· 综　述 ·

# 冠心病相关中医证候 DNA 甲基化研究进展

李　敏　孙　杨　邱瑞瑾　李承羽　陈诗琪　商洪才

冠心病是由冠状动脉粥样硬化、冠状动脉痉挛、炎性狭窄等引起的冠状动脉供血不足,心肌急剧缺血缺氧,出现以发作性胸骨后或心前区疼痛为主要表现的临床综合症。冠心病是全球常见病、多发病,严重危害人类健康和生活质量[1]。冠心病属中医学“胸痹”、“心痛”范畴,病位在心,涉及肝、脾、肾等脏。《灵枢·五邪》指出:“邪在心,其病心痛”;《素问·脏气法时论》亦说“心病者,胸中痛,胁支满,胁下痛,膺背肩胛间痛,两臂内痛”。

DNA 甲基化是 DNA 化学修饰的一种常见形式,其可以改变细胞核内 DNA 与转录装置的结合能力,进而调节基因信息的表达。DNA 甲基化表达水平与冠心病息息相关。DNA 甲基化表达异常引起相应调控网络紊乱是冠心病发生进展的重要环节。本文对 DNA 甲基化在冠心病发病机制、中医证候差异及中医药干预中的作用进行综述。

1　DNA 甲基化　表观遗传学主要研究在基因核酸序列不发生改变的情况下,基因功能的可遗传性变化,包括 DNA 甲基化、非编码 RNA 调控、组蛋白修饰等方面,是后基因组时代生命科学领域的重要组成部分。DNA 甲基化是一种常见的表观遗传修饰,其在甲基转移酶催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将活化的甲基引入到胞嘧啶环第 5 位碳原子上,最终形成 5 - 甲基胞嘧啶。在哺乳动物中,胞嘧啶 - 磷酸 - 鸟嘌呤(cytosine-phosphate-guanine, CpG)双核苷酸序列分布不均,通常以两种形式存在,一种分散于 DNA 序列中,其中 70% ~90% 是以甲基化形式存在的;另一种呈现高度聚集状态,称之为 CpG 岛,是富含腺嘌呤和胞嘧啶的 DNA 序列,常位于多数基因的启动子区和第一外显子区,多以非甲基化状态存在。甲基化修饰通常发生在 CpG 序列的胞嘧啶上,从而在不改变 DNA 碱基序列基础上调控基因的转录和表达[2]。

DNA 高度甲基化可以抑制目的基因转录,导致基因沉默,而去甲基化则诱导基因的重新活化和表达。DNA 甲基化和去甲基化这种动态平衡是维持机体表观遗传正常稳态的关键,当这种动态平衡被打破时,会导致部分基因过表达或被抑制,促使疾病的发生。DNA 甲基化异常有两种类型:第一,DNA 序列中散在的 CpG 位点正常的甲基化状态消失,取之以一种低甲基化状态存在,导致染色体结构不稳定、转座子异常表达;第二,CpG 岛位点在正常组织中处于低甲基化状态,疾病发生时,基因调控区 CpG 岛高度甲基化促使染色质构象发生改变,基因表达活性下降甚至丧失。

2　冠心病发病机制与 DNA 甲基化

冠心病发病与内皮细胞功能受损、脂质浸润、炎性反应、血小板黏附、血栓形成、血管平滑肌迁移和增殖等诸多因子有关。异常的 DNA 甲基化修饰参与了冠心病动脉粥样硬化发生发展的病理环节。

2.1　同型半胱氨酸　同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)通过损害血管内皮细胞、刺激平滑肌细胞增值、破坏体内凝血和纤溶系统平衡、促进炎症及氧化低密度脂蛋白产生等途径,成为独立的心血管风险指标[3]。Li JJ 等[4]研究表明,Hcy 可能通过增加启动子 DNA 甲基化,抑制巨噬细胞中胱硫醚 γ - 裂解酶的转录而引发炎症。Sharma P 等[5]对 137 例经冠脉造影证实的冠心病患者和 150 名健康人外周血总 DNA 甲基化进行评估,发现冠心病患者总 DNA 甲基化程度明显高于健康人,且与血浆 Hcy 水平呈正相关。Sharma P 等[6]进一步对冠心病患者高甲基化区域进行研究,发现在 C1QL4 基因的内含子区域、CCDC47 和 TGFBR3 基因的上游区域有 6 个 CpG 位点。

2.2　雌激素核受体　雌激素核受体(estrogen receptor, ER)即经典的雌激素受体,包括 ER-α 和 ER-β 两种亚型。雌激素与受体特异性结合,可提高一氧化氮合酶基因表达,抑制血管平滑肌增殖和迁移,抑制血小板聚集,调控脂质代谢,从而发挥保护心血管的作用[7,8]。Kim J 等[9]分析比较了升主动脉、颈总动脉、股动脉中斑块和非斑块区域 ER-β 基因的甲基化

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81430098);2017 国家重点研发计划项目(No. 2017YFC1700402)

作者单位:北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部和北京市重点实验室(北京 100700)

通讯作者:商洪才, Tel:010 - 84012510, E-mail: shanghongcai@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190318.180

中国中西医结合杂志

状态,发现斑块病变区域比非斑块区域更高的甲基化水平。Post WS 等[10]研究发现,与临近正常组织比较,动脉粥样硬化斑块 ER-α 基因甲基化水平明显升高,且体外培养的人主动脉平滑肌细胞也存在 ER-α 基因的高甲基化表达。在动脉粥样硬化患者中,ER-α 基因启动子区 CpG 岛高度甲基化,与 Hcy 水平呈正相关[11]。此外,靳松等[12]通过对40 例冠心病患者和 20 名健康成人外周血 ER-α 基因启动子区甲基化状态进行检测,发现冠心病患者外周血中存在 ER-α 基因高甲基化和低表达状态。

2.3　金属基质蛋白酶-9/叉头状转录因子 P3　冠心病是一种慢性炎症性疾病,且先天性免疫和获得性免疫炎症机制参与了疾病的发生发展过程。金属基质蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 作为一种重要的炎症介质和细胞外基质代谢酶,是动脉粥样硬化发生发展中的重要因素之一,MMP-9 异常高表达或活性增强时,会导致动脉粥样硬化病变进展和恶化[13]。刘振江等[14]研究表明,与正常对照组相比,稳定性心绞痛患者和急性心肌梗死患者 MMP-9 基因启动子区域甲基化密度明显降低,其血浆 MMP-9 的浓度都显著升高。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)在抑制动脉粥样硬化的形成和进展中起主要作用[15]。叉头状转录因子 P3(fork head transcription factor 3, FOXP3)是 Treg 形成和功能的关键调节因子[16]。Treg 细胞特异性脱甲基区(Treg-cell specific demethylated region, TSDR)位于 FOXP3 的非编码区[17]。贾镭等[18]收集了 114 例急性冠脉综合征患者以及 11 名冠脉造影正常者,研究发现,随着冠状动脉粥样硬化严重程度增加,FOXP3 基因 TSDR 区的去甲基化程度呈现降低趋势,Treg 水平也显著降低。

2.4　三磷酸腺苷结合合转运体 A1/ATP 结合盒亚家族 G 成员 1/N-乙酰氨基半乳糖转移酶2　血脂异常是冠心病发生发展的主要危险因素,DNA 甲基化通过调控脂质代谢相关基因,参与冠心病的病理生理进程。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)是一种整合膜蛋白,其通过介导细胞内脂质流出,结合至细胞表面的载脂蛋白 A-Ⅰ,形成高密度脂蛋白,达到降脂及抗动脉粥样硬化的作用。Guay SP 等[19]通过对 97 例家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH)患者外周血 ABCA1 基因启动子区甲基化进行检测,发现 ABCA1 基因甲基化程度与血浆 HDL、HDL 磷脂水平、HDL 颗粒大小呈明显负相关。且有冠心病病史的 FH 患者,其 ABCA1 基因的甲基化水平更高。Guay SP 等[20]进一步证实,ABCA1 基因甲基化程度与冠状动脉疾病状态及患者年龄有关,而乙酰水杨酸干预,可能降低 ABCA1 基因甲基化水平。ATP 结合盒亚家族 G 成员 1(ATP-binding cassette subfamily G member 1, ABCG1)和 N-乙酰氨基半乳糖转移酶 2 (polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2, GALNT2)等基因通过调控脂质代谢途径影响冠心病的发生发展。Peng P 等[21]通过比较 85 例冠心病患者和 54 例非冠心病患者,发现 ABCG1 和 GALNT2 基因启动子高甲基化状态与冠心病风险增加相关,且吸烟和年龄可以影响 DNA 甲基化水平。

此外,氧化应激相关基因参与了冠心病的发病进程。细胞外超氧化物歧化酶(extracellular superoxide dismutase, EC-SOD)作为一种对细胞外超氧有特异性清除作用的抗氧化酶,可调节一氧化氮的生物活性,参与体内自由基及过氧化物的清除,降低心肌缺血再灌注损伤,参与多种组织器官的生理病理过程[22]。B 淋巴细胞瘤 - 2 (B lymphocytoma-2, BCL2)相互作用蛋白 3(BCL2 interacting protein 3, BNIP3)是一种能与 BCL2 和腺病毒 E1819KD 相互作用的蛋白,仅含有一个 BH3 结构域,可诱导心肌细胞死亡[23]。Lakshmi SV 等[24]通过对冠状动脉疾病患者和对照组外周血进行 DNA 甲基化比较,发现 EC-SOD 基因的高甲基化以及 BNIP3 基因的低甲基化影响氧化应激反应,使冠状动脉疾病具有易感性。

3　冠心病中医证候与 DNA 甲基化　有诸内必形诸外,证侯体现了疾病在分子、细胞、组织、器官、系统水平的综合动态变化。中医学认为胸痹发生多与寒邪内侵、饮食不当、情志波动、年老体虚等因素有关。其主要病机有虚实两个方面,实为血瘀、气滞、寒凝、痰浊,痹阻心阳,阻滞心脉;虚为气血阴阳虚衰,肺脾肝肾亏损,心脉失养。故冠心病患者多见心血瘀阻、气滞心胸、痰浊闭阻、寒凝心脉、气阴两虚、心肾阴虚、心肾阳虚等证。

唐梅森[25]收集经冠脉造影证实的冠心病血瘀证患者 16 例,冠心病痰浊证患者 8 例及健康对照组 8 名,采用焦磷酸测序方法分析三组外周血 ER-α、糖蛋白Ⅵ(glycoprotein Ⅵ platelet, Gp6)基因启动子区域的甲基化状态。结果表明,冠心病血瘀证患者的 ER-α 和 GP6 基因启动子区甲基化阳性率略高于冠心病痰浊证患者,明显高于健康对照组($P < 0.05$)。且 ER-α 基因多态性位点 rs117301G 等位基因可能是早发冠心病血瘀证发生发展的危险因素之一。陈光

等[26]通过对 6 例冠心病不稳定性心绞痛血瘀证和 6 例非血瘀证患者外周血白介素-6(interleukin-6,IL-6)基因启动子区甲基化状态进行分析,发现 IL-6 基因转录起始位点前 -1118 bp ~ -826 bp 序列 7 个 CpG 位点的甲基化程度虽无统计学意义,但血瘀证组高于非血瘀证组的趋势。李楠等[27]发现急性冠脉综合征痰浊血瘀证患者的 ER 基因甲基化率明显高于健康对照组($P<0.01$),而 MMP-9 基因甲基化率偏低($P<0.05$)。向忠军[28]与黄海波[29]通过对早发冠心病血瘀证患者、健康人进行基因 DNA 甲基化检测,筛选出冠心病血瘀证易感的 DNA 甲基化基因,即肌间线蛋白、连环蛋白、细胞黏附分子与同源性 L1 的亲密同族体、锌指 E-box 绑定同源框 2。李颖[30]和迟映雪[31]通过对 60 例急性冠脉综合征(acute coronary syndrome,ACS)痰浊血瘀证患者及 40 名健康人进行比较,发现 ACS 痰浊血瘀证患者血栓调节蛋白基因启动子甲基化检出率显著高于健康人($P<0.05$),而 MMP-9 基因启动子甲基化率明显偏低($P<0.05$)。

## 4 展望

DNA 甲基化与冠心病的发生、发展密切相关。作为一种特异性表观遗传修饰,其在阐明冠心病病理过程和发病机制上具有重要的应用价值。通过深入研究 DNA 甲基化调控机理,开发新的 DNA 甲基化调控技术,平衡异常甲基化表达,调节相应靶基因转录,有利于进一步认知冠心病进展的调节关键节点。目前 DNA 甲基化与冠心病病理机制研究还远远不足。大部分研究集中于 CpG 岛位点的高甲基化,而 DNA 序列中散在的 CpG 位点的低甲基化研究,还有待进一步探索。此外,Nakatochi M 等[32]报告了与心梗相关的锌指同源盒 3 甲基化位点 cg07786668 和 SMARCA4 甲基位点 cg17218495,而其他与冠心病相关的 DNA 甲基化位点却鲜有报道。

利用 DNA 甲基化与冠心病中医证候动态时空定性和定量的相关性研究,可为从转录前水平阐释冠心病中医证候实质提供新的思路,也为寻找中医证候间特定的生物靶标提供新的视角。然而,对于冠心病中医证候之间 DNA 甲基化差异表达,虽然部分文献显示了冠心病血瘀证特有的 DNA 甲基化修饰基因,但大多文献仍呈阴性结果[26,33]。且冠心病中医证候研究多以血瘀证和痰浊证为主,冠心病其他证候 DNA 甲基化研究还未有报道。另外,冠心病中医证候之间是否存在 DNA 甲基化联系,证候在空间时间上动态转化时,CpG 位点是否随之改变,这些都是未来研究方向。

中医药在防治冠心病中具有独特优势,将表观遗传学及分子生物学技术引入到中医学研究领域中,不仅可阐明中医药的分子作用机制,还为冠心病临床治疗提供新的策略。而表观遗传学所涉及的 DNA 甲基化—组学分析—蛋白调控网络,可进一步揭示中医药多层次、多途径、多靶点的治疗效果。目前,针对药物干预 DNA 甲基化以调控疾病进程中西药文献均报道较少。而中医药对 DNA 甲基化—转录组学—蛋白分析的复杂网络调控,也需要进一步探索。尽管如此,DNA 甲基化相关研究为冠心病机制探明提供新的方向,为中医证候间分子研究提供新的靶点,也为未来临床上冠心病风险早期预防和中西医诊疗提供新的思路。

## 参 考 文 献


[1] WHO. About cardiovascular diseases [EB/OL]. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds) [2010-10-24].

[2] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomic [J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(6): 465-476.

[3] 张志强, 李君义. 同型半胱氨酸与冠心病的相关性研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(4): 452-456.

[4] Li JJ, Li Q, Du HP, et al. Homocysteine triggers inflammatory responses in macrophages through inhibiting CSE-H2S signaling via DNA hypermethylation of CSE promoter[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(6): 12560-12577.

[5] Sharma P, Kumar J, Garg G, et al. Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients[J]. DNA Cell Biol, 2008, 27(7): 357-365.

[6] Sharma P, Garg G, Kumar A, et al. Genome wide DNA methylation profiling for epigenetic alteration in coronary artery disease patients [J]. Gene, 2014, 541(1): 31-40.

[7] Castardo-de-Paula JC, de Campos BH, Amorim EDT, et al. Cardiovascular risk and the effect of nitric oxide synthase inhibition in female rats: The role of estrogen[J]. Exp Gerontol, 2017, 97: 38-48.

[8] Huang G, Wang D, Zeb I, et al. Intrathoracic fat, cardiometabolic risk factors, and subclinical cardiovascular disease in healthy, recently menopausal women screened for the Kronos Early Estrogen Prevention Study (KEEPS)[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(1): 198-205.

[9] Kim J, Kim JY, Song KS, et al. Epigenetic chan-


中国中西医结合杂志

ges in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and *in-vitro* vascular senescence[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772(1): 72-80.

[10] 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[J]. Cardiovasc Res, 1999, 43(4): 985-991.

[11] 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): 259-65.

[12] 靳松, 沈干, 胡世莲, 等. 雌激素受体 α 启动子区甲基化与冠状动脉粥样硬化的关系[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(7): 1102-1104.

[13] Kunz J. Matrix metalloproteinases and atherogenesis in dependence of age[J]. Gerontology, 2007, 53(2): 63-73.

[14] 刘振江, 刘启明, 周胜华. 冠心病患者 MMP-9 基因 DNA 去甲基化及其异常表达的研究[J]. 中国医药指南, 2011, 9(25): 177-179.

[15] Hasib L, Lundberg AK, Zachrisson H, et al. Functional and homeostatic defects of regulatory T cells in patients with coronary artery disease [J]. J Intern Med, 2016, 279(1): 63-77.

[16] Hori S. The Foxp3 interactome: a network perspective of T(reg) cells[J]. Nat Immunol, 2012, 13(10): 943-945.

[17] Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate[J]. Nature, 2010, 463(7282): 808-812.

[18] 贾镭, 祝领, 王晓建, 等. 应用焦磷酸测序法检测 FOXP3 基因在冠心病患者中的去甲基化水平[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2016, 16(5): 1842-1845.

[19] Guay SP, Brisson D, Munger J, et al. ABCA1 gene promoter DNA methylation is associated with HDL particle profile and coronary artery disease in familial hypercholesterolemia[J]. Epigenetics, 2012, 7(5): 464-472.

[20] Guay SP, Légaré C, Houde AA, et al. Acetylsalicylic acid, aging and coronary artery disease are associated with ABCA1 DNA methylation in men [J]. Clin Epigenetics, 2014, 6(1): 14.

[21] Peng P, Wang L, Yang X, et al. A preliminary study of the relationship between promoter methylation of the ABCG1, GALNT2 and HMGCR genes and coronary heart disease[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e102265.

[22] 张笑天, 郑晓瑛. 氧化自由基清除剂超氧化物歧化酶与疾病[J]. 中国公共卫生, 2014, 30(10): 1349-1352.

[23] 袁颐捷, 朱智勇, 韩毅. BNIP3 蛋白在缺血性心血管疾病中作用的研究[J]. 心血管康复医学杂志, 2011, 20(2): 182-185.

[24] 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.

[25] 唐梅森. 基于 DNA 单核苷酸多态性和甲基化修饰探讨早发冠心病血瘀证的相关易感基因的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.

[26] 陈光, 周浩强, 刘咏梅, 等. 冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者 IL-6 基因甲基化研究及方法探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 1-4.

[27] 李楠, 宫丽鸿, 程修平. 复方中药对急性冠脉综合征患者雌激素受体基因与基质金属蛋白酶-9 基因甲基化水平的影响[J]. 中国中医急症, 2015, 24(10): 1746-1749.

[28] 向忠军. 基于甲基化修饰探讨加减养心通脉方对冠心病血瘀证及亚型 CTNNB1、DES 基因表达的影响研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.

[29] 黄海波. 养心通脉方对早发冠心病血瘀证家系 CHL1、ZEB2 基因甲基化作用影响的研究[D]. 湖南: 湖南中医药大学, 2015.

[30] 李颖. 中西医结合治疗对 ACS(痰浊血瘀型)患者血浆 TM 基因启动子甲基化的影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.

[31] 迟映雪. 中西医结合治疗对痰浊血瘀型 ACS 患者 MMP-9 基因启动子甲基化水平的影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.

[32] Nakatochi M, Ichihara S, Yamamoto K, et al. Epigenome-wide association of myocardial infarction with DNA methylation sites at loci related to cardiovascular disease[J]. Clin Epigenetics, 2017, 9: 54.

[33] 王萍, 王丽萍, 黄献平, 等. 冠心病血瘀证差异表达基因及其启动子甲基化状态的初步研究[J]. 中医杂志, 2013, 54(11): 949-952.

(收稿: 2017-10-24　在线: 2019-04-04)
责任编辑: 邱　禹

中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志