

文章编号:1003-2754(2019)04-0331-04

# 中国东北地区 CD40 及 CD40L 基因多态性与散发帕金森病的相关性分析

刘琳<sup>1</sup>, 张玮<sup>2</sup>, 罗晓光<sup>3</sup>, 梁战华<sup>1</sup>

**摘要:** 目的 探究 CD40 基因 rs1883832 位点及 CD40L 基因 rs1126535 位点单核苷酸多态性与帕金森病 (Parkinson disease, PD) 的相关性。方法 本研究纳入 285 名中国东北地区汉族健康人和 396 例 PD 患者。根据其发病年龄将 PD 组患者再分为早发 PD 组 (发病年龄 ≤ 50 岁) 和晚发 PD 组 (发病年龄 > 50 岁), 收集一般临床资料, 提取外周血基因组 DNA, 利用 MALDI-TOF-PEX 技术检测 rs1883832 位点及 rs1126535 位点多态性分布情况, 分析其与帕金森病的相关性。结果 EOPD 组与对照组 rs1883832 位点基因型分布有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 等位基因频率在两组间没有统计学差异。PD 组和 LOPD 组与对照组在 rs1883832 位点及 rs1126535 位点上, 基因型及等位基因型频率无统计学差异。结论 CD40 基因 rs1883832 位点单核苷酸多态性与中国东北地区汉族早发帕金森病相关, T 等位基因可能是 EOPD 的危险因素。

**关键词:** 帕金森病; CD40; CD40L; 单核苷酸多态性; 小胶质细胞

**中图分类号:** R742.5 **文献标识码:** A

**Association study of CD40 and CD40L gene polymorphism with Parkinson disease in the northeast Han Chinese population** LIU Lin, ZHANG Wei, LUO Xiaoguang, et al. (Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

**Abstract:** **Objective** We conducted a case-control study to verify the association of CD40 rs1883832 and CD40L rs1126535 gene polymorphism with PD in the northeast Han Chinese population from mainland China. **Methods** A total of 285 unrelated Han Chinese healthy people and 396 PD patients were included in the study. According to the onset age, the PD patients were divided into 2 groups: early onset PD group (onset age ≤ 50 years old) and late onset PD group (> 50 years old). Clinical data was collected and peripheral blood genomic DNA was extracted, and the correlation of rs2070045 SOLR1 with Parkinson's disease was analyzed by using MALDI-TOF-PEX technology. **Results** No significant differences were found in the genotype and allele frequency for rs1883832 and rs1126535 between PD group and healthy control (HC) groups. The genotype for rs1883832 in the early-onset PD group was significantly different from that in the HC group ( $P > 0.05$ ). There were no significant differences in genotype and allele frequency between late-onset PD and HC groups. **Conclusion** We have found that rs1883832 SNP of CD40 was associated with early-onset PD in the northeast Han Chinese population. T-allele of rs1883832 SNP increase the risk for early-onset PD, suggesting T-allele might be a risk factor of early-onset PD.

**Key words:** Parkinson disease; CD40; CD40L; Single nucleotide polymorphism; Microglia

帕金森病 (Parkinson disease, PD) 是一种常见的神经系统变性疾病, 其病因不明, 发病机制可能与环境、遗传、免疫、年龄等多种因素相关。目前普遍认为, 小胶质细胞 (Microglia, MI) 介导的免疫反应参与了整个疾病过程<sup>[1]</sup>。

CD40 是一种分子量 45 kD ~ 50 kD 肿瘤坏死因子受体超家族的跨膜蛋白<sup>[2]</sup>。它在 MI 上表达, 并通过与 CD40L 结合引起 TNF- $\alpha$  的大量分泌, 从而产生神经毒性作用。有研究报道, CD40 与配体 CD40L 相结合, 广泛参与体内的免疫及炎症反应, 与急性冠脉综合症的发病<sup>[3]</sup>、血管内血栓形成<sup>[4]</sup>及

动脉粥样硬化斑块的形成、发展和破裂的整个过程密切相关<sup>[5]</sup>。也有研究表明, CD40 参与的氧化应激反应可能与 PD 相关<sup>[2]</sup>, 而 CD40 与 CD40L 的多态性是否与 PD 发病相关, 目前国内外尚未见文献报道。

收稿日期: 2019-02-28; 修订日期: 2019-03-29

作者单位: (1. 大连医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁 大连 116011; 2. 大连医科大学附属第二医院脊柱外科, 辽宁 大连 116023; 3. 中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁 沈阳 110001)

通讯作者: 梁战华, E-mail: zhanhualiang@163.com

本研究采用 MALDI-TOF-MS 技术探究中国东北地区汉族人群中 CD40 基因 rs1883832 位点及 CD40L 基因 rs1126535 位点单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 频率分布与 PD 是否存在相关性。

## 1 对象及方法

1.1 研究对象 选取 2015 年 - 2018 年大连医科大学附属第一医院神经内科就诊的原发性帕金森病患者 396 例 (PD 组), 其中男性 204 例, 女性 192 例, 平均年龄 (62.23 ± 10.13) 岁 (38 ~ 81 岁), 所有患者的诊断均符合国际运动障碍疾病协会帕金森病诊断标准 (2015), 排除有继发性帕金森病、帕金森综合征、严重内科疾病患者及帕金森阳性家族史者。对照组选取同一时期来自大连医科大学附属第一医院的健康体检者 285 名 (对照组), 其中男性 153 名, 女性 132 名, 平均年龄 (62.48 ± 10.03) 岁 (34 ~ 86 岁)。所有对照组当前或既往无神经科相关疾病、帕金森病阳性家族史、严重的内科系统疾病、精神疾病者。全部对象均为籍贯为东北地区的汉族人群, 且相互间无血缘关系。本研究获得大连医科大学伦理委员会审核批准, 所有研究对象均签署知情同意书。

## 1.2 研究方法

1.2.1 一般资料收集 查阅患者的病历资料, 收集其人口学资料及临床表现, 记录患者的性别、年龄、起病年龄、病程、Hoehn-Yahr 分期等。PD 组按发病的年龄不同分为两组: 一组为早发 PD 组 (Early Onset Parkinson's disease, EOPD), 其发病年龄 ≤ 50 岁, 共 34 例, 年龄 34 ~ 50 岁, 平均年龄 (46.40 ± 4.85) 岁; 另一组为晚发 PD 组 (Late Onset Parkinson's disease, LOPD), 其发病年龄 > 50 岁, 共 362 例, 年龄 51 ~ 80 岁, 平均年龄 (65.55 ± 9.03) 岁。

1.2.2 基因组 DNA 提取 抽取研究对象外周静脉血约 3 ml, 采用 SDS-蛋白酶 K-酚氯仿法提取基因组 DNA 紫外分光光度计测定 DNA 浓度后, -20 °C 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增 用 Assay Designer 软件包设计 PCR 引物和单碱基延伸引物。rs1883832 C/T PCR 引物序列为: 5'-ACGTTGGATGTGGCTCCTGC-CGCCTGGTCT-3', 5'-ACGTTGGATGGCAAAAA-CAACTCACAGCG-3'; 单碱基延伸引物序列为: 5'-ggggAGGCAGACGAACCAT-3'。rs1126535T/C PCR 引物序列为: 5'-ACGTTGGATGGATTGGGTCAG-CACTTTTTG-3', 5'-ACGTTGGATGAGCCTTGTGCT-TCATCTTAC-3'; 单碱基延伸引物序列为: 5'-

gtTTCATCTTACCTTGTCCA-3'。突变分析用美国 SE-QUENOM 公司的 MassArray 系统完成, 该系统是基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 技术。PCR 反应体系总体积 5 μl, 其中含有 1 μl DNA 模版、0.95 μl ddH<sub>2</sub>O、0.625 μl PCR 缓冲液 (10 × 含 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>)、0.325 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L)、dNTP (2.5 mmol/L)、1 μl PCR 引物、1 μl HotStarTaq 酶 (5 U/μl)。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 15 min; 94 °C 变性 20 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 45 圈; 72 °C 延伸 3 min, 最后降至 4 °C。

1.2.4 碱性磷酸酶处理及单碱基延伸 碱性磷酸酶 (SAP) 体系总体积 2 μl, 包含 1.53 μl ddH<sub>2</sub>O、0.17 μl SAP 缓冲液、0.3 μl SAP 酶 (1 U/μl)。该反应在 37 °C 进行 40 min, 85 °C 5 min 最后降至 4 °C。SAP 处理后针对 SNP 位点进行单碱基延伸, 反应体系总体积 2 μl, 包括 0.755 μl ddH<sub>2</sub>O、0.2 μl iPLEX 缓冲液 (10 ×)、0.2 μl iPLEX 终止混合物、0.804 μl 延伸引物、0.041 μl iPLEX 酶。反应条件: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 变性 5 s, 52 °C 退火 5 s, 80 °C 延伸 5 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 3 min, 最后降至 4 °C。之后将产物进行纯化后备用。

1.2.5 MALDI-TOF-MS 分析 用 MassArray Nan-odispenser 将最终的分型产物点样到一块 384 孔的 SpectroCHIP 芯片上, 使用 MassARRAY Analyzer Compac 进行质谱检测。TYPER 软件分析实验结果, 获得分型数据。

1.3 统计学方法 采用统计分析软件 SPSS 22.0 对数据进行分析。运用  $\chi^2$  检验来比较各组间基因型频率及等位基因频率。用比值比 (OR) 值及其 95% 置信区间 (95% CI) 来评价相对风险。各组临床特征的比较采用 *t* 检验。实验数据中计量资料数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 临床资料的分析结果 在 PD 组及对照组中进行了年龄、性别等资料的收集和比较后发现, 两组对象在年龄、性别构成方面无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

2.2 CD40 及 CD40L 基因型检测结果 利用 MALDI-TOF-MS 技术进行 CD40 基因 rs1883832 及 CD40L 基因 rs1126535 分型鉴定。rs1883832 位点标准引物信号峰和 SNP 信号峰值分别为: 6220.1 Da、C: 6506.3 Da、T: 6489.3 Da。rs1126535 位点标准引物信号峰和 SNP 信号峰值分别为: 6012.9 Da、T:

6280.2Da、C:6296.2Da。CD40 基因 rs1883832 检测到 CC、CT、TT 3 种基因型(见图 1); CD40L 基因 rs1126535 检测到 TT、TC、CC 3 种基因型(见图 2)。

2.3 CD40 基因 rs1883832 基因型及等位基因型频率分布的比较 对 rs1883832 位点多态性在不同组中基因频率的分布进行比较后发现,EOPD 组与对照组 CC、CT 和 TT 基因型分布有统计学差异( $\chi^2=9.179, P=0.010$ ),而 C 和 T 等位基因频率在两组间没有统计学差异( $P=0.178$ )(见表 1)。在 PD 组和对照组比较以及 LOPD 组与对照组的比较中,CC、CT 和 TT 基因型分布差异没有统计学意义( $P>0.05$ ),C 和 T 等位基因频率在两组间亦没有

统计学差异( $P>0.05$ )(见表 1)。在多因素 Logistic 回归分析中,经过性别、起病年龄校正后,rs1883832 变异型 T 等位基因携带者(基因型 CT/TT)早发 PD 的发病风险是非携带者的 1.371 倍,提示 T 等位基因可能是早发 PD 的危险因素(95% CI: 1.078 ~ 1.986,  $P<0.05$ )。

2.4 CD40L 基因 rs1126535 基因型及等位基因型频率分布的比较 PD 组、EOPD 组及 LOPD 组分别与对照组比较,rs1126535 位点 CC、CT 和 TT 基因型分布差异没有统计学意义( $P>0.05$ ),C 和 T 等位基因频率在各组间亦没有统计学差异( $P>0.05$ )(见表 2)。

表 1 PD 组、EOPD 组及 LOPD 组 rs1883832 基因型及等位基因型频率分布(n%)

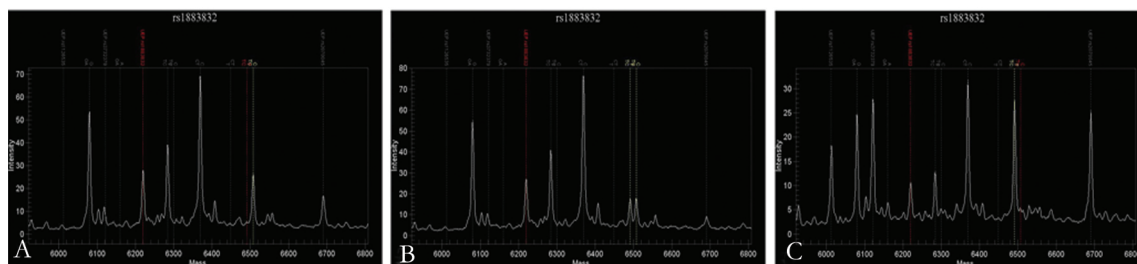
例数	基因型频率				P 值 <sup>1</sup>	等位基因型频率		
	CC	CT	TT			C	T	P 值 <sup>1</sup>
对照组	285	129(45.26%)	108(37.89%)	48(16.84%)		366(64.21%)	204(35.79%)	
PD 组	396	162(40.90%)	178(44.95%)	56(14.14%)	0.175	502(63.38%)	290(36.62%)	0.754
EOPD 组 <sup>2</sup>	34	8(23.53%)	22(64.71%)	4(11.76%)	0.010*	38(55.88%)	30(44.12%)	0.178
LOPD 组	362	154(42.54%)	156(43.09%)	52(14.36%)	0.375	464(64.09%)	260(35.91%)	0.964

注:1. PD 组、EOPD 组和 LOPD 组分别与对照组进行 $\chi^2$  检验,用 Fisher 确切概率法检验计算 P 值;2. EOPD 组和对照组基因型频率分布比较 \*  $P<0.05$

表 2 PD 组、EOPD 组及 LOPD 组 rs1126535 基因型及等位基因型频率分布(n%)

例数	基因型频率				P 值 <sup>1</sup>	等位基因型频率		
	TT	CT	CC			T	C	P 值 <sup>1</sup>
对照组	285	243(85.26%)	33(11.58%)	9(3.16%)		519(91.05%)	51(8.95%)	
PD 组	396	336(84.85%)	38(9.59%)	22(5.56%)	0.057	710(89.65%)	82(10.35%)	0.388
EOPD 组	34	26(76.47%)	7(20.59%)	1(2.94%)	0.325	59(86.76%)	9(13.23%)	0.252
LOPD 组	362	310(85.64%)	31(8.56%)	21(5.80%)	0.144	651(89.92%)	73(10.08%)	0.491

注:1. PD 组、EOPD 组和 LOPD 组分别与对照组进行 $\chi^2$  检验,用 Fisher 确切概率法检验计算 P 值



A:CC 基因型:仅可见单一 C 碱基引物延伸信号峰(6506.3Da),故基因型可以判定为 CC 型纯合子;B:CT 基因型:可见 C 碱基引物延伸信号峰(6506.3Da)及 T 碱基引物延伸信号峰(6489.3Da),故该位点基因型可判定为 CT 型杂合子;C:TT 基因型:仅可见单一 T 碱基引物延伸信号峰(6489.3Da)

图 1 rs1883832 位点经 MALDI-TOF-MS 技术检测后峰图

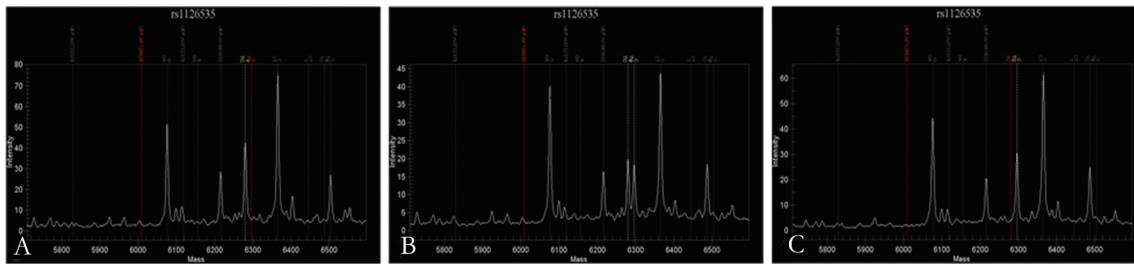


图2 rs1126535 位点经 MALDI-TOF-MS 技术检测后峰图  
A: TT 基因型: 仅可见单一 T 碱基引物延伸信号峰(6280.2Da), 故基因型可以判定为 TT 型纯合子; B: CT 基因型: 可见 T 碱基引物延伸信号峰(6290.2Da) 及 C 碱基引物延伸信号峰(6296.2Da), 故该位点基因型可判定为 CT 型杂合子; C: CC 基因型: 仅可见单一 C 碱基引物延伸信号峰(6296.2Da)

图2 rs1126535 位点经 MALDI-TOF-MS 技术检测后峰图

### 3 讨论

CD40 基因位于 20 号染色体 (q12-q13.2) 中, 编码 1.5 kb 大小的 mRNA<sup>[6]</sup>。CD40L (又称 CD154) 为 39 kDa 大小的 II 型跨膜蛋白, 属于肿瘤坏死因子超家族, 其编码基因位于染色体 Xq26<sup>[7]</sup>。CD40 与 CD40L 结合后激活 NF- $\kappa$ B 等炎性信号传导通路, 上调促炎基因的表达。CD40 基因 rs1883832 位点野生基因型为 CC, 存在 CT 及 TT 两种变异型。CD40L 基因 rs1126535 位点野生基因型为 TT, 存在 TC 及 CC 两种变异型。CD40 及 CD40L 基因多态性与帕金森病患者的相关性未见相关报道。

本研究发现 CD40 基因 rs1883832 位点 CC、CT 及 TT 基因型分布频率在 EOPD 组与对照组间比较有显著差异 ( $P < 0.05$ ), T 等位基因可能是早发帕金森病的危险因素; 而在晚发 PD 患者与对照组间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。该结果提示了早发帕金森病与传统 (晚发) 帕金森病可能存在不同的发病机制及遗传学背景。以往的研究认为早发帕金森病与晚发帕金森病在疾病进程、临床特点及药物疗效等诸多方面存在明显不同<sup>[8]</sup>, 与 EOPD 相关的基因包括 Parkin、PINK1、DJ-1、GBA、LRRK2 等<sup>[9]</sup>, 尚无 CD40 基因的相关报道。近年的研究认为 CD40 基因 rs1883832 与缺血性脑卒中的疾病易感性相关<sup>[10]</sup>, 并可通过调控 CD40/CD40L 的表达水平, 参与缺血性卒中的发生、发展<sup>[11]</sup>。上调的 CD40/CD40L 可介导 MI 的活化<sup>[12]</sup>, 而 MI 的过度活化是 PD 发病的重要原因, 因此 rs1883832 可能参与了 PD 的发病。

综上所述, 本研究显示了 CD40 基因 rs1883832 位点 C/T 多态性与早发帕金森病相关, T 等位基因可能是 EOPD 的危险因素。CD40L 基因 rs1126535 基因型及等位基因频率与 PD 无显著相关性。基因多态性受环境、生活习惯、地域及种族等多种因素影响, 仍需要进行多位点选择、更大规模的协同研究来验证。

### [参考文献]

- [1] Bachiller S, Jimenez-Ferrer I, Paulus A, et al. Microglia in neurological diseases: a road map to brain-disease dependent-inflammatory response [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12:488.
- [2] Okuno T, Nakatsuji Y, Kumanogoh A, et al. Loss of dopaminergic neurons by the induction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via CD 40; relevance to Parkinson's disease [J]. *J Neurosci Res*, 2005, 81:874-882.
- [3] Jansen MF, Hollander MR, van Royen N, et al. CD40 in coronary artery disease: a matter of macrophages [J]. *Basic Res Cardiol*, 2016, 111:38.
- [4] Han L, Dai L, Zhao YF, et al. CD40L promotes development of acute aortic dissection via induction of inflammation and impairment of endothelial cell function [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(3):371-385.
- [5] Jin R, Xiao AY, Song Z, et al. Platelet CD40 mediates leukocyte recruitment and neointima formation after arterial denudation injury in atherosclerosis-prone mice [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188:252-263.
- [6] Pamukcu B, Lip GY, Snezhitskiy V, et al. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease [J]. *Ann Med*, 2011, 43:331-340.
- [7] Garcia-Bermudez M, Gonzalez-Juanatey C, Lopez-Mejias R, et al. Study of association of CD40-CD154 gene polymorphisms with disease susceptibility and cardiovascular risk in Spanish rheumatoid arthritis patients [J]. *PLoS One*, 2012, 7:e49214.
- [8] Sheng K, Fang W, Zhu Y, et al. Different alterations of cerebral regional homogeneity in early-onset and late-onset Parkinson's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2016, 8:165.
- [9] Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, et al. Frequency of known mutations in early-onset Parkinson disease: implication for genetic counseling; the consortium on risk for early onset Parkinson disease study [J]. *Arch Neurol*, 2010, 67:1116-1122.
- [10] Huang HT, Guo J, Xiang Y, et al. A SNP in 5' untranslated region of CD40 gene is associated with an increased risk of ischemic stroke in a Chinese population; a case-control study [J]. *Genet Mol Biol*, 2017, 40:442-449.
- [11] Zhang B, Wu T, Song C, et al. Association of CD40-1C/T polymorphism with cerebral infarction susceptibility and its effect on sCD40L in Chinese population [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16:461-465.
- [12] Giunta B, Rezaei-Zadeh K, Tan J. Impact of the CD40-CD40L dyad in Alzheimer's disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, 9:149-155.