

·综述·

本文引用:陈悦,李杰,陈伶俐,王建国,吴航宇,高玉萍,曾雪芹,张湘卓,周俊鹏.冠心病血瘀证与DNA甲基化/羟甲基化关系及研究进展[J].湖南中医药大学学报,2018,38(9):1077-1081.

冠心病血瘀证与DNA甲基化/羟甲基化关系及研究进展

陈悦,李杰*,陈伶俐*,王建国,吴航宇,高玉萍,曾雪芹,张湘卓,周俊鹏
(湖南中医药大学,湖南长沙410208)

[摘要] 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,血瘀证是其常见证型之一。随着冠心病表观遗传学的研究发展,DNA甲基化和去甲基化作为表观遗传中重要的修饰形式之一,二者参与了多种疾病的病理生理改变,已有研究表明表观遗传学中DNA甲基化修饰与癌症、动脉粥样硬化疾病的发生发展密切相关。而DNA羟甲基化修饰作为DNA去甲基化修饰的关键中间环节也同时参与了基因的表达调控,与癌症和精神性疾病的发生有紧密联系。本团队前期研究表明:DNA甲基化修饰是冠心病血瘀证的发病机制之一,基于DNA甲基化与羟甲基化之间相互转化的关系,本文推测DNA羟甲基化修饰也与心血管疾病密切相关;冠心病血瘀证的发生和发展可能与5-甲基胞嘧啶和5-羟甲基胞嘧啶之间的转化有紧密联系。

[关键词] 冠心病;血瘀证;DNA羟甲基化;DNA甲基化

[中图分类号]R259 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.09.025

Association Between Coronary Heart Disease with Blood Stasis Syndrome and DNA Methylation / Hydroxymethylation and Related Research Advances

CHEN Yue, LI Jie*, CHEN Lingli*, WANG Jianguo, WU Hangyu, GAO Yuping, ZENG Xueqin,
ZHANG Xiangzhuo, ZHOU Junpeng
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] Coronary heart disease (CHD) is a complex disease with polygenic abnormalities caused by the interaction between genetic and environmental factors, and blood stasis syndrome is one of the most common syndromes of CHD. With the development of epigenetics of CHD, DNA methylation and demethylation are one of the important forms of modification in epigenetics and are involved in the pathophysiological changes of many diseases. Some studies have shown that DNA methylation in epigenetics is closely associated with the development and progression of cancer and atherosclerosis. As a key intermediate link of DNA demethylation, DNA hydroxymethylation is also involved in gene expression regulation and is closely associated with the development of cancer and mental diseases. The previous studies of our team have shown that DNA methylation is one of the pathogenesises of CHD with blood stasis syndrome. Based on the mutual transformation between DNA methylation and hydroxymethylation, DNA hydroxymethylation may also be closely associated with cardiovascular diseases; the development and progression of CHD with blood stasis syndrome may be closely associated with the transformation between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine.

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

[收稿日期]2018-03-29

[基金项目]国家自然科学基金项目(81673963);湖南省教育厅重点项目(16A160);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);湖南省中药粉体与创新药物研究省部共建国家重点实验室基地开放基金。

[作者简介]陈悦,女,在读硕士研究生,研究方向:心病证候本质研究。

[通讯作者]*李杰,男,博士,教授,E-mail:317768870@qq.com;*陈伶俐,女,博士,教授,E-mail:linglichen02@sina.com。

冠心病(coronary heart disease, CHD)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,家族和遗传因素在其发生发展中起到重要的作用^[1-3]。随着冠心病表观遗传学的研究发展,DNA甲基化和去甲基化作为表观遗传中重要的修饰形式之一,二者参与了多种疾病的病理生理改变,在心血管领域日益成为研究的焦点^[4-6]。因DNA甲基化中的修饰碱基5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine,5mC)易被10-11易位家族蛋白(ten-eleven translocation,TET)氧化形成5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine,5hmC)^[7],此过程又称为羟甲基化修饰,而DNA羟甲基化与甲基化相比有不同的功能:DNA羟甲基化不止是一种中间状态,它还能重新激活被抑制表达的基因。人基因组CpG岛甲基化与基因表达较低有关,而基因内部羟甲基化则与基因表达较高有关^[8]。羟甲基化修饰尽管在1952年就被发现存在于噬菌体DNA中^[9],但直到近几年才逐渐得到重视^[10]。本文将论述冠心病血瘀证与DNA甲基化/羟甲基化关系及研究进展。

1 DNA甲基化的研究近况

近年来,DNA甲基化是研究的热点。在人的发育过程中,DNA甲基化在基因组中的变化是一个动态过程的结果,涉及到DNA的去甲基化^[11]。DNA甲基化是指S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine,SAM)上的甲基在DNA甲基转移酶(DNA methyl transferase,DNMT)的催化下,与胞嘧啶的C5位结合形成5-甲基胞嘧啶(5 mC)的化学修饰过程^[12]。DNA甲基转移酶(如DNMTs)与DNA去甲基化酶(如TET蛋白等)可调控基因组DNA序列甲基化的动态变化。一般来说,基因启动子区CpG岛的甲基化可以使一些转录因子无法与DNA结合而抑制基因的转录,而该区域的去甲基化则可以激活基因的转录^[13]。DNA甲基化主要发生在CpG异二核苷酸上,在人类基因组中出现的几率较低,主要集中出现在CpG岛上。CpG岛是指由200 bp的碱基组成的DNA序列中GC含量占60%以上的一个区域,这个区域主要位于某些基因的启动子区。CpG岛上DNA的甲基化是表观遗传学研究中的一个重点,其可改变染色体的结构、影响邻近基因的表达。高度甲基化的

DNA与组蛋白结合紧密,能够促进转录抑制因子、抑制转录激活因子与启动子区域的结合,从而达到抑制基因表达的目的;而DNA的低甲基化使得染色体结构松散,促进转录激活因子和RNA多聚酶与靶序列的结合,从而促使相关基因的高表达。如卵巢癌的研究表明^[14],26个与卵巢癌多药耐药调控显著相关的DNA甲基化基因中,至少一半以上的DNA甲基化基因直接或间接地通过调控细胞凋亡信号通路响应耐药调控。作为癌症发生的早期事件,DNA甲基化检测可以在宫颈癌前病变阶段做出分子学诊断,分流亟需临床干预措施的人群,为宫颈癌的筛查和早诊早治提供新的方法^[15]。在大肠癌、胃癌组织中,miR-375基因DNA甲基化阳性率与PDK1蛋白表达强度呈正性相关关系,miR-375基因可能通过作用于3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK1)蛋白从而发挥抑癌基因作用^[16]。DNA甲基化与口腔鳞状细胞癌、肾透明细胞癌也具有明显相关性^[17-18]。由此可知,DNA甲基化是肿瘤抑制基因功能失活和转录抑制的关键机制之一,且在某些情况下可能是唯一的机制^[15]。在心血管疾病中,动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是冠心病的始动病因。有研究表明^[19-20],DNA的异常甲基化与AS的发生密切相关。DNA甲基化在AS的早期病变起到一定作用,它与影响AS的危险因素具有一定相关性^[21-22]。Zhuang等^[23]学者表明,DNA甲基化的阴阳动力学是平滑肌细胞表型转换和血管重塑的关键调节器。因此,AS的形成是多个基因甲基化以及不同基因不同甲基化水平联合作用的结果^[24],可以认为,在癌症和AS疾病中,异常DNA甲基化状态可能是此类疾病明确发生的前奏^[25]。

2 DNA甲基化是羟甲基化的研究基础

在研究DNA甲基化的同时,DNA羟甲基化的研究也逐渐开始。由于DNA甲基化中的修饰碱基5-甲基胞嘧啶(5 mC)易被10~11易位(TET)家族的酶氧化而形成的5-羟甲基胞嘧啶(5 hmC),这一过程称为DNA羟甲基化,而5 hmC作为新发现的一种的修饰碱基,也称为第六个碱基,以低水平存在于哺乳动物的多种细胞类型中^[26],在基因的打开和关闭中起着重要的作用。5 mC修饰和5 hmC修饰

都与基因表达密切相关^[8]。但它们有不同的功能,CpG岛5 mC修饰可抑制基因表达,且基因量较少^[27],而在胸腺嘧啶DNA糖基化酶(thymine DNA glycosylase, TDG)和去甲基酶(demethylase)的共同作用下,5 hmC可进一步通过碱基切除修复继而逆转5 mC修饰,因此5 hmC是DNA去甲基化修饰的关键中间环节^[28-29]。可以认为,DNA甲基化与DNA羟甲基化之间相互转化的过程,可作为DNA羟甲基化的研究基础。

3 DNA羟甲基化的研究近况

最近的羟甲基化研究主要集中在癌症和精神性疾病^[12],5 mC氧化为5 hmC可能是几种活性DNA去甲基化途径中的一步,也可能对癌症的发生和发展起重要作用^[30]。研究表明,在器官成熟和药物诱导反应过程中,5 hmC分析可以作为细胞状态的指标,并为非基因毒性致癌物暴露提供了新的表观遗传特征^[31];而甲基化和羟甲基化标记的动态富集模式,可能使我们能够识别与前列腺癌发生有关的不同表观遗传修饰的靶基因^[32]。通过综合分析肿瘤和正常组织中的总DNA甲基化和羟甲基化情况,可筛选出结肠癌相关基因^[33]。对精神分裂症的研究发现,启动子近端CpG岛在DNA甲基化和DNA羟甲基化修饰之间是处于动态平衡的^[34],而5 mC和5 hmC的改变也与阿尔默茨病的发生密切相关^[35]。也有研究显示TET2的突变可引起血管平滑肌细胞分化,进而向动脉内膜转移并分泌细胞外基质,从而启动AS的进程^[36]。Peng等^[37]发现TET2介导5 mC转化5 hmC,TET2的缺失与晚期AS病变有关。由此可知,5 hmC通过改变DNA甲基化状态来阻止抑制基因和凋亡基因失活,5 hmC水平的降低使得基因缺乏保护导致肿瘤发生,这同样对心脑血管疾病有着提示作用。

4 冠心病血瘀证的遗传研究进展

血瘀证是中医理论传统证候的重要组成部分,是中医临床各科常见的一种证候,也是CHD最常见的证型之一^[38-39]。在中医药现代化的进程中,近年来大量研究从表观遗传学水平来探讨CHD血瘀证的证候实质,主要涉及DNA甲基化修饰、非编码RNA(ncRNA)调控、组蛋白修饰和DNA羟甲基化等层面,这为研究中医学证候本质提供了新的思路与方法,

已成为目前研究的热点^[38,40]。当前国内对CHD血瘀证病因和病机等方面,已经进行了深入的客观化研究^[41],主要方面有:血管与血管内皮相关的研究;血液指标的客观化研究;其他方面客观指标研究;CHD血瘀证的基因组学等分子生物学方面的研究。特别是随着基因组学研究的迅猛发展,把基因组学融入中医学在不断深入。如陈光等^[42]发现:单核苷酸多态性(SNP)与血瘀证相关性的研究,应结合血瘀证形成的相关机制探讨,如找出与血液高凝状态、血栓形成、血小板活化和黏附聚集等相关基因来进一步探讨调节通路的上下游关系;而血瘀证基因表达谱可以描绘特定细胞或组织在特定状态下的基因表达种类和丰度信息。宋曙霞等^[43]研究发现,CHD血瘀证患者的严重程度与ACE基因D型及I/D型呈正相关性,揭示了CHD血瘀证血管病变支数与ACE基因多态性存在一定的关系。郭环宇等^[44]研究表明,老年CHD气虚血瘀证患者PCI术后存在血管内皮损伤及血小板活化,气虚血瘀证和CYP2C19*2基因型突变有关,且这种表现在女性患者中更有意义。这些研究逐步揭示证的生物学物质基础,有助于提高中医辨证的准确性,有助于“治未病”。也有学者研究发现^[45],甲基双加氧酶TET2在参与5 mC和5 hmC之间的转化、DNA的修复、基因组的稳定方面起着重要作用,TET2可能是AS的理想的表现遗传学生物标记物以及防治的靶点。随着检测技术的改进,5 hmC有望成为新的用于疾病早期诊断的表观遗传标志^[46]。

5 冠心病血瘀证与DNA羟甲基化的相关性

目前,国内外并无对CHD血瘀证与DNA羟甲基化修饰之间相关性的研究。

但本团队前期对DNA甲基化的研究表明:DES、CTNNB1、ZEB2、CHL1、ER- α 、GP6、AGTRAP的DNA甲基化修饰可能是CHD血瘀证的易感危险因素,其中DES、ZEB2、ER- α 、GP6、AGTRAP基因的甲基化修饰是CHD血瘀证的发病机制之一,可能导致了CHD血瘀证的发生和发展^[47-49]。结合当前对DNA甲基化修饰与癌症、AS等疾病的相关性研究,以及DNA羟甲基化对DNA甲基化和去甲基化的转化作用,可推测DNA羟甲基化修饰也与心血管疾病密切

相关;CHD血瘀证的发生和发展可能与5mC和5hmC之间的转化有紧密联系。

由于CHD是多因素疾病,发病机制十分复杂。目前的研究针对单一因素的表达及其调控研究(如单个基因的DNA甲基化研究)较多,而对单个基因的羟甲基化研究或多基因的甲基化/羟甲基化研究较少,难以从表观遗传学内环境角度来阐释CHD血瘀证的发生和发展。那么,当前对CHD血瘀证与DNA甲基化和羟甲基化之间的转化关系是否具有相关性的研究思路将为我们今后的研究提供一定方向。

参考文献:

- [1] ALBUS C, BARKHAUSEN J, FLECK E, et al. The diagnosis of chronic coronary heart disease.[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2017,114(42):712-719.
- [2] 胡鸣颖,徐耕.冠心病遗传变异研究方法的进展[J].*心脑血管病防*,2015,15(5):401-405.
- [3] 陈伶俐,王建国,李杰,等.冠心病血瘀证的DNA甲基化修饰与磁场干预的相关探讨[J].*湖南中医药大学学报*,2016,36(9):40-43.
- [4] 韩忠丽,杨晓敏,樊晓寒.DNA甲基化与心血管疾病研究进展[J].*中国分子心脏病学杂志*,2016,16(4):1797-1800.
- [5] 汤海渝,李牧蔚.心血管疾病与表观遗传学研究进展[J].*中华实用诊断与治疗杂志*,2016,30(5):426-428.
- [6] 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.
- [7] 葛苗苗,蔡春.表观遗传新标志物5hmC的研究进展[J].*生物化学与生物物理进展*,2014,41(9):839-850.
- [8] KATO T, IWAMOTO K. Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders[J]. *Neuropharmacology*, 2014,80(5):133-139.
- [9] WYATT G R, COHEN S S. A new pyrimidine base from bacteriophage nucleic acids[J]. *Nature*, 1952,170(4338):1072-1073.
- [10] DAHL C, GRONBAEK K, GULDBERG P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2011,412(11-12):831-836.
- [11] MOORE L D, LE T, FAN G. DNA methylation and its basic function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1):23-38.
- [12] 汤琳琳,麦一峰,段世伟.DNA羟甲基化与表观遗传学调控[J].*中国生物化学与分子生物学报*,2014,30(11):1084-1091.
- [13] 张铁群.系统性红斑狼疮CD4⁺T细胞全基因组DNA羟甲基化研究[D].长沙:中南大学,2013.
- [14] 闫冰冰,李力.DNA甲基化与卵巢癌多药耐药及预后的关系[J].*中国肿瘤生物治疗杂志*,2015,22(3):281-289.
- [15] 殷爱军.DNA甲基化检测在宫颈癌筛查中的应用[D].济南:山东大学,2016.
- [16] 董倩倩.胃肠癌组织中microRNA-375基因DNA甲基化与PDK1表达研究[D].沈阳:辽宁医学院,2013.
- [17] 涂敏松,李逸松,代晓明.DNA甲基化与口腔鳞状细胞癌的相关性研究进展[J].*国际口腔医学杂志*,2016,43(1):79-84.
- [18] 顾殿敏.肾透明细胞癌启动子区域DNA甲基化研究[D].南宁:广西医科大学,2016.
- [19] 刘访遥,雷长城,唐娟.吸烟、F2RL3基因甲基化与稳定性冠状动脉粥样硬化性心脏病预后的关系[J].*中国现代医学杂志*,2018,28(1):92-98.
- [20] 陈晓颖,叶华丹,洪青晓,等.DNA甲基化修饰对血管疾病稳态失衡的影响[J].*遗传*,2015,37(3):221-232.
- [21] ZAINA S, LUND G. Connecting the Dots Between Fatty Acids, Mitochondrial Function, and DNA Methylation in Atherosclerosis[J]. *Current Atherosclerosis Reports*, 2017, 19(9):36.
- [22] FERNÁNDEZ-SANLÉS A, SAYOLS-BAIXERAS S, SUBIRANA I, et al. Association between DNA methylation and coronary heart disease or other atherosclerotic events: A systematic review[J]. *Atherosclerosis*, 2017,263:325-333.
- [23] ZHANG J, LUAN P, LI H, et al. The Yin-Yang Dynamics of DNA Methylation Is the Key Regulator for Smooth Muscle Cell Phenotype Switch and Vascular Remodeling[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2017,37(1):84-97.
- [24] 陈婕,王肖龙.DNA甲基化对动脉粥样硬化影响的研究进展[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2015,13(10):1177-1179.
- [25] 李建涛,荆晶,陈韵岱.心血管疾病与DNA甲基化关系研究进展[J].*解放军医学院学报*,2015,36(7):748-750,754.
- [26] 王学静,黄庆,黄君富,等.表观遗传学新视点——DNA羟甲基化[J].*生命科学*,2012,24(6):521-525.
- [27] WANG T, PAN Q, LIN L, et al. Genome-wide DNA hydroxymethylation changes are associated with neurodevelopmental genes in the developing human cerebellum[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(26): 5500-5510.
- [28] KOLENDOWSKI B, HASSAN H, KRSTIC M, et al. Genome-wide analysis reveals a role for TDG in estrogen receptor-mediated enhancer RNA transcription and 3-dimensional reorganization[J]. *Epigenetics & Chromatin*, 2018, 11(1):5.
- [29] CHENG Y W, CHOU C J, YANG P M. Ten-eleven translocation 1 (TET1) gene is a potential target of miR-21-5p in human colorectal cancer[J]. *Surgical Oncology*, 2018,27(1):76-81.
- [30] CHIAPPINELLI K B, STONE M L, TOPPER M J, et al. Abstract 4019: Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer cells via endogenous retroviruses and recruits immune cells to the tumor microenvironment to sensitize to immune therapy[J]. *Cancer Research*, 2016, 76(14):4019.

- [31] THOMSON J P, HUNTER J M, LEMPIÄINEN H, et al. Dynamic changes in 5-hydroxymethylation signatures underpin early and late events in drug exposed liver[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013,41(11):5639.
- [32] KAMDAR S N, HO L T, KRON K J, et al. Dynamic interplay between locus-specific DNA methylation and hydroxymethylation regulates distinct biological pathways in prostate carcinogenesis [J]. *Clinical Epigenetics*, 2016,8(1):32.
- [33] LI M, GAO F, XIA Y, et al. Filtrating colorectal cancer associated genes by integrated analyses of global DNA methylation and hydroxymethylation in cancer and normal tissue [J]. *Scientific Reports*, 2016(6):31826.
- [34] GRAYSON D R, GUIDOTTI A. The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013,38(1):138-166.
- [35] VAN D L, CHOULIARAS L, RUTTEN B P. The role of 5-hydroxymethylcytosine in aging and Alzheimer's disease: current status and prospects for future studies [J]. *Current Alzheimer Research*, 2012,9(5):545-549.
- [36] LIU R, JIN Y, TANG W H, et al. Ten-eleven translocation-2 (TET2) is a master regulator of smooth muscle cell plasticity[J]. *Circulation*, 2013,128(18):2047-2057.
- [37] PENG J, YANG Q, LI A, et al. Tet methylcytosine dioxygenase 2 inhibits atherosclerosis via upregulation of autophagy in ApoE^{-/-} mice[J]. *Oncotarget*, 2016,7(47):76423-76436.
- [38] 陈光,高嘉良,刘咏梅,等.冠心病血瘀证表观遗传学研究进展[J].*中国中医基础医学杂志*,2017,23(9):1336-1339.
- [39] 李杰,袁肇凯.冠心病血瘀证的病机研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2006,4(7):613-614.
- [40] 李琳,李杰,胡志希,等.早发冠心病血瘀证与血管紧张素转化酶基因单核苷酸多态性的相关性研究[J].*中国中西医结合杂志*,2015,35(6):686-690.
- [41] 陈伶俐,李杰,袁肇凯,等.早发冠心病血瘀证的分子生物学研究现状和探讨[J].*岭南心血管病杂志*,2011,17(S1):55-56.
- [42] 陈光,王阶,高嘉良,等.冠状动脉粥样硬化性心脏病血瘀证基因组学研究进展[J].*国际心血管病杂志*,2016,43(2):72-74.
- [43] 宋曙霞,李建军,刘颖,等.冠心病血瘀证血管病变数与ACE基因多态性的相关性研究[J].*中国中医基础医学杂志*,2017,23(1):90-92.
- [44] 郭环宇,胡细连,曾文平,等.老年冠心病患者PCI术后气虚血瘀证对抗栓疗效的影响及其与CYP2C19*2基因多态性的相关性[J].*中国老年学杂志*,2016,36(14):3417-3419.
- [45] LI X H, YANG Q, WEI D H. TET2: Potential epigenetic biomarker and therapeutic target for atherosclerosis[J]. *Journal of University of South China(Medical Edition)*, 2015,43(1):5-8.
- [46] GILAT N, TABACHNIK T, SHWARTZ A. Single-molecule quantification of 5-hydroxymethylcytosine for diagnosis of blood and colon cancers[J]. *Clinical Epigenetics*, 2017, 9(1):70.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] 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.

(本文编辑 匡静之)