肝癌分子机制研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001347

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 FK228 治疗小鼠肝硬化的实验研究

李梦辉[2]，周恒宇[1]，刘迪娜[1]，蔡　莹[1]，龚建平[2]，唐　霓[1]，黄爱龙[1]，夏　杰[1]
（1. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室，重庆　400016；
2. 重庆医科大学第二附属医院肝胆外科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：观察组蛋白去乙酰化酶抑制剂罗米地辛（Romidepsin，FK228）对四氯化碳（carbon tetrachloride，CCl_4）诱导小鼠肝纤维化模型的治疗性作用，初步探讨 FK228 对减轻小鼠肝纤维化的机制。**方法**：将 30 只 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠随机分为对照组、造模组和治疗组，每组 10 只；对照组腹腔注射生理盐水；造模组腹腔注射 10% CCl4 溶液诱导肝纤维化，持续 24 周；治疗组在诱导纤维化第 20 周开始采用 FK228 进行治疗。检测各组小鼠血清谷丙转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、谷草转氨酶（aspartate transaminase，AST）含量水平；对肝组织进行 HE 染色和天狼星红染色，观察假小叶形态结构；进行 α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）免疫组化染色，观察肝星状细胞活化程度及肝纤维化进程；Western blot 半定量分析 α-SMA 蛋白在肝脏中的表达情况。**结果**：造模组血清 ALT（67.270 ± 11.109）IU/L，而治疗组小鼠的血清 ALT（37.670 ± 8.461）IU/L 显著下降（P=0.019）；肝组织切片 HE 染色和天狼星红染色显示造模组纤维化程度高、假小叶形成明显，而治疗组纤维化程度明显减弱；免疫组化染色和 Western blot 结果显示治疗组 α-SMA 水平相对于造模组明显降低（P=0.001）。**结论**：研究结果首次证实 FK228 对降低小鼠肝纤维化程度有治疗性作用，而且其机制可能与抑制星状细胞活化和降低 α-SMA 蛋白表达水平有关。

【关键词】组蛋白去乙酰化酶抑制剂；FK228；肝纤维化；α-平滑肌肌动蛋白
【中图分类号】R322.47　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2017-02-15

Experimental study of romidepsin in reducing liver cirrhosis

Li Menghui[2], *Zhou Hengyu*[1], *Liu Dina*[1], *Cai Ying*[1], *Gong Jianping*[2], *Tang Ni*[1], *Huang Ailong*[1], *Xia Jie*[1]
(*1. Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases Founded by Ministry of Education, Chongqing Medical University; 2. Department of Liver, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To observe the effect of histone deacetylase inhibitor romidepsin (FK228) on liver cirrhosis in mice, and to investigate the underlying mechanism of renoprotective effect of FK228. ***Methods***: Thirty experimental mice were randomly divided into three groups: control group (group A), model group (group B) and treatment group (group C). To set up the liver cirrhosis model, mice in group B and C were treated with intraperitoneal injection of CCl4 for 24 weeks. From the 21th week, group C were treated with intraperitoneal injection of FK228 weekly. The levels of serum ALT and AST were detected

作者介绍：李梦辉，Email：lmh979913595@hotmail.com，研究方向：肝脏疾病。
通信作者：夏　杰，Email：xiajie2014@foxmail.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81602045、81471946）；重庆市科学技术委员会资助项目（编号：cstc2016jcyjA0206）；重庆医科大学"优秀青年学者"资助项目（编号：CYYQ201503）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170626.1145.016.html（2017-06-26）

tocarcinoma cell[J]. Virus Res, 2011, 157(1): 76-81.
[10] 吕桂帅，陈　磊，王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景[J]. 生命科学，2015，27(3)：237-248.
[11] Wang CC, Lin SY, Lai YH, et al. Dimethylsulfoxide promotes the multiple functions of the tumor suppressor HLJ1 through activator protein-1 activation in NSCLC cells[J]. PLOS One, 2012, 7(4): e33772.
[12] Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, et al. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasia, and prognosis [J]. Lung Cancer, 2002, 36(2): 115-124.
[13] Lin SY, Hsueh CM, Yu SL, et al. HLJ1 is a novel caspase-3 substrate and its expression enhances UV-induced apoptosis innon-small cell lung carcinoma[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(18): 6148-6158.
[14] Bianco R, Rosa R, Damiano V, et al. Vascular endothelial growth-factor receptor-1 contributes to resistance to antiepidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16): 5069-5080.
[15] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, et al. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1[J]. Hepatol Res, 2003, 27(4): 289-301.

（责任编辑：张辉洁）

to judge liver damage degree. HE and sirius red staining were used to observe pseudolobuli and tubercle. Immunohistochemical staining and Western blot analysis were used to detect the expression of osteopontin α-smooth muscle actin(α-SMA) in liver. ***Results***:The data showed the average serum ALT in group C was (37.670 ± 8.461) IU/L and (67.270 ± 11.109) IU/L in group B. It was significantly decreased when treating the experimental mice with FK228(P=0.019). Also,HE and sirius red staining revealed the degree of liver fibrosis in group C were weakened obviously. Additionally,Western blot and immunohistochemistry indicated the levels of α-SMA in group C were notable reduced(P=0.001). ***Conclusion***:The preventive effect of FK228 treatment for liver cirrhosis and the mechanism may involve down regulating levels of α-SMA and inhibition of HSC activation.

【Key words】 histone deacetylase inhibitor;FK228;liver fibrosis;α-smooth muscle actin

肝硬化是由肝纤维化发展而成，是所有慢性肝脏损伤的最终病理阶段[1]。任何引起肝损伤的因素长期、反复作用于肝脏，均可引起肝细胞变性、坏死，继而出现肝细胞再生和纤维组织增生，当肝小叶结构破坏，肝细胞结节再生，增生的胶原包绕形成假小叶即称肝硬化[2]。我国作为乙肝感染大国现有约 7 000 万乙肝病毒感染者，而每年有 3%~4%将转化为肝硬化病人。传统观念认为肝硬化是不能逆转的，但是最近动物实验研究和临床观察的证据表明早期的肝硬化仍然是可以逆转的。一般情况下，肝硬化导致不同程度的肝损伤和门静脉高压，并伴有多系统损伤，晚期常出现肝性脑病、上消化道出血、继发感染、脾功能亢进、腹水、癌变等并发症，严重影响人类健康。

组蛋白是人类染色体的基本组成单位，组蛋白的转录后修饰在基因表达中起决定性的作用，乙酰化是其中一种重要的修饰方式。参与调控组蛋白乙酰化水平的酶包括组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase,HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)。课题组前期对 300 多例肝硬化患者进行组织芯片染色分析发现，组蛋白乙酰化水平与病情严重程度密切相关[3]。HDAC 过量表达造成的乙酰化失衡可能是导致肝硬化进程的原因之一，而通过抑制 HDAC 是否可以很好地抑制肝硬化进程目前尚未被证实。因此，本文将在小鼠肝硬化模型中着力研究 FK228 对小鼠肝纤维化进程的影响，探究其潜在的治疗性价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料

八周龄雄性 C57BL/6 小鼠 30 只，由重庆医科大学实验动物中心提供(本研究符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准)。四氯化碳(川东化工，纯度>99%)，食用橄榄油(RONGS，西班牙)，FK228(上海蓝木化工)，ALT、AST 检测试剂盒(南京建成)，一抗 α-SMA 抗体(杭州华安)，二抗 Biotin-anti-rabbit IgG(Vector lab，美国)，免疫组化 ABC 试剂盒(Thermo，美国)。

1.2 实验动物分组与模型建立

本造模方法参照小鼠肝纤维化模型的建立[4]，将 30 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、造模组和治疗组，每组10只。3 组小鼠均饲养于相同的环境，给予相同的食物、饮水、光照、温度、湿度。造模组按 10 mg/kg 量腹腔注射 10% CCl_4 溶液(1 mL CCl4 溶于 9 mL 橄榄油)，每周 2 次，持续 24 周；治疗组腹腔注射同样剂量 10% CCl_4 溶液，每周 2 次，持续 24周，在造模 20 周时开始按照 5 mg/kg 的浓度每周 2 次腹腔注射 FK228，持续 4 周；对照组给予相等剂量的生理盐水。

1.3 标本采集和血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase，ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase，AST)测定

各组小鼠于最后一次给药 3 d 后取材。将小鼠通过乙醚浅度麻醉进行眼球取血。所取血液静置 30 min 后按照5 000 r/min 的速度离心 5 min，收集血清，分装，-80 ℃保存。将小鼠腹部朝上固定后开腹取下完整肝脏，部分组织用 10%中性福尔马林固定 48 h 后包埋、切片，其余放入液氮中保存备用。血清 ALT、AST 测定根据南京建成生物科技公司试剂盒(C009、C010)说明书进行。

1.4 HE 染色

将 10%中性福尔马林固定 48 h 后的肝脏组织，常规脱水、浸蜡、包埋、切片后经二甲苯脱蜡、水化后行苏木精染色 0.5%盐酸酒精分化在以 0.5%伊红液染色；脱水透明后中性树胶封片。光学显微镜下观察肝脏形态学变化。

1.5 天狼星红染色

将步骤 1.4 所做切片经二甲苯脱蜡、水化后行苏木精染色，再以天狼星红饱和苦昧酸浓染，无水乙醇直接分化与脱水，二甲苯透明后树胶封固。光学显微镜观察胶原纤维染色情况。

1.6 免疫组织化学检测肝脏组织 α-SMA 表达情况

将各组石蜡包埋的小鼠肝脏组织常规切片，采用免疫组化 ABC 法测定组织表达的 α-SMA，操作步骤按照说明书进

行，DAB 染色。以不含一抗的抗体稀释液作为阴性对照试验确保此免疫组化反应具备特异性。采用德国 OLYMPUS 图像采集系统采集图像，选择肝组织汇管区域及门静脉区域之间组织作为观察点采集图片。

1.7 Western blot 检测蛋白表达

取适量肝组织，加入裂解液后匀浆，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，收集上清，BCA 法测定蛋白浓度并调平。配制10% SDS-PAGE，120 V 恒压电泳至蛋白充分分离；将蛋白转膜至 PVDF 膜上；5%脱脂奶粉封闭 1 h 后，一抗 4 ℃过夜；TBST 清洗 3 次后辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h；TBST 清洗 3 次后 ECL 法显色。以 GAPDH 作为内参，使用 Image J 进行蛋白条带灰度分析，计算目的蛋白的相对表达量。

1.8 统计学处理

实验结果应用 SPSS 22.0 软件进行分析处理。定量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组均数比较采用方差分析组间差异，然后以 Bonferroni 方法进行多重比较。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 一般情况

3 组小鼠均生长发育正常，外观、行为、体征未见明显异常。取下完整肝脏后观察发现，与正常肝脏相比，造模组和治疗组肝脏表面均出现蜘蛛样颗粒，颜色灰暗，疑似高水肿反应。造模组和治疗组均发现肝脏表面出现大小不一、独立生长的结构，疑似为腺瘤结节（图 1）。



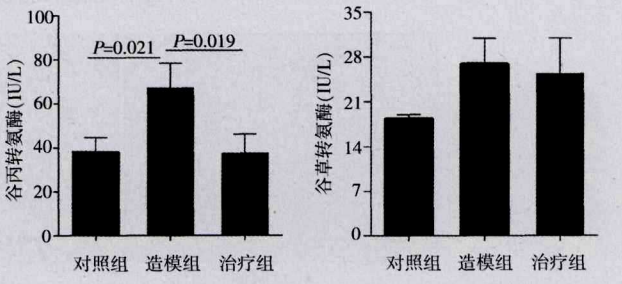
A. 对照组　B. 造模组　C. 治疗组

图 1 各组肝脏外观情况

Fig.1 General conditions of liver on different groups

2.2 血清 ALT、AST 水平检测

参照试剂盒说明书，检测各组小鼠血清 ALT、AST 水平。结果如图所示，对照组 ALT 水平为（38.350 ± 6.198）IU/L，造模组（67.270 ± 11.109）IU/L，治疗组为（37.670 ± 4.885）IU/L。三者存在统计差异（F=11.008，P=0.010），其中造模组相对对照组 ALT 水平明显升高（P=0.021），治疗组 ALT 水平显著低于造模组（P=0.019）。对照组 AST 水平为（18.340 ± 0.670）IU/L，造模组上升至（26.89 ± 4.030）IU/L；有趣的是，3 组模型中 AST 水平并无明显差异（F=3.890，P=0.066），而且 FK228 对降低 AST 水平无明显作用，其 AST 水平为（25.410 ± 5.529）IU/L（图 2B）。



A. 血清中谷丙转氨酶水平　B. 血清中谷草转氨酶水平

图 2 各组血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶水平

Fig.2 Levels of serum ALT and AST on different groups

2.3 HE 染色和天狼星红染色

与对照组相比，显微镜下可见造模组的肝脏中肝细胞间隙明显，水肿反应严重；汇管区上皮细胞成多层重叠状，增生明显；胞外基质连接呈条索状，形成明显的假小叶结构（图 3B）。通过 FK228 治疗后，组织水肿反应明显减弱，汇管区上皮细胞回归正常，假小叶的间隔条索消失。启示 FK228 有显著的降低肝纤维化水平的作用（图 3C）。

进一步用天狼星红染色标记胶原蛋白，结果显示造模组胶原蛋白连通各门静脉血管，将肝细胞合围形成完整的假小叶；汇管区域的胶原蛋白量非常丰富（图 4B）。而治疗组的胶原蛋白量显著降低，合围假小叶结构的条带逐步消失，不再完整，且汇管区的胶原蛋白量显著少（图 4C）。

2.4 免疫组化检测结果

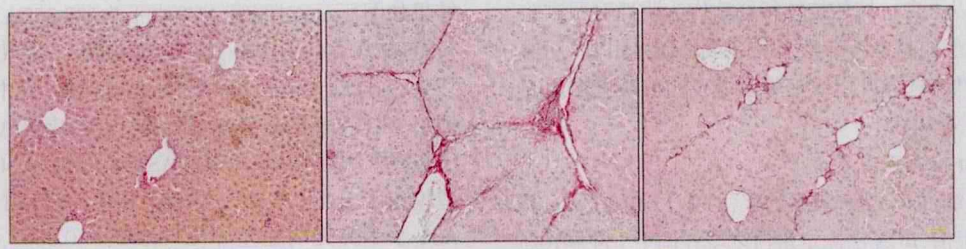
对照组中无 α-SMA 阳性细胞（图 5A）。造模组肝脏中出现大量 α-SMA 阳性细胞，主要分布于汇管区和假小叶条索附近（图 5B）。FK228 治疗组中 α-SMA 阳性细胞数量显著下降，且分布呈不规则状态（图 5C）。



A. 对照组　B. 造模组　C. 治疗组

图 3 各组肝脏 HE 染色情况（200×）

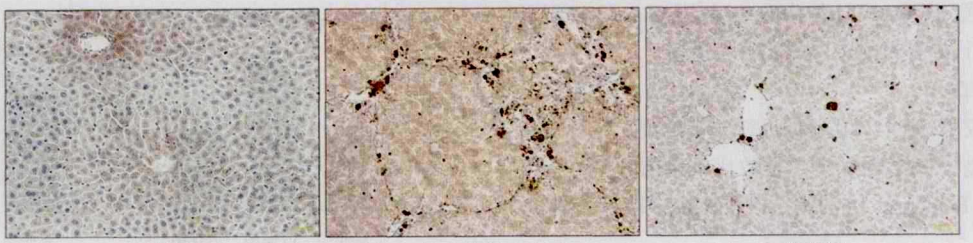
Fig.3 HE staining of different livers (200×)



A. 对照组　　B. 造模组　　C. 治疗组

图 4　各组肝脏天狼星红染色情况 (200×)

Fig.4　Sirius red staining of different livers (200×)



A. 对照组　　B. 造模组　　C. 治疗组

图 5　免疫组化检测 α-SMA 蛋白在各组肝脏中的表达情况 (200×)

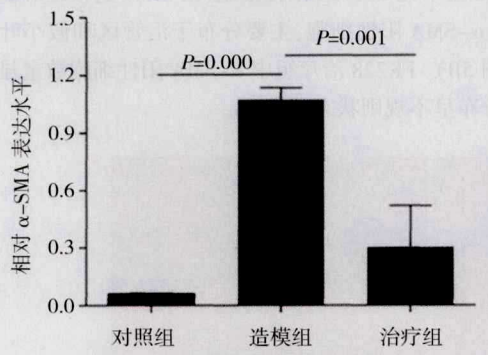
Fig.5　Expression of α-SMA on different livers detected by immunohistochemistry (200×)

2.5　Western blot 检测结果

以 GAPDH 为内参，检测肝组织中 α-SMA 蛋白的含量。结果如图显示，对照组的肝脏中不表达 α-SMA 蛋白，造模组与治疗组均表达此蛋白(图 6A、B)。其中，造模组的 α-SMA 蛋白处于较高表达水平，而治疗组中此蛋白水平显著下降(F=48.981，P=0.001)，差异具有统计学意义(图 6A、B)。



A. α-SMA Western blot 检测结果



B. α-SMA 蛋白水平分析

图 6　Western blot 检测不同组中肝脏组织 α-SMA 蛋白表达量

Fig.6　Expression of α-SMA on different liver tissues detected by western blot

3　讨　论

肝硬化是几乎所有慢性肝病的最终阶段，通常被认为是不能逆转的。但是随着硬化患者逐年增多，对人类健康的影响愈加增大，科学家仍然希望能寻找到逆转肝硬化的方法以挽救患者性命[5]。因此，探讨肝硬化的发病机制并从中寻找到治疗靶点是当前肝硬化研究的重点任务。本研究分析了FK228对于小鼠肝纤维化的抑制作用。结果显示 CCl_4 诱导的小鼠纤维化进程明显受到 FK228 的阻断，通过 FK228 的作用，活化星状细胞表达的 α-SMA 蛋白以及分泌的 ECM 成分胶原蛋白均显著性减少，提示 FK228 是一种理想的肝硬化治疗药物。

本研究以小鼠 CCl_4 诱导肝纤维化为模型，探讨其可能的治疗方式。CCl_4 作用于肝脏中产生的炎症因子和自由基可有效激活 HSC，HSC 为细胞外基质(ECM)的主要来源，过多的 ECM 沉积于肝内导致肝纤维化继而引起肝硬化，这与人类药物性肝硬化病理特点相似[6]。因此，CCl_4 模型常用于探索药物性肝硬化发病机理和评估抗肝硬化药物的药效等实验研究。通常情况下，CCl_4 诱导 4~8 周即可导致肝纤维化的发生。然而由于在诱导早期，小鼠肝脏耐

受 CCl_4 能力弱，导致急性肝损伤的发生，期间 ALT、AST 等水平呈上百倍升高，此过程为急性肝损伤，与人类慢性肝硬化过程不符。因此本研究中采用延长小鼠肝纤维化建模时间，诱导 24 周，一方面使小鼠适应 CCl_4 毒性，减弱肝细胞损伤程度，以排除小鼠自愈能力对研究结果的影响；另一方面，长期诱导可有效稳定 HSC 的活化，使其纤维化程度达到一种较高程度，进而更能准确地检测本研究中 FK228 对代偿期肝硬化的治疗效果。结果显示，经过 CCl_4 诱导后，血清 ALT、AST 水平比正常值稍高但不超过 2 倍，说明肝细胞对 CCl_4 的耐受已经形成；而给药 FK228 后可有效降低 ALT 水平却对 AST 无影响，以及 α-SMA 水平的改变，提示该药治疗肝硬化的机制不是通过增强肝细胞损伤修复能力，而是通过抑制 HSC 活化实现。

本研究所使用的药物 FK228 作为组蛋白去乙酰化酶抑制剂，可同时抑制 HDAC1 和 HDAC2 的去乙酰化功能[7]。作为表观遗传修饰方式之一，组蛋白乙酰化的改变是已经被证实是肝脏损伤后诱发肝硬化甚至肝癌的主要原因之一。Jiang 等[8]更是直接指出组蛋白 H3K9 乙酰化水平改变可以调控肝星状细胞的活化及肝硬化的发生。Barbier-Torres 等[9]发现 HDAC4 可以通过与 PHB-1 相互作用调控肝纤维化。缺少 PHB-1 时，过表达 HDAC4 导致小鼠肝纤维化程度加剧，抑制 HDAC4 的表达或者活性均可以使小鼠肝纤维化程度降低。本研究中，在 CCl_4 诱导小鼠肝硬化后，给予 FK228 腹腔注射后，其肝硬化水平明显减弱，并有逆转趋势，说明 FK228 对肝纤维化，肝硬化有着抑制作用。实验进一步发现肝星状细胞活化相关蛋白 α-SMA 表达水平明显下降，提示FK228 可能通过调控组蛋白乙酰化水平抑制肝星状细胞活化从而抑制肝纤维化、肝硬化的发展。有趣的是 Kim 等发现在卵巢透明细胞癌中，HDAC1/2 的缺失可协同 NF-κB 的异常激活导致炎症基因 IL-6、IL-8 等的表达[10]。这与本研究结果恰好相反，可能原因是在肝纤维化肝硬化的发生发展过程中，存在多个炎症信号通路参与调控，且FK228 可能并未通过调控 NF-κB 而发挥抑制肝纤维化的功能。HDAC1 和 HDAC2 是组蛋白去乙酰酶家族 I 类成员，有学者发现在肝癌患者肝脏中，其表达均明显上调[11]，而临床上超过 90%的肝硬化患者最终都会恶化形成肝癌。作为 HDAC1/2 的特异性抑制剂，FK228 在小鼠肝硬化模型中对肝硬化抑制作用明显，这提示 FK228 可能作为肝硬化的一个新的治疗方式，也有望为预防和治疗肝癌提供新的思路。

参 考 文 献

[1] 范婷婷，谢渭芬. 肝纤维化和肝硬化治疗进展[J]. 国际消化病杂志，2010，30(6)：349-351.

[2] Tsochatzis EA，Bosch J，Burroughs AK. liver cirrhosis[J]. Lancet，2014，383(9930)：1749-1761.

[3] Zhou P，Xia J，Zhou YJ，et al. Proportions of acetyl-histone-positive hepatocytes indicate the functional status and prognosis of cirrhotic patients[J]. World J Gastroenterol，2015，21(21)：6665-6674.

[4] 许建明，徐叔云，张运芳，等. 四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型的建立[J]. 中国药理学通报，2000，16(3)：339-341.

[5] Schuppan D，Afdhal NH. Liver cirrhosis[J]. Lancet，2008，371(9615)：838-851.

[6] 崔承虎，韩明子，金世柱，等. 肝硬化动物模型造模方法的研究进展[J]. 现代生物医学进展，2015，15(12)：2393-2396.

[7] Furumai R，Matsuyama A，Kobashi N，et al. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases[J]. Cancer Research，2002，62(17)：4916-4921.

[8] Jiang Y，Wang S，Zhao Y，et al. Histone H3K9 demethylase JMJD1A modulates hepatic stellate cells activation and liver fibrosis by epigenetically regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ[J]. FASEB J，2015，29(5)：1830-1841.

[9] Barbier-Torres L，Beraza N，Fernandez-Tussy P，et al. Histone deacetylase 4 promotes cholestatic liver injury in the absence of prohibitin-1[J]. Hepatology，2015，62(4)：1237-1248.

[10] Kim M，Lu F，Zhang Y. Loss of HDAC-mediated repression and gain of NF-κB activation underlie cytokine induction in ARID1A-and PIK3CA-mutation-driven ovarian cancer[J]. Cell Reports，2016，17(1)：275-288.

[11] Quint K，Agaimy A，Di Fazio P，et al. Clinical significance of histone deacetylases 1，2，3，and 7- HDAC2 is an independent predictor of survival in HCC[J]. Virchows Arch，2011，459(2)：129-139.

（责任编辑：张辉洁）