

## 论著·基础研究

## 组蛋白乙酰化在 IgA 肾病发病中的作用

戴 芹<sup>1</sup>, 王伟铭<sup>2</sup>

1. 复旦大学附属中山医院徐汇医院肾内科, 上海 200031; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院肾内科, 上海 200025

**[摘要]** **目的**·研究组蛋白乙酰化修饰在 IgA 肾病 (IgA nephropathy, IgAN) 发病机制中的作用, 从表观遗传学角度探讨 IgAN 的发病机制。**方法**·纳入原发性 IgAN 患者 (IgAN 组) 30 例, 对照组 19 例 (血液样本对照组 16 例, 正常肾组织样本对照组 3 例)。收集外周静脉血提取单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 用于检测。ELISA 法检测 IgAN 组及对照组 PBMC 中组蛋白 H3 和 H4 乙酰化水平。Real-time PCR 法检测 *P300*、*CREBBP*、*HDAC1-3*、*HDAC7*、*HDAC8*、*CIGALT1* 和 *ST6GALNAC2* mRNA 表达。染色质免疫共沉淀法检测 *CIGALT1* 和 *ST6GALNAC2* 基因启动子区组蛋白 H3 和 H4 乙酰化水平。免疫荧光法检测肾组织中 HDAC1 和 H3Ac 的蛋白表达量。采用 *t* 检验进行统计分析。**结果**·与对照组比较, IgAN 组组蛋白 H3 和 H4 乙酰化水平均显著升高 ( $P=0.035$ ,  $P=0.012$ ); IgAN 组 *P300*、*CREBBP*、*HDAC1*、*HDAC8* 和 *ST6GALNAC2* mRNA 的表达显著升高 ( $P=0.002$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.045$ ,  $P=0.012$ ), *HDAC2* 和 *CIGALT1* 的 mRNA 表达量显著下降 ( $P=0.035$ ,  $P=0.008$ ); IgAN 组 *CIGALT1* 基因启动子区域组蛋白 H3 和 H4 乙酰化程度显著降低 ( $P=0.043$ ,  $P=0.005$ ); *ST6GALNAC2* 基因启动子区域组蛋白 H3 和 H4 乙酰化程度均显著升高 ( $P=0.038$ ,  $P=0.021$ )。IgAN 患者肾小球及肾小管中 HDAC1 表达明显增多, 而 H3Ac 蛋白表达显著减少。**结论**·IgAN 患者存在组蛋白乙酰化修饰异常, 组蛋白乙酰化修饰可能通过调控糖基化酶基因表达, 从而参与 IgAN 的发病。

**[关键词]** IgA 肾病; 糖基化酶; 组蛋白乙酰化; 表观遗传学

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.08.010 **[中图分类号]** R593.9 **[文献标志码]** A

## Role of histone acetylation in the pathogenesis of IgA nephropathy

DAI Qin<sup>1</sup>, WANG Wei-ming<sup>2</sup>

1. Department of Nephrology, Xuhui hospital, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China; 2. Department of Nephrology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** **Objective**·To study the role of abnormal histone acetylation modification in the pathogenesis of IgA nephropathy (IgAN), and explore the pathogenesis of IgAN from the perspective of epigenetics. **Methods**·30 patients with primary IgAN and 19 healthy controls were included. Of the 19 controls, 16 cases were used to collect blood samples and 3 cases were used to collect normal renal tissues. Peripheral venous blood was collected to extract mononuclear cells (PBMC) for detection. The levels of histone H3 and H4 acetylation in PBMC of IgAN group and healthy control group were detected by ELISA. Real-time PCR was used to detect the mRNA expressions of *P300*、*CREBBP*、*HDAC1-3*、*HDAC7*、*HDAC8*、*CIGALT1* and *ST6GALNAC2*. The acetylation levels of histone H3 and H4 in promoter regions of *CIGALT1* and *ST6GALNAC2* were detected by chromatin immunoprecipitation (CHIP). The protein expression of HDAC1 and H3Ac was detected by immunofluorescence. *T*-test was used for statistical analysis. **Results**·Compared with the healthy control group, the acetylation levels of H3 and H4 in IgAN group were significantly higher than those in healthy control group ( $P=0.035$ ,  $P=0.012$ ); the mRNA expressions of *P300*、*CREBBP*、*HDAC1*、*HDAC8* and *ST6GALNAC2* were significantly increased in IgAN group ( $P=0.002$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.045$ ,  $P=0.012$ ); the mRNA expressions of *HDAC2* and *CIGALT1* were decreased significantly ( $P=0.035$ ,  $P=0.008$ ); the acetylation degree of H3 and H4 in *CIGALT1* promoter region was significantly decreased ( $P=0.043$ ,  $P=0.005$ ), the degree of H3 and H4 acetylation in the promoter region of *ST6GALNAC2* gene was increased significantly in IgAN group ( $P=0.038$ ,  $P=0.021$ ); immune fluorescent results of renal tissue indicated that the HDAC1 protein expression was increased obviously, and H3Ac protein expression was significantly reduced in the renal tissue of IgAN patients. **Conclusion**·Abnormal acetylation modification exists in IgAN patients. Histone acetylation modification may participate in the pathogenesis of IgAN by regulating the expression of glycosylase gene.

**[Key words]** IgA nephropathy; glycosylase; histone acetylation; epigenetics

**[基金项目]** 上海市卫健委课题 (201640045); 上海市高级中西医结合人才培养项目 [ZY(2018-2020)-RCPY-2020]; 上海市徐汇区卫生健康系统人才培养项目 (xhxtc2019-2021)。

**[作者简介]** 戴 芹 (1978—), 女, 副主任医师, 博士; 电子信箱: dai11qin@sina.com。

**[通信作者]** 王伟铭, 电子信箱: wweiming@medmail.com.cn。

**[Funding Information]** Project of Shanghai Municipal Health Commission (201640045); Shanghai Senior Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Talents Training Project [ZY(2018-2020)-RCPY-2020]; Personnel Training Project of Health System in Xuhui District of Shanghai (xhxtc2019-2021)。

**[Corresponding Author]** WANG Wei-ming, E-mail: wweiming@medmail.com.cn。



IgA 肾病 (IgA nephropathy, IgAN) 是全世界最常见的肾小球疾病,也是引起肾衰竭的重要病因<sup>[1]</sup>, IgAN 更是导致年轻人终末期肾病的最常见原因<sup>[2]</sup>。半乳糖缺乏的 IgA1 (galactose deficient IgA1, Gd-IgA1) 是导致 IgAN 最关键的致病因素,血浆 Gd-IgA1 被认为是能够预测 IgAN 预后的重要指标,是 IgAN 重要的早期诊断和临床预后生物学标志物<sup>[3]</sup>。但是, Gd-IgA1 产生的机制目前仍不清楚。表观遗传学在疾病发病中的作用受到日益关注,赖氨酸残基的翻译后乙酰化已成为所有真核生物中的关键调节机制<sup>[4]</sup>。为此,本研究从组蛋白乙酰化角度探索 IgAN 的发病机制。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

纳入 2014 年 1 月—2018 年 12 月于上海交通大学医学院附属瑞金医院肾内科住院的 IgAN 患者 30 例。纳入标准:①新确诊的原发性 IgAN 患者。②之前从未用过激素、免疫抑制剂等治疗。③年龄 15 ~ 65 岁。④慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 1 ~ 4 期的患者。排除标准:①因肿瘤、高血压、代谢性疾病 (如糖尿病)、乙肝、自身免疫性疾病 (如红斑狼疮、甲亢等)、遗传性肾病、系统性血管炎等继发性因素引起者。②肝功能指标异常者。③妊娠或哺乳期妇女。④有感染或应激情况存在者。⑤严重心血管疾病如心功能不全、恶性高血压、心律失常者。⑥ CKD5 期及已经肾替代治疗者。研究获得医院伦理委员会批准 (批号为 No.2013-29), 所有研究对象均签署知情同意书。

### 1.2 材料、试剂与仪器

**1.2.1 材料** IgAN 组血液样本来源于医院住院患者,对照组的血液样本来自瑞金医院体检中心的健康者。收集 IgAN 患者 (30 例) 及对照组 (血样本 16 例) 外周血各 15 mL 至肝素抗凝管。常温 1 500 × g 离心 15 min 后的沉淀物用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 1:1 稀释后充分混匀,用 Ficoll 法<sup>[5]</sup>分离外周血单个核细胞,将单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 约 4 × 10<sup>6</sup>/管,分装至 500 μL EP 管中。

IgAN 组肾组织来自于医院肾内科的患者经皮肾穿刺标本,对照组肾组织样本来源于泌尿外科肾癌患者 (3 例) 经手术切除后留取的癌旁正常肾组织。

**1.2.2 主要试剂** RNA (Trizol) 提取液 (美国 Invitrogen), qRT-PCR 逆转录试剂盒 (美国 Invitrogen), 人外周血淋巴

细胞分离液 (上海普飞), AxyPrep PCR 纯化试剂盒 (美国 Axygen), 染色质免疫共沉淀试剂盒 (美国 Millipore), 组蛋白 H3 乙酰化水平检测试剂盒 (美国 EPIGENTEK), 组蛋白 H4 乙酰化水平检测试剂盒 (美国 EPIGENTEK), cy3- 山羊抗兔 (英国 Abcam), 488-Alex- 山羊抗小鼠 (英国 Abcam), 抗 HDAC1 抗体 (CHIP 级, 英国 Abcam), 抗 H3Ac 抗体 (ChIP 级, 英国 Abcam), 抗 H4Ac 抗体 (CHIP 级, 英国 Abcam), EpiQuik™ 总的组蛋白提取试剂盒 (美国 Epigentek), 蛋白酶 K (上海生工), RNase A (上海生工), 蛋白酶抑制剂复合物 (上海生工), PCR 引物均由铂尚生物技术 (上海) 有限公司合成, 其他试剂均为分析纯产品。

**1.2.3 仪器** 低温离心机 (德国 Eppendorf), 台式微量高速离心机 (德国 Eppendorf), 纯水机 (美国 Millipore), 酶标仪 (美国 Bio-Rad), 倒置相差显微镜及计算机成像系统 (日本尼康), 梯度 PCR 仪 (美国 MJ-research), Opticon 2 荧光实时定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad), 石蜡切片机 (德国 Leica), 微量核酸蛋白定量仪 NanoDrop ND-1000 (美国 NanoDrop)。

### 1.3 方法

**1.3.1 提取组蛋白** 从 -80 °C 冰箱中取出 1 管 “1.2.1” 制备的 PBMC, 冰上融化; 预裂解液裂解 10 min 后低温离心 1 min, 弃去上清; 用 100 μL 的裂解液重悬细胞, 冰孵 30 min; 超声破碎仪 10 Hz 超声 10 s; 低温离心 1 min, 收集上清 (含有酸溶解的蛋白) 至 1 支新的 EP 管内; 立即加 30 μL 的 DTT 平衡液至上清中, 将提取的组蛋白分装后于 -80 °C 冰箱保存。

**1.3.2 ELISA 法检测** 将 “1.3.1” 提取的组蛋白按照试剂盒的说明书步骤调节浓度, 设立空白对照孔、阳性对照孔及样品检测孔, 依次加入一抗、二抗, 最后显色, 观察到样本孔及标准品孔变蓝, 每孔加入 50 μL 终止液终止反应, 在酶标仪 450 nm 波长处读各孔的 OD 值。

**1.3.3 Real-time PCR 检测** 取 “1.2.1” 收集的 PBMC, 通过酚-氯仿法提取总 RNA。根据反转录试剂盒说明书步骤, 将相关试剂与 10 μL 总 RNA 均匀混合 (总体积为 20 μL), 进行反转录, 4 °C 冰箱保存反转录产物。用 real-time PCR 试剂盒相关试剂与 2 μL 反转录产物混合均匀进行 PCR 扩增。反应条件: 50 °C 2 min; 95 °C 预变性 5 min, 1 个循环; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 1 min, 共计 40 个循环; 72 °C 终末延伸 5 min。根据 real-time PCR 原始检测结果, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对定量计算公式计算出各样品目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列  
Tab 1 Primer sequence for real-time PCR

Gene	Sequence (5'→3')
GAPDH	GGAGTCCACTGGCGTCTTC
	GGCATTGCTGATGATCTTGAGG
HDAC1	CGCTCCATCCGTCCAGATAAC
	TTGCCACAGAACCACCACTAG
HDAC2	AACCGACAACAGACTGATATGGC
	TAGTAATTCAAGGATGGCAAGCAC
HDAC3	TCTACTCGTGCTGGGTGGTG
	TCTGGATGAAGTGTGAAGTCTGG
HDAC7	TGACGACGGCAACTTCTTCC
	GCATCACGACTATCCTGAAAGC
HDAC8	TGTTATCTCAATGATGCTGTCCTG
	GGTGAAACTGAATGCGTCTTCTAC
CREBBP	GAGGGCTTTGGTTCGGTATGG
	TGCGAAGGAGATGTTGACTGAG

**1.3.4 染色质免疫共沉淀** 染色质免疫共沉淀法 (chromatin immunocoprecipitation, ChIP) 用于检测各种组蛋白修饰相关的基因组的特定位点, 提示组蛋白修饰的对象。甲醛交联活细胞的蛋白质和相关的染色质后裂解, 染色质-蛋白复合物经超声打断或酶切为约 500bp 的 DNA 片段, 分别用抗 H3Ac 抗体和 H4Ac 抗体将目的蛋白-染色质复合物从细胞碎片中分离出来, 纯化、分离出 DNA 片段, 测定其序列, 获得蛋白质与 DNA 相互作用的信息。

**1.3.5 ChIP-qPCR 检测** ChIP-qPCR 检测半乳糖基转移酶 (core 1β1, 3-galactosyltransferase, *C1GALT1*) 和唾液酸转移酶 (α-N-acetylgala-ctosaminide α-2, 6-sialyltransferase 2, *ST6GALNAC2*) 启动子区 H3 和 H4 乙酰化水平: 使用基因启动子区特异的引物扩增 *C1GALT1* 和 *ST6GALNAC2* 启动子区域, 以 10μL 体系进行 real time-PCR 扩增, 以对应的 input 为对照。每次实验设 3 个复孔, 重复 3 次。启动子区引物序列见表 2。

表 3 研究对象的基本特征比较  
Table 3 Comparison of basic characteristics of the experimental groups

Indicate	Control group (n=19)	IgAN group (n=30)	$t/\chi^2$	P 值
Age/year	36.7±11.4	36.5±10.5	0.063	0.950
Male/n (%)	10 (56.3)	16 (53.3)	1.440	0.230
Hb/(g·L <sup>-1</sup> )	125.6±14.7	124.3±15.2	0.295	0.769
BUN/(mmol·L <sup>-1</sup> )	4.5±1.7	6.8±3.5	2.665	0.011
Scr/(μmol·L <sup>-1</sup> )	63.7±19.2	109.6±56.0	3.436	0.001
Alb/(g·L <sup>-1</sup> )	43.7±5.9	39.8±5.8	2.278	0.027
Proteinuria/g	0.08 (0.010—0.013)	1.95 (0.105—8.362)	3.756	0.001
eGFR/(mL·min <sup>-1</sup> ·1.73 <sup>-1</sup> ·m <sup>-2</sup> )	104.9±26.7	79.7±34.5	2.708	0.009

**Note:** Hb—hemoglobin; BUN—blood urea nitrogen; Scr—serum creatinine; Alb—albumin; eGFR—estimated glomerular filtration rate.

表 2 *C1GALT1* 和 *ST6GALNAC2* 启动子区域引物序列  
Tab 2 Primer sequence of promoter region of *C1GALT1* and *ST6GALNAC2*

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>C1GALT1</i> pro	TACAGGCCACAAGATCCTCG
	CTCCGCATTCTGATCCTGC
<i>ST6GALNAC2</i> pro	CAAGCCCACTACCAGTCTCA
	CTCACAATCATGGCGGAAGG

**1.3.6 组织免疫荧光检测** IgAN 组和对照组肾组织样本的石蜡切片脱蜡至水后抗原修复, 分别加一抗 (抗 HDAC1 抗体、抗 H3Ac 抗体), 切片平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜; 加二抗, 避光室温孵育 60 min, 将玻片置于 PBS 中在摇床上洗 3 次, 5 min/次; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 复染细胞核, 避光室温孵育 10min 后洗 3 次, 5min/次。切片稍干后用抗荧光淬灭封片剂封片。切片于倒置相差显微镜下观察并采集图像。

1.4 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件分析数据, 采用 GraphPad Prism5.0 软件作图。符合正态分布的定量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 非正态分布的定量资料用  $M(Q_1, Q_3)$  表示, 定性资料用  $n(\%)$  表示。采用  $t$  检验和  $\chi^2$  检验进行比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基本特征

研究纳入 IgAN 组及对照组。IgAN 组为医院收治的 IgAN 患者 30 例; 血液样本的对照组为 16 例体检健康者, 肾组织样本的对照组为 3 例肾癌患者手术切除的癌旁正常肾组织。研究对象的基本特征见表 3。

2.2 组蛋白乙酰化修饰比较

2 组 PBMC 中组蛋白乙酰化修饰的比较结果见表 4。与对照组相比, IgAN 组组蛋白 H3 乙酰化水平明显升高 ( $P=0.035$ ), H4 乙酰化水平明显升高 ( $P=0.012$ )。

表 4 IgAN 组与对照组的 PBMC 组蛋白乙酰化修饰  
Tab 4 Level of acetylation of histone in PBMC of IgAN group and control group

Indicator	Control group (n=16)	IgAN group (n=30)	t	P value
H3 Acetylation percentage/%	22.92 ± 1.55	30.84 ± 2.51	2.18	0.035
H4 Acetylation percentage/%	2.91 ± 0.38	7.05 ± 1.13	2.62	0.012

2.3 HAT、HDAC 及糖基化酶 mRNA 比较

2 组研究对象的组蛋白乙酰化相关酶 *HAT*、*HDAC* 及糖基化酶 mRNA 比较结果见图 1, real-time PCR 结果显示: IgAN 组组蛋白乙酰基转移酶 *P300*、*CREBBP* mRNA 的表达分别是对照组的 ( $2.81 \pm 0.39$ ) 倍 ( $P=0.002$ ), ( $2.44 \pm 0.27$ ) 倍 ( $P=0.001$ ), 见图 1A; 组蛋白去乙酰化酶 *HDAC1*、*HDAC2*、*HDAC3*、*HDAC7* 和 *HDAC8* mRNA 的表达分别是对照组的 ( $2.20 \pm 0.18$ ) 倍 ( $P=0.001$ ), ( $0.44 \pm 0.08$ ) 倍 ( $P=0.035$ ), ( $0.98 \pm 0.18$ ) 倍 ( $P=0.690$ ), ( $1.02 \pm 0.21$ ) 倍 ( $P=0.924$ ), ( $1.47 \pm 0.25$ ) 倍 ( $P=0.045$ ), 见图 1B; IgAN 组 *C1GALT1* mRNA 的表达是对照组的 ( $0.28 \pm 0.06$ ) 倍 ( $P=0.008$ ), *ST6GALNAC2* 的 mRNA 表达是对照组的 ( $2.88 \pm 0.60$ ) 倍 ( $P=0.012$ ), 见图 1C。

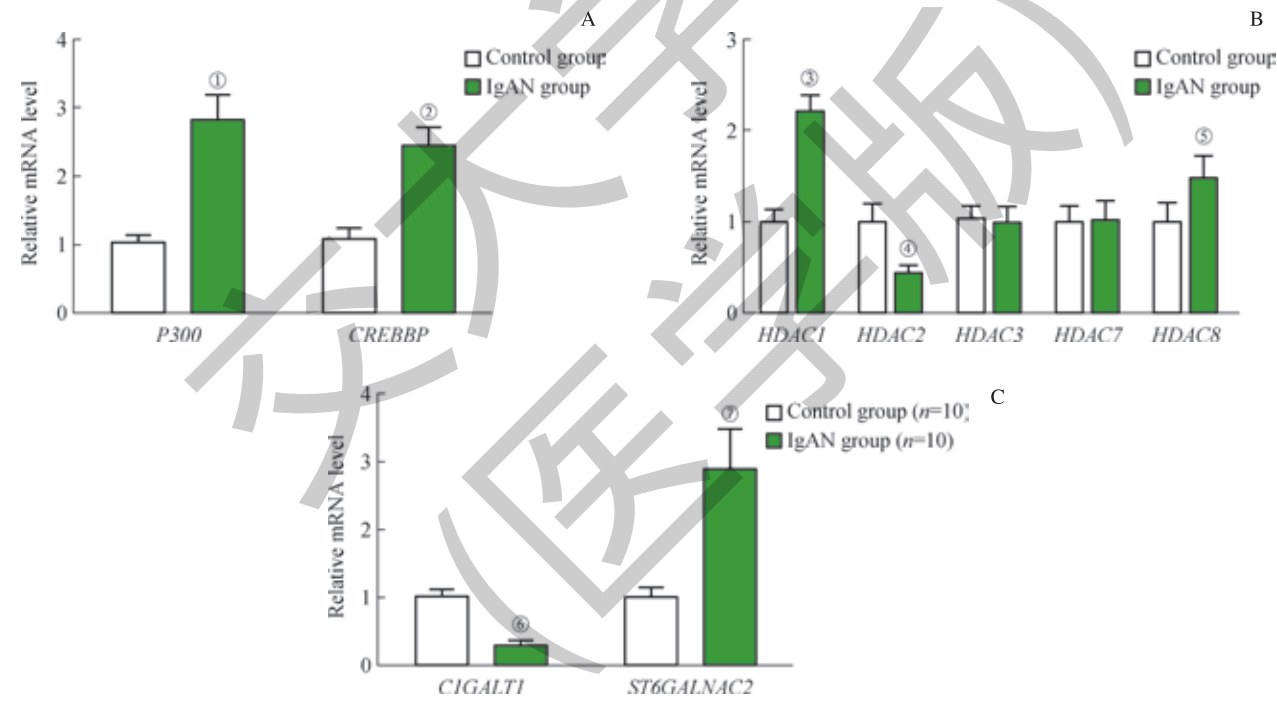
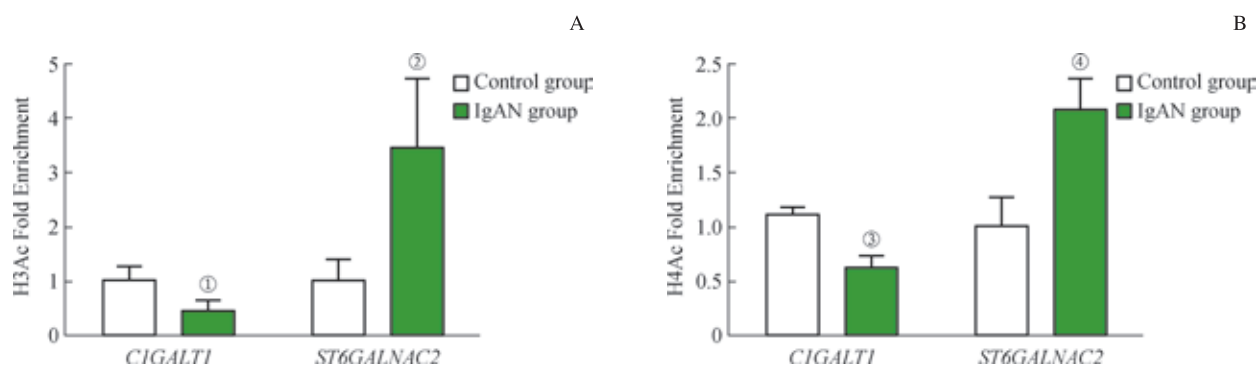


图 1 2 组乙酰化相关酶及糖基化酶 mRNA 表达  
Fig 1 mRNA expression of acetylation related enzyme and glycosylation enzyme in two groups

2.4 C1GALT1 和 ST6GALNAC2 启动子区组蛋白 H3 和 H4 乙酰化水平

用 ChIP 法检测基因启动子区乙酰化水平, 结果见图 2。对“1.3.4”方法获得的 DNA 样本及各自的 Input 使用引物扩增 *C1GALT1* 和 *ST6GALNAC2* 启动子区域, 结果显示: 与对照组相比, IgAN 组 *C1GALT1* 基因启动子区域组蛋白 H3 和 H4 乙酰化程度降低, 分别为 [ $(0.43 \pm 0.12)$  vs ( $1.00 \pm 0.16$ ),  $P=0.043$ ] 和 [ $(0.62 \pm 0.06)$  vs ( $1.07 \pm 0.05$ ),  $P=0.005$ ]; *ST6GALNAC2* 基因启动子区域组蛋白 H3 和 H4 乙酰化程度均显著升高, 分别为 [ $(3.42 \pm 0.76)$  vs ( $1.00 \pm 0.21$ ),  $P=0.038$ ] 和 [ $(2.07 \pm 0.17)$  vs ( $1.10 \pm 0.20$ ),  $P=0.021$ ]。





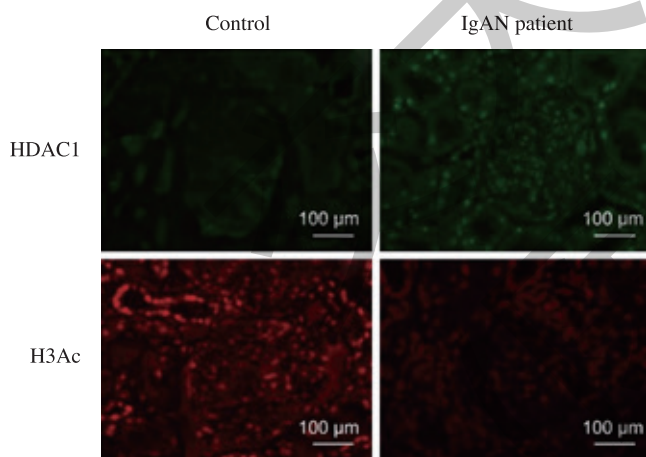
**Note:** A. Comparison of H3Ac enrichment in promoter region of glycosylase in two groups. B. Comparison of H4Ac enrichment in promoter region of glycosylase in two groups. ①  $P=0.043$ , ②  $P=0.005$ , ③  $P=0.038$ , ④  $P=0.021$ , compared with control group.

**图 2** *C1GALT1* 和 *ST6GALNAC2* 启动子区组蛋白 H3 和 H4 乙酰化水平

**Fig 2** H3/H4 acetylation at the *C1GALT1* and *ST6GALNAC2* gene promoter region

## 2.5 肾组织 HDAC1 和 H3Ac 蛋白表达情况

IgAN 患者肾组织与对照组的正常肾组织比较结果见图 3。结果显示, 正常肾组织肾小管以及肾小球间质中 HDAC1 表达都很少, 而 H3Ac 蛋白在肾小管和肾小球表达都较多。与癌旁正常肾组织相比, IgAN 组肾小球及肾小管中 HDAC1 表达明显增多, 而 H3Ac 蛋白表达显著减少, 肾组织呈低乙酰化状态。



**Note:** A. HDAC1 immunofluorescence results of glomeruli in control group. B. HDAC1 immunofluorescence results of glomeruli in IgAN group. C. H3Ac immunofluorescence results of glomeruli in control group. D. H3Ac immunofluorescence results of glomeruli in IgAN group.

**图 3** IgAN 组与正常肾组织中 HDAC1 和 H3Ac 蛋白表达情况 (免疫荧光染色)

**Fig 3** Expression of HDAC1 and H3Ac protein in renal tissue (IF)

## 3 讨论

IgAN 是最常见的肾脏疾病, 以肾小球区 IgA 沉积为特征<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>发现在 IgAN 患者冷冻肾组织中均含有 Gd-IgA1 特异性 IgG 自身抗体, 这一发现提示了 Gd-IgA1 在 IgAN 发病机制中的重要性, 但 IgAN 发病机制至今尚

未清晰。组蛋白乙酰化修饰是表观遗传学的重要作用机制之一, 组蛋白乙酰化和去乙酰化修饰在肾脏的发育和肾脏疾病的发生过程中也起着多重作用<sup>[8-10]</sup>。本研究检测了 IgAN 患者及健康对照者 PBMC 中组蛋白乙酰化水平变化, 以及组蛋白乙酰化修饰酶 mRNA 表达变化。研究发现 IgAN 患者组蛋白 H3 和 H4 乙酰化水平较健康对照组均显著升高, 提示组蛋白乙酰化参与了 IgAN 的发病过程。组蛋白乙酰化和去乙酰化受组蛋白乙酰化相关酶 HAT 和 HDAC 调控。HAT 的主要作用是“打开”染色质结构, 促进基因的转录。HDAC 是一类通过去除组蛋白 (和非组蛋白的蛋白) 赖氨酸 ε-氨基上的乙酰化基团, 引起染色质结构凝聚从而抑制基因表达的蛋白<sup>[11-12]</sup>。染色质通过其相对“打开”和“关闭”的形式调控着基因的表达<sup>[13]</sup>。

本研究应用 real-time PCR 法检测了 2 组研究对象 PBMC 中 *HAT* 和 *HDAC* 的 mRNA 表达水平。结果显示 IgAN 组 *HAT* 均出现了显著上调, 组蛋白去乙酰化酶 *HDAC1* 和 *HDAC8* mRNA 的表达显著上调, *HDAC2* mRNA 的表达显著下调。由此可见, IgAN 患者 PBMC 中 H3 和 H4 乙酰化水平升高是 *HAT* 和 *HDAC* 共同调控的结果。为了明确 IgAN 肾组织乙酰化修饰情况, 我们应用组织免疫荧光技术检测了肾小球中 HDAC1 和 H3Ac 的蛋白表达。研究发现正常肾组织中肾小球中 HDAC1 表达很少, 而 H3Ac 蛋白表达较多。与正常肾组织相比, IgAN 患者的肾小球中 HDAC1 明显上调, 而 H3Ac 蛋白显著减少, 呈低乙酰化状态。由此可见, 组蛋白乙酰化修饰参与了 IgAN 的发病过程。我们在前期研究中应用 IgA 肾病患者来源的聚合 IgA1 (P-aIgA1) 干预人系膜细胞, 发现 P-aIgA1 能够显著促进系膜细胞合成细胞外基质, 上调纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-1) 的表达, 而且系膜细胞中 HDAC1、HDAC2、HDAC8 均显著升高; 应用 HDAC 抑

制剂丙戊酸钠干预后可以显著下调 HDAC1 的表达, 上调 H3Ac 的表达, 提高系膜细胞乙酰化水平, 显著减轻了细胞外基质的合成<sup>[14]</sup>。上述研究进一步表明组蛋白乙酰化不仅参与了 IgA 肾病的发病过程, 而且可以被逆转。

IgA1 糖基化异常是 IgAN 发病过程中重要环节<sup>[3]</sup>。本研究结果显示 IgAN 组 *C1GALT1* mRNA 的表达显著减少, *ST6GALNAC2* 的 mRNA 表达显著增多, 与 Suzuki 等<sup>[1]</sup> 研究结果一致, 但导致这 2 个糖基化酶基因表达异常的机制尚未清晰。为了进一步明确 *C1GALT1* 和 *ST6GALNAC2* 的 mRNA 表达水平发生变化的机制, 我们应用 ChIP 的方法检测了上述 2 个基因启动子区的 H3 和 H4 乙酰化水平。结果显示 IgAN 组 *C1GALT1* 基因启动子区 H3 和 H4 乙酰化较健康对照组均显著下降; *ST6GALNAC2* 基因启动

子区的 H3 和 H4 乙酰化水平较健康对照组均显著升高。*C1GALT1* 基因启动子区的 H3 和 H4 乙酰化水平下降后导致染色质呈相对“关闭”状态, 从而抑制了 *C1GALT1* 基因的表达。*ST6GALNAC2* 基因启动子区的 H3 和 H4 乙酰化水平较正常人升高, 导致染色质呈相对“开放”状态, 从而促进了 *ST6GALNAC2* 基因的表达, 2 个基因的异常导致了 IgA1 的糖基化异常。

综上所述, 我们观察 IgAN 患者 PBMC 和肾组织中组蛋白乙酰化修饰水平, 发现 IgAN 都存在乙酰化修饰异常。本研究还发现组蛋白乙酰化参与调控糖基化酶的基因表达, 并从表观遗传学角度对 IgAN 发病机制进行了探讨。组蛋白乙酰化的可逆性提示其在疾病的干预治疗方面有重要前景, 为 IgAN 的治疗提供了新的思路。

## 参·考·文·献

- [1] Suzuki H, Raska M, Yamada K, et al. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes[J]. J Biol Chem, 2014, 289(8): 5330-5339.
- [2] Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides[J]. Lancet, 2016, 387(10032): 2036-2048.
- [3] Wada Y, Matsumoto K, Suzuki T, et al. Clinical significance of serum and mesangial galactose-deficient IgA1 in patients with IgA nephropathy[J]. PLoS One, 2018, 13(11): e0206865.
- [4] Ali I, Conrad RJ, Verdin E, et al. Lysine acetylation Goes global: from epigenetics to metabolism and therapeutics[J]. Chem Rev, 2018, 118(3): 1216-1252.
- [5] Capece D, Fischietti M, Verzella D, et al., The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 187204.
- [6] Holdsworth S, Gan P Y, Kitching A R, Biologics for the treatment of autoimmune renal diseases[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(4): 217-231.
- [7] Rizk DV, Saha MK, Hall S, et al. Glomerular immunodeposits of patients with IgA nephropathy are enriched for IgG autoantibodies specific for galactose-deficient IgA1[J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(10): 2017-2026.
- [8] Chen SW, Bellew C, Yao X, et al. Histone deacetylase (HDAC) activity is critical for embryonic kidney gene expression, growth, and differentiation[J]. J Biol Chem, 2011, 286(37): 32775-32789.
- [9] Bush EW, McKinsey TA. Protein acetylation in the cardiorenal Axis: the promise of histone deacetylase inhibitors[J]. Circ Res, 2010, 106(2): 272-284.
- [10] Hadden MJ, Advani A. Histone deacetylase inhibitors and diabetic kidney disease[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): E2630.
- [11] Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases[J]. Annu Rev Biochem, 2001, 70: 81-120.
- [12] Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, et al. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 983: 84-100.
- [13] Quintero-Ronderos P, Montoya-Ortiz G. Epigenetics and autoimmune diseases[J]. Autoimmune Dis, 2012, 2012: 593720.
- [14] Dai Q, Liu J, Du YL, et al. Histone deacetylase inhibitors attenuate P-aIgA1-induced cell proliferation and extracellular matrix synthesis in human renal mesangial cells *in vitro*[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(2): 228-234.

[收稿日期] 2019-09-19

[本文编辑] 徐 敏