

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 B₁₂ (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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 α 启动子区 DNA 甲基化和组蛋白甲基化相互作用调控 ERO1 α 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¹,丁 宁¹,刘蓉蓉²,王 燕²;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 α DNA 甲基化和组蛋白甲基化相互作用调控 ERO1 α 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^{-/-}小鼠 HHcy 模型,分为对照组、ApoE^{-/-}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 α 及 G9a 的表达;ntMS-PCR 法检测 ERO1 α 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 α 表达及甲基化程度;构建 ERO1 α 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 α 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 α 的表达下降,与 HHcy 组相比,干预组中 ERO1 α 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 α 甲基化水平及 H3K9me2 显著高于对照组。各组中 ERO1 α 的表达逐渐下降,与 Hcy 呈浓度依赖关系;其中,与 100 μ mol/L Hcy 组比较,叶酸组中 ERO1 α 的表达升高,差异有统计学意义。分别过表达和沉默 ERO1 α 并以 Hcy 作用后,与对照组相比,ERO1 α 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 α 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 μ mol/L Hcy 组比较,ERO1 α DNA 甲基化水平降低了 51%,H3K9me2 水平随之降低;Bix01294 干预后,100 μ mol/L Hcy + Bix01294 组与 100 μ mol/L Hcy 组比较 ERO1 α 启动子区 H3K9me2 水平降低,ERO1 α 甲基化水平随之降低。

【结论】 HHcy 调控 ERO1 α 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 α ;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¹,邹伊舟¹,姜晨晨¹,杨慧¹,晁凡²,管文敏³;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 μ 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 μ 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 μ 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