

# DNA 甲基化与动脉粥样硬化的研究进展

乔鑫彭瑜张钺

**【摘要】** 动脉粥样硬化(AS)的基因水平研究主要集中在表观遗传学方面。DNA 甲基化作为表观遗传学的重要组成部分,在 AS 的病理机制中逐步被认识。该文就近年来 AS 相关的雌激素受体、p53、细胞外超氧化物歧化酶(EC-SOD)、15 脱氢化酶(ALOX15)、叉头样转录因子(FOXP3)、凝血因子Ⅶ(F7)和 PLA2G7 等基因的 DNA 甲基化与 AS 的关系作一综述。

**【关键词】** 表观遗传学;DNA 甲基化;动脉粥样硬化

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.05.006

表观遗传学是从基因角度阐述动脉粥样硬化(AS)的发病过程,是在不改变 DNA 序列的前提下调节特异性基因的表达,其中 DNA 甲基化是重要的组成部分。近年来 DNA 甲基化与冠心病的关系,尤其是与 AS 的关系逐渐受到重视。

## 1 DNA 甲基化

1979 年,McGhee 等<sup>[1]</sup>发现,与鸡 β 珠蛋白基因毗邻的胞嘧啶核苷酸甲基化后,该基因转录受抑制,自此发现 DNA 甲基化现象。它的重要特征是可以被营养-环境因素和基因-环境因素所影响,是复杂的多因素的相互作用的结果,是长期的、稳定的表观遗传修饰过程。DNA 甲基化是将 1 个甲基基团共价结合到 5'胞嘧啶上,主要发生在哺乳动物基因组 CpG 岛的二核苷酸序列中<sup>[2]</sup>。CpG 岛是指 DNA 序列中 1 个至少含有 200 bp 的区域,其中 GC 所占比例超过 50%。

DNA 甲基化不会造成 DNA 核酸序列的变化,其过程是可逆的<sup>[3]</sup>。甲基化模式一般分为:(1)维持性甲基化(maintenance methylation),是在细胞分裂中,通过亲本链上特异的基因甲基化位点,在新生链上相应的位置进行甲基化修饰;(2)从头甲基化(de novo methylation),是催化未甲基化的 CpG 位点发生甲基化。以上由不同的 DNA 甲基化转移酶(DNMT)催化完成。去甲基化包括:(1)与复制依赖性相关的被动去甲基,是通过阻止新生链发生 DNA 甲基化而达到去甲基的作用;(2)非复制依赖性的主动去甲基<sup>[4]</sup>。DNA 甲基化的关键是 DNMT 的参与,目前发现的 DNMT 有 DNMT1、DNMT2

和 DNMT3a/DNMT3b 酶。DNMT1 主要功能是维持 DNA 甲基化状态,并参与 DNA 复制后子链的甲基化,保持亲代与子代之间有相同的甲基化形式,其活性影响 DNA 甲基化过程。DNMT3 主要参与 DNA 的从头甲基化。DNMT2 与 DNA 特异位点结合,其功能尚不清楚。

## 2 与 AS 相关的 DNA 甲基化

由于 DNA 甲基化受环境、营养等诸多因素的影响,当环境发生变化时,体内平衡会被打破,使 DNA 甲基化 CpG 岛移动,从而建立新的平衡。随着高血压、代谢综合征、衰老、饮食及环境等心血管危险因素与 DNA 甲基化相关性的研究,AS 与 AS 的关系也逐步受到临床重视。基因特异的甲基化可以通过参与 AS 的靶基因或靶基因途径进行初步的评价。

### 2.1 激素相关基因

雌激素受体(ER)及脂代谢基因是最早报道与 AS 相关的基因。ER 包括 ER-α 和 ER-β 2 个亚型,分别由不同的基因编码<sup>[5]</sup>。女性在绝经前 AS 的发病率低于同龄组男性,但是绝经期后,这种性别差异逐渐消失<sup>[6-7]</sup>。推测雌激素可通过调节血脂、凝血纤溶系统、抗氧化系统等,起保护作用。

Huang 等<sup>[8]</sup>观察了 AS 斑块 ER-α 基因启动子区甲基化水平,该研究纳入 38 例 AS 患者和 28 名正常对照者,AS 组 ER-α 启动子区高甲基化的发生率为 70.4%,而对照组仅为 28.6% ( $P < 0.05$ )。ER-β 在血管平滑肌细胞中的分泌占优势。Kim 等<sup>[9]</sup>在对 ER-β 启动子区 DNA 甲基化对人体动脉粥样组织和体外血管衰老关系的研究中发现,冠脉粥样病变区的 ER-β 基因甲基化(28.7%)明显高于正常动脉血管(6.7%~10.1%,  $P < 0.05$ )和静脉(18.2%,  $P < 0.05$ ),升主动脉、颈动脉和股动脉的

基金项目:国家临床重点科室项目(2013)

作者单位:730000 兰州大学附属第一医院心血管内科,甘肃省心血管疾病重点实验室

通信作者:张钺,Email: zhangccu@163.com

斑块区也有明显的 ER- $\beta$  基因高甲基化。进一步的体外血管组织培养发现, ER- $\beta$  通道依赖的 DNA 甲基化水平在动脉内皮细胞和平滑肌细胞中升高, DNMT 活性增强, ER- $\beta$  表达受抑制。因此, 表观遗传学的 ER- $\beta$  基因失调与 AS 发生相关, 介导了血管老化过程。

## 2.2 抑癌基因

转录调节因子 p53 基因作为抑癌基因, 能调节细胞周期、诱导细胞凋亡、细胞分化、细胞衰老、DNA 修复和抑制血管生成等, 其在 AS 的发生、发展中一直备受关注。在离体人颈动脉标本中观察到, 斑块区 p53 基因处于高甲基化状态, 提示 p53 基因的失活与 AS 的发生相关。同时, p53 基因在斑块区的表达水平与 AS 病变程度及斑块破裂相关。研究也提示, 早期生长反应因子-1(Egr-1) 表达的增加将使其下游蛋白 p53 蛋白表达受抑制, 二者呈负性相关<sup>[10]</sup>。Egr-1 是一种促炎症基因, 在 AS 中参与细胞凋亡, 促进血管平滑肌细胞及内皮细胞的表达<sup>[11]</sup>。

## 2.3 氧化应激相关基因

细胞外超氧化物歧化酶基因(EC-SOD)主要由血管平滑肌细胞分泌, 参与血管内皮功能调节。Lakshmi 等<sup>[12]</sup>对 352 例确诊的 CAD 患者和 284 名健康对照者采血提取 DNA 后分析发现, 与对照组相比, CAD 组患者 SOD 活性较低 $[(714 \pm 180) \text{ U/g Hb}]$ 对 $[(1\,440 \pm 308) \text{ U/g Hb}]$ , EC-SOD 病例组较对照组表达下降[相对定量 $(0.34 \pm 0.30)$ 对 $(0.81 \pm 0.29)$ ],  $P < 0.0001$ ], EC-SOD 启动子区有明显的超甲基化 $[(62.23 \pm 33.36)\%$ 对 $(32.35 \pm 24.76)\%$ ,  $P < 0.0001$ ], 这表明血管抗氧化防御系统受损, 活性氧生成增多导致了血管受损, 粥样斑块形成。

## 2.4 凝血相关基因

近期一些相关基因研究为 AS 相关的 DNA 甲基化提供了新思路。Friso 等<sup>[13]</sup>在临床研究发现, 影响凝血因子 VII(FVII)表达水平的 FVII 基因与 AS 也有密切的联系。研究纳入 168 例 CAD 患者和 88 名正常对照, 与 CAD 组相比, 对照组 F7 基因有较高的甲基化水平 $[(32.12 \pm 9.80)\%$ 对 $(30.22 \pm 9.23)\%$ ,  $P = 0.012$ ], 对照组 F7 基因 A1A1 区的高甲基化水平与血浆 FVII 的低表达有明显相关性 $[(29.6 \pm 8.93)\%$ 对 $(31.65 \pm 10.29)\%$ ,  $P = 0.011$ ], FVII 作为启动凝血瀑布的主要蛋白酶, 是动脉粥样血栓形成的危险因素之一。

## 2.5 炎症及其他相关基因

PLA2G7(phospholipase A2, group VII)基因作

为一种炎症基因, 其表达产物 Lp-PLA2, 又称血小板活化因子乙酰基水解酶, 大量研究证实其对冠心病的进展有预测价值, 也与斑块特征相关, 可以用来预测未来心血管事件发生率及死亡率<sup>[14]</sup>。Jiang 等<sup>[15]</sup>在 PLA2G7 基因启动子与心血管疾病关系的研究中纳入 36 例冠心病患者和 36 名健康对照, 结果显示 PLA2G7 基因甲基化与冠心病密切相关 $[(6.41 \pm 2.62)\%$ 对 $(4.98 \pm 3.06)\%$ ,  $P = 0.025$ ], 尤其是女性患者( $P = 0.003$ ), 提示女性 PLA2G7 基因甲基化水平与总胆固醇水平( $r = 0.462$ ,  $P = 0.009$ )、三酰甘油( $r = 0.414$ ,  $P = 0.02$ )、载脂蛋白 E( $r = 0.396$ ,  $P = 0.028$ )相关, 但男性无明显差异, ROC 曲线显示女性 PLA2G7 基因甲基化可以预测冠心病的发生( $AUC = 0.912$ ,  $P < 0.01$ ), PLA2G7 甲基化的性别差异可能在冠心病的病理生理的分子机制发挥作用。

已知 T 细胞有促进 AS 病变的作用, 它可以进入内膜, 分泌细胞因子, 使单核巨噬细胞、平滑肌细胞加速迁移和增殖, 放大炎症反应。调节性 T 细胞是维持自身耐受的重要组成, 可以通过抑制炎症免疫反应对 AS 起到保护作用<sup>[16]</sup>。DNA 转录编码反甲基化因子叉头样转录因子(forkhead box P3, FOXP3)作为调节性 T 细胞的特异性标志, 它的去甲基化作用可以促进 AS 形成。Jia 等<sup>[17]</sup>在研究冠状动脉病变的严重程度与调节性 T 细胞 FOXP3 基因甲基化关系中发现, 在 AS 患者中调节性 T 细胞的下调与急性冠脉综合征(ACS)的发病呈正相关, 外周血中 FOXP3 基因的去甲基化水平反映调节性 T 细胞的数量。与正常对照组相比, ACS 患者调节性 T 细胞中 DNMT3b 的表达显著增高( $P < 0.0001$ ), 提示 FOXP3 的去甲基化水平降低, 可能是由于细胞本身所表达的 DNMT3b 增多所致。FOXP3 基因的去甲基化增加了 ACS 的风险。研究纳入冠脉造影证实严重狭窄( $>50\%$ )的男性患者 188 例, 对照组为冠脉造影正常或狭窄 $<20\%$ 的男性患者 68 例, 与对照组相比, 严重冠状动脉病变患者的调节性 T 细胞水平明显下降 $[(3.46 \pm 1.11)\%$ 对 $(1.67 \pm 0.71)\%$ ,  $P < 0.001$ ], 下降程度与病变程度相关( $r = 0.55$ ,  $P < 0.001$ )。在进一步的外周血管单核细胞中观察到, ACS 组患者的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞的 DNMT 水平上调, 其中 DNMT3a 和 3b 表达明显增加。另一项分析 ACS 的发病与 FOXP3 基因甲基化关系的研究中, 纳入 89 例 ACS 患者及 35 名正常对照, 结果发现 ACS 患者 FOXP3 基因 CpG 岛有明显的去甲基化( $P < 0.0001$ ), 且年

轻组 ACS 患者调节性 T 细胞表达下降程度和 FOXP3 基因去甲基化水平均较对照组更明显( $P < 0.0005$ )<sup>[18]</sup>。以上研究均提示,FOXP3 基因去甲基化通过免疫调节相关作用,介导了 AS 的发生发展。

体内外实验及转基因动物模型等证明 15-脂氧合酶基因(ALOX15)的表达产物 12/15-脂氧合酶(12/15-LOX)参与了 AS 的发生、发展过程。通过 DNMT1 抑制 ALOX15 转录沉默,ALOX15 启动子区甲基化可能被其他表观遗传学机制所介导<sup>[19]</sup>。研究发现,ALOX15 作为脂氧化酶超家族的一员,其导致心血管疾病的主要机制是通过影响动脉粥样组织、血管功能和重塑来实现,使单核细胞黏附于血管内皮并透入内皮下形成泡沫细胞,泡沫细胞堆积形成脂质条纹乃至脂质斑块,从而促使 AS 的发生<sup>[20]</sup>。

### 3 小结与展望

AS 的发病是多因素参与的结果,越来越多的研究表明 DNA 甲基化在 AS 的过程中发挥了重要作用。目前 DNA 甲基化机制尚不清楚,但其过程是可逆的,开发具有特异性预防或逆转 AS 的心血管药物,将可能会是未来预防及治疗 AS 的重要策略。目前低剂量去甲基化治疗骨髓异常增生综合征已证实临床治疗有效,研究甲基化在心血管疾病的诊疗中发挥的作用,就可以从基因角度解释 AS 的发病原因,并且可以通过基因筛选,对携带遗传因素的 AS 易感人群及早采取预防措施,进行饮食及环境因素的干预。

### 参 考 文 献

- [1] McGhee JD, Ginder GD. Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken  $\beta$ -globin genes[J]. *Nature*, 1979, 280(5721):419-420.
- [2] Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease[J]. *Nature*, 2007, 447(7143): 433-440.
- [3] Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9): 607-620.
- [4] Ooi SK, Bestor TH. The colorful history of active DNA demethylation[J]. *Cell*, 2008, 133(7):1145-1148.
- [5] Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function[J]. *Circulation*, 1996, 94(4):727-733.
- [6] Kim ES, Menon V. Status of women in cardiovascular clinical trials[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(3):279-283.
- [7] Bittner V. Menopause, Age, and cardiovascular risk: a complex relationship[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(25): 2374-2375.
- [8] Huang YS, Zhi YF, Wang SR. Hypermethylation of estrogen receptor-alpha gene in atheromatosis patients and its correlation with homocysteine[J]. *Pathophysiology*, 2009, 16(4):259-265.
- [9] Kim J, Kim JY, Song KS, et al. Epigenetic changes in estrogen receptor  $\beta$  gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(1):72-80.
- [10] Miah S, Zadeh SN, Yuan XM, et al. Expression of Egr1 and p53 in human carotid plaques and apoptosis induced by 7-oxysterol or p53[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2013, 65(5): 677-682.
- [11] Bhattacharyya S, Fang F, Tourtellotte W, et al. Egr-1: new conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis)[J]. *J Pathol*, 2013, 229(2):286-297.
- [12] Lakshmi SV, Naushad SM, Reddy CA, et al. Oxidative stress in coronary artery disease: epigenetic perspective[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 374(1-2):203-211.
- [13] Friso S, Lotto V, Choi SW, et al. Promoter methylation in coagulation F7 gene influences plasma FVII concentrations and relates to coronary artery disease[J]. *J Med Genet*, 2012, 49(3):192-199.
- [14] 张林娜, 侯静波. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 与冠心病[J]. *国际心血管病杂志*, 2013, 40(3):136-138.
- [15] Jiang D, Zheng D, Wang L, et al. Elevated PLA2G7 gene promoter methylation as a gender-specific marker of aging increases the risk of coronary heart disease in females[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e59752.
- [16] 李昌义, 金 炜. 调节性 T 细胞与动脉粥样硬化[J]. *国际心血管病杂志*, 2012, 39(1):4-6.
- [17] Jia L, Zhu L, Wang JZ, et al. Methylation of FOXP3 in regulatory T cells is related to the severity of coronary artery disease[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228(2):346-352.
- [18] Lü CX, Xu RD, Cao M, et al. FOXP3 demethylation as a means of identifying quantitative defects in regulatory T cells in acute coronary syndrome[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 229(1):263-270.
- [19] Kayama Y, Minamino T, Toko H, et al. Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure[J]. *J Exp Med*, 2009, 206(7):1565-1574.
- [20] Dobrian AD, Lieb DC, Cole BK, et al. Functional and pathological roles of the 12-and 15-lipoxygenases[J]. *Prog Lipid Res*, 2011, 50(1):115-131.

(收稿:2014-03-27 修回:2014-06-23)

(本文编辑:金谷英)