

## DNA 甲基化与自身免疫性疾病

毛妮 综述 陈进伟 审校

(中南大学湘雅二医院风湿免疫科,长沙 410011)

**[摘要]** DNA 甲基化及其调节酶是近年来表观遗传学研究的热点。DNA 甲基化异常可影响某些基因的表达,导致自身免疫性疾病的发生发展。深入研究 DNA 甲基化在自身免疫性疾病中的作用,有利于阐明自身免疫性疾病的发病机制,为治疗这些疾病提供新的线索。

**[关键词]** DNA 甲基化; 自身免疫性疾病; 系统性红斑狼疮; 强直性脊柱炎

**[中图分类号]** R593.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2008)02-0161-04

## DNA methylation and autoimmune diseases

MAO Ni, CHEN Jin-wei

(Department of Rheumatoid Immunology Medicine, Second Xiangya Hospital,  
Central South University, Changsha 410011, China)

**[Abstract]** Recent studies on DNA methylation and its regulatory enzymes, seem hot to researches of epigenetics. Abnormal DNA methylation can influence the expression of certain genes, inducing occurrence and development in autoimmune diseases. These deeper epigenetic studies of the role of DNA methylation in the induction of autoimmune diseases, may give us clues towards elucidation of the pathogenesis of autoimmune diseases and development of new therapeutic strategies for these diseases.

**[Key words]** DNA methylation; autoimmune diseases; systemic lupus erythematosus; ankylosing spondylitis

[Int J Pathol Clin Med, 2008,28(2):0161-04]

DNA 甲基化(DNA methylation)是哺乳动物最普通的一种复制后调节方式。DNA 的甲基化由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)催化完成。在高等真核生物,胞嘧啶的甲基化可能参与基因的表达调控、发育调节、基因组印迹和 X 染色体灭活。近年来有研究表明 DNA 甲基化异常影响某些自身免疫性疾病的发生发展。当各种原因引起 T 细胞 DNA 低甲基化后,对自身免疫有潜在作用的基因表达增加,通过多个环节影响自身免疫性疾病的发生。

### 1 DNA 甲基化与基因表达

早在 1942 年, Waddington 首次提出表观遗传学(epigenetics)的概念,并指出表观遗传与遗传是相对的,它主要研究基因型和表型的关系。几十年后,

Holiday 针对表观遗传学提出了更新的系统性论断,在不改变基因组序列的前提下,通过 DNMTs 和组蛋白乙酰化转移酶(histone acetyltransferase, HAT)及组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的修饰来调控基因表达,这种修饰以 DNA 甲基化最为常见<sup>[1]</sup>。甲基化的 CpG 岛通常存在于失表达的组织特异性基因的启动子、印迹失活的常染色体等位基因的启动子和女性失活的 X 染色体上各基因的启动子<sup>[2]</sup>。

**1.1 DNA 甲基化的作用及影响因素** DNA 甲基化主要有两种功能:(1)在生物细胞的发育和分化中调控基因的表达;(2)中和潜在危险的 DNA 序列,例如转座子和外源病毒等。一般来说, DNA 甲基化与基因表达呈负相关,而启动子区低甲基化与

转录活性正相关(非启动子区甲基化例外,如某些印迹基因),基因本身的甲基化与基因表达也存在弱的负相关,如在体外被甲基化的序列转入细胞后可抑制表达。相反,许多内源基因在经甲基化抑制剂——5-叠氮胞嘧啶(5-azacytidine)处理后被激活。饮食、遗传基因多态性和环境中的化学物质均可导致DNA的甲基化状态改变。饮食中的蛋氨酸和叶酸是DNA甲基化甲基基团的供体。如果饮食中缺乏叶酸,蛋氨酸或硒元素,就会改变基因的甲基化状态,导致神经管畸形、癌症和动脉硬化。职业化学品、化石燃料排放、水污染和吸烟等环境污染,释放出有害物质如砷(砒霜)和多环芳烃(苯并芘)等,均可增加基因不稳定性 and 改变细胞物质代谢。每个人对环境和饮食因素的敏感性可因先天遗传的不同而不同。因此环境因素和个体遗传特性共同作用,决定了潜在的表现遗传疾病的危险性。

**1.2 DNA甲基化的作用机制及检测** DNA甲基化控制基因表达和作用可能有两种机制:直接的机制是CpG岛的甲基化干扰一些转录因子与基因调控区的结合或直接抑制RNA聚合酶活性而抑制基因的表达。间接的机制包括两种类型:(1)甲基化DNA与特异结合蛋白结合,(2)DNA甲基化改变染色质结构,两者均能阻碍转录因子(TF)与DNA结合。前一种情况如甲基CpG结合蛋白(MECs)可以通过改变某些区域的结构间接地阻止基本TF与DNA结合;组蛋白H1及H1家族的一些蛋白属于后一种类型,它们可改变染色质结构,并可抑制卵黄生成素Ⅱ(VitellogeninⅡ)基因的转录。已证实DNA甲基化与组蛋白去乙酰化正相关,而乙酰化是调控基因表达的另一重要方式。随着对甲基化研究的不断深入,各种各样甲基化检测方法被开发出来以满足不同类型研究的要求。这些方法概括起来可分为三类:基因组整体水平的甲基化检测、基因特异位点甲基化的检测和新甲基化位点的寻找。目前常用的定性检测甲基化的方法是甲基化特异性的PCR(methylation-specific PCR, MS-PCR),它将DNA先用重亚硫酸盐处理,这样未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶,而甲基化的不变,随后行引物特异性的PCR。此外,还有甲基化敏感性限制性内切酶法、直接测序法等。在这些方法的基础上,利用限制性内切酶对转化后PCR产物切割的特性,结合凝胶电泳、寡核苷酸杂交等分子生物学技术,可对DNA甲

基化的状态进行全面的了解。随着甲基化研究水平的提高,近年来提出了以限制性标记基因组扫描(RLGS)为代表的一系列新兴的全基因组甲基化扫描分析的新技术,如:甲基化敏感的限制性指纹谱技术、甲基化区间位点扩增等,这些新技术的出现为甲基化新位点的寻找提供了有效的方法学工具。

## 2 DNA甲基化与自身免疫性疾病

DNA甲基化最初是在研究肿瘤的过程中发现的,对自身免疫性疾病的研究近几年逐渐增加。DNA甲基化异常可能与先天自身免疫性疾病相关。DNA甲基化的改变可以影响许多基因的表达,包括一些与黏附因子和细胞因子表达相关的基因,导致T细胞的自身反应性发生改变,从而与自身免疫性疾病发病密切相关<sup>[3-4]</sup>。DNA甲基化对维持T细胞的功能起着至关重要的作用。越来越多的文献证实,没有维持DNA甲基化水平和模式的成熟T细胞,在体外和体内均能发生自身反应性,表现遗传的失控可以引起自身免疫性疾病。

**2.1 DNA甲基化和系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)** SLE是一种以大量的自身抗体产生并引起多系统损伤为主要特征的自身免疫性疾病,具体发病机制不明。其中,SLE患者体内大量自身抗体的产生机制一直是研究的焦点。已有文献报道,在部分接受普鲁卡因酰胺或胍苯达嗪等T细胞DNA甲基化抑制剂治疗后,患者能发生一种以关节炎、浆膜炎及抗核抗体的产生为特征的自身免疫性疾病。用5-叠氮胞嘧啶处理T细胞,过继转移到未暴露射线的鼠同源受体内,可诱导免疫复合物性肾小球肾炎,出现抗DNA抗体、抗组蛋白抗体、诱导狼疮样疾病发生<sup>[5]</sup>。其机制为药物诱导T细胞DNA低甲基化,细胞因子释放聚集,启动B细胞分化,导致自身抗体产生及免疫复合物沉积;狼疮患者T细胞存在不同程度的甲基化胞嘧啶(dmC)含量及DNMTs活性的下降,DNMTs水平是由有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径调节,可能降低信号的转导而引起DNA低甲基化。Deng等<sup>[6]</sup>的研究证实,活动性狼疮患者中DNMTs mRNA下降,且Ras-有丝分裂-激活蛋白激酶(Ras2MAPK)信号转导减少,用可溶性抑制剂来抑制Ras2MAPK途径,可使DNMTs mRNA下降,酶活性降低,且导致DNA低甲基化;已有研究发现,富含CpG双核苷酸且为低甲基化的细菌和病毒DNA在体内外可以诱导类似

SLE 的各种免疫学变化,包括多克隆 B 细胞的活化、自身抗体的产生、IL-6 的分泌、抑制凋亡等<sup>[7]</sup>。为了检测用细菌 DNA 诱导而产生抗体的结构是否与狼疮鼠的抗 DNA 抗体结构相关,用 Southern 印迹分析抗体 H 链和 L 链,提示两种抗体具有相关性,表明用细菌 DNA 免疫正常鼠与 DNA 抗原驱动的免疫反应具有某些共同特征<sup>[8]</sup>。其具有低甲基化细菌 CpG 结构域,可诱导狼疮样自身免疫症状;新近研究发现,T 细胞 B 细胞共刺激因子(CD40LG)、整合素  $\alpha$ L 型(CD11a)、穿孔素(perforin)、肿瘤坏死因子 II 型跨膜蛋白(CD70)及 TCR 信号转导因子(IgE FcRr1)等基因调控序列低甲基化在 SLE 发病机制中起关键作用,DNA 低甲基化重新激活原已失活的 X 染色体是女性易患 SLE 的关键所在,CD40LG 的脱甲基作用激活原已失活的 X 染色体,是女性易患 SLE 的重要原因<sup>[9-12]</sup>。Wen 等<sup>[13]</sup>用同系基因型的活化淋巴细胞来源的 DNA,诱导 SLE 非易感小鼠的研究显示,凋亡细胞的 DNA 存在显著的低甲基化,并导致其诱导抗双链 DNA 抗体和蛋白尿的能力显著受损,是凋亡细胞的 DNA 诱导 SLE 样自身免疫性疾病发生。目前,对表观遗传学的广泛研究发现有助于阐明 SLE 的发病机制,进一步研究 DNA 的甲基化状态,尤其是低甲基化,为寻找治疗 SLE 的新途径提供了重要的线索,同时也有助于对 SLE 病因学的深入探索。

**2.2 DNA 甲基化和类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)** RA 是以慢性、对称性多滑膜关节炎和关节外病变(皮下结节、心包炎、胸膜炎、肺炎、周围神经炎等)为主要临床表现的自身免疫性疾病。确切的病因至今未明。有研究发现,普鲁卡因酰胺和胍苯达嗪可以抑制 T 细胞 DNA 甲基化,并且诱导克隆的 CD4<sup>+</sup> T 细胞的自身反应性。在 RA 患者外周血 T 细胞有 DNA 甲基化的受损,结果支持 DNA 甲基化与类风湿关节炎之间的联系,并且这些药物也可以诱导机体出现一系列自身免疫性疾病的症状。提示 DNA 甲基化,T 细胞自身反应性和自身免疫性疾病之间有一定的联系。目前已有学者对 RA 患者基因组 DNA 甲基化水平及其影响因素进行了初步研究。结果显示,RA 患者基因组普遍 DNA 甲基化水平降低,认为 DNA 的低甲基化可能与 N5, N10-亚甲基四氢叶酸还原酶(N5, N10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)基因的突变和高同

型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)血症有关<sup>[14]</sup>。DNA 的低甲基化可能通过引起 RA 患者的某些基因的异常表达,参与疾病的发生发展。新近研究发现,CD70 在 RA 患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞的表达明显高于年龄匹配的对照组,结果有统计学意义。其潜在的机制与 CD70 表达抑制失控有关,并且不受启动基因的脱甲基化作用影响,T 细胞 CD70 的表达促使 T 细胞反应性退化并最终破坏其耐受机制,导致自身反应性<sup>[15]</sup>。目前,对 RA 基因组 DNA 甲基化的研究尚处于起始阶段,RA 的发病机制与基因组 DNA 低甲基化和 CD70 等某些基因表达异常的关系有待进一步深入研究。

**2.3 DNA 甲基化和强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)** AS 是以主要侵犯脊柱,不同程度的累及骶髋关节和周围关节为主要表现的慢性炎症性自身免疫性疾病。病因迄今未明,一般认为遗传因素和环境因素相互作用所致。大部分病例与人类白细胞抗原-B27(HLA-B27)相关。有学者对单卵双胞胎强直性脊柱炎患者免疫学参数的研究中发现,虽然 90% 的 AS 患者携带 HLA-B27 基因,但是 HLA-B27I 类抗原对于整体疾病风险估计仅约 20% ~ 50%。随机失活的 X 染色体和 DNA 甲基化可能影响疾病的表达,这在某些静默基因中非常重要。目前对风湿性疾病中高 Hcy 血症的临床研究显示,Hcy 水平高于正常高限的比例在 AS 组中有 53.3%,这说明在 AS 患者体内存在高 Hcy 血症,且 Hcy 水平与叶酸、VitB12 水平呈显著负相关。随着 MTHFR 基因 C677T 位点的突变,血浆 Hcy 水平明显升高,突变纯合子(TT 型)的 Hcy 平均水平远高于正常基因型;且与其他 2 种基因型相比,TT 型是 Hcy 升高的易感基因。Hcy 可以通过修饰 T 细胞的 HLA-I 类抗原,如 HLA-B27 分子及其他表面分子等,从而导致细胞毒性 T 细胞的功能发生异常,使 CD4<sup>+</sup> T 细胞具有自身反应性,导致 AS 类自身免疫性疾病的发生<sup>[16]</sup>。目前尚无强直性脊柱炎患者基因组 DNA 甲基化水平的报道。

**2.4 DNA 甲基化和系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)** SSc 是以血管病变、局限性或弥漫性皮肤增厚和纤维化为主要特征的自身免疫性疾病。除皮肤受累外,它也可影响心、肺和消化道等器官。SSc 的病因学和发病机制迄今未明。一般认为与基质金属蛋白酶的表达减少,间质成纤维细胞过度合

成大量的胶原和细胞外基质有关<sup>[17]</sup>。活化的成纤维细胞对 SSc 的组织纤维化和疾病进展起着关键的作用。有研究发现,SSc 患者成纤维细胞胶原合成增加与胶原抑制基因 FLI1 表达失控有关,FLI1 启动子区 CpG 岛大量的甲基化在 SSc 患者成纤维细胞和皮肤活检标本中被证实<sup>[18]</sup>。表观遗传机制可能对 SSc 纤维变性有间接作用,信号转导导致 SSc 患者纤维变性表型的发生积聚在 FLI1 的 DNA 甲基化和组蛋白的去乙酰化。Ozbalkan 等<sup>[19]</sup>对女性 SSc 患者失活的 X 染色体研究发现,失活的 X 染色体出现偏斜,而 DNA 甲基化与维系失活的 X 染色体的静默状态有关。提示偏斜的失活的 X 染色体的镶嵌现象在 SSc 的发病机制中具有重要的作用,同时这也是女性 SSc 发病率高的原因之一。Selmi 等<sup>[20]</sup>和 Knudsen 等<sup>[21]</sup>的研究进一步说明,女性 SSc 患者外周血 X 单染色体细胞比率较健康的、年龄匹配的女性明显增高。此外,在女性 SSc 患者中失活的 X 染色体出现严重偏斜。这些研究有助于阐明 SSc 的发病机制,为探索以女性发病为主的自身免疫性疾病提供了强有力的理论基础。

综上所述,DNA 甲基化作为调节基因表达的一种方式,在个体发育、肿瘤发生、免疫紊乱中起着重要作用,当各种原因引起 T 细胞 DNA 低甲基化后,对自身免疫有潜在作用的基因表达增加,通过多个环节导致自身免疫性疾病的发病。深入研究低甲基化在自身免疫性疾病中的作用,有利于阐明自身免疫性疾病的发病机制,从而为治疗这些疾病提供更为有效的方法。

### 参 考 文 献

- [1] Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin[J]. *Gene*, 2001,27(8): 25-31.
- [2] Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer [J]. *Oncogene*,2001,20(24): 3139-3155.
- [3] Bader S, Walker M, McQueen HA, et al. MBD1, MBD2 and CG-BP genes at chromosome 18q21 are infrequently mutation in human colon and lung cancer[J]. *Oncogene*,2003,22(22): 3506-3510.
- [4] Swkigawa I,Okada M,Ogasavara H,et al. DNA methylation in systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*,2003,12(2): 79-85.
- [5] Magnusson M, Magnusson S, Vallin H, et al. Importance of CpG dinucleotides in activation of naturalIFN- $\alpha$ -producing cells by a lupus-related oligodeoxynucleotide. *Scand [J]. J Immunol*,2001, 54(6): 543-550.
- [6] 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 [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(15): 397-407.
- [7] Kaplan MJ, Attwood J, Richardson BC, et al. DNA methylation and perforin expression in normal and lupus T cells[J]. *Arthritis Rheum*,2001,44(19): 895.
- [8] Sekigawa I, Nawata M, Seta N, et al. Cytomegalovirus infection in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Rheumatol*,2002,20(2): 559-564.
- [9] Lu Q, Wu A, Ray D, et al. DNA methylation and chromatin structure regulate T cell perforin gene expression [J]. *J Immunol*, 2003,170(10): 5124-5132.
- [10] Lu Q, Richardson B. Methods for analyzing the role of DNA methylation and chromatin structure in regulating T lymphocyte gene expression[J]. *Biol Proced Online*,2004,6(1): 189-203.
- [11] Lu Q, Wu A, Richardson BC. Demethylation of the same promoter sequence increase CD70 expression in lupus T cell and T cells treated with lupus-inducing drugs [J]. *J Immunol*, 2005, 174(10): 6212-6219.
- [12] Lu Q, Wu A, Tesmer L, et al. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus[J]. *J Immunol*,2007, 179(9): 6352-6358.
- [13] Wen ZK, Xu W, Xu L, et al. DNA hypomethylation is crucial for apoptotic DNA to induce systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in SLE-non-susceptible mice [J]. *Rheumatology*, 2007,46(12): 1796-1803.
- [14] Xu XY, Wang MM, Xiao CS, et al. The study of DNA methylation in rheumatoid arthritis [J]. *Chin Rheumatol*, 2006, 10(8): 462-465.
- [15] Lee WW, Yang ZZ, Li G, et al. Unchecked CD70 expression on T cells lowers threshold for T cell activation in rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol*,2007,179(4): 2609-2615.
- [16] Xu XY, Zhou WH, Xiao CS, et al. A clinical study of hyperhomocysteinemia in rheumatological diseases [J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*,2005,44(2): 111-114.
- [17] Derk CT, Jimenez SA. Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis [J]. *Autoimmun Rev*,2003,2(4): 181-191.
- [18] Wang Y, Fan PS, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*,2006,54(7): 2271-2279.
- [19] Ozbalkan Z, Bağışlar S, Kiraz S, et al. Skewed X chromosome inactivation in blood cells of women with scleroderma [J]. *Arthritis Rheum*,2005,52(5): 1564-1570.
- [20] Selmi C, Invernizzi P, Gershwin ME. The X chromosome and systemic sclerosis [J]. *Curr Opin Rheumatol*,2006,18(6): 601-605.
- [21] Knudsen GP, Harbo HF, Smestad C, et al. X chromosome inactivation in females with multiple sclerosis [J]. *Eur Neurol*,2007,14(12): 1392-1396.