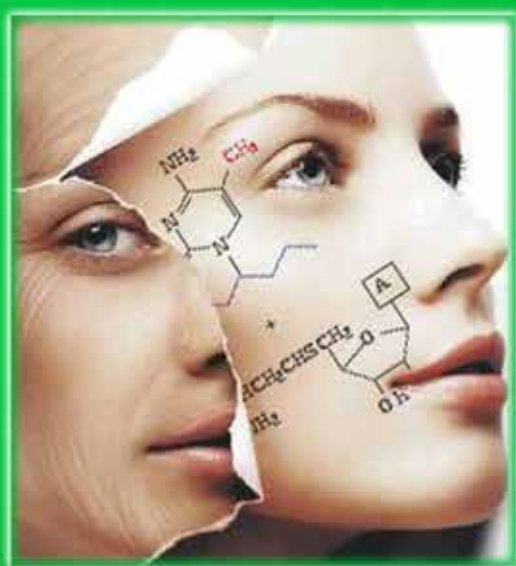


生命奥秘

LifeOmics

2016年 3月刊 总第83期



甲基化与衰老研究概述

- 走近神秘的lncRNA
- 蚜虫用拼凑的方法重新合成必需氨基酸

无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

目录 | CONTENTS

专题

甲基化与衰老研究概述

前言	01
一、衰老研究中的甲基化水平研究背景	02
1. 甲基化与衰老	02
2. 甲基化的类型	02
3. 对模式生物的衰老研究	04
二、甲基化与衰老研究的进展	05
1. DNA甲基化与衰老研究的最新进展	05
2. 组蛋白甲基化与衰老研究进展	10
三、引起衰老过程中甲基化水平异常变化的各种因素	13
1. 衰老过程中与甲基化水平相关的各种生理变化	13
2. 衰老过程中与甲基化水平相关的基因及通路	14
3. 衰老过程相关甲基化水平的改变与已知衰老相关风险因子的关系	14
四、衰老与甲基化水平关系研究的应用前景及未来发展方向	16
五、结语	17

下一期（2016年4月刊）预告：单颗粒冷冻电镜技术

每年年底，《自然-方法》（*Nature Methods*）都会对过去一年中推动生物学发展的技术方法进行回顾与总结，由此评选出当年最受瞩目、影响力最大的技术。2015年，单颗粒冷冻电镜技术（Single-particle cryo-electron microscopy, Single-particle cryo-EM）荣膺《自然-方法》年度生命科学技术。这一期专题将会详细介绍单颗粒冷冻电镜技术最近的技术进展（特别是相关的直接检测摄像头的发展情况）；这些技术进步使得结构生物学技术在成像分辨率上取得了令人印象深刻的飞跃性突破，进而帮助人们进一步了解蛋白功能。

热点

走近神秘的lncRNA	20
-------------------	----

百态

蚜虫用拼凑的方法重新合成必需氨基酸	28
大块头有大勇气	30

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。



专题

Worthy Issues

甲基化与衰老研究概述

特约编辑：叶景佳，女，博士，研究方向：肿瘤生物治疗及发病机制

前言

本世纪以来，人们在研究甲基化水平的改变对衰老过程的影响方面取得了大量突破性的进展。比如科学家们已经建立起了通过检测细胞的DNA甲基化水平来推测机体的生理年龄及死亡率的模型，并且发现了一些组蛋白甲基化调节衰老的直接证据等。随着老龄化社会的到来，这些成果在健康管理等领域将拥有非常广阔的应用前景。

一、衰老研究中的甲基化水平研究背景

1. 甲基化与衰老

人们对发现各种可用于预测疾病和死亡率的风险因子一直抱有浓厚的兴趣。流行病学的研究已鉴定出了大量在整个生命过程中可增加死亡风险的因素，包括各种环境、基因、表观遗传学，乃至生活方式、人格等。

衰老现象牵涉到一系列复杂的生理、生化反应，个体衰老的速率各不相同，并且受到体内各种相关因素的影响。性别、生活方式、端粒长度、基因表达——尤其是与代谢功能和DNA修复途径相关的基因表达，都可以促进或延缓衰老过程。人们可以研究这些因素，从而找出衰老的分子标记，并将其用于预测、监控，进一步研究衰老相关的生理、病理变化，补充关于衰老的理论。人们目前提出了包括程序性衰老、自由基理论等在内的多种学说，它们都能从一定角度解释衰老现象的起因和过程，然而，科学家们还没有建立起一个可以完整诠释衰老现象各个方面的公认的学说。

关于甲基化水平与衰老的关系研究从上世

纪八十年代起就屡见报道，但对于甲基化水平的变化究竟是衰老过程中的伴随现象，还是引起衰老的原因，以及甲基化水平的改变究竟通过何种途径影响机体衰老的具体作用机制尚不明确。

随着本世纪科学技术的发展，检测甲基化水平的研究方法和研究工具也在不断更新，例如检测甲基化程度的抗体的出现、多种高通量DNA甲基化检测方法的应用、甲基转移酶和脱甲基酶的作用被发现等，人们运用这些新技术来研究甲基化水平改变对衰老过程的影响，从而取得了大量突破性的进展。这些进展包括科学家已建立起相关的模型（该模型可以通过检测血标本内的DNA甲基化水平，推测出机体的生理年龄、预测未来数年内的死亡率）和已找到一些组蛋白甲基化调节衰老的直接证据等。这些进展不但扩展了我们对于甲基化水平影响衰老过程机制的认识，而且拥有非常广阔的应用前景，引起了人们极大的兴趣。

2. 甲基化的类型

甲基化是一类重要的表观遗传学现象，它是在特定酶的催化下，将甲基从活性甲基化合物（如S-腺苷基甲硫氨酸）上转移到核酸或蛋白质上进行化学修饰，形成各种甲基化合物的过程。甲基化过程涉及遗传物质稳定、基因表达调控及蛋白质功能调节等机制，与衰老及衰老相关的众多疾病，如肿瘤、高血压和老年痴呆症等都有密切联系。甲基化水平与衰老的关系研究是目前表观遗传学的重要研究方向之一。最常见的甲基化修饰有DNA甲基化和组蛋白甲基化。

2.1 DNA甲基化

DNA甲基化可以发生在腺嘌呤的N-6位、胞嘧啶的N-4位、鸟嘌呤的N-7位或胞嘧啶的C-5位等。真核生物的DNA甲基化修饰几乎只在胞嘧啶残基上出现，并且紧邻鸟嘌呤，通常写成CpG。在哺乳动物中，S-腺苷基甲硫氨酸（S-adenosylmethionine, SAM）上的甲基在DNA甲基转移酶（DNA methylation transferase, Dnmt）的催化下转移至DNA分子中胞嘧啶环第5位碳原子上，形成5-甲基胞嘧啶（5-Mc）（图1a），这个过程是一类相

对稳定的基因组核酸序列未改变的功能性修饰，它在细胞水平上可遗传，也是研究最广泛的表观遗传修饰。

到目前为止，人们对于产生DNA甲基化的各种遗传和环境因素及其生物学效应已经进行了广泛而深入的研究。继人类表观基因组协会于2000年10月发起了人类表观基因组计划（Human Epigenome Project, HEP）以来，美国国立卫生研究院（National Institutes of Health, NIH）也于2008年启动了表观基因组学路线图计划（Roadmap Epigenomics Program），这些计划旨在识别人类基因组中DNA的甲基化模式和变异位点，研究不同来源的人体细胞和组织中的DNA甲基化模式。在众多DNA甲基化研究领域，DNA甲基化水平与衰老研究是目前表观遗传学的一个重要的研究方向。

2.2 蛋白质甲基化

蛋白质的翻译后修饰在调节蛋白质结构和功能上起到重要作用，这些修饰主要包括磷

酸化、乙酰化、泛素化以及甲基化。目前对蛋白质甲基化研究最多的是组蛋白甲基化。组蛋白甲基化发生在H3和H4组蛋白N端精氨酸或者赖氨酸残基上，这个反应由多种组蛋白甲基转移酶催化，并可以单独或多次被甲基化，如精氨酸甲基化可分为单甲基化和双甲基化，其中双甲基化又可分为对称甲基化和非对称甲基化；赖氨酸可以发生单、双或三甲基化；也可在去甲基酶的作用下，通过使组蛋白去甲基化，从而实现基因抑制和活化的调控（图1b）。近十年来的研究表明，动态的组蛋白甲基化水平变化参与了生物体衰老过程。组蛋白甲基化水平变化可通过调节基因转录来影响衰老过程和一些衰老表型，包括寿命、氧化应激效应及胰岛素信号途径等。同时，关于非组蛋白甲基化的研究也取得了很大的进展，但非组蛋白功能调节主要涉及细胞增殖、分化、凋亡、DNA损伤修复和炎症应答等生理及病理过程，在肿瘤发生、发展中同样具有重要意义。

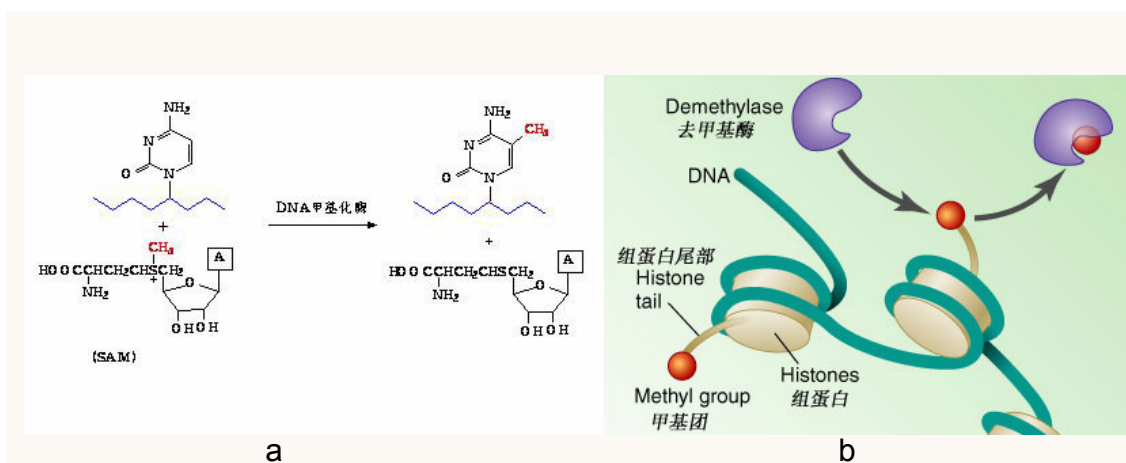


图1. DNA及组蛋白甲基化调控示意图。a. DNA甲基化示意图；b. 组蛋白去甲基化示意图。

图片来源：a: http://blog.sina.com.cn/s/blog_4e6e80a50100qmqv.html；b: <http://s6.sinaimg.cn/origal/61ba4e0en83a5124efe35&690>

3. 对模式生物的衰老研究

在真核生物中，许多衰老相关的生理现象和细胞特性是高度保守的，并且许多对有关衰老的分子机制的理解都源于对各种模式生物——如出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、线虫（*Caenorhabditis elegans*）、果蝇（*Drosophila melanogaster*）、家鼠（*Mus musculus*）——以及哺乳动物组织培养和儿童早衰症的研究。与哺乳动物类似，酵母中也存在复制衰老的现象，即个体的细胞只能经历有限次数的分裂。同样，年龄引起的肌肉衰减症也发生于线虫和果蝇，提示在果蝇中也存在因干细胞耗竭引起衰老的现象。尽管其它和衰老相关的生理现象，如免疫功能下降、慢性炎症和患癌风险的增加未出现在无脊椎模式生物

中，但是与衰老相关的分子途径和功能障碍是高度保守的。随年龄增长而下降的自噬作用首先在酵母中被发现，然后在线虫、果蝇和家鼠中被发现。与在哺乳动物中一致，在酵母、线虫和果蝇中激活应激反应能延长寿命。同样，限制卡路里摄入（卡路里或饮食限制）能延长寿命的现象，最初是在对啮齿类动物的研究中报道的，随后在从酵母到人类的机体中都发现了类似的现象，而相关研究已扩展到线虫上。在线虫体内抑制胰岛素和胰岛素样信号（Insulin/Insulin-like Signaling, IIS）途径能促进长寿，随后的相关研究提示该机制在家鼠和人类中都是保守的。综上，对模式生物，尤其是无脊椎生物模型的研究，是我们了解引起衰老现象的分子途径的知识来源。



资讯 · 频道

www.LifeOmic.com

二、甲基化与衰老研究的进展

1. DNA甲基化与衰老研究的最新进展

随着“表观遗传学漂移”(epigenetic drift)现象(最初在同卵双胞胎中被发现的,DNA甲基化组随着年龄的增长差异越来越大的现象)的发现,表观基因组的概念从最初的一种内在印记,转变成反映年龄变化的一系列动态过程。值得一提的是,DNA甲基化水平与实龄(chronological age)的相关性在长期研究中已被证实,且DNA甲基化水平的改变与各种年龄相关疾病,如代谢病和肿瘤都密切相关,所以目前表观基因组状态与衰老之间的研究引起人们越来越多的兴趣。这方面研究的关键在于能否系统地描述表观基因组的一系列变化,并据此建立稳定的模型,以检测人们的衰老率,最后将不同个体的衰老率与各种临床及环境变量联系起来。

为了更好地了解甲基化谱是如何随年龄变化的,并确定衰老速率能否被定量和比较,Gregory Hannum等人通过对一组年龄跨度很大的人群进行全基因组的甲基化谱研究,构建了一个预测衰老速率的模型。该模型提示衰老速率受到性别和特定遗传变异体的影响。Riccardo E Marioni等人不同人群中检测了实龄和预测年龄(基于甲基化水平)之间的差异是否可以在未来预测总死亡率的问题。Marjolein J. Peters等人鉴定了1497个与实龄表达有差异的基因,并分析了其CpG-甲基化位点特征。这些数据有助于解释“表观遗传学漂浮”现象;提示了在甲基化谱中的衰老相关的变化与转录模式变化之间的关系;提供了评估生物体衰老速率的生物标志。以下将对这些研究的内容分别进行介绍。

1.1 全基因组甲基化模式定量人类衰老率

尽管实龄(chronological age)与DNA甲基化水平变化有关,但是甲基化组(Methylome)尚未被应用于测量和比较人类的衰老率。Hannum等人通过检测来自656人(年龄介于19-101岁)的全血样本中450000个CpG标识,构建了一个定量模型。该模型可测量个体基于甲基化组的衰老率,研究结果显示该衰老率受到性别和基因变异体的影响。该研究还提示不同的衰老率不但有助于解释表观遗传学漂移,还能被体现在转录组中。此外,该模型还强调了衰老过程中的特定影响因子,并提供了定量的数值,以用于研究甲基化水平在衰老相关疾病中的角色。

1.11 大年龄跨度甲基化图谱

Hannum等人检测了年龄介于19-101岁,总数为656人的群体(由426名高加索裔和230名西班牙裔组成)的全血样本。该研究采用Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip assay,检测了485577个CpG标记。为了简化,他们在分析中去除了性染色体上的标记,结果发现70387(约15%)个标记在甲基化和衰老之间存在显著关联。完整的甲基化谱可通过Expression Omnibus(GSE40279)获取。

1.12 衰老甲基化组的预测模型

Hannum等人在上述数据的基础上,运用一种称为“弹性网络”(Elastic Net)的多因素回归分析法结合辅助程序处理构建了衰老的预测模型,并在不同人群中进行了验证。该模型包括各种甲基化和临床因素变量,例如性别和体重指数(body mass index, BMI)。研究

人员在最优化模型中挑选了71个与衰老相关度最高的标记，使预测的年龄与实际年龄相关度达96%，误差3.9岁。几乎所有的标记都位于已知衰老相关基因内部或附近，这些基因包括阿兹海默氏病、肿瘤、组织退化、DNA损伤、氧化应激、肥胖和代谢相关基因等。

1.13 甲基化组的老化速率和关联分析

当确认模型可以准确预测年龄后，就可将其用于鉴别那些检测值偏离预期的个体。利用这个模型可以得出外观甲基化衰老率（**apparent methylomic aging rate, AMAR**），即基于甲基化数据得出的预测年龄与实龄的比值。检测AMAR值和临床因子（包括性别与BMI）的相关性发现，性别而非BMI对AMAR值有显著的影响，在年龄分布相似的情况下，男性的甲基化谱的衰老速度要比女性快约4%。同样，在确认群体中的研究也再次证实男性的衰老速率较高，但BMI值的影响尚不确定。

为了检测并区分带有不同基因变异体的个体的衰老速率，Hannum等人获取了252例个体的全外显子序列。经过序列加工和质控，他们共得到10694个常见的单核苷酸变异体。Hannum等人确定这些变异体本身和衰老过程并不存在明显的相关性，在整个生命过程中是相对稳定的；其次，可望从中发现对衰老相关的分子标记的甲基化水平进行调控的变异体，即甲基化定量特征位点（**methylation quantitative-trait loci, meQTL**）。通过检测这些变异体与衰老相关的甲基化生物标记之间的相关性，Hannum等人共得到303个meQTL。分析结果显示，这些meQTL对衰老甲基化谱有广泛的影响，有可能成为未来衰老相关疾病和长寿研究的对象。

1.14 多组织诊断

由于该模型是基于来自全血标本的数据，为检测是否适用于其它组织，Hannum等人还检测了不同组织来源的组织标本。结果显示来

自每种组织的AMAR值同样支持男性衰老速率高于女性这一结论，说明从血液样本中计算的AMAR值反映的是人体各个组织的共同趋势。

1.15 衰老率和转录组

由于甲基化水平变化直接关系到基因表达水平的变化，为研究衰老相关甲基化组的变化是否对应转录组的功能水平变化，并体现不同的衰老速率，Hannum等人分析了来自488个血标本的基因表达谱，结果发现具有衰老相关表达谱的基因倾向于在附近拥有衰老相关的甲基化标志。这个结果提示衰老相关的甲基化谱的变化与基因表达模式引起的功能改变相关。

1.2 外周血DNA甲基化年龄预测总死亡率

Marioni等人在4组老年群体中检测了实龄和预测年龄（基于甲基化水平）之间的差异是否可以在未来预测总死亡率。该研究具体是通过将甲基化年龄与实龄相减得出年龄差（ Δage ）。在经过年龄和性别校正后，他们发现 Δage 大于5年的个体在未来的总死亡率会增高21%。在排除了童年智商、教育水平、社会地位、高血压、饮食习惯、心脏病和APOE e4状态因素后，在 Δage 大于5年的个体中仍有高出16%的总死亡率。进行遗传学分析后，Marioni等人还发现甲基化年龄与实龄的差值（ Δage ）是可遗传的。得出结论为基于甲基化检测的衰老程度具有可遗传的特点，并且是个独立于健康水平、生活习惯和已知遗传因子的因素。

1.21 甲基化年龄和实龄的差异（ Δage ）可作为生物标志预测死亡率

基于最近的两项通过检查人类基因组中多处CpG位点预测年龄的研究——Hannum等人通过检测全血中DNA甲基化水平预测年龄，及Steve Horvath等人利用多种组织的DNA甲基化水平数据预测年龄（并发现基于甲基化水平预测的年龄和实龄的差异与一些衰老相关的疾病和死亡率相关）的研究，衰老相关

的DNA甲基化水平变化已在多项研究中被证实。Marioni等人在4组人群(表1)中采用了两种DNA甲基化水平检测方法，以检测甲基化年龄与实足年龄的差异与总体死亡率的关系。

表 1 4组分析人群（LBC1921、LBC1936、FHS和NAS）的基本信息

	LBC1921	LBC1936	FHS	NAS
人数	446	920	2635	657
死亡人数	292	106	238	226
死亡时间（岁）	7.2 (3.5)	4.4 (2.2)	6.0 (1.2)	10.5 (3.3)
年龄（岁）	79.1 (0.6)	69.5 (0.8)	66.3 (8.9)	72.9 (6.9)
性别（男）	176 (40%)	465 (51%)	1200 (46%)	657 (100%)
Hannum 甲基化年龄（岁）	85.0 (5.6)	75.8 (5.0)	68.2 (8.7)	77.6 (6.7)
Hannum Δage（岁）	5.9 (5.6)	6.2 (5.1)	1.9 (4.8)	4.6 (4.8)
Hannum 中间误差（岁）	5.5	6.4	1.9	4.6
Horvath 甲基化年龄（岁）	73.7 (6.2)	66.0 (5.8)	65.7 (8.3)	73.5 (7.4)
Horvath Δage（岁）	-5.4 (6.3)	-3.6 (5.8)	-0.6 (5.2)	0.6 (5.8)
Horvath 中间误差（岁）	6.0	4.7	0.69	3.4
样本组织	全血	全血	全血	血沉棕黄色层
甲基化阵列	Illumina 450 k	Illumina 450 k	Illumina 450 k	Illumina 450 k

FHS（Framingham Heart Study）：弗雷明翰心脏研究；LBC（Lothian Birth Cohort）：洛锡安出生组；NAS（Normative Aging Study）：规范衰老研究。

表格来源：Riccardo E Marioni *et al.* (2015) DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biology*, 16:25 DOI 10.1186/s13059-015-0584-6.

采用Hannum等人的预测方法在4组人群中得到的预测值比参与者的实龄平均高2-6岁，标准差约5岁。采用Horvath等人的方法在LBC1921和LBC1936两组人群中的预测年龄比实龄要低4-5岁，标准差约为6岁；但在另外两组人群FHS（Framingham Heart Study）和NAS（Normative Aging Study）中则非常接近——在FHS人群中，预测年龄小于实龄0.60岁，标准差5.2岁；在NAS人群中预测年龄大于实龄0.6岁，标准差5.8岁。

结果显示甲基化年龄的增高可预测死亡率。Marioni等人通过对4组人群进行元分析，在校正了实龄与性别因素后，发现大于5的年龄差Hannum Δ age与增高21%的死亡风险相关，Horvath Δ age的对应死亡风险为11%。Kaplan-Meier生存曲线图（图2）展示了在LBC1921组（4组人群中死亡例数最高的组）中Horvath和Hannum Δ age高死亡率对应高年龄差。

1.22 甲基化年龄预测值与白细胞数的关系

由于不同类型的血细胞拥有独特的甲基化模式，所以研究者还通过调整5种白细胞（嗜碱粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞和中性粒细胞）的数量进行敏感性分析，以降低结果的偏差。此外，他们还发现幼稚型T细胞数与Hannum预测值存在相关性，但在去除了CD8阳性的幼稚型T细胞影响后，与Horvath预测值的数据就接近了。结果提示，Hannum预测值与幼稚型T细胞的增龄性减少相关，这与Hannum预测值是基于全血样本，且幼稚型T细胞由于胸腺退化而呈增龄性减少的情况一致。而T细胞数与Horvath预测值的关联相对较弱，这也可能反映了后者是基于对不同来源的组织和细胞样本的检测。

1.23 甲基化年龄预测与人口学及风险因子的关系

为提高预测的准确性，研究者进行了人口

学变量和风险因子的调整，以期通过敏感性分析控制一些可能存在的干扰变量，如性别、吸烟等。结果发现除了女性的 Δage 比男性显著偏低之外，Hannum Δage 与童年智商及社会地位均有一定的相关性，但在 Horvath Δage 中不存在这种关系。

1.24 甲基化年龄的遗传性

为检测甲基化年龄差的遗传性，研究者对布里斯班系统遗传研究（Brisbane Systems Genetic Study, BSGS）群体——一个包含青少年双胞胎（含同卵和异卵双胞胎）及其兄弟姐妹和父母的人群数据进行分析。结果发现 Horvath 和 Hannum 使用的方法所得的 Δage

遗传可能性分别为 0.43（SE 0.07, $P=9 \times 10^{-13}$ ）和 0.42（SE 0.07, $P = 4 \times 10^{-10}$ ），即大约有 40% 的个体差异来源于遗传因子。

这项研究的优越之处是采用了两套独立的表观遗传学生物标记，在 4 组人群中计算甲基化年龄与实龄的差异，从而发现在不同的人群中该差异都与死亡率的增加相关，并且是可遗传的。这两组数据的相似性提示，甲基化年龄与实龄的差值是评估生物体衰老速率的一个可信的生物标志，而且独立于已知的关于衰老和死亡的其它预测因素，如 APOE 的 e4 位点、教育、儿童期智商、社会地位、糖尿病、高血压以及心脏病等。

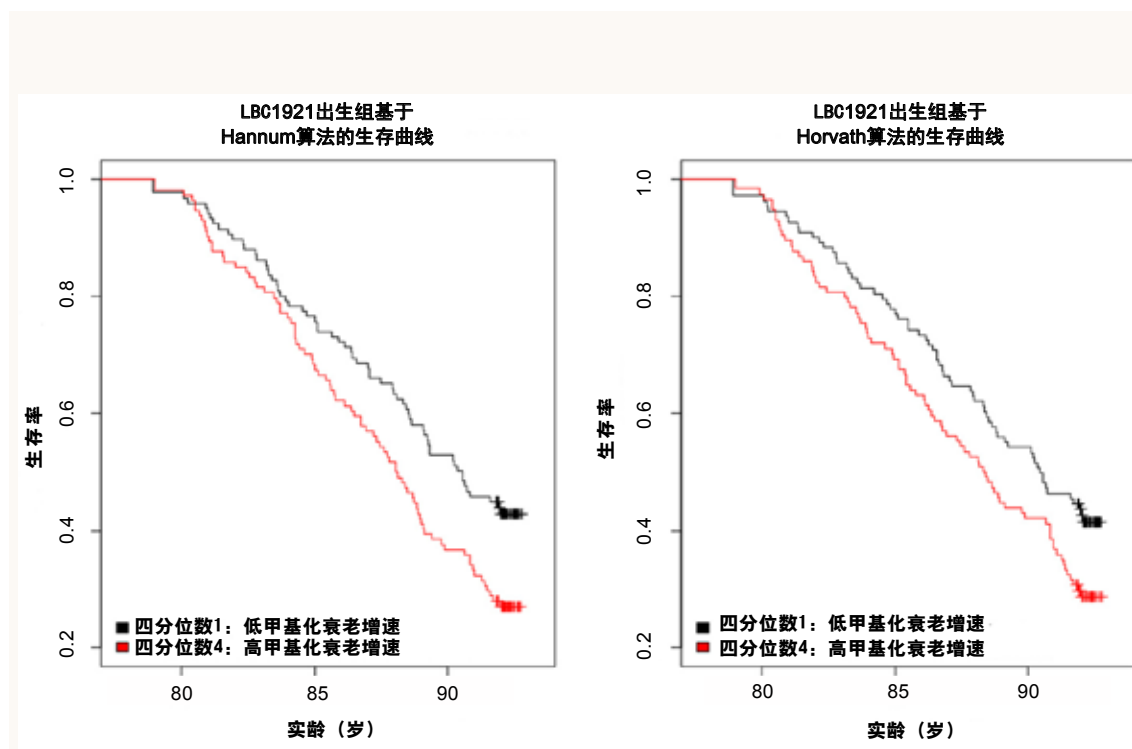


图2. LBC1921人群中生存率分析（基于经性别和实龄校正的 Δage 四分位数）。

图片来源: Riccardo E Marioni *et al.* (2015) DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biology*, 16:25 DOI 10.1186/s13059-015-0584-6.

1.3 外周血中年龄相关转录调节一览

为了对衰老相关的分子事件增加疾病易感性的机制进行研究，Peters等人通过对14983例欧洲人的全血标本进行元分析（meta-analysis），鉴定了1497个表达与实龄（chronological age）相关的基因。分析结果显示，相对其它基因而言，这些基因并不含有更多衰老相关的CpG-甲基化位点。但意外的是，研究人员在一些与实龄和基因表达水平相关的增强子和绝缘子区域发现了丰富的CpG-甲基化位点，这些位点很有可能是功能性的。Peters等人通过基因表达图谱计算出每个人的“转录年龄”，提出“转录年龄”与实龄之间的差异与一些衰老相关的生物学特性，如血压、胆固醇水平、空腹血糖和体重指标相关。这款增加了生物相关性，并补充完善了现存表观遗传学预测模型的转录组预测模型也可用于计算其他人群的“转录年龄”。

1.3.1 随着年龄增长表达发生变化的1497个基因

Peters等人首先对7074例来自欧洲人的血样进行分析，筛选出两千多个表达与实龄相关的基因，再在另外7909例欧洲人的血样中进行验证分析，结果发现有897个基因的表达与实龄呈负相关，600个基因则成正相关——共1497个基因随年龄增长改变表达。

为检测这些衰老相关基因在不同人群、不同组织中的普遍适用性，Peters等人又检测了来自不同人群、不同组织的标本（包括脑组织和特殊类型的血细胞样本），结果发现在美国本土人群中，这1497个基因中有95%显著表达，这些显著表达的基因中有71%（1,005）的表达与实龄相关；在西班牙裔美国人中，这1497个基因中40%的基因显著表达，在显著表达的这些基因中有74%的基因表达随实龄发生趋势一致的变化；在非洲裔美国人的标本中，这1497个基因中99%的基因显著表达，其中27%的基因表达随实龄发生趋势一致的变化。在对两种脑组织样本（394例）的检测中发

现，1497个基因中约有58%的基因显著表达，其中小脑组织内约19%的基因表达随实龄发生趋势一致的变化，在额皮质标本中这个比例为26%。在与实龄相关度最高的基因中，有3个（*SERPINE2*、*LDHB*和*BZW2*）在所有组织中的表达都与实龄相关。

1.3.2 与衰老相关的候选基因之间的关联分析

为了研究上述与实龄相关的基因和以往研究中鉴定的衰老相关的候选基因之间的交集，Peters等人将170个衰老相关候选基因进行全血标本元分析，结果发现其中33个和实龄有显著相关性，这些候选基因包括mTOR/FOXO通路成员（*FOXO1*、*VEGFB*、*EIF4G3*、*SREBF1*、*STAT3*和*RPS6KB1*）、DNA修复基因（*ATM*），以及多种群候选基因（*LDHB*、*IGJ*、*IRF8*和*FCGR1A*）等，其中28个衰老相关候选基因表达趋势通过CHARGE元分析得出的结果，与以往研究的报道是一致的。

早衰症基因 *ATM*（*ataxia-telangiectasia*）、*DKC*（*dyskeratosis congenita*）和*WRN*（*werner syndrome*）在年长个体中都表现出低转录丰度，这与疾病相关突变导致功能缺失的情形一致。基因共表达分析结果显示，这些基因与那些编码核酸代谢相关蛋白、DNA修复以及嘌呤/嘧啶代谢相关蛋白的基因可归为一类。而Hutchinson-Gilford儿童早衰症基因*LMNA*在年长个体中表现出高mRNA水平，这个现象与早先在肌肉中的研究发现一致，该基因与肌动蛋白重构基因可归为一类。

1.3.3 衰老相关位点甲基化模式的研究

由于甲基化水平与衰老之间存在联系，所以Peters等人研究了这1497个衰老相关基因的表达是否存在衰老相关的甲基化现象。他们在来自7组人群，共3073例全血标本或外周血单个核细胞（PBMC）标本中检测这些基因上下游250kb范围内的135230个CpG位点（选择

250kb附近的CpG是基于以往的研究报道，即甲基化作用可以在这个距离调节基因表达）。结果他们在31331个CpG位点观察到甲基化与实龄之间存在显著联系，并且还在12280个CpG位点检测到甲基化和基因表达之间存在显著关系。在这1497个衰老相关基因中，共发现1248个基因（83%）存在一个以上的显著调节CpG位点（数量范围在1-154之间）。

与1497个随机挑选的基因相比，衰老相关基因拥有与实龄相关的CpG甲基化位点的数量稍高，同时它们拥有的与表达相关的CpG甲基化位点数量却显著增多，这种甲基化模式在所有组群中都是一致的，而且特殊生物学特

征的位点，如增强子、启动子和CpG岛等也存在这种模式。这个现象与以下设想一致：尽管存在许多与实龄相关的甲基化位点，但只有那些拥有调节潜能的甲基化位点才能真正引起实龄相关基因的转录表达发生变化。

通过检测和比较基于转录组学分析和基于表观遗传组学分析的衰老预测，研究人员发现这两者在许多表型上都显著相关，但关联模式却不相同。这提示两者背后的生物学机制是不同的。因此将两者结合可能会获得更准确的结果。所有鉴定的基因及相关途径都将为后续的研究提供丰富有用的参考。

2. 组蛋白甲基化与衰老研究进展

2.1 染色质和衰老

在许多生物体中染色质结构随着年龄增加发生变化，在酵母中，一些染色质结构的改变确实会引起年龄相关表型变化。通常认为，染色质在衰老过程中的构造更趋于具有转录活性。染色质状态影响衰老过程的另一个途径是诱导多潜能干细胞（**pluripotent stem cell**, **iPS cell**）。通过多潜能性诱导，终末分化的成人细胞也可以具有胚胎干细胞的特征，这种“返老还童”伴随着、且依赖于核染色质结构的改变。由此，染色质结构的改变有可能影响了衰老表型。

在此，着重介绍真核生物中组蛋白甲基化对衰老过程的影响。许多工作揭示了老年生物体和年轻生物体之间总体的甲基化水平或甲基化模式的改变，提示组蛋白甲基化调节异常可能是导致衰老的一个原因。也有部分工作提示了组蛋白甲基化在一些已知和衰老相关的细胞通路中的作用。综合这些工作，可以为我们提示组蛋白甲基化影响衰老的病理过程的部分机制。

2.2 在衰老生物体中组蛋白甲基化水平的变化

2.2.1 在衰老生物体中组蛋白总体水平的变化

许多研究揭示了动物体内存在衰老相关的组蛋白甲基化水平变化，例如在Hutchinson-Gilford早衰症患者的培养细胞中，存在组蛋白H4的20位赖氨酸三甲基（H4K20me3）升高的现象以及H3K9me3的下调。尽管来自不同的研究或采用不同的方法时，会得到一些有冲突的数据，但组蛋白甲基化水平变化与衰老的相关性仍十分显著，并且在真核基因组中，存在着随年龄增长“活化型”组蛋白标记（H3K4me2/3和 H3K36me3）增加，而“抑制型”标记（H3K27me3和H3K9me2/3）减少，从而引起转录活性增加的现象。这与之前的研究发现，即在衰老细胞及生物体中，染色质拥有更松散（**open**）的结构一致。在衰老个体中，染色质的这种结构有可能促进一些具有抗衰老功能的基因转录，同时也可能带来一些负面影响。

2.2.2 组蛋白甲基化调节衰老的直接证据

对模式生物的研究提示组蛋白甲基化在衰老过程中也可起到驱动作用。例如在线虫中，组蛋白甲基化水平改变启动了源于RNAi屏蔽作用的衰老过程。已鉴定的可能调节了线虫寿命的相关因子包括组氨酸甲基转移酶ASH-2、SET-9、SET-15和SET-26，以及脱甲基酶MES-2、JMJD-2、LSD-1和UTX-1。研究还发现在线虫中高水平的H3K4三甲基降低了预期寿命；在多种模式生物及哺乳动物中抑制H3K27me3修饰也可调节寿命。

2.23 组蛋白甲基化参与了调节衰老和预期寿命的通路

尽管这方面的研究不多，但还是积累了一些证据表明真核动物中组蛋白甲基化可作用于一些已知的影响衰老过程的途径。多数这方面的工作集中于组蛋白甲基化是如何影响同类过程的，不过最近的研究表明压力相关的组蛋白甲基化水平改变影响了寿命和衰老表型。由此可知，对应激反应途径和组蛋白甲基化之间的交叉调节可以加深我们对衰老过程的理解。

2.24 自噬作用

在衰老过程中自噬作用的效率降低，在人类细胞中，启动细胞膜融合并形成自噬体的蛋白LCB3、DOR和WIPI1的表达水平受到组蛋白甲基化水平的调节。因此衰老相关的组蛋白甲基化模式有可能通过调节细胞途径必须的蛋白的基因转录来影响衰老过程。

2.25 DNA损伤应答

在机体衰老过程中DNA损伤会不断积累。一方面，随年龄增长细胞修复功能不断减弱会导致DNA损伤；另一方面，持续激活DNA损伤应答（DNA damage response, DDR）途径也会引起衰老相关的病理变化。

在哺乳动物细胞和酵母中，53BP1能帮助激活DNA损伤修复途径。而在人类细胞和酵母中，H3K79me2或H4K20me2对于53BP1的募集是必须的。在哺乳动物细胞和酵母中，H3K79me2受到甲基转移酶DOT1L（在酵母中为Dot1）的调节，该酶对双链DNA断裂的修复是必需的。因此H3K79和H4K20的甲基化对启动DNA损伤应答起关键作用。综上，当甲基转移酶活性发生改变，调节了包括H3K79me2在内的这些标记时，就可能引起DNA损伤应答下降，并加速衰老过程。

2.26 环境压力应答

细胞在生命周期中需要应对各种内源和外源压力，而且由于许多压力随着年龄增长而增加，年老个体中的压力应答途径也趋向于激活，而激活的压力应答途径有助于延长寿命。毒物兴奋效应——低剂量致毒因素对生物体有益（包括延长寿命和提高对高剂量致毒因素的耐受性），这很有可能将表观遗传学的变化当作细胞记忆的一种形式。最近在酵母中的研究表明，组蛋白甲基化水平的改变对压力应答起到关键作用，该作用可同时通过急性应激反应和毒物兴奋效应两种途径发挥作用。因此调节压力应答相关基因有可能是组蛋白影响衰老过程的重要机制。

2.27 哺乳动物中的细胞衰老

在哺乳动物中，组蛋白甲基化可通过调节细胞周期以及与衰老相关的分泌表型（the senescence-associated secretory phenotype, SASP）来影响衰老过程。这些调节作用包括：细胞周期的转录调控、在衰老细胞中H3K4me3和H3K27me3的重新分配，以及由DNA损伤引起的组蛋白甲基化改变可调节SASP等。

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

三、引起衰老过程中甲基化水平异常变化的各种因素

导致甲基化谱随衰老过程改变的原因目前尚未完全阐明，已有研究表明这至少与两个潜在因素相关。第一个因素是环境暴露激活某些细胞程序，从而引起或伴随甲基化谱变化。第二个因素是自发的表观遗传学变化在年长个体中导致了不可预测的种种表观基因组差

异。所谓自发的变化有可能是由于化学品损伤了DNA甲基基团，或DNA复制过程中在拷贝DNA甲基状态时发生了错误。这两种机制都能导致衰老个体中甲基化谱的差异，这也提示定量检测甲基化谱的状态可能可以鉴定出延缓或促进衰老过程的相关因子。

1. 衰老过程中与甲基化水平相关的各种生理变化

衰老过程与大量损害健康和机体功能的生理效应相关。在人类和其它哺乳动物中，这些效应包括免疫功能减弱、对疾病的易感性增加、慢性炎症、肌肉衰减症、肿瘤发生率增加，以及与年龄相关的各种退行性疾病，如阿兹海默症和亨廷顿舞蹈症等。尽管这些疾病都表现为全身性或器官性病变，但其归根结底还是由细胞功能改变引起的。大量研究发现并鉴定了甲基化水平改变和许多影响衰老进程的分子途径有关。这些途径主要包括随着年龄增长而下降的细胞自噬作用、线粒体（氧化磷酸化）效应、蛋白酶体功能等，以及随着年龄增长而不断上升的DNA损伤过程。其中线粒体效应下降导致代谢过程中产生的活性氧簇（reactive oxygen species, ROS）浓度升高，造成包括DNA在内的大分子损伤；ROS同时可作为第二信使，异位激活信号通路。这两种途径均被认为在促进衰老的病理过程中发挥了作用。除了ROS累积引起的大分子损伤外，通过蛋白酶体或巨噬作用处理受损大分子或不溶蛋白的周转过程也被降低了。此外，由蛋白酶体功能和巨噬作用下降低的蛋白聚集体的累积对阿兹海默症和亨廷顿舞蹈症的病理过程有促进作用。ROS和损伤大分子的增加是细胞压力的重要来源，而众所周知激活压力

反应途径可以延长寿命、延缓衰老过程。

DNA损伤的错误修复是突变的一个来源，基因组突变的积累可引起癌症，而且相对年轻细胞，老化的细胞积累了更多的DNA损伤和突变。经历了分裂失调，并破坏了机体生理功能的肿瘤细胞彻底破坏了细胞的衰老过程，并走向了衰老的反面。在细胞衰老的过程中，肿瘤抑制基因被激活，并不可逆地终止了细胞周期。当机体老去，衰老细胞的数量随之增加；同时，干细胞功能下降，引起组织退化。干细胞功能下降的原因是衰老机体内干细胞的总数减少，以及干细胞多向分化能力的下降。复杂的衰老表型就是这样在衰老过程中由一系列与细胞功能相关的生理过程的变化引起的。

而现有的研究表明，这些过程通过各种相关途径与DNA及组蛋白甲基化水平的改变发生了千丝万缕的关系。

包括DNA甲基化在内的转录水平调节异常影响了正常基因表达是另一种重要的衰老相关的分子现象，这在多种生物体内都能检测到。但究竟是这类调节异常导致了衰老相关的病理现象，还是它本身只是衰老过程的必然结果，尚待进一步研究确认。

2. 衰老过程中与甲基化水平相关的基因及通路

Peters等人通过元分析方法鉴定了1497个衰老相关基因，并检测了其中衰老相关的甲基化水平变化，从而为后续衰老相关甲基化水平及相关基因通路研究提供了有价值的参考和深入研究的对象。对这些基因进行聚类分析后，Peters等人在与衰老过程负相关的基因群里得到三个主要类群（图3a）。最大的群（Cluster 1）包括1109个基因，可分为3个亚群：（Cluster 1a）RNA代谢功能、核糖体生物合成和嘌呤代谢相关基因；（Cluster 1b）多种线粒体及代谢途径相关基因，包括10种线粒体核糖体蛋白（mitochondrial ribosomal protein, MRP）基因，这与早先在家鼠、线虫和果蝇的衰老研究中的发现一致；（Cluster 1c）DNA复制、延伸、修补以及错配修复基因。第二个衰老负相关基因群（Cluster 2）包含12个基因，其中有11个编码细胞质核糖体亚单位，另一个为NACA，它是新生多肽结合复合物的alpha亚单位。引人注目的是，许多编码核糖体亚单位和线粒体核糖体蛋白基因的mRNA丰度与实龄存在显著的相关性：34个核糖体基因存在这种显著相关性，其中33个的

表达与实龄负相关；10个MRP基因表达与实龄负相关。第三个基因群（Cluster 3）由57个基因组成，包含各种免疫相关因子，如T细胞和B细胞信号传导基因，及造血功能相关基因。

与衰老进程正相关基因可分4个大群（图3b）：第一个基因群（Cluster 1）包含77个基因，包括与天然免疫和获得性免疫相关基因、细胞因子和趋化因子信号相关基因。第二个群（Cluster 2）含9个基因，它们与细胞骨架、粘附和紧密连接相关。第三个群（Cluster 3）含8个基因，涉及脂肪酸代谢和过氧化物酶体。第四个群（Cluster 4）含6个基因，涉及细胞溶酶体代谢和粘多糖降解。

Peters等人在来自两种脑组织的标本中检测上述基因的表达，结果发现在小脑组织表达的基因中，与上述衰老相关基因重叠性最好的是衰老正相关的第4个基因群（Cluster 4）的细胞溶酶体代谢和粘多糖降解相关基因。在额皮质组织中，重叠性最佳的是衰老正相关基因群2（Cluster 2）的细胞骨架、粘附和紧密连接相关基因。

3. 衰老过程相关甲基化水平的改变与已知衰老相关风险因子的关系

Marioni等人对已知风险因子进行计算后，报告了一种可预测死亡率的表现遗传学生物标志物。与之相关的个体遗传学背景或环境影响因子虽不明确，但至少与已知经典的生存风险因子没有明显联系。利用DNA甲基化年龄和实龄之间的差异，我们可以在吸烟、教育、童年智商、社会地位、APOE基因型、心血管疾病、高血压和糖尿病这些风险因子之外

预测死亡风险。我们似乎可以将DNA甲基化年龄视为一种“表现遗传学生物钟”，这个生物钟能反映机体的生物年龄，还可以显示该生物年龄与实龄之间的差异，从而提示预期寿命。研究表明，表现遗传学生物标志物，如基因甲基化水平，与其它复杂的生物性状类似，都受到了遗传和环境因素的共同影响，并与健康后果密切相关。

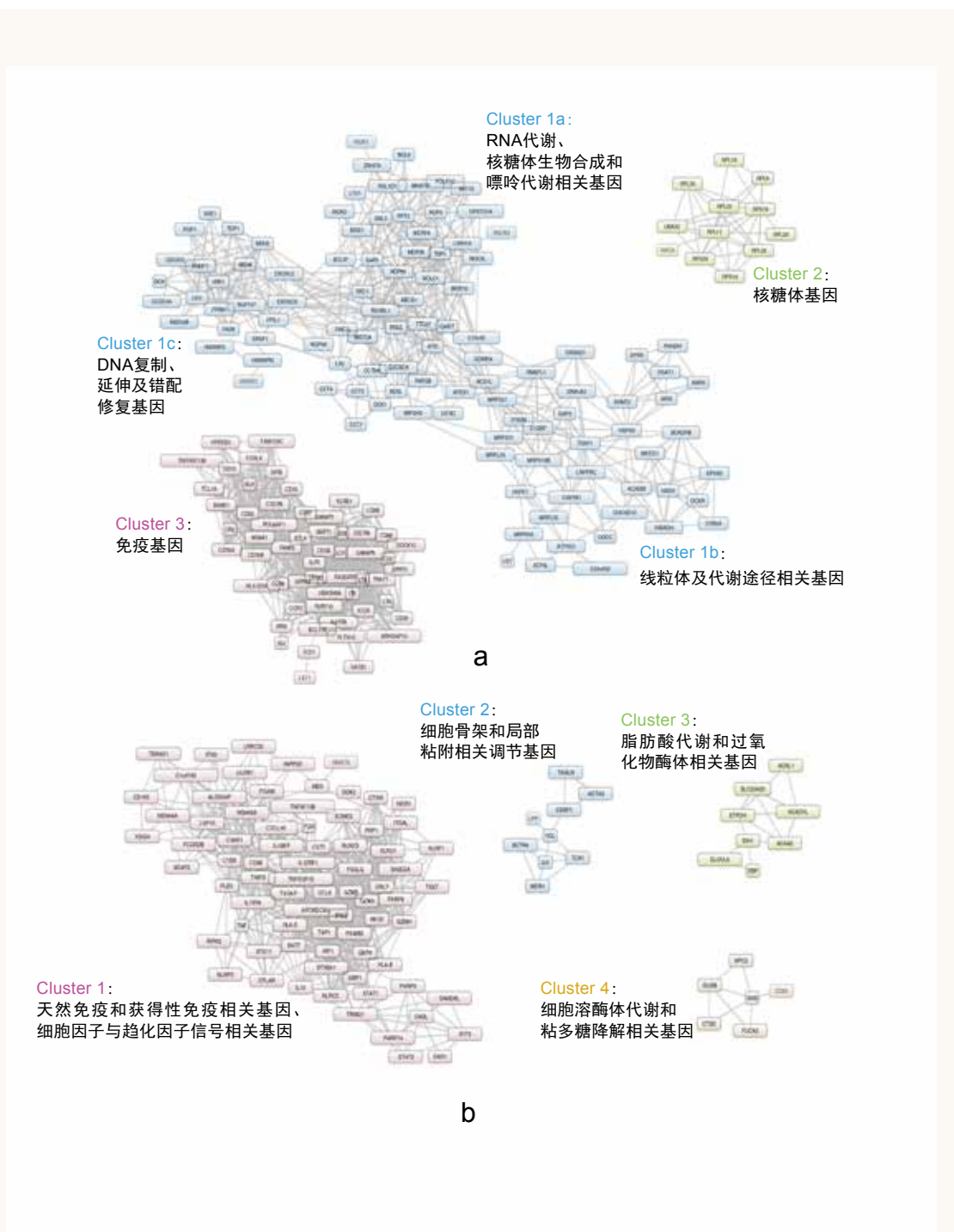


图3. 1479个衰老相关基因聚类分析结果。a, 与衰老过程负相关的3个基因群；b, 与衰老过程正相关的4个基因群

图片来源: Marjolein J. Peters *et al.* (2015) The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. *Nat Commun*, 6:8570. doi: 10.1038/ncomms9570.

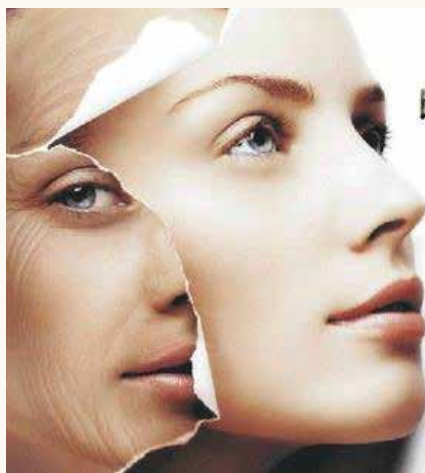
四、衰老与甲基化水平关系研究的应用前景及未来发展方向

借助分子水平检测衰老的方法在很多领域，包括疾病的预防和治疗、取证、延长寿命等都有着非常实际的意义。研究人员目前为衰老过程中甲基化水平变化的研究提供了一种检测机体衰老速率的有效的生物标记，尤其是利用血标本预测衰老成为可能，从而为开启更广泛的纵向研究提供了便利。而且，随着模型的完善和成本的下降，这项技术将拥有非常广阔的应用前景，可用于健康评估、疾病预防、法医鉴定等各个方面。利用这类模型可以对大量环境或生物因子，包括吸烟、酒精摄入、饮食习惯等对健康和寿命的影响进行定量评估。该模型也可用于定期评估个体衰老速率，以检测饮食或环境因子对衰老过程及衰老相关疾病的影响。我们甚至可以想象在未来的诊断和治疗中，基于分子档案的生理年龄会取代患者的实龄，从而为患者的状况提供更精确的描述信息。

虽然组蛋白甲基化在调节寿命和衰老表型中的研究才刚刚开始，但已有足够的证据表明，在衰老过程中组蛋白甲基化整体水平发生了变化，乃至在全基因组范围内特定的甲基化组蛋白出现了重新分布现象。有丰富的证据表明组蛋白甲基化通过转录调控影响长寿和衰老表型相关通路。而且在对无脊椎动物模型的研究中也发现特定组蛋白脱甲基酶和甲基转移酶的缺失能够促进长寿。因此这是一个有望应用于延缓衰老或逆转衰老相关生理变化的非常有潜力的作用靶点。鉴于组蛋白甲基化具有可逆性，所以我们可以调整相关酶的活性来改变组蛋白甲基化模式，从而有可能将老年人的染色质状态恢复到年轻状态，并且在理论上至少可以阻断一部分受染色质状态控制的衰老相关分子路径，如IIS和SASP等。目前研究人员已鉴定了大量组蛋白脱乙酰酶类（histone

deacetylases, HDACi）的小分子抑制剂，部分小分子抑制剂被证实有在肿瘤疗法中有实效。由此可见，染色质修饰酶的活性或许可以作为一种有效对抗衰老和其它由表观遗传学失调引起的疾病的方式。而且最近的研究进展也表明组蛋白脱甲基酶和甲基转移酶的小分子抑制剂可用于抑制特定酶的活性，并且没有明显的细胞毒性。随着越来越多的组蛋白脱甲基酶和甲基转移酶抑制剂被发现，以及组蛋白甲基化影响衰老过程机制的阐明，我们有望开发出新的治疗方式，以延缓或阻止衰老相关的各种病理过程，实现一定意义上的重返青春（图4）。

随着研究的进展，目前亟待阐明的问题包括：1）鉴定和验证在衰老过程中受到DNA甲基化/蛋白质甲基化水平影响的位点及途径；2）甲基化水平变化是否以及如何影响寿命和衰老表型；3）组蛋白甲基转移酶和脱甲基酶的表达水平、活性，以及在染色体上的分布变化是如何改变组蛋白甲基化水平的，驱动该进程的因素为何等。



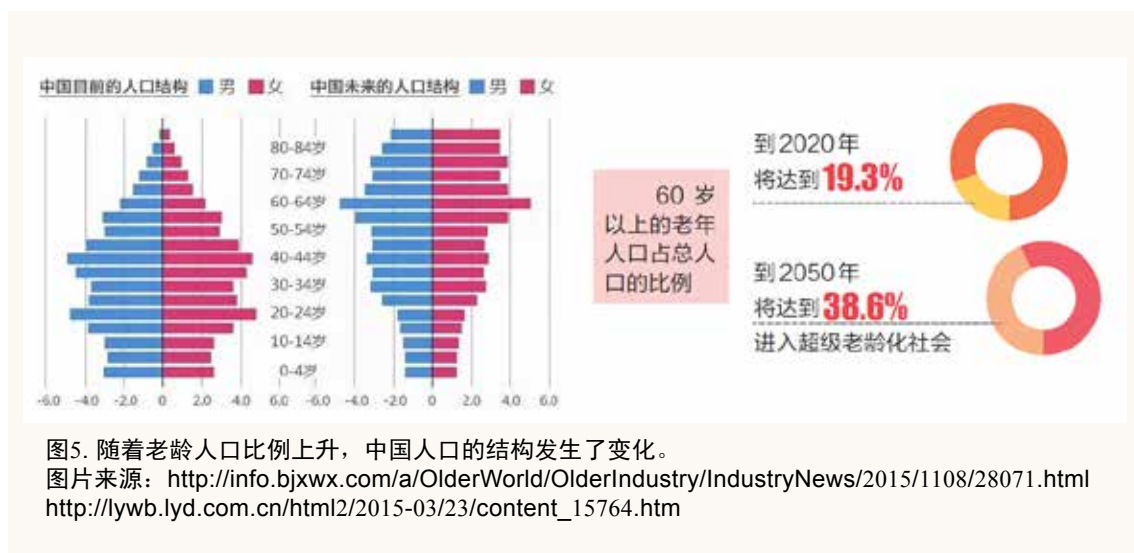
图片来源：http://d06.res.meilishuo.net/pic/_o/7f/fc/f0213375a679b8c47b795edbb421_283_309.c1.jpg

五、结语

十八届五中全会明确提出“全面实施一对夫妇可生育两个孩子政策”，这是对中国社会已经步入老龄化现状的最好的诠释。目前老龄人口不断增加、人口结构已发生根本性变化（图5），一系列健康及养老问题已呈现在所有人的面前，不容回避。从现在起，各种衰老相关的机制和应用研究必将受到更多的关注，各种服务于老年人群的策略和措施将越来越受到重视。生老病死固然是自然规律，但其过程中充满了各种影响因素。面对生命的神奇和脆弱，如何理解其中的规律，选择合适的生活方

式，将是生命科学研究的目标之一。

本专题主要介绍在衰老过程中DNA及蛋白质甲基化水平的变化，及其可能影响衰老过程的机制，具体包括利用DNA甲基化水平变化预测衰老及死亡率、衰老过程中甲基化水平的动态变化、甲基化水平改变通过何种途径影响细胞功能，以及甲基化水平调节对衰老过程有哪些重要的影响。希望通过梳理未来的研究方向和可能的应用前景，为相关领域的研究人员提供一些参考，以促进交流。



原文检索：

- Gregory Hannum *et al.* (2013) Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Molecular Cell*, 49(2): 359–367.
- Riccardo E Marioni *et al.* (2015) DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biology*, 16:25 DOI 10.1186/s13059-015-0584-6.
- Johnathan R. Whetstone. (2014) Methylation: A multifaceted modification — Looking at transcription and beyond. *Biochim Biophys Acta*, 1839(12):1351–1352.
- Marjolein J. Peters *et al.* (2015) The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. *Nat Commun*, 6:8570. doi: 10.1038/ncomms9570.
- Brenna S. McCauley *et al.* (2014) Histone methylation and aging: Lessons learned from model systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839(12):1454–1462.

荧光素酶检测试剂盒系列产品

买 送

购买任意一个试剂盒，可挑选任意一个与之搭配的载体。

活动时间：2015 年 12 月 20 日 - 2016 年 1 月 20 日

Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0 全新升级版！

Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0 (双荧光素酶检测试剂盒 2.0) 具有更高的稳定性和使用灵活性，可搭配使用 96 孔板，方便、高效检测萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferases, FLuc) 和海肾荧光素酶活性 (Renilla luciferases, RLuc)。

货号	产品名称	描述	价格 (¥)
LPFR-P010	Luc-Pair Duo-Luciferase Assay Kits 2.0 (100 次反应)	方便、高效检测萤火虫 (FLuc) 和海肾荧光素酶活性 (RLuc)，可与 GeneCopoeia 3' UTR 表达克隆配套使用，测量 miRNA 对靶基因的抑制效率。	1,190
LPFR-P030	Luc-Pair Duo-Luciferase Assay Kits 2.0 (300 次反应)		3,000

注：该试剂盒与 Promega 的荧光素酶载体相兼容。

萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase) 报告载体

货号	载体	启动子	报告基因	示踪基因	筛选标记	抗性	载体类型
ZX001	pEZX-FR01	N/A*	Firefly luciferase (hLuc)	Renilla luciferase (RLuc)	Puromycin	Kan	Non-viral
ZX002	pEZX-FR02	SV40	Firefly luciferase (hLuc)	Renilla luciferase (RLuc)	N/A*	Amp	Non-viral
ZX003	pEZX-FR03	miniCMV	Firefly luciferase (hLuc)	Renilla luciferase (RLuc)	Puromycin	Kan	Non-viral

Secrete-Pair™ Dual Luminescence & Gaussia Luciferase Assay Kits

GeneCopoeia 公司提供的 Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit 和 Secrete Pair Gaussia Luciferase Assay Kit 具有可活细胞分析、使用灵活、实时研究、双报告系统检测和高通量兼容等特点。

货号	产品名称	描述	价格(¥)
SPDA-D010	Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit (100 次反应)	检测 Gaussia 荧光素酶 (GLuc) 和分泌型碱性磷酸酶活性, 可与 GLuc-ON™ 启动子报告克隆和 miTarget™ miRNA 3' UTR 靶标克隆配套使用。	1,110
SPDA-D030	Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit (300 次反应)		3,100
SPGA-G010	Secrete-Pair Gaussia Luciferase Assay Kit (100 次反应)	检测 Gaussia 荧光素酶 (GLuc) 活性, 可与 GLuc-ON™ 启动子报告克隆配套使用。	620

Gaussia luciferase(GLuc) 报告载体

货号	载体	启动子	报告基因	示踪基因	筛选标记	抗性	载体类型
ZX101	pEZX-GN01	N/A*	Gluc	N/A*	Puromycin	Kan	Non-viral
ZX102	pEZX-GN03	miniCMV	Gluc	N/A*	Puromycin	Kan	Non-viral
ZX103	pEZX-GA01	N/A*	Gluc	Secreted alkaline phosphatase (SEAP)	Puromycin	Kan	Non-viral
ZX104	pEZX-GA02	SV40	Gluc	Secreted alkaline phosphatase (SEAP)	Neomycin	Amp	Non-viral
ZX105	pEZX-GA03	miniCMV	Gluc	Secreted alkaline phosphatase (SEAP)	Puromycin	Kan	Non-viral
ZX106	pEZX-LvGN01	N/A*	Gluc	N/A*	Puromycin	Amp	Lentiviral
ZX107	pEZX-LvGA01	N/A*	Gluc	Secreted alkaline phosphatase (SEAP)	Puromycin	Amp	Lentiviral

...同时购买, 更多**优惠**...

凡购买荧光素酶试剂盒任一产品, 同一订单加购 miTarget™ miRNA 靶标 (3' UTR) 克隆或 GLuc-ON™ 启动子报告克隆, 可再享 **9 折** 优惠!

miTarget™ miRNA 靶标 (3' UTR) 克隆

miTarget™ miRNA 靶标克隆可用于 miRNA 靶标验证、预测靶标的功能确证和 miRNA 对靶标的调控作用的研究。

GLuc-ON™ 启动子报告克隆

GeneCopoeia 提供启动子相关研究平台。根据客户需求, 可提供个性化实验设计、产品和服务。如: 启动子报告克隆、启动子缺失与突变服务、启动子效率验证服务和启动子的慢病毒包装服务等。

GeneCopoeia, Inc.

Tel: 4006-020-200 / 020-32068595
Email: sales@igenebio.com
Web: www.genecopoeia.com
www.igenebio.com

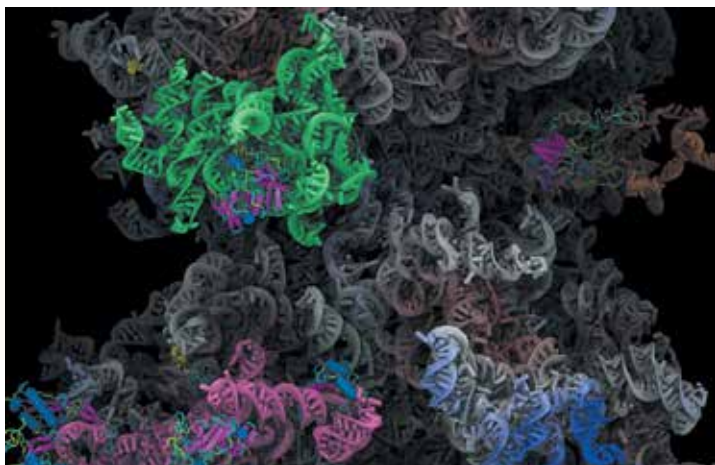


扫描二维码关注
官方微信账号
易锦生物

热点

Hot Topics

走近神秘的lncRNA



长链非编码RNA的概念模型。lncRNA通过高度结构化的结构域（绿色、粉色和橙色）与蛋白（红色）结合，为蛋白提供结构支撑（灰色）。

一直以来，人们对于长链非编码RNA（long non-coding RNAs, lncRNA）的功能知之甚少，但一系列新工具的问世，将改变这一现状。

2013年，一批研究人员决定深入探讨最有名的干细胞系之一——人类胚胎干细胞H1细胞株，结果他们得到了一些惊喜发现。他们发现了2000多种新的RNA分子。其中146种是人类胚胎干细胞特有的，对维持干细胞的多潜能性（具有的分化成机体所有类型细胞的能力）具有重要作用。

这些转录物内含有重复的序列，测序分析仪器会过滤掉这些序列，它们也因此一直被忽略。

这是一个大盲点。其他实验室之前也发现，一些包含重复序列的RNA对人类干细胞非常重要。而这批主要来自于斯坦福大学（Stanford University）的研究人员在研究H1细胞时，偶然发现了这些lncRNA。团队成员Vittorio Sebastiano指出，在他们列出的146个维持干细胞多潜能性的RNA中，三个含量最丰富的lncRNA——分别名为HPAT2、HPAT3和HPAT5——只在囊胚的内细胞团中表达，而内细胞团将发育成胎儿。

这些RNA只是lncRNA大家族中的一小部分。lncRNA至少包含200个碱基序列，但不编码蛋白质，且存在于多种不同组织，并且往往固定存在于细胞内的特定位置。lncRNA的

这些功能一直不明确，甚至一度被认为是转录噪声。

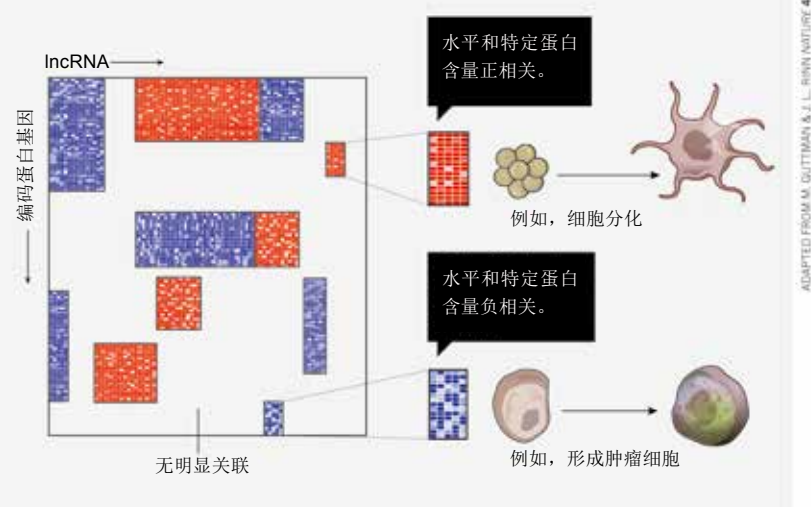
越来越多的证据显示，lncRNA的基因在进化过程中高度保守，这意味着它们应当具有某些特殊功能。鉴于此，学界对lncRNA的态度开始转变。但直到今天，研究者们还未能对lncRNA进行简洁清晰的分类。John Rinn对此评价道，lncRNA的研究还是比较碎片化的，不系统。Rinn在15年前读研究生的时候，发现了lncRNA。他现在在哈佛-麻省理工学院博德研究所（Broad Institute of MIT and Harvard）成立了自己的实验室，专门研究lncRNA分子。

现在，CRISPR-Cas9基因组编辑技术等革命性的工具大大降低了研究各个lncRNA功能的难度。

一些lncRNA被认为是蛋白质支架，可以帮助蛋白质调控DNA包装。研究者们主要通过观察lncRNA与某个蛋白的共存（图“关联研究”），或基因敲除后的影响来研究lncRNA的功能。例如，一些lncRNA基因被敲除后，癌症开始扩散，或者出现自闭症等发育疾病。

关联研究

根据lncRNA与特定蛋白的共存情况，对lncRNA进行分类。这有助于揭示该转录物参与了哪个细胞过程。



悉尼加文医学研究所（Garvan Institute of Medical Research）的负责人、遗传学家John Mattick指出，现在人们都认为，lncRNA具有生物功能。“证据很明显。进化过程中，它们保持不变。”

一些研究者对这些lncRNA的功能持有怀疑，但他们并没有否定lncRNA具有生物功能这一可能性。加利福尼亚大学（University of

California）旧金山分校的Michael McManus就是怀疑者之一。2013年，他的团队发表了RNA序列数据集，发现了数以万计的新的人类lncRNA。其中一些lncRNA在细胞中的含量非常低。McManus表示，大部分lncRNA都需要进一步的研究。即使使用最先进的技术，解密这些lncRNA的功能还是需要一大批专家的。

功能优先

因为lncRNA种类太多，所以关键的一步是确定研究的优先次序。Rinn主张从那些与疾病相关的基因组区域入手。另一种想法是，观察lncRNA所在区域。例如，如果一个lncRNA位于转录起始位点附近，那么它可能参与附近基因的调节。最近，研究人员可以相对简单地追踪细胞内的分子。Rinn和博德研究所的同事，以及来自宾夕法尼亚大学（University of Pennsylvania）的同仁合作，使用单分子RNA荧光原位杂交，确定了61个lncRNA分子在皮肤、肺和宫颈肿瘤细胞中的分布。

科学家们现在也利用CRISPR-Cas9和其它基因编辑技术干扰lncRNA对应的DNA序列或启动子，以此检测lncRNA的功能。利用这些技术，研究者们可以快速筛选大量lncRNA。利用Cas9-CRISPR来研究蛋白编码基因的功能也是同样的道理：在目的DNA中引入单碱基缺失或替换，观测其影响。

斯坦福大学医学院（Stanford School of Medicine）的癌症生物学家Howard Chang表示，唯一的问题是，轻微的基因修饰很难阻断lncRNA基因的表达。为此，Chang研发并应用了新方法，对lncRNA基因作出较大改动，可能涉及多碱基的变动。

RNA研究者们需要创造自己的CRISPR-Cas9技术。他们扩大了CRISPR工具箱，增加了阻止或促进特定lncRNA转录途径的技术

工具。Rinn等人已经研发了另一种方法——一种名为CRISPR Display（简称“CRISP-Disp”）的技术。Rinn把它比作一架可输送物品的无人机，可以把一个特定的lncRNA输送到细胞的各个区域。如果一个lncRNA常位于基因组的特定位置，那么它可能的作用是基因激活。利用CRISP-Disp技术，可以把lncRNA输送到另一个基因位点，观察新位点上基因的激活情况。

Rinn已经尝试了数年，试图使用旧的基因编辑技术完成这一实验。2014年，CRISPR-Cas9技术出现了革新，新的CRISPR技术能大批量编辑基因。几个月后，Rinn基于这一技术研发了CRISP-Disp技术。Rinn表示，CRISP-Disp技术非常高通量，他们可以一次把100种不同的lncRNA运到细胞的不同位置。

但利用这些技术阻断lncRNA的表达，从而研究lncRNA的功能比设想的复杂得多。牛津大学（University of Oxford）的基因编辑专家Andrew Bassett指出，对于一些lncRNA，对应的DNA序列和蛋白质编码基因的重要区域有所重叠，所以修饰这些基因产生的影响到底是lncRNA的影响还是蛋白的影响，非常难说。而且即使敲除后未产生影响，也不能断定该lncRNA没有功能，可能该功能较轻微，或只有在特定刺激下才会发挥功能。

两个经常被引用的例子是众所周知的

NEAT1和 MALAT1。这两种lncRNA在哺乳动物中高度保守，在细胞中表达非常丰富。研究人员已知它们可以促进DNA与蛋白质的结

合，基因敲除这两种lncRNA对小鼠无明显影响。这种现象在lncRNA领域非常普遍。正如Mattick所说，“处处有神秘。”

RNA相互作用组

一种完全不同的方法是找出与lncRNA互动的分子。麻省总医院（Massachusetts General Hospital）分子生物学家兼RaNA公司的共同创立人Jeannie Lee 指出，科学家们认为，lncRNA非常重要，但它需要其它辅助因子才能发挥功能。这些辅助因子通常是蛋白质。

Lee等人使用一种名为Xist的lncRNA来研究lncRNA。女性细胞内含有两条X染色体，Xist RNA能选择性沉默一条X染色体。与Xist结合的蛋白质通过多种机制沉默基因。在过去的一年中，科学家们终于确定了Xist的搭档蛋白。这些蛋白不仅能吸引其它沉默基因转录的分子，还能抑制促进转录的分子。

许多技术可用于探测lncRNA的搭档蛋白质：使用甲醛、紫外线（UV）等方法促进蛋白与RNA的结合，然后使用质谱法确定哪些部分发生了结合，从而确定相互作用。通常，这些分析有许多步骤，因此需要科学家做出许多决策。例如，连接RNA和蛋白质？如何鉴别真正的相互作用和误差？还有一个核心问题是，体外环境下，RNA的作用方式与其在细胞内时有很大差别。

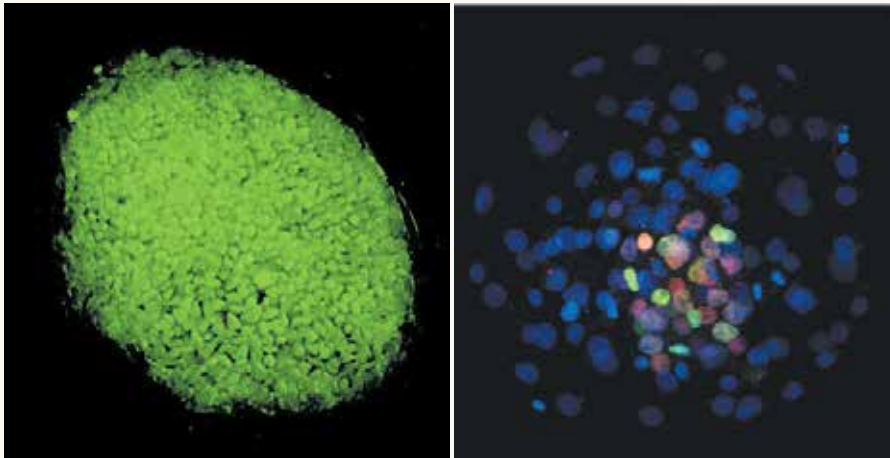
这就是为什么科学家们通过鉴定活细胞内RNA与蛋白的结合来研究Xist与其它分子的相互作用。质谱仪灵敏度的提升大大降低了此类实验的难度。过去一年中，Chang等人使用甲醛为交联剂，采用最新的质谱技术，证明了体内环境下，Xist与81个蛋白结合。Guttman等人采用紫外线结合蛋白和RNA，发现了10个

与Xist结合的蛋白，其中一个Chang组未发现的蛋白。

Lee使用另一种名为直接确定RNA-互动蛋白（identification of direct RNA-interacting proteins, iDRiP）的UV法连接蛋白和RNA，发现Xist与大约100个蛋白发生相互作用。这一RNA-蛋白复合体的大小可与核糖体媲美。Lee认为，iDRiP也可用于研究其它lncRNA，但具体方案可能需要根据各个lncRNA的性质进行调整。她补充说，连接方法的选择，将取决于许多因素，包括lncRNA在细胞内的位置及其丰度。

lncRNA研究得较为充分，但Xist与蛋白的互动并不明确。一个核心的问题是，Xist是否以及如何与PRC2（polycomb repressive complex 2，一种能通过修饰组蛋白，实现基因抑制功能的蛋白复合体）发生互动。一些团队，包括Guttman未发现任何显示Xist与PRC2结合的证据；另一些团队则坚持认为存在互动。Guttman认为，结论不同的原因可能是实验方案的不同：“XIST在体外的结合作用可能比体内更强。同时如何从背景结合中筛选出最强的结合互动也是个问题。”

PRC2的争论突显了一个问题：在今后的相互作用试验中，打断lncRNA与蛋白的互动是否会影响RNA的功能。Guttman发现，PRC2的缺失似乎并不影响Xist对X染色体的沉默作用。相反，他说，阻断Xist与另一种基因沉默相关蛋白SHARP的互动能阻断Xist的沉默作用。



H1细胞等干细胞系（左图中的绿色）中具有lncRNA，因此具有发育成各种细胞类型的能力。在卵裂球的内细胞团（右图中的各种颜色）中也发现了同样的RNA。

结构的秘密

另一种研究lncRNA功能的策略是先研究其结构。研究蛋白结构，能直接预测蛋白功能。解析lncRNA的弯曲和折叠，虽无法直接预测其功能，但也能提供线索。新墨西哥洛斯阿拉莫斯国家实验室（Los Alamos National Laboratory）的结构生物学家Karissa Sanbonmatsu表示，这是一个完全开放的领域，需要大量的工作。lncRNA数目如此之多，会存在很多不同的类别和模体。

我们可以使用化学探测法，例如SHAPE来鉴定lncRNA二级结构。SHAPE探测法需要把乙酰基连接到RNA上，在灵活区域修饰RNA的主干。修饰位点阻断了“读取”RNA序列的酶，阻断产生互补的DNA序列。因此最后产生的是短链DNA片段。这些片段可以测序，或者通过胶来确定大小。

2012年，Sanbonmatsu等人首次描述人类lncRNA——SRA（steroid receptor RNA activator）的二级结构。十几年来，研究者们仅知道，SRA与类固醇受体相关。

通过使用化学探针技术与SRA结合，Sanbonmatsu等人全面描述了lncRNA，包

括其来源、结构。SRA看起来和16S核糖体RNA（一种高度保守的分子机器）很类似。Sanbonmatsu等人后来发现了其它高度结构化的lncRNA，但不明确的是，是否大部分lncRNA都是高度结构化的，还是有些结构比较松散，或是介于二者之间。

结构解析法和相互作用组法一样，也面临着体内和体外不一样的问题。但值得庆幸的是，最新的体内技术也极大推动了lncRNA结构解析。2012年，包括Chang在内的团队研发了一种可在活细胞内使用的SHAPE技术，该技术可以同时解析几千种RNA结构。

结构研究和其他研究一样，需要大量时间的投入——因此研究者们需要先集中研究那些最可能具有功能的lncRNA。Sanbonmatsu指出，研究者们对lncRNA是否有功能的判断也越来越准确了。她建议确定功能重要性概率，科学家们应该先研究表型已知的lncRNA，使用化学探针法得到二级结构，然后检查该lncRNA在各物种中的保守程度。

Sebastino已经选定了三种可能在维持人类胚胎内细胞团多能性中起重要作用的

lncRNA: HPAT2、HPAT3和HPTA5。他计划深入研究这些lncRNA的作用机制，设计了多个实验，包括检测其相互作用组和结构分析。

他表示，要做的工作非常多。这仅仅是个开始。但考虑到这些序列可能可以解释人类乃至灵长类的特殊之处，再多的努力都是值得的。

原文检索：

Kelly Rae Chi. (2016) Finding function in mystery transcripts. *Nature*, 529(1038): 423-425.



张洁/编译

百态 · 频道

www.LifeOmic.com



EndoFectin™ 转染试剂*

买即送 京东购物券！！



明星产品 EndoFectin - Max

适用于多种难转染细胞

1 mL	3 mL
¥ 1600 送 100 元购物券	¥ 4000 送 350 元购物券

- ◆ 转染效率更优良，细胞毒性低；
- ◆ 适用于多种细胞系，包括多种难转染细胞；
- ◆ 操作简便！转染前、转染后均不需清洗细胞、更换培养液或血清
- ◆ 转染原代细胞再也不用担心缺少养分导致细胞损失

与同类产品的实力 PK

转染效率更高

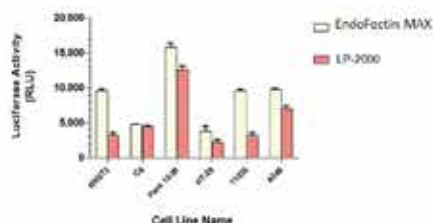


图 1. EndoFectin™ Max, Lipofectamine 2000 分别以 FLuc 表达质粒转染几种低转染效率细胞，通过检测荧光素酶的表达式比较转染效率。

细胞毒性更低

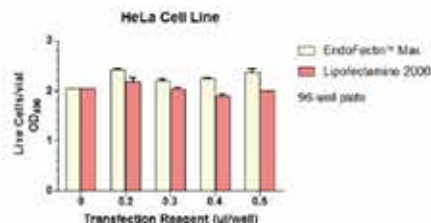


图 2. EndoFectin™ Max, Lipofectamine 2000 分别对 HeLa 细胞进行转染操作，通过计算转染后的细胞存活率比较细胞毒性。

* Lipofectamine® 2000 为 Invitrogen 的注册商标

客户使用实例

实例 1：应用 EndoFectin™ Max 转染试剂，成功转染大鼠海马神经元细胞（原代细胞），转染效率高，转染效率高于 Lipo2000 10 倍。详情请登录 <http://www.igenebio.com/product/endofectin/> 查看。

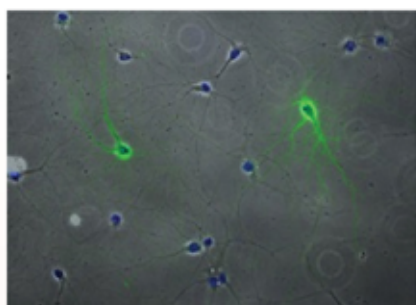


图 3. 体外培养 11 天后，应用 EndoFectin™ Max 将绿色荧光蛋白 (GFP) 转染至大鼠海马神经细胞，转染后 24 小时后荧光观察的转染效果。蓝色荧光：细胞核的 DAPI 荧光染色

实例 2：应用 EndoFectin™ Max 转染试剂，成功转染 Vero 细胞（非洲绿猴肾细胞），该细胞难以转染，EndoFectin™ Max 对比 Lipo2000、Fugene® 均有 2 倍以上的转染效率。

实例 3：应用 EndoFectin™ Max 转染试剂，成功转染 TH+ 神经细胞（一种从诱导多能干细胞分化获得的神经细胞），EndoFectin™ Max 对比 Lipo3000 效果相当，而使用方法更简便，也不会因为转染过程缺少血清而造成细胞损失。

EndoFectin™ 系列转染试剂

EndoFectin™ 系列除了明星产品 Max，更有针对 HepG2、293T、悬浮 293F 细胞的专业转染试剂！

更多专业之选，更多优惠！ 买 1 mL 转染试剂，送 100 元京东购物券；买 3 mL 转染试剂，送 350 元京东购物券！

产品名称	适用性	优惠价 (1 mL)	优惠价 (3 mL)
EndoFectin™ Max	广泛适用于多种细胞	¥ 1,600 (送)	¥ 4,000 (送)
EndoFectin™ Lenti	转染 293T 细胞，可收获更高滴度的慢病毒	¥ 1,360 (送)	¥ 3,200 (送)
EndoFectin™ Expi293	专注转染悬浮细胞 293F，转染效率极高	¥ 1,760 (送)	¥ 4,400 (送)
EndoFectin™ HepG2	专注转染人肝癌细胞系 HepG2，转染效率极高	¥ 1,920 (送)	¥ 4,800 (送)

GeneCopoeia, Inc.

Tel: 4006-020-200 020-32068595
Email: sales@igenebio.com
Web: www.genecopoeia.com
www.igenebio.com



扫描二维码关注
官方微信账号
易锦生物

百态

A *mazing Lives*

蚜虫用拼凑的方法重新合成必需氨基酸



园丁最大的噩梦是什么？是刚刚种下的苗儿被一群蚜虫糟蹋了。它们在吸食植物汁液方面简直停不下来，这一定是它们找到了美好的长期饭票。但事实真的是这样吗？美国贝·汤

姆生植物研究所（Boyce Thompson Institute for Plant Research）的Meena Haribal和Georg Jander告诉我们，那点糖水的营养根本就不够。植物的根部主要产生四种氨基

酸——谷氨酰胺、谷氨酸、天门冬酰胺和天冬氨酸，它们只能为贪吃的蚜虫提供氮。为了克服饮食的限制，许多蚜虫族群与其共生细菌展开了一场合作性交易：蚜虫为寄生的细菌提供食物和庇护所，作为回报，细菌给予蚜虫“房东”自身无法产生的营养补充素。那么，豌豆蚜（*pea aphid, Acyrthosiphon pisum*）及其细菌“租客”——蚜虫巴克纳氏菌（*Buchnera aphidicola*）是如何将四种非必需氨基酸转化为蚜虫生存所必需的氨基酸呢？对此，Haribal和Jander十分好奇。

于是，两位研究者对蚜虫们准备了添加了重氮和碳同位素的氨基酸系列饮食，然后开动脑筋想了一个办法：利用气相色谱质谱（*gas chromatography-mass spectrometry*）实验

弄清蚜虫及其共生细菌的氨基酸合成网络如何连接。他们仔细观察了上百份质谱，以追踪氮原子和碳原子的走向。结果他们发现天门冬酰胺上的胺氮要比其它酰胺氮更容易与别的氨基酸结合。而且，两人还惊奇地发现，蚜虫体内的大多数氨基酸都由正常碳原子和重碳原子组成，这表明蚜虫在合成氨基酸时，并非直接利用四种源自植物的氨基酸骨架，而是将这些氨基酸分解开来，再合成饮食中无法提供的必需氨基酸。随后，两人还发现，蚜虫并非直接利用源自树汁的氨基酸，而是同样将它们进行再合成。因此，Jander表示，即便蚜虫在饮食中摄入过多的氨基酸，它也能将其分解，然后进行再合成。

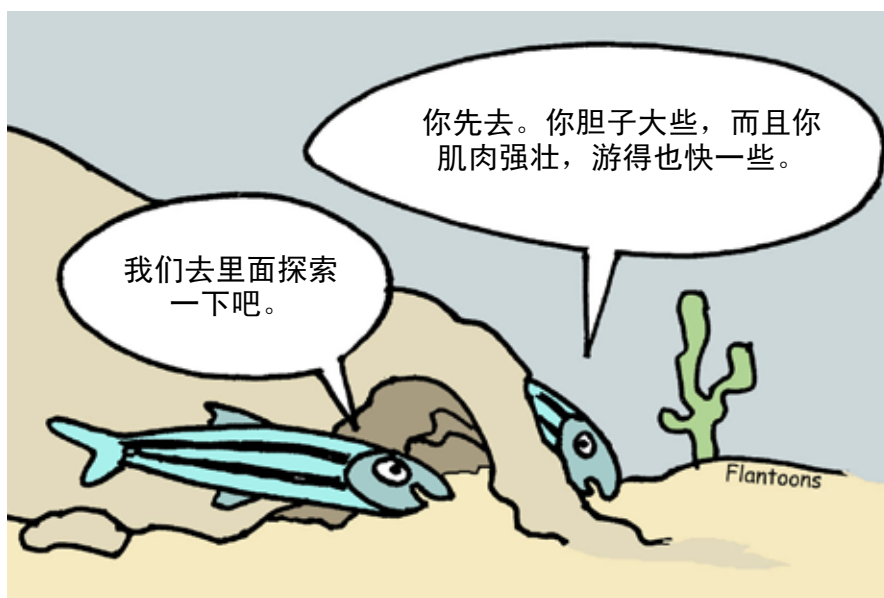
原文检索：

Haribal, M. and Jander, G. (2015). Stable isotope studies reveal pathways for the incorporation of non-essential amino acids in *Acyrthosiphon pisum* (pea aphids). *J. Exp. Biol.* 218, 3797-3806.



文佳/编译

大块头有大勇气



生活充满风险——从潜伏在暗处的饥饿狩猎者，到适应无法预料的环境挑战——简直是无处不在。不过，总有些动物生来大胆，更能轻易地处理种种风险。因此，它们似乎更喜欢探索陌生的环境，而胆小的动物则只能选择躲猫猫。不过，Frank Seebacher及其同事Alexander Little和Rob James对另一个问题十分感兴趣：肌肉赋予动物的力量到底会对其勇气有多大的影响呢？也就是说，大块头就有大勇气吗？

Seebacher表示，动物对运动的选择很大程度上受到能量代谢和肌肉功能的影响。因此，研究小组决定对斑马鱼的肌肉收缩力进行研究，看它如何影响行动决断力。

首先，他们将斑马鱼暴露于硝苯地平药物中（该药能减少肌肉收缩力），然后拍摄它们

进入新的水域以及面对陌生物体的表现。也就是，在它们肌肉变“弱”的情况下，评估鱼儿的勇气和游泳行为。接着，它们直接测定每一条鱼的肌肉收缩力，再探索肌肉功能对鱼儿勇气的影响到底如何。

三位研究人员将几种肌肉收缩特性结合起来，分析这个“肌肉因素”对斑马鱼游泳行为的影响。结果表明，肌肉收缩力对鱼儿的敏捷度有很大的影响；而敏捷度也会显著影响它们的勇气。因此，肌肉收缩力确实能够影响斑马鱼的勇气。Seebacher等人提示，他们所讲的“鱼儿的勇气”可能仅仅通过游泳的快慢反映出来。游得快的鱼儿显得更大胆，这不过是因为它们比游得慢的同胞跑得更远，也就拥有更多机会进行探索。

原文检索：

Seebacher, F., Little, A. G. and James, R. S. (2015). Skeletal muscle contractile function predicts activity and behaviour in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 218, 3878-3884.



文佳/编译

A group of people are standing on their hands, forming a human pyramid. The pyramid is composed of several layers, with the top layer having one person, the middle layer having two people, and the base having three people. The background is a bright, cloudy sky with a large, glowing sun in the upper left corner. The overall image has a purple tint.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255



www.LifeOmicS.com

AAAAA*EUGENIC?COM