

论著 · 临床研究

注意缺陷多动障碍患儿 *COMT* 基因 rs6267 多态性分析

张跃兵¹ 罗学荣¹ 刘霞² 钟燕³ 朱峰¹ 陈雷音¹

(1. 中南大学湘雅二医院精神卫生研究所, 湖南 长沙 410011;
2. 济宁医学院公共卫生学院, 山东 济宁 272067; 3. 湖南省儿童医院, 湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 分析儿茶酚胺氧位甲基转移酶(*COMT*)基因 rs6267 多态性位点与注意缺陷多动障碍(ADHD)的关联,寻找 ADHD 的易感基因。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术分析 114 例 ADHD 儿童与 76 例正常对照组的 *COMT* 基因 rs6267 多态性位点频率,并用儿童行为量表(CBCL)评定儿童行为问题。**结果** rs6267 多态性各基因型及等位基因在 ADHD 组和正常对照组之间的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。基因型为 G/G 的 ADHD 患儿的思维问题和违纪问题(分别为 $1.7 \pm 1.9, 4.5 \pm 3.7$)明显多于基因型为 G/T 的患儿(分别为 $1.0 \pm 0.9, 2.2 \pm 1.4$)($P<0.05$)。**结论** *COMT* 基因 rs6267 多态性可能不是 ADHD 的易感因素;rs6267 多态性可能与 ADHD 的某些临床特征有关。 [中国当代儿科杂志,2011,13(2):127-130]

[关键词] 注意缺陷多动障碍; *COMT* 基因; 多态性; 儿童
[中图分类号] R749.94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)02-0127-04

Catechol-O-methyltransferase gene rs6267 polymorphism in children with attention deficit hyperactivity disorder

ZHANG Yue-Bing, LUO Xue-Rong, LIU Xia, ZHONG Yan, ZHU Feng, CHEN Lei-Yin. Mental Health Institute, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Luo X-R, Email: luoxr@vip.sina.com)

Abstract: Objective To study the relationship between rs6267 polymorphism of catechol-O-methyltransferase (*COMT*) gene and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Methods** One hundred and fourteen children with ADHD and 76 normal volunteers were enrolled. Polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques were used for detecting *COMT* rs6267 polymorphism. The behavioral problems were assessed by Child Behavior Checklist (CBCL). **Results** There were no significant differences in the *COMT* genotype distribution and allele frequencies between the ADHD and normal control groups. The frequencies of thinking problems (1.7 ± 1.9 vs 1.0 ± 0.9) and disciplinary problems (4.5 ± 3.7 vs 2.2 ± 1.4) in ADHD children carrying genotype G/G were significantly higher than those in children carrying G/T ($P<0.05$). **Conclusions** *COMT* rs6267 polymorphism may not contribute to susceptibility to ADHD. However, there might be an association between rs6267 polymorphism and some clinical characters of ADHD. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (2):127-130]

Key words: Attention deficit hyperactivity disorder; Catechol-O-methyltransferase gene; Genetic polymorphism; Child

注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)是儿童期尤其是学龄期儿童最常见的精神障碍,以其年龄不相称的注意涣散、活动过度、行为冲动为主要特征。湖南省流行病学调查发现,在 5~17 岁儿童的时点患病率为 5.95%^[1]。ADHD 的病因及发病机制尚不十分明确,研究表明家系、双生子和寄养子的 ADHD 遗传

度较高^[2]。国内外已有研究发现儿茶酚胺氧位甲基转移酶(catechol-O-methyltransferase, *COMT*)基因多态性与 ADHD 相关,其中多数研究集中在 *COMT* 基因第 4 号外显子的 108 位 SNP(rs4680)变异上,但随后的研究结果不一^[3-4]。*COMT* 是广泛存在于人体内的一种代谢酶,它可将 S-腺苷蛋氨酸提供的甲基转移

[收稿日期]2010-05-25;[修回日期]2010-09-12
[基金项目]国家自然科学基金(基金编号:30570660)。
[作者简介]张跃兵,男,硕士,主治医师。现工作单位:济宁市精神病防治院,邮编 272051。
[通信作者]罗学荣,教授。

到儿茶酚胺苯环的3位氧上,成为3-甲氧基4-羟基衍生物,是具生物活性或毒性的儿茶酚胺的主要代谢酶。目前,对rs4680多态性位点紧密相连的其他相关位点的研究正成为热点之一。*COMT*基因多态性影响了*COMT*活性,研究显示rs6267(Ala72Ser)与*COMT*活性减低相关^[5-6],该位点是否与ADHD存在相关性目前尚未见报道。本研究以汉族人群为研究对象,选择*COMT*基因rs6267多态性作为研究位点,以探索*COMT*基因多态性与ADHD的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 研究组 资料来源于2007年9月至2009年2月中南大学湘雅二医院精神卫生研究所儿童青少年门诊的长沙市初诊患儿及长沙市工读学校入组学生,均明确诊断为ADHD。入组标准:(1)年龄:7~16岁,汉族;(2)按DSM-IV制定的ADHD诊断标准^[7],由两名儿童精神科医师分别诊断为ADHD,且就诊前1周内未服用精神药物如利他林等;(3)无精神发育迟滞、精神分裂症、儿童情感障碍及脑器质性疾病所致精神障碍等;近2周无急、慢性感染史;近期无重大生活事件发生史。ADHD组患儿114名(男92名,女22名),平均年龄 12.5 ± 2.7 岁。

1.1.2 正常对照组 在长沙市一所中学抽取,入组标准如下:排除任何精神障碍;无神经系统疾病史及其他重大疾病史,近2周无急、慢性感染史。正常对照组76名(男52名,女24名),平均年龄 13.1 ± 1.3 岁。

两组在性别构成($\chi^2 = 3.748, P = 0.053$)和年龄构成($t = 1.910, P = 0.058$)等方面差异均无统计学意义。

1.2 工具及方法

1.2.1 Achenbach儿童行为量表 采用Achenbach儿童行为量表^[8],选用父母评儿童行为调查表(Child Behavior Checklist, CBCL)行为问题部分,该部分由113个条目组成,包括8个行为问题分量表,即退缩、躯体主诉、焦虑/抑郁、社交问题、思维问题、注意问题、违纪行为、攻击性行为,前3个分量表归为内化性行为问题,后2个分量表归为外化性行为问题。

1.2.2 标本采集 在征求患儿本人及其监护人同意后,取静脉血3 mL,肝素抗凝,−70℃保存。常规酚-氯仿法提取基因组DNA。

1.2.3 实验方法 选择*COMT*基因rs6267多态性位点进行PCR-RFLP分析,引物采用在线Primer3软件设计(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)。①PCR扩增引物:上游引物为5'-TATCGGCTGGAACGAGTTCAT-3';下游引物为5'-ACTACTACTACTACTACTACTACTACTATGGCCTCC-AGCACGCTeTgCg-3'。PCR反应体系包括:1 × Hot-StarTaq 缓冲液,2.5 mM MgCl₂,0.2 mM dNTP,0.2 μM 每对引物,1 U 热启动Taq 酶以及1 μL 模板DNA。PCR扩增条件:采取Touchdown程序。首先95℃ 15 min,预变性,第1相循环94℃ 变性20 s,起始退火温度62℃ 40 s,后每增加1个循环下降0.5℃,72℃ 延伸1 min,共11个循环,终退火温度为57℃。第2相循环94℃ 变性20 s,57℃ 退火30 s,72℃ 延伸1 min,30个循环,最后72℃ 总延伸2 min,4℃ 保存。酶切反应:取8 μL PCR产物,加入0.2 μL Bsh1236I 酶,1 μL 10 × 酶切缓冲液R以及0.8 μL 灭菌超纯水,然后37℃ 水浴10 h。②判读基因型:酶切产物65℃ 灭活20 min,加入上样缓冲液,2.5% 琼脂糖电泳检测,162 bp 的PCR产物经Bsh1236I 酶切后,G等位基因产物会被切动,产生110 bp 和52 bp 产物,而T等位基因不被切动,仍然是162 bp 的扩增产物,根据琼脂糖电泳图判定样本基因型。

1.3 统计学分析

采用FOXPRO 6.0 建立数据库,统计数据分析选用SPSS 13.0 软件包。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。分别计算rs6267多态性的基因型和等位基因频率,并对其进行Hardy-Weinberg遗传平衡吻合度检验。两组间基因型和等位基因频率比较采用 χ^2 检验,rs6267不同基因型CBCL量表得分比较采用两独立样本资料*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两个多态位点的Hardy-Weinberg平衡吻合度检验

经 χ^2 检验证明rs6267多态性位点基因型频率和等位基因频率分布观察值和期望值差异均无统计学意义($P > 0.05$),符合Hardy-Weinberg平衡定律。

2.2 两组rs4680多态性的基因型及等位基因频率分布的比较

由表1结果显示,ADHD组与正常对照组*COMT*基因rs6267多态性各基因型及等位基因分布差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 两组 rs6267 基因型频率及等位基因频率分布比较 [例(%)]

组别	例数	基因型		等位基因	
		G/G	G/T	G	T
正常对照组	76	72(94.7)	4(5.3)	148(97.4)	4(2.6)
ADHD 组	114	103(90.4)	11(9.6)	217(95.2)	11(4.8)
χ^2 值		1.206		1.157	
P 值		0.272		0.282	

2.3 两组不同性别 rs6267 多态性的基因型及等位基因频率分布的比较

ADHD 组与正常对照组不同性别 COMT 基因 rs6267 多态性各基因型及等位基因分布差异均无统计学意义($P<0.05$)。见表 2 和表 3。

表 2 两组男性儿童 rs6267 基因型频率及等位基因频率分布比较 [例(%)]

组别	例数	基因型		等位基因	
		G/G	G/T	G	T
正常对照组	52	49(94)	3(6)	101(97)	3(3)
ADHD 组	92	82(89)	10(11)	174(95)	10(5)
χ^2 值		1.052		1.003	
P 值		0.305		0.317	

表 3 两组女性儿童 rs6267 基因型频率及等位基因频率分布比较 [例(%)]

组别	例数	基因型		等位基因	
		G/G	G/T	G	T
正常对照组	24	23(96)	1(4)	47(98)	1(2)
ADHD 组	22	21(95)	1(5)	43(98)	1(2)
χ^2 值		—		—	
P 值		0.950		0.950	

注：“—”此处统计的最小理论频数为 0.96,小于 1,需用确切概率法,故无卡方值。

2.4 ADHD 组 CBCL 评分与 rs6267 多态性不同基因型的比较

表 4 结果显示,ADHD 患儿 rs6267 多态性的不同基因型 CBCL 思维问题和违纪问题差异具有统计学意义($P<0.05$),基因型为 G/G 的 ADHD 患者的思维问题和违纪问题明显多于基因型为 G/T 的患者($P>0.05$);而其他各因子差异均无统计学意义。

3 讨论

COMT 基因定位于第 22 号染色体长臂的 11 区 2 带,该基因有 6 个外显子,2 个启动子,rs6267 位于第 3 外显子区。COMT 有可溶型和膜结合型两种异构体,后者存在于大脑前额叶、基底神经节以及边缘系统等多个部位^[9]。

表 4 ADHD 组 rs6267 不同基因型 CBCL 得分比较 ($\bar{x}\pm s$)

因子分	基因型		t 值	P 值
	G/G	G/T		
退缩	3.7 $\pm$ 3.1	2.9 $\pm$ 2.1	0.862	0.391
躯体主诉	2.9 $\pm$ 3.2	2.2 $\pm$ 1.9	0.697	0.487
焦虑抑郁	4 $\pm$ 3	4 $\pm$ 3	0.379	0.705
社交问题	3.3 $\pm$ 2.0	2.9 $\pm$ 1.8	0.595	0.553
思维问题	1.7 $\pm$ 1.9	1.0 $\pm$ 0.9	2.143	0.043
注意问题	6.0 $\pm$ 3.1	5.2 $\pm$ 2.9	0.881	0.380
违纪问题	4.5 $\pm$ 3.7	2.2 $\pm$ 1.4	4.098	<0.01
攻击行为	9 $\pm$ 6	7 $\pm$ 4	1.053	0.295
行为问题总分	45 $\pm$ 24	35 $\pm$ 18	1.256	0.212

本研究未发现 COMT 基因 rs6267 多态性各基因型及等位基因分布与 ADHD 存在关联,提示 COMT 基因多态性可能不是 ADHD 的易感因素。Turic 等^[10]对 ADHD 先证者及其核心家系选取了 rs737865、Val158Met 和 rs165599 等 3 个多态性位点进行研究,结果均提示 COMT 基因与 ADHD 无关联。Song 等^[11]对 60 例患儿采用病例对照研究,发现 ADHD 与 COMT 基因型有关($\chi^2=9.03$, $P<0.05$),而与等位基因型无关,结果提示 COMT 基因并非 ADHD 的易感基因。Cheuk 等^[12]的一项 Meta 分析也认为 COMT 基因与 ADHD 无关联。而 Eisenberg^[13]对 48 例 ADHD 儿童采用单体型相对危险度分析发现高活性的 COMT 基因 Val 等位基因与 ADHD 存在关联,主要和多动冲动型相关($P=0.004$)。Cheon 等^[14]发现 124 例 ADHD 患儿服用哌醋甲酯治疗 8 周后,62.5% 对药物治疗有效的为 Val/Val 基因型,认为 COMT 基因和 ADHD 存在关联。不同人群得到不同的结论,可能是因为不同的种族背景下存在着遗传异质性。

基于男童发生 ADHD 多于女童,并且女性呈现更高的 COMT 基因 mRNA 表达水平,说明性别因素影响到 mRNA 的表达,但也可能影响到基因型及等位基因^[15-16]。Qian 等^[3]则发现在单纯 ADHD (特别是注意缺陷为主型)的男孩中有优先传递,认为该基因的等位基因频率有性别差异。本研究发现 ADHD 组与正常对照组 COMT 基因 rs4680 多态性各基因型及等位基因分布无性别差异,提示不同性别与 COMT 基因无相关性。国外有研究也未发现性别与 COMT 基因型及等位基因的相关性,本研究与之一致^[17]。

本研究发现,ADHD 患者 CBCL 的思维问题和违纪问题在 rs6267 多态性的不同基因型存在差异($P<0.05$),基因型为 G/G 的患者的思维问题和违纪问题明显多于基因型为 G/T 的患者。提示 COMT

基因可能与 ADHD 的某些临床特征有关,而 G/G 可能是其易感基因型。Turic 等^[10]研究发现 ADHD 的临床表现多样性与 *COMT* 基因表达的改变相关,这提示不能完全排除 *COMT* 基因与临床症状有关的可能性。

COMT 基因是否造成 ADHD 的易感基因的假设,尚存在争论。本研究未发现 *COMT* 基因与 ADHD 易感存在关联,而可能与 ADHD 的某些临床特征有关。ADHD 的临床异质性很可能掩盖了其 *COMT* 基因真正的关联,多基因遗传病中,单个基因的致病作用可能是与该基因位点紧密相连的其他相关基因多态性之间的相互作用才对 ADHD 的易感性产生影响。尽管本研究未发现 *COMT* 基因多态性与 ADHD 易感有关联,但发现与 ADHD 症状有某种关联,因此仍不能排除 *COMT* 基因在 ADHD 中起微效基因的作用。

参 考 文 献

[1] 管冰清,罗学荣,邓云龙,韦臻,叶海森,袁秀洪,等. 湖南省中小

学

生

精

神

障

碍

患

病

率

调

查

[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(2): 123-127.

[2] Rietveld MJ, Hudziak JJ, Bartels M, van Beijsterveldt CE, Boomsma DI. Heritability of attention problems in children: cross-section all results from a study of twins, age 3-12 years[J]. Am Med Genet, 2003, 117B(1): 102-113.

[3] Qian Q, Wang Y, Zhou R, Li J, Wang B, Glat S, et al. Family-based and case control association studies of catechol-O-methyltransferase in attention deficit hyperactivity disorder suggest genetic sexual dimorphism[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2003, 118B(1): 103-109.

[4] Sengupta S, Grizenko N, Schmitz N, Schwartz G, Bellingham J, Polotskaia A, et al. COMT Val(108/158) Met polymorphism and the modulation of task-oriented behavior in children with ADHD [J]. Neuropsychopharmacology, 2008, 33(13): 3069-3077.

[5] Lee SG, Joo Y, Kim B, Chung S, Kim HL, Lee I, et al. Association of Ala72Ser polymorphism with COMT enzyme activity and the risk of schizophrenia in Koreans[J]. Hum Genet, 2005, 116: 319-328.

[6] Hong JP, Lee JS, Chung S, Jung J, Yoo HK, Chang SM, et al. New functional single nucleotide polymorphism (Ala72Ser) in the COMT Gene is associated with aggressive behavior in male schizo-

phrenia[J]. Am J Med Genet Part B (Neuropsychiatr Genet), 2008, 147B(5): 658-660.

[7] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder [M]. 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Association, 1994: 129-130.

[8] 张作记. 行为医学量表手册 [M]. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2005: 455-459.

[9] Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Jalkunen I, et al. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme[J]. Biochemistry, 1995, 34(13): 4202-4210.

[10] Turic D, Williams H, Langley K, Owen M, Thapar A, O'Donovan MC. A family based study of catechol-O-methyltransferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) [J]. Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet, 2005, 133B(1): 64-67.

[11] Song EY, Paik KC, Kim HW, Lim MH. Association between catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and attention-deficit hyperactivity disorder in Korean population[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2009, 13(2): 233-236.

[12] Cheuk DK, Wong V. Meta-analysis of association between a catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder[J]. Behav Genet, 2006, 36(5): 651-659.

[13] Eisenberg J, Mei-Tal G, Steinberg A, Tartakovsky E, Zohar A, Gritsenko I, et al. Haplotype relative risk study of catechol-O-methyltransferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): association of the high-enzyme activity Val allele with ADHD impulsive-hyperactive phenotype[J]. Am J Med Genet, 1999, 88(5): 497-502.

[14] Cheon KA, Jun JY, Cho DY. Association of the catechol-O-methyltransferase polymorphism with methylphenidate response in a classroom setting in children with attention-deficit hyperactivity disorder[J]. Int Clin Psychopharmacol, 2008, 23(5): 291-298.

[15] Dempster EL, Mill J, Craig IW, Collier DA. The quantification of COMT mRNA in post mortem cerebellum tissue: diagnosis, genotype, methylation and expression[J]. BMC Med Genet, 2006, 7: 10.

[16] Strous RD, Lapidus R, Viglin D, Kotler M, Lachman HM. Analysis of an association between the COMT polymorphism and clinical symptomatology in schizophrenia[J]. Neurosci Lett, 2006, 393(2-3): 170-173.

[17] Shashi V, Keshavan MS, Howard TD, Berry MN, Basehore MJ, Lewandowski E, et al. Cognitive correlates of a functional COMT polymorphism in children with 22q11.2 deletion syndrome[J]. Clin Genet, 2006, 69(3): 234-238.

(本文编辑:王霞)

• 130 •