化酶抑制剂处理组肝内炎症细胞浸润明显减轻,与此一致,组蛋白去乙酰化酶抑制剂处理组肝组织匀浆中髓过氧化物酶活性及血清转氨酶活性显著降低。结论:组蛋白去乙酰化酶抑制剂处理组可下调脓毒症小鼠肝内粘附分子表达,从而减轻炎症细胞浸润和肝组织损伤。

【关键词】组蛋白去乙酰化酶;脓毒症;粘附分子;炎症;盲肠结扎穿孔术

【中国图书分类法分类号】R364.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2009-07-13

Histone deacetylase inhibitors down-regulate hepatic expression of adhesion molecules in septic mice

WANG Bin, et al

(*Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of histone deacetylase (HDAC) inhibitors on the expression of adhesion molecules in liver tissue and the infiltration of leukocytes in liver tissue during the progression of sepsis. *Methods*: C57BL/6 mice were pre-treated with two structure unrelated HDAC inhibitors, Trichostatin A or sodium butyrate, and then sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP). At 18 h after CLP, hepatic expression of adhesion molecules, including intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and E-selectin, were detected by immunohistochemical analysis. The formalin-fixed liver specimens were also stained with HE routinely for morphologic evaluation. In addition, myeloperoxidase (MPO) activity in liver tissue and serum aminotransferases levels were measured. *Results*: Treatment with HDC inhibitors down-regulated the expression of adhesion molecules. This was accompanied by reduced leukocyte infilatraion in the liver tissue, decreased MPO activity in hepatic homogenates as well as suppressed elevation of serum aminotransferases levels. *Conclusion*: HDAC inhibitors effectively suppressed the expression of adhesion molecules, thus significantly attenuated the recruitment of leukocytes and alleviated hepatic injury induced by sepsis.

【Key words】histone deacetylase; sepsis; adhesion molecule; inflammation; cecum ligation and puncture

组蛋白乙酰化修饰是调控基因表达的重要机制,组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDAC)是调节组蛋白乙酰化水平的关键酶[1]。近期研究表明,HDAC 抑制剂可通过下调多种炎症相关基因的表达而发挥有效的抗炎作用[2]。脓毒症(Sepsis)是严重感染引起的爆发性炎症过程,炎症细胞的过度激活和炎症基因的失控表达可造成全身组织器官的损伤,肝脏的炎症损伤可削弱其防御功能而在脓毒症发生发展过程中有着独特而重要的意义[3]。本实验中,我们复制了盲肠结扎穿孔(Cecal ligation and puncture, CLP)诱导的脓毒症模型,观察了 2 种结构不相关的 HDAC 抑制剂——Trichostatin A 和丁酸钠对肝内粘附分子表达和炎症细胞浸润的影响。

作者介绍:王 彬(1979-),女,助教,硕士,
研究方向:麻醉与器官保护。

通信作者:闵 苏,女,教授,Email:minsu89011068@yahoo.com.cn。

基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(编号:KJ090304)。

1 材料和方法

1.1 动物及实验材料

雄性 C57BL/6 小鼠,体重 20 ~ 25 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。Trichostatin A 和丁酸钠为 Sigma-Aldrich 公

司产品。髓过氧化物酶(Myeloperoxidase,MPO)检测试剂盒、ALT 和 AST 转氨酶检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;兔抗小鼠细胞间粘附分子 -1(Intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)和 E- 选择素(E-selectin)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;生物素标记羊抗兔二抗及 DAB 显色试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.2 盲肠结扎穿孔模型

参照文献方法行小鼠盲肠结扎穿孔术(Cecal ligation and puncture,CLP)以诱导脓毒症[4]。小鼠术前禁食 8 h,以 1%戊巴比妥(50 mg/kg,ip)麻醉后,于腹部作 1 cm 正中切口,找到盲肠后,在距回盲瓣约 0.5 cm 处结扎盲肠,用 7 号针头穿孔 1 次,挤出少量粪便后将盲肠返回腹腔,分层缝合腹壁。术后背部皮下注射生理盐水(50 ml/kg)以补充术中液体丢失。

1.3 实验分组及干预

实验分为 4 组:假手术组:小鼠术前 30 min 经腹腔注射空白溶剂(含 1% DMSO 的生理盐水),麻醉后开腹,但不结扎盲肠也不穿孔,缝合腹壁后予以补液;模型组:小鼠术前30 min 经腹腔注射空白溶剂后行盲肠结扎穿孔术;Trichostatin A 组:小鼠术前 30 min 经腹腔注射 Trichostatin A(2 mg/kg,溶于含 1% DMSO 的生理盐水)后行盲肠结扎穿孔术;丁酸钠组:小鼠术前 30 min 经腹腔注射丁酸钠(200 mg/kg)后行盲肠结扎穿孔术。

1.4 组织病理学检查

术后 18 h,将小鼠麻醉后取肝组织,组织块经福尔马林固定后常规石蜡包埋切片,HE 染色后光学显微镜下观察肝组织受损及炎性细胞浸润情况。

1.5 MPO 检测

肝组织以生理盐水制备成 10%匀浆,按照 MPO 检测试剂盒说明书(南京建成生物工程研究所)方法操作,在 460 nm 处测吸光度,根据标准品计算肝组织中 MPO 活性。

1.6 血清转氨酶检测

各组动物处理 24 h 后收集血清,按说明书方法操作,505 nm 测吸光度,根据标准曲线计算各样本酶活力。

1.7 免疫组织化学分析

石蜡切片常规脱蜡至水,经抗原修复及 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶后,山羊血清室温封闭 30 min,加入 1:100 稀释的一抗 4℃孵育过夜,洗去未结合抗体后,依次孵育生物素化二抗及过氧化物酶标记的链霉卵白素,最后 DAB 法显色,苏木素复染后封片观察。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行比较。

2 结 果

2.1 HDAC 抑制剂下调肝内粘附分子表达

小鼠行 CLP 术后 18 h,肝组织内 ICAM-1 及 E- 选择素表达明显上调;予以 Trichostatin A 预处理后,脓毒症小鼠肝内 2 种粘附分子的表达水平明显降低;换用另一种 HDAC 抑制剂丁酸钠也得到了类似结果(图 1、2)。

2.2 HDAC 抑制剂降低肝组织内 MPO 活性

为进一步分析肝内炎症细胞浸润情况,我们检测了肝组织匀浆中 MPO 活性。结果显示,肝组织内 MPO 活性在 CLP 术后明显上升,而 Trichostatin A 或丁酸钠可显著降低脓毒症小鼠肝组织内 MPO 活性(图 3)。

2.3 HDAC 抑制剂减轻肝组织病理损伤

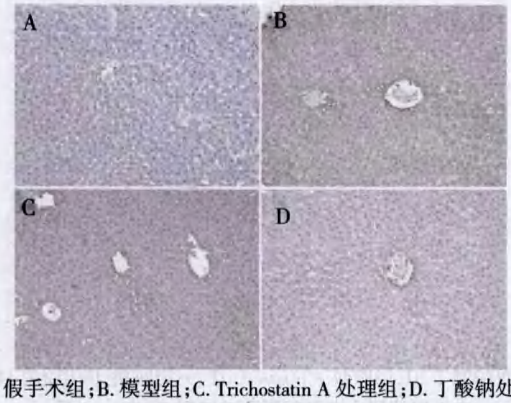
小鼠行 CLP 术后 18 h,肝组织内可见大量的炎症细胞浸润,局部肝细胞变性、坏死(图 4B);而在 Trichostatin A(图 4C)或丁酸钠(图 4D)处理组,肝组织损伤、炎症细胞浸润明显减轻。

2.4 HDAC 抑制剂抑制血清转氨酶升高

我们检测了血清转氨酶(ALT、AST)活性以反映肝脏受损情况。如表 -1 所示,转氨酶活性在 CLP 术后明显上升,应用 Trichostatin A 或丁酸钠后,脓毒症小鼠血清转氨酶水平显著降低。

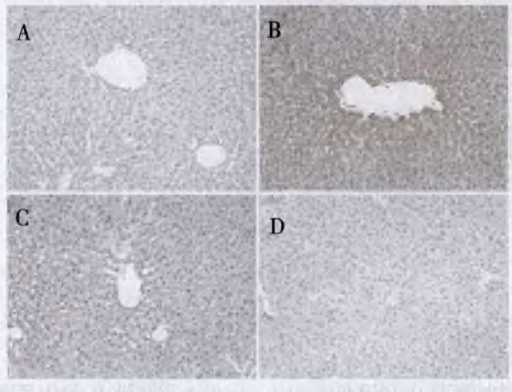
3 讨 论

真核生物的染色质是由组蛋白和 DNA 紧密结合而形成的致密卷曲结构,基因转录激活时,组蛋白的赖氨酸残基上发生乙酰化修饰,以减弱组蛋白与 DNA 间的结合力、促使染色质结构趋于松弛,有利于转录因子与 DNA 的结合及靶基



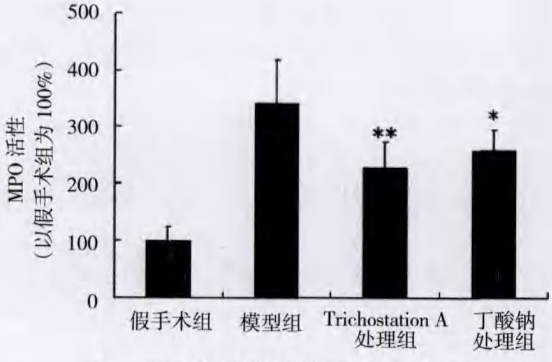
A. 假手术组;B. 模型组;C. Trichostatin A 处理组;D. 丁酸钠处理组

图 1 HDAC 抑制剂下调脓毒症小鼠肝组织内 ICAM-1 表达(免疫组化,×200)



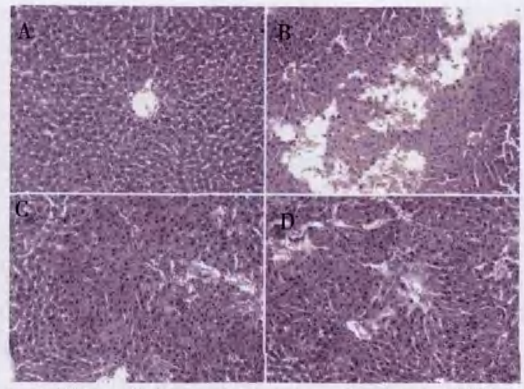
A. 假手术组;B. 模型组;C. Trichostatin A 处理组;D. 丁酸钠处理组

图 2 HDAC 抑制剂下调脓毒症小鼠肝组织内 E- 选择素表达(免疫组化×200)



注:$n=6$,与模型组相比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

图 3 HDAC 抑制剂降低脓毒症小鼠肝组织 MPO 活性



A. 假手术组;B. 模型组;C. Trichostatin A 处理组;D. 丁酸钠处理组

图 4 HDAC 抑制剂减轻脓毒症小鼠肝组织病理学损伤(HE×200)

表 1 脓毒症小鼠血清转氨酶水平

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)
假手术组	14.83 ± 3.54	33.83 ± 6.83
模型组	164.27 ± 30.69	231.77 ± 45.22
Trichostatin A 处理组	96.95 ± 19.13**	161.23 ± 30.61**
丁酸钠处理组	118.78 ± 22.10*	178.57 ± 20.84*

注:$n=6$,与模型组相比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

因转录激活;而组蛋白的去乙酰化则常常与转录抑制有关[1]。组蛋白的乙酰化和去乙酰化修饰分别由组蛋白乙酰转移酶(Histone acetyltransferase,HAT)和 HDAC 所催化,两者间的动态平衡是调节组蛋白乙酰化水平的关键,是调控基因表达的重要开关机制[2]。

大量的实验研究证实,乙酰化修饰的失常与肿瘤的发生发展关系密切,胃癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中均有 HDAC 表达的异常上调,导致了肿瘤细胞内增殖、分化、凋亡相关基因表达的紊乱[5]。鉴于此,现已合成了多种 HDAC 抑制剂,临床试验已证实了其良好的抗肿瘤效应且无明显毒副作用[5]。有趣的是,新近研究发现这些 HDAC 抑制剂也可影响炎症的发生发展,其抗炎效应已在关节炎、结肠炎等多种炎症损伤模型中得到了证实[6,7]。

脓毒症是继发于创伤、烧伤、及外科大手术后的严重感染所引起的爆发性炎症反应,炎症相关基因的失控性表达可引发全身组织器官的广泛炎症损伤[3]。炎症细胞的浸润是炎症损伤的关键起始环节,这一过程受到一系列粘附分子的有序化调控。本实验中,我们检测了脓毒症小鼠肝组织内 I-CAM-1 和 E- 选择素这两种重要粘附分子的表达。结果显示,CLP 术后,肝组织内两种粘附分子表达显著升高,提示这些粘附分子可能参与了肝内炎症细胞的浸润及炎症损伤。而在 HDAC 抑制剂 Trichostatin A 处理组,肝内粘附分子的表达显著降低;换用另一种结构不相关的 HDAC 抑制剂丁酸钠,也得到了类似结果。

随后,我们通过检测肝组织匀浆中 MPO 活性对肝内炎症细胞浸润进行了定量分析。检测结果同样表明,与模型组相比较,Trichostatin A 和丁酸钠处理组肝组织匀浆中 MPO 活性显著降低。与上述结果一致,HE 染色病理切片上也观察到 HDAC 处理组肝组织内炎症细胞浸润和细胞损伤明显减轻。以上结果表明,HDAC 抑制剂可通过下调粘附分子表达而减轻脓毒症时肝内炎症细胞浸润和炎症损伤。

除组蛋白外,近期的研究也发现:炎症反应中的关键转录因子核因子 kappa B(Nuclear factor kappa B, NF-κB)也受乙酰化修饰的调节,其 p65 亚单位上多个赖氨酸残基的乙酰化可影响 NF-κB 与 DNA 的结合力及其转录活性[8,9]。此外,丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 -1(Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1)被乙酰化后,与 p38 的亲和力增加,可增强其对 MAPK 信号通路的负性调节作用[10]。因而,HDAC 抑制剂的应用可通过调节乙酰化修饰状态而对炎症相关信号通路、转录因子乃至炎症基因构象发挥广泛的调节作用,这可能是本实验中 HDAC 抑制剂下调多种粘附分子表达的关键机制。

近年来的研究也发现,慢性阻塞性肺病及哮喘等炎症相关性疾病的发生发展过程中也伴随有 HAT、HDAC 含量及活性的异常[11,12],这些异常势必导致组蛋白及其他蛋白成分的乙酰化修饰异常,可能是炎症基因的表达失控的重要机制。那么,应用可调节蛋白质乙酰化修饰状态的药物对炎症过程中异常的乙酰化修饰予以针对性矫正将有望成为炎症性疾病治疗及抗炎药物开发的新思路。

参 考 文 献

[1] 吕 珂,李 立,彭艳丽.FK228 抑制鼠视网膜新生血管的机制研究 [J].重庆医科大学学报,2008,33(7):807-810.

[2] Blanchard F, Chipoy C. Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases[J].Drug Discov Today,2005,10(3):197-204.

[3] Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dys-

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0011-05

CDH12 基因 siRNA 对涎腺腺样囊性癌细胞侵袭力的影响

苏柏华,王锦锋,佘 林,郑斐斐,丁林灿,卢友光
(福建医科大学附属口腔医院预防科,福州 350002)

【摘 要】目的:探讨钙粘素 12(Cadherin 12,CDH12)对涎腺腺样囊性癌(Salivary adenoid cystic carcinoma,SACC)细胞侵袭和转移能力的影响。方法:以人涎腺腺样囊性癌高转移细胞株(Salivary adenoid cystic carcinoma cell line with high metastatic ability,SACC-M)为研究对象,利用 CDH12 小分子干扰 RNA(Small interfering RNA,siRNA)对 CDH12 基因进行沉默,Western blot 检测转染前后 CDH12 的表达变化,Cell Counting Kit-8 法检测转染前后细胞的生长速度,体外侵袭实验比较细胞侵袭能力变化,体外迁移运动实验比较细胞运动能力的改变。结果:CDH12 siRNA 明显下调 CDH12 基因的表达。CDH12 表达下调后,SACC-M 细胞体外侵袭能力显著降低,体外迁移运动能力明显降低。结论:CDH12 明显地促进了 SACC 细胞的体外侵袭和迁移运动,提示 CDH12 可能在 SACC 的恶性进展中起着重要作用。

【关键词】小分子干扰 RNA;钙粘素 12;腺样囊性癌;侵袭
【中国图书分类法分类号】R739.870.22 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-21

Role of CDH12 siRNA on invasiveness of salivary adenoid cystic carcinoma cells

SU Bo-hua, et al
(*Department of Prevention, the Affiliated Stomatological Hospital, Fujian Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of CDH12 on invasion and migration of human salivary adenoid cystic carcinoma cells in vitro. *Methods*: The highly metastatic human salivary adenoid cystic carcinoma cell line SACC-M was transfected by CDH12 siRNA to silence CDH12 gene. The protein expression of CDH12, before and after siRNA transfection, was examined by Western blot. Cell growth rate was determined with Cell Counting Kit-8. At the same time, the invasive capability and migration capability were evaluated by tumour invasion assay and migration assay, respectively. *Results* CDH12 siRNA transfection specifically down-regulated the CDH12 protein in SACC-M cells. The downregulation of CDH12 supressed the invasive capability and migration capability of SACC-M cells. *Conclusion*: CDH12 obviously promotes the invasion and migration of SACC cells in vitro. These results suggest that CDH12 may play an important role in the malignant progression in salivary adenoid cystic carcinoma.

【Key words】siRNA; CDH12; adenoid cystic carcinoma; invasion

作者介绍:苏柏华(1972-),男,副主任医师,硕士,研究方向:预防口腔医学。
通信作者:卢友光,男,教授,博士,Email:fjlyg63@163.com。
基金项目:福建省科技厅科技计划重点项目(编号:2008Y0041)。

function[J]. Crit Care Med, 2007, 35(10): 2408-2416
[4] Rittirsch D, Huber-Lang M S, Flierl M A, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31-36.
[5] Mehnert J M, Kelly W K. Histone deacetylase inhibitors: biology and mechanism of action[J]. Cancer J, 2007, 13(1): 23-29.
[6] Lin H S, Hu C Y, Chan H Y, et al. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents[J]. Br J Pharmacol, 2007, 150(7): 862-872.
[7] Glauben R, Batra A, Fedke L, et al. Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice[J]. J Immunol, 2006, 176(8): 5015-5022.
[8] Chen LF, Fischle W, Verdin E, et al. Duration of nuclear NF-kappa B action regulated by reversible acetylation[J]. Science, 2001, 293(5535): 1653-1657.
[9] Chen L F, Greene W C. Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation[J]. J Mol Med, 2003, 81(9): 549-557.
[10] Cao W, Bao C, Padalko E, et al. Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling[J]. J Exp Med, 2008, 205(6): 1491-1503.
[11] Adcock I M, Tsaprouni L, Bhavsar P, et al. Epigenetic regulation of airway inflammation[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(6): 694-700.
[12] Ito K, Ito M, Elliott W M, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352(19): 1967-1976.

(责任编辑:冉明会)