

表观遗传调控在糖尿病及其并发症中的作用

董奕君 远航

糖尿病(DM)是一种受多重复杂因素影响的慢性代谢性疾病,遗传和环境因素的改变可导致DM的发生。DM常伴有血管并发症(如动脉粥样硬化、高血压和中风)和微血管并发症(如糖尿病肾病、视网膜病和神经病变)。目前,DM是继心血管疾病和肿瘤之后的第三大非传染性疾病,全球DM的流行给患者和社会带来了沉重的经济负担。近年虽然一些药物可改善DM患者预后,但仍有很多患者出现糖尿病并发症。目前已经证实,患者在确诊DM之前就已经出现糖耐量异常,机体随之形成了代谢性记忆,为以后可能出现的DM相关性血管并发症埋下隐患^[1-2]。同时也提示,表观修饰异常可能通过影响代谢性记忆的发生而参与DM及其并发症的发病机制。目前表观遗传修饰包括:DNA甲基化、组蛋白化学修饰、染色质重塑和miRNA 4种调控方式,笔者主要对其中的DNA甲基化、组蛋白化学修饰在DM及其肾脏并发症中的研究进展进行综述。

一、表观遗传学的概述

早在1942年,康德拉·哈尔·沃丁顿就首次提出了表观遗传学(epigenetics)的概念,几十年后,霍利迪针对表观遗传学提出了更新的系统性论断,即表观遗传学是基因的DNA序列不发生改变的情况下,基因的表达水平与功能发生改变,并产生可遗传的表型。表观遗传对生物体各种类型细胞的生长和分化至关重要,然而随着环境因素的影响或年龄的增长,细胞正常的表观遗传状态也会被打破,这就使得表观遗传改变在一些复杂的多因素疾病,如糖尿病肾病(DN)的发病机制中发挥了重要作用。

1. DNA甲基化: DNA甲基化是最基础的基因表观遗传学修饰,不仅调节基因的表达,而且对染色体保持稳定起重要作用。在脊椎动物中,DNA甲基化主要发生在CpG岛。DNA甲基化由DNA甲基转移酶家族(DNA methyltransferases, DNMTs)催化,将甲基基团合成到5'-CpG-3'中胞嘧啶的第五位碳原子上。尽管基因组大部分

基因是非甲基化的,但是基因启动子区的CpG岛在成长过程中易发生动态甲基化改变。通常基因启动子区域的CpG岛处于非甲基化状态,当发生甲基化时,可导致基因沉默的发生^[3-4],而产生这一作用的机制可能与阻碍AP2、NF- κ B、c-Myc和E2F等转录因子与启动子的结合、结合转录抑制因子(如甲基化结合蛋白)和改变染色质的结构有关^[5]。

2. 组蛋白化学修饰: 组蛋白是染色体基本结构核小体的重要组成部分,包括:组蛋白H1、H2(H2A和H2B)、H3、H4和H5。组蛋白尾部(N端氨基酸残基)可发生乙酰化、甲基化、磷酸化及泛素化等多种共价修饰作用,且这些修饰作用大多是可逆的。组蛋白化学修饰通过影响组蛋白与DNA双链的亲合性,从而改变染色质的疏松或凝集状态,或通过影响转录因子与结构基因启动子的亲合性来发挥基因调控作用。

组蛋白乙酰化(acetylation, Ac)修饰是一个快速动态修饰的过程,主要是在组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)的协调作用下进行的。HATs催化组蛋白乙酰化,导致染色质结构松散,促进基因转录;而HDACs使组蛋白去乙酰化,导致染色质凝聚,抑制基因转录。组蛋白乙酰化呈多样性,核小体上有多个位点可提供乙酰化,但特定基因部位的组蛋白乙酰化和去乙酰化以一种非随机的、位置特异的方式进行。

组蛋白甲基化是指发生在组蛋白N端精氨酸或赖氨酸残基上的甲基化,由组蛋白甲基转移酶(histone methyltransferase, HMTs)和去甲基化酶(lysine demethylase, LSD)动态调节。与组蛋白乙酰化不同,组蛋白甲基化更加稳定和持久。根据组蛋白甲基化形式、甲基化位点和被修饰的氨基酸残基类型的不同^[6],组蛋白甲基化可导致转录的激活或抑制。

如今,组蛋白修饰在表观遗传机制中起重要作用的观点,被越来越多的人认同,但其具体的作用机制还没有被完全认识。Vaissiere等^[7]发现,CpG岛DNA甲基化可促进组蛋白去乙酰化,导致相关基因转录抑制,且其通过调节H3K9me3的组蛋白甲基转移酶SUV39H1的募集可以进一步增强转录抑制。反之,组蛋白乙酰化可以通过抑制DNA甲基转移酶与CpG岛的结合来抑制DNA甲基化。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2014.02.015

作者单位:130041 长春,吉林大学白求恩第二医院肾内科
通信作者:远航,Email:hangyuan75@gmail.com

Murr 等^[8]发现 DNA 甲基化及其它的组蛋白修饰之间也存在类似的相互作用。表观遗传机制间的相互作用使基因调控变得更加复杂,而它们在 DM 及其并发症中的作用机制仍有待进一步的研究。

3. 表观遗传修饰与代谢性记忆: 所谓“代谢性记忆”现象是指高糖介导的微血管病变即使在后续血糖控制达标后仍可持续进展。研究表明,代谢记忆的分子机制是糖尿病诱导的关键靶细胞中特定转录复合器在血糖恢复正常后仍持续启动,介导后续核内基因表达谱异常^[9]。相关研究提示即使不再存在环境因素刺激,组蛋白异常修饰及 DNA 甲基化改变也不会恢复,这种持久的改变可遗传给后代^[10]。国外学者采用染色质共沉淀-测序技术分析高糖负荷条件下血管平滑肌细胞的表观修饰模式,发现组蛋白 H3K9、H3K14 呈高度乙酰化修饰,并参与了内皮功能异常的发生^[11]。同时研究还发现,预先进行高糖培养的系膜细胞 2 d 后再恢复正常糖浓度培养 3、6、9 d, H3 和 H4 乙酰化蛋白水平仍较正常糖浓度组显著上调,与 Zhong 等^[12]在细胞和糖尿病大鼠记忆模型中的研究结果相似。以上结果表明高糖可诱导靶细胞、染色质组蛋白乙酰化重塑,且该效应在血糖恢复正常后仍持续存在。

有趣的是,即使短期的高血糖刺激也可以导致长期的表观遗传修饰的改变。El-Osta 等^[9、13]通过体外分离培养的上皮细胞实验发现,上皮细胞暴露于高糖环境 16 h 后,在正常糖浓度中培养若干天,其 NF- κ B、p65 表达持续增加,同时启动子 H3K4me1 标志物表达持续增加,伴随组蛋白甲基化酶 SET7 在 p65 启动子区募集增多。但上述这些改变可以被线粒体电子传递链阻碍复合体阻断^[9]。总之,目前的研究均表明高糖可以导致靶细胞表观遗传改变,且即使血糖控制在正常水平时,表观遗传改变仍可以导致 DM 微血管及大血管并发症发病相关基因持续表达。

二、表观遗传调控在糖尿病及其并发症发展中的作用

1. DNA 甲基化与糖尿病及其并发症: 研究发现某些 DNA 甲基化参与了 DM 发生。例如 DM 状态下,转录辅助活化因子 1 α (PGC-1 α) 启动子区 DNA 甲基化增加,而 PGC-1 α 表达下降。由于 PGC-1 α 与葡萄糖刺激胰岛素的分泌呈正相关,提示 DNA 甲基化修饰通过抑制 PGC-1 α 表达导致糖尿病 db/db 小鼠胰岛素分泌减少^[14]。此外,全基因组研究表明,在高糖条件下细胞内组蛋白 DNA 甲基化存在明显差异,且血管内皮细胞炎性反应基因启动子区的 DNA 甲基化呈现长期持久的变化,提示表观遗传调控可能与糖尿病代谢机制有关^[14]。同样在 DN 和慢性肾脏病 (CKD) 患者中均发现有不同程度的 DNA 甲基化^[15]。DNA 甲基化也受到与肾衰竭相关的尿毒症成分的影响。

研究表明,CKD 和终末期肾病 (ESRD) 患者均可出现高同型半胱氨酸血症,伴 S 腺苷同型半胱氨酸升高。同型半胱氨酸前体 S-腺苷同型半胱氨酸是 S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶的强拮抗因子,同时也是导致 DNA 甲基化改变的重要因子之一,在多种高同型半胱氨酸血症性疾病 (包括尿毒症) 中均显著增高。事实上,血清中 S-腺苷同型半胱氨酸水平升高在伴有血管疾病的 CKD 患者中已有报道^[16]。上述研究均提示 DNA 甲基化异常可能通过影响启动子区域的基因结构来参与 CKD 的发生发展。最新研究报告显示,对唾液中提取的 DNA 基因进行甲基化水平测定,发现在糖尿病肾病 (DN) 不同发展阶段, DNA 甲基化修饰存在显著差异,并可识别糖尿病终末期肾病与无肾脏并发症的糖尿病患者,两组至少有两个 CpG 位点甲基化存在明显差异^[17]。这表明 DNA 甲基化水平差异可能在预测疾病易感性及疾病进展方面起作用。

2. 组蛋白修饰与糖尿病及其并发症: 目前研究表明组蛋白修饰在 DM 及其并发症中起重要作用。Miao 等^[18]发现体外分离培养高糖刺激的单核细胞及 DM 患者外周血中的单核细胞内 TNF- α 和 COX-2 基因启动子上 H3K9 和 H3K14Ac 水平增高,还发现 HAT (pCAF) 与 NF- κ B 信号通路的转录因子 p65 结合能力增加且促进了 NF- κ B 途径的转录活性,提示 DM 时炎症反应相关基因的过度表达与组蛋白过乙酰化反应相关。Boekhoudt 等^[19]发现 TNF- α 诱导单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 基因启动子区发生高乙酰化反应,增加 Sp1 和 p65 在该调控区的结合而促进 MCP-1 基因表达。上述研究均表明组蛋白高乙酰化修饰与病理状态下 NF- κ B 信号通路的活化及下游调控基因的高表达密切相关。Reddy 等^[20]还发现氯沙坦作用于体外高糖培养的肾小球系膜细胞时,可部分逆转其 RAGE、血浆纤溶酶原活化因子抑制剂 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 及启动子 MCP-1 已经增加的 H3K9/14 乙酰化水平,为糖尿病肾病提供了更加有效的靶向治疗策略。Yuan 等^[21]应用体外分离培养的原代肾小球系膜细胞,以 PAI-1 和 P21 基因作为研究中心,观察高糖及转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 刺激对细胞内靶基因启动子区组蛋白乙酰化修饰影响及 HAT/HADC 的表达变化,观察与目标基因表达密切相关的转录因子 Smad2/3 和 Sp1 蛋白乙酰化修饰的改变,以及这些化学修饰改变对靶基因转录水平的影响,并应用糖尿病动物模型,观察高糖环境以及胰岛素治疗对肾小球内乙酰化修饰、基因表达以及肾小球肥大的影响。结果显示,糖尿病大鼠肥大的肾小球及高糖环境下系膜细胞内 PAI-1 和 p21 基因启动子上的组蛋白 H3K9 及 Smad2/3、Sp1 蛋白发生高乙酰化修饰,提示高乙酰化修饰参与 PAI-1 与 p21 基因表达调控,并与糖尿病性肾小球肥大的发生有关。

肾脏纤维化与肾脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度蓄积和肾小管上皮细胞上皮-间质转型有关,是导致肾小球滤过率下降进而出现肾功能损害的主要病理表现。有研究证明,HDACs特别是HDAC-2的活性在DN模型db/db小鼠体内明显增强,在以TGF- β 1处理过的正常鼠肾小管上皮细胞中也有相同表现,且HDACs抑制剂能明显减少ECM成分基因的mRNA和蛋白表达,并能防止肾小管上皮细胞上皮-间质转型^[22]。这些研究表明HDACs在肾脏纤维化和TGF- β 1致纤维化作用相关的DN等慢性肾脏损伤模型中发挥重要作用。Kaur等^[23]研究发现,作为体内重要的HAT,p300在高糖处理的内皮细胞NF- κ B信号通路活化以及DM相关的肾脏ECM沉积中发挥重要作用。进一步研究表明,高糖增加p300的表达,导致血管内皮细胞ECM基因和血管活性因子启动子区组蛋白乙酰化增加^[24]。有趣的是,在体外分离培养的人脐静脉内皮细胞实验中p300抑制剂如姜黄素,能阻碍高糖诱导的糖尿病血管并发症相关基因的表达^[23]。遗憾的是,在进行小鼠实验时发现,无论在诱导小鼠产生DM之前或之后,进食姜黄素均不能减少糖尿病小鼠蛋白尿^[25]。

Francis等^[26]采用小干扰RNA表达的腺病毒载体转染BTC3细胞系,抑制PDX-1基因表达,发现转染细胞胰岛素基因启动子邻近区域的H3K4me2水平也明显下降,同时TNF- α 诱导的NF- κ B依赖的炎性反应基因,如MCP-1、TNF- α 和IL-8的表达也显著减少。Li等^[27]通过体外分离培养的人THP-1单核细胞和HEK293细胞系实验发现,高糖刺激时,内皮细胞内Set7/9表达增多,其活化的NF- κ B的表达也增多。沉默Set7/9也能减少NF- κ B途径P65亚单位和p300募集到MCP-1和TNF- α 启动子上,同时MCP-1和TNF- α 启动子上的H3K4me相应减少。这些结果提示,Set7/9也许通过启动子H3K4甲基化修饰来共激活NF- κ B的转录,从而对糖尿病环境下的炎性反应刺激物作出反应。Sun等^[28]发现采用siRNA沉默SET7/9基因,能显著减少TGF- β 1诱导的ECM相关基因表达,并且发现TGF- β 1抗体不仅能阻碍高糖诱导的ECM基因的表达,而且可逆转高糖刺激时ECM相关基因启动子上H3K4me的水平及SET7/9的募集。Keating等^[29]发现,SET7/9组蛋白甲基转移酶是调节组蛋白及非组蛋白赖氨酸残端甲基化作用的关键酶。因此,Set7/9也许是控制包括DM在内的炎性反应性疾病的一个新的治疗靶标。还有研究发现,db/db小鼠的血管平滑肌细胞中SUV39H1蛋白水平降低,同时IL-6和MCP-1启动子上的H3K9me3相应减少^[30]。因此,在炎性基因启动子中,SUV39H1或其介导的H3K9me3的减少,可能导致抑制性蛋白的丢失,从而使各种炎性基因过度表达,最终导致DM患者的血管病变^[22]。

综上,特定的靶基因启动子的表观遗传改变也许可以解释糖尿病肾脏及其它并发症的快速进展,以及即使

在药物治疗或血糖水平已经控制时仍存在持续性代谢记忆的发生。

三、总结

表观遗传在疾病的发生和发展中起着十分重要的作用^[31-32]。研究表明高糖刺激可使基因发生表观遗传改变,如DNA甲基化、组蛋白乙酰化、染色质重塑及microRNAs,从而来调节细胞内炎性反应基因及纤维化基因表达相关的信号传导通路,最终使靶细胞主要的炎性反应及纤维化基因表达失调。这种持续的表观遗传改变也许是代谢记忆的重要机制。但是,各种表观遗传修饰如何作用于复杂的细胞循环途径仍不十分清楚。不同于不可逆的基因序列改变,表观遗传修饰通常是可逆的,这为人们通过药物干预病理状态下表观遗传修饰提供了可能性。高通量测序技术的快速出现和进展,便于集中研究DM及其并发症的表观遗传,必将为DM及其并发症的发病机制及防治策略带来新的思路和机遇。

参 考 文 献

- [1] Villeneuve LM, Natarajan R. The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299: F14-F25.
- [2] Pirola L, Balcerzyk A, Okabe J, et al. Epigenetic phenomena linked to diabetic complications[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2010, 6: 665-675.
- [3] Holliday R. Epigenetics: a historical overview[J]. *Epigenetics*, 2006, 1: 76-80.
- [4] Robertson KD. DNA methylation and human disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 597-610.
- [5] Clouaire T, Stancheva I. Methyl - CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin?[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 1509-1522.
- [6] Marmorstein R, Trievel RC. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1789: 58-68.
- [7] Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing[J]. *Mutat Res*, 2008, 659: 40-48.
- [8] Murr R. Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms[J]. *Adv Genet*, 2010, 70: 101-141.
- [9] El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia[J]. *J Exp Med*, 2008, 205: 2409-2417.
- [10] Jimenez - Chillaron JC, Isganaitis E, Charalambous M, et al. Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity

- by in utero undernutrition in mice[J]. *Diabetes*, 2009, 58: 460-468.
- [11] Pirola L, Balcerczyk A, Tothill RW, et al. Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells[J]. *Genome Res*, 2011, 21: 1601-1615.
- [12] 苏红, 周波. 转录共激活因子 p300 及表观修饰在高糖致人系膜细胞代谢记忆中的汇聚作用[J]. *解放军医学杂志*, 2013, 38: 173-179.
- [13] Siebel AL, Fernandez AZ, El - Osta A. Glycemic memory associated epigenetic changes. *Biochem Pharmacol*[J]. 2010, 80: 1853-1859.
- [14] Villeneuve LM, Reddy MA, Natarajan R. Epigenetics: deciphering its role in diabetes and its chronic complications[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011, 38: 401-409.
- [15] Reddy MA, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90: 421-429.
- [16] Stenvinkel P, Karimi M, Johansson S, et al. Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease?[J]. *J Intern Med*, 2007, 261: 488-499.
- [17] Sapienza C, Lee J, Powell J, et al. DNA methylation profiling identifies epigenetic differences between diabetes patients with ESRD and diabetes patients without nephropathy[J]. *Epigenetics*, 2011, 6: 20-28.
- [18] Miao F, Gonzalo IG, Lanting L, et al. In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 18091-18097.
- [19] Boekhoudt GH, Guo Z, Beresford GW, et al. Communication between NF - kappa B and Sp1 controls histone acetylation within the proximal promoter of the monocyte chemoattractant protein 1 gene[J]. *J Immunol*, 2003, 170: 4139-4147.
- [20] Reddy MA, Sumanth P, Lanting L, et al. Losartan reverses permissive epigenetic changes in renal glomeruli of diabetic db/db mice[J]. *Kidney Int*, 2014, 85: 362-373.
- [21] Yuan H, Reddy MA, Sun G, et al. Involvement of p300/CBP and epigenetic histone acetylation in TGF - beta1 - mediated gene transcription in mesangial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304: F601-F613.
- [22] Noh H, Oh EY, Seo JY, et al. Histone deacetylase-2 is a key regulator of diabetes - and transforming growth factor - beta1 - induced renal injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297: F729-F739.
- [23] Kaur H, Chen S, Xin X, et al. Diabetes induced extracellular matrix protein expression is mediated by transcription coactivator p300[J]. *Diabetes*, 2006, 55: 3104-3111.
- [24] Chen S, Feng B, George B, et al. Transcriptional coactivator p300 regulates glucose induced gene expression in endothelial cells[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298: E127 - E137.
- [25] Ma J, Phillips L, Wang Y, et al. Curcumin activates the p38MPAK - HSP25 pathway in vitro but fails to attenuate diabetic nephropathy in DBA2J mice despite urinary clearance documented by HPLC[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2010, 10: 67.
- [26] Francis J, Chakrabarti SK, Garmey JC, et al. Pdx - 1 links histone H3-Lys-4 methylation to RNA polymerase II elongation during activation of insulin transcription [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 36244-36253.
- [27] Li Y, Reddy MA, Miao F, et al. Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF - kappa B dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 26771-26781.
- [28] Sun G, Reddy MA, Yuan H, et al. Epigenetic histone methylation modulates fibrotic gene expression[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21: 2069-2080.
- [29] Keating S, El - Osta A. Transcriptional regulation by the Set7 lysine methyltransferase[J]. *Epigenetics*, 2013, 8: 361-372.
- [30] Marfella R, D'Amico M, Filippo C, et al. Increased activity of the ubiquitin - proteasome system in patients with symptomatic carotid disease is associated with enhanced inflammation and may destabilize the atherosclerotic plaque: effects of rosiglitazone treatment[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47: 2444-2455.
- [31] Liu L, Li Y, Tollefsbol TO. Gene - environment interactions and epigenetic basis of human diseases[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2008, 10: 25-36.
- [32] Ling C, Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2009, 58: 2718-2725.

(收稿日期:2013-08-19)

(本文编辑:王欣)