

# 5-氮杂-2'-脱氧胞苷通过上调法尼酯 X 受体启动子甲基化水平抑制 HepG2 细胞载脂蛋白 A 表达

马小峰<sup>1,2</sup>, 谭剑凯<sup>1,2</sup>, 张海<sup>1</sup>, 何兴兰<sup>1</sup>, 瞿凯<sup>1</sup>, 雷建军<sup>1</sup>, 王佐<sup>1</sup>

(1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001;

2. 南华大学附属南华医院心内科, 湖南省衡阳市 421002)

[关键词] 载脂蛋白 A; 脂蛋白(a); 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; DNA 甲基化; 法尼酯 X 受体

[摘要] **目的** 探索 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)的 DNA 去甲基化作用对 HepG2 细胞载脂蛋白 A(ApoA)表达的影响,并探讨其作用机制。**方法** 选取 ApoA 高表达细胞株 HepG2 细胞为研究对象。噻唑蓝法测定 HepG2 经不同浓度(0、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ )的 5-Aza-CdR 处理不同时间(12、24、48、72、96 h)后细胞相对存活率;Western blot 检测 5-Aza-CdR 不同浓度组 HepG2 细胞 ApoA、法尼酯 X 受体(FXR)的表达水平;逆转录聚合酶链反应检测 ApoA、FXR 的 mRNA 水平;亚硫酸氢盐测序 PCR 检测 FXR 基因启动子在 5-Aza-CR 不同浓度组的甲基化水平。**结果** 与对照组相比,5-Aza-CR 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  组在 12、24、48、72 h 各组间细胞存活率无统计学差异( $P > 0.05$ ),而在 20  $\mu\text{mol/L}$  96 h 组、40  $\mu\text{mol/L}$  96 h 组、80  $\mu\text{mol/L}$  24 h 组、80  $\mu\text{mol/L}$  48 h 组、80  $\mu\text{mol/L}$  72 h 组以及 80  $\mu\text{mol/L}$  96 h 组 HepG2 细胞存活率存在统计学差异( $P < 0.05$ ),选取 0~40  $\mu\text{mol/L}$  为 5-Aza-CdR 的安全浓度范围,0~72 h 为合适作用时间。与对照组相比,5-Aza-CdR 呈剂量和时间依赖性上调 FXR 蛋白、下调 ApoA 蛋白表达,其中以 40  $\mu\text{mol/L}$  组最为明显( $P < 0.05$ );与对照组相比,5-Aza-CdR 呈剂量依赖性上调 FXR mRNA、下调 ApoA mRNA 表达,其中以 40  $\mu\text{mol/L}$  组最为明显( $P < 0.05$ )。随着 5-Aza-CdR 浓度的递增,FXR 基因启动子甲基化水平呈下降趋势,其中对照组 FXR 基因启动子甲基化率为 58.3%,而 40  $\mu\text{mol/L}$  组 FXR 基因启动子甲基化率仅为 8.3%。**结论** 5-Aza-CdR 通过 DNA 去甲基化作用促进 FXR 表达,从而下调 ApoA 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## 5-Aza-2'-Deoxycytidine Inhibits HepG2 Cells Apolipoprotein A Expression via Increasing Farnesoid X Receptor Promoter Methylation

MA Xiao-Feng<sup>1,2</sup>, TAN Jian-Kai<sup>1,2</sup>, ZHANG Hai<sup>1</sup>, HE Xing-Lan<sup>1</sup>, QU Kai<sup>1</sup>, LEI Jian-Jun<sup>1</sup>, and WANG Zuo<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Cardiology, Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein A; Lipoprotein(a); 5-Aza-2'-Deoxycytidine; DNA Methylation; Farnesoid X Receptor

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the DNA demethylation effect of 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on the expression of apolipoprotein A (ApoA) and its mechanisms in HepG2 cells. **Methods** HepG2 cells, high ApoA expression cell lines, were selected for our study. ①In order to get an appropriate drug concentration and effect time, HepG2 cells were treated with different concentration(0, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$ ) and different time (12, 24, 48, 72, 96 h), then the relative survival ratio of HepG2 cells were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. ②mRNA and protein level of ApoA and farnesoid X receptor (FXR) were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot respectively in HepG2 cells which was treated with 5-Aza-CdR. ③DNA methylation

[收稿日期] 2014-06-24

[基金项目] 国家自然科学基金(810702)

[作者简介] 马小峰, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管相关疾病研究, E-mail 为 13786437543@139.com。谭剑凯, 硕士, 主要从事心血管相关疾病研究。通讯作者王佐, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 smt121101@163.com。

status of FXR gene promoter in different 5-Aza-CdR concentration was analyzed by bisulfite sequencing PCR (BSP).

**Results** ①Results of MTT: compared with control group, at different time point (12, 24, 48, 72 h), the survival ratio of HepG2 cells had no significant difference in 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$  groups ( $P > 0.05$ ). But in group of 20  $\mu\text{mol/L}$  96 h, 40  $\mu\text{mol/L}$  96 h, 80  $\mu\text{mol/L}$  24 h, 80  $\mu\text{mol/L}$  48 h, 80  $\mu\text{mol/L}$  72 h and 80  $\mu\text{mol/L}$  96 h, the survival ratio of HepG2 cells had obviously significant difference. We chose 0-40  $\mu\text{mol/L}$  as safe concentration range, and selected 0-72 h as appropriate time. ②Results of RT-PCR: compared with control group, the expression of ApoA mRNA were down-regulated by 5-Aza-CdR dose dependently, while the expression of FXR mRNA were up-regulated by 5-Aza-CdR dose dependently, and obvious change appeared at 40  $\mu\text{mol/L}$  72 h ( $P < 0.05$ ). ③Results of Western blot: compared with control group, the expression of ApoA were down-regulated by 5-Aza-CdR dose dependently, while the expression of FXR were up-regulated by 5-Aza-CdR dose dependently, and obvious change appeared at 40  $\mu\text{mol/L}$  72 h ( $P < 0.05$ ). ④Results of BSP: with the increase of concentration of 5-Aza-CdR, the methylation status of FXR gene promoter was gradually reduced, and the methylation ratio of control group was 58.3%, the 40  $\mu\text{mol/L}$  group was 8.3%. **Conclusion** 5-Aza-CdR can promote the expression of FXR through the demethylation effect, then down-regulate the expression of ApoA.

脂蛋白(a) [lipoprotein(a), Lp(a)] 是 1963 年由挪威遗传学家 Berg 等<sup>[1]</sup> 在研究低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 的遗传变异时, 从血浆中分离出的一种富含胆固醇的特殊脂蛋白复合物。Lp(a) 的化学组成与 LDLC 相似, 由 LDLC 微粒核心及载脂蛋白 B100 (apolipoprotein B100, ApoB100) 经二硫键与载脂蛋白 A (apolipoprotein A, ApoA) 连接而成<sup>[2]</sup>。与 LDLC 相比 Lp(a) 游离脂肪酸含量较高, 且 ApoA 上的环饼结构域 IV (kringle IV) 为氧化磷脂的结合位点, 有着较 LDLC 更高的氧化易感性; 氧化型脂蛋白(a) [oxidized lipoprotein(a), ox-Lp(a)] 通过损伤血管内皮细胞依赖的舒张功能、诱导巨噬细胞泡沫化及促进血管平滑肌细胞增殖等生物殖学效应参与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的形成。此外, ApoA 在结构域上与纤维蛋白溶解酶原 (plasminogen, Plg) 具有高度的同源性, 可竞争性地抑制纤维蛋白原的激活从而促进血栓形成<sup>[3]</sup>, 因此其致 As 的作用较 LDLC 更强<sup>[4,5]</sup>。因此高 Lp(a) 已经成为 As 的一个独立危险因素<sup>[6]</sup>, 对高 Lp(a) 进行有效干预具有十分重要的意义。

血浆中 Lp(a) 的浓度主要由遗传因素所决定, 目前已证实, 血浆 Lp(a) 水平 90% 由 ApoA 的编码基因 LPA 所决定<sup>[7]</sup>。法尼酯 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 是核受体超家族成员之一, 主要在肝脏、小肠、肾脏及肾上腺等组织表达。研究发现, 在 LPA 基因的启动子 -826 ~ -814 区域存在 FXR 的负性反应元件, FXR 通过与肝细胞核因子 4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ ) 竞争性结合此反应元件抑制 LPA 基因的表达, 进而影响血浆 Lp(a) 水平<sup>[8]</sup>。大量研究表明, 基因的表观遗传修饰在 As 的发生发展中有着十分重要的作用, DNA 甲基化作

为最常见的表观遗传调控方式目前已成为表观遗传学领域研究的热点。但甲基化是否影响 Lp(a) 的水平尚未见报道。本研究拟以 FXR 及其调控的 LPA 为研究对象, 初步探讨 DNA 甲基化与 FXR 基因表达的关系及其对 ApoA 表达的影响, 从表观遗传角度调控 Lp(a), 为 As 的防治提供实验依据和干预靶点。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

人肝癌细胞株 HepG2 细胞由南华大学病原实验室惠赠。苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) (碧云天生物技术公司), 胎牛血清 (杭州四季青生物公司), 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) (美国 Sigma 公司)。兔抗人 ApoA 一抗 (台湾 Abnova 公司), 兔抗人 FXR 一抗、兔抗人  $\beta$ -actin 一抗 (Santa Cruz 生物技术公司), 羊抗兔辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记二抗、超纯 RNA 提取试剂盒、DNA 提取试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司), ECLplus 化学发光试剂盒 (碧云天生物技术公司), 第一链 cDNA 合成试剂盒 (美国 Fermentas 公司), TaqDNA 聚合酶 SC0010、聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 产物纯化回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、感受态细胞制备试剂盒 (上海生工生物有限公司)。其他试剂均为进口或国产分析纯。-80 $^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱 (日本三洋公司), Exl800 型酶标仪 (美国 Biotek 公司), ECL 化学发光成像分析系统 (Tanon 生物技术公司), 3730 测序列分析仪 (美国 ABI 公司), 电子

分析天平(上海舜宇恒平科学仪器厂)。

## 1.2 CpG 岛预测

FXR 启动子序列来自“UCSC”(http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgNear),“MethprimerTools and Databases-Li Lab, UCSC”在线预测 FXR 基因启动子 CpG 岛(http://www.urogene.org/methprimer/index1.html),点击“Go to Methprimer(plus CpG Island Prediction)”,将 FXR 基因启动子序列输入页面中间空白处,点击“Submit”。

## 1.3 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基进行培养,静置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱内,每隔 24 h 更换培养基,待细胞进入对数生长期后进行实验。

## 1.4 MTT 检测细胞存活率

取处于对数生长期的 HepG2 细胞,在胰蛋白酶消化后经台盼蓝染色计数,调整细胞密度为  $1 \times 10^7/L$ ,按每孔 200  $\mu L$  细胞悬液接种于 96 孔板。总共接种 5 块板,每组设 5 个复孔。待细胞贴壁后进行如下处理:弃去上清液,用 5-Aza-CdR 浓度分别为 0、10、20、40、80  $\mu mol/L$  的培养基继续培养 HepG2 细胞 12、24、48、72、96 h,每隔 24 h 更换培养基。在各时间点分别取 1 块板,每孔加入 MTT 20  $\mu L$ ,静置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 4 h 后终止培养,小心吸尽培养基,每孔加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)150  $\mu L$ ,置于脱色摇床上振荡 10 min,酶标仪上选择 570 nm 波长测定各孔吸光度值。

## 1.5 逆转录聚合酶链反应

总 RNA 提取采用 Ultrapure RNA Kit 试剂盒分离纯化总 RNA,纯度鉴定后置于 -80℃ 冰箱保存备用。cDNA 制备采用 Fermentas 逆转录试剂盒,PCR 仪上设定 42℃ 60 min,70℃ 5 min 后终止反应,制备出 cDNA。PCR 反应,ApoA 引物序列:正向链:5'-CTACCACGGAAATGGACAGAGT-3',反向链:5'-GTAACACCAAGGGCGAATCTC-3',扩增产物长度 526 bp,反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,57.7℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环,72℃ 延伸 5 min;FXR 引物序列:正向链:5'-CCGACTTATCCTAATGCGAAAT-3',反向链:5'-CGATGTCTTCTACCTCCTCTAA-3',扩增产物长度 312 bp,反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,56.5℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环,72℃ 延伸 5 min; $\beta$ -actin 引物序列:正向链:5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3',反向链:5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3',扩增产物长度 285 bp,反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,55℃

30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环,72℃ 延伸 5 min。反应结束后取 10  $\mu L$  反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA 表达水平。

## 1.6 Western blot

收集细胞并分瓶,每瓶细胞加入细胞裂解液 100  $\mu L$ (裂解液与 PMSF 按 96:4 比例配置),冰上裂解细胞 30 min,提取总蛋白液。从其中取 6  $\mu L$  用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法进行蛋白定量,其余总蛋白样本按照蛋白:十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液为 4:1 的比例加入蛋白上样缓冲液,于涡旋器上震荡 5 s 混匀样本,沸水中煮沸 5 min。ApoA 检测采用 4% 浓缩胶,6% 分离胶,FXR 和  $\beta$ -actin 检测采用 5% 浓缩胶,10% 分离胶。每孔蛋白上样量 40  $\mu g$ ,电泳采用恒压模式,先 80 V 电泳 30 min,然后电压切换至 100 V 电泳直至溴酚蓝跑出胶外后再延时 5 min。小心卸开制胶玻璃板,将 SDS-PAGE 胶浸泡于转膜液中平衡 3 min,二氟化树脂(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜于甲醇溶液中浸泡 5~10 s 使其激活。转膜采用湿转,恒流 200 mA 转膜 2 h,转膜完成后在 4℃ 冰箱用 1% BSA 封闭 8 h 或过夜。TBST 稀释一抗,抗体稀释比例 1:6000,4℃ 冰箱孵育 6 h 或过夜,TBST 洗膜 6 次,每次 10 min。TBST 稀释二抗,抗体稀释比例 1:2000,室温下 2 h,TBST 洗膜 6 次,每次 10 min。用滤纸吸干 PVDF 膜上的液体,ECL 显影液在 Tanon 化学发光成像系统显影。

## 1.7 亚硫酸氢盐测序 PCR

采用通用型 TissueGene DNA Kit 提取细胞总 DNA。对提取的 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰后,再进行甲基化特性 PCR,此即亚硫酸氢盐测序 PCR(bisulfite sequencing PCR,BSP)。FXR 甲基化 PCR 引物:正向序列:5'-GAATTTTTTAAGGGGTTAGAGAG-3',反向序列:5'-TTTTAAAACTAAAACCTCACTC-TATC-3'。50  $\mu L$  PCR 体系:在 EP 管中依次加入经亚硫酸氢盐修饰的 DNA 模板 3  $\mu L$ ,正反引物各 1  $\mu L$ ,脱氧核苷三磷酸(deoxynucleosine triphosphate, dNTP)1  $\mu L$ ,以 Taq 缓冲液稀释 10 倍的 PCR 缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>)5  $\mu L$ ,Taq 酶 0.8  $\mu L$ ,去酶水 38.2  $\mu L$ 。PCR 反应条件:98℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 45 s,72℃ 延伸 1 min,以上步骤重复 20 个循环,然后按照 94℃ 变性 45 s,56℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,重复 20 个循环,每经 1 个循环温度降低 0.5℃,72℃ 修复延伸 8 min。将 PCR 纯化产物连接到 pUC18-T 载体,18℃ 连接过夜,并把连接产物转换,制备感受态

细胞,筛选蓝白斑,提取质粒。采用美国 ABI 公司 3730 测序仪进行质粒测序,测序图谱的峰图文件用 Chromas 软件打开。

## 1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计学软件分析所有数据,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。样本的组间比较采用单因素方差分析及  $t$  检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FXR 基因启动子 CpG 岛预测

“MethprimerTools and Databases-Li Lab, UCSC” 预测结果显示,在 FXR 基因启动子 82 ~ 195 bp 处有一长度为 114 bp 的 CpG 岛。

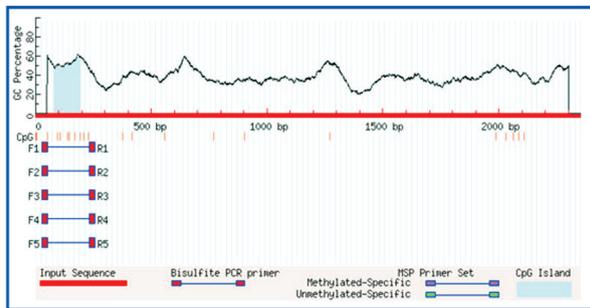


图 1. UCSC 预测 FXR 基因启动子 CpG 岛

Figure 1. Prediction CpG island of FXR promoter through UCSC

### 2.2 5-Aza-CdR 对 HepG2 细胞存活率的影响

用 MTT 方法检测 5-Aza-CdR 各浓度组及时间组 HepG2 细胞的存活率(图 2)。以 5-Aza-CdR 0  $\mu\text{mol/L}$  组为对照组(下同)。与对照组相比,5-Aza-CdR 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  组在 12、24、48、72 h 各组间 HepG2 细胞存活率差异不显著( $P > 0.05$ )。而在 20  $\mu\text{mol/L}$  96 h 组、40  $\mu\text{mol/L}$  96 h 组、80  $\mu\text{mol/L}$  24 h 组、80  $\mu\text{mol/L}$  48 h 组、80  $\mu\text{mol/L}$  72 h 组以及 80  $\mu\text{mol/L}$  96 h 组 HepG2 细胞存活率存在显著差异( $P < 0.05$ )。故后续实验把 5-Aza-CdR 的浓度控制在 0 ~ 40  $\mu\text{mol/L}$ ,时间控制在 0 ~ 72 h,以排除 5-Aza-CdR 的毒性效应。

### 2.3 5-Aza-CdR 对 HepG2 细胞 ApoA 表达的影响

与对照组相比,5-Aza-CdR 20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  组 ApoA mRNA 的表达水平显著减低( $P < 0.05$ ),30、40  $\mu\text{mol/L}$  组与 10  $\mu\text{mol/L}$  组相比 ApoA mRNA 的表达也明显减低( $P < 0.05$ ),40  $\mu\text{mol/L}$  组与 20

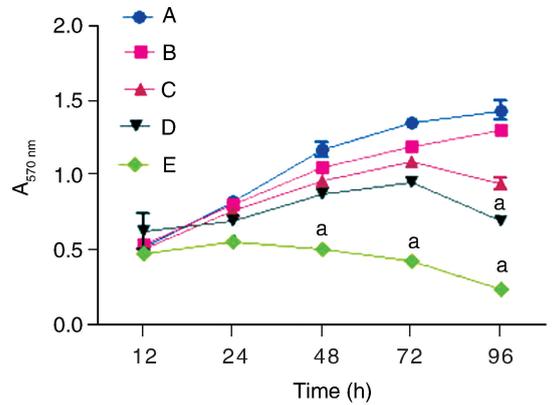


图 2. 5-Aza-CdR 对 HepG2 细胞存活率的影响( $n = 5$ )

A、B、C、D、E 分别为 5-Aza-CdR 0、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  组。a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较。

Figure 2. Effect of 5-Aza-CdR on survival rate of HepG2 ( $n = 5$ )

$\mu\text{mol/L}$  组相比 ApoA mRNA 的表达水平亦明显减低,但 10  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组相比 ApoA mRNA 的表达水平无明显差别(图 3A、图 3B)。与对照组相比,5-Aza-CdR 30、40  $\mu\text{mol/L}$  组 HepG2 细胞 ApoA 的表达明显下调,其中 40  $\mu\text{mol/L}$  组 ApoA 下调最为明显( $P < 0.05$ ),30、40  $\mu\text{mol/L}$  组与 10、20  $\mu\text{mol/L}$  组相比 ApoA 表达也明显下调( $P < 0.05$ ),但 10、20  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组相比 ApoA 表达无显著差异(图 3C、图 3D)。

### 2.4 5-Aza-CdR 对 HepG2 细胞 FXR 表达的影响

以 5-Aza-CdR 0、10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  处理 HepG2 细胞 72 h 后,采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 5-Aza-CdR 不同浓度组 HepG2 细胞 FXR mRNA 水平(图 4A、图 4B)。结果显示:与对照组相比,5-Aza-CdR 20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  组 HepG2 细胞 FXR mRNA 水平明显增高,其中以 40  $\mu\text{mol/L}$  组 FXR mRNA 增高最为明显,结果具有统计学差异( $P < 0.05$ );30、40  $\mu\text{mol/L}$  组与 10、20  $\mu\text{mol/L}$  组组间比较 FXR mRNA 水平明显增高,结果有统计学差异( $P < 0.05$ );但 10  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组相比 FXR mRNA 的表达无统计学差异( $P > 0.05$ )。用 5-Aza-CdR 0、10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  处理 HepG2 细胞 72 h 后,采用 Western blot 检测 5-Aza-CdR 不同浓度组 HepG2 细胞 FXR 蛋白的表达水平(图 4C、图 4D)。结果显示:与对照组相比,10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  组 HepG2 细胞 FXR 的表达明显上调,其中以 40  $\mu\text{mol/L}$  组 FXR 蛋白上调最为明显,结果具有统计学差异( $P < 0.05$ );20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  组与 10  $\mu\text{mol/L}$

组相比 FXR 蛋白的表达也明显上调,结果有统计学差异( $P < 0.05$ )。

### 2.5 FXR 基因启动子甲基化水平检测

将浓度分别为 0、40  $\mu\text{mol/L}$  的 5-Aza-CdR 干预 HepG2 细胞 72 h 后,采用 BSP 检测 FXR 基因启动子甲基化水平,结果如图 5 所示(由于序列较长,图

5 只显示了部分序列)。在选定的 FXR 基因长度为 250 bp 的序列中含有 12 个 CpG 位点,分别位于 34、50、52、99、140、153、184、194、216、238、255、276 bp 处。其中 0  $\mu\text{mol/L}$  组 FXR 基因启动子甲基化率为 58.3% (7/12),而 40  $\mu\text{mol/L}$  组 FXR 基因启动子甲基化率仅为 8.3% (1/12)。

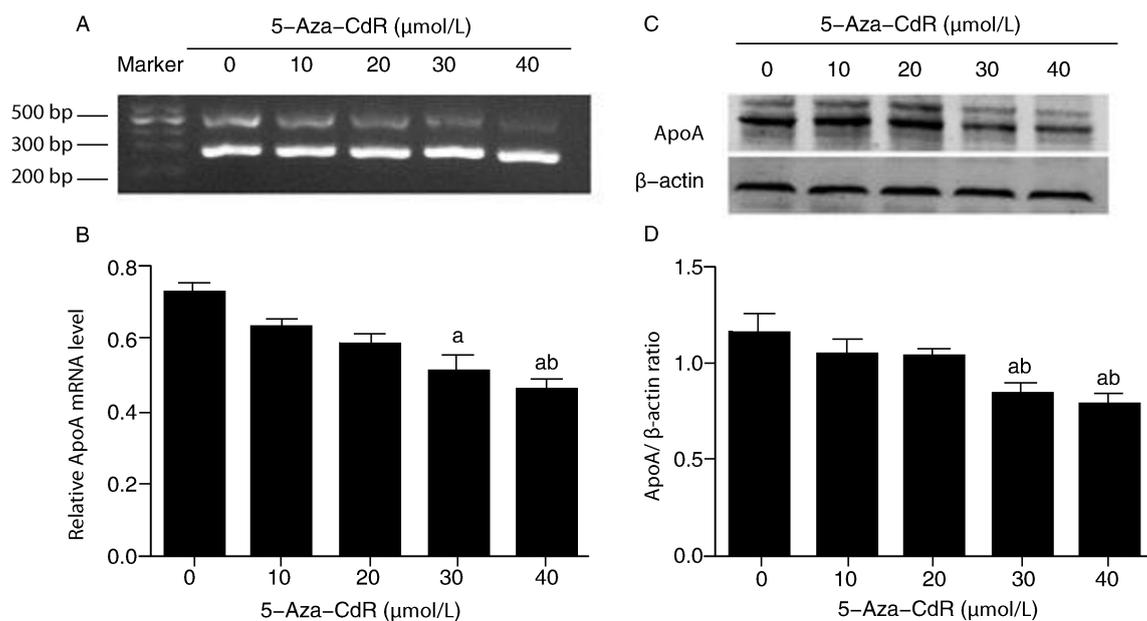


图 3. 5-Aza-CdR 对 HepG2 细胞 ApoA 表达的影响 ( $n=3$ ) A、B 分别为 ApoA mRNA 检测的电泳图、统计图, C、D 分别为 ApoA 蛋白检测的电泳图、统计图。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 5-Aza-CdR 10、20  $\mu\text{mol/L}$  组比较。

Figure 3. Effect of 5-Aza-CdR on expression of apolipoprotein A in HepG2 ( $n=3$ )

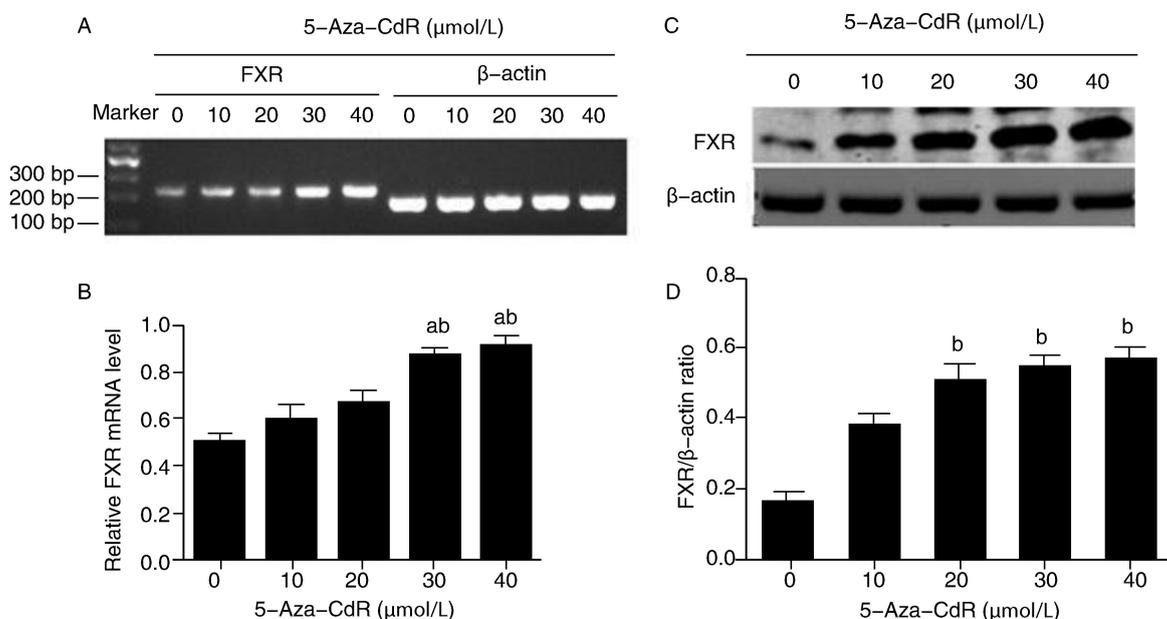
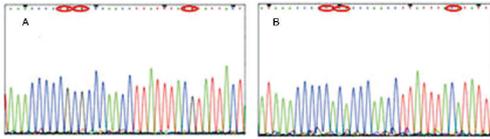


图 4. 5-Aza-CdR 对 HepG2 细胞 FXR 表达的影响 ( $n=3$ ) A、B 分别为 FXR mRNA 检测的电泳图、统计图, C、D 分别为 FXR 蛋白检测的电泳图、统计图。a 为  $P < 0.05$ , 与 5-Aza-CdR 10  $\mu\text{mol/L}$  组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 5-Aza-CdR 20  $\mu\text{mol/L}$  组比较。

Figure 4. Effect of 5-Aza-CdR on expression of FXR in HepG2 ( $n=3$ )



**图 5. HepG2 细胞 FXR 启动子甲基化分析** A 为未经 5-Aza-CdR 处理 FXR 启动子部分测序(克隆号 3485-3),所示 3 个 CpG 均保持不变,说明其维持甲基化状态;B 为经 5-Aza-CdR 处理 FXR 启动子部分测序(克隆号 3486-1),所示相同位置 3 个 CpG 均转变为 CA,说明其发生了去甲基化。

**Figure 5. Methylation analysis of FXR promoter in HepG2**

### 3 讨论

我们前期研究结果显示,HepG2 细胞为 ApoA 高表达细胞株,为了研究 DNA 甲基化对 FXR 及 ApoA 表达的影响,HepG2 细胞无疑是一个十分合适的细胞模型。本研究通过生物信息学软件分析了 FXR 基因启动子 5'端 -5000 ~ +200 bp 区域存在一典型的 CpG 岛,提示 FXR 基因可能受 DNA 甲基化的潜在调控。本研究发现 5-Aza-CdR 总体上呈剂量依赖性上调 HepG2 细胞 FXR mRNA 的表达,其中以 40  $\mu\text{mol/L}$  及 72 h 组尤为明显,而 Torres 等<sup>[9]</sup>以 0、1、10  $\mu\text{mol/L}$  三个不同浓度 5-Aza-CdR 处理 HepG2 细胞,并未观察到上述现象;同样,在我们的研究中,10  $\mu\text{mol/L}$  及 12 h 组 FXR mRNA 的表达较对照组也无明显差异,考虑原因为 5-Aza-CdR 对 HepG2 细胞 FXR 表达的调控存在浓度阈值,5-Aza-CdR 浓度较低或干预时间过短都不足以发挥其作用。同时 Western blot 及 RT-PCR 结果显示,随着 FXR 表达的上调 ApoA 的表达随之受到抑制。由此我们推测 5-Aza-CdR 可能是通过 DNA 去甲基化作用使原来低表达的 FXR 基因得以重新表达,从而发挥抑制 ApoA 表达的作用。

为了进一步验证上述假设,随后我们采用 BSP 法检测 HepG2 细胞 FXR 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态,该检测方法的原理是 DNA 片段经亚硫酸氢盐处理后甲基化胞嘧啶保持不变,而非甲基化胞嘧啶转变为尿嘧啶,通过比较两者之间的序列差别来判断基因的甲基化程度。结果显示:未经 5-Aza-CdR 处理的 HepG2 细胞 FXR 基因启动子甲基化程度为 58.3% (7/12),而 5-Aza-CdR 处理组 FXR 基因启动子甲基化程度仅为 8.3% (1/12),几近完全去甲基化,由此可以证明 HepG2 细胞 FXR 基因的表达受 DNA 甲基化调控,并且通过对 HepG2 细胞 FXR 基因的甲基化调控可有效抑制 ApoA 的表达。

本研究首次证实通过调控 FXR 基因的甲基化水

平可抑制 ApoA 的表达,这为降 Lp(a)的研究及 As 的防治提供了一种新的干预策略。本研究尚存在不足之处:首先,本课题组前期做了 HepG2、SMMC7721 以及 HUVEC12 三种细胞株 ApoA 表达水平的比较,结果提示 HepG2 细胞 ApoA 表达水平较高,SMMC7721 细胞次之,HUVEC12 细胞最低,这也是我们选取 HepG2 细胞作为细胞模型的原因,但是如果同时检查三种 ApoA 表达存在差异的细胞株 FXR 启动子甲基化情况,抑或正常 Lp(a)人群与高 Lp(a)人群的 FXR 启动子甲基化状态,则越能说明 FXR 基因的 DNA 甲基化调控在 ApoA 表达中的作用。其次,FXR 基因启动子甲基化检测上只做了空白对照与 40  $\mu\text{mol/L}$  组的比较,如果对所有 5-Aza-CdR 浓度组样本行 FXR 基因启动子甲基化检测,在此基础上的甲基化差异则更具意义。

#### [参考文献]

- [1] Berg K. A new serum type system in man--the Lp system [J]. Acta Pathol Microbiol Scand, 1963, 59: 369-382.
- [2] Jenner JL, Seman LJ, Millar JS, et al. The metabolism of apolipoproteins A and B-100 within plasma lipoprotein (a) in human beings[J]. Metabolism, 2005, 54(3): 361-369.
- [3] Miles LA, Fless GM, Levin EG, et al. A potential basis for the thrombotic risk associated with lipoprotein[J]. Nature, 1989, 339(6222): 301-303.
- [4] Heermeier K, Schneider R, Heinloth A, et al. Oxidative stress mediates apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein and oxidized lipoprotein (a) [J]. Kidney Int, 1999, 56(4): 1 310-312.
- [5] Galle J, Bengen J, Schollmeyer P, et al. Impairment of endothelium-dependent dilation in rabbit renal arteries by oxidized lipoprotein (a): Role of oxygen-derived radicals [J]. Circulation, 1995, 92(6): 1 582-589.
- [6] Zlatohlavek L, Zidkova K, Vrablik M, et al. Lipoprotein (a) and its position among other risk factors of atherosclerosis[J]. Physiol Res, 2008, 57(5): 777-783.
- [7] Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, et al. Apolipoprotein A gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein (a) concentrations [J]. J Clin Invest, 1992, 90(1): 52-60.
- [8] Chennamsetty I, Claudel T, Kostner KM, et al. Farnesoid X receptor represses hepatic human APOA gene expression [J]. J Clin Invest, 2011, 121(9): 3 724-734.
- [9] Torres JI, Bao X, Iuga AC, et al. Farnesoid X receptor expression is decreased in colonic mucosa of patients with primary sclerosing cholangitis and colitis-associated neoplasia [J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(2): 275-282.

(此文编辑 曾学清)