

动脉粥样硬化 DNA 异常甲基化研究进展

余小平, 张媛 综述; 凌文华 审校

(中山大学公共卫生学院营养系, 广东省广州市 510080)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; DNA 甲基化; 甲基转移酶

[摘要] 动脉粥样硬化是严重危害人类健康的血管疾病, 其发病机制较为复杂, 迄今为止提出了多种病源学说, 但具体原因尚未完全阐明。近年来, 遗传物质 DNA 甲基化这一基因组表遗传修饰现象作为基因表达沉默的重要机制逐渐被人们认识, 基因组表遗传修饰导致动脉粥样硬化相关基因转录失调在动脉粥样硬化形成过程中扮演重要角色。研究发现动脉粥样硬化形成过程中基因 DNA 甲基化谱变化的一个显著特点是整体基因组的低甲基化与部分特异基因启动子 CpG 岛的高甲基化并存。本文简述了近年来动脉粥样硬化形成过程中 DNA 异常甲基化的研究进展, 为阐明动脉粥样硬化的形成机制及预防和治疗提供理论依据。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)位居人类疾病谱的首位, 包括心脑血管和外周血管动脉粥样硬化, 高脂高糖等不合理膳食, 不良的生活习性, 机体患有高血糖、高血压、胰岛素抵抗、高脂血症等都是其发病的危险因素^[1]。一个半世纪以来人们先后提出了脂质浸润学说、平滑肌细胞增殖学说、血栓源学说、血流动力学说以及损伤反应学说等, 但是这些学说都不能对 As 的发生发展机制提供较为满意的解释。DNA 甲基化是一种从遗传中获得的使 DNA 发生甲基化学修饰的基因组表遗传修饰调控过程。已有研究资料表明在 As 的形成过程中 DNA 甲基化的特点是整个基因组中 5 甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5-MC)百分比减少, 而特异基因启动子区 CpG 岛甲基化位点增加^[2]。本文就 As 中 DNA 甲基化相关内容作一综述。

1 DNA 甲基化

基因组表遗传修饰包括 DNA 的甲基化修饰和组蛋白脱乙酰基修饰。DNA 甲基化是指 DNA 复制后在 CpG 岛序列内的 5' 胞嘧啶被甲基修饰, 导致 DNA 结合蛋白与 DNA 主螺旋沟的结合能力降低, 从而在不改变基因结构的基础上抑制基因的转录。DNA 甲基化主要参与机体正常生长, X 染色体失活及寄生性 DNA 序列的抑制^[2]。

1.1 DNA 甲基化供体

现已研究表明蛋氨酸代谢中间产物 S 腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)是体内大多数 DNA 甲基化供体, 其参与的转甲基反应超过 100 个。蛋氨酸在 ATP 作用下由蛋氨酸腺苷转移酶(methionine adenosyltransferase, MAT)催化生成 SAM, SAM 在甲基转移酶(methyltransferases, MT)作用下, 将甲基转移至甲基受体时自身转变成 S 腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)。现已研究表明胞内甲基受体主要有 DNA、RNA、磷脂、蛋白质、组蛋白、神经递质及儿茶酚胺类等。在生理条件下, SAH 被 SAH 水解酶(S-adenosylhomocysteine hydrolase, SAHH)以可逆方式水解为同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)和腺苷。营养缺乏或先天性代谢紊乱可以导致 Hcy 以及 SAH 升高, 产生高半胱氨酸血症(Hyperhomocysteinemia, HHcy), HHcy 与阻塞性血管疾病的发生密切相关^[3]。Caudill 等^[4]结合遗传和膳食方法对大鼠的研究发现体内 SAM/SAH 的比率可能是机体 DNA 甲基化的生物标志物。但 Rita 等^[5]在测定 17 个患有心血管疾病的病人空腹血浆总 Hcy、SAH 和白细胞甲基化时却发现 DNA 甲基化和 SAM/SAH 的比率无关, 其原因不明。

1.2 DNA 甲基转移酶

催化 DNA 甲基化这一过程的酶是 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT), 目前已发现了 3 类: DNMT1、DNMT2 和 DNMT3a/DNMT3b。DNMT1 主要功能是维持 DNA 甲基化, 其活性的高低是影响 DNA 甲基化水平的重要因素^[6]; DNMT2 可与 DNA 特异位点结合, 但具体作用尚不清楚; 而 DNMT3 主要参与 DNA 的从头甲基化。另外根据转甲基酶作用底物分为维持甲基转移酶和重头甲基转移酶。DNMT 催化的转甲基反应详细过程至今不是十分清楚。据现有资料提示其过程可能为 DNMT 识别胞嘧啶并把它转移到甲基转移酶的催化袋, 与酶催化结构域中的半胱氨酸形成共价键, 胞嘧啶的 5 位被激活, 然后 SAM 的甲基在酶作用下转移到胞嘧啶的 5 位^[7]。可见, DNMT 在 DNA 甲基化过程中发挥了关键性作用。因此对 DNMT 活性部分的抑制导致 DNA 甲基化的改变有可能成为许多疾病治疗的靶点。

[收稿日期] 2005-01-05

[修回日期] 2006-01-06

[基金项目] 国家自然科学基金(30371215); 中国博士后科学基金(2005037174)

[作者简介] 余小平, 讲师, 在站博士后, 主要研究方向为营养与心血管疾病; 原工作单位为第三军医大学营养与食品卫生学教研室; 联系电话 020-87333726(办), 020-80975108(小灵通); E-mail 为 yuxiaoping2005@sina.com。凌文华, 教授, 博士研究生导师, 研究方向营养与慢性疾病, 曾获国家杰出青年基金、国家自然科学基金和多项省、部级基金的资助, 发表 SCI 文章 20 余篇。联系电话 020-87331597(办), 13802980289(手机), E-mail 为 whling@gzsums.edu.cn。

2 动脉粥样硬化与基因组低甲基化

现有资料充分表明 As 形成过程中整体基因组发生低甲基化。早在 1930~1932 年间 Bunting 和 Best 等人首次把异常甲基代谢和疾病发生联系起来。在 1969 年, Kilmer McCully 对蛋氨酸先天性代谢紊乱儿童的研究发现蛋氨酸脱甲基产物即 Hcy 的升高是 As 的早期事件, 并提出 Hcy 是 As 的一个独立危险因素。直到 1990 年, 人们进一步发现膳食甲基缺乏可以导致体内甲基供体不足以及 DNA 和特殊基因的异常甲基化, 同时也表明亚甲基四氢叶酸还原酶(负责 Hcy 再甲基化的还原酶)的失活与增加 As 风险、神经紊乱、出生缺陷等病理现象有关。从此以后, 对 DNA 甲基化和甲基代谢方面的研究迅速增加, 发现基因组 DNA 异常甲基化可能与多种疾病的发生相关, 特别是参与年龄相关慢性疾病(包括 As 和肿瘤)形成过程。As 斑块形成过程中动脉中膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)发生迁移和增殖是中心事件^[8]。Hiltunen 等^[9]对严重 As 病变患者和载脂蛋白 E 基因敲除鼠的研究表明该中心事件的关键环节是基因组 CpG 岛发生低甲基化, 整体基因组 5-MC 百分含量明显减少。另外在对大鼠和兔 As 病变中的研究资料也发现 MT mRNA 表达下降, 基因组出现低甲基化, 提示基因组低甲基化可能影响 As 病变中相关基因表达。Rita 等^[5]的临床对照研究也表明 As 患者血浆中总 Hcy、SAH 明显升高的同时, 基因组 DNA 呈现低甲基化。最近 Lund 等^[10]采用 DNA 指纹法、体外甲基接受分析、5-MC 定量分析等多种技术相结合对载脂蛋白 E 缺陷小鼠 As 动物模型研究综合表明基因组低甲基化现象出现在 As 病理表现之前, 提示基因组低甲基化可能是 As 形成的早期标志物, 且也可能是 As 发生的原因。可见, 基因组 DNA 的低甲基化与 As 的形成密切相关。

3 动脉粥样硬化与特异基因 DNA 异常甲基化

在 As 发生发展中对特异基因启动子甲基化的研究较少, 目前只有对雌激素受体(estrogen receptor, ER)、细胞外超氧化物歧化酶(extracellular superoxide dismutase, EC-SOD)及抑癌基因 p53 等少数几个基因的报道。

3.1 雌激素受体基因

雌激素受体(estrogen receptor, ER)属于核受体家族, 人们相继发现 ER 有 ER- α 和 ER- β 两个亚型。人类 ER- α 基因在 6 号染色体 6q25.1, ER- β 基因位于 14 号染色体 14q22-24 区, 编码蛋白分别为 595 和 48 个氨基酸, 分子量分别为 66 kDa 和 54.2 kDa。ER α 和 ER β 在分子结构上极其相似, 在功能上二者既独立作用又相互依赖, 在组织学分布上也各有侧重^[11]。Kortelainen 等^[12]用 ER 的单克隆抗体检测发现绝经前女性中患有明显 As 者其表达降低, 提示 ER 基因表达沉默与 As 形成有明显的相关性。Post 等^[13]的研究表明 As 患者右心房 ER- α 基因甲基化增加, 斑块比邻近正常动脉 ER- α 基因甲基化也显著增加, 而对体外培养人动脉内皮细胞的检测结果却发现 ER- α 基因甲基化却保持较低。另外, 对离体培养动脉 SMC(与 As 斑块中 SMC 有相似的表现型)的研究发现 ER- α 基因甲基化水平也较高(19%~99%), 从而提示血管组织中

ER- α 基因发生甲基化致其表达失活在 As 形成和血管系统老化中发挥重要作用。由此可见, 在 As 形成过程中 ER- α 基因产生高甲基化。

3.2 细胞外超氧化物歧化酶基因

细胞外超氧化物歧化酶(extracellular superoxide dismutase, EC-SOD)是 Marklund 在 1982 年发现的一种糖蛋白, 主要由血管 SMC 和巨嗜细胞产生, 释放到细胞外后与细胞表面的硫酸乙酰肝素结合。研究表明体内 70% SOD 的活性都由 EC-SOD 执行, 其最重要的功能是防止胞内蛋白、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)以及一氧化氮(nitric oxide, NO)等分子被超氧阴离子氧化。NO 是促进血管 EC-SOD 表达的主要调节因子, NO 供体可明显诱导 SMC 表达 EC-SOD。研究发现在内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)基因敲除的小鼠中血管内皮细胞产生 NO 减少, 可导致 EC-SOD 水平降低。另外, EC-SOD 还受肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和 Hcy 负性调节^[14]。

近来研究表明, 在 As 发生过程中 EC-SOD 基因启动子发生低甲基化。采用生物化学和原位杂交技术研究发现在 As 形成早期, 动脉壁内 EC-SOD mRNA 表达和酶活性增加, 这种表达增高使胞外超氧阴离子含量下降, 从而阻止超氧阴离子的有害损伤。Laukkanen 等^[15]以遗传性高脂血症兔(WHL)为 As 动物模型, 采用甲基特异 PCR 法检测到 As 动脉弓中 EC-SOD 基因启动子 CpG 二核苷酸甲基化明显减少, 整体基因组 5-MC 百分含量也减少, 提示 EC-SOD 基因低甲基化影响其转录表达, 这可能与 As 发生有关。

3.3 P53 基因

人类 P53 基因定位于 17p13, 全长 20 kb, 含 11 个外显子, 其表达产物 P53 蛋白含有 393 个氨基酸残基。该基因广泛存在于各种正常组织中, 一方面能通过诱导 P21 转录, 抑制细胞周期调节蛋白及其激酶的活性, 细胞分裂被阻止在 G(1)期; 另一方面 P53 还能诱导促凋亡蛋白 Bax 表达, 促进细胞凋亡, 故 P53 基因被称为抑癌基因。但近年来有研究资料提示 p53 基因发生高甲基化与 As 形成密切相关^[12,9]。Guevara 等^[16]研究发现 P53 基因敲除小鼠的胚胎纤维原细胞较野生型有更高的增殖率, 若将 P53 基因和载脂蛋白 E 基因双敲除小鼠和载脂蛋白 E 基因单敲除小鼠饲以 21% 高脂膳食, 观察到双基因敲除小鼠中 As 损伤明显增加 50~100%, 进一步检测发现细胞增殖能力增强, 但凋亡率并不减少, 提示 p53 也能通过抑制细胞增殖发挥抗 As 效应。Mayr 等^[17]利用自体颈静脉移植或腔静脉移植到颈静脉建立的血管硬化鼠模型, 发现 P53 基因缺失小鼠(P53^{-/-})静脉移植体新内膜增生比野生型对照组增加 2 倍, 凋亡率减少, 新内膜中 SMC 的 P53 表达增加, SMC 有较高的增殖率和迁移率, 提示 P53 基因表达沉默易化 SMC 增殖及抗凋亡从而加速新内膜形成。但是, Rodriguez Campos 等^[18]以培养猪动脉中膜 SMC 的研究结果发现 p53 蛋白和 mRNA 的表达完全下调, 且发现该抑制效应并不是 p53 基因启动子的甲基化介导。由此看来, As 形成过程中 p53 基因沉默是不是由 DNA 启动子的高甲基化所致有待进一步研究。

4 结语

尽管人们对 DNA 甲基化的研究在肿瘤方面取得进展较快,但对 As 时 DNA 甲基化研究才刚刚开始。现有资料充分表明在 As 形成过程中 DNA 的异常甲基化是早期事件,也可能是 As 形成的主要原因,但仍有许多问题尚不清楚: ①DN-MT 的表达变化、影响因素及调节机制是什么? ②DNA 启动子发生甲基化的具体过程怎样? ③As 形成过程中哪些基因发生了高甲基化? 哪些基因表现为低甲基化? ④整个基因组表现为低甲基化而部分特异性基因却表现为高甲基化,其产生的具体原因是什么? 或许这些问题的解决有助于我们进一步明白 As 发生发展的机制。

[参考文献]

- [1] Klein L, Gheorghiade M. Coronary artery disease and prevention of heart failure [J]. *Med Clin North Am*, 2004, **88** (5): 1 209-235
- [2] Dong CM, Yoon WH, Goldschmidt-Clermont PJ. DNA methylation and atherosclerosis[J]. *J Nutr*, 2002, **132** (8): 2 406-409
- [3] 董剩勇, 舒茂琴. 高同型半胱氨酸血症与心血管疾病的研究进展[J]. *临床心血管病杂志*, 2005, **21** (2): 123-125
- [4] Caudill MA, Jennie C. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine β -synthase heterozygous mice[J]. *J Nutr*, 2001, **131** (11): 2 811-818
- [5] Rita C, Isabel R, and Eduard A. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease[J]. *Clin Chem*, 2003, **49** (8): 1 292-296
- [6] Chen T, Li E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2004, **60** (1): 55-89
- [7] Hemann A, Gowher H, and Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, **61** (19): 2 571-587
- [8] Loktionov A. Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases[J]. *J Nutr Biochem*, 2003, **14** (8): 426-451
- [9] Hiltunen MO, Ylä-Herttuala S. DNA methylation, smooth muscle cells, and atherogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (10): 1 750-753
- [10] Lund G, Andersson L, Lauria M, Lindholm M, Fraga MF, Villar-Garea A, et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E[J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (28): 29 147-154
- [11] 孙明晓, 郭立新, 周迎生, 李慧, 王晓霞, 潘琦, 等. 男性及绝经后女性雌激素受体基因多态性与糖尿病大血管病变的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 189-193
- [12] Kortelainen ML, Huttunen P. Expression of estrogen receptors in the coronary arteries of young and premenopausal women in relation to central obesity[J]. *Int J Obes Relat Metab Dis*, 2004, **28** (4): 623-627
- [13] Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, et al. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system[J]. *Cardiovasc Res*, 1999, **43** (4): 985-991
- [14] Shurr ichi NH, Hiromi T. Hyperhomocysteinemia is associated with human coronary atherosclerosis through the reduction of the ratio of endothelium bound to basal extracellular superoxide dismutase[J]. *Circ J*, 2004, **68** (9): 822-828
- [15] Laukkanen MO, Mannermaa S, Hiltunen MO, Aittomäki S, Airenne K, Janne J, et al. Local hypomethylation in atherosclerosis found in rabbit e-cadherin gene[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (9): 2 171-178
- [16] Guevara NV, Kim HS, Antonova EI, Chan L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo[J]. *Nat Med*, 1999, **5** (3): 335-339
- [17] Mayr U, Mayr M, Li CH, Wernig F, Dietrich H, Hu Y, et al. Loss of p53 accelerates neointimal lesions of vein bypass grafts in mice[J]. *Circ Res*, 2002, **90** (2): 197-201
- [18] Rodríguez-Campos A, Ruiz-Enríquez P, Faraudo S, Badimon L. Mitogen-induced p53 downregulation precedes vascular smooth muscle cell migration from healthy tunica media and proliferation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (2): 214-219

(此文编辑 胡必利)

读者·作者·编者

关于汉字文稿中名词术语使用英文缩写词的规定

当一个多汉字的名词术语在汉字文稿中反复出现时,作者往往喜欢用一个英文缩写词来代替;这样做,既节省篇幅,又避免繁琐重复,为多数期刊所称颂,我刊亦不例外。然而在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的英文缩写时存在以下问题: 同一个英文名词术语,译成的汉文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有的译为衍化,还有的译成衍生; ②缩写不规范,英文字母的大小写不一致,如载脂蛋白 (apolipoprotein), 缩写为 apo 已不规范,而它却有 Apo 和 apo 两种写法; ③用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词,有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写词来代替;而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,我刊对汉字文稿中名词术语使用英文缩写词来代替作如下规定,请遵照执行。

1 名词术语在 3 个 (含 3 个) 汉字内,一律使用汉文;多于 3 个汉字的,才可使用英文缩写词;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等,都只能用汉字;但冠心病、肺心病

等例外。

2 文题、摘要、关键词、正文中的各层次标题、插图和表格标题中的名词术语,不得使用英文缩写词来代替。

3 段首的名词术语需用缩写词时,为了阅读方便,可在缩写词左右加圆括号,左半圆括号之前写出汉字名词术语全称。

4 第一次使用英文缩写词来代替名词术语时,必须按照下列格式来写: 汉文全称 (英文全称,缩写词)。如极低密度脂蛋白胆固醇 (very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等。

5 英文缩写词在汉字文稿中不用复数。

6 书写时缩写词字母之间不用连字符;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符 (用半字线),如 IL-1。

7 名词术语的英文缩写词不移行。

8 汉字文稿中不宜过多使用英文缩写词,我刊规定文献综述可用 4~6 个,其它文稿限 4 个内。

以上规定请共同遵照执行。

(胡必利起草、修订)