

# 多巴胺 D4 受体基因和 5-HT2C 受体基因与海洛因依赖

赵敏\* 杨德森 郝伟 张向晖 张亚林 李凌江 王小平

**【摘要】目的** 探讨多巴胺 D4 受体基因外显子 III VNTR 多态性和 5-HT2C 受体基因 cys23/ser23 多态性与海洛因依赖的关联。**方法** 采用聚合酶链式反应 (PCR) 技术, 对 102 例海洛因依赖者和 64 例正常对照者的多巴胺 D4 受体基因外显子 III VNTR 多态性进行检测, 同时采用 PCR 结合限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析技术, 检测 5-HT2C 受体基因 cys23/ser23 多态性分布。**结果** 海洛因依赖组多巴胺 D4 受体基因外显子 III VNTR 多态性的基因型和等位基因型的频率与对照组无显著差异, 5-HT2C 受体基因的 ser23 等位基因频率仅为 0.9%。**结论** 未发现海洛因依赖与多巴胺 D4 受体基因外显子 III VNTR 多态性相关联, 在中国汉族人未发现 5-HT2C 受体基因 cys23/ser23 多态性。

**【关键词】** 海洛因依赖 多巴胺 D4 受体基因 5-HT2C 受体基因

**Associations between heroin dependence and dopamine D4 and 5-HT2C receptor gene** Zhao min, Yang Desen, Hao Wei, et al. Mental Health Institute, Hunan Medical University, Changsha, 410011

**【ABSTRACT】 Objective:** To explore the association between the Dopamine D4 receptor gene exon III VNTR polymorphism and 23cys/23ser polymorphism of 5-HT2C receptor gene and heroin dependence. **Method:** Genotype and allele frequencies of the dopamine D4 receptor gene exon III VNTR polymorphism and 23cys/23ser polymorphism of 5-HT2C receptor gene in 102 heroin addicts and 64 normal controls were examined by PCR and RLFP technique. **Result:** The genotype and the allele frequency of dopamine D4 receptor gene exon III VNTR in heroin addicts had no difference from that in control group, the ser23 allele frequency of 5-HT2C is only 0.9%. **Conclusion:** The dopamine D4 receptor gene exon III VNTR polymorphism has no association with heroin dependence. 23cys/23ser polymorphism of 5-HT2C receptor gene is not found in Hans of Chinese.

**【KEY WORDS】** heroin dependence dopamine D4 receptor gene 5-HT2C receptor gene

家系调查、双生子研究、寄养子研究及现代分子遗传学研究发现遗传因素在物质依赖中起一定的作用<sup>[1][2]</sup>。药物依赖与中枢神经系统的<sup>1</sup>阿片肽系统、多巴胺系统、5-羟色胺系统等有关<sup>[3]</sup>, 多巴胺受体拮抗剂和 5-HT 受体部分拮抗剂均减轻可卡因依赖者对可卡因的心理渴求。有研究发现多巴胺 D4 受体基因及 5-HT2C 受体基因与物质依赖及寻求刺激的人格特征有关<sup>[4]</sup>。本研究以多巴胺 D4 受体基因外显子 III VNTR 多态性及 5-HT2C 受体基因 cys23/ser23 多态性位点为研究靶点, 探讨海洛因依赖与多巴胺 D4 及 5-HT 受体基因是否存在关联。

## 对象与方法

### 一. 研究对象

共分析了海洛因依赖者 102 例 (男 61, 女 41, 均为汉族, 平均年龄  $26.8 \pm 6.2$  岁), 均来自于湖南省新开铺劳教所的吸毒劳教人员。正常对照组 64 例 (男 37, 女 27, 均为汉族, 平均年龄  $22.8 \pm 3.4$  岁), 来自湖南医科大学 93 精神卫生系和 95 医疗系的自愿者及湖南医科大学精研所的部分医护人员。两组在性别、年龄组成上差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

### 二. 试验方法

1. 人类外周血 gDNA 的提取: 采用酚氯仿法提取外周血基因组 DNA (gDNA)。

2. 多巴胺 D4 受体基因外显子 III VNTR 多态性: 人类多巴胺 D4 受体基因外显子 III 含有 48bp 可变串联重复序列 (VNTR), 其拷贝数从 2 倍到 10 倍不等, 从而形成多巴胺 D4 受体基因外显子 III VNTR 多态性。按 Gelernter 等<sup>[5]</sup>的试验方法, (1)PCR 扩增: 引物为 5'-GCG ACT ACG TGG TCT ACT CG-3' 和 5'-AGG ACC CTC ATG GCC TTG-3'。20ul 反应体系, 含 100ng 模板 DNA, 引物各 0.2uM, dATP、dCTP、dTTP 各 100uM, dGTP 50uM, 7-deaza-dGTP50uM, Tag DNA 聚合酶 1U, 1×Tag Buffer (含  $MgCl_2$  1.5mM)。PCR 反应条件: 95°C 预变性 4min, 94°C 变性 30 秒, 56°C 复性 30 秒, 72°C 延伸 30 秒, 共 35 个循环, 72°C 延伸 4min。(2) 结果观察: PCR 产物在含有 EB 的 3% 琼脂糖凝胶中电泳 (75V, 1hr), 紫外灯下观察结果,

照像。根据 PCR 扩增的 DNA 片段大小判断多巴胺 D4 受体基因的基因型和等位基因型, 当 48bpVNTR 拷贝数分别为 2、3、4、5、6、7、8 拷贝时, 其等位基因分别为 389bp、437bp、485bp、533bp、581bp、629bp、677bp。(图 1)。

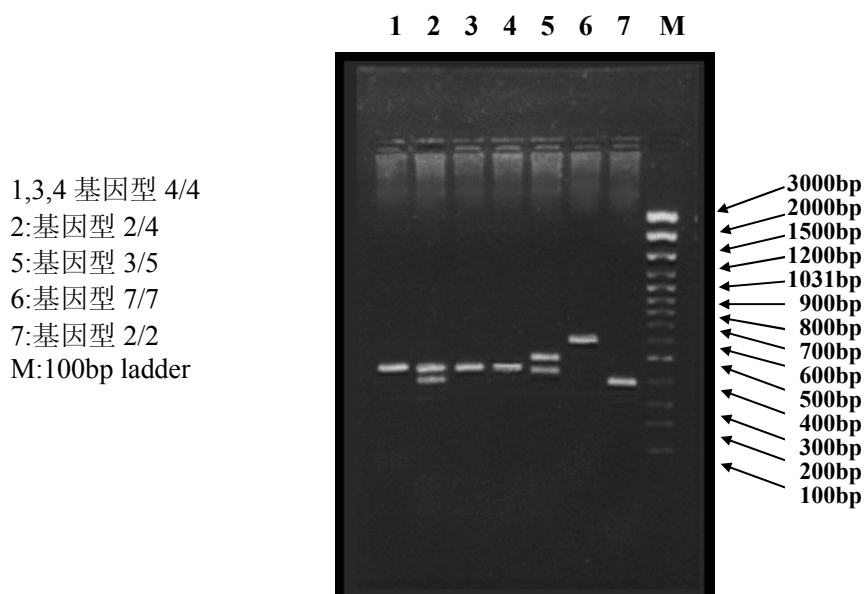


图 1 多巴胺 D4 受体基因 PCR 产物

3. 5-HT<sub>2C</sub> 受体基因 cys23/ser23 多态性检测: 人类 5-HT<sub>2C</sub> 受体基因外显子 II 129 位有碱基 G 或 C 的变化, 从而形成该基因 cys23/ser23 多态性<sup>[6]</sup>。按 Ebstein 等<sup>[4]</sup>的试验方法, 在引物上设计一个 NlaIII 酶切位点。(1)PCR 扩增: 20ul 反应体系, 含 100ng 模板 DNA, dNTP 各 200uM, 1×Tag Buffer(含 MgCl<sub>2</sub> 1.5mM), Tag DNA 聚合酶 1U, 引物各 0.5uM, 引物为 5'-GGC CTA TTG GTT TGG CAA T-3'和 5'-CCG TCT GGG AAT TTG AAG C-3'。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5min, 94°C 变性 30 秒, 58°C 复性 30 秒, 72°C 延伸 30 秒, 共 35 个循环, 72°C 延伸 4min。(2) 酶切反应: 取 10ul PCR 产物, 加 NlaIII 10U, 1×NlaIII buffer, 15ul 反应体积, 37°C 酶切反应 3 小时。(3) 结果观察: 酶切产物在 12%聚丙烯酰胺凝胶中电泳 (100V, 2hr), 0.5%AgNO<sub>3</sub> 染色, 显色后观察结果, 照像。如果 5-HT<sub>2C</sub> 受体基因 129 位为碱基 C, PCR 产物不能被 NlaIII 酶切, 仍为 104bp, 如果 129 位为碱基 G, PCR 产物被 NlaIII 酶切成 16bp 和 88bp 两个片段。如两条等位基因 129 位均为碱基 G 时, 判断该个体的基因型为 cys23/cys23, 如两条等位基因 129 位均为碱基 C 时, 判断该个体的基因型为 ser23/ser23, 如两条等位基因分别为 cys23 和 ser23 时, 判断该个体的基因型为 cys23/ser23 (图 2)。

### 三. 统计分析

所有资料的统计均由 SPSS 8.0 for windows 统计软件包完成。根据 Hardy-weinberg 定律, 比较各基因型的实得数与预期数, 了解各基因型在人群中遗传平衡符合程度 (goodness of fit), 用  $\chi^2$  检验; 比较两组间各基因型及等位基因的频率的差异, 用  $\chi^2$  检验。

## 结 果

### 一. 多巴胺 D4 受体基因 VNTR 多态性分析

1. 多巴胺 D4 受体基因外显子 III VNTR 多态性的 PCR 扩增产物电泳结果见图 1。
2. 两组多巴胺 D4 受体基因型的分布: 见表 1。

表1 海洛因依赖组和正常对照组多巴胺D4受体基因型的比较

基因型	2/2	2/4	3/3	3/5	4/4	4/6	5/5	5/6	5/7	6/6	7/7
海洛因依赖组(102)	0	8	0	4	62	4	16	2	2	4	0
正常对照组(64)	2	8	2	2	38	0	8	0	0	2	2

与对照组比较, 经  $\chi^2$  检验,  $P>0.05$

实验结果发现在本研究人群中多巴胺 D4 受体基因型共有 11 种, 分别为: 2/2、2/4、3/3、3/5、4/4、4/6、5/5、5/6、5/7、6/6、7/7, 其中 4/4 的频率最高 (59.4%)。各基因型在海洛因依赖组和正常对照组中的分布无统计学上差异。

3. 两组多巴胺 D4 受体等位基因型的分布: 见表 2。

结果发现, 多巴胺 D4 受体各等位基因型在海洛因依赖组和正常对照组中的分布无统计学上差异。再按照 Muramata 等<sup>[7]</sup>的方法, 根据多巴胺 D4 受体 VNTR 的拷贝数, 把多巴胺 D4 受体分为长等位基因 (L, 拷贝数 $\geq 5$ ) 和短等位基因 (S, 拷贝数 $< 5$ ), 等位基因 L 在两组中的分布也无统计学上差异。

**表2 海洛因依赖组和正常对照组多巴胺D4受体等位基因型的比较**

等位基因型	2	3	4	5	6	7	L
海洛因依赖组(204)	8	4	136	40	14	2	56
正常对照组(128)	12	6	80	22	4	4	30

与对照组比较, 经  $\chi^2$  检验,  $P > 0.05$

## 二. 5-HT<sub>2C</sub> 受体基因 cys23/ser23 多态性位点 RFLP 分析

试验结果发现绝大多数基因型为 cys23/cys, 仅发现两例突变型 (海洛因依赖者中一例 ser23/ser23 纯合子, 正常对照组中一例 cys23/ser23 杂合子, 见图 2), 5-HT<sub>2C</sub> 受体等位基因 ser23 的频率 (0.9%) 很低, 提示研究样本的 5-HT<sub>2C</sub> 受体基因不存在 cys23/ser23 多态性。

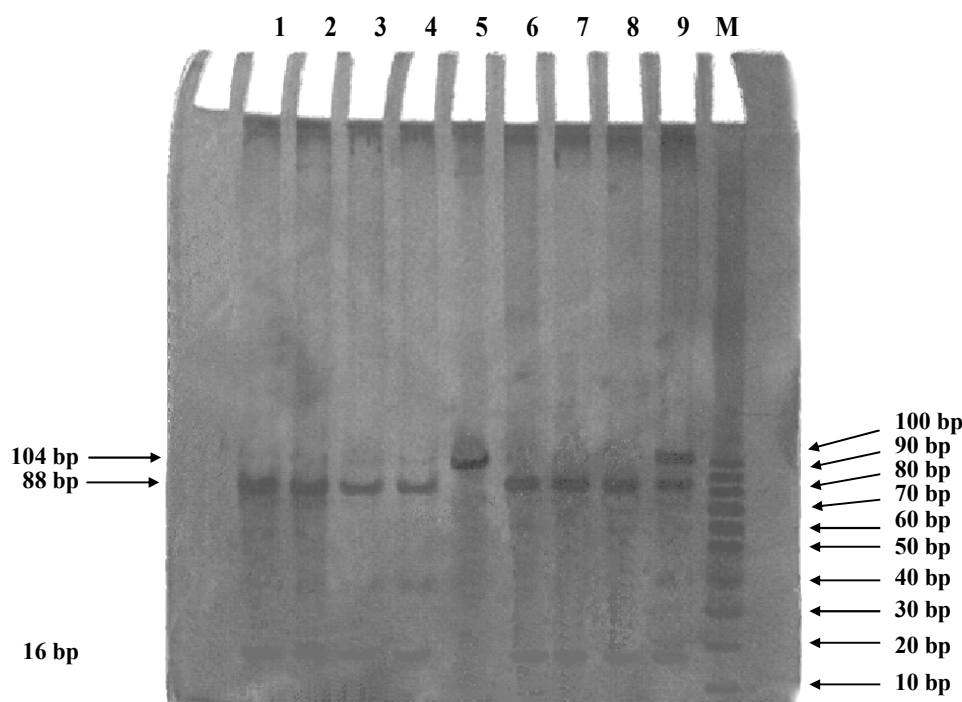


图 2 5-HT<sub>2C</sub> 基因 NlaIII/RFLP 分析

1、2、3、4、6、7、8: 基因型 cys23/cys23

9: 基因型 cys23/ser23 5: 基因型 ser23/ser23 M: 10 bp ladder

## 讨 论

本研究发现多巴胺 D4 受体基因型共有 11 种, 分别为: 2/2、2/4、3/3、3/5、4/4、4/6、5/5、5/6、5/7、6/6、7/7, 基因型 4/4 的频率最高 (59.4%), 这与国外类似的研究结果相似<sup>[4][5][7]</sup>。关联分析结果提示, 多巴胺 D4 受体基因 VNTR 多态性各基因型和等位基因型与海洛因依赖缺乏关联。有研究根据多巴胺 D4 受体 VNTR 的拷贝数, 把多巴胺 D4 受体分为长等位基因 (L, 拷贝数 $\geq 5$ ) 和短等位基因 (S, 拷贝数 $< 5$ ), 结果发现等位基因 L 与海洛因依赖相关联<sup>[7][8]</sup>, 但本研究不支持此结果。可能与样本不纯、种族差异及基因型多而样本量相对较小等有关。有关 5-HT<sub>2C</sub> 受体基因 23cys/23ser 多态性分析结果显示, 基因型 23ser

频率很低(0.9%),明显低于同类研究<sup>[6]</sup>(13%),有研究发现存在种族疾病易感性基因,如日本人 Alzheimer's 病(AD)的危险因子 ApoE 基因等位基因  $\epsilon$  4 的频率较低,日本人 AD 的患病率也较低<sup>[9]</sup>。欧美的研究发现 5-HT<sub>2C</sub> 基因型 23ser 与追求新奇、刺激的人格特征明显相关<sup>[4]</sup>,而中国人倾向于内向、保守,由于人格特征除与遗传因素有关外,还与复杂的社会心理因素及环境因素有关,本研究发现基因型 23ser 的频率很低,是否与东西方人的人格特征的差异有关,有待进一步研究证实,但此研究结果对种族人格特征的易感基因研究提供了某些的启发。

虽然本研究未能证实多巴胺 D<sub>4</sub> 受体基因 VNTR 多态性和 5-HT<sub>2C</sub> 受体基因 cys23/ser23 多态性与海洛因依赖相关联,但这并不能排除多巴胺和 5-HT 受体基因的其他亚型及其它多态性位点与海洛因依赖相关联,如研究者的另外一个研究发现 5-HT<sub>2A</sub> 受体的 1438A/G 和海洛因依赖的易感性有关<sup>[10]</sup>,需进一步扩大样本及进行其它亚型和其它多态性位点的研究以了解海洛因依赖的遗传机制。

### 参考文献

- 1 Tsuang MT, Lyons MJ, Eisen SA, et al. Genetic influences on DSM-III-R drug abuse and dependence: a study of 3372 twin pairs. *Am J Med Genet*, 1996, 67(3): 473.
- 2 Cadoret RJ, Troughton E, O'Gorman TW, et al. An adoption study of genetic and environmental factors in drug abuse. *Arch Gen Psychiatry*, 1986, 43(4): 1131.
- 3 Little KY, Patel UN, Clark TB, et al. Alteration of brain dopamine and serotonin levels in cocaine users: a preliminary report. *Am J Psychiatry*, 1996, 153(9):1216-8.
- 4 Ebstein RP, Segman R, Benjamin J, et al. 5-HT<sub>2C</sub> serotonin receptor gene polymorphism associated with the human personality traits of reward dependence: interaction with dopamine D<sub>4</sub> receptors and dopamine D<sub>3</sub> receptor polymorphisms. *Am J Med Genet*, 1997, 74(1): 65.
- 5 Gelernter J, Kranzler H, Coccaro E, et al. D<sub>4</sub> dopamine-receptor (DRD4) alleles and novelty seeking in substance-dependent, personality-disorder, and control subjects. *Am J Hum Genet*, 1997, 61(5): 1144-52.
- 6 Jaakko L, Li L, Michael D, et al. Identification, expression, and pharmacology of a cys23/ser23 substitution in the human 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene(HTR2C). *Genomics*, 1995, 27: 274-279.
- 7 Muramatsu T, Higuchi S, Murayama M, et al. Association between alcoholism and the dopamine D<sub>4</sub> receptor gene. *J Med Genet*, 1996, 33:113-115.
- 8 Li T, Xu K, Deng H, et al. Association analysis of the dopamine D<sub>4</sub> gene exon III VNTR and heroin abuse in Chinese subjects. *Mol Psychiatry*, 1997, 2: 413-416.
- 9 Kawamata J, Tanaka S, Shimohama S, et al. Apolipoprotein E polymorphism in Japanese with Alzheimer's disease or vascular dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1994, 57: 1414-1416.
- 10 赵敏, 杨德森, 郝伟等. 5-HT<sub>2A</sub> 受体基因 1438A/G 多态性与海洛因依赖的关系. *中国药物依赖性杂志*, 2000, 9(4):283-284.