

DNA 甲基化与肺动脉高压患病风险相关性的研究进展

朱才民 李旒 孙乐波 郑大为 石活顺 徐国栋 邵国丰

【摘要】 肺动脉高压是一种严重而无法治愈的肺血管疾病,其发病机制复杂。DNA 甲基化是在甲基化转移酶的作用下调控基因选择性转录表达的表观遗传学修饰。近期研究发现,DNA 甲基化在肺动脉高压的发生、发展过程中起着重要作用。该文就近年来对 DNA 甲基化影响肺动脉高压形成的研究作一综述。

【关键词】 肺动脉高压; DNA 甲基化; 基因; 表观遗传学

Research progress on the correlation between DNA methylation and the risk of pulmonary arterial hypertension Zhu Caimin, Li Ni, Sun Lebo, Zheng Dawei, Shi Huoshun, Xu Guodong, Shao Guofeng. Ningbo University Medical College, Ningbo 315211, China

Corresponding author, Shao Guofeng, E-mail: sgf1958@sina.com

【Abstract】 Pulmonary arterial hypertension is a serious and incurable pulmonary vascular disease with complex pathogenesis. DNA methylation is an epigenetic modification that electively regulates the transcriptional expression of genes under the action of methyltransferase. Recent studies have demonstrated that DNA methylation plays a crucial role in the incidence and progression of pulmonary arterial hypertension. This review summarizes recent studies focusing upon the effect of DNA methylation on the incidence of pulmonary arterial hypertension.

【Key words】 Pulmonary arterial hypertension; DNA methylation; Gene; Epigenetics

肺动脉高压(PAH)是以肺血管阻力进行性升高,肺动脉平均压力升高为其特性的一种病理生理状态,最终致使患者右心功能衰竭而死亡,且发病以女性为主,女:男比例约为 2.3:1,若未及时诊断并积极干预,患者一般在出现症状后 2~3 年内死亡^[1-2]。血流动力学诊断标准为:在海平面、静息状态下,右心导管测量 mPAP ≥ 25 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa)^[3-4]。PAH 分为原发性和继发性两类。原发性肺动脉高压(PPH)是目前原因不明的肺动脉高压,属致命性 PAH,是一种少见疾病,包括特发性肺动脉高压(IPAH)与家族性肺动脉高压(FPAH)。继发性 PAH 可发生于重症慢性肺部疾病、心脏瓣膜病、冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)、先天性心脏病、风湿性心脏病、艾滋病等,除有 PAH 的表现外,还有原发病的表现,

继发性肺动脉高压较常见^[5]。虽然近年来随着靶向药物上市及临床诊疗路径的规范使得 PAH 患者生存率有所提高,但从长期看,预后仍不容乐观。

大量研究结果表明,PAH 的发生是遗传因素和环境因素共同作用的结果,而表观遗传学正是从遗传-环境交互作用的角度来探讨疾病的发生^[6-7]。目前对 PAH 进行 DNA 甲基化方面的研究很少。然而在其他领域比如癌症研究中却十分常见,比如 DNA 甲基化作为核酸类的肿瘤标记物,在胰腺癌的诊断方面具有明显优势已被证实^[8]。这些说明在 PAH 领域中,亟需开展表观遗传学方面的研究。随着遗传学技术进步,有关 PAH 的易感基因和致病基因被陆续发现。近年来对 IPAH 的发病机制研究不断深入,最为重要的进展即在分子遗传方面发现 PAH 具有易感性。另外,PAH 体外肺动脉内皮

细胞培养表现为高增殖活性, 抗凋亡倾向, 与肿瘤发生机制相似, PAH 可能是由于肺血管细胞遗传学改变所致^[9]。

DNA 甲基化是在甲基化转移酶的作用下调控基因选择性转录表达的表现遗传学修饰。而越来越多的研究表明 PAH 患者基因组存在 DNA 甲基化, 并且相关基因的甲基化也逐渐被提及。现依据近些年来关于 DNA 甲基化修饰与 PAH 患病风险的相关性研究结果作一综述。

一、DNA 甲基化修饰

在人所有基因组中大约 60%~90% 的胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤 (CpG) 是被甲基修饰的, 但 CpG 岛是未被甲基化修饰的^[10]。因此 DNA 甲基化是相对稳定的表现遗传学修饰, 甚至可以由细胞遗传。一旦 DNA 甲基化转移酶 (DNMT) 调节出现紊乱时, 催化腺苷或胞嘧啶 DNA 核苷酸通过共价相互作用添加甲基使 DNA 构象发生改变, 阻碍基因转录, 使得基因表达受到限制。具有特定碱基序列的 CpG 岛序列通常位于基因启动子中, 可以发生较高的甲基化概率, 被认为是隐性遗传的一个标志。DNA 甲基化完成转录抑制可能通过以下 3 条途径完成: ①直接屏蔽转录因子结合位点; ②募集转录调节阻遏蛋白; ③改变染色质结构, 抑制基因表达^[11]。近些年来, 随着基因芯片技术及高通量测序技术的发展, 对人全基因组甲基化谱的研究逐年增多, 涉及多个领域范围, 这些研究大大提高了人类对 DNA 甲基化在疾病中整体影响的认识。

二、DNA 甲基化及肺血管重塑与 PAH 的关系

DNA 甲基化可以调节某些被甲基化区域的基因表达和血管平滑肌细胞的分化从而促使 PAH 的形成^[12]。PAH 的致病基因活化素受体类激酶 1 (ACVRL1/ALK1) 的表达主要集中于血管内皮细胞中, 并受 CpG 岛甲基化控制, 介导 ACVRL1/ALK1 启动子区域的转录因子 Sp1^[13]。持续性血管收缩和血管重塑是 PAH 的两个重要的病理变化。有学者证实, 具有强烈血管收缩功能的内皮素-1 受人肺动脉内皮细胞中胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 调控, 在低氧诱导肺动脉小鼠模型中, IGF-1 启动子区域有一个特定的胞嘧啶甲基化位点是对缺氧作出反应的, 因此推测 IGF-1 基因甲基化可能调控内皮素-1 形成从而对小鼠 PAH 形成发挥作用^[14]。不同刺激 (如受伤和缺氧) 会导致肺动脉壁结构和功能上的改变, 随后引起细胞存活和凋亡之间的不平衡, 从而引发了肺血管的重塑, 超氧歧化酶 2

(SOD2) 启动子区域 CpG 岛甲基化引起氧化还原反应信号通路受损, 从而造成肺动脉平滑肌细胞 (PASMC) 的增殖与凋亡抵抗, 最终引发 PAH^[15-16]。肺动脉压力的增加伴随着肺血管重塑的不断增加, DNA 甲基化参与调控 PAH 的肺血管重塑。

三、相关基因甲基化与 PAH 的关系

1. 编码 SOD2 基因

SOD2 基因编码线粒体中的 SOD。SOD2 是一种由过氧化氢 (H_2O_2) 参与监管的酶, 与低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 相互作用, 也有肿瘤抑制基因的作用^[17]。在 SOD2 介导的细胞增殖和凋亡中, PASMC 受到影响, 首先在 fawn-hooded 大鼠模型和 IPAH 患者中被证实, 而在人 PAH 中, 肺动脉和从状病变中发现 SOD2 的缺乏^[18]。Archer 等^[16]证实, 在自发性 PAH 的 fawn-hooded 大鼠模型和人高度增殖的平滑肌细胞中 SOD2 基因表达下降, 导致线粒体低极化, 引起氧化还原反应信号通路受损, 损害了机体氧化应激信号通路, 激活 HIF-1 α , 使得 PASMC 过度增生, 凋亡抵抗, 从而诱发 PAH, 且 SOD2 表达的下降主要是通过 SOD2 启动子区域 CpG 岛 DNA 甲基化引起 SOD2 基因转录抑制所致。调节 5-氮杂胞苷 (甲基转移酶抑制剂) 逆转了甲基化和增加了 SOD2 的表达。随后 fawn-hooded 大鼠模型中增加 SOD2 降低了平均肺动脉压力和动脉厚度。这些发现清晰地凸显了通过 SOD2 和 HIF-1 α 致使 PASMC 增殖的表现遗传通路, 并为 PAH 的治疗提供了新的靶点。

2. IGF-1 基因表达

Perkett 通过对山羊持续性空气栓塞 12 d 形成 PAH 模型, 发现 IGF-1 在第 2 日时显著升高, 并在 12 d 中持续升高^[19]。IGF-1 对肺血管平滑肌细胞有促进其增殖的作用, 并促使肺血管重塑, 在低氧刺激下, IGF-1 信号在肺动脉内皮细胞和平滑肌细胞呈激活状态, IGF-1 参与低氧性肺血管重塑, 以内分泌和自分泌/旁分泌方式刺激血管平滑肌细胞增生肥厚^[20-21]。IGF-1 基因的 mRNA 表达与 DNA 甲基化及组蛋白修饰关联密切, 其通过调节肺动脉内皮细胞表达内皮素-1 而发挥作用, 组蛋白脱乙酰酶 (HDACs) 调节 IGF-1 的表达。Zhao 等^[22]研究证实, HDAC1 和 HDAC5 的水平在 2 组 PAH 患者和一组 PAH 大鼠模型中均高于对照组, 并证实组蛋白乙酰化的表现遗传学修饰与 PAH 的发生发展有关系, 而 HDACs 抑制剂可以对上述大鼠模型的 PAH 发生逆转。另外, Yang 等^[14]通过对小鼠的实

验性研究发现, HDACs 抑制剂抑制的 HDACs 将减少新生小鼠肺内低氧诱导的 DNA 甲基化总体水平和肺内 IGF-1 启动子区域周围的胞嘧啶甲基化水平。但是国内外关于 HDACs 抑制剂通过影响 DNA 甲基化从而影响 IGF-1 基因表达, 致使 PAH 进一步发展的研究并不多, 这可能是未来研究的一个新方向。

3. 腺苷三磷酸结合盒转运体 A1 (ABCA1)

ABCA1 是具有跨膜结构域的对称结构, 近几年, 对于 ABCA1 的研究是国内外的热点。其在胆固醇逆向转运、代谢及高密度脂蛋白代谢过程中发挥重要作用, 国外学者证实 ABCA1 DNA 甲基化抑制了 ABCA1 的表达, 造成体内胆固醇大量蓄积^[23]。胆固醇在肺血管内积聚造成肺血管增粗, 可能会引起 PAH, 国内有学者证实他汀类药物对 PAH 有治疗作用, 从侧面证实了这一点^[24]。炎症作用是 PAH 的发病机制之一, 另外 IL-8 等炎症因子可参与血管重构和血管新生, 使得 PAH 进一步进展^[25]。在肺内 ABCA1 蛋白的表达与炎症反应密切相关, ABCA1 介导的胆固醇运输活动与 ABCA1 抗炎活性有关^[26]。炎症反应本身就是 PAH 的一个发病因素。国外学者实验证明, PAH 肺动脉内皮细胞中 ABCA1 基因启动子序列与正常人相比呈高甲基化状态^[19]。

4. 与 PAH 有关的其他基因

除了以上 3 中研究较多的基因外, 国内外报道较多的与 PAH 形成及发展有关的基因包括骨形态发生蛋白 2 基因、5-羟色胺转运体基因等, 另外, PAH 中, 小窝蛋白、酸敏感钾离子通道蛋白 3、SMAD9 基因的突变已被证实, 而这些基因的甲基化或多个基因表达水平协同作用可能都会导致 PAH 形成。

5. 与 PAH 患病相关的基因

笔者收集了 6 例 PAH 和 6 名正常人作预实验, 其中, 病例组 1 包括 4 例可逆病人, 病例组 2 包括 2 例不可逆病人。通过病例组 1 与对照组的比较, 调整 P 值具有统计学意义的有 4 个基因。通过病例组 2 与对照组的比较, 调整 P 值 < 0.05 的有 6 个基因。2 个病例组相比较, 我们发现了 16 个调整 P 值 < 0.05 的基因。之后, 我们在有统计学差异的基因中筛选出位于编码区或者 UTR 区(非编码区)的候选基因, 它们分别是: ABCA6 (17q24.3), C13orf28 (13q34), MMP27 (11q24), COPB1 (11p15.2), HLA-DRB6 (6p21.3), HLA-DRB1

(6p21.3), HLA-DRB5 (6p21.3)^[27]。这有助于说明肺动脉高压与基因位点的甲基化有着密切关联。

四、总结与展望

大量研究结果表明, PAH 的发生是遗传因素与环境因素共同作用的结果, 而表观遗传学正是从遗传-环境相互作用的角度来探讨疾病的发生。目前越来越多的证据表明表观遗传学机制参与 PAH 的形成及发展, 而 DNA 甲基化是主要的表观遗传调控机制之一, 其对 PAH 影响的研究还处于初步阶段, 在 PAH 领域中, 亟需开展表观遗传学方面的研究。哪一些基因甲基化影响 PAH, 这些相关基因在什么时候发生甲基化, DNMT 如何识别基因甲基化位点等等还需要更进一步深入研究。随着对 PAH 患者或动物模型的相关基因的差异甲基化和外周血全基因组的甲基化谱的进一步研究, 将有助于我们对 PAH 发生发展的认识, 并为 PAH 的治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Galiè N, Corris PA, Frost A, Girgis RE, Granton J, Jing ZC, Klepetko W, McGoon MD, McLaughlin VV, Preston IR, Rubin LJ, Sandoval J, Seeger W, Keogh A. Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62 (25 Suppl): D60-D72.
- [2] Gaine SP, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, 1998, 352 (9129): 719-725.
- [3] Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M, Aboyans V, Vaz Carneiro A, Achenbach S, Agewall S, Allanore Y, Asteggiano R, Paolo Badano L, Albert Barberà J, Bouvaist H, Bueno H, Byrne RA, Carerj S, Castro G, Erol Ç, Falk V, Funck-Brentano C, Gorenflo M, Granton J, Iung B, Kiely DG, Kirchhof P, Kjellström B, Landmesser U, Lekakis J, Lionis C, Lip GY, Orfanos SE, Park MH, Piepoli MF, Ponikowski P, Revel MP, Rigau D, Rosenkranz S, Völler H, Luis Zamorano J. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (APEC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*, 2016, 37 (1): 67-119.
- [4] Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyńska M, Langhagen D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB. Definitions and diagnosis of pulmona-

- ry hypertension. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 2014, 42(suppl 1): 55-66.
- [5] Nider V. Pulmonary arterial hypertension. Recognition is the first essential step. *Adv NPs Pas*, 2013, 4 (5): 33-37.
- [6] Aldred MA, Comhair SA, Varella-Garcia M, Asosingh K, Xu W, Noon GP, Thistlethwaite PA, Tudor RM, Erzurum SC, Geraci MW, Coldren CD. Somatic chromosome abnormalities in the lungs of patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182 (9): 1153-1160.
- [7] Wang Y, Kahaleh B. Epigenetic repression of bone morphogenetic protein receptor II expression in scleroderma. *J Cell Mol Med*, 2013, 17 (10): 1291-1299.
- [8] 周原, 陆才德. DNA 甲基化作为诊断标记物在胰腺癌诊断中的研究进展. *新医学*, 2016, 47 (6): 349-353.
- [9] Pullamsetti SS, Schermuly R, Ghofrani A, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W. Novel and emerging therapies for pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189 (4): 394-400.
- [10] Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*, 2001, 278 (1-2): 25-31.
- [11] 邱烈. CpG 岛甲基化异常的致癌作用. *检验医学与临床*, 2007, 4 (8): 746-748.
- [12] Hiltunen MO, Ylä-Herttuala S. DNA methylation, smooth muscle cells, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 (10): 1750-1753.
- [13] Garrido-Martin EM, Blanco FJ, Fernandez-L A, Langa C, Vary CP, Lee UE, Friedman SL, Botella LM, Bernabeu C. Characterization of the human activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. *BMC Mol Biol*, 2010, 11 (1): 1-22.
- [14] Yang Q, Sun M, Ramchandran R, Raj JU. IGF-1 signaling in neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension: role of epigenetic regulation. *Vascul Pharmacol*, 2015, 73: 20-31.
- [15] Lee SJ, Smith A, Guo L, Alastalo TP, Li M, Sawada H, Liu X, Chen ZH, Ifedigbo E, Jin Y, Feghali-Bostwick C, Ryter SW, Kim HP, Rabinovitch M, Choi AM. Autophagic protein LC3B confers resistance against hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183 (5): 649-658.
- [16] Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, Dyck JR, Gombert-Maitland M, Thébaud B, Husain AN, Cipriani N, Rehman J. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation*, 2010, 121 (24): 2661-2671.
- [17] Li N, Oberley TD, Oberley LW, Zhong W. Overexpression of manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype. *Prostate*, 1998, 35 (3): 221-233.
- [18] Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL. An abnormal mitochondrial-hypoxia-inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 2006, 113 (22): 2630-2641.
- [19] Hautefort A, Chesné J, Preussner J, Pullamsetti SS, Tost J, Looso M, Antigny F, Girerd B, Riou M, Eddahibi S, Deleuze JF, Seeger W, Fadel E, Simonneau G, Montani D, Humbert M, Perros F. Pulmonary endothelial cell DNA methylation signature in pulmonary arterial hypertension. *Oncotarget*, 2017, 8 (32): 52995-53016.
- [20] 吴淑会, 刘臣. 胰岛素样生长因子 I (IGF-I) 与各疾病的相关性研究进展. *中国实验诊断学*, 2014, 18 (7): 1214-1216.
- [21] 林勇, 陈文彬, 程德云. 低氧性肺动脉高压大鼠血清 IGF-1 的变化. *江苏医药*, 2010, 26 (4): 273-275.
- [22] Zhao L, Chen CN, Hajji N, Oliver E, Cotroneo E, Wharton J, Wang D, Li M, McKinsey TA, Stenmark KR, Wilkins MR. Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid. *Circulation*, 2012, 126 (4): 455-467.
- [23] Liang Y, Yang X, Ma L, Cai X, Wang L, Yang C, Li G, Zhang M, Sun W, Jiang Y. Homocysteine-mediated cholesterol efflux via ABCA1 and ACAT1 DNA methylation in THP-1 monocyte-derived foam cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45 (3): 220-228.
- [24] 卢献灵, 何建国. 他汀类药物治疗肺动脉高压的作用及机制. *中华心血管病杂志*, 2010, 38 (10): 954-957.
- [25] 宋钊, 庞婷婷, 范右飞, 王玉林. IL-8 与肺动脉高压大鼠血管重构和血管新生的关系. *新医学*, 2013, 44 (7): 508-518.
- [26] Zhu X, Lee JY, Timmins JM, Brown JM, Boudyguina E, Mulya A, Gebre AK, Willingham MC, Hiltbold EM, Mishra N, Maeda N, Parks JS. Increased cellular free cholesterol in macrophage-specific ABCA1 knock-out mice enhances pro-inflammatory response of macrophages. *J Biol Chem*, 2008, 283 (34): 22930-22941.
- [27] Zheng D, Chen X, Li N, Sun L, Zhou Q, Shi H, Xu G, Liu J, Xu L, Duan S, Shao G. Differentially methylated regions in patients with rheumatic heart disease and secondary pulmonary arterial hypertension. *Exp Ther Med*, 2017, 14 (2): 1367-1372.

(收稿日期: 2017-10-06)

(本文编辑: 杨江瑜)