

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000548

NPTX2 基因甲基化与年龄推断的相关性研究

邢 扬, 幸 宇, 李倩楠, 甘 丽, 邓世雄

(重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨神经元正五聚蛋白 2(neuronal pentraxin II, NPTX2) 基因启动子区 CpG 位点甲基化与年龄的关系。**方法:**提取 170 例活体外周血样本的基因组 DNA, 经甲基化修饰试剂盒修饰后, 利用甲基化特异性-PCR(methylation specific-PCR, MSP) 检测其 NPTX2 基因启动子区甲基化情况, 并分析其与性别、年龄的关系。**结果:**以每个样本年龄、性别为自变量, 是否甲基化为因变量, 用二分类的 logistic 回归分析显示, 是否甲基化与性别因素不具有统计学意义 ($P=0.843$), 表明性别因素对 NPTX2 基因甲基化影响不明显; 而是否甲基化与年龄因素则具有统计学意义 ($P=0.000$), 表明年龄因素显著影响该基因的甲基化。以五岁为一个年龄段, 对其定性情况进行线性回归分析显示男性 ($P=0.001$)、女性 ($P=0.000$)、总体 ($P=0.000$) 均存在线性关系, 表明甲基化率是随年龄段的增加而呈线性增长的。**结论:**NPTX2 基因启动子区甲基化程度随年龄的增加而增加。可进一步研究建立回归模型, 进行年龄推断。

【关键字】神经元正五聚蛋白 2; 年龄推断; 甲基化; 甲基化特异性-PCR

【中图分类号】DF795.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-09-23

Correlation between the methylation of NPTX2 gene and age estimation

Xing Yang, Xing Yu, Li Qiannan, Gan Li, Deng Shixiong

(Teaching and Research Section of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the relationship between age and the methylation of CpG loci, which is in the neuronal pentraxin II (NPTX2) gene's promoter region. **Methods:** Genomic DNA was extracted from 170 cases of peripheral blood samples of living, and then modified by methylation modification kit. The NPTX2 gene promoter methylation status was detected by the methylation specific-PCR (MSP) method, and its relationship with gender, age was analyzed. **Results:** Age and sex of each sample were taken as independent variables while whether having methylation was taken as dependent variable. Binary logistic regression analysis showed that statistical significance was not found between whether having methylation and gender factor ($P=0.843$), suggesting that gender does not affect NPTX2 gene methylation; and statistical significances were found between whether having methylation and age factor ($P=0.000$), suggesting that age factors significantly influences the gene methylation. Taking five-year-old as an age group, linear regression analysis revealed that there were linear relationship among male ($P=0.001$), female ($P=0.000$) and the overall ($P=0.000$), indicating that methylation rate is linearly increased with the increase of age. **Conclusion:** The methylation rate of NPTX2 gene promoter increased with age. Further research may establish a regression model for age estimation.

【Key words】neuronal pentraxin II; estimation of age; DNA methylation; methylation-specific PCR

个体的年龄推断是法医物证学和法医人类学中的一项目重要且经常性的工作, 在实践中, 个体年龄的评估主要通过对骨骼、牙齿等组织的形态学检验进行推断, 此法存在一定的局限性且受观察者的水平、经验等主观因素影响较大, 且对其他生物源

性检材(如血、唾液、肌肉等)不适用。这一直是法医学和人类学等学科所关注和期盼解决的疑难问题之一。近年来, 随着细胞生物学和分子生物学的迅猛进展, 在细胞和分子水平发现了一些与年龄紧密相关的指标。越来越多的证据表明许多衰老的临床表现是表观遗传学控制的^[1]。

神经元正五聚蛋白 2 (neuronal pentraxin II, NPTX2) 基因位于 7 号染色体长臂 (7q21.3-q22.1), 是神经元正五聚蛋白 (neuronal pentraxin, NPTX) 家族成员, 此家族目前包括 NPTX1、NPTX2、NPTR

作者介绍: 邢 扬, Email: xingyang0924@126.com,

研究方向: 法医物证学。

通信作者: 邓世雄, Email: dengshixiong1963@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (编号: 81202385)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150310.2137.001.html>

(2015-03-10)

(neuronal pentraxin receptor)3 个成员^[2]。NPTX 家族与 C 反应蛋白等急性反应蛋白同源,并且与神经突触的重塑相关^[3]。研究表明,NPTX2 基因启动子区域甲基化跟胰腺癌^[4]、胶质母细胞瘤^[5-6]等肿瘤的发生、发展相关。与此同时,Bocklandt 等^[7]基于对 34 个单卵双生子唾液样本的大范围的基因扫描发现,多个基因位点的甲基化与年龄相关,且多位于 CpG 岛内,在 NPTX2 等 3 个基因启动子区域的甲基化与跨度超过五十岁的范围内的年龄有线性关系。Koch 等^[8]研究了人体多个组织的 DNA 甲基化情况,也证实 NPTX2 基因的甲基化程度与年龄呈正相关。

目前报道的研究均是以北美地区白种人为研究对象,针对中国地区黄种人的研究尚未见报道。本研究以外周血^[9-11]为研究对象,采用甲基化特异性 PCR(methylation specific-PCR, MSP)检测 NPTX2 基因的甲基化状态,初步探索外周血中该基因甲基化与年龄的关系。

1 材料与方法

1.1 实验对象

活体外周血样本 170 例(同一性别、同一年龄最多检测 2 例),其中男性 90 例,年龄构成为:1~10 岁 20 例,11~20 岁 13 例,21~30 岁 17 例,31~40 岁 20 例,41~50 岁 20 例;女性 80 例,年龄构成为:1~10 岁 20 例,11~20 岁 11 例,21~30 岁 15 例,31~40 岁 18 例,41~50 岁 16 例。以上样本均来自于重庆地区汉族健康志愿者,且这些志愿者均签署了知情同意书。本课题研究也得到了重庆医科大学道德委员会的批准。

1.2 主要的实验试剂及仪器

血液基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司 DP318),EZ DNA Methylation-Gold Kit™(北京天漠科技开发有限公司 D5006),Takara EpiTaq HS(大连宝生物工程有限公司 R110A),Epitect Control DNA(德国凯杰生物技术有限公司 59655),Epitect Control DNA unmethylated(德国凯杰生物技术有限公司 59665);核酸蛋白浓度分析仪(Nanodrop),普通 PCR 仪(Eppendorf),梯度 PCR 仪(Eppendorf),凝胶成像系统(Bio-Rad)。

1.3 方法

1.3.1 甲基化位点的选定及其对应引物的合成 采用 Meth-primer 软件对 NPTX2 基因序列进行分析,发现 NPTX2 基因启动子区存在 1 个 CpG 岛;同时,软件给出 5 组 MSP 引物,通过对比分析得出最佳的引物序列为甲基化(M):正向引物:5'-GAAGTTATTTTGGAGAAAGGGGTATC-3',反向引物:5'-AAAAAAACCTAAAATAAAAAACGAC-3',扩增片段长度为 158 bp。非甲基化(U):正向引物:5'-GAAGTTATTTTGGAG-AAAGGGGTATT-3',反向引物:5'-AAAAAAACCTAAAAT-AAAAACAAC-3',扩增片段长度为 157 bp。由上海生工生

物工程股份有限公司合成。

1.3.2 甲基化阴阳对照实验 用甲基化的阳性对照(Epitect Control DNA)和甲基化的阴性对照(Epitect Control DNA unmethylated)为模板进行 PCR,摸索出这两对引物的最佳退火温度,根据引物的合成报告和 PCR 试剂盒给出的建议退火温度,设置甲基化引物(M)退火温度为 56℃、57℃、58℃,非甲基化引物(U)退火温度为 52℃、53℃、54℃。

1.3.3 PCR 之前样本的处理 按照 DNA 提取试剂盒说明书步骤,提取血液基因组 DNA;再用核酸蛋白浓度测定仪测量所提取 DNA 的浓度和纯度,保证其纯度 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间;用 1×TAE 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性;参照 EZ DNA Methylation-Gold Kit™ 说明书对符合要求的 DNA 进行重亚硫酸氢盐处理;立即使用或者-20℃保存。

1.3.4 验证所选位点的分辨性 选取处理后的 10、30、50 岁男性标本各 3 例,对其进行 MSP 检测,以确定所选引物对应的 CG 位点的 C 确实可以分辨,实验重复 3 次。

1.3.5 MSP 检测样本中 NPTX2 基因甲基化情况 用 1.3.2 中摸索的最佳条件对样本进行检测,PCR 产物经 2×TAE 琼脂糖凝胶电泳,在 EB 中浸泡 5 min,再用凝胶成像系统对电泳凝胶进行观察、摄影。

1.3.6 结果判定 甲基化引物扩增有条带,而非甲基化引物扩增无条带说明样本中该位点完全甲基化;甲基化引物扩增无条带,而非甲基化引物扩增有条带则说明该位点完全非甲基化;甲基化和非甲基化引物均扩增出条带的为部分甲基化。用 Quantity One 软件对部分甲基化标本的条带进行半定量分析比较。最后,将甲基化的吸光度值大于非甲基化的样本和完全甲基化的样本判定为甲基化;反之则为非甲基化。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件对本实验中数据进行录入与分析。用二分类的 logistic 回归分析法对不同年龄、性别样本是否甲基化进行分析;再以间隔 5 岁为 1 个年龄段,对各年龄段的甲基化率进行线性回归分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

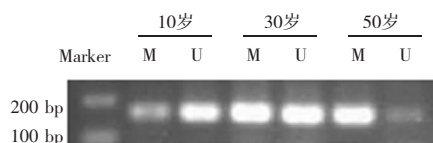
2 结果

2.1 甲基化阴阳对照实验

甲基化引物的退火温度为 56℃和 57℃时,甲基化的阴性对照有条带,存在错配,而在 58℃时甲基化的阴性对照无条带,而甲基化的阳性对照条带明亮,所以,在此温度下引物和模板能达到最佳结合的状态,所以选择甲基化引物最佳退火温度为 58℃。同理可得非甲基化的引物最佳退火温度为 54℃。再结合多次反复地条件摸索后最终确定 PCR 反应条件:甲基化:94℃ 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 45 s,45 个循环;72℃ 10 min;4℃ 保存。非甲基化:94℃ 5 min;94℃ 30 s,54℃ 45 s,72℃ 45 s,45 个循环;72℃ 10 min;4℃ 保存。

2.2 验证所选位点的分辨性

如图 1 所示,年龄相差 20 岁的 3 个样本 MSP 检测发现:这 3 个样本中甲基化引物(M)条带与非甲基化引物(U)条带明暗不同,说明在不同的年龄个体中,NPTX2 基因甲基化程度是不同的。



M: 甲基化引物的 PCR 结果; U: 非甲基化引物的 PCR 结果, 下同

图 1 3 个男性标本 MSP 检测结果

Fig.1 Methylation-specific PCR test results of 3 male samples

2.3 MSP 检测样本

如图 2 所示, 5 岁以下的标本检测显示 M 条带不明显, 而 U 条带明显, 说明该基因位点在年龄较小时甲基化程度低。如图 3、4 所示, 同一年龄的不同样本 M、U 条带的明暗程度不一样, 说明每个年龄不同样本该位点的甲基化情况不同。

2.4 统计分析

2.4.1 用二分类的 logistic 回归分析法对每个样本的情况进

行分析 依据 1.3.6 结果判定标准判断, 给所有样本进行甲基化定性。以每个样本年龄、性别(0=“女”, 1=“男”)为自变量, 是否甲基化(0=“非甲基化”, 1=“甲基化”)为因变量输入 SPSS 19.0 软件, 用二分类的 logistic 回归分析, 如表 1 所示。是否甲基化与性别因素无统计学差异($P=0.843$), 表明性别因素对 NPTX2 基因甲基化影响不明显; 而是否甲基化与年龄因素差异具有统计学意义($P=0.000$), 表明年龄因素影响该基因的甲基化。

2.4.2 用线性回归分析对年龄段的甲基化率进行统计分析

以 5 岁为 1 个年龄段, 对其定性情况进行统计, 结果如表 2 所示。再对其进行线性回归分析, 可得男性($P=0.001$)、女性($P=0.000$)、总体($P=0.000$)差异均具有统计学意义, 存在线性关系, 见图 5、6。由图可见, 甲基化率是随年龄段的增加而呈线性增长的。

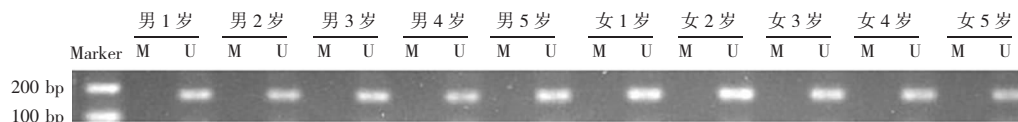


图 2 各年龄标本 MSP 检测结果 1

Fig.2 Methylation-specific PCR test result 1 of various age samples

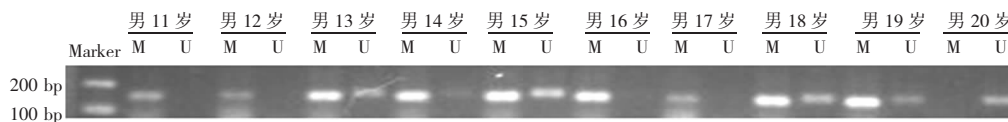


图 3 各年龄标本 MSP 检测结果 2

Fig.3 Methylation-specific PCR test result 2 of various age samples

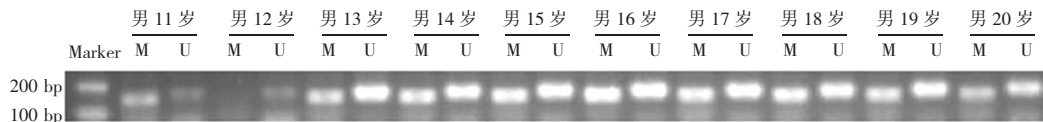


图 4 各年龄标本 MSP 检测结果 3

Fig.4 Methylation-specific PCR test result 3 of various age samples

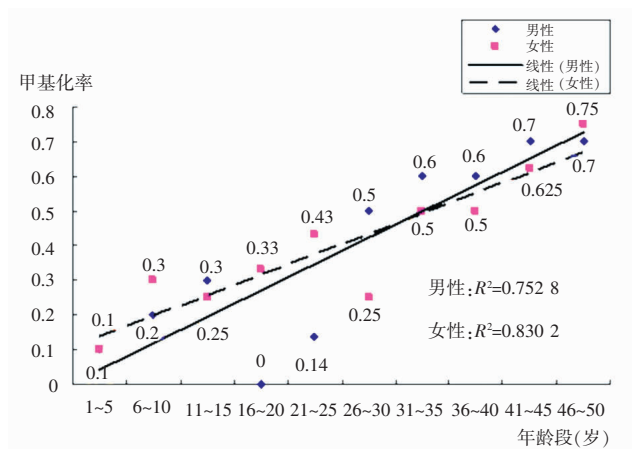


图 5 不同年龄段男女 NPTX2 基因甲基化率

Fig.5 NPTX2 gene methylation rate of male and female samples in various age groups

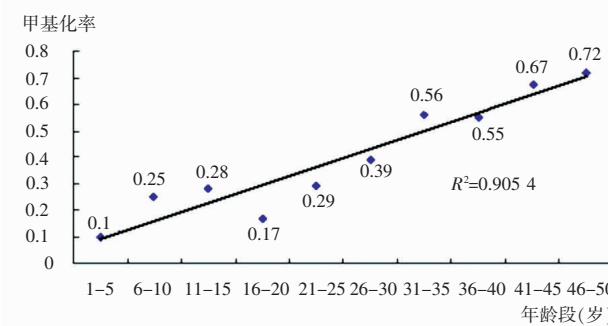


图 6 不同年龄段标本 NPTX2 基因甲基化率

Fig.6 NPTX2 gene methylation rate of samples in various age groups

表 1 是否甲基化与年龄、性别的 logistic 回归分析结果

Tab.1 Logistic regression analysis result between methylation status and age, gender

变量	<i>B</i>	<i>S.E.</i>	<i>Wald</i>	<i>df</i>	<i>P</i>	<i>Exp (B)</i>	95% CI for <i>EXP (B)</i>	
							Lower	Upper
年龄	0.061	0.012	24.366	1	0.000	1.063	1.037	1.088
性别	-0.067	0.341	0.039	1	0.843	0.935	0.479	1.825
常量	-1.966	0.420	21.923	1	0.000	0.140		

表 2 各年龄段男女甲基化率

Tab.2 Methylation rate of male and female samples in various age groups

年龄段 (岁)	样本数(个)									甲基化率		
	男性			女性			合计			男性	女性	总
	共	M	U	共	M	U	共	M	U			
1~5	10	1	9	10	1	9	20	2	18	0.1	0.1	0.1
6~10	10	2	8	10	3	7	20	5	15	0.2	0.3	0.25
11~15	10	3	7	8	2	6	18	5	13	0.3	0.25	0.28
16~20	3	0	3	3	1	2	6	1	5	0	0.33	0.17
21~25	7	1	6	7	3	4	14	4	10	0.14	0.43	0.29
26~30	10	5	5	8	2	6	18	7	11	0.5	0.25	0.39
31~35	10	6	4	8	4	4	18	10	8	0.6	0.5	0.56
36~40	10	6	4	10	5	5	20	11	9	0.6	0.5	0.55
41~45	10	7	3	8	5	3	18	12	6	0.7	0.625	0.67
46~50	10	7	3	8	6	2	18	13	5	0.7	0.75	0.72
总计	90	38	52	80	32	48	170	70	100	0.42	0.4	0.41

3 讨 论

甲基化的阳性对照是人类全基因组 DNA 经过 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)处理,使序列中所有的胞嘧啶碱基 C 均发生了甲基化,再进行重亚硫酸氢盐转化后制成。甲基化的阴性对照则是序列中所有的胞嘧啶碱基 C 均未发生甲基化的人类全基因组 DNA,进行重亚硫酸氢盐转化以后制成。由于甲基化和非甲基化两对引物序列很相近,在进行 PCR 扩增的过程中,如果条件控制不当就很容易引起碱基错配而导致最后结果的误判。Zhang 等^[12]和 Ali 等^[13]的文献中记载在进行 MSP 实验之前,有必要进行甲基化的阴阳对照实验,目的是验证引物的特异性和敏感性,以及摸索 PCR 反应的最佳条件。

多年以来,随着分子生物学、法医物证学的发展以及公安机关侦查犯罪的需求,针对随年龄变化的基因或者基因组某些区域的研究越来越多。很多基础研究都表明某些区域的 DNA 甲基化改变可随年龄增长表现出高甲基化或去甲基化^[14-15]。随年龄的升高而去甲基化的现象在许多物种中长期被观

察到,包括大马哈鱼^[16],大鼠^[17],小鼠^[18]。但最近研究显示有许多 CpG 位点符合年龄相关的高甲基化。统计学分析表明高甲基化比去甲基化与年龄的相关性更好,且高甲基化代表了细胞衰老的表观遗传学的内在固有变化^[19]。与年龄相关的高甲基化优先地发生于 CpG 岛,它位于二倍体染色质领域与关键的发育基因相关联的启动子,以及在蜂巢状蛋白的靶点^[15]。表观遗传学的改变在不同的组织类型中有明显的不同^[20],很多年龄相关的改变都依赖于组织类型^[21]。但是一些最近的研究显示年龄依赖性的 CpG 特征可以被独立定义于性别,组织类型和疾病状态。与此同时,也有一些最近的文献描述基人体于特殊组织(比如唾液、表皮)的甲基化水平的年龄推断^[7,22]。

针对北美地区白种人组织样本检测的研究有很多^[7,20-22],而对于东方黄种人特别是重庆地区汉族人的血液样本的检测目前尚未见报道。本实验利用经典的甲基化检测方法—MSP,检测重庆地区汉族人群中 170 个不同年龄的无关个体血液样本中 NPTX2 基因启动子区域甲基化情况。从结果中我们可以看出,按照年龄段来进行统计分析,可见随年龄段的增大,所选位点的甲基化率越来越大;且男

性的甲基化率曲线斜率大于女性,符合男性衰老得比女性更快这一规律,这也与 Horvath 的统计结论^[22]一致。而用 SPSS 软件分析,样本是否甲基化和性别因素的关系没有通过显著性检验,说明它们之间没有显示出足够相关性,原因可能是样本量不足,也可能是该统计方法的局限性。与此同时,是否甲基化与年龄因素则通过了显著性检验,这也验证了许多文献中报道的甲基化与年龄相关。基于对该基因与衰老、年龄相关疾病的研究,其随年龄变化的原理机制可能是 DNA 甲基转移酶的数量增加或者是酶的活性增强,导致甲基化程度升高^[7,22]。但是具体是那一项起主导作用,酶的调控又是怎么进行,有待进一步研究证实。

经过本实验研究,进一步验证了 NPTX2 基因甲基化与年龄的相关性,下一步将检测多个与年龄相关的 CpG 位点的甲基化程度。通过高分辨率溶解曲线^[23](high resolution melting, HRM)来寻找与年龄相关的多 CpG 位点的 DNA 片段;再通过焦磷酸测序技术来对所选的片段甲基化程度进行定量;从而构建血液组织的甲基化谱。由于甲基化有组织特异性^[21],将以同样的方式比较各年龄阶段相同个体的不同组织中上述位点甲基化情况的差异,构建组织特异性甲基化谱。通过多因素比较的回归分析建立年龄与甲基化程度的数学模型,让年龄推断不再受组织类型的限制,从而为年龄推断提供新的手段和策略。

参 考 文 献

- [1] Campisi J, Vijg J. Does damage to DNA and other macromolecules play a role in aging? If so, how? [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2009, 64A(2): 175–178.
- [2] Dodds DC, Omeis IA, Cushman SJ, et al. Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(34): 21488–21494.
- [3] Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, et al. Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(23): 6269–6281.
- [4] Yao F, Sun M, Dong M, et al. NPTX2 hypermethylation in pure pancreatic juice predicts pancreatic neoplasms [J]. *Am J Med Sci*, 2013, 346(3): 175–180.
- [5] Shukla S, Pia Patric IR, Thinagararajan S, et al. A DNA methylation prognostic signature of glioblastoma: identification of NPTX2–PTEN–NF-κB nexus [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(22): 6563–6573.
- [6] Skiriute D, Vaitkienė P, Ašmonienė V, et al. Promoter methylation of REG, HOXA11, hMLH1, NDRG2, NPTX2 and Tes genes in glioblastoma [J]. *J Neurooncol*, 2013, 113(3): 441–449.
- [7] Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, et al. Epigenetic predictor of age [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e14821.
- [8] Koch CM, Wagner W. Epigenetic–aging–signature to determine age in different tissues [J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(10): 1018–1027.
- [9] Florath I, Butterbach K, Müller H, et al. Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(5): 1186–1201.
- [10] Rakyan VK, Down TA, Maslau S, et al. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains [J]. *Genome Res*, 2010, 20(4): 434–439.
- [11] McClay JL, Aberg KA, Clark SL, et al. A methylome-wide study of aging using massively parallel sequencing of the methyl–CpG-enriched genomic fraction from blood in over 700 subjects [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(5): 1175–1185.
- [12] Zhang Q, Hu G, Yang Q, et al. A multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of early-stage ovarian cancer using cell-free serum DNA [J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 130(1): 132–139.
- [13] Ali AH, Kondo K, Namura T, et al. Aberrant DNA methylation of some tumor suppressor genes in lung cancers from workers with chromate exposure [J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50(2): 89–99.
- [14] Horvath S, Zhang Y, Langfelder P, et al. Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue [J]. *Genome Biol*, 2012, 13(10): R97.
- [15] Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(8): e1000602.
- [16] Berdyshev G, Korotaev G, Boiarskikh G, et al. Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning [J]. *Biokhimiia*, 1967, 32(5): 988–993.
- [17] Vanyushin B, Nemirowsky L, Klimenko V, et al. The 5 methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents [J]. *Gerontologia*, 1973, 19(3): 138–152.
- [18] Wilson V, Smith R, Ma S, et al. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(21): 9948–9951.
- [19] Rakyan VK, Down TA, Maslau S, et al. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains [J]. *Genome Res*, 2010, 20(4): 434–439.
- [20] Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, et al. The NIH roadmap epigenomics mapping consortium [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(10): 1045–1048.
- [21] Thompson RF, Atzmon G, Gheorghe C, et al. Tissue-specific dysregulation of DNA methylation in aging [J]. *Aging Cell*, 2010, 9(4): 506–518.
- [22] Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types [J]. *Genome Biol*, 2013, 14(10): R115.
- [23] Farnen E, Hultman MT, Anglès d'Auriac M, et al. Development of a screening system for the detection of chemically induced DNA methylation alterations in a zebrafish liver cell line [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2014, 77(9–11): 587–599.

(责任编辑: 冉明会)