

三等位基因 5-HTTLPR 与青少年 重性抑郁障碍的关联研究

马静¹, 苏林雁¹, 禹顺英², 梁珊^{*}, 丁军¹, 冯哲¹, 杨帆¹,
高维佳¹, 林佳妮¹, 黄春香¹, 刘铁桥¹, 谢光荣¹

(1.中南大学湘雅二医院精神卫生研究所,湖南 长沙 410011;

2.上海交通大学医学院上海市精神卫生中心遗传学实验室,上海 200030)

【摘要】 目的:探讨三等位基因 5-羟色胺转运体基因连锁多态区多态性(5-HTTLPR+rs25531)与青少年重性抑郁障碍之间有无关联。方法:404 名研究对象(病例 187 人,正常对照 217 人)使用 SNaPshot 系统进行基因分型。结果:三等位基因 5-HTTLPR 与青少年抑郁症是否患病、抑郁严重程度、是否共病焦虑、是否出现自杀观念/行为/企图均无关。结论:尚不能认为三等位基因 5-HTTLPR 与青少年重性抑郁障碍有关。

【关键词】 5-HTTLPR; rs25531; 青少年抑郁症; 关联分析

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2010)02-0142-04

Association Analysis of Triallelic 5-HTTLPR Polymorphism and Adolescent Depressive Disorder

MA Jing, SU Lin-yan, YU Shun-ying, LIANG Shan, et al

Mental Health Institute, Second Xiangya Hospital, Central South University School of Medicine, Changsha 410011, China

【Abstract】 **Objective:** To explore whether triallelic 5-HTTLPR polymorphism (5-HTTLPR + rs25531) is related to adolescent major depressive disorder (MDD) in Chinese Han population or not. **Methods:** 404 Chinese Han subjects, including 187 adolescent patients with MDD and 217 normal control students were recruited to the research. 5-HTTLPR and rs25531 were genotyped using SNaPshot system. **Results:** Triallelic 5-HTTLPR polymorphism was not related with the occurrence, severity of adolescent MDD, and was not related to whether adolescent MDD comorbid anxiety or with suicidal behavior/attempt/ideation or not. **Conclusion:** Triallelic 5-HTTLPR polymorphism is not related to adolescent MDD.

【Key words】 5-HTTLPR; rs25531; Adolescent depressive disorder; Association analysis

抑郁症是一种严重的慢性、反复发作性、遗传性精神疾病。抑郁症常常起病于青少年期。青少年重性抑郁障碍严重损害青少年的社会功能,若共病焦虑或出现自杀观念/企图/行为者,则预后更差。5-羟色胺转运体基因连锁多态区(5-HTT gene-linked polymorphic region, 5-HTTLPR)是青少年抑郁症病例对照关联研究中研究较多的位点。rs25531 位于 5-HTTLPR 的近邻,有 A/G 两种等位基因型,有研究表明它也会影响 5-HTT 基因启动子区的转录效能。既往国外研究中将 5-HTTLPR、rs25531 合称为三等位基因 5-HTTLPR(triallelic 5-HTTLPR)。三等位基因型 5-HTTLPR 与青少年重性抑郁障碍关联的研究国外较少见,国内还未见报道。

1 对象与方法

1.1 对象

研究对象为青少年重性抑郁障碍患者 187 人(门诊 83 人,学校 104 人),正常对照 217 人。

患者来源:①学校:在 10 所学校 3965 名中学生中使用儿童自评情绪和感受问卷、抑郁自评量表筛查,将 MFQ-C ≥ 15 分且自评 SDS ≥ 41 分的学生筛选出来作为可能抑郁组。组织并集中可能抑郁组学生进行 DAWBA 半定式访谈。依据 DSM-IV 重性抑郁障碍诊断标准进行严格诊断。最终筛选出符合 DSM-IV 重性抑郁障碍诊断标准的患者 104 人。②门诊:为 2008.09~2009.12 在中南大学湘雅二医院精神卫生研究所门诊就诊,儿童精神科教授诊断明确的青少年重性抑郁障碍患者 83 人。门诊患者也在知情同意后完成 MFQ-C、SDS、接受 DAWBA 半定式访谈。

全部患者入组标准:汉族,年龄 11~18 岁,门诊自评 MFQ-C ≥ 18 ,DAWBA 半定式访谈发现有抑郁或兴趣丧失且符合 DSM-IV 重性抑郁障碍诊断标准。排除躯体疾病所致抑郁状态、脑器质性精神障碍、精神分裂症、双相情感障碍、物质滥用、注意缺陷多动障碍、精神发育迟滞等。

正常对照组来源:来自被调查的 10 所学校。在初次量表筛查中 MFQ-C < 15 且自评 SDS < 41 分的学

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(30770767)

通讯作者:苏林雁,*长沙市未成年人心理发展咨询指导中心

生中随机选取 217 人,作为正常对照组。

1.2 筛查及访谈工具

1.2.1 自评情绪和感受问卷(child Mood and Feelings Questionnaire,MFQ-C) MFQ-C 包含 33 个条目,这些条目涵盖了 DSM-IV 青少年抑郁症诊断标准中的所有症状。MFQ-C 在既往的研究中显示出较好的信度及内部一致性,用于筛查重性抑郁障碍青少年的效度国外也早有报道^[1]。本研究提示 MFQ-C 中文版具有良好的信度和效度。

1.2.2 抑郁自评量表(Self-Rating Depression Scale, SDS) 由 20 个条目组成,每个条目代表一个有关的症状,按 1~4 级评分。

1.2.3 长处和困难问卷(strength and difficulty questionnaire,SDQ) SDQ 是与 DAWBA 配套的症状筛查量表,包括教师版、学生版和家长版三个版本,本研究中使用学生版。SDQ 由 28 个条目组成,含 5 个因子,分别为:情绪因子、多动因子、品行因子、同伴因子和亲社会行为因子^[2]。

1.2.4 精神发育及健康状况评定量表(The Development and well-Being Assessment,DAWBA) 该量表适用于 9~18 岁的青少年,是与 ICD-10、DSM-IV 儿童青少年精神障碍诊断标准配套的半定式检查工具。DAWBA 类似于成人临床精神检查。因此模拟了临床诊断过程,诊断更为准确可靠。DAWBA 在国外应用较多,被证实具有良好的信度和效度。本研究中 5 位评分者之间 DAWBA 评分结果无显著差异(Friedman $\chi^2=1.000, P=0.801$),提示本研究中 DAWBA 访谈评分者信度未发现问题。

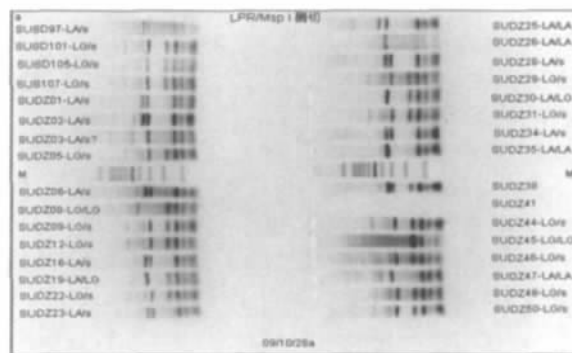
1.3 多态性测定

1.3.1 模板 DNA 制备 根据天根生化科技有限公司的口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒(货号:DP322-03)

1.3.2 引物设计 自行设计扩增引物并由 Invitrogen 公司合成。5HTT-LPR 引物:正向引物:5' GGCGTTGCCGCTCTGAATGC 3',反向引物:5' GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC 3';rs25531 引物:正向:5'-CCCTCGCGGCATCCC-3',反向:5'-ATGCTGGAAGGGCTGCA-3'。

1.3.3 基因分型 5-HTTLPR:(1)反应体系 30ul,加 DNA 1ul,dNTP 6.25mmol (for each),PrimeStar HS DNA Polymoerase 1.25U (Takara),引物 10umol。(2)PCR 反应程序:95℃ 3min,(98℃ 10sec+63℃ 10sec+72℃ 30sec)×1 个循环,(98℃ 10sec+62℃ 10sec+72℃ 30sec)×1 个循环;(98℃ 10sec+61℃ 10sec+

72℃ 30sec)×35 个循环,72℃ 7min。(3)2.5%Agarose 电泳:EB 染色,PCR 扩增片段,S 等位基因:约 485bp;L 等位基因:约 529bp;LL 等位基因:大于 551bp。rs25531 的分型:(1)酶切:对 5HTTLPR 分型后含 L 和 LL 等位基因的样本为检测样本以 MspI 内切酶进行 RFLP 酶切,反应体系:PCR 产物 10μl, Msp (10U/μl)(Takara) 1μl。酶切条件:37℃水浴箱孵育过夜 37℃水浴箱孵育过夜。(2)2.5%Agarose 电泳:①S 等位基因含有 2 个固定的 Msp 酶切位点,酶切后产生 62bp、127 bp 和 297 bp 三个片段;②L 等位基因除 2 个固定的 Msp 酶切位点以外,A→G 突变(LG)又产生第 3 个 Msp 酶切位点,因此酶切后 L_A 等位基因产生 62 bp、127 bp 和 340 bp 三个片段,L_G 等位基因则产生 62 bp、127 bp、166bp 和 174bp 四个片段。③LL 等位基因除 2 个固定切点外无第 3 个酶切点,分型均纳入 L_A。因此,酶切后 S/L、L/L 2 种基因型进一步被划分为 S_A/L_A、S/L_G、L_A/L_A、L_A/L_G、L_G/L_G 5 种基因型,具体如下:S_A/L_A=62 bp+127 bp+297 bp+340 bp;S_A/L_G=62 bp+127 bp+166 bp+174 bp+297 bp;L_A/L_A=62 bp+127 bp+340 bp;L_A/L_G=62 bp+127 bp+166 bp+174 bp+340 bp;L_G/L_G=62 bp+127 bp+166 bp+174 bp (三等位基因型 5-HTTLPR 分型结果如附图所示)。



附图 三等位基因型 5-HTTLPR 电泳分型

2 结果

2.1 三等位基因 5-HTTLPR 等位基因频率及分布

湖南省汉族青少年重性抑郁障碍及正常对照三等位基因型 5-HTTLPR 基因型频数和百分比分布情况如下:三等位基因型 5-HTTLPR L_A/L_A,LL_A/L_A 型 12 例 (3.0%)、L_G/S_A,LL_G/S_A 型 60 例 (14.9%)、L_A/S_A,LL_A/S_A 型 94 例 (23.3%)、S_A/S_A 型 214 例 (53.0%)、L_A/L_G 型 17 例 (4.2%)、L_G/L_G,LL_G/L_G 型 7 例 (1.7%)。

2.2 Hardy Weinberg 平衡检验

为验证该样本三等位基因型 5-HTTLPR 基因

频率是否可以代表当地人群的基因频率,进行基因型的 Hardy Weinberg 平衡检验 (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>)。分别输入常见纯和子、杂合子及罕见纯和子的数目,系统自动运行该检验。结果显示: $\chi^2=0.01, P>0.05$, 说明此样本基因频率可以代表当地人群三等位基因型 5-HTTLPR 的等位基因频率。

2.3 多个配对组别基因型分布比较

附表 三等位基因 5-HTTLPR(5-HTTLPR+rs25531)基因型和等位基因分布的比较

比较组别	N	基因分布[n(%)]		等位基因分布[n(%)]			Person χ^2	P	OR	95%CI
		L _s /L _s ,LL _s /L _s	L _g /L _g ,LL _g /L _g ,L _s L _g /S _s ,LL _g /S _s	L _s	L _g	S _s				
		L _s /S _s ,LL _s /S _s ,S _s /S _s								
病例组	187	6(3.2)	181(96.8)	64(8.68)	91(12.35)	582(78.97)	0.07	0.79	1.166	0.37-3.68
对照组	217	6(2.8)	211(97.2)	69(15.90)	55(12.67)	310(71.43)				
学校患者	104	4(3.8)	100(96.2)	43(27.56)	18(11.54)	95(60.90)	0.31	0.58	0.62	0.11-3.46
门诊患者	83	2(2.4)	81(97.6)	23(13.86)	18(10.84)	125(75.30)				
有自杀的抑郁	68	4(5.9)	64(94.1)	26(19.12)	9(6.62)	101(74.26)	2.46	0.12	3.66	0.65-20.51
无自杀的抑郁	119	2(1.7)	117(98.3)	40(16.81)	27(11.34)	171(71.85)				
男性患者	61	0(0.0)	61(100.0)	18(14.75)	10(8.20)	94(77.05)	3.03	0.08	0.66	0.60-0.73
女性患者	125	6(4.8)	119(95.2)	47(18.80)	26(17.33)	177(70.80)				
抑郁共病焦虑	100	2(2.0)	98(98.0)	32(16.00)	24(12.00)	144(72.00)	1.01	0.32	2.36	0.42-13.42
不共病焦虑	87	4(4.6)	83(95.4)	34(19.54)	12(6.90)	128(73.56)				
女性患者	125	6(4.8)	119(95.2)	47(18.80)	26(10.40)	177(70.80)	0.55	0.46	1.70	0.41-6.96
女性对照	104	3(2.9)	101(97.1)	35(16.83)	29(13.94)	144(69.23)				
男性患者	61	0(0.0)	61(100.0)	18(14.75)	10(8.20)	94(77.05)	1.65	0.19	0.97	0.94-1.00
男性对照	113	3(2.7)	110(97.3)	34(15.11)	25(11.11)	166(73.78)				
轻中度抑郁	52	1(1.9)	51(98.1)	21(20.19)	12(11.54)	71(68.27)	0.38	0.54	1.96	0.22-17.20
严重抑郁	135	5(3.7)	130(96.3)	45(16.67)	24(8.89)	201(74.44)				
门诊患者 vs 正常对照组							0.03	0.86	0.87	0.17-4.39
学校患者 vs 正常对照组							0.27	0.60	1.41	0.39-5.10

3 讨 论

5-HTT 是调节脑内 5-羟色胺代谢的关键物质,位于突触前膜,在 5-HT 再摄取至突触前膜的过程中发挥重要的作用。人类的 5-HT 转运体基因位于染色体 17q11.1-12,由 SLC6A4 基因编码,包含 14 个外显子,全长约 35kb,其中已知有数个外显子区域影响 5-HTT 的转录活性,如 5-HTTLPR 和 rs25531。既往国外研究中将 5-HTTLPR、rs25531 合称为三等位基因 5-HTTLPR,本研究中沿用这两个概念。

三等位基因 5-HTTLPR 与抑郁症的关联研究尚无明确的结论,其中有肯定二者间关联关系的研究结果^[3-13],亦有否定这种关联的研究^[14-18]。代表性的研究有:Wüst 等发现 5-HTTLPR 多态性影响女性神经内分泌系统下丘脑-垂体-肾上腺轴,认为 5-HTTLPR 可能与女性抑郁症患病率高有关,未发现 rs25531 的调节或影响作用^[15]。Sheikh 等发现儿童携带 5-HTTLPR S 等位基因及/或 rs25531 G 等位基因与对负性生活事件的抑郁归因显著相关,提示二者是可能与抑郁症认知易感性有关^[7]。有研究者认

结果显示:有和无自杀观念/自杀企图/自杀行为的两组患者、病例组与正常对照组、学校患者和门诊患者、男性患者和女性患者、抑郁共病焦虑的患者和不共病焦虑的患者、门诊患者和正常对照、学校患者和正常对照组、女性患者和女性对照、男性患者和男性对照组、轻中度抑郁组和重度抑郁组三等位基因 5-HTTLPR 基因型分布、等位基因型频率分布均无差别。见附表。

为 5-HTTLPR S 和 LG 等位基因型与抑郁症有微弱的关联,尤其是和应激性生活事件交互作用时^[12-13];Dannlowski 等发现携带 5-HTTLPR 及 rs25531 抑郁相关等位基因的个体双侧杏仁核对情绪刺激的反应显著高于携带其它基因型的个体^[11];国内 Zhang 等纳入 306 名帕金森患者,检测 5-HTTLPR 及 rs25531 多态性,发现三等位基因 5-HTTLPR、二等位基因 5-HTTLPR 均与帕金森患者的抑郁症状无关联^[14]。国内迄今为止还没有青少年抑郁症和 rs25531 多态性的关联研究。

本研究发现:三等位基因 5-HTTLPR 基因型与青少年抑郁症是否患病、抑郁严重程度、是否共病焦虑、是否出现自杀观念/行为无关。本研究是国内迄今为止第二个抑郁症与 rs25531 多态性关联的研究,也是第一个青少年抑郁症与 rs25531 多态性关联的研究。这一结果与国内 Zhang 等在成人帕金森共病抑郁患者中进行的研究结果一致。

总之,根据本研究的结果,尚不能认为三等位基因 5-HTTLPR 基因型与青少年抑郁症严重程度、是否共病焦虑、是否出现自杀观念/行为无关。亟待出现更多这一类在中国汉族人群中进行的研究工作,

来为这一领域增添更多研究证据。

参 考 文 献

- Kent L, Vostanis P, Feehan C. Detection of major and minor depression in children and adolescents: Evaluation of the mood and feelings questionnaire. *J Child Psychol Psychiatr*, 1997, 38(5): 565-573
- 寇建华, 杜亚松, 夏黎明. 长处和困难问卷(学生版)上海常模的制订. *中国健康心理学杂志*, 2007, 15(1): 3-5
- Syagailo YV, Stober G, Grassle M, et al. Association analysis of the functional monoamine oxidase: A gene promoter polymorphism in psychiatric disorders. *Am J Med Genet*, 2001, 105(2): 168-171
- Phillips-Bute B, Mathew JP, Blumenthal JA, et al. Relationship of genetic variability and depressive symptoms to adverse events after coronary artery bypass graft surgery. *Psychosom Med*, 2008, 70(9): 953-959
- Yoshida K, Naito S, Takahashi H, et al. Monoamine oxidase: A gene polymorphism, tryptophan hydroxylase gene polymorphism and antidepressant response to fluvoxamine in Japanese patients with major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2002, 26 (7-8): 1279-1283
- Wendland JR, Martin BJ, Kruse MR, et al. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol Psychiatry*, 2006, 11(3): 224-226
- Sheikh HI, Hayden EP, Singh SM, Dougherty LR, et al. An examination of the association between the 5-HTT promoter region polymorphism and depressogenic attributional styles in childhood. *Pers Individ Dif*, 2008, 45(5): 425-428
- Brummett BH, Muller CL, Collins AL, et al. 5-HTTLPR and gender moderate changes in negative affect responses to tryptophan infusion. *Behav Genet*, 2008, 38(5): 476-483
- Ramasubbu R, Tobias R, Bech-Hansen NT. Extended evaluation of serotonin transporter gene functional polymorphisms in subjects with post-stroke depression. *Can J Psychiatry*, 2008, 53(3): 197-201
- Baune BT, Hohoff C, Mortensen LS, et al. Serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) association with melancholic depression: A female specific effect? *Depress Anxiety*, 2008, 25(11): 920-925
- Dannlowski U, Ohrmann P, Bauer J, et al. Serotonergic genes modulate amygdala activity in major depression. *Genes Brain Behav*, 2007, 6(7): 672-676
- Vergne DE, Nemeroff CB. The interaction of serotonin transporter gene polymorphisms and early adverse life events on vulnerability for major depression. *Curr Psychiatry Rep*, 2006, 8(6): 452-457
- Canli T, Lesch KP. Long story short: The serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat Neurosci*, 2007, 10(9): 1103-1109
- Zhang JL, Yang JF, Chan P. No association between polymorphism of serotonin transporter gene and depression in Parkinson's disease in Chinese. *Neurosci Lett*, 2009, 455(3): 155-158
- Wüst S, Kumsta R, Treutlein J, et al. Sex-specific association between the 5-HTT gene-linked polymorphic region and basal cortisol secretion. *Psychoneuroendocrinology*, 2009, 34(7): 972-982
- Segal J, Schenkel LC, Oliveira MH, et al. Novel allelic variants in the human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) among depressed patients with suicide attempt. *Neurosci Lett*, 2009, 451(1): 79-82
- Kohen R, Cain KC, Mitchell PH, et al. Association of serotonin transporter gene polymorphisms with post-stroke depression. *Arch Gen Psychiatry*, 2008, 65(11): 1296-1302
- Chan F, Lanctôt KL, Feinstein A, et al. The serotonin transporter polymorphisms and major depression following traumatic brain injury. *Brain Inj*, 2008, 22(6): 471-479

(收稿日期: 2009-10-28)

杨德森精神医学奖励基金通知

杨德森精神医学奖将于 2010 年开始评选。首届(2010 年度)奖励将于 2010 年 10 月 1 日-11 月 15 日接受申报。现将有关事项通知如下:

(一) 研究生优秀论文奖: 奖励金额: 5000 元/篇(税前), 每年奖励 2 篇。参评条件: ①出自杨德森教授师门的硕士或博士生为第一作者, 导师为通讯作者; ②在本参评年度发表(每年 11 月 15 日前 12 个月); ③研究生期间科研工作论文(不包括综述)。

(二) 精神医学优秀著作奖: 奖励金额: 10000 元/本(税前), 每 2 年奖励 1 本(双年接受申报)。参评条件: ①所有公开正式出版精神医学著作; ②出版时间为本参评年度(每年 11 月 15 日)前 2 年至 5 年(含 5 年); ③主编申请或同行专家提名参评。

(三) 中国道家认知治疗推广应用成就奖: 奖励金额: 5000 元/人(税前), 每年奖励 1 人。所有从事与道家认知治疗有关个人(医、护、技师、心理咨询师)均可参评, 个人成就包括与道家认知治疗有关的科普文章、论文、著作、音影像资料、推广、培训活动及相关工作等; 申请者自己申请或同行专家提名。

符合上述申报要求的参评人把论文、著作和相关材料电子邮件传到 xiaop6@yahoo.com.cn, 或邮寄到: 长沙市人民中路 139 号, 中南大学湘雅二医院精神卫生研究所 王小平, 邮编 410011。当年 12 月 31 日将评审结果在 www.rxxin.net 公布。颁奖地点和时间另行通知。

杨德森精神医学奖励基金会

2010-2-19