

## 优降宁对 CYP3A4/3A7 基因启动子和增强子区组蛋白甲基化修饰及其转录的影响

何 航<sup>1,3</sup>, 王 沛<sup>1</sup>, 李世刚<sup>1</sup>, 陈钰龙<sup>2</sup>, 阚全程<sup>2</sup>, 张莉蓉<sup>1\*</sup>

(1. 郑州大学基础医学院, 河南 郑州 450001; 2. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052; 3. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046)

**摘要:** 观察优降宁 (pargyline) 对细胞色素 P450 3A (cytochrome P450 3A, CYP3A) 亚型 CYP3A4/3A7 启动子及增强子区组蛋白甲基化修饰及其基因转录的影响。原代分离培养人胎肝细胞, 分为空白对照组、溶媒组、优降宁低、中、高 (0.6、1.2、2.4 mmol·L<sup>-1</sup>) 浓度组, HepG2 细胞用 0.03、0.3、3 mmol·L<sup>-1</sup> 优降宁处理 48 h, 观察组蛋白甲基化修饰对 CYP3A4/3A7 基因表达的影响; 3 mmol·L<sup>-1</sup> 优降宁处理组与对照组的 HepG2 细胞进行染色质免疫共沉淀, 选取特异 CYP3A4/3A7 启动子、增强子区位点设计引物进行实时定量 PCR, H3K4me2 富集以 input 百分比表示观察富集的改变。结果表明, 优降宁能促进人原代胎肝细胞、HepG2 细胞增殖生长, 与溶媒对照组相比, 优降宁 (1.2、2.4 mmol·L<sup>-1</sup>) 显著升高人原代胎肝细胞 CYP3A7 表达水平, 且优降宁 (3 mmol·L<sup>-1</sup>) 显著升高 HepG2 细胞 CYP3A4/3A7 表达水平 ( $P < 0.001$ ); CYP3A4 近端启动子区 (-362~+53) 和增强子区 (-7 836~-6 093) 的肝细胞核因子 4A (hepatocyte nuclear factors 4A, HNF4A) 结合位点及 CYP3A7 启动子区 (-163~+103) 和增强子区 (-4 054~-3 421, -6 265~-6 247) 的糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 结合位点与对照组相比, 处理组均表现为 H3K4me2 高度修饰 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。提示优降宁诱导 CYP3A4/3A7 启动子及增强子区 HNF4A、GR 结合位点 H3K4me2 高度富集激活 CYP3A4/3A7 基因转录。

**关键词:** 个体发育; 细胞色素 P450 3A4; 表观遗传; 组蛋白甲基化; 核受体; 优降宁

中图分类号: R968

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0091-08

## Effects of pargyline on histone methylation in promoter and enhancer regions and transcription of CYP3A4/3A7

HE Hang<sup>1,3</sup>, WANG Pei<sup>1</sup>, LI Shi-gang<sup>1</sup>, CHEN Yu-long<sup>2</sup>, KAN Quan-cheng<sup>2</sup>, ZHANG Li-rong<sup>1\*</sup>

(1. School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 3. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract:** This study was designed to investigate effects of pargyline on histone methylation in the promoter and enhancer regions and transcription of cytochrome P450 3A4/3A7 (CYP3A4/3A7) gene. Human primary fetal liver cells were isolated, cultured and randomly divided into several groups including control, solvent, pargyline low, middle, high dose (treated with 0.6, 1.2, 2.4 mmol·L<sup>-1</sup>). HepG2 cells were cultured and treated with 0.03, 0.3, 3 mmol·L<sup>-1</sup> pargyline. After 48 hours, total RNAs were prepared from the cells to determine the expression of CYP3A mRNA in primary fetal cells and HepG2 cells with real-time quantitative PCR (qPCR). HepG2 cells were cultured and then treated with 3 mmol·L<sup>-1</sup> pargyline for 48 hours. The chromatin immuno-

收稿日期: 2016-08-03; 修回日期: 2016-10-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173127, 81273581).

\*通讯作者 Tel: 86-371-67781855, Fax: 86-371-66913510, E-mail: zhanglirongzhu@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0767

precipitation (ChIP) assay was performed with dimethylation of histone H3 at lysine 4 (H3K4me2), and IgG antibodies respectively. The precipitated DNA was resuspended and used for qPCR. Primers were used to detect different regions of CYP3A4/3A7 promoter and enhancer. Occupancy of H3K4me2 was shown as percent of input DNA relative to control cells. The results suggested that pargyline has an effect on primary fetal liver cells and HepG2 cells proliferation. The level of CYP3A7 was markedly enhanced in human primary fetal liver cells by treatment with 1.2, 2.4 mmol·L<sup>-1</sup> of pargyline ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and the levels of CYP3A4/3A7 were remarkably enhanced by treatment with 3 mmol·L<sup>-1</sup> of pargyline in HepG2 cells ( $P < 0.001$ ) compared with solvent control. Occupancy of H3K4me2 on human CYP3A4 promoter (-362 to +53) and enhancer segment (-7836 to -6093) harbored the overlapping hepatocyte nuclear factors 4A (HNF4A) binding site compared with a negative control. Occupancy of H3K4me2 on human CYP3A7 promoter (-163 to +103) and enhancer segment (-4054 to -3421, -6265 to -6247) overlapped with glucocorticoid receptor (GR) binding site. In conclusion, the enriched H3K4me2 in the promoter and enhancer regions was induced by pargyline with HNF4A or GR binding site in CYP3A4/3A7 gene to activate the corresponding genes.

**Key words:** ontogeny; cytochrome P450 3A4; epigenetics; histone methylation; nuclear receptor; pargyline

表观遗传调控主要涉及 DNA 甲基化和组蛋白修饰, 组蛋白修饰是发生在组蛋白 N 端的共价修饰, 主要包括甲基化、乙酰化和泛素化等在调控基因表达过程中发挥重要作用<sup>[1, 2]</sup>, 同时影响细胞分化和组织器官的发育。Lu 等<sup>[3]</sup>研究发现, 不同发育阶段的 C57BL/6 小鼠表观遗传修饰存在差异, 如表观修饰酶和核小体重塑分子在胎鼠中的表达水平显著高于成年鼠, 而且表观遗传修饰在肝脏、肾脏及小肠存在差异, 且转录因子则可介导组蛋白甲基化或去甲基化等, 激活或沉默基因, 通过表观遗传机制发挥发育调控作用。

组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶 (lysine-specific demethylase 1, LSD1) 是组蛋白去甲基化酶家族成员, 可去除组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸二甲基及一甲基修饰 (dimethylation or mono-methylation of histone H3 at lysine 4, H3K4me2 or H3K4me1), 为胚胎发育所必需<sup>[4, 5]</sup>。优降宁 (pargyline) 属于单胺氧化酶抑制剂, 可显著抑制 LSD1 活性, 解除 LSD1 靶基因的转录抑制, 促进靶基因转录。由于大多数的表观修饰酶自身没有结合 DNA 的能力, 通过转录因子募集这些具有酶活性的蛋白, 精准靶向作用于 DNA 序列, 发挥重要调控作用。

前期研究<sup>[6]</sup>发现, 人个体发育过程中细胞色素 P450 3A4 (cytochrome P450 3A4, CYP3A4) 主要在成人肝脏表达, CYP3A7 主要在胎儿肝脏表达, 肝细胞核因子 4A (hepatocyte nuclear factors 4A, HNF4A) 是成人肝脏调控 CYP3A4 基础表达的重要核受体, 而糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 在胎儿肝脏调控 CYP3A7 表达中发挥至关重要的作用。利用染色质免疫沉淀高通量测序 (chromatin

immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq) 技术发现: 胎儿肝脏特异性高表达的基因如 CYP3A7、开叉蛋白 A3 (forkhead box protein A3, FOXA3)、甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 和白蛋白 (albumin, ALB) 等启动子区 H3K4me2 富集程度显著高于成人; 与胎儿比较, 成人肝脏特异性高表达基因如 CYP3A4, 其启动子区 H3K4me2 修饰富集程度显著高于胎儿, 但目前调控人肝脏发育过程中 CYP3A4/3A7 差异性表达的机制尚不清楚。因此, 本研究旨在探讨 LSD1 抑制剂优降宁对 CYP3A4/3A7 基因启动子及增强子区组蛋白甲基化修饰及其转录的影响, 提高个体发育中药物代谢酶调控机制认知水平, 更好地预测婴幼儿对药物代谢能力的显著差异, 从而改善儿童患者用药的有效性与安全性。

## 材料与方法

**药品与主要试剂** 人肝癌细胞株 HepG2 (中国科学院上海细胞库); 细胞培养基 DMEM、胎牛血清、Hank's 液、Williams'E、左旋谷氨酰胺、青链霉素混合液、Hepes 液、I 型鼠尾胶原 (Lot#1612737) (美国 Life 公司); 胰岛素-转铁蛋白-硒混合物 (ITS mix 100×, 美国 Gibco 公司); 优降宁 (5 g, 纯度 97%, Lot#STBB4251V)、地塞米松 (Lot# BCBL8331V) (Sigma-aldrich 公司); 胶原酶 P (collagenase P, 500 g, Lot#10089621, Roche 公司); ChIP 级 Dimethyl-Histone H3 (Lys4) 抗体 (Millipore 17-677)、Normal Mouse IgG 抗体 (Millipore 12-371) (默克密理博公司); DNA 纯化试剂盒 (上海碧云天生物公司); PrimeScript RT reagent Kit (AK3301)、SYBR Premix Ex Taq™ (AK5101) (TaKaRa 公司); Realtime PCR、CHIP-qPCR

所用引物由上海生物工程公司设计合成。

缓冲液 A ( $\text{NaCl } 1.42 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{KCl } 67 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{HEPES } 100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); Hank's 平衡盐 ( $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ 、0.03% collagenase P, Roche 公司); Williams' E-S 培养基 (10% 灭活胎牛血清、 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  L-谷氨酰胺、 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  地塞米松、 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  胰岛素、 $5.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  转铁蛋白、 $6.7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  硒、 $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$  青霉素、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素)。

**胎儿肝脏样本** 胎儿肝脏组织样本取材于郑州大学第一附属医院产科, 并获得伦理委员会的批准及家属的知情同意, 胎儿肝脏组织均是经合法流产, 并经超声诊断确定估计孕龄 (estimated gestational age, EGA), 所有孕妇查 HCV-Ab、HBV 及 HIV-Ab 均为阴性, 肝功能谷丙转氨酶和 ALB 等均在正常水平。胎儿肝脏组织重量 6~8 g, 为避免影响分离后肝细胞活力, 冷却血时间控制在 30 min 内, 样本详细资料见表 1。

**Table 1** Demographic data for fetal liver samples. EGA: Estimated gestational age; f: Fetal liver

ID No.	EGA/wk	Gender	Cause of abortion
f001	35	Female	Fetal cerebral ventriculomegaly and chromosome 9 abnormality
f002	17	Female	Spontaneous abortion
f003	22	Male	Fetal abnormalities, spina bifida
f004	39	Female	Fetal abnormalities, spina bifida and cerebral ventriculomegaly
f005	24	Female	Spontaneous abortion
f006	34	Male	Ventricular septal defect
f007	17	Male	Spontaneous abortion
f008	22	Female	Spontaneous abortion
f009	26	Male	Ventricular septal defect, cleft lip and palate

**原代胎肝细胞的分离培养**<sup>[7,8]</sup> 取新鲜刚娩出死亡胎儿肝脏, 75%乙醇消毒置超净台, 无菌镊取组织块放入平皿, 注射器多点注入预热的 37 °C 缓冲液 A, 灌流清洗去除结缔组织。用 Hank's 平衡盐灌流至灌流液变得清亮, 肝组织块由暗红色变为灰白色, 质地变软。钝性分离剪碎, 转入 15 mL 离心管, 加入 0.03% 胶原酶 P 37 °C 消化 30 min, 吹打细胞悬液, 置于冰上, 80  $\mu\text{m}$  细胞筛过滤, 滤液置于离心管中, 离心 160  $g \times 5 \text{ min}$ , 4 °C 下 Williams' E-S 培养基洗涤重悬 2 次。倒置显微镜下观察肝细胞形态, 调整肝细胞数为每平方厘米  $3 \times 10^5$  个接种于铺有 I 型鼠尾胶原包被的 6 孔培养板, 置于 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 培养箱中培养, 镜下观察大部分细胞贴壁后, 继续培养, 每天换液观察细胞生长情况。

**HepG2 细胞传代与培养** 复苏 HepG2 细胞用高糖 DMEM 培养基, 加入 10% FBS, 加入 1% 青霉素、链霉素, 培养条件为 37 °C、5%  $\text{CO}_2$ , 贴壁后生长融合到 60%~70%, 用 PBS 洗涤后加入适量 0.25% 胰酶, 置 37 °C 孵育 5 min, 镜下观察至细胞变圆, 中止消化, 反复吹打成单细胞悬液后传至皿中。

**优降宁对原代胎肝细胞及 HepG2 细胞 CYP3A4/3A7 表达影响** 以上述方法分离新鲜的胎儿肝细胞, 分为空白对照组、溶媒组、优降宁低、中、高浓度组, 倒置显微镜下观察, 培养 6 h 后贴壁生长良好; 培养 48 h 后加入优降宁使终浓度分别为 0.6、1.2 和 2.4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。48 h 后收集细胞, 提取各组 RNA, 按 PrimeScript™ RT with gDNA Eraser reagent Kit 说明书合成 cDNA, 按 ABI PRISM7500 Fast 操作说明书进行 Real-Time quantitative PCR (qPCR), 反应体系 20  $\mu\text{L}$ : 模板 2  $\mu\text{L}$ , 上游下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , SYBR 10  $\mu\text{L}$ , 灭菌水 6.8  $\mu\text{L}$ , 反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 3 s, 60 °C 30 s 共 40 个循环, GAPDH 为内参基因, 检测 CYP3A7 等基因表达, 引物序列见表 2。HepG2 细胞培养 48 h 后, 分组方法同上, 加入优降宁使终浓度分别为 0.03、0.3 和 3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 48 h 后收集细胞, 提取各组 RNA, 反转录后 qPCR 定量检测基因表达, 方法同上。

**Table 2** Primer sequences for real-time qPCR

Gene		Sequence (5'-3')	Product size/bp
GAPDH	Forward	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	212
	Reverse	TGAGCTTGACAAAGTGGTCG	
CYP3A7	Forward	AAGTCTGGGGTATTTATGACT	130
	Reverse	CGCTGGTGAATGTTGGAGAC	
GR	Forward	CAGGCTGGAATGAACCTGGAA	176
	Reverse	GGTTCATAAACCCTCCAACAGTGACA	
FOXA3	Forward	CCAAGTTGGCCACCATTCTG	91
	Reverse	GCCCACTGACGTTGTCACCTA	
ALB	Forward	AACTTCGGGATGAAGGGAAG	101
	Reverse	AGCTACTGCCATGCTTTGA	
CYP3A4	Forward	CACAGATCCCCCTGAAATTAAGCTTA	106
	Reverse	AAAATTCAGGCTCCACTTACGGTG	
AFP	Forward	GCTTTGCTGAAGAGGGACAA	106
	Reverse	CACACCGAATGAAAGACTCG	

**优降宁对 CYP3A4/3A7 启动子及增强子区组蛋白甲基化修饰及其转录的影响**

**细胞培养及药物处理** HepG2 细胞置于 10% FBS, 含 1% 青霉素、链霉素双抗高糖 DMEM 培养基中培养, 贴壁后生长融合到 60%~70% 加入终浓

度  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  优降宁处理, 不加药培养皿中的细胞为对照。

**细胞的甲醛交联与超声破碎** 取 48 h 后生长状态良好的细胞 ( $1\times 10^7\sim 2\times 10^7$ ), 除去培养基, PBS 洗涤后每皿中加入 37% 甲醛 243  $\mu\text{L}$ , 使得终浓度为 1%, 室温孵育 10 min, 加入  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  甘氨酸 562.5  $\mu\text{L}$ , 使得终浓度为  $0.125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 混匀, 室温下放置 5 min 终止交联。弃掉含甲醛和甘氨酸的缓冲液, 加预冷含  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的 PBS, 刮下细胞后收集到离心管中; 按照每  $1\times 10^7$  细胞加入 CHIP lysis Buffer 750  $\mu\text{L}$ , 将裂解液超声 (diagenode bioruptor pico, Belgium) 处理 10 min (30 s 超声间歇 30 s) 使 DNA 断裂成约 200~500 bp 片段。取 10% 超声后样本作为 Input, 100  $\mu\text{L}$  加入  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 4  $\mu\text{L}$ ,  $65^\circ\text{C}$  处理过夜解交联, 凝胶电泳分离 DNA 片段检测超声破碎效果。

**免疫复合物的沉淀及洗涤** 优降宁处理组、对照组分别取上清液 100  $\mu\text{L}$  加 H3k4me2 抗体、IgG 抗体, 再加入含  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  PMSF CHIP dilution buffer 稀释使终体积为 1 mL。于  $4^\circ\text{C}$  加入 70  $\mu\text{L}$  protein A/G beads 缓慢摇摆转动混匀 60 min, 以减少 protein A/G beads 与目的蛋白或 DNA 序列的非特异性结合。 $4^\circ\text{C}$ ,  $2795 \times g$  离心 2 min, 转上清至离心管中加入适量一抗  $4^\circ\text{C}$  缓慢转动过夜, 加入 protein A/G 100  $\mu\text{L}$ , 以沉淀一抗识别的蛋白 DNA 结合的复合物,  $4^\circ\text{C}$  静置,  $2795 \times g$

离心 2 min, 弃液体勿触及沉淀。依次用如下缓冲溶液低盐、高盐、LiCl 和 TE 缓冲液洗涤沉淀, 洗涤液用量为 1 mL,  $4^\circ\text{C}$  缓慢转动 5 min 后,  $2795 \times g$  离心 2 min, 弃液体勿触及沉淀, 加入新鲜配制的洗脱液 250  $\mu\text{L}$  进行洗涤, 室温下旋转 30 min 静置后,  $4^\circ\text{C}$  下  $2795 \times g$  离心 2 min, 收集上清液, 最终洗脱液每管 500  $\mu\text{L}$ 。

**解交联、蛋白酶消化及 DNA 分离纯化** 每管中加入  $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 20  $\mu\text{L}$  混匀,  $65^\circ\text{C}$  解交联过夜, 每管加入下列溶液:  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA 10  $\mu\text{L}$ 、 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 6.5) 20  $\mu\text{L}$ 、蛋白酶 K ( $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ,  $45^\circ\text{C}$  孵育 1.5 h。应用 DNA 纯化试剂盒进行 DNA 纯化。

**CYP3A4/3A7 启动子及增强子区位点的 qPCR 检测** 引物设计根据文献<sup>[9,10]</sup>报道, 选取在 CYP3A4 启动子区 (-362~+53) 及增强子区 (-7836~-6093) 的 HNF4A 的结合位点; 在 CYP3A7 的启动子区 (-163~+103) 及增强子区 (-4054~-3421, -6265~-6247), 由上海生物工程公司合成, 引物序列及产物片段见表 3。反应体系 20  $\mu\text{L}$ : ChIP DNA 或 Input control 15 ng,  $\text{dH}_2\text{O}$  根据 DNA 体积而调整, 上游、下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , SYBR 10  $\mu\text{L}$ , 反应条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 30 s,  $95^\circ\text{C}$  3 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s 共 40 个循环, Real time qPCR 结果分析如下: Input Ct 值用 Input 稀释因子校正后, 标准化 DNA 的量 (normalize DNA); 应用

**Table 3** Primer sequences for ChIP qPCR

Primer	Sequence (5'-3')	Position	Predicted size/bp
CYP3A4-F	GTGTTCTCAGGCACAGATTTC	(-362 - +53)	76
CYP3A4-R	ATGGCACCGTAAGTGAG		
CYP3A4-F	CATGGATGAAGCCCATCTT	(-362 - +53)	76
CYP3A4-R	CTGTGCTGAGAACCACAGA		
CYP3A4-F	CCCGTTATTATGCAGTCC	(-362 - +53)	91
CYP3A4-R	GCCTGAGAACCACAGAGACC		
CYP3A4-F	CAGCAGACAGAGAACCAGA	(-6093 - -6574)	147
CYP3A4-R	ACCCAGCAAAGGCAGATTAC		
CYP3A7-F	CCAAGTCTCCTTTGCTCTGG	(-6247 - -6265)	95
CYP3A7-R	AACATCCCCTCCCTCTATG		
CYP3A7-F	TTCTCCAAGTCTCCTTTGC	(-6247 - -6265)	102
CYP3A7-R	AAAACATCCCCTCCCTCTA		
CYP3A7-F	CGTCTTCATTTCAGGGTCTAT	(-163 - +103)	90
CYP3A7-R	AGGACTTCTGGTTTGCTCTTA		
CYP3A7-F	CAGGCTCCACTTACGGTCTC	(-163 - +103)	90
CYP3A7-R	CCCTGAAATTACGCTTTGGA		
CYP3A7-F	TTGCGTCTTCACTTTGTTGA	(-4054 - -3421)	151
CYP3A7-R	GGAAACTCTTCAGGACATTGG		
CYP3A7-F	CGTCTTCACTTTGTTGATTGCT	(-4054 - -3421)	148
CYP3A7-R	GGAAACTCTTCAGGACATTGG		

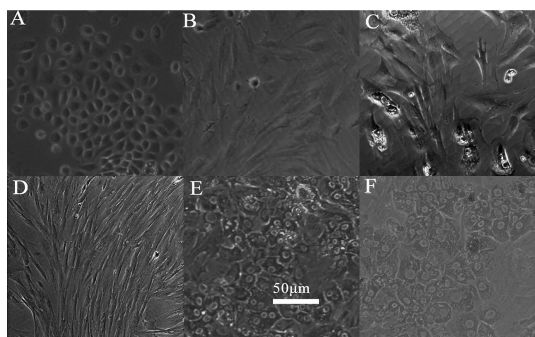
$2^{-\Delta C_t[\text{normalized ChIP}]}$  计算 ChIP 反应样品中 DNA 目的片段占 Input control 百分比 (% Input)。

**统计学方法** 以均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示所有计量资料, 采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间均数用独立样本的 *t* 检验分析均数显著性, 且  $P < 0.05$  表示差异具有显著的统计学意义。

## 结果

### 1 人原代胎肝细胞形态观察

在倒置相差显微镜观察人原代胎肝细胞形态, 接种约 6 h 后肝细胞部分贴壁, 24 h 时大部分肝细胞由球形伸展形成梭形; 48 h 变为扁平的多面梭形细胞生长增殖较快; 72 h 生长迅速继续保持梭形; 第 5 天增殖转变为多边形, 细胞浆丰富, 核清晰, 具有非常典型的肝细胞形态结构特征, 有双核或多核 (图 1), 肝细胞在 William's E 完全培养基中培养时, 多边形的正常形态可维持到分离的第 7 天, 细胞失去正常的形态, 折光性减弱, 细胞自然失去继续增殖的能力而死亡。

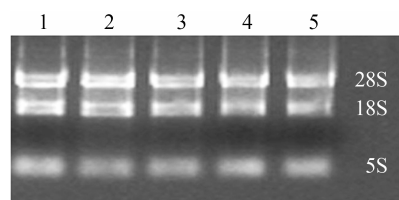


**Figure 1** Primary culture of human fetal cells (200 $\times$ ). Cells culture for A: 6 h; B: 24 h; C: 48 h; D: 72 h; E: 5 days; F: 7 days

### 2 优降宁对原代人胎肝细胞和 HepG2 细胞 CYP3A4/3A7 基因表达的影响

**2.1 Trizol 法提取人原代胎肝细胞总 RNA 的鉴定** 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 5S、18S 和 28S 条带清晰, 二者之比约为 1 : 2 (图 2), RNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 大于 1.85。

**2.2 Pargyline 对原代人胎肝细胞和 HepG2 细胞 CYP3A4/3A7 基因表达的影响** Real-time qPCR 方法检测结果显示, LSD1 抑制剂优降宁处理 48 h, 能促进原代胎肝细胞的增殖生长, 且具有剂量依赖性。与溶媒对照组相比, 1.2 和 2.4 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度组 CYP3A7 的表达水平显著升高, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , 图 3A); 2.4 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度组的 FOXA3



**Figure 2** 1.5% Denaturing agarose gel of total RNA, 1-5: control, vehicle, pargyline treatment (0.6, 1.2, 2.4 mmol·L<sup>-1</sup>) in primary human fetal cells)

表达水平显著升高, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 3B); 1.2 和 2.4 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度组的 ALB 表达水平显著升高, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图 3C); 1.2 和 2.4 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度组的 AFP 表达水平显著升高, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ , 图 3D)。

LSD1 抑制剂优降宁能促进 HepG2 细胞的增殖生长, 且促进 CYP3A4/3A7 基因表达, 呈剂量依赖性, 与溶媒对照组相比, 3 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度优降宁组 CYP3A7 的表达水平显著升高, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图 3E); 0.3 和 3 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度优降宁组 CYP3A4 的表达水平显著升高, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ , 图 3F)。

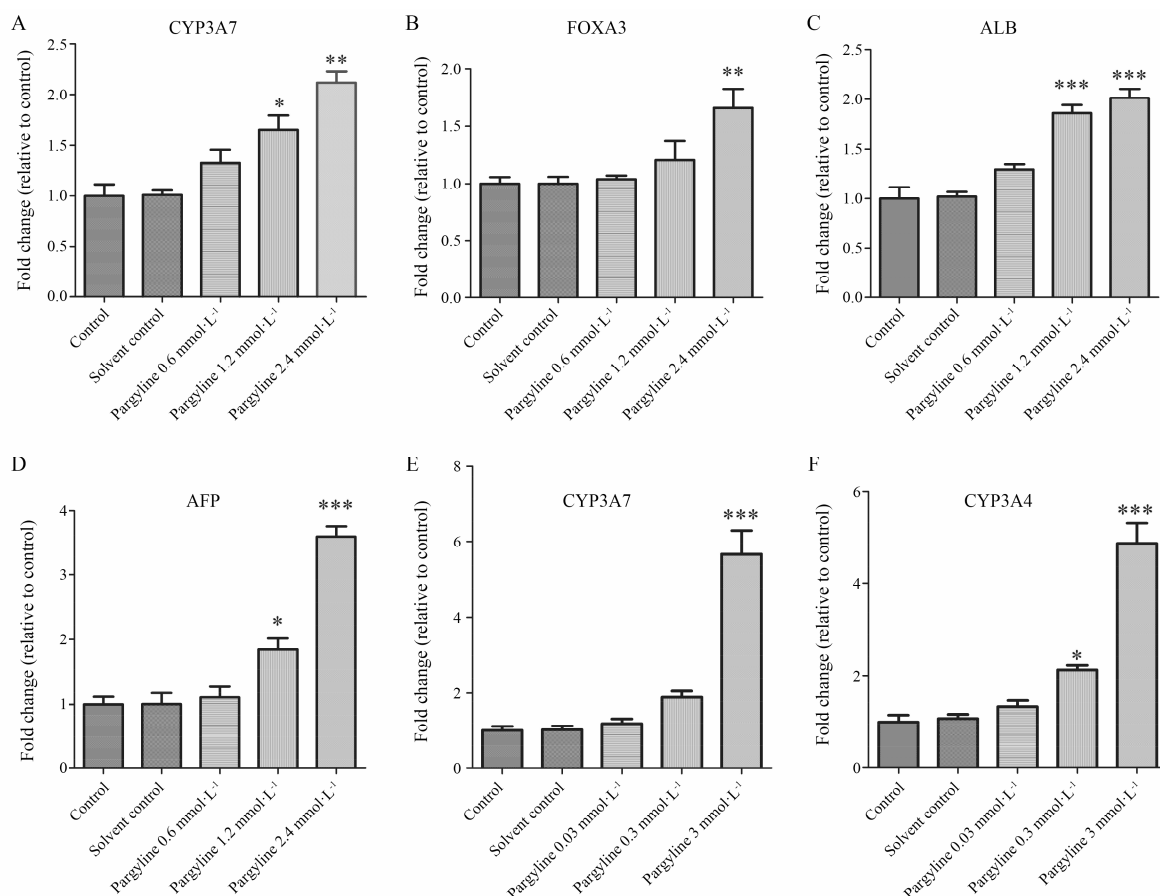
### 3 优降宁对 CYP3A4/3A7 启动子及增强子区组蛋白甲基化修饰状态的影响

**3.1 样品超声碎断 DNA 片段大小检测及 DNA 浓度检测** Tiangen D2000 (marker) 上样 6  $\mu$ L, 处理组与未处理组样本 DNA 上样 2  $\mu$ L, 电压 150 V, 电泳 40 min, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 4。凝胶电泳条带显示主要分布 100~500 bp, 且主要条带明显。

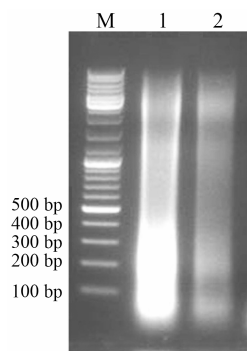
**3.2 CYP3A4/3A7 启动子及增强子区组蛋白甲基化修饰状态** 在 CYP3A4 近端启动子区 (-362~+53) 及增强子区 (-7836~-6093) 的转录因子 HNF4A 结合位点 H3K4me2 富集情况下, 优降宁未处理组 H3K4me2 部分修饰, 处理组均表现 H3K4me2 高度修饰, 而在阴性对照组 IgG 中, 几乎不发生 H3K4me2 的富集; CYP3A7 的启动子区 (-163~+103) 及增强子区 GR 的结合位点 (-4054~-3421, -6265~-6247) H3K4me2 富集情况: 优降宁未处理组 H3K4me2 部分修饰, 处理组均表现 H3K4me2 高度修饰, 而在阴性对照组 IgG 中, 几乎不发生 H3K4me2 的富集 (图 5)。

## 讨论

个体发育过程中, 从胎儿到成人, CYP3A4/3A7 活性并非呈线性发育, 随个体的生长发育发生较大



**Figure 3** Effects of methylation of histone on CYP3A4/3A7 expressions. A–D: realtime qPCR results for CYP3A7, forkhead box protein A3 (FOXA3), albumin (ALB), alpha fetoprotein (AFP), genes following vehicle or pargyline treatment (0.6, 1.2, 2.4 mmol · L<sup>-1</sup>) in primary human fetal cells. Realtime qPCR results for CYP3A7 (E), CYP3A4 (F) genes following vehicle or pargyline treatment (0.03, 0.3, 3 mmol · L<sup>-1</sup>) in HepG2 cells. Data were shown as mean ± SD (n = 3). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs solvent control group

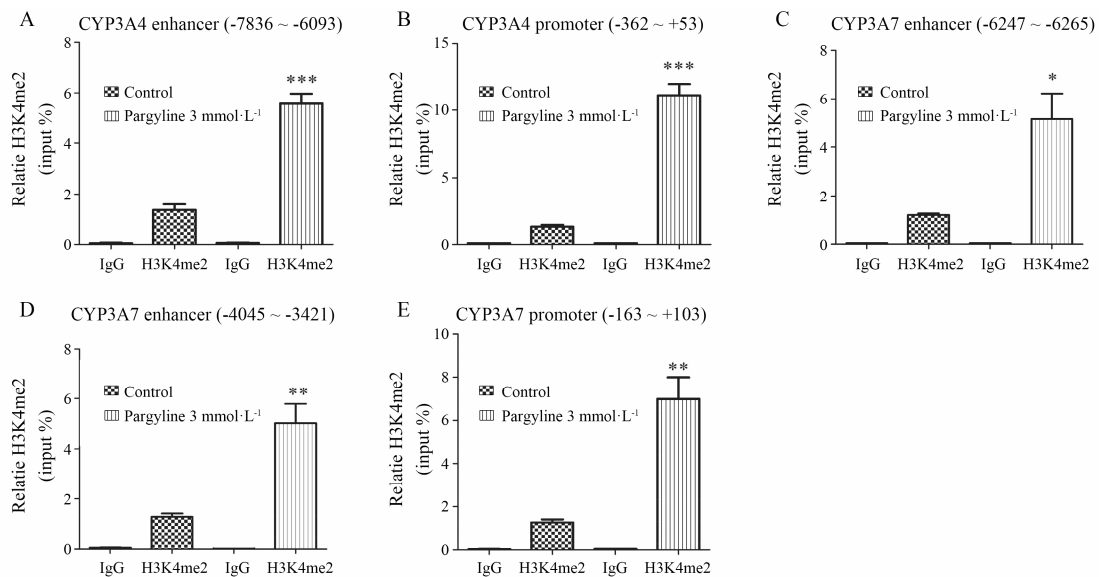


**Figure 4** Agarose gel electrophoresis of DNA fragments after ultrasonication. M: Marker; 1: Pargyline treatment group; 2: Control group

变化, 直接影响儿童安全用药。因此, 了解发育过程中 CYP3A4/3A7 的变化规律, 探讨其基因启动子区、增强子区组蛋白的甲基化修饰对其基因转录活性的影响, 有可能预测不同个体对药物代谢能力, 从而有效改善儿童患者治疗效果, 为儿童患者合理、安全和有效用药提供更坚实的依据。

优降宁可显著抑制 LSD1 酶活性, 而 LSD1 可特异性去除 H3K4me2 二甲基。Whyte 等<sup>[11–13]</sup>应用胚胎干细胞 CHIP-seq 分析结果显示, LSD1 主要富集在激活基因的增强子区及核心启动子区, 发挥抑制转录调控作用, 因此, 优降宁可解除 LSD1 靶基因的转录抑制, 促进靶基因转录。

本研究应用优降宁处理分离培养人原代胎肝细胞、HepG2 细胞 48 h 后, 结果显示优降宁能促进原代胎肝细胞、HepG2 细胞的增殖生长, 促进 CYP3A4/3A7 基因表达。文献<sup>[14]</sup>报道中草药异鼠李素可以通过激活 PXR 可促 CYP3A4 mRNA 表达, 而 HNF4A 主要调控肝脏 CYP3A4 等特异性靶基因的基础表达<sup>[9, 15]</sup>。CYP3A7 主要在胎儿肝脏中高表达且活性高度变异<sup>[16–19]</sup>。GR 可调控 CYP3A7 等代谢酶及核受体基因的表达<sup>[20, 21]</sup>。ChIP-qPCR 检测结果也充分显示, 优降宁处理组在 CYP3A4 近端的启动子区 (–362~+53) 及增强子区 (–7836~–6093) 转录因子 HNF4A 结合位点, CYP3A7 的启动子区 (–163~+103) 及增



**Figure 5** ChIP-qPCR validation of hepatocyte nuclear factors 4A (HNF4A) or glucocorticoid receptor (GR) binding in CYP3A4/3A7 promoter and enhancer in HepG2 cells. ChIP-qPCR enrichment, shown as % of input DNA; error bars are standard deviation from triplicate experiments. Data were shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

强子区 GR 的结合位点 (-4 054 ~ -3 421, -6 265 ~ -6 247) 均存在 H3K4me2 高度修饰。

因此, HNF4A 介导 CYP3A4 表达变化及 GR 调控 CYP3A7 的组蛋白修饰机制, 可能涉及 CYP3A4 及 CYP3A7 启动子区及增强子区核受体与染色质的相互作用。优降宁处理 HepG2 细胞后, 抑制 LSD1 特异性识别活化基因启动子区 H3K4me2 甲基化位点, 导致去除 H3K4me2 甲基受阻, 从而解除对靶基因 CYP3A4/3A7 的转录抑制作用, 促进基因转录进行, 充分说明了动态 H3K4me2 修饰标志对 CYP3A4/3A7 基因发育表达的重要性, 组蛋白修饰可能通过调节染色体结构, 改变了转录因子的易接近性, HNF4A、GR 介导的 CYP3A4/3A7 发育表达改变可能涉及与靶基因启动子区及增强子区高度富集的 H3K4me2 相互作用、相互协同, 促进 CYP3A4/3A7 基因的转录。H3K4me2 作为基因转录过程中关键的调控因子已经明确, 但 LSD1 介导的组蛋白 H3K4 去甲基化在人发育过程中 CYP3A 亚型表达变化及对临床用药的影响的机制尚需进一步探讨。

**致谢:** 郑州大学第一附属医院麻醉科主任张卫教授、产科扬凯护士长及产科所有老师在收集标本中给予大力的帮助与支持; 郑州大学基础医学院臧明玺教授在 CHIP-qPCR 实验中所涉及的技术方法中给予的指导和帮助。

## References

- [1] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function [J]. *Cell*, 2007, 128: 693–705.
- [2] Kim TH, Barrera LO, Zheng M, et al. A high-resolution map of active promoters in the human genome [J]. *Nature*, 2005, 436: 876–880.
- [3] Lu H, Cui JY, Gunewardena S, et al. Hepatic ontogeny and tissue distribution of mRNAs of epigenetic modifiers in mice using RNA-sequencing [J]. *Epigenetics*, 2012, 7: 914–929.
- [4] Foster CT, Dovey OM, Lezina L, et al. Lysine-specific demethylase 1 regulates the embryonic transcriptome and CoREST stability [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30: 4851–4863.
- [5] Fang R, Barbera AJ, Xu Y, et al. Human LSD2/KDM1b/AOF1 regulates gene transcription by modulating intragenic H3K4me2 methylation [J]. *Mol Cell*, 2010, 39: 222–233.
- [6] He H, Nie YL, Li JF, et al. Developmental regulation of CYP3A4 and CYP3A7 in Chinese han population [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*. DOI: 10.1016/j.dmpk.2016.08.008.
- [7] Deurholt T, ten Bloemendaal L, Chhatta AA, et al. *In vitro* functionality of human fetal liver cells and clonal derivatives under proliferative conditions [J]. *Cell Transplant*, 2006, 15: 811–822.
- [8] Vondran FW, Katenz E, Schwartlander R, et al. Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: criteria for identification of the most promising liver specimen [J]. *Artif Organs*, 2008, 32: 205–213.
- [9] Tegude H, Schnabel A, Zanger UM, et al. Molecular mechanism of basal CYP3A4 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ : evidence for direct regulation in the intestine [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 946–954.

- [10] Pang XY, Cheng J, Kim JH, et al. Expression and regulation of human fetal-specific CYP3A7 in mice [J]. *Endocrinology*, 2012, 153: 1453–1463.
- [11] Whyte WA, Bilodeau S, Orlando DA, et al. Enhancer decommissioning by LSD1 during embryonic stem cell differentiation [J]. *Nature*, 2012, 482: 221–225.
- [12] Nair VD, Ge Y, Balasubramaniyan N, et al. Involvement of histone demethylase LSD1 in short-time-scale gene expression changes during cell cycle progression in embryonic stem cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32: 4861–4876.
- [13] Rudolph T, Beuch S, Reuter G. Lysine-specific histone demethylase LSD1 and the dynamic control of chromatin [J]. *Biol Chem*, 2013, 394: 1019–1028.
- [14] Ding LL, Zhang JJ, Dou W. Effects of isorhamnetin on CYP3A4 and herb-drug interaction [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 1006–1010.
- [15] Bolotin E, Liao H, Ta TC, et al. Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4alpha target genes using protein binding microarrays [J]. *Hepatology*, 2010, 51: 642–653.
- [16] Leeder JS, Gaedigk R, Marcucci KA, et al. Variability of CYP3A7 expression in human fetal liver [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 314: 626–635.
- [17] Vyhldal CA, Pearce RE, Gaedigk R, et al. Variability in expression of CYP3A5 in human fetal liver [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43: 1286–1293.
- [18] Shuster DL, Risler LJ, Prasad B, et al. Identification of CYP3A7 for glyburide metabolism in human fetal livers [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 92: 690–700.
- [19] Burk O, Tegude H, Koch I, et al. Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 24280–24288.
- [20] Pascussi JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, et al. Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 6346–6358.
- [21] Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, et al. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function [J]. *Steroids*, 2010, 75: 1–12.