

Shank3 基因多态性与汉族儿童孤独症的关联研究

李小平¹, 胡正茂², 郭 辉², 郝朝亮¹

(1. 南华大学附属第一医院生殖医学中心, 湖南 衡阳, 421001; 2. 中南大学医学遗传学国家重点实验室)

摘要: **目的** 研究 Shank3 基因的单核苷酸多态性(SNPs)与汉族儿童孤独症的相关性。**方法** 采用 Illumina CNV 370-Duo 芯片对 280 个汉族人群孤独症核心家系的 Shank3 基因单核苷酸多态性位点 rs9616816、rs736334、rs2040487、rs6009951、rs715586、rs8137951 进行基因分型检测,对基因分型数据采用 haploview4.1 软件进行连锁不平衡检测和家系为基础的关联分析(FBAT)。**结果** 家系为基础的关联分析结果显示 Shank3 基因的 rs715586、rs6009951 位点的等位基因和 rs715586-rs8137951 的 G-A, A-G 单体型在孤独症中的传递差异具有统计学意义($P < 0.05$),但经 1000 次模拟的置换检验后不再具有统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Shank3 基因可能不是汉族儿童孤独症的致病基因,至少不是其致病的主效基因。

关键词: Shank3 基因; 家系为基础的相关性检验; 单核苷酸多态性

中图分类号: R749.94

文献标识码: A

Association Study of Shank3 Gene Polymorphism with Autism in the Chinese Han Children

LI Xiaoping, HU Zhengmao, GUO Hui, et al

(Reproduction Medicine Center, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the association of single nucleotide polymorphisms (single nucleotide polymorphisms, SNPs) of the Shank3 gene with autism in the Chinese Han children. **Methods** The single nucleotide polymorphism loci rs9616816 rs736334 rs2040487, rs6009951, rs715586, rs8137951 of the Shank3 gene were genotyped by using Illumina CNV 370-Duo in 280 Chinese Han autistic trios, the linkage disequilibrium and the family based associated test (FBAT) was performed using genotyping data by haploview4.1 software. **Results** The results of the family based associated test (FBAT) demonstrated that the transmission of the allelic rs715586, rs6009951 and the haplotype G-A, A-G of rs715586-rs8137951 in 280 autistic trios had statistical significance ($P < 0.05$), but the results had no statistical significance after the 1000 times permutation ($P > 0.05$). **Conclusion** The Shank3 gene may not be the pathogenic gene of autism in the Chinese Han children, at least not a major susceptibility gene for autism.

Key words: Shank3 gene; FBAT; SNPs

孤独症是一种广泛发育障碍性疾病,其主要临床特征为语言交流障碍,刻板的行为模式和兴趣狭窄,其男女发病比例大约为 4:1^[1]。家系及双生子研究显示遗传因素在孤独症的致病中起了重要作用^[2]。孤独症具有明显的多基因病的特点,其遗传异质性高,病因复杂,且病因至今未明。目前已有的

研究表明 Shank3 基因可能与孤独症的致病相关,因此,有必要研究该基因与汉族儿童孤独症的相关性,以期明确该基因与孤独症致病的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

共 280 个采集于中南大学湘雅二医院精神卫生研究所精神卫生门诊和青岛以琳培训中心的孤独症

核心家系被纳入本研究。280 例孤独症儿童的平均年龄 4.3 ± 1.3 岁,其中男 206 例,女 74 例。孤独症儿童的诊断符合 DSM-IV 标准和国际疾病分类诊断标准,并排除脆性 X 染色体综合征、染色体畸变、及由于药物或神经疾病导致的与孤独症症状相似的疾病。纳入本研究的 280 个孤独症核心家系的孤独症患儿的父母双方均无孤独症。研究对象或其父母对本研究均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采集研究对象静脉血 3 mL,常规氯仿-饱和酚白细胞提取法提取 DNA,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.2 基因分型检测 采用 Illumina CNV 370-Duo 芯片检测所有样本的 SNPs 位点的等位基因型,提取 Shank3 基因的 SNPs 位点分型数据,其中 rs9616816、

rs736334、rs2040487、rs6009951、rs715586、rs8137951 的基因分型数据符合进一步分析的要求。

1.3 统计学处理

数据资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 haploview 4.1 分析软件对 Shank3 基因的 rs9616816、rs736334、rs2040487、rs6009951、rs715586、rs8137951 的基因分型频率的数据进行卡方 (χ^2) 检验。

2 结 果

2.1 哈德温伯格遗传平衡检验

对 280 个孤独症核心家系的 Shank3 基因的 6 个 SNPs 分型结果进行哈德温伯格遗传平衡检验结果显示各位点的基因型频率分布均未偏离哈德温伯格平衡,哈德温伯格平衡检验结果见表 1。

表 1 孤独症核心家系的哈德温伯格平衡检验

单核苷酸位点	染色体位置	哈温 P 值	基因分型百分率	核心家系数	孟德尔错误	最小等位基因频率
rs9616816	49470371	0.2496	100	280	0	0.267
rs736334	49486044	0.3233	100	280	0	0.268
rs2040487	49493881	0.7985	100	280	0	0.425
rs6009951	49498216	0.9726	100	280	0	0.151
rs715586	49510004	0.8665	100	280	0	0.097
rs8137951	49512530	0.2559	100	280	0	0.358

2.2 Shank3 基因的 6 个 SNPs 的连锁不平衡检验与家系为基础的关联分析

对 280 个汉族儿童孤独症的家系为基础的关联分析结果显示 rs715586、rs8137951 位点等位基因传递与未传递的频率差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),但经 1000 次模拟的置换检验后等位基因频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Shank3 基因的 6 个 SNPs 分型结果的连锁不平衡检验结果见图 1。Shank3 基因的 6 个 SNPs 家系为基础的关联分析结果见表 2。

表 2 Shank3 基因 6 个 SNPs 位点家系为基础的关联分析结果

单核苷酸位点	优势传递等位基因	传递数:未传递数	卡方值	P 值
rs9616816	G	128: 104	2.483	0.1151
rs736334	G	125: 106	1.563	0.2113
rs2040487	G	141: 131	0.368	0.5443
rs6009951	A	77: 69	0.438	0.5079
rs715586	A	61: 36	6.443	0.0111
rs8137951	G	153: 119	4.25	0.0393

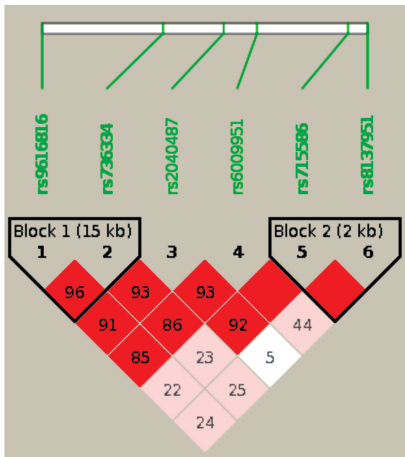


图 1 图中正方形内数值为 Shank3 基因的 6 个 SNPs 间的配对连锁不平衡 D' 值,正方形的颜色越深表示连锁的程度越高

2.3 Shank3 基因家系为基础的单体型分析结果

Shank3 基因家系为基础的单体型分析结果显示 rs715586-rs8137951 的 G-A、A-G 单体型在孤独症家系中的传递差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),但经 1000 次模拟的置换检验后单体型传递差异无统

计学意义 ($P < 0.05$), 单体型分析结果见表 3。

表 3 Shank3 基因单体型分析结果

单体型	频率	传递数: 未传递数	卡方值	P 值
rs9616816-rs736334				
G-G	0.726	125.0: 107.0	1.397	0.2373
A-A	0.261	103.0: 128.0	2.706	0.1
rs715586-rs8137951				
G-G	0.545	143.0: 134.0	0.292	0.5887
G-A	0.358	119.0: 153.0	4.25	0.0393
A-G	0.097	61.0: 36.0	6.443	0.0111

3 讨 论

孤独症的病因至今不明,已有的研究发现多个基因可能和孤独症的致病相关,Shank3 基因是孤独症致病的候选基因之一。Shank3 基因位于 22q13.3,编码一个 1731 个氨基酸的富含脯氨酸的突触相关蛋白 2(ProSAP2)^[3]。SHANK3 是 SHANK 突触骨架蛋白的一员,在兴奋性突触的突触后致密结构含量丰富。多个研究显示 SHANK3 的结合结构域与多种膜蛋白和胞质蛋白相互作用,在神经树突成熟、功能性突触的形成及突触的功能发挥中具有重要的作用^[4-6]。22q13.3 缺失综合症的患者表现为严重的智力、语言、行为的损害及孤独症样行为,且 Shank3 基因单倍剂量不足或缺失的 22q13.3 缺失综合症患者表现出孤独症的相关症状,提示 Shank3 基因与孤独症的致病可能相关^[7]。多个研究在 ASD 患者中发现了 Shank3 基因的变异,包括了点突变和基因拷贝数变异,在 ASD 中该基因突变的频率为 1% 左右,Shank3 基因突变研究的结果提示 Shank3 基因的一些位点的突变与孤独症的某些类型相关,Shank3 基因可能是孤独症的重要致病基因^[8-10]。此外,Shank3 基因缺失鼠模型表现出明显的孤独症样行为,如社会交往障碍,社会沟通障碍和强迫性重复动作等,且发现其脑神经突触的形成和神经信号传递受到影响^[9,11,12]。尽管已有的研究在中国汉族人群未发现 Shank3 基因与孤独症的致病存在相关性^[13,14],但 Shank3 基因与突触的结构和功能相关,与脑的功能相关,该基因可能在孤独症的致病发挥了作用^[15]。

本研究采用基因芯片对 Shank3 基因的 6 个 SNPs 进行基因分型检测和统计学分析的结果显示,在未经置换检验前,Shank3 基因单核苷酸多肽性位点 rs715586,rs8137951 的等位基因频率和 rs9616816-

rs736334 的 G-G、A-A 单体型频率和 rs715586-rs8137951 的 G-A、A-G 单体型频率在孤独症的家系传递中的差异具有统计学意义,但经 1000 次模拟的置换检验后,结果不再具有统计学意义,提示在汉族人群中 Shank3 基因可能不是汉族人群孤独症的致病基因,至少不是其致病的主效基因。这与 Jian Qin 等的研究结果一致^[14]。然而,本研究结果的准确性可能受到以下原因的影响。首先,来自不同地域的样本,由于其遗传异质性的差异可能导致本研究结果出现偏差。其次研究样本量的限制可能导致微效基因效应不能检出。此外,Shank3 基因的表现遗传修饰可能在孤独症的致病中起了作用。基于以上原因,有必要进一步扩大样本量对该基因进行家系为基础的关联研究和表现遗传方面的研究。

参考文献:

[1] Volkmar FR, Lord C, Bailey A, et al. Autism and pervasive developmental disorders[J]. J Child Psychol Psychiatry, 2004, 45(1): 135-170.

[2] Bailey A, Le Couteur A, Gottesman IA, et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study[J]. Psychol Med, 1995, 25(1): 63-77.

[3] Boeckers TM, Liedtke T, Spilker CA, et al. C-terminal synaptic targeting elements for postsynaptic density proteins ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3[J]. J Neurochem, 2005, 92(3): 519-524.

[4] Raab M, Boeckers TM, Neuhuber WL. Proline-rich synapse-associated protein-1 and 2 (ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3)-scaffolding proteins are also present in postsynaptic specializations of the peripheral nervous system[J]. Neuroscience, 2010, 171(2): 421-433.

[5] Wendholt D, Spilker C, Schmitt AA, et al. ProSAP-interacting protein 1 (ProSAPiP1), a novel protein of the postsynaptic density that links the spine-associated Rap-Gap (SPAR) to the scaffolding protein ProSAP2/Shank3[J]. J Biol Chem, 2006, 281(19): 13805-13816.

[6] Grabrucker AM, Schmeisser MJ, Udvardi PTA, et al. Amyloid beta protein-induced zinc sequestration leads to synaptic loss via dysregulation of the ProSAP2/Shank3 scaffold[J]. Mol Neurodegener, 2011, 6: 65.

[7] Soorya L, Kolevzon A, Zweifach JA, et al. Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency[J]. Mol Autism, 2013, 4(1): 18.

[8] Wilson HL, Crolla JA, Walker DA, et al. Interstitial 22q13 deletions: genes other than SHANK3 have major effects on cognitive and language development[J]. Eur J Hum Genet, 2008, 16(11): 1301-1310.

[9] Durand CM, Perroy J, Loll FA, et al. SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine

- morphology via an actin-dependent mechanism [J]. Molecular Psychiatry, 2012, 17(1):71-84.
- [10] Durand CM, Betancur C, Boeckers TMA, et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders [J]. Nat Genet, 2007, 39(1):25-27.
- [11] Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou DA, et al. Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication [J]. Molecular Autism, 2010, 1(1):15.
- [12] Peca J, Feliciano C, Ting JTA, et al. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction [J]. Nature, 2011, 472(7344):437-442.
- [13] Liu Y, Du Y, Liu WA, et al. Lack of association between NLGN3, NLGN4, SHANK2 and SHANK3 gene variants and autism spectrum disorder in a Chinese population [J]. PLoS One, 2013, 8(2):e56639.
- [14] Qin J, Jia M, Wang LA, et al. Association study of SHANK3 gene polymorphisms with autism in Chinese Han population [J]. BMC Med Genet, 2009, 10:61.
- [15] Alarcon M, Abrahams BS, Stone JLA, et al. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene [J]. Am J Hum Genet, 2008, 82(1):150-159.

(此文编辑:秦旭平)