

夏童童,马芳,刘虹麟,等. DNMT1 调控 LSM4 在 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡中的作用及其研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 34-42.

Xia TT, Ma F, Liu HL, et al. Role and mechanism of DNMT1 in regulating LSM4 in Hcy-induced hepatocyte apoptosis in mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 34-42.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.005

DNMT1 调控 LSM4 在 Hcy 诱导小鼠肝细胞 凋亡中的作用及其研究

夏童童¹, 马芳^{1,2}, 刘虹麟^{1,3}, 张正皓^{1,2}, 丁寒霜¹, 郝银菊⁴, 张慧萍⁵,
吴凯², 焦运⁶, 姜怡邓¹, 李桂忠^{1,2*}

(1.国家卫生健康委员会代谢性心血管疾病研究重点实验室,银川 750004;2.宁夏医科大学基础医学院,银川 750004;
3.宁夏医科大学检验学院,银川 750004;4.宁夏医科大学总医院,银川 750004;
5.湖南省妇幼保健院医学遗传科,长沙 410008;6.宁夏医科大学总医院感染科,银川 750004)

【摘要】 目的 探讨 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)调控 LSM4 蛋白(Sm-like protein-4, LSM4)在同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)诱导小鼠肝细胞凋亡中的作用及机制研究。**方法** 将 ApoE^{-/-}小鼠(12 只)均分为 2 组,给予普通饲料喂养设为饮食对照组(ND 组, $n=6$),给予高蛋氨酸饲料喂养设为高蛋氨酸组(HMD 组, $n=6$);NCTC1469 小鼠正常肝细胞分为正常对照组(Control 组, 0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy)、Hcy 干预组(Hcy 组, 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy)、转染干扰片段对照组(si-NC 组, 0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy)、转染 LSM4 干扰片段组(si-LSM4 组, 0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy)、转染 DNMT1 干扰片段组(si-DNMT1 组, 0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy)、Hcy 干预下对照干扰组(Hcy+si-NC 组, 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy)、Hcy 干预下 LSM4 干扰组(Hcy+si-LSM4 组, 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy)和 Hcy 干预下 DNMT1 干扰组(Hcy+si-DNMT1 组, 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy);NCBI 数据库分析 LSM4 在多种组织中表达;实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测小鼠组织(HMD 组和 ND 组)和肝细胞(Control 组和 Hcy 组)LSM4 蛋白表达差异;Western blot 检测凋亡指标 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X, Bax)和 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)表达变化;流式细胞术检测 Control 组、Hcy 组、Hcy+si-NC 组和 Hcy+si-LSM4 组细胞凋亡率变化;MethPrimer 在线软件分析 LSM4 启动子区 CpG 岛;qRT-PCR 和 Western blot 检测 Hcy+si-DNMT1 组中 LSM4 蛋白表达。**结果** 与 ND 组、Control 组相比,HMD 组、Hcy 组 LSM4 蛋白表达显著增高($P<0.05$);与 Control 组比较,Hcy 组中 Bax 蛋白表达显著上调($P<0.05$),而 Bcl-2 表达明显降低($P<0.05$);与 Hcy+si-NC 组比较,Hcy+si-LSM4 组中 Bax 蛋白表达量显著减少($P<0.05$),Bcl-2 蛋白表达量明显增多($P<0.05$);与 Control 组相比,Hcy 组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);相较 Hcy+si-NC 组,Hcy+si-LSM4 组细胞凋亡率下降($P<0.05$);MethPrimer 在线软件分析显示 LSM4 启动子区 GC 含量丰富且存在 1 个 CpG 岛;与 Hcy+si-NC 组相比,Hcy+si-DNMT1 组 LSM4 蛋白表达增高($P<0.05$)。**结论** DNMT1 通过调控 LSM4 低甲基化使其表达升高,从而促进 Hcy 诱导的小鼠肝细胞凋亡。

【关键词】 内分泌与代谢病;LSM4;同型半胱氨酸;凋亡;DNA 甲基转移酶 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0034-09

【基金项目】 国家自然科学基金(82370293, U21A20343, 82060110);宁夏回族自治区重点研发计划重点项目(2023BEG02074, 2022BFH02013, 2022BEG02054, 2021BEG02028, 2020BEG03005);宁夏医科大学校级科研项目重点项目(XZ2022005)。

【作者简介】 夏童童(1997—),女,硕士研究生,研究方向:代谢性血管病学。E-mail:xiayezi77@163.com

【通信作者】 李桂忠(1965—),男,教授,硕士生导师,研究方向:血管钙化机制研究。E-mail:lilylove36@163.com

Role and mechanism of DNMT1 in regulating LSM4 in Hcy-induced hepatocyte apoptosis in mice

XIA Tongtong¹, MA Fang^{1,2}, LIU Honglin^{1,3}, ZHANG Zhenghao^{1,2}, DING Hanshuang¹, HAO Yinju⁴,
ZHANG Huiping⁵, WU Kai², JIAO Yun⁶, JIANG Yideng¹, LI Guizhong^{1,2*}

(1. NHC Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Diseases Research, Yinchuan 750004, China. 2. School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 3. School of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 4. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 5. Department of Medical Genetics, Hunan Maternal and Child Health Hospital, Changsha 410008. 6. Department of Infection, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

[Abstract] Objective To study the effect of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) on sm-like protein-4 (LSM4) in hepatocyte apoptosis in mice induced with Hcy. **Methods** 12 ApoE^{-/-} mice were divided into two groups: normal diet (ND, *n*=6) and high methionine diet (HMD, *n*=6) groups. Normal hepatocytes of NCTC1469 were divided into a normal group (control, 0 μL/L Hcy), Hcy intervention group (Hcy, 100 μL/L Hcy), NC siRNA-transfected control group (si-NC group, 0 μmol/L Hcy), LSM4 siRNA-transfected group (si-LSM4 group, 0 μmol/L Hcy), DNMT1 siRNA-transfected group (si-DNMT1 group, 0 μmol/L Hcy), NC siRNA-transfected Hcy intervention group (Hcy+si-NC group, 100 μmol/L Hcy), LSM4 siRNA-transfected Hcy intervention group (Hcy+si-LSM4 group, 100 μmol/L Hcy), and DNMT1 siRNA-transfected Hcy intervention group (Hcy+si-DNMT1 group, 100 μmol/L Hcy). Analysis of the expression of LSM4 in various tissues was conducted using the NCBI database. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect differences in LSM4 protein expression in mouse tissues (HMD and ND) and hepatocytes (control and Hcy). Western blot was used to detect the expression of Bcl2-associated X (Bax) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2). The cell apoptosis rate in the Control, Hcy, Hcy+si-NC, and Hcy+si-LSM4 groups were detected by flow cytometry. MethPrimer online software was used to analyze the CpG islands of LSM4 promoter region. The expression of LSM4 in the Hcy+si-DNMT1 group was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** The expression of LSM4 in HMD,Hcy group was higher than that in the ND and Control group (*P*<0.05). Bax protein expression was significantly higher, but Bcl-2 was significantly lower in Hcy group compared with those of the Control group (*P*<0.05). The expression of Bax protein was significantly lower, but the level of Bcl-2 was significantly higher in the Hcy+si-LSM4 group compared with those in the Hcy+si-NC group (*P*<0.05). The cell apoptosis rate in the Hcy group was higher than that in the Control group (*P*<0.05), while the apoptosis rate in the Hcy+si-LSM4 group was lower than that in the Hcy+si-NC group (*P*<0.05). MethPrimer database analysis showed that the promoter region of LSM4 was GC-rich, and there was one CpG island. Compared with the Hcy + si-NC group, the Hcy+si-DNMT1 group's expression of LSM4 protein was increased (*P*<0.05). **Conclusions** DNMT1 regulates LSM4 hypomethylation to increase its expression, thereby promoting Hcy-induced apoptosis of mouse hepatocytes.

[Keywords] endocrinology and metabolism; LSM4; homocysteine; apoptosis; DNMT1

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

同型半胱氨酸(homocysteine,Hcy)是蛋氨酸循环、叶酸代谢和硫代谢途径中的代谢物质,是甲硫氨酸去甲基化的中间产物。最新研究显示,高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia,HHcy)与心血管、糖尿病、肝脂质沉积等疾病密切相关^[1-2]。肝是Hcy等多种生物分子的重要代谢脏器,在调控体内Hcy水平中发挥重要作用,已被发现并证明Hcy水平升高与肝损伤相关疾病的进展和肝癌的转移有关^[3-5]。肝损伤可导致Hcy代谢失调,而Hcy水平

升高又可反过来诱导肝细胞凋亡^[6],但Hcy诱导肝细胞凋亡而引起肝损伤中的具体作用机制仍不明确,因此有必要进行深入的探讨。

有研究发现LSM4蛋白(Sm-like protein-4, LSM4)参与乳腺癌^[7]、皮肤黑色素瘤^[8]、肝损伤等疾病的发生发展进程^[9]。例如,LSM4的敲低可抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[10]。另有研究发现,LSM4是促进mRNA前体剪接和mRNA脱帽的复合体的组成部分,可增强mRNA的稳定性并诱导

caspase 介导的细胞凋亡^[11]。然而,LSM4 是否在 Hcy 引起的肝细胞凋亡中发挥作用尚不清楚。DNA 的表观遗传修饰包括乙酰化、甲基化、氢甲基化等,其中具有可逆性特点的 DNA 甲基化在调节基因表达、细胞分化和机体发育等过程中必不可少,已成为一个研究热点。因此,本研究旨在探讨 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 调控 LSM4 在 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡中的作用及其机制研究,可能为肝损伤相关疾病的诊断和治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 ApoE^{-/-}小鼠 12 只(雄),6 周龄,体重 25~28 g,自北京唯尚立德生物科技有限公司购入[SCXK(京)2021-0010],相关动物实验内容经宁夏医科大学总医院医科听伦理委员会授权[KYLL-2024-0303],于宁夏医科大学动物实验中心 SPF 级动物房开展造模实验[SYXK(宁)2020-0001],昼夜节律交替照明(12 h/12 h),温度(23±2)℃,日温差<4℃,相对湿度 60%。小鼠于 IVC 实验动物笼具中

饲养,定期更换垫料和正常饮用水,分别给予普通饲料和高蛋氨酸饲料喂养。所有实验均遵循宁夏医科大学实验动物伦理规范和 3R 原则,给予人道关怀。

1.1.2 细胞

NCTC1469 小鼠正常肝细胞购于上海联迈生物工程有限公司,连续传 10 代以上。

1.2 主要试剂与仪器

总蛋白提取试剂盒和蛋白定量试剂盒(货号:KGP250/23227,凯基生物);RNA 提取试剂盒(货号:DP304,天根);逆转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂(货号:RR037A/RR820A, TaKaRa);流式凋亡试剂盒(货号:BD556547, BD);Bcl-2 抗体(货号:BS1511,巴傲得);DNMT1 抗体(货号:GTX116011, 欣博盛);Bax 抗体(货号:50599-2-Ig, Proteintech);HRP 标记的山羊抗小鼠/兔 IgG(货号:bs-0296 G/bs-0295 G,博奥森);小鼠 GAPDH 内参引物、LSM4 和 DNMT1 上下游引物及 NC、LSM4 和 DNMT1 干扰片段(上海,吉玛)。实时荧光定量分析仪(德国,耶拿);电泳仪、电转仪及凝胶成像仪(美国, Bio-Rad);流式细胞仪(美国, ACEA Biosciences)。所用干扰片段及引物序列见表 1、表 2。

表 1 干扰片段序列
Table 1 Sequences of the siRNA

名称 Name	siRNA 序列 siRNA sequence	产物/bp Product
NC	正义链 Sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'	21
	反义链 Antisense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'	
LSM4-Mouse-1	正义链 Sense 5'-CUCGCUGAUUGGUCAUAGUTT-3'	21
	反义链 Antisense 5'-ACUAUGACCAAUCAGCGAGTT-3'	
LSM4-Mouse-2	正义链 Sense 5'-GCUGUGACAACUGGAUGAATT-3'	21
	反义链 Antisense 5'-UUCAUCCAGUUGUCACAGCTT-3'	
LSM4-Mouse-3	正义链 Sense 5'-GCAUCCUGAUGAGAUCAUTT-3'	21
	反义链 Antisense 5'-AUGAUCUCAUCAGGGAUGCTT-3'	
DNMT1-Mouse-1	正义链 Sense 5'-GGGAGAAAUAUAAACUUACUTT-3'	21
	反义链 Antisense 5'-AGUAAGUUUAAUUUCUCCCTI-3'	
DNMT1-Mouse-2	正义链 Sense 5'-GAGGCCUACAAUUCAAAGATT-3'	21
	反义链 Antisense 5'-UCUUUGAAUUGUAGGCCUCTT-3'	
DNMT1-Mouse-3	正义链 Sense 5'-CGCAUCAGCUGCAGUAAAATT-3'	21
	反义链 Antisense 5'-UUAACUGCAGCUGAUGCGTT-3'	

表 2 引物序列
Table 2 Sequences of the primers

名称 Name	引物序列 Primer sequence	产物/bp Product
GAPDH-Mouse	上游引物 Forward: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'	21
	下游引物 Reverse: 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'	
LSM4-Mouse	上游引物 Forward: 5'-CAGCGCAGAATCACCCCAT-3'	21
	下游引物 Reverse: 5'-TTGATGTTTCATCCAGTTGTCACA-3'	
DNMT1-Mouse	上游引物 Forward: 5'-CCGTGGCTACGAGGAGAAC-3'	21
	下游引物 Reverse: 5'-TTGGGTTTCCGTTAGTGGGG-3'	

1.3 实验方法

1.3.1 动物及分组

选取 12 只 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为饮食对照组 (ND 组, $n=6$) 和高蛋氨酸组 (HMD 组, $n=6$), 室内环境温度 (25 ± 2) °C, 相对湿度 60%, 喂养 12 周后进行实验。

1.3.2 细胞培养及分组

NCTC1469 小鼠正常肝细胞培养于 37 °C 环境 (95% O₂ + 5% CO₂) 培养箱中, 采用 DMEM 培养液 (10% 特级马血清 + 1% 青链霉素) 进行常规培养, 细胞生长至 85% 时传代培养。干扰片段转染 24~48 h 后裂解细胞提 RNA 和蛋白。实验分组为正常对照组 (Control 组, 0 μmol/L Hcy)、Hcy 干预组 (Hcy 组, 100 μmol/L Hcy)、转染干扰片段对照组 (si-NC 组, 0 μmol/L Hcy)、转染 LSM4 干扰片段组 (si-LSM4 组, 0 μmol/L Hcy)、转染 DNMT1 干扰片段组 (si-DNMT1 组, 0 μmol/L Hcy)、Hcy 干预下对照干扰组 (Hcy + si-NC 组, 100 μmol/L Hcy)、Hcy 干预下 LSM4 干扰组 (Hcy + si-LSM4 组, 100 μmol/L Hcy) 和 Hcy 干预下 DNMT1 干扰组 (Hcy + si-DNMT1 组, 100 μmol/L Hcy)。

1.3.3 NCBI 数据库分析 LSM4 在多种器官组织中表达

通过 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 查看 LSM4 在小鼠肝、肾等多种组织中的表达情况。

1.3.4 qRT-PCR 检测 DNMT1 和 LSM4 mRNA 表达

ND 组和 HMD 组小鼠处死后, 取肝组织, 每只分离 80 mg 进行组织匀浆; NCTC1469 细胞经 100 μmol/L Hcy 干预 24 h 后收集细胞; si-NC/si-LSM4/si-DNMT1 干扰片段分别转染经 100 μmol/L Hcy 干预后的肝细胞和正常肝细胞, 24 h 后分别进行细胞采集。按 RNA 提取试剂盒说明书提炼 RNA; 逆转录合成 cDNA 以逆转录试剂说明为基准; PCR 扩增以 StepOnePlus™ qRT-PCR 系统为操作平台。

1.3.5 Western blot 实验检测 LSM4、DNMT1、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

取 ND 组和 HMD 组小鼠肝组织研磨, NCTC1469 细胞经 100 μmol/L Hcy 干预 24 h 后收集细胞; si-NC/si-LSM4/si-DNMT1 干扰片段分别转染经 100 μmol/L Hcy 干预后的肝细胞和正常肝细胞 48 h 后收集细胞。分别加入细胞裂解液进行取样, 以 BCA 法测得的蛋白含量为依据, 采用 Loading

buffer 稀释法对不同浓度的蛋白进行均匀稀释并分别加至不同的加样孔; 利用电泳和电转实现蛋白质印迹的液相-固相转移; 封闭 1~2 h 后, 分别以一抗 (各自说明书推荐比例) 4 °C 孵育过夜, 二抗 (1 : 5000) 室温孵育 1~2 h; 采用电化学法洗涤并显影后, 采集条带并使用 Image J 软件进行灰度值分析和计算。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集 Control 组、Hcy 组、Hcy + si-NC 组和 Hcy + si-LSM4 组的肝细胞, 将细胞密度调整为 1×10^6 / mL; 用胰蛋白酶-EDTA 消化液 (不含酚红) 消化收集后, 离心 5 min 去上清; 预冷 $1\times$ PBS 重悬, 2000 r/min 离心 5~10 min 后去上清; $1\times$ Binding Buffer (300 μL) 悬浮细胞, 另加 Annexin V-FITC (5 μL), 轻轻摇晃, 充分混合后, 避光孵育 15 min; 开机 5 min 前, 加入 5 μL PI 染剂, 轻轻摇动, 使之均匀; 上机前补加 $1\times$ Binding Buffer (200 μL), 随之流式细胞术定量细胞凋亡。

1.4 统计学方法

本实验所有结果均为计量资料, 以 Prism 8.3.0 软件为工具进行统计学分析处理, 所有资料均以平均数 ± 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 以 t 检验进行两组间比较; 利用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 检验行多组间比较。经统计学处理, 以 $P<0.05$ 为结果有显著性差异。

2 结果

2.1 肝组织和肝细胞 LSM4 的表达变化

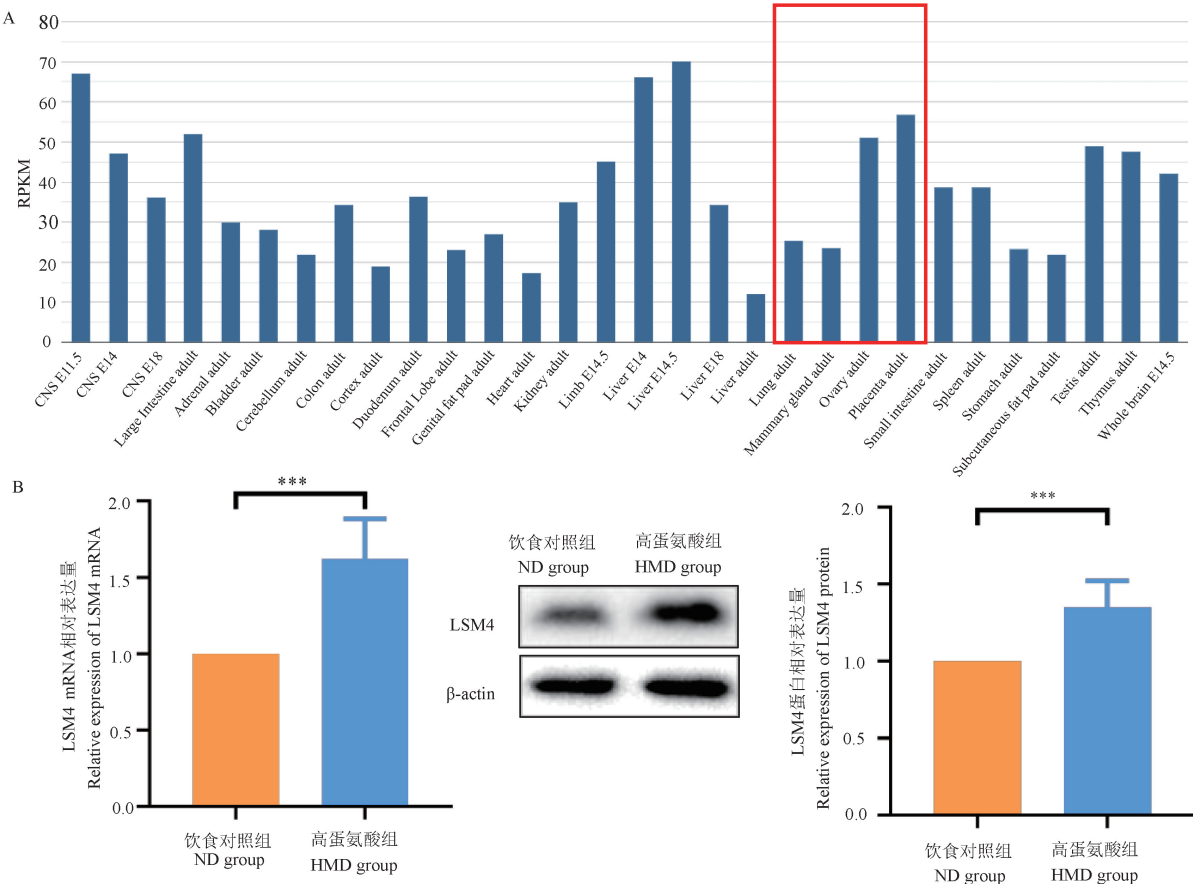
NCBI 数据库 RNA 表达分析图结果显示, 红框所标注区域内, LSM4 在不同时期的肝组织中表达发生改变 (图 1A); qRT-PCR 和 Western blot 检测结果发现, 与 ND 组和 Control 组比较, LSM4 mRNA 和蛋白表达量在 HMD 组和 Hcy 组中显著增加 ($P<0.05$) (图 1B)。

2.2 LSM4 siRNA 干扰自身验证

qRT-PCR 和 Western blot 检测结果发现, 与 si-NC 组比较, si-LSM4-1 组、si-LSM4-2 组和 si-LSM4-3 组的 LSM4 mRNA 表达显著减少 ($P<0.05$), LSM4 siRNA 干扰片段构建成功 (图 2)。综合考虑, 干扰效果最显著的 LSM4 siRNA-3 干扰片段用于后续实验。

2.3 Hcy 干预下干扰 LSM4 表达后肝细胞凋亡率变化

Western blot 检测结果发现, Hcy 组内 Bax 蛋白

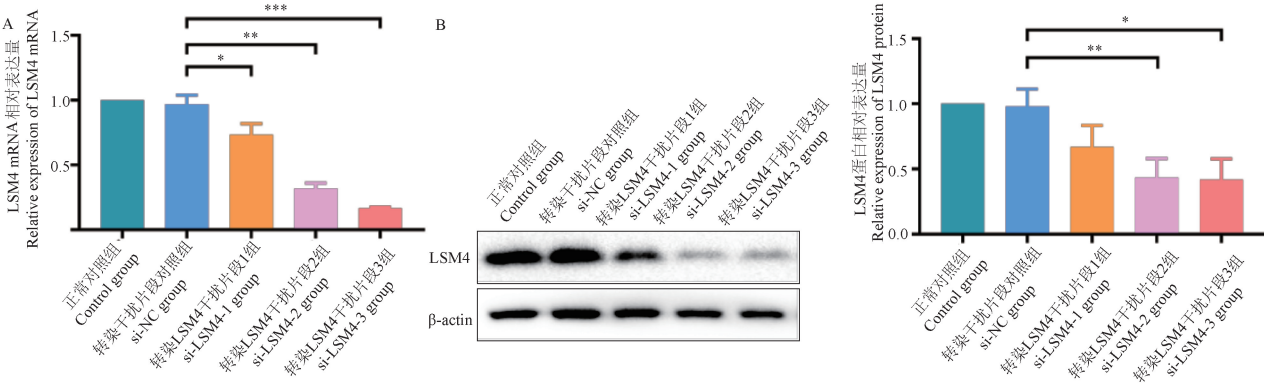


注:A:NCBI 数据库 RNA 表达分析图;B:LSM4 mRNA 和蛋白表达变化。与饮食对照组相比,*** $P<0.001$ 。

图 1 Hcy 调控 LSM4 的表达

Note. A, Analysis map of NCBI database RNA sequencing. B, Expression of LSM4 mRNA and protein in liver tissue and hepatocytes. Compared with ND group, *** $P<0.001$.

Figure 1 Hcy regulates LSM4 expression



注:A:LSM4 mRNA 表达;B:LSM4 蛋白表达。与转染干扰片段对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 2 LSM4 siRNA 干扰自身验证

Note. A, LSM4 mRNA expression. B, LSM4 protein expression. Compared with the si-NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 2 LSM4 siRNA interference self-validation

含量在与 Control 组对比中呈显著升高趋势($P<0.05$),而 Bcl-2 蛋白水平则显著下降($P<0.05$)(图 3A)。相较于 Hcy + si-NC 组,Hcy + si-LSM4-3 组的 Bax 蛋白含量显著下降($P<0.05$),而 Bcl-2 蛋白含

量显著增加($P<0.05$)(图 3B)。流式细胞术结果显示,与 Control 组比较,Hcy 组细胞凋亡率明显升高($P<0.05$);与 Hcy+si-NC 组比较,Hcy+si-LSM4-3 组细胞凋亡率降低($P<0.05$)(图 3C)。

2.4 LSM4 DNA 启动子区 CpG 岛预测

MethPrimer 在线软件([http://www. urogene. org/methprimer](http://www.urogene.org/methprimer))分析 LSM4 的 DNA 启动子区 GC 含量,显示 GC 含量丰富且存在 1 个 CpG 岛,提示 LSM4 表达可能受甲基化调控(图 4)。

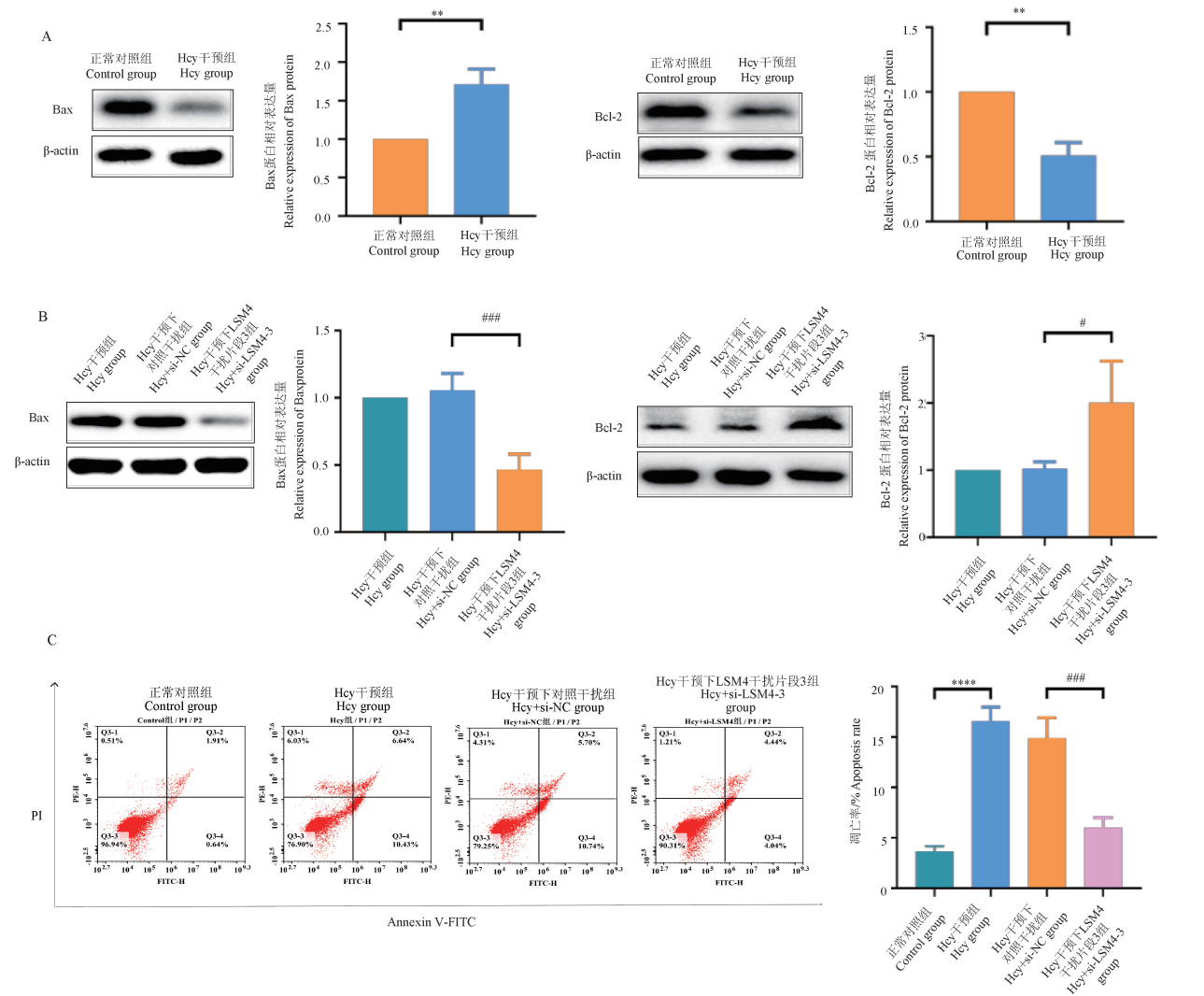
2.5 DNMT1 siRNA 干扰自身验证

qRT-PCR 和 Western blot 检测结果发现,与 si-

NC 组比较,DNMT1 mRNA 和蛋白表达水平在 si-DNMT1-1 组、si-DNMT1-2 组和 si-DNMT1-3 组中都有降低($P<0.05$),LSM4 siRNA 干扰片段构建成功(图 5)。选择干扰效果较为明显的 DNMT1 siRNA-3 干扰片段用于后续实验。

2.6 Hcy 干预下干扰 DNMT1 表达后肝细胞 LSM4 的表达变化

如图 6 所示,qRT-PCR 和 Western blot 的检测结果显示,与 Hcy+si-NC 组比较,LSM4 mRNA 和蛋白的表达水平在 Hcy+si-DNMT1-3 组中明显升高($P<0.05$)。



注:A:凋亡相关蛋白表达变化;B:凋亡相关蛋白表达变化;C:流式细胞凋亡率散点图及统计图。与正常对照组相比,** $P<0.01$,**** $P<0.0001$;与 Hcy 干预下对照干扰组相比,# $P<0.05$,### $P<0.001$ 。

图 3 干扰 LSM4 抑制 Hcy 诱导的小鼠肝细胞凋亡

Note. A, Expression of apoptosis-related proteins. B, Expression of apoptosis-related proteins. C, Flow cytometry of apoptosis. Compared with the Control group, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$. Compared with the Hcy+si-NC group, # $P<0.05$, ### $P<0.001$.

Figure 3 Inhibiting Hcy induced hepatocyte apoptosis in mice by interfering with LSM4

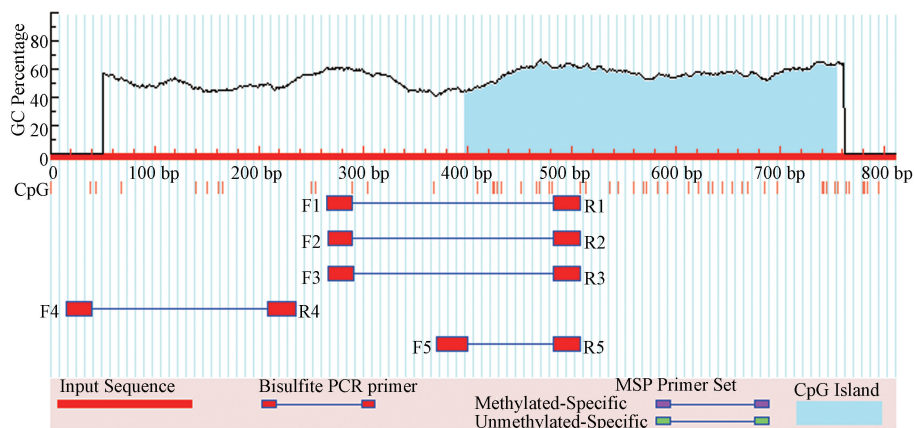
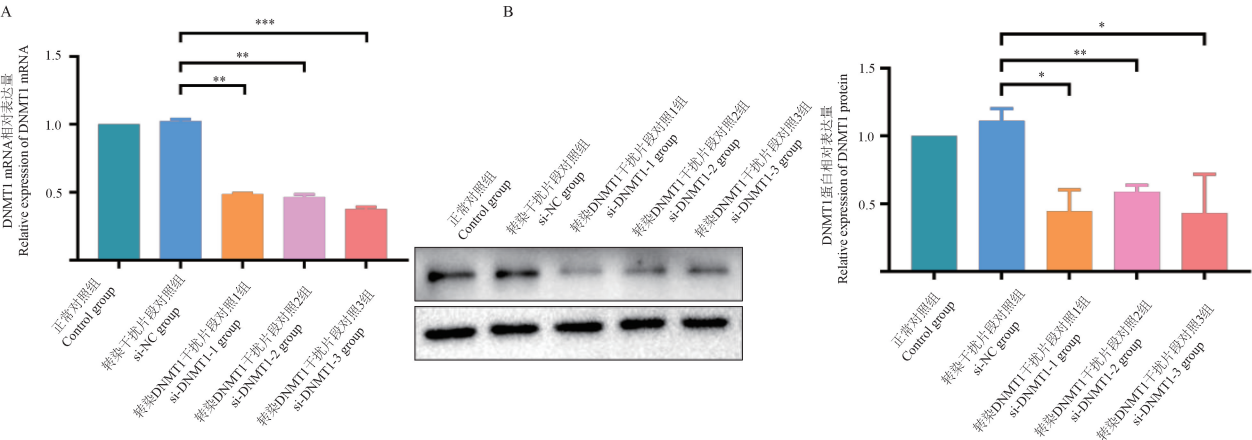


图 4 LSM 启动子区 CpG 岛预测
Figure 4 CpG island prediction in the LSM4 promoter region

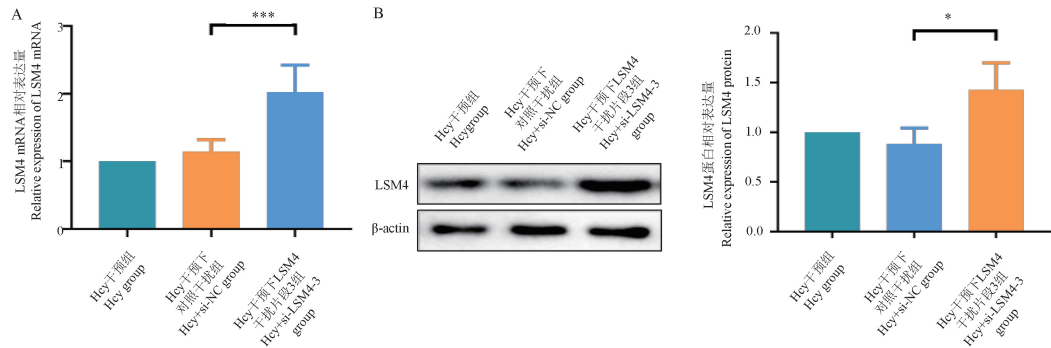


注:A:DNMT1 mRNA 表达;B:DNMT1 蛋白表达。与转染干扰片段对照组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图 5 DNMT1 siRNA 干扰自身验证

Note. A, DNMT1 mRNA expression. B, DNMT1 protein expression. Compared with the si-NC group, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

Figure 5 DNMT1 siRNA interference self validation



注:A:LSM4 mRNA 表达;B:LSM4 蛋白表达。与 Hey 干预下对照干扰组相比, $*P<0.05$, $***P<0.001$ 。

图 6 DNMT1 在 Hey 干预下调控 LSM4 的表达

Note. A, LSM4 mRNA expression. B, LSM4 protein expression. Compared with the Hey+si-NC group, $*P<0.05$, $***P<0.001$.

Figure 6 DNMT1 regulates LSM4 expression in response to Hey intervention

3 讨论

Hcy 是蛋氨酸转化为半胱氨酸过程中所形成的中间产物,属于一种含硫氨基酸。血液中 Hcy 水平升高与基因异常有关,也与营养因素有关,如低叶酸、维生素 B₆、维生素 B₁₂ 和蛋氨酸摄入量过多^[12]。Hcy 通过两条途径代谢,即再甲基化反应和转硫基反应。有研究发现,Hcy 在神经退行性病变、心血管征候、糖尿病和酒精性肝病等疾病发展中均有参与。已有研究发现,Hcy 可促进多种炎症介质释放,如 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8,也可导致细胞内超氧阴离子的产生增加,从而导致细胞内氧化压力升高,NO 含量下降,进而诱发内质网应激,其发生机制均是 Hcy 通过促进细胞凋亡、脂肪堆积和炎症等途径导致细胞损伤过程^[13]。课题组前期研究已证实 Hcy 能够明显引起肝损伤,HMD 组肝组织与 ND 组相比,肝小叶结构排列紊乱,且 Hcy 可诱导人源肝细胞凋亡^[14-15],但对 Hcy 引起肝细胞凋亡的具体凋亡机制仍不清楚。

LSM 蛋白是 RNA 结合蛋白家族,共有 13 个成员 (LSM1~LSM14B)。这些成员与多种类型肿瘤发生和转移密切相关,其中 LSM4 已被证明参与肝损伤^[16]、肠道疾病和卵巢癌的发生和恶化^[17]。研究表明,在卵巢癌中,LSM4 的敲低可抑制卵巢细胞的细胞迁移和侵袭,而过表达 LSM4 又逆转敲低 circ_0、025、033 对上述过程的抑制作用^[18];沉默 LSM4 可减少 miR-503 对 CUGBP1 表达的抑制,从而降低肠道上皮细胞对凋亡的敏感性^[19]。本研究发现 LSM4 在 HMD 组和 Hcy 组中表达上调,这提示 LSM4 可能参与 Hcy 致肝损伤的发展过程。然而,LSM4 是否与 Hcy 致肝细胞凋亡有关仍不明确。故本研究通过 Western blot 检测凋亡相关指标蛋白变化和流式细胞术定量细胞凋亡水平,验证 Hcy 可促进肝细胞凋亡,而干扰 LSM4 的表达可削弱 Hcy 对肝细胞凋亡的促进作用。DNA 甲基化是一种至关重要的表观遗传修饰方式,可引起相关基因的转录促进或抑制,从而调节靶细胞功能。在多种人类疾病的发生机制中均可发现存在 DNA 甲基化的变化^[20],例如,CYP2D6 和 CYP2E1 的甲基化水平可影响其自身表达,进而影响药物的半衰期,从而导致肝细胞损伤^[21]。为此,接下来探讨 Hcy 刺激 LSM4 如何发生改变,通过 MethPrimer 网站分析 LSM4 的 DNA 启动子区 GC 含量,显示 GC 含量丰富

且存在 1 个 CpG 岛,提示 LSM4 表达可能受甲基化调控。

DNMT1 是一个广泛存在于 DNA 甲基化修饰过程的酶,它在 DNA 复制过程中发挥重要维持甲基化作用,还在整个甲基化进程中发挥重要调节作用^[22-23]。有研究发现 CFP1 缺失可通过降低 DNMT1 合成致 DNA 损伤增加^[24],另有研究发现 DNMT1 基因缺失的小鼠在发育后不久死亡,并且肝受损严重^[25],这是 DNMT1 功能关键性的证据,同时也提示了 DNMT1 与肝损伤密切相关^[26]。为验证 LSM4 与 DNMT1 是否在 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡中存在关联,本研究在 Hcy 干预下干扰 DNMT1 表达后,通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测 LSM4 表达情况。结果显示,在 Hcy 干预下干扰 DNMT1 表达后,LSM4 表达水平明显上调,提示 DNMT1 通过调控 LSM4 甲基化影响 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡进程。

此前,对于肝损伤中肝细胞凋亡机制的研究仍局限于相关有机化合物^[27]、lncRNA^[28]等,本研究首次提出 DNA 甲基化在 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡中的机制作用,将 DNMT1 对 LSM4 的甲基化调控和 Hcy 致肝细胞凋亡的机制串联起来,为肝损伤中 Hcy 致肝细胞凋亡的机制研究提供新思路。

综上所述,本研究探索并验证 DNMT1 调控 LSM4 在 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡中的作用及机制,LSM4 有望成为治疗 Hcy 致肝细胞凋亡的一个新的干预靶点,对临床上肝损伤相关疾病的诊断和治疗具有重要意义。

参考文献:

- [1] WANG R, JIN Y, YAO X H, et al. A novel mechanism of the M1-M2 methionine adenosyltransferase switch-mediated hepatocellular carcinoma metastasis [J]. Mol Carcinog, 2018, 57(9): 1201-1212.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] VENTURA P, VENTURELLI G, MARCACCI M, et al. Hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T polymorphism in patients with portal vein thrombosis complicating liver cirrhosis [J]. Thromb Res, 2016, 141: 189-195.
- [4] POGRIBNY I P, DREVAL K, KINDRAT I, et al. Epigenetically mediated inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase and the associated dysregulation of 1-carbon metabolism in nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma [J].

FASEB J, 2018, 32(3): 1591–1601.

[5] LATTEI S, MALAGUARNERA G, CATANIA V E, et al. Homocysteine serum levels as prognostic marker of hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis [J]. Curr Mol Med, 2019, 19(7): 532–538.

[6] 王青青, 焦运, 吴欣妍, 等. FoxO1 经 ATF6 调控 Hcy 诱导的肝细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(2): 203–209. WANG Q Q, JIAO Y, WU X Y, et al. FoxO1 regulates Hcy-induced hepatocyte apoptosis through ATF6 [J]. Chin Pharmacol Bull, 2021, 37(2): 203–209.

[7] YIN J, LIN C, JIANG M, et al. CENPL, ISG20L2, LSM4, MRPL3 are four novel hub genes and may serve as diagnostic and prognostic markers in breast cancer [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 15610.

[8] SUN X, ZHANG J, XIAO C, et al. Expression profile and prognostic values of LSM family in skin cutaneous melanoma [J]. BMC Med Genomics, 2022, 15(1): 238.

[9] XUE R, HUA L, XU W, et al. Derivation and validation of the potential core genes in pancreatic cancer for tumor-stroma crosstalk [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 4283673.

[10] SUN Z P, TAN Z G, PENG C. Long noncoding RNA LINC01419 promotes hepatocellular carcinoma malignancy by mediating miR-485-5p/LSM4 axis [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2022, 38(9): 826–838.

[11] RAJU K K, NATARAJAN S, KUMAR N S, et al. Role of cytoplasmic deadenylation and mRNA decay factors in yeast apoptosis [J]. FEMS Yeast Res, 2015, 15(2): fou006.

[12] WANG Z, YIP L Y, LEE J H J, et al. Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells [J]. Nat Med, 2019, 25(5): 825–837.

[13] JI C, KAPLOWITZ N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(12): 1699–1708.

[14] ZHANG Z, YU Y, ZHANG P, et al. Identification of NTRK3 as a potential prognostic biomarker associated with tumor mutation burden and immune infiltration in bladder cancer [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 458.

[15] 马芳, 张辉, 李桂忠, 等. MiR-148a-5p 参与了高蛋氨酸饮食诱导 ApoE^{-/-}小鼠的肝细胞凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(35): 5632–5637. MA F, ZHANG H, LI G Z, et al. Involvement of miR-148a-5p in ApoE^{-/-} mouse hepatocyte apoptosis induced by high methionine diet [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2020, 24(35): 5632–5637.

[16] CHEN L, LIN Y H, LIU G Q, et al. Clinical significance and potential role of LSM4 overexpression in hepatocellular carcinoma: an integrated analysis based on multiple databases [J]. Front Genet, 2021, 12: 804916.

[17] TA H D K, WANG W J, PHAN N N, et al. Potential therapeutic and prognostic values of LSM family genes in breast cancer [J]. Cancers, 2021, 13(19): 4902.

[18] HOU W, ZHANG Y. Circ_0025033 promotes the progression of ovarian cancer by activating the expression of LSM4 via targeting miR-184 [J]. Pathol Res Pract, 2021, 217: 153275.

[19] CUI Y H, XIAO L, RAO J N, et al. MiR-503 represses CUG-binding protein 1 translation by recruiting CUGBP1 mRNA to processing bodies [J]. Mol Biol Cell, 2012, 23(1): 151–162.

[20] SMITH ZD, MEISSNER A. DNA methylation: roles in mammalian development [J]. Nat Rev Genet, 2013, 14(3): 204–220.

[21] WEI Y, HUAI C, ZHOU C, et al. A methylation functional detection hepatic cell system validates correlation between DNA methylation and drug-induced liver injury [J]. Pharmacogenomics J, 2020, 20(5): 717–723.

[22] SONG J, TEPELOVA M, ISHIBE-MURAKAMI S, et al. Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation [J]. Science, 2012, 335(6069): 709–712.

[23] JELTSCH A, JURKOWSKA R Z. New concepts in DNA methylation [J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(7): 310–318.

[24] 王东升, 穆思宇, 王健岗, 等. CXXC 锌指蛋白 1 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 144–148. WANG D S, MU S Y, WANG J G, et al. Research progress on the role of CXXC zinc finger protein 1 in malignant tumors [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 144–148.

[25] TAKEBAYASHI S, TAMURA T, MATSUOKA C, et al. Major and essential role for the DNA methylation mark in mouse embryogenesis and stable association of DNMT1 with newly replicated regions [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(23): 8243–8258.

[26] MA J, ZHANG L, HUANG Y, et al. Epigenomic profiling indicates a role for DNA methylation in the postnatal liver and pancreas development of giant pandas [J]. Genomics, 2022, 114(3): 110342.

[27] 黄向华, 张祥宏, 左连富, 等. 杂色曲霉素对小鼠肝脏细胞凋亡和增殖影响的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2002, 12(2): 109–112. HUANG X H, ZHANG X H, ZUO L F, et al. Effects of sterigmatocystin on apoptosis and proliferation of hepatocytes in KM mice [J]. Chin J Comp Med, 2002, 12(2): 109–112.

[28] 刘远光, 刘怀海. LncRNA HULC 通过 miR-372/CXCR4 轴来调控肝癌细胞的增殖、凋亡与上皮-间质转化 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 44–55. LIU Y G, LIU H H. LncRNA HULC regulates proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition of hepatoma cells via the miR-372/CXCR4 axis [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(10): 44–55.