

· 论著·临床·

GRIA1、GRM3、TCF4 基因单核苷酸多态性与精神分裂症的关联研究

杨 静¹,程宇琪¹,姜红燕¹,罗雄剑²,陈娴瑜¹,沈宗霖¹,周 聪¹,许秀峰^{1*}

(1. 昆明医科大学第一附属医院,云南 昆明 650000;

2. 中国科学院大学昆明动物所,云南 昆明 650000

*通信作者:许秀峰,E-mail:xfxu2004@sina.com)

【摘要】 目的 探讨 GRIA1、GRM3 和 TCF4 基因单核苷酸多态性与精神分裂症的关联,为精神分裂症的遗传学研究提供参考。方法 选取昆明医科大学第一附属医院精神科的 663 例符合《精神障碍诊断与统计手册(第 4 版)》(DSM-IV)诊断标准的精神分裂症患者为病例组,以昆明市第一人民医院体检中心的 690 例健康人为对照组,使用 SNaPshot 基因分型方法对受试者 GRIA1、GRM3、TCF4 三个候选基因 12 个 SNPs 进行基因分型,并进行遗传学分析。结果 GRM3 多态性位点 rs6465084 的 A 等位基因频率与对照组相比差异有统计学意义($P=0.027$);以性别特异性做相关分析,表明多态性位点 rs6465084 A 等位基因频率在男性精神分裂症患者与正常对照组中差异有统计学意义($P=0.02$)。结论 GRM3 多态性位点 rs6465084 可能与精神分裂症存在关联,其等位基因 A 可能增加精神分裂症的发病风险。

【关键词】 精神分裂症;GRIA1;GRM3;TCF4;单核苷酸多态性

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



微信扫描二维码

听独家语音释文

与作者在线交流

中图分类号:R749.3

文献标识码:A

doi:10.11886/scjsws20190326001

Association between single nucleotide polymorphisms of GRIA1, GRM3, TCF4 genes and schizophrenia

Yang Jing¹, Cheng Yuqi¹, Jiang Hongyan¹, Luo Xiongjian², Chen Xianyu¹, Shen Zonglin¹, Zhou Cong¹, Xu Xiufeng^{1*}

(1. The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, China;

2. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650000, China

*Corresponding author: Xu Xiufeng, E-mail: xfxu2004@sina.com)

【Abstract】 Objective To explore the relationships between three candidate functional genes (GRIA1, GRM3 and TCF4) and schizophrenia, and to provide references for genetic research of schizophrenia. **Methods** A total of 663 schizophrenia patients in the psychiatry department of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University who met the diagnostic criteria of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition (DSM-IV) were selected as the research group, meanwhile, 690 healthy individuals in the physical examination center of the First Hospital of Kunming were set as the control group. 12 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of three candidate functional genes were genotyped by the SNaPshot assay, and the genetic analysis was also performed. **Results** The A allele frequency of GRM3 SNP rs6465084 in the research group was significantly different from that of the control group ($P=0.027$). Gender-specific correlation analysis revealed that A allele frequency of SNP rs6465084 had statistic difference between male patients in research group and control group ($P=0.02$). **Conclusion** The SNP rs6465084 of GRM3 may be associated with the schizophrenia, and its A allele may increase the risk of schizophrenia.

【Keywords】 Schizophrenia; GRIA1; GRM3; TCF4; Single nucleotide polymorphisms

近年来,家系、双胞胎和寄养研究表明,精神分裂症具有很强的遗传倾向,其遗传度高达 80%~85%^[1]。目前精神分裂症病因学研究尚未得出一致结论,神

经发育障碍是最主要的机制,影响因素包括遗传、表观遗传以及后天环境等。遗传流行病学研究显示,遗传因素对精神分裂症的发生影响较大^[2-3]。随着新型遗传标记的出现,病例-对照相关分析被大量应用于甄别精神分裂症的易感基因,主要利用单核苷酸多态性位点(Single nucleotide polymorphism,

项目基金:国家自然科学基金(81660237);云南省应用基础研究(昆医联合专项)[2017FE468(-176)];昆明医科大学第一附属医院重大精神疾病研究省创新团队(2017HC004)

SNP)作为遗传标记,其分辨率可以达到一个碱基,可以进行较为精准的易感基因定位。近年来,随着分子遗传学技术的进步,疾病的易感基因发现与定位有了可能,大量的精神分裂症全基因组关联分析研究已经甄别到了许多达到基因组范围内显著相关的位点和基因,包括MHC、MIR137、TCF4、CACNA1C、GRM3、GRIA1、ZNF804A、VRK2、ITIH3/4、NDST3、NOTCH4和BCL9等^[4-9]。本研究结合近年来精神分裂症相关热点基因阳性结果,选择代谢型谷氨酸受体3基因(GRM3)、AMPA受体1基因(GRIA1)和转录因子4基因(TCF4)部分多态性位点,从分子水平上探索遗传学因素与精神分裂症的关系,为精神分裂症的遗传学研究提供参考。

1 对象与方法

1.1 对象

于2011年9月-2013年12月在昆明医科大学第一附属医院精神科选取精神分裂症患者为病例组。入组标准:①符合《精神障碍诊断与统计手册(第4版)》(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition, DSM-IV)精神分裂症诊断标准,由两名精神科副主任医师职称及以上的医师做出一致诊断;②年龄12~48岁;③患者本人或其法定监护人签署知情同意书。排除标准:①精神发育迟滞;②有脑器质性疾病、头部外伤史、癫痫发作史;③当前或既往有物质滥用史;④既往患有严重躯体疾病,如神经、内分泌、心血管、肝、肾、血液系统、呼吸系统疾病等。符合入组标准且不符合排除标准共663例,其中男性296例,女性367例,年龄(30.9±11.2)岁。于2016年9月-11月在昆明市第一人民医院体检中心选取健康人为对照组。入组标准:①当前或既往无精神障碍史;②年龄12~48岁;③均签署知情同意书。排除标准:①精神发育迟滞;②患有脑器质性疾病、有头部外伤史、癫痫发作史;③当前或既往有物质滥用史;④既往患有严重躯体疾病,如神经、内分泌、心血管、肝、肾、血液

系统、呼吸系统疾病等;⑤精神病家族史阳性者。符合入组标准且不符合排除标准共690例。其中男性414例,女性276例,年龄(35.9±12.7)岁。本研究通过昆明医科大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 实验方法

采用酚/氯仿法提取基因组DNA,DNA样本成品放置于-80℃冰箱中备用。利用primer 5.0进行PCR引物设计,采用SNaPshot基因分型技术对12个SNPs进行基因型检测,12个SNPs的选择主要基于以下标准:①主要选择以前研究中最显著的位点,这些位点很可能包含致病位点或与致病突变紧密相连,如rs9636107和rs12704290与精神分裂症相关;②考虑所选SNP是否有潜在的功能,如rs1428920和rs2926835位于GRIA1的内含子中,可能会影响GRIA1的表达,rs274622和rs12966547位于GRM3和TCF4启动子附近,因而也有可能影响GRM3和TCF4表达;③通过Ensemble数据库(<http://www.ensemble.org>)确定上述位点在中国汉族人群中的最小等位基因频率(Minor Allele Frequency, MAF)>0.05。

1.3 统计方法

运用Plink 1.07对所选SNP进行哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE)及相关分析;运用Haploview 4.2对同一基因的多态性位点进行连锁分析;单倍型分析使用SHEsis在线分析软件(<http://analysis.bio-x.cn>);运用在线软件(<http://www.genemania.org/>)^[10]分析GRIA1、GRM3、TCF4之间是否存在功能联系;运用Quanto 1.2.4对样本的统计效能进行分析。

2 结果

2.1 两组等位基因频率

病例组GRM3多态性位点rs6465084的A等位基因频率与对照组相比差异有统计学意义($P=0.027$)。见表1。

表1 两组等位基因频率

位点	变异位置	等位基因频率		<i>P</i>	<i>P'</i>	OR(95% CI)	
rs1428920	内含子	C	T	0.530	/	1.054(0.917~1.276)	
		病例组	32.05				67.95
		对照组	30.91				69.09
rs2926835	内含子	A	T	0.037	0.408	0.777(0.624~0.977)	
		病例组	84.60				15.40
		对照组	87.39				12.61
rs274622	上游	C	T				

续表1:

位 点	变异位置	等位基因频率		P	P'	OR(95% CI)
病例组		11.26	88.74	0.268	/	0.877(0.722~1.15)
对照组		12.65	87.35			
rs2189814	内含子	C	T			
病例组		71.15	28.85	0.103	/	0.883(0.744~1.048)
对照组		73.96	26.04			
rs6465084	内含子	A	G			
病例组		86.29	13.71	0.003	0.027	1.373(1.115~1.691)
对照组		82.01	17.99			
rs12704290	内含子	G	A			
病例组		96.233	3.767	0.218	/	1.265(0.849~1.766)
对照组		95.283	4.717			
rs4309482	氨基酸	A	G			
病例组		39.60	60.40	0.654	/	0.965(0.835~1.138)
对照组		40.44	59.56			
rs12966547	氨基酸	A	G			
病例组		59.07	40.93	0.738	/	1.026(0.878~1.198)
对照组		58.43	41.57			
rs2958182	内含子	A	T			
病例组		14.22	85.78	0.791	/	0.971(0.789~1.213)
对照组		14.58	85.42			
rs9636107	内含子	A	G			
病例组		13.64	86.36	0.343	/	0.901(0.737~1.136)
对照组		14.91	85.09			

2.2 等位基因频率和性别特异性相关分析

性别特异性相关分析结果表明,多态性位点 rs6465084在男性中有统计学意义(P=0.02)。见表2。

表2 等位基因频率和性别特异性相关分析

位 点	变异位置	等位基因频率		P	P'
rs1428920	内含子	C	T		
男性	病例组	32.14	67.86	0.938	/
	对照组	31.93	68.07		
女性	病例组	31.93	68.07	0.499	/
	对照组	30.22	69.78		
rs2926835	内含子	T	A		
男性	病例组	16.58	83.42	0.253	/
	对照组	14.23	85.77		
女性	病例组	13.95	86.05	0.176	/
	对照组	11.52	88.48		
rs274622	上游	C	T		
男性	病例组	12.05	87.95	0.646	/
	对照组	12.91	87.09		
女性	病例组	10.30	89.70	0.206	/
	对照组	12.47	87.53		
rs2189814	内含子	T	C		
男性	病例组	27.99	72.01	0.353	/
	对照组	25.65	74.35		
女性	病例组	29.90	70.10	0.144	/

续表2:

位 点	变异位置	等位基因频率		P	P'
		对照组	26.37 73.63		
rs6465084	内含子	G	A		
男性	病例组	12.26	87.74	0.002	0.02
	对照组	18.57	81.43		
女性	病例组	15.56	84.44	0.314	/
	对照组	17.61	82.39		
rs12704290	内含子	A	G		
男性	病例组	3.10	96.90	0.098	/
	对照组	4.891	95.109		
女性	病例组	4.575	95.425	0.982	/
	对照组	4.60	95.40		
rs4309482	氨基酸	A	G		
男性	病例组	40.22	59.78	0.771	/
	对照组	41.03	58.97		
女性	病例组	38.83	61.17	0.644	/
	对照组	40.05	59.95		
rs12966547	氨基酸	G	A		
男性	病例组	41.39	58.61	0.743	/
	对照组	42.31	57.69		
女性	病例组	40.37	59.63	0.794	/
	对照组	41.07	58.93		
rs2958182	内含子	A	T		
男性	病例组	12.67	87.33	0.401	/

续表2:

位 点	变异位置	等位基因频率		P	P'
女性	对照组	14.29	85.71	0.491	/
	病例组	16.11	83.89		
rs9636107	内含子	A	G	0.102	/
	男性	病例组	12.67		
女性	对照组	15.88	84.12	0.791	/
	病例组	14.80	85.20		
	对照组	14.30	85.70		

2.3 连锁不平衡分析结果

连锁不平衡分析显示,多态性位点 rs6465084 和 rs12704290 高度连锁不平衡(D'=0.88)。见图1。

2.4 GRM3 基因相关位点的单倍型频率

本研究对两位点构建了3种单倍型,其中 A-G (P=0.004, OR=1.357) 与 G-G (P=0.018, OR=0.754)

在病例组与对照组之间差异有统计学意义。见表3。

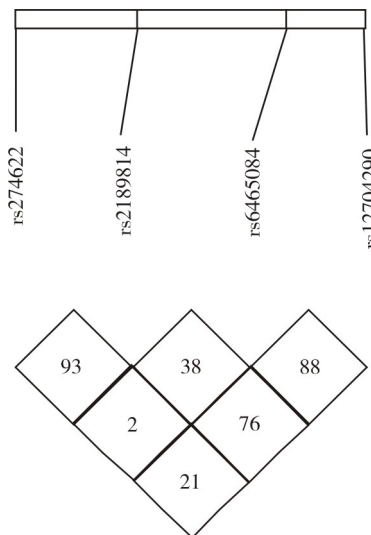


图1 GRM3 基因上多态性位点间连锁不平衡分析结果

表3 GRM3 基因相关位点的单倍型频率

单倍型	SNPs		等位基因频率(%)		P	OR(95% CI)
	rs6465084	rs12704290	病例组	对照组		
单倍型1	A	G	85.6	81.7	0.004*	1.357(1.102~1.672)
单倍型2	G	A	3.3	4.4	0.144	0.745(0.502~1.107)
单倍型3	G	G	10.6	13.6	0.018*	0.754(0.596~0.953)

注:*表示易感单倍

3 讨 论

在本研究中,除了 rs2958182 位点在对照中不符合 HWE,其余所有位点在病例对照中均符合 HWE。本研究通过测序证实 rs2958182 位点基因分型的正确性,因此排除了其不符合 HWE 并不是由于基因分型误差造成的。与对照组相比,GRM3 rs6465084 位点在精神分裂症患者中有统计学意义(P=0.027),Chang 等^[11]对中国汉族人群(包括 1115 例精神分裂症患者和 2289 例健康对照者)的研究显示,rs6465084 位点与精神分裂症相关,与本研究结果一致。由于 rs6465084 位点位于 GRM3 内含子上,该位点的变异不会造成谷氨酸受体的结构和功能改变,但内含子的变异可能会调控基因表达,因此该位点的变异可能导致 GRM3 转录时的改变,使得 GRM3 表达异常,谷氨酸受体与游离谷氨酸结合力下降,降低脑内谷氨酸水平,增加精神分裂症的发病风险。

GRM3 存在于人类染色体 7q21.1,长度约为 220 kb,主要与学习记忆中的突触传递、可塑性改变、神经递质的调节等生理过程以及脑缺血、神经元变性疾病等病理过程密切相关。GRM3 主要存在于大脑背外侧前额叶皮层(PFC)的锥体细胞层内,

N-乙酰天冬氨酸(N-acetylaspartat, NAA)是 GRM3 的激动剂,正常情况下, NAA 通过抑制突触后 cAMP-K⁺通道来增强突触的连接性,从而增加细胞的放电频率,维持正常的工作记忆,因此, PFC 受损会影响 cAMP 信号通路的传导,导致细胞放电频率降低,进而影响工作记忆,产生认知功能缺陷^[12]。Egan 等^[13]研究表明, rs6465084 位点与精神分裂症相关(P=0.02), A/A 基因型个体右背外侧前额叶皮层 NAA 水平和语言流畅性均低于 G 等位基因携带者, A 等位基因携带者的学习、记忆能力较低。A/A 基因型个体的前额叶皮层的兴奋性氨基酸转运蛋白 2 (excitatory amino acid transporter 2, EAAT2)的 mRNA 水平较低。胶质谷氨酸转运蛋白的主要功能是清除突触间隙的谷氨酸,神经胶质细胞中的 GRM3 通过增加 EAAT2 受体的表达,从而增加谷氨酸的摄取,使细胞内外的谷氨酸水平达到稳态^[14-15]。Kerdsan 等^[16]研究表明, rs6465084 位点的变异与 EAAT2 的水平无关。Xia 等^[17]的研究与 Egan 等的研究结果一致,发现 rs6465084 位点 A/A 基因型个体的右背外侧前额叶皮层 NAA 水平比 G 等位基因携带者的 NAA 水平低。Mössner 等^[18]研究显示, A/A 基因型患者的

决策能力以及对数字、符号等的测试成绩更差。以上结果均证实 rs6465084 位点的等位基因 A 是导致精神分裂症发生的风险等位基因,其机制可能是通过影响 GRM3 的转录与翻译过程从而降低大脑背外侧前额叶皮层的 EAAT2 水平,使得突触间隙谷氨酸水平升高、细胞内外的谷氨酸水平失衡,导致谷氨酸受体与谷氨酸的结合率下降,中枢谷氨酸水平下降,从而影响认知、学习、记忆等过程,产生一系列精神病性症状,增加精神分裂症的易感性。

本研究亦发现 GRM3 rs6465084 位点对精神分裂症的发病机制与性别相关,男性更易发病。有研究报道 COMT 对精神分裂症的影响与性别相关,且 Reelin rs7341475 位点的突变在女性中与精神分裂症显著相关^[19-20],该结果与本研究结果相反。动物学研究显示,NRG1 是精神分裂症的风险因素,可以使小鼠内表型发生突变,并且与性别相关,雄性精神分裂症模型小鼠主要表现为记忆和情绪的缺陷,而雌性精神分裂症模型小鼠并无任何缺陷^[21]。

本研究中,多态性位点 rs6465084 与 rs12704290 呈高度连锁不平衡,但 rs12704290 位点与精神分裂症无关联,rs12704290 位点的 OR 值为 1.265,其 G 等位基因携带者仍有一定的发病风险,符合两位点连锁不平衡的遗传特征。

本研究局限性在于:①由于地域、种族的差异以及精神分裂症的遗传异质性较高,本研究中的其余位点尚未能在云南地区人群中重复验证;②本研究样本量较小,以致造成诸多局限,未来有必要在更大样本中验证这种相关性并了解其分子机制。

参考文献

- [1] Avramopoulos D. Recent advances in the genetics of schizophrenia[J]. *Mol Neuropsychiatry*, 2018, 4(1): 35-51.
- [2] Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2003, 60(12): 1187-1192.
- [3] 司天梅. 中国精神分裂症的研究现状与展望[J]. *中华精神科杂志*, 2015, 48(3): 131-135.
- [4] Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci[J]. *Nature*, 2014, 511(7510): 421-427.
- [5] Purcell SM, Wray NR, Stone JL, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Nature*, 2009, 460(7256): 748-752.
- [6] Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, et al. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(10): 1150-1159.
- [7] Zheng F, Cui Y, Yan H, et al. The effects of a genome-wide supported variant in the CACNA1C gene on cortical morphology in schizophrenia patients and healthy subjects [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34298.
- [8] Xiao X, Luo X, Chang H, et al. Evaluation of European schizophrenia GWAS loci in Asian populations via comprehensive meta-analyses [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(6): 4071-4080.
- [9] O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, et al. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(9): 1053-1055.
- [10] Mostafavi S, Ray D, Warde-Farley D, et al. GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function [J]. *Genome Biol*, 2008, 9(Suppl 1): S4.
- [11] Chang M, Sun L, Liu X, et al. Evaluation of relationship between GRM3 polymorphisms and cognitive function in schizophrenia of Han Chinese [J]. *Psychiatry Res*, 2015, 229(3): 1043-1046.
- [12] Jin LE, Wang M, Galvin VC, et al. mGluR2 versus mGluR3 metabotropic glutamate receptors in primate dorsolateral prefrontal cortex: postsynaptic mGluR3 strengthen working memory networks [J]. *Cereb Cortex*, 2018, 28(3): 974-987.
- [13] Egan MF, Straub RE, Goldberg TE, et al. Variation in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate, and risk for schizophrenia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(34): 12604-12609.
- [14] Tanaka K, Watase K, Manabe T, et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1 [J]. *Science*, 1997, 276(5319): 1699-1702.
- [15] Aronica E, Gorter JA, Ijlst-Keizers H, et al. Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins [J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 17(10): 2106-2118.
- [16] Kerdsan W, Thanoi S, Nudmamud-Thanoi S, et al. An association between genotypic variations and protein expression of the glial glutamate transporter 2 in the human nucleus accumbens [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 523(2): 108-110.
- [17] Xia Y, Ma D, Hu J, et al. Effect of metabotropic glutamate receptor 3 genotype on N-acetylaspartate levels and neurocognition in non-smoking, active alcoholics [J]. *Behav Brain Funct*, 2012, 8: 42.
- [18] Mössner R, Schuhmacher A, Schulze-Rauschenbach S, et al. Further evidence for a functional role of the glutamate receptor gene GRM3 in schizophrenia [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2008, 18(10): 768-772.
- [19] Shifman S, Johannesson M, Bronstein M, et al. Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women [J]. *PLoS Genet*, 2008, 4(2): e28.
- [20] Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 71(6): 1296-1302.
- [21] Wickens MM, Bangasser DA, Briand LA. Sex differences in psychiatric disease: a focus on the glutamate system [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 197.

(收稿日期:2019-03-26)

(本文编辑:陈霞)