

# 雌激素受体 $\alpha$ 基因甲基化与缺血性卒中的相关性研究

徐营营, 周晓艳, 谢兆宏, 许顺良, 于 君, 毕建忠

(山东大学第二医院神经内科, 山东省济南市 250033)

[关键词] 雌激素受体  $\alpha$ ; 基因; 甲基化; 缺血性卒中; 甲基化特异性聚合酶链反应

[摘要] 目的 DNA 甲基化作为一种主要的表观遗传修饰模式, 与许多疾病的发生及发展相关。而关于缺血性卒中病人基因甲基化方面的研究较少。本研究主要探讨人雌激素受体  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) 基因启动子区甲基化状态与缺血性卒中的相关性。方法 入选 83 例缺血性卒中患者和 94 例对照者, 所有患者记录梗死灶大小, 行 NIHSS 评分及 Barthel 指数评定。行颈动脉彩色超声及颅脑磁共振血管造影的患者, 计算 Crouse 积分及斑块指数, 评估颅内动脉硬化程度。所有研究对象均抽取清晨空腹静脉血, 采用甲基化特异性聚合酶链反应 (MSP) 检测静脉血 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化状态。结果 缺血性卒中组 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化检出率较对照组升高 (42.2% 比 19.1%,  $P < 0.05$ )。有 52 例患者行颈动脉彩色超声检查, 完全甲基化组、部分甲基化组及非甲基化组间颈动脉内膜中膜厚度、Crouse 积分及斑块指数存在差异 ( $P < 0.05$ )。有 57 例患者行颅脑磁共振血管造影检查, 非动脉硬化组、动脉硬化组、动脉狭窄组及动脉闭塞组甲基化检出率有升高趋势 (分别为 40.9%、42.9%、52.4%、57.1%), 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。根据梗死灶大小分为小梗死组、中等梗死组和大梗死组, 甲基化检出率依次增高 (分别为 32.8%、56.3%、77.8%), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。完全甲基化组、部分甲基化组及非甲基化组间 NIHSS 评分和 Barthel 指数存在差异 ( $P < 0.05$ )。结论 缺血性卒中患者 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化程度较对照组升高, 其与颈动脉硬化程度、梗死灶大小、神经功能缺损严重程度等相关。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

## Study of Relationship Between DNA Methylation of Estrogen Receptor- $\alpha$ Gene and Ischemic Stroke

XU Ying-Ying, ZHOU Xiao-Yan, XIE Zhao-Hong, XU Shun-Liang, YU Jun, and BI Jian-Zhong

(Department of Neurology, the Second Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250033, China)

[KEY WORDS] Estrogen Receptor- $\alpha$ ; Gene; Methylation; Ischemic Stroke; Methylation Specific Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** Epigenetic features such as DNA methylation are increasingly being recognized as an important factor in the occurrence of many complex diseases. However, there are limited data on the DNA methylation changes in ischemic stroke patients. This study is designed to determine whether the DNA methylation status of estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) gene promoter is related to ischemic stroke. **Methods** 83 ischemic stroke patients and 94 control subjects were selected for research. The infarct size was recorded and the severity of neurological impairment was assessed by National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) and Barthel Index. For patients with carotid artery color Doppler ultrasound and brain magnetic resonance angiography (MRA), Crouse score and plaque index were calculated to evaluate the severity of intracranial atherosclerosis. Morning fasting venous blood sample was taken for DNA extraction. The methylation status of ER- $\alpha$  gene promoter was measured by methylation specific polymerase chain reaction (MSP). **Results** The ER- $\alpha$  gene promoter methylation frequency was higher in ischemic stroke group than in control group (42.2% vs 19.1%,  $P < 0.05$ ). Carotid artery color ultrasound examination was performed in 52 patients, and there were statistical differences in carotid intima-media thickness (CMT), Crouse score and plaque index among full-methylation, part-methyl-

[收稿日期] 2015-06-04

[修回日期] 2015-07-16

[基金项目] 山东省科技计划项目(2011GSF11811); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2013WS0248)

[作者简介] 徐营营, 硕士, 医师, 研究方向为脑血管病, E-mail 为 xuyingying1987@163.com。周晓艳, 硕士, 医师, 研究方向为脑血管病, E-mail 为 zxydsu@126.com。通讯作者毕建忠, 博士, 主任医师, 研究方向为阿尔茨海默病及脑血管病, E-mail 为 bjz@sdu.edu.cn。

ation and non-methylation subgroups ( $P < 0.05$ ). Brain MRA was performed in 57 patients, and the methylation frequency had tendency to increase with the severity of intracranial atherosclerosis (respectively 40.9%, 42.9%, 52.4%, 57.1%), but there was no statistical significance ( $P > 0.05$ ). According to the size of infarct, the patients was divided into small infarction group, middle infarction group and large infarction group, and methylation frequency increased in turn (respectively 32.8%, 56.3%, 77.8%), the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There were statistical differences in NIHSS score and Barthel index among full-methylation, part-methylation and non-methylation subgroups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The ER- $\alpha$  gene promoter methylation frequency is higher in ischemic stroke patients than in control group. The ER- $\alpha$  gene promoter methylation status is related to the severity of carotid atherosclerosis, infarct size and the severity of neurological impairment.

卒中是环境因素与遗传因素共同作用导致的一种多因素的疾病,其中缺血性卒中最为常见。表观遗传学是指通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、核小体重塑等方式导致的基因表达水平的改变,它不引起 DNA 序列的改变,是连接环境因素与遗传因素、表型与基因型的桥梁<sup>[1]</sup>。DNA 甲基化作为一种主要的表观遗传修饰模式,与基因表达调控密切相关。目前国内外关于 DNA 甲基化与卒中关系的研究较少,结果并不完全一致,DNA 甲基化在卒中发病中的地位仍不十分清楚。雌激素具有调节血脂代谢、改善血管内皮功能、防止动脉粥样硬化、神经保护等作用。雌激素生物学效应的发挥不仅与雌激素本身的分泌及代谢相关,还取决于与其特异性受体相结合,通过雌激素应答元件调节基因转录。已有研究发现,雌激素受体  $\alpha$  (estrogen receptor- $\alpha$ , ER- $\alpha$ ) 基因启动子区甲基化参与 ER- $\alpha$  的表达调控,与基因沉默有关<sup>[2]</sup>。本研究采用甲基化特异性聚合酶链反应 (methylation specific polymerase chain reaction, MSP) 方法对 83 例缺血性卒中及 94 例对照者外周血 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化状态进行检测,以探讨 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化与缺血性卒中的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

缺血性卒中组系 2010 年 10 月至 2011 年 2 月间在山东大学第二医院神经内科住院的缺血性卒中患者,符合全国第 4 届脑血管病学术会议修订的诊断标准<sup>[3]</sup>,并经头颅 CT/MRI 证实;共 83 例,男 45 例,女 38 例,平均年龄  $61.60 \pm 9.73$  岁。对照组为同期健康体检者,病史及体格检查中无缺血性卒中证据,和(或)头颅 CT/MRI 检查正常;共 94 例,男 52 例,女 42 例,平均年龄  $61.67 \pm 6.98$  岁。排除肿瘤、神经系统退行性疾病、心源性脑栓塞、其他原因

所致的卒中、脑出血、动脉瘤、严重肺、肝、肾病及内分泌代谢疾病、结缔组织疾病等。

### 1.2 资料收集

所有受试者均由有经验的神内科医师进行详细的病史采集及体格检查,记录其临床资料及危险因素。记录颈动脉彩色超声检查结果,包括颈动脉内膜中膜厚度(carotid intima-media thickness, CIMT),计算 Crouse 积分<sup>[4]</sup>及斑块指数<sup>[5]</sup>。根据颅脑磁共振血管造影(magnetic resonance angiography, MRA)检查结果评估颅内动脉硬化程度<sup>[6]</sup>。测量梗死灶大小<sup>[7]</sup>。利用美国国立卫生研究院神经功能缺损评分(National Institute of Health Stroke Scale, NIHSS)<sup>[8]</sup>及 Barthel 指数<sup>[9]</sup>评价临床神经功能缺损严重程度。

### 1.3 标本采集

空腹 12 h 后,取肘静脉血 2 mL,乙二胺四乙酸抗凝,室温静置 2 min,2 h 内将标本于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。用作对照的胎盘组织离体后用生理盐水冲洗,切成 50 mg 左右的小块,于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存备用。

### 1.4 DNA 提取

使用离心柱型血液基因组 DNA 提取试剂盒及组织基因组 DNA 提取试剂盒,从全血标本及胎盘标本中提取基因组 DNA,严格按说明书操作。取提取的 DNA 溶液 2  $\mu\text{L}$ ,用紫外可见分光光度计检测其浓度和纯度。

### 1.5 DNA 的亚硫酸氢钠修饰

使用美国 Millipore 公司的 Cp Genome DNA Modification Kit 试剂盒进行亚硫酸氢盐修饰,严格按照说明书操作。取 DNA 溶液(含 DNA 1~2  $\mu\text{g}$ ),用去离子水补齐至 100  $\mu\text{L}$ ,加入 3 mol/L NaOH 7.0  $\mu\text{L}$ , $50^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min;加入 550  $\mu\text{L}$  新配制的修饰试剂 I, $50^{\circ}\text{C}$  避光水浴 16 h;加入 5.0  $\mu\text{L}$  试剂 III 及 750  $\mu\text{L}$  修饰试剂 II,室温孵育 10 min;离心弃上清,加入 70% 冰乙醇,反复漂洗;沉淀加入 20 mmol/L NaOH/90% EtOH 溶液 50  $\mu\text{L}$ ,室温孵育 5 min,以 5000 g 离心力离心 30 s;加

入 90% 的乙醇溶液 1 mL,离心弃上清,重复 1 次;室温干燥 10 ~ 20 min;加入 TE 缓冲液 80  $\mu$ L,50 ~ 60 $^{\circ}$ C 水浴 15 ~ 60 min;离心取上清用于后续实验或于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存备用。

表 1. ER- $\alpha$  的 MSP 引物

Table 1. MSP primer of ER- $\alpha$

引物名称	引物序列	产物大小	退火温度
非甲基化上游引物	5'-GGATATGTTTGTATTTTGTTC-3'	123 bp	50 $^{\circ}$ C
非甲基化下游引物	5'-ACAAACAATTCAAAAACCTCCAAC-3'	123 bp	50 $^{\circ}$ C
甲基化上游引物	5'-GATACGGTTTGTATTTTGTTCGC-3'	121 bp	48 $^{\circ}$ C
甲基化下游引物	5'-CGAACGATTCAAAAACCTCCAAC-3'	121 bp	48 $^{\circ}$ C

反应对照设置:用甲基转移酶(M. SssI)处理的胎盘组织 DNA 经亚硫酸氢盐修饰后作为阳性对照,以未用 M. SssI 处理的胎盘组织 DNA 经亚硫酸氢盐修饰后作为阴性对照,以去离子水作为空白对照。反应体系:AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix 5.0  $\mu$ L、360 GC Enhancer 1.0  $\mu$ L、去离子水 2.0  $\mu$ L、上游引物 0.5  $\mu$ L、下游引物 0.5  $\mu$ L、DNA 1.0  $\mu$ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,扩增 40 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 反应产物 5  $\mu$ L,2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.7 统计分析

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料两组间比较采用独立样本 *t* 检验,偏态分布计量资料组间均数比较采用秩和检验;计数资料用卡方检验或 Fisher 确切概率法分析。以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况统计

两组研究对象一般临床资料的比较,在年龄、性别构成上无显著性差异。缺血性卒中组与对照组相比,高血压(*P* < 0.001)、糖尿病(*P* = 0.023)、吸烟史(*P* = 0.043)、饮酒史(*P* = 0.025)、饮食情况(*P* = 0.009)、运动情况(*P* < 0.001)、腰围(*P* = 0.005)、收缩压(*P* < 0.001)、甘油三酯(*P* = 0.035)及胆固醇(*P* = 0.005)的差异有统计学意义。提示这些危险因素在缺血性卒中的发病中起重要作用。

2.2 MSP 电泳图

应用 MSP 方法检测缺血性卒中组及对照组的外周血 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化状态,电泳图见图 1。

1.6 甲基化特异性聚合酶链反应

在人类基因组数据库中查找基因及上游启动子系列,引物设计参考文献[10]。用于 MSP 的 ER- $\alpha$  引物名称、序列、产物片段大小及退火温度见表 1。

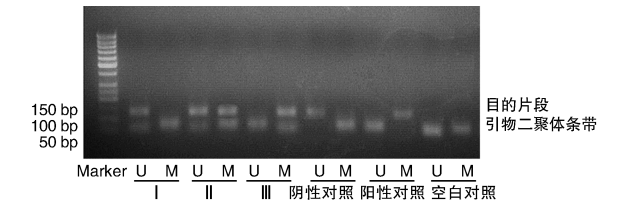


图 1. MSP 法检测 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化电泳图 M 为用 ER- $\alpha$  甲基化特异性引物扩增;U 为用 ER- $\alpha$  非甲基化特异性引物扩增;I、II、III 为 3 个不同样本。

Figure 1. Electropherogram of methylation status in ER- $\alpha$  gene promoter region detected by MSP

2.3 两组 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化状态分析

缺血性卒中患者共 83 例,ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化检出率为 42.2% (35/83);对照组共 94 例,甲基化检出率为 19.1% (18/94)。两组比较,差异有统计学意义(应用 Fisher 确切概率法,*P* = 0.002),缺血性卒中组 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化检出率显著高于对照组(表 2)。

表 2. 两组甲基化检出率比较

Table 2. Comparison of methylation frequency between two groups

分 组	例数	完全 甲基化	部分 甲基化	非甲基化	甲基化 检出率
缺血性卒中组	83	4	31	48	42.2%
对照组	94	2	16	76	19.1%

2.4 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化状态与动脉粥样硬化的关系

行颈动脉彩色超声检查的缺血性卒中患者共 52 人,按甲基化程度不同将其分为 3 组:完全甲基化组、部分甲基化组和非甲基化组。ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化状态与 CIMT、Crouse 积分及斑块指数的关系详见表 3。

表 3. 缺血性卒中组内不同甲基化程度亚组间 CIMT、Crouse 积分和斑块指数比较

Table 3. Comparison of CIMT, Crouse score and plaque index among different degree of methylation subgroups in ischemic stroke group

项 目	完全甲基化组	部分甲基化组	非甲基化组	P 值
例数	4	21	27	
CIMT( mm)	1.45 ± 0.58	0.97 ± 0.18	0.86 ± 0.18	0.004
Crouse 积分	6.05 ± 6.35	4.54 ± 3.05	2.44 ± 3.26	0.021
斑块指数				
0 级	5.9% (1/17)	11.8% (2/17)	82.4% (14/17)	
1 级	0.0% (0/2)	50.0% (1/2)	50.0% (1/2)	
2 级	0.0% (0/23)	56.5% (13/23)	43.5% (10/23)	0.002
3 级	25.0% (1/4)	50.0% (2/4)	25.0% (1/4)	
4 级	33.3% (2/6)	50.0% (3/6)	16.7% (1/6)	

行颅脑 MRA 检查的缺血性卒中患者共 57 人, 参考文献[6], 根据检查结果将其分为非动脉硬化组、动脉硬化组、动脉狭窄组及动脉闭塞组共 4 组, 各组甲基化检出率分别为 40.9% (9/22)、42.9% (3/7)、52.4% (11/21)、57.1% (4/7), 随着颅内动脉粥样硬化程度增加, ER-α 基因启动子区甲基化检出率有增高的趋势, 但差异无统计学意义(应用 Fisher 确切概率法,  $P=0.849$ )。

2.5 ER-α 基因启动子区甲基化状态与梗死灶大小的关系

参考文献[7], 根据梗死灶直径将缺血性卒中患者分为 3 组: 小梗死组、中等梗死组和大梗死组, 各组甲基化检出率分别为 32.8% (19/58)、56.3% (9/16)、77.8% (7/9), 随着梗死灶大小的增加, ER-α 基因启动子区甲基化检出率增高, 差异有统计学意义( $\chi^2=8.087, P=0.018$ )。

2.6 ER-α 基因启动子区甲基化状态与神经功能缺损程度的关系

按甲基化程度不同将缺血性卒中患者分为 3 组: 完全甲基化组、部分甲基化组和非甲基化组。ER-α 基因启动子区甲基化程度与 NIHSS 评分、Barthel 指数的关系见表 4。

表 4. 缺血性卒中组不同甲基化程度对应的 NIHSS 评分、Barthel 指数比较

Table 4. Comparison of NIHSS score and Barthel index among different degrees of methylation in ischemic stroke group

项 目	完全甲基化组	部分甲基化组	非甲基化组	P 值
例数	4	31	48	
NIHSS 评分	4.00 ± 4.90	3.29 ± 3.31	1.77 ± 2.59	0.020
Barthel 指数	78.75 ± 23.23	81.45 ± 21.99	92.19 ± 15.16	0.008

3 讨 论

DNA 甲基化是一种常见的表观遗传修饰模式, 是指在 DNA 甲基转移酶催化作用下, 甲基基团从 S 腺苷蛋氨酸转移至胞嘧啶的第 5 位碳原子上, 使之变成 5-甲基胞嘧啶的共价修饰方式, 主要发生在 CpG 双核苷酸序列内<sup>[1]</sup>。DNA 甲基化与基因表达调控密切相关, DNA 高甲基化可抑制基因转录, DNA 甲基化异常与许多疾病的发生发展相关。本研究显示, 缺血性卒中组 ER-α 基因启动子区甲基化检出率明显高于对照组, 提示外周血中 ER-α 基因启动子区高甲基化状态与缺血性卒中发病相关。

雌激素受体主要包括 ER-α、ER-β 及位于内质网的 G 蛋白偶联雌激素受体, 是雌激素发挥作用的中介。其中 ER-α 属于核受体超家族, 基因位于染色体 6q25, 包括 8 个外显子及 7 个内含子, 在启动子及第一外显子区域有典型的 CpG 岛, 包含多个甲基化敏感性限制性酶切位点, 具有受甲基化调控的结构基础。ER-α 基因启动子区高甲基化, 可能通过调控基因表达, 使 ER-α 基因沉默, ER-α 表达下调, 影响内源性雌激素的调节血脂代谢、改善血管内皮功能、防止动脉粥样硬化、神经保护等生物学效应的发挥, 从而影响卒中的发病<sup>[2]</sup>。

颅内外血管动脉粥样硬化、狭窄和闭塞是缺血性卒中发生的重要危险因素, 研究发现欧美人动脉粥样硬化病变好发于颅外动脉, 尤其是颈动脉, 而亚洲人好发于颅内动脉<sup>[11]</sup>。1999 年, Newman<sup>[12]</sup> 第一次报道了动脉粥样硬化中整体基因组 DNA 低甲基化改变。此外, 一些特殊基因启动子区域的甲基化改变与动脉粥样硬化的发生发展相关, 包括 ER、细胞外超氧化物歧化酶及 P53 基因等。其中 ER-α 基因高甲基化相关的基因失活促使 ER-α 表达下



调,影响雌激素生物学效应的发挥,与动脉粥样硬化及血管系统老化相关<sup>[2]</sup>。本文实验结果显示,不同甲基化程度分组间 CIMT、颈动脉斑块的 Crouse 积分及斑块指数比较,差异具有统计学意义,表明 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化与颈动脉粥样硬化有关,ER- $\alpha$  基因启动子区的甲基化修饰对颈动脉粥样硬化的影响可能是其促进缺血性卒中发病的机制之一。MRA 是一种较好的无创颅内血管狭窄检测方法,可以对颅内动脉硬化及狭窄情况进行评估。本实验结果显示 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化检出率随颅内动脉硬化程度增加有增高趋势,但差异无统计学意义,尚不能认为 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化状态与颅内动脉硬化有关;这可能与样本量少或检查手段不够精准有关。增加样本量,联合其他检查手段对颅内血管动脉硬化程度进行评估,有助于我们进一步了解分析 ER- $\alpha$  基因启动子区甲基化与颅内动脉粥样硬化及缺血性卒中发病的关系。

本研究利用 MSP 的方法揭示了 ER- $\alpha$  基因甲基化与缺血性卒中的关系,为研究缺血性卒中的发生机制并探索其早期预防措施提供了新的方向。

# [参考文献]

- [1] 王柏琦,陈艳华,蒋丽琴,等. 姜黄素对鼻咽癌细胞 RECK 基因甲基化以及 MMP-9 表达与活性的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2014, 42(2): 116-119.
- [2] Grimaldi V, Vietri MT, Schiano C, et al. Epigenetic reprogramming in atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2015, 17(2): 476.
- [3] 中华神经科学会,中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29

(6): 379.

- [4] Crouse JR, Harpold GH, Kahl FR, et al. Evaluation of a scoring system for extracranial carotid atherosclerosis extent with B-mode ultrasound[J]. Stroke, 1986, 17(2): 270-275.
- [5] Sutton-Tyrrell K, Alcorn HG, Wolfson SK Jr, et al. Predictors of carotid stenosis in older adults with and without isolated systolic hypertension[J]. Stroke, 1993, 24(3): 355-361.
- [6] 鞠炜仙,刚宝芝,王颖,等. 脑梗死患者血浆同型半胱氨酸与颅内动脉狭窄的相关性[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2009, 16(4): 271-272, 280.
- [7] 王晓,毕建忠,孙昭辉,等. 脑梗死和脑出血患者急性期血清可溶性 TRAIL 的表达[J]. 山东大学学报(医学版), 2009, 47(1): 79-81.
- [8] Brott T, Adams HP Jr, Olinger CP, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale [J]. Stroke, 1989, 20(7): 864-870.
- [9] Mahoney FI, Barthel DW. Functional evaluation: The Barthel index[J]. Md State Med J, 1965, 14: 61-65.
- [10] Sasaki M, Kotcherguina L, Dharia A, et al. Cytosine-phosphoguanine methylation of estrogen receptors in endometrial cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61(8): 3262-266.
- [11] Caplan LR, Gorelick PB, Hier DB. Race, sex and occlusive cerebrovascular disease: a review[J]. Stroke, 1986, 17(4): 648-655.
- [12] Newman PE. Can reduced folic acid and vitamin B12 levels cause deficient DNA methylation producing mutations which initiate atherosclerosis? [J]. Med Hypotheses, 1999, 53(5): 421-424.

(此文编辑 曾学清)