

动脉粥样硬化患者 ER- α 基因启动序列的高甲基化改变

智艳芳 李肖甫 邱翠 荣守华 张新 贾莉婷 张展

作者单位: 450052 郑州市, 郑州大学第三附属医院细胞室

通讯作者: 智艳芳, E-mail: zhiyanfang1980@126.com

【摘要】 目的 探讨动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)患者雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER- α) 基因启动序列 CpG 岛的甲基化改变情况。方法 经颈部血管彩超检查共筛选出 72 例 AS 患者, 健康对照者 30 例。采集所有研究对象的外周血, 巢式甲基化特异性 PCR (nested-methylation-specific PCR, nMSP) 法检测 ER- α 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态, 对检测结果进行统计学分析。结果 72 例 AS 患者, ER- α 基因启动序列有 49 例发生了甲基化, 其中, 完全甲基化 22 例, 半甲基化 27 例, 甲基化率为 68.06% (49/72); 30 例健康对照者 ER- α 基因启动序列有 9 例发生了甲基化, 其中完全甲基化 2 例, 半甲基化 7 例, 甲基化率为 30.00% (9/30), 两组甲基化率差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。将 AS 患者分为未甲基化组、半甲基化组和完全甲基化组, 随甲基化程度的增高, Crouse 积分与颈动脉内膜中层厚度(carotid intima-media thickness, CIMT) 均显著增高, 组间差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), 不同甲基化组间两两比较, 差异亦均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。ER- α 基因启动序列甲基化程度与 Crouse 积分和 CIMT 间呈明显正相关, 相关系数 r 分别为 0.696 和 0.712 (P 均 < 0.01)。结论 AS 患者 ER- α 基因启动序列 CpG 岛高度甲基化, 且甲基化程度与 AS 程度呈正相关, ER- α 基因的高甲基化很可能促进 AS 的发生、发展。

【关键词】 动脉粥样硬化; 雌激素受体 α ; 甲基化; PCR; 基因

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.04.004

Hypermethylation of estrogen receptor- α gene in atherosclerosis patients

ZHI Yan-fang, LI Xiao-fu, QIU Cui, et al. Department of Cytopathology, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

【Abstract】 Objective To investigate the methylation status in promoter region of estrogen receptor α (ER- α) gene in atherosclerosis (AS) patients. **Methods** 102 cases including 72 AS patients and 30 healthy control subjects were selected under carotid colorized ultrasound examination. Peripheral blood samples were prepared from all subjects. The methylation status of CpG islands in ER- α gene promoter region were analyzed by nested-methylation-specific PCR (nMSP). The results were analyzed statistically. **Results** Hypermethylation of ER- α gene promoter region was found in 49 cases of 72 AS patients, 22 cases were full-methylation and 27 cases were half-methylation, the methylation frequency was 68.06% (49/72). While in 30 healthy control subjects, only 7 cases were half-methylation and 2 cases were full-methylation, the methylation frequency was 30.00% (9/30), which much lower than the one in AS patients and the difference had statistical significance ($P < 0.01$). The Crouse integral and carotid intima-media thickness (CIMT) showed an upward trend along with the increase of methylation degree, and the differences among three groups all had statistical significance (P all < 0.01). The difference between each two methylation groups all had statistical significance (P all < 0.01). The Spearman rank correlation analysis explored an obviously correlation between the degree of methylation in ER- α gene promoter region and the severity of AS lesion. The coefficient correlation r were 0.696 and 0.712 respectively (P all < 0.01). **Conclusion** Hypermethylation of CpG islands in ER- α gene promoter region was found in AS patients, which is positive correlated with the severity of AS lesion. The hypermethylation of ER- α gene hence to promote the occurrence and development of AS.

【Key words】 Atherosclerosis; Estrogen receptor- α ; Methylation; PCR; Gene

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重危害 人体健康, 导致心、脑等重要器官发生缺血性病变的

常见病、多发病。近年来,不仅发病率明显上升,发病年龄也日趋年轻化。随着对 AS 发病机制的不断深入研究,基因组异常甲基化导致 AS 相关基因转录失调逐渐成为关注焦点。有研究^[1]报道,在 AS 形成过程中出现整体基因组的低甲基化和部分特定基因启动区 CpG 岛的高甲基化,而高甲基化可抑制基因的表达。相关研究^[2]表明,雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER- α) 基因可以通过调节脂质代谢对血管壁平滑肌细胞和内皮细胞起保护作用,故绝经前的女性 AS 发生率显著低于男性,而绝经后二者并无明显差异。且单克隆抗体检测发现 ER- α 的表达在绝经期妇女的体内明显降低,表明 ER- α 基因表达沉默与 AS 的发生密切相关。

本文研究收集 72 例 AS 患者和 30 例健康对照者外周血标本,检测 AS 病变的程度及 ER- α 基因启动区的甲基化水平,以期从表观遗传学角度探讨 ER- α 基因异常甲基化可能在 AS 发病中的作用,为 AS 的防治提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择河南省人民医院心内科 2012 年 1 月至 2013 年 5 月住院的 72 例 AS 患者,均经颈部血管彩超证实有 AS 斑块形成,男 35 例,女 37 例,年龄(70.63 \pm 8.64)岁,排除严重肝、肾疾病,内分泌代谢疾病,结缔组织疾病和乳腺癌等。30 例健康对照者来自该院体检中心,男 15 例,女 15 例,年龄(66.57 \pm 8.52)岁,体检结果正常,且经颈部血管彩超证实无颈动脉内膜增厚及斑块形成,并排除高血压、冠心病等其他心脑血管疾病。

1.2 颈部血管超声 由固定专人采用美国 SONO5500 型彩色超声血流仪,对所有研究对象行两侧颈动脉检查(颈总动脉、颈动脉分叉部、颈内动脉起始处及颈外动脉)。检查内容包括:颈动脉内膜中层厚度(carotid intima-media thickness, CIMT)及有无斑块形成。内膜中层厚度<1.0 mm 为正常;1.0 mm~1.3 mm 为增厚;以内膜局限性突出管腔,厚

度 \geq 1.3 mm 为斑块形成。以任何一处最大 CIMT 作为判定标准^[3]。采用 Crouse 氏方法^[4]计算颈动脉斑块积分。

1.3 标本采集 所有研究对象清晨空腹采集肘静脉血 3 ml,用北京 TIANGEN 公司的 DP319--5 ml 血液基因组提取试剂盒提取基因组 DNA,操作严格按说明书进行。提取 DNA 以 λ -HindIII Marker 做参照在 1%琼脂糖上电泳,并检测浓度和纯度。提取 DNA 直接修饰或-80℃冰箱保存备用。

1.4 基因组 DNA 的亚硫酸氢钠修饰及纯化 使用上海七海复泰生物公司的甲基化修饰、纯化试剂盒,取基因组 DNA 500 ng 左右,操作严格按说明书进行。修饰、纯化后的 DNA 直接 PCR 或-80℃冰箱保存备用。

1.5 巢式甲基化特异性 PCR (nested-methylation-specific PCR, nMSP) DNA 经过修饰,未甲基化的胞嘧啶 C 脱氨基转变成 T,而甲基化的 C 不变。基于此原理,针对 ER- α 基因启动区 CpG 岛完全甲基化和完全非甲基化两种情况,设计引物:甲基化特异性引物(ER-pM)和非甲基化特异性引物(ER-pU)。在外围不含 CG 区域再设计一对引物(ER-pN),对修饰后的 DNA 进行第一轮扩增,再分别用 ER-pM 和 ER-pU 进行第二轮扩增。所有引物均由上海英俊生物技术有限公司合成,引物序列、片段长度及退火温度详见表 1。

PCR 反应体系:12.5 μ l,第一轮使用 ER-pN 扩增,其中含有:修饰后 DNA 2 μ l,2 \times Taq PCR Master-mix 6.3 μ l (包括 0.1U Taq Polymerase/ μ l,500uM dNTP each,20 mM tris-HCL,PH 8.3;100 mM KCl,3 mM MgCl₂,其他稳定剂和增强剂),上下游引物 20 uM 各 0.3 μ l,加水补充至 12.5 μ l。

反应条件:采用 Touchdown-PCR,第一轮条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,65℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,以后每个循环退火温度降 1℃,20 个循环后退火温度降至 45℃;94℃变性 30 s,45℃

表 1 ER- α 基因 nMSP 引物

引物	序列	片段长度(bp)	退火温度(℃)
ER-pN	S:5'-GAGGTGATTTGGATAGTAG-3'	422	48.8
	A:5'-AACTCCCTAAACTCTCCCTT-3'		
ER-pM	S:5'-CGTCGTGATAATTAATTTCCAGGGC-3'	283	53.8
	A:5'-CTCGCGCACCGTATAACCGCTAAAC-3'		
ER-pU	S:5'-TGTTCTGTATAATTAATTTGAGGGT-3'	283	48.0
	A:5'-CTCACACACCATATAACCACTAAAC-3'		

注:ER-pN:外侧引物;ER-pM:甲基化特异性内侧引物;ER-pU:非甲基化特异性内侧引物

退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 20 个循环; 72 °C 延伸 7 min。取第一次 PCR 产物 2 μl 为模板, 分别用 ER-pM 和 ER-pU 进行第二轮扩增, 扩增体系及扩增条件同上。

取 5 μl PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 在凝胶成像系统下观察并拍照存档。

1.6 统计学处理 所有资料经 SPSS 17.0 统计软件建立数据库, 进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态分布计量资料多组间均数比较采用方差分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 相关分析采用 Spearman 等级相关分析, 以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 nMSP 结果 采用 nMSP 联合 Touchdown-PCR, 可明显提高扩增的灵敏度和特异性, 扩增的目的产物特异、浓度高, 电泳条带明亮、整齐、清晰, 无非特异性扩增现象出现。

ER- α 基因启动子区甲基化状态存在三种情况: 1. 完全甲基化, 即甲基化特异性引物能扩增出目的条带, 而非甲基化特异性引物扩增不出目的条带; 2. 半甲基化, 即甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物均能扩增出目的条带; 3. 未甲基化, 即甲基化特异性引物扩增不出目的条带, 而非甲基化特异性引物能扩增出目的条带, 详见图 1。

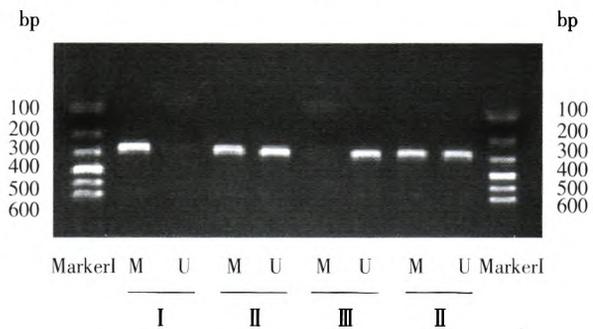


图 1 nMSP 法检测 ER- α 基因甲基化电泳图

注: Marker I: 100 bp 梯度 marker; M: 用 ER-pM 特异性引物进行扩增; U: 用 ER-pU 特异性引物进行扩增; I: 完全甲基化标本; II: 半甲基化标本; III: 未甲基化标本

2.2 ER- α 基因启动序列的甲基化检测结果 72 例 AS 患者, ER- α 基因启动序列有 49 例发生了甲基化, 其中, 完全甲基化 22 例, 半甲基化 27 例, 甲基化率为 68.06% (49/72); 30 例健康对照者 ER- α 基因启动序列有 9 例发生了甲基化, 完全甲基化 2 例, 半甲基化 7 例, 甲基化率为 30.00% (9/30), AS 组与对照组甲基化率差异具有统计学意义 ($P = 0.0004$), 见表 2。

表 2 两组甲基化率比较

组别	例数	甲基化例数	甲基化率 (%)
对照组	30	49	68.06
AS 组	72	9	30.00

注: 两组间甲基化率比较 $\chi^2 = 12.5029, P = 0.0004$

2.3 ER- α 基因启动序列甲基化程度与 Crouse 积分和 CIMT 的关系 按甲基化程度将 AS 患者分为三组, 即未甲基化组、半甲基化组和完全甲基化组, 随 ER- α 基因启动序列甲基化程度的增高, 反映 AS 程度的指标 Crouse 积分与 CIMT 均显著增高, 组间差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), 见表 3。

表 3 不同甲基化程度对应的 Crouse 积分和 CIMT 比较

组别	例数	Crouse 积分	CIMT (mm)
未甲基化组	23	4.05 ± 3.91	0.72 ± 0.10
半甲基化组	27	8.10 ± 4.51*	1.09 ± 0.11*
完全甲基化组	22	11.69 ± 4.12* [△]	1.19 ± 0.12* [△]
F 值	-	83.286	330.707
P 值	-	0.000	0.000

注: *与未甲基化组比较, $P < 0.01$; [△]与半甲基化组比较, $P < 0.01$

将 ER- α 基因启动序列甲基化程度与 Crouse 积分和 CIMT 分别进行 Spearman 等级相关分析, 相关系数 r 分别为 0.696 ($P < 0.01$) 和 0.712 ($P < 0.01$)。可见, ER- α 基因启动序列甲基化程度与 AS 程度呈明显正相关。

3 讨论

AS 是由多因素引起的心脑血管系统的慢性炎症性疾病, 其以平滑肌细胞异常增殖和迁徙、内膜下脂质沉积以及泡沫细胞形成为主要特征, 最终导致动脉弹性下降和管腔狭窄, 进而导致其供血区缺血甚至坏死。有关 AS 的发病机制有多种学说, 如脂质浸润学说、炎症学说、氧化应激学说、感染学说以及遗传环境相互作用学说等, 但到目前为止, 还没有一种学说能将 AS 的发生机制彻底解释清楚。近年来的研究^[5]表明, 相关基因表达和功能改变在 AS 的发生和发展过程中发挥重要作用。AS 过程中伴随 DNA 甲基化的改变, 而甲基化是调节基因表达和功能的一种重要的表观遗传学修饰方式, 也是目前研究最集中和发展最成熟的部分。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶催化作用下, 以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体, 将甲基基团合成到 CpG 结构中胞嘧啶的第五位碳原子上, 使之变成 5-甲基胞嘧啶的化学修饰过程^[6]。DNA 甲基化和去甲基化与基因的表达密切相关, 一般而言, 基因调节序列高甲基化抑制基因转录, 而低甲基化则激活基因转录^[7]。

近年来,以颈动脉超声监测的 CIMT 被认为能较准确反映动脉内膜的病损程度,是一种较好的无创 AS 监测方法^[8]。由于颈动脉表浅,超声能较清晰的显示从内膜表面到中膜与外膜界面间(外弹力膜)的距离,即内膜-中层厚度^[9]。AS 主要侵犯内膜,中膜通常不受影响,因此,CIMT 增厚主要反映内膜增殖,即 AS 病变,在 AS 斑块形成时可观察到内膜局部的偏心性增厚并向管腔膨出^[10]。因此,本文研究监测的 CIMT 和 Crouse 积分能较准确地反映 AS 病损的性质和程度。

雌激素受体(estrogen receptor, ER)属于核受体家族,有 ER- α 和 ER- β 两个亚型。二者的分子结构极其相似,功能上二者既独立作用又相互依赖,组织学分布上具有特异性^[11]。实验证明,雌二醇通过与 ER- α 结合在抗 AS 发生中发挥重要作用。已有不少研究^[12]表明 ER 启动子区甲基化是其基因表达沉默的重要机制。Kortelainen 等^[13]用 ER 的单克隆抗体检测发现绝经前女性中患有明显 AS 者其表达降低,提示 ER 基因表达沉默与 AS 形成具有明显相关性。本文研究结果显示,AS 患者的 ER- α 基因启动子 CpG 岛的甲基化率高达 68.06%,显著高于对照组的 30.00%,差异具有统计学意义。此外,ER- α 基因启动序列甲基化程度与反映动脉粥样硬化程度的 Crouse 积分和 CIMT 之间呈明显正相关。该结果不仅表明 AS 患者 ER- α 基因有较高的甲基化发生率,还表明 ER- α 受体很可能通过甲基化修饰抑制其表达或失表达,进而促进 AS 的发生发展,这很可能是 AS 形成的另一重要机制。这与许多学者的研究结果相近,Post 等^[14]的研究表明 AS 患者右心房 ER- α 基因甲基化增加,斑块比邻近正常动脉 ER- α 基因甲基化也显著增加,Kim 等^[15]也得出了相似结果。还有学者研究^[16]发现,收缩表型的平滑肌细胞 ER- α 启动子区域 CpG 岛未甲基化,而合成表型的平滑肌细胞则呈现高甲基化。以上研究均提示血管组织中 ER- α 基因发生甲基化致其表达失活在 AS 形成和血管系统老化中发挥重要作用。此外,Lund 等^[17]的研究表明,在 apoE 基因缺陷小鼠尚未出现任何组织学上可以检测的血管病变时,DNA 异常甲基化(包括低甲基化和高甲基化)在主动脉和外周血单核细胞中已经出现,这表明 DNA 甲基化的异常改变很可能是 AS 发生的早期标志。另外,本文研究分离 AS 患者外周血单个核细胞检测 ER- α 基因甲基化不仅具有代表性,也避免了采样给患者带来的痛苦。

本文研究探讨了 AS 患者 ER- α 基因启动子区

的甲基化改变情况及其与 AS 病损程度间的关系,从甲基化修饰的角度为 AS 的发生揭示了另一种可能的病理生理机制,该机制可能在 AS 的发生、发展中发挥重要作用。那么,通过检测 ER- α 基因启动子区的甲基化程度来预测 AS 的发生风险,通过药物干预 ER- α 基因的甲基化治疗 AS 都是有可能的,因此,AS 甲基化的研究对 AS 的预防及治疗均提供了崭新的思路和方向。

4 参考文献

- 1 Findeisen HM, Kahles FK, Bruemmer D. Epigenetic regulation of vascular smooth muscle cell function in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 2013, 15:319.
- 2 Losordo DW, Kearney M, Kim EA, et al. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*, 1994, 89:1501-1510.
- 3 O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. N Engl J Med*, 1999, 340:14-22.
- 4 Crouse JR, Harpold GH, Kahl FR, et al. Evaluation of a scoring system for extracranial carotid atherosclerosis extent with B-mode ultrasound. *Stroke*, 1986, 17:270-275.
- 5 Hiltunen MO, Yla-Herttuala S. DNA methylation, smooth muscle cells, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23:1750-1753.
- 6 Pogribny IP, Beland FA. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66:2249-2261.
- 7 Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, 2006, 174:341-348.
- 8 Watanabe H, Yamane K, Fujikawa R, et al. Westernization of lifestyle markedly increases carotid intima-media wall thickness (IMT) in Japanese people. *Atherosclerosis*, 2003, 166:67-72.
- 9 Taylor-Robinson D, Boman J. Comments on the failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2003, 22:709-710.
- 10 Kakko S, Paivansalo M, Koistinen P, et al. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2003, 168:147-152.
- 11 孙明晓,郭立新,周迎生,等. 男性及绝经后女性雌激素受体基因多态性与糖尿病大血管病变的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12:189-193.
- 12 Wang YS, Chou WW, Chen KC, et al. MicroRNA-152 mediates DNMT1-regulated DNA methylation in the estrogen receptor alpha gene.

PLoS One, 2012, 7:30635.

13 Kortelainen ML, Huttunen P. Expression of estrogen receptors in the coronary arteries of young and premenopausal women in relation to central obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004, 28:623-627.

14 Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, et al. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, 1999, 43:985-991.

15 Kim J, Kim JY, Song KS, et al. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro

vascular senescence. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772:72-80.

16 Ying AK, Hassanain HH, Roos CM, et al. Methylation of the estrogen receptor-alpha gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 2000, 46:172-179.

17 Lund G, Andersson L, Lauria M, et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem*, 2004, 279:29147-29154.

(收稿日期:2013-10-11)

(本文编辑:杨军)

2014(第五届)国际体外诊断产业高峰论坛

随着新医改政策的出台, 公众对医疗健康需求不断扩增。同时, 由于国家“十二五”规划及 863 计划的支持, 体外诊断产业科研成果不断涌现, 且逐步取得产业化进展。另外, 上市公司及社会资本频繁进军体外诊断领域, 促使行业逐渐从分散走向集中, 体外诊断产业走向受益于基层医疗的改革, 生化及免疫诊断细分市场潜力巨大。由于对健康筛查与体检、重大疾病预警与诊断的需求不断上升, 分子诊断技术亦颇受关注。中国人口众多、医疗资源差异大, POCT 产品面临尚未被满足的巨大蓝海市场。此外, 通过行业延伸与跨领域合作, 个体化治疗、伴随诊断及移动医疗等细分领域的发展逐渐深入。如何把握细分市场机遇, 这对体外诊断企业战略规划及产品研发提出了更高的要求。

除国内医院临床诊断、独立实验室及体检中心外, 越来越多的中国体外诊断企业试图拓展海外业务, 欧美注册法规及市场准入标准获得广泛关注, 与此同时, 体外诊断产品的质量标准也不断提升。如何为国内外体外诊断市场提供更优质的产品, 将是企业得以持续发展的重要因素之一。

2014(第五届)国际体外诊断产业高峰论坛将于 2014 年 3 月 8-9 日在厦门召开, 该论坛是中国体外诊断行业最大的行业首届峰会, 覆盖体外诊断全行业。本届会议将侧重解析 POCT 和分子诊断两大快速发展产品领域, 涉及体外诊断产品市场分析、项目合作、质量控制和临床应用等方面, 预计会议规模在 300 人以上。

1 会议议题

- 中国体外诊断产业政策导向及市场机会;
- 医疗服务价格项目规范指导下的产品定价策略;

- 跨国企业在全身体外诊断市场的战略布局;
- 私立医疗机构的发展与市场空间预测;
- 肿瘤分型诊断的临床诊疗现状与需求;
- 感染性疾病诊断趋势及耐药性检测;
- POCT 产品临床应用标准及质控体系建设;
- 如何利用二代测序技术开展肿瘤个体化治疗。

2 往届部分发言嘉宾

- 安娟娟(审评三处处长): 国家食品药品监督管理局医疗器械技术审评中心;
- 康熙雄(教授): 北京天坛医院实验诊断中心;
- 陈学东(副总裁): 浙江迪安诊断技术股份有限公司;
- 谭宏东(总经理): 广州立菲达安诊断产品技术有限公司;
- 陈华(研发总监): 凯杰生物;
- 杨晓楠(华东片区第一负责人): 华大基因;
- 郑立谋(董事长): 厦门艾德生物医药科技有限公司;
- 夏宁邵(教授): 厦门大学;
- 刘昭前(临床药理研究所副所长): 中南大学;
- 张捷(研发副总裁): 康圣环球。

3 联系方式

- 联系人: 全小姐
- 热 线: 86-21-51550869
- 传 真: 86-21-51552421
- 邮 箱: jessicaquan@cbichina.com
- 官 网: ivdsummit.cbichina.com