

·研究论文·

DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2019.03.001

APP 基因启动子区甲基化与冠心病相关性的研究

季慧慧, 郑中华, 段世伟*

(宁波大学 医学院 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 中国浙江 宁波 315211)

摘要:为了探讨淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)基因甲基化与冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart disease, CHD)之间的关系,采用甲基化特异性实时定量聚合酶链反应(quantitative methylation-specific PCR, qMSP)检测538名CHD患者及453名正常对照者的APP甲基化修饰水平。结果显示:CHD组的年龄、男性人数、吸烟及糖尿病患者人数均高于对照组(年龄, $P=8.0E-08$; 男性人数, $P=7.0E-07$; 吸烟, $P=0.001$; 糖尿病, $P=0.019$)。CHD组患者白蛋白水平显著低于对照组($P=0.001$),而AST、ALP及 γ -GT的水平在CHD组中显著高于对照组(AST, $P=3.0E-04$; ALP, $P=0.001$; γ -GT, $P=0.018$)。在总体样本及男性样本中,APP基因甲基化水平在CHD组显著高于对照组(总体, $P=0.026$; 男性, $P=0.025$)。在非吸烟CHD患者中,APP基因甲基化水平与狭窄程度呈正比($r=0.076$, $P=0.046$)。在总体CHD伴高血压患者及男性CHD伴高血压患者中,APP基因甲基化水平和狭窄程度呈正比(总体, $r=0.096$, $P=0.029$; 男性, $r=0.135$, $P=0.019$)。年龄分层分析后发现,在年龄 ≥ 63 岁的男性CHD伴高血压患者中,APP基因甲基化水平与狭窄程度呈正比($r=0.219$, $P=0.020$)。在年龄 <63 岁的不吸烟或非高血压CHD患者中,APP基因甲基化水平与狭窄程度呈负相关(不吸烟, $r=-0.223$, $P=0.008$; 非高血压, $r=-0.216$, $P=0.010$)。在男性CHD患者中,APP基因甲基化水平与年龄呈正相关($r=0.163$, $P=0.001$)。在女性CHD患者中,APP基因甲基化水平与年龄呈负相关($r=-0.192$, $P=0.015$)。在男性正常对照组中,APP基因甲基化水平与年龄呈负相关($r=-0.203$, $P=0.001$)。在女性正常对照组中,APP基因甲基化水平与ApoB、白蛋白及ALT水平呈负相关($r=-0.160$, $P=0.028$; $r=-0.151$, $P=0.036$; $r=-0.163$, $P=0.024$)。在正常对照组中,APP基因甲基化水平与Lp(a)水平呈正相关($r=0.108$, $P=0.031$)。以上结果初步表明APP基因甲基化水平增高可能和男性CHD患病风险有关。

关键词:淀粉样前体蛋白基因(APP); 冠心病(CHD); DNA 甲基化; 男性

中图分类号: Q341

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2019)03-0173-10

Study on the Correlation Between Methylation of APP Gene Promoter Region and Coronary Heart Disease

JI Hui-hui, ZHENG Zhong-hua, DUAN Shi-wei*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pathophysiology, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China)

Abstract: To investigate the relationship between methylation of amyloid precursor protein (APP) gene and coronary heart disease (CHD), the APP methylation levels of 538 CHD patients and 453 normal controls were detected using the quantitative methylation-specific PCR (qMSP). The results showed that the age, the numbers of males, smokers and diabetic patients were significantly higher in CHD patients than in controls (age, $P=8.0E-08$; males, $P=7.0E-07$; smokers, $P=0.001$; diabetes, $P=0.019$). Albumin levels were significantly lower in the CHD group than in the control group ($P=0.001$), while AST, ALP, and γ -GT levels were significantly higher in the CHD group than in control group (AST, $P=3.0E-04$; ALP, $P=0.001$; γ -GT, $P=0.018$). In both total and male samples, the methylation levels of the APP gene were found to be significantly higher in the CHD group than in the control group (total samples, $P=0.026$; males, $P=0.025$). In non-smoking CHD pa-

收稿日期: 2018-12-10; 修回日期: 2019-02-23

基金项目: 宁波大学王宽诚幸福基金资助项目

作者简介: 季慧慧(1991-), 女, 浙江丽水人, 博士研究生; 季慧慧和郑中华对本文的贡献相同, 为本文共同第一作者; *通讯作者: 段世伟(1976-), 男, 湖北武汉人, 宁波大学研究员, 主要从事医学及表观遗传研究, Tel: 0574-64709950, E-mail: duanshiwei@nbu.edu.cn。

tients, the *APP* methylation level was positively related to the degree of stenosis ($r=0.076, P=0.046$). In both total CHD patients with hypertension and CHD male patients with hypertension, *APP* methylation levels were found to be positively related to the degree of stenosis (total samples, $r=0.096, P=0.029$; males, $r=0.135, P=0.019$). After age stratification, it was found that the *APP* methylation level was positively related to stenosis in CHD male patients with hypertension aged ≥ 63 years ($r=0.219, P=0.020$). In non-smoking or non-hypertensive CHD patients aged <63 years, *APP* methylation levels were found to be negatively correlated with stenosis (non-smoking, $r=-0.223, P=0.008$; non-hypertension, $r=-0.216, P=0.010$). In CHD male patients, a positive correlation was found between the *APP* methylation level and the age ($r=0.163, P=0.001$). In CHD female patients, an inverse correlation was observed between the *APP* methylation level and the age ($r=-0.192, P=0.015$). In normal male controls, the *APP* methylation level was inversely correlated with the age ($r=-0.203, P=0.001$). In normal female controls, *APP* methylation level was inversely correlated with ApoB, albumin and ALT levels ($r=-0.160, P=0.028$; $r=-0.151, P=0.036$; $r=-0.163, P=0.024$, respectively). In the normal group, the *APP* methylation level was positively correlated with Lp(a) level ($r=0.108, P=0.031$). In conclusion, the above results showed that the increased methylation level of *APP* gene might be related to the risk of CHD in males.

Key words: amyloid precursor protein (*APP*); coronary heart disease (CHD); DNA methylation; male

(*Life Science Research*, 2019, 23(3): 173~182)

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart disease, CHD)简称“冠心病”,是全球死亡率最高的疾病之一,也是全球公共卫生面临的主要挑战。根据2014年世界卫生组织的报告,从2000年到2012年,全球有5 600万人死于CHD^[1]。CHD是一种由多种因素导致的复杂疾病。相关研究表明,年龄、吸烟史、饮酒史、高血压病史、糖尿病史、肥胖、炎症、高血脂等是早发CHD的危险因素^[2]。据报道,包括DNA甲基化、组蛋白修饰、染色质重构和非编码RNA调控在内的表观遗传因子通过改变基因与环境的相互作用而引起CHD^[3]。DNA甲基化是指通过DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt)的作用在5'-CpG-3'二核苷酸胞嘧啶的第5个碳原子上合成甲基。DNA甲基化涉及多种细胞生理和病理活动,例如时间和空间特异性基因表达、X染色体失活、衰老、癌症和心血管疾病^[4]。已知淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)高甲基化与阿尔茨海默病相关^[5]。*APP*致病变体或重复会导致 β 淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)相关的脑淀粉样血管病的发生,是原发性非创伤性脑出血的主要原因^[6]。慢性炎症引起的疾病如动脉粥样硬化等是由多种遗传因素和环境因素共同作用的结果,并且这些疾病具有共同的分子机制。越来越多的小鼠模型表明*APP*在血管炎症中起核心作用,可激活内皮细胞和巨噬细胞中的一系列促炎事件^[7~8]。本研究主要观察CHD患者*APP*甲基化水平并探讨其可

能存在的调节机制,旨在阐明CHD与*APP*甲基化水平改变之间的关系。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

2015年2月至2018年2月,从浙江省宁波市第一医院收集CHD患者538名(63 ± 10 岁,男性378名,女性160名),作为病例组,同期健康体检者453名(59 ± 10 岁,男性249名,女性204名),作为正常对照组。纳入病例组的标准:采用Judkins冠状动脉造影术,将左回旋支、左前旋降支、左冠状动脉主干、右冠状动脉中至少有一支冠状动脉狭窄程度大于或等于50%的患者纳入病例组。排除标准:1)患有先天性心脏病、风湿性心脏病、肺性心脏病、高血压心脏病等的患者;2)患有精神疾病的患者;3)患有恶性肿瘤、肝肾功能不全、血液系统疾病的患者。对照组入选对象为该院同期健康体检者,无肝肾功能异常、恶性肿瘤、心脏病等。本研究获得了所有研究对象的知情同意,并且通过了宁波大学医学院伦理委员会的批准。

1.2 血液采集及一般临床资料

受试者空腹8 h后,抽取肘静脉血5 mL,用2%乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝。收集一般资料,包括年龄、性别、吸烟史、高血压病史、糖尿病史、冠状动脉狭窄程度等。采用Beckman AU5800全自动生化分析仪测定低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、总

胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、甘油三酸酯(triglyceride, TG)、载脂蛋白A(apolipoprotein A, ApoA)、载脂蛋白B(apolipoprotein B, ApoB)、载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)、脂蛋白(a)[lipoprotein (a), Lp(a)]、C-反应蛋白(C-reactin protein, CRP)、白蛋白(albumin)、球蛋白(globulin)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸盐(alkaline phosphate, ALP)、 γ -谷氨酰转移酶(γ -glutamyl transferase, γ -GT)等的浓度。

1.3 DNA 提取及亚硫酸氢盐修饰

根据 E.Z.N.A.TM 血液试剂盒(Omega Bio-Tek, Norcross, GA)的说明书, 提取基因组 DNA, 保存在-20℃冰箱中。通过 Nanodrop 2000 分光光度计(Thermal Scientific Co. Ltd, Wilmington, USA)测量 DNA 浓度。通过 EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Orange, USA)进行亚硫酸氢盐修饰。基因组 DNA 通过亚硫酸氢盐修饰后, 未甲基化的胞嘧啶相应地转化为尿嘧啶, 而已甲基化的胞嘧啶则保留在反应中。

1.4 甲基化特异性实时定量聚合酶链反应(quanti-tative methylation-specific PCR, qMSP)

将经过亚硫酸氢盐修饰的 DNA 用作 qMSP 测定中的模板, 最终反应体系共 20 μL, 含有 10 μL SYBR Green I Master (Roche, Basel, Switzerland)、0.5 μL 正向引物、0.5 μL 反向引物、1 μL DNA 样本以及 8 μL ddH₂O。正向引物的序列为 5'-GTTGTCGTCGTTAGTAGTC-3', 反向引物的序列为 5'-TCGTTTCACCTTCCTCTC-3'。PCR 反应在 Light Cycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) 中进行, 具体条件如下。首先, 95℃下进行 1 个 10 min 的循环; 其次, 95℃下持续 20 s, 58℃下退火 20 s, 72℃持续 30 s, 循环 45 次; 然后, 1 循环的融化分析曲线在下列条件进行: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 之后以每秒增加 0.11℃的幅度升温至 95℃; 最后, 40℃下延伸扩展 10 min。

1.5 Sanger 测序及毛细管电泳

我们随机选取亚硫酸氢盐修饰过的 DNA 进行 Sanger 测序。与原序列相比, 亚硫酸氢盐修饰后的尿嘧啶完全转化为胸腺嘧啶, 甲基化胞嘧啶保持不变, 则转化过程得到验证。采用全自动高分辨率毛细管电泳仪(Qsep100, Bioptic Inc., Taiwan, China)对 qMSP 产物进行分析, 以验证产物的片段

大小是否与理论片段长度相符。

1.6 统计分析

所有的统计分析均使用 SPSS 18.0 软件(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)。独立样本 t 检验、卡方检验及 Mann-Whitney U test 检验用于评估临床特征及 APP 基因甲基化水平在 CHD 组与对照组之间的差异。采用 Spearman 相关性测试来评估 APP 甲基化与生化指标之间的相关性。DNA 甲基化水平采用相对甲基化率(percentage of methylated reference, PMR)表示。每个样本的 PMR 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 量化方法计算^[9], 具体公式为

$$\text{PMR} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%, \Delta\Delta Ct = \text{sample DNA } (Ct_{APP} - Ct_{ACTB}) - \text{fully methylated } (Ct_{APP} - Ct_{ACTB})$$

符合正态分布的数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 不符合正态分布的数据用中位数(四分位距)表示。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者临床基线特征

我们一共收集了 538 名 CHD 患者(63 ± 10 岁, 男性 378 名, 女性 160 名)及 453 名正常对照(59 ± 10 岁, 男性 249 名, 女性 204 名)。其中, CHD 组吸烟及糖尿病患者人数显著高于对照组(吸烟, $P=0.001$; 糖尿病, $P=0.019$, 表 1), 但白蛋白水平显著低于对照组($P=0.001$, 表 1)。此外, AST、ALP 及 γ -GT 水平在 CHD 组中显著高于对照组(AST, $P=3.0E-04$; ALP, $P=0.001$; γ -GT, $P=0.018$, 表 1)。

年龄是 CHD 的重要影响因素^[10], 因此我们进一步根据年龄分层进行亚组分析。以 CHD 组的平均年龄 63 岁为界, 结果发现在年龄 ≥ 63 岁的人群中, CHD 组白蛋白水平显著低于对照组($P=0.016$, 表 2)。在年龄 < 63 岁的人群中, CHD 组糖尿病患者人数显著高于对照组($P=0.001$, 表 2)。在两个亚组中, CHD 组吸烟人数显著多于对照组(≥ 63 岁, $P=0.001$; < 63 岁, $P=5.0E-05$, 表 2); AST、ALP 水平在 CHD 组中显著高于对照组(表 2)。

2.2 APP 启动子 CpG 岛区域的靶序列说明

启动子 CpG 岛异常甲基化与基因转录失活有关^[11]。由于甲基化往往发生在 CpG 二核苷酸的位置, 所以我们选择了启动子区域 CpG 岛位置的位点(chr21: 26 169 970~26 170 045)进行研究(图 1A)。同时, 我们的研究是基于平均甲基化率, 而不是针对某个特定的 cg 位点。Sanger 测序结果表明, 扩增片段与目标序列吻合, 亚硫酸氢盐转化

表 1 根据 CHD 进行血管造影研究的人群的基线特征
Table 1 Baseline characteristics of the population undergoing angiographic study according to CHD

Variables	CHD patients (n=538)	Non-CHD patients (n=453)	P
Age (years)	63±10	59±10	8.0E-08^a
Male/Female	378/160	249/204	7.0E-07^c
Smoking, Y/N	187/242	113/288	0.001^c
Hypertension, Y/N	288/186	225/209	0.225 ^c
Diabetes, Y/N	105/357	63/363	0.019^c
LDL (mmol/L)	2.59±0.94	2.59±0.87	0.896 ^c
TC (mmol/L)	4.34±1.19	4.40±1.04	0.475 ^c
HDL (mmol/L)	1.05 (0.91, 1.23)	1.08 (0.95, 1.23)	0.079 ^b
TG (mmol/L)	1.38 (1.02, 1.99)	1.38 (1.00, 1.92)	0.595 ^b
ApoA (g/L)	0.98 (0.84, 1.12)	0.98 (0.84, 1.11)	0.525 ^b
ApoB (g/L)	0.78±0.28	0.77±0.26	0.516 ^c
ApoE (mg/dL)	4.00 (3.20, 5.20)	4.00 (3.20, 5.03)	0.581 ^b
Lp(a) (g/L)	0.35 (0.12, 0.78)	0.27 (0.13, 0.61)	0.110 ^b
CRP (ng/dL)	2.6 (1.20, 6.30)	2.35 (1.10, 5.10)	0.111 ^b
Albumin (g/L)	40.53±4.65	41.48±3.83	0.001^c
Globulin (g/L)	25.14±4.28	24.88±4.24	0.368 ^c
ALT (U/L)	21.00 (14.75, 33.00)	20.00 (15.00, 29.00)	0.206 ^b
AST (U/L)	24.00 (18.00, 35.00)	22.00 (17.00, 29.00)	3.0E-04^b
ALP (U/L)	70.00 (56.00, 87.00)	65.00 (53.00, 79.00)	0.001^b
γ-GT (U/L)	25.50 (16.75, 45.25)	22.50 (15.00, 38.00)	0.018^b

注: LDL, 低密度脂蛋白; TC, 总胆固醇; HDL, 高密度脂蛋白; TG, 甘油三酸酯; ApoA, 载脂蛋白 A; ApoB, 载脂蛋白 B; ApoE, 载脂蛋白 E; Lp(a), 脂蛋白(a); CRP, C-反应蛋白; ALT, 丙氨酸转氨酶; AST, 天冬氨酸转氨酶; ALP, 碱性磷酸盐; γ-GT, γ-谷氨酰转移酶。^a 为独立样本 t 检验的 P 值, ^b 为 Mann-Whitney U 检验的 P 值, ^c 为卡方检验的 P 值。有统计学意义的结果($P<0.05$)加粗表示。表内数据采用中位数(四分位距)或平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

Notes: LDL, low-density lipoprotein; TC, total cholesterol; HDL, high-density lipoprotein; TG, triglyceride; ApoA, apolipoprotein A; ApoB, apolipoprotein B; ApoE, apolipoprotein E; Lp(a), lipoprotein (a); CRP, C-reactive protein; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphate; γ-GT, γ-glutamyl transferase. ^a stands for the P value for the independent sample t test, ^b stands for the P value for the Mann-Whitney U test, and ^c stands for the P value for the chi-square test. Statistically significant results ($P<0.05$) are in bold. Data are presented as median (interquartile range) or $\bar{x}\pm s$.

效果良好(图 1B)。毛细管电泳结果(图 1C)证实扩增产物长度为 76 bp。

2.3 CHD 患者 APP 甲基化与正常对照之间的比较

qMSP 检测发现 APP 基因甲基化水平在 CHD 组显著高于对照组($P=0.026$, 表 3)。进一步的性别分层分析发现, APP 基因甲基化水平在男性 CHD 组显著高于男性对照组($P=0.025$, 表 3)。

2.4 CHD 患者 APP 甲基化与冠脉狭窄程度之间的相关性

冠状动脉狭窄程度是 CHD 的主要评判依据。在 CHD 患者中, 我们发现不吸烟患者的 APP 甲基化水平和狭窄程度(Gensini 冠脉狭窄评分)呈正比($r=0.076$, $P=0.046$, 表 4)。在 CHD 伴高血压患者中, APP 甲基化水平和狭窄程度也呈正比($r=0.096$, $P=0.029$, 表 4)。性别分层分析发现, 在男性 CHD 伴高血压患者中, APP 甲基化水平和狭窄程度呈正比($r=0.135$, $P=0.019$, 表 4)。

进一步的年龄分层分析发现, 在年龄 ≥ 63 岁

的男性 CHD 伴高血压患者中, APP 甲基化水平与狭窄程度呈正比($r=0.219$, $P=0.020$, 表 5); 在年龄 <63 岁的不吸烟或非高血压 CHD 患者中, APP 甲基化水平与狭窄程度呈负相关(不吸烟, $r=-0.223$, $P=0.008$; 非高血压, $r=-0.216$, $P=0.010$, 表 5)。

2.5 受试者 APP 甲基化与临床特征之间的关系

如表 6 所示, 在男性 CHD 患者中, APP 甲基化水平与年龄呈正相关($r=0.163$, $P=0.001$); 在女性 CHD 患者中, APP 甲基化水平与年龄呈负相关($r=-0.192$, $P=0.015$)。此外, 在正常对照组中, APP 甲基化水平与 Lp(a) 水平呈正相关($r=0.108$, $P=0.031$, 表 6)。在男性正常对照组中, APP 甲基化水平与年龄呈负相关($r=-0.203$, $P=0.001$, 表 6); 在女性正常对照组中, APP 甲基化水平与 ApoB、白蛋白及 ALT 水平呈负相关(ApoB, $r=-0.160$, $P=0.028$; 白蛋白, $r=-0.151$, $P=0.036$; ALT, $r=-0.163$, $P=0.024$, 表 6)。

进一步的年龄分层分析发现, 在年龄 ≥ 63 岁的 CHD 患者及女性 CHD 患者中, APP 甲基化水

表2 根据CHD进行血管造影研究的人群的基线特征(按年龄分层)

Table 2 Baseline characteristics of the population undergoing angiographic study according to CHD (age stratification)

Variables	≥63 (years)			<63 (years)		
	CHD patients (n=287)	Non-CHD patients (n=170)	P	CHD patients (n=251)	Non-CHD patients (n=283)	P
Age (years)	69 (66, 73)	67 (65, 71)	0.038^b	56 (51, 59)	55 (49, 59)	0.141 ^b
Male/Female	194/93	85/85	2.0E-04^c	184/67	164/119	0.003^c
Smoking, Y/N	78/144	30/124	0.001^c	109/98	83/164	5.0E-05^c
Hypertension, Y/N	177/72	105/58	0.160 ^c	111/114	120/151	0.279 ^c
Diabetes, Y/N	62/182	39/122	0.815 ^c	43/175	24/241	0.001^c
LDL (mmol/L)	2.54±0.88	2.53±0.86	0.841 ^a	2.63±1.01	2.63±0.87	0.984 ^a
TC (mmol/L)	4.27±1.11	4.31±1.03	0.740 ^a	4.44±1.24	4.45±1.05	0.934 ^a
HDL (mmol/L)	1.07 (0.93, 1.24)	1.09 (0.93, 1.25)	0.533 ^b	1.03 (0.90, 1.22)	1.08 (0.96, 1.22)	0.673 ^b
TG (mmol/L)	1.26 (1.00, 1.86)	1.32 (0.95, 1.84)	0.967 ^b	1.55 (1.03, 2.15)	1.42 (1.03, 1.98)	0.048^b
ApoA (g/L)	1.00±0.21	1.01±0.23	0.799 ^a	0.98±0.25	0.99 (0.85, 1.11)	0.197 ^b
ApoB (g/L)	0.78±0.26	0.76±0.26	0.364 ^a	0.78±0.29	0.78±0.26	0.878 ^a
ApoE (mg/dL)	3.91 (3.10, 5.00)	3.92 (3.20, 4.70)	0.764 ^b	4.1 (3.2, 5.3)	4.0 (3.1, 5.13)	0.530 ^b
Lp(a) (g/L)	0.37 (0.14, 1.04)	0.32 (0.17, 1.09)	0.743 ^b	0.30 (0.1, 0.65)	0.23 (0.1, 0.52)	0.250 ^b
CRP (ng/dL)	2.80 (1.30, 6.50)	2.60 (1.20, 5.50)	0.430 ^b	2.6 (1.1, 6.7)	2.4 (1.2, 5.1)	0.254 ^b
Albumin (g/L)	39.50±4.12	40.54±3.92	0.016^a	41.64±4.96	42.06±3.67	0.292 ^a
Globulin (g/L)	25.47±4.26	25.31±4.85	0.728 ^a	24.77±4.28	24.62±3.81	0.687 ^a
ALT (U/L)	19.00 (14.00, 30.00)	19.00 (14.00, 27.00)	0.396 ^b	25.0 (16.0, 40.0)	20.0 (15.0, 32.0)	0.075 ^b
AST (U/L)	24.00 (19.00, 35.00)	23.00 (17.00, 29.00)	0.013^b	23.0 (18.0, 35.0)	21.0 (17.0, 29.0)	0.021^b
ALP (U/L)	74.52±28.00	67.48±22.51	0.015^a	72.58±22.42	67.74±20.90	0.019^a
γ-GT (U/L)	25.00 (16.00, 43.25)	22.00 (15.00, 36.00)	0.120 ^b	26.5 (17.0, 46.75)	24.0 (15.0, 40.0)	0.057 ^b

注: LDL, 低密度脂蛋白; TC, 总胆固醇; HDL, 高密度脂蛋白; TG, 甘油三酸酯; ApoA, 载脂蛋白 A; ApoB, 载脂蛋白 B; ApoE, 载脂蛋白 E; Lp(a), 脂蛋白(a); CRP, C-反应蛋白; ALT, 丙氨酸转氨酶; AST, 天冬氨酸转氨酶; ALP, 碱性磷酸盐; γ-GT, γ-谷氨酰转移酶。^a为独立样本t检验的P值, ^b为Mann-Whitney U检验的P值, ^c为卡方检验的P值。有统计学意义的结果($P<0.05$)加粗表示。表内数据采用中位数(四分位距)或平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

Notes: LDL, low-density lipoprotein; TC, total cholesterol; HDL, high-density lipoprotein; TG, triglyceride; ApoA, apolipoprotein A; ApoB, apolipoprotein B; ApoE, apolipoprotein E; Lp(a), lipoprotein (a); CRP, C-reactive protein; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphate; γ-GT, γ-glutamyl transferase. ^a stands for the P value for the independent sample t test, ^b stands for the P value for the Mann-Whitney U test, and ^c stands for the P value for the chi-square test. Statistically significant results ($P<0.05$) are in bold. Data are presented as median (interquartile range) or $\bar{x}\pm s$.

表3 CHD患者与正常对照的APP甲基化差异

Table 3 The difference of APP methylation between CHD patients and normal controls

	CHD patients	Non-CHD patients	P
Total	0.18 (0.06, 0.41)	0.14 (0.05, 0.34)	0.026
Male	0.17 (0.06, 0.39)	0.16 (0.05, 0.32)	0.025
Female	0.22 (0.06, 0.55)	0.13 (0.04, 0.40)	0.237

注: 有统计学意义的结果($P<0.05$)用黑体表示。表内PMR数据采用中位数(四分位距)表示。

Notes: Statistically significant results ($P<0.05$) are in bold. PMR data are presented as median (interquartile range).

表4 CHD患者APP甲基化与冠状动脉狭窄积分的相关性

Table 4 Correlation between APP methylation and stenosis score in CHD patients

Variables	Total		Male		Female		
	r	P	r	P	r	P	
Smoking	Smoking	-0.069	0.236	-0.049	0.399	-0.676	0.140
	Non-smoking	0.076	0.046	0.097	0.077	0.058	0.275
Hypertension	Hypertension	0.096	0.029	0.135	0.019	0.038	0.578
	Non-hypertension	-0.025	0.579	-0.058	0.294	0.057	0.485
Diabetes	Diabetes	0.002	0.975	0.113	0.288	-0.121	0.291
	Non-diabetes	0.044	0.203	0.024	0.571	0.086	0.148

注: 有统计学意义的结果($P<0.05$)用黑体表示。

Note: Statistically significant results ($P<0.05$) are in bold.

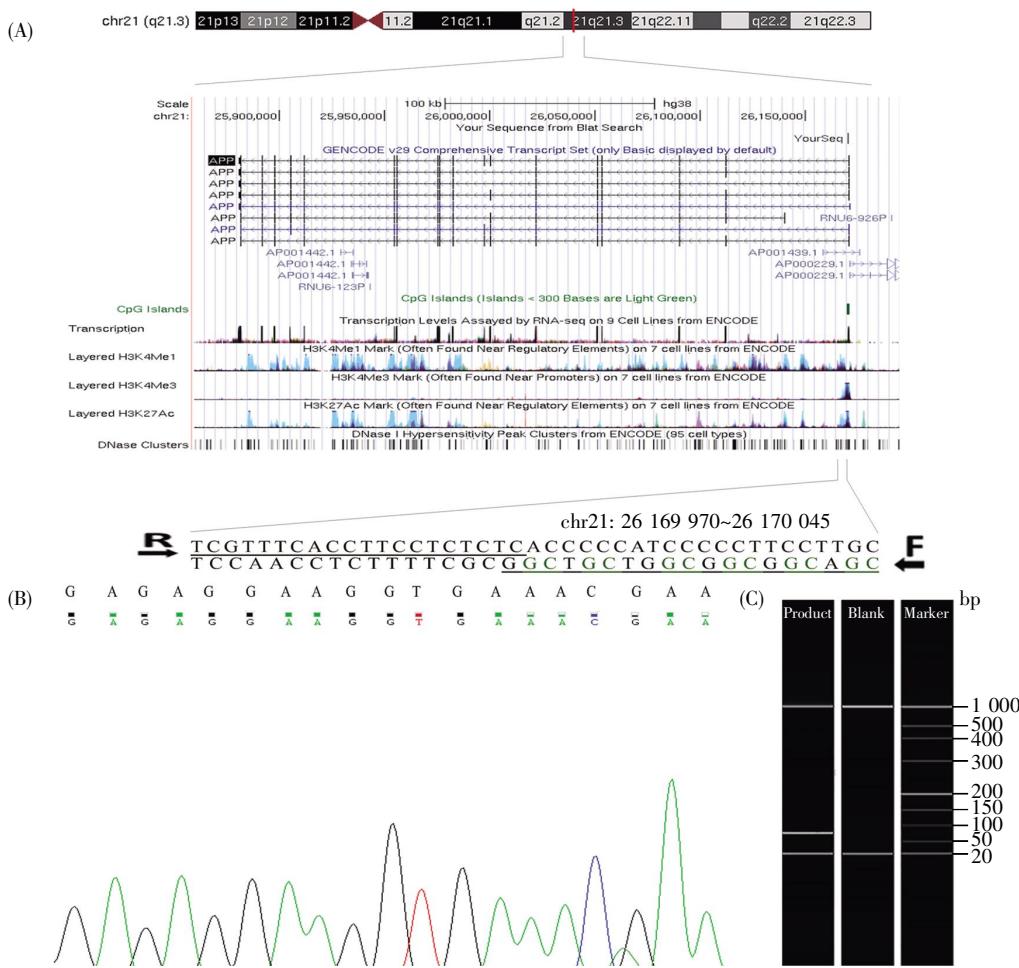


图1 APP 启动子 CpG 岛的引物及目标扩增序列

(A) 目标序列定位及功能注释。根据人类 2013 (GRCh38/hg38) 装配, 来自 UCSC 基因组浏览器。目标序列位于 *APP* 的 CpG 岛区域, 引物用下划线标示, F 和 R 分别为正向引物和反向引物。图中淡蓝色代表 HUVEC 细胞系, 紫色代表 NHEK 细胞系, 绿色代表 HSMM 细胞系, 红色代表 GM12878 细胞系, 橘黄代表 H1-hESC 细胞系, 粉红色代表 NHLF 细胞系, 深蓝色代表 K562 细胞系。6 个 CpG 位点为绿色; (B) 部分 Sanger 测序结果; (C) 毛细管电泳扩增片段结果。

Fig.1 The target sequence and primers in APP promoter CpG island region

(A) The location and functional annotation of the target sequence from the University of California Santa Cruz genome browser based on human 2013 (GRCh38/hg38). The target sequence is located in the CpG island region of *APP*, and the primers are underlined and six CpG sites are in green. F and R are forward and reverse primers, respectively. Light blue represents HUVEC cell line, purple represents NHEK cell line, green represents HSMM cell line, red represents GM12878 cell line, orange represents H1-hESC cell line, pink represents NHLF cell line, and dark blue represents K562 cell line; (B) Sanger sequencing of the converted DNA; (C) The size verification of the amplified product by capillary electrophoresis.

表5 CHD 患者 APP 甲基化与冠状动脉狭窄积分的相关性(按年龄分层)

Table 5 Correlation between APP methylation and stenosis score in CHD patients (age stratification)

Variables	≥63 (years)				<63 (years)								
	Total		Male		Female		Total		Male		Female		
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	
Smoking	Smoking	-0.063	0.588	-0.063	0.588	NA	NA	-0.041	0.674	-0.030	0.757	NA	NA
	Non-smoking	0.039	0.579	0.154	0.097	-0.089	0.401	-0.223	0.008	-0.036	0.757	-0.217	0.079
Hypertension	Hypertension	0.130	0.085	0.219	0.020	-0.057	0.656	-0.055	0.566	-0.044	0.707	-0.106	0.551
	Non-hypertension	-0.136	0.156	-0.109	0.331	-0.196	0.309	-0.216	0.010	-0.160	0.099	-0.098	0.587
Diabetes	Diabetes	-0.016	0.902	-0.008	0.965	-0.248	0.212	-0.061	0.537	-0.050	0.700	-0.098	0.531
	Non-diabetes	0.027	0.684	0.038	0.633	-0.012	0.921	-0.063	0.191	-0.040	0.481	-0.128	0.171

注: 有统计学意义的结果($P<0.05$)用黑体表示。NA 表示样本不足没有分析(1 个样本)。

Notes: Statistically significant results ($P<0.05$) are in bold. NA stands for not analyzed due to insufficient samples ($n=1$).

平与 HDL 水平呈正相关(总体, $r=0.160$, $P=0.008$; 女性, $r=0.261$, $P=0.012$, 表 7)。在年龄 ≥ 63 岁的女性 CHD 患者中, APP 甲基化水平与 ALP 水平呈负相关($r=-0.250$, $P=0.040$, 表 7)。在年龄 ≥ 63 岁的正常对照组及女性正常对照组中, APP 甲基化水平与 ALP 呈正相关(总体, $r=0.223$, $P=0.009$; 女性, $r=0.242$, $P=0.047$, 表 7)。在年龄 ≥ 63 岁的正常对照组中, APP 甲基化水平与 ApoB 水平呈正相关($r=0.180$, $P=0.025$, 表 7)。在年龄 <63 岁的男性 CHD 患者中, APP 甲基化水平与年龄呈正相关($r=0.145$, $P=0.049$, 表 8)。在年龄 <63 岁的正常对照组中, APP 甲基化水平与年龄、白蛋白水平呈负相关(年龄, $r=-0.124$, $P=0.038$; 白蛋白, $r=-0.134$, $P=0.030$, 表 8), 与 Lp(a) 水平呈正相关($r=0.127$, $P=0.046$, 表 8)。在年龄 <63 岁的女性正常对照组中, APP 甲基化水平与白蛋白水平呈负相关($r=-0.197$, $P=0.036$, 表 8)。在年龄 <63 岁的男性正常对照组中, APP 甲基化水平与 ALP 水平呈负相关($r=-0.061$, $P=0.042$, 表 8)。

3 讨论

本研究发现 CHD 组的年龄、男性人数、吸烟及糖尿病患者人数均高于对照组; CHD 组白蛋白水平显著低于对照组, 而 AST、ALP 及 γ -GT 的水

平在 CHD 组中显著高于对照组(表 1)。在总体样本及男性样本中, 我们均发现 APP 基因甲基化水平在 CHD 组显著高于对照组(表 3)。在非吸烟 CHD 患者中, 我们发现 APP 甲基化水平与狭窄程度呈正比。在总体 CHD 伴高血压患者及男性 CHD 伴高血压患者中, APP 甲基化水平和狭窄程度呈正比(表 4)。年龄分层分析后发现, 在年龄 ≥ 63 岁的男性 CHD 伴高血压患者中, APP 甲基化水平与狭窄程度呈正比; 在年龄 <63 岁的不吸烟或非高血压 CHD 患者中, APP 甲基化水平与狭窄程度呈负相关(表 5)。性别分层分析结果显示, 在男性 CHD 患者中, APP 甲基化水平与年龄呈正相关; 在女性 CHD 患者中, APP 甲基化水平与年龄呈负相关。此外, 在男性正常对照组中, APP 甲基化水平与年龄呈负相关; 在女性正常对照组中, APP 甲基化水平与 ApoB、白蛋白及 ALT 水平呈负相关; 在正常对照组中, APP 甲基化水平与 Lp(a) 水平呈正相关(表 6)。

血管会随着年龄的增长而老化, 表现为血管弹性下降、血液难以透过血管壁。同时, 被称为斑块的脂肪沉积也会沿着动脉壁堆积, 进而减缓心脏的血液流动。因此, 随着年龄的增长, CHD 的患病风险也会增加。Fukumoto 等^[12]在 628 名日本 CHD 患者中发现, 年龄、男性、HbA1c、血脂异常

表 6 受试者 APP 甲基化与临床特征的相关性分析

Table 6 Correlation analysis between APP methylation and clinical characteristics of subjects

Variables	CHD						Non-CHD					
	Total		Male		Female		Total		Male		Female	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Stenosis (Gensini)	-0.059	0.174	-0.015	0.773	-0.169	0.033	0.004	0.934	0.045	0.480	-0.046	0.509
Age (years)	0.058	0.178	0.163	0.001	-0.192	0.015	-0.078	0.096	-0.203	0.001	0.093	0.188
LDL (mmol/L)	0.063	0.154	0.040	0.455	0.068	0.394	0.009	0.850	0.090	0.173	-0.071	0.325
TC (mmol/L)	0.060	0.172	0.027	0.615	0.086	0.283	0.026	0.588	0.124	0.060	-0.073	0.314
HDL (mmol/L)	0.085	0.053	0.043	0.422	0.143	0.074	0.021	0.661	0.086	0.190	-0.050	0.487
TG (mmol/L)	-0.048	0.278	-0.061	0.252	-0.029	0.721	0.031	0.517	0.089	0.177	-0.032	0.660
ApoA (g/L)	-0.008	0.866	-0.027	0.612	-0.003	0.974	-0.012	0.806	0.102	0.128	-0.121	0.100
ApoB (g/L)	-0.040	0.376	-0.075	0.165	0.011	0.889	-0.038	0.444	0.081	0.226	-0.160	0.028
ApoE (mg/dL)	0.022	0.644	-0.038	0.505	0.088	0.304	0.013	0.801	0.093	0.181	-0.066	0.377
Lp(a) (g/L)	0.045	0.335	0.024	0.667	0.048	0.568	0.108	0.031	0.095	0.164	0.126	0.088
CRP (ng/dL)	0.051	0.294	0.102	0.081	-0.052	0.560	0.009	0.866	-0.044	0.536	0.074	0.351
Albumin (g/L)	-0.010	0.829	-0.057	0.307	0.086	0.298	-0.026	0.601	0.103	0.122	-0.151	0.036
Globulin (g/L)	0.006	0.904	-0.008	0.879	0.009	0.908	-0.063	0.199	-0.033	0.622	-0.093	0.195
ALT (U/L)	-0.068	0.146	-0.099	0.077	0.014	0.869	-0.063	0.206	0.006	0.935	-0.163	0.024
AST (U/L)	-0.044	0.344	-0.040	0.477	-0.046	0.582	-0.052	0.293	-0.043	0.527	-0.075	0.305
ALP (U/L)	-0.006	0.897	0.011	0.853	-0.082	0.358	-0.030	0.564	-0.023	0.751	-0.043	0.578
γ -GT (U/L)	-0.056	0.254	-0.045	0.438	-0.040	0.653	0.036	0.496	0.052	0.465	0.020	0.798

注: 有统计学意义的结果($P<0.05$)用黑体表示。

Note: Statistically significant results ($P<0.05$) are in bold.

表 7 年龄 63 岁以上受试者 APP 甲基化与临床特征的相关性分析

Table 7 Correlation analysis between APP methylation and clinical characteristics of subjects above 63 years old

Variables	CHD						Non-CHD					
	Total		Male		Female		Total		Male		Female	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
Stenosis (Gensini)	0.016	0.782	0.064	0.376	-0.089	0.396	0.007	0.928	0.096	0.382	-0.077	0.484
Age (years)	-0.036	0.545	0.091	0.207	-0.115	0.271	-0.044	0.571	-0.114	0.300	0.069	0.530
LDL (mmol/L)	0.039	0.519	-0.009	0.902	0.033	0.759	0.089	0.258	0.023	0.839	0.112	0.321
TC (mmol/L)	0.055	0.366	-0.002	0.981	0.054	0.609	0.067	0.396	0.113	0.314	0.018	0.873
HDL (mmol/L)	0.160	0.008	0.011	0.885	0.261	0.012	-0.043	0.583	0.080	0.478	0.199	0.073
TG (mmol/L)	-0.065	0.281	-0.051	0.497	-0.052	0.628	0.083	0.296	0.114	0.310	0.072	0.524
ApoA (g/L)	0.020	0.746	0.001	0.989	0.019	0.863	0.076	0.346	0.094	0.416	-0.159	0.161
ApoB (g/L)	-0.038	0.534	0.043	0.574	-0.082	0.449	0.180	0.025	0.158	0.169	0.187	0.099
ApoE (mg/dL)	-0.035	0.592	-0.052	0.523	-0.023	0.838	0.010	0.906	0.080	0.506	0.014	0.904
Lp(a) (g/L)	-0.004	0.946	-0.032	0.688	0.034	0.766	0.105	0.200	0.065	0.582	0.145	0.208
CRP (ng/dL)	0.020	0.771	0.072	0.400	-0.085	0.493	0.101	0.262	-0.063	0.625	0.233	0.068
Albumin (g/L)	-0.010	0.875	0.023	0.768	-0.044	0.692	0.110	0.166	0.122	0.286	0.108	0.338
Globulin (g/L)	-0.066	0.294	-0.030	0.701	-0.159	0.145	0.050	0.529	0.074	0.518	0.012	0.913
ALT (U/L)	-0.097	0.129	-0.133	0.091	-0.064	0.564	-0.073	0.361	0.054	0.641	-0.127	0.264
AST (U/L)	-0.047	0.462	-0.027	0.731	-0.100	0.365	-0.040	0.616	0.049	0.672	-0.063	0.582
ALP (U/L)	-0.095	0.168	0.022	0.793	-0.250	0.040	0.223	0.009	0.098	0.430	0.242	0.047
γ -GT (U/L)	-0.033	0.632	-0.028	0.739	-0.070	0.572	-0.055	0.527	0.047	0.703	-0.014	0.909

注: 有统计学意义的结果($P<0.05$)用黑体表示。

Note: Statistically significant results ($P<0.05$) are in bold.

表 8 年龄 63 岁以下受试者 APP 甲基化与临床特征的相关性分析

Table 8 Correlation analysis between APP methylation and clinical characteristics of subjects under 63 years old

Variables	CHD						Non-CHD					
	Total		Male		Female		Total		Male		Female	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
Stenosis (Gensini)	-0.157	0.013	-0.111	0.135	-0.241	0.050	0.002	0.967	0.020	0.796	-0.031	0.738
Age (years)	0.085	0.180	0.145	0.049	-0.085	0.495	-0.124	0.038	-0.143	0.068	-0.020	0.827
LDL (mmol/L)	0.051	0.428	0.075	0.321	-0.044	0.723	-0.070	0.259	0.007	0.936	-0.122	0.192
TC (mmol/L)	0.050	0.436	0.071	0.348	-0.020	0.871	-0.071	0.252	0.025	0.758	-0.135	0.152
HDL (mmol/L)	0.066	0.306	0.005	0.948	0.122	0.328	0.063	0.310	0.151	0.066	0.053	0.576
TG (mmol/L)	-0.014	0.827	-0.021	0.788	0.053	0.675	-0.003	0.964	0.051	0.533	-0.102	0.280
ApoA (g/L)	-0.040	0.544	-0.047	0.547	0.013	0.920	0.007	0.905	-0.024	0.772	-0.171	0.078
ApoB (g/L)	0.002	0.972	0.017	0.832	-0.086	0.501	-0.109	0.082	-0.039	0.637	-0.155	0.110
ApoE (mg/dL)	0.102	0.141	0.010	0.902	0.179	0.176	0.012	0.853	0.013	0.879	-0.001	0.993
Lp(a) (g/L)	0.090	0.188	0.059	0.465	0.077	0.551	0.127	0.046	0.144	0.089	0.104	0.289
CRP (ng/dL)	0.043	0.539	0.120	0.150	-0.107	0.428	-0.021	0.753	-0.060	0.502	0.013	0.900
Albumin (g/L)	-0.030	0.650	-0.021	0.796	-0.133	0.291	-0.134	0.030	-0.014	0.867	-0.197	0.036
Globulin (g/L)	-0.033	0.625	-0.021	0.793	-0.100	0.428	0.038	0.537	-0.051	0.538	0.067	0.479
ALT (U/L)	-0.019	0.779	-0.019	0.813	0.106	0.416	-0.055	0.383	-0.031	0.717	-0.177	0.062
AST (U/L)	-0.042	0.537	-0.052	0.520	0.041	0.752	-0.056	0.385	-0.083	0.333	-0.090	0.351
ALP (U/L)	-0.132	0.056	-0.118	0.147	-0.257	0.047	-0.029	0.658	-0.061	0.042	-0.033	0.742
γ -GT (U/L)	-0.067	0.331	-0.040	0.621	0.044	0.739	0.094	0.154	0.485	0.636	0.051	0.615

注: 有统计学意义的结果($P<0.05$)用黑体表示。

Note: Statistically significant results ($P<0.05$) are in bold.

均能增加患 CHD 的风险。Abbott 等^[13]对 18 456 名年龄在 45~93 岁的样本进行了 6 年的随访, 结果发现 677 名发生 CHD, 并且随着年龄的增长, 危险因素(如高血压等)对 CHD 发病的影响增加。在本研究中, 我们发现 CHD 组的年龄均高于对照组, 且在男性 CHD 患者中, APP 甲基化水平与年

龄呈正相关。年龄分层分析后发现, 在年龄 ≥ 63 岁的男性 CHD 伴高血压患者中, APP 甲基化水平与狭窄程度呈正比。已有的研究表明, 在血小板活化后, sAPP 由 α -颗粒分泌并抑制凝血因子, 从而防止脑、冠状动脉和外周动脉中的血栓形成^[14]。APP 能在血小板中表达, 且是凝血酶的抑制剂,

DNA 甲基化很可能通过调控 APP 基因的表达水平,从而影响血小板的活性,进而对 CHD 的发生发展过程产生影响。

性别也是 CHD 患病风险的影响因素之一。近 30 年来,我国 CHD 发病率、死亡率呈上升趋势,且在不同的性别中呈现不同的发病率和死亡率,男性的患病率和死亡率明显高于女性^[15]。Fukumoto 等^[12]在日本人群中的研究亦表明,男性患 CHD 的风险高于女性。另外,李威等^[16]发现 2010–2014 年间,天津市报告的居民急性冠心病事件中,男性平均粗发病率多于女性,且男性平均发病年龄早于女性。本研究的结果表明,CHD 组的男性人数高于对照组,且在总体样本及男性样本中,均发现 APP 基因甲基化水平在 CHD 组显著高于对照组。此外,在男性 CHD 患者中,APP 甲基化水平与年龄呈正相关。两性的 CHD 患病风险因素及临床特征存在差异,很可能是 DNA 和组蛋白修饰的差异、X 和 Y 染色体携带基因的不同、性激素等共同作用的结果^[17]。由此,根据我们的结果推测,APP 基因启动子甲基化水平存在性别差异是以上因素共同调节所导致的。

王广娟等^[18]在山东人群中发现,冠心病组吸烟率及同型半胱氨酸血症(homocysteine, Hcy)均高于对照组,吸烟者患冠心病的风险是不吸烟者的 4.832 倍,高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)者患冠心病的风险是正常 Hcy 者的 1.019 倍,有 HHcy 且吸烟者患冠心病的风险是无 HHcy 且不吸烟者的 2.473 倍。HHcy 正是高血压的一个独立风险因素^[19],且能够刺激血管平滑肌细胞增殖,增强凝血功能和诱导血栓形成,促进炎症因子表达^[20]。我们的研究发现 CHD 组的吸烟人数高于对照组,而且在总体 CHD 伴高血压患者及男性 CHD 伴高血压患者中,APP 甲基化水平和狭窄程度呈正比。我们猜测,APP 基因甲基化水平或许通过吸烟及 HHcy 水平的调节,对 CHD 的发病机制产生作用。

Booth 等^[21]在加拿大人群中发现,糖尿病患者较非糖尿病患者提前 15 年进入心血管疾病高风险状态。CHD 合并糖尿病患者具有更高的斑块负荷、动脉粥样硬化体积和相对狭窄的冠脉血管直径^[22]。和他们的研究结果一致,我们亦发现 CHD 组的糖尿病患者人数高于对照组。

本研究是通过 qMSP 技术来检测 APP 基因甲基化水平与 CHD 的相关性,从而探究 CHD 的

发生与发展机制。qMSP 技术是一种具有高度特异性、敏感性和重现性的方法,基因启动子的甲基化水平可以以百分比的形式实现,从而更精确、更容易解释高甲基化状态的识别^[23]。结合高度精确的设置,qMSP 技术适用于检测完全甲基化和未甲基化 DNA 的部分,可显示正确的甲基化和非甲基化 DNA 的比例^[23]。同时,基于 SYBR-green 的 PCR 技术检测高甲基化基因表达的能力已被确定为诊断良性前列腺增生早期非侵袭性癌变的一个有价值的工具^[24]。另外,目前关于 APP 基因启动子甲基化和 CHD 的研究国内外都很少,因此本研究具有一定的新颖性和创新性,填补了 APP 基因启动子甲基化与 CHD 关系的空白。此外,本研究收集了大量的样本,对其作用机制进行研究,在统计学上具有很好的可靠性,所得结果具有一定的指导价值。但也存在以下不足:病例组与对照组之间的年龄、性别等存在一定的差别,且未进行蛋白质表达水平的研究等。

综上所述,APP 基因甲基化水平和年龄呈正相关。随着年龄的增长,APP 基因的表达下降,从而导致血小板功能增强,进一步加重 CHD 的病程。此外,男性吸烟很可能是导致男性 CHD 患病年龄早于女性的原因。同以往的研究结果^[25]一致,糖尿病和高血压都是 CHD 重要的风险因素。总的来讲,应及时开展干预措施,降低吸烟率,加大 CHD 预防措施的宣传,以减少该疾病的发生率。

参考文献(References):

- [1] GLOBAL HEALTH ESTIMATES. Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000–2012[M]. Geneva: World Health Organization, 2014.
- [2] 夏燕美,姬国华.早发冠心病的临床危险因素分析与护理对策[J].中华全科医学(XIA Yan-mei, JI Guo-hua. Clinical risk factor analysis and nursing strategy of premature coronary artery disease[J]. Chinese Journal of General Practice), 2017, 15(1): 173–175.
- [3] UDALI S, GUARINI P, MORUZZI S, et al. Cardiovascular epigenetics: from DNA methylation to microRNAs[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2013, 34(4): 883–901.
- [4] DUAN L, LIU Y, WANG J, et al. The dynamic changes of DNA methylation in primordial germ cell differentiation[J]. Gene, 2016, 591(2): 305–312.
- [5] IWATA A, NAGATA K, HATSUTA H, et al. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation[J]. Human Molecular Genetics, 2014, 23(3): 648–656.

- [6] NICOLAS G, WALLON D, GOUPIL C, et al. Mutation in the 3' untranslated region of APP as a genetic determinant of cerebral amyloid angiopathy[J]. European Journal of Human Genetics, 2016, 24(1): 92–98.
- [7] TIBOLLA G, NORATA G D, MEDA C, et al. Increased atherosclerosis and vascular inflammation in APP transgenic mice with apolipoprotein E deficiency[J]. Atherosclerosis, 2010, 210(1): 78–87.
- [8] VAN DE PARRE T J, GUNS P J, FRANSEN P, et al. Attenuated atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice lacking amyloid precursor protein[J]. Atherosclerosis, 2011, 216(1): 54–58.
- [9] KRISTENSEN L S, MIKESKA T, KRYPUY M, et al. Sensitive Melting Analysis after Real Time -Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(7): e42
- [10] MACKENZIE G, GREIG M, HAY I, et al. Competing risk analysis of factors related to long-term incidence of CHD[J]. Journal of Epidemiology and Community Health, 2017, 71(1): 33–36.
- [11] TEODORIDIS J M, STRATHDEE G, BROWN R. Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker[J]. Drug Resistance Updates, 2004, 7(4–5): 267–278.
- [12] FUKUMOTO R, KAWAI M, MINAI K, et al. Conflicting relationship between age-dependent disorders, valvular heart disease and coronary artery disease by covariance structure analysis: possible contribution of natriuretic peptide[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181206.
- [13] ABBOTT R D, CURB J D, RODRIGUEZ B L, et al. Age-related changes in risk factor effects on the incidence of coronary heart disease[J]. Annals of Epidemiology, 2002, 12(3): 173–181.
- [14] D'USCIO L V, HE T, KATUSIC Z S. Expression and processing of amyloid precursor protein in vascular endothelium[J]. Physiology, 2017, 32(1): 20–32.
- [15] 王薇, 齐玥. 中国女性心血管病流行趋势[J]. 中国实用内科杂志(WANG Wei, QI Yue. Prevalence trend of cardiovascular diseases in Chinese women[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine), 2014, 34(1): 6–9.
- [16] 李威, 王德征, 张颖, 等. 天津市 2010–2014 年急性冠心病发病者吸烟情况分析[J]. 实用预防医学(LI Wei, WANG De-zheng, ZHANG Ying, et al. Smoking status of patients with acute coronary heart disease in Tianjin, 2010–2014[J]. Practical Preventive Medicine), 2018, 25(2): 202–205.
- [17] REGITZ-ZAGROSEK V. Sex and gender specific aspects—from cells to cardiovascular disease[M]//LEGATO M J. Principles of Gender-Specific Medicine—Gender in the Genomic Era (The Third Edition). Elsevier: Academic Press, 2017: 341–362.
- [18] 王广娟, 赵颖馨, 张慧, 等. 吸烟及高同型半胱氨酸血症对冠心病的交互作用[J]. 实用医学杂志(WANG Guang-juan, ZHAO Ying-xin, ZHANG Hui, et al. Synergistic effect between smoking and hyperhomocysteinemia on incidence of coronary heart disease[J]. The Journal of Practical Medicine), 2018, 34(3): 468–471.
- [19] 庄微, 蔡晓敏, 张启高. 高同型半胱氨酸血症与心血管疾病相关性研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志(ZHUANG Wei, CAI Xiao-min, ZHANG Qi-gao. Advances in research on the relationship between hyperhomocysteinemia and cardiovascular diseases[J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy), 2014, 28(5): 433–435.
- [20] 邵明学, 朱建成, 蔡娟, 等. 同型半胱氨酸与冠心病[J]. 现代生物医学进展(SHAO Ming-xue, ZHU Jian-cheng, CAI Juan, et al. Homocysteine and coronary heart disease[J]. Progress in Modern Biomedicine), 2013, 13(15): 2983–2985.
- [21] BOOTH G L, KAPRAL M K, FUNG K, et al. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study[J]. The Lancet, 2006, 368(9529): 29–36.
- [22] LOW WANG C C, HESS C N, HIATT W R, et al. Clinical update: cardiovascular disease in diabetes mellitus: atherosclerotic cardiovascular disease and heart failure in type 2 diabetes mellitus—mechanisms, management, and clinical considerations[J]. Circulation, 2016, 133(24): 2459–2502.
- [23] HATTERMANN K, MEHDORN H M, MENTLEIN R, et al. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O^6 -methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis[J]. Analytical Biochemistry, 2008, 377(1): 62–71.
- [24] BASTIAN P J, ELLINGER J, WELLMANN A, et al. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci[J]. Clinical Cancer Research, 2005, 11(11): 4097–4106.
- [25] 唐军卫, 黄玉晓, 张鑫, 等. 冠心病病人危险因素年龄组分布及聚集状况[J]. 青岛大学医学院学报(TANG Jun-wei, HUANG Yu-xiao, ZHANG Xin, et al. Distribution and aggregation of risk factors of coronary heart disease in patients of different age groups [J]. Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis), 2015, 51(3): 325–328.