

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.07.006

思路与方法

中医阴阳学说指导下的 DNA 甲基化研究思路

周庆兵, 吴立旗, 张颖, 张萍, 童文新, 徐凤芹*

(中国中医科学院西苑医院, 北京市海淀区西苑操场 1 号, 100091)

摘要 中医理论认为, 阴阳失调是疾病发生与发展的关键, 通过调和阴阳使“阴阳自和”是中医治疗疾病的目标。认为阴阳失调的部分现代生物学基础在于 DNA 甲基化的失控(包括异常的高甲基化与低甲基化)。从中医阴阳的“自和”角度出发, 调节疾病异常的高甲基化基因与异常的低甲基化基因, 使其恢复正常, 对于上述疾病的治疗具有重大意义。提出在进行中药干预疾病异常基因甲基化水平的相关研究时, 不仅要关注其去甲基化效应, 同时还应关注其促甲基化作用, 即中药的双向甲基化调控作用。

关键词 DNA 甲基化; 阴阳自和; 高甲基化; 低甲基化

表观遗传学由 Waddington^[1] 于 1942 年作为后生论和遗传学的合词而提出。1975 年 Ledford^[2] 对表观遗传学进行了较为准确的描述, 认为个体在成体阶段可遗传的基因表达改变的相关信息可经有丝分裂、减数分裂方式在细胞和个体间世代传递。而在现代生物学中, 表观遗传学一般是指不涉及 DNA 序列改变的基因或者蛋白表达的变化, 并可以在发育和细胞增殖过程中稳定传递的遗传学分支学科, 主要包括 DNA 甲基化、组蛋白共价修饰、染色质重塑、基因沉默和 RNA 编辑等调控机制, 其中 DNA 甲基化是表观遗传学最主要也是目前研究最多的内容。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的催化下, CpG 序列 5-胞嘧啶选择性添加甲基基团形成 5-甲基胞嘧啶的化学修饰过程^[3]。研究表明, DNA 异常基因甲基化与人类衰老、心脑血管疾病(动脉粥样硬化、高血压病等)、代谢异常疾病(糖尿病、高脂血症)、恶性肿瘤等关系密切^[4-7]。针对异常 DNA 甲基化的治疗研究是防治上述疾病的重要策略。阴阳学说是中医学最核心理论, 该学说一直有效地指导中医临床实践。我们认为, 阴阳学说对 DNA 甲基化研究具有重要的指导意义, 试论述如下。

基金项目: 国家自然科学基金(81603490); 中国博士后基金(2016M590187)

* 通讯作者: 18800021979@163.com

1 DNA 甲基化紊乱是众多疾病的共有模式

得益于基因测序技术的发展, 目前的研究表明, DNA 异常甲基化在心脑血管疾病(动脉粥样硬化、高血压病)、恶性肿瘤、衰老、代谢异常疾病(糖尿病、高脂血症)的发生及进展中占有重要地位。尽管上述疾病有其相对独立的甲基化标志物, 但是上述疾病的异常甲基化模式是一致的, 即这些疾病同时存在高甲基化基因与低甲基化基因, 其 DNA 甲基化呈现出紊乱状态。比如, 动脉粥样硬化是动脉硬化性心血管疾病中最重要的一种, 以动脉粥样硬化为主要病理改变的心脑血管疾病(脑梗死、心肌梗死等)严重威胁着人类的健康^[8-9]。高同型半胱氨酸(HHcy)是心血管疾病的独立危险因素, 其对动脉粥样硬化的危害也是通过甲基化起作用, 能诱导动脉粥样硬化基因组低甲基化^[10]。另外, 三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 A1(ABCA1)是一种以 ATP 为能源, 介导细胞内胆固醇和磷脂流出并转运至贫或无脂的载脂蛋白 A-I(apolipoprotein A-I)形成高密度脂蛋白(HDL), 进而启动胆固醇逆向转运(RCT)的膜整合蛋白, 对防止动脉粥样硬化的形成具有十分重要的意义。Guay 等^[11]报道, 在动脉粥样硬化患者中 ABCA1 基因启动子存在异常的高甲基化, 同时发现, 外周血白细胞 ABCA1 基因启动子的甲基化程度与血浆高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、HDL 颗粒大小呈明

显负相关。我们的研究结论也证实,动脉粥样硬化动物体内存在异常的高甲基化基因与低甲基化基因,我们以高脂饲料造动脉粥样硬化兔模型,运用甲基化免疫共沉淀联合测序技术发现,与正常组兔比较发现,模型组共有 146 个异常差异甲基化基因。对这些异常的甲基化基因分别进行 GO 与 Pathway 分析(见表 1、表 2)^[2],发现这些基因涉及多个动脉粥样硬化相关功能与通路,如蛋白激酶 C 活性、胆固醇转运、MAPK 信号通路、PPAR 信号通路、血管平滑肌收缩通路、炎症通路等。同时我们还发现,涉及这些通路的甲基化基因包括低甲基化基因与高甲基化基因(见表 1、表 2),提示异常的高甲基化基因与低甲基化基因均在动脉粥样硬化发病中占有重要地位。再如,急性白血病是血液系统最常见的恶性肿瘤,目前的研究也证明,基因异常甲基化在其发病中起着重要作用(包括异常的低甲基化与高甲基化),Figuerola 等^[3]证明,相对于原发性白血病(AML),继发性白血病和骨髓增生异常(MDS)患者具有更多的异常高甲基化基因,这些异常的高甲基化基因具有更强的致病性,提示异常的高甲基化基因是 MDS

表 1 动脉粥样硬化兔模型组与空白组差异甲基化下调及上调基因的 GO 分析

GO 功能	差异基因数	下调基因	上调基因
蛋白激酶 C 活性	2	PRKCE、PRKCA	无
脂质蛋白运输	2	MSR1	APOBEC1
泡沫细胞分化积极调控	1	MSR1	无
胆固醇转运	2	NPC1、MSR1	无
内皮细胞迁移积极调控	2	PRKCA	KDR
MAPK 积极调控	3	PRKCE	AR、KDR
内皮细胞增值积极调控	2	PRKCA	KDR
炎症反应负调控	3	HGF、PTGER4、AOAH	无

表 2 动脉粥样硬化兔模型组与空白组差异甲基化下调及上调基因的 KEGG 分析

KEGG 通路	差异基因数	下调基因	上调基因
VEGF 信号通路	3	PRKCA、PPP3CC	KDR
血管平滑肌收缩通路	7	CYP4A5、PRKCA、ADRA1A、PRKCE、RBSLO1	CALM2、CYP4A7
PPAR 信号通路	3	无	CPN2、ACSL6、CYP8B1
MAPK 信号通路	5	CACNB2、PRKCA、PAK2、CACNA2D1、PPP3CC	无
Wnt 信号通路	2	PRKCA、PPP3CC	无

进展为急性 AML 的一个主要机制。同时研究还发现,恶性血液病(包括 MDS 与 AML)患者经常有异常的低甲基化 SALL4 基因,这个基因被认为在 MDS 的病理中起重要作用^[4]。目前的研究已经确认,在肿瘤患者体内 DNA 的低甲基化与高甲基化事件一样频繁^[5]。

2 中医阴阳学说及“阴阳自和”

2.1 中医学理论的核心内容——阴阳学说

阴阳是中医学最核心、最基础也是最重要的内容。《黄帝内经》认为,阴阳是“天地之道,万物之纲纪”,治病所求的根本即在于“阴阳”。明代医家张景岳曰“医道虽繁,而可以一言蔽之者曰阴阳而已。”目前关于阴阳的关系与内容的研究较多,但并没有获得统一认识。如刘力红^[6]认为,阴阳之间以协同为主导,而非以对立制约为主导,其中阳为主导,阴随阳而变化。上述阐述对于理解中医的治疗观十分重要。

2.2 阴阳学说指导下的中医治疗观——调和阴阳以达“阴阳自和”

老子曰“万物负阴而抱阳,冲气以为和。”《黄帝内经》云“阳在外阴之使也,阴在内阳之守也”;“阴平阳秘,精神乃治”。生理状态下,阴阳处于不断运动变化中,二者的关系是“和”的状态,如果阴阳失和,则疾病随之产生;因而在临床治疗中,要调和阴阳,顺应阴阳各自应有的盛衰,使“阴阳自和”而病愈。“阴阳自和”思想基于中国古代哲学关于“和”的理论。“阴阳自和”是中医学的重要理论,如《素问·生气通天论》云“凡阴阳之要,阳密乃固。两者不和,若春无秋,若冬无夏。因而和之,是谓圣度”;张仲景《伤寒论》曰“凡病,若发汗、若吐、若下、若亡血、亡津液,阴阳自和者,必自愈”,说明临床上通过调和阴阳以达到“阴阳自和”是中医治疗疾病的终极目标。

3 中医阴阳学说对研究 DNA 甲基化的启示

中医对疾病病机的认识可归纳为“阴阳失和”。通过调和阴阳使“阴阳自和”是中医治疗疾病的目标。目前研究发现,DNA 异常基因甲基化与人类多种疾病关系密切,针对异常 DNA 甲基化的治疗研究是防治上述疾病的重要策略。从中医“阴阳自和”的角度出发,调节疾病异常的高甲基化基因与异常的低甲基化基因,使其恢复正常,对

于上述疾病的治疗具有重大意义。根据这一提示,我们从临床基础研究角度对 DNA 甲基化基因研究提出几点看法。

3.1 针对 DNA 异常基因甲基化的研究要照顾到异常的高甲基化基因与异常的低甲基化基因两方面

目前经美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的针对 DNA 甲基化的药物有地西他宾 (DAC) 和阿扎胞苷 (AZA), 两药均具有嵌入到 DNA 和抑制 DNA 甲基化转移酶 (DNMT) 的作用, 对 MDS 和急性 AML 的治疗较传统的化疗具有更好的疗效^[17]。然而在临床试验中也发现, 一部分患者对 DAC 或 AZA 产生原发耐药, 另外, 一部分患者在初始治疗有效后最终复发, 并且再继续运用 DAC 或 AZA 治疗后效果不佳 (继发耐药)^[18]。很显然, 对于这类疾病的治疗仍需深入研究, 开发新的针对 DNA 甲基化的治疗药物十分必要。需要注意的是, 基于西医对抗思维的治疗思路, 上述两个药物皆具有显著的去甲基化效应, 即忽视了异常的低甲基化也在疾病发展中发挥作用这一重要事实, 因而未来开发具有双向调控作用的甲基化作用药物或许能进一步提高临床疗效。

3.2 中药的双向甲基化基因调控研究

我们在进行相关的甲基化研究方面特别关注中药的双向调控效应。用解毒活血中药栀子川芎胶囊干预动脉粥样硬化兔的研究表明, 小剂量栀子、川芎能够改变动脉粥样硬化兔异常的甲基化基因。进一步研究发现, 小剂量栀子川芎胶囊能纠正动脉粥样硬化异常的低甲基化与高甲基化基因, 即具有双向的调控作用 (见表 3、表 4), 对这些异常的甲基化基因分别进行 GO 与 Pathway 分析^[12], 发现这些基因涉及多个动脉粥样硬化相关功能与通路, 比如, 蛋白激酶 C 活性、VEGF 信号通路、MAPK 信号通路等。未来我们将进一步以双向甲基化基因调控效应作为切入点, 进一步挖掘临床有效中药方剂的甲基化调控效应。

表 3 栀子川芎胶囊小剂量组与模型组差异甲基化上调及下调基因 GO 分析

GO 功能	差异基因数	上调基因	下调基因
蛋白激酶 C 活性	2	PRKCE、PRKCB	无
内皮细胞分化调节	1	无	PRLR
内皮细胞迁移积极调控	1	PRKCE	无
MAPK 积极调控	3	AR、FGFR2、PRKCE	无
内皮细胞增值调控	2	KGFFGFI	

表 4 栀子川芎胶囊小剂量组与模型组差异甲基化上调及下调基因 KEGG 分析

KEGG 通路	差异基因数	上调基因	下调基因
VEGF 信号通路	3	PRKCA、PRKCB	PPP3CC
血管平滑肌收缩通路	8	PRKCA、EDNRA、PRKCE、PRKCB、RBSLO1	CYP4A5、PP1-BETA、CALD1
MAPK 信号通路	10	CACNB2、PRKCA、KGF、PAK2、CACNA2D1、FGF1、FGFR2、PRKCB	FAS、PPP3CC

4 小结

中医理论的核心内容是阴阳学说, 治疗时调和阴阳使其“自和”是中医治疗疾病的目标。DNA 甲基化是表观遗传学最主要的内容。近年来大量的研究表明, 异常的高甲基化基因和低甲基化基因与威胁人类健康的某些重大疾病 (包括肿瘤、衰老、心脑血管疾病) 密切相关。从已有的研究来看, 只针对 DNA 甲基化的一方面进行干预并不能带来良好的临床效应。在中医阴阳学说的启示下, 对上述疾病中异常高甲基化基因与低甲基化基因进行双向调控或许能达到“阴阳自和”的目的。

参考文献

[1] WADDINGTON CH. The epigenotype: 1942 [J]. Int J Epidemiol, 2012, 41(1): 10-13.

[2] LEDFORD H. Language: Disputed definitions [J]. Nature, 2008, 455(7216): 1023-1028.

[3] ELLIS J, HOTTA A, RASTEGAR M. Retrovirus silencing by an epigenetic TRIM [J]. Cell, 2007, 131(1): 13-14.

[4] WEIDNER CI, LIN Q, KOCH CM, et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites [J]. Genome Biol, 2014, 15(2): R20. doi: 10.1186/96-2014-15-2-r24.

[5] BANSAL A, PINNEY SE. DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes [J]. Pediatric Diabetes, 2017, 18(3): 167-177.

[6] ZHANG YY, ZENG C. Role of DNA methylation in cardiovascular diseases [J]. Clin Exp Hypertens, 2016, 38(3): 261-267.

[7] GORE AV, WEINSTEIN BM. DNA methylation in hematopoietic development and disease [J]. Exp Hematol, 2016, 44(9): 783-790.

[8] CHEN XN, PAN XX, YU HJ, et al. Analysis of cardiovascular disease in Chinese inpatients with chronic kidney disease [J]. Intern Med, 2011, 50(17): 1797-1801.

[9] HANSSON GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. N Engl J Med, 2005, 352(16):

1685-1695.

[10] TURUNEN MP, AAVIK E, YLÄ-HERTTUALA S. Epigenetics and atherosclerosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1790(9): 886-891.

[11] GUAY SP, BRISSON D, MUNGER J, et al. ABCA1 gene promoter DNA methylation is associated with HDL particle profile and coronary artery disease in familial hypercholesterolemia [J]. Epigenetics, 2012, 7(5): 464-472.

[12] 周庆兵. 活血解毒及解毒中药对动脉粥样硬化异常甲基化基因的调控作用研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2017: 5.

[13] FIGUEROA ME, SKRABANEK L, LI Y, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation [J]. Blood, 2009,

114(16): 3448-3458.

[14] LIN J, QIAN J, YAO DM, et al. Aberrant hypomethylation of SALL4 gene in patients with myelodysplastic syndrome [J]. Leu Res, 2013, 37(1): 71-75.

[15] EHRLICH M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little [J]. Oncogene, 2002, 21(35): 5400-5413.

[16] 刘力红. 思考中医 [M]. 南宁: 广州师范大学出版社, 2006: 7.

[17] YAMAZAKI J, ISSA JP. Epigenetic aspects of MDS and its molecular targeted therapy [J]. Int J Hematol, 2013, 97(2): 175-82.

[18] ISSA JP, KANTARJIAN HM. Targeting DNA methylation [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(12): 3938-3946.

DNA Methylation Research Ideas under the Guidance of Chinese Medicine *Yin-yang* Theory

ZHOU Qingbing, WU Liqi, ZHANG Ying, ZHANG Ping, TONG Wenxin, XU Fengqin

(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100091)

ABSTRACT In Chinese medicine theory, *Yin-yang* disorder is the key to the occurrence and development of diseases. Attaining “natural harmony of *Yin-yang*” by regulating *Yin-yang* is the goal of Chinese medicine treating diseases. The authors think that part of the modern biological basis of *Yin-yang* disorder is uncontrolled DNA methylation (including abnormal hypermethylation and hypomethylation). From the aspect natural harmony of *Yin-yang* in Chinese medicine, regulating abnormal hypermethylation genes and abnormal hypomethylation genes of diseases to normal condition is of great significance to treat diseases. The authors put forward that when making related researches of disease abnormal genes methylation levels by Chinese medicine intervention, not only should the demethylation effect be emphasized, but also the effect of promoting methylation should be considered, which is the bidirectional methylation regulation effect of Chinese medicine.

Keywords DNA methylation; natural harmony of *Yin-yang*; hypermethylation; hypomethylation

(收稿日期: 2017-10-19; 修回日期: 2018-01-15)

编辑: 黄 健

(上接第 553 页)

Risk Prognosis Research under Chinese Medicine Disease-syndrome Combination Mode

YE Qianyun¹, HOU Zhengkun², LIU Fengbin²

(1. First Clinical Medicine School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510405; 2. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Risk prognosis research is of great significance for guiding clinic, preventing and treating diseases. The concept of “preventive treatment of disease” in Chinese medicine lays a foundation for the formation and development of risk prognostic medicine. Based on this, combined with modern medicine research result, Chinese medicine emphasizes integration of traditional and western medicine to form a modern system of disease-syndrome combination risk prognosis. Based on the understanding of risk factors and prognostic factors in traditional medicine and the methods of studying risk prognosis, the authors summarize the various development of risk prognosis in modern medicine. By a comparison between ancient and modern risk prognosis studies in Chinese medicine, the authors put forward the study area of Chinese medicine risk prognosis, which includes playing an important role in sub-health population, chronic diseases and critical diseases, as well as constructing risk prognosis prediction model under the mode of Chinese medicine disease-syndrome combination. The above research may provide the right time for Chinese medicine “preventive treatment of disease” intervention and provide ideas for the integration of traditional and western medicine.

Keywords risk prognosis; disease-syndrome combination; risk factor; prognosis factor; prediction model

(收稿日期: 2017-11-01; 修回日期: 2018-01-03)

编辑: 崔京艳