

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.14.006

文章编号: 1005-8982(2016)14-0027-05

论著

Brahma 相关基因 1 在脂多糖诱导的急性肝炎中的作用

刘显灼, 艾芬

(湖北省武汉市中心医院 急诊科, 湖北 武汉 430014)

摘要:目的 观察 Brahma 相关基因 1(BRG1)在脂多糖(LPS)诱导的急性肝炎中的表达变化,并观察干预 BRG1 表达对炎症因子分泌的影响。**方法** 体内实验,腹腔注射 LPS(2.5 mg/kg)构建小鼠肝炎模型,通过免疫组织化学及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 BRG1 的表达变化;体外实验,在人肝细胞 HepG2 及 HepaRG 培养基中加入 LPS(100 ng/ml),Western blot 检测 BRG1 的表达变化,转染 BRG1 质粒或特异性 siRNA,通过 ELISA 检测白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 6(IL-6)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等促炎因子的分泌。**结果** 体内实验,腹腔注射 LPS(2.5 mg/kg)可以显著诱导小鼠的肝细胞坏死,肝细胞核浓聚,肝小叶组织结构破坏及 ALT、AST 的水平明显升高;同时 LPS 处理后肝细胞中的 BRG1 表达上升,BRG1 在细胞核中浓聚。体外实验,LPS(100 ng/ml)处理后的 HepG2 及 HepaRG 细胞中 BRG1 的表达升高。同时 BRG1 过表达可显著促进促炎因子 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的释放,相反 BRG1 沉默后可显著抑制促炎因子 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的释放。**结论** LPS 可促进小鼠肝脏中及体外培养肝细胞的 BRG1 蛋白表达,干预 BRG1 表达可影响细胞释放 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的能力。

关键词: Brahma 相关基因 1;脂多糖;急性肝炎;促炎因子

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of BRG1 in acute hepatitis induced by lipopolysaccharides

Xian-zhuo Liu, Fen Ai

(Emergency Department, Wuhan Central Hospital, Wuhan, Hubei 430014, China)

Abstract: Objective To observe the expression of Brahma-related gene 1 (BRG1) in acute hepatitis induced by lipopolysaccharide (LPS) and the effect of intervention of BRG1 expression on secretion of inflammatory factors. **Methods** For *in vivo* experiments, a hepatitis mouse model was constructed by intraperitoneal injection of LPS (2.5 mg/kg), then the expression of BRG1 was detected through immunohistochemical staining and Western blot. For *in vitro* experiments, LPS (100 ng/ml) was added in human liver cell line HepG2 and HepaRG culture media, and then, the expression of BRG1 was detected through Western blot. Meanwhile, BRG1 plasmid or specific siRNA was transfected into HepG2 and HepaRG cells, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the IL-1, IL-6 and TNF- α secretion. **Results** *in vivo*, intraperitoneal injection of LPS could obviously induce necrosis of hepatic cells and lobules, together with condensation of nuclei in mice. Meanwhile, the expression of BRG1 was enhanced in mouse hepatic cells after procession by LPS, and accumulated in nuclei. *In vitro* experiments showed the expression of BRG1 in HepG2 and HepaRG cells increased after treatment by LPS (100 ng/ml). At the same time, the overexpression of BRG1 significantly promoted the release of pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and TNF- α ; the silence of BRG1 inhibited the release of IL-1, IL-6 and TNF- α . **Conclusions** LPS could promote the expression of BRG1 protein both *in vivo* and in mouse liver cell lines, and intervention of BRG1 expression might

收稿日期: 2015-12-25

[通信作者] 艾芬, E-mail: 13006191071@163.com; Tel: 13006191071

affect the secretion of IL-1, IL-6 and TNF- α .

Keywords: Brahma-related gene 1; lipopolysaccharide; acute hepatitis; pro-inflammatory factor

SWI/SNF 染色质重塑复合物是目前许多真核基因转录调控中的关键因素, *BRG1* 作为 SWI/SNF 的催化酶, 不仅广泛参与包括细胞周期调控和细胞分化在内的多种细胞活动, 在胚胎发育和肿瘤抑制中也发挥着重要的作用。如 AGALIOTI 等人^[1]的研究表明 *BRG1* 通过靶向调节特定核小体的重塑活动, 介导 SWI/SNF 复合物参与调控炎症反应的动力学效应; *BRG1* 可调节细胞间黏附分子的水平, 促进白细胞的黏附作用^[2-3]; *BRG1* 也可调控调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 的活性^[4]。但 *BRG1* 自身在炎症发展过程中的表达及其对于促炎因子的影响并不十分清楚。细菌脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 作为革兰氏阴性杆菌细胞壁的主要成分, 具有内毒素的作用, 能够激活机体的免疫应答。本研究中, 笔者在 C57BL 小鼠腹腔注射 LPS (2.5 mg/kg) 构建体内的肝炎模型, 在人肝细胞 HepG₂ 及 HepaRG 培养基中加入 LPS (100 ng/ml) 建立体外模型, 分别检测 *BRG1* 的蛋白表达变化, 并观察干预 *BRG1* 表达对细胞中促炎因子分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

雌性 C57BL 小鼠购自武汉大学实验动物中心, 动物实验受武汉市中心医院、华中科技大学附属同济医学院医学伦理委员会批准。人肝癌细胞 HepG₂ 及人永生正常肝细胞 HepaRG 购自中科院上海细胞库, 以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基常规培养于 5% 二氧化碳 CO₂, 37℃ 培养箱中。

胎牛血清、RPMI 1640 培养基购自武汉启动子生物有限公司, 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, *BRG1*、GAPDH 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 促炎因子白细胞介素 1 (Interleukin 1, IL-1)、白细胞介素 6 (Interleukin 6, IL-6) 及肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor α , TNF- α) 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自武汉博士德生物有限公司, *BRG1* 质粒购自山东维真生物有限公司, 并经测序检测, *BRG1* 特异性 siRNA (序列为 5'-GGACCUGAAUGA GGAGGAA-3') 及 LPS 购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型及药物诱导 将 8~9 周龄的 C57BL 雌性小鼠饲养于华中科技大学同济医学院基础医学院免疫学系动物中心, 遵循 12 h/12 h 昼夜节律, 自由进食饲料及饮水。按照小鼠体重给以腹腔注射 LPS (2.5 mg/kg) 作为实验组, 给以等量生理盐水 (NS) 腹腔注射作为对照组, 每组 8 只, 8 h 后处死小鼠, 分别取肝脏组织及血清样本行相关检测。该实验得到华中科技大学同济医学院及武汉市中心医院伦理委员会的批准。

1.2.2 细胞药物处理及转染 LPS 以 100 ng/ml 的终浓度处理 HepG₂ 及 HepaRG 细胞, 等量生理盐水作为对照组, 8 h 后收集细胞培养基上清及细胞行相关检测。*BRG1* 过表达质粒及特异性 siRNA 按照 Lipofectamine 2000 试剂说明书常规转染 48 h 后行相关检测, 以空质粒及无意义乱序 siRNA 作为实验的阴性对照组。

1.2.3 ELISA 检测细胞分泌 IL-1、IL-6 及 TNF- α 将 HepG₂ 及 HepaRG 细胞以 1×10^6 个 / 孔密度接种于 6 孔板, 按照上述方法转染质粒或 siRNA, 常规培养 48 h 后, 吸取细胞培养基上清, 离心去固体沉淀后按照 ELISA 试剂盒检测其中的 IL-1、IL-6 及 TNF- α 含量, 并以转染空质粒及无意义乱序 siRNA 组作为 1, 计算相对蛋白含量绘图。相同实验重复 3 次。

1.2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 实验 收集肝脏组织并匀浆, 收集 LPS 处理后或转染处理后的 HepG₂ 及 HepaRG 细胞, 加入适量 RIPA 裂解液 (每 1×10^6 个细胞加入 100 μ l 裂解液), 获取细胞总蛋白液, 加入 SDS 上样缓冲液 100℃ 水浴解除蛋白交联。各组蛋白样品行聚丙烯酰胺凝胶电泳, PVDF 膜转膜并用脱脂奶粉封闭 1 h, 然后依次孵育一抗 4℃ 过夜及辣根过氧化物酶标记的 II 抗室温 1 h 后化学发光法显影, 检测细胞中 *BRG1* 表达情况, 以 GAPDH 作为内参。

1.2.5 免疫组织化学法 收集 LPS 处理后的小鼠肝脏加入多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片, 并行 HE 染色及 *BRG1* 的免疫组织化学染色。在普通光学显微镜下观察肝细胞变化及 *BRG1* 的阳性细胞数和染

色强弱。

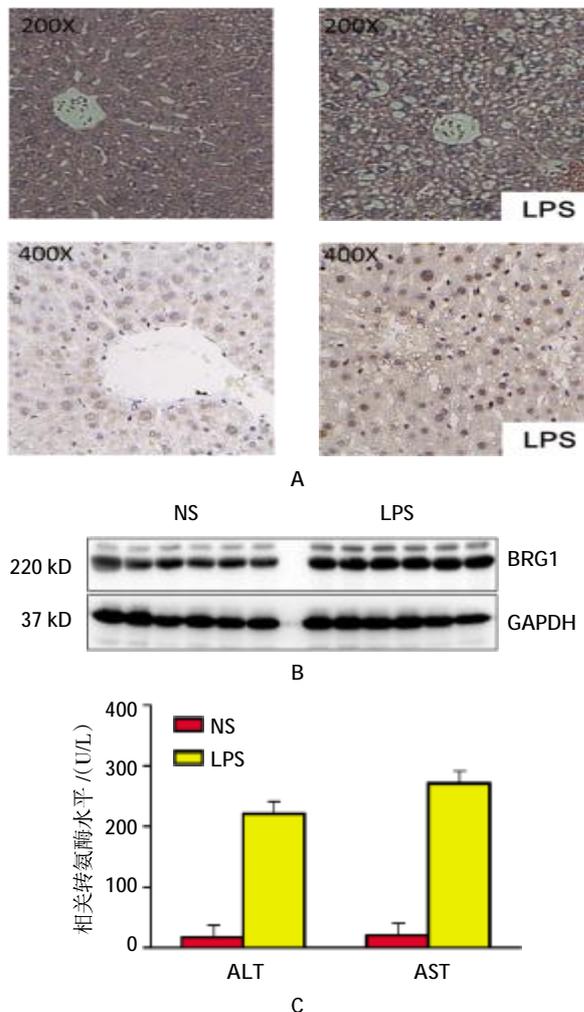
1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 对小鼠肝炎模型中 *BRG1* 表达的影响

将 LPS 处理后及对照组的小鼠肝脏行 HE 染色及免疫组织化学染色, 结果提示腹腔注射 LPS(2.5 mg/kg)可以显著诱导小鼠肝炎发生, 表现为肝细胞坏死, 肝细胞核浓聚, 肝小叶组织结构破坏, 同时伴随 ALT 及 AST 的水平明显升高; 同时观察到 LPS 处理后肝细胞中的 *BRG1* 表达上升, *BRG1* 在细胞核中浓聚。同时将肝组织裂解, Western blot 实验同



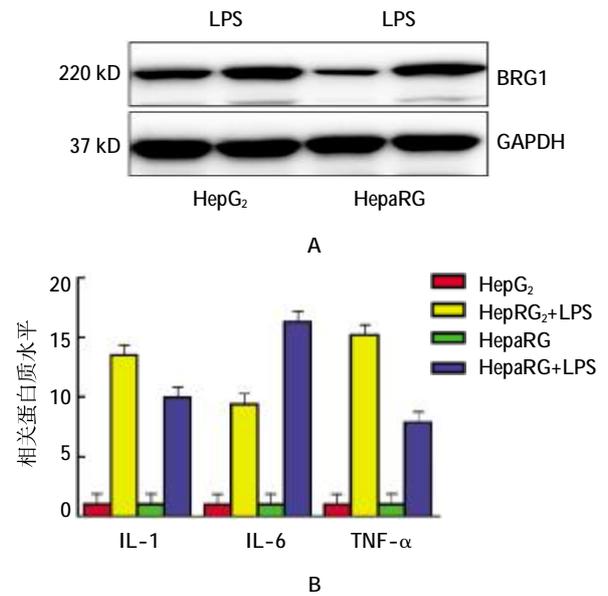
A: 免疫组织化学下脂多糖处理后肝组织细胞的 HE 染色及 *BRG1* 染色表现; B: 蛋白免疫印迹法下 *BRG1* 的表达; C: 经过 LPS 处理(2.5 mg/kg)后小鼠肝脏 ALT、AST 值与处理前比较

图 1 LPS 对小鼠肝炎模型中 *BRG1* 表达的影响

样提示肝细胞中的 *BRG1* 的表达升高(见图 1)。

2.2 LPS 对体外培养肝细胞中的 *BRG1* 表达及促炎因子释放的影响

将 LPS(100 ng/ml)处理后的 HepG₂ 及 HepaRG 细胞及细胞培养基上清分别行 Western blot 实验和 ELISA 实验检测, 结果提示 LPS 可显著促进细胞中 *BRG1* 的表达, 并且升高细胞培养基上清中的 IL-1、IL-6 及 TNF- α 含量。IL-1: HepG₂+LPS vs HepG₂, (13.541 ± 0.140)vs (1.000 ± 0.021), $P < 0.05$; HepaRG+LPS vs HepaRG, (10.010 ± 0.242)vs (1.000 ± 0.112), $P < 0.05$ 。IL-6: HepG₂+LPS vs HepG₂, (9.431 ± 0.262)vs (1.000 ± 0.051), $P < 0.05$; HepaRG+LPS vs HepaRG, (16.321 ± 0.502)vs (1.000 ± 0.050), $P < 0.05$ 。TNF- α : HepG₂+LPS vs HepG₂, (15.231 ± 0.153)vs (1.000 ± 0.071), $P < 0.05$; HepaRG+LPS vs HepaRG, (7.923 ± 0.114)vs (1.000 ± 0.020), $P < 0.05$ (见图 2 和表 1)。



A: 蛋白免疫印迹法下经过 LPS 处理后 *BRG1* 的表达; B: ELISA 检测下促炎因子释放水平比较

图 2 LPS 对体外培养肝细胞中的 *BRG1* 表达及促炎因子释放的影响

表 1 LPS 对体外培养肝细胞中的 *BRG1* 表达及促炎因子释放的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HepG ₂	HepG ₂ +LPS	HepaRG	HepaRG+LPS
IL-1	1.000 ± 0.021	13.541 ± 0.140	1.000 ± 0.112	10.010 ± 0.242
IL-6	1.000 ± 0.051	9.431 ± 0.262	1.000 ± 0.050	16.321 ± 0.502
TNF- α	1.000 ± 0.071	15.231 ± 0.153	1.000 ± 0.020	7.923 ± 0.114

2.3 BRG1 过表达对促炎因子释放的影响

将转染 *BRG1* 过表达质粒后的 HepG₂ 及 HepaRG 的细胞培养基上清行 ELISA 实验检测,结果提示 *BRG1* 过表达可显著促进促炎因子 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的释放。IL-1:HepG₂+*BRG1* vs HepG₂, (6.881 \pm 0.154)vs (1.000 \pm 0.022), $P < 0.05$; HepaRG+*BRG1* vs HepaRG, (6.313 \pm 0.211)vs(1.000 \pm 0.031), $P < 0.05$ 。IL-6:HepG₂+*BRG1* vs HepG₂, (6.010 \pm 0.263)vs(1.000 \pm 0.020), $P < 0.05$; HepaRG+*BRG1* vs HepaRG, (12.161 \pm 0.493)vs (1.000 \pm 0.010), $P < 0.05$ 。TNF- α :HepG₂+*BRG1* vs HepG₂, (9.134 \pm 0.122)vs(1.000 \pm 0.024), $P < 0.05$; HepaRG+*BRG1* vs HepaRG, (7.783 \pm 0.111)vs (1.002 \pm 0.014), $P < 0.05$ (见图 3 和表 2)。

2.4 BRG1 沉默对促炎因子释放的影响

将转染 *BRG1* 特异性 siRNA 后的 HepG₂ 及 HepaRG 的细胞培养基上清行 ELISA 实验检测,结果提示 *BRG1* 沉默后可显著抑制促炎因子 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的释放。IL-1:HepG₂+*siBRG1* vs HepG₂, (0.161 \pm 0.030)vs (1.000 \pm 0.020), $P < 0.05$; HepaRG+*siBRG1* vs HepaRG, (0.163 \pm 0.014)vs (1.000 \pm 0.102), $P < 0.05$ 。IL-6:HepG₂+*siBRG1* vs HepG₂, (0.200 \pm 0.011)vs (1.000 \pm 0.051), $P < 0.05$; HepaRG+*siBRG1* vs HepaRG, (0.084 \pm 0.051)vs (1.002 \pm 0.050), $P < 0.05$; TNF- α :HepG₂+*siBRG1* vs HepG₂, (0.113 \pm 0.024)vs (1.000 \pm 0.071), $P < 0.05$; HepaRG+*siBRG1* vs HepaRG, (0.153 \pm 0.033)vs (1.001 \pm 0.020), $P < 0.05$ (见图 4 和表 3)。

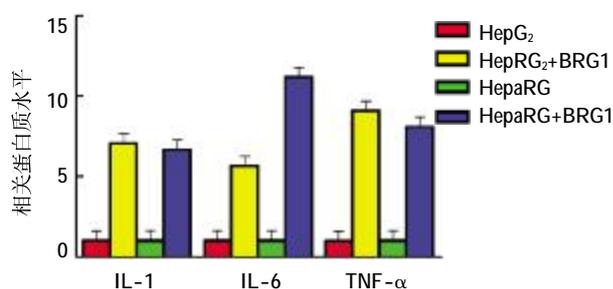


图 3 BRG1 过表达对促炎因子释放的影响

表 2 BRG1 过表达对促炎因子释放的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HepG ₂	HepG ₂ + <i>BRG1</i>	HepaRG	HepaRG+ <i>BRG1</i>
IL-1	1.000 \pm 0.022	6.881 \pm 0.154	1.000 \pm 0.031	6.313 \pm 0.211
IL-6	1.000 \pm 0.020	6.010 \pm 0.263	1.000 \pm 0.010	12.161 \pm 0.493
TNF- α	1.000 \pm 0.024	9.134 \pm 0.122	1.002 \pm 0.014	7.783 \pm 0.111

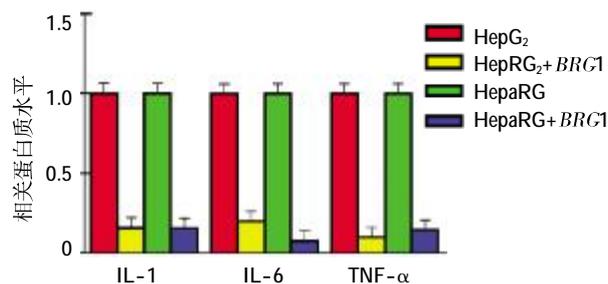


图 4 BRG1 沉默对促炎因子释放的影响

表 3 BRG1 沉默对促炎因子释放的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HepG ₂	HepG ₂ + <i>siBRG1</i>	HepaRG	HepaRG+ <i>siBRG1</i>
IL-1	1.000 \pm 0.020	0.160 \pm 0.030	1.000 \pm 0.102	0.163 \pm 0.014
IL-6	1.000 \pm 0.051	0.200 \pm 0.011	1.002 \pm 0.050	0.084 \pm 0.051
TNF- α	1.000 \pm 0.071	0.113 \pm 0.024	1.001 \pm 0.020	0.153 \pm 0.033

3 讨论

目前研究表明,炎症激活时,如在 LPS 刺激下,核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF κ B)中的 p65 亚基可磷酸化进入细胞核,结合于炎症因子的启动子区域。而且 *BRG1* 自身也可与 NF κ B 中的 p65 亚基相结合,那么是否 *BRG1* 也是通过类似的募集过程,参与炎症反应的动力学过程调控^[5-6]。本研究提示 LPS 刺激下 *BRG1* 的表达水平在体内肝脏组织中及体外肝细胞中都有明显的升高,尤其在体内实验中发现,在 LPS 激活炎症的过程中,*BRG1* 在细胞核中发生浓聚效应,有可能通过募集于促炎因子的核小体附近,重塑其染色质结构,增加细胞中 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的释放。

BRG1 是 SWI/SNF 复合体中的关键催化亚基,它通过对 ATP 水解为整个复合体供能使染色体结构发生改变,进而导致基因序列上启动子结合位点暴露、易化转移因子等转录调控蛋白的结合,从而参与调控目的基因的表达^[7]。SWI/SNF 催化亚基的降解,抑制其活性染色质重塑。现已有文献报导,*BRG1* 在心肌发育、神经系统发育过程中有十分重要的作用,相关数据提示,抑制 *BRG1* 的表达将导致心肌发育以及中枢神经系发育障碍^[8-10]。本研究发现,抑制细胞中 *BRG1* 的表达,能够显著下调促炎因子的分泌,而过表达 *BRG1* 相反可以促进 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的分泌,这提示 *BRG1* 在 LPS 诱导的急性炎症过程中可能扮演着重要的角色。

综上所述,本研究发现,LPS 诱导的小鼠急性肝炎中,*BRG1* 的蛋白表达水平显著上升,并在细胞核

中浓聚。而 LPS 作用于体外培养的肝细胞,也可明显促进细胞中 *BRG1* 的表达。同时肝脏细胞中过表达 *BRG1*,可促进促炎因子 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的释放。相对应的,*BRG1* 沉默后可显著抑制肝细胞促炎因子 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的释放。这提示 *BRG1* 在 LPS 诱导的急性炎症过程中可能扮演着重要的角色,干预其表达有望作为治疗急性炎症的潜在药物靶点。

参 考 文 献:

- [1] AGALIOTI T, LOMVARDAS S, PAREKH B, et al. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter[J]. *Cell*, 2000, 103(4): 667-678.
- [2] CHEN D, FANG F, YANG Y, et al. Brahma-related gene 1 (Brg1) epigenetically regulates CAM activation during hypoxic pulmonary hypertension[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 100(3): 363-373.
- [3] FANG F, CHEN D, YU L, et al. Proinflammatory stimuli engage Brahma related gene 1 and Brahma in endothelial injury[J]. *Circ Res*, 2013, 113(8): 986-996.
- [4] CHAIYACHATI B H, JANI A, WAN Y, et al. BRG1-mediated immune tolerance: facilitation of Treg activation and partial independence of chromatin remodelling[J]. *EMBO J*, 2013, 32 (3): 395-408.
- [5] KAWAHARA T L, MICHISHITA E, ADLER A S, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappa B-dependent gene expression and organismal life span[J]. *Cell*, 2009, 136(1): 62-74.
- [6] NATOLI G, CHIOCCA S. Nuclear ubiquitin ligases, NF-kappa B degradation, and the control of inflammation[J]. *Sci Signal*, 2008, 1(1): 1.
- [7] WILSON B G, ROBERTS C W M. SWI/SNF nucleosome remodelers and cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11(7): 481-492.
- [8] HANG C T, YANG J, HAN P, et al. Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease[J]. *Nature*, 2010, 466(7302): 62-67.
- [9] WEIDER M, KÜSPERT M, BISCHOF M, et al. Chromatin-remodeling factor Brg1 is required for schwann cell differentiation and myelination[J]. *Developmental Cell*, 2012, 23(1): 193-201.
- [10] LIMPET A S, BAI S, NARAYAN M, et al. NF-B forms a complex with the chromatin remodeler BRG1 to regulate schwann cell differentiation[J]. *Journal of Neuroscience*, 2013, 33(6): 2388-2397.

(张蕾 编辑)