

系统性红斑狼疮(SLE)的表观遗传学发病机制研究进展

金永堂 杨森 张学军

【摘要】 表观遗传学是研究 DNA 序列没有发生改变的情况下基因表达的遗传变化。研究表明 DNA 甲基化异常可能与系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)发病有关。DNA 调节序列的低甲基化与 B 和 T 淋巴细胞的激活与分化有关。SLE 患者血浆中低甲基化基因组 DNA 片段,可能模仿了微生物 DNA,诱导了抗 dsDNA 抗体的生物合成。HERV 序列、外源性逆转录病毒和核抗原显示出极度的同源性。外源性逆转录病毒能够识别 HERV 抗原,增加抗 DNA 抗体的产生。针对病毒抗原的免疫反应可能被扩展到其他抗原,如核抗原或 DNA 片段,从而对 SLE 患者抗 DNA 抗体的生物合成产生影响。

【关键词】 系统性红斑狼疮; 表观遗传学; DNA 甲基化

The Epigenetic Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus JIN Yong-tang^{1,2}, YANG Sen², ZHANG Xue-jun². (¹ School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032; ² Institute of Dermatology & Department of Dermatology of the First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, P. R. China)

Corresponding author: JIN Yong-tang. E-mail: jinedu@163.com

【Abstract】 Epigenetics is defined as the investigation of heritable changes in gene expression that occur without a change in DNA sequence. Several lines of evidence have indicated that abnormalities of DNA methylation may contribute to the development of SLE. It has been observed that hypomethylation of DNA regulatory sequences is involved in activation and differentiation of B and T lymphocytes. The hypomethylated genomic DNA fragments in the plasma of SLE patients may induce biosynthesis of anti-dsDNA antibodies, which play a role in the pathogenesis of SLE. The HERV sequences, exogenous retroviruses, and nuclear antigens exhibit profound homology. exogenous retroviruses are also able to recognize HERV antigens and augment production of anti-DNA antibodies.

【Key words】 Systemic lupus erythematosus; Epigenetics; DNA methylation

表观遗传学是研究 DNA 序列没有发生改变的情况下基因表达的遗传变化,这种变化涉及 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化^[1]。最新的研究表明,表观遗传学变化与几类疾病的发病机制有关,主要包括癌症、免疫缺陷病及自身免疫性疾病^{2-3]}。这是医学研究领域日益引起人们关注的热点课题。多个证据表明 DNA 甲基化异常可能与 SLE(systemic lupus erythematosus, SLE)发病有关。鉴于此,本文主要就 DNA 甲基化在 SLE 发病过程中的作用进行了综述。

1 DNA 甲基化

DNA 序列甲基化是一种 DNA 合成后的修饰作

用,是与基因转录活性相关的重要的表观遗传调节方式^[2]。基因组中 CpG 约 60%~90% 被甲基化(未甲基化的 CpG 主要聚集在基因的启动区域富含 CpG 序列)这种修饰在脊椎动物基因组中主要分布在非编码序列,是哺乳动物正常生长发育所必需的。在组织特异性基因表达、基因组印记和 X 染色体失活方面起着重要的作用^[3]。

1.1 DNA 甲基化及其作用:DNA 甲基化是在甲基化转移酶的作用下,以 S-腺苷甲硫胺酸(S-adenosyl-methionine)作为甲基(团)的供体来实现的。在这个过程中,DNA 分子上胞苷(cytosine, C)的嘧啶环第 5 号 C 被甲基化同时被转变成甲基化胞苷(^mC)^[3]。大部分^mC 位于胞苷与鸟苷二聚体核苷酸(即 CpG)上。基因组中富含 CpG 的部位被称为 CpG 岛,它含有 60%~70% 的胞苷和鸟苷二聚体核苷酸(即 CpG)^[4]。CpG 岛长约 0.5~5kb,且其大部分位于基

作者单位:230032 合肥,安徽医科大学公共卫生学院(金永堂)230022 合肥,安徽医科大学皮肤病学研究所、第一附属医院皮肤性病科(金永堂、杨森、张学军)

通讯作者:金永堂(E-mail: jinedu@163.com)

因 5' 端对应的启动区域及第 1 外显子序列^[4]。管家基因和组织特异性基因的启动区域和第 1 外显子含有非甲基化胞苷的 CpG^[4]。这些发现表明,启动区域 CpG 甲基化与 DNA 转录沉默有关,然而同一 DNA 序列没有甲基化就可能诱导这些基因的转录^[5]。

1.2 DNA 甲基化相关的调节酶:哺乳动物和人类的 DNA 甲基状态至少受到 3 类酶的调节,即起维持作用的甲基化转移酶、重新甲基化转移酶和去甲基化酶。DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 是人们认识得比较清楚的 3 种甲基化转移酶,它们负责维持基因组 DNA 重新甲基化^[6]。维持 DNA 甲基化的转移酶 DNMT1 在细胞周期的 S 期发挥作用^[7]。DNMT1 首先识别半甲基化双链 DNA(即母链甲基化,子链未甲基化),并且在有丝分裂期间完成 DNA 母子链对应位置的甲基化(两条链均甲基化),即 DNMT1 识别 DNA 母链(模板链)^mCpG 并且在复制期间使新合成的 DNA 子链(复制链)中相应的胞苷(C)甲基化。DNMT1 的转录水平与细胞活性依赖于细胞周期且在在有丝分裂期间是最高的^[7]。DNMT3A 在大部分人体组织中都能检测到。然而,除了肠、甲状腺、骨髓外, DNMT3B 在大部分组织中表达水平低,却在大部分肿瘤细胞株中显著增加^[6]。与正常个体相比, SLE 患者外周血中单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)显示了较低的转录水平和 DNMT1 酶活性^[8]。人们怀疑这些调节性 DNA 序列的表观遗传改变可能与 SLE 患者免疫系统的改变有关。

1.3 DNA 甲基化抑制因子:抑制 DNA 甲基化的因素称为 DNA 甲基化抑制因子,它能够减少 DNA 调节序列的高度甲基化,也能增加免疫系统多肽成分的表达。最有说服力的是与抗肿瘤有关的抑制基因表达的恢复^[9]。而且, DNA 甲基化抑制结果导致与免疫反应相关的编码蛋白的调节性 DNA 序列的低甲基化。这些抑制剂可用于体外诱发表型类似 SLE 的自身免疫性疾病^[8]。

脱氧胞嘧啶的几个分子异构体(或嘧啶环 5 号 C 的修饰变化)均对甲基化产生抑制作用。这些分子异构体包括 5-氮杂胞苷(5-azacytidine/azacitidine)、5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine/deccitabine)、1-D-阿糖呋喃-5-氮杂胞苷(1-D-arabinofuranosyl-5-azacytosine/fazarabine)和二氢-5-氮杂胞苷(dihydro-5-azacytidine(DHC))^[10]。磷酸化之后, 5-氮杂胞苷和 5-氮杂-2-脱氧胞苷被分别结合在 DNA 或

RNA 上,结果对复制或转录产生了干扰^[9-10]。5-氮杂胞苷和 5-氮杂-2-脱氧胞苷是普通的甲基化抑制剂,经常用在体外来诱导 DNA 的低甲基化。5-氮杂胞苷和 5-氮杂-2-脱氧胞苷共同结合到甲基化转移酶上并使其失活。结果造成新合成的 DNA 链明显低甲基化^[11]。由 5-氮杂胞苷和 5-氮杂-2-脱氧胞苷诱导的低甲基化能使沉默基因重新表达和细胞分化。除此之外,胍苯哒嗪(hydralazine)、普鲁卡因胺(procainamide/Pea)和紫外线(UV light)也是抑制 DNA 甲基化的因子^[12]。胍苯哒嗪抑制胞外信号调节激酶路径,这个路径负责 DNMT1 和 DNMT3A 转录的诱导^[13]。

2 DNA 甲基化与系统性红斑狼疮(SLE)

在动物身上和人群中进行了 DNA 甲基化与 SLE 和/或自身免疫性疾病间关系的研究,结果显示 DNA 甲基化状态在诱发 SLE 方面有重要的作用。

2.1 DNA 低甲基化与淋巴细胞的激活:人们观察到 DNA 调节序列的低甲基化与 B 和 T 淋巴细胞的激活与分化有关^[14]。Richardson 等^[15]首次研究报道了 DNA 低甲基化与免疫细胞激活有关。他们发现在没有抗原情况下,使用 II 类 MHC 分子的巨噬细胞能够激活经过 5-氮杂胞苷处理过的 CD4⁺ T 淋巴细胞。

淋巴细胞功能相关抗原 1(CLA-1;CD11a/CD18)是一黏合分子,与 T 细胞的激活有关。用 CD18 的 cDNA 稳定转染的 T 细胞株出现自身反应。结果显示自身反应性可能是由于 CLA-1 黏合分子表达的增加^[16]。用普鲁卡因胺和 5-氮杂胞苷处理 Th2 细胞株 D10.G4.1,结果造成 CLA-1 启动子低甲基化并使这个黏合分子表达增加 10 倍^[17]。用普鲁卡因胺和 5-氮杂胞苷诱导细胞表面高密度的 CLA-1,产生了 Th2 淋巴细胞自身反应性细胞毒性^[15]。这些淋巴细胞能够引起自身巨噬细胞的溶解/分解,但是,自身 B 淋巴细胞不溶解^[15]。对 B 淋巴细胞缺乏直接细胞毒性,可能是由于 Bcl-2 基因的表达,这个基因阻止 B 淋巴细胞凋亡^[18]。调节性 DNA 序列的低甲基化也与细胞因子的表达和分泌有关。报道显示 5-氮杂胞苷诱导白介素 4 和 6(IL-4, IL6)的生物合成与分泌。这些细胞因子可能诱导 B 淋巴细胞分化成产生免疫球蛋白的母细胞/胚细胞^[19]。

免疫细胞的表型能够被致低甲基化因子(即

DNA 甲基化抑制因子)诱导产生,与 SLE 患者的免疫细胞有许多相似的地方^[15]。SLE 患者的 T 细胞显示细胞表面高密度 LFA-1 与 DNMT1 活性下降 60% 有关^[15, 20]。SLE 患者 T 淋巴细胞也能够溶解自身的巨噬细胞^[15]。5-氮杂胞苷处理过的淋巴细胞与 SLE 患者的淋巴细胞相似,表明调节性 DNA 序列表达遗传改变,在特发性 SLE 发生免疫紊乱的过程中,可能起了关键性的作用^[8]。

2.2 DNA 低甲基化与微生物感染相关的 SLE:微生物感染可能与 SLE 的病因和发病机制有关。临床提供的依据是 SLE 患者出现潮红时常伴随感染的发生^[21]。这种结果可能与细菌感染的 SLE 患者 PBMC 自发凋亡增加有关^[22]。

人们怀疑未甲基化的 CpG 基序(motif)是与微生物 DNA 抗原特性相关的主要化学基团^[23]。含有未甲基化 CpG 基序的 8-寡脱氧核苷酸 DNA 片段,与脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)相比,对 B 淋巴细胞显示出更好的刺激作用。这个发现解释了为什么细菌 DNA 能够致 B 细胞有丝分裂,而脊椎动物 DNA 未显示出这种特性^[24]。甚至 CpG 基序的甲基化导致细菌 DNA 致有丝分裂特性的丧失。这表明人类免疫系统能够根据^mCpG 的结构成分,识别细菌与人类 DNA 间的差异^[25]。

增加细胞凋亡及减少凋亡细胞清除,结果造成血浆循环核抗原水平增加,它含有低甲基化的 DNA 片段^[21]。对健康个体而言,通过 PBMC 表达 DNA 结合受体,把这些 DNA 片段和寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotides, ONDs)从血浆中清除掉^[26]。然而,对 SLE 患者来讲,由于直接针对 DNA 受体的抗体的出现, DNA 清除似乎有缺陷。而且,健康个体的基因组 DNA 含有 2.5% ~ 4.5% 的甲基化胞苷,而来自 SLE 患者血清的 DNA 片段是低甲基化的,且约含有 1% 的甲基化胞苷^[26]。这些研究显示 SLE 患者血浆中低甲基化基因组 DNA 片段,可能模仿了微生物 DNA,诱导了抗 dsDNA 抗体的生物合成,在 SLE 发病机制方面起着重要的作用^[17, 27]。

2.3 DNA 低甲基化与人类内源性逆转录病毒(HERV)序列表达及抗 dsDNA 抗体:人类内源性逆转录病毒(human endogenous retroviruses, HERVs)是过去逆转录病毒感染我们祖先的生殖细胞后遗留下来的。大部分 HERVs 序列大约在(1 ~ 5)千万年前开始出现在人类基因组中,它们形成了 200 多个突

出的群/组和亚群/组^[28]。HERVs 没有胞外生长发育阶段,具有逆转录病毒的特征。HERVs 在人类基因组 DNA 中被普遍发现,占人类基因组的 8%,并且在各种自身免疫性疾病中表达^[28],如,HERV 序列表达可能在 SLE 的发生过程中产生了显著的作用^[29]。人们反复研究的结果表明 HERV 是人类和老鼠 SLE 的致病因素^[30]。逆转录病毒序列的表达能在 SLE 患者的 PBMC 中检测到。对来自 SLE 患者 PBMC 的 mRNA 进行 RT-PCR 分析,显示逆转录病毒 pol 片段基因的各种转录形式。几个研究发现 HERVs 的表达可能被启动区域 CpG 的甲基化所沉默^[31]。这些结果表明 DNA 低甲基化与 SLE 患者 PBMC 中 HERV 序列转录有关。HERV 组分的表达也可能激发抗 DNA 抗体的产生,这种抗体直接针对 SLE 患者的凋亡核残片。HERV 序列、外源性逆转录病毒和核抗原显示出极度的同源性^[32]。外源性逆转录病毒感染可能激发 B 和 T 记忆淋巴细胞的成熟,它们识别 HERV 抗原,增加抗 DNA 抗体的产生^[32]。针对病毒抗原的免疫反应可能被扩展到其他抗原,如核抗原或 DNA 片段,因此对 SLE 患者抗 DNA 抗体的生物合成做出了极大的贡献。

3 小结

多个研究显示了 DNA 甲基化对 SLE 发病的病因学的重要性。在人类和老鼠 SLE 发病过程中,许多特异基因或器官间 DNA 甲基化程度有差异。然而, DNA 低甲基化似乎在 SLE 病因方面起着重要的作用,归纳如下:①通过 CpG 的低甲基化,诱导了 SLE 样自身免疫且测定到 SLE 患者血清中这种低甲基化 CpG;②SLE 的淋巴细胞低甲基化(尤其是 T 细胞),包括 DNMT1 的 mRNA 表达减少;③通过甲基化抑制因子如 5-氮杂脱氧胞苷,在体内外诱发了 SLE 样的自身免疫;④药物性 SLE 中 DNA 甲基化作用;⑤HERV 转录过程中低甲基化的重要作用。这些都可能与 SLE 的病因有关。广泛开展表观遗传学研究,将有助于阐明 SLE 的发病机制。对 SLE 患者 DNA 低甲基化状态的深入研究,可能提供了一个非常重要的线索,既有助于发展新的 SLE 治疗方法,又可以对这种病的病因有较深的理解。

参 考 文 献

1 Wolfe AP, Marzke MA. Epigenetics: regulation through repression. Sci-

- ence, 1999, 286: 481 – 486.
- 2 Reik W, Walter J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat Genet*, 2001, 27: 255 – 256.
 - 3 Singal R, Ginder CD. DNA methylation. *Blood*, 1999, 93: 4059 – 4070.
 - 4 Cross SH, Bird AP. CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev*, 1995, 5: 309 – 314.
 - 5 Tribioli C, Tamanini F, Patrosso C, et al. Methylation and sequence analysis around Eag I sites: identification of 28 new CpG islands in XQ24-XQ28. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 727 – 733.
 - 6 Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 2291 – 2298.
 - 7 Siegfried Z, Eden S, Mendelsohn M, et al. DNA methylation represses transcription *in vivo*. *Nat Genet*, 1999, 22: 203 – 206.
 - 8 Lu Q, Kaplan M, Ray D, et al. Demethylation of ITGAI (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2002, 46: 1282 – 1291.
 - 9 Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med*, 2001, 134: 573 – 586.
 - 10 Izbicka E, Davidson KK, Lawrence RA, et al. 5,6-Dihydro-5'-aza-cytidine (DHAC) affects estrogen sensitivity in estrogen-refractory human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res*, 1999, 19(2A): 1293 – 1298.
 - 11 Juttemann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 11797 – 11801.
 - 12 Qudous J, Johnson KJ, Gavalchin J, et al. Treating activated CD4⁺ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. *J Clin Invest*, 1993, 92: 38 – 53.
 - 13 Deng C, Lu Q, Zhang Z, et al. Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling. *Arthritis Rheum*, 2003, 48: 746 – 756.
 - 14 Qu GZ, Dubeau L, Narayan A, et al. Satellite DNA hypomethylation vs overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res*, 1999, 423: 91 – 101.
 - 15 Richardson BC, Strahler JR, Pivrotto TS, et al. Phenotypic and functional similarities between 5-aza-cytidine-treated T cells and a T cell subset in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1992, 35: 647 – 662.
 - 16 Richardson B, Powers D, Hooper F, et al. Lymphocyte function-associated antigen 1 overexpression and T cell autoreactivity. *Arthritis Rheum*, 1994, 37: 1363 – 1372.
 - 17 Yung RL, Qudus J, Chrisp CE, et al. Mechanism of drug-induced lupus. I. cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors *in vitro* cause autoimmunity *in vivo*. *J Immunol*, 1995, 154: 3025 – 3035.
 - 18 Nunez G, Hockenbery D, McDonnell TJ, et al. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature*, 1991, 353: 71 – 73.
 - 19 Richardson BC, Liebling MR, Hudson JL. CD4⁺ cells treated with DNA methylation inhibitors induce autologous B cell differentiation. *Clin Immunol Immunopathol*, 1990, 55: 368 – 381.
 - 20 Deng C, Kaplan MJ, Yang J, et al. Decreased Ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. *Arthritis Rheum*, 2001, 44: 397 – 407.
 - 21 Herman M, Voll RE, Zoller OM, et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1998, 41: 1241 – 1250.
 - 22 Lorenz HM, Grunke M, Hieronymus T, et al. *In vitro* apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum*, 1997, 40: 306 – 317.
 - 23 Yu D, Zhu FG, Bhagat L, et al. Potent CpG oligonucleotides containing phosphodiester linkages: *in vitro* and *in vivo* immunostimulatory properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297: 83 – 90.
 - 24 Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS, et al. The influence of DNA structure on the *in vitro* stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens. *Cell Immunol*, 1993, 147: 148 – 157.
 - 25 Gantner F, Hermann P, Nakashima K, et al. CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol*, 2003, 33: 1576 – 1585.
 - 26 Bennett RM, Peller JS, Merritt MM, et al. Detective DNA-receptor function in systemic lupus erythematosus and related diseases: evidence for an autoantibody influencing cell physiology. *Lancet*, 1986, 1: 186 – 188.
 - 27 Krieg AM. CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J Clin Immunol*, 1995, 15: 284 – 292.
 - 28 Hughes JF, Coffin JM. Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution. *Nat Genet*, 2001, 29: 487 – 489.
 - 29 Sekigawa I, Ogasawara H, Kaneko H, et al. Retroviruses and autoimmunity. *Intern Med*, 2001, 40: 80 – 86.
 - 30 Urnovitz HB, Murphy WH. Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human diseases. *Clin Microbiol Rev*, 1996, 9: 72 – 99.
 - 31 Hermann M, Kalden JR. PCR and reverse dot hybridization for the detection of endogenous retroviral transcripts. *J Virol Methods*, 1994, 46: 333 – 348.
 - 32 Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell*, 1987, 50: 819 – 820.

(收稿日期 2005-03-25)

(本文编辑 孙岩伟)