

# 血管性认知功能障碍与雄激素受体基因 启动子区甲基化状态、同型半胱氨酸水平的相关性研究

傅增辉<sup>1,2</sup>, 孙洪英<sup>1</sup>, 刘松<sup>1,2</sup>, 贺淑慧<sup>1,2</sup>

1. 包头医学院第一附属医院神经内科, 内蒙古包头市 014010

2. 包头医学院研究生学院, 内蒙古包头市 014010

**摘 要:** **目的** 检测血管性认知功能障碍 (VCI) 患者的雄激素受体 (AR) 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态和同型半胱氨酸 (HCY) 水平, 从分子水平探讨 VCI 与 AR 基因启动子高甲基化、HCY 的关系。 **方法** 采用病例对照研究方法, 选取卒中中慢性期的 VCI 患者 46 例组成病例组, 随机选取年龄相同的健康人 92 例组成对照组。MSP 法和 RT-PCR 法检测研究对象 AR 启动子区 CpG 岛的甲基化状态及 mRNA 表达水平, 采用酶转换免疫法检测 HCY 水平。 **结果** VCI 患者中甲基化率为 71.74%, 对照组患者中甲基化率为 19.57%, 病例组与对照组甲基化率相比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。VCI 组患者较对照组患者 AR 基因 mRNA 表达缺失 5.24 倍, 两组患者 AR 基因 mRNA 表达缺失率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。病例组 HCY 水平为  $14.73 \pm 5.31$ , 对照组为  $7.12 \pm 4.19$ , 病例组显著高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。AR 基因启动子区甲基化程度与 HCY 相关系数为  $r = 0.534$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 随 HCY 水平升高, 病例组甲基化程度亦递次升高。 **结论** AR 基因启动子区高甲基化与 VCI 发病相关; 高 HCY 水平与 AR 基因启动子区高甲基化相关。

**关键词:** 血管性认知功能障碍; 雄激素受体基因; 启动子; CpG 岛; DNA 甲基化; 同型半胱氨酸

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2016.06.005

## Association of vascular cognitive impairment with methylation status of the promoter region of androgen receptor gene and homocysteine level

FU Zeng-Hui, SUN Hong-Ying, LIU Song, HE Shu-Hui. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010, Neimonggu, China

Corresponding author: SUN Hong-Ying, E-mail: sunhongying2004@sina.com

**Abstract: Objective** To investigate the methylation status of the promoter region of androgen receptor (AR) gene and homocysteine (Hcy) level in patients with vascular cognitive impairment (VCI), as well as the association of VCI with a high methylation level of the promoter region of AR gene and Hcy level. **Methods** A case-control study was performed. A total of 46 VCI patients in the chronic period of stroke were enrolled as case group, and 92 healthy persons matched for age were enrolled as control group. Methylation-specific PCR and RT-PCR were used to determine the methylation status of the CpG islands in the promoter region of AR gene and measure the mRNA expression of AR gene, and enzymic transformation was used to measure the Hcy level. **Results** There was a significant difference in methylation rate between the case group and the control group (71.74% vs 19.57%,  $P < 0.05$ ). The mRNA expression of AR gene in the case group was 5.24 times lower than that in the control group, and there was a significant difference in the loss rate of mRNA expression of AR gene between the two groups ( $P < 0.05$ ). The case group had a significantly higher Hcy level than the control group ( $14.73 \pm 5.31$  vs  $7.12 \pm 4.19$ ,  $P < 0.05$ ). The methylation level of the promoter region of AR gene was significantly correlated with Hcy level ( $r = 0.534$ ); in the case group, the methylation level increased with the increasing Hcy level. **Conclusions** A

基金项目: 包头市社会发展科技支撑项目 (2013S2006-8-6)

收稿日期: 2016-08-05; 修回日期: 2016-11-21

作者简介: 傅增辉 (1992-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为老年认知障碍及痴呆。

通讯作者: 孙洪英 (1975-), 女, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管病及癫痫、认知障碍的基础与临床研究。E-mail: sunhongying2004@sina.com。

high methylation level of the promoter region of AR gene is associated with the pathogenesis of VCI, and a high Hcy level is associated with the high methylation level of the promoter region of AR gene.

**Key words:** vascular cognitive impairment; androgen receptor gene; promoter; CpG island; DNA methylation; homocysteine

血管性认知功能障碍 (vascular cognitive impairment, VCI) 是最常见的认知功能障碍类型之一,是指由于各种血管性因素引起的不同程度认知功能障碍综合征,是在对血管性痴呆不断研究的基础上提出来的,其内涵比血管性痴呆更为广泛<sup>[1]</sup>。血管性认知功能障碍是由于血管性因素引起的认知功能损害,其损害的程度还没有达到痴呆的标准,是介于正常和痴呆之间的一种状态。目前普遍认为 VCI 的发病机制为急性缺血使脑组织软化坏死、慢性缺血引起脑白质的损伤、小血管病变、脑血流量下降<sup>[2]</sup>。研究发现,雌激素受体与 VCI 的发生密切相关<sup>[3]</sup>。雌激素受体与雄激素 (androgen receptor, AR) 同属于性激素受体,AR 基因的低表达是否与 VCI 相关? 本课题组研究发现脑梗死患者 AR 基因启动子存在高甲基化状态,而脑梗死是 VCI 的重要病因之一<sup>[4]</sup>。同时, Hainsworth 等<sup>[5]</sup> 研究发现同型半胱氨酸 (homocysteine, HCY) 与 VCI 直接相关。故本研究旨在探明 VCI 与 AR 基因启动子高甲基化、HCY 的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

随机选取 2014 年 8 月至 2016 年 6 月期间就诊于包头医学院第一附属医院神经内科的脑卒中慢性期的患者 46 例作为病例组,脑卒中发病时间为  $(412.31 \pm 220.26)$  d,所有入选对象需经颅脑 MRI 确诊,并经简易智能状态检查量表 (Mini-Mental State Examination, MMSE) 及蒙特利尔认知评估量表 (Montreal Cognitive Assessment, MoCA) 评定符合认知功能障碍的诊断标准<sup>[6]</sup>。排除标准:①既往有抑郁症、精神分裂、帕金森病、癫痫病史;②近 1 个月来服用可影响同型半胱氨酸水平的各种类型的药物,如多巴胺类药物、叶酸、维生素 B 类、避孕药和抗癫痫药等;③因年龄、低文化或失明、聋哑等其他因素不能配合行量表检查者;④严重心肝肾功能障碍;⑤妊娠期或哺乳期妇女。在病例组中按

卒中性质划分,脑梗死病例 30 例,脑出血病例为 16 例;根据病变部位划分,基底节卒中 19 例,皮质卒中 18 例,大面积脑卒中 9 例。

选取经头 MRI 诊断无明显异常的健康人 92 例作为对照组。

两组间性别、年龄、BMI 等基本资料进行统计学检验,差异不具有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 1.2 采集标本

空腹 12 h 后采集全血并分离淋巴细胞、采用酶转换免疫法测定法检测 HCY 水平。

### 1.3 基因组 DNA 提取

DNA 的提取使用试剂盒 Tiangen DNA Mini Kit (Tiangen, 北京天为时代),按产品说明书提供的方法提取细胞 DNA,用 30  $\mu$ l 无菌双蒸水溶解。用核酸蛋白仪监测其浓度及纯度。

### 1.4 亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA

取每份基因组 DNA 样品约 1  $\mu$ g,按修饰试剂盒 Zymo DNA Methylation Kit (ZYMO, 美国)说明书进行修饰,主要步骤:加含氢氧化钠的稀释缓冲液使 DNA 变性,使其保持单链状态,再在含亚硫酸氢钠的修饰试剂 50℃ 水浴 16 h,使用试剂盒中纯化试剂进行 DNA 脱硫,清洗回收,最后溶于 10  $\mu$ l TE 缓冲液 (pH 8.0) 中,将搜集的修饰 DNA 于 -20℃ 保存或立即进行甲基化特异性 PCR (MSP) 反应。

### 1.5 甲基化特异性 PCR

1.5.1 引物设计 实验中使用甲基化 PCR 引物设计软件 MethPrimer 设计 2 对引物 M、U,扩增目的片段位于 AR 基因启动子 5' 端 360 ~ 518 序列,引物 M、U 的设计均用于经修饰试剂处理后的 DNA 模板扩增,其中 M 引物用于扩增甲基化 DNA,引物 U 用于扩增未甲基化 DNA,野生型引物 W 以设计 M、U 引物的相应位点设计,用于未经修饰试剂处理的 DNA 序列的扩增,以检测 AR 基因启动子序列是否发生改变或突变。引物相关数据见表 1。引物核苷酸由北京赛百盛公司合成。

表 1 所需的 PCR 反应引物及条件

引物名称	序列(5' > 3')	变性	退火	延伸	周期
AR-Nf	AGCAAGCCACAGGCAGAGGAGGC	94℃, 5 min	64℃, 30 s	72℃, 60 s	40
AR-Nr	CGGGCGGCGGCTTCAAGC				
AR-Uf	AGTAAGTTTATAGGTAGAGGAGGTG	94℃, 30 s	55℃, 30 s	72℃, 60 s	40
AR-Ur	CAAAACAACAACCTCAAAACCACCAC				
AR-Mf	AGTAAGTTTATAGGTAGAGGAGGCG	94℃, 30 s	57℃, 45 s	72℃, 60 s	40
AR-Mr	CGAACGACGACTTCGAAACCG				
RT-AR-Af	AAGGCTATGAATGTCAGCCCA	95℃, 30 s	95℃, 5 s	60℃, 30 s	40
RT-AR-Ar	CATTGAGGCTAGAGAGCAAGGC				
β-Actin-f	AAGGCCAACCGCGAGAAGAT	95℃, 30 s	95℃, 5 s	60℃, 30 s	40
β-Actin-r	TCGGTGAGGATCTTCATGAG				

1.5.2 甲基化特异性 PCR 在 25 μl MSP 反应体系中,含 1 μl 亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA 模板,10 × 缓冲液 2.5 μl,上、下游引物各 10 pmol,250 μmol/L 的 4 种 dNTP 2.5 μl,1 U TaqHS DNA 聚合酶。于 PCR 仪上扩增,反应循环条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,相应退火温度退火 40 s,72℃ 延伸 60 s,扩增 40 个循环,然后 72℃ 延伸 5 min。反应结束后取上述 PCR 产物 6 μl 经 2.0% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 40 min,凝胶图像分析系统记录图像。

1.6 组织 RNA 的提取及 cDNA 合成

组织总 RNA 按照 TRIZOL 试剂盒(Invitrogen 公司)操作说明书进行,用紫外分光光度计检测其含量和纯度。以提取的总 RNA 为模版,按照 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒(TAKARA 公司)操作说明合成单链 cDNA。

反应条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s,1 个循环。反应体系为:5 × PrimeScript Buffer (for Real Time) 2 μl,PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μl,Oligo dT Primer (50 μM) 0.5 μl,Random 6 mers (100 μM) 0.5 μl,Total RNA,RNase Free dH<sub>2</sub>O up to 10 μl。

1.7 Real-Time PCR 检测 mRNA 基因表达

所需引物均由上海英俊生物技术有限公司提供,PCR 反应试剂盒为 Premix Ex Taq II(大连宝生公司),所需引物见表 1。分别制备 AR 和 β-Actin 的反应体系,具体为 12.5 SYBR® Premix Ex Taq II μl,取 cDNA 2 μl,上下游引物各 1 μl(10 pmol/μl)。PCR 扩增条件为:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,循环 40 个周期。每个样品 3 个复孔,取 CT 平均值,采用 2 - ΔΔCT 法进行结果分析。

1.8 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件。经正态性检验及方差齐性检验后,计数资料比较用卡方检验,计量资

料应用两组均数的 t 检验。Spearman 等级相关分析甲基化程度与 HCY 水平的相关关系。以 P < 0.05 为具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 AR 基因启动子甲基化分析

扩增产物中出现甲基化条带,表明该位点发生甲基化,未出现甲基化条带则表明该位点未发生甲基化,均出现甲基化条带表明该位点发生半甲基化(图 1)。46 例 VCI 患者中,33 例 AR 基因启动子发生甲基化,甲基化率为 71.74%;92 例对照组患者中,18 例 AR 基因启动子甲基化,甲基化率为 19.57%。病例组与对照组甲基化率比较,差异有统计学意义(P < 0.05)。

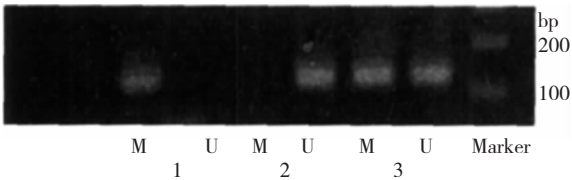


图 1 nMSP 法检测 AR 基因甲基化电泳图。

注:M:用 AR-pM 特异性引物进行扩增;U:用 AR-pU 特异性引物进行扩增;1:甲基化血标本;2:非甲基化血标本;3:半甲基化血标本。

2.2 AR 基因 mRNA 表达

计算各组的相对 ΔCt 值(ΔCt = Avg. AR - Avg. β-Actin)和 ΔΔCt 值(ΔΔCt = Avg. ΔCtVCI 组 - Avg ΔCt 对照组)。AR 在 46 例病例组患者中,ΔCt 值为 10.73 ± 1.29;92 例对照组健康人中,ΔCt 值为 13.12 ± 1.56。运用 Livak 方法计算出病例组患者基因表达缺失为对照组的 5.24 倍,且两组患者 AR 基因 mRNA 表达缺失率间差异有统计学意义(P < 0.05)。见表 2。

表2 AR 基因 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	$\beta$ -Actin	AR	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	2- $\Delta\Delta$ Ct
病例组	46	8.78 $\pm$ 0.74	19.91 $\pm$ 0.84	10.73 $\pm$ 1.29	-2.39 $\pm$ 1.29	5.24
对照组	92	9.69 $\pm$ 0.81	20.68 $\pm$ 1.03	13.12 $\pm$ 1.56	0.00 $\pm$ 1.56	1

### 2.3 HCY 与 AR 基因甲基化程度的关系

病例组 HCY 水平为  $14.73 \pm 5.31$ , 对照组为  $7.12 \pm 4.19$ , 病例组显著高于对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。经 spearman 等级相关分析, AR 基因启动子区甲基化程度与 HCY 相关系数为  $r = 0.534$ , 差异具有统计学意义, 并且随 HCY 升高, 病例组甲基化程度亦递次升高。

### 3 讨论

以往研究认为, 性激素受体变化主要与一些肿瘤的发生相关, 如乳腺肿瘤、膀胱癌、前列腺癌、子宫内膜癌等<sup>[7]</sup>。近年来, 研究发现雄激素与学习记忆能力和认知功能有关<sup>[8]</sup>。AD 患者血清睾酮水平明显下降, 经睾酮替代治疗后认知功能获得不同程度的改善<sup>[9]</sup>。睾酮缺乏可导致海马神经元疏松紊乱、变性肿胀, 凋亡数目增加, 结构形态受损, 神经元大量丢失; 雄激素补充治疗后能减轻神经元丢失, 并改善病理损伤<sup>[8]</sup>。

表观遗传学是指在 DNA 核酸序列不发生改变的情况下, 从染色质水平研究生物体如何对基因的表达实现调控<sup>[10]</sup>。其内容包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、RNA 干扰等。DNA 甲基化是指 DNA 在甲基转移酶的作用下, 生成甲基嘌呤或嘧啶。对真核生物而言, 甲基化位点只发生在 5'-CpG-3' 二核苷酸上, 从而形成 5-甲基胞嘧啶。CpG 二核苷酸主要存在于 CpG 岛。CpG 岛甲基化后一方面可直接干扰转录因子与 DNA 的调控区域结合; 另一方面则可与甲基结合蛋白相结合, 占据转录因子在 DNA 上的结合位点, 影响基因的转录和表达。这样基因就可能通过对 CpG 位点, 特别是 CpG 岛的甲基化状态的调控而实现对基因转录和蛋白质表达水平的调控。而 CpG 岛主要集中在基因的启动子及第一外显子区域<sup>[11]</sup>。

AR 属于配体依赖的转录因子超家族, 人类 AR 由 917 个氨基酸组成, 整个分子可分为 3 个功能区: 具有转录活性的 N 端区 (NTD), 与靶基因上雄激素反应元件特异结合的 DNA 结合域 (DBD) 以及 C 末端的配体结合域 (LBD)。AR 基因位于 Xq11-12, 总长度大于 90 kb, 包括 8 个外显子和 7 个内含子。起始部第一外显子编码受体 N 端区, 第二、三

外显子编码 DBD, 其余 5 个外显子编码 LBD<sup>[12]</sup>。

AR 通过与雄激素结合形成复合物, 再与核中特定 DNA 序列结合, 调节靶基因的表达并发挥其生理作用。Kinoshita 等<sup>[13]</sup>认为 AR 启动子区存在一个 CpG 甲基化的热点, 它是基因沉默的标志。Sasaki 等<sup>[14]</sup>在研究 AR 基因 CpG 岛甲基化时发现, AR 表达缺失的子宫内膜癌组织占 79% (70/89), AR 基因发生甲基化的子宫内膜癌组织占 72% (64/89), 用去甲基化试剂 5'-AzaDC 处理子宫内膜癌细胞株, 使 AR 基因在所有细胞中重新表达, 因此, 推测 AR 基因失活的机制可能是通过 AR 基因 CpG 岛的甲基化来实现的。

HCY 是一种含硫氨基酸, HCY 与 5-甲基四氢叶酸共同合成蛋氨酸, 继而转化成 S-腺普甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM), SAM 是体内活性甲基供体, 直接参与 DNA 甲基化反应, 将其甲基基团供给细胞中 80 多个生物甲基化反应, 对细胞分裂、增殖和组织生长具有极其重要的作用<sup>[15]</sup>。高 HCY 是 AD、轻度认知功能损害和血管性痴呆的独立危险因素, 目前普遍认为 HCY 的致老年痴呆作用与表观遗传学改变相关<sup>[16,17]</sup>。

在本研究中发现 VCI 患者 AR 基因启动子区高甲基化与 VCI 发病相关; 高 HCY 水平与 AR 基因启动子区高甲基化相关。HCY 会导致体内甲基供应增加, 基因组总甲基化水平和特定基因的甲基化水平应该是升高的。Huang 等<sup>[18]</sup>发现 HCY 可导致雌激素受体基因高甲基化。推测可能存在 HCY 水平升高引起 AR 基因启动子区高甲基化导致 AR 基因沉默, 引起 mRNA 转录水平下降, 从而引起 AR 表达水平下降, 可能间接通过促进脑血管疾病的发生而促进 VCI 的发展, 也可能直接引起认知功能的变化。总之 HCY 对 DNA 甲基化水平的影响是极其复杂的, 在不同位点是不同的, 有待于深入研究。还需要对 VCI 的表观遗传学发病机制进一步研究, 本研究可能为其提供了一个新方向, 同时 AR 启动子 CpG 岛的异常甲基化有可能成为 VCI 的参考标记物, 为临床诊断检测 VCI 提供了一个新的分子生物学上的标记。

# 参 考 文 献

- [1] 孟楠,吕佩源. 几种模拟临床发病原因血管性认知功能障碍动物模型的研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39(2): 180-184.
- [2] 蒋艳艳,聂志余,李云霞. 血管性认知功能障碍的影像学研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2014, 41(1): 73-77.
- [3] Lin GF, Ma QW, Zhang DS. Polymorphism of a-estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor genes in dementia patients in Shanghai suburbs. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(7): 651-656.
- [4] 孙洪英,和姬苓,张利荣,等. 脑梗死患者雄激素受体启动子 CpG 岛甲基化及其 mRNA 表达的研究. 第七届国际脑血管病高峰论坛论文集. *Interventional Neurology, World Stroke Organization (WSO)*, 2011, 2.
- [5] Hainsworth AH, Yeo NE, Weekman EM, et al. Homocysteine, hyperhomocysteinemia and vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID). *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(5): 1008-1017.
- [6] 骆迪,毕齐. 血管性认知功能障碍研究进展. *中国全科医学*, 2011, 35: 4003-4006.
- [7] Yan L, Yang X, Davidson NE. Role of DNA methylation and histoneacetylation in steroid receptor expression in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001, 6(2): 183-192.
- [8] Nead KT, Gaskin G, Chester C, et al. Androgen Deprivation Therapy and Future Alzheimer's Disease Risk. *J Clin Oncol*, 2016, 34(6): 566-571.
- [9] Nead KT, Gaskin G, Chester C, et al. Association Between Androgen Deprivation Therapy and Risk of Dementia. *JAMA Oncol*, 2016, 13.
- [10] Broholm C, Olsson AH, Perflyev A, et al. Human adipogenesis is associated with genome-wide DNA methylation and gene expression changes. *Epigenomics*, 2016.
- [11] Wedd L, Maleszka R. DNA Methylation and Gene Regulation in Honeybees: From Genome-Wide Analyses to Obligatory Epialleles. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 945: 193-211.
- [12] 王刚,刘利,陈杰,等. 白血病细胞雄激素受体基因启动子甲基化状态的研究. 第三军医大学学报, 2007, 10: 932-934.
- [13] Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, et al. Methylation of the androgenreceptorm in im alpromoter silences transcription in human prostate cancer. *Cancer Res*, 2000, 60(13): 3623-3630.
- [14] Sasaki M, OhB R, Dhar A, et al. Inactivation of the human androgenreceptor gene is associated with CpG hypermethylation in uterineendometrial cancer. *Mol Carcinog*, 2000, 29(2): 59-66.
- [15] Nourani Khojasteh H, Amiri A. Congenital lens dislocation and fatal cerebral vein thrombosis in a patient with homocysteinemia: a lesson for urgent screening of pediatric population. *Arch Iran Med*, 2013, 16(5): 306-307.
- [16] Halil M, Cemal Kizilarlanoglu M, Emin Kuyumcu M, et al. Cognitive aspects of frailty: mechanisms behind the link between frailty and cognitive impairment. *J Nutr Health Aging*, 2015, 19(3): 276-283.
- [17] 刘培茹. 高同型半胱氨酸血症与帕金森病认知功能的相关性研究. 国际神经病学神经外科学杂志, 2016, 43(1): 30-33.
- [18] Huan UYS, Zhi YF, Wang SR. Hypermethylation of estrogen receptor-alpha gene in atheromatosis patients and its correlation with homocystein. *Pathophysiology*, 2009, 16: 259-265.