表观遗传毒性检测方法研究进展

鲁　姣[1,2]，周长慧[2]，杨　彬[2]，常　艳[1,2]*

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203）

摘要：传统遗传毒性测试主要关注 DNA 序列本身的损伤，难以识别不伴随碱基改变但可能引发长期或跨代表型效应的潜在毒性风险。文章系统综述了近年来不断发展的表观遗传毒性检测方法，如 DNA 甲基化、组蛋白翻译后修饰及非编码 RNA 的检测技术，比较其技术原理、优势与局限性，并探讨其在不同应用场景中的适用性，为药物安全性评价及相关毒理学研究中检测策略的合理选择提供参考。

关键词：表观遗传毒性；DNA 甲基化；组蛋白修饰；非编码 RNA；检测方法；研究进展

中图分类号：Q75；R968　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)03-0268-08

引用：鲁　姣, 周长慧, 杨　彬, 等. 表观遗传毒性检测方法研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(3): 268-275. DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2026.03.002

Progress in Research on Methods for Detecting Epigenetic Toxicity

LU Jiao[1,2], ZHOU Changhui[2], YANG Bin[2], CHANG Yan[1,2]*

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai InnoStar Bio-tech Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Epigenetics refers to the study of heritable changes in gene expression that occur without alterations to the DNA base sequence, primarily through mechanisms such as DNA methylation, histone modification, and non-coding RNA. Traditional genotoxicity testing focuses mainly on damage to the DNA sequence itself, making it difficult to identify potential toxicity risks that do not involve sequence changes but may lead to long-term or transgenerational phenotypic effects. As research into epigenetic regulatory mechanism advances, the importance of epigenetics as a novel target for toxicity assessment has become increasingly evident. This article systematically reviews recently developed methods for detecting epigenetic alterations, including techniques for analyzing DNA methylation, histone post-translational modification, and non-coding RNA. It compares the principles, advantages, and limitations of these methods and discusses their applicability across different application scenarios, providing a reference for selecting appropriate detection strategies in drug safety evaluation and related toxicological studies.

Key Words: epigenetic toxicity; DNA methylation; histone modification; non-coding RNA; detection method; research progress

表观遗传修饰，如 DNA 甲基化、组蛋白修饰及非编码 RNA（non-coding RNA，ncRNA）等，在基因表达调控与表型塑造中发挥关键作用[1]。表观遗传毒性也是遗传毒性研究中需要重点关注的部分。表观遗传机制通常复杂、微妙，例如内分泌干扰物（如双酚 A）或特定药物在低于引起基因突变的剂量下，也可能引起全基因组或特定基因位点（如大鼠精子中与睾丸功能障碍相关的差异性甲基化区域）的 DNA 甲基化异常，或改变关键的组蛋白修饰标志，从而沉默或激活相关基因，驱动病理过程[2]。

传统遗传毒性测试可借助体外和体内试验，识别通过各种机制引起遗传损伤的化合物，是支持药物进入临床试验的重要组成部分[3]。然而，传统遗

收稿日期：2025-10-09

作者简介：鲁　姣，硕士研究生，专业方向：遗传毒理学。

通信作者：常　艳，研究员，从事药物毒理学研究。

传毒性测试难以检出不涉及DNA序列本身改变，但可能通过表观遗传机制影响基因表达的化合物。同时，传统遗传毒性测试大多基于细胞或动物模型进行短期观测，难以全面反映化合物在多代传递中的潜在影响及其在低剂量或慢性暴露下的潜在危害[4-5]。因此，为了更全面地评估化合物的潜在危害，同时弥补传统遗传毒性测试的不足，表观遗传毒性测试开始被应用于检测化合物的毒性。本文综述了目前较为常用的表观遗传毒性测试方法，涵盖检测DNA甲基化模式改变、组蛋白翻译后修饰（histone post-translational modification，HPTM）变化以及ncRNA表达差异等的技术，并对比了各方法的原理、优势与局限性等。

1 DNA甲基化检测方法

DNA甲基化是很常见且研究较为深入的DNA共价修饰方式，主要由DNA甲基化酶（DNA methyltransferase，DNMT）家族催化。值得注意的是，成熟的哺乳动物细胞中仍能表达大量的DNMT，参与基因调控和细胞分化[6]。由于亚硫酸氢盐能选择性地将未甲基化的胞嘧啶（cytosine，C）转化为尿嘧啶（uracil，U），而不能与5-甲基胞嘧啶（5-methylcytosine，5mC）反应，因此常被用于DNA甲基化的鉴别。基于这种特异性的DNA甲基化检测方法包括甲基化特异性PCR（methylation-specific polymerase chain reaction，MSP）和亚硫酸氢盐测序（bisulfite sequencing，BS-Seq）等[7]。

1.1 靶向性检测方法

当研究需要对已知毒性通路中的关键基因进行甲基化状态验证时，靶向性检测是高效且经济的选择。MSP法通常会针对目标序列设计2套特异性引物，通过PCR技术扩增经亚硫酸氢盐处理后的样品并检测其中特定基因位点的甲基化状态[8]。该技术检测灵敏度高（可检测出0.1%甲基化水平的变化）、特异性强且操作简便，是常用的靶向性检测方法，被广泛用于生物标志物和药物作用机制研究[9]。TIERLING等[10]采用MSP法检测胶质母细胞瘤患者*MGMT*启动子区域的甲基化状态，并将其作为预测烷化剂（如替莫唑胺）疗效的生物标志物。结果显示，该区域甲基化水平高的患者生存期更长。WEI等[11]将MSP法用于药物作用机制研究，结果显示川续断皂苷Ⅵ能通过降低*GPX4*启动子的甲基化水平来改善糖尿病导致的骨质疏松。但MSP法依赖精确的引物设计，且存在亚硫酸氢盐转化不完全的风险。为了弥补这些局限性，多种改进技术相继被开发应用。例如，定量甲基化特异性PCR（quantitative methylation-specific polymerase chain reaction，qMSP）可对经甲醛溶液固定、石蜡包埋等处理的组织样本进行定量检测[12]；数字甲基化特异性PCR（digital methylation-specific polymerase chain reaction，dMSP）能有效检测并定量分析唾液等成分复杂的液体活检样本[13]；甲基化特异性多重连接依赖性探针扩增（methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification，MS-MLPA）技术则可同时分析多基因的甲基化状态[14]。

1.2 全基因组高通量检测方法

对于探索未知机制或评估化合物对全基因组表观遗传景观的整体影响时，高通量测序技术更具优势。BS-Seq技术可识别全基因组范围内的甲基化位点，实现单碱基分辨率的甲基化图谱分析。根据测序策略的不同，BS-Seq技术可分为全基因组亚硫酸氢盐测序（whole genome bisulfite sequencing，WGBS）和简化代表性亚硫酸氢盐测序（reduced representation bisulfite sequencing，RRBS）。WGBS作为甲基化分析的金标准，可覆盖全基因组约90%以上CpG岛的单碱基分辨率甲基化图谱。在母体药物暴露与跨代行为研究中，DONG等[15]利用WGBS揭示了甲基苯丙胺引起的伏隔核全基因组甲基化重塑，识别出大量传统方法难以检测的非CpG岛差异性甲基化区域，为理解行为敏感的跨代遗传提供了表观遗传信息。相比之下，RRBS通过酶切CpG岛密集区域，以较低成本实现了功能区域的深度覆盖。OTSUKA等[16]利用人诱导多能干细胞模型结合荧光报告系统筛选增强DNA甲基化水平的候选化合物，再采用RRBS对候选基因的启动子区域进行甲基化定量分析，验证了化合物暴露与基因表达下调的关联性。

随着三代测序技术的发展，研究者基于美国

PacBio 公司和英国 Oxford Nanopore 公司的技术平台开发了长读长测序法，有效改善了短读长测序法在重复序列和等位基因特异性甲基化分析中的局限性。传统的 BS-Seq 技术存在定位率低、基因组覆盖不均匀，以及无法识别 5mC 和 5- 羟甲基胞嘧啶（5-hydroxymethylcytosine，5hmC）的缺陷。为此，研究者相继研发了载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽偶联的表观遗传测序（apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-coupled epigenetic sequencing，ACE-Seq）、10-11 易位（ten-eleven translocation，TET）辅助的吡啶硼烷测序（TET-assisted pyridine borane sequencing，TAPS）、酶促甲基化测序（enzymatic methylation sequencing，EM-Seq）、氧化亚硫酸氢盐测序（oxidative bisulfite sequencing，oxBS-Seq）等技术。SCHUTSKY 等 [17] 基于 DNA 脱氨酶对未甲基化胞嘧啶的特异性脱氨基作用，开发了无需亚硫酸氢盐处理的 ACE-Seq 技术，能在低 DNA 输入量的基础上实现单碱基分辨 5mC 和 5hmC，并成功应用于小鼠皮质兴奋性神经元的 5hmC 图谱构建。通过该法绘制的大脑皮质兴奋性神经元中 5hmC 的单碱基分辨率图谱显示，5hmC 高度富集于 CG 二核苷酸区域。该法不仅避免了传统 BS-Seq 技术导致的 DNA 降解问题，还能通过优化反应条件显著提高 5hmC 检测的特异性和灵敏度，为表观遗传修饰研究提供了更可靠的技术手段。LIU 等 [18] 开发的 TAPS 法需在 TET 甲基胞嘧啶双加氧酶辅助的条件下检测，不仅能区分 5mC 和 5hmC，还具有减少 DNA 损伤、灵敏性高及基因组覆盖均匀的优势。SIEJKA-ZIELIŃSKA 等 [19] 优化了 TAPS 技术并用于循环游离 DNA（circulating cell-free DNA，cfDNA）的检测，通过绘制 cfDNA 的甲基化图谱区分恶性肿瘤与癌前炎症状态，展现了该技术在检测致癌物暴露早期引起表观遗传改变情况的潜力。BOOTH 等 [20] 为了定量分析定位基因组 DNA 中的 5hmC 水平，开发了能达到单核苷酸分辨率的 oxBS-Seq 技术，并成功在小鼠胚胎干细胞上定量解析了 CpG 岛中 5hmC 的水平，提示 5hmC 在这些区域可能存在主动去甲基化或表观遗传重编程作用。VAISVILA 等 [21] 开发的 EM-Seq 法同样使用 TET 酶来确定胞嘧啶甲基化状态，可避免 DNA 降解、假阳性及测序覆盖不均匀等情况。

ELISA 法也可特异性识别 5mC 或 5hmC，并实现定量分析，适用于全基因组的定量分析 [22]。WANG 等 [23] 开发了基于非破坏性全酶法的直接甲基化测序（direct methylation sequencing，DM-Seq）技术，实现了 5mC 的直接检测，分辨率可达单碱基级别，也避免了 BS-Seq 技术对 DNA 的破坏，以及对 5mC 与 5hmC 的误判。DM-Seq 技术仅需纳克级的 DNA 输入量，使其在肿瘤异质性分析、cfDNA 表观遗传检测等样本量有限的场景中具有巨大的应用潜力。例如在胶质母细胞瘤样本中，DM-Seq 技术可用于揭示 BS-Seq 技术无法区分的、与预后相关的 CpG 位点甲基化真实水平。

2 HPTM 检测

2.1 HPTM

表观遗传调控不仅依赖于 DNA 甲基化，HPTM 同样在染色质结构与基因表达调控中发挥关键作用。HPTM 通过改变染色质结构与核小体可及性，调控基因转录活性。以乙酰化为例，组蛋白乙酰转移酶介导的赖氨酸乙酰化通常与开放染色质及转录激活相关；而去乙酰化可促进染色质压缩和基因沉默。特定修饰［如组蛋白 H3 上第 27 位赖氨酸残基发生乙酰化（H3K27ac）］能标记活跃的增强子，驱动细胞类型特异性基因表达程序的建立 [24]。在疾病（尤其是恶性肿瘤）的发生、发展中，HPTM 的异常调控已成为关键病理机制之一。例如，基于该病理机制研发的组蛋白去乙酰化酶抑制剂伏立诺他，已在临床上用于治疗 T 细胞淋巴瘤。随着对 HPTM 作用机制研究的不断深入，针对新型组蛋白修饰（如乳酰化、巴豆酰化、琥珀酰化等）的检测技术与抑制剂研发也在逐步推进 [25]。

2.2 HPTM 检测方法

目前，检测 HPTM 的主要方法包括抗体依赖的染色质免疫沉淀（chromatin immunoprecipitation，ChIP）、靶向剪切及转座酶标记（cleavage under targets and tagmentation，CUT&Tag）等高灵敏度技术，

以及质谱分析等非抗体依赖方法。

ChIP 能全基因组定位 HPTM 位点，使用特异性抗体捕获与目标蛋白结合的 DNA 片段，并采用微阵列分析或测序分析等方法检测这些片段[26]。与亚硫酸氢盐处理一样，ChIP 检测被认为是研究 HPTM 和染色质结构的基本程序。YAMADA 等[27]构建的 epi-TK 毒性检测体系结合了 ChIP 和定量 PCR（quantitative PCR，qPCR）技术，可用于量化化学暴露后特定 HPTM 在靶基因启动子区的动态变化，证实非遗传毒性致癌物佛波酯可引起 *TK* 基因及管家基因启动子区的 H3K27ac 富集水平显著降低，且该变化与 *TK* 回复突变频率下降的表型结果直接相关。REN 等[28]以酵母为模型，采用 ChIP 与 DNA 微阵列杂交芯片结合的 ChIP-chip 技术绘制了转录激活因子 Gal4 和 Ste12 在全基因组范围内的结合图谱，鉴定出二者直接调控的靶基因，并揭示了它们在碳源响应和交配信息素响应中的协同调控功能。但由于该技术依赖于芯片探针的设计，覆盖范围受限于已知基因组区域，且分辨率较低，目前已被逐步替代。染色质免疫沉淀测序（chromatin immunoprecipitation sequencing，ChIP-seq）技术可通过核心组蛋白标记［如组蛋白 H3 上第 4 位赖氨酸残基发生三甲基化（H3K4me3）、H3K27ac 等］，在全基因组范围内识别启动子、增强子、转录区域、异染色质等特征性染色质区域，被广泛应用于绘制各种转录因子的结合位点和组蛋白修饰图谱[29]。文献[30]报道可用 ChIP-seq 技术分析小鼠经辐照后不同组织（胸腺、脾脏和肝脏）中 *p53* 基因的 DNA 结合位点，从而解释组织特异性辐射敏感性的分子机制。此外，在一项针对人类胎儿造血发育的研究[31]中，研究者将单细胞染色质免疫沉淀测序（single-cell chromatin immunoprecipitation sequencing，scChIP-seq）和 单细胞转座酶可及染色质的高通量测序（single-cell assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing，scATAC-seq）技术联合应用。该方法能同时捕捉单细胞的转录状态与染色质开放动态，为解析细胞异质性及染色质动态调控提供了高分辨率的解决方案。

由 Henikoff 实验室开发的 CUT&Tag 技术[32]适用于低样本量检测。YANG 等[33]采用 CUT&Tag 技术检测经芍药苷或糖酵解抑制处理的卵巢癌细胞，结合公共 ChIP-seq 数据进行分析，对比与活跃转录相关的富集区域和组蛋白乙酰化标记区域，结果提示 ACSS2 可能通过直接结合启动子来调控 *SIRT1* 的转录活性。基于 CUT&Tag 技术开发的单细胞靶向剪切及转座酶标记（single-cell cleavage under targets and tagmentation，scCUT&Tag）技术所需的细胞量比 scChIP-seq 技术更少，并能解析复杂组织中的异常修饰[34]。

质谱技术（如 LC-MS/MS）可定量测定全局修饰水平并发现新型修饰。LOPES 等[35]便通过 LC-MS/MS 技术定量分析组蛋白 H2AK119ub（ub 指泛素化修饰）和 H2BK120ub 水平，并通过优化酶解和化学衍生化策略，实现了对 C 末端区域修饰的精准分析。

这些技术不仅揭示了 HPTM 在基因表达调控中的精细作用机制，也为阐明其在发育、疾病等生物学过程中的关键作用提供了新的研究视角。

3 ncRNA 调控研究

3.1 ncRNA

表观遗传调控的复杂性不仅体现在 DNA 甲基化和组蛋白修饰的协同作用上，ncRNA 的参与更进一步丰富了这一调控网络。长链非编码 RNA（long no-coding RNA，lncRNA）可招募染色质修饰复合物至特定基因组位点，从而调控局部染色质状态。lncRNA X 失活特异性转录本（X inactive specific transcript）可招募多梳抑制复合物 2，催化组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸发生三甲基化（H3K27me3），形成抑制性染色质环境，实现整条染色体的转录沉默[36]。外源性化合物可通过干扰 ncRNA 的转录加工或稳定性，破坏其调控网络，最终导致细胞稳态破坏和毒性效应。另有研究[37]显示，在抗结核药物诱导的药物性肝损伤患者中，血清中 miR-122 水平显著升高，并与传统肝酶指标呈正相关，表明 miRNA 可参与调控肝脏中的胆固醇和脂肪酸代谢。

3.2 主要检测技术平台

目前，ncRNA 的主要检测方法包括微阵列、实

时 qPCR（real-time qPCR，RT-qPCR）、RNA 测序（RNA sequencing，RNA-Seq）、单细胞 RNA 测序（single-cell RNA sequencing，scRNA-seq）等技术。基于探针杂交原理的微阵列技术能同时检测数千个已知基因的表达水平，用于检测疾病相关基因，如代谢综合征中 miRNA 和 mRNA 的表达谱，揭示疾病的潜在关键基因和调控机制[38]。相比于微阵列和 RT-qPCR 技术，RNA-seq 不仅能在全基因组范围内高灵敏度地鉴定和定量 ncRNA 表达谱，而且能识别新的 ncRNA［如新型环状 RNA（circular RNA，circRNA）、lncRNA 亚型等］，预测其基因调控网络[39]。JI 等[40]在利用微阵列技术全面筛选和分析差异表达基因后，又采用 RT-qPCR 技术对包括 miR-22-5p 在内的候选 miRNA 进行定量验证，提升了差异表达基因筛选结果的准确性。WANG 等[41]利用 scRNA-seq 技术分析了七氟醚暴露后老年大鼠海马组织中的细胞组成与转录组变化，成功鉴定了神经元等关键细胞类型及其差异表达基因，观察到 lncRNA 核旁斑组装转录本 1（nuclear paraspeckle assembly transcript，NEAT1）显著上调。该研究体现了 scRNA-seq 技术在解析药物毒性的细胞靶点及表观遗传修饰介导的毒性通路方面的重要作用。

SAVILLE 等[42]开发了纳米孔直接 RNA 测序（nanopore direct RNA sequencing，NERD-seq）技术，为全面解析表观转录组提供了新的技术平台。该技术可分离长、短链 RNA，并对短链 RNA 进行人工加尾，使其能与测序适配体结合，同时采用高温耐受反转录酶处理高度结构化的 RNA，最终得到既能保留天然 RNA 修饰信息，又能同步检测包括小核仁 RNA（small nucleolar RNA，snoRNA）、转运 RNA（transfer RNA，tRNA）在内的多类非 poly（A）ncRNA 文库。

4　结语与展望

在表观遗传学研究中，检测 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 ncRNA 的方法是揭示基因表达调控机制的核心工具。不同的表观遗传毒性检测方法均有其一定的优缺点和目前用途（表 1 ～ 3），可根据需要组合用于药物作用机制研究、毒性筛选、肿瘤诊断和分析等。

从 BS-Seq 技术到新兴的酶学转化技术（如 ACE-Seq、TAPS），DNA 甲基化检测方法的革新显著提升了 5mC/5hmC 的区分能力，同时克服了 DNA 降解等技术瓶颈。组蛋白修饰研究则通过 ChIP-seq、CUT&Tag 等高灵敏度技术实现了时空动态解析，同时质谱技术的发展为低丰度及新型翻译后修饰的系统性鉴定提供了技术支撑，显著拓展了组蛋白修饰谱的广度与深度。ncRNA 的检测方法从微阵列到 NERD-seq 的演进历程，不仅提高了检测通量，更实

表 1　DNA 甲基化检测方法的比较

Tab.1　Comparative Assessment of Methods for DNA Methylation

检测方法	优点	缺点	用途
MSP	灵敏度高，操作简便，成本低，适合临床快速检测	仅检测特定 CpG 位点，无法全基因组覆盖；依赖亚硫酸氢盐的转化效率，假阳性风险高	药物作用机制研究，毒性初筛，肿瘤标志物验证
qMSP	可绝对定量甲基化水平，动态范围宽	依赖引物设计，需标准曲线	甲基化标志物的临床定量
dMSP	绝对定量，无需标准曲线；灵敏度高，检测限低（单分子级别）	通量较低，成本高	液体活检，低丰度样本
MS-MLPA	多基因并行分析，无需亚硫酸氢盐处理	位点覆盖有限，探针优化复杂	多基因 Panel 筛查，回顾性研究
RRBS	成本较低，覆盖关键 CpG 区域，数据量适中	非全基因组，依赖酶切位点	经济型全甲基化筛查，肿瘤甲基化标志物研究
WGBS	单碱基分辨率，全基因组覆盖	成本非常高，数据量大	高精度全基因组研究，如胚胎发育、细胞分化
ACE-Seq	无需亚硫酸氢盐处理，保留 DNA 完整性；可区分 5mC 与 5hmC	流程复杂，需优化 APOBEC3A 酶（1 种 DNA 脱氨酶）活性	适用于需要高保真甲基化数据的场景，羟甲基化水平研究
TAPS	反应条件温和，DNA 损伤小；信噪比高	成本高，技术难度大，需 TET 酶预处理	5hmC 研究，干细胞或神经科学领域
ELISA	快速，高通量，适合样本筛查	无位点信息，灵敏度低	初步筛查，大批量样本的甲基化水平比较
DM-Seq	避免亚硫酸氢盐损伤 DNA；无需化学转化，保留原始 DNA；可检测微量 DNA 样本	工作流程复杂，需多步酶促反应；依赖非天然的生化试剂与工程化酶	肿瘤异质性分析，cfDNA 表观遗传检测

表 2 HPTM 检测方法的比较

Tab.2 Comparative Assessment of Methods for HPTM

检测方法	优点	缺点	用途
ChIP	经典方法，已经被广泛验证；可检测特定蛋白（如转录因子）或组蛋白修饰的基因组结合位点	低通量，依赖抗体质量；需要高样品量（通常 >10^6 个细胞）；交联 / 超声操作可能破坏染色质完整性	验证已知蛋白 -DNA 相互作用
ChIP-PCR	靶向精准验证，成本低廉	仅能检测已知位点	检测特定组蛋白修饰在特定基因位点的富集情况
ChIP-chip	早期的高通量技术，成本低于测序技术	分辨率低，仅覆盖芯片设计的区域；无法检测新型结合位点	转录因子或组蛋白修饰的全基因组筛查，现已被 ChIP-seq 技术取代
ChIP-seq	单碱基分辨率，全基因组覆盖；可发现新结合位点，兼容多种抗体（组蛋白修饰、转录因子等）	成本高，抗体特异性和交联效率会影响结果	绘制转录因子结合图谱，组蛋白修饰的全基因组定位
scChIP-seq	解析细胞异质性（如肿瘤微环境中不同亚群的组蛋白修饰差异），揭示发育过程中的表观遗传动态	技术难度高，数据稀疏；需微流控或索引拆分，成本非常高	胚胎发育中组蛋白修饰的细胞类型特异性研究，肿瘤干细胞表观遗传特征分析
scATAC-seq	无需抗体，灵敏度高	间接反映蛋白质 -DNA 相互作用（需结合 ChIP-seq 验证）	染色质可及性图谱，推断转录因子结合
CUT&Tag	信噪比高，所需样本量低；无需交联 / 超声操作，保留完整染色质结构；试验周期短	依赖 Tn5 转座酶效率，对某些抗体（如低亲和力抗体）效果不佳	稀有样本的组蛋白修饰分析；与 scATAC-seq 联合研究染色质状态
scCUT&Tag	单细胞分辨率下检测蛋白 -DNA 相互作用；比 scChIP-seq 更灵敏	数据解析复杂，需高级生物信息学工具；目前仅适用于组蛋白修饰（转录因子应用有限）	肿瘤微环境中组蛋白修饰的细胞亚群差异，早期胚胎发育中表观遗传重编程的动态研究

表 3 ncRNA 检测方法的比较

Tab.3 Comparative Assessment of Methods for ncRNA

检测方法	优点	缺点	用途
微阵列	通量高，成本低，流程标准化，商业化芯片（如 Affymetrix、Agilent）稳定性高	仅限已知序列，灵敏度低，动态范围窄	疾病标志物的初步筛选，已知 ncRNA 的快速检测
RT-qPCR	灵敏度高，绝对定量，灵活性强，支持低样本量（<10 ng RNA）检测	通量低；依赖引物设计，如 circRNA 需跨接头引物，lncRNA 需避免同源序列	候选 ncRNA 的验证，临床诊断
RNA-seq	全转录组覆盖，单碱基分辨率，宽动态范围	成本高，数据分析复杂，难以区分高度同源家族（如 piRNA）	新 ncRNA 的发现与注释；整合分析，如 mRNA-ncRNA 共表达网络
scRNA-seq	细胞异质性解析；多组学整合潜力，联合 scATAC-seq 分析表观遗传调控	噪声大，成本非常高	肿瘤微环境 ncRNA 调控，如免疫细胞亚群；发育轨迹分析，如胚胎干细胞分化
NERD-seq	无逆转录偏差，可直接检测 RNA 修饰；可解析全长 ncRNA 异构体	错误率高，数据分析工具少	RNA 修饰与功能关联，复杂结构 ncRNA 的研究

现了对 RNA 修饰信息的保留。随着表观遗传学技术的持续革新，高通量、低成本、高精度的检测技术不断涌现，有望推动实现更高分辨率和更低检测限的表观遗传学研究。

参考文献：

[1] PANERA N, MANDATO C, CRUDELE A, *et al*. Genetics, epigenetics and transgenerational transmission of obesity in children [J]. *Front Endocrinol* (Lausanne), 2022, **13**: 1006008.

[2] REBUZZINI P, FABOZZI G, CIMADOMO D, *et al*. Multi- and transgenerational effects of environmental toxicants on mammalian reproduction [J]. *Cells*, 2022, **11**(19): 3163.

[3] BALDRICK P. Genotoxicity test battery – an assessment of its utility in early drug development [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2021, **868-869**: 503388.

[4] 王亚楠, 文海若, 王 雪. 遗传毒性基因突变评价方法的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2019, **31**(5): 406-411.

[5] MADIA F, KIRKLAND D, MORITA T, *et al*. EURL ECVAM genotoxicity and carcinogenicity database of substances eliciting negative results in the ames test: construction of the

database［J］. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2020, **854-855**: 503199.

［6］ MATTEI A L, BAILLY N, MEISSNER A. DNA methylation: a historical perspective［J］. *Trends Genet*, 2022, **38**(7): 676-707.

［7］ 方　鑫, 赵瑞奇, 莫　婧, 等. 检测核酸表观遗传修饰的测序方法[J]. 高等学校化学学报, 2023, **44**(3): 44-64.

［8］ RAMALHO-CARVALHO J, HENRIQUE R, JERÓNIMO C. Methylation-specific PCR［J］. *Methods Mol Biol*, 2018, **1708**: 447-472.

［9］ HERMAN J G, GRAFF J R, MYÖHÄNEN S, *et al*. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands［J］. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**(18): 9821-9826.

［10］ TIERLING S, JÜRGENS-WEMHEUER W M, LEISMANN A, *et al*. Bisulfite profiling of the MGMT promoter and comparison with routine testing in glioblastoma diagnostics［J］. *Clin Epigenetics*, 2022, **14**(1): 26.

［11］ WEI F H, RUAN B J, DONG J, *et al*. Asperosaponin Ⅵ inhibition of DNMT alleviates GPX4 suppression-mediated osteoblast ferroptosis and diabetic osteoporosis［J］. *J Adv Res*, 2025, **75**: 331-344.

［12］ LAZAREVIĆ M, JOVANOVIĆ N, CVETKOVIĆ V J, *et al*. A comparison of *MGMT* testing by MSP and qMSP in paired snap-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded gliomas［J］. *Diagnostics*（Basel）, 2023, **13**(3): 360.

［13］ CARDOSO G C, GANZELLA F A O, MINISKISKOSKY G, *et al*. Digital methylation-specific PCR: new applications for liquid biopsy［J］. *Biomol Concepts*, 2024, **15**(1): 20220041.

［14］ KATO N, KAMATAKI A, KUROTAKI H. Mature and immature ovarian teratomas share methylation profiles of imprinted genes: a MS-MLPA analysis［J］. *Virchows Arch*, 2023, **482**(3): 561-566.

［15］ DONG N, ZHU J, WANG R, *et al*. Maternal methamphetamine exposure influences behavioral sensitization and nucleus accumbens DNA methylation in subsequent generation［J］. *Front Pharmacol*, 2022, **13**: 940798.

［16］ OTSUKA S, QIN X Y, WANG W L, *et al*. iGEM as a human iPS cell-based global epigenetic modulation detection assay provides throughput characterization of chemicals affecting DNA methylation［J］. *Sci Rep*, 2023, **13**(1): 6663.

［17］ SCHUTSKY E K, DENIZIO J E, HU P, *et al*. Nondestructive, base-resolution sequencing of 5-hydroxymethylcytosine using a DNA deaminase［J］. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**: 1083-1090.

［18］ LIU Y B, SONG C X. TAPS: the development of a direct and base-resolution sequencing method for DNA methylation［J］. *ACS Chem Biol*, 2022, **17**(10): 2683-2685.

［19］ SIEJKA-ZIELIŃSKA P, CHENG J F, JACKSON F, *et al*. Cell-free DNA TAPS provides multimodal information for early cancer detection［J］. *Sci Adv*, 2021, **7**(36): eabh0534.

［20］ BOOTH M J, BRANCO M R, FICZ G, *et al*. Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution［J］. *Science*, 2012, **336**(6083): 934-937.

［21］ VAISVILA R, PONNALURI V K C, SUN Z Y, *et al*. Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA［J］. *Genome Res*, 2021, **31**(7): 1280-1289.

［22］ OLOVA N N. ELISA-based quantitation of global 5hmC levels［J］. *Methods Mol Biol*, 2021, **2272**: 45-63.

［23］ WANG T, FOWLER J M, LIU L, *et al*. Direct enzymatic sequencing of 5-methylcytosine at single-base resolution［J］. *Nat Chem Biol*, 2023, **19**(8): 1004-1012.

［24］ LI D S, YANG Y Y, WANG S Z, *et al*. Role of acetylation in doxorubicin-induced cardiotoxicity［J］. *Redox Biol*, 2021, **46**: 102089.

［25］ YAO W Y, HU X T, WANG X. Crossing epigenetic frontiers: the intersection of novel histone modifications and diseases［J］. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, **9**(1): 232.

［26］ DECAPRIO J, KOHL T O. Chromatin immunoprecipitation［J］. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020, **2020**(8): 098665.

［27］ YAMADA H, ODAGIRI M, YAMAKITA K, *et al*. Dual-directional epi-genotoxicity assay for assessing chemically induced epigenetic effects utilizing the housekeeping TK gene［J］. *Sci Rep*, 2025, **15**(1): 7780.

［28］ REN B, ROBERT F, WYRICK J J, *et al*. Genome-wide location and function of DNA binding proteins［J］. *Science*, 2000, **290**(5500): 2306-2309.

［29］ NAKATO R, SAKATA T. Methods for ChIP-seq analysis: a practical workflow and advanced applications［J］. *Methods*, 2021, **187**: 44-53.

［30］ RESNICK-SILVERMAN L, ZHOU R, CAMPBELL M J, *et al*. *In vivo* RNA-seq and ChIP-seq analyses show an obligatory role for the C terminus of p53 in conferring tissue-specific radiation sensitivity［J］. *Cell Rep*, 2023, **42**(3): 112216.

［31］ RANZONI A M, TANGHERLONI A, BEREST I, *et al*.

Integrative single-cell RNA-Seq and ATAC-Seq analysis of human developmental hematopoiesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, **28**(3): 472-487.e7.

[32] KAYA-OKUR H S, WU S J, CODOMO C A, *et al*. CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells [J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 1930.

[33] YANG J, WANG H Y, LI B S, *et al*. Inhibition of $ACSS_2$ triggers glycolysis inhibition and nuclear translocation to activate $SIRT_1$/ATG_5/ATG_2B deacetylation axis, promoting autophagy and reducing malignancy and chemoresistance in ovarian cancer [J]. *Metabolism*, 2025, **162**: 156041.

[34] BARTOSOVIC M, KABBE M, CASTELO-BRANCO G. Single-cell CUT&Tag profiles histone modifications and transcription factors in complex tissues [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, **39**(7): 825-835.

[35] LOPES M, LUND P J, GARCIA B A. Optimized and robust workflow for quantifying the canonical histone ubiquitination marks H2AK119ub and H2BK120ub by LC-MS/MS [J]. *J Proteome Res*, 2024, **23**(12): 5405-5420.

[36] NAPPI F. Non-coding RNA-targeted therapy: a state-of-the-art review [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, **25**(7): 3630.

[37] MOOSA M S, RUSSOMANNO G, DORFMAN J R, *et al*. Analysis of serum microRNA-122 in a randomized controlled trial of *N*-acetylcysteine for treatment of antituberculosis drug-induced liver injury [J]. *Br J Clin Pharmaco*l, 2023, **89**(6): 1844-1851.

[38] QIU L Y, SHENG P, WANG X. Identification of metabolic syndrome-related miRNA-mRNA regulatory networks and key genes based on bioinformatics analysis [J]. *Biochem Genet*, 2023, **61**(1): 428-447.

[39] ZHANG P J, WU W Y, CHEN Q, *et al*. Non-coding RNAs and their integrated networks [J]. *J Integr Bioinform*, 2019, **16**(3): 20190027.

[40] JI Y, CHEN H Z, PANG L H, *et al*. AGE induced macrophage-derived exosomes induce endothelial dysfunction in diabetes via miR-22-5p/FOXP1 [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2025, **24**(1): 158.

[41] WANG Y L, LI N, CHEN X Y, *et al*. Mechanistic insights into sevoflurane-induced hippocampal neuronal damage and cognitive dysfunction through the NEAT1/Nrf2 signaling axis in aged rats [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2024, **41**(1): 13.

[42] SAVILLE L, WU L, HABTEWOLD J, *et al*. NERD-seq: a novel approach of nanopore direct RNA sequencing that expands representation of non-coding RNAs [J]. *Genome Biol*, 2024, **25**(1): 233.