

心力衰竭患者 SLC6A2 启动子区甲基化状态及与气虚、血瘀证的相关性

骆杰伟^{1,2} 孟晓嵘^{1,2} 黄昉萌^{1,2} 胡 丹³ 杨 笑⁴ 郑星宇^{1,2}
魏世超² 郭苗苗² 吴仕明³ 陈宏毅^{1,2}

摘要 目的 探讨心力衰竭(简称心衰)患者去甲肾上腺素转运体(NET, SLC6A2)基因启动子区甲基化状态及其与气虚、血瘀证的相关性。**方法** 选择Ⅲ~Ⅳ级心衰患者 36 例作为心衰组,评估气虚、血瘀证积分,另收集同期来自福建省立医院体检人群中健康老年 30 名(老年组)及青年 30 名(青年组)。采用分段焦磷酸测序法检测 SLC6A2 基因启动子 CpG 岛甲基化水平。应用 Pearson 及 Partial 相关分析评价心衰患者 SLC6A2 基因启动子区甲基化状态与气虚、血瘀积分的相关性,应用 Logistic 回归筛查和调整危险因素。**结果** 单因素方差分析:心衰组 SLC6A2 基因启动子区总甲基化率(MTI)为(219.72 ± 54.03)%,明显高于老年组[(194.47 ± 34.92)%]及青年组[(161.60 ± 41.11)%],差异均有统计学意义($P < 0.05$),且老年组高于青年组($P < 0.01$)。协方差分析:控制 BMI、年龄因素后,心衰组总 MTI 仍高于老年组($P = 0.041$),老年组高于青年组($P = 0.016$)。3 组 SLC6A2 基因启动子总 MIT 比较,差异有统计学意义($F = 16.447$, $P = 0.01$),青年组 SLC6A2 基因启动子总 MTI 偏低。Partial 相关分析:心衰组总 MTI 与气虚、血瘀积分均呈正相关(r 值分别为 0.494, 0.419; $P < 0.05$)。Logistic 回归分析:调整混杂因素后,SLC6A2 基因启动子总 MTI 的相对危险度(OR 值)为 1.038 (95%CI:1.006 ~ 1.071, $P = 0.020$)。 **结论** SLC6A2 基因启动子区域甲基化异常升高是心衰的危险因素之一,甲基化程度与心衰患者气虚、血瘀证候呈正相关。

关键词 心力衰竭;去甲肾上腺素转运体;DNA 甲基化;气虚;血瘀

Methylation in Promoter Region of SLC6A2 Gene in Heart Failure Patients and Its Correlation with Qi Deficiency/Blood Stasis Syndrome LUO Jie-wei^{1,2}, MENG Xiao-rong^{1,2}, HUANG Fang-meng^{1,2}, HU Dan³, YANG Xiao⁴, ZHENG Xing-yu^{1,2}, WEI Shi-chao², GUO Miao-miao², WU Shi-ming³, and CHEN Hong-yi^{1,2} 1 Provincial Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou (350001); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou (350001); 3 Second Clinical Medical College, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122); 4 Teaching and Research Faculty of Surgical Nursing, Department of Nursing, Fujian Health College, Fuzhou (350101)

ABSTRACT Objective To explore the methylation status in promoter region of norepinephrine transporter gene (NET, SLC6A2) in heart failure (HF) patients and its correlation with qi deficiency/blood stasis syndrome (QDS/BSS). **Methods** Thirty-six patients with heart failure (NYHA classification III to IV) were recruited in the study (as the heart failure group) and their scores of QDS/BSS were evaluated. Besides, a healthy elderly group (30 cases) and a healthy youth group (30 cases) were also set up. They were recruited from Physical Examination Center of Fujian Provincial Hospital. Pyrosequencing was applied to detect the methylation in promoter region of SLC6A2 gene, and the total methylation index (MTI) of CpG island was calculated. The correlation between the methylation status in promoter region of SLC6A2 and scores of QDS/BSS was assessed using Pearson and Partial analyses. Risk factors were

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(No. 2013J01277);福建省中医药科研项目(No. wzs201317)

作者单位:1. 福建医科大学省立临床医学院(福州 350001);2. 福建省立医院中医科(福州 350001);3. 福建中医药大学第二临床医学院(福州 350122);4. 福建卫生职业技术学院护理系外科护理学教研室(福州 350101)

通讯作者:胡 丹, Tel: 0591-88217471, E-mail: docluo@126.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 12. 1448

screened and adjusted using *Logistic* regression. Results By one-factor analysis of variance, the total MTI in the HF group ($219.72\% \pm 54.03\%$) was obviously higher than that in the healthy elderly group ($194.47\% \pm 34.92\%$) and the healthy youth group ($161.60\% \pm 41.11\%$) (all $P < 0.05$). Meanwhile, the total MTI was higher in the healthy elderly group than in the healthy youth group ($P < 0.01$). By covariance analysis, after controlling age and BMI, the total MTI was higher in the HF group than in the healthy elderly group ($P = 0.041$), while it was higher in the healthy elderly group than in the healthy youth group ($P = 0.016$). Age was found to play an essential role in affecting MTI of SLC6A2 gene promoter region among the 3 groups ($F = 16.447$, $P = 0.01$). The total MTI was quite lower in the healthy youth group. Results of *Partial* correlation analysis showed MTI was positively correlated with scores of qi deficiency and blood stasis respectively ($r = 0.494$ and 0.419 respectively, both $P < 0.05$). *Logistic* regression analysis showed after adjusting confounding factors, the relative risk (OR value) of total MTI of SLC6A2 gene in promoter region was 1.038 (95% CI, 1.006 to 1.071, $P = 0.020$). Conclusions Abnormally elevated methylation of the promoter region of SLC6A2 gene is one of risk factors for HF. In addition, the degree of methylation of the promoter region of SLC6A2 gene was positively correlated with the severity of QDS/BSS.

KEYWORDS heart failure; norepinephrine transporter gene; DNA methylation; qi deficiency; blood stasis

DNA 甲基化是表观遗传学中重要的一种机制,是 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DN-MT) 介导的化学修饰过程,在 DNA 的 CpG 二核苷酸胞嘧啶的 5'-C 上添加甲基,形成 5-甲基化胞嘧啶 (5-methylcytosine),“开启”或“关闭”调节基因的表达。CpG 岛主要位于转座子和基因启动子区域,含有 60%~70% 的 CpG, CpG/GpC 值 ≥ 0.6 ^[1]。2010 年 Movassagh M 等^[2]率先报道了 DNA 甲基化与心力衰竭 (简称心衰) 间的存在关联,在心衰患者心脏移植后留下的心脏组织样本发现 DNA 甲基化痕迹,这一发现为治疗心衰提供了新思路。中医学认为心衰的基本病机为气虚血瘀、阳虚水泛。本研究采用分段区域焦磷酸测序 (pyrosequencing) 技术,探讨心衰患者去甲肾上腺素转运体 (norepinephrine transporter gene, NET, SLC6A2) 基因启动子区甲基化状态与气虚、血瘀证的关系,进一步阐明心衰的发病机制,以期为中医治疗心衰提供新思路。

资料与方法

1 诊断标准 符合美国心脏病学会 (American College of Cardiology, ACC)/美国心脏学会 (American Heart Association, AHA) 心衰诊断标准及分期^[3,4]。参照纽约心脏病协会 (New York Heart Association, NYHA) 标准委员会 1994 年修订的心功能分级^[5]。中医辨证分型标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[6] 制定。

2 纳入与排除标准 纳入标准:符合 ACC/AHA

心衰诊断标准,且 III~IV 级心衰患者,年龄 40~100 岁,基础病为冠心病、高血压病、糖尿病等。健康老年组年龄 65~100 岁,青年组年龄 20~40 岁。排除标准:严重贫血、甲状腺功能亢进、风湿性心脏病、先天性心脏病、心肌病、原发性肾脏病、动静脉瘘、缩窄性心包炎、心包积液、肝硬化、恶性肿瘤、自身免疫性疾病等全身其他器官和系统性疾病。

3 一般资料 36 例均为 2012 年 10 月—2014 年 12 月就诊于福建省立医院门诊和住院的 III~IV 级心衰患者,年龄 41~97 岁,平均 (77.44 ± 10.42) 岁,其中男性 24 例,女性 12 例,心功能 III 级 24 例,病程 0.1~15.0 年,IV 级 12 例,病程 0.2~16.0 年,心衰分期 C 期 (即临床心衰阶段) 28 例, D 期 (即难治性终末期心衰阶段) 8 例,有高血压病病史 29 例,有冠心病病史 27 例 (其中有心肌梗死病史 20 例),有糖尿病病史者 19 例,吸烟者 (指平均每日吸烟 1 支以上并持续至少 12 个月) 12 例,饮酒者 (指平均每日饮酒超过 30 g,并持续或累积 6 个月) 6 例,脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 中位数为 4 433.50 ($3\,044.75 \sim 8\,686.25$) pg/mL,肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 中位数为 0.08 ($0.04 \sim 0.39$) ng/mL。收集同期来自福建省立医院体检中心的体检人群中的健康老年及青年各 30 名作为对照。其中老年组男性 21 例,女性 9 例,年龄 69~96 岁,平均 (76.40 ± 6.52) 岁,吸烟者 5 例,饮酒者 4 例;青年组男性 20 名,女性 10 名,年龄 22~35 岁,平均 (27.97 ± 3.60) 岁,吸烟者 0 名,饮酒者 3 名。

4 方法

4.1 一般资料、生化指标及气虚、血瘀证候积分
记录观察对象的性别、年龄、体重指数 (BMI)、吸烟史、饮酒史、收缩压 (SBP)、舒张压 (DBP)、临床证候及舌脉等。心衰患者中医气虚、血瘀证候积分由一名副主任医师判定。气虚证候包括气短、神疲、乏力、自汗、懒言。血瘀证候包括：胸痛/胁痛、脉络瘀血、皮下瘀斑、癥积 (即肋下触及肝、脾情况)、颈静脉充盈、怒张、肌肤甲错、肢体麻木或偏瘫、痴癫狂躁 (即精神症状)、舌 (舌质紫暗，舌体瘀斑、瘀点)、脉 (涩脉或无脉) 及外伤史、手术史。其中外伤史、手术史按 6 个月内有无外伤史或手术史评定，有则计 1 分，无则计 0 分；各症状按不同程度计分：无此症状计 0 分，轻度计 1 分，中度计 2 分，重度计 3 分，再予累加。并收集以下生化指标：AST、乳酸脱氢酶 (LDH)、 α -羟基丁酸脱氢酶 (α -HBDH)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、cTnI、BNP、TG、TC、HDL-C、LDL-C、空腹血糖 (FPG)、肌酐 (SCr)、尿酸 (URIC)、血红蛋白 (Hb) 等。内生肌酐清除率 (CCr) 按 Cockcroft 公式计算， $CCr (mL/min) = [(140 - \text{年龄}) \times \text{体重} (kg)] / [0.818 \times SCr (\mu mol/L)]$ ，女性为结果 $\times 0.85$ 。生化指标检测按实验室要求严格质控。

4.2 DNA 抽提 抽取受试者外周静脉血 2 mL，EDTA 抗凝用于提取基因组 DNA。采用离心柱型法提取基因组 DNA，按照基因组 DNA 抽提试剂盒说明书操作。试剂盒购自 QIAGEN 公司。

4.3 寻找 SLC6A2 基因启动 CpG 岛及设计引物 寻找 SLC6A2 基因启动子区相对集中 CpG 岛 (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>)。4 个相关片段参照 SLC6A2 基因变体 1 (NM_001172504.1 的 mRNA) 序列，如片段 A：CTGGTGTCTTGGGAGCGGCGAGCGGTGCTCGGCGC (-894 ~ -859)；片段 B：CGTCCGCTCAGCGCGCGTCTATCCAGTGTCTAAGG (-113 ~ -78)；片段 C：CCGGGCCGAGACGCGCCAGCAGAGGGCTAGCGAGTTTGTAGTGCACTGA (-427 ~ -379)；片段 D：TGCGCGCCCGAGTCCCCCAGATCCCTGGGAACCCGCGCCACCCTCC (-843 ~ -798)。

4.4 甲基化修饰及纯化亚硫酸盐修饰的 DNA (1) 将 DNA 中的非甲基化胞嘧啶 (C) 转化为尿嘧啶 (U)，然后通过 PCR 扩增转化为胸腺嘧啶 (T)。用亚硫酸盐试剂溶解 DNA，在每份亚硫酸盐混合液中分别加入 800 μ L 无 RNA 酶的水，充分混匀。亚硫酸盐修饰反应体系 (140 μ L)：DNA 保护溶液 15 μ L、已溶

解的亚硫酸盐混合液 85 μ L、混合液 DNA 和 RNase-free water 总体积 40 μ L。DNA 转化 PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 变性 5 min，60 $^{\circ}$ C 复性 25 min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min，60 $^{\circ}$ C 复性 85 min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min，60 $^{\circ}$ C 复性 175 min $\rightarrow$ 20 $^{\circ}$ C 保持。并纯化亚硫酸盐修饰的 DNA。严格按 QIAGEN 公司转化试剂盒 (EpiTect Bisulfite Kit) 操作。

4.5 甲基化 PCR 由 PyroMark Assay Design 2.0 设计引物，由华大基因公司 (BGI) 合成。片段 A 为反向测序，引物序列见表 1。PCR 反应体系 (50 μ L)：修饰的 DNA 100 ng、1 μ L dNTP (10 μ mol/L)、5 $\times$ buffer GC (KAPA Biosystems) 10 μ L，50 pmol/ μ L 上下游引物各 1 μ L、TaqDNA 聚合酶 2 U；扩增条件：95 $^{\circ}$ C 变性 3 min 预变性 $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，51 $^{\circ}$ C 退火 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min) 40 循环 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 变性 7 min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C 保持。

表 1 SLC6A2 基因启动子区甲基化 PCR 及测序引物

引物名称	碱基序列 (5' - 3')	5' 标记
SLC6A2 1	F: TGGTGGGAGATTAGAGGT R: CCCAAACAAACCTAACCCCTATC S: ACTCCCTTTCTATCCT	生物素
SLC6A2 2	F: GGTGAGTTTAATTTTAGTTATTTGGGGTAG R: TTCCTCCCTACTTACAACCTCC S: GTTTTTTTTTGGGAATTTTG	生物素
SLC6A2 3	F: GGGATAGGGTTAGGTTTGT R: CCCCTCCCCAACTCAAATCC S: GTTTGTTTGGGAGGT	生物素
SLC6A2 4	F: TGGTGGGAGATTAGAGGT R: CCCAAACAAACCTAACCCCTATC S: GTAGGATAGAAAGGGAG	生物素

4.6 Pyrosequencing 检测 于 96 孔 PCR 反应板中加入反应结合珠 2 μ L，结合缓冲液 38 μ L，PCR 产物 40 μ L，室温下充分混匀 10 min。开启真空泵吸取结合珠及 PCR 产物混悬液，依次浸入 70% 乙醇、0.2 mmol/L NaOH 和冲洗缓冲液中各 5 s；关闭真空泵，后将探头上结合珠及 PCR 产物置入 40 μ L 退火缓冲液 (含测序引物 1.5 μ L)，85 $^{\circ}$ C 变性 2 min，冷却至室温，使引物与模板退火杂交。根据 Pyrosequencing 软件序列设计信息所计算出剂量，在试剂舱中依次加入底物混合物、酶混合物及 4 种 dNTP (QIAGEN)，将试剂舱及 96 孔反应板放入 Pyrosequencing 检测仪 (PyroMark Q96 ID, QIAGEN) 进行反应，应用 Pyro Q-CpG 软件自动分析 SLC6A2 基因启动子区各片段每个位点甲基化状态。焦磷酸测序图 DNA 中 R 或 Y 对应 A、B、C、D 片段序列中 CG 中的 C，T 对应非 CG 的 C。计算

DNA 甲基化指数以反映甲基化水平,甲基化率 (methylation index, MTI) (%) = 甲基化峰值高度 / (甲基化峰值高度 + 非甲基化峰值高度) × 100%。

5 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计学软件进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,方差齐采用 LSD 检验;方差不齐采用 Tamhane's T^2 检验,并行协方差分析;不符合正态的计量资料以中位数 $M (P_{25} \sim P_{75})$ 表示,两组间比较采用柯尔莫诺夫-斯米尔诺夫检验 (Kolmogorov-Smirnov Test),3 组间比较采用 Kruskal-Wallis Test。计数资料采用 χ^2 检验。两指标间相关性应用 Pearson 及 Partial 相关分析;筛查和调整危险因素采用 Logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 3 组一般资料、生化指标及心衰患者气虚、血瘀积分 (表 2) 单因素方差分析结果表明,3 组年龄、BMI、吸烟史、SBP、Hb、TG、TC、HDL-C、LDL-C、FPG、CCr、URIC、AST、LDH、 α -HBDH 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组性别、饮酒史比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与青年组比较,心衰及老年组患者 BMI、SBP、AST、LDH、 α -HBDH 明显升高, HDL-C 及 CCr 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);与老年组比较,心衰患者 Hb、TC、HDL-C、LDL-C、CCr 降低, FPG、LDH 及 α -HBDH 升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。3 组 DBP 比较,差异无统计学意义 ($F = 1.783, P = 0.174$)。

心衰组患者气虚积分为 (8.53 ± 3.97) 分,血瘀积分为 (6.36 ± 2.02) 分。

2 3 组 SLC6A2 基因启动子甲基化状态比较 (图 1) 单因素方差分析结果表明,3 组 SLC6A2 基因启动子区总 MTI 比较,差异有统计学意义 ($F = 13.869, P < 0.01$),心衰组总 MTI [$(219.72 \pm 54.03)\%$] 高于老年组 [$(194.47 \pm 34.92)\%$] 及青年组 [$(161.60 \pm 41.11)\%$],差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$),老年组高于青年组 ($P < 0.01$)。

以 SLC6A2 基因启动子总 MTI 为因变量,BMI 及年龄为协变量,应用协方差分析比较 3 组 SLC6A2 基因启动子甲基化状态。控制 BMI、年龄影响因素,组间比较 F 值为 4.911, $P = 0.009$,说明 3 组间 MTI 有差异。心衰组总 MTI 高于老年组 ($P = 0.041$),老年组高于青年组 ($P = 0.016$),提示不同年龄对 SLC6A2 基因启动子总甲基化率的影响差异有统计学意义 ($F = 16.447, P = 0.001$),青年组 SLC6A2 基因启动子总 MTI 偏低。

3 心衰组患者 SLC6A2 基因启动子总 MTI 与气虚证、血瘀证积分的相关性分析 (表 3,4) Pearson 相关分析结果表明,心衰组 SLC6A2 基因启动子总 MTI 与气虚、血瘀积分均呈正相关 (r 值分别为 0.463, 0.522; 均 $P < 0.01$),气虚积分与血瘀积分呈正相关 ($r = 0.546, P < 0.01$)。Partial 相关分析:在控制年龄及 BMI 影响后,心衰组 SLC6A2 基因启动子总 MTI 与气虚、血瘀积分均呈正相关 (r 值分别为 0.494, 0.419; 均 $P < 0.01$),而气虚积分与血瘀积分亦呈正相关 ($r = 0.561, P < 0.01$)。

表 2 各组一般资料及生化指标比较

项目	心衰组(36 例)	老年组(30 人)	青年组(30 人)	F/χ^2 值	P 值
性别(例,男/女)	24/12	21/9	20/10	0.105	0.949
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	77.44 $\pm$ 10.42 $\Delta\Delta$	76.40 $\pm$ 6.52 $\Delta\Delta$	27.97 $\pm$ 3.60	398.237	<0.001
BMI($\text{kg}/\text{m}^2, \bar{x} \pm s$)	23.70 $\pm$ 2.69 $\Delta\Delta$	24.16 $\pm$ 2.66 $\Delta\Delta$	21.09 $\pm$ 2.53	12.079	<0.001
吸烟(例,是/否)	12/24 $\Delta\Delta$	5/25 $\Delta\Delta$	0/30	12.509	0.002
饮酒(例,是/否)	6/30	4/26	3/27	0.623	0.732
SBP(mmHg, $\bar{x} \pm s$)	141.67 $\pm$ 31.31 $\Delta\Delta$	131.67 $\pm$ 5.07 $\Delta\Delta$	118.43 $\pm$ 8.10	9.604	<0.01
DBP(mmHg, $\bar{x} \pm s$)	79.17 $\pm$ 22.41	73.33 $\pm$ 1.30	72.50 $\pm$ 8.11	1.783	0.174
Hb(g/L, $\bar{x} \pm s$)	118.67 $\pm$ 23.01 $**\Delta\Delta$	142.87 $\pm$ 17.56	140.27 $\pm$ 17.37	15.279	<0.001
TG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.00 $\pm$ 0.38	1.17 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta$	0.85 $\pm$ 0.34	5.697	0.005
TC(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	3.95 $\pm$ 1.23 $**$	4.72 $\pm$ 0.77	4.33 $\pm$ 0.61	5.565	0.005
HDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.12 $\pm$ 0.38 $*\Delta\Delta$	1.31 $\pm$ 0.33 Δ	1.52 $\pm$ 0.36	10.475	<0.001
LDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.28 $\pm$ 0.91 $**\Delta\Delta$	3.37 $\pm$ 0.98 $\Delta\Delta$	2.72 $\pm$ 0.50	14.305	<0.001
FPG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	6.67 $\pm$ 2.21 $**\Delta\Delta$	5.39 $\pm$ 0.66	4.96 $\pm$ 0.39	13.103	<0.001
CCr(mL/min)	46.27 (34.94 ~ 56.94) $**\Delta\Delta$	63.93 (56.07 ~ 74.03) $\Delta\Delta$	108.30 (101.52 ~ 124.28)	56.317	<0.001
URIC($\mu\text{mol}/\text{L}, \bar{x} \pm s$)	396.58 $\pm$ 190.34 $\Delta\Delta$	360.53 $\pm$ 80.60	304.97 $\pm$ 58.90	4.121	0.019
AST(U/L, $\bar{x} \pm s$)	27.00 (20.00 ~ 41.00) $\Delta\Delta$	23.00 (20.00 ~ 29.75) $\Delta\Delta$	16.50 (13.75 ~ 22.50)	16.767	<0.001
LDH(U/L, $\bar{x} \pm s$)	237.50 (194.25 ~ 316.50) $**\Delta\Delta$	179.00 (162.50 ~ 189.25) $\Delta\Delta$	145.00 (137.00 ~ 159.75)	55.795	<0.001
α -HBDH(U/L, $\bar{x} \pm s$)	189.50 (147.00 ~ 259.50) $**\Delta\Delta$	140.00 (122.25 ~ 152.00) $\Delta\Delta$	120.50 (109.00 ~ 133.00)	45.540	<0.001
CK-MB(U/L, $\bar{x} \pm s$)	18.47 $\pm$ 12.91	15.80 $\pm$ 5.45	13.43 $\pm$ 3.31	2.775	0.068

注:与老年组比较, $*P < 0.05, **P < 0.01$;与青年组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

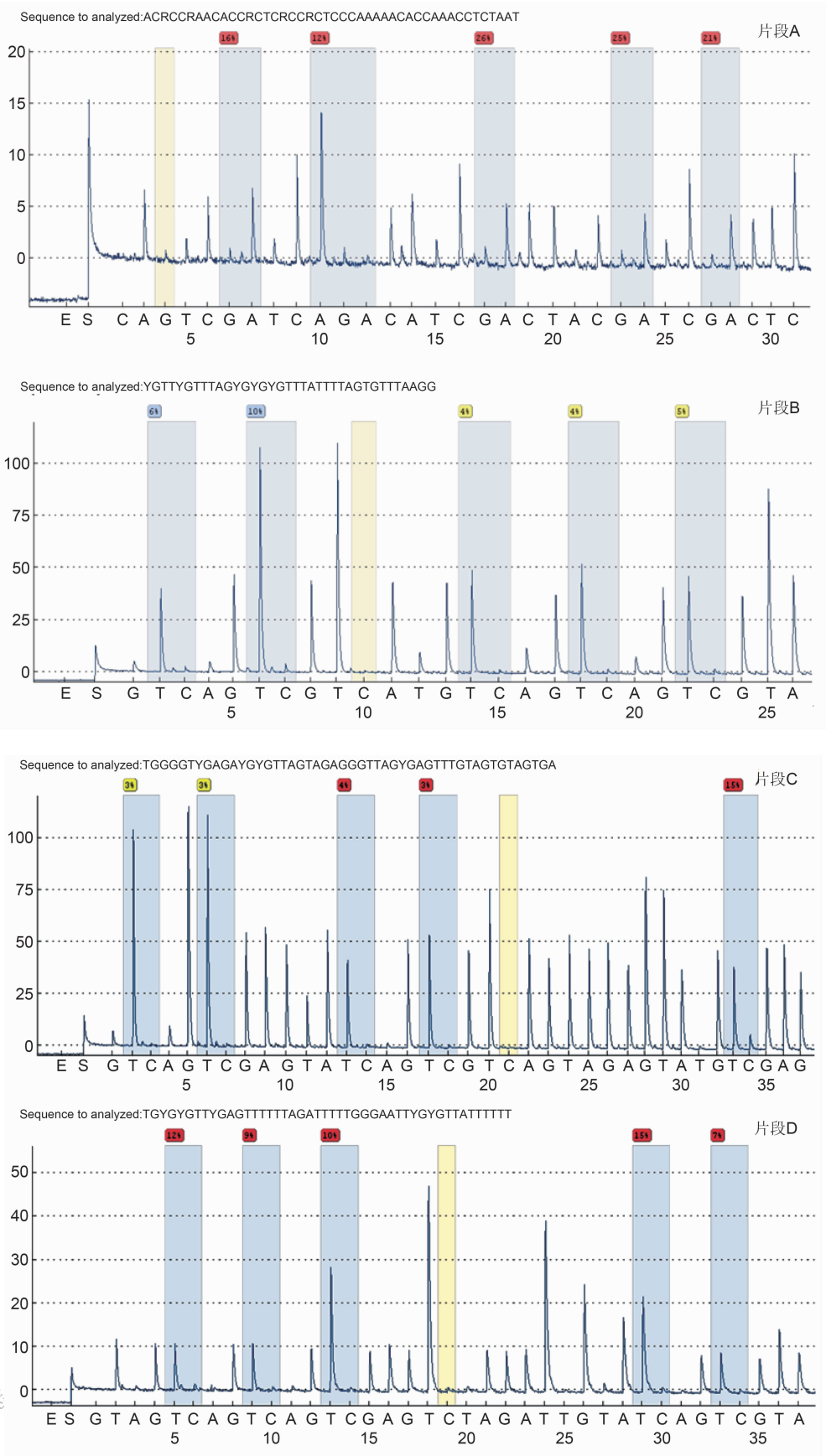


图 1 SLC6A2 基因启动子区域(片段 A ~ D)甲基化位点焦磷酸测序图

表 3 心衰组 SLC6A2 基因启动子总 MTI 与气虚证、血瘀证积分的 *Pearson* 相关分析

	相关系数(<i>r</i>)	<i>P</i> 值
总 MTI 与气虚证积分	0.463	0.004
总 MTI 与血瘀证积分	0.522	0.001
气虚证与血瘀证积分	0.546	0.001

表 4 心衰组 SLC6A2 基因启动子总 MTI 与气虚证、血瘀证积分的 *Partial* 相关分析

	偏相关系数(<i>r</i>)	<i>P</i> 值
总 MTI 与气虚证积分	0.494	0.003
总 MTI 与血瘀证积分	0.419	0.014
气虚证与血瘀证积分	0.561	0.001

4 SLC6A2 基因启动子总 MIT 的相对危险度 (表 5) 心衰患者的多因素二项 *Logistic* 回归分析,二项为心衰组与老年组 2 个组别,以老年组为参照系,以是否有心衰为因变量,以性别、年龄、BMI、吸烟、饮酒、TG、TC、HDL-C、LDL-C、FPG、CCr、URIC、SLC6A2 基因启动子总 MTI 为自变量,调整各种混杂因素后,SLC6A2 基因启动子总 MTI 的 *OR* 值为 1.038 (95%CI:1.006~1.071, *P*=0.020)。

表 5 心衰患者多因素二项 *Logistic* 回归分析

项目	<i>B</i>	<i>Wald</i>	<i>P</i> 值	<i>OR</i> 值	95% CI for Exp(<i>B</i>)	
					下限	上限
性别	-2.549	2.555	0.110	0.078	0.003	1.780
年龄	0.004	0.003	0.953	1.004	0.869	1.161
BMI	-0.086	0.129	0.719	0.917	0.574	1.468
吸烟	1.615	1.099	0.295	5.026	0.245	102.930
饮酒	0.861	0.188	0.665	2.365	0.048	116.226
TG	-3.681	3.089	0.079	0.025	0.000	1.529
TC	1.761	2.679	0.102	5.818	0.706	47.930
HDL-C	-5.629	4.961	0.026	0.004	0.000	0.509
LDL-C	-2.494	6.112	0.013	0.083	0.011	0.596
FPG	1.228	4.235	0.040	3.415	1.060	11.000
URIC	0.008	1.187	0.276	1.008	0.994	1.022
CCr	-0.040	1.844	0.174	0.961	0.908	1.018
总 MTI	0.037	5.422	0.020	1.038	1.006	1.071
常数项	-1.298	0.017	0.895	0.273	—	—

讨 论

NET 将神经元释放的去甲肾上腺素(NE)再摄取回到突触前膜中,对调控突触间隙中 NE 浓度、终止神经冲动信号、维持受体对神经递质的敏感性极为重要,对心血管系统功能起着重要的调节作用.NET 属于 Na^+ 、 Cl^- 依赖性转运蛋白家族成员^[7]。临床研究发现,心衰时心肌 NE 再摄取位点减少,摄取功能下降^[8]。如慢性心衰小鼠 NET 的 mRNA 和蛋白表达

均下调^[9]。心衰时 NET 异常表达可能与交感神经去神经、神经元表面表达降低、内化、转录后异常、氧化负荷增加、细胞因子对心脏交感神经的损伤作用有关,也可能与自身基因缺陷有关。各种原因导致的心脏交感神经及神经递质减少称为交感去神经,而心衰时则发生心脏交感去神经状态^[10,11]。

目前研究 DNA 甲基化影响心衰方法主要包括两个途径:一是探讨心衰与心肌细胞 DNA 甲基化程度的关联性;二是干预心衰 DNA 甲基化药物的研究。如 Movassagh M 等^[2]发现心衰晚期患者心肌细胞 DNA 甲基化与健康对照存在差异,并发现 *pecam1*、*arhgap24*、*amotl2* 等基因的不同甲基化状态影响基因表达,这些基因参与心肌细胞凋亡、钙离子通道信号传导、G 蛋白受体表达等过程。王建龙等^[12]也发现心衰时基因 *abca4* 和 *cd200* 的启动子区甲基化状态发生改变往往伴随着相关基因表达量的改变。申康均^[13]发现 BNP、心钠素 A 受体和细胞间黏附分子-1 基因甲基化异常情况与风湿性心脏病发展为心衰存在关联。另外,如 Kao YH 等^[14]发现 TNF- α 促使 SERCA2a 启动子区甲基化而抑制基因的表达,进而影响细胞内 Ca^{2+} 浓度稳定而促进心衰,而 TNF- α 所介导的高甲基化作用可以被甲基化抑制剂所拮抗。又如 Smyd2 通过调控 p53 基因启动子区甲基化,从而抑制氯化钴诱导的心肌细胞凋亡^[15]。特异 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷可一定程度逆转去甲肾上腺素诱导的心肌细胞 DNA 高甲基化^[16],也提示 DNA 高甲基化可能参与了心肌肥大的病理过程,去甲基化治疗可能为心衰和缺血性心脏病治疗提供新的途径。

关于 SLC6A2 基因甲基化与疾病的关联研究,既往多集中在精神性疾病如焦虑症、抑郁症、强迫症及儿童多动症等,如抑郁症和恐慌症的部分 SLC6A2 基因 CpG 位点的甲基化水平与某些生理指标间存在相关性,但整体甲基化的变化较小^[17]。至今唯一报道有 SLC6A2 基因外显子 9 第 237 位鸟嘌呤突变为胞嘧啶(G→C)的错义突变可引起先天性直立不耐受(idiopathic orthostatic intolerance, IOI)^[18],目前也证实 SLC6A2 启动子区甲基化异常下调了 NET 表达量,参与了 IOI 发病机制^[19]。染色体表观遗传修饰影响基因的表达,如 MeCP2 和 Smarca2 蛋白络合物与 SLC6A2 基因启动子非甲基化区域的分离可引起去极化皮质神经元的 NET 表达升高,说明这种机制参与了 SLC6A2 基因调节。

本研究观察到心衰患者 SLC6A2 基因启动子较

健康老年组甲基化率高,且随着年龄增大,甲基化程度也逐渐升高。该结果表明,SLC6A2 基因启动子甲基化率升高可能是心衰的危险因素,且甲基化程度越高,则心衰的气虚、血瘀证候越重,提示此区域甲基化异常可能影响 NET 蛋白表达,NET 密度下降,NE 再摄取活性下降,心肌间质 NE 浓度增高, β -肾上腺素受体密度下调,心功能下降,进而加剧心衰,也有可能为探索益气活血药物治疗心衰的机制提供新思路、新靶向。

参 考 文 献

- [1] Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(24): 11995-11999.
- [2] Movassagh M, Choy MK, Goddard M, et al. Differential DNA methylation correlates with differential expression of angiogenic factors in human heart failure[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8564.
- [3] Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society[J]. *Circulation*, 2005, 112(12): e154-e235.
- [4] Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation[J]. *Circulation*, 2009, 119(14): e391-e479.
- [5] AHA Medical/Scientific Statement. 1994 revisions to classification of functional capacity and objective assessment of patients with diseases of the heart[J]. *Circulation*, 1994, 90(1): 644-645.
- [6] 郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 79-80.
- [7] Schroeder C, Jordan J. Norepinephrine transporter function and human cardiovascular disease[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(11): H1273-H1282.
- [8] Bohm M, Rosee KL, Schwinger RH, et al. Evidence for a reduction of norepinephrine uptake sites in the failing human heart[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 25(1): 146-153.
- [9] Jin W, Qiao Z, Zheng C, et al. Protein interacting with kinase C α mediates the down-regulation of myocardial norepinephrine transporter expression in mice with adriamycin-induced congestive heart failure[J]. *Chin J Cardiovasc Dis*, 2014, 42(3): 219-224.
- [10] Joseph J, Gilbert EM. The sympathetic nervous system in chronic heart failure[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 1998, 41(Suppl): 9-16.
- [11] 梁栋, 刘旭东, 李贺. 去甲肾上腺素转运蛋白在心力衰竭中的作用[J]. *心血管病学进展*, 2006, 27(6): 793-797.
- [12] 王建龙, 李海涛, 苏丕雄, 等. 慢性心力衰竭患者全基因组的甲基化改变[J]. *首都医科大学学报*, 2012, 33(4): 12-16.
- [13] 申康均. 风湿性心脏病与 DNA 甲基化异常的相关实验研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [14] Kao YH, Chen YC, Cheng CC, et al. Tumor necrosis factor- α decreases sarcoplasmic reticulum Ca $^{2+}$ -ATPase expressions via the promoter methylation in cardiomyocytes[J]. *Crit Care Med*, 2010, 38(1): 217-222.
- [15] Sajjad A, Novoyatleva T, Vergarajaregui S, et al. Lysine methyltransferase Smyd2 suppresses p53-dependent cardiomyocyte apoptosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(11): 2556-2562.
- [16] Xiao D, Dasgupta C, Chen M, et al. Inhibition of DNA methylation reverses norepinephrine-induced cardiac hypertrophy in rats[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 101(3): 373-382.
- [17] Bayles R, Baker EK, Jowett JB, et al. Methylation of the SLC6a2 gene promoter in major depression and panic disorder[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83223.
- [18] Paczkowski F, Bönisch H, Bryan-Lluka LJ. Pharmacological properties of the naturally occurring Ala(457)Pro variant of the human norepinephrine transporter[J]. *Pharmacogenetics*, 2002, 12(2): 165-173.
- [19] Bayles R, Hari Krishnan KN, Lambert E, et al. Epigenetic modification of the norepinephrine transporter gene in postural tachycardia syndrome[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(8): 1910-1916.

(收稿: 2015-04-22 修回: 2015-07-22)