

对胆囊收缩素受体 A 基因进行深度测序寻找精神分裂症相关位点

陈凤萍, 吴霖, 沈岩, 许琪

中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 生物化学与分子生物学系医学分子生物学
国家重点实验室, 北京 100005

通信作者: 许琪 电话: 010-69156432, 传真: 010-65263392, 电子邮件: xuqi@pumc.edu.cn

摘要: 目的 对与精神分裂症相关的胆囊收缩素受体 A 基因 (CCKAR) 进行深度测序, 寻找精神分裂症相关位点。
方法 采用 Haloplex 目标富集系统对 8 个病例样本与 8 个正常对照样本进行 CCKAR 区域的深度测序, 利用 IGV 软件去除结果中的假阳性, 然后利用 Unphased 软件进行分析。**结果** 深度测序后得到 103 个变异位点, 其中 30 个变异位点位于 CCKAR 基因上, 发现了可能与精神分裂症相关的位点 rs191275118。**结论** 发现了新的可能与精神分裂症相关的位点, 对 CCKAR 基因研究资料进行了补充。

关键词: 精神分裂症; 胆囊收缩素受体 A 基因; 深度测序; 变异位点

中图分类号: R394 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2014)05-0466-04

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2014.05.002

Deep Sequencing for Cholecystokinin A Receptor Gene to Get Loci Associated with Schizophrenia

CHEN Feng-ping, WU Lin, SHEN Yan, XU Qi

State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Corresponding author: XU Qi Tel: 010-69156432, Fax: 010-65263392, E-mail: xuqi@pumc.edu.cn

ABSTRACT: Objective To find the risk loci on cholecystokinin A receptor gene (CCKAR) -a schizophrenia candidate gene by using the deep sequencing and then analyze the variations. **Methods** In the present study, 8 schizophrenia patients and 8 healthy controls were recruited. After DNA extraction from peripheral blood, we conducted deep sequencing on CCKAR region by HaloPlex Target Enrichment System (Agilent). We used Unphased software to exclude the false positive. **Results** After deep sequencing, we got 103 loci, among which 30 were located in CCKAR gene. Besides, the SNP rs191275118 was found to be associated with schizophrenia. **Conclusions** A new variation that may be associated with schizophrenia was found. The deep sequencing is effective to find genetic variation.

Key words: schizophrenia; cholecystokinin A receptor gene; deep sequencing; variants

Acta Acad Med Sin, 2014,36(5):466-469

基金项目: 国家自然科学基金 (31222031)、中央高校基本科研业务费专项资金 (2012S05)、协和青年科研基金 (2012J09) 和“新世纪优秀人才支持计划” (NCET-12-0071) Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (31222031), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2012S05), the Youth Foundation of Peking Union Medical College (2012J09), and the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-12-0071)

精神分裂症是一种病因尚未完全阐明的复杂疾病,人群中的终生患病率为 1%^[1-2],遗传度约为 81%^[3]。目前已发现了许多相关基因,例如:乙醛脱氢酶 2 基因 (aldehyde dehydrogenase 2 gene, ALDH2)、儿茶酚-O-甲基转移酶基因 (catechol-O-methyltransferase gene, COMT)、多巴胺 D4 受体基因 (dopamine receptor D4 gene, DRD4) 等^[4]。精神分裂症的发生有多种假说^[5],其中多巴胺假说被广泛接受^[6]。胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK) 广泛存在于中枢及外周神经系统^[7],一般与多巴胺同时存在,调节其释放及其相关行为^[8]。胆囊收缩素受体 A 基因 (cholecystokinin A receptor gene, CCKAR) 是 CCK 的 A 型受体^[9]。CCKAR 基因位于 4p15.2-15.1,表达胆囊收缩素受体 A。Wei 等^[10]研究发现,位于 CCKAR 基因中的 rs1800857 位点可能与精神分裂症相关,并多次被证实^[11-12]。通过持续研究,多个位点被证实与精神分裂症相关,如:rs1800908、rs1799723 等^[13]。本研究通过对 CCKAR 基因进行深度测序,寻找了 CCKAR 基因中其他与精神分裂症相关的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点或罕见变异位点。

对象和方法

对象及分组 2008 年 12 月至 2009 年 2 月在东北招募的精神分裂症患者 8 例 (病例组) 和正常对照者 8 名 (对照组)。病例组 8 例患者中,男 5 例,女 3 例,平均年龄 (37.6 ± 2.9) 岁 (27 ~ 46 岁),均经过 2 名副主任以上医师采用精神障碍诊断与统计手册 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV, DSM-IV) 检查确诊入院。同时应用 DSM-IV 定式临床会谈量表 (Structured Clinical Interview for DSM-IV, SCID) 作为标准化临床诊断工具。实施诊断的医师经过严格培训并在实验前进行诊断一致性检验,保证了入组对象的同质性。对照组 8 名受试者中,男 3 名,女 5 名,平均年龄 (34.6 ± 4.9) 岁 (24 ~ 54 岁),均招募自当地社区,排除有精神或神经系统疾病家族史的个体。所有实验样本均来自北方汉族人群,获得中国医学科学院北京协和医学院伦理委员会批准,均签署知情同意书。

DNA 提取 基因组 DNA 主要由酚-氯仿抽提方法或采用 DNA 提取试剂盒 [Flexi Gene DNA Kit (250), 美国 QIAGEN 公司] 从个体的全血中提取,从 1 ml 全血中提取 DNA 之后将 DNA 样本储存至 4 °C。

CCKAR 基因区域捕获测序 采用 Haloplex 目标富集系统 (美国 Agilent 公司) 对包括 CCKAR 基因 (chr4: 26483018-26492042) 在内的一段区域 (chr4: 26470000-26500000) 的 DNA 序列进行捕获测序。捕获的步骤如下: (1) 采用限制性内切酶降解基因组 DNA; (2) 已降解的 DNA 与 Haloplex 探针在目标区域上杂交; (3) 捕获目的 DNA; (4) 结束捕获,环化片段; (5) 准备 PCR 预混液; (6) 用 NaOH 洗脱捕获到的 DNA; (7) PCR 扩增目的文库; (8) 纯化扩增到的目的文库; (9) 验证富集物及量化富集到的目的 DNA; (10) 用不同的指标对样本进行组合分析。

统计学处理 采用 IGV 软件查看测序结果,去除结果中的假阳性位点 (仅处在片断边缘的突变位点即为假阳性),以免影响后期的分析。对确定为阳性的位点采用 Unphased 2.0 软件进行分析,获得 OR 值,分析测序得到的阳性位点是否与精神分裂症相关。

结 果

通过测序 CCKAR 基因获得的插入/缺失位点 (in/del) 为 16 个 (13.68%), SNP 位点为 75 个 (64.10%), 新发现的未知位点 (即不存在于 NCBI 数据库中的位点,暂命名为 None) 为 10 (8.55%)。对该区域深度测序,芯片覆盖度约为 94.26%,平均测序深度达 115.09。

采用 IGV2.3 软件查看测序结果,去除测序得到的 117 个位点中的 14 个 (11.96%) 假阳性位点,这些假阳性位点均为 None 位点。去除假阳性位点后,在该区域内所检测到的位点,有 30 个位于 CCKAR 基因上,包括:5 个 (4.27%) 插入/缺失位点、22 个 (18.80%) SNP 位点和 3 个 (2.56%) None 位点。

采用 Unphased 软件分析检测到的位于 CCKAR 基因的 SNP 位点,结果发现 1 个较有意义的位点——rs191275118,该位点在病例组样本中出现的次数是 2,在对照组样本中的出现次数为 0 (表 1)。根据 NCBI 的 SNP 数据库显示,rs191275118 位于 CCKAR 基因第 3 内含子,主等位基因为 A,次等位基因为 G,其次等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) 值为 0.002。在 CCKAR 基因中检测到的 3 个未在 NCBI 数据库中出现的变异位点为 chr4: 26485259、chr4: 26487139、chr4: 26488302,其在病例组样本中出现的次数均为 0,在对照组样本中出现的次数均为 1,OR 值为 0。

表 1 SNPs discovered from deep sequencing in CCKAR gene region
Table 1 通过深度测序在 CCKAR 基因内发现的 SNP 位点

染色体 Chromosome	ID	位置 Position	SCZ [<i>n</i> (%)]	CTR [<i>n</i> (%)]	OR
4	rs17846984	26483208	1 (7.14)	1 (6.25)	1.154
4	rs114925681	26483513	0	1 (6.25)	0
4	rs56270760	26483839	1 (6.25)	0	∞
4	rs11726159	26484021	1 (6.25)	2 (12.5)	0.467
4	rs2725301	26484629	16 (100)	16 (100)	1.000
4	rs2725302	26485174	16 (100)	16 (100)	1.000
4	rs55834467	26486091	1 (6.25)	0	∞
4	rs915889	26486194	1 (6.25)	0	∞
4	rs191275118	26486282	2 (12.5)	0	∞
4	rs7665027	26486909	1 (6.25)	0	∞
4	rs7696435	26488035	1 (6.25)	0	∞
4	rs2725307	26489057	16 (100)	16 (100)	1.000
4	rs76729701	26489469	16 (100)	16 (100)	1.000
4	rs184472930	26489816	1 (6.25)	0	∞
4	rs2725306	26490024	0	1 (6.25)	0
4	rs79864310	26490041	0	1 (6.25)	0
4	rs3822222	26490652	1 (6.25)	0	∞
4	rs74385997	26490914	1 (6.25)	0	∞
4	rs199833268	26490940	1 (6.25)	0	∞
4	rs1800857	26491111	1 (6.25)	0	∞
4	rs1800855	26491117	16 (100)	16 (100)	1.000
4	rs2071011	26491433	0	1 (6.25)	0

SNP: 单核苷酸多态性; ID: 编号; SCZ: 精神分裂症; CTR: 对照; OR: 优势比

SNP: single nucleotide polymorphism; ID: identity; SCZ: schizophrenia; CTR: control; OR: odds ratio

讨 论

精神分裂症是典型的多基因复杂疾病,由遗传因素和环境因素共同作用^[14]。其中,遗传因素发挥着重要的作用。目前已报道的有关精神分裂症的关联研究有 1727 项,可能的易感基因 1008 个,多态性位点 8788 个,以及 287 个荟萃分析报道(截止到 2014 年 2 月 28 日, <http://www.schizophreniaforum.org/res/sczgene/default.asp>)。CCKAR 基因是这其中一个重要的与精神分裂症相关的基因。近几年来对 CCKAR 基因的研究很多,但是结果复杂多样,且重复性较差。

遗传异质性是精神分裂症遗传学研究中一个重要

的干扰因素,也是众多复杂疾病研究的障碍之一,往往使复杂疾病的研究变得比较困难。本研究希望能够通过对 CCKAR 基因的深度测序,寻找精神分裂症发病中与 CCKAR 相关的变异位点,从而确定可能是由于某一位点的影响或是这些位点共同作用导致了与 CCKAR 相关的精神分裂症的发生。结果发现 1 个可能与精神分裂症相关的变异位点——rs191275118,位于 CCKAR 基因的第 3 内含子。rs191275118 的 MAF 值为 0.002,属于罕见变异位点(一般认为,MAF < 1% 的变异位点为罕见变异^[15])。目前还几乎没有发现关于 CCKAR 基因中 rs191275118 位点的报道,提示 rs191275118 可能是一个新发现的 CCKAR 基因中与精神分裂症的相关位点。同时,因为这一位点是一个低

频突变位点,可能会对“常见疾病-罕见变异 (common-disease rare variation, CDRV)”的假说起到部分支持作用。本研究属于对 CCKAR 基因及该位点的初步研究,从实验结果看来,该位点具有一定的研究意义,值得深入研究。可以利用大样本对这个位点进行验证,证实 rs191275118 与精神分裂症的相关性。

本研究中未发现该区域中与精神分裂症相关的未知变异位点。但是,并不证明在 CCKAR 基因中不存在与精神分裂症相关的未知变异。推测原因可能是这些位点的频率过低或信号较小不容易被检测到;或是由于二代测序中芯片的覆盖度不能达到 100%,一些突变位点未能被检测到,这有待于技术层面的提升。

综上,本研究虽然仍存在一些缺陷,但发现了 CCKAR 基因中可能与精神分裂症相关的新的变异位点,若其他研究中对这一位点进行后续的研究及分析,可能会发现更多的信息,对 CCKAR 基因的相关资料具有补充作用。

参 考 文 献

- [1] Saha S, Chant D, Welham J, et al. A systematic review of the prevalence of schizophrenia [J]. *PLoS Med*, 2005, 2(5):e141.
- [2] Gottesman II, Shields J. A polygenic theory of schizophrenia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967, 58(1):199-205.
- [3] Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2003, 60(12):1187-1192.
- [4] Burmeister M, McInnis MG, Zollner S. Psychiatric genetics: progress amid controversies [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(7):527-540.
- [5] Raedler TJ, Knable MB, Weinberger DR. Schizophrenia as a developmental disorder of the cerebral cortex [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 1998, 8(1):157-161.
- [6] Lang UE, Puls I, Muller DJ, et al. Molecular mechanisms of schizophrenia [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2007, 20(6):687-702.
- [7] Crawley JN, Corwin RL. Biological actions of cholecystokinin [J]. *Peptides*, 1994, 15(4):731-755.
- [8] Gariano RF, Groves PM. A mechanism for the involvement of colocalized neuropeptides in the actions of antipsychotic drugs [J]. *Biol Psychiatry*, 1989, 26(3):303-314.
- [9] Jensen RT, Qian JM, Lin JT, et al. Distinguishing multiple CCK receptor subtypes. Studies with guinea pig chief cells and transfected human CCK receptors [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, 713(4):88-106.
- [10] Wei J, Hemmings GP. The CCK-A receptor gene possibly associated with auditory hallucinations in schizophrenia [J]. *Eur Psychiatry*, 1999, 14(2):67-70.
- [11] Zhang XY, Zhou DF, Zhang PY, et al. The CCK-A receptor gene possibly associated with positive symptoms of schizophrenia [J]. *Mol Psychiatry*, 2000, 5(3):239-240.
- [12] Sanjuan J, Toirac I, Gonzalez JC, et al. A possible association between the CCK-AR gene and persistent auditory hallucinations in schizophrenia [J]. *Eur Psychiatry*, 2004, 19(6):349-353.
- [13] Toirac I, Sanjuan J, Aguilar EJ, et al. Association between CCK-AR gene and schizophrenia with auditory hallucinations [J]. *Psychiatr Genet*, 2007, 17(2):47-53.
- [14] Harrison PJ, Owen MJ. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications [J]. *Lancet*, 2003, 361(9355):417-419.
- [15] Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(6):415-425.

(收稿日期: 2014-03-07)