

• 证候诊断 •

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

王 萍^{1,2} 王丽萍¹ 黄献平¹ 喻松仁^{1,2} 袁肇凯^{1*}

(1. 湖南中医药大学中医诊断研究所, 湖南省长沙市韶山中路 113 号, 410007; 2. 江西中医学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973717)

* 通讯作者: yuankk1520@yahoo.com.cn, (0731)85381147

[摘要] 目的 探讨冠心病血瘀证差异表达基因及其启动子甲基化的情况。方法 以家系冠心病血瘀证患者 14 例为观察对象, 家系健康人 7 例为对照, 采用表达谱芯片检测冠心病血瘀证差异表达基因。再收集冠心病血瘀证患者 16 例和健康人 7 例, 选择其中 2 个差异基因进行启动子区甲基化特异性 PCR(MS-PCR)研究, 初步分析冠心病血瘀证差异表达基因及其启动子甲基化状态。结果 表达谱芯片结果通过倍数变化值(FC) > 3 或 FC < 1/3、Call = P 筛选, 共获取差异表达基因 26 个, 选择 KLF5 和 LRP12 基因进行 MS-PCR, 冠心病血瘀证与健康人各启动子甲基化率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 冠心病血瘀证差异基因 KLF5 和 LRP12 的启动子甲基化状态和健康人比较无明显区别。

[关键词] 冠心病; 血瘀证; 差异基因; KLF5; LRP12; 启动子; 甲基化

Differentially Expressed Gene and Promoter Methylation Status of Coronary Heart Disease Patients with Blood Stasis Pattern

WANG Ping^{1,2}, WANG Liping¹, HUANG Xianping¹, YU Songren^{1,2}, YUAN Zhaokai¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Province 410007; 2. Jiangxi University of TCM)

ABSTRACT **Objective** To research the differentially expressed gene and promoter methylation status of coronary heart disease (CHD) with blood stasis pattern. **Methods** Fourteen family-related CHD patients with blood stasis pattern were selected as observation subjects and 7 healthy persons were chosen as control. The differentially expressed genes of CHD with blood stasis pattern were detected by microarray. Another 16 CHD patients with blood stasis pattern and 7 healthy persons were chosen and 2 differentially expressed genes were selected to conduct methylation-specific PCR (MS-PCR) of promoter region. The differentially expressed gene and promoter methylation status of CHD with blood stasis pattern was analyzed. **Results** A total of 26 differentially expressed genes were obtained after screening the microarray results which fold change (FC) value > 3 or FC value < 1/3 and Call = P. The KLF5 gene and LRP12 gene were selected to conduct the MS-PCR. There was no significant difference between the CHD patients with blood stasis pattern and healthy persons in the promoter methylation rate ($P > 0.05$). **Conclusion** There is no significant difference between the CHD patients with blood stasis pattern and healthy persons in the promoter methylation status of differentially expressed genes KLF5 and LRP12.

Keywords coronary heart disease; blood stasis pattern; differentially expressed genes; KLF5; LRP12; promoter; methylation

现代医学认为, 冠心病的发生发展与先天遗传和后天生活习惯有密切的关系, 这与中医的疾病观是一致的。中医疾病观认为, 病证的发生发展与先天体质和后天生活方式有关, 通过药物或非药物手段调整体质和生活方式可以阻断或痊愈病证的发展^[1]。同时现代医学也认为, 表观遗传学与冠心病等复杂性疾病有很大关联, 生活方式等通过影响表观遗传学机制调控基因的表达, 但这种方式不涉及基因的结构改变, 只对基因进行诸如甲基化、乙酰化等修饰, 并且这种修饰改变可以通过遗传传给后代^[2]。本研究尝试探讨冠心病血瘀证的易感基因表

达与基因启动子甲基化状态的相关性, 为探究中医药调整病证的机制与表观遗传学机制的关系进行初步研究。

1 资料

1.1 诊断及辨证标准

冠心病诊断参照《内科疾病诊断标准》^[3]。血瘀证辨证标准参照《中医病证诊断疗效标准》^[4]。冠心病血瘀证家系定义为先证者的一级亲属中(包括父母、同胞及子女)至少有 1 人为冠心病血瘀证患者^[5]。

1.2 纳入标准

符合上述诊断和辨证标准者, 年龄 18~75 岁。

1.3 排除标准

①患有糖尿病性心肌病、甲状腺机能亢进性心脏病、高血压性心脏病、肺原性心脏病、贫血性心脏病、风湿性心脏病等；②患有恶性肿瘤、肝肾疾病及甲状腺疾病者；③患有肝炎、结核等传染病者；④患有精神系统疾病者。

1.4 研究对象

冠心病血瘀证患者来源于 2010 年 1 月至 2011 年 1 月湖南中医药大学附属第一医院、湖南省中药研究院附属医院心内科住院患者及在长沙市砂子塘社区、梨子山社区、长沙冶金研究设计院等单位进行冠心病血瘀证遗传流行病学调查者,并同时纳入健康人。收集符合标准的家系冠心病血瘀证患者、家系健康者、非家系冠心病血瘀证患者、非家系健康者。其中表达谱芯片研究纳入家系冠心病血瘀证组 14 例,其中男 8 例,女 6 例,平均年龄 62 岁;家系健康人组 7 例,其中男 4 例,女 3 例,平均年龄 57 岁;甲基化特异性 PCR(MS-PCR)共纳入冠心病血瘀证组 16 例(家系冠心病血瘀证患者 8 例,非家系冠心病血瘀证患者 8 例),其中男 6 例,女 10 例,平均年龄 60 岁;健康人组 7 例(家系健康者 5 例,非家系健康者 2 例),其中男 4 例,女 3 例,平均年龄 54 岁。各组受试者一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

2 方法

2.1 样本准备

由两名经验丰富的护理人员对纳入人群进行清晨空腹静脉采血 8ml,其中 4ml 用 EDTA·Na 抗凝提取 RNA,用于外周血表达谱芯片研究。另外 4ml 不抗凝,血凝块进行 DNA 提取用于 MS-PCR 研究。

2.2 表达谱芯片研究

2.2.1 RNA 的提取 外周抗凝血采用淋巴细胞分离液进行分离,然后 RNA 提取采用 Trizol 法,具体过程参照 Trizol 试剂(Invitrogen 公司,批号 15596-026)说明书。

2.2.2 表达谱芯片检测 冠心病血瘀证的差异基因选用 Affymetrix 公司的 HumanGenome U133 Plus 2.0 芯片进行基因表达谱分析,芯片的探针制备、杂交、洗涤、染色、分析等芯片流程均由上海伯豪生物技术公司实施。芯片杂交采用各组样本混合研究的方法进行,差异表达基因的筛选通过 Excel 表进行。

2.3 MS-PCR 研究

2.3.1 DNA 提取 DNA 提取按照凝血块 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号 DP319]说明书进行。

2.3.2 MS-PCR 检测 DNA 检测质量合格后,采用试剂盒(EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research 公司,批号 D5005)进行亚硫酸氢钠修饰与回收处理。然后进行 PCR 反应和琼脂糖凝胶电泳。电泳完毕后在溴化乙锭(EB)中染色,在紫外灯下观察结果并照相。采用的引物(由上海生工科技有限公司合成)如下:

KLF5:

LeftMprimer-AGGTTTTTGTATAATATTTAAGACGT;

RightMprimer-ATTAACTAACGAAACCGAAAACG;

LeftUprimer-GGTTTTTGTATAATATTTAAGATGT;

RightUprimer-TTAACTAACAAAACCAAAAACAAA。

LRP12:

LeftMprimer-GAGGGGTTTTGTATAAGTTTTGTTC;

RightMprimer-TTAAAAATTCCTTCCTCTATCCGAT;

LeftUprimer-GAGGGGTTTTGTATAAGTTTTGTTT;

RightUprimer-TTAAAAATTCCTTCCTCTATCCAAT。

注:M 表示针对基因甲基化设计的引物;U 表示针对基因未甲基化设计的引物。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行分析,计数资料采用非参数检验。

3 结果

3.1 表达谱芯片结果

表达谱芯片结果通过倍数变化值(FC) >3 或 $FC < 1/3$ 筛选,共获取差异表达的探针 685 个(其中芯片信号 Call 值=P 有 46 个),其中有注释的基因 416 个(Call 值=P 的 26 个,见下表 1)。挑选 5 个基因 202859 __x __at (IL8)、208816 __x __at (ANXA2P2)、228949 __at (GPR177)、204470 __at (CXCL1)、206222 __at (TNFRSF10C)进行实时荧光定量 PCR 验证,其结果与芯片结果趋势较一致,可以认定芯片结果的可靠性。

表 1 家系冠心病血瘀证差异表达基因
($FC > 3$ 或 $FC < 1/3$, Call 值=P)

序号	探针号 (Probe_Set_ID)	FC	表达方向 (Regulation)	基因缩写 (GeneSymbol)
1	1552690_a_at	3.463076	下调	CACNA2D4
2	217588_at	3.096827	下调	CATSPER2
3	233496_s_at	3.267526	下调	CFL2
4	238539_at	3.011764	上调	HPS3

表 1(续) 家系冠心病血瘀证差异表达基因
(FC>3 或 FC<1/3, Call 值=P)

序号	探针号 (Probe_Set_ID)	FC	表达方向 (Regulation)	基因缩写 (GeneSymbol)
5	211506_s_at	4.734489	上调	IL8
6	1553594_a_at	3.396032	下调	INSL3
7	240052_at	3.161851	下调	ITPR1
8	227493_s_at	3.451291	上调	KIAA1143
9	209211_at	4.369784	上调	KLF5
10	1556639_at	4.092331	下调	LOC439914
11	220253_s_at	3.462925	下调	LRP12
12	209840_s_at	3.23167	下调	LRRN3
13	209841_s_at	3.019177	下调	LRRN3
14	201744_s_at	3.176375	下调	LUM
15	1561578_s_at	3.465584	下调	MCART6
16	1569484_s_at	3.979029	下调	MDN1
17	215985_at	4.196189	下调	NCRNA00171
18	214066_x_at	3.451794	下调	NPR2
19	209483_s_at	3.032531	下调	NSL1
20	219975_x_at	3.080876	上调	OLAH
21	205362_s_at	3.302028	下调	PFDN4
22	236218_at	3.444106	上调	PHOSPHO1
23	243851_at	3.110064	下调	RAB3GAP2
24	233123_at	3.168383	下调	SLC40A1
25	209875_s_at	3.127524	上调	SPP1
26	217704_x_at	6.621353	下调	SUZ12P

3.2 MS-PCR 结果

入选的 KLF5、LRP12 两个基因启动子区存在着完全甲基化(M 表示)、不完全甲基化(M、U 共存)和未甲基化(U 表示)3 种模式。冠心病血瘀证组 16 例中 KLF5 基因启动子区甲基化状态为:M(1 例)、M+U(5 例)、U(10 例),完全甲基化水平为 6%,甲基化水平为 38%;健康人组 7 例中甲基化状态为:M(1 例)、M+U(3 例)、U(3 例),完全甲基化

水平为 14%,甲基化水平为 57%,但两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。冠心病血瘀证组 16 例中 LRP12 基因启动子区甲基化状态为:M(3 例)、M+U(5 例)、U(8 例),完全甲基化水平为 19%,甲基化水平为 50%,健康人组 7 例中甲基化状态为:M(3 例)、M+U(1 例)、U(3 例),完全甲基化水平为 43%,甲基化水平为 57%,但两组间差异亦无统计学意义($P>0.05$)。甲基化特异性 MS-PCR 结果如图 1、图 2。

4 讨论

中医证候的形成受先天遗传和后天环境等因素的影响,在以往有关血瘀证的证本质研究中对遗传基因有关的报道较多,如单核苷酸多态性(SNP)与证候形成的关系研究^[6]。但有限的 SNP 并不能很好地阐明证候复杂的形成机制,而以 DNA 甲基化为代表的表观遗传学调控机制可以较好地解释先天遗传与后天调控的双重影响,对其进行深入探讨或许能为证候的科学内涵的揭示提供思路。

KLF5 是 KLF 家族转录因子中的成员,参与多种与增殖相关基因的转录调节。许多癌症研究中,发现 KLF5 参与了癌细胞的增殖^[7]。在心血管系统方面,已有研究表明,KLF5 参与了血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖,而 VSMC 的增殖与动脉粥样硬化有密切的关系^[8]。LRP12 即低密度脂蛋白受体相关蛋白 12,最初作为抑癌基因(ST7)被发现,主要参与细胞内吞和信号转导作用^[9]。其在心血管疾病方面的研究较少,是否会通过抑制 VSMC 细胞的增殖进而阻止疾病的发展,或者与 LRP 家族的其他成员

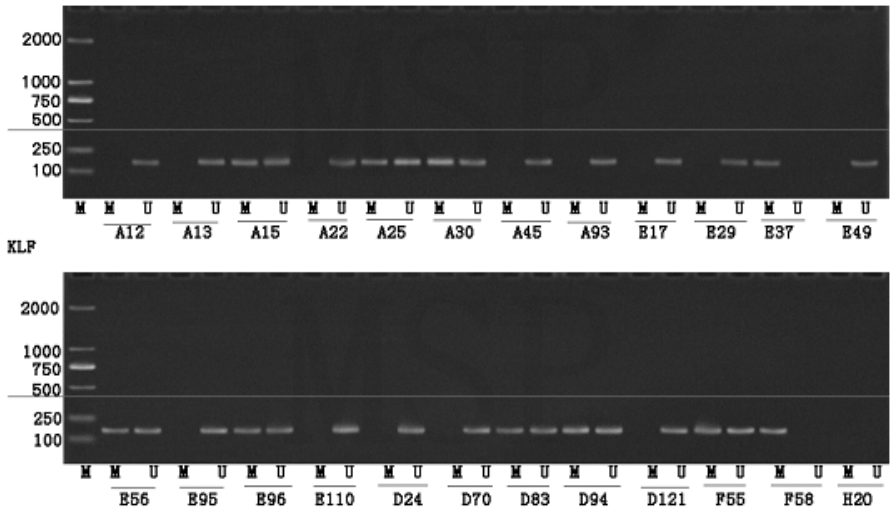


图 1 KLF5 启动子甲基化结果

注:A 或 E 表示冠心病血瘀证组;D 或 F 表示健康人组;H2O 为水阴性对照

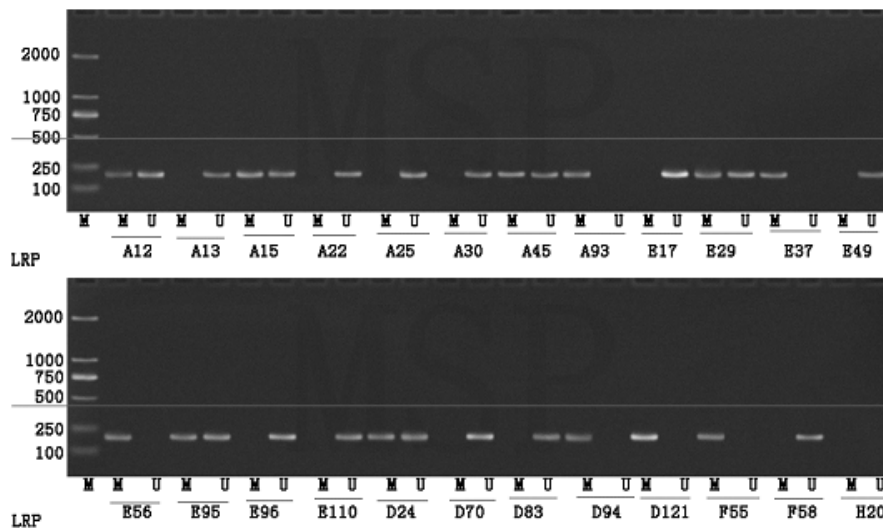


图2 LRP12 启动子甲基化结果

注:A或E表示冠心病血瘀证组;D或F表示健康人组;H₂O为水阴性对照

类似参与动脉粥样硬化的进展等值得研究^[10]。

基因启动子的甲基化会抑制基因的转录^[11],本研究中基因表达谱芯片分析结果表明,KLF5在家系冠心病血瘀证患者表达较家系健康人显著,其表达的上调可能通过VSMC增殖等机制参与冠心病血瘀证的形成。其甲基化研究结果表明,冠心病血瘀证患者的KLF5基因启动子的甲基化水平较健康人低,但二者间差异无统计学意义,KLF5基因启动子的低甲基化水平是否促使KLF5转录增加值得进一步研究。家系冠心病血瘀证患者LRP12的转录水平较家系健康人表达下调,而冠心病血瘀证患者LRP12基因启动子甲基化水平也低于健康人,二者结果不一致,待后续研究的探索。

家系疾病具有家族聚集性特点,其遗传率较高、遗传特征稳定,以其为研究对象将更可能获得所研究病证的易感基因。本研究即首先通过冠心病血瘀证家系人群与家系健康人比较获得了冠心病血瘀证的易感基因。在随后的易感基因启动子甲基化研究中为了更好地探讨基因的启动子甲基化的表达情况,研究对象扩展至非特定人群(包括家系人群和非家系人群),即从家系冠心病血瘀证获得的易感基因在非特定冠心病血瘀证人群中的启动子甲基化分布情况。但由于本研究纳入的样本量较少,未能大样本量分析基因的甲基化与基因的表达关系,另外,在具有遗传背景的冠心病血瘀证和无遗传背景的患病人群中是否存在着基因启动子甲基化状态的差别也是很值得深入探讨的内容。

参考文献

[1]王琦,高京宏. 体质与证候的关系及临床创新思维[J]. 中

医药学刊,2005,23(3):389-392.

[2]Scheen AJ,Junien C. Epigenetics, interface between environment and genes: role in complex diseases[J]. Rev Med Liege, 2012,67(5-6):250-257.

[3]贝政平. 内科疾病诊断标准[M]. 北京:科学出版社,2001:251.

[4]国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京:南京大学出版社,1994:18.

[5]王晓玲,顾东风,孙峰,等. 核心家系中血管紧张素转换酶基因I/D多态性与冠心病关系的研究[J]. 中华心血管病杂志,2002,30(2):59.

[6]李建军,宋曙霞,陈克芳,等. 冠心病血瘀证与血管紧张素转换酶基因多态性和内皮型一氧化氮合成酶基因G894T变异的关系[J]. 环球中医药,2012,5(3):180-184.

[7]Mori A, Moser C, Lang SA, et al. Up-regulation of Krüppel-like factor 5 in pancreatic cancer is promoted by interleukin-1beta signaling and hypoxia-inducible factor-1alpha[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(8): 1390-1398.

[8]刘玉,王海军,李爱英,等. KLF5与c-Jun相互作用促进Ang II诱导的血管平滑肌细胞增殖[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2011,27(7):632-637.

[9]Battle MA, Maher VM, McCormick JJ. ST7 is a novel low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) with a cytoplasmic tail that interacts with proteins related to signal transduction pathways[J]. Biochemistry, 2003, 42(24): 7270-7282.

[10]李颖莉. 低密度脂蛋白受体相关蛋白与动脉粥样硬化的关系[J]. 中国分子心脏病学杂志,2003,3(3):40-46.

[11]林洁,来茂德. DNA甲基化、组蛋白去乙酰化与基因表达抑制[J]. 临床与实验病理学杂志,2006,22(3):353-357.

(收稿日期:2012-11-15;修回日期:2013-03-22)

[编辑:邓媛]