

DNA 羟甲基化在环境流行病学中的研究进展

付铭, 白岩森, 郭欢

华中科技大学同济医学院公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 湖北 武汉 430030

摘要:

5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)是TET(ten-eleven translocation)蛋白通过氧化5-甲基胞嘧啶(5mC)产生的一种修饰碱基。近年来的研究发现,5hmC不仅是DNA主动去甲基化的中间产物,也可作为一种稳定的表观遗传标记,在环境与疾病之间发挥“桥梁”作用。环境因素可以通过影响基因组5hmC的模式参与调控疾病的发生发展,且5hmC在指示某些外界环境因素暴露导致的健康效应变化方面可能比5mC更加敏感。因此,研究5hmC在环境暴露到疾病发生这个连续过程中的分布变化,对阐明疾病的发生发展规律,开发早期诊断技术和发现有效干预靶点具有重要意义。本文以5hmC为中心,对环境因素致5hmC改变的研究现状以及5hmC与慢性疾病的研究进展进行简要综述。

关键词: 5-羟甲基胞嘧啶; 表观遗传; 环境暴露; 环境流行病学; 分子流行病学

Research progress on DNA hydroxymethylation in environmental epidemiology FU Ming, BAI Yansen, GUO Huan (Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract:

5-hydroxymethylcytosine (5hmC) is a major oxidation product of 5-methylcytosine (5mC) catalyzed by ten-eleven translocation (TET) enzymes. Recent studies have revealed that 5hmC is not only an intermediate of active DNA demethylation, but also a stable epigenetic marker that could act as a bridge between environmental exposure and disease outcomes. Exposure to environmental factors can regulate the occurrence and development of diseases by affecting the pattern of genomic 5hmC, while 5hmC may be more sensitive than 5mC in reflecting the health effects caused by exposure to some external environmental factors. Therefore, it is critical to uncover the roles of 5hmC in the associations between environmental exposure and disease outcomes, in order to clarify the underlying mechanisms of the occurrence and development of diseases, develop early diagnostic techniques, and identify effective intervention targets. In the present study, we reviewed the published literature reporting the effects of environmental factors on 5hmC, as well as the associations between 5hmC and chronic diseases.

Keywords: 5-hydroxymethylcytosine; epigenetics; environment exposure; environmental epidemiology; molecular epidemiology

环境污染对人类健康产生了极为深刻的影响,据世界卫生组织统计,仅2012年全球约有1 260万人的死亡归因于空气、水和土壤污染以及气候异常变化等环境因素,占全球死亡总数的23%^[1]。研究表明,环境暴露可通过表观遗传机制影响人体健康^[2],其中DNA甲基化的主要形式5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)作为表观遗传修饰的重要指标,能够响应多种环境因素的改变,在预测环境污染所致的疾病进程中具有现实意义^[3]。5mC的氧化产物5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)不仅是DNA主动去甲基化的中间产物,也是一种稳定的表观遗传标记^[4]。正常的5hmC水平对维持细胞稳态和个体生长发育十分关键,现已在恶性肿瘤、神经系统疾病、心血管系统疾病等多种重大慢性疾病中发现了基因组5hmC水平的异常变化。研究提示环境因素可能通过影响基因组5hmC的模式参与调控疾病的发生发展,并

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20481

基金项目

国家自然科学基金优秀青年科学基金项目(81722038)

作者简介

付铭(1996—),女,博士生;
E-mail: fuming19960609@126.com

通信作者

郭欢, E-mail: ghuan5011@hust.edu.cn

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-10-14

录用日期 2021-03-11

文章编号 2095-9982(2021)06-0660-08

中图分类号 R181.3+4

文献标志码 A

►引用

付铭, 白岩森, 郭欢. DNA羟甲基化在环境流行病学中的研究进展[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(6): 660-667.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20481

Funding

This study was funded.

Correspondence to

GUO Huan, E-mail: ghuan5011@hust.edu.cn

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2020-10-14

Accepted 2021-03-11

►To cite

FU Ming, BAI Yansen, GUO Huan. Research progress on DNA hydroxymethylation in environmental epidemiology[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(6): 660-667.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20481

且5hmC在指示某些外界环境因素暴露导致的健康效应变化方面可能比5mC更加敏感^[5]。因此,本文以5hmC为中心,整合目前环境因素引起5hmC改变的证据,总结5hmC与部分重大慢性病关联的研究现状,提出尚存在的科学问题,展望研究方向,以期对环境分子流行病学研究提供新思路。

1 5hmC背景简述

1.1 5hmC的生成与DNA主动去甲基化

5hmC是5mC在TET (ten-eleven translocation) 蛋白的氧化作用下生成的^[6]。TET蛋白是一类 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶,有TET1、TET2和TET3三个成员^[7]。TET将5mC氧化为5hmC后,还可进一步作用于5hmC将其连续氧化成5-醛基胞嘧啶(5-formylcytosine, 5fC)和5-羧基胞嘧啶(5-carboxylcytosine, 5caC)^[8]。后二者可被胸腺嘧啶DNA糖苷酶识别并切除,形成无碱基位点,然后启动碱基切除修复将该位点修复成未修饰的胞嘧啶^[9],从而实现DNA主动去甲基化过程。

由于TET蛋白存在底物偏好性^[10],5hmC不易被进一步氧化,因此相比5fC和5caC,5hmC是最丰富、最稳定的氧化产物,具有重大的研究意义。近年来的研究认为,5hmC除了作为DNA主动去甲基化的中间产物,通过介导DNA去甲基化减轻5mC的沉默效应,还可以调控基因的表达^[11]。已有研究报道了一些能够识别并结合5hmC的蛋白,如MeCP2、RPL26、MHS6、UHRF、Wdr76、Thy28、Neil1等^[12-14],但具体的生物学作用过程尚不清晰,仍然需要更多深入的功能性研究。

1.2 5hmC在组织和基因组中的分布

5hmC广泛分布于哺乳动物的组织和细胞中,与5mC不同,各组织间5hmC的含量具有明显的差异。Globisch等^[15]通过对成年小鼠的研究发现,5hmC在大脑皮层的含量最高,约占脱氧鸟嘌呤的0.7%;在脾脏中的含量最低,约0.03%;而各组织间5mC含量差别不大,为 $(4.22 \pm 0.22)\%$ 。值得注意的是,5hmC的丰度远低于5mC,人类基因组中约80%的CpG发生了甲基化修饰,而成人5hmC含量最丰富的大脑组织中也仅有约13%的CpG发生了羟甲基化^[16],这对精确检测5hmC提出了挑战。在基因组的分布上,Cui等^[17]通过绘制人体19种组织的5hmC修饰图谱,发现不同组织中5hmC在基因组分布上的一致性:在启动子、外显子和增强子上富集,在基因间区和在转录起始位点

处相对缺失。

1.3 5hmC的检测技术

研究人员基于色谱、质谱、高通量测序等技术开发了多种对5hmC定量或定位的检测方法,根据不同的研究目的,可以从基因组的三个水平上检测5hmC。

(1) 基因组总体5hmC水平:常用的方法有薄层色谱^[6-7]、液相色谱-质谱联用^[15, 18]、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[19]、免疫组化^[18]等。这类方法成本较低、易于开展,然而只能提供基因组5hmC的总体平均水平,无法开展后续基因通路、分子机制的研究。

(2) 基因组特定区域5hmC水平:主要是先通过各种富集方法,如抗体、葡糖基修饰、限制性内切酶^[20]等,将含有5hmC的DNA片段富集后,再联合高通量测序或芯片技术测定基因组特定区域的5hmC分布,如羟甲基化DNA免疫共沉淀测序(hydroxymethylated DNA immunoprecipitation coupled with deep sequencing, hMeDIP-Seq)^[18]等。这类方法可以识别一些差异羟甲基化区域(differentially 5-hydroxymethylated regions, DhMRs),但对5hmC密度低的区域检测灵敏度较低,并不能准确测定5hmC的总量,无法达到单碱基分辨率的水平。

(3) 基因组单碱基5hmC水平:甲基化的常用检测技术如重亚硫酸盐测序(bisulfite sequencing, BS-Seq)等,并不能区分5mC和5hmC,因此研究人员开发出基于BS-Seq的TET辅助重亚硫酸盐测序(TET-assisted bisulfite sequencing, TAB-Seq)、氧化重亚硫酸盐测序(oxidative bisulfite sequencing, OxBS-Seq)等方法^[20],先采用不同的化学修饰手段在测序前将5hmC与5mC区别开,然后通过比对同一样品在化学修饰前后BS-Seq测定的序列,从而定位5hmC。但由于重亚硫酸盐对DNA样本具有较强的破坏性,在样本量少时应用有局限性,因而研究人员又开发了借助单分子实时测序^[21]和纳米孔测序^[22]检测5hmC的第三代测序技术,以及载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽耦联表观遗传测序^[23]、TET辅助吡啶硼烷测序^[24]等不依赖重亚硫酸盐转化的新技术。这类方法可以检测全基因组单个CpG位点的羟甲基化状态,能够提供更多的生物学信息,但目前由于价格昂贵,在大样本人群研究中比较受限。

2 环境因素暴露对5hmC水平影响的研究现状

DNA主动去甲基化增强了细胞和组织的可塑性,

并且为环境分子流行病学研究提供了一个新的潜在的效应生物标志物——5hmC。5hmC是TET的主要氧化产物,故TET蛋白表达增加或者活性增强能够升高5hmC的水平。由于TET的酶促反应需以 α -KG和 O_2 为底物,以 Fe^{2+} 和维生素C作为辅因子,所以各底物和辅因子的浓度能够直接影响5mC的氧化效率^[25-28],进而影响5hmC的水平。研究发现,环境因素可以通过体内的代谢过程影响上述TET的底物和辅因子的水平从而与5hmC关联,也可以通过对TET基因本身或转录后RNA、翻译后蛋白质的调控来影响基因组5hmC水平^[29]。

2.1 金属和类金属

金属和类金属在工业生产和日常生活中应用广泛,人体长时间低剂量接触可使其在某些器官或组织中蓄积,引起慢性毒性作用。目前已有研究报道了砷、铅、汞、镉、铬、镍、锑等金属或类金属与5hmC水平的关联^[30-38],5hmC有望成为某些金属或类金属暴露的效应生物标志物。

砷是确认的人类致癌物,职业暴露可引起肺癌、皮肤癌、膀胱癌等^[31]。目前已有多篇研究报道了砷对5hmC水平的影响。Zhang等^[32]通过给予雄性大鼠8周较低水平(0.5、2或10ppm)的饮用水亚砷酸钠暴露,观察到5hmC的整体水平在心、肺、脾中升高,在胰腺中下降,而大多数器官的5mC整体水平并没有出现明显的改变;作者认为这可能是由于S-腺苷蛋氨酸在低水平砷暴露时仍保持稳态,可以同时为砷甲基化和DNA甲基化提供甲基供体,该研究提示5hmC也许能比5mC更加敏感地指示砷暴露。Niedzwiecki等^[31]基于孟加拉国的两个队列人群(分别为196人和375人)检测外周血白细胞或单核细胞DNA的5hmC水平,发现饮用水中的砷以及人体尿砷、血砷浓度与5hmC水平的关联具有性别差异,在男性中呈正相关,在女性中呈负相关。Du等^[33]对刚断乳的雄性大鼠用三氧化二砷饮水染毒6个月,发现砷暴露可以降低大脑皮层和海马组织中5mC和5hmC的水平,损害大鼠的认知能力,并且这种神经毒性与氧化应激和 α -KG的水平有关。

由于多种重金属或其化合物能够通过胎盘进入胎儿体内,因此孕期铅、汞、镉、砷等重金属的暴露对子代表观基因组的影响是目前的研究热点之一^[34]。Cardenas等^[35]基于美国的出生队列首次评估孕期汞暴露和子代基因组5hmC水平的关系,发现306位孕妇孕中期时红细胞汞浓度与新生儿脐带血中5hmC水

平呈负相关,并且这种关联可持续到出生后5年。Sen等^[36]运用改良的羟甲基化DNA免疫共沉淀结合450K芯片的方法检测基因组5hmC,研究产前铅暴露影响新生儿脐带血基因组5hmC的模式,发现与铅相关的DhMRs可以进一步分为与性别有关和无关的两种类型。

在金属影响5hmC的机制研究方面,Yin等^[37]利用尺寸排阻色谱-电感耦合等离子体质谱分析发现, Ni^{2+} 可与小鼠TET1蛋白的催化中心域结合,并且其亲和力是辅因子 Fe^{2+} 的7.5倍,因此能有效地替换掉 Fe^{2+} ,抑制TET1的催化活性,降低5hmC的形成。此外,他们还发现 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 也有类似的作用,但其亲和力比 Ni^{2+} 弱。Liu等^[38]发现亚砷酸盐在体外可以直接结合到TET蛋白的锌指结构上,抑制TET介导的5hmC生成。

2.2 醌类化合物

醌类化合物是一类广泛存在于环境中的氧化还原活性物质,能够刺激活性氧的产生,具有一定的细胞毒性、免疫毒性和致癌性,同时也因其对癌细胞具有极强的杀伤力而被用作抗癌药物^[28]。Zhao等^[28]研究发现杀虫剂五氯苯酚的活性代谢物四氯苯醌和四氯氢醌可以提高细胞内可利用 Fe^{2+} 的水平,从而刺激TET蛋白的催化活性,促进多种人源细胞株5hmC的形成。Coulter等^[39]也发现了苯的代谢产物氢醌可通过提高TET1的活性,升高HEK293T细胞中的5hmC水平。

2.3 双酚类内分泌干扰物

双酚A和双酚S广泛应用于食品包装、饮料容器、医疗器械等塑料制品的生产,是常见的环境雌激素,研究发现其具有一定的生殖毒性、神经毒性、免疫毒性、胚胎发育毒性和潜在的致癌性等^[40]。Zheng等^[41]对30位双酚A职业暴露的男性和25例对照进行了精子样本的全基因组5hmC的检测,发现职业暴露者的5hmC整体水平升高。Li等^[42]通过对人乳腺癌细胞系的研究揭示双酚A/S可与雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)结合使其形成二聚体和发生磷酸化,激活的ER α 可促进DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)1和DNMT3B甲基化TET2基因的启动子,从而抑制TET2的转录和表达,降低基因组5hmC水平,最终促进乳腺癌细胞的增殖,并具有明显的时间效应关系和剂量效应关系。

2.4 大气颗粒物

大气颗粒物是化学组成较为复杂的环境污染物,可引发呼吸系统、循环系统等多种器官系统的疾病,增加死亡风险。Sanchez-Guerra等^[43]在北京招募60名

卡车司机和60名办公室工作人员作为研究对象,每人佩戴采样器以评估个体 $PM_{2.5}$ 的暴露水平,并根据环境监测点的 PM_{10} 数据综合评估个人1、4、7和14d的 PM_{10} 平均暴露水平,采用ELISA检测外周血DNA 5mC和5hmC水平,观察到 PM_{10} 与5hmC呈稳定的正相关关系,但与5mC关联无统计学意义,认为这可能与暴露水平、检测方法的精确程度以及5hmC、5mC本身具有不同的生物学功能有关。比利时鲁汶大学的学者De Nys等^[44]以26名学生的口腔颊黏膜细胞作为研究对象,发现一周内 $PM_{2.5}$ 和 PM_{10} 的平均暴露水平与细胞5hmC整体水平呈负相关。

2.5 生活方式

目前已有一些研究关注了吸烟、饮酒、锻炼、饮食习惯等多种生活方式与TET蛋白及5hmC水平的关联^[45-48]。Ringh等^[45]通过对20名吸烟和29名不吸烟健康志愿者的支气管肺泡灌洗液细胞进行羟甲基化的芯片检测,发现吸烟者的差异羟甲基化位点几乎均呈高羟甲基化的状态。Gatta等^[46]基于一项25对慢性酗酒者和非酗酒者的病例对照研究,发现酗酒者的小脑组织中TET1 mRNA表达水平高于对照组,但5hmC平均水平升高无统计学意义。Jessop等^[47]发现老年小鼠的自主锻炼情况与海马体中TET1/2 mRNA的表达水平及miR-137基因启动子区的5hmC水平呈正向关联。Spallota等^[48]通过对人群、小鼠和细胞的研究发现,高脂高糖饮食暴露可能会造成心脏间充质干细胞5mC及其氧化产物5hmC、5fC累积。Wu等^[18]研究发现较高的葡萄糖浓度能抑制人外周血单核细胞的5hmC水平,而5mC总体水平变化无统计学意义。

综上所述,多种环境因素的暴露均可引起基因组5hmC水平的改变,并常具有以下共同点:(1)在相同的环境刺激下,基因组5hmC的整体水平出现了明显变化时,5mC的整体水平尚未发生明显改变。这提示5hmC可能是一个比5mC更加敏感的效应标志物,但具体的生物学机制尚不明确;(2)环境因素暴露引起的5hmC变化具有组织器官、细胞类型的差异,因此,在不同的研究过程中要注意所选生物样本对目标疾病的代表性;(3)环境因素暴露引起的5hmC变化存在性别差异。然而,目前的大多数研究仅建立了环境因素与5hmC总体水平的关联,未采用单碱基分辨率的方法,所以无法选出对环境敏感的特异性靶基因或者CpG位点,限制了进一步的分子机制的解析。环境因素通过5hmC影响特定基因表达的机制将是未来环境与健康研究领域的热点之一。

3 5hmC与疾病的研究现状

5hmC的异常改变可能是引起多种疾病发生的生物学基础^[49],已有研究报道了5hmC与多种重大慢性病(包括恶性肿瘤、神经系统疾病、心血管疾病等)的关联。

3.1 5hmC与恶性肿瘤

5hmC整体水平的降低是恶性肿瘤的表现特征之一。研究人员在肺癌、乳腺癌、肝癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、神经胶质瘤和造血系统肿瘤等多种肿瘤样本中均发现了5hmC总体水平的下降^[50-51]。研究发现,肺鳞癌组织中的5hmC水平可低至正常肺组织的1/5,而脑肿瘤中可降低至1/30^[51]。可能的原因有:(1)TET及相关基因如IDH、WT1的突变是多种肿瘤发生的共同早期事件^[25, 52],由此造成的TET的表达减少或功能异常可能造成5hmC生成减少;(2)TET蛋白对 α -KG、 O_2 和 Fe^{2+} 的依赖性使其催化活性受细胞代谢状态的调控^[25-28],而肿瘤细胞异常的能量代谢和氧化状态可能抑制TET的功能,导致5hmC表达水平降低;(3)肿瘤细胞增殖较快,在不断的DNA复制过程中,由于DNMT1具有底物偏好性^[53],难以维持胞嘧啶的羟甲基化,因此逐渐稀释了基因组中5hmC的密度。

研究发现,TET蛋白与5hmC参与肿瘤的发生发展过程。Li等^[42]、Park等^[54]、Lian等^[55]多位研究者通过在人乳腺癌、胃癌、或黑色素瘤细胞系中敲减或敲除TET蛋白,观察到5hmC水平降低和细胞增殖能力提高的现象,且发现过表达TET蛋白可重建5hmC的水平并抑制肿瘤的生长。在5hmC对肿瘤发生发展中的作用机制方面,Kafer等^[56]研究发现5hmC富集在癌细胞系中的内源性DNA损伤位点以及微辐射或阿非迪霉素诱导的外源性DNA损伤位点,认为5hmC在维护基因组的完整性方面发挥着重要作用。Uribe-Lewis等^[57]的研究发现正常组织中基因启动子区的5hmC高表达可以抑制与癌症发生相关的基因启动子区的甲基化。Jia等^[58]研究发现5hmC及其结合蛋白淋巴特异性解旋酶表达水平的降低与肿瘤的转移和基因组不稳定性有关。Sun等^[59]研究发现TET1可以通过调控特定基因(HOXA)启动子的去甲基化来抑制小鼠乳腺癌移植瘤的生长和转移。

5hmC在肿瘤的早期诊断、预后预测和液体活检等方面的具有广阔的临床应用前景。Cai等^[60]利用5hmC-Seal技术检测早期肝癌患者和正常人外周血循环DNA(circulating free DNA, cfDNA)中的5hmC,寻找

有明显差异的 5hmC 位点, 随后利用弹性网络分析和十倍交叉验证的方法对差异位点进一步筛选, 利用得到的 32 个位点建立肝癌的早期诊断模型, 该模型在独立样本中验证 ROC 曲线下的面积可达 88.4%。Song 等^[61]采用改良的 hMe-Seal 技术检测 7 种癌症 cfDNA 的 5hmC, 发现肺癌、肝癌和胰腺癌的 cfDNA 中显示出不同的 5hmC 模式, 使用机器学习算法可以准确区分这三种癌症类型; 还发现 5hmC 水平随着肺癌的进展呈阶段性下降, 且 cfDNA 的 5hmC 水平可用于肝癌患者的治疗和复发情况的监测。随着研究的不断深入, 5hmC 在肿瘤领域的临床应用价值正在逐步被发掘。

3.2 5hmC 与神经系统疾病

脑组织中存在丰富的 5hmC, 因此其在神经系统中的功能引起了研究人员们的关注。研究表明, 5hmC 参与神经系统的发育过程, 且与雷特综合征、孤独症等神经发育障碍性疾病以及阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD)、亨廷顿病、帕金森等神经退行性疾病有关^[62]。Coppieters 等^[63]通过免疫组化分析, 发现与健康对照人群相比, AD 患者额叶中回以及颞中回的 5mC 和 5hmC 水平增加, 且其增加的幅度与 AD 的病理分子标志 (β -淀粉样蛋白、tau 蛋白和泛素蛋白) 呈正相关。Fetahu 等^[64]将 AD 患者和健康对照来源的诱导性多能干细胞逐步诱导分化成皮层神经元, 然后通过 OxBS-Seq 和甲基化酶辅助亚硫酸氢盐测序法以单碱基分辨率绘制全基因组 5mC、5hmC、5fC/5caC 的分布情况, 得到了能够在独立的临床队列中印证的、与 AD 相关的 27 个区域和 39 个 CpG 位点, 证明 5mC 及其氧化产物的改变发生于疾病进展前。由于高度分化的神经元几乎不会分裂, 因此无法通过依赖细胞复制的被动去甲基化机制去甲基化, 所有甲基的消除几乎都需要主动去甲基化, 5hmC 作为主动去甲基化的关键中间产物, 有可能成为 AD 早期诊断的一大突破。

3.3 5hmC 与心血管疾病

越来越多的研究在心血管疾病中发现 TET 和 5hmC 的异常改变。Jiang 等^[65]研究发现 113 位病人外周血单核细胞的 5mC 和 5hmC 水平与颈动脉斑块的严重程度呈正相关; 且校正混杂因素后, 仅发现 5hmC (而不是 5mC) 是冠状动脉粥样硬化的危险因素。Liu 等^[66]研究发现 TET2 和 5hmC 在收缩型的血管平滑肌细胞中富集, 而在去分化型的平滑肌细胞中缺失, 且其缺失程度与小鼠的血管损伤程度和动脉粥样硬化程度呈正相关; 在体内, 局部过表达 TET2 可恢复 5hmC 的水平和收缩相关基因的表达, 并减轻内膜

增生。此外, 除了调节血管平滑肌细胞的表型转换, 5hmC 还可能参与动脉粥样硬化病变过程中血管内皮细胞的程序性死亡、免疫细胞的分化等过程^[67]。

近年来, DNA 羟甲基化与多种重大慢性病的研究取得了一定的进展, 5hmC 的高度组织特异性和敏感性为阐明疾病的发生发展机制, 开发早期诊断技术和发现有效干预靶点提供了极具前景的表观遗传学新策略。然而, 目前关于 5hmC 的流行病学研究通常样本量较小, 今后还需要开展大规模、多中心的前瞻性研究来确定与重大慢性病相关的 5hmC 位点, 并在精细设计的体内外实验中探讨其生物学机制。

4 5hmC 在环境暴露与疾病间关联的作用

5hmC 不仅受到环境因素的影响, 也与多种慢性病的发生有关, 因此 5hmC 作为表观遗传学的重要指标, 在连接环境暴露与疾病发生过程中可能发挥“桥梁”作用。Li 等^[42]基于双酚类内分泌干扰物与乳腺癌的流行病学背景, 研究发现双酚 A 和双酚 S 可通过激活 ER α , 上调 DNMTs 的表达, 进而提高 TET2 基因启动子的甲基化水平, 使 TET2 表达水平和基因组 5hmC 水平降低, 最终促进乳腺癌细胞的增殖, 建立了环境污染-TET2-5hmC-细胞增殖之间的关联。Wu 等^[18]在多种人源肿瘤细胞系中发现, 高糖状态可抑制腺苷酸活化蛋白激酶对 TET2 蛋白的磷酸化作用, 使 TET2 蛋白不稳定, 5hmC 水平下降, 细胞增殖能力增强; 并结合 hMeDIP-seq、基因表达谱芯片、RT-qPCR 发现和验证了高糖环境下与 DhMR 相关的上调原癌基因和下调抑癌基因; 该研究将细胞外葡萄糖浓度与 5hmC 的动态调节、肿瘤细胞的增殖联系起来, 描述了一个从营养环境改变到出现健康效应的表观遗传学机制。随着环境分子流行病学研究的不断深入, 今后将会有更多关于 5hmC 在环境暴露与疾病间关联的研究报道。

5 总结和展望

DNA 羟甲基化作为新兴的表观遗传学标志物, 能够敏感指示环境暴露的生物效应, 在环境分子流行病学中逐渐受到重视。尽管已有大量研究将 5hmC 整体水平的变化与环境暴露或疾病的发生发展相关联, 但是 5hmC 的生物学功能还没有被完全认识, 多种环境因素复合暴露如何诱导 5hmC 谱的变化也尚不清楚。因此, 在今后的体内外功能研究中, 发展准确灵敏且低成本的单细胞组学分析技术, 并结合位点特异性的 5hmC 修饰技术, 实现单个位点的 5hmC 的写入或擦

除,将有助于进一步揭示 5hmC 的生物学功能;在大样本前瞻性队列研究中,将暴露组、表观遗传组、基因组、转录组、蛋白组等多组学生物技术结合起来,有助于进一步明确与疾病有关联的 5hmC 位点,阐明疾病的发生发展机制,探索有效的早期诊断标志物。

参考文献

- [1] World Health Organization. Preventing Disease through Healthy Environments : a global assessment of the burden of disease from environmental risks [EB/OL] . [2020-09-25] . https://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/preventing-disease/en/.
- [2] FEIL R, FRAGA M F. Epigenetics and the environment : emerging patterns and implications [J] . Nat Rev Genet, 2012, 13 (2) : 97-109.
- [3] FEINBERG A P. The key role of epigenetics in human disease prevention and mitigation [J] . N Engl J Med, 2018, 378 (14) : 1323-1334.
- [4] BACHMAN M, URIBE-LEWISS, YANG X, et al. 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification [J] . Nat Chem, 2014, 6 (12) : 1049-1055.
- [5] DAO T, CHENG R Y, REVELO M P, et al. Hydroxymethylation as a novel environmental biosensor [J] . Curr Environ Health Rep, 2014, 1 (1) : 1-10.
- [6] TAHILIANI M, KOH K P, 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.
- [7] ITO S, D'ALESSIO A C, TARANOVA O V, 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.
- [8] 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.
- [9] WEBER A R, KRAWCZYK C, ROBERTSON A B, et al. Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism [J] . Nat Commun, 2016, 7 (1) : 10806.
- [10] HU L, LU J, CHENG J, et al. Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation [J] . Nature, 2015, 527 (7576) : 118-122.
- [11] URIBE-LEWISS, CARROLL T, MENONS, et al. 5-hydroxymethylcytosine and gene activity in mouse intestinal differentiation [J] . Sci Rep, 2020, 10 (1) : 546.
- [12] 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.
- [13] SPRUIJT C G, GNERLICH F, SMITS A H, et al. Dynamic readers for 5- (hydroxy) methylcytosine and its oxidized derivatives [J] . Cell, 2013, 152 (5) : 1146-1159.
- [14] IURLARO M, FICZ G, OXLEY D, et al. A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation [J] . Genome Biol, 2013, 14 (10) : R119.
- [15] GLOBISCH D, MÜNZEL M, MÜLLER M, et al. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates [J] . PLoS One, 2010, 5 (12) : e15367.
- [16] WEN L, LI X, YAN L, et al. Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain [J] . Genome Biol, 2014, 15 (3) : R49.
- [17] CUI X L, NIE J, KU J, et al. A human tissue map of 5-hydroxymethylcytosines exhibits tissue specificity through gene and enhancer modulation [J] . Nat Commun, 2020, 11 (1) : 6161.
- [18] 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.
- [19] CHOWDHURY B, CHO I H, HAHN N, et al. Quantification of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-carboxylcytosine from the blood of cancer patients by an enzyme-based immunoassay [J] . Anal Chim Acta, 2014, 852 : 212-217.
- [20] SHEN L, SONG C X, HE C, et al. Mechanism and function of oxidative reversal of DNA and RNA methylation [J] . Annu Rev Biochem, 2014, 83 : 585-614.
- [21] FLUSBERG B A, WEBSTER D R, LEE J H, et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing [J] . Nat Methods, 2010, 7 (6) : 461-465.
- [22] LASZLO A H, DERRINGTON I M, BRINKERHOFF H, et al. Detection and mapping of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine with nanopore MspA [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110 (47) : 18904-18909.
- [23] SCHUTSKY E K, DENIZIO J E, HU P, et al. Nondestructive, base-resolution sequencing of 5-hydroxymethylcytosine

- using a DNA deaminase [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36 (11) : 1083-1090.
- [24] LIU Y, SIEJKA-ZIELIŃSKA P, VELIKOVA G, et al. Bisulfite-free direct detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at base resolution [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37 (4) : 424-429.
- [25] XU W, YANG H, LIU Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19 (1) : 17-30.
- [26] THIENPONT B, STEINBACHER J, ZHAO H, et al. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity [J]. *Nature*, 2016, 537 (7618) : 63-68.
- [27] YIN R, MAO SQ, ZHAO B, et al. Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135 (28) : 10396-10403.
- [28] ZHAO B, YANG Y, WANG X, et al. Redox-active Quinones induces genome-wide DNA methylation changes by an iron-mediated and Tet-dependent mechanism [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42 (3) : 1593-1605.
- [29] WU X, ZHANG Y. TET-mediated active DNA demethylation : mechanism, function and beyond [J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18 (9) : 517-534.
- [30] XIONG J, LIU X, CHENG QY, et al. Heavy metals induce decline of derivatives of 5-methylcytosine in both DNA and RNA of STEM CELLS [J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12 (6) : 1636-1643.
- [31] NIEDZWIECKI MM, LIU X, HALL MN, et al. Sex-specific associations of arsenic exposure with global DNA methylation and hydroxymethylation in leukocytes : results from two studies in Bangladesh [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015, 24 (11) : 1748-1757.
- [32] ZHANG J, MU X, XU W, et al. Exposure to arsenic via drinking water induces 5-hydroxymethylcytosine alteration in rat [J]. *Sci Total Environ*, 2014, 497-498 : 618-625.
- [33] DU X, TIAN M, WANG X, et al. Cortex and hippocampus DNA epigenetic response to a long-term arsenic exposure via drinking water [J]. *Environ Pollut*, 2018, 234 : 590-600.
- [34] MARTIN EM, FRY RC. Environmental influences on the epigenome : exposure- associated DNA methylation in human populations [J]. *Annu Rev Public Health*, 2018, 39 : 309-333.
- [35] CARDENAS A, RIFAS-SHIMAN SL, GODDERIS L, et al. Prenatal exposure to mercury : associations with global DNA methylation and hydroxymethylation in cord blood and in childhood [J]. *Environ Health Perspect*, 2017, 125 (8) : 087022.
- [36] SEN A, CINGOLANI P, SENUT MC, et al. Lead exposure induces changes in 5-hydroxymethylcytosine clusters in CpG islands in human embryonic stem cells and umbilical cord blood [J]. *Epigenetics*, 2015, 10 (7) : 607-621.
- [37] YIN R, MO J, DAI J, et al. Nickel (II) inhibits Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation by high affinity displacement of the cofactor Iron (II) [J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12 (6) : 1494-1498.
- [38] LIU S, JIANG J, LI L, et al. Arsenite targets the zinc finger domains of Tet proteins and inhibits Tet-mediated oxidation of 5-methylcytosine [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49 (19) : 11923-11931.
- [39] COULTER JB, O'DRISCOLL CM, BRESSLER JP. Hydroquinone increases 5-hydroxymethylcytosine formation through ten eleven translocation 1 (TET1) 5-methylcytosine dioxygenase [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (40) : 28792-28800.
- [40] 顾杰, 吉贵祥, 周林军, 等. 双酚A及其类似物的环境分布和毒性效应研究进展 [J]. *环境与职业医学*, 2020, 37 (8) : 826-832.
- GU J, JI GX, ZHOU LJ, et al. Research progress on environmental distributions and toxic effects of bisphenol A and its analogues [J]. *J Environ Occup Med*, 2020, 37 (8) : 826-832.
- [41] ZHENG H, ZHOU X, LI DK, et al. Genome-wide alteration in DNA hydroxymethylation in the sperm from bisphenol A-exposed men [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (6) : e0178535.
- [42] LI Z, LYU C, REN Y, et al. Role of TET Dioxygenases and DNA hydroxymethylation in bisphenols-stimulated proliferation of breast cancer cells [J]. *Environ Health Perspect*, 2020, 128 (2) : 027008.
- [43] SANCHEZ-GUERRA M, ZHENG Y, OSORIO-YANEZ C, et al. Effects of particulate matter exposure on blood 5-hydroxymethylation : results from the Beijing truck driver air pollution study [J]. *Epigenetics*, 2015, 10 (7) : 633-642.
- [44] DE NYS S, DUCA RC, NAWROT T, et al. Temporal variability of global DNA methylation and hydroxymethylation in buccal cells of healthy adults : association with air pollution [J]. *Environ Int*, 2018, 111 : 301-308.
- [45] RINGH MV, HAGEMANN-JENSEN M, NEEDHAMSEN

- M, et al. Tobacco smoking induces changes in true DNA methylation, hydroxymethylation and gene expression in bronchoalveolar lavage cells [J]. *EBioMedicine*, 2019, 46 : 290-304.
- [46] GATTA E, AUTA J, GAVIN DP, et al. Emerging role of one-carbon metabolism and DNA methylation enrichment on δ -containing GABAA receptor expression in the cerebellum of subjects with Alcohol Use Disorders (AUD) [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2017, 20 (12) : 1013-1026.
- [47] JESSOP P, TOLEDO-RODRIGUEZ M. Hippocampal *TET1* and *TET2* expression and DNA hydroxymethylation are affected by physical exercise in aged mice [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6 : 45.
- [48] SPALLOTTA F, CENCIONI C, ATLANTE S, et al. Stable oxidative cytosine modifications accumulate in cardiac mesenchymal cells from Type2 diabetes patients : rescue by α -ketoglutarate and TET-TDG functional reactivation [J]. *Circ Res*, 2018, 122 (1) : 31-46.
- [49] RICHA R, SINHA R P. Hydroxymethylation of DNA : an epigenetic marker [J]. *EXCLI J*, 2014, 13 : 592-610.
- [50] HUANG Y, RAO A. Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer [J]. *Trends Genet*, 2014, 30 (10) : 464-474.
- [51] JIN SG, JIANG Y, QIU R, et al. 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with *IDH1* mutations [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (24) : 7360-7365.
- [52] WANG Y, XIAO M, CHEN X, et al. WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation [J]. *Mol Cell*, 2015, 57 (4) : 662-673.
- [53] JI D, LIN K, SONG J, et al. Effects of Tet-induced oxidation products of 5-methylcytosine on Dnmt1- and DNMT3a-mediated cytosine methylation [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10 (7) : 1749-1752.
- [54] PARK JL, KIM HJ, SEO EH, et al. Decrease of 5hmC in gastric cancers is associated with *TET1* silencing due to with DNA methylation and bivalent histone marks at *TET1* CpG island 3'-shore [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (35) : 37647-37662.
- [55] 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.
- [56] KAFER GR, LI X, HORII T, et al. 5-Hydroxymethylcytosine marks sites of DNA damage and promotes genome stability [J]. *Cell Rep*, 2016, 14 (6) : 1283-1292.
- [57] URIBE-LEWISS, STARK R, CARROLLT, et al. 5-hydroxymethylcytosine marks promoters in colon that resist DNA hypermethylation in cancer [J]. *Genome Biol*, 2015, 16 (1) : 69.
- [58] JIA J, SHI Y, CHEN L, et al. Decrease in lymphoid specific helicase and 5-hydroxymethylcytosine is associated with metastasis and genome instability [J]. *Theranostics*, 2017, 7 (16) : 3920-3932.
- [59] SUN M, SONG CX, HUANG H, et al. HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (24) : 9920-9925.
- [60] CAI J, CHEN L, ZHANG Z, et al. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosines in circulating cell-free DNA as a non-invasive approach for early detection of hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2019, 68 (12) : 2195-2205.
- [61] SONG CX, YIN S, MA L, et al. 5-Hydroxymethylcytosine signatures in cell-free DNA provide information about tumor types and stages [J]. *Cell Res*, 2017, 27 (10) : 1231-1242.
- [62] WANG J, TANG J, LAI M, et al. 5-Hydroxymethylcytosine and disease [J]. *Mutat Res/Rev Mutat Res*, 2014, 762 : 167-175.
- [63] COPPIETERS N, DIERIKS BV, LILL C, et al. Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35 (6) : 1334-1344.
- [64] FETAHU IS, MA D, RABIDOU K, et al. Epigenetic signatures of methylated DNA cytosine in Alzheimer's disease [J]. *Sci Adv*, 2019, 5 (8) : eaaw2880.
- [65] JIANG D, WANG Y, CHANG G, et al. DNA hydroxymethylation combined with carotid plaques as a novel biomarker for coronary atherosclerosis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (10) : 3170-3181.
- [66] 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.
- [67] 胡颖楚, 胡豪畅, 林少沂, 等. DNA 羟甲基化调控动脉粥样硬化的研究进展 [J]. *遗传*, 2020, 42 (7) : 632-640.
- HU YC, HU HC, LIN SY, et al. The role of DNA hydroxymethylation in the regulation of Atherosclerosis [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2020, 42 (7) : 632-640.

(英文编辑：汪源；责任编辑：丁瑾瑜)