维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0805-03

GABBR1 基因多态性与特发性癫痫关联研究

晏 宁[1],彭惠民[1],晏 勇[2]

(1. 重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室;2. 重庆医科大学附属第一医院神经科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 γ-氨基丁酸 B1 型受体(GABBR1)基因内的单核苷酸多态性(SNP)与特发性癫痫(IGE)的相关性。方法:以紧邻第 7 外显子两侧的 rs3025627 、rs3025628、rs29220 的 SNPs 为遗传标记,对 110 例 IGE 患者及 110 例正常人用等位专一双向特异扩增法(Bi-PASA)进行关联分析。结果:上述 3 位点的 SNPs 基因频率在对照组符合 Hardy-Weinberg 平衡,rs3025627, rs3025628, rs29220 SNP 的杂合度分别为:0.412,0.426,0.412。rs3025627 的 TT 突变型频率在研究组中高于对照组($P<0.05$);rs3025627 的 AT 杂合型频率在研究组低于对照组($P<0.05$)。结论:GABBR1 基因内的 rs3025627 的突变与 IGE 的易感性基因存在关联。rs3025627 、rs3025628、rs29220 的 SNPs3 个位点的杂合度较高,是研究 IGE 有应用价值的遗传学标记。

【关键词】特发性癫痫;GABBR;单核苷酸多态性

【中国图书分类法分类号】R742.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-29

The association study between polymorphism of GABBR1 gene and idiopathic generalize epilepsy

YAN Ning, et al

(*Department of Biology, College of Basical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate whether or not the γ-aminobutyric acid (GABA)receptor subtype B genes are associated with idiopathic generalize epilepsy (IGE). *Methods*: three single nucleotide polymorphisms (SNPs) which loci nearly exon 7 was used as genetic markers. Both case-control study as well as based on Bi-PASA technique were used in 110 with IGE and 110 controls to conduct association analysis. *Results*: The allele frequencies of these SNPs in Chinese normal population are in good agreement with Hardy-Weinberg equilibrium. The heterozygosity of SNP rs3025627 and rs3025628 and rs29220 are 0.412 and 0.426 and 0.412 respectively. The allele of frequency of heterozygote type of the mutation type of TT in rs3025627 are higher in IGE patients than those in normal controls ($P<0.05$). *Conclusions*: All of these SNP rs29220 and rs3025627 and rs3025628 are good genetic markers. The rs3025627 are associated with IGE, but need more samples. All of these SNP rs29220 and rs3025627 and rs3025628 are good genetic markers.

【Key words】 Idiopathic generalize; GABBR; Single nucleotide polymorphisms

癫痫是神经科临床常见的一种综合征。全球约有 3%的人在一生中可能有过癫痫或癫痫样发作。癫痫患者中约 40%可找到病因,称继发性癫痫;而 60%的患者经过现有各种检查均找不到明确的病因,被称为原发性癫痫,或特发性癫痫。多数研究者推测特发性癫痫发病机制与遗传因素有关。近年来,神经递质受体基因变异在癫痫发生机制中的作用成为研究的重点。Winterer 等[1]检测 γ-氨基丁酸 B 型受体(GABBR1)基因外显子第 1、7、11 的多态性与各种癫痫脑电图(EEG)改变的相关性。发现外显子 7 的基因多态性与顶、颞叶癫痫 EEG 改变存在明显一致性。其他多项研究也发现 GABBR 基因可能与特发性癫痫发生机制中的重要环节相关[2-5],提示 GABBR 基因的多态性与特发性癫痫的易感性存在潜在的联系。为研究 GABBR 基因与中国西南地区汉族人群 IGE 的关系,我们选择了紧邻第 7 外显子两侧内含子中的 3 个单核苷酸多态性(Sigle nucleotide polymophism, SNPs)作为遗传标记,采用双向特殊等位基因扩增法(BI-PASA),应用病例-对照研究方法对 110 例中国西南地区汉族

作者介绍:晏 宁(1974-),男,主治医师,博士生,主要研究方向:癫痫遗传学、生物信息学。

基金项目:重庆市科委攻关课题(渝科发 2004-12-1),重庆市卫生局基金课题(编号 2004-03-11)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

特发性全面性癫痫（Idiopathic generalize epilepsy，IGE）患者及来自同一地区的 110 例正常人进行关联分析。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本组 110 例 IGE 患者为重庆医科大学临床学院癫痫门诊就诊和长期随访的患者，均为中国西南地区的汉族人群。入选标准根据 1981 年国际抗癫痫联盟的分类诊断标准，排除所有已知病因的症状性癫痫。入选者按照 1:1 比例安排正常对照。110 例正常对照者来自同一地区，年龄及性别构成与研究组匹配，家族中没有癫痫或高热惊厥病史及患者。研究组年龄（24 ± 2.35）岁；正常对照组（25.5 ± 4.56）岁（P>0.1）。

1.2 试 剂

Ampli Taq、dNTP 及引物合成均为上海生工公司产品。

1.3 方 法

1.3.1 表型判定 癫痫患者的诊断依据 1989 年国际抗癫痫协会提出的癫痫及癫痫综合征分类诊断标准。

1.3.2 DNA 提取 采用改进的 Miller's 盐析法提取外周血 DNA。

1.3.3 PCR 扩增反应采用 BI-PASA 法 各 SNPs 引物序列见表 1。PCR 反应体系为 20μl。含 50μg 基因组 DNA，3.0mmol/L 的 $MgCl_2$，60μmol/L 的 dNTP，0.2U 的 Taq 酶，各引物 0.06μmol/L。在 Gene CyclerTMPCR 扩增仪上进行 PCR 反应。

1.3.4 PCR 产物电泳及基因分型 将 3μl PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳。Quality one 软件分析系统，确定样本的基因型。

1.3.5 统计学分析 组间基因型与基因频率、两组间单倍型频率比较使用 t 检验，并进行单倍型与 IGE 相关分析，在 SPSS11.0 软件包中进行。按文献方法对群体数据作 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验并计算杂合度。

2 结 果

2.1 正常对照组 SNP 为二态变异

经检验符合 Hardy-Weinberg 平衡，杂合度（H）分别 rs3025627：0.412，rs3025628：0.426，rs29220：0.412。

2.2 病例-对照研究

经过 χ^2 检验，研究组和对照组相比，SNP rs3025627 的 TT 基因型频率研究组高于对照组（P<0.05）；rs3025627 的 AT 杂合型的基因型频率研究组又低于对照组（P<0.05）。rs3025628 和 rs29220 基因频率在两组间分布无差异（见表 2）。

表 1 引物序列及设计片断长度

	引物 1	引物 2
rs3025627	5'-ATCTGGTAGTTGGTACTAtG-3'	5'-TAAAGTAGGTTCAATCCAAA-3'
	3'-CTAAGTCTGGTAAGAAGAGA-5'	3'-ACTCTCTCTTCGGCTGTCTG-5'
rs3025628	5'-TCTGTCTGCTCATTTGCCTC-3'	3'-TGTAAACGGAGAACTCCAAC-5'
	3'-GAGAACTCCAACTGTAGTAC-5'	5'-AGACCATTCTTCTCTGATCC
rs29220	3'-CGAGACTTCTGTAGACCGAA-5'	5'-TGTTTACGGAGGGACCAA-3'
	5'-GGGATGGGAAATCAAAGCTC-3'	3'-AAACACTCCACCTCAACC-5'

2.3 SNP 单倍型分析

由于 SNPs 形成的单倍型较单个的 SNP 蕴含了更多的遗传信息，分析单倍型是否与疾病存在关联更有助于揭示疾病的发病原理。

本试验分析 3 个 SNP 构成的单倍型在两组的分布频率的差异（见表 3），经检验没有统计学意义。

3 讨 论

γ-氨基丁酸（GABA）是中枢神经系统（CNS）内主要的抑制性神经递质，癫痫的发生除与神经元兴奋性增高外，还与 GABA 介导的抑制作用减弱或缺失相关。GABA 的功能受其受体的调节，目前已知与癫痫有关的 GABA 受体有 GABA（A）和 GABBR。其中 B 亚型是一种异源寡聚体，是一种代谢性的通道，分为 B1、B2 两个亚单位，B1 亚单位是构成 B 受体的主要成分[6]。GABA 受体 B 亚型与 G 蛋白结合后，通过细胞内的腺苷酸环化酶（cAMP）信号系统增加突触前、后膜上 K+通道的通透性，抑制 Ca^{2+}通道活化，产生长程抑制性突触后电位（Long-lasting inhibaitory postsynaptic potential），进而抑制突触前

维普资讯 http://www.cqvip.com

膜可能的/潜在的神经递质释放,并停止突触后膜的神经元活化[7]。该通道作用慢而持久,主要与抑制异常脑电活动的扩散和神经网络重塑等机制有关。因此,GABBR 基因在癫痫发生机制中的作用备受关注。2001 年 Grambardella 等[5]报道了 GABBR1 基因的 G1465A 的多态性与颞叶癫痫存在关联,但在随后的其它研究中,对此结论存在争议。GABBR 基因多态性是否与癫痫存在关联再次成为关注的重点。

表 2 GABBR1 基因 SNP 基因型频率在 IGE 及对照组间分布频率比较

例数(n)	编号	基因型	研究组(110)	对照组(110)	P
基因型频率 (Genotype frequency)	rs3025627	AA	0.282	0.309	>0.50
		AT	0.355	0.445▲	<0.05
		TT	0.363▲	0.246	<0.05
	rs3025628	CC	0.209	0.164	>0.20
		CT	0.455	0.436	>0.50
		TT	0.336	0.4	>0.10
	rs29220	GG	0.236	0.219	>0.50
		GC	0.445	0.436	>0.50
		CC	0.319	0.345	>0.50

注:IGE vs Normal control,▲为 $P<0.05$, $\nu=n-1$

表 3 GABBR1 基因 SNP 单倍型在 IGE 及对照组间的分布频率比较

单倍型	研究组	对照组	P
A-C-G	0.107	0.109	>0.5
A-C-C	0.107	0.111	>0.5
A-T-G	0.143	0.169	>0.5
A-T-C	0.144	0.142	>0.5
T-C-G	0.104	0.112	>0.5
T-C-C	0.105	0.097	>0.5
T-T-G	0.167	0.124	>0.4
T-T-C	0.123	0.136	>0.5

注:IGE vs Normal control, $\nu=n-1$

本课题选择 GABBR1 基因第 7 外显子为研究对象,分析在中国西南地区人群中 GABBR1 基因是否与 IGE 存在关联。由于第 7 外显子内没有 SNP 位点存在,我们根据 NCBI 中 SNP 数据库公布的的数据,选择了最临近第 7 外显子的 rs3025627、rs3025628 和 rs29220 3 个位点 SNPs 为试验对象,使用关联分析和病例对照研究的方法,通过对比分析 IGE 患者和对照组间这 3 个 SNP 的基因和基因型频率是否有差异,判断 GABBR 基因第 7 外显子多态性变化是否与中国西南地区汉族人群中 IGE 的发病机制相关。

研究选用了 Bi-PASA 的试验方法。这种方法的优点在于:①可以利用调节下游引物的位置来控制扩增片断的长度,能通过片断长度直观的区别同一基因的不同基因型;②实验操作简单,只需要一次 PCR 过程就能鉴别同一位点的不同基因型,避免了传统方法效率较低,反复 PCR 操作中易发生污染的弊端;③因为专一的引物只能在完全匹配时才能被扩增,故试验的精确度很高,能鉴别单个碱基的突变。

对照组中 rs3025628、rs29220、rs3025627 的 SNPs 基因型频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡。试

(下转第 829 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

中，AQPs 的表达异常可能与肺水肿的发生有关[5]。近年来，水通道蛋白在充血性心力衰竭肺水肿中的作用已引起人们的关注。

本研究证实在心肌梗死后引起的充血性心力衰竭肺组织中 AQP_4 表达显著下降，其结果提示，AQP_4 在心力衰竭肺水肿的形成或消散中起一定的作用。TEB 可能通过阻滞交感神经活性，使容量血管和阻力血管扩张，回心血量减少，外周血管阻力下降，降低了心脏的前后负荷，改善左心功能和血流动力学，从而在一定程度上改善肺动脉高压和肺水肿。

内皮素对心力衰竭的发生与发展起重要的作用，而血浆 ANP 含量是判断心衰严重程度和疗效的独立指标[6]。心衰时，心输出量降低、交感神经兴奋、肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性增高都可以激活 ANP 的释放；缺血缺氧、肾上腺素均可以刺激 ET 的释放，导致 ET 分泌增加。本研究中，发现 TEB 治疗能明显降低心力衰竭兔血浆心钠素和内皮素水平，显示其治疗心衰有良好的疗效。TEB 通过阻断过度激活的交感神经，降低心力衰竭兔血浆 ANP、ET-1 水平及纠正肺组织 AQP_4mRNA 的表达异常；可以明显改善心衰兔的血液动力学参数及心功能，为 TEB 的临床应用打下了坚实的临床基础。

参 考 文 献

[1] 孙桂芳，刘凤歧.胸段硬膜外阻滞治疗重度心力衰竭[J]. 临床麻醉学杂志，2005；21(4)：229-231.

[2] Beitz E，Schultz J E. The mammalian aquaporin water channel family：a promising mew drug target[J]. Curr Med Chem，1999；6(6)：457.

[3] Yananoto N，Yoneda K，Asai K. Alterstion in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation[J]. Brain Res，2001；90(1)：26-38.

[4] 王 训，张 成.小鼠成肌细胞的培养纯化和鉴定方法[J]. 中山医科大学学报，2000；21(1)：6.

[5] Fishchman D A. Monoclomal antibodies to desmin：evidence for stage dependent intermediate filament immunoreactivity during cardiac and skeletal muscle development[J]. Amm NY Acad Sci，1985；455(2)：167.

[6] Kitaoka H.Cardiovascular events and plasma atrial matriuretic peptide level in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. Am J Cardiolo，2001；87：1318-1320.

(上接第 807 页)

验结果说明对照人群具有良好的代表性。实验发现 rs3025628、rs29220、rs3025627 的杂合度均接近 0.5，及同一基因座纯合子与杂合子出现的频率相近，说明这 3 个位点杂合度较高，是具有应用价值的遗传学标记。

试验发现，rs3025627 的 TT 基因型在研究组的频率高于对照组($P<0.05$)；rs3025627 的 AT 杂合型在研究组的基因型频率低于对照组($P<0.05$)，提示 GABBR1 的第 7 外显子与中国西南地区汉族人群中 IGE 的发生存在关联。这种关联的原因可能和 T 基因的突变增加了对 IGE 的易感性所致。rs3025627 的 TT 基因型频率在 IGE 患者显著高，为进一步开展 IGE 的分子生物学研究奠定了基础。

由于 SNPs 形成的单倍型较单个的 SNP 蕴含了更多的遗传信息，因此，分析单倍型是否与疾病存在关联更有助于揭示疾病的发病原理。我们对比了 SNPs 形成的单倍型在两组间的分布频率，发现各单倍型的频率在两组间并无差异，这可能与研究纳入的 SNPs 数量较少有关。在后续的研究中我们将扩大 SNPs 的研究数量，以期找到与疾病易感基因存在关联的 SNPs 单倍型。

(通讯作者：彭惠民，重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室 E-mail：penghuimin@sohu.com；作者目前工作单位：重庆市第三人民医院神经科)

参 考 文 献

[1] Winterer G，Smolka M，Samochowiec J，et al. Association of EEG coherence and exonic GABABR1 gene polymorphism[J]. Am Med Genet，2003；117B：15.

[2] Goei VL，Choi J，Ahn J，et al. Human gamma-aminobutyric acid B receptor gene：complementtary DNA cloning expression chromosomal location，and genomic organization[J]. Biol.Psychiat，1998；44：659.

[3] Grifa A，Totaro A，Rommens J M，et al. GABA neurotransmission：identification and fine mapping of the humman GABA-B receptor gene[J]. Biochem Biophys Res Commun，1998；250：240.

[4] Yanovsky Y，Misgeld U.Suppression of epileptiform activity by GABA(B) receptors in wide type and weaver hippocampus 'in vitro' [J]. EpilepsyRES，2003；52：263.

[5] Grambardella 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.

[6] Schuler V，Luscher C，Blanchet C，et al. Epilepsy，hyperalgesia，impaired memory，and loss of pre- and postsynaptic GABA-B responses in mice lacking GABA-B(1)[J]. Neuron，2001；31：471-475.

[7] GABAB receptor gene：OMIM 603540 (www.ncbi.nlm.nih.gov\OMIM).