

## 10/11 易位家族蛋白 2 和羟甲基化修饰在动脉粥样硬化中的作用及其机制

陈杰梅, 朱海波

(天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 新药作用机制研究与药效学评价北京重点实验室,  
中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京市 100050)

[关键词] 10/11 易位家族蛋白 2; 5-羟甲基胞嘧啶; 表观遗传修饰; 动脉粥样硬化

[摘要] 动脉粥样硬化(As)是心脑血管疾病的重要病理基础。近年来,许多研究表明表观遗传机制在 As 的调控中也起着重要作用。被称为 DNA 第 6 种碱基的 5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)是染色体 10/11 易位家族蛋白(TET)介导 DNA 去甲基化产生的一种重要表观遗传修饰,参与多种生物学过程。最近研究表明,TET2 及其介导的羟甲基化修饰不仅参与血管平滑肌细胞表型转化调控,还与内皮功能、炎症免疫反应等 As 的关键因素密切相关。在 As 斑块中也检测到 TET2 和 5hmC 明显缺失,缺失水平与损伤程度呈正相关。TET2 和羟甲基化修饰可能在 As 的病理过程中发挥重要保护作用。本文将介绍 TET2 的结构及其功能、5hmC 的研究概况及检测技术突破,重点阐述 TET2 及其介导的羟甲基化修饰在 As 中的作用及其机制,为 As 的有效防治提供新思路和新靶点。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

### The role and mechanism of ten-eleven translocation 2 and hydroxymethylation in atherosclerosis

CHEN Jiemei, ZHU Haibo

(State Key Laboratory for Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

[KEY WORDS] ten-eleven translocation 2; 5-hydroxymethyl cytosine; epigenetic modification; atherosclerosis

[ABSTRACT] Atherosclerosis (As) is an important pathological basis for cardio-cerebrovascular diseases. In recent years, many studies have shown that epigenetic mechanisms also play an important role in the regulation of As. 5-hydroxymethyl cytosine (5hmC), known as the sixth base of human DNA, is an important epigenetic modification derived from the demethylation process of DNA mediated by the ten-eleven translocation (TET) protein family, and has been known to involve in various biological processes. Recent studies have shown that TET2 and its mediated hydroxymethylation are not only involved in the regulation of phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells, but also closely related to the key factors of As such as endothelial function and inflammatory immune response. It is also found that TET2 and 5hmC are markedly absent in As plaque, and the level of deletion is positively correlated with the degree of injury. TET2 and hydroxymethylation may play an important protective role in the pathological process of As. This review will introduce the structure and function of TET2, the research overview of 5hmC and the breakthrough in detection techniques. It will focus on the role and mechanism of TET2 and its mediated hydroxymethylation modification in As, and provide new ideas and targets for the effective prevention and treatment of As.

[收稿日期] 2018-12-06

[修回日期] 2019-01-27

[基金项目] 国家自然科学基金重大研究计划培育项目(91539126);国家“十三五重大新药创制”科技重大专项课题(2018ZX09711001-003-011);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(CAMS-I2M-1-009)

[作者简介] 陈杰梅,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化相关疾病新药靶的发现和药物研发,E-mail 为 chenjiemei@imm.ac.cn。通信作者朱海波,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化相关疾病新药靶的发现和药物研发,E-mail 为 zhuhaibo@imm.ac.cn。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是环境和遗传因素共同作用的结果,也是多种 As 性心脑血管系统疾病最常见的病理基础<sup>[1]</sup>。但其潜在的调控机制尚未完全阐明。近年来,许多研究表明表观遗传机制在 As 的调控中也起着重要作用。表观遗传修饰包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、RNA 干扰、染色体构型重塑等,其中 DNA 甲基化是研究得最清楚的表观遗传修饰形式。而 5-甲基胞嘧啶 (5-methyl cytosine, 5mC) 是哺乳动物 DNA 甲基化的主要形式,约占 CpG 位点的 60% ~ 80%<sup>[2]</sup>。随着研究的深入,人们发现 DNA 修饰除了 5mC 外,还存在 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethyl cytosine, 5hmC)、5-甲酰胞嘧啶 (5-formyl cytosine, 5fC) 和 5-羧基胞嘧啶 (5-carboxyl cytosine, 5caC) 等<sup>[3-4]</sup>;这些修饰主要发生于染色体 10/11 易位家族蛋白家族 (ten-eleven translocation, TET) 介导的 DNA 去甲基化过程。TET 家族包括 3 个成员: TET1、TET2 和 TET3。TET2 及其介导产生的 5hmC 近年来被广泛研究。TET2 被认为是一种抑癌基因,它的突变伴随 5hmC 水平下降,可以引起多种肿瘤的发生<sup>[5-6]</sup>。最近研究发现, TET2 和 5hmC 在人的冠状动脉 As 斑块中明显缺失<sup>[7]</sup>。在许多 As 相关模型中也发现, 5hmC 的水平随着 TET2 表达下降而降低,与 As 的关键因素密切相关<sup>[7-9]</sup>。因此,深入探讨 TET2 及其介导的羟甲基化修饰在 As 中的作用及其机制,可能为 As 的有效防治提供新的思路和治疗靶点。

## 1 10/11 易位家族蛋白 2 的结构及其功能

TET2 属依赖于  $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -ketoglutaric acid,  $\alpha$ -KG) 和  $\text{Fe}^{2+}$  的 TET 双加氧酶家族。该蛋白羧基末端的核心催化结构域由 1 个双链  $\beta$ -螺旋 (double stranded  $\beta$  helix, DSBH) 域和 1 个富含半胱氨酸域组成<sup>[10]</sup>。其中 DSBH 域具有 3 个  $\text{Fe}^{2+}$  和 1 个  $\alpha$ -KG 的结合位点,可招募  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\alpha$ -KG 将 DNA 中的 5mC 氧化为 5hmC。而富含半胱氨酸的区域围绕着 DSBH 核,以稳定整体结构和 TET 与 DNA 相互作用<sup>[11]</sup>。人类 TET2 基因位于 4q24 上,基因长度为 96 kb,含有 11 个外显子。与 TET1 和 TET3 不同的是, TET2 氨基端不包含核定位序列和 Cys-Xaa-Xaa-Cys (CXXC) 氨基酸序列结合域。研究发现, TET2 的 CXXC 结构域是由于进化过程中的染色体基因倒置而从催化域中分离了出来,在 4 号染色体长臂 22 ~ 24 位形成一个名为 Dvl 和 Axin 复合物抑制因子 (inhibitor of the Dvl and Axin complex, IDAX) 基因

(也被称为 CXXC4)<sup>[12]</sup>。IDAX CXXC 结构域结合未甲基化的 CpG 二核苷酸 DNA 序列,定位于基因组 DNA 的启动子和 CpG 岛,并直接与 TET2 的催化结构域相互作用<sup>[12]</sup>。IDAX 通过 IDAX CXXC 域与 DNA 结合导致 Caspase 活化和 TET2 表达下调,表明 IDAX 在降解前将 TET2 招募到 DNA 中。另外, IDAX 缺失可抑制小鼠胚胎干细胞分化过程 TET2 的下调,短发夹 RNA 对 IDAX 的抑制增加人单核细胞系 U937 TET2 的表达<sup>[12]</sup>。

TET2 可催化 DNA 中 5mC 转化为 5hmC,随后还可继续催化 5hmC 转化为 5fC 和 5caC,然后通过碱基切除修复途径可将该位点转化为非甲基化的胞嘧啶,导致 DNA 去甲基化和基因激活<sup>[13]</sup>。此外, 2018 年最新研究发现, TET2 还介导 mRNA 中的 5mC 氧化为 5hmC, TET2 缺失导致全转录组范围外的 5mC 出现<sup>[14]</sup>。这从表观机制层面揭示了 TET2 参与基因转录后调控。TET2 在体内广泛表达,高表达于造血细胞<sup>[15-16]</sup>。许多研究表明, TET2 介导 DNA 去甲基化、组蛋白糖基化,参与造血细胞和胚胎的发育、胚胎干细胞维持和分化。其中, TET2 及其介导的 DNA 去甲基化过程一直是研究热点,在肿瘤等疾病中被广泛研究。研究表明, TET2 和 5hmC 的缺失是侵袭性黑色素瘤的表观遗传学特征,具有诊断和预后意义<sup>[5-6]</sup>。这些作用依赖于 TET2 的双加氧酶活性。另外,有研究报道, TET2 可选择性的介导抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激的树突状细胞和巨噬细胞等细胞内白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 的转录<sup>[17]</sup>。其机制研究证实, TET2 是通过招募组蛋白去乙酰化酶 2 抑制了 IL-6 的转录,而这个过程独立于 DNA 甲基化及羟甲基化作用。由此可见, TET2 发挥生物学功能,既可依赖于本身的双加氧酶活性,也可独立于双加氧酶活性。

## 2 羟甲基化修饰

### 2.1 5-羟甲基胞嘧啶研究概况

5hmC 是 TET 蛋白家族介导 5mC 主动去甲基化过程的一个相对稳定的中间产物。近年来, 5hmC 是表观遗传学的研究热点。对 5hmC 的分布以及动力学进行全基因组比对分析发现, 5hmC 主要富集于基因体、启动子和增强子中,并且参与哺乳动物发育和细胞分化过程,与基因表达调控密切相关<sup>[18-20]</sup>。最初,研究者发现 5hmC 在人和小鼠大脑以及胚胎干细胞中广泛存在<sup>[21]</sup>。随后,研究发现,

在神经发生过程,5hmC 水平上升<sup>[22]</sup>;在雷特综合征(Rett syndrome)<sup>[23-24]</sup>和亨廷顿舞蹈症<sup>[25]</sup>中,5hmC 水平降低,但具体机制尚未清楚。有研究报道,致 Rett 综合征的甲基化 CpG 结合蛋白 2 突变体只能结合 5mC,而不能结合 5hmC,5hmC 水平与甲基 CpG 结合蛋白 2 含量存在负相关性,提示 5hmC 可能在 Rett 综合征发生发展起着重要作用<sup>[23-24]</sup>。研究也发现,5hmC 与胚胎干细胞多能状态及其分化相关<sup>[26]</sup>,5hmC 水平的降低可导致胚胎干细胞多能性的丧失,随着胚胎干细胞分化,5hmC 水平逐渐减少。当 TET1/2/3 完全敲除时,5hmC 缺失,小鼠胚胎干细胞分化成低分化的胚状体和畸胎瘤<sup>[27]</sup>。此外,大量研究发现,在肿瘤组织中 5hmC 的水平明显降低,不同肿瘤组织的 5hmC 模式不同,可作为诊断肿瘤的生物标志物。近来,外周血游离 DNA (cell free DNA, cfDNA) 的 5hmC 受到了研究者关注,因为它可能为临床诊断和预测人类疾病提供一种基于液体活检的非侵入性方法。几项研究已经证实,cfDNA 的 5hmC 标记物堪比肿瘤活检组织基因组 DNA 的 5hmC 标记物,都可以作为有效的生物标记物用于癌症诊断,而且 cfDNA 的 5hmC 标记物有望以一种无创的方式来诊断和预测人类癌症。此外,研究发现,5hmC 与心脏发育和病理性心肌肥厚也密切相关<sup>[28]</sup>。TET2 通过调控心肌关键基因 Myh7 基因体和增强子的 5hmC 修饰从而调控其表达,参与心脏的发育过程。另外,病理性肥大心肌的 5hmC 分布模式向新生儿转变<sup>[28]</sup>。由此可见,5hmC 修饰在疾病的发生发展过程中扮演重要角色。

## 2.2 5-羟甲基胞嘧啶检测技术的突破

随着研究的深入,5hmC 越来越多的生物学功能被人们发现,这也促使着 5hmC 检测技术和定量方法的不断突破。早期 5hmC 研究受限的很大的原因也可能是由于检测技术和定量方法的限制,一方面是因为当时传统的检测方法难以区分 5mC 和 5hmC;另一方面是由于 5hmC 在组织中含量的低,难以精确定量。最初的传统 5hmC 检测技术和定量方法,如色谱、质谱、特异性抗体识别、重亚硫酸盐测序法(bisulfite sequencing, BS-seq),并不能准确定量 5hmC,也不能区分 5mC 和 5hmC。而近年来,基于 BS-seq 技术发展起来的氧化重亚硫酸盐测序(oxidative bisulfite sequencing, OxBS-Seq)<sup>[29]</sup>,利用重金属盐高钨酸钾将 5hmC 氧化成 5fC,该位点在亚硫酸氢盐处理和 PCR 扩增后转化为胸腺嘧啶被识别,而未被处理的 5mC 则被读为胞嘧啶,最终由同一样品

的 BS-Seq 测序与 OxBS-Seq 测序的信号差值来确定 5hmC 信号。这种方法不仅克服了 BS-seq 不能区分二者的缺点,还实现了 5hmC 的定量定位,达到了精确的单碱基分辨率水平。达到单碱基分辨率检测水平的方法还有 TET 协同的亚硫酸氢钠法测序(tet-assisted bisulfite sequencing, TAB-Seq)<sup>[30]</sup>。TAB-Seq 结合了  $\beta$ -葡萄糖基转移酶( $\beta$ -glucosyl transferase,  $\beta$ -GT)介导的 5hmC 葡萄糖基化保护作用和小鼠重组 TET 介导的 5mC 氧化作用,不仅可以进行全基因组测序,也可进行位点特异性测序。可以对 5hmC 在基因序列进行精确定位的方法还有糖基化和高碘酸氧化结合生物素化的沉淀法<sup>[31]</sup>、RRHP 法<sup>[32]</sup>等。另外,基于化学、酶学修饰建立起来的方法也有很多,如 hMe-Seal 化学标记法<sup>[33]</sup>、结合蛋白 J 沉淀法<sup>[34]</sup>等。其中高效的 hMe-Seal 技术是利用 T4 噬菌体- $\beta$ -GT 将含有叠氮基的 UDP-6-N3-Glc 转移到 5hmC 的羟基上,使 DNA 上的 5hmC 都反应变为 N3-5ghmC,然后利用生物素去连接叠氮基,最后用磁珠将含有 5hmC 的片段洗脱下来,结合高通量测序分析 5hmC 在基因组 DNA 中的分布情况<sup>[33]</sup>。这种方法虽不能达到单碱基分辨率的水平,但是特异性高,可以测定 5hmC 在全基因组中的分布。而基于这种方法改进后的 5hmC-Seal 技术,具有更高的灵敏度和特异性,可以对极少量样品进行检测,输入量可低至 1 ng,极大的方便了一些珍稀样本的检测<sup>[35]</sup>。此外,第 3 代测序技术,如单分子实时 DNA 测序等<sup>[36]</sup>,也已经被用于检测 5mC、5hmC 等表观遗传修饰。这种方法可以测量 DNA 合成过程中核苷酸结合的动力学。核苷酸结合的动力学特征对结合基的序列环境敏感,可用于区分不同类型的碱基修饰。这些方法各有所长,在实际应用中可以根据实验设计 and 要求选择合适的方法。

## 3 10/11 易位家族蛋白 2 及其介导的羟甲基化修饰在 As 中的作用及其机制

As 也被认为是一种慢性、炎症性动脉血管疾病,主要累及周围大、中型动脉,是由大量脂质在动脉血管内膜层堆积引起的,与内皮细胞功能障碍、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖与迁移、表型转化、单核-巨噬细胞侵袭、泡沫细胞形成等密切相关。许多研究表明,TET2 和 5hmC 在 As 斑块中缺失,与 As 的形成与发展密切相关(图 1)。



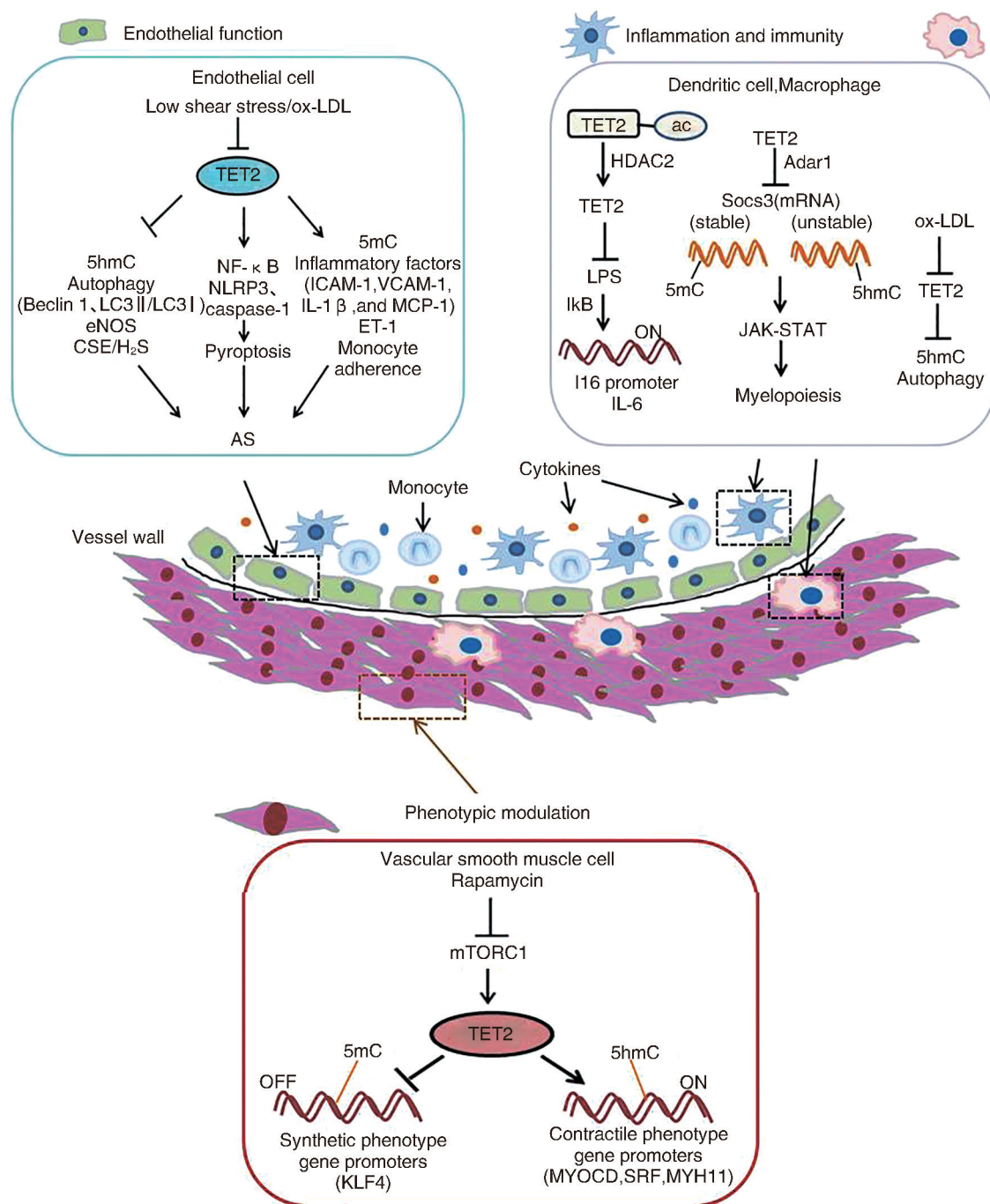


图 1. 10/11 易位家族蛋白 2 和羟甲基化修饰在 As 中的作用及其机制 ac: 乙酰化; Rapamycin: 雷帕霉素; eNOS: 一氧化氮合酶; ET-1: 内皮素 1; Pyroptosis: 焦亡。→: 促进; —|: 抑制。

Figure 1. The role and mechanism of TET2 and 5hmC in the regulation of atherosclerosis processes

### 3.1 10/11 易位家族蛋白 2 及其介导的羟甲基化修饰与血管内皮功能

血管内皮功能障碍是 As 形成的关键过程。血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 是循环血与内皮下层之间的一层动态屏障, 当机体出现高血脂、高血糖、高血压或者血流剪切力出现异常时, 该屏障的功能会发生紊乱。研究发现, 血流低切应力会造成血管内皮细胞 TET2 表达降低, 使自噬生物标记物

Beclin 1 和 LC3II/LC3I 表达降低, 自噬底物 p62 增加, 导致内皮自噬功能障碍; 而过表达 TET2 可逆转自噬功能, 上调内皮型一氧化氮合酶并下调内皮素 1<sup>[37]</sup>。另外, 也有研究发现, 在 TET2 过表达的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠中, As 斑块面积显著减少, 基因组 DNA 的 5hmC 修饰水平显著提高而 5mC 修饰水平显著减低, 斑块中 Beclin 1、LC3 表达明显上调, p62 表达明显下调, 而在 TET2 敲减小鼠中则相反。此外, 在

氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)处理的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)中,过表达和敲减 TET2 也得到了一致的结果<sup>[8]</sup>。进一步研究 TET2 对内皮细胞自噬作用的潜在机制发现,TET2 过表达显著降低 Beclin 1 启动子 662-774 bp CpG 岛的平均甲基化率而不影响 829-1225 bp CpG 岛,从而使 Beclin 1 表达激活<sup>[8]</sup>。此外,TET2 过表达可抑制 ox-LDL 处理的 HUVEC 细胞和 As 斑块中细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1、IL-1 $\beta$  和单核细胞趋化蛋白 1 等炎症因子的表达<sup>[8]</sup>。另外,也有研究发现,TET2 与 CSE/H<sub>2</sub>S 通路也密切相关<sup>[38]</sup>。在心血管系统,H<sub>2</sub>S 主要产生于胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶(cystathionine- $\gamma$ -lyase, CSE)<sup>[39]</sup>。内源性合成的 H<sub>2</sub>S 通过减少血管内膜增生和抑制黏附分子表达,保护血管组织不受 As 损伤<sup>[39-40]</sup>。内源性 H<sub>2</sub>S 的减少易导致动物血管重塑和 As 的早期发展<sup>[39,41]</sup>。TET2 可通过介导去甲基化增加 CSE 基因启动子的 5hmC 水平,上调 CSE/H<sub>2</sub>S 系统,改善 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞 CSE/H<sub>2</sub>S 系统抑制,从而改善内皮功能<sup>[38]</sup>。另外,TET2 过表达还减少 THP-1 细胞对 ox-LDL 激活的 HUVEC 的黏附<sup>[38]</sup>。而最新研究发现,TET2 与 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞焦亡也密切相关<sup>[42]</sup>。焦亡是细胞程序性死亡的方式之一,特点是快速质膜破裂,随之释放细胞内容物和促炎介质,包括 IL-1 $\beta$ 、IL-18,与 As 的发生发展密切相关。ox-LDL 诱导的 HUVEC TET2 表达下调引起的异常甲基化可导致线粒体功能紊乱,产生活性氧类,激活核因子  $\kappa$ B,从而诱导焦亡相关蛋白 Nod 样受体蛋白 3(Nod-like receptor protein-3, NLRP3)、Caspase-1 的激活以及炎症因子 IL-1 $\beta$  的分泌,促进 HUVEC 的焦亡<sup>[42]</sup>。由此可见,TET2 及其介导的羟甲基化修饰参与血管内皮自噬功能、CSE/H<sub>2</sub>S 系统、黏附反应以及焦亡的调控。

### 3.2 10/11 易位家族蛋白 2 及其介导的羟甲基化修饰与血管平滑肌细胞表型转化

血管平滑肌细胞具有可塑性,在损伤或炎症因子刺激下,可由分化的“收缩型”转变为去分化的“合成型”<sup>[43-44]</sup>。这种可塑性一方面有利于血管生长和伤口修复,另一方面也是 As、血管肥大和损伤或临床干预后再狭窄等许多血管疾病的关键机制基础<sup>[45]</sup>。在 As 进程中,VSMC 由“收缩型”转变为“合成型”,迁移性和增殖性增加,侵入血管内膜,从而参与 As 斑块纤维帽及新生血管的生成<sup>[46]</sup>。研究

发现,TET2 和 5hmC 在“收缩型”VSMC 中富集,而在“合成型”中表达减少<sup>[7]</sup>。TET2 敲减可抑制促收缩基因心肌蛋白(myocardin, MYOCD)和血清反应因子(serum response factor, SRF)的表达,上调去分化相关基因 KLF4。此外,TET2 敲减还可阻止雷帕霉素诱导 VSMC 分化,而 TET2 过表达足以诱导其收缩表型。进一步研究发现,TET2 通过在促收缩和去分化相关基因的启动子上对染色质开放性的相反效应协调调控 VSMC 表型,TET2 结合位点和 5hmC 富集区主要集中在激活的促收缩基因 MYOCD、SRF 和 MYH11 启动子的 CA<sub>T</sub>G-富集区域<sup>[7]</sup>。此外,TET2 和 5hmC 缺失与小鼠血管损伤模型和人 As 疾病损伤程度呈正相关,局部的 TET2 敲减也会加剧损伤反应。而局部的 TET2 过表达可恢复 5hmC 修饰水平,促进收缩基因表达,并大大减轻血管内膜增生<sup>[7]</sup>。由此可见,TET2 及其介导的羟甲基化修饰与 VSMC 表型转化密切相关,参与 As 的进程。

### 3.3 10/11 易位家族蛋白 2 及其介导的羟甲基化修饰与炎症免疫反应

炎症免疫反应贯穿 As 发生发展的全过程<sup>[47]</sup>。许多研究表明,TET2 参与炎症免疫反应。TET2 在树突状细胞和巨噬细胞的炎症免疫活化中被显著诱导出来,并通过非酶依赖方式招募组蛋白去乙酰化酶 2,在 LPS 刺激的炎症晚期反馈性地显著抑制炎症因子 IL-6 的分泌<sup>[17]</sup>。TET2 也可抑制巨噬细胞趋化因子和炎症因子 IL-1 $\beta$ 、精氨酸酶 1 的表达<sup>[48]</sup>。也有研究报道,ox-LDL 也通过下调 TET2 影响去甲基化过程从而降低 THP-1 来源的巨噬细胞的自噬功能<sup>[49]</sup>。此外,也有研究发现,TET2 通过 RNA 腺苷脱氨酶 1(adenosine deaminase 1, Adar1)抑制细胞因子诱导骨髓细胞生成至关重要的 JAK-STAT 途径的负调节因子——细胞因子信号转导抑制分子 3(suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3)的 mRNA 水平,促进腹部脓毒症引起的紧急骨髓形成和寄生虫引起的肥大细胞扩增<sup>[14]</sup>。TET2 也可介导 mRNA 中 5mC 氧化为 5hmC,其缺失将导致 5mC 在全转录组范围内出现,包括 SOCS3 的 3'-UTR 区。Adar1 以独立于 RNA 编辑的方式结合并破坏 SOCS3 mRNA 的稳定性,TET2 缺失可能是通过胞嘧啶阅读器 RNA 解旋酶影响 Adar1 结合的双链 RNA 形成<sup>[14]</sup>。在低密度脂蛋白受体缺陷(LDLR<sup>-/-</sup>)小鼠 As 模型中,部分 TET2 缺陷细胞的骨髓重建足以使其克隆扩张,并显著增加 As 斑块面积<sup>[9]</sup>。TET2 缺陷巨噬细胞通过 NLRP3 炎性小体以非酶依赖方式介导 IL-

1 $\beta$  的分泌,促进炎症反应及 As 的发展<sup>[9]</sup>。而最新研究发现,TET2 表达下调可通过激活核因子  $\kappa$ B 信号通路促进 HUVEC 细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1 的激活以及炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌<sup>[42]</sup>。由此可见,TET2 既可以酶活性依赖形式也可以非酶依赖形式来发挥抗炎作用。

### 3.4 10/11 易位家族蛋白 2 及其介导的羟甲基化修饰与其他 As 相关因素

载脂蛋白 A 是 As 的独立风险因素之一。研究发现,维生素 C 通过 TET2 介导的 DNA 去甲基化下调 HepG2 细胞的载脂蛋白 A<sup>[50]</sup>。AMP 激活的蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是一种关键的营养或能量传感器,对葡萄糖浓度有高度敏感性,可调控细胞周期和多种蛋白质合成。早期研究已发现,AMPK 在 As 发生发展过程发挥重要作用。AMPK 的活化可改善内皮细胞功能,抑制平滑肌细胞异常增殖和迁移,促进巨噬细胞内胆固醇流出,减少泡沫细胞形成,从而减少斑块生成,提高斑块稳定性<sup>[51-53]</sup>。最新研究发现,TET2 也是 AMPK 的底物<sup>[54]</sup>。TET2 包含 2 个假定的 AMPK 元件,以第 99 位和第 1205 位丝氨酸为中心,AMPK 能使 TET2 第 99 位丝氨酸 (S99) 磷酸化,从而使 TET2 稳定。高糖会阻碍 AMPK 介导的 TET2 S99 磷酸化,导致 TET2 失稳和 5hmC 的失调以及 TET2 在体内和体外的肿瘤抑制功能失调。而 AMPK 激动剂二甲双胍可保护 AMPK 介导的 TET2 S99 磷酸化,从而提高 TET2 稳定性和 5hmC 水平<sup>[54]</sup>。由此可见,AMPK 介导的磷酸化在维持 TET2 稳定性和 5hmC 水平中起关键作用。这些发现提供了一种新的调节 TET2 稳定性的磷酸化开关,同时也为 As 的研究提供了一个新思路。另外,含卷曲螺旋域蛋白 80 (coiled-coil domain-containing 80, CCDC80),也称为类固醇敏感基因 1 (SSG1) 和 DRO1/URB,在多种细胞中表达,如血管平滑肌细胞、脂肪细胞和肝细胞。脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 是甘油三酯水解的关键酶,它能降低富含甘油三酯的脂蛋白水平,如极低密度脂蛋白和乳糜微粒。提高 LPL 的表达水平和活性,可降低血浆甘油三酯水平和 As 的风险。研究发现,CCDC80 通过抑制 ERK1/2 活化,降低 TET2 表达以及 TET2 介导的 DNA 去甲基化,促进 LPL 基因启动子甲基化,进而抑制 LPL 的表达和活性,从而加速 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 As 斑块的形成<sup>[55]</sup>。

## 4 总结与展望

近年来,TET2 及其介导的羟甲基化修饰在 As

病理过程中的保护性作用以及作用机制逐渐被人们认识。但是,相关研究只是报道了 TET2 和 5hmC 在 As 的形成过程中出现异常以及下游的相关调控机制。TET2 及其介导的羟甲基化修饰在 As 的形成过程中的深入调控机制还有待进一步研究,以及是否在该过程起决定性作用还不能确定,还需要更多的研究证据。尽管如此,TET2 及其介导的羟甲基化修饰在血管平滑肌细胞表型转化、内皮功能障碍和炎症免疫反应等过程发挥重要作用,让我们有理由相信,深入探讨 TET2 及其介导的羟甲基化修饰对 As 发生发展的影响及其作用机制,将从新表观遗传学角度为 As 的有效防治提供新的思路及靶点。

### [参考文献]

- [1] Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, et al. Mechanisms of plaque formation and rupture [J]. *Circ Res*, 2014, 114 (12): 1852-1866.
- [2] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: Roles in mammalian development [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14 (3): 204-220.
- [3] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by Mll partner Tet1 [J]. *Science*, 2009, 324(5929): 930-935.
- [4] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine [J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1300-1303.
- [5] Lian CG, Xu Y, Ceol C, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma [J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1135-1146.
- [6] Gambichler T, Sand M, Skrygan M. Loss of 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation 2 protein expression in malignant melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2013, 23 (3): 218-220.
- [7] Liu R, Jin Y, Tang WH, et al. Ten-eleven translocation-2 (Tet2) is a master regulator of smooth muscle cell plasticity [J]. *Circulation*, 2013, 128(18): 2047-2057.
- [8] Peng J, Yang Q, Li AF, et al. Tet methylcytosine dioxygenase 2 inhibits atherosclerosis via upregulation of autophagy in apoe<sup>-/-</sup> mice [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47): 76423-76436.
- [9] Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, et al. Clonal hematopoiesis associated with Tet2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice [J]. *Science*, 2017, 355(6327): 842-847.
- [10] Pastor WA, Aravind L, Rao A. Tetonic shift: Biological roles of Tet proteins in DNA demethylation and transcription [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(6): 341-356.
- [11] Hu L, Li Z, Cheng J, et al. Crystal structure of Tet2-DNA complex: Insight into Tet-mediated 5mC oxidation



- [J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1545-1555.
- [12] Ko M, An J, Bandukwala HS, et al. Modulation of Tet2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the cxxc domain protein Idax [J]. *Nature*, 2013, 497 ( 7447 ): 122-126.
- [13] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification[J]. *Nature*, 2010, 466 (7310): 1129-1133.
- [14] Shen Q, Zhang Q, Shi Y, et al. Tet2 promotes pathogen infection-induced myelopoiesis through mRNA oxidation [J]. *Nature*, 2018, 554(7690): 123-127.
- [15] Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(7): 838-842.
- [16] Lorschach RB, Moore J, Mathew S, et al. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23)[J]. *Leukemia*, 2003, 17(3): 637-641.
- [17] Zhang Q, Zhao K, Shen Q, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6[J]. *Nature*, 2015, 525(7569): 389-393.
- [18] Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, et al. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation [J]. *Nature*, 2011, 473 (7347): 398-402.
- [19] Pastor WA, Pape UJ, Huang Y, et al. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 394-397.
- [20] Xu Y, Wu F, Tan L, et al. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells [J]. *Mol Cell*, 2011, 42 (4): 451-464.
- [21] Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in purkinje neurons and the brain[J]. *Science*, 2009, 324(5929): 929-930.
- [22] Sun W, Zang L, Shu Q, et al. From development to diseases: The role of 5hmC in brain[J]. *Genomics*, 2014, 104(5): 347-351.
- [23] Mellén M, Ayata P, Dewell S, et al. Mecp2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system[J]. *Cell*, 2012, 151(7): 1417-1430.
- [24] Szulwach KE, Li X, Li Y, et al. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging[J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14(12): 1607-1616.
- [25] Wang F, Yang Y, Lin X, et al. Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of huntington's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(18): 3641-3653.
- [26] Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage-specification in mouse embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(2): 200-213.
- [27] Dawlaty MM, Breiling A, Le T, et al. Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells [J]. *Dev Cell*, 2014, 29(1): 102-111.
- [28] Greco CM, Kunderfranco P, Rubino M, et al. DNA hydroxymethylation controls cardiomyocyte gene expression in development and hypertrophy[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12418.
- [29] Booth MJ, Ost TW, Beraldi D, et al. Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(10): 1841-1851.
- [30] Yu M, Hon GC, Szulwach KE, et al. Tet-assisted bisulfite sequencing of 5-hydroxymethylcytosine [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(12): 2159-2170.
- [31] Pastor WA, Huang Y, Henderson HR, et al. The Glib technique for genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine[J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(10): 1909-1917.
- [32] Sun X, Chung TH, Tan D, et al. Practical guidelines and consideration of using Rhrp for 5hmC detection[J]. *Epigenomics*, 2016, 8(2): 225-235.
- [33] Song CX, Szulwach KE, Fu Y, et al. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29 (1): 68-72.
- [34] Robertson AB, Dahl JA, Vagbo CB, et al. A novel method for the efficient and selective identification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(8): e55.
- [35] Li W, Zhang X, Lu X, et al. 5-hydroxymethylcytosine signatures in circulating cell-free DNA as diagnostic biomarkers for human cancers [J]. *Cell Res*, 2017, 27 (10): 1243-1257.
- [36] Song CX, Clark TA, Lu XY, et al. Sensitive and specific single-molecule sequencing of 5-hydroxymethylcytosine [J]. *Nat Methods*, 2011, 9(1): 75-77.
- [37] Yang Q, Li X, Li R, et al. Low shear stress inhibited endothelial cell autophagy through Tet2 downregulation[J]. *Ann Biomed Eng*, 2016, 44(7): 2218-2227.
- [38] Peng J, Tang ZH, Ren Z, et al. Tet2 protects against ox-LDL-induced HUVEC dysfunction by upregulating the CSE/H<sub>2</sub>S system[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 486.
- [39] Mani S, Li H, Untereiner A, et al. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2013, 127(25): 2523-2534.
- [40] Cheung SH, Kwok WK, To KF, et al. Anti-atherogenic effect of hydrogen sulfide by over-expression of

- cystathionine gamma-lyase (CSE) gene[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113038.
- [41] Wang XH, Wang F, You SJ, et al. Dysregulation of cystathionine gamma-lyase (CSE)/hydrogen sulfide pathway contributes to ox-LDL-induced inflammation in macrophage[J]. Cell Signal, 2013, 25(11): 2255-2262.
- [42] Zhaolin Z, Jiaojiao C, Peng W, et al. Ox-LDL induces vascular endothelial cell pyroptosis through miR-125a-5p/Tet2 pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (5): 7475-7491.
- [43] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis [J]. Acta Physiol (Oxf), 2015, 214(1): 33-50.
- [44] Chaabane C, Coen M, Bochaton-Piallat ML. Smooth muscle cell phenotypic switch: Implications for foam cell formation[J]. Curr Opin Lipidol, 2014, 25(5): 374-379.
- [45] Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis[J]. Br Heart J, 1993, 69(1 Suppl): S30-S37.
- [46] Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis[J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(2): 156-164.
- [47] Yamashita T, Kasahara K, Emoto T, et al. Intestinal immunity and Gut microbiota as therapeutic targets for preventing atherosclerotic cardiovascular diseases [J]. Circ J, 2015, 79(9): 1882-1890.
- [48] Cull AH, Snetsinger B, Buckstein R, et al. Tet2 restrains inflammatory gene expression in macrophages [J]. Exp Hematol, 2017, 55: 56-70.
- [49] Li G, Peng J, Liu Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein inhibits THP-1-derived macrophage autophagy via Tet2 down-regulation[J]. Lipids, 2015, 50(2): 177-183.
- [50] Qu K, Ma XF, Li GH, et al. Vitamin C down-regulate apo(a) expression via Tet2-dependent DNA demethylation in HepG2 cells [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 98: 637-645.
- [51] Steinberg GR, Schertzer JD. AMPK promotes macrophage fatty acid oxidative metabolism to mitigate inflammation: Implications for diabetes and cardiovascular disease [J]. Immunol Cell Biol, 2014, 92(4): 340-345.
- [52] Ewart MA, Kennedy S. AMPK and vasculoprotection[J]. Pharmacol Ther, 2011, 131(2): 242-253.
- [53] Motoshima H, Goldstein BJ, Igata M, et al. AMPK and cell proliferation--AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer [J]. J Physiol, 2006, 574 (Pt 1): 63-71.
- [54] Wu D, Hu D, Chen H, et al. Glucose-regulated phosphorylation of Tet2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer [J]. Nature, 2018, 559(7715): 637-641.
- [55] Gong D, Zhang Q, Chen LY, et al. Coiled-coil domain-containing 80 accelerates atherosclerosis development through decreasing lipoprotein lipase expression via Erk1/2 phosphorylation and Tet2 expression [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 843: 177-189.
- (此文编辑 曾学清)