

TSC1 在肝纤维化中的表达及基因甲基化

陈晨^{1,2}, 黄成^{1,2}, 孟晓明^{1,2}, 李俊^{1,2}

摘要 目的 通过检测在大鼠肝纤维化模型及转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 刺激的大鼠肝星形细胞(HSC) T6 中结节性硬化症(TSC) 相关蛋白错构素(hamartin) 的表达, 并检测 HSC T6 细胞 TSC1 基因启动子甲基化状态, 探讨肝纤维化疾病治疗的新靶点。方法 构建大鼠肝纤维化模型, 培养 HSC T6 细胞。利用 Western blot 法检测 hamartin 蛋白表达, 利用焦磷酸测序检测 TSC1 启动子甲基化。结果 与正常对照组比较, 肝纤维化模型组 TSC1 蛋白表达量较小($P < 0.01$), 且 TSC1 基因启动子甲基化程度较高。结论 TSC1 可能与肝纤维化形成有一定关联。

关键词 TSC1; 肝纤维化; 甲基化

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1132-04

肝纤维化是许多慢性肝病发展到肝硬化的中间

过渡阶段, 其中有 25% ~ 40% 最终发展成为肝硬化, 更严重的发展为肝癌。肝脏的细胞外基质(extracellular matrix, ECM) 的合成和降解不平衡, 而导致纤维结缔组织的过度沉积, 是肝纤维化的主要病理表现^[1]。HSCs 的激活与增殖是肝纤维化发生发展其中的中心环节^[2]。肝纤维化的形成是受各类因素网路调控的, 目前的研究^[1]表明其涉及多种相关细胞因子以及诸多信号转导通路。结节硬化症(tuberous sclerosis complex, TSC) 是一种罕见的常染色体显性遗传病, 其发病机制是由于 TSC1 和 TSC2 基因中任何一个发生变异。TSC1 基因定位 9q34, TSC2 基因定位于 16p13.3, TSC1 和 TSC2 编码的基因产物分别为错构素(hamartin) 和结节素(tuberin), 蛋白分子量大小为 130 ku 与 200 ku^[3-4]。研究^[5]显示 TSC1 在肾纤维化模型中低表达, 并且敲除 TSC1 基因的转基因小鼠可以显示出肾间质纤维细胞的激活以及肾纤维化。该研究旨在探讨 TSC1 是否在肝纤维化中有表达变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料 HSC T6 细胞株来自安徽医科大学

2016-04-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81273526, 81473268); 安徽省科技攻关项目(编号: 1301042212)

作者单位: ¹ 安徽医科大学药学院, ² 安徽医科大学肝病研究所, 合肥 230032

作者简介: 陈晨, 女, 硕士研究生;

李俊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

Effect of PJ34 on the expression of multidrug resistance related gene in A549/DDP cells

Han Ke, Hao Jiqing

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the impact of PJ34 on human pulmonary carcinoma cell line A549/DDP-related multiple drug resistance genes. **Methods** A549/DDP cells were divided into 3 groups: negative control, DDP-treated group, PJ34-treated group, PJ34 and DDP-treated group. The mRNA transcription levels of LRP, MRP, P-gp, GST- π , TOPO-II α were quantified in each group by RT-PCR. **Results** The mRNA transcription levels of LRP, MRP, P-gp, GST- π in A549/DDP cells were significantly higher than those in the A549 cells ($P < 0.05$). The mRNA transcription levels of MRP, P-gp in A549/DDP cells dramatically decreased in a time and dose-dependent manner after PJ34 treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** LRP, MRP, P-gp, GST- π are probably involved in secondary drug resistance of DDP in A549/DDP cells. PJ34 sensitizes DNA to DDP damage by indirectly downregulating mRNA levels of MRP and P-gp.

Key words pulmonary adenocarcinoma; PARP-1 inhibitors; cisplatin; tolerance; multidrug resistance gene

药学院。ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo 公司; TSC1、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA) 和胶原蛋白 I 型(Collagen type I, Col I) 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; DNA 抽提 Kit、Eppendorf 管、PCR 管、移液器吸头购自美国 Axygen 公司; 亚硫酸盐转化试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; TSC1 引物由上海英骏生物技术有限公司提供; 双蒸水、TBE 购自上海希匹吉生物技术有限公司。

1.2 动物及模型制备 清洁级 SD 大鼠 50 只, 雌雄不限, 180 ~ 220 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供。将大鼠随机分为正常对照组、肝纤维化模型组, 每组 10 只。模型组的大鼠皮下注射以橄榄油稀释的 10% CCl_4 (0.5 mg/kg), 每周 2 次, 正常对照组的大鼠则注射同等体积的橄榄油溶媒; 将肝纤维化模型组的大鼠于第 12 周末处死, 正常对照组的大鼠在 20 周末处死, 迅速取出肝组织, 从肝右叶中部切取肝组织两块, 分别置于 10% 甲醛中固定、采用石蜡包埋并提取肝脏总蛋白。

1.3 Western blot 法检测大鼠肝组织蛋白 取各组 100 mg 大鼠肝脏组织, 将其剪成细小的碎片, 置于匀浆器中加入裂解液, 研磨至肝脏组织消失。12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 测定蛋白浓度。取各组蛋白提取液, 并加入等体积的上样缓冲液, 混合, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水煮沸 5 min, 使蛋白变性。提取各组细胞总蛋白, 弃掉旧培养液, 使用 PBS 清洗待处理细胞 2 遍, 每孔加 RIPA 裂解液 200 μl (含 2 μl 蛋白酶抑制剂 1 mmol/L PMSF), 放置在冰上裂解 30 min, 并收集细胞裂解悬液, 于 12 000 r/min 冷冻离心机离心 30 min 后收集上清液。采用 BCA 法定量, 取 20 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 垂直电泳, 分离蛋白质, 并将样品蛋白从凝胶转移至 PVDF 膜上。使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 3 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 分别使用 β -actin、TSC1、 α -SMA 和 Col I 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜 (稀释浓度为 1 : 1 000), 再用 TBST 洗膜 3 次, 每次约 10 min, 对应加入二抗山羊抗鼠和抗兔 (稀释比均为 1 : 10 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 遍后, 最后加入 ECL 化学发光试剂显影。

1.4 焦磷酸测序 按照 Axygen DNA 抽提 Kit 说明提取基因组 DNA, 并对基因组 DNA 进行亚硫酸盐修饰。PCR 反应体系 [50 μl : H_2O 8.5 μl 、KAPA 2G Robust HS ReadyMix 12.5 μl 、up-Primer (50 pmol/ μl) 1 μl 、down-Primer (50 pmol/ μl) 1 μl 、Template (DNA) 2 μl]。引物设计 TSC1 上游引物: 5'-GGGATTGT-

GAGGTAAATAGTTGAG-3'; TSC1 下游引物: 5'-CCCTACCAAACAAATAAATCTCTT-3'; TSC1 测序引物: 5'-GGGTTTTTTGGGGTAG-3', 另 PCR 长度为 161 bp。PCR 扩增后, 使用 QIAGEN PyroMark Q96 ID 焦磷酸测序仪进行测序。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两两比较采用 t 检验, 采用 Pearson 法进行相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝脏组织的 TSC1 蛋白表达 使用 Western blot 法检测正常对照组及肝纤维化模型组的大鼠肝脏组织的蛋白表达量。与正常对照组的大鼠肝组织比较, 肝纤维化模型组的 α -SMA 和 Col I 蛋白表达量明显升高 ($t = 7.283, 9.118, P < 0.01$), 而 TSC1 蛋白的表达量明显减小 ($t = 15.35, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 HSC T6 的 TSC1 蛋白表达 采用 Western blot 法检测正常对照组及 TGF- β 1 刺激组的 α -SMA、Col I 和 TSC1。与正常对照组比较, TGF- β 1 刺激组 α -SMA、Col I 表达上升 ($t = 12.60, 16.49, P < 0.01$), TSC1 表达减少 ($t = 4.256, P < 0.01$)。见图 2。

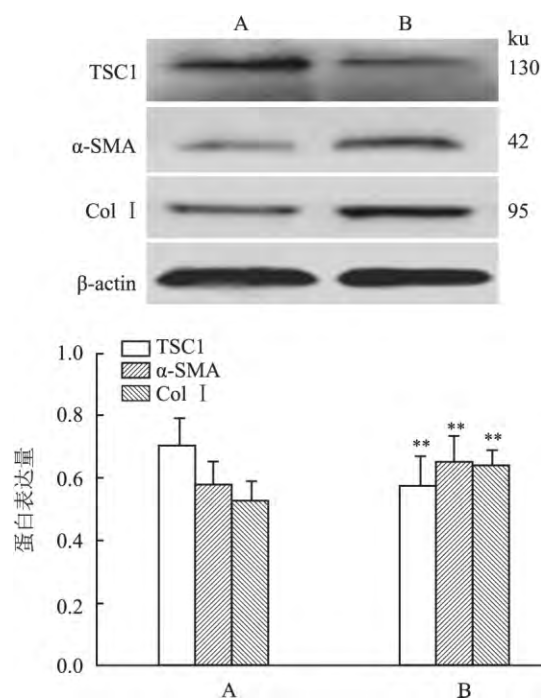


图1 Western blot 法检测大鼠肝脏组织的蛋白表达

A: 正常对照组; B: 肝纤维化模型组; 与正常对照组比较: ** $P <$

0.01

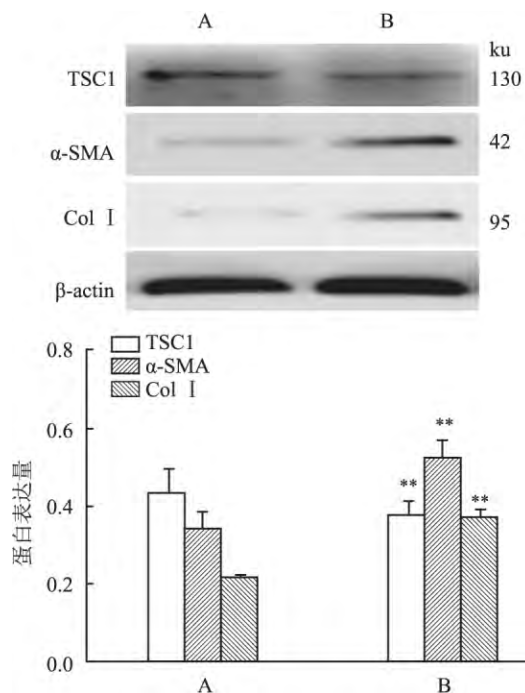


图2 Western blot 法检测大鼠肝脏组织的蛋白表达

A: 正常对照组; B: TGF-β1 刺激组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 TSC1 启动子甲基化焦磷酸测序 提取 HSC T6 细胞的基因组 DNA, 采用焦磷酸测序, 结果见图 3。可以看到测序峰清晰。正常对照组及 TGF-β1 刺激组均检测了同样的 3 个位点。正常对照组 3 个位点 Pos. 1、Pos. 2、Pos. 3 的 TSC1 启动子甲基化程度分别为 18.13%、16.84%、9.49%。TGF-β1 刺激组 3 个位点的 TSC1 启动子甲基化程度分别为 10.73%、32.16%、0。参照文献^[6] 将甲基化程度在 20% 以下视为无甲基化, 而 20% ~ 50% 可视为低

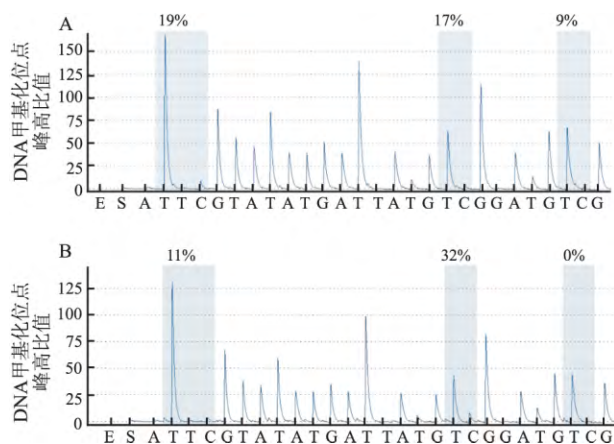


图3 HSC T6 细胞 TSC1 启动子甲基化焦磷酸测序

A: 正常对照组; B: TGF-β1 刺激组

甲基化, 50% 以上视为高甲基化。正常对照组的 Pos. 1、Pos. 2、Pos. 3 的甲基化程度均低于 20%, 可视为无甲基化。而 TGF-β1 刺激组的 Pos. 2 甲基化程度为 32.16%, 高于 20%, 可视为低甲基化。说明 TGF-β1 刺激组的 TSC1 启动子甲基化程度高于正常对照组。

3 讨论

肝纤维化被认为是由多种因素如肝炎病毒、酒精、血吸虫病、毒物等长期持续损害肝脏导致的慢性炎症反应^[2]。多种信号转导通路与细胞因子构成了调控肝纤维化的网络。研究探索与肝纤维化形成进展有关的新机制也是当下的热点。

抑癌基因 TSC1 与 TSC2 分别编码错构素和结节素^[3]。在人体大部分器官组织中, 错构素和结节素可共表达; 两者在细胞质内形成异二聚体而发挥作用, 参与调节细胞生长与增殖、调节细胞周期、调节细胞内吞作用、调节细胞黏附作用、参与 TGF-β/Smad 通路等^[7]。肺淋巴管平滑肌瘤病、口腔鳞癌、子宫内膜癌、胰腺癌等各种肿瘤组织中的 TSC1、TSC2 蛋白表达低或缺失^[8]。TSC1-TSC2 肿瘤抑制因子位于 mTOR 信号通路的上游, 可负调控 mTOR。mTOR/p70S6K 信号通路参与调节胶原蛋白的表达、细胞周期的控制、肝星状细胞的激活与增殖, 进而对肝纤维化起着至关重要的作用。Patsenker et al^[9] 以及 Yu et al^[10] 发现, 抑制 mTOR 可以明显减少纤维化进程。TSC1 在肾纤维化模型中低表达, 并且敲除 TSC1 基因的转基因小鼠可以显示出肾间质纤维细胞的激活以及肾纤维化^[5]。本研究在肝纤维化模型中检测了 TSC1 蛋白的表达, 表明 TSC1 蛋白在肝纤维化模型中与正常对照组比较表达较低; 并在 HSC T6 细胞中进行检测, 由 TGF-β1 刺激的 HSC T6 细胞表达 TSC1 比正常对照组低。提示 TSC1 的表达可能与肝纤维化有一定关联。

蛋白质的表达受多个环节影响, 如 DNA 的复制、转录、翻译、翻译后修饰等, 任何环节的一丝差错都会最终影响蛋白质的表达。针对 TSC1 蛋白在肿瘤组织中低表达的现象, 研究^[3] 表明 TSC1 基因突变及杂合性缺失都可影响其蛋白质表达。至今大约有超过 400 篇关于 TSC 的基因突变、基因缺失等报道, 研究^[11] 显示人乳腺癌中 TSC1 蛋白表达低于正常组织, 并且 TSC1 基因启动子的甲基化程度高于正常组织。DNA 甲基化属于表观遗传学, 是基因表型改变形式之一。正常的甲基化在维持细胞及机体

的正常功能中有着十分重要的作用,但是异常的甲基化则会参与引发多种疾病,如各种肿瘤,自身免疫疾病等等。本研究检测了 TSC1 基因在 HSC T6 细胞中的甲基化程度,显示由 TGF- β 1 刺激的 HSC T6 细胞的 TSC1 基因某位点甲基化程度为 32.16%,高于 20%,可视为低甲基化。而检测的正常对照组各位点的甲基化程度均低于 20%,可视为无甲基化。这有可能是肝纤维化模型组及 TGF- β 1 刺激的 HSC T6 细胞表达 TSC1 蛋白低的原因。虽然这可能不是 TSC1 蛋白表达低的唯一原因,但是肯定也是有着十分紧密的关联。

本研究表明肝纤维化中 TSC1 蛋白表达比正常对照组低,并且检测到由 TGF- β 1 刺激的 HSC T6 细胞表达 TSC1 比正常对照组低。并采用焦磷酸测序实验揭示了 TSC1 基因启动子甲基化有可能是这一现象出现的原因。有关 TSC1 基因启动子甲基化的具体机制和具体作用,目前还没有相关报道,有待进一步的研究。本研究为肝纤维化的形成提供了新的可能机制,并为治疗肝纤维化提供了新的作用靶点。

参考文献

- [1] Poelstra K. Liver fibrosis in 2015: Crucial steps towards an effective treatment[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(2): 67-8.
- [2] Elpek G Ö. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: an update[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(23): 7260-76.
- [3] Islam M P, Roach E S. Tuberous sclerosis complex[J]. Handb Clin Neurol, 2015, 132: 97-109.
- [4] Wheless J W. Use of the mTOR inhibitor everolimus in a patient with multiple manifestations of tuberous sclerosis complex including epilepsy[J]. Epilepsy Behav Case Rep, 2015, 4: 63-6.
- [5] Jiang L, Xu L, Mao J, et al. Rheb/mTORC1 signaling promotes kidney fibroblast activation and fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(7): 1114-26.
- [6] 杜传清, 毛平, 王艳茹, 等. 急性髓系白血病 BCL2L10 基因启动子区异常甲基化定量研究[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(20): 3397-400.
- [7] Thien A, Prentzell M T, Holzwarth B, et al. TSC1 activates TGF- β -Smad2/3 signaling in growth arrest and epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Dev Cell, 2015, 32(5): 617-30.
- [8] Csibi A, Blenis J. Appetite for destruction: the inhibition of glycolysis as a therapy for tuberous sclerosis complex-related tumors[J]. BMC Biol, 2011, 9: 69.
- [9] Patsenker E, Schneider V, Ledermann M, et al. Potent antifibrotic activity of mTOR inhibitors sirolimus and everolimus but not of cyclosporine A and tacrolimus in experimental liver fibrosis[J]. J Hepatol, 2011, 55(2): 388-98.
- [10] Yu S Y, Liu L, Li P, et al. Rapamycin inhibits the mTOR/p70S6K pathway and attenuates cardiac fibrosis in adriamycin-induced dilated cardiomyopathy[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 61(3): 223-8.
- [11] Jiang W G, Sampson J, Martin T A, et al. Tuberlin and hamartin are aberrantly expressed and linked to clinical outcome in human breast cancer: the role of promoter methylation of TSC genes[J]. Eur J Cancer, 2005, 41(11): 1628-36.

The expression and the DNA methylation of TSC1 in liver fibrosis

Chen Chen^{1,2}, Huang Cheng^{1,2}, Meng Xiaoming^{1,2}, et al

(¹School of Pharmacy Anhui Medical University,

²Institute for Liver Disease of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the expression and the promoter methylation status of the TSC1 in HSC T6 differentiation induced by transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) *in vitro*, and the expression of the TSC1 in CCl₄-induced liver fibrosis in rat. **Methods** Western blot was used to detect the expression of the TSC1. Pyrosequencing was used to test the methylation status of the TSC1 promoter. **Results** The expression of TSC1 was significantly reduced in response to TGF- β 1 and CCl₄ ($P < 0.01$), and the TGF- β 1 treated group TSC1 promoter was found to be higher methylated than the control group. **Conclusion** A novel evidence has been provided that TSC1, which may be affected by DNA methylation in TGF- β 1 treated HSC T6, may play a vital role in liver fibrosis.

Key words TSC1; liver fibrosis; methylation