

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01307

OPHN1 基因 rs492933 位点多态性与秦巴山区汉族儿童非特异精神发育迟滞的相关性研究

张来军^{1,2}, 郑子健³, 张科进¹, 高晓彩^{1,3}, 陈超⁵, 黄绍平⁴, 张富昌^{1,3}

1. 西北大学生命科学学院, 西安 710069;
2. 甘肃省陇东学院生命科学系, 庆阳 745000;
3. 西北大学公共管理学院应用心理研究所, 西安 710069;
4. 西安交通大学医学院第二附属医院, 西安 710004;
5. 西北大学国家微检测中心, 西安 710069

摘要: *OPHN1* 基因编码 RhoGTP 酶激活蛋白(RhoGAP), 是 X 连锁的与非特异性精神发育迟滞有关的基因之一。采用 PCR-RFLP 方法, 对 234 名陕西秦巴山区正常的汉族儿童以及精神发育迟滞(Mental retardation, MR)患者的 *OPHN1* 基因 5'非翻译区中的单核苷酸多态位点(Single nucleotide polymorphism, SNP) rs492933 的等位基因频率和基因型频率以及是否与非特异精神发育迟滞相关进行分析。结果发现: 这一位点基因频率 *C* 为 0.826, *T* 为 0.174; MR 组与对照组之间基因型频率和基因频率没有显著性差异, 边缘组与对照组之间基因型频率和基因频率也没有显著性差异。证明 *OPHN1* 基因内 SNP rs492933 的多态性与秦巴山区汉族儿童精神发育迟滞不存在相关性。

关键词: *OPHN1* 基因; 单核苷酸多态性; 精神发育迟滞

An association study between *OPHN1* gene rs492933 polymorphism and mental retardation in children of the Qinba Mountain region

ZHANG Lai-Jun^{1,2}, ZHENG Zi-Jian³, ZHANG Ke-Jin¹, GAO Xiao-Cai^{1,3}, CHEN Chao⁵, HUANG Shao-Ping⁴, ZHANG Fu-Chang^{1,3}

1. College of Biological Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China;
2. Department of Life Sciences, Longdong College, Qingyang, Gansu Province 745000, China;
3. College of Public Management, Institute of Applied Psychology, Northwest University, Xi'an 710069, China;
4. Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China;
5. National Engineering Research Center for Miniaturized Detection System, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: The *OPHN1* gene encodes a Rho-GTPase activating protein (RhoGAP), and mutations in *OPHN1* are responsible for non-specific X-linked mental retardation (NSMR). A SNP located in the 5'-untranslated region (UTRs) of *OPHN1* (rs492933) was examined by PCR-RFLP to assess its contribution to cognitive ability in 234 unrelated healthy and MR

收稿日期: 2007-10-10; 修回日期: 2008-02-10

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2007CB516702)、国家自然科学基金项目(编号: 30470577)和国家十五科技攻关计划项目(编号: 2001BA901A49)资助[Supported by National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2007CB516702), National Natural Science Foundation of China (No. 30470577) and the 10th Five Years Programs for Science and Technology Development of China (No. 2001BA901A49)]

作者简介: 张来军(1968-), 女, 甘肃庆阳人, 讲师, 博士研究生, 研究方向: 遗传学。Tel: 029-88306154; E-mail: ldxyzhj@126.com

通讯作者: 张富昌(1947-), 男, 陕西蓝田人, 博士生导师, 研究方向: 认知神经遗传学。Tel: 029-88303328; E-mail: zhfc@nwu.edu.cn

陈超(1958-), 男, 陕西西安人, 博士生导师, 研究方向: 蛋白质药理学。Tel: 029-88303446/88303800; E-mail: chaochen@nwu.edu.cn

children in the Qinba Mountain region in Shaanxi. The allelic frequencies of rs492933 were 0.826 for the C allele and 0.174 for the T allele. Genotype frequencies and allelic frequencies were not significantly different between the MR and the controls, or between the borderline group and the controls. In conclusion, there is no association between the *OPHN1* gene polymorphism and NSMR in the Qinba Mountain region children.

Keywords: oligophrenin-1 (*OPHN1*); single nucleotide polymorphism (SNP); mental retardation

精神发育迟滞(Mental retardation, MR)是一组由多种不同病因引起的综合病症,其主要特征为智力低下和社会适应困难。其遗传基础研究的结果显示可能有大量基因涉及到精神活动与认知过程。对这些造成精神发育迟滞的基因进行研究,探索其表达产物的生理功能,能为揭示人类精神活动与认知过程的分子基础提供有用的线索。

OPHN1 (Oligophrenin-1)基因是 X 连锁的与非特异性精神发育迟滞有关的基因之一,位于 Xq12 处,约 390 kb,编码 RhoGTP 酶激活蛋白(RhoGAP),由 802 个氨基酸构成,参与调节 RhoGTP 酶的信号传导过程,RhoGAP 结构域可激活 Rho、Rac1 和 Cdc42 等 3 种 GTP 酶的活性^[1],与神经系统的正常发育密切相关。*OPHN1* 基因内的错义突变、小的缺失及插入都会影响信号传导过程,使大脑处理信息的能力被限制,从而导致精神发育迟滞。它与智力之间的关系最早发现于 1997 年,由法国科学家 Bienvenu 等^[2]对一位患有轻度精神发育迟滞并且具有 X:12 平衡易位的女性病人研究发现。

采用单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)对候选基因进行关联分析能够检测到疾病致病机制中十分常见和可能起着重要作用的微效基因。迄今为止 *OPHN1* 基因内部的 SNPs 在中国人群中的分布特点及其与智力分布之间的关系还未见报道。为了进一步了解 *OPHN1* 基因内 SNPs 与人的智力分布及精神发育迟滞的关系,本研究从 SNP 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)中选择 *OPHN1* 基因内位于功能区和 5' 端不翻译区的多个 SNP 位点,通过对这些 SNPs 在秦巴山区人群中的频率分析,了解其在中国人群中的分布特点,并间接研究 *OPHN1* 基因是否与秦巴山区人群精神发育迟滞的发病相关。

1 对象与方法

1.1 对象

本课题采用病例-对照方法,研究对象是 234 例

无血缘关系的陕西南部秦巴山区汉族儿童,女性 129 例,男性 105 例,年龄 5~14 岁。其中,MR 组 72 人,边缘组 46 人,对照组 116 人。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 提取

按知情同意原则,无菌采集前臂静脉全血 1 mL,用酚-氯仿法提取基因组 DNA,保存于-20℃ 冰箱中,或 4℃ 暂存。

1.2.2 *OPHN1* 基因中 SNPs 的选择

选择 *OPHN1* 基因中 3 个功能性 SNPs,分别为 rs12838002、rs5918811 和 rs492933,前两个 SNPs 位于外显子上,rs492933 位于 5' 非翻译区。但是在预实验检测中发现 rs12838002 和 rs5918811 SNP 位点的稀有等位基因频率(Minor allele frequency, MAF)均低于 0.05,所以仅对 rs492933 做了进一步分析。

1.2.3 引物的设计与合成

PCR 引物依据 NCBI 网站公布的人类 *OPHN1* 基因序列,用 Primer5.0 自行设计。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。rs492933 的引物序列为上游引物:5'-AAGTACTGCAGAGGCACCA-3',下游引物:5'-GCAAAGTGGGCTGGAAGATA-3'。

1.2.4 PCR 扩增条件

扩增体系总体积为 25 μ L,其中 ddH₂O 17.3 μ L,10 \times buffer 2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L,10 mmol/L dNTP 0.5 μ L,25 μ mol/L 正反向引物各 1 μ L,DNA 模板 50 ng, *Taq* 聚合酶 1 U,各种试剂均为 TaKaRa 产品, *Taq* 聚合酶为 MBI 产品。扩增程序:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,55℃ 复性 40 s,72℃ 延伸 50 s,35 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min;4℃ 保存。在每次扩增时做一个空白对照,PCR 扩增在 Biometra 的 T-Gradient 进行。每次取 5 μ L 扩增产物,用 2% 琼脂糖凝胶 80 V 电泳 40 min 检验扩增效果。

1.2.5 扩增产物的限制性酶切

用苯酚-氯仿法将第一次 PCR 产物纯化后,再

进行限制性内切酶消化。其消化反应体系是: *Tas* 2~3 U(MBI 生产), 10×buffer 2 μ L, PCR 纯化产物 8~15 μ L, 加入 ddH₂O 使终体积为 20 μ L。65 °C 过夜消化。在酶切产物中加入 4 μ L 上样缓冲液, 混匀后上样, 8%的聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳, 在 1×TBE 电泳缓冲液中 120 V 电泳 10 h, 简易银染法银染, 最后在 UVP(Ultra-Violet products U.S.A)照相保存。用 TIANGEN 公司 MD100 系列 Marker I 做为长度标记判断酶切后 DNA 片段的大小, 并完成该位点的基因分型。

1.2.6 秦巴山区实验点儿童智力分布及精神发育迟滞的诊断

对 4~5 岁儿童用中国幼儿韦氏量表做智力筛查^[3]。对 6~14 岁儿童用中国韦氏儿童量表^[4], 并采用北京医科大学左启华教授等修订的婴幼儿-儿童适应能力测验方法对所有儿童做社会适应行为评定^[5]。对筛查出的 $IQ < 85$, 社会适应能力评定等于或小于 9 分的儿童, 进一步由神经精神学专家、儿科医生及心理学专家对其做行为观察和临床检查, 综合以上测验、观察和检查结果, 采用 1985 年世界卫生组织制定的 MR 诊断标准^[6], 经逐一病例讨论, 确诊出实验区的 MR、边缘及正常儿童。

1.3 统计学处理

用大型统计学软件包 SPSS12.0 进行各种频数统计。HWE 和相关性分析采用在线的 Finitti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) 软件, 软件给出每个位点的病例和对照组中基因频率和基因型频率之间分布的差别。

2 结果与分析

2.1 PCR-RFLP 法确定 *OPHN1* 基因 SNP 位点 rs492933 的基因型

OPHN1 基因的 SNP 位点 rs492933 由于 C/T 的转换, 有 3 种基因型: 有酶切位点的纯合型 *TT*(170 bp,

40 bp), 没有酶切位点的纯合型 *CC*(210 bp), 杂合型 *CT*(210 bp、170 bp 和 40 bp)(图 1)。

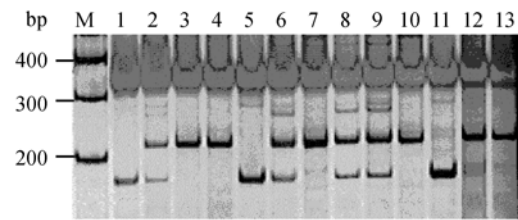


图 1 *OPHN1* 基因 SNP 位点 rs492933 多态性电泳图

M: Marker ; 1, 5, 11: *TT* 基因型; 2, 6, 8, 9: *CT* 基因型; 3, 4, 7, 10, 12, 13: *CC* 基因型。

Fig. 1 PCR-RFLP analysis of the polymorphic site rs492933 of *OPHN1* gene in different individuals

M: Marker ; 1, 5, 11: *TT* genotype; 2, 6, 8, 9: *CT* genotype; 3, 4, 7, 10, 12, 13: *CC* genotype.

2.2 *OPHN1* 基因 SNP 位点 rs492933 的基因型频率与等位基因频率

表 1 所示为 rs492933 的基因型频率与等位基因频率在秦巴山区实验点不同性别儿童中的分布情况, 按照 X-连锁座位上的基因频率计算方法^[7]计算出 rs492933 等位基因的频率 *C* 为 0.826, *T* 为 0.174。各组基因型(基因)分布经卡方检验符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 ($P > 0.05$), 具有群体代表性。

2.3 rs492933 基因型(等位基因)频率分布及与秦巴山区儿童精神发育迟滞的相关性分析

表 2 所示为各组间基因型(基因)频率统计, 以及各组间相关性分析结果。对秦巴山区汉族儿童, 组 3 组, 符合上述条件的女性样本 129 人, 男性样本按 WHO 的诊断标准将其分为: MR 组、边缘组、对照 105 人, 年龄均在 5~14 岁之间。

采用在线的 Finitti(<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) 软件, 对实验样品中 MR 组和边缘组的 rs492933 的基因型频率(基因频率)分别与对照组的基因型频率(基因频率)进行组间相关性分析。由于

表 1 秦巴山区汉族人群 *OPHN1* 基因 SNP 位点 rs492933 多态性的分布

Table 1 Distribution of *OPHN1* gene rs492933 polymorphism in Han population in Qinba Mountain in terms of genotype and allelic frequencies

性别 Sex	人数 N	基因型频率 Genotype frequency (%)			等位基因频率 Allele frequency (%)	
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>
男性 Males	129	74 (0.574)	51 (0.395)	4 (0.031)	199 (0.771)	59 (0.229)
女性 Females	105				94 (0.895)	11 (0.105)
总计 Total	234	74 (0.574)	51 (0.395)	4 (0.031)	293 (0.807)	70 (0.193)

表 2 rs492933 的基因和基因型频率

Table 2 Genotype and allelic frequency of rs492933

性别 Sex	人数 N	基因型频率			等位基因频率		$\chi^2(P\text{ value})$				比值比		
		Genotype frequency (%)			Allele frequency (%)		MR vs. Co.		Bo. vs Co.		Odds ratio		
		CC	CT	TT	C	T	CC vs CT & TT	C vs T	CC vs CT & TT	C vs T	(95% CI)		
女性 Females													
MR	43	28	15	0	71(0.83)	15(0.17)							
Bo.	29	13	15	1	41(0.71)	17(0.29)	0.54 (0.46)	1.15 (0.28)	1.32 (0.25)	0.64 (0.42)	0.68 [0.34~1.38]	1.34 [0.66~2.72]	
Co.	57	33	21	3	87(0.76)	27(0.24)							
男性 Males													
MR	29				28(0.97)	1(0.00)							
Bo.	17				14(0.82)	3(0.18)		3.33 (0.07)		0.77 (0.39)	0.27 [0.06~1.21]	0.63 [0.22~1.78]	
Co.	59				52(0.88)	7(0.12)							

MR: 精神发育迟滞; Bo: 边缘人群; Co: 正常对照人群。

MR: Mental retardation; Bo: Borderline; Co: Controls.

OPHN1 基因位于 X 染色体上, 男性的基因型频率等于基因频率; 结果显示, 男性中这一位点的基因频率在 MR 组与对照组之间、边缘组与对照组之间没有显著性差异。女性比较的结果也同样显示这一位点的基因型频率和基因频率在 MR 组与对照组之间、边缘组与对照组之间没有显著性差异。

3 讨论

OPHN1 是 X 连锁的与非特异性精神发育迟滞有关的基因之一, 其表达产物参与调节 RhoGTP 酶的信号传导过程。由 *OPHN1* 过表达所诱导的细胞形态学改变的实验显示, 在 *OPHN1* 过表达的地方其通过 RhoGAP 结构域使 Rho 和 Cdc42 失活, 以在体内调节细胞骨架^[1]。用 RNA 干扰和反义 RNA 方法, 抑制 *OPHN1* 在大鼠海马脑片 CA1 神经元中的表达水平, 显著减少了树突棘长度^[8]。*OPHN1* 功能的失活增加了不成熟树突棘的密度及比例。用 *OPHN1* 功能缺陷的动物模型, 证实 *OPHN1* 在发育的所有时期都是必需的, 同时揭示了 *OPHN1* 通过维持成熟树突棘的密度或限制新的丝状伪足的延伸调控树突棘的成熟^[9]。*OPHN1* 的 mRNA 在婴儿脑、肺、肾表达, 表达的成人组织有脑、胎盘、骨骼肌、肾、胰脏^[11]。近年来发现了多例由于这个基因的突变导致除认知损害外还有其他临床症状的复杂的综合征^[10, 11]。

以秦巴山区的汉族儿童为研究对象, 选择 *OPHN1* 基因中两个位于外显子上的 SNPs rs12838002、rs5918811 和位于 5' 非翻译区的 rs492933, 试图研究这个基因与这一地区人群精神发育迟滞的相关性。前两个 SNPs 的频率低于 0.05。

用 PCR-RFLP 方法对 SNPs rs492933 多态性进行了分析, 发现这一位点在秦巴山区人群中的频率分布 C 为 0.826, T 为 0.174, 同时也发现其基因型频率和基因频率在 MR 组和对照组之间没有显著性差异。

从以上研究, 我们得出两点结论: (1) rs12838002, rs5918811 位点在该人群中并没有很好的多态性, 不宜用作遗传标记; 而 rs492933 在我国秦巴山区人群中的频率分布 C 为 0.826, T 为 0.174, 具有较好的多态性; (2) 对 rs492933 的多态研究中没有发现其与秦巴山区儿童 NSMR 的相关性。

此外, 本研究还存在不足之处, 由于 rs12838002、rs5918811 两个位点的 MAF 值太低, 不能做为 *OPHN1* 基因的遗传标记, 仅 rs492933 一个 SNP 位点的信息含量非常有限, 要进一步阐明 *OPHN1* 基因与疾病的关系还需做更细致的研究工作。相信随着分子生物学及基因组学的迅速发展, 将来会有更为合适的遗传标记位点可用于揭示 *OPHN1* 基因与人的智力分布及 NSMR 的关系。

秦巴山区是一个相对隔离、偏僻的山区, 也是我国精神发育迟滞的高发区。对该地区 MR 的遗传学调查研究中发现, MR 具有明显家庭聚集性。在实验条件和技术许可的情况下, 选择一些典型的 MR 家系, 直接对患者进行相关基因的突变研究, 寻找出致病的基因, 对揭示这一地区精神发育迟滞的病因将有非常重要的意义。

参考文献(References):

- [1] Fauchereau F, Herbrand U, Chafey P, Eberth A, Koulakoff A, Vinet M-C, Ahmadian MR, Chelly J, Billuart P. The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal do-

- main. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 23(4): 574–586. [\[DOI\]](#)
- [2] Bienvenu T, Der-Sarkissian H, Billuart P, Tissot M, Des Portes V, Bruls T, Chabrolle JP, Chauveau P, Cherry M, Kahn A, Cohen D, Beldjord C, Chelly J, Cherif D. Mapping of the X-breakpoint involved in a balanced X; 12 translocation in a female with mild mental retardation. *Eur J Hum Genet*, 1997, 5(2): 105–109.
- [3] GONG Yao-Xian, DAI Xiao-Yang. Chinese-Wechsler Young Children Scale of Intelligence (C-WYCSI). Changsha: Hunan Map Press, 1992.
龚耀先, 戴晓阳. 中国-韦氏幼儿智力量表(手册). 长沙: 湖南地图出版社, 1992.
- [4] GONG Yao-Xian, CAI Tai-Sheng. Wechsler Intelligence Scale for Children. Changsha: Hunan Map Press, 1993.
龚耀先, 蔡太生. 韦氏儿童智力量表(手册). 长沙: 湖南地图出版社, 1993.
- [5] ZUO Qi-Hua, ZHANG Zhi-Xiang. Adaptive Scale of Infant and Children. Beijing: Medical University of China, 1998.
左启华, 张致祥. 婴儿-初中学生社会生活能力量表. 北京: 中国医科大学, 1998.
- [6] Organization TWH. The ICD-10 classification of mental and behavioral disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines, WHO, Geneva, Switzerland, 1992.
- [7] XU Jin-Lin, XU Qin, CHEN Chun. Population Genetics. Beijing: Science Press, 2001, 812–820.
徐晋麟, 徐沁, 陈淳编著. 群体遗传学. 北京: 科学出版社, 2001, 818–820.
- [8] Govek EE, Newey SE, Akerman CJ. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nature Neuroscience*, 2004, 7(4): 364–372. [\[DOI\]](#)
- [9] Khelfaoui M, Denis C, van Galen E, de Bock F, Schmitt A, Houbroun C, Morice E, Giros B, Ramakers G, Fagni L, Chelly J, Nosten-Bertrand M, Billuart P. Loss of X-linked mental retardation gene oligophrenin1 in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *Journal of Neuroscience*, 2007, 27(35): 9439–9450. [\[DOI\]](#)
- [10] Philip N, Chabrol B, Lossi AM, Cardoso C, Guerrini R, Dobyns WB, Raybaud C, Villard L. Mutations in the oligophrenin-1 gene (*OPHN1*) cause X linked congenital cerebellar hypoplasia. *J Med Genet*, 2003, 40(6): 441–446. [\[DOI\]](#)
- [11] Bergmann C, Zerres K, Senderek J, Rudnik-Schöneborn S, Eggermann T, Häusler M, Mull M, Ramaekers VT. Oligophrenin 1 (*OPHN1*) gene mutation causes syndromic X-linked mental retardation with epilepsy, rostral ventricular enlargement and cerebellar hypoplasia. *Brain*, 2003, 126(Pt 7): 1537–1544. [\[DOI\]](#)

• 遗传咨询 •

智力低下遗传吗?

问: 我(女性)的爷爷奶奶是近亲(姑表)结婚的。我的爸爸和姑姑都正常。我和我姐姐也正常。在我出生前我有两个哥哥, 他们分别在 10 岁左右夭折了。听父母说他们有智障, 同我姐姐现在的两个男孩(12 岁和 5 岁)症状差不多, 表现为: 到现在说话不清楚, 出生 3 个月发现发育较同龄小孩差, 6 个月后明显, 一岁后还不能说话, 喜搞破坏, 有攻击性。在长沙某医院对我姐第二个小孩做了染色体核型分析。结果为: 46, XY, 经缺叶酸培养基 M199 诱导, 在 100 个分裂相中未发现 fra(X)分裂相。还通过 RT-PCR 做了 FMR-1 基因分析。结果为: 1) 应用 PCR 技术对 FMR-1 基因的 CGG 重复序列进行检测, 结果显示该重复序列大小在正常范围之内。2) 将全血提取 RNA 并做反转录, 以此 cDNA 为模板做双重 PCR, 结果显示患者具有正常片段大小相符的条带, 证明 FMR-1 基因有表达。以上为医院检查结果, 我的问题是现在我结婚了想要小孩, 我能否在孕前检查出有没有携带该病的基因, 我们以后生的小孩是否和我姐姐的一样? 医院建议我们生女孩, 要是男孩就不要。我到底应该怎么办?

答: 从你所描述的家系和患者症状来看, 初步判断属于 X 连锁智力低下(简称 XLMR)。致病基因来自你母亲方, 与你爷爷奶奶的近亲结婚没有关系。XLMR 包括多种类型, 其中以脆性 X 综合征最常见, 表现为 X 连锁隐性遗传方式, 约每 2 000 个男性中就有一人发病。其表现主要是智力低下, 患者智商仅为正常人的 40% 左右。男性患者的体貌特征是耳朵大、睾丸大。患者寿命基本正常, 但生活不能自理。你姐姐和你母亲是肯定携带了该致病基因, 所以各生育两个患病的男孩。你本人有 50% 的几率为携带者。如果为携带者, 所生男孩有 1/2 机会发病, 所生女孩有 1/2 机会为携带者。你姐的小孩未能检出脆性 X 综合征致病基因, 可能是其他位于 X 染色体上的基因突变所引起。连锁分析有可能鉴定出你是否为携带者, 这需要对你家族各成员做进一步详细分析才可能判别。在无法做上述分析的情况下, 对男胎的选择性流产是一种很无奈的选择。

(中国科学院遗传与发育生物学研究所 李巍)