

去甲肾上腺素转运体、Gβ₃ 基因多态性与双相障碍 Ⅱ型的关联分析

庞剑月 曹素霞 赵晓锋 李湘露 郝以辉 李恒芬

【摘要】 目的 通过去甲肾上腺素转运体(NET)相关第二信号转导通路部分中介分子的单核苷酸多态性(SNPs)与双相障碍关系的探讨,寻找双相障碍的生物学标记。方法 选择符合DSM-IV有关双相障碍-Ⅱ诊断标准、随访3年以上的患者152例(病例组),健康对照187名(对照组),采用连接酶检测反应(LDR)技术,测定NET基因的rs5569、rs2242446及Gβ₃亚基基因的rs5433共3个SNPs进行检测,比较两组间3个SNPs的基因型及等位基因频率差异,采用最优尺度分析判断不同基因型与情感稳定剂疗效的关系。结果 病例组与对照组比较,3个位点的基因型及等位基因频率分布差异均无统计学意义($P > 0.05$);rs5433的TT型患者对情感稳定剂效果优于其他型,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 没有发现rs5569、rs2242446及rs5433与双相障碍的发病有关,但发现Gβ₃基因多态性与情感稳定剂的预防复发效应有关,提示rs5433可能是使用情感稳定剂标志SNPs之一。

【关键词】 去甲肾上腺素; 多态性,单核苷酸; 生物学标记; 双相情感障碍; Gβ₃基因

doi: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.01.006

Association of norepinephrine transporter and Gβ₃ single nucleotide polymorphisms with bipolar disorder-Ⅱ PANG Jian-yue, CAO Su-xia, ZHAO Xiao-feng, et al. Department of Psychiatry, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

【Abstract】 Objective To investigate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of intermediate molecules in the second signal transduction pathway of norepinephrine transporter (NET) with bipolar disorder, and look for biological markers of bipolar disorder. **Methods** Totals of 152 patients in accord with the diagnostic standard of bipolar disorder in DSM-IV who were followed for more than 3 years and 187 healthy controls were involved. Ligase detection reaction (LDR) was used to detect the genotypes of rs5569 and rs2242446 in NET, and rs5433 in Gβ₃. The frequencies of genotypes and alleles were compared between two groups. Optimal scale analysis was used to determine the association between different genotypes and the effect of emotion stabilizer. **Results** No significant differences were found in frequencies of genotypes and alleles of three SNPs between two groups ($P > 0.05$). Emotion stabilizer showed better effect on patients carried with TT genotype of rs5433 ($P < 0.05$). **Conclusions** There are no association between SNPs rs5569, rs2242446 and rs5433 and bipolar disorder. The polymorphism of Gβ₃ gene is related to recurrence prevention effect of emotion stabilizer, suggesting that rs5433 may be a marker SNP of emotion stabilizer.

【Key words】 Norepinephrine; Polymorphism, single nucleotide; Biological markers; Bipolar disorder; Gβ₃ gene

双相情感障碍(Bipolar Disorder, BPD),简称双相障碍,是心境障碍的一个亚型,患病率为0.5%~1.5%,是一种疾病负担重,自杀率、致残率较高的一组精神障碍^[1]。家系及双生子研究证实,遗传因素是双相障碍的重要易感因素,其基因型及表型之间关系复

杂,尽管连锁分析及候选基因的关联分析均提示某些染色体区域或基因与双相障碍的发病有关^[2-4],但是仍没有支持某特定基因或序列的变异与双相障碍发病有关的确切证据^[2]。单胺类递质(如去甲肾上腺素)功能异常是双相障碍重要的假说之一,因而围绕去甲肾上腺素转运体(NET)及其下游转导通路(即第二信号转导通路)开展研究,可能有助于寻找双相障碍遗传标记。大部分NET需要通过细胞膜上的G蛋白偶联受体进入细胞产生生物学效应,动物试验证明,NET受体、转运体及其G蛋白受体都可能参与

基金项目: 国家自然科学基金项目(81371494);河南省基础与前沿技术研究项目(122300410078)

作者单位: 450052 郑州大学第一附属医院精神医学科(庞剑月、曹素霞、赵晓锋、郝以辉、李恒芬);中原工学院(李湘露)

通讯作者: 李恒芬 Email: lihengfen@sohu.com

了双相障碍发病过程,也有发现可能与非典型抗精神病药和情感稳定剂有关,但另外的研究不支持上述结论,推测研究结果不一致可能与双相障碍亚型诊断及病因的异质性有关,同时也提示多个基因或基因表达异常参与了双相障碍^[5-7]。本研究拟采用病例对照研究,围绕双相障碍II型,通过长期随访明确其临床特征,围绕NET相关第二信号转导通路基因单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)进行探讨,寻找与双相障碍有关的生物学标记。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例组 全部研究病例分别来自2004年10月~2009年5月在郑州大学附属第一医院、新乡医学院第二附属医院门诊及住院患者。入组标准:(1)汉族,年龄18~60岁,男女不限;(2)符合美国精神障碍诊断与统计手册第四版(DSM-IV)双相障碍II型的诊断标准^[3];(3)无合并存在其他精神障碍;(4)无合并存在心、肝、肾疾病、高血压及其他严重躯体疾病,无酒精和药物滥用史;(5)自愿参加本研究,并由本人或法定监护人签署知情同意书;(6)排除两系三代血亲中有非汉族血亲者。共纳入152例,其中男80例,女72例,年龄18~60岁,平均(34±11)岁;发病年龄18~60岁,平均(24±10)岁;总病程0.6~47个月,平均病程(21±1)个月。

1.1.2 对照组 健康对照者分别来自河南科技学院、新乡医学院。入组标准:(1)汉族,年龄18~60岁,男女不限;(2)既往无精神疾病史,无重大躯体疾病史;(3)无烟、酒精依赖及药物滥用史;(4)两系三代无精神病家族史;(5)知情同意;(6)排除两系三代血亲中有非汉族血亲者。共纳入187人,其中男98名,女89名,年龄25~60岁,平均(36±12)岁。两组研究对象性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 临床资料的采集 采用DSM-IV的定式临床检查系统对入组患者进行精神检查,并由两名高年资精神科医师(副主任医师或主任医师)统一诊断。采用面谈和电话相结合的方式追踪随访,每次随访内容包括主要病情变化,药物种类、疗效和不良反应。随访期间建议统一使用碳酸锂(0.25~1.0)g/d和(或)丙戊酸盐(0.25~1.0)g/d预防复发。发病期每2~4周随访一次,缓解期2~3个月随访一次,连续随访3年以上。根据患者的复发次数,将3年内复发4次(包括躁狂或抑郁发作)以上者定义为情感稳定剂无预防复发“无效应”,1~3次为“可疑效应”,3年内无复发者定为“效应良好”。随访结果发现,152例中,效应良好79例,其中男41例,女38例;可疑效应

42例,其中男18例,女24例;无效应31例,其中男21例,女10例。

1.2.2 实验方法 本课题血样的处理及DNA的提取在河南省新乡医学院第二附属医院中心实验室完成,SNP检测在上海东华大学分子生物学实验室完成。目的基因为NET及G蛋白,位点选择根据美国国家生物技术情报中心(Nation Center for Biotechnology Information, NCBI)美国国立人类基因组研究所(Nation Human Genome Research Institute, NHGRI)联合构建的dbSNP数据库,采用Haploview 4.2软件,结合文献,选择NET相关rs5569、rs2242446和Gβ₃相关的rs5433进行检测。(1)样本的采集与处理:对符合要求的被试者在征得同意后,于入组当天上午8:00~10:00抽取肘静脉血3ml,置于-70℃冰箱保存待测。健康对照也采用同种处理方法对血样进行处理和保存。采用TIANGEN公司的AxyPrep-96全血基因组DNA试剂盒成批提取患者与对照组的DNA。(2)工作原理及测序方法 采用连接酶检测反应(Ligase Detection Reaction, LDR)技术,利用高温连接酶实现对基因多态性位点的识别。引物和探针均由上海翼和生物技术公司设计并合成。3个SNPs的引物序列见表1。

表1 3个SNPs的引物序列

| 引物名称 | 序列(5' -3') | 长度(bp) |
|-------------|------------------------|--------|
| rs2242446-F | CCGAACCTCTGTTTCCAAAT | 122 |
| rs2242446-R | CTTGCAACTCCCAAGACCAC | |
| rs5569-F | GCGAGAAGGAAAGTCTGCTGAA | 159 |
| rs5569-R | TCCAGGGAGACCCTAATTCC | |
| rs5443-F | GTCAGGTGGGAGGCAGAG | 283 |
| rs5443-R | TCATGGAGTCCCAGACATTG | |

1.3 统计学方法 全部资料均由SPSS 17.0软件包进行数据处理。采用拟合优度 χ^2 检验分析基因型、等位基因频率是否符合Hardy-Weinberg(H-W)平衡定律;病例组和对照组的基因型和等位基因频度比较采用 χ^2 检验。采用最优尺度分析(Optimal Scaling)检验不同基因型患者使用情感稳定剂预防复发的临床效应。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H-W平衡检验结果 病例组152例全部完成了3个位点的检测,对照组中186人完成了rs5569、rs2242446位点的检测,184人完成了rs5433位点的检测。对两组研究对象的rs5569、rs2242446、rs5433基因型和等位基因进行H-W平衡检验,符合H-W平衡定律($P > 0.05$)。

2.2 病例组和对照组3个SNPs基因型和等位基因频率比较 见表2。两组比较发现,rs5569、rs2242446、rs5433基因型分布频率和等位基因频率差异均无统

统计学意义($P > 0.05$)。

表2 病例组和对对照组基因型频率和等位基因频率比较(例, %)

| SNP | 组别 | 例数 | 基因型 | | | 等位基因 | |
|-----------|------------|-----|---------|--------|---------|---------|---------|
| | | | 11 | 12 | 22 | 1 | 2 |
| rs5569 | 病例组 | 152 | 13(9) | 58(38) | 81(53) | 84(28) | 220(72) |
| | 对照组 | 186 | 27(16) | 56(30) | 103(54) | 110(30) | 262(70) |
| | χ^2 值 | | | 4.188 | | 0.307 | |
| rs2242446 | 病例组 | 152 | 96(63) | 48(32) | 8(5) | 240(79) | 64(21) |
| | 对照组 | 186 | 106(57) | 60(32) | 20(11) | 272(73) | 100(27) |
| | χ^2 值 | | | 3.578 | | 3.094 | |
| rs5433 | 病例组 | 152 | 34(22) | 73(48) | 45(30) | 141(46) | 163(54) |
| | 对照组 | 184 | 33(18) | 92(50) | 59(32) | 158(43) | 210(57) |
| | χ^2 值 | | | 1.049 | | 0.801 | |

注: rs5569和rs5433中1代表T, 2代表C; rs2242446中1代表G, 2代表A; 均 $P > 0.05$

2.3 3个SNPs与情感稳定剂预防复发效应的关系 见表3。采用分类变量的最优尺度回归法, 分析3个位点与情感稳定剂(包括碳酸锂、丙戊酸镁)与预防复发的关系, 发现rs5443与预防复发的效应值有关, 其中rs5443 TT型预防有效值高于TC、CC型($P < 0.05$)。

表3 3个SNPs与情感稳定剂复发次数的比较

| SNP位点 | β 值 | β' 值 | F值 | P值 |
|-----------|-----------|------------|-------|-------|
| rs5569 | -0.070 | 0.071 | 0.942 | 0.397 |
| rs2242446 | 0.078 | 0.076 | 1.087 | 0.346 |
| rs5443 | 0.181 | 0.075 | 5.897 | 0.003 |

注: Dependent Variable: 效应值(1=有, 2=可疑, 3=无效)

3 讨论

NET基因位于16q12.2, 跨度大约45kb, 包含14个外显子和13个内含子^[2]。Stober系统地NET基因的整个编码区进行了扫描, 确认了13个DNA序列的变异: 5个少见的错义突变, 3个沉默突变和5个内含突变^[4]。其中, 位于NET基因的第9个外显子区的rs5569尤其引起了人们的兴趣, 因为同其他标记物相比, 它含有较多的杂合现象, 而且rs5569在多个种群中涉及精神障碍^[8]。rs2242446位于NET基因5'端启动子区域, 而且NET基因5'端启动子区域的结构和序列已经为人们所认识, 含有大约4.7kb碱基, 启动子区域包含了在调节转录方面几个重要的顺式作用元件, DNA启动子区域的结构的变化也许能影响NET基因转录活性的变化, 进而成为抑郁症的一个易感因素^[7]。本研究对双相障碍抑郁相与对照组的比较, 未见两组间存在差异, 提示双相抑郁与单相抑郁虽然临床表征相似, 但生物学背景不同。

分析3个SNPs的基因型及等位基因与双相障碍

II型的关联性, 通过比较发现rs5569、rs2242446及rs5433位点均与双相障碍II型无关联性。Chang等^[7]研究结果亦未发现rs5569、rs2242446与双相障碍的关联意义, 与本研究一致。虽然有研究证实NET基因与双相障碍的发病有关联, 但在本研究未得到证实。

在分析基因型与情感稳定剂预防复发的效应中, 本研究采用了分类变量回归的最优尺度回归法, 它是允许应/自变量为各种类型的变量, 分析时采用一定的非线性变换方法, 对原始分类进行转换, 然后进行反复替代以找到最佳方程式。最优尺度分析的核心目的是力图在低纬度空间表述两个或多个变量之间的关系, 这些变量以分类变量为主, 也可以是连续变量。它共提供了同质分析、分类变量的主成分分析和非线性相关三种方法, 以满足不同情况的数据要求, 实际上属多重对应分析。本研究未发现rs5569、rs2242446与情感稳定剂使用的关联性, 但发现rs5433 TT型在使用情感稳定剂治疗时复发率较低, 推测G β_3 基因多态性可能影响情感稳定剂在细胞内的第二信号转导过程, 影响中枢神经细胞功能的修复^[8-9], 提示rs5433可能是使用情感稳定剂的预防复发效应标志之一。

参 考 文 献

- [1] Lee S, Ng KL, Tsang A. A community survey of the twelve-month prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in Hong Kong [J]. J Affect Disord, 2009, 117(1/2): 79-86.
- [2] Angst J, Angst F, Gerber-Werder R, et al. Suicide in 406 mood-disorder patients with and without long-term medication: a 40 to 44 years' follow-up [J]. Arch Suicide Res, 2005, 9(3): 279-300.
- [3] Goes FS, Sanders LL, Potash JB. The genetics of psychotic bipolar disorder [J]. Curr Psychiatry Rep, 2008, 10(2): 178-189.
- [4] Craddock N, Sklar P. Genetics of bipolar disorder: successful start to a long journey [J]. Trends Genet, 2009, 25(2): 99-105.
- [5] Hamshere ML, Schulze TG, Schumacher J, et al. Mood-incongruent psychosis in bipolar disorder: conditional linkage analysis shows genome-wide suggestive linkage at 1q32.3, 7p13 and 20q13.31 [J]. Bipolar Disord, 2009, 11(6): 610-620.
- [6] Crossley NA, Bauer M. Acceleration and augmentation of antidepressants with lithium for depressive disorders: two meta-analyses of randomized, placebo-controlled trials [J]. J Clin Psychiatry, 2007, 68(6): 935-940.
- [7] Chang CC, Lu RB, Ma KH, et al. Association study of the norepinephrine transporter gene polymorphisms and bipolar disorder in Han Chinese population [J]. World J Biol Psychiatry, 2007, 8(3): 188-195.
- [8] Montezinho LP, Mørk A, Duarte CB, et al. Effects of mood stabilizers on the inhibition of adenylate cyclase via dopamine D(2)-like receptors [J]. Bipolar Disord, 2007, 9(3): 290-297.
- [9] Arnow BA, Blasey C, Williams LM, et al. Depression Subtypes in Predicting Antidepressant Response: A Report From the iSPOT-D Trial [J]. Am J Psychiatry, 2015, 172(8): 743-750.

(收稿日期: 2016-12-24)