

# Pathway Analysis Suggest the Calcium Signaling Pathway Associated with Alcohol Dependence

Yanfang Guo

Institute of Bioinformatics, School of Basic Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou  
Email: [guoyf@smu.edu.cn](mailto:guoyf@smu.edu.cn)

Received: Jan. 4<sup>th</sup>, 2014; revised: Jan. 18<sup>th</sup>, 2014; accepted: Jan. 23<sup>rd</sup>, 2014

Copyright © 2014 Yanfang Guo. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Yanfang Guo. All Copyright © 2014 are guarded by law and by Hans as a guardian.

**Abstract: Background:** Alcohol dependence (AD) is a serious and common public health problem. A large number of association studies were conducted to identify susceptibility genes of AD, but efforts to generate an integrate view of accumulative genetic variants and pathways under alcohol drinking are lacking. **Methods:** We applied enrichment gene set analysis to existing genetic association results to identify pertinent pathways to alcohol dependence in this study. A total of 1438 SNPs ( $P < 1.0 \times 10^{-3}$ ) associated to alcohol drinking related-traits have been collected from 31 studies. **Results:** The calcium signaling pathway (hsa04020) showed the most significant enrichment of associations (21 genes) to alcohol consumption phenotypes ( $P = 5.4 \times 10^{-5}$ ), achieving bonferroni  $P$  value of  $0.8 \times 10^{-3}$  and FDR value of  $0.6 \times 10^{-2}$ , respectively. Interestingly, the calcium signaling pathway was previously found to be essential to regulate brain function. Genes in this pathway link to a depressive effect of alcohol consumption on the body. **Conclusions:** Our findings, together with previous biological evidence suggest the importance of gene polymorphisms of calcium signaling pathway to alcohol dependence susceptibility.

**Keywords:** Genome-Wide Association Study; Pathway Analysis; Alcohol Dependence

## 通路分析提示钙信号转导通路与酒精依赖关联

郭艳芳

南方医科大学基础医学院, 广州  
Email: [guoyf@smu.edu.cn](mailto:guoyf@smu.edu.cn)

收稿日期: 2014年1月4日; 修回日期: 2014年1月18日; 录用日期: 2014年1月23日

**摘要: 背景:** 酒精依赖是一种严重而常见的复杂疾病, 大量关联研究常致力寻找其易感基因, 目前对已发现的遗传变异还缺乏整体的分析和认识。 **方法:** 采用基因富集通路分析法对来自31项饮酒相关研究的1438个单核苷酸多态性进行分析。 **结果:** 钙信号传导通路(hsa04020) ( $P = 5.4 \times 10^{-5}$ )显示出最显著的关联富集, 经多重检验校正后仍显著(bonferroni  $P = 0.8 \times 10^{-3}$ ,  $FDR = 0.6 \times 10^{-2}$ )。有研究证实钙信号转导通路在脑功能调节中必不可少, 该通路中的基因与酒精对身体的抑郁作用有关。 **结论:** 钙信号转导通路可能对酒精依赖具有重要影响。

**关键词:** 全基因组关联研究; 通路分析; 酒精依赖

### 1. 引言

酒精依赖是一种常见严重影响公众健康的疾病,

以心理和生理依赖为主要特点, 具有显著的酒精成瘾行为<sup>[1]</sup>, 遗传率较高(40%~60%)<sup>[2]</sup>, 其致病基因的鉴定

研究有助于提高人们对酒精依赖遗传机制的了解。

候选基因和全基因组关联研究常被用来鉴定与复杂疾病关联的基因。与酒精依赖相关的研究已积累了超过 20 年,发现的这些基因主要参与酒精的分解代谢,然而,已鉴定的基因仅能解释遗传变异不足 5%,绝大部分的遗传基因仍未知。对大量关联研究的结果观察发现,尽管不同饮酒关联研究鉴定的基因不重复,但可能位于同一生物学通路或者是功能相关。比如,ADH1B 基因和 ADH2 基因分别在 McKay's<sup>[3]</sup>和 Takeuchi's<sup>[4]</sup>的研究中报道与饮酒相关,如果仅关注这两个单独的基因,它们可能并不被认为相关,但如果从生物学意义上来说,这两个基因都位于酒精代谢 ADH 和 ADLH 的通路中,在这个通路中提高 ADH 活性或降低 ALDH 活性的突变都可能导致乙醇浓度的增加<sup>[5]</sup>。我们认为如果一条通路中富集了与特定疾病相关的基因,相关通路可能在该疾病的发病机制中起重要作用。通路分析法可挖掘 GWAS 数据检测疾病关联基因,该方法可补充常规单标记分析的结果,检测通路中多个基因是否同时与疾病表型相关<sup>[6]</sup>。最新的综述总结了目前已发表的与饮酒相关的基因,包括来自 GWAS 和候选基因研究,却缺乏对这些基因的相关关系以及整体的分析。本研究汇集目前已发表的关联研究结果进行通路富集分析,旨在发现与酒精依赖等性状相关的生物学通路。

## 2. 方法

### 2.1. 数据的整理与收集

与饮酒可能相关的遗传标记从已发表的 GWAS 和候选基因关联研究结果收集而来,表型性状包括酒精依赖,酒精戒断症状,酒精中毒(基于酒精依赖因子得分,或酒精使用障碍因子得分,或饮用的重量)以及饮酒行为。本研究的数据主要来自 GWASdb 数据库(更新于 2013 年 10 月 4 日)<sup>[7]</sup>,该数据库中收集的至今已发表的与人类表型可能关联的 SNP ( $P < 10^{-4}$ ),不仅囊括了一般数据库的 GWAS 数据,还包含候选基因的数据,但不包含结构突变数据,比如拷贝数变异。作为补充,我们还进行了 PubMed 搜索来获得最新发表的未及时入库到 GWASdb 的数据,以及有关饮酒的拷贝数变异数据。

### 2.2. 基因富集分析法

使用 SNPnexus 将收集到的 SNP 注释到相应的基

因(Hg19)<sup>[8]</sup>。SNPnexus 是一个进行在线 SNP 功能注释的 Web 数据库,提供 SNP 功能的全面注释,分为内含子、5'端非编码区、3'端非编码区、5'端上游、3'端下游、剪接位点或编码(同义和非同义)7 类。内含子 SNP 注释了与剪切位点的距离。编码 SNP 注释了其在 cDNA 中的坐标、编码序列、氨基酸以及所产生的多肽的改变。5'端上游和 3'端下游是指距 UTR 20kb 范围内基因组。

使用生物信息学工具 DAVID (version 6.7)分析参与基因编码的基因的功能富集<sup>[9]</sup>,参数设置如下:similarity term overlap = 10, similarity threshold = 0.50, initial group membership = 5, final group membership = 3, multiple linkage threshold = 0.50 and EASE = 0.01。DAVID 软件包含一组集成的生物学知识信息和工具,对大型的基因或蛋白集进行超几何分布或 Fish 检验,旨在系统地提取具有生物学意义且高度富集的生物学通路。

## 3. 结果

### 3.1. 数据的收集和整理

共计收集到 1438 个可能与饮酒相关表型关联的 SNP ( $P < 1.0 \times 10^{-4}$ ),分别来自 31 项不同的研究,其中候选基因关联研究 10 项, GWAS 19 项,拷贝数变异研究 2 项。图 1A 总结了与不同饮酒相关表型可能关联的 SNP 数目,其中高达 67%的 SNP 与酒精依赖相关。841 个 SNP 被注释到 636 个编码基因将用于后续的分析。图 1B 展示了 SNP 功能分类的分布情况,58%的 SNP 位于内含子区域。图 2 展示了收集到的 SNP 的 P 值情况,在  $3.6 \times 10^{-211}$  至  $9.97 \times 10^{-4}$  范围之内。

### 3.2. 基因富集分析

在所有的 KEGG 通路中,钙信号转导通路(hsa04020)显著富集与饮酒关联的基因( $P = 5.4 \times 10^{-5}$ ) (表 1)。经多重检验校正后,仅有钙信号转导通路仍然显著, bonferroni 和 FDR 值分别为 0.008 和 0.06。

钙信号转导通路包含 176 个基因,富集了 21 个与饮酒表型关联的基因(图 3)。表 2 列出了钙信号转导通路中每个基因 SNP 与饮酒关联的 P 值,其中最显著的三个位点来自基因 *HRH1* (*rs433303*,  $P = 1.72 \times 10^{-6}$ ),

*GRM5* (*rs6483362*,  $P = 4.53 \times 10^{-6}$ ), and *PLCG2* (*rs4312298*,  $P = 1.72 \times 10^{-6}$ ).

使用 FASTSNP 软件(<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>)分析了钙信号转导通路中与饮酒关联的 SNP 位点的潜

在功能<sup>[10]</sup>。潜在功能可推测的 SNP 位点包括 *rs9927767*, *rs1042717*, *rs1042718* 和 *rs17799872*。SNP *rs9927767* 位于基因 *ADCY9*, 此位点等位基因 T 替换为 A 的改变将减少转录因子 CP2 的结合位点。SNP *rs1042717* 和

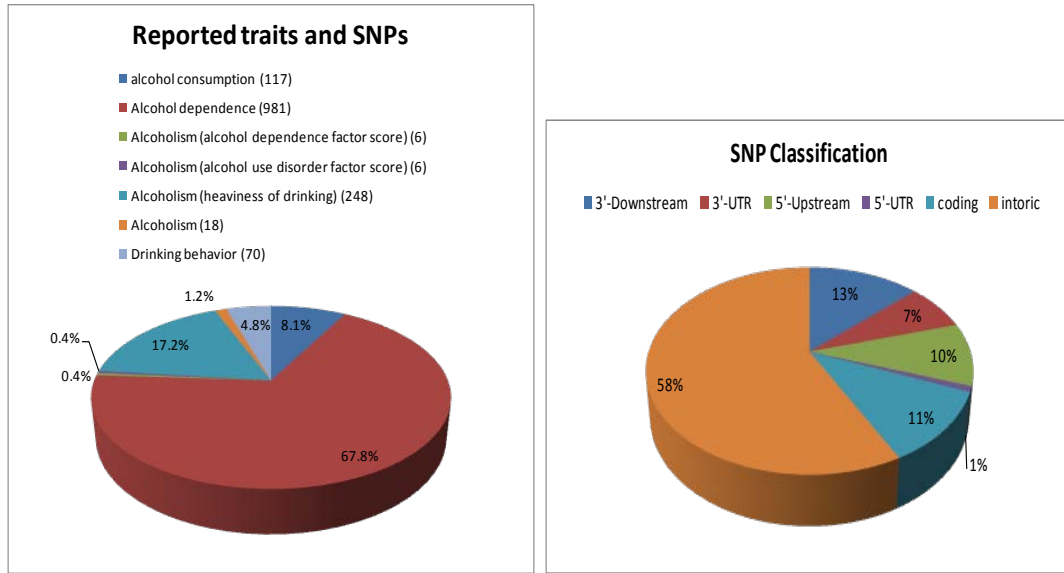


Figure 1. Reported traits and functional category of collected SNPs

图 1. 收集的 SNP 相关的表型和功能分类

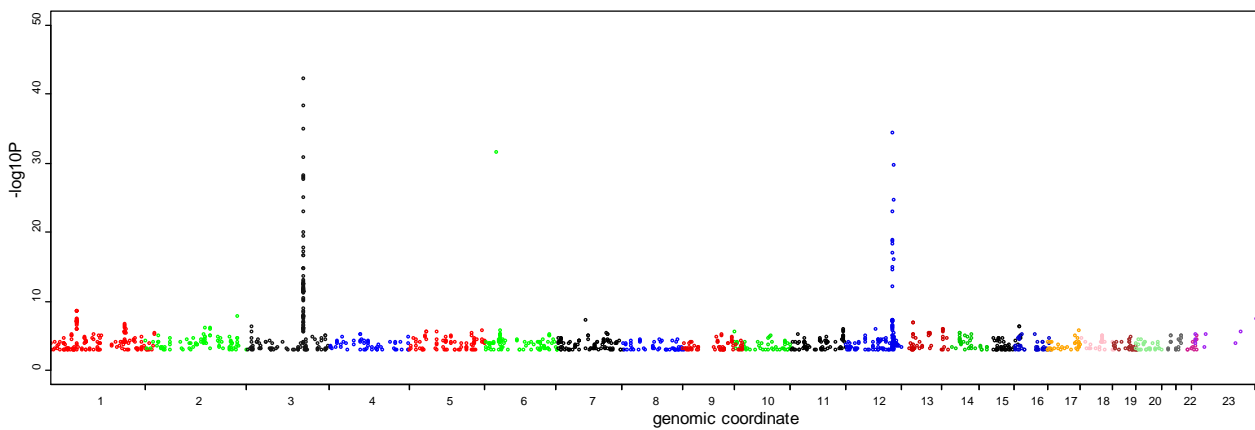


Figure 2. Genomic distribution of P values of collected SNPs potentially associated to alcohol-related traits

图 2. 饮酒相关表型关联的 SNP 位点的基因组分布和 P 值

Table 1. Top enriched pathways for alcohol related-traits at  $p$  values  $\leq 0.01$

表 1. 显著富集与饮酒表型相关基因的通路  $p \leq 0.01$

KEGG_Pathway term	Count	%	$P$ value	Fold Enrichment	Bonferroni	FDR
hsa04020:Calcium signaling pathway	19	3.15	5.48E-05	2.97	0.007	0.06
hsa04540:Gap junction	10	1.65	4.57E-03	3.09	0.47	5.27
hsa04510:Focal adhesion	16	2.65	5.78E-03	2.19	0.56	6.62
hsa04720:Long-term potentiation	8	1.32	1.08E-02	3.23	0.79	12.13

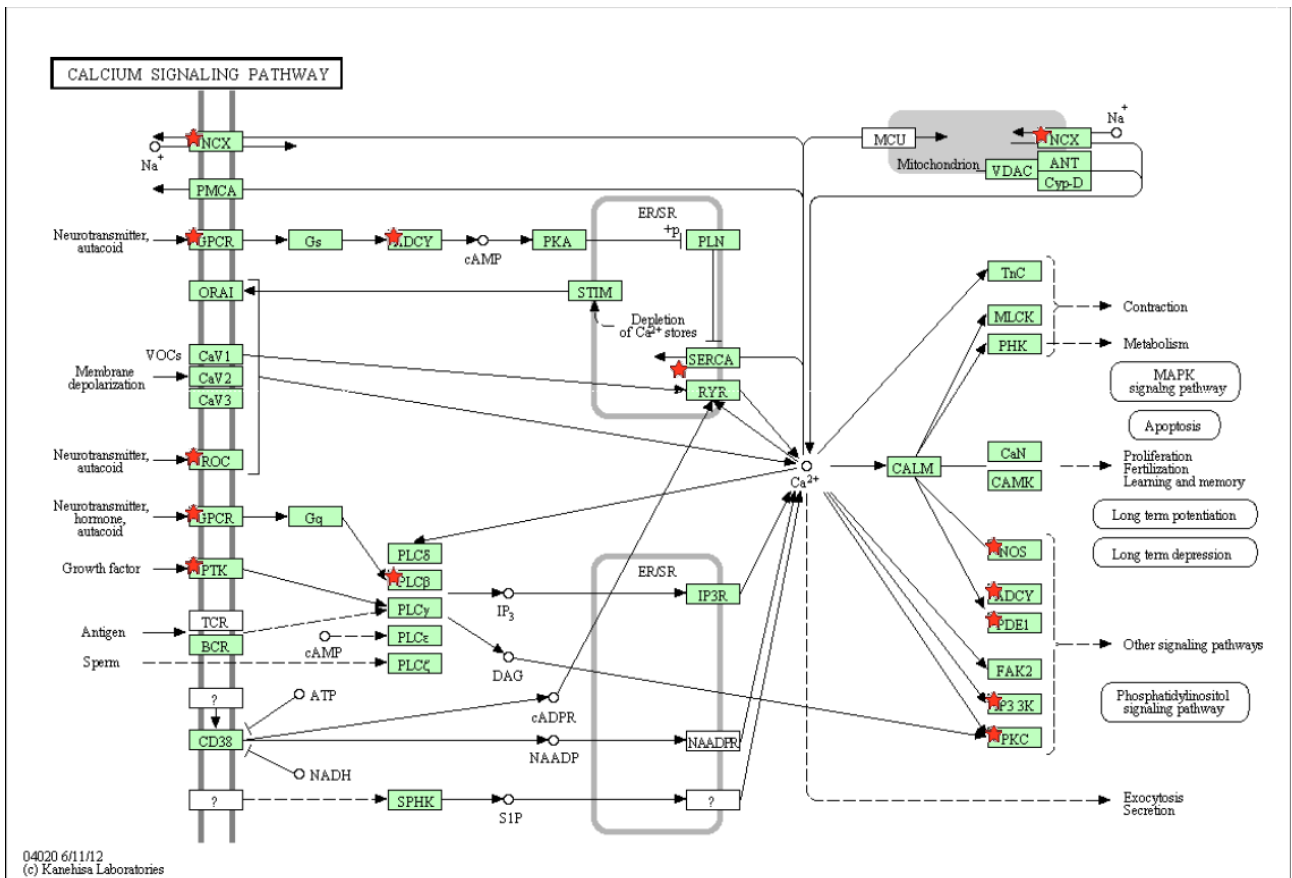


Figure 3. Functional interactions among the genes in the calcium signaling pathway  
图 3. 钙信号转导通路中的基因组互作。星形表示富集在此通路中与饮酒表型关联的 21 个基因

SNP *rs1042718* 都是同义的，位于 *ADRB2* 基因，*rs1042718* 位点等位基因 T 替换为 C 的改变将减少 *SF2/ASF* 和 *Srp40* 的外显子剪切增强子片段。此外，一些 SNP 位点位于基因 3'端非编码区区域，包括 *GRIN2C* 基因的 *rs9901283*，*GRIN2C* 基因的 *rs9901283*，*ITPKB* 基因的 *rs1050492* 和 *PLCG2* 基因的 *rs2206266*，这些 SNP 可能参与基因转录调节。

#### 4. 讨论

GWAS 研究已成为鉴定人类复杂疾病(如酒精依赖)基因的强大工具，但 GWAS 主要集中于最显著的边际效应，并不考虑检测的基因的潜在功能和相互作用，有研究关注基因的潜在功能仅限于个别的 GWAS 研究的候选基因集。本研究通过对现有的 GWAS 研究结果进行通路分析，首次提示钙信号转导通路中的基因对酒精依赖可能有重要的作用。重要的是，在过去的研究中，钙信号转导通路中的基因并没有一个达到全基因组显著水平( $P < 10^{-8}$ )，因此，钙信号转导通路

的重要作用直到基因富集分析研究中才被发现。

人类复杂疾病/性状的遗传研究中通路为基础的方法越来越受到重视，因为它可以提供一组相关基因中的多个突变线索，这些基因共同构成了生物通路或模块<sup>[3]</sup>。许多研究都采用通路为基础的方法，作为单标记关联测试的补充，挖掘常见人类疾病的 GWAS 数据集，如肥胖、骨质疏松症、癌症等。通路为基础的策略也被用在与酒精依赖易感基因的四项研究中。Joslyn 等人在 2010 年对包含 367 个家族史饮酒反应阳性个体的 GWAS 数据集进行了基因组富集分析<sup>[11]</sup>，与此同时，以前的动物研究和候选基因研究都支持神经信号功能基因的富集与酒精反应相关<sup>[12]</sup>。2011 年，两项研究分别对 48 个基因进行了基因富集分析<sup>[13]</sup>，Kendle 研究团队发现饮酒量与参与细胞粘附的通路基因富集相关，Reimers 研究团队却发现酒精依赖相关的基因富集在氨基酸变异和丁酸信令应激反应通路中<sup>[14]</sup>。2012 年，Biernacka 等人对 1165 名酒精依赖病例和 1379 名对照的 GWAS 数据进行基因富集分析



**Table 2. Lists of the 21 enriched genes in Calcium signaling pathway**  
**表 2. 钙信号转导通路中富集的 21 个与饮酒可能相关的基因**

Gene	SNP	P value	SNP Region	Reported traits*
ADCY3	rs17799872	2.10E-03	3'UTR	†
ADCY9	rs10775349	6.13E-04	Intronic	†
	rs9927767	8.42E-04	Promoter	†
ADRB2	rs1042717	5.59E-05	Coding	‡
	rs1042718	5.71E-05	Coding	‡
CHRM5	rs8030094	2.00E-04	Intronic	##
EGFR	rs2877260	4.70E-05	Intronic	#
ERBB4	rs11885579	9.38E-04	Intronic	†
	rs13421680	4.42E-04	Intronic	†
GRIN2A	rs7206714	1.69E-05	Intronic	†
GRIN2C	rs9901283	9.43E-05	3'UTR	†
	rs11652088	7.08E-05	Intronic	†
GRIN2D	rs34997741	4.46E-04	Intronic	†
GRM5	rs1391875	6.03E-04	Intronic	†
	rs6483362	4.53E-06	Intronic	†
	rs443137	1.80E-05	Intronic	†
HRH1	rs433303	1.72E-06	Intronic	†
	rs9822871	6.31E-05	Intronic	†
HTR7	rs11186320	7.92E-04	Intronic	†
ITPKB	rs1050492	8.29E-04	3'UTR	†
NOS1	rs2293050	8.70E-05	Intronic	#
PDE1C	rs13223209	8.59E-04	Intronic	†
PLCB1	rs2206266	7.10E-04	3'UTR	†
PLCG2	rs4312298	7.00E-06	Intronic	†
PRKCB	rs2238493	9.29E-04	Intronic	†
RYR3	rs4144333	1.96E-05	Intronic	†
	rs17236010	9.61E-04	Intronic	†
SLC8A1	rs9789765	4.58E-04	Intronic	†
SLC8A3	rs4902778	2.91E-04	Intronic	†

\*Note: †alcohol dependence, ‡alcohol withdrawal symptoms, #Alcoholism (heaviness of drinking), ##alcohol consumption.

揭示“酮体的合成和降解”通路以及“神经活性配体-受体相互作用”通路<sup>[15]</sup>。

然而，后续独立样本的研究并不能很好的重复之前的有关酒精依赖通路分析中的结果，这可能多方面的原因造成，最重要的两个方面的原因是单个 GWAS 研究的样本量有限，或者不同研究分析的候选基因不同。在本研究中，我们并不涉及任一 GWAS 研究或具体的候选基因集，而是系统地分析了目前所有发表的与饮酒相关的 GWAS 研究和候选基因研究的结果在 KEGG 数据库中所有约 200 条通路中富集情况。值得注意的是，本研究发现显著富集的钙信号转导通路，此前尚未被发现该通路与饮酒相关，并具有较大的遗传效应。由此，知识驱动型通路分析，探讨了由以往

关联分析发现积累的基因集，可能是一种新的分析 GWAS 研究结果的方法，有助于揭示相互作用的通路对人类重大复杂疾病的重要性。

钙离子 Ca<sup>(2+)</sup>是调节细胞内很多生物调节过程中的第二信使(例如收缩,分泌,突触传递,核孔调节,转录等)。在心肌细胞及肌肉细胞中,钙离子(2+)浓度的放松过程中收缩,低层次在高级别之间交替。钙是参与神经递质的关键化学物质,神经系统内细胞间信号释放的关键化学物质。过量或不足的钙都可能引发各种疾病,包括抑郁症。钙信号转导通路的网络复杂而精密,它参与神经元的活性和免疫系统<sup>[16]</sup>。该通路的基因调节脑功能,尤其是在海马,应对压力事件,它与焦虑和抑郁以及抗抑郁药<sup>[17]</sup>的药效相关。

钙信号转导通路的遗传变异与抑郁症关联是由最近的一项 GWAS 通路富集分析报道的,该研究包括 1673 例重性抑郁症患者和 1721 例对照样本<sup>[18]</sup>。虽然钙信号转导通路和酒精依赖之间的联系仍有待阐明,以往的研究已证实饮酒对身体具有抑郁效果。据 [TeensHealth.org](http://TeensHealth.org) 报道,酒精会降低中枢神经系统的兴奋度,降低一个人的大脑接收信息的速度,从而导致协调性受损,视力、听力和情绪和感官的变化。由酒精引起这些变化可能引发或加剧抑郁的状态。所有这些证据表明,钙信号转导通路与酒精依赖的相关不太可能是由于随机因素造成。钙信号转导通路在酒精依赖发病中的生物学机制有待进一步的功能研究。

总之,本研究首次发现钙信号转导通路生物学功可能参与酒精依赖的分子机制,为进一步研究钙信号转导通路在酒精依赖中的功能研究提供统计学依据,从而有助于防治酒精依赖新方法的开发。

## 项目基金

高等学校博士学科点专项科研基金 No. 20124433 120006; 广东省优秀青年人才培养项目 No. LYM11040; 南方医科大学“科研启动计划”基础研究前期启动项目 No. B1012075。

## 参考文献 (References)

- [1] Rietschel, M. and Treutlein, J. (2012) The genetics of alcohol dependence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **8**, 151-157.
- [2] Kimura, M. and Higuchi, S. (2011) Genetics of alcohol depen-

- dence. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, **65**, 213-225.
- [3] McKay, J.D., Truong, T., Gaborieau, V. et al. (2011) A genome-wide association study of upper aerodigestive tract cancers conducted within the INHANCE consortium. *PLOS Genetics*, **7**, e1001333.
- [4] Takeuchi, F., Isono, M., Nabika, T., et al. (2011) Confirmation of ALDH2 as a Major locus of drinking behavior and of its variants regulating multiple metabolic phenotypes in a Japanese population. *Circulation Journal*, **75**, 911-918.
- [5] Zakhari, S. (2006) Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research & Health*, **29**, 245-254.
- [6] Wang, K., Li, M. and Hakonarson, H. (2010) Analysing biological pathways in genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, **11**, 843-854.
- [7] Li, M.J., Wang, P., Liu, X., et al. (2012) GWASdb: A database for human genetic variants identified by genome-wide association studies. *Nucleic Acids Research*, **40**, D1047-D1054.
- [8] Dayem, U.A.Z., Lemoine, N.R., Chelala, C. (2012) SNPnexus: A web server for functional annotation of novel and publicly known genetic variants (2012 update). *Nucleic Acids Research*, **40**, W65-W70.
- [9] Huang da, W., Sherman, B.T. and Lempicki, R.A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, **4**, 44-57.
- [10] Yuan, H.Y., Chiou, J.J., Tseng, W.H., et al. (2006) FASTSNP: An always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Research*, **34**, W635-W641.
- [11] Joslyn, G., Ravindranathan, A., Brush, G., et al. (2010) Human variation in alcohol response is influenced by variation in neuronal signaling genes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **34**, 800-812.
- [12] Uhl, G.R., Drgon, T., Johnson, C., et al. (2008) Higher order addiction molecular genetics: convergent data from genome-wide association in humans and mice. *Biochemical Pharmacology*, **75**, 98-111.
- [13] Kendler, K.S., Kalsi, G., Holmans, P.A., et al. (2011) Genome wide association analysis of symptoms of alcohol dependence in the molecular genetics of schizophrenia (MGS2) control sample. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **35**, 963-975.
- [14] Reimers, M.A., Riley, B.P., Kalsi, G., et al. (2012) Pathway based analysis of genotypes in relation to alcohol dependence. *The Pharmacogenomics Journal*, **12**, 342-348.
- [15] Biernacka, J.M., Geske, J., Jenkins, G.D., et al. (2013) Genome-wide gene-set analysis for identification of pathways associated with alcohol dependence. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, **16**, 271-278.
- [16] Dodd, J.R., Birch, N.P., Waldvogel, H.J., et al. (2010) Functional and immunocytochemical characterization of the creatine transporter in rat hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, **115**, 684-693.
- [17] Popoli, M., Gennarelli, M. and Racagni, G. (2002) Modulation of synaptic plasticity by stress and antidepressants. *Bipolar Disorders*, **4**, 166-182.
- [18] Kao, C.F., Jia, P., Zhao, Z., et al. (2012) Enriched pathways for major depressive disorder identified from a genome-wide association study. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, **15**, 1401-1411.