

细胞复制衰老过程中 *IGF2R* 基因表达及 H3 组蛋白修饰的变化

徐 薇^{1,2}, 庄志雄^{2△}, 杨建平², 杨琳清², 许玉玲², 张文娟², 曾 怡¹

1. 四川省疾病预防控制中心(成都 610041); 2. 深圳市疾病预防控制中心(深圳 518055)

【摘要】 目的 研究细胞复制性衰老过程中胰岛素样生长因子 2 受体基因(*IGF2R*)的表达与 H3 组蛋白修饰谱的变化。**方法** 培养人胚肺成纤维细胞(HPF),以细胞群倍增数(PDL)为 23(PDL23)为年轻组细胞,PDL=50(PDL50)为复制衰老细胞,观察细胞复制衰老过程中生物学性状改变;采用实时定量 PCR 法观察细胞 PDL30、PDL40、PDL50 *IGF2R* 基因的表达,并采用染色质免疫共沉淀-实时定量 PCR 法(chromatinimmunoprecipitation-real time quantitative PCR methods,CHIP-PCR)检测 *IGF2R* 基因转录起始区组蛋白修饰(H3-Ac、H3K9-tri-Me、H3K9-Ac 和 H3K4-tri-Me) 的状况。**结果** 与年轻细胞相比,衰老细胞体积变大,增殖能力减弱,细胞周期停滞,衰老特异性 β -半乳糖苷酶着色阳性,*IGF2R* mRNA 表达增加($P<0.05$),*IGF2R* mRNA 表达与细胞 PDL 呈正相关($r=0.871$)。相对年轻细胞而言,老年细胞的 *IGF2R* 基因在转录起始点上游 0.6 kb 处和转录起始点下游 1.2 kb 处以 H3-Ac、H3K9-Ac 和 H3K4-tri-Me 组蛋白修饰为主,而在转录起始点下游 1.6~4.0 kb 处 H3K9-Ac 修饰降低,H3K9-tri-Me 组蛋白修饰升高,但 H3K4-tri-Me 组蛋白修饰占主要地位。**结论** *IGF2R* 与细胞衰老程度相关,其基因表达受 H3 组蛋白修饰调控,表观遗传学参与细胞衰老进程。

【关键词】 复制性衰老 胰岛素样生长因子 2 受体 基因表达 组蛋白修饰

The Profile of *IGF2R* Gene Expression and H3 Histone Modifications in Replicative Cell Senescence XU Wei^{1,2}, ZHUANG Zhi-xiong^{2△}, YANG Jian-ping², YANG Lin-qing², XU Yu-ling², ZHANG Wen-juan², ZENG Yi¹. 1. Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China; 2. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China

△ Corresponding author, E-mail: zixiongzhuang2007@126.com

【Abstract】 Objective To study the profile of *IGF2R* expression and histone modifications in replicative cell senescence. **Methods** The changes of biological characteristics of young human pulmonary fibroblast (HPF) cells [at population doubling level (PDL) 23] and aging HPF cells (at PDL50) were observed and real-time quantitative PCR was utilized to investigate human *IGF2R* gene expressions profile during the process of cellular aging (at different PDL). Then chromatinimmunoprecipitation-real time quantitative PCR (CHIP-QPCR) methods were conducted to analyze histone modifications of the regions around the transcriptional start site of *IGF2R* (H3-Ac, H3K9-tri-Me, H3K9-Ac and H3K4-tri-Me). **Results** In contrast to young cells, the aging cells were bigger and less proliferative, their cell cycles arrest, and aging specific β -galactosidase staining was positive. *IGF2R* gene expression was in positive correlation with PDL. H3-Ac, H3K9-Ac and H3K4-tri-Me were dominant in the upstream region (-0.6 kb) to the downstream region ($+1.2$ kb) of transcriptional start site (TSS). While in the downstream of TSS from $+1.6$ kb to $+4.0$ kb, H3K9-Ac was declined and H3K9-tri-Me was elevated in turn, but H3K4-tri-Me still prevailed in these areas. **Conclusion** *IGF2R* is related to cell replicative senescence and its gene expression is regulated by histone modification of H3. Therefore, epigenetics may play a role in cell senescence.

【Key words】 Replicative senescence Insulin growth factor II receptor (*IGF2R*) Gene expression Histone modification

胰岛素样生长因子 2 受体(*IGF2R*)是重要的父源印记基因,与细胞生长有密切关系,参与细胞多项生命活动。目前关于该基因的研究主要集中在其和肿瘤的关系上,而有关该基因和细胞衰老关系的研究较少。本研究在国内外首次对细胞衰老过程中组

蛋白修饰情况进行研究,初步探讨衰老过程中组蛋白修饰对 *IGF2R* 基因表达调控的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞

人胚肺成纤维细胞(ccc-HPF-1,简称 HPF),购自中国医学科学院细胞研究所。细胞源自 15 周引

产的正常胚胎肺细胞(核型 XY,46),购买时细胞群倍增数(PDL)为 16。

1.2 主要试剂

TRIzol Reagent (Invitrogen 公司), First Strand cDNA Synthesis Kit (立陶宛 Fermentas 公司), QuantiTect™ SYBR Green PCR (美国 QIAGEN 公司), EZ CHIP™ 试剂盒(美国 Upstate 公司), anti-H3-Ac, anti-H3K9-Ac, anti-H3K9-tri-Me, anti-H3K4-tri-Me(美国 Invitrogen 公司), PCR 引物(上海生物工程公司合成)。β-半乳糖苷酶(SA β Gal)原位染色试剂盒(碧云天)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 L-DMEM 完全培养基培养 HPF,细胞长至 90% 融合时按 1 : 4 传代。细胞每传代 1 次便倍增 2 次。按照此法培养细胞,直到细胞停止增殖。以 PDL=23 (PDL23)为年轻组细胞,PDL=50 (PDL50)为复制衰老细胞。

1.3.2 衰老细胞生物学性状检测 观察 HPF 细胞 PDL23、PDL50 形态学;SA β Gal 活性变化(光镜下观察到细胞变成绿色,即 SA β Gal 表达阳性);细胞周期变化(计算细胞增殖指数 PI,PI=(S%+G₂/M%)/(G₀/G₁%+S%+G₂/M%)×100%;绘制细胞生长曲线[以细胞在 490 nm 的吸光度(A₄₉₀)为纵坐标,以接种天数为横坐标,设 6 个复孔],观察衰老细胞与年轻细胞的差异。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 IGF2R mRNA 总 RNA 提取采用 TRIzol 法,经逆转录后得到 cDNA,然后采用 ABI 7900 Real-time PCR 仪进行基因片段扩增。引物设计:首先在 GenBank 里查

找 IGF2R 的 cDNA 序列,然后用 Primer5 软件设计引物,引物片段跨内含子。IGF2R 上游引物 5'-ACATGGGAAGCTGTTGATACCA-3',下游引物 5'-TCAAAACAGAGTCACCCACTGAA-3',产物片段 151 bp;GAPDH 上游引物 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3',产物片段 226 bp。实时荧光定量 PCR 反应依试剂盒说明操作,反应条件:95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,共 40 次循环,反应结束后作熔解曲线。扩增曲线上设定循环基线和阈值,GAPDH 为内参照,以目的基因 Ct 值减去内参照 Ct 值为 ΔCt,以 2^{-ΔCt} 值计算目的基因的相对表达量,并分析细胞代数与 IGF2R 基因表达量之间的相互关系。

1.3.4 IGF2R 基因 H3 组蛋白修饰情况检测 采用染色质免疫共沉淀-实时定量 PCR 法(chromatinimmunoprecipitation-real time quantitative PCR methods,CHIP-PCR)检测 IGF2R 基因转录起始区组蛋白修饰(H3-Ac、H3K9-tri-Me、H3K9-Ac 和 H3K4-tri-Me)的状况。CHIP 方法按试剂盒说明书进行。体外交联和裂解细胞,超声断裂 DNA,加特异性抗体(anti-H3-Ac、anti-H3K9-Ac、anti-H3K9-tri-Me 和 anti-H3K4-tri-Me 4 种抗体)进行免疫共沉淀,洗脱与逆转交联,DNA 纯化,最后以沉淀所得的 DNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR。CHIP 引物设计:检索 NCBI 核酸数据库,获得有关 IGF2R 基因信息:GeneID:3 482,定位于 6q26,全长 137 452 bp。从转录起始点(TSS)上游 3 000 bp 开始至转录起始点下游 4 000 bp 进行分析,参考文献并设计引物^[1]。见附表。

附表 IGF2R CHIP 引物
Table PCR primers of ChIP-PCR for human IGF2R

Primer set	Location to TSS (kb)	Upstream primer	Downstream primer	Product length (bp)
1	-3.0	5'-CCGGTGCCAAACTTCCATGTGTATGA-3'	5'-GAAAATCTCTGGAGATGGGCACC-3'	83
2	-2.0	5'-GACCAATTTTCCATCTATAGACAACCT-3'	5'-GGAAAATCCAAGGAGAATCCAACA-3'	81
3	-1.0	5'-TGCAAAACGGATGCAATAAAGGCA-3'	5'-GTACGAAGTACTGAAGTGTTTCGGA-3'	94
4	-0.6	5'-CGTTCTACTTTCATTGTGGCTAGCTCA-3'	5'-GACAAAAGTGTCTGTGTCAGCAAGT-3'	95
5	-0.5	5'-CTTGACAGCGACACTTTTGTCCACT-3'	5'-CTCTCAGACCTTCTGTGGGAATGT-3'	110
6	-0.3	5'-ACCTCCCTGGCACTTTGATCCAAGT-3'	5'-GTGCAACCCAGGTTAGAGCAACTGT-3'	86
7	+0.4	5'-AGGAGCTCCTGGGGTCTCCAAGT-3'	5'-ACACCACGCAAGGCAACTTTCCCT-3'	82
8	+0.5	5'-CACTTGTGGCTGTCGCTGAGT-3'	5'-CTGCCTCCAACCTTTCCCGGAC-3'	111
9	+0.6	5'-GTCCGGGAAAGTTGGAGGCAG-3'	5'-TGCGGAAACTCTGATCAAACGCGCA-3'	72
10	+1.2	5'-CTGACCATCCTTTTCTGGACTGT-3'	5'-CATCCTGCTTCCTTTTTACCAAAGT-3'	88
11	+1.6	5'-GAGAAATGGTGGCAGCTTAAACGA-3'	5'-TTGGTCACAGAAGCCATTATTCCA-3'	84
12	+2.1	5'-AAGGTGGCTTCAAGGGCAGACTGA-3'	5'-CAAGACACTGCCATGACTAACCT-3'	84
13	+3.1	5'-CCGTAAATGTAGCATGTAGTTGAGGA-3'	5'-CACGTCACACCTTGGTGACACGA-3'	97
14	+4.0	5'-GTAGAGCAAGAAGAGAGGGCATTCA-3'	5'-GCTGAGATCACTTTAGACACTGTTGT-3'	97

以年轻细胞组蛋白修饰情况为参考基准,分析老年细胞组蛋白修饰图谱的变化。

1.4 统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 或百分率表示,细胞生长采用 t 检验分析;*IGF2R*基因表达采用方差分析和 Bivariate 变量相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 衰老细胞生物学性状

2.1.1 形态学特征 与年轻组细胞(PDL23)相比,复制衰老细胞(PDL50)细胞体积大,较圆钝,边界模糊;单个细胞形态呈梭形、多边形或不规则状,与周边细胞联系少;融合时细胞较少形成漩涡,多为网状或连成一片;分裂相细胞少。见图 1。

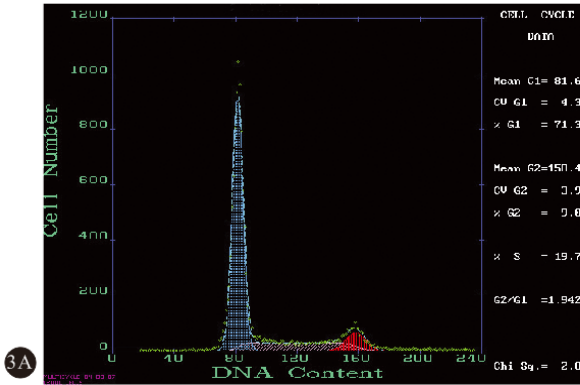
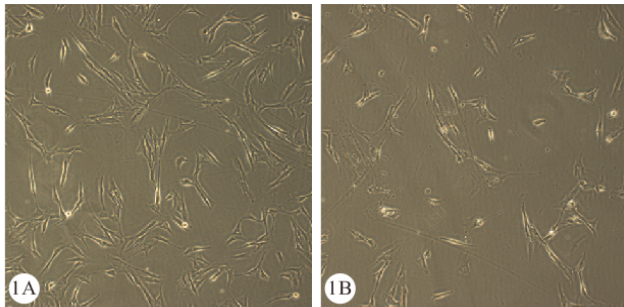


图 1 年轻与衰老细胞形态。×200

Fig 1 Cell morphology for young and aging cells. ×200

A: PDL23 group; B: PDL50 group

以 PDL23 组细胞的基因表达量为基准参考值, PDL30、PDL40、PDL50 组细胞 *IGF2R* 表达升高 (PDL30 为 3.21 ± 0.12 , PDL40 为 9.47 ± 0.12 , PDL50 为 7.94 ± 0.02), 各组间差异有统计学意义 (P 均 <0.001)。对细胞代数和基因表达量进行相关分析, *IGF2R* 表达量与细胞代数呈正相关 ($r=0.871, P=0.000$)。

2.3 *IGF2R* 基因的组蛋白修饰相对定量结果

2.1.2 衰老细胞特异性 SA β Gal 染色 由图 2 可见,衰老组细胞着色细胞多,且着色深。

2.1.3 细胞周期检测结果 与年轻组细胞 (PDL23)相比,复制衰老细胞组 (PDL50)处于 S 期的细胞明显减少。年轻组细胞增殖指数 PI 为 28.7%,而老年组细胞 PI 为 14.4%。见图 3。

2.1.4 细胞生长曲线 由图 4 可见,复制衰老组细胞增殖曲线较年轻组细胞增殖曲线平缓,衰老细胞增殖能力弱。接种起始两组细胞的 A 值差异无统计学意义 ($t=9.139, P=0.064$),即两组细胞初始接种密度相同。从接种第 2 d 至接种后第 6 d,与 PDL23 组细胞相比, PDL50 组细胞的 A 值降低,差异有统计学意义 (P 均 <0.001)。

2.2 *IGF2R* 基因表达

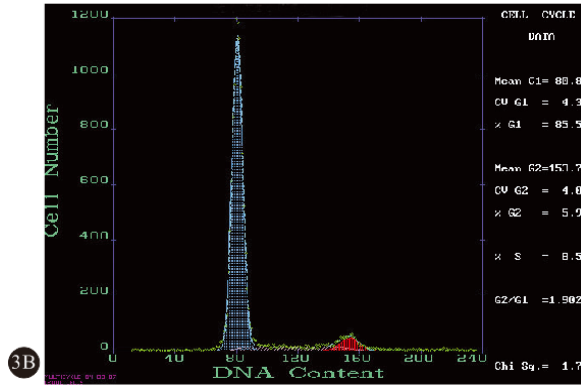
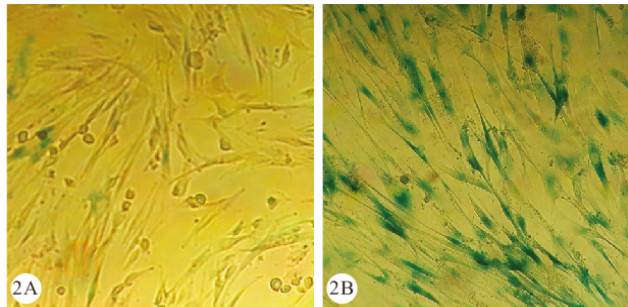


图 2 衰老特异性 β -半乳糖苷酶染色。×400

Fig 2 Aging specific β -galactosidase staining. ×400

图 3 细胞周期图

Fig 3 Cell cycle

相对于年轻细胞而言,老年细胞在 TSS 上游 0.6 kb 至 TSS 下游 1.2 kb 处, H3-Ac、H3K9-Ac 和 H3K4-tri-Me 组蛋白修饰升高至年轻细胞的 2 倍左右,而 H3K9-tri-Me 修饰降低至年轻细胞的 0.5 倍左右;而在 TSS 下游 1.6~4.0 kb 处, H3K9-Ac 组蛋白修饰降低至年轻细胞的 0.5 倍左右, H3-Ac 和 H3K9-tri-Me 组蛋白修饰与年轻细胞修饰水平相仿,而 H3K4-tri-Me 修饰升高至年轻细胞的 1.5 倍

左右。组蛋白修饰谱见图 5。

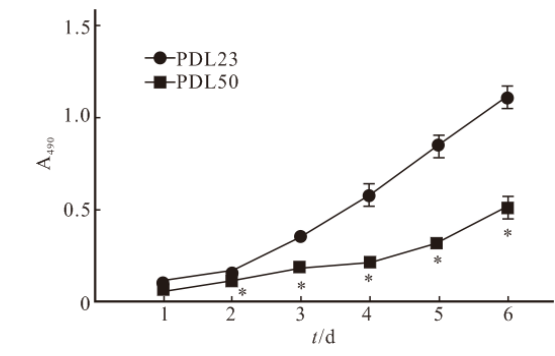


图 4 细胞生长曲线图
Fig 4 Cellular growth curve

* P<0.05, vs. PDL23 group

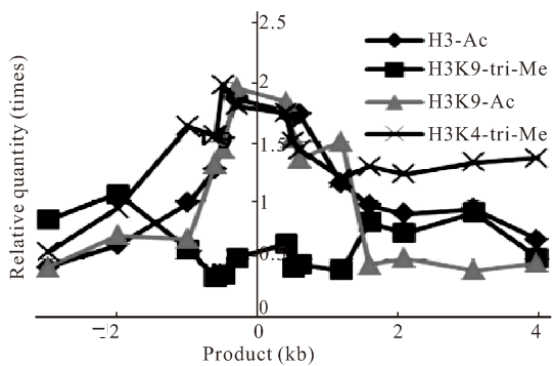


图 5 IGF2R 基因转录起始点附近 H3 组蛋白修饰谱
Fig 5 H3 histone modification profile for IGF2R near transcriptional start site

3 讨论

IGF2R 是印记基因,在啮齿类中为父源印记基因,只表达母方等位基因;但在人类细胞中的表达呈多态性,在大多数人的体细胞中为双等位基因表达。IGF2R 可与 IGF2 和 6-磷酸甘露糖糖基蛋白结合,将其转运至溶酶体降解,进而负调节细胞生长;IGF2R 也诱导心肌细胞发生线粒体依赖凋亡^[2]。IGF2R 也是重要的抑癌基因^[3],可抑制肿瘤发生。研究表明肝细胞癌、乳腺癌、胃癌等多种癌细胞中均有该基因的突变^[4],此外该基因与肿瘤的诊断、治疗、预后都有关系^[3,5,6]。但是有关 IGF2R 和细胞衰老的研究却很少。本研究结果显示,随着体外 PDL 的增加,细胞逐渐衰老。衰老细胞体积增大,与周围细胞联系减少;细胞增殖能力减弱,细胞周期停滞;衰老特异性 SA β Gal 着色细胞多,着色深。PDL50 组细胞与 PDL23 组细胞相比,呈明显衰老状态。本研究动态观察细胞复制衰老过程中 IGF2R 的基因表达,结果表明 IGF2R 基因表达与 PDL 呈正相关,在 PDL40 时达到高峰,PDL50 次之。提示 IGF2R 的高表达与细胞衰老有一定关联。

目前认为表观遗传学对印记基因的表达调控有很重要的影响。动物实验发现该基因启动子的高甲基化和去乙酰化与 IGF2R 表达降低有密切关系^[7-9],体外细胞研究也表明组蛋白修饰参与调控 IGF2R 的基因表达,H3K4-tri-Me 活化基因表达,而 H3K9-tri-Me 降低基因表达^[1,10]。本研究在国内外首次对细胞衰老过程中 IGF2R 的组蛋白修饰情况进行研究。研究发现老年细胞在 TSS 上游 0.6 kb 处至 TSS 下游 1.2 kb 处的组蛋白修饰以活化转录的修饰为主,即 H3-Ac、H3K9-Ac 和 H3K4-tri-Me 修饰为主,其中 H3K4-tri-Me 修饰最为丰富,而抑制基因转录的 H3K9-tri-Me 修饰丰度最低。从 TSS 下游 1.6 kb 至 4.0 kb 处,H3K9-Ac 组蛋白修饰降低,H3-Ac 和 H3K9-tri-Me 组蛋白修饰与年轻细胞修饰水平相仿,而活化基因转录的 H3K4-tri-Me 修饰升高。根据组蛋白密码假说^[11],这种修饰变化有利于基因表达,说明表观遗传学参与了细胞衰老进程。本研究为衰老机制研究和 IGF2R 的基因表达调控提供了研究资料,对于引起这些现象的深层原因仍需要进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*,2003;425(6954):191-196.
- 2 Chu CH, Tzang BS, Chen LM, *et al.* Activation of insulin-like growth factor II receptor induces mitochondrial-dependent apoptosis through G (alpha) q and downstream calcineurin signaling in myocardial cells. *Endocrinology*, 2009; 150 (6): 2723-2731.
- 3 Martin-Kleiner I, Gall Troselj K. Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) in carcinogenesis. *Cancer Lett*,2010;289(1):11-22.
- 4 Kreiling JL, Montgomery MA, Wheeler JR, *et al.* Dominant-negative effect of truncated mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor species in cancer. *FEBS J*,2012;279 (15):2695-2713.
- 5 Kalla Singh S, Tan QW, Brito C, *et al.* Insulin-like growth factors I and II receptors in the breast cancer survival disparity among African-American women. *Growth Horm IGF Res*,2010;20(3):245-254.
- 6 Probst OC, Puxbaum V, Svoboda B, *et al.* The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor restricts the tumourigenicity and invasiveness of squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer*,2009;124(11):2559-2567.
- 7 Hu JF, Pham J, Dey I, *et al.* Allele-specific histone acetylation accompanies genomic imprinting of the insulin-like growth factor II receptor gene. *Endocrinology*,2000;141(12): 4428-4435.
- 8 Young J, Smith JR. Epigenetic aspects of cellular senescence. *Exp Gerontol*,2000;35(1):23-32.
- 9 Yang Y, Li T, Vu TH, *et al.* The histone code regulating expression of the imprinted mouse *Igf2r* gene. *Endocrinology*, 2003;144(12):5658-5670.
- 10 Jiang G, Yang F, Sanchez C, *et al.* Histone modification in constitutive heterochromatin versus unexpressed euchromatin in human cells. *J Cell Biochem*,2004;93(2):286-300.
- 11 Cosgrove MS, Wolberger C. How does the histone code work? *Biochem Cell Biol*.2005;83(4):468-476.

(2013 - 06 - 06 收稿,2013 - 09 - 25 修回)
编辑 沈 进