

宫内生长受限大鼠肝脏组蛋白 H3 乙酰化的研究

刘晓梅<sup>1</sup>, 张海兰<sup>2</sup>, 宋薇薇<sup>3</sup>, 焦伊胜<sup>3</sup>, 卢岩<sup>1</sup>

(中国医科大学附属盛京医院 1. 实验研究中心; 2. 小儿外科; 3. 妇产科, 辽宁 沈阳 110004)

**〔摘要〕** 目的 研究孕期营养不良造成的宫内生长受限 (intrauterine growth retardation, IUGR) 大鼠肝脏中组蛋白 H3 的乙酰化水平, 以及组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylase, HDAC1) 的表达变化, 探讨两者之间的相互联系。方法 采用孕期全程低蛋白饮食法建立大鼠 IUGR 模型, 分离成年雄性子鼠 (8 周) 的肝脏, 采用荧光定量 RT-PCR 技术检测肝脏中 HDAC1 的 mRNA 表达, Western blot 方法检测肝细胞核中 HDAC1 的蛋白含量, 以及组蛋白 H3/K9 的乙酰化水平。结果 IUGR 组 HDAC1 的 mRNA 水平仅是对照组的 54% ( $t = 2.042, P < 0.05$ ), 肝细胞核中的 HDAC1 蛋白表达同样明显低于对照组 ( $438 \pm 47$  vs  $1\,128 \pm 110$ ) ( $t = 2.179, P < 0.05$ )。与之相反, 与对照组 ( $10.5 \pm 1.2$ )% 相比, IUGR 大鼠肝脏中乙酰化的 H3/K9 占总 H3 组蛋白的百分比 ( $17.3 \pm 1.6$ )% 明显增高 ( $t = 3.597, P < 0.01$ ), 且核中的 HDAC1 蛋白水平与 H3/K9 乙酰化水平明显负相关 ( $r = -0.781, P < 0.01$ )。结论 IUGR 大鼠肝细胞核中 HDAC1 蛋白表达降低, 引起组蛋白 H3 的乙酰化水平增高, 染色质的表观遗传学变化可能是肝脏某些基因转录调控变化的分子基础。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11 (9): 753 - 756]

**〔关键词〕** 宫内生长受限; 组蛋白; 组蛋白去乙酰化酶; 乙酰化; 大鼠

**〔中图分类号〕** R-33 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008 - 8830 (2009) 09 - 0753 - 04

Acetylation of hepatic histone H3 in rats with intrauterine growth retardation

LIU Xiao-Mei, ZHANG Hai-Lan, SONG Wei-Wei, JIAO Yi-Sheng, LU Yan. Experimental Research Center, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: liuxm1@sj-hospital.org)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of intrauterine growth retardation (IUGR) caused by malnutrition during pregnancy on the acetylation of histone H3 and expression of histone deacetylase 1 (HDAC1) in the liver of the adult offspring and to explore the relationship between them. **Methods** Male 8-week-old offspring from maternal protein-malnutrition dams were studied. The expression of HDAC1 mRNA in the liver was measured by fluorescent quantization RT-PCR. The levels of hepatic nuclear HDAC1 protein and acetylation of histone H3/K9 were assessed by Western blot. **Results** The hepatic HDAC1 mRNA expression in IUGR rats was reduced to 54% of that of normal control rats ( $t = 2.042, P < 0.05$ ). A decline in nuclear expression of HDAC1 protein ( $438 \pm 47$ ) was also noted when compared with normal controls ( $1\,128 \pm 110$ ) ( $t = 2.179, P < 0.05$ ). In contrast, the percentage of acetylated histone H3/K9 in IUGR rats ( $17.3 \pm 1.6\%$ ) increased significantly compared with that of normal control rats ( $10.5 \pm 1.2\%$ ) ( $t = 3.597, P < 0.01$ ). The level of acetylated histone H3/K9 was negatively correlated with the HDAC1 protein concentration ( $r = -0.781, P < 0.01$ ). **Conclusions** Increased hepatic acetylation of histone H3 in the IUGR offspring might be caused by decreased HDAC1 expression in nuclear protein. This may contribute to the transcription change of some genes in the liver. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (9): 753 - 756]

**Key words:** Intrauterine growth retardation; Histone; Histone deacetylase; Acetylation; Rats

国内外流行病学研究和动物实验都证实宫内生长受限 (IUGR) 是糖耐量异常和成年 2 型糖尿病独立的危险因素<sup>[1,2]</sup>。笔者采用蛋白营养不良法建立一种 IUGR 大鼠模型, 该模型持续喂养至成年, 观察到机体明显存在胰岛素抵抗, 出现肥胖及糖尿病的临床表现, 且发现 IUGR 大鼠肝脏和肌肉中多个基因表达发生变化, 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (phosphoenol-pyruvate carboxykinase, PEPCK) 和葡萄糖 6 磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase) 等糖异生限速酶的 mRNA 表达增高, 从而引起糖代谢紊乱<sup>[3]</sup>。造成这种持续存在至成年的表观遗传学改变的分子机制尚不清楚。有研究发现染色质的组蛋白高乙酰

[收稿日期] 2009 - 02 - 04; [修回日期] 2009 - 02 - 27  
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30672237)。  
[作者简介] 刘晓梅, 女, 博士, 助理研究员。主攻方向: 胎儿起源的成人疾病。

化会促进转录,而组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylases,HDAC1) 可以去掉组蛋白 H3,H4 的 N 端尾上的赖氨酸上的乙酰基,从而抑制转录<sup>[4]</sup>。所以我们推测上述基因表达的变化可能与乙酰化的改变有关。为证实这一假设,我们进一步研究 IUGR 大鼠肝组织中组蛋白 H3 的乙酰化水平,以及 HDAC1 的表达,探讨宫内营养不良对子代染色质表观遗传学的影响。

# 1 材料与方法

## 1.1 动物模型的制作

参考 Desai 方法<sup>[5]</sup>建立 IUGR 模型,Wistar 大鼠由中国医科大学实验动物中心提供,体重 230 ~ 280 g,每天光照 12 h,室温保持 24℃。雌性与雄性按 2:1 比例合笼,次日晨取阴道涂片镜检发现精子为确定妊娠,孕鼠随机分为两组,其中正常对照组孕鼠饲以标准饲料(蛋白质含量 23%),IUGR 组孕鼠受孕第 1 日饲以热卡相同的低蛋白饲料(蛋白质含量 8%),每日进食饲料量均为 18 ~ 20 g。孕鼠自然分娩,每窝超过 10 只者舍弃部分雌鼠仔,使鼠仔控制在 8 ~ 10 只。分娩后两组母鼠都饲以标准饲料,满 3 周后断乳子鼠饲以标准饲料,8 周时空腹 12 h 后两组随即取 8 只雄性子鼠后处死分离肝脏 - 80℃ 冻存。

## 1.2 试剂

兔抗大鼠 HDAC1、组蛋白 H3 和第 9 位赖氨酸乙酰化的 H3/K9 IgG (Santa Cruz),AP 标记的山羊抗兔二抗(中杉公司),TRIzol (Invitrogen),PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa),大鼠 HDAC1 (GenBank no. NM001025409) 及内参 GAPDH (GenBank no. M17701)引物及 TaqMan 荧光探针由 TaKaRa 公司合成。HDAC1: 上游引物: 5-TGAGAATGCCCCAT-ACC-3, 下游引物: 5-GGAAATTGTTTGT-CAGGGTCTT-3, 探针: 5-TCCCTGAGGATGCCATC-CCAGAAG-3。GAPDH: 上游引物: 5-CAAGATGGT-GAAGGTCGGTGT-3, 下游引物: 5-CAAGAGAAG-GCAGCCCTGGT-3, 探针: 5-GCGTCCGATACGGC-CAAATCCG-3。

## 1.3 实时荧光定量 RT-PCR

采用 TRIzol 试剂提取肝组织总 RNA,逆转录反应体系中加入总 RNA 1 μg,5 × PrimeScript Buffer 2 μL,PrimeScript RT 酶 0.5 μL,Oligo dT 引物 (50 μM)1 μL,无 RNase 水加至 10 μL,37℃ 15 min,85℃ 5 s,产物为 cDNA。PCR 反应体系中,加入待

测样本 cDNA 2 μL,上、下游引物 (10 μM) 各 0.5 μL,TaqMan 探针 (3 μM) 1 μL,Premix Ex Taq (2 ×) 12.5 μL,dH<sub>2</sub>O 加至 25 μL。在 LightCycler (Roche) 荧光定量 PCR 仪中进行扩增,反应条件: 95℃ 10 s,然后 93℃ 5 s,60℃ 20 s,40 个循环,每个样本重复实验 2 次。反应结束后分析扩增曲线,采用 2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算 HDAC1 mRNA 相对含量<sup>[6]</sup>。

## 1.4 Western blot 检测

参考文献提取大鼠肝组织的组蛋白和肝细胞核蛋白<sup>[7,8]</sup>,采用 BCA 法进行蛋白定量。分别取 20 μg 组蛋白和 50 μg 核蛋白经 (15% 组蛋白,10% 核蛋白) SDS-PAGE 电泳分离,将蛋白转移至 PVDF 膜上。转印膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别与抗乙酰化 H3/K9 (1: 400)、抗 H3 (1: 1 000) 和抗 HDAC1 (1: 500) 的一抗 4℃ 杂交过夜。洗膜后与碱性磷酸酶标记的对应二抗室温下杂交 2 h,加入显色底物反应至特异性条带出现,应用 GIS-2020 凝胶成像及分析系统分析目的蛋白的相对表达。每个样本重复实验 2 次。

## 1.5 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,实验数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,均数比较采用 *t* 检验,相关分析用 Pearson 直线相关分析,*P* < 0.05 为差异具有显著性意义。

# 2 结果

## 2.1 两组大鼠肝脏组蛋白 H3 乙酰化水平的比较

总的组蛋白 H3 含量两组比较差异无显著性,IUGR 组乙酰化的 H3/K9 占总 H3 组蛋白的百分比为 (17.3 ± 1.6)%,明显高于对照组的 (10.5 ± 1.2)% (*t* = 3.597,*P* < 0.01)。Western blot 结果见图 1,统计分析结果见表 1 和图 2。

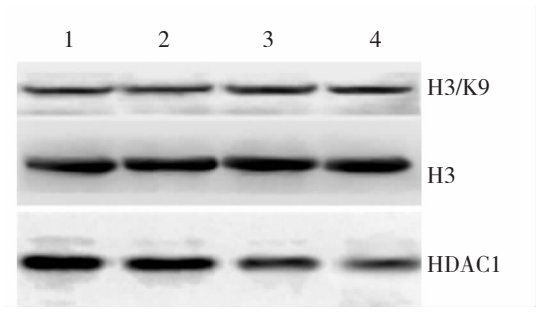


图 1 Western blot 检测肝脏乙酰化的 H3/K9 和 HDAC1 等蛋白的表达 1 ~ 2 为对照组; 3 ~ 4 为 IUGR 组。

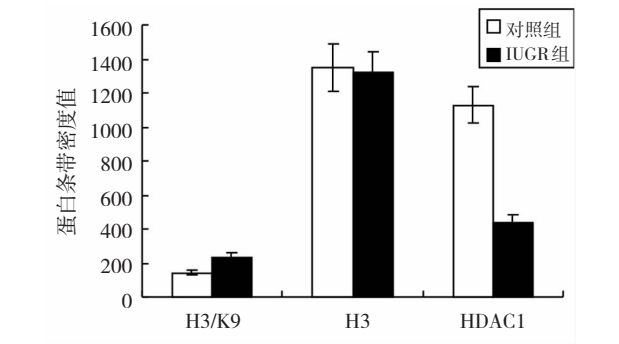


图 2 肝脏乙酰化的 H3/K9、H3 和 HDAC1 蛋白表达变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 表 1 H3/K9、HDAC1 蛋白的密度值和 HDAC1 mRNA 的相对量 |                             |                   |                             |                                       | ( $\bar{x} \pm s$ ) |
|-----------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| 组别                                      | H3/K9                       | H3                | HDAC1                       | HDAC1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) |                     |
| 对照组                                     | 142.7 ± 15.09               | 1 347.92 ± 141.86 | 1 128.34 ± 109.51           | 1.01 ± 0.13                           |                     |
| IUGR 组                                  | 228.63 ± 28.14 <sup>b</sup> | 1 318.17 ± 127.54 | 437.83 ± 46.59 <sup>a</sup> | 0.54 ± 0.06 <sup>a</sup>              |                     |
| t 值                                     | 3.597                       | 1.685             | 2.179                       | 2.042                                 |                     |

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$

3 讨论

IUGR 个体成年后糖尿病和高血压等代谢综合征的发病率明显增加,这一点已在多个国家和民族的流行病学调查和实验研究中得到了证实。IUGR 个体发生胰岛素抵抗的分子机制目前是胎儿起源的成人疾病领域研究的重点。目前有多个研究提示 IUGR 个体的胰岛素抵抗与胰岛素敏感器官(肝、骨骼肌和脂肪)中的胰岛素信号通路分子和糖代谢相关酶的表达和活性改变有关<sup>[9]</sup>。我们采用妊娠期蛋白营养不良大鼠模型进行研究,该模型已经证实造成小鼠机体产生胰岛素抵抗<sup>[3]</sup>,发现 IUGR 大鼠肝脏中多个糖代谢关键酶的 mRNA 表达增高,抑制了肝糖原的合成,促进肝葡萄糖输出。但造成这些基因的转录调控变化的分子机制尚不清楚。

表观遗传学研究发现基因转录激活在 DNA 水平多表现为该基因启动子序列相关组蛋白的乙酰化,组蛋白高乙酰化是基因转录激活的一个标志。组蛋白乙酰化参与真核细胞转录起始调控的机制有二:一是组蛋白的赖氨酸残基乙酰化,中和了电特性,进而改变组蛋白与 DNA 的结合状态,组蛋白-DNA 连接的破坏允许转录因子接近并启动基因转录。二是组蛋白尾部乙酰化修饰是转录调控蛋白的识别信号。组蛋白乙酰化状态呈多样性,特定基因部位的组蛋白乙酰化以位点特异方式进行<sup>[10,11]</sup>。

2.2 肝脏 HDAC1 的表达的研究

$2^{-\Delta\Delta CT}$  数值表示 IUGR 组 HDAC1 mRNA 表达的拷贝数与对照组的拷贝数之比,结果显示,IUGR 组肝组织中 HDAC1 mRNA 含量明显降低,约是对照组的 54% ( $t = 2.042, P < 0.05$ )。蛋白印迹结果同样显示 IUGR 组肝细胞核中的 HDAC1 蛋白水平明显低于对照组 ( $t = 2.179, P < 0.05$ ),Western blot 结果见图 1,统计分析结果见图 2。而且肝细胞核中的 HDAC1 蛋白水平与 H3/K9 乙酰化水平明显负相关( $r = -0.781, P < 0.01$ )。

研究证实组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸的乙酰化将激活基因的表达<sup>[12]</sup>。本研究针对 H3 的第 9 位赖氨酸位点(H3/K9)进行对比研究,结果显示 IUGR 成年大鼠肝脏中乙酰化的 H3/K9 占总 H3 组蛋白的百分比明显高于对照组,高乙酰化的组蛋白常聚于染色质的转录活跃区域,促进特定基因的转录。

组蛋白乙酰化主要由组蛋白乙酰化酶(histo-neacetylases, HATs)和组蛋白去乙酰化酶催化完成。HATs 通过在组蛋白的 N 端赖氨酸残基上引入疏水的乙酰基,使 DNA 与组蛋白间的静电引力和空间位阻增大,两者间的相互作用减弱, DNA 易于解聚,染色质呈转录活性结构,因此有利于转录因子与 DNA 模板相结合,进而激活基因转录。相反,组蛋白去乙酰化酶主要是在组蛋白 H3、H4 的 N 端尾上的赖氨酸去掉乙酰基,进而抑制基因转录<sup>[13]</sup>。本研究结果显示 IUGR 成年大鼠肝中的 HDAC1 的 mRNA 和蛋白水平明显低于对照组,且与组蛋白 H3 的乙酰化水平明显负相关。可以推测 IUGR 个体细胞核中 HDAC1 的蛋白含量降低,其对组蛋白 H3 的赖氨酸的去乙酰基作用减弱,组蛋白 H3 的高乙酰化促进了肝脏某些糖代谢关键酶基因的转录激活,从而引起胰岛素抵抗和糖尿病的发生。

基因转录的调控是 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化等机制彼此之间复杂的相互作用所导致的。未来有必要进一步研究 IUGR 个体染色质的 DNA 整体甲基化水平和关键基因的启动子的甲基化水平变化

以及 DNA 甲基化相关酶的变化,才能更深入阐明 IUGR 对染色质结构的表观遗传学影响。

[参 考 文 献]

[1] Ozanne SE, Fernandez-Twinn D, Hales CN. Fetal growth and adult diseases[J]. *Semin Perinatol*, 2004, 28(1):81-87.

[2] Lane RH, MacLennan NK, Jennifer LH, Janke SM, Pham TD. Increased hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator-1 gene expression in a rat model of intrauterine growth retardation and subsequent insulin resistance [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(7):2486-2490.

[3] 刘晓梅,卢岩,李书琴,潘莉莉. 宫内生长受限大鼠肝脏糖异生酶的表达增加与胰岛素抵抗[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(2):216-220.

[4] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications[J]. *Nature*, 2000, 403(6765):41-45.

[5] Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth restricted newborns: modulation by newborn nutrition[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288(2):91-96.

[6] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T))

method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.

[7] Baserga M, Hale MA, Ke X, Wang ZM, Yu X, Callaway CW, et al. Uteroplacental insufficiency increases p53 phosphorylation without triggering the p53-MDM2 functional circuit response in the IUGR rat kidney[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 291(2):412-418.

[8] Galasinski SC, Louie DF, Gloor KK, Reing KA, Ahn NG. Global regulation of posttranslational modifications on core histones[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(4):2579-2588.

[9] Vuguin P, Raab E, Liu B, Barzilai N, Simmons RA. Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation [J]. *Diabetes*, 2004, 53(10):2617-2622.

[10] Glazak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer[J]. *Oncogene*, 2007, 26(12):5420-5432.

[11] Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription[J]. *Nature*, 2007, 447(4):407-412.

[12] Shahbazian MD, Grunstein M. Function of site-specific histone acetylation and deacetylation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76(1):75-100.

[13] Grewal SI, Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression[J]. *Science*, 2003, 301(5634):798-802.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

欢迎订阅 2010 年《实用儿科临床杂志》

《实用儿科临床杂志》是由新乡医学院主管、主办的儿科学类高级学术刊物,为儿科学类核心期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),RCCSE 中国核心学术期刊,河南省一级期刊,美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、波兰《哥白尼索引》、美国《乌利希期刊指南》来源期刊,首批加入 WHO 西太平洋地区医学索引。本刊辟有专家论坛、学术争鸣、热点、论著、小儿神经基础与临床、中西医结合、实验研究、儿童保健、误诊分析、药物与临床、综述、小儿外科、病例(理)讨论、病例报告、临床应用研究、英文原著、诊断标准·治疗方案、继续教育等栏目。本刊为半月刊,大 16 开本,80 页,铜版纸印刷,每月 5、20 日出版。ISSN 1003-515X, CN 41-1106/R, CODEN SELZBJ, Dewey #:618. 92。国内外公开发行,国内邮发代号:36-102,国外邮发代号:SM 1763。欢迎广大儿科医务工作者和医学科教人员,各级图书馆(室)、科技情报研究院(所)通过全国各地邮局订阅,也可与本刊编辑部直接联系订阅邮购。国内定价:7. 20 元/期,172. 80 元/年;国外定价:10. 00 美元/期,240 美元/年。联系地址:河南省新乡市新乡医学院《实用儿科临床杂志》编辑部,邮政编码 453003。联系电话:0373-3029144, 0373-3831456;传真:0373-3029144;E-mail:syqk@chinajournal. net. cn; syqk@xxmu. edu. cn。