

冠心病血瘀证的DNA甲基化修饰与 磁场干预的相关性探讨

陈伶俐¹, 王建国¹, 李杰^{1*}, 简维雄¹, 向忠军², 黄海波³, 陈悦¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.长沙医学院,湖南长沙410219;

3.贵州职业技术学院,贵州铜仁554300)

[摘要] 基于甲基化的表观遗传学在阐明疾病基因和环境相互作用方面发挥重要作用。本文从对冠心病遗传基因甲基化和磁场干预研究、冠心病血瘀证的分子遗传学研究、磁场和中医证型的相关性研究等方面出发,探讨内外界环境磁场与冠心病血瘀证的表观遗传学之间的相关可能性机制。为从基因表达-内部表型-疾病模式-磁场干预的系统生物学角度出发进行个体化差异预防和治疗心血管疾病提供思路和方法。

[关键词] 冠心病;血瘀证;DNA甲基化;磁场

[中图分类号] R256.2

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.09.010

Investigating DNA methylation Modification and Magnetic Field Intervention of Coronary Heart Disease with Blood Stasis Syndrome

CHEN Lingli¹, WANG Jianguo¹, LI Jie^{1*}, JIAN Weixiong¹, XIANG Zhongjun², HUANG Haibo³, CHEN Yue¹

(1. Hunan University of Chinese medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Changsha Medical University, Changsha, Hunan 410219, China; 3. Guizhou Technical College, Tongren, Guizhou 554300, China)

[Abstract] Geneticist based on methylation plays an important role in elucidating disease gene and environment interaction. In this paper, we studied DNA methylation modification, magnetic field, molecular genetics and the relevance between TCM syndrome types and magnetic field intervention about the coronary heart disease (CHD) with blood stasis syndrome. To investigate the correlation between the internal and external magnetic field and the apparent genetic mechanism of CHD with blood stasis syndrome. It will provide thinking and methods for individual preventing and treating cardiovascular diseases from the view of systems biology including gene methylation-internal phenotype-patterns of disease-magnetic field intervention.

[Keywords] coronary heart disease; blood stasis syndrome; DNA methylation; magnetic field

临床研究发现,冠心病是由遗传因素和环境因素相互作用而引起的多基因异常的复杂性状疾病^[1-2]。而通过表观遗传学机制研究,就能充分阐释环境和基因的交互作用^[3]。

特别是DNA甲基化作为表观遗传修饰中最为重要的修饰形式之一,在心血管领域日益成为研究的焦点^[4]。研究发现,DNA甲基化能够调节特异性基

因的表达,引起动脉粥样硬化(AS),从而导致冠心病或冠心病血瘀证的发生^[5]。冠心病血瘀证患者因年老体衰或嗜食肥甘,导致痰浊内生,阻碍血行,形成血瘀,痰瘀互结于心脉,而致心脉痹阻。中医治疗一般采取化痰消瘀的治疗原则。

磁场作为外界环境广泛存在的重要组成部分,具有相对无创性和便捷性的特点,其作用于人体后

[收稿日期] 2016-05-06

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81373550,81202647);湖南省科技厅计划项目(2013RS4038);湖南省中医药科研计划项目(201427);国家重点学科中医诊断学开放基金项目(2014029)。

[作者简介] 陈伶俐,女,博士,副教授,研究方向:心病证候本质的研究。

[通讯作者] *李杰,男,博士,教授,E-mail:317768870@qq.com。

会使人体产生一系列变化。磁场作为简单无创的物理疗法用于临床治疗由来已久,在非侵入性物理疗法医学领域中有着巨大的应用潜力。研究发现利用磁场可以降低人体血液的粘度^[6]。通过合适的磁场强度和脉冲时间,就能控制红细胞聚集成链的大小,由此控制血液粘度。此机制正好与中医上述的治疗思维不谋而合。

因此,是否可以基于遗传和环境因素的表现遗传学角度出发研究冠心病血瘀证 DNA 甲基化调节机制;并利用表现遗传变化的可逆性,采用外界环境(磁场)干预手段,结合临床探讨磁场如何调控冠心病血瘀证的发生机制,以谋求在冠心病血瘀证病证结合诊断和治疗方面的理论和实践突破,对于冠心病中医药防治有着重要的现实意义。为此,可以从以下几个方面进行探讨。

1 心血管的 DNA 甲基化研究

目前 DNA 甲基化在心血管领域的研究仍处于探索阶段,现状主要包括:基因组 DNA 的异常甲基化水平(包括低甲基化和高甲基化),或多种因素如 MTHFR 基因 C677T 多态性等引起的高同型半胱氨酸(HHcy)血症,也可较早出现冠状动脉和其他动脉的粥样硬化病变^[7-10]。

相关候选或特异性基因的异常甲基化修饰也被证实和动脉粥样硬化的发病存在一定的联系。如雌激素受体(ER)基因,雄激素受体(AR)基因,细胞外超氧化物歧化酶(EC-SOD)基因,叉状头转录因子(FOXP3)基因,XV 型胶原 $\alpha 1$ (COL15A1)基因,成纤维细胞生长因子 2(FGF2)基因,p53 基因,MMP-9 基因,组织因子途径抑制物 2(TFPI-2)等基因^[11-13]。

Peng 等^[14]研究发现,ABCG1 和 GALNT2 基因启动子高甲基化状态与冠心病危险的增加明显相关,吸烟和年龄可以影响 DNA 甲基化水平。其他因素如高饱和胆固醇、脂蛋白等饮食营养成分和生活习惯、大气污染等环境因素影响,将是有关 AS 研究的新方向^[15]。以上这些因素通过引起 DNA 甲基化修饰的改变,而改变某些基因的表达。

2 心血管的磁场干预作用研究

国内外磁场对心血管系统影响研究主要有包括对心脏功能、血管内皮细胞、平滑肌细胞、细胞因子等方面研究。特别是在磁场频率接近机体正常功能活动的频率而发挥其有效作用的脉冲磁场方面研究较多,如研究报道,脉冲磁场通过促进内皮细胞成纤维细胞生长因子(FGF)的分泌,从而促进内皮细胞修

复,提示脉冲磁场对血管形成具有促进作用,在促进血管生化方面具有一定的应用潜力^[16]。罗海燕等^[17]发现低频脉冲磁场能促进大鼠心肌微血管内皮细胞增殖和增强细胞活力,下调缝隙连接蛋白 43(Cx43)表达,其在分子水平上的可能作用机制表现为对 Cx43 的有效调控。Brunella 等^[18-19]发现低频磁场作用于人体后,通过发挥降血脂、改善微循环、防治动脉粥样硬化等作用,对心血管机能产生明显的调节作用,从而达到对高血压和冠心病等心血管疾病的治疗作用。虽然磁场作用于细胞的生物学效应与作用强度以及作用频率有着密切的关系,但目前在这方面尚无统一的参考标准。

3 冠心病血瘀证的分子遗传学研究

目前国内对冠心病血瘀证病因和病机等方面,已经进行了深入的客观化研究,主要方面有血管与血管内皮相关、血液指标的客观化、其他方面客观指标研究、冠心病血瘀证的基因组学等分子生物学方面的研究。特别是基因组学研究,把基因组学不断融入中医学;如王阶等^[20]通过筛查冠心病血瘀证病证结合的相关基因,发现相关基因能从不同途径参与动脉硬化和内皮损伤的形成。杨杰等^[21]通过对冠心病血瘀证患者治疗前后芯片对比发现:冠心病血瘀证与凝血、血流异常相关基因的相关性可能是活血化瘀中药的重要分子靶点。张娅等^[22]对 PCI 术后研究发现 CYP2C19*2 基因突变患者可能易患重度血瘀证。这些研究提示在治疗时,可以根据基因和基因功能表达谱,采取宏观辨证与微观辨证相结合,更能针对性地对患者进行个体化治疗和对易感人群的预防。

课题组在冠心病血瘀证的遗传易感基因方面已完成了多项研究^[23-30];袁肇凯教授运用家系分析法发现:心血瘀阻证可能是一种具有遗传倾向的“多基因证”^[30]。ACE 基因 I/D 多态、FVII 基因 M1/M2 多态性是冠心病血瘀证的发病危险因素之一^[23-24];ApoE 基因多态性是湖南汉族人群冠心病血瘀证的遗传易感基因。基因芯片研究发现冠心病血瘀证的差异基因表达主要涉及到基质金属蛋白酶 MMP 系、细胞色素氧化酶 P450(CYP)系、白介素细胞因子等基因的改变^[28]。差异基因的甲基化表达谱芯片研究发现:ER- β 、CHL1、ZEB2 等 8 个基因的启动子区甲基化状态冠心病血瘀证与健康人比较有统计意义^[30-33]。

目前我国尚未研制出成熟的去甲基化药物并且药物细胞毒性较大,因而通过对甲基化修饰的调控来拮抗冠心病及血瘀证的进一步发展的中药研究更

加成为研究者关注的焦点。有学者通过中药血府逐瘀胶囊和四季三黄胶囊联合作用发现可使整个基因组甲基化水平增加而降低机体内三酰甘油的含量,增加动脉内斑块的稳定性,但对AS发生的作用还待进一步确定^[34]。李楠等^[35]发现复方中药对ACS痰浊血瘀证患者MMP-9基因与ER基因甲基化水平的双向调节可能是其发挥临床效用的机制之一。程修平等^[36]用稳斑汤辅助西医治疗可显著降低ACS痰浊血瘀证患者中医证候积分,临床疗效优于单纯西医治疗,其作用机制可能与降低患者TM基因启动子甲基化水平有关。

以上可以看出中医对冠心病证候本质研究在DNA甲基化方面逐步深入,特别是分子网络和中药作用研究有了新的进展,但尚未完全阐明冠心病血瘀证候的分子生物学本质。冠心病血瘀证这些遗传基因的表达是否受到其他环境因素的影响和调控,影响到血瘀证的发生和发展?改变环境因素是否会对血瘀证型的改变造成影响?值得进一步探讨。

4 磁场和中医的相关性研究

中医理论在两千多年前就提出“天人合一”的整体观念,强调人体内外环境的整体统一性;在诊断和治疗疾病方面提出“三因”制宜,即因人、因时、因地制宜,强调环境因素的重要性。作为构成环境重要因素的磁场,在两千多年前就已记载将磁疗应用于中医诊疗。因此,磁场与中医理论关系源远流长。应该说,中医学最早记录了医学物理学的一个重要分支—磁医学。

现代研究中,陶必修^[37]提出从量子力学和电动力学等现代科学的观点出发,论证人体腧穴的非稳态电磁场,对中医人体经络理论进行研究。韩金祥^[38]通过比较气与电磁辐射场的特征,提出中医人体之气的物质基础是机体辐射电磁(量子)场。

董天朗等^[39]提出将中医的经络学、磁石治病和现代医学、现代物理学相结合发展现代磁场疗法,同时发现特殊地域磁场(地域磁医学)对养生保健和疾病治疗有益。陈锐等^[40]应用磁圆针(经穴磁导疗法)治疗高脂血症技术列入中医社区适宜推广技术;任超学等^[41]将手法与磁场治疗腰肌劳损疗效观察,和中医理论相结合,对于指导中西医临床实践都具有很重要的指导和应用价值。张建勇等^[42]发现复方黄柏液联合低频电磁场能明显促进血清缺氧诱导因子-1 α 、血管内皮细胞生长因子及金属蛋白酶抑制物-1生成,抑制血清金属蛋白酶-9生成、促进缺血性足溃疡愈合。

但目前磁场理论关于磁场环境的干预与冠心病等心血管疾病中医证型变化研究较少;在其作用过程中其遗传基因的甲基化等表观遗传学是否发生差异改变?外界磁场和人体磁场强度、频率与作用时间对心血管疾病治疗的最佳有利组合是什么?长期临床安全性如何等等,都还有待后续的研究。

5 前景与展望

表观遗传学的研究思路和相关技术从微观角度解释中医证候、中药的作用机制等方面逐渐应用于中医药研究中。正因为中医的“证候”是内外环境与人体相互影响的阶段性病理概括,现代医学未能合理解释“证候”机体功能改变。因此,表观遗传学的“微观”概念或将成为中医证候的研究切入点^[43]。

许多表观遗传修饰的改变是可逆的,这种可逆性修饰为疾病的治疗和预防提供了乐观的前景。同时,也从另一个角度为基础研究及研发相关外界环境如磁场干预提供了新思路^[44]。因此,是否可以利用表观遗传变化的可逆性,采用磁场干预和中药手段,以DNA甲基化修饰的表观遗传调控作为研究方向或治疗调控靶点?可能成为中医证候研究的一个新的突破点。

总之,中医药表观遗传学不但在阐述证候与相关DNA甲基化的关系,而且在验证外界环境中中药干预可以逆转DNA异常甲基化方面已有所作为。鉴于磁疗“简、效、便、廉”和中医药类似的效果及其在中国学应用的悠久历史,可以利用现代高科技的磁性材料或脉冲磁场,在中医经络理论的指导下,通过磁场干预中医证型及表观遗传学的机制研究,实现延缓或阻止冠心病及血瘀证的早期发生或发展,将为中医药预防诊断和治疗冠心病提供重要的理论和依据。

参考文献:

- [1] 葛均波,徐永健.内科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2014:227.
- [2] Abu-Amro KK, Wyngaard CA, Al-Boudari OM, et al. lack of association of lipoprotein lipase gene polymorphisms with coronary artery disease in the Saudi Arab population[J]. Arch Pathol Lab Med, 2003, 127(5): 597-600.
- [3] 王萍,杨海燕,王丽萍,等.从表观遗传学开展复杂性疾病证候本质的研究[J].中华中医药杂志,2011,26(5):1208-1210.
- [4] 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.
- [5] Tang MS, Huang CT, Xiang ZJ, et al. Research into relationship between estrogen receptor gene β promoter region methylation

- status and blood stasis syndrome of premature coronary heart disease [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2015, 30(5): 6-8.
- [6] Tao RJ, Huang K. Reducing blood viscosity with magnetic fields [J]. *Physical Review E*.2011,84(1 Pt 1):1-5.
- [7] Kim M, Long TI, Arakawa K, et al. DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk [J]. *PLoS One*. 2010, 5(3): e9692.
- [8] Fan FF, Huo Y, Wang X, et al. Effect of enalapril on plasma homocysteine levels in patients with essential hypertension[J]. *Zhejiang Univ Sci B*, 2010, 11(8): 583-591.
- [9] 赖伟华,潘伟祥,冯颖青,等.MeDIP-Seq 法检测冠心病患者全基因组甲基化谱[J].*中国药房*,2015,26(35):4938-4941.
- [10] 付龙,孙溢晗,张月兰.MTHFR 基因 C677T 多态性与 H 型高血压合并冠心病患者 HCY、冠状动脉病变的关系[J]. *中国医科大学学报*,2015,44(4):351-356.
- [11] 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.
- [12] Connelly JJ, Cherepanova OA, Doss JF, et al. Epigenetic regulation of COL15A1 in smooth muscle cell replicative aging and atherosclerosis[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(25): 5107-5120.
- [13] Yang TC, Chen YJ, Chang SF, et al. Malondialdehyde mediates oxidized LDL-induced coronary toxicity through the Akt-FGF2 pathway via DNA methylation[J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21:11.
- [14] 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.
- [15] Napoli C, Crudele V, Soricelli A, et al. Primary prevention of atherosclerosis: a clinical challenge for the reversal of epigenetic mechanisms[J]. *Circulation*, 2012, 125(19): 2363-2373.
- [16] 刘楠,李飞,王海昌.低频脉冲磁场对大鼠心肌微血管内皮细胞迁移和 NO 分泌能力的影响[J].*现代生物医学进展*,2010,10(6): 1027-1029.
- [17] 罗海燕,郑昭芬.低频脉冲磁场能促进大鼠心肌微血管内皮细胞增殖和缝隙连接蛋白 43 表达的影响 [J]. *中国老年病学杂志*, 2013,33(22):5673-5675.
- [18] Brunella DR, Pamela M, Entele G, et al. Assessing LINE-1 retrotransposition activity in neuroblastoma cells exposed to extremely low-frequency pulsed magnetic fields[J]. *Mutation Res/Genetic Toxicol Environ Mutagen*, 2012, 749(1): 76-81.
- [19] Jacques V, Hynek B. Does magnetoreception mediate biological effects of power-frequency magnetic fields [J]. *Sci Total Environ*, 2012, 417(15): 299-304.
- [20] 王阶,杨保林,姜燕.冠心病血瘀证相关基因研究[J].*世界科学技术-中医药现代化*,2005,7(1):17-19.
- [21] 杨杰,王米渠,杜英杰,等.活血化瘀中药治疗冠心病血瘀证个案疗效评价及与凝血、血流异常相关基因的相关性[J].*中国中医药信息杂志*,2011,18(11):18-19.
- [22] 张娅,陈慧,李灿东,等.重度血瘀证与血浆遗传性假血友病因子水平及 CYP2C19*2 基因多态性的关系 [J]. *中医杂志*, 2011,52(11):826-831.
- [23] 李杰,袁肇凯,黄献平,等.湖南汉族人群 ACE I/D 基因多态性与冠心病血瘀证的遗传流行病学研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2007, 5(9):787-789.
- [24] 李杰,袁肇凯,黄献平,等.湖南汉族人群 FVII 基因 M1/M2 多态性与冠心病血瘀证的遗传流行病学研究 [J]. *中国中医急症*,2009,18(2):253-255.
- [25] 唐梅森,黄政德,瞿岳云,等.雌激素受体基因多态性与早发冠心病血瘀证相关性及中药的干预作用[J].*中国中医急症*,2014,23(2):314-316.
- [26] 王丽萍,袁肇凯,黄献平,等.冠心病血瘀证体质的遗传流行病学研究[J].*中国中医基础医学杂志*,2013,19(9):852-855.
- [27] 李杰,陈伶俐,袁肇凯,等.基于亚健康状态的早发冠心病危险因素探讨[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2013,11(7):857-858.
- [28] 胡志希,胡思远,李琳,等.血管紧张素转换酶基因多态性对早发冠心病血瘀证的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2013,11(5):515-518.
- [29] 李琳,胡志希,李杰,等.冠心病及其血瘀证遗传学研究进展 [J].*湖南中医药大学学报*,2013,33(11):101-103.
- [30] 袁肇凯,王丽萍,黄献平,等.冠心病血瘀证遗传相关的差异基因筛选及其功能路径分析 [J]. *中国中西医结合杂志*,2012,32(10): 1313-1318.
- [31] 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].长沙:湖南中医药大学,2015.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 赵伟峰,周明学,王绿娅,等.活血解毒中药对动脉粥样硬化小鼠斑块稳定性、血脂及 DNA 甲基化水平的影响[J].*北京中医药*, 2014,33(3):215-218.
- [35] 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.
- [36] 程修平,宫丽鸿,李楠,等.稳斑汤辅助治疗对急性冠状动脉综合征痰浊血瘀证患者血浆血栓调节蛋白基因启动子甲基化的影响[J].*中医杂志*,2016,57(2):140-144.
- [37] 陶必修.人体经络和人体谐振腔[J].*贵州科学*,2013,31(1):39-44.
- [38] 韩金祥.试探中医基础理论现代化[J].*中国医学创新*,2011,8(2): 184-189.
- [39] 董天朗,张沪生,丁来标,等.地域磁医学和东方传统医学相结合在养生中创造奇迹[C].第二届世界养生大会论文集,2002.
- [40] 陈锐.磁圆针(经穴磁导疗法)治疗高脂血症技术[J].*中国社区医师*,2014,30(1):33.
- [41] 任超学,强大平,桑锰钢.手法与磁场治疗腰肌劳损疗效观察[J].*陕西中医*,2014,35(9):1182-1184.
- [42] 张建勇,彭辉,胡翠芬.复方黄柏液联合低频电磁场促进缺血性足溃疡愈合作用的实验研究[J].*新疆中医药*,2015,33(6):72-74.
- [43] 李琦,蔡大可.表观遗传学在中医药研究中的应用进展[J].*广东医学*,2014,35(23):3762-3765.
- [44] 辛卫云,白明,苗明三.基于表观遗传学的中医药现代研究思考[J].*中华中医药学刊*,2016,34(1):94-97.