

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.09.015

肾阳虚体质大鼠肝细胞全基因组 DNA 甲基化的测序与分析

欧阳双, 李晗, 蔡海洋, 吴晶, 汤朝晖, 李炜弘✉

成都中医药大学, 成都市温江区柳台大道 1166 号, 611137

[摘要] **目的** 探讨肾阳虚体质大鼠肝细胞 DNA 甲基化特征。**方法** 选取本课题组前期研发的自发性肾阳虚体质模型大鼠子一代、子四代雄性各 3 只分别组成子一代组和子四代组, 3 只正常 SD 大鼠设为空白组。取各组大鼠肝脏组织, 进行 DNA 抽取与质检, 构建 DNA 文库, 进行甲基化测序, 与参考基因组进行唯一比对, 定位富集区域。将子一代组、子四代组富集区域分别与空白组比较, 取差异富集区域。子一代组、子四代组差异富集区域取交集, 将富集区域关联到基因, 并根据组间富集区域富集样本个数差异筛选组间差异的甲基化富集区域。针对差异关联基因集进行 GO、KEGG 功能分析。**结果** 子一代组共获得 276 091 个富集区域, 子四代组共获得 309 430 个富集区域, 空白组共获得 275 413 个富集区域。与空白组大鼠相比, 子一代组肾阳虚体质大鼠差异富集区域共 372 个, 其中甲基化水平增高 89 个, 甲基化水平降低 283 个; 子四代组肾阳虚体质大鼠差异富集区域共 51 条, 其中甲基化水平增高 30 个, 甲基化水平降低 21 个。取子一代组与子四代组差异富集区域的交集, 初步筛选出差异富集区域 12 个。对差异富集区域进行 GO、KEGG 功能分析, 密切关联到基因 11 个, 其中甲基化水平增高有 Gdap1、Cdkal1、Cd300lb, 甲基化水平降低有 Zmiz1、Fam111a、Sh3bp4、As3mt、Col16a1、LOC103690271、Wdpcp、LOC102553861, 基因功能涉及线粒体膜生成、代谢过程、细胞增殖、细胞吞噬、信号转导、生物调节、蛋白定位等。**结论** 肾阳虚体质大鼠存在肝细胞 DNA 甲基化的差异表达, 差异甲基化位点其关联基因集中于肿瘤发生和线粒体能量代谢、糖脂代谢等生物学功能紊乱。

[关键词] 肾阳虚; 体质; 肝细胞; DNA 甲基化; 表观遗传学; 大鼠

表观遗传学主要是指在不改变 DNA 序列的情况下而表现为 DNA 甲基化谱、染色质结构状态以及基因表达谱在各个细胞之间传递生物信息的遗传现象的一门学科^[1]。本课题组前期进行了肾虚证及肾阳虚体质的研究, 发现肾虚证关联的免疫相关基因存在 DNA 甲基化水平差异^[2-3]。基于此, 采用课题组研发的自发性肾阳虚体质大鼠模型, 研究肾阳虚体质模型大鼠全基因组 DNA 甲基化表达差异, 分析肾阳虚体质 DNA 甲基化特异位点, 从表观遗传学角度揭示肾阳虚体质在遗传与环境相互作用下的 DNA 甲基化调控特征, 初步论证引入先天禀赋理念构建中医体质模型的可行性。本实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会审查通过(批号

Dossy20220325001)。

1 材料与方法

1.1 动物

本课题组前期研发的自发性肾阳虚体质模型大鼠^[4], 子一代雄鼠 3 只, 体重 326~335 g; 子四代雄鼠 3 只, 体重 330~334 g, 均为 90 日龄。SPF 级 SD 雄鼠 3 只, 体重 382~390 g, 90 日龄, 购于成都达硕实验动物有限公司, 生产许可证号 SCXK(川)2015-030。大鼠饲养于成都达硕实验动物有限公司, SPF 环境, 饲养环境温度 (20±1)℃, 自由进食及饮水。

1.2 主要试剂及仪器

DNeasy Blood & Tissue 试剂盒 (Qiagen 公司, 批号 69504); SimpleDIP™ Hydroxymethylated DNA IP (hMeDIP) 试剂盒 (CST 公司, 批号 95176);

基金项目: 国家自然科学基金 (81873204)

✉ 通讯作者: lwh@cdutcm.edu.cn

TruSeq DNA LT Sample Prep 试剂盒 (Illumina 公司, 批号 FC-121-2001); 戊巴比妥钠 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20141117)。

Qubit Flex 荧光计 (ThermoFisher 公司, 型号 Q33327); 超声破碎仪 (Diagenode 公司, 型号 Bioruptor pico); DNA 测序仪 (Illumina 公司, 型号 NovaSeq6000); 凝胶成像系统 (Bio-rad 公司, 型号 GelDoc XR Biorad)。

1.3 动物分组

采用随机数字表法选取 3 只子一代大鼠组成子一代组, 3 只子四代大鼠组成子四代组; 3 只正常 SD 大鼠设为空白组。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 宏观行为学观察 实验开始后第 3 天 20:00 观察各组大鼠的精神状况、活动情况、反应灵敏情况、毛色及二便情况。

1.4.2 肝组织 DNA 抽取与质检 各组大鼠取材前一晚禁食过夜。2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 取肝脏右叶, 用干净剪刀迅速沿肝脏边缘剪取 0.4 g 肝组织, 立即置入 -80 °C 以下液氮中低温保存。采用 DNeasy Blood & Tissue 试剂盒, 按照说明书步骤进行大鼠肝组织中 DNA 的提取。提取后的 DNA 采用 Qubit Flex 荧光计进行定量, 凝胶成像系统检测 DNA 完整度。样本 DNA 浓度不低于 50 ng/μl, 样品总量 DNA 不低于 2 μg, 质检合格的 DNA 样本于 -80 °C 保存。

1.4.3 DNA 文库构建与甲基化测序 每个 DNA 样本取 2 μg, 用 Biorupter 超声破碎仪进行 DNA 片段化。片段化的 DNA 进行末端补平、加接头。按照 SimpleDIP™ Hydroxymethylated DNA IP (hMeDIP) 说明书步骤富集甲基化区域 DNA, TruSeq DNA LT Sample Prep 试剂盒进行文库构建, Qubit Flex 荧光计定量 DNA 文库。构建完成的文库放在 DNA 测序仪上进行测序。

1.4.4 甲基化数据处理与生物信息学分析 测序完成后, 对原始数据进行质控、预处理, 与参考基因组进行唯一比对。采用 MACS 2 软件对测序序列 (reads) 在基因组上的甲基化富集区域进行定位, 即富集区域定位。将子一代组、子四代组富集区域分别与空白组比较, 取差异富集区域。子一代组、子四代组差异富集区域取交集, 将富集区域关联到基因, 并根据组间富集区域富集样本个数差异筛选组间差异的甲基化富集区域。同时, 针对目的基因集 (差异关联基因) 进行 GO、KEGG 功能分析,

从而对基因进行功能注释和归类。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠宏观行为学观察结果

前期研究^[5-6]论证宏观行为学足以作为模型评价的依据。空白组大鼠精神状态良好, 双目有神, 活动及反应迅速灵敏, 皮毛光泽、柔顺、浓密, 睡眠时喜扎堆, 二便正常; 子一代组、子四代组大鼠精神状态尚可, 两目神色稍暗, 反应稍显迟钝, 毛色晦暗凌乱, 活动减弱, 喜弓背扎堆, 肛周污染。

2.2 各组大鼠肝细胞 DNA 富集区域定位结果

子一代组肾阳虚体质大鼠共获得 276 091 个富集区域, 子四代组肾阳虚体质大鼠共获得 309 430 个富集区域, 空白组大鼠共获得 275 413 个富集区域。

2.3 各组大鼠肝细胞 DNA 差异富集区域组间分析结果

与空白组大鼠相比, 子一代组肾阳虚体质大鼠差异富集区域共 372 个, 其中甲基化水平增高 89 个, 甲基化水平降低 283 个; 子四代组肾阳虚体质大鼠差异富集区域共 51 个, 其中甲基化水平增高 30 个, 甲基化水平降低 21 个。差异甲基化位点子一代组较子四代组多。

2.4 各组大鼠肝细胞 DNA 差异富集区域交集分析结果

子一代组肾阳虚体质大鼠差异富集区域与子四代组肾阳虚体质大鼠差异富集区域取交集, 得到相同的差异富集区域 12 个, 并密切关联到基因 11 个。表 1-2 示, 与空白组比较, 子一代组和子四代组大鼠肝细胞 DNA 甲基化水平增高的有: Gdap1、Cdkal1、Cd300lb; 甲基化水平降低的有: Zmiz1、Fam111a、Sh3bp4、As3mt、Col16a1、LOC103690271、Wdpcp、LOC102553861。针对关联基因进行 GO 和 KEGG 数据库的功能注释和归类, 其中 GO 数据库收录 10 个 (LOC102553861 未收录), KEGG 数据库目前均未收录。关联基因的功能注释及归类结果详见表 3。

3 讨论

大鼠宏观行为学观察结果示, 肾阳虚体质大鼠精神状态尚可, 两目神色稍暗, 反应稍显迟钝, 毛色晦暗凌乱, 活动减弱, 喜弓背扎堆, 肛周污染。神色稍暗, 反应稍显迟钝, 毛色晦暗凌乱均为阳气

表1 子一代组肾阳虚体质大鼠与空白组大鼠肝细胞DNA 关联基因甲基化水平比较

基因	子一代组	空白组	Fold 值	FDR 值
Gdap1	35. 42±2. 34	16. 1±5. 53	1. 14	0. 046
Zmiz1	26. 69±19. 86	74. 34±6. 3	-1. 48	0. 015
Fam111a	36. 66±23. 35	240. 96±154. 39	-2. 72	0. 003
Cdkal1	64. 54±14. 67	23. 29±4. 72	1. 47	0. 000
Sh3bp4	18. 25±3. 9	41. 37±4. 85	-1. 18	0. 018
As3mt	15. 93±5. 29	43. 05±4. 91	-1. 43	0. 001
Col16a1	52. 37±6. 45	100. 19±15. 6	-0. 94	0. 013
Cd300lb	61. 48±24. 36	16. 22±13. 31	1. 92	0. 047
LOC103690271	12. 07±4. 46	66. 71±24. 37	-2. 47	0. 000
Wdpcp	26. 03±5. 38	59. 88±9. 73	-1. 20	0. 005
LOC102553861	29. 13±15. 85	68. 75±12. 72	-1. 24	0. 047
LOC102553861	44. 31±26. 97	118. 02±45. 74	-1. 41	0. 050

注：Fold 值即富集度子一代组/空白组取 log2，正值表示甲基化水平增高，负值表示甲基化程度降低，Fold 值的绝对值越大，表示甲基化程度越高；FDR 即经 Benjamini & Hochberg 多重检验校正后的 P 值；LOC103690271 基因上发现两个位点，因此有两组数据。

不足，失于对脏腑机能的温煦，推动脏腑功能活动能力减弱的表现；“阳主动”，大鼠活动减弱说明阳气虚弱致活力下降；喜弓背扎堆提示大鼠畏寒怯冷，通过扎堆取暖；肛周污染是因为大鼠大便时有溏泄所致，对应了肾阳失于温煦，腐熟运化水谷与蒸腾气化水液之力下降，进而造成大便溏薄。

经 MeDIP-Seq 甲基化 DNA 免疫共沉淀测序，发现子一代组和子四代组肾阳虚体质模型大鼠与空白组大鼠基因甲基化位点均存在显著差异，初步提示肾阳虚体质与 DNA 甲基化相关。从差异甲基化富集区域数量上看，子一代组明显比子四代组多，

表2 子四代组肾阳虚体质大鼠与空白组大鼠肝细胞DNA 关联基因甲基化水平比较

基因	子四代组	空白组	Fold 值	FDR 值
Gdap1	47. 53±15. 23	19. 15±4. 89	1. 31	0. 028
Zmiz1	28. 94±3. 08	84. 65±7. 04	-1. 55	0. 000
Fam111a	43. 37±21. 45	274. 4±175. 8	-2. 66	0. 001
Cdkal1	59. 89±18. 64	26. 1±5. 99	1. 20	0. 041
Sh3bp4	22. 42±1. 65	47. 12±5. 64	-1. 07	0. 026
As3mt	18. 88±4. 99	49. 03±5. 62	-1. 38	0. 002
Col16a1	64. 02±1. 97	114. 08±17. 63	-0. 83	0. 023
Cd300lb	74. 94±5. 73	26. 98±15. 43	1. 47	0. 007
LOC103690271	10. 02±2. 33	76. 02±27. 95	-2. 92	0. 000
Wdpcp	32. 83±6. 80	68. 19±11. 07	-1. 05	0. 007
LOC102553861	40. 08±8. 31	78. 28±14. 42	-0. 97	0. 038
LOC102553861	22. 70±11. 10	134. 40±52. 10	-2. 57	0. 000

注：Fold 值即富集度子四代组/空白组取 log2，正值表示甲基化水平增高，负值表示甲基化程度降低，Fold 值的绝对值越大，表示甲基化程度越高；FDR 即经 Benjamini & Hochberg 多重检验校正后的 P 值；LOC103690271 基因上发现两个位点，因此有两组数据。

说明子一代组模型大鼠甲基化水平差异更明显，一定程度上提示子一代肾阳虚模型更优于传代培养的子四代。

子一代肾阳虚体质大鼠差异富集区域与子四代肾阳虚体质大鼠差异富集区域取交集，筛出 12 个差异富集区域，并关联到 Gdap1、Cdkal1、Cd300lb、Zmiz1、Fam111a、Sh3bp4、As3mt、Col16a1、LOC103690271、Wdpcp、LOC102553861 11 个基因。基因功能集中于线粒体能量代谢、糖脂代谢以及肿瘤发生。

本课题组前期研究^[2,7-10]表明，肾虚证及肾虚体质与线粒体能量代谢相关，其他研究^[11]也

表3 大鼠肝细胞DNA 关联基因在GO 数据库中的功能注释

基因	生物过程	细胞成分	分子功能
Gdap1	线粒体蛋白质定位方法的建立，线粒体组织	线粒体，线粒体膜部分	—
Zmiz1	细胞增殖，基因表达	细胞器部件，细胞内膜结合细胞器	结合，金属离子结合
Fam111a	细胞过程的调控，含核苷酸的复合代谢过程	细胞核，染色体部分	—
Cdkal1	TRNA 加工，有机物代谢过程	细胞内细胞器，膜结合细胞器	甲硫基转移酶活性，转移酶活性
Sh3bp4	细胞吞噬，调节细胞过程	细胞质，细胞核	水解酶活性，嘌呤核苷酸结合
As3mt	肿乙酸盐代谢过程，羧酸代谢过程	细胞内部分，细胞质	亚砷酸盐甲基转移酶活性，甲基转移酶活性
Col16a1	黏附连接组件，细胞-衬底黏附正向调节	蛋白质类细胞外基质，细胞外区部分	蛋白质结合，蛋白质复合物结合
Cd300lb	—	膜的整体成分，膜	—
LOC103690271	对化学刺激的感官感知，检测与感官感知有关的刺激物	膜，膜的固有成分	信号转导活性，受体活性
Wdpcp	生物调节，蛋白质定位的调节	细胞质部分，细胞顶端部分	—
LOC102553861	—	—	—

注：表中GO 数据库功能注释举例2 条进行说明；“—” 表示未收入。

论证了肾阳虚与能量代谢相关并且存在以线粒体为中心的代谢缺陷。Gdap1 基因编码的 Gdap1 蛋白定位于线粒体外膜上,提示 Gdap1 与线粒体形态结构和功能关系密切^[12-13]。Gdap1 基因与线粒体动力学调控相关,维持线粒体的形态和功能的必要条件是保持线粒体分裂和融合之间的平衡,同时这种平衡也是维持神经元生存所必需的条件^[14-15]。本实验中,该基因的甲基化水平增高,导致该基因低表达,影响 Gdap1 蛋白的生成,导致线粒体结构被破坏、功能发挥异常、能量代谢障碍,使脏腑功能低下,从而出现肾阳虚表现的一系列症状等,论证了肾阳虚能量代谢障碍与 Gdap1 甲基化高水平有关。

肾阳是五脏六腑阳气之根本,对全身各脏腑功能起着推动、温煦作用。肾阳亏虚,肾的气化功能失常,导致津液的产生及输布功能失常,而出现痰饮,痰饮停聚不散,气机郁滞,进一步导致津液输布功能异常。基于肾阳虚大鼠肝脏线粒体的研究^[16]发现,糖类和脂类物质分解代谢受抑以及细胞内信号转导异常,进一步提示肾阳虚大鼠可能因为糖脂代谢异常而出现虚寒症状,从而说明了肾阳虚与糖脂代谢相关。Cdkal1 基因,基因编码 Cdkal1 蛋白。Cdkal1 蛋白可以促进腺苷三磷酸(ATP)的生成,从而控制胰岛素在胰岛β细胞内第一阶段的释放^[17]。Cdkal1 基因与代谢综合征有关^[18],为 2 型糖尿病候选基因之一^[19-20]。本实验中,关联基因 Cdkal1 的甲基化水平增高,导致该基因低表达状态,从而抑制 Cdkal1 蛋白的生成、影响胰岛素的生成与释放,论证了肾阳虚与糖类物质分解代谢障碍相关。

《灵枢·百病始生》曰:“积之始生,得寒乃生,厥乃成积。”肿瘤为有形实邪,阳虚寒凝是部分患者的发病始动因素^[21]。阳虚体质的人群较其他偏颇体质的人群患肿瘤的概率更高,临床肿瘤发病的重要内在因素之一就是阳虚体质^[22]。Fam111a 基因在日本群体中为前列腺癌的易感基因位点^[23],可作为预测宫颈癌转移可能性的基因标记^[24]。Zmiz1 基因编码的 MIZ 型结构域的锌指蛋白 1 (Zmiz1 蛋白),已被发现是 Smad3/4^[25]和 p53^[26]这两条重要的癌症通路的调节因子。Zmiz1 基因甲基化是肿瘤细胞迁移的驱动力^[27]。As3mt 基因编码亚砷酸盐甲基转移酶(As3mt)^[28],长期砷暴露可通过表观遗传机制促进肿瘤发生,亚砷酸盐甲基转移酶(As3mt)在此过程中起重要作用^[29]。Wdpcp 基因编码的蛋白参与构成 CPLANE 蛋白组件,在哺乳

动物中调节纤毛发育^[30]。纤毛几乎存在于所有细胞表面,分为运动纤毛和初级纤毛两种。初级纤毛是调节细胞内 Shh、Wnt 等信号传递的重要细胞器^[31-32]。刺猬信号通路(Hedgehog, HH)异常激活与肿瘤的发生、侵袭和转移密切相关^[33-34],Shh 信号通路作为 HH 信号的重要分支,在血液肿瘤中发挥着重要作用^[35]。Wnt 信号通路广泛参与各种生物的胚胎发育、组织分化及细胞增殖、迁移、凋亡等,是近年来分子生物学、细胞生物学和肿瘤学研究的热点之一^[36]。本实验中,关联基因 Fam111a、Zmiz1、As3mt、Wdpcp 甲基化水平降低,基因呈现高表达状态,促进肿瘤发生、调节肿瘤信号通路、驱动肿瘤细胞迁移。提示这四种基因在肾阳虚体质中的甲基化修饰能参与和促进肿瘤细胞的生成、迁移,与肾阳虚体质为肿瘤好发体质相一致。

Sh3bp4 编码的 SH3 结构域结合蛋白 4(Sh3bp4)与肿瘤的进程有关,Sh3bp4 基因在部分肿瘤中存在缺失突变^[37-38],包括乳腺癌、肾癌、非小细胞型肺癌和神经母细胞瘤,且能抑制乳腺癌细胞的迁移^[39]。Sh3bp4 是一个潜在的抑癌基因,主要作用于氨基酸依赖型哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTORC1)信号通路,且参与调控细胞增殖和自噬^[40]。Sh3bp4 亦可抑制肝癌细胞迁移、侵袭和增殖,可能为肝癌的诊治提供一个新的靶标^[41]。本实验中,关联基因 Sh3bp4 甲基化水平增高,基因呈现低表达状态,作为潜在抑癌基因被抑制,无法实现抑制肿瘤细胞的迁移、侵袭,提示该基因在肾阳虚体质中的甲基化修饰抑制了其正常功能的发挥,相对而言促进了肿瘤细胞的迁移、侵袭,与肾阳虚体质为肿瘤好发体质相一致。

本实验结果中基因 Col16a1、Cd300lb、LOC103690271、LOC102553861 目前国内外均未见相关研究记载,本研究初步发现这些基因可能与肾阳虚体质相关,为后续研究提供了空间。本研究结果显示,Col16a1 呈现低甲基化趋势,GO 功能富集分析提示其功能主要集中于细胞对各类物资的反应及黏附、细胞外基质和蛋白质结合等方面。Cd300lb 呈现高甲基化趋势,GO 功能富集分析提示其功能主要与膜的成分有关。LOC103690271 呈现低甲基化趋势,GO 功能富集分析提示其功能主要集中于细胞对刺激和感觉的反应、细胞膜的成分以及受体结合等方面。LOC102553861 呈现低甲基化趋势,GO 和 KEGG 均未收录此基因的功能。

综上所述, 肾阳虚体质大鼠肝细胞 DNA 甲基化特征为: Gdap1 甲基化高水平, 影响线粒体网络的形成, 显示肾阳虚体质与线粒体能量代谢相关; Cdkal1 甲基化高水平, 影响胰岛素的生成与释放, 说明了肾阳虚与糖脂代谢相关; Fam111a 作为肿瘤易感基因、Zmiz1 作为癌症通路调节因子、As3mt 作为肿瘤相关基因、Wdpcp 作为肿瘤信号通路相关基因均表现甲基化低水平, Sh3bp4 作为潜在抑癌基因表现甲基化高水平, 提示肾阳虚体质为肿瘤好发体质。这些关联基因还需要进一步验证, 后续应继续梳理关联基因之间的联系, 以及基因所表达的蛋白的情况, 来构建肾阳虚体质 DNA 甲基化的生物图谱, 为揭示肾阳虚体质的发生发展以及中医干预肾阳虚的效应机制奠定基础。

参考文献

- [1] BIRD A. Perceptions of epigenetics [J]. *Nature*, 2007, 447(7143): 396-398.
- [2] 王米渠, 丁维俊, 李炜弘, 等. 基因表达谱芯片发现热药疗寒的相关七类基因初报 [J]. *中医杂志*, 2003, 44(2): 119-122.
- [3] 曾跃琴, 李炜弘, 张天娥, 等. 肾阳虚证免疫相关基因 CPG 岛调控机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(6): 1515-1517.
- [4] 和靖. 自发性肾阳虚体质动物模型的构建及评价研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
- [5] 陈博武, 贾茹, 钱晨, 等. 基于中医四诊方法对哮喘大鼠肾阳虚证模型建立的评价研究 [J]. *中国中医药科技*, 2017, 24(5): 537-539, 543.
- [6] 卢德赵, 沃兴德, 沃立科, 等. 温补肾阳药对甲状腺切除的肾阳虚大鼠肝线粒体蛋白质组的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(10): 1251-1256.
- [7] 李炜弘, 雍小嘉, 范怀昌, 等. 老龄肾阳虚证的差异表达基因谱分析 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(5): 1210-1212.
- [8] 李炜弘, 范怀昌, 丁维俊, 等. 运用基因芯片技术分析老龄肾阳虚证与 Wnt/B-catenin 信号通路的相关性 [J]. *四川中医*, 2009, 27(12): 15-17.
- [9] 李炜弘, 许嗣立, 张天娥, 等. 老龄肾阳虚证差异表达基因的筛选与鉴定 [J]. *辽宁中医杂志*, 2012, 39(4): 590-592.
- [10] 乔卫龙. 基于线粒体母系遗传研究肾阳虚体质能量代谢低下分子机制 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [11] 卢德赵, 沃兴德, 施孟如, 等. 激素型肾阳虚动物肝线粒体蛋白质组与能量代谢相关性 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21(6): 807-814.
- [12] NIEMANN A, RUEGG M, PADULA VLA, et al. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease [J]. *J Cell Biol*, 2005, 170(7): 1067-1078.
- [13] PEDROLA L, ESPERT A, WU X, et al. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria [J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(8): 1087-1094.
- [14] LACKNER LL. Shaping the dynamic mitochondrial network [J]. *BMC Biol*, 2014, 12: 35. doi: 10.1186/1741-7007-12-35.
- [15] SAFIULINA D, KAASIK A. Energetic and dynamic: how mitochondria meet neuronal energy demands [J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(12): e1001755.
- [16] 卢德赵, 沃兴德, 沃立科, 等. 甲状腺切除的肾阳虚大鼠肝线粒体蛋白质组的研究 [J]. *中医药学报*, 2008, 36(4): 11-15.
- [17] OHARA-IMAIZUMI M, YOSHIDA M, AOYAGI K, et al. Deletion of CDKAL1 affects mitochondrial ATP generation and first-phase insulin exocytosis [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15553.
- [18] 陈继承, 庄耀东, 李灿东, 等. 代谢综合征痰证人群不同症候群与 CDKAL1、CDKN2A 的相关性 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8): 3426-3430.
- [19] KAWAI VK, LEVINSON RT, ADEFURIN A, et al. A genetic risk score that includes common type 2 diabetes risk variants is associated with gestational diabetes [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2017, 87(2): 149-155.
- [20] TARNOWSKI M, MALINOWSKI D, PAWLAK K, et al. GCK, GCKR, FADS1, DGKB/TMEM195 and CDKAL1 gene polymorphisms in women with gestational diabetes [J]. *Can J Diabetes*, 2017, 41(4): 372-379.
- [21] 余茁萃, 吕俊, 蔡昂. 癌症恶病质中医证治探讨 [J]. *中国民间疗法*, 2020, 28(21): 11-13.
- [22] 郭威堂, 汪鸣, 韩琦, 等. 论阳虚体质与肿瘤的发病关系 [J]. *中医药信息*, 2016, 33(6): 17-19.
- [23] AKAMATSU S, TAKATA R, HAIMAN CA, et al. Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(4): 426-429.
- [24] FERNANDEZ-RETANA J, ZAMUDIO-MEZA H, RODRIGUEZ-MORALES M, et al. Gene signature based on degradome-related genes can predict distal metastasis in cervical cancer patients [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 1010428317711895.
- [25] LI X, THYSSEN G, BELIAKOFF J, et al. The novel PIAS-like protein hZimp10 enhances Smad transcription-

- al activity[J]. J Biol Chem, 2006, 281(33): 23748-23756.
- [26] LEE J, BELIAKOFF J, SUN Z. The novel PIAS-like protein hZimp10 is a transcriptional co-activator of the p53 tumor suppressor[J]. Nucleic Acids Res 2007, 35(13):4523-4534.
- [27] MATHIOS D, HWANG T, XIA Y, et al. Genome-wide investigation of intragenic DNA methylation identifies ZMIZ1 gene as a prognostic marker in glioblastoma and multiple cancer types[J]. Int J Cancer, 2019, 145(12): 3425-3435.
- [28] 宋晓丽, 耿志荣, 王志林. 无机砷甲基化研究进展[J]. 无机化学学报, 2012, 28(10):2025-2035.
- [29] SMITH AH, LOPIPERO PA, BATES MN, et al. Public health Arsenic epidemiology and drinking water standards[J]. Science, 2009, 296(5576):2145-2146.
- [30] SUN M, TAN J, WANG M, et al. Inorganic arsenic-mediated upregulation of AS3MT promotes proliferation of nonsmall cell lung cancer cells by regulating cell cycle genes[J]. Environ Toxicol, 2021, 36(2):204-212.
- [31] RECIO-VEGA R, HERNANDEZ-GONZALEZ S, MICHEL-RAMIREZ G, et al. Association between the polymorphism of three genes involved in the methylation and efflux of arsenic (As3MT, MRP1, and P-gp) with lung cancer in a Mexican cohort[J]. J Appl Toxicol, 2021, 41(9):1357-1366.
- [32] SIMONS M, GLOY J, GANNER A, et al. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways[J]. Nat Genet, 2005, 37(5): 537-543.
- [33] LI Z, MAO S, JIN J. Activation of hedgehog pathway in acute myeloid leukemia patients[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(8):8605-8609.
- [34] MERCHANT AA, MATSUI W. Targeting Hedgehog: a cancer stem cell pathway[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(12):3130-3140.
- [35] 姚柳, 赵芳, 秦玉婷, 等. Shh 信号通路在骨髓增生异常综合征中的表达及 SMO 抑制剂对 MUTZ-1 细胞作用的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(1):32-39.
- [36] 张香红, 王荟荟, 黄小燕, 等. Wnt 信号通路在慢性阻塞性肺疾病中的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(4):628-631, 645.
- [37] BEROUKHIM R, GETZ G, NGHIEMPHU L, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(50):20007-20012.
- [38] BEROUKHIM R, MERMEL CH, PORTER D, et al. The landscape of somatic copy number alteration across human cancers[J]. Nature, 2010, 463(7283):899-905.
- [39] FRANCAVILLA C, RIGBOLT KT, EMDAL KB, et al. Functional proteomics defines the molecular switch underlying FGF receptor trafficking and cellular outputs[J]. Mol Cell, 2013, 51(6):707-722.
- [40] KIM YM, KIM DH. dRAGging amino acid-mTORC1 signaling by SH3BP4[J]. Mol Cells, 2013, 35(1):1-6.
- [41] 郑亚秋, 潘琦, 梁利, 等. SH3BP4 基因对肝癌细胞迁移和增殖作用的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(5):617-623.

Whole-genome DNA Methylation Sequencing and Analysis of Hepatocytes in Rats with Kidney *Yang* Deficiency Constitution

OUYANG Shuang, LI Han, CAI Haiyang, WU Jing, TANG Zhaohui, LI Weihong

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 611137

ABSTRACT Objective To explore the characteristics of DNA methylation of hepatocytes in rats with kidney *yang* deficiency constitution. **Methods** Three first-generation and three fourth-generation male offspring of spontaneous kidney *yang* deficiency model rats developed by our previous research were selected as the first-generation offspring group and fourth-generation offspring group, respectively, and three normal SD rats were set as the blank group. The liver tissues of rats in each group were collected for DNA extraction and quality inspection, and DNA libraries were then constructed. Methylation sequencing was performed, and the results were uniquely compared with the reference genome to identify the location of enrichment regions. The enriched region of the first-generation offspring group and the fourth-generation offspring group were compared to that of the blank group, respectively, to identify the differentially enriched regions. The differentially enriched regions of first-generation offspring group and the fourth-generation offspring group were intersected, and the enrichment region was associated with genes. The methylation-enriched regions that differ between groups were then identified according to the differences in the number of enriched samples in enriched regions between groups. GO and KEGG functional analysis was performed on differentially expressed genes.

Results A total of 276 091 enrichment regions were obtained in the first-generation offspring group, while 309 430 enrichment regions and 275 413 enrichment regions were identified in the fourth-generation offspring group and the blank group, respectively. Compared to the rats in the blank group, there were 372 differentially enriched regions in the kidney *yang* deficiency rats in the first-generation offspring group, among which 89 regions had increased methylation levels and 283 had decreased methylation levels; there were 51 differentially enriched regions in the kidney *yang* deficiency rats in the fourth-generation offspring group, among which 30 regions had increased methylation levels and 21 had decreased methylation levels. The intersection of the differentially enriched areas of the first-generation offspring group and the fourth-generation offspring group preliminarily identified 12 differentially enriched regions. GO and KEGG functional analysis of differentially enriched regions showed that 11 genes were closely related. Gdap1, Cdkal1, and Cd300lb had an increase in the methylation level, while Zmiz1, Fam111a, Sh3bp4, As3mt, Col16a1, LOC103690271, Wdpcp, and LOC102553861 had a decrease in the methylation level. Gene function was involved with mitochondrial membrane formation, metabolic process, cell proliferation, cell phagocytosis, signal transduction, biological regulation, protein localization, etc. **Conclusion** DNA methylation of hepatocytes is differentially expressed in rats with kidney *yang* deficiency constitution, and the genes associated with differential methylation sites are mainly involved with tumorigenesis and biological function disorders such as mitochondrial energy metabolism and glucose and lipid metabolism.

Keywords kidney *yang* deficiency; constitution; hepatocytes; DNA methylation; epigenetics; rat

(收稿日期: 2021-11-09; 修回日期: 2022-02-25)

[编辑: 王利芬]

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951—2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951—1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社,邮政编码:100700

电话:(010) 64035632 联系人:杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951—1986 年光盘合订本每套(4 张光盘)480 元

1987—1994 年光盘合订本每套(1 张光盘)260 元

1995—2004 年光盘合订本每套(1 张光盘)280 元

2005—2013 年光盘合订本每套(1 张光盘)300 元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统 3.5—《中医杂志》(1987—1994)

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

