

Association of CCKAR Gene Polymorphism with Gallstone Disease

Saman Milanizadeh, Amirhooshang Mohamadalizadeh, Pedram Azimzadeh, Sara Romani, Mahsa Khanyaghma, Seyed Reza Mohebbi*, Mohammadreza Zali, Mohammad Roshani

Gastroenterology and Liver Disease Research Center, Sahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

Received: 30 May, 2012 Accepted: 4 Sep, 2012

Abstract

Backgrounds and Objectives: Bile stagnation leads to cholesterol concentrates and Crystal formation that are gall stone precursors. Cholecystokinin kinase hormone receptor (CCKAR) role in contraction and depletion of gall bladder. Polymorphisms of this receptor could have some role in gall bladder stone formation.

Materials and Methods: Study on 116 gallstone cases and 118 healthy controls were performed. For molecular analysis, amplification of polymorphism containing sequence was obtained by polymerase chain reaction and then genotyping were carried out by restriction fragment length polymorphism. Finally statistical analysis had carried out for detection of association.

Results: With case-control study we recognize that C/T genotype in rs1800857 polymorphism increases gall stone risk more than 3 times ($P=0/035$; $OR=2/954$; $CI95\%= 1/072-8/14$).

Conclusion: This analysis confirms previous studies on rs1800857 polymorphism susceptibility to gall stone only in female and clarify the importance of this region to make a disease prediction.

Keywords: Gall stone, Cholecystokinin kinase receptor, Polymorphism

*Corresponding author:

E-mail: srmohebbi@gmail.com

مقاله پژوهشی

ارتباط پلی مورفیسم ژن CCKAR و احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا

سامان میلانی زاده: مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 امیر هوشنگ محمد علیزاده: مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 پدram عظیم زاده: مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 سارا رومانی: مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 محمد روشنی: مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 مهسا خوان یغما: مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 محمد رضا زالی: مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 سید رضا محبی: مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، نویسنده رابط:

E-mail: srmohebbi@gmail.com

دریافت: ۹۱/۳/۱۰ پذیرش: ۹۱/۶/۱۴

چکیده

زمینه و اهداف: در صورت ثابت ماندن طولانی صفرا در کیسه صفرا کلسترول موجود در آن اجازه پیدا می کند تا تجمع یافته و تشکیل کریستال هایی را بدهد که مبنای سنگ کیسه صفرا می باشد. از ژن های مهم دخیل در این بیماری گیرنده هورمون کوله سیستوکینین کیناز می باشد که نقش اصلی را در انقباض و تخلیه صفرا بازی می کند. عواملی که باعث تغییر این گیرنده می شوند از جمله پلی مورفیسم ها می توانند در عملکرد آن مؤثر باشند.

مواد و روش ها: مطالعه بر روی ۱۱۶ بیمار مبتلا به سنگ کیسه صفرا و ۱۱۸ فرد سالم انجام شد. برای بررسی مولکولی از تکثیر قطعه مورد نظر حاوی پلی مورفیسم به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرازی و سپس شناسایی ژنوتایپ افراد به وسیله آنزیم محدود کننده استفاده شد. نهایتاً بررسی آماری برای تایید ارتباط پلی مورفیسم با ابتلا به سنگ کیسه صفرا انجام شد.

یافته ها: با بررسی مورد- شاهدهی بر روی 1800867 و تاثیر گزاری آن در احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا در این مطالعه مشخص شد که ژنوتیپ C/T در این پلی مورفیسم نزدیک به سه برابر احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا را در بانوان افزایش می دهد (P=0/025; OR=2/954; CI=1/072-1/072). (۸/۱۴)

نتیجه گیری: این مطالعه یافته های پیشین را در مورد تاثیر پلی مورفیسم 1800867 در احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا تنها در گروه مؤنث تایید می کند و بیانگر اهمیت این ناحیه در رسیدن به یک پیش بینی برای ابتلا به بیماری می باشد.

کلید واژه ها: سنگ کیسه صفرا، گیرنده کوله سیستوکینین کیناز، پلی مورفیسم

مقدمه

چربی نیز به اسیدهای صفراوی موجود در صفرا بستگی دارد. در بسیاری از موارد سنگ های کیسه صفرا بدون علامت و فاقد درد می باشند که در این صورت به اقدامات درمانی احتیاجی نیست اما به طور معمول دو دسته علائم در این بیماران بوجود می آید: علائم مربوط به بیماری خود کیسه صفرا و علائم ناشی از انسداد مجاری صفراوی به وسیله سنگ. از جمله این علائم می توان به موارد زیر اشاره کرد: درد، یرقان، تغییر رنگ ادرار و مدفوع. مرحله اولیه در ایجاد سنگ کیسه صفرا اشباع بیش از اندازه صفرا با کلسترول می باشد (۳). کم تحرکی کیسه صفرا به دلیل پیام رسانی نامناسب موجب ساکن ماندن صفرا می شود این امر زمان کافی را

کیسه صفرا، کیسه ای کوچک در مجاورت کبد بوده که بخشی از دستگاه گوارش محسوب می شود و صفرا در آن ذخیره می-گردد. کیسه صفرا زمانی که به هر دلیلی ملتهب و دردناک شود برداشته می شود. سنگ کیسه صفرا شایعترین دلیل التهاب آن می باشد. سنگ کیسه صفرا جزو بیماری های معمول درگیر کننده سیستم گوارش بوده و در سرتاسر جهان شیوع دارد (۱). عوامل ژنتیکی و محیطی فراوانی در ابتلا به این بیماری دخیل می باشند. سنگ های کلسترولی که حاوی حداقل ۵۰ درصد کلسترول می باشند ۹۰ درصد سنگ های کیسه صفرا در جوامع غربی را تشکیل می دهند (۲). کلسترول در آب نامحلول است و حلالیت آن در

شرکت Sigma بودند. تکثیر واکنش زنجیره ای پلیمرازی از یک قطعه ۲۲۱ نوکلئوتیدی انجام شد. شرایط واکنش زنجیره ای در جدول ۱ قابل مشاهده می باشد. برای تایید انجام واکنش PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شد و الکتروفورز انجام شد سپس توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد تا قابل مشاهده باشد.

جدول ۱: برنامه زمانی و دمایی واکنش زنجیره ای پلیمرازی

زمان	دما (°C)
۵ دقیقه	۹۵
۴۵ ثانیه	۹۵
۹۰ ثانیه	۷۲
۱۰ دقیقه	۷۲

تکرار ۴۰ چرخه

محصول تکثیر شده واکنش زنجیره ای پلیمرازی برای انجام RFLP مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم به کار رفته در این واکنش PstI و محصول شرکت New England Biolabs می باشد. محصول واکنش زنجیره ای پلیمرازی پس از برش خوردن و تولید قطعات برای مشخص کردن ژنوتایپ و میزان هتروزیگوسیتی بر روی ژل آگارز ۳٪ الکتروفورز شده و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید تشخیص الگوی بانندی را میسر کرد. داده ها به وسیله نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد. سطح معنی دار آماری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. در آنالیز نتایج و در آنالیز توصیفی از فراوانی و درصد فراوانی و نیز شاخص مرکزی میانگین و در آنالیز تحلیلی از تست مربع کای استفاده شده است.

یافته‌ها

در بین افراد مورد مطالعه ۵۲٪ مرد و ۴۸٪ زن بودند که در بین آن‌ها ۲۹٫۳٪ افراد سیگاری و ۷۰٫۷٪ افرادی بودند که مصرف دخانیات نداشتند. میانگین سنی جمعیت مورد مطالعه ۵۰/۵ سال بود. خصوصیات جمعیت مورد مطالعه برای گروه های بیمار و کنترل به صورت مجزا در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: خصوصیات جمعیت مورد مطالعه

P value	کنترل (تعداد=۱۱۸)	بیمار (تعداد=۱۱۶)	خصوصیات جمعیت مطالعه
۰/۱۷۸	۵۸ (۲/۴۹)	۶۵ (۵۶) **	مرد
	۶۰ (۵۰/۸)	۵۱ (۴۴)	زن
>۰/۰۰۱	±۱/۵	۵۸±۱/۶	سن *
۰/۱۱۶	۲۴ (۲۵/۳)	۴۱ (۲۹/۳)	سیگاری
	۷۱ (۷۴/۷)	۷۵ (۷۰/۷)	مصرف سیگار غیر سیگاری

*سن بر اساس میانگین جمعیت،
** (درصد) تعداد

تعیین ژنوتایپ که به وسیله الگوی برش آنزیمی انجام شده در شکل ۱ قابل شناسایی می باشد. طول قطعه PCR شده ۲۲۱ نوکلئوتید بوده که در صورت تاثیرگذاری آنزیم واکنش RFLP دو قطعه ۱۳۵ نوکلئوتیدی و ۸۶ نوکلئوتیدی حاصل شد. افرادی که در rs1۸۰۰۸۶۷ ایترونی CCKAR هموزیگوت C/C می باشند فقط دارای قطعه ۲۲۱ نوکلئوتیدی بوده و افرادی که به صورت هموزیگوت T/T بوده اند دارای دو قطعه ۱۳۵ نوکلئوتیدی و ۸۶

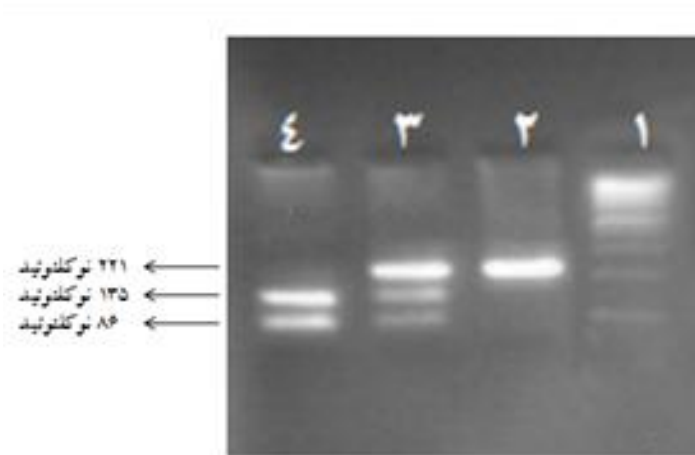
به کلسترول موجود در صفرا می دهد تا به ذرات کوچک تجمع یافته و کریستاله شود و مبنای سنگ های کیسه صفرا را تشکیل دهد (۴). هورمون کوله سیستوکینین پیغام بر اصلی برای عملکرد انقباضی کیسه صفرا می باشد و گیرنده کوله سیستوکینین A جزو گیرنده های جفت شونده با G پروتئین دارای هفت ماریچ عرض غشایی می باشد که به هورمون های کوله سیستوکینینی غیر سولفات ه پاسخ می دهد (۵-۶). این گیرنده یکی از میانجی های اصلی در انقباض کیسه صفرا می باشد. در نتیجه عملکرد صحیح این گیرنده برای تخلیه به موقع صفرا و هضم چربی ها ضروری می باشد (۷). تخلیه ناقص کیسه صفرا در بیماران دارای سنگ کیسه صفرا کلسترولی به علت نقص در گیرنده CCK-A گزارش شده است (۸). از آنجایی که عملکردهای فیزیولوژیکی مهمی به وسیله گیرنده های CCK-A انجام می گیرد می تواند در ایجاد سنگ کیسه صفرا وابسته به کم تحرکی کیسه صفرا مؤثر باشند. چند شکلی های ژنتیکی در تفاوت های عملکردی محصولات ژنی مؤثر می باشند. یکی از چند شکلی هایی که در ژن گیرنده CCK-A مورد بررسی قرار گرفته و در جوامع متفاوت ارتباط آن با سنگ کیسه صفرا تایید شده C/T در ایترون ۱ این ژن می باشند (۹-۱۱).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از روش بررسی مورد - شاهدهی استفاده شده است. بدین منظور افرادی که در سال ۱۳۹۰ با علائم مشکلات کیسه صفرا و جهت تشخیص بیماری به بیمارستان طالقانی مراجعه کرده بوده اند انتخاب شدند. برای گروه بیماران تعداد ۱۱۶ نفر که به وسیله متخصص و با تشخیص سنگ کیسه صفرا تحت عمل ERCP قرار گرفته بودند و تخلیه سنگ انجام شده و یا کوله سیستکتومی شده بودند انتخاب شدند. برای افراد کنترل نیز تعداد ۱۱۸ نفر که فاقد سنگ کیسه صفرا بوده و سابقه خانوادگی این بیماری را نداشته اند انتخاب شدند. برای شرکت در این طرح از تمام این افراد رضایت نامه کتبی که توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه شهید بهشتی تهیه و تنظیم شده بود گرفته شد. سپس ۴ میلی لیتر نمونه خون محیطی از هر فرد تهیه و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA به وسیله روش استخراج نمکی از کل خون انجام شد و DNA ژنومی به دست آمده برای انجام آزمایش ژنتیکی و تشخیص پلی مورفیسم مورد استفاده قرار گرفت. برای شناسایی ناحیه چند شکل از واکنش زنجیره ای پلیمرازی (PCR) به همراه چند شکلی قطعات طولی محدود شونده (RFLP) استفاده شد. پرایمرهای واکنش زنجیره ای پلیمرازی به وسیله نرم افزار Gene runner طراحی شده و صحت آن ها به وسیله انجام BLAST در نرم افزار بانک اطلاعاتی PubMed تایید شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق شامل توالی ۵'-
3-GTTGCCAGGACAGGAATCGTG برای ناحیه
Forward و توالی پرایمر Reverse ۵'-
3-CGGTGATGACCAGCGTGTTC بود که محصول

ژنوتایپ های مورد مطالعه، ژنوتایپ C/T در افراد مؤنث احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا را افزایش می داد ($P=0/035$ ؛ $OR=2/954$ ؛ $CI=1/072-8/14$) که نتایج به دست آمده از این تحلیل در جدول ۲ قابل مشاهده می باشد. بررسی آماری فوق با یکسان سازی گروه ها از نظر سن انجام شد و همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود ارتباط معنی داری بین ژنوتایپ های متفاوت در گروه مذکر با احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا یافت نشده است در صورتی که در گروه مؤنث ژنوتایپ C/T نزدیک به سه برابر احتمال ابتلا به این بیماری را افزایش می دهد.

نوکلئوتیدی می باشند. الگوی باندهای افراد هتروزیگوت C/T به صورت سه باند ۲۲۱ نوکلئوتیدی، ۱۳۵ نوکلئوتیدی و ۸۶ نوکلئوتیدی قابل رویت می باشد. طبق نتایج به دست آمده ۶۲/۶٪ افراد دارای ژنوتایپ T/T و ۳۰/۸٪ افراد دارای ژنوتایپ C/T بودند، همچنین ۶/۳٪ افراد ژنوتایپ C/C داشتند. هنگام بررسی آماری مستقیم ژنوتایپ های مورد مشاهده و تاثیرگذاری آن ها در احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا اختلاف معنی داری یافت نشد. اما با یکنواخت سازی داده ها از نظر سن و جدا سازی بر اساس گروه های جنسی ارتباط متغیر ها با احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا مشخص تر شد. طبق این یافته ها در بین



شکل ۱: باند های تشکیل شده پس از انجام واکنش آنزیمی محدود کننده. ردیف ۱=سایز مارکر ۱۰۰bp؛ ردیف ۲=هوموزیگوت C/C؛ ردیف ۳=هتروزیگوت C/T؛ ردیف ۴=هوموزیگوت T/T

جدول ۳: بررسی پلی مورفیسم در گروه های بیمار و کنترل براساس تفاوت های جنسیتی.

ژنوتایپ	بیمار (تعداد=۱۱۶)		کنترل (تعداد=۱۱۸)		P value	OR	C.I. 95%
	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)			
مذکر	T/T	۴۲ (۳۶/۶)	۳۷ (۳۱/۳)	۱	۰/۸۴	مرجع	بالا
	C/T	۱۷ (۱۴/۶)	۱۶ (۱۳/۶)	۰/۳	۰/۷۶۶	۲/۶۴	۰/۲۶۷
	C/C	۶ (۵/۲)	۳ (۲/۴)	۰/۳	۰/۲۳۶	۳/۶۲۳	۰/۰۱۵
آلل	T	۱۰۱ (۸۷/۷)	۹۲ (۷۹/۳)	۱	۰/۷۵۸	مرجع	پایین
C	۲۹ (۲۵/۳)	۲۴ (۲۰/۷)	۰/۳	۰/۲۳۶	۲/۰۲۶	۰/۵۷۹	۱/۰۱۴
مؤنث	T/T	۳۷ (۵۲/۹)	۴۰ (۳۴/۷)	۱	۰/۳۶	مرجع	بالا
	C/T	۲۲ (۳۳/۱)	۱۶ (۲۶/۷)	۰/۳	۰/۷۶۶	۲/۹۵۴	۱/۰۷۲
	C/C	۲ (۳/۹)	۴ (۶/۷)	۰/۳	۰/۲۳۶	۳/۵۹۹	۱/۲۳۶
آلل	T	۷۶ (۷۴/۵)	۹۶ (۸۰)	۱	۰/۳۳	مرجع	پایین
C	۲۶ (۲۵/۵)	۲۴ (۲۰)	۰/۳	۰/۲۳۶	۱/۳۶۸	۰/۷۲۷	۲/۵۷۲

داده ها از نظر سن یکسان سازی شده اند

بحث

در افراد دارای سنگ کیسه صفرا نسبت به افراد سالم بیشتر می باشد. این نتیجه مشخص کرد که ژنوتایپ C/C در افزایش احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا مؤثر می باشد ($P=0/008$, $OR=2/25$). با ضریب اطمینان $CI/95=1/2-4/1$ (۱). این یافته‌ها با ژنوتیپ های مورد بررسی در این تحقیق تفاوت هایی نشان می دهند که می تواند به دلیل اختلاف بین جمعیت های متفاوت در بروز و تاثیرگذاری ژنوتیپ های یک پلی مورفیسم بر روی یک بیماری باشد. تاثیر ژنوتایپ C/T در افزایش احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا در جنس مؤنث می تواند بیانگر تفاوت های جمعیتی جهت تاثیر گذاری این چند شکلی باشد و همچنین بیانگر تأیید بالا بودن ابتلا به این بیماری در جنس مؤنث باشد (۲۰). در مورد علت ارتباط این چند شکلی با ابتلا به سنگ کیسه صفرا تاثیر آن در سرعت تخلیه صفرا مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که تغییر در این ناحیه موجب تغییر در ترشح می شود (۱۹) و از آنجا که تاخیر در تخلیه شدن کیسه صفرا احتمال رسوب کلسترول و تشکیل سنگ کیسه صفرا را افزایش می دهد این ارتباط قابل قبول به نظر می رسد. همچنین این ناحیه در ایترون ۱ ژن CCKAR قبل از آگزون ۲ قرار گرفته است. نواحی ایترونی در ساختار پروتئین دخیل نمی باشند اما می توانند در پیرایش mRNA و حذف قطعات ایترونی و اتصال آگزون ها به هم مؤثر باشند و به نظر می رسد در تنظیم رونویسی نقش داشته باشد، به صورتی که با تغییرات ایترونی پیرایش mRNA دستخوش تغییرات خواهد شد.

نتیجه گیری

با بررسی های به عمل آمده در این تحقیق مشخص شد که پلی مورفیسم C/T در ایترون ژن CCKA-R با احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا در یک جامعه ایرانی مرتبط می باشد و از آنجایی که این بیماری یکی از بیماری های شایع در جامعه ما می باشد انجام مطالعات بیشتر بر روی افرادی که عوامل خطر ساز از جمله سابقه خانوادگی برای آن ها مثبت است می تواند برای پیش آگاهی مفید واقع شود.

تقدیر و تشکر

با تشکر از همکار گرانقدر جناب آقای بهزاد دماوند که ما را در انجام بهینه مراحل آزمایشگاهی این طرح یاری کردند.

سنگ کیسه صفرا یک بیماری شایع می باشد که قابلیت درمان داشته و مرگ و میر ناشی از آن تنها در صورتی است که برنامه درمانی که شامل جراحی می شود به تعویق بیفتد. عوامل مختلفی شامل عوامل محیطی و ژنتیکی می توانند در ابتلا به این بیماری دخیل باشند که می تواند شامل تغذیه، سابقه خانوادگی، و تغییرات ژنتیکی در ژن های صفراوی باشد (۱۳-۱۲). به علت گستردگی عملکرد پیام رسانی گیرنده کوله سیستوکینین A در بدن در اندام های گوارشی گرفته تا مغز که با تحریک ترشح لوزالمعده و انقباض کیسه صفرا عملکرد خود را نشان می دهد مطالعات متعددی بر روی آن انجام شده است (۱۴). مطالعه رای و همکاران در ۲۰۱۱ نشان داد که این گیرنده در بیمارانی که سنگ کیسه صفرا داشته و به سرطان مبتلا شده اند افزایش پیدا کرده است (۱۵). برای شناسایی عملکرد CCKAR در کیسه صفرا ساتو و همکاران موش های دستورزی شده ژنتیکی تولید کردند که ژن CCKAR آن ها بیان نمی شد. تولید سنگ کیسه صفرا در موش هایی که بیان ژن آن ها خاموش شده بود بسیار بیشتر بود در صورتی که میزان کلسترول پلاسما بین دو دسته تفاوتی نداشت. در این مطالعه مشخص شد که تولید سنگ کیسه صفرا در سنین بالا به علت کاهش انقباض صفراوی و تخلیه آن انجام می شود (۱۶). از تغییرات ژنتیکی که در عملکرد پروتئین ها تاثیرگذار می باشد پلی مورفیسم ها می باشند. مهم ترین پلی مورفیسم ژن CCKAR، rs1800867 در ایترون ۱ این ژن می باشد. تاثیر این پلی مورفیسم در بیماری های متفاوت بیانگر اهمیت بالای این چند شکلی ژنتیکی و تاثیرات بالقوه آن بر روی افراد در جوامع مختلف می باشد. بدین منظور ضرورت بررسی این پلی مورفیسم در ارتباط با ابتلا به سنگ کیسه صفرا در یک جامعه ایرانی غیر قابل چشم پوشی می باشد. طبق نتایج حاصل از مطالعه حاضر ژنوتایپ C/T احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا را تنها در جنس مؤنث افزایش می دهد ($P=0/035$; $OR=2/954$; $CI/95=1/072-8/14$) در مطالعات مشابهی که بر روی این پلی مورفیسم و احتمال دیگر بیماری ها انجام شده لووین و همکاران در ۲۰۰۴ (۱۱) و کوفود و همکاران در ۲۰۰۹ (۱۷) ارتباط این پلی مورفیسم را با ابتلا به اسکیزوفرنی تایید کردند (به ترتیب $OR=2/76$ و $OR=3/19$). همچنین نقش این چند شکلی در محافظت از ابتلا به اختلالات عصبی (اختلال هراس) و تمایل به مصرف سیگار بررسی شده است (۱۸-۱۹). مطالعات انجام شده توسط سریواستاوا و همکاران برای تایید ارتباط این چند شکلی با سنگ کیسه صفرا در یک جامعه هندی مشخص کرد که ژنوتایپ C/C به میزان قابل توجهی

References

1. Srivastava A, Pandey S, Dixit M, Choudhuri G, Mittal B. Cholecystokinin receptor A gene polymorphism in gallstone disease and gallbladder cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; **23**(6): 90-95.
2. Lammert F, Matern S. The genetic background of cholesterol gallstone formation: an inventory of human lithogenic genes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; **5**(2): 63-70.

3. Maringhini A, Moreau J, Melton L. Gallstones, gallbladder cancer, and other gastrointestinal malignancies. An epidemiologic study in Rochester, Minnesota. *Ann Intern Med* 1987; **107**(1): 30-45.
4. Langer I, Tikhonova I, Travers M, Archer-Lahlou E, Escrieut C. Evidence that interspecies polymorphism in the human and rat cholecystokinin receptor-2 affects structure of the binding site for the endogenous agonist cholecystokinin. *J Biol Chem* 2005; **280**(23): 198-204.
5. Crawley J, Corwin R. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 1994; **15**(4): 31-55.
6. Inoue H, Iannotti C, Welling C, Veile R, Donis-Keller H, Permutt M. Human cholecystokinin type A receptor gene: cytogenetic localization, physical mapping, and identification of two missense variants in patients with obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Genomics* 1997; **42**(2): 33-45.
7. Pellegrini M, Mierke D. Molecular complex of cholecystokinin-8 and N-terminus of the cholecystokinin A receptor by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1999; **38**(45): 75-83.
8. Zhu J, Han TQ, Chen S, Jiang Y, Zhang S. Gallbladder motor function, plasma cholecystokinin and cholecystokinin receptor of gallbladder in cholesterol stone patients. *World J Gastroenterol* 2005; **11**(11): 85-89.
9. Wei J, Hemmings GP. The CCK-A receptor gene possibly associated with auditory hallucinations in schizophrenia. *Eur Psychiatry* 1999; **14**(2): 67-70.
10. Takimoto T, Terayama H, Waga C, Okayama T, Ikeda K, Fukunishi I, et al. Cholecystokinin (CCK) and the CCKA receptor gene polymorphism, and smoking behavior. *Psychiatry Res* 2005; **133**(2-3): 23-38.
11. Lu WT, Zhang X, Zhang M, Gong S, Wei J. Association analysis of the cholecystokinin type A receptor gene in schizophrenia. *Chin Med J* 2004; **117**(4): 27-39.
12. Marschall HU, Einarsson C. Gallstone disease. *J Intern Med* 2007; **261**(6): 29-42.
13. Kusters A, Jirsa M, Groen A. Genetic background of cholesterol gallstone disease. *Biochim Biophys Acta* 2003; **20**(1): 1-19.
14. Raybould H. Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Curr Opin Pharmacol* 2007; **7**(6): 70-84.
15. Rai R, Tewari M, Kumar M, Singh TB, Shukla HS. Expression profile of cholecystokinin type-A receptor in gallbladder cancer and gallstone disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011; **10**(4): 8-14.
16. Sato N, Miyasaka K, Suzuki S, Kanai S, Ohta M, Kawanami T, et al. Lack of cholecystokinin-A receptor enhanced gallstone formation: a study in CCK-A receptor gene knockout mice. *Dig Dis Sci* 2003; **48**(10): 44-47.
17. Koefoed P, Hansen TV, Woldbye D, Werge T, Mors O, Hansen T, et al. An intron 1 polymorphism in the cholecystokinin-A receptor gene associated with schizophrenia in males. *Acta Psychiatr Scand* 2009; **120**(4): 28-37.
18. Koefoed P, Woldbye DP, Hansen TO, Hansen, S, Knudsen GM, Bolwig TG, et al. Gene variations in the cholecystokinin system in patients with panic disorder. *Psychiatr Genet* 2010; **20**(2): 59-64.
19. Liebrechts T, Adam B, Holtmann G. Susceptibility genes and functional gastrointestinal disorders. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; **20**(11): 92-103.
20. Yoon J, Kuver R, Choi HS. ABCG8 D19H polymorphism: a basis for the genetic prediction of cholesterol gallstone disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; **25**(11): 13-24.