

# 三氧化二砷对 MRL/lpr 狼疮鼠脾脏淋巴细胞组蛋白乙酰化的影响

嘉 婷 强孚勇 张 挺 朱载华 朱小春\*

(温州医学院附属第一医院风湿免疫科, 温州 325000)

**摘要** 观察三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)对 MRL/lpr 狼疮鼠脾脏淋巴细胞组蛋白 H3 乙酰化水平的影响以及对组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferases, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)活性的影响。将 20 周龄 MRL/lpr 狼疮鼠和正常 C57BL/6J 小鼠无菌条件下取出脾脏, 配制成脾脏淋巴细胞悬液。体外经 PHA-p (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 和 IL-2 (1 000 U/ml) 常规刺激 48 h 后, 随机分为 3 组: ATO 组; 曲古抑菌素(Trichostatin A, TSA) 组; RPMI 1640 组。继续培养 24 h。免疫印迹法测定乙酰化组蛋白 H3 的表达量; 酶活性试剂盒分别测定 HAT 和 HDAC 活性。结果显示在 MRL/lpr 狼疮鼠中 RPMI 1640 组、ATO 组、TSA 组组蛋白 H3 乙酰化水平分别为  $0.46\pm 0.06$ 、 $0.87\pm 0.02$ 、 $1.6\pm 0.13$  ( $n=3$ ), 且差异具有显著的统计学意义( $P<0.01$ ); ATO 和 TSA 能明显降低 HDAC 活性( $P<0.01$ ); 而对于 HAT, 三组间两两相比差异无统计学意义; ATO 组和 TSA 组 HDAC/HAT 的比值明显低于 RPMI 1640 组。而在 C57BL/6J 小鼠中, ATO 组和 RPMI 1640 组之间以上指标均无差异。研究结果表明 ATO 能明显抑制 MRL/lpr 狼疮鼠脾脏淋巴细胞的 HDAC 活性, 下调 HDAC/HAT 的比值, 提高组蛋白 H3 的乙酰化水平, 而对正常小鼠并无明显影响。

**关键词** 系统性红斑狼疮; 三氧化二砷; 组蛋白; 乙酰化; 组蛋白去乙酰化酶

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种慢性的、多系统累及的自身免疫性疾病。其病因和发病机制未明, 重症狼疮的治疗仍是一大难题。目前组蛋白乙酰化修饰在狼疮发病机制中的重要性逐渐得到人们的关注<sup>[1]</sup>。组蛋白乙酰化程度受 HAT 和 HDAC 调控。有研究<sup>[2]</sup>表明 MRL/lpr 狼疮鼠 CD4+T 细胞存在 HAT 与 HDAC 的差异性表达。ATO 是我国中药砒霜的主要成分, 自成功地应用于急性早幼粒细胞白血病的临床治疗后, 掀起了世界范围的研究热潮。目前国内外均有研究<sup>[3-6]</sup>证实 ATO 是一种治疗自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮很有前景的药物。本文将探讨 ATO 对 MRL/lpr 狼疮鼠 HDAC/HAT 平衡及组蛋白 H3 乙酰化程度的影响, 为 ATO 治疗 SLE 的作用机制提供一定的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

三氧化二砷钠注射针(哈尔滨伊达药业有限公司); rabbit polyclonal to Histone H3 (acetyl K9) (Abcam ab61231); purified anti-Histone H3 (Biologend 601901); 羊抗兔 -HRP IgG 抗体(武汉博士德公司); Colorimetric Histone deacetylase (HDAC) Activity Assay Kit

(Biovision K331-100); Histone acetyltransferase (HAT) Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision K332-100); BCA 蛋白定量试剂盒以及 TSA 购自碧云天公司; 植物血球凝集素 (PHA-p) (Sigma); 重组人 IL-2 (上海华新生物高技术有限公司); 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)和 RPMI 1640 均购自 Gibco 公司; 高速冷冻离心机(Beckman); 垂直电泳仪(Bio-Rad); 酶标仪(Bio-Tek)。

### 1.2 实验动物

20 周龄 MRL/lpr 雌性狼疮小鼠 18 只, 体重 36~38 g; 20 周龄 C57BL/6J 小鼠 24 只, 体重 20~22g, 引自上海斯莱克实验动物有限公司, 饲养于动物实验中心清洁级(SPF)动物房中。

### 1.3 细胞培养与实验分组

将小鼠处死, 无菌条件下取出脾脏, 针戳法制备小鼠脾脏悬液。再用淋巴细胞分离液和红细胞裂解液制备成淋巴细胞悬液。调整细胞密度为  $1\times 10^6/\text{ml}$ , 加入 10% FCS-RPMI 1640 培养液、PHA-p(终浓度

收稿日期: 2010-05-21 接受日期: 2010-08-31

温州市科技计划(No.Y20090240)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 13705881616, E-mail: zhuxiaochunwz@yahoo.com.cn

为 20  $\mu\text{g/ml}$ )和 IL-2(终浓度为 1 000U/ml)两种刺激素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 48 h 后, 随机分为 3 组: ATO 组: 1.0  $\mu\text{mol/L}$  ATO 作为实验组<sup>[7]</sup>; TSA 组: 300 ng/ml TSA<sup>[8]</sup>作为阳性对照组; RPMI 1640 组: 10% FCS-RPMI 1640 作为空白对照组。继续培养 24 h。台盼蓝染色法测定细胞存活率>95%。

#### 1.4 组蛋白提取与 Western 印迹分析

组蛋白提取采用酸抽提组蛋白法。PBS 及 Triton Extraction Buffer (TEB: 0.5% Triton-X 100 (V/V), 2 mmol/L 苯甲磺酰基氟化物(PMSF), 0.02% (W/V)  $\text{NaN}_3$ , 溶于 PBS)中加入丁酸钠(终浓度为 5 mmol/L)来维持组蛋白的乙酰化状态。收集细胞, 用冷 PBS 洗两次, 加入适量 TEB, 于 4 $^{\circ}\text{C}$  6 500 g 离心 10 min, 弃上清液。用一半体积的 TEB 重悬沉淀, 离心如前得到细胞核沉淀。将沉淀溶于适量 0.2 mol/L 盐酸中, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。同上离心, 保留上清液。于上清液中加入预冷丙酮, -20 $^{\circ}\text{C}$ , 8 h, 4 $^{\circ}\text{C}$  14 000 g 离心 10 min, 风干沉淀。再将蛋白沉淀溶解在一定体积的预冷蒸馏水中, 用 BCA 法测待测蛋白的浓度。Western 印迹法参考文献<sup>[9]</sup>, 将等量组蛋白样品(10  $\mu\text{g}$ )与 4 倍体积上样缓冲液混匀 100 $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min 充分变性。经 15% SDS-PAGE 电泳后, 转移至 PVDF 膜。加入 5% 脱脂奶粉室温 2 h 封闭。进行一抗、二抗孵育。本实验一抗: rabbit polyclonal to Histone H3 (acetyl K9), 1 : 500 稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。二抗: goat anti-rabbit IgG, 1 : 15 000, 室温 2 h 孵育。ECL 试剂盒化学发光后曝光成像, 同时检测 purified anti-Histone H3 (一抗: 1 : 300)表达量作为内参。图像经 Quantity One 分析软件分析各条带的光密度值, 以目的与内参光密度值的比值反映组蛋白乙酰化程度。

#### 1.5 HDAC 活性测定

严格按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(碧云天)的说明书操作, 抽提细胞核蛋白。Colorimetric Histone deacetylase (HDAC) Activity Assay Kit 测定脾脏淋巴细胞核蛋白(100  $\mu\text{g}$ )HDAC 活性。严格按照说明书操作。用重蒸水稀释待测蛋白样品至 85  $\mu\text{l}$  (终体积), 加入 U 型 96 孔板(只加 85  $\mu\text{l}$  重蒸水作为空白对照)。每孔中加 10 $\times$ HDAC Assay Buffer 和 HDAC colorimetric substrate, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 再加入 Lysine Developer 终止反应。37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。酶标仪于 405 nm 波长处测定样品吸光度。使用试剂盒中一系列已知浓度的去乙酰化标准品绘制蛋白浓度的标准曲线。从标准曲线中计算去乙酰化赖氨酸的浓度(代表 HDAC 活性)。

#### 1.6 HAT 活性测定

使用 Histone acetyltransferase (HAT) Activity Colorimetric Assay Kit 测定脾脏淋巴细胞核蛋白中 HAT 活性。严格按说明书操作。用重蒸水稀释核蛋白(50  $\mu\text{g}$ )至 40  $\mu\text{l}$  (终体积), 加入 U 型 96 孔板(只加 40  $\mu\text{l}$  重蒸水作为空白对照)。每孔中加入 65  $\mu\text{l}$  Assay Mix (包括 HAT Assay Buffer、Substrate、NADH Generating Enzyme)。37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, 用酶标仪于 450 nm 波长处测定样品相对吸光度。

#### 1.7 统计学处理

实验数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 使用 SPSS16.0 统计软件进行分析。组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA),  $q$  检验, 以  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

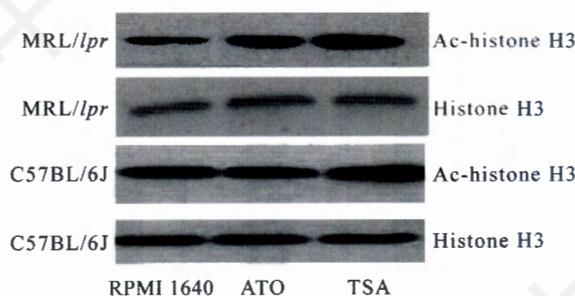
## 2 结果

### 2.1 乙酰化组蛋白 H3 的蛋白表达水平

Western blot 结果显示, 在 MRL/lpr 狼疮鼠中, RPMI 1640 组、ATO 组、TSA 组目的蛋白与内参的灰度比值分别为  $0.46 \pm 0.06$ 、 $0.87 \pm 0.02$ 、 $1.6 \pm 0.13$  ( $n=3$ ); 同 RPMI 1640 组相比, ATO 组的表达量明显增加( $P < 0.01$ ); TSA 组组蛋白乙酰化程度同 RPMI 1640 组相比也有显著的统计学差异( $P < 0.01$ )。在 C57BL/6J 小鼠中 RPMI 1640 组、ATO 组、TSA 组三组目的与内参的灰度比值分别为  $0.75 \pm 0.04$ 、 $0.71 \pm 0.09$ 、 $1.48 \pm 0.05$  ( $n=3$ ); 同 RPMI 1640 组相比, ATO 组的表达量无明显差异,  $P=0.489$ ; TSA 组组蛋白 H3 乙酰化程度升高,  $P=0.000$  (图 1, 图 2)。

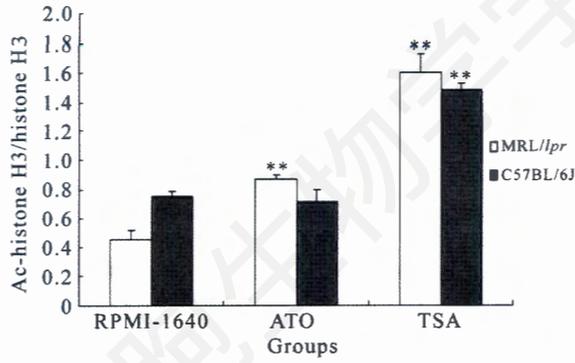
### 2.2 组蛋白去乙酰化酶(HDAC)活性的水平

细胞经 ATO、TSA、RPMI 1640 处理后核蛋白的平均去乙酰化赖氨酸表达量即 HDAC 活性。在 MRL/lpr 狼疮鼠中, 经 RPMI 1640 处理后 HDAC 活性



**Fig.1** Western blot analysis of acetylated histone H3 in MRL/lpr and C57BL/6J splenic lymphocytes

Acetylation was detected using anti-acetylated H3 Ab. Expression of histone H3 is shown as a control for protein loading in each lane.

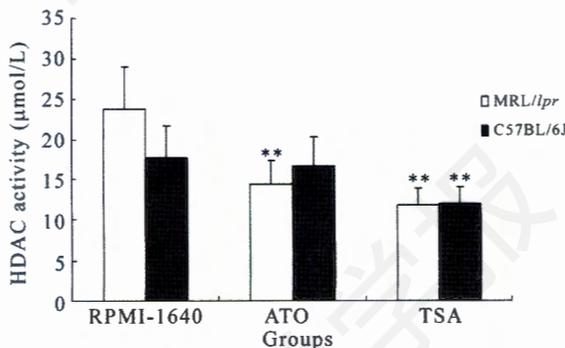


**Fig. 2** The relative gray scale map of Western blot  
\*\* $P<0.01$ , compared with RPMI 1640 group.

为 $(23.73\pm 5.28)\mu\text{mol/L}$  ( $n=6$ ), 而经 ATO 和 TSA 处理后, HDAC 的活性分别为 $(14.47\pm 2.89)\mu\text{mol/L}$  和  $(11.83\pm 2.10)\mu\text{mol/L}$ 。ATO 组与 RPMI 1640 组相比,  $P=0.001$ , TSA 组与 RPMI 1640 组相比,  $P=0.000$ , 有显著的统计学意义。在 C57BL/6J 小鼠中, 经 RPMI 1640 组、ATO 组、TSA 组处理后 HDAC 活性分别为 $(17.72\pm 3.92)\mu\text{mol/L}$ 、 $(16.55\pm 3.68)\mu\text{mol/L}$ 、 $(11.91\pm 2.08)\mu\text{mol/L}$  ( $n=6$ ); 同 RPMI 1640 组相比, ATO 组的表达量无明显差异,  $P=0.550$ ; TSA 组 HDAC 活性下降,  $P=0.009$ (图 3)。

### 2.3 组蛋白乙酰基转移酶(HAT)活性的水平

在 MRL/lpr 狼疮鼠中, RPMI 1640 组、ATO 组和 TSA 组 HAT 活性分别为 $(1.34\pm 0.49)\mu\text{mol/L}$ 、 $(1.38\pm 0.60)\mu\text{mol/L}$ 、 $(1.24\pm 0.35)\mu\text{mol/L}$  ( $n=6$ ), 三组细胞的 HAT 活性大致相同,  $P$  值分别为 0.618、0.890、0.718, 并无统计学差异。在 C57BL/6J 小鼠中, 经 RPMI 1640 组、ATO 组、TSA 组处理后 HAT 活性分别为 $(4.36\pm 1.00)\mu\text{mol/L}$ 、 $(4.29\pm 0.99)\mu\text{mol/L}$ 、 $(6.23\pm 1.98)\mu\text{mol/L}$  ( $n=6$ ); 同 RPMI 1640 组相比, ATO



**Fig. 3** HDAC activities in MRL/lpr and C57BL/6J splenic lymphocytes treated for 24 h  
\*\* $P<0.01$ , compared with RPMI 1640 group.

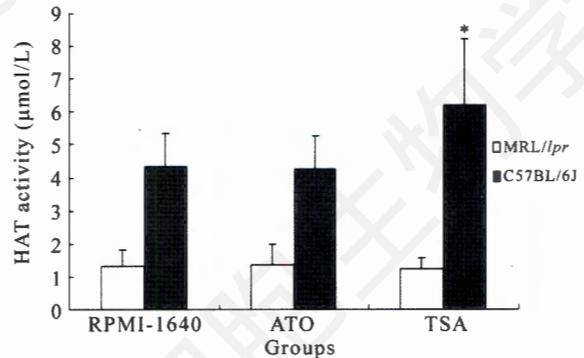
组的表达量无明显差异,  $P=0.931$ , TSA 组 HAT 活性升高,  $P=0.036$  (图 4)。

### 2.4 三组 HDAC/HAT 比值的水平

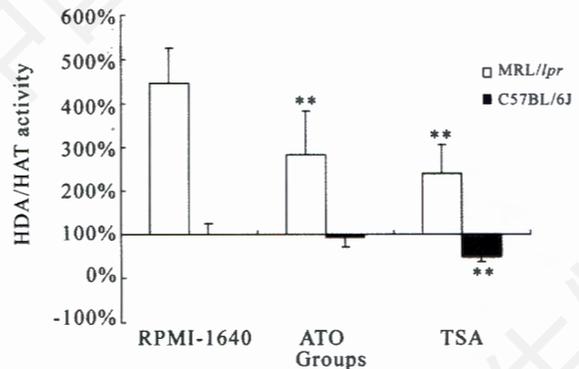
以 C57BL/6J 空白对照组(RPMI 1640)HDAC/HAT 的比值作为样品校正, 其值设置为 100% ( $100\%\pm 26\%$ )。则 MRL/lpr 狼疮鼠 RPMI 1640 组、ATO 组、TSA 组 HDAC/HAT 的比值分别为  $444\%\pm 81\%$ 、 $282\%\pm 101\%$ 、 $240\%\pm 66\%$ 。C57BL/6J 小鼠 HDAC/HAT 的比值分别为  $100\%\pm 26\%$ 、 $94\%\pm 23\%$ 、 $48\%\pm 12\%$ 。在狼疮鼠中, ATO 组与 TSA 组 HDAC/HAT 的比值均低于 RPMI 1640 组,  $P$  值分别为 0.004 和 0.001。在 C57BL/6J 小鼠中, 同 RPMI 1640 组相比, ATO 组的表达量无明显差异,  $P=0.569$ , TSA 组 HDAC/HAT 的比值下降,  $P=0.001$  (图 5)。

## 3 讨论

系统性红斑狼疮(SLE)是一种常见多因性自身免疫病, 其病因和发病机制尚未完全阐明。现认为表



**Fig. 4** HAT activity in MRL/lpr and C57BL/6J splenic lymphocytes treated for 24 h  
\* $P<0.05$ , compared with RPMI 1640 group.



**Fig. 5** Ratio of HDAC activity to HAT activity in MRL/lpr and C57BL/6J splenic lymphocytes treated for 24 h  
\*\* $P<0.01$ , compared with RPMI 1640 group.

观遗传学的改变在其发病机制中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。其中组蛋白乙酰化在狼疮发病机制中的重要性逐渐得到人们的关注。MRL/lpr 小鼠含有与细胞自发性程序性死亡有关的 *Fas* 基因隐性突变, 出现与人类 SLE 类似的自身免疫综合征, 它是研究 SLE 发病机制和治疗方法的良好工具。文献<sup>[10,11]</sup>报道 SLE 病人 CD4+T 细胞与 MRL/lpr 小鼠脾脏细胞中存在组蛋白 H3 总体的异常低乙酰化, 且组蛋白 H3 的乙酰化程度与系统性红斑狼疮活动评分成负相关。MRL/lpr 小鼠 CD4+T 细胞存在 HATs 与 HDACs 的差异表达<sup>[2]</sup>。

我们前期实验表明 1.0  $\mu\text{mol/L}$  ATO 体外作用 MRL/lpr 狼疮小鼠 24 h 是最佳的作用剂量和作用时间, 能在一定程度上有效抑制 IFN- $\gamma$  的异常分泌且无明显的细胞毒作用<sup>[7]</sup>。TSA 是众所周知的一种组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂, 它参与多种基因的转录调控, 增强了染色质的趋近性, 参与免疫功能的调节。因此本实验用 ATO 作为实验组, 用 TSA 作为阳性对照、RPMI 1640 作为空白对照, 来探讨 ATO 对 MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏淋巴细胞组蛋白 H3 乙酰化的影响以及对 HDAC/HAT 平衡的影响。Garcia 等<sup>[11]</sup>研究结果就表明 TSA 处理 MRL/lpr 小鼠可以纠正组蛋白 H3 的异常低乙酰化, 从而改善疾病。本实验 Western blot 结果提示 MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏淋巴细胞经 TSA 处理后, 组蛋白 H3 的乙酰化水平明显升高。这与 Garcia 等的研究结果相符。本实验还证实了用 ATO 处理 MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏淋巴细胞, 乙酰化组蛋白 H3 的表达量也明显增多。因此推断 ATO 可能和 TSA 相似, 均通过纠正 MRL/lpr 狼疮小鼠组蛋白 H3 的低乙酰化状态从而达到治疗作用的。然而 Casandra 等<sup>[12]</sup>则认为凋亡诱导的组蛋白高乙酰化可能会诱发 SLE 早期的自身免疫反应。Casandra 等研究的对象是凋亡诱导细胞的组蛋白 H2B 的乙酰化, 而本实验中 MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏淋巴细胞经 ATO、TSA、1640 处理 24h 后, 细胞的存活率均 >95%, 即研究的是非凋亡细胞的组蛋白 H3 的乙酰化。组蛋白的乙酰化修饰不仅与细胞的类型, 药物处理的时间、浓度有关, 还与染色质的特定功能与特定过程有关。分析原因可能 Casandra 等研究组蛋白 H2B 的乙酰化修饰主要涉及凋亡过程, 而本实验组蛋白 H3 的乙酰化修饰主要涉及基因转录调控过程。

Ramirez 等<sup>[13]</sup>研究表明: 亚砷酸作用于 HepG2 肝癌细胞能够抑制 HDAC 的活性。本实验酶活性测定结果显示了经 ATO 和 TSA 处理后, MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏淋巴细胞 HDAC 的活性都明显下降(同 RPMI

1640 相比)。证实了 ATO 具有和 TSA 相似的抑制 HDAC 活性功能。与文献报道的结果具有很好的一致性。然而对于 HAT 活性, 三组之间的差异并没有统计学意义。表明 ATO 对 MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏淋巴细胞 HAT 活性无明显的调控。由于组蛋白的乙酰化程度受 HAT 和 HDAC 之间动态平衡的控制, 即为 HAT 和 HDAC 共同作用的结果。我们发现 ATO 和 TSA 都能够下调 HDAC/HAT 的比值。

本研究发现 1.0  $\mu\text{mol/L}$  ATO 体外作用 MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏淋巴细胞 24 h 可以抑制 HDAC 的活性, 下调 HDAC/HAT 的比值, 提高组蛋白 H3 的乙酰化水平, 然而 ATO 作用于 C57BL/6J 小鼠上述的各项指标并无显著差异。故我们推测 ATO 是在 HDAC/HAT 比值失衡的情况下发挥作用, 对正常 C57BL/6J 小鼠 (HDAC/HAT 比值处于动态平衡) 并无明显作用。也更进一步说明了该浓度、该作用时间 ATO 的安全性。

组蛋白乙酰化修饰是基因转录调控的重要机制。IFN- $\gamma$  和 IL-4 基因启动子低甲基化和组蛋白的低乙酰化是导致 IFN- $\gamma$  和 IL-4 基因转录表达量增加的主要机制<sup>[14-16]</sup>。本实验证实 ATO 作用 MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏淋巴细胞后可以纠正组蛋白的低乙酰化, 推测可能通过是通过组蛋白的高乙酰化抑制 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的基因转录和蛋白的合成, 抑制异常的自身免疫反应, 对 SLE 起治疗作用。

综上所述, 通过 MRL/lpr 狼疮鼠这个模型我们可以推测 ATO 同 TSA 均可以通过下调 HDAC/HAT 的比值(主要是通过抑制 HDAC 活性调控, 与 HAT 活性调控关系不大), 来增加组蛋白 H3 的乙酰化程度, 从而影响 IL-4、IFN- $\gamma$  等基因转录调控, 达到治疗狼疮的目的。但 ATO 是否通过组蛋白修饰影响 IL-4、IFN- $\gamma$  基因的转录及通过何种途径来影响均尚待进一步研究。

#### 参考文献(References)

- 1 Ballestar E, Esteller M, Richardson BC. The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2006; 176(12): 7143-7.
- 2 Hu N, Long H, Zhao M, Yin H, Lu Q. Aberrant expression pattern of histone acetylation modifiers and mitigation of lupus by SIRT1-siRNA in MRL/lpr mice. *Scand J Rheumatol* 2009; 38(6): 464-71.
- 3 Bobé P, Bonardelle D, Benihoud K, Opolon P, Chelbi-Alix MK. Arsenic trioxide: A promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice. *Blood* 2006; 108(13): 3967-75.
- 4 朱小春, 金晓冬, 黄朝兴, 张文辉, 徐玉兰, 许菲菲, 等. 三氧化二砷对 BXSB 自发狼疮小鼠血清自身抗体与肾小球免疫球

- 蛋白沉着的影响。中华内科杂志 2001; 40(11): 764-5.
- 5 朱小春, 张文辉, 高申孟, 许菲菲, 徐玉兰, 吴建波, 等. 三氧化二砷对 BXSB 自发狼疮小鼠免疫系统的影响。中华风湿病学杂志 2002; 6(5): 343-6.
  - 6 王晓冰, 陈培荣, 张挺, 朱小春, 周艳, 孙莉, 等. 三氧化二砷对 MRL/lpr 狼疮鼠 IFN- $\gamma$ 、IL-4 表达和 Th1/Th2 平衡的影响。细胞生物学杂志 2008; 30(4): 509-14.
  - 7 陈培荣, 朱载华, 邹正平, 朱小春. 三氧化二砷对 MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞 IFN- $\gamma$  表达及其 mRNA 的影响。温州医学院学报 2009; 39(4): 333-7.
  - 8 Mishra N, Reilly CM, Brown DR, Ruiz P, Gilkeson GS. Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. J Clin Invest 2003; 111(4): 539-52.
  - 9 Lin T, Chen H, Koustova E, Sailhamer EA, Li Y, Shults C, et al. Histone deacetylase as therapeutic target in a rodent model of hemorrhagic shock: effect of different resuscitation strategies on lung and liver. Surgery 2007; 141(6): 784-94.
  - 10 Hu N, Qiu X, Luo Y, Yuan J, Li Y, Lei W, et al. Abnormal histone modification patterns in lupus CD4<sup>+</sup> T cells. J Rheumatol 2008; 35(5): 804-10.
  - 11 Garcia BA, Busby SA, Shabanowitz J, Hunt DF, Mishra N. Resetting the epigenetic histone code in the MRL-lpr/lpr mouse model of lupus by histone deacetylase inhibition. J Proteome Res 2005; 4(6): 2032-42.
  - 12 van Bavel CC, Dieker J, Muller S, Briand JP, Monestier M, Berden JH, et al. Apoptosis-associated acetylation on histone H2B is an epitope for lupus autoantibodies. Mol Immunol 2009; 47(2-3): 511-6.
  - 13 Ramirez T, Brocher J, Stopper H, Hock R. Sodium arsenite modulates histone acetylation, histone deacetylase activity and HMGN protein dynamics in human cells. Chromosoma 2008; 117(2): 147-57.
  - 14 Long M, Slaiby AM, Wu S, Hagymasi AT, Mihalyo MA, Bandyopadhyay S, et al. Histone acetylation at the Ifng promoter in tolerized CD4 cells is associated with increased IFN-gamma expression during subsequent immunization to the same antigen. J Immunol 2007; 179(9): 5669-77.
  - 15 Yano S, Ghosh P, Kusaba H, Buchholz M, Longo DL. Effect of promoter methylation on the regulation of IFN-gamma gene during *in vitro* differentiation of human peripheral blood T cells into a Th2 population. J Immunol 2003; 171(5): 2510-6.
  - 16 Makar KW, Wilson CB. DNA methylation is a nonredundant repressor of the Th2 effector program. J Immunol 2004; 173(7): 4402-6.

## The Effects of Arsenic Trioxide on Acetylation of Histone H3 of Splenic Lymphocytes in MRL/lpr Mice

Ting Jia, Fu-Yong Qiang, Ting Zhang, Zai-Hua Zhu, Xiao-Chun Zhu\*

(Division of Rheumatology, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

**Abstract** This study aimed to investigate the effects of arsenic trioxide (ATO) on the acetylation status of the histone H3 of splenic lymphocytes from MRL/lpr mice and the activities of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). Spleens were isolated from MRL/lpr mice and C57BL/6J mice at 20 weeks of age under specific pathogen-free condition and made to suspensions. Splenic lymphocytes were stimulated *in vitro* for 48 h in the presence of PHA-p (20  $\mu$ g/ml) and IL-2(1 000 U/ml), then were divided randomly into 3 groups: ATO group (treated with 1.0  $\mu$ mol/L ATO for 24 h), TSA group (treated with 300 ng/ml TSA for 24 h) and RPMI 1640 group (treated with RPMI 1640 for 24 h). Expression levels of acetylated histones H3 in 20-week-old MRL/lpr splenocytes were detected by Western blot. The activities of HDAC and HAT were evaluated via the corresponding activity assay kits. The results showed that in MRL/lpr mice, the degrees of acetylated histone H3 in RPMI 1640 group, ATO group and TSA group were  $0.46\pm 0.06$ ,  $0.87\pm 0.02$  and  $1.6\pm 0.13$ , respectively. And the difference was statistically significant ( $P<0.01$ ). Compared with RPMI 1640 group, ATO group and TSA group could significantly reduce the activity of HDAC ( $P<0.01$ ). However, for the HAT activity, no significant difference was observed between ATO group as well as between TSA group versus RPMI 1640 group. HDAC/HAT ratios in ATO group as well as TSA group were lower than RPMI 1640 group. There was no difference between ATO group and RPMI 1640 group in C57BL/6J mice ( $P<0.05$ ). It was concluded that ATO can inhibit the activity of HDAC, lower the ratio of HDAC/HAT, and improve the acetylation level of histone H3 in the MRL/lpr splenic lymphocytes, and it was of no effect in normal mice.

**Key words** systemic lupus erythematosus; arsenic trioxide; histone; acetylation; histone deacetylases

Received: May 21, 2010 Accepted: August 31, 2010

This work was supported by the Project of Science and Technology of Wenzhou City (No.Y20090240)

\*Corresponding author. Tel: 13705881616, E-mail: zhuxiaochun@yahoo.com.cn