

血清 SAM/SAH 在 Hcy 引起动脉粥样硬化 基因组 DNA 甲基化中的作用

张辉¹, 郭伟², 高婷婷¹, 马燕琼¹, 惠淑宁¹, 马胜超², 杨晓玲², 蒋袁絮², 田珏², 姜怡邓²

(宁夏医科大学 1. 临床医学院, 2. 基础医学院, 宁夏银川市 750004)

[关键词] 动脉粥样硬化; B1 重复序列; DNA 甲基化; S-腺苷甲硫氨酸/S-腺苷同型半胱氨酸

[摘要] **目的** 探讨血清 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)/S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)比值在同型半胱氨酸(Hcy)致载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠血管动脉粥样硬化(As) B1 重复序列 DNA 甲基化改变中的作用。**方法** 36 只饲养 4 周龄 ApoE^{-/-}小鼠, 随机分为三组: 模型对照组、高蛋氨酸组、叶酸+VitB₁₂ 干预组, 每组 12 只, 分别给予不同饮食; 另取健康 4 周龄雄鼠(SPF 级 C57BL/6J) 12 只作为正常对照组, 饲以普通饮食。饲养 15 周后, HE 染色观察血管内动脉斑块的形成, 高效液相色谱检测血清中 Hcy、SAM、SAH 的水平改变, nMS-PCR 检测各组小鼠动脉粥样硬化斑块中 B1 重复序列 DNA 甲基化改变。**结果** 高蛋氨酸组血清 Hcy 与正常对照组相比升高约 2.39 倍 ($P < 0.01$), HE 染色可见高蛋氨酸组中有动脉斑块形成; 与正常对照组相比, 模型对照组、高蛋氨酸组 SAM/SAH 增加了 1.68 倍和 2.75 倍 ($P < 0.01$); 高蛋氨酸组 B1 重复序列 DNA 甲基化水平降低 11.8% ($P < 0.05$), 且与 SAM/SAH 比值呈明显负相关 ($r = -0.3638, P = 0.0210$)。**结论** ApoE^{-/-}小鼠中 B1 重复序列发生 DNA 低甲基化改变, 且与 SAM/SAH 呈负相关, 提示血清 SAM/SAH 可作为一个判断血管 As 的生物学指标。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Role of serum SAM/SAH in atherosclerosis genomic DNA methylation induced by Hcy

ZHANG Hui¹, GUO Wei², GAO Ting-Ting¹, MA Yan-Qiong¹, HUI Shu-Ning¹, MA Sheng-Chao², YANG Xiao-Ling², JIANG Yuan-Xu², TIAN Jue², JIANG Yi-Deng²

(1. Department of Clinical Medicine, 2. Department of Preclinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; B1 repetitive sequence; DNA methylation; S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of serum S-adenosylmethionine (SAM)/S-adenosylhomocysteine (SAH) in vascular atherosclerosis B1 repetitive sequence DNA methylation induced by Hcy in ApoE^{-/-} mice. **Methods** 36 male ApoE^{-/-} mice fed for 4 months were randomly divided into 3 groups: model control group, high methionine group and folic acid+VitB₁₂ intervention group, 12 mice in each group, and they were respectively fed with different diets. 12 healthy 4-week-old male C57BL/6J mice were taken as normal control group which were fed with normal diet for 15 weeks. The atheromatous plaque were detected by HE staining, the levels of SAM and SAH in the serum were detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and the methylation levels of B1 repetitive sequences by methylmion specific PCR (MSP). **Results** Compared with the normal control group, serum Hcy levels of high methionine group were significantly increased by 2.39 fold ($P < 0.01$). The arterio-plaque formed in the high methionine group by HE staining. The expression of SAM/SAH increased by 1.68 and 2.75 fold in the model control group and the high methionine group ($P < 0.01$). Compared with the normal control group, the methylation levels of B1 repetitive sequences significantly decreased 11.8% in the high methionine group ($P < 0.05$), and had negative correlation with SAM/SAH ($r = -0.3638, P = 0.0210$).

[收稿日期] 2016-06-08

[修回日期] 2016-09-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81360063 和 81560242); 宁夏教育厅资助项目(NGY2015092)

[作者简介] 张辉, 硕士研究生, 研究方向为心脑血管病理生理学研究, E-mail 为 15109587_042@163.com。通讯作者姜怡邓, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心脑血管病理生理学研究, E-mail 为 jydcan@126.com。

Conclusion B1 repetitive sequences in ApoE^{-/-} mice had DNA low methylation and it was negatively correlated with SAM/SAH, which suggested that serum SAM/SAH could be used as a biological index to determine vascular As.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是由遗传和环境因素共同作用的多因素复杂疾病^[1]。大量研究证实基因组 DNA 甲基化参与了 As 形成并影响其发展^[2]。B1 重复序列广泛存在于全基因组中,含有大量 CpG 岛,是发生 DNA 甲基化的主要区域,可作为衡量整体基因组 DNA 甲基化的重要标志^[3]。蛋氨酸循环作为必需氨基酸,其在体内代谢可与 5-甲基四氢叶酸共同合成甲硫氨酸,随之转化成 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM),可直接参与 DNA 的甲基化过程,该物质脱甲基后又可生成 S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH),高浓度的 SAH 可以抑制 DNA 发生甲基化改变,因此 SAM、SAH 可作为 DNA 发生甲基化的重要指标^[4]。而外周血相关疾病标志性指标的检测,因其操作简单、风险小、患者易于接受等特点,越来越受到人们的青睐^[5]。但关于外周血中 SAM/SAH 比值是否可以作为血管 As 病变的替代指标的研究则鲜有报道。因此,本研究复制载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠 As 动物模型,检测血清中 SAM/SAH 比值的变化及小鼠 As 斑块 B1 重复序列 DNA 甲基化改变,为 As 的诊断提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

12 只 SPF 级近交系 C57BL/6J 雄性纯合子小鼠和 36 只 ApoE^{-/-}小鼠(北京大学实验动物中心);西门子 ADVIA-2400 型全自动生化分析仪;生化检测试剂批号 01218LH(北京利德曼公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);高效液相色谱系统(日立高新技术公司,日本);HE 染液(武汉博士德公司,中国);CM1850 切片机(德国 Leica 公司);普通 PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国);DNA 提取试剂盒(TIAN-GEN 公司);DNA 甲基化修饰试剂盒(ZYMO 公司);基因引物(上海生工生物有限公司)。

1.2 动物模型与分组

选取 36 只 4 周龄雄性纯合子 ApoE^{-/-}鼠(SPF 级近交系 C57BL/6J),随机分为模型对照组、高蛋氨酸组、叶酸+VitB₁₂干预组,每组 12 只,分别给予普通饮食、高蛋氨酸饮食(普通饮食中加入 1.7%蛋氨酸)、高蛋氨酸加 0.06%叶酸和 0.004%VitB₁₂饮食;另取健康 4 周龄雄鼠(SPF 级 C57BL/6J) 12 只作为

正常对照组,饲以普通饮食。小鼠均饲养于 SPF 级环境内,分笼饲养,室内温度控制 20℃~25℃,自由摄食和饮水,饲养 15 周后,单侧眼球摘除取血并处死,取材、进行下一步实验。

1.3 小鼠血清 Hcy、SAM 和 SAH 浓度检测

取小鼠外周血,3000 g 离心 10 min,分离血清,高效液相色谱法测定 Hcy、SAM 和 SAH 浓度,0.22 μm 微孔滤过样本,加载到 C18 柱子中,由高效液相色谱系统连接到紫外检测器,进行监测、筛选。色谱图记录自动峰面积积分,标准品识别洗脱峰^[6]。

1.4 主动脉 HE 染色观察 As 斑块

小鼠处死后,分离主动脉,取腹主动脉进行石蜡包埋切片,用 HE 染色,普通光学显微镜观察血管及斑块的形态结构^[7]。

1.5 巢式降落式甲基化特异性 PCR 检测 B1 序列甲基化改变

按 DNA 提取试剂盒说明书提取各组血管组织全基因组 DNA,亚硫酸盐修饰法对全基因组 DNA 进行甲基化修饰,MSP 法检测 B1 序列甲基化程度的改变,针对 B1 启动子区,在线(<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)设计一对外引物及两对内引物(外引物上游 5'-ATAGAA GTG GAT GTT TAT AGT TAG TTA TTG-3',下游 5'-CAC TCC AAC TTT TTA ACC CTA AC-3';甲基化引物上游 5'-GTT AGT TAT TGG ATG GGT TAT ACG G-3',下游 5'-TAC AAC TAA AAA CAA AAA CTC CGA A-3';非甲基化引物上游 5'-GTT AGT TAT TGG ATG GGT TAT ATG G-3',下游 5'-TAC AAC TAA AAC AAA AAC TCC AAA-3')。外引物扩增反应条件为:94℃ 5 min,94℃ 30 s,69℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环,每个循环降 0.5℃ 至 52℃,72℃ 7 min;以外引物的 PCR 产物为模板,进行内引物的扩增反应条件与外引物相同,将内引物的产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析仪成像并分析甲基化条带和非甲基化条带的光密度,按公式进行计算:甲基化=甲基化 OD 值/(甲基化 OD 值+非甲基化 OD 值)×100%,取 3 次实验结果的平均值。

1.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料两组间比较采用配对 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料用 χ^2 检验,采用 Pearson 相关系数进行相关性分析,以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 Hcy 及血管 As 斑块面积的变化

与正常对照组相比,高蛋白组血清 Hcy 浓度升高约 2.39 倍 ($P < 0.01$);与模型对照组相比,高蛋白组血清 Hcy 浓度升高约 1.34 倍 ($P < 0.01$),提示高蛋白饮食能够导致 Hcy 代谢异常;与高蛋白组比较,叶酸+VitB₁₂干预组 Hcy 浓度下降约 41% ($P < 0.01$),提示叶酸和 VitB₁₂干预可有效改善高蛋白饮食诱发的 Hcy 代谢紊乱(图 1)。

光学显微镜下,正常对照组小鼠血管壁结构清晰,内膜表面光滑、完整,厚薄均匀,未见 As 斑块;而另三组 ApoE^{-/-}鼠均出现了不同程度血管斑块形成,其中高蛋白组有明显的 As 斑块,在 As 斑块中出现大量泡沫细胞堆积,局部可见巨噬细胞聚集,血管中膜结构严重破坏,脂质侵蚀,内膜明显增厚;模型对照组血管壁内膜增厚,厚薄不均;叶酸+VitB₁₂干预组血管斑块程度明显减轻,内中膜增厚程度较高蛋白组稍轻;提示 Hcy 促进 ApoE^{-/-}鼠 As 形成,叶酸和 VitB₁₂干预对高蛋白诱发的血管损伤具有拮抗作用(图 2)。

2.2 血清 SAM 和 SAH 浓度的变化

与正常对照组相比,模型对照组、高蛋白组及叶酸+VitB₁₂干预组血清 SAM 浓度明显增加,分别增加了 3.02 倍、3.41 倍和 2.46 倍 ($P < 0.01$);高蛋白组血清 SAH 浓度与正常对照组相比增加了 1.08 倍 ($P < 0.05$);模型对照组和高蛋白组 SAM/SAH 比值与正常对照组相比增加了 1.68 倍、2.75 倍 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型对照组相比,高蛋白组血清 SAM、SAH 浓度无明显变化,但 SAM/SAH 比值增加了 1.40 倍 ($P < 0.05$)。表明 Hcy 可以增加 SAM、SAH 浓度和 SAM/SAH 比值(图 3)。

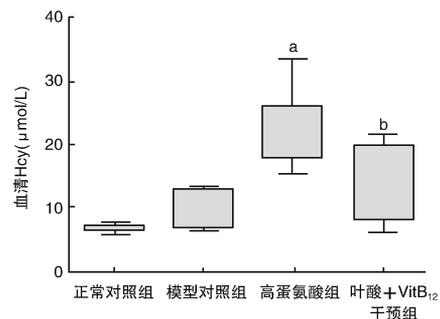


图 1. 各组血清 Hcy 水平 a 为 $P < 0.01$,与正常对照组和模型对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与高蛋白组比较。

Figure 1. Serum Hcy levels in each group

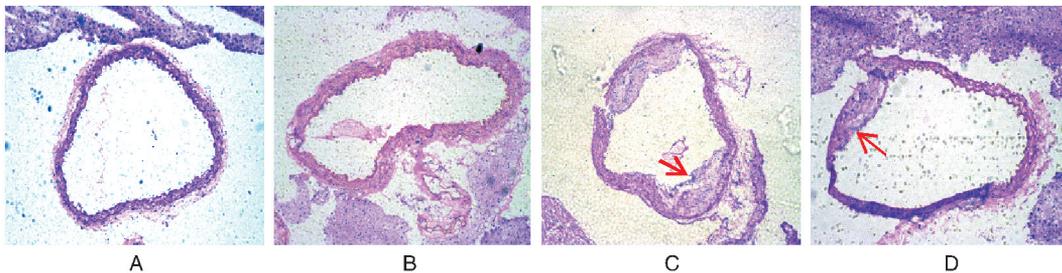


图 2. 各组主动脉 HE 染色 (100×) A 为正常对照组,B 为模型对照组,C 为高蛋白组,D 为叶酸+VitB₁₂干预组。

Figure 2. Aortic HE staining in each group (100×)

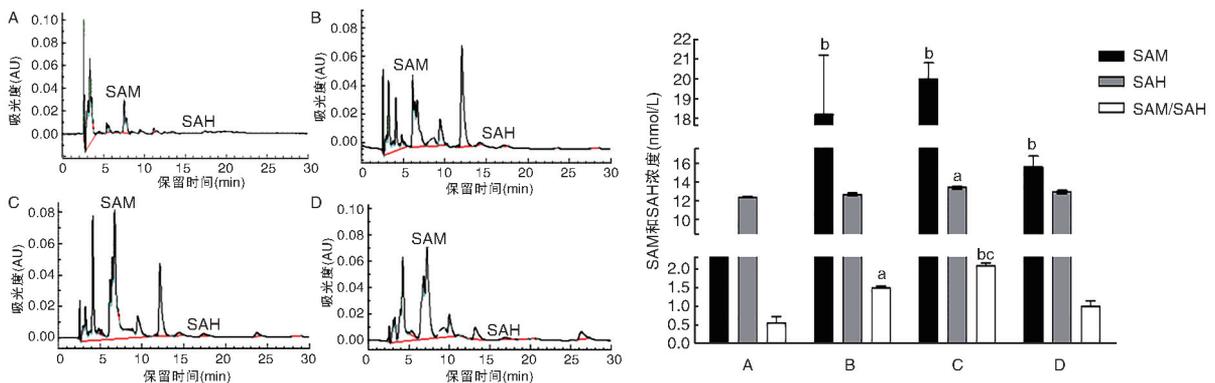


图 3. 各组血清 SAM、SAH 浓度及 SAM/SAH 比值变化 A 为正常对照组,B 为模型对照组,C 为高蛋白组,D 为叶酸+VitB₁₂干预组。a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;c 为 $P < 0.05$,与模型对照组比较。

Figure 3. Changes of serum SAM, SAH concentration and SAM/SAH ratio in each group (100×)

2.3 小鼠血管 B1 重复序列 DNA 甲基化改变

高蛋氨酸组 B1 重复序列 DNA 甲基化水平与正常对照组、模型对照组相比分别下降了 11.8%、

9.4% ($P < 0.05$), 表明 Hcy 能引起 B1 重复序列发生 DNA 低甲基化(图 4)。

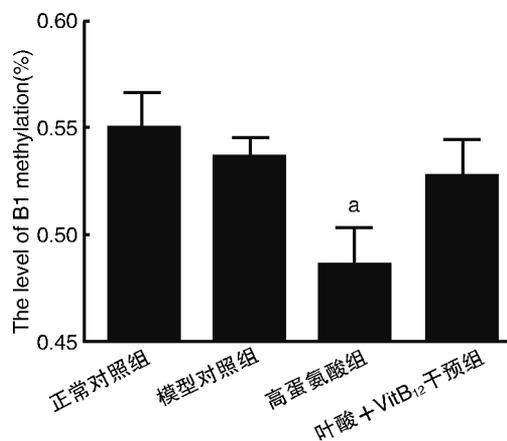
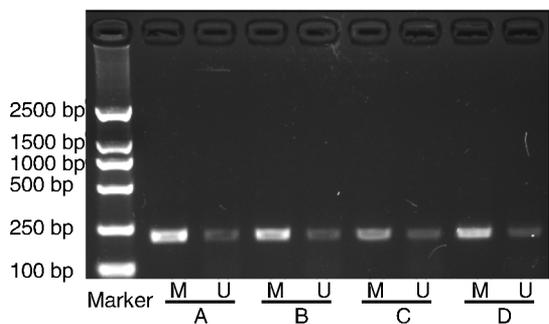


图 4. B1 重复序列 DNA 甲基化水平 a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组或模型对照组比较。

Figure 4. The methylation levels of B1 repetitive sequences

2.4 整体小鼠血管 B1 重复序列 DNA 甲基化与血清 SAM/SAH 的相关性分析

B1 重复序列 DNA 甲基化水平与 SAM/SAH 比值呈负相关 ($r = -0.3638$, $P = 0.0210$), 提示血清 SAM/SAH 比值与 B1 重复序列 DNA 甲基化水平相关(图 5)。

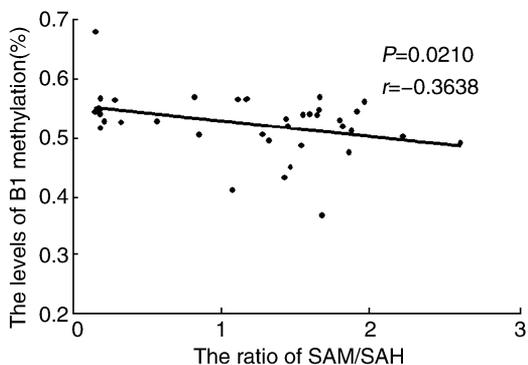


图 5. B1 重复序列 DNA 甲基化与 SAM/SAH 比值的相关性
Figure 5. The correlation between B1 repetitive sequences and SAM/SAH ratio

3 讨论

As 是由多种因素导致的慢性疾病,其形成包括平滑肌细胞增殖、内皮细胞损伤、脂质沉积等^[8]。本研究中,三组 ApoE^{-/-} 鼠均可见 As 斑块,而与模型对照组相比,高蛋氨酸组主动脉斑块面积显著增

加,证实本研究 ApoE^{-/-} 鼠 As 动物模型复制成功,与文献[9-10]报道一致。

B1 重复序列广泛存在于基因组中,富含基因组甲基化的主要底物 CpG 二核苷酸,由于极其广泛、丰富的分布,B1 重复序列甲基化变化可有效反映出基因组整体的甲基化状态,可作为 DNA 甲基化的指示性指标^[11]。本研究在检测了各组小鼠血管 B1 重复序列 DNA 甲基化改变后发现,相较于模型对照组,高蛋氨酸组 B1 重复序列 DNA 甲基化发生了明显的 DNA 低甲基化改变。提示喂饲高蛋氨酸饲料在建立 As 模型的同时,能够导致 ApoE^{-/-} 鼠整体 DNA 甲基化程度降低,而这种甲基化状态的改变,可能与体内蛋氨酸代谢相关。一些研究也表明 DNA 甲基化的改变与疾病的发生发展密切相关,如 Liu 等^[12] 研究 As 过程中发现,ApoE^{-/-} 小鼠在无明显 As 病变时基因组高低甲基化并存,而在明显的 As 斑块形成后基因组呈低甲基化状态;也有研究发现 ApoE^{-/-} 小鼠 As 斑块内基因组存在明显低甲基化状态^[13],Hcy 是 As 的独立危险因素,课题组前期在平滑肌细胞增殖中也观察到高 Hcy 可引起基因组广泛的去甲基化^[14],提示 B1 重复序列甲基化是 Hcy 引起血管 As 斑块形成的重要特征。

蛋氨酸是体内必须氨基酸,其在 ATP 的参与下生成 SAM,SAM 在甲基转移酶的作用下去甲基生成 SAH,而后水解成腺苷和 Hcy^[15],生成的 Hcy 主要经转甲基或转硫基途径进行代谢^[16]。文献[17]也

显示血管动脉粥样斑块中 SAM 和 SAM/SAH 比值明显降低,这可能是 Hcy 引起基因组广泛去甲基化的重要原因,这主要是由于蛋氨酸代谢异常,导致 SAH 堆积,进而使得 SAM 代谢受阻,SAM 可直接参与 DNA 的甲基化过程,而高浓度的 SAH 可以抑制 DNA 发生甲基化改变。本研究发现,血管斑块中 B1 重复序列 DNA 甲基化水平与 SAM/SAH 比值呈负相关,提示血清 SAM/SAH 比值与 B1 序列的甲基化水平密切相关,血清 SAM/SAH 可作为一个判断血管 As 的生物学指标。

综上,本研究在 ApoE^{-/-}鼠 As 模型的基础上,发现 B1 序列发生低甲基化改变,且与血清 SAM/SAH 比值呈负相关,提出了 SAM/SAH 可作为判断 As 改变的敏感指标,为今后 As 所致的基因甲基化状态改变提供新思路,但更深层次的作用机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Bloomfield GS, DeLong AK, Akwanalo CO, et al. Markers of atherosclerosis, clinical characteristics, and treatment patterns in heart failure: A case-control study of middle-aged adult heart failure patients in rural Kenya[J]. *Glob Heart*, 2016, 11(1): 97-107.
- [2] Hai Z, Zuo W. Aberrant DNA methylation in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 456: 69-74.
- [3] Tanas AS, Kuznetsova EB, Borisova ME, et al. Reduced representation bisulfite sequencing design for assessing the methylation of human CpG islands in large samples[J]. *Mol Biol*, 2015, 49(4): 689-699.
- [4] Stender S, Chakrabarti RS, Xing C, et al. Adult-onset liver disease and hepatocellular carcinoma in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency[J]. *Mol Genet Metab*, 2015, 116(4): 269-274.
- [5] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E[J]. *Science*, 1992, 258(5081): 468-471.
- [6] 李潮生,王振花,谭振宇,等. 氨基胍抑制氨基脲敏感性胺氧化酶活性对糖尿病大鼠血管并发症的预防作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(12): 1 213-219.
- [7] 杨洪强,朱杰,王中群,等. 血管生成素样蛋白 2 促进 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化内膜钙化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(5): 757-762.
- [8] Shen Y, Ward NC, Hodgson JM, et al. Dietary quercetin attenuates oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice fed a high-fat diet: a critical role for heme oxygenase-1[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65(11): 908-915.
- [9] 陈文强,张运. 动脉粥样硬化易损斑块的动物模型和检测技术[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(7): 649-656.
- [10] 孔繁琪,马胜超,张辉. MMP-9/TIMP-1 在 HHcy 致 ApoE^{-/-}小鼠肾脏损伤中的作用机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(6): 541-548.
- [11] Wang HC, Chiang WF, Huang HH, et al. Promoter hypermethylation of the gene encoding heat shock protein B1 in oral squamous carcinoma cells[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2013, 115(3): 376-384.
- [12] Liu Y, Tian T, Zhang H, et al. The effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid on flow-mediated vasodilation in patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 235(1): 31-35.
- [13] Lund, Hare DL. High dietary methionine plus cholesterol stimulates early atherosclerosis and late fibrous cap development which is associated with a decrease in GRP78 positive plaque cells[J]. *Int J Exp Pathol*, 2009, 90(3): 311-320.
- [14] 吴凯,马胜超,孙炜炜,等. 在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠和人脐静脉平滑肌细胞中同型半胱氨酸对 B1 和 Alu 重复序列甲基化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(9): 785-790.
- [15] Liu C, Wang Q, Guo H, et al. Plasma S-adenosylhomocysteine is a better biomarker of atherosclerosis than homocysteine in apolipoprotein E-deficient mice fed high dietary methionine[J]. *J Nutr*, 2008, 138(2): 311-315.
- [16] 康静婷,梁前进,梁辰,等. 表观遗传学研究进展[J]. *科技导报*, 2013, 31(19): 66-74.
- [17] Zhang J, Zheng YG. SAM/SAH analogs as versatile tools for SAM-dependent methyltransferases[J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(3): 583-597.

(此文编辑 文玉珊)