

〔文章编号〕 1007-0893(2021)14-0036-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.14.014

过氧化物酶体增殖物活化受体- α 基因表达与甲基化的关系

屈 飞 黄浩辉 郑晓筠 吴晓晓

(广州市第一人民医院鹤洞分院, 广东 广州 510180)

〔摘要〕 **目的:** 探讨过氧化物酶体增殖物活化受体 (PPAR)- α 的表达与甲基化的关系及检测甲基化位点。**方法:** 将人正常肝细胞 L02 细胞株 (L02 细胞) 分为正常组、油酸组、正常 + 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-CdR) 组、油酸 + 5-Aza-CdR 组。生化仪检测细胞内三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC) 及上清液 TG、TC、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 含量; 油红 O 染色观察细胞脂肪沉积量; 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 PPAR- α 信使核糖核酸 (mRNA) 表达; 焦磷酸测序检测 PPAR- α 启动子区甲基化水平。**结果:** (1) 与正常组比较, 油酸组细胞内 TG、TC 及上清液 ALT、AST 升高, 油红染色可见明显脂滴沉积, PPAR- α mRNA 表达下降, PPAR- α 启动子区 -273、-234 位点甲基化率升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。 (2) 与油酸组比较, 油酸 + 5-Aza-CdR 组细胞内 TG、TC 及上清液 ALT、AST 下降, 油红染色脂滴沉积减少, PPAR- α mRNA 表达增加, 在 PPAR- α 启动子区 -273、-234 位点甲基化率降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 5-Aza-CdR 可通过降低 PPAR- α 启动子区甲基化率, 促进 PPAR- α 表达, 改善非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 的脂肪变性。**〔关键词〕** 非酒精性脂肪性肝病; 过氧化物酶体增殖物活化受体- α ; 脱氧核糖核酸甲基化
〔中图分类号〕 R 575.5; S 432.2⁺² 〔文献标识码〕 A

The Relationship between the Methylation of the Peroxisome Proliferator-activated Receptors-alpha and the Expression of PPAR- α mRNA

QU Fei, HUANG Hao-hui, ZHENG Xiao-jun, WU Xiao-xiao

(The Hedong Department of Guangzhou First People's Hospital, Guangdong Guangzhou 510180)

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the relationship between the methylation of the Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha (PPAR- α) and the expression of PPAR- α mRNA, and to detect the methylation site. **Methods** The normal human hepatocytes (L02 cells) were divided into 4 groups: normal group, oleic acid group, normal + 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) group, oleic acid + 5-Aza-2'-deoxycytidine group. Biochemical assays were used to assess the TG, TC contents in cells and the TG, TC, ALT, AST levels in supernatant. Oil red staining was used to observe the droplets accumulation in cells. The level of PPAR- α mRNA expression was measured by real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The DNA methylation level was analyzed by pyro-sequencing. **Results** (1) Compared with the normal group, there are significant increase was observed in TG, TC contents in cells and the ALT, AST levels in supernatant, and more droplets accumulation in cells in oleic acid group, and so was the down-regulation of the expression of PPAR- α mRNA and the high-regulation of the DNA methylation of CpG-273,-234 ($P < 0.05$). (2) Compared with the oleic acid group, there are significant reduction was observed in TG, TC contents in cells and the ALT, AST levels in supernatant, and less droplets accumulation in cells in oleic acid + 5-Aza-2'-deoxycytidine group, and so was the up-regulation of PPAR- α mRNA and the down-regulation of the DNA methylation of CpG-273,-234 ($P < 0.05$). **Conclusion** 5-Aza-2'-deoxycytidine can increase the expression of PPAR- α mRNA through down-regulates the methylation on CpG promoters in PPAR- α , thereby ameliorating hepatocytostosis in nonalcoholic fatty liver disease.

〔Key Words〕 Nonalcoholic fatty liver disease; Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha; DNA methylation

世界上约有 1/4 的人患有非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)^[1]。NAFLD 常伴有代谢综合征, 可发展为非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌^[2]。药物治疗相对有限, 主要为胰岛素增敏剂、他汀类及过氧

化酶体增殖物活化受体 (peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR)- α 和 PPAR- γ 激动剂等^[3]。PPARs 参与调节糖脂代谢、炎症反应等, 与 NAFLD 的发生发展关系密切。研究发现人体肝脏 PPAR- α 表达水平与 NASH 严重程度、内脏肥胖、胰岛素抵抗呈负相关, 与脂联素呈正相关, 且

〔收稿日期〕 2021-05-13

〔作者简介〕 屈飞, 女, 住院医师, 主要研究方向是非酒精性脂肪性肝病的表现遗传学。

组织学的改善与 PPAR-α 及其靶基因表达增加有关^[4]。表明 PPAR-α 可能是的一个潜在治疗靶点。一项随机对照试验^[5]证明 PPAR-α 激动剂可显著改善 NASH 的组织学，并具有良好的安全性。本研究探讨在 L02 细胞中 PPAR-α 基因表达及与脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 甲基化的关系，详情如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人正常肝细胞 L02 细胞株 (广州医科大学附属第二医院赠送)、改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco, DMEM)、胰酶、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered solution, PBS)、胎牛血清、油红 O、油酸、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 及逆转录、荧光定量、DNA 提取试剂盒等 (均购自大连宝生 TaKaRa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及检测 (1) 细胞培养及处理: 细胞株培养 24 h 融合度达到 80% 时, 正常组: DMSO 处理 48 h; 油酸组: 20 μg · mL⁻¹ 的油酸处理 48 h; 正常 + 5-Aza-CdR 组: 5 μmol · L⁻¹ 5-Aza-CdR + DMSO 处理 48 h; 油酸 + 5-Aza-CdR 组: 5 μmol · L⁻¹ 5-Aza-CdR + 20 μg · mL⁻¹ 油酸处理 48 h。(2) 检测细胞内三酰甘油 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 及上清液 TG、TC、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST), 油红 O 染色观察细胞形态; 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 PPAR-α 信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA); 焦磷酸测序法检测 DNA 甲基化水平。

1.2.2 油红 O 染色 (1) 取出细胞, PBS 洗 2 遍, 10%

甲醛固定 10 min, PBS 再洗 2 遍。(2) 将油红染色液加入培养孔中室温染色 1 h, PBS 洗 4~5 遍后拍照。

1.2.3 PPAR-α mRNA 检测 PPAR-α 上游引物: 5'-AGTGACATTGCTAAAATACGGAGT-3', 下游引物: 5'-GTCATCCAGTTCCAGTGCATT-3'。扩增条件: 50 °C 2 min, 95 °C 5 min, 95 °C 30 s、56 °C 30 s、72 °C 30 s 循环 40 次, 72 °C 延伸 10 min。

1.2.4 焦磷酸测序 提取基因组 DNA 经亚硫酸盐转化后, 取 5 μL 产物行 PCR 扩增。上游引物为: 5'-GGGGTGTGTTTAGTTTTGAAT-3', 下游引物为: 5'-TCACCCCTGTCCTAAAACC-3', PyroMarkQ96ID 仪器测序, 测序引物为: 5'-GGGATTTAGTAGGGGA-3', 共 6 个 CpG。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 计数资料用百分比表示, 采用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞油红 O 染色结果

正常组、正常 + 5-Aza-CdR 组油红 O 染色未见明显脂滴沉积; 油酸组可见大片脂滴沉积; 油酸 + 5-Aza-CdR 组可见部分脂滴沉积, 见图 1。

2.2 各组细胞及上清液生化指标测定

与正常组比较, 油酸组细胞内 TG、TC 及上清液 AST、ALT 均升高, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05); 与油酸组比较, 油酸 + 5-Aza-CdR 组的细胞内 TG、TC 及上清液 AST、ALT 均下降, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05), 见表 1。

2.3 各组细胞 PPAR-α mRNA 表达

较正常组, 油酸组的 PPAR-α 表达下降, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05); 较油酸组, 油酸 + 5-Aza-CdR 组的 PPAR-α 表达水平升高, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05), 见图 2。

表 1 各组细胞及上清液生化指标分析 (n = 3, $\bar{x} \pm s$, mmol · L⁻¹)

组别	细胞内 (mg · 10 ⁶ cell)		上清液 (mg · 10 ⁵ cell)			
	TG	TC	TG	TC	ALT	AST
正常组	2.63 ± 0.10	2.03 ± 0.13	0.12 ± 0.02	0.05 ± 0.01	2.56 ± 0.11	5.64 ± 0.10
油酸组	3.73 ± 0.11 ^a	4.44 ± 0.24 ^a	0.13 ± 0.02	0.07 ± 0.02	5.66 ± 0.19 ^a	7.77 ± 0.05 ^a
正常 + 5-Aza-CdR 组	2.61 ± 0.11	2.07 ± 0.05	0.13 ± 0.01	0.04 ± 0.15	2.54 ± 0.10	5.71 ± 0.02
油酸 + 5-Aza-CdR 组	3.22 ± 0.12 ^b	3.70 ± 0.16 ^b	0.13 ± 0.02	0.05 ± 0.01	3.79 ± 0.13 ^b	6.70 ± 0.07 ^b

与正常组比较, ^a*P* < 0.05; 与油酸组比较, ^b*P* < 0.05

注: TG 一三酰甘油; TC 一总胆固醇; ALT 一谷丙转氨酶; AST 一谷草转氨酶

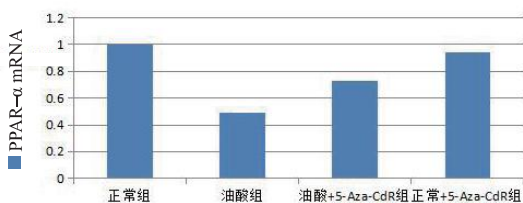


图 2 不同组别 PPAR-α mRNA 相对表达量

2.4 各组 PPAR-α 启动子区甲基化率比较

PPAR-α 启动子区 CpG 序列片段如下:

5'-CG₋₂₇₈GGCCG₋₂₇₃CCTCCACCCCTACG₋₂₅₉CACTTCTGAGCCTCAAGGGCACCCG₋₂₃₄GTCCCG₋₂₂₈GTCCCG₋₂₂₂G-3'

与正常组比较, 油酸组在 PPAR-α 启动子区 -273 及 -234

位点的甲基化率升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 区 -273 及 -234 位点的甲基化率降低, 差异具有统计学意义与油酸组比较, 油酸 + 5'-Aza-CdR 组在 PPAR- α 启动子区 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组 PPAR- α 启动子区甲基化率比较 (n = 3)

组 别	-278	-273	-259	-234	-228	-222
正常组	1.65 ± 0.07	2.35 ± 0.18	1.12 ± 0.02	3.65 ± 0.44	1.08 ± 0.04	2.64 ± 0.10
油酸组	1.74 ± 0.11	14.77 ± 1.04 ^c	1.52 ± 0.06	17.36 ± 0.86 ^c	1.33 ± 0.22	3.78 ± 0.06
正常 + 5-Aza-CdR 组	1.76 ± 0.15	2.25 ± 0.32	1.25 ± 0.02	3.31 ± 0.44	1.08 ± 0.08	2.74 ± 0.07
油酸 + 5-Aza-CdR 组	1.51 ± 0.41	6.75 ± 0.08 ^d	1.48 ± 0.08	6.34 ± 0.14 ^d	1.15 ± 0.11	3.70 ± 0.07

与正常组比较, ^c $P < 0.05$; 与油酸组比较, ^d $P < 0.05$

3 讨 论

目前, NAFLD 机制尚未阐明, 比较认同的是“二次打击学说”。近年 DNA 甲基化在 NAFLD 发生发展中的作用越来越受到重视。PPARs 是核受体超家族成员之一, PPAR- α 具有调节糖脂代谢和抗炎抗纤维化的作用, 可作为治疗 NAFLD 有效靶点之一。本研究发现, 油酸作用于 L02 细胞后可造成细胞脂肪变性及脂质沉积。与正常组比较, 油酸组 PPAR- α 表达下降, PPAR- α 启动子区甲基化率升高, 以 -273、-234 两个位点明显, 说明 PPAR- α 具有促进糖脂代谢的作用。与油酸组比较, 油酸 + 5-Aza-CdR 组 PPAR- α 表达增加, PPAR- α 启动子区 -273、-234 两个位点存在甲基化率减低。说明去甲基化药物 5-Aza-CdR 可减少 PPAR- α 启动子区的甲基化水平, 从而使 PPAR- α 表达增加, 改善细胞脂肪变性程度, 可为 NAFLD 的治疗提供一定的思路及参考。但体外实验不等同体内, 仍需动物实验来证实。

[参考文献]

- (1) Erica J, Janisha P, Eleonora S, et al. Diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease (J) . Postgraduate Medical Journal, 2019, 95(1124): 314-322.
- (2) Sui-Weng W, Yi-Wen T, Chan WK. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma and its implications (J) . JGH Open, 2018, 2(5): 235-241.
- (3) 南月敏, 苑喜微, 张思雨. 非酒精性脂肪性肝病的药物治疗 (J) . 中华消化杂志, 2020, 40(9): 591-594.
- (4) Francque S, Verrijken A, Caron S, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis (J) . Journal of Hepatology, 2015, 63(1): 164-173.
- (5) Ratzu V, Harrison S, Francque S, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and- δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening (J) . Gastroenterology, 2016, 150(5): 1147-1159.

[文章编号] 1007-0893(2021)14-0038-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.14.015

颅内肿瘤术后凝血功能障碍的原因及应对措施

曾永亲 林 涛 郭东亮 史 涛 张旭标

(广东三九脑科医院, 广东 广州 510000)

[摘 要] **目的:** 探讨颅内肿瘤术后凝血功能障碍的原因及应对措施。**方法:** 选取 2018 年 7 月至 2019 年 7 月在广东三九脑科医院接受治疗的 60 例颅内肿瘤患者, 对术后凝血功能障碍原因进行分析并探讨有效的应对措施。**结果:** 60 例患者中发生凝血功能障碍 24 例, 凝血功能正常 36 例。多因素 logistic 回归分析显示, 导致颅内肿瘤术后凝血功能障碍的独立危险因素主要为术后低体温、术后低钙血症和输注红细胞过多。将凝血功能障碍组与凝血功能正常组术后颅内血肿发生率进行比较, 前者明显高于后者; 将凝血功能障碍组与凝血功能正常组格拉斯哥预后评分 (GOS) 进行比较, 前者明显低于后者, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 颅内肿瘤患者术后存在较高的凝血功能障碍发生风险, 术中控制红细胞输注量, 术后对血钙浓度、体温进行全面复查, 采取相应的处理措施, 可以预防凝血功能障碍。

[关键词] 颅内肿瘤; 凝血功能障碍; 应对措施

[中图分类号] R 73 [文献标识码] B

[收稿日期] 2021 - 05 - 07

[作者简介] 曾永亲, 男, 主治医师, 主要从事神经外科工作。