

· 临床研究 ·

多巴胺 D4 受体基因多态性与原发性夜间遗尿症的关联研究

戴晓梅¹, 麻宏伟¹, 卢瑶², 潘学霞¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院发育儿科; 2. 中国医科大学实验技术中心三部, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 研究多巴胺 D4 受体(dopamine D4 receptor, DRD4)基因的多态性及其组合分布与原发性夜间遗尿症(PNE)的相关性。方法 选取无亲缘关系的PNE儿童86例以及无亲缘关系的健康儿童100例为对照组,提取静脉血白细胞基因组DNA,采用聚合酶链反应及等位基因特异性扩增技术检测DRD4基因-1240L/S, -521C/T与-616C/G 3个位点的基因型。结果 PNE组与对照组DRD4-616C/G的等位基因频率及基因型频率差异存在显著性($\chi^2 = 8.13, P < 0.05$; $\chi^2 = 6.23, P < 0.05$)。等位基因组合分布研究发现DRD4-1240L/S-616C/G-521C/T组合的单倍型LCT分布频率在PNE组明显高于正常对照组($\chi^2 = 5.88, P < 0.05$)。结论 PNE儿童DRD4基因-616位点由G到C的转换可能影响DRD4基因的诱导及转录,DRD4基因启动子区3个功能多态位点构成的单倍型LCT可能进一步协同抑制了DRD4基因的转录活性,可能使DRD4蛋白表达降低,注意力缺陷,睡眠觉醒障碍,引起夜间遗尿。
[中国当代儿科杂志, 2008, 10(5): 607-610]

[关键词] 原发性夜间遗尿症;多巴胺 D4 受体;聚合酶链反应;等位基因特异性扩增

[中图分类号] R694⁺.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)05-0607-04

Relationship between dopamine D4 receptor gene polymorphisms and primary nocturnal enuresis

DAI Xiao-Mei, MA Hong-Wei, LU Yao, PAN Xue-Xia. Department of Developmental Pediatrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Ma H-W, Email: mahongwei1960@hotmail.com)

Abstract: Objective To study polymorphisms of dopamine D4 receptor (DRD4) in children with primary nocturnal enuresis (PNE) and explore the relationship between DRD4 gene polymorphisms and PNE. **Methods** Genomic DNA was isolated from leukocytes in 86 unrelated children with PNE and in 100 healthy unrelated children (controls). Polymorphisms of DRD4-1240L/S, -616C/G and -521C/T were genotyped by allele-specific primer PCR. **Results** There were significant differences in allele frequencies ($\chi^2 = 8.13, P < 0.05$) and genotypes frequencies ($\chi^2 = 6.23, P < 0.05$) of DRD4-616C/G between PNE patients and healthy controls. The frequency of haplotype LCT consisting of 3 function polymorphic sites DRD4-1240L/S, -616C/G and -521C/T in PNE patients was statistically higher than that in healthy controls ($\chi^2 = 5.88, P < 0.05$). **Conclusions** The change of C to G of DRD4-616 may affect the induction and transcription of DRD4 gene. The haplotype LCT consisting of 3 function polymorphic sites DRD4-1240L/S, -616C/G and -521C/T may synergistically inhibit the transcription activity of DRD4 gene. This might lead to a reduction of DRD4 protein expression and cause nocturnal enuresis.
[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(5): 607-610]

Key words: Primary nocturnal enuresis; Dopamine D4 receptor; Polymerase chain reaction; Allele specific amplification

原发性夜间遗尿症(primary nocturnal enuresis, PNE),是指5岁以上儿童夜间不能从睡眠中醒来控制排尿而发生的无意识排尿行为,发生率在7岁儿童中约为10%~15%。有关PNE与注意力缺陷多动障碍(ADHD)等神经心理问题的研究越来越受到人们的重视,1991年Bhatia^[1]就提出PNE与ADHD为共患病,PNE患儿中ADHD的发病率日益增

高^[2]。为探讨与ADHD有关的致病基因是否与PNE存在相关,本文采用病例-对照研究设计,测定DRD4启动子区3个多态性位点(-1240L/S, -521C/T, -616C/G),比较基因型及其组合分布在PNE儿童和正常儿童中的频率分布差异,为探讨影响PNE儿童的遗传因素提供证据。

[收稿日期]2008-03-05; [修回日期]2008-04-08

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30571985)。

[作者简介]戴晓梅,女,回族,博士研究生。主攻方向:原发性夜间遗尿症基础与临床研究。

[通讯作者]麻宏伟,教授,博士生导师。中国医科大学附属盛京医院发育儿科,邮编:110004。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 PNE 组 PNE 组选自中国医科大学附属盛京医院 2005 年 1 月至 2007 年 7 月发育儿科门诊资料完整者 86 例,其中男 59 例,女 27 例,年龄 6.1~15.8 岁,平均 7.56 ± 1.72 岁,智商 ≥ 85 。美国精神心理学学会《诊断与统计手册》的遗尿症 (DSM-IV) [3] 定义为:5 岁或 5 岁以上的小儿,每周至少有 2 次夜间遗尿,并持续至少 3 个月。所有病例均符合诊断标准。

1.1.2 对照组 同期选取我院发育儿科门诊正常体检儿童 100 例作为对照,年龄及性别与 PNE 组差异无显著性。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用 EDTA 抗凝外周静脉全血 5 mL, DNA 提取参照文献 [4]。用碘化钾法提取全基因组 DNA。

1.2.2 -1240L/S 基因型分析 聚合酶链反应 (PCR) 反应体系:100 ng 模板 DNA, 10 × PCR Buffer 1 μL, 2.5 mM dNTP 0.8 μL, 上下游引物各 50 ng, Tag 聚合酶 0.1 μL, Sterile distilled H₂O 5.1 μL, 加无菌去离子水至 10 μL 反应体系,参照 Seaman 等 [5] 的方法,检测 DRD4 基因上游 5' 端 1 240 位的 120 bp 的串联重复多态性,引物 5' GTTGTCTGTCTTTTCTCATTGTTTCCATTG 3' 5' GAAGGAGCAGGCACCGTGAGC 3'。扩增条件:94℃ 预变性 10 min, 然后 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环 35 次, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物与分型标准物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 恒定电压为 100 v, 时间为 1 h, 经图像分析系统处理后进行基因型判读, 保存结果。

1.2.3 -616C/G 基因型分析 采用等位基因特异性扩增 (allele specific amplification, ASA) 技术检测 DRD4 基因上游 5' 端启动子区 -616 C/G 多态性, 聚合酶链反应 (PCR) 反应体系:100 ng 模板 DNA, 10 × PCR Buffer 1 μL, 2.5 mM dNTP 0.8 μL, 上下游引物各 50 ng, Tag 聚合酶 0.1 μL, Sterile distilled H₂O 5.1 μL, 加无菌去离子水至 10 μL 反应体系, 参照文献 [6] 的方法, 检测 DRD4 基因上游 5' 端 1 240 位的 120 bp 的串联重复多态性, 引物 5' GAACCTACCCCGCCTGTCTGT 3', 5' AGACGGGAATGAAGCGAGCTGG 3', 5' TGGTCGCGGGGCTGAGC 3', 5' CCCCCMGCAGCCTCTGGYC 3'。扩增条件:94℃ 预变性 10 min, 然后 94℃ 30 s, 69℃ 30 s, 72℃

1 min, 循环 35 次, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物与分型标准物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 恒定电压为 100 v, 时间为 1 h, 经图像分析系统处理后进行基因型判读, 保存结果。

1.2.4 -521C/T 基因型分析 采用 ASA 技术检测 DRD4 基因上游 5' 端启动子区 -521 C/T 多态性, 聚合酶链反应 (PCR) 反应体系:100 ng 模板 DNA, 10 × PCR Buffer 1 μL, 2.5 mM dNTP 0.8 μL, 上下游引物各 50 ng, Tag 聚合酶 0.1 μL, Sterile distilled H₂O 5.1 μL, 加无菌去离子水至 10 μL 反应体系, 参照 Ronai 等 [7] 的方法, 引物 5' GGAATGGAGGAGGGGACCGGG 3', 5' CGCTCCACCGTGAGCCCAGTAT 3', 5' GGAGCGGGCGTGGAGGGC 3', 5' GCCTCGACCTCGTGCGCA 3'。扩增条件:94℃ 预变性 10 min, 然后 94℃ 30 s, 69℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环 35 次, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物与分型标准物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 恒定电压为 100 v, 时间为 1 h, 经图像分析系统处理后进行基因型判读, 保存结果。

PCR 扩增 C 特异性产物片段为 405 bp, T 特异性产物片段为 235 bp, 共有产物片段为 605 bp。

1.3 统计分析

利用聚类分析法对每个多态性位点的等位基因, 分别进行组合分析, 获得每个组合等位基因的分布频数、频率。采用分类资料相关分析, 以 $P < 0.05$ 作为统计学差异的判别标准。

2 结果

2.1 DRD4 基因启动子区的 3 个功能多态性 -1240L/S、-616C/G、-521C/T 位点 PCR 扩增产物电泳谱带分析

-1240L/S 位点 PCR 扩增产物长片段 (L) 为 549 bp, 短片段 (S) 为 429 bp (图 1)。

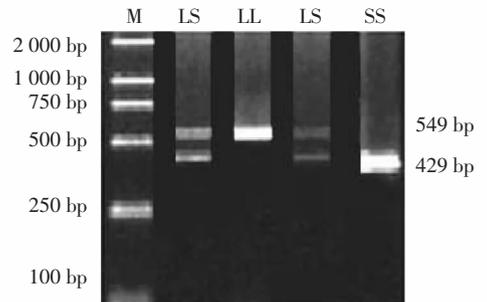


图 1 -1240L/S 位点琼脂糖凝胶电泳结果

-616C/G 位点 PCR 扩增 C 特异性产物片段为 415 bp, G 特异性产物片段为 267 bp, 共有产物片段

为 645 bp(图 2)。

-521C/T 位点 PCR 扩增 C 特异性产物片段为 405 bp, T 特异性产物片段为 235 bp, 共有产物片段为 605 bp(图 3)。

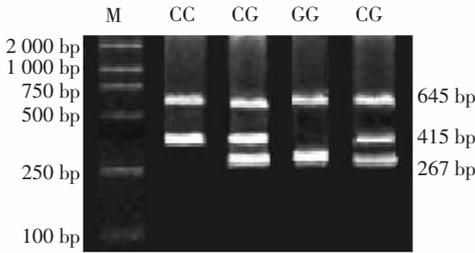


图 2 -616C/G 位点琼脂糖凝胶电泳结果

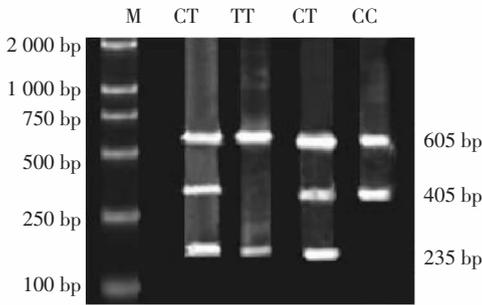


图 3 -521C/T 位点琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 PNE 组与正常儿童 DRD4 基因启动子区的 3 个多态性位点的等位基因及等位基因型分布

DRD4 基因启动子区 3 个功能多态位点 -1 240 L/S、-616 C/G、-521 C/T 的等位基因和基因型频率在 PNE 组和正常对照组的分布,均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律(表 1)。

2.3 -1240L/S 位点和 PNE 的关联分析

PNE 组与正常对照组 -1240L/S 位点基因多态性比较见表 1。两组等位基因比较($\chi^2 = 1.35, P = 0.12$), 差异无显著性; 两组基因型比较($\chi^2 = 1.58, P = 0.32$), 差异亦无显著性。

表 1 PNE 组与正常对照组之间的 DRD4 基因启动子区的 3 个功能多态性位点的等位基因及基因型频率

多态位点	基因型频率			等位基因频率	
	LL	LS	SS	L	S
-1240L/S					
对照组(100)	33(0.33)	49(4.90)	18(0.18)	115(0.58)	85(0.42)
PNE 组(86)	38(0.44)	35(0.41)	13(0.15)	111(0.65)	61(0.35)
-616C/G					
对照组(100)	4(0.04)	28(0.28)	68(0.68)	36(0.18)	164(0.82)
PNE 组(86)	8(0.09)	32(0.37)	46(0.54)	48(0.28)	124(0.72)
-521C/T					
对照组(100)	12(0.12)	54(0.54)	34(0.34)	78(0.39)	122(0.61)
PNE 组(86)	12(0.14)	44(0.51)	30(0.35)	68(0.40)	104(0.60)

2.4 -616C/G 位点和 PNE 的关联分析

PNE 组与正常对照组 -616C/G 位点位点基因多态性比较见表 1。PNE 组 C 等位基因的频率显著高于正常对照组($\chi^2 = 8.13, P = 0.004, OR = 2.04, 95\% CI: 1.25 \sim 3.32$), 基因型 CC、CG、GG 频率比较差异也有显著性($P = 0.02, \chi^2 = 6.23$)。

2.5 -521C/T 位点和 PNE 的关联分析

PNE 组与正常对照组 -521C/T 位点基因多态性比较见表 1。两组等位基因比较($\chi^2 = 0.42, P = 0.31$), 差异无显著性; 两组基因型比较($\chi^2 = 0.73, P = 0.85$), 差异亦无显著性。

2.6 PNE 组与正常儿童 DRD4 基因启动子区的 3 个多态性位点的单倍型分析

DRD4 基因启动子区 3 个功能多态位点 (-1 240L/S、-616C/G、-521C/T) 组成的单倍型频率分布见表 2。结果显示单倍型 LCT 在 PNE 组的频率显著高于正常对照组($\chi^2 = 5.88, P = 0.018, OR = 2.52, 95\% CI: 1.32 \sim 6.43$)。

表 2 PNE 组与正常儿童之间的 DRD4 基因启动子区的 3 个功能多态性位点的单倍型频率分布

编号	单倍型	PNE, %	正常, %	χ^2 值	比值比	95% CI
1	L C C	7.2	4.6	1.54	1.75	0.53 ~ 3.24
2	L C T	9.3	3.7	5.88 ^a	2.52	1.32 ~ 6.43
3	L G C	15.2	13.1	1.24	1.40	0.27 ~ 2.91
4	L G T	28.4	38.6	2.14	0.75	0.37 ~ 1.67
5	S C C	8.3	4.9	1.02	1.56	0.64 ~ 3.17
6	S C T	4.4	4.8	0.01	0.79	0.42 ~ 2.27
7	S G C	8.5	16.4	3.38	0.46	0.35 ~ 1.24
8	S G T	10.2	13.9	0.21	1.75	0.53 ~ 1.44

a: $P < 0.05$

3 讨论

原发性夜间遗尿症是一类具有复杂遗传效应的疾病,近年来的研究显示 PNE 除与遗传因素有关外,精氨酸加压素(AVP)夜间分泌不足、睡眠觉醒障碍、膀胱功能障碍可能是其发病机制之一。关于分子水平的研究 Loeyls^[8]对 32 个遗尿症家系进行研究,检测了染色体 13q13-14.3 等,并分析其与临床表型的关系,结果发现了遗尿症的基因型和表型的异质性。染色体 13 长臂 13-14.3 序列已被命名为 ENUR1 基因,可调控肾集合管上皮细胞侧壁上水孔蛋白 2 (Aquaporin2) 蛋白受体的表达。但在最近的一项研究中 Bayoumi^[9]对美国的 10 个 PNE 家系进行研究发现 PNE 与过去报道的 12、13 号染色体位点并没有相关性,提出 PNE 的遗传异质性值得进一步的研究。

一系列研究显示 PNE 儿童除夜间遗尿外,常伴有不同程度的神经心理损害,同时合并其他神经精神类疾病^[10],我们在研究中发现 PNE 儿童同时伴有 ADHD 占全部 PNE 患儿的 42%,与国外 Robson 等^[11]报道 PNE + ADHD 占全部 PNE 患儿 40% 基本一致。通过智力结构分析和视听整合持续操作测试^[12,13],发现不伴有 ADHD 的单纯 PNE 儿童亦存在注意力缺陷问题,我们推测注意力缺陷引起的睡眠觉醒障碍可能为遗尿发生机制之一,PNE 与 ADHD 常同时患病,可能存在共同的致病基因,因此与注意力缺陷有关的一切基因,也就是与 ADHD 有关的基因都有可能成为 PNE 的候选基因。

目前认为与 ADHD 最为密切的神经递质是多巴胺,多巴胺相关基因也一直是 ADHD 遗传学研究的重点^[14]。尤其是多巴胺 D4 受体基因,定位于人类第十一号染色体短臂 15 区 5 带(11P15.5),它包含 5 个外显子和 4 个内含子。该基因极具多态性,其中位于非编码区的启动子区的多态性,可能改变 mRNA 聚合酶与启动子的亲和力,从而影响基因的转录启动频率,使基因表达水平升高或降低,进而影响蛋白的表达和功能,神经递质的改变可能引起儿童神经心理特征的变化,因此 PNE 儿童 DRD4 基因启动子区多态性的研究极具理论和现实意义。

本研究对 DRD4 基因启动子区 3 个功能多态位点(-1240 L/S、-616C/G、-521C/T)进行检测结果显示,-1240L/S 和 -521C/T 位点与 PNE 无相关联。DRD4 基因 -616C/G 位点在 PNE 组 C 等位基因的频率显著高于正常对照组,提示 DRD4 基因 -616C/G 位点可能与 PNE 相关联。在单倍型研究中发现 LCT 单倍型在 PNE 组显著高于正常对照组,可能与 PNE 相关联。Barr 等^[15]提出 -616C/G 存在 AP-2 的结合位点,AP-2 有诱导和分化转录因子的功能。因此我们推测 PNE 儿童-616 位点由 G 到 C 的转换可能影响 AP-2 结合位点的活性,从而影响 DRD4 基因的诱导及转录,DRD4 基因启动子区 3 个功能多态位点构成的单倍型 LCT 可能进一步协同抑制了 DRD4 基因的转录活性,使 DRD4 蛋白的表达降低,功能减弱,多巴胺递质代谢通路障碍,引起注意力缺陷,不能优化感觉传导通路,膀胱扩张的刺激信号难以被有效的识别和区分,阻碍机体唤醒机制发挥作用,睡眠觉醒障碍,导致夜间遗尿。这只是我们的一种假设,DRD4 蛋白的表达是否降低,功能是否改变有待于今后进一步进行实验加以证实。我们在治疗过程中发现,部分以注意力不集中为主诉的 PNE 患儿在应用专注达(盐酸哌甲酯胶囊)治

疗后遗尿行为得到明显改善,观察的 14 例中,3 例遗尿行为完全消失,8 例夜间遗尿次数,尿量明显减少,这就进一步证实注意力缺陷引起的睡眠觉醒障碍可能为 PNE 的发病机制之一,为 PNE 发病机制的研究和治疗的完善提供了新的线索。

[参 考 文 献]

- [1] Bhatia MS, Nigam VR, Bohra N, Malik SC. Attention deficit disorder with hyperactivity among paediatric outpatients[J]. J Child Psychol Psychiatry, 1991, 32(2):297-306.
- [2] Baeyens D, Roeyers H, Demeyere I, Verté S, Hoebeke P, Vande Walle J. Attention-deficit hyperactivity disorder(ADHD) as a risk factor for persistent nocturnal enuresis in children: a two-year follow-up study[J]. Acta Paediatr, 2005, 94(11):1619-1625.
- [3] Makari J, Rushton HG. Nocturnal enuresis[J]. Am Fam Physician, 2006, 73(9):1611-1613.
- [4] 赵书平,张俊洁,杨玉红,于丽华,郭峰.用碘化钾提取基因组 DNA[J]. 临床检验杂志,2000,18(1):38-39.
- [5] Seaman MI, Fisher JB, Chang F, Kidd KK. Tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4)[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 1999, 88(6):705-709.
- [6] Ronai Z, Szantai E, Szmola Z, Szekely A, Gervai J, Guttman A. A novel A/G SNP in the -615th position of the dopamine D4 receptor region as a source of misgenotyping of the -616 C/G SNP [J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2004, 126(1):74-78.
- [7] Ronai Z, Barta C, Guttman A, Lakatos K, Gervai J, Staub M. Genotyping the -521C/T functional polymorphism in the promoter region of dopamine D4 receptor (DRD4) gene[J]. Electrophoresis, 2001, 22(6):1102-1105.
- [8] Loeys B, Hoebeke P, Raes A, Messiaen L, De Paepe A, Vande Walle J. Does monosymptomatic enuresis exist? A molecular genetic exploration of 32 families with enuresis/incontinence [J]. BJU, 2002, 90(1):76-83.
- [9] Bayoumi RA, Eapen V, Al-Yahyaee S, Al Barwani HS, Hill RS, Al Gazali L. The genetic basis of inherited primary nocturnal enuresis: A UAE study[J]. J Psychosom Res, 2006, 61(3):317-320.
- [10] Van Hoecke E, De Fruyt F, De Clercq B, Hoebeke P, Vande Walle J. Internalizing and externalizing problem behavior in children with nocturnal and diurnal enuresis: A five-factor model perspective[J]. J Pediatr Psychol, 2006, 31(5):460-468.
- [11] Robson WL, Jackson HP, Blackhurst D, Leung AK. Enuresis in children with attention-deficit hyperactivity disorder [J]. South Med J, 1997, 90(5):503-505.
- [12] 戴晓梅,麻宏伟,潘学霞. 遗尿症患者智力水平和智力结构分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(5):344-346.
- [13] 戴晓梅,麻宏伟,潘学霞. 遗尿症患者视听整合持续操作测试对照研究[J]. 中国儿童保健杂志,2007,15(4):337-339.
- [14] Paterson AD, Sunohara GA, Kennedy JL. Dopamine D4 receptor gene: novelty or nonsense? [J]. Neuropsychopharmacology, 1999, 21(1):3-16.
- [15] Barr CL, Feng Y, Wigg KG, Schachar R, Tannock R, Roberts W, et al. 5'-untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder[J]. Am J Med Genet, 2001, 105(1):84-90.

(本文编辑:吉耕中)