

• 临床研究 •

50 例帕金森病 PINK1 基因 5 号外显子的多态性分析*

卢翠玲, 罗曙光[△], 王 进, 杨华丹, 袁志刚, 林伟雄, 窦霄云, 李 卫

(广西医科大学第一附属医院神经内科, 南宁 530021)

摘要:目的 探讨广西地区帕金森病(PD)的同源性磷酸酶张力蛋白诱导的激酶 1(PINK1)基因 5 号外显子的多态性分布特征,及其与 PD 的关系。方法 应用聚合酶链反应(PCR)、单链构象多态性分析(SSCP)、DNA 直接测序等技术对广西地区 28 例早发 PD 组患者、22 例晚发 PD 组患者(早发 PD 组+晚发 PD 组为 PD 组)及 55 名健康对照组的 PINK1 基因 5 号外显子的多态性进行分析。结果 PINK1 基因 5 号外显子 G12164A、IVS5-5G-A(内含子上游调控区 5-5G-A)连锁多态,统计结果显示 PD 组基因型 G/A、A/A(42.0%)与对照组(23.6%)相比有升高趋势($\chi^2=4.034, P=0.045$),晚发 PD 组基因型 G/A、A/A(45.5%)与对照组中 38 名年龄大于 50 岁的健康人(21.1%)相比有升高趋势($\chi^2=3.951, P=0.047$),各组之间的等位基因频率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 G12164A、IVS5-5G-A 连锁多态可能是广西地区晚发 PD 患者的易感因素。

关键词:帕金森病;磷酸酶张力蛋白诱导激酶基因;多态性,单核苷酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.34.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)34-4120-03

The analysis of polymorphism on PINK1 gene of exon 5 in 50 patients with Parkinson disease *

Lu Cuiling, Luo Shuguang, Wang Jin, Yang Huadan, Yuan Zhigang, Lin Weixiong, Dou Xiaoyun, Li Wei

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To study polymorphism of phosphatase and tensin homologue (PTEN)-induced kinase 1(PINK1) gene of exon 5 in Parkinson patients who located in Guangxi, and its relationship with Parkinson disease(PD). **Methods** PCR, single strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing analyze were conducted to analyze the PINK1 gene's exon 5 polymorphism in 28 cases of early-onset PD patients, 22 cases of late-onset PD patients(early-onset PD patients+ late-onset PD patients=PD group) and 55 of control group. **Results** The intronic intervening sequence 5-5G-A(IVS5-5G-A) polymorphism and G12164A polymorphism which were located on PINK1 gene of exon 5 were chain relation. The G/A, A/A genotype frequency was significantly higher in PD group (42.0%) than that in control group (23.6%) ($\chi^2=4.034, P=0.045$). The frequency was also significantly higher in late-onset PD patients (45.5%) than that of 38 cases who were older than 50 years old in control group(21.1%) ($\chi^2=3.951, P=0.047$). There were no significant differences in alleles. **Conclusion** This research suggests that chain relation polymorphism at IVS5-5G-A and G12164A in PINK1 gene may be a susceptible factor for PD patients in Guangxi.

Key words: Parkinson disease; phosphatase and tensin homologue (PTEN)-induced kinase 1; polymorphism; single nucleotide

帕金森病(Parkinson disease, PD)是一种常见的神经系统退行性变性疾病,晚期患者行走困难、生活不能自理,给家庭和社会带来很多负担,目前 PD 发病机制和病因的研究成为热点。有研究发现同源性磷酸酶张力蛋白诱导的激酶 1 基因[phosphatase and tensin homologue (PTEN)-induced kinase 1, PINK1]基因突变是常染色体隐性遗传性早发性 PD 家系的第二大常见病因^[1],突变频率约为 15%。在此,本研究探讨广西地区 PD 的 PINK1 基因 5 号外显子的单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP)分布特征及与 PD 的发病关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2004 年 3 月至 2008 年 3 月在本院参照国际通用的 PD 临床诊断标准^[2]诊断为 PD 的患者 50 例(PD 组),其中包括早发 PD 组患者 28 例(发病年龄小于或等于 50 岁)和晚发 PD 组患者 22 例(发病年龄大于 50 岁),另外设置有年龄基本匹配的对照组 55 例(其中年龄小于或等于 50 岁的 17 例,大于 50 岁的 38 例),均无明确神经系统疾病和 PD 家族史。所有受试者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 DNA 制备 在签署知情同意后,取所有患者和 55 例对照组的外周静脉血 2~3 mL,按常规酚/氯仿法从白细胞

中提取基因组 DNA。紫外分光光度法测定 DNA 浓度, -20℃ 保存。

1.2.2 PCR 扩增 扩增 PINK1 基因 5 号外显子的引物来自参考文献[3],以 GeneBank 中 NT-004610 序列为参照。引物由上海生工生物公司合成。上游引物:5'-AAA CGT ATT GGG AGT CGT CGA-3', 下游引物:5'-CTC TAG TGC CCC TGG AGA GCT-3', 扩增片段大小为 266 bp。PCR 反应总体积为 20 μ L, 内含 0.4 μ g DNA、10 $\times$ 缓冲液(10 $\times$ buffer) 2.5 μ L、2 mmol/L MgCl₂、4 种 dNTP 各 0.1 mmol/L、上下游引物各 10 pmol、1 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应条件:95℃ 预变性 4 min; 94℃ 40 s, 60℃ 1 min, 72℃ 55 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。反应结束后 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后紫外分析仪检测 PCR 扩增产物相对含量和相对特异性。

1.2.3 单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)分析 SSCP 电泳槽缓冲液为 0.025 mol/L 的三羟甲基氨基甲烷(Tris), 0.088 mol/L 的甘氨酸(pH 8.8), 电泳槽使用 Hoefer 260。胶缓冲液为 0.112 mol/L Tris~0.112 mol/L 醋酸盐(pH 6.5), 上样液为含 0.05% 溴酚蓝的 10% 蔗糖。取 PCR 终产物 50 μ g 和 3 μ L 上样缓冲液, 98℃ 变性 3 min 后置入冰浴中骤冷, 上样于 12% 聚丙烯酰胺凝胶(10 cm $\times$ 10

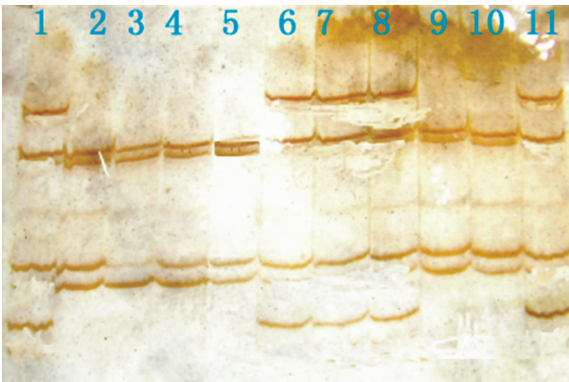
cm,0.03 mm 厚,含 10% 甘油,丙烯酰胺:双丙烯酰胺为 35:1)中,恒压 300 V(恒压仪型号 3000Xi,BIORAD),在恒温箱(MIR-153,SANYO)中进行。SSCP 最适温度根据以下公式计算: $T=[80\times C/(A+1)]/\{2.71+[C/(A+1)]\}^{[4]}$ (C 表示碱基 C 的数量,A 表示碱基 A 的数量),在此温度的上下 5℃ 进行摸索最适合的电泳温度。此片段的最适合 SSCP 电泳温度是 29℃,电泳 4 h。电泳结束后,银染观察。

1.2.4 DNA 测序 对 SSCP 所发现的有异常片段的 DNA 交给上海生工进行正反双向测序测序,所用测序仪器为 ABI PRISM 3730,测序试剂为 Big Dye terminator v3.1。测序结果与 GeneBank 中的基因序列 NT-004610 比较。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,基因频率和基因型频率采用基因计数法,计数资料以率(%)表示,两组间基因型频率、等位基因频率分布的差异性比较行 χ^2 检验或 Fisher 精确概率检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

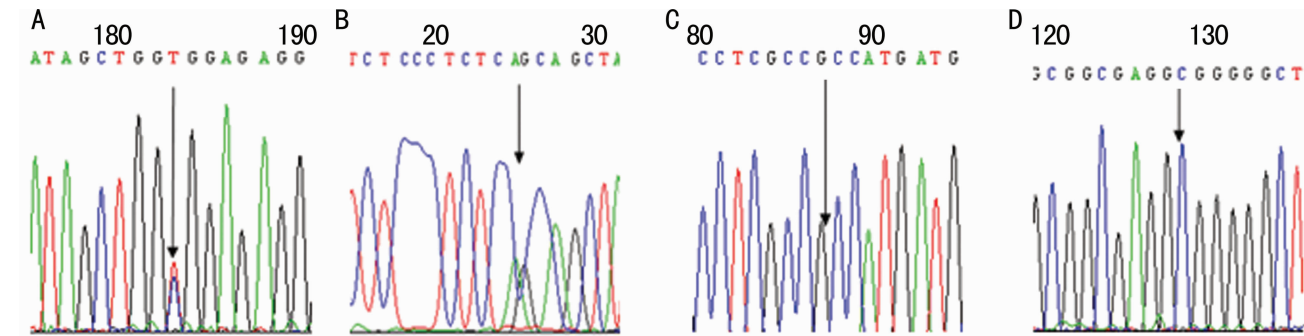
2 结果

2.1 SSCP 结果 PINK1 外显子 5 的 SSCP 分析结果显示存在 Aa(如样本 1)、Bb(如样本 2)两种带型,见图 1。

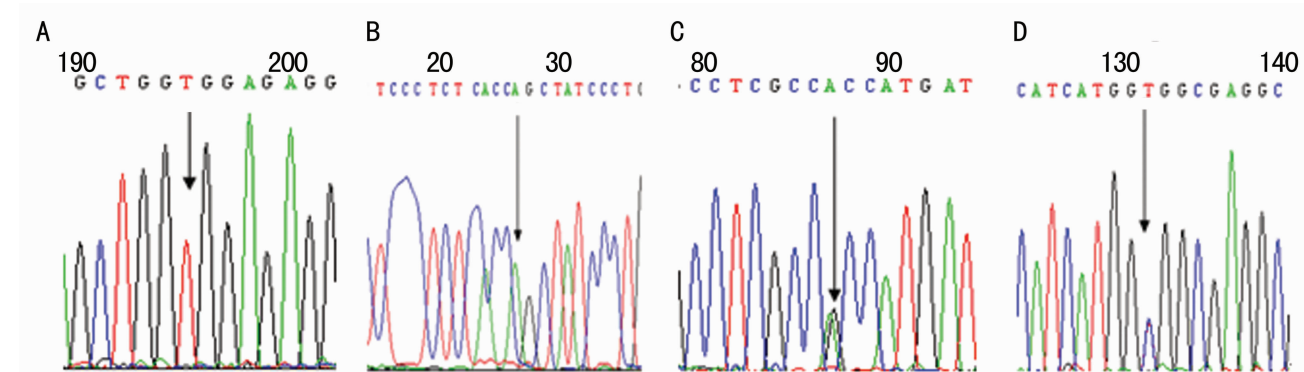


1、3、5、7、9、11:对照组;2、4、6、8、10:PD组。
图 1 PINK1 外显子 5 的 SSCP 分析结果

2.2 DNA 测序结果 PINK1 基因 5 号外显子存在 IVS5-5 G/A 杂合及 G12164A,G/G 纯合连锁多态,IVS5-5 A/A 纯合及 G12164 A,G/A 杂合连锁多态。两样本均未见 IVS5-5 G/G 纯合型及 12164 A/A 型,见图 2、3,表 1。



A:SSCP 电泳 Bb 型的反链测序图,提示 IVS5-5G-A 多态杂合 C/T 型;B:SSCP 电泳 Bb 型的正链测序图,提示 IVS5-5G-A 多态杂合 G/A 型;C:SSCP 电泳 Bb 型的正链测序图,提示 G12164A 多态的野生 G/G 型;D:SSCP 电泳 Bb 型的反链测序图,提示 G12164A 多态纯合 C/C 型。
图 2 SSCP 电泳 Bb 型的 DNA 测序图



A:SSCP 电泳 Aa 型的反链测序图,提示 IVS5-5G-A 多态的纯合 T/T 型;B:SSCP 电泳 Aa 型的正链测序图,提示 IVS5-5G-A 多态的纯合 A/A 型;C:SSCP 电泳 Aa 型的正链测序图,提示 G12164A 多态杂合 G/A 型;D:SSCP 电泳 Aa 型的反链测序图,提示 G12164A 多态的杂合 C/T 型。
图 3 SSCP 电泳 Aa 型的 DNA 测序图

表 1 G12164A 及 IVS5-5 G-A 多态性位点基因型频率和等位基因频率(n)

组别	n	基因型分布		P	G12164A 等位基因频率		P	IVS5-5 G-A 等位基因频率		P
		GG/GA	GA /AA		GG/GA	GA /AA		GG/GA	GA /AA	
PD 组	50	29	21	0.045 ^a	79	21	0.071	21	71	0.257 ^a
<50 岁 PD 组	28	17	11	0.502	45	11	0.553 ^b	17	39	0.627 ^b
>50 岁 PD 组	22	12	10	0.047	34	10	0.071 ^c	12	32	0.177 ^c
对照组	55	42	13		97	13		40	70	
<50 岁对照组	17	12	5		29	5		12	22	
>50 岁对照组	38	30	8		68	8		30	46	

^a:与对照组比较;^b:与<50 岁对照组比较;^c:与>50 岁对照组比较。

2.3 哈迪-温伯格 (Hardy-Weinberg) 吻合度检验 两样本 G12164A G/A 多态连锁 IVS5-5G-A 多态基因型观察值与期望值检测符合 Hardy-Weinberg 平衡, 吻合良好 (PD 组 $\chi^2 = 3.533, P=0.06$; 对照组 $\chi^2 = 0.988, P=0.32$)。

2.4 基因型频率和等位基因频率比较结果 PD 组基因型 G/A、A/A (42%) 与对照组 (23.6%) 相比有升高趋势 ($\chi^2 = 4.034, P=0.045$), 晚发 PD 组基因型 A/A、G/A (45.5%) 与对照组中同年龄段老年人 (21.1%) 相比有升高趋势 ($\chi^2 = 3.951, P=0.047$), 各组之间的等位基因频率比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

3 讨 论

目前研究普遍认为氧化应激、线粒体功能障碍、泛素蛋白酶体系障碍、炎症反应、兴奋性氨基酸毒性和细胞凋亡都可能是 PD 的发病机制, 而线粒体功能障碍不仅是极其重要的发病机制之一, 还有可能是众多机制的中心枢纽^[5-6]。PINK1 基因编码的 PINK1 蛋白定位于线粒体内膜, 是首次将线粒体功能障碍与 PD 发病机制联系起来的蛋白。

Hatano 等^[7]对日本人进行 PINK1 基因的研究发现了 5 号外显子 G1018A、IVS4-5C-T 多态, Groen 等^[8]的研究发现 1 号外显子的 C283T、5 号外显子 A340T 和 8 号外显子 A521T 均为多态, 各等位基因或基因型水平与 PD 发病风险没有关联, 且在 PD 组未发现基因型对发病年龄有影响。袁静等^[9]对中国早发性和晚发性 PD 患者的 PINK1 基因的突变研究, 未发现基因突变是早发性或晚发性 PD 的易感因素。有研究发现 A340T、IVS5-5G-A 多态可能是中国汉族晚发性 PD 的危险因素^[10-11]。本实验发现 5 号外显子 G12164A、内含子上游调控区 5-5G-A (intervening sequence 5-5G-A, IVS5-5G-A) 多态, 与他们不同点是发现 G12164A、IVS5-5G-A 多态呈现连锁关系, G12164A 多态有 G/G 和 G/A 基因型, IVS5-5G-A 多态有 G/A 和 A/A 基因型, G/G 与 G/A 基因型连锁, G/A 与 A/A 基因型连锁; 结果显示 PD 组基因型 G/A、A/A (42%) 与对照组 (23.6%) 相比有升高趋势 ($\chi^2 = 4.034, P=0.045$); 晚发 PD 组基因型 G/A、A/A (45.5%) 与对照组中同年龄段老年人 (21.1%) 相比有升高趋势 ($\chi^2 = 3.951, P=0.047$); 各组之间的等位基因频率比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 提示 G/A 与 A/A 基因型可能是晚发性 PD 的易感因素。且基因型频率, 等位基因型频率均较高, G12164A 多态没有 A/A 基因型, IVS5-5G-A 多态没有 G/G 基因型。这可能与地域、民族差异有关, 国内学者研究的对象主要是北方汉族人群, 而本研究对象主要是南方人群。

G12164A 多态导致第 340 位氨基酸的丙氨酸被苏氨酸所替换 (A340T), 此位点正好处于 PINK1 蛋白的蛋白激酶结构域, 有可能导致 PINK1 蛋白的构象或功能的改变, 或者影响 PINK1 蛋白的稳定性而使其非正常程序的被降解, 最终会影响 PINK1 蛋白对神经元的保护作用, 导致机体易感 PD。

IVS5-5G-A 多态即是 PINK1 基因第 5 外显子上游调控区第 5 个碱基处发生了 G-A 的变异, 内含子可以通过影响基因构象, 进而影响基因转录、翻译等过程^[12], 也有研究表明内含子区的突变可影响前体 mRNA 剪接^[13], 通过控制剪接体的组装, 细胞可以调节剪接的质量和数量, 从而调节基因表达。本研究与既往报道不同, 发现 PINK1 基因呈现 G12164A 多态与 IVS5-5G-A 连锁关系, 且两者位置较靠近, 极有可能相互作用最后影响 PINK1 蛋白的正常表达, 进一步导致线粒体功能障碍,

提示 G12164A 多态 G/A 基因型连锁 IVS5-5G-A 多态 A/A 基因型可能是晚发性 PD 的易感因素。当然还有待于扩大样本量进行重复实验并同时研究与之相关蛋白的表达来进一步证实。

参考文献:

- [1] Bonifati V, Dekker MC, Vanacore N, et al. Autosomal recessive early onset parkinsonism is linked to three loci: PARK2, PARK6, and PARK7 [J]. *Neu Neurol Sci*, 2002, 23(2): S59-60.
- [2] Farrer MJ. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects [J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(4): 306-318.
- [3] Schlitter AM, Kurz M, Larsen JP, et al. Exclusion of PINK1 as candidate gene for the late-onset form of Parkinson's disease in two European populations [J]. *J Negat Results Biomed*, 2005, 4: 10.
- [4] Wei L, Gao F, Junlin L, et al. Estimation of the optimal electrophoretic temperature of DNA single strand conformation by DNA base composition [J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(14): 2283-2289.
- [5] Fornai F, Lenzi P, Gesi M, et al. Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition [J]. *Neurosci*, 2003, 23(26): 8955-8966.
- [6] Ranjita B, Todd B, Sherer J, et al. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease [J]. *Exp Neurology*, 2005, 191(Suppl 1): s17-27.
- [7] Hatano Y, Li Y, Sato K, et al. Novel PINK1 mutations in early-onset Parkinsonism [J]. *Ann Neurol*, 2004, 56(3): 424-427.
- [8] Groen JL, Kawarai T, Toulina A, et al. Genetic association study of PINK1 coding polymorphisms in Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 372(3): 226-229.
- [9] 袁静, 刘艺鸣, 肖志英, 等. 帕金森病患者 PINK1 基因的突变研究 [J]. *中国神经精神疾病志*, 2010, 36(2): 115-117.
- [10] Wang F, Feng X, Ma J, et al. A common A340T variant in PINK1 gene associated with late-onset Parkinson's disease in Chinese [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 410(2): 121-125.
- [11] 王枫, 陈彪, 冯秀丽, 等. PINK1 基因多态位点 IVS5-5G>A 可能增加中国人晚发性帕金森病的发病 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2007, 24(3): 305-309.
- [12] Hisatsune H, Matsumura K, Ogawa M, et al. A high level of endothelial cell specific gene expression by a combination of 5' flanking region and 5' half of the first intron of VE-cadherin gene [J]. *Blood*, 2005, 105(12): 4657-4663.
- [13] Albanese A, Valente EM, Romito LM, et al. The PINK1 phenotype can be indistinguishable from idiopathic Parkinson disease [J]. *Neurology*, 2005, 64(11): 1958-1960.