

上海交通大学学位论文

**LEP及GHSR基因甲基化联合环境因素对神经性厌食临床症状的影响**

**姓 名： 连成**

**学 号：** 315714910005

**导 师：陈珏**

**学 院**： **医学院**

**学科/专业名称：临床医学（精神病与精神卫生学）**

**学位类型：专业学位**

**申请学位层次：博士（八年制）**

**2023年2月**

A Dissertation Submitted to

Shanghai Jiao Tong University for Doctoral Degree

DISSERTATION TEMPLATE FOR MASTER DEGREE OF ENGINEERING IN

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

**Author: CHENG LIAN**

**Supervisor: JUE CHEN**

School of Medicine

Shanghai Jiao Tong University

Shanghai, P.R.China

February 21th, 2023

**上海交通大学**

**学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

**上海交通大学**

**学位论文使用授权书**

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。

本学位论文属于□**公开论文**

□**内部论文**，□1年/□2年/□3年 解密后适用本授权书。

□**秘密论文**， 年（不超过10年）解密后适用本授权书。

□**机密论文**， 年（不超过20年）解密后适用本授权书。

（请在以上方框内打“**√**”）

学位论文作者签名： 指导教师签名：

日期： 年 月 日 日期： 年 月 日

# 摘 要

【研究目的】：

1. 明确未经治疗的女性AN（Anorexia Nervosa，AN）患者GHSR及LEP基因甲基化的特点及与临床症状之间的关系；
2. 探究AN患者的负性生活事件对LEP及GHSR基因甲基化的影响
3. 探索AN患者的负性生活事件对AN患者临床症状的影响

【内容与方法】：本研究共纳入符合入排标准的未治疗AN女性患者（n=100）及匹配的健康对照（Healthy controls，HC,n=43），对所有被试进行LEP及GHSR基因的甲基化水平及临床症状评估，并对被试的负性生活事件进行评估。

LEP及GHSR基因的甲基化的甲基化亚硫酸氢盐扩增子测序（Bisulfite Amplicon Sequencing， BSAS），通过BMI、EAT26及EDE-Q6.0量表对进食障碍相关临床症状进行评估，通过青少年生活事件量表（ASLEC）对负性生活事件进行评估。

结果：

1. 未治疗AN患者LEP基因启动子区域甲基化特点对临床症状的影响：
2. 未治疗的AN患者LEP基因启动子区域表现为低甲基化状态，CpG2，CpG6,CpG7的甲基化水平显著低于于对照组（P值均小于0.05），而GHSR基因的CpG11位点的甲基化水平显著高于对照组(P值<0.05)；
3. AN患者的LEP基因CpG2位点的甲基化水平与EDE-Q6.0量表总分有显著负相关（r=-0.187，p=0.024），GHSR基因CpG11位点的甲基化水平与AN患者的EDE-Q6.0呈显著正相关（r=0.218, p=0.037），CpG12位点的甲基化水平与AN患者的EDE-Q6.0呈显著负相关（r=-0.204, p=0.019）。
4. 负性生活事件对AN患者临床症状的影响：
5. AN患者的LEP基因的CpG2甲基化水平与健康适应因子与得分有显著负相关（r=-2.05，p=0.039），CpG3，CpG4均与丧失因子得分正相关（r=-0.175，p=0.044；r=-0.180，p=0.037），GHSR基因的CpG10甲基化水平与丧失因子与得分正相关（r=0.186，p=0.024）
6. 综合分析健康适应因子分与GHSR基因的CpG11位点、LEP基因的CpG2位点甲基化水平对AN患者症状严重程度的影响，健康适应因子与EDE-Q总分存在正相关趋势（p=0.065），LEP基因CpG2位点的甲基化水平与EDE-Q总分负相关（p=0.011），GHSR基因CpG11位点的甲基化水平与EDE-Q总分正相关（p=0.004）。。

结论：1 GHSR基因及LEP基因甲基化于AN患者临床症状的产生相关， AN患者的GHSR及LEP基因为低甲基化水平；2 负性生活事件与AN患者临床症状的严重程度有关，与GHSR基因及LEP基因甲基化水平相关。3.GHSR基因及LEP基因甲基化水平与负性生活事件共同影响AN患者的临床症状。

**关键词：**神经性厌食；进食障碍；DNA甲基化；青少年生活事件量表

**目 录**

[摘 要 I](#_Toc127773979)

[第一章 绪论 1](#_Toc127773980)

[1. 1引言 1](#_Toc127773981)

[1.2食欲调节异常在AN发病中的作用 1](#_Toc127773982)

[1.2.1食欲调节紊乱对AN的影响 1](#_Toc127773983)

[1.2.2 ghrelin与leptin的食欲调节机制 2](#_Toc127773984)

[1.2.3 AN的遗传学研究 4](#_Toc127773985)

[1.3 AN的基因甲基化研究 5](#_Toc127773986)

[1,4 AN的发病风险及环境因素 7](#_Toc127773987)

[1.4.1不良家庭环境与对AN的影响 8](#_Toc127773988)

[1.4.2 负性生活事件对AN的影响 8](#_Toc127773989)

[1.4.3 环境因素对甲基化的影响 8](#_Toc127773990)

[第二章 研究方法及对象 11](#_Toc127773991)

[2.1 研究对象和流程 11](#_Toc127773992)

[2.1.1研究对象 11](#_Toc127773993)

[2.1.2 研究流程 12](#_Toc127773994)

[2.2 研究方法 13](#_Toc127773995)

[2.2.1临床评估工具 13](#_Toc127773996)

[2.2.2实验室检测 14](#_Toc127773997)

[2.2.4实验仪器 21](#_Toc127773998)

[2.2.5实验试剂 21](#_Toc127773999)

[2.2.6软件与网络资源 21](#_Toc127774000)

[2.3 统计分析 22](#_Toc127774001)

[2.3.1 一般资料及心理量表评估比较 22](#_Toc127774002)

[2.3.2 LEP及GHSR基因启动子区域的DNA甲基化水平比较 22](#_Toc127774003)

[第三章 研究结果 23](#_Toc127774004)

[3.1一般人口学资料及心理量表特征评估 23](#_Toc127774005)

[3.1.1 AN患者与健康对照组人口学特征及心理量表得分比较 23](#_Toc127774006)

[3.2 LEP及GHSR基因甲基化结果 25](#_Toc127774007)

[3.2.1 AN患者与健康对照组基因甲基化结果 25](#_Toc127774008)

[3.2.2不同亚型AN患者的LEP及GHSR基因启动子区域DNA甲基化特点 26](#_Toc127774009)

[3.2.3 LEP及GHSR基因启动子区域DNA甲基化与AN患者的临床症状分析 27](#_Toc127774010)

[3.3负性生活事件对AN患者LEP及GHSR基因启动子区域甲基化水平及临床症状的影响 28](#_Toc127774011)

[3.3.1负性生活事件对AN患者LEP及GHSR基因甲基化水平的影响 28](#_Toc127774012)

[3.3.2 AN和HC组负性生活事件评估比较 29](#_Toc127774013)

[3.3.2 负性生活事件对AN患者临床症状的影响 29](#_Toc127774014)

[第四章 讨论 30](#_Toc127774015)

[4.1 AN患者的LEP及GHSR基因启动子区甲基化水平特点 30](#_Toc127774016)

[4.2.AN患者的LEP及GHSR基因启动子区甲基化水平临床症状的关系 32](#_Toc127774017)

[4.3负性生活事件对AN的影响 32](#_Toc127774018)

[4.4. 创新性与局限性 33](#_Toc127774019)

[4.1 特色与创新 33](#_Toc127774020)

[4.2 研究不足与今后工作方向 34](#_Toc127774021)

[第五章 总结 34](#_Toc127774022)

[参 考 文 献 36](#_Toc127774023)

# 第一章 绪论

## 1. 1引言

神经性厌食（Anorexia Nervosa，AN），即厌食症，是以患者有意严格限制进食，使体重明显下降并低于正常水平所导致的身体功能受损为主要特征的一类进食障碍[1]。美国《精神疾病诊断与统计手册第5版》的诊断标准中，依据患者是否存在无规律的暴食-清除行为将神经性厌食分为限制型（restricting type，AN-R）及暴食-清除型（binge/purging,type，AN-BP）[2]。AN病程迁延，病死率高，是精神疾病中致死率最高、疾病负担最终的疾病之一。AN常导致躯体并发症，涉及各个系统器官；AN女性较正常女性社会适应更差、社交、工作、休闲活动受限，难以胜任自己的社会角色，同时也造成了沉重的社会负担。自上世纪90年代以来，随着经济的发展及文化的融合，“以瘦为美”的思潮逐渐蔓延，我国的AN患者患病率呈现逐年增加趋势，AN已成为危害我国年轻女性健康和生活的重大精神障碍之一。

AN的起病因素复杂，如生物、心理及社会因素等，目前已有的研究结果并未完全明确AN的发病机制。AN具有显著遗传性及高聚集性[3]，目前相关研究普遍证实AN为遗传因素及环境因素共同导致。遗传因素是AN的“内因”，而环境因素则是“外因”。遗传因素和环境因素的相互作用共同导致了AN的临床症状。

## 1.2食欲调节异常在AN发病中的作用

### 1.2.1食欲调节紊乱对AN的影响

既往研究发现由于食欲调节的紊乱导致的低能量摄入及低体重及激素异常与AN患者的临床症状的产生密切相关。近几十年来，国内外大量学者致力于探索AN发病的精神病理学机制，其中食欲调节的机制已经逐渐清晰。食欲调节系统的稳态由外周激素及中枢神经共同维持。胃肠道、肝脏等外周器官可以监测体内营养状况及进食状况释放调节食欲的细胞因子如胆囊收缩素、肽 YY等、胃饥饿素等。外周激素可通过迷走神经或直接作用于中枢的受体发挥调节食欲的生理作用。下丘脑弓状核（Arcuate nucleus,ARC）是食欲调节网络的重要中枢，ARC神经元表达多种外周激素的受体，接受外周激素的化学信号并进一步上传至腹侧被盖区、杏仁核等部位，通过对食欲的产生及进食行为的调节使机体保持内环境稳态。而外周食欲激素的紊乱是导致AN发病的重要机制。

### 1.2.2 ghrelin与leptin的食欲调节机制

Ghrelin是胃肠道分泌的一种神经肽，除具有内分泌和食欲调节作用外，在中枢神经、心血管、胃肠道、生殖和免疫系统的病变中也发挥着重要作用。ghrelin的前体蛋白主要由胃黏膜内分泌细胞(主要为P/D1细胞)合成并分泌，在外周循环中通过对自身的乙酰化转化有生理活性的ghrelin。胃饥饿素可透过血脑屏障，直接结合丘脑ARC中的特异性受体，并增加NPY和AGRP神经元的兴奋性，从而产生对食欲的促进作用。胃饥饿素促进食欲的另一种途径是通过迷走神经和脑神经核的上升神经网络，最终到达下丘脑并产生饥饿感，增加进食行为并调节体内的糖代谢[4]。除下丘脑外ghrelin还通过海马体、杏仁核、腹侧被盖区（ventral tegmental area， VTA）等下丘脑外区域的多巴胺能神经元诱导进食欣快感[5]，并且通过促进胃排空及胃酸分泌进一步调节进食。当进食的不足导致体内脂肪或血糖含量下降时ghrelin可通过促进肝细胞自噬作用促进糖异生增加血糖水平。胃饥饿素是机体在长期的低热量摄入的情况下维持体内血糖水平，以确保体内重要器官的能量供应，在严重疾病或重度营养不良的情况下对维持机体正常生命活动具有重要作用。此外，ghrelin还具有促进生长激素分泌、增强胃肠道蠕动、增加胃酸分泌、促进胃排空和小肠转运等功能。

Leptin是由白色脂肪组织分泌的多肽类激素激素。瘦素的作用与多个组织器官，包括肝脏、肾脏、骨骼肌及下丘脑等部分均有瘦素受体分布。瘦素可作用于白色脂肪组织增加葡萄糖摄取及利用，也可作用于小肠、肝脏、骨骼肌等器官调节血糖的摄取及释放，以维持体内血糖的平衡。瘦素通过作用于迷走神经增加餐后GLP-1、CCK等抑制食欲激素的释放以调节进食的平衡。瘦素也可直接作用于弓状核区域特异性受体并影响POMC的转录[6]，其转录产物与黑皮质素受体（MCR）结合激活饱腹感相关神经元，并导致食欲的抑制。此外，瘦素也通过抑制神经元中的神经肽Y(Neuropeptide Y，NPY) / 刺鼠相关蛋白(Agouti-Related Protein ,AgRP)的合成，降低AgRP对MCR的激动作用，从而导致食欲的下降。瘦素同样参与奖赏通路抑制进食[7]。瘦素也直接提高交感神经兴奋性并促进脂肪组织分解，以维持体内脂代谢稳定。leptin及ghrelin分别导致食欲的下降及上升，两者之间的动态平衡对进食行为的稳定及机内环境稳态具有重要意义。

既往研究表明，AN患者与健康人群的血浆ghrelin及leptin水平有显著差异，一项研究发现AN女性患者的血清瘦素水平比同龄人下降71%。且外周循环leptin水平与AN患者的体脂率及BMI相关。本课题组既往研究也发现了AN患者较健康人群呈现低水平leptin。而在AN患者的康复阶段，循环leptin水平随着进食和体重恢复而增加，但依然低于健康人群。此外血浆leptin水平与AN患者的抑郁情绪及认知失调症状相关。一项家系研究表明，婴儿脐带血leptin基因甲基化水平与母亲孕期的营养、生活习惯、分娩方式及母亲leptin基因甲基化水平相关[8]。另一项对孕期环境因素对婴儿leptin甲基化影响也得到了类似的结果[9]。以上研究结果表明，环境因素及个体健康水平对leptin的表达具有重要影响。

血浆ghrelin及leptin的异常是AN发生发展的影重要响因素[10]。相比于健康人群，AN患者的血浆ghrelin显著上升，而在治疗期间随进食行为的规律及体重的恢复逐渐降低，其降低程度与临床症状的严重程度及BMI之间呈现显著相关性，低水平ghrelin的AN患者康复时间短于高水平ghrelin患者。与ghrelin想反，AN患者的血浆leptin水平下降，同样AN患者的低水平leptin则会随病情的好转逐渐恢复至正常。血浆的低瘦素水平导致大脑的边缘系统激活下降，与AN患者的抑郁症状相关，瘦素治疗也被证实可缓解AN患者的抑郁症状，并且在一定程度促进进食行为。以上研究表明Ghrelin及leptin的相互作用是导致AN发生发展的重要因素。

Ghrelin及leptin的表达除了受营养状况、

### 1.2.3 AN的遗传学研究

复习文献发现，既往的多项家系研究[11, 12]、双生子研究[3, 13]及候选基因研究[14]证实AN是一种遗传度很高的精神疾病，近年来针对AN遗传学研究发现了影响AN临床症状的相关基因。部分也是综合AN的分子遗传学研究发现，易感基因及相关单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）的研究位点也多集中在食欲调节系统和脂代谢系统。分子遗传学研究中，ghrelin系统相关的研究集中于ghrelin受体（growth hormone secretagogue receptor,GHSR）基因。GHSR基因位于染色体3q26区域，编码产物GHS-R1a为7跨膜的G蛋白偶联受体。该基因由2个由1个内含子隔开的外显子组成（图3a），表达产物有GHS-R1a和GHS-R1b两种形式。GHS-R1a是GHSR的功能活性和信号转导形式, 而GHS-R1b保留了内含子，缺乏高亲和力的配体结合和信号转导活性，不作为 ghrelin 的受体发挥作用，可能起到减弱GHS-R1a亚型活性的作用。GHS-R1a受体在下丘脑和垂体前叶均有表达，这与其调节生长激素释放的作用一致, 同时其在胃肠道、甲状腺、胰腺、心肌等部位也有表达[15]。GHS-R1a的激活可促进生长激素的释放，既往动物研究证明， 低体重小鼠常伴随GHS-R1a的功能异常，生理活性下降，并伴随进食减少，予以GHS-R1a激动剂治疗后则可恢复正常进食行为。分子生化研究中，直接针对AN患者GHS-R1a功能的临床研究较少，但多数研究均发现AN患者的生长激素水平下降，这表明AN患者的GHS-R1a的生理活性低于健康人群。

国外有研究团队发现该基因启动子区域的rs509030G/C基因多态性与胰岛素抵抗及代谢综合征相关，国内的一项研究发现GHSR基因启动子中的A/A基因型（rs2922126）并与的BMI及代谢综合征的风险相关[16]。AN患者的GHSR基因的甲基化研究发现[17]，AN患者的GHSR基因甲基化水平高于健康人群及从AN中恢复的患者，并与AN临床症状（EDI量表总分）之间呈现相关性。之前的研究表明，AN患者 的GHSR基因启动子区域的甲基化水平及血浆ghrelin水平高于健康人群及AN康复人群，而GHSR基因启动子区域高甲基化会降低mRNA水平，进而导致ghrelin的特异性受体（GHS-R1a）蛋白表达减少，导致ghrelin生理功能的异常，即“ghrelin抵抗”，从而影响ghrelin的促进食欲的功能及对代谢、进食、情绪的影响。

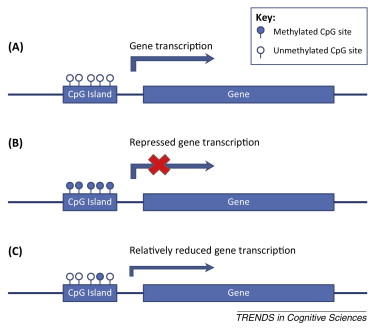
瘦素由位于人类7号染色体的LEP基因编码而成。LEP基因全长20 Kb，包括3个外显子和2个内含子，表达产物为167个氨基酸的多肽。瘦素受多种因素影响，包括炎症因子、糖皮质激素、胰岛素等。有研究发现，LEP基因序列中的rs2167270 A等位基因与糖尿病的发病风险相关[18]。有研究发现肥胖患者的LEP基因甲基化水平高于健康人群[19]，而高脂饮食的LEP受体基因甲基化水平上升导致的瘦素抵抗，是导致肥胖的发生的原因。一项关于围生期母亲状况对婴儿影响的研究发现，围生期母体的营养状况及喂养对会导致到婴儿的LEP甲基化水平的升高[8]。有研究发现不良生活习惯如酗酒、吸烟等也会影响LEP基因的甲基化水平。既往研究发现，AN患者的血浆游离leptin较健康人群减低，而LEP基因的甲基化水平下降[20]，研究者认为这是由于低营养状况下脂肪细胞的不足及leptin水平的下降导致的适应性改变，在对AN患者进行的随访研究发现随着AN患者体重的增加及营养的恢复，血浆leptin逐渐恢复至正常水平。以上研究均表明LEP基因的表达与环境因素密切相关。

## 1.3 AN的基因甲基化研究

表观遗传（Epigenetics）是指不涉及DNA序列发生改变、可遗传的影响基因表达的变化，包括基因甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA等。表观遗传受环境因素影响较大，如家庭环境、生活事件及健康状况等，是分析环境因素与遗传因素相互作用的重要手段。表观遗传学改变一定程度上反映了当前状态的基因表达水平，也是对将来一段时间的基因表达水平进行预测的因素之一。

基因甲基化是表观遗传修饰形式之一，是影响基因表达的重要因素。DNA甲基化常出现在基因启动子的5’UTR区域，通过对该区域内CpG位点的胞嘧啶残基上增加一个甲基，形成5-甲基胞嘧啶。CG片段高的核苷酸序列称为CpG岛（CpG island）。大量研究发现，启动子区域的高甲基化会导致基因表达水平的下降。基因启动子5’UTR区域CpG岛中包含转录因子的结合位点。CpG位点的甲基化会导致转录因子结合异常，从而影响基因的转录水平。通常健康人基因组中CpG岛中的甲基化位点处于非甲基化状态，而CpG岛之外的区域处于高甲基化状态。

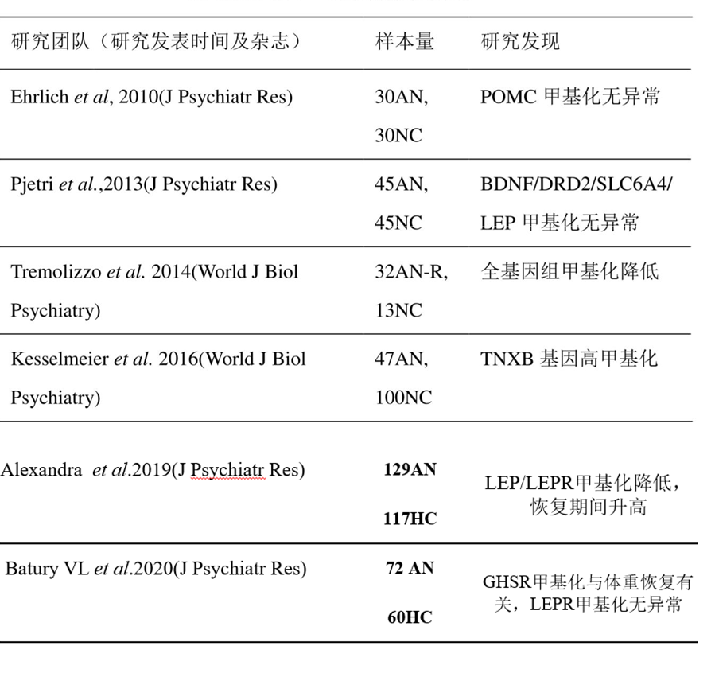
图1.1 甲基化调控基因表达示意图



目前AN的甲基化相关研究还处于探索阶段，但已有部分研究表明基因的甲基化与AN的临床症状之间存在相关性。高通量全基因组甲基化研究表明，AN患者的全基因平均甲基化水平低于健康人群，但并未进一步研究差异性基因的作用机制及意义。2010年一项研究比了多巴胺受体2基因、脑源性神经营养因子基因、LEP及GHSR基因、催产素受体基因、黑阿皮素基因在AN患者与健康人群中的差异，但发现统计学异常。2014年一项研究[21] 对比了15名女性AN患者及36名健康女性的催产素受体基因的甲基化差异，并发现了并确定了具有显著差异的5个CpG位点，确定了差异性位点与AN患者临床症状之间的相关性。但该研究为发现随访期间的甲基化水平变化，也没有排除环境因素对基因甲基化的影响，因此得出的结论可信度较差。

综合目前AN患者的基因甲基化研究发现，存在以下特点1：多数研究为AN患者的特定基因甲基化水平与健康人群之间的差异，以及康复过程中甲基化水平的改变，但未关注环境因素对甲基化结果的影响；2、研究纳入的样本量较少且未控制年龄、体重等因素对甲基化的影响；3、相较于其他精神科疾病，AN的甲基化研究较少且多数研究结果存在一定差异性，且部分研究结果与分子生化研究无法印证。4、上述研究均未严格控制入组样本的种族，且缺乏中国汉族人群的全基因组研究。

表1 AN甲基化研究现状



## 1,4 AN的发病风险及环境因素

基因的甲基化水平与环境因素存在显著相关性。环境因素可以通过影响基因的甲基化调节基因的表达，并通过促进或抑制蛋白合成及分泌改变内环境稳态并最终导致临床症状的产生。

### 1.4.1不良家庭环境与对AN的影响

不良的家庭环境会导致AN患者的发病率增加，本课题组既往的研究结果表明，低亲密度、低情感表达、高矛盾性等家庭环境因素伴随更高的AN的发病风险，且与AN患者临床症状的严重程度及病程相关。除此之外，父母对孩子的教养方式也是导致AN发病的风险因素，如对孩子严厉的惩罚、过度干涉、过度保护、过度控制等。不良家庭环境常伴有更高的非自杀性自伤风险及人格障碍，以及更严重的抑郁症状。此外家庭治疗的有效性也证实了不良家庭环境对AN的影响。既往多项研究对比AN及健康人群的家庭环境相关量表得分证实了父母的受教育水平、人格特质、对子女关注程度等对AN发病风险的影响[22-25]。上述研究结果表明家庭环境对AN的发病机制具有

### 1.4.2 负性生活事件对AN的影响

患者在发病前成长阶段（如围产期、儿童期、成年期）所经历的负性生活事件均有可能成为影响疾病发生发展的因素。负性生活事件对AN的影响的研究主要集中于童年期及青春期的创伤性经历。青少年时期是生理及心理发育的重要阶段，该时期内遭遇的创伤性经历为对心理发展产生重要影响了。2020年一项研究发现[26]，存在创伤经历的人群有更高的AN发病风险，并伴随更严重的抑郁症状。有研究发现AN患者的最多创伤性事件为童年期的躯体虐待[27]。相比于AN-R患者， AN-BP患者遭受更多的童年情感虐待，且存在更加严重的人格障碍[28]。近年一项meta分析也报道了AN患者比健康人群遭遇更严重的童年期的情感忽视[29]。2012年Erin E.[30]进行了童年情绪虐待与AN的相关性研究并提出了假说：童年情绪虐待通过情绪失调导致了AN症状的产生，该假说解释了AN患者童年情绪虐待抑郁症状相关性。

### 1.4.3 环境因素对甲基化的影响

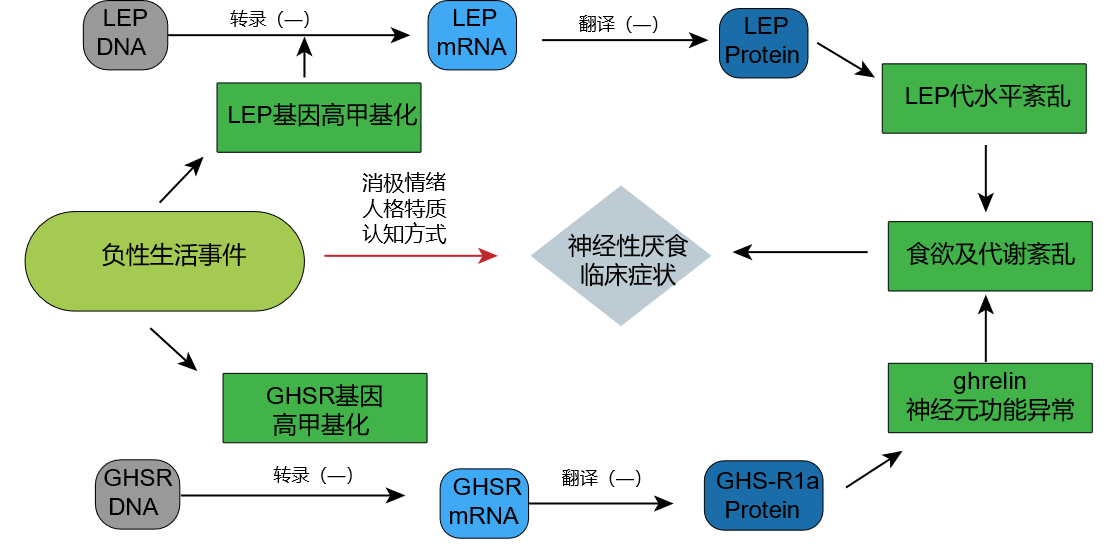
根据表观遗传学的观点，环境可以通过对影响特定基因的甲基化从而改变基因的表达，进而导致临床症状的产生，近年来对环境因素与疾病之间的关系进行更加的研究也在逐渐增加。研究发现[8, 31]，胎儿的LEP基因的甲基化与母体妊娠时期的营养状况(早产、妊娠期疾病)及不良生活习惯（如吸烟、酗酒）相关。近期一项在青少年抑郁症患者中的研究[32]也发现青少年时期的负性生活事件也会导致GHSR基因甲基化水平的上升并导致抑郁症状的产生。虽然目前的研究对环境因素与AN患者的DNA甲基化相关性研究较少，但在肿瘤[33, 34]、肥胖[35]、糖尿病[36]等疾病中已得到了充分研究，这对进一步研究环境与AN发病的相关性提供了参考。

综合以上研究结果发现，环境因素可以改变LEP及GHSR基因启动子区域CpG岛的DNA甲基化，进而影响该基因的表达，最终产生疾病症状。但是在AN中针对环境因素与AN患者的DNA甲基化的影响较少。因此，探索环境因素是否通过对GHER及LEP基因的甲基化水平的影响从而参与AN的发病机制，有助于进一步明确AN的病理机制,为AN的诊断及干预提供科学依据

综合以上的研究背景，提出如下假设：

* + 1. AN患者的GHSR基因表现为高甲基化状态，LEP基因表现为低甲基化状态，且与AN患者临床症状的严重程度相关。
    2. AN患者的GHSR及LEP基因的甲基化水平与负性生活事件相关。
    3. 基因甲基化的异常与负性生活事件共同影响AN患者临床症状的产生

图4 环境因素通过改变基因甲基化水平对影响精神性厌食症状假设



# 第二章 研究方法及对象

## 2.1 研究对象和流程

### 2.1.1研究对象

1.1.1.1样本组成及来源：

本研究共纳入符合入组标准及排除标准的AN患者100例子，其中AN-R57例，AN-BP43例，健康对照40例。本研究中所有的样本进行外周血GHSR及LEP基因启动子区域甲基化检测，并评估进食障碍相关临床症状。本研究已获上海市精神卫生中心伦理委员会审查通过。

1.1.1.2入排标准：

1）病例组：本研究的病例组来源于2014-2020年在上海市精神卫生中心的心理咨询门诊收集的AN患者。所有患者均在获得知情同意书后入组。共收集符合入排标准的AN患者100例，其中AN-R57例，AN-BP43例

具体入排标准如下：

A.AN-R组

入组标准：

1. 符合DSM-5中AN的诊断标准，由受过专门培训的研究者进行评定，亚型诊断为AN-R；
2. 年龄13-30岁，女性，汉族，初中及以上文化程度；
3. 无精神科药物服用史，或停药时间超过12个月;
4. 13.0≤ BMI≤17.5(kg/m2);
5. 本人或其法定监护人签署知情同意

排除标准

1. 符合除了AN外的DSM-5诊断标准的其他精神疾病； 具有严重躯体合并症，（如神经系统疾病，心率失常，严重电解质紊乱等） ；
2. 怀孕、哺乳者
3. 具有严重的消极自杀意念或行为者；
4. 有精神障碍家族史；
5. 1个月内服用过精神类药物、激素类药物等。

B.AN-BP

入组标准：

1. 年龄12-18岁，女性，汉族，初中及以上文化程度；符合DSM-5中AN的诊断标准，由受过专门培训的研究者进行评定，亚型诊断为AN-BP；
2. 年龄12-18岁，女性，汉族，初中及以上文化程度；
3. 符合DSM-5中AN的诊断标准，由受过专门培训的研究者进行评定，亚型诊断为AN-BP；
4. 13.0≤ BMI≤17.5(kg/m2)
5. 无精神科药物服用史，或停药时间超过12个月;
6. 患者和其法定监护人签署知情同意

排除标准：

1. 符合除了AN外的DSM-5诊断标准的其他精神疾病； 具有严重躯体合并症，（如神经系统疾病，心率失常，严重电解质紊乱等） ；
2. 怀孕、哺乳者
3. 具有严重的消极自杀意念或行为者；
4. 有精神障碍家族史；
5. 1个月内服用过精神类药物、激素类药物等。

2)健康对照组

入组标准：

1. 年龄13-30岁，女性，汉族；年龄、与AN组的年龄及文化程度相匹配。
2. 18.5<BMI<23.9(kg/m2)；
3. 饮食态度调查表（EAT-26）评分<20分；
4. 月经正常
5. 本人或其法定监护人签署知情同意

排除标准：

1. 符合DSM-5任一诊断，即患有精神障碍；
2. 有严重躯体疾病或躯体合并症者（如有神经系统疾病、心律失常、浮肿、肝肾功能损害等）；
3. 怀孕、哺乳、药物滥用者；
4. 1个月内服用过精神类药物、激素类药物、避孕药

### 2.1.2 研究流程

研究流程可以分为3个阶段

第1阶段：被试者入组。研究团队在入组研究被试前，熟悉整个研究操作和规范。对来诊的AN患者进行入组评估及在校学生和社会中招募匹配的HC，先进行躯体评估，即心电图、血常规、电解质、肝肾功能等检查，符合入组、排除标准后签署知情同意书予以入组。

第2阶段：血样本收集。对所有符合入组、排除标准的AN及HC进行静脉采血。

第3阶段：心理评估。对入组的AN患者及HC进行心理量表评估（具体参见研究方法部分）

## 2.2 研究方法

### 2.2.1临床评估工具

本研究中纳入的临床评估工具主要用于筛查研究被试、评估被试的进食障碍症状相关特点及评估与厌食症发病有关的环境因素。

1. 自编人口学资料收集表：

对AN患者进行以下评定：

1. 自制调查表，包括研究编号、姓名、性别、职业、婚姻、文化程度、身高、体重，理想体重、最低体重、最高体重，闭经史，患者的起病年龄、总病程、本次病程、起病诱因、家族史，诊断（包括当前亚型），是否有过暴食清除行为，内分泌系统疾病、神经系统疾病、心律失常、浮肿、肝肾功能损害，是否有酒依赖、物质滥用、自杀史，既往治疗情况等。
2. 对HC进行以下评定： 自制调查表，包括研究编号、姓名、性别、职业、婚姻、文化程度，身高、体重、理想体重、最低体重、最高体重，闭经史，家族史，是否有内分泌系统疾病、神经系统疾病、心律失常、浮肿、肝肾功能损害等，是否有酒依赖、物质滥用、自杀史，服药史。
3. 进食障碍症状相关评估量表
4. 进食态度量表-26项 (Eating Attitudes Test-26，EAT-26)： 该量表是标准化的、进食障碍症状自评筛选表。EAT-26共有26个条目，主要评估节食、贪食和食物的先占观念、口欲控制三个维度的进食症状。该量表填写简单，常用是使用最广泛的自我筛查问卷。目前本课题组已收集相关数据并撰写文章，初步证实该量表在中国大陆的信效度良好，内部一致性为0.910，重测信度为0.817，聚合效度为0.744，特异性为0.84，敏感性为0.64[37]
5. 进食障碍检查自评问卷6.0 (Questionnaire Version of the Eating Disorders Examination，EDE-Q 6.0)： 为自评问卷，共有28个条目，用于评估进食障碍主要的行为和心理特征，并可以评定行为发生的频度和强度，即评估进食障碍的严重程度。该量表共有四个分量表（限制进食、对进食的关注、对体形的关注、对体重的关注）。该量表的中文版由香港中文大学李诚教授提供，目前已在香港的华人人群的研究中广泛应用。目前本课题组已收集相关数据并撰写文章，初步证实该量表在中国大陆的信效度良好，内部一致性0.95，敏感度为0.79,特异度为0.88重测信度0.73，4个因子的重测信度分别为0.58、0.68、0.69和0.71[38]。
6. 其他心理量表：

除前述量表外，本研究还纳入他评量表，如贝克抑郁量表(Beck Depression Inventory , BDI)、贝克焦虑量表(Beck Anxiety Inventory, BAI)评估AN患者的抑郁和焦虑情绪。

1. 负性生活事件评估量表：

青少年生活事件量表(Adolescent Self - Rating Life Events Check List, ASLEC): 为自评问卷，包括26个条目，主要评估人际关系、学习压力、受惩罚、丧失、健康有关的生活事件，适用于青少年生活事件发生频度和应激强度的评定，该问卷中文版具有良好的信度和效度[39]。

### 2.2.2实验室检测

2.2.2.1血液样本采集

对所有入组的AN及NC于早上7:00-9:00采集空腹状态下的肘前静脉血5mL置于乙二胺四乙酸（Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA）抗凝真空管中，其中2ml全血分装后保存于与冻存管中通过DNA提取试剂盒提取DNA，用于GHSR及LEP基因启动子区DNA甲基化水平分析。所有血样本经过预处理后-80℃超低温冰箱保存。

2.2.2.2 DNA甲基化水平检测

1. DNA提取

采用莱枫1ml血液基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取，按说明书进行操作，具体操作步骤如下：

取0.5ml血细胞样本，加入等体积的Buffer MG-A，剧烈摇晃20次；12000g离心2分钟，可见底层沉淀物，缓慢弃去上层液体。

1. 加入1/2体积离心管体积的Buffer MG-S，剧烈摇晃悬浮沉淀物，12000g离心2分钟，底层可见沉淀物，缓慢弃去上层液体，将离心管倒扣于吸水纸上2分钟。
2. 根据步骤中沉淀物的多少决定加入Buffer MG-S的体积：若沉淀物体积≤50µL，加入150µLBuffer MG-S；若沉淀物含有血凝块者，加Buffer MG-S至总体积200µL；若沉淀物体积≥150µL，不需加 Buffer MG-S。剧烈摇晃40次，裂解沉淀物。
3. 加入200µLGLA和10µL Proteinase K，剧烈摇晃40次充分混匀。
4. 水浴锅中65℃水浴≥1小时，水浴期间摇晃混匀2-3次。
5. 水浴后，加入300µLBuffer GB，缓慢翻转离心管20次混匀，转移
   * 1. 至DNA吸附柱-C50中，室温放置5分钟；12000g离心2分钟。
6. 离心后转移-C50吸附柱至另一干净收集管中，在DNA吸附柱中加入500µLBuffer WB1，12000g离心2分钟，弃废液，将DNA吸附
   * 1. 柱放回收集管中。
7. 重复步骤7）后12000g离心2分钟。
8. 离心后，将DNA吸附柱-C50转移至试剂盒携带的1.5ml离心管中，向吸附柱中央加入已经过65℃水浴的TE，室温置5分钟，12000g离心2分钟进行洗脱；重复洗脱一次。
9. 采用紫外分光光度仪(NanoDrop2000)进行DNA浓度及光密度值的
   * 1. 测定。
10. -20℃保存。

2）应用NanoDrop 2000 分光光度计检测DNA质量

i. 检测原理

分光光度计的基本工作原理是基于物质对光的波长的吸收具有选择性，不同的物质都有各自的吸收光带，所以当光色散后的光谱通过某一溶液时，其中某些波长的光线就会被溶液吸收。DNA或RNA链上碱

ii. 操作步骤：

1. 打开NanoDrop 2000软件，软件进入后在主画面点选Nucleic Acid，使得计算机与仪器自动联机。然后对仪器进行矫正空白对照，依照被检测的DNA所溶于的液体准备该溶液(一般为TE buffer)。吸取1.5µL TE点在检测台上，放下仪器上臂后再点击Blank。
2. 在右上方拉选Sample Type选DNA-40，在Sample ID位置输入样品名称，提前将样品混匀，用2.5µL移液枪取出1.5 µL样品点在检测台上，放下上臂后点击Measure。
3. 使用干净的无尘纸擦干净上下基座，之后进行下一个样本的检测。
4. 检测完成后，点击左侧的export，将检测结果导入到excel表中。 结果分析主要依靠Nucleic Acid Conc 的值来分析DNA浓度，OD260、OD280和OD230，计算其比值来衡量样品浓度。
5. DNA 甲基化水平的检测

DNA甲基化水平的检测由上海邃志公司完成，采用亚硫酸氢盐扩增子测序（BSAS）分析，通过亚硫酸氢盐（bisulfite）处理，用多重PCR扩增目的片段，添加barcode和测序通用接头，在Illumina二代测序平台对PCR产物进行高通量测序，利用生物信息学方法，精确定量计算目标区间内的甲基化位点的甲基化状态（图2.1）。BSAS结合了亚硫酸盐转换、靶向扩增子高通量测序技术，可实现多区段、多位点的甲基化精确定量分析。本方法适用于感兴趣的目的片段的甲基化研究，在大样本中进一步确认全基因组甲基化研究挑选的阳性位点。

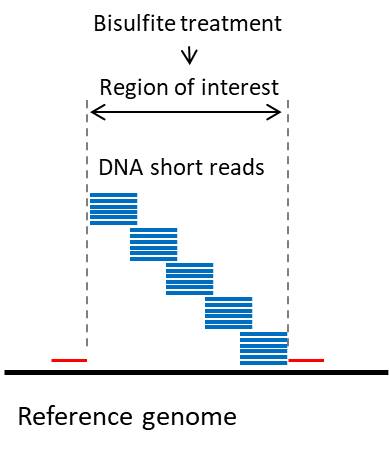
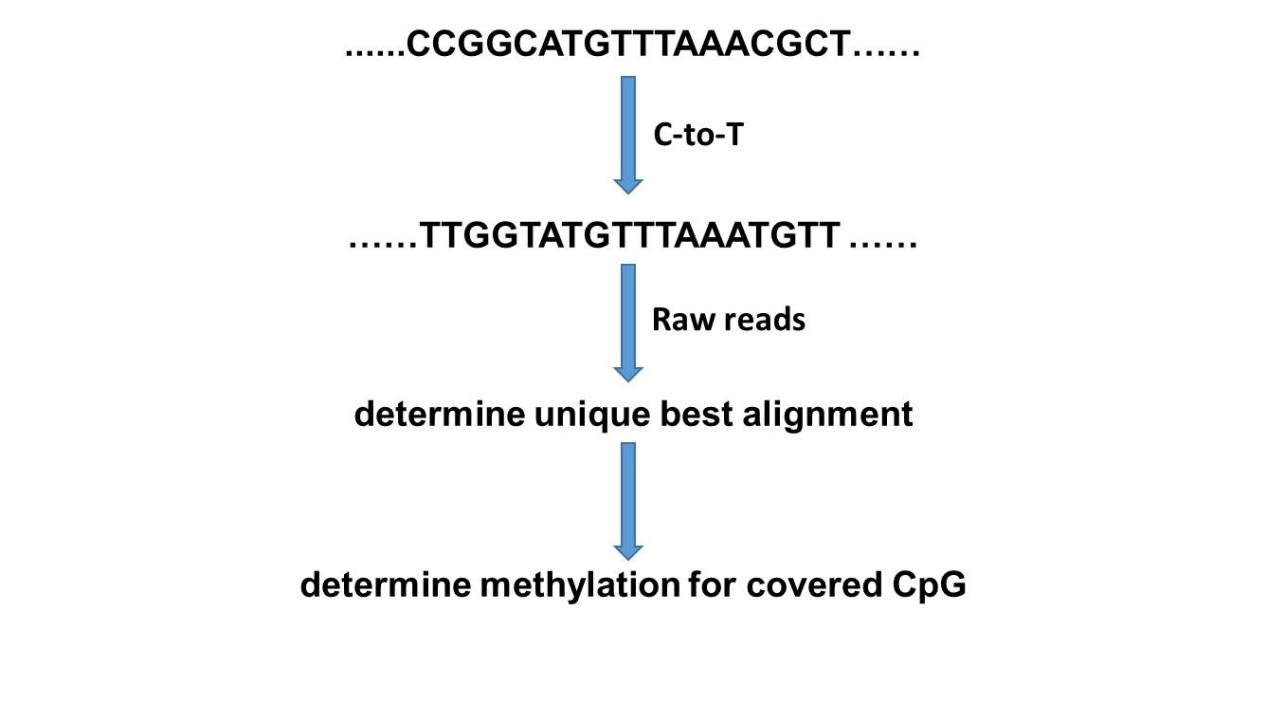


图2.1 目标区间甲基化测序原理示意图

重亚硫酸盐处理样本基因组DNA之后，使用多重PCR扩增技术进行目标片段的高效富集。多重PCR引物设计使用本公司开发软件计算引物之间的相互作用，对无法避开CpG位点的区段设计兼并引物。多重PCR捕获之后，经过两轮PCR建库，质控合格之后，在Illumina 二代测序平台上机测序。下机原始数据经过生信分析，最终获得目标区间内每个样本的甲基化率等结果，对每个样本目标区间胞嘧啶的甲基化水平实现定量分析。

图2.2甲基化判断原理



A.甲基化化引物的设计

根据NCBI数据库公布的LEP及GHSR基因的启动子序列(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6532)，使用Methprime在线软件进行CpG岛进行预测(<http://www.epidesigner.com>)，使用Premier 3软件进行引物设计，其扩增片段覆盖LEP及GHSR基因转录起始位点上游500范围内的的启动子区域,.使用PROMO在线网站对启动子区域内的转录因子结合位点进行预测，共筛选出LEP基因的7个转录因子结合位点片段及GHSR基因的12个转录因子结合位点（表2.1）结合位点片段覆盖区域的CpG位点如图所示：

表2.1 PROMO预测的转录因子及其结合位点（Maximum matrix dissimilarity rate=0.05）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 转录因子 | 结合位点序列 |
| LEP | GCF | AAGCCGCGC |
| GCF | GCTCCGCGC |
| ETF | GCGCCCCGCGC |
| GCF | GCGCCGGAG |
| RXR-α | GGGTGCG |
| ENKTF-1 | TGGCGCGC |
| GR-alpha | CCCGCGAG |
| GHSR | p53 | GCCGCC |
| c-Jun | TGACGCG |
| GCF | CAGCGGCGC |
| E2F-1 | GCGGCGCT |
| Pax-5 | GGGCGTG |
| E2F-1 | CAGACCGC |

将预测的转录因子与CpG结合位点进行匹配最终在LEP基因中启动器区域确定了7个相关CpG位点，在LEP基因中启动器区域确定了5个相关CpG位点（对相邻CpG位点的进行和并取平均甲基化值），

图2.3 LEP甲基化引物及预测片段

***LEP* F1 Primer**

AGCCCTCCAGAGAGCGTGCACTC**CCTGGGGTGCCAGCCAGAGAC**AACTTGCCCTGAGGCTTG

***LEP* F2 Primer**

63 GAACTCGATTCTCCGCGTG**CCAGAGAAGGGGTGGGACTTCAG**AACCCCCAACCCCGCAATCT

125 GGGTCGGGGAGCCTGGCGCACTGCGGGCCGCTCCCTCTAACCCTGGGCTTCCCTGGCGTCCA

187 GGGCCGTCGGGGCCGAGTCCCGATTCGCTCCCACCCCGAAGCCGCGCCAGGACCAACGAGGG

GCF

249 CGCAGCCGTATGCCCCAGCCCGCTCCGCGGAGCCCCTCACAGCCACCCCCGCCCCGACCGCG

GCF

311 CCCCGCGCGGCTCGAAGCACCTTCCCAAGGGGCTGGTCCTTGCGCCATAGTCGCGCCGGAGC

ETF GCF

373 CTCTGGAGGGACATCAAGGATTTCTCGCTCCTACCAGCCACCCCCAAATTTTTGGGAGGTAC

435 CCAAGGGTGCGCGCGTGGCTCCTGGCGCGCCGAGGCCCTCCCTCGAGGCCCCGCGAGGTGCA

RXR-α ENKTF-1 GR-alpha

497 CACTGCGGGCCCAGGGCTAGCAGCCGCCCGGCACGTCGCTACCCTGAGGGGCGGGGCGGGAG

559 CTGGCGCTAGAAATGCGCCGGGGCCTGCGGGGCAGTTGCGCAAGTTGTGATCGGGCCGCTAT

***Exon 1***

621 AAGAGGGGCGGGCAGGCATGGAGCCCCGTAGGA**ATCGCAGC**GCCAGCGGTTGCAAGGTAAGG

683 CCCCGGCGCGCTCCTTCCTCCTTCTCTGCTGGTCTTTCTTGGCAGGCCACAGGGCCCCACAC

***LEP* R2 Primer**

745 AACTCTGGATCCCGG**GGAAACTGAGTCAGGAGGGATGCA**GGGCGGATGGCTTAGTTCTGGAC

***LEP* R1 Primer**

807 TATGATAGCTTTGTACCGA**GTTCTAGCCAGATAGAAGGTTACC**GGGAGCTGGGGAGCGTTGG

图2.4 GHSR甲基化引物及预测片段

***LEP* F1 Prime**

1 TTCACGCATTTGTGCACACATTCAGTCTTAGGTCTTTGTGGACTTTTAAGTATTAACAATTT

***LEP* F2 Primer**

63 AGGTAGTAGAGGTGGTACAAACTGTCTGTGAAAGGCAAGTACAAACGCATTCAACTGAGGGG

125 GATACTCTCTCATACACAGTACGTGGTATCTCATCGGGTGAGCGCCGATGTGTATGGTCAAG

187 GCAGTGACTAACGCCGGCCTGTGCTTCGTGGGAGTCTGCCCTGCTCCTCCGTGGGGTAGGAC

p53

249 TGAGGCGTTAGAAGCGCAAGTTAAAAACGGTGGGAGTGACAGGGAAGCCATTCCTCCAGCGG

c-Jun GCF

311 CGCTTTGCGGTAGGATGGATGTGGCGCTGGCCACAGTGCTGAATATGTTCCTGGGGCGGTCC

E2F-1

373 CGAGGTCGGTGGGCCGGGAGGGGCCGGTCGGATTTGTGAATTCGCTGGCAACTGGCAGTCTC

435 ATGCCTTCGGGTGCTGATTTCTGGCTCTGAGCAGGAGACGCACAGACCGCGTCCAGAGGGTC

***GHSR* R2 Primer E2F-1**

497 ACCTTGCTAGTGTAGGGGTGGCCTTTGACCTGTTCCCACCGGCACAGCTTCTACTTCTCAAC

***GHSR* R1 Primer**

559 AGCAACGCGTCTTCTATTTATTGAGTGCCTCCGGTGGTCCCTGACACTTGATATCACCCCCA

B.扩增目标基因片段

1. 样本的转化处理

2. 一轮PCR

取调整好的多重引物工作液配制PCR mix，分装于与所需数量相对应的96孔板中。取样本板充分解冻、震荡，1000rpm离心1s后进行加样。加样时每板预留2个孔，分别加入阳性及阴性对照。一轮扩增体系及反应条件如下。

扩增体系：

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Master mix** | **ddH2O** | **Primer mix A/B（1μM）** | **Sample** | **石蜡油** |
| 20μl | 10μl | 6μl | 2μl | 2μl | 20μl |

PCR 程序：

94℃ 5min

98℃ 15s

35 cycles

60℃ 90s

3. 二轮PCR

一轮产物每孔加ddH2O 100μl，瞬时离心，室温静置10min。以稀释液作为二轮扩增模板，扩增体系及反应条件如下：

扩增体系：

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Master mix** | **ddH2O** | **Index** | **Sample** | **石蜡油** |
| 20μl | 10μl | 4μl | 4μl | 2μl | 20μl |

PCR 程序：

94℃ 5min

98℃ 15s

10cycles

60℃ 90s

4. 扩增结束后，将PCR产物进行电泳检测，3%琼脂糖凝胶，PCR产物上样5μl，观察电泳条带是否均一，是否有杂带等。

C.文库混样

1. 取96孔板1块。调排枪至5μl，插取Axygen 10μl枪头，PCR板每孔吸取5μl产物转移至U型槽中，转移产物时应慢速吸取，保证无漏吸枪头。

2. 取圆底离心管1支，将管盖拧下，以封口膜缠绕圆底离心管的螺旋口2周备用，注意缠绕时为顺时针方向。

3. 取200μl移液枪，插取Axygen枪头将U型槽中的产物mix转移至圆底离心管中。

4. 拧紧管盖，涡旋震荡30秒。

5. 将离心管平行固定在摇床上，启动摇床，观察管中液体移动状态，调整摇床至适合的速

度，以管中液体振幅最大为宜，将产物mix震荡过夜。

D.纯化

1. 将混样后的文库上样电泳，电泳完毕后，割取目标片段，将片段切碎，分为4份置于4个1.5ml低吸附EP管中。将内置凝胶的EP管称重，减去管重，计算凝胶质量并记录于管盖。向胶块中加入等倍体积溶液PN(如果凝胶重为0.1g，其体积可视为100μl，则加入100μl PN溶液)，50℃水浴放置，其间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解。如果还有未溶的胶块，可继续放置几分钟或再补加一些溶胶液，直至胶块完全溶解。

2. 凝胶溶解时，取4个吸附柱放入收集管中，向吸附柱中加入500μl平衡液BL，12000 rpm离心1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

3. 将融化好的凝胶溶解降至室温，加入4个吸附柱CA2中(吸附柱放入收集管中)，室温放置2 min，12,000 rpm离心30s，弃废液，将吸附柱CA2放入收集管中。(吸附柱容积为800μl，若样品体积大于800μl可分批加入)

4. 向吸附柱CA2中加入600μl漂洗液PW(使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，静置2min，12000rpm离心30sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CA2放入收集管中。此步骤重复2次。

5. 将吸附柱12000rpm离心2 min，尽量除尽漂洗液。将吸附柱CA2开盖置于室温放置10min。

6. 将吸附柱CA2放到1.5ml低吸附EP管中，向吸附膜中间位置悬空滴加50μl洗脱缓冲液EB，室温放置2min，12000rpm离心2min收集DNA溶液。将离心得到的溶液重新

加回离心吸附柱中，室温放置2min，12000rpm离心2 min，将DNA溶液收集到离心管中。4个收集管震荡离心，将其中3个收集管中的溶液以低吸附枪头转移到另一个收集管中，震荡30s并瞬时离心，于4℃暂存。

E.启动子区域的高通量测序

1. 桥式PCR

1. 使用NaOH将双链DNA文库变性为单链。

2. 将单链DNA模板杂交到Flow Cell 上。

3. 以Flow Cell 表面上的oligos为引物合成第一链。

4. 冲走单链DNA模板，以合成的第一链为模板进行35循环的桥式PCR。

5. 将与P5接头连接的DNA链从Flow Cell 上去除。

6. 阻断3’–OH防止在后续测序过程中继续延伸DNA链。

7. 杂交测序引物。

1. 测序

1. 桥式PCR产物于Illumina X-10测序平台上机测序，操作流程按照标准SOP进行。

2. 试剂配制，加样上机，进行Read1测序。

3. 杂交Index测序引物，进行Index测序。

4. Paired End Turnround，合成Read1互补链。

5. 杂交Read 2测序引物，进行Read 2 测序。

### 2.2.4实验仪器

主要实验仪器及生产厂家

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **仪器名称** | **型号** | **生产厂家** |
| **1** | PCR仪 | A-100 | 杭州朗基科学仪器有限公司 |
| **2** | PCR仪 | Gene Amp PCR system 9600 | Norwalk,CT.06859 USA |
| **3** | 电泳仪 | JY600+ | 北京君意东方电泳设备有限公司 |
| **4** | 全自动紫外与可见分析装置 | FR-200A | 上海复日科技有限公司 |
| **5** | 生物电泳图像分析系统 | / | 上海复日科技有限公司 |
| **6** | 高通量测序仪 | Illumina X10 | Illumina, CA, USA |

### 2.2.5实验试剂

主要实验试剂、耗材及生产厂家

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **试剂或耗材名称** | **型号** | **供应商** |
| **1** | PCR引物 | PAGE纯化 | 生工生物 |
| **2** | 10× Reaction buffer | / | TaKaRa |
| **3** | Taq酶体系 | / | TaKaRa |
| **4** | EpiTect Bisulfite Kit (48) | / | Qiagen |

### 2.2.6软件与网络资源

主要实验软件与网络资源

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **软件** | **版本** | **开发商或网址** |
| **1** | Primer 3 online | Version 0.4.0 | http://frodo.wi.mit.edu/ |
| **2** | Oligo | Version 6.31 | Molecular Biology Insights Inc., USA |
| **3** | UCSC | / | http://genome.ucsc.edu/ |
| **4** | NCBI | / | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |

## 2.3 统计分析

所有数据录入到R 2.4.0软件中进行初步统计，p<0.05表示具有统计学差异，并使用进行作图。

### 2.3.1 一般资料及心理量表评估比较

将所一般人口学资料、进食障碍症状量表及环境因素量表数据录入SPSS24.0中，建立数据库并进行统计。计量资料中符合正态分布的数据采用参数检验，统计描述均用（均数±标准差）表示，两组比较采用t检验，三组比较采用单因素方差分析（ANOVA）；不符合正态分布的数据采用非参数检验，统计描述采用[中位数（最大值、最小值）]表示，两组比较采用Mann-Whitney U检验；统计描述用例数（百分比）表示。

### 2.3.2 LEP及GHSR基因启动子区域的DNA甲基化水平比较

将MassArray Epityper质谱仪分析得到的LEP及GHSR基因启动子区域CpG岛的甲基化水平（百分比）数据录入到SPSS数据库中，并进行统计。LEP及GHSR启动子区CpG位点的甲基化水平属于计量资料，除了CpG5位点的甲基化水平不符合正态分布外，其余位点均符合正态分布，统计方法与1）中计量资料的一致。采用Pearson（正态分布数据）或Spearman（非正态分布数据）相关分析甲基化位点间的相关性。采用重复测量方差分析比较治疗前后LEP及GHSR基因启动子区域DNA甲基化水平的变化。

# 第三章 研究结果

## 3.1一般人口学资料及心理量表特征评估

### 3.1.1 AN患者与健康对照组人口学特征及心理量表得分比较

本研究收集143名被试，其中AN患者100例，健康对照43例， 比较所有入组的AN及NC的一般人口学资料及心理量表评分差异，统计结果显示，所有入组的AN和NC在年龄的分布上没有显著统计学差异（p值均>0.05），AN患者的当前BMI、理想体重及理想BMI均显著低于NC（p值均<0.05），但是对于最高BMI，两组没有显著差异（p值均>0.05），对于EAT-26及EDE-Q6量表评分，AN患者的进食障碍症状得分明显高于HC组（p值均<0.001）。AN患者的焦虑及抑郁症状得分也明显高于HC组（p值均≤0.001）。详见表2。

表3.1 AN组与HC组人口学特征及心理量表得分比较

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | AN（n=100） | HC （n=43） | t/χ2 | P |
| 年龄（岁） | 18.12±4.14 | 21.23±3.82 | -1.862 | 0.065 |
| 受教育年限（年） | 11.44±3.6 | 14.20±3.08 | -5.067 | 0.001\*\* |
| 病程 | 23.1±25.18 | 17.93±3.73 | / | / |
| 起病年龄 | 15.53±3.81 | 17.57±4.09 | / | / |
| 当前体重 | 39.4±6.88 | 40.18±5.56 | -9.629 | **0.000\*\*\*** |
| 最高体重 | 52±3.87 | 55.36±7.22 | -10.88 | **0.000\*\*\*** |
| 当前BMI | 14.83±2.04 | 17.19±1.86 | -0.914 | **0.000\*\*\*** |
| 理想BMI | 17.42±3.13 | 19.25±2.21 | -5.47 | **0.000\*\*\*** |
| 最高BMI | 20.34±2.18 | 21.42±3.47 | -1.102 | 0.313 |
| EAT总分 | 22.25±13.89 | 5.350±3.815 | 6.846 | **0.000\*\*\*** |
| EDE-Q 总分 | 1.59±1.71 | 2.71±1.69 | 3.015 | **0.000\*\*\*** |
| EDE-Q 饮食限制 | 1.63±1.73 | 1.57±1.5 | 0.565 | **0.000\*\*\*** |
| EDE-Q 进食顾虑 | 1.79±1.57 | 2.09±1.65 | 1.894 | **0.000\*\*\*** |
| EDE-Q 体型顾虑 | 1.14±1.03 | 1.27±1.03 | 1.780 | 0.267 |
| EDE-Q 体重顾虑 | 1.7±1.49 | 1.81±1.46 | 0.362 | **0.000\*\*\*** |
| BDI | 61.98±59.04 | 74.25±59.84 | 0.964 | **0.000\*\*\*** |
| BAI | 60.68±59.52 | 70.86±57.09 | 0.798 | **0.001\*\*** |

注：BMI:体重指数，BAI:贝克焦虑量表，BDI贝克抑郁量表，EAT-26:进食态度问卷，EDE-Q6.0: 进食障碍检查自评问卷6.0，EAT：进食态度问卷。

病程呈非正态分布，采用[中位数（最大值、最小值）]进行描述统计

**3.1.2 不同亚型AN之间的人口学特征及心理量表得分比较**

根据DSM-IV-TR诊断标准，AN可以分为两种类型，一种是限制型（restricting subtype, AN-R），另一种是暴食-清除型(binge/purging subtype, AN-BP)。所有入组的100例AN患者中，有57例患者属于AN-R，43例患者属于AN-BP。比较二组AN患者的一般人口学资料及心理量表评分差异，统计结果显示，AN各亚组患者之间的年龄、体重、最高BMI、理想BMI、抑郁症状（BDI）、焦虑症状（BAI）得分无显著差异（p值均>0.05），最高体重（p=**0.038**），EDEQ总分（P=**0.030\***）、饮食限制(P=0.029)、进食顾虑(P=0.034)存在显著差异。

表3.2 ANR组与ANBP组人口学及心理量表资料比较

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | ANR （n=57） | ANBP （n=43） | t/χ2 | P |
| 年龄（岁） | 16.94±3.22 | 21.23±3.82 | -0.406 | 0.685 |
| 受教育年限（年） | 11.29±3.91 | 14.20±3.08 | 0.108 | 0.914 |
| 病程 | 15.21±2.16 | 17.93±3.73 | -1.706 | 0.076 |
| 起病年龄 | 15.39±2.88 | 17.57±4.09 | 0.568 | 0.571 |
| 当前体重 | 39.43±6.9 | 40.18±5.56 | 0.565 | 0.574 |
| 最高体重 | 49.16±5.24 | 57.36±7.22 | -1.946 | **0.038\*** |
| 当前BMI | 14.84±2.18 | 17.19±1.86 | 0.766 | 0.446 |
| 理想BMI | 16.42±3.13 | 18.12±2.21 | -1.142 | 0.159 |
| 最高BMI | 18.34±2.31 | 22.52±2.16 | 0.818 | 0.353 |
| EAT总分 | 19.34±11.31 | 24±16.31 | -1.153 | 0.148 |
| EDE-Q 总分 | 1.59±1.71 | 2.71±1.69 | 3.015 | **0.003\*** |
| EDE-Q 饮食限制 | 1.63±1.73 | 1.57±1.5 | 0.565 | 0.573 |
| EDE-Q 进食顾虑 | 1.79±1.57 | 2.09±1.65 | 1.894 | **0.029\*** |
| EDE-Q 体型顾虑 | 1.14±1.03 | 1.27±1.03 | 1.780 | **0.034\*** |
| EDE-Q 体重顾虑 | 1.7±1.49 | 1.81±1.46 | 0.362 | 0.718 |
| BDI | 61.98±59.04 | 74.25±59.84 | 0.964 | 0.337 |
| BAI | 60.68±59.52 | 70.86±57.09 | 0.798 | 0.427 |

注：BMI:体重指数，BAI:贝克焦虑量表，BDI贝克抑郁量表，EAT-26:进食态度问卷，EDE-Q6.0: 进食障碍检查自评问卷6.0，EAT：进食态度问卷。

病程呈非正态分布，采用[中位数（最大值、最小值）]进行描述统计，采用曼惠特尼U非参数检验

## 3.2 LEP及GHSR基因甲基化结果

### 3.2.1 AN患者与健康对照组基因甲基化结果

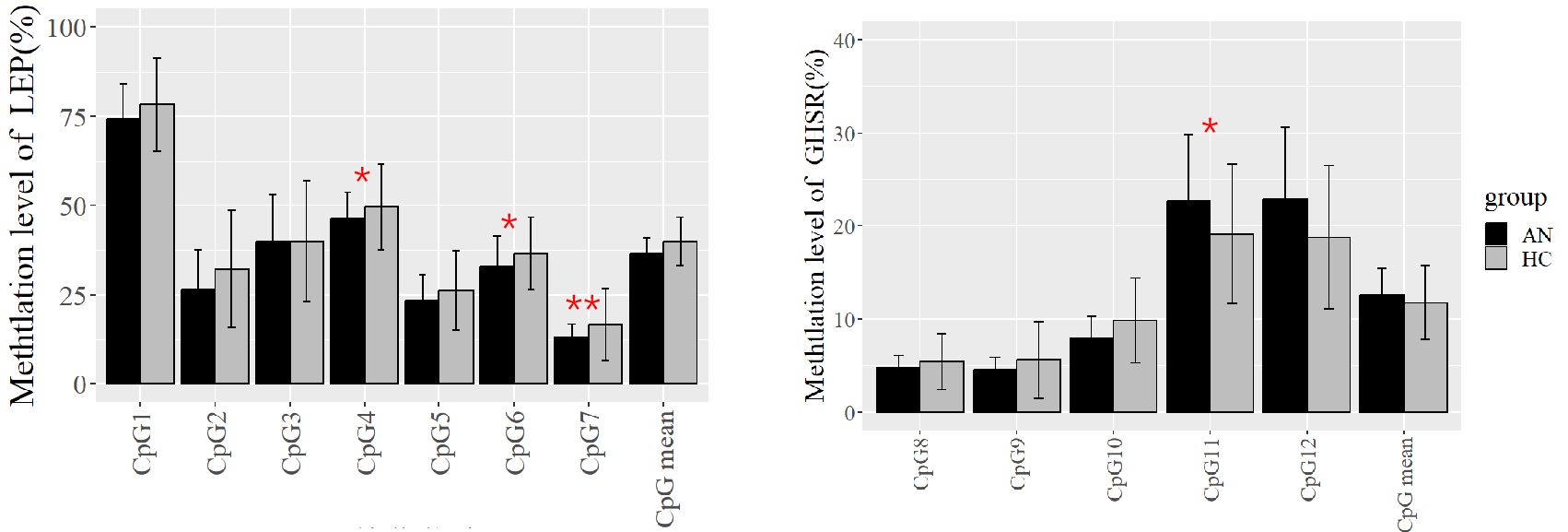
共有100例AN及43例HC完成LEP及GHSR基因甲基化水平检测。根据Illumina X-10测序分析得到的每个CpG单位的甲基化水平，用甲基化率（百分比）量化每个位点的甲基化水平。本实验最终每个样本扩增的LEP DNA片段中包含7个CpG位点, GHSR DNA片段中包含5个CpG位点。通过组间比较，对AN组和NC组的各CpG位点的甲基化水平及平均甲基化水平进行统计分析发现，AN组的LEP基因CpG4、CpG6、CpG7、以及GHSR 基因的CpG11甲基化水平(CpG\_mean)低于HC组（p值均<0.05）。详见表6及图4。

表3.3AN组与HC组LEP及GHSR启动子区域甲基化检测结果比较

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | AN （n=100） | HC （n=43） | t/χ2 | P |
| LEP | CpG1 | 74.26±9.93 | 78.37±12.96 | 1.85 | 0.066 |
| CpG2 | 26.47±11.02 | 32.2±16.51 | 2.08 | **0.039\*** |
| CpG3 | 39.92±13.16 | 39.9±16.97 | -0.01 | 0.995 |
| CpG4 | 46.29±7.46 | 49.56±11.99 | 1.98 | 0.103 |
| CpG5 | 23.18±7.38 | 26.17±11.12 | 1.62 | 0.108 |
| CpG6 | 32.95±8.42 | 36.64±10.1 | 2.1 | **0.037\*** |
| CpG7 | 13.13±3.73 | 16.58±10.07 | 2.98 | **0.003\*\*** |
| GHSR | CpG8 | 4.72±1.34 | 5.41±3.02 | 1.91 | 0.058 |
| CpG9 | 4.56±1.26 | 5.59±4.14 | 0.27 | 0.25 |
| CpG10 | 7.93±2.33 | 9.82±4.55 | 0.87 | 0.174 |
| CpG11 | 22.63±7.18 | 19.15±7.49 | -2.58 | **0.011\*** |
| CpG12 | 22.91±7.65 | 18.77±7.7 | -0.95 | 0.073 |

\*表示p<0.05, \*\*表示p<0.01

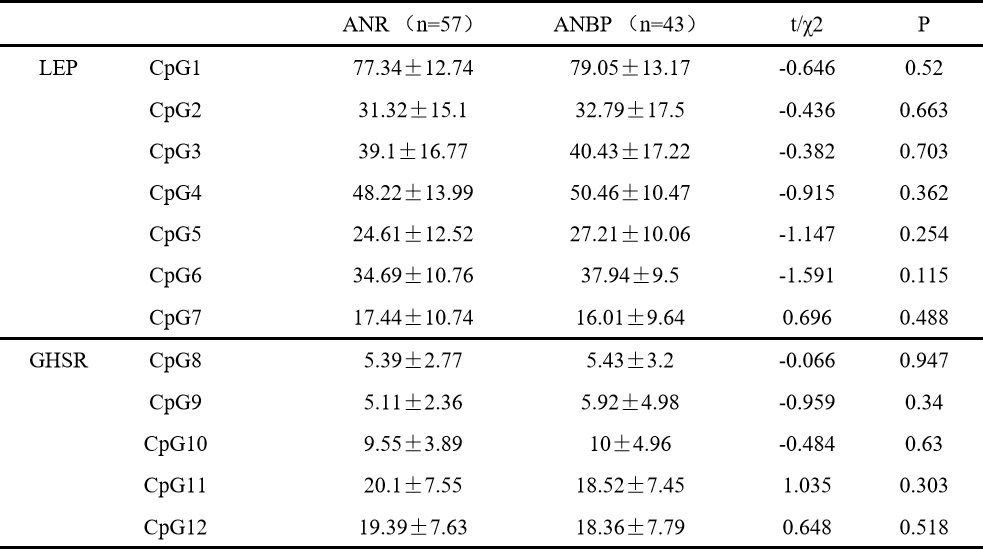
图3.1 AN组与HC组LEP及GHSR启动子区域甲基化检测结果比较



### 3.2.2不同亚型AN患者的LEP及GHSR基因启动子区域DNA甲基化特点

将AN组按照亚型进一步分为AN-R（n=57）和AN-BP（n=43），Mann-Whitney U检验比较对AN-R、AN-BP组CpG位点的甲基化水平，各CpG位点均未发现显著性差异。

表3.4 AN不同亚组LEP及GHSR启动子区域甲基化检测结果比较



### 3.2.3 LEP及GHSR基因启动子区域DNA甲基化与AN患者的临床症状分析

通过分析LEP及GHSR基因启动子区DNA甲基化与AN患者的进食障碍相关临床症状发现，LEP基因CpG2位点的甲基化水平与EDE-Q6.0量表总分有显著负相关（r=-0.187，p=0.024），GHSR基因CpG11位点的甲基化水平与AN患者的EDE-Q6.0呈显著正相关（r=0.218, p=0.037），CpG12位点的甲基化水平与AN患者的EDE-Q6.0呈显著负相关（r=-0.204, p=0.019）。

表3.5 LEP及GHSR基因甲基化水平与AN临床症状的相关性

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | EDE-Q 饮食限制 | EDE-Q 进食顾虑 | EDE-Q 体型顾虑 | EDE-Q 体重顾虑 | EDE-Q 总分 |
| LEP | CpG1 | 0.074 | 0.092 | 0.048 | -0.069 | 0.065 |
| CpG2 | -0.178\* | 0.081 | 0.186\* | -0.086 | -0.187\* |
| CpG3 | 0.008 | 0.108 | 0.068 | -0.06 | 0.061 |
| CpG4 | 0.043 | -0.021 | -0.002 | 0.011 | -0.006 |
| CpG5 | -0.022 | -0.027 | -0.014 | -0.013 | -0.024 |
| CpG6 | 0.016 | -0.09 | -0.043 | 0.062 | -0.043 |
| CpG7 | 0.068 | -0.028 | 0.087 | 0.013 | 0.067 |
| GHSR | CpG8 | -0.067 | 0.087 | 0.055 | -0.044 | 0.037 |
| CpG9 | -0.019 | 0.083 | 0.124 | 0.021 | 0.087 |
| CpG10 | -0.05 | -0.032 | -0.004 | 0.011 | -0.024 |
| CpG11 | 0.196\* | 0.180\* | -0.217\* | 0.155 | 0.218\* |
| CpG12 | -0.176\* | -0.176\* | -0.200\* | 0.155 | -0.240\* |

\*表示p<0.05

## 3.3负性生活事件对AN患者LEP及GHSR基因启动子区域甲基化水平及临床症状的影响

### 3.3.1负性生活事件对AN患者LEP及GHSR基因甲基化水平的影响

通过分析LEP及GHSR基因启动子区DNA甲基化与AN患者负性生活事件的相关性发现，LEP基因的CpG2甲基化水平与健康适应因子与得分有显著负相关（r=-2.05，p=0.039），CpG3，CpG4均与丧失因子得分正相关（r=-0.175，p=0.044；r=-0.180，p=0.037），GHSR基因的CpG10甲基化水平与丧失因子与得分正相关（r=0.186，p=0.024）

表3.6 LEP基因DNA甲基化水平与负性生活事件的相关性

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | CpG1 | CpG2 | CpG3 | CpG4 | CpG5 | CpG6 | CpG7 |
| 人际关系 | -0.126 | -0.03 | -0.129 | 0.098 | -0.012 | 0.066 | 0.047 |
| 学习压力 | -0.018 | -0.079 | -0.104 | -0.006 | -0.078 | -0.009 | -0.064 |
| 受惩罚 | -0.098 | -0.025 | -0.049 | 0.075 | 0.015 | 0.086 | 0.01 |
| 健康适应 | 0.034 | **-.205\*** | -0.171 | 0.078 | 0.006 | 0.044 | -0.133 |
| 丧失 | 0.061 | -0.035 | **0.175\*** | **0.180\*** | 0.168 | 0.129 | 0.142 |

\*表示p<0.05, \*\*表示p<0.01

表3.7 GHSR基因DNA甲基化水平与负性生活事件的相关性

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | CpG8 | CpG9 | CpG10 | CpG11 | CpG12 |
| 人际关系 | 0.06 | 0.047 | 0.094 | 0.067 | 0.047 |
| 学习压力 | -0.047 | 0.015 | 0.061 | 0.039 | -0.064 |
| 受惩罚 | 0.017 | 0.074 | 0.068 | 0.148 | 0.01 |
| 健康适应 | -0.055 | -0.063 | 0.077 | -0.02 | -0.133 |
| 丧失 | 0.065 | -0.004 | **0.186\*** | -0.08 | 0.142 |

\*表示p<0.05,

### 3.3.2 AN和HC组负性生活事件评估比较

通过比较AN与HC组ASL分量表得分发现，AN患者的人际关系、学习压力、丧失、受惩罚、健康适应得分均显著高于HC组.详见表3.8

表3.8 AN组和NC组负性生活事件评估比较

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | AN （n=100） | HC （n=43） | t/χ2 | P |
| 人际关系 | 6.87±5.2 | 3.05±3.59 | 4.866 | **0.000\*\*\*** |
| 学习压力 | 7.24±5.53 | 4.07±3.87 | 3.762 | **0.000\*\*\*** |
| 受惩罚 | 8.08±8.34 | 5.77±4.8 | 1.990 | **0.040\*** |
| 丧失 | 3.94±3.22 | 1.74±1.72 | 5.027 | **0.000\*\*\*** |
| 健康适应 | 2.09±2.94 | 0.14±0.56 | 5.916 | **0.000\*\*\*** |

\*表示p<0.05, \*\*表示p<0.01，\*\*\*表示p<0.001

### 3.3.2 负性生活事件对AN患者临床症状的影响

分析相关负性生活事件对AN患者的BMI及EDE-Q各分量表得分的影响发现，健康适应因子分与AN患者的EAT-26总分及EDEQ6.0总分均呈显著正相关（r=0.239，p=0.049；r=0.441，p=0.000；r=0.368，p=0.002），而体重顾虑与人际关系、学习压力、丧失、受惩罚、健康适应得分均显著正相关。（详见表 3.9）

表3.9 负性生活事件与AN临床症状的相关性

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 人际关系 | 学习压力 | 受惩罚 | 健康适应 | 丧失 |
| BMI | -0.197\* | -0.185 | -0.112 | -0.157 | -0.194\* |
| EDE-Q 饮食限制 | 0.063 | 0.054 | 0.011 | 0.179\* | 0.174 |
| EDE-Q 进食顾虑 | -0.07 | -0.061 | -0.148 | 0.072 | 0.035 |
| EDE-Q 体形顾虑 | 0.108 | 0.04 | -0.052 | 0.085 | 0.127 |
| EDE-Q 体重顾虑 | 0.731\*\* | 0.748\*\* | 0.833\*\* | 0.670\*\* | 0.463\*\* |
| EDE-Q 总分 | 0.05 | 0.02 | -0.065 | 0.11\* | 0.12 |

\*\*表示p<0.01

### 3.3探索性分析LEP及GHSR基因甲基化、家庭环境对AN临床症状的影响

本研究在分别分析LEP及GHSR基因甲基化与环境因素对AN患者临床症状的相关性发现，LEP及GHSR基因启动子区的CpG2，CpG11位点的甲基化水平及健康适应因子均与AN的临床症状严重程度（EDEQ-6.0总分）有关，因此进一步通过线性回归分析进行探索性分析，EDE-Q6.0总分作为因变量，同时纳入影响AN症状的其他因素，如年龄、起病年龄、病程等因素，综合分析CpG3位点的甲基化水平、健康适应对AN临床症状的影响，统计发现，在该模型中（F=3.300，p=0.038），起病年龄、病程AN进食障碍症状得分均无影显著影响，健康适应因子与EDE-Q总分存在正相关趋势（p=0.065），LEP基因CpG2CpG11位点、GHSR基因CpG11位点的甲基化水平的甲基化水平对EDE-Q总分有显著影响。详见表13.

表3.10 LEP及GHSR基因甲基化、健康适应对AN临床症状的影响

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 模型 | 未标准化系数 | | 标准系数 | t | 显著性 | B 的 95.0% 置信区间 | |
| B | 标准误差 | 下限 | 上限 |
| (常量) | 1.162 | 0.432 |  | 2.691 | 0.008 | 0.307 | 2.017 |
| CpG11 | 0.025 | 0.008 | 0.281 | 3.192 | **0.002** | 0.01 | 0.041 |
| CpG2 | -0.048 | 0.016 | -0.26 | -3.013 | **0.003** | -0.08 | -0.017 |
| 健康适应 | 0.076 | 0.041 | 0.163 | 1.871 | 0.064 | -0.004 | 0.157 |

# 第四章 讨论

## 4.1 AN患者的LEP及GHSR基因启动子区甲基化水平特点

本研究通过检测AN患者及匹配的健康对照其外周血的LEP及GHSR基因启动子区的DNA甲基化水平，进一步将AN患者按照亚型分为限制型（AN-R，n=57）和暴食-清除型（AN-BP，n=43），并未发现不同亚型的AN患者在该基因甲基化水平上存在差异，研究结果提示AN-R和AN-BP在LEP及GHSR基因甲基化并不能作为区分AN两种亚型的标志物。

本研究中基线部分的研究结果提示：AN患者存GHSR基因CpG11位点高甲基化，与既往关于GHSR在AN及健康人群中的差异研究一致[17]，该研究纳入AN患者39人，AN康复者22人，健康对照54人。与本研究相同结果，该研究发现AN患者的GHSR平均甲基化水平高于健康人群，单在AN的亚组之间未发现明显差异，符合之前多数研究者对AN患者的高循环ghrelin所提出的“ghrelin拮抗”假说，即AN患者由于ghrelin受体表达减少从而导致ghrelin通过增加食欲或调节代恢复营养水平稳定的功能受限，因此ghrelin持续分泌并维持高循环水平。

目前对于与AN有关的LEP基因甲基化的研究很少，通过文献检索，目前仅能发现两项研究探索AN患者的LEP基因甲基化水平特点。Pjetri等[40]最早进行了关于LEP基因甲基化水平的研究，这项研究纳入45名AN患者及有过AN病史的患者，与年龄相匹配的健康人群进行包括LEP在内的4个基因甲基化水平进行比较，未发现统计学差异。研究者表示在血样采集时，尚不清楚AN组那些人群目前生病或康复，因此AN组包括一部分当前无AN临床表现的人群。因此，导致该研究结果缺乏差异部分可能的原因是，既往AN患者的LEP DNA甲基化的正常化导致AN组与健康人群之间的差异不显著。该假设与一项对AN患者康复期间LEP甲基化水平的纵向研究的结果相一致[20]。该研究纳入129名AN患者及年龄匹配的117名健康对照，基线甲基化分析表明,AN患者LEP基因甲基化水平均低于健康人群。而在一年的随访中，AN患者的LEP甲基化水平随病情的恢复及BMI的上升逐渐恢复至健康人群水平，且基线表现为低水平甲基化的患者康复状况更好。该结果表明LEP基因的甲基化的变化程度一定意义上反映了机体对环境的适应能力。另一项关于脂肪合成的动物研究发现，小鼠的无法合成瘦素的3T3-L1脂肪细胞表现为LEP基因高度甲基化，施用甲基转移酶抑制剂抑制3T3-L1脂肪细胞的LEP基因甲基化之后成功表达出LEP蛋白，结果表明低甲基化水平是调节脂肪的合成的重要因素，而LEP基因的动态变化则是个体对不同营养状况适应性的表现。

近年来对与LEP基因的甲基化研究在肿瘤、妊娠、肥胖、抑郁等方面都有研究，在抑郁症患者中的研究结果表明，不尽一致，有的研究未发现该基因的启动子区甲基化水平与健康对照有显著差异，也有相反研究结果的报道；对于焦虑症的甲基化研究相对较少，且并没有证实该基因甲基化水平存在异常。而GHSR的甲基化相关研究则多集中于肿瘤及肥胖患者，也有针对抑郁症患者的相关研究[41]。尽管LEP及GHSR基因启动子区水平的甲基化在多个不同人群中均被检测研究过，但通过比较该基因的甲基化水平可以发现，不同人群中的甲基化水平数值差异较大，而LEP基因的甲基化水平在同一个体的不同组织中也存在差异[42]提示该基因甲基化对AN的影响可能是特异性的。

在甲基化的研究中通常以启动子区域位点的平均甲基化水平进行研究[17]，而单个CpG位点的甲基化也会通过影响特定转录因子的结合位点从而导致基因表达的异常，但之前的研究中很多仅仅比较启动子区域的平均甲基化水平但没有 对单个CpG位点进行分析，因此在结果上会出现部分偏差，忽略部分具有重要意义的基因。

### 4.2.AN患者的LEP及GHSR基因启动子区甲基化水平临床症状的关系

为了明确AN患者的LEP及GHSR基因启动子区的DNA甲基化水平，并探索该基因的甲基化水平是否对食障碍相关症状有影响，研究纳入100例AN及匹配的43名NC，收集相关资料后分析发现：AN患者LEP基因启动子区（转录其实位点上游-506~-39区域）呈低甲基化状态（在CpG2、CpG6、CpG7位点），其中CpG3位点的甲基化水平与焦虑症状有关；GHSR呈高甲基化状态（在CpG11位点）。基因的启动子区平均甲基化水平增加与其mRNA表达水平降低有关；进一步分析该基因的甲基化水平对AN患者的临床症状的影响发现，LEP基因CpG2、GHSR基因CpG11、CpG12位点的甲基化水平与AN患者的进食障碍症状严重程度有关。之前一项针对AN患者及AN康复者的研究得到发现了GHSR启动子区域的甲基化与AN患者临床症状（EDI-2）之间的相关性（r= 0.199，p = 0.035） 但未发现与AN患者其他症状如焦虑、强迫之间的相关性。可能的原因是AN组及健康对照组的年龄差异较大（P=0.033），而基因的甲基化水平受年龄及营养状况影响较大，因此未发现显著性差异。

在一项AN患者中的全基因组甲基化研究发现，AN患者的平均甲基化水平低于健康人群[13]，但并未找到具有显著性差异的CpG位点。在基因层面也仅发现TNXB在AN患者中的高甲基化，该基因表达抗粘附作用的糖蛋白，与结缔组织疾病以及肿瘤相关，目前并未在AN患者中该基因表达的深入研究。2019年的一项全基因组研究发现了AN患者的58个差异甲基化位点 [43]，虽然未能明确有意义的基因，但研究者发现AN患者的平均甲基化水平与BMI及炎症反应的相关性。这表明AN患者的甲基化水平受营养状况及内环境稳定的影响。

### 4.3负性生活事件对AN的影响

背景部分提及遗传与环境环境因素的相互作用是参与AN的发生发展。环境因素可通过对甲基化的影响从而导致基因表达的异常，进而导致疾病的产生。本研究发现AN患者的LEP及GHSR基因启动子区域甲基化水平异常状态。为研究基因的甲基化受环境影响的具体机制，本研究分析了AN患者的临床症状严重程度与负性生活事件的相关性，发现AN患者的临床症状受人际关系、健康适应及丧失的影响较大。既往研究则发现AN-BP患者较AN-R患者存在更多的环境因素影响[44]，包括受虐待、情感缺乏等，且具有更高的人格障碍风险[28]，但本研究在AN不同亚型之间未发现以上结果。这可能是由于本研究纳入的ANR患者未进行之后的随访，无法判断之后是否会转型为AN-BP,因此对结果会产生一定的影响。

环境对基因甲基化的影响也在大量的研究中得到证实，针对围生期婴儿的基因甲基化研究[8, 45]表明，既往研究发现[31]新生儿的血浆LEP水平与孕期低营养状态的孕妇的营养水平相关，低营养状况的孕妇养育的后代常表现出LEP基因的低甲基化，且幼年时期基因甲基化的改变对个体的影响周期长[42]，并具有更高的肥胖风险。存在青少年时期创伤性经历的AN患者的常表现为更加严重的情绪症状及精神病性症状[32]。在抑郁症患者中也发现了不良家庭环境与GHSR基因甲基化水平的相关性[46]。虽然目前没有相关研究直接表明AN患者的GHSR基因与环境因素的直接相关性，在本研究中也仅仅发现了健康适应因子对AN患者临床症状严重程度的影响，并未深入研究环境因素导致AN症状产生的其他机制。本研究的重要缺陷在于缺乏随访，仅从入组时的状况无法对AN患者进行准确的亚组分型，无法排除患者之后的转型对本研究的影响。且本研究仅评估AN患者的负性生活事件，未纳入个体经历的环境中存在的其他因素如母孕期状况、个体营养状况、家庭环境等因素。因此在将来的研究中除了增加患者的随访之外还需要将更多的环境因素纳入研究并进一步分析环境因素及基因的甲基化对AN患者临床症状的影响。

## 4.4. 创新性与局限性

### 4.1 特色与创新

本研究主要探索GHSR及LEP基因启动子区甲基化以及环境因素对神经性厌食患者临床症状的影响，特色与创新之处如下：

1. 首次通过较大样本来AN女性患者的GHSR基因的甲基化状态与负性生活事件的相关性，并分析其对AN患者临床症状的影响。之前仅一项研究因甲基化对AN的影响，目前在AN领域，仅发现有一项小样本研究报道AN患的GHSR基因甲基化在AN患者和健康人群之间的差异，未评估AN患者的症状严重程度与甲基化水平之间的相关性。
2. 通过对负性生活事件与LEP及GHSR基因甲基化的相关性分析研究环境因素对AN发病机制的作用.既往对AN患者LEP的研究局限于与临床症状及康复情况的研究，缺乏环境因素对AN症状影响机制的研究。

### 4.2 研究不足与今后工作方向

本研究在研究方法及样本方面存在一些问题，需要在今后的工作中进一步改善。

1. 研究被试的选择

本研究为纳入的健康对照年龄及BMI与AN组存在一定差异，而年龄及营养状况对基因甲基化会产生一定影响，对最终的结果会产生一定影响。在之后的健康对照入组招募中可以针对性选择低年龄、低体重健康人群以排除混杂因素对结果的影响。

1. 样本组织的选择

本研究中的检测了外周血中的基因甲基化水平、然而GHSR与主要表达的部位为脑组织，而LEP表达于脂肪组织。虽然之前的研究并未发现人体不同组织中上述两个基因的甲基化存在显著差异，但理论上以合成及分泌的组织作为研究样本最佳。 因此将来可以在 动物模型中尝试更加深入的研究，进一步探索GHSR及LEP基因的甲基化在基因表达、蛋白质功能方面的影响。

1. 评估工具的选择：

本研究中纳入的环境因素仅评估了负性生活事件，而对基因甲基化产生影响的可能环境因素还包括妊娠环境、家庭成长环境。本研究仅针对基因的甲基化进行研究，并未同时对相关基因的转录、翻译水平及蛋白血浆水平进行分析，需在之后的研究中完善。

# 第五章 总结

本研究通过对纳入的AN患者和匹配的健康对照进行检测LEP基因及GHSR基因启动子区甲基化水平并评估进食障碍相关症状，明确AN患者的LEP基因及GHSR基因启动子区甲基化水平及其与临床症状的关系；并评估研究被试的与AN发病有关的生活事件因素，探索生活事件因素对LEP基因及GHSR基因甲基化及AN相关临床症状的影响；经过分析，我们可以得出以下结论：

1. GHSR基因及LEP基因甲基化于AN患者临床症状的产生相关，AN患者的GHSR基因启动子区域为高甲基化水平，LEP基因启动子区域为甲基化水平；
2. 负性生活事件与AN患者体型关注的严重程度有关，与GHSR基因及LEP基因甲基化水平相关。
3. GHSR基因及LEP基因甲基化水平与负性生活事件共同影响AN患者的临床症状。

本研究结果从表观遗传学的角度证实了GHSR基因及LEP基因甲基化参与AN的发病机制，对负性生活事件导致的基因甲基化水平异常进行了研究，并对对AN患者临床症状的影响因素进行综合分析，发现了负性生活事件可通过影响AN患者的基因甲基化水平导致临床症状的产生，对AN发病机制的研究提供了参考与启示。

# 参 考 文 献

[1] 王向群，王高华, 中国进食障碍防治指南[M], 北京：中华医学电子音像出版社 (2015).

[2] D.E. Battle, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM), Codas 25 (2013) 191-192.

[3] C. Iranzo-Tatay, D. Hervas-Marin, L.M. Rojo-Bofill, D. Garcia, F.J. Vaz-Leal, I. Calabria, L. Beato-Fernandez, S. Oltra, J. Sandoval, L. Rojo-Moreno, Genome-wide DNA methylation profiling in anorexia nervosa discordant identical twins, Transl Psychiatry 12 (2022) 15.

[4] A. Asakawa, A. Inui, T. Kaga, H. Yuzuriha, T. Nagata, N. Ueno, S. Makino, M. Fujimiya, A. Niijima, M.A. Fujino, M. Kasuga, Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin, Gastroenterology 120 (2001) 337-345.

[5] T.D. Müller, R. Nogueiras, M.L. Andermann, Z.B. Andrews, S.D. Anker, J. Argente, R.L. Batterham, S.C. Benoit, C.Y. Bowers, F. Broglio, F.F. Casanueva, D. D'Alessio, I. Depoortere, A. Geliebter, E. Ghigo, P.A. Cole, M. Cowley, D.E. Cummings, A. Dagher, S. Diano, S.L. Dickson, C. Diéguez, R. Granata, H.J. Grill, K. Grove, K.M. Habegger, K. Heppner, M.L. Heiman, L. Holsen, B. Holst, A. Inui, J.O. Jansson, H. Kirchner, M. Korbonits, B. Laferrère, C.W. LeRoux, M. Lopez, S. Morin, M. Nakazato, R. Nass, D. Perez-Tilve, P.T. Pfluger, T.W. Schwartz, R.J. Seeley, M. Sleeman, Y. Sun, L. Sussel, J. Tong, M.O. Thorner, A.J. van der Lely, L.H. van der Ploeg, J.M. Zigman, M. Kojima, K. Kangawa, R.G. Smith, T. Horvath, M.H. Tschöp, Ghrelin, Mol Metab 4 (2015) 437-460.

[6] M.A. Cowley, J.L. Smart, M. Rubinstein, M.G. Cerdán, S. Diano, T.L. Horvath, R.D. Cone, M.J. Low, Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus, Nature 411 (2001) 480-484.

[7] J.F. Davis, D.L. Choi, S.C. Benoit, Insulin, leptin and reward, Trends Endocrinol Metab 21 (2010) 68-74.

[8] C. Lesseur, D.A. Armstrong, A.G. Paquette, D.C. Koestler, J.F. Padbury, C.J. Marsit, Tissue-specific Leptin promoter DNA methylation is associated with maternal and infant perinatal factors, Mol Cell Endocrinol 381 (2013) 160-167.

[9] T. Mansell, A.L. Ponsonby, F. Collier, D. Burgner, P. Vuillermin, K. Lange, J. Ryan, R. Saffery, Genetic variation, intrauterine growth, and adverse pregnancy conditions predict leptin gene DNA methylation in blood at birth and 12 months of age, Int J Obes (Lond) 44 (2020) 45-56.

[10] L. Beranová, D. Sedlácková, J. Kopecková, V. Hainer, H. Papezová, H. Kvasnicková, J. Nedvídková, [Neuropeptide Y, ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and their changes during six-week refeeding], Vnitr Lek 55 (2009) 925-928.

[11] J.M. Eagles, M.I. Johnston, H.R. Millar, A case-control study of family composition in anorexia nervosa, Int J Eat Disord 38 (2005) 49-54.

[12] T. Bienvenu, N. Lebrun, J. Clarke, P. Duriez, P. Gorwood, N. Ramoz, Exome sequencing in a familial form of anorexia nervosa supports multigenic etiology, J Neural Transm (Vienna) 126 (2019) 1505-1511.

[13] M. Kesselmeier, C. Pütter, A.L. Volckmar, H. Baurecht, H. Grallert, T. Illig, K. Ismail, M. Ollikainen, Y. Silén, A. Keski-Rahkonen, C.M. Bulik, D.A. Collier, E. Zeggini, J. Hebebrand, A. Scherag, A. Hinney, High-throughput DNA methylation analysis in anorexia nervosa confirms TNXB hypermethylation, World J Biol Psychiatry 19 (2018) 187-199.

[14] M.R. Ceccarini, V. Precone, E. Manara, S. Paolacci, P.E. Maltese, V. Benfatti, K. Dhuli, K. Donato, G. Guerri, G. Marceddu, P. Chiurazzi, L. Dalla Ragione, T. Beccari, M. Bertelli, A next generation sequencing gene panel for use in the diagnosis of anorexia nervosa, Eat Weight Disord 27 (2022) 1869-1880.

[15] C. Blanchet, S. Guillaume, F. Bat-Pitault, M.E. Carles, J. Clarke, V. Dodin, P. Duriez, P. Gerardin, M. Hanachi-Guidoum, S. Iceta, J. Leger, B. Segrestin, C. Stheneur, N. Godart, Medication in AN: A Multidisciplinary Overview of Meta-Analyses and Systematic Reviews, J Clin Med 8 (2019).

[16] F.E. Joatar, A.A. Al Qarni, M.E. Ali, A. Al Masaud, A.M. Shire, N. Das, K. Gumaa, H.A. Giha, Leu72Met and Other Intronic Polymorphisms in the GHRL and GHSR Genes Are Not Associated with Type 2 Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, or Serum Ghrelin Levels in a Saudi Population, Endocrinol Metab (Seoul) 32 (2017) 360-369.

[17] V.L. Batury, E. Walton, F. Tam, M.L. Wronski, V. Buchholz, H. Frieling, S. Ehrlich, DNA methylation of ghrelin and leptin receptors in underweight and recovered patients with anorexia nervosa, J Psychiatr Res 131 (2020) 271-278.

[18] M. Romanowski, V. Dziedziejko, A. Maciejewska-Karlowska, M. Sawczuk, K. Safranow, L. Domanski, A. Pawlik, Adiponectin and leptin gene polymorphisms in patients with post-transplant diabetes mellitus, Pharmacogenomics 16 (2015) 1243-1251.

[19] L.E. Olofsson, E.K. Unger, C.C. Cheung, A.W. Xu, Modulation of AgRP-neuronal function by SOCS3 as an initiating event in diet-induced hypothalamic leptin resistance, Proc Natl Acad Sci U S A 110 (2013) E697-706.

[20] A. Neyazi, V. Buchholz, A. Burkert, T. Hillemacher, M. de Zwaan, W. Herzog, K. Jahn, K. Giel, S. Herpertz, C.A. Buchholz, A. Dinkel, M. Burgmer, A. Zeeck, S. Bleich, S. Zipfel, H. Frieling, Association of Leptin Gene DNA Methylation With Diagnosis and Treatment Outcome of Anorexia Nervosa, Front Psychiatry 10 (2019) 197.

[21] P.A. Shih, D.B. Woodside, Contemporary views on the genetics of anorexia nervosa, Eur Neuropsychopharmacol 26 (2016) 663-673.

[22] J.C. Ahrén, F. Chiesa, B. Af Klinteberg, I. Koupil, Psychosocial determinants and family background in anorexia nervosa--results from the Stockholm Birth Cohort Study, Int J Eat Disord 45 (2012) 362-369.

[23] M.J. Jacobs, S. Roesch, S.A. Wonderlich, R. Crosby, L. Thornton, D.E. Wilfley, W.H. Berrettini, H. Brandt, S. Crawford, M.M. Fichter, K.A. Halmi, C. Johnson, A.S. Kaplan, M. Lavia, J.E. Mitchell, A. Rotondo, M. Strober, D.B. Woodside, W.H. Kaye, C.M. Bulik, Anorexia nervosa trios: behavioral profiles of individuals with anorexia nervosa and their parents, Psychol Med 39 (2009) 451-461.

[24] S. Fassino, F. Amianto, G. Abbate-Daga, The dynamic relationship of parental personality traits with the personality and psychopathology traits of anorectic and bulimic daughters, Compr Psychiatry 50 (2009) 232-239.

[25] P.E. Garfinkel, D.M. Garner, J. Rose, P.L. Darby, J.S. Brandes, J. O'Hanlon, N. Walsh, A comparison of characteristics in the families of patients with anorexia nervosa and normal controls, Psychol Med 13 (1983) 821-828.

[26] P. Longo, E. Marzola, C. De Bacco, M. Demarchi, G. Abbate-Daga, Young Patients with Anorexia Nervosa: The Contribution of Post-Traumatic Stress Disorder and Traumatic Events, Medicina (Kaunas) 57 (2020).

[27] S.H.W. Mares, M.S. Vroling, [Trauma and anorexia nervosa: the association between trauma characteristics, PTSD and the duration of the eating disorder], Tijdschr Psychiatr 62 (2020) 541-548.

[28] J. Spiegel, S. Arnold, H. Salbach, E.G. Gotti, E. Pfeiffer, U. Lehmkuhl, C.U. Correll, C. Jaite, Emotional abuse interacts with borderline personality in adolescent inpatients with binge-purging eating disorders, Eat Weight Disord 27 (2022) 131-138.

[29] A.M. Pignatelli, M. Wampers, C. Loriedo, M. Biondi, J. Vanderlinden, Childhood neglect in eating disorders: A systematic review and meta-analysis, J Trauma Dissociation 18 (2017) 100-115.

[30] E.E. Burns, S. Fischer, J.L. Jackson, H.G. Harding, Deficits in emotion regulation mediate the relationship between childhood abuse and later eating disorder symptoms, Child Abuse Negl 36 (2012) 32-39.

[31] F.Y. Tian, S.L. Rifas-Shiman, A. Cardenas, A.A. Baccarelli, D.L. DeMeo, A.A. Litonjua, J.W. Rich-Edwards, M.W. Gillman, E. Oken, M.F. Hivert, Maternal corticotropin-releasing hormone is associated with LEP DNA methylation at birth and in childhood: an epigenome-wide study in Project Viva, Int J Obes (Lond) 43 (2019) 1244-1255.

[32] A. Córdova-Palomera, H. Palma-Gudiel, J. Forés-Martos, R. Tabarés-Seisdedos, L. Fañanás, Epigenetic outlier profiles in depression: A genome-wide DNA methylation analysis of monozygotic twins, PLoS One 13 (2018) e0207754.

[33] W. Verlaat, P.J.F. Snijders, P.W. Novianti, S.M. Wilting, L.M.A. De Strooper, G. Trooskens, J. Vandersmissen, W. Van Criekinge, G.B.A. Wisman, C. Meijer, D.A.M. Heideman, R.D.M. Steenbergen, Genome-wide DNA Methylation Profiling Reveals Methylation Markers Associated with 3q Gain for Detection of Cervical Precancer and Cancer, Clin Cancer Res 23 (2017) 3813-3822.

[34] J. Bosschieter, J.A. Nieuwenhuijzen, A. Hentschel, A.P. van Splunter, L.I. Segerink, A.N. Vis, S.M. Wilting, B.I. Lissenberg-Witte, A.v.M. RJ, R.D. Steenbergen, A two-gene methylation signature for the diagnosis of bladder cancer in urine, Epigenomics 11 (2019) 337-347.

[35] F. Coppedè, M. Seghieri, A. Stoccoro, E. Santini, L. Giannini, C. Rossi, L. Migliore, A. Solini, DNA methylation of genes regulating appetite and prediction of weight loss after bariatric surgery in obese individuals, J Endocrinol Invest 42 (2019) 37-44.

[36] G.A. Dunn, T.L. Bale, Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice, Endocrinology 150 (2009) 4999-5009.

[37] Q. Kang, R.C.K. Chan, X. Li, J. Arcelus, L. Yue, J. Huang, L. Gu, Q. Fan, H. Zhang, Z. Xiao, J. Chen, Psychometric Properties of the Chinese Version of the Eating Attitudes Test in Young Female Patients with Eating Disorders in Mainland China, Eur Eat Disord Rev 25 (2017) 613-617.

[38] 古练, 进食障碍检查自评问卷6.0中文版在女性进食障碍患者中应用的效度和信度[J], 中国心理卫生杂志,2017,31(05):350-355. (2017).

[39] 刘. 刘贤臣, 杨杰,柴福勋,王爱祯,孙良民,赵贵芳,马登岱., 青少年生活事件量表的信度效度检验[J].中国临床心理学杂志,1997(01):39-41.

[40] E. Pjetri, E. Dempster, D.A. Collier, J. Treasure, M.J. Kas, J. Mill, I.C. Campbell, U. Schmidt, Quantitative promoter DNA methylation analysis of four candidate genes in anorexia nervosa: a pilot study, J Psychiatr Res 47 (2013) 280-282.

[41] H.P.-G. Aldo Córdova-Palomera , Jaume Forés-Martos , Rafael Tabarés-Seisdedos , Lourdes Fañanás Epigenetic outlier profiles in depression: A genome-wide DNA methylation analysis of monozygotic twins, PLoS One 13 (2018) e0207754.

[42] C. Jousse, L. Parry, S. Lambert-Langlais, A.C. Maurin, J. Averous, A. Bruhat, V. Carraro, J. Tost, P. Letteron, P. Chen, R. Jockers, J.M. Launay, J. Mallet, P. Fafournoux, Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome, Faseb j 25 (2011) 3271-3278.

[43] H. Steiger, L. Booij, Kahan, K. McGregor, L. Thaler, E. Fletcher, A. Labbe, R. Joober, M. Israël, M. Szyf, L.B. Agellon, L. Gauvin, A. St-Hilaire, E. Rossi, A longitudinal, epigenome-wide study of DNA methylation in anorexia nervosa: results in actively ill, partially weight-restored, long-term remitted and non-eating-disordered women, J Psychiatry Neurosci 44 (2019) 205-213.

[44] S.M. Innis, C.L. Birmingham, E.J. Harbottle, Are plasma homocysteine and methionine elevated when binging and purging behavior complicates anorexia nervosa? Evidence against the transdiagnostic theory of eating disorders, Eat Weight Disord 14 (2009) e184-189.

[45] K. Raspopow, A. Abizaid, K. Matheson, H. Anisman, Psychosocial stressor effects on cortisol and ghrelin in emotional and non-emotional eaters: influence of anger and shame, Horm Behav 58 (2010) 677-684.

[46] S. Penner-Goeke, E.B. Binder, Epigenetics and depression Dialogues Clin Neurosci 21 (2019) 397-405.