

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.01.018
文章编号: 1005-8982 (2018) 01-0092-07

吸烟、*F2RL3* 基因甲基化与稳定性冠状动脉粥样硬化性心脏病预后的关系

刘访遥, 雷长城, 唐娟

(南华大学附属第二医院 心血管内科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 探讨 *F2RL3* 基因甲基化与稳定性冠状动脉粥样硬化性心脏病 (简称冠心病) 继发心血管事件、死亡率的相关性, 及 *F2RL3* 基因甲基化与吸烟导致稳定性冠心病患者有害作用的关系。**方法** 募集南华大学附属第二医院 121 例经历过急性冠状动脉综合征、心肌梗死或冠状动脉介入治疗后接受心血管康复计划的住院患者。随访超过 8 年。*F2RL3* 基因位点甲基化特点采用 Sequenom 基质辅助激光解吸电离时间飞行质谱分析。*F2RL3* 基因甲基化、吸烟与继发性心血管事件、特因和全因死亡率之间的相关性由估计混杂因素控制危险比的多变量 Cox 回归模型分析。**结果** 随访期间, 5 例患者发生非致死性心肌梗死, 4 例患者发生非致死性脑卒中, 6 例患者发生心血管疾病死亡, 5 例患者因为其他原因死亡。调整已知预后因素后, Cox 模型分析显示 *F2RL3* 基因甲基化与死亡率密切相关。与 *F2RL3* 基因甲基化四分位数最高的稳定性冠心病患者相比, 四分位最低的患者死于心血管疾病、非心血管疾病或其他任何原因的校正危险比 (95%CI) 分别为 2.32 (0.97, 5.58)、5.16 (1.81, 14.7) 和 3.19 (1.64, 6.21)。两组患者继发性心血管事件无相关性。将 *F2RL3* 纳入回归模型后, 吸烟与所有预后结果的相关性减弱。**结论** *F2RL3* 甲基化是吸烟有害影响的潜在介导者, 并与稳定性冠心病死亡率密切相关。

关键词: 稳定型冠状动脉粥样硬化性心脏病; 甲基化; *F2RL3*

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

Correlations of smoking and *F2RL3* gene methylation with prognosis of stable coronary heart disease

Fang-yao Liu, Chang-cheng Lei, Juan Tang

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To determine whether methylation of *F2RL3* gene is associated with secondary cardiovascular events and mortality of stable coronary heart disease and with the harmful effect of smoking.

Methods A total of 121 inpatients participating cardiovascular rehabilitation programmes after experiencing acute coronary syndrome, myocardial infarction or coronary intervention were recruited in our hospital. Active follow-up was conducted over 8 years. Methylation of *F2RL3* gene was characterized by Sequenom matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Associations of methylation of *F2RL3* gene and smoking with secondary cardiovascular events, and specific-cause and all-cause mortality were examined by multiple Cox's regression model through estimating confounder-controlled hazard ratios. **Results** During the follow-up, 5 patients suffered from non-fatal myocardial infarction, 4 had non-fatal strokes, 6 died of cardiovascular diseases, and 5 died due to other causes. After controlling established prognostic factors, Cox's regression analysis revealed *F2RL3* methylation was closely associated with mortality. Adjusted hazard ratios (95% CI) for death from cardiovascular,

non-cardiovascular, and any other cause were 2.32 (0.97, 5.58), 5.16 (1.81, 14.7), and 3.19 (1.64, 6.21) in the subjects with the lowest quartile of methylation of *F2RL3* gene in comparison to those with the highest quartile. There was no association between the secondary cardiovascular event outcomes of the two groups. The strong associations of smoking with all outcomes were markedly weakened when *F2RL3* was included in the regression models. **Conclusions** The results seem to indicate methylation of *F2RL3* is a potential mediator of the detrimental impact of smoking and is strongly related to mortality of patients with stable coronary heart disease.

Keywords: stable coronary heart disease; epigenetic methylation; *F2RL3*

吸烟相关发病率和死亡率已成为世界性公共卫生系统的关键挑战^[1]。控制吸烟仍然是主要措施, 但许多吸烟者戒烟过程中遇到很大困难^[2-3]。这种情况下, 对与吸烟相关疾病的潜在发病机制进行深入研究和对吸烟潜在影响进行更深入理解, 从而制定针对吸烟继发性疾病的有效预防措施具有重要临床意义。其中一个机制是表观遗传修饰, 例如基因组 DNA 序列 CpG 位点甲基化。

最近有研究表明^[4-5]未吸烟者和当前吸烟者间甲基化程度和特异性明显存在差异。尤其是 *F2RL3* 基因的 CpG 位点, 其在吸烟者中显示出低甲基化水平。*F2RL3* 基因编码蛋白酶活化受体 4, 参与血液凝固等生理过程, 也是潜在的药物靶点^[6-7]。因此, 了解 *F2RL3* 甲基化的个体差异具有重要临床意义。

本研究报道检测了最近发现的 *F2RL3* 基因的 CpG 位点的甲基化程度与已建立的稳定性冠状动脉粥样硬化性心脏病 (简称冠心病) 高发人群的心血管标志物之间的相关性。此外, 本文旨在确定这一位点的甲基化是否与继发性心血管疾病事件和死亡率相关, 并且可能是吸烟导致的有害影响的潜在介导者。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本前瞻性队列研究纳入 2005 ~ 2007 年 121 例由于近期急性心血管事件或心血管手术 (急性冠状动脉综合征、心肌梗死或冠状动脉介入) 而接受心血管康复治疗的住院患者, 年龄 30 ~ 70 岁。患者接受定期随访至 2015 年 12 月, 生存时间是指纳入研究开始至研究结束或在研究期间因任何原因死亡。

1.2 数据和样品采集

住院康复开始和结束时通过标准化调查问卷获得与健康相关数据。住院康复阶段结束时, 采集空腹血标本并对血液进行离心分离, 冷却, 并储存在 -80℃ 冰箱备用检测。而标准常规临床参数 (γ 谷氨酰转氨酶、肌酐、空腹血糖、高密度脂蛋白、总胆固醇和

三酰甘油的血清水平) 从住院检查资料获得。康复出院后第 1、3、4、5、6 和 8 年, 通过电子邮件方式联系受试者, 非死亡性心脑血管事件 (心肌梗死和脑卒中) 信息通过标准化的问卷调查获得。

1.3 甲基化评估

基线时, 提取受试者全血 DNA。检测 *F2RL3* 基因 Cg03636183 位点 CpG 甲基化, 研究已经证实该位点与吸烟行为相关, 并采用 Sequenom 基质辅助激光解吸电离时间飞行质谱检测。样品首先使用 EZ-96 DNA 甲基化试剂盒进行亚硫酸氢盐转化。随后, 利用先前特定亚硫酸氢盐的引物对包含 cg03636183 扩增子和邻近 6 个外加 CpG 位点进行扩增。碱性磷酸酶 (SAP) 处理后, 用 Rnase A 进行切割, 树脂清洗, PCR 产物片段被转移到 384 SpectroCHIPS 并与通过美国 Sequenom 公司质谱系统连同 SpectroACQUIRE v3.3.1.3 和 MassARRAY EpiTyper V1.0 软件相结合进行测定。DNA 甲基化的标准 (0%、20%、40%、60%、80% 和 100%) 被用来作为控 PCR 扩增偏差的对照。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件处理数据, 非正态计量资料以中位数 (Q1~Q3) 表示, 比较采用秩和检验, 相关分析采用 Spearman 法, Kaplan -Meier 法绘制生存曲线, 比较采用 log-rank 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 影响因素的分析采用 Cox 回归模型。

2 结果

2.1 一般结果

共 121 例患者纳入本次研究, 随访期间, 5 例患者发生非致死性心肌梗死, 4 例患者发生致死性卒中, 6 例患者发生心血管疾病的死亡, 5 例患者死于其他原因。受试者重要基线特征见表 1。半数以上的受试者年龄在 60 岁以上, 男性占主导地位。大约 70% 的受试者目前或曾经吸烟。

表 1 稳定冠心病患者不同影响因素 *F2RL3* 甲基化基线情况 (CpG-4)

影响因素	例 (%)	甲基化程度		<i>H</i> 值	<i>P</i> 值
		中位数 (Q1~Q3)			
所有患者	121 (100)	0.67 (0.54~0.74)			
年龄					
30 ~ 39 岁	3 (2)	0.56 (0.48~0.66)		8.972	0.000
40 ~ 49 岁	15 (13)	0.56 (0.47~0.70)			
50 ~ 59 岁	32 (29)	0.65 (0.51~0.75)			
60 ~ 70 岁	71 (55)	0.69 (0.59~0.75)			
性别					
女	17 (16)	0.70 (0.60~0.77)		10.728	0.000
男	104 (84)	0.66 (0.52~0.74)			
患者分组					
急性冠状动脉综合征	13 (12)	0.68 (0.54~0.74)		2.782	0.021
冠状动脉介入	32 (29)	0.69 (0.59~0.75)			
心肌梗死	76 (59)	0.66 (0.51~0.74)			
糖尿病					
无	90 (82)	0.66 (0.52~0.74)		1.983	0.034
有	31 (18)	0.69 (0.59~0.76)			
高血压					
无	49 (45)	0.61 (0.49~0.73)		9.782	0.000
有	72 (55)	0.69 (0.59~0.75)			
出院后用药情况					
血管紧张素转换酶抑制剂					
未使用	63 (47)	0.67 (0.54~0.74)		0.427	0.862
使用	58 (53)	0.67 (0.54~0.74)			
降脂药					
未使用	35 (22)	0.69 (0.58~0.75)		2.673	0.022
使用	86 (78)	0.66 (0.52~0.74)			
乙酰水杨酸					
未使用	24 (12)	0.69 (0.55~0.76)		0.746	0.146
使用	97 (88)	0.67 (0.53~0.74)			
β 阻滞剂					
未使用	14 (13)	0.65 (0.52~0.74)		0.627	0.337
使用	107 (87)	0.67 (0.54~0.74)			
吸烟情况					
仍然吸烟	18 (16)	0.53 (0.45~0.66)		7.482	0.000
急性事件发生后戒烟	18 (16)	0.51 (0.45~0.61)			
急性事件发生前戒烟	42 (39)	0.66 (0.57~0.73)			
从不吸烟	43 (29)	0.74 (0.70~0.79)			

2.2 *F2RL3* 甲基化程度与心血管危险标志物的相关性

F2RL3 基因甲基化程度与年龄呈正相关, 与性别也具有相关性。高血压患者表现出较高的甲基化水平。从不吸烟受试者、目前仍然吸烟受试者及心血管急性事件发生后戒烟受试者的 *F2RL3* 基因甲基化水平明显不同。调整年龄、性别、吸烟后, 持续心血管疾病风险指标相关性发现, *F2RL3* 基因甲基化程度与血清白蛋白 Spearman 相关系数 >0.10 , 与 N 末端原 B-利尿钠肽、高敏 C 反应蛋白和白细胞介素 6 Spearman 相关系数 <-0.10 。见表 2。

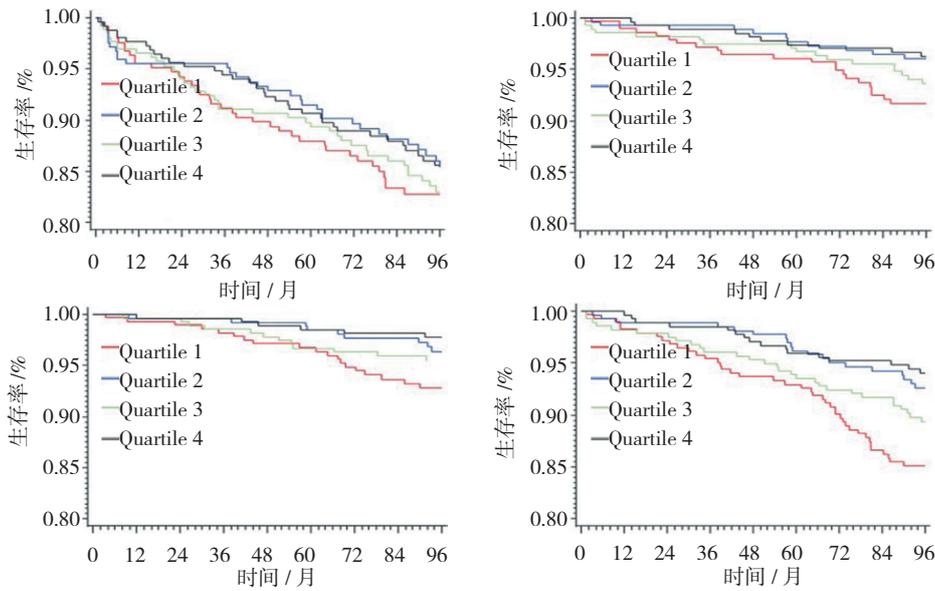
2.3 *F2RL3* 甲基化程度与患者预后相关性

根据 *F2RL3* 甲基化程度四分位数分层后, Kaplan-Meier 曲线分析 4 组患者生存事件差异 (见附图)。与 *F2RL3* 甲基化最低的两组患者相比, *F2RL3* 甲基化四分位数最高的两组患者预后更好。随访后期, *F2RL3* 甲基化四分位数最低组患者全因死亡率增加。控制潜在混杂变量后, 各组患者估计危险比见表 3。甲基化四分位数最低组患者全因死亡率风险比甲基化四分位数最高组患者的 3 倍。调整 *F2RL3* 甲基化后, 持续吸烟者的危害比明显下降。见表 4、5。

表 2 *F2RL3* 甲基化程度与血管危险标志物的相关性分析

血管危险标志物	$r_s^{1)}$	P 值	$r_s^{2)}$	P 值
体重指数	0.062	0.039	0.072	0.018
高敏 C 反应蛋白	-0.228	0.000	-0.207	0.000
白细胞介素 -6	-0.188	0.000	-0.152	0.000
血清白蛋白	0.155	0.000	0.103	0.0008
脂联素	-0.016	0.602	-0.036	0.238
末端原 B- 利尿钠肽	-0.122	0.000	-0.116	0.0001
高密度脂蛋白胆固醇	0.022	0.474	0.001	0.964
总胆固醇	-0.085	0.006	-0.061	0.044
三酰甘油	-0.082	0.007	-0.019	0.529
游离脂肪酸	0.022	0.467	0.012	0.692
胆固醇酯转移蛋白	0.028	0.356	0.025	0.408
脂蛋白相关磷脂酶 A2	-0.049	0.105	-0.048	0.110
分泌型磷脂酶 A2	-0.063	0.038	-0.054	0.077
空腹血糖	-0.006	0.842	-0.004	0.897
血清球蛋白	0.008	0.781	0.056	0.064
脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白	0.014	0.641	0.002	0.960
视黄醇结合蛋白 4	0.022	0.467	0.043	0.154
估算肾小球滤过率 (CKD-EPI)	-0.063	0.039	-0.009	0.770
估算肾小球滤过率 (Amal-Dade)	0.072	0.017	0.070	0.021
康复期间饮酒情况	-0.048	0.114	-0.046	0.128
康复前一年饮酒情况	-0.029	0.344	0.015	0.616
γ - 谷氨酰基转移酶	-0.054	0.076	-0.084	0.006

注: 1) 调整年龄和性别后, 甲基化程度与血管危险标志物的相关系数; 2) 调整年龄、性别和吸烟状态后, 甲基化程度与血管危险标志物的相关系数。



附图 4 种结局的生存曲线分析

表 3 F2RL3 甲基化程度和稳定性冠心病患者预后的 Cox 回归模型分析

甲基化程度	二级 CVD 事件			CVD 死亡			非 CVD 死亡			全因死亡		
	H [^] R	95%CI 下限 上限		H [^] R	95%CI 下限 上限		H [^] R	95%CI 下限 上限		H [^] R	95%CI 下限 上限	
模型 1												
>0.74 (Quartile 4)	1.00			1.00			1.00			1.00		
≤ 0.74 (Quartile 3)	0.96	0.59	1.55	1.05	0.45	2.43	1.45	0.55	3.83	1.21	0.64	2.27
≤ 0.67 (Quartile 2)	1.22	0.77	1.92	1.80	0.85	3.83	1.84	0.72	4.69	1.82	1.01	3.27
≤ 0.54 (Quartile 1)	1.46	0.92	2.32	3.00	1.45	6.23	3.97	1.66	9.49	3.38	1.94	5.91
模型 2												
>0.74 (Quartile 4)	1.00			1.00			1.00			1.00		
≤ 0.74 (Quartile 3)	0.92	0.57	1.50	1.06	0.46	2.46	1.55	0.59	4.12	1.26	0.67	2.37
≤ 0.67 (Quartile 2)	1.14	0.71	1.84	1.89	0.85	4.16	2.33	0.88	6.19	2.07	1.12	3.83
≤ 0.54 (Quartile 1)	1.40	0.83	2.36	3.49	1.51	8.04	5.36	1.93	14.8	4.19	2.20	8.00
模型 3												
>0.74 (Quartile 4)	1.00			1.00			1.00			1.00		
≤ 0.74 (Quartile 3)	0.90	0.55	1.46	1.06	0.45	2.51	1.53	0.58	4.07	1.23	0.65	2.33
≤ 0.67 (Quartile 2)	1.08	0.66	1.77	1.80	0.79	4.12	2.27	0.84	6.10	1.93	1.03	3.63
≤ 0.54 (Quartile 1)	1.14	0.66	1.97	2.32	0.97	5.58	5.16	1.81	14.7	3.19	1.64	6.21
甲基化程度每减少 0.10	1.03	0.89	1.20	1.30	1.04	1.63	1.41	1.09	1.83	1.35	1.14	1.59
模型 3b												
>0.74 (Quartile 4)	1.00			1.00			1.00			1.00		
≤ 0.74 (Quartile 3)	0.90	0.56	1.47	1.13	0.48	2.64	1.53	0.58	4.06	1.25	0.66	2.37
≤ 0.67 (Quartile 2)	1.11	0.68	1.80	2.06	0.92	4.63	2.30	0.87	6.11	2.08	1.12	3.87
≤ 0.54 (Quartile 1)	1.18	0.69	2.01	2.82	1.21	6.59	5.28	1.89	14.8	3.54	1.85	6.79
甲基化程度每减少 0.10	1.04	0.90	1.21	1.37	1.10	1.71	1.43	1.11	1.84	1.39	1.18	1.64

注：模型 1：调整性别和年龄；模型 2：模型 1+ 调整吸烟情况（仍然吸烟；急性事件发生后戒烟；急性事件发生前戒烟从不吸烟）；模型 3：模型 1，2+ 调整高血压史、NT-proBNP（log）、高敏 C 反应蛋白（log）和白蛋白等风险指标与甲基化水平的交互作用；模型 3b：除不调整高敏 C 反应蛋白（log）和白蛋白外，其余与模型 3 一致。

表 4 经年龄和性别调整后, 吸烟和稳定性冠心病患者预后的 COX 回归模型分析

吸烟程度	二级 CVD 事件			CVD 死亡			非 CVD 死亡			全因死亡		
	HR	95%CI		HR	95%CI		HR	95%CI		HR	95%CI	
		下限	上限		下限	上限		下限	上限		下限	上限
从不吸烟	1.00			1.00			1.00			1.00		
曾经吸烟	1.25	0.84	1.87	1.33	0.72	2.45	0.87	0.45	1.66	1.09	0.70	1.71
仍然吸烟	2.10	1.29	3.44	2.22	1.06	4.62	1.51	0.67	3.39	1.86	1.08	3.20

表 5 经年龄、*F2RL3* 甲基化和性别调整后, 吸烟和稳定性冠心病患者预后的 COX 回归模型分析

吸烟状态	二级 CVD 事件			CVD 死亡			非 CVD 死亡			全因死亡		
	HR	95%CI		HR	95%CI		HR	95%CI		HR	95%CI	
		下限	上限		下限	上限		下限	上限		下限	上限
从不吸烟	1.00			1.00			1.00			1.00		
曾经吸烟	1.16	0.75	1.79	0.91	0.46	1.79	0.49	0.24	1.03	0.69	0.42	1.14
仍然吸烟	1.89	1.10	3.25	1.30	0.57	2.98	0.67	0.26	1.70	0.97	0.52	1.79

3 讨论

本研究结果表明稳定性冠心病患者 *F2RL3* 基因低甲基化程度与死亡率相关。甲基化水平仅与几种目前一致心血管风险标志物相关, 并且与预后关联性很大程度上独立于潜在混杂因素。

F2RL3 基因甲基化近来发现与吸烟行为、心血管发病率和全因死亡率的发生风险有关, 但对于甲基化程度差异的功能效应还没有证据显现^[8]。鉴于 *F2RL3* 基因产物在血小板活化, 内膜增生和炎症过程发挥作用^[9], 因此 *F2RL3* 基因甲基化与心血管患者预后相关并不令人感到意外。这一相关性类似于其他风险预测标志物如炎症标志物和肥胖相关变量与心血管患者预后的相关性, 并且还能延伸至非心血管死亡率。非致死性和致死性心血管事件之间的关联性的不同解释仍然需要进一步探索。

基于单学科知识, 鉴别出独立、有效且与已知疾病途径和标志物无内在联系的风险预测物非常困难^[10]。近来研究发现 *F2RL3* 甲基化与吸烟相关。尽管在 Cox 多元回归分析中, *F2RL3* 甲基化作为验证吸烟行为的标志物进行调整, 但在本组心血管基本患者中 *F2RL3* 甲基化仍然与预后相关。除 N 末端原 B- 利尿钠肽和 C- 反应蛋白 2 种特别建立, 且高度变异变量等危险因子外, 本组其他危险因素均与患者预后无相关性。C 反应蛋白是 *F2RL3* 编码蛋白酶活化受体 4

的下游生理分子, 小鼠模型中, C 反应蛋白活化导致炎症反应^[11]。人类和动物研究发现 C- 反应蛋白至少与冠心病的因果关系被排除^[12], *F2RL3* 甲基化改变血小板生物学和凝血功能的作用更能解释 *F2RL3* 甲基化与心血管疾病死亡的相关性^[13]。

多学科研究方法探讨 *F2RL3* 甲基化与心血管病死亡的相关性十分重要。任何情况下, 对 *F2RL3* 甲基进行校正后, 持续吸烟与各种死亡结果的相关性减弱, 提示 *F2RL3* 甲基化是吸烟有害影响的潜在介导者。无论对何种因果关系进行考察, *F2RL3* 甲基化都是与吸烟有关的风险预测标志物, 临床结果显示, 与已验证的吸烟行为标志物相比, *F2RL3* 甲基化表现出更为紧密的相关性。这可能是由于 *F2RL3* 甲基化更接近于病理生理进程, 或者是由于 *F2RL3* 甲基化能够准确反映过去和现在的吸烟暴露强度, 或者是这 2 种机制的组合。

总之, 本研究结果支持 *F2RL3* CpG 位点甲基化差异与临床的相关性。*F2RL3* 甲基化是吸烟有害影响的潜在介导者, 并与稳定性冠心病死亡率密切相关。

参考文献:

- [1] PIRIE K, PETO R, REEVES G K, et al. The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK[J]. The Lancet, 2013, 381(9861): 133-141.

- [2] 石荟, 徐浩, 白冲, 等. 2010-2011 年上海市医院工作人员吸烟及控烟状况调查 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(6): 420-424.
- [3] 张梅, 李镒冲, 姜勇. 我国居民对烟草危害及控烟问题的认知情况 [J]. 中国健康教育, 2012, 28(2): 101-103.
- [4] ZEILINGER S, KÜHNEL B, KLOPP N, et al. Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation[J]. PloS one, 2013, 8(5): e63812.
- [5] SHENKER N S, UELAND P M, POLIDORO S, et al. DNA methylation as a long-term biomarker of exposure to tobacco smoke[J]. Epidemiology, 2013, 24(5): 712-716.
- [6] ZHANG Y, SCHÖTTKER B, ORDÓÑEZ - MENA J, et al. F2RL3 methylation, lung cancer incidence and mortality[J]. International Journal of Cancer, 2015, 137(7): 1739-1748.
- [7] ZHANG Y, YANG R, BURWINKEL B, et al. F2RL3 methylation in blood DNA is a strong predictor of mortality[J]. International Journal of Epidemiology, 2014, 43(4): 1215-1225.
- [8] BREITLING L P, YANG R, KORN B, et al. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication[J]. The American Journal of Human Genetics, 2011, 88(4): 450-457.
- [9] LEGER A J, COVIC L, KULIOPULOS A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases[J]. Circulation, 2006, 114(10): 1070-1077.
- [10] O'DONOGHUE M, MORROW D A. The future of biomarkers in the management of patients with acute coronary syndromes[J]. Current Opinion in Cardiology, 2008, 23(4): 309-314.
- [11] MCDUGALL J J, ZHANG C, CELLARS L, et al. Triggering of proteinase - activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice[J]. Arthritis & Rheumatism, 2009, 60(3): 728-737.
- [12] TRION A, DE MAAT M P M, JUKEMA J W, et al. No effect of C-reactive protein on early atherosclerosis development in apolipoprotein E* 3 – leiden / human C-reactive protein transgenic mice[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005, 25(8): 1635-1640.
- [13] BORISSOFF J I, SPRONK H M H, ten CATE H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis[J]. New England Journal of Medicine, 2011, 364(18): 1746-1760.

(张西倩 编辑)