

·论著·

# 半胱氨酸代谢关键酶基因DNA甲基化与动脉粥样硬化性缺血性脑卒中的相关性研究

何发毅<sup>1,3</sup>, 聂毅<sup>2</sup>, 罗丹阳<sup>2</sup>, 姚琴<sup>1</sup>, 刘光波<sup>1</sup>, 柳华<sup>1,2,3</sup>

## 作者单位

1. 盐亭县人民医院  
神经内科

四川 盐亭 621600

2. 南充市中心医院  
神经内科

四川 南充 637000

3. 成都市第三人民  
医院(西南交通大  
学附属医院)神经  
内科

成都 610031

## 基金项目

四川省科技厅项目

(No. 2010SZ0296)

## 收稿日期

2018-05-27

## 通讯作者

柳华

hxlumedidocor@

163.com

**摘要 目的:**探讨半胱氨酸代谢关键酶基因表观遗传学改变与汉族人群缺血性脑卒中(IS)的发病关系。**方法:**采用病例-对照研究设计,以动脉粥样硬化性脑梗死(ATS)患者30例为病例组,另选择同期体检健康人群30例为对照组。寻找目的基因(基因上游5 kb的区域一直到第2外显子区域)的CpG岛区域,使用重亚硫酸盐修饰直接测序技术进行样本DNA甲基化检测,运用单因素或Logistic回归分析检测2组间DNA甲基化分布差异。**结果:**胱硫醚-β-合成酶(CBS)基因4个CpG岛同源性非常高,放弃甲基化分析;5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因有2个CpG岛;半胱氨酸合成酶(MTR)基因有1个CpG岛。结果显示,2组这2个基因所有CpG岛都未发现DNA甲基化情况。**结论:**未发现MTHFR和MTR基因DNA甲基化改变与汉族人群ATS相关。

**关键词** 表观遗传学;脑卒中;DNA甲基化;半胱氨酸代谢酶;5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶;半胱氨酸合成酶;胱硫醚-β-合成酶

**中图分类号** R741;R741.02;R743.3 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.03.003

何发毅, 聂毅, 罗丹阳, 等. 半胱氨酸代谢关键酶基因DNA甲基化与动脉粥样硬化性缺血性脑卒中的相关性研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(3): 116-119.

**Relationship between DNA Methylation of Key Enzyme Genes in Homocysteine Metabolism and Atherothrombotic Stroke** HE Fa-yi<sup>1,3</sup>, NIE Yi<sup>2</sup>, LUO Dan-yang<sup>2</sup>, YAO Qin<sup>1</sup>, LIU Guang-bo<sup>1</sup>, LIU Hua<sup>1,2,3</sup>.

1. Department of Neurology, Yanting People's Hospital, Sichan Yanting 621600, China; 2. Department of Neurology, Nanchong Central Hospital, Sichuan Nanchong 637000, China; 3. Department of Neurology, The Third People's Hospital of Chengdu, Southwest Jiaotong university, Chengdu 610031, China

**Abstract Objectives:** To investigate the relationship between the epigenetic alterations of genes encoding the key enzymes of homocysteine (Hcy) metabolism and the risk for atherothrombotic stroke (ATS) in the Chinese Han population. **Methods:** This case-controlled study enrolled 30 cases with ATS and 30 healthy controls. The CpG islands region of the targeted gene (5kb upstream region to exon 2) was identified. Detection of DNA methylation was accomplished by sequencing bisulfite-altered DNA. Univariate and multivariate logistic regression analysis were used to detect the differences in DNA methylation levels between the two groups. **Results:** DNA methylation analysis of the cystathionine-β-synthase (CBS) gene was abandoned because of the high homology of the 4 CpG island sequences. There were respectively 2 and 1 CpG islands found in the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase (MTR) genes. However, no change in DNA methylation levels was detected in the CpG islands of these two genes. **Conclusion:** Our study suggested no significant association between DNA methylation alterations of the MTHFR and MTR genes with ATS among the Han Chinese.

**Key words** epigenetics; ischemic stroke; atherothrombotic stroke; DNA methylation; 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase; methionine synthase; cystathionine-β-synthase

脑卒中(Stroke)是世界上第二位最常见的死亡原因<sup>[1]</sup>和第三位影响伤残调整生命年指标的主要原因<sup>[2]</sup>。我国年度新发卒中人数大概为(1.5~2)百万人<sup>[3]</sup>,脑血管病已跃居为居民首位死因<sup>[4]</sup>。缺血性卒中(ischemic stroke, IS)占有所有卒中的43.7%~78.9%<sup>[3]</sup>,其发病具有强烈的遗传背景<sup>[5]</sup>。IS的主要病理改变是动脉粥样硬化性血栓形成<sup>[6]</sup>。因此,卒中遗传研究者们致力于探讨动脉粥样硬化相关易感基因。10%的人群可见高同型半

胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy),后者与动脉粥样硬化密切相关。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平升高增加缺血性心脏病和卒中的风险<sup>[7]</sup>。HHcy在血管疾病中的发病机制可能与DNA甲基化有关,高Hcy导致外周血淋巴细胞DNA甲基化状态减少35%,并且增加动脉粥样硬化的风险<sup>[8]</sup>。5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶(5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)、半胱氨酸合成酶(methionine synthase, MTR)和胱硫

酰-β-合成酶(cystathionine beta-synthase, CBS)是半胱氨酸代谢途径的3个关键酶。上述基因突变能导致酶活性减低和Hcy浓度改变<sup>[9,10]</sup>。MTHFR基因启动子DNA甲基化导致酶的表达下调,活性减低。可见,在Hcy代谢和病理生理过程中,表观遗传学的改变不能忽略。

为更精确地评估遗传因素对IS的影响,本研究以中国汉族成人动脉粥样硬化血栓形成脑梗死(atherothrombotic stroke, ATS)为对象,探讨MTHFR、CBS和MTR基因DNA甲基化状况。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

在笔者以前拷贝数变异(copy number variation, CNV)研究的样本中<sup>[11]</sup>随机选取ATS患者30例,即选择2012年1月至2015年1月在盐亭县人民医院、南充市中心医院神经内科连续入院的19~70岁的汉族首次发病的急性IS患者(WHO标准),时间在2周内,符合韩国修订版的TOAST分型ATS亚型为病例组,彼此间无血缘关系,排除继发性脑梗死、合并严重肝肾功能不全、恶性肿瘤及其他严重疾病的患者。选择同期体检的年龄性别匹配的健康人群或自愿者30例为对照组,临床表现及体格检查确定无神经系统疾病。

### 1.2 方法

1.2.1 血液DNA提取 取受试者枸橼酸钠抗凝静脉血,使用血液基因组DNA提取试剂盒(DP318-02/03, 购于北京天根生化科技有限公司)提取模板DNA。

1.2.2 寻找目的基因CpG岛区域 ①通过计算机软件寻找目的基因(基因上游5 kb的区域一直到第2外显子区域)的CpG岛区域;②CpG岛定义:片段长度 $\geq 200$  bp, G+C的含量 $\geq 50\%$ , CpG二核苷酸的实际观察值与期望值之比 $\geq 60\%$ (常用参数)。

1.2.3 甲基化检测 DNA样本经重亚硫酸盐(Bisulfite)处理后,甲基化的胞嘧啶(C)保持不变,而非甲基化的胞嘧啶被转化成尿嘧啶,处理后的DNA模板在后续PCR中,甲基化的胞嘧啶不变,而非甲基化胞嘧啶变成胸腺嘧啶,通过测序可以鉴定胞嘧啶甲基化情况,并对甲基化比例作初步分析。①DNA样本使用EZDNA Methylation-Gold Kit(购于美国Zymo Research公司)试剂盒进行二硫氢酸盐处理。②PCR反应。反应体系为20  $\mu$ L,包括1 $\times$  GC buffer I(购于日本Takara公司)、2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、0.2 mmol/L dNTP、每个引物(表1)0.2  $\mu$ mol/L、1 U HotStar Taq polymerase

(购于德国Qiagen公司)、1  $\mu$ L模板DNA。PCR循环程序:第一步95  $^{\circ}$ C预变性2 min;第二步是11个循环,依次是:94  $^{\circ}$ C变性20 s, 62  $^{\circ}$ C退火40 s(在该步骤中每个循环每次降低0.5  $^{\circ}$ C), 72  $^{\circ}$ C延伸1 min;第三步是24个循环,分别是:94  $^{\circ}$ C变性20 s, 56  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸1 min;第四步72  $^{\circ}$ C延伸2 min,最后保持在4  $^{\circ}$ C。PCR产物纯化:使用SAP和Exo I进行PCR产物纯化:在8  $\mu$ L PCR产物中加入0.5 U SAP酶和4 U Exo I酶, 37  $^{\circ}$ C孵育(温浴)60 min,然后75  $^{\circ}$ C孵育15 min。纯化产物测序,测序及分析反应体系:取3  $\mu$ L BigDye3.1 mix, 2  $\mu$ L测序引物(1  $\mu$ mol/L), 1~2  $\mu$ L纯化PCR产物混匀, 96  $^{\circ}$ C预变性1 min后,后28个循环,依次是:96  $^{\circ}$ C变性10 s, 50  $^{\circ}$ C退火5 s, 60  $^{\circ}$ C延伸4 min;最后保持在4  $^{\circ}$ C。测序产物上ABI3730XL测序仪,测序文件用Codon Code Aligner软件分析,并结合人工校对记录后整理出结果。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS19.0软件处理数据,计量资料以(均数 $\pm$ 标准差)表示, *t*检验;计数资料采用 $\chi^2$ 检验,单因素和多元回归分析检测危险因素,单变量分析中 $P \leq 0.10$ 的变量被纳入回归模型,使用优势比(OR)及其95%可信区间(95%CI)表示率的相关度; $\alpha=0.05$ 为检验水准。

## 2 结果

### 2.1 2组一般资料比较

2组在性别、年龄、BMI、糖尿病病史、血脂异常、吸烟史、饮酒史上差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),病例组的高血压比例高于对照组( $P=0.028$ );多元Logistic回归分析显示,经调整协变量后,2组仅高血压的差异有统计学意义( $P=0.035$ ),见表2。

### 2.2 甲基化分析

2.2.1 MTHFR、MTR、CBS三个基因CpG岛情况 ①MTHFR基因有2个CpG岛,两个测序反应基本可以覆盖:长度371(4 920~5 290),长度236(5 502~5 737);②MTR基因有1个CpG岛,3个测序反应可以覆盖:长度1 060(5 667~6 726);③CBS基因同样是4个CpG岛,由于同源性非常高,最后放弃:长度233(4 392~4 624),长度685(4 678~5 362),长度678(5 411~6 088),长度878(6 106~6 983)。

2.2.2 2组样本目的基因甲基化情况总结 对照组和病例组的MTHFR M1片段、MTHFR M2片段、MTR M1片段、MTR M2片段、MTR M3片段等全部标本均未发现甲基化情况。

表1 针对CpG岛的PCR引物

引物名称	长度	熔解温度	Gc比例	自身互补评分	3'自身互补评分	3'稳定性	引物序列
MTHFR M1F	23	61.06	47.83	2	0	8.2	GGGATTGAGATTAGGAGTGGTTG
MTHFR M1R	22	60.18	40.91	2	0	7	CCTCCAATCCCRAATAACTCAA
MTHFR M2F	24	59.65	37.50	2	0	8.4	GTGATTTAGTGATTTGGTGATTGG
MTHFR M2R	25	58.88	36.00	3	0	6.4	RCCAAAAAACCAATACTACCACTC
MTHFR M2F2	25	59.12	28.00	2	0	6.9	ATTTAGTGATTTGGTGATTGGATT
MTHFR M2R2	28	58.60	39.29	2	0	5.4	CTACCACTCTCTCAAATAAACCTCTAC
MTR M1F	27	58.35	25.93	6	2	6	AAATTTTTAGAGGGTTTAGTTGGTTTA
MTR M1R	28	57.58	35.71	5	0	7	CRTACTATAACCTCCTAATCCCTAAAAC
MTR M2F	29	58.71	31.03	3	2	5.6	GTTTTTGGTGTYGGTTTAGTAGTTAGATA
MTR M2R	25	60.81	36.00	2	0	8.2	ACRAAACTACATCTCCCAAAAAACC
MTR M3F	23	61.57	43.48	2	0	5.7	GGGGTTTTTTGGGAGATGTAGTT
MTR M3R	28	58.66	28.57	6	1	7.2	CAACCCTAAAAAATTCTAATTACTACCA

注:MTHFR基因和MTR两个基因共3个CpG岛的PCR引物。CBS基因有4个CpG岛,由于同源性非常高,最后放弃

表2 2组人口学特征及临床特点比较

组别	例数	男/女	年龄/ (岁, $\bar{x}\pm s$ )	BMI/ (kg/m <sup>2</sup> , $\bar{x}\pm s$ )	高血压/ 例	糖尿病/ 例	血脂异常/ 例	吸烟/ 例	饮酒/ 例
对照组	30	18/12	59.07±7.76	23.64±2.27	16	3	8	13	7
病例组	30	15/15	60.53±8.49	23.51±2.99	24	2	13	15	13
P值		0.436	0.488	0.848	0.028	1.000 <sup>①</sup>	0.176	0.605	0.100
OR (95%CI)		0.667(0.240~ 1.854)	/	/	3.500(1.112~ 11.017)	0.643(0.100~ 4.153)	2.103(0.711~ 6.221)	1.308(0.473~ 3.615)	2.513(0.826~ 7.642)
P'值		/	/	/	0.035	/	/	/	0.115
OR' (95%CI)		/	/	/	3.538(1.093~ 11.455)	/	/	/	2.549(0.797~ 8.148)

注: ①连续性校正; P'、OR'(95%CI)'为 Logistic 回归分析,仅纳入单因素分析中 P≤0.10 的变量

### 3 讨论

本研究未发现MTHFR和MTR基因的甲基化改变与ATS发病风险具有相关性。而马来西亚一个研究却发现MTHFR甲基化增加IS发病风险4.73倍(95% CI 2.56~8.75, P<0.001)<sup>[12]</sup>。另外一些研究也探讨不同基因DNA甲基化水平和卒中的关系。2个研究发现在男性IS群体中,长散在核元件-1(LINE-1)整体DNA甲基化水平偏低<sup>[13,14]</sup>。在女性IS群体中,雌激素受体α基因(estrogen receptor α, ERα)甲基化水平较对照组更低,特别是在大动脉和心源性脑栓塞患者中更明显<sup>[15]</sup>。在卒中后一年,脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)启动子高水平DNA甲基化与较差的预后有关<sup>[16]</sup>。然而,西班牙一个研究在485例IS患者中,未发现IS或任何亚型与任何基因甲基化的关系<sup>[17]</sup>。

脑血管病领域表观遗传学的研究正逐渐引起重视。DNA甲基化是最有代表性的表观遗传学机制,在

调节整体和特定基因表达、重要细胞进程的促进中起重要作用,后者比如基因组稳定、X染色体失活和基因组印迹<sup>[18]</sup>。越来越多的证据表明,在脑卒中的病理生理进程中,有表观遗传的机制参与。在脑缺血中,表观遗传机制涉及多个方面,从全基因组到影响中枢神经系统对损伤的易感性的特定基因事件都有涉及。在大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)鼠模型的缺血性脑组织中,DNA甲基化水平增加,可能由此对细胞死亡有促进作用,事实上,经DNA甲基化抑制剂处理后,MCAO后的脑损伤程度减小<sup>[19]</sup>。DNA甲基转移酶(DNA Methyltransferase, DNMT)表达的活性调节和DNA甲基化状态在避免脑缺血细胞死亡中具有重要作用<sup>[19]</sup>。并且,卒中发生中的其它遗传机制都与诸如X染色体失活、基因组印迹等细胞进程有关,后者都由DNA甲基化媒介,特定基因的DNA甲基化媒介的调节在卒中的病理生理学中也扮演着重要角色<sup>[19]</sup>。研究表明,HHcy人群卒中风险

增加5倍,主要与大动脉粥样硬化和静脉血栓形成有关,同时,HHcy也通过其它机制影响IS发病,比如遗传学和表观遗传学方面,Hcy代谢通路上的基因变异(MTHFR、CBS、MTR和DNMT)增加HHcy人群中卒中发病风险<sup>[20]</sup>。Hcy或Hcy代谢关键酶甲基化水平改变会导致脑对缺血性损伤的耐受性发生变化<sup>[20]</sup>。

本研究呈阴性结果,有可能是由于标本的选取偏倚。甲基化研究可能选取病变组织更有意义,然而,由于在脑卒中患者中难以获得脑组织标本,而外周血标本容易获取和具有更好的实用性,因此,与大多数使用外周血细胞研究卒中流行病学一样<sup>[21]</sup>,对于表观遗传研究,外周血DNA已经包含足够信息<sup>[21]</sup>。本研究样本量小也是一个可能影响因素,但本研究只是探索性的定性研究。最后,也可能二者确实没有相关性。

本研究首次在中国人群中探讨Hcy关键酶基因DNA甲基化与ATS发病风险的关系,而表观遗传机制是可干预的,本研究结果对于卒中防治提供了一定依据。本研究未发现MTHFR和MTR基因DNA甲基化改变与汉族人群ATS的相关性。未来研究需要扩大样本,或在其他种族人群例如非洲、高加索人群中进行,需要采用高效率、特异性的新技术如检测全基因组范围的DNA甲基化的甲基化微阵列芯片和全基因组亚硫酸氢盐测序。

### 参考文献

- [1] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380: 2095-2128.
- [2] Murray CJ, Vos T, Lozano R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380: 2197-2223.
- [3] Liu M, Wu B, Wang WZ, et al. Stroke in China: epidemiology, prevention, and management strategies [J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6: 456-464.
- [4] 陈竺. 全国第三次死因回顾抽样调查报告[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008.
- [5] Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke [J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6: 149-161.
- [6] Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches [J]. *Lancet Neurol*, 2004, 3: 227-236.
- [7] 李刚, 赵东刚, 陈少军, 等. 血清同型半胱氨酸与血浆纤维蛋白原在脑梗死诊断中的价值[J]. *神经损伤与功能重建*, 2017, 12: 463-464.
- [8] Castro R, Rivera I, Struys EA, et al. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease [J]. *Clin Chem*, 2003, 49: 1292-1296.
- [9] Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase [J]. *Nat Genet*, 1995, 10: 111-113.
- [10] Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations [J]. *Genetic Epidemiol*, 1999, 17: 298-309.
- [11] Liu H, Yang M, Wang X, et al. The research on association of copy number variation in chromosome 9p21 region with atherothrombotic stroke in the Han Chinese population [J]. *J Neurol Sci*, 2017, 377: 88-94.
- [12] Wei LK, Sutherland H, Au A, et al. A potential epigenetic marker mediating serum folate and vitamin B12 levels contributes to the risk of ischemic stroke [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 167976.
- [13] Baccarelli A, Wright R, Bollati V, et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation [J]. *Epidemiology*, 2010, 21: 819-828.
- [14] Lin RT, Hsi E, Lin HF, et al. LINE-1 methylation is associated with an increased risk of ischemic stroke in men [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2014, 11: 4-9.
- [15] Lin HF, Hsi E, Liao YC, et al. Demethylation of Circulating Estrogen Receptor Alpha Gene in Cerebral Ischemic Stroke [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0139608.
- [16] Kim JM, Stewart R, Park MS, et al. Associations of BDNF genotype and promoter methylation with acute and long-term stroke outcomes in an East Asian cohort [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e51280.
- [17] Soriano-Tárraga C, Jiménez-Conde J, Giralt-Steinhauer E, et al. Global DNA methylation of ischemic stroke subtypes [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e96543.
- [18] Robertson KD. DNA methylation and human disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 597-610.
- [19] Qureshi IA, Mehler MF. Emerging role of epigenetics in stroke: part 1: DNA methylation and chromatin modifications [J]. *Arch Neurol*, 2010, 67: 1316-1322.
- [20] Kalani A, Kamat PK, Tyagi SC, et al. Synergy of homocysteine, microRNA, and epigenetics: a novel therapeutic approach for stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48: 157-168.
- [21] Fernández-Roig S, Lai SC, Murphy MM, et al. Vitamin B12 deficiency in the brain leads to DNA hypomethylation in the TCblR/CD320 knockout mouse [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2012, 9: 41.

(本文编辑:王晶)