

人类染色体 22q11 精神分裂症 易感基因的筛查研究

谢林 鞠桂芝 刘树铮 史杰萍 于雅琴 尉军

【摘要】 目的 在人类 22q11 区域内筛查与精神分裂症相关的易感基因。方法 由中国汉族精神分裂症患者和他们的健康父母组成的 100 个核心家系作为研究对象。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法对 22q11 区域内分别位于腭心面综合征中缺失的狢狢重复基因(ARVCF)上的 rs165655(A/G 碱基改变)、rs165815(C/T 碱基改变)和 LOC128979(EST 序列)位点上的 rs756656(A/C 碱基改变) 3 个单核苷酸多态性(SNP)进行检测。用连锁不平衡方法分析基因型数据,连锁不平衡方法包括单体型相对风险分析(HRR)、传递不平衡检验(TDT)和单倍型传递分析。结果 3 个 SNP 基因型频率分布都符合 Hardy-Weinberg 平衡;HRR 和 TDT 分析结果都显示 rs165815 与精神分裂症有关联($P < 0.05$),而 rs165655 和 rs756656 与精神分裂症无关联;单倍型传递分析结果显示,父母传递给患病子女的 rs165655-rs165815 单倍体和 rs756656-rs165655-rs165815 单倍体的频率偏离 50%,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论 对于中国汉族精神分裂症患者而言,ARVCF 基因本身或其附近的基因可能与精神分裂症的易感性有关联。

【关键词】 精神分裂症;染色体;单核苷酸多态性;易感基因

Searching for a schizophrenia susceptibility gene in the 22q11 region XIE Lin, JU Gui-zhi, LIU Shu-zheng, SHI Jie-ping, YU Ya-qin, WEI Jun. Research Center for Genomic Medicine & the Ministry of Health Radiobiology Research Unit, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China
Corresponding author: JU Gui-zhi, Email: gzju@jlu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the genetic association for schizophrenia within the long arm region 1 band 1 of chromosome 22(22q11) in a Han Chinese population. **Methods** Polymerase chain reaction(PCR)-based restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis was used to detect three single nucleotide polymorphism(SNPs), rs165655(A/G base change) and rs165815(C/T base change) present in the ARVCF (armadillo repeat gene deletion in velocardiofacial syndrome) locus, and rs756656(A/C base change) in the LOC128979 (expressed sequence tags, EST) locus, among 100 nuclear families composed of fathers, mothers and affected offspring with schizophrenia. Genotyping data were analyzed by linkage disequilibrium methods including haplotype relative risk(HRR) analysis, transmission disequilibrium test(TDT) and haplotype transmission analysis. **Results** The genotype frequency distributions of three SNPs were all in Hardy-Weinberg equilibrium; Both HRR and TDT analysis showed that rs165815 was associated with schizophrenia($P < 0.05$), whereas the other two SNPs did not show any allelic association. The haplotype transmission analysis showed a biased transmission for the rs165655-rs165815 haplotype system and for the rs756656-rs165655-rs165815 haplotype system($P < 0.01$).

Conclusion Either ARVCF gene itself or a nearby locus might confer susceptibility to schizophrenia in a Han Chinese population.

【Key words】 Schizophrenia; Chromosome; Single nucleotide polymorphism; Susceptibility gene

精神分裂症是一种严重的精神疾病^[1]。连锁分析显示 22 号染色体长臂可能存在精神分裂症易感基因^[2-4];此外,精神分裂症患者多伴有 22 号染

色体长臂一区一带(22q11)微小缺失,并且 20%~30% 的 22q11 微小缺失患者在青春期和成人期发生精神分裂症^[5-7]。我们以中国汉族精神分裂症核心家系为研究对象,对分别位于 22q11 区域内腭心面综合征中缺失的狢狢重复基因(armadillo repeat gene deletion in velocardiofacial syndrome, ARVCF)的 rs165655、rs165815 和 LOC128979(EST 序列)位

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30170343)

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卫生部放射生物学重点实验室

通讯作者 鞠桂芝, Email: gzju@jlu.edu.cn

点上的 rs756656 三个单核苷酸多态性 (SNP) 进行检测, 探讨 22q11 微小缺失区域内是否存在与精神分裂症关联的位点。

对象与方法

1. 研究对象: 中国汉族精神分裂症患者及其健康父母双亲组成的 100 个核心家系为研究对象, 精神分裂症患者 100 例为病例组, 男性 65 例, 女性 35 例, 平均年龄 (26.8 ± 6.7) 岁, 平均发病年龄 (22.9 ± 5.6) 岁, 病程 3~276 个月。患者均于 2000~2002 年在吉林省的精神病院入院治疗, 至少经 2 名有经验的医师依据国际疾病分类第 10 版精神分裂症诊断标准 (ICD-10) 诊断为精神分裂症。在获得知情同意后采集家系成员静脉血。

2. 确定 SNP 基因型: 利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法检测 rs165815、rs165655 和 rs756656 三个 SNP。三个 SNP 间跨度 379 362 bp, 包括 ARVCF 基因和 LOC128979 位点。rs165815 引物序列为 5'-TAG GCTGCTCTCCAGCAACC-3' 及 5'-TGTCTCCCA AAGCCCCTGTC-3'; PCR 产物长度为 256 bp, 含 Msp I 酶切位点。rs165655 引物序列为 5'-CAG CATGGGCTGGAGAAAGG-3' 及 5'-GGGGCTGGG AAAGA ACTTGG-3'; PCR 产物长度为 223 bp, 含 Hae III 酶切位点。rs756656 引物序列为 5'-AGA GACATTCCTCTCTGACTGG-3' 及 5'-CCTCAA GTAGCCATTGTCCAGC-3'; PCR 产物长度为 276 bp, 含 EcoR I 酶切位点。

用星普液体微量 DNA 试剂盒从全血中提取基因组 DNA。PCR 反应体系为 25 μl, 其中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂ · 0.001% (W/V) gelatin, 200 μmol dNTP, 上下游引物各 0.4 μmol, Taq DNA 聚合酶 1.0 U, DNA 模板 20~40 ng。PCR 扩增条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 45 s, 58~60℃ 1 min, 72℃ 1 min;

35~40 循环, 最后 72℃ 10 min 延伸。应用 TC-1 仪 (PE, USA) 进行 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后用溴化乙锭染色, 用相应的限制性内切酶消化 PCR 产物, 根据酶切图谱中 DNA 片段长度判断个体基因型。

3. 统计学分析: 应用拟合优度 χ^2 检验分析基因型频率分布是否符合 Hardy-Winberg 平衡定律。每个位点 SNP 等位基因与疾病关联的研究应用单体型相对风险 (HRR) 分析和传递不平衡检验 (TDT) 分析方法^[8-10]。TDT 分析只利用双亲为杂合子基因型的家系。在这种家系研究中, 以父母传递给受累子代的等位基因为“疾病”基因, 未传递的等位基因为“虚拟对照”基因, 从而构建在遗传学上完全匹配的“病例与对照”样本。应用 Transmit v 2.5 软件进行含有两个或三个 SNP 的单倍型传递分析。

结 果

1. SNP 的基因型频率和等位基因频率: 用 SPSS 10.0 软件计算出每个 SNP 父母组及患者组的基因型和等位基因数目及频率, 结果见表 1。拟合优度 χ^2 检验结果表明, rs165655、rs165815 和 rs756656 基因型分布频率都符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。

2. 单体型 HRR 分析: 如表 2 所示, rs165815 与精神分裂症有关联 ($\chi^2 = 6.447, \nu = 1, P = 0.011$); rs165655 和 rs756656 与精神分裂症无关联 ($P > 0.05$)。

3. TDT 检验: 结果显示 rs165815 与精神分裂症有关联 ($\chi^2 = 6.313, \nu = 1, P = 0.012$), rs165655 和 rs756656 与精神分裂症无关联 ($P > 0.05$); rs165815 是 C/T 碱基改变, 父母向患病子女传递的等位基因 C 过多, 说明在含 rs165815 (C) 的单倍体上可能存在决定精神分裂症易感性的位点 (表 2); 此结果与 HRR 的分析结果一致。

4. 单倍型传递分析全部 χ^2 检验: 结果显示

表1 基因型和等位基因频数与频率分布

组 别	例数	基 因 型			等 位 基 因		
		1/1	1/2	2/2	1	2	
rs756656	父母组	200	43(21.5)	100(50.0)	57(28.5)	186(46.5)	214(53.5)
	病例组	100	21(21.0)	53(53.0)	26(26.0)	95(47.5)	105(52.5)
rs165655	父母组	200	38(19.0)	101(50.5)	61(30.5)	177(44.3)	223(55.7)
	病例组	100	18(18.0)	54(54.0)	28(28.0)	90(45.0)	110(55.0)
rs165815	父母组	200	33(16.5)	99(49.5)	68(34.0)	165(41.3)	235(58.7)
	病例组	100	18(18.0)	59(59.0)	23(23.0)	95(47.5)	105(52.5)

注: rs756656 1(A)2(C), rs165655 1(G)2(A), rs165815 1(C)2(T) 括号内数据为频率(%) 括号外数据为例数

表2 SNP 与精神分裂症的 HRR 和 TDT 关联分析

SNP	等位基因	HRR		χ^2 值	P 值	TDT		χ^2 值	P 值
		传递例数	未传递例数			传递例数	未传递例数		
rs756656	A	95	91	0.161	0.688	52	48	0.160	0.689
	C	105	109			48	52		
rs165655	G	90	88	0.040	0.841	52	50	0.039	0.843
	A	110	112			50	52		
rs165815	C	95	70	6.447	0.011	62	37	6.313	0.012
	T	105	130			37	62		

rs756656-rs165655-rs165815 单倍体系统和 rs165655-rs165815 单倍体系统同精神分裂症相关联 ($\chi^2 = 20.965, \nu = 7, P = 0.0038; \chi^2 = 17.224, \nu = 3, P = 0.0006$), 未发现其他单倍体系统与精神分裂症相关联。

讨 论

有研究报道,对 8 个美国犹他州精神分裂症家系的连锁研究发现,22q11-12 区域的 D22S315 标记与精神分裂症有显著性连锁^[11]。Li 等^[12]报道中国 198 个精神分裂症核心家系与 22q11 的 6 个 SNP 标记和 2 个双核苷酸重复标记的研究,观察到由 5 个 SNP 标记构成的单倍体传递过多。近年来,有关腭心面综合征(VCFs)与精神分裂症的关系研究颇多,VCFS 是由 22q11 的微小缺失而引起的,VCFS 患者多伴有神经性症状,提示该区域上的某一位点可能与神经性紊乱有关,如精神分裂症。VCFS 区域(22q11 微小缺失区域)大约含有 30 多个已知基因^[13]。已有报道该区域中的 3 个基因与精神分裂症有关联,它们是儿茶酚胺氧位甲基转移酶(Catechol-O-Methyltransferase, COMT)基因,泛有素融合降解 I 型蛋白(Ubiquitin fusion degradation 1-like, UFD1L)基因和脯氨酸脱氢酶(Proline oxidase, PRODH2)基因^[12-15]。本研究旨在对含有 COMT 基因的区域筛选与精神分裂症关联的位点,选择该区域内的 ARVCF 基因的 rs165655、rs165815 和 LOC128979 位点的 rs756656 三个 SNP 进行检测,在中国汉族人群中研究其与精神分裂症是否存在关联,这三个 SNP 都与 COMT 基因位置接近。

拟合优度 χ^2 检验结果表明,三个 SNP 基因型分布频率都没有偏离 Hardy-Weinberg 平衡,表明该样本适合遗传学分析。TDT 和 HRR 分析都显示 rs165815 与精神分裂症相关联,而其他两个 SNP 与精神分裂症无关联。rs165815 是 ARVCF 基因的一个错义突变。对于此 SNP,父母传递给患病子女过

多的 C。此外单倍型传递分析显示 rs165655-rs165815 和 rs756656-rs165655-rs165815 单倍体系统与精神分裂症关联。多位点 SNP 的单倍型传递分析易于找到含有疾病易感基因的特异单倍体或染色体。ARVCF 是连接素家族的成员,在形成粘附连接复合物中起重要作用,可促进细胞内外环境中的物质交换。ARVCF 基因含有核定位序列,显示其可能具有核蛋白的功能^[16]。

综上所述,对于中国汉族人群,ARVCF 基因与精神分裂症相关联,此研究结果提示 ARVCF 基因本身或其附近的基因可能是精神分裂症的遗传易感基因。ARVCF 基因位于 COMT 基因的端粒端,ARVCF 基因与精神分裂症的关联可能是由于其位于精神分裂症易感位点 COMT 基因的连锁不平衡范围之内。今后要扩大样本量进一步证实本研究结果,从而确定 ARVCF/COMT 位点内是否存在决定精神分裂症的易感基因。

(对长春市凯旋医院桑红教授的热情帮助深表感谢)

参 考 文 献

- Schultz SK, Andreasen NC. Schizophrenia. Lancet, 1999, 353: 1425-1430.
- Coon H, Holik J, Hoff M, et al. Analysis of chromosome 22 markers in nine schizophrenia pedigrees. Am J Med Genet, 1994, 54: 72-79.
- Vallada HP, Gill M, Sham P, et al. Linkage studies on chromosome 22 in familial schizophrenia. Am J Med Genet, 1995, 60: 139-146.
- Moises HW, Yang L, Li T, et al. Potential linkage disequilibrium between schizophrenia and locus D22S278 on the long arm of chromosome 22. Am J Med Genet, 1995, 60: 465-467.
- Murphy KC. Schizophrenia and velo-cardio-facial syndrome. Lancet 2002, 359: 426-430.
- Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. Arch Gen Psychiatry, 1999, 56: 940-945.
- Pulver AE, Nestadt G, Goldberg R, et al. Psychotic illness in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome and their relatives. J Nerv Ment Dis, 1994, 182: 476-478.
- Falk CT, Rubinstein P. Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. Ann

Hum Genet, 1987, 51:227-233.

9 Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based test for linkage disequilibrium and association. Am J Hum Genet, 1996, 59: 983-989.

10 Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Am J Hum Genet, 1993, 52:506-516.

11 Myles - Worsley M, Coon H, McDowell J, et al. Linkage of a composite inhibitory phenotype to a chromosome 22q locus in eight Utah families. Am J Med Genet, 1999, 88:544-550.

12 Li T, Ball D, Zhao J, et al. Family-based linkage disequilibrium mapping using SNP marker haplotypes: application to a potential locus for schizophrenia at chromosome 22q11. Mol Psychiatry, 2000, 5:77-84.

13 Lindsay EA. Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. Nat Rev Genet, 2001, 2:858-868.

14 De Luca A, Pasini A, Amati F, et al. Association study of a promoter polymorphism of UFD1L gene with schizophrenia. Am J Genet, 2001, 105:529-533.

15 Liu H, Heath SC, Sobin C, et al. Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 3717-3722.

16 Sirotkin H, O'Donnell H, DasGupta R, et al. Identification of a new human catenin gene family member (ARVCF) from the region deleted in velo-cardio-facial syndrome. Genomics, 1997, 41:75-83.

(收稿日期: 2003-08-21)
(本文编辑: 尹廉)

· 疾病控制 ·

蓬莱市 1993~2003 年肾综合征出血热疫情分析

罗昌生 迟立宗 孙爱民

肾综合征出血热(HFRS)在山东省流行趋势是自西向东逐渐蔓延,早在 1970 年在德州、泰安等地均有发病,至 1980 年烟台地区有的县市开始发病,蓬莱市居烟台地区东面,于 1993 年发现首例 HFRS 后,疫情不断发生,疫区逐年扩大,虽然每年发病例数不多,但危害严重,病程长、病死率高,给患者身体造成很大损害,同时造成很大经济负担。为探讨该病的流行规律并为制定有效的防治措施提供科学依据,现将蓬莱市 1993~2003 年疫情资料进行分析。此期间共发病 240 例,死亡 6 例,平均发病率为 4.50/10 万,死亡率为 0.11/10 万,病死率为 2.50%, 1999 年为发病高峰年,发病率为 15.39/10 万。疫区自西向东逐年扩散,病例分布范围相当广泛,1993 年仅有 1 个乡镇 1 个村发病 1 例,至 1997 年已扩散到 7 个乡镇,到 2001 年全市 18 个乡镇均有发病。病例多以村为单位呈散在分布。病例大多集中在蓬莱西半区乡镇。主要发生和流行于农村(91.7%, 220/240),城市发病较少,仅占 8.3%(20/240)。全年均有发病,但有明显的季节多发的特点,呈秋冬季发病高峰,多发于每年的 10 月至翌年的 4 月,以 12 月至翌年 3 月为发病高峰,占 68.3%(164/240)。发病年龄最小的为 10 岁,最大的为 73 岁,其中以 20~50 岁年龄组发病占发病例数的 77.92%(187/240),男性多于女性,分别占 71.25%和 28.75%,男女之比为 2.5:1,性别差异有显著性($P < 0.01$),见表 1。发病职业以农民最多,占总发病的 81.25%(195/240),其次是工人占 7.92%(19/240),学生占 5.00%(12/240),儿童占 0.83%(2/240),其他占 5.00%(12/240)。流行形式主要为点状散发,调查 240 例中 1 户 1 例占

100%, 1 村 1 例的占 85.7%。在同一村一个潜伏期发生多例尚少见。由此可见,蓬莱市 HFRS 病例主要分布在农村,因此防治重点主要在农村,改善农民的居住条件,防鼠灭鼠,注意环境卫生,对预防 HFRS 有非常重要的意义。病例有明显的年龄、性别、职业分布,以青壮年男性农民发病最多,提示对疫区青壮年应及时接种疫苗,以降低发病率,保护农村劳动力。

表1 蓬莱市 1993~2003 年 HFRS 病例数和发病率(/10 万)的年龄、性别分布

年龄组 (岁)	男		女		合计	
	病例数	发病率	病例数	发病率	病例数	发病率
0~	0	0.00	0	0.00	0	0.00
5~	1	0.02	1	0.02	2	0.04
10~	3	0.06	3	0.06	6	0.12
15~	4	0.07	2	0.04	6	0.12
20~	10	0.19	5	0.09	15	0.28
25~	14	0.26	5	0.09	19	0.36
30~	15	0.28	8	0.15	23	0.43
35~	32	0.60	14	0.26	46	0.86
40~	24	0.45	6	0.11	30	0.56
45~	21	0.39	5	0.09	26	0.49
50~	20	0.38	8	0.15	28	0.53
55~	9	0.17	4	0.08	13	0.24
60~	8	0.15	2	0.04	10	0.19
65~	5	0.09	3	0.06	8	0.15
70~	5	0.09	3	0.06	8	0.15
合计	171	3.21	69	1.30	240	4.51

(收稿日期: 2004-06-17)
(本文编辑: 张林东)