

· 综述 ·

糖尿病肾病的表观遗传学机制

吴一鸣 杨震 秦利

【摘要】 表观遗传学是指 DNA 序列不发生变化的情况下基因表达发生的可遗传的改变。大量的研究发现,表观遗传机制参与调控糖尿病肾病的肾脏纤维化、足细胞凋亡、慢性炎症反应、氧化应激等各个病理生理过程。

【关键词】 糖尿病肾病;表观遗传学;调控

基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目(14ZR1427400)

Epigenetic mechanism of diabetic nephropathy Wu Yiming, Yang Zhen, Qin Li. Department of Endocrinology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Corresponding author: Qin Li, Email: qinli@medmail.com.cn

【Abstract】 Epigenetics refers to the heritable alteration of gene expression without the change of DNA sequence. Emerging evidence from research suggests a key role for epigenetic mechanisms in the regulation of physiological and pathological processes of diabetic nephropathy including renal fibrosis, podocyte apoptosis, chronic inflammation, oxidant stress and so on.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Epigenetics; Regulation

Fund program: Scientific Research Plan of Shanghai Science and Technology Committee(14ZR1427400)

糖尿病肾病(DN)是由糖尿病引起的肾脏微血管病变,在血糖控制理想的情况下,DN 的各个病理过程仍持续进展,这一现象被称为“代谢记忆”。大量的研究表明,表观遗传修饰可能是导致代谢记忆的潜在机制。本文重点从表观遗传学角度阐述 DN 的病理生理机制,为 DN 的靶向治疗提供新方向。

1 表观遗传学概述

表观遗传学是研究 DNA 序列不发生变化的情况下基因表达发生的可遗传的改变,表观遗传调控过程十分复杂,主要包括:DNA 甲基化、组蛋白修饰和微小 RNA(miRNA)干扰等。DNA 甲基化主要发生在基因启动子区的 CpG 岛,可导致基因沉默。组蛋白修饰主要发生在氨基末端,常见的组蛋白修饰包括甲基化、乙酰化等。组蛋白赖氨酸甲基化通常发生在组蛋白 H3 和 H4,形式有单甲基化、双甲基化和三甲基化。组蛋白赖氨酸 4/36/79 甲基化(H3K4me、H3K36me 及 H3K79me)可激活转录,而 H3K9me、H3K20me 及 H4K27me 抑制转录。组蛋白

乙酰化一般激活转录。非编码 RNA 包括长链非编码 RNA 和 miRNA,miRNA 能够通过和靶基因 3'端非翻译区结合,抑制靶基因表达或降解靶 mRNA。

2 表观遗传调控与 DN

2.1 表观遗传调控与肾脏纤维化 细胞外基质过度蓄积和肾小管上皮细胞上皮-间充质转分化是导致 DN 肾脏纤维化的主要原因。转化生长因子- β (TGF- β)信号通路在肾脏纤维化中发挥重要作用。

TGF- β 主要通过激活转录因子 Smad2~4,促进下游细胞外基质蛋白及其调控因子纤溶酶原激活物抑制因子-1(PAI-1)的表达,PAI-1 是抑制细胞外基质降解的主要物质。

RASAL1 基因主要编码 RAS 蛋白的抑制剂。研究发现,纤维母细胞中 RASAL1 基因高甲基化,RASAL1 表达下调,从而增加 RAS 的激活,导致细胞增殖和纤维化^[1]。胶原蛋白(COL)IV α 1、COLIV4 α 1/ α 2 是重要的肾小球基底膜蛋白。通过分析慢性肾病患者的肾组织样本,发现这些基因启动子区呈低甲基化状态,COLIV α 1、COLIV4 α 1/ α 2 分泌增加,基底膜增厚,符合肾脏纤维化的早期病理改变^[2]。DN 患者结缔组织生长因子(CTGF)基因启动子显著低甲基化状态导致 CTGF 高表达,促进肾

脏纤维化^[3]。

体外实验表明,高糖导致TGF- β 增加,TGF- β 诱导系膜细胞中PAI-1、COL I α 1 和 CTGF 高表达,伴随这些基因启动子区 H3K4me1/2/3 水平升高, H3K9me2/3 水平下降^[4]。在高糖干预的鼠系膜细胞中,TGF- β 通过招募组蛋白乙酰基转移酶p300/cAMP反应元件结合蛋白(p300/CBP)至PAI-1和细胞周期抑制因子 p21 基因启动子区,从而增加Smad和 SP1 结合位点的H3K9/14乙酰化(H3K9/14ac)水平,从而使PAI-1、p21 高表达,细胞外基质降解减少。

在肾小球系膜细胞中上调的 miRNA-192、miRNA-200b/c,通过下调增强子的抑制物锌指 E 盒结合蛋白 1/2,上调 COL I α 2 / COL IV α 1 表达^[5]。miRNA-216a通过抑制人 Y-框结合蛋白 1,使TGF- β 诱导基因 22 表达增加, COL I α 2 生成增多^[6]。Smad7是Smad3依赖的 TGF- β 信号通路的抑制剂,在鼠近端肾小管上皮细胞中,miRNA-21过表达可抑制Smad7表达,从而上调下游细胞外基质相关基因表达^[7]。miRNA-26a通过直接抑制靶基因CTGF,减少TGF- β 诱导的细胞外基质表达。研究发现,在高糖培养的人足细胞中,miRNA-26a表达下调^[8]。在高糖状态下的足细胞中,miRNA-93表达下调,导致其靶基因血管内皮生长因子-A 表达上调,足细胞分泌血管内皮生长因子-A 增多,增加下游COL IV α 3和纤连蛋白 1 表达。miRNA-192/215、miRNA-200 家族/miRNA-205通过下调 E-钙黏素的转录抑制子锌指 E 盒结合蛋白 1/2,导致 E-钙黏素表达上调,减弱肾小管上皮细胞上皮-间充质转分化过程。研究表明,在 DN 肾脏中上述 miRNA 水平降低^[9-10]。miRNA-23b通过作用于靶基因高迁移率族蛋白 A2,抑制磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路激活,从而减弱肾小管上皮细胞上皮-间充质转分化过程,使糖尿病鼠肾组织中miRNA-23b表达下调^[11]。

浆细胞瘤易位变异 1 (PVT1) 是迄今发现的唯一一个与 DN 相关的长链非编码RNA。在高糖处理的人系膜细胞中,PVT1 表达显著上调,伴随纤连蛋白 1、COL IV α 1、TGF- β 和PAI-1表达上调。敲除PVT1 基因显著降低细胞外基质蛋白水平及其调节因子TGF- β 和PAI-1的水平。表明PVT1通过介导细胞外基质的产生,促进 DN 的发展^[12]。

2.2 表观遗传调控与足细胞损伤 蛋白尿是 DN 的标志性表现,足细胞是肾小球滤过屏障的重要组

成部分,足细胞减少是导致蛋白尿的重要原因。足细胞足突间的裂孔隔膜主要由nephrin和podocin蛋白构成。Nephrin 由 NPHS1 基因编码, podocin 由 NPHS2编码。

Kruppel 样因子 4 (KLF4) 在保护足细胞完整性中具有重要作用。研究发现, DN 患者转录因子 KLF4的水平降低。KLF4能与特定反应元件结合导致nephrin基因启动子区低甲基化和H3K9乙酰化,使nephrin生成增多。正常情况下KLF4与NPHS1基因启动子区结合,从而阻止甲基转移酶DNMT1结合到启动子区,使NPHS1低甲基化,激活转录。高糖状态可活化肾素-血管紧张素系统,使血管紧张素 II 形成增多,下调KLF4的表达,导致DNMT1与NPHS1启动子结合,使其高甲基化,基因沉默,nephrin合成减少,裂孔隔膜破坏,出现蛋白尿^[13]。Neph1 ~ 3 是nephrin的同源蛋白,研究发现,编码Neph3和Neph1的基因启动子区 DNA 高甲基化导致基因沉默。高糖状态下,近端肾小管中低水平的组蛋白去乙酰化酶Sirt1可导致足细胞中Sirt1的低活动状态,紧密连接蛋白claudin1基因启动子区H3/H4ac水平升高而H3K9me2水平降低, claudin1 高表达,进而激活 β -catenin-snail通路,下调膜蛋白podocin和突触极蛋白的表达,促进足细胞凋亡^[14]。细胞信号转导与转录激活因子 1 (STAT1) 能调控细胞内的自噬,高糖引起组蛋白去乙酰化酶 4 高表达,STAT1基因去乙酰化使STAT1生成减少,足细胞内基本的自噬活动下降引起足细胞损伤,而组蛋白去乙酰化酶 4 基因敲除可修复足细胞的自噬功能^[15]。

实验表明,高表达的miRNA-29c通过降低软脂酰化磷蛋白同源物 1 的表达,激活Rho激酶,引起足细胞凋亡。足细胞通过 $\alpha_3\beta_1$ 整合素与基底膜紧密黏附,研究发现,miRNA-124作用于该靶基因,导致机械应力下足细胞的黏附损伤。上调的miRNA-195通过降低 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白水平激活 caspase 3,促进足细胞凋亡。miRNA-34c通过作用于靶基因Notch1和Jagged1,抑制Notch信号通路激活,减少DN足细胞凋亡,研究发现,在高糖培养的足细胞中miRNA-34c水平下降^[16]。

2.3 表观遗传调控与肾脏炎症反应 DN 时肾脏血管发生了慢性炎症改变,表现为巨噬细胞渗透和炎症因子基因表达增加。核因子- κ B是一个调控炎症因子基因表达的重要转录因子。采用小分子RNA干扰技术沉默单核细胞组蛋白甲基转移酶

SET7/9 基因,能减少核因子- κ B 依赖的炎性因子基因如单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6 的表达,伴随这些基因启动子区 H3K4me 水平降低。高糖培养的人微血管内皮细胞中,核因子- κ B p65 基因启动子区 H3K4me 水平升高, H3K9me 水平下降, p65 表达上调,进而增加 IL-6 和 TNF- α 的表达^[17]。在血管内皮细胞中,高糖干预导致 p65 启动子区 H3K4me 水平升高, p65 表达增多,作为重要的转录因子促进 MCP-1、血管细胞黏附分子表达。在糖尿病小鼠平滑肌细胞中, IL-6、巨噬细胞集落刺激因子、MCP-1 的基因启动子区 H3K9me 水平降低, IL-6、巨噬细胞集落刺激因子、MCP-1 表达上调^[18]。高糖导致人血管内皮细胞中重组人血红蛋白加氧酶 1、细胞间黏附分子、IL-8 基因启动子区 H3K4me 水平升高,促进转录^[19]。在糖尿病 OVE26 小鼠肾脏中,环氧合酶 2 和 MCP-1 表达增多伴随基因启动子区 H3K27me 水平下降。组蛋白乙酰化也参与了核因子- κ B 信号通路的炎性反应机制。在高糖干预的活体单核细胞中,用染色质免疫共沉淀试验 ChIP 分析发现,高糖招募核因子- κ B p65、p300/CBP 至 TNF- α 和环氧合酶-2 的启动子区,导致启动子区 H3K9/14ac、H4K5/8/12ac 水平升高, TNF- α 和环氧合酶 2 表达上调。

在糖尿病小鼠中,过表达的 miRNA-125b 通过下调组蛋白甲基转移酶 Suv39h1 的表达导致 MCP-1、IL-6 启动子区 H3K9me3 水平降低,促进转录^[20]。新近研究发现,miRNA-146a 在炎性反应信号通路中起负反馈调节作用,在链脲佐菌素诱导的 1 型糖尿病大鼠肾脏中 miRNA-146a 表达上调,进而下调巨噬细胞中 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 表达,表明 miRNA-146a 在 DN 中具有抗炎作用^[21]。以上研究表明,高糖可通过诱导炎性基因发生表观遗传修饰来调控 DN 慢性炎性反应。

2.4 表观遗传调控与氧化应激

氧化应激反应增强、活性氧簇产生增多在 DN 发生、发展中起重要作用。研究发现,高糖可导致氧化还原酶 Src 同源区 2 结构域蛋白 C 基因编码蛋白 P66 (P66shc) 基因启动子区低甲基化,并且高糖可通过增加组蛋白乙酰化酶合成通用控制蛋白 5 的活性导致启动子区 H3K9 乙酰化,从而促进 P66shc 基因转录,上调 P66shc 表达,而 P66shc 能使活性氧簇生成增加,引起足细胞氧化应激损伤^[22]。

超氧化物歧化酶 (SOD) 作为重要的抗氧化酶,

是机体内清除氧自由基的首要物质。研究表明,高糖可招募转甲基酶 Suv420h2 及组蛋白去甲基化酶 LSD1 至 SOD2 基因启动子区。Suv420h2 导致启动子区 H4K20me3 水平升高,而 LSD1 导致 H3K4me1/2 水平下降,从而抑制 SOD2 基因转录,使其表达下调^[23]。

在实验性 DN 模型中,下调的 miRNA-25 可导致 NADPH 氧化酶 4 表达上调,促进肾脏氧化应激损伤。研究发现,解耦联蛋白 2 是活性氧簇的负调节因子,在自发性卒中型高血压鼠肾系膜细胞中 miRNA-24 和 miRNA-34a 作用于解耦联蛋白 2,导致基因沉默,活性氧簇产生增加^[24]。

综上所述, DN 的发病机制比较复杂,本文主要从表观遗传修饰方面分析 DN 的各个病理生理过程,包括肾脏纤维化、足细胞凋亡、慢性炎性反应、氧化应激等。表观遗传修饰是一个可逆转的过程,因此,研究 DN 的表观遗传学机制,可为其预防和治疗提供新的靶点和方向。

参 考 文 献

- [1] Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney [J]. Nat Med, 2010, 16 (5): 544-550. DOI: 10.1038/nm.2135.
- [2] Ko YA, Mohtat D, Suzuki M, et al. Cytosine methylation changes in enhancer regions of core pro-fibrotic genes characterize kidney fibrosis development [J]. Genome Biol, 2013, 14 (10): R108. DOI: 10.1186/gb-2013-14-10-r108.
- [3] Zhang H, Cai X, Yi B, et al. Correlation of CTGF gene promoter methylation with CTGF expression in type 2 diabetes mellitus with or without nephropathy [J]. Mol Med Rep, 2014, 9 (6): 2138-2144. DOI: 10.3892/mmr.2014.2067.
- [4] Sun G, Reddy MA, Yuan H, et al. Epigenetic histone methylation modulates fibrotic gene expression [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21 (12): 2069-2080. DOI: 10.1681/ASN.2010060633.
- [5] Kato M, Arce L, Wang M, et al. A microRNA circuit mediates transforming growth factor- β 1 autoregulation in renal glomerular mesangial cells [J]. Kidney Int, 2011, 80 (4): 358-368. DOI: 10.1038/ki.2011.43.
- [6] Kato M, Putta S, Wang M, et al. TGF- β activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN [J]. Nat Cell Biol, 2009, 11 (7): 881-889. DOI: 10.1038/ncb1897.
- [7] McClelland AD, Herman-Edelstein M, Komers R, et al. miR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7 [J]. Clin Sci (Lond), 2015, 129 (12): 1237-1249. DOI: 10.1042/CS20150427.
- [8] Koga K, Yokoi H, Mori K, et al. MicroRNA-26a inhibits TGF- β -induced extracellular matrix protein expression in podocytes by targeting CTGF and is downregulated in diabetic nephropathy [J]. Diabetologia, 2015, 58 (9): 2169-2180. DOI: 10.1007/

- s00125-015-3642-4.
- [9] Wang B, Herman-Edelstein M, Koh P, et al. E-cadherin expression is regulated by miR-192/215 by a mechanism that is independent of the profibrotic effects of transforming growth factor-beta [J]. *Diabetes*, 2010, 59(7):1794-1802. DOI: 10.2337/db09-1736.
- [10] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5):593-601. DOI:10.1038/ncb1722.
- [11] Liu H, Wang X, Liu S, et al. Effects and mechanism of miR-23b on glucose-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic nephropathy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 70:149-160. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.11.016.
- [12] Alvarez ML, DiStefano JK. Functional characterization of the plasmacytoma variant translocation 1 gene (PVT1) in diabetic nephropathy [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):e18671. DOI:10.1371/journal.pone.0018671.
- [13] Hayashi K, Sasamura H, Nakamura M, et al. Renin-angiotensin blockade resets podocyte epigenome through Kruppel-like factor 4 and attenuates proteinuria [J]. *Kidney Int*, 2015, 88(4):745-753. DOI:10.1038/ki.2015.178.
- [14] Hasegawa K, Wakino S, Simic P, et al. Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes [J]. *Nat Med*, 2013, 19(11):1496-1504. DOI:10.1038/nm.3363.
- [15] Wang X, Liu J, Zhen J, et al. Histone deacetylase 4 selectively contributes to podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2014, 86(4):712-725. DOI: 10.1038/ki.2014.111.
- [16] Liu XD, Zhang LY, Zhu TC, et al. Overexpression of miR-34c inhibits high glucose-induced apoptosis in podocytes by targeting Notch signaling pathways [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5):4525-4534.
- [17] Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, et al. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail [J]. *Diabetes*, 2009, 58(5):1229-1236. DOI: 10.2337/db08-1666.
- [18] Villeneuve LM, Reddy MA, Lanting LL, et al. Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(26):9047-9052. DOI: 10.1073/pnas.0803623105.
- [19] Okabe J, Orlowski C, Balcerzyk 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.
- [20] Villeneuve LM, Kato M, Reddy MA, et al. Enhanced levels of microRNA-125b in vascular smooth muscle cells of diabetic db/db mice lead to increased inflammatory gene expression by targeting the histone methyltransferase Suv39h1 [J]. *Diabetes*, 2010, 59(11):2904-2915. DOI: 10.2337/db10-0208.
- [21] Bhatt K, Lanting LL, Jia Y, et al. Anti-Inflammatory role of microRNA-146a in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(8):2277-2288. DOI: 10.1681/ASN.2015010111.
- [22] 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.
- [23] Zhong Q, Kowluru RA. Epigenetic modification of Sod2 in the development of diabetic retinopathy and in the metabolic memory: role of histone methylation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(1):244-250. DOI: 10.1167/iovs.12-10854.
- [24] Di Castro S, Scarpino S, Marchitti S, et al. Differential modulation of uncoupling protein 2 in kidneys of stroke-prone spontaneously hypertensive rats under high-salt/low-potassium diet [J]. *Hypertension*, 2013, 61(2):534-541. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00101.

(收稿日期:2016-01-23)

《国际内分泌代谢杂志》第三届编委会名单

总 编 辑 方佩华

副总编辑 冯 凭 矫叔华 曾正陪 陈祖培

顾 问 陈家伦 史轶蘩 潘长玉

编 委(按姓氏笔画排列):

于德民 王 坚 邓华聪 宁 光 白悦心 吴从愿 李光伟 李江源 李秀钧 杨文英 杨立勇
 杨明功 邱明才 邹大进 单忠艳 周智广 孟迅吾 林丽香 罗 敏 施秉银 胡 玲 胡仁明
 项坤三 倪安民 徐焱成 贾伟平 高 妍 高 硕 高 鑫 傅祖植 程 桦 董砚虎 廖二元
 谭 建 樊继援

本刊编辑部