

# 孤独症谱系障碍患者基因组 DNA 甲基化水平的初步研究

赵莎, 徐宁安, 朱莎, 陈宇, 钟燕

湖南省儿童医院儿童保健所, 湖南 长沙 410007

**摘要:** **目的** 检测孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 患者基因组 DNA 甲基化的水平, 探讨其在 ASD 发病中的意义。 **方法** 采集 2014 年 1 月–2016 年 2 月在儿童保健所门诊就诊及训练的 30 例 ASD 患者和正常对照组外周静脉血, 分离外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMCs), 抽提 DNA, 采用 Methyflash™ 总体 DNA 甲基化试剂盒检测外周血单个核细胞基因组 DNA 甲基化水平, 实时荧光定量 PCR 技术检测 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) mRNA 表达水平, 分析两者之间的相关性及其与儿童孤独症行为量表 (Autism Behavior Checklist, ABC) 得分的相关性。 **结果** 与正常对照组相比, 20 例 ASD 患者外周血单个核细胞基因组总体 DNA 甲基化水平明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 两组间 DNMT1 基因 mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。ASD 患者基因组 DNA 总体甲基化水平与 DNMT1 的 mRNA 表达水平无明显相关性 ( $r = 0.311$ ,  $P = 0.182$ ); ASD 患者基因组 DNA 总体甲基化水平与 ABC 量表得分呈负相关 ( $r = -0.504$ ,  $P = 0.038$ )。ASD 患者 DNMT1 的 mRNA 表达水平与 ABC 量表得分无显著相关性 ( $r = -0.112$ ,  $P = 0.645$ )。 **结论** ASD 患者基因组 DNA 甲基化水平降低。

**关键词:** 孤独症谱系障碍; DNA 甲基化; DNA 甲基转移酶; 总体甲基化

**中图分类号:** R749.94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)07-0801-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.07.010

## Preliminary study on genomic DNA methylation in children with autism spectrum disorder

ZHAO Sha, XU Ning-an, ZHU Sha, CHEN Yu, ZHONG Yan

Department of Child Health Care, Hunan Children's Hospital, Changsha, Hunan 410007, China

Corresponding author: ZHONG Yan, E-mail: zhongyan@163.com

**Abstract:** **Objective** To determine the methylation level of genomic DNA in patients with autism spectrum disorder (ASD), and to explore its significance in the pathogenesis of ASD. **Methods** We collected peripheral venous blood samples from 30 ASD patients and 20 healthy controls in Department of Child Health Care, Hunan Children's Hospital from January, 2014 to February, 2016. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated, and DNA was extracted with Tiangen Genomic DNA kit. The global genomic DNA methylation levels in PBMCs were measured through commercial kit. The mRNA expression levels of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) were detected by real-time quantification PCR. And the correlation between global DNA methylation level and DNMT1 mRNA as well as their correlation with the scores of Autism Behavior Checklist (ABC) were analyzed. **Results**

The global DNA methylation level in PBMCs in the ASD patients was significantly lower than that of the healthy controls, with a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). No statistically significant difference was found in the expression of DNMT1 mRNA between the ASD patients and the healthy controls ( $P > 0.05$ ). There was no obvious correlation between the expression of global DNA methylation and the expression of DNMT1 mRNA ( $r = 0.311$ ,  $P = 0.182$ ) in the ASD patients, but the global methylation level was negatively correlated with the scores of ABC in the ASD patients ( $r = -0.504$ ,  $P = 0.038$ ). No significant correlation was observed between the expression level of DNMT1 mRNA and the scores of ABC ( $r = -0.112$ ,  $P = 0.645$ ). **Conclusions** The global genomic DNA methylation levels of the ASD patients are decreased.

**Key words:** autism spectrum disorder; DNA methylation; DNA methyltransferase; global methylation

**基金项目:** 湖南省科技厅一般项目 (2011SK3166); 湖南省科技厅重点项目 (2012WK2012)

**作者简介:** 赵莎 (1980-), 女, 湖南邵阳人, 博士, 副主任医师, 研究方向: 小儿内分泌疾病及小儿神经发育。

**通信作者:** 钟燕, E-mail: zhongyan@163.com。

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASDs)是一类以社交功能损害、沟通障碍和重复刻板的行为、兴趣为主要特征的神经发育障碍性疾病<sup>[1]</sup>。近年来患病率呈逐年上升的趋势<sup>[2]</sup>。该病的发病机制不明确,目前认为 ASD 可能是多基因遗传疾病,是遗传变异与环境因素之间相互作用所致<sup>[3]</sup>。而 DNA 甲基化异常可能是 ASD 发生发展的重要机制之一。本研究通过检测 ASD 患儿外周血单个核细胞基因组 DNA 总体甲基化水平以及 DNA 甲基化修饰酶的改变,探讨 ASD 的发病机制,并观察 DNA 甲基化与疾病症状严重程度的相关性,为儿童孤独症谱系障碍的诊断和治疗提供一些新的思路。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 2014 年 1 月-2016 年 2 月在本院儿童保健所门诊就诊及训练的儿童孤独症患者 30 例,男 24 例,女 6 例;男女性别比 4:1。年龄从 2 岁 8 个月~5 岁 5 个月,平均年龄  $(3.45 \pm 1.16)$  岁。病例纳入标准<sup>[4]</sup>:(1)完全符合美国《精神障碍诊断和统计手册》(DSM-IV)规定的孤独症的诊断标准;(2)孤独症行为量表(ABC)评分  $\geq 67$  分;(3)儿童期孤独症评定量表(CARS)评分  $\geq 30$  分;(4)排除器质性精神障碍、脑瘤、代谢性疾病及其它疾病所致的智力低下等。另随机抽取来本院儿童保健门诊体检的同年龄、同性别的健康儿童作为对照组,共 20 例,其中男 16 例,女 4 例。病例组和对照组两组儿童的年龄差异无统计学意义。

**1.2 外周血单个核细胞(PBMC)** 分离 ASD 组和正常对照组于清晨空腹取静脉血 5 ml,EDTA 抗凝,PBS 等体积稀释,缓慢加入淋巴细胞分离液液面上,2 000 r/min 离心 20 min,吸取中间乳白色 PBMC 层,分离出 PBMC 后,加入 5 倍体积 PBS,1 500 r/min 离心 10 min,洗涤 2 次。

**1.3 DNA 抽提** 采用北京天根生物有限公司的 DNA 提取试剂盒,按照试剂盒说明书进行,抽提的 DNA 保存 -20 ℃ 备用。

**1.4 T 淋巴细胞基因组 总甲基化水平检测** 采用美国 Epigentek 公司 Methyflash™ 总体 DNA 甲基化试剂盒 ASD 患儿与正常对照组儿童 T 淋巴细胞基因组总体甲基化水平。在荧光酶标仪上(波长 530 EX/EM)检测相对荧光值,然后根据以下公式计算甲基化比例。

$$\text{甲基化比例} = \frac{(\text{样本荧光值} - \text{阴性对照荧光值}) \div S}{(\text{阳性对照荧光值} - \text{阴性对照荧光值}) \times 2 \div P} \times 100\%$$

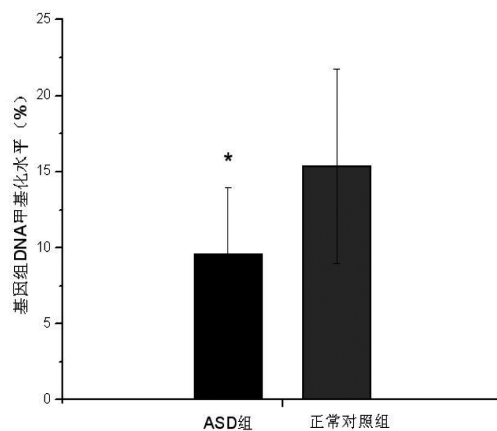
S 是样本 DNA 量(ng),P 是阳性对照组 DNA 量(ng)。

**1.5 荧光定量 PCR 检测** (1)RNA 抽提采用 Qiagen RNA mini kit 提取,紫外分光光度计测定浓度和纯度, -20 ℃ 保存备用。(2)实时-定量 RT-PCR 反应体系、反应条件及具体步骤根据 QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit(Qiagen, Holland)说明书及引物退火温度设定,反应体系为 20  $\mu\text{l}$ :2 $\times$ QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix 10  $\mu\text{l}$ ,上游引物(10 ng/ $\mu\text{l}$ )1.0  $\mu\text{l}$ ,下游引物(10 ng/ $\mu\text{l}$ )1.0  $\mu\text{l}$ ,QuantiTect RT Mix 0.2  $\mu\text{l}$ ,无酶水 4.8  $\mu\text{l}$ ,RNA 3.0  $\mu\text{l}$ 。引物如下:DNMT1 F:5'-GATCCGGAACCTTGCCAAGA-3'; R:5'-CCTTCACCCGCAGCATCT-3';  $\beta$ -actin F:5'-CGCGAGAAGATGACCCAGAT-3'; R:5'-GCACTGTGTTGCCGTACAGG-3'。反应条件:逆转录 50 ℃,20 min;起始激活 95 ℃,15 min;40 个循环(94 ℃,变性 15 s;55 ℃,退火 30 s;72 ℃,延伸 30 s);4 ℃ 保温。

**1.6 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行储存和分析数据。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两个独立样本均数比较采用 *t* 检验。两变量相关关系分析采用 Pearson 相关分析检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ASD 患儿与正常对照组外周血单个核细胞的基因组 DNA 总体甲基化水平比较** 结果显示,与正常对照组比较,ASD 患儿外周血单个核细胞 DNA 总体甲基化水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1。



注: \* 与对照组比较,  $P < 0.05$ 。

图1 ASD患者与正常对照组基因组DNA甲基化水平比较

**2.2 ASD 患儿与正常对照组 DNMT1 的 mRNA 表达水平比较** 结果显示:与正常对照组比较,ASD 组 DNMT1 的 mRNA 表达水平有降低,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 2。

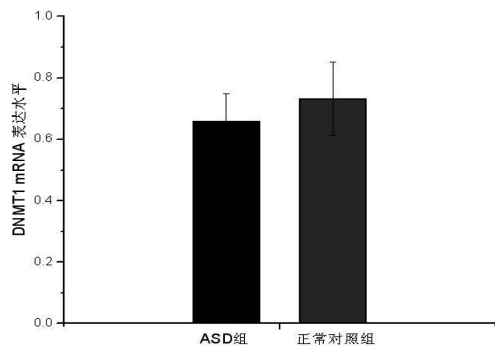


图2 ASD患者与正常对照组 DNMT1 mRNA 表达水平

2.3 ASD 患儿外周血单个核细胞 DNA 总体甲基化水平、DNMT1 的 mRNA 表达水平与症状严重程度的相关性分析 结果显示: ASD 患者 DNA 总体甲基化水平与 DNMT1 mRNA 表达水平无明显相关性 ( $r = 0.311$ ,  $P = 0.182$ ); ASD 患者 DNA 总体甲基化水平与 ABC 量表得分呈负相关 ( $r = -0.504$ ,  $P = 0.038$ )。ASD 患者 DNMT1 mRNA 表达水平与 ABC 量表总分无明显相关性 ( $r = -0.112$ ,  $P = 0.645$ )。

### 3 讨论

近年来 DNA 甲基化的研究已成为生命科学关注的热点, DNA 甲基化的作用是使特定基因有序表达, 调节基因的表达和基因组的完整性<sup>[5]</sup>; 对染色质结构的稳定和构成以及在人类疾病的发生、发展中起着重要作用<sup>[6]</sup>。DNA 甲基化在大脑发育、突触形成、学习、记忆及认知下降的过程中起着关键的作用<sup>[7]</sup>。研究显示 DNA 甲基化相关的基因多态性及 DNA 甲基转移酶 I/Ⅲ均可影响精神疾病的发病及疾病表观遗传易感性<sup>[8]</sup>。

孤独症谱系障碍是一类多基因复杂性疾病, 表观遗传学机制对人类各种疾病, 包括对孤独症谱系障碍等神经发育障碍性疾病的发病机制提出了新的解释和观点<sup>[9]</sup>。有资料显示<sup>[10]</sup>在 ASD 患者中存在有 DNA 甲基化异常状态。并发现 DNA 甲基化修饰状态与 ASD 严重程度相关。研究者通过对一组 50 对同卵双胞胎儿童进行全基因组 DNA 甲基化分析, 发现许多差异甲基化区域与 ASD 有关。本研究结果发现 ASD 患者外周血单个核细胞基因组 DNA 总体甲基化水平低于正常对照组, ASD 患者外周血单个核细胞基因组 DNA 总体甲基化水平与 ABC 量表得分呈负相关, 提示表观遗传学的改变是 ASD 发病的重要机制。对于 ASD 患者 DNA 甲基化水平异常的形成和调控机制有待进一步研究。深入研究 ASD 患者 DNA 低甲基化状态, 为解释 ASD 发病机制提供了新的线索, 对寻找新的诊断

和治疗靶点有重要意义。

DNA 甲基转移酶(DNMTs)是 DNA 甲基化反应的催化剂, 在染色质重构和基因表达调控中起关键作用<sup>[11]</sup>。目前在哺乳动物中已经发现并鉴定了三个 DNA 甲基转移酶: DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b。DNMT1 是 DNMTs 中最为重要的一员, 起着维持甲基化的作用。DNMT1 活性改变可使 DNA 发生异常甲基化、基因活性改变和染色体不稳定。本研究发现, ASD 患者 DNMT1 mRNA 表达水平低于正常对照组, 但差异无统计学意义, 并且 DNMT1 mRNA 的表达水平与 DNA 总体甲基化水平以及 ABC 量表得分均无显著相关性。该结果提示 DNA 甲基化是表观遗传修饰的一种, 参与基因表达调控, 但基因表达受多种因素的影响, 经典遗传学改变也可影响基因的表达。以上结果为探索 ASD 发病机制提供了实验依据, DNA 甲基化异常改变可能是 ASD 的重要调控机制。

### 参考文献

- [1] Loke YJ, Hannan AJ, Craig JM. The role of epigenetic change in autism spectrum disorders[J]. Front Neurol, 2015, 6:107.
- [2] LaSalle JM. Epigenomic strategies at the interface of genetic and environmental risk factors for autism[J]. J Hum Genet, 2013, 58(7):396-401.
- [3] Tordjman S, Somogyi E, Coulon N, et al. Gene × environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms [J]. Front Psychiatry, 2014, 5(1):53.
- [4] James SJ, Melnyk S, Jernigan S, et al. A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2010, 153B(6):1209-1220.
- [5] Grayson DR, Guidotti A. Merging data from genetic and epigenetic approaches to better understand autistic spectrum disorder [J]. Epigenomics, 2016, 8(1):85-104.
- [6] Richardson B. Primer: epigenetics of autoimmunity[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007, 3:521-527.
- [7] Zovkic IB, Guzman-Karlsson MC, Sweatt JD. Epigenetic regulation of memory formation and maintenance[J]. Learn Mem, 2013, 20(1):61-74.
- [8] Xing B, Liu P, WJ Xu, et al. Effect of microinjecting of 5-aza-2-deoxycytidine into ventrolateral orbital cortex on depressive-like behavior in rats[J]. Neurosci Lett, 2014, 574(1):11-14.
- [9] Oliveira AM, Hemstedt TJ, Bading H. Rescue of aging-associated decline in Dnmt3a2 expression restores cognitive abilities[J]. Nat Neurosci, 2012, 15(8):1111-1113.
- [10] Grayson DR, Guidotti A. The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders [J]. Neuropsychopharmacology, 2013, 38(1):138-166.
- [11] Wong CC, Meaburn EL, Ronald A, et al. Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioral traits[J]. Mol Psychiatry, 2014, 19(4):495-503.