基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0568-03

5- 羟色胺转运体基因第二内含子及启动子区多态性与自杀未遂的关联分析

黎雪梅,况 利,艾 明
(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 5- 羟色胺转运体(Serotonin transporter, 5-HTT)基因第二内含子多态性(Serotonin transporter gene 2 VNTR polymorphism,5-HTTVNTR)及启动子区多态性(Serotonin-transporter-linked promoter region,5-HTTLPR)与自杀未遂的相关性研究。方法:运用聚合酶链反应技术(Polymerase chain reaction,PCR)检测 71 例自杀未遂患者(患者组)和 80 名健康对照者(对照组)5-HTTVNTR 及 5-HTTLPR 的 3 种基因型及等位基因分布频率。结果:自杀未遂组第二内含子基因型及等位基因分布频率与正常对照组之间无显著性差异;自杀未遂组与对照组 5-HTTYLPR 的基因型及等位基因(S/L)频率差异无统计学意义(χ^2=1.08,P=0.58;χ^2=0.99,P=0.32);进一步分析显示,有精神疾病自杀未遂组(37 例)的短重复序列 S 等位基因频率为 85.1%,与正常对照组 S 等位基因频率(72.5%)及无精神疾病自杀未遂组(69.1%)的差异均具有统计学意义(χ^2=4.49,P=0.04;χ^2=5.21,P=0.03)。结论:5-HTTLPR 的 S/S 等位基因可能是自杀未遂的易感基因之一,而汉族人群中 5-HTT 基因第二内含子多态性与自杀未遂没有明显相关性。

【关键词】自杀未遂;基因;多态现象(遗传学);5- 羟色胺转运体
【中国图书分类法分类号】R195.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-3-23

An analysis on the relationship between polymrhism of intron 2 in serotonin transporter and polymrhism of serotonin transporter gene and attempted suicide

LI Xue-mei, et al
(*Center of Mental Health, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the association between attempted suicide and polymrhism of intron 2 in serotonin transporter and polymrhism of serotonin transporter (5-HTTLPR).*Methods*: Using the technique of polymerase chain reaction (PCR), the variable number of tandem repeat polymorphism (5-HTTVNTR) and 5-HTTLPR was determined in 71 patients with attempted suicide subjects and 80 control subjects. The allelic and genetypes distributions in two groups were compared.*Results*: There were no significant differences in intron 2-VNTR genotype and allele frequency distributions between attempted suicide and healthy control subjects (χ^2=1.08, P=0.58;χ^2=0.99, P=0.32). The frequencies of allele S were significantly higher in suicides attempted suicide patients with psychiatric disorder (85.1%) than in normal controls(72.5%)and suicides without psychiatric disorder(69.1%) (χ^2=4.49,P=0.04; χ^2=5.21,P=0.03).*Conclusion*:The results suggested that the polymrhism of intron 2 of 5-HTT gene no associated with attempted suicide in the Han nationality. But the presence of 5-HTTLPR alleles S may increase the risk for attempted suicide.

【Key words】Attempted suicide;Genes;Polymorphism (genetics);Serotonin transporter (5-HTT)

自杀的生化研究结果显示[1],自杀未遂者和自杀死亡者的 5- 羟色胺(5-HT)功能均下降,且这种变化与自杀者是否患某种精神疾病无关。因而,自杀候选基因主要从与 5-HT 的合成、失活、作用、转运等过程相关的酶或受体基因中选择,如色氨酸羟化酶(TPH)基因、5-HT 转运体基因、一些 5-HT 亚型的受体基因和单胺氧化酶基因等。近年来,5- 羟色胺转运体(5-hydroxytryptamine transporter,5-HTT)已成为自杀未遂病因机制研究的一个新方向。因此,我们进行了汉族人群自杀未遂与 5-HTT 基因启动子区多态性(5-HTT variable number of tandem repeat polymorphism,5-HTTVNTR)及 5-HTT 基因启动子区多态性(5-HTT gene-linked polymorphic region,5-HTTLPR)的相关性研究,旨在探寻 5-HTT 基因与自杀未遂的关系。

作者介绍:黎雪梅(1973-),女,讲师,硕士,
研究方向:抑郁症及自杀的病因学。
通讯作者:况 利,女,教授,E-mail:Kuangli0308@163.com。
基金项目:重庆市卫生局科研项目(编号:07-2-049)。

1 对象和方法

1.1 材料

1.1.1 试验组 研究对象来自重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心住院部、急诊科、重庆市精神病医院收集的自杀未遂的病例。纳入标准(1)年龄≥15 岁;(2)汉族;(3)有自杀未遂行为; 自杀未遂者中分为无精神病自杀未遂(Suicide without psychiatric disorder,NS)和有精神病自杀未遂(Suicide with psychiatric disorder,PS),精神病包括精神分裂症、情感性精神病及其它精神疾病。自杀未遂定义主动结束自己的生命但未导致死亡的结局, 包括决心自杀但 未死亡和自杀意图不强而蓄意自伤两种情况[2]。精神疾病的诊断依照 DSM-Ⅳ标准。符合实验组纳入标准,共 71 例,男 28 例,女 43 例;平均年龄(33 ± 12)岁。自杀方式包括:上吊 13 例,坠落 17 例,服过量治疗药物 12 例,服农药 20 例,用刀等工具 9 例。

1.1.2 正常对照组 重庆医科大学附属第一医院的工作人员和学生,本人无精神病史和自杀未遂史,均为汉族,相互间无血缘关系。参考《行为医学量表手册》自编调查表[3],包括社会人口学资料、疾病发作特点、家族史、个人史和既往情况等。对照组按照与患者组性别、年龄相当的在我院职工及大学生志愿者选取 80 名,均排除精神疾病及重大躯体疾病,无精神病家族史。其中男 33 名,女 47 名;平均年龄(35 ± 11)岁。

1.2 研究方法

1.2.1 脱氧核糖核酸(DNA)采集及抽取 采集肘静脉血 5 ml,0.2% EDTA 抗凝剂抗凝, 常规酚、氯仿法抽提基因组 DNA。

1.2.2 聚合酶链反应技术(Polymerase chain reaction,PCR)条件及 5-HTTVNTR 基因多态性检测 PCR 引物参考文献报道[4]如下:正向 5'-GTCAGTATCACAGGCTGCGAG-3',反向 5'-TGTTCCTAGTCTTACGCCAGTG-3',5-HTTLPR 基因的多态性 PCR 引物如下[4]:正向 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3',反向 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3',采用宝生物工程(大连)有限公司的 TaKaRa Ex Taq 酶。PCR 反应液共 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 $MgCl_2$。PCR 条件:94℃ 4 min 预变性,继以 94℃变性 1 min,61℃退火 1min,72℃延伸 1 min,共 35 个循环;72℃延伸 10 min。将 PCR 产物于 2%琼脂糖凝胶中电泳分离,以溴乙锭染色法检视各区带,与分子量标准物比较各片段的大小。

1.3 统计学处理

所得资料采用 χ^2 检验做关联分析, 用 SPSS 10.0 统计分析软件包进行分析。

2 结 果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡的吻合度检验

患者组和正常对照组基因型检验均为 $P>0.05$,无显著性差异。符合 Hardy-Weinberg 平衡法则。

2.2 5-HTTVNTR 及 5-HTTLPR 基因型琼脂糖电泳结果(见图 1、图 2)。

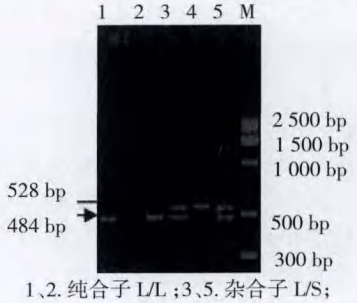
2.3 自杀未遂组与对照组间 5-HTTVNTR 及 5-HTTLPR 的基因型与等位基因分布频率的比较

2.3.1 组间 5-HTTVNTR 多态性比较(见表 1)自杀未遂组与正常对照 5-HTTVNTR 的基因型及等位基因频率在两组间无显著性差异($\chi^2=0.181$;$P=0.914$;$\chi^2=0.016$;$P=0.898$)。考虑到精神疾病可能是自杀未遂危险因素。按照无精神病自杀未遂和有精神病自杀未遂分组后再进行比较。结果显示,5-HTTVNTR 的基因型及等位基因频率在无精神病自杀未遂



1. 纯合子 12/12;2. 纯合子 10/10;
3. 杂合子 10/12;M. DNA 标志 DL2500

图 1 5-HTTVNTR 基因型电泳图



1、2. 纯合子 L/L ;3、5. 杂合子 L/S;
4. 纯合子 S/S; M. DNA 标志 DL2500

图 2 5-HTTLPR 基因型电泳图

表 1 自杀未遂组与对照组的 5-HTTVNTR 基因型及等位基因频率

组别	例数	基因型			等位基因	
		10/10	10/12	12/12	10	12
NC	80	7(8.8)	31(38.8)	42(52.4)	45(28.1)	115(71.9)
NC+PS	71	5(7.0)	29(40.8)	37(52.2)	39(27.5)	103(72.5)
NS	34	3(8.8)	14(41.2)	17(50.0)	20(29.4)	48(70.6)
PS	37	2(5.4)	17(45.9)	18(48.7)	21(28.4)	53 (71.6)

NC:正常对照,NS+PS:全部自杀未遂组, NS:无精神病自杀组, PS:精神病自杀组

表 2 自杀未遂组与对照组的 5-HTTLPR 基因型及等位基因频率

组别	例数	基因型			等位基因	
		L/L(%)	L/S(%)	S/S(%)	L(%)	S(%)
自杀未遂组	71	6 (8.5)	20(28.2)	45(63.4)	32(77.5)	110(22.5)
无精神病自杀组	34	4 (11.8)	13(38.2)	17(50.0)	21(30.9)	47(69.1)
精神病自杀组	37	2 (5.4)	7 (18.9)	28(75.7)	11(14.9)*#	63(85.1)*#
正常对照	80	11(13.8)	22(27.5)	47(58.8)	44(27.5)	116(72.5)

* 与正常对照的等位基因频率比较，经 χ^2 检验，$P<0.05$；# 与无精神病自杀组的等位基因频率比较，经 χ^2 检验，$P<0.05$

与有精神病自杀未遂相互比较中也无显著性差异（$\chi^2=5.768$，$P=0.056$；$\chi^2=0.018$，$P=0.892$）。

2.3.2 组间 5-HTTLPR 多态性比较（见表 2）自杀未遂组与对照组 5-HTTLPR 的基因型及等位基因频率差异无统计学意义（$\chi^2=1.08$，$P=0.58$；$\chi^2=0.99$，$P=0.32$）。考虑到精神疾病可能是自杀未遂危险因素，按照无精神病自杀未遂和有精神病自杀未遂分组后再进行比较。结果显示，有精神病自杀未遂组与正常对照组间 S 等位基因频率差异有统计学意义（$\chi^2=4.49$，$P=0.04$），OR 值为 2.17（OR 值的 $\chi^2=4.47$，$P<0.05$，95%CI：1.05～4.50，有无精神病自杀未遂组间 S 等位基因频率的差异也有统计学意义（$\chi^2=5.21$，$P=0.03$），OR 值为 2.56（$\chi^2=5.17$，$P<0.05$，95%CI：1.13～5.82，提示 S 等位基因与有精神病自杀未遂存在关联。

3 讨 论

人类 5-HTT 基因定位于 17q11.1-q12（基因标志是 SLC 6A4）与 D17S98 紧密相邻[5]，跨度 37.8 kb，由 14 个外显子组成，编码约 630 个氨基酸组成的蛋白，目前共发现5HTT 有 3 种多态性，其中第二内含子区存在 17 bp 可变数目串联重复多态性（5-HTTVNTR），该多态性的两个等位基因 10repeat（简称 10）与 12repeat（简称 12）等位基因组成 3 种基因型 10/10、10/12、12/12，267 bp 片段为 10repeat，301 bp 为 12 repeat，一些研究报道罕见的 9repeat 等位基因[6]，我们在研究中未发现。

目前研究结果显示不同的人群 5-HTTVNTR 基因型分布不同，我们的研究结果显示，汉族人群中，10/10 基因型占 8.8%、10/12 基因型占 38.8%、12/12 基因型占 52.4%，10 等位基因频率为 28.1%，12 等位基因频率为 71.9%，，日本人和华人（旧金山）的等位基因频率分布相当类似（均为低 10、高 12），而与欧洲和北美人种差异显著，与文献报道相似。但仍需更大样本量的研究以得出中国人 5-HTTVNTR 基因多态性分布状况。

本研究采用病例－对照关联分析方法，结果表明：5-HTTVNTR 基因型及等位基因频率与自杀未遂缺乏关联。但将自杀患者分为无精神病自杀未遂和有精神病自杀未遂后再进行比较仍无显著性差异。Hranilovic 等对克罗地亚的自杀死亡与正常对照的研究中发现 5-HTTVNTR 基因型及等位基因频率与自杀死亡缺乏关联[6]，De Luca 等对自杀未遂的对照研究中亦未发现相关联[7]，Shen 等发现对 5-HTTVNTR 基因型及等位基因频率与精神病自杀行为也无关联[8]。上述研究与我们的研究结果一致，Yen 等通过对中国台湾地区 83 例双相情感障碍、77 例重性抑郁症和 169 例非情感障碍研究也发现 5-HTTVNTR 与自杀行为无明显关联[9]。目前的研究均显示 5-HTTVNTR 基因型及等位基因频率与自杀缺乏关联。

本研究关联分析结果表明：5-HTTYLPR 基因型与总的自杀未遂缺乏关联。但将自杀患者分为无精神病自杀未遂和精神病自杀未遂后再进行比较，显示 S 等位基因频率在正常对照组与有精神病自杀未遂组及有无精神病自杀未遂组间的差异均有统计学意义。结果提示 S 等位基因与精神病的自杀可能存在关联，这与国外有些研究结果相似，Courtet 等[10]发现 s 等位基因增加了自杀企图的危险率，s/s 基因型出现的频率增加则自杀企图发生次数也随之增加，Joiner 等[11]报道有显著自杀家族史的人群比没有家族史的人群携带 s/s 基因型的可能性更大。然而台湾 Chong 等[12]报道 S 等位基因与伴有精神病的自杀未遂无关联。Brown 等[13]的 meta 分析表明自杀死亡者携带 S 等位基因的可能性明显低于对照组，Daria 等[14]发现只有俄罗斯女性自杀未遂者与 L/L 基因型有关联，与这与我们的研究结果不一致。

上述研究结果的不一致可能与遗传异质性以及种族间的遗传差异有关，但也与许多研究者从不同的角度细分自杀行为有关，如暴力性自杀、抑郁性自杀、酒精依赖性自杀、甚至单独研究女性自杀。本研究表明在汉族人群中 5-HTTVNTR 基因多态性与自杀未遂没有遗传关联而 5-HTTLPR 基因多态性可能与精神病自杀关联，而与正常人自杀无关。但由于本研究样本量较小，也很难排除精神病的混杂影响。因此，结果有待进一步验证。

参 考 文 献

[1] Golden R N, Gilmore J H, Gorrigan M H, et al. Serotonin, suicide and aggression[J]. Clin Psychiatry, 1991, 52(12): 61-69.

[2] 李献云，费立鹏，王玉萍，等. 冲动性与非冲动性自杀未遂的比较[J]. 中国神经精神疾病杂志，2003，29(1)：27-31.

[3] 张作记. 行为医学量表手册[J]. 中国行为医学科学，2001，10(特刊)：143-148.

[4] K. Glatz, R. Mossner, A.Heils, et al. Glucocorticoid-regulated human serotonin transporter (5-HTT) expression is modulated by the 5-HTT gene-promotor-linked polymorphic region[J]. Neurochem, 2003, 86(5): 1072-1078.

[5] Ramamoorthy S, Bauman A L, Moore K R, et al. Antidepressant and cocaine sensitive human serotonin transporter: molecular cloning and

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0571-04

羟基红花黄色素 A 对人主动脉内皮细胞增殖及血小板反应蛋白表达的影响

涂利宽,罗文军,王银光,张 琴
(重庆医科大学附属第二医院血管外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨羟基红花黄色素 A(Hydroxysafflor yellow A,HSYA)对人主动脉内皮细胞(Human aortic endothelial cells,HAEC)血小板反应蛋白 1(Trombospondin-1,TSP-1)表达的影响,以进一步研究 HSYA 抑制内皮细胞增殖及抗肿瘤的作用机制。方法:采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法观察 HSYA 对 HAEC 增殖作用的影响。Real Time PCR 法及免疫细胞化学法分别检测 HSYA 作用后,HAEC 内 TSP-1 的 mRNA 及蛋白表达;ELISA 法检测上清液中 TSP-1 含量。结果:HSYA 对 HAEC 增殖作用的影响表现出浓度依赖性,较高浓度(>0.065 7 g/L)对 HAEC 的增殖有抑制作用,较低浓度(<0.065 7 g/L)表现出促进作用。HSYA 对 TSP-1mRNA 表达有促进作用,且这种作用随浓度增加而增强;TSP-1 的蛋白表达与释放情况与 RT-PCR 结果相似。结论:HSYA 能促进 HAEC 表达 TSP-1;HSYA 对内皮细胞的增殖表现出促进和抑制的双向作用,可能是 TSP-1 和血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)等多种因素共同作用的结果。而 HSYA 的抗肿瘤作用可能是通过较高浓度 HSYA 提高 TSP-1 的表达抑制内皮细胞增殖进而抑制血管形成来实现的。

【关键词】羟基红花黄色素 A;血小板反应蛋白 1;血管生成抑制剂;抗肿瘤作用;血管内皮细胞
【中国图书分类法分类号】R654.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-17

Influence of hydroxysafflor yellow A on the proliferation and expression of thrombospondin-I in human aortic endothelial cells

TU Li-kuan, et al
(*Department of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of Hydroxysafflor yellow A (HSYA)on the expression of thrombospondin-1(TSP-1) in human aortic endothelial cells for a further study of the mechanism of hydroxysafflor yellow A inhibiting endothelial cells' proliferation and preventing the growth of tumor. *Methods*: We use the method of MTT to observe the proliferation of HAEC with the influence of HSYA. Real Time PCR and immunocytochemistry were used to detect the level of mRNA and protein of TSP-1 after HSYA's effect.TSP-1 in the culture medium is assayed in the way of ELISA.*Results*: HSYA's effect on proliferation of HAEC showed a concentration-depen dence, for higher concentration (>0.065 7 g/L)causing inhibition of the proliferation of HAEC while a lower concentration(<0.065 7

作者介绍:涂利宽(1982-),男,硕士,
研究方向:周围血管疾病的微创疗法。
通讯作者:罗文军,男,教授,E-mail:Luowenjun516@yahoo.com.cn。

chromosomal localization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(6): 2542-2546.

[6] Hranilovic D, Stefulj J, Furac I, et al. Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR) polymorphisms in Croatian suicide victims[J]. Biol Psychiatry, 2003, 54(9): 884-889.

[7] De Luca V, Tharmalingam SKN, Strauss J, et al. Association study of a novel functional polymorphism of the serotonin transporter gene in bipolar disorder and suicidal behaviour[J].Psychopharmacology, 2005, 182: 128-131.

[8] Shen Y, Li H, Gu N, et al. Relationship between suicidal behavior of psychotic inpatients and serotonin transporter gene in Han Chinese [J]. Neurosci Lett, 2004, 372(1-2): 94-98.

[9] Yen F C, Hong C J.Hou S J, et al.Association study of serotonin transporter gene VNTR polymorphism and mood disorders: on set age and suicide attempts in a Chinese sample [J].Neuropsychobiology, 2003, 48 (1): 5-9.

[10] Courtet P, Baud P, Abbar M, et al. Association between violent suicidal behavior and the low activity allele of the serotonin transporter gene [J]. Mol Psychiatry, 2001, 6(3): 338-341.

[11] Joiner T E.Association between serotonin transporter gene polymorphism and family history of attempted and completed suicide [J].Suicide Life Threat Behav, 2002, 32(3): 329.

[12] Chong S A, Lee W L, Tan C H, et al. Attempted suicide and polymorphism of the serotonin transporter gene in Chinese patients with schizophrenia[J]. Psychiatry Res, 2000, 97(2-3): 101-106.

[13] Brown J S.The serotonin transporter gene's association with mental disorders: a meta analysis[J]. Mol Psychiatry, 2003, 4: 125.

[14] The serotonin transporter gene: polymorphism and haplotype analysis in russian suicide attempters[J].Neuropsychobiology, 2006, 54(1): 70-74.

(责任编辑:关蕴良)