

plays a key role in ovarian cancer cell adhesion and motility[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(2): 274-280.

[13] Terry KL, Sluss PM, Skates SJ, et al. Blood and urine markers for ovarian cancer: a comprehensive review[J]. *Dis Markers*, 2004, 20(2): 53-70.

[14] Buller RE, Berman ML, Bloss JD, et al. Serum CA125 regression in epithelial ovarian cancer: correlation with reassessment findings and survival[J]. *Gynecol Oncol*, 1992, 47(1): 87-92.

[15] Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(2): 402-408.

[16] Anton C, Carvalho FM, Oliveira EI, et al. A comparison of CA125, HE4, risk ovarian malignancy algorithm (ROMA), and risk malignancy index (RMI) for the classification of ovarian masses[J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2012, 67(5): 437-441.

[17] Bolstad N, Øijordsbakken M, Nustad K, et al. Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(1): 141-148.

[18] 王慧杰, 齐军, 王海, 等. 人附睾蛋白 4 与糖类抗原 125 联合检测在卵巢癌诊断中的应用价值[J]. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33(7): 540-543.

[19] Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, et al. A risk of malignancy index

incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer[J]. *Br J Obstet Gynaecol*, 1990, 97(10): 922-929.

[20] Van Holsbeke C, Daemen A, Yazbek J, et al. Ultrasound methods to distinguish between malignant and benign adnexal masses in the hands of examiners with different levels of experience[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2009, 34(4): 454-461.

[21] Moore RG, Mcmeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 112(1): 40-46.

[22] Karlsen MA, Sandhu N, Høgdall C, et al. Evaluation of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic tools of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 127(2): 379-383.

[23] Plotti F, Capriglione S, Terranova C, et al. Does HE4 have a role as biomarker in the recurrence of ovarian cancer[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(6): 2117-2123.

[24] 刘倩, 郭健. HE4 和 CA125 监测老年卵巢癌转归的价值[J]. *标记免疫分析与临床*, 2011, 18(6): 374-379.

(收稿日期: 2012-10-10)

• 综 述 •

表观遗传学在糖尿病中的调节作用

李霞莲, 武春梅, 尹莉莉, 李倩 综述; 苗晋华[△]

(中国人民解放军第二六四医院检验科, 山西太原 030001)

关键词: 糖尿病; 甲基化; 表观遗传学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)09-1124-03

随着生活水平的提高、生活方式的改变, 糖尿病患病率急剧增长, 而关于糖尿病的发病机制目前尚未阐明。最近有报道认为表观遗传学在糖尿病的发病中发挥着重要的调节作用。患者在出生前营养不良、遗传过程中的甲基化改变(包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰)在各种功能紊乱中发挥着重要作用。

1 表观遗传学调节机制

表观遗传学是指基因在表达过程中发生的改变, 而 DNA 序列不发生变化。表观遗传学改变对于器官中不同细胞的分化、发育起着重要的作用。然而, 表观遗传学也受年龄或环境影响, 越来越多的研究发现, 表观遗传学改变在肿瘤及其他疾病的发展过程中发挥了重要作用。

真核生物基因组包括 2 种染色质, 即常染色质和异染色质。异染色质是高度压缩的 DNA, 主要, 特点是 DNA 的转录受到限制, 着丝粒和端粒都属于异染色质; 相反, 常染色质则较活跃, 该区的 DNA 序列可被转录为 RNA。这 2 种染色质是由可逆转的 DNA 甲基化、组蛋白修饰调控的, 这种调节只发生在表观遗传学水平, 而不引起 DNA 序列的变化。异染色质的功能有维持基因组的稳定性。有丝分裂过程中, 染色体适度分离并防止端粒融合^[1]。异染色质通过基因沉默或移除基因表达的沉默标志对基因表达发挥抑制或激活作用^[2], 上述这些机制在细胞的不同生理阶段发挥了重要的调节作用。另外, 由于

异染色质的多样性, 哺乳动物基因组包含一段与其他区域明显不同的序列, 它是由重复的 CpG 序列组成的。过去认为该区域是染色体进化过程中形成的多余的无功能区, 但近来有研究指出该区域在组蛋白修饰以及基因沉默调节网络中发挥重要功能^[3]。总的来说, 表观遗传学在基因转录翻译中的调节机制主要包括读取基因密码时对其进行修饰以及对染色质进行压缩。

以 DNA 甲基化为背景, 基因组可分为 2 类: 缺乏 CpG 的区域和 CpG 富集区(又称为 CpG 岛)。CpG 岛是指大于 500 bp 且 GC 碱基对含量超过 55% 的区域^[4]。CpG 岛常出现在启动区, 而且含有 CpG 岛的基因有一半以上都位于 5' 末端区。改变 GC 富集区的甲基化状态可能会引起染色质结构发生改变, 并使转录启动子对转录机制的精细调节机制发生调整。这种改变引起过甲基化区域抑制基因的表达。相反, 基因的不稳定性及异常表达与低甲基化区域有关。有学者提出, 超过一半的 CpG 岛重复序列由于甲基化而最终参与了转录调节^[5]。组蛋白是 DNA 组装并形成染色质的核心蛋白质。组蛋白会发生翻译后修饰, 从而改变了与 DNA 及核蛋白之间的相互作用。4 种核心组蛋白的 N 末端均不稳定, 会受环境的影响发生一系列的翻译后修饰, 包括乙酰化、甲基化、O-乙酰氨基葡糖化修饰、磷酸化以及泛素化修饰^[6-7], 这些都会引起基因表

达的改变。组蛋白修饰会引起染色质激活或抑制,“组蛋白密码”假说认为各种组蛋白修饰的联合形成了染色质复杂的功能调节体系。组蛋白修饰中的关键酶包括:组蛋白乙酰转移酶、组蛋白去乙酰化酶、组蛋白甲基转移酶类以及甲基化 CpG 结合蛋白^[23]。组蛋白 H3 的第 9 位赖氨酸(histone H3 lysine 9, H3-K9)的甲基化被认为是异染色质中基因沉默的标志,而组蛋白 H3 的第 4 位赖氨酸(histone H3 lysine 9, H3-K4)的甲基化则标志着基因的激活,位于激活基因的启动子区。有证据表明,多种甲基化的 CpG 序列结合组蛋白的去乙酰化作用,就将 DNA 甲基化与组蛋白的修饰联系起来^[8]。另外, CpG 岛的 DNA 甲基化与组蛋白的去乙酰化作用及 H3-K9 的甲基化存在关联,这种甲基化也受小 RNA 的直接干扰。

总的来说,表观遗传学是在基因表达水平进行调节,而不引起基因序列的改变。目前表观遗传学机制已基本阐明,但尚不能将参与病理生理过程中的所有元素联系起来。

2 糖尿病中的表观遗传学调节

表观遗传学调节机制已逐渐被认可,为代谢综合征、肥胖及 2 型糖尿病的发病机制提供了一种新的解释。2 型糖尿病以胰岛素抵抗及胰岛素分泌不足为特征。影响胰岛素分泌的因素有高血脂、高血糖及氧化应激的累积损伤。有研究表明,氧化压力和活性氧直接影响 DNA 甲基化及组蛋白结构,进而使多个基因的表达发生改变^[9]。另外,早期人体营养状况及子宫内营养缺乏对 DNA 甲基化存在长期影响,进而影响基因的表达^[10]。有学者考虑到饮食因素的影响,如叶酸、维生素 B₁₂ 与单碳代谢有关,为生物甲基化反应提供甲基。在胚胎发育过程中,基因组在去甲基化后又发生甲基化,对生长发育有意义的 DNA 甲基化状态必须在快速的细胞增殖周期中保持下来^[11]。胚胎发育期间营养不平衡会影响 DNA 的甲基化,而这种影响可能是不可逆的^[12]。流行病学调查结果表明,子宫内营养低下或过量可能会引起染色质修饰改变,该机制也可能与 2 型糖尿病有关^[13]。有研究表明怀孕大鼠的低蛋白饮食与糖皮质激素受体及过氧化物酶体增殖物活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)- γ 的低甲基化有关^[14]。PPAR- γ 辅助激活因子 1 α (PPAR- γ coactivator 1 alpha, PGC-1 α)是糖尿病发病机制中的一个重要节点,也是线粒体基因转录的辅助激活蛋白^[15]。在 2 型糖尿病患者中,PGC-1 α 表达降低与氧化磷酸化障碍引起的 ATP 生成减少有关。有报道称糖尿病患者体内 PGC-1 α 基因启动子的甲基化程度增高,表明 2 型糖尿病患者 PGC-1 α 基因相关的 mRNA 表达及胰岛素分泌减少^[16]。因此,饮食中过度的甲基供体将作用于 PGC-1 α 基因启动区,影响 DNA 甲基化,成为 2 型糖尿病的潜在病因。在裂殖酵母体内已经发现异染色质转录中基因沉默、组蛋白 H3-K9 甲基化及来自异染色质的 siRNA^[17],这种表观遗传调节发生在细胞周期的 S 期。在哺乳动物, DNA 甲基化水平与年龄有关^[18],这也说明基因表达可通过时间来抑制。另外,有研究表明发育中的调节因子配对盒 2(paired box2, PAX2)基因通过核因子 PTIP(PAX transactivation activation domain-interacting protein)促进了 H3-K4 甲基转移酶复合体的聚集^[19]。PTIP 复合体定位于 PAX2 调节因子的 DNA 结合序列,并使甲基转移酶复合体聚集。在胚芽发育中, PAX2 和 PAX8 在中胚层及泌尿生殖上皮细胞分化为肾结构的过程中发挥了重要的作用^[20]。因此,在发育过程中 PAX2 为甲基化修饰提供了特异性位点。另外,有研究表明肿瘤细胞中过甲基化或沉默的基因需要功能完整的 DICER 以维持它们的甲基化状态^[21]。

综上所述, RNA 介导的 DNA 甲基化与环境因素联合成为基因及异染色质表观遗传学的危险因素。

3 研究表观遗传过程的工具

在复杂疾病尤其是代谢紊乱性疾病(如 2 型糖尿病)中,单个基因的表达结果不能完全解释它们对发病机制的影响。任何一种多基因疾病都需要多因素来解释。如 DNA 突变、蛋白质翻译后修饰、复杂的环境因素、饮食及运动因素。然而,越来越多的证据表明表观调节机制及其与其他因素的结合与疾病的表现有关。现在的 DNA 分析技术,如全基因组测序以及绘制单核苷酸多态性位点,还不能解释疾病的发病机制。结合现有高通量测序技术、表观遗传学调节及转录后修饰对蛋白质的影响形成了独特的数据流,可用于阐明疾病的发病机制。微阵列结合全基因组关联分析为研究个体的发病机制提供了依据。应用互联网数据库[如美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)、加州大学圣克鲁兹分校(University of California, Santa Cruz, UCSC)]对感兴趣的基因启动区的 CpG 岛进行分析是很重要的一步。应用微阵列技术对 DNA 甲基化进行全基因组关联分析来区分启动区甲基化和未甲基化的基因序列^[22]。许多其他方法也可用于区别全基因组中的甲基化部位,包括限制性内切酶图谱法、重亚硫酸盐核苷酸测序法、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增法及 DNA 微阵列染色质免疫沉淀法^[23]。应用现有的微阵列技术,通过寻找活化基因的转录通路,可以监测 DNA 去甲基化或组蛋白去乙酰化酶抑制剂的影响。

参考文献

- [1] Bailis JM, Forsburg SL. S phase assembly of centromeric heterochromatin and cohesion[J]. Cell Cycle, 2004, 3(4): 416-418.
- [2] Piacentini L, Fanti L, Berloco M, et al. Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in Drosophila euchromatin[J]. J Cell Biol, 2003, 161(4): 707-714.
- [3] Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes[J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(5): 490-495.
- [4] Takai D, Jones PA. The CpG island searcher; a new WWW resource[J]. In Silico Biol, 2003, 3(3): 235-240.
- [5] Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(5): 1412-1417.
- [6] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code[J]. Science, 2001, 293(5532): 1074-1080.
- [7] Kaleem A, Hoessli DC, Ahmad I, et al. Immediate-early gene regulation by interplay between different post-translational modifications on human histone H3[J]. J Cell Biochem, 2008, 103(3): 835-851.
- [8] Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators[J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(2): 89-97.
- [9] Cerda S, Weitzman SA. Influence of Oxygen radical injury on DNA methylation[J]. Mutat Res, 1997, 386(2): 141-152.
- [10] Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic[J]. Diabetes, 2005, 54(7): 1899-1906.
- [11] Morgan HD, Santos F, Green K, et al. Epigenetic reprogramming in mammals[J]. Hum Mol Genet, 2005, 14: R47-58.
- [12] Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic im-

- printing that lead to chronic disease[J]. *Am J Clin Nutr*, 1999, 69(2):179-197.
- [13] Devaskar SU, Thamocharan M. Metabolic programming in the pathogenesis of insulin resistance[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2007, 8(2):105-113.
- [14] Simmons RA. Developmental origins of beta-cell failure in type 2 diabetes: the role of epigenetic mechanisms[J]. *Pediatr Res*, 2007, 61(5 Pt 2):64R-67R.
- [15] Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(2):611-638.
- [16] Ling C, Del Guerra S, Lupi R, et al. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion[J]. *Diabetologia*, 2008, 51(4):615-622.
- [17] Kloc A, Zaratiegui M, Nora E, et al. RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication[J]. *Curr Biol*, 2008, 18(7):490-495.
- [18] Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks[J]. *Trends Genet*, 2007, 23(8):413-418.
- [19] Patel SR, Kim D, Levitan I, et al. The BRCT-domain containing protein PTIP links PAX2 to a histone H3, lysine 4 methyltransferase complex[J]. *Dev Cell*, 2007, 13(4):580-592.
- [20] Bouchard M, Souabni A, Mandler M, et al. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(22):2958-2970.
- [21] Ting AH, Suzuki H, Cope L, et al. A requirement for DICER to maintain full promoter CpG island hypermethylation in human Cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(8):2570-2575.
- [22] Shi H, Maier S, Nimmrich I, et al. Oligonucleotide-based microarray for DNA methylation analysis: principles and applications[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 88(1):138-143.
- [23] Ho SM, Tang WY. Techniques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: an emphasis on fetal-based adult diseases[J]. *Reprod Toxicol*, 2007, 23(3):267-282.

(收稿日期:2012-11-25)

• 综 述 •

RNA 干扰技术在抗病毒感染中的应用

付 瑞 综述;段 勇[△],王 玉 明 审核

(昆明医科大学第一附属医院检验科,云南昆明 650032)

关键词:RNA 干扰; 病毒感染; 治疗结果

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1126-03

病毒感染性疾病严重危害着人类的健康。目前临床控制这类疾病的主要方法是通过接种疫苗来预防病毒感染或使用抗病毒药物来降低病毒的活性以达到治疗的目的。但抗病毒药物缺乏特异性,且其较强的不良反应会对机体造成损害,此外,长期应用会诱发耐药株的产生。因此,寻找新的抗病毒治疗方法已成为一个急需解决的问题。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是序列特异的双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA)介导同源 mRNA 降解,使细胞表现出特定基因缺失表型的过程。它作为一种新的基因阻断技术,具有高效、特异、操作简便等优点,是传统基因敲除技术和反义技术所无法比拟的,目前已广泛应用于功能基因组学、基因治疗及药物设计等领域,特别是在抗病毒感染方面取得了显著的进步。大量体外实验表明,应用 RNAi 技术能有效地抑制病毒复制相关基因的表达, RNAi 技术已成为抗病毒感染治疗的有力工具。

1 RNAi 的作用机制

RNAi 现象广泛存在于生物界中,随着研究的不断深入, RNAi 的机制正在被逐步阐明,其过程可分为起始、效应、扩增 3 个阶段。

1.1 起始阶段 RNA 酶 III 家族(Dicer 核酸酶)依赖 ATP 将内源性或外源性的 dsRNA 切割成约 21~23 碱基对的小干扰 RNA(short interfering RNA, siRNA)。siRNA 是完成 RNAi 的主要部分,它们通常具有 5' 单磷酸和 3' 羟基末端,且 3' 端均有 2~3 个突出的核苷酸。

1.2 效应阶段 siRNA 的一条链与 Argonaute 亚家族蛋白结合形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing com-

plex, RISC),依赖于 ATP, siRNA 解旋释放正义链从而激活 RISC。有活性的 RISC 中的 siRNA 反义链按 Watson-Crick 碱基配对原则与同源 mRNA 分子上的靶序列结合,随后自 siRNA 的 3' 端将靶 mRNA 切割成小于 12 个碱基的片段^[1]。

1.3 扩增阶段 这一阶段类似聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR), RISC 与靶 mRNA 结合后,以 siRNA 反义链为引物,靶 mRNA 为模板,在 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)的作用下,将单链 mRNA 转变为双链,随后 Dicer 核酸酶再对其进行切割,导致靶 mRNA 的降解^[2]。这种 PCR 使细胞内的 siRNA 数量明显增加,新产生的 siRNA 可再次参与上述循环,产生级联放大效应,从而显著增强了对基因表达的抑制作用^[3]。

2 RNAi 的生物学特性

RNAi 具有以下几个重要的特性:(1)RNAi 是转录后水平的基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)机制,迄今的研究认为, RNAi 不会影响染色体 DNA 序列的复制和转录过程。(2)RNAi 具有普遍性。1998 年人们在对线虫的研究中首次发现了 RNAi 现象,随后,科学家们对不同种属的生物进行了深入的研究,证实该现象广泛存在于多种生物中。细胞培养和动物模型的实验都证实, siRNA 可特异性地抑制多种器官细胞中基因的表达。(3)RNAi 具有高度的序列特异性。dsRNA 只降解与之序列相应的内源性 mRNA,而其他 mRNA 的表达不受影响, siRNA 除正义 3' 端 2 个碱基在序列识别中不起重要作用外,其他单个碱基的改变可能导致 RNAi 效应大大减弱,甚至消失。(4)RNAi 具有抑制基因表达的高