

蛋白精氨酸甲基转移酶在 E3 大鼠哮喘模型中表达变化的研究

孙青竹,焦芳芳,杨旭东,钟波,蒋梅花,李国良,吕彬,韩燕,宁启兰,张富军,孙健,吕社民(西安交通大学医学院遗传与分子生物学系,陕西 西安 710061)

摘要: **目的** 观察 1~6 型蛋白精氨酸甲基转移酶(PRMTs)在 E3 大鼠急性哮喘模型肺脏和脾脏中的表达变化。**方法** 构建卵清蛋白诱导的 E3 大鼠急性哮喘模型,分为对照组和哮喘组,每组各 10 只大鼠,病理及生化检测评估模型构建情况,半定量 PCR 检测 1~6 型 PRMTs 的表达差异。**结果** 和对照组相比,哮喘组大鼠肺脏组织中 PRMT1($P<0.01$)、PRMT2($P<0.01$)、PRMT3($P<0.05$)、PRMT5($P<0.05$)的表达有显著性升高,而 PRMT4($P<0.05$)的表达显著性降低;哮喘组大鼠脾脏组织中 PRMT2($P<0.05$)、PRMT5($P<0.05$)的表达也出现显著性升高。**结论** 蛋白精氨酸甲基转移酶在 E3 大鼠急性哮喘模型肺脏和脾脏中有差异性表达,这可能在哮喘发病的基因转录后调节过程中发挥着重要的作用。

关键词: 蛋白精氨酸甲基转移酶;哮喘;E3 大鼠

中图分类号:R394.3 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2010)04-0716-04

Expression of protein arginine N-methyltransferases in E3 rat models of acute asthma

SUN Qing-zhu, JIAO Fang-fang, YANG Xu-dong, ZHONG Bo, JIANG Mei-hua, LI Guo-liang, LÜ Bin, HAN Yan, NING Qi-lan, ZHANG Fu-jun, SUN Jian, LÜ She-min

Department of Medical Genetics and Molecular Biology, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710061, China

Abstract: **Objective** To observe the expression of protein arginine N-methyltransferase (PRMT) genes in the lung and spleen of E3 rats with acute asthma. **Methods** E3 rats with ovalbumin-induced pulmonary inflammation were divided into two groups ($n=10$), and the validity of the acute asthma model was evaluated by histological observation with HE and PAS staining and by measurement of NO production. Semi-quantitative RT-PCR was employed to detect the expressions of PRMT1-PRMT6 genes in the lung and spleen tissues of the rats. **Results** In the lung tissue of the asthmatic rats, the gene expressions of PRMT1 ($P<0.01$), PRMT2 ($P<0.01$), PRMT3 ($P<0.05$) and PRMT5 ($P<0.05$) were significantly increased, but the expression of PRMT4 gene ($P<0.05$) was significantly decreased as compared with those in the control tissue. In the spleen tissue of the asthmatic rats, the expressions of PRMT2 ($P<0.05$) and PRMT5 genes ($P<0.05$) showed a significant increase as compared with those in the control rat tissue. **Conclusion** The gene expressions of PRMTs vary significantly between asthmatic rats and control rats, suggesting that PRMTs play an important role in the post-translational modification process of asthma-related genes.

Key words: protein arginine N-methyltransferases; asthma; E3 rats

支气管哮喘是一种由多种炎性细胞浸润所致的反复发作的慢性气道炎症性疾病,临床上以气道高反应为特征,突出表现为可逆的气道阻塞,发作性的呼气性呼吸困难^[1]。近十年来,哮喘的发病率明显上升,我国的发病率由原来的 1%增至 3%,欧美等国家的发病率均已超过 10%^[1]。但由于目前其病因和发病机制仍然不够明晰,临床上的防治也主要以缓解症状为主,缺乏有效的预防和根治措施。因此,进一步阐明哮喘的病因和发病机制,可以为提高该病的预防和治疗

效果提供实验和理论依据,具有重要的科学和实践意义。

蛋白精氨酸甲基转移酶 (protein arginine methyltransferase, PRMT) 是广泛存在于真核细胞中的催化蛋白质精氨酸残基甲基化修饰的一种酶,它通过对组蛋白精氨酸残基和转录因子的甲基化修饰,发挥其表观遗传调控作用^[2]。目前,已有 11 种 PRMTs,分别为 PRMT1~PRMT11。按照其催化甲基化的功能分为三型,Ⅰ型催化生成非对称的二甲基精氨酸,包括 PRMT1、3、4、6、8;Ⅱ型催化生成对称的二甲基精氨酸,包括 PRMT5 和 7;其他 PRMTs 功能研究尚不清楚。有研究表明,PRMTs 在体外可以催化组蛋白 H4 的第 8 位精氨酸残基甲基化,并与 FCP1 相互作用,使 RNA 聚合酶 II 的羧基末端去磷酸化,进而延长转录时间,而组蛋白 H4 甲基化可调节参与 Tregs 分化的重要分子 foxp3 的表达^[3];同时,PRMTs 可通

收稿日期:2009-12-05

基金项目:国家大学生创新性实验项目(1600 011263);国家自然科学基金(30630058;30801027)

作者简介:孙青竹,女,博士研究生,E-mail: violetjoanne@163.com;焦芳芳,女,本科,国家大学生创新性实验项目获得者,E-mail: fangfangj@stu.xjtu.edu.cn

通讯作者:吕社民,男,教授,博士生导师,E-mail: lushemin@mail.xjtu.edu.cn

过催化蛋白质的甲基化促进 IL-2 基因的表达^[4],而 IL-2 可以通过促进 foxp3 的表达来影响 Treg 细胞的分化。此外,PRMTs 还参与了抗原提呈细胞对 T 细胞活化的诱导过程^[3]。由此可见,PRMTs 可调节免疫反应,影响炎症基因的表达。但是 PRMTs 共有 11 种亚型,是哪一种亚型对炎症基因的表达有影响,至今尚未被阐明,而 PRMTs 在哮喘中表达的变化,目前也尚未有研究报道。因此,本实验检测了 E3 大鼠哮喘模型中 PRMT1~6 的表达,以探求其在大鼠急性哮喘模型中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8~10 周龄 E3 大鼠,雌雄皆用,系西安交通大学遗传与分子生物学实验室从瑞典隆德大学引进(中华人民共和国进境动植物检疫许可证编号:AC000400108)。动物在 SPF 级动物房繁育,环境维持室温(25±3)℃,相对湿度 40%~60%,每日人工照明 12 h。动物垫料经高压蒸汽灭菌,动物饮水灭菌凉开水,喂无菌颗粒饲料。

1.1.2 主要试剂 鸡卵清蛋白(OVA)、铝佐剂购于美国 Sigma 公司,DEPC 购于深圳晶美公司,Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司,反转录试剂盒(RevertAid™)购于加拿大 Fermentas Life Sciences,International 公司,Prmts 引物和 GAPDH 引物由奥科生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 哮喘模型建立 8~10 周龄的 E3 大鼠 20 只,雌雄各半,随机分为两组,每组 10 只。OVA-PBS(哮喘组)或 1×PBS(对照组)滴双侧鼻腔攻击,每侧 50 μl,1 次/日,持续 1 周,构建 E3 大鼠哮喘模型^[5]。

1.2.2 迟发型超敏反应(DTH) 末次攻击时,在每只大鼠的左耳皮下注射 1×PBS 液 20 μl,右耳皮下注射 1 mg/ml OVA-PBS 溶液 20 μl,48 h 后处死大鼠,将左右耳廓剪下,8 mm 打孔器在左右耳同一部位打下同面积组织片,分析天平称质量,以耳廓肿胀度(右耳片质量-左耳片质量)表示迟发型超敏反应值。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液的获取 大鼠麻醉处死后,小心取下全肺,保留气管、心脏及胸腺。用自制圆头注射器将 2 ml 无菌 PBS 沿气管缓慢注入肺中,保留 30 s 后尽量将溶液全部吸出,反复 3 次,得支气管肺泡灌洗液(BALF)约 5~6 ml。1000 r/min 离心后,用 1 ml 无菌 PBS 悬浮,龙胆紫染色后,细胞计数板计总细胞数。Giemsa Wright 染色后,根据形态学计数嗜酸性细胞数。

1.2.4 组织学与病理学分析 取部分新鲜肺组织浸入 10%福尔马林中固定,常规石蜡包埋、切片,切片厚度 6 μm,HE 染色后观测肺部炎症情况。Periodic Acid Schiff (PAS)染色,观察支气管中杯状细胞粘液分泌情况,计分标准为:0 分,分泌粘液细胞占总支气管细胞数 0%~1%;1 分为 1%~5%;2 分为 5%~10%;3 分为 10%~20%;4 分为 20%~40%;5 分为 ≥50%。

1.2.5 半定量 PCR Trizol 法提取总 RNA,试剂盒法反转录得 cDNA,储存于-20℃备用。由 NCBI 网站获取大鼠 Prmts 及 GAPDH 序列全长,Primer5 软件设计跨外显子引物。引物及 PCR 条件见表 1。20 μl PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

表 1 Prmts 引物及反应条件

	引物	退火温度(℃)	循环数
Prmt1	上游引物 5'TACTTTGACTCCTATGCCCACT3'	59	30
	下游引物 5'CAATAACCCATCCATCGC3'		
Prmt2	上游引物 5'TGTCGGAGTGGATGGG3'	65	30
	下游引物 5'TGGCTCAGAGAGGCAGTC3'		
Prmt3	上游引物 5'CAAACACGCCGATAGAAT3'	62	30
	下游引物 5'CAGGGTCACAATGAGGGA3'		
Prmt4	上游引物 5'ATGCCTACTGCCTACGACCT3'	57	30
	下游引物 5'CGGGTGTTCACGCTTCTC3'		
Prmt5	上游引物 5'CGGCGGATTAGGCTGTATG3'	64	30
	下游引物 5'GGTCTCTGGGCGGATACTCA3'		
Prmt6	上游引物 5'TGGATGGGCTACGGACTAC3'	65	30
	下游引物 5'GAGGGCAGCAGGGTGAT3'		
GAPDH	上游引物 5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3'	65	28
	下游引物 5'TCCACCACCCTGTGCTGTGA3'		

1.3 统计学分析

所有计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用 *t* 检验或方差分析,所有统计用 Statview 软件完成。相关分析采用 Pearson 检验,*P*<0.05 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 哮喘模型的评估

2.1.1 哮喘组肺病理分析 光镜下 HE 染色显示:对照组大鼠肺泡及支气管结构完整,无炎性细胞浸润及肺泡壁增厚(图 1 A);哮喘组大鼠肺组织巨噬细胞和淋巴细胞浸润增多,支气管壁粘膜下层增厚,管壁褶皱增多,部分支气管壁组织破坏,粘膜下及支气管周围有较多的炎性细胞浸润。肺泡壁增厚,炎性细胞浸润增多(图 1 B)。PAS 染色显示对照组支气管粘液分泌不明显(图 1 C),哮喘组支气管粘液分泌增多(图 1 D)。

2.1.2 哮喘组 BALF 中总细胞数及嗜酸性细胞计数增加 计数 BALF 中总细胞数($\times 10^4$)结果显示哮喘组

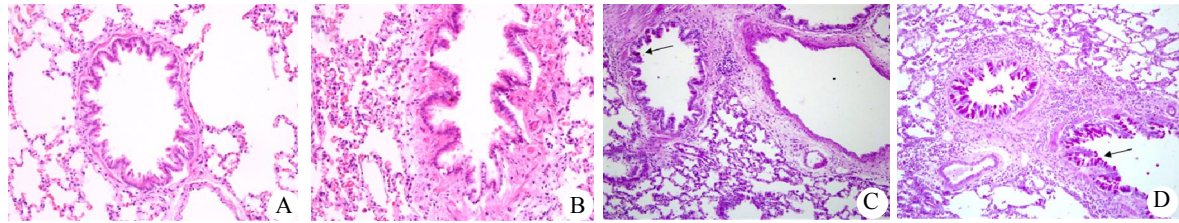


图 1 对照组与哮喘组大鼠肺组织病理切片

A: 对照组肺泡结构完整,无炎性细胞浸润及肺泡壁增厚(HE 200 $\times$);B: 哮喘组肺泡气管壁平滑肌明显肥厚,黏膜下及支气管周围有较多炎性细胞浸润(HE 200 $\times$);C:对照组支气管粘液分泌不明显(PAS 200 $\times$);D:哮喘组支气管粘液分泌明显增多。箭头所示为粘液(PAS 200 $\times$)

与对照组之间两者有显著性差异 (313.9 ± 27.01 vs 140.5 ± 21.14 , $n=10$, $P<0.01$)。嗜酸性细胞数($\times 10^4$)结果显示哮喘组与对照组有显著性差异(6.048 ± 0.5215 vs 2.993 ± 0.2965 , $n=10$, $P<0.01$)。

2.1.3 DTH 以左右耳片重量差值(mg)表示迟发型超敏反应值,哮喘组与对照组比较差异有统计学意义(4.970 ± 0.8442 vs 1.510 ± 0.8171 , $n=10$, $P<0.01$),提示在哮喘组大鼠体内有明显的迟发型超敏反应发生。

2.2 PRMTs 在肺脏和脾脏中的表达变化

2.2.1 PRMTs 在肺脏中的表达变化 PCR 产物电泳

条带灰度扫描分析结果用 GAPDH 校正后,哮喘组与对照组比较,哮喘组肺脏 Prmt1、Prmt2、Prmt3、Prmt5 的表达显著上升,Prmt4 的表达显著下降,Prmt6 的表达差异无统计学意义(图 4 A、B)。

2.2.2 PRMTs 在脾脏中的表达变化 PCR 产物电泳条带进行灰度扫描分析结果用 GAPDH 校正后,哮喘组与对照组比较,哮喘组脾脏 Prmt2、Prmt5 的表达明显上升。Prmt1、Prmt3、Prmt4、Prmt6 的表达差异无统计学意义(图 4 C、D)。

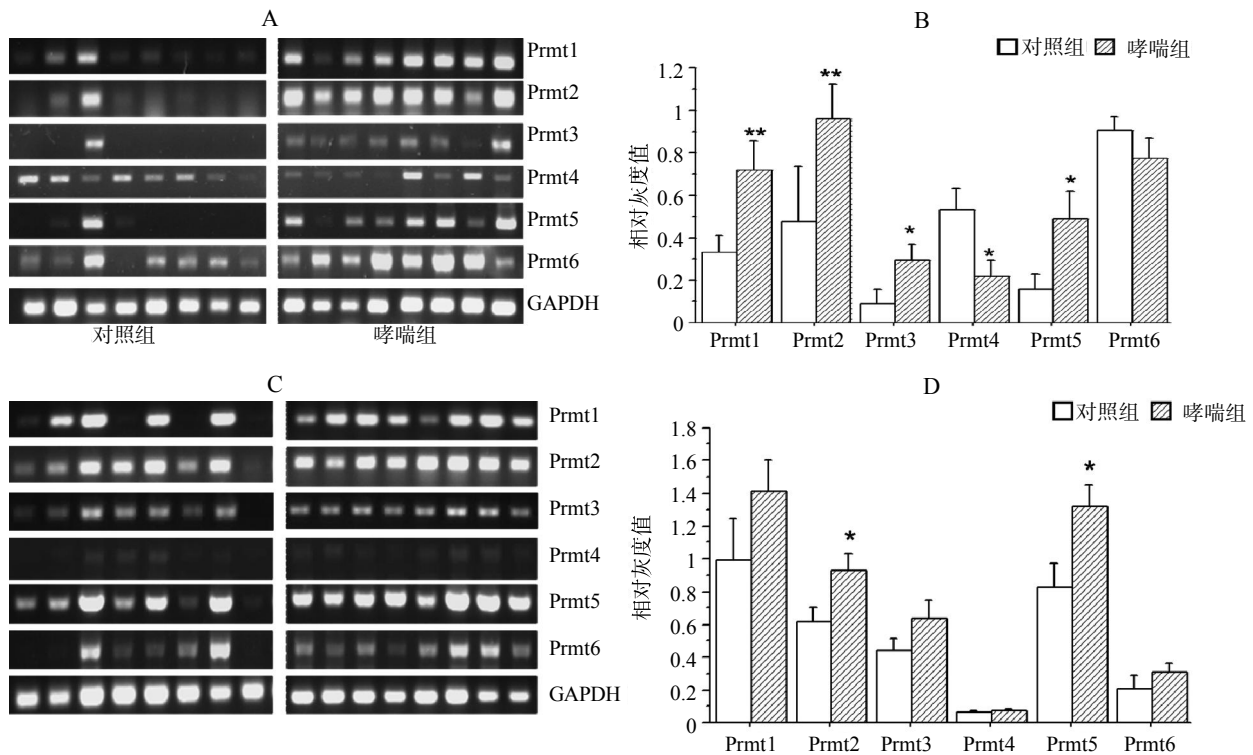


图 2 E3 大鼠肺脏和脾脏中 Prmt1~6 型表达的变化

A: 琼脂糖凝胶电泳显示肺脏 Prmt1~6 的 PCR 产物,结果显示哮喘组较对照组 Prmt1、Prmt2、Prmt3、Prmt5 的表达上升,Prmt4 的表达下降,Prmt6 的表达无明显变化;B: 凝胶成像系统灰度扫描显示肺脏 Prmt1、Prmt2、Prmt3、Prmt4、Prmt5 在哮喘组与对照组的表达差异有统计学意义,结果用 GAPDH 校正;C: 琼脂糖凝胶电泳显示脾脏 Prmt1~6 的 PCR 产物,结果显示哮喘组较对照组 Prmt2、Prmt5 的表达上升,Prmt1、Prmt3、Prmt4 和 Prmt6 的表达无明显变化;D: 凝胶成像系统灰度扫描显示脾脏 Prmt2 和 Prmt5 在哮喘组与对照组的表达差异有统计学意义,结果用 GAPDH 校正; * $P<0.05$ ** $P<0.01$

2.3 相关性分析

分析 Prmt1、Prmt2、Prmt3、Prmt4、Prmt5、Prmt6、PAS 计分、嗜酸性细胞数和总细胞数间的相关性。Prmt1 和 Prmt5 的表达呈正相关, $P<0.0001$, $R=0.789$ 。Prmt1 和 Prmt3、Prmt2 和 Prmt3、Prmt2 和 Prmt4、Prmt2 和 Prmt6、Prmt3 和 Prmt5 的表达均有相关性, $P<0.05$ 。PAS 评分与 Prmt4 的表达呈负相关, $P<0.001$ 。PAS 计分和嗜酸性细胞数呈正相关, $P<0.05$ 。总细胞数和嗜酸性细胞数呈正相关, $P<0.05$ (表 2)。

表 2 Prmt 表达与病理指标的相关性分析

	Prmt2	Prmt3	Prmt4	Prmt5	Prmt6	PAS score	Total cells	Eosinophils
Prmt1	0.195	0.457*	0.019	0.789**	0.154	0.004	0.303	0.590**
Prmt2		0.538**	0.535**	0.252	0.457*	0.010	0.303	0.149
Prmt3			0.197	0.548**	0.232	0.078	0.391*	0.292
Prmt4				-0.193	-0.213	-0.541**	-0.490*	-0.192
Prmt5					0.039	0.034	0.249	0.494*
Prmt6						0.391*	0.108	0.334
PAS score							0.177	0.517**
Total cells								0.495*

*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$

3 讨论

本研究成功建立了 OVA 诱导的 E3 大鼠急性哮喘模型, 表现为 E3 大鼠肺组织炎症细胞浸润明显增多, 肺泡壁增厚, 嗜酸性细胞浸润增多, BALF 中总细胞数和嗜酸性细胞数明显增加, PAS 染色示粘液产生明显增多, PAS 计分具有显著性差异, 哮喘组大鼠两耳重量差明显增大, 说明迟发型免疫反应增强。这些结果提示, E3 大鼠经诱导后, 发生了类似于过敏性哮喘样的病理性改变。在此动物模型上我们观察了 PRMTs 的表达变化, 结果显示: 哮喘组大鼠肺脏和脾脏中 Prmt2 和 Prmt5 的表达均有显著性升高, 而在肺脏中 Prmt1 和 Prmt3 的表达增高, Prmt4 的表达反而降低。

PRMTs 是目前已知的唯一一种精氨酸残基甲基化酶, 它通过对组蛋白精氨酸残基的修饰在基因转录后的调节过程中发挥重要的作用, 其与肺部疾病尤其是哮喘的关系尚不明确。PRMTs 有三种产物: 单甲基精氨酸(MMA)、不对称二甲基精氨酸(ADMA)和对称二甲基精氨酸(SDMA), 其中 MMA 和 ADMA 是一氧化氮合成酶(NOS)的内源性抑制剂, 可以使 NO 的合成减少^[6]。而 NO 通过其血管舒张作用在肺脏维

持其功能中起着重要的作用, 具体包括巨噬细胞激活、肺动脉舒张和支气管收缩, 并能够抑制多种炎症因子的表达, 如 eNOS 衍生的 NO 能通过 NF- κ B 途径抑制气道炎症的发生。有报道称肺脏是 ADMA 的重要来源^[7], 因此, 肺脏中 PRMTs 的表达升高可能通过 ADMA 途径影响哮喘炎症发生发展的过程。

Prmt2 能抑制 NF- κ B 依赖的转录过程而诱导凋亡发生, 而且在小鼠慢性缺氧模型中 Prmt2 的表达也升高^[4,8], 我们的研究发现 Prmt2 在肺脏和脾脏中的表达均升高, 说明 Prmt2 可能在支气管管壁损伤过程中发挥着作用。

E3 大鼠急性哮喘模型肺脏和脾脏中 PRMTs 1~6 型均有表达, 且在肺脏和脾脏中的表达谱不同, 说明 PRMTs 各亚型在哮喘疾病的发生过程中起着不同的作用。各亚型 PRMTs 的转录后修饰功能在肺脏和脾脏中的生理和病理作用有待进一步的研究, 可以相信, 随着 PRMTs 在哮喘发病机制中研究的深入, 必将在哮喘的治疗过程中发挥重要的指导作用。

参考文献:

- [1] Braman SS. The global burden of asthma [J]. Chest, 2006, 130(1 Suppl): 4S-12S.
- [2] Pal S, Sif S. Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases [J]. J Cell Physiol, 2007, 213 (2): 306-15.
- [3] Schurter BT, Blanchet F, Acuto O. Protein arginine methylation: a new frontier in T cell signal transduction [J]. Adv Exp Med Biol, 2006, 584: 189-206.
- [4] Richard S, Morel M, Cleroux P. Arginine methylation regulates IL-2 gene expression: a role for protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) [J]. Biochem J, 200, 388(Pt 1): 379-86.
- [5] Shahzad M, Yang X, Raza Asim MB, et al. Black seed oil ameliorates allergic airway inflammation by inhibiting T-cell proliferation in rats [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2009, 22(1): 37-43.
- [6] Beltowski J, Kedra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy [J]. Pharmacol Rep, 2006, 58 (2): 159-78.
- [7] Bulau P, Zakrzewicz D. Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA [J]. Am J Physiol, 2007, 292(1): L18-24.
- [8] Yildirim AO, Bulau P. Increased protein arginine methylation in chronic hypoxia: role of protein arginine methyltransferases [J]. Am J Resp Cell Mole Biol, 2006, 35(4): 436-43.