

DOI: 10.13376/j.cblls/2020058

文章编号: 1004-0374(2020)05-0461-10

DNA甲基化与2型糖尿病血管并发症的研究进展

封凡^{1#}, 许峰晟^{1#}, 杜飞^{1,2}, 杨康鹃^{1*}

(1 延边大学医学院, 延吉 133002; 2 延边大学附属医院, 延吉 133002)

摘要: 2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种复杂的以慢性高血糖为特征的代谢性疾病。近年来, 越来越多的研究发现 T2DM 患者体内的高糖环境可以改变 DNA 甲基化程度, 影响相关基因功能, 从而导致糖代谢、脂肪代谢和能量代谢紊乱或炎症反应, 进而造成血管病变。T2DM 常见的血管并发症有大血管病变引起的心脑血管疾病, 以及微血管病变引起的糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病周围神经病变等。DNA 甲基化标记在 T2DM 血管并发症的早期诊断与治疗中可能有重要意义, 已成为相关领域的研究热点。现主要对近期 DNA 甲基化在 T2DM 血管并发症方面的研究及其研究策略加以综述, 以期深入了解 T2DM 血管并发症发生发展的表观遗传机制和可能的防治途径。

关键词: 2型糖尿病 (T2DM); 血管并发症; DNA 甲基化; 表观遗传

中图分类号: Q756; R587.2 **文献标志码:** A

Advances in research on DNA methylation and vascular complications in type 2 diabetes mellitus

FENG Fan^{1#}, XU Feng-Sheng^{1#}, DU Fei^{1,2}, YANG Kang-Juan^{1*}

(1 College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, China; 2 Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a complex metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia. In recent years, more and more studies have found that high glucose environment in T2DM patients can change DNA methylation. It can affect the function of related genes leading to disorders of glucose metabolism, fat metabolism and energy metabolism, or inflammatory reactions, which cause vascular lesions ultimately. Common vascular complications of T2DM include cardiovascular disease caused by macroangiopathy, as well as diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, and diabetic peripheral neuropathy caused by microvascular disease. DNA methylation biomarkers may be of great significance in the early diagnosis and treatment of T2DM vascular complications, and have become a research hotspot. This article reviews the recent research on DNA methylation in T2DM vascular complications and its research strategies, in order to understand the epigenetic mechanism and possible prevention and treatment of T2DM vascular complications.

Key words: type 2 diabetes mellitus (T2DM); vascular complications; DNA methylation; epigenetic

2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种以慢性高血糖为主要特征的代谢性疾病, 也是由遗传因素及环境因素共同作用而引起的多基因遗传性疾病, 其原因为胰岛素分泌和 (或) 利用缺陷, 但主要病理生理机制尚不清楚。2017年, 据国际糖尿病联盟 (International Diabetes Federation, IDF) 评估, 全球已有 4.25 亿人患有糖尿病; 到 2045 年, 预计将会有 6.93 亿 18 岁以上人群患有糖尿病,

其中 95% 以上是 T2DM。

T2DM 与遗传因素和环境因素密切相关, 而表观遗传是基因与环境因素之间的分子桥梁。环境因

收稿日期: 2019-11-18; 修回日期: 2020-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060154, 81460158)

[#]共同第一作者

*通信作者: E-mail: yangkj@ybu.edu.cn

素作用于机体, 通过影响 DNA 甲基化程度、组蛋白修饰以及非编码 RNA 调控等表观遗传因素, 改变相关基因表达, 影响机体相关功能, 进而导致 T2DM^[1]。其中, DNA 甲基化是一种主要的表观遗传修饰方式, 即在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 的催化下, 以 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体, 将活化的甲基加在胞嘧啶的 5' 碳端, 将其修饰为 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5mC)^[2]。5mC 多位于启动子胞嘧啶-鸟嘌呤 (cytosine-phosphate guanine, CpG) 岛, 该区域高甲基化通常会导导致基因表达的下调。大量研究表明, DNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象和稳定性、DNA 与蛋白质相互作用方式的改变, 从而控制基因表达 (图 1)。DNA 甲基化在 T2DM 的发生发展及持续存在的 T2DM 并发症中起重要作用^[3]。同时, 2019 年也有研究发现, 高血糖环境反过来也可以影响 DNA 甲基化, 并表现为外周血中 DNA 羟甲基化酶 2 (ten-eleven-translocation 2, Tet2) 和沉默信息调节因子 6 (silent information regulator 6, SIRT6) 上调, 促进 DNA 去甲基化, 这可能是机体的一种自我修复机制^[4]。

T2DM 常伴有一系列并发症。由大血管动脉硬化引起的大血管并发症 (例如心肌梗死和中风) 是导致 T2DM 人群过早死亡的主要原因。T2DM 还与微血管并发症的发生有关, 临床上表现为肾病、视网膜病和神经病^[5]。长期的高血糖症可能导致表观遗传信息的持续改变, 即使在血糖恢复后, 先前高血糖导致的表观遗传记忆也可能导致异常基因表达和疾病的发展, 这一现象被称为“代谢记忆”^[6]。“代谢记忆”效应是 T2DM 和其并发症间的桥梁。因此, T2DM 并发症的发病率及严重性与血糖水平

不一致, 探索相关 DNA 甲基化标记对 T2DM 及其血管并发症的早期诊断与治疗意义重大。

DNA 甲基化检测主要分为甲基化分型与甲基化图谱^[7]。前者是对特定位置点进行甲基化检测, 后者是对大量基因甚至全基因组进行检测。目前甲基化分型检测 DNA 甲基化位点的技术借助于特异性甲基化限制性内切酶、蛋白质或化学物质对 DNA 特定甲基化位点的识别能力^[8]。其中, 甲基化敏感的限制性内切酶法最为经典, 其利用限制性内切酶识别特定位置点, 易操作、低成本, 但缺点较多。而亚硫酸氢盐测序法 (bisulfite sequencing PCR, BSP) 被认为是 DNA 甲基化分析的金标准, 能检测到目的片段中每一个 CpG 位点的甲基化状态, 但过程繁琐, 费用较高^[9]。以此为基础发展出许多 CpG 岛甲基化检测方法, 如芯片杂交技术、甲基化特异性的 PCR (methylation specific PCR, MSP)、结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法 (combined bisulfite restriction analysis, COBRA) 等。甲基化图谱多通过测定基因组中 5mC 的含量, 进而对全基因组进行甲基化检测, 经典方法有甲基化胞嘧啶分离分析技术和甲基化亲和蛋白荧光检测法等多种基于生物亲和的方法。甲基化胞嘧啶分离分析技术包括毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 和高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC)。利用各种检测方法检测 DNA 甲基化, 对于包括 T2DM 在内的众多疾病的早期诊断具有重要意义。而这也对 DNA 甲基化检测技术的特异性、高效性、灵敏度提出了更多的要求, 已出现多技术结合趋势, 各种检测技术相互结合弱化各自局限性的新技术正在不断研发过程中^[10], 未来对于特定基因位点甲基化的检测有望成为 T2DM 及其血管并发症早期诊断的新

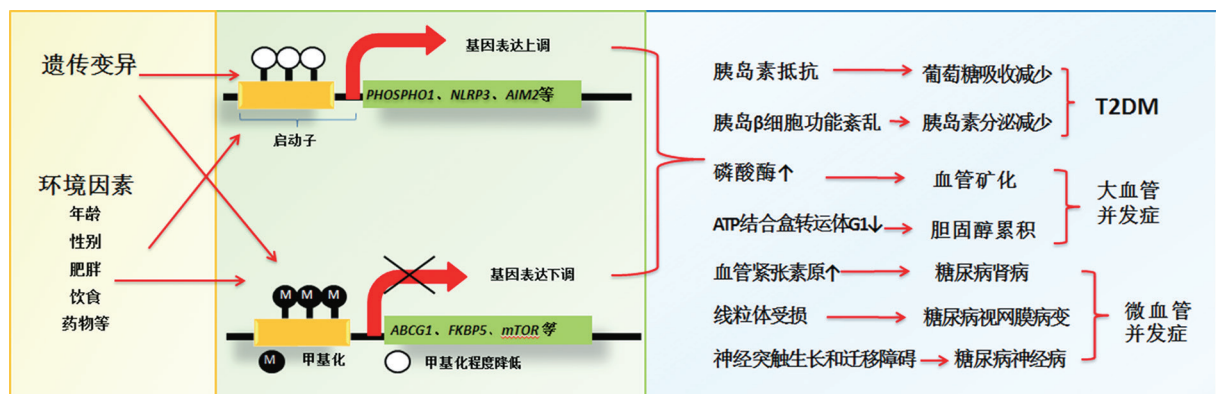


图1 DNA甲基化在T2DM及其血管并发症中的作用机制示意图

手段。

目前,国内外关于T2DM血管并发症与DNA甲基化关系的研究取得大量进展,本文拟就DNA甲基化在T2DM血管并发症方面的研究及其研究策略加以综述。

1 DNA甲基化与糖尿病大血管病变

大血管病变是导致T2DM患者高死亡率、高致残率的主要原因。研究发现,T2DM伴随的全身异常代谢状态是导致血管功能异常的主要原因,包括胰岛素抵抗、慢性高血糖状态、脂代谢紊乱等,这些因素明显促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)形成,进而引发心脑血管系统疾病(cardiovascular disease, CVD),例如冠心病、中风等^[11-12]。目前CVD的诊断多依赖发病后的典型临床表现和有创影像学检查(如冠状动脉造影、颅脑CT及MRI等),因此寻找T2DM大血管并发症的早期生物学标志物成为当务之急。国内外多项研究表明,DNA甲基化标记物具备作为T2DM患者大血管并发症预测指标的可能性,将有助于早期识别CVD的发病风险,降低T2DM的致残率和致死率。

Dayeh等^[13]检测了先前报道的5个与T2DM相关的DNA甲基化基因位点(*ABCG1*、*PHOSPHO1*、*SOCS3*、*SREBF1*和*TXNIP*)对T2DM的预测情况。研究发现,外周血DNA中*PHOSPHO1*基因的cg0265-0017位点发生DNA甲基化,未来患T2DM的风险降低15%(OR = 0.85, 95% CI = 0.75~0.95, *P*值 = 0.006, *Q*值 = 0.018)。而*ABCG1*基因的cg06500161位点DNA甲基化,未来患T2DM的风险增加9%(OR = 1.09, 95% CI = 1.02~1.16, *P*值 = 0.007, *Q*值 = 0.018)。究其原因,将该位点的DNA甲基化与T2DM的危险因素相关联,发现*PHOSPHO1*基因座cg02650017的DNA甲基化与高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)水平呈正相关,而血液中cg06500161(*ABCG1*)的DNA甲基化与HDL水平呈负相关。*PHOSPHO1*编码在骨骼肌中高度表达的磷酸酶,在血管矿化中起关键作用。而心血管矿化是动脉粥样硬化心血管事件和脑卒中发生的重要标志。*ABCG1*编码ATP结合盒蛋白家族成员,*ABCG1*在巨噬泡沫细胞的胆固醇外流中起关键作用:游离的载脂蛋白A-I(apolipoprotein A-I, apoA-I)可以与巨噬泡沫细胞中的ABCA1相互作用,促进游离胆固醇(free cholesterol, FC)外流,形成新生的HDL颗粒,该颗粒进一步被卵磷脂胆固醇脂酰转

移酶(lecithin-cholesterolacyltransferase, LCAT)修饰生成胆固醇酯(cholesteryl ester, CE),并形成成熟的HDL,而成熟的HDL颗粒可以充当ABCG1介导的胆固醇外流的受体(图2a)。甲基化造成的ABCG1的缺失会导致胆固醇积累,引起动脉粥样硬化、葡萄糖刺激下的胰岛素分泌受损和胰岛β细胞发炎。因此,*PHOSPHO1*基因cg02650017位点和*ABCG1*基因cg06500161位点DNA甲基化有望作为T2DM早期预测标志物,并成为心血管治疗靶标。

研究发现,亚临床高皮质激素血症和下丘脑-垂体-肾上腺轴(the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)功能障碍也与T2DM、CVD有关^[14-16]。糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)是一种核激素受体,位于细胞质中,可与FKBP5、热休克蛋白90(heat shock proteins 90, HSP90)和热休克蛋白70(HSP70)组成的伴侣复合物结合。FKBP5起抑制伴侣的作用,可防止GR转运到细胞核^[17]。结合糖皮质激素(glucocorticoid, GC)后,GR从伴侣复合物中解离,FKBP5被FKBP4取代,从而实现了易位和基因激活,产生更多的FKBP5,阻碍GR进一步从伴侣复合物中解离,形成细胞内的负反馈回路。这种细胞内负反馈回路的失调被认为是糖皮质激素抵抗和高皮质醇血症的主要原因(图2b)。Ortiz等^[18]研究发现,*FKBP5*基因内含子2的甲基化可能是T2DM患者心血管风险较高的一个标志。若进一步证实*FKBP5*与T2DM和心血管疾病的纵向相关性,那么它有可能成为恢复HPA轴功能从而治疗T2DM及其大血管并发症的一个靶点。他们首先采用亚硫酸氢盐焦磷酸测序法(bisulfite pyrosequencing)检测受试者*FKBP5*内含子2中的9个CpG岛的甲基化程度;然后,采用多元线性回归模型分析*FKBP5*甲基化程度与CVD危险因素糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、体重指数(body mass index, BMI)、腰围(waist circumference, WC)之间的关系;最终发现,*FKBP5*基因内含子2中一个焦磷酸化的CpG岛(CpG9)的高甲基化与HbA1c和LDL-C水平升高显著相关,而另一个CpG岛(CpG7)的高甲基化明显与较高的BMI和WC相关。

据报道,炎症反应及炎症相关基因如*NLRP3*、*AIM2*、*ASC*基因与T2DM的发病机制及其血管并发症密切相关^[19]。*NLRP3*或*AIM2*炎性小体主要由胞质传感器分子*NLRP3*或*AIM2*、衔接蛋白*ASC*

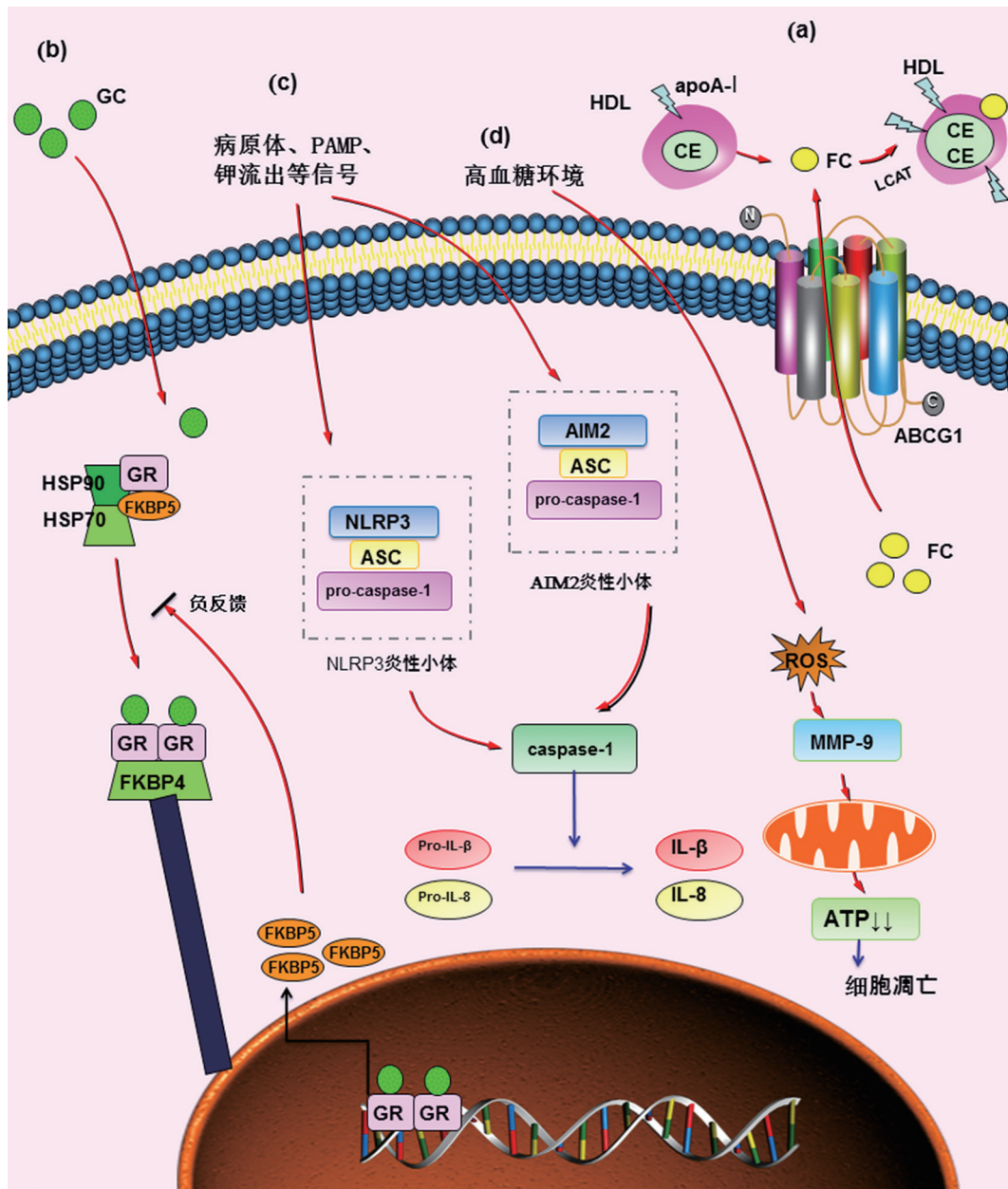


图2 *ABCG1*、*FKBP5*、*NLRP3*、*AIM2*、*ASC*、*MMP-9*基因与T2DM及血管病变相关代谢通路示意图

和效应分子 pro-caspase-1 组成。*NLRP3*、*AIM2* 和 *ASC* 的高表达可诱导炎症小体的组装和 caspase-1 的激活，活化的 caspase-1 随后诱导白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白细胞介素-18 (IL-18) 分泌，促进动脉粥样硬化，进一步破坏动脉粥样硬化斑块的稳定性，提示其在 CVD 发病中具有重要作用^[20] (图 2c)。Zhou 等^[21] 在中国南方汉族人群中进行了病例对照研究。采用 BSP 测序法对 *NLRP3*、*AIM2*、*ASC* 基因启动子区甲基化水平进行测定，发现 T2DM 患者 *NLRP3*、*AIM2* 和 *ASC* 基因启动子甲基化水平越低，表达量越高，发生血管并发症的风险

越高；而且，年龄与 *ASC* 甲基化水平呈负相关。因此，年龄与 T2DM 大血管并发症呈正相关，即 *ASC* CpG1 或 CpG3 的甲基化水平在年龄和 T2DM 大血管并发症之间具有部分中介作用。

2 DNA甲基化与糖尿病肾病

肾脏是一个高度异质性的器官，由十几种不同的细胞类型组成，整个肾脏的 DNA 甲基化改变是各个细胞类型实际甲基化改变的总和。因此，虽然糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是 T2DM 患者严重的微血管并发症之一，但由于研究难度较大，

糖尿病肾脏中的DNA甲基化研究成果有限。DN的特征为持续性微量蛋白尿或不伴肾小球滤过率下降,可诱发终末期肾病^[22]。DN是一种异质性疾病,受遗传易感性和环境的双重影响。多个研究表明,表观遗传机制可能是DN进展的基础,同时也提示糖尿病早期诱发的紊乱可能对DN的发展有重要意义。因此,在DN早期,即发生明显的组织学病变之前,进行早期诊断与治疗具有重要意义,而特异性DNA甲基化靶点使之成为可能。

Marumo等^[23]针对DN患者肾近端小管(proximal renal tubule, PT)细胞的DNA甲基化改变做了多项研究。首先,通过聚类分析比较了糖尿病小鼠纯化的PT细胞与对照组小鼠纯化的PT细胞的甲基化状态,结果发现:与对照组相比,糖尿病小鼠的*Agt*、*Abcc4*、*Cyp4a10*、*Glut5*、*Met*基因异常低甲基化,*Kif20b*、*Cldn18*、*Slco1a1*基因异常高甲基化。然后,定量RT-PCR研究发现,这些基因的mRNA表达同样存在显著差异,除*Met*外的其余基因表达与甲基化呈负相关。以上研究结果表明,DNA甲基化和表达之间存在普遍但不完全的负相关性。研究人员还针对*Agt*基因进行了BSP测序,将分析扩展到该基因的启动子区域,结果发现转录起始位点下游470 bp、183 bp和上游592 bp处的CpG显著去甲基化。原位杂交实验结果显示,在糖尿病小鼠髓质PT细胞中,*Agt* mRNA表达明显增加,表明*Agt*主要在糖尿病小鼠PT细胞中被诱导表达,同时伴有DNA去甲基化。为了描述时间依赖性的表观遗传变化,该研究还分析了5周和8周的小鼠。在第5周时,PT细胞中*Agt*的去甲基化并不明显,此时血糖水平和体重开始增加;而在第8周时,*Agt*发生显著的去甲基化。这些结果表明,去甲基化过程发生在代谢紊乱开始之后。相比之下,糖尿病患者肾脏中*AGT*的mRNA水平在第5周已经升高。对人肾近端小管内皮细胞的研究发现,DNA甲基化对*AGT*的作用与在小鼠体内相似。此外,该研究对抗糖尿病治疗对DNA甲基化的影响进行了探究,发现抗糖尿病药物(如:吡格列酮)虽然可以降低小鼠血糖水平以及抑制白蛋白的排泄,但不能逆转DNA甲基化。这项研究发现的靶基因异常甲基化机制或可为开发新的预防或治疗糖尿病肾病的治疗手段提供思路。

有报道称DNA甲基化与免疫细胞的代谢调节有关,持续性高血糖可能会导致外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的调节基

因发生异常DNA甲基化,从而激活DN的肾脏炎症^[24]。Chen等^[25]的研究验证了这一假说。首先,研究证实DNMT1表达与DN患者PBMCs炎症激活呈正相关。而DNMT1抑制剂——5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC)可显著增加糖尿病动物PBMC中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的比例从而改善肾脏炎症。该研究团队利用全基因组DNA甲基化分析,在糖尿病患者PBMC中发现了哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路中的上游调控蛋白基因启动子区域的异常甲基化。同时,mRNA阵列证实了mTOR通路中基因诱导表达的一致性。接下来,他们又验证了mTOR活性与炎症反应的相关性。因此,高血糖可导致DNMT1在免疫细胞中表达上调,诱导mTOR通路上游调控蛋白基因启动子的胞嘧啶异常甲基化,激活mTOR通路的致病作用,引发糖尿病免疫细胞失调,从而导致糖尿病肾脏炎症。提示5-Aza-dC等DNMT1抑制剂可通过抑制mTOR通路改善糖尿病肾脏炎症反应,对DN有一定治疗作用。据报道,此类去甲基化药物还可影响Wnt通路^[26]、p53通路^[27]、E2F1通路^[28],这些通路在DN的进展中也起重要作用。这一发现突出了免疫系统DNA甲基化标记在糖尿病肾病治疗中的潜力。

Rorbach-Dolata等^[29]研究发现,在微血管并发症中,线粒体DNA甲基化的影响最大。此外,参与这些过程的酶也存在表观遗传修饰,尤其是甲基化酶。MTHFR是同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)代谢的关键酶,也是甲基化过程中的重要酶。*MTHFR*启动子区甲基化会影响*MTHFR*的活性,导致HCY代谢阻断和异常甲基化。Yang等^[30]对85例糖尿病患者和30例健康体检者进行了研究。他们采用MSP法检测*MTHFR*基因启动子的甲基化状态,并测定了各样本血清HCY蛋白的表达情况。研究发现,DN患者的*MTHFR*基因启动子异常去甲基化造成*MTHFR*表达上调,推测该过程阻断了5,10-亚甲基四氢叶酸转化为5-亚甲基四氢叶酸,从而影响蛋氨酸的循环,诱导HCY聚集。而高HCY可影响血管平滑肌细胞增殖,直接影响细胞毒性和凝血系统,进而引起血管病变,参与DN的发生发展。此外,高HCY可控制一氧化氮合成酶的表达,从而减少一氧化氮,破坏血管收缩剂和血管舒张剂的稳定性,成为糖尿病肾病的危险因素^[31]。因此,*MTHFR*启动子去甲基化可能参与了

DN 的发病机制, 而高 HCY 通过改变 DNA 甲基化修饰改变 *MTHFR* 基因的表达。

表观遗传学的 DNA 修饰具有潜在的可逆性, 这为未来的基因组治疗提供了强有力的理论依据, 并可能防止肾功能的恶化。

3 DNA甲基化与糖尿病视网膜病变

约三分之一的糖尿病患者有不同程度的视网膜病变, 这也是成人获得性失明的主要原因。糖尿病性视网膜病变也是糖尿病微血管并发症之一, 是一种具有特异性改变的眼底病变。

在高血糖环境中, 葡萄糖的自氧化可引发许多代谢异常, 增加视网膜活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 造成自由基过多, 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 受损, 电子传递链发生障碍, 导致自由基恶性循环, 细胞启动凋亡机制, 继而发生一系列视网膜组织病变。高血糖环境也影响了表观遗传机制, mtDNA 的高甲基化会破坏其转录, 进一步导致线粒体损伤, 加速毛细血管细胞凋亡。因此, 揭示 mtDNA 损伤的机制以及 DNA 甲基化在线粒体内环境稳定中的作用可为糖尿病视网膜病变提供新的治疗靶点^[32]。

与 mtDNA 的其他编码区域相比, D-loop 区域表现出更多的损伤和序列变异^[33]。Mishra 等^[34]对 DNA 进行亚硫酸氢盐转化, 然后通过 MSP 和 5mC 定量分析研究了高糖 (20 mmol/L) 对视网膜内皮细胞 mtDNA 甲基化的影响, 并用染色质免疫沉淀法分析了 mtDNA D-loop 区和细胞色素 *b* (cytochrome *b*, Cytb) 区的 DNMT1 结合情况。在糖尿病视网膜病变中, 随着 5mC 水平的升高, 视网膜 mtDNA 发生高甲基化; 与其他区域相比, D-loop 区域的 5mC 水平更高。同时, DNMT 活性增加, DNMT1 在视网膜及其毛细血管细胞中表达增多, DNA 聚合酶 γ 1 被高度甲基化, 与 D-loop 区结合受损, 损害了电子传递链和线粒体生物发生。同时, 该研究团队还发现, *Dnmt1*-siRNA 或药物抑制剂对 DNMT 的抑制可改善葡萄糖诱导的 5mC 水平升高和细胞凋亡。以上研究结果提示, mtDNA 甲基化的调控具有恢复线粒体稳态和抑制糖尿病视网膜病变发展的潜力。

ROS 增加还会诱导视网膜及其毛细血管细胞中的 MMP-9 表达上调, 激活 MMP-9 对线粒体的损伤, 使线粒体不再产生 ATP 并且通透性增加, 允许细胞色素 *c* 渗入细胞浆, 从而加速视网膜毛细

血管细胞凋亡^[35](图 2d)。Kowluru 等^[36]发现, 高血糖环境会使 *MMP-9* 启动子的甲基化程度降低, 促进 DNMT1 与之结合。已知 DNA 的去甲基化可以由 Tet 介导, 将 5mC 氧化为 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC), 因此研究人员猜测, DNMT1 结合启动子的同时激活了 Tet 介导的去甲基化过程。实验中发现, 糖尿病患者视网膜内皮细胞 Tet 活性增加, *MMP-9* 启动子同一区域的 5hmC 水平升高, 而 Tet 抑制剂可使 *MMP-9* 转录减少, 这些数据结果进一步支持了去甲基化的激活。因此, 尽管 DNMT1 表达增多、活性增加, *MMP-9* 启动子仍保持低甲基化状态, 促进转录过程, 造成线粒体功能紊乱, 从而导致糖尿病性视网膜病变。此外, 在糖尿病中, Tet2 是视网膜及其毛细血管细胞中受影响最大的 Tet 家族成员, 其 siRNA 不仅可以抑制葡萄糖引起的 5hmC 升高, 还可抑制 5mC 降低, 从而抑制 *MMP-9* 表达, 改善糖尿病引起的 mtDNA 损伤, 并抑制糖尿病视网膜病变的发展。因此, 线粒体在糖尿病视网膜病变的发展过程中起着重要的作用, 通过药物或分子手段调控表观遗传变化, 维持线粒体稳态, 有助于延缓糖尿病视网膜病变的进一步发展, 挽救糖尿病患者的视力损失。

此外, 最新研究表明, 高糖环境导致的 DNA 甲基化也可使 mtDNA 碱基错配增加, 造成视网膜线粒体功能异常, 尤其是在非编码区和 D-loop 区域碱基错配率较高。Mishra 等^[37]利用酶切检测仪研究了人视网膜内皮细胞中 5-Aza-dC 和 *Dnmt1*-siRNA 对葡萄糖诱导的 mtDNA 碱基错配的抑制作用, 并通过 Sanger 测序进行了验证。结果表明, 调节 DNA 甲基化可以显著抑制碱基错配, 防止线粒体功能障碍。此外, 研究发现, 调节脱氨因子、过氧亚硝酸盐和载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽样蛋白 3A (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3A, APOBEC3A) 也能抑制碱基错配的增加。这种 DNA 甲基化和碱基不匹配之间的相互作用在高血糖终止后仍在继续, 表明其参与了“代谢记忆”。

4 DNA甲基化与糖尿病周围神经病变

糖尿病性神经病变是 T2D 常见的微血管并发症之一, 具有遗传异质性, 可影响神经系统的不同部位, 并呈现出不同的临床表现^[38]。而糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是最常见的糖尿病神经病变类型, 是一种慢性、对称性、

进行性的外周神经系统疾病,影响约50%的糖尿病患者。DPN最初累及四肢最长的轴突,并由远端至近端发展,合并外周血管疾病以及细菌感染可导致糖尿病足^[39]。

T2D和DPN的发病机制在很大程度上受生活方式等因素的驱动,如过少的体育活动和不良的饮食习惯^[40]。同时,T2D和DPN的发生发展存在明显的多基因风险^[41-42]。Hur等^[43]对小鼠模型的转录分析证明,DNA甲基化与DPN有关。Guo等^[44]采用简化表观亚硫酸氢盐测序(reduced representation bisulfite-sequencing, RRBS)比较了腓肠神经活检中全基因组DNA甲基化的情况,并采用GO和KEGG分析对显著的差异性甲基化CpG(differentially methylated CpG, DMG)进行了通路富集,确定了T2D和DPN涉及的基因和信号通路的表观遗传调控作用。在这些通路中,*NTN4*是一个重要的DMG,是促进神经突触伸长和生长的基因。数据表明,*NTN4*的差异DNA甲基化调控其基因表达,进而在DPN的神经再生和修复中发挥重要作用。

甘油磷脂代谢是另一个显著的富集途径。甘油磷脂是神经膜的主要成分,其水平变化与神经紊乱有关^[45]。有研究表明,甘油磷脂代谢通路基因的差异DNA甲基化也参与了DPN的发病机制和疾病进展。

MAPK信号通路响应多种信号,在细胞死亡、分化、生长和炎症中发挥调控作用^[46]。MAPK信号家族三个分支:细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和p38蛋白在多种DPN模型以及DPN患者的DMGs中均有富集现象^[47-48]。综上,DNA甲基化有助于调节相关生物功能和信号通路,如神经系统发育、轴突引导、甘油磷脂代谢和MAPK信号通路,表观遗传调控在DPN进展中发挥了重要作用。

此外,miRNA的甲基化调节也参与神经退行性疾病进展^[49]。miR3138是一种可参与肿瘤抑制的miRNA^[50],其靶点表皮生长因子受体4基因(human epidermal growth factor receptor 4, *ERBB4*)是参与DPN进展的重要基因^[51]。*ERBB4*也与感觉神经丢失和神经再生有关^[52],这为miR3138在DPN神经退行性病变和神经再生中的潜在调控作用提供了证据。通过RRBS分析和焦磷酸测序(pyrosequencing)发现,*miR3138*基因甲基化与退化腓肠神经中miR3138

表达的下调有关,提示表观遗传下调miR3138表达可能在DPN进展中发挥作用。

5 展望

综上所述,DNA甲基化在糖尿病血管并发症的发病机制中起重要作用,然而对于具体的作用机制尚需进一步研究。糖尿病是一种多基因遗传性疾病,单个基因的DNA甲基化改变难以全面揭示疾病发生的分子机制。能否通过多基因表观遗传修饰进一步阐明T2DM发病的分子机制,单一DNA甲基化标记能否确诊这一多基因遗传病,能否通过简单高效的DNA甲基化检测手段诊断这类疾病,都是亟待解决的问题。此外,还有很多分子机制亟待阐明,例如在同一因子影响下为何某些基因出现去甲基化,而另一些基因出现高甲基化;哪些DNA甲基化修饰是致病性的,哪些是代偿性的等。

近些年,很多研究利用T2DM血管并发症患者的外周血或病变组织绘制了DNA甲基化图谱,并结合生物信息学分析,探寻在血管病变发生过程中出现的特异性甲基化改变和相关信号通路。本文对相关研究成果进行了总结(表1),阐述了DNA甲基化对糖尿病大血管病变、糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变和糖尿病周围神经病变发生发展的影响。上述并发症相关基因的甲基化研究主要集中在糖代谢、脂质代谢、能量代谢、炎症等方面。这些研究成果为后续早期诊断和治疗靶点的探寻奠定了基础,将有助于降低T2DM血管并发症的致残率和致死率。但上述研究仍有众多不明之处,可为相关领域的科学研究提供方向,例如是否可通过与DNA甲基化有关的酶促进*PHOSPHO1*基因cg02650017位点的甲基化,以治疗T2DM及其并发症;*FKBP5*基因内含子2的CpG9能否成为早期诊断和治疗的指标;目前发现的具有脱甲基化作用的5-Aza-dC和*Dnmt1*-siRNA是否有发展为临床治疗药物的可能性等。

表观遗传学尤其是DNA甲基化在环境与遗传因素之间的连接作用给T2DM及其并发症带来了新的研究方向和理论指导。各种表观遗传修饰酶抑制剂以及有相似作用的药物不断被开发研究,有望干预或逆转DNA甲基化,从而治疗T2DM血管并发症。此外,饮食、运动等环境因素均可作为逆转T2DM血管并发症DNA甲基化异常的有力调节剂。

表1 与DNA甲基化有关的T2DM血管并发症基因

基因	位点	功能	甲基化紊乱的影响
磷酸胆碱磷酸酶基因 ^[13] (phosphocholine phosphatase, <i>PHOSPHO1</i>)	cg02650017	在骨骼和其他硬组织的生物矿化以及血管病理性矿化过程中有重要作用	去甲基化可引起血管矿化
ATP结合盒转运体G1基因 ^[13] (ATP-binding cassette, transporter G1, <i>ABCG1</i>)	cg06500161	编码ATP结合盒蛋白家族的成员, <i>ABCG1</i> 在巨噬泡沫细胞的胆固醇外流中起关键作用	其甲基化水平与BMI、HbA1c、空腹胰岛素和甘油三酯水平和心肌梗死呈正相关。 <i>ABCG1</i> 的缺失会导致固醇积累、葡萄糖刺激下的胰岛素分泌受损和胰腺β细胞发炎。
FK506结合蛋白5基因 ^[14-18] (FK506 binding protein 5, <i>FKBP5</i>)	内含子2 CpG9 和 CpG7	编码糖皮质激素受体的分子伴侣, 可限制糖皮质激素受体转运到细胞核。与代谢功能障碍有关, 包括减肥手术后体重的调节和非糖尿病患者的胰岛素抵抗	CpG9甲基化水平与HbA1c和LDL-C升高相关, CpG7甲基化水平与较高的BMI和WC相关。 <i>FKBP5</i> 内含子甲基化的缺失与库欣综合征相关
含NLR家族PYRIN域蛋白3基因 ^[21] (NACHT、LRR and PYD domains-containing protein 3, <i>NLRP3</i>)	CpG1、CpG2、 CpG4、启动子	激活caspase-1的炎症小体, 产生IL-1β和IL-18, 促进炎症性免疫细胞浸润	甲基化水平越低, 表达量越高, 可导致IL-1β、IL-18分泌增加, 促进动脉粥样硬化以及炎症性免疫细胞浸润, 导致胰岛β细胞死亡和功能障碍, 并导致T2DM。
黑素瘤缺乏因子2基因 ^[21] (absent in melanoma 2, <i>AIM2</i>)	启动子		
凋亡相关斑点状蛋白基因 ^[21] (apoptosis associated speck like protein containing a CARD, <i>ASC</i>)	CpG1、CpG3、 启动子		
血管紧张素原基因 ^[23] (angiotensinogen, <i>AGT</i>)	转录起始点下游 470 bp、183 bp 和上游592 bp的 CpG	编码血管紧张素原, 参与血压的维持; 该基因的突变与原发高血压的易感性有关, 并可引起肾小管发育不全	糖尿病肾病患者的PT细胞中 <i>AGT</i> 异常低甲基化
亚甲基四氢叶酸还原酶基因 ^[29-31] (methylenetetrahydrofolate reductase, <i>MTHFR</i>)	启动子	编码的蛋白质催化5,10-亚甲基四氢叶酸转化为5-亚甲基四氢叶酸, 是同型半胱氨酸再甲基化为蛋氨酸的共底物	启动子区甲基化会影响 <i>MTHFR</i> 的活性, 导致Hcy代谢阻断; 启动子去甲基化导致Hcy水平提高, 破坏血管收缩剂和血管舒张剂的稳定性
基质金属蛋白酶9 ^[35-36] (matrix metalloproteinase 9, <i>MMP-9</i>)	启动子	编码的蛋白质在正常的生理过程(如胚胎发育、繁殖和组织重塑)以及疾病过程中参与细胞外基质的分解	高糖环境会促使 <i>MMP-9</i> 启动子与DNMT1结合, 但同时激活Tet介导的去甲基化过程, 总体表现为低甲基化, 使线粒体受损
人轴突生长诱导因子4 ^[44] (netrin-4, <i>NTN4</i>)	未明确	编码的蛋白质参与神经突触生长和迁移, 血管生成和肿瘤发生等过程	<i>NTN4</i> 的差异DNA甲基化调控其基因表达, 进而在DPN的神经再生和修复中发挥重要作用

[参 考 文 献]

- [1] Karachanak-Yankova S, Dimova R, Nikolova D, et al. Epigenetic alterations in patients with type 2 diabetes mellitus. *Balkan J Med Genet*, 2016, 18: 15-24
- [2] Yagi S, Hirotsawa M, Shiota K. DNA methylation profile:

- a composer-, conductor-, and player-orchestrated mammalian genome consisting of genes and transposable genetic elements. *J Reprod Dev*, 2012, 58: 265-73
- [3] Raciti GA, Nigro C, Longo M, et al. Personalized medicine and type 2 diabetes: lesson from epigenetics. *Epigenomics*, 2014, 6: 229-38

- [4] Yuan EF, Yang Y, Cheng L, et al. Hyperglycemia affects global 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in blood genomic DNA through up regulation of SIRT6 and TETs. *Clin Epigenetics*, 2019, 11: 63
- [5] Keating ST, van Diepen JA, Riksen NP, et al. Epigenetics in diabetic nephropathy, immunity and metabolism. *Diabetologia*, 2018, 61: 6-20
- [6] Kato M, Natarajan R. Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15: 327-45
- [7] Heller G, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. Lung cancer: from single-gene methylation to methylome profiling. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29: 95-107
- [8] Zhang L, Xu YZ, Xiao XF, et al. Development of techniques for DNA-methylation analysis. *Trends Anal Chem*, 2015, 72: 114-22
- [9] Miura F, Enomoto Y, Dairiki R, et al. Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: e136
- [10] Liu T, Zhao J, Zhang D, et al. Novel method to detect DNA methylation using gold nanoparticles coupled with enzyme-linkage reactions. *Anal Chem*, 2010, 82: 229-33
- [11] Wu MY, Li CJ, Hou MF, et al. New insights into the role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: E2034
- [12] Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, et al. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: cause or consequence? *J Hepatol*, 2018, 68: 335-52
- [13] Dayeh T, Tuomi T, Almgren P. DNA methylation of loci within ABCG1 and PHOSPHO1 in blood DNA is associated with future type 2 diabetes risk. *Epigenetics*, 2016, 11: 482-8
- [14] Joseph JJ, Wang X, Spanakis E, et al. Diurnal salivary cortisol, glycemia and insulin resistance: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Psychoneuroendocrinology*, 2015, 62: 327-35
- [15] Nederhof E, van Oort FV, Bouma EM, et al. Predicting mental disorders from hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning: a 3-year follow-up in the TRAILS study. *Psychol Med*, 2015, 45: 2403-12
- [16] Joseph JJ, Golden SH. Cortisol dysregulation: the bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1391: 20-34
- [17] Cattaneo A, Riva MA. Stress-induced mechanisms in mental illness: a role for glucocorticoid signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 160: 169-74
- [18] Ortiz R, Joseph JJ, Lee R, et al. Type 2 diabetes and cardio metabolic risk may be associated with increase in DNA methylation of FKBP5. *Clin Epigenetics*, 2018, 10: 82
- [19] Keating ST, El-Osta A. Epigenetic changes in diabetes. *Clin Genet*, 2013, 84: 1-10
- [20] Travers ME, Mackay D, Nitert MD, et al. Insights into the molecular mechanism for type 2 diabetes susceptibility at the KCNQ1 locus from temporal changes in imprinting status in human islets. *Diabetes*, 2013, 62: 987-92
- [21] Zhou Z, Wang L, Wen Z, et al. Association analysis of NLRP3 inflammation-related gene promoter methylation as well as mediating effects on T2DM and vascular complications in a southern Han Chinese population. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 709
- [22] Persson F, Rossing P. Diagnosis of diabetic kidney disease: state of the art and future perspective. *Kidney Int Suppl* (2011), 2018, 8: 2-7
- [23] Marumo T, Yagi S, Kawarazaki W, et al. diabetes induces aberrant DNA methylation in the proximal tubules of the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26: 2388-97
- [24] Álvarez-Errico D, Vento-Tormo R, Sieweke M, et al. Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15: 7-17
- [25] Chen G, Chen H, Ren S, et al. Aberrant DNA methylation of mTOR pathway genes promotes inflammatory activation of immune cells in diabetic kidney disease. *Kidney Int*, 2019, 96: 409-20
- [26] Goeppert B, Konermann C, Schmidt CR, et al. Global alterations of DNA methylation in cholangiocarcinoma target the Wnt signaling pathway. *Hepatology*, 2014, 59: 544-54
- [27] Ng KP, Ebrahem Q, Negrotto S, et al. p53 independent epigenetic-differentiation treatment in xenotransplant models of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2011, 25: 1739-50
- [28] Gurha P, Chen X, Lombardi R, et al. Knockdown of Plakophilin2 downregulates miR-184 through CpG hypermethylation and suppression of the E2F1 pathway and leads to enhanced adipogenesis *in vitro*. *Circ Res*, 2016, 119: 731-50
- [29] Rorbach-Dolata A, Kubis A, Piwowar A. Epigenetic modifications: an important mechanism in diabetic disturbances. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2017, 71: 960-74
- [30] Yang XH, Cao RF, Yu Y, et al. A study on the correlation between MTHFR promoter methylation and diabetic nephropathy. *Am J Transl Res*, 2016, 8: 4960-7
- [31] Hirsch S, Ronco AM, Guerrero-Bosagna C, et al. Methylation status in healthy subjects with normal and high serum folate concentration. *Nutrition*, 2008, 24: 1103-9
- [32] Kowluru RA. Mitochondrial stability in diabetic retinopathy: lessons learned from epigenetics. *Diabetes*, 2019, 68: 241-7
- [33] Kowluru RA, Mishra M. Therapeutic targets for altering mitochondrial dysfunction associated with diabetic retinopathy. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22: 233-45
- [34] Mishra M, Kowluru RA. Epigenetic modification of mitochondrial DNA in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56: 5133-42
- [35] Kowluru RA, Mishra M. Regulation of matrix metalloproteinase in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 148: 67-85
- [36] Kowluru RA, Shan Y, Mishra M. Dynamic DNA methylation of matrix metalloproteinase-9 in the development of diabetic retinopathy. *Lab Invest*, 2016, 96: 1040-9
- [37] Mishra M, Kowluru RA. DNA methylation—a potential source of mitochondria DNA base mismatch in the development of diabetic retinopathy. *Mol Neurobiol*, 2019, 56: 88-101

- [38] Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, et al. Diabetic neuropathy: a position statement by the American diabetes association. *Diabetes Care*, 2017, 40: 136-54
- [39] Iqbal Z, Azmi S, Yadav R, et al. Diabetic peripheral neuropathy: epidemiology, diagnosis, and pharmacotherapy. *Clin Ther*, 2018, 40: 828-49
- [40] Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*, 2017, 389: 2239-51
- [41] Jhamb S, Vangaveti VN, Malabu UH. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: clinical review. *J Tissue Viability*, 2016, 25: 229-36
- [42] Witzel II, Jelinek HF, Khalaf K, et al. Identifying common genetic risk factors of diabetic neuropathies. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6: 88
- [43] Hur J, O'Brien PD, Nair V, et al. Transcriptional networks of murine diabetic peripheral neuropathy and nephropathy: common and distinct gene expression patterns. *Diabetologia*, 2016, 59: 1297-306
- [44] Guo K, Elzinga S, Eid S, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of human diabetic peripheral neuropathy in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Epigenetics*, 2019, 14: 766-79
- [45] Zhi L, Yu Y, Jiang Z, Wang D. mir-355 functions as an important link between p38 MAPK signaling and insulin signaling in the regulation of innate immunity. *Sci Rep*, 2017, 7: 14560
- [46] Daulhac L, Mallet C, Courteix C, et al. Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal MAPKs activation in neurons and microglia via NMDA-dependent mechanisms. *Mol Pharmacol*, 2006, 70: 1246-54
- [47] Purves T, Middlemas A, Agthong S, et al. A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J*, 2001, 15: 2508-14
- [48] Roubroeks JAY, Smith RG, van den Hove DLA, et al. Epigenetics and DNA methylomic profiling in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, 2017, 143: 158-70
- [49] Piletič K, Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol*, 2016, 90: 2405-19
- [50] Braoudaki M, Lambrou GI, Papadodima SA, et al. MicroRNA expression profiles in pediatric dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Med Oncol*, 2016, 33: 5
- [51] Hur J, Sullivan KA, Pande M, et al. The identification of gene expression profiles associated with progression of human diabetic neuropathy. *Brain*, 2011, 134: 3222-35
- [52] Gambarotta G, Pascal D, Ronchi G, et al. Local delivery of the Neuregulin1 receptor ecto-domain (ecto-ErbB4) has a positive effect on regenerated nerve fiber maturation. *Gene Ther*, 2015, 22: 901-7