

丙戊酸钠对哮喘相关基因ORMDL3的作用及其机制研究

章素芬¹, 金蕊², 周国平²

(¹南京医科大学第一附属医院儿保科,²儿科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨丙戊酸钠对人血清类黏蛋白1样蛋白3(ORMDL3)转录表达的影响及其机制。方法:利用RT-PCR测定丙戊酸钠对人ORMDL3 mRNA表达的影响;通过点突变、双光荧光素酶报告基因分析方法确定丙戊酸钠对ORMDL3启动子活性的影响及其作用机制。结果:在人胚肾293细胞(HEK293)中,丙戊酸钠(终浓度2 mmol/L)可明显降低哮喘ORMDL3基因的表达量。荧光素酶分析结果显示:丙戊酸钠能够明显抑制ORMDL3基因的启动子活性;对人ORMDL3核心启动子区正向调控ORMDL3表达的p300、CREB位点逐个突变后,丙戊酸钠对突变质粒的降低作用较野生型质粒无显著性差异。结论:丙戊酸钠可下调HEK293细胞ORMDL3转录表达水平,此调节作用并非通过降低与ORMDL3核心启动子区p300和CREB位点的结合而发挥。

[关键词] 人血清类黏蛋白1样蛋白3;丙戊酸钠;启动子;哮喘

[中图分类号] R725.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)12-1587-04

doi:10.7655/NYDXBNS20171210

Effect of sodium valprate on ORMDL3 transcriptional regulation and its possible mechanism

Zhang Sufen¹, Jin Rui², Zhou Guoping²

(¹Department of Child Health Care, ²Pediatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** The main purpose is to investigate the effect and mechanism of sodium valprate on the transcriptional expression of the human orosomucoid 1-like protein3 (ORMDL3). **Methods:** The effect of sodium valprate on the mRNA expression of ORMDL3 was determined by using semi-quantitative RT-PCR. The effect of sodium valprate on ORMDL3 promoter activity and its mechanism were detected by point mutations and Dual-Luciferase reporter assays. **Results:** By adding sodium valprate (final concentration of 2 mmol/L) in human embryonic kidney 293 cells (HEK293 cells), it can significantly reduce the expression amount of the human ORMDL3 gene. The luciferase analysis showed that sodium valprate can significantly inhibit the promoter activity of ORMDL3 gene. P300 and CREB binding to the promoter region can drive the ORMDL3 transcription. When sodium valprate act on the plasmids without the binding region of p300 or CREB, there was no significant difference compared with the wild-type plasmid. **Conclusion:** Sodium valprate can reduce the mRNA level of the human ORMDL3 in HEK293 cells independently of binding with the p300 and CREB in core promoter area of ORMDL3 gene.

[Key words] ORMDL3; sodium valprate; promoter; asthma

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(12):1587-1590]

血清类黏蛋白1样蛋白3 (orosomucoid 1-like protein 3, ORMDL3) 基因是儿童期发病的哮喘的易感基因^[1]。ORMDL3 基因是目前为止发现的与哮喘关联依据最充分的基因。尽管 ORMDL3 的功能还不太清楚,但现有报道提示 ORMDL3 的转录水平与哮喘的发病相关。本实验小组前期研究^[2]已经发现:人 ORMDL3 基因的最小活性启动子区域位于-84~+58 bp 处,而且在-84~-9 bp 区域之间存在重要的调控元件,其中 Ets-1、p300 和 CREB 转录因子能与 ORMDL3 的启动子区结合并正向调控 ORMDL3 的

表达,是维持 ORMDL3 基因启动子基本转录活性所必需的顺式作用元件,且 Ets-1 和 p300 在转录调控中起协同作用。

丙戊酸钠(sodium valprate)是一种人工合成的化合物,不存在于正常人体组织中。目前在临床上是一种广谱抗癫痫药。近几年有研究证实丙戊酸钠在抗癫痫有效治疗浓度时表现出很强的抑制组蛋白去乙酰化酶的活性。目前组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDAC inhibition, HDACi)已经被证实可以通过控制细胞周期、凋亡从而调节许多基因的表达^[3-4]。已

有研究证实,HDACi 可通过改变一些炎症反应进程来改变基因的表达^[5]。另外,HDACi 对 T 细胞的增殖具有免疫抑制作用,并且伴随着白介素-2(IL-2)的分泌下降和 CD40L 的表达^[6]。据此推测,HDACi 有可能降低具有 T 细胞依赖的疾病,如哮喘的发生。综合前文中所提到的 ORMDL3 基因与哮喘之间的密切相关性,我们提出假设,是否丙戊酸钠可通过 ORMDL3 基因对哮喘产生治疗作用。

本研究中本文观察了丙戊酸钠作用下 ORMDL3 mRNA 在 HEK293 细胞中的表达,及丙戊酸钠是否通过影响 ORMDL3 核心启动子区域 p300 和 CREB 转录因子结合位点而对 ORMDL3 的转录水平产生影响。

1 材料与方法

1.1 材料

荧光素酶报告基因分析用质粒 pGL3-Basic、荧光素酶报告基因阳性对照质粒 pGL3-Control 及内参报告基因质粒 pRL-TK 均购自美国 Promega 公司。含有哮喘 ORMDL3 基因启动子序列的荧光素酶报告质粒 pGL3-0.6k、人胚肾 293(HEK293)细胞系为本实验室保存。丙戊酸钠、DEPC、氨苄青霉素、链霉素购自美国 Sigma 公司,TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DL2000 Plus DNA Marker、MutanBEST 试剂盒、TRIzol 试剂、RT-PCR 试剂盒均为大连 TaKaRa 公司产品。去内毒素质粒大量提取试剂盒为德国 Qiagen 公司产品。Super Signal West Pico 试验试剂盒购自美国 Thermo 公司。DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司。无支原体胎牛血清购自杭州四季青生物有限公司。转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司。双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Dual-Luciferase Reporter Assay System)为美国 Promega 公司产品。小量胶回收试剂盒和小量质粒提取试剂盒均购自美国 Axygen 公司。实验中用到的引物均为上海英俊生物有限公司合成。各种工具酶购自美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及活性检测

HEK293 细胞株采用加入 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基,在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。培养约 12 h 后滴入丙戊酸钠溶液(将丙戊酸钠溶于 DMEM 中配制成 100 mmol/L 保存液,置于 -20 °C 保存),每孔终浓度 2 mmol/L,继续培养 24 h 后收集细胞。采用台盼蓝染色法计算

细胞死亡率。

1.2.2 细胞总 RNA 抽提及半定量 RT-PCR

按 TRIzol 使用说明书提取 HEK293 细胞总 RNA,将提取的总 RNA 反转录为 cDNA 并以此为扩增 ORMDL3 基因的模板。反转录反应条件:37 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C 5 min。所用引物根据 GenBank 中 ORMDL3 序列,利用 Oligo6 设计,上游引物:5'-CCGTTGATCTTCGGCCCCACAC-3',下游引物:5'-GGGATAAGCACGCTCATCAGGG-3'。

1.2.3 人 ORMDL3 基因启动子区 p300 及 CREB 结合位点的点突变质粒构建

以含有 ORMDL3 启动子区序列的报告基因表达质粒 pGL3-0.6k 为模板,TaKaRa MutanBEST 试剂盒进行点突变,构建突变质粒,点突变引物结构如下:pGL3-0.6k/p300:5' -AAGAACTACAACCTCGGTGAA GCGTC-3';pGL3-0.6k/CREB:5'-GGCGCGGGCGGT GAGCAACGGGGACC-3',斜体部分为拟突变的碱基。PCR 模板为准备进行突变的质粒。反应条件:94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 5 min。切胶回收目的 DNA 片段,进行 Blunting Kination 反应及 Ligation 反应,反应液全量转化至 100 μL 的感受态细胞中。摇菌提取突变质粒,进一步进行转染实验。

1.2.4 脂质体瞬时转染及荧光强度测定

采用脂质体 2000 转染试剂进行质粒转染试验。具体方法为:转染前 1 d 于 96 孔板中接种每孔约 3×10⁴ 个 HEK293 细胞,次日待细胞生长至 80%~90%融合度时进行转染。每个质粒转 3 个复孔。培养约 12 h 后加入丙戊酸钠,终浓度 2 mmol/L。继续培养 12 h 后进行荧光强度测定。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件处理数据。原始数据符合正态分布的采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丙戊酸钠下调 ORMDL3 mRNA 的表达

以丙戊酸钠处理 HEK293 细胞,丙戊酸钠终浓度分别为 0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mmol/L,培养 24 h 后分别提取细胞的总 RNA 做半定量 RT-PCR,比较 PCR 产物条带的灰度值,以 ORMDL3/GAPDH 代表 ORMDL3 mRNA 水平的相对表达量,以不加丙戊酸钠的 ORMDL3 相对表达量设定为 1,结果显示:丙戊酸钠终浓度上升至 8 mmol/L 时细胞已死亡超过 95%,终浓度为 2、4 mmol/L 时细胞死亡率小于 5%。

不同浓度的丙戊酸钠对 ORMDL3 mRNA 表达量下调作用影响不一, 终浓度 2 mmol/L 时即可明显下调 ORMDL3 转录水平 (终浓度 4 mmol/L 时亦能明显下调转录水平, 但由于丙戊酸钠本身毒性, 故采取 2 mmol/L 相对安全浓度)(图 1)。

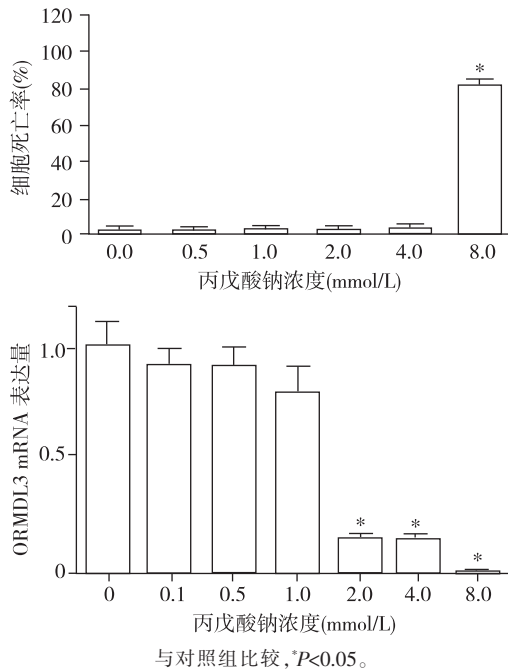


图 1 不同浓度丙戊酸处理 HEK293 细胞后 ORMDL3 的 mRNA 表达改变

Figure 1 The expression of ORMDL3 in mRNA after treatment with different concentrations of Sodium valproate in HEK293 cells

以终浓度 2 mmol/L 丙戊酸钠处理 HEK293 细胞 0、6、12、24、36、48 h 后, RT-PCR 检测 ORMDL3 转录水平, 结果显示作用 24 h 后明显下调 ORMDL3 mRNA, 降低至未经丙戊酸钠处理组的 1/7, 处理 24 h 后细胞死亡率小于 5%, 处理 36 h 后细胞死亡率已接近 70%, 处理 48 h 后细胞死亡率超过 95%(图 2)。

2.2 ORMDL3 启动子区 p300、CREB 位点突变后再行丙戊酸处理所致的活性变化

以上实验已证实经丙戊酸钠处理 HEK293 细胞后可下调 ORMDL3 mRNA 的表达, 本实验小组前期研究已在数个细胞系中证实 p300 及 CREB 位点正向调节 ORMDL3 基因启动子的基础转录活性^[2]。为确定丙戊酸钠是否通过抑制 p300 及 CREB 结合位点降低 ORMDL3 启动子活性从而下调了 ORMDL3 转录水平, 进行了双荧光素酶报告基因分析实验。同时, 为找出影响启动子活性的转录因子位点, 构建了 2 个转录因子结合位点分别突变的荧光素酶报告质粒 pGL3-0.6k/p300、pGL3-0.6k/CREB 分别转染加入丙戊

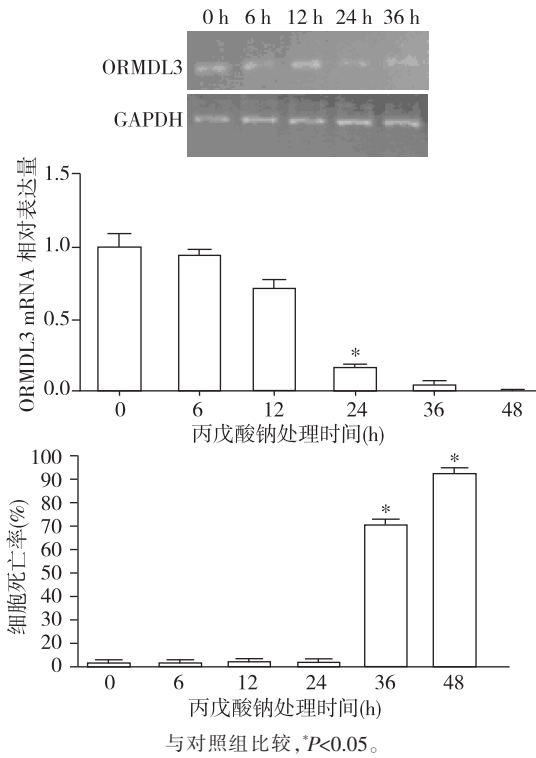


图 2 丙戊酸钠处理 HEK293 细胞不同时间后 ORMDL3 的 mRNA 表达改变

Figure 2 Changes of mRNA expression of ORMDL3 after treatment with Sodium valproate for HEK293 cells at different time

酸钠 (终浓度 2 mmol/L) 和未加丙戊酸钠的 HEK293 细胞, 并与未突变质粒 pGL3-0.6k 荧光素酶报告基因活性比较。荧光素酶活性检测显示突变后加丙戊酸钠处理的 ORMDL3 启动子活性与未突变组加丙戊酸钠处理的 ORMDL3 启动子活性无明显差异(图 3)。这说明丙戊酸钠并非通过影响 p300 及 CREB 结合位点来降低 ORMDL3 启动子的活性。

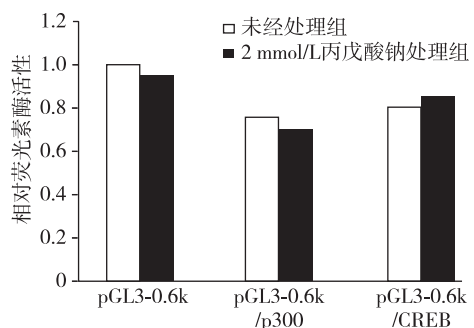


图 3 丙戊酸钠处理 HEK293 细胞后 ORMDL3 启动子活性 Figure 3 ORMDL3 promoter activity after Sodium valproate treatment of HEK293 cells

3 讨论

本研究证实丙戊酸钠能够降低 ORMDL3 mRNA 表达, 但并非通过降低 ORMDL3 核心启动子区

域 p300 及 CREB 结合位点来调控其表达。本课题组的前期研究已在数个细胞系中证实人 ORMDL3 基因核心启动子内的 p300 及 CREB 位点是调控人 ORMDL3 启动子基础转录活性的主要顺式作用元件^[2]。本研究结果显示在未经任何处理的 HEK293 细胞中加入终浓度 2 mmol/L 的丙戊酸钠可显著抑制人 ORMDL3 mRNA 的表达。进一步探讨 ORMDL3 表达下调的机制时,结果证实丙戊酸钠可明显抑制 ORMDL3 启动子的活性,但通过点突变实验证实丙戊酸钠不是通过对其核心启动子区域 p300 及 CREB 结合位点的抑制作用而影响其启动子活性。

ORMDL3 是目前为止被充分证实与哮喘发病相关的易感基因,ORMDL3 基因的 RNA 表达水平在哮喘组中显著高于正常对照组^[7]。因此,鉴于丙戊酸钠下调 ORMDL3 的表达,推测其可能是哮喘治疗的一个潜在药物。

但本实验未找到具体抑制的作用机制。综合已有文献报道的丙戊酸钠对不同细胞的作用机制,对其可能的作用机制进行推测,可能有以下几种可能:①通过加速 RNA 的降解来调节 ORMDL3 的表达。已有研究表明,HDACi 可加速 RNA 的降解^[8]。②通过抑制组蛋白去乙酰化酶 6 (HDAC6) 来调节 ORMDL3 的表达。有研究发现,丙戊酸钠作为 HDACi 可能通过抑制 HDAC6 抑制抗病毒免疫,通过 HDAC8 抑制变异的 p53 转录^[9]。HDAC6 是许多基因的共激活因子^[10]。而病毒感染可调节 ORMDL3 的表达,病毒性呼吸道感染与哮喘发作密切相关。因此,丙戊酸钠有可能通过抑制 HDAC6 来调节 ORMDL3 的表达。

此外,丙戊酸钠在抗癫痫的治疗中,最常见的不良反应之一为肥胖、胰岛素抵抗。有研究表明,丙戊酸钠能阻碍脂肪形成的过程^[11]。丙戊酸钠对脂肪连接蛋白的抑制与其组蛋白去乙酰化酶活性的抑制相关,并且,丙戊酸钠在转录水平对脂肪连接蛋白细胞产生抑制作用,可能与下调 C/EBP α 以及它在脂肪连接蛋白基因启动子区的结合位点有关^[12]。另外,丙戊酸钠能够抑制瘦素分泌,并且降低脂肪细胞中瘦素 mRNA 水平。已有报道 ORMDL3 与糖尿病有关^[13]。加之,ORMDL3 基因的转录水平与哮喘的发病有着非常密切的关系,这也从另一个方面支持丙戊酸钠对哮喘作用的猜想。

单纯从组蛋白去乙酰化酶的角度来看,丙戊酸钠作为一种可抑制组蛋白去乙酰化酶活性的物质,可提高组蛋白 H4、H3 乙酰化蛋白活性,从而有助于诱导哮喘的发生。但丙戊酸钠作为一种在不同细胞

体系有着不同作用机制的物质,结合本实验结果,丙戊酸钠对哮喘的最终结果目前仍未可知。

[参考文献]

- [1] Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 470-473
- [2] Jin R, Xu HG, Yuan WX, et al. Mechanisms elevating ORMDL3 expression in recurrent wheeze patients: role of Ets-1, p300 and CREB[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44 (7): 1174-1183
- [3] Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, et al. Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells[J]. *Blood*, 2003, 101(10): 4055-4062
- [4] Mielnicki LM, Ying AM, Head KL, et al. Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 249(1): 161-176
- [5] Yu Z, Zhang W, Kone BC. Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(8): 2009-2017
- [6] Skov S, Rieneck K, Bovin LF, et al. Histone deacetylase inhibitors: a new class of immunosuppressors targeting a novel signal pathway essential for CD154 expression[J]. *Blood*, 2003, 101(4): 1430-1438
- [7] 金哲,蔡欣,王强,等. 北京地区哮喘儿童 ORMDL3 基因表达水平、生活方式与室内空气质量的相关性研究[J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(10): 22-25
- [8] Grabiec AM, Korchynskyi O, Tak PP, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay[J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(3): 424-431
- [9] Yan W, Liu S, Xu E, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via histone deacetylase 8[J]. *Oncogene*, 2013, 32(5): 599-609
- [10] Boyault C, Sadoul K, Pabion M, et al. HDAC6 at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination[J]. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5468-5476
- [11] Lagace DC, Nachtigal MW. Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (18):18851-18860
- [12] Qiao L, Schaack J, Shao J. Suppression of adiponectin gene expression by histone deacetylase inhibitor valproic acid[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(2):865-874
- [13] Verlaan DJ, Berlivet S, Hunninghake GM, et al. Allele-specific chromatin remodeling in the ZBP2/GSDMB/ORMDL3 locus associated with the risk of asthma and autoimmune disease[J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 85(3):377-393

[收稿日期] 2016-12-07