

CLOCK 基因 T3111C 多态性与儿童注意缺陷 多动障碍及相关睡眠障碍的关联研究

曹银利¹ 崔勤涛² 唐成和¹ 常晓¹

(1. 新乡医学院第一附属医院小儿内科, 河南 新乡 453100; 2. 新乡医学院第一附属医院心脏外科, 河南 新乡 453100)

[摘要] 目的 探讨 CLOCK 基因 3'非编码区 SNP 位点 T3111C 与儿童注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)及相关睡眠障碍的关联性。方法 取无亲缘关系的 ADHD 患儿 166 名以及正常儿童(对照组)150 名,根据睡眠障碍量表(Sleep Disturbance Scale for Children, SDSC)评分筛查睡眠障碍,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术,检测 ADHD 组和对照组 CLOCK 基因的 T3111C 基因型和等位基因的频率分布。结果 CLOCK 基因的 T3111C 基因型及等位基因频率分布在 ADHD 组和对照组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),ADHD 组中等位基因 C 频率显著高于对照组($\chi^2 = 7.254, P = 0.007, OR = 1.740, 95\% CI = 1.160 \sim 2.612$)。伴有睡眠障碍的 ADHD 患儿等位基因 C 频率显著高于不伴有睡眠障碍者($\chi^2 = 13.052, P < 0.001, OR = 2.766, 95\% CI = 1.573 \sim 4.865$)。结论 CLOCK 基因 T3111C 位点与 ADHD 易感性存在关联,也是影响 ADHD 患儿相关睡眠障碍的重要因素。携带 C 等位基因的个体罹患 ADHD 以及 ADHD 相关睡眠障碍的相对风险增高。

[中国当代儿科杂志,2012,14(4):285-288]

[关键词] 注意缺陷多动障碍;睡眠障碍;CLOCK 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(2012)04-0285-04

Association of CLOCK gene T3111C polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder and related sleep disturbances in children

CAO Yin-Li, CUI Qin-Tao, TANG Cheng-He, CHANG Xiao. First Affiliated Hospital of Xin-xiang Medical University, Xinxiang, Henan 453100, China (Email: caoyinli2011@163.com)

Abstract: Objective To examine the association between CLOCK gene T3111C polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and ADHD related sleep disturbances in children. **Methods** One hundred and sixty-six unrelated children with ADHD diagnosed according to DSM-IV criteria and a control group of 150 normal children were enrolled in this study. Parents filled out the Sleep Disturbance Scale for Children (SDSC). Genotype and allele frequencies of T3111C of the CLOCK gene were examined by PCR-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP). **Results** There were significant differences in the genotype and allele frequencies of T3111C of the CLOCK gene between the ADHD and control groups ($P < 0.05$). C allele frequency in the ADHD group was significantly higher than in the control group ($\chi^2 = 7.254, P = 0.007, OR = 1.740, 95\% CI = 1.160-2.612$). The ADHD children with sleep disturbances were found to have higher C allele frequency than those without sleep disturbances ($\chi^2 = 13.052, P < 0.001, OR = 2.766, 95\% CI = 1.573-4.865$). **Conclusions** There is an association between CLOCK gene T3111C polymorphism and both ADHD and related sleep disturbances in children. The individuals with C allele are susceptible to ADHD as well as ADHD related sleep disturbances.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(4):285-288]

Key words: Attention deficit hyperactivity disorder; Sleep disturbance; CLOCK gene; Polymorphism; Child

注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)是常见的学龄期儿童精神障碍之一。该病以注意力易分散、活动过度和行为冲动为核心症状,可引起学习困难和社会适应功能不良^[1-2]。目前已发现包括多巴胺、去甲肾上腺素、

5-羟色胺等多个神经递质系统相关基因与该病的发生发展密切相关^[3-4]。然而这些神经递质的紊乱都不能完全解释 ADHD 的发病和存在的所有症状。近来的研究发现,基于昼夜节律改变而导致的肾上腺皮质类固醇激素水平变化可能参与了失眠和相关精

神障碍的发病;相对于对照组,ADHD模型大鼠出现了明显的冲动和夜间多动行为^[5]。ADHD患儿家长经常反映患儿会伴有不同形式的睡眠障碍^[6]。CLOCK基因是内源性分子昼夜生物钟的最重要的基因之一,它转录和编码的CLOCK蛋白是哺乳动物形成昼夜节律的分子生物学基础,CLOCK基因功能异常所表现的特征与ADHD的某些临床表现类似^[7]。CLOCK基因3非编码区的单核苷酸多态性位点T3111C和亚洲人群的睡眠紊乱相关,可能会影响人的行为模式^[8]。目前的研究仅针对CLOCK基因与ADHD的易感性做了关联分析^[9-10],但不同人种的易感基因及其对疾病的作用可能存在一定差异。目前还未见报道中国汉族人群CLOCK基因多态性与ADHD相关症状的关系,本研究拟通过检测CLOCK基因3非编码区的T3111C多态性位点,探讨其与ADHD易感性及ADHD相关睡眠障碍的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

新乡医学院第一附属医院小儿内科就诊的ADHD患儿共166例,其中男147例(88.6%),女19例(11.4%);年龄4~16岁,平均 9.1 ± 2.4 岁。入组标准为:汉族,符合美国精神障碍诊断与统计手册第4版(DSM-IV)制定的ADHD诊断标准,韦氏儿童智力测查 $IQ \geq 70$,躯体及神经系统检查未见明显异常并排除儿童精神分裂症、情感障碍、孤独症和癫痫等及其他器质性疾病。对照组:汉族,智力正常,经检查无躯体及精神疾病的儿童150名,男124例(82.7%),女26例(17.3%),年龄4~15岁,平均 8.6 ± 2.6 岁。所有研究对象及其父母在知情同意的情况下参与本研究,并签署知情同意书,本研究在我院医学伦理委员会批准监督下进行。

1.2 研究方法

1.2.1 睡眠情况评定 由家长填写睡眠障碍量表(Sleep Disturbance Scale for Children,SDSC)。SDSC包含2项评估睡眠质量(总睡眠时间和延迟入睡)和24项评估睡眠障碍症状的频率,可分为入睡和保持睡眠障碍(如睡眠时间、睡眠潜伏期、夜间觉醒和入睡焦虑),睡眠呼吸障碍(如打鼾和呼吸困难),夜间睡眠唤醒梦魇障碍(如梦游、睡眠恐惧和梦魇),睡眠-觉醒转换障碍(如有节奏的运动、说梦话和磨牙症),过度白天嗜睡障碍(如难醒、早晨疲倦和不适当的午睡),睡眠多汗症(如夜间出汗)等6个题

目,分5个等级评分,累积各成分得分为量表总分,量表总分高于39分的被视为存在睡眠障碍。

1.2.2 基因组DNA的提取 取外周血5 mL(EDTA抗凝),参照美国Promega公司基因组DNA纯化试剂盒说明书从外周血单核细胞中提取基因组DNA,-20℃冰箱储存备用。

1.2.3 基因型检测 采用PCR-RFLP技术检测T3111C多态性位点。PCR扩增采用25 μL反应体系,内含50~200 ng基因组DNA,2×PCR缓冲液,15 mmol/L MgCl₂,5 μmol/L引物,0.5 U Tag酶(北京天根公司)。上游引物:5'-TCCAGCAGTTTCATGAGATGC-3';下游引物:5'-GAGGTCATTTCAAGCTCAGC-3',循环条件参照文献^[9]。分型时,取扩增产物20 μL加入Bsp12861限制性内切酶(New England Biolabs公司)3 U,37℃恒温水浴过夜后,取10 μL酶切产物,经2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶(EB)染色,221 bp的片段代表T等位基因,125 bp和96 bp两条片段代表C等位基因,凝胶成像分析仪(BIO-RAD公司)下观察并记录结果。

1.3 统计学分析

采用HaploView 4.0软件进行Hardy-Weinberg平衡检验、连锁不平衡分析以及计算病例组和对照组间基因型频率和等位基因频率。应用SPSS 13.0软件进行统计学分析,计量资料用t检验,等位基因及基因型频率分布差异比较采用 χ^2 检查, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组T3111C多态性位点基因型及等位基因频率分布

CLOCK基因T3111C多态性位点的基因型及等位基因频率在ADHD组和对照组的分布均符合Hardy-Weinberg平衡。

CLOCK基因T3111C位点的基因型及等位基因频率分布在ADHD组与对照组间差异有统计学意义($P < 0.05$),ADHD组等位基因C频率显著高于对照组($\chi^2 = 7.254, P = 0.007, OR = 1.740, 95\% CI = 1.160 \sim 2.612$),见表1。

表1 两组T3111C多态性位点基因型及等位基因频率分布比较 [例(%)]

组别	例数	T3111C基因型			T3111C等位基因	
		TT	TC	CC	T	C
对照组	150	107(71.3)	41(27.3)	2(1.3)	255(85.0)	45(15.0)
ADHD组	166	98(59.0)	58(34.9)	10(6.0)	254(76.5)	78(23.5)
χ^2 值		7.858			7.254	
P值		0.020			0.007	

2.2 两组的SDSC评分比较

ADHD组的入睡和保持睡眠障碍、睡眠呼吸障碍、过度白天嗜睡障碍及SDSC总分均显著高于对照组($P < 0.05$);而夜间睡眠唤醒梦魇障碍、睡眠-觉醒转换障碍以及睡眠多汗症在两组间差异无统计学意义。见表2。

表2 两组的SDSC评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

SDSC	对照组 (n=150)	ADHD组 (n=166)	t值	P值
入睡和保持睡眠障碍	10.2 ± 2.3	6.4 ± 1.5	17.1	<0.05
睡眠呼吸障碍	5.8 ± 0.7	3.1 ± 0.3	43.4	<0.05
夜间睡眠唤醒梦魇障碍	4.7 ± 2.1	4.1 ± 1.6	1.9	0.07
睡眠-觉醒转换障碍	8.7 ± 1.9	7.8 ± 2.4	1.3	0.23
过度白天嗜睡障碍	7.9 ± 1.8	3.1 ± 0.5	30.2	<0.05
睡眠多汗症	4.4 ± 1.7	3.8 ± 1.2	1.2	0.24
总分	43.7 ± 2.2	29.7 ± 1.4	46.2	<0.05

2.3 ADHD患儿T3111C多态性与睡眠障碍的关联分析

ADHD患儿伴有明显睡眠障碍(SDSC总分小于39)的有94人(56.6%),不伴有明显睡眠障碍的有72人(43.4%)。CLOCK基因T3111C位点的基因型及等位基因频率分布在伴有与不伴有睡眠障碍的ADHD患儿间差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表3。

表3 ADHD组件/不伴有睡眠障碍患儿T3111C多态性位点基因型及等位基因频率分布比较 [例(%)]

组别	例数	T3111C基因型			T3111C等位基因	
		TT	TC	CC	T	C
无睡眠障碍	72	53(74)	18(25)	1(1)	124(86)	20(14)
有睡眠障碍	94	45(48)	40(43)	9(10)	130(69)	58(31)
χ^2 值		14.323			13.052	
P值		0.001			<0.001	

3 讨论

ADHD患儿常伴有不同形式的睡眠障碍。国内研究报道ADHD患儿伴有睡眠障碍可高达80%以上^[11]。本研究中,伴显著睡眠障碍的ADHD患儿占56.6%。这些结果说明ADHD患儿伴有睡眠障碍的比例很高,睡眠障碍是ADHD重要的并发症之一。有学者甚至提出ADHD相关睡眠障碍可能明显影响ADHD的病程和预后^[10]。任衍镇等^[12]通过香港中文大学定式化睡眠问卷调查和logistic回归分析,发现ADHD症状和多项睡眠问题存在明显关联。本研究通过SDSC量表评分,同样表明ADHD患儿存在显著的睡眠障碍,较之正常对照,ADHD患

儿在入睡和保持睡眠障碍、睡眠呼吸障碍和过度白天嗜睡障碍的得分显著增高。

作为一种复杂性疾病,遗传因素对于ADHD的发病起到重要作用,寻找ADHD的候选基因一直是ADHD分子遗传学研究领域的热点之一。目前的遗传学研究已经发现多个神经递质系统相关基因与ADHD的发病相关联,神经影像学和动物模型研究也找到了单胺类等神经递质系统紊乱与ADHD发病相联系的证据^[13]。但既有的研究结果都不能完全解释ADHD的临床症状,特别是ADHD患儿普遍存在的睡眠障碍现象。基于此,有学者提出昼夜节律相关基因如CLOCK基因可能参与了ADHD的发病。CLOCK基因定位于人类染色体长臂4q12,包含25个外显子,在基因组的跨度为115.138 kb,其转录翻译的CLOCK蛋白介导多个昼夜节律基因的转录调控,是调节哺乳动物昼夜节律的核心蛋白之一。同时,约有高达10%的哺乳动物转录组序列可能受昼夜节律的影响,CLOCK蛋白水平的变化与这些转录调控密切相关^[14]。

近年来,多个不同研究小组发现位于CLOCK基因3非编码区的多态性位点T3111C与包括精神分裂症、重症抑郁以及双相障碍等多种精神疾病存在关联^[15-17]。最近的一项研究通过包括亚洲和欧洲人群的家庭传递不平衡检验表明T3111C多态性位点的T等位基因的优先传递与ADHD的易感性密切相关^[9]。本研究通过中国汉族人群的病例-对照分析在国内首次表明T3111C位点的C等位基因可能是ADHD发病相关的危险因素。

目前对ADHD伴有睡眠障碍的机制仍不清楚,而CLOCK基因由于在昼夜节律调控方面的重要作用受到学界的广泛关注。多种精神疾患如重症抑郁和双相障碍伴有的睡眠障碍与CLOCK基因多态性显著相关^[15,17]。而ADHD相关睡眠障碍与CLOCK基因多态性的关系目前未见报道。本研究在国内首次发现,ADHD伴有与不伴有睡眠障碍患儿在T3111C位点的基因型及等位基因频率间差异有统计学意义,携带C等位基因的患儿伴有睡眠障碍的相对风险显著增高。关于T3111C位点内在的生物学效应机制,有学者指出位于3'非编码区的T3111C位点很可能是一个具有功能的多态性位点,它可显著影响CLOCK基因mRNA的转录表达^[18],以往研究也发现T3111C位点的C等位基因与人类昼夜偏好(diurnal preference)有关,而T等位基因可能是睡眠时相延迟综合征(delayed sleep phase syndrome, DSPS)的风险等位基因^[19]。有关该位点影响睡眠

过程的具体神经生物学机制仍需深入研究。

综上所述,本研究结果表明,CLOCK基因的T3111C位点可能是决定ADHD易感性的重要因素,ADHD伴有的睡眠障碍可能与该位点的C等位基因相关联。在后续研究中,应加大样本量采用不同族群的样本对本研究结果进行验证,同时也应对CLOCK基因其他多态性位点进行综合与连锁分析。

[参 考 文 献]

[1] Biederman J, Faraone SV. Attention-deficit hyperactivity disorder [J]. *Lancet*, 2005, 366(9481): 237-248.

[2] 徐通. 注意缺陷多动障碍的过去、现在与将来[J]. *中国实用儿科杂志*, 2009, 24(3): 231-233.

[3] 钱秋瑾,张浩波,王玉凤,杨莉,管丽丽,陈芸. 单胺氧化酶基因多态性与注意缺陷多动障碍智商的相关性研究[J]. *中国实用儿科杂志*, 2009, 24(1): 26-30.

[4] Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder[J]. *Biol Psychiatry*, 2005, 57(11): 1313-1323.

[5] Kamimura E, Ueno Y, Tanaka S, Sawa H, Yoshioka M, Ueno KI, et al. New rat model for attention deficit hyperactive disorder (ADHD) [J]. *Comp Med*, 2001, 51(3): 245-251.

[6] 韩颖,秦炯. 儿童注意缺陷多动障碍与睡眠障碍[J]. *中国实用儿科杂志*, 2010, 25(9): 662-665.

[7] McClung CA, Sidiropoulou K, Vitaterna M, Takahashi JS, White FJ, Cooper DC, et al. Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the CLOCK gene[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(26): 9377-9381.

[8] Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Saitoh H, Mishima Y. The 3111T/C polymorphism of hCLOCK is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005, 133B(1): 101-104.

[9] Xu X, Breen G, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P. Association study between a polymorphism at the 3'-untranslated region of CLOCK gene and attention deficit hyperactivity disorder

[J]. *Behav Brain Funct*, 2010, 6: 48.

[10] Kissling C, Retz W, Wiemann S, Coogan AN, Clement RM, Hünnerkopf R, et al. A polymorphism at the 3'-untranslated region of the CLOCK gene is associated with adult attention-deficit hyperactivity disorder [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2008, 147(3): 333-338.

[11] 陈湘红,张利之,杨春柳. 注意缺陷多动障碍儿童睡眠障碍与铁缺乏关系的临床研究[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(10): 1937-1939.

[12] 任衍镇,戚元丽,张斌. 小学生的注意缺陷多动症状与睡眠的相关性[J]. *中国心理卫生杂志*, 2011, 25(6): 438-443.

[13] 赵爱玲,程道猛,苏林雁. 注意缺陷多动障碍与单胺类神经递质基因[J]. *国外医学精神病学分册*, 2004, 31(1): 47.

[14] Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atsumi G, et al. Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 41519-41527.

[15] Serretti A, Benedetti F, Mandelli L, Lorenzi C, Pirovano A, Colombo C, et al. Genetic dissection of psychopathological symptoms insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2003, 121B(1): 35-38.

[16] Takao T, Tachikawa H, Kawanishi Y, Mizukami K, Asada T. CLOCK gene T3111C polymorphism is associated with Japanese schizophrenics: a preliminary study[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2007, 17(4): 273-276.

[17] Benedetti F, Dallaspesza S, Fulgosi MC, Lorenzi C, Serretti A, Barbini B, et al. Actimetric evidence that CLOCK 3111 T/C SNP influences sleep and activity patterns in patients affected by bipolar depression[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007, 144B(5): 631-635.

[18] Katzenberg D, Young T, Finn L, Lin L, King DP, Takahashi JS, et al. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference[J]. *Sleep*, 1998, 21(6): 569-576.

[19] Iwase T, Kajimura N, Uchiyama M, Ebisawa T, Yoshimura K, Kamei Y, et al. Mutation screening of the human CLOCK gene in circadian rhythm sleep disorders[J]. *Psychiatry Res*, 2002, 109(2): 121-128.

(本文编辑:王庆红)