

1 型糖尿病大鼠视网膜基因启动子区域的甲基化水平变化及其意义

李亚红 耿超 刘胜男 王奇 李筱荣 张琰

天津医科大学眼科医院 眼视光学院 眼科研究所 天津市视网膜功能与疾病重点实验室, 天津 300384

通信作者:李筱荣,Email:lixiaorong@tmu.edu.cn;张琰,Email:yanzhang04@tmu.edu.cn

【摘要】 目的 研究 1 型糖尿病 (T1D) 大鼠视网膜基因启动子区域甲基化水平, 并探讨其与 T1D 引起的视网膜损伤之间的关系。方法 采用随机数字表法将 20 只 8~10 周龄雄性 SD 大鼠分为对照组和 T1D 组, 每组 10 只。T1D 组大鼠采用鼠尾静脉注射链脲佐菌素 (STZ) 法建立大鼠 T1D 模型, 对照组同法注射等容积枸橼酸钠溶液。于注射前和注射后每周监测 2 个组大鼠体质量, 于造模后 3 d 和 5 周监测各组大鼠血糖浓度。采用甲基化 DNA 免疫共沉淀-芯片 (MeDIP-chip) 技术分析对照组与 T1D 组大鼠视网膜基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态, 并进行基因富集的基因本体 (GO) 分析和通路分析。结果 与对照组比较, T1D 组大鼠出现体质量减轻、多饮、多食、多尿等典型表现。与对照组比较, T1D 组大鼠视网膜中共鉴定出 1 478 个差异性甲基化位点, 包括 689 个高甲基化和 789 个低甲基化位点, 其中 768、365 和 345 个差异性甲基化位点分别位于高、中、低 CpG 岛密度启动子上。GO 分析显示, 差异性甲基化基因影响了蛋白结合等分子功能。通路分析显示, 高甲基化基因与丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和钙信号通路有关, 而低甲基化基因与 MAPK、Notch 及谷氨酸能突触信号通路有关。结论 与对照组大鼠比较, T1D 大鼠视网膜中多数基因的甲基化水平发生变化, 这些启动子区域的差异性甲基化为糖尿病视网膜病变 (DR) 分子机制的阐明以及新型治疗靶点的确定提供了依据。

【关键词】 糖尿病, 1 型; DNA 甲基化; 甲基化 DNA 免疫沉淀; CpG 岛; 糖尿病视网膜病变; 表观遗传; 动物模型

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81970827); 天津市自然科学基金重点项目 (17JCZDJC35600); 天津市高校中青年骨干创新人才培养计划项目; 高水平创新型人才计划—杰出学者/中年领军人才项目 (YDYYRCXM-B2018-02); 校级大学生创新创业项目训练项目 (201910062073)

DOI:10.3760/cma.j.cn115985-20190616-00262

Changes in DNA methylation of retinal gene promoter regions and their significance in type 1 diabetic rats

Li Yahong, Geng Chao, Liu Shengnan, Wang Qi, Li Xiaorong, Zhang Yan

Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Corresponding authors: Li Xiaorong, Email:lixiaorong@tmu.edu.cn; Zhang Yan, Email:yanzhang04@tmu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To study the methylation level of retinal gene promoter region in a rat model of type 1 diabetes (T1D) and investigate the correlation between DNA methylation level and retinal damage caused by T1D.

Methods Twenty male SD rats aged 8~10 weeks were randomly divided into a control group and a T1D group using a random number table. T1D model was established via a rat tail vein injection of streptozotocin (STZ). The same volume of sodium citrate buffer was injected in the same way in the control group. Body mass of the rats was monitored before and after the injection of STZ. Blood glucose concentration of the rats was detected three days and five weeks following the injection. Methylated DNA immunoprecipitation-chip (MeDIP-chip) technology was employed to analyze the DNA methylation in the CpG islands of retinal gene promoter regions of the rats. Methylation data were compared between the two groups and subjected to Gene Ontology (GO) and pathway enrichment analyses. This study protocol was evaluated and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Tianjin Medical University, and the use and care of the animals were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the

National Institutes of Health. **Results** Compared to the normal control group, typical deregulated metabolic syndromes were found in the T1D group, including hyperphagia, polydipsia, polyuria, and loss of body weight. According to the results of MeDIP-chip analysis, 1 478 differentially methylated gene loci were detected in the T1D group compared to the normal control group, of which 689 were hypermethylated and 789 hypomethylated. Of these differentially methylated loci 768, 365 and 345 were located in high, intermediate, and low CpG-density promoters, respectively. GO analysis showed that the differentially methylated genes were involved in some molecular functions such as protein binding. The pathway analysis revealed that the hypermethylated genes in the rats of the T1D group were associated with mitogen-activated protein kinase (MAPK) and calcium signaling pathways; whereas the hypomethylated genes were associated with MAPK, Notch, and glutamatergic synapse signaling pathways.

Conclusions Methylation level of the majority of genes was altered in T1D rats. A differential methylation in the retinal gene promoter regions provides a preliminary theoretical basis for elucidating the molecular mechanism underpinning diabetic retinopathy and searching for novel therapeutic targets.

[**Key words**] Diabetes, type 1; DNA methylation; Methylated DNA immunoprecipitation; CpG island; Diabetic retinopathy; Epigenetics; Disease model, animal

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81970827); Key Project of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (17JCZDJC35600); Training Program for Young and Middle-aged Backbone Talents in Colleges and Universities in Tianjin; High-level Innovative Talent Program for Distinguished Scholar (YDYRCXM-B2018-02); Municipal College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (201910062073)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115985-20190616-00262

糖尿病是以血糖水平异常升高为主要特征的代谢紊乱综合征,已成为 21 世纪公共卫生面临的重大挑战^[1-2]。截至 2017 年全球约 500 万 20~99 岁年龄段人群死于糖尿病。国际糖尿病联合会预测,到 2049 年将有 6.93 亿人罹患糖尿病,比 2017 年增加 2.42 亿人^[3]。此外,2017 年全球糖尿病患者医疗费达 8 500 亿美元^[3]。1 型糖尿病(type 1 diabetes, T1D)是自身免疫性 T 细胞破坏胰岛 β 细胞后,胰岛素分泌绝对不足所致^[4]。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的严重眼部并发症,是工作年龄人群首要的致盲因素^[2,5-6]。DNA 甲基化是对基因启动子区域的 CpG 岛进行甲基化修饰,在转录水平调控基因表达的表观遗传学调控方式。研究表明,DNA 甲基化是细胞维持生理功能所必需的,与疾病发生和发展密切相关,DNA 甲基化异常可导致 T1D 发病率增加^[7-10]。目前,甲基化 DNA 免疫共沉淀芯片(methylated DNA immunoprecipitation-chip, MeDIP-chip)是分析基因组 DNA 甲基化准确、可靠的高通量技术手段,可检测全基因组范围内的甲基化位点以及甲基化水平,揭示启动子甲基化对基因表达的调控^[11-12],但糖尿病引起的视网膜损害是否存在基因启动子区域的甲基化水平变化及其涉及的功能通路鲜有研究。本研究中采用 MeDIP-chip 检测 T1D 大鼠模型视网膜中基因启动子区域的甲基化状态,探究调控 DR 发生和发展的表观遗传学机制,为寻找 DR 新型分子治疗靶点提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 20 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 8~10 周龄雄性 SD 大鼠(解放军军事医学科学院实验动物中心),体质量为 200~220 g,饲养于中国医学科学院放射研究所动物房。饲养环境温度 22~25 ℃,湿度 40%~70%,12 h 明/暗循环光照,动物食、水不限。本研究经天津医科大学动物保护与使用机构委员会评审批准(批文号:SYXK2018-0004),符合国家卫生研究所颁布的实验动物护理和使用指南的要求。

1.1.2 主要试剂 枸橼酸钠(北京索莱宝科技有限公司);质量分数 2% 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国 Amresco Chemical 公司);质量分数 10% 水合氯醛注射液(天津医科大学眼科医院)。Arraystar 4 × 180 K 启动子芯片(美国 Arraystar 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及视网膜标本制备 采用随机数字表法将大鼠随机分为对照组和 T1D 组,每组 10 只。T1D 组大鼠经尾静脉注射 pH 4.5 枸橼酸钠溶液配制的 2% STZ,剂量为 45 mg/kg。注射后 72 h,随机血糖浓度高于 20 mmol/L 视为造模成功^[13-14]。对照组鼠尾静脉注射等容积枸橼酸钠溶液。每周监测大鼠体质量,于造模后 3 d 和 5 周检测 2 个组大鼠

的血糖水平^[14]。造模后 5 周采用 10% 水合氯醛注射液静脉注射处死大鼠,沿上下眼睑放入弯镊夹住眼球并轻柔向上提,用剪刀剪断视神经及周围组织,取出完整眼球,于冰上迅速分离视网膜,液氮速冻, -80 °C 储存。

1.2.2 MeDIP-chip 法检测各组启动子区 CpG 岛的甲基化状态 委托天津华生源科技有限公司对 2 个组大鼠视网膜标本进行 MeDIP-chip 技术服务。提取样本全基因组 DNA,超声波打断为 200~1 000 bp 片段,偶联抗 5-甲基胞苷单克隆抗体的生物磁珠进行免疫共沉淀,经酚、氯仿和乙醇抽提得到纯化甲基化 DNA 片段(MeDIP DNA);经超声波打断的其他 DNA 样本作为总量输入 DNA。总量输入 DNA 和 MeDIP DNA 分别用 Cy3 和 Cy5 标记,与包含约 180 000 个探针的大鼠 4×180 K 启动子芯片进行杂交。

1.2.3 数据分析和生物信息分析 (1)采用 NimbleScan v2.5 软件 1 500 bp 的滑动窗口分析芯片数据,得出差异富集峰(differential enrichment peaks, DEP)。DEP 是 2 个组样本间 DNA 甲基化位点显著富集的区域,位于基因的启动子区域(-1 300~+500 bp)内。根据 GC 含量,启动子区域分为低密度 CpG 岛启动子(low CpG-density promoter, LCP)、中等密度 CpG 岛启动子(intermediate CpG-density promoter, ICP)和高密度 CpG 岛启动子(high CpG-density promoter, HCP)。本研究针对距离转录起始位点(transcriptional start sites, TSS)-700~+200 bp 的窗口。评估标准:任一 500 bp 启动子的 G+C 比例≥0.55,且 CpG 含量与期望含量之比≥0.6 为 HCP;任一 500 bp 启动子 CpG 含量与期望含量之比<0.4 为 LCP;非 HCP、非 LCP 的启动子为 ICP。(2)差异甲基化基因界定标准为 log₂ 对照组甲基化峰值-log₂ T1D 组甲基化峰值>0.25;log₂ T1D 组甲基化峰值<0.4;对照组和 T1D 组基因的甲基化比较,差异有统计学意义(P<0.05)。(3)基因本体(Gene

Ontology, GO)分析和采用京都基因与基因组百科全书(kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库进行通路分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 mean±SD 表示,组间数据经 Levene 检验证实方差齐;计数资料采用频数进行表达。对照组与 T1D 组大鼠不同时间点的体质量和血糖浓度总体差异比较采用重复测量两因素方差分析,多重比较采用 Tukey post hoc 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。采用 Fisher 精确概率法对 GO 进行分析,P≤0.05 为差异有统计学意义。通路分析按不同情况,采用 EASE 评分、Fisher 精确概率法或超几何检验得到的 P 值代表信号通路的富集程度,P≤0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组和 T1D 组大鼠一般表现

造模后 T1D 组大鼠明显消瘦,精神萎靡,动作迟缓,毛发无光泽,饮水、进食量明显增多,尿量显著增加,符合糖尿病表现^[5,14],对照组大鼠体型适中,精神状态良好,反应灵敏,毛发有光泽。

2.2 对照组和 T1D 组大鼠体质量和血糖浓度比较

对照组和 T1D 组大鼠不同时间点体质量总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 20.750, P = 0.001; F_{\text{时间}} = 18.845, P < 0.001$);造模后各时间点 T1D 组大鼠体质量均低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$) (表 1)。对照组和 T1D 组大鼠不同时间点血糖浓度总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 554.329, P < 0.001$);不同时间点血糖浓度比较差异无统计学意义($F_{\text{时间}} = 0.739, P = 0.413$)。各时间点 T1D 组大鼠血糖浓度均高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$) (表 2)。

表 1 2 个组大鼠不同时间点体质量比较 (mean±SD, g)
Table 1 Comparison of body mass between the two groups at various time points (mean±SD, g)

组别	样本量	不同时间点体质量					
		造模前	造模后 1 周	造模后 2 周	造模后 3 周	造模后 4 周	造模后 5 周
对照组	10	331.20±15.79	346.90±19.55	376.50±25.23	348.90±40.48	352.90±37.15	389.30±34.17
T1D 组	10	333.60±11.10	291.80±11.75 ^a	319.30±22.82 ^a	294.50±28.90 ^a	284.90±28.73 ^a	308.20±34.40 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 20.750, P = 0.001; F_{\text{时间}} = 18.845, P < 0.001; F_{\text{交互作用}} = 9.355, P < 0.001$ 。与各自时间点对照组比较, ^a $P < 0.01$ (重复测量两因素方差分析, Tukey post hoc 检验) T1D: 1 型糖尿病
Note: $F_{\text{group}} = 20.750, P = 0.001; F_{\text{time}} = 18.845, P < 0.001; F_{\text{interaction}} = 9.355, P < 0.001$ 。Compared with the control group at corresponding time point, ^a $P < 0.01$ (repeated measurement two-way ANOVA, Tukey post hoc test) T1D: type 1 diabetes

表 2 2 个组大鼠不同时间点血糖浓度比较 (mean±SD, mmol/L)
Table 2 Comparison of blood glucose concentration between the two groups at various time points (mean±SD, mmol/L)

组别	样本量	不同时间点血糖浓度	
		造模后 3 d	造模后 5 周
对照组	10	6.51±1.46	6.82±1.11
T1D 组	10	24.82±2.89 ^a	25.82±3.62 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 554.329, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 0.739, P = 0.413; F_{\text{交互作用}} = 0.161, P = 0.698$. 与各自时间点对照组比较, $^a P < 0.01$ (重复测量两因素方差分析, Tukey post hoc 检验) T1D: 1 型糖尿病
 Note: $F_{\text{group}} = 554.329, P < 0.001; F_{\text{time}} = 0.739, P = 0.413; F_{\text{interaction}} = 0.161, P = 0.698$. Compared with the control group at corresponding time point, $^a P < 0.01$ (repeated measurement two-way ANOVA, Tukey post hoc test) T1D: type 1 diabetes

2.3 各组样本 DNA 质量评估

2 个组样本提取基因组 DNA, A_{260}/A_{280} 接近 1.8, 提示 DNA 纯度可用于后续研究。对照组和 T1D 组所提取的 DNA 质量浓度分别为 74.76 ng/μl 和 90.03 ng/μl, 样本量均大于 5 μg, 满足实验需要。全基因组 DNA 进行超声处理后, 大部分片段长度位于 200~1 000 bp, 符合后续实验要求。

2.4 各组基因启动子区 CpG 岛甲基化状态比较

甲基化位点统计显示, 视网膜基因启动子区域共 5 165 个基因甲基化, 其中对照组和 T1D 组分别有 2 597 个和 2 568 个。2 个组甲基化位点在 1 号染色体分布最多, 11 号染色体最少 (图 1A)。其中, 对照组位于 HCP、ICP、LCP 的甲基化位点分别为 1 512、645 和 440 个; T1D 组为 1 486、623 和 459 个。2 个组甲基化位点主要位于 HCP 启动子区, 约占总数的 58% (图 1B)。从 1 号染色体到 X 染色体, 2 个组视网膜基因启动子的甲基化位点个数整体呈下降趋势 (10 号染色体除外) (图 1C)。2 个组视网膜共 2 063 个基因位于相同密度 CpG 岛启动子上, 其中 HCP 1 217 个, ICP 502 个, LCP 344 个 (图 1D)。对照组和 T1D 组视网膜中位于

HCP 的正链基因为 725 个和 700 个, 分别占 48% 和 47%; 位于 ICP 的正链基因为 290 个和 286 个, 分别占 45% 和 46%, 位于 LCP 的正链基因为 208 和 230 个, 分别占 47% 和 50% (图 1E)。HCP 发生甲基化的基因在对照组和 T1D 组各染色体均有分布, 1 号和 10 号染色体分布最多, 其中约 50% 在正链, 约 50% 在负链 (图 1F)。

2.5 对照组与糖尿病组高甲基化和低甲基化基因比较

与对照组相比, 糖尿病组视网膜基因启动子区域共 1 478 个差异性甲基化位点, 其中 200 个分布于 1 号染色体, 129 个分布于 10 号染色体, 108 个分布于 5

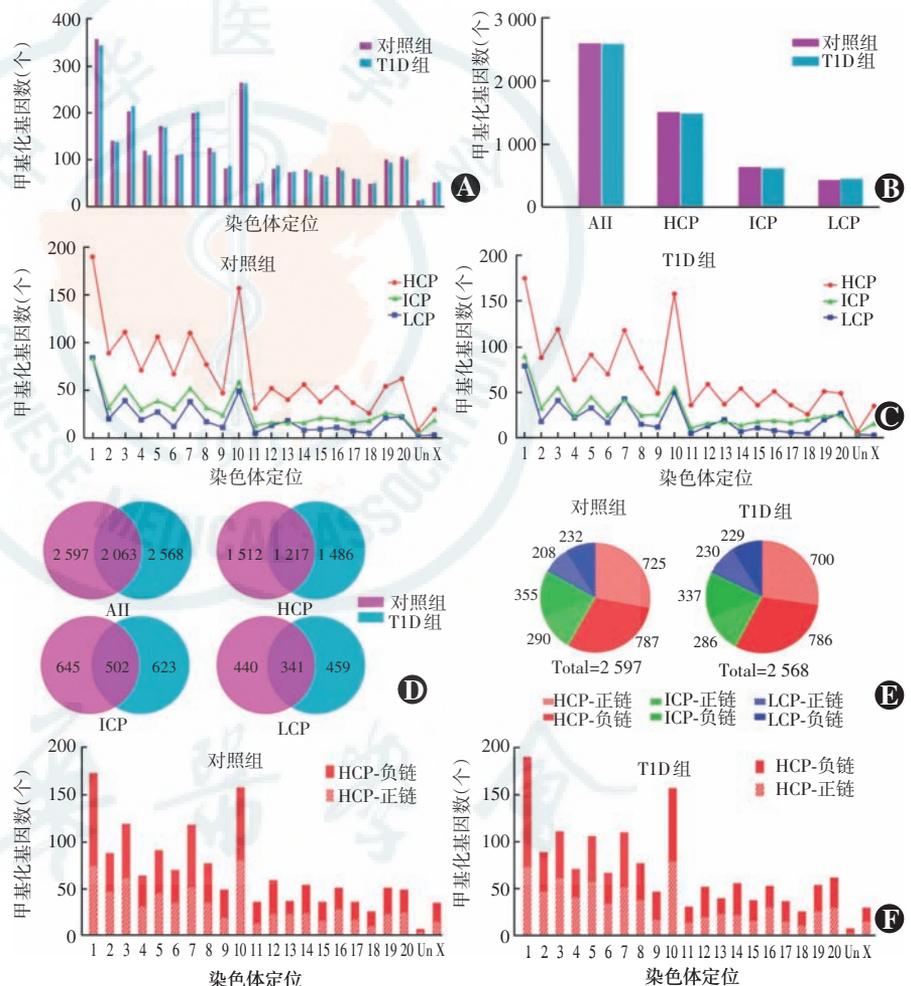


图 1 对照组与 T1D 组甲基化芯片检测结果 A: 2 个组样本中甲基化的基因在染色体中的分布 B: 2 个组甲基化基因在 HCP、ICP 和 LCP 区域中的分布个数 C: 不同 GC 含量区域内甲基化基因位点在染色体上的分布 D: 位于同种 GC 含量区域内甲基化基因的个数 E: 不同 GC 含量区域内甲基化基因的转录链 F: 对照组和 T1D 组视网膜基因中 HCP 区域内甲基化基因的正链和负链个数在染色体上的分布 T1D: 1 型糖尿病; HCP: 高密度 CpG 岛启动子; ICP: 中等密度 CpG 岛启动子; LCP: 低密度 CpG 岛启动子

Figure 1 Results of methylation chip between the control group and T1D group A: The distribution of methylated genes on chromosomes between the control group and the T1D group B: The distribution of methylated genes in HCP, ICP, and LCP regions between the control group and the T1D group C: The distribution of methylated genes within different GC content regions across chromosomes D: The number of methylation genes within HCP, ICP, and LCP regions E: The transcription chains (positive or negative) of methylation genes within HCP, ICP, and LCP regions F: The distribution of positive and negative chains of methylation genes within HCP region across chromosomes in the control group and the T1D group T1D: type 1 diabetes; HCP: high CpG-density promoter; ICP: intermediate CpG-density promoter; LCP: low CpG-density promoter

号染色体,98 个分布于 7 号染色体(图 2A)。与对照组相比,T1D 组视网膜基因组中分别有 329、193 和 167 个高甲基化位点位于 HCP、ICP 和 LCP 区域;分别有 439、172 和 178 个低甲基化位点位于 HCP、ICP 和 LCP 区域(图 2B)。与对照组视网膜基因相比,T1D 组位于 HCP 区域内的高甲基化基因中有 167 个为正链,占 51%,位于 ICP 区域内的高甲基化基因有 112 个为正链,占 58%,位于 LCP 区域内的高甲基化基因有 94 个为正链,占 56%;位于 HCP 的低甲基化基因中有 204 个正链,占 46%,位于 ICP 的低甲基化基因中有 78 个正链,占 45%,位于 LCP 的低甲基化基因中有 85 个正链,占 48%(图 2C)。与对照组相比,糖尿病组的前 20 个高甲基化基因包括锌指 CCHC 结构域蛋白质 8、信号识别粒子 68 000 蛋白、DNA 定向 RNA 聚合酶 III 亚基 RPC10、神经元硝酸羧基末端 PDZ 配体等;前 20 个低甲基化基因包括 F-box/LRR-重复蛋白 17、 δ 型阿片受体、谷胱甘肽过氧化物酶 7、假想蛋白 LOC679682PDZ 和 LIM 结构域蛋白 2 等(图 2D)。差异性甲基化基因主要位于 HCP 区域,高甲基化基因多分布于 3 号染色体,低甲基化基因多分布于 9 号染色体(图 2D,E)。高甲基化和低甲基化的 DEP 峰的位置相近。T1D 组高甲基化和低甲基化基因的 HCP、ICP 和 LCP 主要集中在 TSS 附近;TSS 上游差异性甲基化基因比下游多(图 2F)。

2.6 GO 及通路分析

GO 分析包括分子功能、细胞成分和生物学过程。高甲基化基因主要在蛋白结合、细胞色素 c 氧化酶活性、血红素-铜端氧化酶活性、氧化还原酶活性、RNA 茎环结合、结合、无机阳离子转运体活性、电子转移活性和阳离子转运体活性等方面发挥分子功能,除蛋白结合、RNA 茎环结合外,均涉及细胞色素 c 氧化酶家族,如细胞色素 c 氧化酶

亚基 8A (cytochrome c oxidase subunit 8A, *Cox8a*)、*Cox8b*、*Cox6a1*、*Cox7a2*、*Cox7a2l* 和 *Cox6c*。低甲基化基因主要在蛋白结合、蛋白结构域特异性结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性、含复合支架的蛋白质活性、蛋白质异二聚化活性、信号受体结合、JUN 激酶结合、蛋白激酶 A 调节亚基结合和转录抑制活性等方面,其中 JUN 激酶结合的分子功能涉及的基因主要有丝裂原活化蛋白激酶激酶 1 (*mitogen-activated protein kinase kinase 1*, *Map3k1*)、死亡结构域相关蛋白 (*death domain-associated protein*, *Daxx*)、c-jun-氨基端激酶相互作用蛋白 3 和双特异性蛋白磷酸酶 10

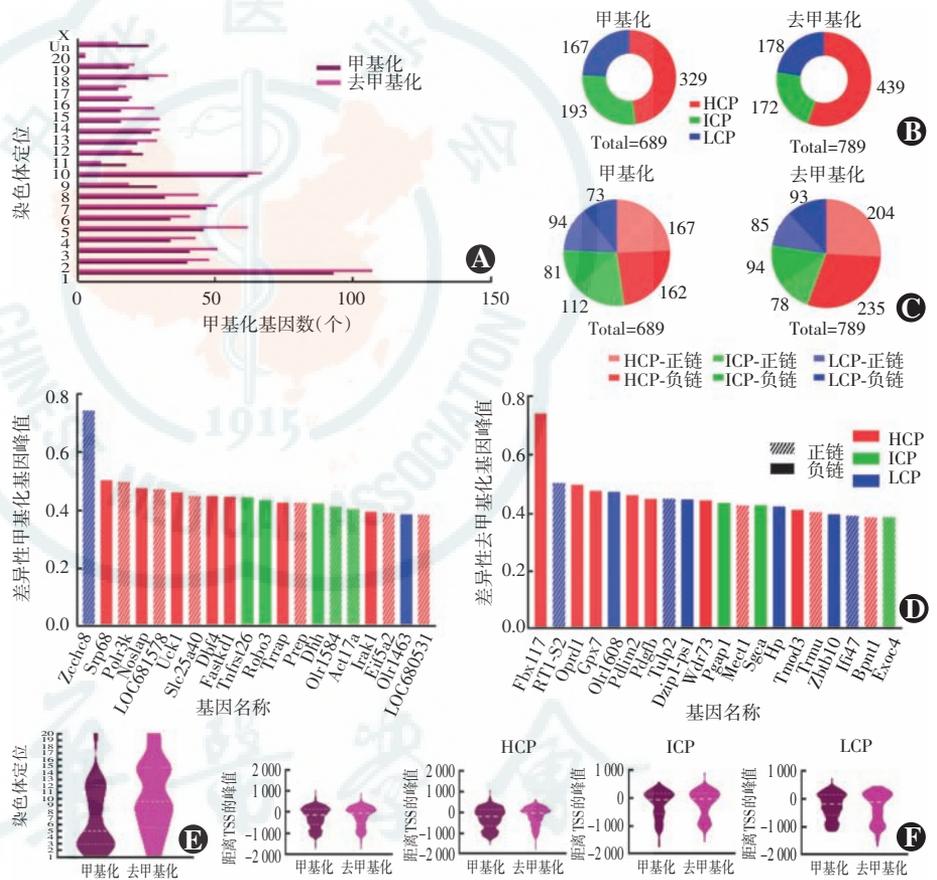


图 2 T1D 组视网膜基因组中甲基化和去甲基化基因的分布和转录链情况 A: 差异性甲基化基因位点在染色体上的分布 B: 位于 HCP、ICP 和 LCP 区域的差异性甲基化基因个数 C: 视网膜中甲基化和去甲基化基因的转录链 D: 大鼠视网膜中前 20 个差异性甲基化、去甲基化基因峰值越大,差异性甲基化或去甲基化程度越高 E: 大鼠视网膜中前 20 个差异性甲基化基因在染色体上的分布 F: 前 20 个差异性甲基化基因在距 TSS 不同距离上的分布 HCP: 高密度 CpG 岛启动子;ICP: 中等密度 CpG 岛启动子;LCP: 低密度 CpG 岛启动子;TSS: 转录起始位点

Figure 2 Distribution and transcription chains of hypermethylation and hypomethylation genes in retinal genome of the T1D group A: Distribution of differential methylation genes on chromosomes

B: The number of differentially methylated genes in HCP, ICP, and LCP regions under diabetic condition C: Transcription chains of hypermethylation and hypomethylation genes in rat retina D: The top 20 differentially methylated genes in rat retina. The greater the peak value, the higher the degree of methylation or demethylated E: The distribution of top 20 differentially methylated genes in rat retina on chromosomes F: Distribution of top 20 differentially methylated genes on the distance from TSS HCP: high CpG-density promoter; ICP: intermediate CpG-density promoter; LCP: low CpG-density promoter; TSS: transcriptional start sites

(dual specificity protein phosphatase 10, *Dusp10*)。转录抑制活性涉及的基因有精氨酸-谷氨酸二肽重复、T-box 转录因子 18 和 *Sirt6* 等(图 3, 4, 表 3)。

高甲基化基因主要涉及阳离子和蛋白质在细胞内的定位和转运;而低甲基化基因则主要涉及细胞膜和细胞器成分。相应地,高甲基化基因主要参与蛋白质的转运和定位;而低甲基化基因主要对细胞形态结构、组织解剖结构的分化与发育进行调控。通路分析显示,高甲基化基因富集较多的通路是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路和钙信号通路。其中 MAPK 通路主要富集的基因有钙电压门控通道辅助亚基 $\gamma 1$ 、*Dusp9*、白细胞介素-1 受体辅助蛋白、成纤维细胞生长因子 23 和血管内皮生长因子 A 等。钙信号通路富集的基因有 $\beta 1$ 肾上腺素能受体、人肌质/内质网钙 ATP 酶 3、缓激肽 B1、钙调蛋白样蛋白 3 和神经元乙酰胆碱受体亚基 $\alpha 7$ 等。低甲基化基因富集的信号通路除 MAPK 信号通路外,还包括 Notch 信号通路和谷氨酸能突触等信号通路等,其中 MAPK 通路富集的基因有电压依赖性钙通道亚基 $\alpha 2/\delta 1$ 、*Daxx*、*Dusp10*、*Map3k1* 和血小板衍生生长因子亚单位 A 等。Notch 信号通路富集的基因为 CREB 结合蛋白(CREB binding protein, *Crebbp*)、C-末端结合蛋白 2(C-terminal binding protein 2, *Ctbp2*)、蓬乱蛋白同源物 3(dishevelled homolog 3, *Dvl3*)、组蛋白去乙酰化酶 2(histone deacetylase 2, *Hdac2*)和蛋白锯齿-1(protein jagged-1, *Jag1*)等。谷氨酸能突触信号通路富集的基因包括腺苷酸环化酶 4、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 抑制肽 3、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基 4、蛋白激酶 C γ 型和兴奋性氨基酸转运体 3 等(图 3, 4, 表 3)。

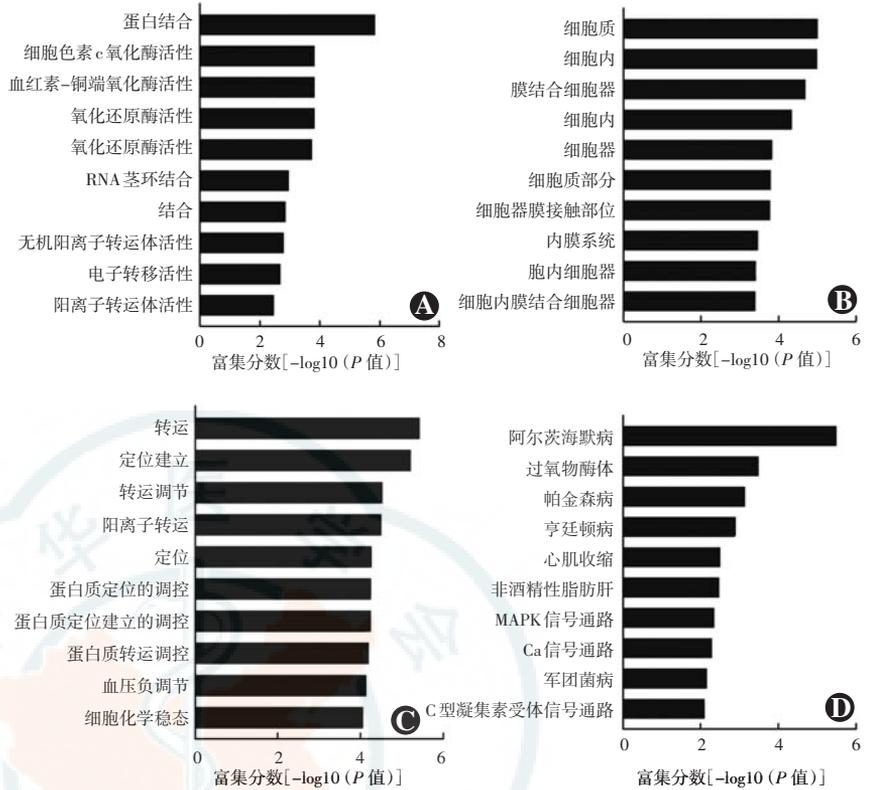


图 3 高甲基化基因的 GO 分析和通路分析 A:分子功能 B:细胞成分 C:生物学过程 D:通路分析 MAPK:丝裂原活化蛋白激酶

Figure 3 GO analysis and pathway analysis of hypermethylation genes A: Molecular function B: Cell component C: Biological process D: Pathway analysis MAPK: mitogen activated protein kinase

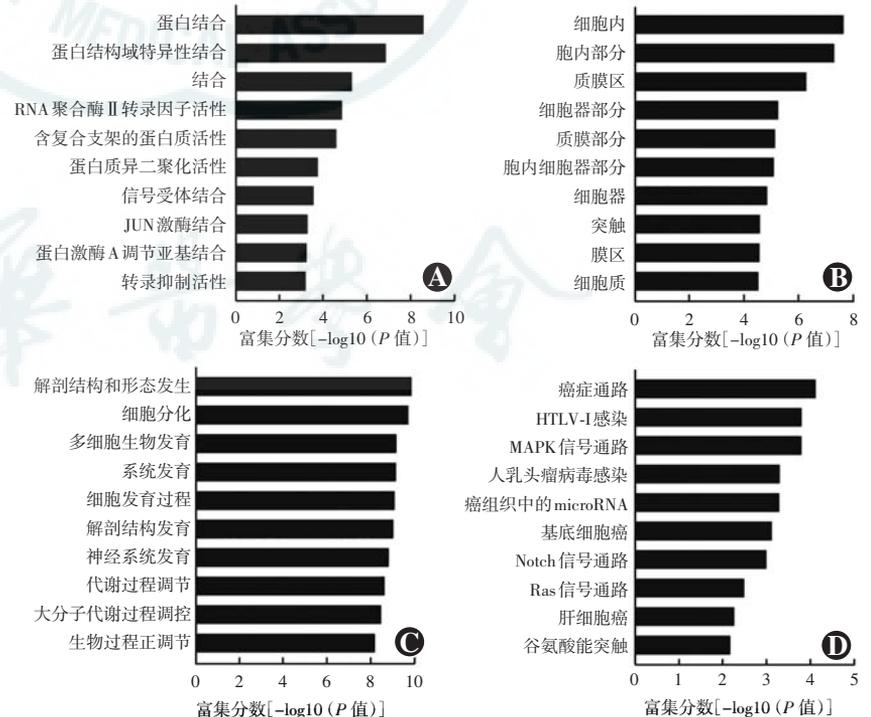


图 4 低甲基化基因的 GO 分析和通路分析 A:分子功能 B:细胞成分 C:生物学过程 D:通路分析 HTLV:人 T 细胞白血病/淋巴瘤病毒;MAPK:丝裂原活化蛋白激酶

Figure 4 GO analysis and pathway analysis of hypomethylation genes A: Molecular function B: Cell component C: Biological process D: Pathway analysis HTLV: human T-cell leukemia/lymphoma virus; MAPK: mitogen activated protein kinase

表 3 T1D 组高甲基化和低甲基化基因的通路分析
Table 3 Pathway analysis of hypermethylation and hypomethylation genes in the T1D group

通路	个数	富集分数	基因名称(前 5 个)
高甲基化			
MAPK 信号通路	18	0.070	<i>Cacng1</i> , <i>Dusp9</i> , <i>Il1rap</i> , <i>Fgf23</i> , <i>Vegfa</i>
钙信号通路	13	0.051	<i>Adrb1</i> , <i>Atp2a3</i> , <i>Bdkrb1</i> , <i>Calml3</i> , <i>Chrna7</i>
低甲基化			
MAPK 信号通路	26	0.077	<i>Cacna2d1</i> , <i>Daxx</i> , <i>Dusp10</i> , <i>Map3k1</i> , <i>Pdgfa</i>
Notch 信号通路	8	0.024	<i>Crebbp</i> , <i>Ctbp2</i> , <i>Dvl3</i> , <i>Hdac2</i> , <i>Jag1</i>
谷氨酸能突触	11	0.033	<i>Adcy4</i> , <i>Gnai3</i> , <i>Gnb4</i> , <i>Prkg</i> , <i>Slc1a1</i>

注: T1D: 1 型糖尿病; MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶; *Cacng1*: 钙电压门控通道辅助亚基 $\gamma 1$; *Dusp9*: 双特异性蛋白磷酸酶 9; *Il1rap*: 白细胞介素-1 受体辅助蛋白; *Fgf23*: 成纤维细胞生长因子 23; *Vegfa*: 血管内皮生长因子 A; *Adrb1*: $\beta 1$ 肾上腺素能受体; *Atp2a3*: 人肌质/内质网钙 ATP 酶 3; *Bdkrb1*: 缓激肽 B1; *Calml3*: 钙调蛋白样蛋白 3; *Chrna7*: 神经元乙酰胆碱受体亚基 $\alpha 7$; *Cacna2d1*: 电压依赖性钙通道亚基 $\alpha 2/\delta 1$; *Daxx*: 死亡结构域相关蛋白; *Pdgfa*: 血小板衍生生长因子亚单位 A; *Crebbp*: CREB 结合蛋白; *Ctbp2*: C-末端结合蛋白 2; *Dvl3*: 蓬乱蛋白同源物 3; *Hdac2*: 组蛋白去乙酰化酶 2; *Jag1*: 蛋白锯齿-1; *Adcy4*: 腺苷酸环化酶 4; *Gnai3*: 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 抑制肽 3; *Gnb4*: 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基 4; *Prkg*: 蛋白激酶 C γ ; *Slc1a1*: 兴奋性氨基酸转运体 3

Note: T1D: type 1 diabetes; MAPK: mitogen-activated protein kinase; *Cacng1*: calcium voltage-gated channel auxiliary subunit $\gamma 1$; *Dusp9*: dual specificity protein phosphatase 9; *Il1rap*: interleukin-1 receptor accessory protein; *Fgf23*: fibroblast growth factor 23; *Vegfa*: vascular endothelial growth factor A; *Adrb1*: $\beta 1$ adrenergic receptor; *Atp2a3*: human sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3; *Bdkrb1*: bradykinin B1; *Calml3*: calmodulin like protein 3; *Chrna7*: neuron acetylcholine receptor subunit $\alpha 7$; *Cacna2d1*: voltage dependent calcium channel subunit $\alpha 2/\delta 1$; *Daxx*: death domain-associated protein; *Pdgfa*: platelet-derived growth factor subunit A; *Crebbp*: CREB binding protein; *Ctbp2*: C-terminal binding protein 2; *Dvl3*: dishevelled homolog 3; *Hdac2*: histone deacetylase 2; *Jag1*: protein jagged-1; *Adcy4*: adenylate cyclase 4; *Gnai3*: guanine nucleotide binding protein alpha inhibitory peptide 3; *Gnb4*: guanine nucleotide binding protein subunit 4; *Prkg*: protein kinase C γ ; *Slc1a1*: excitatory amino acid transporter 3

3 讨论

T1D 的高血糖状态是胰岛 B 细胞功能缺陷所致胰岛素产生绝对不足引起的^[3]。研究表明, STZ 诱导的 T1D 大鼠视网膜可出现炎症、氧化应激、神经细胞凋亡、血-视网膜屏障破坏、视网膜神经和血管损伤的表型^[5,13,15-16]。DNA 甲基化是常见的表观遗传学调控方式, 易受环境影响, 可在多种疾病的起始和转归中发挥作用^[17-20]。MeDIP-chip 是目前检测全基因组 DNA 甲基化状态的一种芯片, 可特异性富集发生甲基化的 DNA 片段^[21]。固定于 Arraystar 4 \times 180K 芯片上的探针可特异性结合所有 RefSeq 数据库基因的启动子区域, 即 TSS 上游 1 300 bp 至下游 500 bp 的区域。与高效液相色谱法、甲基化敏感扩增多态性技术^[22]、全基因组重亚硫酸盐测序和甲基化 DNA 捕捉测序法等相

比, MeDIP-chip 具有定位甲基化的 CpG 位点、检测所有位点的胞嘧啶甲基化、成本低及测序覆盖度高等优点^[23]。本研究中采用 MeDIP-chip 技术检测 STZ 诱导的 T1D 大鼠视网膜基因差异性甲基化状况, 为 DR 的表观遗传学机制提供了理论基础。

通过 MeDIP-chip 共检测到 5 165 个基因的启动子区域存在甲基化。与对照组相比, T1D 组有 1 487 个差异性甲基化位点, T1D 组 CpG 岛存在异常甲基化状态。研究表明, 多数基因的启动子区均有 CpG 岛分布, CpG 岛是 DNA 甲基化的高发区域^[24]。CpG 岛的低甲基化或非甲基化状态通常对应基因的转录激活, 其高甲基化状态导致转录抑制, 故促进糖尿病视网膜高甲基化基因或抑制其低甲基化基因的表达或许是潜在的 DR 干预手段^[25]。Stefan 等^[26]应用全基因组 DNA 甲基化分析显示, DNA 甲基化模式的异常可能与 T1D 发病机制相关。Rui 等^[27]研究发现, T1D 进展中胰岛 β 细胞的 DNA 甲基化改变可调控胰岛素的基因表达, 提示糖尿病可能导致 DNA 甲基化。本研究侧重于发现在早期 T1D 中视网膜基因差异性甲基化, 并对其富集的 GO 及通路进行分析, 发现在细胞成分中, 多数细胞外基质基因的甲基化水平发生改变, 提示 T1D 引起视网膜的病理改变可能与细胞外基质基因的甲基化有关。在分子功能中, 蛋白结合能力的富集提示在 T1D 条件下, 视网膜中蛋白的定位以及所介导的信号传导通路均处于活跃状态。在生物学过程中, 甲基化水平改变的基因主要富集在转运过程中, 提示细胞内外物质的交换与运输可能在 T1D 的疾病过程中发挥重要作用。

通路分析显示, MAPK、Notch 和谷氨酸能突触等信号通路与 T1D 密切相关。MAPK 信号通路是 STZ 诱导的 T1D 模型中的重要通路。Malik 等^[28]研究证实, MAPK 通过激活下游核因子- κ B 而增加肿瘤坏死因子- α 水平, 进而导致炎症加剧; 同时 MAPK 上游的转化生长因子- β 可通过作用于 MAPK 而促进纤维化过程。另外, MAPK 信号级联是糖尿病诱导的促凋亡信号的重要组成部分。再有, 抗氧化物对 MAPK 活性的抑制也提示了 MAPK 在糖尿病条件下对氧化应激的促进作用^[29]。本研究通路分析显示, 糖尿病大鼠视网膜中 44 个差异性甲基化基因(18 个高甲基化和 26 个低甲基化基因) 富集在 MAPK 信号通路中, 如 *Cacna2d1*、*Daxx*、*Pusp10*、*Dusp16* 和 *Dusp3*。因此, 以这些甲基化基因为靶点的分子干预措施可能调控 MAPK 信号通路, 进而减轻糖尿病导致的炎症、纤维化、氧化应激等视网膜损伤。

Notch 信号通路对细胞分化、增生与凋亡起重要作用^[30]。研究表明, Notch 通路与胰腺发育有关。Notch 受体激动剂可促进胚胎干细胞分化为胰岛 β 细胞^[31]。Notch 通路异常与糖尿病并发症密切相关。血管内皮生长因子诱导的 Delta 样配体-4 激活后, 可作用于 Notch 通路, 调节血管收缩并抑制血管过度增生^[30]。本研究中发现糖尿病大鼠视网膜中 *Crebbp*、*Ctbp2*、*Dvl3*、*Hdac2*、*Jag1*、 $\beta 1$ 、3-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶和 γ -分泌酶亚基 PEN-2 等 8 个低甲基化基因富集在 Notch 通路, 对其甲基化进行调控可能减轻 DR 损伤。

谷氨酸能突触是中枢神经系统中主要的兴奋性突触类型。增加谷氨酸可诱发神经元去极化、钙内流和氧化应激, 造成视网膜缺血^[32]。谷氨酸能突触信号通路对于神经环路调节有重要作用。研究发现, 在 STZ 诱导的 T1D 大鼠发病后 3 个月, 视网膜谷氨酸水平增加了 1.6 倍, 且谷氨酸转换为谷氨酰胺的能力降低至对照组的 65%; 同时, 神经胶质细胞的功能也出现异常, 提示 DR 期间神经视网膜的损伤可能与早期的谷氨酸兴奋性毒性有关^[33]。一氧化氮合酶 1 适配子基因编码的蛋白能结合并激活神经型一氧化氮合酶, 使一氧化氮生成增多, 从而导致谷氨酸能神经元在突触释放过多的神经递质, 产生神经兴奋性毒性作用^[34]。本研究结果提示, 抑制谷氨酸能突触的神经递质释放或拮抗谷氨酸兴奋性毒性亦可成为早期 DR 的有效干预措施。

本研究中采用 MeDIP-chip 技术对正常大鼠和糖尿病大鼠视网膜进行基因启动子区域的甲基化水平分析, 筛选糖尿病早期差异性甲基化基因。本研究样本量较小, MeDIP-chip 技术达不到单碱基分辨率^[21], 无相关 RNA 表达谱的局限性。今后需对差异性甲基化的代表性基因进行大样本的常规方法验证和深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Hu C, Jia W. Diabetes in China: epidemiology and genetic risk factors and their clinical utility in personalized medication [J]. *Diabetes*, 2018, 67(1): 3-11. DOI: 10.2337/dbi17-0013.
- [2] 李筱荣, 刘巨平. 重视糖尿病眼部并发症的诊断和治疗[J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(7): 577-580. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.07.001.
Li XR, Liu JP. Paying close attention to diagnosis and management of diabetic ocular complications [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(7): 577-580. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.07.001.
- [3] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138: 271-281. DOI: 10.1016/j.diabres.2018.02.023.
- [4] Boitard C. Pancreatic islet autoimmunity [J]. *Presse Med*, 2012, 41(12 p 2): 636-650. DOI: 10.1016/j.lpm.2012.10.003.
- [5] Cai S, Yang Q, Hou M, et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects early diabetic retina from blood-retinal barrier breakdown and vascular leakage via MC4R [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(2): 505-522. DOI: 10.1159/000487029.
- [6] Abcouwer SF, Gardner TW. Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1311: 174-190. DOI: 10.1111/nyas.12412.
- [7] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(6): 465-476. DOI: 10.1038/nrg2341.
- [8] Liu Z, Luo W, Zhou Y, et al. Potential tumor suppressor NESG1 as an unfavorable prognosis factor in nasopharyngeal carcinoma [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27887 [2019-02-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027887>. DOI: 10.1371/journal.pone.0027887.
- [9] 王勇, 管怀进. DNA 甲基化在晶状体发育及白内障中的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(8): 747-751. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.017.
Wang Y, Guan HJ. Research progress of DNA methylation in lens development and cataract [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(8): 747-751. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.017.
- [10] Bansal A, Pinney SE. DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes [J]. *Pediatr Diabetes*, 2017, 18(3): 167-177. DOI: 10.1111/pedi.12521.
- [11] Cortijo S, Wardenaar R, Colome-Tatche M, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in Arabidopsis using MeDIP-chip [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1112: 125-149. DOI: 10.1007/978-1-62703-773-0_9.
- [12] Weng X, Liu F, Zhang H, et al. Genome-wide DNA methylation profiling in infants born to gestational diabetes mellitus [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 142: 10-18. DOI: 10.1016/j.diabres.2018.03.016.
- [13] Zhang L, Dong L, Liu X, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects retinal vascular endothelial cells from oxidative stress and apoptosis in a rat model of diabetes [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93433 [2019-03-21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093433>. DOI: 10.1371/journal.pone.0093433.
- [14] 韩倩, 张琰, 薄其玉, 等. α -黑素细胞刺激素对早期糖尿病大鼠视网膜血管渗漏的保护作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(4): 316-322. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.006.
Han Q, Zhang Y, Bo QY, et al. Alleviating effects of α -melanocyte-stimulating hormone on retinal vessel leakage in diabetic rats [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(4): 316-322. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.006.
- [15] Zhang Y, Bo Q, Wu W, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone prevents glutamate excitotoxicity in developing chicken retina via MC4R-mediated down-regulation of microRNA-194 [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15812 [2019-03-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26507936/>. DOI: 10.1038/srep15812.
- [16] 周伟, 靳春杰, 孟兆联, 等. 糖尿病视网膜病变模型鼠品系的选择 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(1): 32-35. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.007.
Zhou W, Jin CJ, Meng ZL, et al. Selection of two types of rat strains for easily diabetic retinopathy [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(1): 32-35. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.007.
- [17] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development [J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1089-1093. DOI: 10.1126/science.1063443.
- [18] Weber M, Hellmann I, Stadler M B, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(4): 457-466. DOI: 10.1038/ng1990.
- [19] 耿爽, 陈有信, 姚翔, 等. 糖尿病模型大鼠视网膜 PGC-1 α 表达和表观遗传修饰的变化 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36(6): 410-416. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.06.003.

- Geng S, Chen YX, Yao X, et al. The alterations of PGC-1 α expression and epigenetic modifications in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36(6) : 410-416. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.06.003.
- [20] 杜钰, 竺向佳, 卢奕. DNA 甲基化在常见眼科疾病中的研究进展 [J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2016, 16(1) : 60-64. DOI: 10.14166/j.issn.1671-2420.2016.01.022.
- Du Y, Zhu XJ, Lu Y. The research progress of DNA methylation in common ocular diseases [J]. Chin J Ophthalmol Otorhinolaryngol, 2016, 16(1) : 60-64. DOI: 10.14166/j.issn.1671-2420.2016.01.022.
- [21] Palmke N, Santacruz D, Walter J. Comprehensive analysis of DNA-methylation in mammalian tissues using MeDIP-chip [J]. Methods, 2011, 53(2) : 175-184. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.07.006.
- [22] Guevara MA, de Maria N, Saez-Laguna E, et al. Analysis of DNA cytosine methylation patterns using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1456 : 99-112. DOI: 10.1007/978-1-4899-7708-3_9.
- [23] 段昕好, 肖衡, 陈善元. DNA 甲基化测序技术及其在哺乳动物中的应用研究进展 [J]. 生物学杂志, 2018, 35(5) : 79-82, 86. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2018.05.079.
- Duan XY, Xiao H, Chen SY. Research progress of DNA methylation sequencing technology and application in mammal [J]. J Biol, 2018, 35(5) : 79-82, 86. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2018.05.079.
- [24] Deaton AM, Webb S, Kerr AR, et al. Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system [J]. Genome Res, 2011, 21(7) : 1074-1086. DOI: 10.1101/gr.118703.110.
- [25] Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(4) : 286-298. DOI: 10.1038/nrg2005.
- [26] Stefan M, Zhang W, Concepcion E, et al. DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology [J]. J Autoimmun, 2014, 50 : 33-37. DOI: 10.1016/j.jaut.2013.10.001.
- [27] Rui J, Deng S, Lebastchi J, et al. Methylation of insulin DNA in response to proinflammatory cytokines during the progression of autoimmune diabetes in NOD mice [J]. Diabetologia, 2016, 59(5) : 1021-1029. DOI: 10.1007/s00125-016-3897-4.
- [28] Malik S, Suchal K, Khan SI, et al. Apigenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via MAPK-NF-kappaB-TNF-alpha and TGF-beta1-MAPK-fibronectin pathways [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 313(2) : 414-422. DOI: 10.1152/ajprenal.00393.2016.
- [29] Sadek KM, Lebda MA, Nasr SM, et al. Spirulina platensis prevents hyperglycemia in rats by modulating gluconeogenesis and apoptosis via modification of oxidative stress and MAPK-pathways [J]. Biomed Pharma, 2017, 92 : 1085-1094. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.023.
- [30] Kim W, Shin YK, Kim BJ, et al. Notch signaling in pancreatic endocrine cell and diabetes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 392(3) : 247-251. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.115.
- [31] Larsen ZM, Angelo AD, Cattaneo M, et al. Complete mutation scanning of the human SEL 1L gene; a candidate gene for type 1 diabetes [J]. Acta Diabetol, 2001, 38(4) : 191-192. DOI: 10.1007/s592-001-8078-0.
- [32] Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, et al. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies [J]. Prog Retin Eye Res, 2004, 23(1) : 91-147. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2003.12.001.
- [33] Lieth E, Barber AJ, Xu B, et al; Penn State Retina Research Group. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy [J]. Diabetes, 1998, 47(5) : 815-820. DOI: 10.2337/diabetes.47.5.815.
- [34] Jaffrey SR, Snowman AM, Eliasson MJ, et al. CAPON; a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95 [J]. Neuron, 1998, 20(1) : 115-124. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80439-0.

(收稿日期: 2019-06-16 修回日期: 2020-02-14)

(本文编辑: 杜娟)

读者 · 作者 · 编者

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或 1975 年赫尔辛基宣言(2005 年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和和使用指南。

本刊对稿件组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片,为了反映组织标本大小的最精确尺度,请在电子版图片的左下方附注标尺。

(本刊编辑部)