

湖南地区汉族人群 Per2 基因多态性与睡眠癫痫的相关性研究

李国良, 罗雅元, 刘杰, 厉含之

中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘要:目的 探讨 Per2C111G 基因多态性与中国湖南地区汉族人群睡眠癫痫的关系。方法 选取湖南地区汉族癫痫患者 300 例及健康对照组 100 例, 癫痫患者按好发时间分为觉醒癫痫组、不定期癫痫组、睡眠癫痫组。采用聚合酶链反应 (PCR) 和基因测序方法检测 Per2 基因 C111G 位点的多态性。结果 湖南地区汉族人群中, Per2 基因 C111G 多态位点的基因型频率分别为: CC 型 87.0%、CG 型 13.0%、GG 型 0.0%, 等位基因 C 和 G 频率分别为 93.5% 和 6.5%。癫痫组和对对照组间基因型及等位基因型频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 个癫痫亚组间基因型及等位基因型频率差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 Per2 基因 C111G 位点多态性可能与湖南地区汉族人群睡眠癫痫无关。

关键词: 睡眠癫痫; Per2 基因; 基因多态性

Association of Per2C111G gene polymorphisms with sleep-related epilepsy in a Han population of Hunan

Li Guo-Liang, LUO Ya-Yuan, LIU Jie, LI Hang-Zhi. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: Objective To investigate the association of Per2C111G gene polymorphisms with sleep-related epilepsy in a Han population in Hunan Province. **Methods** Three hundred Han epileptic patients and 100 healthy controls from Hunan Province were enrolled in the study. According to sleep/wake patterns of seizures, the epileptic patients were divided into 3 groups: sleep epilepsy, wakefulness epilepsy and aperiodic epilepsy. Per2C111G gene polymorphisms were investigated by polymerase chain reaction (PCR) and gene sequencing. **Results** The frequency of Per2 site C111G genotypes in the Han population in Hunan was 87.0% (CC), 13.0% (CG) and 0.0% (GG). C and G allele gene frequencies were 93.5% and 6.5% respectively. There were no significant differences in both the genotype frequency and allele frequency in Per2C111G between epileptic patients and controls. There were also no significant differences among 3 subgroups of epileptic patients ($P > 0.05$). **Conclusions** Per2C111G gene polymorphisms may not be associated with sleep-related epilepsy in the Han population of Hunan Province.

Key words: sleep-related epilepsy; Per2 gene; gene polymorphisms

癫痫发作易受睡眠觉醒周期的影响, 有学者因此提出按癫痫好发时间分为觉醒癫痫、不定期癫痫和睡眠癫痫^[1]。近年研究已肯定癫痫发作存在具有功能意义的昼夜生物节律性^[2]。哺乳动物调控昼夜节律的生物钟位于下丘脑视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN)。在哺乳动物中已克隆鉴定了 8 种生物钟相关基因^[3], 分别为 *perl*、*per2*、*per3*、*cry1*、*cry2*、*clock*、*bmal1* 和 *Tim*, 其中 Per2 基因 C111G 多态性位点与昼夜节律密切相关已得到证实^[4], Per2 基因变异与嗜酒患者睡眠障碍有关^[5]。

那么 Per2 基因是否与睡眠癫痫相关? 国内外尚未见研究报道。本研究通过对不同好发时间癫痫组与对照组 Per2 基因 C111G 基因型频率和等位基因频率进行分析, 旨在探讨湖南地区汉族人群睡眠癫痫与 Per2 基因 C111G 位点多态性之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例组 2009 年 3 月 ~ 2010 年 2 月在中南大学湘雅医院神经内科门诊就诊的癫痫患者, 共

收稿日期: 2012-04-12; 修回日期: 2012-06-01

作者简介: 李国良 (1962-), 男, 教授, 博士, 主要从事癫痫临床与基础研究。

300 例,其中男 173 例,女 127 例,将其按照好发时间分为 3 组:觉醒癫痫组 136 例,男 80 例,女 56 例,年龄 5 ~ 46 岁,平均年龄 22.99 ± 11.06 岁;不定期癫痫组 90 例,男 50 例,女 40 例,年龄 2 ~ 66 岁,平均年龄 23.98 ± 14.07 岁;睡眠癫痫组 74 例,男 43 例,女 31 例,年龄 5 ~ 72 岁,平均年龄 21.02 ± 11.89 岁。均为湖南地区汉族居民。癫痫发作及癫痫类型的诊断按照国际抗癫痫联盟 1981 年及 1989 年制定的标准。

1.1.2 健康对照组 为同期中南大学湘雅医院健康体检人员,共 100 例,其中男 55 例,女 45 例,年龄 5 ~ 64 岁,平均年龄 23.54 ± 12.09 岁,在性别、年龄组成上与病例组相比差异没有统计学意义,均为湖南地区汉族居民。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 抽取研究对象外周静脉血 5 ml,EDTA 抗凝,血样采集后采用常规酚/氯仿抽提法提取 DNA, -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 引物根据基因组序列用 Primer 5 软件设计,由上海英骏生物技术公司合成。引物序列为:上游 5' -AAGAGTCAAATGGGTGCT-3',下游为:5' -GCAATCAAATCACAGCAGA-3'。扩增片段长度为 415 bp。PCR 反应体系 40 μ l, ddH₂O 14 μ l, 2 \times Taq PCR MasterMix 20 μ l, 正反引物各 1 μ l, gDNA4 μ l。PCR 反应条件:93℃ 预变性 5 min, 93℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 循环 30 周期后再 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,在紫外灯下观察结果,经凝胶图像分析系统照像分析。

1.2.3 基因测序 PCR 扩增送南京金斯瑞生物

科技有限公司测序。

1.3 统计方法

采用 SPSS 17.0 软件包统计学处理。按 Hardy-Weinberg 平衡法检测样本代表性。通过直接计数对 SNP 位点等位基因频率和基因型的分布进行计算。计量资料的主要统计指标均进行正态性检验,正态分布的各统计指标均以均数 \pm 标准差表示。计量资料的组间比较用两个独立样本 *t* 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验。双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Per2 基因 C111G 位点 PCR 扩增产物检测

如图 1 所示,扩增片段长度为 415 bp。

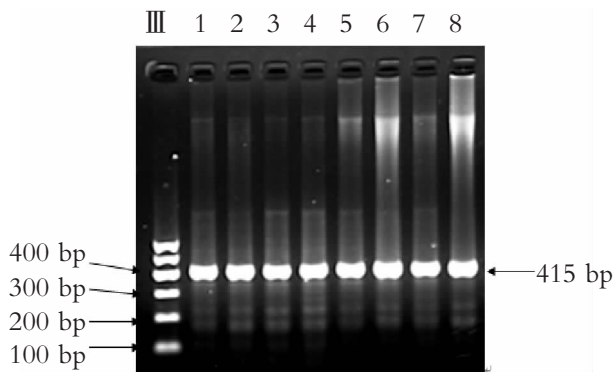


图 1 Per2 基因 C111G 位点 PCR 扩增产物检测。M: DNA marker; 1 ~ 8 泳道: Per2 基因 C111G 位点 PCR 扩增产物

2.2 Per2 基因 C111G 位点 PCR 扩增产物测序

如图 2、3 所示,由图中箭头所示,可知多态性位点 C \rightarrow G。

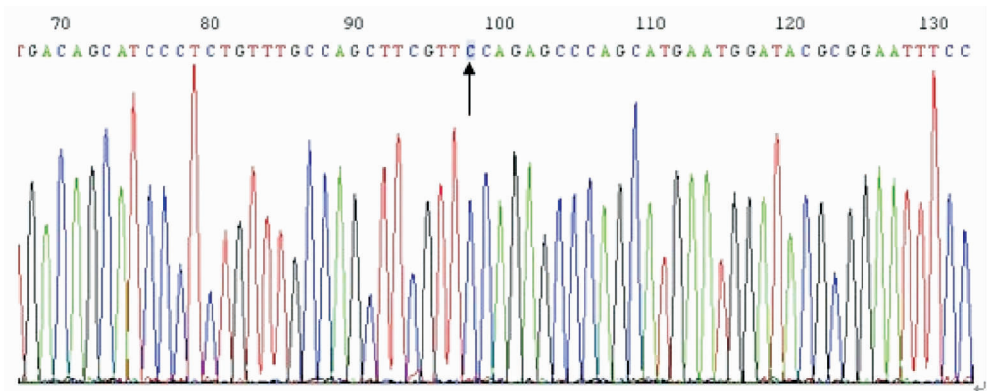


图 2 Per2 基因 C111G 位点测序图。箭头所示为多态性位点 C。

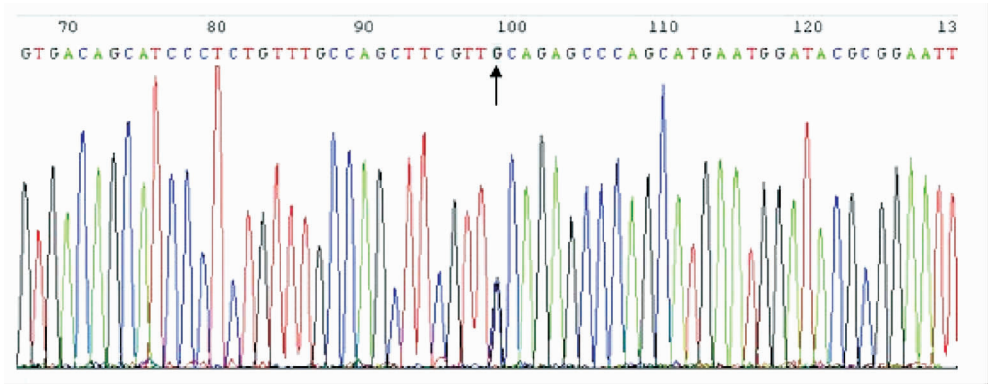


图3 Per2 基因 C111G 位点测序图。箭头所示为多态性位点 C→G。

2.3 Per2 C111G 基因型、等位基因频率比较

经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,所有基因型和等位基因在病例组与对照组中分布符合遗传平衡($P>0.05$),说明该研究人群具有群体代表性。对

病例组和对照组的 Per2 C111G 位点基因型及等位基因分布进行适合度检验如表 1 所示, P 均 >0.05 ,差异无统计学意义。

表1 病例组及对照组 Per2 C111G 基因型及等位基因频率比较 [n(%)]

组别	例数	基因型			等位基因频率	
		CC	CG	GG	C	G
觉醒癫痫组	136	115(83.6)	21(15.4)	0(0)	251(92.3)	21(7.7)
不定期癫痫组	90	77(85.6)	13(14.4)	0(0)	167(92.8)	13(7.2)
睡眠癫痫组	74	61(82.4)	13(17.6)	0(0)	135(91.2)	13(8.8)
对照组	100	87(87)	13(13)	0(0)	187(93.5)	13(6.5)

注:病例组与对照组四组间基因型比较, $\chi^2=0.739,P=0.864$;病例组与对照组四组间基因频率比较, $\chi^2=0.679,P=0.878$ 。

2.4 中国湖南地区汉族人群 Per2 C111G 多态性的分布(见表2)

表2 中国湖南汉族人群与其他地区健康人群 Per2 C111G 位点多态分布的比较 [n(%)]

分组	例数	基因型			等位基因频率	
		CC	CG	GG	C	G
中国湖南汉族人群	100	87(87.0)	13(13.0)	0(0)	187(93.5)	13(6.5)
欧洲人群	120	102(85.0)	18(15.0)	0(0)	222(92.5)	18(7.5)
亚洲人群	90	78(86.7)	12(13.3)	0(0)	158(93.3)	12(6.7)
南非人群	120	98(81.7)	20(16.7)	2(1.7)	216(90.0)	24(10.0)

注:与欧洲人群相比: $\chi^2=0.180,P=0.671$,差异无统计学意义。与亚洲人群相比: $\chi^2=0.005,P=0.946$,差异无统计学意义。与南非人群相比: $\chi^2=2.340,P=0.310$,差异无统计学意义,南非人群存在 GG 基因型。

3 讨论

目前对睡眠相关的基因研究方兴未艾,研究最多也最充分的是昼夜节律基因,即最先在果蝇中发现的 Per 基因。研究证实,Per 基因是果蝇的主控基因,影响昼夜节律。Per 基因经转录和翻译后,形成 Per 蛋白,组成生物钟的反馈回路,并作为负性成分发挥作用^[6]。在人类的研究发现,早起和晚睡的人群中,Per2 C111G 位点等位基因突变频率明显高于作息时间规律的人群,提示了 Per2 C111G 位点与昼夜节律存在关联^[7]。

尽管睡眠与癫痫的关系研究较多,但主要集中在脑电生理方面^[8-10],业已证明癫痫发作及痫样放电主要出现于非快速眼动期睡眠(nonrapid eye movement sleep,NREM)期,尤其多见于 NREM 1,2 期。Loddenkemper 等^[9]对 380 例小儿不同类型癫痫随访 2 年的视频脑电图资料进行分析,发现全面性发作和颞叶癫痫常发生在觉醒状态,而额叶和顶叶癫痫发作常发生在睡眠中。Zarowski 等^[10]对 360 例全面性癫痫患儿随访 5 年的视频脑电图资料进行分析发现,强直和强直一阵挛发作更常发生在睡眠

中,而其他发作类型的全面性发作更常发生在觉醒状态。认识癫痫的昼夜节律模型对了解癫痫的病理生理机制大有帮助^[9,10]。但迄今对癫痫发作的昼夜节律性相关机制研究甚少。随着遗传学技术的发展,与某些特定睡眠觉醒期癫痫相关的基因相继被发现,如编码 nAChRs 亚基(α_4 和 β_2)的两种基因(CHRNA4 和 CHRNA2)突变被认为与常染色体显性遗传的夜间额叶癫痫有关^[11]。Cl-通道基因 CLCN2 被认为与觉醒时全身强直一阵挛性发作癫痫有关^[12]。这些与睡眠觉醒发作相关的单基因病的发现极大地促进了对癫痫及睡眠癫痫的认识,但尚不足以解释癫痫发作的昼夜倾向性。那么,这一时间发作特性是否统一受某一生物钟基因的调控呢?与昼夜节律关系密切的 Per2 基因是否是这一候选基因?本研究选择 Per2 中与昼夜节律关联密切的 C111G 多态位点为突破口,以期了解和发现 Per2 多态位点与睡眠相关癫痫易感的关联。以中国湖南地区汉族人群为研究对象,采用 PCR 扩增和基因测序的方法测定其 Per2 C111G 基因型,发现中国湖南地区汉族人群存在 Per2 C111G 多态性,其中以 CC 基因型最多见,并未发现 GG 基因型的存在。本实验发现病例组与对照组比较及 3 组病例组之间的比较,各组间 Per2 C111G 基因型分布和等位基因频率差异无统计学意义,因此尚不能推断 Per2 C111G 多态性与湖南汉族人群睡眠癫痫之间的相关性。尽管得出阴性结果,但尚不能排除其他生物钟基因与睡眠癫痫的相关性。因此,有必要扩大样本数并对其他生物钟相关基因作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 沈鼎烈. 临床癫痫学. 上海: 上海科学技术出版社, 1994, 72-77.
- [2] Matzen J, Buchheim K, Holtkamp M. Circadian dentate gyrus excitability in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*, 2012, 234(1): 105-111.
- [3] King DP, Takahashi JS. Molecular genetics of circadian rhythms in mammalian. *Annu Rev Neurosci*, 2000, 23: 713-742.
- [4] Kavcic P, Rojc B, Dolenc-Groselj L, et al. The impact of sleep deprivation and nighttime light exposure on clock gene expression in humans. *Croat Med J*, 2011, 52(5): 594-603.
- [5] Comasco E, Nordquist N, Göktürk C, et al. The clock gene PER2 and sleep problems: association with alcohol consumption among Swedish adolescents. *Ups J Med Sci*, 2010, 115(1): 41-48.
- [6] Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 2000, 288(5468): 1013-1019.
- [7] Carpen JD, Archer SN, Skene DJ, et al. A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the hPER2 gene is associated with diurnal preference. *Sleep Res*, 2005, 14(3): 293-297.
- [8] 高伟, 吴立文. 频繁的临床下癫痫样放电对睡眠结构的影响. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2008, 35(5): 403-406.
- [9] Loddenkemper T, Vendrame M, Zarowski M, et al. Circadian patterns of pediatric seizures. *Neurology*, 2011, 76(2): 145-153.
- [10] Zarowski M, Loddenkemper T, Vendrame M, et al. Circadian distribution and sleep/wake patterns of generalized seizures in children. *Epilepsia*, 2011, 52(6): 1076-1083.
- [11] Rodrigues-Pinguet N, Jia L, Li M, et al. Five ADNFLE mutation reduce the Ca^{2+} dependence of the mammalian $4\beta 2$ acetylcholine response. *J Physiol*, 2003, 550(Pt 1): 11-26.
- [12] Hang K, Wamstedt M, Alekov AK, et al. Mutations in CLCN2 encoding a voltage gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet*, 2003, 33(4): 527-532.