

· 学术交流 ·

双相 II 型障碍伴冲动攻击行为患者的全基因组 DNA 甲基化修饰研究

芹那尔·波拉提江 邹韶红 赵宗峰

830001 乌鲁木齐, 新疆维吾尔自治区人民医院临床心理科

通信作者: 邹韶红, Email: zoushaohong@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2019.06.009

【摘要】目的 探讨双相 II 型障碍伴冲动攻击行为患者的全基因组 DNA 甲基化修饰情况。**方法** 纳入 5 例有冲动攻击行为的双相 II 型障碍患者(攻击组)及 5 例无冲动攻击行为的双相 II 型障碍患者(非攻击组), 采用 Illumina 公司的人类 450K 甲基化芯片技术对 10 例患者的全血进行甲基化水平的分析。利用 R 软件对原始数据进行预处理并筛选出样本分组间的差异甲基化位点采用 GCBI 在线分析软件对差异候选基因进行功能富集分析。**结果** (1)攻击组与非攻击组样本比较甲基化水平有差异。(2)攻击组与非攻击组样本差异甲基化位点在染色体上的分布有差异。(3)按基因注释分类和 CpG 岛注释分类筛选攻击组与非攻击组样本间的差异甲基化区域, 差异甲基化区域在 11 个注释区域内均有分布。(4)GO 分析结果显示, 差异甲基化位点参与信号传递等功能。Pathway 分析中, 主要参与多巴胺能神经突触信号通路、趋化因子信号通路。**结论** 有冲动攻击行为的双相 II 型障碍患者的全基因组 DNA 甲基化水平及差异甲基化 DNA 在染色体上的分布均有差异, 差异甲基化位点主要参与信号传递等。

【关键词】 双相情感障碍; 冲动攻击行为; 基因甲基化

Study on the whole genomic DNA methylation modification of impulsive aggression in patients with bipolar II disorder

Qin Naer·Bo Latijiang, Zou Shaohong, Zhao Zongfeng

Department of Clinical Psychology, Xinjiang Uygur Municipal Region People's Hospital, Urumqi 830001, China

Corresponding author: Zou Shaohong, Email: zoushaohong@126.com

【Abstract】Objective To explore the whole genome DNA methylation modification of impulsive aggression in patients with bipolar II disorder. **Methods** The Illumina human 450k methylation chip technology was used to analyze the level of methylation of the whole blood genomic DNA samples of 5 cases of bipolar II disorder patients with impulsive behavior and 5 cases of bipolar II disorder patients without impulsive behavior. The R software was used to preprocess the raw data and select the differentiated methylation loci between sample groups. Finally, the GCBI online analysis software was used to analyze the functional enrichment of different candidate genes. **Results** (1)There was a difference in the methylation levels between the aggression group and the non-aggression group. (2)There was a difference in the distribution of methylation loci on the chromosome between the aggression group and the non-aggression group. (3)The differentiated methylation loci were classified by gene annotation classification and CpG island annotation classification, and the differentiated methylation loci were distributed in 11 annotation areas. (4)The result of GO analysis showed that the differentiated methylation loci participated in signal transmission and other functions. The pathway analysis showed that the affected function was mainly related with dopaminergic synaptic and chemokine signaling pathway. **Conclusions** In this study, the whole genomic DNA methylation levels and the distribution of methylated DNA on the chromosome in the aggression group were different from the non-aggression group.

【Key words】 Bipolar disorder; Aggression behavior; Gene methylation

双相障碍是以反复发作的躁狂和抑郁为主要临床表现的一种重型精神障碍, 具有高复发率、高致残率、高自杀率等特点^[1]。攻击行为指使另一种生

物体受到不愿意接受的伤害, 其伤害形式可以是任意的。攻击行为可分为精神病性攻击行为、手段性攻击行为、冲动性攻击行为。双相障碍患者的攻击

行为以冲动性攻击行为为主^[2],患者受到精神症状的影响,可能做出任何形式的攻击行为^[3]。从大脑结构与功能区域分析来看,前额叶控制功能以及前额叶皮质对皮层下的调节作用在攻击行为中可能起关键作用^[4],也有学者报道,颞叶也是攻击行为的敏感区域^[5]。另外有研究者认为,边缘系统活性增强及海马功能异常与某些攻击行为的发生是紧密相关的^[6]。此外,各种神经递质、神经内分泌和神经肽类物质也参与冲动攻击行为的产生,其中5-羟色胺(5-HT)不足、催产素水平的下降、乙酰胆碱减少,而多巴胺和去甲肾上腺素增加,以及谷氨酸/ γ -氨基丁酸系统活性的失调,也可导致冲动攻击行为的发生^[7-9]。

表观遗传学(epigenetics)是传统遗传学的一个支系,指基因的功能或者基因表达产物发生改变的遗传类型。常见的表观遗传类型有基因沉默、DNA甲基化、核仁显性、基因组印记等。近几年的研究显示,表观遗传学与多种疾病的发生发展相关,环境压力导致产生的一些小的物质也会引起表观遗传发生改变^[10]。DNA甲基化修饰改变是一类重要的表观遗传学类型^[11]。DNA甲基化是将2-巯基-4-氨基嘧啶转化为5-甲基-2-巯基-4-氨基嘧啶的反应,其中甲基产生于甲基化合物S腺苷甲硫氨酸的催化过程中。

随着相关学科与技术的不断发展,与各类精神障碍、冲动攻击行为,甚至与精神障碍患者的冲动攻击行为相关的一些表观遗传学内容逐步被揭示和确认,特别是甲基化修饰改变。与精神障碍患者冲动攻击行为相关的基因的甲基化修饰改变有5-HT基因、脑源性神经营养因子(BDNF)基因、单胺氧化酶A(MAOA)基因以及儿茶酚氧位甲基转移酶(COMT)基因甲基化修饰改变。有研究提示,在自杀者的大脑和其他体液中BDNF水平显著下降^[12]。另外,BDNF基因高甲基化区域的甲基化修饰水平与抑郁症患者的自杀行为相关^[13]。此外,反社会人类的MAOA基因的失调可能与表观遗传学相关^[14]。但到目前为止,国内针对双相障碍患者冲动攻击行为的DNA甲基化修饰相关专项研究仍少见。

一、对象与方法

1.研究对象:选取2015年12月至2016年6月在新疆维吾尔自治区人民医院临床心理科住院的首发且首次就诊的汉族双相II型障碍(目前为重度抑郁发作)患者共计10例。年龄24~64岁,按照有、无冲动攻击行为分为攻击组和非攻击组,有冲动性攻击行为必须同时满足下列2个标准:修改版外显行

为攻击量表(Modified Overt Aggression Scale, MOAS)加权总分 >4 分,且体力攻击分数 ≥ 1 分;修订版Barratt冲动量表(Barratt Impulsivity Scale-11, BIS-11)总分 ≥ 70 分。无冲动攻击行为必须同时满足下列2个标准:MOAS加权总分 ≤ 4 分;且表中体力攻击为0分;BIS-11总分 < 70 分。攻击组共5例患者,男3例,女2例,平均年龄 (36.7 ± 3.25) 岁;非攻击组共5例患者,男3例,女2例,平均年龄 (37.0 ± 3.25) 岁。

所有入组患者由两名精神科主治医师及以上的医师使用《精神障碍诊断与统计手册第五版》(DSM-5)、汉密尔顿抑郁量表(Hamilton Depression Scale, HAMD)、轻躁狂症状自评量表(Hypomania Check List 32, HCL-32)明确诊断,根据纳入标准与排除标准进行样本的筛选。本研究所有受试者均自愿参加本研究,并由受试者本人或法定监护人签署书面知情同意书。并排除:(1)合并有其他器质性疾病者,或者合并其他精神疾病者;(2)意识不清、严重精神性病性症状者;(3)严重的语言或听力障碍者或因其他不能配合者。

两组间的年龄、病程、性别、受教育程度、职业、经济状况及婚姻状态等一般资料比较,差异均无统计学意义。另外,HAMD得分与HCL-32量表得分比较差异无统计学意义,MOAS得分与BIS-11得分差异有统计学意义。

2.方法:(1)样本准备。清晨空腹采集所有受试者肘静脉血4 ml,置于5 ml的乙二胺四乙酸(EDTA)-Na₂抗凝管中,贴好标签在 -80°C 冰箱内保存备用。提取样本DNA,保证样本DNA纯度:OD_{260/280}值均在1.7~2.0,并将RNA去除干净,样本DNA浓度均 $\geq 55 \text{ ng}/\mu\text{l}$,样品总量均 $> 5 \mu\text{g}$ 。将样本溶解在TE中。保证低温运输(-20°C)样本,为防止污染,运输时用parafilm密封管口。(2)甲基化450K的设计原理:illumina Human甲基化450K芯片采用illumina Bead Array TM Infinium技术,特异性的识别甲基化位点。(3)实验流程:用TIANGEN血液基因组DNA提取试剂盒提取样本DNA,并采用EZ DNA Methylation-Gold Kit(Zymo, USA)试剂盒对每个样本DNA进行亚硫酸盐处理,其过程包括:变性,碱变性-基因组全扩增,杂交,洗涤,延伸,染色等。采用Infinium Human Methylation 450 BeadChip(Illumina, USA)进行甲基化检测。芯片共包含人类全基因组的45 000个甲基化位点。最后使用iSan对芯片对进行扫描。

3.统计学方法:芯片原始数据用R软件进行预处理,再继续应用R软件筛选样本组间的差异甲基化位点。依据illumina公司该芯片推荐筛选标准:

以样本之间基因甲基化差异 $> 14\%$ ($| \Delta \beta | > 0.14$), $P < 0.05$ 列为差异候选基因。为了挖掘高甲基化或低甲基化的基因是否有染色体的偏向性或成簇分布的特点将样本分组间差异甲基化位点定位在染色体上, 统计染色体上差异甲基化区域的分布。按基因注释分类、CpG 岛注释分类将各区域内的所有探针的信号值取算数平均值后, 采用 pooled t 检验法筛选样本分组的差异甲基化区域。采用人类的参考基因组(hg27)关联 CpG 注释的 5 个差异甲基化区域。采用 GCBI 在线分析软件对差异候选基因进行功能富集分析(包括 GO 分析, Pathway 分析), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 450K 甲基化芯片检测结果: Methylation450 芯片覆盖位点包括 96% 的 CpG 岛、CpG 岛以外的 CpG 位点、FANTOM4 启动子、DNase hypersensitive sites、miRNA promotor regions、Human Methylation27 BeadChip 中 90% 的位点。严格按照 Illumina Infinium Human Methylation 450 BeadChip 操作手册完成 DNA 抽提、转化、扩增、亚硫酸盐处理等, 经 QC Report 检测得到各项质控指标符合 Illumina 的质量要求。

图 1(见本期封三) Hybridization Controls 杂交质控图显示阳性参照中绿色探针产生的 $\log_2(\text{信号值}) > 12$, 标记实验成功。Target Removal Controls 背景图显示阴性参照探针中绿色荧光 $\log_2(\text{背景值})$ 和上图的阳性参照的 $\log_2(\text{信号值})$ 的差值在 2 个数量级以上, 洗脱实验成功。

2. 筛选差异甲基化位点结果: 本研究数据结果提示所有样本的未甲基化修饰改变的密度峰值 < 0.2 , 甲基化修饰改变的密度峰值 > 0.8 。所有样本的甲基化修饰改变密度曲线成“双峰曲线”, 提示样本的 β 值密度曲线趋于一致。攻击组与非攻击组比较, 差异甲基化位点总数为 340 个, 其中高甲基化修饰改变位点为 110 个, 低甲基化修饰改变的位点为 230 个。

3. 甲基化区域的分布情况: 攻击组与非攻击组比较除了 Y, 1~22 的染色体上均有差异甲基化区域。第 22 染色体只有差异低甲基化区域分布, 染色体 1~21、X 有差异高甲基化区域与差异低甲基化区域分布。在染色体 3、4、5、10、19 上高甲基化区域有集中分布现象。染色体 5 上差异高甲基化区域分布最多, 染色体 1 差异低甲基化区域分布最多。在染色体 1、6、10、13 上低甲基化区域的分布有集中现象。

4. 差异甲基化区域: 结果提示, 按照 CpG 岛注释分类样本攻击组与非攻击组双相 II 型障碍患者在 N shelf、N shore、CpG Island、S shore、S Shelf 五个

CpG 岛注释区域差异甲基化区域分别有 6 个、17 个、12 个、14 个、17 个, 按基因注释分类攻击组与非攻击组样本双相 II 型障碍患者差异甲基化区域分别是 7 个、5 个、7 个、6 个、9 个。

5. CpG 注释分类中的基因注释: 在攻击组与非攻击组组对比中找到 5-HT 受体 4。

6. 功能富集分析结果: 见图 2(见本期封三)。GO 分析结果提示, 差异甲基化位点主要参与信号传递等功能。Pathway 分析显示, 差异甲基化位点主要参与多巴胺能神经突触信号通路、趋化因子信号通路等信号传导通路。

讨论 近年来本课题组着力于研究双相障碍与冲动行为相关性, 发现新疆维吾尔族及汉族双相障碍患者冲动攻击行为与单胺氧化酶 A rs1137070 基因多态性可能具有关联性^[15], 还发现新疆维吾尔族双相障碍患者冲动攻击行为与 5-羟色胺受体 1B (rs6296 位点) 基因多态性可能具有关联性^[16]。故本研究将探讨双相 II 型障碍患者冲动攻击行为的全基因组 DNA 甲基化修饰。

本研究利用 Methylation450 芯片技术, 分别检测出有、无冲动攻击行为的双相障碍患者全血 DNA 甲基化位点, 分析攻击组与非攻击组之间差异甲基化位点, 进一步分析差异甲基化位点所在染色体分布情况, 对差异甲基化区域进行分析。

本研究采用 β 值做样本分组之间的差异甲基化趋势的比较, 所有样本的未甲基化的密度峰值 $0 \sim < 0.2$, 甲基化的密度峰值 $0.8 \sim 1.0$ 。说明所有样本的 β 值密度曲线趋于一致, 曲线符合“双峰分布”。进一步完善数据归一化处理, 数据归一化结果提示 β 值的总体分布趋于一致且分组符合实验设计要求。

本样本结果显示攻击组与非攻击组比较差异甲基化位点总数为 340 个, 其中差异高甲基化修饰位点共 110 个, 差异低甲基化修饰位点共 230 个, 提示样本攻击组与非攻击组比较甲基化修饰水平是有差别的, 且差异低甲基化水平较高甲基化水平高 1.09%。

为了挖掘高甲基化或低甲基化的基因是否有染色体的偏向性或成簇分布的特点, 本研究进一步统计样本组之间差异甲基化位点在染色体上的分布情况, 将样本分组间差异甲基化位点定位在染色体上。分析结果提示攻击组与非攻击组比较差异甲基化区域在染色体上的分布有偏向性, 且在部分染色体上高甲基化或低甲基化区域有成簇分布的特点。

进一步结果提示按照 CpG 岛注释分类和基因注

释分类,攻击组与非攻击组双相 II 型障碍患者的甲基化区域的分布有差别。两组双相 II 型障碍患者比较找到 5-HT 受体 4 存在差异。提示 5-HT 甲基化水平可能与双相障碍患者的冲动攻击行为相关。

采用 GCBI 在线分析软件对差异候选基因进行功能富集分析,视 $P < 0.05$ 时有统计学意义。攻击组与非攻击组双相 II 型障碍患者比较 Gene ontology 分析结果提示差异甲基化位点基因参与多种生物功能,Pathway 分析结果提示差异甲基化位点主要参与多种信号传导通路。

本研究样本攻击组与非攻击组比较双相 II 型障碍患者冲动攻击行为的全基因组 DNA 甲基化水平及甲基化 DNA 在染色体上的分布均有差别,攻击组与非攻击组比较,按基因注释分类和 CpG 岛注释分类的 11 个区域内均有差异甲基化区域的分布,差异甲基化位点主要参与信号传递等生物功能和多巴胺能神经突触、趋化因子信号通路等信号传导通路。不足的是此次研究结果没有采用焦磷酸测序的方法对此次研究中检测到的差异甲基化基因进行验证,今后研究中需要进一步完善。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 课题设计、实施到资料分析与撰写为芹那尔·波拉提江、邹韶红,修改为邹韶红,实验指导、收集资料、数据录入为赵宗峰

参 考 文 献

- [1] 杜霞,魏立和,陈景旭.心境障碍相关发病机制的研究进展[J].国际精神病学杂志,2013,13(4):231-234. DOI: 10.13479/j.cnki.jip.2013.04.013.
- [2] Schaffer A, Isomets ET, Tondo L, et al. Epidemiology, neurobiology and pharmacological interventions related to suicide deaths and suicide attempts in bipolar disorder: Part I of a report of the International Society for Bipolar Disorders Task Force on Suicide in Bipolar Disorder[J]. Aust N Z J Psychiatry, 2015, 49(9): 785-802. DOI: 10.1177/0004867415594427.
- [3] 赵容,邵阳,谢斌.精神障碍冲动性攻击的相关机制研究进展[J].神经疾病与精神卫生,2017,17(1):52-55. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.01.015.
Zhao R, Shao Y, Xie B. Research progress on relative mechanism of impulsive aggression in mental disorders[J]. Journal of Neuroscience and Mental Health, 2017, 17(1): 52-55.
- [4] 张怀晨,苏中华,张明,等.急性期精神分裂症住院患者激越症状与院前冲动攻击行为相关性分析[J].精神医学杂志,2016,29(3):177-181. DOI: 10.3969/j.issn.2095-9346.2016.03.006.
Zhang HC, Su ZH, Zhang M, et al. Correlation between agitation and preadmission aggressive behaviors in the acute inpatients with schizophrenia[J]. Journal of Psychiatry, 2016, 29(3): 177-181.
- [5] Gereffi G, Lee J. Economic and Social Upgrading in Global Value Chains and Industrial Clusters: Why Governance Matters[J]. J Bus Ethics, 2016, 133(1): 25-38. DOI: org/10.1007/s10551-014-2373-7.
- [6] Minzenberg MJ, Fan J, New AS, et al. Front-limbic dysfunction in response to facial emotion in borderline personality disorder: an event-related fMRI study[J]. Psychiatry Res, 2007, 155(3): 231-243. DOI: 10.1016/j.psychres.2007.03.006.
- [7] Coccaro EF, Lee R, Groer MW, et al. Toxoplasma gondii infection: relationship with aggression in psychiatric subjects[J]. J Clin Psychiatry, 2016, 77(3): 334-341. DOI: 10.4088/JCP.14m09621.
- [8] McCloskey MS, Phan KL, Angstadt M, et al. Amygdala hyperactivation to angry faces in intermittent explosive disorder[J]. J Psychiatr Res, 2016, 79: 34-41. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2016.04.006.
- [9] 李冠男,崔洪梅,李丹,等.精神分裂症稳定期减少抗精神病药物剂量对精神症状的影响[J].中国神经精神疾病杂志,2018,44(4):212-216. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0152.2018.04.005.
Li GN, Cui HM, Li D, et al. Influence of reducing antipsychotic drug dose on psychotic symptoms in schizophrenia stabilization period[J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2018, 44(4): 212-216.
- [10] Lovinsky-Desim S, Miller RL. Epigenetics, asthma and allergic diseases: a review of the latest advancements[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2012, 12(3): 211-220. DOI: 10.1007/s11882-012-0257-4.
- [11] 徐宁,张广芬,余海鹰,等.抑郁症的表观遗传学机制研究进展[J].医学研究生学报,2016,29(10):1093-1096. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2016.10.019.
Xu N, Zhang GF, Yu HY, et al. Research advances on epigenetic mechanisms of depression[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2016, 29(10): 1093-1096.
- [12] Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, et al. Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects[J]. Arch Gen Psychiatry, 2010, 67(3): 258-267. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.9.
- [13] Buchman AS, Yu L, Boyle PA, et al. Higher brain BDNF gene expression is associated with slower cognitive decline in older adults[J]. Neurology, 2016, 86(8): 735-741. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002387.
- [14] Philibert RA, Gunter TD, Beach SR, et al. MAOA methylation is associated with nicotine and alcohol dependence in women[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2008, 147B(5): 565-570. DOI: 10.1002/ajmg.b.30778.
- [15] 赵宗峰,邹韶红,赵志强,等.新疆酒依赖共病双相情感障碍患者冲动攻击行为与单胺氧化酶 A 基因多态性关联分析[J].中华实用诊断与治疗,2015,29(10):961-963. DOI: 10.13507/j.issn.1674-3474.2015.10.009.
Zhao ZF, Zou SH, Zhao ZQ, et al. Association between polymorphism of monoamine oxidase A gene and aggressive behavior in alcohol-dependent patients combined with bipolar affective disorder in Xinjiang[J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2015, 29(10): 961-963.
- [16] 胡伟,邹韶红,赵宗峰,等.谷氨酸受体 6 基因多态与双相障碍患者冲动攻击行为关联分析[J].中国医师杂志,2017,19(5):664-666. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2017.05.008.
Hu W, Zou SH, Zhao ZF, et al. An association analysis between polymorphism of glutamate receptor 6 gene and impulsively aggressive behavior in patients with bipolar disorder[J]. Journal of Chinese Physician, 2017, 19(5): 664-666.

(收稿日期:2018-12-30)

(本文编辑:戚红丹)