

· 论 著 ·

TNF-α-308 基因多态性与强迫症的易感性研究

高玉峰¹, 邱海棠², 王帆³, 张向阳³, 傅一笑², 罗庆华², 杜莲², 邱田², 蒙华庆^{2Δ}
(1. 广东省中山市第三人民医院二科 528451; 2. 重庆医科大学附属第一医院
心理卫生中心 400016; 3. 北京回龙观医院中心实验室 100096)

摘要:目的 探讨 TNF-α-308 基因多态性与强迫症(OCD)易感性的关系。方法 收集 26 例 OCD 患者及 14 例健康对照者的血液,提取 DNA 后采用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)法测定 TNF-α-308 位点的基因多态性,进行各组间基因型分布和等位基因频率的 χ^2 检验,比较各组间基因型分布的差异。计算等位基因的 OR 值和 95%CI,以确定基因多态性与 OCD 易感性的关系。结果 OCD 组及健康对照组均以 TNF1/1 占优势,OCD 组为 16.7%(TNF1/2)和 83.3%(TNF1/1),而健康对照组中全为 TNF1/1 型。两组之间的基因型频率分布的比较,差异有统计学意义($\chi^2=15.73, P<0.01$)。OCD 组与健康对照组的差异主要来自 G 等位基因,差异有统计学意义($P<0.01$),使其患 OCD 的危险性提高了 1.93 倍。结论 TNF-α-308 基因多态性可能与 OCD 的易感性相关。

关键词:肿瘤坏死因子 α;强迫症;基因多态性;疾病易感性
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.04.005 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)04-0396-03

The association of TNF-α-308 gene polymorphism and obsessive compulsive disorder

Gao Yufeng¹, Qiu Haitang², Wang Fan³, Zhang Xiangyang³, Fu Yixiao², Luo Qinghua², Du Lian², Qiu Tian², Meng Huaqing^{2Δ}
(1. Department of the Second, the Third People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan, Guangdong 528451, China;
2. Mental Health Center, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;
3. Central Laboratory, HuiLongGuan Hospital, Beijing 100096, China)

Abstract:Objective The purpose of this study was to investigate the relationship between TNF-α-308 gene polymorphisms and susceptibility to obsessive-compulsive disorder(OCD). **Methods** DNA samples with OCD were collected from 26 severe OCD patients and 14 control ones. The TNF-α-308 gene polymorphisms were analyzed with PCR-RFLP. The data were analyzed by χ^2 test. **Results** Majority the gene type of OCD and the controls are TNF1/1. The OCD are 16.7%(TNF1/2), 83.3%(TNF1/1), and all of the controls are TNF1/1, the difference are significant($\chi^2=15.73, P<0.01$). The difference between OCD and controls is from the gene G, which make the risk of OCD more than controls 1.93. **Conclusion** The TNF-α-308 gene polymorphism probably has association with OCD.

Key words: tumor necrosis factor-alpha; obsessive-compulsive disorder; gene polymorphism; disease susceptibility

强迫症(obsessive-compulsive disorder, OCD)是以强迫观念,强迫意向,强迫行为为主要临床表现的神症。普通人群患病率 1.1%~3.3%。OCD 的病因至今未明,但已有研究显示强迫症具有家族遗传聚集性,患者家属中 OCD 及亚临床 OCD 患病率较普通人群高 10%~20%^[1]。5-HT 类基因是 OCD 的候选基因,然而已有的研究显示 5-HT 对 OCD 易感性的影响结论不一,使得研究人员不得不进一步寻找除此之外的其他影响因素^[2-3]。Marazziti 等^[4]研究发现,OCD 患者较健康人 CD8(TS 细胞)明显增多,CD4(Th 细胞)明显减少。Barber 等^[5]研究也发现,男性 OCD 患者的自然杀伤(NK)细胞升高,都提示 OCD 患者的免疫系统也发生了改变。编码人肿瘤坏死因子 α(TNF-α)的基因定位于 6 号染色体短臂上,位于 MHC-III 区,现已发现有高度的基因多态性。其多态性表现为两个不同的等位基因形式,将-308 位是鸟嘌呤(G)的等位基因定义为常见型 TNF1/1,为腺嘌呤(A)时定义为稀少型 TNF2,即 TNF-308 位 G 被 A 替换,形成 TNF2 等位基因形式(包括 TNF2/2 和 TNF1/2)^[6]。研究表明, TNF2 可以提高 TNF-α 转录活性而增加 TNF-α 的产生^[7]。多项研究都显示, TNF2 等位基因与一系列感染性疾病及自身免疫性疾病有关^[8-9]。本研究通过比较分析 TNF-α-308 基因型在 OCD 组及健康对照组中的分布,探讨其基因多态性与 OCD 易感性的关系,现报道

如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2008 年 2 月至 2008 年 6 月重庆医科大学附属第一医院精神科门诊就诊及北京回龙观医院住院的 26 例 OCD 患者(OCD 组)。其中男 12 例,平均(32.12±5.39)岁,起病年龄(18.27±4.94)岁,平均病程(5.32±1.74)年;女 14 例,平均(30.29±6.36)岁,起病年龄(19.36±5.19)岁,平均病程(6.4±2.95)年。入组标准:(1)符合中国精神障碍分类与诊断标准第 3 版(CCMD-3)中 OCD 的诊断标准;(2)无器质性疾病;(3)年龄在 18~65 岁;(4)均为汉族。收集重庆医科大学附属第一医院体检中心的 14 例健康体检人员及志愿者(健康对照组)。其中,男 7 例,平均(30.27±5.78)岁;女 7 例,平均(34.29±7.29)岁。入组标准:年龄 18~65 岁;无重大躯体疾病,无任何符合诊断标准的精神疾病;既往无精神疾病史,无精神疾病家族史,所有研究对象均无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 抽取肘静脉血 2 mL 置于含乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝的试管中,轻轻摇匀后置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 DNA 提取 采用 Promega 生物工程有限公司基因组 DNA 提取试剂盒,参照说明书步骤进行。

1.2.3 PCR 扩增 TNF- α 基因启动子-308 位点引物(引物由北京生工合成)FW:5'-GAG GCA ATA GGT TTT GAG GGC CAT;RV:GGG ACA CAC AAG CAT CAA G-3',扩增产物长度为 147 bp。PCR 反应体系:总体积 10 μ L,含引物(各 5 pmol/ μ L)0.6 μ L,10 \times PCR 缓冲液 1 μ L,DNA(模板)2 μ L,taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L)0.4 μ L,脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)0.2 μ L,三蒸水 5.2 μ L。采用热循环仪,95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,59 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 30 次;最后 72 $^{\circ}$ C 5 min 末次延伸。

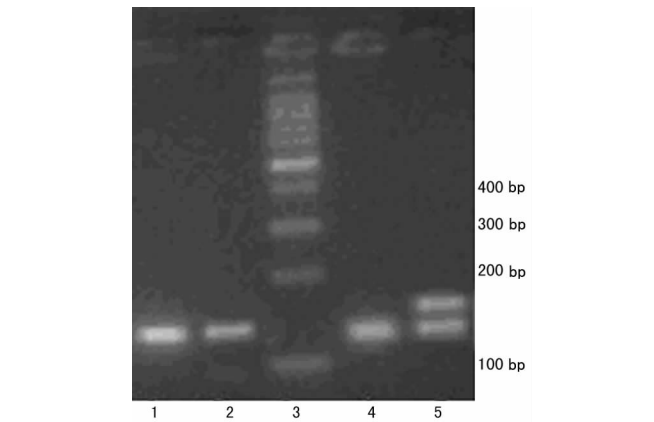
1.2.4 酶切及电泳 酶切体系总体积 10 μ L,含 PCR 扩增产物 9 μ L,10 \times 缓冲液 0.7 μ L,限制性内切酶 *Nco* I 0.3 μ L(10 U/ μ L,购至 MBI 公司),37 $^{\circ}$ C 过夜。将产物上样于 3% 琼脂糖胶,与标准 DNA Maker 同步电泳,恒定电压 120 V 电泳 50 min 后分析结果。酶切后产生 3 种结果 147 bp,147 bp 126 bp 21 bp,126 bp 21 bp,分别代表 TNF- α 1/1 型(终产物为 126 bp 1 条带,G 等位基因纯合子);TNF- α 1/2(终产物为 147 bp、126 bp 两条带,杂合子),TNF- α 2/2(终产物为 147 bp 1 条带,A 等位基因纯合子)。由于 21 bp 的条带长度太小,在凝胶上无法分辨,故能够观测到的是 147 bp 和 126 bp 两个条带。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行分析,采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。将 TNF- α -308 基因型等位基因 TNF- α 1/1 及 1/2 型以四格表进行 χ^2 检验,计算比值比(OR)和 95%CI,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 质量控制结果 随机抽取 5 例样本,重复检测基因型结果与前完全一致,证明本试验结果可靠。

2.2 TNF- α -308 位基因多态性 PCR 结果 其中 1 泳道为 TNF1 纯和基因型;2 泳道为 TNF2 纯和基因型;5 泳道为 TNF1/2 杂合型,见图 1。



1,2,4;TNF- α 1/1 纯合基因型;3;DNA Marker;5;TNF- α 1/2 杂合基因型。

图 1 TNF- α 基因启动子-308 位点 3% 琼脂糖胶电泳图

2.3 两组 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验 OCD 组 TNF- α 基因型分布的观察值和期望值吻合度良好,差异无统计学意义($P>0.05$);健康对照组 TNF- α 基因型分布的观察值和期望值吻合度良好;均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡法则。

2.4 OCD 和健康人 TNF- α 基因检测结果 本实验结果 TNF- α 基因启动子区域-308 位点只发现 TNF- α 1/1 型及 TNF- α 1/2 型两种基因型,未发现 TNF- α 2/2 基因型。TNF 的基因型在 OCD 组及健康对照组中分布均以 1/1 型纯合子占优势,OCD 组为 16.7%(TNF1/2)和 83.3%(TNF1/1),而健康人中全为 TNF1/1 型。两组之间的基因型频率分布的比较,差异有统计学意义($\chi^2=15.73,P<0.01$)。

2.5 两组 TNF- α -308 位基因多态性与 OCD 的相关分析 OCD 组与健康对照组的差异主要来自 G 等位基因,差异有统计学意义($P<0.01$),使其患 OCD 的危险性提高了 1.93 倍。因此,等位基因 G 与 OCD 易感性存在正相关。

3 讨 论

已有许多研究提示,免疫系统在包括抑郁、痴呆、精神分裂症等精神疾病的发生、发展中所起的作用,一些焦虑的疾病包括创伤后应激障碍、惊恐障碍、社交恐惧和 OCD 患者^[10-11]。人们很早就注意到免疫系统在精神疾病中的病理生理作用。近年来的研究表明,细胞因子特别是 TNF- α 参与了急、慢性神经退行性变,并且与神经递质尤其是儿茶酚胺系统的平衡有相互作用。TNF- α 是具有多种生物学效应的一种细胞因子,不仅对肿瘤细胞有细胞毒、细胞溶解、抑制增殖等作用,还影响多种正常细胞的生长分化。另外,TNF- α 还是一种重要的炎性介质,参与免疫病理反应,在机体免疫-炎症协调的信号网络调节中起重要作用,还通过迷走神经对中枢产生直接和间接的影响^[12]。

人类细胞因子基因多态性数据库已报道了其启动子区的 8 个单核苷酸多态性(SNP)位点,且一些 SNP 位点的等位基因与某些感染性和自身免疫性疾病相关^[13]。TNF- α 基因启动子区域多态性分布是非随机性的,而很可能与选择性的功能表达相关^[14]。有研究首先报道了 TNF- α 基因启动子区域内-308 位点的双等位基因多态性,-308 位点的 G-A 突变在高加索人种中出现频率高,较早就已成为研究热点^[15-16]。Louis 等^[6]发现,用脂多糖刺激 TNF- α -308-2 等位基因携带者个体的血细胞与 TNF- α 2 等位基因相比较,能产生较多量的 TNF- α ,表明 TNF- α -308-2 等位基因携带者由于 TNF- α 诱导表达水平增高,可能增加相关疾病的易感性。虽然 TNF- α 对疾病具有重要意义,但-308 位点 G-A 突变发生率相当低。据报道,在新西兰,健康人群 TNF- α 基因该位点突变率发生率为 5.3%^[17]。笔者采用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)法对 TNF- α 基因多态性进行分析发现,在 OCD 患者中点突变的发生率为 16.7%,健康人中未发现点突变,可能与样本量较小有关。OCD 组 TNF- α 点突变显著高于对照组,结果与 Konuk 等^[18]的研究相似。而 Monteleone 等^[19]的研究发现,在血浆 IL-1 β 及 IL-6 的水平与健康对照组都没有发现显著性差异,而 OCD 患者的 TNF- α 水平显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P=0.001$)。

综上所述,TNF- α 等位基因可能与 OCD 的易感性相关,TNF- α 的功能为基因频率在临床上可作为遗传性标记进行检测,对于预防早期 OCD 的发展具有重要意义。但本研究没有考虑其他细胞因子的多态性位点及其他危险因素的影响,不能排除 TNF- α -308 位点与其他细胞因子的位点基因连锁而成为 OCD 易感性相关的遗传标志,还有待于扩大样本进行多因素分析。

参考文献:

[1] Jonnal AH,Gardner CO,Prescott CA,et al. Obsessive and compulsive symptoms in a general population sample of female twins[J]. Am J Med Genet,2000,96(6):791-796.
[2] Cavallini MC,Di Bella D,Siliprandi F,et al. Exploratory factor analysis of obsessive-compulsive patients and association with 5-HTLPR polymorphism [J]. Am J Med Genet,2002,114(30):347-353.
[3] Di Bella D,Erzegovesi S,Cavallini MC,et al. Obsessive-

- Compulsive Disorder, 5-HT polymorphism and treatment response[J]. *Pharmacogenomics*, 2002, 2: 176-181.
- [4] Marazziti D, Presta S, Pfanner C, et al. Immunological alternation in adult obsessive-compulsive disorder[J]. *Biol Psychiatry*, 1999, 46(6): 810-814.
 - [5] Barber Y, Toren P, Achiron A, et al. T cell subsets in obsessive-compulsive disorder [J]. *Neuropsychobiology*, 1996, 34(2): 63-66.
 - [6] Louis E, Franchimont D, Piron A, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphism influences TNF alpha production in LPS-stimulated whole blood cell culture in healthy humans[J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 113(3): 401-406.
 - [7] Harcos P, Laki J, Kiszal P. Decreased frequency of the TNF2 allele of TNF-alpha-308 promoter polymorphism is associated with lacunar infarction[J]. *Cytokine*, 2006, 33(2): 100-105.
 - [8] Perera MK, Herath NP, Pathirana SL, et al. Association of high plasma TNF-alpha levels and TNF-alpha/IL-10 ratios with TNF2 allele in severe P. falciparum malaria patients in Sri Lanka[J]. *Pathog Glob Health*, 2013, 107(1): 21-29.
 - [9] Charli-Joseph Y, Cruz-Fuentes C, Orozco-Topete R. Incidence of adverse cutaneous drug reactions in a Mexican sample: an exploratory study on their association to tumour necrosis factor alpha TNF2 allele[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2009, 23(7): 788-792.
 - [10] Leonard BE, Myint A. Changes in the immune system in depression and dementia: causal or coincidental effects? [J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2006, 8(2): 163-174.
 - [11] Hinze-Selch D, Pollmacher T. in vitro cytokine secretion in individuals with schizophrenia: results, confounding factors, and implications for further research[J]. *Brain Behav Immun*, 2001, 15(4): 282-318.
 - [12] Prasad R, Kapoor R, Srivastava R, et al. Cerebrospinal fluid TNF- α , IL-6, and IL-8 in children with bacterial meningitis[J]. *Pediatr Neurol*, 2013, 8(16): 1.
 - [13] Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement[J]. *Genes Immun*, 2002, 3(6): 313-330.
 - [14] 郭芮兵, 陈仕林. TNF- α 基因多态性对 TNF- α 产物的影响及其与疾病的关系[J]. *医学研究生学报*, 2003, 16(5): 382-385.
 - [15] Auguet T, Vidal F, López-Dupla M, et al. A study on the TNF-alpha system in Caucasian Spanish patients with alcoholic liver disease[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2008, 92(1/3): 91-99.
 - [16] Hong J, Leung E, Fraser AG, et al. IL4, IL10, IL16, and TNF polymorphisms in New Zealand Caucasian Crohn's disease patients[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2008, 23(3): 335-337.
 - [17] Noronha IL, Niemir Z, Stein H, et al. Cytokines and growth factors in renal disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1995, 10(6): 775-786.
 - [18] Konuk N, Tekin IO, Ozturk U, et al. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in obsessive compulsive disorder[J]. *Mediators Inflamm*, 2007, 2007: 65704.
 - [19] Monteleone P, Catapano F, Fabrazzo M, et al. Decreased blood levels of tumor necrosis factor-alpha patients with obsessive-compulsive disorder [J]. *Neuropsychobiology*, 1998, 37(4): 182-185.

(收稿日期: 2013-09-10 修回日期: 2013-11-25)

(上接第 395 页)

- et al. The feasibility of creating a population-based national twin registry in the United States[J]. *Twin Res Hum Genet*, 2006, 9(6): 919-926.
- [2] Polderman TJ, Gosso MF, Posthuma D, et al. A longitudinal twin study on IQ, executive functioning, and attention problems during childhood and early adolescence[J]. *Acta Neurologica Belgica*, 2006, 106(4): 191-207.
 - [3] 李晶, 陈莉, 马凤兰, 等. 遗传及环境因素对儿童智力影响的双生子研究[J]. *济宁医学院学报*, 2001, 24(3): 44.
 - [4] 张悦, 季成叶, 白燕, 等. 青春性发育前后儿童智力的遗传效应[J]. *中国心理卫生杂志*, 2009, 23(3): 217-219.
 - [5] 张悦, 季成叶, 潘勇平, 等. 遗传和环境效应对儿童青少年智力影响的双生子研究[J]. *中国学校卫生*, 2008, 29(11): 974-975.
 - [6] 张晓薇, 黄颐, 向云, 等. 儿童青少年智力的双生子研究[J]. *中华遗传学杂志*, 2009, 26(3): 326-330.
 - [7] Yang MJ, Tzeng CH, Tseng JY, et al. Determination of twin zygosity using a commercially available STR analysis of 15 unlinked loci and the gender-determining marker amelogenin—a preliminary report [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(8): 2175-2179.
 - [8] Benyamin B, Wilson V, Whalley LJ, et al. Large, consistent estimates of the heritability of cognitive ability in two entire populations of 11-year-old twins from Scottish mental surveys of 1932 and 1947[J]. *Behav Genet*, 2005, 35(5): 525-534.
 - [9] Galton F. Hereditary talent and character[J]. *Macmillan's Magazine*, 1865, 12(157/166): 318-327.
 - [10] Bouchard TJ. The wilson effect; the increase in heritability of IQ with age[J]. *Twin Res Hum Genet*, 2013, 16(5): 923-930.
 - [11] 姚英民, 王鲜艳, 杨明, 等. 11 种营养素与学习障碍儿童智力 and 行为问题相关性的研究[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(11): 2094-2095.
 - [12] 孙涛. 分娩方式对新生儿智力, 注意力及感觉统合能力的影响[J]. *海南医学院学报*, 2011, 17(9): 39.
 - [13] 甄宏, 季成叶, 杨莉萍, 等. 双生子儿童智力影响因素分析[J]. *中国行为医学科学*, 2002, 11(6): 676-678.
 - [14] 张晓薇, 黄颐, 高欣, 等. 遗传和环境因素对儿童青少年认知功能和人格的影响分析[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2008, 36(6): 349-352.

(收稿日期: 2013-09-18 修回日期: 2013-11-29)