

雌激素受体 2 基因 5' 近端调控区 DNA 甲基化与男童孤独症的关联研究

王雪莱, 梁爽, 孙艺, 李海欣, 孙彩虹, 夏薇, 武丽杰

哈尔滨医科大学公共卫生学院/儿少卫生与妇幼保健学教研室, 黑龙江 150081

【摘要】 目的 探讨雌激素受体 2 基因(Estrogen Receptor beta, ESR2)的表观遗传修饰作用与孤独症发病的关联性, 为孤独症的病因学研究提供依据。方法 收集哈尔滨医科大学儿童发育行为研究中心的孤独症男性患儿 54 例, 并按年龄-性别匹配原则随机收集正常对照男性儿童 54 名, 运用亚硫酸盐测序法(Bisulfite Sequencing PCR, BSP)检测外周血细胞 ESR2 基因 5' 近端调控区的 DNA 甲基化。通过 Mann-Whitney U 检验比较病例组和对照组的 DNA 甲基化水平。结果 ESR2 基因 5' 近端调控区的整体甲基化水平在孤独症组和对照组间的差异无统计学意义($P>0.05$), 但启动子区甲基化岛(Prom CGI)所包含的 15 个 CpG 位点中, 有 7 个位点(CpG 5, 6, 8, 9, 10, 11 和 12)的甲基化水平在孤独症组明显升高(P 值均 <0.05), 部分位点存在于转录因子结合位点的保守序列中, 包括 USF2, ZBTB33, REL, ESR2 和 TFEC。此外, 外显子区甲基化岛(Exon CGI)包含 26 个 CpG 位点, 其中 CpG41 位点的甲基化水平在孤独症组($31.30\pm2.74\%$)高于对照组($24.07\pm2.59\%$)($P<0.05$)。结论 ESR2 基因 5' 近端调控区的表观遗传修饰与孤独症的发病有明显关联。

【关键词】 受体, 雌激素; 基因; DNA 甲基化; 孤独性障碍; 儿童

【中图分类号】 Q 343.1¹5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-9817(2016)06-0821-06

Association study of DNA methylation status in 5' regulatory region of the ESR2 gene with autism/WANG Xuelai, LIANG Shuang, SUN Yi, LI Haixin, SUN Caihong, XIA Wei, WU Lijie. Department of Children and Adolescent Health, Public Health College, Harbin Medical University, Harbin(150081), China

【Abstract】 **Objective** A case-control study was performed to explore the association between DNA methylation status of the Estrogen Receptor Beta (ESR2) gene and autism, which could imply an evidence of autism etiology. **Methods** A random sample of 54 boys with autism and 54 normal boys was performed DNA methylation in 5' regulatory region of the ESR2 gene by Bisulfite Sequencing PCR. The different DNA methylation between autism and control was compared by Mann-Whitney U-test. **Results** The DNA methylation of the entire 5' regulatory region in the ESR2 gene showed no difference between autism and control ($P>0.05$). Prom CGI contains 15 CpG sites, in which 7 CpG sites (CpG 5, 6, 8, 9, 10, 11 and 12) were hypermethylation in the autism group ($P<0.05$). Most of these sites were in the motifs for transcription factor binding sites, including USF2, ZBTB33, REL, ESR2 and TFEC. Among 26 CpG sites in the Exon CGI, CpG 41 was hypermethylation in the autism group ($P<0.05$). **Conclusion** The present study provides insight into the common genetic variation in ESR2 gene in autism through an epigenetic mechanism.

【Key words】 Receptors, estrogen; Genes; DNA methylation; Autistic disorder; Child

孤独症是一类广泛发育障碍性疾病, 男性的患病率明显高于女性, 提示性激素可能与孤独症的发生有关。Baron-Cohen^[1]把孤独症患者的大脑称为极端男性大脑模式(extreme male brain, EMB), 这归因于胎儿期性激素暴露对大脑产生的性分化作用。在男性大脑的发育过程中, 睾酮通过芳香化酶的催化作用, 转化成雌激素。雌激素再与雌激素受体结合, 调控了男性化(masculinization)和去女性化(defeminization)两个重要过程, 最终形成男性大脑^[2], 而女性大脑的

发育过程未接受性激素的暴露。大脑结构和功能的性别分化, 影响着个体出生后的行为表现^[3]。大量研究表明, 雌激素及其受体与神经精神疾病的发生发展有关联, 并有明显的性别差异, 如抑郁症^[4]、焦虑症^[5]等; 此外还参与情绪调节、学习能力和认知功能^[6], 但与孤独症的关联研究尚不多见。因此, 本研究以孤独症患病率的性别差异为切入点, 从表观遗传学的角度出发, 探索雌激素受体 2 基因(Estrogen Receptor beta, ESR2)DNA 甲基化对孤独症的影响。

1 对象与方法

1.1 对象 收集 2011 年 3 月—2013 年 3 月, 前往哈尔滨医科大学儿童发育行为研究中心就诊的汉族孤独症男性患儿 54 名, 平均年龄为(4.24 ± 0.98)岁。经

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81202221)。

【作者简介】 王雪莱(1984-), 女, 黑龙江人, 在读博士, 主要研究方向为儿童孤独症病因学。

【通讯作者】 武丽杰, E-mail: wulijehyd@126.com。

DOI: 10.16835/j.cnki.1000-9817.2016.06.006

哈尔滨医科大学附属医院副高级以上职称的精神科或儿科医生诊断,符合美国 DSM-IV 儿童孤独症诊断标准^[7]。采用孤独症行为检查量表(ABC)^[8]和儿童孤独症评定量表(CARS)^[9]评估患儿的病情程度,纳入标准需同时满足 ABC≥67 分和 CARS≥30 分。同时排除阿斯伯格综合征(AS)、未分类的广泛性发育障碍(PDD-NOS)、脆性 X 染色体综合征,确保入选的患者样本为典型孤独症儿童。按照年龄—性别匹配原则,随机收集哈尔滨地区幼儿园的健康男性儿童 54 名为对照组,平均年龄为(4.37±0.80)岁。对照组儿童无任何躯体、精神、脑发育疾病。参与者的父母或监护人均签署知情同意书,并经哈尔滨医科大学医学伦理委员会通过。

1.2 方法 亚硫酸盐测序法(Bisulfite Sequencing PCR, BSP)是目前检测 DNA 甲基化水平的金标准。经亚硫酸盐处理过的基因组 DNA,未发生甲基化的胞嘧啶转化成尿嘧啶,发生甲基化的胞嘧啶不转化。通过设计 BSP 引物进行 PCR,在扩增过程中尿嘧啶全部转化为胸腺嘧啶,对纯化后的 PCR 产物进行 T-A 克隆,挑取阳性克隆进行测序,能明显提高测序的成功率^[10]。最后将测得的 DNA 序列与原始序列比对,进行 DNA 甲基化水平的分析。具体实验步骤如下:(1) 收集外周静脉血提取 DNA(试剂为 QIAamp DNA Blood Mini Kit)。(2) 亚硫酸盐修饰基因组 DNA(试剂为 EZ DNA Methylation-GoldTM kit)。(3) 聚合酶链式反应(PCR)50.0 L 体系,包括 5.0 L 10×ImmoBuffer,5.0 L 10 mM dNTP Mix,1.5 L 50 mM MgCl₂,1.25 L 10 M 上游引物,1.25 L 10 M 下游引物,0.5 L BIOTaq 酶,2.0 L 修饰后的 DNA,33.5 L MilliQ 水。反应条件为 95°C 10 min → 95°C 30 s → 57°C 45 s → 72°C 45 s

→ 72°C 10 min → 4°C 结束,第 2~4 步为 42 个循环。ESR2 基因 5' 近端调控区上游引物序列为:5'-GTT ATT ATT TTT GTG GGT GGA TTA G-3';下游引物序列为:5'-ACC TTA CCT TCT CTA AAA TAC-3'。(4) 琼脂糖电泳,回收纯化 DNA(试剂为 QIAquick Gel Extraction Kit)。(5) TA 克隆(试剂为 pGEM-T Easy Vector)。(6) 随机挑选白色菌落提取重组质粒 DNA(试剂为 QIAprep Spin Miniprep Kit)。(7) 测序 PCR(试剂为 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)。(8) 纯化产物,测序。

1.3 统计学处理 运用 SPSS 19.0 数据分析软件进行非参数检验(Mann-Whitney U),比较孤独症组和对照组 ESR2 基因 5' 近端调控区甲基化岛(CpG 岛)的整体甲基化水平和每个甲基化位点(CpG 位点)的甲基化水平。所有计算的 P 值均为双侧检验,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ESR2 基因 5' 近端调控区甲基化岛的结构 ESR2 基因 5' 近端调控区 CpG 岛的核苷酸序列长度为 501 bp,覆盖了启动子 0N 和非编码外显子 0N(Exon 0N)的部分区域,分别命名为启动子区 CpG 岛(Prom CGI, -610~-419)和外显子区 CpG 岛(Exon CGI, -418~-110),分别包含 15 个 CpG 位点(CpG1~CpG15)和 26 个 CpG 位点(CpG16~CpG41)。外显子 1(Exon 1)的起始密码子 ATG 腺嘌呤位置标记为+1,在 Exon 0N 和 Exon 1 之间连接着长度为 10 957 bp 的内含子。运用数据库 JASPAR 预测该区域的转录因子结合位点,由下划线表示。见图 1。

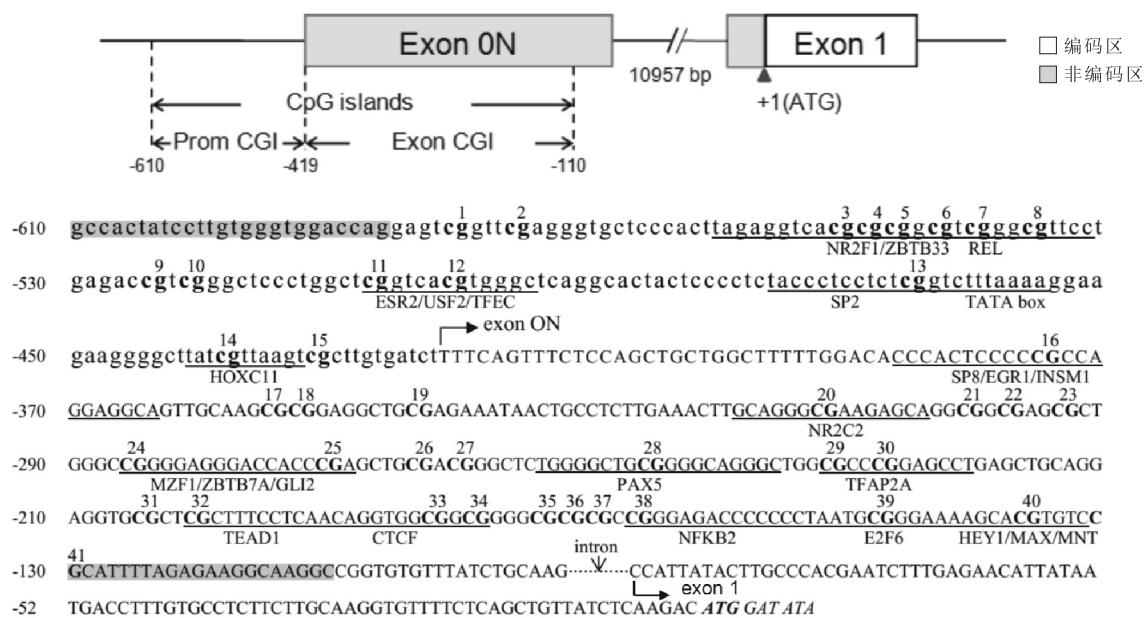


图 1 ESR2 基因 5' 近端调控区甲基化岛结构

2.2 ESR2 基因 Prom CGI 甲基化水平与孤独症的关联 病例组和对照组 Prom CGI 的 DNA 甲基化范围分别是 0~51.87% 和 0.67%~60.00%，均值分别为 (19.24 ± 1.68)% 和 (18.25 ± 1.86)%。通过 Mann-Whitney U 检验得出 Prom CGI 的整体甲基化水平两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。分别比较 15 个 CpG 位点 DNA 甲基化可知, CpG10, CpG11 位点的甲基化水平两组间

的差异均有统计学意义 (P 值均 < 0.05)。如图 2 所示, 病例组和对照组 CpG10 位点的甲基化水平分别是 (8.80 ± 1.36)% 和 (5.74 ± 1.26)% ($P = 0.041$) ; 病例组和对照组 CpG11 位点的甲基化水平分别为 (9.04 ± 1.29)% , (6.11 ± 1.25)% ($P = 0.029$)。其他位点甲基化水平的差异均无统计学意义 (P 值均 > 0.05)。

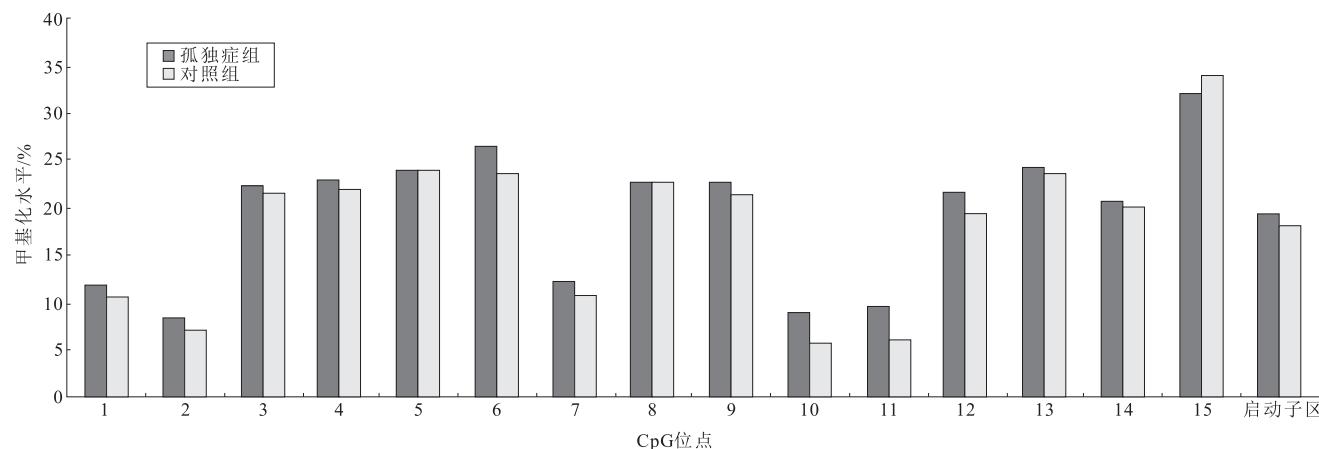


图 2 孤独症组和对照组 ESR2 基因启动子区 CGI 甲基化水平的整体比较

按照 Prom CGI 整体甲基化水平从低到高的顺序, 将病例组和对照组的样本分别进行三等分: 低甲基化组、中甲基化组和高甲基化组每组的样本量为 18 例。两组的甲基化差异见表 1。Prom CGI 低甲基化组中病例和对照的甲基化水平为 (6.06 ± 1.05)% 和 (4.37 ± 0.71)% , 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。分别对 15 个 CpG 位点进行比较, 如图 3 所示, CpG5 位点在病例组的甲基化水平为 (8.39 ± 1.85)% , 对照组为 (3.33 ± 1.40)% ($P = 0.033$) ; CpG8 位点的甲基化水平在病例组和对照组分别为 (7.77 ± 1.77)% 和 (2.22 ± 1.01)% ($P = 0.028$) ; 病例组和对照组的 CpG9 位点甲基化水平分别是 (6.67 ± 1.61)% 和 (2.22 ± 1.01)% ($P = 0.032$)。其他位点甲基化的差异均无统计学意义 (P 值均 > 0.05)。

表 1 ESR2 基因 5' 近端调控区 DNA 甲基化水平分组/%

组别	人数	低 (n=18)	中 (n=18)	高 (n=18)
Prom CGI				
孤独症组	54	0~12.67	13.33~26.00	26.44~51.87
对照组	54	0.67~9.33	9.33~23.33	24.00~60.00
Exon CGI				
孤独症组	54	0~18.46	19.23~29.62	30.38~63.46
对照组	54	0.38~19.62	19.62~29.62	30.77~56.54

Prom CGI 中甲基化组的甲基化水平在病例组和对照组分别是 (18.04 ± 0.89)% 和 (16.44 ± 0.95)% , 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。分别比较 15 个 CpG 位点, 可知 CpG6 位点的甲基化水平在病例组为 (26.78 ± 1.68)% , 对照组为 (21.67 ± 2.32)% ($P = 0.033$) ; CpG9

位点的甲基化水平在病例组和对照组分别为 (20.51 ± 1.09)% 和 (17.78 ± 1.29)% ($P = 0.028$) ; 病例组和对照组 CpG12 位点的甲基化水平为 (22.09 ± 2.21)% 和 (16.67 ± 2.80)% ($P = 0.032$)。其余位点甲基化水平的差异均无统计学意义 (P 值均 > 0.05)。见图 4。

高甲基化组的病例和对照的甲基化水平为 (33.70 ± 1.51)% 和 (34.11 ± 2.11)% , 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

2.3 ESR2 基因 Exon CGI 甲基化水平与孤独症的关联 病例组 ($n = 54$) 和对照组 ($n = 54$) Exon CGI 的 DNA 甲基化范围分别是 0~63.46% 和 0.38%~56.54% , 均值分别为 (25.94 ± 1.95)% 和 (25.32 ± 1.89)% , 经 Mann-Whitney U 检验, 两组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。分别对 26 个 CpG 位点进行比较, 发现 CpG41 位点的甲基化水平在两组间的差异有统计学意义, 病例组 CpG41 位点的甲基化水平为 (31.30 ± 2.74)% , 对照组为 (24.07 ± 2.59)% ($P = 0.044$)。其余各位点的甲基化水平在两组间的差异均无统计学意义 (P 值均 > 0.05)。见图 6。

按照 Prom CGI 的分组方式, 将 Exon CGI 进行甲基化水平由低到高的分组比较。见表 1。中甲基化组 CpG41 位点的甲基化水平在两组间的差异有统计学意义, 该位点的甲基化水平在病例组和对照组分别为 (29.44 ± 3.28)% 和 (20.00 ± 2.56)% ($P = 0.037$)。低、中、高甲基化组甲基化水平差异均无统计学意义 (P 值均 > 0.05)。见图 7~9。

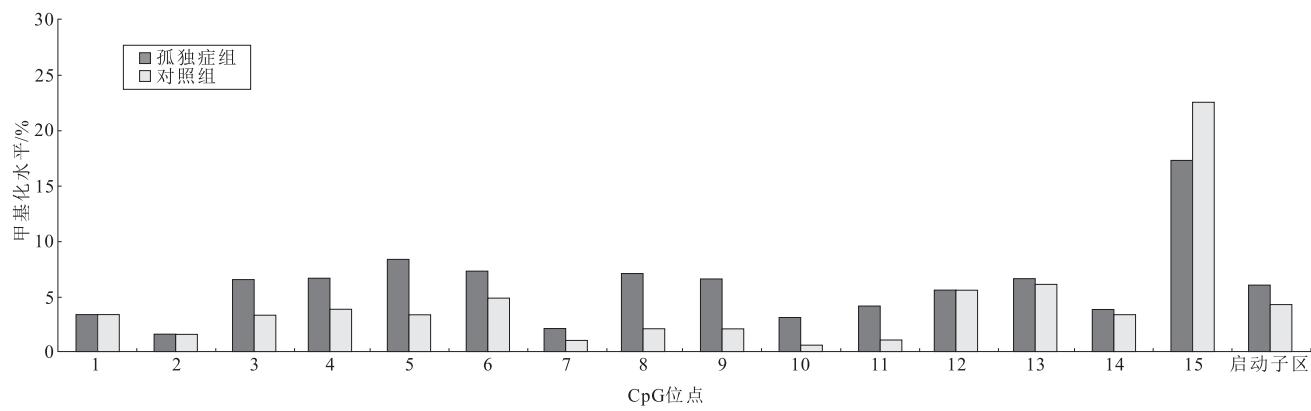


图 3 孤独症组和对照组 ESR2 基因启动子区 CGI 低甲基化组甲基化水平比较

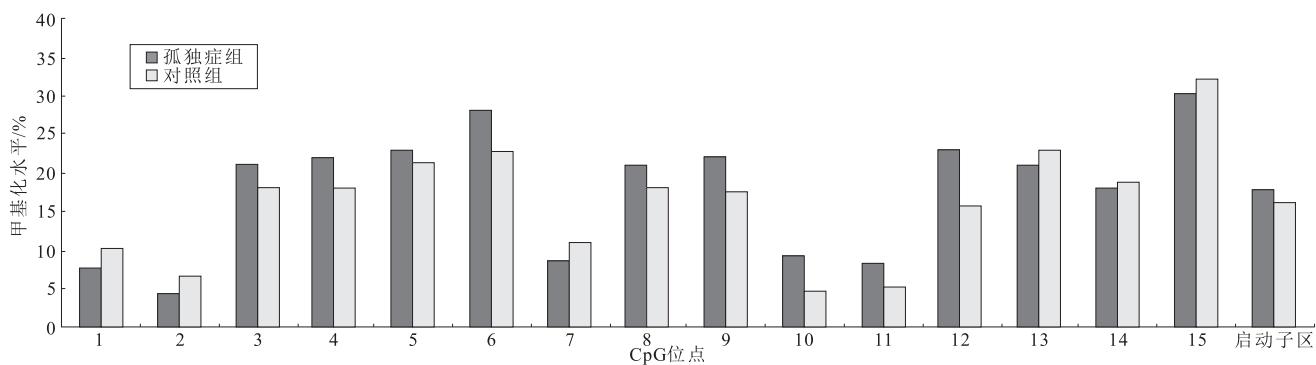


图 4 孤独症组和对照组 ESR2 基因启动子区 CGI 中甲基化组甲基化水平比较

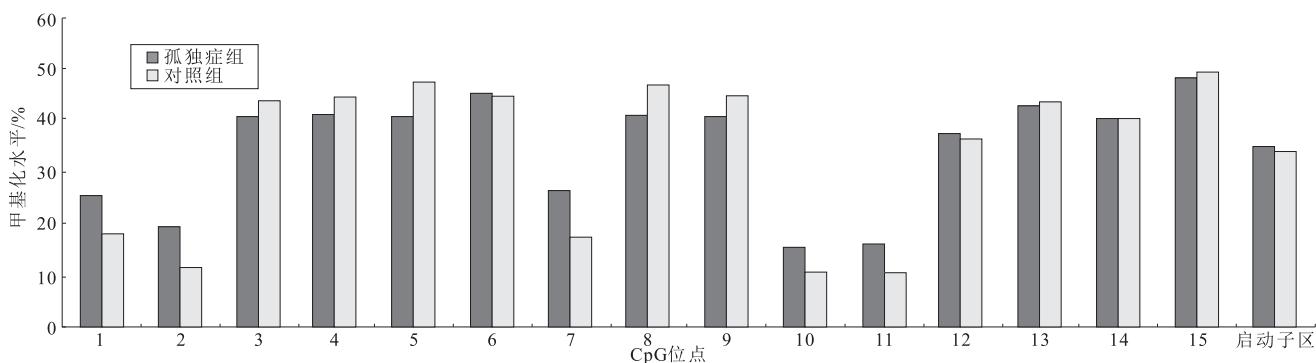


图 5 孤独症组和对照组 ESR2 基因启动子区 CGI 高甲基化组甲基化水平比较

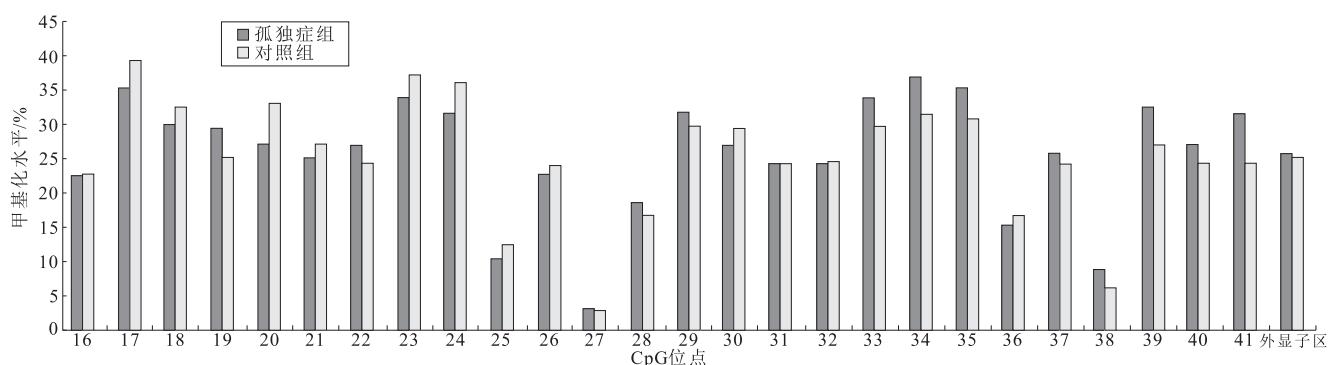


图 6 孤独症组和对照组 ESR2 基因外显子区 CGI 甲基化水平的整体比较

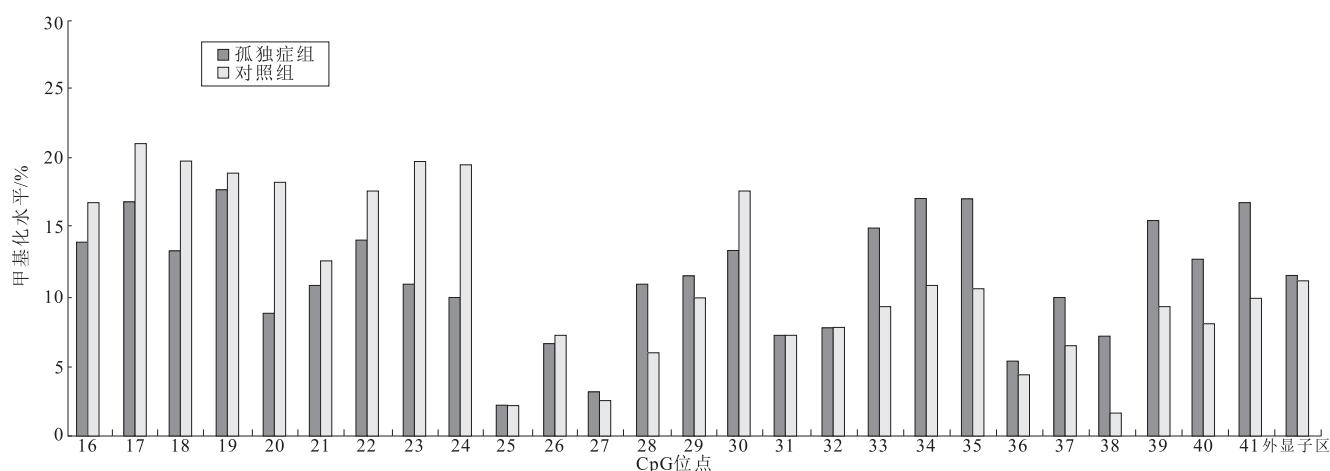


图 7 孤独症组和对照组 ESR2 基因外显子区 CGI 低甲基化组甲基化水平比较

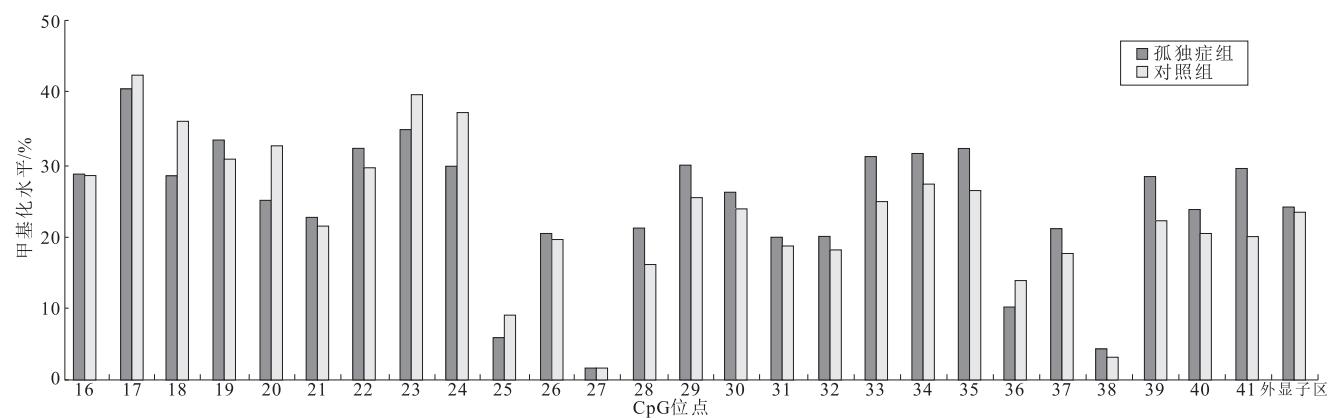


图 8 孤独症组和对照组 ESR2 基因外显子区 CGI 中甲基化组甲基化水平比较

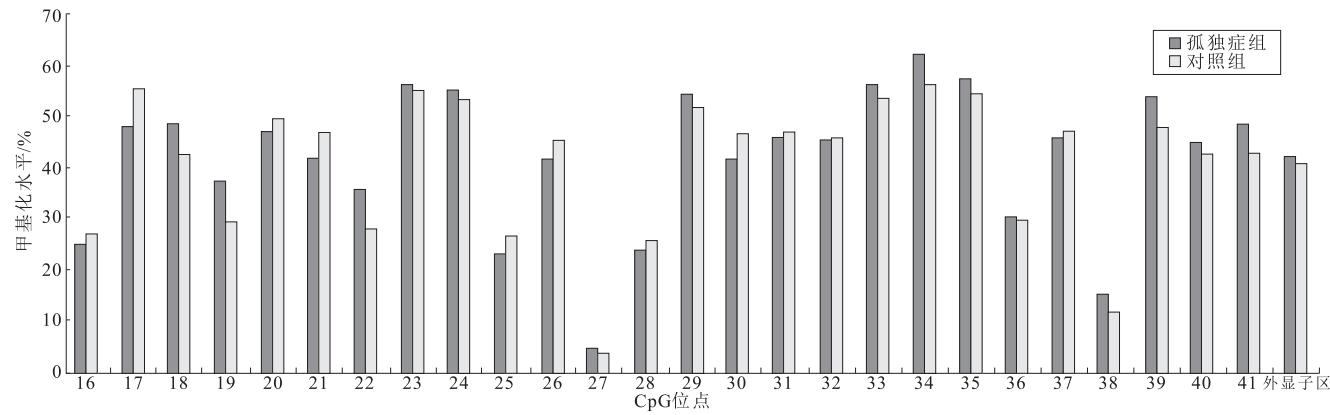


图 9 孤独症组和对照组 ESR2 基因外显子区 CGI 高甲基化组甲基化水平比较

3 讨论

全球范围内,儿童孤独症患病均有明显的性别差异,可见性激素与孤独症的发病可能有一定关联^[11]。本研究探讨了外周血细胞雌激素受体 2 基因(ESR2 基因)DNA 甲基化与汉族儿童孤独症发病的关联性。结果表明,在 ESR2 基因 5' 近端调控区包含了长度为 501 bp 的甲基化岛,其整体甲基化水平与孤独症未见明显关联。该区域包含 41 个 CpG 位点,有 8 个位点(CpG 5,6,8,9,10,11,12 和 41)的甲基化水平在孤独症组中显著升高。同时以上部分的 CpG 位点出现在

转录因子结合位点的保守序列中,包括 USF2, ZBTB33, REL, ESR2 和 TFEC 等。提示在特定 CpG 位点的甲基化作用下,ESR2 基因与孤独症有一定关联。

DNA 甲基化是一种重要的遗传修饰。最主要的甲基化位点是 CG 二核苷酸,即 5'-CG-3' 序列。CpG 岛主要分布于基因的 5' 端非编码区,通常处于非甲基化状态,当外界环境引起甲基化状态发生改变时,会影响基因的表达水平,进而诱导疾病的发生。DNA 甲基化与癌症、衰老、阿尔茨海默症等许多疾病有密切联系。

大量研究发现,ESR2 基因的甲基化异常与癌症相关,不同区域的 CpG 岛发挥不同的作用。人乳腺癌组织和细胞的 ESR2 基因启动子 0N 的甲基化水平高于正常乳腺组织和细胞,并引起了 mRNA 表达水平下降^[12-13]。前列腺癌细胞 ESR2 基因启动子 0N 的甲基化水平升高,直接引起 mRNA 的表达下降;而外显子 0N 的甲基化能促使启动子 0N 的甲基化发生改变,间接调控 mRNA 的表达^[14]。由本研究可知,在 Prom CGI 的 15 个 CpG 位点中,孤独症组 CpG1~14 位点的甲基化水平高于对照组;而在 Exon CGI 的 CpG16~26 位点的部分区域,孤独症组的甲基化水平低于对照组。综上,特定 CpG 位点的甲基化对 ESR2 基因表达起到了关键作用。

目前,国内尚缺乏关于 ESR2 基因与孤独症关联研究的报道。Chakrabarti 等^[15]首次发现了 ESR2 基因单核苷酸多态性与阿斯伯格综合征有关联,并影响其临床表型特征。Crider 等^[16]通过对孤独症患者脑组织的检测得出孤独症患者额中回处 ESR2 基因的 mRNA 和蛋白质水平均低于正常对照。本研究从表观遗传学角度出发,发现 ESR2 基因 5' 近端调控区内特定 CpG 位点的高甲基化状态与孤独症有明显关联。此外这些 CpG 位点出现在转录因子结合位点的保守序列中,CpG 位点的异常甲基化状态可能会干扰转录因子对 ESR2 基因的调控作用,导致孤独症患者 ESR2 基因表达水平下降。

有研究表明,孤独症患者外周血维甲酸相关孤儿受体 α 基因 (RORA) 上游启动子区的甲基化水平升高,同时患者大脑 RORA 蛋白表达下降^[17]。外周血细胞催产素受体基因 (OXTR) 特定 CpG 位点的甲基化水平升高,并与孤独症患者颞叶皮层组织的 mRNA 表达下降有关联性^[18]。本研究以外周血为样本,检测出孤独症患者 ESR2 基因 5' 近端调控区甲基化状态发生改变,进一步说明外周血细胞 DNA 甲基化异常与孤独症发病的关联,将在后续实验中通过分析该基因的 mRNA 表达水平深入探讨 ESR2 基因表观遗传修饰对孤独症的作用机制。

4 参考文献

- [1] BARON-COHEN S. The extreme male brain theory of autism [J]. Trends Cogn Sci, 2002, 6(6): 248-254.
- [2] KUDWA A E, MICHOPoulos V, GATEWOOD J D, et al. Roles of estrogen receptors alpha and beta in differentiation of mouse sexual behavior [J]. Neuroscience, 2006, 138(3): 921-928.
- [3] KAWATA M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system [J]. Neurosci Res, 1995, 24(1): 1-46.
- [4] ROCHA B A, FLEISCHER R, SCHAEFFER J M, et al. 17 Beta-estradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor-beta knockout (BERKO) mice [J]. Psychopharmacology (Berl), 2005, 179(3): 637-643.
- [5] IMWALLE D B, GUSTAFSSON J A, RISSMAN E F. Lack of functional estrogen receptor beta influences anxiety behavior and serotonin content in female mice [J]. Physiol Behav, 2005, 84(1): 157-163.
- [6] GILLIES G E, MCARTHUR S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines [J]. Pharmacol Rev, 2010, 62(2): 155-198.
- [7] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorder [M]. 4th ed. Washington, DC: American psychiatric association, 1994.
- [8] KRUG D A, ARICK J, ALMOND P. Behavior checklist for identifying severely handicapped individuals with high levels of autistic behavior [J]. J Child Psychol Psychiatry, 1980, 21: 221-229.
- [9] CHLEBOWSKI C, GREEN J A, BARTON M L, et al. Using the childhood autism rating scale to diagnose autism spectrum disorders [J]. J Autism Dev Disord, 2010, 40(7): 787-799.
- [10] 贾文亮, 张庆瑜, 李素丽, 等. 应用亚硫酸氢盐修饰后 PCR 联合 TA 克隆测序对 E-cadherin 启动子区甲基化水平的检测 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(6): 611-616.
- [11] BARON-COHEN S, LOMBARDO M V, AUYEUNG B, et al. Why are autism spectrum conditions more prevalent in males [J]. PLoS Biol, 2011, 9(6): 1-10.
- [12] ZHAO C, LAM E W, SUNTERS A, et al. Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation [J]. Oncogene, 2003, 22(48): 7600-7606.
- [13] AL-NAKHLE H, SMITH L, BELL S M, et al. Regulation of estrogen receptor beta1 expression in breast cancer by epigenetic modification of the 5' regulatory region [J]. Int J Oncol, 2013, 43(6): 2039-2045.
- [14] ZHU X, LEAV I, LEUNG Y K, et al. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis [J]. Am J Pathol, 2004, 164(6): 2003-2012.
- [15] CHAKRABARTI B, DUDBRIDGE F, KENT L, et al. Genes related to sex steroids, neural growth, and social-emotional behavior are associated with autistic traits, empathy, and Asperger syndrome [J]. Autism Res, 2009, 2(3): 157-177.
- [16] CRIDER A, THAKKAR R, AHMED A O, et al. Dysregulation of estrogen receptor beta (ERbeta), aromatase (CYP19A1), and ER co-activators in the middle frontal gyrus of autism spectrum disorder subjects [J]. Mol Autism, 2014, 5(1): 46.
- [17] NGUYEN A, RAUCH T A, PFEIFER G P, et al. Global methylation profiling of lymphoblastoid cell lines reveals epigenetic contributions to autism spectrum disorders and a novel autism candidate gene, RORA, whose protein product is reduced in autistic brain [J]. Faseb J, 2010, 24(8): 3036-3051.
- [18] GREGORY S G, CONNELLY J J, TOWERS A J, et al. Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism [J]. BMC Med, 2009, 7: 62.

收稿日期:2016-04-11;修回日期:2016-05-19