

六号染色体短臂 MHC 区 DRB3、DRB1 基因多态性与精神分裂症症状的关系探讨

于雅琴 俞琼 郭英君 桑红 史洁萍 刘树铮 尉军

【摘要】 目的 探讨六号染色体短臂 MHC 区 DRB3、DRB1 基因多态性与精神分裂症症状的相关性。方法 采用聚合酶链反应(PCR)和限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)方法检测两个基因位点上的单核苷酸多态性(SNPs),并对 116 例精神分裂症患者家系进行连锁不平衡分析。结果 DRB1 的 SNF(rs707954:G/T 碱基互换)等位基因与关系妄想症状呈显著相关($\chi^2 = 5.484, df = 1, P = 0.019$),GG、GT、TT 三种基因型频率在关系妄想症状中呈显著相关($\chi^2 = 6.771, df = 2, P = 0.034$)。rs707954 的三种基因型频率与情感淡漠症状呈显著相关($\chi^2 = 12.110, df = 4, P = 0.017$)。结论 DRB1 位点等位基因与关系妄想和情感淡漠症状高度相关,DRB1 基因型与关系妄想症状高度相关。

【关键词】 精神分裂症;易感基因;单核苷酸多态性

Study on the genetic association between DRB3 and DRB1 loci in the human MHC region and psychotic symptoms of schizophrenia YU Ya-qin*, YU Qiong, GUO Ying-jun, SANG Hong, SHI Jie-ping, LIU Shu-zheng, WEI Jun. *Center for Genomic Medicine, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China

【Abstract】 Objective The genomic region of the human major histocompatibility complex (MHC) is located in the short arm of chromosome 6 (6p). Linkage studies have shown that the 6p region may contain a gene for schizophrenia, the MHC region has thus become particularly important in searching for the schizophrenia susceptibility gene. The present study was designed to investigate the genetic association of DRB3 and DRB1 genes with psychotic symptoms of schizophrenia. **Methods** PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was applied to genotype two single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the DRB3 locus and in the DRB1 one in 116 Chinese Han family trios consisting of fathers, mothers and affected offspring with schizophrenia. Chi-square (χ^2) test and haplotype-based relative risk (HRR) analysis were used on genotyping data. **Results** Data on HRR analysis did not show a genetic association either between the DRB3 locus and schizophrenia or between the DRB1 locus and the illness. However, the SNP rs707954, a G to T base change, present in the DRB1 locus showed strong association with idea of reference ($\chi^2 = 5.484, df = 1, P = 0.019$), while the genotype of rs707954 showed an association with idea of reference ($\chi^2 = 6.771, df = 2, P = 0.034$) as well as with apathy ($\chi^2 = 12.110, df = 4, P = 0.017$). **Conclusion** DRB1 locus seemed likely to be associated with psychotic symptoms as idea of reference and apathy. Further studies were necessary to reveal the relations between DRB1 gene or nearby locus with its susceptibility to schizophrenia.

【Key words】 Schizophrenia; Predisposing genes; Single nucleotide polymorphisms

精神分裂症是一种以基本个性改变、思维情感分裂、精神活动与环境不协调为主要特征的一类最常见的精神病,也是所有精神疾病中最严重的一种,

其终身患病率已高达 1%。家系调查、双生子以及寄养子流行病学研究已经证实,精神分裂症是一种多基因遗传病,且有遗传异质性的特点。全基因组扫描和连锁不平衡分析显示,该病的易感基因很可能分布在第 6、8、13 和 22 号染色体上。由于人类主要组织相容性复合体(MHC)区位于 6p 上,而且已有人报道 DRB1(DRB4)位点与精神分裂症相关联。因此,本项研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39970165);国家“863”高技术研究发展计划基金资助项目(2001AA221072)

作者单位:130021 长春,吉林大学公共卫生学院基因组医学研究中心(于雅琴、俞琼、郭英君、史洁萍、刘树铮、尉军);长春市凯旋医院(桑红)

多态性(PCR-RFLP)技术分析 DRB1 及其相邻位点 DRB3 的多态性是否在中国汉族人群中与精神分裂症相关联。

对象与方法

1. 研究对象:吉林省四平市精神病院和长春市凯旋医院经临床诊断(符合国际疾病分类标准第 10 版精神分裂症诊断标准 ICD-10),参照我国精神疾病诊断标准与分类方案第二版修订本确诊为精神分裂症的患者。共收集 116 个核心家系(包括 116 例患病个体和 232 名健康父母),348 个样本均为中国汉族人。采取外周静脉血 5 ml, -20℃ 保存至提取基因组 DNA。

临床资料的评定参照精神科评定量表手册编制量表^[1]根据研究的需要设计一系列代表疾病症状的变量,由主管医师针对患者的病史资料记录详细情况。同时排除资料不全或难以判定的病例。将精神分裂症的所有症状做详细分类,均列入调查表中,再将量表中的结果输入数据库。

2. 引物:本项研究采用计算机国际互联网在人类基因组数据库中检索 6 号染色体短臂 MHC 区的单核苷酸多态性(SNPs),从中选出在 DRB3 和 DRB1 位点上已知的 SNPs,rs701831(DRB3)和 rs707954(DRB1)进行分析。rs701831 为 C/A 碱基互换,形成 Taq I 酶切位点。rs707954 为 G/T 碱基互换,形成 Msp I 酶切位点。用于扩增含有 rs701831 和 rs707954 的 DNA 片段的引物分别设计如下:引物 1(DRB3)上游:5'-AGCATTG AAGTCAGGTGGTTCC-3';下游:5'-GATGGAG ATGAGAACATGGAGC-3';引物 2(DRB1)上游:5'-TTCAAAGACCCAGCCCCTGC-3';下游:5'-CACAGTCCCCTTCTTGGTGG-3'。

3. 实验方法:

(1)模板 DNA 的制备:取 5 ml 枸橼酸钠抗凝的外周静脉血,采用“星普液体微量 DNA 纯化试剂盒”(宁波)提取基因组 DNA,其步骤按说明书进行,包括分离白细胞,用酚/氯仿抽提,无水乙醇沉淀等过程。提取后的基因组 DNA 放置 -20℃ 保存备用。

(2)特定基因片段的 PCR 扩增:PCR 反应体系 20 μl H₂O(高压灭菌的双蒸水)14.3 μl,10 倍工作液浓度的 PCR 反应缓冲液 2 μl, Mg²⁺(25 mol/L) 1.2 μl dNTP(10 mol/L) 0.4 μl,引物(30 mmol/L)

0.2 μl, Taq 酶(5 U/μl) 0.4 μl,基因组 DNA(20~30 mg/L) 1.5 μl。PCR 扩增条件为:94℃ 5 min; 96℃ 35 s, 60℃ 45 s, 68℃ 45 s, 2 个循环; 96℃ 35 s, 58℃ 45 s, 68℃ 45 s, 10 个循环; 94℃ 55 s, 56℃ 45 s, 68℃ 45 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶, 80 V 电压电泳 30 min, 溴化乙锭(EB)染色,紫外灯下观察扩增结果。

(3)PCR 产物的 RFLP 分析:PCR 扩增产物酶切体系共 20 μl, 10 倍工作液浓度的缓冲液(10 mol/L) 2 μl, BSA(10 g/L) 0.2 μl, 限制性内切酶(10 g/L) 0.7 μl 和 DNA(PCR 扩增后) < 1 μg, H₂O(高压灭菌的双蒸水)定容至 20 μl。

将酶切混合液混均后, 37℃ 恒温箱中闭盖进行酶切 4~5 h。酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶, 90 V 电压电泳 50 min, EB 染色,紫外灯下观察酶切产物,并根据产物的片段大小确定基因型。即切开纯合型、未切开纯合型及杂合型。

4. 统计学分析:本研究资料分析拟采用基于家系的单体型相对风险方法(HRR)处理数据。以父母双亲传递给患病子女的等位基因为“疾病”基因,未传递的为“对照”基因。经 SPSS 统计软件检验 2 个 SNP 位点等位基因频率分布是否有差异,同时还检验它们与精神分裂症临床症状之间的关系。

结 果

1. DRB3、DRB1 位点多态性与精神分裂症的关系:含 rs701831 的 PCR 扩增产物全长为 314 bp,被 Taq I 内切酶水解的等位基因(A)片段长度分别为 133 bp 和 181 bp。经 χ^2 检验传递的等位基因和未传递的等位基因频率差异无显著性(表 1)。含 rs707954 的 PCR 扩增产物全长为 310 bp,被 Msp I 内切酶水解的等位基因(G)片段长度分别为 82 bp 和 228 bp。经 χ^2 检验传递的等位基因和未传递的等位基因频率差异无显著性(表 1)。

表 1 DRB3 和 DRB1 位点的 SNP 等位基因频数分布及 HRR 分析

位点	等位基因	传递	未传递	χ^2 值	P 值
DRB3	A	52	47	0.324	0.569
	C	172	177		
DRB1	G	177	185	0.858	0.354
	T	51	43		

2. DRB3、DRB1 位点多态性与精神分裂症临床症状之间的关系:

(1) rs707954 的两个等位基因 G、T 的分布与精神分裂症患者的关系妄想症状密切相关 ($P = 0.019$), 而与其他症状均无关 ($P > 0.05$) (表 2, 3)。表 2 显示等位基因 G 的阳性率高于等位基因 T 的阳性率, G、T 在有无关系妄想的精神分裂症患者中分布差异呈现显著性。因此等位基因 G 与关系妄想的产生相关联。

(2) rs701831 的两个等位基因 A、C 的分布与精神分裂症各临床诊断类型无相关性 ($P > 0.05$) (表 3)。

表2 rs707954 等位基因在有无关系妄想患者中的频数分布

多态类型	关系妄想患者		合计
	有	无	
G	119	65	184
T	35	7	42
合计	154	72	226

$P = 0.019$

表3 DRB3 和 DRB1 位点的 SNP 等位基因频率与精神分裂症各临床症状之间关系

症状	rs701831		rs707954	
	χ^2 值	P 值	χ^2 值	P 值
真性听幻觉	1.394	0.238	0.392	0.531
关系妄想	3.344	0.067	5.484	0.019*
影响妄想	-	0.317	-	0.601
自责自罪妄想	-	0.363	-	0.309
虚无妄想	-	0.628	-	0.437
读心症	-	0.479	-	0.544
被害妄想	0.137	0.711	0.040	0.841
嫉妒妄想	-	0.375	-	0.528
夸大妄想	-	0.415	-	0.499
钟情妄想	-	0.093	-	0.122
其他妄想	-	0.416	-	0.528
思维连贯性障碍	0.966	0.326	1.105	0.293
思想逻辑性障碍	-	0.314	-	0.095
怪异行为	0.01	0.919	0.003	0.956
冲动伤人行为	0.396	0.529	0.078	0.780
妄想综合征	0.145	0.704	0.380	0.538
思维贫乏	0.643	0.725	0.272	0.873
情感迟钝、淡漠	0.107	0.948	1.372	0.504
意志缺乏	2.853	0.240	4.106	0.128
诊断类型	3.731	0.589	3.654	0.723
病前人格	0.504	0.777	0.571	0.752

* $P < 0.05$; - "用 Fisher's 精确概率法

3. DRB3 和 DRB1 位点的 SNP 等位基因型与精神分裂症各临床症状之间的关系:

(1) 如表 4 所示, 在有情感淡漠症状的患者中, rs707954 的三种基因型 (GG、GT、TT) GG 分布频率明显高于没有该症状的患者 ($\chi^2 = 12.1, df = 4, P =$

0.017)。提示, GG 基因型可能与精神分裂症的情感淡漠症状相关。

(2) rs707954 的三种基因型分布与精神分裂症的关系妄想症状也有相关性 ($\chi^2 = 6.771, df = 2, P = 0.034$) (表 4)。

表4 DRB1 位点的 rs707954 三种基因型与关系妄想和情感淡漠症状之间的相关性

症状	严重程度	基因型			χ^2 值	df	P 值
		GG	GT	TT			
关系妄想	有	46	27	4	6.771	2	0.034
	无	29	7	0			
情感淡漠	轻	19	5	1	12.1	4	0.017
	中	30	20	0			
	重	7	1	2			

(3) rs701831 的基因型分布与精神分裂症各临床诊断类型无相关性 ($P > 0.05$) (表 5)。

表5 DRB3 和 DRB1 位点的 SNP 等位基因型与精神分裂症各临床症状之间关系

症状	DRB3		DRB1	
	χ^2 值	P 值	χ^2 值	P 值
真性听幻觉	3.006	0.222	1.399	0.497
关系妄想	4.615	0.100	6.771	0.034*
影响妄想	1.007	0.605	0.754	0.686
自责自罪妄想	0.948	0.623	1.858	0.395
虚无妄想	1.046	0.593	1.658	0.437
读心症	0.487	0.784	0.371	0.831
被害妄想	1.695	0.429	0.748	0.668
嫉妒妄想	0.781	0.677	1.747	0.417
夸大妄想	0.554	0.758	0.545	0.761
钟情妄想	5.359	0.069	4.215	0.122
其他妄想	0.484	0.785	0.944	0.624
思维连贯性障碍	2.042	0.360	1.799	0.407
思想逻辑性障碍	5.143	0.076	2.389	0.303
怪异行为	1.196	0.550	0.862	0.650
冲动伤人行为	1.058	0.589	0.367	0.832
妄想综合征	0.570	0.752	0.389	0.823
思维贫乏	1.477	0.831	7.064	0.133
情感淡漠	5.340	0.254	12.100	0.017*
意志缺乏	4.566	0.355	8.401	0.078
诊断类型	12.433	0.257	10.219	0.597
病前人格	7.017	0.135	6.732	0.151

* $P < 0.05$

讨 论

精神分裂症是一种多基因遗传疾病, 其遗传机制十分复杂。已有的家系研究、双生子研究和寄养子女研究资料表明, 遗传因素在精神分裂症发病过程中起着重要的作用。精神分裂症家族遗传是 Ruclin 1916 年发现的, 并在 Kallmann, Shields^[2] 及

纪明等家系调查的结果中得到进一步的证实。近年来,应用相关分析方法对某些精神分裂症的候选基因进行了研究,其中包括多巴胺 D3 受体(DRD3)基因、5-羟色胺受体 2A(5HTR2A)基因^[3]、较小的钙激活钾离子通道基因家族成员之一的 KCNN3 基因等^[4-6],曾受到学者们的关注。然而这些候选基因的报道结果一直未能获得满意的重复。

近年来,全基因组的扫描研究发现十几个染色体区域可能含有精神分裂症易感基因。6p 是这些阳性染色体区域中的一个。鉴于人类 MHC 区定位于 6p 区域内,因此 MHC 区已成为筛选精神分裂症易感基因的热点。连锁研究结果表明,6 号染色体短臂上的一些遗传标记,包括位于 HLA 区域端粒侧的 D6S274 和 D6S296 两个遗传标记以及位于着丝粒侧的 D6S291 与精神分裂症连锁^[7]。尽管也有阴性报道,但是在 6p21.3 带的 HLA 区域内或附近仍然可能存在精神分裂症的易感位点。Zamani 等^[8]发现,在白种人中 DRB1 * 0101 与精神分裂症相关($P = 0.018$);Wright 等^[9]也发现 HLA DRB1 * 04 的等位基因频率分布在精神分裂症患者及母亲组中均显著低于正常对照。Arinami 等^[10]在日本人群中也得出了同样的结论。本项研究表明,在中国汉族人群中 DRB1 位点与精神分裂症某些症状相关联。如表 2 所示,DRB1 位点上的 SNP 等位基因 rs707954(G)的频率在有关系妄想症状患者中的分布明显高于没有该症状的患者($P = 0.019$)。rs707954 的 GG 基因型频率分布也显示同样的趋势(表 4)。此外,rs707954 的 GG 基因型频率在有情感淡漠症状患者中的分布明显高于没有该症状的患者(表 4)。本研究结果提示,DRB1 基因位点本身或其附近的位点可能与精神分裂症的易感性有关。

目前对精神分裂症等精神疾病的临床诊断,仍局限于患者的症状和行为,造成大量的漏诊和误诊。定位和克隆精神分裂症易感基因,不仅有助于其分

子病因学的发展,同时将为临床基因诊断、基因治疗和药物设计奠定基础。随着基因芯片技术的发展及 SNPs 图的构建与完善,有望在不久的将来能够精确定位和克隆精神分裂症易感基因,提高精神疾病基因诊断的方法,并应用基因技术进行治疗。

参 考 文 献

- 1 张明园. 精神科评定量表手册. 第 1 版. 长沙: 湖南科学技术出版社,1993. 100-101.
- 2 杨德森, 主编. 基础精神医学. 长沙: 湖南科学技术出版社,1994. 158-160.
- 3 Inayama Y, Yoneda H, Sakai T, et al. Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet*,1996, 67:103-105.
- 4 Jonsson EG, Nimgaonkar VL, Zhang XR, et al. Trend for an association between schizophrenia and D3S1310, a marker in proximity to the dopamine D3 receptor gene. *Am J Med Genet*, 1999, 88:352-357.
- 5 Morris AG, Gaitonde E, McKenna PJ, et al. CAG repeat expansions and schizophrenia association with disease in females and with early age-at-onset. *Hum Mol Genet*,1995, 10:1957-1961.
- 6 O'Donovan MC, Owen MJ. Dynamic mutations and psychiatric genetics. *Psychol Med*,1996, 26:1-6(30 ref.).
- 7 Straub RE, MacLean CJ, Kendler KS. The putative schizophrenia locus on chromosome 6p: a brief overview of the linkage studies. *Mol Psychiatry*,1996, 1:89-92.
- 8 Zamani MG, DeHert M, Spaepen M, et al. Study of the possible association of HLA Class II CD4 and CD3 polymorphisms with schizophrenia. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet*,1994, 54: 372-377.
- 9 Wright P, Donaldson PT, Underhill JA, et al. Genetic association of the HLA DRB1 gene locus on chromosome 6p 21.3 with schizophrenia. *Am J Psychiatry*,1996, 153:1530-1533.
- 10 Arinami T, Otsuka Y, Hamaguchi H, et al. Evidence supporting an association between the DRB1 gene and schizophrenia in Japanese. *Schizophr Res*,1998, 32:81-86.

(收稿日期:2002-10-26)

(本文编辑:尹廉)