

# 同型半胱氨酸对内皮细胞 Bcl-2 基因甲基化水平的影响

李录<sup>1</sup>, 贾绍斌<sup>2</sup>, 孙娜<sup>1</sup>

(1. 宁夏医科大学, 2. 宁夏医科大学附属总院心脏中心, 宁夏银川市 750004)

[关键词] 动脉粥样硬化; 同型半胱氨酸; 人脐静脉内皮细胞; Bcl-2; 甲基化

[摘要] **目的** 研究同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞 Bcl-2 基因启动子区甲基化水平及其表达的影响。**方法** 以人脐静脉内皮细胞为实验对象, 用含有不同浓度同型半胱氨酸的 RPMI1640 培养液对其作用 48 h, MTT 法测定细胞增殖生长能力并确定实验药物浓度; 流式细胞术测定细胞凋亡水平; 荧光定量 PCR 测定 Bcl-2 mRNA 表达; 甲基化特异性 PCR 联合巢式降落式 PCR 测定 Bcl-2 启动子区甲基化水平。**结果** 同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞的增殖能力有明显的抑制作用, OD 值从  $0.99 \pm 0.05$  逐渐下降至  $0.28 \pm 0.03$  ( $P < 0.01$ ), 呈明显的剂量效应关系; 与对照组相比, 实验组细胞凋亡率由  $2.30\% \pm 0.60\%$  上升至  $16.40\% \pm 0.73\%$  ( $P < 0.01$ ), Bcl-2 mRNA 表达明显下降 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2 基因启动子区甲基化水平降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 同型半胱氨酸通过下调 Bcl-2 启动子区的甲基化水平导致其 mRNA 表达水平减少, 继而诱发内皮细胞凋亡, 这可能在同型半胱氨酸促动脉粥样硬化过程中起到重要作用。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

## Effects of Homocysteine on Bcl-2 Gene Methylation of Endothelial Cell

LI Lu<sup>1</sup>, JIA Shao-Bin<sup>2</sup>, and SUN Na<sup>1</sup>

(1. Ningxia Medical University, 2. Heart Center, Affiliated General Hospital of Ningxia Medical University, Yingchuan, Ningxia 750004, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Homocysteine; Human Umbilical Endothelial Cell; Bcl-2; Methylation

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of homocysteine (Hcy) on methylation of Bcl-2 in human umbilical endothelial cells (HUVEC). **Methods** After human umbilical endothelial cells were treated with different concentrations of Hcy for 48 h, MTT was used to measure the reproduction of human umbilical endothelial cells and IC50 concentration of Hcy, the flow cytometry assay was used to detect the rate of cell apoptosis, the expressions of Bcl-2 mRNA level were analyzed by fluorescence quantitative PCR, the methylation of Bcl-2 promoter region methylation level was determined by nest touch-down PCR combined methylation specific PCR (MSP). **Results** The proliferation of human umbilical endothelial cells was inhibited by Hcy in a dose-independent manner, the OD value decreased from  $0.99 \pm 0.05$  to  $0.28 \pm 0.03$  ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the rate of apoptosis in human umbilical endothelial cells increased from  $2.30\% \pm 0.60\%$  to  $16.40\% \pm 0.73\%$  ( $P < 0.01$ ), the expressions of Bcl-2 mRNA were significantly depressed ( $P < 0.01$ ), the Bcl-2 promoter region methylation levels in experimental group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Increasing endothelial cell apoptosis by decreasing Bcl-2 promoter region methylation level and reducing expression of Bcl-2 may play an important role in the pathogenesis of Hcy induced atherosclerosis.

人类基因组计划完成后, 基因组学的研究进入功能基因组学时代, 其中 DNA 甲基化的表观遗传学的研究受到重视。DNA 甲基化与包括动脉粥样硬化在内的多种疾病的发生、发展有关<sup>[1]</sup>。高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocystinemia, HHcy) 是动脉粥

样硬化的独立危险因素, 血浆同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 水平与冠状动脉硬化性心脏病的关系密切, Hcy 每升高  $5 \mu\text{mol/L}$ , 冠心病事件的发生率上升 20%<sup>[2,3]</sup>, 且与冠心病的严重程度呈正相关<sup>[4]</sup>。但 Hcy 致动脉粥样硬化的发病机制并不完全清楚,

[收稿日期] 2013-05-02

[基金项目] 宁夏自然科学基金(NZ11266)资助

[作者简介] 李录, 硕士研究生, 研究方向为冠状动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 lnr0923@163.com。通讯作者贾绍斌, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化及高血压病发病机制, E-mail 为 jsbxn@163.com。孙娜, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床。

有学者认为与内皮细胞凋亡有关。Bcl-2 是调节凋亡的关键基因,其启动子区甲基化状态在此过程中是否起到调节作用值得深入研究。本研究通过 MTT 法对 Hcy 进行浓度筛选,流式细胞术进行细胞凋亡率的比较,然后从 Bcl-2 的 mRNA 表达、Bcl-2 启动子区甲基化水平等方面进行观察,探索 Bcl-2 甲基化在 Hcy 促内皮细胞凋亡中的作用,从而为 Hcy 致动脉粥样硬化发病机制提供新的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical endothelial cell, HUVEC)株(ATCC, 美国), Hcy 试剂(Sigma, 美国), RPMI1640 培养液(Hyclone, 美国), 胎牛血清(北京全金金生物技术有限公司), MTT 细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司), 细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物技术有限公司), Trizol(Invitrogen, 美国), DNA 提取纯化试剂盒, SYBR Green qPCR supermix、2 × Gotag Green Master Mix (Promega, 美国), EZ DNA Methylation-Gold™ Kit、DNA 甲基化阳性对照(ZYMO, 美国), Bcl-2 mRNA 引物及甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)引物均由上海生工生物有限公司合成。

### 1.2 人脐静脉内皮细胞的培养及实验分组

细胞以含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养、传代。MTT 细胞增殖实验分为 5 组:对照组、2 mmol/L Hcy 组、4 mmol/L Hcy 组、8 mmol/L Hcy 组、16 mmol/L Hcy 组、32 mmol/L Hcy 组。作用时间为 48 h。以改良寇氏公式计算半数增殖抑制率(IC<sub>50</sub>),以 IC<sub>50</sub> 时 Hcy 浓度组作为后续实验组。作用时间仍为 48 h。

### 1.3 MTT 法测定细胞增殖生长能力

收集对数期生长细胞,以培养液重悬,调整悬液浓度,按每孔 100 μL 均匀铺于 96 孔板,常规培养,待细胞长满孔底约 70% 时,用含不同浓度的 Hcy 培养液干预细胞。每组设 6 个复孔。48 h 后每孔加入 50 μL 1 × MTT, 37℃ 孵育 4 h。吸取上清液后每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,摇床平摇 10 min,于酶标仪 490 nm 波长处检测每孔光密度(optical density, OD)值。抑制率(%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%, 根据改良寇氏公式<sup>[4]</sup>计算半数抑制率(IC<sub>50</sub>)。以 IC<sub>50</sub> 时 Hcy 浓度组作用后续实验的实验组。

### 1.4 流式细胞术测定细胞凋亡率

分别对对照组和实验组细胞培养、干预 48 h,用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞,并以 2000 r/min 离心 5 min 后,弃培养液。用冷 PBS 洗涤细胞 3 次,用 400 μL 1 × Annexin V 结合液悬浮细胞,使其浓度约为 1 × 10<sup>9</sup>/L。加入 5 μL Annexin V-FITC 染色液,于 4℃ 避光条件下孵育 15 min。加入 10 μL PI 染色液后混匀于 4℃ 避光孵育 5 min。立即以流式细胞仪进行分析,激发波长为 488 nm。

### 1.5 荧光定量 PCR 测定 Bcl-2 mRNA 表达

采用 Trizol 法按试剂说明书提取细胞总 RNA。使其 OD<sub>260/280</sub> 位于 1.8 ~ 2.0 之间。每组取 1 mg 总 RNA,逆转录为 cDNA。随后配制 20 μL PCR 反应体系: Nuclease-Free Water 5.2 μL、上游引物(10 μmol/L) 0.4 μL(序列 5'-ATG TGT GTG GAG AGC AA-3')、下游引物(10 μmol/L) 0.4 μL(序列 5'-ACC TAC CCA GCC TCC GTT AT-3')、2 × GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix 10 μL、模版 cDNA 4 μL。反应条件:95℃ 预变性 2 min,1 个循环;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 1 min。变性及退火共进行 40 个循环,采用 Roche Lighter Cycle 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应。以 β-actin 为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法对 Bcl-2 mRNA 表达进行半定量分析。

### 1.6 DNA 的提取及亚硫酸盐修饰

按照 DNA Purification Kit 说明进行 DNA 提取,紫外分光光度仪测定其浓度,并使 OD<sub>260/280</sub> 位于 1.6 ~ 1.8 之间。分别取实验组及对照组 500 pg DNA,用去离子水将其体积调整到 20 μL,加入 130 μL CT 转化试剂,98℃ 孵育 10 min,64℃ 孵育 2.5 h,经脱硫后用 10 μL 溶解液洗脱 DNA。-80℃ 保存用于 MSP 法测定甲基化水平。

### 1.7 MSP 法测定 Bcl-2 基因启动子区甲基化水平

为提高扩增效率,联合应用 MSP 及巢式降落式 PCR。使用在线软件 Methptimer 设计 Bcl-2(NM\_138764) 外引物和 MSP 引物,巢式外引物上游为 GTTT TGTT TTTA TTTA TTTA GTAG TTTT T,下游为 AATC CTAT AATA TTTT CCCC TTCT C,产物长度 224 bp; Bcl-2 甲基化引物上游为 GTTT TCGT TTTC GGT TTTT TATC,下游为 CCTA TAAT ATTT TCCC CTTC TCGA C,产物长度 146 bp; Bcl-2 非甲基化引物上游为 TTTT TGTT TTTC GTTT TTTT ATTT T,下游为 CCTA TAAT ATTT TCCC CTTC TCAA C,产物长度 145 bp。按下述体积建立 50 μL PCR 反应体系:2 × Gotag Green Master Mix 25 μL, Nuclease-Free Water 20 μL, 上游引物(10 μmol/L) 1 μL, 下游引物(10

μmol/L) 1 μL, DNA 模版 3 μL。反应条件:95℃ 预变性 10 min, 1 个循环;95℃ 变性 30 s, 退火温度 68℃ → 48℃, 每循环降低 1℃, 72℃ 延伸 30 s, 共扩增 20 个循环;50℃ 退火温度下再扩增 30 个循环。PCR 产物行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以 Quantity One 软件测量条带灰度值。以甲基化条带灰度值/非甲基化条带灰度值(M/U) 计算甲基化水平。同时设置人类 DNA 甲基化阳性对照、以水代替模版的空白对照。

1.8 统计学方法

各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。经正态性检验及方差齐性检验后, 多组间均数的比较采用单因素方差分析, 两组间均数的比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖能力

随着 Hcy 浓度的增加, 各组 OD 值逐渐降低 ( $P < 0.01$ ), 且呈剂量效应关系。IC50 的 Hcy 浓度为 9.28 mmol/L, 取其近似值 9.00 mmol/L 作为后续实验组 Hcy 浓度(表 1)。

表 1. MTT 法检测各组细胞增殖能力( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1. Cell proliferation ability in different groups were treated with Hcy by MTT( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分 组	OD 值
对照组	0.99 ± 0.05
2 mmol/L Hcy 组	0.82 ± 0.07 <sup>ab</sup>
4 mmol/L Hcy 组	0.74 ± 0.05 <sup>ab</sup>
8 mmol/L Hcy 组	0.56 ± 0.05 <sup>ab</sup>
16 mmol/L Hcy 组	0.42 ± 0.05 <sup>ab</sup>
32 mmol/L Hcy 组	0.28 ± 0.03 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 不同浓度 Hcy 组间比较。

2.2 细胞凋亡水平

第一象限为晚期凋亡细胞, 第四象限为早期凋亡细胞, 本研究将第一和第四象限之和进行统计。内皮细胞凋亡率由对照组的 2.30% ± 0.60% 上升至实验组的 16.40% ± 0.73% ( $P < 0.05$ ; 图 1)。

2.3 Bcl-2 mRNA 的表达

与对照组相比, 实验组 Bcl-2 mRNA 的表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ; 图 2)。

2.4 Bcl-2 基因启动子区甲基化水平

M/U 比值由对照组的 1.96 ± 0.26 下降至实验组的 1.20 ± 0.19, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 图 3)。

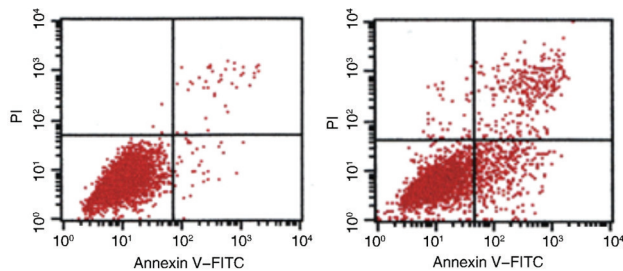


图 1. 两组细胞凋亡分析 左图为对照组, 右图为实验组。

Figure 1. Apoptosis analysis of HUVEC in each group

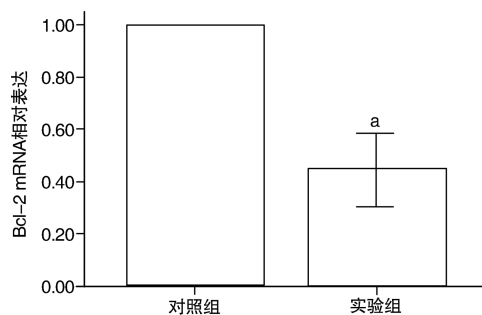


图 2. 两组 Bcl-2 mRNA 的表达水平( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

Figure 2. The expression of Bcl-2 mRNA level in each group( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

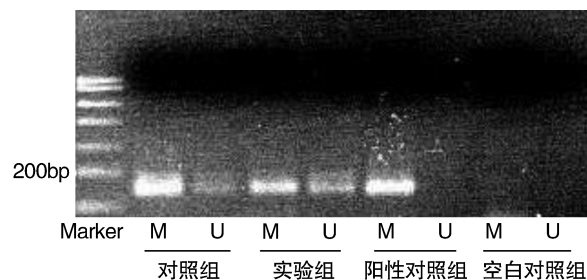


图 3. HUVEC Bcl-2 基因启动子区甲基化水平 M 为甲基化条带, 146 bp; U 为非甲基化条带, 145 bp。

Figure 3. Bcl-2 promoter region methylation level in HUVEC

3 讨论

表观遗传学是指在 DNA 核酸序列不发生改变的情况下, 从染色质水平研究生物体如何对基因的表达实现调控<sup>[5,6]</sup>。其内容包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、RNA 干扰等<sup>[7,8]</sup>。近年来基因的甲基化与动脉粥样硬化的关系, 特别是与冠心病的关系逐渐受到人们的重视。DNA 甲基化是指 DNA 在甲基转移酶的作用下, 生成甲基嘌呤或嘧啶。对真核生物而言, 甲基化位点只发生在 5'-CpG-3' 二核苷酸上, 从而形成 5-甲基胞嘧啶<sup>[9]</sup>。CpG 二核苷酸主要存在于 CpG 岛<sup>[10]</sup>。CpG 岛甲基化后一方面可直接干扰转录因子

与 DNA 的调控区域结合,另一方面则可与甲基结合蛋白相结合,占据转录因子在 DNA 上的结合位点,影响基因的转录和表达<sup>[11]</sup>。这样基因就可能通过对 CpG 位点,特别是 CpG 岛的甲基化状态的调控而实现对基因转录和蛋白质表达水平的调控。而 CpG 岛主要集中在基因的启动子及第一外显子区域。

Hcy 是甲硫氨酸代谢过程中的重要中间产物。甲硫氨酸在腺苷转移酶的作用下形成 S-腺苷甲硫氨酸,并最终在甲基转移酶的作用下形成 S-腺苷同型半胱氨酸,继而形成 Hcy。在此过程中生成的 S-腺苷甲硫氨酸正是 DNA 甲基化过程中的甲基供体。HHcy 是动脉粥样硬化的独立风险因素,有学者认为 Hcy 的致动脉粥样硬化作用与其促进内皮功能失调有关,其中促内皮细胞凋亡是其重要一环<sup>[12]</sup>。

细胞凋亡的过程主要是通过以下两种基本信号途径得以实现:一是死亡受体途径,又称外源性凋亡途径;二是线粒体凋亡途径,又称内源性途径。但无论内源性凋亡途径,还是外源性凋亡途径,在其最终均有赖于 Caspase 3 的激活<sup>[13]</sup>。Bcl-2 基因可通过抑制细胞色素 C 从线粒体透过线粒体膜向胞浆的释放,阻止 Caspase 9 前体活化,从而最终阻止 Caspase 3 活化,防止凋亡的发生。作为调节细胞凋亡的关键基因,Bcl-2 在 Hcy 致内皮细胞凋亡进而引起动脉粥样硬化的过程中是否起到了调节作用,以及 Bcl-2 启动子区 CpG 岛是否发生了甲基化水平的改变,值得进一步研究与探讨。

本研究发现,Hcy 可使 Bcl-2 基因启动子区发生低甲基化,同时 mRNA 表达含量下降,与此同时内皮细胞凋亡比率却明显升高,由此提示,HHcy 的致动脉粥样硬化作用可能正是通过下调 Bcl-2 基因启动子区的甲基化水平,减少 Bcl-2 的表达,引起动脉内皮凋亡,这样吞噬了低密度脂蛋白的单核细胞才得以在动脉内皮下浸润,形成泡沫细胞。

然而 Hcy 生成过程中,提供了大量的甲基供体,在理论上似乎有理由相信,HHcy 只会导致基因组的高甲基化,与本研究得出的结论相悖,既往的研究也提示 Hcy 对基因组甲基化水平的调节相当复杂,可能有一组织特异性,如 Devlin 等<sup>[14]</sup>发现,HHcy 鼠的 H19 基因甲基化水平在肝脏中低甲基化,而在脑组织及主动脉组织中却截然相反,发生这一现象的原因尚不清楚。我们既往在对 HHcy 大鼠主动脉组织的研究中发现,虽然 Bcl-2 启动子区同样发生了去甲基化,但其 Bcl-2 的 mRNA 表达却明显增加<sup>[15]</sup>。究其原因可能与大鼠主动脉组织中主要以平滑肌细胞为主有关。这与 Chiang

等<sup>[16]</sup>的研究结果相符。提示 DNA 甲基化水平的改变对基因表达的调控在不同的组织与位点是不同的,但其明确原因有等后续研究进一步深入。

综上所述,我们有理由认为,Hcy 是通过下调 Bcl-2 基因启动子区的甲基化水平降低 Bcl-2 的表达,从而引起内皮细胞凋亡,并且有可能是 Hcy 促进动脉粥样硬化发生与发展的重要机制之一。

#### [参考文献]

- [1] 姜绮霞,袁洪,黄志军,等. DNA 甲基化与心血管疾病[J]. 生命的化学, 2009, 29 (2): 239-242.
- [2] Humphrey LL, Fu R, Rogers K, et al. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis [J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83 (11): 1 203-212.
- [3] Christen WG, Ajani UA, Glynn RJ, et al. Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease: causal or casual [J]? Arch Intern Med, 2000, 160: 422-434.
- [4] 钟白云,李腊秀,廖经忠,等. 同型半胱氨酸与冠状动脉硬化性心脏病的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 12: 1 802-805.
- [5] Webster AL, Yan MS, Marsden PA. Epigenetics and cardiovascular disease[J]. Can J Cardiol, 2013, 29 (1): 46-57.
- [6] Fazzari MJ, Grealley JM. Introduction to epigenomics and epigenome-wide analysis Methods[J]. Mol Biol, 2010, 620: 243-265. .
- [7] Kundu S, Peterson CL. Role of chromatin states in transcriptional memory[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1790: 445-455.
- [8] Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66: 596-612.
- [9] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer association with promoter hypermethylation[J]. N Engl J Med, 2003, 349 (21): 2 042-054.
- [10] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory [J]. Genes Dev, 2002, 16 (1): 6-21.
- [11] Davis CD, Uthus EO. DNA Methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2004, 229 (10): 988-995.
- [12] 王雪婷,王俭勤. 内皮细胞凋亡与动脉粥样硬化[J]. 实用医学杂志, 2011, 27 (16): 3 072-074.
- [13] Fulda S. How to target apoptosis signaling pathways for the treatment of pediatric cancers[J]. Front Oncol, 2013, doi: 10.3389/fonc.2013.00022.
- [14] Devlin AM, Bottiglieri T, Domann FE, et al. Tissue-specific changes in H19 methylation and expression in mice with hyperhomocysteinemia[J]. J Biol Chem, 2005, 280 (27): 25 506-511.
- [15] 候建军,贾绍斌,张政军,等. 瑞舒伐他汀对高同型半胱氨酸血症大鼠主动脉组织 Bcl-2 甲基化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (3): 220-224.
- [16] Chiang JK, Sung ML, Yu HR, et al. Homocysteine induces smooth muscle cell proliferation through differential regulation of cyclins A and D1 expression[J]. J Cell Physiol, 2011, 226 (4): 1 017-026.

(此文编辑 文玉珊)