

· 实验室研究 ·

胞浆型磷脂酶 A2 家族基因多态性与精神分裂症的关联性研究

俞琼 史杰萍 寇长贵 孟祥飞 于雅琴

【摘要】 目的 探讨中国北方汉族人群胞浆型磷脂酶 A2(cPLA2)家族基因多态性与精神分裂症的遗传关联性。**方法** 采用聚合酶链反应(PCR)和连接酶检测反应(LDR)方法,在 201 个精神分裂症患者核心家中检测 cPLA2 家族基因上的 10 个单核苷酸多态性(SNPs),对结果进行单倍型相对风险分析(HRR)、传递不平衡分析(TDT)、单倍型分析和多位点联合分析。**结果** 各位点在精神分裂症病例组和对照组中基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。HRR 和 TDT 分析表明,检测的 10 个 SNPs 位点与精神分裂症无关联性($P > 0.05$)。单倍型分析结果显示,由同一染色体上各位点组成的单倍型与精神分裂症均无关联性($P > 0.05$)。多位点联合作用分析显示,rs2162886 与 rs1668589,rs891014 与 rs1668589,rs2307279 与 rs7542180 位点的联合作用与精神分裂症相关联($\chi^2 = 6.913, P = 0.032; \chi^2 = 8.393, P = 0.015; \chi^2 = 8.447, P = 0.038$)。**结论** cPLA2 家族基因中存在多个与精神分裂症关联的易感位点。

【关键词】 精神分裂症;胞浆型磷脂酶 A2;基因多态性

Study on the genetic association between the polymorphism of cytosolic phospholipase A2 family genes and schizophrenia YU Qiong, SHI Jie-ping, KOU Chang-gui, MENG Xiang-fei, YU Ya-qin. Research Center for Genomic Medicine, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China
Corresponding author: YU Ya-qin, Email: yuyaqin5540@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the genetic association between the polymorphism of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) family genes and schizophrenia in the North Han Chinese. **Methods** Method of polymerase chain reaction-based ligase detection reaction (PCR-LDR) was applied to genotype 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of cPLA2 family genes among 201 pedigrees consisting of fathers, mothers and affected offsprings with schizophrenia. Haplotype relative risk (HRR) test, transmission disequilibrium test (TDT), haplotype transmission analysis and multiple locus analysis were conducted to analyze the genotyping data. **Results** The genotypic frequency of cPLA2 gene did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium in both case and control groups. HRR and TDT showed that the 10 SNPs were not associated with schizophrenia ($P > 0.05$). Analysis for haplotype transmission showed that no haplotype systems was associated with schizophrenia ($P > 0.05$). Results from COA and COG tests showed a disease association for the rs2162886-rs1668589, rs891014-rs1668589 and rs2307279-rs7542180 combinations ($\chi^2 = 6.913, P = 0.032; \chi^2 = 8.393, P = 0.015; \chi^2 = 8.447, P = 0.038$). **Conclusion** Many loci in the cPLA2 family genes were associated with schizophrenic.

【Key words】 Schizophrenia; Cytosolic phospholipase A2; Genotype polymorphism

神经细胞的细胞膜大部分由磷脂组成,脑磷脂的异常代谢在神经精神疾病的形成中起着重要的作用。有文献报道,精神分裂症与磷脂和相关脂肪酸的代谢异常相关^[1,2]。精神分裂症患者的尸检中发现,脑中磷脂含量下降,组成成分发生改变,同时磷脂酶 A2(PLA2)活性升高。由于多不饱和脂肪酸在

治疗精神分裂症和其他精神疾病中的有益作用,精神分裂症的膜磷脂假说越来越受到人们的关注^[3]。对膜磷脂代谢通路上相关基因的研究将会提供支持这种新假说的有力证据。目前对于精神分裂症的 PLA2 基因多态性与精神分裂症的相关性研究结果不太一致^[4,7],需要加大样本量,在不同的人群中重复,这样才能确定其与精神分裂症的相关性。

对象与方法

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671808);教育部博士点基金资助项目(20040183043);吉林省科技厅医学专项课题资助项目(20050135)

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

通讯作者:于雅琴,Email: yuyaqin5540@163.com

1. 研究对象:血液样本来自 2000 - 2006 年吉林省四平市精神病医院和长春市凯旋医院住院确诊为

精神分裂症的患者及其健康父母。按国际疾病分类手册(ICD-10)和《中国精神病分类与诊断标准》(第2版)修订本精神分裂症标准诊断,共201个核心家系(包括患者、父亲和母亲),603例研究对象均为中国北方汉族人。年龄为 24.58 ± 6.18 岁。患者中男性141例,女性60例。在获得家系成员知情同意的情况下,采取患者及家系各成员每人外周静脉血5 ml, -20°C 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,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。

2. 位点的选择与引物设计:利用计算机国际互联网和生物信息学方法,在人类基因库中确定cPLA2基因家族中的成员,包括:PLA2G4A、PLA2G4C、PLA2G4D、PLA2G4E、PLA2G4F和PLA2R1基因。选择每个基因上符合条件的单核苷酸多态性(SNPs)进行引物设计。

3. 荧光探针设计:根据LDR探针设计原则,探针长度通常在20~30 bp,对每一个SNP位点,在位点的5'方向根据SNP的碱基类型设计两条特异性探针,每条探针的3'末端碱基分别与此位点的一种等位基因型相对应,这两条特异性探针的长度设计有差异,便于后期的检测。此外在该位点的3'方向序列中设计一条末端带有蓝色荧光(FAM)修饰的通用探针,通用探针的5'端磷酸化,以便与特异性探针连接。

4. 人外周血白细胞基因组DNA的提取:采用液体纯化提取DNA试剂盒(Promega美国产品),严格按照说明书的方法操作。

5. 基因型检测:用聚合酶链反应和连接酶检测反应(PCR-LDR)方法进行基因型检测。多重PCR反应体系为 $10 \mu\text{l}$,其中含有10 mmol/L Tris-HCl (pH 值8.3, 25°C), 50 mmol/L KCl, 3.0 mmol/L MgCl_2 , 0.2 mmol/L dNTP, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 混合引物, 0.25 U HotStar Taq DNA聚合酶(Qiagen), $1 \times \text{Q-solution}$ (Qiagen), 30~50 ng基因组DNA和8 μl 石蜡油。PCR反应条件: 95°C 15 min (94°C 30 s, 60°C 90 s, 72°C 90 s) 35个循环, 72°C 10 min。LTD体系 $10 \mu\text{l}$: ddH_2O 7.5 μl , $10 \times$ 连接酶缓冲液1.0 μl , 荧光探针(5 mol/L) 0.5 μl , Taq DNA连接酶(5 U/ μl) 0.05 μl , DNA模板(PCR扩增后 $< 1 \mu\text{g}$) 1 μl 。连接酶检测反应条件: 94°C 变性2 min; (94°C 30 s, 60°C 2 min) 35个循环。连接酶检测反应后,将LDR产物、蓝色葡聚糖

上样缓冲液和内参比Marker各1 μl 等体积混合,应用377型DNA测序仪(ABI,美国)检测结果。以Marker为内参分子质量标准,检测不同长度DNA片段的荧光强度,并根据产物片段大小确定基因型。

6. 统计学分析:应用拟和优度 χ^2 检验,计算基因型分布是否符合Hardy-Weinberg平衡。借助SPSS 13.0统计软件,采用相对风险分析(HRR)、传递不平衡分析(TDT)方法,检验各位点与精神分裂症的关系。借助Unphased分析平台分析单倍型、多位点联合作用与精神分裂症的关系。

结 果

1. Hardy-Weinberg平衡检验:对患者组和其父母组的基因型频数分布分别进行拟和优度 χ^2 检验,结果表明,各位点基因型在两组中的频数分布均符合Hardy-Weinberg平衡定律($P > 0.05$)。

2. HRR分析:HRR分析是基于家系的相关分析方法。其原理是以父母双亲传递给患病子女的基因为“疾病基因”,没有传递的为“对照基因”,从而构建遗传学上完全匹配的“病例”与“对照”样品。结果表明,检测的10个位点等位基因在病例组和对照组中的频数分布差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3. TDT分析:TDT分析也是基于家系的相关分析方法,是观察杂合子父母亲的两个不同等位基因传递概率是否偏离50%,采用非参数 χ^2 检验。结果表明,检测的10个位点杂合子父母双亲传递给患病子女的两个不同等位基因概率均未偏离50% ($P > 0.05$),结果见表1。

表1 不同等位基因传递不平衡检验结果

位点	传递等位基因频数	χ^2 值	df	P 值
rs7542180	A = 87, G = 94	0.271	1	0.603
rs156631	C = 54, T = 40	2.085	1	0.149
rs2307279	C = 79, G = 65	1.361	1	0.243
rs2162886	C = 32, T = 23	1.473	1	0.225
rs891014	C = 27, T = 34	0.397	1	0.529
rs1668589	C = 93, T = 79	1.140	1	0.286
rs1356410	A = 28, G = 26	0.074	1	0.785
rs3828323	C = 62, T = 74	1.059	1	0.303
rs3749117	C = 85, T = 69	1.662	1	0.197
rs4924595	C = 75, T = 71	0.110	1	0.741

4. 单倍型传递 χ^2 检验:SNP属于双态性遗传标记,在群体中其杂合度和多态信息量均较低。上述HRR和TDT分析,均属于单位点分析。为了提高杂合性,更有效地利用遗传学信息,有必要进行多位点分析,即单倍型分析。单倍型为在给定的一条染色体的紧密连锁的位点上多个等位基因的集合,

通常几个相邻等位基因彼此靠近而构成的单倍型可作为一个整体而遗传。通过单倍型分析可以找到含有疾病易感基因的特异单倍型或染色体。单倍型分析的优点是检验效力强,且可发现多个易感位点。结果显示,由同一染色体上各位点组成的单倍型系统中,父母传递和未传递给患病子女的单倍型差异均无统计学意义($P > 0.05$),结果见表 2。

表2 等位基因单倍型传递 χ^2 检验结果

单倍型	χ^2 值	df	P 值
rs4924595-rs1668589	2.626	3	0.453
rs1668589-rs1356410	1.741	3	0.628
rs1356410-rs1648833	6.183	3	0.103
rs3749117-rs3828323	3.009	3	0.390
rs2307279-rs156631	4.152	3	0.245
rs156631-rs2162886	4.295	3	0.231
rs2162886-rs891014	1.016	1	0.313
rs4924595-rs1668589-rs1356410	4.339	7	0.740
rs2307279-rs156631-rs2162886	6.192	6	0.402
rs156631-rs2162886-rs891014	4.632	3	0.201

5. 条件检验分析:采用 COA 和 COG 两种分析方法分析遗传标记位点间的相互作用与精神分裂症的关系。经 Global χ^2 检验,以等位基因为条件,检验与另一位点的联合作用,结果显示,rs2162886 与 rs1668589,rs891014 与 rs1668589 的联合作用与精神分裂症相关联;同时以基因型为条件,分别检验与另一位点的联合作用,结果也显示 rs2162886 与 rs1668589,rs891014 与 rs1668589,rs2307279 与 rs7542180 的联合作用与精神分裂症相关联。其他基因位点之间未显示联合作用。具体结果见表 3。

表3 与精神分裂症相关联的基因位点检验分析结果

联合作用位点	χ^2 值	df	P 值
以等位基因为条件			
rs2162886-rs1668589	7.088	2	0.029
rs891014-rs1668589	7.005	2	0.030
以基因型为条件			
rs2307279-rs7542180	8.447	3	0.038
rs2162886-rs1668589	6.913	3	0.032
rs891014-rs1668589	8.393	3	0.015

注:P 值均 < 0.05

讨 论

本研究选择 cPLA2 家族基因为候选基因,主要是依据神经细胞膜磷脂代谢异常假说。该假说认为,神经细胞的机能活动将有赖于细胞膜的完整性,而磷脂是细胞膜的重要组成成分,若磷脂的合成发生障碍,则会影响神经细胞的功能,最终导致精神障碍^[8]。PLA2 是磷脂代谢的关键酶,它的异常必将导致神经细胞磷脂的异常,从而导致精神异常,这充分说明 PLA2 与精神分裂症的关系。近来有不少学

者研究报道,cPLA2 可能是精神分裂症的易感基因,这些阳性结果在英国和韩国人群中均得到了重复^[5,9],但也有研究报道 cPLA2 可能不是精神分裂症的易感基因^[10,11]。

本研究对 cPLA2 家族成员 PLA2G4A、PLA2G4C、PLA2G4D、PLA2G4E、PLA2G4F 基因及与它们功能作用相关的 PLA2R1 基因上的 10 个标记 SNPs 进行检测,探讨 cPLA2 家族基因多态性与精神分裂症的关系。HRR 和 TDT 分析表明,检测的 10 个 SNPs 位点与精神分裂症无关联性($P > 0.05$)。HRR、TDT 分析均是局限于传统的单位点(基因)分析方法,但精神分裂症是基因与基因之间、基因与环境之间相互作用形成的复杂疾病,因此对复杂疾病数据的分析不能脱离基因的相互作用进行。只有综合考虑基因间的相互作用,才能发现它们与疾病的联系。单倍型分析结果显示,由同一染色体上各位点组成的单倍型系统中,父母传递和未传递给患病子女的单倍型差异均无统计学意义($P > 0.05$)。多位点联合作用分析显示,rs2162886 与 rs1668589,rs891014 与 rs1668589,rs2307279 与 rs7542180 的联合作用与精神分裂症相关联。提示 PLA2G4A、PLA2G4C 和 PLA2G4D 基因可能是精神分裂症的易感基因或与精神分裂症的易感基因处于紧密连锁,从而证实 cPLA2 与精神分裂症相关联。但它们在精神分裂症的发病过程中,需要与不同的 SNP 位点联合,才能起作用。这也就是说各个基因位点不能单独致病,只在联合作用的情况下,才会参与精神分裂症的发病过程。

综上所述,cPLA2 家族基因中存在多个与精神分裂症关联的易感位点,从而说明 cPLA2 与精神分裂症密切相关,这与上述国外的多数阳性报道相一致,有力地支持了神经细胞膜磷脂代谢异常假说。同时,不同位点间的相互作用参与精神分裂症的发病过程,有力地支持了复杂疾病的多基因学说。虽然本研究获得了部分阳性结果,但还需要扩大样本量,在不同的人群中进行验证,同时对 cPLA2 家族基因的功能进行研究,以早日确证其与精神分裂症的关系。

参 考 文 献

- [1] Klemm S, Rzanny R, Riehemann S, et al. Cerebral phosphate metabolism in first-degree relatives of patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 2001, 158 (6): 958-960.
- [2] Bennett CN, Horrobin DF. Gene targets related to phospholipids and fatty acid metabolism in schizophrenia and other psychiatric disorders: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000, 63(1-2): 47-59.
- [3] Macdonald DJ, Boyle RM, Glen AC, et al. The investigation of

cytosolic phospholipase A2 using ELISA. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004, 70(4):377-381.

[4] Kinney DK, Jacobsen B, Jansson L. Winter birth and biological family history in adopted schizophrenics. Schizophr Res, 2000, 44(2):95-103.

[5] Wei J, Hemmings GP. A study of a genetic association between the PTGS2/PLA2G4A locus and schizophrenia. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004, 70(4):413-415.

[6] Hudson CJ, Kennedy JL, Gotowiec A, et al. Genetic variant near cytosolic phospholipase A2 associated with schizophrenia. Schizophr Res, 1996, 21(2):111-116.

[7] Yu Y, Tao R, Shi J, et al. A genetic study of two calcium-independent cytosolic PLA2 genes in schizophrenia. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005, 73(5):351-354.

[8] Gattaz WF, Brunner J. Phospholipase A2 and the hypofrontality hypothesis of schizophrenia. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1996, 55(1-2):109-113.

[9] Pae CU, Yu HS, Lee KU, et al. Ban I polymorphism of the cytosolic phospholipase A2 gene may confer susceptibility to the development of schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2004, 28(4):739-741.

[10] Chowdari KV, Brandstaetter B, Semwal P, et al. Association studies of cytosolic phospholipase A2 polymorphisms and schizophrenia among two independent family-based samples. Psychiatr Genet, 2001, 11(4):207-212.

[11] Frieboes RM, Moises HW, Gattaz WF, et al. Lack of association between schizophrenia and the phospholipase-A(2) genes cPLA2 and sPLA2. Am J Med Genet, 2001, 105(3):246-249.

(收稿日期:2007-09-17)
(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

青海省 2000 - 2006 年人间鼠疫病例分析

田富彰 王国钧 焦巴太 魏柏青 唐新元 李君 王梅

对青海省 2000 - 2006 年 12 起人间鼠疫病例进行了流行病学和临床特征分析。

1. 对象与方法: 人间鼠疫病例确诊判定标准按 GB 15991-1995 鼠疫诊断标准。调查对象为 2000 - 2006 年青海省人间鼠疫病例并对 6 年人间鼠疫疫情现场调查资料及临床病历资料进行整理和分析。

2. 结果: ①地区分布: 2000 - 2006 年青海省鼠疫病例的发病地点为同德、祁连、囊谦、称多、治多、曲麻莱、天峻、乌兰等 8 个县 10 个乡。其中同德县河北乡 1 例, 祁连县央隆乡 1 例, 囊谦县杂羊乡 14 例, 称多县清水河乡 1 例, 治多县治曲乡 1 例, 曲麻莱县东风乡 2 例和曲麻河乡 1 例, 天峻县生格乡和苏里乡各 1 例, 乌兰县赛什克乡和希里沟镇各 1 例。在 25 例病例中有 6 例在发病后曾经过长距离的转移, 均为湟源、湟中县农民。②时间分布: 青海省 2000 和 2002 年未发生人间鼠疫病例; 2001、2003 年各 1 起, 均发病 1 例并死亡; 2004 年 7 起, 发病 20 例, 死亡 9 例; 2005 年 2 起, 发病 2 例并死亡; 2006 年 1 起, 发病 1 例, 未死亡。25 例病例均发病于 5 - 10 月, 其中 5、7 月各 1 例, 6 月 2 例, 10 月 2 例, 9 月 19 例, 占 76.0%。③人群分布: 25 例病例中藏族牧民 17 例, 占 68.0%, 汉族农民 8 例, 占 32.0%; 病例年龄 5 - 69 岁, 以 20 - 45 岁年龄段为主, 占 68.0%; 其中 20 岁以下 3 例, 20 - 45 岁 17 例, 45 岁以上 5 例; 该 8 例汉族农民患(死)者皆为各次疫情的首发病例。25 例中男性 19 例, 占 76.0%; 女性 6 例, 占 24.0%。④感染途径: 12 例首发病例中有 8 例是在剥食旱獭过程中经伤口感染后发病, 2 例与牧犬密切接触过程被犬体外寄生蚤叮咬感染发病, 1 例在接触了自毙旱獭后感染发病, 1 例是因剥死狐狸皮感染发病; 其余 13 例为接触肺鼠疫患者经空气飞沫传染。⑤临床特征: 25 例病例中, 腺鼠疫 3 例(12.0%); 腺鼠疫继发败血型鼠疫 4 例(16.0%); 腺

鼠疫继发肺鼠疫 1 例(4.0%); 败血型鼠疫继发肺鼠疫 2 例(8.0%); 原发性肺鼠疫 13 例(52.0%); 原发性败血型鼠疫 1 例(4.0%); 腺鼠疫合并鼠疫蜂窝组织炎 1 例(4.0%)。重症鼠疫(包括肺鼠疫和败血型鼠疫)21 例(84.0%)。⑥病程及转归: 腺鼠疫和腺鼠疫合并鼠疫蜂窝组织炎者全部治愈, 病程为 26 - 33 d; 原发性和继发性败血型鼠疫 6 例, 未经及时治疗全部死亡, 病程为 3 - 5 d; 8 例患者经及时抢救治疗全部治愈, 病程为 16 - 21 d。

3. 讨论: 青海省 2000 - 2006 年人间鼠疫疫情较 20 世纪 90 年代有所上升, 一是近年来动物间鼠疫疫情呈明显上升趋势, 染疫动物和媒介昆虫的种类和数量不断增多, 新的疫源地不断发现。二是由于近年来, 旱獭皮价格大幅上涨, 受经济利益的驱动, 每年 8 - 9 月大量捕旱獭人员进入鼠疫疫源地; 这些捕旱獭者不具备自我保护知识和任何的防护措施; 在 12 例首发病例中有 8 例为捕旱獭民工, 主要由于剥食旱獭而发病。三是青海省鼠疫疫源地面积大, 大部分疫源地为交通、通讯欠发达地区, 一旦发生鼠疫病例, 很难得到及时的治疗与报告。在 25 例病例中藏族 17 例, 13 例为接触肺鼠疫患者经空气飞沫传播, 另外 4 例为首发病例, 其发病原因为密切接触患病牧犬、玩耍自毙旱獭和剥自毙狐狸皮。汉族群众有在外地得病后立即返回家中的习俗, 很容易将鼠疫由偏远牧区带到人口相对稠密的农村和城镇, 增加了鼠疫远距离传播的机会。在 8 例汉族农民病例中有 6 例经过了长距离的转运, 其中 3 例因败血症死在转运途中, 3 例回家后在被当地村医发现后上报; 另外 2 例在本县范围内捕旱獭后返回家中在县疾病预防控制中心就诊时被发现。结果提示, 鼠疫远距离传播的威胁正在增加, 防止鼠疫远距离传播是今后鼠疫防治工作的难点。

(收稿日期: 2007-07-05)

(本文编辑: 尹廉)