

肝实质细胞中整合素 $\alpha 5$ 调节醛脱氢酶4A1表达的研究

张璇^{1,2} 曹钰奇¹ 李卫红³ 路欣³ 马许清¹ 马悦佼¹ 张海燕^{1*}

(¹首都医科大学基础医学院细胞生物学系, 北京 100069; ²首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050;

³首都医科大学基础医学院基础医学国家级实验教学中心, 北京 100069)

摘要 该文探讨肝实质细胞中整合素 $\alpha 5$ (ITGA5)对醛脱氢酶4A1(ALDH4A1)表达的影响。利用DNA羟甲基化测序、RNA测序及免疫组织化学分析特异靶向敲减小鼠肝实质细胞Itga5对ALDH4A1基因启动子羟甲基化水平、mRNA及蛋白水平的影响。利用免疫组织化学染色技术分析胆汁性肝硬化患者和正常供者肝组织ITGA5及ALDH4A1的蛋白水平。利用siRNA敲减人肝实质细胞中ITGA5, 利用实时定量RT-PCR及免疫细胞化学染色技术, 分析敲减ITGA5对人肝实质细胞中ALDH4A1 mRNA及蛋白水平的影响。结果显示, 特异敲减小鼠肝实质细胞中Itga5, 肝脏组织中ALDH4A1基因启动子的羟甲基化水平及蛋白水平明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。同样, 敲低人肝实质细胞中ITGA5的表达水平, ALDH4A1的mRNA水平和蛋白水平也明显高于对照组($P < 0.05$)。胆汁性肝硬化患者的肝脏组织中ITGA5蛋白水平低于正常供者, 而ALDH4A1蛋白水平高于正常供者, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。研究表明, 肝实质细胞中整合素 $\alpha 5$ 可能通过调节基因启动子羟甲基化水平调节ALDH4A1的表达。

关键词 整合素 $\alpha 5$; ALDH4A1; 肝实质细胞; DNA羟甲基化修饰

Research on Integrin $\alpha 5$ Regulates Aldehyde Dehydrogenase 4A1 Expression in Hepatocytes

ZHANG Xuan^{1,2}, CAO Yuqi¹, LI Weihong³, LU Xin³, MA Xuqing¹, MA Yuejiao¹, ZHANG Haiyan^{1*}

(¹Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

²Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; ³Experimental Center for Basic Medical Teaching, School of Basic Medical Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract This study investigates the effect of ITGA5 (integrin $\alpha 5$) in hepatocytes on the expression of ALDH4A1 (aldehyde dehydrogenase 4A1). DNA hydroxymethylation sequencing, RNA sequencing, and immunohistochemical analysis were employed to examine the impact of specifically targeted knockdown of Itga5 in mouse hepatocytes on the hydroxymethylation level of the ALDH4A1 gene promoter, as well as its mRNA and protein levels. Immunohistochemical staining was used to analyze the protein levels of ITGA5 and ALDH4A1 in liver tissues from patients with biliary cirrhosis and normal donors. siRNA was utilized to knockdown ITGA5 in human hepatocytes, and real-time quantitative RT-PCR along with immunocytochemical staining were performed to assess the effect of ITGA5 knockdown on ALDH4A1 mRNA and protein levels in human hepatocytes. The results showed that specific knockdown of Itga5 in mouse hepatocytes significantly increased the hydroxymethylation level of the ALDH4A1 gene promoter and its protein level in liver tissues compared to the control group, with a statistically sig-

收稿日期: 2024-10-10 接受日期: 2025-04-17

国家自然科学基金(批准号: 81770616)资助的课题

*通信作者. Tel: 010-83950409, E-mail: culture@ccmu.edu.cn

Received: October 10, 2024

Accepted: April 17, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81770616)

*Corresponding author. Tel: +86-10-83950409, E-mail: culture@ccmu.edu.cn

nificant difference ($P < 0.05$). Similarly, knockdown of ITGA5 in human hepatocytes also led to significantly higher mRNA and protein levels of ALDH4A1 compared to the control group ($P < 0.05$). In liver tissues from biliary cirrhosis patients, ITGA5 protein levels were lower than those in normal donors, whereas ALDH4A1 protein levels were higher, with statistically significant differences ($P < 0.05$). The study suggests that integrin $\alpha 5$ in hepatocytes may regulate the expression of ALDH4A1 by modulating the hydroxymethylation level of the gene promoter.

Keywords integrin $\alpha 5$; ALDH4A1; hepatocyte; DNA hydroxymethylation

表观遗传机制在肝脏疾病发生进展过程中发挥着重要作用, 尤其对于肝纤维化的发生发展^[1], 但其中机制并不清楚。研究表明, 原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)患者肝纤维化水平与肝组织中DNA的5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC)下调密切相关^[1]。我们前期研究发现, 胆汁性肝硬化(biliary cirrhosis)患者肝组织纤维化区域5-hmC水平同样下调, 并伴随细胞外基质受体整合素 $\alpha 5$ (integrin $\alpha 5$, ITGA5)蛋白表达水平低于正常肝组织^[2]。特异性敲减肝实质细胞整合素 $\alpha 5$, 可引起小鼠肝脏组织中5hmC水平以及催化形成5hmC的十-十一转位酶1(ten-eleven translocation enzyme 1, TET1)的mRNA及蛋白水平的下降^[2]。DNA羟甲基化测序分析发现, 敲减肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 小鼠肝脏组织中不同基因的启动子5hmC水平有明显不同^[2]。

醛脱氢酶4A1(aldehyde dehydrogenase 4A1, *ALDH4A1*)基因编码线粒体基质中NAD⁺依赖的脱氢酶, 又称 $\delta(1)$ -吡咯啉-5-羧酸(P5C)脱氢酶(P5CDH), 属于醛脱氢酶超家族成员, 是线粒体脯氨酸代谢途径的关键酶, 参与脯氨酸降解为谷氨酸的关键反应^[3]。醛脱氢酶家族的另一成员ALDH18A1(P5CS)则催化相反的过程, 即将谷氨酸合成为脯氨酸^[4]。研究表明, 当细胞对氧化磷酸化生成ATP过程的依赖性增加时, 脯氨酸和鸟氨酸还原性合成途径中的限速酶-ALDH18A1会被隔离到一类缺乏嵴和ATP合酶的线粒体中^[5], 但这类线粒体中是否含有ALDH4A1尚不清楚。我们前期研究发现, 敲减肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 小鼠肝脏组织中, 缺乏嵴的线粒体数量明显增加, 氧化磷酸化水平增加^[2]。由此推测, 肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 水平的变化可能调节ALDH4A1。

研究表明, 肝癌细胞中部分与代谢和肝功能相关的蛋白表达水平显著增加, 其中包括ALDH4A1^[6]。在乙醇喂养的小鼠血清和肝实质细胞中ALDH4A1的蛋白水平也显著增高^[7]。乙醇处理体外培养的肝实

质细胞可引起ALDH4A1蛋白和mRNA增加^[7], 推测ALDH4A1表达水平与肝损伤有一定关系。本研究旨在利用特异靶向敲减肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 小鼠肝脏组织、胆汁性肝硬化患者肝脏组织以及体外培养的人肝实质细胞, 探究肝实质细胞中整合素 $\alpha 5$ 水平变化对ALDH4A1表达的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人肝癌细胞HepG2由首都医科大学基础医学院细胞生物学系保存。

1.1.2 人体组织 胆汁性肝硬化肝组织样本和供体正常肝组织样本的获取, 已获得首都医科大学伦理委员会批准, 伦理审查批准号为2017SY10。

1.1.3 实验动物 实验小鼠均为4~6周龄, 18~20 g的雄性BALB/c小鼠, 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。利用CRISPR/Cas9技术特异性敲减小鼠肝实质细胞中Itga5的表达水平: 使用CRISPR设计工具(<http://crispr.mit.edu>), 以高靶标效率和低脱靶得分为标准, 设计了四对靶向整合素 $\alpha 5$ 的sgRNA, 经靶点筛选后, 最后确定的一对sgRNA序列为F: 5' cac cgA AGT CCC CGT CGA CGT CTG GGC G-3'; R: 5' aaa cCG CCC AGA CGT CGA CGG GGA CTT c-3', 大写字母表示编码序列(coding sequence, CDS), 这部分序列会被翻译成蛋白质。小写字母表示非编码序列, 这些区域不会被翻译成蛋白质。Itga5-sgRNA和对照小鼠分别采用含肝特异性启动子1(liver-specific promotor-1, LP1)的腺相关病毒血清型8(AAV8)载体包装的整合素 $\alpha 5$ sgRNA-pCas9和对照sgRNA-pCas9, 每只小鼠尾静脉注射剂量为 1×10^{11} 个载体基因组(vector genomes, vgs)。注射4周后处死小鼠^[2]。所有动物实验均按照首都医科大学伦理委员会的规定进行, 伦理审查批准号为2017SY10。

1.1.4 实验数据 特异靶向敲减小鼠肝实质细胞Itga5肝脏组织与对照小鼠肝脏组织DNA羟

甲基化测序数据 (GSE162409) 及 RNA 测序数据 (GSE159053) 来自于本实验室前期已获得的数据。

1.1.5 主要试剂 DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、OPTI-MEM®培养基和0.25%胰酶-EDTA购自美国GIBCO公司; 兔抗ITGA5单克隆抗体(稀释比例1:500)购自美国Abcam公司; 兔抗ALDH4A1单克隆抗体(稀释比例1:200)购自美国Proteintech公司; 柠檬酸盐修复液pH6.0、通用型试剂盒(小鼠/兔聚合物法检测系统)、显色试剂盒和中性树胶封片剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 显微镜盖玻片和黏附载玻片购自江苏世泰实验器材有限公司; 反转录试剂盒、实时定量RT-PCR试剂盒、荧光定量96孔PCR板、光学贴膜(ABI)、青霉素和链霉素购自美国ThermoFisher Scientific公司; RNA提取试剂盒购自德国Qiagen公司; 薄壁管、Tips购自美国Axygen公司; 直径100 mm细胞培养皿购自美国BD公司; ON-TARGET SMARTpool integrin $\alpha 5$ siRNA(L-008003-00-0005)、Non-targeting siRNAs(D-001810-10-05)和Dharma FECT 4购自美国Dharmacon公司; 苏木素-伊红染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。GeneAmp PCR System 2400 PCR仪购自新加坡ABI公司; QuantStudio™ 5 Real-Time PCR仪购自美国ThermoFisher公司; TCS SP8激光共聚焦显微镜(MicroSystem LAS AF-TCS SP8)购自德国Leica公司; Panoramic SCAN病理切片扫描仪购自匈牙利3D Histech公司。

1.2 方法

1.2.1 人肝实质细胞的复苏及传代培养 冻存细胞经复苏后, 加入10 mL含有1%青霉素和链霉素的PBS到15 mL离心管中, 4 °C、1 000 r/min离心5 min、, 弃上清, 重悬于含10% FBS的DMEM培养基中, 37 °C、5% CO₂条件下培养。

1.2.2 siRNA转染 对数生长期HepG2按照 8×10^4 个/孔接种于24孔板中, 37 °C、5% CO₂条件下培养24 h进行转染。配置siRNA转染液, siRNA液(以24孔板1个孔的量为例): 取7.5 μ L浓度为5 μ mol/L的siRNA置于无RNA酶的1.5 mL EP管中, 加入42.5 μ L opti-MEM, 轻轻吹打混匀, 备用。对照siRNA液(以24孔板1个孔的量为例): 取7.5 μ L浓度为5 μ mol/L的Non-targeting siRNA置于无RNA酶的1.5 mL EP管中, 加入42.5 μ L opti-MEM, 轻轻吹打混匀, 备用。转染试剂的配制(以24孔板2个孔为例, 一个ITGA5 siRNA孔和一个Non-targeting siRNA孔): 取4 μ L Dharma FECT 4转染试剂放入无RNA酶的1.5 mL EP管中, 再加入96 μ L的opti-MEM溶液吹打均匀, 不能有气泡, 备用。转染试剂分别取50 μ L加入ITGA5 siRNA溶液和Non-targeting siRNA溶液中, 用移液器上下轻轻吹打混匀3~5次, 室温静置20 min。从培养箱中取出HepG2细胞, 观察细胞状态, 弃去旧培养基, 用无青霉素和链霉素的PBS浸洗细胞1次; 每孔加入400 μ L opti-MEM, 分为对照组和实验组, 分别加入100 μ L的ITGA5 siRNA溶液和Non-targeting siRNA溶液, 每孔都均匀缓慢点加, 不要吹打, 放入培养箱中。培养24 h后, 观察细胞状态, 每孔加入500 μ L DMEM完全培养基。转染72 h后分析基因表达情况。

1.2.3 实时定量RT-PCR检测细胞内各基因的mRNA水平 利用RNeasyMiniKit试剂盒, 按照说明书提取上述各组细胞总RNA。利用SuperscriptIII逆转录试剂盒, 按照说明书的步骤将RNA逆转录成cDNA。实时定量RT-PCR检测各基因mRNA表达水平。使用Primer Premier 5软件设计引物, 引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。PCR引物序列见表1。

1.2.4 石蜡组织切片的HE常温染色 石蜡切片放入电动鼓风干燥箱中70 °C烤20 min, 常规脱蜡水化, 按

表1 本研究中使用的PCR引物表
Table1 List of PCR primers used in this study

mRNA编号 mRNA accession number	基因名 Name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
NM_002205.4	ITGA5	F: TGT GAC TAC TTT GCC GTG AAC C R: CGG AGA TGA GGG ACT GTA AAC C
NM_001161504.2	ALDH4A1	F: ATG ACT CCG TGG GCT ACT TT R: CAG CGT CTC CTT GTA CTT GTC
NM_001317964.1	18S	F: CAC CCA AGA ACA GGG TTT GT R: TGG CCA TGG GTA TGT TGT TA

照下列顺序常温脱蜡水化: 二甲苯 I(5 min)→二甲苯 II(5 min)→二甲苯 III(5 min)→无水乙醇(2 min)→95%乙醇(2 min)→85%乙醇(2 min)→75%乙醇(2 min)→入蒸馏水。苏木素染液滴加到组织上染 7 min。用蒸馏水冲洗 2 min。用 0.5% 盐酸乙醇分化 5 s。蒸馏水冲洗石蜡组织切片反蓝 3 min。伊红染液染 10 s。用蒸馏水冲洗 10 s。切片脱水透明顺序: 75%乙醇(10 s)→95%乙醇 I(10 s)→95%乙醇 II(10 s)→无水乙醇 I(1 min)→无水乙醇 II(1 min)→二甲苯 I(2 min)→二甲苯 II。最后用中性树脂封片。

1.2.5 石蜡组织切片的免疫组织化学染色 将切好的石蜡切片放于电热鼓风干燥箱, 60 °C 烘烤 2 h, 缓慢冷却后拿出。按照下列顺序依次常温浸泡: 二甲苯 I(15 min)→二甲苯 II(15 min)→无水乙醇 I(5 min)→无水乙醇 II(5 min)→95%乙醇(5 min)→90%乙醇(5 min)→80%乙醇(5 min)→70%乙醇(5 min)→水(5 min)。枸橼酸盐抗原修复液(pH 6.0)溶解于 1 L 蒸馏水中, 溶液和石蜡组织切片放入高压锅中进行抗原修复。待切片冷却到室温时, 过纯水 1 min 后放于 PBS 中。用纸将石蜡组织切片周围水分擦干, 滴加 3~4 滴过氧化物阻断剂, 放置于湿盒上, 保持湿润, 室温放置 20 min。PBS 浸洗 3 遍, 每遍 5 min。用抗体稀释剂配制抗体, 每片滴加 3~4 滴, 石蜡组织切片放在湿盒上, 孵育过夜。回收一抗, PBS 浸洗 3 遍, 每遍 5 min。用纸将组织周围水分擦干, 酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物室温孵育 20 min。PBS 浸洗 3 遍, 每次 5 min。用纸把组织周围水分擦干, 立即滴加 DAB 试剂, 在显微镜下观察, 待显色后取下浸没在 PBS 中, 注意全程组织保持湿润。过 1 遍纯水后, 按照下列顺序依次浸泡: 70%乙醇(3 min)→80%乙醇(3 min)→90%乙醇(3 min)→95%乙醇(3 min)→无水乙醇 I(5 min)→无水乙醇 II(5 min)→二甲苯 I(5 min)→二甲苯 II(5 min)。用 Tip 头沾中性树脂滴加到载玻片的一边, 用盖玻片轻轻的盖上, 防止出现气泡。放在一旁晾干。晾干后的切片拿去扫片。

1.2.6 免疫细胞化学染色 分组弃去细胞培养液, 用 PBS 浸洗细胞 3 遍。每孔加入 300 μ L 4% 多聚甲醛, 浸泡 20 min。弃旧液, 每孔加入 1 mL PBS, 浸洗细胞 3 遍, 每遍 5 min。弃旧液, 每孔加入 300 μ L 0.3% Triton X-100, 室温孵育 5 min。弃旧液, 每孔加入 1 mL PBS, 浸洗细胞 3 遍, 每遍 5 min。弃旧液, 加入 300 μ L 10% 羊血清, 室温孵育封闭 60 min。弃旧液, 每孔加入 300 μ L 兔抗 ALDH4A1 抗体(1:200), 放入 4 °C 冰箱孵育过夜。回收

一抗, 每孔加入 1 000 μ L PBS 浸洗细胞 3 遍, 每遍 5 min。弃旧液, 每孔加入 300 μ L Alexa Fluor[®] 488 标记羊抗兔 IgG(1:500), 37 °C 避光孵育 30 min。弃旧液, 每孔加入 1 000 μ L PBS 浸洗细胞 3 遍, 每遍 5 min。弃旧液, 每孔加入 300 μ L DAPI 工作液, 室温孵育 5 min 复染细胞核。弃旧液, 每孔加入 1 000 μ L PBS 浸洗细胞 3 遍, 每遍 5 min。用封片剂将细胞爬片固定在载玻片上, 避光晾干。TCS SP8 激光共聚焦显微镜下观察, 应用 MicroSystem LAS AF-TCS SP8 图像软件拍摄照片。ImageJ 计算两组细胞中荧光密度值, 每组 50 个细胞。

1.2.7 ALDH4A1 基因启动子羟甲基化水平的可视化分析 UCSC 二进制 wig 文件格式的信号曲线是从 hMeDIP-seq 数据生成的, 可以使用 UCSC 进行可视化。

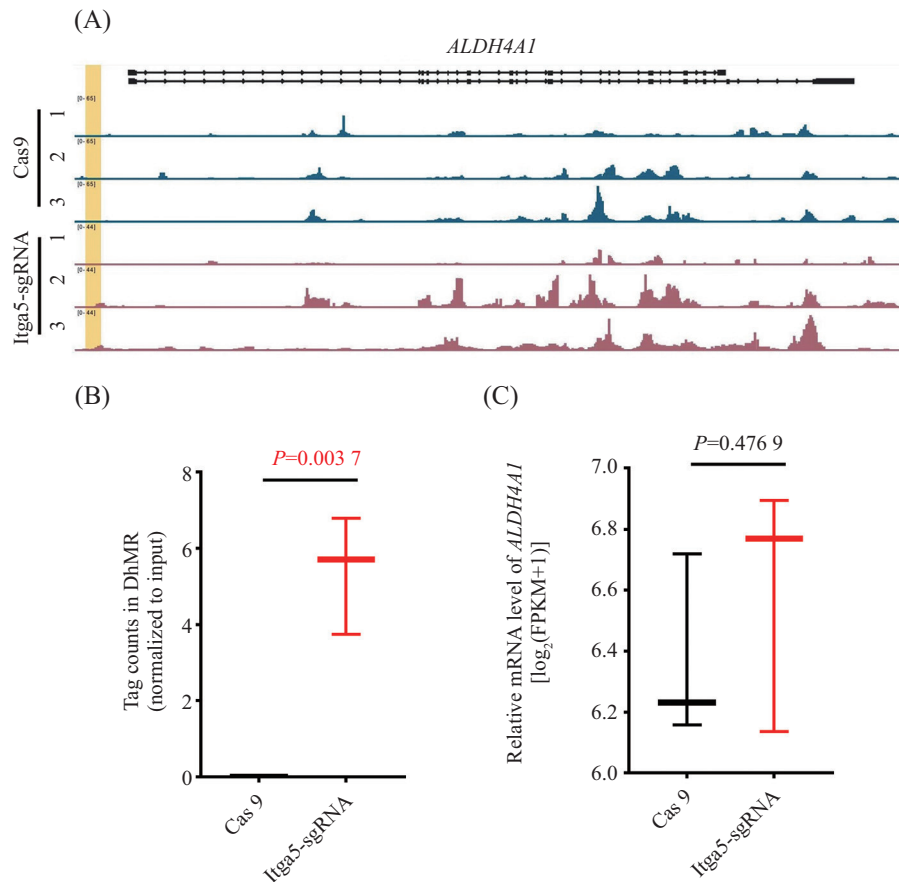
1.2.8 统计学分析 所有实验重复 3 次, 数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件对实验结果进行分析, 两组间比较采用非配对 student's *t* 检验。 $P<0.05$ 为显著性差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 敲减小鼠肝实质细胞中 ITGA5 上调肝脏组织中 ALDH4A1 基因启动子羟甲基化水平和 mRNA 水平

基于我们前期研究已获得的特异靶向敲减小鼠肝实质细胞 ITGA5 肝脏组织与对照小鼠肝脏组织 DNA 羟甲基化测序数据(GSE162409)^[2]进一步分析显示, 其中 18 个基因的启动子呈高羟甲基化水平变化, 其中包括 ALDH4A1^[2]。ALDH4A1 羟甲基化差异距离转录起始位点(transcription start site, TSS)的具体位置 -1313; 位于 4 号染色体(chr4)139621301-139621860 区域, 长度 559 bp, 变化倍数(log₂FC)为 7.29。通过 UCSC 基因组网站(<http://genome.ucsc.edu/>)对 hMeDIP-seq 数据中 ALDH4A1 单基因羟甲基化数据进行了可视化分析(图 1A)。

结果显示, 在肝实质细胞特异性敲减 Itga5(Itga5 sgRNA)小鼠肝脏组织中 ALDH4A1 基因启动子处的羟甲基化水平高于对照组(Cas9), 并有统计学差异(图 1B)。基因启动子羟甲基化水平的增加通常会引起 mRNA 水平的增加, 为此, 我们进一步分析 Itga5-sgRNA 组和 cas9 组小鼠肝脏组织 RNA 测序结果(GSE159053)发现, 在 Itga5 sgRNA 小鼠肝脏组织中 ALDH4A1 mRNA 水平高于对照组, 但由于存在个体



A: *ALDH4A1*单基因羟甲基化结果可视化图。hMeDIP测序结果覆盖*ALDH4A1*基因每个核苷酸位置的读数的标准化数目, 显示在Itga5 sgRNA($n=3$)和Cas9组($n=3$)的各个生物学样本轨道中。*ALDH4A1*基因模型在轨道上方以黑色显示(箭头线表示内含子和基因组中基因的方向, 窄框表示UTRs, 宽框表示外显子), 羟甲基化水平差异区段以黄色高亮显示。B: hMeDIP-seq实验分析*ALDH4A1*启动子区域在Itga5 sgRNA组和Cas9组的羟甲基化水平。Itga5-sgRNA, $n=3$; Cas9, $n=3$ 。C: RNA测序结果显示Itga5 sgRNA组和Cas9组小鼠肝脏组织中*ALDH4A1*的mRNA水平, $n=3$ 。

A: visualization of single-gene hydroxymethylation results for *ALDH4A1*. The normalized number of reads covering each nucleotide position of the *ALDH4A1* gene from hMeDIP sequencing is shown in individual biological sample tracks for the Itga5 sgRNA group ($n=3$) and the Cas9 group ($n=3$). The *ALDH4A1* gene model is displayed in black above the tracks (arrow lines indicate introns and the direction of the gene in the genome, narrow boxes represent UTRs, and wide boxes represent exons), with hydroxymethylation level difference segments highlighted in yellow. B: hMeDIP-seq experimental analysis of hydroxymethylation levels in the *ALDH4A1* promoter region in the Itga5 sgRNA group and the Cas9 group. Itga5-sgRNA, $n=3$; Cas9, $n=3$; C: RNA sequencing results showed the mRNA levels of *ALDH4A1* in the liver tissues of the Itga5 sgRNA group and the Cas9 group, $n=3$.

图1 敲减小鼠肝实质细胞中Itga5对肝脏组织*ALDH4A1*基因羟甲基化水平和mRNA水平的影响

Fig.1 The effect of Itga5 knockdown in mouse hepatocytes on the hydroxymethylation level and mRNA level of the *ALDH4A1* gene in liver tissue

间差异, 统计学差异不明显(图1C)。

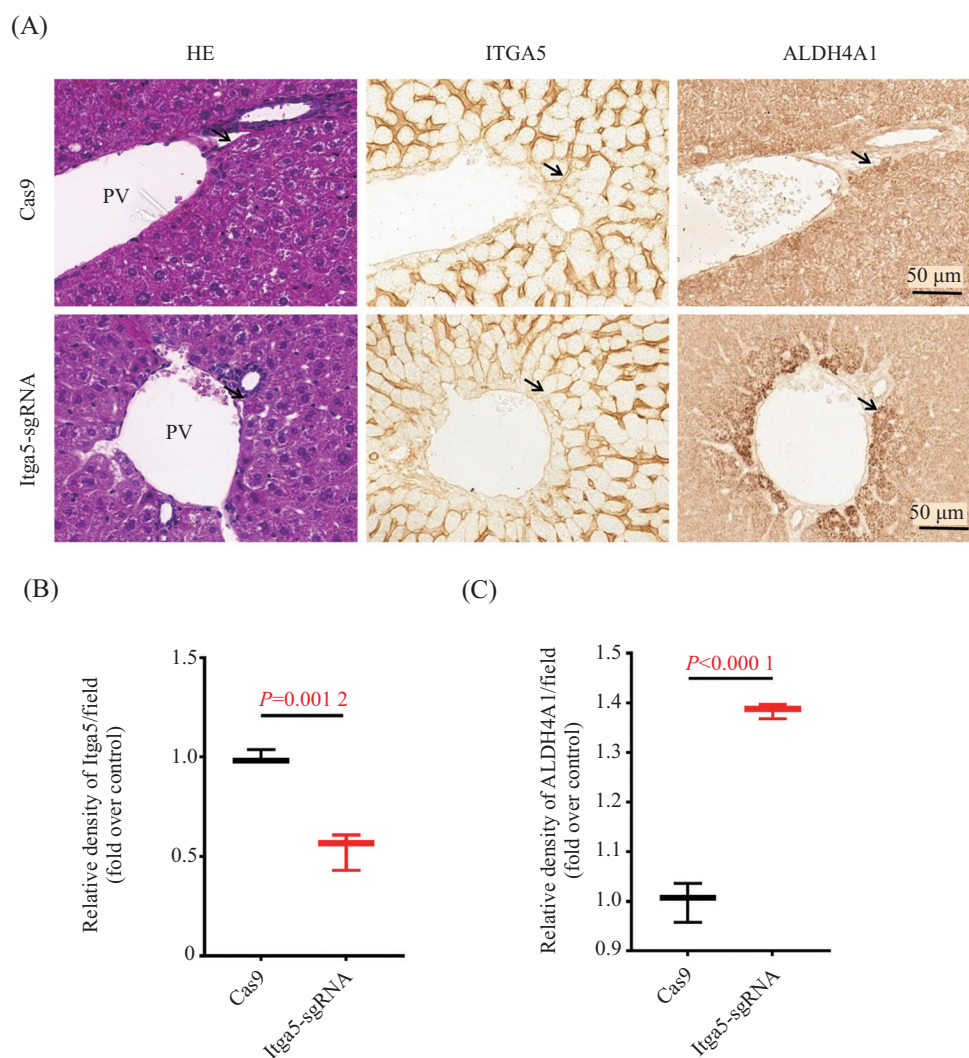
2.2 敲减小鼠肝实质细胞中ITGA5上调肝脏组织ALDH4A1蛋白的表达

为进一步明确敲减小鼠ITGA5是否会影响肝脏组织ALDH4A1蛋白水平的变化, 我们利用免疫组织化学分析Itga5 sgRNA组和Cas9组小鼠肝脏组织中ALDH4A1的表达变化, 结果如图2所示, Itga5 sgRNA组中ITGA5蛋白表达水平明显低于对照组; 而在ITGA5蛋白表达水平降低区域, ALDH4A1表达水平则显著升高, ImageJ半定量分析并统计表明二者具有显著差异($P<0.0001$)。结果表明, 敲减小鼠

肝实质细胞中ITGA5上调肝脏组织ALDH4A1的蛋白水平。

2.3 胆汁性肝硬化患者肝脏组织中ITGA5蛋白低表达区域的ALDH4A1蛋白表达水平增加

我们前期研究表明, 胆汁性肝硬化患者肝脏组织中ITGA5表达下调, 为了探究肝脏疾病患者中ITGA5表达下调是否影响ALDH4A1蛋白表达的情况, 我们利用免疫组织化学分析3例胆汁性肝硬化和1例正常供者的肝脏组织中ALDH4A1的表达变化。结果如图3所示, 与正常肝组织切片相比, 胆汁性肝硬化切片中ITGA5蛋白水平下调的区域, ALDH4A1



A: HE及免疫组织化学染色分析对照组(Cas9)及敲减小鼠肝实质细胞中整合素 $\alpha 5$ 组(Itga5-sgRNA)小鼠肝组织中整合素 $\alpha 5$ 及ALDH4A1的表达。黑色箭头所示肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 表达下降区域。B: ImageJ半定量分析对照组及敲减小鼠肝实质细胞中整合素 $\alpha 5$ 小鼠肝脏组织中整合素 $\alpha 5$ 的蛋白水平。C: ImageJ半定量分析对照组及敲减小鼠肝实质细胞中整合素 $\alpha 5$ 小鼠肝脏组织中ALDH4A1的蛋白水平。

A: the expression of integrin $\alpha 5$ and ALDH4A1 in the liver tissues of mice in the control group (Cas9) and the knockout group (Itga5-sgRNA) were analyzed by HE and immunohistochemical staining. The black arrow shows areas of decreased integrin $\alpha 5$ expression in hepatocytes. B: relative intensity of integrin $\alpha 5$ protein levels in the liver tissue of integrin $\alpha 5$ mice in control group and knockout mice hepatocytes was analyzed using ImageJ software. C: relative intensity of ALDH4A1 protein levels in the liver tissue of integrin $\alpha 5$ mice in control group and knockout mice hepatocytes was analyzed using ImageJ software.

图2 敲减小鼠肝实质细胞中Itga5上调肝脏组织ALDH4A1的蛋白水平

Fig.2 Knockdown of Itga5 in mouse hepatocytes resulted in upregulation of ALDH4A1 protein levels in liver tissue

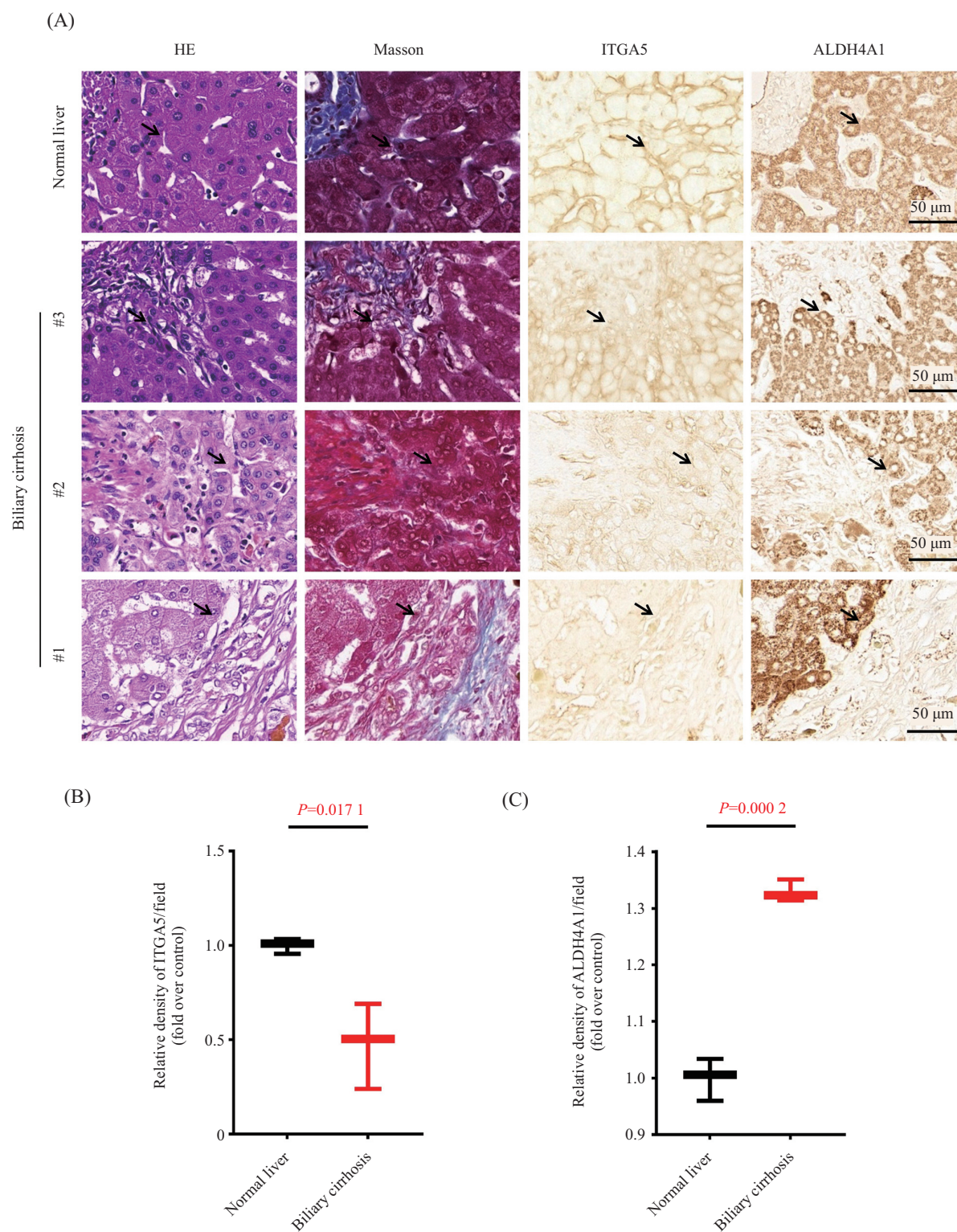
蛋白表达水平显著升高, ImageJ半定量分析并统计表明二者具有显著差异($P=0.0002$)。ALDH4A1蛋白表达水平上调区域伴大量胶原纤维沉积。结果表明, 肝脏疾病中肝实质细胞中ITGA5蛋白低表达区域的ALDH4A1蛋白表达水平增加。

2.4 敲减人肝实质细胞中ITGA5的表达上调ALDH4A1的表达

为探究敲减人肝实质细胞中ITGA5是否影响ALDH4A1的表达, 我们将ITGA5 siRNA与对照

siRNA分别转染至HepG2细胞中, 转染72 h后, 利用实时定量RT-PCR分析细胞中ITGA5和ALDH4A1的mRNA水平。结果表明, 与对照siRNA组相比, ITGA5 siRNA处理组HepG2细胞中ITGA5的mRNA水平降低了60%~70%(图4A), ITGA5 siRNA处理组HepG2细胞中ALDH4A1的mRNA水平显著上调, 差异有统计学意义(图4B)。

转染72 h后, 利用免疫细胞化学分析细胞中ITGA5和ALDH4A1的蛋白水平。结果表明, ITGA5

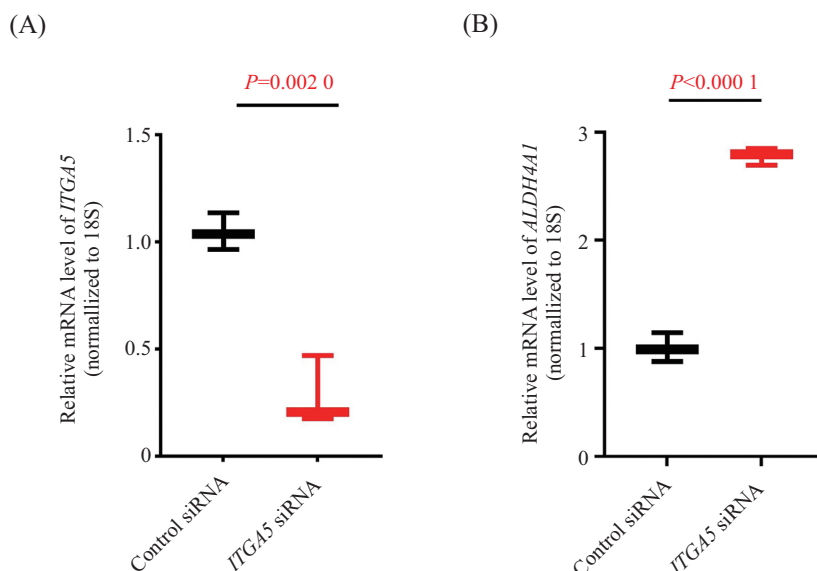


A: HE及免疫组织化学染色分析3例胆汁性肝硬化患者(biliary cirrhosis)及1例对照组(normal liver)肝组织中整合素 $\alpha 5$ 及ALDH4A1的表达。黑色箭头所示肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 表达下调区域。#表示供体; ITGA5: 整合素 $\alpha 5$ 。B: ImageJ半定量分析肝实质细胞中整合素 $\alpha 5$ 的蛋白水平。C: ImageJ半定量分析肝实质细胞中ALDH4A1的蛋白水平。

A: HE and immunohistochemical staining were used to analyze the expression of integrin $\alpha 5$ and ALDH4A1 in the liver tissues of 3 patients with biliary cirrhosis and 1 control case. The black arrow shows areas of decreased integrin $\alpha 5$ expression in hepatocytes. # represents a donor; ITGA5: integrin $\alpha 5$. B: relative intensity of integrin $\alpha 5$ protein levels in hepatocytes was analyzed using ImageJ software. C: relative intensity of ALDH4A1 protein levels in hepatocytes was analyzed using ImageJ software.

图3 胆汁性肝硬化患者肝组织中ALDH4A1表达水平增加

Fig.3 The expression of ALDH4A1 was increased in liver tissues of patients of biliary cirrhosis



A: 实时定量RT-PCR分析ITGA5 siRNA和对照siRNA处理HepG2中ITGA5的mRNA水平。B: 实时定量RT-PCR分析ITGA5 siRNA和对照siRNA处理HepG2中ALDH4A1的mRNA水平。

A: the mRNA level of ITGA5 in control siRNA treated HepG2 and ITGA5 siRNA HepG2 was analyzed by Real-time RT-PCR. B: the mRNA level of ALDH4A1 in control siRNA treated HepG2 and ITGA5 siRNA HepG2 was analyzed by Real-time RT-PCR.

图4 敲减人肝实质细胞HepG2中整合素 $\alpha 5$ 上调ALDH4A1的mRNA水平

Fig.4 Knockdown of integrin $\alpha 5$ in human hepatocytes HepG2 resulted in upregulation of ALDH4A1 mRNA levels

siRNA处理组 HepG2细胞中 ALDH4A1的蛋白水平显著上调(图5A), 差异有统计学意义(图5B)。综上所述, 敲减人肝实质细胞中ITGA5的表达可上调ALDH4A1的表达。

3 讨论

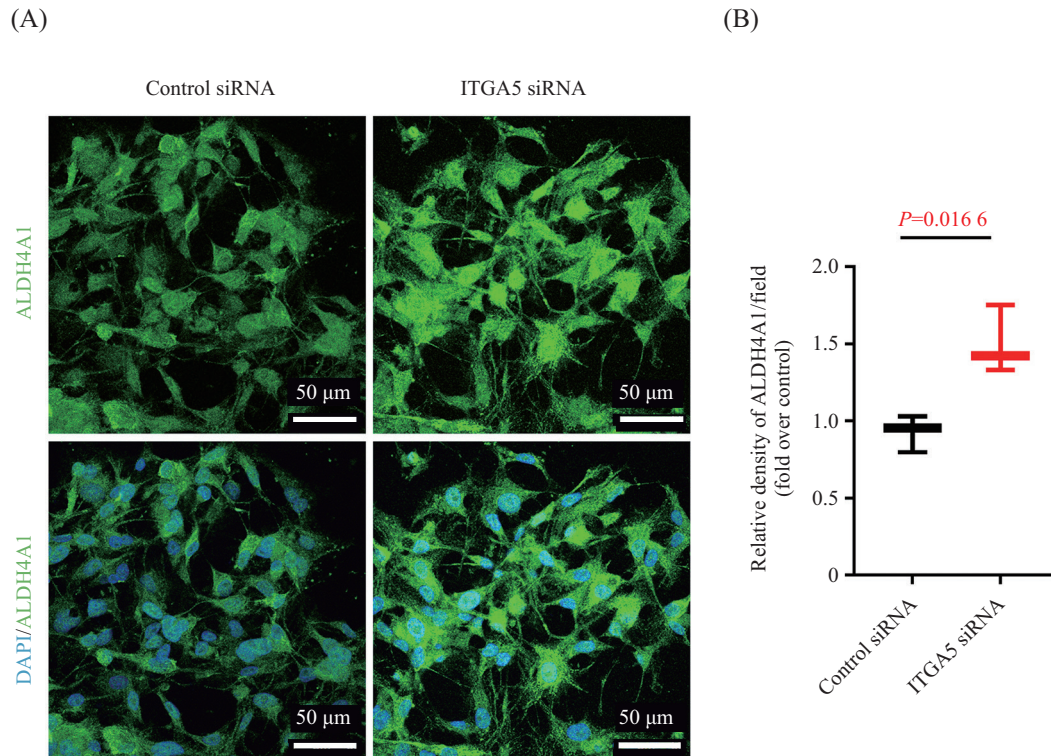
本研究表明, 在胆汁性肝硬化患者肝脏组织中, 细胞外基质增加区域伴随整合素 $\alpha 5$ 表达下调以及ALDH4A1表达上调; 抑制肝实质细胞中整合素 $\alpha 5$ 的表达通过调节ALDH4A1基因启动子羟甲基化水平上调ALDH4A1的表达。由此推测, 肝脏细胞外基质增加可能通过其受体整合素 $\alpha 5$ 调节ALDH4A1的表达。

整合素是一类细胞表面的细胞外基质受体蛋白, 由 α 和 β 两个亚基通过非共价键连接组成的异二聚体。当整合素与细胞外基质结合后, 通过细胞内结构域的构象改变激活细胞内的多种信号通路^[8], 并调节许多基本的细胞过程, 包括分化、迁移、增殖和血管生成。HERRMANN等^[9]研究表明, ECM-整合素 $\alpha 6$ 相互作用通过STAT3-TET3轴调节胶质瘤干细胞重要基因的羟甲基化, 从而增加胶质瘤干细胞的致瘤性和对治疗的耐药性。我们前期研究表明, 整合素 $\alpha 5$ 可通过SRC-TET1介导的DNA羟甲基

化调节肝脏紧密连接蛋白Claudin1的表达^[2]。通过对特异靶向敲减肝实质细胞整合素 $\alpha 5$ 小鼠肝脏组织DNA羟甲基化测序数据深入挖掘我们发现, 整合素 $\alpha 5$ 的表达下调与ALDH4A1基因启动子的羟甲基化水平升高有一定的相关性。

ALDH4A1的主要作用是将L-谷氨酸- γ -半醛(L-glutamate- γ -semialdehyde, GSAL)转化为谷氨酸^[4]。谷氨酸可进一步转化为 α -酮戊二酸(alpha-ketoglutarate, α -KG), 并将碳转移到三羧酸循环中, 而将氮转移到氮循环中^[4]。TET家族的三个TET酶(TET1、TET2和TET3)都具有Fe²⁺和 α -酮戊二酸依赖性的二氧合酶活性, 催化DNA去甲基化的第一步, 将5-甲基胞嘧啶(5mC)转化为5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)^[10]。推测ALDH4A1表达上调与TET酶活性及DNA羟甲基化有关一定的相关性。

最近研究表明, 动脉粥样硬化小鼠和患者血清中ALDH4A1浓度增加, 提示ALDH4A1具有作为疾病生物标志物的潜力^[11]。ST段抬高型心肌梗死患者血浆和冠状动脉血栓中ALDH4A1水平升高^[12]。但目前ALDH4A1表达变化与肝脏疾病的相关性研究甚少。我们研究发现, 胆汁性肝硬化患者肝组织切片中, 肝损伤区域ALDH4A1蛋白表达水平明显升高, 但ALDH4A1能否作为肝损伤的生物标志物仍需深入探究。



A: 免疫细胞化学染色分析ALDH4A1在ITGA5 siRNA和对照处理的HepG2中的表达。B: ImageJ半定量分析ALDH4A1在ITGA5 siRNA和对照处理的HepG2中的蛋白水平。

A: the expression of ALDH4A1 in control siRNA treated HepG2 and ITGA5 siRNA treated HepG2 was analyzed by immunocytochemical staining. B: relative intensity of ALDH4A1 protein levels in hepatocytes was analyzed using ImageJ software.

图5 敲减HepG2细胞中整合素 $\alpha 5$ 上调ALDH4A1的蛋白水平

Fig.5 Knockdown of integrin $\alpha 5$ in human hepatocytes HepG2 resulted in upregulation of ALDH4A1 protein levels

参考文献 (References)

- [1] PAGE A, PAOLI P, SALVADOR E M, et al. Hepatic stellate cell transdifferentiation involves genome-wide remodeling of the DNA methylation landscape [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(3): 661-73.
- [2] MA Y J, ZHANG W T, LI W H, et al. $\alpha 5$ integrin regulates hepatic tight junctions through SRC-TET1-mediated DNA hydroxymethylation [J]. *iScience*, 2022, doi: 10.1016/j.isci.2022.105611.
- [3] MUZIO G, MAGGIORA M, PAIUZZI E, et al. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(4): 735-46.
- [4] GENG P, QIN W, XU G. Proline metabolism in cancer [J]. *Amino Acids*, 2021, 53(12): 1769-77.
- [5] RYU K W, FUNG T S, BAKER D C, et al. Cellular ATP demand creates metabolically distinct subpopulations of mitochondria [J]. *Nature*, 2024, 635(8039): 746-54.
- [6] GAO Q, ZHU H W, DONG L Q, et al. Integrated proteogenomic characterization of HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. *Cell*, 2019, 179(2): 561-77.e22.
- [7] CHOI W M, KIM H H, KIM M H, et al. Glutamate signaling in hepatic stellate cells drives alcoholic steatosis [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(5): 877-89.e7.
- [8] HYNES R O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines [J]. *Cell*, 2002, 110(6): 673-87.
- [9] HERRMANN A, LAHTZ C, SONG J, et al. Integrin $\alpha 6$ signaling induces STAT3-TET3-mediated hydroxymethylation of genes critical for maintenance of glioma stem cells [J]. *Oncogene*, 2020, 39(10): 2156-69.
- [10] JOSHI K, LIU S, BRESLIN S J P, et al. Mechanisms that regulate the activities of TET proteins [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, doi: 10.1007/s00018-022-04396-x.
- [11] LORENZO C, DELGADO P, BUSSE C E, et al. ALDH4A1 is an atherosclerosis auto-antigen targeted by protective antibodies [J]. *Nature*, 2021, 589(7841): 287-92.
- [12] LI J, CHEN R, ZHOU J, et al. Atherosclerotic autoantigen ALDH4A1 as a novel immunological indicator for plaque erosion in patients with st segment elevated myocardial infarction [J]. *Thromb Haemost*, 2024, 124(6): 584-94.