doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.09.016

论著・实验研究

戊二酰辅酶 A 脱氢酶基因沉默及高浓度赖氨酸对 BRL 肝细胞活性的影响

高金枝 张偲 易琴 应艳琴 罗小平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科,湖北武汉 430030)

[摘要] 目的 探讨戊二酰辅酶 A 脱氢酶 (GCDH)基因沉默和赖氨酸代谢物蓄积对肝细胞活性的影响。 方法 将 BRL 肝细胞分为正常对照组、阴性对照组和 GCDH 沉默组。构建含靶向沉默 GCDH 基因的 shRNA 慢病毒载体,分别用该病毒和阴性对照病毒感染 GCDH 沉默组和阴性对照组 BRL 肝细胞。感染后细胞再用含 5 mmol/L 赖氨酸培养基培养。免疫荧光技术检测慢病毒感染效率;Western blot 法检测 GCDH 蛋白表达水平; MTT 法检测细胞活性,Hoechest 33342 染色检测细胞凋亡,Western blot 法检测细胞凋亡的经典指标 Caspase3 水平。 结果 构建的慢病毒可有效沉默肝细胞 GCDH 表达 (*P*<0.01)。MTT 及 Hoechest 33342 染色检测各组间细胞活 性及细胞凋亡比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。Caspase3 蛋白表达在各组间比较差异亦无统计学意义(*P*>0.05)。 结论 GCDH 基因沉默和赖氨酸代谢物蓄积对肝细胞无明显损伤作用。

[中国当代儿科杂志,2017,19(9):1014-1019] [关键词] 戊二酰辅酶 A 脱氢酶;细胞活性;BRL 细胞

Effect of glutaryl-CoA dehydrogenase gene silencing and high-concentration lysine on the viability of BRL hepatocytes

GAO Jin-Zhi, ZHANG Cai, YI Qin, YING Yan-Qin, LUO Xiao-Ping. Department of Pediatrics, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Luo X-P, Email: xpluo@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective To investigate the effect of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH) gene silencing and accumulation of lysine metabolites on the viability of hepatocytes. **Methods** BRL cells were divided into normal control group, negative control group, and GCDH silencing group. The shRNA lentiviral vector for silencing GCDH gene was constructed, and the BRL hepatocytes in the GCDH silencing group and the negative control group were infected with this lentivirus and negative control virus respectively, and then cultured in a medium containing 5 mmol/L lysine. Immunofluorescence assay was used to measure the infection efficiency of lentivirus. Western blot was used to measure the expression of GCDH protein. MTT assay was used to evaluate cell viability. Hoechest33342 staining was used to measure cell apoptosis. Western blot was used to measure the GCDH gene in hepatocytes (P<0.01). MTT assay and Hoechest 33342 staining showed no significant differences in cell viability and apoptosis between groups (P>0.05). There was also no significant difference in the expression of Caspase-3 protein between groups (P>0.05). **Conclusions** GCDH gene silencing and accumulation of lysine metabolites may not cause marked hepatocyte injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(9): 1014-1019]

Key words: Glutaryl-CoA dehydrogenase; Cell viability; BRL cell

[[]收稿日期] 2017-04-30; [接受日期] 2017-07-26

[[]作者简介]高金枝,女,博士,主治医师。

[[]通信作者]罗小平,男,教授。

戊二酸尿症1型(glutaric aciduria type 1, GA1)是一种常染色体隐性遗传疾病,该疾病各 种族发生率不同,台湾地区统计约1/106474,国 内浙江省统计约1/64708^[1-3]。戊二酰辅酶A脱氢 酶 (glutaryl-CoA dehydrogenase, GCDH) 是 色 氨 酸、赖氨酸、羟赖氨酸代谢途径的关键酶。蛋白 质中赖氨酸较色氨酸含量更丰富。GA1 病因为编 码 GCDH 的基因发生突变致 GCDH 活性减低, 最终导致赖氨酸代谢障碍,代谢产物戊二酸、3-羟基戊二酸等在体内蓄积而致病^[4]。GA1常在患 儿 6~36 个月时因感染、腹泻、手术等非特异性 因素诱发急性脑病危象而被发现并诊断。急性脑 病危象后遗留不可逆性神经损伤。除脑组织外肝 脏 GCDH 含量亦很丰富,而且肝脏是氨基酸代谢 和能量代谢的重要器官。肝脏在 GA1 发病中占有 重要角色,由此推测肝脏亦是 GA1 受累器官,然 而 GA1 患儿临床表现少有肝脏损伤。既往动物模 型研究亦显示脑组织损伤明显强于肝脏^[5-8]。研 究 GA1 致神经元和肝细胞损伤的差异性,有助于 为寻找 GA1 治疗的新途径提供新的理论依据。迄 今尚无细胞模型研究肝脏的损伤作用。原代肝细 胞培养操作过程复杂,培养条件苛刻,慢病毒感 染效率难以保证,因此本研究采用正常大鼠永生 化的肝细胞 BRL-3A 细胞 (big rat liver-3A cells) 进行研究,操作简单,成本低,批间差异小。前 期研究已成功构建含 shRNA 慢病毒载体靶向沉默 GCDH 基因, 慢病毒感染神经元结合高浓度赖氨 酸培养成功构建 GA1 神经损伤细胞研究模型^[9]。 为了进一步研究 GA1 对肝脏的损伤作用,本研究 构建含 shRNA 慢病毒载体感染 BRL 肝细胞系, 靶 向沉默 GCDH 基因,结合高浓度赖氨酸培养模拟 GA1 代谢累积物, 通过 MTT 和 Hoechst 33342 检测 细胞活性及调亡情况,通过 Western blot 检测反映 细胞凋亡的经典指标 Caspase3 水平, 以进一步评 价肝细胞活性。

1 材料与方法

1.1 BRL 肝细胞培养

液氮中取出冻存细胞(中科院上海细胞库), 迅速于 37℃水浴中解冻。1000r/min 离心 2 min 后 超净台中弃上清,新鲜培养基重悬细胞(90%DMEM 高糖培养基 +10% 胎牛血清,均购自美国 Gibico 公司),调整细胞数约为5×10⁴/孔种植于6孔板。 细胞生长至90% 融合时胰酶(美国 Gibico 公司) 消化传代。

1.2 慢病毒感染肝细胞及感染率检测

细胞融合度约 30% 时随机分为正常对照组、 阴性对照组和 GCDH 沉默组,正常对照组细胞无 任何处理,阴性对照组和 GCDH 沉默组分别用 阴性对照慢病毒和携带靶向沉默 GCDH 基因的 shRNA 慢病毒转染(上海吉凯基因化学技术有限 公司)^[9]。预实验筛选出最佳感染复数(MOI=病 毒数/细胞数)为 20。慢病毒载体本身携带绿色 荧光蛋白,感染 72 h 后采用荧光显微镜(日本 OLYMPUS)观察阴性对照组和 GCDH 沉默组感染 效率。

1.3 Western blot 法检测 GCDH 蛋白表达水平

慢病毒感染 72h 后弃培养基, PBS 液洗细胞 2次后,加细胞裂解液收集细胞至 Ep 管中,50 W 超声仪震荡 10 s,冰上静置 10 min,重复 3 次。 200 mA SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 75 V 和分离胶 120 V 恒压电泳),转膜 45 min 至 PVDF 膜上。 转膜后 4℃一抗(β-actin 兔抗鼠单克隆抗体购自美 国 Santa Cruz 公司,GCDH 兔抗鼠多克隆抗体购自 武汉三鹰生物技术有限公司,以1:100 稀释)孵 育过夜,二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 购于北京中杉金桥生物技术有限公司,以1:3000 稀释)孵育 1 h,ECL 显色。UVP Labworks 照相, Labworks 4.6 软件定量分析光密度值。每组每次实 验设 3 个平行样本,整个实验独立重复 3 次,检 测结果以 GCDH 相对于β-actin 相对表达量表示。

1.4 MTT 检测细胞活性

BRL 细胞经慢病毒感染 72 h 后传代培养于 96 孔板,分別用普通培养基和含 5 mmol/L 赖氨酸 (美 国 Sigma 公司)的培养基培养 24 h 后行 MTT 检测。 每孔细胞(90 µL 培养基)加 5 mg/mL MTT (美国 Amresco 公司)10 µL, 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中孵 育 4 h 后,换 DMSO 室温摇床震荡 15 min。570 nm 测量波长、630 nm 参照波长测定各孔光密度值(OD 值)。每组设 3 个复孔,整个实验独立重复 6 次。

1.5 Hoechst 33342 检测细胞凋亡

BRL 细胞经慢病毒感染 72 h 后传代培养于 96 孔板,分别用普通培养基和含 5 mmol/L 赖氨酸的

培养基培养 24 h 后行 Hoechst 33342 检测。37℃避 光,终浓度 10 µg/mL Hoechest 33342 (美国 Sigma 公司) 孵育细胞 10 min。4% 多聚甲醛、避光固定 细胞 10 min, PBS 洗涤细胞后荧光显微镜下观察。 每组设 3 个复孔,每孔随机选择 10 个视野拍摄, 计算 Hoechest 33342 染色阳性核比例。整个实验独 立重复 6 次。

1.6 Western blot 检测 Caspase3 表达水平

BRL 细胞经慢病毒感染 72 h 后传代培养于 6 孔板,继续用含 5 mmol/L 赖氨酸的培养基培养 24 h 后提取蛋白,检测方法同 1.3 小节(Caspase3 兔抗鼠多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,以 1:500 稀释)。每组每次实验设 3 个平行样本,整 个实验独立重复 3 次,检测结果以 Caspase3 相对 于 β-actin 相对表达量表示。

1.7 统计学分析

运用 SPSS 17.0 统计软件包对数据行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差(x̄±s)表示,两 组间比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单 因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验。 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BRL 肝细胞培养与慢病毒感染

MOI=20时,倒置显微镜下可见感染后 BRL 细胞与正常对照组 BRL 细胞均呈不规则多角形,相互连接成片,胞核折光性好。荧光显微镜下可见阴性对照组和 GCDH 沉默组 90% 以上 BRL 细胞呈绿色荧光,提示被慢病毒成功感染。见图 1。



图 1 慢病毒感染 BRL 细胞(×200) MOI=20 时,各组细胞在光镜下观察均呈不规则多角形,相互连接成片,胞核折光性好。被慢病毒成功感染的细胞在荧光显微镜下呈绿色荧光,提示阴性对照组和 GCDH 沉默组感染效率高达 90% 以上,且细胞活性好。

2.2 慢病毒感染后 BRL 肝细胞 GCDH 蛋白表达 水平检测

各组 GCDH 蛋白表达量比较差异有统计学意义(F=196.17, P<0.01)。与正常对照组和阴性对

照组比较,GCDH 沉默组 GCDH 蛋白表达量显著 下降(P<0.01);而正常对照组与阴性对照组间比 较,GCDH 蛋白表达量差异无统计学意义(P>0.05)。 见图 2。



图 2 Western blot 检测各组细胞 GCDH 蛋白表达水 平 上图为各组细胞 GCDH 蛋白表达电泳图;下图为各组细胞 GCDH 蛋白水平比较统计图 (*n*=3), a 示与正常对照组比较, *P*<0.01; b 示与阴性对照组比较,*P*<0.01。

2.3 GCDH 基因沉默及高浓度赖氨酸对各组 BRL 肝细胞活性的影响

各处理组间 OD 值比较差异无统计学意义 (*P*>0.05),说明各处理组间细胞活性无明显差异, GCDH 表达减少和 5 mmol/L 赖氨酸对 BRL 肝细胞 活性均无影响,见表 1。

表 1 MTT 检测各组 BRL 细胞 OD 值比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	п	OD 值
正常对照组	6	0.540 ± 0.020
正常对照组 +5 mmol/L 赖氨酸	6	0.528 ± 0.028
阴性对照组	6	0.529 ± 0.040
阴性对照组 +5 mmol/L 赖氨酸	6	0.522 ± 0.023
GCDH 沉默组	6	0.517 ± 0.034
GCDH 沉默组 +5 mmol/L 赖氨酸	6	0.520 ± 0.017
F 值		0.322
<i>P</i> 值		0.890

2.4 GCDH 基因沉默及高浓度赖氨酸对各组 BRL 肝细胞凋亡的影响

各组细胞胞核均被染成蓝色,未见明显局部 深染高密度区或核碎片(图3)。各组细胞正常 细胞核比例均在95%以上,且各组间比较差异无 统计学意义(P>0.05),说明GCDH表达减少和 5 mmol/L赖氨酸对 BRL 肝细胞核形态影响均不明 显,见表2。



图 3 各处理组细胞 Hoechest 33342 染色(荧光显微镜, ×200) 各组细胞胞核均被染成蓝色,未见明显局部 深染高密度区或核碎片。

表 2 Hoechest 33342 染色检测各组 BRL 细胞正常核比 例比较 (x̄±s)

组别	п	正常核比例
正常对照组	6	0.963 ± 0.007
正常对照组 +5 mmol/L 赖氨酸	6	0.954 ± 0.017
阴性对照组	6	0.953 ± 0.014
阴性对照组 +5 mmol/L 赖氨酸	6	0.953 ± 0.011
GCDH 沉默组	6	0.950 ± 0.012
GCDH 沉默组 +5 mmol/L 赖氨酸	6	0.947 ± 0.009
F 值		0.638
P 值		0.675

2.5 赖氨酸作用下 GCDH 沉默组与阴性对照组 Caspase3 表达水平

经 5 mmol/L 赖氨酸培养后,GCDH 沉默组 与阴性对照组间 Caspase3 表达水平比较差异无 统计学意义(P>0.05),说明 GCDH 表达减少和 5 mmol/L 赖氨酸对 BRL 肝细胞凋亡无影响。见图4。



图 4 Western blot 检测 GCDH 沉默组与阴性对照组 间 Caspase3 表达水平变化 上图为电泳条带图;下图为统 计图 (*n*=3)。

3 讨论

GA1 是一种常染色体隐性遗传疾病,是指编码 GCDH 的基因发生突变导致 GCDH 酶活性缺陷 而引起的疾病。GCDH 位于线粒体基质内,GCDH 缺陷致色氨酸、赖氨酸、羟赖氨酸代谢障碍,戊

二酸、3羟基戊二酸、戊二酰肉碱在体液和组织中 浓度升高。GCDH 广泛分布于脑、肾脏、肝脏、心 脏、皮肤等多个器官^[10]。肝脏作为氨基酸代谢和 能量代谢的重要器官,急性脑病危象发作时常伴 有低血糖、代谢性酸中毒、高氨血症等。GA1 治 疗指南中提出在感染、外伤等急性分解代谢状态 时需及时补充葡萄糖等能量供给^[5]。对 GA1 发病 机制的探讨, 肝脏是除脑之外的又一大重要器官。 但 GA1 的临床表现主要为生后早期急性脑病危象 后继发的以纹状体为主的神经系统损伤或年长儿 甚至成人发病的隐匿性神经系统病变, 少有肾脏 损伤的报道,几乎未见肝脏的损伤^[11]。高赖氨酸 饮食饲养 GCDH 基因敲除小鼠模拟了 GA1 体内生 化改变及纹状体为主的神经系统损伤,同时用该 模型检测肝脏转氨酶并无改变^[6]。GCDH 基因敲除 小鼠生后 30 d 时腹膜内注射赖氨酸致使其纹状体 神经元出现明显的氧化应激损伤, 而其肝脏和心 脏并无明显损伤^[7]。GCDH基因敲除小鼠生后15d 时腹膜内注射赖氨酸致使其肝脏及脑组织内还原 性谷胱甘肽和巯基含量降低, 羰基含量增加。但 其脑组织的氧化应激损伤明显强于肝脏¹⁸¹。了解肝 脏受损不明显的机制,有助于为GA1治疗提供新 的理论依据。

前期研究证实携带靶向沉默 GCDH 基因的 shRNA 慢病毒感染原代培养纹状体神经元,结合 高浓度赖氨酸(5 mmol/L)培养环境可有效模拟 GA1 内环境对纹状体神经元的损伤。并利用该细 胞模型初步研究了 GA1 神经元损伤机制^[9]。为了 进一步研究 GA1 对肝脏的损伤作用,本研究用携 带靶向沉默 GCDH 基因的 shRNA 慢病毒感染 BRL 肝细胞系,结合高浓度赖氨酸培养环境模拟 GA1 内环境对肝细胞活性的影响。慢病毒感染 BRL 肝 细胞感染效率及 GCDH 蛋白沉默效率均增高。前 期研究在 GA1 纹状体神经元模型中, 阴性对照病 毒及含 5 mmol/L 赖氨酸培养基对神经元细胞活性 无影响; 靶向沉默 GCDH 基因慢病毒促神经元凋 亡, 且 5 mmol/L 赖氨酸进一步促进该效应¹⁹。在 该实验细胞模型中, MTT 和 Hoechst 33342 染色实 验, Caspase3 水平检测均显示赖氨酸代谢累积物 对肝细胞损伤不明显。

这些研究都提示在 GA1 患儿中脑组织,尤其 是纹状体较周围其他器官组织更易出现损伤。据

血液和尿液中戊二酸、3羟基戊二酸含量的高低, GA1 可分为高分泌型和低分泌型 2 种生化表型。 但是生化表型和临床表现间却无相关性,即体液 中戊二酸、3羟基戊二酸浓度与神经系统损伤程 度不相关^[12]。CGDH 是位于线粒体基质内的酶, 赖氨酸从血液至胞内再至线粒体内代谢,同时其 活性缺陷导致的戊二酸、3羟基戊二酸累积首先 发生在线粒体内,进一步转运至胞浆外。代谢累 积物胞内外的转运与 ORC1/2、ODC、OGC 等多种 转运体蛋白有关^[13]。这些转运体蛋白在 GA1 患儿 神经组织和肝脏中含量可能不一致导致二者间损 伤存在差异性。同时还有研究发现赖氨酸在肝脏 和脑组织中的代谢存在差异^[14]。在肝脏主要经线 粒体酵母氨酸途径代谢,在脑组织主要经过氧化 物酶体甲基哌啶途径代谢, 二者最终的代谢产物 都汇聚至线粒体中经 GCDH 代谢。代谢途径下游 GCDH 活性缺陷,上游代谢累积物及累积方式不同 也可能是 GA1 患儿脑组织和肝脏组织损伤差异性 的原因。

本研究构建含 shRNA 慢病毒载体靶向沉默 GCDH 基因, 慢病毒感染 BRL 肝细胞系, 结合高 浓度赖氨酸培养环境建立 GA1 肝细胞研究模型。 将其和与之对应的神经元模型对比研究 GA1 患 儿脑组织和肝脏组织损伤差异性的机制。有望为 GA1 治疗提供新的理论依据。

[参考文献]

- Govender R, Mitha A, Mubaiwa L. A review of patients with glutaric aciduria type 1 at Inkosi Albert Luthuli Central Hospital, Durban, South Africa[J]. S Afr Med J, 2017, 107(3): 201-204.
- [2] Tsai FC, Lee HJ, Wang AG, et al. Experiences during newborn screening for glutaric aciduria type 1: diagnosis, treatment, genotype, phenotype, and outcomes[J]. J Chin Med Assoc, 2017, 80(4): 253-261.
- [3] Yang L, Yin H, Yang R, et al. Diagnosis, treatment and outcome

of glutaric aciduria type I in Zhejiang Province, China[J]. Med Sci Monit, 2011, 17(7): 55-59.

- [4] Jafari P, Braissant O, Bonafé L, et al. The unsolved puzzle of neuropathogenesis in glutaric aciduria type I[J]. Mol Genet Metab, 2011, 104(4): 425-437.
- [5] Boy N, Mühlhausen C, Maier EM, et al. Proposed recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type I: second revision[J]. J Inherit Metab Dis, 2017, 40(1): 75-101.
- [6] Zinnanti WJ, Lazovic J, Wolpert EB, et al. A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I[J]. Brain, 2006, 129(Pt 4): 899-910.
- [7] Seminotti B, da Rosa MS, Fernandes CG, et al. Induction of oxidative stress in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice by acute lysine administration[J]. Mol Genet Metab, 2012, 106(1): 31-38.
- [8] Seminotti B, Ribeiro RT, Amaral AU, et al. Acute lysine overload provokes protein oxidative damage and reduction of antioxidant defenses in the brain of infant glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: a role for oxidative stress in GA I neuropathology[J]. J Neurol Sci, 2014, 344(1-2): 105-113.
- [9] Gao J, Zhang C, Fu X, et al. Effects of targeted suppression of glutaryl-CoA dehydrogenase by lentivirus-mediated shRNA and excessive intake of lysine on apoptosis in rat striatal neurons[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63084.
- [10] Braissant O, Jafari P, Remacle N, et al. Immunolocalization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH) in adult and embryonic rat brain and peripheral tissues[J]. Neuroscience, 2017, 343: 355-363.
- [11] Kölker S, Valayannopoulos V, Burlina AB, et al. The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype[J]. J Inherit Metab Dis, 2015, 38(6): 1059-1074.
- [12] Wang Q, Li X, Ding Y, et al. Clinical and mutational spectra of 23 Chinese patients with glutaric aciduria type 1[J]. Brain Dev, 2014, 36(9): 813-822.
- [13] Sauer SW. Biochemistry and bioenergetics of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency[J]. J Inherit Metab Dis, 2007, 30(5): 673-680.
- [14] Sauer SW, Opp S, Hoffmann GF, et al. Therapeutic modulation of cerebral L-lysine metabolism in a mouse model for glutaric aciduria type I[J]. Brain, 2011, 134(Pt 1): 157-170.

(本文编辑:万静)