

clock 基因 rs3817444 多态性与大学生抑郁症、原发性失眠的关联分析

胡义秋¹, 刘双金¹, 朱翠英¹, 刘衍华²

(1.湖南农业大学教育学院、湖南省儿童青少年健康促进研究中心, 长沙 410128; 2.衡阳师范学院教育科学系, 衡阳 421008)

【摘要】 目的:探讨 clock 基因与大学生抑郁症、原发性失眠的关联。**方法:**用 Snapshot SNP 分型技术对 88 例(其中抑郁睡眠障碍 65 例)大学生抑郁症患者、55 例原发性失眠患者和 110 名大学生正常对照进行 clock 基因 rs3817444 位点分型,比较三组间该基因多态性基因型和等位基因频率的差异。**结果:**与对照组相比,抑郁症组 rs3817444 多态性的基因型和等位基因的频率差异无统计学意义($P>0.05$);与对照组相比,原发性失眠组 rs3817444 多态性的等位基因频率差异有统计学意义($P<0.05$);对 rs3817444 多态性三种基因型 C/C、A/C、A/A 抑郁症和原发性失眠大学生的临床资料比较,显示各项没有明显差异($P>0.05$)。**结论:**clock 基因 rs3817444 多态性可能与大学生抑郁症的发病无关,但与大学生原发性失眠可能关联。

【关键词】 抑郁症; clock 基因; 大学生; 原发性失眠

中图分类号: R395.1

DOI: 10.16128/j.cnki.1005-3611.2015.03.012

Association of Clock Gene rs3817444 Polymorphism with Depressions and Primary Insomnia

HU Yi-qiu, LIU Shuang-jin, ZHU Cui-ying, LIU Xian-hua

College of Education, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China

【Abstract】 Objective: To explore the association of clock gene with depressions and Primary insomnia. **Methods:** The clock gene rs3817444 was genotyped by Snapshot SNP technique in 88 depressions(including 65 depressions with insomnia), 55 Primary insomnia and 110 controls. **Results:** No significant differences for genotype and allele gene in clock gene rs3817444 were observed between depressions and healthy controls($P>0.05$), while significant differences for allele gene in clock gene rs3817444 were presented between Primary insomnia and healthy controls($P<0.05$); Comparing the depression and the Primary insomnia's clinical data between three genotypes of the rs3817444 polymorphism C/C、A/C、A/A, it showed no significant differences($P>0.05$). **Conclusion:** The clock gene rs3817444 polymorphism may relate to Primary insomnia, but not depressions.

【Key words】 Depressions; Clock gene; College students; Primary insomnia

临床流行病学研究表明:有关睡眠质量的抱怨见于 50-90% 的抑郁症患者中^[1]。而且,普通人群中筛选的主诉为失眠的个体大多被诊断为抑郁症,在所有的具有失眠的精神障碍中,抑郁症是最普遍的障碍^[2]。睡眠紊乱与昼夜生物节律钟(circadian clock)的调控功能有关, clock 基因是内源性分子昼夜节律钟的最重要的基因,编码的蛋白调整昼夜节律。在大鼠 clock 基因位于染色体 5,人类位于染色体 4q12,大约 100kb,有 24 个外显子, cDNA 全长 10kb,编码 bHLH-PAS 家族转录因子的成员之一——clock 蛋白。一些研究^[3-5]已经强调了稳定的睡眠觉

醒周期和适当的睡眠卫生保健对预防抑郁症的复发尤其是轻性抑郁症的再发有重要意义。目前,睡眠紊乱是否是抑郁症的前驱症状或者是抑郁症的启动或风险因素还不清楚。如果抑郁症患者睡眠障碍与抑郁症的易感性指标有关,那么生物钟基因遗传研究对抑郁症的理解可能开辟一个新的有兴趣的领域。本研究拟采用病例对照方法了解 clock 基因多态性与中国汉族大学生抑郁症与原发性失眠的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 抑郁症组 为 2011 年 10 月-2013 年 10 月在湖南农业大学心理普查筛查和中南大学湘雅二医院精神卫生研究所门诊和病房住院的重性抑郁症患者(其中 65 例伴睡眠障碍:HAMD 睡眠障碍分大于或等于 4 分者)。由一名正高或两名副高级职称的医

【基金项目】 2014 年国家社科基金教育学项目“大学生抑郁症易感性:社会心理因素与基因多态性的共同作用”(BBA140047);2013 年湖南省教育规划重点项目(XJK013AXL001)成果;2014 年湖南省教育厅科研重点项目(14A063)

通讯作者:刘衍华,fortune2000947@163.com

师做出无争议诊断者方可入组。入组标准:①符合《中国精神障碍分类方案及诊断标准(第三版)》(CCMD-3)和《美国精神障碍诊断与统计手册第4版》(DSM-IV)的抑郁症诊断标准;②《汉密尔顿抑郁量表》(HAMD)17项版本HAMD总分 ≥ 21 分;③年龄16-24岁,性别不限,均为汉族;④无严重心、脑、肝、肾疾病及其他严重的躯体疾病;无营养不良、肥胖等;⑤无内分泌系统、免疫系统疾病、神经系统疾病,无急、慢性感染;⑥至少半年内未用过免疫抑制剂及免疫增强剂,未应用电抽搐治疗;⑦受试者或其监护人知情同意。排除标准:①1年内有重大生活事件;②其他精神疾病和精神发育迟滞;③酒精和药物滥用史;④血常规、肝脏功能、肾脏功能、心电图、脑电图及体格检查结果有明显异常。共收集符合上述条件的抑郁症大学生88例,其中男性40例,女性48例,年龄16-24岁,平均年龄 19.35 ± 8.23 岁。

1.1.2 原发性失眠组 为2011年10月-2013年10月在湖南农业大学心理普查筛查和中南大学湘雅二医院精神科头痛失眠专科门诊、普通精神科门诊求治的患者。诊断的确定人由一名正高或两名副高级职称的医师作出。入组标准:①符合美国精神科协会制定的《精神障碍诊断与统计手册》(第四版)中“原发性失眠”的诊断标准^[6];②主诉难以入睡和维持睡眠困难,起病至少1月;③睡眠紊乱引起苦恼或社会、职业等方面的障碍;④无严重心、脑、肝、肾疾病及其他严重的躯体疾病,无营养不良、肥胖等;⑤无内分泌系统、免疫系统疾病、神经系统疾病,无急、慢性感染;⑥至少半年内未用过免疫抑制剂及免疫增强剂,未应用电抽搐治疗;⑦受试者或其监护人知情同意。排除标准:①睡眠紊乱由发作性睡病、与呼吸相关的睡眠障碍、生物节律睡眠障碍等障碍所致;②睡眠紊乱由重性抑郁症、广泛性焦虑等障碍所致;③睡眠障碍由其他精神疾病、各种躯体疾病、酒精或药物的心理作用所致;④月经期女性;⑤血常规、肝脏功能、肾脏功能、心电图、脑电图及体格检查结果有明显异常。共收集符合上述条件的原发性失眠大学生55例,其中男性26例,女性29例,年龄16-24岁,平均年龄 19.20 ± 7.32 岁。

1.1.3 对照组 来自湖南农业大学的大学生体检者,均为汉族,汉密尔顿抑郁量表(HAMD)总分少于7分,无重大躯体疾病、遗传性疾病,既往无精神病史及精神疾病阳性家族史。共收集符合上述条件的正常对照者110名,男性51例,女性59例,平均年龄 20.12 ± 7.16 岁。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 取肘静脉血2ml,用基因组DNA提取试剂盒提取。

1.2.2 基因型检测 本研究利用标签SNP原理,通过在线查找 http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap24_B36/($R^2=0.8$; $MAF=0.10$),确定CLOCK基因标签SNP的rs3817444多态性为研究靶点。利用SNaPshot SNP分型技术对253个样本进行CLOCK基因rs3817444位点分型。①设计了1对PCR引物(rs3817444F: TACcagccagcaggaggtgat; rs3817444R: TGCCTTTCTGATTCCCTGGAG)用于扩增了包含该位点的101-179bp片段,也设计了1个紧邻SNP位点的延伸引物用于单碱基延伸。引物用在线Primer3软件设计(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)。PCR产物用Qiagen公司的HotStarTaq进行多重PCR获得,PCR产物经虾碱酶(SAP)(from Promega)和外切酶I(EXO I)(from Epicentre)纯化后用ABI公司的SNaPshot Multiplex kit进行延伸反应。延伸产物用虾碱酶(SAP)(from Promega)纯化后在ABI3130xl上样。②PCR反应体系:(20 μ l)包含1x HotStarTaq buffer, 2.0 mM Mg^{2+} , 0.2 mM dNTP, 每对引物0.1 μ M, 1 U HotStarTaq polymerase (Qiagen Inc.) 和1 μ l样本DNA。PCR循环程序:95 $^{\circ}$ C 15min; 11 cycles x (94 $^{\circ}$ C 20s, 62 $^{\circ}$ C-0.5 $^{\circ}$ C/cycle 40s, 72 $^{\circ}$ C 1min); 24cycles x (94 $^{\circ}$ C 20s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min); 72 $^{\circ}$ C 2min; 4 $^{\circ}$ C for ever。③PCR产物纯化:PCR产物纯化根据ABI公司提供的操作说明采用SAP/Exo I酶法在15 μ l PCR产物中加入5U SAP和2U Exo I酶, 37 $^{\circ}$ C温浴1小时,然后75 $^{\circ}$ C灭活15分钟。④SNaPshot多重单碱基延伸反应。延伸引物:rs3817444SF: Ggaggtgatcataggggca。延伸反应体系(10 μ l): 包括5 μ l SNaPshot Multiplex Kit (ABI), 2 μ l 纯化后多重PCR产物, 2 μ l 延伸引物混合物(0.8 μ M rs3817444SF), 1 μ l 超纯水。PCR循环程序: 96 $^{\circ}$ C 1min; 28 x (96 $^{\circ}$ C 10s, 50 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 30s); 60 $^{\circ}$ C 1min; 4 $^{\circ}$ C for ever。延伸产物纯化:在10 μ l 延伸产物中加入1U SAP酶, 37 $^{\circ}$ C温浴1小时,然后75 $^{\circ}$ C灭活15分钟。⑤利用ABI3130XL测序仪收集原始数据,用GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems Co., Ltd., USA)来分析。

1.3 统计学分析

采用EXCEL软件建数据库,用SPSS17.0进行数据分析。采用卡方检验进行Hardy-Weinberg遗传平衡度检验和组间基因型和等位基因频率比较,不

同基因型组间的计量资料比较采用 F 检验, 差异有统计学意义设为双侧 P 值 < 0.05 。

2 结 果

2.1 抑郁组、失眠组与对照组一般资料比较

从表 1 看出, 抑郁组、失眠组、正常对照组大学生在性别、年龄及体重指数方面无显著性差异 ($P > 0.05$), 三组资料齐同, 具有良好的可比性。

表 1 抑郁组、原发性失眠组和对照组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

	例数(人)	性别(人)		年龄(岁)	体重指数(kg/m ²)
		男	女		
抑郁组	88	40	48	19.35 \pm 8.23	21.03 \pm 4.06
失眠组	55	26	29	19.20 \pm 7.32	20.78 \pm 4.14
对照组	110	51	59	20.12 \pm 7.16	22.51 \pm 3.09
χ^2 或 F 值		0.046		1.442	2.193
P 值		0.977		0.438	0.230

表 2 三组 CLOCK 基因 rs3817444 多态性基因型和等位基因频率比较

	基因型(%)			等位基因(%)	
	C/C	A/C	A/A	C	A
抑郁组	46(0.52)	33(0.38)	9(0.10)	125(0.71)	51(0.29)
失眠组	21(0.38)	24(0.44)	10(0.18)	66(0.60)	44(0.40)
对照组	58(0.53)	42(0.38)	10(0.09)	158(0.72)	62(0.28)
$\chi^2=4.98$	$P=0.289$		$df=4$	$\chi^2=5.31$	$P=0.07$

2.2 三组大学生 CLOCK 基因 rs3817444 多态性基因型和等位基因频率比较

三组大学生 CLOCK 基因 rs3817444 多态性基因型和等位基因频率比较见表 2, 经 Hardy-Weinberg 平衡的吻合度检验, 三组的 CLOCK 基因 rs3817444 多态性基因型符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ($P > 0.05$)。

经 χ^2 检验, 抑郁组、原发性失眠组与对照组之间 CLOCK 基因 rs3817444 多态性基因型及等位基因总体分布的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

同时, 对该基因的两两比较结果发现, 除原发性失眠组与对照组的 rs3817444 多态性等位基因有明显差异外, 其他各组的比较无显著差异。

2.3 原发性失眠组与对照组大学生 CLOCK 基因 rs3817444 多态性基因型和等位基因频率的比较

表 3 显示, 原发性失眠组与对照组的等位基因有明显差异 ($P=0.030$; 小于 0.05)。

2.4 抑郁组大学生 CLOCK 基因 rs3817444 多态性三种基因型临床资料的比较

表 4 显示, 对抑郁组大学生的临床资料进行了基因型 C/C、A/C、A/A 的比较, 计量资料进行 ANO-

VA 检验, 计数资料进行卡方检验 (或 Fisher 精确检验)。结果显示各项之间没有明显差异。

表 3 失眠组与对照组大学生 CLOCK 基因 rs3817444 多态性基因型和等位基因频率比较

	基因型(%)			等位基因(%)	
	C/C	A/C	A/A	C	A
失眠组	21(0.38)	24(0.44)	10(0.18)	66(0.60)	44(0.40)
对照组	58(0.53)	42(0.38)	10(0.09)	158(0.72)	62(0.28)
$\chi^2=4.39$	$P=0.11$		$df=2$	$\chi^2=4.69$	$P=0.030$

表 4 抑郁组大学生 CLOCK 基因 rs3817444 多态性三种基因型临床资料比较

	基因型 C/C (n=46)	基因型 A/C (n=33)	基因型 A/A (n=9)	χ^2 或 F 值	P
性别(男/女)	20/26	12/21	3/6	0.580	0.748
年龄(岁)	20.51 \pm 6.80	19.93 \pm 7.94	20.0 \pm 8.43	0.268	0.573
抑郁类型(首发/复发)	27/19	21/12	7/2	1.19	0.549
本次发作病程	4.60 \pm 3.10	5.55 \pm 4.72	6.21 \pm 5.09	0.966	0.384
17 项版本 HAMD 总分	26.42 \pm 4.33	27.65 \pm 4.547	29.09 \pm 4.87	1.15	0.336
HAMA 总分	9.53 \pm 2.38	9.51 \pm 3.35	9.04 \pm 3.10	0.108	0.689

表 5 原发性失眠大学生 CLOCK 基因 rs3817444 多态性三种基因型临床资料的比较

	基因型 C/C (n=21)	基因型 A/C (n=24)	基因型 A/A (n=10)	χ^2 或 F 值	P
性别(男/女)	7/14	7/17	4/6	0.380	0.826
年龄(岁)	20.12 \pm 5.71	20.82 \pm 9.56	19.89 \pm 8.99	0.788	0.672
本次发作病程	3.20 \pm 1.89	4.33 \pm 2.12	3.21 \pm 2.04	0.856	0.664
HAMA 总分	7.55 \pm 3.47	8.31 \pm 2.25	7.08 \pm 3.47	0.538	0.597

2.5 原发性失眠组大学生 CLOCK 基因 rs3817444 多态性三种基因型临床资料的比较

表 5 显示, 对原发性失眠患者的临床资料进行了基因型 C/C、C/T、T/T 的比较, 计量资料进行 ANOVA 检验, 计数资料进行卡方检验 (或 Fisher 精确检验)。结果显示, 各项之间没有明显差异。

3 讨 论

本研究没有发现抑郁组和抑郁睡眠障碍大学生 rs3817444 基因型和等位基因频率与正常对照者组有显著性差异。这与 Bailer^[7]等对单相和双相抑郁症进行 clockT3111C 基因核苷酸多态性的研究结果一致。

原发性失眠大学生 CLOCK 基因 rs3817444 的等位基因与对照组大学生相比有明显差异, 失眠组 A 等位基因频率明显高于对照组, C 等位基因频率明显低于对照组。这与 Toshio lwase 等的研究一致^[8], Toshio lwase 等发现失眠患者 clock3111C 等位基因频率显著低于对照组。因此我们可以初步假定 CLOCK 基因 rs3817444 的 A 等位基因可能是原发性

失眠致病的相关基因。但是原发性失眠与对照组的基因型频率没有显著差异,可能是样本量少的缘故,今后要进一步扩大样本量研究。

对抑郁症和原发性失眠大学生各自 CLOCK 基因 rs3817444 多态性三种基因型的临床资料进行比较,显示各项临床资料的三种基因型和等位基因没有明显差异,可能是样本量少的缘故,今后要进一步扩大样本量研究。

由于遗传关联本身存在种族和方法差异可能导致的假阳/阴性结果的特点,而目前仅检索到一篇有关该基因位点遗传多态性与单、双相情感障碍无关联,一篇与睡眠障碍有关联^[9]研究,故本研究结论有待在其它样本中得以验证。同时,本研究以后还会对该基因其他多态性位点进行研究。

参 考 文 献

- 1 Tsuno N, Besset A, Ritchie K. Sleep and depression. *Journal Clinic Psychiatry*, 2005, 66(10): 54-69
- 2 Riemann D, Berger M, Voderholzer U. Sleep and depression: Results from psychobiological studies: An overview. *Biological Psychology*, 2001, 57: 67-103
- 3 胡义秋,谢光荣,詹林. Clock 基因 rs1801260 多态性与抑郁症的关联分析. *中国临床心理学杂志*, 2010, 18(5): 591-596
- 4 Timo P. Clock gene variants in mood and anxiety disorders. *Journal of Neural Transmission*, 2012, 119(10): 1133-1145
- 5 Louise KS, Leena K. CLOCK is suggested to associate with comorbid alcohol use and depressive disorders. *Journal of Circadian Rhythms*, 2010, 8: 1
- 6 American Psychiatric Association. The diagnostic and statistical manual of mental disorders, Fourth Edition. Washington DC: American Psychiatric Press, Incorporated, 1994
- 7 Bailer U, Wiesegeger G, Leisch F, et al. No association of clock gene T3111C polymorphism and affective disorders. *European Neuropsychopharmacology*, 2005, 15: 51-55
- 8 Toshio I, Naofumi K, Makoto U, et al. Mutation screening of the human Clock gene in circadian rhythm sleep disorders. *Psychiatry Research*, 2002, 109(2): 121-128
- 9 Mishima K, Tozawa T, Satoh K, et al. The 3111T/C polymorphism of hClock is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatric Genet*, 2005, 133(1): 1-4
- 10 (上接第420页)
mental psychology. B, Comparative and Physiological Psychology, 2004, 57: 25-53
- 8 Raes AK, De Houwer J, Verschuere B, et al. Return of fear after retrospective inferences about the absence of an unconditioned stimulus during extinction. *Behaviour Research and Therapy*, 2011, 49: 212-218
- 9 Bouton ME. Context, ambiguity, and unlearning: Sources of relapse after behavioral extinction. *Biological Psychiatry*, 2002, 52: 976-986
- 10 Di Sevenster, Beckers T, Merel K. Instructed extinction differentially affects the emotional and cognitive expression of associative fear memory. *Psychophysiology*, 2012, 49: 1426-1435
- 11 Field AP, Lawson J. The verbal information pathway to fear and sub-sequent causal learning in children. *Cognition and Emotion*, 2008, 22: 459-479
- 12 Prenoveau J, Michelle G, Craske, et al. Human fear conditioning and extinction: Timing is everything. . .or is it? *Biological Psychology*, 2012, 65: 1-10
- 13 Milad MR, Quirk GJ. Neruons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*, 2002, 420: 70-74
- 14 Norrholm SD, Jovanovic T, Vervliet B, et al. Conditioned fear extinction and reinstatement in a human fear-potentiated startle paradigm. *Learning and Memory*, 2006, 13: 681-685
- 15 Colgan DM. Effect of instructions on the skin conductance response. *Journal of Experimental Psychology*, 1970, 86: 108-120
- 16 Carina CO, Benjamin JD, Field AP. An ERP study of the interaction between verbal information and conditioning pathway to fear. *Biological Psychology*, 2012, 2: 1-13

(收稿日期:2014-11-12)

(收稿日期:2014-11-12)