

胰岛素样生长因子结合蛋白3在宫内
生长受限儿中的甲基化研究

苏爱玲¹ 蒋犁¹ 葛芹玉²

(1. 东南大学附属中大医院儿科, 江苏 南京 210009;
2. 东南大学生物电子学国家重点实验室, 江苏 南京 210096)

[摘要] 目的 探讨胰岛素样生长因子结合蛋白3(IGFBP3)启动子区甲基化状态在胎儿宫内生长受限(IUGR)中的作用。方法 选取IUGR新生儿50例及正常新生儿30例,应用甲基化特异性PCR(MSP)及高分辨率溶解(HRM)技术检测外周血中IGFBP3基因的甲基化状态。结果 IUGR组中IGFBP3启动子区完全甲基化比例为4%(2/50),部分甲基化比例为40%(20/50),未甲基化比例为56%(28/50);对照组中部分甲基化比例为13%(4/30),未甲基化比例为87%(26/30),两组甲基化率差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 IGFBP3基因启动子区的甲基化程度与IUGR的发生有关。
[关键词] 胎儿宫内发育受限; 胰岛素样生长因子结合蛋白3; 甲基化; 新生儿
[中图分类号] R722.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)09-0700-04

Methylation of insulin-like growth factor binding protein 3 gene in neonates with intrauterine growth restriction

SU Ai-Ling, JIANG Li, GE Qin-Yu. Department of Pediatrics, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China (Jiang L, Email: jiangli77777@126.com)

Abstract: Objective To study the role of promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) in intrauterine growth restriction (IUGR). **Methods** Fifty neonates with IUGR and 30 healthy neonates were enrolled. The promoter methylation status of IGFBP3 in peripheral blood was evaluated by methylation-specific PCR (MSP) and high resolution melting (HRM) techniques. **Results** The complete methylation rate, partial methylation rate and non-methylation rate of IGFBP3 promoter in the IUGR group was 4% (2/50), 40% (20/50) and 56% (28/50), respectively. The partial methylation rate and non-methylation rate of IGFBP3 promoter in the control group were 13% (4/30) and 87% (26/30), respectively. There were significant differences in the promoter methylation rate of IGFBP3 between the two groups ($P < 0.01$). **Conclusions** The promoter methylation of IGFBP3 gene is associated with the pathogenesis of IUGR.
Key words: Intrauterine growth restriction; Insulin-like growth factor binding protein 3; Methylation; Neonate

胎儿宫内生长受限(intrauterine growth retardation, IUGR)是指胎儿出生体重或身长低于同胎龄体重或身长的第十百分位数或2个标准差以下。其中以足月小样儿为主^[1]。IUGR不仅影响胎儿期的发育,也影响儿童期及青年期的智力体格发育^[2]。近年来,随着表观遗传学研究的进展,胎儿源性成人疾病的假说得到了越来越多支持。研究显示不良的宫内环境不仅可以导致IUGR的形成,而且可以通过发育程序化途径的修饰,引起机体生理和代谢两方面的永久性变化,增加成年期发生某些疾病的风险^[3]。胰岛素样生长因子结合蛋白3(insulin-like growth factor binding protein 3, IGFBP3)是IUGR形成过程中的一种蛋白。DNA甲基化的改变可以影响许多基因的表达。本研究通过应用甲基化特异性PCR(MSP)及高分辨率溶解技术(HRM)检测IGFBP3基因启动子区CpG岛甲基化状态,探讨其是否在IUGR形成中发挥作用,为临床干预提供思路。

[收稿日期]2011-03-23;[修回日期]2011-04-16
[作者简介]苏爱玲,女,硕士研究生。
[通信作者]蒋犁,教授。

1 资料与方法

1.1 病例来源

样本来源于南京中大医院妇产科 2009 年 6 月至 2010 年 6 月出生的新生儿。IUGR 纳入标准:胎龄在 37~40 周之间,出生体重低于同胎龄儿第十百分位数,母亲年龄 22~35 岁,无基础疾病,孕期正规产检,排除妊娠高血压综合征、糖尿病、子痫前期、羊水过多、孕期胆酸增高等疾病。本研究选取 50 例 IUGR 新生儿(IUGR 组,男 30 例,女 20 例)和 30 例正常新生儿(对照组,男 14 例,女 16 例)。入选新生儿生后 24 h 内采集外周静脉血 1 mL,-20℃ 保存备用。

1.2 DNA 提取

利用 KI 方法提取全血基因组 DNA,NanoDrop ND-1000 紫外分光光度计测定提取的基因组 DNA 浓度和质量。

1.3 MSP 法及 HRM 法检测 IGFBP3 基因 CpG 岛甲基化状态

采用亚硫酸氢钠法修饰 DNA 并纯化回收,按照 DNA 亚硫酸氢盐修饰试剂盒使用说明进行操作。DNA 亚硫酸氢盐试剂盒购自 ZYMO Research 公司,DNA 纯化试剂盒购自南京基天生物公司。根据 IGFBP3 基因序列(GenBank ID:3486)设计 IGFBP3 基因 CpG 岛特异的甲基化(M)和非甲基化(U)引物及高分辨率溶解(HRM)引物(表 1)。

表 1 MSP 和 HRM 引物		
引物	5'→3'	PCR 引物长度
IGFBP3-M(F)	AATTCGATTTCGGTTTTTTAC	817 bp
IGFBP3-M(R)	ACCAAATACCATTTTCTACAACGTA	
IGFBP3-U(F)	TAATTTTGATTTCGGTTTTTTATGA	
IGFBP3-U(R)	AAAACCAAATACCATTTTCTACAA-CATA	763 bp
HRM-F	GGGTAAAGTTAGAGGTGCTGT-TAT	171 bp
HRM-R	AAAAAAATTTACAATTTA-CAAAACTC	

PCR 循环参数,95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 50 s,共 40 个循环,然后在 95℃ 下生成溶解曲线^[4]。使用 ABI7500 PCR 仪器对经亚硫酸氢盐修饰过的 DNA 进行荧光定量 PCR 扩增,荧光标记物选用 SYBR Green I(德国 Roche Diagnostics 公司)。各样品分别使用甲基化、非甲基化引物进行定量分析,根据所测 CT 值及样品的上

样量,通过标准曲线计算在每纳克(ng)样品 DNA 中甲基化的拷贝数。其甲基化百分率计算公式如下:甲基化百分率(M%)=甲基化 DNA 拷贝数/(甲基化 DNA 拷贝数+非甲基化 DNA 拷贝数)×100%。M% 大于 75%,25%~75% 及小于 25% 分别视为完全甲基化、部分甲基化和非甲基化。PCR 循环反应结束后取 5 μL 产物进行 2% 琼脂凝胶电泳,应用凝胶成像分析系统分析电泳结果:出现甲基化条带,无非甲基化条带判定为甲基化;出现非甲基化条带,无甲基化条带视为非甲基化;两者都出现的视为部分甲基化^[5]。各样本应用 HRM 引物进行荧光定量 PCR 分析,根据其溶解温度进一步证实其甲基化程度。提取任意正常健康人的 DNA 在体外经 M. Sss I 甲基化转移酶(CpG methyltransferase)处理,所得到的产物为阳性对照,利用 6N 随机引物进行 PCR 扩增,得到的产物为阴性对照,按 100%、75%、50%、25%、0% 比例混合,即为标准曲线^[6]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计学分析。采用似然比检验(G 检验)及 u 检验进行分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床资料比较

IUGR 组新生儿的胎龄和出生体重均明显低于对照组,差异有统计学意义(表 2)。

表 2 两组胎龄及体重比较 ($\bar{x} \pm s$)			
分组	例数	胎龄(d)	体重(g)
对照组	30	275 ± 8.5	3391 ± 383
IUGR 组	50	270 ± 8.9	2192 ± 257
U 值		4.06	7.38
P 值		<0.01	<0.01

2.2 两组 IGFBP3 基因甲基化比较

琼脂糖凝胶电泳结果,应用甲基化引物和非甲基化引物扩增后产物进行凝胶电泳,出现两个条带的即 IGFBP3 部分甲基化,只出现甲基化条带为完全甲基化,只出现非甲基化条带为未甲基化(图 1);经过体外 Sss I 甲基化转移酶处理制作标准曲线(图 2)。对照组外周血 IGFBP3 基因启动子区部分甲基化比例为 13%(4/30),未甲基化比例为 87%(26/30);IUGR 组中完全甲基化比例为 4%(2/50),部分甲基化比例为 40%(20/50),未甲基化比例为 56%(28/50),采用似然比检验进行统计学分析,显示两

组甲基化程度差异具有统计学意义($P = 0.005$)。见表2。

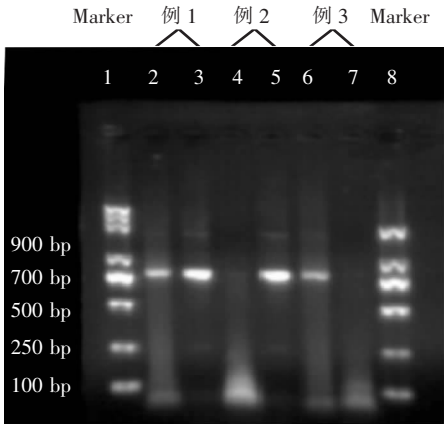


图1 患儿甲基化特异性PCR结果 3个患儿DNA分别用甲基化和未甲基化引物扩增,例1均扩增出条带,表明该患儿IGFBP3启动子区存在部分甲基化;例2仅扩增出非甲基化引物条带(第5条泳道),表明该患儿IGFBP3启动子区未甲基化;例3仅扩增出甲基化引物条带(第6泳道),表明该患儿IGFBP3启动子区存在完全甲基化。甲基化和非甲基化引物扩增条带产物长度在700~900 bp之间。

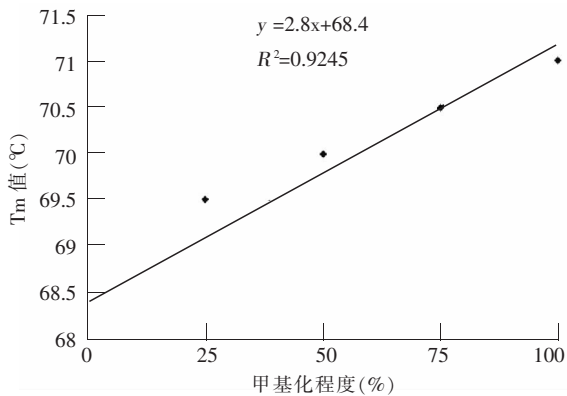


图2 标准曲线 阴阳性样品经DNA甲基化试剂盒转化后,按0%、25%、50%、75%、100%比例混合,制成标准曲线,它们所对应的温度分别为68℃、69.5℃、70℃、70.5℃、71℃。然后各样品经亚硫酸氢盐处理后经实时荧光定量PCR仪器扩增,应用HRM技术进行溶解分析,即为对应各自的溶解温度,其甲基化程度即可分辨出。

表2 IGFBP3在两组外周血中甲基化程度比较 [例(%)]

分组	例数	完全甲基化	部分甲基化	未甲基化
对照组	30	0(0)	4(13)	26(87)
IUGR组	50	2(4)	20(40)	28(56)
G值			9.41	
P值			0.005	

3 讨论

作为重要的表观遗传学现象之一,DNA甲基化

对基因的表达发挥重要的调控功能。胎儿在宫内生长发育调控机制一直是围产医学及儿科学的研究热点之一。近年来不断有学者提出的“编程(programming)”假说,是指不良的宫内状况会导致胎儿长期的物质代谢或结构功能发生改变,可影响到出生后甚至终生。IGF系统轴在胎儿宫内编程中起到了重要作用,IGF系统通过与其他激素的相互作用参加了“程序化”作用过程,其中胰岛素样生长因子1(IGF-I)对其胎儿生长发育起到重要作用,而其活性的表达需要与IGFBP3相结合,才能发挥其促胎儿生长作用,而且IGFBP3本身也具有促进细胞分裂的作用,可直接参与胎盘形成与胎儿的生长发育^[7]。有研究发现IGFBP3启动子区高度甲基化与肿瘤的发生密切相关^[8-9],但尚未有报道IGFBP3启动子区甲基化与IUGR的发生具有相关性。本研究发现,在IUGR组中,大部分病例IGFBP3基因启动子区发生部分甲基化,而对照组中仅个别发生部分甲基化,差异具有统计学意义。这为“编程”假说提供了实验依据,为成年期疾病胎儿起源的可能机制提供了临床资料。

DNA甲基化是表观遗传修饰的主要方式之一,可以直接调控基因表达,决定细胞增殖、分化与功能特化;还对染色体的稳定和构成起重要作用。胚胎发育时期,DNA甲基化状态对环境因素尤为敏感。宫内环境可以通过影响DNA甲基化状态,参与疾病的发生。研究显示,孕妇饮食可以影响DNA甲基化,改变印迹基因(Agouti基因)的表达,进而影响动物毛发颜色^[10];低蛋白饮食引起小鼠糖皮质激素受体(非印迹基因)启动子区的低甲基化,导致糖皮质激素受体表达上调^[11];在低蛋白饮食中,只需添加叶酸(甲基供体),即可以预防子代血管功能受损的发生^[12];DNA的异常甲基化还可引起儿童白血病,例如AKAP12基因高甲基化参与了儿童髓样白血病发病^[13]。本研究证实IGFBP3基因甲基化程度可能与IUGR的发生具有相关性,证实了宫内环境影响了基因的表达进而导致IUGR。

[参考文献]

[1] Mamelle N, Bonid M, Rivière O, Joly MO, Mellier G, Maria B, et al. Identification of newborns with fetal growth restriction (FGR) in weight and/or length based on constitutional growth potential[J]. Eur J Pediatr, 2006, 165(10): 717-725.

[2] Bos AF, Einspieler C, Prechtl HF. Intrauterine growth retardation, general movements, and neurodevelopmental outcome: a review[J]. Dev Med Child Neurol, 2001, 43(1): 61-68.

[3] 蒋晓敏,陶芳标. 胰岛素样生长因子系统与胎儿发育及其宫内

编程[J]. 中国妇幼保健,2008,23(17): 2468-2470.

[4] 顾婷婷,张忠明,郑鹏生. DNA 甲基化研究方法的回顾与评价[J]. 中国妇幼健康研究,2006,17(6):555-560.

[5] 冯景,周有利,张吉才,陶建蜀. 甲基化特异性 P C R 全程易出现的问题与控制措施[J]. 检验医学,2006,21(4):437-438.

[6] Lorente A, Mueller W, Urdangarin E, Lázcoz P, von Deimling A, Castresana JS. Detection of methylation in promoter sequences by melting curve analysis-based semiquantitative real time PCR[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 61.

[7] Turner CL, Mackay DM, Callaway JL, Docherty LE, Poole RL, Bullman H, et al. Methylation analysis of 79 patients with growth restriction reveals novel patterns of methylation change at imprinted loci[J]. Eur J Hum Genet, 2010, 18(6):648-655.

[8] Paquette J, Bessette B, Ledru E, Deal C. Identification of upstream stimulatory factor binding sites in the human IGFBP3 promoter and potential implication of adjacent single-nucleotide polymorphisms and responsiveness to insulin [J]. Endocrinology, 2007, 148(12):6007-6018.

[9] Kawasaki T, Noshio K, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Fuchs CS, et al. IGFBP3 promoter methylation in colorectal cancer: relationship with microsatellite instability, CpG island methylator phenotype, and p53[J]. Neoplasia, 2007, 9(12): 1091-1098.

[10] Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(32): 13056-13061.

[11] Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring[J]. J Nutr, 2005,135(6):1382-1386.

[12] Torrens C, Brawley L, Anthony FW, Dance CS, Dunn R, Jackson AA, et al. Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction [J]. Hypertension, 2006, 47(5): 982-987.

[13] 李玉华,文飞球. DNA 甲基化与儿童白血病的临床研究进展[J]. 中国当代儿科杂志,2011,13(2):174-177.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

第二届全国、全军儿科疾病细胞治疗学习班暨高峰论坛通知

由海军总医院儿科主办,北京医学会儿科学分会、全军儿科学会、中国神经修复学会筹办委员会、中国医药生物技术协会再生医学专业委员会协办的全国暨全军儿科疾病细胞治疗高峰论坛将于2011年10月14-16日在北京举行。

近年来干细胞及其相关临床前研究和临床研究发展迅速,经典的造血干细胞移植方兴未艾,传统的细胞免疫疗法日新月异,胚胎干细胞、iPS 细胞、各种成体干细胞的基础与临床研究突飞猛进,国际上有关干细胞的临床试验逐年增加,我国《国家中长期科技发展纲要》(2006~2020年)将干细胞技术列为重点支持项目,国家高技术研究发展计划(863计划)、973计划、国家自然科学基金每年投入大量资金支持干细胞相关研究。本届论坛将邀请国内外知名院士和专家讲授细胞疗法的基础和临床研究最新进展,涉及血液肿瘤,自身免疫及免疫缺陷病,围产期脑损伤,难治性神经肌肉系统疾病,遗传代谢,消化,内分泌等系统疾病,欢迎您的参加!本次论坛将授予国家、军队继续教育学分。

联系方式:

联系人:霍玉婧 电话:010-88511150-812;13146504773 传真:010-88511150-826

电子信箱:huoyujing.2008@163.com