

散发性早发帕金森病 parkin 基因 1、2 号外显子突变的研究

徐严明, 刘焯霖, 陈彪, 陶恩祥, 陈国俊, 黎锦如

(中山医科大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】研究 parkin 基因 1、2 号外显子突变与散发性早发帕金森病发病的关系。【方法】应用聚合酶链反应(PCR)、琼脂糖凝胶电泳和单链构象多态性(SSCP)方法检测 52 例散发性早发帕金森病患者外周血白细胞 DNA 的 parkin 基因 1、2 号外显子突变情况, 并对 SSCP 有异常泳动外显子进行 DNA 测序。【结果】发现 1 例病人(1.9%)存在 parkin 基因 2 号外显子缺失, 2 例病人(3.8%)分别存在 parkin 基因 1、2 号外显子 PCR 产物 SSCP 发生泳动变位, 测序发现 1 号外显子为杂合突变(T₁₀₃C), 2 号外显子为纯合突变(G₂₃₇C)。【结论】 parkin 基因 1、2 号外显子突变可能与部分散发性早发帕金森病发病有关。

关键词: 帕金森病; 基因; 突变; 多态现象, 单链构象

中图分类号: R742 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)03-0209-03

Mutation Detection on Exon 1 and 2 of Parkin Gene in Sporadic Early-onset Parkinson's Disease

XU Yan-ming, LIU Zhuo-lin, CHEN Biao, TAO En-xiang, CHEN Guo-jun, LI Jin-ru

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To study the relationship between mutations on exon 1, 2 of parkin gene and sporadic early-onset Parkinson's disease. 【Methods】 The deletion and single strand mobility shift on exon 1 and 2 of parkin gene in peripheral white blood cell DNA were detected by using PCR, agarose electrophoresis, and SSCP techniques in 52 patients with sporadic early-onset (onset age ≤ 50) Parkinson's disease. The exons with mobility shift on SSCP were sequenced. 【Results】 One deletion(1.9%) of exon 2, 2 cases with single strand mobility shift(3.8%) on exon 1 and exon 2 respectively, one heterozygous mutation (T₁₀₃C) on exon 1 and one homozygous mutation (G₂₃₇C) on exon 2 were found by sequencing. 【Conclusion】 Mutations on exon 1 and 2 of parkin gene are likely to be related to sporadic early-onset Parkinson's disease.

Key words: Parkinson's disease; gene; mutation; polymorphism, single-stranded conformation

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是老年人中常见的神经变性疾病, 据估计, 55 岁以上人群中患病率为 1%, 但迄今为止, 病因尚不清楚。1998 年 Kitada^[1] 等发现并克隆了常染色体隐性遗传的青少年型帕金森综合症(autosomal recessive juvenile parkinsonism, AR-JP)的致病基因—parkin 基因, 并发现此基因外显子的缺失, 随后新的缺失及

点突变在欧洲相继被发现^[2]。这些研究对于了解帕金森病病因具有重要意义, 成为当前研究的热点。目前, 散发性早发帕金森病(sporadic early-onset Parkinson's disease, sEOPD)与 parkin 基因突变的研究尚少见报道。我们应用聚合酶链反应(PCR)、琼脂糖电泳和单链构象多态性(SSCP)方法检测 sEOPD 病人 parkin 基因 1、2 号外显子突变情况, 以帮助了

收稿日期: 2000-10-13

基金项目: 国家卫生部临床重点学科基金资助项目(97040229); 211 工程基金资助项目([1999] 98119)

作者简介: 徐严明(1972-), 男, 山东青岛人, 博士生, 陈彪, 美国帕金森病研究所; 陶恩祥, 中山医科大学孙逸仙纪念医院神经科。

解 parkin 基因突变与 sEOPD 发病的关系。

1 资料与方法

1.1 资料

52 例 sEOPD 病人均来自中山医科大学附属第一医院神经科帕金森病专科门诊。PD 按照国际上广泛采用的 CAPIT 标准^[3] 诊断。sEOPD 发病年龄要求 ≤ 50 岁, 其中男性 28 例, 女性 24 例, 年龄 46~53 岁(平均 51.2 岁), 发病年龄 38~50 岁(平均 44.4 岁), 父母非近亲结婚, 家族中无类似 PD 患者。

对照组: 10 例正常对照, 来自门诊健康查体人员, 排除肿瘤及神经系统疾病, 无神经系统遗传病家族史, 年龄 28~50 岁, 平均 43.2 岁。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增及外显子缺失检测 常规酚/氯仿法抽提新鲜静脉血基因组 DNA。1 号、2 号引物序列参照文献^[1] 由 Sagon 合成。25 μ L PCR 反应体系含 0.5~1 μ L DNA 样品, 2 mmol/L dNTP 2.5 μ L, 两条 20 pmol/L 引物各 1 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, Taq 酶 1 U, 加去离子双蒸水至 25 μ L。PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min; 之后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 71 $^{\circ}$ C/58 $^{\circ}$ C(1 号外显子/2 号外显子)30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min。发现有外显子缺失的标本, 以 β -actin 为内对照, 与内对照引物共同扩增, 证实缺失。15 g/L 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色, 紫外灯下观察 PCR 产物, DNA 质量标准为 pBR322 DNA/ Msp I (华美生物工程公司)。

1.2.2 SSCP ①含 50 mL/L 甘油的 80 g/L 聚丙烯酰胺凝胶在 220 V (6.6 V/cm) 恒压 26 mA 恒流条件下预电泳 30 min。②PCR 产物 5 μ L 加 10 μ L 载样液(体积浓度 950 g/L 的去离子甲酰胺, 20 mmol/L EDTA, 0.25 g/L 溴酚蓝, 0.25 g/L 二甲苯酚), 在 98 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 冰浴 10 min 后上样。③220 V 恒压 26 mA 恒流条件下电泳 5 h(1 号外显子)/14 h(2 号外显子)。取胶, 固定、银染、显色、摄影。

1.2.3 DNA 测序 PE377 DNA 测序仪对有单链泳动变位的外显子进行正反双向测序。

2 结果

2.1 parkin 基因 1、2 号外显子缺失琼脂糖电泳结果

52 例 sEOPD 及 10 例正常对照基因组 DNA parkin 基因 1 号外显子扩增, 均获得长 112 bp 的特异性扩增带, 1 号外显子未见缺失。正常对照及 51 例 sEOPD 获得 2 号外显子长 308 bp 的特异性扩增带, 1 例病人(代号为 A22, 1.9%) parkin 基因 2 号外显子纯合子缺失, 如图 1 所示。



图 1 parkin 基因 2 号外显子缺失琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 1 Agarose electrophoresis on deletion of exon 2 of parkin gene

Lane 1, Marker; Lane 2, no template DNA; Lane 3, sEOPD with deletion on exon 2; Lane 4, sEOPD with no deletion on exon 2; Lane 5, normal control

2.2 PCR-SSCP 结果

SSCP 分析发现, 1 例病人(代号为 A119, 1.9%) 1 号外显子有单链泳动变位, 具体表现两条单链前多了 1 条异常单链泳动带, SSCP 结果如图 2 所示; 1 例病人(代号为 A35, 1.9%) 2 号外显子有单链泳动变位, 具体表现为两条单链中有 1 条变慢的异常泳带, 因 DNA 单链构象改变而导致泳动变位, 其互补碱基序列虽有改变, 但构象无改变, 故与正常等位基因单链迁移率一致。SSCP 结果如图 3 所示。

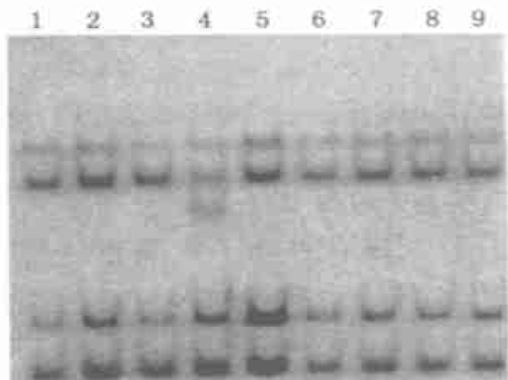


图 2 parkin 基因 1 号外显子 SSCP 电泳图

Fig. 2 SSCP on exon 1 of parkin gene

Lane 1~3, normal control; Lane 4, sEOPD with single strand mobility shift; Lane 5~9, sEOPD with no single strand mobility shift

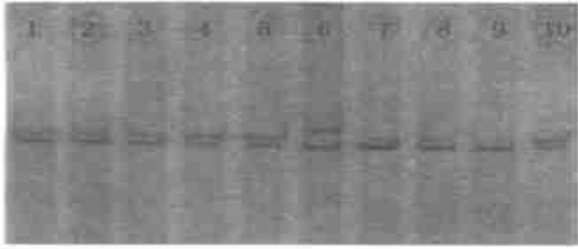


图3 parkin 基因 2 号外显子 SSCP 电泳图

Fig. 3 SSCP on exon 2 of parkin gene

Lane 1~5, normal control; Lane 6, sEOPD with single strand mobility shift; Lane 7~10, sEOPD with no single strand mobility shift

2.3 DNA 测序结果

有单链泳动变位的 1 号外显子测序发现一杂合突变(T₁₀₃C),如图 4 所示;有单链泳动变位的 2 号外显子测序发现一杂合突变(G₂₃₇C),如图 5 所示。

3 讨论

我们研究发现了中国 sEOPD 病人存在 parkin 基因 2 号外显子的纯合子缺失,这与 Ujike 等^[4]对散发性青年型帕金森病的研究结果相一致;而与 Kruger 等^[5]研究结果不一致,可能与下列因素有关:①Ujike 等研究对象为散发性青年型帕金森病人,发病年龄在 40 岁以前, Kruger 等研究对象发病年龄较晚(平均 46.42 岁),年龄范围较宽(22~55 岁),我们研究的对象发病年龄居于其中;②Ujike 等研究对象为日本人, Kruger 等研究对象为欧洲人,而我们研究对象为中国人,人种与地域差异可能有一定的影响;③Ujike 等检测了 1~12 号外显子, Kruger 等检测了 2、4 号外显子,我们检测了 1、2 号外显子,这可能导致缺失阳性率的差异。

我们研究首次发现 sEOPD 存在 1、2 号外显子点突变。1 号外显子杂合性突变(T₁₀₃C)为 mRNA 起始密码子 AUG 中对应的 T 碱基,突变使起始密码子 AUG 变成 ACG,导致蛋白翻译障碍(截短或无)。尽管是杂合突变,可以以另一条 DNA 为模板进行转录翻译,但蛋白合成量可能受到影响,从而促使疾病发生。2 号外显子纯合性突变(G₂₃₇C)为一错义突变,使 46 位氨基酸由丙氨酸(A)变成脯氨酸(P),可能影响 Parkin 二级结构,从而对其功能造成影响。我们研究与 Abbas 等^[6]、Hattori 等^[7]在家族性 EOPD 研究结果一致,这些突变改变

了 Parkin 结构,影响其功能,从而对 EOPD 发病造成影响^[8],可能在 AR-JP 病人大脑黑质神经元的选择性变性中发挥作用。

目前, Parkin 蛋白功能尚不完全清楚, parkin 基因突变如何导致黑质神经元变性的具体机制有待进一步研究。我们的研究发现 sEOPD 病人存在 parkin 基因 2 号外显子缺失及 1、2 号外显子点突变,这些都可能与发病有关。本研究对于理解帕金森病发病机制及明确诊断具有重要意义。在尽可能大的范围内进行家族性及散发性 EOPD 的 parkin 基因突变及 Parkin 蛋白功能研究,将是今后研究的重点。

(本文图 4、5 见封 3)

参考文献:

- [1] Kitada T, Asakawa S, Hattori N, *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism [J]. *Nature*, 1998, 392(6676): 605.
- [2] 徐严明, 刘焯霖. 帕金森病的致病基因[J]. *国外医学神经病学神经外科学分册*, 2000, 27(4): 177.
- [3] Langston J W, Widner H, Goetz C G, *et al.* Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT) [J]. *Mov Dis*, 1992, 7(1): 2.
- [4] Ujike H, Yamamoto M, Yamaguchi K, *et al.* Two cases of sporadic juvenile Parkinson's disease caused by homozygous deletion of parkin gene [J]. *No To Shinkei*, 1999, 51(12): 1061.
- [5] Kruger R, Vieira-Sacker A M M, Kuhn W, *et al.* Analysis of the parkin deletion in sporadic and familial Parkinson's disease [J]. *J Neural Transm*, 1999, 106(2): 159.
- [6] Abbas N, Lucking C B, Ricard S, *et al.* A wide variety of mutation in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(4): 567.
- [7] Hattori N, Matsumine H, Asakawa S, *et al.* Point mutations (Thr204Arg and Ala311stop) in the parkin gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249(3): 754.
- [8] Hattori N, Kitada T, Matsumine H, *et al.* Molecular genetic analysis of a novel parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile Parkinsonism; evidence for variable homozygous deletions in the parkin gene in affected individuals [J]. *Ann Neurol*, 1998, 44(6): 935.

(编辑 刘清海)

p38MAPK 抑制剂通过抑制 JNK 活性抑制培养的小脑颗粒神经元凋亡 (正文见第 165 页)

An Inhibitor of p38 MAPK Prevents Apoptosis of Cultured Cerebellar Granule Neurons via Inhibiting the Activity of JNK (Text in page 165)

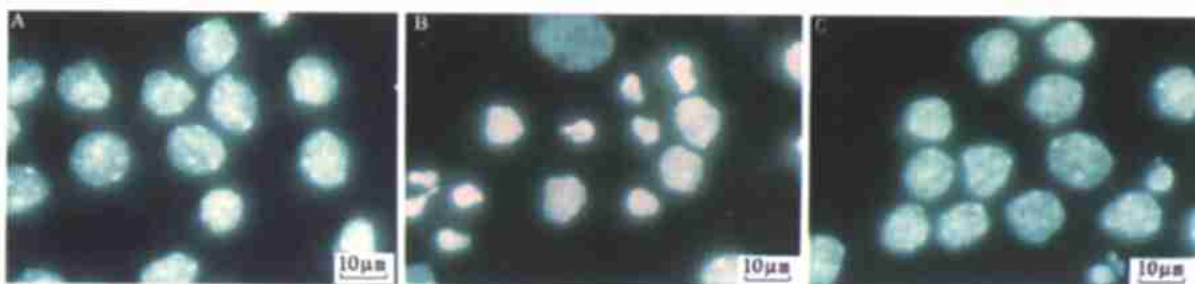


图 1 低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡的形态学特征

Fig. 1 Morphological features of apoptosis induced by low potassium in cultured cerebellar granule neurons

Note the typical apoptotic morphology: nuclear condensation and heterochromatin clumping in neurons in B, but not in A and C. Black arrow, apoptotic neurons (Hoechst 33258 stained, $\times 1000$)



图 4 经 cLK 处理的小脑颗粒神经元中 c - Jun 磷酸化

Fig. 4 c - Jun becomes phosphorylated after cerebellar granule neurons were treated by cLK

Cerebellar granule neurons cultured on glass coverslips were maintained in serum - free medium. (A) control, in cLK medium for 24 h; (B) in cLK medium for 24 h. Nuclear phospho - c - Jun staining was clearly visible; (C) treated with SB203580 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in cLK medium for 24 h (phospho - c - Jun - specific antibody and FITC stained, $\times 1000$)

散发性早发帕金森病 parkin 基因 1、2 号外显子突变的研究 (正文见第 209 页)

Mutation Detection on Exon 1 and 2 of Parkin Gene in Sporadic Early - onset Parkinson's Disease (Text in page 209)

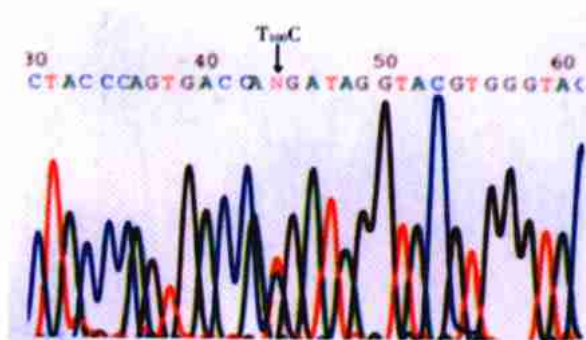


图 4 1 号外显子突变测序图

Fig. 4 Mutation sequencing map of exon 1

↓ : mutation position

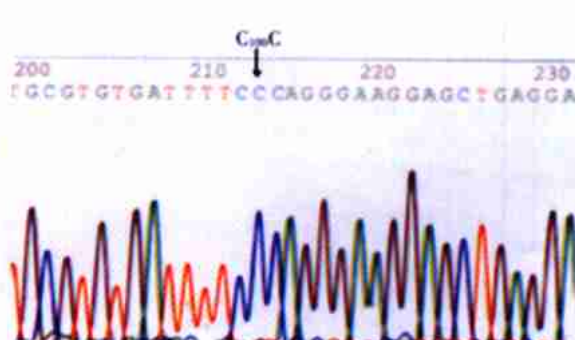


图 5 2 号外显子突变测序图

Fig. 5 Mutation sequencing map of exon 2

↓ : mutation position