doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.047

儿童孤独症与拷贝数变异的研究

雷礼磊 葛陈捷 邬素萍[△] 吴 铮 唐春玲

(哈尔滨医科大学第一临床医学院 精神科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: 儿童孤独症是一种复杂的神经发育性障碍,患儿常表现有认知、情感和行为等多方面的异常,主要临床表现为社会交往障碍,言语交流障碍,重复刻板行为。孤独症多起病于三岁之前,男女发病比例约为 4:1,患儿常伴有明显的精神发育迟滞。近年来,其发病率呈现逐年上升的趋势,最新的流行病学调查显示孤独症在美国的患病率约为 9.1%。据公认的假说“常见疾病-常见变异”推测,孤独症的风险等位基因和其他复杂疾病一样,在普通人群中将会变得很常见。由于该病起病早,难以进行早期识别,而且尚无特效药或方法可以彻底治愈这种病症,因而给社会及患儿家庭带来了沉重的负担。目前其发病原因和机制尚不明确,但关于儿童孤独症的双生子研究和家系研究都显示它是一个高度遗传性疾病,而且很多证据都表明孤独症是受多因素影响的遗传性疾病,近年来关于孤独症和拷贝数变异(CNVs)研究的报道越来越多,本文将主要就儿童孤独症的拷贝数变异研究现状和最新进展进行论述。

关键词: 儿童孤独症;遗传学;拷贝数变异(CNVs)

中图分类号:R749.94 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)06-1186-03

The Copy Number Variants Research of Childhood Autism

LEI Li-lei, GE Chen-jie, WU Su-ping[△], WU Zheng, TANG Chun-ling

(Department of Psychiatry, the First Affiliated Hospital of Harbin, Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT: Autism is a complex neurodevelopment disorders by impairment in social interaction, verbal communication and repetitive/stereotypic behavior. The children often show a wide range of cognitive, emotional and behavioral abnormalities. Autism always begins before the age of three, the male to female ratio is about 4:1, it often accompanied by significant mental retardation. In recent years, the incidence rate of childhood autism showed an increasing trend. The latest epidemiological survey of the prevalence of autism in the United States is about 9.1%. The widely accepted "Common Disease-Common Variant" hypothesis predicts that the risk alleles in ASD's and other complex disorders will be common in the general population. Since the early onset of the disease, it is difficult for early identification, and there is no cure or method can completely cure this disease, which has brought a heavy burden to the society and families of these children. Twin and family studies in autistic disorders (AD) have elucidated a high heritability of AD, and much evidence suggests that autism is multi-factorial with a strong genetic basis, but the underlying mechanisms are far from clear. Recently there are more and more reports on autism and copy number variations (CNVs). The article will discuss the current situation and recent progress of copy number variations of childhood autism.

Key words: Autism; Genetic; Copy number variants (CNVs)

Chinese Library Classification (CLC): R749.94 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2015)06-1186-03

儿童孤独症(Childhood Autism) 又称自闭症,是广泛性发育障碍(PDD)中的一种。自首次发现以来便引起国内外学者不断的追踪与研究,早期认为是父母的冷漠和错误的抚养方式导致患儿出现各种精神症状,直到双生子研究的开展,遗传因素的重要性才引起人们越来越多的关注。目前对于孤独症遗传方面的研究涉及染色体异常、基因突变等多个方面,本文就拷贝数变异这一新的遗传变异方式及其新进展进行简单的介绍。

1 孤独症概述

孤独症是一种严重的广泛性发育障碍,症状包括认知、情

感及行为等多方面异常,患儿的主要临床表现包括:社会交往障碍,言语交流障碍,兴趣范围狭窄和重复刻板行为。孤独症一般起病于婴幼儿期,男孩多见,患儿常伴有明显的精神发育迟滞。美国 CDC 调查显示 2007 年患病率为 6.6%;到了 2009 年,美国公布最新的流行病学调查结果,本症患病率约为 9.1%,其中男孩的患病率更是达到 14.3%;2012 年的一份分析报道指出在中国约有 164 万名孤独症儿童。孤独症发病年龄早,预后差,患病率逐年增加,迄今为止还没有有效的治疗方法,因而是一种严重威胁到患儿的生存质量及其家庭的生活质量的疾病。

1943 年美国精神病医生 Leo Kanner^[1]发现了孤独症,虽然经过几十年的研究,但是孤独症的具体病因及其发病机制尚不明确,目前,多数学者认为孤独症的发病机制是遗传和环境因素共同作用的结果。家系研究发现,儿童孤独症的发病具有明

作者简介:雷礼磊(1987-),男,硕士研究生,主要研究方向:孤独症遗传学,电话:15045669784, E-mail:zhoukaizhen@126.com

[△]通讯作者:邬素萍, E-mail:wsping01@126.com

(收稿日期:2014-05-22 接受日期:2014-06-15)

显的家族聚集性。Bailey 等^[2]人关于双生子的研究显示:孤独症同卵双生子(MZ)的同病率可以高达 60%,与此相比异卵双生子(DZ)的这一数值仅为 5%,两者的差异具有显著意义,提示遗传因素在决定儿童孤独症的发病中扮演着十分重要的角色。细胞遗传学研究发现在所有孤独者患儿中约有 7%的病例存在染色体异常,尤其是那些伴有生理缺陷或者低功能的患儿。在所有的染色体中除了 14 和 20 号以外,其余染色体均存在与孤独症有关的异常报道,其中,对于 7、15 和 22 号染色体的研究较深入。

2 拷贝数变异

近年来一种新发现的遗传变异方式与儿童孤独症的关系被越来越多的研究和报道,这就是不同个体之间同一基因片段的拷贝数量的不同,这些拷贝数的不同会引起个体差异甚至是疾病的发生。伴随着第一代人类基因组拷贝数变异图谱的顺利绘制,学者们对孤独症病因的研究又多了一种途径,除了人们熟知的 SNP 或显微镜检查染色体异常外,还可以对中等长度的 DNA 片段的变异情况进行检测。

拷贝数变异(Copy number variation, CNV)是由基因组发生重排而导致的,一般指长度为 1 kb 至数百万 bp 范围内的基因组大片段的拷贝数增加或者减少,主要表现为亚显微水平的缺失、插入和重复等。它是基因组结构变异(Structural variation, SV)的重要组成部分,一个 CNV 如果要引起疾病的发生,就必须在分子途径上影响与人体生长发育过程密切相关的一个或多个基因。缺失的 CNVs 不但可以通过增加或减少基因产物来改变转录率,还能够揭露隐性突变甚至是改变基因的编码序列,这些都会导致疾病的发生。CNVs 既可以在生殖细胞中重新突变而来(de novo CNVs),也可以由父母一代的染色体上继承而来,其中新出现的 CNVs 与患儿智力障碍和畸形似乎有着更强烈的相关性,而且常常会对孤独症患儿造成更严重的影响,导致出现更严重的孤独症症状(例如染色体 15q11-q13),但却不足以诠释孤独症家族聚集性这一特点。一般认为 CNV 包含的信息量大于单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 2 倍以上,因而 CNV 位点的突变率要远高于 SNP,是人类疾病的重要致病因素之一,它的筛选已被证明是一个快速找出与孤独症易感性相关的基因改变的方法。为了量化 CNV 在孤独症发病者的作用,不同的芯片平台被用于检测孤独症患儿们^[3-4],而且伴随着基因组 DNA 芯片技术的不断向前发展,使得人们能够检测更加微小的 CNVs。很多的疾病都和 CNVs 密切相关,并且人们已经证实 CNVs 在遗传多样性方面起着重要的作用,据报道,不同个体之间的遗传变异主要取决于仅仅 0.1%的碱基对改变。关于孤独症的各个基因,令人关注的是一些重复 CNVs 的鉴定,其中尤为重要的一个是染色体 16p11 约 600kb 的微缺失或微重复^[5],涉及到大约 30 个基因。它是如此的重要以至于在大约 1%的孤独症患者中均能出现这一缺失,并且在一些非孤独症的精神发育迟滞、肥胖、各种其他精神障碍的患儿和一些看似正常的人群中也能发现这一 CNV^[6-9]。比较发现,染色体 16p11.2 的缺失 CNVs 的外显率(在孤独症和精神发育迟滞都接近 100%)要明显高于重复 CNVs (外显率约为 50%)。有专家推测根据 CNVs 所影响基因的功能

能和灵敏度,不同的 CNVs 可能会表现不同的外显率^[10,11]。另一个值得关注的 CNV 是新出现的 7q31 的缺失,它涉及 CADPS2 和其他 7 个基因,在连锁研究中这一区域会复制数倍^[12]。CADPS2 基因敲除小鼠的异常和孤独症患者罕见的错义变异都支持这一区域的潜在作用。据报道超过 25%的孤独症患者有癫痫发作和脑电图异常。早期有研究发现染色体 15q11-q13 的缺失和重复与孤独症患儿的精神发育迟滞及癫痫发作有关,而且与孤独症症状相关的 Angelman 综合征、Prader-Willi 综合征也涉及这一区域的改变,此外,该区域还存在控制哺乳动物神经系统正常发育所必需的印记基因。以上几点都表明染色体 15q11-q13 的 CNVs 与孤独症密切相关。

基因组 DNA 微阵列技术的快速进步大大提高了我们检测亚微观的染色体异常的能力。阵列比较基因组杂交(aCGH)是检测 CNVs 最常用的方法,它是由荧光原位杂交技术与消减杂交技术相结合而衍生的,仅需少量的 DNA 即可完成 CNV 的研究工作。许多研究都显示与健康对照组相比某些 CNVs 在孤独症患者中表现的更多见^[13-15],然而,与细胞遗传学标准染色体核型分析的结果相似,大多数的 CNVs 代表着罕见、唯一的病例,而不是经常性的缺失或者重复。从全基因组研究中我们观察到孤独症患儿在以下染色体上复制的 CNVs 表现的更频繁:1q21,2p16.3 (NRXN1),7q36.2 (DPP6),15q11-13 (GABRB3, OR4M2, OR4N4),16p11.2 (MAPK3, MAZ, DOC2A, SEZ6L2),22q11.2,其中有一些 CNVs 在精神发育迟滞和精神分裂症患者中也较对照组常见。Sebat 等^[16]人使用 aCGH 技术研究 264 个孤独症家庭,通过更高分辨率的微阵列扫描,G-带核型,FISH,和微卫星基因分型验证,发现了 17 个新出现的 CNVs,这些自发产生的 CNVs 会明显增加儿童罹患孤独症的风险。韩国的一个研究小组运用同样的方法在研究中分别发现了染色体 8p23.1 和 17p11.2 上的缺失 CNVs^[17]。同样的,在 2009 年一项关于 100 例孤独症患儿的研究中,研究人员新确定了 9 个 CNVs^[18]。单核苷酸多态性(SNP)阵列分析,不但可以用于确定连锁关系,而且可以用来确定基因组的拷贝数变异^[19]。运用 SNP 阵列分析 Marshall 等^[20]对孤独症患儿进行全基因组评估,发现了 13 个拷贝数变异(CNVs)位点,另一个小组对孤独症欧洲血统的先证者的组合样本集进行 SNP 阵列分析,发现了 6 个 CNVs^[20]。借助于这些拷贝数变异的研究方法,一些孤独症相关的报告研究指出染色体 22q13.3 的重复和缺失是导致孤独症发病的危险因素,继而人们发现 SHANK3 基因的突变与孤独症之间存在相关性,该基因能够编码突触的骨架蛋白,该蛋白拥有一个重要的蛋白相互作用结构域,可以作为桥梁将不同功能的蛋白连接在一起,在脊柱形态和突触可塑性中发挥至关重要地作用。研究发现大约 0.5%-1%孤独症患者存在 SHANK3 基因突变。Durand 等^[21]人对 300 例孤独症患者进行 FISH 分析和直接测序,研究结果发现 SHANK3 基因突变和特发性的孤独症密切相关,随后的一项研究也发现了一个新出现的 SHANK3 基因突变和两个 22q13 的缺失 CNV^[22]。此外,Wisniowicka 等^[23]人对一个孤独症家系进行了 NRXN1 基因研究,该家系中母亲患有 Asperger 综合征,五个子女中四个有孤独症样表现,运用 aCGH 和 FISH 对母亲的 DNA 进行处理后他们发现在 β -NRXN1 外显子 2-4 区有一 380 kb 的缺失 CNV,

只有其正常子女未遗传这一 CNV。

用于确定 CNV 的 aCGH 方法通常检测的基因组范围在 40 KB 到几 MB 之间。通过技术改进,采用寡核苷酸 aCGH 分析,对于 CNV 的检测已经从起初的 1 Mb 精确到 100-200 kb 再到现在广泛使用的 25 bp 探针。显然,高密度的寡核苷酸或 SNP 阵列将能为人们进行 CNVs 分析提供更有利的途径。

3 小结

综上所述,CNVs 研究是研究孤独症基因变异情况的新方向,通过过去近十年的辛苦探索,研究者们借助于大量的信息对孤独症和 CNVs 的相关性进行了深入的研究。尽管在各方面都有了很大的进步,但孤独症相关易感基因的最终定义仍然是一个大的挑战,此外,由于特定拷贝数变异的人群分布情况是未知的,故而对于一个新出现的拷贝数变异确定其是否异常是十分困难的。因此,未来的研究的方向应更多的倾向于基因功能及其路径分析方面,以充分掌握大脑的结构和认知处理的过程,以便特效治疗药物的早日开发,解除疾病给孤独症患者及其家庭带来的痛苦。

参考文献(References)

- [1] Kanner L. Autistic disturbances of affective contact [J]. *Nerv Child*, 1943, 2: 217-250
- [2] Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study [J]. *Psychological Medicine*, 1995, 25: 63-77
- [3] Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders [J]. *Nature*, 2010, 466: 368-372
- [4] Rosenfeld JA, Ballif BC, Torchia BS, et al. Copy number variations associated with autism spectrum disorders contribute to a spectrum of neurodevelopmental disorders[J]. *Genet Med*, 2010, 12: 694-702
- [5] Kumar RA, Kara Mohamed S, Sudi J, et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism[J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17: 628-638
- [6] Rosenfeld JA, Coppinger J, Bejjani BA, et al. Speech delays and behavioral problems are the predominant features in individuals with developmental delays and 16p11.2 microdeletions and microduplications [J]. *J Neurodev Disord*, 2010, 2: 26-38
- [7] Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, et al. A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2 [J]. *Nature*, 2010, 463: 671-675
- [8] McCarthy SE, Makarov V, Kirov G, et al. Microduplications of 16p11.2 are associated with Schizophrenia [J]. *Nat Genet*, 2009, 41: 1223-1227
- [9] Bijlsma EK, Gijsbers AC, Schuurs-Hoeijmakers JH, et al. Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals [J]. *Eur J Med Genet*, 2009, 52: 77-87
- [10] Cook EH Jr, Scherer SW. Copy number variations associated with neuropsychiatric conditions[J]. *Nature*, 2008, 455: 919-923
- [11] Ramocki MB, Zoghbi HY. Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes[J]. *Nature*, 2008, 455: 912-918
- [12] Autism Genome Project Consortium, Szatmari P, Paterson AD, et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements[J]. *Nature Gene*, 2007, 39(3): 19-328
- [13] Marshall CR, Noor A, Vincent JB, et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder [J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 82: 477-488
- [14] Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, et al. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 1685-1699
- [15] Weiss LA, Shen Y, Korn JM, et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358: 667-675
- [16] Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism[J]. *Science*, 2007, 316(5823): 445-449
- [17] Cho SC, Yim SH, Yoo HK, et al. Copy number variations associated with idiopathic autism identified by whole-genome microarray-based comparative genomic hybridization[J]. *Psychiatric Genetics*, 2009, 19(4): 177-185
- [18] Qiao Y, Riendeau N, Koochek M, et al. Phenomic determinants of genomic variation in autism spectrum disorders[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2009, 46(10): 680-688
- [19] Babatz T.D., Kumar R.A., Sudi J, et al. Copy number and sequence variants implicate APBA2 as an autism candidate gene [J]. *Autism Research*, 2009, 2(6): 359-364
- [20] Wang K, Zhang Haitao, Ma Deqiong, et al. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders [J]. *Nature*, 2009, 459(7246): 528-533
- [21] Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders[J]. *Nature Genet*, 2007, 39: 25-27
- [22] Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, et al. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum Disorder [J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81: 1289-1297
- [23] Wisniowicka KB, Nestruk M, Peters SU, et al. Intragenic rearrangements in NRXN1 in three families with autism spectrum disorder, developmental delay, and speech delay[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2010, 135B(5): 983-993