

P300 介导 VEGF 下调致孕期酒精暴露模型子代小鼠宫内生长受限^{*}

倪美艳¹ 王一清² 付虎¹ 向龙¹ 周瑜³

(1. 成都市第一人民医院新生儿科, 四川 成都 610016; 2. 成都市第一人民医院产科, 四川 成都 610016;

3. 四川大学华西第二医院儿童重症医学科, 四川 成都 610041)

【摘要】 目的 探讨 P300 介导血管内皮生长因子(VEGF)下调致孕期酒精暴露模型子代小鼠宫内生长受限的可能机制。**方法** 选取 SPF 级 c57 小鼠 60 只。按照雌雄 2:1 合笼, 次日清晨观察雌鼠阴栓, 有阴栓者即为妊娠成功(妊娠成功 30 只), 记妊娠 0.5 d, 即胎鼠胎龄 E 0.5 d。此时开始给予酒精灌胃(5 μ L/g/d 50% 乙醇)建立胎儿酒精综合征(FAS)模型设为实验组, 另设对照组(予生理盐水灌胃), 实验组及对照组每组各 12 只[6 只雌鼠因灌胃失败未纳入实验]。检测出生体质量; 利用化学比色法测定胎盘组织中组蛋白乙酰化酶活性; 利用荧光测定法测定胎盘组织中组蛋白去乙酰化酶活性; 定量 PCR 检测组蛋白乙酰化酶 p300 和 PCAF 表达, 定量 PCR 和 Western blot 检测 VEGF 表达; ChIP-PCR 技术检测 p300 与 VEGF 启动子结合水平。**结果** 与对照组相比, 实验组小鼠出生体质量显著降低($P < 0.01$), 且存在出生后生长发育迟缓; 实验组小鼠胎盘中组蛋白乙酰化酶活性较对照组明显下降($P < 0.05$), 而去乙酰化酶活性两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 实验组小鼠胎盘中 p300、VEGF 表达较对照组明显下降($P < 0.05$); ChIP-PCR 发现, 与对照组相比, 实验组 p300 与 VEGF 启动子结合水平显著降低($P < 0.05$)。**结论** 孕期酒精暴露通过 p300 介导组蛋白乙酰化修饰下调胎盘组织中 VEGF 表达, 进而引起子代宫内发育受限。

【关键词】 胎儿酒精综合征; p300; 血管内皮生长因子; 宫内生长受限

【中图分类号】 R363.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 02. 009

Possible mechanism of intrauterine growth restriction in offspring mice induced by alcohol exposure during pregnancy

NI Meiyang¹, WANG Yiqing², HU Fu¹, XIANG Long¹, ZHOU Yu³

(1. Department of Pediatrics, The First Hospital of Chengdu, Chengdu 610016, China;

2. Department of Obstetrics, The First Hospital of Chengdu, Chengdu 610016, China;

3. Department of PICU, West China Second University Hospital, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective To explore the possible mechanism of intrauterine growth restriction in offspring mice induced by alcohol exposure during pregnancy. **Methods** 60 SPF grade c57 mice were selected. According to the male and female cages at a ratio of 2:1, the vaginal plugs of the female mice were observed in the early morning of the next day. Those with vaginal plugs were considered as successful pregnancy, and the pregnancy was recorded as 0.5 days, that is, the gestational age of the fetal mice was E0.5 days. At this time, alcohol gavage (5 μ L/g/d 50% ethanol) was started to establish a fetal alcohol syndrome (FAS) model, which was set as the experimental group, and another control group (gavage with normal saline) was established. 12 mice each [6 female mice were not included in the experiment due to failure of gavage]. The birth weight was detected. The activity of histone acetylase in placental tissue was determined by chemical colorimetry. The activity of histone deacetylase in placental tissue was determined by fluorescence assay. The expression of histone acetylase p300 and PCAF was detected by quantitative PCR. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was detected by quantitative PCR and Western blot. The binding level of p300 to VEGF promoter

基金项目:四川省科技厅重点研发项目(2020YFS0258)

通讯作者:周瑜, E-mail: 734340672@qq.com

引用本文:倪美艳,王一清,付虎,等. P300 介导 VEGF 下调致孕期酒精暴露模型子代小鼠宫内生长受限[J]. 西部医学, 2023, 35(2): 203-207.

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 02. 009

was detected by ChIP-PCR. **Results** Compared with the control group, the birth weight of the mice in the experimental group was significantly reduced ($P < 0.01$), and there was postnatal growth retardation. The intrauterine stillbirth rate in the experimental group was significantly increased ($P < 0.05$). Histone acetylase activity was significantly decreased ($P < 0.05$), while deacetylase activity had no significant difference between the two groups. p300 and VEGF expressions in placental tissue of alcohol-exposed mice were significantly decreased ($P < 0.05$). ChIP-PCR found that the binding level of p300 to the VEGF promoter was significantly reduced compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Alcohol exposure during pregnancy down-regulates the expression of VEGF in placental tissue through p300-mediated histone acetylation modification, thereby causing restriction of intrauterine growth in offspring.

【Key words】 Fetal alcohol syndrome; p300; Vascular endothelial growth factor; Intrauterine growth retardation

孕期酒精摄入可引起胎儿酒精综合征(Fetal alcohol syndrome, FAS),其主要以宫内发育迟缓、神经系统发育迟滞、心脏及颅面发育畸形为主要临床特征^[1-3]。目前存在饮酒习惯的女性人数日趋上升,有研究^[4]证实,即使在孕早期聚会饮酒也可导致 FAS 发生。因此 FAS 发生机制的探讨仍然十分重要。在 FAS 众多并发症中,出生低体重常被忽视,因为婴儿生后多数会出现体重追赶。但出生低体重提示胎儿宫内生长受限,目前肥胖、糖尿病、高血压等代谢性疾病与宫内发育相关的学说已被学者所接受,出生低体重与成年后代谢性疾病发生密切相关^[5-8]。已有研究^[9]发现孕期酒精暴露可致子代心脏发育过程中组蛋白乙酰化修饰紊乱,而 P300 是介导组蛋白乙酰化修饰的关键酶之一,其对基因转录调控的作用已为学者所公认^[10],因此 p300 介导的组蛋白修饰为 FAS 的病理机理研究提供新方向。孕期酒精摄入可致后代宫内发育迟缓而出现出生低体重,因此本研究构建了 FAS 模型小鼠,以组蛋白乙酰化修饰为研究切入点,探讨孕期酒精暴露致子代宫内生长受限的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型构建 选取 SPF 级 c57 小鼠(购于四川大学华西基础医学院动物中心)60 只。按照雌雄 2:1 合笼,次日清晨观察雌鼠阴栓,有阴栓者即为妊娠成功(妊娠成功 30 只),记妊娠 0.5 d,即胎鼠胎龄 E 0.5 d。此时开始给予孕鼠 50% 酒精灌胃,剂量为 5 μ L/g/d,连续灌胃 14 d,设为实验组,酒精灌胃剂量参照文献设定^[10-11],灌胃 14 d 后小鼠处于胚胎 14.5 d,此时期四腔心结构已形成;另设对照组,予生理盐水(0.9% NaCl)灌胃。实验组及对照组每组各 12 只(6 只雌鼠灌胃失败未纳入实验)。实验终点(E 19.5 d)利用二氧化碳(CO₂)处死实验动物,随即取出胎盘组织。本研究符合动物伦理要求,通过医院伦理委员会审核批准(批准号:2020028)。

1.2 主要试剂和仪器 100% 乙醇(Sigma 试剂,上海);抗 VEGF 小鼠抗体(Abcam, ab46154);抗 β -actin 小鼠抗体(Abcam, ab8227);ChIP 级抗 p300 小鼠抗

体(Abcam, ab54984)、染色质免疫共沉淀试剂盒(Abcam, ab500);HDAC 酶及 HAT 酶活性检测试剂盒(Biovision);二抗 IgG(Abcam190475);全蛋白提取试剂盒(凯基生物, KGP250);RNA 提取试剂盒(Solabio, R1200);逆转录试剂盒(Qiagen 205111);荧光定量 PCR 试剂盒(赛默飞 A25741)。

1.3 方法

1.3.1 检测 E19.5 d 胎鼠重量 孕鼠分娩期为妊娠后 20~21 d,故在妊娠 19.5 d,剖宫产获取胎鼠及胎盘组织。对 E19.5 d 胎鼠进行体重称量,小鼠生后每周称量体重至 4 周。本次研究中无早产小鼠。

1.3.2 化学比色法及荧光检测法 获取新鲜胎盘组织后随即予以匀浆,匀浆后按照 HDACs 和 HATs 活性测定试剂盒指示,对胎盘组织中 HATs 和 HDACs 活性进行检测。

1.3.3 实时定量 PCR 实验 按照 RNA 提取试剂盒说明提取组织中总 RNA,定量 1 μ g,进行逆转录获得 cDNA,进行后续荧光定量 PCR 实验。各基因引物序列:p300 上游 5'-GAGACGCATAGGAATTTGC-3'下游 5'-AGAGGCCTGGG TCTGACAT-3',产物 136 bp;PCAF 的上游 5'-ATACCTTCTCGGATGTCTGAT-3',下游 5'-TGGAGCTAACGATAAGTACCA-3',产物 133bp;VEGF 上游 5'-CGTGAATCAGTACACTAGT-3'下游 5'-ACTGCTTAAGTCGTGCTCATG-3',产物长度为 125 bp; β -actin 作为内参基因。Bio-Rad-CFX96 荧光定量 PCR 仪器“gene expression”模块(基于 Pfaffl 原理)对各基因相对 β -actin 表达量进行统计、分析。

1.3.4 Western blot 实验 利用前文所及全蛋白提取试剂盒对组织中总蛋白,利用 BCA 法进行标准曲线绘制,并计算各组蛋白浓度。SDS-聚丙烯酰胺凝胶选择浓度未 10%,蛋白上样量为 30 μ g,90v 电泳 30 min 后换电压至 120 v 电泳至溴酚蓝接近胶底部。250mA 湿转 1.5 h 至 0.22 μ m 的 PVDF 膜上。封闭液(5% 脱脂奶粉)1 h 后孵育一抗,4 $^{\circ}$ C 16 h;洗膜后孵育二抗(1:3000)1.5 h(室温),PBST 洗膜后发光成像。统

计各组条带灰度值,β-actin 为内参,计算蛋白的相对表达量(利用 Quantity one 软件)。

1.3.5 染色质免疫共沉淀(Chromatin immunoprecipitation,ChIP)实验 按试剂盒指示进行染色质免疫共沉淀实验:①称取胎盘组织 100 mg,充分匀浆,弃上清后加入 1%的甲醛进行交联反应。②利用超声将大片段 DNA 进行切割,片段长度介于 200~1000 bp 为宜。③加入 p300 ChIP 级抗体,在 4℃下沉淀目的 DNA。④65℃条件下进行逆转交联,并进行 DNA 纯化,所得 DNA 进行后续 PCR 实验。

1.3.6 ChIP-qPCR 实验 针对 VEGF 基因启动子区域利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计。引物 blast 比对无误后送公司合成。VEGF 的上游序列:5'-GCCGTAATTACGCTGGCTTACCA-3',下游序列:5'-CGCATATGACGCGATGACATGGT-3',产物大小为 169 bp。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件包进行统计学分析。所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较应用单因素方差分析,各组间均数的两两

比较应用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子代小鼠出生重量及生后体重 新生小鼠生后当天即进行称重,实验组小鼠 E19.5 d 体重(0.93 ± 0.12)g,较对照组(1.33 ± 0.13)g 明显降低($P < 0.01$)。小鼠生后每周称量体重至 4 周,生后 1 周、2 周实验组小鼠体重仍落后于对照组($P < 0.05$),提示生长发育落后。见表 1。

表 1 子代小鼠体重 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 F1 birth weight

组别	出生体重(g)	1 周体重(g)	2 周体重(g)	3 周体重(g)	4 周体重(g)
实验组	$0.93 \pm 0.12^{\text{①}}$	$6.17 \pm 0.24^{\text{①}}$	$12.01 \pm 0.22^{\text{①}}$	14.46 ± 0.28	17.23 ± 0.47
对照组	1.33 ± 0.13	7.89 ± 0.16	13.67 ± 0.41	15.43 ± 0.47	17.88 ± 0.44

注:与对照组比较,① $P < 0.01$

2.2 胎盘组织中 HATs 及 HDACs 酶活性 胎盘组织中 HATs 酶活性实验组明显低于对照组($P < 0.01$);总 HDACs 酶活性两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

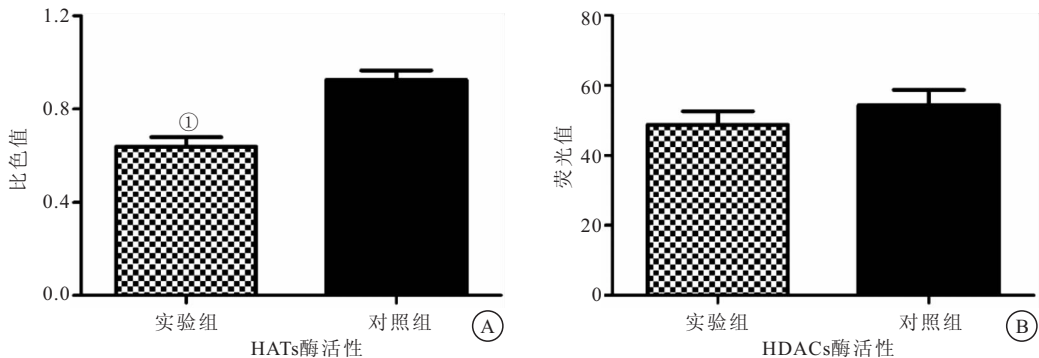


图 1 两组 HATs 及 HDACs 活性检测

Figure 1 HATs and HDACs activities in different groups

注:与对照组比较,① $P < 0.05$

2.3 VEGF、p300 和 PCAF 基因转录表达水平 VEGF 在实验组胎盘组织中 mRNA 水平较对照组显著降低($P < 0.01$);与对照组相比,p300 在实验组胎盘

中表达显著降低($P < 0.05$);而 PCAF 表达在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

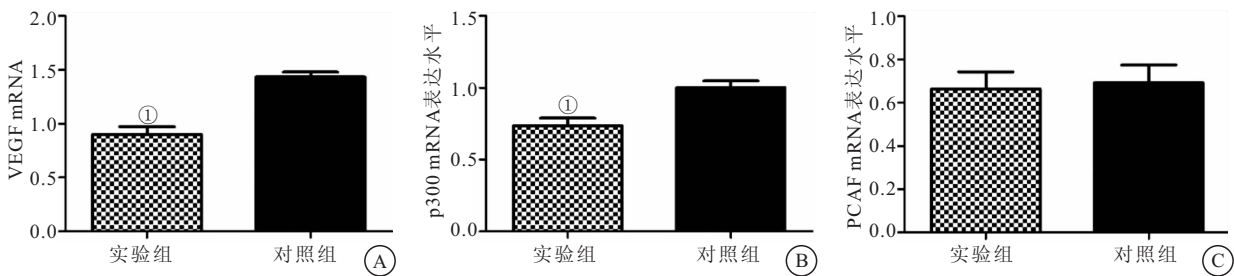


图 2 p300、PCAF 和 VEGF mRNA 相对表达量

Figure 2 mRNA expression levels in different groups

注:A. VEGF mRNA 相对表达量在实验组中明显下降;B. p300 mRNA 相对表达量在实验组中明显下降;C. PCAF mRNA 相对表达量在两组间无统计学差异。与对照组比较,① $P < 0.05$

2.4 VEGF 蛋白在各组间表达水平 实验组中 VEGF 蛋白较对照组显著降低($P<0.01$),见图 3。

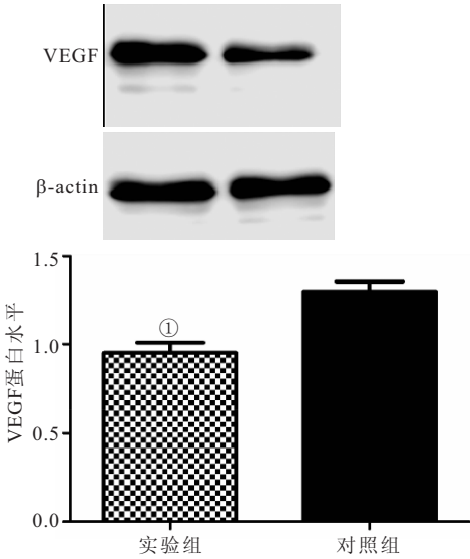


图 3 VEGF 蛋白表达量水平

Figure 3 VEGF protein levels in trial and control group

注:与对照组比较,① $P<0.05$

2.5 p300 与 VEGF 启动子结合水平 P300 与 VEGF 启动子结合区域水平实验组较对照组显著降低($P<0.05$),见图 4。

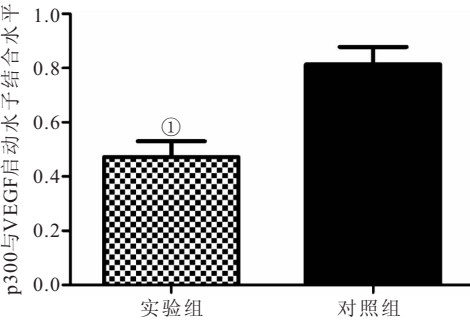


图 4 p300 与 VEGF 启动子结合水平

Figure 4 Binding level of p300 with promoter of VEGF

注:与对照组比较,① $P<0.05$

3 讨论

随着科学研究的不断深入,诸多代谢性疾病宫内发育起源的学说逐渐为学者所认可,目前人群及动物研究均已证实宫内发育迟缓与成年期诸多代谢性疾病相关,如高血压、肥胖、II 型糖尿病、高脂血症等^[11]。孕期酒精暴露是导致宫内生长受限的重要原因,本研究成功构建胎儿酒精综合征动物模型,子代小鼠体重显著降低。这与以往 FAS 研究^[12-13]报道相符。

胎盘是维系子代宫内发育的重要纽带,其宫内的正常维系是子代发育的决定性因素之一。有报

道^[14-16]显示饥饿、孕期药物滥用等等孕期不良因素暴露均可引起胎盘损伤。而胎盘损伤是胎儿宫内生长迟缓(IUGR)发生的关键因素之一^[17-18]。数据首次提示孕期酒精干预可致胎盘组织中 VEGF 表达明显降低,而 VEGF 在血管发生中的关键作用已得到公认^[19-21]。本研究结果发现 VEGF 的下降存在于 mRNA 和蛋白质层面,这提示其降低是发生在转录层面的。近 10 年陆续有研究^[22-23]提示胎儿酒精综合征动物模型中肝脏、心脏组织中组蛋白乙酰化失衡,进而引起发育异常。组蛋白乙酰化于基因转录调控影响重大,通过影响染色质结构的稳定而动态且可逆的调控基因转录^[24-25]。组蛋白乙酰化受 HAT 酶及 HDAC 酶动态调控。所以同时检测了胎盘组织中 HATs 和 HDACs 的总体活性,结果发现 HATs 酶活性显著下降,而 HDACs 酶活性无明显改变,这提示孕期酒精暴露可能通过 HATs 酶而影响胎盘中基因转录表达。因此在后续实验中,我们分别检测了 HATs 酶的重要亚型-p300 及 PCAF 的表达情况,其在胎儿 FAS 模型小鼠心脏中均出现表达异常^[23]。数据提示仅有 p300 在酒精暴露组及对照组之间存在差异,这提示 HATs 酶的重要亚型 p300 很有可能介导了胎盘组织的组蛋白乙酰化失衡。P300 作为重要 HAT 酶,可通过直接调控靶基因启动子区域组蛋白乙酰化水平影响该基因表达^[26],因此实验中检测了 p300 与 VEGF 启动子区域的结合水平,数据证实孕期酒精暴露导致胎盘组织中 p300 活性降低,其可能介导了重要血管发生因子 VEGF 的低表达,引起胎盘受损而带着胚胎宫内生长受限。

胎儿宫内生长受限受多因素影响^[27],胎儿宫内生长受限会引起围生儿发生不良妊娠结局,应加强胎儿宫内生长受限的早期筛查,解除高危因素,改善妊娠结局。本研究从表观遗传角度探讨了宫内生长发育迟缓的可能机理,组蛋白乙酰化酶 p300 可能在此病理发生中扮演重要角色。鉴于组蛋白乙酰化修饰具有可逆的特点,因此这为孕期酒精暴露的早期干预提供了可能理论靶点。然而在这一病理过程中,是否存在其他胎盘受损,如凋亡等因素存在以及能否利用 p300 为切入点改善宫内生长受限,这些问题仍需扩大样本量要进一步深入研究。

4 结论

本研究结果提示,孕期酒精暴露通过 p300 介导组蛋白乙酰化修饰下调胎盘组织中 VEGF 表达,进而引起子代宫内发育受限。目前妊娠后发现饮酒史的妇女逐渐增多,因此本研究有望对备孕家庭咨询以及误饮酒孕妇咨询提供一定借鉴,同时有望为胎儿酒

精综合征的临床治疗转化提供可能靶点。

【参考文献】

- [1] DENNY L, COLES S, BLITZ R. Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Spectrum Disorders[J]. *Am Fam Physician*, 2017,96(8):515-522.
- [2] MAY P A, CHAMBERS C D, KALBERG W O, *et al.* Prevalence of Fetal Alcohol Spectrum Disorders in 4 US Communities[J]. *JAMA*, 2018,319(5):474-482.
- [3] WILHOIT L F, SCOTT D A, SIMECKA B A. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Characteristics, Complications, and Treatment[J]. *Community Ment Health J*, 2017,53(6):711-718.
- [4] DENNY L, COLES S, BLITZ R. Drinking patterns and alcohol-related birth defects[J]. *Alcohol Research and Health*, 2017,25(3):168-169, 2001.
- [5] FIGUEIREDO A C M G, GOMES-FILHO I S, SILVA R B, *et al.* Maternal Anemia and Low Birth Weight: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Nutrients*, 2018,10(5):601.
- [6] SILVEIRA P P, POKHVISNEVA I, GAUDREAU H, *et al.* Birth weight and catch up growth are associated with childhood impulsivity in two independent cohorts[J]. *Sci Rep*, 2018,8(1):13705.
- [7] BOEHMER B H, LINESAND S W, ROZANCE P J. The impact of IUGR on pancreatic islet development and β -cell function[J]. *J Endocrinol*, 2017,235(2): 63-76.
- [8] LANGMIA I M, KRÄKER K, WEISS S E, *et al.* Cardiovascular Programming During and After Diabetic Pregnancy: Role of Placental Dysfunction and IUGR[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 9(10):215.
- [9] CHATER-DIEHL E J, LAUFER B I, SINGH S M. Changes to histone modifications following prenatal alcohol exposure: An emerging picture[J]. *Alcohol*, 2017,60: 41-52.
- [10] BOSE D A, DONAHUE G, REINBERG D, *et al.* RNA Binding to CBP Stimulates Histone Acetylation and Transcription[J]. *Cell*, 2017, 168(1-2):135-149.
- [11] 胡文广, 刘平, 陈聪, 等. P300-PPAR- γ 通路在孕期胎儿酒精综合征小鼠子代神经细胞糖代谢紊乱中的作用[J]. *西部医学*, 2020, 32(5):53-57.
- [12] YAN X, PAN B, LV T, *et al.* Inhibition of histone acetylation by curcumin reduces alcohol-induced fetal cardiac apoptosis[J]. *J Biomed Sci*, 2017,24(1):1.
- [13] MENENDEZ-CASTRO C, RASCHER W, HARTNER A. Intrauterine growth restriction - impact on cardiovascular diseases later in life[J]. *Mol Cell Pediatr*, 2018,5(1):4.
- [14] GUPTA K K, GUPTA V K, SHIRASAKA T. An Update on Fetal Alcohol Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2016,40(8):1594-1602.
- [15] DARENDELILER F. IUGR: Genetic influences, metabolic problems, environmental associations/ triggers, current and future management[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2019,33(3): 101260.
- [16] GURUGUBELLI KRISHNA R, VISHNU BHAT B. Molecular mechanisms of intrauterine growth restriction[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2018,31(19):2634-2640.
- [17] CIRRONIS M, VEZZONI G M, DEPAULIS N G, *et al.* Neonatal abstinence syndrome and intra-uterine growth restriction secondary to maternal antimigraine drug abuse[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2021,128(4):625-627.
- [18] BIRON-SHENTAL T, SADEH-MESTECHKIN D, AMIEL A. Telomere homeostasis in IUGR placentas - A review[J]. *Placenta*, 2016,39:21-23.
- [19] MAJEWSKA M, LIPKA A, PAUKSZTO L, *et al.* Placenta Transcriptome Profiling in Intrauterine Growth Restriction (IUGR)[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(6):1510.
- [20] 蒙智慧, 舒智宇, 覃冬, 康柏西普联合玻璃体切除术治疗增殖型糖尿病视网膜病变效果及对血清血管内皮生长因子和胎盘生长因子水平的影响[J]. *实用医院临床杂志*, 2020,17(6):114-117.
- [21] 蔡姝萍, 刘美香, 刘辉, 等. 血清异常 VEGF、ANG-2、NSE 和 S100B 与脑卒中认知功能障碍的相关性分析[J]. *实用医院临床杂志*, 2019,16(1):187-189.
- [22] 于瑾, 赵志英, 张静温, 等. LAM β 1 基因下调 VEGF 表达抑制人胆管癌裸鼠移植瘤生长[J]. *西部医学*, 2019,31(7):1010-1013.
- [23] SHUKLA S D, RESTREPO R, AROOR A R, *et al.* Binge Alcohol Is More Injurious to Liver in Female than in Male Rats: Histopathological, Pharmacologic, and Epigenetic Profiles[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019,370(3):390-398.
- [24] BONNAUD E M, SUBERBIELE E, MALNOU C E. Histone acetylation in neuronal (dys) function[J]. *Biomol Concepts*, 2016,7(2):103-116.
- [25] MARTIN B J E, BRINDAMOUR J, KUZMIN A, *et al.* Transcription shapes genome-wide histone acetylation patterns[J]. *Nat Commun*, 2021,12(1):210.
- [26] LIU Y, YANG E J, SHI C, *et al.* Histone Acetyltransferase (HAT) P300/CBP Inhibitors Induce Synthetic Lethality in PTEN-Deficient Colorectal Cancer Cells through Destabilizing AKT[J]. *Int J Biol Sci*, 2020,16(11):1774-1784.
- [27] 许迷娜. 胎儿宫内生长受限的影响因素分析[J]. *中国妇幼保健*, 2021,36(16):3811-3813.

(收稿日期:2021-08-15;修回日期:2022-04-15;编辑:王小菊)