

·专题·

RELN 基因单核苷酸多态性与儿童孤独症临床特征的相关分析

孙颖¹, 盛昭明², 刘明远³, 杨利敏³, 李兴洲³, 姜志梅¹

[摘要] 目的 探讨 RELN 基因 exon 6 SNP 基因型与儿童孤独症临床特征的相关性。方法 应用限制性片段长度多态性聚合酶链式反应(PCR-RFLP)测定 30 例孤独症患儿及 30 例正常儿童的基因型和等位基因频率。采用孤独症行为检查表(ABC)对患儿行为进行评定。结果 孤独症组与对照组 exon 6 SNP 基因型和等位基因频率存在显著性差异($P<0.05$); 基因型为 A/A 和 A/G 之间、A/A 和 G/G 之间的孤独症儿童交往因子存在显著性差异($P<0.05$), 基因型为 A/G 和 G/G 的孤独症儿童 ABC 总分存在显著性差异($P<0.05$)。结论 exon 6 SNP 与儿童孤独症相关, 携带基因型 G/G、A/G 的患儿比携带基因型 A/A 的患儿有更严重的人际交往障碍。

[关键词] 儿童; 孤独症; RELN 基因; 单核苷酸多态性; 孤独症行为检查表

RELN Gene Single Nucleotide Polymorphism Related with Clinical Features of Autism SUN Ying, SHENG Zhao-ming, LIU Ming-yuan, et al. The Third Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjiang, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between RELN gene single nucleotide polymorphism (SNP) and childhood autism in Jiamusi, Heilongjiang. **Methods** Polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to determine allele and genotype of SNP (exon 6) of RELN in 30 children with autism and 30 normal children. Autism Behavior Checklist (ABC) was used to evaluate the children. **Results** There was a significant difference in the distribution of the allelic frequencies and genotype in exon 6 between these groups ($P<0.05$). There was a significant difference in the communication factors between patients with genotype of A/A and A/G or A/A and G/G ($P<0.05$), as well as in the total scores of ABC between A/G and G/G ($P<0.05$). **Conclusion** The SNP of RELN (exon 6) associated with the childhood autism. There is a more serious communication disorder in children with genotype of G/G, A/G than that of A/A.

Key words: child; autism; gene RELN; single nucleotide polymorphism (SNP); Autism Behavior Checklist

[中图分类号] R749.94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2011)05-0411-04

[本文著录格式] 孙颖, 盛昭明, 刘明远, 等. RELN 基因单核苷酸多态性与儿童孤独症临床特征的相关分析[J]. 中国康复理论与实践, 2011, 17(5): 411—414.

儿童孤独症是一种较为严重的发育障碍性疾病, 多于 3 岁前发病, 男孩比女孩多见。它的基本特征是不同程度的言语发育障碍、人际交往障碍、兴趣狭窄和行为方式刻板。孤独症的病因涉及环境和遗传因素, 家系研究和双生子研究证实遗传因素在孤独症发病中起关键的作用。

RELN 基因定位在孤独症的易感基因座位 7q22, 编码的 reelin 蛋白在与脑发育相关的神经元迁移和定位过程发挥重要作用。国外已进行许多该基因与孤独症的关联研究, 但有关研究得出的结论不一。

1 资料与方法

1.1 临床资料 2006 年 1 月~2007 年 12 月佳木斯大学附

属第三医院发育与行为儿科收治孤独症患儿 30 例, 均为汉族, 其中男性 24 例, 女性 6 例; 年龄 3~12 岁。同期选取佳木斯幼儿园和小学的健康儿童 30 例为对照组, 其中男性 24 例, 女性 6 例; 年龄 3~12 岁。两组儿童性别及年龄无显著性差异($P>0.05$)。

1.2 诊断标准 所有患儿符合美国《精神障碍诊断和统计手册》第 4 版(DSM-IV)规定的儿童孤独症的诊断标准^[2]。

1.3 纳入标准

1.3.1 病例组 ①年龄 3~12 岁汉族儿童; ②完全符合儿童孤独症的诊断标准; ③孤独症儿童行为检查量表 (Autism Behavior Checklist, ABC) 评分 ≥ 67 分; 儿童

作者单位: 1. 佳木斯大学附属第三医院, 黑龙江佳木斯市 154003; 2. 黑龙江省农垦总局牡丹江分局中心医院康复科, 黑龙江牡丹江市 158300; 3. 佳木斯大学基础医学院, 黑龙江佳木斯市 154007。作者简介: 孙颖(1977-), 女, 山东黄县人, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 小儿脑损伤的发病机制及早期防治研究。通讯作者: 姜志梅。

孤独症评定量表(CARS)评分 ≥ 30 分; ④家长知情同意。

1.3.2 对照组 ①年龄 3~12 岁, 与相应匹配的病例组儿童的年龄相差不超过 0.5 岁; ②与病例组相应匹配儿童的性别相同; ③汉族; ④孕期及出生时正常; ⑤与病例组儿童无血缘关系; ⑥家长知情同意。

1.4 排除标准 全面体格检查和神经精神检查后认为该名儿童可能存在已知病因的发育障碍或其他神经精神疾病, 包括精神发育迟滞、其他广泛性发育障碍。

1.5 检测方法 每名研究对象抽取静脉血 2 ml 置于 EDTA 抗凝管内, 摇匀后立即 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。使用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

RELN 基因 exon 6 SNP 的基因分型采用聚合酶链式反应技术。PCR 引物如下:

正向 5' -ACA GCA TGT TGG CAC TTG TG-3'
反向 5' -TTG GTG GTA GGA GTC AAA GT-3'

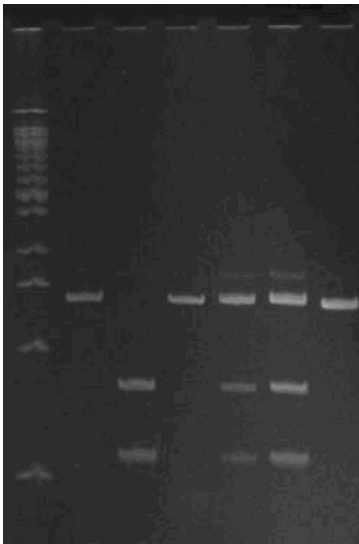
用大连宝生物公司的 TaKaRa Taq™ 试剂盒扩增。PCR 反应液共 25 μl , 内含基因组 DNA、引物、Taq 酶、缓冲液、dNTPs。PCR 条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 继以 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终末延伸 8 min。经 PCR 仪扩增后产物为 135 bp, 由内切酶 Pvu II 酶切后产生 79 bp 和 56 bp 两个片断, 组成 3 种基因型: A/A (135 bp/135 bp), A/G (135 bp/79 bp/56 bp), G/G (79 bp/56 bp)。

1.6 统计学方法 应用统计分析软件 SPSS 11.5 计算不同基因型在不同组间的分布情况。

2 结果

2.1 RELN 基因 exon 6 SNP 基因型分布 A 等位基因 PCR 产物不含 Pvu II 酶切位点, 只有一个长度为 135 bp 的片段。G 等位基因 PCR 产物含 Pvu II 酶切位点, 酶切后产生长度分别为 79 bp 和 56 bp 的片段。根据电泳结果, exon 6 SNP A/A 基因型为一条长 135 bp 的条带, A/G 基因型为 3 条长度为 135 bp、79 bp 和 56 bp 的条带, G/G 基因型为两条长 79 bp 和 56 bp 的条带 (图 1)。

2.2 基因型和等位基因频率 χ^2 检验显示基因型及等位基因频率分布符合 H-W 平衡法则。儿童孤独症组与对照组 exon 6 SNP 基因型和等位基因频率存在显著性差异 ($P<0.05$)。见表 1。



1: 50 bp DNA Ladder Marker; 2、4、7: A/A; 3: G/G; 5、6: A/G。

图 1 exon 6 SNP 基因型分型电泳图
表 1 两组 exon6 SNP 基因型与等位基因频率

组别	例数	A/A	A/G	G/G	A	G
孤独症组	30	3	17	10	23	37
对照组	30	10	16	4	36	24
χ^2			6.371		5.635	
P			0.041		0.018	

2.3 基因型与临床特征的关系 单因素方差分析显示, 不同基因型孤独症儿童 ABC 总分及交往因子得分存在非常显著性差异 ($P<0.01$); 经进一步 LSD 分析, 在基因型为 A/A 和 A/G、A/A 和 G/G 孤独症儿童之间, 交往因子存在显著性差异 ($P<0.05$), 基因型为 A/G 和 G/G 之间 ABC 总分存在显著性差异 ($P<0.05$)。见表 2。

2.4 病情严重程度与 exon 6 SNP 的关系 重度与轻中度孤独症组 exon 6 SNP 基因型及等位基因分布存在显著性差异 ($P<0.05$)。见表 3。

2.5 不同基因型儿童 CARS 得分的比较 单因素方差分析显示, 不同基因型的孤独症儿童模仿、听觉反应、非语言和总分存在显著性差异 ($P<0.05$); LSD 分析, 在基因型为 A/A、G/G 的孤独症儿童之间在模仿、听觉反应和 CARS 总分存在显著性差异 ($P<0.05$); 在基因型为 A/A 和 A/G、A/A 和 G/G 的孤独症儿童之间, 非语言存在显著性差异 ($P<0.01$)。见表 4。

表 2 exon 6 SNP 不同基因型 ABC 得分的比较(n=30)

	A/A	A/G	G/G	F	P
感觉	10.67±6.43	12.76±2.68	13.10±4.18	0.535	0.592
交往	17.00±0.00	21.24±3.40	24.70±4.57	5.709	0.009 ^a
躯体运动	11.00±4.58	12.29±3.95	12.10±7.28	0.075	0.928
语言	18.33±1.16	11.12±5.13	13.20±5.79	2.593	0.093
生活自理	11.67±3.79	11.65±3.37	12.30±2.36	0.146	0.865
总分	68.67±0.58	69.06±3.01	75.10±6.86	5.900	0.007 ^b

注：a：A/A 和 A/G 比较， $t=2.109$ ， $P=0.049$ ；A/A 和 G/G 比较， $t=2.829$ ， $P=0.016$ 。b：A/G 和 G/G 比较， $t=2.641$ ， $P=0.023$ 。

表 3 孤独症组 CARS 评分重度组与轻中度组 exon 6 SNP 比较

病情	n	A/A	A/G	G/G	A	G
轻中度	14	3	10	1	16	12
重度	16	0	7	9	7	25
χ^2			9.840			6.116
P			0.007			0.049

表 4 不同基因型 CARS 评分比较

项目	A/A	A/G	G/G	F	P
人际关系	2.33±0.58	2.71±0.85	3.10±0.57	1.524	0.236
模仿	2.00±0.00 ^a	2.88±0.78	3.40±0.70 ^a	4.577	0.019
情感反应	2.33±0.58	2.53±0.72	2.80±0.79	0.650	0.530
躯体运用	2.67±0.58	2.29±0.47	2.40±0.70	0.582	0.566
与非生命	2.33±0.58	2.88±0.49	2.80±0.79	1.034	0.369
环境适应	2.00±0.00	2.18±0.53	2.40±0.70	0.755	0.480
视觉反应	2.67±1.16	2.59±0.71	2.60±0.52	0.016	0.984
听觉反应	2.00±0.00 ^a	2.12±0.33	2.50±0.53 ^a	3.488	0.045
近感觉	2.67±0.58	2.53±0.62	2.90±0.74	0.989	0.385
焦虑反应	1.33±0.58	2.41±0.71	2.40±0.70	3.190	0.057
语言交流	3.00±0.00	3.00±0.50	3.10±0.32	0.184	0.833
非语言	2.00±0.00 ^a	2.18±0.39 ^a	2.70±0.68 ^a	4.307	0.024
活动水平	2.00±0.00	2.41±0.80	2.40±0.70	0.418	0.663
智力水平	2.00±0.00	2.24±0.44	2.50±0.71	1.324	0.283
总分	33.33±2.52 ^a	37.41±4.82	41.10±5.09 ^a	3.621	0.040

注：a：两两比较有显著性差异。

3 讨论

基因组筛查和细胞遗传学研究显示，7q 存在孤独症易感基因座位^[1-5]。RELN 基因定位在 7q22^[6]，其表达产物 reelin 蛋白为 3461 个氨基酸残基组成的巨大基质外糖蛋白，与神经元的正确迁移以及大脑皮层、小脑皮层和海马等分层结构的正确形成有关。

研究表明，与 reelin 蛋白有关的任一自然突变或定向突变会影响小鼠大脑皮层分层结构的形成，导致

胚胎脑的发育异常。RELN 基因突变导致 reelin 表达异常。研究发现，孤独症患者脑组织和血中 reelin 水平比对照下降。孤独症患者存在海马、内嗅皮质、杏仁核、扣带回皮质神经解剖异常，包括神经元大小和数目的改变。海马回负责学习和记忆，孤独症患儿的社会行为退缩、强迫行为、不知危险、不能从记忆库存中提取信息、不能调节自己以适应新环境均与海马回受损有关；损伤海马回的动物可以出现刻板行为、自

我刺激行为和多动行为。

本研究提示, exon 6 SNP 与儿童孤独症的严重程度有关: 携带基因型为 G/G 的患儿比携带基因型 A/A 的患儿模仿和听觉反应能力差, 携带基因型为 G/G、A/G 的患儿比携带基因型 A/A 的患儿有更严重的非语言交流障碍。

Weeber 等报道, RELN 和 ApoER₂ 基因共同作用提高海马的突触可塑性和学习能力^[10]。RELN 基因突变与人^[11]和鼠^[12]学习障碍、小脑发育不全、共济失调和认知障碍明显相关。

本研究结果与其他学者不一致可能由遗传异质性导致, 因为儿童孤独症是多基因复杂性疾病。也可能由于本研究样本量较小, 进一步研究应扩大样本量并进行家系研究。

[参考文献]

- [1] Lamb JA, Parr JR, Bailey AJ, et al. Autism: in search of susceptibility genes[J]. *Neuromol Med*, 2002, 2: 11-28.
- [2] International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q[J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7: 571-578.
- [3] Phillippe A, Martinez M, Guilloud-Bataille M, et al. Genome-wide scan for autism susceptibility genes[J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8: 805-812.
- [4] Ashley-Koch A, Wolpert CM, Menold MM, et al. Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7[J]. *Genomics*, 1999, 61: 227-236.
- [5] Collaborative Linkage Study of Autism. Barrett S, Beck JC, Bernier R, et al. An autosomal genomic screen for autism[J]. *Am J Med Genet*, 1999, 88: 609-615.
- [6] DeSilva U, D' Arcangelo G, Braden VV, et al. The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7[J]. *Genome Res*, 1997, 7: 157-164.
- [7] Anderson GM, Gutknecht L, Cohen DJ, et al. Serotonin transporter promoter variants in autism: functional effects and relationship to platelet hyperserotonemia[J]. *Mol Psychiatry*, 2002, 7 (8):831-836.
- [8] Shuang M, Liu J, Jia MX, et al. Family-based association study between autism and glutamate receptor 6 gene in Chinese Han trios[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2004, 131 (1):48-50.
- [9] Bah J, Quach H, Ebbstein RP, et al. Maternal transmission disequilibrium of the glutamate receptor GRIK2 in schizophrenia[J]. *Neuroreport*, 2004, 15:1987-1991.
- [10] Weeber EJ, Beffert U, Jones C, et al. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:39944-39952.
- [11] Hong SE, Shugart YY, Huang DT, et al. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations[J]. *Nat Genet*, 2000, 26:93-96.
- [12] Goffinet AM. The Reeler gene: A clue to brain development and evolution[J]. *Int J Dev Biol*, 1992, 36:101-107.

(收稿日期: 2011-01-12 修回日期: 2011-04-11)