

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.16.007

文章编号: 1005-8982(2017)16-0035-05

临床研究·论著

热性惊厥患儿血清中表观遗传标志物的表达及临床意义*

徐健¹, 孙明强¹, 王媛媛², 张成元³

(山东省潍坊市妇幼保健院 1. 检验科, 2. 儿科, 3. 新生儿科, 山东 潍坊 261011)

摘要:目的 分析热性惊厥(FS)患儿血清中 DNA 甲基转移酶 1、3A、3B(DNMT1、DNMT3A、DNMT3B)、组蛋白甲基转移酶 EZH2(EZH2)及组蛋白去乙酰化酶 4(HDAC4)的变化情况,探讨其在 FS 疾病中的临床意义。**方法** 选取 60 例 FS 患儿,其中包括 30 例单纯型 FS(SFS)和 30 例复杂型 FS(CFS)。另选取 30 例正常健康体检儿童为正常对照组,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和酶联免疫吸附实验(ELISA)检测比较 3 组间 3 种酶基因和蛋白之间的表达水平变化。**结果** ①SFS 组和 CFS 组 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、EZH2、HDAC4 基因表达均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);SFS 组与 CFS 组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。②SFS 组和 CFS 组 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、EZH2、HDAC4 蛋白表达水平均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);SFS 组与 CFS 组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** SFS 和 CFS 组患儿血清中 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、EZH2 和 HDAC4 基因及蛋白水平均呈现高表达模式,提示表观遗传修饰在 FS 中的发生发展过程中发挥着重要作用,为深入研究 FS 的致病机制及防治 FS 提供了实验依据。

关键词: 热性惊厥;表观遗传;DNA 甲基转移酶;组蛋白甲基化酶;组蛋白去乙酰化酶

中图分类号: R742

文献标识码: A

Expression and significance of epigenetic markers in serum of children with febrile seizures*

Jian Xu¹, Ming-qiang Sun¹, Yuan-yuan Wang², Cheng-yuan Zhang³

(1. Clinical Laboratory, 2. Department of Pediatrics, 3. Department of Neonatology, Weifang Maternal and Child Care Hospital, Weifang, Shandong 261011, China)

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of epigenetic markers in the serum of the children with febrile seizures (FS). **Methods** RT-PCR and ELISA were used to measure the gene and protein expressions of DNA methyltransferase 1 (DNMT1), DNMT3A, DNMT3B, histone methyltransferase EZH2 (EZH2), and histone deacetylase 4 (HDAC4) in 60 children with febrile seizures [30 with simple FS (SFS) and 30 with complex FS (CSF)] and 30 healthy controls. **Results** The gene expression levels of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 and HDAC4 in the SFS and CFS groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), while there were no significant differences between the SFS group and the CFS group ($P > 0.05$). The protein expressions of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 and HDAC4 in the SFS and CFS groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$); there were no significant differences between the SFS group and the CFS group ($P > 0.05$). **Conclusions** DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 and HDAC4 are highly expressed at the gene and protein

收稿日期: 2016-12-19

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81401230); 潍坊市科学技术发展计划项目(No: 2014001)

[通信作者] 孙明强, E-mail: 763050348@qq.com; Tel: 0536-8089176

levels in the serum of the children with SFS and CFS, which suggests that these epigenetic modifications may play important roles in the occurrence and development of FS and provides a reliable theoretical basis for further research of pathogenesis and prevention of FS.

Keywords: febrile seizure; epigenetic; DNA methyltransferase; histone methyltransferase; histone deacetylase

热性惊厥(febrile seizures,FS)是小儿时期较常见的中枢神经系统功能异常的紧急症状^[1],一般情况下无并发症,但突发惊厥可致外伤,严重持续惊厥可致脑缺氧、脑损伤。根据临床表现主要分为单纯型FS(simple febrile seizures,SFS)和复杂型FS(complex febrile seizures,CFS)。前者具有良好的自愈性,一般不会留下后遗症。后者如果反复发生,具有发展成癫痫的可能性,导致智力低下,增加死亡的危险^[2]。

近年来,DNA 甲基化、组蛋白甲基化、组蛋白乙酰化等表观遗传调控机制研究为惊厥或癫痫发病机制的研究热点^[3]。研究表明^[4-5],中枢神经系统中 DNA 甲基化可调控神经网络活性和突触可塑性。DNA 甲基化主要由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)来完成的,主要维持体内基因甲基化状态的催化酶,尤其是 DNMT1 被认为是维持 DNA 甲基化的关键酶^[6]。组蛋白甲基转移酶 EZH2(enhancer of zeste homolog 2,EZH2)作为一种重要的调节组蛋白甲修饰的酶类,主要特异性的完成H3K27的甲基化修饰。研究表明,EZH2 可以介导 H3K27 甲基化从而影响神经元的分化以及神经退行性疾病等^[7]。另一种表观遗传修饰酶—组蛋白去乙酰化酶主要是调控组蛋白乙酰化水平的重要催化酶。经研究表明,组蛋白去乙酰化酶 4(histone deacetylase 4, HDAC4) 可以影响许多神经元相关基因的异常表达,导致神经元细胞死亡,进而影响神经疾病的发生发展^[8]。

本研究通过检测 FS 患儿血清中 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、EZH2、HDAC4 的基因及蛋白表达情况,探讨这些表观遗传修饰在 FS 中的临床价值,为治疗 FS 提供更好的临床指导。

1 资料与方法

1.1 研究对象

FS 组:选取 2015 年 7 月 -2016 年 8 月来山东省潍坊市妇幼保健院就诊的 60 例 FS 儿童(不包括新生儿)。根据病史及临床特征,符合 FS 的临床诊断标准。其中包括 30 例 SFS 患儿和 30 例 CFS 患

儿。两组分别男 15 例,女 15 例;年龄 1~5 岁,平均(2.9±1.2)岁。对照组:30 例健康体检儿童,排除感染或具有免疫疾病者;男 15 例,女 15 例;年龄 1~5 岁,平均(3.0±1.2)岁;既往均无 FS 及癫痫病史。所有 FS 患儿治疗方案均告知家长,并在家长签署同意书的情况下执行。3 组患儿性别、年龄及发热程度差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 研究方法

1.2.1 血液样本收集 SFS 组和 CFS 组在惊厥发作后 5 h 内抽取静脉血 5 ml(需 EDTA 抗凝)。全血样本一部分立即进行 3 000 r/min,离心 10 min,取上清冷冻保存于 -80℃ 冰箱,准备后续进行酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测。另一部分血液样本用于提取 RNA,准备后续进行基因表达检测。对照组血液样本按照上述方法进行同样的处理。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应检测 首先将前面提取的 RNA 逆转录成 cDNA 作为模板,加入引物、DNA 聚合酶,混匀后进行实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测。PCR 反应体系如下所示:cDNA 1 μl;2×SYBR Green Mix 9 μl;正向引物(10 μmol)0.5 μl;反向引物(10 μmol)0.5 μl;水 9 μl;总体积 20 μl。PCR 扩增反应参数:预变性 95℃ 3 min,94℃ 30 s,退火温度(基因不同,退火温度不同)15 s,72℃延伸 15 s,35 个循环。β-actin 基因为内参基因。根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct} = [Ct(\text{target}) - Ct(\text{actin})]A - [Ct(\text{target}) - Ct(\text{actin})]B$,分析各组间基因相对表达量。引物序列见表 1。

1.3 ELISA 检测

按照博士德公司购买的酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒说明书操作,每份标准品测 3 孔,取其平均值,根据标准曲线计算出样本浓度。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析,各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间采用 t 检验,3 组间采用 One-way ANOVA 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
DNMT1	ACCGCTTCTACTTCCTCGAGGCCTA;GTTGCAGTCCTCTGTGAACACTGTGG
DNMT3A	CACACAGAAGCATATCCAGGAGTG;AGTGGACTGGGAACCAAATACCC
DNMT3B	AAGTGTGTGAGGAGTCCATTGC;GGCTGGATTACATTTGAGAGAT
EZH2	GCCAGACTGGGAAGAAATCTG;TCACTGGTCACTGAACACTCC
HDAC4	CTTGTTGAGAACAAACTCCTGCAGCT;AGCCCTACACTAGTGTGTGTACACA
β -actin	CACGATGGAGGGCCGGACTCATC;TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT

2 结果

2.1 DNMT基因在 FS 患儿血清中的表达

SFS 组和 CFS 组 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 表达均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),SFS 组和 CFS 组两组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

2.2 EZH2 在 FS 患儿血清中的表达

SFS 组和 CFS 组中 EZH2 表达均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),SFS 组和 CFS 组两组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。

2.3 HDAC4 在 FS 患儿血清中的表达

SFS 组和 CFS 组中 HDAC4 表达均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),SFS 组和 CFS 组两组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

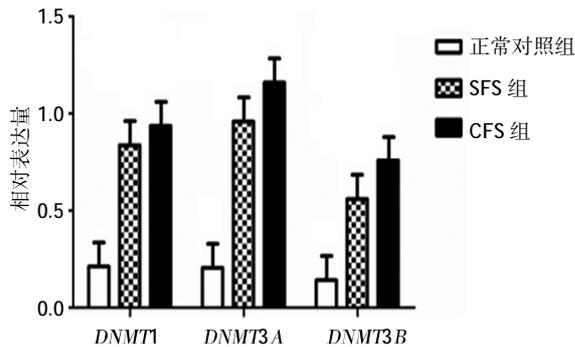


图 1 DNA 甲基转移酶基因 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 基因表达

2.4 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、EZH2、HDAC4 蛋白表达情况

SFS 组和 CFS 组血清中 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、EZH2、HDAC4 的蛋白的表达情况均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),与 SFS 组比较,CFS 组中 DNMT1 蛋白表达高于 SFS 组,差异有统计学意义($P = 0.011$)。其余各指标两组间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

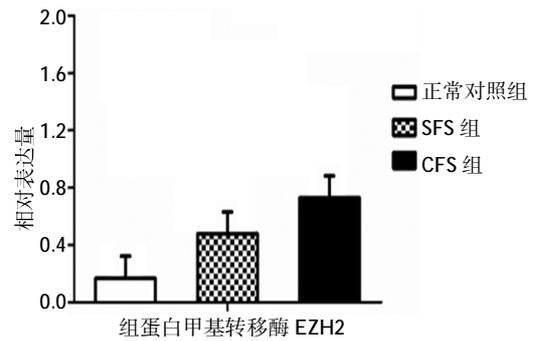


图 2 组蛋白甲基转移酶 EZH2 基因表达

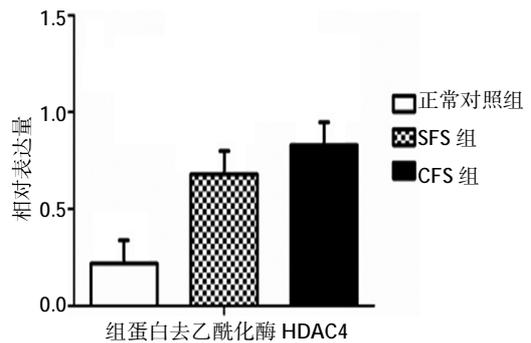


图 3 组蛋白去乙酰化酶 HDAC4 基因表达

表 2 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、EZH2、HDAC4 在 FS 患儿血清中的蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	DNMT1/(μ g/L)	DNMT3A/(μ g/L)	DNMT3B/(μ g/L)	EZH2/(ng/L)	HDAC4/(ng/L)
正常对照组($n = 30$)	12 \pm 3	11 \pm 4	10 \pm 4	264 \pm 32	362 \pm 45
SFS 组($n = 30$)	96 \pm 22 ¹⁾	101 \pm 34 ¹⁾	88 \pm 34 ¹⁾	679 \pm 75 ¹⁾	691 \pm 34 ¹⁾
CFS 组($n = 30$)	153 \pm 35 ¹⁾²⁾	115 \pm 43 ¹⁾	92 \pm 43 ¹⁾	725 \pm 64 ¹⁾	765 \pm 55 ¹⁾

注:1)与正常对照组比较, $P < 0.05$;2)与 SFS 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

近年来,表观遗传调控在许多重要的神经系统疾病当中起到重要的作用,例如,癫痫、阿尔兹海默病、帕金森病等^[9]。FS 可以使神经系统中大量的神经细胞受损,进而影响各种信号通路之间的信号传递,信号通路中的各种因子受到 DNA 甲基化、组蛋白甲基化、乙酰化等修饰后,改变了蛋白的活性进而影响疾病的进程。表观遗传调控机制主要包括 DNA 甲基化、组蛋白甲基化、组蛋白乙酰化等修饰,这些修饰可以影响紧密染色质结构的改变和基因表达模式的改变,并且对于中枢神经系统发育、突触可塑性、学习记忆等方面起到调控作用^[9]。许多研究者希望能从表观遗传学方面解释 FS 的发病机制,以期在不远的将来能寻找新干预措施。

本研究结果显示,在 SFS 和 CFS 组中 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、EZH2、HDAC4 基因及蛋白表达水平呈现高表达模式,说明在 FS 疾病过程中 DNA 甲基转移酶的变化可能会影响某些基因甲基化状态的改变,进而影响 FS 的发生发展。经过理论分析和实验研究,有关科学家提出了“甲基化假说”。该假说认为,惊厥可以使表观遗传染色质结构发生改变,进而影响某些关键基因的表达,最终增加了导致惊厥或癫痫的发病条件,这种异常的表现遗传染色质修饰已经在许多神经系统疾病中被发现,包括自闭症、精神分裂症、脑肿瘤等^[9]。DNA 甲基转移酶是 DNA 甲基化的关键调控酶,迄今发现主要有 3 种 DNMTs 参与基因的甲基化过程。DNMTs 的表达与基因的甲基化水平呈正相关,且其改变常早于基因甲基化状态的改变,因此,常作为基因甲基化状态的参考指标^[10]研究表明,DNA 甲基化可以调节神经元的发育及突触可塑性^[9]。在动物实验中,如果敲除海马区的 DNMT 基因,其突触的形成会受到抑制。另有研究显示,DNMT3A 能够使神经干细胞向神经元方向进行分化,如果敲除该基因会使神经元的数量显著减少,进而产生一系列的神经异常变化^[11]。

本研究结果显示 SFS 组和 CFS 组的 EZH2 表达高于正常对照组,表明 EZH2 在 FS 的发生发展中同样也起到一定的作用。组蛋白甲基化水平由组蛋白甲基化酶和去甲基化酶催化决定。目前已发现 3 个家族的酶能够将 S-腺苷甲硫氨酸上的催化基团转移到组蛋白氨基酸残基^[12]。组蛋白甲基化与 DNA 甲基化之间存在密切的联系。在神经细胞实验研究

中发现,组蛋白甲基转移酶 EZH2 可以与 DNMT3A、DNMT3B 相互作用^[13],受 PRC2 复合体调控的基因出现 DNA 甲基化。组蛋白甲基化和 DNA 甲基化都可以引起基因转录抑制,组蛋白甲基化引起基因转录抑制的两种机制包括介导染色体局部异染色质形成和介导 DNA 甲基化^[14]。组蛋白甲基化与 DNA 甲基化两种表观遗传机制可以通过组蛋白甲基化在 DNA 复制过程中将 DNA 甲基化导入到 DNA 链上的相应位置,复制结束后甲基化 DNA 成为组蛋白甲基化的模板。这两种机制之间的对话主要是通过组蛋白甲基转移酶和 DNA 甲基转移酶之间的相互作用来交流的。

大量研究显示^[15],组蛋白去乙酰化酶及其抑制剂与多种神经系统疾病有着密切的联系。在神经疾病条件下,组蛋白乙酰化水平被降解,去乙酰化水平增强,因此造成染色质组蛋白乙酰化稳态失去平衡,进而使神经细胞的正常功能受损,最终产生一系列神经异常变化^[16]。研究显示^[17],HDAC1、HDAC4、HDAC6 在小鼠海马及杏仁核区域呈现高表达,癫痫可以使组蛋白去乙酰化水平增加,进而引起组蛋白乙酰化水平下降。另外,HDAC 抑制剂丁酸钠可以很好地改善脑损伤后的小鼠的学习记忆能力,起到一种神经保护作用。

综上所述,本文通过检测 FS 患儿血清中各种表观遗传标志物的变化情况,提示表观遗传修饰在 FS 中的发生发展过程中发挥着重要作用。表观遗传标志物作为 FS 一种新的潜在的临床干预靶点,其抑制或者促进惊厥或癫痫的作用机制尚需进一步的研究,希望能够为临床 FS 的治疗提供更可靠的临床依据。

参 考 文 献:

- [1] LEE S H, BYEON J H, KIM G H, et al. Epilepsy in children with a history of febrile seizures[J]. Korean Journal of Pediatrics, 2016, 59(2): 74-79.
- [2] PAVLIDOU E, PANTELIADIS C. Prognostic factors for subsequent epilepsy in children with febrile seizures [J]. Epilepsia, 2013, 54(12): 2101-2107.
- [3] FENG J, FAN G. The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders [J]. International Review of Neurobiology, 2009, 89: 67-84.
- [4] FENG J, ZHOU Y S, LE T, et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult fore-brain neurons[J]. Nature Neuroscience, 2010, 13(13): 423-430.
- [5] 肖小晶,唐含林,姬晨,等. DNA 甲基化在中枢神经系统发育中的

- 研究进展[J]. 生理科学进展, 2014(5): 399-400.
- [6] 赵娜, 赵翠萍. DNA 甲基化的相关研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(8): 1359-1361.
- [7] YU Y L, CHOU R H, SHYU W C, et al. Smurf2-mediated degradation of EZH2 enhances neuron differentiation and improves functional recovery after ischaemic stroke[J]. *Embo Molecular Medicine*, 2013, 5(4): 531-547.
- [8] QURESHI I A, MEHLER M F. Epigenetic mechanisms underlying human epileptic disorders and the process of epileptogenesis. *Neurobiol Dis* (in eng), 2010, 39: 53-60.
- [9] URDINGUIO R G, SANCHEZ-MUT J V, ESTELLER M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies[J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8: 1056-1072.
- [10] 王志刚, 吴建新. DNA 甲基转移酶分类、功能及其研究进展[J]. 遗传, 2009, 31(9): 903-912.
- [11] WU Z, HUANG K, YU J, et al. DNMT3A regulates both cell proliferation and differentiation of mouse neural stem cells[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2012, 90(10): 1883-1891.
- [12] 赵俊龙, 秦鸿雁, 韩骅. 组蛋白甲基转移酶的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2011, 34(3): 141-147.
- [13] SINHA S, THOMAS D, YU L, et al. Mutant WT1 is associated with DNA hypermethylation of PRC2 targets in AML and responds to EZH2 inhibition[J]. *Blood*, 2015, 125(2): 316-326.
- [14] CEDAR H, BERGMAN Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(5): 295-304.
- [15] PARK M J, SOHRABJI F. The histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, exhibits neuroprotective effects for ischemic stroke in middle-aged female rats[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 300.
- [16] LANGLEY B, GENSERT J M, BEAL M F, et al. Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents [J]. *Current Drug Targets Cns & Neurological Disorders*, 2005, 4(1): 41-50.
- [17] 乔珊, 韩涛, 李文娜, 等. 新型组蛋白脱乙酰酶抑制剂 11r 对癫痫持续状态大鼠的神经保护作用[J]. 山东大学学报(医学版), 2015, 53(6): 39-43.

(张蕾 编辑)