

BDNF 基因 CpG 位点甲基化水平与急性应激障碍发生风险的因果关系:两样本孟德尔随机化分析

唐雨晴¹, 谢伟², 白海花³, 乔瑞^{1*}

¹包头医学院公共卫生学院, 内蒙古包头 014000; ²包头医学院医学技术与麻醉学院, 内蒙古包头 014000; ³内蒙古民族大学附属医院基因检测中心, 内蒙古通辽 028000

[中图分类号] R749.5 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1769.2025.0407

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 唐雨晴, 谢伟, 白海花, 等. BDNF 基因 CpG 位点甲基化水平与急性应激障碍发生风险的因果关系:两样本孟德尔随机化分析[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(8): 925-934.

[收稿日期] 2024-11-04

[录用日期] 2025-01-31

[上线日期] 2025-04-07

[摘要] 目的 探讨脑源性神经营养因子(BDNF)基因 CpG 位点甲基化水平与急性应激障碍(ASD)[创伤后应激障碍(PTSD)或创伤后抑郁症]发生风险的因果关系。方法 (1)将 30 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠随机分为对照组、24 h 束缚应激(Res)组和 Res+5-氮-2'脱氧胞苷(5-Aza-cdR)组, 每组 10 只。采用 24 h 束缚应激建立 ASD 小鼠模型。每天记录小鼠的体重;造模成功后 24、48 h 采用旷场实验评估小鼠活动水平和焦虑样行为, 采用 RT-qPCR 与 Western blotting 检测各组小鼠海马中 BDNF mRNA 和蛋白表达水平。(2)采用相关的全基因组关联研究(GWAS)汇总数据进行工具变量(IVs)的筛选, 两样本孟德尔随机化(TSMR)方法分析 BDNF 基因 CpG 位点甲基化与 ASD 之间的因果关系; 采用 leave-one-out 法对结果进行验证。结果 (1)体重监测和旷场实验结果显示, 与对照组比较, Res 组小鼠的体重和运动时间、运动距离及站立次数均明显降低或减少($P<0.001$); 与 Res 组比较, Res+5-Aza 组小鼠的体重和运动时间、运动距离及站立次数均明显增高或增多($P<0.001$)。RT-qPCR 和 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, Res 组小鼠海马 BDNF mRNA 和蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); 而与 Res 组比较, Res+5-Aza 组 BDNF mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P<0.001$)。(2)TSMR 分析结果显示, BDNF 基因中 cg10635145 位点($OR=0.862$, 95%CI 0.793~0.938, $P=0.043$)与 PTSD 患病风险呈负相关, cg08362738 位点($OR=0.975$, 95%CI 0.960~0.992, $P=0.003$)与创伤后抑郁症患病风险呈负相关, 而 cg18117895 位点($OR=1.008$, 95%CI 1.000~1.016, $P=0.047$)与创伤后抑郁症患病风险呈正相关。Leave-one-out 检验结果显示, BDNF 基因 CpG 位点的 SNP 与 ASD 的因果关系不受某个强工具变量影响。结论 BDNF 基因的 CpG 位点 cg1063145 和 cg08362738 可能为 ASD 相关疾病的保护因素, 而 cg18117895 可能为危险因素。

[关键词] 急性应激障碍; 脑源性神经营养因子; 孟德尔随机化; 因果关联; 压力

Causal relationship between methylation levels of CpG site in BDNF gene and risk of acute stress disorder: a two-sample Mendelian randomization analysis

Tang Yu-Qing¹, Xie Wei², Bai Hai-Hua³, Qiao Rui^{1*}

¹School of Public Health, ²School of Medical Technology and Anaesthesia, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014000, China

³Gene Testing Center, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Minzu University, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China

*Corresponding author, E-mail: qr100983@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82071479, 31860307), and the Baotou Medical College Innovation Team Development Program (bycxttd-12)

[Abstract] **Objective** To investigate the potential association between methylation levels of CpG locus of brain-derived

[基金项目] 国家自然科学基金(82071479, 31860307); 包头医学院创新团队发展计划项目(bycxttd-12)

[作者简介] 唐雨晴, 硕士研究生, 主要从事遗传流行病学、抑郁症分子机制方面的研究

[通信作者] 乔瑞, E-mail: qr100983@163.com

neurotrophic factor (BDNF) gene and risk of acute stress disorder (ASD) [post-traumatic stress disorder (PTSD) or post-traumatic depression]. **Methods** (1) 30 specific pathogen-free (SPF)-grade male ICR mice were randomly divided into control group, 24 h restraint stress (Res) group, and Res+5-Aza-2'-deoxycytidine (Res+5-Aza-cdR) group, with 10 mice in each group. An ASD mouse model was established using 24h restraint stress. The body weight of the mice was recorded daily. At 24 h and 48 h after the successful establishment of the model, open field tests were conducted to evaluate locomotor activity level and anxiety-like behavior of the mice. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were used to detect *BDNF* mRNA and protein expression levels in the hippocampus of mice in each group. (2) Relevant genome-wide association study (GWAS) summary data were utilized for instrumental variable (IV) selection. A two-sample Mendelian randomization (TSMR) approach was applied to analyze the causal relationship between CpG site methylation of *BDNF* gene and ASD risk. The leave-one-out method was used to verify the results. **Results** (1) The results of body weight monitoring and the open field test showed that compared with control group, the body weight, the residence time in the central area, the total movement distance, and the activity times of mice in Res group were significantly decreased ($P<0.001$). Compared with Res group, the body weight, the residence time in the central area, the total movement distance and activity times of mice in Res+5-Aza group were significantly increased ($P<0.001$). The results of RT-qPCR and Western blotting showed that compared with control group, the expression levels of *BDNF* mRNA and protein in the hippocampus of the mice in Res group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with Res group, the expression level of *BDNF* mRNA and protein in Res+5-Aza group was significantly higher ($P<0.001$). (2) TSMR analysis results showed that the cg10635145 site in *BDNF* gene ($OR=0.862$, 95%CI 0.793-0.938, $P=0.043$) was negatively correlated with the risk of PTSD. The cg08362738 site ($OR=0.975$, 95%CI 0.960-0.992, $P=0.003$) was negatively correlated with the risk of trauma-related depression, whereas the cg18117895 site ($OR=1.008$, 95%CI 1.000-1.016, $P=0.047$) was positively correlated with the risk of trauma-related depression. The results of Leave-one-out test showed that the causal relationship between the single nucleotide polymorphism (SNP) of CpG site in *BDNF* gene and ASD was not affected by a strong IV. **Conclusion** The CpG loci cg1063145 and cg08362738 of *BDNF* gene may be protective factors for ASD-related diseases, while cg18117895 may be a risk factor.

[Key words] acute stress disorder; brain-derived neurotrophic factor; Mendelian randomization; causal association; stress

急性应激障碍(acute stress disorder, ASD)是由创伤或严重的压力事件引发的心理健康障碍,常表现为重现体验(如闪回和恶梦)、回避行为、焦虑、抑郁及情绪不稳定等症状^[1]。在ASD的发展过程中,脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)扮演着关键角色。BDNF是重要的神经营养因子,主要分布在海马、额叶和基底神经节等区域。研究显示,创伤后抑郁症(trauma-related depression)等^[2]表现出高度的遗传风险,其持续发展可能导致心理^[3]、生理(包括心血管疾病和免疫功能下降^[4])、社会功能(人际关系和工作表现下降^[5])、认知能力(记忆和学习能力减退^[6])以及成瘾行为等多方面的负面影响。然而,这些影响的因果关系尚未完全确立,且缺乏有关BDNF特异性CpG位点DNA甲基化变化的遗传变异研究^[2]。采用孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)方法,可利用遗传变异为工具变量(instrumental variables, IVs)评估*BDNF*基因CpG位点甲基化水平与ASD[创伤后应激障碍(PTSD)或创伤后抑郁症]之间的因果关系;通过基因随机分配,可有效控制混杂因素和反向因果的问题,从而提供更可靠的因果推断^[7]。

本研究利用*BDNF*的甲基化数量性状位点(methylation quantitative trait loci, meQTL)数据与ASD的全基因组关联研究(Genome-Wide Association Study,

GWAS)数据,采用两样本孟德尔随机化(two-sample Mendelian randomization, TSMR)^[8]方法进行统计分析,以识别可能影响疾病的差异甲基化位点,探讨meQTL与ASD的因果关联,以期为BDNF相关ASD的防治提供数据支持。

1 资料与方法

1.1 动物实验

1.1.1 实验动物及分组 30只4~6周龄SPF级雄性ICR小鼠,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(北京)2016-0002],适应性饲养1周后进行实验。采用随机数字表法将实验小鼠分为对照组、24h束缚应激组(Res组)和Res+5-Aza组[注射5-氮-2'脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-cdR)+24h束缚应激],每组10只。本研究获包头医学院实验动物伦理委员会审批[包医伦审动物2021第(034)号]。

1.1.2 试剂 戊巴比妥钠(P3761)、5-Aza-cdR(189825)购自美国西格玛奥德里奇公司;总RNA提取试剂盒(R1200-100)、5×蛋白上样缓冲液(P1040)、高效RIPA裂解液(R0010)购自中国索莱宝科技有限公司;反转录试剂盒(RR037A)、一步法RT-qPCR探针法检测试剂盒(RR600A)购自日本TaKaRa公司;PageRuler™预染蛋白分子量标准(10-180 kD)(26616)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(A55860)、特超敏ECL化学发光底物

(35055)购自美国赛默飞世尔科技公司;兔源BDNF单克隆抗体(ab108319)、山羊抗兔IgG二抗(ab205718)购自英国Abcam公司;鼠源β-actin单克隆抗体(2Q1055)购自美国Santa Cruz公司;山羊抗鼠IgG二抗(AS003)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.1.3 ASD小鼠模型构建 采用侧脑室注射5-Aza-cdR降低小鼠海马体组织中DNA甲基化转移酶(DNA-methyltransferase, DNMT)活性,进而抑制DNA甲基化水平,调控BDNF的表观遗传状态;而后使用24 h束缚应激造模方法模拟受害者被困情境^[9],诱导小鼠ASD表型。检测各组小鼠行为学表现及其海马组织^[10]BDNF的转录和蛋白表达水平,观察DNA甲基化水平对抑郁样行为的影响。

将Res+5-Aza组小鼠以俯卧位固定在脑立体定位仪上。腹腔注射1.2%戊巴比妥钠,待小鼠进入麻醉状态后,在孔的起点处缓慢注入10 μmol/L 5-Aza-cdR工作液10 μl,5 min后停止注射^[11];注射后12 h,对Res组和Res+5-Aza组小鼠建立ASD模型,具体方法如下:取一支50 ml离心管用于约束小鼠,在离心管管壁上钻几个孔,用于被约束小鼠的散热、排泄和呼吸,试管的其余部分用黑色胶带粘贴,以创造幽闭的环境。将小鼠插入试管,用硬物堵住剩余空间,使前肢和头部可自由活动,但后肢不能活动。置入小鼠的离心管放置在有通风口的泡沫箱中,全程确保环境安静且黑暗。对小鼠约束24 h后,通过旷场实验,以活动距离或运动时间等参数判断小鼠的行为抑制或焦虑,验证造模是否成功。成功后将小鼠脱颈取材,剥离双侧脑海马组织,置于1.5 ml EP管中,于-80 °C冰箱中保存备用。

1.1.4 体重监测 从适应性喂养开始至造模结束的整个周期内,于每天上午9:00对各组小鼠逐只称量体重,记录并绘制体重变化曲线。

1.1.5 旷场实验测定小鼠在新环境下的自主行为、探究行为以及焦虑水平 造模后设置24 h和48 h两个观察节点,每组取10只小鼠进行测试。将开放场

地(50 cm×50 cm×50 cm)底面均分为16宫格,正中4格记为内部场地。每次实验时将小鼠从该开放场地的同一角落逐一放入,并允许其在30 min的测试期间自由探索场地。使用OFT-200软件(成都泰盟公司)记录5 min内小鼠在内、外场地的运动距离、运动时间、静止时间以及站立次数。

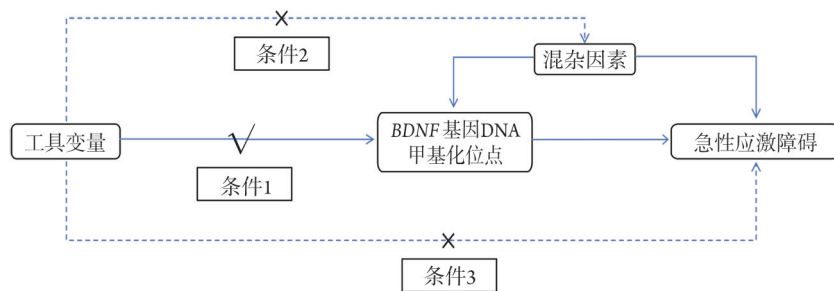
1.1.6 RT-qPCR检测BDNF mRNA的表达 每组取3只小鼠的脑海马组织^[12-13],使用Trizol法提取总RNA,使用反转录试剂盒(Thermo公司),将RNA反转录为cDNA,-20 °C保存。PCR实验重复3次。BDNF和β-Actin引物由生物工程(上海)有限公司合成PCR引物序列:BDNF正向5'-TCTGACGACGCACATCGGC-3',反向5'-CCAGCAGAAAGAGTAGAGGAGG-3';β-actin正向5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCACA-3',反向5'-GGTCATTGATGGCAACAAGG-3'。

1.1.7 Western blotting检测小鼠海马BDNF蛋白表达水平 各组取3只小鼠的海马组织,用含有蛋白酶抑制剂的匀浆液匀浆,测定蛋白浓度后经12.5%SDS-PAGE电泳,半干转膜。用5%脱脂奶粉室温封闭1.5 h,一抗(1:1000)4 °C孵育过夜,室温孵育二抗(1:10 000)1 h后ECL法显色检测。采用ImageJ软件分析条带灰度,实验重复3次。

1.2 TSMR研究

1.2.1 研究设计 选择BDNF基因meQTL作为暴露数据,筛选满足条件的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为IVs;通过以BDNF基因meQTL为暴露分别与ASD中两种疾病结局(创伤后抑郁症或PTSD)进行TSMR分析,探究两者的因果关系。该项MR研究满足以下3个假设:(1)选择与BDNF基因DNA甲基化位点明显相关的SNPs作为IVs;(2)IVs与其他混杂因素无关;(3)IVs仅通过BDNF基因的DNA甲基化位点来影响压力应激相关的精神障碍(图1)。

1.2.2 数据来源 (1)meQTL。本研究使用meQTL作为遗传代用物,其来源于人类DNA甲基化遗传学联盟(Genetics of DNA Methylation Consortium, GoDMC)



BDNF: 脑源性神经营养因子

图1 孟德尔随机化研究的3个假设

Fig.1 Three hypotheses of the Mendelian randomization

的meQTL关联研究^[14]。该研究分析了SNP对DNA甲基化的影响,基于来自36个独立研究的27 750名欧洲血统参与者的数据,识别出102 965 711个顺式候选meQTL关联($P < 1.0 \times 10^{-5}$, SNP位于甲基化位点1 Mb内)和710 638 230个反式候选meQTL关联。DNA甲基化数据的分析基于至少100名欧洲血统参与者的全血或脐带血样本,使用Illumina 450k或EPIC Beadchips阵列进行。为了确保数据的可靠性,DNA_m数据经过了年龄、性别、预测的细胞计数、吸烟情况,以及遗传和非遗传主成分(principal components, PCs)的调整,并进行了标准化和质量控制^[15]。(2)结局。为减少在MR分析中的样本重叠,本研究从IEU OpenGWAS项目和FinnGen获取了公开的GWAS汇总统计数据。该数据包含PTSD(样本数 $n=199\ 213$)和创伤后抑郁症(样本数 $n=66\ 334$)的统计信息,且所有诊断标准均参考ICD-10: F40-F48。上述暴露和结局数据均来源于欧洲血统样本。(3)工具变量的选择。工具变量的筛选标准如下:①利用中国国家生物信息中心的EWAS数据中心(Nucleic Acids Res 2020, <https://ngdc.cncb.ac.cn/ewas/datahub>)获得BDNF相关CpG位点,在总meQTL数据中提取对应位点数据。②以全基因组显著性阈值 $P < 1.0 \times 10^{-5}$ 筛选与ASD明显相关的SNPs作为工具变量^[16]。③通过LD clumping方法减少由于SNPs间的连锁不平衡所带来的冗余信息^[17],可避免多重比较,提高结果的独立性。相关系数设置为clumping distance=100 kb, clumping $r^2 < 0.1$, clumping $P=1$ 。④质量控制。使用PhenoScannerV2二次筛查与结局表型相关的SNP,以减少混淆,排除潜在多效性;为提高分析的准确性和可靠性,剔除回文SNP;计算所有工具变量的F统计量,并保留 $F > 10$ 的SNP以确保工具变量的强度^[18]。

1.2.3 BDNF基因CpG位点甲基化水平与ASD发生风险的因果关系的MR分析 采用R软件(版本4.3.0)的“TwoSampleMR”“MRPRESSO”程序包^[19]进行分析。使用MR-Egger回归、加权中位数(weighted median, WME)、逆方差加权(inverse variance weighted, IVW)、简单众数(simple mode)和加权众数(weighted mode)方法^[20]探究BDNF的DNA甲基化变化与ASD之间的因果关系;采用敏感性分析提高可信度。采用Cochran Q统计量检验SNP间的异质性。通过MR-Egger回归的截距项评估水平多效性;若存在多效性,通过MR-PRESSO法删除影响明显的SNP。使用Leave-one-out方法评估是否存在具有较强影响力的SNPs^[21]。

1.3 统计学处理 采用GraphPad Prism5软件进行统计分析。计量数据经检验均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表

示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 24 h束缚应激诱导小鼠产生抑郁样行为 体重监测和旷场实验结果显示,与对照组比较,经24 h束缚应激处理的Res组小鼠的体重、运动时间、运动距离和站立次数均明显降低或减少($P < 0.001$);与Res组比较,Res+5-Aza组小鼠的体重、运动时间、运动距离和站立次数均明显增高或增多($P < 0.001$,图2)。

2.2 ASD小鼠海马BDNF表达变化 RT-PCR和Western blotting检测结果显示,与对照组比较,造模后24 h,Res组小鼠海马BDNF mRNA和蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与Res组比较,Res+5-Aza组BDNF mRNA和蛋白表达水平明显升高($P < 0.001$,图3)。

2.3 BDNF基因CpG位点甲基化水平与ASD发生风险的TSMR分析结果

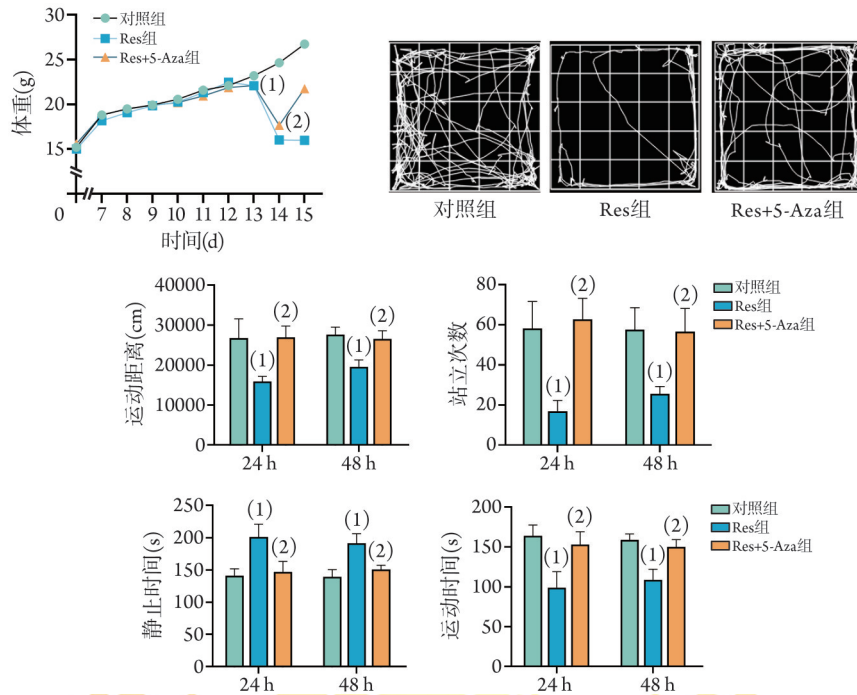
2.3.1 获取工具变量SNPs 从EWAS数据中心共查询到BDNF有77个CpG位点,但在meQTL数据中仅提取出27个位点数据。对CpG所含4135个SNPs进行筛选后,最终获得54个有分析价值的SNPs,包括cg10635145、cg08362738、cg18117895 3种CpG位点,具体信息见表1。

2.3.2 MR分析结果 五种MR分析方法中,IVW分析结果显示,cg10635145位点($OR=0.862$, 95%CI 0.793~0.938, $P=0.043$)与PTSD患病风险呈负相关;cg08362738位点($OR=0.975$, 95%CI 0.960~0.992, $P=0.003$)与创伤后抑郁症患病风险呈负相关,而cg18117895位点($OR=1.008$, 95%CI 1.000~1.016, $P=0.047$)与创伤后抑郁症患病风险呈正相关。阳性数据具体见表2。

2.3.3 敏感性分析结果 Cochran Q检验分析3个CpG位点与ASD的关联,结果显示,各CpG位点的Q检验结果未显示明显的多效性或异质性($P > 0.05$);所选工具变量的甲基化水平与ASD之间存在稳健的因果关联。

MR-Egger截距项检验显示,除cg10635145外,其余两个CpG位点均未呈现明显的多效性($P > 0.05$),提示IVs对暴露与结局间关系未产生显著偏倚。MR-PRESSO结果显示,3个CpG位点甲基化水平的SNPs与结局ASD间不存在水平多效性($P > 0.05$)。

Leave-one-out检验结果显示,BDNF基因CpG位点的SNP与ASD的因果关系不受某个强IV影响,图中所有SNP同向集中(图4)。



造模期间体重变化(D0—11. 喂养及行为学适应性训练; D12. 侧脑室注射 5-Aza-cdR; D13. 24 h 急性束缚应激处理; D14—15. 造模后 24、48 h 旷场实验并取材); Res. 24 h 束缚应激; 5-Aza. 5-氮-2'脱氧胞苷; 与对照组比较, (1) $P < 0.001$; 与 Res 组比较, (2) $P < 0.001$

图2 造模期间小鼠体重变化及 24 h 束缚应激后旷场实验结果($n=10$)

Fig.2 Body weight change and open field experiment results after 24-h restraint stress in mice($n=10$)

表1 筛选获取的脑源性神经营养因子(BDNF)基因 CpG 的 SNP 基本信息

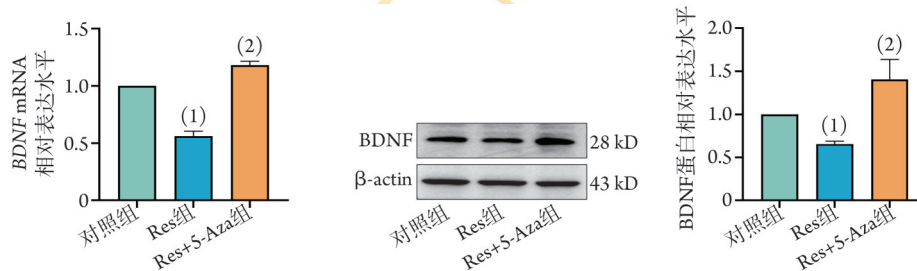
Tab.1 Basic information of SNPs from CpG of brain-derived neurotrophic factor gene

暴露	结果	SNP	EA	OA	Beta	EAF	S_x	P	样本量	F	mean F
cg10635145 ($n=30$)	PTSD	rs116874284	C	T	-0.478	0.028	0.028	3.22E-64	23 741	286.25	545.094
		rs118101868	T	C	-0.406	0.016	0.039	1.00E-200	21 741	107.40	545.094
		rs12793245	C	G	-0.207	0.125	0.014	1.62E-46	22 150	205.07	545.094
		rs1304100	G	A	-0.587	0.236	0.009	1.00E-200	27 247	3870.03	545.094
		rs1375975	T	C	-0.063	0.437	0.009	1.00E-200	27 243	54.10	545.094
		rs143305657	C	T	-0.525	0.027	0.032	1.80E-61	19 618	273.64	545.094
		rs144039322	A	G	-0.463	0.037	0.041	4.75E-29	13 174	125.12	545.094
		rs1442928	G	A	0.088	0.07	0.017	1.00E-200	27 746	28.43	545.094
		rs1442930	A	G	-0.105	0.526	0.009	1.00E-200	27 217	149.27	545.094
		rs147271048	A	G	-0.352	0.014	0.058	1.00E-200	11 512	36.45	545.094
		rs1491851	T	C	0.179	0.459	0.009	1.00E-200	25 066	402.59	545.094
		rs17309979	A	G	-0.217	0.167	0.017	7.76E-38	12 586	165.30	545.094
		rs17310049	C	T	-0.153	0.186	0.011	1.00E-200	25 440	181.20	545.094
		rs1871254	C	T	0.145	0.284	0.009	1.00E-200	27 731	236.01	545.094
		rs1871255	A	G	-0.123	0.376	0.009	1.00E-200	27 256	194.70	545.094
		rs2472632	A	C	-0.14	0.367	0.009	1.00E-200	27 241	249.35	545.094
		rs34548197	G	A	-0.214	0.111	0.015	1.60E-43	21 298	191.34	545.094
		rs34804482	C	T	-0.435	0.025	0.03	3.03E-49	22 720	217.58	545.094
		rs35320983	C	G	-0.158	0.119	0.015	1.48E-27	22 942	118.31	545.094
		rs35548939	T	C	-0.589	0.123	0.013	1.00E-200	24 276	1956.86	545.094
rs4923463	G	A	-0.719	0.208	0.01	1.00E-200	27 744	5679.75	545.094		
rs61887835	C	T	-0.417	0.038	0.025	1.87E-61	23 471	273.57	545.094		
rs79453823	T	A	-0.546	0.014	0.055	1.00E-200	11 888	99.43	545.094		
rs80083564	T	G	0.189	0.132	0.014	2.01E-44	24 390	195.47	545.094		

(续表)

暴露	结果	SNP	EA	OA	Beta	EAF	S_{β}	P	样本量	F	mean F
cg08362738 (n=3)	创伤后 抑郁症	rs11030026	A	G	-0.111	0.161	0.012	3.16E-21	27 257	89.43	255.808
		rs11030066	T	C	-0.13	0.142	0.012	2.97E-25	27 248	107.79	255.808
		rs149198520	C	G	-1.189	0.016	0.05	4.89E-126	14 307	570.20	255.808
		rs10835219	C	A	0.094	0.361	0.01	1.34E-20	20 852	86.58	217.333
		rs111909661	C	G	-0.105	0.209	0.011	1.00E-200	25 974	95.11	217.333
		rs112035538	T	G	-0.345	0.091	0.015	1.00E-200	27 257	522.48	217.333
cg18117895 (n=21)	创伤后 抑郁症	rs112417060	T	C	-0.688	0.017	0.052	1.89E-39	12 105	172.68	217.333
		rs12791818	G	A	0.251	0.089	0.02	7.53E-36	15 686	156.21	217.333
		rs12793245	C	G	0.099	0.125	0.015	7.69E-12	22 150	46.84	217.333
		rs12808112	A	T	0.099	0.278	0.01	1.00E-200	27 231	108.67	217.333
		rs1387144	C	A	0.211	0.4	0.009	1.00E-200	27 750	608.14	217.333
		rs146880014	A	G	-0.346	0.02	0.033	1.17E-25	22 932	109.64	217.333
		rs17309930	A	C	-0.343	0.204	0.011	1.00E-200	26 648	1064.11	217.333
		rs183833930	T	G	-0.246	0.038	0.025	4.81E-23	23 823	97.72	217.333
		rs34548197	G	A	0.108	0.112	0.016	2.96E-12	21 298	48.71	217.333
		rs36211436	A	G	-0.745	0.019	0.058	4.12E-38	9108	166.55	217.333
		rs61887835	C	T	0.237	0.038	0.025	9.24E-21	23 471	87.31	217.333
		rs61888272	G	T	-0.178	0.056	0.019	7.20E-21	26 437	87.80	217.333
		rs66866077	T	C	-0.381	0.055	0.021	1.00E-200	22 946	331.84	217.333
		rs7127273	T	C	-0.240	0.045	0.022	1.01E-27	25 486	119.07	217.333
		rs72887882	T	C	-0.585	0.018	0.033	1.75E-69	25 328	310.42	217.333
		rs75586720	C	T	-0.244	0.074	0.017	1.00E-200	27 233	211.65	217.333
rs76253316	G	A	-0.250	0.036	0.025	3.90E-23	25 392	98.13	217.333		
rs79509437	T	C	-0.421	0.025	0.072	4.80E-09	5245	34.25	217.333		

SNP. 单核苷酸多态性; PTSD. 创伤后应激障碍; EA. 效应等位基因; OA. 非效应等位基因; Beta. 等位基因效应值; S_{β} . Beta的标准误差; EAF. 效应等位基因频率; mean F. 平均F值



BDNF. 脑源性神经生长因子; Res. 24 h 束缚应激; 5-Aza. 5-氮-2'脱氧胞苷; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与Res组比较, (2) $P < 0.05$

图3 急性应激障碍小鼠海马BDNF mRNA及蛋白表达($n=3$)

Fig.3 Expression of BDNF mRNA and protein in hippocampus of mice with acute stress disorder ($n=3$)

3 讨论

ASD(PTSD或创伤后抑郁症)与环境因素(如童年期受虐待或长期社会压力)及遗传背景密切相关,特别是在压力环境中,ASD患病率显著升高。对中国50所大学11 954名学生的调查显示,由压力引起的精神障碍患病率达22.8%(95%CI 22.0%~23.5%)^[22]。因此,ASD被视为对心理健康和生活质量造成明显影响的公共卫生问题^[23]。研究指出,BDNF蛋白水平

降低与抑郁症状的严重程度及抗抑郁药物的疗效明显相关^[24-26]。在压力条件下,BDNF基因启动子区域的甲基化程度增加,从而抑制BDNF基因表达;BDNF的异常甲基化水平被视为ASD的潜在生物标志物^[27]。

本研究结果显示,Res小鼠的行为表现与对照组存在明显差异。Res组小鼠在旷场实验中中心区域的停留时间明显短于对照组,其体重也明显低于对照组,且24 h束缚应激处理可诱导小鼠出现抑郁样行

表2 两样本孟德尔随机化分析的主要结果

Tab.2 Main results of two-sample Mendelian randomization analysis

暴露	结果	SNPs	方法	Beta	S_x	P	OR(95%CI)
cg10635145	PTSD	30	MR-Egger	-0.097	0.07	0.180	0.908(0.791~1.042)
			WME	-0.107	0.059	0.071	0.899(0.800~1.009)
			IVW	-0.148	0.043	0.001	0.862(0.793~0.938)
			Simple mode	-0.218	0.103	0.043	0.804(0.657~0.984)
			Weighted mode	-0.129	0.053	0.022	0.879(0.792~0.976)
			MR-Egger	-0.027	0.011	0.238	0.974(0.954~0.994)
BDNF mQTLs	cg08362738	3	WME	-0.026	0.008	0.002	0.975(0.959~0.99)
			IVW	-0.025	0.008	0.003	0.975(0.960~0.992)
			Simple mode	-0.025	0.012	0.178	0.975(0.951~0.999)
			Weighted mode	-0.026	0.009	0.110	0.974(0.956~0.993)
			MR-Egger	0.006	0.008	0.434	1.006(0.991~1.021)
			WME	0.009	0.006	0.104	1.009(0.998~1.021)
cg18117895	创伤后 抑郁症	21	IVW	0.008	0.004	0.047	1.008(1.000~1.016)
			Simple mode	0.015	0.009	0.110	1.015(0.998~1.032)
			Weighted mode	0.010	0.007	0.157	1.01(0.997~1.023)
			MR-Egger	0.006	0.008	0.434	1.006(0.991~1.021)

BDNF. 脑源性神经营养因子; PTSD. 创伤后应激障碍; SNPs. 单核苷酸多态性数量; MR-Egger. MR-Egger 回归法; WME. 加权中位数法; IVW. 逆方差加权法; Simple mode. 简单多数法; Weighted mode. 加权多数法

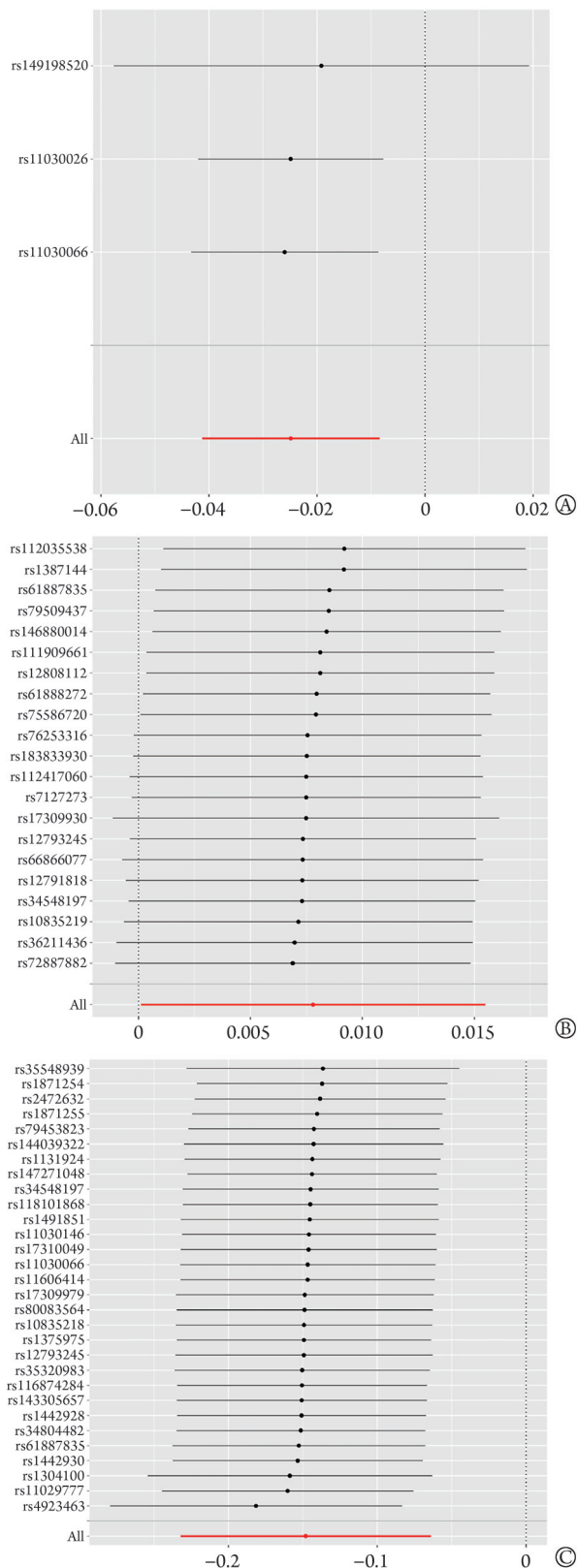
为。RT-PCR和Western blotting检测结果显示, Res组小鼠的BDNF mRNA和蛋白表达水平明显低于对照组。在注射5-Aza-cdR后, Res+5-Aza组小鼠的BDNF表达有所恢复, 接近对照组; 表明BDNF在应激引起的生理和行为变化中可发挥重要作用。DNA甲基转移酶抑制剂的干预效果提示, 抑制DNA甲基转移酶可通过上调小鼠海马中BDNF表达缓解应激引起的抑郁样行为。结合TSMR及敏感性分析确定BDNF基因中3个甲基化位点是否影响ASD发病风险。cg10635145与PTSD、cg08362738与创伤后抑郁症的负相关性提示它们可能作为保护因素, 而cg18117895则与创伤后抑郁症发生风险呈正相关, 可能为疾病危险因素。

应激影响基因表达的方式包括糖皮质激素对基因转录的直接作用及激活表观遗传学机制(如组蛋白修饰、甲基化和羟甲基化), 这些过程可激活及抑制遗传基因^[28]。ASD的病理生理机制尚不明确, 但研究显示BDNF甲基化水平改变影响神经元发育和突触完整性与可塑性。Choi等^[29]利用基因测序与MRI发现抑郁症患者的脑白质结构中BDNF甲基化水平较高, 影响大脑结构完整性; Mariani Wigley等^[30]则认为BDNF的DNA甲基化是早期生活压力与行为表型关系的中介。

人类BDNF基因包含9个功能性启动子和11个外显子, 其中启动子I和IV区域与ASD的关系被广泛研究^[31]。研究显示, BDNF基因启动子I和IV的位点高甲基化会影响抑郁症的诊断和儿童创伤问卷

(CTQ)评分^[32], 如cg08362738位点。经历早期生活压力的抑郁症患者, 其cg18117895和cg27351358位点的甲基化水平明显不同^[33], 进而影响成年后的心理健康^[34]。BDNF高甲基化被认为是PTSD的危险因素^[35]和有效诊断生物标志物, 并且特定CpG位点甲基化与产前压力明显相关, 强调环境压力与基因相互作用对BDNF基因甲基化状态和精神健康的长期影响^[36]。

结合上述研究结果, 对BDNF基因3个CpG位点的甲基化变化影响ASD的发病路径进行假设: (1)调节BDNF基因的转录活性或表达水平。BDNF基因中的cg18117895位点位于染色体11的p13区域, 并具有H3K27Ac标记; cg08362738位于CpG岛上, 这两个位点可能参与BDNF基因的转录调控^[37]。cg18117895甲基化水平增高时, 可能导致BDNF基因启动子区域的超甲基化, 抑制基因转录并降低BDNF表达, 从而影响大脑神经系统的正常功能和心理健康状态; 反之则可能促进基因表达。(2)CpG位点甲基化水平对疾病的潜在逆向作用。cg10635145位于CpG岸且甲基化水平较低, 可能通过促进BDNF基因表达、增强神经可塑性和减轻炎症反应^[38]而发挥保护作用。相对而言, cg08362738的超甲基化通常显著抑制BDNF的表达, 负面影响神经元生长和突触可塑性。尽管其高甲基化似乎对创伤后抑郁症发挥保护作用的结果相矛盾; 但在特定环境中, 该位点可能通过平衡其他神经营养因子的表达发挥心理保护作用^[39]。cg10635145和cg08362738在ASD中的



A. cg08362738—创伤后抑郁症；B. cg18117895—创伤后抑郁症；C. cg10635145—创伤后应激障碍

图4 脑源性神经营养因子(BDNF)基因中CpG位点甲基化与急性应激障碍(ASD)的“leave-one-out”敏感性分析结果

Fig.4 Results of “leave-one-out” sensitivity analysis of CpG site methylation in BDNF gene and ASD

保护机制差异明显。(3)神经元的敏感性调节。BDNF在大脑及周围神经系统中调节特定神经元群的增殖、存活和分化；即使在低浓度下，也可作为兴奋性神经递质，快速去极化突触后膜并长期改变突触可塑性^[40]。BDNF的位点甲基化变化影响其表达水平，调整神经元对压力刺激的适应性反应，进而长期影响记忆、学习和适应性行为等心理过程^[41]。(4)环境与基因相互作用。功能代谢相关的基因多态性变化可影响多个与情绪相关的脑区结构和功能，如五羟色胺、Y脑神经肽(neuropeptide Y, NPY)、BDNF及下丘脑—垂体—肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)，这些基因大多与压力环境因素交互作用^[42-43]。中断HPA轴活动是神经精神疾病的主要危险因素，促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)作为HPA轴的主要调节因子，是糖皮质激素负反馈的重要靶点。BDNF或其受体TrkB的减少会降低CRH的表达，而CRH的调控依赖于cAMP反应元件结合蛋白共激活因子CRTC2，可影响HPA轴的正常功能^[44]。表明早期环境因素与基因变化的相互作用可能导致甲基化水平变化，最终影响BDNF基因在精神健康和疾病中的作用。

本研究存在以下局限性：(1)部分CpG位点在某些精神障碍中增多，但不代表在所有精神障碍中均成立。未来研究需更大样本量及其他生物标志物，以全面评估CpG位点在各种精神障碍中的作用。因此，本文仅附阳性结果，未标出的均为阴性。(2)个体基因组和环境差异可能导致对相同甲基化状态的反应不同。(3)使用leave-one-out检验解释cg10635145敏感性可能隐藏多效性和偏倚问题。(4)尽管揭示了因果联系，仍需独立队列研究和多学科数据验证，以增强结果的普适性和可靠性。

综上所述，本研究结果显示，24 h束缚应激处理的小鼠呈现抑郁样行为，同时海马区BDNF蛋白表达水平降低；TSMR评估结果显示，BDNF基因的DNA甲基化位点cg1063145和cg08362738可能为ASD的保护因素，而cg18117895则可能是危险因素，这将为早期识别ASD潜在患者提供理论支持。

【参考文献】

- [1] Maul S, Giegling I, Fabbri C, et al. Genetics of resilience: Implications from genome-wide association studies and candidate genes of the stress response system in posttraumatic stress disorder and depression[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2020, 183(2): 77-94.
- [2] Luo L, Pang T, Zheng H, et al. xWAS analysis in neuropsychiatric disorders by integrating multi-molecular phenotype quantitative trait loci and GWAS summary data[J]. J Transl Med, 2024, 22

- (1): 387.
- [3] Knezevic E, Nenic K, Milanovic V, *et al.* The role of cortisol in chronic stress, neurodegenerative diseases, and psychological disorders[J]. *Cells*, 2023, 12(23): e3602.
- [4] Tomasdottir MO, Sigurdsson JA, Petursson H, *et al.* Self-reported childhood difficulties, adult multimorbidity and allostatic load: A cross-sectional analysis of the Norwegian HUNT Study[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130591.
- [5] Krishnan V, Han MH, Graham DL, *et al.* Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions[J]. *Cell*, 2007, 131(2): 391-404.
- [6] Warren SL, Zhang Y, Duberg K, *et al.* Anxiety and stress alter decision-making dynamics and causal amygdala-dorsolateral prefrontal cortex circuits during emotion regulation in children[J]. *Biol Psychiatry*, 2020, 88(7): 576-586.
- [7] Zuber V, Grinberg NF, Gill D, *et al.* Combining evidence from Mendelian randomization and colocalization: Review and comparison of approaches[J]. *Am J Hum Genet*, 2022, 109(5): 767-782.
- [8] Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, *et al.* Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology[J]. *Stat Med*, 2008, 27(8): 1133-1163.
- [9] Chu X, Zhou Y, Hu Z, *et al.* 24-hour-restraint stress induces long-term depressive-like phenotypes in mice[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32935.
- [10] Taliac D, Stall N, Dar DE, *et al.* Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis[J]. *Mol Psychiatry*, 2010, 15(1): 80-92.
- [11] Zhang S, Fu W, Jia X, *et al.* Hypoxic preconditioning modulates BDNF and its signaling through DNA methylation to promote learning and memory in mice[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(12): 2320-2332.
- [12] Musazzi L, Tornese P, Sala N, *et al.* Acute stress induces an aberrant increase of presynaptic release of glutamate and cellular activation in the hippocampus of BDNF(Val/Met) mice[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(10): 3834-3844.
- [13] Duman RS, Aghajanian GK. Synaptic dysfunction in depression: Potential therapeutic targets[J]. *Science*, 2012, 338(6103): 68-72.
- [14] Min JL, Hemani G, Davey Smith G, *et al.* Meffil: efficient normalization and analysis of very large DNA methylation datasets[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(23): 3983-3989.
- [15] Min JL, Hemani G, Hannon E, *et al.* Genomic and phenotypic insights from an atlas of genetic effects on DNA methylation[J]. *Nat Genet*, 2021, 53(9): 1311-1321.
- [16] Pan S, Zhang Z, Pang W. The causal relationship between bacterial pneumonia and diabetes: a two-sample mendelian randomization study[J]. *Islets*, 2024, 16(1): 2291885.
- [17] Bulik-Sullivan BK, Loh PR, Finucane HK, *et al.* LD Score regression distinguishes confounding from polygenicity in genome-wide association studies[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(3): 291-295.
- [18] Li J, Li S, Fei G. Potential correlation between tea intake and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a Mendelian randomization study[J]. *Neurodegener Dis*, 2024, 25(4): 810-820.
- [19] Hemani G, Zheng J, Elsworth B, *et al.* The MR-base platform supports systematic causal inference across the human phenome[J]. *Elife*, 2018, 7: e03095.
- [20] Burgess S, Scott RA, Timpson NJ, *et al.* Using published data in Mendelian randomization: a blueprint for efficient identification of causal risk factors[J]. *Eur J Epidemiol*, 2015, 30(7): 543-552.
- [21] Zhang Z, Kutty S, Peng W, *et al.* Causal association of depression, anxiety, cognitive performance, the brain cortical structure with pulmonary arterial hypertension: a Mendelian randomization study[J]. *J Affect Disord*, 2024, 356: 356-362.
- [22] Wu D, Yu L, Yang T, *et al.* The impacts of uncertainty stress on mental disorders of Chinese college students: evidence from a nationwide study[J]. *Front Psychol*, 2020, 11: 243.
- [23] 李婷婷, 韩琦, 杜巧荣. 基于父母的心理干预对治疗青少年抑郁障碍疗效的 Meta 分析[J]. *医学新知*, 2024, 34(10): 1140-1150.
- [24] Zheng W, Zhou YL, Wang CY, *et al.* Plasma BDNF concentrations and the antidepressant effects of six ketamine infusions in unipolar and bipolar depression[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10989.
- [25] Deyama S, Kondo M, Shimada S, *et al.* IGF-1 release in the medial prefrontal cortex mediates the rapid and sustained antidepressant-like actions of ketamine[J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12(1): 178.
- [26] 范小琳, 王鸿, 王琪, 等. 诺卡酮对轻度脑爆震伤大鼠抑郁样行为的缓解作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(6): 694-700.
- [27] 张克, 赵媚, 林文娟. 表观遗传修饰在应激诱发抑郁症中的作用[J]. *心理科学进展*, 2016, 24(12): 1882-1888.
- [28] Gelernter J, Sun N, Polimanti R, *et al.* Genome-wide association study of post-traumatic stress disorder reexperiencing symptoms in >165,000 US veterans[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(9): 1394-1401.
- [29] Choi S, Han KM, Won E, *et al.* Association of brain-derived neurotrophic factor DNA methylation and reduced white matter integrity in the anterior corona radiata in major depression[J]. *J Affect Disord*, 2015, 172: 74-80.
- [30] Mariani Wigley ILC, Mascheroni E, Peruzzo D, *et al.* Neuroimaging and DNA methylation: an innovative approach to study the effects of early life stress on developmental plasticity[J]. *Front Psychol*, 2021, 12: 672786.
- [31] Bakusic J, Schaufeli W, Claes S, *et al.* Stress, burnout and depression: a systematic review on DNA methylation mechanisms [J]. *J Psychosom Res*, 2017, 92: 34-44.
- [32] Ferrer A, Labad J, Salvat-Pujol N, *et al.* BDNF genetic variants and methylation: effects on cognition in major depressive disorder[J]. *Transl Psychiatry*, 2019, 9(1): 265.
- [33] Weder N, Zhang H, Jensen K, *et al.* Child abuse, depression, and methylation in genes involved with stress, neural plasticity, and brain circuitry[J]. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2014, 53(4): 417-424.e5.
- [34] Zhou A, Ancelin ML, Ritchie K, *et al.* Childhood adverse events and BDNF promoter methylation in later-life[J]. *Front Psychiatry*, 2023, 14: 1108485.
- [35] Baghaei A, Zoshk MY, Hosseini M, *et al.* Prominent genetic variants and epigenetic changes in post-traumatic stress disorder among combat veterans[J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 325.
- [36] Fachim HA, Corsi-Zuelli F, Loureiro CM, *et al.* Early-life stress effects on BDNF DNA methylation in first-episode psychosis and in rats reared in isolation[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 108: 110188.
- [37] You H, Lu B. Diverse functions of multiple Bdnf transcripts driven by distinct Bdnf promoters[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(4): 521.
- [38] Ravi M, Miller AH, Michopoulos V. The immunology of stress and

- the impact of inflammation on the brain and behavior[J]. *BJPsych Adv*, 2021, 27(Suppl 3): 158-165.
- [39] Dhar GA, Saha S, Mitra P, *et al*. DNA methylation and regulation of gene expression: guardian of our health[J]. *Nucleus (Calcutta)*, 2021, 64(3): 259-270.
- [40] Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(1): 24-32.
- [41] Li ZH, Li B, Zhang XY, *et al*. Neuropeptides and their roles in the cerebellum[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(4): 829.
- [42] Lamadé EK, Pedraz-Petrozzi B, Lindner O, *et al*. Stress during pregnancy and fetal serum BDNF in cord blood at birth[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2024, 165: 107035.
- [43] Lyons-Ruth K, Chasson M, Khoury J, *et al*. Reconsidering the nature of threat in infancy: integrating animal and human studies on neurobiological effects of infant stress[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2024, 163: 105746.
- [44] Jeanneteau FD, Lambert WM, Ismaili N, *et al*. BDNF and glucocorticoids regulate corticotrophin-releasing hormone (CRH) homeostasis in the hypothalamus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(4): 1305-1310.

(责任编辑: 蒋铭敏)

