

· 论 著 ·

SET7/9 在 2 型糖尿病大血管病变中的作用*

陈 果,高陈林,徐 勇[△],阳 诚,唐小平,夏纪毅

(泸州医学院附属医院内分泌科,四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨 SET7/9 在 2 型糖尿病大血管病变中的作用。方法 随机选取 10 例 2 型糖尿病无大血管病变患者(DM 组)和 10 例 2 型糖尿病并大血管病变患者(DV 组),以 10 名健康志愿者作对照(NC 组),分别检测各组外周血中组蛋白甲基化酶 SET7/9 和炎症因子 kappa B(NF-κB)的表达,并比较各组结果。结果 与 NC 组相比,DM 组和 DV 组的 SET7/9 和 NF-κB 表达均增高($P < 0.05$);且 DV 组较 DM 增高($P < 0.05$)。结论 糖尿病患者体内存在 SET7/9 表达失调,这种表达失调进而激活 NF-κB 可能是 2 型糖尿病大血管并发症发生、发展的重要表观遗传机制。

关键词:糖尿病,2 型;大血管病变;表观遗传学;组蛋白甲基化酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.10.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)10-1081-03

The effects of SET7/9 on macrovascular complications in patients with type 2 diabetes*

Chen Guo, Gao Chenlin, Xu Yong[△], Yang Cheng, Tang Xiaoping, Xia Jiyi

(Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To explore the role of SET7/9 in the diabetic macrovascular diseases. **Methods** We randomly selected 10 type 2 diabetes mellitus patients without macrovascular complications (DM group), 10 type 2 diabetes mellitus patients with macrovascular complications (DV group) and 10 healthy volunteers (NC group); and then the expression of histone methyltransferases SET7/9 and factor of inflammatory NF-κB in the peripheral blood were detected and compared in each group. **Results** The expression of SET7/9 and NF-κB was increased in DM group and DV group compared with NC group ($P < 0.05$), and the expression was increased in DV group compared with DM group ($P < 0.05$). **Conclusion** There were disorders of SET7/9 expression in diabetic patients, and it would activate NF-κB expression by which may be the important epigenetic mechanism of the occurrence and development of type 2 diabetic macrovascular complications.

Key words: diabetes mellitus, type 2; macrovascular disease; epigenetics; histone methyltransferases

当今社会,人均寿命延长生活水平提高,2 型糖尿病患者的发病人数正在迅速增加。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是 2 型糖尿病血管病变必不可少的发病基础,而 AS 的中心环节是血管内皮的受损和血管中膜病变,这些环节都受炎症反应调控^[1-2]。因此,AS 与炎症反应密切相关。而调控炎症反应的核心细胞因子炎症因子 Kappa B(NF-κB)除了受高血糖、糖基化终末期产物、高血脂等各种因素影响外,还受到组蛋白甲基化酶 SET7/9 等表观遗传机制所调控^[3]。故本研究通过检测并比较健康人、2 型糖尿病无大血管病变患者和 2 型糖尿病并发大血管病变患者的 SET7/9 蛋白和 mRNA 表达水平以及各组中 NF-κB 的 mRNA 表达水平,从而探讨 SET7/9 在 2 型糖尿病大血管病变中的作用,为治疗糖尿病大血管病变提供重要的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对照组(NC 组):健康志愿者 10 名,平均(47.6±11.47)岁,身体健康,无器质性疾病,无明确用药史,同时也无“三多一少”症状,且糖化血红蛋白(HbA1c)≤6.0%。2 型糖尿病无大血管病变组(DM 组):随机选取 10 例 2 型糖尿病患者,平均(54.6±6.28)岁,诊断采用 1999 年世界卫生组织(WHO)诊断及分型标准,同时满足既往无脑血管意外史;无冠

脉综合症的临床表现,经心电图检查无阳性发现;排除高血压(标准采用 2005 年《中国高血压防治指南》);ABI 在 0.9~1.3 之间。同时排除感染、肿瘤、肝肾脏功受损;排除药物等因素引起的糖耐量异常。2 型糖尿病大血管病变组(DV 组):随机选取 10 例糖尿病并大血管患者,平均(59.60±12.37)岁,2 型糖尿病诊断明确,同时满足如下条件中 1 项以上:经检查发现颈动脉或双下肢动脉血管壁有病变;经冠脉 CT 或经冠脉造影发现冠脉病变;既往曾经有脑血管意外发作史,脑部 CT 或 MRI 检查发现梗死病灶;高血压诊断明确。同时排除感染、肿瘤、肝、肾脏功能受损。

1.2 方法 (1)取样本:各组对象在知情同意后行一般情况检查,再分别用抗凝管采取外周静脉血 3.5 mL,其中从 3 mL 血液中分离出外周单个核细胞,用于蛋白免疫印记法(Western blotting);0.25 mL 血液用于总 RNA 提取,用于逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)实验。(2)将分离出的单个核细胞提取总蛋白,用 Western blotting 的方法检测各组中 SET7/9 蛋白表达。SET7/9 兔抗人单克隆抗体购于美国 CST 公司,SET7/9 一抗浓度 1:500,内参 GAPDH 鼠抗人单克隆抗体购于碧云天公司,一抗浓度 1:1 000,将结果用 Bio-Rad 凝胶摄像分析,再用分析软件 Quantity One 分析其目标蛋白条带灰度值,用灰

表 1 各组研究对象一般情况比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	年龄(岁)	病程(年)	HbA1c(%)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL(mmol/L)
NC 组	47.60±11.47■	0▲■	5.29±0.33▲■	4.57±1.34	2.21±0.98	2.38±0.7
DM 组	54.60±6.28	4.3±3.89●■	9.33±2.66●	4.69±1.35	2.21±1.43	2.61±0.87
DV 组	59.60±12.37●	9.9±4.51●▲	8.18±1.91●	4.79±1.65	2.28±1.79	2.43±1.02

●: $P<0.05$, 与 NC 组比较; ▲: $P<0.05$, 与 DM 组比较; ■: $P<0.05$, 与 DV 组比较。

度值表示蛋白的表达水平, 以 SET7/9 的灰度值除以内参 GAPDH 的灰度值得到 SET7/9 的相对表达量, 以每组相对表达量统计各组之间的差异性。(3) 用 RT-PCR 的方法检测各组 SET7/9 和 NF- κ B 的 mRNA 表达。引物由上海生工生物工程有限公司设计和合成, 凝胶定量分析软件 Quantity One 分析电泳条带灰度值, 以条带灰度值代表每个指标 mRNA 的相对表达量。以 SET7/9 和 NF- κ B 的灰度值除以 GAPDH 的灰度值分别得到各检测指标相对灰度值, 以每组相对灰度值统计各组之间的差异性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件统计分析数据, 所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 其中两两比较采用 q 检验, 组内比较采用独立样本均数 t 检验, 检验水准选择 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般情况比较 本研究发现, (1) 年龄: NC 组同 DV 组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 但 DM 组与 DV 组年龄差异无统计学意义; (2) 病程: DM 组较 NC 组 (NC 组病程均认定为 0 年) 病程长, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), DV 组较 DM 组病程长, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); (3) HbA1c: DM 组和 DV 组较 NC 组高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而 DM 组和 DV 组之间差异无统计学意义; (4) 血脂: TC、TG 和 LDL 3 项指标各组间差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

2.2 SET7/9 蛋白表达 Western blotting 结果 DV 组与 NC 组比较, SET7/9 蛋白表达增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); DM 组与 NC 组比较, SET7/9 蛋白表达变化差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 DM 组相比较, DV 组 SET7/9 表达增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 1, 表 2。

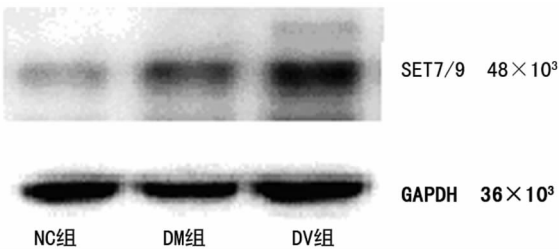


图 1 Western blotting 检测各组中 SET7/9 蛋白表达

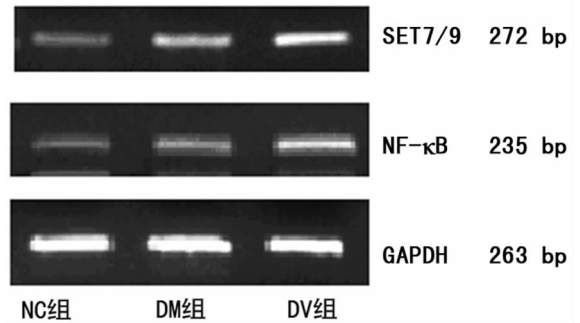
2.3 SET7/9 mRNA 表达 RT-PCR 结果 DM 组和 DV 组与 NC 组比较, SET7/9 mRNA 表达增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 DM 组比较, DV 组 SET7/9 mRNA 表达增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 2, 表 3。

2.4 NF- κ B mRNA 表达结果 RT-PCR 结果显示, DM 组和 DV 组与 NC 组比较, NF- κ B mRNA 表达增加 ($P<0.05$); 与 DM 组比较, DV 组 SET7/9 mRNA 表达增加 ($P<0.05$), 见表 3。

表 2 Western blotting 检测各组中 SET7/9 蛋白相对表达量($\bar{x}\pm s, n=10$)

分组	SET7/9 蛋白相对表达量
NC 组	2.222 9±0.512 0■
DM 组	2.596 2±0.468 8■
DV 组	4.641 6±1.038 8●▲

●: $P<0.05$, 与 NC 组比较; ▲: $P<0.05$, 与 DM 组比较; ■: $P<0.05$, 与 DV 组比较。

图 2 SET7/9, NF- κ B 及 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图表 3 RT-PCR 检测各组 SET7/9 和 NF- κ B 表达

分组	SET7/9	NF- κ B
NC 组	1.070 5±0.084 9▲■	1.082 4±0.201 1▲■
DM 组	1.394 5±0.282 4●■	1.491 8±0.229 8●■
DV 组	1.818 0±0.237 8●▲	1.868 5±0.316 1●▲

●: $P<0.05$, 与 NC 组比较; ▲: $P<0.05$, 与 DM 组比较; ■: $P<0.05$, 与 DV 组比较。

3 讨论

2 型糖尿病大血管病变的基础病理生理学改变是 AS, 这一过程有多种炎症因子参与, 他们对推动其发展有密切作用^[4-5]。AS 的特征性病变是炎症反应并且伴有纤维细胞增殖, 这一过程受到炎症的核心因子 NF- κ B 的调控, 因此可以推断, NF- κ B 和 AS 的发生密切相关^[6]。NF- κ B 活化后能够诱导各种细胞因子转录^[7], 这些因子繁多, 包括细胞生长因子、趋化因子、黏附分子和 I κ B 等, 他们可以使单核细胞参与 AS 早期病理生理步骤, 从而促进糖尿病大血管病变发生。本研究发现, 2 型糖尿病大血管病变患者的 NF- κ B 基因表达水平较正常对照组和 2 型糖尿病无大血管病变组均有增高, 所以, 2 型糖尿病大血管并发症和 NF- κ B 密切相关, 可以推测在 2 型糖尿病患者体内, 多种原因引起 NF- κ B 基因表达的上调, NF- κ B 的过度激活促使了血管炎症的发生。

SET7/9 是组蛋白特异性的甲基转移酶, 它可以在特定的

组蛋白的氨基酸残基上加上一个或多个甲基。Li 等^[3]研究发现, SET7/9 催化的组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸残基的单甲基化 (H3K4me1) 能通过干扰 NF- κ B 和改变染色质启动子的修饰, 调节 NF- κ B 关键亚基下游的炎症基因表达。他们在后续的研究中通过基因敲除 SET7/9 的方法发现, H3K4me1 启动子基因表达明显减少, 同时 NF- κ B 的 p65 亚基与单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 启动子的相互结合也减少。这表明在高糖情况下, SET7/9 可能协同激活了 NF- κ B 的转录活性, 通过这一途径刺激炎症反应。同样在高糖环境下, 内皮细胞中的 SET7/9 也表现出调节 NF- κ B 表达的作用^[8-9]。本研究发现, 2 型糖尿病大血管病变组患者 SET7/9 蛋白和 mRNA 表达水平较 2 型糖尿病无大血管病变组及健康对照组均明显增高, 同时还发现, 在各组中 NF- κ B 的 mRNA 表达水平变化情况与 SET7/9 一致。可见, 在糖尿病患者体内, SET7/9 的蛋白表达同糖尿病大血管并发症的形成密切相关, 由此可以推测, 随着这些患者体内 SET7/9 蛋白表达水平的升高, SET7/9 通过组蛋白甲基化途径使 NF- κ B 等各种炎症因子活化增强, 从而参与了糖尿病大血管并发症的发生、发展。而 SET7/9 还可以通过其他途径催化各种转录因子如 p53、TAF10 等的甲基化调控炎症反应^[10-11]。

糖尿病患者可以通过营养运动、药物干预等综合治疗控制血糖恢复正常。但是有许多患者在一定时间内血糖控制不佳, 虽然在其后的治疗中血糖控制达标, 但仍然会发生某些糖尿病并发症, 这种现象被学者称为“代谢记忆”效应。最近的研究表明, “代谢记忆”可能与表观遗传改变有关, 可能受染色质重构、组蛋白甲基化的改变所影响。Brasacchio 等^[8]将内皮细胞在高糖环境培养 16 h, 然后再在普通糖浓度中培养数天, 他们发现, 在这些细胞中 H3K4me1 启动子被其甲基转移酶 SET7/9 占位增加, 从而使 NF- κ B p65 亚基表达增加。也就是说糖浓度恢复正常培养数天后, 这些细胞的炎症基因表达仍然和高糖环境下相似。所以, 暴露在高血糖环境中一定时期可以导致表观遗传改变, 从而通过改变靶细胞染色质结构来改变其基因表达, 这种现象和糖尿病的代谢记忆效应相似。本研究纳入的大部分 2 型糖尿病患者, 由于没有定期做体检, 等到出现了严重的“三多一少”临床症状才“初诊”糖尿病, 此时他们虽然没有出现并发症, 但是血糖已经很高, 并且可能已经持续了相当长的时间。而他们中的部分患者在糖尿病诊断后血糖控制一直达标, 但最终还是出现了糖尿病大血管的并发症。也就是说这些患者已经发生了代谢记忆效应。以此推测在这些患者体内, 高血糖使 SET7/9 基因表达增加, 同时伴有 SET7/9 在 H3K4me1 启动子的招募增加。这样就改变了 H3K4 甲基化水平, 而在其后的治疗中, 虽然血糖控制达标, 但上述改变可能并没有得到恢复, 这些改变使 NF- κ B p65 亚基表达增加, 导致糖尿病大血管病变的出现, 即代谢记忆效应。

虽然目前本研究尚不能阐明 SET7/9 参与 2 型糖尿病患者大血管并发症的具体机制, 还应当在今后的研究中证实。

但是有理由相信, SET7/9 可能会成为治疗糖尿病大血管并发症, 逆转代谢记忆效应的新靶点。

参考文献:

- [1] Sjöholm A, Nyström T. Endothelial inflammation in insulin resistance[J]. *Lancet*, 2005, 365(9459): 610-612.
- [2] Loppnow H, Werdan K, Buerke M. Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine and innate immunity-related inflammatory mechanisms[J]. *Innate Immun*, 2008, 14(2): 63-87.
- [3] Li Y, Reddy MA, Miao F, et al. Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF- κ B-dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(39): 26771-26781.
- [4] Wilson AM, Ryan MC, Boyle AJ. The novel role of C-reactive protein in cardiovascular disease risk marker or pathogen[J]. *Int J Cardiol*, 2006, 106(3): 291-297.
- [5] Lobbes MB, Lutgens E, Heeman S, et al. Is there more than C-reactive protein and Fibrinogen? The prognostic value of soluble CD40 ligand, in interleukin-6 and oxidized Low-density lipoprotein with respect to coronary and cerebral vascular disease [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 187(1): 18-25.
- [6] Wilson SH, Caplice NM, Simari RD, et al. Activated nuclear factor- κ B is present in the coronary vasculature in experimental hypercholesterolemia[J]. *Atherosclerosis*, 2000, 148(1): 23-30.
- [7] Brasier AR. The NF- κ B regulatory network[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2006, 6(2): 111-113.
- [8] Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, et al. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail[J]. *Diabetes*, 2009, 58(5): 1229-1236.
- [9] El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia [J]. *J Exp Med* 2008, 205(10): 2409-2417.
- [10] Wang H, Cao R, Xia L, et al. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase[J]. *Mol Cell*, 2001, 8(6): 1207-1217.
- [11] Kouskouti A, Scheer E, Staub A, et al. Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation [J]. *Mol Cell*, 2004, 14(2): 175-182.