

• 综 述 •

DNA 甲基化在女性正常妊娠与输卵管妊娠中的作用*

纪艺珍,张瑞晴 综述,张佳荣[△] 审校

(上海交通大学附属第一人民医院妇产科 200080)

关键词: DNA 甲基化; DNA 甲基转移酶; 宫内妊娠; 输卵管妊娠; 雌激素受体**DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.17.059 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)17-2643-03**

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNMTs)的作用下,将 S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基基团共价结合到 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5 碳位上的过程。虽然目前普遍认同 DNA 甲基化可以调节参与胚胎着床及妊娠,但是其在胚胎着床中发挥的具体作用仍未明确。表观遗传修饰特别是 DNA 甲基化目前已经成为正常妊娠和异位妊娠机制研究的热点问题,本文就这方面内容进行综述。

1 DNA 甲基化与 DNMTs

DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要方式,能在不改变 DNA 序列的前提下,改变遗传表现。DNA 甲基化是由 DNMTs 催化 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体,将胞嘧啶转变为 5-甲基胞嘧啶的一种反应。在真核生物 DNA 中,5-甲基胞嘧啶是唯一存在的化学性修饰碱基。CpG 二核苷酸是最主要的甲基化位点,它在基因组中呈不均匀分布,存在高甲基化、低甲基化和非甲基化的区域,在哺乳动物中 5-甲基胞嘧啶占胞嘧啶总量的 2%~7%。在成熟体细胞组织中,DNA 甲基化一般发生于 CpG 二核苷酸部位,而非 CpG 甲基化则于胚胎干细胞中较为常见。

一般认为,哺乳动物的 DNMTs 有 4 种,分为两个家族:DNMT1 和 DNMT3(另有一种 DNMT2,主要为 tRNA 的甲基转移酶,也有报导称 DNMT2 具有微弱的 DNMTs 活性)。DNMT1 家族在 DNA 复制和修复中维持其甲基化;而 DNMT3 家族则催化 CpG 从头甲基化。DNMT3 包括了两个从头甲基转移酶 DNMT3a、DNMT3b 和一个调节蛋白 DNMT3L^[1]。DNMT1 持续表达于增殖的细胞,DNMT3a 普遍表达于成熟的组织中,DNMT3b 在除外睾丸、甲状腺和骨髓组织的大多组织中均为低表达。

一般情况下 DNA 甲基化可抑制基因的表达,甲基化缺失与基因的过表达相关。目前研究已知的转录因子多含有能够识别富含 GC 二核苷酸的 DNA 序列的结合位点,并且许多转录因子的识别因子包含 CpG 双核苷酸。正常情况下,转录因子结合到基因启动子区域的 CpG 位点而激活基因的转录^[2]。在病理状态下,由于 DNA 甲基化的上调,过度的 CpG 二核苷酸甲基化干扰了启动子与转录因子的结合,进而抑制了基因的转录。

DNA 甲基化是一种活跃的表现遗传基质,并且在调节组织与细胞特异性基因表达中发挥重要的作用^[2]。在基因组水平,限制性标志基因组扫描和基于微阵列的方法已经识别出某些特异组织中促进基因表达的差异性甲基化区域。在单一基因水平,随着研究的进展发现越来越多的基因通过甲基化的调节在成熟机体疾病的早期发展发挥作用。Maekawa 等^[3]的研究发现反常的 DNA 甲基化及其相关的异常转录可能与肿瘤的发生进程相关,并且可能是细胞转化的关键机制。

2 DNA 甲基化与子宫内膜

育龄期女性中,子宫内膜经受着复杂的形态学和功能学改变,形成月经周期。子宫内膜的主要功能是为胚胎植入及胚胎发育提供一个最佳种植位点。DNA 甲基化对于维持子宫内膜形态功能具有重要作用。马小平^[4]通过荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)、甲基化特异性聚合酶链反应对子宫内膜生理病理状态下输卵管内皮生长因子(VEGF)的甲基化水平测定发现,VEGF 的高甲基化水平对于维持正常子宫内膜形态具有重要作用,子宫内膜癌内膜的 VEGF 的甲基化水平明显降低。邓凯贤等^[5]通过 RT-PCR 发现子宫内膜异位症异位灶的 HOXA10 基因启动区甲基化率明显高于正常子宫内膜。

现有研究表明,可以测定月经周期中人子宫内膜 DNMTs 表达的 mRNA 及蛋白质表达谱,并且可以分析在离体子宫内膜外植体系统中卵巢类固醇激素所导致的 DNMTs 基因表达的改变。Yamagata 等^[6]的研究发现 DNMT1 mRNA 在月经周期中并没有改变;与之相反,DNMT3a 的转录在子宫内膜分泌早期和分泌晚期的表达表现出明显地降低;并且,DNMT3b 的转录在早、中、晚分泌期明显低于增生期。当增生期子宫内膜外植体系统与雌激素和孕激素接触反应 48 h 后,3 种 DNMTs 的转录均表现为明显的抑制。此外,孕酮单独作用 48 h 后,DNMT1 mRNA 的表达明显下调;雌激素单独作用 48 h 后,DNMT3b mRNA 的表达明显下调。DNMTs mRNA 与蛋白质表达可能与 mRNA、蛋白质的差异转换率有关,此现象在乳腺癌与肺癌组织细胞系中已有报道^[7]。蛋白质与 mRNA 分离的现象可能与子宫内膜细胞系随着月经周期改变有关,细胞特异性的 DNMTs 表达可能也参与了下一期观察到的变化。

子宫内膜基因主要受雌激素和孕激素的调节,雌激素和孕激素通过其与细胞核受体的结合发挥作用^[6]。在子宫内膜、子宫肌层及乳腺组织中均已发现雌、孕激素受体受甲基化的影响^[8-9]。在分泌期子宫内膜中,DNMTs 水平的升高伴随着孕酮水平的降低;孕激素处理子宫内膜后,DNMTs mRNA 的表达水平降低。有研究发现 DNMTs 通过促进甲基化及反甲基化在雌激素受体 α 的目标基因转录周期中发挥重要的作用。

3 DNA 甲基化与正常宫内妊娠

子宫内膜容受性指子宫内膜允许胚胎着床的接受状态,这种状态的持续时间称为着床窗,具体时间范围在正常月经周期的第 20~24 天,即黄体生成素高峰后 7~11 d。在一个月经周期中,胚泡能够成功种植在子宫内膜的时间窗只有 4 d。此时间窗调控机制复杂而精细,涉及多个基因、生物分子、细胞因子和信号传导通路。O'doherty 等^[10]通过焦磷酸测序技术发现牛科动物的差异性甲基化区域在胚胎发育早期的甲基化水平变化较大,并且在胚泡期的波动最大。

子宫内膜基质细胞的增生和蜕膜化是胚胎着床的重要环

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81200408);复旦大学附属妇产科医院基金资助项目(14DZ2271700)。

[△] 通信作者,E-mail:maggie1974@126.com。

节。碱性磷酸酶活性提高是子宫内膜基质细胞蜕膜化的主要标志物。有研究报道,通过甲基化敏感的限制性指纹谱技术发现在蜕膜化的小鼠模型中,与未分化的子宫内膜间质细胞相比,蜕膜化的细胞出现多个基因的高度甲基化或低甲基化^[11-12]。以上研究发现蜕膜化的子宫内膜上皮细胞中 Bcl3 与 Slc16a3 等多个基因的异常高度甲基化,更是说明 DNA 甲基化在子宫内膜的蜕膜化发挥作用。Agoulnik 等^[13]研究发现用 DNA 甲基化抑制剂——去甲基化药物 5-氮-2 脱氧胞苷用于小鼠的动物实验导致宫内胚胎着床减少。该研究发现用 5-氮-2 脱氧胞苷处理小鼠后,基质细胞的碱性磷酸酶活性降低。5-氮-2 脱氧胞苷可抑制 DNA 转甲基化酶的表达,并且呈现时间依赖性和剂量依赖性。小剂量的 5-氮-2 脱氧胞苷主要抑制 DNMT3a 的表达,大剂量的 5-氮-2 脱氧胞苷对 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 蛋白质的表达均有抑制作用。CBX4 基因在细胞增殖、分化、衰老过程均发挥作用。Ponsuksili 等^[14]研究发现 CBX4 基因参与牛子宫内膜蜕膜化过程。有研究者通过甲基化敏感的限制性指纹谱技术发现 CBX4 基因在小鼠蜕膜化子宫内膜间质细胞高度甲基化,进一步证实 CBX4 基因甲基化在子宫内膜蜕膜化发挥作用。Haouzi 等^[15]研究发现在胎盘组织中,由于启动子区域的甲基化导致 DNMT1 的表达下调,与之相反,促进了 DNMT3a 和 DNMT3b 的表达。还有研究者通过 DNMT3a si-RNA 敲除小鼠内源性 DNMT3a 的表达,发现小鼠胎盘无法正常形成。

4 雌激素受体、孕激素受体与妊娠

雌激素受体 α 、孕激素受体是调节胚胎容受性和蜕膜化的必要基因,它们的异常表达可能会导致哺乳动物中胚胎着床的缺陷^[16]。Shao 等^[17]曾经通过延迟着床的小鼠模型,证实胚胎以雌激素依赖的黏附方式黏附于处于着床窗的子宫内膜并实现着床。雌激素通过与细胞核的雌激素受体结合,雌激素受体通过与特定的 DNA 序列片段结合而调节基因的转录。Diao 等^[18]的研究发现雌激素受体 α 缺陷的雌性小鼠无法实现胚胎的着床。有研究者通过 Western Blot 研究证实由于 5-氮-2 脱氧胞苷的去甲基化作用,雌激素受体 α 、孕激素受体的表达受抑制^[13,19]。雌激素受体 α 、孕激素受体的表达抑制存在组织特异性:孕激素受体主要在基质细胞中表达降低;雌激素受体 α 主要在基质细胞、腺上皮中表达降低。多项研究表明 DNA 甲基化对子宫内膜变化调节基因的表达具有双向调节作用^[20]。在输卵管上皮细胞中可以检测到雌激素受体 α 的表达,并且其表达不受月经周期的影响。在输卵管妊娠的女性中,与输卵管妊娠非着床位点相比,输卵管妊娠着床位点的雌激素受体 α 表达明显降低。

5 DNMTs 与输卵管妊娠

输卵管上皮通过阻碍输卵管上皮细胞和早期胚胎的直接接触而抑制输卵管妊娠的发生。输卵管的炎症损伤、微环境的改变可能促进输卵管妊娠的发生。直接比较妊娠时限一致的输卵管妊娠和宫内妊娠的 DNMTs 表达情况及整体的 DNA 甲基化状态实在困难。因此有学者研究正常女性输卵管、输卵管妊娠胚胎着床位点、非着床位点输卵管的 5-甲基胞嘧啶水平和 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 水平。DNMT1 家族主要功能是在 DNA 复制和修复中维持其甲基化,当 DNA 损伤位点的 DNA 修复程序激活, DNMT1 就会积聚到 DNA 损伤位点^[3]。免疫组织化学试验发现在输卵管妊娠女性的非着床位点,输卵管上皮细胞细胞质中检测到有 DNMT1 及 5-甲基胞嘧啶的表达,然而在输卵管妊娠女性的着床位点输卵管上皮细胞中未检测到 DNMT1 及 5-甲基胞嘧啶的表达。是否由于 DNMT1 表达的缺失使得排卵后的输卵管上皮细胞 DNA 损伤修复进程受阻,从而导致了输卵管上皮细胞与胚胎的直接接触进而导

致胚胎在输卵管着床仍有待进一步研究证实。然而 RT-PCR 分析发现, DNMT1 的 mRNA 表达水平在输卵管妊娠着床位点及非着床位点之间没有明显差别。DNMT1 在输卵管妊娠着床位点的蛋白质和 mRNA 表达分离,其在转录过程的调控有待进一步研究。DNMT3a、DNMT3b 的 mRNA 表达水平在输卵管妊娠着床位点明显升高,虽然未能直接说明 DNA 甲基化在输卵管妊娠中所发挥的作用,但是 DNMT1、DNMT3a、5-甲基胞嘧啶在输卵管妊娠着床位点表达的差异说明着床的胚胎通过细胞特异性的旁分泌方式调节输卵管的 DNA 甲基化状态。总而言之,甲基化在 DNA 损伤修复中扮演重要角色。

DNA 甲基化在异位妊娠的发生、发展过程中如何发挥作用,目前较少有关于特异性基因甲基化水平在异位妊娠的研究。Nafise 等通过反转录聚合酶链反应及 FQ-PCR 发现,输卵管妊娠妇女的 VEGF、血管内皮生长因子受体 1(VEGFR1)、血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)的表达相比对照组明显降低。但是未深入研究 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 基因启动子 CpG 岛的甲基化水平,是否是 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 启动子 CpG 岛的高度甲基化导致 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 的表达降低有待进一步研究。Balasubramaniam 等^[21]通过免疫组织化学技术发现与正常输卵管相比,异位妊娠输卵管的胚胎着床位点及其附近的输卵管组织白细胞介素(IL)-6、IL-8 表达水平升高。Rajendiran 等^[22]在其研究的基础上通过测定 IL-6、IL-8 水平,证明与正常宫内妊娠妇女血清相比,在异位妊娠妇女血清中 IL-6 水平明显升高;与之相反,IL-8 水平明显降低。Refaat 等^[23]通过 RT-PCR 研究发现 MUC-1 黏蛋白在输卵管妊娠胚胎着床位点的表达水平较正常输卵管明显降低。

目前有较多研究说明 VEGF、IL-6、IL-8、MUC-1 黏蛋白等因子在异位妊娠输卵管中 mRNA 水平、蛋白水平的改变,但均未深入研究其 DNA 水平的分子机制及其作用。目前研究报道了各个输卵管妊娠相关因子在输卵管妊娠的着床位点或患者血清中表达有过表达也有低表达,说明其对应基因的甲基化水平同样有高低。在异位妊娠的发生过程中可能存在 DNA 甲基化异常,因此通过检测未行超声检查明确正常宫内妊娠的早孕孕妇外周血差异甲基化基因可能成为预测异位妊娠发生的新的标志物。异位妊娠患者的女性后裔可以行基因筛查,明确自身异位妊娠的风险。然而特异基因在输卵管妊娠中的甲基化情况仍然有待进一步研究。

6 小 结

DNA 甲基化对维持正常子宫内膜形态具有重要作用, DNA 甲基化异常可能导致子宫内膜病变。DNA 甲基化在正常宫内妊娠、胚胎早期发育中发挥作用, DNA 甲基化异常可能导致胚胎着床延后、胚胎发育缺陷。相关特异基因甲基化模式的研究可以从新的角度解释异位妊娠发生发展的分子机制。虽然现在很多研究报道了表观遗传修饰与正常宫内妊娠和异位妊娠的关系,然而目前较少有关于异位妊娠中特异基因甲基化的研究。通过检测特异基因的甲基化水平有望成为检测异位妊娠新的特异性指标,甚至可能成为异位妊娠的特异性生物靶点。

参考文献

- [1] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(7):484-492.
- [2] Cedar H, Bergman Y. Programming of DNA methylation patterns[J]. Annu Rev Biochem, 2012, 81(1):97-117.
- [3] Maekawa R, Sato S, Okada M, et al. Tissue-Specific Expression of Estrogen Receptor 1 Is Regulated by DNA

- Methylation in a T-DMR[J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 30(3):335-347.
- [4] 马小平. 子宫内腺癌组织 VEGF-C 启动子早基化状态与蛋白表达的检测及意义[D]. 济南:山东大学, 2015.
- [5] 邓凯贤, 柳晓春, 郑玉华, 等. 子宫内腺异位症内膜组织中 HOXA10 基因异常 DNA 甲基化及意义[J]. *现代妇产科进展*, 2011, 20(11):868-872.
- [6] Yamagata Y, Asada H, Tamura I, et al. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen[J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(5):1126-1132.
- [7] Huh SJ, Clement K, Jee D, et al. Age- and pregnancy-associated DNA methylation changes in mammary epithelial cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4(2):297-311.
- [8] Li BL, Lu W, Lu C, et al. CpG island hypermethylation-associated silencing of microRNAs promotes human endometrial cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1):44-47.
- [9] Ding N, Bonham EM, Hannon BE, et al. Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage[J]. *J Mol Cell Biol*, 2016, 8(3):244-254.
- [10] O'doherty AM, Magee DA, O'shea LC, et al. DNA methylation dynamics at imprinted genes during bovine pre-implantation embryo development[J]. *BMC Dev Biol*, 2015, 15(1):13-17.
- [11] Gao F, Das SK. Epigenetic regulations through DNA methylation and hydroxymethylation: clues for early pregnancy in decidualization[J]. *Biomol Concepts*, 2014, 5(2):95-107.
- [12] Gao F, Ma X, Rusie A, et al. Epigenetic changes through DNA methylation contribute to uterine stromal cell decidualization[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(12):6078-6090.
- [13] Agoulnik I, Ding YB, Long CL, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine Leads to Reduced Embryo Implantation and Reduced Expression of DNA Methyltransferases and Essential Endometrial Genes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e45364.
- [14] Ponsuksili S, Murani E, Schwerin M, et al. Gene expression and DNA-methylation of bovine pretransfer endometrium depending on its receptivity after in vitro-produced embryo transfer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e42402.
- [15] Haouzi D, Dechaud H, Assou S, et al. Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophectoderm and endometrial cells during the implantation period[J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(6):1440-1449.
- [16] Ramathal C, Bagchi I, Taylor R, et al. Endometrial Decidualization of Mice and Men[J]. *Semin Reproduct Med*, 2010, 28(1):17-26.
- [17] Shao R. Understanding the mechanisms of human tubal ectopic pregnancies: new evidence from knockout mouse models[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(3):584-587.
- [18] Diao H, Li R, El Zowalaty AE, et al. Deletion of lysophosphatidic acid receptor 3 (Lpar3) disrupts fine local balance of progesterone and estrogen signaling in mouse uterus during implantation[J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(5):123-129.
- [19] Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(4):670-676.
- [20] Curtis HS, Goulding EH, Eddy EM, et al. Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent[J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(4):1268-1277.
- [21] Balasubramaniam ES, Van Noorden S, El-Bahrawy M. The expression of interleukin (IL)-6, IL-8, and their receptors in fallopian tubes with ectopic tubal gestation [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(4):898-904.
- [22] Rajendiran S, Senthil Kumar GP, Nimesh A, et al. Diagnostic significance of IL-6 and IL-8 in tubal ectopic pregnancy[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2016, 36(7):909-911.
- [23] Refaat B, Simpson H, Britton E, et al. Why does the fallopian tube fail in ectopic pregnancy? The role of activins, inducible nitric oxide synthase, and MUC1 in ectopic implantation[J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(5):1115-1123.

(收稿日期:2017-03-16 修回日期:2017-04-23)

• 综 述 •

血小板抑菌作用的研究进展*

李贞贞^{1,2}, 易 静¹综述, 胡兴斌¹, 尹 文^{1,2Δ} 审校

(1. 第四军医大学西京医院输血科, 西安 710032; 2. 第四军医大学基础部微生物学教研室, 西安 710032)

关键词: 细菌性感染; 抗菌药物; 血小板; 抑菌作用; 抑菌模式

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.17.060 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)17-2645-04

血小板是哺乳动物体内最小(直径 2~4 μm)、无细胞核、来自巨核细胞系的细胞, 在人体内的寿命大约为 7 d^[1]。虽然血小板没有细胞核, 不能自我复制, 但血小板能够利用来自巨核细胞稳定的 mRNA 进行翻译, 并能独立合成蛋白质^[2]。血小板包括 3 种颗粒^[3]: δ 颗粒分泌血小板紧张度调节肽——核

酸(ADP 和 GTP)、生物活性胺类(组胺、5-羟色胺)及生物活性离子(Ca²⁺ and PO₄⁻); α 颗粒主要分泌黏附分子、血小板抗凝血素、细胞因子源性抗菌肽、促有丝分裂因子、凝血因子、蛋白酶抑制剂; λ 颗粒分泌多种多样的酶类, 如蛋白酶、糖苷酶, 这些蛋白酶可促进血小板-纤维蛋白凝块收缩, 组织再生和伤口

* 基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划青年人才项目(2016JQ8033)。

Δ 通信作者, E-mail: yinwen@fmmu.edu.cn。