DNA甲基化在长期空气污染暴露与心血管疾病高危人群血脂水平关系中的中介效应

庞慧芳[1,2]，陈伯望[1,2]，吴超群[1,2]，侯丽波[1,2]，王思铭[1,2]，王艳萍[1,2]，高岩[1,2]

1. 国家心血管病中心，北京 102300
2. 中国医学科学院阜外医院国家心血管疾病临床医学研究中心，北京 102300

摘要：

[背景] 长期的空气污染暴露会影响人类血脂的正常水平，然而这其中确切的分子生物学机制目前尚不清楚。

[目的] 探讨DNA甲基化在各项空气污染物（$PM_{2.5}$、PM_{10}、NO_2、SO_2、CO和O_3）平均暴露1年与心血管疾病高危人群的血脂水平关系中是否具有中介效应。

[方法] 本研究样本来源于冠心病医疗结果评价和临床转化研究-百万人群项目，共选择了176例研究对象样本，这些研究对象来自中国大陆15个省的61个城市。首先对样本人群血样中的总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）和低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）等各项血脂指标以及其他生化指标进行检测，同时利用各项污染物1年平均暴露水平的数据以及前期研究已获得的全基因组甲基化芯片（EPIC 850K）数据，通过因果推理检验（CIT）方法识别在空气污染物暴露与血脂水平之间具有中介效应的甲基化位点。

[结果] 在调整年龄、性别、体重指数（BMI）、目前吸烟情况、饮酒情况、高血压和糖尿病因素后，仅NO_2污染物暴露（以每增加10 μg·m^{-3}为1个单位）与TC、LDL-C、非高密度脂蛋白胆固醇（nHDL-C）的水平升高具有相关性［估计值（b）=0.259，标准误（S_b）=0.084，P=0.002；b=0.173，S_b=0.059，P=0.004；b=0.227，S_b=0.082，P=0.006），其他空气污染物（SO_2、PM_{10}、$PM_{2.5}$、O_3、CO）与血脂水平都不具有相关性（P>0.05）。CIT分析结果显示，在NO_2暴露相关的5 615个甲基化位点（P<0.01）中，分别有2个甲基化位点（无注释基因）、16个甲基化位点（11个有注释基因）和32个（23个有注释基因）甲基化位点介导了NO_2暴露增加与TC、LDL-C及nHDL-C水平升高的相关性（$P1$<0.05，$P2$<0.05，$P3$<0.05，$P4$>0.05）。

[结论] NO_2长期暴露引起的特定位点DNA甲基化可能与TC、LDL-C和nHDL-C水平升高有相关性。

关键词：DNA甲基化；空气污染；血脂；总胆固醇；甘油三酯；高密度脂蛋白胆固醇；低密度脂蛋白胆固醇；中介效应

Mediation effect of DNA methylation on relationship between long-term air pollution exposure and blood lipid level in population at high risk for cardiovascular disease

PANG Huifang[1,2], CHEN Bowang[1,2], WU Chaoqun[1,2], HOU Libo[1,2], WANG Siming[1,2], WANG Yanping[1,2], GAO Yan[1,2]
(1.National Center for Cardiovascular Diseases, Beijing 102300, China; 2.National Clinical Center of Cardiovascular Diseases, Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 102300, China)

Abstract:

[Background] Long-term exposure to air pollution affects blood lipids, but the exact molecular biological mechanism is not yet clear.

[Objective] This study explores a potential mediation effect of DNA methylation on the relationship between one-year average exposure to air pollutants ($PM_{2.5}$, PM_{10}, NO_2, SO_2, CO, and O_3) and blood lipid levels in population at high risk for cardiovascular disease.

[Methods] A total of 176 cases were selected from the China Patient-Centered Evaluative Assessment of Cardiac Events Million Persons Project across 61 cities in 15 provinces of China's mainland. The blood levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and other biochemical indicators

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20397

基金项目
中国医学科学院重大协同创新项目（2017-I2M-2-002）；国际科技创新合作重点专项（2016YFE0103800）

作者简介
庞慧芳（1989—），女，硕士；
E-mail：huifang.pang@fwoxford.org

通信作者
高岩，E-mail：yan.gao@fwoxford.org

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2020-08-16
录用日期 2020-11-24

文章编号 2095-9982(2021)01-0010-07
中图分类号 R12
文献标志码 A

▸引用
庞慧芳，陈伯望，吴超群，等. DNA甲基化在长期空气污染暴露与心血管疾病高危人群血脂水平关系中的中介效应［J］. 环境与职业医学，2021，38（1）：10-16.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20397

Funding
This study was funded.

Correspondence to
GAO Yan, E-mail: yan.gao@fwoxford.org

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2020-08-16
Accepted 2020-11-24

▸To cite
PANG Huifang, CHEN Bowang, WU Chaoqun, et al. Mediation effect of DNA methylation on relationship between long-term air pollution exposure and blood lipid level in population at high risk for cardiovascular disease[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(1): 10-16.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20397

were measured. Meanwhile, based on the data of one-year average exposure to air pollutants and of genome-wide methylation chips (EPIC 850 k) obtained from previous projects, causal inference test (CIT) method was employed to identify DNA methylation sites that exhibit a mediation effect on the relationship between air pollutant exposure and lipid levels.

[Results] Only NO_2 exposure (per 10 μg·m^{-3} increase) was associated with elevated levels of TC (b=0.259, S_b=0.084, P=0.002), LDL-C (b=0.173, S_b=0.059, P=0.004), and non-HDL-C (nHDL-C) (b=0.227, S_b=0.082, P=0.006) after adjustment for age, gender, body mass index (BMI), current smoking, drinking, hypertension, and diabetes, while other air pollutants (SO_2, PM_{10}, $PM_{2.5}$, O_3, and CO) were not (P>0.05). The CIT analysis results showed that there were 2 methylation sites (without annotation genes), 16 methylation sites (11 sites with annotation genes), and 32 methylation sites (23 sites with annotation genes) mediating the association between increased NO_2 pollutant exposure and elevated levels of TC, LDL-C, and nHDL-C ($P1$<0.05, $P2$<0.05, $P3$<0.05, $P4$>0.05) among the included 5 615 methylation loci related with NO_2 exposure (P<0.01), respectively.

[Conclusion] DNA methylation at specific sites caused by long-term NO_2 exposure is correlated with elevated levels of TC, LDL-C, and nHDL-C.

Keywords: DNA methylation; air pollution; blood lipid; total cholesterol; triglyceride; high-density lipoprotein cholesterol; low-density lipoprotein cholesterol; mediation effect

空气污染已成为全球一个主要公共卫生问题。空气污染的成分包括但不限于颗粒物、臭氧（ozone，O_3）、二氧化硫（sulfur dioxide，SO_2）、氮氧化物、一氧化碳（carbon monoxide，CO）、苯、炭黑、多环芳烃和有毒金属。暴露于空气污染对人类健康包括心血管系统[1]、呼吸系统[2]和脑血管系统[3]的不良影响已得到充分证明。

血脂异常表现为总胆固醇（total cholesterol，TC）、甘油三酯（triglyceride，TG）和低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoproteincholesterol，LDL-C）水平升高以及高密度脂蛋白胆固醇（high-density lipoproteincholesterol，HDL-C）水平降低，已成为一个公认的心血管疾病危险因素[4]。大量研究证明，血脂水平与总死亡率、心血管疾病死亡率呈正相关[5]。之前也有一些研究已经报道了空气污染物暴露和血脂水平之间的关系[6-9]，而且自主功能障碍[10]、炎症[11]、氧化应激[12]、凝血[13]和内皮功能障碍[14]被认为是目前空气污染对心血管产生不良影响的潜在生物学机制。然而，空气污染暴露与血脂水平关系间确切的分子生物学机制目前尚不清楚。

近年来，表观遗传学被认为是环境暴露和疾病发展之间的一个桥梁，可能介导环境与基因之间的相互作用[15]。DNA 甲基化作为表观遗传学修饰的一个重要类型，通过一个甲基共价结合在胞嘧啶-腺嘌呤二核苷酸（5'-C-phosphate-G-3'，CpG）的胞嘧啶 C5 上，调控基因转录活性，最终改变生物学功能。许多研究使用全基因组甲基化分析方法，已揭示了长期或短期环境空气污染会导致不同 DNA 位点的甲基化[16-19]。同时，DNA 甲基化与血脂特性之间的相关关系也已经被证实[20-22]。然而，DNA 甲基化是否介导了空气污染暴露与血脂水平之间的关系，目前还没有相关的报道。本研究以心血管疾病高危人群为研究对象，通过因果推理检验（causal inference test，CIT）的方法，探讨各项空气污染暴露对血脂［TC、TG、LDL-C、HDL-C 和非高密度脂蛋白胆固醇（nHDL-C）］影响的表观遗传学生物机制。

1 对象与方法

1.1 研究人群

该研究样本来源于“冠心病医疗结果评价和临床转化研究-百万人群项目（China Patient-Centered Evaluative Assessment of Cardiac Events Million Persons Project，China PEACE Million Persons Project）[23]。此项目所有高危患者在基线均进行了心电图检测，心脏及颈动脉超声检查，血液和尿液分析以及生活方式和病史的问卷调查。该项目通过了国家心血管病中心伦理委员会的批准（2018-1022）。所有参与者在参与项目前均签署了知情同意书。本研究选择在 2016 年 1 月—2017 年 5 月期间入选的高危心血管疾病患者样本，且所有患者均进行了两年的随访。

本研究基于以下入选标准在上述人群中筛选受试者：①有完整的基线期数据，主要包括血脂指标和一些用于调整分析模型的协变量；②在居住地点 10 km 范围内有空气质量监测站，记录了从患者采集血样至之前 1 年内的完整环境空气污染数据；③有全基因组甲基化芯片检测数据。

本研究共筛选出 176 例研究对象符合以上入选标准。研究对象来自 15 个省（自治区）的 61 个城市，包括广西壮族自治区、贵州省、河南省、湖北省、吉林省、江苏省、江西省、辽宁省、内蒙古自治区、山东省、陕西省、四川省、西藏自治区、云南省和浙江省。

1.2 空气污染暴露评估

本研究采用政府气象部门在研究对象居住的县级区域每日发布的细颗粒物（fine particulate matter with median aerodynamic diameter ≤ 2.5 μm，$PM_{2.5}$）、可吸入颗粒物（particulate matter with median aerodynamic diameter ≤ 10 μm，PM_{10}）、二氧化氮（nitrogen dioxide，NO_2）、SO_2、CO 及 O_3 数据评价空气污染暴露。每个空气污染监测站距研究对象居住地址在 10 km 范围以内，每位研究对象从采血日至之前 1 年的每日空气污染数据的平均值被定义为每个研究对象年均各项污染指数暴露水平。

1.3 生化指标检测和变量定义

所有样本生化指标在国家心血管病中心实验室检测。采用 AU680 分析仪（Beckman Coulter，美国）测定血脂（TC、LDL-C、HDL-C 和 TG）和高敏 C 反应蛋白的水平。心血管疾病高危患者的定义已在以前的文章中报道[23]。本研究高血压定义为收缩压 ≥ 140 mmHg，或舒张压 ≥ 90 mmHg，或服用抗血压药物。血脂异常定义为 TC 浓度 ≥ 6.2 $mmol·L^{-1}$，或 LDL-C 浓度 ≥ 4.1 $mmol·L^{-1}$，或服用降脂药物。糖尿病定义为禁食至少 8 h 的血糖水平高于 7 $mmol·L^{-1}$，或随机血糖高于 11.1 $mmol·L^{-1}$，或服用任何降糖药物。吸烟指数定义为每日吸烟数量乘以吸烟年限。年平均温、湿度是指由距离 China PEACE Million Persons Project 项目点最近的空气监测站发布的自采血日期至采血前 1 年的每日温度及湿度的平均值。

1.4 全基因组 DNA 甲基化评估

采用 Chemagic 360 全自动 DNA 提取仪（PerkinElmer，美国）及 Chemagic DNA Buffy Coat 200 试剂盒（PerkinElmer，美国）提取人基因组 DNA。使用 DropSense 96 分光光度计（Caliper，美国）对提取的基因组 DNA 进行定量及质检。采用 Infinium™ Human Methylation EPIC（850 K）芯片（Illumina，美国）检测基因组 DNA 的甲基化状态。甲基化检测首先使用 EZ DNA 甲基化试剂盒（zymo Research，美国）对 DNA 样本（500 ng）进行重亚硫酸化处理，具体步骤遵循 Infinium HD 甲基化检测说明书。最初的质量控制使用 R 中的 CHAMP 包，以下位点的探针将被过滤掉：①检测 $P > 0.01$；②在至少 5% 的样品中探针数 < 3 个；③ non-CpGs 位点探针；④ Multi-hit 探针。最终共有 814 318 个位点通过了质控标准。每个位点的甲基化水平通过 β 值来反映，并采用 BMIQ（beta mixture quantile dilation）方法进行数据的归一化处理。

1.5 统计学分析

连续变量以中位数（第 25，75 百四分位数）[M（P_{25}，P_{75}）] 及均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）分别表示，分类变量以频数（构成比）表示。

在进行表观基因组关联分析之前，先对 176 例样本的甲基化数据进行主成分分析，并将前 4 个方差比例 >1% 的主成分作为协变量纳入模型进行调整。同时，我们选取表观基因组关联研究中与 NO_2 暴露相关的 5 615 个 DNA 甲基化位点（$P < 0.01$），用于本研究的相关性分析。

本研究采用 CIT 分析方法[24] 来评估 DNA 甲基化在空气污染暴露与血脂水平之间的中介效应。CIT 分析包括 4 个线性回归模型，当前 3 个模型满足 $P < 0.05$，并且第 4 个模型满足 $P > 0.05$ 时，则表明存在中介效应。具体 4 个模型如下：模型 1 评估空气污染物暴露（$PM_{2.5}$、PM_{10}、NO_2、SO_2、CO 和 O_3）分别与 TC、TG、LDL-C、HDL-C、nHDL-C 水平之间的相关性。 此模型调整了年龄、性别、体重指数（body mass index，BMI）、目前吸烟情况、饮酒情况、高血压和糖尿病（以下简称通用协变量）。模型 2 评估空气污染物暴露与全基因组 DNA 甲基化水平的相关性。此模型除了调整通用协变量，还调整了相应的血脂指标、细胞组分（CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞）、4 个主成分及年平均温度和湿度。模型 3 评估 DNA 甲基化与各项血脂指标（TC、TG、LDL-C、HDL-C 和 nHDL-C）的相关性。此模型除了调整通用协变量，还调整了空气污染物暴露、细胞组分和 4 个主成分。模型 4 在调整通用协变量及相应位点 DNA 甲基化水平后，评估空气污染物暴露与各项血脂指标是否不具有相关性。在 CIT 分析的前 3 个模型中，$P < 0.05$ 被认为关联具有统计学意义；第 4 个模型使用 bootstrap 方法随机抽样，重复建模 1 000 次，统计 1 000 个 P 值的分布情况，P 值的中位数 > 0.05 被认为是不相关。CpG 位点所在基因采用 Illumina 和加州大学圣克鲁兹分校（University of California Santa Cruz，UCSC）提供的 UCSC 数据库（GRCh37/hg19）进行注释。使用的统计分析软件为 R 3.5。

2 结果

2.1 研究人群的基线期特征

表 1 显示，176 位研究对象的年龄为（61.7±8.1）岁，男性 100 例（56.8%），血脂异常患者为 31 例（17.6%）。

临床检验结果显示，受试者基线期的血脂TG、HDL-C、TC、LDL-C、nHDL-C平均水平分别为（1.5±0.9）、（0.9±0.3）、（4.6±1.3）、（2.7±0.9）、（3.6±1.2）mmol·L^{-1}。空气污染物NO_2、SO_2、PM_{10}、$PM_{2.5}$、O_3、CO的年均暴露质量浓度（后称浓度）分别为（33.2±12.8）、（24.2±10.9）、（98.1±38.9）、（55.4±20.1）、（91.1±14.4）、（1.0±0.3）μg·m^{-3}。

表1 研究人群的基线期特征（n=176）

Table 1 Baseline characteristics of study population (n=176)

基线特征 Baseline characteristics	$\bar{x}\pm s$或频数（%） $\bar{x}\pm s$ or frequency（%）	M（P_{25}，P_{75}）
年龄/岁（Age/years）	61.7±8.1	62（58，68）
男性（Male）	100（56.8）	—
汉族（Han ethnic group）	164（93.2）	—
目前吸烟者（Current smoker）	56（31.8）	—
吸烟指数（Smoking index）	653.7±350.1	640（380，920）
饮酒者（Drinker）	25（14.2）	—
BMI/（kg·m^{-2}）	25.7±3.8	25.6（23.1，27.8）
诊断指标（Diagnosis index）		
高血压（Hypertension）	162（92.0）	—
糖尿病（Diabetes）	70（39.8）	—
血脂异常（Dyslipidemia）	31（17.6）	—
临床检验（Clinical examination）		
收缩压/mmHg（Systolic pressure/mmHg）	163.9±21.3	165（152，177.3）
舒张压/mmHg（Diastolic pressure/mmHg）	94.0±12.7	95（85，103）
糖化血红蛋白比例/%（HbA1c/%）	5.3±1.1	4.9（4.7，5.3）
高敏C反应蛋白浓度/（mg·L^{-1}） High sensitivity C-reactive protein concentration/（mg·L^{-1}）	1.9±1.9	1.1（0.6，2.4）
血脂浓度/（mmol·L^{-1}） Lipid concentration/（mmol·L^{-1}）		
TG	1.5±0.9	1.3（0.9，1.8）
HDL-C	0.9±0.3	0.9（0.7，1.1）
TC	4.6±1.3	4.4（3.6，5.2）
LDL-C	2.7±0.9	2.6（2.1，3.2）
nHDL-C	3.6±1.2	3.5（2.8，4.3）
空气污染物浓度/（μg·m^{-3}） Air pollutant concentration/（μg·m^{-3}）		
NO_2	33.2±12.8	30.9（23.8，43.1）
SO_2	24.2±10.9	22.3（16，30.9）
PM_{10}	98.1±38.9	85.2（67.1，131.4）
$PM_{2.5}$	55.4±20.1	53.5（39.8，71.2）
O_3	91.1±14.4	92.5（83.2，102.1）
CO	1.0±0.3	1.0（0.8，1.3）

2.2 CIT分析

2.2.1 空气污染与血脂水平的相关性 模型1在调整通用协变量后，NO_2暴露（以每增加10 μg·m^{-3}为1个单位）分别与TC、LDL-C和nHDL-C［估计值（b）=0.259，标准误（S_b）=0.084，P=0.002；b=0.173，S_b=0.059，P=0.004；b=0.227，S_b=0.082，P=0.006）］水平相关（表2）。其他空气污染物（SO_2、PM_{10}、$PM_{2.5}$、O_3、CO）与任何血脂指标水平均不具有相关性（P>0.05）。因此，后续分析仅在NO_2暴露与TC、LDL-C、nHDL-C水平之间进行。

表2 NO_2暴露与研究人群（n=176）血脂水平的相关性分析

Table 2 Correlation between NO_2 exposure and blood lipid level in study population (n=176)

血脂 Blood Lipid	$b\pm S_b$[a]	P
TC	0.259±0.084	**0.002**
TG	−0.015±0.058	0.080
LDL-C	0.173±0.059	**0.004**
HDL-C	0.034±0.021	0.111
nHDL-C	0.227±0.082	**0.006**

［注］a：$b\pm S_b$是基于每增加10 μg·m^{-3} NO_2浓度而计算得出。线性回归分析模型调整了年龄、性别、BMI、目前吸烟情况、饮酒情况、高血压、糖尿病因素。

［Note］a: $b\pm S_b$ is calculated based on per 10 μg·m^{-3} increase in NO_2 concentration. b: Linear regression model is adjusted for age, sex, BMI, current smoking, drinking, hypertension, and diabetes.

2.2.2 NO_2暴露与DNA甲基化的相关性 模型2在调整通用协变量、血脂水平（TC、LDL-C、nHDL-C）、细胞组分、4个主成分及年平均温度和湿度后，结果显示，与NO_2暴露相关的DNA甲基化位点（P<0.05）分别有5 570个（调整TC）、5 560个（调整LDL-C）、5 574个（调整nHDL-C）。

2.2.3 DNA甲基化与血脂水平的相关性 模型3在调整通用协变量、NO_2暴露、细胞组分和4个主成分后，结果显示，在模型2中与NO_2暴露相关的甲基化位点中分别有5 529个、5 506个、5 104个位点与TC、LDL-C、nHDL-C水平相关（P<0.05）。

2.2.4 NO_2暴露与血脂水平的相关性（调整甲基化水平） 在CIT分析的模型1中，NO_2与TC、LDL-C和nHDL-C水平具有相关性。在模型4中除了调整通用协变量后，还分别调整了模型3中所有显著位点的DNA甲基化水平，采用bootstrap方法随机抽样，最终在满足P值中位数>0.05的CpG位点中，介导TC水平的有2个甲基化位点（无注释基因），介导LDL-C的有16个位点（11个有注释基因），介导nHDL-C的有32个位点（23个有注释基因），相关结果见补充材料附表1（www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20397）。我们将具有注释基因的CpG位点按照模型4中P值中位数从大到小进行排列，并在表3中列出了介导LDL-C、nHDL-C水平的前10个CpG位点。

表3 DNA甲基化在NO_2暴露与LDL-C、nHDL-C水平之间的CIT分析

Table 3 CIT analysis on DNA methylation between NO_2 exposure and LDL-C and nHDL-C levels

CpGs	基因 Gene	染色体 Chromosome	模型1（Model 1）		模型2（Model 2）			模型3（Model 3）			模型4（Model 4）	
			$b\pm S_b$	*P*1	$b\pm S_b$	*P*2	FDR	$b\pm S_b$	*P*3	FDR	$b\pm S_b$	*P*4
LDL-C#												
cg26517171	*TLX3*	5	0.163±0.059	**0.007**	−0.007±0.002	**0.003**	0.013	−3.034±2.225	**0.038**	0.039	−3.492±1.87	0.063
cg23050405	*ESR1*	6	0.163±0.059	**0.007**	0.009±0.003	**0.012**	0.017	2.986±1.479	**0.047**	0.047	3.253±1.368	0.061
cg08489551	*PLEKHG5*	1	0.163±0.059	**0.007**	−0.006±0.003	**0.038**	0.039	−4.282±1.875	**0.042**	0.042	−4.51±1.755	0.055
cg17945419	*PAX2*	10	0.163±0.059	**0.007**	−0.001±0.000	**0.010**	0.016	−17.028±10.42	**0.036**	0.037	−19.516±9.702	0.055
cg24412760	*ILKAP*	2	0.163±0.059	**0.007**	−0.009±0.004	**0.016**	0.020	−2.332±1.388	**0.037**	0.038	−2.074±1.258	0.053
cg05942334	*FSCN3*	7	0.163±0.059	**0.007**	−0.006±0.002	**0.000**	0.013	−4.277±3.055	**0.047**	0.048	−3.673±2.814	0.053
cg19594852	*EXTL3*	8	0.163±0.059	**0.007**	−0.003±0.001	**0.037**	0.038	−10.631±4.276	**0.045**	0.046	−10.308±3.938	0.052
cg14186992	*ZBTB48*；*TAS1R1*	1	0.163±0.059	**0.007**	−0.003±0.001	**0.012**	0.017	−7.435±3.815	**0.043**	0.044	−7.550±3.620	0.051
cg22118112	*PRPF6*	20	0.163±0.059	**0.007**	−0.001±0.000	**0.012**	0.017	−31.770±17.170	**0.042**	0.043	−31.896±16.79	0.051
cg15709445	*SH3KBP1*	23	0.163±0.059	**0.007**	−0.006±0.002	**0.003**	0.013	−4.499±2.773	**0.045**	0.045	−2.310±1.078	0.051
nHDL-C#												
cg19318064	*MBNL3*；*RAP2C-AS1*	23	0.214±0.083	**0.011**	0.007±0.003	**0.012**	0.017	2.538±2.681	**0.045**	0.051	5.25±1.854	0.077
cg09720420	*SLITRK4*	23	0.214±0.083	**0.011**	−0.006±0.002	**0.007**	0.014	−3.222±3.01	**0.048**	0.053	−3.796±1.419	0.077
cg13549303	*RPS6KA6*	23	0.214±0.083	**0.011**	−0.008±0.003	**0.012**	0.017	−1.257±2.264	**0.036**	0.046	−2.855±1.272	0.074
cg04907664	*EFNB1*	23	0.214±0.083	**0.011**	−0.009±0.003	**0.007**	0.014	−0.349±2.102	**0.030**	0.045	−2.192±0.882	0.069
cg07222039	*PPEF1*	23	0.214±0.083	**0.011**	−0.007±0.003	**0.031**	0.033	−2.138±2.332	**0.040**	0.048	−3.47±1.651	0.067
cg16928929	*SLITRK4*	23	0.214±0.083	**0.011**	−0.006±0.002	**0.007**	0.015	1.563±3.441	**0.021**	0.045	−3.791±2.114	0.066
cg17377054	*PCSK1N*	23	0.214±0.083	**0.011**	−0.009±0.003	**0.006**	0.014	−0.452±2.12	**0.031**	0.045	−2.705±1.245	0.064
cg14462307	*C5orf45*	5	0.214±0.083	**0.011**	−0.001±0.000	**0.012**	0.017	−26.653±23.901	**0.049**	0.054	−32.176±24.203	0.063
cg18080558	*MAB21L2*；*LRBA*	4	0.214±0.083	**0.011**	−0.001±0.000	**0.007**	0.014	−10.221±16.329	**0.040**	0.048	−19.81±15.61	0.063
cg04419618	*RBMX*	23	0.214±0.083	**0.011**	−0.007±0.002	**0.005**	0.014	−0.379±3.109	**0.030**	0.045	−3.099±1.441	0.062

［注］FDR，错误发现率。$b\pm S_b$是基于每增加10 μg·m^{-3} NO_2浓度而计算得出。*P*1、*P*2、*P*3分别对应模型1、2、3中的*P*值，*P*4是模型4中bootstrap方法随机抽样1 000次得到的1 000个*P*值的中位数。#：列出与LDL-C、nHDL-C相关的前10个带有注释基因的显著位点。

［Note］FDR, false discovery rate. $b+S_b$ is calculated based on per 10 μg·m^{-3} increase in NO_2 concentration. *P*1-*P*3 correspond to the *P* value in model 1-3, respectively, and *P*4 is a median of 1 000 *P* values derived from 1 000 random samples using bootstrap method in model 4. #: The top 10 significant DNA methylated sites with annotation genes are listed according to the descending order of *P*4.

3 讨论

本研究首次探讨了中国心血管疾病高危人群基因组DNA甲基化在空气污染暴露1年与血脂水平之间的中介效应。通过CIT分析发现NO_2暴露增加与TC、LDL-C和nHDL-C水平的升高具有相关性，并且在与NO_2暴露相关的5 615个甲基化位点中，分别有2、16、32个CpG位点介导了TC、LDL-C、nHDL-C水平的改变。

关于中国一些地区的空气污染与特定人群血脂之间的相关性研究已有报道。2018年基于中国西北地区金昌前瞻性队列的研究发现，在3 912例II型糖尿病人群中，4年时间内NO_2日均暴露浓度的增加与LDL-C水平的升高、HDL-C水平的降低具有相关性，SO_2、PM_{10}暴露也分别与LDL-C、TC等血脂指标具有相关性[7]。另一则最近的研究报道称，在中国大规模农村人群队列（*n*=39 057）中，3年时间内NO_2平均暴露水平的增加分别与高胆固醇血脂症（TC浓度≥6.22 mmol·L^{-1}）、低α-脂蛋白血症（HDL-C浓度<1.04 mmol·L^{-1}）患病风险增加呈正相关，而$PM_{2.5}$暴露的增加与TC和LDL-C的升高、TG和HDL-C的降低均具有相关性[9]。但本研究未发现除NO_2外的其他空气污染物与血脂水平相关，可能的原因包括：研究样本量少；采用的空气污染暴露是基于1年时间的数据；研究对象为心血管高危人群，相较于健康人有更多的混杂因素。

CIT分析表明1年时间的NO_2暴露会通过特定位点的DNA甲基化作用影响TC、LDL-C和nHDL-C的水平。例如，高甲基化状态的cg23050405（*ESR1*基因）和去甲基化状态的cg05942334（*FSCN3*基因）位点介导了NO_2暴露与LDL-C之间的相关性。其中，雌激素受体1（*estrogen receptor 1*，*ESR1*）基因位于6号染色体上，可编码雌激素受体α蛋白质，后者已被证明参与调节血脂代谢相关蛋白的表达，例如载脂蛋白E[25]和LDL受体[26]。

研究报道称*ESR1*对调节糖异生和脂代谢途径至

关重要，降低肝脏 *ESR1* 的表达可导致糖稳态失衡和血脂异常[27]。在本次研究中，位点 cg23050405 处于高甲基化的状态，因而阻碍了注释基因 *ESR1* 的正常表达，由此可能导致了 LDL-C 水平的升高。对于 *FSCN3* 基因，其编码的束蛋白 3（Fascin-3）是保守的肌动蛋白束蛋白家族的成员之一，由 498 个氨基酸残基组成，可能与其他的束蛋白（Fascin-1、Fascin-2）一样，可以与 F- 肌动蛋白结合形成紧密稳定的肌动蛋白束，在细胞黏附和细胞迁移方面发挥重要的作用[28]。此外，人的 FSCN3 蛋白在 11—50 残基之间具有一段高度保守的区域，并且这个区域可被蛋白激酶 C 磷酸化[28]。蛋白激酶 C 通过调控蛋白激酶级联反应等作用机制参与了多种病理过程，包括血管平滑肌的生长 / 增殖、血管生成和凋亡、血管炎症和再狭窄、氧化应激、冠心病和动脉粥样硬化等[29]。已有的研究表明，蛋白激酶 C 被激活后，会引起核因子 κB（nuclear factor-κB，NF-κB）的高水平表达，从而导致下游炎症反应和脂质代谢紊乱的发生[30]。在我们的研究中，由于受 NO_2 暴露水平的影响，位点 cg05942334 呈现为低甲基化的状态，有利于其注释基因 *FSCN3* 的表达，进而激活了与血脂水平相关的信号通路和生理过程。本研究发现的具有中介效应的其他的甲基化位点，其注释基因与血脂水平相关的功能研究还没有相关的报道，需要在未来的研究中进一步验证。

本研究存在着一定的局限性：第一，研究样本量比较小，且缺少验证人群；第二，采用研究对象所在县级的空气污染物年均数据作为污染物暴露浓度，可能不能够完全反映每个研究对象所处的空气污染环境，同时没有考虑饮食情况对甲基化的影响；第三，并没有对具有中介效应的 CpG 位点与其注释基因表达之间的相关性进行深入的功能研究；第四，由于 DNA 样品不足和资金等问题，我们没有对所筛选出的 DNA 甲基化位点进行甲基化特异位点验证；第五，该研究结果仅针对中国的高危人群，对于正常人群还需要进一步研究。

综上，本研究发现，在中国心血管病高危人群中，长期 NO_2 暴露与血脂水平升高具有相关性，并且在与 NO_2 长期暴露相关的 5 615 个甲基化位点中，分别有 2、16、32 个 CpG 位点在 NO_2 暴露与 TC、LDL-C、nHDL-C 水平的相关关系中发挥了中介效应。该研究结果有必要在其他大人群中做进一步的验证。本研究为揭示空气污染导致血脂异常的表观遗传学机制提供了研究基础。

参考文献

[1] SUN Q，HONG X，WOLD L E. Cardiovascular effects of ambient particulate air pollution exposure [J]. Circulation，2010，121（25）：2755-2765.

[2] CHUNG K F，ZHANG J，ZHONG N. Outdoor air pollution and respiratory health in Asia [J]. Respirology，2011，16（7）：1023-1026.

[3] LJUNGMAN P L，MITTLEMAN M A. Ambient air pollution and stroke [J]. Stroke，2014，45（12）：3734-3741.

[4] FRANSSEN R，MONAJEMI H，STROES E S，et al. Obesity and dyslipidemia [J]. Med Clin North Am，2011，95（5）：893-902.

[5] ANDERSON K M，CASTELLI W P，LEVY D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study [J]. JAMA，1987，257（16）：2176-2180.

[6] YANG B Y，BLOOM M S，MARKEVYCH I，et al. Exposure to ambient air pollution and blood lipids in adults：the 33 communities Chinese health study [J]. Environ Int，2018，119：485-492.

[7] WANG M，ZHENG S，NIE Y，et al. Association between short-term exposure to air pollution and dyslipidemias among type 2 diabetic patients in Northwest China：a population-based study [J]. Int J Environ Res Public Health，2018，15（4）：631.

[8] MCGUINN L A，SCHNEIDER A，MCGARRAH R W，et al. Association of long-term PM2.5 exposure with traditional and novel lipid measures related to cardiovascular disease risk [J]. Environ Int，2019，122：193-200.

[9] MAO S，CHEN G，LIU F，et al. Long-term effects of ambient air pollutants to blood lipids and dyslipidemias in a Chinese rural population [J]. Environ Pollut，2020，256：113403.

[10] PARK S K，O'NEILL M S，VOKONAS P S，et al. Effects of air pollution on heart rate variability：the VA normative aging study [J]. Environ Health Perspect，2005，113（3）：304-309.

[11] POPE III C A，HANSEN M L，LONG R W，et al. Ambient particulate air pollution，heart rate variability，and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects [J]. Environ Health Perspect，2004，112（3）：339-345.

[12] CHUANG K J，CHAN C C，SU T C，et al. The effect of urban air pollution on inflammation，oxidative stress，coagulation，

and autonomic dysfunction in young adults [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176 (4): 370-376.

[13] RÜCKERL R, IBALD-MULLI A, KOENIG W, et al. Air pollution and markers of inflammation and coagulation in patients with coronary heart disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173 (4): 432-441.

[14] RAJAGOPALAN S, SUN Q, CHEN L C. Particulate pollution and endothelial function: déjà vu all over again in the air [J]. Circulation, 2005, 111 (22): 2869-2871.

[15] MARSIT C J. Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation [J]. J Exp Biol, 2015, 218 (Pt 1): 71-79.

[16] CHI G C, LIU Y, MACDONALD J W, et al. Long-term outdoor air pollution and DNA methylation in circulating monocytes: results from the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) [J]. Environ Health, 2016, 15 (1): 119.

[17] PLUSQUIN M, GUIDA F, POLIDORO S, et al. DNA methylation and exposure to ambient air pollution in two prospective cohorts [J]. Environ Int, 2017, 108: 127-136.

[18] DE F C LICHTENFELS A J, VAN DER PLAAT D A, DE JONG K, et al. Long-term air pollution exposure, genome-wide DNA methylation and lung function in the LifeLines cohort study [J]. Environ Health Perspect, 2018, 126 (2): 027004.

[19] LEE M K, XU C J, CARNES M U, et al. Genome-wide DNA methylation and long-term ambient air pollution exposure in Korean adults [J]. Clin Epigenet, 2019, 11: 37.

[20] IRVIN M R, ZHI D, JOEHANES R, et al. Epigenome-wide association study of fasting blood lipids in the genetics of lipid-lowering drugs and diet network study [J]. Circulation, 2014, 130 (7): 565-572.

[21] PFEIFFER L, WAHL S, PILLING L C, et al. DNA methylation of lipid-related genes affects blood lipid levels [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2015, 8 (2): 334-342.

[22] SAYOLS-BAIXERAS S, SUBIRANA I, LLUIS-GANELLA C, et al. Identification and validation of seven new loci showing differential DNA methylation related to serum lipid profile: an epigenome-wide approach. The REGICOR study [J]. Hum Mol Genet, 2016, 25 (20): 4556-4565.

[23] LU J, XUAN S, DOWNING N S, et al. Protocol for the China PEACE (Patient-centered Evaluative Assessment of Cardiac Events) Million Persons Project pilot [J]. BMJ Open, 2016, 6 (1): e010200.

[24] MILLSTEIN J, ZHANG B, ZHU J, et al. Disentangling molecular relationships with a causal inference test [J]. BMC Genet, 2009, 10: 23.

[25] SRIVASTAVA R A, SRIVASTAVA N, AVERNA M, et al. Estrogen up-regulates apolipoprotein E (ApoE) gene expression by increasing ApoE mRNA in the translating pool via the estrogen receptor α-mediated pathway [J]. J Biol Chem, 1997, 272 (52): 33360-33366.

[26] LI C, BRIGGS M R, AHLBORN T E, et al. Requirement of Sp1 and estrogen receptor a interaction in 17β-estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression [J]. Endocrinology, 2001, 142 (4): 1546-1553.

[27] QIU S, VAZQUEZ J T, BOULGER E, et al. Hepatic estrogen receptor α is critical for regulation of gluconeogenesis and lipid metabolism in males [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 1661.

[28] KUREISHY N, SAPOUNTZI V, PRAG S, et al. Fascins, and their roles in cell structure and function [J]. Bioessays, 2002, 24 (4): 350-361.

[29] RINGVOLD H C, KHALIL R A. Protein kinase C as regulator of vascular smooth muscle function and potential target in vascular disorders [J]. Adv Pharmacol, 2017, 78: 203-301.

[30] SHUKLA R, BANERJEE S, TRIPATHI Y B. Pueraria tuberosa extract inhibits iNOS and IL-6 through suppression of PKC-α and NF-kB pathway in diabetes-induced nephropathy [J]. J Pharm Pharmacol, 2018, 70 (8): 1102-1112.

（英文编辑：汪源；责任编辑：王晓宇）