论著

文章编号:1000-5404(2007)15-1488-03

GABBR1基因G1465A多态与中国汉族青少年肌阵挛癫痫的关系

张 政[1],罗勇军[2],晏 宁[1],晏 勇[3],彭惠民[1] (重庆医科大学:[1]细胞生物学及遗传学教研室,[3]附属第一医院神经内科,重庆 400016;[2]第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨γ-氨基丁酸B受体B1亚单位(gamma-aminobutyric acid B receptor 1,GABBR1)基因G1465A多态与中国汉族人青少年肌阵挛癫痫(juvenile myoclonic epilepsy,JME)的关系。**方法** 柱层析法提取血细胞基因组DNA,应用PCR-RFLP检测105例青少年肌阵挛癫痫患者和100例中国汉族正常人GABBR1基因G1465A多态基因型。**结果** ① A/A基因型频率在JME组(0.524)显著高于对照组(0.360)($P<0.05$)。② A等位基因频率在JME组(0.695)显著高于对照组(0.560)($P<0.05$)。③ A等位基因频率患JME的相对风险度为1.792(95% CI:1.195~2.688)($P<0.05$)。**结论** GABBR1基因G1465A多态与中国汉族人群JME相关,A等位基因可能是JME的易感基因。

关键词: 癫痫;GABA B受体;多态性

中图法分类号: R181.33; R394.1; R749.17 **文献标识码:** A

G1465A polymorphism of GABBR1 gene is associated with juvenile myoclonic epilepsy in Chinese Han nationality

ZHANG Zheng[1], LUO Yong-jun[2], YAN Ning[1], YAN Yong[3], PENG Hui-min[1] ([1]Department of Cell Biology and Genetics, [3]Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, [2]Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between gamma-aminobutyric acid B receptor 1 (GABBR1) gene G1465A polymorphism and juvenile myoclonic epilepsy (JME) in Chinese Han nationality. **Methods** EDTA-blood specimens were collected from the unrelated individuals of Han nationality in Chongqing. DNA samples were extracted with column chromatography. The G1465A polymorphism was detected by PCR-RFLP and DNA sequencing for 105 individuals of JME group and 100 controls. **Results** The frequency of A/A genotype was significantly higher in JME group (0.524) than that in control group (0.360) ($P<0.05$). The frequency of A allele was significantly higher in JME group (0.695) than that in control group (0.560) ($P<0.05$). The odd ratio for the A allele carrier with JME was 1.792 (95% CI: 1.195-2.688) ($P<0.05$). **Conclusion** The G1465A polymorphism of GABBR1 gene confers a highly increased susceptibility to JME in Chinese Han nationality. Moreover, the A allele may be the susceptible gene of JME patients.

Key words: epilepsy; GABA B receptor; polymorphism

青少年肌阵挛癫痫(juvenile myoclonic epilepsy,JME)是一种非进行性特发性全身发作性癫痫,严重影响人们的健康。该病具有明显的遗传倾向,遗传方式较为复杂,其发病机制可能与神经递质谷氨酸、γ-氨基丁酸及其受体的结构和功能有关[1,2]。γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)是中枢神经系统内主要的抑制性神经递质。GABA受体是一组与GABA配体相关的蛋白质家族,主要有三种亚型:分别为GABA A、GABA B和GABA C受体。其中GABA B受体(gamma-aminobutyric acid B receptor, GABBR)有B1、B2两个亚单位,B1是主要成分。国外研究对GABBR1基因与JME的研究集中在动物模型[3],但该基因与JME患者的相关研究,国内外少见报道。因此本研究拟探讨GABBR1基因第7外显子G1465A多态性与中国汉族JME的关系。

基金项目: 重庆市科委攻关项目(2004-12-1)
Supported by the Sci & Tech Research Project of Scientific Committee of Chongqing (2004-12-1)

作者简介: 张 政(1976-),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事多基因疾病的分子遗传学方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)66621900

通讯作者: 彭惠民,E-mail: penghuimin6@sohu.com

收稿日期: 2006-10-20;**修回日期:** 2006-12-08

1　对象与方法

1.1　研究对象

JME 患者 105 例,为 2001 年 9 月至 2006 年 7 月重庆医科大学第一附属医院癫痫门诊就诊和长期随访的患者,来自中国西南地区的汉族人群,根据《1989 年国际癫痫和癫痫综合征分类》的诊断标准,符合 JME 诊断标准,排除心、脑、肝、肾及内分泌代谢等疾病。对照(CON)组 100 例,系体检健康者,来自于同一地区,年龄及性别构成与研究组匹配,无心、脑、肝、肾及内分泌代谢疾病,家族中没有癫痫或高热惊厥病史及患者。

1.2　研究方法

1.2.1　基因组 DNA 提取　　研究对象签署知情同意书,并上报伦理委员会同意后,取患者和正常人静脉血 1 ml,EDTA 抗凝,采用小量血液基因组 DNA 提取试剂盒(上海华舜公司),柱层析法提取血细胞基因组 DNA,TE 溶解置 -20℃保存。

1.2.2　PCR-RFLP 法检测 GABBR1 基因 G1465A 多态性　①PCR 反应:引物:上游 5′-AACAGTAACACAAACCCATCC-3′,下游 5′-GCATGTTTGTAGAAGGTGCC-3′。30 μl 扩增体系包括基因组 DNA 50 ~ 200 ng,1 × PCR 缓冲液,$MgCl_2$ 1.5 mmol/L,dNTP 200 μmol/L,*Taq* 酶 1.5 U,引物各 0.2 μmol/L。PCR 循环参数:95℃预变性 5 min,按 94℃变性 1 min,62℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,循环 30 次,最后一个循环结束于 72℃再延伸 10 min。②RFLP 检测:PCR 产物用 *Eag* Ⅰ酶(MBI 公司)37℃酶切 17 h,酶切产物在含溴化乙锭的 3% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯观察结果并摄片。③基因型判读:PCR 产物总长 441 bp。GABBR1 基因第 7 外显子1 465位存在 G→A 的多态性。若 1 465位为 G 等位基因,则存在 *Eag* Ⅰ酶切位点,电泳带上出现 258 bp 和 183 bp 两个片段;若 1465 位为 A 等位基因,则不存在 Eag Ⅰ酶切位点,电泳带上出现 441 bp 一个片段。因此,G1465A 多态的基因型为:①A/A 型:441 bp 一个片段;②A/G 型:441 bp、258 bp 和 183 bp 3 个片段;③G/G 型:258 bp 和 183 bp两个片段。

1.2.3　PCR 产物的测序　　部分 PCR 产物经纯化后行 DNA 全自动测序(上海 Sangon 生物工程公司),进一步证实样本基因型。

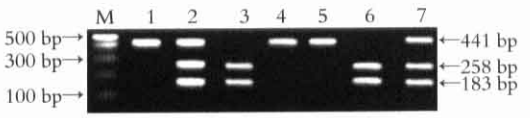
1.3　统计学处理

数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件,GABBR1 基因频率用基因记数法计算;按文献[4]的方法对群体数据作 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验;组间基因型与等位基因频率比较用 χ^2 检验;各指标间采用 Logistic 回归分析。

2　结果

2.1　基因型频率分布

结果提示,GABBR1 共 3 种基因型(图 1),分别为 A/A、A/G 和 G/G,根据 *Eag* Ⅰ酶切位点的存在与否表现为长度不同的片段:A/A 基因型为 441 bp 的条带;A/G 基因型为 3 条带,分别为 441 bp、258 bp 和 183 bp;G/G 基因型为两条 258 bp 和 183 bp 的条带。且其基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。结果还提示,A/A 基因型在 JME 组最常见,A/G基因型在 CON 组最常见。A/A 基因型频率(0.524)在 JME 组显著高于 CON 组(0.360),差异有统计学意义($\chi^2 = 3.967$, $P = 0.046$)。A/A 和 G/G 基因型频率在 JME 组和 CON 组差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。



M: DNA 标准;1:A/A;2:A/G;3:G/G;4:A/A;5:A/A;6:G/G;7:A/G

图 1　PCR 酶切产物凝胶电泳图

表 1　JME 组和 CON 组 G1465A 基因型和等位基因频率分布

组别	例数	基因型			等位基因	
		A/A	A/G	G/G	A	G
CON 组	100	36(0.360)	40(0.400)	24(0.240)	112(0.560)	88(0.440)
JME 组	105	55(0.524)[a]	36(0.343)	14(0.133)	146(0.695)[a]	64(0.305)

a:$P < 0.05$,与 CON 组比较

2.2　等位基因分布

结果显示,A 等位基因频率在 JME 组(0.695)显著高于 CON 组(0.560)($\chi^2 = 4.481$, $P = 0.034$)。G 等位基因频率在 JME 组(0.305)和 CON 组(0.440)差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。

2.3　Logistic 回归分析结果

携 A 等位基因者患 JME 的相对危险度(OR)是 1.792,95% 可信区间(CI)为 1.195 ~ 2.688($P < 0.05$)。

3　讨论

人 GABBR1 基因定位于 6p21.3,mRNA 长 4.4 kb,含 22 个外显子,编码 961 个氨基酸,在中枢神经系统中高水平表达,在小肠和子宫中低水平表达[5]。动物研究提示,GABBR 基因敲除鼠模型表现肌阵挛性癫痫发作[3]。有学者认为,GABBR 表达水平、受体分布以及受体活性的改变直接影响脑内神经调节网络的功能是导致 JME 的主要原因[6]。JME 定位克隆研究中,Elmsile 等[7]发现其定位于 6p21-3 区域,而此位置正是 GABBR1 基因所在区域。进一步的研究表明 GABBR1 基因第 7 和 11 外显子与包括 JME 在内的多种神经精神疾病的脑电图紊乱相关[8],提示 GABBR1 基因第 7 外显子可能与 JME 关系密切。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)分布广泛,是稳定的分子标志,SNP 中错义突变及微小片段缺失或插入引起氨基酸的改变,从而影响蛋白质的功能,其中错义突变与疾病机制的关系最为密切。而第 7 外显子的 G1465A 是 GABBR1 基因为数不多的错义突变其中之一。国外有学者报道,该多态位点与意大利人群颞叶癫痫相关[9],但该多态位点与 JME 的关系,目前少见报道。

本研究采用 PCR-RFLP、DNA 测序等技术,检测了 100 例健康中国汉族人和 105 例 JME 患者 G1465A 多态位点,结果显示,A/A 基因型分布频率在 JME 组显著高于 CON 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。A 等

位基因频率在 JME 组显著高于 CON 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。且携 A 等位基因者患 JME 的相对危险度（OR）是 1.792，95% 可信区间（CI）为 1.195～2.688（$P<0.05$）。结果提示 A/A 基因型可能与 JME 相关，且 A 等位基因可能为中国汉族人群 JME 的易感基因，与 JME 的发生发展可能存在着一定的联系。

我们的结果显示 JME 与 GABBR1 基因 G1465A 多态相关，其原因可能是 G1465A 多态可引起 Gly489Ser 氨基酸改变，即在 489 位上由非极性的藏于蛋白质分子内部的甘氨酸突变为极性的位于蛋白质分子表面的丝氨酸，且第 489 位氨基酸位点位于 GABBR1 的 N-末端细胞外区域，而此 N-末端细胞外区域正是受体要结合相应配体所必需的结构。因此，G1465A 的多态对 GABBR1 的结构和空间构象改变产生影响，使 GABA 功能不能正常发挥，可能是导致 JME 的发生发展的机制之一。

但对于 GABBR1 基因到底是通过具体哪些调控途径来影响 JME 的发生发展，目前尚不明了。进一步的研究尚有待于对 GABBR1 基因结构及表达调控进行深入的了解，以探寻 JME 的发病机制，为基因水平治疗 JME 及研制相关药物等方面奠定基础。

参考文献：

[1] Izzi C, Barbon A, Toliat M R, *et al*. Candidate gene analysis of the human metabotropic glutamate receptor type 4(GRM4) in patients with juvenile myoclonic epilepsy[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2003, 123(1): 59-63.

[2] Cossette P, Liu L, Brisebois K, *et al*. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy[J]. Nat Genet, 2002, 31(2): 184-189.

[3] Prosser H M, Gill C H, Hirst W D, *et al*. Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA(B1)-deficient mice[J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17(6): 1059-1070.

[4] Hou Y, Prinz M, Staak M. Comparision of different tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium of AMFLP population data[M]//Bar W, Fiori A, Rossi U. Advances in forensic haemogenetics 5. Berlin, Heideberg, New York: Springer-Verlag, 1994:511-514.

[5] Calver A R, Medhurst A D, Robbins M J, *et al*. The expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor subunits in the cNS differs from that in peripheral tissues[J]. Neuroscience, 2000, 100(1): 155-170.

[6] Billinton A, Baird V H, Thom M, *et al*. GABA(B) receptor autoradiography in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy[J]. Br J Pharmacol, 2001, 132(2): 475-480.

[7] Elmslie F V, Williamson M P, Rees M, *et al*. Linkage analysis of juvenile myoclonic epilepsy and microsatellite loci spanning 61 cM of human chromosome 6p in 19 nuclear pedigrees provides no evidence for a susceptibility locus in this region [J]. Am J Hum Genet, 1996, 59(3): 653-663.

[8] Winterer G, Smolka M, Samochowiec J, *et al*. Association of EEG coherence and exonic GABA(B)R1 gene polymorphism[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2003, 117(1): 51-56.

[9] Gambardella A, Manna I, Labate A, *et al*. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy[J]. Neurology, 2003, 60(4): 560-563.

（编辑 栾 嘉）

中华临床医师杂志（电子版）征稿启事

中华临床医师杂志（电子版）是新闻出版总署“十一五”国家重点出版规划立项的电子出版物之一（新出音[2006]817号），由中华人民共和国卫生部主管，中华医学会主办，中华医学电子音像出版社出版（新出音[2006]74号）面向国内外公开发行。

中华临床医师杂志（电子版）以 CD-ROM 光盘附导读形式出版具有形式新颖、报道信息容量大的特点。本刊不仅可以传递文字信息和图形信息，还可以传递视频课件，具有很强的互动性。主要栏目有：述评、临床研究、实验研究、短篇论著、综述、专家讲座（视频形式）、临床经验、病例报告、疑难病例分析、会议报道和继续医学教育课堂等。

著名医学专家郭应禄院士、谌贻璞教授担任本刊总编，与全国80余位各医学学科的知名专家组成了期刊编委会。在编委会的集体领导下，本刊将以科学的流程，给予作者投稿及时处理，分科送审，快速回复，在最短时间内将专家意见反馈给作者，信守科研、编辑道德，以使作者的科研成果、临床经验第一时间得以传播，同时为读者提供最新的医学信息，从中获得科研实践的借鉴。

欢迎医学界同行积极投稿并订阅杂志。

地 址：北京市 100035-50 信箱《中华临床医师杂志》（电子版）编辑部 邮 编：100035

电 话：(010)62219211 传 真：(010)62234701 E-mail：Ledoctor@163.com

网 址：www.clinicmed.net & www.clinicmed.cn