

同型半胱氨酸干扰胰岛素样生长因子 2和 H19的印迹表达及其与血管平滑肌细胞增殖的关系

李丽娟¹, 杨 艳¹, 徐海燕¹, 唐薇薇¹, 刘佳云¹, 王树人²

(1. 遵义医学院病理生理教研室, 贵州省遵义市 563003)

2. 四川大学华西基础与法医学院病理生理教研室, 四川省成都市 610041)

[关键词] 同型半胱氨酸; 血管平滑肌细胞; 基因印迹; 印迹丢失; 胰岛素样生长因子 2 H19 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 采用动脉粥样硬化的独立危险因素同型半胱氨酸刺激脐静脉血管平滑肌细胞, 观察同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2和 H19表达的干扰作用, 分析二者与血管平滑肌细胞增殖的关系及其在动脉粥样硬化发病中的可能作用。方法 将培养的脐静脉血管平滑肌细胞分为 0、50、100、200、500及 1000 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸组, 以 0 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸组为空白对照组。用不同浓度的同型半胱氨酸刺激血管平滑肌细胞 48 h后, MTT法检测血管平滑肌细胞的增殖水平; 半定量逆转录聚合酶链反应法检测血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2和 H19的 mRNA表达水平, Western Blotting法检测血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2的蛋白表达水平。结果 与空白对照组相比较, 同型半胱氨酸各浓度组血管平滑肌细胞的增殖活力明显增加, 以高浓度(500及 1000 $\mu\text{mol/L}$)组为著($P < 0.05$)。同时, 同型半胱氨酸组血管平滑肌细胞 H19的 mRNA表达水平增加, 500及 1000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组(0.5486 ± 0.0633 及 0.7333 ± 0.0496)明显高于空白对照组(0.2022 ± 0.0124)($P < 0.05$); 胰岛素样生长因子 2的 mRNA和蛋白表达均下降, 尤以高浓度组为著, 500及 1000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组的 mRNA(0.2588 ± 0.0248 及 0.1689 ± 0.0696)和蛋白(0.1167 ± 0.0155 及 0.0837 ± 0.0180)表达水平均明显低于空白对照组(0.5158 ± 0.0189 和 0.2443 ± 0.0423)($P < 0.05$)。结论 同型半胱氨酸能干扰胰岛素样生长因子 2和 H19的表达, 并可能进一步促进血管平滑肌细胞的增殖。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Homocysteine Harass the Imprinting Expression of Insulin-Like Growth Factor-2 and H19 and Its Correlation with the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

LI Li-Juan¹, YANG Yan¹, XU Hai-Yan¹, TANG Wei-Wei¹, LU Jia-Yun¹, and WANG Shu-Ren²

(1. Department of Pathophysiology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003; 2. Department of Pathophysiology, West China School of Preclinical Medical Sciences & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041)

[KEY WORDS] Homocysteine Vascular Smooth Muscle Cell Gene Imprinting Loss of Imprinting Insulin Like Growth Factor 2 H19 Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the potential impact of homocysteine (Hcy) on the expression of insulin-like growth factor-2 (IGF-2) and H19 in vascular smooth muscle cells (VSMC), analyze its possible correlation with the proliferation of VSMC and its role in the pathogenesis of atherosclerosis (As). **Methods** Cultured human umbilical VSMC were divided into 0, 50, 100, 200, 500, 1000 $\mu\text{mol/L}$ Hcy group and the 0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy group was the control. After the VSMC were treated with different concentrations of Hcy for 48 h, the cell viability was detected by MTT, the mRNA levels of H19 and IGF-2 were determined by reverse transcription polymerase chain reaction, and the protein expression of IGF-2 by Western Blotting. **Results** Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy groups, the viability of VSMC was increased in the Hcy groups, especially in 500 and 1000 $\mu\text{mol/L}$ Hcy groups ($P < 0.05$). The H19 expression of VSMC in Hcy groups was increased, and its levels in the 500 and 1000 $\mu\text{mol/L}$ group (0.5486 ± 0.0633 and 0.7333 ± 0.0496) were significantly higher than that in the 0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy group (0.2022 ± 0.0124) ($P < 0.05$), while the IGF-2 mRNA and protein was down-expressed, which were also more significant in the 500 and 1000 $\mu\text{mol/L}$ group (mRNA: 0.2588 ± 0.0248 and 0.1689 ± 0.0696 vs 0.5158 ± 0.0189 , $P < 0.05$; protein: 0.1167 ± 0.0155 and 0.0837 ± 0.0180 vs 0.2443 ± 0.0423 , $P < 0.05$). **Conclusion** Hcy harassed the imprinting expression of IGF-2 and H19 in the VSMC. The expression of H19 was increased and that of IGF-2 decreased. The aberrant expression of IGF-2 and H19 possibly induced the proliferation of VSMC.

[收稿日期] 2010-08-06 [修回日期] 2010-10-29

[基金项目] 贵州省科技厅课题[黔科合 J 字(2010)2277]和遵义医学院博士启动基金(F-460)

[作者简介] 李丽娟, 博士, 副教授, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail为 lili11@sohu.com。王树人, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail为 wangshuren1945@yahoo.com.cn。

同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 是目前公认的动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 最重要的独立危险因素之一^[1], 血浆 Hcy 的浓度升高可直接诱导血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 增殖, 后者是 As 斑块形成的关键环节^[2,3]。大量研究表明, 印迹基因的表达紊乱是肿瘤等增殖性疾病的重要发病机制; 而与 As 发病密切相关的 VSMC 增殖表现的单克隆性与肿瘤细胞的生长方式相似, 因此, 我们推测某些印迹基因的表达改变可能参与 As 的发病。胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor-2, IGF-2) 和 H19 是发现最早的印迹基因之一, 二者的表达紊乱与多种肿瘤的发病密切相关^[4,5]。已有研究显示, IGF-2 和 H19 的印记表达紊乱可能参与 As 的发病^[6,7], 但 IGF-2 和 H19 与 VSMC 增殖的关系及其在 As 发病中的作用, 目前并不清楚。本研究拟采用不同浓度的 Hcy 刺激 VSMC, 探讨 Hcy 对 IGF-2 和 H19 表达的影响及其与 VSMC 增殖的关系。

1 材料和方法

1.1 实验仪器及试剂

CO₂ 孵箱 (Heraeus, Germany); 倒置相差显微镜 (Nikon, Japan); 酶标仪 (Bio-RAD, America); 电泳电转移系统 (Bio-RAD, America); PCR 仪 (Biotetra, Germany); 图象采集与分析仪 (Nikon ECLIPSE E600 Diagnostic Instrument Inc. SPOT); DEME/F12 干粉状培养基 (GIBCO BRL 公司); 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料研究所); 鼠抗人平滑肌肌动蛋白单克隆抗体及羊抗兔 IgG/HRP (北京中杉金桥生物技术有限公司); 即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 同型半胱氨酸及四甲基偶氮唑蓝盐 (MTT) (Sigma); 兔抗人 IGF-2 多克隆抗体 (ABCOM); 兔抗人 β -actin 多克隆抗体 (博士德生物技术有限公司); ECL 试剂 (Pierce 生物技术公司); 细胞总 RNA 提取试剂-TRIZOL (北京天根生物技术有限公司); RT-PCR 试剂盒 (TOYOBO 公司)。

1.2 人脐静脉血管平滑肌细胞的培养及鉴定

无菌条件下取胎儿脐带, 分离脐静脉血管中膜, 采用贴块法接种 VSMC。组织块于接种后第 4~5 天, 倒置显微镜观察可见 VSMC 垂直方向从组织块边缘迁移萌出, 细胞形态多样, 常表现为梭形、菱形或星形等; 6~9 天后, 组织块周围细胞密度更加增大, 并呈现平滑肌细胞特征性的“峰谷”样; 采用 SP

法, 用平滑肌肌动蛋白抗体对培养的 VSMC 作免疫组织化学染色, 阳性染色率达 95% 以上。取鉴定后的 3~6 代 VSMC 进行实验研究。

1.3 实验分组及处理

将 VSMC 分为 0、50、100、200、500 及 1 000 μ mol/L Hcy 组, 以不加 Hcy 组为空白对照组。待 VSMC 覆盖瓶底 70% 后, 用 PBS 冲洗 2 次, 然后分别用含 0、50、100、200、500 及 1 000 μ mol/L Hcy 的无血清 DMEM/F12 培养基培养孵育 VSMC 48 h。

1.4 MTT 法检测血管平滑肌细胞增殖水平

脐静脉 VSMC 经 0.25% 胰酶消化后, 加入含 16% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基, 重悬, 以每孔 2×10^5 个细胞接种于 96 孔板, 细胞培养 48 h 后, 用 200 μ L 分别含 0、50、100、200、500 及 1 000 μ mol/L Hcy 的无血清 DMEM/F12 培养液继续培养 48 h, 加入 20 μ L MTT 工作液, 置于 CO₂ 孵箱 37℃ 孵育 4 h 后, 小心吸除上清, 每孔加入二甲亚砜 (DMSO) 150 μ L, 震荡 10 min, 使结晶充分溶解, 选择 490 nm 波长, 酶联免疫检测仪检测各孔吸光度值 (A 值)。以只加培养液不含细胞的培养孔为调零组。计算各浓度组吸光度平均值, 以浓度为横坐标, 吸光度平均值为纵坐标, 绘制曲线图。

1.5 半定量逆转录聚合酶链反应法检测血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2 和 H19 的 mRNA 表达

根据 Genebank 中 IGF-2 (BC000531)、H19 (BC053636) 和 β -actin (NM001101) 的 mRNA 序列, 采用 Primer 5.0 软件进行引物设计。H19 引物上游为 5'-GGC CTT CCT GAA CAC CTT AG-3', 下游为 5'-TGA GCT GGG TAG CAC CAT TT-3', 扩增长度为 142 bp。IGF-2 引物上游为 5'-CAT CGT TGA GGA GTG CTG TTT-3', 下游为 5'-GTC TTG GGT GGG TAG AGC AAT-3', 扩增长度为 300 bp。内参 β -actin 引物上游为 5'-CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG C-3', 下游为 5'-GTG ATC TCC TTC TGC ATC CT-GT-3', 扩增长度为 695 bp。引物由 Invitrogen 公司合成。按照试剂盒的操作说明提取 VSMC 总 RNA, 将 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0 之间的 RNA 逆转录为 cDNA 后用于 PCR 扩增, PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 退火 (H19 56℃、IGF-2 54℃、 β -actin 57℃) 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 30 个循环, 72℃ 再延伸 5 min。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳后, 于凝胶成像分析系统中分析 PCR 反应结果。

1.6 Western Blotting 法检测血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2 的蛋白表达

弃培养基后用生理盐水将 VSMC 洗涤 1~2 次,

收集 VSMC, 提取细胞总蛋白, 检测其中蛋白含量后, 用 Western Blotting 及化学发光法检测 IGF-2 的蛋白水平。将 80 μ g 蛋白样品加入等量 $2 \times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 使蛋白变性。用 5% 积层胶、12% 分离胶不连续性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离。电泳完毕后切下 IGF-2 (20 kDa) 及 β -actin (42 kDa) 所在部位的凝胶, 转膜 50 min, 使电泳后的蛋白转移至硝酸纤维膜。用 10% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜。PBST 洗膜, 15 min $\times$ 1 次。将兔抗人 IGF-2 及 β -actin 多克隆抗体按 1: 1 000 及 1: 500 稀释, 各取 5 mL 与载有相应蛋白的硝酸纤维膜 4℃ 孵育过夜。PBST 洗膜, 15 min $\times$ 1 次。将山羊抗兔 IgG-HRP 按 1: 1 000、1: 500 稀释, 各取 5 mL 与标记有抗 IGF-2 抗 β -actin 的硝酸纤维膜 37℃ 孵育 1 h。PBST 洗膜, 15 min $\times$ 1 次。ECL 化学发光试剂显色, X 片压片, 显影, 定影。数码相机照相后, 用凝胶成像系统分析 X 片上显影条带的灰度值, 以 IGF-2 与 β -actin 条带的灰度比值评定 IGF-2 蛋白的相对表达水平。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据的统计分析。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行多个样本均数的两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞增殖活力的变化

在 Hcy 刺激 VSMC 48 h 后, 随着 Hcy 浓度的增加, 细胞增殖活力也增加, 以 500 和 1 000 μ mol/L Hcy 组为著, 与空白对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 提示 Hcy 能直接诱导平滑肌细胞增殖 (图 1)。

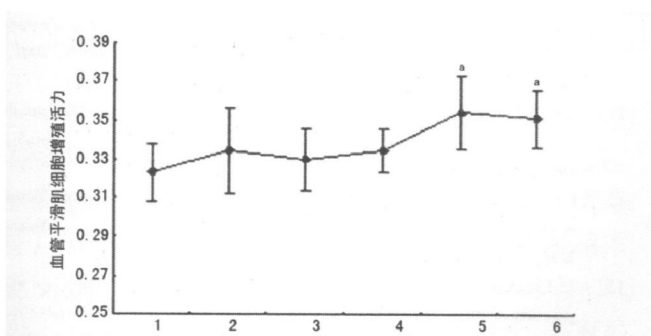


图 1 同型半胱氨酸处理 48 h 后血管平滑肌细胞增殖活力的变化 1 为 0 μ mol/L Hcy 组, 2 为 50 μ mol/L Hcy 组, 3 为 100 μ mol/L Hcy 组, 4 为 200 μ mol/L Hcy 组, 5 为 500 μ mol/L Hcy 组, 6 为 1 000 μ mol/L Hcy 组。a 为 $P < 0.05$ 与 0 μ mol/L Hcy 组 (空白对照组) 比较 ($n = 10$)。

2.2 血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2 和 H19 的 mRNA 水平变化

Hcy 刺激 VSMC 48 h 后, 随着 Hcy 浓度的增加, H19 mRNA 的相对水平明显增加, 而 IGF-2 mRNA 的相对水平降低, 以 500 μ mol/L 和 1 000 μ mol/L Hcy 组为著 ($P < 0.05$)。结果表明, Hcy 对 VSMC H19 和 IGF-2 的 mRNA 表达分别表现为促进和抑制的作用 (图 2 和表 1)。

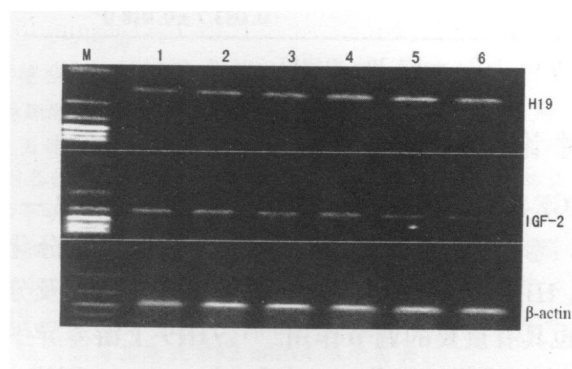


图 2 同型半胱氨酸处理 48 h 后血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2 和 H19 的 mRNA 表达变化 M 为 Marker 1~6 分别为 0、50、100、200、500 和 1 000 μ mol/L Hcy 组。

表 1 同型半胱氨酸处理 48 h 后血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2 和 H19 的 mRNA 表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Hcy 浓度 (μ mol/L)	H19/ β -actin	IGF-2/ β -actin
0 (空白对照组)	0.202 $\pm$ 0.012	0.515 $\pm$ 0.018
50	0.265 $\pm$ 0.051	0.484 $\pm$ 0.053
100	0.307 $\pm$ 0.031	0.522 $\pm$ 0.045
200	0.428 $\pm$ 0.106	0.362 $\pm$ 0.015 ^a
500	0.548 $\pm$ 0.063 ^a	0.258 $\pm$ 0.024 ^a
1 000	0.733 $\pm$ 0.049 ^a	0.168 $\pm$ 0.069 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与 0 μ mol/L Hcy 组比较。

2.3 血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2 的蛋白表达变化

当 Hcy 刺激 VSMC 48 h 后, 随着 Hcy 浓度的增加, VSMC IGF-2 的蛋白水平明显降低, 与其 mRNA 水平的变化一致 ($P < 0.05$, 图 3 和表 2)。

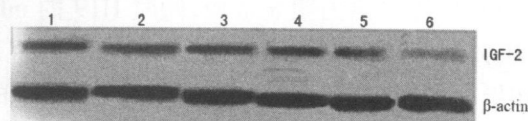


图 3 同型半胱氨酸刺激 48 h 后血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2 的蛋白表达变化 1~6 分别为 0、50、100、200、500 和 1 000 μ mol/L Hcy 组。

表 2 同型半胱氨酸处理 48 h 后血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子 2 的蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Hcy 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	IGF-2/ β -actin
0(空白对照组)	0.244 3 $\pm$ 0.042 3
50	0.218 0 $\pm$ 0.062 6
100	0.171 7 $\pm$ 0.007 5 ^a
200	0.163 0 $\pm$ 0.021 4 ^a
500	0.116 7 $\pm$ 0.015 5 ^a
1 000	0.083 7 $\pm$ 0.018 0 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与 0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组比较。

3 讨论

IGF-2 和 H19 是最早发现的印迹基因之一。IGF-2 调节胚胎和胎盘的发育、细胞的增殖及分化等; 人 H19 具有 mRNA 的功能, 对细胞的增殖及分化等也具有重要的调节作用^[8-9]。H19 上游差异甲基化区 (differentially methylated regions, DMR) CCCTC 结合分子 (CCCTC-binding factor, CTCF) 结合位点的甲基化状态是 IGF-2 和 H19 最重要的印迹调控区。CTCF 可与该区域母本未甲基化 DNA 结合而不与父本甲基化 DNA 结合, 因与 DNA 结合状况的不同而对 IGF-2 和 H19 基因的表达行差异调控, 呈单亲本表达, 即父本的 H19 不表达 (被印迹) 而表达 IGF-2 而母本的 IGF-2 不表达 (被印迹) 而表达 H19^[4]。当 H19 上游 DMR 出现低甲基化时, 正常不表达 H19 的父本等位基因可表达 H19, 即 H19 印迹丢失, 同时沉默正常表达 IGF-2 父本等位基因^[10]; 而 H19 上游 DMR 区出现高甲基化时, 正常因为低甲基化而不表达 IGF-2 的母本等位基因可表达 IGF-2 即 IGF-2 印迹丢失, 同时沉默正常表达 H19 的母本等位基因^[11, 12]。可见, IGF-2 和 H19 的表达常呈交互抑制模式。IGF-2 和 H19 印迹表达紊乱被认为是肿瘤等增殖性疾病的重要发病机制, 但其与 VSMC 增殖之间的关系及其在 As 发病中的作用, 目前不清楚。

本研究结果表明, Hcy 刺激脐静脉 VSMC 48 h 后, VSMC 的增殖活力明显增加, 同时 H19 的 mRNA 表达随着 Hcy 浓度的增加而增加, 而 IGF-2 的 mRNA 和蛋白表达相应下调。由于 H19 和 IGF-2 的表达变化符合交互抑制模式, 因此本研究认为二者表达的改变可能与 Hcy 诱导 VSMC H19 上游差异甲基化区域的去甲基化改变有关, 后者导致了 H19 的表达上调和 IGF-2 表达下调^[13], 并进一步促进 VSMC 增殖。在近来的研究中发现, 在 As 的斑块组

织中有 H19 的再表达, 这可能是 As 发病的重要环节, 我们的实验结果与文献报道相一致; 另外, 有研究也提示 IGF-2 亦具有致动脉粥样硬化的活性^[7], 且 IGF-2 作为胰岛素家族的生长因子, 具有促细胞增殖的作用。本文显示 Hcy 抑制 IGF-2 表达似与其致动脉粥样硬化的特性相悖, 但 Jones 等^[14] 在小鼠的实验显示, IGF-2 表达的下调伴随着脂肪的堆积和肥胖, 而后者又是 As 的重要危险因素。因此, IGF-2 表达下调并不一定提示抗动脉粥样硬化。

本研究提示, Hcy 可干扰 IGF-2 和 H19 的印迹表达, 并可能进一步促进 VSMC 的增殖。

[参考文献]

- [1] Duell PB, Malinow MR. Homocyst(e)ine: an important risk factor for atherosclerotic vascular disease [J]. *Curr Opin Lipidol* 1997; **8** (1): 28-34
- [2] 王玉芳, 王树人. 同型半胱氨酸致动脉粥样硬化的机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998; **6** (3): 263-269
- [3] Ross R, Gilmset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis [J]. *Science* 1973; **180**: 1332-339
- [4] Takai D, Gonzales FA, Tsai YC, et al. Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer [J]. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 2619-2626
- [5] Ulaner GA, Vu TH, Li T, et al. Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site [J]. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 535-549
- [6] Han DK, Khaing ZZ, Pollock RA, et al. H19, a marker of developmental transition, is reexpressed in human atherosclerotic plaques and is regulated by the insulin family of growth factors in cultured rabbit smooth muscle cells [J]. *J Clin Invest* 1996; **97**: 1276-285
- [7] Zaina S, Pettersson L, Ahren R, et al. Insulin-like growth factor II plays a central role in atherosclerosis in a mouse model [J]. *J Biol Chem*, 2002; **277** (6): 4505-511
- [8] Constancia M, Hemberger M, Hughes J, et al. Placenta-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth [J]. *Nature* 2002; **417**: 945-948
- [9] Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor [J]. *RNA*, 2007; **13**: 313-316
- [10] Takai D, Gonzales FA, Tsai YC, et al. Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer [J]. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 2619-2626
- [11] Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, et al. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour [J]. *Nature* 1993; **362**: 749-751
- [12] Cui H, Horon IL, Ohlsson R, et al. Loss of imprinting in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability [J]. *Nature Med*, 1998; **4**: 1276-280
- [13] Li LJ, Xie J, Zhang M, et al. Homocysteine harasses the imprinted expression of IGF2 and H19 by demethylation of differentially methylated region between IGF2/H19 genes [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2009; **6**: 464-471
- [14] Jones BK, Levorse J, Tilghman SM. Deletion of a nuclease-sensitive region between the IGF2 and H19 genes leads to IGF2 misregulation and increased adiposity [J]. *Hum Molec Genet* 2001; **10**: 807-814

(此文编辑 许雪梅)