

与 DNMT1 相互调控的分子机制。

**【方法】** 培养 THP-1 单核源性泡沫细胞,油红 O 染色鉴定;生物信息学预测调控 DNMT1 的特异性 miRNA;运用 qRT-PCR 和 Western Blot 检测不同浓度 Hcy(0、50、100、200、500  $\mu\text{mol/L}$ )及 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy+叶酸+维生素 B<sub>12</sub> (H+F+V)干预泡沫细胞后,miR-148a 和 DNMT1 的表达。使用慢病毒 miR-148a mimic 和 inhibitor 分别过表达和抑制 miR-148a,检测其对 DNMT1 表达的影响;针对 miR-148a 与 DNMT1 特异性结合的碱基位点,构建野生型(Wt)和突变型(Mut)的 3'UTR 荧光素酶报告质粒,与 miR-148a mimic 共转染,运用双荧光素酶报告基因检测系统检测 DNMT1 荧光素酶活性。采用胆固醇检测试剂盒分析 miR-148a 过表达或抑制后对细胞内胆固醇含量的影响。用 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy 干预泡沫细胞,通过甲基化特异性 PCR(nMS-PCR)检测 miR-148a 启动子区甲基化改变,同时构建 DNMT1 重组质粒并感染泡沫细胞,检测 DNMT1 过表达后 miR-148a 启动子区 DNA 甲基化变化。

**【结果】** 分析提示调控 DNMT1 的特异性 miRNA 为 miR-148a;不同浓度 Hcy 干预泡沫细胞后, DNMT1 表达降低,miR-148a 表达升高,以 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy 组改变最为明显,差异均有显著性( $P < 0.05$ );给予 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy+叶酸+维生素 B<sub>12</sub> 后上述情况改善( $P < 0.05$ )。过表达 miR-148a 后 DNMT1 mRNA 和蛋白水平明显下降,而抑制 miR-148a 后 DNMT1 mRNA 和蛋白水平明显升高,差异均有显著性( $P < 0.05$ )。将 WtDNMT1 3'UTR 荧光素酶报告质粒与 miR-148a 共转染,荧光素酶活性显著下降( $P < 0.05$ );将 MutDNMT1 3'UTR 荧光素酶报告质粒与 miR-148a 共转染,荧光素酶活性无明显改变。提示 miR-148a 可能通过与 DNMT1 的 mRNA 3'UTR 碱基 UGCACUG 发生互补配对结合,从而靶向抑制其表达。过表达 miR-148a 后,细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量明显增加;沉默 miR-148a 后,细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量明显降低( $P$  均  $< 0.05$ );而细胞内胆固醇酯含量无明显变化。给予 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy 干预泡沫细胞后,miR-148a 甲基化呈显著下降趋势;给予叶酸+维生素 B<sub>12</sub> 干预后,miR-148a 甲基化水平较 Hcy 显著升高( $P$  均  $< 0.05$ )。过表达 DNMT1 后,miR-148a 启动子区 DNA 甲基化水平升高( $P < 0.05$ )。

**【结论】** miR-148a 是 DNMT1 的特异性 miRNA,其可能通过直接与 DNMT1 3'UTR 部分碱基序列 UGCACUG 发生互补配对结合影响 DNMT1 表达;miR-148a 可通过增加泡沫细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量参与 Hcy 致泡沫细胞的形成过程;DNMT1 在 miR-148a 启动子区甲基化过程中发挥重要作用。

**关键词:** 关键词: MiR-148a; DNMT1; 同型半胱氨酸; 泡沫细胞

## A-S2-30

# ERO1 $\alpha$ 启动子区 DNA 甲基化和组蛋白甲基化相互作用调控 ERO1 $\alpha$ 表达改变介导 Hcy 致肝脏脂代谢紊乱的分子机制

王 羽,刘向明<sup>1</sup>,丁 宁<sup>1</sup>,刘蓉蓉<sup>2</sup>,王 燕<sup>2</sup>;指导教师:张鸣号,聂黎虹,田 珏,马胜超

1. 宁夏医科大学 2012 级生物技术
2. 宁夏医科大学 2012 级临床检验

**【目的】** 探讨 ERO1 $\alpha$  DNA 甲基化和组蛋白甲基化相互作用调控 ERO1 $\alpha$  基因表达介导同型半胱氨酸致肝脏脂代谢紊乱的分子机制。

**【方法】** 建立 apoE<sup>-/-</sup>小鼠 HHcy 模型,分为对照组、ApoE<sup>-/-</sup>对照组、HHcy 组和干预组。检测肝脏脂质沉积情况、TC、TG 及 DNMT1 含量、ERO1 $\alpha$  及 G9a 的表达;ntMS-PCR 法检测 ERO1 $\alpha$  DNA 甲基化改变;CHIP-qPCR 法检测 H3K9me2 含量;不同 Hcy 刺激 HL-7702 肝细胞,验证 ERO1 $\alpha$  表达及甲基化程度;构建 ERO1 $\alpha$  和 DNMT1 的重组表达及沉默载体,检测肝细胞内 TC 和 TG 含量变化;AZC 及 Bix01294 干预细胞后,分别检测 H3K9me2 表达及 ERO1 $\alpha$  甲基化水平。

**【结果】** HHcy 组小鼠肝脏脂质面积和血脂水平显著高于对照组,TC、TG 与其血清 Hcy 水平呈正相关。与对照组相比,各组中 ERO1 $\alpha$  的表达下降,与 HHcy 组相比,干预组中 ERO1 $\alpha$  表达升高,均与蛋白检测结果趋势一

致;HHcy组DNMT1及G9a表达显著高于对照组,HHcy组中ERO1 $\alpha$ 甲基化水平及H3K9me2显著高于对照组。各组中ERO1 $\alpha$ 的表达逐渐下降,与Hcy呈浓度依赖关系;其中,与100  $\mu$ mol/L Hcy组比较,叶酸组中ERO1 $\alpha$ 的表达升高,差异有统计学意义。分别过表达和沉默ERO1 $\alpha$ 并以Hcy作用后,与对照组相比,ERO1 $\alpha$ 过表达组TC和TG分别下降48.5%和38.1%,沉默组分别增加39.3%和46.4%。分别过表达和沉默DNMT1,结果显示,与对照组比较,过表达DNMT1后ERO1 $\alpha$ 甲基化水平增加15.9%,沉默组则下降55.9%,差异均有显著性。AZC抑制DNMT1并以Hcy干预后,抑制剂组与100  $\mu$ mol/L Hcy组比较,ERO1 $\alpha$  DNA甲基化水平降低了51%,H3K9me2水平随之降低;Bix01294干预后,100  $\mu$ mol/L Hcy+Bix01294组与100  $\mu$ mol/L Hcy组比较ERO1 $\alpha$ 启动子区H3K9me2水平降低,ERO1 $\alpha$ 甲基化水平随之降低。

**【结论】** HHcy调控ERO1 $\alpha$ 启动子区DNA甲基化,和组蛋白甲基化相互作用导致ApoE $^{-/-}$ 鼠肝脏脂代谢紊乱。

**关键词:** 高同型半胱氨酸血症;ERO1 $\alpha$ ;DNA甲基化;组蛋白甲基化

## A-S2-31

# 维生素E经LOX-1/NADPH氧化酶/ROS通路抑制oxLDL诱导的HUVEC细胞损伤

史源<sup>1</sup>,邹伊舟<sup>1</sup>,姜晨晨<sup>1</sup>,杨慧<sup>1</sup>,晁凡<sup>2</sup>,管文敏<sup>3</sup>;指导教师:韩梅,高慧

1. 青岛大学医学院 2011级临床医学

2. 青岛大学医学院 2010级临床医学

3. 青岛大学医学院 2010级医学影像

**【目的】** 复制氧化性低密度脂蛋白(oxygenized low density lipoprotein,oxLDL)诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell,HUVEC)损伤模型,建立慢病毒介导的LOX-1-shRNA转染HUVEC细胞模型,从LOX-1/NADPH氧化酶/ROS信号通路研究维生素E(Vit E)对oxLDL诱导的HUVEC细胞氧化损伤的保护作用。

**【方法】** 以200  $\mu$ g/mL oxLDL与HUVEC细胞共孵育24 h,用于复制细胞损伤模型;实验设计分为:正常对照组、oxLDL模型组、药物组(200  $\mu$ mol/L Vit E);以MTT检测细胞存活率,DCFH-DA检测细胞内ROS及蛋白质印迹法检测LOX-1、NADPH氧化酶亚基(gp91phox、p47phox、p67phox)蛋白经时改变(3、6、12、24 h);real-time PCR检测24 h后LOX-1、NADPH氧化酶亚基(p22phox、gp91phox、rac1)mRNA的表达,采用慢病毒介导的基因沉默技术抑制LOX-1表达48 h后,用oxLDL诱导24 h,检测LOX-1蛋白、NADPH氧化酶亚基(p47phox、p67phox、gp91phox)蛋白和ROS的含量。采用SPSS 17.0进行统计学分析。

**【结果】** 与正常组比较,oxLDL处理后细胞生存率仅为50.31%,LOX-1蛋白伴随细胞氧化损伤在3、6、12、24 h表达量显著增加,且在3 h和24 h时呈现两个表达高峰( $P < 0.05$ ),NADPH氧化酶亚基(p47phox、p67phox、gp91phox)蛋白表达水平在各时间点均显著升高( $P$ 均 $< 0.01$ ),24 h达高峰,ROS检测结果表明其动态经时改变在3 h和24 h达峰值( $P < 0.05$ )。Real-time PCR结果显示,LOX-1 mRNA及NADPH氧化酶亚基(gp91phox、p22phox、rac1) mRNA表达水平显著升高( $P < 0.01$ )。慢病毒介导LOX-1基因沉默后,最佳转染效率为73.23%。oxLDL诱导24 h后,LOX-1及NADPH氧化酶亚基(p47phox、p67phox、gp91phox)蛋白表达下调,ROS生成量相应降低。VitE组下调LOX-1和NADPH氧化酶的mRNA及蛋白质表达并降低ROS生成。

**【结论】** oxLDL经LOX-1/NADPH氧化酶/ROS通路诱导HUVEC细胞损伤。200  $\mu$ mol/L的VitE可通过抑制LOX-1/NADPH氧化酶/ROS信号通路的活化而发挥对oxLDL诱导的HUVEC细胞损伤的保护作用。

**关键词:** 维生素E;oxLDL;LOX-1/NADPH氧化酶/ROS;LOX-1-shRNA