论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0614-04

同型半胱氨酸致巨噬细胞TNFSF4基因启动子去甲基化并增加其mRNA表达

黄丹丹,王树人 (四川大学华西基础医学与法医学院病理生理学教研室,成都 610041)

摘 要:**目的** 探讨同型半胱氨酸对THP-1巨噬细胞TNFSF4基因甲基化及mRNA表达的影响。**方法** 在由0.1 μmol/L佛波脂(phorbot 12-myristate 13-acetate, PMA)诱导分化的THP-1巨噬细胞中加入不同浓度的高同型半胱氨酸(homocysteine, HCY),并孵育不同时间。另设空白对照组。应用MS-PCR技术检测TNFSF4基因甲基化状态,应用RT-PCR检测TNFSF4基因表达水平差异。**结果** 与对照组比较,随时间和浓度的不断增加,各药物浓度组非甲基化条带越来越浓($P<0.01$),甲基化条带越来越淡($P<0.01$),72 h处理组全部只出现非甲基化条带,同时各药物浓度组24 h TNFSF4基因mRNA表达增加,且呈剂量依赖关系($P<0.01$)。**结论** 同型半胱氨酸可致THP-1巨噬细胞TNFSF4基因启动子区去甲基化,同时其mRNA表达水平增加。

关键词:同型半胱氨酸;TNFSF4基因;DNA甲基化;MS-PCR

中图法分类号:R392.12;R392.2;R977.4 **文献标识码**:A

Effects of homocycteine on methylation status and mRNA expression of TNFSF4 gene in macrophages *in vitro*

HUANG Dan-dan, WANG Shu-ren (Department of Pathophysiology, West China School of Preclinical and Forensic Medical Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of homocysteine (Hcy) on methylation status and mRNA expression of TNF superfamily member 4 (TNFSF4) gene in THP-1 macrophages. Methods Cultured THP-1 monocytes were induced to macrophages by 0.1 μmol/L PMA treatment for 72 h, then the differentiated THP-1 macrophages were incubated with homocysteine (50 – 1 000 μmol/L) for 24, 48 or 72 h. The status of methylation of TNFSF4 gene in THP-1 macrophages was analyzed by methylation specific polymerase chain reaction (MS-PCR). The expression level of TNFSF4 mRNA was determined by RT-PCR. Results The MS-PCR results showed that the unmethylated bands gradually became stronger, and the methylated bands gradually became weaker along with the prolongation of treatment time and the increased Hcy concentrations. The 72-hour treatment with Hcy induced a complete demethylation in the promotor region of TNFSF4 gene, where left the only unmethylated bands. Meanwhile, the TNFSF4 mRNA expression was also increased in a dose-dependent manner. Conclusion Hcy may contribute to atherogenesis by inducing demethylation in the promotion region of the TNFSF4 gene and increasing TNFSF4 expression in THP-1 macrophages.

Key words: homocysteine; TNF superfamily member 4; DNA methylation; methylation specific polymerase chain reaction

高同型半胱氨酸(homocysteine,Hcy)血症是近年来确认的动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)的重要独立危险因素[1],但其导致AS的主要分子机制至今并不清晰。目前认为主要与活性氧(reactive oxygen species,ROS)生成增多有关[2]。已有的研究表明,Hcy在过渡金属元素的催化下发生自氧化导致ROS增多,可引起血管平滑肌增殖、内皮损伤、促进炎性细胞因子如单核细胞趋化因子1、白细胞介素-8的表达增多等等[3,4]。但结构与Hcy极相似的半胱氨酸(cysteine,Cy)亦具有自氧化特性和许多与Hcy类似的化学反应特性,高浓度的半胱氨酸(Cy)亦导致ROS增多;且Cy的血浓度约20倍于Hcy的血浓度,但Cy并不被认为是促AS的危险因子[5,6]。因此,该机制尚存诸多疑问。

Hcy和Cy在体内参与的代谢途径中有一个重要的差异点,即Hcy参与的蛋氨酸循环是体内转甲基反应的重要环节[7]。转甲基反应涉及到基因的表达调控、激素、蛋白质代谢等许多重要生命过程,但Cy无

基金项目:教育部"高等学校博士学科点专项科研基金"(2005-216)
Supported by the Fund of High-college Doctoral Subject of Ministry of Education(2005-216)

作者简介:黄丹丹,女,四川省苍溪县人,硕士研究生,讲师,主要从事病理生理学方面的研究。电话:(028)81079333, E-mail:helen314679@sina.com
通信作者:王树人, E-mail:wangshuren1945@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-11-26 修回日期:2008-01-09

此代谢途径。该差异点可能是高 Hcy 致 AS 的重要分子机制所在。已有研究表明，高 Hcy 可导致某些基因表达谱的改变[8,9]。那么，高 Hcy 是否会通过干扰基因的甲基化修饰，从而引起 AS 相关基因的表达改变？因此，本课题选择了 TNFSF4 基因，探讨高 Hcy 对其启动子区甲基化修饰及表达的影响。该基因是一个重要的免疫、炎症的调控基因，并与 AS 紧密相关。基因敲除 TNFSF4 的小鼠（TNFSF $4^{-/-}$）显示出明显的抗高脂膳食的 AS 诱导；而转基因高表达 TNFSF 4 的小鼠则出现更显著的 AS 病变，与非转基因的对照小鼠比较，AS 病变扩大 2.3 倍，但二者的血脂水平却相似[10]。AS 被认为是大、中动脉内膜的慢性炎症性疾[11]，TNFSF4 基因既是免疫、炎症的调控基因，又是目前动物实验证据最充分的 AS 相关基因。而 Hcy 是否干扰 TNFSF4 基因的甲基化修饰呢？本实验研究 Hcy 对体外培养的人单核细胞株 THP-1 细胞 TNFSF4 基因甲基化及 mRNA 表达的影响，探讨高 Hcy 致 AS 分子机制的这一可能通路。

1　材料与方法

1.1　THP-1 细胞培养及诱导转化

THP-1 单核细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基，在 37 ℃、5% CO_2 环境中培养。待细胞生长接近融合时传代。2～3 代后 THP-1 细胞用于实验。诱导转化细胞用 0.5×10^9/L 细胞密度，加终浓度为 0.1 μmol/L 的佛波酯（PMA），刺激 72 h。

1.2　实验分组

以 0.5×10^9/L 细胞密度将 THP-1 单核细胞接种于 24 孔板，加佛波酯刺激 72 h 后，弃去旧培养液并用灭菌 PBS（pH = 7.4）冲洗 2 遍，更换为含 0、50、100、200、500、1 000 μmol/L Hcy 的 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基培养 24、48 及 72 h，以不加 Hcy 处理组为对照。

1.3　基因组 DNA 的提取及亚硫酸氢钠修饰

细胞基因组 DNA 提取试剂盒（TIANGEN 公司）提取各组细胞基因组 DNA。紫外光分光光度计测其纯度和浓度。

参照 Herman 的方法[12]，取 1～2 μg 基因组 DNA，加入双蒸水至 50 μl，加 1.1 μl 3 mol/L NaOH，37 ℃变性 10 min，向变性后的 DNA 中加入分别加入 6 μl 10 mmol/L 对苯二酚和 104 μl 3.6 mol/L $Na_2S_2O_3$（pH = 5.0），混匀后覆盖 40 μl 50% 甘油 50℃16 h。用 ddH_2O 配制 1% 琼脂糖溶液，取 1.5 ml 加入 2 ml EP 管中，冷却前插入 200 μl Tip 头，冷却后移去 Tip 头，将经过处理 DNA 转移到琼脂糖柱子里经过 2 次 1 h 以上的层析以去除盐离子，加入 1/10 体积的 3 mol/L NaOH 后水浴 15 min，接着加 3 μl DNA 共沉剂、16 μl 3 mol/L CH_3COONa（pH = 5.2）溶液及 350 μl 无水乙醇混匀后，13 000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，得到沉淀的 DNA，用 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次，空气中干燥5 min，溶解于 10 μl ddH_2O，置于 -20℃冰箱保存，取 1 μl DNA 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳并测定光密度值。

1.4　巢式甲基化特异性 PCR（nMS-PCR）检测TNFSF4 基因启动子区甲基化修饰

引物序列及产物长度见表 1。引物均由上海 Invitrogen 公司合成。

反应总体系 25 μl 包括：0.05 U/μl 的 *Taq* Polymerase，250 μmol/L 的 4 种 dNTP，10 mmol/L 的 Tris-HCl（pH = 8.3），50 mmol/L KCl，1.5 mmol/L $MgCl_2$，1 μl 上下游引物，3 μl DNA 模板。第 2 轮 PCR 反应中的 DNA 模板使用的是第一轮 PCR 扩增产物。反应条件为：94 ℃热启动 3 min，然后于 94 ℃ 45 s，65 ℃ 45 s，72 ℃ 45 s 循环 20 次，每循环退火温度降低 1 ℃。94 ℃ 45 s，45 ℃ 45 s，72 ℃ 45 s 循环 20 次。最后于 72 ℃延伸 5 min。取扩增产物，于 1% 的琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统观察拍照分析。

表 1　nMSPCR 法扩增 TNFSF4 基因的引物序列

引物	引物序列（5′→3′）	产物大小
TNFSF4n 上游	AGAAAGAAAGTAAAGGGG	434 bp
下游	CTACCATCAACATAAACTAATA	
TNFSF4m 上游	TTCGTTTGTTTGTAAAAGTTGTAGC	262 bp
下游	CACCAACAATAACTTATTCCTCTCG	
TNFSF4u 上游	TGTTTGTTTGTAAAGTTGTAGTGT	262 bp
下游	CACCAACAATAACTTATTCCTCTCA	

TNFSF4n：外围引物；TNFSF4m：甲基化特异性引物；TNFSF4u：非甲基化特异性引物

1.5　RT-PCR 检测 TNFSF4 基因的表达

BIZOL 试剂一步法（TIANGEN 公司）提取 24 h 各组细胞总 RNA。紫外分光光度计测其纯度和浓度。取 2 μg 总 RNA 用 M-MLV 逆转录酶进行逆转录。再以 cDNA 为模板扩增 TNFSF4 基因，同时扩增 GAPDH 内参。TNFSF4 基因引物序列为：上游 5′-GTCTGGGGATGTGATGCTTTGAA-3′，下游 5′-AAGACATGGAGCTGAGTGCGTAT-3′，产物长度为 257 bp。GAPDH 的引物序列为：上游 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′；下游 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′，产物长度为 450 bp。反应条件为：94 ℃变性 3 min、94 ℃ 45 s、61.2 ℃ 45 s、72 ℃ 45 s，30 个循环，72 ℃延伸 5 min。

取 PCR 反应产物于 1% 的琼脂糖凝胶中电泳，凝胶成像系统观察拍照分析。

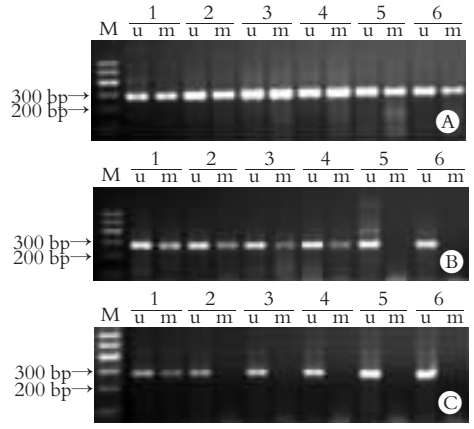
1.6　统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 软件分析。多组间比较用单因素方差分析。

2　结果

2.1　Hcy 处理细胞后 TNFSF4 基因启动子区甲基化状态的改变

不同浓度的 Hcy 处理细胞 24 h 后，采用 nMS-PCR 法检测 TNFSF4 基因启动子区甲基化状态时，甲基化特异性 PCR 产物与非甲基化特异性 PCR 产物均出现，说明此时 TNFSF4 基因启动子区处于部分甲基化状态。不同浓度的 Hcy 处理细胞 48 h 后，500 μmol/L Hcy 和 1 000 μmol/L Hcy 浓度组的甲基化特异性 PCR 产物消失，只有非甲基化特异性 PCR 产物，说明这 2 个浓度组的 TNFSF4 基因启动子区已处于去甲基化状态。不同浓度的 Hcy 处理细胞 72 h 后，所有浓度组的甲基化特异性 PCR 产物均消失，只有非甲基化特异性 PCR 产物，说明此时 TNFSF4 基因启动子区已完全处于去甲基化状态。



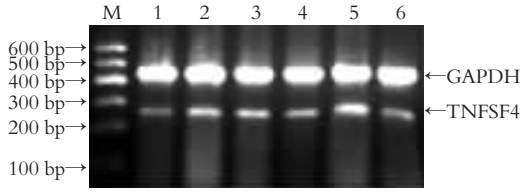
A:24 h;B:48 h;C:72 h

M:DNA 标准;u:非甲基化条带;m:甲基化条带;1:对照组(0 μmol/L Hcy);2:50 μmol/L Hcy 组;3:100 μmol/L Hcy 组;4:200 μmol/L Hcy 组;5:500 μmol/L Hcy 组;6:1 000 μmol/L Hcy 组

图1 不同浓度不同时间 Hcy 处理后 THP-1 细胞 TNFSF4 基因启动子区甲基化状态

2.2 Hcy 处理细胞后 TNFSF4 基因表达的改变

RT-PCR 检测 THP-1 细胞经不同浓度 Hcy 处理 24 h 后 TNFSF4 基因 mRNA 表达的情况(图 2),并用 TNFSF4 与 GAPDH 积分吸光度比值表示 THP-1 细胞 TNFSF4 基因 mRNA 的表达水平。其中 50、100、200、500、1 000 μmol/L Hcy 处理后 TNFSF4/GAPDH 比值分别为(0.425 ± 0.031)、(0.491 ± 0.034)、(0.526 ± 0.042)、(0.582 ± 0.048)、(0.412 ± 0.025),与未加药组比值(0.263 ± 0.032)相比,TNFSF4 基因 mRNA 的表达皆显著增加($P < 0.01$)。



M:DNA 标准;1:对照组(0 μmol/L Hcy);2:50 μmol/L Hcy 组;3:100 μmol/L Hcy 组;4:200 μmol/L Hcy 组;5:500 μmol/L Hcy 组;6:1 000 μmol/L Hcy 组

图2 不同浓度 Hcy 处理 THP-1 细胞 24 h 后 TNFSF4 基因 mRNA 表达的改变

3 讨论

DNA 甲基化修饰的甲基供体为 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylme thionine, SAM),SAM 给出甲基后生成 S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH),SAH 水解则生成 Hcy。因此 Hcy 的异常升高将会反馈干扰转甲基反应。DNA 甲基化修饰的异常既包括去甲基化,也包括再甲基化。如在恶性肿瘤,大量证据显示,癌细胞常呈现基因组整体的去甲基化和部份基因(主要为抑癌基因,DNA 损伤修复基因等)的高甲基化。高 Hcy 亦显示能使某些基因脱甲基,而使另一些基因再甲基化。其细节机制尚不清,但无论是脱甲基或是再甲基化,都可能造成基因表达的异常,从而参与某些病理生理过程的发生。

TNFSF4 系编码 TNF 受体配体 OX40L(又称 CD134L)的基因。OX40/OX40L 属于 TNFR 及其配体超家族成员,具有传输共刺激信号的能力,能增强 $CD4^+$ T 细胞、B 细胞、DC 细胞的扩增、成熟和产生效应功能,还能影响 $CD8^+$ T 细胞的杀伤效应,能使 T 细胞免于凋亡,并促进更多记忆 T 细胞的生成[13,14]。OX40/OX40L 不仅是免疫、炎症反应的关键信号分子之一,亦被证实与 AS 紧密相关。TNFSF4 是目前经数量性状基因座(QTL)分析发现,并经证实与 AS 敏感性相关的唯一炎症基因。因此,本研究以 AS 的独立危险因素——Hcy 作用于巨噬细胞,观察其对 TNFSF4 基因的影响。结果证实了高 Hcy 促使 TNFSF4 基因启动区脱甲基并使其 mRNA 高表达,这强烈提示高 Hcy 可能通过该条途径参与 AS 的发病。

目前对体内 Hcy 浓度升高导致 AS 的机制多涉及与 ROS 产生增多的有关认识。Hcy 可通过损伤内皮细胞、诱导平滑肌细胞增殖、促血小板激活、促脂质过氧化及增加肝细胞胆固醇合成等途径诱导 AS 病变发生。近年,Hcy 更被认为是一种炎症刺激物,可刺激平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞分泌单核细胞趋化因子 1、白细胞介素-8 等细胞因子[3]。上述机制均被认为与 ROS 产生增多有关。

本研究结果显示 Hcy 可促进 THP-1 巨噬细胞 TNFSF4 基因启动子区去甲基化及其 mRNA 表达上调,且该作用随着 Hcy 浓度的增加及处理时间的延长而增大。随着 TNFSF4 基因表达增强,激活一系列炎症反应通路及致 AS 效应,这可能是 Hcy 促进动脉粥样硬化发生发展的另一重要途径和机制。

参考文献:

[1] Guthikonda S, Haynes W G. Homocysteine: role and implications in atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2006, 8(2): 100-106.

[2] Lang D, Kredan M B, Moat S J, *et al*. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(2): 422-431.

[3] Postea O, Krotz F, Henger A, *et al*. Stereospecific and redox-sensitive increase in monocyte adhesion to endothelial cells by homocysteine[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006,26(3): 508-513.

[4] Zeng X, Dai J, Remick D G, *et al*. Homocysteine mediated expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human monocytes[J]. Circ Res, 2003, 93(4): 311-320.

[5] van-den-Brandhof W E, Haks K, Schouten E G, *et al*. The relation between plasma cysteine, plasma homocysteine and coronary atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2001, 157(1): 403-409.

[6] Jacob N, Bruckert E, Giral P, *et al*. Cysteine is a cardiovascular risk factor in hyperlipidemic patients[J]. Atherosclerosis, 1999, 146(1): 53-59.

[7] Turski W A, Bald E. Molecular mechanisms of biotoxicity of homocysteine--facts and hypotheses[J]. Postepy Biochem, 2005, 51(4): 395

-406.
[8] Huang Y, Peng K, Su J, *et al*. Different effects of homocysteine and oxidized low density lipoprotein on methylation status in the promoter region of the estrogen receptor alpha gene[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2007, 39(1): 19-26.
[9] Jiang Y D, Zhang J Z, Huang Y, *et al*. Homocysteine-mediated aberrant DNA methylation in vascular smooth muscle cells and its potential pthogenic mechanism[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2007, 34(5): 479-489.
[10] Wang X, Ria M, Kelmenson P M, *et al*. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility[J]. Nat Genet, 2005, 4(37): 365-372.
[11] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
[12] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, *et al*. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(18): 9821-9826.
[13] Soroosh P, Ine S, Sugamura K, *et al*. OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity[J]. J Immunol, 2006, 176(10): 5975-5987.
[14] de-Boer O J, Becker A, van-der Wal A C. T lymphocytes in atherogenesis-functional aspects and antigenic repertoire[J]. Cardiovasc Res, 2003, 60(1): 78-86.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2008)07-0617-01

个案与短篇

胆囊炎性肌纤维母细胞瘤 1 例

马　巍[1]，胡　光[1]，马　静[2]，程树杰[1]，田春辉[1]　（[1] 河北大学附属医院普外科；[2] 保定市第一中心医院儿科，河北 保定 071000）

患者，女性，72 岁，因“右上腹间断性疼痛 10 年，加重 3 d”入院。10 年前，患者出现右上腹间断性钝痛，以“胃炎”治疗好转，此后症状反复发作。3 d 前右上腹再次出现疼痛，以“胆囊炎”入院。体检无特殊发现。血、尿、便化验正常，B 超及 CT 示萎缩性胆囊炎。经术前准备，行胆囊切除术，术中见胆囊成“磁化胆囊”状，外观灰白色，大小约 3 cm×2 cm×2 cm，术后打开胆囊，胆囊底部有一黄色球状肿物，约 1 cm×1 cm×1 cm 大小，质地中等，呈鱼肉样。病理诊断：胆囊炎性肌纤维母细胞瘤（图 1）。患者恢复良好，随访 6 个月未见复发。

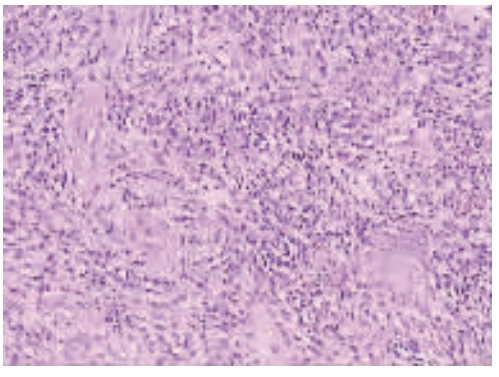


图 1　胆囊炎性肌纤维母细胞瘤病理变化　（HE×100）

讨论

根据 WHO 软组织肿瘤国际组织学分类定义，炎性肌纤维母细胞瘤是指由分化的肌纤维母细胞性梭形细胞组成，常伴大量浆细胞和（或）淋巴细胞浸润的一种间叶性肿瘤。曾被称为炎性假瘤，认为是非肿瘤性病变。近年来研究表明炎性肌纤维母细胞瘤是一种真性肿瘤[1]。

本病起病较隐匿，临床表现缺乏特异性，术前确诊较困难。确诊依靠病理学检查。大体为实性肿物，质地坚实，切面黄褐色或灰白色，一般无出血、坏死。直径大小不等，常无明显包膜。光镜下纤维母细胞及肌纤维母细胞混合性增生，细胞梭形、不规则、淡染，细胞核嗜酸或双染，可见核仁，核分裂少见。肿瘤中有大量炎细胞散在分布，主要为成熟浆细胞，还可见淋巴细胞、嗜酸性白细胞。黏液样水肿间质伴多量细小血管形成疏松背景，梭形细胞间可见钙化。电镜下细胞有纤维母细胞特点：发育良好的高尔基复合体、丰富的粗面内质网、细胞内胶原；还具有平滑肌细胞特点：细胞质内有密集的微丝束，包膜下密体及胞饮小泡，不见细胞连接、基板。这些细胞伴有成熟的纤维母细胞、间充质细胞及炎细胞，包括成熟的浆细胞。免疫组织化学染色的意义在于证实肌纤维母细胞的免疫表型，与其他疾病鉴别。国内报道炎性肌纤维母细胞瘤患者中间变性淋巴瘤激酶（anaplastic lymphoma kinase, ALK）阳性率 40%（26/68）[2]，国外报道 ALK 阳性率 60%（44/73）[3]。ALK 可作为诊断炎性肌纤维母细胞瘤的一项指标。

胆囊炎性肌纤维母细胞瘤治疗以胆囊切除为主，术中冰冻切片明确诊断，避免误行根治性手术。术后应随访观察，防止复发。

关键词：胆囊；炎性肌纤维母细胞瘤；病理学；诊断；治疗
中图法分类号：R735.8　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 纪小龙，马亚敏. 从炎性假瘤到炎性肌纤维母细胞瘤——浅谈病理形态学发展的过程[J]. 临床与实验病理学杂志，2003，19(3)：319-320.
[2] 郑　杰. 重视疾病的分子病理诊断[J]. 北京大学学报：医学版，2003，35(1)：1-3.
[3] Lawrence B, Perez-Atayde A, Hibbard M K, *et al*. TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors[J]. Am J Pathol, 2000, 157(2): 377-384.

（编辑　栾　嘉）

作者简介：马　巍，男，回族，河北省保定市人，硕士，主治医师，主要从事肝胆外科方面的研究。电话：(0312)5061058
收稿日期：2008-01-02；修回日期：2008-01-28