

· 国家重点课题总结 ·

精神分裂症多基因遗传位点的筛选

项目名称:精神分裂症多基因遗传位点的筛选 R74 A  
项目来源:国家自然科学基金(39970165)  
项目负责人:尉军、于雅琴(130021 长春,吉林大学公共卫生学院)  
起止时间:2000 年 1 月~2002 年 12 月

精神分裂症(精分症)是人类最常见的精神性疾患之一。在中国,精分症的终身患病率高达 0.7% 左右,不仅给家庭和社会带来沉重的经济负担,而且还严重威胁社会的安全与稳定。可见,确定其病因从而达到防治是医学界乃至整个社会需迫切解决的问题。遗传流行病学研究证实,精分症与遗传因素有密切关系,但不符合经典的孟德尔单基因遗传规律,属于多基因遗传病或人类复杂疾病。人类基因组系统扫描发现,除 19 号、21 号和 Y 染色体以外,其余的染色体上都可能含有精分症易感基因。但是,能获得较好重复性的染色体区域至少有 6 个,包括 1q21-22、5q22-23、6p24-21、8p22-21、13q14-33 和 22q11-12<sup>[1-7]</sup>。本研究工作以中国汉族精分症患者和健康父母双亲组成的核心家系为研究对象,拟在 22 号染色体长臂一区一带(22q11)和 6 号染色体短臂二区一带(6p21)染色体区域构建单核苷酸多态性(SNPs)连锁不平衡图,以筛选精分症易感基因和决定疾病易感性的 SNPs。此项研究工作是后基因组时期功能基因组学研究的前沿课题,将有助于阐明精分症的分子遗传学机制,并具有潜在的经济与社会效益。

一、技术路线

1. 研究对象:中国北方汉族精分症患者和其健康父母双亲组成的核心家系。患病者均为吉林省四平市精神病院、长春市凯旋精神病院、汽车厂职工医院及北京大学第六医院的住院患者。均符合国际疾病分类标准第 10 版精神分裂症诊断标准(ICD-10)和《中国精神病分类与诊断标准》(第 2 版)修订本精神分裂症标准(CCMD-2-R)。在获知情者同意后取外周静脉血 5 ml, -20℃ 保存至提取基因组 DNA。临床资料的评定参照精神科评定量表,根据研究需要设计一系列代表疾病临床症状的变量,由主管医师针对患者的病史资料记录详细情况,同时排除资料不全或难以判定的病例。

2. 遗传标记的选择:染色体阳性区域范围一般在 10~20 cM 之间。平均含 100~200 个基因和 EST。浏览每个基因和 EST 上的 SNPs 图,选择含有限制性酶切位点的 SNPs,构建限制性片段长度多态性(RFLP)-SNPs 图谱。可利用 RFLP 方法检测个体基因型。选定 SNPs 位点后,首先用 20 个无血缘关系的个体 DNA 样品进行基因型分析,只选择杂合度 >10% 的 SNPs 位点进行大样本的基因型鉴定。

3. 引物设计:确定所要检测的 SNPs 遗传标记后,利用

SNPs 数据库网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> 及 SNP BLAST 网络服务系统查询每一个 SNP 的 DNA 序列,在含 SNPs 的 DNA 序列上设计 PCR 引物,并由美国 Sigma 公司合成。

4. 基因型分析:在 PCR 扩增后的反应体系中,加入适量相对应的限制性内切酶及其酶切缓冲液,置 37℃ 温箱 5 h。经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳,根据酶切图谱判断基因型(表 1)。

表 1 SNPs 基因型分析

SNPs	位置	限制性内切酶	酶切片段长度(bp)	基 因 型		
				纯合切开型	杂合型	纯合未切开型
SNP1	22q11	Pst I	29/88/188/217	G/G	A/G	A/A
SNP2	22q11	Pst I	102/148	G/G	C/G	C/C
SNP3	22q11	Dpn II	89/188	C/C	C/G	G/G
SNP4	22q11	BstNI	141/146	G/G	C/G	C/C
SNP5	22q11	EcoRI	91/185	A/A	A/C	C/C
SNP6	22q11	HaeIII	94/129	G/G	A/G	A/A
SNP7	22q11	Msp I	120/136	C/C	C/T	T/T
SNP8	6p21	Taq I	121/193	A/A	G/A	G/G
SNP9	6p21	Msp I	82/228	T/T	G/T	G/G
SNP10	6p21	HaeIII	95/133	A/A	G/A	G/G
SNP11	6p21	Sac I	88/153	C/C	G/C	G/G
SNP12	6p21	Hha I	162/84/48/17	G/G	C/G	C/C

二、已取得的主要研究成果

1. 精分症核心家系样品库的建立:经过努力共收集 200 多个由父母双亲和患病子女组成的中国汉族人核心家系。这是本项研究工作的重要基础。与此同时,还建立了较系统和完整的临床资料数据库。在每个遗传标记位点,先分析 100 个核心家系,发现阳性位点时,用来源不同的核心家系进行重复。

2. 传递不平衡检验(transmission disequilibrium test, TDT):TDT 分析法从一个或多个受累子代开始,至少其父母双亲之一在标记基因座位上为杂合子,其中一个等位基因 M<sub>1</sub> 被怀疑与疾病连锁<sup>[8,9]</sup>。每一杂合双亲的一个标记等位基因之一传递给每一受累子代,另一个等位基因则未传递。对比传递和未传递等位基因中 M<sub>1</sub> 的频率,并用 McNemar  $\chi^2$  法检验其显著性。

22q11 区域 SNPs 位点 TDT 分析结果显示,UFD1L 基因

的 SNP2 与精分症易感基因连锁和关联 ( $P=0.021$ )。杂合子父母将等位基因 G 过多地传递给患病子女 (表 2)。ARVCF 基因的 SNP7 也与精分症易感基因连锁和关联 ( $P=0.02$ )，杂合子父母将等位基因 C 过多地传递给患病子女 (表 2)。其他位点等位基因多态性与精分症易感基因无关联 ( $P>0.05$ )。

表2 22q11 区 SNPs 与精分症的 TDT 关联分析

SNPs	传递值	$\chi^2$ 值	P 值
SNP1	A=85/G=89	0.092	0.762
SNP2	C=50/G=76	5.365	0.021*
SNP3	C=56/G=60	0.138	0.710
SNP4	C=77/G=92	1.331	0.249
SNP5	A=52/C=48	0.160	0.689
SNP6	A=61/G=63	0.032	0.987
SNP7	C=75/T=49	5.542	0.020*

\*  $P<0.05, df=1$

6p21(MHC)区 SNPs 位点 TDT 分析结果显示, DQB1 基因的 SNP11 与精分症易感基因连锁和关联 ( $P=0.046$ )。杂合子父母将等位基因 C 过多地传递给患病子女 (表 3)。其他位点等位基因多态性与精分症易感基因无关联 ( $P>0.05$ )。

表3 6p21 区 SNPs 与精分症的 TDT 关联分析

SNPs	传递值	$\chi^2$ 值	P 值
SNP8	A=36/G=43	0.620	0.431
SNP9	G=38/T=33	0.352	0.533
SNP10	A=16/G=25	1.976	0.160
SNP11	C=60/G=40	4.000	0.046*
SNP12	C=33/G=31	0.063	0.803

\*  $P<0.05, df=1$

3. 单倍体相对风险 (haplotype relative risk, HRR) 检验: HRR 分析法与 TDT 分析法均为基于家系的连锁不平衡分析。两者不同之处在于后者仅利用杂合双亲进行分析, 以检验基因型为  $M_1, M_2$  的杂合双亲传递等位基因的概率是否偏离 50% 的期望值。而 HRR 分析法所观察的对象不仅包括杂合双亲, 也包括纯合双亲。以父母双亲传递给受累子代的等位基因为“疾病”基因, 未传递的为“对照”基因。将传递和未传递的等位基因频率列成  $2 \times 2$  表, 并用  $\chi^2$  法检验其显著性<sup>[9]</sup>。

22q11 区域 SNPs 位点 HRR 分析结果与 TDT 检验类似, 显示 UFDIL 基因的 SNP2 和 ARVCF 基因的 SNP7 与精分症相关联, 前者  $P=0.025$ , 后者  $P=0.016$ 。其余 5 个 SNPs 与精分症无关联 ( $P>0.05$ )。具体结果见表 4。

6p21(MHC)区 SNPs 位点 HRR 分析结果显示 SNP11 位点等位基因多态性与精分症相关联, 其余 4 个 SNPs 与精分症无关联 (表 5)。

4. 多位点单倍体分析: 22q11 SNPs 位点单倍体分析结果显示共有 5 个单倍体系统与精分症有关联, 其中包括 SNP1-SNP2 ( $P=0.0123$ ), SNP2-SNP3 ( $P=0.0162$ ), SNP6-SNP7

( $P=0.0011$ ), SNP2-SNP3-SNP4 ( $P=0.0237$ ) 和 SNP5-SNP6-SNP7 ( $P=0.0061$ )。其余单倍体系统与精分症无关联 (表 6)。

表4 22q11 区 SNPs 与精分症的 HRR 关联分析

SNPs	等位基因	HRR		$\chi^2$ 值	P 值
		传递值	未传递值		
SNP1	G	177	174	0.052	0.820
	A	171	174		
SNP2	G	272	245	5.043	0.025*
	C	80	106		
SNP3	C	86	82	0.126	0.723
	G	262	266		
SNP4	G	193	178	1.307	0.253
	C	153	168		
SNP5	A	95	91	0.161	0.688
	C	105	109		
SNP6	G	103	101	0.035	0.852
	A	131	133		
SNP7	C	112	86	5.846	0.016*
	T	126	152		

\*  $P<0.05, df=1$

表5 6p21 区 SNPs 与精分症的 HRR 关联分析

SNPs	等位基因	HRR		$\chi^2$ 值	P 值
		传递值	未传递值		
SNP8	G	164	156	0.927	0.336
	A	40	48		
SNP9	G	171	161	0.375	0.540
	T	39	44		
SNP10	A	16	25	2.226	0.136
	G	166	157		
SNP11	G	53	72	4.112	0.043*
	C	157	138		
SNP12	C	175	173	0.064	0.800
	G	37	39		

\*  $P<0.05, df=1$

表6 22q11 区 SNPs 全部单倍体传递卡方检验

单倍体	$\chi^2$ 值	df	P 值
SNP1-SNP2	10.895 0	3	0.012 3*
SNP2-SNP3	10.305 0	3	0.016 2*
SNP3-SNP4	1.300 0	3	0.729 2
SNP4-SNP5	1.360 0	3	0.714 9
SNP5-SNP6	1.380 0	3	0.710 3
SNP6-SNP7	16.060 0	3	0.001 1**
SNP1-SNP2-SNP3	13.745 0	7	0.055 9
SNP2-SNP3-SNP4	16.154 0	7	0.023 7*
SNP3-SNP4-SNP5	1.342 0	6	0.969 3
SNP4-SNP5-SNP6	4.242 0	7	0.751 5
SNP5-SNP6-SNP7	19.751 0	7	0.006 1**

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

6p21(MHC)区 SNPs 位点单倍体分析结果显示共有 4 个单倍体系统与精分症有关联, 其中包括 SNP8-SNP9 ( $P=0.0051$ ), SNP11-SNP12 ( $P=0.0200$ ), SNP8-SNP9-SNP10

( $P=0.006 0$ )和SNP10-SNP11-SNP12( $P=0.045 1$ )。其余单倍体系统与精分症无关联(表 7)。

表7 6p21 区 SNPs 全部单倍体传递卡方检验

单倍体	$\chi^2$ 值	df	P 值
SNP8-SNP9	12.818 0	3	0.005 1**
SNP9-SNP10	5.295 3	3	0.151 4
SNP10-SNP11	6.723 5	3	0.081 3
SNP11-SNP12	9.839 4	3	0.020 0*
SNP8-SNP9-SNP10	18.189 0	6	0.006 0**
SNP9-SNP10-SNP11	8.671 7	7	0.277 1
SNP10-SNP11-SNP12	14.365 0	7	0.045 1*

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

三、总结

本研究已构建 22q11 和 6p21 染色体区域的 SNPs 连锁不平衡图,应用基于家系的连锁不平衡方法分析 SNPs 位点与精分症的关系,发现 UFD1L 基因的 SNP2 C/G 等位基因、ARVCF 基因的 SNP7 C/T 等位基因及 DQB1 基因的 SNP11 C/G 等位基因与精分症易感基因既连锁又关联。

第 22 号染色体长臂一区一带和第 6 号染色体 MHC 区两个连锁不平衡图的分析结果均显示,精分症的遗传特点不仅是多基因累积效应,而且还涉及到遗传异质性,包括在一个基因上存在两个或多个决定疾病易感性的突变(即等位基因异质性)和两个易感基因位点紧密连锁在一起(即位点异质性)。等位基因异质性和位点异质性的存在使得连锁不平衡分析结果变得十分复杂。人类基因组计划构建的遗传图和 SNP 图为定位和克隆人类疾病易感基因奠定了重要基础。然而在实践中,人们所遇到的最棘手的问题就是绝大多数的研究结果都不能获得很好的重复。其中一个重要原因就是遗传异质性的存在。本项工作通过筛检精分症易感基因,证实紧密连锁区域内遗传异质性的存在可能是人类复杂疾病遗传规律之一。此外,在 SNP1 位点附近区域的阳性所

见迄今未有人报道,在该区域内可能存在一个新的精分症易感基因。本次实验结果有助于在基因水平上阐明精分症的分子遗传学机制,具有重要的科学意义,同时为在基因水平上建立诊断方法、开发新型药物和预测个体发病风险奠定重要的实验基础。

(于雅琴 谢林 整理)

参加本项目工作的主要研究人员 吉林大学公共卫生学院 尉军、于雅琴、谢林、史杰萍、郭英君、吕天文、张铭、张莹

参 考 文 献

- Harrison PJ, Owen MJ. Gene for schizophrenia? Resent findings and their pathophysiological implications. Lancet,2003,361:417-419.
- Kirov G, Murray R. The molecular genetics of schizophrenia: progress so far. Mol Med Today,1997,3:124-130.
- Brzustowicz LM, Hodgkinson KA, Chow EW, et al. Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-22. Science,2000,288:678-682.
- Wei J, Hemmings GP. The Notch4 locus is associated with susceptibility to schizophrenia. Nature Genet,2000,25:376-377.
- Blouin JL, Dombroski BA, Nath SK, et al. Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. Nat Genet, 1998, 20:70-73.
- Vallada HP, Gill M, Sham P, et al. Linkage studies on chromosome 22 in familial schizophrenia. Am J Med Genet,1995,60:139-146.
- Straub RE, MacClean CJ, O'Neil FA, et al. Genome scan for schizophrenia genes: a detailed report in an Irish cohort. Am J Med Genet, 1999, 74:558.
- 李璞. 医学遗传学. 北京:协和医科大学出版社,1999. 97-98.
- Richard SS, Warren JE. The TDT and other family-based for linkage disequilibrium and association. Am J Genet,1996,59:983-989.

(收稿日期:2003-06-24)

(本文编辑:张林东)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊开设发表论文的“快速通道”

为了更迅速反映我国流行病学及相关学科的新进展和成果,本刊编委会决定对有重大创新和国内首创的科研成果采用“快速通道”方式,使其尽早刊出。凡要求在“快速通道”发表的论文,作者应提供单位正式介绍信、查新报告和两位同行专家的推荐信,以说明该项成果的学术价值。论文投寄本刊后经国内同行专家、本刊总编辑审阅和编委会讨论同意后,将在收到稿件后 4 个月内予以发表。

本刊编辑部