

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.07.011

大鼠总基因组甲基化状态改变相关危险因素的研究

王义勇¹, 贾绍斌¹, 罗彩琴², 丛广志²

(1. 宁夏医科大学总医院心脏中心, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学临床医学院心血管内科, 银川 750004)

【摘要】目的:探讨高胆固醇血症(Hypercholesterolemia, HTC)对 wistar 大鼠主动脉基因组 DNA 总甲基化水平及总甲基转移酶活力的影响并比较高同型半胱氨酸血症(Hyperhomocysteinemia, HHCY)和 HTC 在影响主动脉基因组 DNA 总甲基化水平、总甲基转移酶活力之间的差异。方法:将 wistar 大鼠 33 只,随机分 3 组:对照组、蛋氨酸组、高胆固醇组,每组 11 只。对照组给予普通大鼠饲料,其余各组给予相应的配方饲料。持续喂养 3 个月后心脏取血检测血清同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)等相关指标。提取主动脉基因组 DNA 检测基因组 DNA 总甲基化水平、提取主动脉核蛋白检测基因组 DNA 总甲基转移酶活力。结果:经多个样本均数间的多重比较(Dunnett-t 检验):高胆固醇组大鼠的血清 TC 水平明显高于对照组和蛋氨酸组,且差异有统计学意义($P<0.05$),血清中甘油三酯(Triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein-cholesterol, HDL-C),差异无统计学意义($P>0.05$)。蛋氨酸组大鼠血清 Hcy 水平明显高于对照组及高胆固醇组,且差异有统计学意义($P<0.05$)。HHCY 和 HTC 均增加基因组 DNA 总甲基转移酶活力,可促使基因组 DNA 去甲基化,与对照组相比,各组均具有统计学意义($P<0.05$),但两组之间差异无显著性。结论:HTC 降低大鼠主动脉基因组 DNA 总甲基化水平可能是 HTC 导致动脉粥样硬化发病重要机制之一,且 HHCY 和 HTC 在影响基因组 DNA 低甲基化之间的差异无显著。

【关键词】动脉粥样硬化;高胆固醇血症;高同型半胱氨酸血症;基因组 DNA 总甲基转移酶;基因组 DNA 总甲基化

【中国图书分类法分类号】R543.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-07-17

Research on the relative risk factors for genomic DNA methylation in Wistar rats

WANG Yiyong¹, JIA Shaobin¹, LUO Caiqin², Cong Guangzhi²

(1. Center of Cardiology, General Hospital; 2. Department of Vasculocardiology, College of Clinical Medicine, Ningxia Medical University)

【Abstract】Objective: To discuss the effect of hyperhomocysteinemia (HHCY) and hypercholesterolemia (HTC) on genomic DNA methylation and DNA methyltransferase activity in aortic tissue of Wistar rats and to compare their differences. **Methods:** Totally 33 Wistar rats were equally randomized into three groups: control group, methionine group and high-cholesterol group ($n=11$). The rats in control group were fed with normal chaw while those in the other two groups were fed with formula chaw for three months. Heart blood was drawn to detect the serum homocysteine (Hcy) and total cholesterol (TC). Aortic genomic DNA was extracted to detect genomic DNA methylation levels and aortic nucleoprotein was extracted to detect DNA methyltransferase activity. **Results:** The results of Dunnett-t test showed that serum TC level was significantly higher in high-cholesterol group than in control and methionine groups ($P<0.05$), but there was no statistically significant difference in triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels between high-cholesterol group and the other two groups ($P>0.05$). Serum Hcy was significantly higher in methionine group than in high-cholesterol and control groups ($P<0.05$). Compared with control group, HHCY and HTC significantly increased DNA methyltransferase activity and promoted DNA demethylation in both high-cholesterol and methionine groups ($P<0.05$), though there was no significant difference between high-cholesterol and methionine groups ($P>0.05$). **Conclusions:** Hypomethylation induced by HTC is one of the important mechanisms for the development of atherosclerosis. There is no significant difference between HHCY and HTC in leading hypomethylation.

【Key words】 atherosclerosis; hypercholesterolemia; hyperhomocysteinemia; genomic DNA methyltransferases; genomic DNA methylation

作者介绍: 王义勇(1979-),男,住院医师,硕士,

研究方向:动脉粥样硬化发病机制。

通信作者: 贾绍斌,男,教授, Email: jsbxn@163.com。

DNA 甲基化是指生物体在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 的催化介导下, 以 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylhomocysteine, SAH) 为甲基供体, 在胞嘧啶 C 的 5 号碳原子上加入一个甲基, 使之成为 5-甲基胞嘧啶, 同时 S-腺苷甲硫氨酸转变为 S-腺苷-同型半胱氨酸的过程, 是表观遗传修饰的一个重要方式^[1-4]。在 DNA 甲基化的过程中, 5-胞嘧啶被修饰成 5-甲基胞嘧啶后, 使 DNA 结合蛋白与 DNA 主螺旋沟的结合能力降低, 从而抑制基因的转录, 影响正常细胞的分化和基因表达。它主要是通过 DNMT 来维持^[5]。DNA 甲基化模式可反映基因的表达状态, 不涉及到 DNA 序列本身的改变, 是真核细胞基因表达调控的特点之一, 是维持细胞稳定性的重要因素。基因的正常功能除了依赖于正常结构外, 还依赖于正常的甲基化状态。动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 是心血管系统疾病的主要病因和疾病发生的重要病理基础, 是由多种危险因素联合作用导致的一种复杂性疾病。对其发病机制仍不明确。在后基因组时代, 基因组序列及其常见变异已明, 因此对 AS 的研究也开始着眼于表观遗传学变化。目前已有研究表明同型半胱氨酸血症 (Hyperhomocysteinemia, HHCY) 可引起基因组 DNA 的异常甲基化从而促进 AS 的发生发展。而 HHCY 又是 AS 公认的独立危险因素^[6]。这些表明基因组 DNA 的总甲基化水平与 AS 有相关性。高胆固醇血症 (Hypercholesterolemia, HTC) 作为 AS 最主要的危险因素, 对其致 AS 发病机制仍不明。基因组 DNA 的异常甲基化是不是 HTC 致 AS 发病机制之一还鲜有研究, 本研究在动物模型基础上探讨 HTC 对大鼠主动脉基因组 DNA 总甲基化水平的影响并比较 HTC、HHCY 在影响基因组 DNA 总甲基化水平之间的差异。

1 材料和方法

1.1 动物和分组

健康雄性 wistar 大鼠 33 只, 4 周龄, 体质量 170~200 g, 购于兰州大学实验动物中心 [合格证号 SCXK (甘) 2009-0004]。适应性喂养 1 周后, 随机分为 3 组, 即对照组、蛋氨酸组和高胆固醇组, 每组 11 只。对照组以标准饲料喂养; 蛋氨酸组^[7] (1% 蛋氨酸和 99% 的标准饲料); 高胆固醇组^[8] (3.5% 胆固醇, 10% 猪油, 0.2% 丙基硫氧嘧啶, 0.5% 胆酸钠, 5% 白糖, 和 80.8% 的标准饲料), 饲料均有北京科澳协力饲料有限公司按配方合成。大鼠自由饮水, 自然采光, 持续喂养 3 月。取标本前各组动物禁食过夜, 次日采用水合氯醛腹腔麻醉, 麻醉后胸骨左侧开胸, 暴露心脏, 心脏取血 7~10 ml, 3 000 r/min

离心 10 min, 留取血清-20 ℃冻存, 成批测定血清同型半胱氨酸 (Homocysteine, Hcy)、总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (Low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) 相关指标; 留取主动脉弓组织, 苏木精-伊红染色 (Hematoxylin-eosin stain, HE) 染色, 观察主动脉内膜、中膜和外膜。血清中的 Hcy、TC 分别超过 95% 正常值范围且病理切片可观察到有 AS 相关病理形态变化, 表明 HHCY、HTC 大鼠建模成功。取其主动脉弓至腹主动脉的血管组织, 清除周围组织后存放于 DEPC 处理的冻存管中置于液氮冷却后置 -80 ℃冰箱保存。

1.2 检测指标

1.2.1 血清中血脂、Hcy 的测定 用美国 BECMAN-COULTER SYNCHRON CX9 ALX 大型全自动生化分析仪测定血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 的浓度。用美国雅培公司全自动免疫分析仪, 采用荧光偏振免疫分析法测定血清中 Hcy 浓度。试剂盒由美国雅培公司提供, 严格按试剂盒说明书要求进行样品处理及测定。

1.2.2 组织学检查 留取主动脉弓组织, 甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 显微镜观察主动脉内膜、中膜和外膜的病理形态变化。

1.3 大鼠主动脉基因组 DNMT 活力的测定

DNA 总甲基转移酶活力的测定原理为 DNA 甲基转移酶能把 S-腺苷甲硫氨酸的甲基基团转移到基质 DNA 的胞嘧啶上将其甲基化。甲基化的 DNA 能被抗 5-甲基化胞嘧啶抗体识别。甲基化 DNA 的生成量与酶活性呈线性关系, 可以通过类酶联免疫吸附反应后测定其 A 值, 从而得出结果。按凯基核蛋白提取试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司) 步骤提取大鼠主动脉组织核蛋白。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司) 步骤进行核蛋白定量 (BCA 法)。将定量的核蛋白按照 EpiQuik™ DNA methyltransferase activity assay kit (Product of epigentek group inc, USA) 步骤并依据下面的公式 DNMT 活力 $[A/(h \cdot mg)] = [A(\text{样品孔} - \text{空白对照孔}) / (\text{核蛋白量 } \mu\text{g} \times 3 \text{ h})] \times 1\,000$, 计算 DNA 甲基转移酶的活力。

1.4 大鼠主动脉基因组 DNA 总甲基化水平的测定

按照 Wizard® Genomic DNA Purification kit (普洛麦格北京生物技术有限公司) 说明书步骤提取主动脉基因组 DNA。提取的 DNA 以 λ /Hind III Marker 为参照, 在 1% 的琼脂糖上电泳以检测基因组 DNA 的完整性。并用紫外分光光度计检测其浓度和纯度。将提取的 DNA 按照 Methylamp™ Global DNA methylation quantification kit (Product of epigentek group inc, USA) 步骤并依据下面的公式 DNA 总甲基化% $= [A(\text{样品孔} - \text{空白对照孔}) / (2 \times A(\text{阳性对照孔} - \text{空白对照孔}))] \times 100\%$, 计算基因组 DNA 总甲基化水平。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理。将所有数据用 Levene 法作方差齐性检验。方差齐, 则用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 先行单因素的方差分析 (One-way ANOVA), 如果各组总体均数不全等, 进一步采用多个样本均数间的多重比较 (Dunnett-t) 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 各组血清 Hcy 和血脂水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.1 Comparison of HCY, Lipids levels in every group ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数 (n)	Hcy (umol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
对照组	11	5.72 ± 1.06	1.78 ± 0.16	1.30 ± 0.34	0.33 ± 0.04	0.70 ± 0.04
蛋氨酸组	11	18.31 ± 1.10*	1.89 ± 0.22	1.26 ± 0.21	0.33 ± 0.06	0.70 ± 0.08
高脂组	11	5.83 ± 1.13	5.97 ± 0.36*	1.26 ± 0.14	0.33 ± 0.05	0.68 ± 0.15

注: *, 与对照组相比, $P < 0.05$

2 结果

2.1 构建高同型半胱氨酸血症、高胆固醇血症大鼠模型

采用高胆固醇饲料和蛋氨酸负荷饲料建立大鼠模型, 在模型建立过程中无大鼠死亡, 实际用于结果分析的共 33 只大鼠。

2.1.1 各组血清 Hcy、血脂的测定 高胆固醇组在第 90 天时 TC 值为 (5.97 ± 0.36) mmol/L, 符合 HTC 的诊断标准, 表明 HTC 大鼠模型建成。经 *Dunnett-t* 检验分析, 高胆固醇组大鼠血清 TC 水平明显高于对照组和蛋氨酸组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TG、LDL-C 和 HDL-C 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。蛋氨酸组在第 90 天时 Hcy 值为 (18.31 ± 1.10) μ mol/L, 符合 HHcy 的诊断标准, 表明 HHcy 大鼠模型建成。经 *Dunnett-t* 检验分析, 蛋氨酸组大鼠血清 Hcy 明显高于对照组及高胆固醇组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.1.2 主动脉组织的病理形态观察 光学显微镜观察: 对照组主动脉血管组织正常 (图 1A); 蛋氨酸组: 主动脉中膜增厚, 内弹性膜及中膜的弹性膜极度弯曲, 内膜完整 (图 1B); 高胆固醇组: 主动脉血管外膜增厚, 见少许炎细胞浸润, 滋养血管增生, 血管中膜增厚, 内弹性膜及中膜的弹性膜极度弯曲, 内膜完整, 内皮细胞变形突向管腔, 无明显内膜增生 (图 1C)。

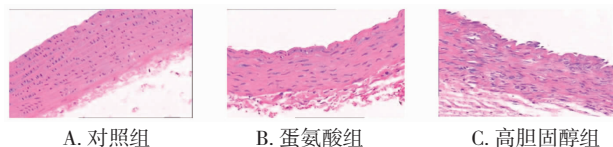


图 1 主动脉组织的病理形态观察 (HE, 400 ×)

Fig.1 Pathological morphology of aortic tissues (HE, 400 ×)

2.2 HHcy、HTC 对大鼠主动脉基因组 DNA 总甲基转移酶活力及总甲基化水平的影响

HHcy 和 HTC 可增加主动脉基因组 DNA 总甲基转移酶活力, 可促使 DNA 去甲基化。经 *Dunnett-t* 检验分析: 与对照组相比, 各组均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。但 2 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。基因组 DNA 总甲基转移酶活性的增加与 DNA 去甲基化程度的增加提示, 该酶活性的增加可能是为对抗 DNA 去甲基化的一种代偿反应, 见表 2。

3 讨论

AS 是严重危害人类身体健康, 导致心、脑等重要器官发生缺血性病变的常见病、多发病, 也是心血管系统疾病的主要病因及疾病发生的重要病理

表 2 第 90 天各组大鼠主动脉基因组 DNA 总甲基转移酶活力及总甲基化水平 ($\bar{x} \pm s$)Tab.2 Comparison of aortic genomic DNA methyltransferase activity, methylation levels in each group on 90th d ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数 (n)	甲基转移酶活力 A/(h·mg)	DNA 甲基化水平
对照组	11	14.59 ± 2.24	0.045 ± 0.004
蛋氨酸组	11	21.36 ± 2.84*	0.038 ± 0.004*
高脂组	11	26.98 ± 1.37*	0.038 ± 0.003*

注: *, 与对照组相比, $P < 0.01$

基础。在欧美等西方国家死于与 AS 有关的心脑血管疾病人数占死亡人数的一半^[9]。在我国 AS 的发病率也呈明显上升的趋势, 发病年龄日趋年青化, AS 已成为全球重要的疾病负担^[10]。但对 AS 发病机制的研究还存在许多问题尚未阐明。Hiltunen 等^[11]发现, 在人与 APOE 基因敲除 (APOE^{-/-}) 小鼠中, 发生 AS 脂肪纹部位的 5-甲基胞嘧啶水平显著降低, 全基因组的甲基化水平降低。另有研究表明, 在动脉粥样硬化的血管组织中膜和内膜的区域, DNMT mRNA 表达有显著异质性, 提示在 AS 发生过程中确实有基因组低甲基化出现。AS 是由多种危险因素联合作用导致的一种由遗传因素与外环境因素共同作用的复杂性、多因子疾病。HTC 和 HHcy 都是 AS 公认的独立危险因素^[12, 13], 已有研究表明, HHcy 可以通过内皮细胞损伤、免疫炎症反应、动脉血管平滑肌细胞 (Smooth muscle cell, SMC) 增生、氧化应激、内质网应激、干扰细胞 L-精氨酸/一氧化氮/NO 合成酶途径, 参与炎症反应和免疫反应等多种机制^[14-18]对心脏、血管及血细胞等发挥广泛的损伤作用, 造成和加速 AS 性血管疾病^[19, 20]。特别是与早发 AS 性心脑血管疾病之间存在着很强的相关性^[21]。近年来大量循证医学证据表明, 血清中 Hcy 升高可引起基因组 DNA 甲基化程度下降^[19]。Rita 等的临床对照研究表明: AS 患者血清中 Hcy、S-腺苷高半胱氨酸 (S-adenosylhomocysteine, SAH) 明显升高的同时, 基因组 DNA 呈现低甲基化。但是关于 HTC 对基因组 DNA 总甲基化水平影响的研究甚少。

本研究为探明 HTC 对基因组 DNA 总甲基化水平有无影响, 并进一步比较 HTC 和 HHcy 在影响基

因组 DNA 总甲基化水平之间的差异,利用特异性甲基检测试剂盒,甲基转移酶活力检测试剂盒分别测定 HTC 和 HHCY 大鼠主动脉组织基因组 DNA 总甲基化水平和总甲基转移酶活力。结果表明:①与对照组比较,HTC 大鼠主动脉组织基因组 DNA 总甲基转移酶活力增高,总甲基化水平降低。②HTC 和 HHCY 都可使大鼠主动脉组织基因组 DNA 总甲基转移酶活力升高,基因组 DNA 总甲基化水平降低,但两者之间的差异无显著性。HHCY 致大鼠主动脉组织基因组 DNA 总甲基转移酶活力升高,基因组 DNA 总甲基化水平降低可能是由于 HCY 是一种含硫氨基酸,是蛋氨酸和半胱氨酸的重要中间代谢产物,是蛋氨酸循环中的关键环节,HCY 增高必然引起 SAH 浓度的升高,SAH 是转甲基反应的强效抑制剂,抑制向 DNA 转移甲基的 DNMT。由于细胞每一轮复制都需要 DNMT 对新合成的子链进行甲基化修饰,DNMT 的受抑,只需几轮复制就可产生基因组广泛的去甲基化。细胞为扭转基因组低甲基化代偿性的引起 DNMT 活性的增高。而本实验发现 HTC 在引起大鼠主动脉组织基因组 DNA 的 DNMT 活性增高和总甲基化水平显著下降与 HHCY 有着相似的结果。那 HTC 是通过何种途径来影响基因组 DNA 总甲基化水平,又是如何使得 DNMT 活力增高尚无确切的解释,还需要进一步深入的研究。但是由于基因组 DNA 总甲基化水平的降低,从而导致大鼠主动脉组织中正常细胞的表达异常,加速 AS 的发生发展。而 DNMT 活力的升高有可能在其中扮演着重要的角色。这为 AS 发病机制提供重要线索,为以 DNMT 为靶点治疗 AS 提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Zachary D S,Michelle M C,Tarjei S,et al.A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo[J].Nature,2012,10(1038):339-344.
- [2] Laird P W.Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis[J].Nature Reviews Genetics,2012,11(1):191-203.
- [3] Assaf Z,Ivy E,McDaniel,et al.References and further reading may be available for this article.To view references and further reading you must purchase this article.Genome-Wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation[J].Science Magazine Search Results,2010,328(5980):916-919.
- [4] Stenvinkel P,Karimi M,Johansson S,et al.Programming of DNA methylation patterns[J].Annual Review of Biochemistry,2012,8(5):488-499.
- [5] Claudio N.Developmental mechanisms involved in the primary prevention of atherosclerosis and cardiovascular disease[J].Current Atherosclerosis Reports,2011,13(2):170-175.
- [6] Ana C M,Alessio,Celio X C,et al.Evaluation of mild hyperhomocysteinemia during the development of atherosclerosis in apolipoprotein edeficient and normal mice[J].Experimental and Molecular Pathology,2011,90(1):45-50.
- [7] Guo Y H,Chen F Y,Wang G S,et al.Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates vascular reverse remodeling of balloon-injured arteries in rat[J].Chinese Medical Journal,2008,121(22):2265-2271.
- [8] 杨鹏远,芮耀诚,焦亚斌.动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立[J].第二军医大学学报,2003,24(7):802-804.
- Yang P Y,Rui Y C,Jiao Y B.Atherosclerosis in rat experimental model to establish[J].Academic Journal of Second Military Medical University,2003,24(7):802-804.
- [9] 高玖鸣,王 文.高血压及心脑血管疾病流行病学的最新数据:美国心脏病和卒中年报[J].中华高血压杂志,2009,6(17):494-495.
- Gao J M,Wang W.Hypertension and cardiovascular and cerebrovascular disease epidemiology data;the American heart and stroke annual report [J].Chinese Journal of Hypertension,2009,6(17):494-495.
- [10] 胡大一.循证行医合理用药预防动脉粥样硬化血栓形成[J].中国实用内科杂志,2006,26(21):1675-1677.
- Hu D Y.Evidence-based medical practice rational drug use prevention of atherosclerotic thrombosis[J].Chinese Journal of Internal Medicine,2006,26(21):1675-1677.
- [11] Hiltunen M O,Turunen M P,Hakkinen T P,et al.Epigenetics,DNA methylation,and chromatin modifying drugs[J].Pharmacology and Toxicology,2009,(49):243-263.
- [12] Wang G,He L Y,Hong T P.Reply to letter to the editor:coronary flow velocity reserve was impaired in chronic hyperhomocysteinemic patients;why?[J].Endocrinology and Metabolism,2011,300(6):1177-1178.
- [13] Mecully K S.Vascular pathology of homocysteinemia;implication for the pathogenesis of arteriosclerosis[J].Am J Pathol,1969,56(1):111-128.
- [14] Zhong J C,Xiao F Y,Hong W.Homocysteinemia and endothelial dysfunction[J].Curr Hypertens,2009,5(2):158-165.
- [15] Hansrani M,Stansby G.The use of an in vivo model to study the effects of hyperhomocysteinemia on vascular function[J].Surg Res,2008,(145):13-18.
- [16] Tasatargil A,Sadan G,Karasu E.Homocysteine-induced changes in vascular reactivity of guinea-pig pulmonary arteries;role of the oxidative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation[J].Pulm Pharmacol Ther,2007,(20):265-272.
- [17] Barroso M,Rocha M S,Esse R,et al.Cellular hypomethylation is associated with impaired nitric oxide production by cultured human endothelial cells[J].Amino Acids,2012,42(5):1903-1911.
- [18] Wilson K M,McCaw R B,Leo L,et al.Prothrombotic effects of hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice [J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2007,27(1):233-240.
- [19] Jiang Y D,Sun T,Xiong J T,et al.Hyperhomocysteinemia mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats[J].Acta Biochimica et Biophysica Sinica,2007,39(9):657-667.
- [20] Yegnasubramanian S,Haffner M C,Zhang Y,et al.DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity [J].Cancer Res,2008,68(21):8954-8967.

(责任编辑:唐秋姝)