

首发精神分裂症患者外周血 Reelin 基因甲基化检测

杨悦, 宋志伟, 韩丽, 马学华, 李秋平, 冯磊光[△] (哈尔滨医科大学附属第一医院检验科, 哈尔滨 150001)

【摘要】 目的 通过精神分裂症患者外周血中 Reelin 基因启动子区 DNA 甲基化状态的研究, 探讨 DNA 甲基化与精神分裂症的关联。**方法** 收集精神分裂症患者 76 例(患者组)和健康对照者 60 例(健康对照组), 采用甲基化特异性 PCR 方法检测 Reelin 基因启动子区 DNA 甲基化状态。**结果** 患者组甲基化阳性率为 78.95%(60 例), 健康对照组甲基化阳性率为 35%(21 例), 两组差异有统计学意义($\chi^2=4.971, P=0.026$); Logistic 回归分析显示, Reelin 基因甲基化与精神分裂症有关($OR=13.084, 95\%CI: 5.079 \sim 26.308$)。**结论** Reelin 基因启动子区 DNA 甲基化与精神分裂症有关, 精神分裂症患者外周血中 Reelin 基因启动子区 DNA 呈超甲基化状态, Reelin 基因 DNA 甲基化是精神分裂症的危险因素。

【关键词】 精神分裂症; Reelin 基因; DNA 甲基化

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.22.031 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)22-3373-03

Detection of peripheral blood Reelin gene methylation in patients with first-episode schizophrenia YANG Yue, SONG Zhi-wei, HAN Li, MA Xue-hua, LI Qiu-ping, FENG Lei-guang[△] (Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

【Abstract】 Objective To study the relationship between DNA methylation with schizophrenia by investigating the DNA methylation status of peripheral blood Reelin gene promoter in the patients with schizophrenia. **Methods** The Reelin gene promoter DNA methylation was measured in 76 patients with schizophrenia(patients group) and 60 healthy controls(healthy control group) by adopting methylation-specific PCR. **Results** The methylation positive rate in the patients group was 78.95%(60 cases), which in the healthy control group was 35%(21 cases), the difference was statistically significant($\chi^2=4.971, P=0.026$); the Logistic regression analysis showed that the Reelin gene methylation was correlated with schizophrenia($OR=13.084, 95\%CI: 5.079 \sim 26.308$). **Conclusion** The Reelin gene promoter DNA methylation is associated with schizophrenia, and the peripheral blood Reelin gene promoter DNA methylation presents the supermethylation status in the patients with schizophrenia. Reelin gene DNA methylation is the risk factor for schizophrenia.

【Key words】 schizophrenia; Reelin gene; DNA methylation

Reelin 是一种由 γ -氨基丁酸能神经元分泌的一种细胞外基质糖蛋白, 参与神经传递、信息形成和突触可塑性的信号调节途径, 在脑发育过程中对神经干细胞迁移和定位起调节作用。在成熟哺乳动物中, Reelin 不仅存在于大脑, 还存在于血液、肝脏等器官和组织^[1]。研究证实 Reelin 与精神分裂症密切相关, Reelin 基因是精神分裂症的风险基因, 国外学者通过对精神分裂症患者尸脑组织的研究发现多个脑区中 Reelin 基因的表达下降, 这种降低可达到 50% 以上^[2], 且外周血中 Reelin 蛋白表达降低^[3]。有研究认为 Reelin 在精神分裂症患者皮层中间神经元中表达降低, 可能和神经元中选择性 DNA 甲基化转移酶增高使 Reelin 启动子过度甲基化有关^[4]。另外对精神分裂症患者基因组的研究发现 DNA 甲基化总体水平是降低的^[5]。本研究检测 76 例精神分裂症患者和 60 例对照者外周静脉血 Reelin 基因启动子区 DNA 甲基化状态, 探讨精神分裂症与 Reelin 基因甲基化的相互关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 首发精神分裂症患者组来自于 2013 年 9 月至 2014 年 10 月就诊于哈尔滨医科大学第一临床医学院精神科的住院患者, 共入组 76 例患者, 其中男 32 例、女 44 例, 年龄

18~58 岁、平均(29.59±11.03)岁, 病程(32.23±6.04)个月。患者组入组标准:(1)符合《美国精神障碍诊断与统计手册第四版》(DSM-IV)精神分裂症的诊断标准;(2)阳性和阴性症状量表(PANSS)总分大于 60 分;(3)首次发作, 从未使用过精神类药物;(4)汉族, 年龄 18~60 岁。患者组排除标准: 排除患心、肝、肾、内分泌、血液、风湿、消化系统等疾病及营养不良者; 排除有烟草、酒精或其他精神活性物质滥用史者。健康对照组为同期在本院体检中心体检者, 共入组 60 例, 其中男 35 例、女 25 例, 年龄 21~55 岁、平均(27.78±10.91)岁。健康对照组入组标准:(1)无精神病及精神病家族史, PANSS 总分不超过 40 分;(2)汉族, 年龄 18~60 岁。健康对照组排除标准与患者组相同。且患者组与健康对照组性别及年龄相匹配。两组在年龄和性别上差异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 PANSS 量表评定 患者组在取血当天由两名受过训练的医生完成 PANSS 量表评定, 以评估症状严重程度。

1.2.2 标本的采集和处理 所有研究对象采集空腹静脉血 3.0 mL, 放入乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中, -80℃ 冰箱保存。

1.2.3 Reelin 基因启动子区 DNA 甲基化检测 采用甲基化特异性 PCR(MS-PCR)方法。MS-PCR 是一种特异位点甲基化检测技术。基本原理是用亚硫酸氢钠处理基因组 DNA,未甲基化的胞嘧啶变成尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶不变,用不同的引物进行 PCR,即可将其区分,从而确定基因有无 CpG 岛甲基化。血液基因组 DNA 提取系统(批号 H6707)及荧光定量 PCR 试剂盒 EP202(均购自天根公司),严格按试剂盒说明书操作,从白细胞中提取基因组 DNA。DNA 甲基化试剂盒为德国 ZYMO 公司生产,所用引物^[6]由黑龙江省哈尔滨市博士生物有限公司合成,引物序列见表 1。用聚合酶链反应热循环仪(ABI7500)进行扩增。Reelin 基因启动子区 DNA 扩增,PCR

反应体系总体积 25 μ L;DNA 模板 2.5 μ L,每个引物各 1 μ L,2 $\times$ Mastermix 12.5 μ L,ddH₂O 5.5 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。Reelin 启动子区 DNA 甲基化扩增 PCR 反应体系总体积 20 μ L;DNA 模版 4.0 μ L,每个引物各 1.0 μ L,2 $\times$ Mastermix 10 μ L,ddH₂O 4.0 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,59 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色后观察结果。

表 1 Reelin 基因引物序列

区域	正向	反向
启动子区	5'-GTA TTT TTT TAG GAA AAA TAG GGT ATA TTG A-3'	5'-ACT CCC AAA ATT ACT TTA AAC C-3'
甲基化	5'-CGG GGT TT TGA CGT TTT TCG-3'	5'-CGC CCT CTC GAA CTA ACT CGA CG-3'
非甲基化	5'-GTG GGG TTT TGA TGT TTT TTG-3'	5'-CAC CCT CTC AAA CTA ACT CAA CA-3'

1.3 统计学处理 所有统计分析采用 SPSS 17.0 完成。计数资料以率表示,组间比较用 χ^2 检验;采用多因素 Logistic 回归分析(Enter 法)控制年龄和性别因素,分析 Reelin 基因甲基化与精神分裂症的关系;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者组和健康对照组 DNA 甲基化情况 患者组甲基化阳性率为 78.95%(60/76),高于健康对照组的 35.00%(21/60),两组比较差异有统计学意义($\chi^2=4.971,P=0.026$)。见表 2。

表 2 两组甲基化阳性率的比较[n(%)]

组别	n	甲基化阳性	非甲基化阳性
患者组	76	60(78.95)	16(21.05)
健康对照组	60	21(35.00)	39(65.00)

2.2 性别对 Reelin 甲基化阳性率的影响 76 例精神分裂症患者中女性甲基化阳性率为 86.36%(38/44),高于男性的 68.75%(22/32),两者比较差异有统计学意义($\chi^2=4.500,P=0.034$)。

2.3 危险因素分析 Logistic 回归分析结果显示,Reelin 启动子区 DNA 甲基化与精神分裂症发生有关($OR=13.084,P<0.01$)。见表 3。

表 3 Logistic 回归分析结果

项目	B	S.E	OR	95%CI	P
年龄	-0.086	0.025	0.918	0.881~0.962	0.001
甲基化	2.571	0.692	13.084	5.079~26.308	<0.01

3 讨 论

精神性疾病已成为中国严重的公共卫生和社会问题。至今精神分裂症的病因和发病机制尚未完全阐明,一直是世界性医学难题,这就要求人们从新的角度进一步阐明精神分裂症的发病机制。越来越多的证据表明,表观遗传参与精神分裂症的病理形成与发展。表观遗传主要包括 DNA 甲基化和组蛋白

修饰。DNA 甲基化在个体发育过程当中起着至关重要的作用,是细胞、组织多样化的重要分子机制之一。

本研究采用亚硫酸盐修饰、甲基化特异性的 PCR 和琼脂糖凝胶电泳等实验技术,初步证实 Reelin 启动子区在精神分裂症患者组和健康对照组的表达存在差异,结果提示在精神分裂症患者组外周血中 Reelin 启动子区发生甲基化者明显多于健康对照组。这与 Abdolmaleky 等^[6]研究精神分裂症患者脑组织中 Reelin 启动子区甲基化状态的结果基本一致。本研究发现女性的甲基化率明显高于男性的甲基化率,其主要原因可能与女性雌激素的分泌有关。

多个精神分裂症风险基因的表达受 DNA 甲基化调控,如儿茶酚氧位甲基转移酶(COMT)、络丝蛋白(RELN)及谷氨酸脱羧酶(GAD1)^[7-9]。但对于 Reelin 基因启动子区的甲基化,不同学者的研究结果并不一致。如 Grayson 等^[10]检测精神分裂症患者死后大脑枕叶及额皮质中 Reelin 基因启动子区的甲基化状态,相对于正常对照而言,CpG 序列的-139 和-134 位置的胞嘧啶甲基化增加,该区域的 DNA 甲基化对于 Reelin 表达调控起重要作用;Abdolmaleky 等^[6]也发现 Reelin 基因 CpG 岛超甲基化,其定位在精神分裂症患者尸检额前皮质标本-139 和-134 的上游位置。然而,在 Tamura 等^[11]对精神分裂症患者和对照者脑组织 Reelin 基因甲基化状态的研究中,未能重复以上的结果,只是在健康对照组检测到 Reelin 基因的甲基化水平与其年龄呈正相关,精神分裂症患者 Reelin 基因甲基化状态与健康对照组没有明显的不同;Tochigi 等^[12]检测 15 例精神分裂症患者和 15 例健康对照的尸脑前额皮质 Reelin 基因启动子区域的 DNA 甲基化状态,同样没有得出阳性结果。这些结果的差异表明 DNA 甲基化可能受到种族及其生活环境的影响,同时 DNA 甲基化总体水平的降低暗示着精神分裂症患者的异常甲基化反应通路。本研究检测血液中 Reelin 基因启动子区 DNA 甲基化状态,结果表明 Reelin 基因启动子区 DNA 甲基化与精神分裂症发生有关,这一研究结果在精神分裂症表观遗传改变方面可能是一个有意义的贡献,为精神分裂症中 Reelin 基因活动减退提供了一个分子学基础,并且为精神分裂症寻找潜在的外周血液标记物,以便对其有效防治提供

新的靶点。

精神分裂症不仅与基因遗传因素有关,还与环境因素有关。表观遗传可能是环境因素在分子水平上的反映。表观调控机制尤其是 DNA 甲基化用于精神分裂症病因及发病机制的研究,将成为该病病因学研究的新途径。

参考文献

[1] Romano E, Michetti C, Caruso A, et al. Characterization of neonatal vocal and motor repertoire of reelin mutant mice [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64407.

[2] Maloku E, Covelo IR, Hanbauer I, et al. Lower number of cerebellar Purkinje neurons in psychosis is associated with reduced reelin expression [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(9): 4407-4411.

[3] 冯磊光, 曹红雁, 祁萍萍, 等. 精神分裂症患者外周血液中 Reelin 的表达 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(10): 1291-1292.

[4] Bönsch D1, Wunschel M, Lenz B, et al. Methylation matters? Decreased methylation status of genomic DNA in the blood of schizophrenic twins [J]. Psychiatry Res, 2012, 198(3): 533-537.

[5] Roth TL, Lubin FD, Sodhi M, et al. Epigenetic mechanisms in schizophrenia [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1790(9): 869-877.

[6] Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A, et al. Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of

schizophrenic patients: a preliminary report [J]. Am J Med Genet, 2005, 134B: 60-66.

[7] Twamley EW, Hua JP, Burton CZ, et al. Effects of COMT genotype on cognitive ability and functional capacity in individuals with schizophrenia [J]. Schizophr Res, 2014, 159(1): 114-117.

[8] Verbrugghe P, Bouwer S, Wiltshire S, et al. Impact of the Reelin signaling cascade (ligands-receptors-adaptor complex) on cognition in? schizophrenia [J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2012, 159(4): 392-404.

[9] Ayalew M, Le-Niculescu H, Levey DF, et al. Convergent functional genomics of schizophrenia: from comprehensive understanding to genetic risk prediction [J]. Mol Psychiatry, 2012, 17(9): 887-905.

[10] Grayson DR, Jia X, Chen Y, et al. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 9341-9346.

[11] Tamura Y, Kunugi H, Ohashi J, et al. Epigenetic aberration of the human Reelin gene in psychiatric disorders [J]. Mol Psychiatry, 2007, 12(6): 519, 593-600.

[12] Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, et al. Methylation status of the reelin promoter region in the brain of schizophrenic patients [J]. Biol Psychiatry, 2008, 63(5): 530-533.

(收稿日期: 2015-03-28 修回日期: 2015-09-23)

(上接第 3372 页)

者体内纤溶系统与凝血的变化,便于医生结合检测结果采取相应的措施,以相对减少肝硬化患者血栓与出血情况的出现,对综合评价肝硬化患者凝血情况,有着不可忽视的临床意义。

参考文献

[1] 魏园园, 谢凯. 肝硬化患者凝血四项及 D-二聚体检测的临床意义 [J]. 徐州医学院学报, 2010, 20(11): 733-734.

[2] 农宝安, 许进福. 血浆 D-二聚体与凝血四项联合检测对肝硬化患者的临床意义 [J]. 右江民族医学院学报, 2012, 34(2): 192-194.

[3] 杨莉, 张岩. 60 例肝硬化患者的凝血四项及血浆 D-二聚体检测的结果分析 [J]. 医学信息, 2010, 23(5): 1485.

[4] 殷琳琳. 肝硬化患者血清 CA125、CA19-9、AFP 及 CEA 水平变化的临床意义探讨 [D]. 大连: 大连医科大学, 2013.

[5] 黎雪英, 邓丽花, 曹龙翎. 肝硬化患者血小板参数和凝血四项的变化及临床意义 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(17): 31-33.

[6] 魏园园, 谢凯. 肝硬化患者凝血四项及 D-二聚体检测的临床意义 [J]. 徐州医学院学报, 2010, 30(11): 733-734.

[7] 周卫萍, 顾桂兰. 产前孕妇凝血四项联合抗凝血酶、D 二聚体检测的意义 [J]. 血栓与止血学, 2012, 18(5): 229-230.

[8] 邓芝云, 张艳, 肖娜娜, 等. 凝血四项与 D-二聚体检测在肝硬化患者中的临床观察分析 [J]. 西北国防医学杂志,

2013, 34(6): 519-520.

[9] 陈艳, 陈燕, 陈德东. 肝癌患者测定 D 二聚体定量及抗凝血酶活性的临床应用研究 [J]. 血栓与止血学, 2013, 19(1): 27-29, 31.

[10] 吴秀继, 唐爱国, 邓碧兰, 等. 凝血四项及 AT-Ⅲ、D-二聚体在肝硬化患者中的变化及临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(6): 755-756.

[11] 陈峻, 徐升强, 胡先泳, 等. 原发性肝癌患者血浆 D-二聚体、纤维蛋白原及抗凝血酶检测的临床价值 [J]. 血栓与止血学, 2015, 21(1): 33-34.

[12] 肖强, 杨善峰. 乙型肝炎肝硬化患者血清 D-二聚体、纤维蛋白原及抗凝血酶-Ⅲ的测定意义 [J]. 实用肝脏病杂志, 2011, 14(3): 214-215.

[13] 王冬梅, 张振宇. 肝硬化患者凝血功能结果分析 [J]. 微量元素与健康研究, 2013, 30(1): 16-17.

[14] 楼江明, 李林静, 龚陈, 等. 肝硬化患者中血小板参数联合 D-二聚体检测的临床意义 [J]. 医学与哲学(B), 2014, 35(9): 33-34.

[15] 朱旦华, 卢放根. 血浆 D-二聚体在肝硬化并自发性细菌性腹膜炎患者中的临床意义 [J]. 胃肠病学, 2015, 20(1): 42-44.

[16] 司毅, 许翠萍. 肝硬化患者血浆 D-二聚体的变化及其临床意义 [J]. 山西医科大学学报, 2009, 40(1): 70-71.

(收稿日期: 2015-04-25 修回日期: 2015-09-16)