

同型半胱氨酸致胰岛β细胞凋亡中肝配蛋白A型受体2 DNA甲基化升高

张晴^{1,2,3}, 高春兰⁴, 于飞飞^{1,2,3}, 张正皓^{1,2,3}, 马芳^{1,2,3}, 高原^{1,2,3}, 李桂忠^{1,2,3}, 姜怡邓^{1,2,3}, 马胜超^{1,2,3}

https://doi.org/10.12307/2023.062

投稿日期: 2022-01-19

采用日期: 2022-03-11

修回日期: 2022-05-13

在线日期: 2022-06-10

中图分类号:

R459.9; R318; R587.1

文章编号:

2095-4344(2023)05-00714-06

文献标识码: B

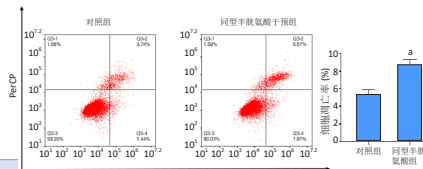
文章快速阅读: 胰岛β细胞中肝配蛋白A型受体2及启动子区DNA高甲基化的机制

小鼠胰岛β细胞株
Min6: 分为对照组
及同型半胱氨酸组。

干预
48 h

检测指标:

- (1) 胰岛β细胞 Bax、Bcl-2 和半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶3 凋亡蛋白表达;
- (2) 胰岛β细胞凋亡率;
- (3) 肝配蛋白A型受体2(EphA2)蛋白和 mRNA 表达;
- (4) EphA2 启动子区 DNA 甲基化水平;
- (5) DNMT1、DNMT3a 的蛋白表达。



结论

- (1) 同型半胱氨酸导致胰岛β细胞发生凋亡;
- (2) EphA2 启动子区 DNA 高甲基化可能是导致胰岛β细胞凋亡的关键机制。

文题释义:

胰岛β细胞: 是胰岛细胞中的一种内分泌细胞, 位于胰岛的中部, 可分泌胰岛素, 在调节体内血糖水平的过程中起着重要的作用。当胰岛β细胞功能受到损伤时, 会导致胰岛素分泌绝对或相对不足, 发生胰岛素抵抗, 使血糖异常升高, 从而引发糖尿病。

EphA2: 肝配蛋白A型受体2(EphA2)位于细胞膜上, 是一种受体酪氨酸激酶, 包含一个保守N端配体结合的胞外结构域、一个跨膜结构域和一个保守酪氨酸激酶结构域。Eph受体和相应的Eph受体相互作用(ephrin)的配体共同构成具有多种功能的关键细胞信号网络。

摘要

背景: 同型半胱氨酸水平增加会导致胰岛β细胞发生凋亡, 但其具体机制尚不明确。

目的: 探讨胰岛β细胞中肝配蛋白A型受体2及其启动子区DNA高甲基化的具体机制。

方法: 体外培养小鼠胰岛β细胞株Min6, 将其分为对照组(0 μmol/L同型半胱氨酸)和同型半胱氨酸组(120 μmol/L同型半胱氨酸)。干预细胞48 h后, 采用免疫荧光和Western blot法检测2组细胞中凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2、半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶3表达情况; Western blot法检测DNA甲基化相关蛋白DNMT1、DNMT3a的表达水平; 实时荧光定量PCR检测两组细胞中肝配蛋白A型受体2 mRNA水平; Western blot检测肝配蛋白A型受体2的蛋白表达情况; 巢式甲基化特异性PCR检测EphA2启动子区DNA甲基化水平。

结果与结论: ①与对照组相比, 同型半胱氨酸组胰岛β细胞中凋亡相关蛋白Bax和半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶3表达明显升高, Bcl-2表达明显下降; 肝配蛋白A型受体2的mRNA和蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$); ②与对照组相比, 同型半胱氨酸组肝配蛋白A型受体2 DNA甲基化水平明显升高($P < 0.05$), 同型半胱氨酸组胰岛β细胞中DNMT1蛋白表达明显增高($P < 0.05$); ③提示肝配蛋白A型受体2 DNA高甲基化在同型半胱氨酸致胰岛β细胞凋亡中的作用明显, 而DNMT1可能参与其高甲基化过程。

关键词: 胰岛β细胞; 同型半胱氨酸; 细胞凋亡; 肝配蛋白A型受体2; DNA甲基化

缩略语: 肝配蛋白A型受体2: Ephrin A receptor 2, EphA2; 半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶3: cysteine-containing aspartate-specific proteases-3, Caspase-3

Ephrin A receptor 2 DNA methylation increases in pancreatic beta cell apoptosis induced by homocysteine

Zhang Qing^{1,2,3}, Gao Chunlan⁴, Yu Feifei^{1,2,3}, Zhang Zhenghao^{1,2,3}, Ma Fang^{1,2,3}, Gao Yuan^{1,2,3}, Li Guizhong^{1,2,3}, Jiang Yideng^{1,2,3}, Ma Shengchao^{1,2,3}

¹School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ²Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research, National Health Commission of China, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ³Ningxia Key Laboratory of Vascular Injury and Repair Research, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ⁴Yinchuan First People's Eye Hospital, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Zhang Qing, Master candidate, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research, National Health Commission of China, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Ningxia Key Laboratory of Vascular Injury and Repair Research, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Corresponding author: Ma Shengchao, Associate professor, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous

¹宁夏医科大学基础医学院, 宁夏回族自治区银川市 750004; ²国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004; ³宁夏血管损伤与修复研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004; ⁴银川第一人民医院, 宁夏回族自治区银川市 750004

第一作者: 张晴, 女, 1997年生, 河北省唐山市人, 汉族, 宁夏医科大学在读硕士, 主要从事同型半胱氨酸对细胞损伤方向的研究。

通讯作者: 马胜超, 副教授, 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏回族自治区银川市 750004; 国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004; 宁夏血管损伤与修复研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004

https://orcid.org/0000-0002-6724-542X(张晴)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81760139), 项目负责人: 马胜超; 宁夏回族自治区重点研发计划一般项目(2018BEG03011), 项目负责人: 马胜超; 第三批宁夏青年科技人才托举工程项目(TJGC2018010), 项目负责人: 马胜超; 2019年宁夏回族自治区重点研发计划(对外科技合作专项)“西部之光”项目, 项目负责人: 马胜超; 宁夏医科大学校级项目(XM2020002), 项目负责人: 于飞飞

引用本文: 张晴, 高春兰, 于飞飞, 张正皓, 马芳, 高原, 李桂忠, 姜怡邓, 马胜超. 同型半胱氨酸致胰岛β细胞凋亡中肝配蛋白A型受体2 DNA甲基化升高[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(5):714-719.



Region, China; Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research, National Health Commission of China, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Ningxia Key Laboratory of Vascular Injury and Repair Research, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Increased homocysteine levels lead to apoptosis of pancreatic β cells, but the exact mechanism remains unclear.

OBJECTIVE: To explore the specific mechanism of DNA hypermethylation of Ephrin A receptor 2 (EphA2) and its promoter region in pancreatic β cells.

METHODS: Mouse insulinoma cell lines (Min6) were cultured *in vitro* and divided into control group (0 $\mu\text{mol/L}$ homocysteine) and homocysteine group (120 $\mu\text{mol/L}$ homocysteine). After 48 hours of intervention in the cells, immunofluorescence and western blot were used to test the expression of apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in pancreatic islet β cells of the two groups. The expression levels of DNA methylation-related proteins DNMT1 and DNMT3a were detected by western blot. Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the level of EphA2 mRNA. Western blot was used to detect the protein expression of EphA2. Nested methylation-specific PCR was used to detect the level of DNA methylation in the promoter region of EphA2.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the expression of apoptosis-related proteins Bax and Caspase-3 in the pancreatic β cells was significantly increased in the homocysteine group, and the expression of Bcl-2 was significantly decreased; the mRNA and protein expression levels of EphA2 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the EphA2 DNA methylation level and the expression of DNMT1 protein in the pancreatic β cells were significantly higher in the homocysteine group ($P < 0.05$). To conclude, EphA2 DNA hypermethylation plays a significant role in homocysteine-induced pancreatic β cell apoptosis and DNMT1 may be involved in its hypermethylation process.

Key words: pancreatic islet β cells; homocysteine; apoptosis; Ephrin A receptor 2; DNA methylation

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81760139 (to MSC); Ningxia Hui Autonomous Region Key R&D Program (General Project), No. 2018BEG03011 (to MSC); The Third-Batch Ningxia Youth Science and Technology Talent Support Project, No. TJGC2018010 (to MSC); "Light of the West" Project of Ningxia Hui Autonomous Region Key R&D Program in 2019 (Special Project for Foreign Scientific and Technological Cooperation) (to MSC); School-level Project of Ningxia Medical University, No. XM2020002 (to YFF)

How to cite this article: ZHANG Q, GAO CL, YU FF, ZHANG ZH, MA F, GAO Y, LI GZ, JIANG YD, MA SC. Ephrin A receptor 2 DNA methylation increases in pancreatic beta cell apoptosis induced by homocysteine. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(5):714-719.

0 引言 Introduction

糖尿病是由胰岛素分泌或作用受损而导致血糖升高的一种慢性代谢性疾病,其中2型糖尿病在糖尿病患者中的比例高达90%^[1-2]。2型糖尿病是由于胰岛素分泌不足,无法在有胰岛素抵抗的情况下降低血糖葡萄糖的浓度,当机体中葡萄糖稳态遭到破坏,会导致糖尿病发生,严重者还可诱发糖尿病肾病、糖尿病神经病变、糖尿病血管病变等并发症的发生,甚至会危及生命。人体释放胰岛素的含量取决于胰岛 β 细胞的功能及数量^[3],同时有研究发现,在胰岛素抵抗的前期,胰岛 β 细胞可通过增加胰岛素分泌以维持血糖正常水平。当细胞发生凋亡时,会导致胰岛 β 细胞的数量骤降及胰岛功能发生不可逆的损伤,从而加快糖尿病的发生与发展。临床研究显示,2型糖尿病患者的血清中多伴有同型半胱氨酸水平升高,并与疾病的严重程度密切相关^[4]。同型半胱氨酸是蛋氨酸在代谢过程中形成的一种中间产物^[5],实验室前期研究证实,同型半胱氨酸具有引起细胞发生凋亡、自噬、焦亡等重要的生物学功能^[6-8]。Ephrin受体(Eph)是最重要的一类受体酪氨酸激酶(RTKs),其中,肝配蛋白A型受体2(Ephrin A receptor 2, EphA2)是Eph受体家族中主要的调节因子^[9-10]。研究发现,EphA2可在同型半胱氨酸诱导内皮细胞损伤的过程中发挥着重要的作用,但其在同型半胱氨酸引起血糖异常中的作用尚不清楚^[11]。DNA甲基化是同型半胱氨酸引起相关疾病的重要机制,且有研究显示,DNA甲基化水平异常是糖尿病发生的关键表观遗传学标志^[12-14]。但同型半胱氨酸是否通过改变EphA2 DNA甲基化水平参与糖尿病的发生发展目前尚未见报道。因而,此次研究旨在探讨EphA2 DNA甲基化在同型半胱氨酸致胰岛 β 细胞凋亡中的作用,为进一步研究同型半胱氨酸导致糖尿病发生发展的分子机制提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验,两组样本比较采用独立样本t检验。

1.2 时间及地点 实验于2020年11月至2021年12月在宁夏医科大学国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室完成。

1.3 材料 小鼠胰岛 β 细胞株(Min6),由宁夏医科大学病理生理学系惠赠。

实验主要试剂盒及仪器:胎牛血清、RPMI-1640培养基(美国,Gibco);胰蛋白酶消化液(碧云天生物技术研究所);同型半胱氨酸粉末(美国,Sigma);基因组DNA提取试剂盒、总RNA提取试剂盒(北京,天根);全蛋白提取试剂盒和蛋白定量试剂盒(南京,凯基);反转录和实时荧光定量PCR试剂盒(美国,Thermo Fisher);DNA甲基化修饰试剂盒(美国,ZYMO);EphA2抗体、Bax抗体、半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶3(cysteine-containing aspartate-specific proteases-3, Caspase-3)抗体、Bcl-2抗体(中国Affinity公司); β -actin抗体(中山金桥,中国);引物由上海生工生物工程有限公司合成;CO₂培养箱(德国,Heraeus);超净工作台(苏州,安泰);5415D型微量台式离心机(德国,Eppendorf);BS110S型精密天平(德国,Sartorius);荧光定量PCR仪(上海,枫岭);电泳仪、电转仪、凝胶成像仪(美国,Bio-rad);激光共聚焦显微镜(Zeiss)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养及处理 在含有体积分数10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中培养小鼠胰岛 β 细胞,置于温度为37 $^{\circ}\text{C}$,体积分数5%的CO₂细胞培养箱中。当细胞密度占培养瓶总体积的80%时,按1:3比例进行传代,2d传代1次,取第3代细胞进行相关实验操作。取状态良好的细胞接种到6孔板中,当细胞浓度达到 1×10^5 个/孔时,分别用同型半胱氨酸浓度为0 $\mu\text{mol/L}$ 作为对照组,同型半胱氨酸浓度为120 $\mu\text{mol/L}$ 作为同型半胱氨酸组,在干预48h后,将细胞收集于离心管中,进行相关指标检测。

1.4.2 免疫荧光染色检测 Bcl-2、Bax及Caspase-3的表达 用体积分数4%甲醛分别固定对照组及同型半胱氨酸组小鼠胰

岛β细胞30 min, PBS冲洗3次,每次5 min,体积分数10%过氧化氢下孵育10 min, PBS冲洗3次后加山羊血清封闭60 min,加入相对的Bcl-2、Bax、Caspase-3一抗抗体(1:400),在4℃条件下孵育过夜后取出细胞,在室温下静置30 min恢复室温, PBS冲洗5 min加入荧光二抗(1:100),在避光条件下37℃孵育1 h后用PBS冲洗并避光加入100 μL DAPI染细胞核5 min,再次用PBS冲洗后滴加荧光淬灭剂封固,将染色后的细胞置于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.4.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 胰岛β细胞分为2组:

①对照组(0 μmol/L同型半胱氨酸);②同型半胱氨酸组(120 μmol/L同型半胱氨酸)。胰岛β细胞同型半胱氨酸干预48 h后,收细胞, PBS洗2遍后,用不含酚红和EDTA的0.25%胰酶消化后将细胞轻吹下来,转入1.5 mL离心管中,用离心机离心(4℃, 1 000 r/min, 5 min)后倒掉废液,加入1 mL PBS吹匀离心,重复上述操作2次。在避光条件下按1:9的比例配结合液加入到各个离心管后,再分别加入PerCP 5 μL, PE 5 μL轻拨混匀,静止15 min。吹匀并用滤膜过滤后,立即用流式细胞仪检测细胞凋亡率。采用NovoExpress软件处理流式数据。

1.4.4 实时荧光定量PCR检测EphA2 mRNA的表达 依据RNA simple Total RNA Kit提取各组中小鼠胰岛β细胞总RNA,将总RNA依据Takara Bio 037A试剂盒反转录后合成cDNA; EphA2序列可通过NCBI及GenBank数据库进行查找并对其进行引物合成。

EphA2: F: 5'-GCA CAG GGA AAG GAA GTT GTT-3'; R: 5'-CAT GTA GAT AGG CAT GTC GTT C-3'。

PCR扩增程序: 95℃(30 s), 95℃(5 s), 55.1℃(34 s), 设循环40次,将GAPDH设置为内参,并根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算待检测各组小鼠胰岛β细胞中EphA2 mRNA的表达量。

1.4.5 Western blot检测Bax、Bcl-2、Caspase-3、EphA2、DNMT1、DNMT3a的蛋白表达 按照全蛋白提取试剂盒说明书提取对照组和同型半胱氨酸组胰岛β细胞全蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度后定量,按1:4加入蛋白loading buffer,金属浴99℃煮沸5 min使蛋白变性,每组取30 μg总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,电压为80 V,30 min后转至120 V,之后进行电转设置程序为:0.3 A,2 h,将蛋白转至PVDF膜,用5%脱脂牛奶封闭2 h,用PBST洗膜4次,每次5 min,分别按说明书上相应比例用抗体稀释液稀释Bcl-2、Bax、DNMT1、EphA2、Caspase-3、DNMT3a以及β-actin抗体,4℃摇床过夜;使用辣根过氧化物酶标记的二抗,按1:5 000比例稀释,室温下孵育2 h, PBST洗膜4次/5 min;在凝胶成像分析仪上进行成像分析,统计Bcl-2、Bax、Caspase-3、EphA2、DNMT1和DNMT3a与β-actin内参灰度值的比值并进行计算分析。

1.4.6 巢式甲基化特异性PCR检测EphA2启动子区DNA甲基化水平 按照TIANamp Genomic DNA kit说明书提取各组细胞的全基因组DNA,并对提取后的全基因组DNA进行

甲基化修饰。巢式甲基化特异性PCR法检测EphA2启动子区DNA甲基化水平是否发生变化。根据EphA2的序列,在MethPrimer网页设计内外引物及甲基化与非甲基化引物,见表1。

表1 | 基因引物序列
Table 1 | Primer sequences

引物	序列
外引物	F: 5'-GGG GGA TGT TAA TAG TTA TAA TGT G-3' R: 5'-CTC CTA CCA ATA CCA AAA ACA AAA C-3'
甲基化引物	F: 5'-GGT GTT TTA GGT TTG GTG ATT C-3' R: 5'-TAT TAA CAT CCC CCT TCT TAC GAT-3'
非甲基化引物	F: 5'-GGT GTT TTA GGT TTG GTG ATT AGT T-3' R: 5'-CTA TTA ACA TCC CCC TTC TTA CAA T-3'

引物反应体系: 总体积为25 μL, PCR MIX: 12.5 μL, ddH₂O: 7 μL, F': 1 μL, R': 1 μL, 修饰后DNA: 3.5 μL; 以外引物PCR产物为模板,引物扩增的反应条件为: 95℃(5 min); 95℃(30 s), 63℃(30 s), 51℃(30 s), 循环数为20次。并对内引物甲基化和非甲基化引物进行扩增,随后用曝光仪在1%的琼脂糖凝胶上进行成像分析。发生甲基化为甲基化阳性条带(M),未发生甲基化为非甲基化阳性条带(U),按规定甲基化公式进行计算: 甲基化 = M/(M+U)×100%。

1.5 主要观察指标 ①Western blot及免疫荧光检测各组细胞Bax、Bcl-2、Caspase-3凋亡相关蛋白表达;②流式细胞术检测细胞凋亡情况;③实时荧光定量PCR及Western blot检测EphA2 mRNA及蛋白表达;④巢式甲基化特异性PCR及Western blot检测在同型半胱氨酸作用下EphA2 DNA甲基化水平的变化。

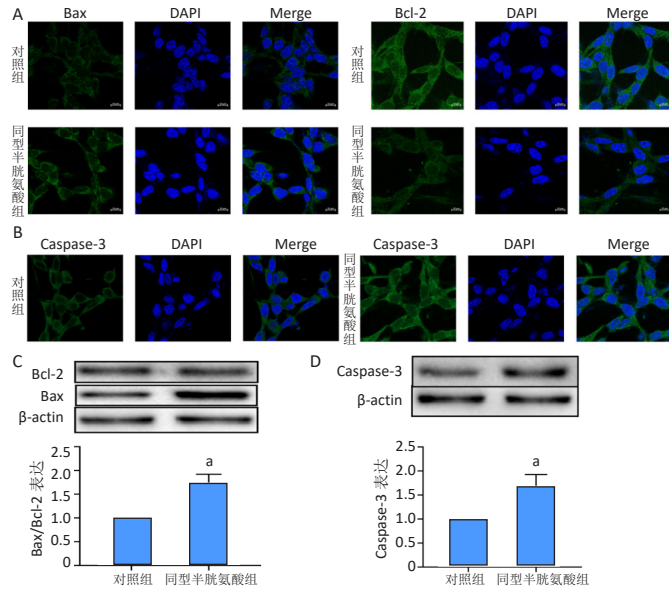
1.6 统计学分析 文章统计学方法已经宁夏医科大学生物统计学专家审核。使用Prism 8.0统计软件对实验数据进行统计并分析,检测结果均属计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本t检验, P < 0.05时表示实验数据差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 同型半胱氨酸对胰岛β细胞凋亡相关指标的影响 采用免疫荧光染色及Western blot检测小鼠胰岛β细胞相关凋亡蛋白表达情况,其中Bax为促凋亡蛋白,Bcl-2为抗凋亡蛋白,而Bax与Bcl-2的比值增大,表明细胞发生凋亡。

结果显示:同型半胱氨酸组胰岛β细胞相关凋亡蛋白Bax荧光强度及蛋白水平表达与对照组相比明显上升,提示在同型半胱氨酸干预后Bax的表达量升高;同型半胱氨酸组Bcl-2荧光强度减弱及蛋白水平降低,提示在同型半胱氨酸干预后Bcl-2表达量下降;同型半胱氨酸组Caspase-3荧光强度及蛋白水平与对照组相比表达上升,提示同型半胱氨酸干预后Caspase-3表达量有所增加。由此证明同型半胱氨酸干预细胞后可以使胰岛β细胞的凋亡水平增加,见图1。

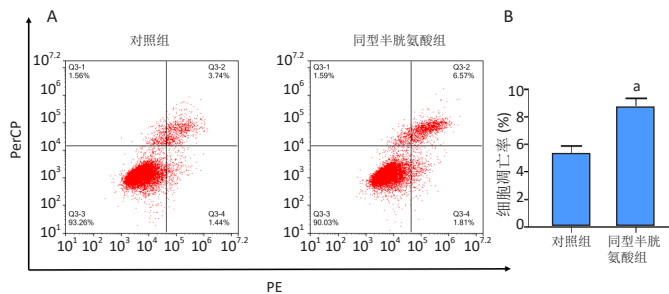
2.2 流式细胞术检测同型半胱氨酸对胰岛β细胞凋亡的影响 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果显示:与对照组相



图注：图 A 为免疫荧光检测两组中 Bax、Bcl-2 的表达情况 (×60)；图 B 为免疫荧光检测两组中 Caspase-3 的表达情况 (×60)；图 C 为 Western blot 检测两组中 Bax/Bcl-2 的蛋白表达；图 D 为 Western blot 检测两组中 Caspase-3 蛋白的表达。与对照组相比，^a*P* < 0.05。Caspase-3 为半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3

图 1 | 胰岛 β 细胞凋亡对相关荧光强度及蛋白表达的影响
Figure 1 | Fluorescence intensity and protein expression in apoptotic pancreatic β cells

比，同型半胱氨酸组细胞凋亡率与对照组相比明显升高。表明同型半胱氨酸干预后可使胰岛 β 细胞凋亡率上升，见图 2。

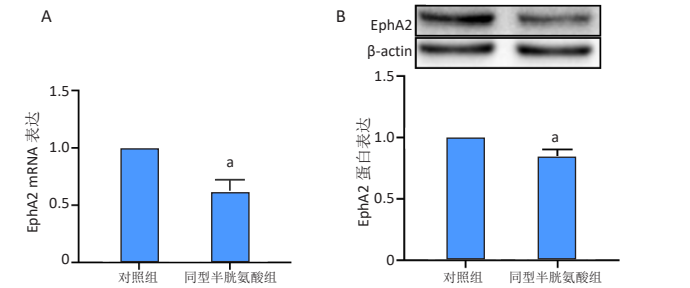


图注：图 A 示采用流式细胞术检测各组胰岛 β 细胞的凋亡情况；图 B 为细胞凋亡率统计图，与对照组相比，^a*P* < 0.05

图 2 | 同型半胱氨酸对胰岛 β 细胞凋亡的影响
Figure 2 | Effect of homocysteine on apoptosis of pancreatic β cells

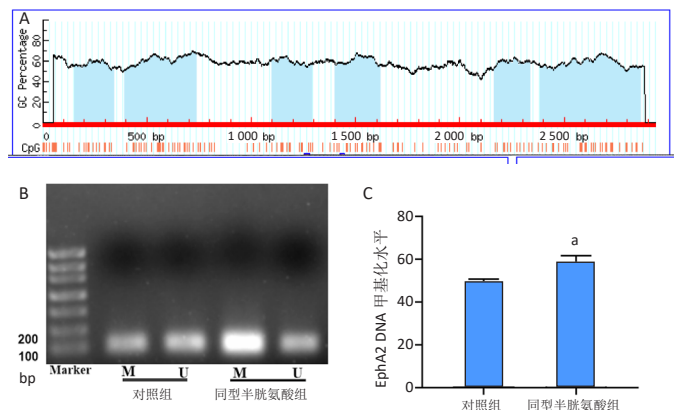
2.3 同型半胱氨酸对 EphA2 表达水平的影响 为了证明 EphA2 可在同型半胱氨酸的诱导下致使胰岛 β 细胞发生凋亡，需检测胰岛 β 细胞中 EphA2 mRNA 和蛋白的表达情况，将分别采取实时荧光定量 PCR 及 Western blot 进行检测。结果显示：同型半胱氨酸组胰岛 β 细胞 EphA2 mRNA 表达与对照组相比，明显降低；且同型半胱氨酸组胰岛 β 细胞 EphA2 相关蛋白表达也明显降低，见图 3。

2.4 同型半胱氨酸组对 EphA2 DNA 甲基化水平的影响 为了深入探索同型半胱氨酸使 EphA2 蛋白含量表达降低的具体机制，需采用巢式甲基化特异性 PCR 检测胰岛 β 细胞中 EphA2 的 DNA 甲基化水平。结果显示，同型半胱氨酸组 EphA2 DNA 甲基化水平与对照组相比明显升高，见图 4。



图注：图 A 示采用实时荧光定量 PCR 检测 EphA2 在胰岛 β 细胞中 mRNA 的表达情况；图 B 为两组中 EphA2 蛋白的表达情况及统计图。与对照组相比，^a*P* < 0.05

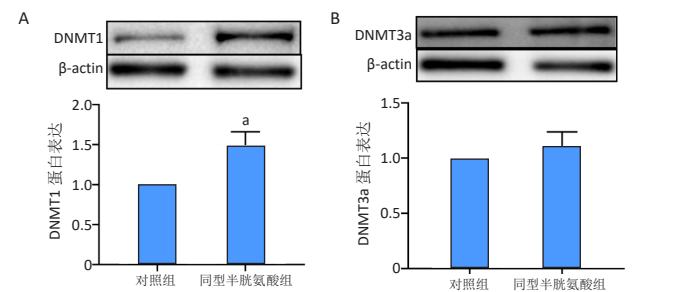
图 3 | 肝配蛋白 A 型受体 2(EphA2) 在胰岛 β 细胞中的表达
Figure 3 | Expression of Ephrin A receptor 2 in pancreatic β cells



图注：图 A 为 EphA2 基因启动子区 CPG 岛图谱；图 B 为 EphA2 基因 DNA 甲基化水平凝胶成像图，M 为发生甲基化的阳性条带，U 为未发生甲基化的阳性条带；图 C 为 EphA2 DNA 甲基化水平统计图；与对照组相比，^a*P* < 0.05

图 4 | 巢式甲基化特异性 PCR 法检测肝配蛋白 A 型受体 2(EphA2)DNA 甲基化水平
Figure 4 | Detection of Ephrin A receptor 2 DNA methylation level by nested methylation-specific PCR

2.5 同型半胱氨酸致胰岛 β 细胞凋亡中对 DNMT1、DNMT3a 蛋白表达的影响 Western blot 法检测小鼠胰岛 β 细胞中 DNMT1 及 DNMT3a 蛋白表达状况。结果显示：同型半胱氨酸组胰岛 β 细胞 DNMT1 蛋白表达与对照组相比有所升高，差异有显著性意义 (*P* < 0.05)；而 DNMT3a 表达两组之间差异无显著性意义，见图 5。



图注：图 A 为 Western blot 检测各组的 DNMT1 蛋白表达；图 B 为 Western blot 检测各组的 DNMT3a 蛋白表达。与对照组相比，^a*P* < 0.05

图 5 | 两组中胰岛 β 细胞 DNMT1、DNMT3a 的蛋白表达
Figure 5 | Protein expression of DNMT1 and DNMT3a in pancreatic β cells

3 讨论 Discussion

随着经济的持续发展,人们的生活质量不断提高,同时2型糖尿病的发病率也日益增加且呈低龄化发展。2017年全球约有4.15亿2型糖尿病患者,预计到2045年将达到6.93亿。2型糖尿病是由胰腺中 β 细胞发生不可逆损伤导致胰岛素分泌下降和外周细胞胰岛素抵抗导致血糖升高、碳水化合物、蛋白质和脂质代谢发生紊乱的一种慢性疾病^[15-16]。研究表明,凋亡对于维持胰岛 β 细胞稳态至关重要,当炎症和高糖高脂等因素对胰岛 β 细胞造成损伤时,会引起其发生凋亡,适当的凋亡水平有助于维持胰岛 β 细胞内环境平衡,但是过量的细胞凋亡水平会导致胰岛 β 细胞数量发生不可逆减少,进而引起胰岛素分泌降低^[17]。因此细胞凋亡在2型糖尿病的发展中起着重要的作用。

细胞凋亡是由机体的异常变化从而触发细胞内预存的死亡程序而导致细胞发生死亡的过程^[18]。细胞主要通过外源性、内源性和穿孔素介导这3种途径被激活而发生凋亡,这些途径都可以导致Caspase-3的激活。Bcl-2是公认的细胞凋亡调控靶点,它可与Bax发生拮抗^[19]。Bcl-2的表达下降,会导致Bax转位到线粒体膜的数量增加,使线粒体的通透性增强并释放细胞色素c,激活Caspase-3的联线反应,进而发生凋亡^[20]。而Caspase-3是细胞凋亡途径中常见的关键蛋白^[21],同时也是细胞凋亡的启动者和执行者,具有促进细胞因子生成和调节细胞生长、分化的作用。研究表明,同型半胱氨酸生物学功能繁多,其可加快血管动脉粥样硬化的形成,对内皮细胞造成损伤并调节脂质代谢等。人体中的同型半胱氨酸多以呈游离型的半胱氨酸结合物在血清中存在,少量以还原型同型半胱氨酸形式存在于血清之中。研究显示,同型半胱氨酸是心血管疾病发生的独立危险因素^[22]。但在糖尿病患者中发现,血清中的同型半胱氨酸水平显著升高,因此糖尿病患者多伴有高同型半胱氨酸血症^[23]。此次研究采用免疫荧光及Western blot检测到,与对照组相比,同型半胱氨酸组细胞Bax/Bcl-2的比值增大。而Bax与Bcl-2的比值决定了Caspase-3的激活程度,其比值越大,被激活程度越高,反之亦然。此次实验中发现,同型半胱氨酸组Caspase-3的蛋白表达明显上升。综上所述,同型半胱氨酸可以刺激胰岛 β 细胞发生凋亡,但是同型半胱氨酸具体通过哪种途径诱导胰岛 β 细胞发生凋亡目前尚不明确。

EphA2是产生促红细胞生成素的肝配蛋白(Eph)受体的主要成员^[24],Eph受体酪氨酸激酶及其ephrin的配体在多种生理和病理过程中都发挥着重要的作用。Eph受体及其配体分为2个亚家族,其中Eph受体是受体酪氨酸激酶(RTK)的最大亚家族。EphA2位于细胞膜上,与ephrin-A配体结合会导致其降解,并抑制细胞的增殖,而在没有配体的情况下,EphA2积累增多,同时增加细胞的侵袭性。研究表明,EphA2在乳腺癌、宫颈癌和胰腺癌中均高表达,在细胞的增殖和转移中发挥着重要作用^[25-26]。WEI等^[27]在研究胰腺癌模型小鼠中发现,降低EphA2的基因表达可使其肿瘤的生长

和转移速度减慢,同时肿瘤细胞的凋亡水平升高。此次实验发现EphA2在同型半胱氨酸干预的胰岛 β 细胞中蛋白含量及mRNA的表达水平明显低于对照组,因此,这提示EphA2可能通过对胰岛 β 细胞凋亡的负向调控,从而在糖尿病发病的病理过程中发挥着功能。

DNA甲基化是表观遗传最具有特征性的机制之一^[28],它通过影响染色质结构、DNA稳定性、DNA构象和DNA与蛋白质相互作用,从而可以调控基因的特异性表达,其中DNMT1和DNMT3a是调控DNA甲基化的关键因子^[29-31]。DNA甲基化对于哺乳动物的组织发育和体内代谢平衡是必不可少的,目前已发现DNA甲基化在包括糖尿病、慢性肾病等疾病中异常表达^[32-33]。虽然理论上游离的甲基可以添加到DNA碱基的任何腺嘌呤或胞嘧啶上,但胞嘧啶甲基化通常仅在基因启动子区的CpG二核苷酸中观察到,这是富含CpG区域的基因是否具有DNA甲基化的重要理论依据^[34]。通过分析EphA2基因启动子区CpG岛提示,EphA2可发生甲基化。人体所有的细胞中都包含胰岛素基因,但胰岛素基因只在胰岛 β 细胞中表达,研究发现,胰岛素基因可以促进胰岛 β 细胞产生,当胰岛素基因发生高甲基化时其功能则被抑制,从而使胰岛 β 细胞生成的数量减少,并且发生胰岛素抵抗,最终导致2型糖尿病的发生^[35]。同时同型半胱氨酸是半胱氨酸参与甲基转移酶反应的副产物,因此其与细胞相关基因的DNA高甲基化密切相关。此次实验发现,同型半胱氨酸组中EphA2 DNA甲基化水平明显升高,而前面的结果已经表明同型半胱氨酸组中EphA2基因的蛋白呈低表达,这就提示EphA2的表达水平降低与EphA2启动子区DNA甲基化水平升高密切相关。DNMT1是DNA复制后维持甲基化模式的主要酶^[36],在多种疾病中发挥着重要的调节作用。CHEN等^[37]发现在2型糖尿病患者和小鼠的胰岛素基因中,均有高甲基化的发生,且检测出DNMT1与2型糖尿病患者的易感性相关,DNMT1在2型糖尿病中的表达明显高于对照组。此次研究发现同型半胱氨酸组中DNMT1表达升高,提示DNMT1可能在导致EphA2 DNA高甲基化中作用明显。

综上所述,EphA2启动子区DNA甲基化水平呈现高表达,可能是同型半胱氨酸导致胰岛 β 细胞凋亡的关键机制,这为进一步探究同型半胱氨酸导致胰岛 β 细胞分泌功能发生障碍并导致糖尿病的发生提供了新的实验依据和研究方向。

作者贡献: 实验设计为马胜超、张晴;实验实施为张晴、高春兰、于飞飞、张正皓;实验评估为马芳、高源、李桂忠、姜怡邓和马胜超。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。
出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究

实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] LI Z, CHENG Y, WANG D, et al. Incidence Rate of Type 2 Diabetes Mellitus after Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of 170,139 Women. *J Diabetes Res.* 2020;2020:3076463.
- [2] ZHANG P, WANG AP, YANG HP, et al. Apelin-13 attenuates high glucose-induced calcification of MOVAS cells by regulating MAPKs and PI3K/AKT pathways and ROS-mediated signals. *Biomed Pharmacother.* 2020;128:110271.
- [3] COLE JB, FLOREZ JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(7):377-390.
- [4] FENG X, GAO X, JIA Y, et al. PPAR- α Agonist Fenofibrate Decreased RANTES Levels in Type 2 Diabetes Patients with Hypertriglyceridemia. *Med Sci Monit.* 2016;22:743-51.
- [5] ZARIC BL, OBRADOVIC M, BAJIC V, et al. Homocysteine and Hyperhomocysteinaemia. *Curr Med Chem.* 2019;26(16):2948-2961.
- [6] XIE L, MA S, DING N, et al. Homocysteine induces podocyte apoptosis by regulating miR-1929-5p expression through c-Myc, DNMT1 and EZH2. *Mol Oncol.* 2021;15(11):3203-3221.
- [7] 殷荷, 王艳华, 吴琪瑞, 等. miR-5088-5p 在子痫前期患者胎盘组织中的表达及其对滋养细胞自噬的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(24):3312-3316+3322.
- [8] 董小艳, 刘达越, 徐灵博, 等. 脂肪酸结合蛋白 4 在同型半胱氨酸致大鼠心肌细胞焦亡中的作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(1): 33-38.
- [9] BAHARUDDIN WNA, YUSOFF AAM, ABDULLAH JM, et al. Roles of EphA2 Receptor in Angiogenesis Signaling Pathway of Glioblastoma Multiforme. *Malays J Med Sci.* 2018;25(6):22-27.
- [10] ANDERTON M, VAN DER MEULEN E, BLUMENTHAL MJ, et al. The Role of the Eph Receptor Family in Tumorigenesis. *Cancers (Basel).* 2021;13(2):206.
- [11] TIAN D, QIN Q, LI M, et al. Homocysteine Impairs Endothelial Cell Barrier Function and Angiogenic Potential via the Progranulin/EphA2 Pathway. *Front Pharmacol.* 2021;11:614760.
- [12] PI T, LIU B, SHI J. Abnormal Homocysteine Metabolism: An Insight of Alzheimer's Disease from DNA Methylation. *Behav Neurol.* 2020;2020:8438602.
- [13] BANSAL A, PINNEY SE. DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2017;18(3):167-177.
- [14] AHMED SAH, ANSARI SA, MENSAH-BROWN EPK, et al. The role of DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Clin Epigenetics.* 2020;12(1):104.
- [15] LOVIC D, PIPERIDOU A, ZOGRAFOU I, et al. The Growing Epidemic of Diabetes Mellitus. *Curr Vasc Pharmacol.* 2020;18(2):104-109.
- [16] LAAKSO M. Biomarkers for type 2 diabetes. *Mol Metab.* 2019;27S(Suppl): S139-S146.
- [17] MOIN ASM, BUTLER AE. Alterations in Beta Cell Identity in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2019;19(9):83.
- [18] XU X, LAI Y, HUA ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019;39(1):BSR20180992.
- [19] D'ORSI B, MATEYKA J, PREHN JHM. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok. *Neurochem Int.* 2017;109:162-170.
- [20] VINCE JE, DE NARDO D, GAO W, et al. The Mitochondrial Apoptotic Effectors BAX/BAK Activate Caspase-3 and -7 to Trigger NLRP3 Inflammasome and Caspase-8 Driven IL-1 β Activation. *Cell Rep.* 2018;25(9):2339-2353.e4.
- [21] NICHANI K, LI J, SUZUKI M, et al. Evaluation of Caspase-3 Activity During Apoptosis with Fluorescence Lifetime-Based Cytometry Measurements and Phasor Analyses. *Cytometry A.* 2020;97(12):1265-1275.
- [22] KAPLAN P, TATARKOVA Z, SIVONOVA MK, et al. Homocysteine and Mitochondria in Cardiovascular and Cerebrovascular Systems. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7698.
- [23] NOOR A, RAHMAN MU, FARAZ N, et al. Relationship of Homocysteine With Gender, Blood Pressure, Body Mass Index, Hemoglobin A1c, and the Duration of Diabetes Mellitus Type 2. *Cureus.* 2021;13(11):e19211.
- [24] LONDON M, GALLO E. The EphA2 and cancer connection: potential for immune based interventions. *Mol Biol Rep.* 2020;47(10):8037-8048.
- [25] REZAIE E, AMANI J, BIDMESHKI POUR A, et al. A new scfv based recombinant immunotoxin against EPHA2-overexpressing breast cancer cells; High in vitro anti-cancer potency. *Eur J Pharmacol.* 2020;870:172912.
- [26] HUANG C, CHEN Z, HE Y, et al. EphA2 promotes tumorigenicity of cervical cancer by up-regulating CDK6. *J Cell Mol Med.* 2021;25(6): 2967-2975.
- [27] WEI Q, ZHANG J, LI Z, et al. Serum Exo-EphA2 as a Potential Diagnostic Biomarker for Pancreatic Cancer. *Pancreas.* 2020;49(9):1213-1219.
- [28] WANG M, NGO V, WANG W. Deciphering the genetic code of DNA methylation. *Brief Bioinform.* 2021;22(5):bbaa424.
- [29] LAW PP, HOLLAND ML. DNA methylation at the crossroads of gene and environment interactions. *Essays Biochem.* 2019;63(6):717-726.
- [30] ANGELONI A, BOGDANOVIC O. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation. *Essays Biochem.* 2019;63(6):707-715.
- [31] EDWARDS JR, YARYCHKIVSKA O, BOULARD M, et al. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin.* 2017;10:23.
- [32] SINGH R, CHANDEL S, DEY D, et al. Epigenetic modification and therapeutic targets of diabetes mellitus. *Biosci Rep.* 2020;40(9): BSR20202160.
- [33] INGROSSO D, PERNA AF. DNA Methylation Dysfunction in Chronic Kidney Disease. *Genes (Basel).* 2020;11(7):811.
- [34] CHOI WY, HWANG JH, CHO AN, et al. DNA Methylation of Intragenic CpG Islands are Required for Differentiation from iPSC to NPC. *Stem Cell Rev Rep.* 2020;16(6):1316-1327.
- [35] NASTESKA D, HODSON DJ. The role of beta cell heterogeneity in islet function and insulin release. *J Mol Endocrinol.* 2018;61(1):R43-R60.
- [36] BRONNER C, ALHOSIN M, HAMICHE A, et al. Coordinated Dialogue between UHRF1 and DNMT1 to Ensure Faithful Inheritance of Methylated DNA Patterns. *Genes (Basel).* 2019;10(1):65.
- [37] CHEN YT, LIN WD, LIAO WL, et al. NT5C2 methylation regulatory interplay between DNMT1 and insulin receptor in type 2 diabetes. *Sci Rep.* 2020;10(1):16087.

(责任编辑: GD, ZN, ZJP)