

神经系统疾病专题·论著

## mTOR 基因多态性与小儿癫痫易感性的相关性

乐鑫<sup>1</sup> 赵培伟<sup>1</sup> 刘智胜<sup>2</sup> 吴革菲<sup>2</sup> 涂飞<sup>1</sup> 胡家胜<sup>2</sup> 何学莲<sup>1</sup>

(武汉市儿童医院 1. 中心实验室; 2. 神经内科, 湖北 武汉 430016)

**[摘要]** **目的** 探讨哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)基因两个SNP位点rs2295080和rs2536的多态性与小儿癫痫易感性的关系。**方法** 采用病例对照研究,选取480例癫痫患儿(包括116例难治性癫痫)以及503例健康儿童作为研究对象。利用PCR-RFLP方法进行两个SNP位点的多态性检测,比较两组儿童基因型及等位基因的分布频率。**结果** 癫痫组SNP位点rs2295080的基因型(TT、TG、GG)频率和等位基因频率与健康对照组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ );SNP位点rs2536的基因型(AA、AG、GG)频率两组比较差异亦无统计学意义( $P>0.05$ ),但癫痫组的等位基因G频率显著高于健康对照组( $OR=1.344$ ,  $P=0.042$ , 95%CI: 1.010~1.789)。**结论** mTOR基因SNP位点rs2536与癫痫的易感性可能相关。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(6): 560-564]

**[关键词]** 癫痫;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;基因多态性;儿童

### Association of mammalian target of rapamycin gene polymorphisms with the risk of pediatric epilepsy

YUE Xin, ZHAO Pei-Wei, LIU Zhi-Sheng, WU Ge-Fei, TU Fei, HU Jia-Sheng, HE Xue-Lian. Clinical Research Center, Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430016, China (He X-L, Email: hexuelian2013@hotmail.com)

**Abstract: Objective** To study the association between two single nucleotide polymorphisms (SNP), rs2295080 and rs2536, in mammalian target of rapamycin (mTOR) gene and the susceptibility to pediatric epilepsy. **Methods** A case-control study was performed on 480 children with epilepsy (116 cases of refractory epilepsy) and 503 healthy children. SNP rs2295080 and rs2536 in the mTOR gene were detected by polymerase chain reaction restriction and fragment length polymorphisms (PCR-RFLP). Genotype and allele frequencies of SNP rs2295080 and rs2536 were compared between the children with epilepsy and healthy controls. **Results** There were no significant differences in the genotype and allele frequencies of SNP rs2295080 between the children with epilepsy and healthy controls. There were no significant differences in the genotype frequencies of SNP rs2536 between the two groups either, but the frequency of G allele of SNP rs2536 was higher in children with epilepsy than that in healthy controls ( $P=0.042$ ,  $OR=1.344$ , 95%CI: 1.010-1.789). **Conclusions** SNP rs2536 of mTOR gene may be associated with the risk of pediatric epilepsy.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(6): 560-564]

**Key words:** Epilepsy; Mammalian target of rapamycin; Genetic polymorphism; Child

癫痫是危害儿童身心健康和认知功能的神经系统的重要疾病之一,目前发病机制还不完全清楚,遗传因素在其中占有重要的地位。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种进化上高度保守的苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶,其广泛参与到包括神经发育在内的多

项生理病理过程。目前研究表明,mTOR信号通路的异常激活和癫痫的发生发展有着重要联系<sup>[1]</sup>,动物实验发现,雷帕霉素不仅可以控制癫痫发作,还能够改善甚至逆转相关的病理改变<sup>[2]</sup>。然而,该信号通路异常介导癫痫发生发展的分子机制仍不是十分清楚。

[收稿日期] 2015-03-21; [接受日期] 2015-05-26

[基金项目] 湖北省自然科学基金(2011CDB306)。

[作者简介] 乐鑫,男,博士,主管技师。

[通信作者] 何学莲,女,副主任技师。

mTOR 基因上存在许多单核苷酸多态性 (SNP) 位点, 其中 rs2295080 位于该基因的启动子区, 与基因的转录活性相关, rs2536 位于该基因的 3' 非翻译区 (3'UTR), 能够影响 miRNA 的结合<sup>[3]</sup>。以上两个 SNP 位点能够分别在转录和翻译水平调控 mTOR 基因的表达, 导致 mTOR 信号通路活性的改变, 进而可能与癫痫的发生发展相关。本研究以我国中部地区儿童为研究对象, 通过对癫痫患儿以及健康对照儿童 mTOR 基因 SNP rs2295080 和 rs2536 位点的检测, 探讨 mTOR 基因多态性与儿童癫痫易感性的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

2010年9月至2012年9月我院神经内科门诊或住院的480例癫痫患儿作为研究对象, 所有患儿均行脑电图 (EEG)、头颅CT或MRI检查, 诊断标准参照2005年国际抗癫痫联盟 (ILAE) 和国际癫痫局 (IBE) 对癫痫的最新定义<sup>[4]</sup>。480例癫痫患儿中, 难治性癫痫 (RE) 116例, 非RE 364例。RE患儿的入选标准为: 临床上每月4次以上频繁的癫痫发作, 应用抗癫痫药物进行正规治疗且血药浓度在有效范围之内, 两年以上仍不能控制发作, 同时排除了进行性中枢神经系统疾病或占位性病变。并选择同时期体检正常的汉族儿童503例作为对照组。本研究经我院学术伦理委员会讨论通过并获得家长书面知情同意。

癫痫组480例患儿中, 男277例, 女203例, 均为汉族, 平均年龄  $5.1 \pm 3.2$  岁; 对照组儿童503例, 男296例, 女207例, 均为汉族, 平均年龄  $5.5 \pm 3.5$  岁。两组儿童的年龄、性别差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 1.2 基因组DNA的提取

采集患儿静脉血2 mL, 用DNA抽提试剂盒 (Axygen) 提取基因组DNA, 并测定其浓度。

### 1.3 mTOR 基因多态性分析

针对 mTOR 的两个 SNP 位点 rs2295080 和

rs2536, 分别设计引物 (上海生工公司合成): mTOR rs2295080-F: 5'-GTGGGTCTGGACATTACGCC-3'; mTOR rs2295080-R: 5'-CAGTCCATCTTCT-CCCTATACCTG-3'; mTOR rs2536-F: 5'-TGCAGC-AGGGTTCTGGGATGTTT-3'; mTOR rs2536-R: 5'-TTTAGTTGAGTATTTGTTCTGCTCAGAATT-3'。

PCR 反应体系为: 基因组 DNA 100 ng, dNTP 200  $\mu$ M,  $MgCl_2$  1.5 mM, 上下游引物各 0.5  $\mu$ M, Taq DNA 聚合酶 (TAKARA) 1 U, 加水至终体积 25  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 5  $\mu$ L PCR 扩增产物分别利用限制性内切酶 (NEB) FokI (rs2295080) 和 EcoRI (rs2536) 进行酶切处理后, 于 3% 琼脂糖凝胶中电泳 30 min 观察条带并判定基因型。

### 1.4 统计学分析

利用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析, 频率计数法计算癫痫组和对照组基因型和等位基因频率, 并利用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验。各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, 关联程度采用 logistic 回归分析, 以 OR 和 95%CI 表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 mTOR 基因多态性的判读

利用 PCR-RFLP 对 mTOR 基因多态性进行检测: 对于 rs2295080 位点, PCR 扩增产物为 222 bp, 经 FokI 酶切后, TT 基因型为 167 和 55 bp 两个片段, TG 基因型为 222、167 和 55 bp 3 个片段, GG 基因型为 222 bp 1 个片段 (图1); 对于 rs2536 位点, PCR 扩增产物为 149 bp, 经 EcoRI 酶切后, AA 基因型为 149 bp 1 个片段, AG 基因型为 149、121 和 28 bp 3 个片段, GG 基因型为 121 和 28 bp 两个片段 (图1)。

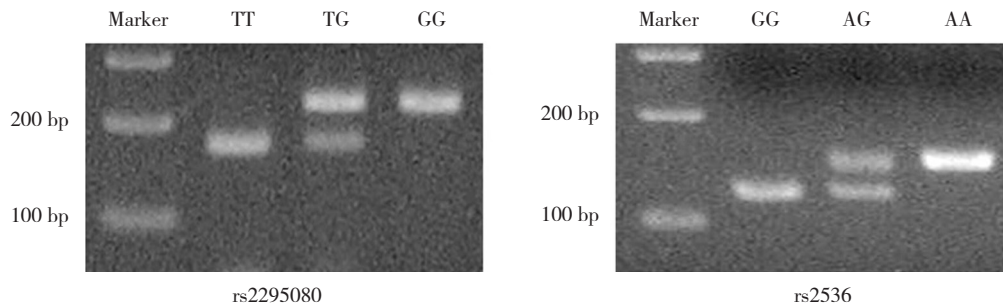


图 1 mTOR 基因两个 SNP 位点基因型的确定 rs2295080 位点的 3 个基因型分别为 TT、TG 和 GG；rs2536 位点的 3 个基因型分别为 GG、AG 和 AA。

## 2.2 mTOR 基因多态性和癫痫的相关性分析

癫痫组和对照组两组经检验均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律，说明其具有群体代表性。对于 rs2295080 位点，癫痫组和对照组中的基因型及等位基因频率差异均无统计学意义（表 1）。对于 rs2536 位点，癫痫组和对照组中的基因型分布总体差异无统计学意义（ $P=0.087$ ），但癫痫组的

G 等位基因频率高于对照组，表明 G 为易感等位基因（ $OR=1.344$ ， $P=0.042$ ，95%CI: 1.010~1.789）（表 2）。

## 2.3 RE 和非 RE 患儿 mTOR 基因多态性的比较

RE 亚组和非 RE 亚组 rs2295080 位点和 rs2536 位点的基因型及等位基因频率差异均无统计学意义（表 3~4）。

表 1 癫痫组和对照组间 rs2295080 位点基因型及等位基因频率比较 [例(%)]

| 组别           | 例数  | 基因型       |                    |                    | 等位基因      |                    |
|--------------|-----|-----------|--------------------|--------------------|-----------|--------------------|
|              |     | TT        | TG                 | GG                 | T         | G                  |
| 对照组          | 503 | 293(58.2) | 188(37.4)          | 22(4.4)            | 774(76.9) | 232(23.1)          |
| 癫痫组          | 480 | 271(56.5) | 179(37.3)          | 30(6.2)            | 721(75.1) | 239(24.9)          |
| $\chi^2$ 值   |     |           | 1.772              |                    |           | 0.907              |
| $P$ 值        |     |           | 0.412              |                    |           | 0.341              |
| $OR(95\%CI)$ |     | 1.00      | 1.029(0.791~1.339) | 1.474(0.830~2.619) | 1.00      | 1.106(0.899~1.360) |

表 2 癫痫组和对照组间 rs2536 位点基因型及等位基因频率比较 [例(%)]

| 组别           | 例数  | 基因型       |                    |                     | 等位基因      |                    |
|--------------|-----|-----------|--------------------|---------------------|-----------|--------------------|
|              |     | AA        | AG                 | GG                  | A         | G                  |
| 对照组          | 503 | 410(81.5) | 91(18.1)           | 2(0.4)              | 911(90.6) | 95(9.4)            |
| 癫痫组          | 480 | 368(76.7) | 106(22.1)          | 6(1.2)              | 842(87.7) | 118(12.3)          |
| $\chi^2$ 值   |     |           | 4.874              |                     |           | 4.125              |
| $P$ 值        |     |           | 0.087              |                     |           | 0.042              |
| $OR(95\%CI)$ |     | 1.00      | 1.298(0.949~1.776) | 3.342(0.670~16.663) | 1.00      | 1.344(1.010~1.789) |

表 3 RE 亚组和非 RE 亚组间 rs2295080 位点基因型及等位基因频率比较 [例(%)]

| 组别           | 例数  | 基因型       |                    |                    | 等位基因      |                    |
|--------------|-----|-----------|--------------------|--------------------|-----------|--------------------|
|              |     | TT        | TG                 | GG                 | T         | G                  |
| 非 RE 亚组      | 364 | 202(55.5) | 141(38.7)          | 21(5.8)            | 545(74.9) | 183(25.1)          |
| RE 亚组        | 116 | 69(59.5)  | 38(32.8)           | 9(7.7)             | 176(75.9) | 56(24.1)           |
| $\chi^2$ 值   |     |           | 1.648              |                    |           | 0.094              |
| $P$ 值        |     |           | 0.439              |                    |           | 0.759              |
| $OR(95\%CI)$ |     | 1.00      | 0.789(0.503~1.238) | 1.255(0.549~2.870) | 1.00      | 0.948(0.672~1.337) |

表 4 RE 亚组和非 RE 亚组间 rs2536 位点基因型及等位基因频率比较 [例(%) ]

| 组别         | 例数  | 基因型       |                    |                    | 等位基因      |                    |
|------------|-----|-----------|--------------------|--------------------|-----------|--------------------|
|            |     | AA        | AG                 | GG                 | A         | G                  |
| 非 RE 亚组    | 364 | 277(76.1) | 83(22.8)           | 4(1.1)             | 637(87.5) | 91(12.5)           |
| RE 亚组      | 116 | 91(78.4)  | 23(19.8)           | 2(1.7)             | 205(88.4) | 27(11.6)           |
| $\chi^2$ 值 |     |           | 0.691              |                    |           | 0.121              |
| P 值        |     |           | 0.708              |                    |           | 0.728              |
| OR(95%CI)  |     | 1.00      | 0.844(0.502~1.417) | 1.522(0.274~8.447) | 1.00      | 0.922(0.583~1.457) |

### 3 讨论

mTOR 基因定位于染色体 1p36.2 上, 编码的蛋白质含有 2549 个氨基酸残基, 分子量为 289 KD, 是一种保守的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶。mTOR 在人体内以两种复合物的形式存在, 即 mTORC1 和 mTORC2, 其受上游多种信号途径调控, 主要包括 PI3K/Akt 通路的激活作用和 LKB1/AMPK 通路的抑制作用<sup>[5-6]</sup>, 然后 mTOR 通过磷酸化核糖体 S6 蛋白激酶 (RSK) 和起始因子 4E 结合蛋白 (4E-BPs) 等多种翻译因子调节细胞的生长、增殖、分化和代谢<sup>[6-7]</sup>。

在大脑皮层的发育过程中, mTOR 信号通路发挥了关键的作用<sup>[7]</sup>, 该通路受到多种因子的负调控, 其中包括肿瘤抑制基因 TSC1 和 TSC2, 以及它们的上游调控子 PTEN、NF1 和 STRADA 等<sup>[8]</sup>。这些基因的突变会导致 mTOR 信号通路的异常激活, 从而产生异常的分化、增殖和生长等细胞学效应, 并引发多种遗传性癫痫疾病, 例如结节性硬化症、多发性神经纤维瘤、Proteus 综合征、羊水过多 - 巨颅 - 症状性癫痫综合征等。最近的几组研究表明, 在半侧巨脑畸形所致的顽固性癫痫患儿体内, 存在 PI3K、AKT3 和 mTOR 基因的突变<sup>[9-10]</sup>。在一项以婴儿痉挛和 Lennox-Gastaut 综合征为代表的癫痫性脑病患儿新生突变的筛查中, 也发现了 mTOR 基因的突变, 并且该突变不伴随脑部畸形<sup>[11]</sup>。这些结果表明, mTOR 上游的调控因子以及 mTOR 自身的异常与癫痫的发病相关。然而, mTOR 信号通路异常介导癫痫发生发展的下游分子机制仍不十分清楚, 从已有的研究推测, 其可能与离子通道、细胞凋亡、炎症因子、胶质增生和突触可塑性等一系列的异常相关<sup>[12]</sup>。

目前, mTOR 基因上已发现有 3000 多个 SNP 位点, 其中 rs2295080 位点定位于该基因的启动子

区域, 被证明与转录调控相关, 含有等位基因 T 的启动子具有较高的转录活性, 相应的基因型为 TT 的个体 mTOR 的 mRNA 水平较高<sup>[13]</sup>; rs2536 位点定位于该基因的 3' 非翻译区, 被认为与 miRNA 的结合相关, 包含两种等位基因的序列, 分别能结合不同的 miRNA, 从而在翻译水平调控 mTOR 的表达<sup>[14]</sup>。鉴于 mTOR 在 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中的核心作用, 推测其多个功能性的 SNP 位点可能参与到该信号通路的调控中, 特别是以上两个 SNP 位点, 它们能分别在转录和翻译水平调控 mTOR 基因的表达, 进一步导致 mTOR 通路活性的改变, 从而可能和多种疾病相关联。目前研究得比较多的是 mTOR 基因多态性和癌症的相关性: mTOR rs2295080 与多种癌症的易感性相关, 携带 TT 基因型人群的患病风险增加<sup>[15]</sup>; mTOR rs2536 与前列腺癌以及小儿急性淋巴细胞白血病具有相关性<sup>[14-15]</sup>, 但与其他类型的癌症并未发现关联。虽然已知 mTOR 信号通路异常和癫痫的发病相关, 但 mTOR 基因多态性与癫痫的相关性还未见报道, 在小儿癫痫中进行该基因多态性的研究, 对于阐明 mTOR 信号通路的异常激活导致癫痫发生发展的机制具有重要意义。

本研究探讨了 mTOR 基因两个多态性位点和小儿癫痫易感性的相关性, 其中 SNP 位点 rs2295080 与小儿癫痫易感性未见相关性, 而 SNP 位点 rs2536 的 G 等位基因频率在癫痫组中显著高于对照组, 表明 G 可能为癫痫的易感等位基因; 另外, RE 和非 RE 患儿以上两个 SNP 位点基因频率的分布没有显著性差异。然而, 在癫痫患儿体内, SNP 位点 rs2536 是如何致病的, 其激活 mTOR 信号通路并影响患儿神经系统功能的相关机制还不清楚, 这是我们下一步探索和研究的重点。本研究探讨的是 mTOR 基因的两个多态性与小儿癫痫易感性的相关性, 而并非 mTOR 基因突变研究,



此外研究对象的父母,特别是对照组儿童父母血液的获取也存在一定难度,因此并没有检测研究对象父母相应的基因型和等位基因频率。

综上所述, mTOR 基因 SNP 位点 rs2536 与小儿癫痫易感性可能存在相关性,但是该位点导致 mTOR 信号通路的异常激活,进而介导癫痫发生的具体机制还需要继续深入研究。同时,通过扩大样本量和增加 mTOR 基因 SNP 位点等手段,有助于深入探索 mTOR 基因多态性和癫痫的相关性,从而进一步揭示 mTOR 信号通路介导癫痫发生发展的分子机制。

#### [参 考 文 献]

- [1] Lipton JO, Sahin M. The neurology of mTOR [J]. *Neuron*, 2014, 84(2): 275-291.
- [2] Zeng LH, Rensing NR, Wong M. The mammalian target of rapamycin signaling pathway mediates epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(21): 6964-6972.
- [3] Shao JB, Li Y, Zhao PW, et al. Association of mTOR polymorphisms with cancer risk and clinical outcomes: a meta-analysis [J]. *PloS one*, 2014, 9(5): e97085.
- [4] 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.
- [5] Kwiatkowski DJ. Tuberous sclerosis: from tubers to mTOR [J]. *Ann Hum Genet*, 2003, 67(Pt1): 87-96.
- [6] Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(1): 19-24.
- [7] Crino PB. mTOR: A pathogenic signaling pathway in developmental brain malformations [J]. *Trends Mol Med*, 2011, 17(12): 734-742.
- [8] Galanopoulou AS, Gorter JA, Cepeda C. Finding a better drug for epilepsy: The mTOR pathway as an antiepileptogenic target [J]. *Epilepsia*, 2012, 53(7): 1119-1130.
- [9] Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, et al. De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(8): 941-945.
- [10] Poduri A, Evrony GD, Cai X, et al. Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations [J]. *Neuron*, 2012, 74(1): 41-48.
- [11] Epi4K Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project (Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, et al). De novo mutations in epileptic encephalopathies [J]. *Nature*, 2013, 501(7466): 217-221.
- [12] 林堃, 林元相, 康德智. mTOR 信号通路与癫痫 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2012, 39(2): 168-172.
- [13] Cao Q, Ju X, Li P, et al. A functional variant in the MTOR promoter modulates its expression and is associated with renal cell cancer risk [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50302.
- [14] Li Q, Gu C, Zhu Y, et al. Polymorphisms in the mTOR gene and risk of sporadic prostate cancer in an Eastern Chinese population [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71968.
- [15] Huang L, Huang J, Wu P, et al. Association of genetic variations in mTOR with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population [J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(5): 947-951.

(本文编辑: 邓芳明)