

枸杞多糖对Hcy诱导的小鼠肝细胞损伤的保护作用及其机制

王佩佩¹, 岳云², 曹丽翠¹, 李宏伟³, 刘丽¹, 李航鹰⁴, 王晓丽^{1*}¹银川市第一人民医院中医科, 宁夏银川 750004; ²中卫市中医院针灸科, 宁夏中卫 755000; ³宁夏回族自治区人民医院中医科, 宁夏银川 750004; ⁴宁夏医科大学药学院, 宁夏银川 750004

[中图分类号] R36 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0903.2024.0131

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 王佩佩, 岳云, 曹丽翠, 等. 枸杞多糖对Hcy诱导的小鼠肝细胞损伤的保护作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(5): 542-549.

[收稿日期] 2023-06-28 [录用日期] 2023-10-08 [上线日期] 2024-01-31

[摘要] 目的 探讨枸杞多糖(LBP)对同型半胱氨酸(Hcy)诱导的小鼠肝细胞损伤的作用及其机制。方法 体外培养正常 C3H/An 小鼠肝细胞(NCTC 1469), 采用不同浓度的 Hcy(0、50、100、200、500 μmol/L)处理 NCTC 1469 细胞, 使用 MTT 法检测不同浓度 Hcy 对细胞活性的影响。取对数生长期细胞, 设置: (1)对照组(采用 10% 马血清的 DMEM 培养基培养)与 Hcy 组(采用 100 μmol/L Hcy 溶液处理 48 h), 收集细胞。采用细胞活力染色检测细胞凋亡情况, 谷草转氨酶(AST)/谷丙转氨酶(ALT)活性检测试剂盒检测 AST、ALT 活性, RT-qPCR 检测 YAP1(Yes 相关蛋白 1)、DNMT1、DNMT3a、DNMT3b mRNA 的表达, Western blotting 检测 YAP1 蛋白的表达, 巢式甲基化特异性 PCR(nMS-PCR)检测 YAP1 启动子区 DNA 甲基化率。(2)对照组、LBP 组、Hcy 组与 Hcy+LBP 组, LBP 组采用 4 mg/ml LBP 溶液处理 2 h, Hcy 组、Hcy+LBP 采用 100 μmol/L Hcy 溶液处理 48 h, 46 h 时 Hcy+LBP 组加入 4 mg/ml LBP 溶液处理, 收集细胞。采用 RT-qPCR 检测 YAP1、DNMT1、DNMT3a、DNMT3b mRNA 的表达, Western blotting 检测 YAP1、Bax、Bcl-2 蛋白的表达, AST/ALT 活性检测试剂盒检测 AST、ALT 活性。采用生物信息学方法预测 YAP1 启动子区 DNA 甲基化 CpG 岛。结果 根据 MTT 法检测结果, 选择 100 μmol/L Hcy 处理 NCTC 1469 细胞进行后续实验。与对照组比较, Hcy 组细胞凋亡率增高($P<0.01$), ALT、AST 活性增高($P<0.001$), YAP1 mRNA 和蛋白相对表达水平降低($P<0.001$), YAP1 启动子区域甲基化率增高($P<0.01$), DNA 甲基化酶 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b mRNA 相对表达水平增高($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。与 Hcy 组比较, Hcy+LBP 组 DNA 甲基化酶 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b mRNA 相对表达水平降低($P<0.001$), YAP1 mRNA 和蛋白相对表达水平明显增高($P<0.01$ 或 $P<0.001$), Bcl-2 蛋白相对表达水平明显升高($P<0.001$), Bax 蛋白相对表达水平明显降低($P<0.001$), ALT、AST 活性降低($P<0.001$)。结论 YAP1 表达降低可能是 Hcy 诱导的小鼠 NCTC 1469 细胞损伤的关键过程, YAP1 启动子区域甲基化的改变可能是 Hcy 引起 YAP1 表达变化的分子机制。LBP 可能通过正向调节 YAP1 的表达改善 Hcy 引起的小鼠 NCTC 1469 细胞损伤。

[关键词] 枸杞多糖; 同型半胱氨酸; 肝细胞损伤; DNA 甲基化**Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on Hcy-induced mouse hepatocyte injury and its mechanism**Wang Pei-Pei¹, Yue Yun², Cao Li-Cui¹, Li Hong-Wei³, Liu Li¹, Li Hang-Ying⁴, Wang Xiao-Li^{1*}¹Department of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan First People's Hospital, Yinchuan, Ningxia 750004, China²Acupuncture Department of Zhongwei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongwei, Ningxia 755000, China³Department of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Hui Autonomous Region People's Hospital, Yinchuan, Ningxia 750004, China⁴College of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

*Corresponding author, E-mail: wxl842@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22267017)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of lycium barbarum polysaccharide (LBP) on hepatocyte**[基金项目]** 国家自然科学基金(222607017)**[作者简介]** 王佩佩, 硕士研究生, 主要从事中医药防治脑病、肝病的基础与临床研究**[通信作者]** 王晓丽, E-mail: wxl842@163.com

injury induced by homocysteine (Hcy). **Methods** Normal C3H/An mouse hepatocytes (NCTC 1469) were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of Hcy (0, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{mol/L}$). The optimal concentrations of Hcy-treated NCTC 1469 cells were detected by MTT assay. When the cells reached the logarithmic growth stage, the conditions were set up as follows: (1) control group (cultured with DMEM medium supplemented with 10% horse serum) and Hcy group (treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy solution for 48 h), and the cells were collected. Cell viability staining was used to detect apoptosis, aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT) activity detection kit was used to detect AST and ALT activities, RT-qPCR was used to detect the expression levels of *YAP1*, *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b* mRNA, and Western blotting was used to detect the expression of YAP1 protein, nested methylation specific PCR (nMS-PCR) was used to detect DNA methylation rates in the YAP1 promoter region. (2) Control group, LBP group, Hcy group and Hcy+LBP group. LBP group was treated with 4 mg/ml LBP solution for 2 h, Hcy group and Hcy+LBP group were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy solution for 48 h, and Hcy+LBP group was treated with 4 mg/ml LBP solution at 46 h, and the cells were collected. The expression levels of *YAP1*, *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b* mRNA were detected by RT-qPCR; the expression of YAP1, Bax and Bcl-2 proteins was detected by Western blotting; AST/ALT activity detection kit was used to detect AST and ALT activities. Prediction of DNA methylation CpG islands in YAP1 promoter region by bioinformatics. **Results** NCTC 1469 cells were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy according to the results of MTT assay. Compared with control group, the apoptosis rate of Hcy group increased ($P<0.01$), the activities of ALT and AST increased ($P<0.001$), the mRNA and protein expression levels of *YAP1* decreased ($P<0.001$), and the methylation rate of YAP1 promoter region increased ($P<0.01$), the mRNA expression levels of *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b* increased ($P<0.01$ or $P<0.001$). Compared with Hcy group, the mRNA expression levels of *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b* in the Hcy+LBP group decreased ($P<0.001$), the mRNA and protein expression levels of *YAP1* significantly increased ($P<0.01$ or $P<0.001$). In addition, in the Hcy+LBP group, cells showed significantly elevated of Bcl-2 protein ($P<0.001$), but decreased Bax protein ($P<0.001$), and decreased activities of ALT and AST ($P<0.001$). **Conclusions** The decrease of YAP1 expression may be the key process of Hcy induced injury of NCTC 1469 cells, and the methylation of the YAP1 promoter region may be the molecular mechanism of Hcy induced YAP1 expression change. LBP may improve NCTC 1469 cell damage induced by Hcy by positively regulating YAP1 expression.

[Key words] lycium barbarum polysaccharide; homocysteine; liver cell damage; DNA methylation

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种非必需的含巯基的氨基酸, 来源于甲硫氨酸代谢, 其代谢过程与甲基化修饰有关^[1]。肝是Hcy代谢的主要器官。近年来, 越来越多的研究表明Hcy与肝相关疾病有关, 但其主要分子机制尚不明确^[2]。肝作为机体最大的实质性器官, 几乎所有的物质代谢都与其相关。有研究表明, Hcy含量异常增加可导致肝细胞损伤^[3], 因此探究引起肝相关疾病的分子机制和干预措施非常必要。枸杞多糖(lycium barbarum polysaccharides, LBP)是枸杞中一种天然成分, 研究发现其可治疗肝损伤相关疾病^[4]。

Yes相关蛋白1(Yes-associated protein, YAP1)是Hippo信号通路上关键的一种转录共激活因子, 其通过促进下游靶基因的表达来发挥促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用。已有研究发现, YAP1在心血管相关疾病、膀胱癌、肿瘤中均能够抑制细胞凋亡, 但其对肝细胞损伤的调控机制尚不清楚^[5-7]。DNA甲基化(DNA methylation)是表观遗传学最为常见的调控方式, 广泛参与机体多种生理病理变化; YAP1启动子区存在发生甲基化的架构基础, 这为研究YAP1 DNA甲基化调控提供了理论支撑。本研究旨在探究Hcy含量异常增加引起肝细胞损伤的分子机制, 探索LBP对Hcy引起的肝细胞损伤的调控作用及其机制, 以期对肝损伤相关疾病的治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 C3H/An小鼠肝细胞NCTC 1469(上海拜力生物有限公司); DNA甲基化修饰试剂盒(美国ZYMO公司); 全RNA提取试剂盒(北京天根生化技术有限公司); MTT细胞活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); 琼脂糖粉(中国赛维儿公司); 1640培养基、胎牛血清(美国Gibco公司); 反转录试剂盒、荧光PCR试剂盒(日本TaKaRa公司); 细胞活力染色试剂盒(中国罗氏生物科技有限公司); BCA试剂盒(中国凯基生物科技发展有限公司); 青链霉素、胰蛋白酶消化液、NP-40(中国碧云天生物技术有限公司); 苯甲基磺酰氟(PMSF)蛋白酶抑制剂(北京索莱宝科技有限公司); YAP1抗体、Bax抗体、Bcl-2抗体(英国Abcam公司); ACTB(美国SANTA公司); 辣根过氧化物酶标记的兔抗(北京金桥有限公司); 脱脂奶粉(美国BD公司); Lipo2000(美国Thermo Fisher公司); 引物均由上海生物工程公司合成。谷草转氨酶(AST)/谷丙转氨酶(ALT)活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); 超净工作台(苏州安泰生物技术有限公司); 5415D型微量台式离心机、CO₂培养箱(德国Eppendorf公司); 超微量分光光度计(美国SimpliNano公司); 电泳槽、垂直电泳仪、转膜仪、曝光仪(美国Bio-Rad公司); BS110S型

精密天平(德国 Sar-torius 公司); 水平摇床(美国 Thermo Fisher 公司); 梯度 RCR 仪(德国 Biometra Tone 公司); 荧光定量 PCR 仪(上海枫岭生物技术有限公司); 激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 用含 10% 马血清的 DMEM 培养基培养正常 C3H/An 小鼠肝细胞 NCTC 1469, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 待细胞长至 80% 左右时, 收集对数生长期细胞, 设置: (1) 对照组(采用 10% 马血清的 DMEM 培养基培养)与 Hcy 组(采用 100 μmol/L Hcy 溶液处理 48 h), 收集细胞。采用细胞活力染色检测细胞凋亡情况, AST/ALT 活性检测试剂盒检测 AST、ALT 活性, 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 检测 *YAP1*、*DNMT1*、*DNMT3a*、*DNMT3b* mRNA 的表达, Western blotting 检测 YAP1 蛋白的表达, 巢式甲基化特异性 PCR(nested methylation specific PCR, nMS-PCR)检测 YAP1 启动子区 DNA 甲基化水平。(2) 对照组、LBP 组、Hcy 组与 Hcy+LBP 组, LBP 组采用 4 mg/ml LBP 溶液处理 2 h, Hcy 组、Hcy+LBP 组采用 100 μmol/L Hcy 溶液处理 48 h, 46 h 时 Hcy+LBP 组加入 4 mg/ml LBP 溶液处理, 收集细胞。采用 RT-qPCR 检测 *YAP1*、*DNMT1*、*DNMT3a*、*DNMT3b* mRNA 的表达, Western blotting 检测 YAP1、Bax、Bcl-2 蛋白的表达, AST/ALT 活性检测试剂盒检测 AST、ALT 活性。

1.2.2 MTT 检测细胞活性 为了明确 Hcy 干预 NCTC 1469 细胞的最合适浓度, 采用 MTT 检测试剂盒检测不同浓度 Hcy(0、50、100、200、500 μmol/L) 对 NCTC 1469 细胞活性的影响。步骤如下: 收集对数生长期细胞, 调整细胞悬液浓度, 接种至 96 孔板(180 μl/孔, 3000~10 000 个细胞)。置 37 °C、5% CO₂ 温箱培养中, 待细胞贴壁; 继续培养 6~24 h 后加入对应浓度的 Hcy 溶液; 吸去上清, 加入 90 μl 新鲜培养液, 再加入 10 μl MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 110 μl Formazan 溶解液, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。采用酶联免疫检测仪检测 490 nm 处各孔的吸光度(OD)值。

1.2.3 细胞活力染色检测细胞凋亡情况 弃去培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 在 15 ml 离心管中加入 5 ml PBS, 将 5 μl Nuclei Dye、25 μl Dead Dye、3 μl Viable Dye 混合后, 在每个培养皿中依次加入 200 μl 混合染料, 于 37 °C 孵育 30 min 后取出, 再用 PBS 清洗 3 次, 加入抗荧光猝灭剂, 激光共聚焦显微镜观察细胞凋亡情况。

1.2.4 RT-qPCR 检测 *YAP1*、*DNMT1*、*DNMT3a*、*DNMT3b* mRNA 的表达 按 RNA 提取试剂盒说明书提取 NCTC 1469 细胞中总 RNA, 反转录合成 cDNA。

采用 Primerbank 软件设计引物, 引物序列: *YAP1* 上游 5'-TAGCCCTGCGTAGCCAGTTA-3', 下游 5'-TCA TGCTTAGTCCACTGTCTGT-3'; *DNMT1* 上游 5'-CC GTGGCTACGAGGAGAAC-3', 下游 5'-TTGGGTTTC CGTTTAGTGGGG-3'; *DNMT3a* 上游 5'-CAAGACAC AATTCGGCCTGG-3', 下游 5'-TCATGCTTAGTCCAC TGTCTGT-3'; *DNMT3b* 上游 5'-CGTTAATGGGAAC TTCAGTGACC-3', 下游 5'-CTGCGTGTAATTCAGA AGGCT-3'。qPCR 反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 62.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延长 30 s, 40 个循环。反应结束后, 根据扩增曲线数据按照公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct$ 目的 - Ct 内参照, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - 10$) 计算 *YAP1* mRNA 相对表达量。

1.2.5 Western blotting 检测 YAP1、Bax、Bcl-2 蛋白的表达 细胞裂解法提取细胞总蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量后分装, -80 °C 冻存备用。经 SDS-PAGE 浓缩胶 80 V、分离胶 120 V 电泳分离, 电转 2 h 至 PVDF 膜上, 经 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别进行 YAP1(1: 1000)、Bax(1: 1000) 和 Bcl-2(1: 1500) 抗体 4 °C 孵育过夜; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1: 5000)室温孵育 2 h, PBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 曝光。用凝胶成像分析仪成像。结果以目的条带与内参条带的灰度值比值做半定量检测。

1.2.6 AST、ALT 活性检测 按照 AST/ALT 活性检测试剂盒说明书检测各组细胞中 ALT、AST 活性。

1.2.7 nMS-PCR 检测 YAP1 启动子区 DNA 甲基化水平 按 DNA 提取试剂盒说明书提取 NCTC 1469 细胞的全基因组 DNA, 亚硫酸盐修饰法对全基因组 DNA 进行甲基化修饰。针对 YAP1 启动子区, 设计 1 对外引物及 2 对内引物(表 1)。外引物扩增反应条件为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s、49.15 °C 30 s、72 °C 30 s, 每个循环中 49.15 °C 30 s 步骤降 0.5 °C 至 39.15 °C, 72 °C 7 min, 共 20 个循环。以外引物的 PCR 产物为模板, 进行内引物的扩增, 反应条件为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s、46.5/51.6 °C 30 s、72 °C 30 s, 20 个循环, 每个循环中 46.5/51.6 °C 30 s 降 0.5 °C 至 36.5/41.6 °C, 72 °C 7 min。取 5 μl PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像分析仪分析甲基化条带及非甲基化条带的吸光度(M/U)值, 并计算甲基化率。甲基化率(%)=甲基化 M 值/(甲基化 M 值+非甲基化 U 值)×100%。

1.2.8 YAP1 启动子区域甲基化的生物信息学分析 利用生物信息学软件 MethPrimer(<http://www.urogene.org/methprimer/>), 选取基因上游 2500 bp 作为研究对象分析目的基因 YAP1 的 CpG 岛。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 进一步两两比

表1 甲基化的引物序列

Tab.1 Methylation of the primer sequences

基因	引物序列(5'-3')
YAP1-外引物	正向: TGTTGAAAATAATGGATTTTATTAATATT 反向: CCCTTAACTACAAAAATCTCTCC
YAP1-甲基化	正向: AGTTCGTATAGGCGTTTCGTTCC 反向: CTTAACTACAAAAATCTCTCCGCT
YAP1-非甲基化	正向: AAGTTTGTATAGGTGTTTGTGTTGG 反向: CTTAACTACAAAAATCTTCCACT

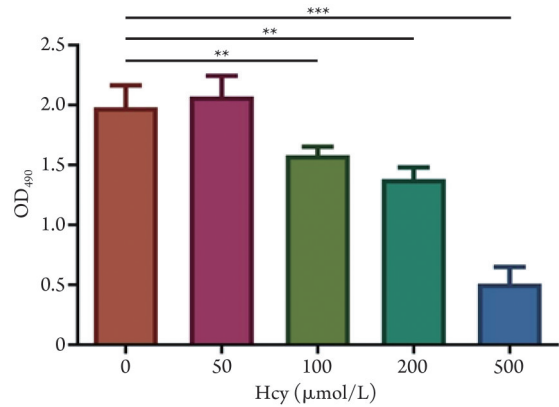
YAP1. Yes相关蛋白1

较采用Student-Newman-Keuls 检验; 两因素间的相关性采用 Pearson 相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hcy对NCTC 1469细胞活性的影响 MTT法检测结果显示, 与对照组(0 μmol/L)比较, 100、200和500 μmol/L Hcy处理的NCTC 1469细胞活性明显降低, 差异有统计学意义(P<0.01 或 P<0.001), 50 μmol/L Hcy处理的NCTC 1469细胞活性差异无统

计学意义(P>0.05, 图1)。据此后续实验采用100 μmol/L Hcy处理NCTC 1469细胞。

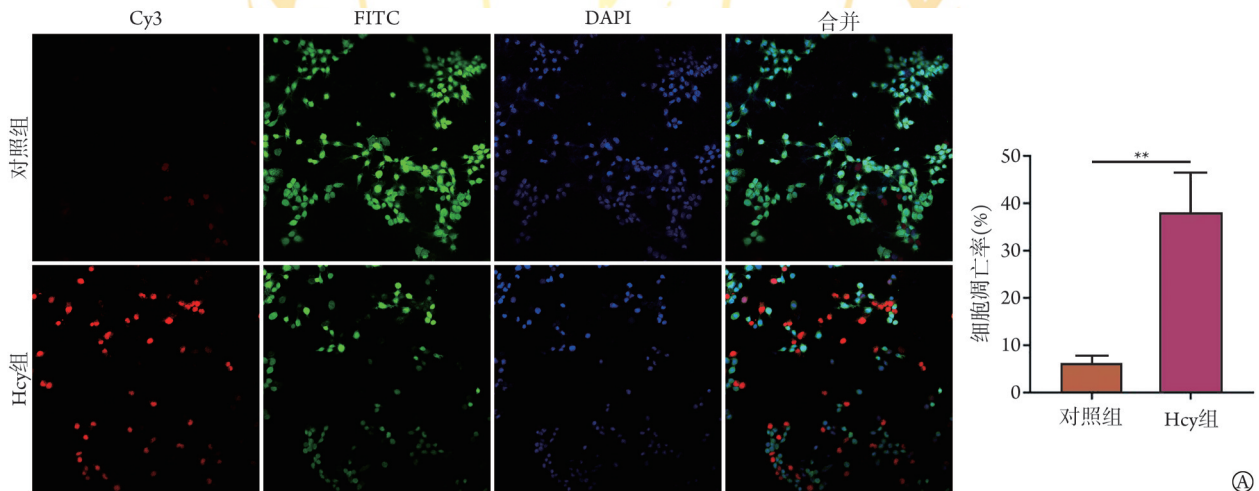


Hcy. 同型半胱氨酸; **P<0.01, ***P<0.001

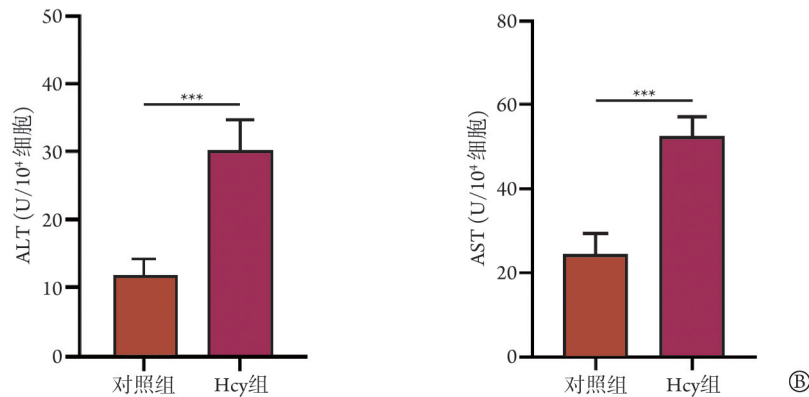
图1 Hcy处理对小鼠NCTC 1469细胞活性的影响

Fig.1 Effect of Hcy on activity of mouse NCTC 1469 cells

2.2 Hcy对NCTC 1469细胞凋亡的影响 细胞活力染色检测结果显示, 与对照组比较, Hcy组细胞凋亡率升高, 差异有统计学意义(P<0.01, 图2A)。与对照组比较, Hcy组NCTC 1469细胞中ALT、AST活



Ⓐ



Ⓑ

Hcy. 同型半胱氨酸; ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; A. 细胞活力染色实验检测细胞凋亡情况(n=3, ×40); 红色为Cy3染死细胞, 绿色为FITC染活细胞, 蓝色为DAPI染细胞核; B. ALT、AST活性; **P<0.01, ***P<0.001

图2 Hcy对小鼠NCTC 1469细胞凋亡的影响

Fig.2 Effects of Hcy on apoptosis of mouse NCTC 1469 cells

性明显升高, 差异有统计学意义($P<0.001$, 图2B)。

2.3 Hcy对NCTC 1469细胞中YAP1表达的影响

RT-qPCR和Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, Hcy组NCTC 1469细胞中YAP1 mRNA和蛋白相对表达水平均明显降低, 差异有统计学意义($P<0.001$, 图3)。

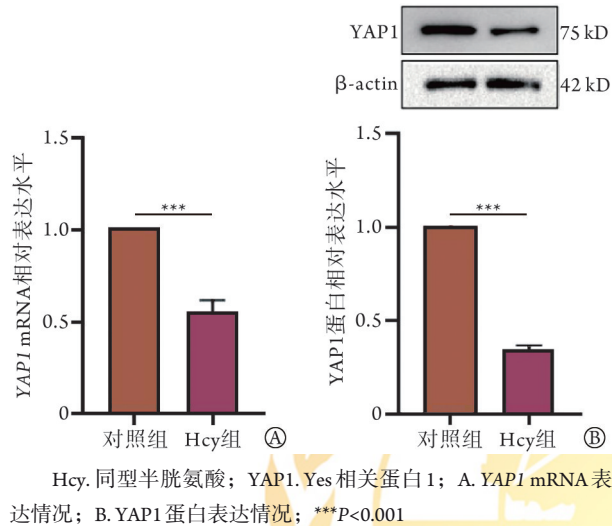


Fig. 3 RT-qPCR and Western blotting 检测 YAP1 在小鼠 NCTC 1469 细胞中的表达($n=3$)

Fig. 3 Expression of YAP1 in mouse NCTC 1469 cells detected by RT-qPCR and Western blotting ($n=3$)

2.4 YAP1启动子区域甲基化的生物信息学分析 利用生物信息学软件MethPrimer分析YAP1启动子区CpG岛, 选取YAP1基因上游2500 bp作为研究对象, 结果显示, YAP1启动子区1431—2000 bp有1个CpG岛, 提示YAP1基因可能受甲基化的调控(图4)。

2.5 Hcy对YAP1启动子区域甲基化水平的影响

RT-qPCR检测结果显示, 与对照组比较, Hcy组DNA甲基转移酶DNMT1、DNMT3a及DNMT3b mRNA相对表达水平升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$, 图5A)。nMS-PCR检测结果显示, 与对照组比较, Hcy组YAP1启动子区DNA甲基化率明显升高($P<0.01$, 图5B)。

2.6 LBP对NCTC 1469细胞中DNA甲基转移酶及YAP1表达的影响

RT-qPCR检测结果显示, 与对照组比较, LBP组NCTC 1469细胞中DNA甲基转移酶DNMT1、DNMT3a、DNMT3b mRNA相对表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), Hcy组DNA甲基转移酶DNMT1、DNMT3a、DNMT3b mRNA相对表达水平升高($P<0.001$); 与Hcy组比较, Hcy+LBP组DNA甲基转移酶DNMT1、DNMT3a、DNMT3b mRNA相对表达水平降低($P<0.001$, 图6A)。

RT-qPCR和Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, LBP组NCTC 1469细胞中YAP1 mRNA和蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$), Hcy组NCTC 1469细胞中YAP1 mRNA和蛋白相对表达水平降低($P<0.001$); 与Hcy组比较, Hcy+LBP组NCTC 1469细胞中YAP1 mRNA和蛋白相对表达水平升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$, 图6B、C)。

2.7 LBP对NCTC 1469细胞损伤的影响

Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, LBP组NCTC 1469细胞中Bcl-2、Bax蛋白相对表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), Hcy组NCTC 1469细胞中Bcl-2蛋白相对表达水平明显降低, Bax蛋白相对表达水平明显升高($P<0.001$); 与Hcy组比较, Hcy+LBP组NCTC 1469细胞中Bcl-2蛋白相对表达水平明显升

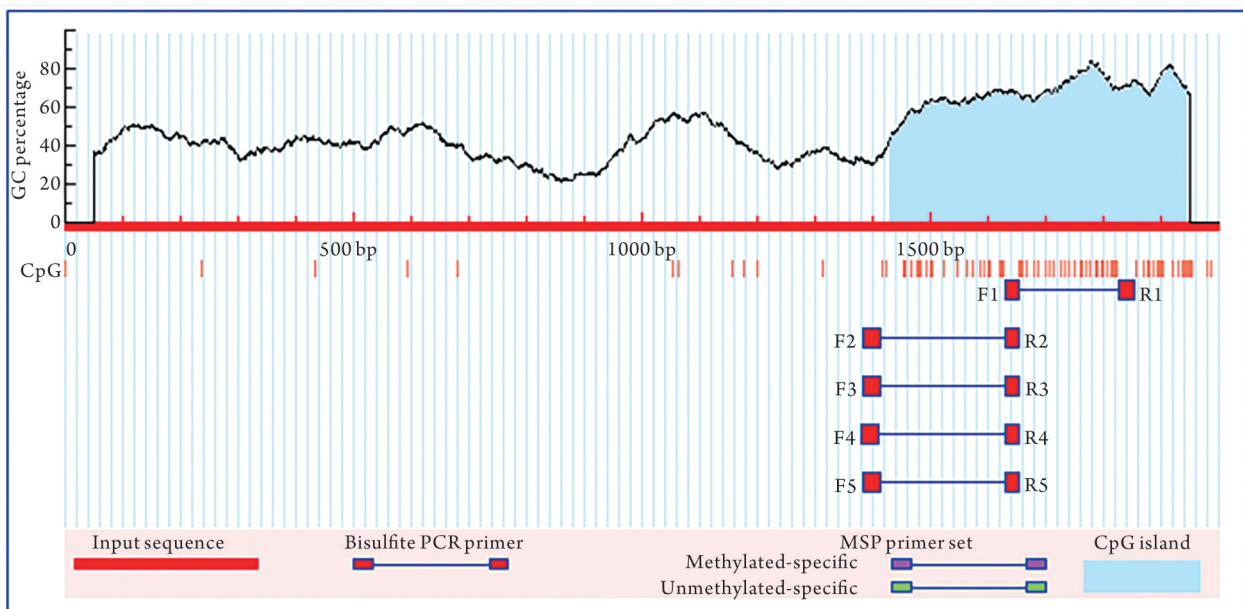
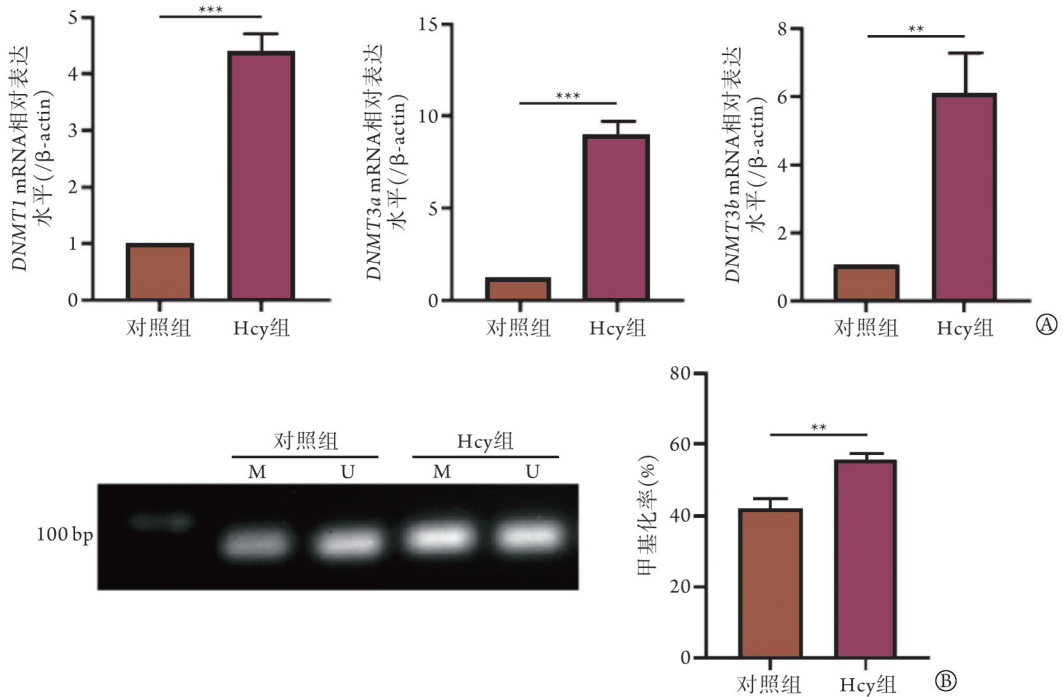


图4 YAP1(Yes相关蛋白1)启动子区的生物信息学分析

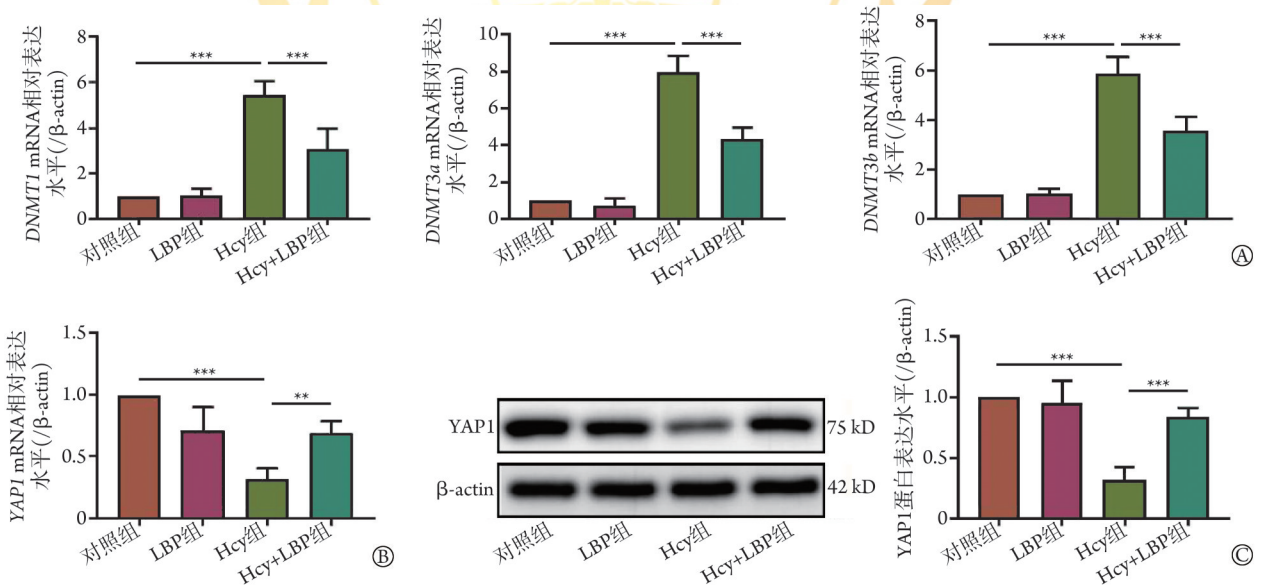
Fig. 4 Bioinformatics analysis of YAP1 promoter region



Hcy. 同型半胱氨酸; A. Hcy对甲基转移酶DNMT1、DNMT3a及DNMT3b mRNA表达的影响; B. Hcy对YAP1启动子区域甲基化的影响; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图5 Hcy对YAP1启动子区域甲基化水平的影响

Fig.5 Effect of Hcy on methylation of YAP1 promoter region



Hcy. 同型半胱氨酸; LBP. 枸杞多糖; A. RT-qPCR检测DNA甲基转移酶DNMT1、DNMT3a、DNMT3b mRNA的表达; B. RT-qPCR检测YAP1 mRNA的表达; C. Western blotting检测YAP1蛋白的表达; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图6 LBP对小鼠NCTC 1469细胞中DNA甲基转移酶及YAP1表达的影响($n=3$)

Fig.6 Effects of LBP on the expression of DNA methyltransferase and YAP1 in mouse NCTC 1469 cells ($n=3$)

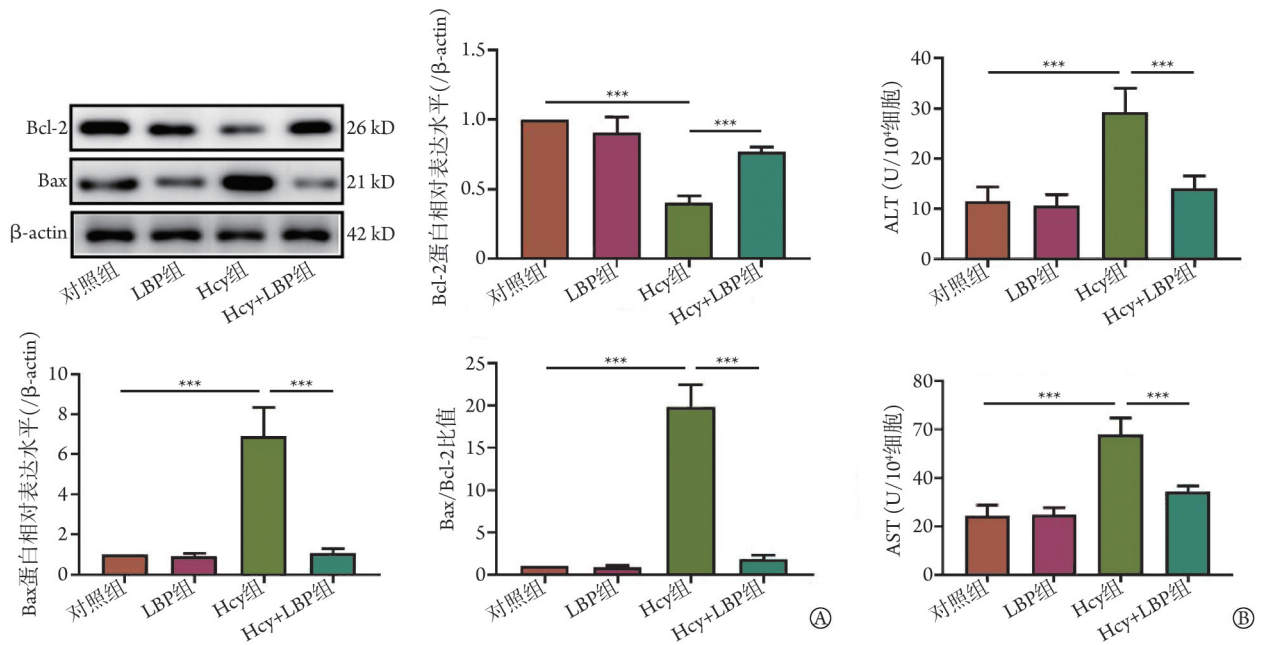
高, Bax 蛋白相对表达水平明显降低 ($P < 0.001$, 图7A)。

与对照组比较, LBP组NCTC 1469细胞中ALT、AST活性差异无统计学意义($P > 0.05$), Hcy组NCTC 1469细胞中ALT、AST活性升高($P < 0.001$); 与Hcy组比较, Hcy+LBP组NCTC 1469细胞中ALT、AST

活性降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$, 图7B)。

3 讨论

枸杞子来源于宁夏道地传统名贵中药材枸杞的干燥成熟果实,味甘,性平,归肝、肾经。中医学认为,枸杞子性平味甘,具有滋补肝肾、益精明目



Hcy. 同型半胱氨酸; LBP. 枸杞多糖; ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; A. Western blotting 检测 Bax、Bcl-2 蛋白的表达; B. ALT 和 AST 活性; *** $P < 0.001$

图7 LBP对小鼠NCTC 1469细胞损伤的影响

Fig.7 Effects of LBP on mouse NCTC 1469 cell damage

之功。明代《本草纲目》记载，枸杞子“甘平而润，性滋而补，能补肾、润肺、生精、益气，此乃平补之药”^[8]。枸杞子有助于体内阴阳的平衡，而阴阳二气的平衡有助于滋养肝和肾^[9]。名方一贯煎中含有枸杞子，具有滋阴疏肝之效，现代临床也将其应用于治疗慢性肝炎、肝硬化、脂肪肝等疾病^[10]。肝作为机体最重要的代谢性器官，其功能异常与多种疾病的发生和发展关系密切。肝参与机体大部分物质的代谢过程，如代谢物质异常增加或减少都会对肝细胞造成损伤。随着人们食物种类的多样化，肝相关疾病的发生也越来越多。因此探究更多的治疗肝相关疾病的方法非常必要。肝作为机体最大的实质性器官，其组成主要是肝细胞，肝细胞占据肝80%之多。因此，探究肝细胞损伤的分子机制及其治疗方法是治疗肝损伤相关疾病的基础。Hcy是一种非必需的含巯基的氨基酸，来源于甲硫氨酸代谢，其代谢过程与甲基化修饰有关。近年来，越来越多的研究表明Hcy与肝相关疾病有关^[11]，但其主要的分子机制尚不明确。

LBP是一种由阿拉伯多糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖等共同组成的一类大分子水溶性多糖，现代研究显示其具有抗炎、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、调节免疫力等多种生理作用^[12-14]。已有研究表明，LBP可以通过降低肝受损状态下氧化应激水平达到对肝损伤的治疗作用^[15]，但是LBP对Hcy引起的肝细胞损伤的作用尚不明确。本研究发现，与对照组

比较，Hcy组肝细胞凋亡增加，肝细胞损伤加重。

YAP1是Hippo途径的转录共激活因子，被认为是参与肿瘤发生的肿瘤蛋白。有研究表明，膀胱癌组织中YAP1的表达较相邻正常组织升高，YAP1过表达可促进HT-1376和J82膀胱癌细胞的增殖并抑制其凋亡^[16]；有研究发现，过表达YAP1可促进心肌细胞增殖并抑制缺氧暴露的H9c2细胞凋亡^[17]，提示YAP1能够调控细胞凋亡，但其在小鼠NCTC 1469细胞凋亡中的作用目前尚不清楚。本研究发现，与对照组比较，Hcy组YAP1表达明显降低。为了进一步明确YAP1在Hcy引起的NCTC 1469细胞损伤中的分子机制，生物信息学分析发现YAP1启动子区域CpG较多，提示YAP1启动子区域具有发生甲基化的结构基础；Hcy作为甲硫氨酸代谢的中间产物，其代谢过程中可形成甲基供体，提示Hcy可能是通过引起YAP1启动子区域发生甲基化，从而逆向调节YAP1的表达，引起肝细胞凋亡及损伤。DNA甲基化是以未改变核苷酸顺序及其组成的方式影响DNA构象的稳定性，从而达到调控基因表达目的的重要的表观遗传学修饰^[18]。针对DNA甲基化的研究主要集中在促进甲基化和去甲基化两个方面，DNA高甲基化能够减弱或者沉默基因的表达，而去甲基化则能使基因活化或重新表达。已有研究表明，Hcy引起肝相关疾病变化时，主要与甲基化修饰有关^[19]。本研究生物信息学分析发现YAP1启动子区存在CpG位点，因此推测，DNA甲基化这一表观遗传学机制参与了

Hcy 逆向调节 YAP1 的表达引起肝细胞损伤的过程。进一步使用 Hcy 处理 NCTC 1469 细胞后, YAP1 启动子区 DNA 甲基化程度明显升高。DNA 高甲基化作为基因转录降低的重要标志之一, 当基因启动子区域发生甲基化增加时, 蛋白转录受阻, 因此蛋白表达降低。本研究发现, 当 YAP1 启动子区域甲基化增加时, YAP1 蛋白表达随之降低。DNA 甲基化主要受 DNA 甲基转移酶的调控, 因此, 本研究检测 3 种主要的 DNA 甲基化酶 *DNMT1*、*DNMT3a* 及 *DNMT3b* mRNA 的表达情况发现, 与对照组比较, Hcy 组 *DNMT1*、*DNMT3a* 及 *DNMT3b* mRNA 表达均升高。以上结果表明, Hcy 可通过正向改变蛋白 YAP1 的启动子区域的甲基化, 从而负向调节蛋白 YAP1 的表达, 引起肝细胞凋亡和损伤的发生。已有研究显示, LBP 可改善 Hcy 引起的血管平滑肌细胞的增殖和表型转换^[20]。但 LBP 对 Hcy 引起的 NCTC 1469 细胞损伤的作用尚不明确, 因此本研究探究 LBP 对 Hcy 引起的 NCTC 1469 细胞损伤的作用; 结果发现, 与 Hcy 组比较, Hcy+LBP 组 YAP1 表达增加, NCTC 1469 细胞的凋亡和损伤减轻。提示, LBP 可能通过正向调节蛋白 YAP1 的表达, 从而改善 Hcy 引起的 NCTC 1469 细胞损伤。

综上所述, 本研究发现, YAP1 表达降低可能是 Hcy 引起小鼠 NCTC 1469 细胞损伤的关键过程, YAP1 启动子区域甲基化的改变可能是 Hcy 引起蛋白 YAP1 表达变化的分子机制。LBP 可通过正向调节蛋白 YAP1 的表达, 从而改善 Hcy 引起的小鼠 NCTC 1469 细胞损伤。但不足之处在于本研究仅在细胞层面探究了 Hcy 引起肝细胞损伤的分子机制, 未在动物整体水平进行进一步探索, 因此后续应继续更深层次探究 Hcy 引起肝损伤的分子机制及治疗措施, 以期对肝损伤的治疗提供更多的科研思路和方法。

【参考文献】

- [1] Xu L, Zhang H, Wang Y, *et al.* FABP4 activates the JAK2/STAT2 pathway *via* Rap1a in the homocysteine-induced macrophage inflammatory response in ApoE^{-/-} mice atherosclerosis[J]. *Lab Invest*, 2022, 102(1): 25-37.
- [2] Shen J, Jiao Y, Ding N, *et al.* Homocysteine facilitates endoplasmic reticulum stress and apoptosis of hepatocytes by suppressing ERO1 α expression *via* cooperation between DNMT1 and G9a[J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(8): 1236-1248.
- [3] Yang A, Zeng W, Zhang H, *et al.* Homocysteine accelerates hepatocyte autophagy by upregulating TFEB *via* DNMT3b-mediated DNA hypomethylation[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2023, 55(8): 1184-1192.
- [4] Gao LL, Li YX, Ma JM, *et al.* Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide supplementation in non-alcoholic fatty liver disease patients: study protocol for a randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2021, 22(1): 566.
- [5] Ajani JA, Xu Y, Huo L, *et al.* YAP1 mediates gastric adenocarcinoma peritoneal metastases that are attenuated by YAP1 inhibition[J]. *Gut*, 2021, 70(1): 55-66.
- [6] Hong Y, Ye M, Wang F, *et al.* MiR-21-3p promotes hepatocellular carcinoma progression *via* SMAD7/YAP1 regulation[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 642030.
- [7] Chen X, Li Y, Luo J, *et al.* Molecular mechanism of Hippo-YAP1/TAZ pathway in heart development, disease, and regeneration[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 389.
- [8] 车招娣, 周正群, 肖佳. 宁夏枸杞子治疗肝脏疾病的作用机制[J]. *科学通报*, 2022, 67(4): 351-363.
- [9] Chang RC, So KF. Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum* against aging-associated diseases. What do we know so far [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(5): 643-652.
- [10] 宁冰冰, 边艳琴, 张文萌, 等. 一贯煎保肝作用研究[J]. *长春中医药大学学报*, 2012, 28(3): 546-548.
- [11] Li L, Huang Q, Yang L, *et al.* The association between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and advanced fibrosis with serological vitamin B₁₂ markers: results from the NHANES 1999-2004[J]. *Nutrients*, 2022, 14(6): 1224.
- [12] Ding H, Wang JJ, Zhang XY, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide antagonizes LPS-induced inflammation by altering the glycolysis and differentiation of macrophages by triggering the degradation of PKM2[J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44(3): 379-388.
- [13] Xing DU, Zhang J, Liu L, *et al.* A novel anticancer property of *Lycium barbarum* polysaccharide in triggering ferroptosis of breast cancer cells[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2022, 23(4): 286-299.
- [14] Song Q, Yong HM, Yang LL, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide protects against osteonecrosis of femoral head *via* regulating Runx2 expression[J]. *Injury*, 2022, 53(4): 1361-1367.
- [15] Peng Y, Zhao L, Hu K, *et al.* Anti-fatigue effects of *lycium barbarum* polysaccharide and effervescent tablets by regulating oxidative stress and energy metabolism in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10920.
- [16] Xu M, Gu M, Zhou J, *et al.* Interaction of YAP1 and mTOR promotes bladder cancer progression[J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(1): 232-242.
- [17] Hong L, Zha Y, Wang C, *et al.* Folic acid alleviates high glucose and fat-induced pyroptosis *via* inhibition of the Hippo signal pathway on H9C2 cells[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 698698.
- [18] Zhang X, Huang Z, Xie Z, *et al.* Homocysteine induces oxidative stress and ferroptosis of nucleus pulposus *via* enhancing methylation of GPX4[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 552-565.
- [19] Hu J, Zhu H, Xu G, *et al.* Significant association between DHFR promoter methylation and ischemic stroke in a Chinese hypertensive population[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(8): e23322.
- [20] Li Y, Yang B, Zhang X, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide antagonizes cardiomyocyte apoptosis by inhibiting the upregulation of GRK2 induced by I/R injury, and salvage mitochondrial fission/fusion imbalance and AKT/eNOS signaling[J]. *Cell Signal*, 2022, 92: 110252.

(责任编辑: 纪方方)