

5-羟色胺转运体、G蛋白 3亚单位基因多态性与抑郁症的相关性研究

曹美群¹, 胡随瑜¹, 张春虎¹, 李云辉¹, 夏大胜²

(1.中南大学湘雅医院中西医结合研究所, 湖南 长沙 410008; 2.天津第一中心医院, 天津 300000)

【摘要】 目的: 观察 5-羟色胺转运体基因(5-HTTLPR)和 G 蛋白 3 亚单位基因(GN 3 C825T)多态性在中国抑郁症患者中的分布情况及特点, 探讨抑郁症发生的遗传机制。方法: 采用聚合酶链反应和限制性片段内切酶的方法检测了 180 例抑郁症患者(其中男性 84 例, 女性 96 例)及 156 例健康人对照组的 5-HTTLPR 和 GN 3 C825T 基因多态性。结果: 5-HTTLPR 和 GN 3 C825T 基因多态性在两组人群中的分布差异均有显著性, 抑郁症组的 5-HTTLPR SS 基因型及 S 等位基因频率和 GN 3 825 TT 基因型及 T 等位基因频率均高于对照组($P < 0.05$)。进一步联合基因型分析显示: 同时具有 5-HTTLPR S 和 GN 3 825T 等位基因者患抑郁症的相对危险度($OR=3.25$, $P=0.001$)比单独具有 5-HTTLPR S 等位基因($OR=1.817$, $P=0.01$)或 GN 3 825T 等位基因者高($OR=2.214$, $P=0.001$)。结论: 5-HTTLPR 和 GN 3 C825T 基因可能均是抑郁症的易感基因, 且显示这两个基因在抑郁症的发病中存在微效协同作用。

【关键词】 抑郁症; 基因多态性; 5-HTTLPR; GN 3 C825T

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2007)03-0318-03

Study of the Relationship Between 5-HTTLPR and G-protein 3 Subunit Polymorphisms and Depression

CAO Mei-qun, HU Sui-yu, ZHANG Chun-hu, LI Yun-hui, XIA Da-sheng

Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

【Abstract】 Objective: To assess whether 5-HTTLPR and GN 3 C825T gene polymorphisms are associated with depression and explore the genetic mechanism of the pathogenesis of depression. Methods: The genotypes were determined with polymerase chain reaction and allele-specific restriction enzyme analysis. Depression patients ($n=180$) and sex and age-matched controls ($n=156$) were included in this study. Results: The frequency of 5-HTTLPR SS genotype, S allele and GN 3 825TT genotype, 825T allele were significantly higher in the depression group than in the controls ($P < 0.05$). Combined genotype analysis showed that individuals with both 5-HTTLPR S and GN 3 825T allele ($OR=3.25$, $P=0.001$) had a higher risk than those with 5-HTTLPR S allele ($OR=1.817$, $P=0.01$) or GN 3 825T allele ($OR=2.214$, $P=0.001$) only for depression. Conclusion: The 5-HTTLPR and GN 3 C825T polymorphisms are predisposing genes of depression. Our data also suggest a significant interaction between the 5-HTTLPR S allele and GN 3 825T allele in depression.

【Key words】 Depression; Polymorphisms; 5-HTTLPR; GN 3 C825T

有研究表明: 5-羟色胺是一种很重要的中枢性神经递质, 与其靶细胞膜上的受体结合后, 通过耦联的 G 蛋白, 激活或抑制腺苷酸环化酶或抑制磷脂酶 C, 离子型 5-HT 受体能激活人 T 细胞的蛋白激酶依赖的磷脂酶 D 途径, 进而产生第二信使以进一步调节细胞的活动, 与情感障碍、精神分裂症等有关^[1,2]。本研究探讨与上述机制密切相关的 5-羟色胺转运体(5-HTTLPR)和 G 蛋白 3 亚单位(GN 3 C825T)基因多态性位点与抑郁症的相关性, 以初步探索抑郁症发病的遗传机制。

1 对象与方法

【基金项目】 国家“十五”科技攻关项目资助(编号 2001BA701A22)
通讯作者: 曹美群

1.1 研究对象

1.1.1 抑郁症试验组 为 2003 年 1 月~2004 年 12 月在天津市第一人民医院门诊和住院部诊断为轻中度抑郁发作的患者。纳入标准: 符合 CCMD- 及 ICD- 10 抑郁发作诊断标准^[3], 包括无精神病性症状的抑郁(43.5%)和复发性抑郁(56.5%), 且汉密顿抑郁量表(HAMD)评分 ≥ 18 分, 抑郁自评量表(SDS)标准评分 > 41 分^[4]。本组共 180 例, 其中男性 84 例, 女性 96 例, 年龄在 40~70 岁之间, 平均年龄 55.84 ± 8.522 岁, 病程 0.5~35 个月。

1.1.2 健康人对照组 为 2003 年 1 月~2004 年 12 月天津市第一人民医院门诊和住院部健康体检者, 无心、肺、肝、肾等器质性疾病, 均经汉密顿抑郁量表

(HAMD)和抑郁自评量表(SDS)测量,且汉密顿抑郁量表(HAMD)评分 12 分,抑郁自评量表(SDS)标准评分 30 分,排除抑郁症及其它精神疾病,能正常工作和生活。本组共 156 例,其中男性 76 例,女性 80 例,年龄 42~69 岁,平均年龄 54.44 ± 6.542 岁。

所有入选对象的诊断和量表的测量均由精神科医生操作完成;所有试验均取得受试者或家属对本研究的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及基因组 DNA 提取 空腹 12 h 后静脉抽血,0.5mol/L EDTA-Na₂ 抗凝。DNA 的制备按购自美国 Gentra 公司的 DNA 提取试剂盒说明操作提取。

1.2.2 引物序列 5-HTTLPR 引物序列: forward, 5'-GGC GTT GCC GCT CTG AAT GC-3', reverse, 5'-GAG GGA CTG AGC TGG ACA ACC AC-3';

G 3 C825T 引物序列: forward, 5'-TGA CCC ACT TGC CAC CCG TGC-3', reverse, 5'-GCA GCA GCC AGG GCT GGC-3'。

1.2.3 基因型分析 采用聚合酶链反应(PCR)和限制性片段内切酶的方法: 5-HTTLPR 基因型分析: PCR 反应体系共 20 μ l, 含有 50ng~100ng 基因组 DNA, 10pmol 引物, 1u LA-Taq 酶, 10 μ l 2 \times GC 缓冲液, 250 μ mol/L dNTPs。PCR 条件: 94 5min 预变性, 继以 94 变性 60s, 61 退火 30s, 72 延伸 60s, 共 30 个循环, 72 延伸 10min。将 PCR 产物于 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 4h, 以硝酸银染色法检视各区带。GN 3 C825T 基因型分析: PCR 反应体系共 20 μ l, 含有 50ng~100ng 基因组 DNA, 10pmol 引物, 1u Taq 酶, 2 μ l 10 \times Buffer, 2.5mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs。PCR 条件: 94 5min 预变性, 继以 94 变性 45s, 60 退火 30s, 72 延伸 45s, 共 30 个循环, 72 延伸 10min。将 PCR 产物中加入 5U 限制性内切酶 BseD 于 55 温箱中消化 3h, 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 3h, 以硝酸银染色法检视各区带。

1.3 统计方法

应用 Finetti 网络程序(<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.p1>) 分析各基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。两组间基因型和等位基因频率分布差异统计学意义检验采用 χ^2 检验, 理论值小于 5 时采用 Fisher 确切概率分析。等位基因与疾病的关联程度用相对危险度(OR)及其 95% 可信区间(CI)表示。所有统计均用 SPSS11.5 运行。

2 结 果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡的吻合度检验

5-HTTLPR 和 GN 3 C825T 基因型频率分布在抑郁症试验组和正常对照组中均符合 Hardy-Weinberg 平衡法则($P>0.05$)。

2.2 5-HTTLPR 和 GN 3 C825T 基因型的判别

5-HTTLPR 基因多态性, PCR 扩增后判定为四种基因型: LL 型(528bp), SS 型(484bp), SL 型(484/528bp), XLS 型(484/618bp)。GN 3 C825T 基因多态性, PCR 扩增片段大小为 268bp, 根据限制性内切酶 BseD 酶切产生片段长度的不同判定为三种不同基因型: TT 型(268bp), CC 型(116/152bp), CT 型(116/152/268bp)。

表 1 5-HTTLPR 和 GN β 3 C825T 基因多态性分布特点

基因型	抑郁组 例数(%)	正常对照组 例数(%)	χ^2	P值	OR	95%CI
5-HTTLPR						
LL	4(2.22)	8(5.13)	11.556	0.03*		
SL	56(31.11)	72(46.15)				
SS	120(66.67)	76(48.72)				
5-HTTLPR 等位基因						
L	64(17.8)	88(28.21)	10.383	0.01*	1.817	1.260-2.619
S	296(82.2)	224(71.79)				
GN β 3 基因型						
CC	20(11.1)	44(28.2)	23.13	0.001*		
CT	76(42.2)	72(46.2)				
TT	84(46.7)	40(25.6)				
GN β 3 等位基因						
C	116(32.2)	160(51.3)	24.31	0.001*	2.214	1.619-3.029
T	244(67.8)	152(48.7)				

2.3 5-HTTLPR 和 GN 3 C825T 基因型分布

5-HTTLPR 基因多态性在两组人群中的分布差异有显著性, 抑郁组 SS 基因型和 S 等位基因频率显著高于对照组($P<0.05$)。GN 3 C825T 基因多态性在两组人群中的分布差异有显著性, 抑郁组 T 等位基因和 TT 基因型频率显著高于对照组($P<0.01$)。见表 1。

2.4 5-HTTLPR 和 GN 3 C825T 基因型联合分析

5-HTTLPR 和 GN 3 C825T 联合基因分布结果见表 2, -/- 表示不携带 S 和 T 易感等位基因的个体; -/+ 表示携带有一个 S 或 T 等位基因的个体; +/+ 表示同时携带 S 和 T 两个等位基因的个体。结果抑郁组中同时具有 5-HTTLPR S 和 GN 3 825T 等位基因者明显多于正常对照组, 差异有统计学意义($\chi^2=27.456$, $P=0.001$)。

5-HTTLPR 和 GN 3 C825T 基因多态性与抑郁

症风险性的关系见表 3, 结果表明同时具有 5-HTTLPR S 和 GN 3 825T 等位基因者患抑郁症的相对危险度 ($OR=3.25, P=0.001$) 比单独具有 5-HTTLPR S 等位基因 ($OR=1.817, P=0.01$) 或 GN 3 825T 等位基因 ($OR=2.214, P=0.001$) 者患抑郁症的相对危险度均高, 差异有统计学意义。

表 2 5-HTTLPR 和 GN β 3 C825T 联合分析

	抑郁症试验组 (180例)	正常对照组 (156例)	χ^2	P 值
- / -	32 (17.78%)	68 (43.59%)	27.456	0.001*
- / +	92 (51.11%)	60 (38.46%)		
+ / +	56 (31.11%)	28 (17.95%)		

注: -/-: 无 S 和 T 等位基因; -/+ : 带有 S 或 T 等位基因中的一个; +/+ : 带有 S 和 T 两个等位基因。

表 3 5-HTTLPR 和 G β 3 C825T 基因多态性
与抑郁症的关系

基因多态性	OR	95% CI	P 值
5-HTTLPR S 等位基因	1.817	1.260-2.619	0.01
GN β 3 825T 等位基因	2.214	1.619-3.029	0.001
5-HTTLPR S 和 GN β 3 825T 等位基因	3.250	1.887-5.597	0.001

3 讨 论

抑郁症是一种多基因疾病, 其遗传机制研究涉及多个基因, 但具体机制尚不十分清楚。抑郁症存在神经递质功能异常, 尤其是 5-羟色胺功能低下的假说已被广泛接受。5-羟色胺, 又称血清素, 是一种广泛分布的生物性吲哚胺, 分布于神经元、血清及内脏, 对中枢神经系统、胃肠道系统和心血管系统都有很重要的作用^[5]。5-羟色胺转运体 (5-HTT) 位于突触前膜, 它从神经突触间隙中重新摄取 5-羟色胺进入突触前神经元, 从而调节脑内 5-羟色胺的作用强度和持续时间, 关系到突触后受体介导信号的数量和作用时间。另外, 研究表明 5-HTT 是很多抗抑郁剂的主要作用位点, 情感障碍、重性精神病和焦虑症状的发生可能与 5-HTT 有关^[6,7]。目前人类 5-HTT 基因已经被克隆, 由染色体 17q12 上的单基因 (SLC6A4) 编码。因此, 5-HTT 基因作为情感性精神障碍的候选基因是较好的研究指标。Lesch 等^[8]研究认为, 在 5-羟色胺转运蛋白基因转录启动部位上游约 1 kb 处, 6~8 个重复元件含 44 bp 碱基片段的插入/缺失, 影响了 5-羟色胺转运蛋白的功能, 构成 S (缺失) 和 L (插入) 两个等位基因, S 等位基因限制 5-羟色胺转运蛋白基因启动子的转录活性, 从而导致 5-羟色胺转运体的低表达。本文研究结果显示抑郁症组 5-HTTLPR SS 基因型和 S 等位基因频率明显高于正常对照组, 表明 SS 基因型个体是抑郁症的易

感人群。

近年来临床药理及动物实验研究发现在单、双相情感障碍病理机制中存在复杂的信号传导紊乱现象。Sifert 等^[9]报道在编码 G 蛋白 β 3 亚基基因的第 10 外显子上存在着 C825T 基因多态性, 这种基因片段异型导致 G 蛋白 β 3 亚基缺失 41 个氨基酸, 产生变异。G 蛋白可偶联 80% 的已知膜受体和效应器, 在受体和第 2 信使系统间跨膜转运过程中起着重要的调节作用, 这种 GN 3 变型影响信号传导和离子转运, 与抑郁情绪和抗抑郁疗效有关^[10,11]。本文研究结果表明 GN 3 825TT 基因型和 T 等位基因频率在抑郁症组中明显高于正常对照组, 因此 GN 3 基因也可能是抑郁症的易感基因。

由于抑郁症是多基因疾病, 由多个易感基因与环境相互作用而形成的。5-羟色胺与相应受体结合后, 通过 G 蛋白介导, 进而产生第二信使以进一步调节细胞活动, 由此推测 5-羟色胺转运体与 G 蛋白之间存在某些功能性联系。因此本研究进一步联合分析 5-HTTLPR 和 GN 3 基因, 发现同时具有 5-HTTLPR S 和 GN 3 825T 等位基因个体患抑郁症的相对危险度 ($OR=3.25$) 大于单纯具有 5-HTTLPR S 等位基因个体 ($OR=1.817$) 或 GN 3 825T 等位基因个体 ($OR=2.214$), 表明 5-HTT 基因和 GN 3 基因在抑郁症的发病中可能存在微效协同作用。

参 考 文 献

- 1 Petrus JP. Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60 (12): 1743-1750
- 2 Fenrick R, Pou C, Beliveau M, et al. The human 5-hydroxytryptamine 1A receptor differentially modulates phospholipase C and adenylyl cyclase activities. *Gen Pharmacol*, 1996, 27(3): 263-268
- 3 中华医学会精神科分会编. 中国精神障碍分类与诊断标准. 济南: 山东科学技术出版社, 2001. 83-90
- 4 张明圆. 精神科评定量表手册. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998. 151-154
- 5 Mossner R, Lesch K. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun*, 1998, 12(4): 249-271
- 6 Angelova M, Benkelfat C, Turecki G. A systematic review for association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. *Mol psychiatry*, 2003, 8: 547-591
- 7 Lotrich F, Pollock BG. Meta-analysis of serotonin transporter polymorphisms and affective disorders. *Psychiatry Genet*, 2004, 14: 121-129

(下转第 317 页)

苯二氮卓类药物是通过在中枢内与 GABA A 受体的 BZ 位点结合, 以增强 GABA 介导的神经抑制过程而起作用的^[15]。本研究发现大鼠在经条件恐惧训练前 30 分钟腹腔注射地西洋后, 其 GRP mRNA 和蛋白表达水平明显降低。已知地西洋是 GABA A 受体的正性变构调制物, 地西洋作用下 GRP mRNA 和蛋白表达水平下降, 其作用机制及意义似乎有待于进一步研究, BDZ 类降低了 GRP 水平, 似乎能使其对恐惧记忆的负反馈作用减弱。有一项研究结果与本结果有一定的呼应: 一种仓鼠恐惧习得模型—条件性挫败 (Conditioned Defeat) 中, 发现大剂量地西洋作用下恐惧记忆增强, 小剂量则记忆减弱^[16]。地西洋这种作用的机制尚不明确, 是否可能与 GRP 的下降有关似乎是个值得研究的方向。同时这也提示苯二氮卓类药物对恐惧记忆的作用可能比较复杂, 这一结果与临床中地西洋治疗 PTSD 的效果是否一致尚待进一步验证。

参 考 文 献

- Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Review of Neuroscience*, 1992, 15: 353- 375
- Rauch SL, Shin LM, Wright CI. Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 985: 389- 410
- Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE. Fear conditioning enhances different temporal components of tone- evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron*, 1997, 19: 613- 624
- Gallagher M, Holland PC. The amygdala complex: Multiple roles in associative learning and attention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91: 11771- 11776
- 陶嵘, 张亚林. 杏仁核在条件恐惧中的神经生物学机制研究进展. *中华精神科杂志*, 2006, 39(1): 58- 60
- M van nobelen, L kokkinidis. Amygdaloid GABA, not glutamate neurotransmission or mRNA transcription controls footshock - associated fear arousal in the acoustic startle paradigm. *Neuroscience*, 2006, 137: 707- 716
- Yadin Dudai. Fear thou not. *Nature*, 2003, 421: 325- 327
- Takehito S, Kunio S, Masashi N, et al. Effect of paroxetine on a model of posttraumatic stress disorder in rats. *Neuroscience Letters*, 2004, 357: 37- 40
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol*, 1969, 67: 370- 375
- Nick A, Ben DM, Isabel G, et al. Effect of gastrin- releasing peptide on rat hippocampal extracellular GABA levels and seizures in the audiogenic seizure- prone DBA/2 mouse. *Brain Research*, 2000, 859: 386- 389
- K Lee, AK Dixon, I Gonzalez, et al. Bombesin- like peptides depolarize rat hippocampal interneurons through interaction with subtype 2 bombesin receptors. *Journal of Physiology*, 1999, 518(3): 791- 802
- Moody TW, Merali Z. Bombesin- like peptides and associated receptors within the brain: Distribution and behavioral implications. *Peptides*, 2004, 25(3): 511- 20
- Ali RP, Mohammad ER. Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage. *Brain Research*, 1998, 814: 127- 132
- Merali Z, McIntosh J, Kent P, et al. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin- releasing hormone and bombesin- like peptides at the central nucleus of the amygdala. *J Neurosci*, 1998, 18: 4758- 66
- Adolphs R, Tranel D, Damasio AR. The human amygdala in social judgment. *Nature*, 1998, 393: 470- 474
- MA Hebert, M Potegal, T Moore, et al. Diazepam Enhances Conditioned Defeat in Hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1996, 55(3): 405- 113

(收稿日期:2006- 10- 24)

(上接第 320 页)

- Lesch KP, Bengel D, Heils A, et al. Association of anxiety- related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene: Possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol Psychiatry*, 1996, 1(6): 4563- 4560
- Siffrts W, Roszkopf D, Moritz A, et al. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J Clin Invest*, 1995, 96: 759- 766
- Zill P, Baghai TC, Zwanzer P, et al. Evidence for an association between a G- protein beta3- gene variant with depression and response to antidepressant treatment. *Neuroreport*, 2000, 11: 1893- 1897

- Lin CN, Tsai SJ, Hong CJ. Association analysis of a functional G protein beta3 subunit gene polymorphism(C825T) in mood disorders. *Neuropsychobiology*, 2001, 44: 118- 121
- Reutens S, Sachdev P. Homocysteine in neuropsychiatric disorders of the elderly. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2002, 17: 859- 864
- Christopher B, Anne P, Timothy G, et al. The MTHFR C677T polymorphism is associated with depressive episodes in patients from Northern Ireland. *Journal of Psychopharmacology*, 2004, 18: 567- 571

(收稿日期:2006- 11- 25)