

• 临床检验研究论著 •

产妇外周血和胎儿脐血白细胞介素 28 启动子甲基化差异研究*

马建鸿¹, 张元珍¹, 祝成亮², 周 春¹, 王 燕¹, 陈 红¹, 李家福¹

(1. 武汉大学中南医院妇产科, 湖北武汉 430071; 2. 武汉大学人民医院检验科, 湖北武汉 430060)

摘 要:目的 探讨产妇外周血和胎儿脐血白细胞介素 28(IL-28)启动子甲基化差异及其对 IL-28 表达的影响。方法 采用甲基化特异性 PCR(MSP)方法检测产妇外周血和胎儿脐血 IL-28 启动子甲基化水平的差异;分离外周血单核细胞(PBMC),比较 DNA 甲基化酶活性的差异;RT-PCR 检测两者 PBMC 中 IL-28 mRNA 的含量;采用 ELISA 法检测产妇外周血和胎儿脐血 IL-28 水平的差异。结果 IL-28 启动子在胎儿脐血中均以甲基化形式存在,而在产妇外周血中为非甲基化形式;胎儿脐血 PBMC 细胞核甲基化酶活性升高($P<0.05$);IL-28 mRNA 在产妇外周血 PBMC 中的表达水平高于胎儿脐血 PBMC;胎儿脐血 IL-28 含量较产妇外周血低($P<0.01$)。结论 胎儿脐血细胞核内甲基化酶活性升高导致 IL-28 启动子高甲基化,进而引起 IL-28 的合成和分泌降低。

关键词: 胎血; 白细胞介素 28; 甲基化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.02.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)02-0132-02

Study of the methylation difference in the promoter of interleukin 28 between maternal peripheral blood and fetal cord blood*

Ma Jianhong¹, Zhang Yuanzhen¹, Zhu Chengliang², Zhou Chun¹, Wang Yan¹, Chen Hong¹, Li Jiafu¹

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, Central South Hospital of Wuhan University, Wuhan,

Hubei 430071, China; 2. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of

Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: **Objective** To explore the difference of interleukin 28 (IL-28) promoter methylation between maternal peripheral blood and fetal cord blood and its effect on the expression of IL-28. **Methods** The methylation specific PCR (MSP) method was applied to detect the methylation of IL-28. The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) was separated from maternal peripheral blood and fetal cord blood in order to compare the differences in the DNA methyltransferase activity. The levels of IL-28 mRNA in PBMC were measured by RT-PCR, and changes of IL-28 were analyzed by ELISA. **Results** IL-28 promoter was in the form of methylation in fetal cord blood. The DNA methyltransferase activity was increased in PBMC of fetal cord blood ($P<0.05$). The expression levels of IL-28 mRNA was higher in PBMC of maternal peripheral blood, and IL-28 was reduced in fetal cord blood ($P<0.01$). **Conclusion** The increasing DNA methyltransferase activity in fetal cord blood could lead to high methylation of IL-28 promoter, which would cause the reduction of IL-28.

Key words: fetal blood; interleukin-28; methylation

传统产前诊断获取胎儿组织的方法,如羊膜腔穿刺、绒毛膜取样、脐带取血等均具有创伤性,对胎儿和产妇都有一定的危险性^[1-2]。近年来随着分子生物学技术的不断发展和对遗传病认识的不断深入,应用表观遗传学 DNA 甲基化技术,从母亲和胎儿 DNA 甲基化的差异性上突破母血中检测胎儿 DNA 技术的局限已取得很大的进展^[3-4]。前期工作中笔者采用甲基化芯片筛选到产妇外周血和胎儿脐血中甲基化差异基因白细胞介素 28(IL-28)启动子。本研究主要通过临床标本分析 IL-28 启动子在产妇外周血和胎儿脐血中的甲基化差异及其机制,并探讨其对 IL-28 合成和分泌的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机收集武汉大学中南医院 2009 年 1~10 月产妇 100 例。分别采集产妇肘静脉血及产后脐带血,1 000 r/min 离心 10 min,血清置-70℃保存待测,同时采用淋巴细胞分离液分离外周血单核细胞(PBMC)。所有产妇均知情同意,并经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 亚硫酸盐修饰基因组 DNA 采用 Qiagen 公司提供

的试剂盒提取全血基因组 DNA,紫外分光光度计进行定量,取基因组 DNA 2 μg,0.2 mmol/L NaOH 变性后,加入 3.1 mmol/L 亚硫酸钠和 0.5 mmol/L 氰脲,样品置 55℃水浴 16 h,采用 DNA Clean-Up System 试剂盒纯化处理过的基因组,加入 0.3 mmol/L NaOH,再以 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀,沉淀溶解于 30 μL TE 缓冲液。

1.2.2 甲基化特异性 PCR(MSP) 采用甲基化 PCR 引物设计软件 MethPrimer 设计引物,引物 M:5'-TGT ATG TTT ATA GTT TTT TTT ATT CGG-3'(上游引物);5'-AAA CTA ATC TCG AAC TCT TAA CGT C-3'(下游引物)。引物 U:5'-TGT TTA TAG TTT TTT TTA TTT GG-3'(上游引物);5'-AAC TAA TCT CAA ACT CTT AAC ATC-3'(下游引物)。其中引物 M 用于扩增甲基化 DNA,引物 U 用于扩增未甲基化 DNA,β-actin 作为参照。以亚硫酸盐修饰基因组 DNA 作为模板进行 PCR,产物以 1% 琼脂糖进行凝胶电泳检测。

1.2.3 甲基化酶活性的检测 采用淋巴细胞分离液分离产妇外周血和脐带血 PBMC,加入细胞裂解液,全细胞裂解液或者

* 基金项目:湖北省科技攻关项目(2007AA301B37-2);武汉市科技攻关项目(200760423158)。 作者简介:马建鸿,女,副主任医师,主要从事围产医学及产前诊断研究。

核抽提物经过蛋白质浓度定量之后,使用甲基化酶活测定试剂盒测定甲基化酶活性。

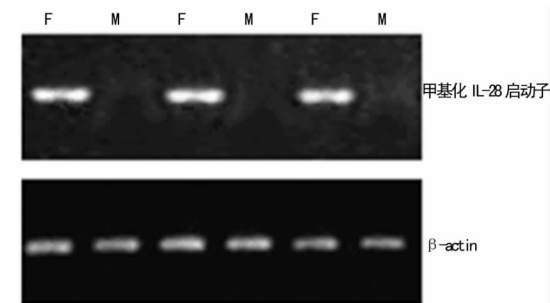
1.2.4 RT-PCR 检测 按照 Trizol 试剂说明书分别提取产妇外周血和脐带血的总 RNA。以总 RNA 为模板进行 RT-PCR,反转录合成相应的 cDNA。再以 cDNA 作模板,用 IL-28 基因的检测引物 5'-AGT GCT GGT GCT GAT GGC-3'(上游引物),5'-GTG GGC TGA GGC TGG ATA-3'(下游引物)进行 PCR 扩增,同时用 β -actin 的检测引物 5'-ATG ATA TCG CCG CGC TCG-3'(上游引物),5'-CGC TCG GTG AGG ATC TTC A-3'(下游引物)进行平行 PCR 扩增,产物以 1% 琼脂糖进行凝胶电泳检测。

1.2.5 ELISA 法检测 IL-28 取 100 μ L 血清加入到 ELISA 板小孔中,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,PBS 洗 ELISA 板 5 次。配 3% 脱脂奶粉,用 PBST 溶解,每孔 100 μ L 加入到 ELISA 板中,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。用 PBST 洗 ELISA 板 5 次。IL-28 抗体用 PBST 按 1:100 稀释,每孔加 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 放置 1 h,用 PBST 洗 5 次。辣根过氧化物酶偶联的兔抗羊 IgG 用 PBST 按 1:5 000 稀释,37 $^{\circ}$ C 放置 30 min,用 PBST 洗 5 次。每孔分别加入显色液,37 $^{\circ}$ C 避光显色 5 min。每孔加终止液 1 滴,酶标仪读数。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析。组间计量数据比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

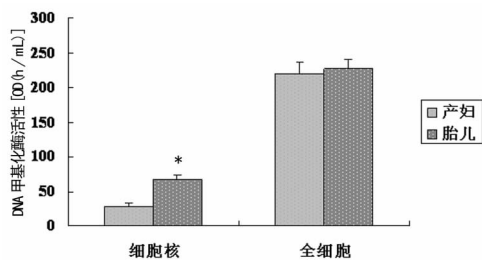
2 结果

2.1 IL-28 基因启动子甲基化检测结果显示,在产妇外周血未发现甲基化 IL-28 启动子,而在胎儿脐血甲基化 IL-28 启动子检出率为 100%(图 1),表明 IL-28 启动子在胎儿均以甲基化形式存在,而在产妇中为非甲基化形式。



F: 胎儿脐血; M: 产妇外周血。

图 1 产妇外周血和胎儿脐血 IL-28 启动子甲基化引物扩增产物



*: $P<0.05$, 与产妇细胞核 DNA 甲基化酶活性比较。

图 2 产妇外周血和胎儿脐血 PBMC 全细胞及细胞核 DNA 甲基化酶活性分析

2.2 甲基化酶活性检测结果显示,在全细胞水平上,产妇外周血和胎儿脐血甲基化酶的活性无统计学差异($P>0.05$);而对于核抽提物来说,胎儿脐血核内的 DNA 甲基化酶的活性增加,见图 2。表明胎儿 IL-28 基因启动子甲基化水平升高可能

是由于脐血核内的 DNA 甲基化酶活性升高引起的。

2.3 RT-PCR 检测产妇外周血和胎儿脐血 PBMC 中 IL-28 mRNA 的表达,结果见图 3,IL-28 mRNA 的表达水平在胎儿脐血明显低于产妇外周血,表明 IL-28 启动子的甲基化能够在转录水平调节 IL-28 的表达。

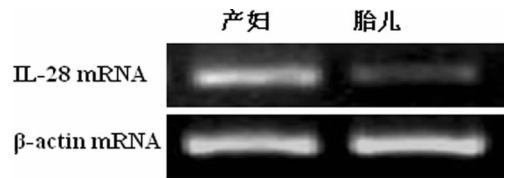


图 3 RT-PCR 检测产妇外周血和胎儿脐血 PBMC 中 IL-28 mRNA 的表达

2.4 ELISA 法检测产妇外周血和胎儿脐血 IL-28 血清水平结果显示,与胎儿脐血中 IL-28 水平[(37.9±5.6)pg/mL]相比,产妇外周血中 IL-28 水平[(51.4±7.6)pg/mL]显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

表观遗传学信息的改变,可导致基因转录抑制、基因组印记、细胞凋亡、染色体灭活以及肿瘤发生等[5],而表观遗传学最具特征的就是 DNA 甲基化。在前期工作中笔者采用甲基化芯片筛选了产妇外周血和胎儿脐血中基因组 DNA 的甲基化差异,其中 IL-28 基因启动子的甲基化水平在胎儿脐血升高。MSP 是一种分析目的 DNA 序列是否甲基化的快速、定性方法,其灵敏度高。由于甲基化芯片存在一定的假阳性,笔者采用 MSP 对芯片结果进行了验证,结果发现在产妇外周血未发现甲基化 IL-28 启动子,而在胎儿脐血甲基化 IL-28 启动子检出率为 100%,这与甲基化芯片结果相一致。

DNA 甲基化由 DNA 甲基转移酶催化,在多种调节因子的参与下,与组蛋白修饰相互作用,抑制基因转录,导致基因沉默[6]。为探讨产妇外周血和胎儿脐血 IL-28 启动子甲基化差异的机制,笔者采用淋巴细胞分离液提取了产妇外周血和胎儿脐血的 PBMC,采用甲基化检测试剂盒对全细胞和核抽提物的甲基转移酶活性进行了检测,结果发现在全细胞水平,两者 PBMC 中 DNA 甲基转移酶活性改变不大($P>0.05$),而对于核抽提物而言,胎儿脐血 PBMC 甲基转移酶活性明显升高($P<0.05$)。这说明胎儿脐血 PBMC 细胞核中 DNA 甲基转移酶活性升高是导致 IL-28 启动子高甲基化的重要原因。

由于启动子甲基化会导致细胞很多基因表达水平的降低或沉默,为探讨 IL-28 启动子甲基化对 IL-28 转录表达水平的影响,笔者采用 RT-PCR 对 IL-28 mRNA 的水平进行检测,结果表明 IL-28 mRNA 在胎儿脐血 PBMC 中的含量降低,说明 IL-28 启动子的甲基化能够在转录水平影响 IL-28 的表达。进一步检测 IL-28 在蛋白水平的变化,结果显示产妇外周血中 IL-28 的表达水平明显高于胎儿脐血中 IL-28 的表达水平($P<0.01$),表明 IL-28 启动子的甲基化在转录水平抑制了 IL-28 的表达,进而在蛋白水平抑制其合成和分泌。但 IL-28 启动子上哪些位点被甲基化,其具体调节机制如何,尚待深入探讨。

综上所述,笔者分析了产妇外周血和胎儿脐血中 IL-28 基因启动子甲基化的差异,并通过临床样本检测两者 IL-28 的 mRNA 和蛋白水平,证实胎儿脐血细胞核内 DNA 甲基化酶活性升高导致 IL-28 启动子高甲基化,引起 IL-28 合成和分泌降低,可为临床无创性产前诊断提供参考。

(下转第 135 页)

岁,自然流产次数 3~4 次。选择同期健康经产妇 36 例作为健康对照组,年龄 25~35 岁,平均 26.8 岁,均排除遗传、内分泌、子宫畸形、病毒感染等因素造成的流产,无其他内科系统疾病。

1.2 仪器与试剂 血清 ACA-IgG、ACA-IgA、ACA-IgM 的 ELISA 检测试剂由浙江伊利康公司提供,IgA 抗 β 2-GP I 检测试剂由美国 RB 公司提供。

1.3 方法 所有对象于清晨空腹抽取静脉血 2 mL,分离血清于 -20℃ 保存待测。采用 ELISA 法进行血清 ACA-IgG、ACA-IgA、ACA-IgM 和 IgA 抗 β 2-GP I 检测,操作和结果判断均按试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计学软件进行统计学分析,组间 ACA-IgG、ACA-IgA、ACA-IgM 及 IgA 抗 β 2-GP I 阳性率比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

RSA 组 ACA-IgG、ACA-IgA、ACA-IgM 阳性例数分别为 42、13、16 例,阳性率分别为 41.1%、12.7%、15.7%,IgA 抗 β 2-GP I 阳性 37 例,阳性率为 36.2%,其中早期流产组 ACA-IgG、ACA-IgA、ACA-IgM 阳性例数分别为 23、7、9,阳性率分别为 40.3%、12.2%、15.7%,IgA 抗 β 2-GP I 阳性 21 例,阳性率 36.8%;晚期流产组 ACA-IgG、ACA-IgA、ACA-IgM 阳性例数分别为 19、6、7 例,阳性率分别为 42.2%、13.3%、15.5%,IgA 抗 β 2-GP I 阳性 16 例,阳性率 35.6%。健康对照组 ACA-IgG、ACA-IgA、ACA-IgM 阳性例数分别为 2、0、1 例,阳性率分别为 5.5%、0.0%、2.7%,IgA 抗 β 2-GP I 阳性 3 例,阳性率 8.3%。与健康对照组比较,早期流产组、晚期流产组 ACA-IgG、ACA-IgA、ACA-IgM 和 IgA 抗 β 2-GP I 阳性率均显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而早期流产组与晚期流产组 ACA-IgG、ACA-IgA、ACA-IgM 和 IgA 抗 β 2-GP I 阳性率无统计学差异($P > 0.05$)。

3 讨 论

越来越多的研究表明 RSA 与 APA 有关,是 APS 的主要的临床表现之一。APA 大体可分为两类:一类抗体作用于磷脂,其中与 RSA 关系密切的主要为 ACA;另一类抗体作用于磷脂结合蛋白,这些磷脂结合蛋白中 β 2-GP I 在 APA 的活性上起主要作用,是主要的自身抗原和必要的辅助因子^[2-3]。ACA 的靶抗原是存在于细胞膜和线粒体膜中带负电荷的心磷脂,为甘油磷脂类结构。ACA 与心磷脂的免疫病理反应是通过 β 2-GP I 而起作用的^[4]。病理状态下这类磷脂分布到细胞膜外,当其与血清中的 β 2-GP I 结合后即暴露出抗原位点,诱导产生相应的自身抗体。 β 2-GP I 依赖性的 ACA 与 RSA 存在密切关联。ACA 在 RSA 中的作用可总结为:(1)ACA 作用于滋养层表面的磷脂依赖抗原,影响其黏附、融合和分化过程,

使合体滋养层细胞形成不足,造成子宫对胚胎接受性降低,维持妊娠的胎盘激素分泌减少。(2)ACA 可干扰血栓素 A2 和前列腺环素的平衡,导致血小板聚集,形成微血栓,引起胎盘梗死,从而造成不良妊娠结局。(3)ACA 作用于胎盘血管内皮细胞膜的磷脂上,引起胎盘血栓形成和血管收缩,胎盘血流量减少,或引起胎盘血管炎,致使胎儿氧供及营养不足而死亡。(4)ACA 可干扰钙依赖磷脂结合蛋白-V 的作用(钙依赖磷脂结合蛋白-V 是一种具有抗凝特性的磷脂结合蛋白),抑制蛋白 C 的激活,降低抗凝血酶Ⅲ的功能。ACA 可诱导内皮细胞表达血管内皮细胞黏附分子以及细胞内黏附分子等黏附蛋白,从而导致血栓形成。但 ACA 产生时需 β 2-GP I 介导,而 β 2-GP I 可抑制磷脂依赖性的凝血反应。当 ACA 与 β 2-GP I 结合后,可使其结构发生改变,导致 IgA 抗 β 2-GP I 对血液凝固调节发生障碍。

综上所述,各种原因导致凝血异常,血管内血栓形成,尤其以胎盘循环为主,造成胎盘功能减退,从而导致 RSA 发生。国外报道 ACA 在 RSA 患者中的阳性率为 5%~51%^[5]。国内研究者报道 ACA 在 RSA 患者中阳性率为 14.29%。本研究结果显示 ACA-IgG、ACA-IgA、ACA-IgM 在 RSA 患者中的阳性率分别为 41.1%、12.7%、15.7%。同时笔者检测出 IgA 抗 β 2-GP I 阳性 37 例,阳性率为 36.2%。对于 RSA 患者检测 ACA 的同时再配合检测 IgA 抗 β 2-GP I,将有助于 RSA 患者病因的诊断,以便及时通过特异性的免疫治疗,提高妊娠成功率,减少妊娠并发症。

参考文献

- [1] 林其德.免疫所致复发性流产和习惯性流产[J].中华妇产科杂志,2000,35(12):760-760.
- [2] Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, et al. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome[J]. Blood, 2007, 109(2):422-430.
- [3] Lin WS, Chen PC, Yang CD, et al. Some antiphospholipid antibodies recognize conformational epitopes shared by beta2-glycoprotein I and the homologous catalytic domain of several serine proteases[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(5):1638-1647.
- [4] Keane PA, Ravikumar K, O'shea SI, et al. Anti-beta2 glycoprotein 1 and the anti-phospholipid syndrome[J]. Am J Ophthalmol, 2006, 142(4):701-702.
- [5] Vinatier D, Dufour P, Cosson M, et al. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriages[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2001, 96(1):37-50.

(收稿日期:2012-09-12)

(上接第 133 页)

参考文献

- [1] Hahn S, Chitty LS. Noninvasive prenatal diagnosis: current practice and future perspectives[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2008, 20(2):146-151.
- [2] Cleary-Goldman J, D'Alton ME, Berkowitz RL. Prenatal diagnosis and multiple pregnancy[J]. Semin Perinatol, 2005, 29(5):312-320.
- [3] Tong YK, Lo YM. Plasma epigenetic markers for cancer detection and prenatal diagnosis[J]. Front Biosci, 2006, 11(13):2647-2656.

- [4] Hahn S, Zhong XY, Holzgreve W. Recent progress in non-invasive prenatal diagnosis[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2008, 13(2):57-62.
- [5] Dworkin AM, Huang TH, Toland AE. Epigenetic alterations in the breast: implications for breast cancer detection, prognosis and treatment[J]. Semin Cancer Biol, 2009, 19(3):165-171.
- [6] Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker[J]. Methods Mol Biol, 2009, 507(1):3-20.

(收稿日期:2012-07-08)