

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00860

· 论 著 ·

# ZNF804A 基因外显子 4 区域单核苷酸多态性在中国汉族精神分裂症患者核心家系中的传递不平衡检验

李慧娴<sup>1</sup>, 陈 慧<sup>1</sup>, 惠 珂<sup>1</sup>, 马 征<sup>1</sup>, 张 蕊<sup>1</sup>, 杜小云<sup>1</sup>, 张 欢<sup>2</sup>, 马 捷<sup>1\*</sup>

1. 西安交通大学医学院遗传学与分子生物学系, 西安 710061

2. 西安交通大学医学院第二附属医院精神科, 西安 710004

**[摘要]** **目的** 研究 ZNF804A 基因外显子 4 区域中的单核苷酸多态性位点(SNPs)和精神分裂症的相关性。**方法** 在 69 个中国汉族精神分裂症患者的核心家系中,采用 MassARRAY 等位基因分型技术对位于 ZNF804A 基因外显子 4 的 7 个 SNPs 以及 2 个侧翼的遗传标记进行基因分型和传递不平衡检验(TDT)。**结果** (1)存在 4 个罕见(少数等位基因频率 < 1%)的 SNPs (rs79776875、rs78816540、rs79082132 和 rs62198467),因其不符合分析要求,予以排除。(2)对其余 5 个 SNPs (rs4667000、rs61739290、rs61739288、rs1366842、rs3731834)的分析表明,遗传标记 rs3731834 的传递不平衡结果具有统计学意义( $P < 0.05$ )。(3)在连锁不平衡分析中,对 5 个 SNPs 构建的单倍型分析显示其传递差异具有统计学意义(整体  $P < 0.05$ )。**结论** ZNF804A 基因外显子 4 区域的 SNPs 与中国汉族人群精神分裂症的遗传易感性相关。

**[关键词]** 精神分裂症;ZNF804A;非同义突变;传递不平衡性检验;单核苷酸多态性**[中图分类号]** R 749.3**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)08-0860-04

## A family-based transmission disequilibrium test of single nucleotide polymorphisms in exon 4 of ZNF804A gene in Han Chinese patients with schizophrenia

LI Hui-xian<sup>1</sup>, CHEN Hui<sup>1</sup>, HUI Ke<sup>1</sup>, MA Zheng<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, DU Xiao-yun<sup>1</sup>, ZHANG Huan<sup>2</sup>, MA Jie<sup>1\*</sup>

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 of Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710004, Shaanxi, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the association of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 4 of ZNF804A gene with schizophrenia in a family-trios sample. **Methods** MassARRAY genotyping technique and the transmission disequilibrium test (TDT) were employed to study the association of SNPs (seven nonsynonymous and two intronic) encompassing exon 4 of ZNF804A gene with schizophrenia in 69 nuclear families. **Results** (1) Four SNPs (rs79776875, rs78816540, rs79082132 and rs62198467) in this study were found to be rare variants ( $0 < \text{minor allele frequency} < 1\%$ ) and were therefore excluded for further analysis. (2) The TDT result of rs4667000, rs61739290, rs61739288, rs1366842 and rs3731834 showed that it was significant for marker rs3731834 ( $P < 0.05$ ). (3) Linkage disequilibrium analysis showed significant association in five-SNP haplotype test (global  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The results suggest that SNPs in exon 4 of ZNF804A gene is associated with schizophrenia susceptibility in Han Chinese population.

**[Key words]** schizophrenia; ZNF804A; non-synonymous variants; transmission disequilibrium test; single nucleotide polymorphism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(8):860-863]

精神分裂症(schizophrenia)是以个性改变,思维、情感、行为的异常,精神活动与环境不协调为主要特征的一类常见的精神疾病。在世界范围内精神分裂症的终生患病率约为 1%<sup>[1-2]</sup>,而遗传因素在其

发生中发挥主要作用<sup>[3]</sup>。2008年,O'Donovan等<sup>[4]</sup>率先在欧洲等人群中完成了精神分裂症的全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWASs)工作,并且发现精神分裂症的风险因子单

**[收稿日期]** 2012-05-22**[接受日期]** 2012-07-01**[基金项目]** 国家自然科学基金(30800618),国家级大学生创新训练项目(201210698110),西安交通大学本科生科研训练和实践创新基金(2012125)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30800618), National Innovation Training Program for University Students (201210698110), and Scientific Training and Practice Innovation Program for Undergraduates of Xi'an Jiaotong University (2012125)。**[作者简介]** 李慧娴,西安交通大学医学院临床医学专业七年制学生。E-mail: 602323737@qq.com

\* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 029-82657013-800, E-mail: majie@mail.xjtu.edu.cn

核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点 rs1344706, 鉴定出 ZNF804A 是疾病的重要候选致病基因。此后, ZNF804A 基因与精神分裂症的关联得到不同研究团队的后续研究支持, 包括研究对象来自不同人群的数个 GWASs 和一些临床研究<sup>[1,5-15]</sup>。ZNF804A 基因由 4 个外显子组成, 位于人类染色体区域 2q32.1。该基因在大脑中可翻译出 1 210 个氨基酸残基组成的蛋白质产物, 属于具有 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 结构域的锌指蛋白家族成员, 然而, 其生物学功能仍不清楚。

本课题组前期研究表明, 位于 rs1344706 下游的高度保守区域与精神分裂症之间存在高度的相关性<sup>[16]</sup>。为进一步揭示 ZNF804A 基因与精神分裂症遗传易感性的关系, 我们集中对 ZNF804A 的非同义突变区域展开研究, 选取了位于该基因外显子 4 的 7 个 SNPs 以及 2 个侧翼的遗传标记, 在 69 个中国汉族的精神分裂症核心家系中进行基因分型和传递不平衡检验 (transmission disequilibrium test, TDT), 在分析这些非同义突变对疾病易感性作用的同时, 探讨 ZNF804A 基因与精神分裂症间潜在的联系。

## 1 对象和方法

1.1 SNPs 的选择 根据 SNP 数据库 (dbSNP 135), ZNF804A 基因的非同义突变位点共有 76 个, 其中 74 个位于外显子 4 区域。我们选择了 7 个位于外显子 4 的 SNPs (rs61739290、rs61739288、rs1366842、rs79776875、rs78816540、rs79082132 和 rs3731834) 以及 2 个侧翼的遗传标记 (rs4667000 和 rs62198467), 对外显子 4 区域进行了高密度的覆盖。这 9 个 SNPs 跨越了约 6.0 kb 的区域, 平均间距为 760 bp, 其中 3 个 SNPs (rs61739290、rs61739288 和 rs1366842) 在此前欧洲人的研究中已被发现与精神分裂症关联, 而遗传标记 rs3731834 也显示出关联的趋势<sup>[17-18]</sup>。

1.2 研究对象 收集患精神分裂症的先证者及其生物学父母的 69 个三口之家共计 207 名成员作为研究对象。先证者均来自中国西安, 其中男性 32 名, 平均年龄 (25.75 ± 7.73) 岁, 首次发病年龄为 (20.75 ± 3.90) 岁; 女性 37 名, 平均年龄 (24.35 ± 7.69) 岁, 首次发病年龄为 (20.84 ± 4.71) 岁。所有先证者均由西安交通大学第一附属医院精神科医师根据精神分裂症的 Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) 标准, 并结合患者病例记录及临床问诊进行诊断。两位资深的精神疾病医师分别独立地对患者资料进行复核。所有研究对象均为中国汉族血统。本研究得到西安交通大学医学院医学生物科研

伦理委员会的同意, 并且所有研究对象均知情同意。

1.3 DNA 提取 抽取研究对象的外周静脉血 2 ml, 以 2% EDTA 抗凝, 基因组 DNA 提取严格参照哺乳动物血液 DNA 提取试剂盒 (北京天根生物技术公司) 的标准流程进行。

1.4 基因分型 基因分型采用 MassARRAY 等位基因分型技术 (美国 Sequenom 公司)。特异性引物设计使用 MassARRAY 设计软件 3.0 版。对每一份 DNA 样本均进行多重 PCR 扩增反应, 随后 PCR 产物被用于位点特异性单碱基延伸反应。反应产物经脱盐后转移至 384 孔微阵列板, 之后进行 MALDI-TOF 质谱鉴定。鉴定结果由 MassARRAY TYPER 软件分析, 并提供最终基因分型结果。我们采用了严格的质量控制流程: 在每一块盛放 DNA 样本的 96 孔板中均设 2 个双盲重复的 DNA 样本孔, 所有的双盲重复反应结果一致率为 100%。

1.5 数据分析 运用在线软件 Finetti (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) 对所有 SNPs 进行哈德-温伯格平衡 (HWE) 检验。运用软件 UNPHASED 系统中的 TDT 程序进行单个 SNP 分析和多个 SNP 的单倍型分析。运用软件 Haploview 4.1 进行连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 分析。

## 2 结果

2.1 总体结果 4 个 SNPs (rs79776875、rs78816540、rs79082132 和 rs62198467) 的等位基因频率分布不具备多态性 (少数等位基因频率 < 1%), 且 TDT 结果为阴性 ( $P > 0.05$ ), 因此在后续的分析中予以排除。其余 5 个 SNPs 位点都具有高度多态性, 纳入后续分析。

2.2 HWE 检验 在正常的父母中, 5 个 SNPs (rs4667000、rs61739290、rs61739288、rs1366842 和 rs3731834) 基因型分布都符合 HWE, 说明本研究所应用的抽样群体来自随机婚配的自然群体。

2.3 单位点的 TDT 分析结果 由表 1 可见, 遗传标记 rs3731834 的等位基因 G 从杂合父母向患病子女的传递中, 传递差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 7.17, P = 0.0074$ )。经过 Bonferroni 校正 ( $n = 5$ ) 后, rs3731834 的传递差异仍然具有统计学意义 ( $P = 0.037$ )。

2.4 LD 分析结果 为了确定所选 SNPs 之间的 LD 程度, 我们在未患病的父母中对两两遗传标记之间的 LD 做了评估 (图 1), 结果提示相邻的遗传标记之间不存在 LD 状态 ( $0 < D' < 0.5$ )。

2.5 单倍型分析结果 为了进一步研究单倍型的传递状态, 我们进行了单倍型分析。由 5 个 SNPs

位点 (rs4667000、rs61739290、rs61739288、rs1366842 和 rs3731834)构建的单倍型可观察到 14 种单倍型,其中 8 种属于罕见单倍型(频率<1%),不具备研究价值,在后续的分析中予以剔除,另外 6 种单倍型的结果见表 2。这些单倍型整体 P 值为

0.012 9( $\chi^2=14.46, df=5$ ),其中最常见单倍型 CAGTG 的传递差异有统计学意义( $\chi^2=5.21, P=0.022$ )。经多重检验校正后(6 个单倍型和 5 个等位基因的比较),传递差异不再存在。

表 1 单个位点的 TDT 分析结果

Tab 1 TDT analysis of single polymorphism

Marker	Allele <sup>a</sup>	TDT <sup>b</sup> % (n/N)		$\chi^2$	P value
		Transmitted	Non-transmitted		
rs4667000	<u>CA</u>	83.3 (115/138)	73.9 (102/138)	3.67	0.055
rs61739290	<u>AG</u>	97.1 (134/138)	95.7 (132/138)	0.42	0.518
rs61739288	<u>AG</u>	96.3 (131/136) <sup>c</sup>	96.3 (131/136) <sup>c</sup>	0.0	1.0
rs1366842	<u>TG</u>	79.0 (109/138)	74.6 (103/138)	0.73	0.392
rs3731834	<u>GC</u>	85.5 (118/138)	72.5 (100/138)	7.17	0.007 4

<sup>a</sup>: The allele with increased frequency in transmitted group compared to non-transmitted group is underlined; <sup>b</sup>: Number of alleles for each SNP is given in parentheses; <sup>c</sup>: The genotyping of rs61739288 failed in a couple of parents. TDT: Transmission disequilibrium test

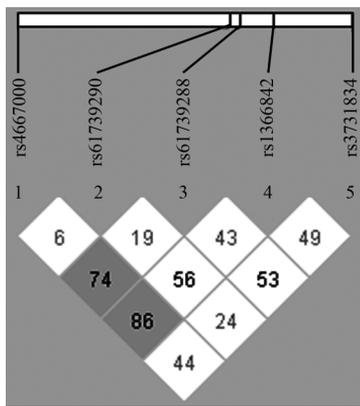


图 1 遗传标记之间的连锁不平衡(LD)分析结果

Fig 1 Linkage disequilibrium analysis results between genotyped markers

表 2 单倍型分析结果

Tab 2 Haplotype analysis results

Haplotype	TDT (%)		$\chi^2$	P value
	Transmitted	Non-transmitted		
CAGTG	61.9	45.3	5.21	0.022
CAGTC	12.5	22.2	3.60	0.058
AAGGG	11.7	17.7	2.18	0.140
CAGGG	5.6	2.5	2.49	0.115
CGGTG	1.7	1.3	1.06	0.303
AAAGG	1.6	1.5	0.85	0.356
Global P			14.46	0.012 9

Haplotype analysis of 5 SNPs (rs4667000, rs61739290, rs61739288, rs1366842, and rs3731834) only lists P values of haplotype with a frequency >1%. TDT: Transmission disequilibrium test

### 3 讨论

根据 NCBI 数据库中信息,ZNF804A 基因的非同义突变的 80%以上均位于外显子 4 区域。本研究选取了 7 个位于 ZNF804A 基因外显子 4 的非同义突变

以及 2 个侧翼的遗传标记,对外显子 4 区域进行高密度的覆盖,以研究 ZNF804A 基因外显子 4 区域是否与精神分裂症相关联。我们使用了基于核心家系的传递不平衡检验的方法,该方法可以有效避免由于人群层化导致的一些假阳性结果。经检索,对 ZNF804A 基因外显子 4 区域的研究仅在欧洲人群的病例-对照样本中有 1 例报道<sup>[18]</sup>,而我们此处采用核心家系的研究工作在国内外尚属首次。同时,我们采用了新一代的基因分型技术(MassARRAY 等位基因分型技术),很好地保证了基因分型结果的准确性。

本研究发现,在 5 个常见的 SNPs 中,rs3731834 的等位基因 G 从杂合父母向患病子女的传递过程中,传递差异具有统计学意义( $P=0.007 4$ )。经过多重检验校正后,rs3731834 的传递差异仍然具有统计学意义( $P=0.037$ )。以上分析结果支持遗传标记 rs3731834 与疾病显著性关联。此外,我们还鉴定了中国人群中的 4 个罕见 SNPs,发现这 4 个 SNPs 与精神分裂症无关。此前,在欧洲人群中的一项研究也发现 ZNF804A 基因内的罕见遗传变异不是疾病的风险因子<sup>[18]</sup>,其结论与我们的发现相一致。

在单倍型分析中,我们发现最常见的单倍型 CAGTG 的传递差异有统计学意义( $P=0.022$ )。尽管经过多重检验校正后,CAGTG 的传递差异不复存在。但是考虑到(1)Bonferroni 校正用于多重检验次数接近 10 的数据分析时,结果过于保守,易造成假阴性结论;(2)在单位点分析中 rs3731834 的传递差异经校正后仍然存在的事实,因此我们认为对 CAGTG 的传递差异应保持谨慎的支持,并在后续的研究中进行进一步的验证。

目前,对 ZNF804A 基因功能的研究仍在持续进行中。已经发现 ZNF804A 的同源基因 *zfp804a* 是 *Hoxc8* 基因的靶基因,这表明该基因可能参与早期神经发育的调节过程<sup>[19]</sup>。同时,运用从患者特异性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iP-SCs)衍生出来的人类神经细胞,发现在多能干细胞向神经元早期分化期,ZNF804A 的表达激增,这提示在某些亚型的患者当中可能有该基因的异常表达<sup>[20-21]</sup>。遗憾的是,根据现有的研究进展,尚不足以清晰地鉴定出 ZNF804A 基因具体的生物学功能。

综上所述,我们的研究为 ZNF804A 基因与精神分裂症之间的相关性提供了新的证据支持。但由于临床收集患者特别是核心家系的 DNA 样本的困难较大,本研究中能够使用的样本量不够大,这在一定程度上会削弱数据的统计效力和实验结果的稳定性。鉴于精神分裂症候选基因作用模式的复杂性,为进一步了解 ZNF804A 基因的生物学功能及其在精神分裂症致病机制中的作用,诸如扩大样本量、采用基因敲除和基因功能增强等研究方法和手段都将是未来研究工作中的重要内容。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

(志谢 衷心感谢此项研究所涉及到的所有家庭成员以及参与鉴定患者的所有工作人员和医师!)

#### [参考文献]

- [1] International Schizophrenia Consortium; Purcell S M, Wray N R, Stone J L, Visscher P M, O'Donovan M C, Sullivan P F, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Nature*, 2009, 460: 748-752.
- [2] 韩燕,张欢,宁启兰,钟波,孙青竹,温玉荣,等. 中国汉族女性中 G72 基因与精神分裂症的关系[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31: 826-829.  
Han Y, Zhang H, Ning Q L, Zhong B, Sun Q Z, Wen Y R, et al. Association of G72 gene locus with schizophrenia in Chinese females of Han ethnicity[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31: 826-829.
- [3] Zhang R, Zhong N N, Liu X G, Yan H, Qiu C, Han Y, et al. Is the EFN2 locus associated with schizophrenia? Single nucleotide polymorphisms and haplotypes analysis [J]. *Psychiatry Res*, 2010, 180: 5-9.
- [4] 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.
- [5] Shi J, Levinson D F, Duan J, Sanders A R, Zheng Y, Pe'er I, et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia [J]. *Nature*, 2009, 460: 753-757.
- [6] Stefansson H, Ophoff R A, Steinberg S, Andreassen O A, Cichon S, Rujescu D, et al. Common variants conferring risk of schizophrenia [J]. *Nature*, 2009, 460: 744-747.
- [7] Walters J T, Corvin A, Owen M J, Williams H, Gragovic M, Quinn E M, et al. Psychosis susceptibility gene ZNF804A and cognitive performance in schizophrenia [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2010, 67: 692-700.
- [8] Zhang R, Lu S M, Qiu C, Liu X G, Gao C G, Guo T W, et al. Population-based and family-based association studies of ZNF804A locus and schizophrenia [J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16: 360-361.
- [9] Zhang R, Valenzuela R K, Lu S, Meng L, Guo T, Du X, et al. Is the conserved mammalian region of ZNF804A locus associated with schizophrenia? A population-based genetics analysis [J]. *Schizophr Res*, 2011, 133(1-3): 159-164.
- [10] Li M, Luo X J, Xiao X, Shi L, Liu X Y, Yin L D, et al. Allelic differences between Han Chinese and Europeans for functional variants in ZNF804A and their association with schizophrenia [J]. *Am J Psychiatry*, 2011, 168: 1318-1325.
- [11] Steinberg S, Mors O, Børglum A D, Gustafsson O, Werge T, Mortensen P B, et al. Expanding the range of ZNF804A variants conferring risk of psychosis [J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16: 59-66.
- [12] Xiao B, Li W, Zhang H, Lv L, Song X, Yang Y, et al. Association of ZNF804A polymorphisms with schizophrenia and antipsychotic drug efficacy in a Chinese Han population [J]. *Psychiatry Res*, 2011, 190(2-3): 379-381.
- [13] Esslinger C, Kirsch P, Haddad L, Mier D, Sauer C, Erk S, et al. Cognitive state and connectivity effects of the genome-wide significant psychosis variant in ZNF804A [J]. *Neuroimage*, 2011, 54: 2514-2523.
- [14] Rasetti R, Sambataro F, Chen Q, Callicott J H, Mattay V S, Weinberger D R, et al. Altered cortical network dynamics: a potential intermediate phenotype for schizophrenia and association with ZNF804A [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2011, 68: 1207-1217.
- [15] Donohoe G, Rose E, Frodl T, Morris D, Spoletini I, Adriano F, et al. ZNF804A risk allele is associated with relatively intact gray matter volume in patients with schizophrenia [J]. *Neuroimage*, 2011, 54: 2132-2137.
- [16] 韩燕,王彬,焦李子,马旭东,李建鹏,牛晓蓉,等. ZNF804A 基因遗传多态性在精神分裂症患者核心家系中的传递不平衡检验[J]. *西安交通大学学报*, 2012, 33: 142-145.
- [17] Williams H J, Norton N, Dwyer S, Moskvina V, Nikolov I, Carroll L, et al. Fine mapping of ZNF804A and genome-wide significant evidence for its involvement in schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16: 429-441.
- [18] Dwyer S, Williams H, Holmans P, Moskvina V, Craddock N, Owen M J, et al. No evidence that rare coding variants in ZNF804A confer risk of schizophrenia [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2010, 153B: 1411-1416.
- [19] Chung H J, Lee J Y, Deocaris C C, Min H, Kim S H, Kim M H. Mouse homologue of the schizophrenia susceptibility gene ZNF804A as a target of *Hoxc8* [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 231708.
- [20] Lin M, Pedrosa E, Shah A, Hrabovsky A, Maqbool S, Zheng D, et al. RNA-Seq of human neurons derived from iPSCs reveals candidate long non-coding RNAs involved in neurogenesis and neuropsychiatric disorders [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e23356.
- [21] Hill M J, Jeffries A R, Dobson R J, Price J, Bray N J. Knock-down of the psychosis susceptibility gene ZNF804A alters expression of genes involved in cell adhesion [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21: 1018-1024.