

精神分裂症易感基因 DKK4 与中国人群众脑容量的相关性

← BACK

张丽华¹, 李明^{2,3}, 施晓东⁴, 任惠¹, 宿兵^{2,*}, 徐忠^{5,*}

- (1. 昆明医学院第一附属医院 干部医疗科, 云南 昆明 650031;
2. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室, 云南 昆明 650223;
3. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 4. 曲靖师范学院 生物资源与环境科学学院, 云南 曲靖 655011;
5. 昆明医学院第一附属医院 神经内科, 云南 昆明 650031)

摘要: 精神分裂症是一种复杂的精神疾病, 全世界约有 1% 的人患有这种疾病。以往的研究发现, 精神分裂症患者的脑容量比正常人小, 且一些精神分裂症易感基因的 DNA 序列多态性也同时与脑的结构异常有关, 这与精神分裂症的神经发育假说是吻合的。最近研究发现, 人的 DKK4 基因的 SNP(rs2073665) 与精神分裂症显著相关。为了研究 DKK4 精神分裂症易感 SNP 是否与脑发育相关, 本文检测了 961 个正常人 rs2073665 的基因型并测量了他们的脑容量。相关性分析发现, rs2073665 在加性模型下和显性模型下都与脑容量存在显著相关性, 这为精神分裂症易感基因同时能影响脑容量提供了证据, 同时也为精神分裂症的神经发育异常假说提供了佐证。

关键词: 精神分裂症; 脑容量; DKK4; 单核苷酸多态性

中图分类号: Q987.2; Q593.2; R749.3 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)01-0062-04

Association of the schizophrenia susceptible gene DKK4 with brain volume in Chinese populations

ZHANG Li-Hua¹, LI Ming^{2,3}, SHI Xiao-Dong⁴, REN Hui¹, SU Bing^{2,*}, XU Zhong^{5,*}

- (1. Department of Geratology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, China; 2. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology and Kunming Primate Research Center, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Biological Resources and Environmental Science College, Qujing Normal University, Qujing 655011, China; 5. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

Abstract: Schizophrenia is one of the most severe mental disorders with a worldwide incidence of 1%. Previous studies suggested that the brain volumes of the schizophrenia patients were much smaller than the healthy individuals and many schizophrenia susceptible genetic variants have been shown associated with structural brain abnormalities in patients, which is consistent with the neurodevelopmental hypothesis of the etiology of schizophrenia. Recently, the DKK4 gene involved in the Wnt signaling was found to be significantly associated with schizophrenia. To test whether DKK4 is associated with neurodevelopment, we genotyped one DKK4 SNP in 961 healthy Chinese individuals and measured their brain volumes. We found that the SNP was significantly associated with brain volume under both additive and dominant genetic models, providing evidence that schizophrenia susceptible genes could influence brain volume. Our findings support the neurodevelopmental hypothesis of the etiology of schizophrenia.

Key words: Schizophrenia; Brain volume; DKK4; Single nucleotide polymorphism (SNP)

精神分裂症是一种严重的精神疾病, 全世界约有 1% 的人患有这种疾病 (Jablensky et al, 1987)。目前关于精神分裂症发病机制的研究虽然很多, 但仍

然不是很清楚。目前累积的数据表明, 主要有几种可能的机制, 包括神经发育异常假说、多巴胺假说、谷氨酸假说、 γ -氨基丁酸能假说以及免疫假说等

收稿日期: 2010-08-17; 接受日期: 2010-11-10

*通讯作者(Corresponding authors), E-mail: xz2006951@yahoo.cn; sub@mail.kiz.ac.cn

等 (Lang et al, 2007)。其中, 神经发育异常假说是目前比较被研究者接受的假说。这个假说的核心是精神分裂症源于个体发育早期异常, 如出生前和出生后的很多有害事件(如母亲营养状况异常和病毒感染等)能显著增加精神分裂症的发病率。神经发育异常假说还得到了大量来自精神分裂症患者脑形态学研究的支持。研究发现相对于正常人, 精神分裂症患者的脑容量 (Cahn et al, 2002)、灰质体积 (Lawrie & Abukmeil, 1998)以及海马区都有不同程度的减小 (Velakoulis et al, 1999)。此外, 大脑的其它区域, 如白质、左侧上颞叶回等在精神分裂症患者中也呈减小趋势 (Honea et al, 2005)。

研究表明, 很多精神分裂症的易感基因与正常人的脑容量或者脑内结构有关, 这与精神分裂症的神经发育异常假说是吻合的 (Ho et al, 2005,2007)。人的 DKK4 基因(也称 Dickkopf homolog 4 基因)位于第 8 号染色体的 8p11.2-p11.1 区域。它编码一个 181 个氨基酸的蛋白质。DKK4 作为 Wnt 蛋白的抑制因子, 参与 Wnt 信号通路的转导, 进而调控细胞分化和凋亡等 (Mao et al, 2002)。最近, Proitsi et al (2008) 研究发现 DKK4 基因中的单核苷酸多态性位点 rs2073665 在中国人群中与精神分裂症显著相关。为了验证神经发育异常假说, 并进一步揭示 DKK4 的致病机理, 我们在 961 个中国健康人群中研究了 DKK4 与脑容量变化的相关性。

1 材料和方法

1.1 样本

在本次研究中, 我们一共收集了 961 个正常成年人的血液样本, 包括 442 个男性和 519 个女性。大部分的样本为汉族, 少数来自 14 个西南少数民族群体。所有的样本均从云南采集, 所有的个体均提供了知情同意书。我们同时收集了患者的相关信息, 比如脑容量、身高、体重和年龄等。这些样本年龄均为 19 岁到 28 岁。

1.2 基因分型

我们采集了每个志愿者的血样, 并用酚氯仿的方法抽提了基因组的 DNA。对于 SNP 位点的选择, 我们首先在 Hapmap 的数据库里分析了 DKK4 在中国人群中的连锁图, 发现所有的 SNP 位点高度连锁 (图 1)。因此, 我们选择了被报道过与精神分裂症相关的位点 rs2073665 作为我们的候选位点。通过 PCR(聚合酶链式反应)的方法扩增 rs2073665 的

DNA 片段。rs2073665 的正反引物分别是 5'-CTGCGAATGCTGTTCTTACCCTT-3'和 5'-CAACA GCTCTTGCCAATGACTTG-3', 反应条件为预变性 95°C 5 min, 变性 95°C 30 s, 退火 58°C 30 s, 延伸 72°C 30 s, 共 45 个循环, 延伸 72°C 10 min。基因分型采用的是 ABI (Applied Biosystems) 公司的 SNaPShot 的方法, 并在 3130 测序仪上完成。我们通过 GeneMapper 4.0 软件自动读取基因分型结果, 并人工检查校正。

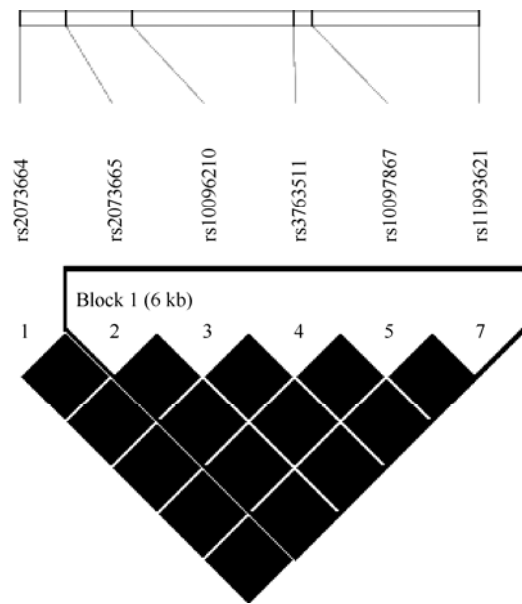


图 1 DKK4 基因在 HapMap 数据库中国北京人群(CHB)中的遗传连锁图

Fig. 1 The LD map of DKK4 in Han Chinese from Beijing (CHB), data obtained from Hapmap database

图中 SNP 的位置位于第 8 号染色体的 42231586 到 42239674 区域之间, 共有 7 个 SNP。其中 SNP6 在 CHB 中没有多态性, 其余 6 个 SNP 高度连锁。采用 D' 计算该区域 SNP 间的连锁关系。

All 7 SNPs are located between chromosome 8: 42231586–42232489, in which SNP6 shows no polymorphism in CHB and all the other 6 SNPs are in high linkage. The linkage disequilibrium (LD) was calculated using D' algorithm.

1.3 脑容量的测量

通过测量头颅体积的方法来间接测量脑容量, 分别测量 3 个主要的测量指标: 颅长(L, 从眉间点到枕骨隆突的距离); 颅宽(B, 顶骨宽, 两个顶节之间的距离); 颅高(H, 从内耳道到头颅最高点的距离)。头颅容积的计算采用由 Williamms et al (1995) 提出的公式: 男性, $0.337 (L-1.1)(B-1.1)(H-1.1) + 406.01$ mL; 女性, $0.400 (L-1.1)(B-1.1)(H-1.1) + 206.60$ mL。

表 1 SNP rs2073665 的特征及等位基因频率

Tab. 1 Characters and allele frequencies of SNP rs2073665

SNP	染色体位置 Chromosome location	等位基因 Alleles	低频等位基因 Minor allele	低频等位基因频率 Minor allele frequency (%)
rs2073665	chr8: 42232489	A/G	G	12.05

表 2 SNP rs2073665 与脑容量的相关性分析的 P 值Tab. 2 P values of the association tests of SNP rs2073665 with brain volume

SNP	加性模型 Additive model			显性模型 Dominant model
	总的样本 All	男性 Males	女性 Females	总的样本 All
rs2073665	0.02213	0.1584	0.1214	0.01461

表 3 SNPrs2073665 三种基因型(GG, GA, AA)个体的平均脑容量

Tab. 3 Average cranial volumes of individuals with three different genotypes (GG, GA, AA) at SNP rs2073665

SNP	基因型 Genotype	基因型 Genotype		
		GG	GA	AA
rs2073665	个体数目 Individual counts	14	202	745
	平均脑容量 Average cranial volumes (mL)	1 296	1 305	1 283
	标准差 Standard deviation (mL)	98.89	112.4	109

1.4 数据分析

哈迪温伯格平衡检验采用软件 PLINK (Purcell et al, 2007)完成。SNP 和脑容量的相关性分析采用 PLINK (Purcell et al, 2007)软件进行分析。在分析中,我们采用线性模型来分析每个 SNP 的加性效应,即分别将两种纯合的基因型赋值为 0 和 2,而将杂合的基因型赋值为 1,并统计基因型和脑容量的相关性。我们分别在 3 种遗传模型(加性模型、显性模型和隐性模型)下分析了 DKK4 与脑容量的相关性。

2 结果

2.1 SNP 特征及哈迪温伯格平衡检验

我们选取了 DKK4 基因在 Proitsi et al (2008)的研究中和精神分裂症显著相关的 SNP 位点(rs2073665)来检测它是否也和脑容量有关。rs2073665 位于 DKK4 基因的内含子中。rs2073665 的每个基因型的频率见表 1。经过检验,rs2073665 符合哈迪温伯格平衡。

2.2 相关性分析

我们用线性回归的方法检测 rs2073665 在加性模型下是否与脑容量相关。当用所有样本来统计时,rs2073665 与脑容量显著相关($P=0.02213$)(表 2),每种基因型个体对应的平均脑容量数据见表 3。为了检验这个 SNP 是否存在性别特异性的相关性,我们将男性样本和女性样本分别进行统计,分析发现单独的男性样本和女性样本都不和脑容量相关(表 2)。

为了进一步研究 rs2073665 与脑容量的相关性,我们也分别在显性模型和隐性模型下检测了它们

的相关程度。我们发现,在显性模型下,即携带 G 等位基因的基因型(GG 和 GA)个体对应的脑容量比基因型 AA 个体对应的脑容量大很多,相关程度已达到显著($P=0.01461$)(图 2)。在 Proitsi et al (2008)的研究中,报道了 rs2073665 的 A 等位基因为疾病易感基因,这与我们的研究结果是一致的,即易感基因型对应较小的脑容量,也证实了神经发育异常假说。

据报道,身高和体重是和脑容量紧密相关的(Ho et al, 1980),在我们所用的样本中,身高和体重也与脑容量紧密相关($P<0.001$),这和前人的结果是一致的。为了排除身高和体重的因素对 rs2073665 和脑容量的相关性影响,我们引入身高和体重作为协变量,分析发现,rs2073665 经过身高和体重矫正

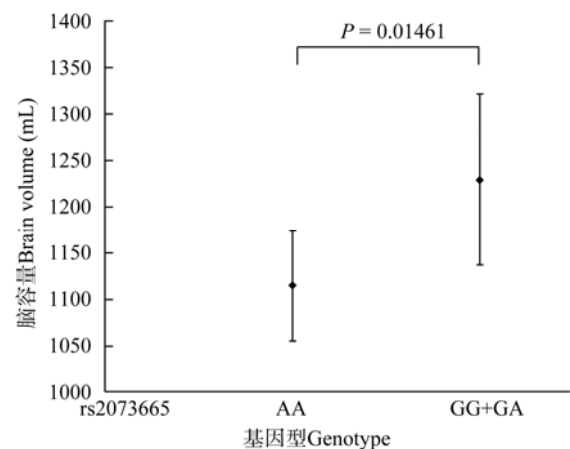


图 2 SNP rs2073665 在显性模型下与脑容量的相关性
Fig. 2 Association of SNP rs2073665 with brain volume under dominant genetic model

后仍与脑容量相关($P < 0.05$), 从而排除了由身高、体重带来检验误差的可能性。

3 讨论

本研究以 961 个中国人为样本, 研究了 DKK4 基因中与精神分裂症相关的关键 SNP 位点 rs2073665 与脑容量的相关性, 研究结果显示 DKK4 基因与脑容量存在显著的相关性, 这为精神分裂症易感基因同时也能影响脑容量的假说提供了证据。

越来越多的证据显示, 神经发育异常假说可能是精神分裂症的关键诱因, 其核心内容是早期的发育异常导致神经系统的发育紊乱, 包括脑容量减少和脑区连接的紊乱, 最终导致精神分裂症的发生。此外, 研究表明, 精神分裂症患者的智力、工作记忆、概念组织和语言加工等与正常人相比都发生了异常, 而脑容量已被证明与这些特征呈正相关, 这些结果表明脑容量减少可能也是精神分裂症患者的临床特征之一。目前, 大量的研究结果也证实了这个假说 (Rimol et al, 2010; Steen et al, 2006)。

参考文献:

- Cahn W, Hulshoff Pol HE, Lems EB, van Haren NE, Schnack HG, van der Linden JA, Schothorst PF, van Engeland H, Kahn RS. 2002. Brain volume changes in first-episode schizophrenia: A 1-year follow-up study [J]. *Arch Gen Psychiatry*, **59**(11): 1002-1010.
- Clevers H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease [J]. *Cell*, **127**(3): 469-480.
- Fuerer C, Nusse R, Ten Berge D. 2008. Wnt signalling in development and disease. Max Delbrück Center for Molecular Medicine meeting on Wnt signaling in Development and Disease [J]. *EMBO Rep*, **9**(2): 134-138.
- Ho BC, Andreasen NC, Dawson JD, Wassink TH. 2007. Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met gene polymorphism and progressive brain volume changes in schizophrenia [J]. *Am J Psychiatry*, **164**(12): 1890-1899.
- Ho BC, Wassink TH, O'Leary DS, Sheffield VC, Andreasen NC. 2005. Catechol-O-methyl transferase Val158Met gene polymorphism in schizophrenia: Working memory, frontal lobe MRI morphology and frontal cerebral blood flow [J]. *Mol Psychiatry*, **10**(3): 229, 287-298.
- Ho KC, Roessmann U, Straumfjord JV, Monroe G. 1980. Analysis of brain weight. II. Adult brain weight in relation to body height, weight, and surface area [J]. *Arch Pathol Lab Med*, **104**(12): 640-645.
- Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE. 2005. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: A meta-analysis of voxel-based morphometry studies [J]. *Am J Psychiatry*, **162**(12): 2233-2245.
- Jablensky A, Sartorius N, Korten A, Ernberg G, Anker M, Cooper JE, Day R. 1987. Incidence worldwide of schizophrenia [J]. *Br J Psychiatry*, **151**: 408-409.
- Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J. 2007. Molecular mechanisms of schizophrenia [J]. *Cell Physiol Biochem*, **20**(6): 687-702.
- Lawrie SM, Abukmeil SS. 1998. Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies [J]. *Br J Psychiatry*, **172**: 110-120.
- Logan CY, Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and

DKK4 是 Wnt 信号通路的抑制因子, 它通过与 Wnt 蛋白的膜受体 LRP6 结合从而抑制 Wnt 蛋白与 LRP6 的结合, 影响 Wnt 信号通路, 最终导致 Wnt 信号通路下游的基因表达变化, 调控细胞的正常生理功能, 如细胞的分化、增殖、迁移和凋亡等。大量的证据表明 Wnt 信号通路参与神经系统的发育 (Clevers, 2006; Fuerer et al, 2008; Logan & Nusse, 2004), 信号通路中的关键基因异常都可能会导致神经系统发育异常, 进而导致疾病的发生 (Proitsi et al, 2008; Yang et al, 2003)。

总之, 我们的结果证实了精神分裂症易感基因 DKK4 在中国人脑中与脑容量存在显著的相关性, 这为精神分裂症的神经发育异常假说提供了强有力的证据。

致谢: 感谢为本研究开展提供 DNA 样本的志愿者。感谢中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验的张慧和李燕皎在实验方面的技术支持。本实验结果分析过程中得到马杰、何灵江等的帮助, 在此一并致谢。

- disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**: 781-810.
- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Nature*, **417**(6889): 664-667.
- Proitsi P, Li T, Hamilton G, Di Forti M, Collier D, Killick R, Chen R, Sham P, Murray R, Powell J, Lovestone S. 2008. Positional pathway screen of wnt signaling genes in schizophrenia: association with DKK4 [J]. *Biol Psychiatry*, **63**(1): 13-16.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. 2007. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses [J]. *Am J Hum Genet*, **81**(3): 559-575.
- Rimol LM, Hartberg CB, Nesvåg R, Fennema-Notestine C, Hagler DJ Jr, Pung CJ, Jennings RG, Haukvik UK, Lange E, Nakstad PH, Melle I, Andreasen OA, Dale AM, Agartz I. 2010. Cortical thickness and subcortical volumes in schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Biol Psychiatry*, **68**(1): 41-50.
- Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA. 2006. Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies [J]. *Br J Psychiatry*, **188**: 510-518.
- Velakoulis D, Pantelis C, McGorry PD, Dudgeon P, Brewer W, Cook M, Desmond P, Bridle N, Tierney P, Murrin V, Singh B, Copolov D. 1999. Hippocampal volume in first-episode psychoses and chronic schizophrenia: a high-resolution magnetic resonance imaging study [J]. *Arch Gen Psychiatry*, **56**(2): 133-141.
- Yang J, Si T, Ling Y, Ruan Y, Han Y, Wang X, Zhang H, Kong Q, Li X, Liu C, Zhang D, Zhou M, Yu Y, Liu S, Shu L, Ma D, Wei J, Zhang D. 2003. Association study of the human FZD3 locus with schizophrenia [J]. *Biol Psychiatry*, **54**(11): 1298-1301.