

人类糖皮质激素受体基因表达调控的表观遗传学机制相关性研究

万小妍 综述, 姜 悦 审校

(中山大学附属第一医院检验医学部, 广州 510080)

关键词:糖皮质激素受体; 表观遗传学; 甲基化; 乙酰化**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.14.023**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)14-1714-03

研究者们对患有精神性疾病如抑郁症、慢性代谢性疾病如 2 型糖尿病及激素抵抗的人群调查发现^[1],这类人群多伴有血浆高糖皮质激素水平,组织细胞糖皮质激素受体(GR)表达减少^[2]。进一步研究认为,上述现象由调节 GR 基因表达的分子机制介导,包括基因表观遗传学改变、基因突变、核苷酸序列多态性、糖皮质激素反应元件的自身调节等^[3]。其中,表观遗传学修饰中的 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化是研究焦点^[4]。近年来,对调节 GR 基因的表观遗传学机制的相关性研究有许多新发现,介绍如下。

1 糖皮质激素受体基因的结构、功能及其分布特点

1.1 糖皮质激素受体基因的结构 人类糖皮质激素受体基因,由该受体委员会命名为 NR3C1(member 1),位于 5 号染色体上,包含 9 个外显子和 8 个内含子,在小鼠体内有同源序列存在^[4]。外显子 1(exon1s)为 5'端非翻译序列,外显子 2 编码受体的氨基端部分,含有转录起始密码子 ATG,外显子 3~5 编码 DNA 结合区,外显子 5~9 编码激素结合区。外显子 1 由内含子分隔为至少 13 个小片段,即 1A1、1A2、1A3、1B、1C1、1C2、1C3、1D、1E、1F、1H、1I 和 1J,每个片段以其邻近的内含子为启动子^[5]。除 1A1、1A2、A3 和 1I 外,这些片段均位于 CpG 岛内^[6]。有人推测,人体组织存在着与小鼠 exon1-8 同源的 exon1G,但在人体组织中尚未检测到。除了在 exon1E 上游含一个 TATA 盒外,整个基因中缺乏 TATA 盒,但富含 Sp1 结合位点,该位点与 NR3C1 的持续表达有关^[7]。

1.2 糖皮质激素受体基因的分布及功能 NR3C1 于机体所有组织均表达,但 exon1s 不同片段 mRNA 的分布具有组织特异性。海马表达全部片段,1B 和 1C 出现于各种组织细胞,1D 仅存在于海马细胞,1A、1E 和 1F 存在于免疫系统,1E 还出现于甲状腺组织,1H 存在于肝、肺、平滑肌和免疫系统^[6]。目前,研究集中于 exon1F,exon1F 位于外显子 2 上游-3605/-3190,含 13 个 CG 碱基对。exon1F 与小鼠 exon1-7 是同源序列,被认为是具有脑组织特异性的启动子,其 mRNA 存在于海马、BCDA2⁺ 的外周血树突状细胞和 CD8⁺ T 细胞^[8]。海马 exon1F 含有可特异地与神经生长因子诱导的转录因子 A (NGFI-A) 结合的一致序列,如 FP7^[9]。在人类,该序列中的两个 CG 碱基对通常处于非甲基化状态,一旦被甲基化,该基因则失去结合 NGFI-A 的能力,导致海马 GR 表达减少^[2]。exon1s 不同片段的启动子可独立启动相应片段,使其与外显子 2 共同表达。目前认为,exon1s 的组织特异性分布导致 GR 表达的组织特异性,同时也引起受体的亚型剪接和分布的组织特异性^[10]。

GR mRNA 经过不同剪接,得到不同蛋白,即 GR α 、GR β 和 GR-P。 α 受体与糖皮质激素结合而发挥生理效应。GR β 不能与激素结合,无直接效应,常被认为是糖皮质激素作用的一个内源性抑制剂。GR-P 与激素结合后可增强 GR α 的活性。

同 exon1s 的组织特异性分布相同,GR mRNA 的表达亦具有组织特异性,多数细胞中 GR α mRNA 表达水平远远高于 GR β ^[11]。GR β mRNA 主要分布于 T 淋巴细胞、巨噬细胞和嗜碱性粒细胞。在神经内分泌系统中,GR β mRNA 仅出现于下丘脑和海马神经元;而 GR α mRNA 则广泛存在于脑内神经元和神经胶质细胞,并以分泌肾上腺皮质激素释放激素和垂体加压素的下丘脑小细胞神经元、海马、垂体促肾上腺皮质激素分泌细胞最为丰富^[12]。此外,即使是同种细胞,处于不同发育阶段者其 GR 的表达水平也有差异。

2 糖皮质激素受体基因的甲基化/去甲基化调节

2.1 糖皮质激素受体基因的甲基化/去甲基化调节机制 DNA 甲基转移酶(DNMT) 将 S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移到 GC 碱基对的胞嘧啶残基的 5 位碳原子上,使 DNA 甲基化。糖皮质激素受体基因第一外显子及其启动子甲基化导致整个基因表达降低或不表达,而去甲基化则增强其转录活性^[13]。糖皮质激素受体基因的甲基化调节存在三种机制:将转录因子的识别位点和结合位点甲基化(如改变海马 exon1F 上 NGFI-A 的结合位点^[14]),使其不能与相应的转录因子结合^[13];甲基化的 exon1s 直接作用于甲基化敏感转录因子 E2F、CREB、AP2、CM 和 Cmyb 等,或甲基化 CpG 黏附分子作用于甲基化非敏感转录因子 SP1、CTF 和 YY1 等,使转录因子失去结合 exon1s 的功能,从而阻断转录^[6];已被甲基化的 exon1s 吸引 DNA 甲基结合蛋白(methyl-CpG binding domain protein, MBD),这些蛋白募集大量抑制性蛋白如 SIN3A 和组蛋白去乙酰化酶,导致染色质浓缩,失去转录活性^[12]。

在去甲基化酶的作用下,甲基化的 exon1s 也可去甲基化,恢复转录活性。传统认为,去甲基化发生在细胞分裂期,但有研究者在失去分裂能力的海马神经元细胞中也发现了基因去甲基化现象。有两种蛋白可引起糖皮质激素受体基因 exon1s 去甲基化:G/T 错配修复糖基化酶,可识别 exon1s 中甲基化的胞嘧啶,并使其中的共价键断裂,这种去甲基化可发生于整个序列中,不能识别位点,因而导致广泛的基因损伤^[10],甲基化结合蛋白 MBD4 与糖基化酶的作用机制相似,也可发挥去甲基化作用,并具有位点特异性^[15];甲基化结合蛋白 MBD2b,可直接将甲基从甲基化的胞嘧啶上移走,恢复 exon1s 的转录活性^[16]。如 NGFI-A 和 MBD2b 可同时结合到 exon1-F 序列中的同一个分子上(这种共同结合需要高的 NGFI-A 生理浓度)^[9],NGFI-A 的存在使 MBD2b 发挥着去甲基作用^[4]。

2.2 糖皮质激素受体基因甲基化/去甲基化调节的影响因素

早期经历如胎儿期暴露于高糖皮质激素水平、宫内营养不足、出生后缺乏母爱等,影响 NR3C1 甲基化状态,这一过程同时受到机体多种因素的影响,其中,甲基转移酶、甲基供体的影响最为显著。

2.2.1 甲基化/去甲基化酶对糖皮质激素受体基因甲基化的

影响 目前,在哺乳动物细胞中发现了 5 种 DNA 甲基转移酶:DNMT1、DNMT2、DNMT3a、DNMT3b 和 DNMT3L^[17]。DNMT1 为 DNA 甲基化维持酶,在细胞有丝分裂过程中使半甲基化的 DNA 双链完全甲基化;DNMT2 缺乏转移甲基的活性;DNMT3a 和 DNMT3b,是负责基因组起始性 DNA 甲基化的旁系同源蛋白,称为从头甲基化酶,主要表达于胚胎干细胞,在胚胎发育中发挥主要作用;DNMT3L 缺乏催化活性,但参与基因印记,并辅助 DNMT3a 和 DNMT3b^[18]。外界环境对糖皮质激素受体基因甲基化的影响需要 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 和 DNMT3L 的协同作用才能实现,任何引起 DNMTs 表达水平异常的因素都会改变外界环境的影响作用。如胎儿期母体处于应激状态通常会诱发 exon1F 甲基化,但若同时伴有编码 DNMTs 的 DNA 的甲基化改变,则 exon1F 甲基化的程度就会受到相应影响^[19]。

糖皮质激素受体基因去甲基化反应受到多种转录因子和蛋白的协同作用。其中,NGFI-A 发挥着关键作用。Weaver^[2]在实验中发现,exon1-7 被甲基化后,环境因素又可诱导编码 NGFI-A 的基因 Kro-24 过量表达,吸引 MBD2b,引起去甲基化反应。其他转录因子也可以通过募集组蛋白乙酰化酶(HATs),引起组蛋白乙酰化,辅助相应蛋白的去甲基化作用^[15]。

2.2.2 甲基供体对糖皮质激素受体基因甲基化的影响

DNA 甲基化所需的甲基供体来自 s-腺苷甲硫氨酸(SAM),后者是以同型半胱氨酸、叶酸、胆碱为原料,在多种酶的催化作用下合成的,其中亚甲基四氢叶酸还原酶起着关键作用。SAM 过多可导致海马糖皮质激素受体基因 exon1-7 甲基化增高,SAM 缺乏可导致基因的甲基化程度普遍减低^[20]。这种作用具有组织特异性和时间特异性:妊娠中期一碳单位缺乏,可致子代肝、肾基因甲基化水平减低,心脏和前额叶无明显影响^[21];妊娠晚期一碳单位缺乏,可致子代肾脏和前额叶基因甲基化水平升高,心脏无影响^[22]。孕期营养限制不仅导致甲基供体不足,而且抑制 DNMT1 的活性,这种复杂作用导致 NR3C1 的甲基化水平增高或减低^[23]。胚胎期营养严重缺乏时,一方面,SAM 缺乏本身可导致机体甲基化水平整体减低;另一方面,营养严重缺乏作为一应激因素可引起机体某些组织 NR3C1 的甲基化水平增高,应激与甲基供体异常并存对糖皮质激素受体基因甲基化的影响则是复杂的^[24]。

2.3 糖皮质激素受体基因甲基化调节的特点 NR3C1 的甲基化调节具有组织特异性和时间特异性。如 exon1F 的甲基化调节发生在海马,控制着海马区糖皮质激素受体的表达,exon1-10 的甲基化调节主要发生在肝细胞^[23]。动物实验提示,环境因素对 NR3C1 甲基化的影响主要发生在胚胎末周和出生后第一周^[14]。目前认为,糖皮质激素受体基因 exon1s 甲基化的组织特异性和时间特异性导致了其不同片段分布的组织特异性和时间特异性。

3 组蛋白乙酰化/去乙酰化对糖皮质激素受体基因的调节

组蛋白乙酰化由乙酰化酶介导,该酶有多种,介导糖皮质激素受体基因乙酰化的有 CREB 结合蛋白、E1A 结合蛋白 p300 和锌指蛋白 220 等,不同位置的修饰需要特定的酶来完成。HATs 在 exon1F 外伸的组蛋白(通常是 H3 或 H4)N-末端尾部合成乙酰基,中和带有正电荷的氨基酸残基如赖氨酸和精氨酸^[25]。通常,DNA 通过其本身的负电荷与带正电荷的组蛋白形成稳定而闭合的结构,阻挡转录因子与其结合。组蛋白乙酰化后,一方面,中合电荷导致染色质瓦解,暴露出转录因子

NGFI-A 和 RNA 聚合酶结合位点,促进两者与 DNA 的结合,引起 exon1s 转录^[16];另一方面,乙酰化的组蛋白为辅助延伸进程的复合物提供识别位点,后者的结合促进转录的延伸^[12]。NR3C1 乙酰化的组蛋白在去乙酰基转移酶的作用下可脱去乙酰基,使染色质高度螺旋化,凝缩成团,失去转录活性。组蛋白乙酰化的作用是短暂的,但由此造成染色质结构持久的改变^[4]。exon1F 迅速地乙酰化/去乙酰化循环对 NR3C1 的调控起着重要作用^[2]。

4 组蛋白乙酰化和 DNA 甲基化的相互影响

有研究者认为,组蛋白乙酰化将染色质打开,暴露出甲基化酶结合位点,从而促进 NR3C1 甲基化^[13],也有认为,被乙酰化的染色质吸引去甲基化分子与之结合,引起去甲基化反应而恢复 NR3C1 的转录活性^[6]。有学者推测,DNMT1 可能直接与去乙酰化酶联合作用而阻断 NR3C1 的转录^[12],具体机制有待进一步探讨。

5 展望

糖皮质激素受体基因在特定组织的表达水平影响着该组织对糖皮质激素的敏感性,在整个机体的表达水平则影响着下丘脑-腺垂体-肾上腺皮质轴及机体多个系统的功能。临床许多疾病的发生,以及原本对糖皮质激素治疗敏感的疾病在部分人群中出现激素治疗抵抗,都与 GR 在机体的表达异常有关。NR3C1 的表观遗传学改变,作为引起 GR 表达降低的原因之一,一方面具有稳定性和遗传性而导致健康问题伴随生命始终并代代相传,严重影响人类健康;另一方面,具有可逆性而提供了治疗的机会。因此,糖皮质激素受体基因表达的表观遗传学机制值得更深入研究。

参考文献

- [1] Sanchez-Vega B, Gandhi V. Glucocorticoid resistance in a multiple myeloma cell line is regulated by a transcription elongation block in the glucocorticoid receptor gene(NR3C1) [J]. Br J Haematol, 2009,144(6):856-864.
- [2] Weaver IC. Shaping adult phenotypes through early life environments[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2009, 87(4):314-326.
- [3] Geng CD, Schwartz JR, Vedeckis WV. A conserved molecular mechanism is responsible for the auto-up-regulation of glucocorticoid receptor gene promoters[J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(12):2624-2642.
- [4] Weaver IC. Epigenetic effects of glucocorticoids[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2009, 14(3):143-150.
- [5] Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, et al. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene(NR3C1) and infant cortisol stress responses [J]. Epigenetics, 2008, 3(2):97-106.
- [6] Cao-Lei L, Leija SC, Kumsta R, et al. Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: identification and analysis of alternative promoter regions[J]. Hum Genet, 2011, 129(5):533-543.
- [7] Turner JD, Laetitia PL. Highly individual methylation patterns of alternative glucocorticoid receptor promoters suggest individualized epigenetic regulatory mechanisms[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(22):7207-7218.
- [8] Turner JD, Muller CP. Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon1[J]. Journal of Molecu-

- lar Endocrinology, 2005, 35(2): 283-292.
- [9] Moser D, Molitor A, Kumsta R, et al. The glucocorticoid receptor gene exon 1-F promoter is not methylated at the NGFI-A binding site in human hippocampus[J]. World J Biol Psychiatry, 2007, 8(4): 262-268.
- [10] Mc Gowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse[J]. Nat Neurosci, 2009, 12(3): 342-348.
- [11] Pujols L, Mullol J, Torrego A, et al. Glucocorticoid receptors in human airways [J]. Allergy, 2004, 59(10): 1042-1052.
- [12] Turner JD, Alt SR, Cao L, et al. Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more[J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 80(12): 1860-1868.
- [13] Bird AP, Wolffe AP. Methylation induced repression-belts, braces, and chromatin[J]. Cell, 1999, 99(5): 451-454.
- [14] Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, et al. Epigenetic programming by maternal behavior[J]. Nat Neurosci, 2004, 7(8): 847-854.
- [15] Szyf M, Meaney MJ. Epigenetics, behaviour, and health[J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2008, 4(1): 37-49.
- [16] Alexander U, Moshe S, Peter W, Nathanielsz. Organ and gestational age effects of maternal nutrient restriction on global methylation in fetal baboons[J]. J Med Primatol, 2009, 38(4): 219-227.
- [17] Eglen RM, Reisine T. Screening for compounds that modulate epigenetic regulation of the transcriptome; an overview[J]. J Biomol Screen, 2011, 16(10): 1137-1152.
- [18] Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective[J]. Structure, 2008, 16(3): 341-350.
- [19] Hu YG, Hirasawa R, Hu JL. Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development[J]. Hum Moz Genet, 2008, 17(17): 2654-2664.
- [20] Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, et al. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring[J]. Br J Nutr, 2008, 100(2): 278-282.
- [21] Takaya J, Iharada A, Okihana Y, et al. Magnesium deficiency in pregnant rats alters methylation of specific cytosines in the hepatic hydroxysteroid dehydrogenase-2 promoter of the offspring[J]. Epigenetics, 2011, 6(5): 573-578.
- [22] Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring[J]. J Nutr, 2005, 135(6): 1382-1386.
- [23] Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, et al. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications[J]. Br J Nutr, 2007, 97(6): 1064-1073.
- [24] Meaney MJ, Szyf M, Seckl JR. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health[J]. Trends Mol Med, 2007, 13(7): 269-277.
- [25] Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, et al. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome[J]. Environ Health Perspect, 2006, 114(4): 567-572.

(收稿日期: 2011-12-10)

• 综 述 •

细菌分子生物学分型技术进展

陆水英 综述, 陈维贤 审校

(重庆医科大学附属第二医院检验科 400010)

关键词: 电泳, 凝胶, 脉冲场; 聚合酶链反应; 分子生物学; 细菌分型技术**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 14. 024**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)14-1716-03

耐药细菌尤其是多耐药、超级耐药细菌的出现, 以及由细菌造成的医院感染和暴发流行的发生, 不仅严重威胁着人类健康, 也造成了医疗资源的浪费, 是当今医学界面临的严重挑战。对细菌的正确分型是诊断医院感染、确定暴发流行并采取控制措施的关键。传统的细菌分型方法如细菌的形态特征、染色特征、血清型、噬菌体型等在微生物研究中起了重要作用, 但上述方法存在分辨率不高、鉴定时间长等诸多局限。针对这些缺陷, 建立有效、快速、灵敏、重复性好、分辨力高的分型方法十分必要。近年来, 随着分子生物学技术的迅速发展, 特别是聚合酶链反应(PCR)技术的发展, 分子生物学技术应用于病原微生物分子分型成为临床诊断研究中的热点^[1]。

1 脉冲场凝胶电泳(PFGE)

PFGE 技术是 1984 年由 Schwartz 和 Cantor 发展起来的, 该技术采用多个电场交替地开启和关闭, 使包埋在琼脂糖凝胶中的 DNA 分子的电泳方向随电场方向发生相应改变。在凝胶上出现按分子大小排列的条带, 通过比较核酸限制性内切酶

图谱, 进行细菌的分型。PFGE 相较于其他方法有分辨率高、重复性好、结果稳定、易标准化的优点, 被誉为细菌分子生物学分型技术的“金标准”^[2]。Palade 等^[3]采用噬菌体分型技术和 PFGE 对流行病学上不具相关性的 18 株肠道沙门菌进行分型, 噬菌体分型技术仅能将其中 4 株分为 DT41、DT86、DT1 三型, 而以 XbaI 和 BlnI 设计染色体进行的 PFGE 可分出 7 个型别和 8 个型别。林一曼等^[4]也证实同种噬菌体分型的肠炎沙门菌用 PFGE 可以分出更多的型。Knabel 等^[5]联合 PFGE、MLST 及 MVLST 三种方法证实了 1988~2010 年在加拿大境内流行的单核增生李斯特菌为同一克隆。随着该方法的应用增多, 目前已发展出脉冲场梯度凝胶电泳、正向交变电场凝胶电泳、横向交变电场电泳、电场倒转凝胶电泳、转动凝胶电泳、转动电场电泳、双重脉冲场凝胶电泳、钳位均匀电场电泳等技术。随着该方法的不断优化, 该技术已用于肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、肠球菌及非结核杆菌等多种病原体的分子流行病学调查及分型研究。但该方法操作复杂、耗时长、费