

## 血管性认知障碍肾阳虚证的调查研究及DNA甲基化本质

刘晓林<sup>1</sup>, 丁小燕<sup>1</sup>, 刘藜<sup>1</sup>, 王红芹<sup>1</sup>, 祁轶斐<sup>1</sup>, 童文新<sup>1</sup>, 陈宝鑫<sup>2</sup>, 周庆兵<sup>1\*</sup>, 张颖<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091;

2. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

**[摘要]** **目的:**在病证结合背景模式下,调查血管性认知障碍肾阳虚证的分布情况并从DNA甲基化角度探讨血管性认知障碍肾阳虚证的生物学内涵,为未来中医药治疗该病证提供表观遗传学层面的靶点。**方法:**2020年9月至2022年11月,通过量表对北京社区居民进行认知障碍筛查,对血管性认知障碍(VCI)患者进行证候分析;后纳入VCI肾阳虚证患者与健康对照者,采集外周血,采用Illumina Human Methylation 850K BeadChip对受试者的外周静脉血进行全基因组DNA甲基化检测,筛选差异甲基化基因并对其进行生信分析。**结果:**研究共调查1902人,患有VCI的人数为201例,占总调查人数的10.57%,其中肾阳虚证者占72.14%;甲基化结果显示,与正常组比较,VCI组有386个差异甲基化位点,可注释到136个基因。京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析显示,两组间差异基因主要涉及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路、雌激素(Estrogen)信号通路、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路等通路。蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析显示,表皮生长因子受体(EGFR)、EGF、信号转导和转录激活因子3(STAT3)等甲基化差异基因在网络中占有重要地位。**结论:**VCI以肾阳虚证为主要证型,甲基化差异基因EGFR、EGF、STAT3等及相关差异通路mTOR信号通路、Estrogen信号通路、cAMP信号通路可能在认知障碍肾阳虚证的发生发展中占有重要作用。

**[关键词]** 血管性认知障碍; 肾阳虚证; DNA甲基化; 病证结合

**[中图分类号]** R284.2;R285;R289;R287;R22;R2-031;R33;R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)06-0111-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230216

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230113.1405.002.html>

**[网络出版日期]** 2023-01-14 16:32:22

### Vascular Cognitive Impairment with Kidney Yang Deficiency Syndrome and DNA Methylation Essence

LIU Xiaolin<sup>1</sup>, DING Xiaoyan<sup>1</sup>, LIU Li<sup>1</sup>, WANG Hongqin<sup>1</sup>, QI Yifei<sup>1</sup>, TONG Wenxin<sup>1</sup>, CHEN Baoxin<sup>2</sup>, ZHOU Qingbing<sup>1\*</sup>, ZHANG Ying<sup>1\*</sup>

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the distribution of vascular cognitive impairment (VCI) with kidney Yang deficiency syndrome and explore the biological nature of VCI with kidney Yang deficiency syndrome from the perspective of DNA methylation under the combination of disease and syndrome, so as to provide an epigenetic target for traditional Chinese medicine (TCM) treatment of this disease with this syndrome in the future. **Method:** Community residents in Beijing were screened out for cognitive impairment from September 2020 to November 2022 through the scale, and VCI patients were analyzed for the syndrome. VCI

**[收稿日期]** 2022-11-07

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2018YFC1704303);中国中医科学院科技创新工程项目(C12021A01407)

**[第一作者]** 刘晓林,在读硕士,从事中医药防治老年病与心血管疾病的研究,E-mail:xiaolinliu7@163.com

**[通信作者]** \*周庆兵,博士,副主任医师,硕士生导师,从事中医药防治老年相关疾病的机制研究,E-mail:zhouqingbing0910@163.com;

\*张颖,博士,主任医师,博士生导师,从事中医药防治老年病与心血管疾病的研究,E-mail:doctoronline@126.com

patients with kidney Yang deficiency syndrome and healthy people were enrolled in this study. Peripheral venous blood was collected and subjected to genome-wide DNA methylation detection by Illumina Human Methylation 850K BeadChip. Then, differentially methylated genes (DMGs) were screened out for bioinformatics analysis. **Result:** A total of 1 902 people were investigated in this study, and 201 of them had VCI, accounting for 10.57%, including 72.14% with kidney Yang deficiency syndrome. The methylation results showed that compared with the normal group, the VCI group had 386 differential methylation sites, and 136 DMGs were annotated. The Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis showed that the DMGs between the two groups were mainly involved in mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, Estrogen signaling pathway, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway, etc. Protein-protein interaction (PPI) analysis showed that DMGs, such as epidermal growth factor receptor (EGFR), epidermal growth factor (EGF), and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), played important roles in the network. **Conclusion:** Kidney Yang deficiency is the main syndrome in VCI patients. DMGs including EGFR, EGF, and STAT3 and the related pathways such as mTOR signaling pathway, Estrogen signaling pathway, and cAMP signaling pathway may play a vital role in the occurrence and development of VCI with kidney Yang deficiency syndrome.

**[Keywords]** vascular cognitive impairment; kidney Yang deficiency syndrome; DNA methylation; combination of disease and syndrome

血管性认知障碍(VCI)是指由脑血管病危险因素和(或)脑血管疾病引起的认知功能损害<sup>[1]</sup>。随着全球人口老龄化及人们饮食、生活方式的改变,VCI的患病率逐年递增。研究表明,中国65岁以上人群VCI的患病率为8.7%<sup>[2]</sup>,若不对VCI患者进行及时干预,病情会逐渐进展,直至痴呆<sup>[3]</sup>,然而,目前临床上尚无可以逆转或改变VCI病程的公认药物。因此,有必要从新的视角加强针对VCI的研究。

VCI虽无中医病名,但在许多中医古籍中都有对其症状的描述,如《黄帝内经·素问·调经论》指出:“血并于下,气并于上,乱而善忘”,《黄帝内经·灵枢·海论》谓:“髓海不足,脑转耳鸣,脘酸眩暈,目无所视,懈怠安卧”等。肾藏先后天之精,肾精化为肾气,其中对机体有温煦、激发、兴奋、蒸化、封藏和制约阴寒等作用者称之为肾阳。肾阳是人体生命活动的原动力,为人体生命之根本,肾虚则不能生髓充脑,髓海空虚,脑失所养,导致VCI的发生发展。《中医治未病·血管性轻度认知障碍专家共识》<sup>[4]</sup>指出肾阳虚证是VCI的主要证型之一,但仍需要对VCI肾阳虚证的分布规律进行进一步研究。

DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶(DNMTs)的催化下,CpG序列5-胞嘧啶选择性添加甲基基团形成5-甲基胞嘧啶的化学修饰过程<sup>[5-6]</sup>。DNA甲基化可调控基因的下游表达,因而在生命活动中具有重要作用。另外,基因甲基化易受外界环境和机体遗传的影响,与中医“外因”“内因”理论

不谋而合<sup>[7]</sup>;而从DNA甲基化角度探讨病证的生物学本质逐渐受到研究者的关注<sup>[8]</sup>。

“证”是中医学的主要特征之一,而将西医的疾病与中医的证候相结合,可以实现中西医的优势互补<sup>[9-10]</sup>。病证结合,不仅可反映疾病的共性和本质,还可体现疾病的状态和特点<sup>[11-12]</sup>。本次研究首先观察VCI肾阳虚证型在人群中的分布特点,进一步运用全基因组甲基化芯片,从DNA甲基化角度探索VCI肾阳虚证的生物学标志物,为未来中医药治疗该病证提供表观遗传学层面的靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 筛查对象及样本量** 2020年9月至2022年11月,根据“病证结合”自然人群队列建设技术规范,选取相对稳定的特定的具有代表性的北京市海淀区的4个社区(分别是甘家口社区卫生服务中心、航材院社区卫生服务中心、北太平庄社区卫生服务中心和聂各庄社区卫生服务中心)的常住居民,年龄≥60岁以上者作为自然人群筛查对象。本研究严格遵守《赫尔辛基宣言》,方案通过中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批(伦理号2021XLA001-2),所有受试者均为自愿参加试验并签署知情同意书。

样本量确定公式 $N=Z_{\alpha}^2 p(1-p)/d^2$ 。取 $\alpha=0.05$ , $Z_{\alpha}^2=1.96$ ,根据既往文献研究中国居民血管性认知障碍患病率取 $p=8.7\%$ <sup>[2]</sup>, $d$ 为容许误差取0.15p,计算得出样本量 $N=1\ 792$ 人。为保证调查结果的准确性,考虑到筛查表不合格,中途退出等情况的影响,

实际调查人数为2340人,去除信息不全、不符合要求的筛查表后,最终筛查表为1902份,符合样本量要求。

**1.2 筛查方法** 对符合年龄的筛查对象,由各个社区卫生服务中心的医务人员提前致电约定时间地点,按照预约时间分别到各个社区的指定现场,由经过专业培训的调查员对筛查对象进行筛查表的询问及填写,最后将筛查表统一回收保存。结束后将所有信息录入Excel数据库,一人录入,一人核对,保证数据的真实完整。

筛查内容主要包括基本信息、认知功能和肾阳虚证3部分。调查对象基本信息包括姓名、性别、年龄、文化程度、婚姻状况、民族、工龄、工作类型、年收入、家族遗传史、吸烟史、饮酒史、运动情况、膳食情况等。

认知功能的筛查主要依靠认知能力自评表(AD8)和蒙特利尔认知评估(北京版)(MOCA)两个量表。AD8包括判断力是否有问题、兴趣爱好有无减退、是否重复做一件事、学习使用日常工具有无困难、记不清当前日期、处理复杂经济问题有困难、忘记与人约定、日常记忆和思考出现问题等8个条目,总分8分,每个问题回答是得1分,得分 $\geq 2$ 分则为筛查阳性。MOCA包括视空间与执行功能(5分),命名(3分),注意(6分),语言的重复与流畅性(3分),抽象力(2分),延迟回忆(5分),定向力(6分),总分30分,得分 $< 26$ 分视为筛查阳性,若研究对象受教育年限 $\leq 12$ 年总分可加1分。即AD8 $\geq 2$ 分且MOCA $< 26$ 分(高中及以下文化水平MOCA $< 27$ 分)可判定其有认知障碍,同时排除汉密尔顿抑郁量表(HAMD-17)评估 $\geq 17$ 分由抑郁导致认知障碍者。

肾阳虚证诊断标准参考至中华中医药学会认证的《肾阳虚证诊断标准》<sup>[13]</sup>,标准包括定位条目、定性条目、舌象和脉象,定位条目可以反映疾病部位,定性条目可以反映疾病属性,舌象、脉象是中医临床辨证的重要依据。肾藏精,主生长发育与生殖,肾主水,与膀胱相表里,故肾阳虚证的定位条目主要围绕水液代谢、生长发育等肾与膀胱的病理特点,定性辨证的条目则体现阳气不足。标准经过文献分析、问卷调查、专家访谈、专家研讨与论证等步骤,确定了肾阳虚证诊断条目及权重。其中定位条目至少具备1条,定性条目至少具备1条,同时具备舌象或脉象其中1条,方可诊断为肾阳虚证,权重分值可作为病情轻重的参考依据,见表1。

表1 肾阳虚证诊断标准

Table 1 Diagnostic criteria of kidney Yang deficiency syndrome

条目类型	条目内容	权重/分
定位条目	①夜尿频多	6
	②腰部酸痛	6
	③五更泻	6
	④性欲低下(仅适用于18周岁以上的人群)	4
定性条目	①畏寒/畏寒肢冷	6
	②水肿	4
	③面色晄白	4
舌象	①舌质淡嫩	4
脉象	①脉沉无力,尺部尤甚	4

**1.3 甲基化检测病例诊断标准** VCI诊断标准参考《2019年中国血管性认知障碍诊治指南》<sup>[14]</sup>,包括轻度血管性认知障碍(mild VCI)和重度血管性认知障碍(major VCI或VaD)。肾阳虚证诊断标准参考中华中医药学会认证的《肾阳虚证诊断标准》<sup>[13]</sup>。

**1.4 甲基化检测病例纳入标准** ①同时满足VCI诊断标准与肾阳虚证诊断标准;②患者年龄在60~85岁,性别不限;③AD8测试 $\geq 2$ 分,且MOCA测试 $< 26$ 分;④患者意识清楚,能够配合完成认知功能评定;⑤患者或家属自愿参加并签署知情同意书。

**1.5 甲基化检测病例排除标准** ①非血管性因素导致的认知功能障碍;②确诊的抑郁症或HAMD-17评分 $\geq 17$ 分;③患有严重外伤或神经缺损、精神疾病、病情危重等任何其他不能准确反映认知功能的因素。

**1.6 DNA提取及甲基化检测** 研究共采集30例外周血样本,来源于15例VCI肾阳虚证患者与15例健康志愿者,采用DNA提取试剂盒(DNeasy Blood and Tissue Kit)提取DNA,采用Illumina Bead Array™ Infinium技术对提取的DNA进行检测分析,具体流程见图1。

**1.7 全基因组甲基化分析** 本研究采用MethylationEPIC BeadChip芯片(简称850K芯片)技术对样本进行全基因组范围内的甲基化检测。850K芯片可检测人全基因组约853307个CpG位点的甲基化状态,在原450K芯片的基础上增加了413745个位点,不但保持了对CpG岛、基因启动子区的全面覆盖,还特别加强了增强子区及基因编码区的探针覆盖。整个甲基化分析流程分为4步,①数据质量控制;②预处理;③甲基化差异位点分析;④差异甲基化区域分析。一般采用Beta值( $\beta$ )作为衡量该位点甲基化程度的指标,该值区间为

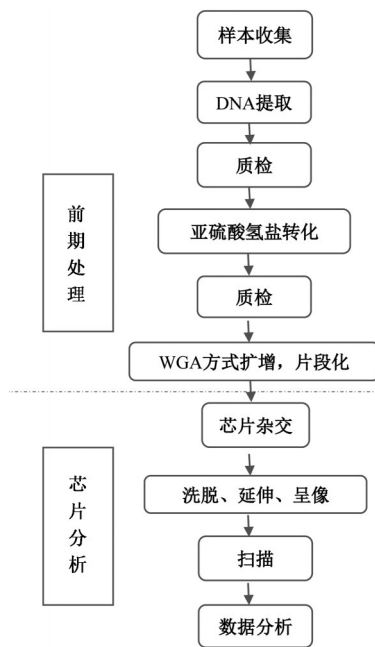


图1 甲基化检测技术流程

Fig. 1 Technical process of methylation detection

0~1,越接近于1则表示该位点甲基化程度越高,越接近于0则表示该位点甲基化程度越低。采用pool-t-test方法筛选组间的差异甲基化位点,筛选标准为 $P < 0.05$ , $|\Delta\beta| > 0.1$ ,满足此条件可认为该位点为甲基化差异位点,该位点所在基因即为甲基化差异基因。

### 1.8 京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析

将两组差异基因导入Metascape平台(<https://metascape.org/>)进行KEGG分析,保存结果并通过R软件进行可视化。

### 1.9 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析

将甲基化差异基因导入STRING 11.5数据库(<https://string-db.org/>),以degree值 $\geq 0.400$ 为条件对其进行筛选,隐藏无联系靶点,将获得结果导入Cytoscape 3.6.0软件(<https://cytoscape.org/>),得出差异基因的PPI网络图。

### 1.10 统计方法

本研究均采用SPSS 26.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布且方差齐,组间比较采用t检验;非正态分布采用非参数检验,组间比较采用Mann-Whitney U检验。计数资料采用卡方检验,等级资料采用秩和检验。统计检验采用双侧的差异性检验, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 VCI肾阳虚证的总体分布情况

本次研究完成1 902例60岁以上人群的调查分析,结果显示患有VCI的人数为201例,占总调查人数的10.57%。

VCI人群中肾阳虚证者145例,占VCI总数的72.14%。在所有910例肾阳虚证人群中,VCI患者145例,占比为15.93%,明显高于非肾阳虚证人群中VCI的占比位5.65%,差异具有统计学意义。见表2。

表2 VCI患病率与肾阳虚证的关系

Table 2 Relationship between prevalence of VCI and kidney Yang deficiency syndrome

中医证型	例数	VCI/例	非VCI/例	VCI占比/%
肾阳虚证	910	145	765	15.93 <sup>1)</sup>
非肾阳虚证	992	56	936	5.65

注:与非肾阳虚组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ (表3同)

### 2.2 VCI肾阳虚证与非肾阳虚证量表积分比较

将VCI人群按照肾阳虚证诊断标准,分为肾阳虚组和非肾阳虚组,分别统计两组AD8及MOCA得分情况,观察是否存在差异。结果表明,两组之间AD8得分差异有统计学意义,肾阳虚组AD8得分更高;两组间MOCA得分差异无统计学意义,但肾阳虚组MOCA得分平均值较非肾阳虚组低。已知AD8得分越高,MOCA得分越低,认知障碍的程度越严重,二者均表明肾阳虚组认知障碍的情况更严重。见表3。

表3 肾阳虚证量表得分情况( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Relationship between kidney Yang deficiency syndrome and scale scores ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	例数	AD8得分	MOCA得分
肾阳虚组	145	3.25 $\pm$ 3.91 <sup>1)</sup>	17.89 $\pm$ 6.64
非肾阳虚组	56	3.18 $\pm$ 1.38	18.24 $\pm$ 5.77

### 2.3 VCI与肾阳虚证在不同年龄段中的分布情况比较

在1 902例调查人群中,年龄最小的60岁,最大的90岁,平均年龄71岁。以10岁为一个年龄段,将人群为3组,60~70、71~80、81~90岁,分别调查各组中肾阳虚人数和VCI人数,观察其占比情况。结果表明,随着年龄增长,VCI与肾阳虚占比均随年龄段增加而升高。见表4。

表4 年龄与肾阳虚证、VCI的关系

Table 4 Relationship between age and kidney Yang deficiency syndrome, VCI

年龄/岁	调查数/例	肾阳虚人数/例	肾阳虚占比/%	VCI数/例	VCI占比/%
60~70	1 021	477	46.72	85	8.33
71~80	619	296	47.82	77	12.44
81~90	262	137	52.29	39	14.89

2.4 甲基化检测样本两组间一般资料比较 为进一步探讨VCI肾阳虚证的生物学内涵,本研究选取了性别、年龄相匹配的VCI肾阳虚证患者与健康志

愿者各15例进行全基因组DNA甲基化检测。两组之间一般资料差异均无统计学意义,基线一致,具有可比性。见表5。

表5 两组间一般资料对比 (n=15)

Table 5 Comparison of general data of groups (n=15)

组别	年龄( $\bar{x}\pm s$ ) /岁	性别 (男/女)	文化程度(文盲 和小学/中学/ 大专及以上)	婚姻状况 (已婚/未婚 离异丧偶)	工作类型 (体力/体力+脑力/ 脑力)	吸烟史 (有/无)	饮酒史 (有/无)	运动情况 (经常/ 缺乏)
VCI组	65.67±13.00	6/9	3/7/5	12/3	7/3/5	1/14	5/10	8/7
健康组	65.53±12.75	6/9	0/10/5	12/3	5/5/5	1/14	3/12	12/3
$t/\chi^2$	0.028	0.000	3.529	0.000	0.833	0.000	0.682	2.400

组别	收缩压( $\bar{x}\pm s$ ) /mmHg	舒张压( $\bar{x}\pm s$ ) /mmHg	空腹血糖( $\bar{x}\pm s$ ) /mmol·L <sup>-1</sup>	糖化血红蛋白 ( $\bar{x}\pm s$ )/%	甘油三酯( $\bar{x}\pm s$ ) /mmol·L <sup>-1</sup>	总胆固醇( $\bar{x}\pm s$ ) /mmol·L <sup>-1</sup>	同型半胱氨酸 ( $\bar{x}\pm s$ )/μmol·L <sup>-1</sup>
VCI组	141.80±16.18	86.20±10.37	6.16±1.83	5.13±0.63	1.71±0.71	4.47±0.95	15.50±2.10
健康组	130.07±13.79	80.73±7.93	6.30±1.78	5.44±0.36	1.28±0.16	4.98±1.12	14.56±0.87
$t/\chi^2$	2.138	1.622	-0.212	-1.678	-1.245	-1.326	-0.083

注:1 mmHg≈0.133 kPa

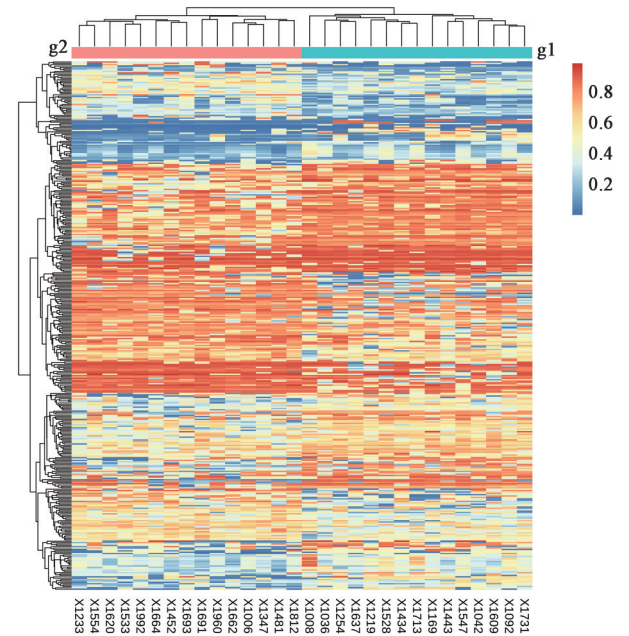
2.5 两组甲基化差异概况 热图显示,两组间总体上甲基化差异明显,见图2。两组差异位点的分布见图3,高甲基化位点主要分布于5'UTR、3'UTR、TSS1500等区域,低甲基化位点主要分布于1stExon、TSS200、N-shore等区域。火山图显示,两组共存在386个甲基化差异位点,与健康组比较,VCI肾阳虚组上调的位点有172个,占总异常甲基化位点的44.6%,下调的位点有214个,占总异常甲基化位点的55.4%,分别对应63上调基因和73个下调基因,见图4。表6和表7分别列出了上调与下调TOP10基因位点信息。

2.6 两组差异甲基化基因的KEGG分析 对差异基因进行KEGG通路分析,共富集到175条通路,主要包括哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路、雌激素(Estrogen)信号通路、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路等,见图5。

2.7 两组差异甲基化基因的PPI网络分析 PPI分析显示,表皮生长因子受体(EGFR)、信号转导和转录激活因子3(STAT3)、表皮细胞生长因子(EGF)、磷脂酶C-γ1(PLCG1)、CBL、EP300等基因 degree 值较高,且互相联系紧密,见图6。

### 3 讨论

本研究共调查1902住居民,通过资料采集和量表测试,发现VCI人群201例,占总人数的10.57%。VCI患者中肾阳虚证者有145例,占VCI人群的72.14%,说明肾阳虚证为VCI主要证型。在10276名65岁及以上中国人群的流行病学调查中<sup>[2]</sup>,VCI患病率为8.7%,本研究肾阳虚证人群中

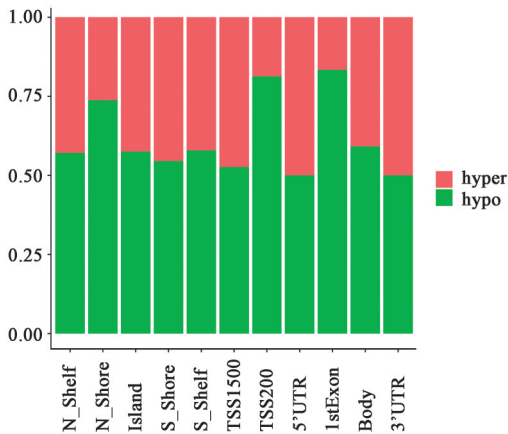


注:g1.健康组;g2.VCI组

图2 VCI肾阳虚患者甲基化差异位点的热图

Fig. 2 Heatmap of differential methylation sites in patients with kidney Yang deficiency of VCI

VCI的占比为15.93%,高于一般人群的患病率,可知肾阳虚证人群中VCI患病率更高。进一步研究发现,与VCI非肾阳虚组比较,VCI肾阳虚组AD得分更高,提示VCI肾阳虚组认知障碍的程度更严重。对年龄分层分析发现,随着年龄增加,肾阳虚证人群比例逐渐递增,VCI人群占比也随之递增,提示增龄可能是肾阳虚与VCI的高危因素。以上结果表明,对肾阳虚证VCI进行更深一步的研究具



注:横坐标代表不同注释功能区域,纵坐标代表对应区域内高低甲基化的相对比例,红色代表相对高甲基化,绿色代表相对低甲基化

图3 VCI肾阳虚患者甲基化差异位点的分布

Fig. 3 Distribution map of differential methylation sites in patients with kidney Yang deficiency of VCI

有重要意义。

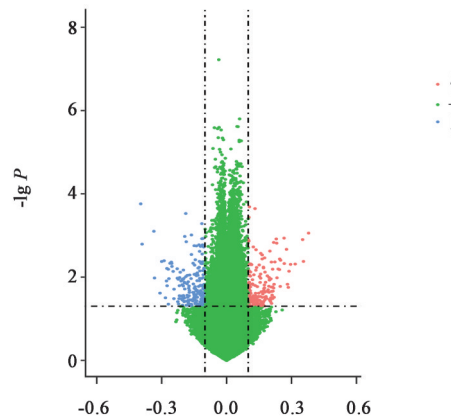
甲基化检测在分析疾病的发病机制、治疗靶点上有着重要的作用,也是探索中医证候生物学基础的重要手段。众多研究结果表明,基因甲基化与认知障碍之间存在密切联系。一项系统回顾性研究表明<sup>[15]</sup>,在48项研究中,67%的研究证实了DNA甲基化与认知水平呈正相关,DNA甲基化可成为判断痴呆发生的生物标志物;孙蓉等<sup>[16]</sup>研究表明,基因

表6 VCI肾阳虚患者上调甲基化基因信息(Top10)

Table 6 Hypermethylated genes information in patients with kidney Yang deficiency of VCI (Top10)

基因ID	P	β值	Uscs Refgene 名称	Uscs Refgene 区域	Relation to CpG Island
cg14001750	0.049 773 655	0.159 943 038	PRKCA	Body	S_Shelf
cg05111645	0.049 400 606	0.174 558 796	OR2H1	5'UTR	Unkown
cg13967339	0.048 120 548	0.108 377 568	MTUS1	Body	Unkown
cg04509103	0.047 929 078	0.140 426 443	SGMS1	5'UTR	Unkown
cg12359832	0.047 895 333	0.119 781 752	TRAP1	Body	Unkown
cg05704942	0.047 255 942	0.153 809 861	MRTO4	Body	Unkown
cg15898343	0.046 850 053	0.100 459 633	RAB11FIP5	Body	S_Shelf
cg25531220	0.046 031 722	0.126 022 934	GRIK2	Body	Unkown
cg00443543	0.045 918 165	0.104 361 126	SERPINF2	TSS1500	Unkown
cg22405556	0.045 434 365	0.164 243 060	NRP1	Body	Unkown

本次研究进一步纳入了15例VCI肾阳虚证患者和15例健康对照者,两组人群性别、年龄等相匹配,具有可比性。全基因组甲基化检测结果表明,与健康对照组比较,VCI肾阳虚证存在大量异常的差异甲基化基因,共有136个差异甲基化基因,分别包括63个上调基因和73个下调基因。KEGG通路



注:横坐标表示基因甲基化差异程度,纵坐标表示统计学上的显著性水平。红色为高甲基化位点,蓝色为低甲基化位点,绿色为非显著基因位点

图4 VCI肾阳虚患者甲基化差异位点的火山图

Fig. 4 Volcano plot of methylation sites in patients with kidney Yang deficiency of VCI

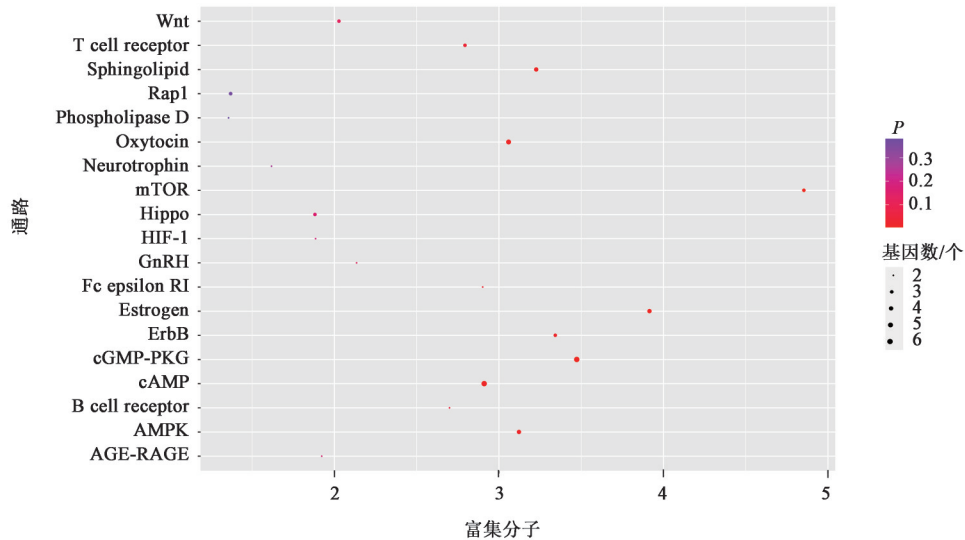
甲基化程度与认知障碍发病明显有关。CHEN等<sup>[17]</sup>提出,BACE1等基因甲基化程度降低,会加速转录,使β-淀粉样蛋白增多,致使Aβ脑内沉积,导致认知障碍的发生发展。目前VCI的甲基化研究大多只聚焦在西医的诊疗方面,涉及中医证候的文献报道较少,而从病证结合角度探索VCI的DNA甲基化本质,有可能为中医药治疗VCI奠定坚实的基础。

富集分析显示,健康人与肾阳虚证VCI患者的差异甲基化基因主要富集在mTOR信号通路、Estrogen信号通路、cAMP信号通路等。mTOR信号通路可促进物质代谢、参与细胞凋亡、自噬,在多种疾病中扮演着不可忽视的角色,mTOR的衰减有助于神经血管功能的恢复,从而提高小鼠的认知功能<sup>[18-19]</sup>。

表7 VCI肾阳虚患者下调甲基化基因信息(Top10)

Table 7 Hypomethylated genes information in patients with kidney Yang deficiency of VCI (Top10)

基因 ID	P	β值	Ucsc Refgene 名称	Ucsc Refgene 区域	Relation to CpG Island
cg26434487	0.049 063 252	-0.128 769 797	RABGAP1L	Body	Unkown
cg18892258	0.048 637 600	-0.163 830 080	GABBR2	Body	Unkown
cg04597526	0.048 523 538	-0.123 233 097	ANO2	Body	Unkown
cg16033700	0.048 493 970	-0.160 690 748	LINC00504	Body	S_Shelf
cg01874867	0.048 300 044	-0.116 329 358	PON1	TSS200	S_Shore
cg03115532	0.048 218 203	-0.168 925 098	LOC222699	Body	N_Shore
cg06324373	0.048 002 735	-0.113 218 469	CRTAC1	Body	Unkown
cg11144103	0.047 464 673	-0.175 992 422	PTRF	Body	S_Shelf
cg14811585	0.047 439 792	-0.203 416 832	NCOA7	Body	Unkown
cg23423607	0.047 415 954	-0.185 683 499	NDUFB1	Body	N_Shelf



注:节点面积越大,颜色越深,代表 degree 值越大,连线越粗,代表基因间联系越紧密

图5 VCI肾阳虚患者差异基因的KEGG分析

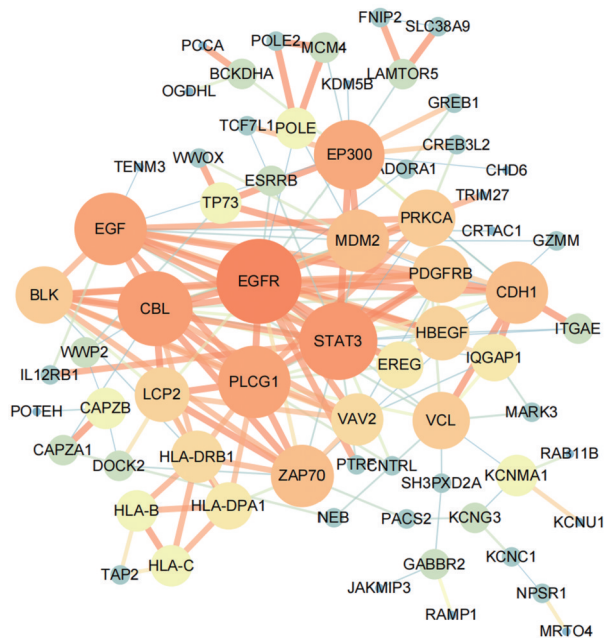
Fig. 5 KEGG network analysis of differential methylation genes in patients with kidney Yang deficiency of VCI

雷帕霉素作为mTOR抑制剂,可以改善微血管内皮血管扩张功能,提高脑血管的密度,从而改善VCI的症状<sup>[20]</sup>。大脑是雌激素的重要靶器官,体外实验证明,海马神经元处于内源性高雌激素水平时,神经突触生长加快,数目增多<sup>[21-22]</sup>。雌激素还可调控多种神经递质、增加脑血流量,改善认知功能,绝经后低雌激素水平是绝经早期认知障碍的危险因素之一<sup>[23-24]</sup>。cAMP相关通路是中枢神经维持正常生理的主要信号,可以促进神经细胞存活、再生及分化,目前已经证实cAMP相关信号的激活与突触可塑性、学习记忆能力的形成有密切的关系<sup>[25-26]</sup>。

进一步PPI分析显示,EGFR、EGF、STAT3等基因在网络中占据核心位置。MESCHI等<sup>[27]</sup>研究表明,与EGFR结合的EGF样代谢激素是神经活动

的关键调节器;BONDS等<sup>[28]</sup>观察到从小鼠分离的海马神经中EGFR的表达减少,或与认知能力下降有关。海马神经元易受大脑低灌注的影响,产生炎症反应进而导致神经元的损伤,从而诱发认知障碍,而抑制STAT3相关通路磷酸化可改善大鼠脑缺血再灌注损伤<sup>[29-31]</sup>。提示EGFR、EGF、STAT3等基因可能是VCI肾阳虚证的核心靶点。

综上,本研究首先通过流行病学调查得出肾阳虚证是VCI的主要证型,后通过病证结合的模式,运用850K芯片将肾阳虚证VCI患者和健康人进行甲基化的检测,得出VCI肾阳虚证甲基化的本质,结果发现VCI肾阳虚证存在大量差异甲基化基因,提示DNA甲基化在VCI肾阳虚证中扮演着重要角色。进一步分析发现,甲基化差异基因主要富集于



注:节点面积越大,颜色越深,代表degree值越大,连线越粗,代表基因间联系越紧密

图6 VCI肾阳虚患者差异基因的PPI分析

Fig. 6 PPI network analysis of differential methylation genes in patients with kidney Yang deficiency of VCI

mTOR 信号通路、Estrogen 信号通路、cAMP 信号通路等通路, PPI 网络分析提示 EGFR、EGF 和 STAT3 为核心基因。本研究在国际范围内首次从基因甲基化角度找到了 VCI 肾阳虚证的甲基化标记物, 为未来中医药针对性治疗该病证提供了表观遗传学层面的靶点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[ 1 ] VAN DER FLIER W M, SKOOG I, SCHNEIDER J A, et al. Vascular cognitive impairment[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4:18003.

[ 2 ] HAN Y, ZHOU A, LI F, et al. Apolipoprotein E ε4 allele is associated with vascular cognitive impairment no dementia in Chinese population[J]. J Neurol Sci, 2020, 409:116606.

[ 3 ] 任剑羽, 牛秀茹, 孙佳, 等. 非痴呆型血管性认知功能障碍的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015(2):207-210.

[ 4 ] 周小炫, 黄俊山, 谢敏, 等. 中医治未病·血管性轻度认知障碍专家共识[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(3):1-5.

[ 5 ] TIRADO-MAGALLANES R, REBBANI K, LIM R, et al. Whole genome DNA methylation: Beyond genes silencing[J]. Oncotarget, 2017, 8(3):5629-5637.

[ 6 ] 丁小燕, 王洪志, 张颖, 等. 雄黄主要成分二硫化二砷对骨髓增生异常综合征 SKM-1 细胞的甲基化作用效应[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9):66-71.

[ 7 ] 李晓娟, 邱文琪, 刘玥芸, 等. DNA 甲基化及其在中医证候研究中运用研究进展探析[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(11):1984-1988.

[ 8 ] 周庆兵, 徐凤芹, 童文新, 等. 从 DNA 甲基化探讨中医阴阳的本质[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10):4713-4715.

[ 9 ] 魏佳, 李灿东. 中西医病证结合的异与同[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7):3310-3313.

[ 10 ] 王阶, 熊兴江, 邢雁伟, 等. 冠心病血瘀证标准规范、生物学基础及循证评价——基于病证结合的“证候”研究思路与方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8):1-6.

[ 11 ] 乔利杰, 彭广操, 卫靖靖, 等. 基于文献研究分析冠心病心力衰竭气虚血瘀证的用药规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9):176-183.

[ 12 ] 陶文娟, 陈启亮, 靖媛, 等. 传统及中西医“病证结合”的同与异[J]. 天津中医药, 2021, 38(4):409-413.

[ 13 ] 孙明月, 訾明杰, 秦义, 等. 基于混合方法的《肾阳虚证诊断标准》制定[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1):284-288.

[ 14 ] 2019 年中国血管性认知障碍诊治指南[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(35):2737-2744.

[ 15 ] FRANSQUET P D, LACAZE P, SAFFERY R, et al. Blood DNA methylation as a potential biomarker of dementia: A systematic review [J]. Alzheimers Dement, 2018, 14(1):81-103.

[ 16 ] 孙蓉, 肖琳, 宋明洁, 等. β 分泌酶-1 基因甲基化与阿尔茨海默病的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2022, 26(4):475-480.

[ 17 ] CHEN K L, WANG S S, YANG Y Y, et al. The epigenetic effects of amyloid-beta (1-40) on global DNA and neprilysin genes in murine cerebral endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378(1):57-61.

[ 18 ] DE BRUIJN R F, IKRAM M A. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease[J]. BMC Med, 2014, 12:130.

[ 19 ] 张杰, 周媛, 马云枝, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨补肾通络方对血管性痴呆大鼠海马神经元突触可塑性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18):25-31.

[ 20 ] VAN SKIKE C E, JAHRLING J B, OLSON A B, et al. Inhibition of mTOR protects the blood-brain barrier in models of Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,

- 2018,314(4):H693-H703.
- [21] PHAN A, SUSCHKOV S, MOLINARO L, et al. Rapid increases in immature synapses parallel estrogen-induced hippocampal learning enhancements [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(52):16018-16023.
- [22] NEVZATI E, SHAFIGHI M, BAKHTIAN K D, et al. Estrogen induces nitric oxide production via nitric oxide synthase activation in endothelial cells [J]. Acta Neurochir Suppl, 2015, 120:141-145.
- [23] 唐明山, 邹耀兵, 潘成德, 等. 绝经后早期认知功能障碍与血浆性激素水平的关系 [J]. 中国药业, 2010, 19(19):64-65.
- [24] 黄丽, 莫林宏, 刘爱贤. 养血清脑颗粒治疗阿尔茨海默病的疗效及对血管内皮生长因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(14):121-126.
- [25] WANG H, ZHANG Y, LI H, et al. Shuyu capsules relieve liver-Qi depression by regulating ERK-CREB-BDNF signal pathway in central nervous system of rat [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5):4831-4838.
- [26] LEE B, SUR B, SHIM J, et al. Acupuncture stimulation improves scopolamine-induced cognitive impairment via activation of cholinergic system and regulation of BDNF and CREB expressions in rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14:338.
- [27] MESCHI E, LÉOPOLD P, DELANOUE R. An EGF-responsive neural circuit couples insulin secretion with nutrition in drosophila [J]. Dev Cell, 2019, 48(1):76-86.
- [28] BONDS J A, SHETTI A, STEPHEN T, et al. Deficits in hippocampal neurogenesis in obesity-dependent and independent type-2 diabetes mellitus mouse models [J]. Sci Rep, 2020, 10(1):16368.
- [29] 泥文娟, 张书琦, 王晓艳, 等. 当归-川芎药对对脑缺血/再灌注损伤大鼠 JAK-STAT 信号通路的影响 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(9):1305-1311.
- [30] TANG Y, TONG X, LI Y, et al. JAK2/STAT3 pathway is involved in the protective effects of epidermal growth factor receptor activation against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Neurosci Lett, 2018, 662:219-226.

[责任编辑 顾雪竹]