

急性缺血性脑卒中患者外周血白细胞 miR-335 基因启动子甲基化状态及意义

袁梅¹, 周成芳¹, 汤永红¹, 袁海军²

(南华大学附属第二医院 1.神经内科, 2.急诊科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 缺血性脑卒中; DNA 甲基化; microRNA-335

[摘要] **目的** 探讨急性缺血性脑卒中(AIS)患者外周血白细胞 microRNA-335(miR-335)基因启动子区甲基化状态及在发病中的意义。**方法** 应用生物信息学分析并使用亚硫酸氢钠测序(BSP)法检测 30 例 AIS 患者及 30 例健康对照者外周血白细胞 miR-335 基因(MIR335)启动子区甲基化状态,比较并分析与卒中严重程度(NIHSS 评分)和血浆 miR-335 水平的关系。**结果** 生物信息学分析显示 MIR335 启动子区与 CpG 岛区域重叠;AIS 患者外周血白细胞中 MIR335 启动子区呈高甲基化水平,明显高于健康对照组($P<0.01$);AIS 患者 MIR335 甲基化水平与 miR-335 表达水平呈负相关($r=-0.72, P<0.01$),与病情严重程度呈正相关($r=0.74, P<0.01$)。**结论** AIS 患者外周血白细胞 MIR335 启动子区呈明显高甲基化状态,可能参与了脑卒中缺血后调控。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Relationship between acute ischemic stroke and miR-335 gene promoter methylation of peripheral blood leucocyte in patients

YUAN Mei¹, ZHOU Cheng-Fang¹, TANG Yong-Hong¹, YUAN Hai-Jun²

(1.Department of Neurology, 2.Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Acute ischemic stroke; DNA methylation; microRNA-335

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between acute ischemic stroke (AIS) and miR-335 gene (MIR335) promoter methylation of peripheral blood leucocyte in patients. **Methods** The study included 30 AIS patients and 30 age- and sex-comparable healthy controls. Bioinformatics database analysis was used to describe the CpG island of MIR335 promoter region. The quantitative methylation level in the 33 CpG sites of the MIR335 promoter was measured by bisulfite sequencing PCR in each participant. Stroke severity was evaluated by the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). **Results** Bioinformatic searches show that the fragment surrounding the transcription start site of MIR335/MEST exhibits a characteristic CpG island which overlaps with the promoter region. Compared with healthy controls, the levels of MIR335 promoter methylation were significantly higher in stroke patients ($P<0.01$). The level of MIR335 promoter methylation was negatively correlated to the level of plasma miR-335 ($r=-0.72, P<0.01$), and positively correlated to NIHSS ($r=0.74, P<0.01$). **Conclusion** Ischemic stroke patients have higher MIR335 promoter methylation levels in the peripheral blood leucocyte than those in the controls. The study implies that hypermethylation of MIR335 promoter CpG island might be involved in ischemic stroke.

启动子区 CpG 岛 DNA 甲基化抑制基因转录起始从而沉默基因表达,是基因表达调控的重要方式。越来越多的证据表明^[1-2],一些微小 RNA(mi-croRNA, miRNA)也受到其编码基因启动子区 DNA

甲基化的表观遗传沉默。前期研究^[3]发现,mi-croRNA-335(miR-335)明显下调参与急性缺血性脑卒中(acute ischemic stroke, AIS)发病后病理损伤及损伤后修复。我们推测, AIS 患者 miR-335 低表达也受

[收稿日期] 2016-12-12

[修回日期] 2017-05-18

[基金项目] 湖南省教育厅优秀青年基金项目(15B209)

[作者简介] 袁梅,博士,副主任医师,研究方向为脑血管病防治,E-mail 为 meimeihaijun@163.com。通讯作者周成芳,副教授,研究方向为脑血管病防治,E-mail 为 55584552@qq.com。汤永红,教授,硕士研究生导师,研究方向为脑血管病防治。

到其基因启动子区 CpG 岛高甲基化调控,而目前尚未见报道。本研究应用生物信息学软件分析并使用亚硫酸氢钠测序(bisulfite sequencing PCR, BSP)方法检测 AIS 患者外周血白细胞 miR-335 基因(MIR335)启动子区 CpG 岛甲基化状态,探讨其在 AIS 发病中的作用,有助于我们进一步揭示脑卒中的发生机制,为脑卒中的早期诊治提供了更加广阔的前景。

1 资料和方法

1.1 临床资料

本研究连续收集 2015 年 1 月至 3 月南华大学附属第二医院神经内科住院的发病 14 天内(≤ 14 天)的 AIS 患者,共 30 例,其中男性 15 例,女性 15 例,年龄 61.5 ± 8.6 岁,所有入选患者根据病史、神经功能缺损和核磁共振(MRI+DWI+MRA)结果,均符合 1995 年我国第四次全国脑血管病会议制定的脑卒中诊断标准和国际 TOAST 卒中分类标准,最终被确诊为大动脉粥样硬化性卒中。根据起病至入组时间,AIS 组患者分为 ≤ 3 天组(12 例)、4~7 天组(10 例)和 8~14 天组(8 例)。对患者进行美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health stroke scale,NIHSS)评分。健康对照组来自同期本院体检中心健康普查的健康随机个体,共 30 例,其中男性和女性各 15 例,年龄 59.2 ± 8.4 岁。两组之间性别、年龄均无明显差异。入选和排除标准参考前期研究^[4]。本研究由医院伦理委员会批准,每个研究对象或家属均获得知情同意并签署同意书。

1.2 标本采集与处理

所有受测者均采用 EDTA 抗凝管抽取静脉血 5 mL,常温下 3000 r/min 离心 10 min,分别收集上层血清 2 mL 和血细胞沉淀保存,于 -20°C 保存,用于提取 RNA 和 DNA。

1.3 MIR335 启动子生物信息学分析

通过美国国立生物技术信息中心 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)数据库搜索并获得 miR-335 基因的 5'上游的 5 kb 序列,然后使用 CpG 岛搜索网站 MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index.html>)数据库扫描该基因序列中的 CpG 岛,参数标准设置:GC% $> 50\%$,ObsCpG/ExpCpG > 0.60 ,长度 > 200 bp,相邻岛之间的间隙 > 100 bp。启动子预测使用 BDGP 在线分析软件(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)对该基因序列进行可能的启动子搜索,最低可信值设为 0.90。使用

MethPrimer 设计 BSP 引物。

1.4 血清 miR-335 表达水平的检测

使用标准 Trizol 方案(Trizol 抽提试剂盒,Invitrogen,CA,USA)从血浆中提取总 RNA,用分光光度计检测 RNA 质量。通过茎环引物使用逆转录试剂盒(TaKaRa,大连,中国)逆转录 RNA,使用 SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems,USA)试剂盒在 Applied Biosystems 7500 PCR 系统进行定量 PCR 以检测 miRNA 表达,记录样本 CT 值,操作严格按照制造商说明书进行。以 cel-miR-39 为内参。miR-335 引物、内参 cel-miR-39 引物与 PCR 反应条件参考先前研究^[3],引物由大连 TaKaRa 合成。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法确定 miR-335 相对表达量。

1.5 DNA 提取与甲基化分析

使用全血 DNA 提取试剂盒(Promega,USA)分离提取来自患者外周血白细胞的基因组后用 BSP 法进行 DNA 甲基化分析。使用 EZ DNA Methylation-Gold™ 试剂盒(Zymo Research Corporation,CA,USA)根据使用说明书对基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐转化和纯化。运用 PCR 进行扩增,PCR 上游引物为 5'-AAA GGG GGT TTT GTT TTT TTA ATT-3',下游引物为 5'-CCC ACA AAC TAC CCA CAA AC-3',反应条件:94°C 5 min 1 次;94°C 40 s,56°C 40 s,72°C 50 s,循环 35 次;最后 72°C 延伸 8 min。扩增产物 465 bp。引物由大连 TaKaRa 合成。将扩增的 PCR 产物纯化并克隆到 pMD19-T(TaKaRa,大连),送检公司测序。通过 QUMA(<http://quma.cdb.riken.jp/>)分析每个 DNA 克隆序列的甲基化状态并比较。

1.6 统计学分析

统计学分析采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,比较每个 DNA 克隆序列的甲基化状态采用 QUMA 软件分析,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较使用 *t* 检验,NIHSS 分值与 CpG 甲基化水平相关性采用 Spearman 等级相关分析,miR-335 表达水平与 CpG 甲基化水平相关性采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 被认为差异有显著性。

2 结果

2.1 MIR335 启动子区的生物信息学分析结果

通过 NCBI 检索,首先选择 MIR335 编码基因上游 5 kb 进行分析,MIR335 编码基因位于 MEST 基因第 2 个内含子区,MIR335 与 MEST 共用启动子区。MIR335 编码基因上游 -3797 bp ~ -3772 bp 和

-743 bp~-589 bp 区分别为 MEST 基因的第一、二个内含子。因此,本研究选取 MIR335 上游-5000 bp~-3798 bp(共 1203 bp)序列进行启动子区域分析,使用 Methprimer 数据库扫描该序列中的 CpG 岛,发现在其上游-4899 bp~-4542 bp 和-4196 bp~-3845 bp 区域存在 CpG 岛。BDGP 在线数据库对上述序列分

析,结果显示存在两个分值在 0.95 以上的启动子区间,分别是 -4871 bp~-4821 bp 和 -4064 bp~-4014 bp,该区域坐落在 CpG 岛区域内,表明该区域 CpG 岛 DNA 甲基化水平可能干扰 miR-335 表达。使用 Methprimer 设计 BSP 引物,扩增产物长度为 465 bp,包含 33 个 CpG 位点(图 1)。

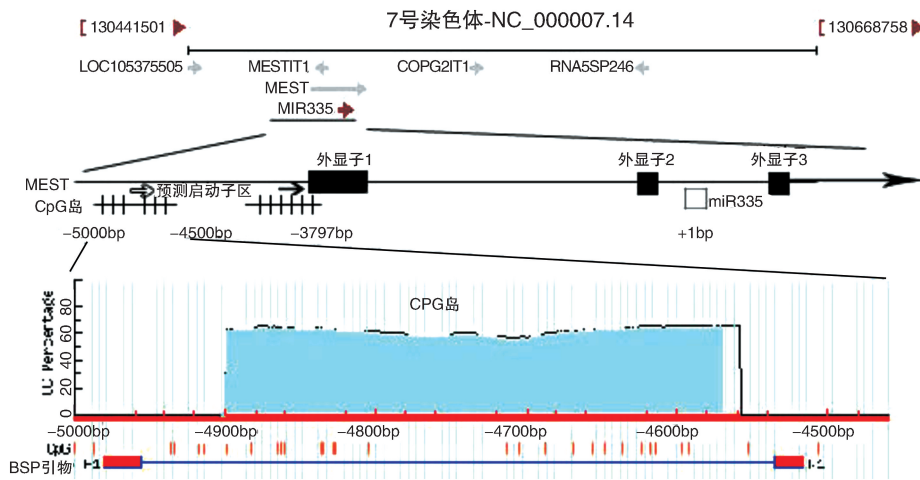


图 1. MEST/MIR335 基因 5'-调节序列中 CpG 岛示意图 Pre-has-miR-335 起始位标记为+1,短竖线表示 CpG 位点,预测启动子区、CpG 岛和 BSP 引物区如图所示。

Figure 1. Schematic map of the CpG island extending into 5'-regulatory sequence of MEST/MIR335

2.2 血清 miR-335 表达分析

使用 qRT-PCR 来分析各标本 miR-335 的表达,结果发现,与健康对照组 (1.00 ± 0.36) 相比, AIS 组血清 miR-335 表达 (0.34 ± 0.26) 明显下调,差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2.3 外周血白细胞 MIR335 启动子区甲基化状态的分析

BSP 法对检查的 33 个 CpG 位点进行检测,使

用 QUMA 软件分析,以样本(甲基化 CpG 位点个数)/33 表示该样本甲基化状态,发现 AIS 患者外周血白细胞 MIR335 启动子区甲基化 (0.31 ± 0.14) 明显高于健康对照组 (0.06 ± 0.05),差异有显著性 ($P < 0.01$)。AIS 患者 ≤ 3 天组 (0.32 ± 0.15)、4~7 天组 (0.30 ± 0.13) 和 8~14 天组 (0.31 ± 0.14) 甲基化水平均高于健康对照组(均 $P < 0.05$),AIS 三个亚组之间比较差异无显著性 ($P > 0.05$;图 2)。

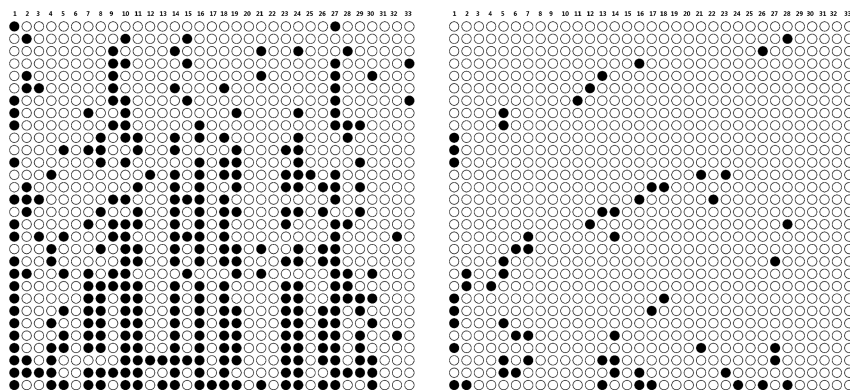


图 2. MIR335 基因上游 5'-调控序列 33 个 CpG 位点甲基化状态 左图为 AIS 组,右图为健康对照组;空心圆圈表示非甲基化 CpG 位点,实心圆圈表示甲基化 CpG 位点。

Figure 2. Methylation status of 33 CpG sites in 5'-regulatory sequence of MIR335

2.4 AIS 患者外周血白细胞 MIR335 启动子区甲基化状态与 miR-335 表达水平的相关性

采用 Pearson 相关分析患者外周血 DNA 甲基化对 miR-335 表达的影响, 结果发现该区域甲基化水平与 miR-335 表达水平呈明显负相关($r = -0.72, P < 0.01$; 图 3)。

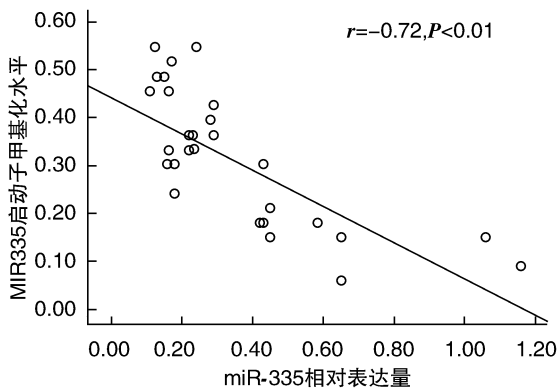


图 3. AIS 患者外周血白细胞 MIR335 启动子甲基化水平与 miR-335 相对表达量的相关性

Figure 3. Relationship between MIR335 methylation level in peripheral white cells and plasma miR-335 in AIS patients

2.5 AIS 患者 NIHSS 评分与 MIR335 启动子区甲基化水平的相关性

对所有 AIS 患者在入组时 NIHSS 评分与 MIR335 启动子区甲基化水平进行 Spearman 相关分析, 发现二者呈明显正相关($r = 0.74, P < 0.01$; 图 4)。

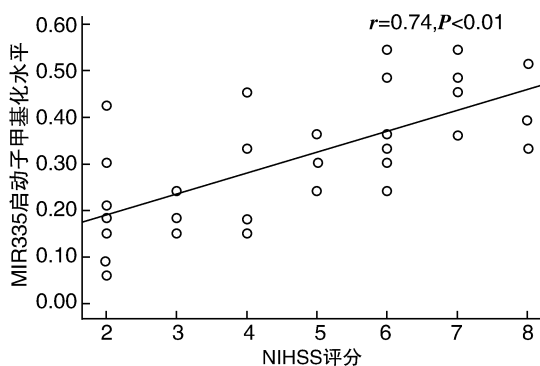


图 4. AIS 患者外周血白细胞 MIR335 启动子甲基化水平与 NIHSS 评分的相关性

Figure 4. Relationship between MIR335 methylation level in peripheral white cells and NIHSS score in AIS patients

3 讨论

启动子区 DNA 甲基化调控是基因表达转录水

平调控的重要方式。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶催化下, 利用 S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基转移至 DNA 胞嘧啶(C)的 5 位碳上生成 5-甲基胞嘧啶的过程, 这在维持机体正常的细胞功能、生长发育、肿瘤发生和疾病损伤中起重要作用。在真核生物基因组中某些区段, CpG 双核苷酸含量大于 50% 且长度超过 200 bp, 定义为 CpG 岛。而位于 CpG 岛内的 CpG 二核苷酸序列常处于未甲基化状态, 在许多疾病的发生、发展过程中, 特定基因启动子区 CpG 岛异常高甲基化状态可导致基因表观遗传学沉默, 在其发病中起着至关重要的作用。研究表明, 基因启动子区甲基化水平改变可影响动脉粥样硬化及缺血性脑卒中的发生^[5], 缺血缺氧后也可导致脑细胞多种基因启动子区甲基化水平随之发生改变^[6-7], 脑缺血卒中相关基因启动子区 CpG 岛甲基化状态改变被认为是调控基因表达影响卒中发生、卒中后损伤及修复的重要因素之一, 是近年来研究的热点。

前期研究^[3]发现, AIS 患者存在 miR-335 表达水平明显下降, 与脑卒中后病情密切相关。然而, 缺血性脑卒中诱导 miR-335 表达下调的机制目前尚不清楚。miR-335 编码基因位于第 7 号染色体 MEST 基因座中的第二个内含子中, 其基因转录表达受 MEST 基因上游 5'-调控区启动子调控。有关在缺血性脑卒中发病后是否存在基因启动子区甲基化调控机制介导 miR-335 表达下调目前未见相关报道。值得注意的是, miRNA 和 DNA 甲基化两种表观遗传学调控方式可相互影响, 构成基因表达调控的复杂网络^[8], miR-335 在胃癌中有表达下调, 其下调的原因是与启动子区高甲基化水平有关^[9]。本研究通过病例-对照研究观察外周血白细胞中 MIR335 编码基因启动子区 DNA 甲基化状态, 探讨卒中后 miR-335 表达下调的可能机制。

为探讨启动子区甲基化对 miR-335 调控的机制, 我们首先采用生物信息学数据库对选择 MIR335 上游 5 kb 序列启动子 CpG 岛进行预测分析, 发现 MIR335/MEST 基因启动子区域位于 MIR335 编码基因上游 -3798 bp 之前。使用 Methprimer 软件数据库扫描该序列中 CpG 岛, 发现在其上游 -4899 bp ~ -4542 bp 和 -4196 bp ~ -3845 bp 区域存在 CpG 岛, 与 CpG Island Searcher 和 CpGplot 等方法检索结果^[9]基本一致。同时使用 BDGP 数据库进行启动子预测分析发现存在 -4871 bp ~ -4821 bp 和 -4064 bp ~ -4014 bp 启动子区域, 提示启动子区与 CpG 岛区域重叠, 表明该启动子区域 CpG 岛甲基化水平增

高可能干扰基因转录,存在基因表达甲基化调控的结构基础。继续使用 Methprimer 信息学软件对该启动子区域设计 BSP 引物,引物扩增产物包含 33 个 CpG 位点。该区域的 CpG 位点甲基化水平与 miR-335 表达关系密切^[9]。本研究进一步通过实验分析各样本 CpG 位点甲基化状态并进行比较。

本研究通过病例-对照研究发现 AIS 患者血清 miR-335 水平明显下降,低于健康对照组,与先前的研究^[3]相一致。与健康对照组相比较,AIS 患者外周血白细胞中 MIR335 编码基因启动子区 DNA 甲基化水平明显增高,且发病后采血时间 ≤ 3 天、4~7天和 8~14 天的 3 个不同时间亚组的甲基化水平均高于健康对照组。进一步分析发现该区域甲基化水平与 miR-335 表达呈负相关,并且甲基化水平与神经功能缺损严重程度呈正相关,与前期发现^[3] miR-335 表达水平与病情严重程度呈负相关结论相照应。这提示 MIR335 编码基因启动子区 DNA 甲基化高水平调控与 AIS 密切相关,在缺血性脑卒中发病后,可能在早期损伤阶段及随后的修复阶段均有高甲基化异常的存在导致 miR-335 低表达。

我们分析了缺血性卒中与患者外周血而不是脑组织分离的基因组 DNA 中 MIR335 基因启动子区甲基化水平的相关性。外周血 DNA 甲基化是否能代表脑卒中缺血区 DNA 甲基化状态目前尚不完全清楚。然而,有研究^[10-11]发现外周血标本基因 DNA 甲基化水平与脑卒中存在相关性。特别注意的是 Lin 等^[10]通过分析缺血性脑卒中患者外周血中雌激素受体 α 启动子的甲基化水平发现脑卒中组甲基化水平低于对照组,这与大鼠模型脑组织研究^[12]结论相一致。表明外周血 DNA 甲基化与脑组织局部甲基化水平可能存在一定相关性。虽然难以验证患者大脑和外周血之间甲基化水平的相关性,但血液样本由于易于采集获得、无创及更好的实践性特点,在一定程度上反映患者机体状态,因而具有其医学价值。

总之,本研究通过生物信息学方法和病例-对照分析缺血性脑卒中患者外周血白细胞 MIR335 基因上游启动子甲基化状态,提示 AIS 患者甲基化水平明显上调,并与 miR-335 水平呈负相关,与脑卒中病情严重程度呈正相关。由于本研究的样本量较少,关于 MIR335 基因 DNA 甲基化状态改变参与缺血性脑卒中发病后的调控机制仍需进一步实验研究

证实。

[参考文献]

- [1] Doecke JD, Wang Y, Baggerly K. Co-localized genomic regulation of miRNA and mRNA via DNA methylation affects survival in multiple tumor types[J]. *Cancer Genet*, 2016, 209(10): 463-473.
- [2] Agustriawan D, Huang CH, Sheu JJ, et al. DNA methylation-regulated microRNA pathways in ovarian serous cystadenocarcinoma: A meta-analysis[J]. *Comput Biol Chem*, 2016, 65: 154-164.
- [3] 袁梅,周成芳,汤永红,等.急性缺血性脑卒中患者血清 miRNA-335 表达水平及临床意义[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(6): 589-593.
- [4] 袁梅,周成芳,夏健,等.急性缺血性脑卒中患者血清钙调蛋白水平检测及意义[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 30(7): 645-647.
- [5] 徐营营,周晓艳,谢兆宏,等.雌激素受体 α 基因甲基化与缺血性卒中的相关性研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(10): 1 021-025.
- [6] Meller R, Pearson A, Simon RP. Dynamic changes in DNA methylation in ischemic tolerance[J]. *Front Neurol*, 2015, 6: 102.
- [7] Hartley I, Elkhoury FF, Heon Shin J, et al. Long-lasting changes in DNA methylation following short-term hypoxic exposure in primary hippocampal neuronal cultures [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77 859.
- [8] 钱星,林超,徐斌,等.动脉粥样硬化中 DNA 甲基化与微小 RNA 的相互作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(12): 1 275-280.
- [9] Li Z, Li D, Zhang G, et al. Methylation-associated silencing of microRNA-335 contributes tumor cell invasion and migration by interacting with RASA1 in gastric cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2014, 4(6): 648-662.
- [10] Lin HF, Hsi E, Liao YC, et al. Demethylation of circulating estrogen receptor alpha gene in cerebral ischemic stroke[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0139 608.
- [11] Baccarelli A, Wright R, Bollati V, et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation [J]. *Epidemiology*, 2010, 21(6): 819-828.
- [12] Westberry JM, Prewitt AK, Wilson ME. Epigenetic regulation of the estrogen receptor alpha promoter in the cerebral cortex following ischemia in male and female rats [J]. *Neuroscience*, 2008, 152(4): 982-989.

(此文编辑 许雪梅)