

杨星九,黄昊,马竣,等. 鉴定与衰老相关的甲基化基因及筛选具有逆调控效应的物质 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 8-16.

Yang XJ, Huang H, Ma J, et al. Identification of aging-related methylation genes and screening for substances with adverse regulatory effects [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(7): 8-16.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.07.002

鉴定与衰老相关的甲基化基因及筛选具有逆调控效应的物质

杨星九^{1#}, 黄昊^{2#}, 马竣², 周光朋², 蔡海利², 叶志海², 王建铭²,
韩晓亮^{2*}, 高苒^{1*}

(1.中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京 100021;
2.博尔诚(北京)科技有限公司,北京 102600)

【摘要】 目的 筛选和验证与人体衰老进程相关的甲基化基因,建立方便、灵敏、准确的检测方法,筛选能够逆向调控与衰老过程相关的甲基化基因的物质。**方法** 通过 GEO (Gene Expression Omnibus) 公共数据库筛选并验证与人体衰老进程相关的甲基化基因,建立甲基化 qPCR 检测体系,验证目标基因与人体衰老的相关性。使用一组具有抗衰老功效的天然提取物/物质处理体外培养的细胞系,检测细胞系表型变化及目标基因甲基化水平变化。**结果** 建立了促泌素 (secretagoin, SCGN) 和整合素亚基 $\alpha 2b$ (integrin subunit alpha 2b, ITGA2B) 基因的甲基化检测体系,在 53 例独立样本中验证了 SCGN 和 ITGA2B 基因的甲基化调控与人体衰老进程相关。表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 和没食子酸 (gallic acid, GA) 抑制体外培养的细胞系的存活能力,且能逆转 SCGN 和 ITGA2B 基因在衰老进程中发生的甲基化调控。**结论** SCGN 和 ITGA2B 基因甲基化水平的变化有可能用于评估人体衰老状态和监测人体衰老进程,同时也为开发基于 DNA 甲基化调控机制的抗衰老药物或产品提供了功效监测和评估工具。

【关键词】 衰老; SCGN; ITGA2B; DNA 甲基化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 07-0008-09

Identification of aging-related methylation genes and screening for substances with adverse regulatory effects

YANG Xingjiu^{1#}, HUANG Hao^{2#}, MA Jun², ZHOU Guangpeng², CAI Haili², YE Zhihai²,
WANG Jianming², HAN Xiaoliang^{2*}, GAO Ran^{1*}

(1. Institute of Medical Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences; Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China. 2. BioChain (Beijing) Science & Technology Inc., Beijing 102600)

【Abstract】 Objective To screen and validate aging-associated DNA methylation dysregulation and to establish convenient, sensitive, accurate assays for detecting and screening substances capable of reversing dysregulated DNA

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助(2016-I2M-3-019);国家自然科学基金青年科学基金项目(81602460)。

[作者简介] 杨星九(1992—),男,技师。E-mail: star_tlbs@163.com

黄昊(1986—),男,研发经理。E-mail: huang.hao@biochainbj.com [#]共同第一作者

[通信作者] 高苒(1980—),女,副研究员,研究方向:肿瘤学、免疫学。E-mail: gaoran26@hotmail.com

韩晓亮(1957—),男,首席技术官。E-mail: sean.han@biochainbj.com ^{*}共同通信作者

methylation associated with the aging process. **Methods** The Gene Expression Omnibus (GEO) database was used to screen and validate DNA methylation alterations in the human aging process. A methylation qPCR detection system was developed to verify the correlation between DNA methylation levels of target genes and human age. Cancer cells were treated with a set of natural extracts/substances that had anti-aging properties to detect their effects on DNA methylation levels of target gene and phenotypic changes. **Results** A methylation detection system for the secretagoin (SCGN) and integrin subunit alpha 2b (ITGA2B) genes was established. Methylation levels of SCGN and ITGA2B genes were found to be correlated with human age, which was verified in 53 independent samples. Epigallocatechin gallate (EGCG) and gallic acid (GA) inhibited the tumor cell survival and reversed SCGN and ITGA2B methylation dysregulation associated with aging. **Conclusions** Measurements of SCGN and ITGA2B methylation level changes may be used to monitor the aging process in humans. They may also be used to provide experimental evidence for the development of anti-aging drugs or products based on DNA methylation regulation mechanisms.

[Keywords] aging; SCGN; ITGA2B; DNA methylation

衰老是指机体对环境的生理和心理适应能力进行性降低、逐渐趋向死亡的现象。病理学上,衰老是应激和劳损,损伤和感染,免疫反应衰退,营养失调,代谢障碍以及疏忽和滥用药物积累的结果,是包括癌症、糖尿病、心血管疾病和神经退行性疾病的主要危险因素^[1]。寻找可靠的衰老生物标志物和延缓生理衰老的方法一直是科学家们热衷研究的领域之一。

衰老是一个缓慢而复杂的生物进程,涉及遗传学、表观遗传学等因素的作用和相互作用^[2]。DNA 甲基化修饰是一种表观遗传标记,是在 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)或去甲基化酶的作用下,在基因组 DNA 中的 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5' 碳位共价键结合或去除一个甲基基团。DNA 甲基化修饰是能够在不改变 DNA 序列的前提下,改变遗传表现,进而通过基因表达调控实现多种生物过程的发生和进行,包括胚胎发育、基因组印记和衰老等^[3]。多种常见疾病涉及 DNA 甲基化修饰异常,如癌症、心血管疾病、衰老和代谢紊乱等^[4]。

DNA 甲基化是一种可以在人群中定量检测的表观遗传标记。近年的研究证明了人体基因组 DNA 甲基化的整体水平随着年龄的增长显著下降,并且很多研究报道了特定甲基化修饰位点与实际年龄具有显著相关性^[5]。Horvath 和 Hannum 等^[6-7]通过整合 353 和 71 个 CpG 位点建立了基于 DNA 甲基化的“表观遗传时钟”模型;这些 CpG 位点的基因与细胞存活和发育显著相关,通过检测这些位点的 DNA 甲基化水平,可以评估机体的衰老进程。研究发现在患有与衰老相关疾病的人群中,如阿尔茨海默病、癌症、心血管疾病和亨廷顿病, DNA 甲基化年龄超过了实际年龄,此现象被定义为“年龄加速

(age acceleration)”^[5]。

越来越多的证据支持营养和饮食可以调控 DNA 甲基化修饰,进而调节健康状况和影响衰老进程。Hannum 等^[8]运用 71 个 CpG 位点的 DNA 甲基化水平建立了年龄预测模型,并通过观察性研究发现增加鱼类和蔬菜的摄入与表观遗传老化程度减弱具有相关性。Lee 等^[9]在近期也证明了外源补充叶酸、维生素 B12 和黄烷醇能够延缓女性甲基化年龄的衰老。因此,通过饮食干预逆转 DNA 甲基化修饰异常,从而延缓衰老进程将可能成为一个新兴的研究领域。

我们通过数据库(Pubmed, CNKI 和万方数据库)检索关于 DNA 甲基化标志物和年龄预测的文献,根据发表文献中特定基因的 DNA 甲基化率与年龄的相关性,确定了两个与人体衰老进程相关的甲基化基因,分别是促泌素(secretagoin, SCGN)和整合素亚基 $\alpha 2b$ (integrin subunit alpha 2b, ITGA2B) 基因。本研究进一步运用 GEO 数据库验证了 SCGN 和 ITGA2B 基因甲基化标志物与人体衰老进程的相关性,并基于全基因组甲基化芯片数据,筛选其中与衰老进程相关性最高的甲基化位点,从而建立了相应的甲基化 qPCR 检测体系。最后,我们通过独立样本的检测进一步验证其与衰老的相关性,并评估了抗衰老天然提取物中的有效物质对与衰老相关的 DNA 甲基化标志物甲基化水平的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 外周血样本

53 名健康志愿者参与了此项研究;其中男性 30 例,平均 41 岁(24~60 岁),女性 23 例,平均 41.4 岁(27~60 岁),相应性别和年龄分布见表 1,年龄和性

别分布无显著差异 ($P=0.756$)。本研究的相关实验遵循福利伦理的相关规则和要求,符合涉及人的生物医学研究的伦理原则,包括知情同意原则、控制风险原则、免费和补偿原则、保护隐私原则、依法赔偿原则和特殊保护原则,所有志愿者同意此项研究并签署了知情同意书。

1.1.2 细胞

胃癌 AGS 细胞系和肝癌 HepG2 细胞系购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

1.1.3 文献数据库

PubMed 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), 中国知网数据库 (www.cnki.net/) 和万方数据库 (www.wanfangdata.com.cn); 全基因组甲基化谱数据来源: 基因表达汇编 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)。

1.2 主要试剂与仪器

血细胞基因组 DNA 提取试剂盒和亚硫酸氢盐处理试剂盒购自博尔诚 (北京) 科技有限公司; 细胞 RPMI-1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 阿扎胞苷 (5-azacytidine, 5-Aza)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 和没食子酸 (gallic acid, GA) 购自美国 Sigma 公司; CCK8 试剂盒购自日本同仁化学研究所; PCR 引物和探针由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。磁珠分离架购自美国 Invitrogen 公司, 实时定量 PCR 仪 ABI 7500 购自 Life Technologies 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 筛选和验证与衰老进程相关的甲基化基因

表 1 健康志愿者性别、年龄分布资料
Table 1 Sex and age distribution of the healthy volunteers

性别 Sex	例数 Number	年龄 (岁)	Age (Years old)	卡方 χ^2	P
		21~40	41~60		
男 Male	30	19 (63.3%)	11 (36.7%)	0.097	0.756
女 Female	23	13 (56.5%)	9 (39.1%)		

表 2 引物、探针序列
Table 2 Sequences of the primers and probes

基因 Gene	引物/探针 Primers/Probes	序列 (5'→3') Sequences
SCGN	上游引物 Forward	GAGAGTAAGTTAAGAAATAC
	下游引物 Reverse	CCAAACACCCGACGCG
	探针 Probe	Cy5-GTGAAGGAGTTTTTTTTAAAGTTGTTTAG
ITGA2B	上游引物 Forward	TGATTTTTTAGGTTGGTTGT
	下游引物 Reverse	CCTATAAACAAACCAAAAAATAACAATAT
	探针 Probe	FAM-GTGGGTTAATAATGTAGGTATAG
ACTB	上游引物 Forward	GTGATGGAGGAGGTTTACTAAGTT
	下游引物 Reverse	CCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA
	探针 Probe	JOE-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA

通过数据库 (Pubmed, 中国知网和万方) 检索关于 DNA 甲基化标志物和衰老相关的文献, 关键词 “methylation”, “biomarker”, “aging” 和 “甲基化”, “标志物”, “衰老” 或 “年龄”, 根据发表文献中特定基因的 DNA 甲基化率与年龄的相关性, 筛选出了一组候选的与衰老相关的 DNA 甲基化标志物。通过检索公共数据库 Gene Expression Omnibus (GEO), 获取涉及人体衰老进程的全基因组甲基化调控的数据, 并利用这些数据通过与年龄的相关性分析对上述甲基化基因进行验证。

1.3.2 建立和验证与衰老进程相关的甲基化基因的 qPCR 检测方法

细胞基因组 DNA 提取、定量及亚硫酸氢盐处理: 血液和培养的细胞均按照血细胞基因组 DNA 提取试剂盒 (博尔诚 (北京) 科技有限公司) 说明书步骤, 提取细胞基因组 DNA, 使用核酸蛋白浓度分析仪测定所提取 DNA 的浓度和纯度。使用亚硫酸氢盐处理试剂盒 (博尔诚 (北京) 科技有限公司) 说明书对符合要求的血细胞基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐转化处理、纯化; -20℃ 保存, 48 h 内使用。

1.3.3 DNA 甲基化位点的选定及其对应引物、探针的合成

基于全基因组甲基化芯片数据, 挑选了与人体衰老进程相关性最高的 *SCGN* 和 *ITGA2B* 基因及位点, 采用 Meth-Primer 软件对基因序列进行分析, 设计相应基因序列的引物序列及探针, 建立了其甲基化 qPCR 检测体系。引物和探针序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 序列见表 2。

1.3.4 DNA 甲基化阴阳性对照实验及实时定量 PCR 及其结果判定

使用 DNA 甲基转移酶处理的白细胞基因组 DNA 作为目标基因靶序列甲基化状态的阳性参考品,全基因组扩增的白细胞基因组 DNA 作为目标基因靶序列甲基化水平的阴性参考品, ACTB (β-Actin) 作为内参,进行实时定量 PCR,摸索基因的引物、探针等最佳反应条件。本研究使用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪对 DNA 样本进行 PCR 反应,50 μL 体系中添加 PCR 反应液 30 μL 和 DNA 样本液 20 μL,反应液中包含正、反向引物(0.3 μmol/L),检测探针(1 μmol/L)。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因特异位点甲基化在细胞系中相对水平,其中 ΔCT (试验样品)=CT(试验样品,目的基因)—CT(试验样品,内参基因 ACTB), $\Delta\Delta CT$ (试验样品)= ΔCT (试验样品)— ΔCT (阳性参考品)。

1.3.5 细胞培养

胃癌 AGS 细胞和肝癌 HepG2 细胞常规培养于 DMEM 完全培养液内(含 10% 胎牛血清),每 48 h 更换培养基,使用 0.04% 胰酶消化液消化细胞传代,对数生长期细胞进行细胞学实验。

1.3.6 细胞存活实验

对数生长期细胞 1×10^4 个接种于 96 孔板,3 种药物按照不同浓度稀释加入培养孔,每种药物设 3 个复孔。培养 48 h 后吸弃上清,更换完全培养液(含 10% CCK8),继续 37℃ 孵箱培养 3 h,振荡床轻微振荡 10 s,采用自动酶标仪(Bio-Rad)检测各孔 450 nm 波长的吸光度。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad Prism 5.0 软件对本实验中的数

据进行分析。卡方检验分析性别和年龄分布的差异。用线性回归分析甲基化水平与年龄的相关性。相关性的统计学显著性评估通过公式 $t = \frac{\gamma}{\sqrt{(1-\gamma^2)/(N-2)}}$ 首选计算 t 值(其中 γ 为相关系数, N 为样本数目),然后根据 t 值表和样本数码 N 检索相应 P 值, $P<0.05$ 表示具有统计学意义。两因素方差分析药物处理对细胞 DNA 甲基化水平的影响, $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

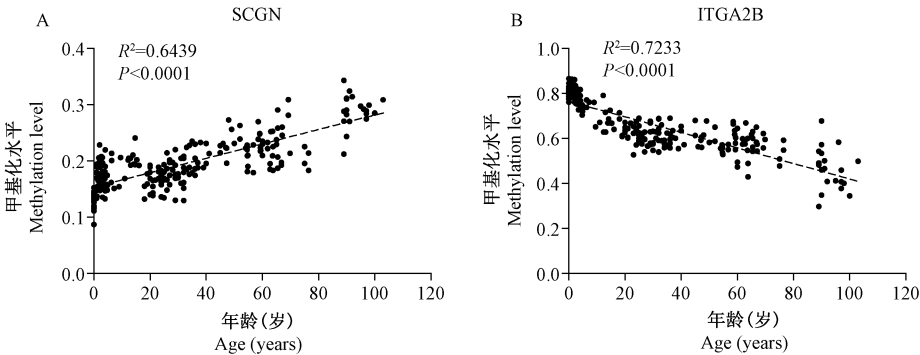
2 结果

2.1 甲基化基因特异位点的筛选及验证

通过 256 例人体外周血白细胞基因组 DNA 的全基因组甲基化芯片(Illumina 公司的 Human Methylation 450k 芯片)数据与相应个体年龄的相关性分析,验证了候选 DNA 甲基化标志物促泌素(secretagogen, SCGN)和去甲基化标志物整合素亚基 $\alpha 2b$ (integrin subunit alpha 2b, ITGA2B)的甲基化率(β)与生物年龄均具有显著性相关性(图 1),相关系数 R^2 分别为 0.6439 和 0.7233, P 值均小于 0.001。

2.2 甲基化阴阳性对照体系的选择

在本研究中,DNA 甲基转移酶处理的白细胞基因组 DNA 的目标基因靶序列为完全甲基化状态,全基因组扩增的白细胞基因组 DNA 的目标基因靶序列为完全去甲基化状态。因此,我们使用 DNA 甲基转移酶处理的白细胞基因组 DNA 作为目标基因靶序列甲基化状态的阳性参考品,全基因组扩增的白细胞基因组 DNA 作为目标基因靶序列甲基化水平的阴性参考品。



注:A:SCGN 甲基化水平与年龄呈正相关;B:ITGA2B 甲基化水平与年龄呈负相关。

图 1 SCGN 和 ITGA2B 基因甲基化水平与年龄的相关性

Note. A, Methylation level of SCGN was positively correlated with age. B, Methylation level of ITGA2B was negatively correlated with age.

Figure 1 Correlation between SCGN and ITGA2B methylation levels and age

经多次实验摸索条件后确定最优反应条件: 94℃ 20 min; 55.5℃ 35 s, 93℃ 30 s, 45 个循环; 40℃ 5 s; 4℃ 保存。对阳性参考品的检测中, SCGN 基因靶序列显示发生扩增, 在 45 个循环内未检测到 ITGA2B 基因靶序列的扩增(图 2A), 对阴性参考品的检测中, ITGA2B 基因靶序列显示发生扩增, 而在 45 个循环内未检测到 SCGN 基因靶序列的扩增(图 2B), 说明本系统均能够特异检测到处于甲基化状态的 SCGN 和去甲基化状态 ITGA2B 基因。

2.3 SCGN 的甲基化和 ITGA2B 的去甲基化水平均与年龄呈线性关系

提取 54 名志愿者的外周血白细胞 DNA, 并对 DNA 样本进行亚硫酸氢盐预处理, 按检测试剂盒操作。结果显示 SCGN 基因靶序列的甲基化水平与年龄呈显著正相关, $R^2 = 0.2689, P < 0.0001$ (图 3A), ITGA2B 基因靶序列的甲基化水平与年龄呈负相关, $R^2 = 0.1003, P = 0.0209$ (图 3B)。以上结果说明随着年龄的增加, SCGN 的甲基化水平逐渐增加, ITGA2B 的甲基化水平逐渐下降(即去甲基化增强)。进一步对 SCGN 和 ITGA2B 基因的甲基化的水平进行回归分析, 获得回归方程, 结果显示, 运用几何平均值计算的模型相对值($y = \sqrt{a * b}$, a、b 分别是 SCGN 的甲基化水平和 ITGA2B 基因的去甲基化水平)与年龄呈正相关, $R^2 = 0.3985, P < 0.0001$ (图 3C)。进一步分别对男性和女性的模型相对值与年龄进行回归分析, 结果显示男性($R^2 = 0.445, P < 0.001$)和女性($R^2 = 0.282, P = 0.008$)的模型相对值均与年龄具有线性相关(图 3D)。以上结果说明根据 SCGN 的甲基化水平和 ITGA2B 的去甲基化水

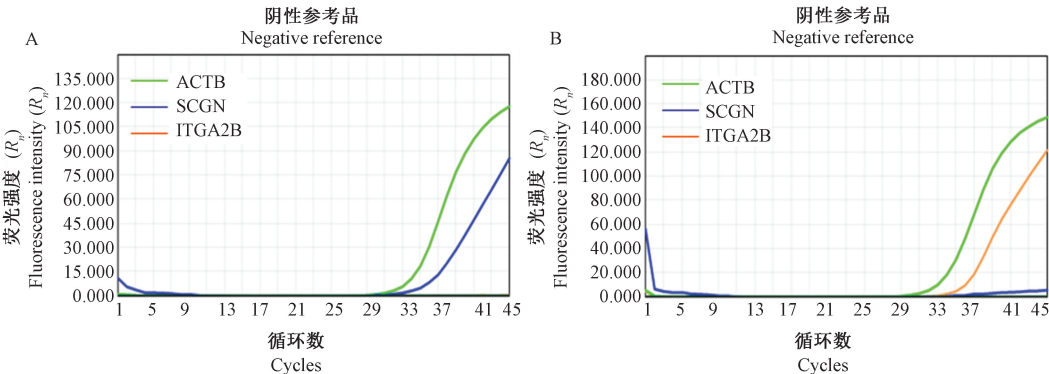
平的回归模型相对值是随年龄的增加而增长的。

2.4 EGCG 和 GA 抑制肿瘤细胞存活

肿瘤是衰老的一种表现, 绿茶提取物的主要成分 EGCG 和 GA 已证明具有延缓衰老的功效, 本研究使用 EGCG 和 GA 作用于胃癌细胞 AGS 和肝癌细胞 HepG2, 观察 EGCG 和 GA 对肿瘤细胞存活能力的影响, 化疗药物 5-Aza 作为阳性对照。结果显示 5-Aza, EGCG 和 GA 对胃癌细胞 AGS 和肝癌细胞 HepG2 均具有显著的抑制生存作用(剂量-存活曲线, 见图 4), IC50 分别为 21.4 $\mu\text{mol/L}$ 、26.1 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 和 13.9 $\mu\text{mol/L}$ 、62.1 $\mu\text{mol/L}$ 、114.4 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.5 EGCG 和 GA 逆转细胞中的 SCGN 的甲基化和 ITGA2B 的去甲基化水平

阿扎胞苷(5-Aza)是一种胞嘧啶核苷类药物, 能直接掺入 DNA 中, 抑制 DNA 和 RNA 合成, 可杀伤处于 S 期的细胞, 其可以抑制基因组 DNA 的整体甲基化, 无特异靶向性, 本研究中使用 5-Aza 作为逆转 DNA 甲基化的阳性对照药物。绿茶提取物的主要成分 EGCG 和 GA 已证明具有延缓衰老的功效, 我们使用 EGCG 和 GA 处理胃癌细胞 AGS 和肝癌细胞 HepG2 后, 发现基因组 DNA 中 SCGN 基因的甲基化水平下降, ITGA2B 基因的去甲基化水平下降, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$), 而已知的广谱的 DNA 甲基化抑制剂 5-Aza 能够显著抑制 SCGN 的甲基化水平和增加 ITGA2B 的去甲基化水平(即 ITGA2B 的甲基化水平下降)(如图 5)。以上说明 EGCG 和 GA 可能通过多靶点抑制衰老作用基因的甲基化水平(SCGN)和去甲基化

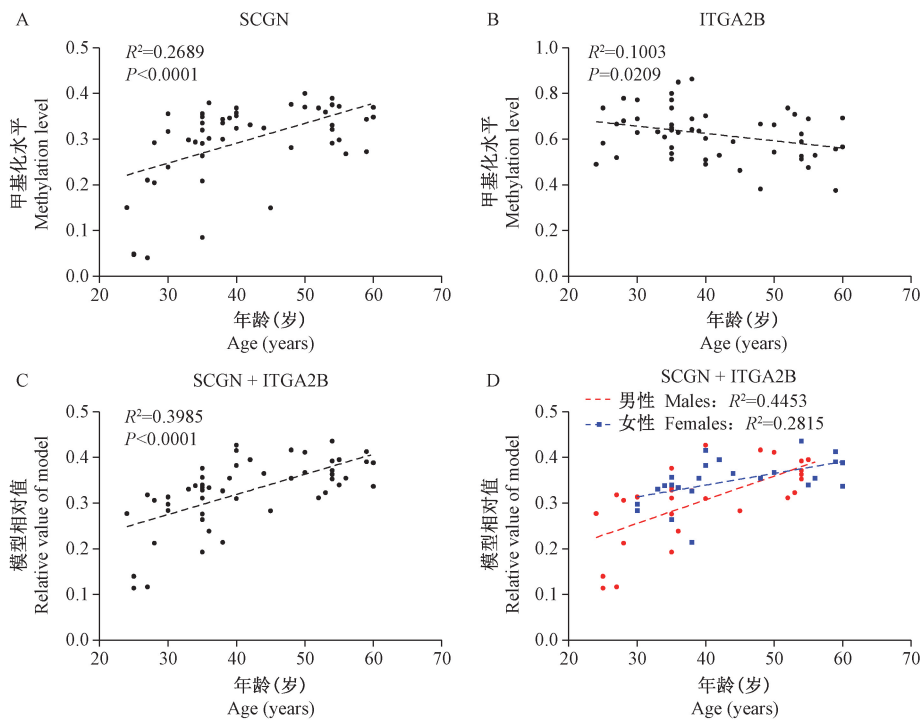


注: A: 阳性参考品能特异检测到甲基化的 SCGN; B: 阴性参考品能特异检测到去甲基化的 ITGA2B。

图 2 SCGN 和 ITGA2B 检测体系的扩增曲线

Note. A, Positive reference can specifically detect methylated SCGN. B, Negative reference can specifically detect demethylated ITGA2B.

Figure 2 Amplification curves of the SCGN and ITGA2B detection systems

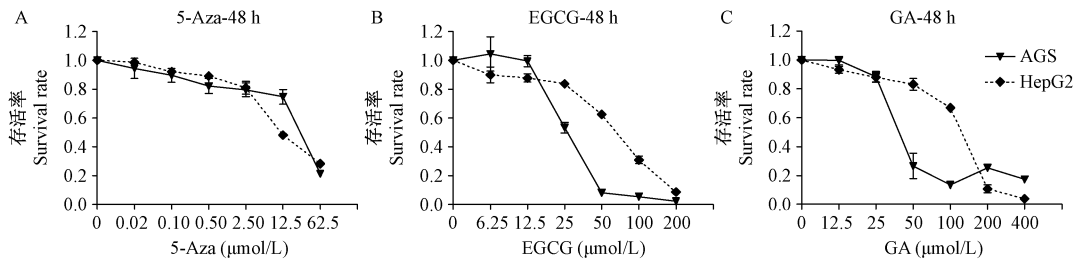


注:A:SCGN 甲基化水平与年龄呈正相关;B:ITGA2B 甲基化水平与年龄呈负相关;C:基于 SCGN 和 ITGA2B 甲基化水平的模型相对值与年龄呈正相关;D:男性和女性的基于 SCGN 和 ITGA2B 甲基化水平的模型相对值与年龄均呈正相关。

图 3 SCGN 和 ITGA2B 基因甲基化水平与年龄的相关性

Note. A, Methylation level of SCGN was positively correlated with age. B, Methylation level of ITGA2B was negatively correlated with age. C, Relative values of the model based on SCGN and ITGA2B methylation levels were positively correlated with age. D, Both relative values of the model based on SCGN and ITGA2B methylation levels of males and females were positively correlated with age.

Figure 3 Correlation between SCGN and ITGA2B gene methylation level and age



注:A、B 和 C:分别显示 5-Aza、EGCG 和 GA 对胃癌 AGS 和肝癌 HepG2 细胞 48 h 的剂量—存活曲线。

图 4 药物对 AGS 和 HepG2 细胞的剂量—存活曲线

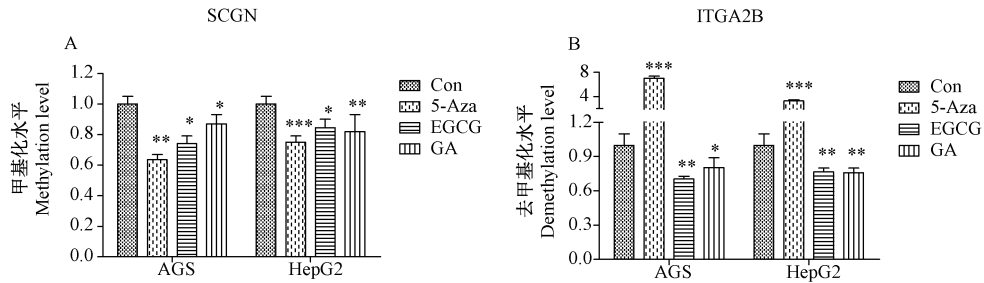
Note. Dose-survival curves of 5-Aza (A), EGCG (B), and GA (C) for gastric cancer AGS cells and liver cancer HepG2 cells for 48 h, respectively.

Figure 4 Dose-survival curves of drugs on AGS and HepG2 cells

水平(ITGA2B)从而逆转衰老进程,而 5-Aza 通过抑制基因组 DNA 的整体甲基化水平,更多的发挥细胞毒性作用。因此,本检测方法能够用于监测药物、营养品、或保健品对细胞、组织、或人体的抗衰老作用和功效评估。

3 讨论

迄今为止,DNA 甲基化是在衰老研究中最为广泛研究的表观遗传机制。近年全基因组 DNA 甲基化测序技术的广泛应用,DNA 甲基化在衰老研究领



注:A:5-Aza、EGCG 和 GA 均能下调 AGS 和 HepG2 细胞的 SCGN 甲基化水平;B:5-Aza 上调 AGS 和 HepG2 细胞的 ITGA2B 的去甲基化水平(即下调甲基化),EGCG 和 GA 显著下调 ITGA2B 的去甲基化。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 5 药物对细胞系 SCGN、ITGA2B 基因甲基化水平的影响

Note. A, 5-Aza, EGCG, and GA down-regulated SCGN methylation levels in AGS and HepG2 cells. B, 5-Aza up-regulated the demethylation level of ITGA2B in AGS and HepG2 cells (i.e., down-regulation of methylation), and EGCG and GA significantly down-regulated the demethylation of ITGA2B. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 5 Effect of drugs on the methylation levels of SCGN and ITGA2B genes in cell lines

域中的研究成果快速增长。随着机体组织的衰老,基因组 DNA 甲基化整体水平通常会降低,但某些与特定基因相关的 DNA 序列在衰老过程中发生 DNA 甲基化水平上升^[10]。随着这些研究成果的积累,表观年龄的概念被逐步建立和接受。在已建立的多种“表观遗传时钟”模型中,Horvath 等建立的基于 353 个 CpG 位点的 DNA 甲基化预测模型被广泛使用,其年龄预测准确度为 ± 3.6 年^[6]。Hannum 等利用血细胞基因组 DNA 甲基化数据建立的基于 71 个 CpG 位点的年龄预测模型与年龄具有较高的相关性,预测准确度为 ± 4.9 年^[7]。即使 Horvath 和 Hannum 的“表观遗传时钟”模型显示与实际年龄较高的相关性,但两个模型只共享了 5 个 CpG 位点^[5]。Weidner 等开发了一种基于血液样本的“表观遗传时钟”,其优先将数据集减少到与年龄高度相关的 102 个 CpG 位点,其中 ITGA2B, ASPA 和 PDE4C 基因上的 3 个 CpG 位点构建的预测模型显示与实际年龄具有较高的相关性,预测准确度为 ± 3.3 年^[11]。以上位点的数据均是基于微阵列芯片研究,需要大量的 DNA 和复杂的生物信息学分析。因此,我们拟筛选一组与年龄相关的甲基化基因,并通过设计特异引物和探针识别和量化与单个表观遗传位点相关的 CpG 位点的甲基化状态,从而简化操作流程和降低检测成本。

通过文献检索分析,我们确定了一组与人体衰老进程相关的甲基化基因,运用 GEO 数据库对这些甲基化相关标志物进行了验证,结果发现 SCGN 和 ITGA2B 基因甲基化水平与年龄具有显著相关性。

根据微阵列芯片中基因甲基化与年龄的相关性及探针位点 (SCGN: cg06493994, ITGA2B: cg25809905),我们对 SCGN 和 ITGA2B 的特异位点的 DNA 甲基化检测建立了定量 PCR 检测体系。SCGN 基因位于 6 号染色体上,编码的蛋白是一种分泌型钙结合蛋白,主要位于细胞质中,该蛋白被认为参与氯化钾刺激的钙通量和细胞增殖^[12-13]。ITGA2B 基因位于 17 号染色体上,编码的蛋白是整合素链家族成员之一,编码前原蛋白经蛋白水解生成轻链和重链,通过二硫键结合形成 α -2b/ β -3 整合素细胞粘附受体的亚基,这种受体通过介导血小板聚集在血液凝固系统中起着至关重要的作用^[14]。

在本研究中,我们使用 DNA 甲基转移酶处理的白细胞基因组 DNA 和全基因组扩增的白细胞基因组 DNA 分别作为目标基因靶序列甲基化状态的阳性参考品和阴性参考品,建立了 SCGN 和 ITGA2B 的特异位点的 DNA 甲基化检测体系。对 53 名志愿者血浆检测结果显示 SCGN 和 ITGA2B 基因靶序列的甲基化水平均与年龄呈显著的相关性,其与相关研究结果一致。进一步对 SCGN 基因靶序列的 Ct 值和 ITGA2B 基因靶序列的 Ct 值进行回归分析,获得回归方程,结果显示回归方程计算的几何平均值与年龄具有更显著的相关性。Horvath 和 Hannum 的 DNA 甲基化表观年龄预测的检测使用甲基化芯片检测 (Infinium 450K),检测费用昂贵,技术难度大,难以广泛推广。我们在本研究中通过检测 SCGN 的甲基化和 ITGA2B 的去甲基化水平,建立了一种新的 DNA 甲基化衰老预测模型,该模型推算的

结果与生物年龄具有较好的相关性。

营养素和饮食,如叶酸、胆碱、蛋氨酸、维生素 B6 和 B12,可以通过参与单碳代谢,促进 S-腺苷-L-甲硫氨酸(SAM)(通用甲基供体)产生,增强 DNA 甲基化,从而实现 DNA 甲基化修饰的调控^[15-16]。天然提取物的主要成分,如表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)、没食子酸(GA)、白藜芦醇、类黄酮、木黄酮和槲黄素等,可以通过抑制 DNA 甲基化转移酶,导致整体 DNA 甲基化水平下降^[16]。营养素和饮食可以通过 DNA 甲基化的调控调节代谢、改变疾病易感性,从而维持健康及预防疾病发生^[17-19]。

肿瘤是细胞衰老的表现和结果。我们使用肿瘤细胞模型对化疗药物 5-Aza 和天然化合物 EGCG、GA 进行了评估,观察化合物对细胞生长增殖能力及对 SCGN 和 ITGA2B 的甲基化水平的影响。结果显示 5-Aza,EGCG 和 GA 对胃癌细胞 AGS 和肝癌细胞 HepG2 均具有显著的抑制生长增殖作用。EGCG 和 GA 能够逆转基因组 DNA 中 SCGN 的甲基化和 ITGA2B 的去甲基化,而已知的 DNMT1 抑制剂 5-Aza 能够显著抑制基因组的 DNA 甲基化水平,包括 SCGN 和 ITGA2B。说明 EGCG 和 GA 可能通过多种机制调控衰老相关基因的甲基化水平(SCGN)和去甲基化水平(ITGA2B),从而逆转衰老程度。天然化合物 EGCG 和 GA 是绿茶提取物和发酵乌龙茶提取物的主要成分,已证明具有逆转 DNA 甲基化及延缓衰老的功效^[20-22],本研究的结果与其相一致。因此,通过检测 SCGN 和 ITGA2B 的甲基化水平,可以评估机体的衰老程度,进一步可以作为评估药物、营养品或保健品对细胞、机体或人体的抗衰老作用和功效。

本研究建立的基于 SCGN 和 ITGA2B 的甲基化水平衰老预测模型,与实际年龄具有较好的相关性,但标准误差仍然较大,可能与模型建立使用的样本量太小(53 例)相关。另一方面,表观遗传学的变化与机体的健康状态相关,我们猜测模型构建的样本人群的健康状态也是导致标准误差较大的主要原因之一,即模型预测值反映的是机体的健康状态,根据模型预测值推算的生物年龄高于正常值,说明机体可能处于亚健康状态。因此,我们需要大规模收集样本,并了解样本人群的健康状态,整体评估衰老预测模型,同时评估基于 SCGN 和 ITGA2B 的甲基化水平衰老预测模型用于评估机体

健康状态的可能性。

人体衰老是一个缓慢而复杂的生物进程,涉及遗传学、表观遗传学等因素的作用和相互作用。基因组甲基化调控是表观遗传学的一种重要机制。此项研究验证了文献报道的 SCGN 和 ITGA2B 基因甲基化调控与衰老进程的相关性,并建立了一种方便、便捷的甲基化 qPCR 检测方法及衰老预测模型。借助这一检测方法,我们筛选、验证了抗衰老天然提取物中有效成分对 SCGN 和 ITGA2B 基因甲基化调控的逆转效应。此项研究证明了与人体衰老相关的甲基化调控有可能在药物或营养物质的作用下发生逆转,并通过检测特定基因甲基化调控的变化有可能用于监测人体衰老进程,另一方面,检测特定基因甲基化调控的变化有可能用于检测人体的健康状态,这为基于基因甲基化调控机制开发抗衰老或者调节健康状态的药物或产品提供了实验证据和研发工具。

参考文献:

- [1] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging [J]. Cell, 2013, 153(6): 1194-1217.
- [2] Sen P, Shah PP, Nativio R, et al. Epigenetic mechanisms of longevity and aging [J]. Cell, 2016, 166(4): 822-839.
- [3] Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases [J]. Genes Dis, 2018, 5(1): 1-8.
- [4] Luo C, Hajkova P, Ecker JR. Dynamic DNA methylation: in the right place at the right time [J]. Science, 2018, 361(6409): 1336-1340.
- [5] Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing [J]. Nat Rev Genet, 2018, 19(6): 371-384.
- [6] Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types [J]. Genome Biol, 2013, 14(10): R115.
- [7] Hannum G, Guinney J, Zhao L, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates [J]. Mol Cell, 2013, 49(2): 359-367.
- [8] Quach A, Levine ME, Tanaka T, et al. Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors [J]. Aging (Albany NY), 2017, 9(2): 419-446.
- [9] Sae-Lee C, Corsi S, Barrow TM, et al. Dietary intervention modifies DNA methylation age assessed by the epigenetic clock [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(23): e1800092.
- [10] Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, et al. The role of DNA methylation in epigenetics of aging [J]. Pharmacol Ther, 2019, 195: 172-185.
- [11] 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): R24.

- [12] Khandelwal R, Sharma AK, Chadalawada S, et al. Secretagoin is a redox-responsive Ca^{2+} sensor [J]. *Biochemistry*, 2017, 56(2):411-420.
- [13] Wagner L, Oliarnyk O, Gartner W, et al. Cloning and expression of secretagoin, a novel neuroendocrine- and pancreatic islet of Langerhans-specific Ca^{2+} -binding protein [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(32):24740-24751.
- [14] Hongli W, Weizhang S. Gene symbol: ITGA2B. Disease: Glanzmann thrombasthenia [J]. *Hum Genet*, 2006, 119(6):676.
- [15] Sapienza C, Issa JP. Diet, nutrition, and cancer epigenetics [J]. *Annu Rev Nutr*, 2016, 36:665-681.
- [16] Huang D, Cui L, Ahmed S, et al. An overview of epigenetic agents and natural nutrition products targeting DNA methyltransferase, histone deacetylases and microRNAs [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 123:574-594.
- [17] Choi SW, Claycombe KJ, Martinez JA, et al. Nutritional epigenomics: a portal to disease prevention [J]. *Adv Nutr*, 2013, 4(5):530-532.
- [18] Kalea AZ, Drosatos K, Buxton JL. Nutriepigenetics and cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2018, 21(4):252-259.
- [19] Andreescu N, Puiu M, Niculescu M. Effects of dietary nutrients on epigenetic changes in cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1856:121-139.
- [20] Chu C, Deng J, Man Y, et al. Green tea extracts Epigallocatechin-3-gallate for different treatments [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:5615647.
- [21] Weng YP, Hung PF, Ku WY, et al. The inhibitory activity of gallic acid against DNA methylation: application of gallic acid on epigenetic therapy of human cancers [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1):361-374.
- [22] Khurana S, Venkataraman K, Hollingsworth A, et al. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging [J]. *Nutrients*, 2013, 5(10):3779-3827.

[收稿日期]2019-02-14

(上接第 7 页)

- [5] DB11/T 1461.5-2018. 实验动物 繁育与遗传监测 第 5 部分: 实验用长爪沙鼠 [S]. 2018.
- [6] T/CALAS 59-2018. 实验动物 长爪沙鼠遗传质量控制 [S]. 2018.
- [7] Chambers GK, MacAvoy ES. Microsatellites: consensus and controversy [J]. *CBP Part B*, 2000, 126: 455-476.
- [8] 李薇, 江其辉, 杜小燕, 等. 封闭群长爪沙鼠遗传标准的建立 [J]. *实验动物科学*, 2011, 28(2): 31-34.
- [9] 李长龙, 杜小燕, 王冬平, 等. 长爪沙鼠脑缺血模型近交系的培育及其发病机制研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(4): 512-517.
- [10] 杜小燕, 李长龙, 王冬平, 等. 长爪沙鼠自发性糖尿病模型近交系培育及其生物学特性的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(4): 507-511.
- [11] 张于光, 李迪强, 肖启明, 等. 微卫星技术及在动物遗传多样性研究中的应用 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2001, 27(5): 410-414.
- [12] 肖兵兵. 利用微卫星 DNA 技术对 SPF 种禽的分子遗传学研究 [D]. 中国农业科学院, 2008.
- [13] 倪丽菊, 赵丽亚, 赵立虎, 等. 利用多重荧光 STR 技术分析上海地区 7 品系常用近交系小鼠核心群的遗传特性 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(1): 72-79.
- [14] 郑龙, 李建辉, 王俊霞, 等. 微卫星 DNA 标记在近交系大鼠 HFJ 和 MIJ 遗传监测中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(2): 32-36.

[收稿日期]2019-02-03