



中国人群原发性不宁腿综合征新风险基因的相关性研究

黄雷¹, 陈捷², 黄豫萌², 王佩², 马建芳²

摘要: 目的 研究中国人群中新风险基因的主要单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNPs)是否与不宁腿综合征(Restless legs syndrome/William-Ekbom disease, RLS/WED)的发病风险相关。方法 本次研究共纳入了184例RLS/WED患者和230例健康对照者。采用聚合链反应和测序技术检测了19个基因中的20个单核苷酸多态位点。结果 在被检测的20个主要SNPs中,位于MYT1基因上的rs365032的等位基因G在RLS/WED患者组出现频率高于对照($OR=1.36, P=0.032$),并在经过性别与年龄校正后的显性模型(GG/GA和AA)中显示与RLS/WED发生风险相关($OR=1.77, P=0.009$)。但是所有的差异经Bonferroni校正后无统计学意义。结论 我们的研究并没有在中国人群中复刻出19个风险基因的主要SNPs与RLS/WED发病风险的联系。未来还需要大规模的全外显子测序,甚至全基因组测序来探寻中国人群中的19个风险基因的潜在致病突变。

关键词: 不宁腿综合征; 基因相关性研究; 单核苷酸多态性

中图分类号:R742;R338.63 文献标识码:A

Association Study Of Novel Risk Loci For Restless Legs Syndrome In Chinese Population HUANG Lei, CHEN Jie, HUANG Yumeng, et al. (Wuliqiao Community Health Center, Huangpu District, Shanghai 200023, China)

Abstract: Objective We aimed to examine whether lead single nucleotide polymorphism(SNPs) within novel risk loci were associated with the risk for RLS in Chinese population. **Methods** A total of 184 RLS patients and 230 controls were enrolled in this study. Polymer chain reaction(PCR) and sequencing were used to detect 20 lead single nucleotide polymorphisms within 19 genetic loci. **Results** Among the 20 selected lead SNPs, the frequency of the rs365032G allele localized in MYT1 gene was higher in RLS patients($OR=1.36, P=0.032$) and contributed to the risk of RLS in the dominant model(GG and GA vs AA) after adjustment for age and sex($OR=1.77, P=0.009$). However, none of these were survived after Bonferroni correction. **Conclusion** Our study failed to replicate the association between lead SNPs identified in 19 genomic risk loci with RLS in Chinese population. Large-scale whole-exome sequences, or even whole-genome sequencing studies, are certainly needed in the future to investigate possible causative variants across 19 risk loci.

Key words: Restless legs syndrome; Genetic association study; Single nucleotide polymorphism

不宁腿综合征(Restless legs syndrome/William-Ekbom disease, RLS/WED)是一种神经系统疾病,其特征是患者出现想要活动双腿的强烈冲动,伴或不伴有腿部感觉不适^[1,2]。这种症状主要出现在平卧或静坐等休息状态,主要在夜间出现或夜间症状更明显,持续行走可以缓解,可导致失眠影响患者生活质量^[3]。研究表明欧洲和北美的成年人群的RLS/WED患病率为1.9%~4.6%^[4],然而亚洲国家RLS/WED患病率显著下降(约0.1%~3.9%)^[5~9]。此外,RLS/WED症状更易出现在铁缺乏、肾功能不全、心血管疾病、糖尿病或偏头痛人群中^[10]。目前多巴胺能药物是最有效的治疗药物,但长期服用多巴胺能药物可能导致严重的副反应,如症状加重现象^[11]。

RLS/WED是一种复杂的疾病,环境和遗传因素都可影响其表型,但其发病机制目前仍未明确,遗传学研究为潜在发病机制提供了线索^[12]。迄今为止,全基因组测序(Genome-Wide Association Study, GWAS)已经发现了6个风险基因点与不宁腿综合征相关,包括MEIS1、BTBD9、PTPRD、MAP2K5/

SKOR1、TOX3和Intergenic region of 2p14^[13~16]。近期,一个纳入了3个全基因组相关性研究的荟萃分析证实了之前报道的6个风险基因并发现了13个新的风险基因^[17]。我们的团队之前报道过中国人群中BTBD9和MAP2K5/SKOR1与RLS/WED的联系^[18]。本次研究,我们选取了荟萃分析中发现的19个风险基因中的20个主要SNPs,研究其在中国人群中是否与RLS/WED发病风险相关。

1 资料与方法

1.1 资料 研究人群:所有RLS/WED患者均在门诊招募,临床症状符合国际不安腿综合征研究组(International RLS study Group Rating Scale,

收稿日期:2020-03-20;修订日期:2021-05-05

基金项目:国家重点研发计划项目(No. 2016YFC1306000)

作者单位:(1.上海市黄浦区五里桥街道社区卫生服务中心,上海200023;2.上海交通大学医学院附属瑞金医院神经内科,上海200025)

通讯作者:马建芳, E-mail: mjf10924@rjh.com.cn

IRLSSG)的诊断标准^[3],排除了继发性 RLS/WED,包括继发于帕金森病、周围神经病、肾功能不全、缺铁、妊娠、肌痛和静脉血粘滞等。缺铁的判断标准为血清铁蛋白 < 30 ng/ml。IRLSSG 评分量表用于评估 RLS/WED 的严重程度^[19]。我们同时收集了 RLS/WED 患者的家族史。对照人群是在社区招募,拥有相同种族背景的人群,所有人都接受了完整的神经系统检查,排除了系统性疾病,震颤和其他运动障碍,并通过了 RLS/WED 排除标准的评估且没有 RLS/WED 家族史。该研究得到上海交通大学医学院附属瑞金医院伦理委员会的批准。所有参与者均签署了知情同意书。

1.2 方法 DNA 制备和基因分型:从患者组和对照组中每人收集 2ml 血液,采用苯酚-氯仿-异丙醇法提取 DNA^[20]。我们选择了 Schormair 等的荟萃分析中报道的具有显著性的 20 个主要单核苷酸多态性(包括 rs12046503,rs10208712,rs113851554,rs1820989,rs80319144,rs1848460,rs35987657,rs17636328,rs61192259,rs10952927,rs1836229,rs62535767,rs340561,rs996064,rs111652004,rs868036,rs45544231,rs12450895,rs12962305,rs365032)^[17]。其中的 7 个 SNPs (rs12046503,rs1848460,rs61192259,rs10952927,rs62535767,rs340561,rs12450895)采用了 Sanger 测序法进行基因分型。其他 13 个 SNPs 采用 SNaPshot 多重单碱基延伸 SNP 分型技术(Multiplex SNaPshot)进行基因分型。PCR 产物采用磷酸化酶(FastAP)和核酸外切酶 I(EXO I)纯化,用 ABI SNaPshot 多重分析试剂盒延长。延长产物采用磷酸化酶(FastAP)纯化并负载至 ABI3730xl。SNP 的基因分型使用 GeneMapper 4.0(Applied Biosystems)进行分析。

统计分析:使用 SAS(9.4 TS1 M2 版本;SAS Institute Inc,Cary,NC)软件包进行统计分析。Wilcoxon 秩和检验用于比较 RLS/WED 患者和非 RLS/WED 对照之间的年龄差异。卡方检验用来比较组与组之间的性别构成比以及在总研究人群中的哈温平衡,所有 SNPs 的等位基因频率也通过卡方检验进行比较。我们评估了经性别和年龄校正后的显

性模型,隐性模型和加性模型。采用 logistic 回归进行基因型关联分析,计算出每个 SNP 的比值比(odds ratio,OR)和 95% 的置信区间(confidence intervals,CI)。R 语言(版本 3.3.1)用于通过 Bonferroni 方法校正 P 值。运用 Power and Sample Size Calculations(version 3.1.2)来计算检验效能^[21,22]。遗传功效是基于本研究中患者和对照人群的实际等位基因频率。

2 结果

本次研究总共纳入了 184 例原发性 RLS/WED 患者和 230 例健康对照。人口学资料显示,RLS/WED 患者与对照组之间在年龄和性别上无统计学差异。31.6% 的患者有 RLS/WED 家族史。在 RLS/WED 患者组,IRLSSG 评分量表的平均分为(20.42 ± 4.71),平均铁蛋白水平为(140.76 ± 84.20) ng/ml(见表 1)。

在检测的 20 个 SNPs 中,有 3 个对照组的 SNPs (rs1836229,rs996064,rs12450895)不符合哈迪-温伯格平衡,2 个 SNPs (rs10208712,rs113851554)未见基因的多态变化。因此只有 15 个 SNPs 被纳入最终的数据分析。所有的 SNPs 漏检率都小于 3.5%。研究中我们发现 RLS/WED 患者的 rs365032 等位基因 G 出现频率高于对照组(OR = 1.36, P = 0.032)(见表 2)。在经年龄和性别校正后的显性模型中,rs365032 的基因型 GG 型和 GA 型相对于 AA 型(显性模型)在 RLS/WED 患者中较高(OR = 1.77, P = 0.009)(见表 3)。但是经 Bonferroni 方法校正后所有的差异均无统计学意义。其他 SNPs 的基因型或等位基因突变频率也未发现有显著差异。

另外,为了确定这 20 个与 RLS/WED 相关的 SNPs 是否与性别有关,我们根据性别做了进一步的亚组分析。在女性组,RLS/WED 患者的 rs868036 的等位基因 T 频率高于对照组(OR = 1.56, P = 0.021)。在男性组,经过年龄校正的加性模型显示 rs10952927 存在等位基因剂量效应(OR = 1.65, P = 0.036)。但是 Bonferroni 校正后所有差异无统计学意义。

表 1 病例和对照的人口统计信息

| | RLS/WED 患者(n = 184) | 对照组(n = 230) | P |
|----------------------------------|---------------------|--------------|-------|
| 性别,女性,n(%) | 102(55.43) | 122(53.04) | 0.628 |
| 年龄,平均数(SD),岁 | 61.40(16.48) | 62.82(21.15) | 0.186 |
| 家族史,是(%) | 31.6 | - | - |
| RLS/WED 严重度,平均数(SD) ^a | 20.42(4.71) | - | - |
| 铁蛋白水平,平均值(SD)(ng/ml) | 140.76(84.20) | - | - |

RLS/WED:不宁腿综合征;a:由国际 RLS/WED 研究小组(IRLSSG)评级量表评估

表 2 20 个 SNPs 位点与 RLS 风险关联分析

| SNP | 基因 | MAF (病例/对照) | 等位基因 | | | 研究效率 |
|-------------|----------------------------|----------------|------|-----------------|-------|-------|
| | | | 风险位点 | OR(95% CI) | P | |
| rs12046503 | PRMT6, NTNG1 | 0.46/0.48 | C | 1.26(0.96,1.66) | 0.099 | 0.116 |
| rs10208712 | DCDC2C | - | - | - | - | - |
| rs113851554 | MEIS1 | - | - | - | - | - |
| rs1820989 | MEIS1, C1D, APLF | 0.39/0.42 | A | 0.88(0.67,1.17) | 0.385 | 0.095 |
| rs80319144 | CCDC148, PKP4, TANC1 | 0.12/0.11 | C | 0.90(0.58,1.39) | 0.639 | 0.081 |
| rs1848460 | CNTN4, CRBN, LRRN1 | 0.24/0.22 | T | 1.10(0.79,1.52) | 0.576 | 0.076 |
| rs35987657 | ATP2C1, ASTE1 | 0.26/0.32 | A | 1.30(0.96,1.77) | 0.087 | 0.127 |
| rs17636328 | RNF8, CCDC167, MDGA1 | 0.15/0.16 | A | 1.11(0.76,1.62) | 0.593 | 0.08 |
| rs61192259 | BTBD9, GLO1 | 0.07/0.05 | A | 1.46(0.80,2.69) | 0.219 | 0.386 |
| rs10952927 | ADAM2, STEAP4, ZNF804B | 0.46/0.49 | G | 1.20(0.91,1.58) | 0.2 | 0.119 |
| rs1836229 | PTPRD | - | - | - | - | - |
| rs62535767 | PTPRD | 0.07/0.07 | C | 1.02(0.59,1.75) | 0.944 | 0.05 |
| rs340561 | DACH1, DIS3 | 0.16/0.14 | A | 1.18(0.81,1.74) | 0.389 | 0.131 |
| rs996064 | DPH6, MEIS2 | - | - | - | - | - |
| rs111652004 | SEMA6D | 0.22/0.20 | G | 0.90(0.64,1.26) | 0.525 | 0.083 |
| rs868036 | SMAD3, MAP2K5, SKOR1, CLN6 | 0.41/0.36 | T | 1.25(0.94,1.65) | 0.125 | 0.124 |
| rs45544231 | TOX3 | 0.21/0.19 | C | 1.12(0.79,1.57) | 0.532 | 0.088 |
| rs12450895 | HOXB cluster, PRAC1 | - | - | - | - | - |
| rs12962305 | SETBP1 | 0.25/0.25 | T | 1.04(0.76,1.43) | 0.815 | 0.052 |
| rs365032 | MYT1 | 0.44/0.37 | G | 1.36(1.03,1.79) | 0.032 | 0.095 |

MAF:最小等位基因频率(minor allele frequency)

表 3 年龄性别校正后 20 个 SNPs 位点与 RLS 风险关联分析

| SNP | 基因 | 风险位点 | 显性模型 | | 隐性模型 | | 加性模型 | |
|-------------|----------------------------|------|------------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| | | | OR(95% CI) | P | OR(95% CI) | P | OR(95% CI) | P |
| rs12046503 | PRMT6, NTNG1 | C | 1.13(0.72,1.79) | 0.593 | 1.38(0.88,2.17) | 0.158 | 1.18(0.90,1.56) | 0.237 |
| rs10208712 | DCDC2C | - | - | - | - | - | - | - |
| rs113851554 | MEIS1 | - | - | - | - | - | - | - |
| rs1820989 | MEIS1, C1D, APLF | A | 0.72(0.47,1.09) | 0.12 | 0.92(0.53,1.60) | 0.76 | 0.83(0.62,1.11) | 0.213 |
| rs80319144 | CCDC148, PKP4, TANC1 | C | 1.34(0.12,15.02) | 0.815 | 0.91(0.56,1.49) | 0.718 | 0.93(0.59,1.48) | 0.767 |
| rs1848460 | CNTN4, CRBN, LRRN1 | T | 1.29(0.86,1.93) | 0.217 | 0.58(0.23,1.45) | 0.246 | 1.10(0.79,1.52) | 0.581 |
| rs35987657 | ATP2C1, ASTE1 | A | 1.22(0.56,2.66) | 0.616 | 1.34(0.90,2.00) | 0.148 | 1.25(0.91,1.73) | 0.171 |
| rs17636328 | RNF8, CCDC167, MDGA1 | A | 1.35(0.39,4.68) | 0.642 | 1.08(0.70,1.69) | 0.723 | 1.09(0.74,1.61) | 0.648 |
| rs61192259 | BTBD9, GLO1 | A | 1.31(0.68,2.53) | 0.423 | - | - | 1.36(0.72,2.57) | 0.340 |
| rs10952927 | ADAM2, STEAP4, ZNF804B | G | 1.57(0.96,2.59) | 0.076 | 1.27(0.81,2.00) | 0.300 | 1.29(0.97,1.73) | 0.085 |
| rs1836229 | PTPRD | - | - | - | - | - | - | - |
| rs62535767 | PTPRD | C | 0.68(0.09,4.94) | 0.706 | 0.99(0.55,1.79) | 0.975 | 0.97(0.57,1.64) | 0.898 |
| rs340561 | DACH1, DIS3 | A | 1.09(0.70,1.71) | 0.699 | 0.54(0.10,2.84) | 0.466 | 1.03(0.69,1.55) | 0.879 |
| rs996064 | DPH6, MEIS2 | - | - | - | - | - | - | - |
| rs111652004 | SEMA6D | G | 1.20(0.46,3.18) | 0.71 | 0.93(0.61,1.41) | 0.723 | 0.97(0.69,1.38) | 0.874 |
| rs868036 | SMAD3, MAP2K5, SKOR1, CLN6 | T | 1.43(0.94,2.17) | 0.094 | 1.12(0.63,1.99) | 0.695 | 1.24(0.92,1.66) | 0.161 |
| rs45544231 | TOX3 | C | 1.01(0.66,1.53) | 0.978 | 1.63(0.61,4.36) | 0.33 | 1.07(0.75,1.52) | 0.710 |
| rs12450895 | HOXB cluster, PRAC1 | - | - | - | - | - | - | - |
| rs12962305 | SETBP1 | T | 1.12(0.75,1.68) | 0.577 | 1.25(0.58,2.72) | 0.571 | 1.12(0.81,1.54) | 0.499 |
| rs365032 | MYT1 | G | 1.77(1.15,2.73) | 0.009 | 1.09(0.62,1.91) | 0.770 | 1.36(1.01,1.83) | 0.046 |

3 讨论

这是首次在中国 RLS/WED 人群中重复 GWASs 荟萃分析^[17]发现的 20 个独立关联信号的研究。在中国人群中,我们没有发现 SNPs 的基因型或等位基因突变频率在 RLS/WED 患者和健康对照之间有明显差异。

本研究中,我们发现 rs365032 的多态性与 RLS/WED 的发病风险相关,此外 rs868036 和 rs10952927 的多态性分别在女性分组和男性分组显示出与 RLS/WED 的相关性,尽管所有显示的差异经 Bonferroni 校正后无统计学意义。rs365032 是 MYT1 上游的突变,MYT1 在中枢和外周神经系统均有表达,有

促进神经细胞分化的功能^[23]。rs868036 位于 MAP2K5 的内含子中,有趣的是,这个基因曾被报道与中国人 RLS/WED 发病风险相关^[18]。SNP rs10952927 位于 ZNF804B 和 ADAM22 附近的风险基因,这两个基因都与神经退行性疾病的发病机制相关^[24,25]。但是,因为这 3 种 SNPs 的差异经多次校正后无显著性,以上的发现只是一些推测,还需大样本或基础研究来证实。

和本研究相似的是,在 Guy 等的研究^[26]中,他们综合了 7 个法国-加拿大大家族的全体外显子序列来探究位于 19 个风险位点内小于 1Mb 的基因上的可能导致蛋白质改变的潜在致病突变。但他们没有发现任何与 RLS/WED 风险相关的非同义突变。他们研究的家族出现 RLS/WED 可能是由于 19 个风险位点的非编码调节区域出现了突变或者存在尚未发现的风险位点。

我们的研究存在一定的局限性。首先,病例组和对照组的样本量小,降低了研究的说服力,且可能导致由膨胀效应引起的假阴性。第二,因为资金限制,我们只检测了 GWASs 荟萃分析中报道的风险基因的主要 SNPs。这些风险基因可能还有其他的具有显著性的突变,而不同的人种中相同危险基因的 SNP 也并不相同,这需要通过进一步大样本的全基因组测序来确定。第三,我们采用自我报告的形式判断种族背景而不是进行遗传学祖源检验,这使得我们研究的人群中可能存在种族背景的亚组。总之,我们的研究并没有在中国人人群中复制出 19 个风险基因的主要 SNPs 与 RLS/WED 发病风险的联系。种族的异质性和样本量小可能是我们的研究结果不同于 GWASs 荟萃分析结果的原因。未来还需要大规模的全外显子测序,甚至全基因组测序来探索中国人人群的 19 个风险基因的潜在致病突变。

[参考文献]

[1] Dauvilliers Y, Winkelmann J. Restless legs syndrome: update on pathogenesis[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2013, 19(6):594-600.

[2] Allen RP, Picchietti D, Hening WA, et al. Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. A report from the restless legs syndrome diagnosis and epidemiology workshop at the National Institutes of Health[J]. *Sleep Med*, 2003, 4(2):101-119.

[3] Allen RP, Picchietti DL, Garcia-Borreguero D, et al. Restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease diagnostic criteria; updated International Restless Legs Syndrome Study Group (IRLSSG) consensus criteria--history, rationale, description, and significance[J]. *Sleep Med*, 2014, 15(8):860-873.

[4] Ohayon MM, O'Hara R, Vitiello MV, et al. Epidemiology of restless legs syndrome: a synthesis of the literature[J]. *Sleep Med Rev*, 2012, 16(4):283-295.

[5] Tan EK, Seah A, See SJ, et al. Restless legs syndrome in an Asian population: A study in Singapore[J]. *Mov Disord*, 2001, 16(3):577-579.

[6] Cho YW, Shin WC, Yun CH, et al. Epidemiology of restless legs syndrome in Korean adults[J]. *Sleep*, 2008, 31(2):219-223.

[7] Cho SJ, Hong JP, Hahn BJ, et al. Restless legs syndrome in a community sample of Korean adults; prevalence, impact on quality of life, and association with DSM-IV psychiatric disorders[J]. *Sleep*, 2009, 32(8):1069-1076.

[8] Chen NH, Chuang LP, Yang CT, et al. The prevalence of restless legs syndrome in Taiwanese adults[J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2010, 64(2):170-178.

[9] Ma JF, Xin XY, Liang L, et al. Restless legs syndrome in Chinese elderly people of an urban suburb in Shanghai: a community-based survey[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2012, 18(3):294-298.

[10] Trenkwalder C, Allen R, Högl B, et al. Restless legs syndrome associated with major diseases: A systematic review and new concept[J]. *Neurology*, 2016, 86(14):1336-1343.

[11] García-Borreguero D, Williams AM. Dopaminergic augmentation of restless legs syndrome[J]. *Sleep Med Rev*, 2010, 14(5):339-346.

[12] Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, García-Martín E, et al. Genetics of restless legs syndrome: An update[J]. *Sleep Med Rev*, 2018, 39:108-121.

[13] Winkelmann J, Czamara D, Schormair B, et al. Genome-wide association study identifies novel restless legs syndrome susceptibility loci on 2p14 and 16q12.1[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(7):e1002171.

[14] Winkelmann J, Schormair B, Lichtner P, et al. Genome-wide association study of restless legs syndrome identifies common variants in three genomic regions[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(8):1000-1006.

[15] Stefansson H, Rye DB, Hicks A, et al. A genetic risk factor for periodic limb movements in sleep[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(7):639-647.

[16] Schormair B, Kemlink D, Roeske D, et al. PTPRD (protein tyrosine phosphatase receptor type delta) is associated with restless legs syndrome[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(8):946-948.

[17] Schormair B, Zhao C, Bell S, et al. Identification of novel risk loci for restless legs syndrome in genome-wide association studies in individuals of European ancestry: a meta-analysis[J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(11):898-907.

[18] Li G, Tang H, Wang C, et al. Association of BTBD9 and MAP2K5/SKOR1 With Restless Legs Syndrome in Chinese Population[J]. *Sleep*, 2017, 40(4):28329290.

[19] Walters AS, LeBrocq C, Dhar A, et al. Validation of the International Restless Legs Syndrome Study Group rating scale for restless legs syndrome[J]. *Sleep Med*, 2003, 4(2):121-132.

[20] Ahmad NN, Cu-Unjieng AB, Donoso LA. Modification of standard proteinase K/phenol method for DNA isolation to improve yield and purity from frozen blood[J]. *J Med Genet*, 1995, 32(2):129-130.

[21] Dupont WD, Plummer WD Jr. Power and sample size calculations. A review and computer program[J]. *Control Clin Trials*, 1990, 11(2):116-128.

[22] Dupont WD, Plummer WD Jr. Power and sample size calculations for studies involving linear regression[J]. *Control Clin Trials*, 1998, 19(6):589-601.

[23] Vasconcelos FF, Sessa A, Laranjeira C, et al. MyT1 Counteracts the Neural Progenitor Program to Promote Vertebrate Neurogenesis[J]. *Cell Rep*, 2016, 17(2):469-483.

[24] Sun Y, Hu D, Liang J, et al. Association between variants of zinc finger genes and psychiatric disorders: systematic review and meta-analysis[J]. *Schizophr Res*, 2015, 162(1-3):124-137.

[25] Fukata Y, Yokoi N, Miyazaki Y, et al. The LGII-ADAM22 protein complex in synaptic transmission and synaptic disorders[J]. *Neurosci Res*, 2017, 116:39-45.

[26] Akimen F, Spiegelman D, Dionne-Laporte A, et al. Screening of novel restless legs syndrome-associated genes in French-Canadian families[J]. *Neurol Genet*, 2018, 4(6):e296.