

# DRD1 基因 4 个多态性位点与 注意缺陷多动障碍的关联分析

高雪屏<sup>1</sup>, 苏林雁<sup>1</sup>, 赵爱玲<sup>2</sup>, 夏昆\*

(1.中南大学湘雅二医院精神卫生研究所,湖南 长沙 410011;

2.广东省精神卫生研究所,广东省人民医院,广东 广州 510120)

【摘要】 目的:探讨 ADHD 与 DRD1 基因 4 个多态性(G-48A,G-1251C,T-800C 和 T1403C)单个位点的关系。方法:对 138 名 ADHD 患者和 119 名正常对照进行以下遗传学分析:应用 PCR-限制性内切酶分析技术分析 4 个 SNP 位点,检测各位点基因型和等位基因频率,经  $\chi^2$  检验比较两组间各位点基因型及等位基因频率的差异。结果:①ADHD 组中 DRD1 基因 G-48A 多态性-48G/-48G 基因型频率明显低于对照组,差异有统计学意义( $\chi^2=4.318$ ,  $P=0.045$ )。②ADHD 组和对照组在 DRD1 基因的其他 3 个多态性位点(G-1251C,T-800C 和 T1403C)等位基因和基因型频率分布均无统计学差异( $P>0.05$ )。结论:①DRD1 基因 G-48A 多态性与 ADHD 可能存在关联。-48G/-48G 基因型可能是 ADHD 的保护因素。②DRD1 基因的其他三个 SNP (G-1251C, T800C 和 T1403C)与 ADHD 可能均无关联。

【关键词】 注意缺陷多动障碍; 基因; 单核苷酸多态性; DRD1; 病例-对照

中图分类号: R395.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2009)06-0658-03

## Association Analysis of 4 Polymorphisms in DRD1 Gene and Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)

GAO Xue-ping, SU Lin-yan, ZHAO Ai-ling, XIA Kun

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

【Abstract】 **Objective:** To investigate the relationship between each of the 4 polymorphisms(G-48A,G-1251C,T-800C and T1403C) in DRD1 gene and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Methods:** 139 patients with ADHD and 119 normal controls in Hunan area were involved: The genotype and allele frequencies of every single nucleotide polymorphisms (SNP) of the DRD1 gene in these patients and normal controls were examined with polymerase chain reaction (PCR); the significance for the association was estimated by  $\chi^2$  test. **Results:** ①The frequency of -48G/-48G genotype of the G-48A polymorphism of DRD1 gene was significantly lower in ADHD than that in normal controls. ②Between patients with ADHD and normal controls, there were no significant differences in the frequencies of the genotypes and alleles of the three polymorphisms in DRD1 gene. **Conclusion:** ①The G-48A polymorphism of DRD1 gene may be associated with ADHD. The -48G/-48G genotype may be a protective factor of ADHD. ②Between ADHD and normal controls, there is no significant association in the three polymorphisms in DRD1 gene.

【Key words】 Attention deficit hyperactivity disorder; Gene; Single nucleotide polymorphism; DRD1; Case-control

注意缺陷/多动障碍(Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, ADHD) 是学龄期儿童常见的行为障碍,患病率约为 3%~5%<sup>[1]</sup>。临床表现为与年龄不相称的注意力不集中、活动过度和行为冲动三大核心症状。大量研究已证实遗传因素在其发生中的重要作用<sup>[2]</sup>,为多基因遗传疾病<sup>[3]</sup>,因此推测 ADHD 的发生可能因多个基因间累积效应或相互作用而引起。

有关 ADHD 候选基因的关联研究已有一些有意义的发现,多巴胺 D1 受体基因(DRD1)是其中的一个候选基因。DRD1 主要分布在前额叶皮质和纹状体,动物实验表明,分布在前额叶脑区的 DRD1 对工作记忆等认知功能有调节作用,DRD1 基因敲除

鼠表现为多动<sup>[4]</sup>。DRD1 基因定位于 5q35,经定位的 ADHD 易感基因位点之一是 5q33<sup>[5]</sup>。因此,DRD1 基因引起了人们的研究兴趣。本研究拟选择 DRD1 基因 4 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)(G-48A,G-1251C,T-800C 和 T1403C)作为研究靶目标,旨在中国 ADHD 人群中通过探讨 ADHD 与这些 SNP 单个位点的关系,以此研究 DRD1 基因在 ADHD 分子遗传学中的作用。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

ADHD 组:为 2003 年 1 月至 2005 年 1 月在中南大学湘雅二医院精神卫生研究所儿童青少年心理门诊就诊的患者共 138 例。其中男性 115 例

【基金项目】 国家自然科学基金(30370521,30570659)

通讯作者:苏林雁;\* 中南大学医学遗传学国家重点实验室

(83.3%), 女性 23 例(16.7%); 年龄 6-16 岁, 平均  $9.9 \pm 2.6$  岁。采用龚耀先等<sup>[6]</sup>修订的中国韦氏儿童智力量表测定智商, 智商 74-124 分, 平均  $95 \pm 11.3$  分。入组标准: ①符合 DSM-IV 制定的 ADHD 诊断标准; ②年龄 6-17 岁; 智商(IQ)  $\geq 70$ ; ③祖籍湖南省; ④汉族; ⑤均征得患者监护人对本研究的知情同意。排除广泛性发育障碍、儿童精神分裂症、情感障碍、神经系统疾病史及其它重大躯体疾病史。

对照组: 从中国医学遗传学国家重点实验室的中国遗传病资源保藏中心所收集的正常人标本中选取共 119 例, 其中男性 97 名 (81.5%), 女性 22 名 (18.5%); 年龄 6-16 岁, 平均  $9.6 \pm 2.4$  岁。排除标准同 ADHD 组。

## 1.2 方法

取肘静脉血 2ml, 肝素抗凝, 常规酚-氯仿法抽提基因组 DNA,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

1.2.1 引物设计 DRD1 基因的 G-48A、G-1251C、T-800C 和 T1403C 引物设计均参照文献<sup>[7]</sup>。基因多态性位点引物序列见表 1。全部引物由上海博亚生物技术公司合成。

1.2.2 PCR 反应和基因型分析 (1)DRD1 基因 4

个 SNP 位点的 PCR 反应体系和反应条件相同: ①PCR 反应体系: 总体积为  $10\mu\text{l}$ , 包括  $100\text{ng}/\mu\text{l}$  正向引物和  $100\text{ng}/\mu\text{l}$  反向引物各  $0.3\mu\text{l}$ ,  $10\times\text{PCR buffer}$   $1.0\mu\text{l}$ ,  $10\text{mM dNTPs}$   $0.2\mu\text{l}$ ,  $5\text{U}/\mu\text{l}$  Hotstart 酶  $0.05\mu\text{l}$ , Q 缓冲液  $2.0\mu\text{l}$ ,  $\text{MgCl}_2$  ( $25\text{mM}$ )  $0.75\mu\text{l}$ , dd  $\text{H}_2\text{O}$   $4.4\mu\text{l}$ ,  $50\text{ng}/\mu\text{l}$  模板  $1.0\mu\text{l}$ 。②反应条件: 采用 Touchdown 程序,  $95^{\circ}\text{C}$  预变性  $15\text{min}$ ;  $95^{\circ}\text{C}$  变性  $50\text{sec}$ ,  $66^{\circ}\text{C}$  退火  $30\text{sec}$ , 每个循环下降  $1^{\circ}\text{C}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $1\text{min}30\text{sec}$ , 10 个循环; 然后  $95^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{sec}$ ,  $56^{\circ}\text{C}$  退火  $30\text{sec}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $40\text{sec}$ , 25 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  充分延伸  $10\text{min}$ ;  $40^{\circ}\text{C}$  保存。(2)基因型分析: 各位点的扩增片段长度和限制性内切酶类型详见表 1。①酶切反应体系: HaeIII、Dde I、Bsp1286I 酶的三个酶切反应体系总体积在  $10\mu\text{l}$ ~ $15\mu\text{l}$  之间, 其中, PCR 扩增产物体积为  $5\mu\text{l}$ ~ $8\mu\text{l}$ , 限制性内切酶体积为  $0.1\mu\text{l}$ ~ $1.5\mu\text{l}$ 。酶切反应条件均为  $37^{\circ}\text{C}$  酶切过夜(约 12 小时)。②基因型分析: 4 个 SNP 位点的酶切产物分别与分型标准物 (GeneRuler™50bp DNA Ladder) 以 PAGE 进行同步电泳, 恒定电压为  $250$ ~ $300\text{V}$ , 时间为  $45$ ~ $60\text{min}$ , 经银染和 Gene Genius 图像分析处理系统处理后进行基因型判读并保存结果。各位点基因型检测法见表 1。

表 1 DRD1 基因 4 个 SNP 多态性位点的引物序列及基因型检测方法

多态性位点	引物序列	扩增片段长度(bp)	限制性核酸内切酶	基因型检测方法
G-48A	5'-ACTGACCCCTATTCCTGCT-3' 5'-AGCACAGACCAAGCGTGTTC-3'	207	Dde I	10 % PAGE
G-1251C	5'-GAGACTGGCGAGGTAACCAG-3' 5'-TCAGGAGCCTGTGGCAAT-3'	249	HaeIII	6 %PAGE
T-800C	5'-CTCTCGAAAGGAAGCCAAGA-3' 5'-CGGCTCCGAAACGTTGAG-3'	281	HaeIII	6 %PAGE
T1403C	5'-TGGAGAAGCTGTCCCCAG-3' 5'-GTACCTTAGTTTCTTAATAGCGA-3'	189	Bspl286 I	6 %PAGE

注: PAGE 为聚丙烯酰胺凝胶电泳

## 1.3 统计分析

全部资料均由 SPSS10.0 进行数据处理。ADHD 组和对照组的关联分析: 采用  $\chi^2$  检验对两组的 4 个 SNP 位点基因型和等位基因频率进行 Hardy-Weinberg 定律的遗传平衡吻合度检验; 比较两组间各位点基因型及等位基因频率的差异。

## 2 结 果

### 2.1 DRD1 基因 4 个多态性位点 PCR-限制性内切酶分析

G-48A 位点 PCR 产物( $207\text{bp}$ )经 Dde I 酶切产生  $146\text{bp}$  和  $61\text{bp}$  两个片段。 $-48$  位的一个 G $\rightarrow$ A 改变产生一个新 Dde I 酶切位点, 把  $61\text{bp}$  片段酶切并产生  $19\text{bp}$  和  $42\text{bp}$  两个片段, 其中  $19\text{bp}$  太小而跑出

胶外。故在 PAGE 胶图上, 产生野生型纯合子 ( $146\text{bp}$ ,  $61\text{bp}$ )、突变型纯合子 ( $146\text{bp}$ ,  $42\text{bp}$ ) 及杂合子 ( $146\text{bp}$ ,  $61\text{bp}$ ,  $42\text{bp}$ )。形成  $-48\text{G}/-48\text{G}$ 、 $-48\text{G}/-48\text{A}$  和  $-48\text{A}/-48\text{A}$  三种基因型。

G-1251C 位点 PCR 产物( $249\text{bp}$ )经 HaeIII 酶切产生  $191\text{bp}$  和  $58\text{bp}$  两个片段。 $-1251$  位的一个 G $\rightarrow$ C 改变产生一个新 HaeIII 酶切位点, 把  $191\text{bp}$  片段酶切并产生  $172\text{bp}$  和  $19\text{bp}$  两个片段, 其中  $19\text{bp}$  太小而跑出胶外。故在 PAGE 胶图上, 产生野生型纯合子 ( $191\text{bp}$ ,  $58\text{bp}$ )、突变型纯合子 ( $172\text{bp}$ ,  $58\text{bp}$ ) 及杂合子 ( $191\text{bp}$ ,  $172\text{bp}$ ,  $58\text{bp}$ )。形成  $-1251\text{G}/-1251\text{G}$ 、 $-1251\text{G}/-1251\text{C}$  和  $-1251\text{C}/-1251\text{C}$  三种基因型。

T-800C 位点 PCR 产物( $281\text{bp}$ )经 HaeIII 酶切产生  $169\text{bp}$  和  $112\text{bp}$  两个片段。 $-800$  位的一个 T $\rightarrow$

C 改变产生一个新 HaeIII 酶切位点, 把 169bp 片段酶切并产生 143bp 和 26bp 两个片段, 其中 26bp 太小而跑出胶外。故在 PAGE 胶图上, 产生野生型纯合子 (169bp, 112bp)、突变型纯合子 (143bp, 112bp) 及杂合子 (191bp, 143bp, 112bp)。形成 -800T/-800T, -800T/-800C 和 -800C/-800C 三种基因型。

T1403C 位点 PCR 产物 (189bp) 经 BspI286 I 酶切产生 167bp 和 22bp 两个片段, 22bp 太小而跑出胶外。故在 PAGE 胶图上, 产生野生型纯合子 (189bp)、突变型纯合子 (167bp) 及杂合子 (189bp, 167bp)。形成 1403T/1403T, 1403T/1403C 和 1403C/1403C 三种基因型。

## 2.2 DRD1 基因 4 个多态性与 ADHD 的关联分析

经 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验, ADHD 组和对照组 DRD1 基因 4 个多态性基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ( $P>0.05$ )。两组在 4 个多态性位点基因型和等位基因频率总体分布比较 ( $\chi^2$  检验) 结果见表 2。进一步分析发现 ADHD 组中 -48G/-48G 基因型频率与对照组相比明显减少, 差异有统计学意义 [ $\chi^2=4.318, P=0.045$  (Fisher's Exact Test, two side)]。

表 2 ADHD 组 (n=139) 和对照组 (n=119) 间 4 个多态性位点基因型和等位基因频率总体分布比较 (P)

多态性位点	基因型频率(P)	等位基因频率(P)	相对危险度(OR)
G-48A	0.112	0.191	0.755
G-1251C	0.282	0.144	0.631
T-800C	0.552	0.134	1.469
T1403C	0.581	0.278	1.303

## 3 讨 论

多项研究表明 ADHD 的发生和发展与 DA 系统、5-羟色胺 (5-HT) 系统等多个神经递质系统功能失调有关, 而 DA 系统功能低下假说一直占主导地位<sup>[8,9]</sup>。近年提出的谷氨酸/多巴胺系统功能低下假说认为异常的 DA 能信号首先激活 DA 受体, 再通过一系列信号转导过程最终引起 NMDA 受体失活, 从而导致 ADHD 的认知和注意缺陷<sup>[10]</sup>。因此, DA 受体基因又是 ADHD 的功能候选基因。

本研究选取 DRD1 基因启动子区的 G-1251C 和 T-800C、5' 端非编码区的 G-48A 和 3' 端非编码区的 T1403C 共四个 SNP 坐遗传标记, 研究 DRD1 基因与中国 ADHD 的关系, 发现 DRD1 基因 G-48A 多态性与 ADHD 可能存在关联。ADHD 组中 -48G/-48G 基因型频率与对照组相比明显减少, -48G/-48G 基因型可能是 ADHD 的保护因素。其他三个

SNP 位点与 ADHD 可能无关联。这些发现在国内属首次报道。

本研究结果与国外学者的结果有某些不一致<sup>[7,11]</sup>。Bobb 等<sup>[11]</sup>发现患者组 G-48A 多态性的 -48A 等位基因是 ADHD 的风险等位基因, 但未发现 -48G/-48G 基因型可能是 ADHD 的保护因素。同时, 他们还发现 ADHD 组的 1403C 等位基因的频率高于对照组, 差异具有显著性。Misener 等<sup>[7]</sup>未发现这四个 SNP 单个位点与 ADHD 存在关联, 却发现这四个 SNP 构成的单倍体 3(-1251G/-800T/-48A/1403C) 在 ADHD 患者中优先传递。Elia 等<sup>[12]</sup>最近的综述也提及 DRD1 基因与 ADHD 有关联。这些研究虽都有阳性发现, 但所得结果不一致。由于 ADHD 是一类具有临床异质性和遗传异质性的复杂性疾病, 因此, 造成研究结果不一致的原因很可能是因为各个研究中患者的临床特征可能不同, 其病因也可能有差异。另外, 还需要考虑种族的纯度差异, Kirley 等<sup>[13]</sup>研究了爱尔兰 ADHD 核心家系, 未发现 DRD1 基因与 ADHD 的关联, 但他们研究的家系中, 有近一半家族的祖先不是纯爱尔兰人。Bobb 等<sup>[11]</sup>和 Misener<sup>[7]</sup>等用于研究的绝大部分家系均为高加索人, 我们进行病例-对照研究的 ADHD 患者和对照组祖籍均为湖南汉族人, 这样的群体相对隔离, 就避免了群体分层现象。因此, 样本在种族构成上的慎重很可能将避免假阴性结果的产生。

本研究虽获得了一些阳性结果, 但由于样本量较少, 对结果的解释和分析难免有一定的局限性, 对 ADHD 组未能按临床亚型和性别进行分组研究。由于复杂遗传病的多基因本质和易感基因之间可能出现互相作用效应, 因此, 当前的遗传研究发现候选基因多态性单个位点与疾病的关联分析已不足以解释 ADHD 的全部特征。采用多位点关联分析方法研究多个基因多个位点与 ADHD 的联合效应也许能为寻找 ADHD 的遗传病因提供新的思路。

## 参 考 文 献

- 1 Scahill L, Schwab-Stone M. Epidemiology of ADHD in school-age children. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am, 2000, 9:541-555
- 2 Thapar A, Holmes J, Poulton K, et al. Genetic basis of attention deficit and hyperactivity. Br J Psychiatry, 1999, 174:105-111
- 3 Rietveld MJ, Hudziak JJ, Bartels M, et al. Heritability of attention problems in children: I cross-sectional results from a study of twins, age 3-12 years. Am J Med Genet, 2003, 117:102-113

的特定变化(如左侧前额叶),因为这些因素影响的  
是大脑特定的功能侧化区域<sup>[13]</sup>,受损脑区的异常通  
过与其相连的胼胝体连接纤维的异常反映出来。这  
种特定解剖和电生理学上的异常多发生在左侧大脑  
半球,如左侧脑室的增大比右侧脑室更明显<sup>[10]</sup>。本研  
究中患者左侧前额叶和胼胝体膝部共同出现白质密  
度的降低进一步为这一观点提供了直接的证据。

本研究还发现精神分裂症患者的健康同胞同时  
出现左侧前额叶和胼胝体膝部的白质密度比正常对  
照降低,研究结果支持左侧前额叶和胼胝体膝部与  
精神分裂症有关的研究报道。

#### 参 考 文 献

- Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: Evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry*, 2003, 60(12): 1187-1192
- Tsuang M. Schizophrenia: Genes and environment. *Biol Psychiatry*, 2000, 47(3): 210-220
- Walterfang M, Wood SJ, Velakoulis D, et al. Neuropathological, neurogenetic and neuroimaging evidence for white matter pathology in schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev*, 2006, 30(7): 918-948
- Konrad A, Winterer G. Disturbed structural connectivity in schizophrenia primary factor in pathology or epiphenomenon? *Schizophr Bull*, 2008, 34(1): 72-92
- Hulshoff Pol HE, Brans RG, van Haren NE, et al. Gray and white matter volume abnormalities in monozygotic and same-gender dizygotic twins discordant for schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 2004, 55(2): 126-130
- Snitz BE, Macdonald AW, Carter CS. Cognitive deficits in unaffected first-degree relatives of schizophrenia patients: A meta-analytic review of putative endophenotypes. *Schizophr Bull*, 2006, 32(1): 179-194
- David AS. Schizophrenia and the corpus callosum: Developmental, structural and functional relationships. *Behav Brain Res*, 1994, 64(1-2): 203-211
- Wright IC, McGuire PK, Poline JB, et al. A voxel-based method for the statistical analysis of gray and white matter density applied to schizophrenia. *Neuroimage*, 1995, 2(4): 244-252
- Keshavan MS, Diwadkar VA, Harenski K, et al. Abnormalities of the corpus callosum in first episode, treatment naive schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002, 72(6): 757-760
- Innocenti GM, Ansermet F, Parnas J. Schizophrenia, neurodevelopment and corpus callosum. *Mol Psychiatry*, 2003, 8(3): 261-274
- Highley JR, Esiri MM, McDonald B, et al. The size and fibre composition of the corpus callosum with respect to gender and schizophrenia: A post-mortem study. *Brain*, 1999, 122: 99-110
- 贺忠, 匡凡, 谭利华, 杨立萍, 梁猛. 精神分裂症静息状态下的功能磁共振成像研究. *中国临床心理学杂志*, 2008, 16(2): 154-157
- Crow TJ. Schizophrenia as the price that homo sapiens pays for language: A resolution of the central paradox in the origin of the species. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000, 31(2-3): 118-129
- Kent L. Recent advances in the genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Curr Psychiatry Rep*, 2004, 6(2): 143-148
- Ferguson SS. Receptor tyrosine kinase transactivation: fine-tuning synaptic transmission. *Trends Neurosci*, 2003, 26(3): 119-122
- Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E, et al. Support for Association Between ADHD and Two Candidate Genes: NET1 and DRD. *Am J Med Genet Part B(Neuropsychiatric Genetics)*, 2005, 134B: 67-72
- Elia J, Devoto M. ADHD genetics: 2007 update. *Curr Psychiatry Rep*, 2007, 9(5): 434-439
- Kirley A, Hawi Z, Daly G, et al. Dopaminergic system genes in ADHD: Toward a biological hypothesis. *Neuropsychopharmacology*, 2002, 27: 607-619
- Clifford JJ, Tighe O, Croke DT, et al. Topographical evaluation of the phenotype of spontaneous behaviour in mice with targeted gene deletion of the D1 A dopamine receptor: Paradoxical elevation of grooming syntax. *Neuropharmacology*, 1998, 37: 1595-1602
- Arcos-Burgos M, Castellanos FX, Pineda D, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: Linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(6): 998-1014
- 龚耀先, 蔡太生. 中国修订韦氏儿童智力量表. 湖南地图出版社, 1993
- Misener VL, Luca P, Azeke O, et al. Linkage of the dopamine receptor D1 gene to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 2004, 9(5): 500-509
- Faraone SV. Genetics of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am*, 2004, 27(2): 303-321

(收稿日期: 2009-03-16)

(上接第 660 页)

(收稿日期: 2009-05-26)