

甜菜碱对载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化发生过程中铜锌超氧化物歧化酶基因甲基化及表达的影响

孙 爱¹, 范锐心², 杜艳平², 侯孟君², 唐志红², 朱惠莲²

(1. 广州市健康教育所, 广东省广州市 510403; 2. 中山大学公共卫生学院营养学系, 广东省广州市 510080)

[关键词] 甜菜碱; 动脉粥样硬化; 铜锌超氧化物歧化酶; 甲基化

[摘要] 目的 检测载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化发生过程中肝脏铜锌超氧化物歧化酶基因启动子区 CpG 岛甲基化及其表达状态, 探讨甜菜碱对动脉粥样硬化的作用及其可能的机制。方法 将正常的 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组, 同品系载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠分为模型组、1%、2% 和 4% 甜菜碱组。用油红 O 染色法检测小鼠主动脉粥样斑块面积, 应用甲基化特异性聚合酶链反应检测肝脏铜锌超氧化物歧化酶基因甲基化, 荧光定量逆转录聚合酶链反应检测铜锌超氧化物歧化酶 mRNA 表达, 免疫组织化学检测其蛋白表达。结果 饲养至 14 周, 2% 和 4% 甜菜碱组小鼠主动脉粥样斑块面积明显少于模型组 ($P < 0.05$); 各组铜锌超氧化物歧化酶基因 CpG 岛甲基化状态差异无显著性 ($P > 0.05$); 各时间段正常对照组铜锌超氧化物歧化酶 mRNA 表达均高于模型组, 7 周时 1% 甜菜碱组 mRNA 表达高于 2% 和 4% 甜菜碱组, 14 周时 1% 甜菜碱组 mRNA 表达高于模型组和 2% 甜菜碱组; 各时间段正常对照组铜锌超氧化物歧化酶蛋白表达均高于模型组、1%、2% 和 4% 甜菜碱组 ($P < 0.05$), 但模型组、1%、2% 和 4% 甜菜碱组间无显著性差异。结论 铜锌超氧化物歧化酶基因可能没有参与动脉粥样硬化过程中 DNA 甲基化的异常改变, 补充甜菜碱可以增加肝脏铜锌超氧化物歧化酶 mRNA 表达, 改善载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠的脂质沉积, 减少主动脉粥样斑块面积。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effects of Betaine on CuZnSOD Gene Methylation and Expression in Atherosclerosis of Apolipoprotein E-Deficient Mouse

SUN Ai¹, FAN Rui-Xin², DU Yan-Ping², HOU Meng-Jun², TANG Zhi-Hong², and ZHU Hui-Lian²

(1. Guangzhou Health Education Institute, Guangzhou 510403, China; 2. Faculty of Nutrition, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

[KEY WORDS] Betaine; Atherosclerosis; CuZnSOD; Methylation

[ABSTRACT] **Aim** To detect the methylation and expression of CpG island in the gene promoter region of live CuZnSOD during the occurrence of atherosclerosis (As) on apolipoprotein E-deficient mouse, explore the effects of betaine on atherosclerosis and its possible mechanisms. **Methods** Normal C57BL/6J mouse were taken as control group, apolipoprotein E-deficient mouse were randomly divided into model group, 1%, 2% and 3% betaine group. Oil red O staining method was used to detect the lipid plaque area in mouse aortic sinus, methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was applied to examine the gene methylation of liver CuZnSOD, quantitative fluorescence reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) was taken to detect the expression of mRNA in CuZnSOD gene and by immunohistochemical method its protein expression was detected. **Results** In 14th week, the lipid plaque areas of aortic sinus in 2% and 4% betaine mouse group were less than the model group, the difference was significant ($P < 0.05$); The CpG island methylation status of CuZnSOD gene in each group had no significant difference ($P > 0.05$); in all time the expression of mRNA in the normal groups were higher than that in the model groups; the 7th week, the expression of mRNA in 1% betaine group was higher than that in 2% and 4% betaine group; the 14th week, the expression of mRNA in 1% betaine group was higher than that in model group and 2% betaine group. In all time the expression of CuZnSOD protein in the normal group was higher than that in the other four groups ($P < 0.05$), but the expression in the other four groups had no significant difference. **Conclusions** CuZnSOD gene may not be involved in the abnormal DNA methylation changes in the process of atherosclerosis, supplement of betaine can increase the expression of CuZnSOD gene mRNA in liver, thus improve the lipid aggregation of apolipoprotein E-deficient mouse and reduce the plaque area of aortic.

[收稿日期] 2009-03-03 [修回日期] 2009-05-02

[基金项目] 国家自然科学基金(30671753)和广东省自然科学基金(06021315)资助

[作者简介] 孙爱, 硕士, 住院医师, 研究方向为健康教育, E-mail for sunai.1981@163.com. 范锐心, 硕士, 住院医师, 研究方向为营养与疾病。朱惠莲, 博士, 副教授, 研究方向为营养与疾病。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是严重危害人类健康的心脑血管疾病,但由于其确切的发病机制未明,难以进行有效的防治。近年来的研究表明,As的发生发展与DNA的异常甲基化密切相关^[1,2]。甜菜碱广泛存在于各种植物中,是一种高效价的甲基供体而具有多生物活性。但目前国内外对甜菜碱的应用仅限于饲料工业,以促进动物脂肪代谢、提高禽畜的瘦肉率,在医药中的应用很少,更未见其抗As作用的研究报导。本研究以载脂蛋白E^{-/-}小鼠建立As整体动物模型探讨甜菜碱对As发生发展的影响,并从铜锌超氧化物歧化酶(CuZnSOD)基因甲基化及表达初步探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

DNA提取试剂盒和聚合酶购自TaKaRa公司,DNA纯化回收试剂盒购自Promega公司,逆转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒购自TOYOBO公司,一抗Rabbit polyclonal to Superoxide Dismutase 1购自Abcam公司,二抗即用型快速免疫组化MaxVisionTM试剂盒(兔)和DAB显色剂购自福州迈新生物技术开发公司。PCR仪购自Biometra公司,ABI7500荧光定量PCR仪购自Applied Biosystems公司。

1.2 实验动物及分组

54只7周龄雄性载脂蛋白E^{-/-}小鼠(品系C57BL/6J)由美国Jackson实验室惠赠,由中山大学北校区实验动物中心繁殖提供,18只7周龄同品系同性别的野生型小鼠由中山大学北校区实验动物中心提供,作为正常对照组。54只载脂蛋白E^{-/-}小鼠按体重随机分成四组:模型组($n=18$)、1%、2%和4%甜菜碱组($n=12$);正常对照组和模型组饲以AIN-93饲料,1%、2%和4%甜菜碱组分别饲以添加1%、2%和4%甜菜碱的AIN-93饲料。所有实验小鼠放在层流架中分笼饲养,每笼3只,自由摄食饮水,每周称体重,并记录进食量。0周时分别从载脂蛋白E^{-/-}小鼠和正常小鼠中随机抽取6只,饲养至第7周时每组随机抽取6只,其余小鼠饲养至14周。所有小鼠取肝脏一部分冻存于-80℃,另一部分用10%福尔马林液固定备用,并取14周末时各组小鼠心脏置于10%福尔马林溶液中固定。

1.3 主动脉窦脂质斑块大小评价

将心脏固定、OTC包埋剂包埋后,行主动脉窦连续冰冻切片。切片厚度8 μm,每间隔50 μm取片,每只小鼠共6张切片。切片经油红O染色后显

显微镜下观察、拍照,由图像分析软件测定斑块面积和管腔横截面积,并计算斑块占管腔面积百分比。以6张切片百分比的平均值作为该小鼠As斑块大小。

1.4 铜锌超氧化物歧化酶基因启动子区CpG岛甲基化检测

严格按照Universal Genomic DNA Extraction Kit说明书提取肝脏DNA,用亚硫酸氢钠(pH 5.0)和氢醌修饰后待用。实验采用甲基化特异性PCR(MSP)。甲基化引物上游5'-TCG GTG TAG GGA ATT ATT TAT TTC-3',下游5'-TTA ACG AAC TCA AA CCG TAA CG-3',扩增片段长度124 bp;未甲基化引物上游5'-GTT TGG TGT AGG GAA TTA TTT ATT TTG-3',下游5'-AAC ACT TAA CAA ACT CAA ACC ATA ACA-3',扩增片段长度131 bp,以上引物由大连宝生物工程有限公司合成。反应条件:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,62℃退火温度30 s,72℃延伸30 s,35个循环,最后72℃延伸10 min。产物点样于2%琼脂糖,90 V电压,电泳40 min后在紫外灯下观察,并用凝胶成像分析仪处理分析PCR结果。

1.5 荧光定量逆转录聚合酶链反应检测铜锌超氧化物歧化酶mRNA表达

按Trizol提取肝脏总RNA,逆转录成cDNA待用。利用Primer 5.0进行引物设计,目的基因引物上游5'-AAC CAG TTG TGT TGT CAG GAC -3',下游5'-CCA CCA TGT TTC TTA GAG TGA GG-3',扩增片段长度139 bp;内参GAPDH引物上游5'-CAT GTT CCA GTA TGA CTC CAC TC-3',下游5'-GGC CTC ACC CCA TTT GAT GT-3',扩增片段长度132 bp,以上引物由英伟创津生物公司合成。反应条件:95℃预变性60 s,95℃变性15 s,68℃退火15 s,72℃延伸45 s,40个循环。将反应液混匀,置于ABI7500荧光定量PCR仪上进行扩增。应用ABI7500 System Software v1 4.0对实验结果进行分析。

1.6 铜锌超氧化物歧化酶蛋白水平检测

每组选取5只小鼠肝脏组织速冻。冰冻切片成3~6 μm厚度,采用免疫组织化学法对小鼠肝脏CuZnSOD蛋白表达进行检测。制作好的切片应用Motic数码互动形态教学系统摄像软件拍片,以细胞浆和细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性细胞,每张切片于400倍取5个视野,用Image-pro plus图像分析软件观察、测量阳性细胞的平均光密度。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以百分率表

示;两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD 或 Tamhane 检验,对各组间百分率的比较用精确概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 主动脉粥样斑块面积

14 周时,2% 和 4% 甜菜碱组主动脉粥样斑块面积明显低于模型组($P < 0.05$;表 1 和图 1)。

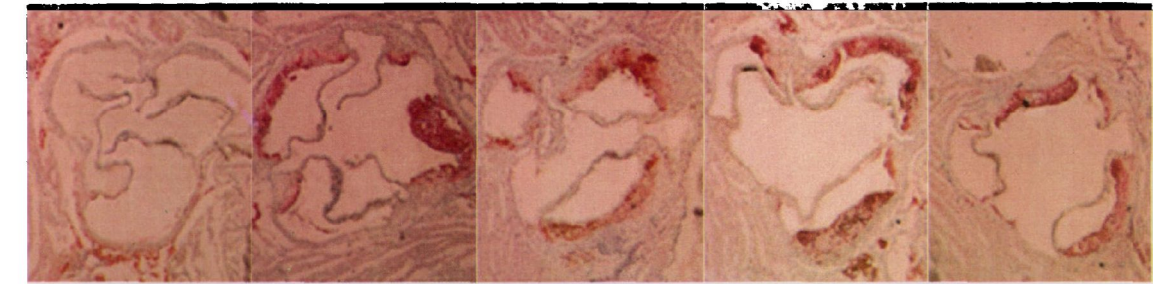


图 1. 油红 O 染色(×40) 从左至右为正常对照组、模型组、1% 甜菜碱组、2% 甜菜碱组和 4% 甜菜碱组。

表 1. 14 周时各组小鼠主动脉粥样斑块面积比值

分 组	n	主动脉粥样斑块面积比值
正常对照组	5	0
模型组	4	19.31%5.42% ^a
1% 甜菜碱组	5	17.23%2.84% ^a
2% 甜菜碱组	4	11.43%2.65% ^{ab}
4% 甜菜碱组	5	12.09%3.07% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组相比;b 为 $P < 0.05$,与模型组相比。由于每只小鼠主动脉标本量非常少,加之冰冻切片的失误导致每组样本量有部分缺失。

菜碱组($P < 0.05$;表 3、图 3 和图 4)。

表 2. 不同时间各组小鼠 CuZnSOD 基因甲基化状况

	n	未甲基化	甲基化
0 周			
正常对照组	6	5	1
模型组	6	5	1
7 周			
正常对照组	6	4	2
模型组	6	6	0
1% 甜菜碱组	6	6	0
2% 甜菜碱组	6	6	0
4% 甜菜碱组	6	4	2
14 周			
正常对照组	6	5	1
模型组	6	6	0
1% 甜菜碱组	6	6	0
2% 甜菜碱组	6	4	2
4% 甜菜碱组	6	6	0

2.2 肝脏铜锌超氧化物歧化酶基因启动子区 CpG 岛甲基化状况

各时间点载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠与同品系基因正常组小鼠 CuZnSOD 启动子区 CpG 岛甲基化状况没有显著性差异,补充甜菜碱没有引起其甲基化模式的改变(图 2 和表 2)。

2.4 肝脏铜锌超氧化物歧化酶蛋白的表达

模型组、1%、2% 和 4% 甜菜碱组 CuZnSOD 蛋白表达明显低于正常对照组($P < 0.05$),但模型组、1%、2% 和 4% 甜菜碱组之间差异没有显著性(表 4 和图 5)。

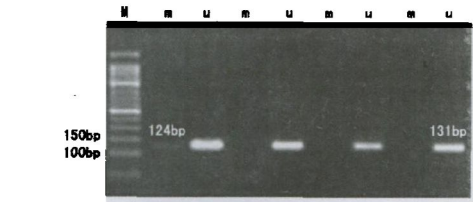


图 2. CuZnSOD 基因 MSP 扩增产物琼脂糖电泳 M 为 Marker,u 为未甲基化,m 为甲基化。

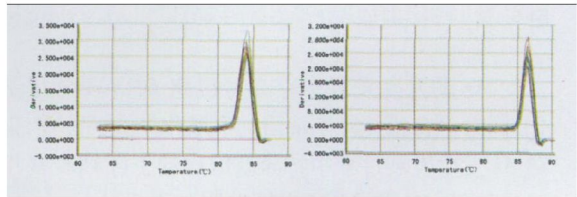


图 3. 荧光定量 PCR 溶解曲线 左图为 CuZnSOD 基因,右图为 GAPDH 基因。

2.3 肝脏铜锌超氧化物歧化酶 mRNA 的表达

与第 14 周比较,0 周、第 7 周正常对照组 CuZnSOD mRNA 表达量均高于模型组($P < 0.05$);7 周时,1% 甜菜碱组 CuZnSOD mRNA 表达高于 2% 甜菜碱组和 4% 甜菜碱组($P < 0.05$);14 周时,1% 甜菜碱组 CuZnSOD mRNA 表达高于模型组和 2% 甜

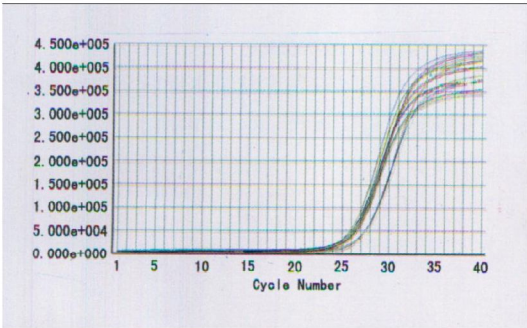


图 4. 荧光定量 PCR 产物扩增曲线

表 3. 不同时间各组小鼠 CuZnSOD mRNA 的表达

	n	RQ
0 周		
正常对照组	6	1
模型组	6	0.632 ± 0.143 ^a
7 周		
正常对照组	6	1
模型组	6	0.567 ± 0.086 ^a
1% 甜菜碱组	6	0.725 ± 0.061
2% 甜菜碱组	6	0.537 ± 0.041 ^b
4% 甜菜碱组	6	0.539 ± 0.065 ^b
14 周		
正常对照组	6	1
模型组	6	0.383 ± 0.073 ^{ab}
1% 甜菜碱组	6	0.571 ± 0.074
2% 甜菜碱组	6	0.375 ± 0.091 ^b
4% 甜菜碱组	6	0.501 ± 0.105

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与模型组相比。RQ 为各组与正常对照组相比较得到的倍数关系。

表 4. CuZnSOD 蛋白的表达

	n	平均光密度值
7 周		
正常对照组	5	0.934 ± 0.073
模型组	5	0.601 ± 0.055 ^a
1% 甜菜碱组	5	0.536 ± 0.077 ^a
2% 甜菜碱组	5	0.673 ± 0.085 ^a
4% 甜菜碱组	5	0.542 ± 0.056 ^a
14 周		
正常对照组	5	1.033 ± 0.086
模型组	5	0.449 ± 0.074 ^a
1% 甜菜碱组	5	0.451 ± 0.095 ^a
2% 甜菜碱组	5	0.396 ± 0.082 ^a
4% 甜菜碱组	5	0.488 ± 0.906 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组相比。

3 讨论

甜菜碱有 3 个活性甲基,是高效的甲基供体。并且现有研究已经表明它能够降低血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)浓度。流行病学资料显示 Hcy 与 As 及其并发症、冠心病、脑卒中等疾病的发生密切相关^[3],补充甜菜碱能够显著降低这个危险因素^[4]。研究表明,甜菜碱能够改善包括心脏病在内的一些慢性疾病,对失代偿性心脏病和充血性心力衰竭都有改善作用。Craig 等^[5]研究发现,甜菜碱能够升高血清磷脂和血清胆固醇的比率,增加食欲,减少心绞痛和呼吸困难的发生,并且甜菜碱和维生素 B₁₂ 的联合补充可以显著降低 As 的死亡率。本研究发现,2% 和 4% 甜菜碱组脂质斑块面积少于模型组,提示甜菜碱补充对载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠脂质斑块面积可能有一定的抑制作用。

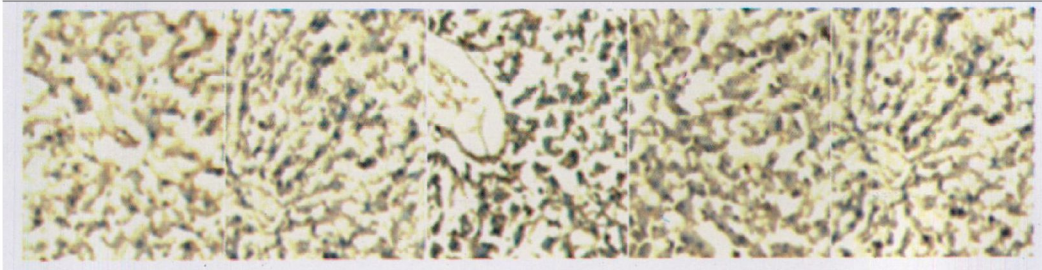


图 5. 第 14 周免疫组织化学染色 (×40) 从左至右为正常对照组、模型组、1% 甜菜碱组、2% 甜菜碱组、4% 甜菜碱组。

As 的发生发展中存在基因组 DNA 异常甲基化,同时也有相关特异基因的甲基化模式的改变,但对 As 发生发展过程中特异基因启动子区 CpG 岛甲基化的研究比较少,目前只有雌激素受体(estrogen receptor, ER)、细胞外超氧化物歧化酶(extracellular superoxide dismutase, EC-SOD)及抑癌基因 p53 等少

数几个基因的报道^[2,6,7]。As 的发生发展是一个多因素参与的复杂病变过程,除了上述基因,可能还有其它基因参与了 As 过程中 DNA 甲基化模式的异常改变。As 是一种慢性炎症性疾病,炎症反应伴随着 As 的发生发展直至其斑块破裂的全部过程^[8,9]。这些炎性标志物水平随着 As 斑块进展的不同时期和

阶段而呈动态变化。CuZnSOD 基因是和 As 发生密切相关的一个抗氧化因子。CuZnSOD 被认为是内皮细胞中主要形式的 SOD,在血管壁中调节超氧阴离子水平、NO 生物利用度及内皮功能,增加机体抗氧化能力,保护内皮细胞的功能。通过细胞的内吞作用,CuZnSOD 发挥舒张血管改善高血压、抗 As 等疾病的作用^[10]。

本研究中,没有发现载脂蛋白 E^{-/-}小鼠 CuZnSOD 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态与同品系基因正常组小鼠有显著性差异,提示可能在 As 发生发展过程中载脂蛋白 E^{-/-}小鼠 CuZnSOD 基因没有出现 DNA 甲基化的异常改变,其启动子区 CpG 岛的甲基化没有参与该基因的表达调节。

氧化应激通过过氧化作用、诱导血管炎症基因表达、促进局部炎症反应和细胞增殖,多方面参与 As 的发生发展。作为体内最关键抗氧化酶之一的 CuZnSOD,在 As 发生发展过程中要清除累积的超氧阴离子,从而被消耗。本研究结果发现,CuZnSOD 基因在载脂蛋白 E^{-/-}小鼠肝脏内的表达较同品系基因正常小鼠要低,14 周时 1% 甜菜碱组 CuZnSOD 基因表达高于模型组。本课题组已有研究结果表明,甜菜碱能够降低血清 TNF- α 水平,减轻 As 过程中的炎性损伤,本研究中补充甜菜碱后能增加 CuZnSOD mRNA 的表达,这与已有结果相一致,提示补充 1% 甜菜碱能增加 CuZnSOD mRNA 表达,从而发挥抗 As 的作用。甜菜碱对 CuZnSOD mRNA 表达的作用没有同时表现在 CuZnSOD 基因蛋白表达上,考虑可能有实验误差的存在。

从甲基化的角度研究 As 与氧化应激的关系,并探讨补充甜菜碱对 As 相关特异基因甲基化模式的影响是一个值得关注的课题,为阐明 As 的复杂病因提供新的思路,并为临床防治 As 提供新资源。在 CuZnSOD^{-/-}的小鼠体内过氧化物水平增多,并且随着时间的推移,不能清除的过氧化物在体内不断累积增加,内皮功能明显受损^[11],但是也有研究表明,在 CuZnSOD 过表达的载脂蛋白 E^{-/-}小鼠体内,其脂质过氧化和 As 的发展并没有得到缓解^[12]。本研

究中,从低到高设置了三个甜菜碱剂量组,我们考虑一是研究甜菜碱对 As 发生发展的影响,同时也是在摸索其产生效应的可能剂量范围,由于实验动物对甜菜碱代谢耐受的原因,故本研究结果中未呈现明显的剂量-效应关系。因此,关于肝脏 CuZnSOD 基因在载脂蛋白 E^{-/-}小鼠 As 发生发展过程中可能所起的作用和补充甜菜碱对小鼠 As 的影响以及其可能的作用机制还有待更多的实验来探讨和发现。

[参考文献]

- [1] Mikko O, Hiltunen, Seppo Ylä-Herttuala. DNA methylation, smooth muscle cells, and atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 1 750.
- [2] Gertrud Lund, Linda Andersson, Massimiliano Lauria, et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E [J]. *Biol Chem*, 2004, 279: 29 147-154.
- [3] Malinow MR, Ducimetiere P, Luc G, et al. Plasma homocysteine levels and graded risk for myocardial infarction: finding in two populations at contrasting risk for coronary heart disease [J]. *Atherosclerosis*, 1996, 126: 27-34.
- [4] Steenge GR, Verhoef P, Katan MB. Betaine supplementation lowers plasma homocysteine in healthy men and women [J]. *J Nutr*, 2003, 133: 1 291-295.
- [5] Craig SAS. Betaine in human nutrition [J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80 (3): 539-549.
- [6] Kortelainen ML, Huttunen P. Expression of estrogen receptors in the coronary arteries of young and premenopausal women in relation to central obesity [J]. *Int J Obes Relat Metab Dis*, 2004, 28 (4): 623-627.
- [7] Laukkanen MO, Mannermaa S, Hiltunen MO, et al. Local hypomethylation in atherosclerosis found in rabbit ec-sod gene [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19: 2 171-178.
- [8] Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, et al. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis heart [J]. *Ambrose JA*, 2003, 89 (9): 993-997.
- [9] Shovman O, Gilburd B, Shoenfeld Y. The role of inflammatory cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus-related atherosclerosis: a novel target for treatment [J]. *Rheumatol*, 2006, 33 (3): 445-447.
- [10] Waelti ER, Barton M. Rapid endocytosis of copper-zinc superoxide dismutase into human endothelial cells: role for its vascular activity [J]. *Pharmacology*, 2006, 78 (4): 198-201.
- [11] Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, et al. Heterozygous CuZn superoxide dismutase deficiency produces a vascular phenotype with aging [J]. *Hypertension*, 2006, 48 (6): 1 072-079.
- [12] Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/ZnSOD dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E [J]. *Circ Res*, 2004, 95 (11): 1 075-081.

(此文编辑 文玉珊)