

· 临床研究 ·

抑郁发作期双相障碍患者外周血 5-HTR1A 启动子区甲基化水平与抑郁发作的相关性

于妍¹ 杜启峰¹ 赵存友² 李淑芬² 张岱威¹ 蒋廷云¹

【摘要】 目的 探讨处于抑郁发作期的双相障碍患者外周血细胞五羟色胺 1A 受体基因(5-HTR1A)启动子区甲基化水平以及与抑郁症状的关系。**方法** 收集 2017 年 8 月至 2019 年 8 月来自广东省精神卫生中心、中山市第三人民医院和江门市第三人民医院的 65 例处于抑郁发作期的双相障碍患者(研究组)和 59 名健康人(对照组)的外周血,对 2 组血细胞 5-HTR1A 启动子区甲基化水平使用焦磷酸测序技术进行检测,采用 *t* 检验进行对比。研究组同时进行汉密尔顿抑郁量表(HAMD)评分,采用 Pearson 相关分析对甲基化水平与量表评分之间的相关性进行分析。**结果** 抑郁发作期的双相障碍患者外周血细胞 5-HTR1A 启动子区甲基化水平低于对照组 [(46.86±6.75)% vs (50.03±8.85)%], 差异具有统计学意义 (*t*=2.255, *P*=0.013)。Pearson 相关分析显示研究组 HAMD 评分与其甲基化率呈负相关 (*r*=-0.631, *P*<0.01)。**结论** 抑郁发作期的双相障碍患者外周血的 5-HTR1A 启动子区甲基化水平与抑郁发作之间可能存在相关性。

【关键词】 双相障碍; 抑郁发作; DNA 甲基化

5-HTR1A promoter methylation levels in peripheral blood cells of patients with depressive episode of bipolar disorder and correlation with depressive episode Yu Yan¹, Du Qifeng¹, Zhao Cunyou², Li Shufen², Zhang Daiwei¹, Jiang Tingyun¹. ¹Department of Affective Disorder, the Third People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan 528451, China; ²Department of Genetics, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: Du Qifeng, Email: 547050904@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the levels of 5-hydroxytryptamine receptor 1A (5-HTR1A) promoter methylation in peripheral blood of patients with bipolar disorder during their depressive episode, and to explore the relationship between the methylation levels and depressive symptoms of the patients. **Methods** Blood samples were collected from 65 patients (study group) with bipolar disorder who were in the stage of depressive episode and 59 healthy people (control group) from August 2017 to August 2018 at Mental Health Center of Guangdong, the Third People's Hospital and Jiangmen City People's Hospital. Methylation levels in the 5-HTR1A promoter region in peripheral blood cells were detected and compared by pyrosequencing. In the study group, the Hamilton depression scale score was used to assess the patients' depressive level and correlation analysis was conducted between methylation levels and the Hamilton depression scale scores. **Results** The methylation level of 5-HTR1A promoter region in peripheral blood was significantly reduced in the study group than in the control group [(46.86±6.75)% vs (50.03±8.85)%, *t*=2.255, *P*=0.013]. A negative correlation was found between Hamilton depression scale scores and methylation levels in the study group (*r*=-0.631, *P*<0.01). **Conclusion** There is a correlation between depressive episode and the methylation levels of 5-HTR1A promoter region in peripheral blood of patients with bipolar disorder.

【Key words】 Bipolar disorder; Epigenetics; DNA methylation

双相障碍是一种常见的精神障碍,严重有损患者的社会功能,对家庭造成沉重精神负担和经济负担^[1]。双相障碍的发病与遗传因素密切相关,并受环境因素影响^[2],故难以用少量基因的改变进行解释^[3]。目前认为双相障碍的发病受多种基因共同影响^[4],由表观遗传学改变调控这些基因的表达水平^[5]。DNA甲基化是一种常见的表观遗传学改变^[6]。本研究通过对抑郁发作阶段的双相障碍患者外周血细胞五羟色胺1A受体基因(5-hydroxytryptamine receptor 1A, 5-HTR1A)启动子区甲基化水平进行研究,探讨表观遗传学在双相障碍发病机制中可能存在的病理学变化。

资料与方法

一、对象

收集2017年8月至2019年8月在广东省精神卫生中心、中山市第三人民医院及江门市第三人民医院就诊的门诊或住院的抑郁发作期的双相障碍患者作为研究组,纳入标准:(1)年龄18~60岁之间,符合《国际疾病分类(第10版)》^[7]中双相障碍的诊断标准;(2)近1个月未服用抗精神病药物或心境稳定剂;(3)能配合血液标本采集;(4)能够独立或在协助下完成量表测评;(5)有严重抑郁症状,汉密尔顿抑郁量表24项版^[8]

(Hamilton depression scale, HAMD-24)评分>35分。排除标准:(1)不愿合作者;(2)合并严重躯体疾病(如心脏病、呼吸系统疾病等);(3)患有其他严重精神疾病(如精神分裂症发病期、精神发育迟滞、脑器质性损伤致精神障碍等);(4)存在酒精或其他精神活性物质滥用情况。对照组由同期健康志愿者组成,不符合任何精神障碍的诊断标准,年龄也在18~60岁之间,排除严重躯体疾病及精神活性物质滥用史。入组者均为自愿参加,本研究通过了中山市第三人民医院医学伦理委员会的审批。

二、方法

1. 研究工具:本研究采用HAMD-24量表对研究组进行症状严重程度评定,以总分>20分为存在明确的抑郁症状,总分>35分为重度抑郁状态。该量表在临床及科研中应用广泛,适用于抑郁症、双相障碍等各种存在抑郁症状的成年人,信效度良好。

2. 病例的质量控制:本研究所有调查员均为经

一致性培训的有多年工作经验的精神科主治以上医师,统一诊断标准。在研究前对所有调查员做过2次一致性评价,Kappa系数分别为0.84和0.87,均大于0.8,可认为一致性良好。

3. 提取外周血有核细胞DNA:(1)抽取静脉血5 ml至15 ml离心管,加入红细胞裂解液至15 ml。(2)上下颠倒10次,充分混匀,常温放置15 min后在常温下以3000 r/min离心30 min,离心半径为10 cm;离心后形成的上部清液为血清,将其去除。(3)再次加入红细胞裂解液至15 ml并混匀,常温放置10 min,再次常温离心20 min。(4)装入2 ml离心管,-4℃低温离心10 min。(5)加入200 μ l Trizol试剂连续吹打,将白细胞团块打散,进行DNA提取,后冻存于-80℃冰箱中。

4. DNA亚硫酸盐修饰:为检测5-HTR1A启动子区甲基化水平,本研究采用亚硫酸盐修饰技术对DNA进行处理。亚硫酸盐能够使DNA中未发生甲基化的胞嘧啶(C)脱氨基转变成尿嘧啶(U);而甲基化的胞嘧啶(C)保持不变。由于尿嘧啶(U)与胸腺嘧啶(T)结构相似。在进行聚合酶链式反应时,母链DNA中的尿嘧啶(U)在产物中会由胸腺嘧啶(T)替代。亚硫酸盐修饰过程:(1)双链DNA变性;(2)单链的DNA与亚硫酸氢盐反应脱氨基;(3)经亚硫酸氢盐处理后的DNA脱盐纯化,即将亚硫酸氢盐洗脱;(4)将纯化的DNA脱磺酸基;(5)DNA纯化回收。保存处理后样本,准备进行测序检验。

5. DNA甲基化测序检测:本研究采用焦磷酸测序技术检测外周血细胞中5-HTR1A启动子区甲基化水平。焦磷酸测序技术是一种新的酶联级测序技术,有良好的可重复性和精确性,是基因启动子甲基化分析的优选方法^[9]。基本原理为:引物与模板DNA退火(是指模板双链DNA经热变性、双螺旋解开成单链后,通过缓慢冷却到55℃左右,使引物与该模板DNA单链重新配对,形成新的双链分子的过程)后,在DNA聚合酶、ATP硫酸化酶、荧光素酶和三磷酸腺苷双磷酸酶的协同作用下,将引物上每一个脱氧核苷酸三磷酸的聚合与一次荧光信号的释放偶联起来,通过检测荧光的释放和强度,达到测定目的。

三、统计学分析

数据采用SPSS 19.0软件包进行统计学分析。性别为计数资料,采用例数表示,组间比较采用 χ^2 检验;年龄、受教育年限、5-HTR1A启动子区

甲基化水平和 HAMD-24 量表评分为计量数据, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验比较组间差异; 采用 Pearson 相关分析对研究组 HAMD-24 量表评分与其甲基化率进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、2 组患者基本资料对比

本研究共采集血液样本 136 例, 其中研究组 74 例、对照组 62 例。最终合格样本 124 例, 总体合格率为 91.18% (124/136), 其中研究组 65 例、对照组 59 例。研究组中家族史阳性者 28 例, 阳性率为 43.08% (28/65)。研究组平均病程为 (8.32±5.48) 年。2 组年龄、性别及受教育年限比较, 差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05 , 表 1)。

表 1 2 组研究对象一般临床资料的比较

组别	例数	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	性别 (男 / 女)	受教育年限 (年, $\bar{x} \pm s$)
研究组	65	37.42±11.90	35/30	15.91±5.34
对照组	59	40.15±11.88	30/29	17.04±3.38
统计值		$t=1.277$	$\chi^2=0.112$	$t=1.392$
P 值		0.102	0.857	0.083

注: 研究组为抑郁发作期的双向障碍患者, 对照组为健康人群

二、2 组 5-HTR1A 启动子区甲基化水平的比较

研究组 5-HTR1A 启动子区甲基化水平为 (46.86±6.75)%, 对照组为 (50.03±8.85)%, 研究组低于对照组, 差异具有统计学意义 ($t=2.255$, $P=0.013$)。

三、研究组不同性别 5-HTR1A 启动子区甲基化水平的比较

将研究组患者男性 35 例, 5-HTR1A 启动子区甲基化水平为 (44.87±6.43)%, 女性 30 例, 5-HTR1A 启动子区甲基化水平为 (47.04±7.17)%, 男性低于女性, 但差异无统计学意义 ($t=1.286$, $P=0.102$)。

四、研究组 HAMD 评分与其甲基化率的相关分析

研究组 HAMD 量表评分为 (52.48±13.08) 分, 其甲基化水平为 (46.86±6.75)%。Pearson 相关分析显示, 研究组 HAMD-24 量表评分与其甲基化率呈负相关 ($r=-0.631$, $P < 0.01$)。

讨 论

双相障碍遗传方式复杂, 在发病的因素中表观遗传修饰有显著作用^[10]。五羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 与双相障碍的发病密切相关^[11], 5-HT 受体亚型种类繁多, 中枢神经系统内以 5-HTR1A 为最多, 在双相障碍等精神障碍疾病过程中起重要作用^[12]。5-HTR1A 基因位于染色体 5q11.2-13, 其启动子区甲基化水平直接影响中枢 5-HTR1A 受体数量^[13]。DNA 甲基化检测技术种类多样, 差异较大, 各有优势, 其中亚硫酸盐修饰技术比较稳定, 在 DNA 甲基化检测中应用较广泛, 而本研究所选用的焦磷酸测序技术^[14]更加实用, 是一种通过合成来进行 DNA 分析的方法, 可用于基因组甲基化、单核苷酸多态性和等位基因的定量分析, 该技术相对较新, 不需要电泳、染色, 所得结果快速直观, 更容易被重复。

本研究由于样本来自不同单位, 诊断一致性显得尤其主要, 因此本研究在开始实施前进行了 2 次严格的一致性评价, 均显示一致性良好, 保证了结果的可靠性。通过对照研究, 双相障碍抑郁发作期患者的 5-HTR1A 启动子区甲基化水平低于正常对照组。Smith 等^[15]的研究发现伴抑郁的妊娠妇女脐血 DNA 甲基化水平显著降低, 另外有研究发现双相情感障碍患者 KITLG 位点的基因片段甲基化程度处于低水平^[16], 但该研究并未对患者的发作时相进行区分。因此, 笔者有理由相信抑郁发作期的双相障碍的 5-HTR1A 启动子区甲基化水平是降低的。

为了研究性别在 5-HTR1A 启动子区甲基化中是否有影响, 本研究将研究组按照男女进行了分组, 对比后发现男女甲基化水平没有差别, 说明性别不会影响该区域的甲基化水平。Ceylan 等^[17]的研究得出了相似的结论, 性别对双相障碍患者的 DNA 甲基化整体上没有影响。

本研究显示, HAMD 得分与甲基化率呈中等强度的负相关, 也就是说 HAMD 得分越高的患者其 5-HTR1A 启动子区的甲基化水平越低, 即症状越重甲基化水平越低。国外也有研究^[18]发现, 双相障碍基因甲基化水平会随着病情变化而发生变化。Abdolmalek 等^[19]研究发现, 5-HTR2A 的表达水平低于正常的健康对照人群, 且与其基因甲基化水平呈负相关, 也支撑本研究的结论。

综上所述, 本研究对双相障碍的发病机制进行探索, 发现处于抑郁发作期的双相障碍患者外周血

细胞 5-HTR1A 启动子区甲基化水平较低, 其下降水平与表现出来的抑郁症状严重程度一致, 认为 5-HTR1A 启动子区的表观遗传学改变或与双相障碍发病有关, 有研究也显示出将 DNA 甲基化作为双相障碍的生物学标志的证据越来越多^[20-21]。本研究的不足之处在于未做患者自身治疗前后对照分析, 另外没有将不同类型的患者分别进行研究, 后续可继续扩大研究, 争取更多发现。

参 考 文 献

- 张理义, 张晋, 孔令明, 等. 不同性别、城乡、教育水平中国人的精神障碍风险特征分析 [J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(21): 3832-3835.
- Song J, Bergen SE, Kuja-Halkola R, et al. Bipolar disorder and its relation to major psychiatric disorders: a family-based study in the Swedish population [J]. *Bipolar Disord*, 2015, 17(2): 184-193.
- D'Addario C, Palazzo MC, Benatti B, et al. Regulation of gene transcription in bipolar disorders: Role of DNA methylation in the relationship between prodynorphin and brain derived neurotrophic factor [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 82(1): 314-321.
- Mosheva M, Serretti A, Stukalin Y, et al. Association between CANCAIC gene rs1034936 polymorphism and alcohol dependence in bipolar disorder [J]. *J Affect Disord*, 2020, 261(1): 181-186.
- Cruceanu C, Kutsarova E, Chen ES, et al. DNA hypomethylation of Synapsin II CpG islands associates with increased gene expression in bipolar disorder and major depression [J]. *BMC Psychiatry*, 2016, 16(1): 286.
- Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, et al. The role of DNA methylation in epigenetics of aging [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 195(1): 172-185.
- Soldatos CR, Paparrigopoulos TJ, Pappa DA, et al. Early post-traumatic stress disorder in relation to acute stress reaction: an ICD-10 study among help seekers following an earthquake [J]. *Psychiatry Res*, 2006, 143(2-3): 245-253.
- Park SC, Jang EY, Kim JM, et al. Clinical Validation of the Psychotic Depression Assessment Scale, Hamilton Depression Rating Scale-6, and Brief Psychiatric Rating Scale-5: Results from the Clinical Research Center for Depression Study [J]. *Psychiatry Investig*, 2017, 14(5): 568-576.
- Johannessen LE, Brandal P, Myklebust TA, et al. MGMT Gene Promoter Methylation Status-Assessment of Two Pyrosequencing Kits and Three Methylation-specific PCR Methods for their Predictive Capacity in Glioblastomas [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2018, 15(6): 437-446.
- Pisanu C, Papadima EM, Del Zompo M, et al. Understanding the molecular mechanisms underlying mood stabilizer treatments in bipolar disorder: Potential involvement of epigenetics [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 669(1): 24-31.
- Rao S, Han X, Shi M, et al. Associations of the serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) with bipolar disorder and treatment response: A systematic review and meta-analysis [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2019, 89(1): 214-226.
- Fjukstad KK, Engum A, Lydersen S, et al. Metabolic risk factors in schizophrenia and bipolar disorder: The effect of comedication with selective serotonin reuptake inhibitors and antipsychotics [J]. *Eur Psychiatry*, 2018, 48(1): 71-78.
- Wu X, Xu FL, Ding M, et al. Characterization and functional analyses of the human 5-HTR1A gene: 5' regulatory region modulates gene expression in vitro [J]. *BMC Genet*, 2018, 19(1): 115.
- Kreutz M, Hochstein N, Kaiser J, et al. Pyrosequencing: powerful and quantitative sequencing technology [J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2013, 104(1): 7.15.1-7.15.23.
- Smith AK, Conneely KN, Newport DJ, et al. Prenatal antiepileptic exposure associates with neonatal DNA methylation differences [J]. *Epigenetics*, 2012, 7(5): 1-6.
- He Y, Vinkers CH, Houtepen LC, et al. Childhood Adversity Is Associated With Increased KITLG Methylation in Healthy Individuals but Not in Bipolar Disorder Patients [J]. *Front Psychiatry*, 2018, 9(1): 743.
- Ceylan D, Scola G, Tunca Z, et al. DNA redox modulations and global DNA methylation in bipolar disorder: Effects of sex, smoking and illness state [J]. *Psychiatry Res*, 2018, 261(1): 589-596.
- Li S, Yang Q, Hou Y, et al. Hypomethylation of LINE-1 elements in schizophrenia and bipolar disorder [J]. *J Psychiatr Res*, 2018, 107(1): 68-72.
- Abdolmaleky HM, Yaqubi S, Papageorgis P, et al. Epigenetic dysregulation of HTR2A in the brain of patients with schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Schizophr Res*, 2011, 129(2-3): 183-190.
- Goud Alladi C, Etain B, Bellivier F, et al. DNA Methylation as a Biomarker of Treatment Response Variability in Serious Mental Illnesses: A Systematic Review Focused on Bipolar Disorder, Schizophrenia, and Major Depressive Disorder [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 3026.
- Jia YF, Choi Y, Ayers-Ringler JR, et al. Differential SLC1A2 Promoter Methylation in Bipolar Disorder With or Without Addiction [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11(1): 217.

(收稿日期: 2020-02-18)

(本文编辑: 吴春风)

于妍, 杜启峰, 赵存友, 等. 抑郁发作期双相障碍患者外周血 5-HTR1A 启动子区甲基化水平与抑郁发作的相关性 [J/OL]. 中华临床医师杂志(电子版), 2020, 14(4): 241-244.