

· 论 著 ·

与绝经年龄相关的差异甲基化位点筛选及其与抑郁关联基因的初步分析

牛净 卢莎 张治芬

[摘要] **目的** 应用基因甲基化芯片技术筛选脂肪组织与绝经年龄相关的甲基化位点,并分析其中可能与绝经年龄相关抑郁的差异甲基化基因的功能。**方法** 应用甲基化450K芯片对早绝经组和晚绝经组人体脂肪组织基因组DNA进行甲基化分析,筛选出异常甲基化位点,按甲基化 β 值差值区分高甲基化低甲基化、位点;进一步对抑郁相关差异甲基化位点行生物信息学分析,初步了解其相关功能。**结果** 共检出早绝经组、晚绝经组的差异明显甲基化位点415个,其中高甲基化位点169个,低甲基化位点共246个。在前40位差异明显的基因中,6号染色体有11个差异化位点,1号染色体有10个差异化位点,11号染色体有7个差异化位点。GO和KEGG分析显示,与抑郁相关的高甲基化3个基因包括脑源性神经生长因子(BDNF)、钙离子通道的 $\alpha 1C$ 亚单位基因(CACNA1C)以及Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子(ARHGEF10)可能与DNA结合、转录因子活性、信号转导通路等有关。蛋白质网络结构图可见,BDNF分别参与神经生长、营养、调控细胞增殖和凋亡等功能。ARHGEF10主要作用蛋白为WDR48,该蛋白与泛素特异性肽酶1(USP1)相互作用,激活USP1的去泛素活性。CACNA1C主要参与肌肉收缩、激素或神经递质释放、基因表达、细胞运动、细胞分裂和细胞死亡等生物学过程。**结论** 早绝经组与晚绝经组存在大量差异甲基化位点,其中BDNF、ARHGEF10及CACNA1C甲基化异常可能与女性绝经年龄相关抑郁有关,它们的主要功能可能与DNA结合、转录因子活性、信号转导通路等有关。基因芯片技术可用于抑郁相关甲基化差异甲基化位点的初筛,但构建抑郁关联差异甲基化谱作为临床分子标记物仍需行进一步验证。

[关键词] DNA甲基化; 绝经年龄; 抑郁

Screening of menopausal age-related differential methylation sites and its association with depression NIU Zheng, LU Sha, ZHANG Zhifen. Department of Gynecology, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhengjiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China.

[Abstract] **Objective** To screen the menopausal age-related differential methylation sites by the gene methylation chip technology, and analyze the function of differentially methylated genes that may be associated with menopausal age-related depression. **Methods** The methylation 450K chip was used for methylation analysis of human adipose tissue genomic DNA in early menopause and late menopause, and abnormal methylation sites were screened out, and hypermethylation and low methylation sites were distinguished by the difference of methylation β value. The further bioinformatics analysis of depression-related differential methylation sites was carried out. **Results** A total of 415 methylation sites with significant differences between early and late menopause groups were detected, including 169 hypermethylated sites and 246 hypomethylation sites. Among the top 40 genes with significant differences, 11 differential sites were on chromosome 6, 10 differential sites on chromosome 1, and 7 differential sites on chromosome 11. The GO and KEGG analysis showed that 3 significant hypermethylation genes (BDNF, CACNA1C, and ARHGEF10) may be related to DNA binding, transcription factor activity, and signal transduction pathways. The protein network structure diagram showed that BDNF were involved in nerve growth, nutrition, regulation of cell proliferation and apoptosis. ARHGEF10 interacted with ubiquitin-specific peptidase 1 (USP1) to activate the deubiquitin activity of USP1. CACNA1C were mainly involved in the biological processes of muscle contraction, hormone or neurotransmitter release, gene expression, cell movement, cell division and cell

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.009.004

作者单位: 310006 浙江杭州, 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院妇科(牛净); 杭州市妇产科医院妇科(卢莎、张治芬)

通讯作者: 张治芬, Email: zhangzf@zju.edu.cn

death. **Conclusion** A large number of differentially methylated sites exist in the early and late menopause groups. Among them, abnormal methylation of BDNF, ARHGEF10 and CACNA1C may be related to the menopausal age-related depression, whose main functions may be related to DNA binding, transcription factor activity, and signal transduction pathways. Gene chip technology can be used for the preliminary screening of depression-related differential methylation sites, and it is need to further verify that the construction of depression differential methylation profiles can be as the clinical molecular markers.

[Key words] DNA methylation; menopausal age; depression

绝经是指女性在未孕情况下,月经周期消失至少12个月以上;全基因组表观遗传学分析显示参与激素信号、谷氨酸信号、褪黑素和昼夜节律信号途径的基因甲基化发生了明显变化,并且DNA甲基化调节了围绝经期到绝经的整个过渡期^[1]。但多为一个或数个基因的研究,全基因组水平绘制特异性甲基化谱的研究尚处于探索阶段。本次研究拟采用人脂肪组织,提取基因组DNA,采用Illumina Human Methylation 450K甲基化芯片筛选早绝经和晚绝经女性间甲基化差异明显的基因,同时通过文献发掘对可能与绝经年龄相关的忧郁相关的3个高甲基化基因,包括脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、钙离子通道的 $\alpha 1C$ 亚单位基因(calcium voltage-gated channel subunit $\alpha 1C$, CACNA1C)以及Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子(Rho guanine nucleotide exchange factor 10, ARHGEF10)^[1-3]进行重点讨论。

1 材料与方法

1.1 一般资料 随机选取2017年6月至2019年2月就诊于浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院妇科的6例住院患者,平均年龄(57.86 ± 5.60)岁,均已绝经,均因良性疾病就诊,包括卵巢囊肿2例、子宫肌瘤4例。患者无激素替代治疗史,无焦虑、抑郁等精神症状和疾病;无烟者或酗酒史。

1.2 方法 本次研究将绝经年龄 ≤ 48 岁纳为早绝经组, ≥ 52 岁为晚绝经组,各3例。两组均在手术过程中各取脂肪组织1份,均约3~5 g,冻存于 -80°C 冰箱备用。采用DNA提取试剂盒(由德国Qiagen公司生产)提取脂肪组织中DNA,分离、纯化后的脂肪组织DNA置 -80°C 保存备用。DNA甲基化水平采用Illumina Human Methylation 450 K Beadchip芯片(由美国Illumina公司生产)检测,其覆盖99%参考序列基因的450 000个CpG岛。将4 μl 经亚硫酸盐转化的DNA处理后与芯片进行杂交,经基因扫描仪获取实验数据。芯片原始数据首先采用R软件

minfi包进行预处理,然后应用R软件IMA包筛选样本分组间的甲基化位点和甲基化区域的差异。整个分析流程分为四步:数据质量控制、预处理、甲基化差异位点分析以及差异甲基化区域分析;以 $|\Delta\beta| > 0.20$ 作为阈值来筛选甲基化差异位点。

运用GO数据库(www.geneontology.org)首先将芯片筛选出的差异甲基化位点对应的基因映射到GO数据库的各个条目中,进行GO功能注释,计算映射到各条目的基因数,利用超几何分布计算得到P值。然后利用KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库,将差异甲基化基因进行映射和通路分析。通过STRING Interaction Network(<http://version10.5.string-db.org>)分析明显高甲基化的3个基因(BDNF、ARHGEF10及CACNA1C)编码蛋白可能相互作用蛋白的网络结构图。

2 结果

2.1 甲基化芯片分析结果发现,早绝经组与晚绝经组女性脂肪组织比较后筛选出415个差异甲基化基因位点,其中有169个为高甲基化基因位点,另外246个为低甲基化位点。在前40位差异明显的基因中,6号染色体有11个差异化位点,1号染色体有10个差异化位点,11号染色体有7个差异化位点。早绝经组与晚绝经组脂肪组织中显著甲基化水平差异的前20位基因位点见表1。

表1 早绝经组与晚绝经组脂肪组织前20位甲基化水平差异明显的基因位点

基因位点	UCSC数据库代码	对应染色体	位于正/负链	$\Delta\beta$
CAMTA1	NM_015215	1	负链	0.89
MRGPRX2	NM_054030	11	负链	0.76
SCD	NM_005063	10	正链	0.76
TAP2	NM_000544	6	负链	0.67
LOC391322	NM_001144931	22	负链	0.67
ASAP1	NM_018482	8	负链	0.62

续表 表1 早绝经组与晚绝经组脂肪组织前20位
甲基化水平差异明显的基因位点

基因位点	UCSC数据库代码	对应 染色体	位于正 /负链	$\Delta\beta$
GSTT1	NM_000853	22	负链	0.62
BDNF	NM_170731	11	负链	0.62
ARHGEF10	NM_014629	8	负链	0.50
CACNA1C	NM_001129844	12	正链	0.49
FHAD1	NM_052929	1	负链	-0.86
COL4A2	NM_001846	13	正链	-0.86
DNAJC15	NM_013238	13	正链	-0.68
SIGLEC14	NM_001098612	19	负链	-0.67
MEPE	NM_020203	4	负链	-0.64
PRDM16	NM_022114	1	正链	-0.49
LCLAT1	NM_182551	2	负链	-0.49
PSORS1C1	NM_014068	6	负链	-0.49
LAMB1	NM_002291	7	负链	-0.48
SNPH	NM_014723	20	负链	-0.48

2.2 BDNF、ARHGEF10及CACNA1C三个基因GO
和KEGG信号通路分析见表2

表2 BDNF、ARHGEF10及CACNA1C基因GO分析及KEGG信号通路分析

基因	参与生物学过程	分子功能	GO细胞组分分析	信号通路
BDNF	正向调节 BDNF 受体信号途径(GO: 0031550); BDNF 受体信号途径(GO: 0031547); 正向调节非跨膜酪氨酸激酶活性(GO:1903997); 神经生长受体信号途径(GO:0038180); 神经营养素 TRK 受体信号通路(GO:0048011)	生长因子活性(GO: 0008083)	核粒(GO:0016607); 线粒体(GO:0005739); 突触部分(GO:0044456)	MAPK 信号通路; Ras 信号通路; GPCR 信号通路; ERK 信号通路
ARHGEF10	正向调节应力纤维组装(GO: 0051496); 激活 GTP 酶活性(GO: 0090630)	结合驱动蛋白(GO: 0051496)	微管组织中心(GO:0005815); 中心粒(GO:0005813)	调节 RhoA 活性; Slit 信号通路; NgR-p75 (NTR)介导的信号通路; 干扰素信号途径; Rho GDI 途径
CACNA1C	膜去极化(GO:0098912); 钙离子通过高压门钙通道跨膜转运(GO: 0061577); 细胞外钙介导的信号系统(GO:0035585); 正向调节腺苷酸环化酶活性(GO:0045762)	参与 AV 结细胞钙离子通道活性(GO: 0086056); 高压门钙通道活(GO: 0008331); 结合钙调蛋白(GO: 0005516)	L 型电压门钙离子通道复合物(GO:1990454); Z 盘(GO:0030018); 核周质(GO:0043204); 突触膜(GO:0097060)	心肌细胞中的肾上腺素信号途径; 醛固酮合成和分泌; 阿尔海默氏病; 苯丙胺上瘾

由表2可见, BDNF具有生长因子活性, ARHGEF10可以结合驱动蛋白, CACNA1C参与AV结细胞钙离子通道活性、高压门钙通道活性等分子功能, 并BDNF可能通过可能通过MAPK信号通路、RAS信号通路等调节, ARHGEF10通过Slit信号通路, CACNA1C通过腺素信号途径、醛固酮合成和分泌等调节。

2.3 通过STRING Interaction Network分析明显高甲基化的3个基因(BDNF、ARHGEF10及CACNA1C)编码蛋白可能相互作用蛋白的网络结构图。

BDNF主要作用蛋白有人源全长重组蛋白3、神经营养性酪氨酸激酶受体1、神经生长因子受体、丝裂原活化蛋白激酶9等, 分别参与神经生长、营养、调控细胞增殖和凋亡等功能。ARHGEF10主要作用蛋白为WDR48, 该蛋白与泛素特异性肽酶1(recombinant ubiquitin specific peptidase 1, USP1)相互作用, 激活USP1的去泛素活性。CACNA1C作用蛋白有钙离子通道的 $\alpha 1D$ 亚单位基因、钙离子通道的 $\alpha 1F$ 亚单位基因、重组人钙调蛋白2、雷诺定受体2及重组人突触蛋白融合1A等, 主要参与肌肉收缩、激素或神经递质释放、基因表达、细胞运动、细胞分裂和细胞死亡等生物学过程。

3 讨论

表观遗传学研究的最多是DNA甲基化,也就是指CpG岛上甲基化状态的改变,在人类生命周期早期全基因组DNA甲基化水平增高,而在成年后全基因组DNA甲基化水平下降,提示表观遗传学修饰在人类衰老过程中可能起重要作用^[4]。最近研究显示与衰老紧密相关的绝经年龄早晚亦显示出一些独特的甲基化差异^[5]。

本次研究采用Illumina公司450K甲基化磁珠芯片具有操作过程简便,不需要复杂的免疫共沉淀实验,甲基化位点检测准确率高、通量大的特点。本次研究中芯片结果分析发现,早绝经与晚绝经女性组间共筛选出415个差异甲基化基因位点,其中有169个为高甲基化位点,另外246个为低甲基化位点,两组间差异低甲基化位点占明显优势。最近的研究显示基因组中Alu和LINE-1重复序列单元甲基化水平随着衰老减少,高通量芯片结果确认了随着衰老DNA低甲基化,然而某些特异性位点出现高甲基化^[6]。在前40位差异明显的基因中,6号、1号和11号染色体差异化位点最为丰富,差异甲基化位点在开放性读码框内分布最常见。在女性年龄相关的表观基因组学研究中,有结果揭示基因甲基化差异性位点主要集中在1号、3号和11号染色体上^[7]。Wang等^[8]在研究帕金森病患者和健康对照外周血基因甲基化差异时,发现低甲基化基因富集在1、11和17号染色体上,其中甲基化位点cg13060970、cg02861056、cg21495704、cg16643542、cg19081101与帕金森病密切相关。这些实验结果提示绝经早晚和衰老、帕金森病发生可能存在一些相同的分子机制。

本次研究重点分析了其中3个可能与焦虑、抑郁相关的高甲基化基因,包括BDNF、ARHGEF10及CACNA1C。通过生物信息学分析发现它们可能涉及神经生长、营养、激素或神经递质释放、调控细胞增殖和凋亡等生物学过程。综合文献看,BDNF参与一系列心境障碍和精神疾病谱的致病过程。最近,有研究认为BDNF甲基化和某些精神疾病发生相关联,并有可能成为其诊断标志物^[9]。ARHGEF10位于8号染色体短臂,该区域可能与神经病变、精神失调,包括抑郁症相关。CACNA1C过甲基化与自杀倾向、双相情感障碍及抑郁症有关。目前,BDNF、ARHGEF10及CACNA1C甲基化异常与女性绝经年龄相关的焦虑和抑郁的关联研究还未见详细的报

道。因此,在脂肪组织,特别是外周血中确认BDNF、ARHGEF10及CACNA1C甲基化是否与女性绝经年龄相关,并进一步探讨其与绝经年龄相关的焦虑和抑郁的关系显得尤为必要。

综上所述,脂肪组织中早绝经、晚绝经组存在大量差异甲基化位点,其中BDNF、ARHGEF10及CACNA1C甲基化异常可能与女性绝经年龄相关抑郁有关,它们的主要功能可能与DNA结合、转录因子活性、信号转导通路等有关。基因芯片技术可用于抑郁相关甲基化差异甲基化位点的初筛,但构建结肠癌差异甲基化谱作为临床分子标记物仍需进一步验证。

参考文献

- 1 Han KM, Choi S, Kim A, et al. The effects of 5-HTTLPR and BDNF Val66Met polymorphisms on neurostructural changes in major depressive disorder[J]. *Psychiatry Res Neuroimaging*, 2018, 273(1): 25-34.
- 2 Dima D, Jogia J, Collier D, et al. Schizophrenia related variants in CACNA1C also confer risk of autism [J]. *JAMA Psychiatry*, 2013, 70(12): 1303-1311.
- 3 Lu DH, Liao HM, Chen CH, et al. Impairment of social behaviors in ARHGEF10 knockout mice [J]. *Mol Autism*, 2018, 9(11): 234-248.
- 4 Benayoun BA, Pollina EA, Brunet A. Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(10): 593-610.
- 5 Lu S, Xu F, Hu W, et al. SCD1 methylation in subcutaneous adipose tissue associated with menopausal age[J]. *Climacteric*, 2019, 19(3): 1-8.
- 6 Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging[J]. *Aging Cell*, 2015, 14(6): 924-932.
- 7 Bell JT, Tsai PC, Yang TP, et al. Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(4): e1002629.
- 8 Wang C, Chen L, Yang Y, et al. Identification of potential blood biomarkers for Parkinson's disease by gene expression and DNA methylation data integration analysis [J]. *Clinical Epigenetics*, 2019, 11(1): 24.
- 9 Zheleznyakova GY, Cao H, Schiöth HB. BDNF DNA methylation changes as a biomarker of psychiatric disorders: literature review and open access database analysis[J]. *Behav Brain Funct*, 2016, 12(1): 17.

(收稿日期 2020-05-14)

(本文编辑 蔡华波)