

论著 · 临床研究

儿童攻击行为与 COMT Val158Met 及 5-HTTLPR 基因多态性关联分析

曹玉萍¹ 李龙飞² 赵幸福³ 张亚林¹

(1. 中南大学湘雅二医院精神卫生研究所, 湖南 长沙 410011;
2. 山东省济宁市精神病防治院精神科, 山东 济宁 272051;
3. 江苏无锡精神卫生中心精神科, 江苏 无锡 214151)

〔摘要〕 目的 探讨儿茶酚胺氧位甲基转移酶 (COMT) 第 158 位密码子从缬氨酸到蛋氨酸的错义突变 (Val158Met) 多态性及 5-羟色胺转运体 (5-HTT) 基因启动子区缺失/插入多态性 (5-HTTLPR) 是否为家庭暴力环境下儿童攻击行为的易感因素。方法 以家庭暴力环境下 68 例儿童作为研究对象, 依据 Achenbach 儿童行为量表 (父母卷) 评分, 其中 24 例为攻击行为高分组, 44 例为低分组。采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术, 检测两组 COMT Val158Met 和 5-HTTLPR 多态性, 对所得基因型和等位基因频率进行对照和关联分析。结果 攻击行为高分组与低分组 COMT Val158Met 多态性的各基因型差异 ($\chi^2 = 1.612, P = 0.447$) 和等位基因频率差异 ($\chi^2 = 1.648, P = 0.119$) 均无统计学意义。两组 5-HTTLPR 多态性的各基因型差异 ($\chi^2 = 1.807, P = 0.405$) 和等位基因频率差异 ($\chi^2 = 0.403, P = 0.527$) 亦无统计学意义。结论 本研究结果不支持 COMT Val158Met 和 5-HTTLPR 基因多态性是儿童攻击行为产生的易感因素。提示儿童攻击行为可能是多因素共同作用的结果。

[中国当代儿科杂志, 2011, 13(5): 361-364]

〔关键词〕 攻击行为; COMT Val158Met; 5-HTTLPR; 儿童
〔中图分类号〕 R72 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2011)05-0361-04

Association between aggressive behaviors and COMT Val158Met and 5-HTTLPR polymorphisms in children

CAO Yu-Ping, LI Long-Fei, ZHAO Xing-Fu, ZHANG Ya-Lin. Mental Health Institute, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Zhang Y-L, Email: zhangyl69@vip.sina.com)

Abstract: Objective To investigate the association between aggressive behaviors and catechol-O-methyltransferase (COMT) single nucleotide polymorphism at position 158 from a valine to a methionine (Val158Met) as well as serotonin (5-HT) transporter gene linked polymorphic region (5-HTTLPR) in children. **Methods** A total of 68 children who were exposed to domestic violence were recruited. The frequencies of genotypes and alleles of COMT Val158Met and 5-HTTLPR were examined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques. A comparison was conducted between 24 children with high scores of aggressive problems and 44 control children with low scores of aggressive problems according to Child Behavior Checklist (for parents). **Results** There were no significant differences in genotypes of COMT Val158Met ($\chi^2 = 1.612, P = 0.447$) and 5-HTTLPR ($\chi^2 = 1.807, P = 0.405$) between the two groups. There were also no significant differences in the frequencies of alleles of COMT Val158Met ($\chi^2 = 1.648, P = 0.119$) and 5-HTTLPR ($\chi^2 = 0.403, P = 0.527$) in the two groups. **Conclusions** COMT Val158Met and 5-HTTLPR might not be the susceptible genes of children's aggression, suggesting that children's aggressive behaviors might be affected by multivariate factors. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(5): 361-364]

Key words: Aggressive behavior; COMT Val158Met; 5-HTTLPR; Child

研究显示,儿童攻击行为受社会和家庭环境等因素的影响^[1]。遭受过虐待的儿童,其成年后可能会出现更多的攻击与敌对行为^[2-4]。然而也有研究显示,儿童期受虐待虽然可能增加其行为不良和成年犯罪、暴力行为,但大多数受虐待儿童成年后并无行为不良、犯罪或攻击行为^[5]。多数经历负性压力者也并未发生攻击行为^[6]。那么,为什么身处类似环境、遭受类似经历,一些人比另一些人更具有攻击

[收稿日期] 2010-12-21; [修回日期] 2011-01-29
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30670753); 国家社会科学基金项目(06BSH043); 美国中华医学基金会项目(01749)。
[作者简介] 曹玉萍,女,博士,副教授。
[通信作者] 张亚林,教授。

性呢?从生物-心理-社会医学模式来说,个体的生物素质基础及其所处的社会环境因素均影响其心理及行为状况^[7-8]。生物遗传学研究显示,遗传基因可能影响个体的兴奋水平。在攻击行为中个体差异存在基因因素,使得某些人比其他入更富有攻击性^[9]。并发现攻击行为可能与儿茶酚胺氧位甲基转移酶(catechol-O-methyltransferase, COMT)和5-羟色胺(serotonin, 5-HT)基因有关,并推测该两种基因可能参与了个体对环境刺激的敏感性的调节^[9-11]。

研究显示,COMT第158位密码子从缬氨酸到蛋氨酸的错义突变(COMT Val158Met)多态性通过其基因型活性影响单胺代谢,进而影响攻击行为^[12]。COMT低活性基因型或等位基因与攻击行为、暴力自杀企图相关联^[13-14]。但也有相反的研究结果,认为COMT高活性者增加精神分裂症攻击行为^[15]。

5-HTT基因启动子区缺失/插入多态性(5-HT transporter gene linked polymorphic region, 5-HTTLPR)被认为是行为和精神障碍的潜在易感性基因,研究显示,5-HTTLPR低活性基因型与男性暴力犯罪者的暴力行为关联^[16],暴力性犯罪的违法青少年较正常对照组5-HT2A受体结合部位的最大结合量降低^[17]。少年犯全血5-HT含量与其攻击行为的数量和程度呈正相关^[18]。

由于目前对儿童攻击行为的分子生物学研究尚为数不多,为此,本研究选取普通人群中儿童作为研究对象,采用病例对照方法,分析Val158Met和5-HTTLPR与儿童攻击行为的关联性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象为河南省新乡市市区及近郊社区12~16岁的少年儿童。其家庭中近1年内有严重家庭暴力行为发生,根据躯体虐待问卷^[19]确认。排除曾患精神疾病、脑器质性疾病或严重躯体疾病的儿童。以《Achenbach儿童行为量表(父母卷)》评分所得攻击行为因子分为分组依据,以第84百分位(8分)为划界分^[20],大于等于8分者作为高分组,小于8分者作为低分组。共收集到有效样本68例,其中高分组24例,低分组44例。

本研究取得儿童本人及其父母的书面知情同意,并获得中南大学湘雅二医院医学伦理委员会批准。

1.2 研究方法

1.2.1 血标本的采集 取早晨空腹肘静脉血

5 mL,EDTA抗凝(全血:EDTA=5:1),置于15 mL离心管内,4℃冰箱保存,提取基因组DNA(gDNA)。

1.2.2 酚氯仿法提取外周血基因组DNA EDTA抗凝静脉血5 mL,离心(3000 r/min)20 min,去上清;加2倍体积细胞裂解液,混匀,置-20℃冰箱中30 min,离心(12000 r/min)3 min,倒去上清液,留下层白细胞;加20% SDS 150 μL,摇匀,加STE 700 μL,混匀;加20%蛋白酶K 18 μL,混匀,37℃恒温水浴箱中过夜;加饱和酚 700 μL,混匀,离心(12000 r/min)3 min,吸去上清液;分别加饱和酚和氯仿各350 μL,混匀,离心(12000 r/min)3 min,吸上清液;加氯仿 700 μL,混匀,离心(12000 r/min)3 min,吸上清液;加2倍体积的无水乙醇,可见絮状物,分装2管,保存在-70℃冰箱。溶解DNA时,倒去储存用无水乙醇,加70%乙醇洗涤1次;倒去乙醇,自然风干,加200 μL TE溶解,测OD值。

1.2.3 COMT Val158Met多态性分析 PCR扩增引物引导合成包括COMT基因Val158Met多态性位点在内的210 bp的DNA片段。①引物设计:上游为5'-CTC ATC ACC ATC GAG ATC AA-3'(nucleotides 1881-1900);下游为5'-GAT GAC CCT GGT GAT AGT GG -3'(nucleotides 2071-2090)。委托宝生物工程(大连)有限公司合成。②PCR反应体系:200 ng genomic DNA,dNTP各0.2 mM,1×Taq buffer(含MgCl₂ 1.5 mM),上下游引物各1 pM,1 U Taq polymerase,加无菌双蒸水至25 μL反应体积。③PCR反应条件:94℃预变性3 min,按如下顺序扩增循环30次:94℃变性1 min,57℃复性30 s,72℃延伸30 s,最后72℃延伸3 min。④酶切反应条件:9 μL PCR产物,NlaIII限制性内切酶(NEB公司)5 U,1×NEBuffer,加无菌双蒸水至20 μL反应体积,37℃酶切反应3 h。⑤取3 μL酶切产物在6%非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳(300 V,3.5 h),0.5% AgNO₃染色,显色后观察分型结果,照像。⑥基因型分型标准:PCR产物为210 bp,可产生85 bp、54 bp和71 bp等3个片段。若COMT基因第158位为碱基G(高酶活性等位基因),则PCR产物被酶切成85 bp、54 bp和71 bp等3个片段;若COMT基因第158位为碱基A(低酶活性等位基因),则PCR产物被酶切成67 bp、18 bp、54 bp和71 bp等4个片段。其中,18 bp片段在电泳时泳出,故未见显色条带。当两条等位基因第158位均为碱基G时,判断该个体的基因型为GG;均为碱基A时,判断其基因型为AA;分别为碱基G和A时,则判断其基因型为GA。

1.2.4 5-HTTLPR多态性分析 人类5-HTTLPR

为一 44 bp 片段的缺失/插入所造成的多态性,可形成长片段(L)和短片段(S)两种等位基因, S 等位基因的活性较 L 等位基因的低。①引物设计:上游为 5'-GGC GTT GCC GCT CTG AAT GC-3';下游为 5'-GAG GGA CTG AGC TGG ACA ACC AC-3'。委托宝生物工程(大连)有限公司合成。②PCR 反应体系:100 ng 模版 DNA,dNTPs(dATP、dTTP、dGTP、dCTP)各 200 μM,1 × PCR Buffer(含 MgCl₂ 1.2 mM),上、下游引物各 0.3 μM,TaqDNA 聚合酶 1 U,加无菌双蒸水至 25 μL 反应体积。③PCR 反应条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,61℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环,最后在 72℃延伸 10 min。④取 3 μL PCR 产物,在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳(300 V,1 h),1% AgNO₃ 染色,显色后照像并观察分型结果。⑤基因型分型标准:PCR 产物有 484 bp (S)和 528 bp(L)两种等位基因片段,可形成 3 种基因型。当两条等位基因均为 L 时,判断该个体的基因型为 LL;均为碱基 S 时,判断其基因型为 SS;分别为 L 和 S 时,则判断其基因型为 LS。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件包进行统计学分析。根据 Hardy-Weinberg 平衡定律,分别计算 5-HTT 和 COMT 的基因型与等位基因频率,并对其进行 Hardy Weinberg 遗传平衡吻合度检验;采用χ² 检验比较各组间各基因型和等位基因频率的差异。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

共收集有效样本 68 例。其中高分组 24 例,平均年龄 14.4 ± 1.2 岁,男 23 例(96%),女 1 例(4%);低分组 44 例,平均年龄 14.9 ± 1.3 岁,男 32 例(73%),女 12 例(27%)。两组儿童性别差异有统计学意义(χ² = 5.362, P < 0.05),高分组男性比例明显高于低分组,而女性比例明显低于低分组。两组在年龄、学习成绩、家庭结构(如:独生子女、单亲/重组家庭、多代同堂等)与经济状况及母孕产期状况等方面差异均无统计学意义(P>0.05)。

2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡法则的吻合度检验

Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验显示,两组 COMT Val158Met 多态性的各基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡法则,说明这两个研究人群来自大的群体,个体间是随机分配,不存在明显的自然选择、迁移等因素对遗传平衡的影响。

2.3 两组 COMT Val158Met 多态性的基因型及等位基因频率分布的比较

结果显示,高分组 24 例中,10 例(42%)是高活性的纯合子,11 例(46%)是高活性的杂合子,3 例(13%)是低活性的纯合子。而低分组 44 例中,25 例(57%)是高活性的纯合子,16 例(36%)是高活性的杂合子,3 例(7%)是低活性的纯合子。两组 COMT Val158Met 多态性的各基因型和等位基因频率差异无统计学意义。见表 1。

表 1 两组 COMT 基因型和等位基因频率比较 [例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		GG	GA	AA	G	A
高分组	24	10(42)	11(46)	3(13)	31(65)	17(35)
低分组	44	25(57)	16(36)	3(7)	66(75)	22(25)
χ ² 值		1.612			1.648	
P 值		0.447			0.199	

2.4 两组 5-HTTLPR 多态性的基因型及等位基因频率分布的比较

结果显示,高分组 24 例中,2 例(8%)是高活性的纯合子,11 例(46%)是高活性的杂合子,11 例(46%)是低活性的纯合子。低分组 44 例中,5 例(11%)是高活性的纯合子,13 例(30%)是高活性的杂合子,26 例(59%)是低活性的纯合子。两组 5-HTTLPR 多态性的基因型和等基因频率之间的差异无统计学意义。见表 2。

表 2 两组 5-HTTLPR 基因型和等位基因频率比较

[例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		LL	LS	SS	L	S
高分组	24	2(8)	11(46)	11(46)	15(31)	33(69)
低分组	44	5(11)	13(30)	26(59)	23(26)	65(74)
χ ² 值		1.807			0.403	
P 值		0.405			0.525	

3 讨论

本研究采用病例对照研究方法了解儿童攻击行为与 COMT Val158Met 多态性的关系。结果发现攻击行为因子分高的儿童组含低活性的 A 型等位基因的各基因型频率和等位基因频率稍高于低分组,但差异无统计学意义。提示 COMT Val158Met 多态性不论高活性、低活性、杂合子基因型还是高活性、低活性等位基因型均与普通人群儿童的攻击行为无显著性关联。COMT Val158Met 多态性可能不是儿

童产生攻击行为的易感基因,这与 Jones 等^[15]的推测不一致。韩国的一项研究同样也尚未发现 COMT Val158Met 多态性与精神分裂症患者的攻击行为有直接的关联^[21],Zalsman 等^[22]研究 98 例精神病患者 COMT Val158Met 多态性基因型与脑脊液单胺代谢产物的关系,亦未发现二者之间有关。

本研究同时选择 5-HTTLPR 多态性位点进行对照研究,结果亦未发现攻击行为高分组儿童与低分组儿童之间 5-HTTLPR 多态性各基因型频率和等位基因频率分布存在差异。提示 5-HTTLPR 多态性不论高活性、低活性、杂合子基因型还是高活性、低活性等位基因均可能与儿童的攻击行为无显著性关联,即不支持 5-HTTLPR 多态性是儿童攻击行为遗传易感基因这一推论。同样,May 等^[23]最近研究亦未发现 5-HTTLPR 多态性与智力障碍成年男性患者的攻击行为有直接相关性。

本研究结果与已有的阳性结果报道不一致,可能因为多数研究对象为精神障碍患者,攻击行为的产生有其一定的病理基础,与本研究中的正常普通社区人群攻击行为产生的机理有差异;也可能与种族的差异、样本大小的差异等因素有关。此外,基因多态性可能与其他因素联合起来共同影响人类行为,单一基因的影响可能被其他因素所覆盖或抵消。

总之,本研究未能证实 COMT Val158Met 和 5-HTTLPR 基因多态性与儿童攻击行为有关。由于受时间及其他一些条件限制,本研究样本量相对较小,且在研究中未能对儿童攻击行为的不同类型予以分别研究。有待于扩大样本量,减少临床异质性,进一步探讨儿童攻击行为可能的生化代谢异常及其基因多态性的关联/连锁,分析基因-行为以及环境-基因-行为间复杂的相互作用。

[参 考 文 献]

- [1] Simons RL, Johnson C, Beaman J, Conger RD, Whitbeck LB. Parents and peer group as mediators of the effect of community structure on adolescent problem behavior[J]. *Am J Community Psychol*, 1996, 24(1): 145-171.
- [2] Pereplechikova F, Kaufman J. Emotional and behavioral sequelae of childhood maltreatment[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2010, 22(5): 610-615.
- [3] Pears KC, Capaldi DM. Intergenerational transmission of abuse; a two-generational prospective study of an at-risk sample[J]. *Child Abuse Negl*, 2001, 25(11): 1439-1461.
- [4] 严琴琴,焦文燕,蒯婧,焦富勇. 儿童期躯体情感虐待经历对大学生心理健康的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(8): 675-678.
- [5] Thompson R, Tabone JK. The impact of early alleged maltreatment on behavioral trajectories[J]. *Child Abuse Negl*, 2010, 34(12): 907-916.
- [6] Romans SE, Poore MR, Martin JL. The perpetrators of domestic violence[J]. *Med J Aust*, 2000, 173(9): 484-488.
- [7] Yeh MT, Coccaro EF, Jacobson KC. Multivariate behavior genetic analyses of aggressive behavior subtypes[J]. *Behav Genet*, 2010, 40(5): 603-617.
- [8] Tuvblad C, Raine A, Zheng M, Baker LA. Genetic and environmental stability differs in reactive and proactive aggression[J]. *Aggress Behav*, 2009, 35(6): 437-452.
- [9] Ward D, Bray-Ward P, Lombroso PJ. Genetics of childhood disorders: VI. FISH, FISH, and more FISH[J]. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1999, 38(9): 1200-1202.
- [10] Albaugh MD, Harder VS, Althoff RR, Rettew DC, Ehli EA, Lengyel-Nelson T, et al. COMT Val158Met genotype as a risk factor for problem behaviors in youth[J]. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2010, 49(8): 841-849.
- [11] Beitchman JH, Baldassarra L, Mik H, De Luca V, King N, Bender D, et al. Serotonin transporter polymorphisms and persistent, pervasive childhood aggression[J]. *Am J Psychiatry*, 2006, 163(6): 1103-1105.
- [12] Ratey JJ, Gordon A. The psychopharmacology of aggression: toward a new day[J]. *Psychopharmacol Bull*, 1993, 29(1): 65-73.
- [13] Han DH, Park DB, Na C, Kee BS, Lee YS. Association of aggressive behavior in Korean male schizophrenic patients with polymorphisms in the serotonin transporter promoter and catecholamine-O-methyltransferase genes[J]. *Psychiatry Res*, 2004, 129(1): 29-37.
- [14] Gu Y, Yun L, Tian Y, Hu Z. Association between COMT gene and Chinese male schizophrenic patients with violent behavior[J]. *Med Sci Monit*, 2009, 15(9): 484-489.
- [15] Jones G, Zammit S, Norton N, Hamshire ML, Jones SJ, Milham C, et al. Aggressive behavior in patients with schizophrenia is associated with catechol-O-methyltransferase genotype[J]. *Br J Psychiatry*, 2001, 179: 351-355.
- [16] Liao DL, Hong CJ, Shih HL, Tsai SJ. Possible association between serotonin transporter promoter region polymorphism and extremely violent crime in Chinese males[J]. *Neuropsychobiology*, 2004, 50(4): 284-287.
- [17] Blumensohn R, Ratzoni G, Weizman A, Israeli M, Greuner N, Apter A. Reduction in serotonin 5-HT₂ receptor binding on platelets of delinquent adolescents[J]. *Psychopharmacology*, 1995, 118: 354-356.
- [18] Alan SU, Edwin HC, Jennifer GV, Gjerde DK, Perry BD, Mason C, et al. Platelet serotonin measures in adolescents with conduct disorder[J]. *Biol Psychiatry*, 1997, 42(42): 553-559.
- [19] Moffitt TE, Caspi A, Krueger RF, Magdol L, Margolin G, Silva P A, et al. Do partners agree about abuse in their relationship? A psychometric evaluation of interpartner agreement[J]. *Psychol Assess*, 1997, 9(1): 47-56.
- [20] 苏林雁,李雪荣,杨志伟,罗学荣,万国斌. CBCL 及 TRF 在儿童精神障碍流行病学调查中的应用——兼论划界分的选择[J]. *中国心理卫生杂志*, 1997, 11(1): 37-40.
- [21] Kim YR, Kim JH, Kim SJ, Lee D, Min SK. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism in relation to aggressive schizophrenia in a Korean population[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2008, 18(11): 820-825.
- [22] Zalsman G, Huang YY, Harkavy-Friedman JM, Oquendo MA, Ellis SP, Mann JJ. Relationship of MAO-A promoter (u-VNTR) and COMT (V158M) gene polymorphisms to CSF monoamine metabolites levels in a psychiatric sample of caucasians: A preliminary report[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatry Genet*, 2005, 132B(1): 100-103.
- [23] May ME, Lightfoot DA, Srouf A, Kowalchuk RK, Kennedy CH. Association between serotonin transporter polymorphisms and problem behavior in adult males with intellectual disabilities[J]. *Brain Res*, 2010, 1357: 97-103.

(本文编辑:王庆红)