

网络出版时间: 2020-5-8 15:44 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200507.0934.003.html

胰岛素生长因子 2 甲基化对高糖诱导滋养层细胞凋亡及 PI3K/Akt 通路的影响

李 琴, 谢莹莹

摘要 目的 探究胰岛素生长因子 2(IGF-II) 甲基化对高糖诱导滋养层细胞凋亡及 PI3K/Akt 通路的影响。方法 体外培养人绒毛膜滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 随机分为对照组、高糖组、5-杂氮-2-脱氧胞苷(甲基转移酶抑制剂 5-aza-dc) + 高糖组(葡萄糖浓度为 50 mmol/L)、高糖组及 5-aza-dc + 高糖组以高糖培养基培养, 5-aza-dc + 高糖组以 5-aza-dc 处理后, 以巢式甲基化特异性聚合酶链式反应(nMS-PCR) 检测各组细胞 IGF-II 甲基化水平; 以 CKK-8 法检测各组细胞增殖情况; 以流式细胞技术检测各组细胞凋亡情况, 计算细胞相对存活率及凋亡率; 以 Western blot 法检测各组细胞 IGF-II 蛋白、凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax、caspase-3)、PI3K/Akt 通路蛋白(PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt) 表达情况。结果 与对照组相比, 高糖组细胞相对存活率、IGF-II、Bcl-2、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达降低($P < 0.05$), IGF-II 甲基化水平、细胞凋亡率、Bax、caspase-3 蛋白表达升高($P < 0.05$), PI3K、Akt 蛋白表达无变化($P > 0.05$); 与高糖组相比, 5-aza-dc + 高糖组细胞相对存活率、IGF-II、Bcl-2、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达升高

($P < 0.05$), IGF-II 甲基化水平、细胞凋亡率、Bax、caspase-3 蛋白表达降低($P < 0.05$), PI3K、Akt 蛋白表达无变化($P > 0.05$)。结论 IGF-II 甲基化介导高糖诱导的滋养层细胞凋亡, 抑制其甲基化可促进滋养层细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 可能是通过上调 PI3K/Akt 通路实现的。

关键词 IGF-II 甲基化; 高糖; 凋亡; PI3K/Akt 通路; 滋养层细胞

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)05-0665-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.003

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是在妊娠期才首次出现或被确诊的糖尿病, 可使胎盘滋养层细胞持续处于高糖环境中, 使其增殖活性降低进而影响胎盘功能, 诱导胎盘组织发生明显的体积、结构及血流灌注异常, 增加畸胎、巨大儿、围产期死亡、流产等的发生率, 严重威胁胎儿及孕妇的健康^[1-2]。研究^[3]表明, 胰岛素生长因子 2(insulin-like growth factor II, IGF-II)可调节机体合成代谢与细胞生长分化, 在胎盘、胚胎早期发育中发挥着重要作用, 其表达水平低, 会使胎盘、胚胎发育

2020-02-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81760276)

作者单位: 青海大学附属医院产科, 青海 810000

作者简介: 李 琴, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: liqin2893@163.com

com

to detect the expression of LMO4 and CD133 in prostate cancer tissues and prostatic hyperplasia tissues. Fluorescence activated cell sorting was used to harvest CD133⁺ and CD133⁻ cells. Colony formation assay was performed to determine proliferation ability. RNA interference was performed to knockdown *Lmo4* expression in PC-3 cells. Western blot and immunofluorescence assay were used to detect the expression of LMO4 and CD133 protein in PC-3 cells or PC-3/Si*Lmo4* cells. Flow cytometry tested the CD133⁺ cells number and cells proliferation ability. Colony formation assays were used to determine PC-3 cells clonogenic capability. Co-immunoprecipitation (Co-IP) was used to detect the interaction between LMO4 and cyclin-dependent kinase 9(CDK9). **Results** Comparing to prostatic hyperplasia tissues, CD133 and LMO4 expressions dramatically increased in prostate cancer tissues. CD133⁺ subpopulation of PC-3 cells exhibited high clonogenic capability. Both CD133 expression and numbers of CD133⁺ cells significantly decreased in LMO4 knockdown PC-3 cells. Furthermore, silencing *Lmo4* led to decrease the abilities of cell proliferation and clonogenic. Co-immunoprecipitation analysis showed that LMO4 and CDK9 could form a LMO4/CDK9 complex in prostate cells. However, CDK9 may leave from the complex owing to LMO4 overexpression in prostate cells. Interestingly, the LMO4/CDK9 complex was not detected in PC-3/Si*Lmo4* cells. **Conclusion**

Up-expression of the nuclear transcription factor LMO4 is consistent with higher expression of cancer stem marker CD133 in prostate cancer. Prostate cancer cells proliferation may be regulated by LMO4 in an independent-LMO4/CDK9 complex manner.

Key words prostate cancer; cell proliferation; CDK9; LMO4; CD133

异常,引起流产。甲基化是在转录水平对基因的一种修饰方式,对基因表达及细胞正常分化具有重要作用,去甲基化可使基因的表达增强^[4],对叶酸缺乏孕鼠的研究^[5]发现,胰岛素生长因子系统的甲基化异常升高会影响胎鼠宫内的生长发育,表明 IGF-II 甲基化可影响 IGF-II 蛋白表达,进而调控滋养层细胞增殖及凋亡,因而其甲基化可能影响高糖诱导的滋养层细胞凋亡。PI3K/Akt 通路在细胞生长、发育、凋亡等生理过程中起重要的调节作用^[6],可参与调节由牙龈卟啉单胞菌诱导的胚胎滋养层细胞的凋亡和炎症过程,抑制 PI3K/Akt 通路活性,可促进细胞凋亡和炎症因子的分泌^[7],但 IGF-II 甲基化对 PI3K/Akt 通路的影响目前还不清楚。现通过高糖培养基诱导滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 凋亡,探究 IGF-II 甲基化对高糖诱导滋养层细胞凋亡及 PI3K/Akt 通路的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂 人绒毛膜滋养层细胞系 HTR-8/SVneo(货号: HTX-1923)(深圳市豪地华拓生物科技有限公司); IGF-II 甲基化引物、IGF-II 非甲基化引物、IGF-II nMS-PCR 外侧引物(上海生工生物工程股份有限公司); 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine 5-aza-dc 货号: A119533)(上海恒斐生物科技有限公司); RPMI-1640 培养基(货号: 31800)、胎牛血清(FBS,货号: 11011-8611)、青链霉素混合液(货号: P1400)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(货号: P1200-50T)、PBS 缓冲液(货号: P1022)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(货号: T1300)、D-葡萄糖粉(货号: G8150)(美国 Solarbio 公司); CpGenome DNA 修饰试剂盒(货号: S7820)(美国 Intergen 公司); 基因组 DNA 提取试剂盒(货号: YY-62019)(上海优予生物科技有限公司); TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer(货号: RR02AG)(日本 TaKaRa 公司); 琼脂糖(货号: A3381)(上海士锋生物科技有限公司); AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(货号: V13242)、兔源 GAPDH(货号: PA5-85082)、IGF-II(货号: ab9574)、PI3K(货号: 710400)、Akt(货号: 44-609G)、p-Akt(货号: 44-621G)、Bax(货号: PA5-11378)、caspase3(货号: PA5-86276)一抗、鼠源 Bcl-2(货号: 13-8800)一抗、羊抗鼠二抗(货号: A-11029)、羊抗兔二抗(货号: A-11034)(美国 Cell Singaling Technology 公司); 蛋白裂解液(货号: P0013K)、CKK-8 试剂盒(货号:

C0037)、BCA 试剂盒(货号: P0011)、96 孔板、25 cm² 培养瓶、60 mm 培养皿(上海碧云天公司)等。

1.1.2 仪器 酶标仪(Model 680)、小型垂直电泳系统(美国 Bio-Rad 公司); PCR 扩增仪(PC808)(美国 Astec 公司); 流式细胞仪(CytoFLEX,美国贝克曼库尔特公司); 双人单面超净工作台、CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司); 高速离心机(Biofuge 28RS)(德国 Heraeus); 制冰机(XB-70,美国 GRANT 制冰机公司); 恒温水浴锅(上海析达仪器有限公司生产)等。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及分组处理 细胞完全培养基的配制: 向 RPMI-1640 培养基中加入 10% FBS、1% 青链霉素混合液,上下颠倒,混合均匀。细胞高糖培养基的配制: 参照文献^[8],向细胞完全培养基(根据说明书可知葡萄糖终浓度为 11.11 mmol/L)中加入 D-葡萄糖粉,使培养基中葡萄糖终浓度为 50 mmol/L。

购买的冻存细胞,在 39 °C 左右水浴中快速融化,3 000 r/min,室温离心 5 min,向细胞沉淀中加入 5 ml 完全培养基,轻轻吹打均匀接种在 25 cm² 培养瓶中,放置在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,每天观察细胞生长状态,当细胞长至 85% 左右时,胰酶消化后以 1:3 的比例进行传代培养。

使用 RPMI-1640 培养基将 5-aza-dc 配制为 50 mmol/L 的储备液备用。传代培养的细胞长至 80% 以上时,胰酶消化后接种于 60 mm 培养皿中,随机分为对照组、高糖组、5-aza-dc + 高糖组,在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后,高糖组、5-aza-dc + 高糖组将培养基更换为高糖培养基,5-aza-dc + 高糖组细胞加入 5-aza-dc 储备液,使终浓度为 20 μmol/L^[9],对照组细胞不做处理,继续在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 48 h 后收集各组细胞。

1.2.2 巢式甲基化特异性聚合酶链式反应(nested methylation specific PCR, nMS-PCR)检测 IGF-II 甲基化水平 将收集的各组细胞,参照文献^[10]的方法,使用基因组 DNA 提取试剂盒提取各组细胞的基因组 DNA,取各组细胞的基因组 DNA 样品约 1 μg,采用 CpGenomeDNA 修饰试剂盒对 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰后得到进行 PCR 反应的模板 DNA,操作步骤分别参照各自说明书,以得到的亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA 为模板,IGF-II 甲基化引物、IGF-II 非甲基化引物共同的 nMS-PCR 外侧引物 P3 为反应引物进行 PCR 扩增反应,再以 PCR 产物为模板,分别用 IGF-II 甲基化引物 P3M、IGF-II 非甲基化引物

P3U 为反应引物进行 PCR 扩增反应,反应条件的设定、反映体系的配制依照说明书进行,最终得到的 IGF-II 甲基化、非甲基化 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析仪成像并分析甲基化条带及甲基化条带的吸光度,计算甲基化水平,公式为:甲基化水平 = 甲基化吸光度 (optical density, OD) 值 / (甲基化 OD 值 + 非甲基化 OD 值) × 100%,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	PCR 产物长度(bp)
P3	F: TGGTTTTTTTAGATTTTTAAATTAT R: AACTCAAATGCTACCTACATAACC	181
P3M	F: TTTTTAAATTATCGTGGTGGTTTTTC R: GTCTAAATAACTCGCCTTTACGAC	122
P3U	F: TTTTTAAATTATTGTGGTGGTTTTTG R: CATCTAAATAACTCACCTTTACAAC	123

1.2.3 细胞增殖、凋亡情况检测 细胞增殖检测: 传代培养的细胞长至 80% 以上时,胰酶消化后计数,以 5×10^5 个/ml 浓度接种在 96 孔板中,随机分为对照组、高糖组、5-aza-dc + 高糖组,每组设 4 个孔,参照 1.2.1 项中处理细胞的步骤分别处理细胞,48 h 后每孔中加入 CKK-8 试剂,继续培养 2 h,采用全自动酶标仪测定 450 nm 波长下各孔 OD,计算各组细胞的相对存活率,公式为:相对存活率(%) = 药物处理组 OD 值 / 对照组 OD 值 × 100%。

细胞凋亡检测: 1.2.1 中收集的各组细胞分别加入完全培养基后,吹打均匀后计数,取含有约 1×10^6 个细胞的细胞混悬液到一个 5 ml 离心管中,1 000 r/min 室温离心 5 min,细胞沉淀以 PBS 溶液漂洗 2 次后,加入 200 μ l 的 Binding Buffer 及 10 μ l 的 Annexin V-FITC 轻轻震荡混匀,室温避光反应 15 min,再加入 300 μ l 的 Binding Buffer 及 5 μ l PI 震荡混匀,继续室温避光反应 15 min,1 000 r/min 室温离心 5 min,细胞沉淀以 PBS 溶液漂洗 2 次后,加入 PBS 溶液混匀,在流式细胞仪中检测细胞凋亡情况。

1.2.4 Western blot 法检测蛋白表达水平 1.2.1 中收集的各组细胞加入蛋白裂解液(含有蛋白酶抑制剂)提取总蛋白,使用 BCA 试剂盒并参照说明书的步骤测定总蛋白浓度,根据结果调整各组蛋白使浓度相同,采用 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒配制 SDS-PAGE 浓缩胶及分离胶,各组分比例及配制方法参照说明书,取 20 μ g 总蛋白在垂直电泳仪中进行电泳并转移分离的蛋白至 PVDF 膜上,根据目的蛋白分子量截取相应的条带分别置于小盒中,加入

5% 脱脂牛奶,室温封闭 2 h,加入 1 : 1 000 的兔源 GAPDH、IGF-II、PI3K、Akt、p-Akt、Bax、caspase3 一抗,鼠源 Bcl-2 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 溶液漂洗 3 次,加入 1 : 2 000 的羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗,室温孵育 2 h,TBST 溶液漂洗 3 次,以 ECL 显色,在凝胶成像仪中观察蛋白条带并分析其相对表达量。

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计数资料以率(%)表示;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较以单因素方差分析,两两比较行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 各组细胞 IGF-II 甲基化及蛋白表达水平的比较 对照组、高糖组、5-aza-dc + 高糖组细胞甲基化水平比较差异有统计学意义 ($F = 24.857$); 三组间蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 86.135$)。其中与对照组相比,高糖组细胞 IGF-II 甲基化水平升高 ($P < 0.05$),IGF-II 的蛋白水平降低 ($P < 0.05$); 与高糖组相比,5-aza-dc + 高糖组细胞 IGF-II 甲基化水平降低 ($P < 0.05$),IGF-II 的蛋白水平升高 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 IGF-II 甲基化对细胞增殖的影响 对照组、高糖组、5-aza-dc + 高糖组细胞相对存活率分别为 (100.00 \pm 0.00) %、(57.61 \pm 11.01) %、(82.60 \pm 15.02) % ($F = 47.128$)。其中与对照组相比,高糖组细胞相对存活率明显降低 ($P < 0.05$); 与高糖组相比,5-aza-dc + 高糖组细胞相对存活率升高 ($P < 0.05$)。

2.3 IGF-II 甲基化对细胞凋亡的影响 对照组、高糖组、5-aza-dc + 高糖组细胞凋亡率比较差异有统计学意义 ($F = 49.796$)。其中与对照组相比,高糖组细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与高糖组相比,5-aza-dc + 高糖组细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.4 IGF-II 甲基化对细胞凋亡相关蛋白表达的影响 对照组、高糖组、5-aza-dc + 高糖组细胞 Bcl-2 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 314.900$); Bax 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 431.232$); caspase-3 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 220.667$)。其中与对照组相比,高糖组细胞 Bcl-2 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$),Bax、caspase-3 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与高糖组相比,5-aza-dc + 高糖组细胞 Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$),Bax、caspase-3 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。见图 3。

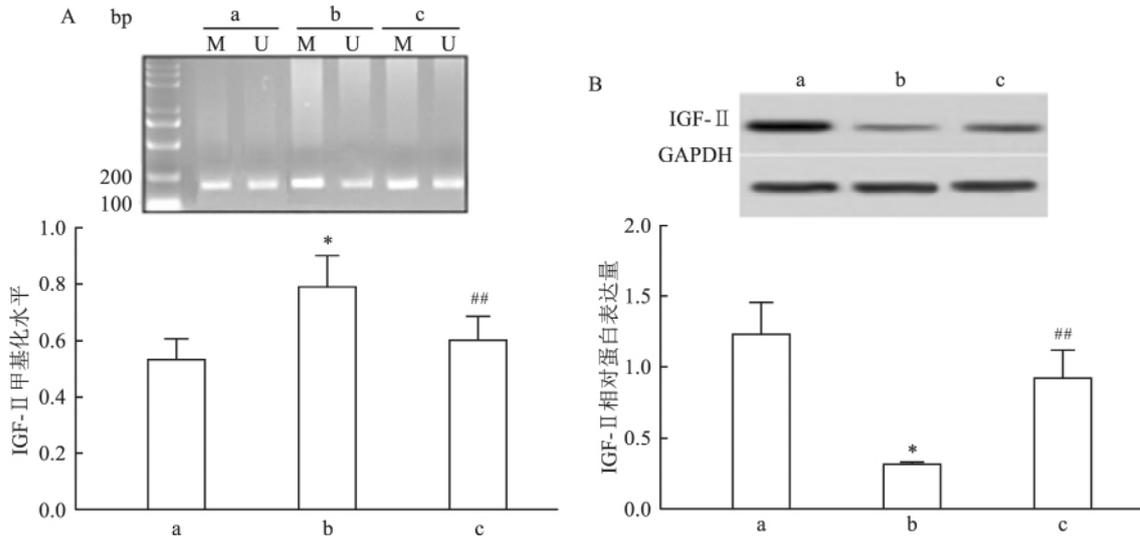


图1 各组细胞 IGF-II 的甲基化水平及蛋白水平

A: 各组细胞 IGF-II 的甲基化水平; M: IGF-II 的甲基化产物; U: IGF-II 的非甲基化产物; B: 各组细胞 IGF-II 的蛋白水平; a: 对照组; b: 高糖组; c: 5-aza-dc + 高糖组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与高糖组比较: ## $P < 0.05$

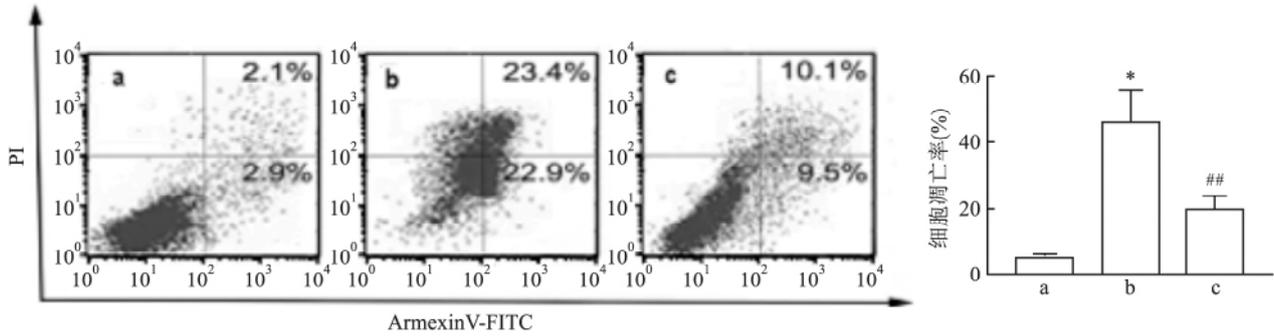


图2 各组细胞凋亡情况

a: 对照组; b: 高糖组; c: 5-aza-dc + 高糖组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与高糖组比较: ## $P < 0.05$

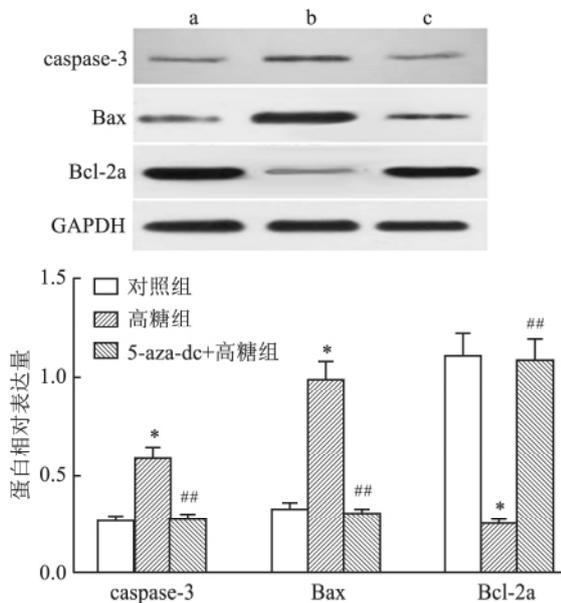


图3 各组细胞凋亡相关蛋白表达

a: 对照组; b: 高糖组; c: 5-aza-dc + 高糖组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与高糖组比较: ## $P < 0.05$

2.5 IGF-II 甲基化对细胞 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达的影响 对照组、高糖组、5-aza-dc + 高糖组细胞 p-PI3K 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 110.576$); p-Akt 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 58.469$)。其中与对照组相比 高糖组细胞 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), PI3K、Akt 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$); 与高糖组相比 5-aza-dc + 高糖组细胞 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), PI3K、Akt 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$)。见图 4。

3 讨论

胎盘是母亲与胎儿进行营养物质交换的重要枢纽,是妊娠建立的基础,而胎盘滋养层细胞的增殖活性对胎盘组织的形成、发展及胎儿的生长发育至关重要,其在妊娠早期向子宫内膜的侵袭确保了胚胎

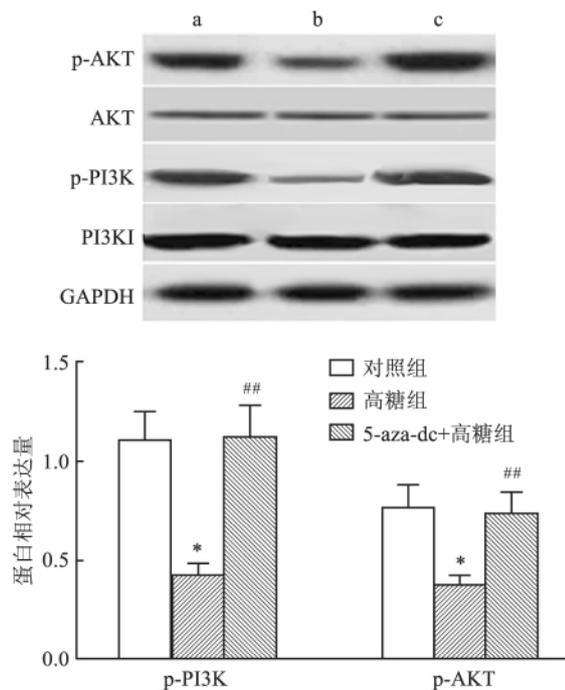


图4 各组细胞 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达

a: 对照组; b: 高糖组; c: 5-aza-dc + 高糖组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与高糖组比较: ## $P < 0.05$

的着床植入及营养物质的传递,保证了胎盘正常功能和妊娠的顺利进展,而滋养层细胞增殖活性在妊娠早期受抑制可导致胎盘发育不良,诱发流产,在妊娠中晚期受抑制则会造成胎儿营养物质供应不足,引起胎儿慢性宫内缺氧及生长发育迟缓^[11]。GDM使胎盘滋养层细胞持续处于高糖环境中,降低其增殖及侵袭活性,损害胎盘功能,导致早期流产、胎盘形成不良、胎儿宫内发育迟缓与畸形等严重后果^[12]。因此关于高糖引起的滋养层细胞凋亡的预防及作用机制的研究具有重要的临床意义。研究^[13]发现,IGF-II可促进滋养层细胞中PKB和P70S6K蛋白表达,进而促进滋养层细胞增殖,维持胎盘的正常发育,而IGF-II甲基化异常增高,可抑制IGF-II表达,引起胚胎停育^[14],因此IGF-II的甲基化可能影响高糖诱导的滋养层细胞凋亡。本文研究结果显示,与对照组相比,高糖组细胞相对存活率、IGF-II蛋白表达明显降低,IGF-II甲基化水平、细胞凋亡率明显升高;与高糖组相比,5-aza-dc + 高糖组细胞相对存活率、IGF-II蛋白表达升高,IGF-II甲基化水平、细胞凋亡率降低,表明在高糖诱导的滋养层细胞凋亡过程中,IGF-II甲基化水平升高,IGF-II蛋白表达降低,而以5-aza-dc降低其甲基化水平后,可促进

IGF-II蛋白表达,抑制滋养层细胞凋亡,增强滋养层细胞增殖活力,揭示IGF-II甲基化可促进高糖诱导的滋养层细胞凋亡,抑制IGF-II甲基化可抑制其凋亡。

细胞凋亡是细胞的一种自主、有序的死亡过程,多种基因及蛋白参与其中,caspase-3是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,在细胞凋亡中起着不可替代的作用,细胞中抑凋亡蛋白Bcl-2与促凋亡蛋白Bax表达量的比值在细胞凋亡的调节中具有关键作用^[15]。在尤文肉瘤的研究^[15]中发现,miR-30d可通过下调PI3K/Akt通路抑制Bcl-2表达,促进caspase-3、Bax表达,进而增强尤文肉瘤凋亡。肖艳平等^[16]发现脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)可激活PI3K/Akt/mTOR信号,提高人滋养层细胞HTR-8/Svneo增殖和侵袭能力,因此激活PI3K/Akt信号可能是IGF-II低甲基化抑制高糖诱导的滋养层细胞凋亡的作用机制。本研究结果显示,与对照组相比,高糖组细胞Bcl-2、p-PI3K、p-Akt蛋白表达明显降低,Bax、caspase-3蛋白表达明显升高,PI3K、Akt蛋白表达无明显变化;与高糖组相比,5-aza-dc + 高糖组细胞Bcl-2、p-PI3K、p-Akt蛋白表达升高,Bax、caspase-3蛋白表达降低,PI3K、Akt蛋白表达无明显变化,表明在高糖诱导的滋养层细胞凋亡过程中,PI3K/Akt通路被抑制,而激活PI3K/Akt通路,滋养层细胞凋亡减少,增殖增强,揭示PI3K/Akt信号可能是IGF-II甲基化调节高糖诱导的滋养层细胞凋亡的作用靶点,降低IGF-II甲基化水平可能通过激活PI3K/Akt信号抑制高糖诱导的滋养层细胞凋亡。

参考文献

- [1] Wang C, Wei Y, Zhang X, et al. A randomized clinical trial of exercise during pregnancy to prevent gestational diabetes mellitus and improve pregnancy outcome in overweight and obese pregnant women[J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 216(4): 340-51.
- [2] Zhu W W, Yang H X, Wang C, et al. High prevalence of gestational diabetes mellitus in Beijing: effect of maternal birth weight and other risk factors[J]. Chin Med J(Engl), 2017, 130(9): 1019-25.
- [3] 程露平,洪慧莉,孙睿,等. 过期流产组织中胰岛素样生长因子-2与H19印记基因的表达[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(20): 4222-4.
- [4] 樊博,王仲凯,齐盼,等. RASSF2A基因的甲基化及表达在肾细胞癌中的作用[J]. 河北医学, 2019, 25(3): 623-6.
- [5] 吴蒙蒙,杨凡,屈艺,等. 孕鼠叶酸缺乏对子鼠胰岛素样

- 生长因子系统甲基化的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(4): 470-4.
- [6] Li A, Gu Y, Li X, et al. S100A6 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells *via* the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5685-93.
- [7] 郭海盈,任洪芋,季耀庭,等. p-Akt对牙龈卟啉单胞菌诱导的人胚胎滋养层细胞凋亡的影响[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(5): 500-4.
- [8] Ding J, Ji L L, Xu Y T, et al. High glucose induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis of trophoblast [J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 2016, 25(1): 13-7.
- [9] 刘文华,马艳萍. 多发性骨髓瘤细胞中胰岛素样生长因子结合蛋白7的基因表达及甲基化调控[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(3): 813-7.
- [10] 谢琳,丁宁,徐灵博,等. FoxO1 DNA甲基化在同型半胱氨酸致肝细胞凋亡中的作用[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(16): 2659-62, 2669.
- [11] Erboga M, Kanter M. Trophoblast cell proliferation and apoptosis in placental development during early gestation period in rats[J]. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*, 2015, 37(5): 286-94.
- [12] 纪璐璐,熊国平,汪琳. 高糖环境下 beclin2 介导的自噬增强绒毛膜滋养层细胞凋亡[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2017, 26(2): 109-14.
- [13] 王阳,宋薇薇,付景丽,等. 瘦素、胰岛素及 IGF-2 影响滋养层细胞中 PKB 和 P70S6K 蛋白表达的机制[J]. 现代妇产科进展, 2010, 19(7): 494-7.
- [14] 赵琳琳,卢晓琳,刘鑫丽,等. 叶酸缺乏对胚胎停育患者绒毛印记基因甲基化的影响[J]. 中国妇幼健康研究, 2017, 28(11): 1317-20.
- [15] Ye C, Yu X, Liu X, et al. miR-30d inhibits cell biological progression of Ewing's sarcoma by suppressing the MEK/ERK and PI3K/Akt pathways *in vitro* [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 4390-6.
- [16] 肖艳平,付久园,王哲,等. 脑源性神经营养因子对人滋养层细胞增殖和侵袭的影响及其机制[J]. 山东医药, 2017, 57(35): 33-5.

Effects of IGF-II methylation on apoptosis of trophoblast cells induced by high glucose and PI3K/Akt pathway

Li Qin, Xie Yingying

(Dept of Obstetrics, Affiliated Hospital of Qinghai University, Qinghai 810000)

Abstract Objective To investigate the effect of insulin-like growth factor II (IGF-II) methylation on trophoblast cells apoptosis induced by high glucose and PI3K/Akt pathway. **Methods** Human chorion trophoblast cell line HTR-8/SVneo was cultured *in vitro* and randomly divided into control group, high glucose group, 5-Aza-2'-deoxycytidine (methyltransferase inhibitor) + high glucose group (50 mmol/L of glucose). High glucose group and 5-aza-dc + high glucose group were cultured in high glucose medium, then 5-aza-dc + high glucose group was treated with 5-aza-dc. The methylation level of IGF-II was detected by nested methylation specific PCR (nMS-PCR). The cell proliferation was detected by CKK-8. The cell apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expressions of IGF-II protein, apoptosis-related protein (Bcl-2, Bax, caspase-3), PI3K/Akt pathway protein (PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt) were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the cell relative survival rate and the expressions of IGF-II, Bcl-2, p-PI3K and p-Akt proteins in the high glucose group decreased ($P < 0.05$); the methylation level of IGF-II, apoptotic rate, expressions of Bax and caspase-3 protein increased ($P < 0.05$), the expressions of PI3K and Akt protein did not change ($P > 0.05$). Compared with the high glucose group, the relative survival rate and the expressions of IGF-II, Bcl-2, p-PI3K and p-Akt in the 5-aza-dc + high glucose group increased ($P < 0.05$); IGF-II methylation level, apoptotic rate, Bax and caspase-3 protein expressions decreased ($P < 0.05$), the expressions of PI3K and Akt protein did not change ($P > 0.05$). **Conclusion** IGF-II methylation mediates trophoblast cells apoptosis induced by high glucose. Inhibition of IGF-II methylation can promote proliferation and inhibit apoptosis of trophoblast cells, which may be achieved by up-regulating PI3K/Akt pathway.

Key words IGF-II methylation; high glucose; apoptosis; PI3K/Akt pathway; trophoblast cells