

表观遗传调控在动脉粥样硬化中的研究进展

胡琳 王子媛 张秋芳

【摘要】 表观遗传是在基因组 DNA 序列不发生改变的情况下,基因表达发生了可遗传性改变。发生动脉粥样硬化时,炎性细胞因子、氧化低密度脂蛋白和内膜下的胆固醇晶体等刺激巨噬细胞,诱导其发生表观遗传学改变,从而导致巨噬细胞无法正常转录。靶向干预泡沫细胞的表观遗传改变可能是抑制巨噬细胞表型转变及降低粥样斑块形成速度的有效治疗策略。组蛋白修饰异常、DNA 甲基化和非编码 RNA 等表观遗传改变在调控巨噬细胞参与动脉粥样硬化炎症反应中发挥重要作用。

【关键词】 动脉粥样硬化;巨噬细胞;表观遗传学;转录调控

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2021.03.002

动脉粥样硬化是心脑血管疾病的主要基础病因,积极防治动脉粥样硬化能够有效降低缺血性心脑血管疾病的发病率^[1]。动脉粥样硬化是一种以胆固醇等脂质代谢紊乱为主要特征,巨噬细胞吞噬脂质诱导的慢性血管壁炎症反应^[2]。动脉粥样硬化可使脂质沉积和坏死细胞在病灶内沉积,形成粥样斑块。表观遗传是在 DNA 序列不发生变化的条件下,基因表达的性状出现可遗传的表现型变化,主要包括 DNA 甲基化、染色质重构、组蛋白修饰以及 X 染色体失活等。表观遗传在不同因素的刺激下发生动态改变,在多种疾病的发生和发展中发挥重要作用^[3]。在动脉粥样硬化形成的不同病理阶段,受到脂质、炎症因子、胆固醇结晶等刺激,不同表型的巨噬细胞呈现出表观遗传修饰的多样性。

1 组蛋白修饰异常调控巨噬细胞转录

核小体是真核细胞染色质的基本单位,主要由组蛋白和 DNA 组成,DNA 缠绕在由组蛋白 H2A、H2B、H3、H4 构成的蛋白八聚体上。组蛋白的 N 末端突出于核小体,通常发生乙酰化、甲基磷酸化和泛素化等修饰,影响染色质开放性,最终影响基因表达^[4-5]。

基金项目:国家自然科学基金(81641140,81303254);十堰市科学技术研究与开发项目计划(2020k36);十堰市引导性科研项目(19Y09);湖北省知识创新基金(2018CFB522);湖北医药学院研究生科技创新项目(YC2020002)

作者单位:442000 十堰,湖北医药学院基础医学院药理学教研室(胡琳,张秋芳),药学院(王子媛)

通信作者:张秋芳,E-mail:zqf1112000@163.com

1.1 组蛋白 H3 乙酰化

研究发现,在动脉粥样硬化过程中,脂质过氧化以及巨噬细胞所引发的炎症反应会影响巨噬细胞转录过程中的组蛋白修饰,从而影响染色质开放性。巨噬细胞中组蛋白 H3 乙酰化增加可使巨噬细胞产生更多开放性染色质,促进 DNA 与转录因子结合,最终影响巨噬细胞的吞噬功能^[6]。巨噬细胞在吞噬脂质的过程中,组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸二甲基化(H3K9me2)和三甲基化(H3K9me3)使开放性染色体减少,从而抑制基因转录^[7]。组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸三甲基化(H3K4me3)是基因转录启动的标志,组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸单甲基化(H3K4me1)通常与基因远端调控元件增强子相关,组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸乙酰化(H3K27ac)在转录起始位点附近和增强子附近较多,均通过影响巨噬细胞的基因转录参与动脉粥样硬化的发生发展^[6]。

1.2 干扰素

研究发现, γ 干扰素(IFN- γ)可以诱导巨噬细胞分化为 M1 型巨噬细胞,分泌促炎性细胞因子和趋化因子。IFN- γ 通过抑制巨噬细胞对胆固醇的降解及再利用过程促进泡沫细胞形成。在低密度脂蛋白(LDL)受体敲除的动脉粥样硬化合并胰岛素抵抗小鼠模型中,抑制 IFN- γ 信号通路可以降低动脉粥样硬化的程度,但不影响其损伤面积,还可以减少高胰岛素血症引起的主动脉根部损伤^[8]。研究发现, β 干扰素(IFN- β)通过组蛋白去乙酰化酶 1(HDAC1)抑制组蛋白 H3 乙酰化,作用于基质金属

蛋白酶-9(MMP-9)的启动子,抑制 MMP-9 与转录因子激活蛋白-1 的结合,降低 MMP-9 的表达水平,从而影响巨噬细胞的吞噬功能,促进动脉粥样硬化的发生^[9]。

1.3 沉默调节蛋白 1 重组蛋白

氧化低密度脂蛋白(oxLDL)是动脉粥样硬化的主要致病因素。研究发现,巨噬细胞吞噬 oxLDL 是由清道夫受体 A(SR-A)、CD36 和凝集素样 oxLDL 受体-1(LOX-1)等介导的,而沉默信息调节因子 1(SIRT1)可以抑制巨噬细胞 LOX-1 基因表达,减少巨噬细胞对 oxLDL 的吞噬,从而减少内膜下脂质沉积,延缓动脉粥样硬化进展^[10]。巨噬细胞在不同因素的刺激下,出现组蛋白不同位点的表观修饰,这些修饰是否具有相同的功能,以及在时间和空间上的总体效应对巨噬细胞吞噬功能的调节作用都需要进一步研究。

2 DNA 甲基化调控巨噬细胞的转录

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶(DNMT)的作用下,在基因组 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5'碳位共价结合 1 个甲基基团。DNA 甲基化可引起染色质结构、DNA 结构、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式等的改变,以调控基因表达,参与动脉粥样硬化的发病和局部炎症反应^[11]。研究发现,超氧化物歧化酶(SOD)在动脉粥样硬化中使自由基发生歧化反应生成氧和过氧化氢,以防止自由基对细胞的损伤。在动脉粥样硬化病程中,巨噬细胞内 SOD 基因的甲基化程度增强,细胞外 SOD 水平降低,对自由基的清除作用减弱,大量的自由基蓄积在巨噬细胞的线粒体中,诱发巨噬细胞线粒体功能障碍,导致细胞内部释放大量的炎症介质,促使脂质沉积以及 oxLDL 生成^[12]。在 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化小鼠模型中, DNMT1 可通过催化巨噬细胞内 SOD 基因的甲基化,降低细胞外 SOD 水平,加重氧化应激损伤,促进动脉粥样硬化发生发展^[13-14]。巨噬细胞内的 15-脂氧合酶(15-LOX)属于不饱和脂肪酸的氧合酶,研究发现 15-LOX 基因启动子区域高度甲基化后细胞基本不表达 15-LOX,巨噬细胞吞噬脂质的过程中 15-LOX 甲基化水平增加,这使 LDL 的氧化作用增强,促进了单核细胞在血管壁沉积,促使动脉粥样硬化发生^[15]。动脉粥样硬化患者巨噬细胞中存在与疾病相关的危险基因,在 DNA 修饰阶段,这些基因增强子附近的组蛋白发生甲基化后,患者罹患动脉粥样

硬化的危险性明显降低^[16]。

3 非编码 RNA 调控巨噬细胞转录

非编码 RNA(ncRNA)是一类不具备编码蛋白质功能的基因转录产物^[17]。在动脉粥样硬化的进程中,长链非编码 RNA(lncRNA)、微小 RNA(miRNA)在表观遗传调控、转录调控和转录后调控多个阶段干扰基因的表达,调控巨噬细胞表型和炎症反应,影响动脉粥样硬化的进程^[18]。

3.1 lncRNA

lncRNA 是一类由 RNA 聚合酶 II 合成的长度约为 200 个核苷酸的 RNA,通常以其在基因组中的定位进行分类。lncRNA 参与基因的表观遗传学修饰。在单核细胞以及动脉粥样硬化的斑块中,lncRNA AT102202 表达水平较高,促使巨噬细胞吞噬内皮下脂质及胆固醇,逐渐转变为泡沫细胞^[18]。研究发现,在体外培养的人 HepG2 肝细胞中,表没食子儿茶素没食子酸酯可上调 lncRNA AT102202 的表达,下调羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶的表达,降低巨噬细胞内胆固醇水平,减少泡沫细胞聚积,延缓动脉粥样硬化的病程^[19]。在 2 型糖尿病小鼠的巨噬细胞以及动脉粥样硬化患者的单核细胞中,lncRNA E330013P06 的表达上调,促进 M2 型巨噬细胞向 M1 型转变,巨噬细胞向泡沫细胞转变,增强了血管壁的局部炎症反应^[20]。Li 等^[21]发现动脉粥样硬化斑块和小鼠巨噬细胞来源的泡沫细胞中的 lncRNA CDKN2B-AS1 表达下调,MMP-10 表达上调;在过表达 lncRNA CDKN2B-AS1 或沉默 MMP-10 后,巨噬细胞内脂质沉积减少,胆固醇向细胞外转移增加,因此 lncRNA CDKN2B-AS1 可能是通过 DNMT1 介导的 MMP-10 甲基化抑制 MMP-10 转录,从而延缓动脉粥样硬化的发生发展。lncRNA 在基因组中的定位不同,在启动子、增强子和内含子区域中发挥着不同作用,不同区域的 lncRNA 的时间及空间累积效应对巨噬细胞的调控需要进一步研究。

3.2 miRNA

miRNA 主要通过靶向 mRNA 的 3'端非编码区降解目标 mRNA 或是通过抑制其翻译调控基因表达。miR-497 能够抑制巨噬细胞中 apelin 蛋白的表达,apelin 蛋白可抑制巨噬细胞脂质沉积,miR-497 可通过作用于 apelin 蛋白发挥抗动脉粥样硬化作用^[22]。三磷酸腺苷结合盒转运子 A1(ABCA1)可通过调控胆固醇的逆向转运发挥抗动脉粥样硬化作用。miR-20a/b 可以抑制 ABCA1 的转录后表

达,诱导巨噬细胞向泡沫细胞分化,促进动脉粥样硬化的发生^[23]。核仁蛋白 PES1 在核糖体中参与核糖体 RNA(rRNA)前体的剪切, *INK4* 基因座中反义非编码 RNA(ANRIL)能够结合 *PES1* 基因,抑制血管平滑肌细胞和巨噬细胞中 *IKK4* mRNA 前体的加工和成熟,诱发核仁内 mRNA 前体超载,引起巨噬细胞凋亡,抑制细胞分化,从而导致动脉粥样硬化的发生^[24]。

miRNA 在调控基因的表达中发挥重要作用,体外合成相关 miRNA 有望成为精准治疗的方法,但要密切关注体外合成 miRNA 的体内靶向性以及对其他基因的异常调控。

4 转录因子通过表观遗传激活巨噬细胞

转录因子可通过特定信号通路发挥调节动脉粥样硬化的作用,如干扰素调节因子(IRF)、白细胞介素(IL)-4、信号转导和转录激活因子(STAT)等。巨噬细胞激活受多种转录因子调控。研究发现,信号依赖性转录因子(SDTF)可介导炎症反应。SDTF 属于 IRF 家族,IRF1、IRF3、IRF5 和 IRF8 可使巨噬细胞发生促炎性表型转变^[25],IRF 与 PU.1 相互作用后作用于核因子 κ B(NF- κ B),促使 NF- κ B 入核发挥作用。小鼠巨噬细胞的 IRF8 无上述作用,SDTF 单独发挥作用^[26]。IL-4 主要通过信号转导及转录激活蛋白 6(STAT6)信号通路调节巨噬细胞抗炎相关程序基因,募集组蛋白乙酰化酶复合物参与靶基因抑制,在巨噬细胞活化中发挥作用^[27]。抑制 STAT6 结合位点缺少典型的 STAT6 模体,表明 STAT6 通过间接结合或与非典型酪氨酸基序结合抑制下游靶分子功能。而 IL-6 受 NF- κ B 的调控,又是 STAT6 的上游信号分子,可调控炎症反应,因此在巨噬细胞中促炎性或抗炎性细胞因子信号转导主要通过 NF- κ B 和 STAT 途径^[28]。胆固醇通过转化生长因子(TGF)- β 信号通路诱导平滑肌细胞转变为泡沫细胞,这类泡沫细胞高表达 CD86、ATP 结合盒转运体 A1 和半乳糖凝集素 3,靶向 TGF- β 信号通路可从转录前抑制泡沫细胞的过度产生^[26]。进一步利用谱系跟踪实验检测关键基因的表达,可辅助理解这些表型转换的特征和潜在的表观遗传机制。转录因子无论在转录水平还是在转录后水平都直接或者间接通过某些特定的信号通路发挥重要作用,然而,转录因子具体调控位点以及不同信号通路之间的交互调节位点还需要进一步研究。

5 表观遗传酶影响粥样斑块巨噬细胞

泡沫细胞脂代谢相关酶的转录谱发生改变,如 ATP 结合盒脂质转运蛋白家族的表现遗传学改变可使泡沫细胞获得独特的转录途径,oxLDL 通过激活类视黄醇 X 受体(RXR_s)和过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR) γ 转录因子,提高脂肪酶编码基因的表达水平,增强脂质处理能力^[29]。激活转录因子 3(ATF3)是脂滴形成的关键调节因子,巨噬细胞内的 ATF3 通过抑制胆固醇 25-羟化酶(*Ch25h*)的基因转录抑制 25-羟基胆固醇的形成^[30]。ATF3 缺失导致 *Ch25h* 表达下调和 RXR_s 配体 25-羟基胆固醇的合成增加,从而诱导泡沫细胞的形成。高密度脂蛋白诱导 ATF3 表达,其抗炎作用也取决于对 ATF3 依赖性促炎性细胞因子表达的抑制,从而发挥抗动脉粥样硬化作用^[30]。Cochain 等^[31]证明 Zeste 同源增强子 2(EZH2)参与巨噬细胞表型的调节。组蛋白甲基转移酶 EZH2 促使组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(H3K27me₃)并与细胞因子信号转导抑制因子 3(SOCS3)启动子结合,抑制 SOCS3 的表达,最终导致造血干细胞髓样分化,髓样分化蛋白 88(MYD88)依赖的 NF- κ B 激活减少,巨噬细胞促炎作用减弱^[32]。此类突变通常出现在编码表观遗传酶的基因中,如 DNMT、甲基胞嘧啶双加氧酶 2(*TET2*)和去甲基酶。研究发现 *TET2* 的缺乏可部分改变巨噬细胞表型,加重动脉粥样硬化的炎症反应。与野生型小鼠相比,动脉粥样硬化小鼠模型体内缺失 *TET2* 基因的巨噬细胞对脂多糖(LPS)、IFN- γ 和 oxLDL 的刺激反应更强,可使炎症性细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 表达上调,诱发炎症反应,提示 *TET2* 可对巨噬细胞进行调控^[33]。

6 小结

动脉粥样硬化主要由炎症反应驱动,在复杂的斑块微环境中,巨噬细胞发生大量的表观遗传改变,这种改变对于动脉粥样硬化的发生发展起着双向调节作用。一系列转录因子及酶的功能发生动态变化,调控巨噬细胞的吞噬功能及表型转变。*TET2*、IRF 等转录因子在细胞分化和连续的刺激中对染色质进行动态修饰形成细胞记忆,巨噬细胞再次遇到相同的微环境时可以迅速反应。表观遗传不仅能使巨噬细胞有效地对病原性刺激快速反应,也可能使巨噬细胞过度活化,从而加重动脉粥样硬化。近年来,随着单细胞测序技术及转录本测序技术的发展,对转录因子及酶的表观遗传机制已

有了解,但仍有很多问题需要进一步探索。动脉粥样硬化不同阶段的不同表现遗传修饰是否存在协同或拮抗作用,在动脉粥样硬化的发病机制中,如何通过转录因子和表观遗传对各种巨噬细胞活化状态进行严格调控是未来研究热点。

参 考 文 献

- [1] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics—2020 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2020, 141(9): e139-e596.
- [2] Fernández-Ruiz I. Redefining leukocytes in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(6):319.
- [3] Grootaert M, Moulis M, Roth L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4):622-634.
- [4] Dekkers KF, Neele AE, Jukema JW, et al. Human monocyte-to-macrophage differentiation involves highly localized gain and loss of DNA methylation at transcription factor binding sites [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2019, 12(1):34.
- [5] Schübeler D. Function and information content of DNA methylation[J]. *Nature*, 2015, 517(7534):321-326.
- [6] Saeed S, Quintin J, Kerstens HH, et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity [J]. *Science*, 2014, 345(6204):1251086.
- [7] Novakovic B, Habibi E, Wang SY, et al. β -Glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance [J]. *Cell*, 2016, 167(5):1354-1368.
- [8] Reardon CA, Lingaraju A, Schoenfelt KQ, et al. Obesity and insulin resistance promote atherosclerosis through an IFN γ -regulated macrophage protein network[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(10):3021-3030.
- [9] Findeisen HM, Kahles FK, Brummer D. Epigenetic regulation of vascular smooth muscle cell function in atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2013, 15(5):216-223.
- [10] Chan SH, Hung CH, Jy S, et al. Exercise intervention attenuates hyperhomocysteinemia-induced aortic endothelial oxidative injury by regulating SIRT1 through mitigating NADPH oxidase/LOX-1 signaling[J]. *Redox Biol*, 2018, 14(3):116-125.
- [11] Catania S, Dumesic PA, Pimentel H, et al. Evolutionary persistence of DNA methylation for millions of years after ancient loss of a De Novo methyltransferase[J]. *Cell*, 2020, 180(4):816.
- [12] Khosravi M, Poursaleh A, Ghasempour G, et al. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis[J]. *Biol Chem*, 2019, 400(6):711-732.
- [13] Tang RZ, Zhu JJ, Yang FF, et al. DNA methyltransferase 1 and Krüppel-like factor 4 axis regulates macrophage inflammation and atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 128(3):11-24.
- [14] Willemsen L, de Winther MP. Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies [J]. *J Pathol*, 2020, 250(5):705-714.
- [15] Reilly KB, Srinivasan S, Hatley ME, et al. 12/15-lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10):9440-9450.
- [16] Kuznetsova T, Prange K, Glass CK, et al. Transcriptional and epigenetic regulation of macrophages in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(4):216-228.
- [17] Xu S, Kamato D, Little PJ, et al. Targeting epigenetics and non-coding RNAs in atherosclerosis: from mechanisms to therapeutics[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 196(6):15-43.
- [18] Shen S, Zheng X, Zhu Z, et al. Silencing of GAS5 represses the malignant progression of atherosclerosis through upregulation of miR-135a[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118(5):109302.
- [19] Liu G, Zheng X, Xu Y, et al. Long non-coding RNAs expression profile in HepG2 cells reveals the potential role of long non-coding RNAs in the cholesterol metabolism [J]. *Chin Med J*, 2015, 128(1):91-97.
- [20] Reddy MA, Chen Z, Park JT, et al. Regulation of inflammatory phenotype in macrophages by a diabetes-induced long noncoding RNA [J]. *Diabetes*, 2014, 63(12): 4249-4261.
- [21] Li H, Han S, Sun Q, et al. Long non-coding RNA CDKN2B-AS1 reduces inflammatory response and promotes cholesterol efflux in atherosclerosis by inhibiting ADAM10 expression [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(6): 1695-1715.
- [22] Cui J, Ren Z, Zou W, et al. miR-497 accelerates oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation in macrophages by repressing the expression of apelin [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(9):1012-1019.
- [23] Liang B, Wang X, Song X, et al. MicroRNA-20a/b regulates cholesterol efflux through post-transcriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1 [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(9): 929-938.
- [24] Holdt LM, Stahringer A, Sass K, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(3):12429.
- [25] Günthner R, Anders HJ. Interferon-regulatory factors determine macrophage phenotype polarization [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013:731023.
- [26] Mancino A, Termanini A, Barozzi I, et al. A dual cis-regulatory code links IRF8 to constitutive and inducible gene expression in macrophages [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(4):394-408.
- [27] Miloudi H, Leroy K, Jardin F, et al. STAT6 is a cargo of

exportin 1; biological relevance in primary mediastinal B-cell lymphoma[J]. Cell Signal, 2018, 46(2):76-82.

[28] Czimmerer Z, Daniel B, Horvath A, et al. The transcription factor STAT6 mediates direct repression of inflammatory enhancers and limits activation of alternatively polarized macrophages[J]. Immunity, 2018, 48(1):75-90.

[29] Kim K, Shim D, Lee JS, et al. Transcriptome analysis reveals nonfoamy rather than foamy plaque macrophages are proinflammatory in atherosclerotic murine models[J]. Circ Res, 2018, 123(10):1127-1142.

[30] Winkels H, Ehinger E, Vassallo M, et al. Atlas of the immune cell repertoire in mouse atherosclerosis defined by single-cell RNA-sequencing and mass cytometry [J]. Circ Res, 2018, 122(12):1675-1688.

[31] Cochain C, Vafadarnejad E, Arampatzi PA, et al. Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of aortic macrophages in murine atherosclerosis [J]. Circ Res, 2018, 122(12):1661-1674.

[32] Zhang X, Wang Y, Yuan J, et al. Macrophage/microglial Ezh2 facilitates autoimmune inflammation through inhibition of Socs3[J]. J Exp Med, 2018, 215(5):1365-1382.

[33] Zhang P, Chen X, Zhang Y, et al. Tet3 enhances IL-6 expression through up-regulation of 5-hmC in IL-6 promoter in chronic hypoxia induced atherosclerosis in offspring rats [J]. Life Sci, 2019, 232(8):116601.

(收稿:2020-05-13 修回 2021-02-03)

(本文编辑:胡晓静)

**To cure sometimes,
to relieve often,
to comfort always.**

—Edward Livingston Trudeau

有时，去治愈，
常常，去帮助，
总是，去安慰。

—爱德华·利文斯顿·特鲁多

