

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.04.013

Shank3 基因多态性与汉族儿童孤独症的病例对照研究*

李小平¹,郝朝亮¹,郭辉²

(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,湖南长沙 410078)

[摘要] **目的** 探讨 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 芯片和 Illumina 610 芯片对 455 例孤独症患者(孤独症组)和 1 097 例无孤独症及相关精神疾病儿童(对照组)的 Shank3 基因 SNPs 位点进行基因分型检测,对基因分型数据采用 haploview4.1 软件进行关联分析。**结果** Shank3 基因的 rs736334、rs8137951 位点的等位基因频率和 rs9616816-rs736334 的 G-G、A-A 及 rs715586-rs8137951 的 G-A 单体型频率在两组间的传递比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但经 1 000 次模拟置换检验后的结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Shank3 基因与汉族儿童孤独症的致病不存在相关性,Shank3 基因可能不是汉族儿童孤独症的易感基因。

[关键词] Shank3 基因;多态性;单核苷酸;病例对照研究**[中图分类号]** R729**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)04-0469-03

A case-control study on Shank3 gene polymorphism and autism in Han children*

Li Xiaoping¹, Hao Chaoliang¹, Guo Hui²

(1. Reproductive Medicine Center, First Affiliated Hospital, South China University, Hengyang, Hunan 421001, China;

2. State Key Laboratory of Medical Genetics, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

[Abstract] **Objective** To study the correlation between the single nucleotide polymorphisms(SNPs) of Shank3 gene with autism in the Han children. **Methods** The SNPs loci of Shank3 gene in 455 Han autistic children (autism group) and 1 097 Han children with no autism and related mental illness (control group) were detected by using Illumina CNV 370-Duo and Illumina 610 chips, the genotyping data were performed the association analysis by using the haploview4.1 software. **Results** The transmission of allelic frequency of rs736334 and rs8137951 in Shank3 gene and the haplotype frequencies of G-G, A-A in rs9616816-rs736334 and G-A in rs715586-rs8137951 had statistically significant difference between the autism group and the control group ($P < 0.05$), but after the replacement of 1 000 times of simulation test, the results was no longer statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Shank3 gene has no correlation with the pathogenesis of autism in the Han children. The Shank3 gene may not be the pathogenic gene of autism in Han children.

[Key words] Shank3 gene; polymorphism; single nucleotide; case-control study

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^[1]。孤独症的病因复杂,且具有明显的多基因病的特点,其病因至今未明,其遗传力高达 90%^[2]。Shank3 基因是 SHANK 突触骨架蛋白的一员,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^[3-5]。有文献报道在自闭症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 患者中发现了 Shank3 基因的点突变和基因拷贝数变异,Shank3 基因单倍剂量不足患者表现出孤独症的相关症状^[6-9]。已有研究提示,Shank3 基因与孤独症的致病可能相关,作者对该基因与汉族儿童孤独症的相关性进行研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 1 月至 2009 年 12 月中南大学医学遗传学国家重点实验室遗传门诊、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收治的汉族孤独症儿童共 455 例(孤独症组),其中男 365 例,女 90 例;年

龄 3~10 岁,平均(5.12±1.23)岁。455 例孤独症患儿诊断均符合 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。选择同期中南大学医学遗传学国家重点实验室遗传门诊无孤独症及相关的精神疾病,无脑发育异常、精神或重大躯体疾病的汉族儿童共 1 097 例,其中男 876 例,女 221 例;年龄 3~10 岁,平均(5.24±1.36)岁。两组研究对象的父母或监护人对本研究均知情同意并签署知情同意书。两组儿童性别、年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

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-酚和酚白蛋白提取法提取 DNA,置于-80℃冰箱保存。

1.2.2 基因分型 采用 Illumina CNV 370-Duo 芯片和 Illumina 610 芯片检测所有样本的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点的等位基因型,获取 Shank3 基因的 6 个 SNPs 位点:即 rs9616816、rs736334、rs2040487、rs6009951、rs715586、rs8137951 的基因分型数据。

* 基金项目:湖南省卫生计生厅资助项目(B2011-067)。 作者简介:李小平(1975—),助理研究员,博士研究生,主要从事人类疾病遗传致病机制方面的研究。

1.3 统计学处理 应用 SPSS18.0 软件进行统计学分析。两组间的年龄比较采用 t 检验。哈德温伯格遗传平衡吻合度检验、等位基因频率及单体型频率比较采用 χ^2 检验进行, 检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。应用 haploview 4.1 分析软件对 Shank3 基因的 6 个 SNPs 位点的基因分型数据进行连锁不平衡和单体型分析。

2 结果

2.1 哈德温伯格遗传平衡检验 采用 Haploview 4.1 软件对两组对象的 Shank3 基因分型结果进行哈德温伯格遗传平衡检验, Shank3 基因的 6 个 SNPs 分型的基因型频率分布均未偏离哈德温伯格平衡 ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 Shank3 基因分型结果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 (%)	孟德尔错误	最小等位基因频率
rs9616816	49470371	1.00	100.00	0	0.28
rs736334	49486044	0.89	100.00	0	0.29
rs2040487	49493881	0.13	100.00	0	0.38
rs6009951	49498216	0.25	99.92	0	0.13
rs715586	49510004	0.43	100.00	0	0.11
rs8137951	49512530	0.08	100.00	0	0.37

2.2 Shank3 基因 SNPs 的配对连锁不平衡检测与病例对照关联分析 采用 Haploview 4.1 软件对 Shank3 基因的 6 个 SNPs 进行连锁不平衡检验, 见表 2。病例对照关联分析结果显示, rs736334、rs8137951 位点在病例对照间传递与未传递的等位基因比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 但经 1 000 次模拟置换检验后的结果比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。Shank3 基因的 6 个 SNPs 的病例对照分析结果, 见表 3。

表 2 Shank3 基因的 6 个 SNPs 的配对连锁不平衡 D' 值

SNPs	rs736334	rs2040487	rs6009951	rs715586	rs8137951
rs9616816	0.97	0.89	0.94	0.23	0.27
rs736334	—	0.92	0.90	0.27	0.26
rs2040487	—	—	0.93	0.91	0.10
rs6009951	—	—	—	1.00	0.31
rs715586	—	—	—	—	1.00

—: 此项无数据。

表 3 Shank3 基因 6 个 SNPs 位点病例对照分析结果

SNPs 位点	等位基因	等位基因比例		基因频率		χ^2	P
		孤独症组	对照组	孤独症组	对照组		
rs9616816	G	675 : 235	1 551 : 643	0.74	0.71	3.85	0.05
rs736334	G	673 : 237	1 530 : 664	0.74	0.70	5.56	0.02
rs2040487	A	367 : 543	825 : 1 369	0.40	0.38	2.02	0.16
rs6009951	G	126 : 784	289 : 1 903	0.14	0.13	0.24	0.62
rs715586	A	115 : 795	225 : 1 969	0.13	0.10	3.74	0.05
rs8137951	G	598 : 312	1 357 : 837	0.66	0.62	4.12	0.04

2.3 Shank3 基因病例对照单体型分析 Shank3 基因病例对

照单体型分析结果显示, rs9616816-rs736334 的 G-G、A-A 单体型及 rs715586-rs8137951 的 G-A 单体型在病例对照间的传递比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 但经 1 000 次模拟置换检验后的结果比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 单体型分析结果, 见表 4。

表 4 Shank3 基因病例对照单体型分析结果

SNPs 单体型	单体型比例		单体型频率		χ^2	P
	孤独症组	对照组	孤独症组	对照组		
rs9616816-rs736334						
G-G	667 : 243	1 520 : 674	0.73	0.69	4.99	0.03
A-A	229 : 681	633 : 1 561	0.25	0.29	4.36	0.04
G-A	8 : 902	31 : 2 163	0.01	0.01	1.47	0.23
rs715586-rs8137951						
G-G	483 : 427	1 132 : 1 062	0.53	0.52	0.57	0.45
G-A	312 : 598	837 : 1 357	0.34	0.38	4.12	0.04
A-G	115 : 795	225 : 1 969	0.13	0.10	3.74	0.05

3 讨论

Shank3 是重要的突触后致密结构骨架蛋白, 是构建突触后密度复合体的主要成员, 在神经信号的传递中起桥梁作用, 并在突触的装配及树突的形成和成熟中起了重要作用。Shank3 基因与突触的结构和功能相关, 与语言发育相关^[3-6]。已有研究报道了在部分孤独症患者中 Shank3 基因存在突变, 而在对照中则没有发现该基因的突变^[7-8]。且在鼠模型中对 Shank3 基因进行的功能研究显示 Shank3 基因可能与孤独症的致病相关^[10-11]。以上研究结果提示, Shank3 基因可能是孤独症的一个重要的候选基因, 但关于该基因的多态性与孤独症的相关性研究在不同人群中的研究结果并不一致。

本研究结果显示, 在未经置换检验前, Shank3 基因单核苷酸多肽性位点 rs736334、rs8137951 的等位基因频率, rs9616816-rs736334 的 G-G、A-A 单体型频率和 rs715586-rs8137951 的 G-A 单体型频率在孤独症的病例对照间的传递差异有统计学意义 ($P<0.05$), 但经 1 000 次模拟置换检验后, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。尽管对 Shank3 基因功能研究的结果提示该基因可能参与孤独症的致病, 且在部分孤独症样本中发现了该基因的点突变和 CNVs 的变异, 以上研究均提示 Shank3 基因可能与孤独症的致病相关。但本研究在汉族人群中未发现所研究的 6 个 SNPs 与孤独症存在相关性。本研究选择的 SNPs 位点与 Qin 等^[12]研究所选择的位点不同, 但二者在汉族人群中的研究结果具有一致性。导致各研究结果不一致的可能原因有: (1) 基因型分布在不同种族中存在差异, 不同种族的孤独症致病基因存在差异。 (2) 由于孤独症的高度异质性, 尽管在孤独症的患者中发现了 Shank3 基因的突变, 但其所占的比例少, 本研究样本中可能存在该种变异的样本少, Shank3 基因可能不是孤独症致病的主效基因。此外, 本研究样本只纳入了典型孤独症的患儿, 不包括非典型孤独症患者、阿斯伯格综合征患者, 样本的差异可能导致研究结果不一致。

本研究结果提示, 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。然而, 本研究结果的准确性可能受到以下原因的影响。 (1) 采用

病例对照研究方法本身受到人群分层的影响,可能导致本研究结果出现偏差。(2)研究样本量的限制可能导致微效基因效应不能检出。(3)可能 Shank3 基因的表现遗传修饰在孤独症的致病中起了作用,而本研究不能检出。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观遗传方面的研究。

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 I, et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study[J]. *Psychol Med*, 1995, 25(1):63-77.

[3] 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.

[4] Wendholt D, Spilker C, Schmitt A, 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.

[5] Grabrucker AM, Schmeisser MJ, Udvardi PT, 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.

[6] Soorya L, Kolevzon A, Zweifach J, et al. Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency[J]. *Mol Autism*, 2013, 4(24):18-20.

[7] Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, 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.

[8] Sykes NH, Toma C, Wilson N, et al. Copy number variation and association analysis of SHANK3 as a candidate gene for autism in the IMGSAC collection[J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(10):1347-1353.

[9] Chen BY, Zou XB, Zhang J, et al. Copy-number variations of SHANK3 and related clinical phenotypes in children with autism[J]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2011, 49(8):607-611.

[10] Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, et al. Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication[J]. *Mol Autism*, 2010, 1(1):164-176.

[11] Peca J, Feliciano C, Ting JT, et al. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction[J]. *Nature*, 2011, 472(7344):437-442.

[12] Qin J, Jia M, Wang L, et al. Association study of SHANK3 gene polymorphisms with autism in Chinese Han population[J]. *BMC Med Genet*, 2009, 10(7):61.

(收稿日期:2015-07-02 修回日期:2015-10-24)

(上接第 468 页)

32(6):197-202.

[12] Shiozaki T, Otsuka H, Nakata Y, et al. Spinal cord shift on magnetic resonance imaging at 24 hours after cervical laminoplasty[J]. *Spine*, 2009, 34(3):274-279.

[13] Yang CW, Fuh JL. C5 palsy after cervical spine decompression surgery[J]. *J Chin Med Assoc*, 2013, 76(7):363-364.

[14] Yamanaka K, Tachibana T, Moriyama T, et al. C₅ palsy after cervical laminoplasty with instrumented posterior fusion[J]. *J Neurosurg Spine*, 2014, 16(1):1-4.

[15] Nassr A, Eck JC, Ponnappan RK, et al. The incidence of C5 palsy after multilevel cervical decompression procedures: a review of 750 consecutive cases[J]. *Spine*, 2012, 37(3):174-178.

[16] Sasai K, Saito T, Akagi S, et al. Preventing C5 palsy after laminoplasty[J]. *Spine*, 2003, 28(17):1972-1977.

[17] Zhang J, Tsuzuki N, Hirabayashi S, et al. Surgical anatomy of the nerves and muscles in the posterior cervical

spine: a guide for avoiding inadvertent nerve injuries during the posterior approach[J]. *Spine*, 2003, 28(13):1379-1384.

[18] Katsumi K, Yamazaki A, Watanabe K, et al. Analysis of C5 palsy after cervical open-door laminoplasty: relationship between C5 palsy and foraminal stenosis[J]. *J Spinal Disord Tech*, 2013, 26(4):177-182.

[19] Imagama S, Matsuyama Y, Yukawa Y, et al. C5 palsy after cervical laminoplasty: a multicentre study[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2010, 92(3):393-400.

[20] Lubelski D, Derakhshan A, Nowacki AS, et al. Predicting C5 palsy via the use of preoperative anatomic measurements[J]. *Spine J*, 2013, 14(9):1895-1901.

[21] 刘继军, 张伟, 阿尔宾, 等. 颈椎后路椎间孔开大预防颈 5 神经根麻痹临床疗效分析[J]. *包头医学院学报*, 2013, 29(1):30-34.

(收稿日期:2015-07-08 修回日期:2015-09-16)