

脑源性神经营养因子基因多态性与注意缺陷多动障碍的关联性研究

曹银利 唐成和 李树军 常 晓 崔勤涛

(新乡医学院第一附属医院小儿内科 河南 新乡 453101)

摘要 目的:探讨脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) G196A、C270T 及 Val66Met 3 个单核苷酸多态性(SNP)位点与注意缺陷多动障碍(ADHD)的关系。方法:选取无亲缘关系的 ADHD 患者共 114 例,健康对照共 96 例。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 G196A、C270T 和 Val66Met 3 个多态性位点的多态性,采用 HaploView4.0 及 SPSS13.0 软件进行连锁不平衡分析并比较两组基因型分布和等位基因频率。结果:BDNF 三个多态性位点基因型及等位基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg 定律。ADHD 组 G196A 和 C270T 多态性位点分布与正常对照组比较差异无统计学意义,而 BDNF 基因 Val66Met 位点的基因型及等位基因频率分布在 ADHD 组与对照组存在显著性差异 ($p<0.05$),ADHD 组 Val66Met 位点的等位基因 G (Val) 频率显著高于正常对照组。结论:BDNF 基因 Val66Met 多态性可能与 ADHD 发病有关,携带有 Val66Met 多态性位点 G 等位基因的个体可能更容易产生 ADHD。

关键词:脑源性神经营养因子;注意缺陷多动障碍;关联

中图分类号:R748 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-317-03

Association between Gene Polymorphism of Brain-derived Neurotrophic Factor and Attention Deficit Hyperactivity Disorder

CAO Yin-li, TANG Cheng-he, LI Shu-jun, CHANG Xiao, CUI Qin-tao

(First affiliated hospital of Xingxiang medical college, department of Pediatric Medicine Henan, Xinxiang 453101)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the G196A, C270T and Val66Met polymorphisms of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Methods:** Genomic DNA was isolated from the venous blood leukocytes of 114 unrelated patients with ADHD based on DSM-IV criteria and 96 healthy unrelated individuals (control group). Polymorphism of G196A, C270T and Val66Met, were genotyped by PCR-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP). The software HaploView4.0 and SPSS13.0 was used to detect the linkage disequilibrium, Genotype and allele frequencies of the SNPs of BDNF gene in the ADHD and control group. **Results:** The genotypic distributions of these 3 SNPs did not deviate significantly from Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.05$). There were significant differences in both allele and genotype frequencies of Val66Met between the ADHD and control group ($p<0.05$). The allele G of Val66Met was significantly higher than that of controls ($\chi^2=9.714$, $p=0.002$, $OR=0.522$, $95\%CI=0.347\sim0.788$). No significant differences in both allele and genotype frequencies of G196A and C270T was found between the ADHD and control group ($p>0.05$). **Conclusion:** There was relationship between Val66Met polymorphism and ADHD. The individuals with G (Val) allele of Val66Met were susceptible to ADHD.

Key words: Brain-derived neurotrophic factor; Attention deficit hyperactivity disorder; Association

Chinese Library Classification: R748 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)02-317-03

前言

注意缺陷多动障碍 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 是一种神经发育障碍性疾病,影响大约 3%~5% 的学龄儿童,尤以男性多见^[1,2]。它以注意力分散、活动过度和冲动行为为核心症状,显著影响儿童的社会能力、教育状况以及心理健康。对于基于家系、双胞胎以及寄养子的遗传分析研究表明遗传因素对于 ADHD 的发病起到了重要作用^[3,4]。近来的关联研究表明多巴胺、儿茶酚胺、5-羟色胺以及谷氨酸系统多个基因参与了 ADHD 的发病过程,但这些致病基因并不能完全解释

ADHD 具有的全部特征,提示应该有更多的基因参与了 ADHD 的发生发展^[5]。

由于 ADHD 与神经发育密切相关,作为对神经元生长、分化和发育起到关键作用的神经生长因子家族的脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 可能参与了该病的发病过程^[6]。有证据表明 BDNF 参与了大脑发育过程中多巴胺能神经元的生存和分化以及谷氨酸能神经元的可塑性,这些大脑发育过程中的异常在 ADHD 的病因中发挥着一定的作用^[4,7]。中枢神经系统 5-羟色胺活动减少是引发冲动行为的重要因素,而动物实验表明内源性 BDNF 是具有正常发育和功能中枢 5-羟色胺能神经元的关键调控因子,也是冲动行为控制的间接调节节点^[8,9]。

基于上述原因,为了开展 BDNF 基因与中国人 ADHD 的相关性研究,我们通过采用聚合酶链反应-限制性片段长度

作者简介:曹银利(1979-),女,住院医师,主要研究方向:小儿注意缺陷多动障碍机制,

电话:13782510905, E-mail: cyl3000@yahoo.com.cn

(收稿日期:2010-09-01 接受日期:2010-09-24)

多态性(PCR-Polymorphism Restriction Fragment, PCR-RFLP)技术检测 G196A, C270T 和 Val66Met 3 个多态性位点的基因型,将 114 例 ADHD 和 96 例健康儿童,用病例-对照研究方法对 BDNF 基因的这 3 个 SNP 位点的基因型及等位基因与 ADHD 的相关性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验对象

114 例 ADHD 患者来自 2006~2010 年到新乡医学院第一附属医院小儿内科就诊的门诊患者,汉族,其中男性 86 例(75.44%),女性 28 例(24.56%),年龄 6~16 岁,平均(8.4±2.9)岁,符合美国精神障碍诊断与统计手册第 4 版(DSM-IV)制定的 ADHD 诊断标准,韦氏儿童智力测验 IQ≥70,经系统检查未见明显异常并排除常见儿童神经精神疾病及其他严重器质性疾病。同时收集 96 例汉族,智力正常,经检查无躯体精神疾病的 6~16 岁儿童,平均年龄(8.8±3.5)岁,其中男 62 例(64.58%),女 34 例(35.42%),作为对照组。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 基因分型 采用 EDTA 抗凝真空采血管收集外周血 5mL,采用北京天根公司基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,-20℃ 储存备用。PCR 扩增采用 25μl 反应体系,含 300~1000ng 基因组 DNA,1×PCR 缓冲液,15mmol/L MgCl₂,5μmol/L 引物,1.5U Tag 酶。BDNF 基因多态性位点的引物设计参考文献^[14,15]。G196A 引物为上游:5'-ACT CTG GAG AGC GTG AAT-3',下游 5'-ATA CTG TCA CAC ACG CTC-3'。PCR 扩增循环参数如下:95℃预变性 5min,95℃变性 30s,60℃退火 30s,72℃延伸 30s,30 个循环,72℃总延伸 15min,4℃保存。10μl PCR 反应产物用 10U NlaIII 限制性内切酶 37℃过夜消化;C270T 引物为上游:5'-CAG AGG AGC CAG CCC GGT GCG-3',下游 5'-CTC CTG CAC CAAGCC CCA TTC-3'。PCR 扩增循环参数如下:95℃预变性 5min,95℃变性 30s,64℃退火 30s,72℃延伸 30s,30 个循环,72℃总延伸 15min,4℃保存。10μl PCR 反应产物用 10U HinfI 限制性内切酶 37℃过夜消化;Val66Met 引物为上游:5'-ATC CGA GGA CAA GGT GGC-3',下游:5'-CCT CAT GGA CAT GTT TGC AG-3'。PCR 扩增循环参数如下:95℃预变性 5min,95℃变性 30s,60℃退火 30s,72℃延伸 30s,30 个循环,72℃总延伸 15min,4℃保存。10μl PCR 反应产物用 10U PmlI 限制性内切酶 37℃过夜消化。PCR 及酶切产物用 2~4%琼脂糖凝胶电泳,经 BIO-RAD 凝胶成像仪系统处理后进行基因分型判读。

1.2.2 统计学分析 采用 HaploView4.0 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,计算病例组和对对照组间基因型频率和等位基因频率。采用 SPSS13.0 软件进行 χ^2 检验,统计分析等位基因及基因型频率分布差异, $p<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 PCR 检验结果

BDNF 基因 G196A 位点扩增产物为单一的 308 bp 条带,NlaIII 酶切后等位基因片段结果如下:GG 型为 243 bp,59 bp,6 bp;AG 型为 243 bp,168 bp,75 bp,59 bp,6 bp;AA 型为 168

bp,75 bp,59 bp,6 bp。BDNF 基因 C270T 位点扩增产物为单一的 223 bp 条带,HinfI 酶切后等位基因片段结果如下:CC 型为 127 bp,78 bp 和 18 bp;CT 型为 127 bp,78 bp,65 bp,18 bp 和 15 bp;TT 型为 127 bp,65 bp,18 bp 和 15 bp。BDNF 基因 Val66Met 位点扩增产物为单一的 300 bp 条带,PmlI 酶切后等位基因片段结果如下:GG 型为 180 bp 和 120 bp;AG 型为 300 bp,180 bp 和 120 bp;AA 型为 300 bp。

2.2 ADHD 组及正常对照组 BDNF 基因 3 个 SNP 位点基因型及等位基因频率分布

BDNF 基因 G196A、C270T 和 Val66Met 3 个 SNP 多态性位点的基因型及等位基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。这些多态性位点的基因型、等位基因频率在 ADHD 组和对对照组中的分布及统计结果见表 1。

BDNF 基因 Val66Met 位点的基因型及等位基因频率分布在 ADHD 组与正常对照组存在显著性差异($p<0.05$),而 ADHD 组的 Val66Met 位点的等位基因 G 频率显著高于正常对照组($\chi^2=9.714$, $p=0.002$, $OR=0.522$, $95\%CI=0.347\sim0.788$)。G196A 和 C270T 位点的基因型及等位基因频率分布在两组之间并没有显著性差异($p>0.05$)。这些结果提示,BDNF 基因 Val66Met 位点多态性可能与 ADHD 的发病有关,携带有 Val66Met 多态性位点 G (Val) 等位基因的个体可能更容易产生 ADHD,而 G196A 和 C270T 位点可能与 ADHD 的发生发展没有明显的关联性。

3 讨论

ADHD 是一个复杂的多基因遗传病^[3]。在该病的发病过程中,遗传因素占很大的比重,目前已发现有多多个 ADHD 易感基因,包括多巴胺系统、谷氨酸系统、儿茶酚胺系统以及 5-羟色胺系统中的多个基因^[10-13]。但是目前已发现的这些易感基因都无法解释 ADHD 的所有特征。有研究表明,在发育过程中的大脑中,神经营养因子家族的 BDNF 对多巴胺能神经元的存活和分化非常关键,由于阻滞多巴胺能神经传递对于 ADHD 产生明显的治疗效果,所以 BDNF 可能在 ADHD 的发病过程中起到十分关键的作用^[5,7]。本研究选取 BDNF 基因 G196A、C270T 和 Val66Met 等 3 个 SNP 位点研究 BDNF 基因多态性与儿童 ADHD 的关联性,结果发现 Val66Met 位点和 ADHD 可能存在关联,而 G196A 和 C270T 与 ADHD 的发病没有明显关系。这些发现在国内属首次报道。

本研究结果显示,BDNF 三个 SNP 位点 Hardy-Weinberg 平衡检验差异无显著性,表明入组的 ADHD 患者和健康对照儿童具备群体代表性。Val66Met 是位于 BDNF 基因 66 号编码区的一个功能多态性位点(G/A),可使缬氨酸(valine)转变为甲硫氨酸(methionine)。本研究发现,BDNF 基因 Val66Met 位点的基因型及等位基因频率分布在 ADHD 组与对照组存在显著性差异($p<0.05$),该位点多态性的基因型和等位基因频率分布可能与 ADHD 的发生发展相关,ADHD 组 Val66Met 位点的等位基因 G 频率显著高于正常对照组($p=0.002$, $OR=0.522$),提示等位基因 G 有可能是 ADHD 发病的危险因子,携带有 Val66Met 多态性位点 G 等位基因的个体可能在儿童时期更易患有 ADHD。以往有家系研究发现 BDNF 基因 Val66Met 位点 G 等位

基因存在的父系偏移传递,并与 ADHD 的发病具有很强的关联性^[14]。而本研究结果进一步提示至少在中国汉族人群中,Val66Met 位点的 G 等位基因以及 GG 基因型可能增加儿童罹患 ADHD 的危险性,考虑到不同地域群体的基因频率分布普遍存在差异以及 ADHD 的临床异质性,采用更大样本量以及

不同群体对该位点与 ADHD 的关系进行进一步的验证很有必要。另外,ADHD 的发病存在明显的性别差异,男性患病率显著高于女性^[15],但由于本次研究群体中女性样本较少,无法按性别将该阳性位点的等位基因进行分层研究,这也是未来研究中需着力解决的问题。

表 1 BDNF 基因 3 个 SNPs 基因型及等位基因频率在 ADHD 及对照组的分布

Table1 Genotype and allele frequencies of G196A, C270T and Val66Met of the BDNF gene in ADHD and control group

position	genotyping	control(n,%)	ADHD(n,%)
G196A genotype	AA	26(27.54)	29(25.07)
	AG	47(48.84)	59(51.37)
	GG	23(23.62)	26(23.56)
	χ^2, p	0.164, 0.921	
G196A allele	A	99(51.56)	117(51.32)
	G	93(48.44)	111(48.68)
	χ^2, p, OR, CI	0.003, 0.960, 1.010, 0.688~1.483	
C270T genotype	CC	86(89.65)	104(91.21)
	CT	2(2.21)	5(4.17)
	TT	8(8.14)	5(4.62)
	χ^2, p	2.156, 0.340	
C270T allele	C	174(90.63)	213(93.42)
	T	18(9.38)	15(6.58)
	χ^2, p, OR, CI	1.126, 0.289, 0.681, 0.333~1.390	
Val66Met genotype	ValVal	38(39.58)	65(57.02)
	ValMet	37(38.54)	37(32.46)
	MetMet	21(21.88)	12(10.53)
	χ^2, p	8.048, 0.018	
Val66Met allele	Val	113(58.85)	167(73.25)
	Met	79(41.15)	61(26.75)
	χ^2, p, OR, CI	9.714, 0.002, 0.522, 0.347~0.788	

G196A 是位于 BDNF 编码区, C270T 是位于 BDNF 内含子区的 SNP 多态性位点。有证据发现这两个位点与某些认知功能障碍相关疾病例如 Alzheimer 病存在一定的关联性^[15]。不过这些位点与 ADHD 的相关性的研究在学界尚未展开。我们的研究表明, G196A 以及 C270C 位点的基因型和等位基因频率在 ADHD 组和健康对照组之间均不存在显著性差异, 这说明, 至少在中国汉族群体中, BDNF 基因 G196A 和 C270T 单个位点的多态性与 ADHD 可能不存在明显关联关系。不过要得到明确的结论, 仍需在不同人种、地区及人群中进行进一步研究证实。由于 ADHD 具有临床异质性, 所以针对不同症状进行分层研究也是很有必要的, 不能排除这些位点只与 ADHD 其中的某些症状, 例如冲动行为或是注意力易分散, 存在一定关联的可能性。

我们的研究与以往的研究共同表明: BDNF 基因在 ADHD 的发生过程中发挥一定的作用, 特别是 Val66Met 位点与 ADHD 发生存在明显相关。不过 BDNF 基因 Val66Met 的多态性

位点是如何影响 BDNF 蛋白的表达并引发 ADHD 和 ADHD 相应的注意力易分散、活动过度以及冲动行为等核心症状, 有待于更深入的机制研究。我们的研究结果为后续研究作出了重要的提示。需要指出的是, BDNF 基因多态性位点与 ADHD 的研究仍处于起步阶段, 尚需更大的样本量以及其他地域和民族的基础数据, 这些多态性位点以及它们构成的单倍型与 ADHD 关系在不同人群和地区仍需进一步研究验证, 同时针对不同性别和症状的分层研究也是阐明 ADHD 遗传特征的重要手段。

参考文献(References)

- [1] Swanson JM, Sergeant JA, Taylor E, et al. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder[J]. Lancet, 1998, 351(9100): 429-433
- [2] Fair DA, Posner J, Nagel BJ, et al. Atypical Default Network Connectivity in Youth with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder[J]. Biol Psychiatry, 2010, doi:10.1016/j.biopsych.2010.07.003, in press

(下转第 299 页)

- Xiao JP. Clinical analysis of serum IL-6, MMP-9 on edaravone on acute cerebral hemorrhage[J]. Clinical Research, 2010, 17(17): 29-31
- [6] Suda S, Igarashi H, Arai Y, et al. Effect of edaravone, a free radical scavenger, on ischemic cerebral edema assessed by magnetic resonance imaging[J]. Neurol Med Chir, 2007, 47(5): 197-201
- [7] Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat [J]. Neurology, 1997, 48: 921-926
- [8] 刘宗超, 饶明俐, 张淑琴. 实验性脑出血后脑水肿的动态变化及其与 MMP-9 的关系[J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(4): 416-418
Liu ZC. Dynamic change of brain edema and expression of MMP-9 and the possible relationship between them after experimental ICH in rats [J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2007, 24(4): 416-418
- [9] Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, et al. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress associated blood brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(12): 1393-1400
- [10] Lee JG, Lee SH, Park DW, et al. Phosphatidic acid as a regulator of matrix metalloproteinase-9 expression via the TNF- α signaling pathway[J]. FEBS Letters, 2007, 581(4): 787-793
- [11] Edaravone acute infarction study group. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters [J]. Cerebrovasc Dis, 2003, 15(3): 222-229
- [12] Noor J I, Ikeda T, Ueda Y, et al. A free radical scavenger, edaravone, inhibits lipid peroxidation and the production of nitric oxide in hypoxic ischemic brain damage of neonatal rats [J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 193(5): 1703-1708
- [13] Alvarez-Sabin J, Delgado P, Abilleira S, et al. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome [J]. Stroke, 2004, 35: 1316-1322
- [14] Tejima E, Zhao BQ, Tsuji K, et al. Astrocytic induction of matrix metalloproteinase-9 and edema in brain hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(3): 460-468.
- (上接第 319 页)
- [3] Thapar A, Holmes J, Poulton K, et al. Genetic basis of attention deficit and hyperactivity[J]. Br J Psychiatry, 1999, 174: 105-111
- [4] Faraone SV, Biederman J. Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder[J]. Biol Psychiatry, 1998, 44(10): 951-958
- [5] Kent L. Recent advances in the genetics of attention deficit hyperactivity disorder[J]. Curr Psychiatry Rep, 2004, 6(2): 143-148
- [6] Tsai SJ. Attention-deficit hyperactivity disorder and brain-derived neurotrophic factor: a speculative hypothesis [J]. Med Hypotheses, 2003, 60(6): 849-851
- [7] Hyman C, Hofer M, Barde YA, et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra [J]. Nature, 1991, 350(6315): 230-232
- [8] Lucki I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin [J]. Biol Psychiatry, 1998, 44(3): 151-162
- [9] Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, et al. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(26): 15239-15244
- [10] Li D, Sham PC, Owen MJ, et al. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) [J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(14): 2276-2284
- [11] Lehigh M, Kellaway L, Russell VA. NMDA receptor function in the prefrontal cortex of a rat model for attention-deficit hyperactivity disorder[J]. Metab Brain Dis, 2004, 19(1-2): 35-42
- [12] Kent L, Doerry U, Hardy E, et al. Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis [J]. Mol Psychiatry, 2002, 7(8): 908-912
- [13] Quist JF, Barr CL, Schachar R, et al. The serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder [J]. Mol Psychiatry, 2003, 8(1): 98-102
- [14] Kent L, Green E, Hawi Z, et al. Association of the paternally transmitted copy of common Valine allele of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with susceptibility to ADHD[J]. Mol Psychiatry, 2005, 10(10): 939-943
- [15] 钱云, 张志珺, 袁勇贵, 等. 脑源性神经营养因子基因单体型与散发性 Alzheimer 病的关系[J]. 临床神经病学杂志, 2009, 22(1): 4-7
Qian Yun, Zhang Zhi-jun, Yuan Yuan-gui, et al. Relationship between haplotypes of brain-derived neurotrophic factor gene and sporadic Alzheimer's disease[J]. J Clin Neurol, 2009, 22(1): 4-7