

· 论 著 ·

## 印迹基因 H19 对人绒毛膜上皮癌细胞 JEG-3 基因表达谱的影响\*

俞丽丽<sup>1</sup>, 李力<sup>1△</sup>, 赵丹<sup>1</sup>, 卢林杉<sup>1</sup>, 郑英如<sup>1</sup>, 陈星云<sup>2</sup>, 李平<sup>2</sup>, 周元国<sup>2</sup>  
(第三军医大学大坪医院野战外科研究所:1. 妇产科;2. 第七研究室, 重庆 400042)

**摘要:**目的 获得印迹基因 H19 对滋养细胞株人绒毛膜上皮癌细胞系(JEG-3)细胞基因表达谱的影响,以期探讨 H19 对滋养细胞生物学行为的调控机制。方法 含人全长 H19 cDNA 重组真核表达质粒 pRc/CMV 经测序鉴定正确后,转染 JEG-3 细胞,采用 Affymetrix 的 U133 plus 2.0 Array 基因表达谱芯片检测基因表达谱的变化。结果 转染后 H19 mRNA 表达显著升高, JEG-3 细胞基因表达谱明显改变,共筛选出 96 条差异基因,其中上调基因 19 条,下调基因 77 条。选择其中一种差异表达基因 HES1,采用荧光定量 PCR 检测发现重度子痫前期胎盘组织 HES1 mRNA 的表达水平较正常晚孕胎盘组织中 HES1 mRNA 的表达水平明显降低。结论 高通量基因芯片筛选出了 H19 调控滋养细胞的相关基因,为进一步探讨 H19 对滋养细胞生物学行为的调控机制提供了实验基础。

**关键词:** H19;滋养细胞;基因芯片;子痫前期;HES1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.29.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)29-3468-04

### The effect of imprinting gene H19 on the gene expression profile of human choriocarcinoma cell line JEG-3\*

Yu Lili<sup>1</sup>, Li Li<sup>1△</sup>, Zhao Dan<sup>1</sup>, Lu Linshan<sup>1</sup>, Zheng Yingru<sup>1</sup>, Chen Xingyun<sup>2</sup>, Li Ping<sup>2</sup>, Zhou Yuanguo<sup>2</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, 2. No. 7 Institution, Molecular Biology Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To obtain the expression pattern of imprint gene H19 in JEG-3 cell in order to explore the regulation mechanism of H19 on trophoblast cellular biological behavior. **Methods** After correct identification with sequencing for the recombinant eukaryotic expression plasmid pRc/CMV which including the whole length of H19 cDNA, the plasmid was transfected to the cell line JEG-3. The expression of H19 mRNA was observed and the gene expression profile of three groups of JEG-3 cell were detected with Affymetri; U133 plus 2.0 Array. **Results** After being transfected with target H19 gene, the expression of the mRNA level was significantly increased compared with control group. And the gene expression profile was changed significantly. 19 genes were up-regulated, 77 genes were down-regulated. Expression levels of HES1 gene which being choosed as a different expression gene were detected by fluorescence quantitative PCR in severe preeclampsia placenta tissue and normal late pregnant placenta. The expression level of HES1 mRNA in severe preeclampsia placenta decreased significantly than normal late pregnant placenta tissues. **Conclusion** Many genes induced by H19 have been screened by high-throughput gene chip method. It provides the experimental basis for advanced studying the regulation the cellular biological behavior with H19 gene.

**Key words:** H19 gene; trophoblast; gene chip; pre-eclampsia; HES1

基因印迹是一种不遵从经典的孟德尔遗传规律的依靠单亲传递某些遗传学性状的现象,目前已成为遗传学领域的研究热点。其中 H19 作为发现最早的印迹基因之一,主要在人胎盘及胚胎组织中丰富表达,在成人组织中很少表达。而且有证据表明, H19 在配子形成、胚胎的早期形成、着床以及生长发育过程中发挥了重要的生理功能,并与肿瘤的发生密切相关<sup>[1]</sup>。但 H19 的作用机制目前仍未能完全阐明。因此,本研究利用国际常用的人滋养层细胞模型—人绒毛膜上皮癌细胞系(JEG-3)作为体外实验模型,通过基因工程技术来深入探讨 H19 对滋养细胞基因表达谱的影响,以期阐明 H19 对滋养细胞生物学行为的调控机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒** 包含人全长 H19 cDNA 重组真核表达质粒 pRc/CMV 由蒙特利尔大学医院内分泌科 Cheri. L. Deal 教授

惠赠。空载质粒 pRC/CMV 购自 invitrogen 公司。

**1.1.2 细胞系** JEG-3 细胞,为人滋养细胞肿瘤株,由第四军医大学唐都医院妇产科实验室惠赠,购买于美国 ATCC 细胞库。

**1.1.3 主要试剂及仪器** DMEM/F12 基础培养基和胎牛血清,质粒小量提取试剂盒(OMEGA),质粒去内毒素纯化试剂盒 D6944-1, Trizol、脂质体转染试剂盒(Lipofectamine 2000),定量 PCR 试剂(ABI Power SYBR Green PCR Master Mix),定量 PCR 仪(7000 Sequence Detection System)。H19 基因和 GAPDH 基因上、下游引物均由上海英俊生物技术有限公司合成。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 JEG-3 细胞的培养** 冻存于液氮的 JEG-3 细胞经复苏后,于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中,经 3 次传代稳定后,进行基因转染。

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070505)。 作者简介:俞丽丽(1972~),博士,副主任医师,主要从事围产医学的研究。

△ 通讯作者, Tel: 13808339118; Email: lililiyuyu@sina.com。

表 1 验证基因 PCR 引物序列

基因名称	基因文库号	有义(F)/反义(R)	引物序列
EPS15	NM_001981	F	5'-TGC TGT GTC CAA GGA GGA GTA G-3'
		R	5'-TGC TGT CCC AAA CCC TTT ACA TA-3'
DUSP5	NM_004419	F	5'-GGT AGT TGG TTG AAG TAG CAA GAT GTT-3'
		R	5'-TGG AAT GAG ACA AGT TCA AGT ATG ACT-3'
HES1	NM_005524	F	5'-TCA GCG AGT GCA TGA ACG A-3'
		R	5'-GAG TGC GCA CCT CGG TAT TAA-3'
IGF2	NM_000612	F	5'-CCG TGC TTC CGG ACA ACT T-3'
		R	5'-GGA CTG CTT CCA GGT GTC ATA TT-3'
MMP-9	NM_004994	F	5'-TGC CAG GAC CGC TTC TAC TG-3'
		R	5'-GGT CAC GTA GCC CAC TTG GT-3'
GAPDH	NM_002046	F	5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA-3'
		R	5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-3'

**1.2.2 质粒的纯化及鉴定** 重组 H19 真核表达质粒 pRc/CMV-H19 质粒,先用 OMEGA 质粒小提试剂盒抽提后送 in-vitrogen 公司测序。测序结果经 BLAST 确证后 pRc/CMV-H19 质粒和空载质粒 pRc/CMV 按 QIAGEN 试剂盒手册操作大量抽提。

**1.2.3 基因转染和鉴定** 以 pRc/CMV-H19 质粒转染 JEG-3 细胞,按 Lipofectamine 2000 手册操作,并以空载质粒 pRc/CMV 转染 JEG-3 细胞为 pRc/CMV 转染阴性对照,以仅加 Lipofectamine 2000 的 JEG-3 细胞为空白对照。实验组和对照组在转染后 24 h 收集细胞,采用 Trizol 一步法提取总 RNA,逆转录后荧光定量 PCR 分析 H19 基因表达变化。H19 基因上游引物:5'-TCC CAG AAC CCA CAA CAT GAA-3',下游引物:5'-TTC ACC TTC CAG AGC CGA TTC-3' (150 bp), GAPDH 基因上游引物:5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA-3',下游引物:5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-3'。SYBR Green RT-PCR 反应条件:50℃ 孵育 2 min,95℃ 2 min,95℃ 15 s,59℃ 1 min,40 个循环。

**1.2.4 芯片检测** 3 组细胞采用 Trizol 一步法提取总 RNA,经纯化后合成 cDNA 和生物素标记 cDNA,采用 Affymetrix 公司生产的 U133 plus 2.0 Array 基因表达谱芯片,在 Affymetrix Genechip Hybridization Oven640 中杂交后,在 Affymetrix Fluidics Station 450 中洗脱和染色,芯片结果采用 Gene array Scanner3000 7G 进行扫描。GCOS 软件读取、处理数据。差异基因筛选标准为实验组和对照组比值取  $\text{Log}^2$  后的值即  $\text{Signal Log Ratio} \geq 1$  (上调)或  $\leq -1$  (下调)。

**1.3 荧光定量 PCR 验证芯片结果** 分别选取芯片结果中已知的差异基因 (EPS15、DUSP5、HES1) 和非差异基因 (IGF2、MMP-9),采用 SYBER Green 荧光定量 PCR 方法检测 3 组细胞中相关基因的 mRNA 的表达,验证两种方法是否一致。各检测基因引物序列见表 1。

**1.4 荧光定量 PCR 检测差异基因 HES1 (hairy enhancer of split 1) 的表达水平** 采用 Trizol 一步法提取重度子痫前期胎盘组织与正常晚孕胎盘组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,采用 SYBER Green 荧光定量 PCR 方法检测 RNA 的表达水平。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 pRc/CMV-H19 质粒的测序结果** 测序结果与 Gene-Bank 上的序列进行 BLAST,结果完全正确。

**2.2 各组细胞 H19 基因的表达** 荧光定量 PCR 的检测结果显示 pRc/CMV-H19 质粒转染组、pRc/CMV 转染阴性对照组和空白对照组的  $\Delta\text{CT}$  分别为  $-0.859 4$ 、 $4.297 5$ 、 $3.428 4$ 。pRc/CMV-H19 质粒转染组 H19 mRNA 水平相对于 pRc/CMV 转染阴性对照组和空白对照组高 16 倍以上,而 pRc/CMV 转染阴性对照组和空白对照组 H19 mRNA 水平无差异。该检测结果与后期芯片的检测结果是—致的。

**2.3 芯片检测结果** 通过采用 Affymetri;U133 plus 2.0 Array 基因表达谱芯片共检测了三张芯片,检测工作均由上海生物芯片有限公司 (生物芯片上海国家工程研究中心) 完成,有严格的样本质检报告以及质控标准。结果发现 pRc/CMV-H19 质粒转染组细胞与空白对照组细胞相比,共有 491 条上调基因,664 条下调基因;pRc/CMV-H19 质粒转染组细胞与 pRc/CMV 转染阴性对照组细胞相比,共有 82 条上调基因,220 条下调基因;pRc/CMV 转染阴性对照组细胞与空白对照组细胞相比,共有 409 条上调基因,314 条下调基因。为了获得印迹基因 H19 对 JEG-3 细胞基因表达谱的影响,进一步优化筛选标准:pRc/CMV-H19 质粒转染组细胞与两对照组细胞相同的差异基因,但必须是两对照组之间的非差异基因。结果发现共有 96 条差异基因,其中上调基因 19 条,下调基因 77 条。见表 2。

**2.4 荧光定量 PCR 检测 H19 过表达对 IGF2、HES1、EPS15、DUSP5、MMP-9 基因 mRNA 的影响** 以验证芯片数据的可靠性:除 EPS15 外其余基因荧光定量 PCR 结果与芯片相符。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算各组目的基因相对于阴性对照组目的基因的相对表达水平,  $\Delta\Delta\text{CT} = \text{各样品 } \Delta\text{CT} - \text{阴性对照组 } \Delta\text{CT}$  平均值。荧光定量 PCR 的检测结果显示 H19 质粒转染后 HES1、DUSP5 mRNA 表达较阴性对照组明显下调,而 EPS15、IGF2、

MMP-9 mRNA 表达则无明显改变。H19 质粒转染组 HES1 和 DUSP5 mRNA 相对于阴性对照组的表达倍数分别是  $0.44 \pm 0.07$ 、 $0.38 \pm 0.02$ ，与阴性对照组比较， $P < 0.01$ 。即 H19 过表达后 HES1 和 DUSP5 mRNA 表达水平分别被抑制了 56% 和 62%，而 EPS15、IGF2 mRNA 和 MMP-9 基因表达水平与阴性对照组比较，差异无统计学意义。空白对照组 HES1、DUSP5、IGF2 和 MMP-9 mRNA 表达相对于阴性对照组的表达倍数分别是  $3.16 \pm 1.13$ 、 $3.89 \pm 0.08$ 、 $1.95 \pm 0.37$  和  $0.15 \pm 0.02$ ，而 EPS15 mRNA 表达则无明显改变。见图 1。实验结果显示除 EPS15 外其余基因荧光定量 PCR 结果与芯片相符。

表 2 差异基因的基因分类

基因分类	下调基因数目	上调基因数目
抗氧化活性相关基因	1	0
结构分子活性相关基因	1	0
转录调控相关基因	13	2
翻译调控相关基因	0	1
物质转运相关基因	2	1
结合(受体)相关基因	41	8
催化活性相关基因	12	4
酶活性调控相关基因	4	1
分子信号传导相关基因	5	1
细胞黏附相关基因	3	0
细胞代谢相关基因	33	4
多细胞生物进程相关基因	13	0
复制相关基因	1	0
应激相关基因	5	1
生物学调节相关基因	29	6
细胞进程相关基因	47	10
发育相关基因	15	1
定位建立相关基因	8	2
细胞生长相关基因	3	0
免疫应答相关基因	1	1
定位相关基因	8	2
细胞周期相关基因	1	0
肿瘤或凋亡相关相关基因	1	0

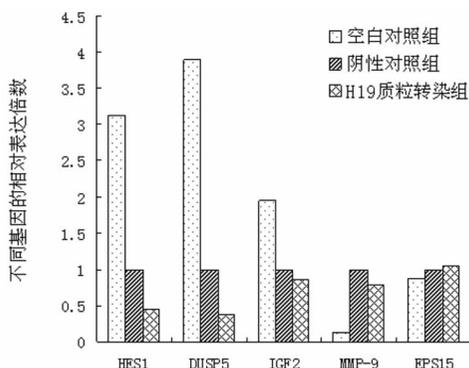


图 1 H19 过表达对 EPS15、DUSP5、HES1、IGF2、MMP-9 基因 mRNA 表达的影响

2.5 重度子痫前期胎盘组织与正常晚孕胎盘组织 HES1 mRNA 表达水平 重度子痫前期胎盘组织 HES1 mRNA 相对表达倍数为  $0.14 \pm 0.05$ ，正常晚孕胎盘组织 HES1 mRNA 相对表达倍数为  $0.49 \pm 0.27$ 。两者比较，重度子痫前期胎盘组织 HES1 mRNA 的表达水平较正常晚孕胎盘组织中 HES1 mRNA 的表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

正常的基因印迹在功能上与胎儿及胎盘的发育、细胞分化和增殖等有关<sup>[2]</sup>。基因印迹异常(如印迹丢失、杂合性丢失、单亲二倍体等现象)与某些特殊的遗传性疾病及肿瘤的发生密切相关<sup>[3]</sup>。人 H19 是一种母方表达、父方沉默的印迹基因，定位于染色体 11p15.5 区，全长约 3 kb，共含有 5 个外显子、4 个内含子。目前公认 H19 不能产生蛋白质，其最终表达产物是 RNA，并在 RNA 水平发挥作用。但 H19 的作用机制目前仍未能完全阐明。有学者认为它是原癌基因<sup>[4]</sup>，也有学者认为它是抑癌基因，因此有人认为 H19 在细胞的增殖、分化和侵袭方面具有双重作用<sup>[5]</sup>。本研究以人滋养细胞肿瘤细胞系 JEG-3 为体外实验模型，通过含人全长 H19 cDNA 重组真核表达质粒转染 JEG-3 后，结果发现 3 组之间的细胞基因表达谱均存在的明显差异。作者运用生物信息学方法进一步优化筛选标准：pRc/CMV-H19 质粒转染细胞与两对照组细胞均存在差异的基因，但这些基因必须是两对照组之间的非差异基因。结果发现共有 96 条差异基因，其中上调基因 19 条，下调基因 77 条。这些基因共有 30 条为未知功能基因，66 条已知功能基因主要与转录调控、受体结合、细胞代谢、细胞发育、细胞进程和生物学调节功能相关。

胰岛素样生长因子-2(IGF2)作为与 H19 互为连锁的印迹基因，位于同一条染色体上，也是人类基因组中最早被鉴定的印迹基因之一，在大部分组织中呈父系表达，母系印迹。有文献报道 H19 可调控 IGF2 的表达，H19 基因的缺失，将导致 IGF2 基因母系等位基因表达<sup>[6-8]</sup>。之后越来越多的研究结果发现 H19、IGF2 的表达水平和印迹状态之间，H19 与 IGF2 之间并未存在固定的联系<sup>[9-10]</sup>。本研究前期发现 H19 过表达不引起 IGF2 的表达变化；同样采用 RNA 干扰的方法来观察 H19 对 IGF2 表达的影响也发现在滋养细胞中 H19 与 IGF2 之间不存在固定的联系<sup>[11]</sup>。

HES1 属于 HES 基因家族，而 HES 基因家族又属于抑制型 bHLH(basic helix-loop-helix)基因。HES 基因编码的蛋白为碱性螺旋-环-螺旋结合蛋白，是一类含有特征性碱性螺旋-环-螺旋结构(bHLH)的 DNA 结合蛋白，在进化过程中高度保守，可通过 bHLH 区域直接与靶 DNA 或与其他 bHLH 蛋白结合形成无活性二聚体阻断激活路径而抑制转录，最终抑制干细胞分化而影响细胞命运。HES1 基因敲除的小鼠神经细胞在前体细胞增殖前就过早分化，结果导致神经系统严重发育异常，如无脑畸形、眼形成异常等，在胚胎发育晚期或出生后不久即死亡<sup>[12-13]</sup>。Kunnimalaiyaan 等<sup>[14]</sup>通过将 HES1 基因稳定地导入 H727 类癌细胞，使其稳定表达，发现可以抑制类癌细胞的增殖。Liu 等<sup>[15]</sup>研究发现在宫颈上皮内瘤变及宫颈癌中 HES1 表达增强，并随着病变加重表达逐渐增强。

在正常胎盘滋养细胞以及滋养细胞肿瘤组织中均未见 HES1 的研究报道，也无印迹基因 H19 与 HES1 之间关系的

研究报告。经芯片检测的结果提示,通过定量 PCR 方法检测了 H19 的过表达可下调 JEG-3 细胞 HES1 的表达。进一步研究表明重度子痫前期胎盘组织中 HES1 mRNA 表达水平下调,提示 HES1 表达受阻时,滋养细胞的分化障碍导致滋养细胞功能异常,从而参与子痫前期的发病。

总之,本次芯片实验结果表明印迹基因 H19 主要可引起转录调控、受体结合、细胞代谢、细胞发育、细胞进程和生物学调节相关基因的改变,从而调节滋养细胞的生物学功能,对未知功能基因的深入研究将有助于进一步了解 H19 对滋养细胞的调控机制。

#### 参考文献:

[1] Marques CJ,Carvalho F,Sousa M,et al. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis[J]. *Lancet*,2004,363(9422):1700-1702.

[2] Isles AR,Holland AJ. Imprinted genes and mother-offspring interactions[J]. *Early Hum Dev*,2005,81(1):73-77.

[3] Feinberg AP,Cui H,Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from Cancer into epigenetic mechanisms[J]. *Semin Cancer Biol*,2002,12(5):389-398.

[4] Matouk I,Ayesh B,Schneider T,et al. Oncofetal splice-pattern of the human H19 gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2004,318(4):916-919.

[5] Lottin S,Adriaenssens E,Berteaux N,et al. The human H19 gene is frequently overexpressed in myometrium and stroma during pathological endometrial proliferative events[J]. *Eur J Cancer*,2005,41(1):168-177.

[6] Li YM,Franklin G,Cui HM,et al. The H19 transcript is associated with polysomes and May regulate IGF2 expression in trans[J]. *J Biol Chem*,1998,273(43):28247-28252.

[7] Runge S,Nielsen FC,Nielsen J,et al. H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein[J]. *J Biol Chem*,2000,275(38):29562-29569.

[8] Eggenschwiler J,Ludwig T,Fisher P,et al. Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes[J]. *Genes Dev*,1997,11(23):3128-3142.

[9] Wilkin F,Paquette J,Ledru E,et al. H19 sense and anti-sense transgenes modify insulin-like growth factor-II mRNA levels[J]. *Eur J Biochem*,2000,267(13):4020-4027

[10] Lustig-Yariv O,Schulze E,Komitowski D,et al. The expression of the imprinted genes H19 and IGF-2 in choriocarcinoma cell lines. Is H19 a tumor suppressor gene? [J]. *Oncogene*,1997,15(2):169-177.

[11] Yu LL,Chang K,Lu LS,et al. Lentivirus-mediated RNA interference targeting the H19 gene inhibits cell proliferation and apoptosis in human choriocarcinoma cell line JAR[J]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3679798/g>.

[12] Ishibashi M,Ang SL,Shiota K,et al. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors,premature neurogenesis, and severe neural tube defects[J]. *Genes Dev*,1995,9(24):3136-3148.

[13] Tomita K,Ishibashi M,Nakahara K,et al. Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis[J]. *Neuron*,1996,16(4):723-734.

[14] Kunnimalaiyaan M,Yan S,Wong F,et al. Hairy Enhancer of Split-1(HES-1),a Notch1 effector,inhibits the growth of carcinoid tumor cells[J]. *Surgery*,2005,138(6):1137-1142

[15] Liu J,Ye F,Chen HZ,et al. Expression of Differentiation Associated Protein Hes1 and Hes5 in Cervical Squamous Carcinoma and its Precursors[J]. *Int J Gynecol Cancer*,2007,17:1-7.

(收稿日期:2013-06-12 修回日期:2013-07-25)

(上接第 3467 页)

*Cancer Biol*,2008,18(5):356-364.

[10] Hutmacher DW,Singh H. Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture[J]. *Trends Biotechnol*,2008,26(4):166-172.

[11] Cabello CM,Bair WB,Lamore SD,et al. The cinnamon-derived Michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth

[J]. *Free Radic Biol Med*,2009,46(2):220-231.

[12] Kim A,Son M,Kim KI,et al. Elevation of intracellular cyclic AMP inhibits NF- $\kappa$ B-mediated thymosin  $\beta$ 4 expression in melanoma cells[J]. *Exp Cell Res*,2009,15(19):3325-3335.

(收稿日期:2013-05-12 修回日期:2013-06-22)