

· 临床研究 ·

外周血中脑源性神经营养因子基因启动子区甲基化调控与帕金森病的相关性

赵艳青¹, 袁瑞¹, 王欣琪¹, 王丽珍^{2,3*}, 杨志甫^{1*}

(内蒙古科技大学包头医学院:¹ 第一附属医院神经内科,² 基础医学与法医学院病理教研室,³ 第一附属医院病理科, 内蒙古包头 014000)

【摘要】 目的 观察帕金森病(PD)患者外周血脑源性神经营养因子(BDNF)基因启动子区甲基化及其表达水平的改变,分析二者的相关性,从表观遗传调控的角度探讨PD的发生机制。**方法** 选择2020年9月至2023年10月于包头医学院第一附属医院就诊的54例PD患者(PD组)和51例同期健康体检人(对照组)为研究对象,采用甲基化特异性聚合酶链式反应(MS-PCR)检测外周血BDNF基因启动子区的甲基化状态;采用实时定量聚合酶链式反应(Q-PCR)测定外周血中BDNF mRNA表达水平。采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。根据数据类型,组间比较分别采用 t 检验或Mann-Whitney U 检验。采用Spearman秩相关分析BDNF基因启动子区甲基化水平与mRNA表达的相关性。采用Pearson相关分析BDNF mRNA表达水平与帕金森病综合评量表(UPDRS)总评分、UPDRS运动症状评分、UPDRS非运动症状评分的相关性。采用二元logistic回归模型分析PD发病的影响因素。**结果** PD组外周血BDNF启动子区甲基化率显著高于对照组,且中晚期PD患者外周血BDNF启动子区甲基化率高于早期PD患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。PD组患者外周血BDNF表达水平低于对照组,且中晚期PD患者外周血BDNF表达水平低于早期PD患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。PD组外周血BDNF mRNA表达水平与BDNF启动子区甲基化水平呈显著负相关($r=-0.928;P<0.001$),与UPDRS总评分、UPDRS运动症状评分、UPDRS非运动症状评分呈负相关($r=-0.461, -0.429, -0.298;P<0.05$)。二元logistic回归分析显示,BDNF启动子区甲基化状态是PD发病的一个危险因素($OR=3.887, 95\%CI\ 1.035\sim14.597;P=0.044$),甘油三酯是PD发病的保护因素($OR=0.392, 95\%CI\ 0.155\sim0.997;P=0.049$)。**结论** PD患者外周血BDNF启动子区呈异常高甲基化,BDNF基因mRNA表达下调,且两者存在负相关,提示BDNF启动子区异常高甲基化可能通过下调其表达而参与PD的发生发展。

【关键词】 帕金森病;表观遗传修饰;DNA甲基化;神经营养因子,脑源性

【中图分类号】 R742.5;R592

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2025.04.055

Correlation between methylation of peripheral brain derived neurotrophic factor gene promoter region and Parkinson's disease

Zhao Yanqing¹, Yuan Rui¹, Wang Xinqi¹, Wang Lizhen^{2,3*}, Yang Zhifu^{1*}

(¹Department of Neurology, First Affiliated Hospital, ²Department of Pathology, School of Basic Medicine and Forensic Medicine, ³Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014000, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

【Abstract】 Objective To observe the alterations in the methylation of brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene promoter region and its expression level in peripheral blood of Parkinson's disease (PD) patients, and analyze their correlation in order to explore the pathogenesis of PD from the perspective of epigenetic regulation. **Methods** A total of 54 PD patients (PD group) admitted to the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College from September 2020 to October 2023 were enrolled, and another 51 healthy individuals who taking physical examination in the hospital during same period served as control group. Methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) was applied to assess the methylation status of peripheral BDNF promoter, and quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-PCR) was conducted to determine the mRNA expression of BDNF in peripheral blood. SPSS statistics 20.0 was used for data analysis. Depending on data type, t test or Mann-Whitney U test was used for inter-group comparison. Spearman rank correlation analysis was employed to analyze the correlation between the methylation level of BDNF gene promoter region

收稿日期: 2024-03-06; 接受日期: 2024-04-23

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2021MS08053);内蒙古自治区卫生健康科技计划项目(202201422);包头医学院青年科技人才发展计划(BYJJ-DXK 2022042)

通信作者: 王丽珍, E-mail: wanglizhen1979@163.com; 杨志甫, E-mail: zhifuyang@126.com

and mRNA expression. Pearson correlation analysis was utilized to analyze the correlation of BDNF mRNA level with the total score, motor symptom score and non-motor symptom score of unified Parkinson's disease rating scale (UPDRS). Binary logistic regression model was built to identify the influencing factors for PD incidence. **Results** The methylation rate of peripheral BDNF promoter was significantly higher in the PD group than the control group, and the rate was also higher in the PD patients in mid-to-late stage than those in early stage ($P<0.05$). The PD patients exhibited significantly lower expression level of peripheral blood BDNF than the control group, and the level was notably lower in mid-to-late-stage PD patients than the early-stage PD patients ($P<0.05$). In PD group, the mRNA level of BDNF in peripheral blood was negatively correlated with its promoter methylation level ($r=-0.928$; $P<0.001$), and the total score, motor symptom score and non-motor symptom score of UPDRS ($r=-0.461$, -0.429 , -0.298 ; $P<0.05$). Binary logistic regression analysis showed that the methylation status of BDNF promoter was a risk factor for PD ($OR=3.887$, $95\%CI$ 1.035–14.597; $P=0.044$), and triglyceride was a protective factor for PD ($OR=0.392$, $95\%CI$ 0.155–0.997; $P=0.049$). **Conclusion** In PD patients, peripheral BDNF promoter is abnormally hypermethylated, its mRNA expression is down-regulated, and there is a negative correlation between the two indicators. It is suggested that abnormal promoter hypermethylation of BDNF may be involved in the occurrence and development of PD by down-regulating its expression.

【Key words】 Parkinson's disease; epigenetic modifications; DNA methylation; neurotrophic factor, brain derived

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2021MS08053), the Project of Health Science and Technology Plan of Inner Mongolia Autonomous Region (202201422), and the Youth Science and Technology Talent Development Plan of Baotou Medical College (BYJJ-DXK 2022042).

Corresponding author: Wang Lizhen, E-mail: wanglizhen1979@163.com; Yang Zhifu, E-mail: zhifuyang@126.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种以运动障碍为特征的慢性脑部疾病,病程长、致残率高,临床表现为典型的运动症状和广泛的非运动症状^[1]。PD的病理学特征主要包括黑质中多巴胺能神经元丢失和细胞内 α 突触核蛋白异常聚集成路易小体。目前,PD的病因尚不明确,多数研究认为PD是遗传因素和环境因素综合作用的结果,而表观遗传调控在其中充当重要的角色。DNA甲基化是基因表达调控最为广泛的表观遗传调控机制之一,是近年来PD等神经退行性疾病的研究热点^[2]。脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是一种具有神经再生和神经保护作用的神经营养因子,与调节突触可塑性和多巴胺神经元分化、存活有关,在神经退行性疾病和神经精神疾病中的作用备受学者们的关注^[3]。BDNF介导的神经营养不良可能与PD的病因、病程密切相关^[4]。研究表明,PD患者外周血BDNF表达明显下降,且与PD患者的认知功能、帕金森病综合评价量表(unified Parkinson's disease rating scale, UPDRS)、Hoehn-Yahr分期相关^[5,6]。BDNF基因启动子区存在富含胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤二核苷酸区域(即CpG岛),后者是其表达受DNA甲基化调控的结构基础;且外周血与脑组织中BDNF甲基化改变相一致^[7,8]。BDNF基因启动子区异常的甲基化调控与抑郁症、精神分裂症等疾病相关^[9]。但目前有关外周血BDNF基因甲基化调控与PD相关性的研究很少。因此,本研究通过观察PD患者外周血BDNF基因启动子区甲基化状态及其表达水平的改变,并分析二者之间的相关性,进而从BDNF基因甲基化调控的角度探讨PD的发病机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择2020年9月至2023年10月于包头医学院第一附属医院神经内科门诊或住院治疗的54例PD患者为PD组,年龄(68.17 ± 8.03)岁,病程1~14年,均为散发性PD患者。纳入标准:(1)符合《中国帕金森病的诊断标准(2016版)》中临床确诊PD的诊断标准^[10];(2)年龄50~80岁;(3)能配合完成临床量表评估。选择同一时期在本院体检的51例健康体检者为对照组,年龄50~80岁。排除标准:(1)帕金森叠加综合征、遗传性及继发性帕金森病综合征、特发性震颤;(2)恶性肿瘤、严重器官功能障碍(心脏、肝脏、肾脏);(3)痴呆及严重精神疾病;(4)药物或乙醇依赖。所有受试者均自愿参加并签署知情同意书,本研究经包头医学院第一附属医院医学伦理委员会审核批准(包医伦审2022第20号)。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集 由2名高年资神经病学专科医师对研究对象进行详细的病史采集及体格检查,包括丙氨酸氨基转移酶、门冬氨酸氨基转移酶、肌酐、尿酸、尿素、空腹血糖、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇、同型半胱氨酸等常规化验结果以及吸烟、饮酒史等临床资料。参照世界运动障碍病学会修订版帕金森病综合评价量表工作手册进行UPDRS评分和Hoehn-Yahr分期。

1.2.2 甲基化特异性聚合酶链式反应法检测 BDNF 基因启动子区甲基化状态 采集所有研究对象清晨空腹肘静脉血2 ml,将其置于乙二胺四乙酸二钠(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝管中

保存于-80℃备用,根据血基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取全血标本 DNA。检测 DNA 样本浓度用 Nano OD 和琼脂糖电泳。按 EZ DNAMethylation-Gold TM kit 修饰试剂盒说明书对 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰及纯化,将产物保存于-20℃备用。甲基化特异性聚合酶链式反应 (methylation specific polymerase chain reaction, MS-PCR) 反应体系:经亚硫酸氢钠修饰后的 DNA 2 μl 为模板,BDNF 甲基化特异性引物(brain derived neurotrophic factor-Methylation specific primers,BDNF-M)或非甲基化特异性引物 (brain derived neurotrophic factor-Unmethylation specific primers,BDNF-U) 0.3 μl、Taq DNA 聚合酶 0.5 μl、双蒸水 9.7 μl。本研究扩增使用降落式 PCR。将最终聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶进行电泳。观察记录拍照留存。BDNF 基因启动子区甲基化引物序列引用参考文献[11]。引物序列见表 1。

1.2.3 实时定量 PCR 法检测 BDNF mRNA 表达水平 采集所有研究对象清晨空腹肘静脉血 2 ml,用 RNAisoPLUS 提取外周血细胞总 RNA,以逆转录试剂盒合成互补脱氧核糖核酸为模板,BDNF 和内参基因 β-肌动蛋白 (β-actin) 引物与其混合,再与混合溶液进行实时定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, Q-PCR) 反应。Q-PCR 反应体系:荧光定量 PCR 混合溶液 10 μl;正向引物 (10 μmol/L) 0.4 μl;反向引物 (10 μmol/L) 0.4 μl;模板 DNA 1 μl;无菌超纯水 8.2 μl;经三步法扩增 40 个循环,溶解曲线阶段按照仪器默认设置。Q-PCR 反应条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 10 s;55℃退火 20 s;72℃延伸 20 s。分析 Q-PCR 结果:ΔCT = CT_{BDNF} - CT_{β-actin}, ΔΔCT = ΔCT_{PD} - ΔCT_{对照组}, 2^{-ΔΔCT} 描述 BDNF 基因的表达量。引物序列 β-actin 引用参考文献[12],BDNF 使用引物软件 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 设计。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primers used in the experiment

Primer	Sequence(5' to 3')	Product	
		size	method
BDNF-M-F	GTAGTTCCTGATGATGAGGAAGC	163 bp	MS-PCR
BDNF-M-R	AATATAAATTAACAACCCGATACG		
BDNF-U-F	GTAGTTCCTGATGATGAGGAAGTG	176 bp	MS-PCR
BDNF-U-R	TATAAATTAACAACCCCAATACACA		
BDNF-F	GCGAAGGTTTCTTACCTGGC	181 bp	Q-PCR
BDNF-R	TTACTGGGTCCTGGCACTGA		
β-action-F	GGGAAATCGTGCGTGACATTAAAG	274 bp	Q-PCR
β-action-R	TGTGTGGCGTACAGGCTTTTG		

BDNF: brain derived neurotrophic factor; M: methylation specific primers; F: forward primer; R: reverse primer; U: unmethylation specific primers; MS-PCR: methylation specific PCR; Q-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction.

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;不符合正态分布的计量资料使用中位数 (四分位数间距) [$M(Q_1, Q_3)$] 表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验;方差不齐的多组间均数比较采用 Kruskal-wallis 检验。计数资料以例数 (百分率) 表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 Spearman 秩相关分析 BDNF 基因启动子区甲基化水平与 mRNA 表达的相关性,采用 Pearson 相关分析 BDNF mRNA 表达水平与 UPDRS 总评分、UPDRS 运动症状评分、UPDRS 非运动症状评分的相关性。采用二元 logistic 回归模型分析 PD 发病的影响因素。使用 GraphPad Prism9 软件作图。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD 组与对照组基线资料比较

PD 组与对照组甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、胆固醇 (cholesterol, CHO) 水平比较,差异有统计学意义 (*P* < 0.05; 表 2)。PD 组患者,病程为 (3.48±3.01) 年,其中 37 例 (68.5%) 接受抗帕金森药物治疗,17 例 (31.5%) 未接受药物治疗。患者入院时 UPDRS 总评分为 (55.42±19.64) 分,其中 UPDRS 运动症状评分为 (29.52±10.99) 分、UPDRS 非运动症状评分为 (10.94±4.52)。根据 Hoehn-Yahr 分期将 PD 组患者分为两组,早期组 20 例 (37.0%),中晚期组 34 例 (63.0%)。

2.2 外周血 BDNF 启动子区甲基化状态

BDNF 启动子区存在三种甲基化状态,Ⅰ:完全甲基化标本,即仅经 BDNF-M 扩增存在目的条带;Ⅱ:部分甲基化标本,即经 BDNF-M 和 BDNF-U 扩增均存在目的条带;Ⅲ:完全非甲基化标本,即仅经 BDNF-U 扩增存在目的条带 (图 1)。统计各组甲基化率时,完全甲基化与部分甲基化标本均判定为甲基化状态,完全非甲基化标本判定为非甲基化状态。

2.3 PD 组与对照组外周血 BDNF 启动子区甲基化率的比较

54 例 PD 患者中,35 例 BDNF 启动子区发生甲基化 (11 例完全甲基化,24 例部分甲基化);51 例对照中,18 例 BDNF 启动子区发生甲基化 (4 例完全甲基化,14 例部分甲基化),PD 组外周血 BDNF 启动子区甲基化率 (64.8%) 显著高于对照组 (35.3%),差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.144, P = 0.002$)。

表 2 PD 组与对照组基线资料比较

Table 2 Comparison of baseline data between PD group and control group ($\bar{x}\pm s$)

Item	PD group(<i>n</i> = 54)	Control group(<i>n</i> = 51)	<i>t</i> / χ^2 / <i>Z</i>	<i>P</i> value
Age(years, $\bar{x}\pm s$)	68. 17±8. 03	66. 10±6. 48	-1. 448	0. 151
Gender(male/female, <i>n</i>)	32/22	23/28	2. 109	0. 146
FBG(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	5. 14±0. 62	5. 36±0. 82	1. 662	0. 108
TG(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	1. 23±0. 49	1. 47±0. 57	2. 291	0. 024
HDL-C(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	1. 28±0. 31	1. 26±0. 28	-0. 225	0. 822
LDL-C(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	2. 70±0. 82	3. 15±0. 79	2. 867	0. 005
CHO(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	4. 24±0. 90	4. 70±0. 88	2. 623	0. 010
ALT[U/L, <i>M</i> (<i>Q</i> ₁ , <i>Q</i> ₃)]	19. 00(12. 75, 26. 00)	19. 00(14. 00, 27. 00)	-1. 120	0. 263
AST[U/L, <i>M</i> (<i>Q</i> ₁ , <i>Q</i> ₃)]	19. 00(14. 00, 24. 00)	19. 00(15. 00, 25. 00)	-0. 578	0. 563
Cr(μ mol/L, $\bar{x}\pm s$)	73. 91±15. 84	72. 08±12. 40	-0. 656	0. 513
UREA(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	6. 07±1. 86	5. 53±1. 54	-1. 599	0. 113
UA(μ mol/L, $\bar{x}\pm s$)	309. 24±78. 55	320. 96±74. 70	0. 783	0. 436
Smoking[<i>n</i> (%)]	17(31. 5)	18(35. 3)	0. 172	0. 679
Alcohol drinking[<i>n</i> (%)]	17(31. 5)	11(21. 6)	1. 318	0. 251

PD: Parkinson's disease; FBG: fasting blood glucose; TG: triglyceride; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; CHO: cholesterol; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; Cr: creatinine; UA: uric acid.

根据 Hoehn-Yahr 分级结果将 PD 组分为早期 PD 组(1~2.5 级)和中晚期 PD 组(3~5 级)。20 例早期 PD 患者中,9 例 BDNF 启动子区发生甲基化(2 例完全甲基化,7 例部分甲基化);34 例中晚期 PD 患者中,26 例 BDNF 启动子区发生甲基化(9 例完全甲基化,17 例部分甲基化),中晚期 PD 组(76.5%)外周血 BDNF 启动子区甲基化率高于早期 PD 组(45.0%),差异有统计学意义($\chi^2 = 5.469$, $P=0.019$)。

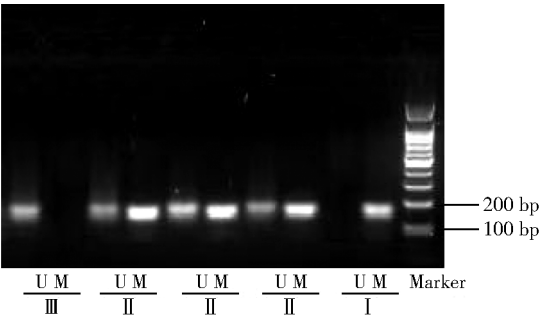


图 1 MS-PCR 法检测 BDNF 基因启动子区甲基化状态
琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of methylation status of BDNF gene promoter region detected by MS-PCR
MS-PCR: methylation specific polymerase chain reaction; BDNF: brain derived neurotrophic factor; U: non-methylation specific primers-primers; M: methylation specific primers.

2.4 PD 组与对照组外周血 BDNF mRNA 表达水平比较

Q-PCR 检测各组外周血 BDNF mRNA 表达水平,结果显示,PD 患者外周血 BDNF 表达水平低于对照

组[(0.86±0.47)和(1.15±0.65)],差异有统计学意义($t=2.592$, $P=0.011$);中晚期 PD 组患者外周血 BDNF 表达水平低于早期 PD 组患者[(0.76±0.46)和(1.05±0.43)],差异有统计学意义($t=2.292$, $P=0.026$)。

2.5 PD 患者外周血中 BDNF 启动子区甲基化状态与其 mRNA 表达水平的相关性

PD 患者中,根据外周血 BDNF 启动子区甲基化状态将其分为 BDNF 完全甲基化组、部分甲基化组和完全非甲基化组,各组外周血 BDNF mRNA 表达水平分别为(0.30±0.09)、(0.72±0.22)和(1.38±0.29),三组比较,差异有统计学意义($Z=45.610$, $P<0.001$)。Spearman 秩相关性分析显示,PD 组 BDNF 基因启动子区甲基化状态与其 mRNA 表达水平之间存在显著负相关($r=-0.928$; $P<0.001$)。

2.6 PD 患者外周血 BDNF 基因 mRNA 表达水平与 UPDRS 评分的相关性

Pearman 相关分析显示,PD 患者外周血 BDNF mRNA 表达水平与其 UPDRS 总评分、UPDRS 运动症状评分、UPDRS 非运动症状评分存在负相关($r=-0.461$, -0.429 , -0.298 ; $P<0.05$;图 2)。

2.7 二元 logistic 回归分析 PD 发生的影响因素

以是否患 PD 为因变量,以性别、年龄、TG、LDL-C、CHO、外周血 BDNF 启动子区甲基化状态及其 mRNA 表达水平等因素为自变量,进行二元 logistic 回归分析。结果显示,BDNF 基因甲基化状态是 PD 发病的危险因素,TG 是 PD 发病的保护因素(表 3)。

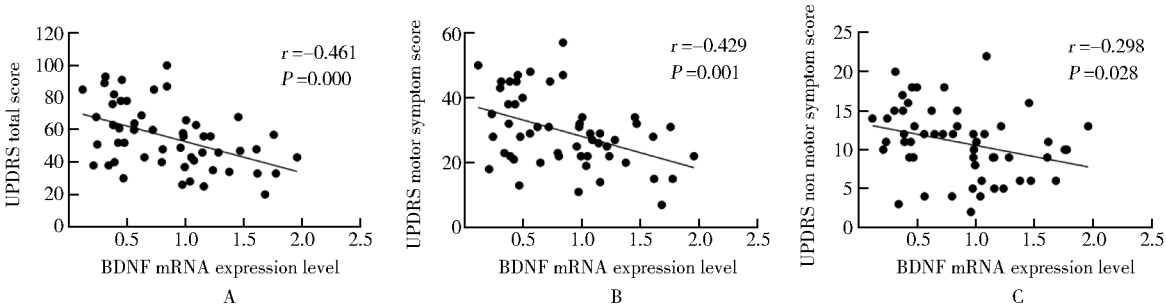


图2 PD患者外周血BDNF基因mRNA表达水平与UPDRS评分的相关性

Figure 2 Correlation between mRNA expression level of BDNF gene in peripheral blood and UPDRS scores of PD patients

A: BDNF mRNA expression level and UPDRS total score; B: BDNF mRNA expression level and UPDRS motor symptom score; C: BDNF mRNA expression level and UPDRS non-motor symptom score. PD: Parkinson’s disease; BDNF: brain derived neurotrophic factor; UPDRS: unified Parkinson’s disease rating scale.

表3 二元logistic回归分析PD发生的影响因素

Table 3 Binary logistic regression analysis of influencing factors of PD

Factor	Variable assignment	Wald χ^2	OR	95%CI	P value
Gender	Female = 0, Male = 1	0.576	1.400	0.587–3.339	0.448
Age	Continuous variable	0.211	1.015	0.953–1.080	0.646
Triglyceride	Continuous variable	3.869	0.392	0.155–0.997	0.049
Low-density lipoprotein cholesterol	Continuous variable	1.172	0.559	0.195–1.601	0.279
Cholesterol	Continuous variable	0.122	0.842	0.321–2.209	0.727
BDNF methylation status	Demethylation = 0, Methylation = 1	4.044	3.887	1.035–14.597	0.044
Expression of BDNF mRNA	Continuous variable	0.170	0.783	0.245–2.499	0.680

PD: Parkinson’s disease; BDNF: brain derived neurotrophic factor.

3 讨论

BDNF 基因位于 11p13 染色体上,由 11 个外显子、9 个启动子组成,其启动子的表观遗传调控在具有功能活性依赖效应的 BDNF 基因表达中发挥作用^[13]。BDNF 广泛表达于中枢神经系统,通过影响细胞分化,神经元发育、生长和存活,神经发生,突触发生和突触可塑性在神经系统发育中发挥关键作用^[3]。

DNA 甲基化是最重要的表观调控方式,主要发生在胞嘧啶(C)–鸟嘌呤(G)二核苷酸序列的第 5 碳原子上,需 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化。研究表明,DNA 甲基化能够通过影响染色质结构,DNA 构象、稳定性以及与蛋白相互作用方式等机制调控基因的转录表达。当 DNA 处于异常高甲基化状态时,基因表达受抑制;反之,促进基因表达^[14]。BDNF 基因是表观遗传机制中研究最广泛的候选基因之一。Zheng 等^[15]研究表明,产前应激大鼠脑组织中 DNMT1 和 DNMT3b 水平的升高可导致 BDNF 基因高甲基化,进而下调其蛋白表达。BDNF 启动子区异常甲基

化参与神经、精神疾病的发展^[16],并与药物对疾病的治疗效果相关^[17]。Ceccarini 等^[18]采用 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)处理人神经母细胞瘤细胞系(SH-SY5Y)的方法制作 PD 细胞模型,经研究发现,PD 细胞模型 BDNF 启动子区呈异常高甲基化,其蛋白表达明显下调。但 BDNF 启动子区甲基化调控与 PD 相关性的体内研究目前仍未见报道。本研究结果显示,PD 患者外周血 BDNF 基因启动子区甲基化率显著高于对照组,且与 BDNF mRNA 表达水平呈负相关,与 Ceccarini 体外研究结果的规律相一致。进一步经二元 logistic 回归分析发现,BDNF 启动子区的甲基化状态是 PD 发病的危险因素。

研究表明,BDNF 基因表达水平降低参与 PD、阿尔茨海默病、抑郁症和自闭症等神经系统疾病的发生^[3]。大量研究表明,无论是在 PD 患者脑组织还是外周血中,BDNF 表达水平均下降^[3,5],且预测外周血 BDNF 表达水平有望成为早期 PD 诊断的生物标志物^[19]。BDNF 参与 PD 的病理生理机制不明,可能与导致 α -突触蛋白过表达和多巴胺神经元变性死亡有关^[20]。本研究结果显示,PD 患者外周

血 BDNF mRNA 表达水平低于对照组,与上述研究结果相似。本研究中,Pearson 相关性分析结果显示,BDNF 基因 mRNA 表达水平与 PD 患者的 UPDRS 总评分、UPDRS 运动症状及 UPDRS 非运动症状均存在负相关,提示外周血 BDNF mRNA 表达水平与 PD 患者的临床表现存在相关性。这与 Huang 等^[21]研究结论相一致,即 PD 合并抑郁患者外周血 BDNF 水平与其 UPDRS III 呈负相关。进一步根据 Hoehn-Yahr 分期对 PD 患者进行分组,发现外周血 BDNF 启动子区甲基化率及其 mRNA 表达水平随着 PD 患者病情的进展而呈动态演变,二者有望成为评价 PD 患者临床症状严重程度、判断其预后的潜在临床标志物。

综上所述,PD 患者外周血 BDNF 启动子区呈异常高甲基化,BDNF 基因 mRNA 表达下调,两者存在负相关,且随着 PD 患者病程的进展呈动态演变;PD 患者外周血 BDNF mRNA 表达水平与其临床症状评分存在负相关;BDNF 启动子区的甲基化状态是 PD 发病的危险因素。进一步推测,BDNF 启动子区异常高甲基化可能通过下调其转录表达而参与 PD 的发生发展,有望成为 PD 疾病的预测因子。本研究从外周血 BDNF 甲基化及 mRNA 表达水平的角度分析 PD 的发生与发展,为 PD 发病机制的研究、早期诊断生物标志物的发掘提供新的思路。

【参考文献】

- [1] Costa HN, Esteves AR, Empadinhas N, *et al.* Parkinson's disease: a multisystem disorder[J]. *Neurosci Bull*, 2023, 39(1): 113–124. DOI: 10.1007/s12264-022-00934-6.
- [2] Voisin S, Jacques M, Landen S, *et al.* Meta-analysis of genome-wide DNA methylation and integrative omics of age in human skeletal muscle[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2021, 12(4): 1064–1078. DOI: 10.1002/jcs.m.12741.
- [3] Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, *et al.* BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1170. DOI: 10.3390/ijms21031170.
- [4] 吴擎,俞鸣,刘红艳. 血清 BDNF, Val66Met 基因多态性和早期帕金森病临床症状的相关性[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2022, 39(5): 425–429. DOI: 10.19845/j.cnki.zfysjbjzz.2022.0108.
- [5] Martínez-Iglesias O, Naidoo V, Cacabelos N, *et al.* Epigenetic biomarkers as diagnostic tools for neurodegenerative disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 13. DOI: 10.3390/ijms23010013.
- [6] Huang Y, Huang C, Yun W. Peripheral BDNF/TrkB protein expression is decreased in Parkinson's disease but not in essential tremor[J]. *J Clin Neurosci*, 2019, 63: 176–181. DOI: 10.1016/j.jocn.2019.01.017.
- [7] Lacroix A, Ramoz N, Girard M, *et al.* BDNF CpG methylation and serum levels covary during alcohol withdrawal in patients with alcohol use disorder: a pilot study[J]. *World J Biol Psychiatry*, 2023, 24(9): 854–859. DOI: 10.1080/15622975.2023.2242924.
- [8] Rodríguez-Carrillo A, Verheyen VJ, Van Nuijs ALN, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor (BDNF): an effect biomarker of neurodevelopment in human biomonitoring programs[J]. *Front Toxicol*, 2024, 5: 1319788. DOI: 10.3389/ftox.2023.1319788.
- [9] Treble-Barna A, Heinsberg LW, Stec Z, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) epigenomic modifications and brain-related phenotypes in humans: a systematic review[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2023, 147: 105078. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2023.105078.
- [10] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组,中国医师协会神经内科医师分会帕金森病及运动障碍专业. 中国帕金森病的诊断标准(2016版)[J]. *中华神经科杂志*, 2016, 49(4): 268–271. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2016.04.002.
- [11] Çöpoğlu ÜS, igci M, Bozgeyik E, *et al.* DNA methylation of BDNF gene in schizophrenia[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 397–402. DOI: 10.12659/msm.895896.
- [12] Byun HM, Barrow TM. Analysis of pollutant-induced changes in mitochondrial DNA methylation[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1265: 271–283. DOI: 10.1007/978-1-4939-2288-8_19.
- [13] Geng X, Zou Y, Li J, *et al.* BDNF alleviates Parkinson's disease by promoting STAT3 phosphorylation and regulating neuronal autophagy[J]. *Cell Tissue Res*, 2023, 393(3): 455–470. DOI: 10.1007/s00441-023-03806-1.
- [14] Li Y, Chen X, Lu C. The interplay between DNA and histone methylation: molecular mechanisms and disease implications[J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(5): e51803. DOI: 10.15252/embr.202051803.
- [15] Zheng Y, Fan W, Zhang X, *et al.* Gestational stress induces depressive-like and anxiety-like phenotypes through epigenetic regulation of BDNF expression in offspring hippocampus[J]. *Epigenetics*, 2016, 11(2): 150–162. DOI: 10.1080/15592294.2016.1146850.
- [16] Bandeira IC, Giombelli L, Werlang IC, *et al.* Methylation of BDNF and SLC6A4 gene promoters in Brazilian patients with temporal lobe epilepsy presenting or not psychiatric comorbidities[J]. *Front Integr Neurosci*, 2021, 15: 764742. DOI: 10.3389/fnint.2021.764742.
- [17] Pathak H, Borchert A, Garaali S, *et al.* BDNF exon IV promoter methylation and antidepressant action: a complex interplay[J]. *Clin Epigenetics*, 2022, 14(1): 187. DOI: 10.1186/s13148-022-01415-3.
- [18] Ceccarini MR, Ceccarelli V, Codini M, *et al.* The polyunsaturated fatty acid EPA, but not DHA, enhances neurotrophic factor expression through epigenetic mechanisms and protects against Parkinsonian neuronal cell death[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 16176. DOI: 10.3390/ijms232416176.
- [19] Yi X, Yang Y. Serum mBDNF and ProBDNF expression levels as diagnosis clue for early stage Parkinson's disease[J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 680765. DOI: 10.3389/fneur.2021.680765.
- [20] Azman KF, Zakaria R. Recent advances on the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in neurodegenerative diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6827. DOI: 10.3390/ijms23126827.
- [21] Huang Y, Huang C, Zhang Q, *et al.* Serum BDNF discriminates Parkinson's disease patients with depression from without depression and reflect motor severity and gender differences[J]. *J Neurol*, 2021, 268(4): 1411–1418. DOI: 10.1007/s00415-020-10299-3.