

宁夏回汉族 As 患者外周血中 ICAM-1 基因 DNA 甲基化与血脂水平的关系

吴凯¹, 马胜超¹, 徐灵博¹, 张辉¹, 王艳华¹, 杨晓玲¹, 姜怡邓¹, 沈江涌²

(1. 宁夏医科大学基础医学院; 2. 宁夏医科大学总医院烧伤整形外科, 宁夏银川市 750004)

[关键词] 细胞间黏附分子 1; DNA 甲基化; 动脉粥样硬化; 血脂

[摘要] **目的** 探讨宁夏回、汉族动脉粥样硬化(As)患者外周血中细胞间黏附分子 1(ICAM-1)基因 DNA 启动子区甲基化水平及其与血脂的关系。**方法** 选择经颈部彩色多普勒超声确诊的回、汉族 As 患者各 50 例,全自动生化分析仪检测血脂水平,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测外周血 ICAM-1 mRNA 的表达,巢式降落式甲基化特异性 PCR(nt-MSP)检测外周血 ICAM-1 基因 DNA 启动子区甲基化程度。**结果** 与回族 As 组相比,汉族 As 组甘油三酯显著升高($P<0.001$);回族 As 患者 ICAM-1 表达水平较汉族 As 组升高($P<0.001$),ICAM-1 DNA 甲基化在回族 As 患者中下调显著($P<0.001$);利用相关性分析发现外周血 ICAM-1 基因甲基化水平与血清中甘油三酯呈负相关($r=-0.5783, P<0.001$)。**结论** 回族 As 患者外周血中 ICAM-1 DNA 低甲基化与 As 的发生发展相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The relationship between ICAM-1 DNA methylation and serum lipid level in Hui and Han race patients with atherosclerosis of Ningxia

WU Kai¹, MA Sheng-Chao¹, XU Ling-Bo¹, ZHANG Hui¹, WANG Yan-Hua¹, YANG Xiao-Ling¹, JIANG Yi-Deng¹, SHEN Jiang-Yong²

(1. School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University; 2. Department of Burn and Plastic Surgery of General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[KEY WORDS] Intercellular adhesion molecule 1; DNA methylation; Atherosclerosis; Blood lipids

[ABSTRACT] **Aim** To study the relationship between DNA methylation level of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and atherosclerosis (As) occurrence, development and changes of blood lipids. **Methods** The atherosclerosis patients (100 patients from Hui and Han ethnic with As) were confirmed by carotid artery Doppler ultrasound and the serum lipids were measured by ADVIA 2400 automatic biochemistry analyzer, ICAM-1 mRNA expression was determined by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The methylation status of ICAM-1 gene promoter region was examined using nest touch down methylation specific polymerase chain reaction (nt-MSP). **Results** Compared with As patients from Han ethnic, ICAM-1 mRNA expression levels were promoted in Hui ethnic ($P<0.001$), and the levels of ICAM-1 promoter methylation was decreased in Hui ethnic ($P<0.001$). Compared with As patients from Hui ethnic, triglycerides (TG) concentrations was promoted in As patients from Han ethnic ($P<0.001$), and was negatively correlated with ICAM-1 promoter methylation ($r=-0.5783, P<0.001$). **Conclusion** ICAM-1 DNA hypomethylation is related to the occurrence and development of As and the changes of serum lipids in peripheral blood mononuclear cells of Hui patients.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种由环境和遗传因素共同作用所致的复杂性疾病,受地域、生活习惯等因素影响,是人类最常见和最具有危害性的以脂代谢紊乱为特征最终导致慢性炎症

的全身性疾病,表现为白细胞的黏附等^[1]。在这一过程中,活化的血管内皮细胞分泌细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1),又名 CD54,可能介导了内皮细胞与白细胞、血小板间的

[收稿日期] 2017-04-28

[修回日期] 2017-06-24

[基金项目] 宁夏高等学校科学研究项目(NGY2016086)

[作者简介] 吴凯,副教授,研究方向为心血管发病机制研究,E-mail 为 429036602@qq.com。通讯作者沈江涌,硕士,主任医师,主要从事感染及创面修复研究,E-mail 为 jydcan@126.com。

起始黏附,它们在 As 发展过程中起着重要作用^[2]。近年来研究发现,As 与 DNA 甲基化调控特异性基因的表达,主要受环境因素的影响,可作为联系遗传和环境因素的纽带,As 发生发展中存在 DNA 甲基化的异常改变^[3]。宁夏是一个回汉民居住的地区,两民族间生活方式、生活习惯、生活水平不同,各种疾病的发生发展有其特殊性,但在 As 的发生发展过程中 ICAM-1 甲基化是否发生改变目前尚无文献报道。国内的研究对象大部分是不同区域的汉族人群,本研究在回、汉族人群中利用彩色多普勒超声筛选有颈部斑块的患者作为回、汉 As 组,检测外周血中 ICAM-1 基因 DNA 启动子区甲基化程度,并检测 ICAM-1 mRNA 表达水平及血脂水平变化,探讨回、汉族 As 患者是否存在 ICAM-1 DNA 甲基化不同程度改变及其与血脂的相关性。

1 资料和方法

1.1 研究对象

收集 2012 年 1 月至 2013 年 12 月宁夏回族自治区宁夏医科大学附属总医院住院期间经颈部多普勒超声确诊的回汉族 As 患者各 50 例为研究对象(符合总医院伦理委员的标准并得到委员会的批准,所有入选者都已签订知情同意书;患者均未服用降脂药物)。排除标准:As 组均排除孕妇、合并感染性疾病、严重肝肾功能不全者、糖尿病和高血压、恶性肿瘤等疾病者。入选分组:经美国产 SEQUOIA512 型彩色多普勒颈部超声检查有 As 斑块,且结合临床症状和血脂水平确诊为 As 的患者共 100 例。其中回族 As 患者 50 例,男性 35 例,女性 15 例,年龄 55 ± 6 岁;汉族 As 患者 50 例,男性 37 例,女性 13 例,年龄 51 ± 4 岁。

1.2 试剂及仪器

总 RNA 提取试剂盒(北京天根生物技术有限公司);逆转录和实时荧光定量 PCR 试剂盒(Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix)(Fermentas 公司);DNA 提取试剂盒(爱思进公司,杭州);DNA 甲基化修饰试剂盒(ZYMO,美国);引物由上海生工公司合成;荧光定量 PCR 仪(上海枫岭生物技术有限公司);电泳仪及凝胶成像仪(Bio-Rad,美国);全自动生化分析仪(BECKMAN,美国)。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 ICAM-1 mRNA 表达

按照总 RNA 抽提试剂盒说明书抽提外周血单个核细胞中总 RNA。取 5 μ L RNA 样品进行凝胶电泳,胶浓度为 1.0%,电压为 120 V,电泳 15 min,利用凝胶成像系统检测 RNA 的完整性和纯度。在 Gen-

Bank 数据库中查询 ICAM-1,利用 Premier5.0 设计荧光 PCR 引物(forward 5'-ACGCTGCTGTAGAACCTATTGA-3'; reverse 5'-GGCTTCATTTACTTCCCA-CATT-3')。按反转录试剂盒说明书加入反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR。反转录条件:70℃ 10 min,42℃ 30 min。以人 GAPDH 为内参,荧光 PCR 反应条件为:94℃ 预变性 10 min,94℃ 变性 30 s,59℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,扩增 40 个循环。待反应结束后,结合扩增曲线及熔解曲线分析选择符合要求的 qRT-PCR 原始数据,用内参基因 GAPDH 校正,结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析。

1.4 巢式降落式甲基化特异性 PCR(nt-MSP)检测 ICAM-1 甲基化程度^[4]

提取基因组 DNA 后,利用在线甲基化软件针对 ICAM-1 基因启动子区设计引物,分别设计外引物和内引物(外引物上游 5'-GTAAGAGTTTACTGGAATTCGTTTCG-3',下游 5'-GAATCACTAACCATCCAA AAACG-3';甲基化引物上游 5'-TAAGAGTTTACTGGAATTT GTTTGA-3',甲基化引物下游 5'-TAA-GAGTTTACTGGAATTTGTTTGA-3';非甲基化上游 5'-TAAGAGTTTACTGGAATTT GTTTGA-3',非甲基化下游 5'-CCTAAAACCTTTCCTA TTATAAAAC-3')。ICAM-1 外引物 PCR 反应条件均为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 30 s,共 20 个循环,退火温度每个循环下降 0.5℃;95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,共 20 个循环;72℃ 7 min。将外引物 PCR 扩增的产物为模板与 ICAM-1 内引物做上述扩增,退火温度为 52℃ 每个循环下降 0.5℃。用 5 μ L PCR 产物上样于 2% 琼脂糖凝胶,120 V 电泳 15 min,凝胶成像仪分析吸光度(A)值,计算甲基化百分比,公式如下:甲基化(%)=甲基化 A 值/(甲基化 A 值+非甲基化 A 值)×100%。

1.5 全自动生化仪检测血脂

经颈部多普勒超声确诊的回汉族 As 患者收治入院进行治疗前静脉采血,全血室温静置 30 min,3000 r/min 离心 20 min 后取上清,全自动生化仪检测血脂水平。

1.6 统计学分析

采用 Prism 5.0 统计软件对实验数据进行分析整理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数间比较采用 Student's *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂水平

与回族 As 组相比,汉族 As 组甘油三酯(TG)更

高,差异具有显着性 ($P<0.05$),而两组总胆固醇 (TC)、极低密度脂蛋白胆固醇 (VLDL)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL) 差异无显著性 ($P>0.05$;表 1)。

表 1. 入选患者的血脂水平 ($\bar{x}\pm s$, mmol/L)
Table 1. Blood lipid levels of patients ($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

血脂	汉族 As 组 (n=50)	回族 As 组 (n=50)
TC	5.02±1.39	4.98±0.94
TG	2.80±0.67 ^a	1.93±0.88
VLDL	2.83±1.47	2.82±0.72
HDL	0.94±0.28	0.96±0.19

a 为 $P<0.05$,与回族 As 组比较。

2.2 qRT-PCR 检测 ICAM-1 mRNA 表达水平

qRT-PCR 分析了回汉族 As 患者外周血单个核细胞中 ICAM-1 的 mRNA 表达,结果表明回族 As 组 ICAM-1 mRNA 表达水平较汉族 As 组升高,差异有统计学意义 ($P<0.01$;图 1)。

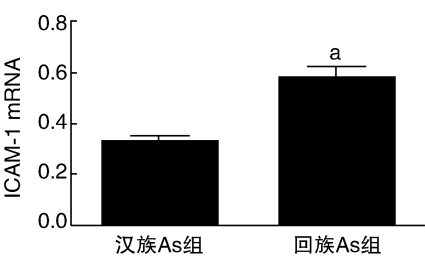


图 1. 回汉族患者中 ICAM-1 mRNA 表达水平 a 为 $P<0.01$,与汉族 As 组相比。

Figure 1. ICAM-1 mRNA expression levels in Hui and Han people

2.3 ICAM-1 DNA 甲基化水平

为了研究回、汉族 ICAM-1 DNA 甲基化是否存在不同程度改变,我们分别检测了外周血中 ICAM-1 基因 DNA 启动子区甲基化程度,结果表明,与汉族 As 组相比,回族 As 组 ICAM-1 DNA 甲基化程度降低,差异具有统计学意义 ($P<0.01$;图 2)。

2.4 ICAM-1 DNA 甲基化水平与血清甘油三酯的相关性分析

相关性分析发现,外周血 ICAM-1 DNA 甲基化水平与血清中 TG 含量呈负相关(图 3)。

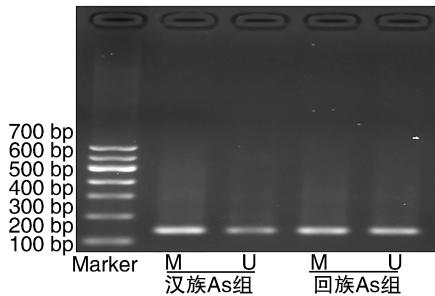


图 2. 回汉族患者中 ICAM-1 DNA 甲基化程度 M 为甲基化条带,U 为非甲基化条带。a 为 $P<0.01$,与汉族 As 组相比。

Figure 2. The ICAM-1 DNA methylation levels in Hui and Han people

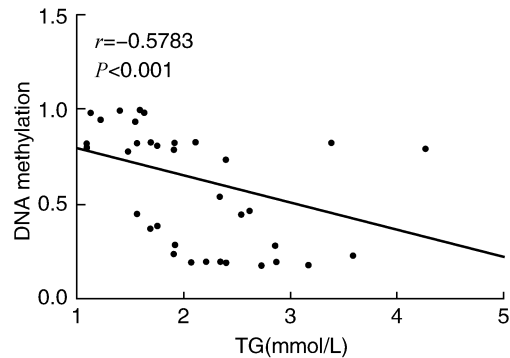
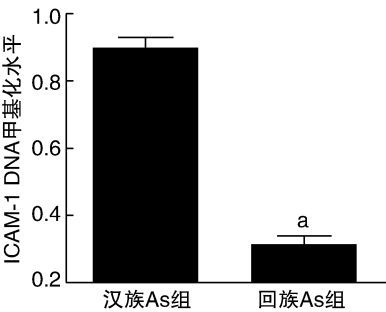


图 3. ICAM-1 DNA 甲基化程度与 TG 的相关性分析
Figure 3. The correlationship of ICAM-1 DNA methylation and TG levels

3 讨论

As 是心脑血管疾病的重要基础性病变,严重危害人类的身心健康,目前已发展为世界疾病死亡原因的首位。到目前为止,As 的发病机制尚未完全清楚,大量的基础和临床研究表明,As 与炎症息息相关,免疫球蛋白超家族成员 ICAM-1 是存在于细胞膜表面的一类糖蛋白物质,细胞间黏附分子本身的作用较广,其主要的作用是促进细胞与细胞以及细胞与细胞外基质之间的黏附,尤其是在炎症反应时白细胞的附壁、移行过程中具有重要的作用^[5-6],说明 ICAM-1 参与了 As 形成的过程。

DNA 甲基化被认为是 As 早期诊断的生物学标

志物,在细胞转化过程中 DNA 甲基化现象比临床症状出现更早,疾病未出现临床症状前 DNA 甲基化即已发生了典型改变^[7]。DNA 甲基化作为调节基因表达的重要机制逐渐被人们认识,DNA 甲基化修饰导致了 As 相关基因异常表达,在 As 发生发展中有重要作用^[8]。本研究在宁夏回、汉两民族 As 患者中发现回族 As 组 ICAM-1 DNA 甲基化程度明显减低,而 ICAM-1 mRNA 表达水平明显高于汉族 As 组,提示回族 As 患者 ICAM-1 水平升高可能与其基因低甲基化有关。回族是一个信仰伊斯兰教的民族,相对聚居于西北各省区,尤其在宁夏,回族约占宁夏回族自治区人口总数的三分之一。宁夏回族由于特殊的饮食结构,喜食牛羊肉,As 患病率也较高,同时回族禁止与汉族之间通婚,因此形成了遗传上相对纯洁性,是一个保持自身民族特性的遗传资源,这也为研究遗传与 As 提供了一个理想群体。本研究中,外周血 ICAM-1 基因甲基化水平与血清中 TG 呈负相关,可能由于不同种族间所处的环境不同,相同基因的多态性在不同的人群中作用强度可能也不同,ICAM-1 的低甲基化可能引起 ICAM-1 表达升高,但基因的多态性使得 TG 水平与 ICAM-1 甲基化程度负相关,这与 Cho 等^[9]研究结果一致,同时,Peng 等^[10]也在 ApoE^{-/-}小鼠动脉斑块中证实 ICAM-1 参与 TET2 DNA 低甲基化是自噬上调的主要原因。

胆固醇作为 As 斑块中脂质的主要成分,低密度脂蛋白为其主要来源。当低密度脂蛋白含量持续增高,进入血管内膜后被氧化,形成氧化型低密度脂蛋白,被巨噬细胞摄取后,在细胞内逐渐堆积,促进斑块形成。高密度脂蛋白胆固醇是低密度脂蛋白分子所携带的胆固醇,是逆向转运的内源性胆固醇酯将其运入肝脏,再清除出血液。有研究发现,TG 和高密度脂蛋白、低密度脂蛋白中的胆固醇酯存在动态交换;也有研究表明,一次高脂饮食所造成的一过性餐后高 TG 改变,可引起血管内皮细胞氧化应激反应造成血管内皮损伤,参与 As 的发生发展^[11-12]。本研究结果发现,回族 As 患者低密度脂蛋白胆固醇及高密度脂蛋白胆固醇相较于汉族 As 患者并未发生明显改变,而甘油三酯显著降低,这可能与回、汉族长期的饮食结构及生活方式不同有关。

也有研究表明,DNA 的异常甲基化与 As 的发生发展有着密切的联系^[13],这为从分子水平进一步

了解 As 的发病机制提供了新的途径,然而,DNA 甲基化在 As 领域的研究尚处于起步阶段,研究的范围和深度十分有限,许多问题还需做深入的研究。相信随着 DNA 甲基化研究的深入,ICAM-1 DNA 甲基化在 As 中的相关机制将会得到进一步阐明,这将为 As 的预防和诊疗发挥积极的作用。

[参考文献]

- [1] 刘金凤,马洪胜,李峰,等. ApoE 基因多态性与脂质代谢相关性[J]. 中国老年学杂志, 2002, 5(23): 1 802-804.
- [2] Braun F, Rinschen MM, Bartels V, et al. Altered lipid metabolism in the aging kidney identified by three layered omic analysis[J]. Aging (Albany NY), 2016, 8(3): 441-57.
- [3] Ma S, Zhang H, Sun W, et al. Hyperhomocysteinemia induces cardiac injury by up-regulation of p53-dependent Noxa and Bax expression through the p53 DNA methylation in ApoE^(-/-) mice[J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai), 2013, 45(5): 391-400.
- [4] 张辉,郭伟,高婷婷,等. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(2): 129-133.
- [5] Dong HL, Yuan N, Sun T, et al. Effects of selenium supplement on atherogenesis of ApoE-knockout mice fed high fat diet[J]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2016, 44(3): 244-249.
- [6] 毛洋,刘小琼,王洪梅,等. 细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 促进兔动脉粥样硬化斑块内血管新生[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(3): 217-222.
- [7] Morihara N, Hino A, Yamaguchi T, et al. Aged garlic extract suppresses the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice[J]. J Nutr, 2016, 146(2): 460S-463S.
- [8] 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.
- [9] Cho KH, Kim HJ, Rodriguez-Iturbe B, et al. Niacin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and hypertension in rats with chronic renal failure[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(1): 106-113.
- [10] Peng J, Yang Q, Li AF, et al. Tet methylcytosine dioxygenase 2 inhibits atherosclerosis via upregulation of autophagy in ApoE^{-/-} mice[J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 76 423-436.
- [11] Jiang Y, Zhang H, Sun T, et al. The comprehensive effects of hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia on pathogenesis of atherosclerosis and DNA hypomethylation in ApoE^{-/-} mice[J]. 2012, 44(10): 866-875.
- [12] 王志会,王雪燕,刘淑霞,等. 类风湿关节炎患者早发动脉粥样硬化的脂代谢紊乱与内皮细胞功能异常初步探讨[J]. 临床荟萃, 2013, 28(6): 610-612.
- [13] 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.

(此文编辑 许雪梅)