

文章编号:1003-2754(2020)11-0978-06

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbbz.2020.0502

不宁腿综合征/Willis-Ekbom 病的原发性震颤 易感基因的相关性研究

赖小梅¹, 李根², 陈捷², 黄豫萌², 马建芳²

摘要: 目的 本研究的目的是研究原发性震颤(Essential tremor, ET)的易感基因是否和原发性不安腿综合征/Willis-Ekbom 病的发病相关。方法 根据 2014 年国际不安腿综合征研究小组的诊断标准,共纳入 121 例原发性不安腿综合征/WED 患者和 300 例健康对照者。采用 MassARRAY 和聚合链反应(PCR)及测序技术检测原发性震颤发病相关的 16 个单核苷酸多态性(SNPs)以及 15 个基因中的 16 个突变。结果 我们的研究发现,1 例不安腿综合征/WED 患者携带 TENM4 的 p. R1632H 具有杂合子,但该患者未出现 ET 症状。Bonferroni 校正后,未发现其他 ET 相关的危险 SNP 与不安腿综合征有关。结论 我们的结果提示 TENM4 的 p. R1632H 突变可能与中国南方人群的原发性不安腿综合征/WED 有关。

关键词: 不安腿综合征; 原发性震颤; TENM4

中图分类号:R742

文献标识码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Genetic Markers of Essential Tremor in Restless Legs Syndrome/Willis-Ekbom Disease in Southern Chinese Population LAI Xiaomei, LI Gen, CHEN Jie, et al. (Ruijin People's Hospital, Ruijin 342500, China)

Abstract: Objective The aim of this study was to investigate the relationship between genetic markers of essential tremor and primary restless legs syndrome/Willis-Ekbom Disease (RLS/WED) in southern Chinese population. **Methods** Totally, 121 RLS/WED patients and 300 healthy controls were enrolled based on the diagnostic criteria of International RLS Study Group in 2014. MassARRAY and polymer chain reaction (PCR) and sequencing were used to detect 16 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 16 mutations of 15 genes. **Results** Our study found that one RLS/WED patient had a heterozygote of p. R1632H of TENM4. However, this patient did not present symptoms of ET. None of other ET risky SNPs was found associated with RLS after Bonferroni correction. **Conclusion** Our results suggested p. R1632H mutation of TENM4, may be associated with primary RLS/WED in southern Chinese population.

Key words: Restless legs syndrome; Essential tremor; TENM4

不宁腿综合征/Willis-Ekbom 病(RLS/WED, Restless Legs Syndrome/Willis-Ekbom Disease)是一种睡眠障碍,其特征是患者出现无法抗拒的想活动双腿的冲动,有时伴有各种感觉不适,在夜间平躺或静坐后会恶化,行走后缓解,影响患者的日常生活质量^[1,2]。中国的原发性 RLS/WED 患病率约为 0.69%,远低于高加索人群^[3]。原发性震颤(Essential tremor, ET)在 RLS/WED 患者中并不少见^[4,5]。有趣的是,ET 和 RLS 都具有遗传特质,且存在家族共分离现象,提示两种疾病可能具有相同的致病机制。到目前为止,与 ET 相关的危险 SNP 包括:CTNNA3, LINGO1, SLC1A2, FUS, SCN4A, DRD3, HTRA2, HAPLN4, HS1BP3, USP46, STK32B, TENM4, KCNS2, NOS3 和 PPARGC1A^[6~15]。目前,这些 ET 的危险 SNP 是否与 RLS/WED 相关尚不清楚。所以,我们对中国 RLS 患者的那些遗传标记进行了测

序,以研究中国人群 RLS/WED 与 ET 之间的遗传联系。

1 资料与方法

1.1 资料 研究人群:RLS/WED 是由 2 位 RLS/WED 专家根据 2014 年国际 RLS/WED 研究组(IRLSSG)诊断标准的修订版进行诊断的^[2]。我们入组了原发性 RLS/WED,排除了继发性 RLS/WED,包括继发于帕金森病、肾功能不全、缺铁、糖尿病和周围神经病等。对照组样本招募了社区健康人群,并由 RLS/WED 专家进行了评估,以排除

收稿日期:2020-11-08;修订日期:2020-11-15

基金项目:国家重点研发计划项目(No. 2016YFC1306000)

作者单位:(1. 瑞金市人民医院,江西 瑞金 342500;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

RLS/WED 和原发性震颤。我们对每位入组的患者和健康人群都进行了铁蛋白的检测,铁蛋白水平降低的患者也被排除在外。IRLSSG 评分量表用于评估 RLS/WED 的严重程度^[16]。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。此外,所有 RLS/WED 的治疗病史由上海交通大学附属瑞金医院提供。所有参与者均签署知情同意书。

1.2 方法 DNA 制备和基因分型:我们从每个参与者收集约 2 ml 血液样品,采用苯酚-氯仿-异丙醇法提取 DNA^[17]。通过聚合物链反应(PCR)扩增的基因片段包含:*STK32B* 的 *rs10937625*,*CTNNA3* 的 *rs7903491*, *rs10822974* 和 *rs12764057* 以及 *PPARGC1A* 的 *rs17590046*。扩增引物设计来自于国家生物技术信息中心(NCBI)的 Primer-BLAST 网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)。使用 Sequenom MassARRAY 系统上的 MALDI-TOF 质谱进行基因分型。使用 MassARRAY 系统对以下 SNP 和突变进行基因分型:(1) SNP 位点:*SCN4A* 的 *rs571210585*, *HAPLN4* 的 *rs781390304*, *USP46* 的 *rs759572548*, *HTRA2* 的 *rs72470545*, *HS1BP3* 的 *rs11680700*, *DRD3* 的 *rs6280* *rs6280*, *SLO17603490* 的 *rs11280700*, *FUS* 的 *rs387907274* 和 *rs751937417*;(2) 突变位点:*KCNS2* c. 1137T>A, *NOS3* c. 46G>A, *NOS3* c. 164C>T, *FUS* c. 1129C>T, *TENM4* c. 158G>C, *TENM4* c. 1421C>A, *TENM4* c. 1553G>A, *TENM4* c. 3053G>A, *TENM4* c. 3412G>A, *TENM4* c. 4100C>A, *TENM4* c. 4324G>A, *TENM4* c. 4603A>C, *TENM4* c. 4895G>A, *TENM4* c. 5287G>A 和 *TENM4* c. 7353G>A。测定设计 3.1 软件用于设计由 MassARRAY 测试的 SNP 的引物。这些 SNP 和突变的引物列于表 1 中,PCR 的反应系统列于表 2 中。

统计分析:使用 SAS(9.4 TS1M2 版本;SAS Institute Inc., Cary, NC)软件包进行统计分析。*t* 检验用于比较 RLS/WED 患者和非 RLS/WED 对照之间的年龄差异。卡方检验用于评估 RLS/WED 与对照之间所有 SNP 分布的性别、Hardy-Weinberg 平衡(HWE)、基因型和等位基因的差异。通过逻辑回归进行风险分析。计算出每个 SNP 或单倍型的比值比(OR)和 95% 的置信区间(CI)。同时,我们评估了显性模型,隐性模型和显性模型。通过 Cochran-

Armitage 趋势测试对加性模型进行了测试。通过 Haploview 软件(4.2 版)测试了同一染色体中 SNP 的连锁不平衡(LD)。Haploview 还测试了单倍型以及 1,000,000 个排列检验。R 语言(版本 3.3.1)用于通过 Bonferroni 方法校正 *p* 值。功效和样本量计算(版本 3.1.2)用于计算遗传功效^[18,19]。

功能预测:我们使用以下关键字搜索 PubMed, Embase 和 EBSCO 数据库:“(Restless legs syndrome) AND (gene OR polymorphism)”。我们收集了在 RLS/WED 中发现的所有基因名称。然后,我们使用以下关键字搜索“在线孟德尔遗传在线”(OMIM)数据库:“dopamine *”。我们将这些基因名称识别为多巴胺相关基因。该数据库,用于检索相互作用基因/蛋白质的搜索工具(String)(版本 10.5)用于预测新基因与 RLS/WED 的已知基因和多巴胺相关基因之间的蛋白质-蛋白质相互作用。我们通过注释、可视化和综合发现数据库(DAVID)(v6.8)进行富集分析,评估新基因与 RLS/WED 的已知基因和多巴胺相关基因之间的可能关联。

2 结果

这项研究招募了 130 例 RLS/WED 患者和 300 例健康对照。9 例 RLS/WED 患者因低铁蛋白被排除在外。共有 121 个 RLS/WED,最后招募了 300 个对照。RLS/WED 患者与对照组之间在年龄和性别上无统计学差异。家族性 29 例 RLS/WED 患者(23.97%),女性 63 例 RLS/WED 患者(56.76%) (见表 3)。

在 SNP 的相关研究中,年龄和性别匹配后在显性或显性模型中我们发现 2 个 *CTNNA3* 的 SNP 与 RLS/WED 有关联的趋势(*rs10822974*: *OR* = 0.61, *P* = 0.043, 显性模型; *rs12764057*: *OR* = 1.76, *P* = 0.020, 显性模型; *OR* = 0.54, *P* = 0.008, 显性模型),但是 Bonferroni 方法校正 *P* 值后无显著差异(见表 4)。此外,我们也没有发现 *CTNNA3* 中的单倍型与 RLS/WED 相关联(见表 5)。

在相关基因突变的研究中,我们发 1 例 RLS/WED 患者为 *TENM4* 的 *p. R1632H* 杂合子携带者,但该患者没有出现临床 ET 的症状,存在慢性持续性 RLS/WED 症状,家族史阳性。在对照组中未发现 *TENM4* 的 *p. R1632H*。我们在对照组和 RLS/WED 组中均未发现其他的突变位点。

使用先前给出的搜索方法,将 336 个基因用于以下生物信息学研究(见表 6)。我们没有发现使用 DAVID 和 STRING 工具在 *CTNNA3* 或 *TENM4* 与已

知 RLS/WED 基因与多巴胺能途径之间的已知相互作用。

表 1 经测试的 SNP 和突变的引物

MassARRAY				
基因	单核苷酸多态性	1st Primer	2nd Primer	UEP_SEQ
<i>NOS3</i>	c. 164C > T	ACGTTGGATGCTTCACACGAGGGAACCTTG	ACGTTGGATGACAAAACCCCTTCCTGATGACC	CTCCCAACAGCCCCC
<i>TENM4</i>	c. 4324G > A	ACGTTGGATGTTGCTTAGCAGGAAGTGGTC	ACGTTGGATGTGTGGTCCCTGCAAATCTCTG	CAGGTGCGCATTTGTC
<i>TENM4</i>	c. 1553G > A	ACGTTGGATGTGAAGCCTGTCTCATGGCTG	ACGTTGGATGATGGCAGGAGGCTCCTAAC	ACCCCGCGCCAGTCTC
<i>NOS3</i>	c. 46G > A	ACGTTGGATGTGCTTGCCGCACAGCCCAA	ACGTTGGATGACATGGGCAACTTGAAGAGC	GCCTGGGCCACCCCTGC
<i>LINGO1</i>	rs9652490	ACGTTGGATGACCCGCTGCTAAAGCTGG	ACGTTGGATGAGATGTCACAGATCAGTGCC	CAGAGTGAAGCTAGGC
<i>TENM4</i>	c. 3382G > A	ACGTTGGATGCATTTCGGACAAGACAGACG	ACGTTGGATGAGGCTTACCAAAGGCTTCTG	TTCTGAAAGCCCAAACA
<i>TENM4</i>	c. 4895G > A	ACGTTGGATGAGACAACAATGGCAACATGG	ACGTTGGATGCATGGTCACCCAGTACACCT	TCCAGTAGAGTCTCGG
<i>TENM4</i>	c. 1421C > A	ACGTTGGATGTGTATGTGAAGGAGGGAG	ACGTTGGATGTAGACCATCCTGTGCATCTG	ggCTCTGGGAAAGCGAG
<i>TENM4</i>	c. 7353G > A	ACGTTGGATGACCTTAGTACAGCAACGTC	ACGTTGGATGACTTGTATCTCTGGGAGTTG	GGGTTTGTGTTTTGAA
<i>SCN4A</i>	rs571210585	ACGTTGGATGACAGCATCATCTGCCTGTTT	ACGTTGGATGCTGTGAGGATGGGCTTGAG	cttcGGAGCCCGTCCCAGC
<i>LINGO1</i>	rs11856808	ACGTTGGATGTCTCAAAAATCCCCACTGC	ACGTTGGATGGGGACTTAGTTCTCTCACTC	CTCAGAAAGTCAACCAAAC
<i>SLC1A2</i>	rs3794087	ACGTTGGATGCGTAGGCTTCTTAGCATCC	ACGTTGGATGTCTCCAGGAAAGAAAAGG	AAGGGAACCAAAGCCAACT
<i>HS1BP3</i>	rs11680700	ACGTTGGATGGCATGGTTCATTTTCTCCG	ACGTTGGATGTAAGACACATTGGGCTCTGG	gggaGGTGAGAGCCGCTCCC
<i>TENM4</i>	c. 4603A > C	ACGTTGGATGCTCGAGACGATGCTTATGC	ACGTTGGATGACACACAGCCAAGGAAGATG	GGAAGATGGCGTATTTAACT
<i>FUS</i>	c. 1129C > T	ACGTTGGATGACTAGCAGGTAGCTCCAC	ACGTTGGATGAGGTCTCATTTGCTACTCGC	acctCGGGGAGACTTTAAT
<i>TENM4</i>	c. 5287G > A	ACGTTGGATGAGCAGCCCAAGGAGCCAT	ACGTTGGATGTTCTGAGCAGTCTGTGCTTG	GTCCGGAACAGCTACTACATC
<i>TENM4</i>	c. 3053G > A	ACGTTGGATGTTCTCTGACAGGAGCTGG	ACGTTGGATGATGAGATTCACAGCTGTGAC	tggGACCTGAGCAATTTTGGCC
<i>DRD3</i>	rs6280	ACGTTGGATGTGGCACCTGTGGAGTTCTCT	ACGTTGGATGCTCTGGGCTATGGCATCTCTG	ggcagCTCTGAGCCAGCTGAGT
<i>KCNK2</i>	c. 1137T > A	ACGTTGGATGAGGCAGAGGCACTCAGCTTT	ACGTTGGATGTACCCGTCAGTATGACCACAG	tgcCCACAGTGGGTACGGGA
<i>FUS</i>	rs387907274	ACGTTGGATGGCCACAGACTCAATTGTAAC	ACGTTGGATGTGTTCAACAAGCAGAACAGG	catACAACAACACCATCTTTGTG
<i>HAPLN4</i>	rs781390304	ACGTTGGATGAGTAGACCCGAAGAGCCG	ACGTTGGATGTACCCATCGTGAACCCGC	ccccGCCTGGTGTGGCAGCCTC
<i>TENM4</i>	c. 3412G > A	ACGTTGGATGCTGGGCTTTGCTCACTTATG	ACGTTGGATGCTGGGCAGGATTCATATTC	tgaAGGATTCATAITCATAACCCA
<i>TENM4</i>	c. 4100C > A	ACGTTGGATGCAGGCATTACACTGGACAAG	ACGTTGGATGGATCCCATCTGATCGATGC	gttgATCGATGCGCTGATCATG
<i>TENM4</i>	c. 158G > C	ACGTTGGATGTCCGGCACAATGTCCTTGAC	ACGTTGGATGCAGAAATCCTACAGCTCCAG	gttcAGGCCACGACCAGGACGCC
<i>HTRA2</i>	rs72470545	ACGTTGGATGATATCACTGCAGCCCTCTC	ACGTTGGATGTCAGCATGCTGACTCATCC	ccgtcCTCATCAAAGTCAATCTCTG
<i>USP46</i>	rs759572548	ACGTTGGATGTCTCTTTCTCTCTCTCTG	ACGTTGGATGCTACATGCAGCAGGATGCTC	TTTTAAATTTTCTTAAACACTATTG

聚合物链反应 (PCR)

基因	单核苷酸多态性	Forward Primer	反向引物	PCR 反应条件
<i>STK32B</i>	rs10937625	GTGCCCTTTATCTCCATCCCT	GCGCTGCAGCTCTGATTCTA	95 °C 2 min→95 °C
<i>CTNNA3</i>	rs7903491	AGGTGCTCTGATGTTGGG	TTCTTGGGCTTCTTATGG	30 s→54 °C 30 s→72 °C
<i>CTNNA3</i>	rs10822974	ACCTCTCTAGGTTCTAAGGCCA	GGACGGCCTAGATGTTACCC	1 min→go to step 2
<i>CTNNA3</i>	rs12764057	ATACGCAAGCCTGCACAAAC	TGGGTGAATGAAACCAATTCCC	for 35 times→72 °C 5 min
<i>PPARGC1A</i>	rs17590046	ACTTGAGGTGTCAGAGCA	GGAGCAAGTGGTCACCTGAA	

表 2 PCR 反应系统

体积			
R Taq	0.25 μl		Code No. R001A, Takara
10 × loading buffer	5 μl		Code No. R001A, Takara
dNTP Mixture	4 μl		Code No. R001A, Takara
ddH ₂ O	37.75 μl		
Template	1 μl		
Forward Primer (10 μmol/L)	1 μl		
Reverse Primer (10 μmol/L)	1 μl		

表3 病例和对照的人口统计表 1 病例和对照的人口统计信息

	RLS 患者 (n = 121)	非 RLS 控制 (n = 300)	P Value
性别, 女性, n (%)	63 (56.76)	164 (54.67)	0.705
年龄, 平均数 (SD), 岁	63.17 (15.44)	63.61 (9.33)	0.782
家族性 RLS, n (%)	29 (23.97)	-	-
RLS 严重度, 平均值 (SD) *	21.41 (2.58)	-	-
药物治疗 RLS, n (%)	64 (52.89)	-	-
铁蛋白水平, 平均值 (SD) (ng/ml)	141.05 (92.84)	-	-
慢性持久性 RLS, n (%)	67 (55.37)	-	-

RLS: 不安腿综合征; SD: 标准差。* 由国际 RLS 研究小组 (IRLSSG) 评级量表评估

表4 候选基因的 SNP 关联以及比值比与 RLS/WED 风险

Gene	SNP	HWE P value	MAF (case/control)	Allele			Dominant Model (adjusted) ^b				
				Ancestral allele	P ^a	P _{trend} ^c	OR ^a	95% CI ^a	P	OR	95% CI
CTNNA3	rs7903491	0.677	0.45/0.44	A	0.808	0.797	0.96	0.70 ~ 1.32	0.846	1.05	0.63 ~ 1.77
	rs10822974	0.245	0.43/0.46	A	0.444	0.447	0.89	0.65 ~ 1.21	0.123	1.65	0.87 ~ 3.12
	rs12764057	0.211	0.37/0.31	T	0.086	0.081	1.32	0.96 ~ 1.80	0.02	1.76	1.09 ~ 2.83
DRD3	rs6280	0.588	0.24/0.28	C	0.304	0.305	0.83	0.59 ~ 1.18	0.669	1.23	0.48 ~ 3.15
LINGO1	rs9652490	0.265	0.24/0.22	G	0.671	0.671	0.92	0.64 ~ 1.33	0.844	1.05	0.65 ~ 1.69
	rs11856808	0.389	0.39/0.34	T	0.183	0.188	0.81	0.59 ~ 1.10	0.575	1.14	0.72 ~ 1.83
PPARGC1A	rs17590046	0.381	0.10/0.08	T	0.489	0.494	1.20	0.71 ~ 2.04	0.206	1.46	0.81 ~ 2.63
STK32B	rs10937625	0.092	0.14/0.12	T	0.455	0.448	1.18	0.76 ~ 1.85	0.891	1.04	0.60 ~ 1.79
SLC1A2	rs759572548	0.284	0.42/0	G	0.284	0.112	1.00	0.99 ~ 1.01	-	-	-
USP46	rs3794087	0.907	0.19/0.19	C	0.977	0.978	0.99	0.67 ~ 1.47	0.637	0.88	0.53 ~ 1.47

Gene	SNP	Genetic Power	Recessive Model (adjusted) ^b			Overdominant model (adjusted) ^b			Number of sample tested	
			P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	Case	Control
CTNNA3	rs7903491	0.054	0.691	0.89	0.49 ~ 1.62	0.893	1.03	0.65 ~ 1.64	107	295
	rs10822974	0.08	0.395	1.25	0.75 ~ 2.10	0.043	0.61	0.38 ~ 0.99	114	280
	rs12764057	0.134	0.572	1.25	0.57 ~ 2.73	0.008	0.54	0.34 ~ 0.85	120	296
DRD3	rs6280	0.113	0.6	0.88	0.55 ~ 1.41	0.755	1.08	0.67 ~ 1.74	115	294
LINGO1	rs9652490	0.066	0.087	5.87	0.77 ~ 44.69	0.285	0.77	0.47 ~ 1.25	114	296
	rs11856808	0.102	0.852	0.94	0.48 ~ 1.85	0.672	0.9	0.57 ~ 1.44	117	298
PPARGC1A	rs17590046	0.128	0.964	-	-	0.111	0.62	0.34 ~ 1.18	109	299
STK32B	rs10937625	0.118	0.944	-	-	0.595	0.86	0.50 ~ 1.49	118	290
SLC1A2	rs759572548	0.05	-	-	-	-	-	-	119	300
USP46	rs3794087	0.05	0.944	0.96	0.33 ~ 2.78	0.824	1.13	0.40 ~ 3.20	112	280

CI = 置信区间; HWE = Hardy-Weinberg 平衡; MAF = 次要等位基因频率; OR = 比值比; RLS/WED = 不安腿综合征/Willis Ekbohm 病; SNP = 单核苷酸多态性。通过风险分析获得 aP 值, OR 和 95% CI, 并参考风险等位基因 b 根据年龄和性别进行调整。

通过 Cochran-Armitage 趋势测试计算等位基因剂量的 cP 值

表5 CTNNA3 的单倍型

SNPs			Frequency		P value	OR	95% CI
rs12764057	rs10822974	rs7903491	Case	Control			
G	A	A	0.084	0.069	-	-	-
G	A	G	0.074	0.073	0.577	1.18	0.65 ~ 2.15
G	G	A	0.111	0.105	0.638	1.14	0.66 ~ 1.96
G	G	G	0.131	0.137	0.378	1.26	0.75 ~ 2.13
T	A	A	0.16	0.181	0.222	1.37	0.83 ~ 2.26
T	A	G	0.119	0.118	0.492	1.21	0.71 ~ 2.05
T	G	A	0.173	0.164	0.594	1.15	0.70 ~ 1.89
T	G	G	0.148	0.153	0.388	1.25	0.75 ~ 2.08

CI = 置信区间; OR = 比值比; SNP = 单核苷酸多态性

表 6 搜索了 336 个基因,可用于以下生物信息学研究

<p><i>ABO, ADD1, ADGRL3, ADH1B, ADH1C, ADHD1, ADHD2, ADHD3, ADHD4, ADORA2A, ADRA1B, ADRA2A, ADRB2, AGO2, AGT, AGTR1, AIMP2, AKT1, ALDH1A1, ALDH2, ALG9, ANKK1, AOC2, APOL2, APOA, ARMETL1, ARNTL, ASCL1, ATP13A2, ATP1A3, ATP5B, ATP7A, ATXN2, ATXN3, BDNF, BECN2, BEX1, BEX4, BTBD9, C6orf55, CALY, CBWD1, CCK, CCN1, CDK5, CEL, CH3L1, CHRNA4, CHRNA5, CHRNA6, CHRN2, CLN3, CLOCK, CMM, CNTNAP2, CNTNAP4, COMT, COQ2, CP, CREB1, CRH, CRHR1, CRHR2, CRYAB, CSNK1D, CUL3, CYB561, CYP2A6, DAO, DAOA, DBH, DBP, DCTN1, DDC, DISC1, DISC2, DJ1, DLG4, DNAAF4, DNAJC12, DNAJC6, DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, DRD5, DRIP78, DVLI, DYNC1H1, DYT1, E2F1, EDNRB, EFHC1, EIF4G1, EN1, EN2, ERCC8, ETV1, FAAH, FAF1, FAS, FBXW5, FEZ1, FEZF2, FGF14, FKBP4, FKBP5, FMR1, FOSB, FOXP2, GABRA1, GABRA2, GABRG2, GAL, GATA3, GBA, GCH1, GDNF, GHRL, GHSR, GLUD2, GNAL, GNB5, GPR10, GPR119, GPR143, GPR19, GPR27, GPR37, GPR51, GPR61, GPR88, GPRASP1, GPRIN2, GRIA2, GRIN1, GRIN2A, GRK6, GRM2, GSN, GSTO1, GTF2I, GTS, GUCY2C, HDC, HLF, HMOX1, HMOX2, HOMER1, HOMER2, HPCA, HPR1, HSPA1A, HTR2A, HTR2B, HTR2C, HTR6, HTRA2, HTT, HYDIN2, ICOSLG, IDO1, IDO2, IKBKAP, IL17A, IL1B, KCNJ3, KCNJ6, KCTD17, KDR, KIF1B, KLF16, KLHL12, LAG3, LEP, LILRA3, LMO3, LMX1A, LRRK2, LRRN6A, MAFD1, MAOA, MAOB, MAP2K5, MAPT, MC1R, MC4R, MDD1, MDD2, MEFV, MEIS1, MIR133B, MIR184, MIR34B, MIR34C, MIRLET7A1, MOXD1, MSX1, MTHFR, MTPN, NBP1, NCAM1, NDN, NF1, NME1, NOS1, NPEPPS, NR1H2, NR2F1, NR3C1, NR4A2, NTSR1, ODS1, OHDS, PANK2, PARK21, PAWR, PDE10A, PDE1B1, PDE8B, PDXK, PHOX2A, PINK1, PITX3, PLA2G6, PLXNA4, PMX2B, PNR, PNU11, PNU12, POU1F1, PPP2CA, PPP3CC, PRKN, PRLH, PRLR, PRRT2, PSPN, PTEN, PTGER1, PTPRD, PTS, QDPR, RAB1, RAB39B, RARB, RET, RGS9, RTI2, RLS1, RNLS, RPS6KA3, RTN4R, RXFP3, RXRA, RXRB, RXRG, S1PR2, SCZD1, SCZD11, SCZD12, SCZD2, SCZD3, SCZD5, SCZD6, SCZD7, SCZD8, SDHB, SEMA6A, SGCE, SH3GL1, SHH, SIRT2, SKOR1, SLC18A1, SLC18A2, SLC1A1, SLC20A2, SLC22A3, SLC29A4, SLC6A1, SLC6A15, SLC6A3, SLC6A4, SLIT1, SLIT2, SLITRK1, SNCA, SNCAIP, SNCB, SNRPN, SPI1, SPR, SRGAP2, SSTR3, SSTR5, STIL, STUB1, SULT1A1, SULT1A3, SULT1A4, SULT1B1, SULT1C1, SULT1C2, SUPT5H, SYN2, SYNJ1, TAAR1, TAAR6, TAF1, TAF4, TAS2R16, TBP, TBX1, TDO2, TEF, TFDP1, TH, THAP1, THPH2, TNFAIP8, TOX3, TPH2, TSC1, TSC2, TYR, UCHL1, UCPI1, UGT2B17, USP30, VEGF, VLDLR, VPS35, WFS1, ZIC2, ZNF746</i></p>
--

3 讨论

据我们所知,这是首次讨论 RLS/WED 中原发性震颤的遗传标志物的研究。我们的研究发现 *CTNNA3* 的 rs10822974 和 rs12764057 可能与 RLS/WED 超显性模型相关。由 *CTNNA3* 编码的蛋白质属于 *vinculin/α-catenin* 家族。*CTNNA3* 可以通过免疫共沉淀分析直接结合 *β-catenin*^[20]。*Wnt/β-catenin* 信号传导的剂量可影响中脑多巴胺能神经元的神经发生^[21]。*Wnt/β-catenin* 信号传导还可诱导小鼠脊髓和后脑底板中的神经发生^[22]。此外,*CTNNA3* 还与免疫状态异常有关,例如小儿食物过敏和哮喘^[23~25]。免疫学异常可以在 RLS/WED 患者中并不少见。*IL1A* 和 *IL1B* 基因的多态性与 RLS/WED 相关^[26]。某些自免性疾病患者群体中 RLS/WED 患病率较高,如类风湿性关节炎,银屑病和多发性硬化症等自身免疫性疾病^[27~29]。

TENM4 与原发性震颤有关。使用少突胶质前体细胞和斑马鱼,*TENM4* 突变的发病机制被认为与轴突导向和中央髓鞘形成的调节有关^[14]。在小鼠中,*TENM4* 的功能是诱导中胚层,后者在脊索中进化^[30]。此外,*TENM4* 可能会影响运动神经元生长锥的引导^[31]。

我们的研究存在一些局限性。首先,中国 RLS/WED 的患病率相对较低,因此能够招募的 RLS/WED 患者的数量很少。为了进一步证实我们在亚洲人群中的发现,需要增加样本量进行验证。RLS/WED 中亚洲人和高加索人之间的遗传背景不同^[32]。

所以,也希望也在高加索地区进行类似的研究进一步验证两者之间的关系。其次,我们的研究并未检测到所有与震颤相关的必需基因突变或危险 SNP,例如 *SCN11A*^[33]。

我们的结果表明,*CTNNA3* 和 *TENM4* 可能与中国南方人群的 RLS/WED 相关。希望将来有更多的亚洲人群 RLS/WED 队列,继续探索 RLS/WED 的致病基因。

缩略语

6-OHDA, 6-羟基多巴胺

BLAST, 基本局部比对搜索工具

CI, 置信区间

DAVID, 用于批注, 可视化和集成发现的数据库

DNA, 脱氧核糖核酸

HWE, Hardy-Weinberg 平衡

IRLSSG, 国际 RLS/WED 研究小组

LD, 连锁不平衡

MPTP, N-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶

NCBI, 国家生物技术信息中心

OMIM, 人类在线孟德尔遗传

或, 优势比

PCR, 聚合物链反应

RLS/WED, 腿动综合征/Willis-Ekbom 病

SAS, 统计分析系统

SNP, 单核苷酸多态性

STRING, 用于检索相互作用的基因/蛋白质的

搜索工具

[参考文献]

- [1] Allen RP. Restless Leg Syndrome/Willis-Ekbom Disease Pathophysiology[J]. *Sleep Med Clinic*, 2015, 10(3):207-214.
- [2] 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.
- [3] 马建飞, 辛新贤, 梁丽, 等. 上海城市郊区中国老年人的躁动腿综合征: 一个社区基础的调查[J]. *帕金森氏症和相关疾病*, 2013, 18(3):294-298.
- [4] Peeraully T, Tan EK. Linking restless legs syndrome with Parkinson's disease: clinical, imaging and genetic evidence[J]. *Transl Neurodegener*, 2012, 1(1):6.
- [5] Ondo WG, Lai D. Association between restless legs syndrome and essential tremor[J]. *Mov Disord*, 2006, 21(4):515-518.
- [6] Muller SH, Girard SL, Hopfner F, et al. Genome-wide association study in essential tremor identifies three new loci[J]. *Brain*, 2016, 139(Pt 12):3163-3169.
- [7] Rajput A, Rajput AH, Rajput ML, et al. Identification of FUS p. R377W in essential tremor[J]. *Eur J Neurol*, 2014, 21(2):361-363.
- [8] Wu YR, Foo JN, Tan LC, et al. Identification of a novel risk variant in the FUS gene in essential tremor[J]. *Neurology*, 2013, 81(6):541-544.
- [9] Deng H, Gu S, Jankovic J. LINGO1 variants in essential tremor and Parkinson's disease[J]. *Acta Neurol Scand*, 2012, 125(1):1-7.
- [10] Jimenez-Jimenez FJ, Alonso-Navarro H, Garcia-Martin E, et al. Update on genetics of essential tremor[J]. *Acta Neurol Scand*, 2013, 128(6):359-371.
- [11] Unal Gulsuner H, Gulsuner S, Mercan FN, et al. Mitochondrial serine protease HTRA2 p. G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(51):18285-18290.
- [12] Schmouh JF, Dion PA, Rouleau GA. Genetics of essential tremor: from phenotype to genes, insights from both human and mouse studies[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 119-120(8/9):1-19.
- [13] Liu X, Hernandez N, Kisselev S, et al. Identification of candidate genes for familial early-onset essential tremor[J]. *Eur J Hum Genet*, 2016, 24(7):1009-1015.
- [14] Hor H, Francescato L, Bartesaghi L, et al. Missense mutations in TENM4, a regulator of axon guidance and central myelination, cause essential tremor[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(20):5677-5686.
- [15] Bergareche A, Bednarz M, Sanchez E, et al. SCN4A pore mutation pathogenetically contributes to autosomal dominant essential tremor and may increase susceptibility to epilepsy[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(24):7111-7120.
- [16] 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.
- [17] 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 Genetic*, 1995, 32(2):129-130.
- [18] Dupont WD, Plummer WDJr. Power and sample size calculations for studies involving linear regression[J]. *Control Clin Trials*, 1998, 19(6):589-601.
- [19] Dupont WD, Plummer WDJr. Power and sample size calculations. A review and computer program[J]. *Control Clin Trials*, 1990, 11(2):116-128.
- [20] Janssens B, Mohapatra B, Vatta M, et al. Assessment of the CTNNA3 gene encoding human alpha T-catenin regarding its involvement in dilated cardiomyopathy[J]. *Hum Genet*, 2003, 112(3):227-236.
- [21] Joksimovic M, Awatramani R. Wnt/beta-catenin signaling in mid-brain dopaminergic neuron specification and neurogenesis[J]. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(1):27-33.
- [22] Joksimovic M, Patel M, Taketo MM, et al. Ectopic Wnt/beta-catenin signaling induces neurogenesis in the spinal cord and hindbrain floor plate[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e30266.
- [23] Li J, Fung I, Glessner JT, et al. Copy Number Variations in CTNNA3 and RFX1 Associate with Pediatric Food Allergy[J]. *J Immunol*, 2015, 195(4):1599-1607.
- [24] Perin P, Potocnik U. Polymorphisms in recent GWA identified asthma genes CA10, SGK493, and CTNNA3 are associated with disease severity and treatment response in childhood asthma[J]. *Immunogenetics*, 2014, 66(3):143-151.
- [25] Bernstein DI, Kashon M, Lummus ZL, et al. CTNNA3 (alpha-catenin) gene variants are associated with diisocyanate asthma: a replication study in a Caucasian worker population[J]. *Toxicol Sci*, 2013, 131(1):242-246.
- [26] Hennessy MD, Zak RS, Gay CL, et al. Polymorphisms of Interleukin-1 Beta and Interleukin-17 Alpha Genes Are Associated With Restless Legs Syndrome[J]. *Biol Res Nurs*, 2014, 16(2):143-151.
- [27] Schell C, Schleich R, Walker F, et al. Restless legs syndrome in psoriasis: an unexpected comorbidity[J]. *Eur J Dermatol*, 2015, 25(3):255-260.
- [28] Taylor-Gjevrev RM, Gjevrev JA, Skomro R, et al. Restless legs syndrome in a rheumatoid arthritis patient cohort[J]. *J Clin Rheumatol*, 2009, 15(1):12-15.
- [29] Auger C, Montplaisir J, Duquette P. Increased frequency of restless legs syndrome in a French-Canadian population with multiple sclerosis[J]. *Neurology*, 2005, 65(10):1652-1653.
- [30] Nakamura H, Cook RN, Justice MJ. Mouse Tenm4 is required for mesoderm induction[J]. *BMC Dev Biol*, 2013, 13(4):9.
- [31] Zheng L, Michelson Y, Freger V, et al. Drosophila Ten-m and filamin affect motor neuron growth cone guidance[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8):e22956.
- [32] 李刚, 唐红, 王超, 等. BTBD9 和 MAP2K5/SKOR1 与中国人群腿躁症的关联[J]. *睡眠*, 2017, 40:4.
- [33] 冷晓蓉, 齐晓红, 周艳婷, 等. SCN11A 的功能获得性突变 p. Arg225Cys 引起家族性阵发性疼痛并导致原发性震颤[J]. *人类遗传学杂志*, 2017, 62(6):641-646.