

网络出版时间: 2020-7-15 9:02 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200713.1200.025.html>

哮喘患者外周血全基因组 DNA 甲基化检测及临床意义分析

张露露, 王 炯

摘要 目的 探讨哮喘患者和健康对照者外周血基因组 DNA 甲基化差异及其临床意义。方法 收集诊断明确的哮喘急性发作期成人患者及健康对照者 2 ml 外周血标本, 提取外周血 DNA 之后, 采用 Illumina DNA 甲基化芯片检测全基因组 DNA 甲基化水平, 并与下载 GSE56553 数据库中 96 个基因芯片数据样本取交集, 对差异基因功能通路进行生物学分析。结果 哮喘患者与健康对照者外周血基因组 DNA 甲基化程度差异有统计学意义, 发现差异基因 1 493 个, 其中甲基化程度上调基因有 923 个, 甲基化程度降低基因有 570 个, GO 和 KEGG 通路功能富集分析获得的差异基因主要集中于参与突触信号传导调控, 肌肉收缩, 细胞黏附等生物过程, 通过构建基因相互作用网络筛选出了 TNF、GNB1、PIK3R1、CDC5L、IL-10、CD44 等 24 个关键基因。结论 哮喘患者外周血与健康对照者比较, 基因组 DNA 甲基化程度差异有统计学意义, 这种差异很有可能是哮喘发生发展的原因。利用生物信息学方法筛选出哮喘发生发展过程中的关键基因和信号通路, 可以为哮喘治疗提供新靶点和策略。

关键词 哮喘; DNA 甲基化; 基因芯片; GO/KEGG 功能富集分析

中图分类号 R 562.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)08-1275-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.025

支气管哮喘(简称哮喘)是一种常见的呼吸道慢性疾病, 其发病机制尚不明确, 目前研究结果表

明: 复杂的基因与环境之间相互作用共同参与了哮喘的发病, 可能是患者先后暴露于环境后表观遗传改变的结果, 如 DNA 甲基化修饰、组蛋白共价修饰、miRNA 改变、染色质改变等^[1-2], 针对表观遗传学的治疗有可能为哮喘个体化精准治疗开辟新的途径。该研究对临床收集的哮喘急性发作期患者及健康对照者外周血全基因组 DNA 甲基化进行检测, 并与下载的 GSE56553 数据库中的 96 个基因芯片数据样本取交集, 对差异基因功能通路进行生物学分析, 探讨哮喘急性发作期患者与健康对照者之间 DNA 甲基化表观遗传学差异, 以期筛选出哮喘发生发展过程中的关键基因和信号通路, 为哮喘治疗提供新的靶点和策略。

1 材料与方法

1.1 实验对象与材料 收集 2018 年 8 月~2019 年 9 月经安徽医科大学第一附属医院老年呼吸与危重症医学科明确诊断为哮喘急性发作期的成人患者及同期健康体检者 2 ml 外周血标本各 3 份。患者知情同意, 自愿参与研究, 并签署知情同意书。GSE56553 数据库为 96 例国人外周血标本 Illumina DNA 甲基化芯片检测数据集, 其中正常人 24 例, 哮喘急性发作期患者 72 例。

1.2 主要试剂与仪器 PureLink Genomic DNA Mini KIT 购自德国赛默飞世尔科技公司; 基因芯片仪器: 杂交炉、振荡器、Hyb Chambers 杂交盒、Hyb Chamber inserts 均购自美国 Illumina 公司。

1.3 方法

1.3.1 主要实验步骤 本研究主要实验步骤依次

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1608085MH191)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院老年呼吸与危重症医学科, 合肥 230022

作者简介: 张露露, 女, 硕士研究生;

王 炯, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangjiong7286@163.com

that of group QA, and group QD was lower than group QB; the stillbirth of group QB、QC and QD was lower than that of group QA, group QD was lower than group QB; the neonatal mortality rate of group QD was lower than that of group QA and QB; the survival rate of newborns in group QB、QC and QD was higher than that of group QA, group QD was higher than group QB, the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** ① Patients should be strictly selected, and expectant treatment should not be given blindly; ② For patients with stable condition, expectant treatment should be carried out under strict supervision to improve neonatal outcome. However, whether expectant treatment should be given to patients under 28 weeks needs further study.

Key words early onset severe preeclampsia; expectant treatment; maternal complications; perinatal outcome

如下: ① 提取哮喘急性发作期及健康对照者外周血 DNA; ② 采用 Illumina Infinium Methylation EPIC BeadChip 芯片, 对提取的外周血 DNA 进行全基因组 DNA 甲基化状态检测, 并与健康对照者甲基化谱进行比较, 获得甲基化差异基因; ③ 对筛选出来的哮喘患者外周血特异性甲基化基因进行 GO/KEGG 功能富集分析, 以探讨差异性甲基化基因具体参与分子通路以及与哮喘发病的具体关系。

1.3.2 外周血 DNA 甲基化芯片检测 本研究采用的甲基化特异性芯片为 Illumina Human methylation 450K Beadchip 全基因组甲基化芯片, 提取外周血 DNA 后, 重亚硫酸盐处理获得 gDNA, 处理后的 gDNA 和每种探针互补杂交, 再利用芯片上的特异性捕获探针和互补的酶切基因片段结合之后, 杂交过夜、清洗、延伸、染色、扫描获得原始数据。甲基化的程度根据两种探针的荧光强度判断。

1.4 统计学处理 原始数据标准化处理后, 采用 Benjamini & Hochberg 方法进行多重检验校正计算得到调整后的 P 值, 根据调整后的 P 值筛选出差异的探针位点, 根据探针水平计算甲基化差异程度 (beta 值)。下载 GSE56553 数据库中甲基化的数据。运用 R 语言包 ChAMP 对甲基化数据进行分析, 使用内置的色彩校正和背景减法进行阵列归一化, 并使用 lumi 包的分位数归一化函数进行默认设置, 然后使用基于峰值的校正。差异甲基化的筛选标准为: $P < 0.05$, 筛选出 1 493 个差异甲基化基因。采用 SPSS 17.0 统计学软件包进行统计学处理。

2 结果

2.1 甲基化差异基因检测结果 对哮喘急性发作期患者和健康对照者外周血全基因组 DNA 进行甲基化检测, 发现病例组和对照组甲基化程度差异有统计学意义(见图 1), 筛选出差异基因有 1 493 个, 甲基化程度明显上调基因有 923 个, 降低基因有 570 个, 部分差异基因见表 1。甲基化差异区域 (DMRs) 见表 2。

2.2 GO/KEGG 功能富集分析 根据分析结果列表显示, 共有 422 个差异甲基化基因的功能类别, 包含了 17 283 个基因。其中生物过程和细胞组分部分含有的基因功能类别富集最多; 从生物进程、通过细胞组分和分子功能方面对差异基因进行了全面的注释, 差异基因主要富集通路和功能见图 2。根据

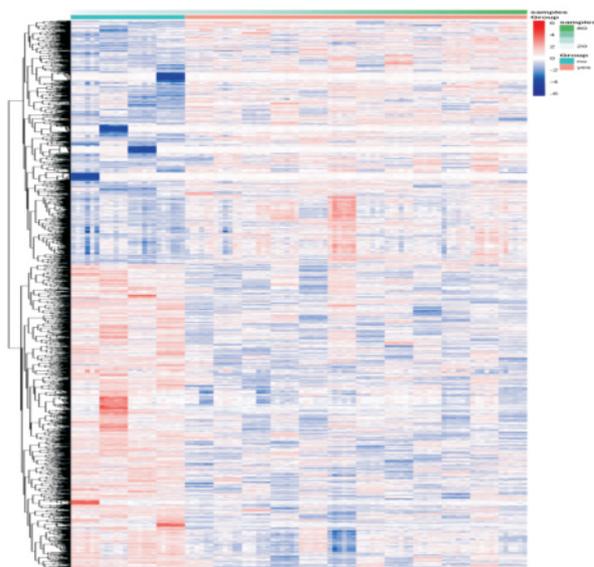


图 1 哮喘患者和健康对照者外周血全基因组 DNA 甲基化位点热图
哮喘患者和健康对照者外周血全基因组 DNA 甲基化位点热图, 红色为对应高甲基位点, 蓝色对应低甲基位点; 与正常人比较, 哮喘患者差异基因甲基化水平有上调和下调

表 1 哮喘患者与健康对照者部分甲基化差异基因

甲基化结果	Beta 差值	差值的 log2	作用
甲基化下调			
IL-1R1	-0.072 22	-0.437 94	促进炎症反应
ADAM33	-0.026 58	-0.517 37	促进气道重塑
IL-18	-0.123 33	-0.627 53	诱导炎症因子产生
CH3LI	-0.206 28	-0.639 05	促进气道重构
IL-10	-0.088 24	-0.698 98	参与炎症反应
甲基化上调			
IL-2	0.109 68	0.486 43	抑制 TH2 细胞激活
CTLA4	0.131 49	0.300 40	抑制 T 细胞激活
STAT3	0.157 80	0.335 15	抑制炎症, 氧化激活

表 2 哮喘患者和健康对照者差异甲基化主要涉及的区域

全基因组	DMRs
1stExon	39
3'UTR	52
5'UTR	153
body	535
TSS1500	235
TSS200	79
IGR	399

柱状图显示甲基化差异基因的集中在突触信号转导的调控、突触膜形成、化学突触传递的调节、肌肉收缩、无机分子实体跨膜转运蛋白活性等类别上。为进一步研究两组直接差异基因所参与的通路功能, 进行了 KEGG 信号通路分析。筛选出富集程度最高的 20 条通路(见图 3), 甲基化差异基因主要涉及

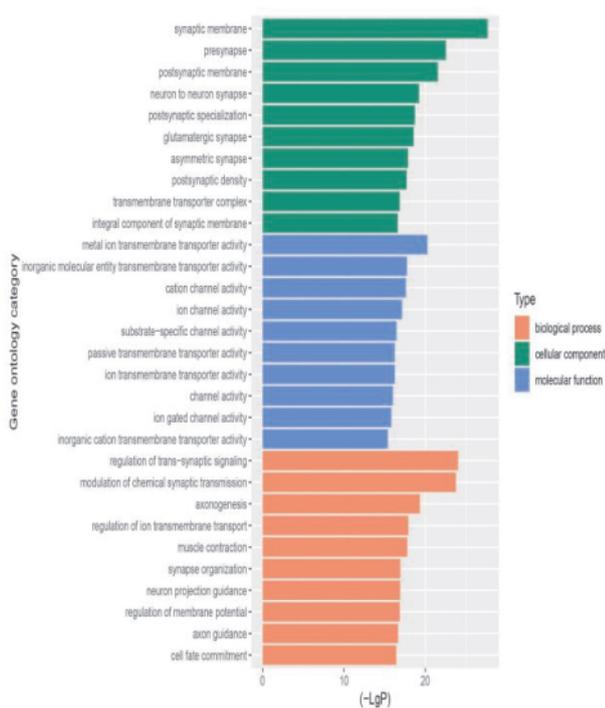


图2 GO 通路分析结果

纵坐标代表富集的 GO 名称,横坐标为 -logP,横坐标越显著说明该通路富集程度越高

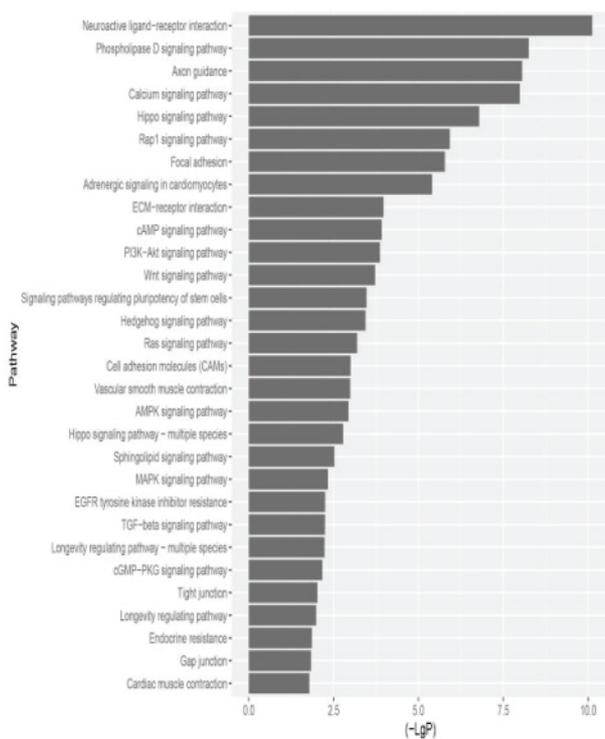


图3 KEGG 通路分析结果

纵坐标 -logP 横坐标为富集 KEGG 通路的名称,纵坐标高度与富集程度正相关

磷脂酶 D 信号通路、钙离子信号通路、Rap 通路、细胞黏附、细胞外基质相互作用等功能。结合 GO 和 KEGG 通路功能富集分析,提示哮喘发病是一个复杂过程,与各种信号通路激活相互作用有密切关联。

2.3 核心基因筛选 通过 STRING v11 数据库对 1 493 个差异基因进行基因相互作用的分析。限定研究物种为“Homo sapiens”,得到初始基因质互作关系,限定“minimum required interaction score”为 0.5,进一步得到由 726 个差异基因参与的基因质互作关系,把 726 个差异基因及其间关联的“combined score”另外导入 Cytoscape 软件中得到初始基因相互作用网络,用 NetworkAnalyzer 对其进行分析,导出分析结果后用 Microsoft Office Excel 2007 对 Degree 值按降序进行排序后,筛选出 24 个(Degree > 20) 差异基因为核心基因。获得图 4,通过构建差异基因的相互作用网络,我们可以得到网络中每个基因与其他基因的作用关系。Betweenness Centrality 表示基因在网络中的 pathway 中的枢纽评分,分值越高表示在网络中的枢纽位置更中心。Degree 表示基因和其他基因关联的个数,如 Degree = 10 代表与该基因有相互作用关系的基因有 10 个, Degree 越大,代表与它有相互作用的基因越多。表 3 是基因的 Degree 和 Betweenness Centrality,并按照 Degree 进行排序,获得 24 个关键基因。

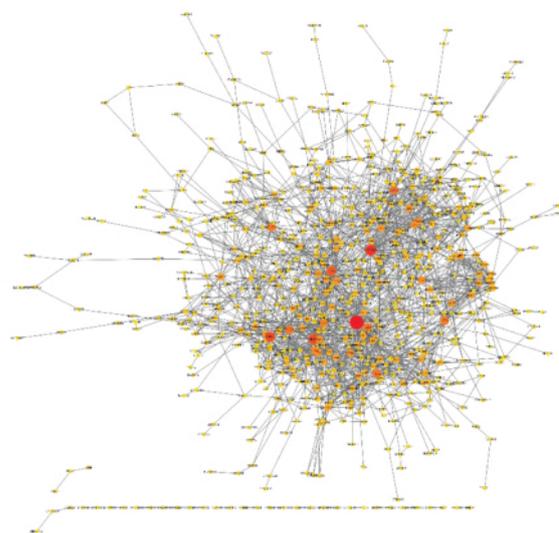


图4 基因网络图

图为核心靶点的基因相互作用网络,节点代表基因,边代表基因间的相互关系,共涉及 726 个节点,2 054 条边。节点的大小和颜色代表 Degree 值的大小,节点越大 Degree 值越大,颜色由黄变红对应的 Degree 值越大

表3 关键基因

基因	Degree 值	Betweenness Centrality 值
TNF	57	0.145 187 70
CREBBP	41	0.096 977 58
GNB1	37	0.034 327 73
PIK3R1	37	0.054 532 92
KRAS	34	0.073 313 66
GNG7	29	0.011 405 83
CDC5L	29	0.065 218 90
IL-10	29	0.030 051 23
ITGB2	29	0.036 302 13
DLG4	28	0.057 987 52
UBR4	28	0.034 515 99
GNAI1	25	0.026 667 31
PTK2	25	0.030 005 91
CD44	23	0.031 619 86
HDAC4	23	0.018 342 59
STUB1	23	0.031 231 60
HDAC5	23	0.023 094 28
POMC	22	0.025 140 06
PRKCA	22	0.036 377 30
PIK3R2	22	0.010 639 85
H2AFJ	22	0.021 474 12
PRKCZ	21	0.032 828 01
LMO7	21	0.010 113 05
ZBTB16	21	0.019 417 71

3 讨论

随着对分子遗传学的研究的深入,人们发现在DNA分子结构不变的情况下,一些修饰可以引起生物性状改变,这种改变具有遗传性称为表观遗传。表观遗传学即主要包含DNA甲基化、蛋白质的共价修饰、染色质重塑、非编码RNA调控等。DNA甲基化中最主要的修饰机制,主要影响基因表达和细胞分化发育方面^[3]。哮喘是一种呼吸道慢性炎症性疾病,严重影响人类健康,近年来发病率逐渐升高^[4]。对哮喘的表观遗传学研究,尤其是甲基化研究,逐渐成为哮喘发病机制研究^[5-6]的新方向。本研究对外周血基因组DNA甲基化差异进行生物学分析,获得了差异基因1493个,甲基化程度上调基因有923个,甲基化程度降低基因有570个,对比哮喘患者和健康对照者基因芯片结果进行分析,发现大部分促进哮喘发病的基因甲基化程度降低,如IL-1R1,ADM33等,而抑制哮喘发病的多数基因甲基化程度升高,如STAT3,IL-2等,说明基因甲基化水平的变化会造成基因表达谱的区别,抑制哮喘发病的基因表达降低而促进哮喘发病基因表达增加,进而导致机体内原有的平衡被打破,通过调节细胞

代谢以及许多细胞因子诱导的免疫及炎症反应从而参与哮喘发生发展,也进一步表明^[7]表观遗传学改变是参与哮喘发病的重要机制之一。

GO通路分析发现差异基因的功能主要集中在突触信号转导的调控、突触膜形成、化学突触传递的调节、肌肉收缩、无机分子实体跨膜转运蛋白活性等方面,说明神经通路激活及肌肉收缩与哮喘发病有密切关系^[8]。KEGG通路分析显示甲基化差异基因主要涉及磷脂酶D信号通路、钙离子信号通路、Rap通路、细胞黏附、细胞外基质相互作用、PI3K-Akt信号通路等功能,提示哮喘的发生发展是多途径分子生物学信号通路共同作用所致。PI3K信号通路通过刺激支气管平滑肌细胞增殖,黏附分子诱导白细胞聚集进入气道,钙离子通道激活致使支气管平滑肌收缩等从而参与哮喘发病进程^[9-10]。而磷脂酶D信号通路及Rap通路在哮喘中的作用机制尚未明确,是哮喘研究的新方向。

对1493个差异基因进行基因相互作用进一步分析,按照基因相关度获得关键基因24个。TNF编码肿瘤坏死因子参与气道炎症发生发展,是判断支气管哮喘病情严重程度和治疗效果的重要指标之一;IL-10可以限制炎症反应以及自身免疫反应,在哮喘的发病机制调节中起到对哮喘有利的作用^[11-12]。CREBBP基因编码的蛋白质CBP,参与气道重塑^[13]。IGBT2和CD44分别编码CD18和CD44蛋白,是黏附分子中整合素家族的重要成员,其高表达会加重气道炎症,使气道的高反应性增加^[14]。HDAC4和HDAC5属于组蛋白乙酰化酶家族,通过维持气道Th1细胞免疫应答、T细胞免疫应答平衡和抑制优势Th2细胞免疫应答中发挥重要作用,其活性与哮喘发生相关^[15]。PRKCA表达蛋白激酶C-α促进平滑肌增生,激活嗜酸性粒细胞,参与哮喘发病^[16]。GNB1、PIK3R1、PIK3R2、GNGT、CDC5L、DLG4、UBR4等基因在哮喘中的作用尚待探究,进一步深入研究将会为哮喘靶向治疗和早期诊断提供新的方向和策略。

参考文献

[1] Qi C, Xu C J, Koppelman G H. The role of epigenetics in the development of childhood asthma [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2019, 16(1): 1287-302.
 [2] 曾蕾,徐雪莲,罗曼曼等.高通量自动化SNP检测技术研究进展[J].中国生物学报,2019,41(7):1412-22.

- [3] 惠瑞敏,王小荣,朱文婷,等.表观遗传学的作用机制及其与经典遗传学的异同[J].生物化工 2018 4(5):102-4.
- [4] 钟南山,曾广翘.慢性呼吸疾病的防治策略[J].中国临床保健杂志 2020 23(1):1-4.
- [5] Xu C J, Söderhäll C, Bustamante M, et al. DNA methylation in childhood asthma: an epigenome-wide meta-analysis [J]. *Lancet Respir Med* 2018 6(5):379-88.
- [6] Renz H. DNA methylation and a biomarker panel to predict asthma development [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2019 144(1):49-50.
- [7] 菜旭龙,林玛丽,曹珊,等.IL1R1 基因多态性与黑衣壮儿童哮喘的相关性研究[J].右江医学 2017 45(1):6-10.
- [8] Niimi A, Fukumitsu K, Takeda N, et al. Interfering with airway nerves in cough associated with asthma [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2019 59:101854.
- [9] 沈金花,韩淑慧,时顺波,等.白鲜碱对气管平滑肌的舒张作用及机理研究[J].中南民族大学学报(自然科学版) 2020 39(1):24-8.
- [10] 蔡上道,管朝慧,顾豪,等.离子通道在哮喘发病机制中作用的研究进展[J].上海交通大学学报(医学版) 2016 36(4):580-3.
- [11] 杨璐瑜.哮喘患者血清 IL-6, TNF- α , IL-10 表达变化与气道炎症的关系探讨[J].临床肺科杂志 2013 18(8):1389-91.
- [12] 张世杰,宋晓丹,马慧敏,等. TNF- α 对哮喘小鼠肺泡灌洗液中白三烯含量的影响[J].安徽医科大学学报 2013 48(11):1320-3.
- [13] 贾宵宵,郑榕颖,黄悦,等. Wnt/ β -catenin 信号通路调控哮喘气道重塑的机制研究[J].中国病理生理杂志 2017 33(9):1683-9.
- [14] Pan S, Shah S D, Panettieri RA Jr, et al. Bnip3 regulates airway smooth muscle cell focal adhesion and proliferation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2019 317(6):L758-67.
- [15] 陈黛诗,柯朝阳,陈雷,等.组蛋白去乙酰化酶在呼吸道相关疾病中的作用及展望[J].解放军医学杂志 2017 42(11):962-7.
- [16] 潘琼,岳虹霓,丁梅芳,等.蛋白激酶 C- α 基因 rs228883 多态性与哮喘易感性的关系[J].中华医院感染学杂志 2011 21(18):3795-7.

Detection and clinical significance of DNA methylation in peripheral blood of asthmatic patients

Zhang Lulu, Wang Jiong

(Dept of Geriatric Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the differences of genomic DNA methylation in peripheral blood between asthmatic patients and healthy controls and its clinical significance. **Methods** 2 ml peripheral blood were collected from patients with acute exacerbation of asthma and healthy controls. After extracting peripheral blood DNA, the whole genome DNA methylation was detected by Illumina DNA methylation gene chip, and they were intersected with the 96 gene chip data samples in the download GSE56553 data set, then they were performed biological analysis on the functional pathways of different genes. **Results** There was a statistically significant difference in peripheral blood genomic DNA methylation between patients with asthma and healthy people. 1 493 differential genes were found, of which 923 were methylation-up-regulated genes and 570 were methylation-reduced genes. The differential genes obtained by functional enrichment analysis of GO and KEGG pathways were mainly involved in the processes of the regulation of synaptic signaling, muscle contraction, and cell adhesion. By constructing the gene interaction network, TNF, GNB1, PIK3R1, CDC5L, IL-10, CD44 and other 24 key genes were screened. **Conclusion** Differences in genomic DNA methylation between peripheral blood and healthy controls are statistically significant, and these differences may be the main causes of initiation and progression of asthma. The use of bioinformatics methods to screen out the key genes and signaling pathways in the development of asthma can provide new targets and strategies for asthma treatment.

Key words asthma; DNA methylation; gene chip; GO/KEGG functional enrichment analysis