

- cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas[J]. *Cancer*, 2001,92:2786-2795.
- 20 Bantis A, Giannopoulos A, Gonidi M, et al. Expression of p120, Ki-67 and PCNA as proliferation biomarkers in imprint smears of prostate carcinoma and their prognostic value[J]. *Cytopathology*, 2004,15:25-31.
 - 21 Freeman JW, McGrath P, Bondada V, et al. Prognostic significance of proliferation associated nucleolar antigen p120 in human breast carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1991,51:1973-1978.
 - 22 Sarrio D, Perez-Mies B, Hardisson D, et al. Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions[J]. *Oncogene*, 2004, 23:3272-3283.
 - 23 Shibata T, Kokubu A, Sekine S, et al. Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer [J]. *Am J Pathol*, 2004,164:2269-2278.
 - 24 Dabbs DJ, Bhargava R, Chivukula M. Lobular versus ductal breast neoplasms: the diagnostic utility of p120 catenin[J]. *Am J Surg Pathol*, 2007,31:427-437.
 - 25 Karatzas G, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, et al. Expression patterns of the E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex in gastric cancer[J]. *Hepatogastroenterology*, 2000,47:1465-1469.
 - 26 Jawhari AU, Noda M, Pignatelli M, et al. Up-regulated cytoplasmic expression, with reduced membranous distribution, of the src substrate p120(ctn) in gastric carcinoma[J]. *J Pathol*, 1999,189: 180-185.
 - 27 Bellocin DI, Betes RC, Muzikansky A, et al. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease [J]. *Cancer Res*, 2005,65:10938-10945.
 - 28 Syrigos KN, Karayiannakis A, Syrigou EI, et al. Abnormal expression of p120 correlates with poor survival in patients with bladder cancer[J]. *Eur J Cancer*, 1998,34:2037-2040.
 - 29 Huang HY, Nong CZ, Guo LX, et al. p120(ctn) tyrosine phosphorylation are involved in the biologic behavior changes of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2003,83:1801-1806.

[收稿日期 2008-09-25][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

基金课题综述

Parkin 基因结构功能及其表达与帕金森病

杨华丹(综述), 罗曙光(审校)

基金项目:广西自然科学基金项目(桂科自 0832139)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院神经内科

作者简介:杨华丹(1981-),女,医学硕士,研究方向:神经系统变性疾病及运动障碍性疾病的发病机制。E-mail: yanghuadan@yahoocn.

[摘要] Parkin 基因是与帕金森病关系最为密切的基因,对其结构、功能及其表达各方面研究也越来越多,尤其是表观遗传调控机制的提出,为我们从另一角度理解帕金森病提供了重要线索。本文从 Parkin 基因的结构、功能及其表达对 Parkin 基因进行了详细的阐述,并试述了其甲基化的可能性。

[关键词] 帕金森病; Parkin 基因; 表达

[中图分类号] R 742 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2009)02-0204-04

The genomic structure, function and expression of the human Parkin gene in Parkinson's disease YANG Huadan, LUO Shu-guang. *The First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, 530021, China*

[Abstract] Parkin gene, identified as a causative gene of Parkinson's disease(PD), has been studied more and more on the construction, function and transcription, expression. Especially, Epigenetics is raised as the important clue, to comprehend PD for us from another view. This article summarizes Parkin gene, in detail on the construction, function and transcription, expression, as well as tries to state its methylation possibility.

[Key words] Parkinson's disease; Parkin gene; Expression

帕金森病(parkinson disease, PD)是临床上最常见的中枢神经系统变性疾病之一,定位于锥体外系,以黑质多巴胺(DA)能神经元变性缺失和路易小体(lewy body)形成为特征,慢性进展,最终将导致患者的肢体功能严重下降及运动障碍,其病因和发病机制尚不清楚。近年来,国内外学者对PD发病从多种角度、不同环节等多方面进行了多方位研究和探讨,普遍认为,PD发病是一个集生理退化、环境因素与病理损害等多因素造成的错综复杂、交互影响的病变过程,其中遗传机制不可忽视,多基因可能涉及其中,而Parkin作为近年来PD相关基因的研究热点之一,其与PD的密切关系更是越来越引起研究者的关注和重视。

1 Parkin 基因的结构

Parkin 基因,又称 PARK2,定位于染色体 6q25.2-q27, 包含 12 个外显子,长约 1.5Mb,在正常人脑组织中呈散在分布,包括黑质、新皮质和海马等部位。自 1998 年 Kitada 等^[1]首次在一个日本人帕金森家族中发现 Parkin 基因突变,作为 PD 的相关基因之一, Parkin 成为国内外研究的热点,全长达 1.5Mb,是迄今为止发现的一个与帕金森相关的最大基因, 12 个外显子,其中包含了一个庞大的开放阅读框架,这就决定了其基因发生变异的多样性和复杂性。

1.1 外显子的变异 自从首例 Parkin 基因的突变报道后,各种不同地区、不同民族、不同类型的基因变异均陆续被发现并报道出来,如 Lucking 等^[2]在 12 个 Parkin 基因相关的 AR-JP 家系中寻找 Parkin 基因上的缺失,结果在 1 个阿尔及利亚家系中发现 8、9 号外显子缺失,在 1 个法国家系和 1 个葡萄牙家系中发现 3 号外显子缺失。Hedrich 等^[3]在 21 个平均发病年龄为 40 岁的 PD 患者中发现杂合的 4 号外显子重复变异。纵观国内外有关的报道 80 余篇文章,该基因的 12 个外显子中都有不同程度的序列改变,变异的类型包括外显子或单个碱基的缺失、重复、插入、点突变等。突变的热点主要为外显子 2、4、5、6、7、9;缺失或者点突变将可能导致结构移位、翻译的蛋白断裂、功能丧失或者致翻译提前结束,产生不完整的蛋白,影响其正常功能,或因错义突变产生虽完整但无活性或活性低的蛋白,与正常蛋白竞争底物而损害了正常蛋白的功能。对文献的统计分析显示,缺失突变主要见于家族性 PD,而点突变则是散发性 PD 的主要变异形式,且点突变比缺失突变更多见,这也符合 PD 的临床发病规律。

1.2 基因的多态性 在对基因的研究分析中,许多学者发现,某些基因位点常常具有多样性,但在正常人群及某些患病人群中,却又表现为不同的分布频率,即“基因的多态性”。在研究 PD 的人群时,也有同样的发现。日本学者 Wang 等^[4]的研究结果显示:R/W366 多态性 T 等位基因频率 PD 组显著低于对照组,说明此多态性可能是 PD 的一个保护性因素,他们还利用遗传信息处理软件分析了 Parkin 蛋白的二级结构,发现 R/W366 多态性可能可部分改变 Parkin 蛋白的二级结构(从 α -螺旋变为 β -折叠),从而影响该蛋白的功能;而 Christine^[5]在 100 例欧洲血统的研究中未发现 Parkin 基

因具有 R/W366 多态性。国内宁玉萍等^[6,7]的研究结果大致与日本学者相同,但其研究还发现 V/L380 多态性与女性散发性 PD 的遗传易感性相关联,女性 PD 组等位基因 C 的频率(15.1%)显著高于女性对照组(6.7%);S/N167 多态性可能是早发性 PD 的危险因素,PD 组与正常组 S/N167 多态性等位基因频率差异无显著性($P=0.39$);而早发性 PD 组 S/N167 多态性等位基因频率显著高于正常对照组($P=0.016$);早发性 PD 组较晚发性 PD 组 S/N167 多态性等位基因频率显著增高($P=0.001$),其患 PD 的风险性较正常组增高 1.69 倍。West 等^[8]对 Parkin 核心启动子区-258T/G 多态进行了功能研究和初步的病例对照分析,证实该位点的多态性与原发性 PD 存在相关关系;其后邹海强等对国内部分 PD 患者也进行了相似的研究,结果显示:-258T/G 多态可能是中国人晚发 PD 的一个危险因素。越来越多的研究和事实显示:PD 的发生常常并非单一因素所致,多种因素可能参与其中,如年龄、环境、遗传等;基因的多态性给我们解释 PD 的发生提供了更多的可能性;在家族性病例中,遗传因素起主要作用,可能会直接导致疾病的发生;但是对于散发病例,某些基因位点多态性给正常人群的一部分打上了易感的标记,当这部分人群与其他正常人群一起处在某种不良环境中或随着年龄的进展等不利因素时,这部分人群也许更容易发生 PD。

2 Parkin 基因的功能

Parkin 基因,编码 465 个氨基酸的 Parkin 蛋白,分子量为 52kD,其 N-末端为一泛素样结构(ubiquitin-like domain, UBL),C-末端则由两侧的指环结构(RING-finger motifs, RING1 和 RING2)及中间的半胱氨酸富集区(in-between RING, IBR)组成,构成 RING1-IBR-RING2 结构;RING1-IBR-RING2 和 UBL 之间为 Parkin 蛋白的特有结构(unique parkin domain, UPD);Parkin 蛋白的独特分子结构提示其在泛素-蛋白水解酶系统(ubiquitin-proteasome system)中的作用,在其中, Parkin 蛋白作为“E3 泛素蛋白连接酶”发挥作用,与该系统的 Ub 活化酶(Ub-activating enzyme, E1)和 Ub 共轭酶(Ub-conjugating enzyme, E2),一起促使一种或几种未知底物蛋白的泛素化及降解,其主要功能区域为 RING1-IBR-RING2 环;作为细胞内重要的监视系统,当细胞内蛋白质未按预定程序折叠或错误折叠,无法发挥正常功能时,该系统能及时地清除或降解,有效的降低了由于垃圾蛋白过度积累而导致的细胞毒性负荷,从而维持细胞内稳态,该机制对细胞有重要的保护作用;如 Peal 受体蛋白, Kitao 等^[9]研究证实,它具有多巴胺神经毒性,可在细胞的内质网及胞浆引起应激,从而诱导大脑黑质的多巴胺能神经元死亡,该破坏作用在 Parkin 蛋白失活时,得到增强。Yamamoto 等^[10]实验发现,当细胞暴露在 PD 相关的折叠蛋白引起的应激状态时, Parkin 蛋白脱磷酸化,活性更强,在细胞面临错误翻译的或可能给细胞带来威胁的蛋白时, Parkin 蛋白的磷酸化与去磷酸化状态的变更可迅速、有效地调节其功能和活性;Avraham 等^[11]在实验研究中有同样的发现,周期素依

赖性蛋白激酶-5(Cyclin-dependent Kinase5)在体内和体外实验均可致使 Parkin 磷酸化,从而促进毒性物质的蓄积,降低多巴胺能神经元细胞处理毒性损伤的能力。Huynh 等^[12]用免疫沉淀的方法发现 Parkin 蛋白可与突触结合蛋白 XI 相互作用,该机制可能导致该蛋白的泛素化及降解,但同时, Parkin 蛋白与突触结合蛋白家族的成员相互结合后,可影响突触前末梢神经递质的传输,恰好解释了伴有 Parkin 基因突变的 PD 病人多巴胺缺乏的现象。除了通过以上途径保护细胞外, Jiang 等^[13]发现 Parkin 还可抑制单胺氧化酶的表达,限制了多巴胺氧化过程中,活性氧簇的产生,有利于多巴胺能神经元细胞的存活; Kuroda 等^[14]在研究线粒体的生物起源时,实验结果表明, Parkin 可调节线粒体的复制和转录水平,且该机制与泛素-蛋白水解酶系统介导的蛋白降解作用无关。多巴胺能神经元细胞死亡是 PD 病人共同的病理表现,基于 Parkin 重要的保护细胞的作用,弄清 Parkin 蛋白的功能对于理解 PD 的发病有重要意义。

3 Parkin 基因的表达

Shimura^[15]对正常人三个脑区石蜡切片行 Parkin 免疫组化染色,发现正常人的黑质、壳核、额叶中均有 Parkin 表达,但在黑质的表达高于其它两个部位, Parkin 主要位于胞浆高尔基体和突触中。Parkin 基因的正常表达与否对其功能的影响起着关键的作用,其基因遗传信息从复制、转录、翻译,从 DNA→RNA→蛋白质,经过一系列步骤的传递,最终经过修饰成为功能蛋白质,然后作用于机体,每一步都在机体严密的调控状态下进行,有条不紊、按部就班非常重要,其中的任何环节发生改变,均可能影响最终的结果,从而导致其表达发生变化,影响基因在人体发挥其正常的功能;在 Parkin 基因表达存在情况下, Lewy 小体等聚集物的数量显著降低, Parkin 基因表达缺失,细胞内异常蛋白聚集物的增多可能在环境因素的共同作用下产生细胞毒性而导致细胞死亡,从而使某些重要的组织,如黑质等,丧失功能,最终导致疾病如 PD 的发生;伴 Parkin 突变的 PD 病人中脑黑质多巴胺能神经元死亡,也说明了这一点。法国 Lesage 等^[16]对 435 个 PD 病人进行了 Parkin 基因 RNA 转录水平的检测,其 RNA 水平却一致的显示转录缺失或不同程度的转录下调。Deng 等^[17]在研究一个三代同堂,共 20 人的白人家族时,其中 4 人为早发性帕金森(EOPD)患者,该 4 人 DNA 分析均显示外显子 5、6 复合杂合子缺失,另一 56 岁的女性也携带此种变异,但她没 PD 的临床表现,对其 RNA 进行分析对比后发现,由其 RNA 逆转录得到的 cDNA 的序列分析显示,也呈现外显子 5、6 的缺失, Parkin 伴有缺失时虽可有 RNA 水平的转录,但其转录得到的产物,却可能不具备应有的功能,仍会导致 PD。由此可见, Parkin 基因表达正常与否与 PD 的发生关系密切。尽管基因表达调控可发生在遗传信息传递过程的任何环节,但发生在转录水平,尤其是转录起始水平的调节,对基因表达起着至关重要的作用,即转录起始是基因表达的基本调控点。West 等^[18,19]研究发现,在 Parkin 基因的启动子区域,转录起始位点的上游约 44bp 处,有一 E-box

基因序列(CGCGTGC GC),该区域可与核内蛋白相互作用, N-myc 可结合于该位置,抑制 Parkin 的转录,机制尚不清楚,推测 N-myc 可能竞争取代了转录激活因子的位置,上述 Parkin 基因启动子区转录激活位点的存在为这一假说提供了可能性; RT-PCR 及半定量实验结果显示,当 N-myc 呈现表达丰富时, Parkin 基因表达与之相反。

4 表观遗传调控

遗传因素导致疾病的发生主要有两大类机制:基因机制(genetic mechanism)和表观遗传机制(epigenetic mechanism)。基因机制包括基因突变、染色体丢失和重排,产生结构异常的基因产物,即:DNA 链的序列和碱基异常;表观遗传机制^[20]则主要指 DNA5 胞嘧啶被甲基化修饰,引起基因表达异常,而 DNA 序列不变, DNA 甲基化最主要的机制就是参与转录调控,且多与基因的转录呈负相关。在以往 PD 致病机制的研究中,人们更多关注于基因机制,但随着表观遗传调控的提出, DNA 甲基化最初在研究肿瘤的过程中发现并证实,其与神经系统疾病的发生之间的联系,也越来越引起重视。DNA 的甲基化常具备以下 4 个特点^[21~24]:(1)基因组内甲基化多数发生在与鸟嘌呤相连的胞嘧啶上;(2)G+C 丰富区域的 CpG 即 CpG 岛是非甲基化的, CpG 岛位于转录起始点的上游。如看家基因的启动子都含 CpG 岛,且保持非甲基化状态;(3)启动子区的 CpG 被甲基化时转录受到抑制,基因下游即非岛区的 CpG 甲基化不抑制基因的转录;(4)启动子区 CpG 甲基化的密度与转录的抑制程度有关,弱的启动子能被密度较低的甲基化完全抑制,当启动子被增强子增强时,恢复转录功能;如果甲基化的密度进一步增加,转录也进一步被完全抑制。根据 Asakawa^[25]对 Parkin 基因结构的研究显示:其启动子区的确具备了发生甲基化可能性的理论依据,如其 CG 含量到达 72%,包含丰富的 CpG 岛,且靠近转录起始点。在对既往的研究报道统计中,我们发现, Parkin 基因外显子数量的变化虽然占全部突变的 70%,但仍有近 30%的病例没有发现异常,外显子异常并不能解释所有的病例。Lesage 等^[16]对 435 例病人进行了 Parkin 外显子及 RNA 转录水平等一系列的检测,其中 318 名(约 73%)病人没有外显子的缺失,但其 RNA 却一致的显示转录缺失或下降,是否也提示着表观遗传调控机制在其中可能担当着重要的角色,但迄今为止,仍未见这方面有较确切深入的研究报道,尚待进一步的研究证实。从表观遗传调控的角度,探讨 Parkin 基因启动子区是否存在甲基化状态,对于从表观遗传学方向研究帕金森病的发病机制的研究非常重要。这方面的研究将有助于拓宽我们对于探讨帕金森病发病机制的研究思路,为发现新的疾病筛选指标和探索新的治疗方法奠定基础,例如去甲基化药物的研发等。

综上所述, Parkin 基因作为 PD 相关基因的研究热点之一,其功能的正常表达与否,与 PD 的发生关系密切。深入了解其结构、功能及表达的调控等各方面的研究进展,对于研究 PD 的发病机制及制定新的临床治疗手段至关重要,也为今后新的研究方向的开辟提供参考。

参考文献

1 Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism[J]. Nature, 1998, 392:605-608.

2 Lucking CB, Abbas N, Durr A, et al. Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism[J]. Lancet, 1998, 352:1355-1356.

3 Hedrich K, Kann M, Lanthaler AJ, et al. The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the parkin gene in early onset parkinsonism[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10: 1649-1656.

4 Wang M, Hattori N, Matsumine H, et al. Polymorphism in the parkin gene in sporadic Parkinson's disease[J]. Ann Neurol, 1999, 45:655-658.

5 Klein C, Schumacher K, Jacobs H, et al. Association studies of Parkinson's disease and parkin polymorphisms[J]. Ann Neurol, 2000, 48:126-127.

6 宁玉萍, 徐严明, 王玉凯, 等. Parkin 基因 R/W366 及 V/L380 多态性与散发性帕金森病[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2002, 28(1):17-19.

7 宁玉萍, 刘焯霖, 徐严明, 等. Parkin 基因 S/N167 多态性与散发性帕金森病关联研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(6):513-514.

8 West A, Maraganore D, Crook J, et al. Functional association of the parkin gene promoter with idiopathic Parkinson's disease[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11:2787-2792.

9 Kitao Y, Imai Y, Ozawa K, et al. Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16:50-60.

10 Yamamoto A, Friedlein A, Imai Y, et al. Parkin phosphorylation and modulation of its E3 ubiquitin ligase activity[J]. J Biol Chem, 2005, 280(5):3390-3399.

11 Avraham E, Rott R, Liani E, et al. Phosphorylation of Parkin by the cyclin-dependent kinase 5 at the linker region modulates its ubiquitin-ligase activity and aggregation[J]. J Biol Chem, 2007, 282(17):12842-12850.

12 Huynh D, Scoles D, Nguyen D, et al. The autosomal recessive juvenile parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(20): 2587-2597.

13 Jiang H, Jiang Q, Liu W, et al. Parkin suppresses the expression of monoamine oxidases[J]. J Biol Chem, 2006, 281(13): 8591-8599.

14 Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, et al. Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(6):883-895.

15 Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al. Immunohistochemical and subcellular localization of parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients[J]. Ann Neurol, 1999, 45(5):668-672.

16 Lesage S, Magali P, Lohmann E, et al. Deletion of the parkin and PACRG gene promoter in early-onset parkinsonism[J]. Hum Mutat, 2007, 28:27-32.

17 Deng H, Le WD, Hunter CB, et al. Heterogeneous phenotype in a family with compound heterozygous parkin gene mutations[J]. Arch Neurol, 2006, 63: 273-277.

18 West AB, Lockhart, PJ, O'Farrell C, et al. Identification of a novel gene linked to parkin via bi-directional promoter[J]. J Mol Biol, 2003, 326:11-19.

19 West AB, Kapatos G, O'Farrell C, et al. N-myc regulates parkin expression[J]. J Biol Chem, 2004, 279(28):28896-28902.

20 王学梅, 陈 彪. 表观遗传机制及其在帕金森病中的作用[J]. 中华神经科杂志, 2005, 38(11):723-724.

21 Bird A P. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8(7):1499-1504.

22 Bird A. CpG-rich islands and the function of DNA methylation[J]. Nature, 1986, 321(6067):209-212.

23 Bird A P. The essentials of DNA methylation[J]. Cell, 1992, 70(1):5-8.

24 宫时玉, 蒋曹德, 邓昌彦. DNA 甲基化及其生物学功能[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(6):651-657.

25 Asakawa S, Tsunematsu K, Takayanagi A, et al. The genomic structure and promoter region of the human parkin gene[J]. Biochem Biophys Res Commun 2001, 286:863-868.

[收稿日期 2008-10-20][本文编辑 谭 毅 刘京虹]

《中国临床新医学》杂志会员入会登记表
(复印填写后寄回本刊)

姓 名		性 别		出生年月		职 务		
职 称		学 位		专 业				
单 位		地 址						
电 话		E-mail					邮 编	