

· 技术与应用 ·

过敏者外周血DNA甲基化差异

刘明哲¹, 郭华林¹, 冯彦², 李建国³, 李鹏飞¹, 高彩荣¹, 郭相杰¹

1. 山西医科大学法医学院, 山西 晋中 030600; 2. 山西医科大学第一医院, 山西 太原 030000; 3. 中国辐射防护研究院, 山西 太原 030000

摘要: 目的 通过研究头孢类药物过敏性休克死亡者外周血有核细胞DNA甲基化情况, 为药物过敏性休克死亡的法医学诊断提供新的研究方向和依据。方法 运用甲基化芯片检测头孢类药物过敏性休克死亡者和免疫正常者外周血有核细胞DNA甲基化情况。使用R语言methykit、ChAMP包分别对测序数据、芯片数据进行DNA甲基化差异分析, 运用随机森林算法对所得DNA甲基化差异位点重要性进行评估。结果 在*ETS1*、*PRR23B*、*GNAS*等基因座上获得与头孢类药物过敏高度相关的DNA甲基化差异位点。结论 头孢类药物过敏与DNA甲基化相关, DNA甲基化有望成为过敏性休克死亡的法医学鉴定新策略。

关键词: 法医病理学; 过敏反应; DNA甲基化; DNA芯片; 药物过敏

中图分类号: DF795.1 文献标志码: A doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2019.490414

文章编号: 1004-5619(2021)02-0211-04

DNA Methylation Differences in Peripheral Blood of Patients with Anaphylaxis

LIU Ming-zhe¹, GUO Hua-lin¹, FENG Yan², LI Jian-guo³, LI Peng-fei¹, GAO Cai-rong¹, GUO Xiang-jie¹

1. School of Forensic Medicine, Shanxi Medical University, Jinzhong 030600, Shanxi Province, China; 2. First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China; 3. China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030000, China

Abstract: **Objective** To study the DNA methylation of nucleated cells in peripheral blood of patients died from anaphylactic shock caused by cephalosporin drugs and to provide a new research direction and basis for the forensic diagnosis of shock caused by drug hypersensitiveness. **Methods** Methylation microarray was used to detect DNA methylation of nucleated cells in peripheral blood of patients died from anaphylactic shock caused by cephalosporin drugs and normal subjects. Sequencing data and chip data were analyzed for differences in DNA methylation using R language methykit, ChAMP package. Random forest algorithm was used to evaluate the importance of the DNA methylation differential sites. **Results** Differential sites of DNA methylation highly associated with anaphylaxis caused by cephalosporin drugs were obtained at loci such as *ETS1*, *PRR23B* and *GNAS*. **Conclusion** Cephalosporin allergy is associated with DNA methylation, and DNA methylation may be a new strategy for forensic identification of anaphylactic shock and death.

Keywords: forensic pathology; anaphylactic response; DNA methylation; DNA chip; drug anaphylaxis

近年来, 过敏反应的发病率逐年升高, 已成为影响人类健康的全球性疾病^[1]。虽然过敏与遗传因素有关^[2], 但传统的遗传易感模型不能完全解释近年来过敏反应快速增加的现象。研究表明, 过敏反应可能与早期环境暴露有关^[3], 环境因素可能通过影响DNA甲基化水平改变基因表达, 进而影响过敏的发生、发展^[4]。

在我国, 严重药物过敏反应导致的死亡也时有发生, 法医学实践中常涉及药物过敏性休克死亡的鉴定, 其中以头孢类药物过敏最为多见^[5]。本研究通过

对头孢类药物致过敏性休克死亡者外周血有核细胞DNA进行甲基化芯片检测, 运用生物信息学和随机森林算法进行分析, 对DNA甲基化与头孢类药物过敏的相关性进行研究, 为过敏性休克死亡提供新的鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

2100生物分析仪(美国Agilent公司), 甲基化芯

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81971790); 山西省科技厅自然科学基金面上项目(201601D102070); 山西医科大学博士启动基金资助项目(03201536)

作者简介: 刘明哲(1992—), 男, 硕士, 主要从事过敏性休克死亡相关法医学研究; E-mail: 1435884000@qq.com

通信作者: 郭相杰, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事法医病理学研究; E-mail: 258187101@qq.com

片 Infinium MethylationEPIC BeadChip (简称“850K 芯片”), HiSeq™ 2000 高通量测序仪(美国 Illumina 公司)。

磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司], Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒(美国 Beckman Coulter 公司), EZ DNA Methylation-Gold™ 试剂盒(美国 Zymo Research 公司)。

1.2 研究对象

收集头孢类药物过敏性休克死亡者 5 例为实验组, 免疫正常者 5 例为对照组, 分别采集外周静脉血, 采用磁珠法提取 DNA 样本以备检测。本实验已通过山西医科大学科学研究伦理审查委员会审批(审批号 2018LL016)。

头孢类药物过敏性休克死亡者样本从山西医科大学司法鉴定中心获得, 均为山西汉族人, 年龄 20~60 岁, 其中男性 3 人、女性 2 人。入选标准: (1) 有明确的首孢类药物输注史或血液(或可疑输注部位皮肤)检出头孢类药物成分; (2) 输注头孢类药物后出现休克症状, 并在短时间内死亡; (3) 咽喉、肺及胃肠组织免疫组织化学染色结果显示类胰蛋白酶、类糜蛋白酶多量阳性表达; (4) 排除其他原因(疾病、中毒)死亡的可能; (5) 尸体未发生腐败, 血清总 IgE > 200 IU/mL。

对照组为身体健康的山西汉族人, 年龄 20~25 岁, 其中男性 2 人、女性 3 人, 无过敏史、既往无手术史, 实验室皮肤点刺实验均为阴性, 血清总 IgE < 100 IU/mL, 中国人群常见过敏原特异性 IgE 均为阴性, 头孢类及青霉素类药物皮试阴性。

1.3 构建 DNA 文库

(1) 样本 DNA 片段化处理后连接甲基化接头并纯化; (2) 加接头的 DNA 片段经重亚硫酸盐处理, 未发生甲基化的 C 碱基转化为 U 碱基; (3) 利用 PCR 选择性富集、扩增加接头的 DNA 片段, 构建 DNA 文库; (4) 使用定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 进行 DNA 文库定量; (5) 使用 2100 生物分析仪对 PCR 富集片段进行质量控制, 验证 DNA 文库的片段大小及分布。

1.4 DNA 甲基化检测

基于二代测序平台(HiSeq™ 2000 高通量测序仪), 使用 850K 芯片对头孢类药物过敏性休克死亡者与免疫正常者进行 DNA 甲基化检测。

1.5 过敏相关 DNA 甲基化位点的筛选

对数据进行质量控制和过滤(过滤低质量位点、SNP 干扰位点等)后, 使用 R 语言 methylkit 包分析测序数据、R 语言 ChAMP 包分析芯片数据, 得到头孢类

药物过敏性休克死亡者与免疫正常者的 DNA 甲基化差异位点, 与人类参考基因组 37 (Genome Reference Consortium human 37, GRCh37; <https://grch37.ensembl.org>) 比对并进行注释。使用 R 语言随机森林包(randomForest) 基于所得 DNA 甲基化差异位点进行有监督的随机森林类别回归(classification) 分析, 并评估 DNA 甲基化差异位点重要性^[6]。在 R 语言的随机森林算法(randomForest 包) 中, 使用 MeanDecreaseAccuracy (变量被替换后的准确率下降平均值) 与 MeanDecreaseGini (变量被替换后 Gini 指数下降平均值) 参数对变量的重要性进行评估, 数值越大, 重要性越高, 即对模型准确分型的贡献越高, 则该变量(DNA 甲基化差异位点) 的差异更为显著。对两种参数获得 DNA 甲基化差异位点的可靠性进行评估时, 认为分布梯度(即不同差异位点之间横坐标指数差异) 越明显, 该参数获得的 DNA 甲基化差异位点越可信^[6]。随机森林函数关键参数: ntree=500, mtry=2, importance=TURE; 余为默认值。

2 结 果

对头孢类药物过敏性休克死亡者与免疫正常者外周血 DNA 进行甲基化检测后, 分析甲基化差异位点, 得到约 10 000 个甲基化差异位点($P < 0.05$)。使用 R 语言 randomForest 包进行有监督的随机森林类别回归分析, 评估 DNA 甲基化差异位点的重要性, 得到前 30 个位点(图 1)。由图 1 可见, 在评估头孢类药物过敏相关 DNA 甲基化位点的可靠性时, MeanDecreaseAccuracy 的梯度分布更优, MeanDecreaseAccuracy 前 30 个位点的详细信息见表 1, 其中头孢类药物过敏相关前 30 个甲基化差异位点对应在 *ETSI*、*PRR23B*、*GNAS* 等 27 个基因上。

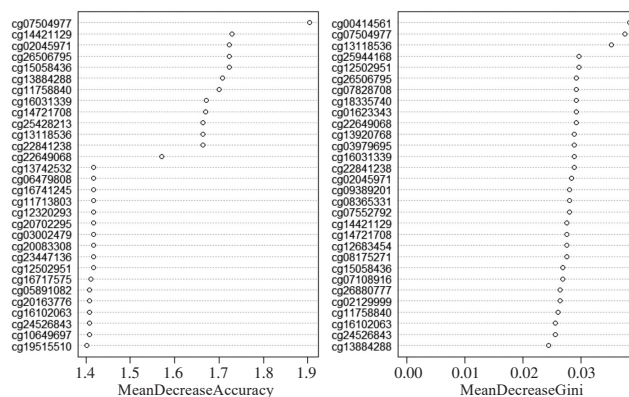


图 1 头孢类药物过敏相关 DNA 甲基化差异位点的重要性(前 30 个)

Fig. 1 Importance of DNA methylation differential sites associated with cephalosporin drug anaphylaxis (top 30)

表1 头孢类药物过敏相关DNA甲基化差异位点信息(MeanDecreaseAccuracy前30个)

Tab. 1 Information of the DNA methylation differential sites associated with cephalosporin drugs anaphylaxis (top 30 of MeanDecreaseAccuracy)

甲基化位点	染色体	位置(Mapping)	DNA链 ¹⁾	P值	甲基化差异 ²⁾	基因注释
cg07504977	10	102131012	-	0.006 021	hyper	/
cg14421129	11	128372897	+	0.005 674	hyper	<i>ETS1</i>
cg02045971	3	138739874	+	0.007 277	hypo	<i>PRR23B</i>
cg26506795	20	57467130	-	0.007 861	hyper	<i>GNAS</i>
cg15058436	10	32636315	+	0.008 440	hyper	<i>EPC1</i>
cg13884288	22	38004832	-	0.007 861	hyper	<i>GGA1</i>
cg11758840	21	34696588	-	0.005 685	hyper	<i>IFNAR1</i>
cg16031339	15	41047896	+	0.008 680	hyper	<i>FAM82A2</i>
cg14721708	22	43606235	-	0.005 955	hypo	<i>SCUBE1</i>
cg25428213	17	80929211	-	0.008 096	hypo	<i>B3GNTL1</i>
cg13118536	22	41215559	+	0.008 947	hyper	<i>SLC25A17</i>
cg22841238	18	43536317	+	0.009 092	hypo	<i>EPG5</i>
cg22649068	1	150552352	+	0.008 301	hyper	<i>MCL1</i>
cg13742532	3	42850848	+	0.000 775	hypo	<i>CCBP2</i>
cg23447136	8	54755782	-	0.004 620	hyper	<i>ATP6V1H</i>
cg06479808	9	131790695	-	0.007 437	hyper	<i>SH3GLB2</i>
cg16741245	12	66565224	+	0.007 686	hypo	<i>TMBIM4</i>
cg11713803	19	22034876	-	0.007 861	hyper	<i>ZNF43</i>
cg12320293	2	102314131	+	0.008 424	hyper	<i>MAP4K4</i>
cg20702295	22	20307583	+	0.008 638	hyper	<i>DGCR6L</i>
cg12502951	9	649594	+	0.008 663	hyper	<i>KANK1</i>
cg03002479	7	143106004	+	0.008 947	hyper	<i>EPHA1</i>
cg20083308	1	100731655	+	0.009 180	hyper	<i>RTCA-AS1</i>
cg16717575	18	32303367	+	0.006 021	hyper	<i>DTNA</i>
cg05891082	8	28480185	-	0.005 674	hyper	/
cg20163776	19	7078211	+	0.007 075	hypo	<i>ZNF557</i>
cg16102063	8	22298240	-	0.008 117	hyper	<i>PPP3CC</i>
cg24526843	6	32081263	-	0.008 313	hypo	/
cg10649697	21	26212729	+	0.008 947	hypo	<i>LOC339622</i>
cg19515510	17	73201236	-	0.007 277	hyper	<i>NUP85</i>

注:1)“+”、“-”分别表示DNA链的正链、负链;2)hypo表示与对照组相比,DNA甲基化水平升高,hyper反之;“/”表示未注释到基因。

3 讨论

药物过敏性休克死亡的死因判定是法医病理学鉴定的一大难题。目前,涉及过敏性休克死亡的鉴定,是在结合案情、发病经过、临床症状、尸体检验结果和实验室检查结果的基础上,综合分析得出的排除性结论^[7]。因此,寻找准确、客观的实验室诊断指标是药物过敏性休克死亡法医学鉴定亟待解决的问题。

已有研究^[3-4]表明,DNA甲基化水平的改变与过敏反应的发生、发展有关。但是,目前过敏与DNA甲基化的相关研究大都局限于过敏性哮喘^[8-9]、过敏性紫癜等过敏性疾病中。本研究对头孢类药物过敏性休克死亡者外周血DNA甲基化进行检测、分析,获得10 000个甲基化差异位点,其中前30个位点对应*ETS1*、*PRR23B*、*GNAS*等27个基因。HE等^[10]研究认

为,*ETS1*基因甲基化通过调节T细胞参与了过敏性疾病的发生,说明头孢类药物过敏与DNA甲基化有关,通过寻找DNA甲基化差异可能为药物过敏性休克死亡的法医学鉴定提供辅助诊断依据。本实验筛选获得的DNA甲基化差异位点,可将头孢类药物过敏性休克死亡者与正常人群区分开来,说明其有望应用于过敏性休克死亡案例的鉴定诊断。但由于本实验样本量相对较小,在实际应用中还存在一定的局限,下一步实验还需进一步扩大样本量进行药物过敏与DNA甲基化差异研究。

由于不同过敏原的致敏机制不同^[11-12],致敏的发生也与环境影响因素有关^[13-14],因此,法医学实践中运用DNA甲基化差异进行药物过敏性休克死亡法医学辅助诊断时,应考虑到药物种类不同其相关的DNA甲基化差异位点(基因)也不同。

综上所述,头孢类药物过敏与DNA甲基化相关,通过寻找DNA甲基化差异可能为药物过敏性休克死亡的法医学鉴定提供辅助诊断依据。

参考文献:

- [1] DHAMI S, SHEIKH A. Anaphylaxis: Epidemiology, aetiology and relevance for the clinic[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13(9):889-895. doi:10.1080/1744666X.2017.1334552.
- [2] CHEN C B, ABE R, PAN R Y, et al. An updated review of the molecular mechanisms in drug hypersensitivity[J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 6431694. doi:10.1155/2018/6431694.
- [3] LEE S, HESS E P, LOHSE C, et al. Trends, characteristics, and incidence of anaphylaxis in 2001-2010: A population-based study[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(1):182-188.e2. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.029.
- [4] PASCUAL M, SUZUKI M, ISIDORO-GARCIA M, et al. Epigenetic changes in B lymphocytes associated with house dust mite allergic asthma[J]. *Epigenetics*, 2011, 6(9):1131-1137. doi:10.4161/epi.6.9.16061.
- [5] SHEN Y, LI L, GRANT J, et al. Anaphylactic deaths in Maryland (United States) and Shanghai (China): A review of forensic autopsy cases from 2004 to 2006[J]. *Forensic Sci Int*, 2009, 186(1/2/3): 1-5. doi:10.1016/j.forsciint.2008.12.007.
- [6] LIAW A, WIENER M. Classification and regression by randomForest[J]. *R News*, 2002, 2(3):18-22.
- [7] 陈劲果, 乔东访, 岳霞. 过敏性休克诊断的法医学研究进展[J]. *中国法医学杂志*, 2017, 32(4): 359-362, 367. doi:10.13618/j.issn.1001-5728.2017.04.006
- CHEN J G, QIAO D F, YUE X. Advancement on the diagnosis of anaphylactic shock in forensic medicine[J]. *Zhongguo Fayixue Zazhi*, 2017, 32(4): 359-362, 367.
- [8] RUNYON R S, CACHOLA L M, RAJESHUNI N, et al. Asthma discordance in twins is linked to epigenetic modifications of T cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e48796. doi:10.1371/journal.pone.0048796.
- [9] 树叶, 罗鸯鸯, 罗勇奇, 等. 过敏性紫癜患者CD4⁺ T细胞叉头框蛋白3基因甲基化水平及其与调节性T细胞的关系[J]. *中华皮肤科杂志*, 2019, 52(3):162-166. doi:10.3760/cma.j.issn.0412-4030.2019.03.003.
- SHU Y, LUO Y Y, LUO Y Q, et al. DNA methylation status of the forkhead box protein 3 gene in CD4⁺ T cells of patients with Henoch-Schonlein purpura and its correlation with regulatory T cells[J]. *Zhonghua Pifuke Zazhi*, 2019, 52(3):162-166.
- [10] HE C F, LIU Y S, CHENG Y L, et al. *TNIP1*, *SLC15A4*, *ETS1*, *RasGRP3* and *IKZF1* are associated with clinical features of systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population[J]. *Lupus*, 2010, 19(10):1181-1186. doi:10.1177/0961203310367918.
- [11] 王东明, 左媛媛, 何翔, 等. 食物过敏的致敏途径及发生机制的研究进展[J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2017, 16(5):477-480.
- WANG D M, ZUO Y Y, HE X, et al. Research progress on sensitization pathway and pathogenesis of food allergy[J]. *Zhongguo Zhongxiyijiehe Pifuxingbingxue Zazhi*, 2017, 16(5):477-480.
- [12] 刘志刚, 李静, 鄢玉兰, 等. 中国特色过敏原的基础研究[C]//中华医学会2009年全国变态反应学术会议论文集, 厦门, 2009:70-72.
- LIU Z G, LI J, WU Y L. Basic research on Chinese characteristic allergens[C]// Proceedings of 2009 National Allergy Academic Conference of Chinese Medical Association, Xiamen, 2009:70-72.
- [13] MARTINO D, DANG T, SEXTON-OATES A, et al. Blood DNA methylation biomarkers predict clinical reactivity in food-sensitized infants[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(5):1319-1328.e12. doi:10.1016/j.jaci.2014.12.1933.
- [14] 王麦秋. 环境空气污染的长期暴露与全基因组DNA甲基化的关联研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- WANG M Q. Association analysis of genome-wide DNA methylation with long-term ambient air pollution exposure[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.

(收稿日期:2019-04-25)

(本文编辑:黄平)

(上接第210页)

- [7] 黄丽丹, 邓丽珠, 赵文俊, 等. 颈内动脉虹吸部血流动力学模拟与影响因素[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(37): 5998-6004. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.37.018.
- HUANG L D, DENG L Z, ZHAO W J, et al. Hemodynamics simulation of internal carotid artery siphon and relevant influential factors[J]. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*, 2015, 19(37):5998-6004.
- [8] SALVATORI M, KODIKARA S, POLLANEN M. Fatal subarachnoid hemorrhage following traumatic

rupture of the internal carotid artery[J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2012, 14(6):328-330. doi:10.1016/j.legalmed.2012.06.004.

- [9] CHIBA F, INOKUCHI G, MAKINO Y, et al. Post-mortem angiography revealing traumatic rupture of the intracranial internal carotid artery[J]. *Int J Legal Med*, 2018, 132(2):589-592. doi:10.1007/s00414-017-1752-x.

(收稿日期:2020-03-30)

(本文编辑:张建华)