DOI:10.16016/j.1000-5404.201908210

何首乌提取液对衰老小鼠脑组织 DNA 甲基化和基因转录的影响

邹佳益,杨江权,徐 林,范 芳,葛正龙 563099 贵州 遵义,遵义医科大学生物化学与分子生物学教研室

[**摘要**] **目的** 分析何首乌提取液(*Polygonum multiflorum* extract,PME)对 D-半乳糖致衰老 C57BL/6 小鼠脑组织 DNA 甲基化和转录组水平的影响,探讨何首乌延缓衰老的作用机制。**方法** 50 只 C57BL/6 小鼠分为 5 组:正常对照组(CC)、衰老组(MC)、PME 高剂量组(MH)、中剂量组(MM)及低剂量组(ML);除 CC 组外,其余 4 组用 D-半乳糖诱导建立衰老模型,60 d 后 MH 组、MM 组及 ML 组分别以 1、0.6、0.3 g·mL^{-1}·kg^{-1} 的 PME 灌胃 60 d,CC 组及 MC 组灌胃等体积生理盐水。各组处理好后,麻醉小鼠并摘除眼球取血,通过检测血清中丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性判断衰老模型建立及何首乌延缓小鼠衰老的作用;采用简化甲基化测序(reduced representation bisulfite sequencing,RRBS)和 RNA-seq 测序方法检测各组小鼠脑组织 DNA 甲基化水平和转录水平,并利用生物信息学方法分析各组样本间差异性甲基化区域(differentially methylated region,DMR)以及差异表达基因,对 DMR 位于启动子区的相关基因进行 GO 聚类及 KEGG 通路分析,并通过实时荧光定量 PCR 验证部分基因的表达。**结果** 与 CC 组比较,MC 组中 SOD、GSH-Px 活性明显下降($P<0.05$),MDA 含量明显升高($P<0.05$);PME 作用后,衰老小鼠中抗氧化酶活性及 MDA 含量均明显缓解,以 MM 组较为明显($P<0.05$)。在 DNA 甲基化测序中发现,CC 组与 MC 组间及 MC 组与 MM 组间均发生甲基化变化的 DMR 位于启动子区的相关基因有 52 个,其中有 7 个基因的甲基化水平与转录组结果呈负相关,包括与衰老相关的 *Synpo* 和 *Mapkapk5*;13 个基因的甲基化水平与转录组呈正相关,包括与衰老相关的 *Tcf7* 和 *Rab15*;且这 4 个基因 mRNA 水平均与转录组测序结果一致。**结论** 何首乌提取液可能通过调控衰老小鼠中 *Synpo*、*Mapkapk5*、*Tcf7* 和 *Rab15* 基因甲基化水平,进而调节其转录水平,发挥延缓小鼠衰老的作用。

[**关键词**] 何首乌;衰老;甲基化;转录组
[**中图法分类号**] R282.71; R285.5; R339.38 [**文献标志码**] A

Effects of *Polygonum multiflorum* extract on DNA methylation and gene transcription in brain tissue of aging mice

ZOU Jiayi, YANG Jiangquan, XU Lin, FAN Fang, GE Zhenglong Department of Molecular Biology and Biochemistry, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou Province, 563099, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of *Polygonum multiflorum* extract (PME) on DNA methylation and transcriptome levels in the brain tissue of D-galactose-induced senescence C57BL/6 mice, and explore its mechanism of delaying aging. **Methods** Fifty C57BL/6 mice were randomly divided into 5 groups, that is, normal control group (CC), aging group (MC), high-, medium- and low-dosed PME groups (MH, MM and ML). Except the CC group, the mice of the other 4 groups were induced to establish an aging model by D-galactose. Sixty days later, the mice of the MH, MM and ML groups were given intragastrical infusion with PME at 1, 0.6 and 0.3 g·mL^{-1}·kg^{-1} for 60 d, and those of CC group and the MC group received same volume of normal saline. All the mice were anesthetized, and the eyeballs were removed to collect blood samples for malondialdehyde (MDA) content, and superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities to determine the establishment of aging model and the effect of *Polygonum multiflorum* in delaying aging in mice. The DNA methylation level and transcription level in brain tissue of each group of mice were detected by reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) and RNA-seq

[**基金项目**] 国家自然科学基金地区科学基金(81660756),贵州省科技计划项目(黔科合基础[2016]1169)
[**通信作者**] 葛正龙,E-mail:1908754624@qq.com

sequencing. And bioinformatics analysis was used to analyze the differentially methylated region (DMR) and differentially expressed genes in the brain samples of each group. The related genes in the promoter region of DMR were analyzed by GO clustering and KEGG pathway analysis. Real-time qPCR was used to verify the expression of some genes. **Results** Compared with the CC group, the activities of SOD and GSH-Px were decreased obviously ($P<0.05$), and the content of MDA was increased significantly in the MC group ($P<0.05$). After PME treatment, the activities of antioxidant enzymes and MDA content in aging mice were distinctly relieved, especially in the MM group ($P<0.05$). In DNA methylation sequencing, there were 52 related genes in the promoter region of DMR with methylation changes between the CC group and the MC group, and between the MC group and the MM group. Among these genes, the methylation levels of 7 genes were negatively correlated with transcriptome results, including *Synpo* and *Mapkapk5* (associated with senescence), while the methylation levels of 13 genes were positively correlated with the transcriptome, including *Tcf7* and *Rab15* (associated with senescence). The mRNA levels of these 4 genes were consistent with the transcriptome sequencing results. **Conclusion** PME exerts a delaying senescence effect probably by regulating the methylation of *Synpo*, *Mapkapk5*, *Tcf7* and *Rab15* genes, and thereby regulating their transcription levels in senescent mice.

[**Key words**] *Polygonum multiflorum*; senescence; methylation; transcriptome

Supported by the Reginal Program of National Natural Science Foundation of China (81660756) and the Project of Science and Technology Plan of Guizhou Province (2016-1169). Corresponding author: GE Zhenglong, E-mail: 1908754624@qq.com

何首乌为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* thunb)的块根,是一味养生抗衰老中药[1],具有抗氧化[2]、细胞保护特性[3]、乌发[4]、治疗与衰老相关的神经退行性疾病[5]以及改善与衰老有关的疾病等作用。何首乌可通过调节和增强机体非特异性及特异性免疫功能,消除衰老动物体内自由基达到抗衰老作用[6],但其具体机制还未明了,尤其是对衰老细胞表观遗传学、基因的表达以及一些物质代谢的作用靶点还不清楚。

在衰老过程中,表观遗传学变化包括甲基化(如组蛋白 H4K20、H3K4 高度甲基化,H3K9、H3K27 低度甲基化)、H4K16 乙酰化以及异染色质蛋白 1-α(HP1α)减少等[7]。而 DNA 甲基化是调节基因表达的关键表观遗传修饰之一,可作为衰老的标志,但迄今为止尚无证据表明特定 DNA 甲基化模式的改变可以延长寿命[7-8]。脑老化作为衰老的主要特征之一,表现为广泛的行为缺陷,包括焦虑和认知功能受损,并可影响全身的老化[9]。相对于其他组织,大脑显示出较高水平的甲基化,特别是在基因组的重复序列。DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质构象改变等表观遗传学修饰均可调控基因表达并参与衰老及许多疾病的发生、发展。

研究表明,在阿尔茨海默病的早期,*Synpo* 作为神经元间的功能性突触蛋白减少[10];*Mapkapk5* 在细胞生长、营养饥饿反应、程序性细胞死亡、衰老和运动过程中扮演着多种角色[11],且有证据证明 *Mapkapk5* 可以磷酸化多种底物,包括 *Foxo1*、*Foxoa3* 和 *Rheb*,但 *Mapkapk5* 的生物学作用远未完全了解[12-14];作为 T 细胞特异性转录因子的 *Tcf7* 及 *RAS* 家族中的 *Rab15* 参与了机体的免疫调节过程[15-16]。在衰老过程相关研究中,这些基因的作用尚不明确。因此,本研究应用简化甲基化测序(reduced representation bisulfite sequencing,RRBS)和 RNA-seq 测序方法,观察何首乌对 D-半乳糖致衰老 C57BL/6 小鼠脑组织 DNA 甲基化和转录的影响,探讨何首乌延缓衰老的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

何首乌:用 75%乙醇提取,减压回收乙醇,减压浓缩至 100 g 生药/100 mL(遵义医科大学附属医院中药房,批号:160801);D-半乳糖购自美国 Sigma 公司;SOD、MDA 和 GSH-Px 检测试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所;RNAiso Plus、PrimeScript™RT 试剂盒及 TB Green™ Premix Ex *Taq*™ Ⅱ试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 动物分组及给药

C57BL/6 雄性小鼠购自第三军医大学医学实验动物中心,许可证号[SCXK(辽)015-0001],体质量(20±2)g,饲养于普通环境,自由饮食,适应性喂养 1 周。按处理方式不同将 50 只小鼠分为 5 组:正常对照组(CC)、衰老组(MC)、何首乌提取液高剂量组(MH)、中剂量组(MM)以及低剂量组(ML)。除 CC 组外,其余 4 组用 D-半乳糖(800 mg · mL^{-1} · kg^{-1})连续腹腔注射 60 d 以建立亚急性衰老模型,而 CC 组腹腔注射等体积生理盐水;衰老模型建立好后,参照 LEE 等[17]和吕锦芳等[18]的研究及前期药物浓度实验摸索确定用药浓度,MH 组、MM 组和 ML 组分别按 1、0.6、0.3 g · mL^{-1} · kg^{-1} PME 每天灌胃,CC 组和 MC 组灌

胃等量生理盐水,连续灌胃 60 d。造模结束,小鼠腹腔注射4%水合氯醛(每 100 g 体质量 1 mL)。待小鼠麻醉后,摘除眼球取血,在 4 ℃下 3 500 r/min 离心 10 min,取上清于-20 ℃待用;断头处死小鼠,取出脑组织,并标记组别及日期,于-80 ℃冰箱保存。

1.3 血清样本测定

取每组离心所得血清样本,根据试剂盒说明,配置检测 GSH-Px 活性、SOD 活性及 MDA 含量所需的试剂溶液,通过化学比色分析并计算酶活性和 MDA 含量。

1.4 脑组织 DNA 的提取及测序

根据建模结果,选取 CC 组、MC 组及 MM 组小鼠脑组织进行甲基化测序,每组选取 3 只小鼠的脑组织,按 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit 操作说明提取脑组织基因组 DNA,用微量核酸蛋白分析仪对 DNA 进行定量检测。合格的 DNA 样本送至深圳华大基因科技服务有限公司进行建库及 RRBS 测序。流程如下:将质量检测合格的基因组 DNA 片段用限制性内切酶 *Msp* Ⅰ进行处理,对酶切后的 DNA 片段进行末端修复、3′端加 A 碱基,并连接甲基化接头,切胶选择 40~200 bp 的酶切片段,采用 ZYMO EZ DNA Methylation-Gold kit 进行亚硫酸盐(Bisulfite)处理;聚合酶链式反应(PCR)扩增文库,合格的文库通过高通量测序平台 Illumina Hiseq X-ten 进行上机测序得到数据。

1.5 脑组织 RNA 的提取及测序

根据建模结果,选取 CC 组、MC 组及 MM 组小鼠脑组织进行转录组测序,每组选取 5 只冻存的小鼠脑组织,称取 30 mg,按照 RNAiso Plus 操作步骤提取 RNA,用微量核酸蛋白分析仪检测 $D(260)/D(280)$,结果在 1.8~2.0 之间,最后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,均符合转录组测序要求。将合格的总 RNA 送至深圳华大基因科技服务有限公司建立 DNA 文库,且合格的文库通过高通量测序平台 BGISEQ-500 进行上机测序得到转录组测序数据。

1.6 差异基因启动子区 DMR 相关基因功能聚类分析

筛选出启动子区甲基化发生差异变化的基因,并用 GO 功能聚类及 KEGG 通路富集分析。

1.7 基因表达分析

用 RNAiso Plus 试剂盒提取脑组织的总 RNA,核酸蛋白仪测总 RNA 的浓度及纯度。将 1 μg RNA 用逆转录试剂盒 Pri-meScript™RT 逆转为 cDNA,用 TB Green™ Premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒进行荧光定量 PCR,总反应体系为 20 μL,反应程序为 95 ℃,30 s;GOTO(95 ℃,5 s;60 ℃,30 s);95 ℃,10 s;60 ℃,5 s;95 ℃,50 s;40 个循环。以 GAPDH 为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。目的基因的引物设计和合成均由生工生物(上海)有限公司完成,引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列与产物长度

基因	引物序列(5′→3′)	产物长度/bp
Gapdh	上游:TGTGTCCGTCGTGGATCTGA 下游:CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	161
Tcf7	上游:GCAGCATCCGCAGCCTCAAC 下游:GCCTGTGAACTCCTTGCTTCTGG	152
Rab15	上游:AGGAGTACGGCATGGACTTCTACG 下游:CTCCTCCAGCTCGGCCAGTG	164
Synpo	上游:GTGGCACCAGCAGAACAAGAGG 下游:GCAGGCTTGGCTAGTGTGAGATG	95
Mapkapk5	上游:TGATGATGGATAAGGCGGTGGTTG 下游:GCAGCTTCCTCTTCCTGAGAATGG	141

1.8 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间数据比较采用 t 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 PME 对衰老小鼠血清抗氧化指标的影响

通过对血清中氧化酶的检测,衰老组(MC)SOD、GSH-Px 的酶活性较正常对照组(CC)显著降低($P<0.05$),MDA 的含量较 CC 组显著升高($P<0.05$);灌胃 PME 后,何首乌提取液中、高剂量组的 SOD、GSH-Px 酶活性较 MC 组显著升高($P<0.05$),中、高剂量组的 MDA 含量较 MC 组显著降低($P<0.05$,表 2),且中剂量组(MM)作用效果相对明显。因此,选取正常对照组、衰老组及何首乌提取液中剂量组进行甲基化和转录组测序以及后续实验。

表 2 PME 对衰老小鼠血清抗氧化指标的影响($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

组别	SOD/U·mL^{-1}	MDA/nmol·mL^{-1}	GSH-Px/U·mL^{-1}
正常对照组	85.68±4.79	1.947±0.765	431.77±24.94
衰老组	71.95±3.12[a]	4.132±0.926[a]	384.30±31.46[a]
何首乌提取液			
高剂量组	79.20±4.14[b]	2.358±0.722[b]	436.33±33.66[b]
中剂量组	82.37±3.22[b]	2.252±1.350[b]	424.94±19.40[b]
低剂量组	68.09±7.70	3.351±1.032	414.68±53.79

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与衰老组比较

2.2 RRBS 测序的质控及 PME 作用后脑组织基因组整体甲基化水平的变化

DNA 甲基化测序数据显示,经过去污染、去测序接头和去低质量碱基比例过高的 reads 后,在 Bisulfite 处理时,非甲基化胞嘧啶的转化效率均在 99%以上,捕获效率均在 83%以上,即比对到目标区域的 base 数

占所有比对上参考基因组的 base 总数的比例在 83%以上。对 3 组样本的启动子区和 CpG 岛甲基化 C 碱基中 CG、CHG 与 CHH 分布比例进行分析,正常对照组(CC)、衰老组(MC)和何首乌提取液中剂量组(MM)中甲基化 C 碱基以 CG 类型为主,在启动子区域和 CpG 岛 CG 碱基分别占全部甲基化 C 碱基类型(CG、CHG、CHH)的 85%和 95%以上。对所有甲基化 C 碱基的平均甲基化水平进行分析,MC 组基因启动子区域的所有甲基化 C 碱基及甲基化 CG 类型的平均甲基化水平均显著高于 CC 组和 MM 组($P<0.05$);3 组 CpG 岛的所有甲基化 C 碱基的平均甲基化水平差异无统计学意义($P>0.05$,图 1)。

2.3 RNA-seq 测序数据的质控报告

转录组测序结果显示,去除原始数据中的低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的 reads,得到高质量 reads,测得每个样品平均产出 21.53M 数据。

2.4 PME 作用后脑组织基因组 DMR 及 DMR 位于启动子区的相关基因分析和鉴定

进一步分析启动子区域有 5 个以上 CpG 覆盖的基因甲基化情况,最终获得启动子区 C 位点的平均甲基化水平和基因区 C 位点的甲基化水平。用 CG 甲基化水平的差异来寻找 DMR,从而确定在每条染色体上有差异的区域长度和有差异的基因。与正常对照组比较,衰老组有 164 个 DMR,平均长度为 15 750 bp;与衰老组比较,MM 组有 140 个 DMR,平均长度为 13 672 bp。根据启动子区域发生甲基化差异的基因,正常对照组与衰老组相比有 178 个,而衰老组与 MM 组相比有 154 个,在 3 组中有 52 个 DMR 位于启动子区的相关基因,包括与衰老密切相关的 4 个基因:*Rab15*、*Tcf7*、*Synpo* 和 *Mapkapk5*。

2.5 DNA 甲基化与基因表达之间的重叠变化

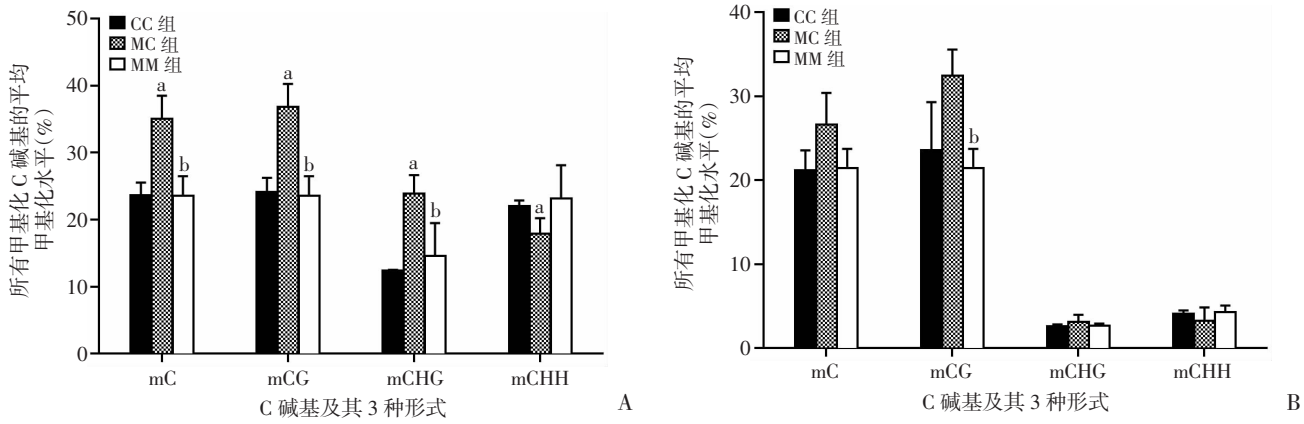
为了找到何首乌延缓衰老作用的分子靶点,在 CC 组与 MC 组及 MC 组与 MM 组之间,对启动子区域发生甲基化差异及相应发生基因表达差异的基因进行了分析,发现 27 个基因在两者之间均发生了变化,其中 *Cmip*、*Deaf1*、*Arhgef2*、*Tmem2*、*Rab15*、*Tcf7* 和 *Erbb3* 与基因表达呈现负性相关,*Igf2r*、*Adgrl4*、*Slc15a1*、*Dnase1l2*、*Smad3*、*Synpo* 和 *Mapkapk5* 等 13 个基因与其表达呈正相关,结果见表 3。

2.6 基因启动子区 DMR 相关基因功能注释、聚类及通路分析

为了评估启动子区发生甲基化变化的差异甲基化基因是否富集于特定的生物过程或功能,用 GO 分析对启动子 DMR 相关的基因进行功能分类。CC 组与 MC 组之间以及 MC 组与 MM 组之间,启动子 DMR 相关的基因都富含了 24 种细胞成分类别,注释基因也都参与了 14 个分子功能和 9 个生物过程(图 2)。在生物过程中,CC 组与 MC 组和 MC 组与 MM 组出现了不同组分,在 CC 组与 MC 组比较中,有排毒和参与化学突触传递的突触前过程;MC 组与 MM 组比较中,除细胞杀伤和色素沉着功能,其余组分均相同。就 CC 组与 MC 组之间以及 MC 组与 MM 组之间,对启动子区域发生甲基化差异基因进行 KEGG 富集通路分析,参与多条生物通路,如肿瘤通路、急性髓性白血病、黏着力和 B 细胞受体信号通路等,见表 4。其中 *Mapkapk5* 和 *Tcf7* 分别参与了与衰老密切相关的 MAPK 信号通路和 Wnt 信号通路。

2.7 实时荧光定量 PCR 结果

结果显示,经 PME 作用后,衰老小鼠脑组织中 *Synpo*、*Mapkapk5*、*Tcf7* 及 *Rab15* 的表达均上调,差异有统计学意义($P<0.05$,图 3),且与 RNA-seq 测序结果一致。

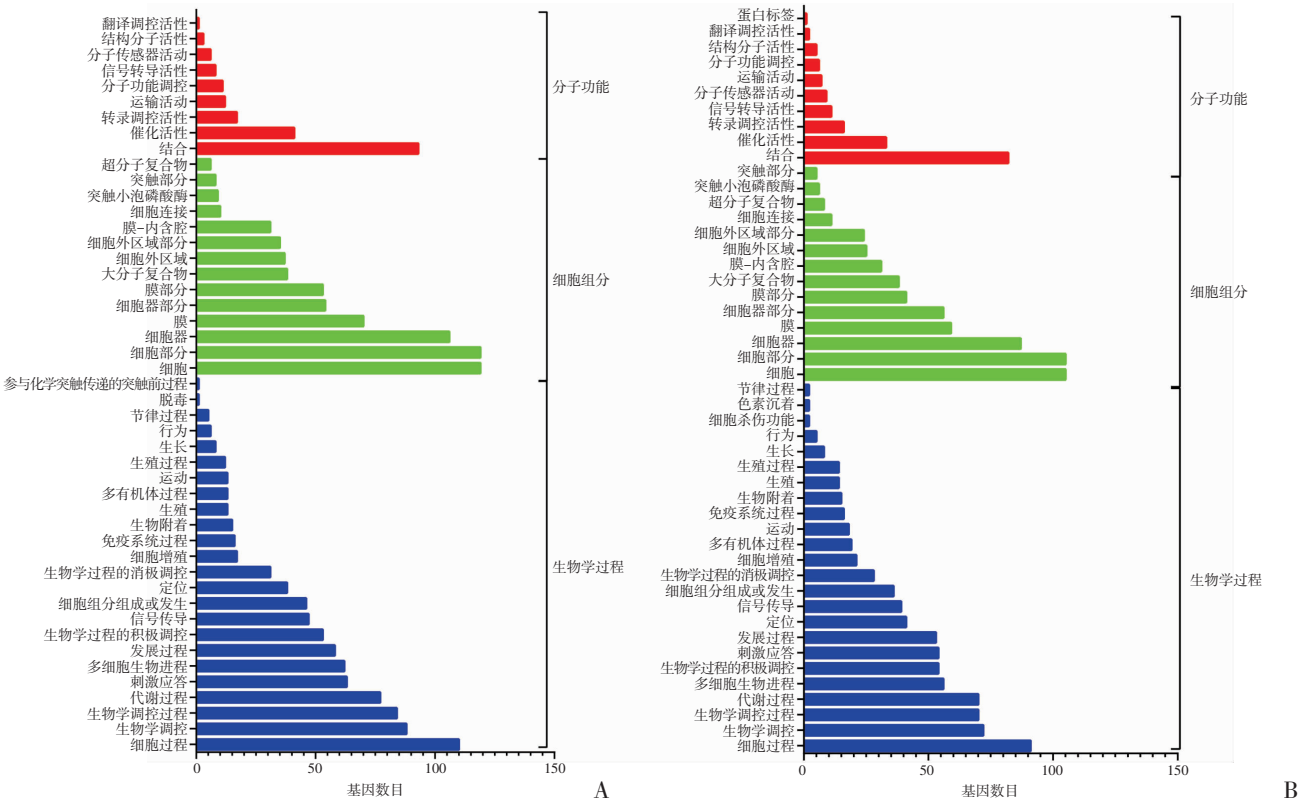


A:启动子区;B:CpG 岛 a:$P<0.05$,与 CC 组比较;b:$P<0.05$,与 MC 组比较

图 1 PME 作用于衰老小鼠后脑组织基因组平均甲基化水平分析

表 3　PME 作用于衰老小鼠后的脑组织 DNA 甲基化与基因表达之间的重叠变化

基因名	差异甲基化			基因表达			
	Log2 差异甲基化倍数（CC/MC）	Log2 差异甲基化倍数（MC/MM）	*P* 值	Log2 差异表达倍数（CC/MC）	Log2 差异表达倍数（MC/MM）	校正 *P* 值（CC/MC）	校正 *P* 值（MC/MM）
Cmip	6.161	−6.118	<0.05	−0.382	0.137	<0.05	<0.05
Deaf1	1.216	0.521	<0.05	−0.226	−0.120	<0.05	<0.05
Rab15	1.049	−0.895	<0.05	−0.158	0.320	<0.05	<0.05
Tcf7	1.049	−0.646	<0.05	−0.231	0.316	<0.05	<0.05
Arhgef2	0.214	−0.191	<0.05	−0.100	0.272	<0.05	<0.05
Tmem2	−0.326	0.327	<0.05	0.133	−0.319	<0.05	<0.05
Erbb3	−1.110	1.191	<0.05	0.148	−0.325	<0.05	<0.05
Igf2r	1.390	−0.836	<0.05	0.152	−0.092	<0.05	<0.05
Adgrl4	0.822	−0.631	<0.05	0.478	−0.356	<0.05	<0.05
Slc15a1	−0.203	0.252	<0.05	−1.080	0.459	<0.05	<0.05
Dnase1l2	−0.357	0.294	<0.05	−1.457	1.086	<0.05	<0.05
Smad3	−0.454	0.301	<0.05	−0.195	0.204	<0.05	<0.05
Nnat	−0.223	0.329	<0.05	−1.014	0.160	<0.05	<0.05
Catsperg1	−0.259	0.330	<0.05	−0.821	0.950	<0.05	<0.05
Synpo	−0.654	0.922	<0.05	−0.572	0.366	<0.05	<0.05
Mapkapk5	−1.570	1.394	<0.05	−0.251	0.289	<0.05	<0.05
9-Sep	−1.140	1.423	<0.05	−0.335	0.076	<0.05	<0.05
Nfatc2	−0.388	1.494	<0.05	−0.342	0.547	<0.05	<0.05
P3h3	−0.504	1.514	<0.05	−0.801	0.984	<0.05	<0.05
Nub1	−2.226	2.198	<0.05	−0.181	0.129	<0.05	<0.05

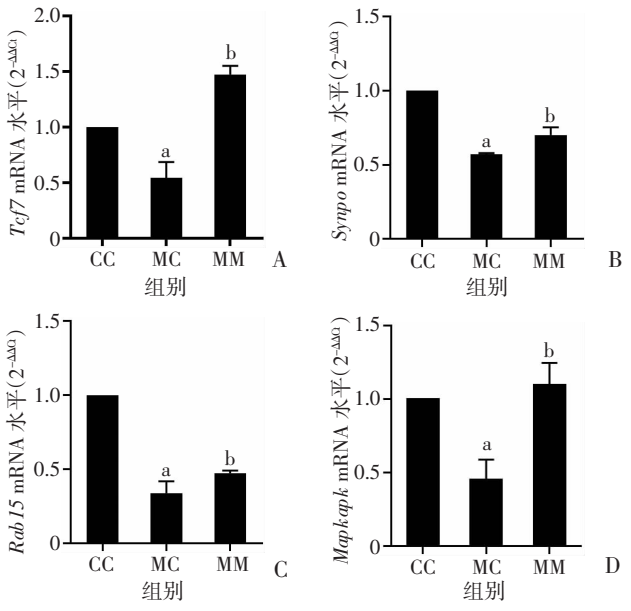


A：正常对照组（CC）与衰老组（MC）的启动子区 DMR 相关基因的 GO 功能分类图；B：衰老组（MC）与何首乌提取液中剂量组（MM）的启动子区 DMR 相关基因的 GO 功能分类图

图 2　PME 作用于衰老小鼠后脑组织基因启动子区 DMR 相关基因 GO 分析

表 4 PME 作用于衰老小鼠后的脑组织基因启动子 DMR 相关基因通路

通路 ID	通路名称	*P* 值
正常对照组与衰老组比较		
ko00514	其他类型的 O-聚糖生物合成	0.00 271 593
ko05221	急性髓细胞白血病	0.02 175 338
ko04672	肠免疫网络产生 IgA	0.04 122 130
ko04512	ECM-受体相互作用	0.04 125 208
ko04550	调节干细胞多能性的信号通路	0.04 857 240
衰老组与何首乌提取液中剂量组比较		
ko05200	癌症通路	0.00 006 475
ko05221	急性髓细胞白血病	0.00 017 332
ko04510	粘着斑	0.00 170 871
ko04662	B 细胞受体信号通路	0.00 217 413
ko04012	ErbB 信号通路	0.00 428 466
ko05161	乙型肝炎	0.00 576 464
ko04550	调节干细胞多能性的信号通路	0.00 703 979
ko05321	炎性肠病	0.00 721 948
ko04024	cAMP 信号通路	0.00 770 444
ko05416	病毒性心肌炎	0.00 857 148
ko04921	催产素信号通路	0.00 958 345
ko05202	癌症中的转录失调	0.01 001 671
ko04520	黏着连接	0.01 220 692
ko04664	FcεRI 信号通路	0.01 292 794
ko04370	VEGF 信号通路	0.01 383 705
ko04650	自然杀伤细胞介导的细胞毒性	0.01 742 397
ko04950	青年成熟期发病型糖尿病	0.01 806 356
ko05130	致病性大肠杆菌感染	0.01 891 861
ko04974	蛋白质消化和吸收	0.01 900 314
ko05212	胰腺癌	0.02 426 306
ko04010	MAPK 信号通路	0.02 453 871
ko05216	甲状腺癌	0.02 490 214
ko05210	结直肠癌	0.02 490 214
ko04670	白细胞经内皮迁移	0.02 565 680
ko05220	慢性髓细胞白血病	0.02 687 362
ko05412	致心律失常性右室心肌病	0.02 962 858
ko04672	肠免疫网络产生 IgA	0.03 226 757
ko05142	美洲锥虫病	0.03 327 437
ko04310	Wnt 信号通路	0.03 368 032
ko05205	癌症中的蛋白多糖	0.03 709 201
ko05032	吗啡成瘾	0.03 714 303
ko04066	HIF-1 信号通路	0.03 714 303
ko0492	醛固酮的合成和分泌	0.03 794 331
ko04660	T 细胞受体信号通路	0.03 957 026
ko05215	前列腺癌	0.04 039 688
ko05206	癌症中的微小 RNA	0.04 116 418
ko05131	志贺氏菌病	0.04 292 905
ko04810	肌动蛋白细胞骨架的调控	0.04 910 963
ko04015	Rap1 信号通路	0.04 965 487



A:*Tcf7*;B:*Sympo*;C:*Rab15*;D:*Mapkapk5*　a:$P<0.01$,与 CC 组比较;b:$P<0.05$,与 MC 组比较

图 3　PME 对衰老小鼠脑组织中 4 个基因 mRNA 表达的影响

3　讨论

衰老是一个极其复杂的过程,包括机体的各方面机能下降以及对环境的适应性降低等,如机体的免疫能力下降、神经退行性病变、抗氧化力减弱及与衰老相关的脏器病变等。机体可通过调节免疫能力、抑制神经变性和抗氧化等达到抗衰老目的。何首乌作为抗衰老药物,可以抗炎、抗氧化[19],预防和治疗衰老相关的骨质流失[20]和减轻神经退行性疾病,如阿尔茨海默症和帕金森病[21]等,但具体抗衰老分子途径不明了。为探寻何首乌延缓衰老的作用机制,本研究将何首乌作用后的衰老小鼠脑组织进行 RRBS 和 RNA-seq 测序。

在衰老机制研究中,常采用 D-半乳糖建立小鼠亚急性衰老模型模拟人体衰老[22]。此模型建立机制是过量 D-半乳糖在机体不能被代谢,会在细胞内聚集产生大量 ROS,使机体氧化损伤[23],致使机体逐渐衰老。常用 MDA、SOD 和 GSH-Px 等指标验证衰老模型建立是否成功,本实验结果与以往实验结果一致[24],用 D-半乳糖建立的衰老小鼠模型,血清中 MDA 含量升高,SOD 和 GSH-Px 酶活性降低。经 PME 作用于衰老小鼠后,血清中抗氧化酶活性明显提高,MDA 含量下降,尤以中剂量组效果相对显著。这些结果表明,本实验衰老模型建立成功,且何首乌具有延缓衰老作用。

小鼠脑组织 DNA 甲基化及转录组测序结果显示,3 组启动子区超过 85%的 CG 位点都被甲基化。D-半乳糖致小鼠衰老前后以及经 PME 作用前后,小鼠脑组织中基因启动子区甲基化水平及转录水平均发生差异变化的有 20 个。由于启动子相关的 CpG 岛甲基化水平通常与基因表达呈负相关,但某些基因也会出现相反结果[25],故对启动子甲基化变化与转录水平变化相同或相反基因均进行研究。结果显示,启动子甲基化与转录水平变化趋势相同的 13 个基因中的 *Sympo* 和 *Mapkapk5* 基因,以及变化趋势相反的 7 个基因中的 *Tcf7* 和 *Rab15* 基因,均可能与何首乌延缓衰老作用相关。

最新研究表明,在神经元中 *Bag3* 与 *Sympo* 相互协同调节自噬[26],*Sympo* 在阿尔茨海默症患者中的表达显著下调[27],突触功能障碍与自噬的调节密切相关,可以通过调节自噬功能来治疗与年龄相关的神经系统疾病[28]。本研究在 D-半乳糖致衰老的小鼠脑组织中发现 *Sympo* 低甲基化,基因表达下调,经 PME 作用后甲基化水平和基因表达水平均升高。由此,我们推测何首乌可能通过调节 *Sympo* 基因表达来调控自噬系统以此达到延缓衰老的目的。

Mapkapk5 亦称 *PRAK*,属于 p38 MAPK 信号转导途径的关键成分,p38 调节/活化激酶(*PRAK*)被细胞应激激活。但是,*PRAK* 及其下游交互作用蛋白的功能尚未明确。文献[29]报道 *PRAK* 与 *DJ-1* 相互作用可以防止氧化应激导致的细胞死亡。本研究发现,衰老小鼠经 PME 作用后,脑组织中 *Mapkapk5* 甲基化水平和转录水平均提高,结果提示:何首乌发挥延缓衰老作用,可能是通过调节 *Mapkapk5* 基因,防止因氧化应激导致的细胞死亡。

Tcf7 作为调节 T 细胞分化的关键因子之一,在衰老过程中其表达量降低与 DNA 高甲基化相关[30],即在抗衰老过程中 *Tcf7* 表达量增加与 DNA 低甲基化相关。此外,*Tcf7* 与衰老有关的骨质疏松密切相关,与视黄觉受体相关的 Rorβ 缺失可通过增加 *Tcf7* 的表达和 Wnt 信号反应来增强骨形成,从而防止骨质疏松[31]。衰老可降低人体的整体免疫能力,尽管所有免疫细胞受到影响,但 T 细胞所受的影响最大[32],且衰老的免疫系统失去抵御感染的能力[33]。树突状细胞(DC)对于病毒感染会发起保护性 T 细胞免疫,而 *Rab15* 可赋予 CD 亚群中的 $CD141^+$DC 抗感染能力,当 *Rab15* 表达水平提高可提高抗感染能力[34]。本研究发现,经 PME 作用后衰老小鼠脑组织中 *Tcf7* 和 *Rab15* 两者低甲基化,基因表达上调,且通过分析 DMR 位于启动子区基因的富集通路发现,*Tcf7* 参与了 Wnt 信号通路。

表明何首乌可能是通过调控 *Tcf7* 和 *Rab15* 的表观遗传来影响其表达,从而提高机体免疫力以达到延缓衰老作用,且通过调节 *Tcf7* 的表达来防止衰老相关的骨质疏松。

综上,本研究利用 DNA 甲基化及转录组测序技术,分析比较启动子甲基化水平及转录水平均发生变化的基因,初步确定何首乌可能通过调节 *Synpo*、*Mapkapk5*、*Tcf7* 和 *Rab15* 的启动子区域甲基化变化来影响其表达。推测何首乌可能是通过调节自噬系统以防止神经退行性病变、抗氧化及调控或增强机体免疫功能等,影响基因的表观遗传进而调节其基因的表达,达到延缓衰老的作用。为后续何首乌延缓衰老的具体机制研究提供了方向。

参考文献:

[1] CHEN T, YANG Y J, LI Y K, *et al*. Chronic administration tetrahydroxystilbene glucoside promotes hippocampal memory and synaptic plasticity and activates ERKs, CaMKII and SIRT1/miR-134 *in vivo*[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 190: 74-82. DOI:10.1016/j.jep.2016.06.012.

[2] LV L, GU X H, TANG J, *et al*. Antioxidant activity of stilbene glycoside from *Polygonum multiflorum* Thunb *in vivo*[J]. Food Chem, 2007, 104(4): 1678-1681. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.03.022.

[3] STEELE M L, TRUONG J, GOVINDARAGHAVAN S, *et al*. Cytoprotective properties of traditional Chinese medicinal herbal extracts in hydrogen peroxide challenged human U373 astroglia cells[J]. Neurochem Int, 2013, 62(5): 522-529. DOI:10.1016/j.neuint.2012.08.018.

[4] HAN M N, LU J M, ZHANG G Y, *et al*. Mechanistic studies on the use of *Polygonum multiflorum* for the treatment of hair graying[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015(2): 647-655. DOI:10.1155/2015/651048.

[5] CHAN Y C, WANG M F, CHANG H C. *Polygonum multiflorum* extracts improve cognitive performance in senescence accelerated mice[J]. Am J Chin Med, 2003, 31(2): 171-179. DOI:10.1142/S0192415X03000862.

[6] LEE S Y, AHN S M, WANG Z Y, *et al*. Neuroprotective effects of 2, 3, 5, 4′-tetrahydoxystilbene-2-O-β-D-glucoside from *Polygonum multiflorum* against glutamate-induced oxidative toxicity in HT22 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 195: 64-70. DOI:10.1016/j.jep.2016.12.001.

[7] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, *et al*. The hallmarks of aging[J]. Cell, 2013, 153(6): 1194-1217. DOI:10.1016/j.cell.2013.05.039.

[8] JUNG M, PFEIFER G P. Aging and DNA methylation[J]. BMC Biol, 2015, 13(1):7-14. DOI:10.1186/s12915-015-0118-4.

[9] SADIGH-ETEGHAD S, MAJDI A, MCCANN S K, *et al*. D-galactose-induced brain ageing model: A systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices[J]. PLoS ONE, 2017, 12(8): e0184122. DOI:10.1371/journal.pone.0184122.

[10] GOETZL E J, KAPOGIANNIS D, SCHWARTZ J B, *et al*. Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease[J]. FASEB J, 2016, 30(12): 4141-4148. DOI: 10.1096/fj.201600816R.

[11] DWYER S F, GELMAN I H. Cross-phosphorylation and interaction between src/FAK and MAPKAP5/PRAK in early focal adhesions controls cell motility[J]. J Cancer Biol Res, 2014, 2(1): 1045.

[12] CHOW K T, TIMBLIN G A, MCWHIRTER S M, *et al*. MK5 activates Rag transcription *via* Foxo1 in developing B cells[J]. J Exp Med, 2013, 210(8): 1621-1634. DOI: 10.1084/jem.20130498.

[13] KOSTENKO S. Physiological roles of mitogen-activated-protein-kinase-activated p38-regulated/activated protein kinase [J]. World J Biol Chem, 2011, 2(5): 73-89. DOI:10.4331/wjbc.v2.i5.73.

[14] ZHENG M, WANG Y H, WU X N, *et al*. Inactivation of Rheb by PRAK-mediated phosphorylation is essential for energy-depletion-induced suppression of mTORC1[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(3): 263-272. DOI: 10.1038/ncb2168.

[15] UTZSCHNEIDER D T, DELPOUX A, WIELAND D, *et al*. Active maintenance of T cell memory in acute and chronic viral infection depends on continuous expression of FOXO1 [J]. Cell Rep, 2018, 22(13): 3454-3467. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.020.

[16] WONG P, IWASAKI A. RAB15 empowers dendritic cells to drive antiviral immunity[J]. Sci Immunol, 2017, 2(13): eaan6448. DOI:10.1126/sciimmunol.aan6448.

[17] LEE S V, CHOI K H, CHOI Y W, *et al*. Hexane extracts of *Polygonum multiflorum* improve tissue and functional outcome following focal cerebral ischemia in mice[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4): 1415-1421. DOI:10.3892/mmr.2014.1943.

[18] 吕锦芳, 宁康健, 丁小燕, 等. 何首乌粗提物对小鼠部分抗氧化抗衰老指标的影响[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(7): 58-60.
LYU J F, NING K J, DING X Y, *et al*. Effects of crude extract of polygonum multiflorum on partial antioxidant and

anti-aging index in mice[J]. Animal Husb Vet Med, 2012, 44(7): 58-60.

[19] KIM S J, HWANG Y H, MUN S K, *et al*. Protective effects of 2, 3, 5, 4′-tetrahydroxystilbene-2-O-β-d-glucoside on ovariectomy induced osteoporosis mouse model[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): E2554. DOI:10.3390/ijms19092554.

[20] ZHOU M R, LI J, WU J K, *et al*. Preventive effects of *Polygonum multiflorum* on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(3): 2445-2460. DOI:10.3892/etm.2017.4802.

[21] YU Y, LANG X Y, LI X X, *et al*. 2, 3, 5, 4′-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-d-glucoside attenuates MPP+/MPTP-induced neurotoxicity *in vitro* and *in vivo* by restoring the BDNF-TrkB and FGF2-Akt signaling axis and inhibition of apoptosis[J]. Food Funct, 2019, 10(9): 6009-6019. DOI:10.1039/c9fo01309a.

[22] ZHANG Y, LIU B, CHEN X, *et al*. Naringenin ameliorates behavioral dysfunction and neurological deficits in a d-galactose-induced aging mouse model through activation of PI3K/akt/Nrf2 pathway[J]. Rejuv Res, 2017, 20(6): 462-472. DOI:10.1089/rej.2017.1960.

[23] FENG Y, YU Y H, WANG S T, *et al*. Chlorogenic acid protects D-galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice[J]. Pharm Biol, 2016, 54(6): 1027-1034. DOI: 10.3109/13880209.2015.1093510.

[24] GAO J Q, YU Z P, JING S, *et al*. Protective effect of Anwulignan against D-galactose-induced hepatic injury through activating p38 MAPK-Nrf2-HO-1 pathway in mice[J]. Clin Interv Aging, 2018, 13: 1859-1869. DOI:10.2147/CIA.S173838.

[25] GUTIERREZ-ARCELUS M, LAPPALAINEN T, MONTGOMERY S B, *et al*. Correction: Passive and active DNA methylation and the interplay with genetic variation in gene regulation[J]. eLife, 2013, 2: e01045. DOI: 10.7554/elife.01045.

[26] JI C Y, TANG M P, ZEIDLER C, *et al*. BAG3 and SYNPO (synaptopodin) facilitate phospho-MAPT/Tau degradation *via* autophagy in neuronal processes[J]. Autophagy, 2019, 15(7): 1199-1213. DOI: 10.1080/15548627.2019.1580096.

[27] DATTA A, CHAI Y L, TAN J M, *et al*. An iTRAQ-based proteomic analysis reveals dysregulation of neocortical synaptopodin in Lewy body dementias[J]. Mol Brain, 2017, 10(1): 36. DOI:10.1186/s13041-017-0316-9.

[28] BOURDENX M, DEHAY B. Autophagy and brain: the case of neurodegenerative diseases[J]. Med Sci (Paris) 2017, 33(3): 268-274. DOI: 10.1051/medsci/20173303013.

[29] TANG J, LIU J H, LI X, *et al*. PRAK interacts with DJ-1 and prevents oxidative stress-induced cell death[J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014: 735618. DOI: 10.1155/2014/735618.

[30] TSEREL L, KOLDE R, LIMBACH M, *et al*. Age-related profiling of DNA methylation in $CD8^+$ T cells reveals changes in immune response and transcriptional regulator genes[J]. Sci Rep, 2015, 5: 13107. DOI:10.1038/srep13107.

[31] FARR J N, WEIVODA M M, NICKS K M, *et al*. Osteoprotection through the deletion of the transcription factor rorβ in mice[J]. J Bone Miner Res, 2018, 33(4): 720-731. DOI:10.1002/jbmr.3351.

[32] TSEREL L, KOLDE R, LIMBACH M, *et al*. Age-related profiling of DNA methylation in $CD8^+$ T cells reveals changes in immune response and transcriptional regulator genes[J]. Sci Rep, 2015, 5: 13107. DOI:10.1038/srep13107.

[33] WEYAND C M, GORONZY J J. Aging of the immune system. mechanisms and therapeutic targets[J]. Ann Am Thorac Soc, 2016, 13(Suppl 5): S422-S428. DOI:10.1513/AnnalsATS.201602-095AW.

[34] SILVIN A, YU C N, LAHAYE X, *et al*. Constitutive resistance to viral infection in human $CD141^+$ dendritic cells[J]. Sci Immunol, 2017, 2(13): eaai8071. DOI:10.1126/sciimmunol.aai8071.

(收稿:2019-08-03;修回:2019-11-07)

(编辑 汪勤俭)