

论著·临床研究

## 谷氨酸受体2基因多态性与儿童癫痫的相关性

王娴 朱天娇 万致婷 朱雪梅

(咸宁市中心医院 / 湖北科技学院附属第一医院新生儿科, 湖北 咸宁 437100)

**[摘要]** **目的** 探讨我国中部地区汉族人群中谷氨酸受体2 (GRIK2) 基因两个 SNP 位点 rs9390754 和 rs4840200 的多态性与儿童癫痫遗传易感性的关系。**方法** 利用病例对照研究方法, 选取来自我国中部地区的 284 例癫痫患儿 (包括 132 例难治性癫痫) 以及 315 例正常体检儿童 (对照组) 作为研究对象。利用限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 的方法测定 SNP 位点 rs9390754 和 rs4840200 的多态性分布, 并比较组间的基因型频率的差异。**结果** 癫痫组儿童 SNP 位点 (rs9390754) 的基因型 (GG、GA、AA) 频率与对照组相比差异有统计学意义 ( $P=0.016$ ), 等位基因频率差异也有统计学意义 ( $P=0.002$ )。而 SNP 位点 (rs4840200) 基因型 (CC、CT、TT) 频率以及等位基因频率与对照组相比差异均无统计学意义。难治性癫痫亚组 SNP 位点 (rs4840200) C 等位基因频率高于非难治性癫痫亚组 ( $OR=1.435$ , 95%  $CI$ : 1.021~2.016,  $P=0.037$ )。**结论** 我国中部地区汉族人群 GRIK2 基因 SNP 位点 (rs9390754) 的多态性与癫痫的易感性相关, 而 SNP 位点 (rs4840200) 的 C 等位基因可能是癫痫患儿发生耐药的遗传学危险因素。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18(6): 492-495]

**[关键词]** 癫痫; GRIK2 基因; 多态性; 儿童

### Association between glutamate receptor 2 polymorphisms and epilepsy in children

WANG Xian, ZHU Tian-Jiao, WAN Zhi-Ting, ZHU Xue-Mei. Department of Pediatrics, Xianning Central Hospital/First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei 437100, China (Wan Z-T, Email: Wanzt\_xn@163.com)

**Abstract: Objective** To investigate the association between two single nucleotide polymorphisms (SNPs), rs9390754 and rs4840200, in the glutamate receptor 2 (GRIK2) gene and the genetic susceptibility to epilepsy (EP) in the Han population in Central China. **Methods** A case-control study was performed in 284 EP children (including 132 children with refractory epilepsy) and 315 normal children from Central China. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to determine the genotypes of the two SNPs rs9390754 and rs4840200. The genotype frequency was compared between groups. **Results** The frequencies of GG, GA, and AA genotypes of SNP rs9390754 showed a significant difference between the EP and normal control groups ( $P=0.016$ ). The allele frequency also showed a significant difference between the two groups ( $P=0.002$ ). The frequencies of CC, CT, and TT genotypes of SNP rs4840200 and allele frequency showed no significant differences between the two groups. The C allele frequency of SNP rs4840200 in the refractory EP subgroup was significantly higher than in the non-refractory EP subgroup ( $OR=1.435$ , 95%  $CI$ : 1.021-2.016,  $P=0.037$ ). **Conclusions** In the Han population in Central China, the polymorphisms of SNP rs9390754 in the GRIK2 gene may be associated with EP susceptibility, and the C allele of SNP rs4840200 may be a genetic risk factor for the development of drug resistance in children with EP.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(6): 492-495]

**Key words:** Epilepsy; GRIK2 gene; Polymorphism; Child

[收稿日期] 2016-01-12; [接受日期] 2016-03-22

[作者简介] 王娴, 女, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 万致婷, 女, 主任医师。

癫痫是由多种病因引起的脑功能障碍综合征，是危害儿童身心健康和认知功能的神经系统疾病，目前癫痫的发病机制还不十分清楚，但多数学者认为遗传因素是一个重要的发病原因<sup>[1]</sup>。在癫痫人群中约有25%的患儿进展为难治性癫痫<sup>[2]</sup>。谷氨酸受体基因(GRIK2)定位于6号染色体q21区域，研究表明该区域与多种精神疾病的易感性相关<sup>[3]</sup>。GRIK2是离子型谷氨酸受体家族的一员，在大脑中大量表达，尤其是在海马和杏仁核区<sup>[3]</sup>。Guo等<sup>[4]</sup>研究人员发现GRIK2基因与癫痫的易感性相关。由于环境、地域以及人群的差异，该基因的多态性是否与我国中部地区汉族人群中儿童癫痫的易感性相关值得进一步探讨。本研究以我国中部地区儿童癫痫患儿为研究对象，探讨GRIK2基因两个SNP位点(rs9390754和rs4840200)的多态性与儿童癫痫的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取2009年6月至2014年9月在我院就诊、诊断为癫痫的患儿284例作为研究对象。患儿均来自我国中部地区的汉族儿童。癫痫的诊断标准参考2005年国际抗癫痫联盟(ILAE)对癫痫的定义<sup>[5]</sup>：癫痫是一种脑部疾病，特点是持续存在产生痫性发作的持久性改变，并出现相应的神经生物学、认知、心理学及社会等方面的后果；诊断癫痫至少需要一次以上的痫性发作。

284例患儿中，难治性癫痫132例，非难治性癫痫组152例。其中难治性癫痫的诊断标准为：患儿每月发作4次以上，正规使用抗癫痫药物且血药浓度在有效范围内，治疗两年以上仍不能控制发作，同时排除中枢性神经系统疾病或占位性病<sup>[6]</sup>。选取同期来我院体检的中部地区正常汉族儿童315例作为对照。284例癫痫患儿中，男160例，女124例，平均年龄 $5 \pm 3$ 岁；对照组315例儿童中，男173例，女142例，平均年龄 $5 \pm 3$ 岁。两组儿童的年龄、性别差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。本研究得到我院医学伦理委员会批准及患儿家长的知情同意。

### 1.2 基因组DNA提取

分别抽取癫痫患儿和对照组儿童静脉血

2 mL，利用提基因组的试剂盒(上海生工公司)提取DNA，并测定浓度。PCR分别扩增含有两个SNP位点的片段。设计的引物分别为F1: CAGTCTATGTTTTGACACTGAT, R1: CAATTAGAGCAGAGAACAGAAAAG(引入酶切位点EcoRV, 扩增含rs9390754的片段); F2: CACAATTACATATGCACCATTGAATT, R2: AGAGGTTCA AGAACCAAGAAGC(引入酶切位点EcoRI, 扩增含rs4840200的片段)。PCR反应体系为25  $\mu$ L, 含有10倍浓度PCR反应缓冲液2.5  $\mu$ L, 10 mM dNTP混合液1  $\mu$ L, 10  $\mu$ M引物各1  $\mu$ L, Taq酶1U(TAKARA公司)。PCR反应条件: 94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 57  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 共34个循环。PCR产物分别利用限制性内切酶EcoRV和EcoRI进行酶切分析。

### 1.3 统计学分析

所有数据采用SPSS 16.0统计软件分析，频率计数法计算基因型和等位基因频率，组间基因型频率分布和等位基因频率分布比较采用 $\chi^2$ 检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 癫痫组及对照组中GRIK2基因型频率分布

癫痫组和对照组两组的基因型均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律( $P > 0.05$ )，说明各组具有群体代表性。该基因SNP位点rs9390754的基因型确定：PCR产物经酶切电泳后GG基因型显示172 bp 1个条带，AA基因型显示149 bp 1个条带，而AG基因型显示以上两个条带。SNP位点rs4840200的基因型确定：经酶切以后TT基因型显示166 bp 1个条带，CC基因型显示142 bp 1个条带，CT基因型显示以上两个条带。见图1。

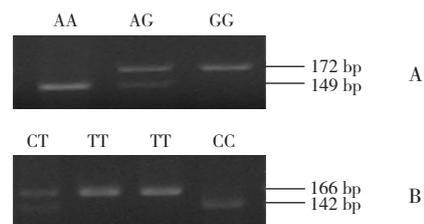


图1 GRIK2基因SNP位点的基因型电泳分析

A: rs9390754位点的3种基因型: AA、AG和GG; B: rs4840200位点的3种基因型: CT、TT和CC。

SNP 位点 (rs9390754) 的基因型分布及等位基因分布与对照组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。利用 PS (Power and Sample Size Program) 软件对其群体的统计学效率分析得

出 power 值为 0.870, 排除了假阳性的可能。而另一个 SNP 位点 (rs4840200) 的基因型分布及等位基因分布与对照组相比差异均无统计学意义, 见表 2。

表 1 GRIK2 基因 SNP 位点 (rs9390754) 基因型及等位基因在癫痫组及对照组中的分布 [n (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		GG	AG	AA	G	A
对照组	315	48(15.2)	129(40.9)	138(43.9)	225(35.7)	405(64.3)
癫痫组	284	65(22.9)	122(42.9)	97(34.2)	252(44.4)	316(55.6)
$\chi^2$ 值		8.324			9.331	
OR(95%CI)		1.927(1.223~3.035)	1.345(0.940~1.926)	1.000	1.435(1.138~1.811)	
P 值		0.016			0.002	

表 2 GRIK2 基因 SNP 位点 (rs4840200) 基因型及等位基因在癫痫组及对照组中的分布 [n (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
对照组	315	94(29.8)	163(51.7)	58(18.5)	351(55.7)	279(44.3)
癫痫组	284	99(34.9)	146(51.4)	39(13.7)	344(60.6)	224(39.4)
$\chi^2$ 值		3.191			2.883	
OR(95%CI)		1.556(0.955~2.568)	1.332(0.838~2.117)	1.000	1.221(0.970~1.537)	
P 值		0.203			0.089	

## 2.2 GRIK2 基因两个 SNP 位点的基因型频率在癫痫亚组中的分布

GRIK2 基因的 SNP 位点 (rs9390754) 的基因型频率以及等位基因频率在难治性癫痫和非难治性癫痫两组间差异无统计学意义 (分别  $P=0.645$ 、

0.321), 见表 3。SNP 位点 (rs4840200) 的基因型频率在两组之间差异无统计学意义, 但难治性癫痫组患儿携带 C 等位基因的频率显著高于非难治性癫痫组患儿 ( $P=0.037$ ), 见表 4。

表 3 GRIK2 基因 SNP 位点 (rs9390754) 基因型频率在癫痫亚组中的分布 [n (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		GG	AG	AA	G	A
非难治性组	152	32(21.1)	65(42.8)	55(36.1)	129(42.4)	175(57.6)
难治性组	132	33(25.0)	57(43.2)	42(31.8)	123(46.6)	141(53.4)
$\chi^2$ 值		0.878			0.989	
OR(95%CI)		1.350(0.719~2.537)	1.148(0.672~1.964)	1.000	1.183(0.849~1.649)	
P 值		0.645			0.321	

表 4 GRIK2 基因 SNP 位点 (rs4840200) 基因型频率在癫痫亚组中的分布 [n (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
非难治性组	152	47(30.9)	78(51.3)	27(17.8)	172(56.6)	132(43.4)
难治性组	132	52(39.4)	68(51.5)	12(9.1)	172(65.2)	172(34.8)
$\chi^2$ 值		5.325			4.348	
OR(95%CI)		2.489(1.134~5.464)	1.962(0.923~4.168)	1.000	1.435(1.021~2.016)	
P 值		0.069			0.037	

### 3 讨论

谷氨酸是中枢神经系统内重要的兴奋性神经递质,在突触的信号传递、学习记忆以及神经系统发育过程中发挥着重要作用;而谷氨酸受体分为两类:代谢型和离子型受体<sup>[7]</sup>。GRIK2是离子型受体家族的一员,GRIK2基因位于6q21区,也就是存在于被报道的多种精神疾病的易感连锁区域。2015年Manuel等<sup>[8]</sup>利用全基因组关联分析(GWAS)发现该基因与强迫性的神经失调存在相关性。Cordoba等<sup>[9]</sup>研究发现GRIK2基因的异常突变可能导致智力障碍等相关的疾病。Lee等<sup>[10]</sup>研究小组发现GRIK2基因的三联碱基TAA的重复突变与亨廷顿舞蹈症的发病年龄不存在相关性。Griswold等<sup>[11]</sup>和Casey等<sup>[12]</sup>均发现GRIK2基因可能与孤独症谱系障碍的发病相关。

GRIK2一直被认为是癫痫的候选基因,细胞水平改变GRIK2基因的表达实验以及敲除的小鼠模型实验均表明该基因对癫痫发作的维持以及控制存在相关性<sup>[13]</sup>。SNP位点(rs9390754)位于GRIK2基因的内含子区域,本研究发现该位点的多态性与癫痫的易感性相关,G等位基因为风险因子,携带GG基因型的人群患癫痫的风险是AA基因型的1.927倍,该结论与Guo等<sup>[4]</sup>研究小组的结果具有一致性,推测该位点可能单独或者连锁其他位点共同影响GRIK2基因的表达水平,导致机体在兴奋传导过程中发生异常,进而导致癫痫的发作,具体的分子机制还需进一步研究证实。

SNP位点rs4840200也位于GRIK2基因的内含子区域,本研究显示该位点的多态性与癫痫的易感性不相关,该结论与Guo等<sup>[4]</sup>研究小组的结果存在差异,可能的原因是:(1)地区及人群不同;(2)本研究的研究对象均是儿童患者,不包括成人,而Guo等<sup>[4]</sup>的研究对象包括成人。

此外,本研究根据治疗效果将癫痫患儿分为难治性癫痫和非难治性癫痫两个亚组,并比较各位点基因型在两组间的分布差异,发现SNP位点(rs4840200)的C等位基因频率在两组中的分布差异有统计学意义,推测该位点可能与癫痫的疗效相关,即携带C等位基因的患儿发作不容易控制,易进展为难治性癫痫。

综上所述,GRIK2基因的SNP位点(rs9390754)的多态性与癫痫的易感性相关,而另一SNP位点

(rs4840200)的C等位基因可能是容易发生耐药的遗传学危险因素,该结论对深入认识癫痫的发病及耐药机制提供了一定的依据。但以上结论需要大样本、多中心的进一步验证,具体的分子机制还需要今后进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Hani AJ, Mikait HM, Mikait MA. Genetics of pediatric epilepsy[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2015, 62(3): 703-722.
- [2] 孟曙庆,张洪. 难治性癫痫的治疗进展[J]. *中华临床医师杂志*, 2013, 7(15): 7115-7119.
- [3] 高成阁,陈元堂,余冰,等. 谷氨酸受体基因多态性与精神分裂症的相关性研究[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2009, 18(12): 1093-1096.
- [4] Guo YL, Larry W, Sham PC, et al. Two-stage genome-wide association study identifies variants in CAMSAP1L1 as susceptibility loci for epilepsy in Chinese[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(5): 1184-1189.
- [5] Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) [J]. *Epilepsia*, 2005, 46(4): 470-472.
- [6] 吴逊,沈鼎烈. 难治性癫痫[J]. *中华神经科杂志*, 1998, 31(1): 4.
- [7] Laqrnha VL, Matte U, Carvalho TG, et al. Increased glutamate receptor and transporter expression in the cerebral cortex and striatum of *gcdh*<sup>-/-</sup> mice: possible implications for the neuropathology of glutaric acidemia type I[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90477.
- [8] Manuel M, Samuels JF, Wang Y, et al. Genome-wide association study in obsessive-compulsive disorder: results from the OCGAS[J]. *Mol Psychiatry*, 2015, 20(3): 337-344.
- [9] Cordoba M, Rodriguez S, Gonzalez MD, et al. Expanding the spectrum of Grik2 mutations: intellectual disability, behavioural disorder, epilepsy and dystonia[J]. *Clin Genet*, 2015, 87(3): 293-295.
- [10] Lee JH, Lee JM, Ramos EM, et al. TAA repeat variation in the GRIK2 gene does not influence age at onset in Huntington's disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(3): 404-408.
- [11] Griswold AJ, Ma D, Cukier HN, et al. Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(15): 3513-3523.
- [12] Casey JP, Maqalhaes T, Conroy JM, et al. A novel approach of homozygous haplotype sharing identifies candidate genes in autism spectrum disorder[J]. *Hum Genet*, 2012, 131(4): 565-579.
- [13] Telfeian AE, Federoff HJ, Leone P, et al. Overexpression of GluR6 in rat hippocampus produces seizures and spontaneous nonsynaptic bursting *in vitro*[J]. *Neurobiol Dis*, 2000, 7(4): 362-374.

(本文编辑: 邓芳明)