

DNA 甲基化与糖尿病肾病的研究进展

陈林娜 张 鹏 王汉民

摘 要 糖尿病肾病是糖尿病常见的并发症之一,其具体的发病机制目前并不完全清楚。近年来有研究表明,表观遗传学修饰可能在糖尿病肾病的发生、发展中起着十分重要的作用。表观遗传学修饰包括了 DNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA、基因组记忆、基因沉默等,其中研究较多的则是 DNA 甲基化。本文就 DNA 甲基化与糖尿病肾病之间的最新研究进展做一综述,以期对糖尿病肾病的临床诊治提供新的理论依据。

关键词 糖尿病肾病 表观遗传学 DNA 甲基化

中图分类号 R587.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.12.004

近年来,随着我国居民生活水平逐步提高、饮食方式的改变和人口老龄化趋势的加剧,糖尿病以及糖尿病肾病的发生率和病死率呈逐年上升趋势,目前糖尿病肾病已成为导致尿毒症的最主要病因之一^[1]。糖尿病肾病的发病机制复杂,可能涉及遗传因素、氧化应激、糖代谢异常、血流动力学异常、炎性损伤等多种机制,但以上因素尚不能完全解释糖尿病肾病的发生机制^[2]。近年来的研究发现表观遗传变异可能在糖尿病肾病的发生、发展中扮演了关键角色。其中 DNA 甲基化目前研究较为深入,本文现就 DNA 甲基化的研究进展及其与糖尿病肾病之间的关系做一综述,以期对糖尿病肾病的临床诊治提供新的理论依据。

一、代谢记忆、表观遗传变异和糖尿病肾病

Zoungas 等^[3]研究发现,针对 2 型糖尿病患者,给予强化血糖管理,其益处可以持续到干预停止后的相当长一段时间,存在“遗赠效应”;而早期暴露于高血糖水平的患者,即使疾病后期接受强化血糖控制,糖尿病导致的微血管并发症仍持续进展,存在“代谢记忆”现象,而这种“代谢记忆”现象与表观遗传修饰密切相关。表观遗传变异(epigenetic variation)是指在基因的 DNA 序列没有发生改变的情况下,基因功能发生了可遗传的变化,并最终导致了表型的变化。

表观遗传修饰涉及 DNA 甲基化、非编码 RNA、基因组记忆、基因沉默、组蛋白转录后修饰等,目前

DNA 甲基化研究较为深入。

二、DNA 甲基化与糖尿病肾病

1. 启动子区 DNA 甲基化与糖尿病肾病有关: DNA 甲基化是指通过 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-methionine, SAM)作为甲基供体,再将胞嘧啶转变为 5-甲基胞嘧啶的过程。在哺乳动物中, DNA 甲基化主要发生在胞嘧啶-鸟嘌呤(CpG)双核苷酸序列的胞嘧啶上。DNA 甲基化可以引起 DNA 构象、染色体结构、翻译过程发生改变,最终可以在不改变基因组碱基序列的前提下实现对基因表达的调控。CpG 的甲基化与否起着十分重要的作用, CpG 双核苷酸虽只占人类基因组的 10%, 但约 >80% 的 CpG 双核苷酸处于甲基化状态, 未发生甲基化的余下的 CpG 双核苷酸分布在启动子区和第一外显子区。启动子区 DNA 甲基化可以抑制基因的表达, 进而影响转录和选择性剪切。此外, 启动子区的 DNA 甲基化还可影响沉默子和增强子等转录活性因子的活性^[4]。文利等^[5]报道了糖尿病肾病患者中微小 RNA(miRNA)中 let-7a 家族基因启动子区域甲基化水平存在异常, 通过检测甲基化位点, 发现 let-7a-3 启动子区域高度甲基化很可能是糖尿病肾病患者 let-7a-3 及 let-7a 低表达的一个重要因素, 并促进了糖尿病肾病的发生和发展。还有研究者发现, 结缔组织生长因子(CTGF)是推动糖尿病肾病患者肾间质纤维化进程的关键细胞因子。糖尿病肾病患者肾小球 CTGF 的表达明显升高, 与持续高血糖水平降低了 CTGF 相关基因启动子区 CpG 甲基化水平有关^[6]。总之, 启动子区 DNA 甲基化能通过多种机制导致基因沉默, 广泛参与了多种生理过程如细胞周期调控、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81770669)

作者单位:710021 西安医学院(陈林娜);710032 西安,空军军医大学西京医院肾脏内科(张鹏、王汉民)

通讯作者:张鹏,副主任医师,副教授,硕士生导师,电子信箱:zhangpeng@fmmu.edu.cn;王汉民,副主任医师,副教授,电子信箱:whm@medmail.com.cn

基因印记、X 染色体失活等。

2. 糖尿病肾病患者全基因组甲基化整体水平明显增加: Maghbooli 等^[7]通过反向高效液相色谱法(RP-HPLC)研究发现,糖尿病肾病患者相比于单纯糖尿病患者的基因组整体甲基化水平明显升高。近年来还有研究发现糖尿病患者基因组异常的 DNA 甲基化修饰可使胰岛素相关基因的表达、信号转导发生改变,从而影响整个疾病进程。有研究对单纯糖尿病与糖尿病肾病患者全基因组的甲基化水平进行了比较,两组患者的基因组甲基化水平呈现出显著性差异,其中单纯糖尿病患者的基因甲基化程度相对较低,提示 DNA 甲基化可能与糖尿病肾病的发病机制有关^[8]。此外,王晓楠等^[9]利用全基因组甲基化测序进一步证实了 DNA 甲基化与糖尿病肾病的关系密切。实验收集了糖尿病肾病患者、糖尿病非肾病患者和正常人肾脏组织标本进行检测,结果显示,糖尿病肾病患者全基因组 CpG 甲基化水平明显高于其他两组患者,进一步对 3 组患者差异甲基化区域(DMR)数关联到的差异基因进行差异基因功能分类注释(GO)分析和差异基因生物学路径(KEGG)分析,整合素相关差异基因(FOXC1、ITGA8、MYLK3、FGF9、COL4A3、FLT1、MYC)等 62 个基因甲基化水平与表达水平呈负相关,并通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路发挥作用。以上表明了 DNA 甲基化可能在糖尿病肾病的发生、发展中起着关键作用。

3. DNA 甲基化与炎症损伤:有研究发现,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)等炎症因子启动子区的甲基化水平与其表达水平呈负相关,IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-17、IL-10、IL-11 启动子区的低甲基化可以上调上述炎症因子的表达水平,从而促进炎症反应的发生或提高炎症水平;有些炎症因子可以增加 DNA 甲基化转移酶的活性,进而引起 DNA 异常甲基化。Bomsztyk 等^[10]更进一步研究证实,糖尿病肾病患者的 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-17 启动子的区低甲基化可能直接与肾组织炎症水平有关。还有研究认为,糖尿病肾病患者中,促炎转录因子(NF- κ B)活性增加,而表观遗传修饰对高糖诱导的 NF- κ B 的激活、糖尿病并发症相关炎症基因在血管细胞和单核细胞中的表达均有作用。此外,叉头转录因子 3(FOXP3)是促进调节性 T 细胞(Treg)成熟和调节其功能的重要因子,在维持机体免疫耐受和免疫抑制中扮演了关键角色。Fontenot 等^[11]研究发现,FOXP3 基因过度甲基化可能是糖尿病肾病免

疫失调的重要原因之一,FOXP3 基因启动子区的高度甲基化可以下调 FOXP3 蛋白的表达,继而削弱了 Treg 细胞的免疫抑制功能,加剧了糖尿病肾病患者的免疫失调和炎症损伤。上述研究表明 DNA 甲基化与糖尿病肾病的炎症损伤有密切关系。

4. DNA 甲基化与氧化应激:持续高血糖和 TGF 表达水平升高均可导致过氧化应激,从而损伤肾小球和肾小管细胞,糖代谢紊乱还可使机体维生素 C、维生素 E 和谷胱甘肽(GSH)等抗氧化剂水平下降,削弱了机体抗氧化能力。此外,氧化应激还可上调一系列炎症细胞因子的表达,提高机体炎症水平,而炎症反应水平的升高也会反过来刺激氧化应激水平进一步增加,形成恶性循环^[12]。凝固酶活性蛋白 C 可通过抗氧化作用而起到降低肾组织氧化应激损伤的作用,原癌基因 shc 编码的蛋白(p66shc 蛋白)其水平升高可加剧高血糖所致的细胞损害,Shahzad 等^[13]研究发现,凝固酶活性蛋白 C 水平下降可使 p66shc 基因启动子区甲基化水平下降并使 p66shc 蛋白表达上调,提示凝固酶活性蛋白 C 可能调节 p66shc 基因甲基化水平,从而影响糖尿病肾病的发生和发展。Swan 等^[14]比较了单纯 1 型糖尿病患者与糖尿病肾病患者的基因组跨越 450K 和 27K 甲基化序列,结果发现两组患者线粒体功能相关基因(PMPCK、TSFM、AUH)的甲基化水平差异显著,而线粒体应激、内质网应激与糖尿病肾病的发生、发展有一定关系,表明基因甲基化异常与 1 型糖尿病肾病密切相关。但总体而言,关于 DNA 甲基化与氧化应激损伤在糖尿病肾病中关系的研究报道尚不多见,二者的联系需要更多的研究进一步证实。

5. DNA 甲基化与肾脏纤维化:糖尿病肾病主要病理改变表现为肾小球基膜增厚、肾小管间质纤维化、细胞外基质蛋白沉积增多、系膜扩张,最终导致肾小球完全硬化^[15]。有研究者发现,糖尿病肾病、慢性肾衰竭患者肾小管细胞全基因组 DNA 中纤维化相关基因甲基化水平与正常人比较差异显著,提示 DNA 甲基化在肾脏组织纤维化过程中扮演了重要角色^[16]。研究证实,持续的高血糖水平可诱导肾脏固有细胞内转化生长因子- β 1(TGF- β 1)表达上调,病理条件下,TGF- β 1 可诱导多种细胞表型转化和异常增殖,趋化成纤维细胞和单核细胞,继而增加细胞外基质蛋白的沉积,促进纤维化进程^[17]。多项研究发现,TGF- β 1 基因低甲基化水平是 TGF- β 1 蛋白高表达的分子基础,TGF- β 1 基因调控区存在一

个横跨启动子及第一外显子区的 CpG 序列,而对该 CpG 序列的甲基化修饰主要发生于第一外显子区。张倩等^[18]研究证实,糖尿病肾病患者 TGF- β 1 第一外显子区甲基化水平较健康人群和单纯糖尿病患者显著下降,这种 DNA 甲基化水平的异常下降与 TGF- β 1 的过度表达存在一定的因果关系,并最终参与了肾脏纤维化过程。调控蛋白水解活性与细胞外基质蛋白沉淀的酶系(NMMPs)通过降解肾细胞外基质中胶原和非胶原成分而对肾细胞外基质沉淀-降解的动态平衡发挥调控作用。冯诗雅^[19]研究发现,糖尿病肾病患者的基质金属蛋白酶家族相关基因(MMP-9)启动子区甲基化水平明显降低,而MMP-9的表达水平则显著升高,且患者的MMP-9启动子区去甲基化程度与其肾病病程呈正相关,并与肾小球滤过率(GFR)呈负相关,上述研究结果证明MMP-9启动子区甲基化促进了MMP-9蛋白的表达,从而推动了糖尿病肾病患者肾脏纤维化进程。上述研究表明,DNA 甲基化可能与糖尿病肾病的肾脏纤维化密切相关。

6. DNA 甲基化与细胞凋亡:肾小管上皮细胞、肾小球固有细胞、足细胞凋亡均属于糖尿病肾病的重要特征,并参与了糖尿病肾病的发病及进展。肾病相关基因(UNC13B 基因)介导了高血糖水平下肾小球固有细胞的凋亡,有研究证实,1 型糖尿病肾病患者 UNC13B 基因启动子 CpG 岛的甲基化水平出现了异常降低,同时观察到 UNC13B 呈高表达,由此推测,UNC13B 基因的甲基化异常可能促进了肾小球细胞的凋亡,从而参与了糖尿病肾病的发病与进展^[20]。

7. DNA 甲基化与非编码 RNA:非编码 RNA(ncRNA)是指不被翻译成蛋白质的一类功能性 RNA,可粗略分成两类:(1)短链 ncRNA:主要为微小 RNA(miRNA),其他的有 Piwi 蛋白相互作用的 RNA(piRNA)、小干扰 RNA(siRNA)等。(2)长链 ncRNA(lncRNA)。miRNA 是一类长度约 21~23 个核苷酸的非编码小 RNA,它参与多种疾病的进程,其中包括糖尿病肾病的发生和发展。Gondaliya 等^[21]利用肾近端小管上皮细胞模拟建立了体外糖尿病肾病微环境的模型证实了 miR29b 可以靶向结合 DNA 甲基转移酶(DNMT)。在高糖条件下,miR29b 的表达下调,使得 DNA 甲基化特异性标志物(DNMT3A、DNMT3B、DNMT1)的表达水平提高,提示 miR29b 与糖尿病肾病发病机制中的 DNA 甲基化存在相关性。研究还进一步证实了 miR29b 可以显著抑制糖尿病肾病中肾近端小管上皮细胞的肾损伤,具有一定的肾脏保护作用。

此外,还有研究发现,在妊娠期糖尿病肾病患者胎盘组织中 miR-98 基因表达上调或下调后,DNA 甲基化的水平随后也发生了相关性的变化,通过进一步原位杂交检测、定量反转录聚合酶连锁反应(qRT-PCR)、蛋白免疫印迹实验以及免疫组化检测等验证了 miR-98 可结合甲基 CpG 结合蛋白 2(MeCP2)的 3'-非翻译区(UTR)来抑制 Mecp2 的表达,从而使与葡萄糖摄取相关的基因 TrPC3 表达失调^[22]。

综上所述,DNA 甲基化与糖尿病肾病的发病密切相关,现已证实 DNA 甲基化与糖尿病肾病发病过程中炎性损伤、氧化应激、肾脏纤维化、细胞凋亡、非编码 RNA 等机制有关,对 DNA 甲基化的进一步研究有助于加深对于糖尿病肾病发病机制的理解。此外,由于表观遗传学修饰具有可逆性,DNA 甲基化的相关研究为糖尿病肾病的防治提供了新的思路,有利于提高糖尿病肾病的临床诊治水平。

参考文献

- Reddy MA, Zhang E, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory [J]. *Diabetologia*, 2015,58(3):443-455
- 杨晓丹,巴应贵.糖尿病肾病发病机制的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(51):94-95
- Zoungas S, Arima H, Gerstein HC, et al. Effects of intensive glucose control on microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes: a Meta-analysis of individual participant data from randomised controlled trials[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017,5(6):431-437
- 王瑞娟,徐建红.基因组 DNA 甲基化及组蛋白甲基化[J].遗传,2014,36(3):191-199
- 文利,彭睿,孙艳,等. MicroRNA let-7a-3 基因甲基化与糖尿病肾病的关系[J].基础医学与临床,2016,36(4):474-479
- 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
- Maghbooli Z, Larijani B, Emamgholipour S, et al. Aberrant DNA methylation patterns in diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2014,13:69
- 杨晓丽. DNA 甲基化在糖尿病肾病发病机制中作用研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2017,31(10):1031-1033
- 王晓楠,徐婷婷,赵婷婷,等.糖尿病肾病患者 DNA 甲基化表达谱分析[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2018,27(3):235-239
- Bomszyk K, Denisenko O, Wang Y. DNA methylation yields epigenetic clues into the diabetic nephropathy of Pima Indians [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(6):1272-1275
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Pillars Article: Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells Nat. Immunol [J]. *J Immunology*, 2017,198(3):986-992

(下转第 132 页)

起炎症介质的释放,进一步损害肝细胞。本研究结果显示,观察组的双歧杆菌、乳酸杆菌显著高于对照组,大肠杆菌明显低于对照组。朱超霞等^[21]研究发现,小檗碱可能通过改善肠道菌群的结构和减轻高脂饮食所致肠道黏膜损伤,对高脂饮食所诱导的非酒精性脂肪性肝病发挥治疗作用。提示盐酸小檗碱片联合甘草酸二铵肠溶胶囊通过调节肠道菌群紊乱可能是其治疗非酒精性脂肪性肝病的有效途径之一。

综上所述,盐酸小檗碱片联合甘草酸二铵肠溶胶囊治疗非酒精性脂肪性肝病可促进患者肝功能和血脂水平的改善,提高疗效,调节 Th17/Treg 细胞失衡和改善肠道菌群紊乱可能与上述治疗效果有关。

参考文献

- 1 于文畅,鲍晓蕾. 肠道益生菌联合多烯磷脂酰胆碱治疗老年非酒精性脂肪性肝病疗效[J]. 中国老年学杂志,2016,36(9):2195-2197
- 2 黄振,宋双临,谭克平,等. 穴位埋线治疗肝郁脾虚型非酒精性脂肪性肝病:随机对照研究[J]. 中国针灸,2016,36(2):119-123
- 3 郁强,张声生,周滔,等. 调肝理脾方治疗非酒精性脂肪性肝病肝郁脾虚证的随机对照研究[J]. 中国中西医结合杂志,2015,35(4):401-405
- 4 续畅,刘学龙,倪建腾,等. 盐酸小檗碱片治疗非酒精性脂肪性肝病疗效的 Meta 分析[J]. 中国药房,2015,26(30):4232-4235
- 5 陈婷,叶晓光. 常用非酒精性脂肪性肝病药物治疗方案的药物经济学评价[J]. 肝脏,2017,2222(9):794-799
- 6 Swiderska M, Jaroszewicz J, Stawicka A, et al. The interplay between Th17 and T - regulatory responses as well as adipokines in the progression of non - alcoholic fatty liver disease[J]. Clin Exp Hepatol, 2017,3(3):127-134
- 7 Halmos T, Suba I. Non - alcoholic fatty liver disease, as a component of the metabolic syndrome, and its causal correlations with other extra-hepatic diseases[J]. Orv Hetil, 2017,158(52):2051-2061
- 8 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 中国非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010 年修订版)[J]. 中国医学前沿杂志:电子版,2012,4(7):4-10

- 9 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 非酒精性脂肪性肝病的中西医结合诊疗共识意见[J]. 中国中西医结合杂志, 2011,31(2):155-158
- 10 董妹,刘平,孙明瑜. 非酒精性脂肪肝发病机制——“二次打击”学说研究进展[J]. 临床肝胆病杂志,2012,28(7):551-555
- 11 Heeba GH, Morsy MA. Fucoidan ameliorates steatohepatitis and insulin resistance by suppressing oxidative stress and inflammatory cytokines in experimental non - alcoholic fatty liver disease[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015,40(3):907-914
- 12 Zhao L, Cang Z, Sun H, et al. Berberine improves glucogenesis and lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease[J]. BMC Endocr Disord, 2017,17(1):13
- 13 Zhu X, Bian H, Gao X. The potential mechanisms of berberine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Molecules, 2016,21(10):1336
- 14 霍晴. 甘草酸二铵肠溶胶囊治疗脂肪性肝病疗效 Meta 分析[J]. 实用肝脏病杂志,2015,18(4):371-374
- 15 方媛,刘欣,史海涛,等. 甘草酸二铵脂质配位体对非酒精性脂肪性肝病糖脂代谢的影响[J]. 山西医科大学学报,2017,48(8):783-787
- 16 姚贺之,孙明月,柴露露,等. 基于网络药理学研究舒肝降脂胶囊治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制[J]. 中成药,2018,40(11):2389-2393
- 17 金鹏,许尊贵,杨莉,等. 乌丹降脂胶囊对非酒精性脂肪性肝病大鼠 Treg 细胞的影响[J]. 中西医结合肝病杂志,2015,25(5):286-288
- 18 唐涛,蔡旭华,李伟平,等. HIF-1 α 、Treg 和 Th17 在非酒精性脂肪性肝病患者外周血中的表达及其临床意义[J]. 中华全科医学, 2017,15(10):1672-1674,1820
- 19 刘嘉琪,周少明. 非酒精性脂肪性肝病肠道菌群的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志,2017,33(12):2453-2456
- 20 易艳容,曾亚,何佳,等. 非酒精性脂肪性肝病患者肠道菌群变化及双歧杆菌三联活菌胶囊对肠道菌群、肝功能、血脂及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国肝脏病杂志:电子版,2016,8(3):87-92
- 21 朱超霞,仓桢,加孜热亚·再依拿提,等. 盐酸小檗碱对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病大鼠肠道菌群的影响[J]. 上海交通大学学报:医学版,2015,35(4):483-488

(收稿日期:2019-03-12)

(修回日期:2019-04-16)

(上接第 13 页)

- 12 崔洪臣. 氧化应激与糖尿病肾病[J]. 临床内科杂志,2015,32(1):65-66
- 13 Shahzad K, Gadi I, Nazir S, et al. Activated protein C reverses epigenetically sustained p66 Shc expression in plaque - associated macrophages in diabetes[J]. Commun Biol, 2018,1(1):104-121
- 14 Swan EJ, Maxwell AP, Mcknight AJ. Distinct methylation patterns in genes that affect mitochondrial function are associated with kidney disease in blood - derived DNA from individuals with type 1 diabetes[J]. Diabetic Med, 2015, 32(8):1110-1115
- 15 Lu Z, Na L, Feng W. Epigenetic regulations in diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Res, 2017,2017:7805058
- 16 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):108-121
- 17 Lópezhernández FJ, Lópeznoa JM. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects

[J]. Cell Tissue Res, 2016,347(1):141-154

- 18 张倩,杨丽铃,吴琼,等. 糖尿病肾病患者 TGFB1 基因表达调控区甲基化水平变化[J]. 中华肾脏病杂志,2016,32(2):99-105
- 19 冯诗雅. 基质金属蛋白酶-9 基因启动子区甲基化与糖尿病肾病关系的研究[D]. 遵义:遵义医学院,2016
- 20 Tréguet DA, Groop PH, Meginn S, et al. G/T substitution in intron 1 of the UNC13B gene is associated with increased risk of nephropathy in patients with type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2008,57(10):2843-2850
- 21 Gondaliya P, Dasare A, Srivastava A, et al. Correction: miR29b regulates aberrant methylation in In - Vitro diabetic nephropathy model of renal proximal tubular cells[J]. PLoS One, 2019,14(1):e0211591
- 22 Cao J L, Zhang L, Li J, et al. Up - regulation of miR - 98 and unraveling regulatory mechanisms in gestational diabetes mellitus[J]. Sci Rep, 2016,30(6):32268

(收稿日期:2019-03-05)

(修回日期:2019-04-15)