临床研究 文章编号:0253-3626(2011)04-0470-04

cAMP反应元件结合蛋白基因与抑郁症及自杀行为的关联研究

王 我,艾 明,李大奇,况 利,楼丹丹,陈建梅
(重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 cAMP 反应元件结合蛋白(Cyclic adenosine monophosphate response element binding protein,CREB)基因多态性与抑郁症及自杀行为的相关性。方法:运用聚合酶链反应(Polymerase chain reaction,PCR)及限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism,RFLP)的方法检测 50 例抑郁症患者(患者组)和 50 名健康对照者(对照组)的 CREB 基因上单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism,SNP)rs10932201、rs6740584、-835 C→A 的等位基因和基因型分布情况,确定其与抑郁症及自杀行为是否相关。结果:3 个 SNP 位点符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡度检验。rs10932201 和rs6740584 位点的基因型和等位基因在抑郁患者和正常对照组中差异无统计学意义。-835 C→A 位点在病人组和对照组之间差异无统计学意义;但将病人分层后,其 C/A 基因型在有自杀行为的抑郁患者组和对照组中差异有统计学意义(χ^2=5.140 9,P=0.023 4)。结论:汉族人群中 CREB 基因启动子区域 -835C→A 多态性可能与有自杀行为的抑郁症存在相关性。

【关键词】cAMP 反应元件结合蛋白;抑郁症;自杀;基因多态性;聚合酶链反应
【中国图书分类法分类号】R749.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-14

Association between polymorphism of cAMP response element binding protein gene promoter region and major depressive disorder and suicide

WANG Wo, et al
(*Center of Mental Health, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the association between polymorphism of the cAMP-responsive element binding protein (CREB) gene promoter region, major depressive disorder and suicidal behaviors. *Methods*: The allele and genotype distribution of CREB gene SNP rs10932201, rs6740584, -835 C→A were detected in 50 depression patients and 50 healthy control subjects by using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP), so as to determine the association between CREB and depression. *Results*: The gene polymorphism at rs10932201, rs6740584, and -835 C→A were indefinite. However, the significant difference in C/A genotype distribution at -835 C→A was found between the depressive patients with suicidal behavior and control group (χ^2=5.140 9, P=0.023 4). *Conclusion*: The findings support that the gene polymorphism of -835C→A at CREB gene promoter region in Han nationality is associated with depressive patients who have suicidal behavior.

【Key words】cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein; depression; suicide; gene polymorphism; polymerase chain reaction (PCR)

抑郁症是最常见的精神疾病之一,其发病机制复杂。近年兴起的神经可塑性假说认为,抑郁症发生机制除了受到受体和受体前水平影响外,还可能与突触可塑性相关的受体后信号传导、基因转录调控及下游靶基因表达水平的改变密切相关。转录因子环磷腺苷反应元件结合蛋白(Cyclic adenosine monophosphate response element binding protein,CREB)是 DNA 活性转录因子家庭中的成员,是与抑郁症相关的信号通路中的一个交汇点,对胞内的生化过程有着重要的影响[1],包括 cAMP 通路、Ca^{2+}-CaMK 通路、PI3 激酶/Akt 通路、应激状态诱导的 P38MAPK 通路以及磷酸酶反向调节通路等在内的多种信号传导通路。这些通路发挥功能作用均涉及 CREB 蛋白的磷酸化及其下游信号通路的活化[2]。CREB 被认为是神经元总的存活程序的可能调节物,所以编码 CREB 的基因多态性与抑郁症的相关性非常重要。在以往的文献报道中,对 CREB 与抑郁症以及其他精神疾病的相关性研究较多,结论很不一致。此外,自伤自杀行为是严重抑郁症的重要临床表现之一,给患者及家庭带来非常大的痛苦,也成为近年来日益严重的社会公共卫生问题。而在以往关于 CREB 的研究中,对于自杀

作者介绍:王 我(1978-),男,硕士,住院医师,研究方向:抑郁症及自杀的病因学。
通信作者:况 利,女,教授,Email:Kuangli0308@163.com。
基金项目:重庆市卫生局资助项目(编号:06-2-180)。

自伤行为几乎没有将单列出来进行研究。基于以上原因，我们选取前期报道中与抑郁症可能相关的 CREB 基因的第 3 内含子内的 2 个 SNP 位点（rs10932201、rs6740584）及处于启动子区域的 -835 C→A 多态性进行研究，并将自杀自伤行为进行单列分析，尝试寻找 CREB 与严重抑郁患者的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

来自重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心门诊及住院部的的抑郁症患者。入组标准：①符合 CCMD-3 抑郁发作诊断标准；②年龄 19~50 岁；③中国汉族；④汉密尔顿抑郁量表（Hamilton' s depression scale，HMAD）17 项评分测评总分≥18。排除标准：①有严重躯体疾病或脑器质性疾病；②伴发于其他精神障碍的抑郁状态；③物质滥用或依赖者；④有双相情感障碍家族史者。共 50 例。由高年资精神科医师复核诊断，所有患者均知情同意。

根据有无自伤自杀行为，将入组的研究对象进一步分为有自杀行为组 27 人和无自杀行为组 23 人。入选自杀行为组标准为：以患者客观行为为标准，只要出现自伤或者自杀行为均可入组。

正常对照组同期在我院门诊体检人员中随机抽取获得，共50例。入组标准：①年龄19~50岁；②中国汉族；③HMAD17 项评分测评总分 <5 分；④无严重躯体疾病或脑器质性疾病；⑤无精神疾病及病史；⑥无物质滥用或依赖者；⑦家族中无精神疾病患者；⑧与患者无血缘关系；⑨本人知情同意 。

研究组和对照组在性别和年龄等人口学资料上的差异均无统计学意义（$P>0.05$）。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血 DNA 采集 采集肘静脉血 5 ml，2%乙二胺四乙酸（Ethylene diamine tetracetic acid，EDTA）抗凝剂抗凝，常规酚-氯仿法抽提基因组 DNA。

1.2.2 聚合酶链反应（Polymerase chain reaction，PCR）及基因多态性检测 选取检测位点：①通过查询 NCBI 网站（http://www.ncbi.nlm.nih.gov），查到 CREB 中等位基因频率 > 0.30的 SNP（rs10932201、rs6740584），且该位点在中国人群中已有研究。②在以往文献中与抑郁症可能相关的该基因启动子区域的 -835 C→A。生物公司设计合成相关 SNPs 多态性 PCR 引物。PCR 反应及酶切条件见表 1。PCR 反应体系共50 μl，含有 50 ~ 100 ng 基因组 DNA，10 pmol 引物，1 U TaKaRa Ex Taq 酶，10 × Ex Taq Buffer（Mg^{2+}-Free）缓冲液，2.5 mmol/L dNTPs，1.5 mmol/L Mg^{2+}。PCR 反应条件：94℃ 4 min 预变性，继以94℃ 变性 30 s，退火温度 30 s，72℃延伸 1 min，共 35 个循环；72℃ 再延伸 8 min。将 PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶中电泳分离，通过凝胶成像系统确定扩增结果。

1.2.3 限制性内切酶酶切 反应体系 20 μl，其中 PCR 产物 8 μl；10 × Buffer 缓冲液 3.5 μl，0.1%TritonX-100 0.5 μl，限制性核酸内切酶 3.5 μl（所选用的限制性核酸内切酶见表 1，内切酶用量根据酶最小活性单位确定），无菌双蒸水 4.5 μl。37℃ 恒温箱中闭盖水浴过夜酶切，产物于 3%琼脂糖凝胶中电泳分离，通过凝胶成像系统确定扩增结果。

1.3 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件进行数据分析。使用 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验验证研究对象是否来自遗传平衡群体；基因频率用基因型计数法计算，组间基因型与等位基因频率比较用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 H-W 平衡检验

rs10932201（$\chi^2=3.664$）、rs6740584（$\chi^2=4.118$）、-835C→A（$\chi^2=0.536$）多态性在抑郁组和对照组均符合 H-W 平衡（$P>0.05$），即来自遗传平衡群体。

2.2 基因型和等位基因频率比较结果

rs10932201、rs6740584 多态的基因型和等位基因在抑郁组与对照组之间均差异无统计学意义（见表 2）。CREB 基因功能区上游 -835 C→A 多态的 C/C、C/A、A/A，3 种基因型和 C、A，2 种等位基因在抑郁组与对照组之间差异无统计学意义。将抑郁组进一步分为有自杀组和无自杀组分析：与正常对照组相比，-835 C→A 多态的 C/A 基因型在有自杀组中显著增高（$\chi^2=5.1409$，$P=0.0234$）；rs10932201、rs6740584 的各基因型和 -835 C→A 的其余基因型差异无统计学意义（$P>0.05$）。-835 C→A 多态性的基因型频率和等位基因频率在 2 组中的分布（见表 3、图 1）。有无自杀行为患者及对照组的 -835 C→A 基因型及等位基因频率分布（见表 4）。

表 1 SNP 的 PCR 反应条件及酶切条件

SNPs	位置	引物	内切酶	酶切片段
rs10932201	第 3 内含子	正向：5' -TACCTCCCCAGCCCTTAG-3'	*Hinf* Ⅰ	GG：278 bp；AA：220 bp+58 bp；
		反向：5' -GGAAGCAGTCCAATAGAACA-3'		AG：278 bp+220 bp+58 bp
rs6740584	第 3 内含子	正向：5' -GAGGTTGAGTCTGGAGGAT-3'	*Ssp* Ⅰ	CC：309 bp；TT：221 bp+88 bp；
		反向：5' -TATTGGAAAGGTGGAGGAC-3'		TC：309 bp+221 bp+88 bp
-835C→A	启动子区	正向：5' -AGCAAACAAGATAATGACCG-3'	*SgrB* Ⅰ	AA：516 bp；CC：410 bp+106 bp；
		反向：5' -AGGGCGACCCGAGAAG-3'		CA：516 bp+410 bp+106 bp

表 2　抑郁组与对照组的 rs10932201 和 rs6740584 基因型及等位基因频率

	组别	例数	基因型			等位基因	
			G/G	G/A	A/A	G	A
rs10932201	抑郁组	50	8（16.0%）	20（40.0%）	22（44.0%）	36（36.0%）	64（64.0%）
	对照组	50	10（20.0%）	17（34.0%）	23（46.0%）	37（37.0%）	63（63.0%）
	χ^2		0.271	0.386	0.040	0.022	
	P		0.603	0.534	0.841	0.883	
	组别	例数	基因型			等位基因	
			C/C	C/T	T/T	C	T
rs6740584	抑郁组	50	21（42.0%）	18（36.0%）	11（22.0%）	60（60.0%）	40（40.0%）
	对照组	50	25（50.0%）	16（32.0%）	9（18.0%）	66（63.0%）	34（37.0%）
	χ^2		0.644	0.178	0.250	0.772	
	P		0.422	0.673	0.617	0.380	

表 3　抑郁组与对照组的 −835 C→A 基因型及等位基因频率

组别	例数	基因型			等位基因	
		C/C	C/A	A/A	C	A
抑郁组	50	18（36.0%）	26（52.0%）	6（12.0%）	62（62.0%）	38（38.0%）
对照组	50	25（50.0%）	18（36.0%）	7（14.0%）	68（68.0%）	32（32.0%）
χ^2		1.999 2	2.597 4	0.088 4	0.791 2	
P		0.157 4	0.107 0	0.766 2	0.373 7	

表 4　有无自杀行为患者及对照组的 −835 C→A 基因型及等位基因频率比较

	抑郁组		对照组	χ_1^2	P_1	χ_2^2	P_2	χ_3^2	P_3
	有自杀组	无自杀组							
C/C	8（29.6%）	10（43.5%）	25（50.6%）	1.033 8	0.309 3	2.970 7	0.084 8	0.268 5	0.604 4
C/A	17（63.0%）	9（39.1%）	18（36.0%）	2.826 3	0.092 7	5.140 9	0.023 4*	0.066 2	0.796 9
A/A	2（7.4%）	4（17.4%）	7（14.0%）	Fisher	0.394 6	Fisher	0.481 4	Fisher	0.732 8
C	33（61.1%）	29（63.0%）	68（68.0%）	0.039 4	0.842 7	0.737 3	0.390 5	0.347 1	0.555 7
A	21（38.9%）	17（37.0%）	32（32.0%）						

注：P_1：有自杀组 − 无自杀组；P_2：有自杀组 − 对照组；P_3：无自杀组 − 对照组；*P_2<0.05

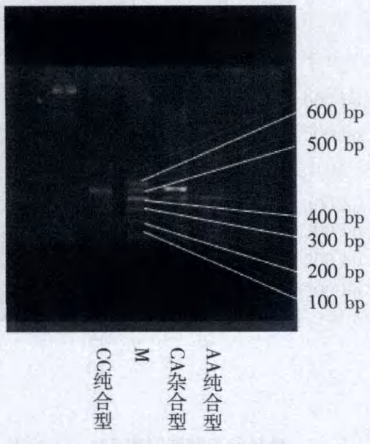


图 1　*SgrB* Ⅰ酶切产物电泳结果

3　讨　论

近年研究发现，抑郁症患者功能相关受体的结构和分子水平上可能存在神经可塑性的改变。抗抑郁治疗主要是通过调控受体后的信号转导及基因表达来逆转这些改变。由此产生了抑郁症的神经可塑性的假说。转录因子 CREB 是该假说的核心蛋白之一[3]。CREB 蛋白可调节多种神经功能，包括神经兴奋性、发育和突触可塑性等。通过对相关基因的转录进行调节，从而调控多种细胞因子的表达，包括对这些细胞因子转录启动的影响、细胞因子的内分泌以及对应激的行为反应。多项研究表明，CREB 蛋白在抑郁症发病过程中以及抗抑郁药发挥疗效的过程发挥着重要作用[1,4,5]。但也有研究对 CREB 蛋白与抑郁症的相关性存在不同的观点[6-8]。因此，明确脑内 CERB 蛋白与抑郁的关系将为我们深入探究抑郁症的病理生理学的特点，及抗抑郁药物的开发提供重要依据。国内已经在开展动物模型的药物研究[9,10]，并取得一些积极成果。

现有对 CREB 与抑郁症的关联性的研究结果存在不一致性。我们对处于 CREB 第 3 内含子的 rs10932201、rs6740584 进行分析，其基因型和等位基因在病人组和对照组均差异无统计学意义，未发现该基因的这 2 个位点与抑郁症有相关性，这与刘晓华等[8]的研究部分相符。在 Hettema 等[11]人的研究中，也发现 CREB1 的 8 个 SNP 位点与抑郁症没有相关性。而 Zubenko[12]等却发现 CREB 的数个 SNP 均与抑郁症相关，并

在 2q33-q34 包含 CREB1 基因在内的 451 kb 区域内，找到了与女性抑郁症连锁的证据。这种差异出现的原因可能与实验对象是不同的人种、所选的样本量及取标记等多种因素有关。本实验 rs10932201、rs6740584 的阴性结果也有可能与样本量较小、人种等有关。

有研究发现，许多精神疾病患者 CREB 基因启动子区域存在多态性[13]，尤以 -413 至 -983 区域为多。其中，-851C→G、-933T→C 多态性与典型精神症状相关；-834C→A、-932C→T、-970G→A 多态性与情感性精神疾病相关[14]。但在众多的研究中，作为反映抑郁症的严重程度的自伤自杀行为没有作为一个重要因素进行单列分析，也缺乏这方面的研究数据。而近年来，此起彼伏的自杀事件已经引起社会公众的高度关注，其中相当大一部分自杀行为是由抑郁导致。我们的研究尝试给予完善相关的信息，将病人组进行分层研究，探讨抑郁症中有自杀行为的病人组与对照组的差异，以及与抑郁症中无自杀行为的病人组的差异。基于以上因素，本实验从 CREB3 基因功能区上游扩增该基因启动子区域的 CCGCGG（-837→-832）段，并用限制性核酸内切酶 *SgrB* Ⅰ（*Sac* Ⅱ）消化该片段并得到了预期的产物。对得到的产物进行分析，抑郁组 -835 C→A 各基因型与对照组没有差异性。而将抑郁组进一步细分为有无自杀行为组，进一步发现，有自杀行为的抑郁患者 C/A 基因型与健康对照比较有显著的差异，提示 -835 C→A 基因多态性很可能与伴有自杀行为的严重抑郁症具有密切联系。这也是本研究的重要发现，提示我们在以后的研究中，可将自杀行为作为一个重要的分析因素。

值得注意的是，自杀行为本身有较多分类标准。有的患者有明显的消极意念，主观上想结束自己的生命；而有的患者主观消极意念不强，只是想通过伤害自己的身体来进行情绪的疏泄；还有患者的自伤自杀行为更多是一种冲动行为，本身不想死。这给我们界定自杀分组带来一定难度。在目前本研究样本量较小的情况下，我们采取了以客观行为方式为主的分类方法，即只要有自伤自杀行为，就列入自杀行为组。如果要进一步考虑自杀的主观意愿和是否冲动导致，则需要我们采用心理问卷的方法，发现患者的主观意愿、个性特点以及自杀当时的行为特征，同时结合生物学研究结果进行关联分析。这也是本研究以后进一步研究的方向。

目前 CREB 与抑郁症的关联性研究仍不明确，有待进一步深入。而本研究也因样本量较小而存在很大不足，需要继续扩大样本量进行更深入的探索研究。

参 考 文 献

[1] Julie A, Blendy. The role of CREB in depression and antidepressant treatment[J]. Biol Psychiatry, 2006, 59(12): 1144-1150.

[2] Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB[J]. Nal Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(8): 599-609.

[3] Duman R S. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity[J]. Eur Psychiatry, 2002, 17(s13): 306-310.

[4] Wallace T L, Stellitano K E, Neve R L, et al. Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein over expression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety[J]. Biol Psychiatry, 2004, 56(3): 151-160.

[5] Koch J M, Kell S, Hinze-Selch D, et al. Reduced phosphorylations of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbit frontal cortex of patients with major depressive disorders[J]. J Neural Transm, 2003, 110(6): 671-680.

[6] Hettema J M, An S S, Van den Oord E J C G, et al. Association study of CREB1 with major depressive disorder and related phenotypes[J]. Am J Med Genet Part B, 2009, 150b(8): 1128-1132.

[7] 刘晓华，徐一峰，崔东红，等. 抑郁症患者外周血白细胞中CREB1基因表达研究[J]. 中国神经精神疾病杂志，2010，36(4)：237-240.

[8] 刘晓华，徐一峰，崔东红，等. 抑郁症与 cAMP 反应元件结合蛋白基因的关联研究[J]. 中华医学遗传学杂志，2010，27(3)：263-266.

[9] 李晶晶，袁勇贵，侯　钢，等. 不同剂量文拉法辛对抑郁模型大鼠海马区 pCREB 和 BDNF 表达的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志，2008，34(11)：645-649.

[10] 符文彬，刘健华. 电针对抑郁症大鼠海马 CREB-BDNF 受体后信号转导通路的作用[J]. 中国老年学杂志，2009，29(23)：3038-3042.

[11] John M, Hettema, Seon-Sook A, et al. van den Oord. Association study of CREB1 with major depressive disorder and related phenotypes[J]. Am J Med Genet Part B, 2009, 150b(8): 1128-1132.

[12] Zubenko G S, Hughes H B 3rd, Stiffler J S, et al. Sequence variations in CREB1 cosegregate with depressive disorders in women[J]. Mol Psychiatry, 2003, 8(6): 611-618.

[13] Carlezon W AJr, Duman R S, Nestler E J. The many faces of CREB [J]. Trends in Neurosciences, 2005, 28(8): 436-445.

[14] Kawanishi Y, Harada S, Tachikawa H, et al. Novel variants in the promoter region of the CREB gene in schizophrenic Patients[J]. Hum Genet 1999, 44(6): 428-430.

（责任编辑：张学颖）