

混合家系中 NOTCH4 基因多态与精神分裂症、心境障碍关联的研究

汪作为¹, 方贻儒², 洪武², 汪栋祥², 江三多²

(1. 上海市虹口区精神卫生中心, 上海 200083; 2. 上海市精神卫生中心, 上海 200030)

摘要:为探讨 NOTCH4 基因多态性与精神分裂症(SP)、心境障碍(MD)的关系, 搜寻了中国汉族人群 SP 与 MD 的共同易患基因。在中国汉族人群中收集 61 个 SP 与 MD 的混合家系, 应用 PCR-RFLP 方法对 NOTCH4 基因多态性 -1725 T/G、-25 T/C 分型, 进行传递不平衡检验(TDT)和基于单体型单体型相对风险分析(HHRR)。结果显示 -1725 T/G 与 SP 或 MD 无明显关联($P > 0.05$); -25 T/C 与 SP 无明显关联($P > 0.05$), 与女性或发病年龄 ≤ 25 岁的 MD 相关联($P < 0.05$); 单体型 -1725 G/-25 T 与 SP 相关联($P < 0.05$), 与 MD 无明显关联($P > 0.05$)。结果提示, 在研究的家系中 NOTCH4 或邻近基因可能是精神分裂症与心境障碍的共同易患基因之一。

关键词:精神分裂症; 心境障碍; 混合家系; NOTCH4 基因; 多态性

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)06-0865-04

Association Study of NOTCH4 Gene Polymorphisms with Schizophrenia and Mood Disorders in Mixed Pedigrees

WANG Zuo-Wei¹, FANG Yi-Ru², HONG Wu², WANG Dong-Xiang², JING San-Duo²

(1. Hongkou District Mental Health Center, Shanghai 200083, China; 2. Shanghai Mental Health Center, Shanghai 200030, China)

Abstract: This study was to explore the relationships between NOTCH4 Gene and schizophrenia (SP) and mood disorders (MD), and to search for a common susceptible gene for SP and MD in Chinese Han population. We collected 61 mixed pedigrees of SP and MD in Chinese Han population. NOTCH4 polymorphisms -1725 T/G and -25 T/C were genotyped by applying PCR-RFLP technique, then transmission disequilibrium test (TDT) and haplotype-based haplotype relative risk analysis (HHRR) were performed. The results showed that -1725 T/G was not associated with SP or MD ($P > 0.05$), -25 T/C was not associated with SP ($P > 0.05$), but associated significantly with MD for female or early-onset (age of onset ≤ 25 years) group ($P < 0.05$), and -1725 G/-25 T haplotype was significantly associated with SP ($P < 0.05$), but not associated with MD ($P > 0.05$). Our results suggested NOTCH4 or neighboring gene might be a common susceptible gene for SP and MD in the pedigrees studied.

Key words: schizophrenia; mood disorders; mixed pedigree; NOTCH4 Gene; polymorphism

迄今为止, 精神分裂症(schizophrenia, SP)、心境障碍(mood disorders, MD)的病因和遗传机制尚不明确, 二者是否属于同一疾病谱, 国内外学者对此

意见不统一, 对于分裂情感性精神病(schizoaffective psychosis, SAP)的本质更是众说纷纭, 或不典型 SP, 或 MD 亚型, 或独立疾病单元, 或介于二者之

收稿日期: 2004-10-09; 修回日期: 2004-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30270494) [The Project was supported by National Natural Sciences Foundation of China (No. 30270494)]

作者简介: 汪作为(1978—), 男, 安徽人, 住院医师, 硕士研究生, 研究方向: 精神病分子遗传学。Tel: 021-56662531; E-mail: wangwang96jw2001@yahoo.com.cn

通讯作者: 方贻儒(1964—), 男, 湖南人, 教授, 主任医师, 博士, 研究方向: 生物精神医学。E-mail: fang-yr@online.sh.cn

间的中间状态^[1]。我们以往研究发现,SP先证者的亲属中MD患病率或MD先证者的亲属中SP患病率均较一般人群明显增高,并且血缘关系越近,患病率越高,提示二者之间可能存在共同的遗传机制^[2]。人类NOTCH4基因位于SP易患基因连锁的可能染色体区域6p21.3,编码大分子跨膜受体蛋白,调节神经系统发育(胚胎细胞迁移、血管形态形成及重塑等),后者亦与SP发生有关^[3]。为了探讨SP与MD是否具有共同遗传机制和验证NOTCH4是否与中国汉族人群SP、MD易患性关联,本研究对SP与MD的混合家系进行初步研究分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 混合家系定义

本文定义混合家系为:SP先证者3代以内亲属至少有一位MD患者,MD先证者3代以内亲属至少有1位SP患者,或SAP先证者3代以内亲属至少有一位SP或MD患者。

1.1.2 混合家系的筛选

以2001年1月~2004年6月上海市精神卫生中心门诊或住院病人作先证者,先证者诊断符合CCMD-3诊断标准的SP、MD或SAP,排除器质性精神障碍、精神活性物质所致精神障碍和精神发育迟滞等。所有研究对象均经患者及家属知情同意。结果收集到61个混合家系(其中42个核心家系资料完整)。先证者情况:男28例,女33例;31例诊断SP,28例诊断MD,2例诊断SAP;年龄(31.34±9.81)岁,发病年龄(24.54±8.90)岁,病程(6.80±7.13)年,父母年龄(58.84±10.88)岁。

1.1.3 DNA提取

抽取先证者及生物父母静脉血各2 mL,2% EDTA抗凝,分离白细胞,常规提取DNA于-20℃条件下保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因分型

NOTCH4基因多态性-1725T/G、-25T/C分型应用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法。-1725T/G引物为5'-TGC TGG CTC ACG GGC TTC C-3'和5'-TGG ATT GCA GTG GCA CGA CC-3',-25T/C引物为5'-

AAA CAG CAG GGC TGG GAC TG-3'和5'-ACC TCT GGG TCT GAC CAC TG-3'。PCR反应条件为:反应总体积30 μL,其中10×PCR缓冲液3 μL, MgCl₂ 1.5 mmol/L, Dntp 200 μmol/L,引物0.3 μmol/L, DNA模板100 ng, Taq酶1.5 U。



图1 -1725T/G多态性酶切后凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis of -1725T/G polymorphism

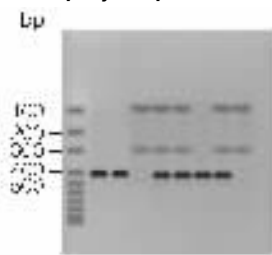


图2 -25T/C多态性酶切后凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of -25T/C polymorphism

热循环参数:95℃预变性3 min,然后是95℃变性30 s,64℃退火30 s,72℃延伸30 s的30个循环,最后是72℃延伸7 min。PCR扩增产物经同一种限制性内切酶Msp I于37℃条件下过夜消化。酶切产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳及溴乙啶染色在紫外线灯下进行分型。-1725G等位基因酶切后出现277 bp和105 bp两条带,-25C等位基因酶切后出现96 bp和328 bp两条带,-1725T和-25T等位基因因无Msp I切点仅呈一条条带(分别为382 bp和424 bp)(图1和图2)。

1.2.2 统计学处理

对患者及父母的基因型分布进行Hardy-Weinberg平衡检验;应用基于家系资料的关联分析方法:传递不平衡检验(transmission disequilibrium test, TDT)和基于单体的单体型相对风险分析(haplotype-based haplotype relative risk, HHRR)^[4],经 χ^2 检验基因多态性与疾病关联与否。统计过程应用SPSS11.5软件包。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡检验

经 χ^2 检验,患者组和父母组基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$)。患者组与父母组之间等位基因、基因型及单体型的分布均无显著差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1 患者与父母的等位基因、基因型和单体型分布

Table 1 Distributions of allele, genotype and haplotype of patients and parents

		患者组	父母组	
		Patients' group	Parents' group	
等位基因	-1725T	81(0.664)	130(0.631)	
Allele	-1725G	41(0.336)	76(0.369)	
	-25T	31(0.254)	66(0.320)	
	-25C	91(0.746)	140(0.680)	
	基因型	-1725T/T	30(0.492)	38(0.369)
Genotype	-1725T/G	21(0.344)	54(0.524)	
	-1725G/G	10(0.164)	11(0.107)	
	-25T/T	3(0.049)	12(0.116)	
	-25T/C	25(0.410)	42(0.408)	
	-25C/C	33(0.541)	49(0.476)	
	单体型	-1725T/-25T	14(0.137)	25(0.153)
	Haplotype	-1725T/-25C	58(0.569)	85(0.518)
		-1725G/-25T	6(0.059)	19(0.116)
-1725G/-25C		24(0.235)	35(0.213)	

2.2 传递不平衡检验(TDT)

2.2.1 -1725T/G 多态性 TDT

-1725T/G 多态性与本研究疾病总体($\chi^2 = 1.92, \nu = 1, P > 0.05$)、SP($\chi^2 = 1.29, \nu = 1, P > 0.05$)或 MD($\chi^2 = 0.18, \nu = 1, P > 0.05$)均无明显关联(表 2)。

表 2 等位基因与双位点单体型的传递不平衡检验(TDT)

Table 2 Transmission disequilibrium test(TDT) of allele and two-site haplotype

		-1725T/G		-25T/C		-1725T /-25T	-1725T /-25C	-1725G /-25T	-1725G /-25C
		T	G	T	C				
Total	T	31	21	13	26	12	38	6	16
	NT	21	31	26	13	13	26	17	16
SP	T	17	11	8	14	6	18	2	8
	NT	11	17	14	8	5	14	9	6
MD	T	12	10	3	12	4	19	4	7
	NT	10	12	12	3	8	11	8	7

注:T代表传递,NT代表未传递。

Note:T for transmitted, NT for non-transmitted.

2.2.2 -25T/C 多态性 TDT

-25T/C 多态性与本研究疾病总体($\chi^2 = 4.33, \nu = 1, P < 0.05$)和 MD($\chi^2 = 5.40, \nu = 1, P < 0.05$)相关联,与 SP 无明显关联($\chi^2 = 1.64, \nu = 1, P > 0.05$)。对 MD 患者依次按性别和发病年龄进一步分组,TDT 结果显示-25T/C 多态性与女性($\chi^2 = 5.44, \nu = 1, P < 0.05$)和发病年龄 ≤ 25 岁的 MD($\chi^2 = 7.36, \nu = 1, P < 0.01$)相关联,与男性或发病年龄 > 25 岁的 MD 无明显关联($P > 0.05$)。

2.2.3 双位点单体型 TDT (two-site haplotype TDT)

单体型-1725G/-25T 与本研究疾病总体($\chi^2 = 5.26, \nu = 1, P < 0.05$)及 SP($\chi^2 = 4.45, \nu = 1, P < 0.05$)相关联,但与 MD($\chi^2 = 1.33, \nu = 1, P > 0.05$)无明显关联;其他单体型-1725T/-25T、-1725T/-25C 及-1725G/-25C 与本研究疾病总体、SP 或 MD 均无明显关联($P > 0.05$)。

2.3 基于单体型的单体型相对风险分析 HHRR

2.3.1 -1725T/G 多态性 HHRR

-1725T/G 多态性与本研究疾病总体($\chi^2 = 2.13, \nu = 1, P > 0.05, OR = 1.54, 95\% CI(0.86, 2.73)$)、SP($\chi^2 = 1.08, \nu = 1, P > 0.05, OR = 1.54, 95\% CI(0.68, 3.50)$)、MD($\chi^2 = 0.14, \nu = 1, P > 0.05, OR = 1.18, 95\% CI(0.50, 2.79)$)均无明显关联(表 3)。

表 3 基于单体型的单体型相对风险分析(HHRR)

Table 3 Haplotype-based haplotype relative risk analysis (HHRR)

		-1725T/G		-25T/C	
		T	G	T	C
Total	T	69	32	25	75
	NT	59	42	38	62
SP	T	37	15	17	40
	NT	32	20	23	34
MD	T	30	16	6	33
	NT	27	17	15	24

2.3.2 -25T/C 多态性 HHRR

-25T/C 多态性与本研究疾病总体($\chi^2 = 3.92, \nu = 1, P < 0.05, OR = 0.54, 95\% CI(0.30, 1.00)$)和 MD($\chi^2 = 5.28, \nu = 1, P < 0.05, OR = 0.29, 95\% CI(0.10, 0.86)$)相关联,携带-25C 等位基因者患病风险增加;但与 SP 无明显关联($\chi^2 = 1.39, \nu = 1, P > 0.05, OR = 1.59, 95\% CI(0.73, 3.46)$)。对 MD 患者进行分组 HHRR 分析,结果显示-25T/C 多态性

亦与女性 [$\chi^2 = 4.70, u = 1, P < 0.05, OR = 0.25, 95\% CI (0.07, 0.90)$] 和发病年龄 ≤ 25 岁 [$\chi^2 = 5.58, u = 1, P < 0.05, OR = 0.18, 95\% CI (0.04, 0.80)$] 的 MD 相关联, 与男性或发病年龄 > 25 岁的 MD 无明显关联 ($P > 0.05$)。

3 讨论

精神分裂症 (SP)、心境障碍 (MD) 和分裂情感性精神病 (SAP) 的病因虽尚未明确, 大量的家系调查、双生子及寄养子等研究已证实遗传因素在这些疾病的发生过程中起重要作用。随着分子生物学技术的发展, 又揭开了精神疾病遗传学和病因学研究新的一页^[5]。目前分子生物学研究支持它们是多基因遗传病, 具有遗传异质性。2000 年 Wei 和 Hemmings^[6] 首先报道在英国威尔士人群中 NOTCH4 基因与 SP 关联。但随后人们在德国、以色列、保加利亚、日本、中国等人群及英国的高加索和苏格兰血统人群中进行研究, 结果阴性, 2004 年 Luo 等在非洲和欧洲血统的美国人群中进行病例对照研究, 发现在非洲血统人群中 -1725G/-25T 单体型与 SP 关联, 但在欧洲血统人群中未见任何关联^[7]。不同实验结果的差异可能主要有 3 种原因: 第一, 阴性关联分析结果可能由于偶然性或随机抽样差异造成的; 第二, 在不同种族背景下存在着遗传异质性; 另外, 相同疾病可能存在不同的病理机制^[8]。目前尚无 NOTCH4 基因与 MD 阳性关联的报道。

本组研究选择以往研究支持关联的 NOTCH4 基因多态性 -1725T/G 和 -25T/C 作遗传标志, 在中国上海地区汉族人群中进行基于家系资料的关联研究。TDT 检验和 HHRR 分析的结果一致, 显示 -25T/C 多态性与女性或发病年龄 ≤ 25 岁的 MD 相关联, 携带 -25C 等位基因者患病风险增加, 提示 NOTCH4 基因可能影响年轻女性的 MD 易感性, 可能是 MD 易患基因之一。双位点单体型 TDT 检验显示 -1725G/-25T 单体型与 SP 相关联, 表现为该单体型传递过少会增加疾病易感性, 提示 NOTCH4 基因亦可能是 SP 易患基因之一。

参考文献 (References):

- [1] SHEN Yu-Cun Chief Editor. Psychiatrics. Beijing: Sciencetech Press of People Guard, 1994, 614~617.
沈渔邨主编. 精神病学. 北京: 人民卫生出版社, 1994, 614~617.
- [2] HONG Wu, YUAN Cheng-Mei, FANG Yi-Ru, JIANG Kai-Da, SHI Shen-Xun, ZHAO Lan-Ying, WANG Zu-Cheng, JIANG San-Duo. A study on the genetic effect of mixed-family of schizophrenia and affective disorders. *Shanghai Archives of Psychiatry*, 2003, 15(5): 260~263.
洪武, 苑成梅, 方贻儒, 江开达, 施慎逊, 赵兰英, 王祖承, 江三多. 精神分裂症和情感障碍混合家系的遗传调查. *上海精神医学*, 2003, 15(5): 260~263.
- [3] Fan J B, Tang J X, Gu N F, Feng G Y, Zou F G, Xing Y L, Shi J G, Zhao S M, Zhu S M, Ji L P, Sun W W, Zheng Y L, Liu W Q, Breen G, St Clair D, He L. A family-based and case-control association study of the NOTCH4 Gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 2002, 7: 100~103.
- [4] GUO Zheng, LI Xia, LI Jing. Computational Molecular Biology and Genome Informatics. Harbin: Heilongjiang Sciencetech Press, 1998, 230~239.
郭政, 李霞, 李晶编著. 计算机分子生物学与基因组信息学. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1998, 230~239.
- [5] WU Huai-An, DENG Xiao-Min, YAN Xiao-Hua, LIU Tie-Bang, HU Ji-Ze, GAO Huan, SHEN Qi-Jie. Association study of five pedigree with high incidence of schizophrenia. *Hereditas (Beijing)*, 2003, 25(6): 652~654.
吴怀安, 邓小敏, 阎小华, 刘铁榜, 胡纪泽, 高欢, 沈其杰. 5 个精神分裂症高发家系与 COMT 关联的分析. *遗传*, 2003, 25: 652~654.
- [6] Wei J, Hemmings G P. The NOTCH4 locus is associated with susceptibility to schizophrenia. *Nat Genet*, 2000, 25: 376~377.
- [7] Luo X G, Klempan T A, Lappalainen J, Rosenheck R A, Charney D S, Erdos J, Kammen D P, Kranzler H R, Kennedy J L, Gelernter J. NOTCH4 gene haplotype is association with schizophrenia in African Americans. *Biol Psychiatry*, 2004, 55: 112~117.
- [8] LI Sheng, GU Niu-Fan, FENG Guo-Qin, LIU Wang-Qing, SHEN Tao, HE Lin. Analysis of association between T102C polymorphism in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia in Chinese population. *Hereditas (Beijing)*, 1998, 20(6): 14~16.
李胜, 顾牛范, 冯国勤, 刘万清, 沈韬, 贺林. 中国人 5-羟色胺 2A 受体基因中 T102C 多态性与精神分裂症的联系. *遗传*, 1998, 20(6): 14~16.