

田艺博,吴雨静,肖君华,等. 小鼠血液中年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型的筛选与验证 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(5): 592-599.

TIAN Y B, WU Y J, XIAO J H, et al. Screening and validation of age-related DNA methylation microhaplotypes in mouse blood [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(5): 592-599.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.05.006

小鼠血液中年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型的筛选与验证

田艺博,吴雨静,肖君华,周宇荀,李凯*

(东华大学生物与医学工程学院,上海 201620)

【摘要】 目的 DNA 甲基化微单倍型是指极短范围内多个甲基化位点的组合,其单倍型具有丰富的多样性。筛选和验证小鼠血液中年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型。方法 首先,构建基于小鼠参考基因组的 DNA 甲基化微单倍型理论数据集。其次,利用网络数据库中小鼠血液 DNA 甲基化高通量测序信息,采用 Spearman 秩相关分析方法筛选年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型。最后,以验证数据集交叉验证。结果 小鼠基因组中 50 bp 范围内的 DNA 甲基化微单倍型位点数量共计 6787 142 个,由个位数的 CpG 位点所组成的 DNA 甲基化微单倍型占比 98.64%。在 58 个小鼠血液样本中共筛选出 5835 个年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型(Spearman 秩相关检验, $|rho| > 0.5$, $P < 0.01$),在 DNA 甲基化微单倍型中占 0.086%。最后,在 95 例独立的样本中对具有高相关性的前 100 个年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型进行验证,最终得到 44 个位点。结论 本研究筛选出的年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型可以为后续小鼠血液表观年龄预测及衰老研究提供借鉴。

【关键词】 血液;DNA 甲基化微单倍型;Spearman 秩相关系数;年龄;筛选

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 05-0592-08

Screening and validation of age-related DNA methylation microhaplotypes in mouse blood

TIAN Yibo, WU Yujing, XIAO Junhua, ZHOU Yuxun, LI Kai*

(School of Biological and Medical Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Corresponding author: LI Kai. E-mail: likai@dhu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** The DNA methylation microhaplotype (DMH) refers to the combination of multiple methylation sites within a very short range, and these haplotypes show wide diversity. We carried out screening and validation of age-related DMHs in mouse blood. **Methods** We initially constructed a theoretical dataset of DMHs based on the mouse reference genome. We then screened age-related DMHs by Spearman's rank correlation analysis, using high-throughput sequencing information for DNA methylation in mouse blood from a network database. Finally, cross-validation was performed using a validation dataset. **Results** A total of 6787 142 DMH sites were identified within 50 bp in the mouse genome, including 98.64% of single-digit CpG sites. A total of 5835 age-associated DMHs were screened in 58 mouse blood samples ($|rho| > 0.5$, $P < 0.01$), accounting for 0.086% of DMHs. Finally, we validated the top 100 age-associated DMHs with high correlation in 95 independent samples, Resulting in 44 loci. **Conclusions** The age-associated

【基金项目】 国家重点研发计划(2018YFA0801101)。

Funded by National Key Research and Development Program of China (2018YFA0801101)。

【作者简介】 田艺博,男,在读硕士研究生,研究方向:生物信息学。Email:13251601687@163.com

【通信作者】 李凯,男,副研究员,研究方向:小鼠基因组学。Email:likai@dhu.edu.cn

DMHs screened in this study may be useful in future studies of apparent age prediction using mouse blood and in aging studies.

[Keywords] blood; DNA methylation microhaplotype; Spearman's rank correlation coefficient; age; screening

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

衰老是指生命过程中细胞、组织和机体功能的逐渐衰退,最终导致与年龄相关的疾病^[1]。衰老受遗传、环境、生活方式和疾病等多种因素的影响,亦包括 DNA 甲基化这一重要因素。DNA 甲基化发生在 5-CpG 二核苷酸序列中的胞嘧啶残基上^[2],整体甲基化水平随着年龄的增加而降低,而局部甲基化水平会升高或降低^[3]。2009 年,研究发现特定 DNA 甲基化位点与年龄有显著的相关性^[4]。2011 年,BOCKLANDT 等^[5]提出了 DNA 甲基化年龄估计器,即一种基于(唾液)甲基化数据估计人的实际年龄的数学算法。2013 年,HORVATH^[6]通过整合 353 个 CpG 位点建立了基于 DNA 甲基化的“表观遗传时钟”。近几年,利用亚硫酸盐测序也建立了数十个至数百个位点的小鼠多组织^[7-9]、血液^[10]、肝^[11]等表观遗传时钟。甚至,利用少量 CpG 位点建立的模型同样可以用来预测年龄^[12-18],例如 3 个 CpG 位点的 DNA 甲基化水平建立的模型也能够预测人类年龄^[12,17]。

单个 CpG 位点具有二态性,分析一连串共同变化的 DNA 甲基化信号比单个 CpG 位点信号变化所提供的信息更丰富。哺乳动物 CpG 甲基化是一种相对稳定的表观遗传修饰^[19],并由一系列酶动态建立或去除^[20]。由于酶的局部空间可及性,同一 DNA 分子上相邻的 CpG 位点具有相似的甲基化状态^[21]。微单倍型是指在一定 DNA 片段范围之内,由至少 2 个单核苷酸多态性位点组成的多等位基因遗传标记^[22]。微单倍型的理论框架应用到 CpG 共甲基化,则有 DNA 甲基化微单倍型(DNA methylation microhaplotype, DMH),即分析在一定的片段范围区间,多个相邻且具有不同甲基化模式位点的组合,其高多样性可能比单个 CpG 位点具有更高的生物学标志潜能。例如,GUO 等^[21]利用 DNA 甲基化单倍型来进行血浆 DNA 的肿瘤起源组织定位。

本文首先构建了小鼠参考基因组范围内的 DNA 甲基化微单倍型数据集。其次,利用数据库中小鼠血液 DNA 甲基化高通量测序数据,筛选年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型。最后,在独立的样本中对具有高相关性的 DNA 甲基化微单倍型进行验证,证明了甲基化微单倍型具有生物标志物的潜能。

1 材料与方法

1.1 DNA 甲基化微单倍型的组装

对所构建 DNA 甲基化微单倍型的要求:全基因组范围内所有长度在 50 bp 以内,至少包含 2 个 CpG 位点的 C 碱基。DNA 甲基化微单倍型示意图如图 1 所示。

从 GENCODE (<https://www.encodegenes.org/>) 下载小鼠参考基因组(GRCm38. p2/mm10),提取所有常染色体上 DNA 正链上每个 CpG 位点中 C 碱基的坐标,获得每条染色体上 C 碱基物理坐标依次递增的预筛选集合。首先,以某一条染色体上的第 1 个 C 碱基作为 DMH 的“起始 C 碱基”。然后,比较第 2 个 C 碱基与“起始 C 碱基”的坐标距离是否小于 50,如果小于 50,继续判断第 3 个 C 碱基与“起始 C 碱基”的坐标距离。如果满足 DMH 的要求,继续上述过程;如果不满足,则把前两个 C 碱基作为一个 DMH,并输出该 DMH。同时,把“起始 C 碱基”依次向后移动,循环上述过程。当“起始 C 碱基”移动至预筛选集合的最后一个 C 碱基时,该染色体检索结束。最后,对所有常染色体进行检索,并对输出的 DMH 进行编号。以上组装过程基于 Python 脚本实现。

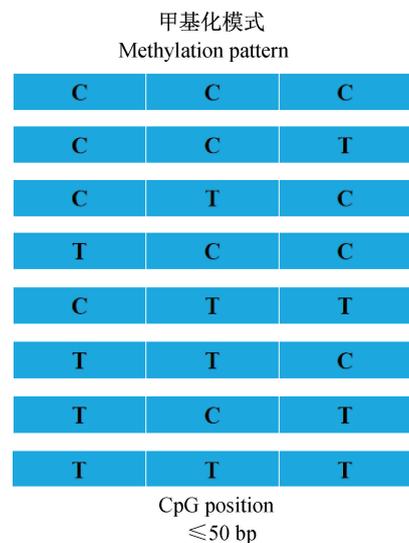


图 1 DNA 甲基化微单倍型示意图

Figure 1 Diagram of DNA methylation microhaplotypes

1.2 年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型的筛选与验证

1.2.1 公共数据收集

本文所分析的全部数据来自于 GEO (Gene Expression Omnibus) 数据集 GSE80672。此数据集包含 153 个 C57BL/6J 雄性小鼠血液样本 (图 2)。选择 0.67、1.17、3、6、12、20、30 月龄共 7 个年龄点共 58 个样本为筛选数据集, 剩余 95 个样本为验证数据集。

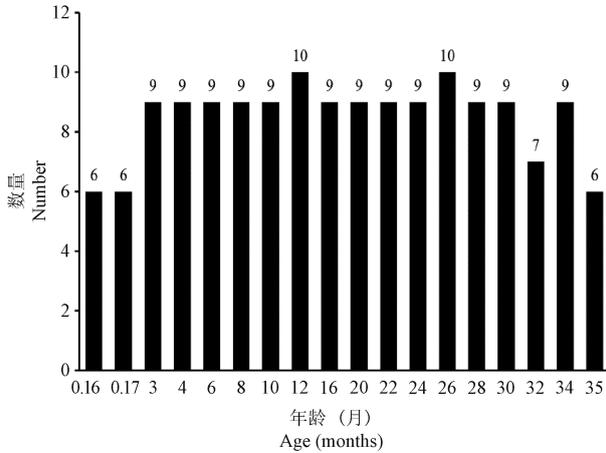


图 2 153 个 0.67 ~ 35.00 月龄 C57BL/6J 雄性小鼠血液样本

Figure 2 Blood samples from 153 male C57BL/6J mice aged 0.67 ~ 35.00 months

1.2.2 数据预处理

从 GEO 数据库中下载小鼠血液 DNA 甲基化高通量测序数据。使用 FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>; v. 0.11.9) 对 reads 进行质控, 评估数据质量; 使用 Trim Galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/; v. 0.6.7) 去除接头和低质量的碱基, 获得 clean reads。对小鼠参考基因组 (GRCm38. p2/mm10) 建立索引, 用 Bismark^[23] 把 clean reads 比对到参考基因组上, 获得 bam 文件, 再对 bam 文件进行排序, 构建索引。最后, 利用 Python 第三方模块 pysam 提取 DNA 甲基化微单倍型。

1.2.3 年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型的筛选

本文采用 Spearman 秩相关方法计算每个 DNA 甲基化微单倍型的等位基因频率与年龄的相关性。按照年龄从小到大的顺序排列样本, 得到每个样本中每个 DNA 甲基化微单倍型的等位基因频率, 进而计算与年龄的相关性。当一个 DNA 甲基化微单倍

型的一个等位基因的 Spearman 秩相关系数 (ρ), P 值同时满足以下两个标准: $|\rho| > 0.5$ 和 $P < 0.01$ 时, 该 DNA 甲基化微单倍型就被认为与年龄相关。

在进行统计分析之前, 首先过滤含有大于或等于 4 个连续 CpG 位点的 DNA 甲基化微单倍型, 其目的是去除重复序列。其次, 去除少于 5 条 reads 覆盖的 DNA 甲基化微单倍型。在计算年龄关联之前, 进一步过滤 DNA 甲基化微单倍型, 使其至少在 95% 的样本中被覆盖。最后, 计算每个 DNA 甲基化微单倍型下每个等位基因的频率与年龄的 Spearman 秩相关系数和 P 值, 并进行判断。

1.2.4 年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型的验证

为了分析年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型是否具有普适性, 根据相关系数 $|\rho|$ 的大小进行排序, 选择前 100 个具有高相关性的 DNA 甲基化微单倍型在独立的样本中进行验证, 评估其可重复性。

2 结果

2.1 小鼠基因组中 DNA 甲基化微单倍型的数量

对小鼠基因组进行初步筛选后, 在 19 条常染色体上共得到 20 383 623 个 CpG 位点。按照既定组装策略, 获取 DMH 共计 6787 142 个, 其中 1 号染色体的 DMH 数量最多, 19 号染色体的 DMH 数量最少, 分别为 474 593 和 197 583 (表 1)。

表 1 CpG 及 DMH 在不同染色体上的数量统计

Table 1 Statistics on the number of CpG and DMH on different chromosomes

染色体 Chromosome	#CpGs	#DMH \leq 50 bp
1	1477 561	474 593
2	1521 437	428 691
3	1191 216	381 258
4	1332 974	458 137
5	1352 625	471 765
6	1165 998	379 461
7	1224 939	416 306
8	1133 971	394 277
9	1070 707	365 277
10	1106 705	376 782
11	1163 543	416 987
12	956 515	315 826
13	983 784	328 105
14	941 369	300 809
15	870 934	296 966
16	755 291	244 286
17	854 457	301 633
18	721 541	238 373
19	558 056	197 583
总计 Total	20 383 623	6787 142

图 3 以密度图的形式展示了每条染色体上 DMH 的分布情况。大部分 DMH 均匀地分布在各个染色体上,而在某些区域 DMH 则高度聚集。例如,在 4、5、8、11 号染色体的近端粒处分布着高密度的 DMH。结构注释表明,DMH 主要定位于启动子 (62.64%)、远端基因间 (17.96%)、内含子 (13.08%)、外显子 (5.01%)、5' UTR (0.09%) 和 3' UTR (1.23%)。

图 4 列出了含有不同 CpG 位点数的 DMH。由图 4 可知,定义 DNA 甲基化微单倍型的 CpG 个数在 2 ~ 19 之间。其中由 2 个 CpG 构成的 DMH 最多,占 57.4%,由 3、4、5、6、7 ~ 19 个 CpG 构成的 DMH 分别占 21.87%、8.74%、4.34%、2.45% 和 5.2%。

2.2 年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型的筛选

根据年龄与 6787 142 个 DNA 甲基化微单倍型的 Spearman 秩相关分析,总共得到 5835 (0.086%) 个年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型,定位到 3346 个基因上。功能富集分析表明这些基因主要与肌动蛋白结合、GTPase 调节活性、核苷三磷酸酶调节剂活性、通道活性、DNA 结合转录抑制因子活性、

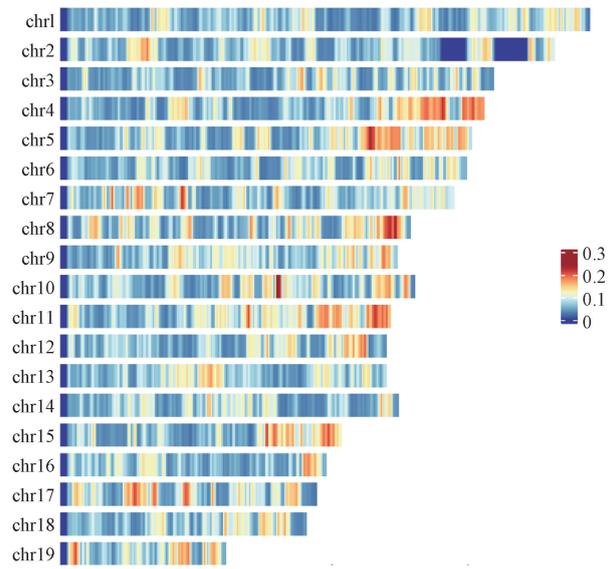


图 3 小鼠基因组中 DMH 的密度分布图

Figure 3 Density distribution of DMH in the mouse genome RNA 聚合酶 II-特异性 DNA 结合转录抑制因子活性、细胞黏附分子结合等功能有关。

由图 5 可知,4 号染色体上 AR-DMH 分布最多,16 号染色体上分布最少,11、7、5 号染色体也分布着

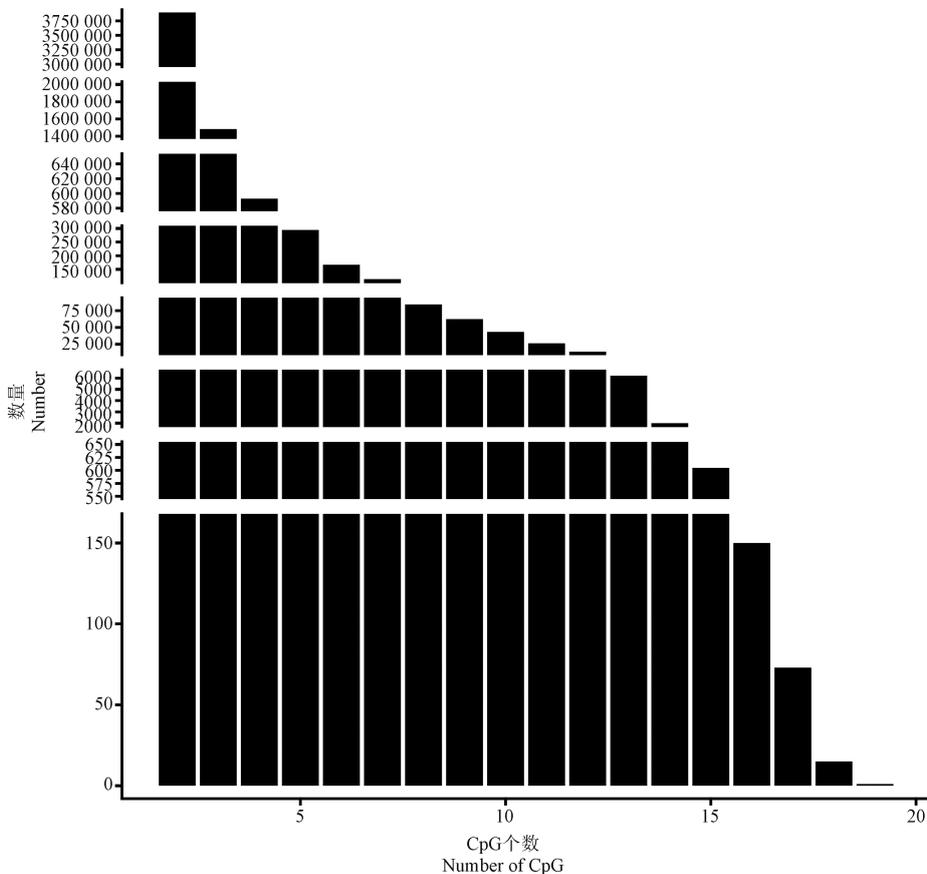


图 4 DNA 甲基化微单倍型的种类及数量

Figure 4 Types and number of DNA methylation microhaplotypes

相对较多的 AR-DMH, 50% 以上染色体上 AR-DMH 分布低于平均数。

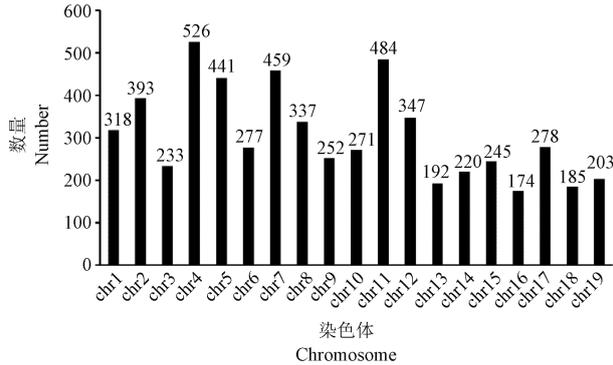


图 5 AR-DMH 的染色体分布

Figure 5 Chromosome distribution of AR-DMH

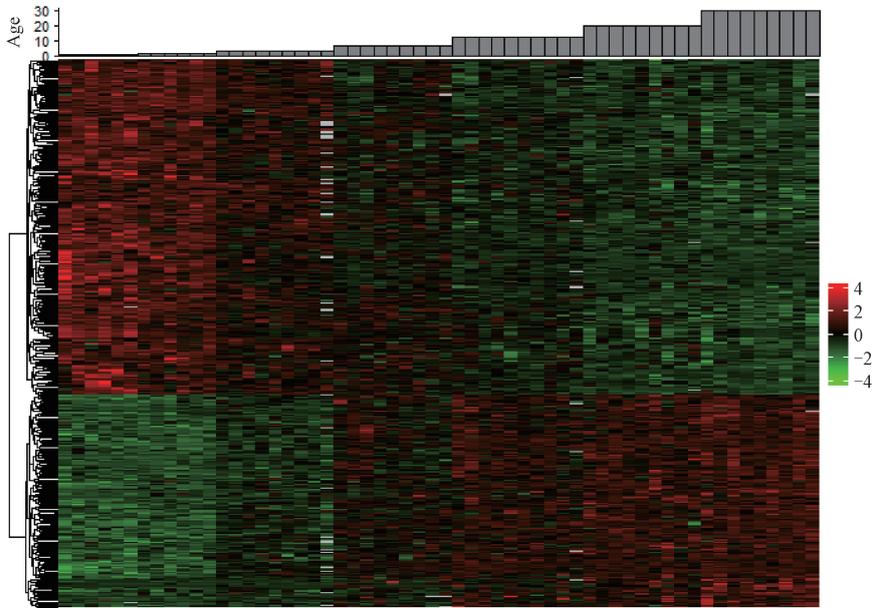
图 6 采用一个更加严格的水平 $|rho| > 0.7$ 来筛选高性能的年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型。在该水平下, 共得到 417 个年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型。利用这些 AR-DMH 的等位基因的频率数据绘制热图, 结果显示这些高性能的 AR-DMH 的

频率随着年龄的增长而显著的持续上升或持续下降, 符合预期。

2.3 年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型在独立样本中的验证

通过相关系数的大小对这些 AR-DMH 进行排序, 选择前 100 个 AR-DMH, 在独立的 95 例样本中, 年龄范围为 4 ~ 35 个月, 进行验证。最终, 得到了 44 个 AR-DMH。利用这 44 个 AR-DMH 在不同年龄点的频率数据构成的热图 (图 7), 结果显示这些 AR-DMH 的频率整体上随着年龄的增长而持续上升或持续下降。

这些 AR-DMH 定位到 22 个基因, 包括 *Zcchc3*、*Fut9*、*XR_001784289.1*、*Raplga*、*Clec1a*、*Plekha5*、*Plxna4*、*Nlrp5-ps*、*Dact3*、*Gabrg3*、*Cdh8*、*Hsf4*、*Phldb1*、*Stx8*、*Unc45b*、*Rundc3a*、*2410018L13Rik*、*Gcnt2*、*Nrbp2*、*Tbx1*、*Fbxo40*、*Cyp4f40*。这些基因在细胞的生长、分化、代谢、信号传导等方面发挥着重要的作用, 与细胞存活和发育显著相关 (图 8)。上述基因

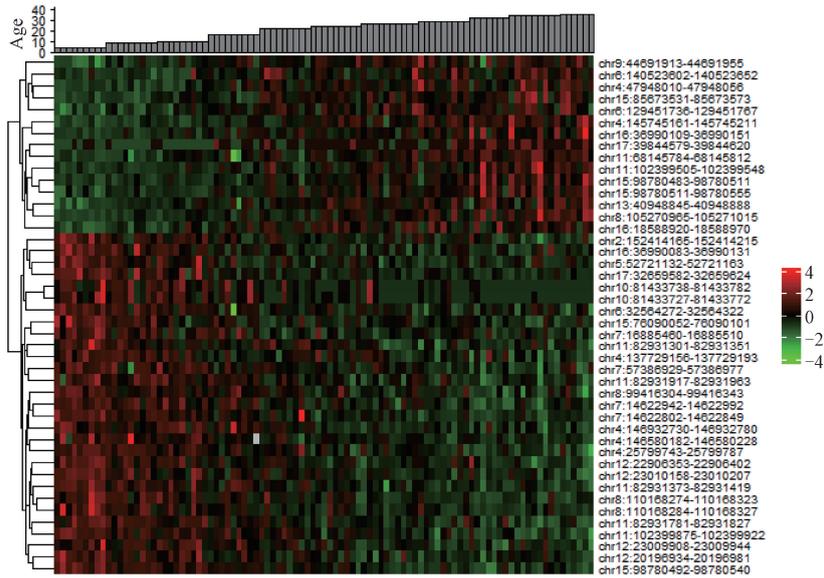


注: 数据来自 58 个血液样本的 DNA 甲基化分析结果。58 个样本的年龄分布范围为 0.67、1.17、3.6、12、20、30 个月。根据 Spearman 秩相关分析 ($|rho| > 0.7$ 和 $P < 0.01$) 筛选年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型。有些年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型下有多个等位基因与年龄相关, 选择相关系数最大的等位基因来代表这个微单倍型进行作图。所有位点的值经过归一化处理。红色和绿色分别表示高和低频率, 灰色表示缺失值。

图 6 年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型的热图

Note. Data were obtained from DNA methylation analyses of 58 blood samples. The age distribution of the 58 samples ranged from 0.67, 1.17, 3, 6, 12, 20, and 30 months. Age-associated DNA methylation microhaplotypes were screened according to Spearman rank correlation analysis ($|rho| > 0.7$ and $P < 0.01$). Some age-associated DNA methylation microhaplotypes had multiple alleles associated with age under them, and the allele with the largest correlation coefficient was chosen to represent this microhaplotype for plotting. Values were normalized for all loci. Red and green indicate high and low frequencies, respectively, and gray indicates missing values.

Figure 6 Heat map of age-related DNA methylation microhaplotypes



注:数据来自 95 个雄性小鼠血液样本的验证分析结果。95 个样本的年龄分布范围为 4、8、10、16、22、24、26、28、32、34、35 个月。通过计算 Spearman 秩相关系数获得 44 个 AR-DMH。有些年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型下有多个等位基因与年龄相关,选择相关系数最大且稳定的等位基因来代表这个微单倍型进行作图。所有位点的值经过归一化处理。红色和绿色分别表示高和低频率,灰色表示缺失值。

图 7 44 个年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型热图

Note. Data were obtained from the results of validation analysis of 95 blood samples from male mice. The age distribution of the 95 samples ranged from 4, 8, 10, 16, 22, 24, 26, 28, 32, 34, and 35 months. Forty-four AR-DMHs were obtained by calculating Spearman rank correlation coefficients. Some age-related DNA methylation microhaplotypes had multiple alleles associated with age under them, and the allele with the largest and stable correlation coefficient was selected to represent this microhaplotype for plotting. Values were normalized for all loci. Red and green indicate high and low frequencies, respectively, and gray indicates missing values.

Figure 7 Heat map of 44 age-related DNA methylation microhaplotypes

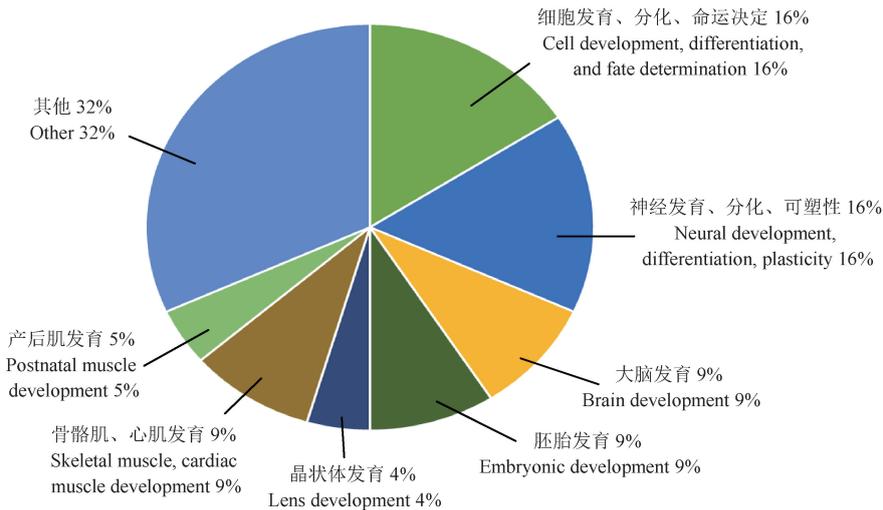


图 8 AR-DMH 定位基因的功能分布

Figure 8 Functional distribution of AR-DMH localized genes

与衰老密切相关,在与衰老相关的生理过程中发挥一定的作用。例如,研究表明 *Dact3* 可能通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路参与某些与衰老相关的生物学过程^[24]。

3 讨论

目前 DNA 甲基化已经成为预测年龄最受欢迎的生物标志物^[25]。研究者通过筛选年龄相关的

DNA 甲基化位点,再通过统计学或机器学习的方式把离散的年龄相关的 DNA 甲基化位点整合成一个数学模型来预测年龄。研究表明,相邻的 CpG 位点有共甲基化的现象^[26],并且距离越近、共性越强。基于此,本文提出 DNA 甲基化微单倍型的概念,并基于小鼠参考基因组构建了 DNA 甲基化微单倍型数据集,获得 DMH 6787 142 个。同时,在小鼠血液中筛选了 5835 个年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型,又在独立的样本中对前 100 个 AR-DMH 进行了验证,最终得到 44 个 AR-DMH。

本文构建的 DMH 大多数是由少量 CpG 位点组成,尤其是由 2 ~ 3 个 CpG 位点组成的 DMH,占全部 DMH 的 79.26%。虽然 DMH 较为均匀地分布在各个染色体上,但对得到的 DMH 进行结构注释可以发现,大部分 DMH 被定位到启动子以及增强子中。这与本文利用的小鼠血液 DNA 甲基化高通量数据所采用的建库方式——简化还原亚硫酸盐测序 (reduced representation bisulfite sequencing, RRBS) 有关。RRBS 是利用限制性内切酶对基因组进行酶切,富集启动子、CpG 岛以及增强子区域等的 CpG 位点并进行重亚硫酸盐测序^[27]。如果是全基因组的甲基化测序,或许可以改善区域的偏向性。

筛选阶段,由于各种原因会引入假阳性位点。为了剔除这些假阳性位点,在独立的样本对具有高相关性的 DNA 甲基化微单倍型进行验证。验证结果得到了 44 个位点,文献检索发现 chr6 : 129451736-129451767 (Clec1a)、chr8 : 105270965-105271015 (Hsf4)、chr11 : 82931301-82931351 (Unc45b)、chr11 : 82931373-82931419 (Unc45b)、chr16 : 36990083-36990131 (Fbxo40)、chr10 : 81433738-81433782 共 6 个 AR-DMH 所包含的部分 CpG 位点已经包括在由 MEER 等^[9]、PETKOVICH 等^[10]建立的多组织、血液表观遗传时钟中。尤其是 chr8 : 105270965-105271015 (Hsf4) 所包含的 CpG 位点被证实与年龄有很强的相关性^[28]。此外,基于相关性的筛选方法易受到样本数量的影响。故这些 AR-DMH 与年龄的关系还需要在更多的数据集上去进行评估。对这些 AR-DMH 定位到的基因功能进行研究,发现大部分基因参与细胞、神经和大脑的发育。例如,研究表明 Fut9 在皮层和视网膜神经前体细胞的分化、迁移和成熟中发挥了重要作用^[29]。

综上所述,本研究基于小鼠参考基因组建立了

DNA 甲基化微单倍型数据集;利用数据库中小鼠血液 DNA 甲基化高通量测序数据,筛选出了与年龄相关的 DNA 甲基化微单倍型,并对一部分具有高相关性的位点进行了验证。本研究所筛选出的位点可以为后续小鼠血液表观年龄预测及衰老研究提供借鉴。

参 考 文 献 (References)

- [1] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. Hallmarks of aging: an expanding universe [J]. *Cell*, 2023, 186(2): 243-278.
- [2] MATTEI A L, BAILLY N, MEISSNER A. DNA methylation: a historical perspective [J]. *Trends Genet*, 2022, 38(7): 676-707.
- [3] WILSON V L, SMITH R A, MA S, et al. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(21): 9948-9951.
- [4] BOKS M P, DERKS E M, WEISENBERGER D J, et al. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6767.
- [5] BOCKLANDT S, LIN W, SEHL M E, et al. Epigenetic predictor of age [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e14821.
- [6] HORVATH S. DNA methylation age of human tissues and cell types [J]. *Genome Biol*, 2013, 14(10): R115.
- [7] STUBBS T M, BONDER M J, STARK A K, et al. Multi-tissue DNA methylation age predictor in mouse [J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 68.
- [8] THOMPSON M J, CHWIAKOWSKA K, RUBBI L, et al. A multi-tissue full lifespan epigenetic clock for mice [J]. *Aging*, 2018, 10(10): 2832-2854.
- [9] MEER M V, PODOLSKIY D I, TYSHKOVSKIY A, et al. A whole lifespan mouse multi-tissue DNA methylation clock [J]. *Elife*, 2018, 7: e40675.
- [10] PETKOVICH D A, PODOLSKIY D I, LOBANOV A V, et al. Using DNA methylation profiling to evaluate biological age and longevity interventions [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(4): 954-960.
- [11] COLE J J, ROBERTSON N A, RATHER M I, et al. Diverse interventions that extend mouse lifespan suppress shared age-associated epigenetic changes at critical gene regulatory regions [J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 58.
- [12] PARK J L, KIM J H, SEO E, et al. Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2016, 23: 64-70.
- [13] YE Z, JIANG L, ZHAO M, et al. Epigenome-wide screening of CpG markers to develop a multiplex methylation SNaPshot assay for age prediction [J]. *Leg Med*, 2022, 59: 102115.
- [14] HAN X, XIAO C, YI S, et al. Accurate age estimation from blood samples of Han Chinese individuals using eight high-performance age-related CpG sites [J]. *Int J Legal Med*, 2022,

- 136(6): 1655–1665.
- [15] PAN C, YI S, XIAO C, et al. The evaluation of seven age-related CpGs for forensic purpose in blood from Chinese Han population [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2020, 46: 102251.
- [16] DIAS H C, CORDEIRO C, PEREIRA J, et al. DNA methylation age estimation in blood samples of living and deceased individuals using a multiplex SNaPshot assay [J]. *Forensic Sci Int*, 2020, 311: 110267.
- [17] YI S H, JIA Y S, MEI K, et al. Age-related DNA methylation changes for forensic age-prediction [J]. *Int J Legal Med*, 2015, 129(2): 237–244.
- [18] CORREIA DIAS H, CUNHA E, CORTE REAL F, et al. Age prediction in living: forensic epigenetic age estimation based on blood samples [J]. *Leg Med*, 2020, 47: 101763.
- [19] WIGLER M, LEVY D, PERUCHO M. The somatic replication of DNA methylation [J]. *Cell*, 1981, 24(1): 33–40.
- [20] ZHANG W, QU J, LIU G H, et al. The ageing epigenome and its rejuvenation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(3): 137–150.
- [21] GUO S, DIEP D, PLONGTHONGKUM N, et al. Identification of methylation haplotype blocks aids in deconvolution of heterogeneous tissue samples and tumor tissue-of-origin mapping from plasma DNA [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(4): 635–642.
- [22] KIDD K K, PAKSTIS A J. State of the art for microhaplotypes [J]. *Genes*, 2022, 13(8): 1322.
- [23] KRUEGER F, ANDREWS S R. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(11): 1571–1572.
- [24] JIANG X, TAN J, LI J, et al. DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(6): 529–541.
- [25] SEALE K, HORVATH S, TESCHENDORFF A, et al. Making sense of the ageing methylome [J]. *Nat Rev Genet*, 2022, 23(10): 585–605.
- [26] AFFINITO O, PALUMBO D, FIERRO A, et al. Nucleotide distance influences co-methylation between nearby CpG sites [J]. *Genomics*, 2020, 112(1): 144–150.
- [27] FENNEL L J, HARTEL G, MCKEONE D M, et al. Comparative analysis of Illumina Mouse Methylation BeadChip and reduced-representation bisulfite sequencing for routine DNA methylation analysis [J]. *Cell Rep Methods*, 2022, 2(11): 100323.
- [28] HAN Y, EIPEL M, FRANZEN J, et al. Epigenetic age-predictor for mice based on three CpG sites [J]. *Elife*, 2018, 7: e37462.
- [29] ABDULLAH A, HAYASHI Y, MORIMURA N, et al. Fut9 deficiency causes abnormal neural development in the mouse cerebral cortex and retina [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(9): 2793–2804.

[收稿日期] 2023-08-23