

泛素特异蛋白酶 24 基因内含子 rs12138592 A/G 位点多态性与帕金森病的关系

林智君, 陈煜森, 洗文川, 陈军, 钟望涛, 许志恩, 刑永前, 赵斌

[摘要] **目的** 探讨中国粤西地区汉族人群泛素特异蛋白酶 24(USP24) 基因内含子 rs12138592 A/G 单核苷酸多态性与帕金森病(PD)的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法测定 81 例 PD 患者(病例组)与 100 名健康成人(对照组)USP24 基因内含子 rs12138592 A/G 位点多态性。**结果** 病例组 GG 基因型为 77.8%, 对照组为 62.0% ($\chi^2=5.213, P=0.022$)。G 等位基因频率在病例组和对照组分别为 88.3% 和 79.5% ($\chi^2=4.980, P=0.026$)。**结论** USP24 基因内含子 rs12138592 A/G 位点的 G 等位基因与 GG 基因型均可以增加 PD 的患病风险。

[关键词] 泛素特异蛋白酶 24 基因; 单核苷酸多态性; 帕金森病

Association of Intron rs12138592 A/G polymorphism of Ubiquitin Specific Proteases (USP24) Gene with Parkinson Disease LIN Zhijun, CHEN Yu-sen, XIAN Wen-chuan, et al. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between Parkinson disease (PD) and intron rs12138592 A/G polymorphism of ubiquitin specific proteases (USP24) gene in Han population of the Western Guangdong province in China. **Methods** 81 PD cases and 100 ethnically matched controls were investigated USP24 gene rs12138592 A/G polymorphism with polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** The incidence of GG genotype was 77.8% in the cases and 62.0% in the controls ($\chi^2=5.213, P=0.022$), and the G allele was 88.3% in the cases, 79.5% in the controls ($\chi^2=4.980, P=0.026$). **Conclusion** The G allele and GG genotype of USP24 gene rs12138592 A/G polymorphism can increase the risk of suffering from PD.

Key words: ubiquitin specific proteases 24 gene; single-nucleotide polymorphism; Parkinson disease

[中图分类号] R742.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2011)01-0056-03

[本文著录格式] 林智君, 陈煜森, 洗文川, 等. 泛素特异蛋白酶 24 基因内含子 rs12138592 A/G 位点多态性与帕金森病的关系[J]. 中国康复理论与实践, 2011, 17(1): 56—58.

帕金森病(Parkinson disease, PD)是一种常见于中老年的进行性神经系统变性疾病,以黑质多巴胺能神经元变性缺失和路易小体形成为特征,临床上以静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态障碍为主要特征。帕金森病发病原因迄今不明,但已证明其发病是多种因素相互作用的结果,遗传因素在其发病过程中起着重要作用。泛素特异蛋白酶 24(USP24)基因位于人类染色体 1p32.3,在心脏、大脑、肺、肝和肾脏呈中度表达^[1]。USP24 属于半胱氨酸蛋白酶大家族的一个成员,酶分子含有两个短而保守的片段即赖氨酸盒和组氨酸盒,序列中具有起催化作用的三联残基,即半胱氨酸、组氨酸、天冬氨酸/天冬酰胺,能将泛素分子从大的蛋白上移除,发挥着去泛素化酶的功能^[2]。单核苷酸多态性是一种重要的遗传标记。近年的研究发现,USP24 多个单核苷酸多态性位点与帕金森病发病

密切相关^[3-5]。本文应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对 USP24 基因第 9 内含子 rs12138592 A/G 位点多态性进行检测,探讨 USP24 基因多态性与帕金森病发病的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象 病例组 81 例,均为本院 2006 年 8 月~2010 年 10 月在神经内科住院的帕金森病患者,其中男性 48 例,女性 33 例;年龄 46~87 岁,平均(67.05±9.69)岁,所有病例按照 2006 年中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组讨论决定的帕金森病诊断标准进行选择,并排除非帕金森病的诊断。对照组 100 例,为本院健康体检者,其中男性 62 例,女性 38 例;年龄 50~89 岁,平均(64.48±8.75)岁,无帕金森病病史。两组间男女构成比($P=0.707$)、平均年龄($P=0.063$)均无显著性差异。病例组和对照组均为粤西地区汉族人,所有受试者均经知情同意,并经广东医学院医学研究伦理委员会同意。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采早晨空腹肘部静脉血

作者单位: 广东医学院附属医院神经内科, 广东湛江市 524001。作者简介: 林智君(1982-),男,广东湛江市人,硕士研究生,主要研究方向: 脑血管病与神经系统变性疾病。通讯作者: 陈煜森。

5 ml, 3.8% 柠檬酸钠抗凝, 用 KI 法提取外周血白细胞的基因组 DNA, 在 -20°C 冰箱中保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 USP24 基因内含子 rs12138592 A/G 位点及其侧翼序列 利用 rs12138592 A/G 侧翼序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=rs12138592>), 通过 Primer 5.0 软件设计引物。上游引物为 5'-AAC CTC AAT CAG GCA CTC-3', 下游引物为 5'-TGG GCA ACA GAA CAA CTA-3', 引物由上海生工合成。PCR 反应体系 12.5 μl , 其中包括 10 \times Buffer 1.25 μl , dNTP (10 mmol/L) 1.0 μl , 引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μl , 基因组 DNA 1.0 μl , TaqDNA 聚合酶 0.1 μl , H_2O 9.0 μl 。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min (94°C , 45 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s) 33 个循环后, 再于 72°C 延伸 10 min, 终止反应。

1.2.3 酶切反应 利用 rs12138592 A/G 侧翼序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=rs12138592>) 在网络软件 NEBcutter V 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) 上找到其合适的限制性内切酶 HpyCH4 III, 用 PCR-RFLP 法对病例组和对照组全部样本的多态性进行检测, 根据酶切片段条带的不同分析其基因型和多态性。取 PCR 扩增产物 0.5 μl 、NEB Buffer 0.5 μl 、HpyCH4 III 0.3 μl 、 H_2O 3.7 μl , 总体积为 5 μl , 37°C 酶切 6 h, 进行 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 电泳。100 V 电泳 2 h 以后用银染法染色, 观察结果。

1.2.4 测序 分别对不同基因型样本进行双向测序, 测序由上海生工公司完成。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件和遗传学数理统计方法对所有资料进行统计分析, 基因型和等位基因频率采用直接计数法统计, 遗传平衡性采用 Hardy-Weinburg 平衡吻合度检测, 基因型和等位基因频率比较采用四格表 χ^2 检验, 计量资料用两样本均数 t 检验。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

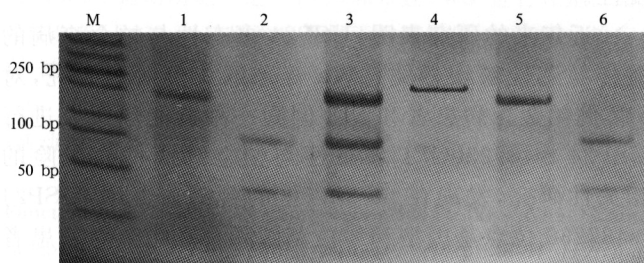
2 结果

2.1 多态性 rs12138592 A/G 位点的扩增片段长度为 282 bp, HpyCH4 III 酶在此 PCR 片段中为双位点内切酶, 除了 rs12138592 A/G 酶切位点外, 还有另一固定酶切位点, 纯合子 AA 基因型因有 1 个酶切位点, 经 HpyCH4 III 酶切后可见 235 bp 和 47 bp 2 个片段 (47 bp 片段由于较小显示不清), 纯合子 GG 基因型因有 2 个酶切位点, 酶切后有 158 bp、77 bp 和 47 bp 3 个片段, 杂合子 GA 基因型酶切后则有 235 bp、158 bp、77 bp 和 47 bp 4 个片段。PCR 产物经酶切后结果见图 1。

为验证 PCR-RFLP 方法的可靠性, 选取 3 号标本送上海生工进行测序, 测序结果与 PCR-RFLP 的结果

吻合。

2.2 Hardy-Weinburg 吻合度检验 病例组与对照人群的 rs12138592 A/G 基因型分布经 χ^2 检验均符合 Hardy-Weinburg 平衡, 表明两者的多态性位点的基因型分布在所研究的人群中已达到了遗传平衡 (病例组 $\chi^2=0.02$, $P>0.05$; 对照组 $\chi^2=0.54$, $P>0.05$)。



M: 50 bp DNA Marker; 1, 5: AA 基因型; 2, 6: GG 基因型; 3, 4: GA 基因型。

图 1 rs12138592 A/G 位点酶切产物电泳图

2.3 基因型频率和等位基因频率 病例组基因型频率分布 GG 为 77.8% (63/81), GA 为 21% (17/81), AA 为 1.2% (1/81); 而对照组 GG 为 62% (62/100), GA 为 35% (35/100), AA 为 3% (3/100), $\chi^2=5.213$, $P=0.022$ 。病例组 G、A 等位基因频率分别为 88.3% (143/162)、11.7% (19/162); 对照组 G、A 等位基因频率分别为 79.5% (159/200)、20.5% (41/200), $\chi^2=4.980$, $P=0.026$ 。

3 讨论

到目前为止, 帕金森病发病的确切机制尚未完全清楚, 普遍认为多个基因和环境因素以及它们之间复杂的相互作用在帕金森病的发病过程中起着重要的作用^[6]。有关研究已经发现 α -synuclein (PARK1)、Parkin (PARK2)、PINK1 (PARK6)、DJ-1 (PARK7)、LRRK2 (PARK8)、ATP13A2 (PARK9) 等基因突变与家族性帕金森病有关^[7]。帕金森病的病理标志是路易小体, 多种异常蛋白的聚集参与路易小体的形成, 由泛素介导的蛋白降解途径的功能受损被认为可能是帕金森病发病的共同分子机制, 这种途径即是泛素蛋白酶体系统 (UPS)。UPS 可选择性地降解细胞内错误折叠蛋白或其他突变蛋白, 是一条重要的非溶酶体降解途径, 它在多种与细胞周期性增殖及凋亡相关蛋白的降解中发挥重要作用^[8]。该途径也是一个被严格调控的可逆过程, 其中去泛素化酶的调节就是一个重要的环节。

USP24 是一种去泛素化酶, 通过裂解切断泛素链与底物蛋白之间的连接及泛素化链之间的连接, 使单

泛素分子从泛素化蛋白底物上或从蛋白酶体降解底物中脱离出来,从而防止多聚泛素在底物蛋白的聚集,使单泛素分子可以重新进入细胞内蛋白调节的循环中^[9]。USP24 的水解作用可以使游离单个泛素分子循环利用,通过调节其在细胞内的降解,稳定单个泛素分子的水平。USP24 突变后,其水解泛素分子间肽键的能力下降,影响异常蛋白质的清除,进而引起神经元变性。

近年来的研究表明,USP24 多态性与帕金森病的遗传易感性密切相关。Wu 等采取病例对照研究,对 517 例帕金森病患者和 518 例同一种群的健康人进行 USP24 rs487230C/T 多态性与帕金森病发病风险的相关性研究,发现在 60 岁以上的台湾人群中,USP24 rs487230 位点基因型和等位基因频率在帕金森病患者和对照组之间有显著性差异($P=0.035$),等位基因 T 和 CT/TT 基因型能够减少帕金森病的发病风险($P=0.020$),USP24 与帕金森病患病风险呈独立相关性($P=0.010$)^[5]。Li 等也证实 USP24 多个与疾病相关的单核苷酸多态性,其中,rs487230 C/T 位点与帕金森病的患病风险显著相关($P=0.0012$)^[4]。

越来越多的研究发现,内含子可能与基因表达的调控有关,对基因的表达起增强或抑制作用,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^[10];此外,一些基因的内含子突变会引起基因表达效应的变化。在本研究中,帕金森病患者 USP24 基因内含子 rs12138592 A/G 位点的 G 等位基因和 GG 基因型频率均高于正常对照组。这表明 rs12138592 A/G 的 G 等位基因和 GG 基因型与帕金森病密切相关,两者均可以增加中国粤西地区汉族人群帕金森病的患病风险。rs12138592 A/G 位于 USP24 基因第 9 内含子,内含子调节基因的功能主要通过影响启动子或增强子区域转录因子结合位点进行转录调控^[11],或通过剪接增强子或沉默子调节选择性剪接^[12-13],或通过微小 RNA 结合位点调节基因的功能^[14-15]。通过网络软件 FastSNP Search (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw/>) 和 SNPinfo Web Server (<http://snpinfonihs.nih.gov/cgi-bin/snpinfo/snpfunc.cgi>) 对 rs12138592 A/G 位点多态性进行分析,未发现相关功能。我们推测 rs12138592 A/G 多态位点与帕金森病的相关性可能是通过与其他功能性多态性位点呈连锁不平衡的作用,从而影响基因表达的调控而导致 USP24 去泛素化酶活性的改变,最终促进了帕金森病的发生。

由于本研究样本量有限,两者的相互关系,需要进一步研究,特别是大样本量的多中心研究来进一步明确。

[参考文献]

- [1] Kikuno R, Nagase T, Ishikawa K, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro[J]. DNA Res, 1999,6: 197-205.
- [2] Baek SH, Park KC, Lee JI, et al. A novel family of ubiquitin-specific proteases in chick skeletal muscle with distinct N- and C-terminal extensions[J]. Biochem J, 1998, 334 (Pt3): 677-684.
- [3] Oliveira SA, Li YJ, Nouredine MA, et al. Identification of risk and age-at-onset genes on chromosome 1p in Parkinson disease[J]. Am J Hum Genet, 2005,77:252-264.
- [4] Li Y, Schrodi S, Rowland C, et al. Genetic evidence for ubiquitin-specific proteases USP24 and USP40 as candidate genes for late-onset Parkinson disease[J]. Hum Mutat, 2006,27:1017-1023.
- [5] Wu YR, Chen CM, Chen YC, et al. Ubiquitin specific proteases USP24 and USP40 and ubiquitin thioesterase UCHL1 polymorphisms have synergic effect on the risk of Parkinson's disease among Taiwanese[J]. Clinica Chimica Acta, 2010,411:955-958.
- [6] Schapira AH. Etiology of Parkinson's disease[J]. Neurology, 2006, 66:S10-23.
- [7] Mizuno Y, Hattori N, Kubo S, et al. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008,363:2215-2227.
- [8] 谭玉燕,周海燕,陈生弟. 泛素蛋白酶体系统功能障碍与帕金森病[J]. 临床神经病学杂志, 2007,20(4):313-315.
- [9] 王素霞,刘媛,吴慧娟,等. 去泛素化酶的研究及其进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2008,24(6):734-737.
- [10] 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.
- [11] Prokunina L, Alarcón-Riquelme ME. Regulatory SNPs in complex diseases: their identification and functional validation[J]. Expert Rev Mol Med, 2004,1-15.
- [12] Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans[J]. Nature Genet, 2002, 32(4): 3266-3269.
- [13] Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1[J]. Nature Genet, 2002, 32(4): 30377-30384.
- [14] Carrington J, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development[J]. Science, 2003, 301(5631):336-338.
- [15] Griffiths-Jones S, Grocock R, van Dongen S, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34:D140.

(收稿日期:2010-11-25)