

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00826

中国汉族女性中 G72 基因与精神分裂症的关系

韩 燕¹, 张 欢², 宁启兰¹, 钟 波¹, 孙青竹¹, 温玉荣¹, 高成阁³, 马 捷^{1*}

1. 西安交通大学医学院遗传学与分子生物学系, 西安 710061

2. 西安交通大学第二附属医院精神科, 西安 710004

3. 西安交通大学第一附属医院精神科, 西安 710061

[摘要] **目的** 研究在中国汉族女性中 NMDA 受体途径重要基因 G72 与精神分裂症的关系。**方法** 在 545 名中国汉族女性(精神分裂症患者 260 例, 正常对照 285 例)中对位于 G72 基因的 3 个单核苷酸多态性位点(rs3916965、rs3916967 和 rs2391191)进行基因分型和连锁不平衡分析。**结果** 遗传标记 rs3916967 的等位基因 G($P=0.0386$)和 rs2391191 的等位基因 A($P=0.0096$)均与精神分裂症相关。此外, 由 3 个单核苷酸多态性位点构建的单倍型分析表明, 单倍型 GAG 在病例-对照组中表现出统计学差异($P=0.0024$)。**结论** 在中国汉族女性中, G72 基因是精神分裂症的一个重要易感基因, 在后续的研究中有必要对本结果进行进一步的验证。

[关键词] 精神分裂症; G72 基因; 连锁不平衡; 单核苷酸多态性; 汉族

[中图分类号] R 749.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0826-04

Association of G72 gene locus with schizophrenia in Chinese females of Han ethnicity

HAN Yan¹, ZHANG Huan², NING Qi-lan¹, ZHONG Bo¹, SUN Qing-zhu¹, WEN Yu-rong¹, GAO Cheng-ge³, MA Jie^{1*}

1. Department of Genetics and Molecular Biology, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710061, Shaanxi, China

2. Department of Psychiatry, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710004, Shaanxi, China

3. Department of Psychiatry, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710061, Shaanxi, China

[Abstract] **Objective** To examine the relationship between G72 gene locus (an important gene of NMDA receptor pathway) and schizophrenia in Chinese females. **Methods** We genotyped three single-nucleotide polymorphisms(rs3916965, rs3916967 and rs2391191) in G72 gene locus region in 545 Chinese females of Han ethnicity(260 schizophrenia cases and 285 healthy controls) and performed the linkage disequilibrium analysis. **Results** Significant association was found between two SNPs and schizophrenia ($P = 0.038, 6$ for the allele G of rs3916967 and $P = 0.009, 6$ for the allele A of rs2391191). Furthermore, three SNPs were used in multiple haplotype analysis and significant difference was found for the common haplotype GAG($P = 0.002, 4$). **Conclusion** G72 gene may be a candidate susceptible gene for schizophrenia in the Chinese females of Han ethnicity. Further efforts are warranted to confirm our findings.

[Key words] schizophrenia; G72 gene; linkage disequilibrium; single nucleotide polymorphism; Han nationality

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):826-829]

精神分裂症(MIM 181500)在人群中的发病率大约为 1%, 表现为幻听、幻视、认知改变、情绪激动和行为异常。在各种致病因素中, 遗传因素起作用者大约占 80%, 而且表现为多个微效基因共同起作用^[1]。此外, 精神分裂症的患病率与发病年龄在男

性与女性之间存在差异, 青年期男性发病比例高于女性, 而中年以后女性发病比例则高于男性^[2]。

近年来, 多项连锁研究都表明染色体 13q22-34 区域存在精神分裂症的重要候选基因。2002 年, Chumakov 等^[3]首先发现位于染色体 13q33 的 G72

[收稿日期] 2010-01-20 **[接受日期]** 2010-06-29

[基金项目] 国家自然科学基金(30800618); 教育部新教师基金(20090201120062). Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800618) and Foundation for New Teachers of Ministry of Education (20090201120062).

[作者简介] 韩 燕, 实验师. E-mail: hanyan@mail.xjtu.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 029-82657697, E-mail: majie_xjtu@yahoo.cn

基因与精神分裂症密切相关。此后陆续发表的多篇研究报道相继证实了这一结果^[4]。其中, Wang 等^[5]率先在中国人群中证实了 G72 与精神分裂症的关联, 他们得到的阳性结果的数据主要来自于汉族女性患者, 因此我们认为有必要在中国女性中深入研究 G72 与精神分裂症关联的性别倾向性。为此, 我们选取了 260 例女性患者和与之匹配的 285 例正常女性作为研究对象, 运用连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)分析的方法研究 G72 座位在精神分裂症易感性中的作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象 所有患者及其家属均知情同意, 并签署了知情同意书。每份患者的血液样本都有严格的诊断和详细、完备的病历记录。诊断标准为依据临床检查和医院病史记录, 参照精神疾病的诊断和统计指南(DSM-IV)标准进行。由精神科医生对所有患者的病历资料按同一诊断标准进行复核。样本共计 545 份, 其中包括精神分裂症女性患者 260 人, 来自西安交通大学第一和第二附属医院精神科, 平均年龄(31.5±10.9)岁, 平均发病年龄(27.1±9.5)岁。正常对照女性共有 285 人, 是在西安交通大学第一和第二附属医院接受体检的健康志愿者, 均无神经病史或重要的精神疾病, 平均年龄(35.4±8.4)岁。所有接受检查者都是汉族起源。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用经典的酚氯仿法从患者和正常对照的血液样本中提取 DNA。

1.2.2 基因分型 在 G72 座位附近的单核苷酸多态性位点(SNPs)中选取了 3 个(rs3916965、rs3916967 和 rs2391191), 这些位点在亚洲和欧洲人群的研究中均显示了等位基因与精神分裂症的显著性关联^[3,5]。基因分型采用等位基因特异性 PCR 方

法进行, 设计了两对引物分别在两个独立的 PCR 反应中来特异性扩增不同的等位基因。对于每个样品准备两个 PCR 反应体系(5 μl): 10~20 ng 基因组 DNA, 2.5 μl TaqMan[®] universal PCR master mix (Applied Biosystems), 0.2 μmol/L 等位基因特异性引物, 0.2 μmol/L 通用引物和 0.2 倍 SYBR[®] Green I (Molecular Probe, Inc.)。反应条件依据 TaqMan[®] universal PCR master mix 的使用说明书: 先在 50℃ 孵育 2 min, 以利 PCR master mix 中的 UNG 酶去除可能存在的 PCR 产物污染。然后 95℃ 下 12 min 灭活 UNG 酶并启动热启动 DNA 聚合酶。热循环条件为: 95℃ 变性 15 s, 退火(退火温度见表 1)30 s, 55 个循环后结束^[5-6]。PCR 引物由 tetra-primer ARMS-PCR 引物设计程序设计。引物序列如表 1 所示。为了保证所获得基因型的正确性, 我们对随机选出的 60 份 DNA 样本用这 3 个 SNPs 重新进行基因分型, 所有的结果与第一次基因分型的结果相符, 没有发现基因分型错误。

1.2.3 数据分析 原始数据的处理与分析用 Excel 2003(Microsoft)及 SPSS 11.0 (SPSS Inc.)完成。使用 Finetti 软件程序(<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hw1.pl>)对 3 个 SNPs 进行哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)检验。使用软件程序 Epi_Info (<http://www.cdc.gov/epiinfo/>)对 SNPs 的等位基因进行 χ^2 检验。使用 2LD(Two-locus LD calculator)软件程序对数据进行连锁不平衡分析, 并计算出 D' 值。根据 D' 值构建单倍型, 使用 PHASE 软件程序进行单倍型分析。所有单倍型在患者和正常对照之间的分布由 Epi_Info 软件程序进行比较。Bonferroni 校正被用于进行各项统计结果的校正。

表 1 等位基因特异性 PCR 所使用的遗传标记和引物

Tab 1 Markers and primers used for allele-specific PCR

Marker	Primer sequence ^a	Annealing temperature $\theta/^\circ\text{C}$
rs3916965	F-5'- GCT TGT AGG ATT ACT CAT TTA CA/G-3'	58
	R-5'- AAT ACA GGG AAA AAA GTG ATG ACA-3'	
rs3916967	F-5'- GGG TCC CTG GCT AAT CTT TCA ACT A/G-3'	58
	R-5'- GTT ATT CTT CTC TCC TCA TAT TCA A-3'	
rs2391191	F-5'- CTA CTT CAT AGG TTT TCC AAA/G-3'	56
	R-5'- AGA TAA AGA GTA ACA TAC CAA TAG A-3'	

^a An additional mismatch was deliberately put at position 3 from the 3' terminus of the allele-specific primer to confer the specificity of PCR amplification

2 结果

在 260 个中国汉族血统的女性精神分裂症患者样本中,位于 G72 基因区域的 3 个 SNPs 的等位基因的频率,以及相应的 285 个正常女性对照样本的等位基因频率如表 2 所示。在两组样本中,这 3 个 SNPs 位点均具有极高的杂合度。我们通过哈迪-温伯格平衡检验发现,病例和对照组均符合哈迪-温伯

格平衡($P > 0.05$)。通过进一步的分析后,对于遗传标记 rs3916967,我们在患者和对照之间发现其等位基因 G 的频率差异存在统计学意义($\chi^2 = 4.28, P = 0.0386$)。与此同时,我们还发现遗传标记 rs2391191 在患者和对照之间的等位基因 A 的频率差异存在统计学意义($\chi^2 = 6.71, P = 0.0096$)。经过多重检验校正后,遗传标记 rs2391191 的统计学差异仍然存在($P = 0.029$)。

表 2 病例组和对照组中遗传标记的等位基因分布频率

Tab 2 SNPs allele frequencies in the cases and controls

Marker	Allele	Allele distribution (% , n/N)		χ^2	P value
		Case	Control		
rs3916965	A	61.2(318/520)	56.1(320/570)	2.82	0.093
	G	38.8(202/520)	43.9(250/570)		
rs3916967	G	63.8(332/520)	57.7(329/570)	4.28	0.0386
	A	36.2(188/520)	42.3(241/570)		
rs2391191	A	62.3(324/520)	54.6(311/570)	6.71	0.0096
	G	37.7(196/520)	45.4(259/570)		

遗传标记两两之间在对照人群中的 LD 检验结果(以 D' 表示)如表 3 所示。根据这些结果,在 3 个 SNP 的连锁不平衡的分析中,我们观测到高度的 LD ($D' > 0.7$),即这 3 个 SNPs 位于同一个 LD 区块。

由于存在高度的 LD,因此,3 个 SNPs (rs3916965、rs3916967 和 rs2391191)都被用来构建单倍型,并进行多位点单倍型分析。共出现 8 种单倍型,但是有 5 种单倍型因频率过低($< 3\%$),分析时被排除在外^[7],纳入分析的 3 种单倍型见表 4。

表 3 遗传标记之间的连锁不平衡状态的模拟分析(以 D' 表示)

Tab 3 Estimation of LD between each pair of loci (denoted as D')

	rs3916965	rs3916967	rs2391191
rs3916965	—		
rs3916967	0.985	—	
rs2391191	0.916	0.976	—

通过单倍型分析,我们发现所有单倍型在患者和正常人中的分布存在统计学差异(整体 $P = 0.0001$)。在病例和对照之间比较单个单倍型分布频率时,我们发现常见单倍型 G-A-G 显示了统计学差异($\chi^2 = 9.23, P = 0.0024$),其频率在病例组中明显偏低(32.5% vs 41.4%)。对上述结果进行严格修正(8 种单倍型和 3 个等位基因的比较)后,单倍型 G-A-G 仍然保持了统计学差异($P = 0.026$)。

表 4 多位点的单倍型分析

Tab 4 Estimated frequency of multi-marker haplotype analysis

Haplotype	Frequency (% , n/N)		χ^2	P value	OR (95% CI)
	Case	Control			
A-G-A	56.2(292/520)	52.6(300/570)	1.36	0.244	1.15 (0.90-1.47)
A-G-G	3.3(17/520)	3.2(18/570)	0.01	0.917	1.04 (0.50-2.13)
G-A-G	32.5(169/520)	41.4(236/570)	9.23	0.0024	0.68 (0.53-0.88)
Global P			20.63	0.0001	

3 讨论

目前,有关性别与精神分裂症患病风险的研究多有报道,但是结果并不尽如人意^[2]。

精神分裂症患者之间的关系,我们在中国汉族人血统的女性样本中对 3 个 SNPs 位点(rs3916965、rs3916967 和 rs2391191)进行基因分型和统计分析。

我们在遗传标记 rs2391191 的等位基因 A 和精神分裂症之间发现了显著的关联($P = 0.0096$;多重

本次研究的目的是为了检验 G72 座位和女性

检验校正后 $P=0.029$),这一结果与 Wang 等^[5]的报道一致。此外,我们还发现遗传标记 rs3916967 的等位基因 G 在病例和对照组中的分布也存在显著性差异($P=0.0386$),该位点在 Chumakov 等^[3]的研究中,同样是一个阳性位点。通过生物信息学的分析,我们发现 SNP rs2391191 恰好位于 G72 的非翻译区,因此,rs2391191 的多态性很可能在转录水平影响到 G72 基因的表达,从而产生功能上的影响^[8-9]。

为了获得更多的关联分析的统计数据,我们进行了单倍型分析,这种方法利用了遗传标记之间的连锁不平衡信息,可以基于个别 SNP 的关联分析而得出更多的结果^[10]。

因为 3 个遗传位点之间存在强烈连锁不平衡($D'>0.7$),所以 3 个位点位于同一个 LD 区块中,可以被用来构建单倍型(rs3916965-rs3916967-rs2391191),并进行单倍型分析。事实上,该连锁不平衡分析结果与 Wang 等^[5]的研究一致,并在其他人群中也得证实^[4,10]。我们的单倍型分析结果显示 G72 座位与疾病具有显著性关联(整体 $P=0.0001$)。当把每种单倍型分别在病例和对照之间进行比较时发现,在常见单倍型 G-A-G 中显示了明显的统计学差异($P=0.0024$;多重检验校正后 $P=0.026$),此单倍型在患者中出现频率远低于在对照中。这一结果表明,单倍型 G-A-G 很可能是作为一种保护因素在发挥作用,与文献一致^[10]。

需要注意的是,同目前国外普遍采用的全基因组关联研究相比,本项研究中所使用的样本量偏小,这有可能导致统计效力不强,同时研究结果也不够稳定^[11]。

综上所述,我们的数据进一步证明了 G72 座位和精神分裂症之间的关联,也证明了基因 G72 是该病的一个易感基因。目前已知,G72 蛋白可以与位于染色体 12q24 的编码 D-氨基酸氧化酶的基因(DAAO)相互作用,通过 N-甲基-D-天冬氨酸盐(NMDA)受体途径来调节谷氨酸能神经递质系统。因此,G72 对疾病的作用可能是通过 DAAO 对 D-丝氨酸的氧化作用来削弱 NMDA 受体的活性^[3],至少在一些中国女性患者中如此。在后续的研究中有必要对我们的结果进行进一步的验证,同时对 G72 基

因功能的研究也是必不可少的。

[参考文献]

- [1] O'Donovan M C, Craddock N, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V, et al. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up[J]. *Nat Genet*, 2008, 40:1053-1055.
- [2] Aleman A, Kahn R S, Selten J. Sex differences in the risk of schizophrenia[J]. *Arch Gen Psychiat*, 2003, 60:565-571.
- [3] Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, et al. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:13675-13680.
- [4] Shi J, Badner J A, Gershon E S, Liu C. Allelic association of G72/G30 with schizophrenia and bipolar disorder: a comprehensive meta-analysis[J]. *Schizophr Res*, 2008, 98(1-3): 89-97.
- [5] Wang X, He G, Gu N, Yang J, Tang J, Chen Q, et al. Association of G72/G30 with schizophrenia in the Chinese population[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2004, 319:1281-1286.
- [6] Ma J, Sun J, Zhang H, Zhang R, Kang W, Gao C, et al. Evidence for transmission disequilibrium at the DAOA gene locus in a schizophrenia family sample[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 462:105-108.
- [7] Wu S, Ma J, Xing Q, Xu Y, Meng J, Cao D, et al. Further evidence that the chromogranin B gene confers predisposition to schizophrenia: a family-based association study in Chinese[J]. *J Neural Transm*, 2007, 114:641-644.
- [8] Chen J, Ferec C, Cooper D N. A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview[J]. *Hum Genet*, 2006, 120:1-12.
- [9] Pickering B M, Wills A E. The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16:39-47.
- [10] Korostishevsky M, Kaganovich M, Cholostoy A, Ashkenazi M, Ratner Y, Dahary D, et al. Is the G72/G30 locus associated with schizophrenia? Single nucleotide polymorphisms, haplotypes, and gene expression analysis[J]. *Biol Psychiat*, 2004, 56:169-176.
- [11] Ma J, Qin W, Wang X Y, Guo T W, Bian L, Duan S W, et al. Further evidence for the association between G72/G30 genes and schizophrenia in two ethnically distinct populations[J]. *Mol Psychiatr*, 2006, 11:479-487.

[本文编辑] 孙岩