

· 综述 ·

糖尿病大血管病变的表观遗传学标志物

陈明云 李连喜

【摘要】 表观遗传学是指在不改变核苷酸序列的情况下,基因的表达活性发生了可遗传的变化,它包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、miRNA 等。表观遗传学在糖尿病大血管病变的发生、发展过程中发挥了重要的作用。近年来研究发现了一些反映糖尿病大血管病变的表观遗传学标志物,包括 LINE-1 甲基化、Alu 甲基化、DDAH2 启动子甲基化;Sirt1 与 SET7 等组蛋白修饰相关酶;miRNA-126、miRNA-21、miRNA-125b 等。随着表观遗传改变检测手段的改进,表观遗传学标志物有可能成为糖尿病大血管病变新的诊断手段。

【关键词】 糖尿病;大血管病变;表观遗传;生化标志物

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170759),上海市科学技术委员会资助项目(15411960600)

Epigenetic biomarkers of diabetic macrovascular complications Chen Mingyun, Li Lianxi. Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai Clinical Center for Diabetes, Shanghai Diabetes Institute, Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus, Shanghai 200233, China

Corresponding author: Li Lianxi, Email: lilx@sjtu.edu.cn

【Abstract】 Epigenetics are heritable traits that do not change DNA sequence, including DNA methylation, histone modification, and noncoding RNA action and so on. Epigenetics play an important role in the occurrence and development of diabetic macrovascular disease. Recently, a number of epigenetic biomarkers have been identified and used to reflex diabetic macrovascular complications, such as LINE-1 methylation, Alu methylation, methylation of DDAH2 promoter, Sirt1 and SET7 which take part in histone modification, miRNA-126, miRNA-21 and miRNA-125b, etc. With the improvement of detection of epigenetic changes, epigenetic biomarkers may become new diagnostic tools for diabetic macrovascular complications.

【Key words】 Diabetes mellitus; Macrovascular complications; Epigenetics; Biomarkers

Fund program: National Natural Science Foundation of China (811770759); Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (15411960600)

糖尿病大血管病变是糖尿病的主要并发症之一,主要表现为多部位的动脉粥样硬化,可能与高血糖的“代谢记忆”效应有关。高血糖“代谢记忆”是指糖尿病患者早期血糖控制不佳,即使之后有效控制血糖,仍较早期血糖控制良好患者更易发生脏器的损伤和血管并发症^[1]。近来的研究表明,高血糖“代谢记忆”可能与靶细胞的表观遗传学改变相关。随着一系列有效检测疾病表观遗传改变手段的出现,越来越多人意识到表观遗传学标志物是可行的疾病诊断手段。

1 表观遗传学概述

表观遗传学指在不改变核苷酸序列的情况下,基因表达活性发生了可遗传的变化^[2]。目前研究较充分的有 DNA 甲基化、组蛋白修饰和小分子 RNA(miRNA)。

DNA 甲基化是在胞嘧啶的脱氧核糖的 5-C 上加入甲基基团,多发生于 CG 双核糖核苷酸富集区域,即 CpG 岛,约占人类基因组的 40%^[3]。DNA 甲基化通常发生在基因的启动子区域,接近转录的起始位点,抑制了目标基因表达。

组蛋白修饰又称转录后修饰或“组蛋白密码”,通常发生在组蛋白 N 端尾部,在相关酶的作用下发生乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化及 SUMO 化等。组蛋白的乙酰化通常在乙酰化转移酶介导下发生在

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2016.02.015

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科,上海市糖尿病研究所,上海市糖尿病临床医学中心,上海市糖尿病重点实验室

通信作者:李连喜,Email:lilx@sjtu.edu.cn

赖氨酸残基,促进基因的转录;而组蛋白去乙酰化酶则起到移除乙酰化基团的作用,抑制基因转录。组蛋白的甲基化也发生在赖氨酸残基,与组蛋白乙酰化不同的是,其对基因转录的影响取决于修饰的残基位点,如 H3K9 与 H3K27 的甲基化与抑制 DNA 的表达相关,而 H3K4 的甲基化与活化 DNA 的表达相关。组蛋白 SUMO 化和组蛋白泛素化作用机制至今没有被阐明。

MiRNA 是内源性具有调控功能的非编码 RNA,通常由 DNA 的内含子编码,通过与目标 mRNA 的 3'非编码区相结合,介导基因表达的转录后调控,即通过介导转录沉默,抑制翻译及降解相关 RNA,进而抑制目标蛋白的表达。

2 糖尿病大血管病变相关表观遗传学标志物

2.1 DNA 甲基化 DNA 甲基化参与了多种疾病包括糖尿病及糖尿病大血管病变的发生、发展。目前,许多高效的检测手段如 DNA 甲基化芯片、全基因组亚硫酸氢盐测序等,为 DNA 甲基化作为诊断疾病发生的标志物提供了可能性^[4]。

约 55% 人类基因包含重复元件,其中包括近 500 000 个长散布核元件-1 (LINE-1) 重复序列,占基因组的 17%。它们是“反转位子”,这些流动的遗传元素首先被转录成 RNA,然后再被由该反转位子本身产生的一种逆向转录酶逆转录成 DNA。该 DNA 可在任何位置整合进基因组中。LINE-1 能高度代表正常组织中 DNA 甲基化水平,因此常被用来作为检测总 DNA 甲基化水平的标志物。Wei 等^[5]对中国人群外周血淋巴细胞研究发现,LINE-1 甲基化水平下降与心血管事件的发生高度相关,且和动脉粥样硬化独立危险因素同型半胱氨酸的升高高度相关。Greiβel 等^[6]研究发现,动脉粥样硬化斑块组织 LINE-1 甲基化水平显著低于正常动脉组织,且重度颈动脉狭窄患者血清中 LINE-1 甲基化也显著低于正常人。Martín-Núñez 等^[7]基于对西班牙人 (n = 155) 的队列研究发现,低 LINE-1 甲基化水平是糖尿病等代谢性疾病的独立危险因素,可作为评估糖尿病及其大血管病变的潜在生化标志物。然而, Pearce 等^[8]对英国纽卡斯尔千户研究 (Newcastle Thousand Families Study, NTFS) 分析发现,高甲基化 LINE-1 水平与患者空腹血糖、甘油三酯和低密度脂蛋白-胆固醇升高相关,与高密度脂蛋白-胆固醇水平降低相关,而这些都可作为预测 2 型糖尿病及心血管疾病发生的生化标志物。上述研究结果相悖可

能是因为研究所选取的细胞种类不同及伴随着衰老的过程,人体 DNA 甲基化水平下降,对研究结果造成干扰。但是,LINE-1 甲基化水平的变化作为糖尿病及心血管疾病的表观遗传学标志物却是毋庸置疑的。

Alu 重复序列同样可以作为评估 DNA 甲基化水平的可靠指标。由于这种 DNA 序列中有限制性内切核酸酶 Alu 的识别序列 AGCT,所以称为 Alu 重复序列。Kim 等^[9]评估 286 名志愿者外周血淋巴细胞 Alu 重复序列的水平,发现曾有心肌梗死、卒中、高血压及糖尿病病史的患者有更高的总 DNA 甲基化水平。同样这和患者血清中高同型半胱氨酸表达相关。因此,Alu 重复序列的甲基化水平也可作为评估糖尿病大血管病变潜在的表观遗传学标志物。

临床研究及动物实验都表明内皮细胞修复取决于内皮祖细胞 (EPCs),而高血压、高脂血症、冠心病、糖尿病等疾病状态都可损害 EPCs 功能。EPCs 可以用来评估血管功能及心血管风险。Niu 等^[10]对比冠心病患者与正常人的外周血 EPCs 的甲基化发现,冠心病患者的 EPCs 中调控二甲基精氨酸二甲氨水解酶 (DDAH2) 的基因启动子区呈高甲基化状态。且 DDAH2 mRNA 呈低水平表达,EPCs 黏附功能受损。非对称性二甲基精氨酸可抑制一氧化氮合酶发挥作用。DDAH2 可抑制非对称性二甲基精氨酸的作用,因此被视为动脉粥样硬化、糖尿病等相关血管性疾病的保护因子。因此 DDAH2 启动子高甲基化可能是继 LINE-1 和 Alu 之后又一潜在的评估相关糖尿病大血管病变的生化标志物。

2.2 组蛋白修饰 沉默信息调节因子相关酶类 1 (Sirt1) 是组蛋白去乙酰化酶之一,参与调控能量平衡、细胞周期、细胞凋亡、炎症反应与氧化应激等。Sirt1 能够降低糖尿病患者组蛋白乙酰化水平,并脱去与 Shc 相关磷酸化酪氨酸适配蛋白 (p66Shc) 及核因子- κ B p65 启动子相结合的 H3 组蛋白上乙酰化基团,而后者与氧化反应及炎症反应相关基因的上调相关^[11]。Paneni 等^[12]通过高糖刺激人主动脉内皮细胞,发现 H3 组蛋白发生高乙酰化,促进 p66 Shc 的高表达和活性氧簇的生成,提示其可能为诱导糖尿病大血管病变的作用机制,且这种影响在细胞恢复正常糖培养下并未消除,他们通过小鼠实验也同样验证了以上结论。Kim 等^[13]发现高糖刺激 THP-1 巨噬细胞,可增加组蛋白乙酰化转移酶的活性,催化核因子- κ B p65 的基因发生乙酰化,上调下

游白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子 α 等炎性因子的表达水平。Sirt1 还可改善内皮细胞的胰岛素抵抗、氧化应激状态,阻碍动脉粥样硬化发生、发展。动物水平研究发现,Sirt1 活化剂能改善胰岛素抵抗,增加动脉弹性。Sirt1 活化剂药物目前已经进入了 II a 期临床试验阶段,有望成为治疗糖尿病大血管病变的新型药物^[14]。

H3K9 的甲基化与调控自身免疫及炎症反应的基因密切相关。Greiβel 等^[6]发现,动脉粥样硬化斑块组织中 H3K9 甲基化水平显著低于正常动脉组织,且在颈动脉壁上平滑肌细胞与炎性细胞中表达水平也显著降低。抑制人平滑肌细胞 H3K9 甲基化转移酶 Suv39h1 的基因表达,可促进炎性因子的表达,同样在糖尿病 db/db 小鼠来源的平滑肌细胞也表现出单核细胞趋化蛋白 1 和白细胞介素-6 等炎性因子的表达水平上升,而 H3K9 甲基化水平下降与 H3K4 的甲基化水平增加相关^[15]。

SET7(也称作 SET9 或者 SET7/9)甲基化转移酶可催化 H3K4 发生单甲基化。SET7 在炎症反应过程中发挥正性调节作用。SET7 可上调核因子- κ B p65 在内皮细胞中的表达,并在内皮细胞的先天免疫过程中发挥重要作用^[16]。Okabe 等^[17]发现,高糖状态可刺激 SET7 在内皮细胞核内聚集,促进促炎因子基因的表达。Paneni 等^[18]发现,2 型糖尿病患者 SET7 表达水平显著高于正常人,且 SET7 高表达上调了核因子- κ B 的活化水平及核因子- κ B 下游的氧化应激及炎症反应相关的基因及血浆中细胞间黏附分子-1 与单核细胞趋化蛋白-1 的表达水平。给予人动脉内皮细胞高糖刺激可见到上述相似表现,而抑制 SET7 可以抑制 H3K4 发生单甲基化,并抑制核因子- κ B 依赖的氧化应激与炎症反应。SET7 可能是潜在的糖尿病大血管病变的诊疗靶标。

由于炎性因子在糖尿病大血管病变的发生中起着十分关键的作用,因此,细胞内组蛋白乙酰化水平及甲基化水平的变化有望成为预测糖尿病大血管病变发生的表观遗传学标志物。传统的基序检测与蛋白检测相结合的手段和生化技术,已能高效检测组蛋白甲基化。LANCE Ultra 和 AlphaLISA 等技术的发展与优化,显著提高了检测的灵敏度^[19]。组蛋白修饰作为潜在的生化标志物应用于临床指日可待。

2.3 MiRNA MiRNA 参与调控人类基因组中 1/3 ~ 2/3 的基因,参与细胞生长、增殖、分化、信号转导、凋亡、代谢与衰老等过程。并且 miRNA 可在血

液、尿液、唾液、泪液及乳汁中检测到,可作为有效的诊断标志物^[20]。

MiRNA-126 又被称为血管特异性 miRNA,只由内皮细胞内含子的表皮生长因子样结构域 7 编码,是调控动脉粥样硬化的重要因子。相关研究表明,miRNA-126 通过上调血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子的表达,下调血管内皮生长因子的抑制剂 Spred-1 的表达,促进心血管的生成,在保持血管的完整性及血管的生成中发挥重要作用^[21]。研究表明,糖尿病患者 EPCs 的数量减少且功能不全,而 EPCs 对内皮的再生极为重要。研究揭示,糖尿病患者 EPCs 的 miRNA-126 表达水平较对照组下降 ($P < 0.05$),并提出 EPCs 低表达的 miRNA-126 可能通过调控 Spred-1 损伤血管功能^[20]。Jansen 等^[22]则通过检测 176 例冠心病患者血液中 miRNA-126 微粒数量,发现合并糖尿病的患者 miRNA-126 的表达水平显著低于不合并糖尿病的患者。因此 miRNA-126 水平的变化有可能作为糖尿病大血管病变的表观遗传学标志物而应用于临床。

Fleissner 等^[23]研究表明,血液中有较高 ADMA 表达的冠状动脉粥样硬化患者 EPCs 的 miRNA-21 表达水平较对照组明显上升,而参与线粒体氧化防御反应的超氧化物歧化酶-2 的表达水平则显著下降。这可能激活细胞外信号调节激酶/丝裂原活化蛋白激酶通路,促进活性氧簇生成及血管 EPCs 迁移功能受损。Zeng 等^[24]同样发现糖尿病患者的 EPCs miRNA-21 表达水平较对照组明显增加。

此外,miRNA-125b 可以下调 Suv39h1 水平,抑制白细胞介素-6 和单核细胞趋化蛋白-1 启动子 H3K9 甲基化,进而促进大血管炎性反应的发生与动脉粥样硬化的形成^[25]。因此,miRNA-21 和 miRNA-125b 等 miRNA 都可能是潜在的糖尿病大血管病变的表观遗传标志物。

3 总结

糖尿病大血管病变是糖尿病致死、致残的主要原因。糖尿病高血糖“代谢记忆”提示早期控制血糖的重要性,因此我们亟需高效的糖尿病大血管病变的诊断指标。表观遗传学反映了环境对糖尿病大血管病变的影响,在糖尿病大血管病变的发生、发展中发挥了重要作用。因此我们希望能从中发现新的诊断和治疗的生化标志物,通过阐明表观遗传学的机制为疾病的预防和治疗提供新的方向。

参 考 文 献

- [1] Cencioni C, Spallotta F, Greco S, et al. Epigenetic mechanisms of hyperglycemic memory[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 51: 155-158. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.04.014.
- [2] Bird A. Perceptions of epigenetics [J]. *Nature*, 2007, 447 (7143): 396-398.
- [3] Dunn J, Qiu H, Kim S, et al. Flow-dependent epigenetic DNA methylation regulates endothelial gene expression and atherosclerosis[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124 (7): 3187-3199. DOI: 10.1172/JCI74792.
- [4] Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13 (10): 679-692. DOI: 10.1038/nrg3270.
- [5] Wei L, Liu S, Su Z, et al. LINE-1 hypomethylation is associated with the risk of coronary heart disease in Chinese population[J]. *Arq Bras Cardiol*, 2014, 102 (5): 481-488.
- [6] Greißel A, Culmes M, Napieralski R, et al. Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques[J]. *Thromb Haemost*, 2015, 114 (2): 390-402. DOI: 10.1160/TH14-10-0852.
- [7] Martín-Núñez GM, Rubio-Martín E, Cabrera-Mulero R, et al. Type 2 diabetes mellitus in relation to global LINE-1 DNA methylation in peripheral blood: a cohort study[J]. *Epigenetics*, 2014, 9 (10): 1322-1328. DOI: 10.4161/15592294.2014.969617.
- [8] Pearce MS, McConnell JC, Potter C, et al. Global LINE-1 DNA methylation is associated with blood glycaemic and lipid profiles[J]. *Int J Epidemiol*, 2012, 41 (1): 210-217. DOI: 10.1093/ije/dys020.
- [9] Kim M, Long TI, Arakawa K, et al. DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk[J]. *PLoS One*, 2010, 5 (3): e9692. DOI: 10.1371/journal.pone.0009692.
- [10] Niu PP, Cao Y, Gong T, et al. Hypermethylation of DDAH2 promoter contributes to the dysfunction of endothelial progenitor cells in coronary artery disease patients[J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 170. DOI: 10.1186/1479-5876-12-170.
- [11] Paneni F, Volpe M, Lüscher TF, et al. SIRT1, p66 (Shc), and Set7/9 in vascular hyperglycemic memory: bringing all the strands together[J]. *Diabetes*, 2013, 62 (6): 1800-1807. DOI: 10.2337/db12-1648.
- [12] Paneni F, Mocharla P, Akhmedov A, et al. Gene silencing of the mitochondrial adaptor p66 (Shc) suppresses vascular hyperglycemic memory in diabetes[J]. *Circ Res*, 2012, 111 (3): 278-289. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.266593.
- [13] Kim HJ, Kim SH, Yun JM. Fisetin inhibits hyperglycemia-induced proinflammatory cytokine production by epigenetic mechanisms[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 639469. DOI: 10.1155/2012/639469.
- [14] 许琼, 高鑫. SIRT1 对糖尿病大血管病变的改善作用研究进展[J]. *中国临床医学*, 2012, 19 (2): 183-186. DOI: 10.3969/j.issn.1008-6358.2012.02.035.
- [15] Keating ST, El-Osta A. Epigenetic changes in diabetes[J]. *Clin Genet*, 2013, 84 (1): 1-10. DOI: 10.1111/cge.12121.
- [16] Keating ST, Ziemann M, Okabe J, et al. Deep sequencing reveals novel Set7 networks[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71 (22): 4471-4486. DOI: 10.1007/s00018-014-1651-y.
- [17] Okabe J, Orłowski C, Balcerczyk A, et al. Distinguishing hyperglycemic changes by Set7 in vascular endothelial cells[J]. *Circ Res*, 2012, 110 (8): 1067-1076. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.266171.
- [18] Paneni F, Costantino S, Battista R, et al. Adverse epigenetic signatures by histone methyltransferase Set7 contribute to vascular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2015, 8 (1): 150-158. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000671.
- [19] Gauthier N, Caron M, Pedro L, et al. Development of homogeneous nonradioactive methyltransferase and demethylase assays targeting histone H3lysine 4[J]. *J Biomol Screen*, 2012, 17 (1): 49-58. DOI: 10.1177/1087057111416659.
- [20] Chien HY, Lee TP, Chen CY, et al. Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications[J]. *J Chin Med Assoc*, 2015, 78 (4): 204-211. DOI: 10.1016/j.jcma.2014.11.002.
- [21] Rawal S, Manning P, Katara R. Cardiovascular microRNAs: as modulators and diagnostic biomarkers of diabetic heart disease[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014, 13: 44. DOI: 10.1186/1475-2840-13-44.
- [22] Jansen F, Yang X, Hoelscher M, et al. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles[J]. *Circulation*, 2013, 128 (18): 2026-2038. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001720.
- [23] Fleissner F, Jazbutyte V, Fiedler J, et al. Short communication: asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microRNA-21-dependent mechanism[J]. *Circ Res*, 2010, 107 (1): 138-143. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.216770.
- [24] Zeng J, Xiong Y, Li G, et al. MiR-21 is overexpressed in response to high glucose and protects endothelial cells from apoptosis[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2013, 121 (7): 425-430. DOI: 10.1055/s-0033-1345169.
- [25] Kato M, Castro NE, Natarajan R. MicroRNAs: potential mediators and biomarkers of diabetic complications[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 64: 85-94. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.009.

(收稿日期: 2015-06-02)