

论著·实验研究

缺氧缺血脑损伤新生大鼠大脑皮质组织 线粒体 DNA 羟甲基化水平

彭华¹ 陈敏文² 林月钰¹ 赵方¹ 周于新¹ 王国新²

(1. 北京大学深圳医院儿科, 广东 深圳 518036;

2. 深圳清华大学研究院等离子体纳米生物芯片研发中心, 广东 深圳 518057)

[摘要] **目的** 检测缺氧缺血脑损伤新生大鼠大脑皮质组织线粒体 DNA (mtDNA) 中 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC) 的甲基化含量及动态变化。**方法** 将 24 只 7 日龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为对照组、24 h 模型组和 48 h 模型组, 每组 8 只。采用结扎颈总动脉结合缺氧法构建新生大鼠缺氧缺血性脑损伤动物模型, 对照组不接受结扎及缺氧处理。采用化学氧化法结合重亚硫酸盐转化测序技术 (oxBS-Seq) 检测大鼠大脑皮质组织 mtDNA 的 5hmC 水平。使用 Western blot 验证 5hmC 相关酶 TET1、TET2、DNMT1 的表达水平。**结果** 模型组 24 h、模型组 48 h 的 5hmC 含量显著高于对照组 ($P<0.05$)。Western blot 显示 mtDNA 中 5hmC 相关酶 DNMT1 的表达在 24 h 和 48 h 模型组中显著升高 ($P<0.05$)。与对照组相比, 多个线粒体基因位点在模型组大鼠中均呈现 5hmC 水平差异 ($P<0.05$)。**结论** 缺氧缺血脑损伤新生大鼠大脑皮质组织 mtDNA 中 5hmC 相关酶 DNMT1 的表达水平增高, 提示大鼠在缺氧缺血脑损伤后 5hmC 甲基化水平存在异常, 可能与缺氧缺血性脑损伤的调节有关。**[中国当代儿科杂志, 2019, 21(3): 300-304]**

[关键词] 缺氧缺血性脑病; 线粒体 DNA; 羟甲基化; 新生大鼠

Mitochondrial DNA hydroxymethylation level in the cerebral cortex of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

PENG Hua, CHEN Min-Wen, LIN Yue-Yu, ZHAO Fang, ZHOU Yu-Xin, WANG Guo-Xin. Department of Pediatrics, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong 518036, China (Email: penghua1111@126.com)

Abstract: Objective To study the methylation level and dynamic change of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) in mitochondrial DNA (mtDNA) in the cerebral cortex of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. **Methods** A total of 24 male Sprague-Dawley rats aged 7 days were randomly divided into control group, 24-hour model group and 48-hour model group ($n=8$ each). Common carotid artery ligation combined with hypoxic treatment was performed to establish an animal model of hypoxic-ischemic brain damage. The rats in the control group were not given ligation or hypoxic treatment. Oxidative bisulfite sequencing was used to measure the level of 5hmC in the cerebral cortex. Western blot was used to measure the expression of 5hmC-related enzymes TET1, TET2 and DNMT1. **Results** The 24- and 48-hour model groups had a significantly higher level of 5hmC than the control group ($P<0.05$). Western blot showed a significant increase in the expression of DNMT1 in the 24- and 48-hour model groups ($P<0.05$). Compared with the control group, the 24- and 48-hour model groups had significant differences in the 5hmC level at multiple mitochondrial genetic loci ($P<0.05$). **Conclusions** The level of DNMT1, a key enzyme for 5hmC modification in mtDNA, in the cerebral cortex increases in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage, suggesting that there is an abnormal methylation level of 5hmC after hypoxic-ischemic brain damage, which might be associated with the regulation of hypoxic-ischemic brain damage. **[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(3): 300-304]**

Key words: Hypoxic-ischemic encephalopathy; Mitochondrial DNA; Hydroxymethylation; Neonatal rats

[收稿日期] 2018-09-18; [接受日期] 2019-02-03

[基金项目] 深圳市科技研发资金 (JCYJ20160428172856747)。

[作者简介] 彭华, 女, 硕士, 副主任医师。Email: penghua1111@126.com。

缺氧缺血性脑病 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) 是常见的可造成严重危害的新生儿脑病, 发生率约为 1.5%, 是新生儿死亡、严重脑瘫、神经感觉缺陷和认知障碍的重要病因之一^[1-2]。目前尚未有针对缺氧缺血性脑损伤的有效治疗措施, 其疾病机制也尚不明确。研究显示, 表观遗传学与氧化应激反应密切相关, 可参与调节活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 并与癫痫、缺血性脑中风等神经系统疾病的细胞凋亡、坏死等生物学过程有关^[3-5]。在 HIE 中, 表观遗传修饰也被证实参与调节疾病的致病过程^[6]。但是 HIE 中, 大脑组织线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的表观遗传修饰, 如 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC) 的修饰水平的变化尚未见报道。

本研究构建了新生儿 HIE 大鼠模型, 通过比较对照组和模型组之间 mtDNA 的 5hmC 表达水平的差异探讨 HIE 模型鼠 mtDNA 中表观遗传修饰的作用。

1 材料与方法

1.1 动物造模与样本处理

随机将 24 只 7 日龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随机分为对照组、24 h 模型组和 48 h 模型组, 每组 8 只。采用动脉结扎的方法造模, 分离各组大鼠右颈总动脉, 模型组大鼠用线结扎血管两端 (相隔一定距离), 缝合伤口, 等待大鼠苏醒, 苏醒后的大鼠放置于 8% 氧气的容器内 2 h; 对照组不进行动脉结扎及缺氧处理^[7]。实验结束后, 解剖各组大鼠, 收集大脑皮质组织, 使用 Mitochondrial DNA Isolation Kit (Biovision, 德国) 提取各组大鼠大脑皮质组织 mtDNA。操作按照试剂盒说明书进行。

1.2 线粒体羟甲基化测序和检测

用琼脂糖凝胶电泳检测提取 mtDNA 的完整性, 用 Nanodrop2000 检测 DNA 纯度, 并用 Qubit 对 DNA 浓度及总量进行定量。超声将 mtDNA 打断成为 350 bp 左右的片段, 采用化学氧化法结合重亚硫酸盐转化测序技术 (oxidative bisulfite sequencing, oxBS-Seq) 测序并构建文库, 片段经末端修复、加 A 碱基、加接头后纯化产物。高温变形后用氧化剂对 DNA 进行氧化反应, 随后进行

Bisulfite (BS) 处理、PCR 扩增, 所得文库经质检合格后, 在 illumina X ten PE150 平台上机测序。

采用试剂盒 MethylFlash™ Hydroxymethylated DNA Quantification Kit (Epigentek, 美国) 检测大鼠大脑皮质组织 mtDNA 的 5hmC 甲基化水平, 实验步骤按照说明书进行。

1.3 Western blot 检测

按照试剂盒 Tissue Mitochondria Isolation Kit (上海碧云天生物技术有限公司) 说明书分离大鼠大脑皮质组织线粒体。液氮研磨大鼠皮质组织线粒体后, 使用 RIPA 在低温条件下进行组织裂解, 离心去除沉淀, 收集上清。使用 BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 方法进行蛋白定量。使用 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上, 4℃ 条件下过夜孵育 1011 易位甲基胞嘧啶双加氧酶 1 (ten-eleven translocation protein1, TET1) 多克隆抗体 (美国 Abcam 公司, 1:1000)、TET2 多克隆抗体 (美国 Invitrogen 公司, 1:1000) 和 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, 1:100) 一抗, 室温下孵育 HRP 标记山羊抗鼠或山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (广州永诺生物科技有限公司, 1:3000) 二抗 1 h 后, 加入 ECL 化学发光液及显色液显色。兔抗人线粒体外膜转位酶 20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOMM20, 武汉博士德生物工程有限公司, 1:100) 单克隆抗体作为内参蛋白。胶片显影后扫描, 进行灰度值定量分析, 结果以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比进行表示。

1.4 生物信息学分析

进行单个位点差异 5hmC 分析, 对 BS 和 oxBS 测序数据中的单个 CpG 位点进行卡方检验: oxBS 数据中, 两个样本统计检验结果 $P < 0.05$ 的位点定义为差异 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 位点; 按照公式计算其羟甲基化水平:

羟甲基化水平 = 甲基化和羟甲基化水平 - 真实甲基化水平。

BS 数据中, 两个样本统计检验结果 $P < 0.05$ 的位点, 且该位点样本间修饰水平变化趋势与 oxBS 数据中样本间修饰水平变化趋势相反, 则该位点定义为 5hmC 位点。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验; 计数资料采用百分率 (%) 表示, 对测序数据进行卡方检验筛选有意义位点。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠大脑皮质 mtDNA 的 5hmC 甲基化水平变化

对照组、模型组 24 h、模型组 48 h 大鼠大脑皮质 mtDNA 的 5hmC 甲基化水平比较差异有统计学意义 ($F=93.810$, $P < 0.001$)。模型组 24 h、模型组 48 h 的 5hmC 甲基化水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 两模型组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。

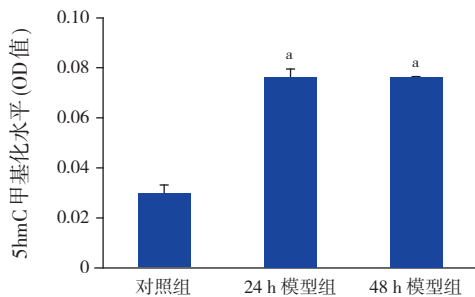


图1 各组大鼠大脑皮质 mtDNA 的 5hmC 甲基化水平比较 ($n=8$) a 示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 甲基化酶在 HIE 模型大鼠大脑皮质线粒体中的表达检测

Western blot 检测甲基化过程重要酶 TET1、TET2 和 DNMT1 的表达结果显示: TET1 和 TET2 的蛋白表达水平在各组间比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$); 但与对照组比较, DNMT1 的表达水平在 24 h 组和 48 h 组均显著上调 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 HIE 模型大鼠大脑皮质组织中多个线粒体基因位点 5hmC 甲基化水平差异

基于 BS 和 α BS 测序数据中的单个 CpG 位点进行卡方检验, 筛选差异羟甲基化位点。结果显示,

相比对照组, 24 h 模型组 9 个基因 15 个位点呈现 5hmC 甲基化水平差异 ($P < 0.05$, 表 1)。在 48 h 模型组中, 5hmC 甲基化水平在线粒体 8 个基因的 14 个位点与对照组相比呈现差异 ($P < 0.05$, 表 2)。

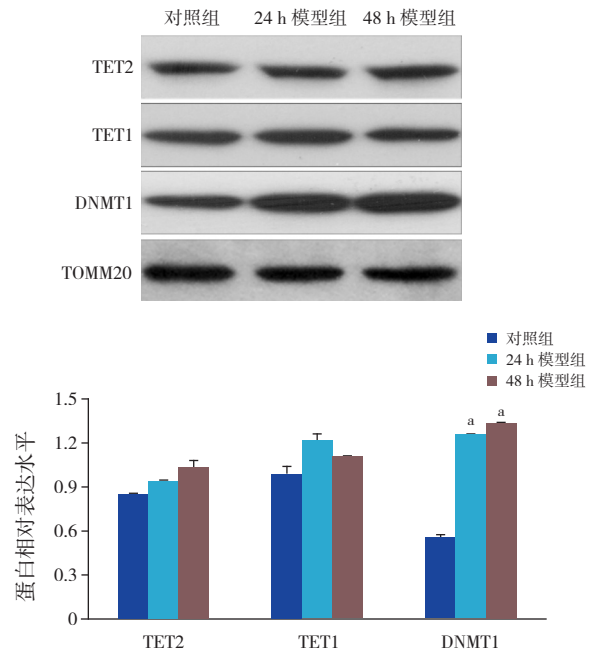


图2 Western blot 检测各组大鼠大脑皮质线粒体中甲基化过程重要酶 TET1、TET2 和 DNMT1 的蛋白表达水平 上图为各组蛋白表达电泳图; 下图为各组蛋白相对表达量统计图 ($n=8$), a 示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表1 24 h 模型组和对照组多个线粒体基因位点的 5hmC 甲基化率比较 (%)

基因名	染色体	位置	正负链	对照组	24 h 模型组	χ^2 值	P 值
Mt-nd1	chrM	2924	-	4.78	3.07	4.146	0.042
Mt-nd2	chrM	4600	-	2.71	1.37	5.293	0.021
Mt-co1	chrM	6330	+	0.28	2.06	4.006	0.045
Mt-co1	chrM	6760	+	2.86	0.70	4.085	0.043
Mt-co2	chrM	7177	-	4.57	2.63	5.271	0.022
Mt-co2	chrM	7521	+	4.01	1.35	5.430	0.020
Mt-co2	chrM	7525	-	2.69	0.66	9.394	0.002
Mt-atp6	chrM	8376	+	6.80	2.61	5.581	0.018
Mt-co3	chrM	8938	-	2.10	4.88	5.715	0.017
Mt-nd4	chrM	10298	-	1.19	2.54	4.212	0.040
Mt-nd4	chrM	10820	-	1.81	0.38	7.142	0.008
Mt-nd4	chrM	11325	+	0.40	3.15	4.706	0.030
Mt-nd5	chrM	13098	+	3.21	0.74	4.504	0.034
Mt-cyb	chrM	14705	+	3.70	0.63	3.980	0.046
Mt-cyb	chrM	14980	-	4.64	2.44	5.790	0.016

表 2 48 h 模型组和对照组多个线粒体基因位点的 5hmC 甲基化率比较 (%)

基因名	染色体	位置	正负链	对照组	48 h 模型组	χ^2 值	P 值
Mt-nd2	chrM	4375	-	1.54	3.81	9.324	0.002
Mt-co1	chrM	5884	-	2.94	1.28	6.721	0.010
Mt-co1	chrM	6714	+	0	2.49	4.197	0.040
Mt-co1	chrM	6760	+	2.86	0.41	7.826	0.005
Mt-co2	chrM	7474	-	2.57	1.16	4.164	0.041
Mt-co2	chrM	7521	+	4.01	1.40	5.341	0.021
Mt-co2	chrM	7525	-	2.69	1.04	5.807	0.016
Mt-co2	chrM	7568	-	3.96	2.07	4.429	0.035
Mt-atp6	chrM	8115	-	4.40	2.45	7.003	0.008
Mt-atp6	chrM	8441	-	2.26	1.11	4.108	0.043
Mt-nd3	chrM	9574	-	2.49	1.27	5.345	0.021
Mt-nd4	chrM	11196	-	2.15	1.02	4.688	0.030
Mt-nd5	chrM	13039	-	3.35	1.95	5.117	0.033
Mt-cyb	chrM	14705	+	3.70	0.82	6.197	0.037

3 讨论

尽管已有研究提示甲基化修饰与新生大鼠大脑的缺血缺氧损伤有关,但是有关 mtDNA 中的甲基化修饰研究仍较为缺乏。本研究发现缺血缺氧大鼠大脑皮质组织 mtDNA 的 5hmC 水平比对照组显著升高,mtDNA 甲基化过程的关键酶 DNMT1 的表达也升高,其中,在 24 h 模型组中有 15 个 mtDNA 的位点 5hmC 水平呈现差异,48 h 模型组中有 14 个 mtDNA 的位点呈现 5hmC 水平差异。

线粒体是细胞内细胞器,含有 mtDNA,是一种环状双链 DNA,长度为 16 569 bp,编码 tRNA、rRNA 和呼吸链重要组分蛋白,包括 ND 基因(ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5 和 ND6)、细胞色素 b (cytochrome b, cyb)、细胞色素 C 氧化酶(CO1、CO2 和 CO3)、ATPase 6 和 ATPase 8^[8-9]。与核 DNA 一样,mtDNA 也可被甲基化修饰,目前发现甲基化形式有 5hmC 和 5mC^[10]。5hmC 由 TET 蛋白(包括 TET1、TET2 和 TET3)催化而形成^[11]。具体作用机制是:DNMT1 在线粒体基质中与 CpG 富集的 mtDNA 位点结合,促进 mtDNA 甲基化的形成和维持,进一步影响 5mC 向 5hmC 的转化^[11-12]。本研究中,我们发现在大鼠 HIE 模型中,缺血缺氧处理后 24 h 和 48 h 均出现大脑皮质组织 mtDNA 中 5hmC 总量的升高,同时 DNMT1 也呈现高表

达,这一对应的关系,支持 DNMT1 在 mtDNA 甲基化中的促进作用。但是,未观察到 TET1 和 TET2 的蛋白表达水平有改变。此前有研究表明衰老模型大鼠脑组织中 5mC 和 5hmC 合成涉及的酶 DNMT1、TET1、TET2 和 TET3 的表达变化,发现在额叶皮质中,衰老降低了 mtDNMT1 信使 RNA 水平而不影响 TET1~TET3^[13]。而在小脑中,TET2 和 TET3 表达增加但 DNMT1 则未受影响。由此提示并非所有的甲基化酶都在同一时间或者同一处理背景下发生变化。

新生儿缺氧可导致大脑发育过程中发生不可逆损伤,增加新生儿大脑中枢神经系统畸形的风险及后代长期神经系统并发症^[14]。缺氧与 DNA 修饰有关。在发育过程中,整个不同的大脑皮质层中均出现 DNA 甲基化程序启动的现象。研究显示,胎儿中大脑皮质细胞水平的 DNA 甲基化水平在刺激下可发生变化,如酒精可改变潜在的表型异常导致皮质变薄,系统性红斑狼疮患者抗氧化反应降低也与 DNA 甲基化有关。值得注意的是,作为大脑中的两个关键甲基化标记,随着神经系统发育逐渐成熟,5mC 和 5hmC 的修饰分布也发生相应改变,提示缺氧对 DNA 修饰的调控作用^[15]。然而缺氧环境对大脑皮质 mtDNA 的影响则知之甚少。多项研究表明,在缺氧环境下,线粒体参与能量调节,可生成受体操纵性钙通道并诱导细胞凋亡^[16-18]。在本研究中,我们进一步观察到缺氧对新生大鼠大脑皮质组织 mtDNA 修饰水平的影响。在大脑皮质组织 mtDNA 中检测到 9 个基因 15 个位点和 8 个基因 14 个位点在造模后 24 h 和 48 h 呈现 5hmC 修饰水平差异,提示缺血缺氧的环境可以造成大脑皮质细胞 mtDNA 的 5hmC 修饰水平差异,而这些 mtDNA 的甲基化修饰可导致 mtDNA 基因异常表达。

此前的研究发现 mtDNA 的 5hmC 修饰与细胞增殖及凋亡等行为密切相关。研究显示,5hmC 修饰可参与基因激活及表达量增强从而调节细胞分化、发育和衰老等生物学行为^[19-21]。此外,在疾病的发生过程中,DMNT 转移酶可通过线粒体介导的细胞凋亡途径,影响 Bcl-2 和 BAX 的表达,最终导致细胞凋亡^[22-23]。相反,去线粒体甲基化可引发一系列生物学行为的改变,包括细胞增殖增加和细胞凋亡减少等现象^[24]。在本研究中,我们

观察到模型大鼠中线粒体 CO1、ATP6 和 ND2 基因位点存在 5hmC 修饰水平差异,提示 5hmC 在模型中可能对基因转录具有激活作用。我们推测这种激活可能促进 MT-CO1、ATP6 和 ND2 的表达,调节与线粒体活性氧的产生和细胞凋亡的发生有关的分子事件^[17-18]。此外,在胎儿发育期间,缺氧这样剧烈环境条件可能通过刺激各种表观遗传修饰而影响分子水平的脑发育,并因此增加后代神经障碍的易感性。因此,本研究结果提示表观遗传修饰可能是胎儿发育过程中早期环境因素调节基因组信息输出并影响生命后期表型发育的主要机制。

综上,本研究发现 5hmC 修饰水平的差异可能与缺氧环境下线粒体的氧化应激调节有关,可能是 HIE 发展过程中造成大脑损伤的重要机制之一。

[参 考 文 献]

- [1] Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(2): 156-166.
- [2] Laptook AR, Shankaran S, Tyson JE, et al. Effect of therapeutic hypothermia initiated after 6 hours of age on death or disability among newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2017, 318(16): 1550-1560.
- [3] Qureshi IA, Mehler MF. Emerging role of epigenetics in stroke: part 1: DNA methylation and chromatin modifications[J]. *Arch Neurol*, 2010, 67(11): 1316-1322.
- [4] Hwang JY, Aromolaran KA, Zukin RS. Epigenetic mechanisms in stroke and epilepsy[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1): 167-182.
- [5] Thompson JW, Dave KR, Young JI, et al. Ischemic preconditioning alters the epigenetic profile of the brain from ischemic intolerance to ischemic tolerance[J]. *Neurotherapeutics*, 2013, 10(4): 789-797.
- [6] Felling RJ, Song H. Epigenetic mechanisms of neuroplasticity and the implications for stroke recovery[J]. *Exp Neurol*, 2015, 268: 37-45.
- [7] Wang Y, Cheung PT, Shen GX, et al. Hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat model: relationship between lesion size at early MR imaging and irreversible infarction[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2006, 27(1): 51-54.
- [8] Blanch M, Mosquera JL, Ansoleaga B, et al. Altered mitochondrial DNA methylation pattern in alzheimer disease-related pathology and in parkinson disease[J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(2): 385-397.
- [9] Asin-Cayuela J, Gustafsson CM. Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells[J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(3): 111-117.
- [10] Iacobazzi V, Castegna A, Infantino V, et al. Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool[J]. *Mol Genet Metab*, 2013, 110(1-2): 25-34.
- [11] Shock LS, Thakkar PV, Peterson EJ, et al. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(9): 3630-3635.
- [12] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification[J]. *Nature*, 2010, 466(7310): 1129-1133.
- [13] Öztürk NC, Resendiz M, Öztürk H, et al. DNA methylation program in normal and alcohol-induced thinning cortex[J]. *Alcohol*, 2017, 60: 135-147.
- [14] Zinovkina LA, Zinovkin RA. DNA methylation, mitochondria, and programmed aging[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2015, 80(12): 1571-1577.
- [15] Garcia EG, Olmos CF, Matilla MF, et al. DNA hypomethylation and decreased hydroxymethylation is associated with decreased antioxidant response in systemic lupus erythematosus patients[J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(Suppl 2): 291.
- [16] Naveenkumar SK, Hemshekhar M, Sundaram MS, et al. Cell-free methemoglobin drives platelets to apoptosis via mitochondrial ROS-mediated activation of JNK and p38 MAP kinase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(1): 183-191.
- [17] Shi Y, Hu Y, Wang J, et al. Genetic diversities of MT-ND1 and MT-ND2 genes are associated with high-altitude adaptation in yak[J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2018, 29(3): 485-494.
- [18] Niedzwiecka K, Tisi R, Penna S, et al. Two mutations in mitochondrial ATP6 gene of ATP synthase, related to human cancer, affect ROS, calcium homeostasis and mitochondrial permeability transition in yeast[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(1): 117-131.
- [19] Dzitoyeva S, Chen H, Manev H. Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria[J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(12): 2881-2891.
- [20] Chowdhury B, Seetharam A, Wang Z, et al. A study of alterations in DNA epigenetic modifications (5mC and 5hmC) and gene expression influenced by simulated microgravity in human lymphoblastoid cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147514.
- [21] Han D, Lu X, Shih AH, et al. A highly sensitive and robust method for genome-wide 5hmC profiling of rare cell populations[J]. *Mol Cell*, 2016, 63(4): 711-719.
- [22] Sun N, Zhang J, Zhang C, et al. DNMTs inhibitor SGI-1027 induces apoptosis in Huh7 human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 5799-5806.
- [23] Ding K, Jiang J, Chen L, et al. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 silencing expedites the apoptosis of non-small cell lung cancer cells via modulating DNA methylation[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 7499-7507.
- [24] Tong H, Zhang L, Gao J, et al. Methylation of mitochondrial DNA displacement loop region regulates mitochondrial copy number in colorectal cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 5347-5353.

(本文编辑: 万静)