

· 论 著 ·

NRXN1 基因和 MECP2 基因 SNP 检测及其与儿童自闭症临床表现的关联研究*

邹甜甜¹, 李 胜¹, 方欣怡¹, 柯海燕¹, 魏莉平¹, 沈 翠^{2△}

鄂东医疗集团黄石市妇幼保健院/湖北理工学院附属妇幼保健院:1. 检验科;2. 超声科, 湖北黄石 435000

摘要:目的 探讨神经轴突蛋白 1(NRXN1)基因和甲基 CpG 结合蛋白-2(MECP2)基因单核苷酸多态性(SNP)与儿童自闭症临床表现及易感性的关系。**方法** 选取 2019 年 9 月至 2021 年 6 月于该院就诊或进行康复治疗 128 例自闭症患儿为自闭症组,同期选取该院 145 例体检健康儿童作为对照组。采用 Sequenom MassArray platform 分型技术检测 NRXN1(rs1421589 位点)和 MECP2(rs2239464 位点)基因型,采用孤独症儿童行为检查量表(ABC)评分对患儿临床行为进行测评,采用儿童孤独症评定量表(CARS)评分测评患儿病情严重程度;采用 Logistic 回归分析 NRXN1 和 MECP2 基因型对自闭症发生的影响。**结果** 对照组和自闭症组 NRXN1 基因检出 CC 型、CT 型、TT 型 3 种基因型,MECP2 基因检出 AA 型、AG 型、GG 型 3 种基因型。对照组中 CC 型基因型(49.66%)、AA 型基因型(50.34%)比例较高;自闭症组中 TT 型基因型(57.81%)、GG 型基因型(49.21%)比例较高。经吻合度检验,对照组和自闭症组 NRXN1 基因、MECP2 基因 SNP 分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡法则(NRXN1: $\chi^2 = 1.386, 5.069$; MECP2: $\chi^2 = 4.297, 5.508, P > 0.05$)。NRXN1 和 MECP2 不同基因型自闭症患儿感觉、交往等各因子得分、ABC 总分及疾病严重程度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TT 型基因型(rs1421589 位点)、GG 型基因型(rs2239464 位点)是影响自闭症发生的独立危险因素($P < 0.05$)。**结论** NRXN1 基因和 MECP2 基因 SNP 与儿童自闭症有关,携带基因型 TT、GG 的患儿有更严重的自闭症临床行为。

关键词:儿童; 自闭症; 神经轴突蛋白 1; 甲基 CpG 结合蛋白-2; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.08.019 **中图法分类号:**R749.94

文章编号:1673-4130(2022)08-0990-05 **文献标志码:**A

NRXN1 gene and MECP2 gene SNP detection and its correlation with the clinical manifestations of children with autism*

ZOU Tiantian¹, LI Sheng¹, FANG Xinyi¹, KE Haiyan¹, WEI Liping¹, SHEN Cui^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Ultrasound, Huangshi Maternal and Child Health Hospital/Affiliated Maternal and Child Health Hospital of Hubei Institute of Technology, Huangshi, Hubei 435000, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between single nucleotide polymorphisms(SNPs) of neurexin 1(NRXN1) gene and methyl-CpG-binding protein 2(MECP2) gene and the clinical manifestations and susceptibility of children with autism. **Methods** A total of 128 children with autism who were treated or undergoing rehabilitation in a hospital from September 2019 to June 2021 were selected as the autism group, and 145 healthy children were selected as the control group during the same period. Sequenom MassArray platform typing technology was used to detect NRXN1(rs1421589 locus) and MECP2(rs2239464 locus) genotypes, Autism Behavior Checklist(ABC) score was used to evaluate the children's clinical behavior, the Child Autism Rating Scale(CARS) score was used to assess the severity of the children's condition; Logistic regression was used to analyze the influence of NRXN1 and MECP2 genotypes on the occurrence of autism. **Results** Three genotypes of CC type, CT type and TT type were detected in the NRXN1 gene of the control

* 基金项目:湖北省卫生健康委员会科研项目(WJ2019H447)。

作者简介:邹甜甜,女,主管技师,主要从事关于自闭症的临床相关研究。△ 通信作者, E-mail:49130751@qq.com。

group and the autism group, and three genotypes of AA type, AG type and GG type were detected in the MECP2 gene. In the control group, the proportions of CC genotype (49.66%) and AA genotype (50.34%) were higher; in the autism group, the proportions of TT genotype (57.81%) and GG genotype (49.21%) were higher. After the anastomosis test, the SNP distribution of NRXN1 gene and MECP2 gene in the control group and the autism group conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium rule (NRXN1: $\chi^2 = 1.386, 5.069$; MECP2: $\chi^2 = 4.297, 5.508, P > 0.05$). There were significant differences in the scores of factors such as sensory, communication and other factors, total ABC score and disease severity in children with autism with different genotypes of NRXN1 and MECP2 ($P < 0.05$). TT genotype (rs1421589 locus) and GG genotype (rs2239464 locus) were independent risk factors affecting the occurrence of autism ($P < 0.05$). **Conclusion** NRXN1 gene and MECP2 gene SNP are related to autism in children, and children with genotypes TT and GG have more severe clinical behaviors of autism.

Key words: children; autism; neurexin 1; methyl-CpG-binding protein 2; single nucleotide polymorphism

儿童自闭症又称孤独症,它是一种儿童时期广泛性发育障碍疾病,部分患儿常常与癫痫、精神发育迟滞、注意缺陷多动障碍、进食障碍等疾病共病,对儿童的身心健康造成严重的影响^[1]。目前越来越多的研究学者在积极探索自闭症发病原因及机制,以期为早期干预及预防提供重要依据^[2]。杨柳等^[3]研究显示,CD157/BST-1 基因 rs4301112 位点 AG 基因型和 G 等位基因可能与儿童自闭症谱系障碍发生风险及病情严重程度有关。许天友等^[4]研究表明,GABRB3 基因 rs8179184 位点 CA、AA 型与自闭症患儿的发病密切相关。据此推测儿童自闭症的发病可能与多种基因多态性有密切联系。神经轴突蛋白 1(NRXN1)及其家族作为自闭症的候选致病基因已得到广泛的关注,且许多研究表明其基因变异会改变疾病的发病风险^[5-6]。甲基 CpG 结合蛋白-2(MECP2)是雷特综合征的致病基因,但其基因突变与其他神经系统发育障碍性疾病也有密切联系^[7-8]。YUKA 等^[9]调查显示,包括 NRXN1、MECP2 在内的多种基因的罕见突变均与自闭症谱系障碍有关。本研究主要探讨 128 例自闭症患儿 NRXN1 基因(rs1421589 位点)和 MECP2 基因(rs2239464 位点)单核苷酸多态性(SNP)与自闭症发病风险的关联性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2019 年 9 月至 2021 年 6 月于本院就诊或进行康复治疗的 128 例自闭症患儿(自闭症组)的临床资料,平均(5.34±2.32)岁,男 88 例,女 40 例;同期选取本院 145 例体检健康儿童作为对照组,平均(5.46±2.17)岁,男 86 例,女 59 例。纳入标准:(1)自闭症患儿由神经科医生依据第 5 版《诊断与统计手册:精神障碍》进行专业诊断;(2)临床资料齐全,且均为初次确诊;(3)所有儿童均为汉族人群;(4)研究经医院临床研究伦理委员会批准,家属签

署书面知情同意书,健康儿童无多动症、智力障碍及自闭症等神经发育障碍类疾病。排除标准:(1)伴有先天性心脏病等严重先天性疾病及恶性肿瘤;(2)有厌食症或癔症等精神心理性疾病;(3)有重要脏器组织功能不全及其他遗传性疾病。

1.2 仪器与试剂 聚合酶链反应(PCR)仪(型号:T100)购自美国 Bio-Rad 公司;紫外分光光度计(型号:A30221)购自美国 Thermo Fisher 公司。基因组 DNA 提取试剂盒(货号:D1800)购自上海晶风生物科技有限公司;Taq DNA polymerase(货号:RE0110-0.5kU)购自北京金克隆生物技术有限公司;PCR Buffer(货号:)购自瑞士 Roche 公司;dNTP 溶液(货号:YS-10303RJ)购自上海雅吉生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 观察指标 采用孤独症儿童行为检查量表(ABC)评分测评患儿感觉、交往、语言、躯体运动、生活自理 5 个因子,共 57 个条目(228 分),分数超过 53 分可能患自闭症;超过 67 分可明确诊断自闭症。采用儿童孤独症评定量表(CARS)评分测评患儿病情严重程度,量表评分共 60 分,<30 分为正常;30~<37 分,且低于 3 分的项目不到 5 项为轻中度;37~60 分,且至少 5 项评分高于 3 分为重度。

1.3.2 NRXN1 和 MECP2 基因型检测 采集患儿确诊后外周静脉血样,室温静置 30~60 min,3 000 r/min 离心 15 min 后收集上层血清,置于-80℃保存待测。参照 DNA 提取试剂盒说明书提取血清基因组 DNA,提取后采用紫外分光光度计测定浓度及纯度。PCR 用于扩增 DNA,其体系包括:DNA 模板 2.0 μL,上下游引物各 0.5 μL,MgCl₂ 1.5 μL,dNTP 2.0 μL,PCR Buffer 2.5 μL,Taq DNA polymerase 0.2 μL,ddH₂O 15.8 μL。反应条件均为 95℃预变性 5 min;95℃变性 20 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 1

min, 45 个循环, 引物序列见表 1。本研究基因分型由北京博森生物科技有限公司采用 Sequenom MassAr-

ray platform 分型技术进行。

表 1 PCR 引物序列

基因	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
NRXN1 rs1421589	GAGAAGCCGGGTCTACTG	TATGTGCTGCATCACCAGCC
MECP2 rs2239464	GCACGTGAACGCAGTCGACC	GCATGCTCACAAATCGGACCGAC

1.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析, 计量资料经正态检验后符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两进一步比较采用 SNK-*q* 检验; 计数资料以 *n* 或 [*n*(%)] 表示, 采用 χ^2 检验进行组间比较; 采用拟合优度 χ^2 检验判断 NRXN1 和 MECP2 基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡; 采用 Logistic 回归分析 NRXN1 和 MECP2 基因型对自闭症发生的影响。 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 NRXN1 基因和 MECP2 基因 SNP 基因型分布及 Hardy-Weinberg(H-W)遗传平衡检验 对照组和自闭症组 NRXN1 基因在 rs1421589 位点上检出 CC 型、CT 型、TT 型 3 种基因型, 对照组中 CC 型基因型(49.66%)比例较高, 自闭症组中 TT 型基因型

(57.81%)比例较高, 经吻合度检验, 对照组和自闭症组 NRXN1 基因 SNP 分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡法则($\chi^2 = 1.386, 5.069, P > 0.05$); MECP2 基因在 rs2239464 位点上检出 AA 型、AG 型、GG 型 3 种基因型, 对照组中 AA 型基因型(50.34%)比例较高, 自闭症组中 GG 型基因型(49.21%)比例较高, 经吻合度检验, 对照组和自闭症组 MECP2 基因 SNP 分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡法则($\chi^2 = 4.297, 5.508, P > 0.05$)。见表 2、3。

2.2 NRXN1 和 MECP2 各基因型与自闭症患儿临床行为的关系 NRXN1 和 MECP2 不同基因型自闭症患儿感觉、交往、语言、躯体运动、生活自理得分及 ABC 总分比较, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 4、5。

表 2 两组 NRXN1 基因(rs1421589 位点)SNP 基因型分布及 H-W 遗传平衡检验 [*n*(%)]

组别	<i>n</i>	基因型分布			等位基因频率		χ^2	<i>P</i>
		CC	CT	TT	C	T		
对照组	145	72(49.66)	56(38.62)	17(11.72)	200(68.97)	90(31.03)	1.386	0.500
自闭症组	128	14(10.94)	40(31.25)	74(57.81)	68(26.56)	188(73.44)	5.069	0.079

表 3 两组 MECP2 基因(rs2239464 位点)SNP 基因型分布及 H-W 遗传平衡检验 [*n*(%)]

组别	<i>n</i>	基因型分布			等位基因频率		χ^2	<i>P</i>
		AA	AG	GG	A	G		
对照组	145	73(50.34)	52(35.86)	20(13.80)	198(68.28)	92(31.72)	4.297	0.117
自闭症组	128	20(15.63)	45(35.16)	63(49.22)	85(33.20)	171(66.80)	5.508	0.064

表 4 NRXN1 各基因型 ABC 得分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

基因型	<i>n</i>	感觉	交往	语言	躯体运动	生活自理	ABC 总分
CC 型	14	10.24 ± 2.15	16.94 ± 2.35	11.02 ± 2.06	10.89 ± 2.10	10.58 ± 1.97	60.12 ± 3.75
CT 型	40	12.97 ± 2.36*	20.29 ± 2.41*	13.58 ± 2.37*	12.16 ± 2.08*	11.85 ± 2.01*	70.92 ± 3.46*
TT 型	74	14.16 ± 2.71*#	24.67 ± 2.52*#	17.94 ± 2.46*#	13.14 ± 2.05*#	12.72 ± 2.11*#	82.68 ± 3.35*#
<i>F</i>		14.578	80.094	74.708	8.239	7.226	333.052
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001

注:与 CC 型比较, * *P* < 0.05; 与 CT 型比较, # *P* < 0.05。

2.3 NRXN1 和 MECP2 各基因型与自闭症患儿疾病严重程度的关系 NRXN1 和 MECP2 不同基因型

自闭症患儿疾病严重程度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6、7。

表 5 MECP2 各基因型 ABC 得分比较($\bar{x} \pm s$, 分)

基因型	n	感觉	交往	语言	躯体运动	生活自理	ABC 总分
AA 型	20	10.25 ± 2.10	16.92 ± 2.37	11.04 ± 2.04	10.86 ± 2.15	10.54 ± 1.99	59.64 ± 3.77
AG 型	45	12.95 ± 2.34*	20.31 ± 2.32*	13.61 ± 2.23*	12.19 ± 2.03*	11.89 ± 2.03*	71.01 ± 3.54*
GG 型	63	14.23 ± 2.65*#	24.68 ± 2.49*#	17.92 ± 2.48*#	13.16 ± 2.09*#	12.75 ± 2.10*#	82.76 ± 3.37*#
F		20.020	94.146	85.010	9.879	9.113	378.085
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 AA 型比较,* $P < 0.05$;与 AG 型比较,# $P < 0.05$ 。

表 6 NRXN1 各基因型与自闭症患儿疾病严重程度的关系(n)

基因型	n	轻中度(n=65)	重度(n=63)
CC 型	14	10	4
CT 型	40	27	13
TT 型	74	28	46
χ^2		11.821	
P		0.003	

表 7 MECP2 各基因型与自闭症患儿疾病严重程度的关系(n)

基因型	n	轻中度(n=65)	重度(n=63)
AA 型	20	15	5
AG 型	45	31	14
GG 型	63	19	44
χ^2		21.317	
P		<0.001	

2.4 NRXN1 和 MECP2 基因型影响自闭症发生的 Logistic 回归分析 将儿童自闭症是否发生作为因变量,校正年龄、性别、体质量指数等混杂因素后,分别以 NRXN1 基因的 3 种基因型(CC 型、CT 型、TT 型)、MECP2 基因的 3 种基因型(AA 型、AG 型、GG 型)为自变量进行 Logistic 回归分析,结果显示 TT 型基因型(rs1421589 位点)、GG 型基因型(rs2239464 位点)是影响自闭症发生的独立危险因素($P < 0.05$)。见表 8、9。

表 8 NRXN1 基因型影响自闭症发生的 Logistic 回归分析

基因型	β	SE	Wald	P	OR	95%CI
CC 型	-	-	-	-	1.000	-
CT 型	0.041	0.130	0.100	0.752	1.042	0.808~1.344
TT 型	0.812	0.232	12.258	<0.001	2.253	1.430~3.550

注:—表示无数据。

表 9 MECP2 基因型影响自闭症发生的 Logistic 回归分析

基因型	β	SE	Wald	P	OR	95%CI
AA 型	-	-	-	-	1.000	-
AG 型	0.025	0.128	0.037	0.847	1.025	0.798~1.317
GG 型	0.863	0.274	9.927	0.002	2.371	1.386~4.057

注:—表示无数据。

3 讨论

自闭症的临床表现主要包括感觉、交往、语言、躯体运动、生活自理等方面的缺陷和障碍^[10]。自闭症病因目前尚不十分明确,但许多证据表明其发生具有明显的遗传背景,认为先天性的基因异常与后天环境的相互作用可能是自闭症发病及表型多样化的重要因素^[11-12]。目前儿童自闭症尚缺乏有效的治疗方法,患儿往往预后较差,即使接受较好的训练也很难达到同龄儿童的发育水平,部分患儿甚至终生需要他人监护,加重家庭及社会的经济和精神负担^[13]。

目前发现自闭症相关的多个基因中,许多与脑神经网络异常、突触功能等有关,表明神经网络与自闭症的发病密切相关^[14-15]。NRXN 基因家族广泛表达于神经元中,可编码一类有多态性的细胞表面蛋白,参与细胞与细胞间的相互作用^[16]。NRXN1 基因可形成 α -轴突蛋白和 β -轴突蛋白,其中 α -轴突蛋白参与细胞信号转导、功能性突触的形成及神经递质的释放^[17]。MECP2 最早发现于神经细胞内,主要存在于突触后区和神经元核内,在神经元发育、分化等过程中均有重要作用^[18]。本研究中 NRXN1 基因 rs1421589 位点及 MECP2 基因 rs2239464 位点在自闭症患儿及健康儿童中均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,表明所选样本均来自同一孟德尔群体,可进行群体遗传学研究。NRXN1 基因 rs1421589 位点 TT 型自闭症患儿感觉、交往、语言等临床表现得分均高于 CC 型和 CT 型,同时 MECP2 基因 rs2239464 位点 GG 型患儿各

临床表现得分高于 AA 型和 AG 型,且 TT 型及 GG 型基因型中重度患儿比例更高。提示 NRXN1 基因位点 rs1421589 C-T 突变和 MECP2 基因位点 rs2239464 A-G 突变可能与自闭症患儿的发病及严重程度有关。而戚小兵等^[17] 研究中, NRXN1 基因 rs1045881 位点、rs11885814 位点 SNP 与自闭症易感性无关,其与本研究结果的差异可能由所选位点不同导致,同时也可能与遗传异质性有关。TANTRA 等^[19] 研究表明, MECP2 基因 rs2239464 位点与攻击性社会行为有关,结合本研究结果中 rs2239464 位点 SNP 与自闭症的关系,进一步提示 MECP2 基因 rs2239464 位点可能与神经系统疾病有重要联系。此外,本研究中 NRXN1 基因 rs1421589 位点 TT 型基因型、MECP2 基因 rs2239464 位点 GG 型基因型是影响自闭症发生的独立危险因素,进一步表明 NRXN1 基因(rs1421589 位点)和 MECP2 基因(rs2239464 位点)SNP 可能参与自闭症的发生发展。

综上所述, NRXN1 基因(rs1421589 位点)和 MECP2 基因(rs2239464 位点)SNP 与自闭症的存在相关性,rs1421589 位点 TT 型基因型、rs2239464 位点 GG 型基因型可以增加儿童自闭症的发生风险及自闭症严重程度。但本研究同时存在一定的不足之处,样本选取受制于地区及人群,后续需扩大样本量进一步证实 NRXN1 基因和 MECP2 基因 SNP 与自闭症患儿发病及临床表现的相关性。

参考文献

- [1] SIMONOFF E, KENT R, STRINGER D, et al. Trajectories in symptoms of autism and cognitive ability in autism from childhood to adult life: findings from a longitudinal epidemiological cohort[J]. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2020, 59(12):1342-1352.
- [2] 梁晨, 刘芳, 陈晓丽. 孤独症的早期诊断和遗传研究进展[J]. *职业与健康*, 2019, 35(21):136-142.
- [3] 杨柳, 刘玉山, 吴宁渤. CD157/BST1 基因多态性与自闭症谱系障碍患儿的关系[J]. *西部医学*, 2020, 32(3):448-451.
- [4] 许天友, 留佩宁, 徐仁福, 等. 自闭症患儿与 GABRB3 基因多态性的关系研究[J]. *中国妇幼保健*, 2020, 35(22):4301-4304.
- [5] TROMP A, MOWRY B, GIACOMOTTO J. Neurexins in autism and schizophrenia—a review of patient mutations, mouse models and potential future directions[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(3):747-760.
- [6] 周舒香, 宋兵文, 刘妮, 等. 一例自闭症患者 NRXN1 基因缺失的分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2019, 36(9):935-937.
- [7] 牛玉萍, 陈晓伟, 李杰, 等. 三例 Rett 综合征患者的 MECP2 基因变异分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(9):968-971.
- [8] LI C H, COFFEY E L, DALL'AGNESE A, et al. MeCP2 links heterochromatin condensates and neurodevelopmental disease[J]. *Nature*, 2020, 586(7829):440-444.
- [9] YUKA Y, RYOTA H, HIDENAGA Y, et al. Gene expression analysis in lymphoblasts derived from patients with autism spectrum disorder[J]. *Mol Autism*, 2011, 2(1):1-11.
- [10] 皮翔. 感觉统合训练在自闭症儿童认知能力及动作发展能力中的应用效果[J]. *中国当代医药*, 2020, 27(12):103-106.
- [11] JIN X, SIMMONS S K, GUO A, et al. In vivo Perturb-Seq reveals neuronal and glial abnormalities associated with autism risk genes[J]. *Science*, 2020, 370(1):1-23.
- [12] 黄冠群, 韩丁丁, 仇慎峰, 等. 孤独症谱系障碍发病机制的研究进展[J]. *中国实用儿科杂志*, 2019, 34(8):622-628.
- [13] MITROULAKI S, SERDARI A, TRIPSANIS G, et al. First alarm and time of diagnosis in autism spectrum disorders[J]. *Compr Child Adolesc Nurs*, 2020, 22(1):1-17.
- [14] 胡兴琳, 刘惠, 吴嫣爽, 等. 诱导多能干细胞在孤独症谱系障碍相关的神经发育性疾病中的研究进展[J]. *中华精神科杂志*, 2019, 52(3):219-223.
- [15] HU H T, HUANG T N, HSUEH Y P. KLHL17/Actin-filin, a brain-specific gene associated with infantile spasms and autism, regulates dendritic spine enlargement[J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1):103-121.
- [16] FUCCILLO M V, PAK C. Copy number variants in neurexin genes: phenotypes and mechanisms[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2021, 68(1):64-70.
- [17] 戚小兵, 於娟娟, 钟洁琼, 等. 珠海地区 NRXN1 和 NLGN1 基因多态性与儿童孤独症的关联性研究[J]. *中国儿童保健杂志*, 2019, 27(1):19-22.
- [18] ORTEGA-ALARCON D, CLAVERIA-GIMENO R, VEGA S, et al. Molecular context-dependent effects induced by Rett syndrome-associated mutations in MeCP2[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(11):1533-1552.
- [19] TANTRA M, HAMMER C, KÄSTNER A, et al. Mild expression differences of MECP2 influencing aggressive social behavior[J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(5):662-684.