

本文引用:王东浩,郭利伟,徐艳芹,等.河南汉族一脊髓小脑性共济失调家系基因突变检测[J].新乡医学院学报,2016,33(10):868-871. DOI:10.7683/xyxyxb.2016.10.008.

【临床研究】

河南汉族一脊髓小脑性共济失调家系基因突变检测

王东浩¹, 郭利伟², 徐艳芹³, 杨保胜⁴, 黄艳梅²

(1. 新乡医学院 2012 级本科临床医学专业, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院法医物证学教研室, 河南 新乡 453003; 3. 新乡医学院 2013 级本科法医学专业, 河南 新乡 453003; 4. 新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 检测和分析河南汉族一脊髓小脑性共济失调(SCA)家系亚型分型。**方法** 采用聚合酶链式反应(PCR)技术和 DNA 直接测序法分析该家系患病者 SCA1、SCA2、SCA3、SCA6、SCA7、SCA12、SCA17 共 7 种常见 SCA 亚型基因序列,并与家系中其他正常个体及 50 例健康个体基因序列进行比较分析。**结果** 检测到该家系 4 例患者及家系中 2 例健康成员 SCA3 基因的 1 个等位基因三核苷酸序列 CAG 异常重复扩增,异常重复次数在 71~81 次。其余 6 种亚型基因检测无异常。**结论** 该家系 SCA 患病表现为中国人常见的 SCA3 亚型,家系中 2 例健康成员可能为症状前患者。

关键词: 脊髓小脑性共济失调;基因突变;三核苷酸重复;基因诊断

中图分类号: R394;R744.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2016)10-0868-04

Genetic testing of spinocerebellar ataxia genes of Han population in Henan province

WANG Dong-hao¹, GUO Li-wei², XU Yan-qin³, YANG Bao-sheng⁴, HUANG Yan-mei²

(1. Grade 2012 of Clinical Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Forensic Molecular Genetics, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 3. Grade 2013 of Forensic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 4. Department of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To detect and analyze the subtypes of spinocerebellar ataxia (SCA) pedigree in Henan Han population. **Methods** The gene sequence of seven common genes of SCA including SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA12 and SCA17 of patients were analyzed by polymerase chain reaction and DNA direct sequencing. Then the gene sequences of patients were compared with the other healthy individuals in this family and 50 healthy individuals. **Results** The abnormal repeat amplification protocol of trinucleotide sequence CAG in one allele of SCA3 gene in four patients and two healthy individuals in this family were found; and the times of abnormal repeat was 71~81. The other 6 subtypes of SCA genes in this family members were no abnormal. **Conclusion** The prevalence of SCA pedigree may be showed with SCA3 subtypes which known in Chinese population. Two healthy members of this family may be presymptomatic patients.

Key words: spinocerebellar ataxia; gene mutation; trinucleotide repeat; genetic diagnosis

脊髓小脑性共济失调(spinocerebellar ataxia, SCA)是一类由遗传因素导致的神经系统遗传退行性疾病,多为常染色体显性遗传。临床上根据患者个体症状判断 SCA 的基因亚型困难,通过基因诊断可以快速明确其 SCA 亚型,迄今为止,已有 31 个 SCA 亚型致病基因被定位^[1],我国最常见的 SCA 亚型为 SCA3,其次为 SCA2、SCA1、SCA6、SCA7、SCA12

和 SCA17^[2]。本研究对河南汉族一 SCA 家系上述 7 种 SCA 亚型基因进行基因检测,确定其致病 SCA 亚型,为其临床诊断提供依据。

1 对象与方法

1.1 对象 本研究于 2014 年 7~9 月调查一河南汉族 SCA 家系,5 代 61 人,其中 6 人已去世,7 例为患者,其他家庭成员目前均身体健康,无异常临床症状,家系系谱图见图 1。先证者(Ⅲ 13),男,47 岁,1 a 前无明显诱因行走时摔倒,站立后自觉双下肢无力,走路双腿发软,有踩棉花感。1 a 来自觉记忆力进行性减退,言语较前欠清晰。0.5 a 前双下肢无力逐渐加重,双腿上抬及下落时不能准确定位,行走困难。神志清,精神差,高级智能活动基本正常;颅

DOI:10.7683/xyxyxb.2016.10.008

收稿日期:2016-04-27

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201410472027);河南省教育科学“十二五”规划立项重点课题(编号:2013-JKGHB-0035)。

作者简介:王东浩(1994-),男,河南平顶山人,新乡医学院 2012 级本科临床医学专业学生。

通信作者:黄艳梅(1971-),女,河南新乡人,博士,教授,主要从事人类遗传学研究;E-mail:hym_cn@hotmail.com。

神经检查无异常;指鼻试验、跟-膝-胫实验、快速轮替试验欠准稳;胸椎、腰椎核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)示 L_{3,4}、L_{4,5} 椎间盘膨出;头颅 MRI 示小脑萎缩。

先证者母亲(Ⅱ 1):已去世,55 岁时出现行走困难,后出现肌肉萎缩,并逐渐丧失劳动能力。先证

者哥哥(Ⅲ 7):54 岁,50 岁时出现步态不稳,偶现饮水呛咳,诊断为小脑萎缩,目前已丧失行走能力。2 位姐姐(Ⅲ 9 和Ⅲ 11):分别为 51 岁和 49 岁,症状及发病年龄与先证者类似,行走困难,目前行走均需借助拐杖。本家系患者均无视力障碍或精神异常等症状。

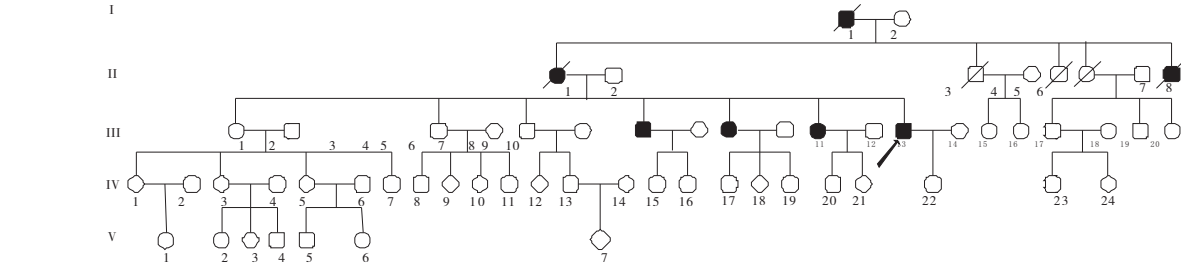


图 1 SCA 家系系谱图(/所指为先证者)
Fig.1 Pedigree chart with SCA (/refer to the proband)

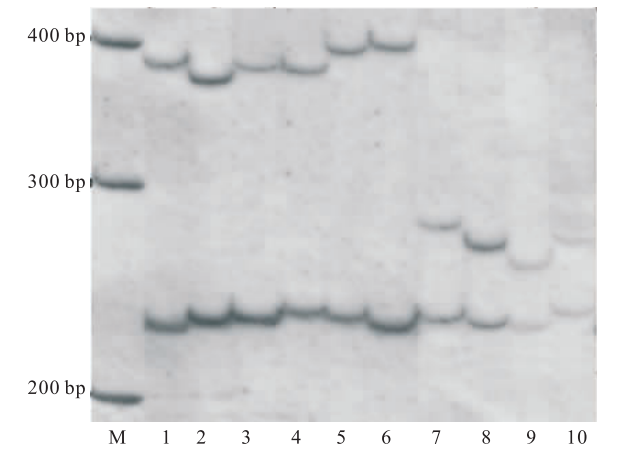
1.2 基因组 DNA 提取 采集该家系 4 例患者(Ⅲ 7、Ⅲ 9、Ⅲ 11、Ⅲ 13)及该家系健康成员 33 人的外周静脉血 2 mL,枸橼酸钠抗凝,另选取同期河南新乡地区 50 例体检健康的非亲属人群作为对照。样本的提取均经研究对象同意并签署知情同意书。所有血液样本均采用有机酚-氯仿法提取基因组 DNA。

1.3 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增及测序 根据患者临床症状,结合我国 SCAs 各型发病的频率,选择在我国发病率较高的 7 种 SCA 亚型 SCA1、SCA2、SCA3、SCA6、SCA7、SCA12、SCA17 基因进行检测。参考文献^[3-4],使用 Primer 5.0 软件设计上述 7 种 SCAs 亚型基因序列基因引物序列。PCR 扩增体系为 25 μL,含 1 × Buffer, Mg²⁺ 1.5 mmol · L⁻¹, 脱氧核糖核苷三磷酸 2.0 mmol · L⁻¹, DNA Taq 酶 1 U, 引物 10 μmol · L⁻¹, 基因组 DNA 模板 10 ~ 100 ng。热循环条件:95 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 45 s,退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,32 个循环;72 °C 再延伸 10 min。扩增产物先用 60 g · L⁻¹ 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染法对扩增产物进行检测和纯化,然后由英潍捷基(上海)贸易公司进行双向测序。

2 结果

2.1 SCA 基因三核苷酸重复片段 PCR 扩增产物电泳结果 分析该家系 37 例成员及 50 例健康对照个体的相关 SCA 基因扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱。在 6 种 SCA 亚型 SCA1、SCA2、SCA6、SCA7、SCA12、SCA17 的基因扩增产物电泳结果中,未发现家系中患者和正常成员及健康对照人群的电泳条带大小有明显差异,均在相关 SCA 基因目的片段大小的正常范围内。

SCA3 基因扩增产物的电泳图谱出现 2 个条带,其中一条带约为 240 bp,家系成员与健康对照人群的片段大小差别不大。但另一条带的片段大小,4 例患者(Ⅲ 7、Ⅲ 9、Ⅲ 11 和Ⅲ 13)和 2 例健康家系成员(Ⅳ 16、Ⅳ 20)的基因扩增产物在 400 bp 左右,明显大于健康对照个体的条带片段大小(图 2)。



M:Marker;1 ~ 4 分别代表家系患者Ⅲ 7、Ⅲ 9、Ⅲ 11、Ⅲ 13(先证者);5 ~ 8 分别代表家系健康成员Ⅳ 16、Ⅳ 20、Ⅳ 17、Ⅳ 22;9、10 分别代表对照健康个体。

图 2 SCA3 基因三核苷酸重复片段 PCR 扩增产物电泳结果
Fig.2 Electrophoresis result of PCR amplification fragments of SCA3 gene

2.2 SCA3 基因序列分析结果 结果见图 3、4。SCA3 基因扩增产物的测序结果中,Ⅲ 7、Ⅲ 9、Ⅲ 11 和Ⅲ 13 4 例患者 SCA3 基因的 1 个等位基因三核苷酸 CAG 片段重复次数均小于 39 次,另 1 个等位基因 CAG 片段重复次数分别为 74、71、73、74 次。此外,在家系健康成员中,发现家系健康成员 IV 16、IV 20 的 SCA3 基因 1 个等位基因 CAG 片段重复次数分别为 78、81 次,且超过了 4 例患者的异常重复次数。

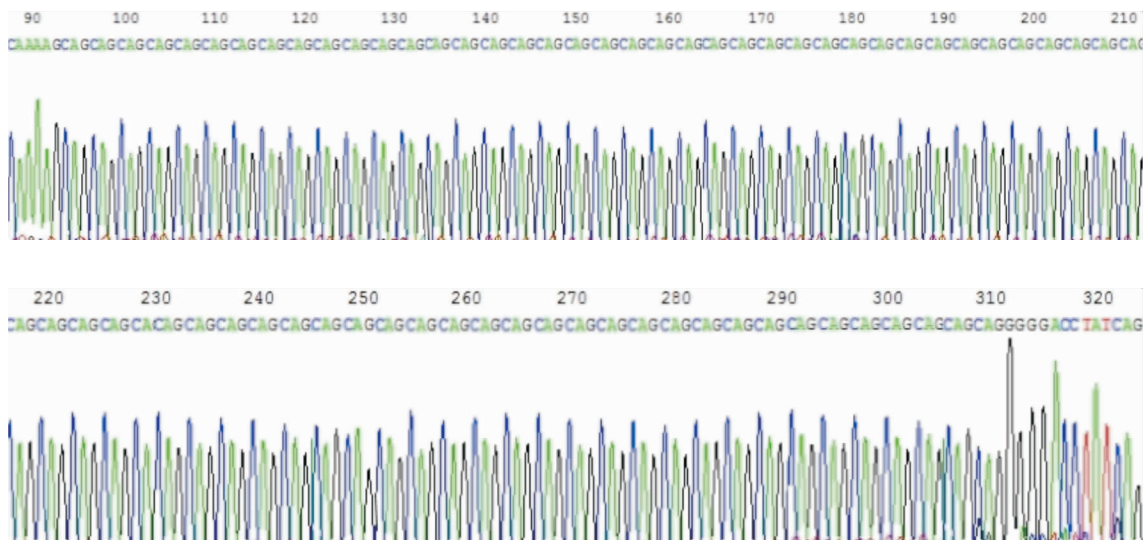


图 3 先证者(Ⅲ 13)SCA3 异常等位基因 CAG 重复片段 PCR 扩增产物测序图

Fig.3 Sequence scheme of product amplified by PCR with trinucleotide repeats of CAG of abnormal allele in SCA3 gene from proband(Ⅲ 13)

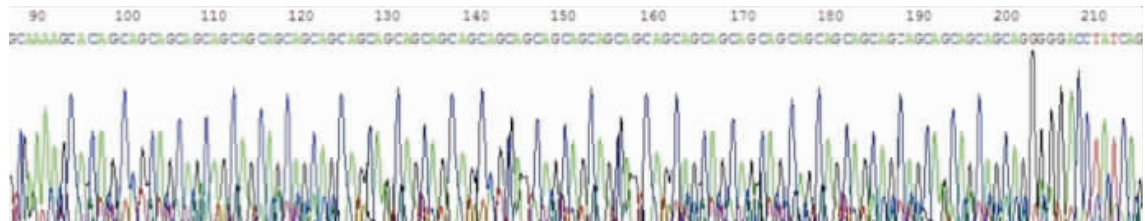


图 4 健康个体 SCA3 正常等位基因 CAG 重复片段 PCR 扩增产物测序图

Fig.4 Sequence scheme of product amplified by PCR with trinucleotide repeats of CAG of normal allele in SCA3 gene from healthy individual

3 讨论

SCAs 临床表现主要为共济失调、构音障碍、意向性震颤、锥体束征、认知功能障碍等^[5],其病理损害部位主要为脊髓、脑干和小脑。普通人群发病率约为 3/10 万,常在 30~50 岁发病,偶在儿童时期或 60 岁之后发病^[6]。SCAs 各亚型间临床症状表现较为相似,仅依照其临床症状进行分型及确诊非常困难。但 SCAs 各亚型致病基因及突变位点不同,通过基因突变检测可将其区别开来,方便快捷^[7]。基因检测顺序应按国内 SCAs 亚型分布频率的多少先后进行,依次为 SCA3、SCA2、SCA1、SCA6、SCA7 和 SCA12,其次为 SCA17 及齿状核红核苍白球路易体萎缩症(dentatorubral-pallidoluysian atrophy, DRPLA)。此外,多数 SCAs 亚型具有特征性临床表现,有助于更快确诊其致病亚型。

有文献报道,SCA3 基因 CAG 三核苷酸序列片段重复次数正常范围为 13~36 次,致病范围为 51~86 次^[8-9]。本家系 4 例 SCA 患者(Ⅲ 7、Ⅲ 9、Ⅲ 11、Ⅲ 13) SCA3 异常等位基因 CAG 重复次数分

别为 74、71、73、74 次,均超过正常范围,在致病重复次数内。此外,在家系健康成员中,发现先证者的 2 位侄子(Ⅳ 16、Ⅳ 20)的 1 个 SCA3 等位基因均存在 CAG 片段异常重复,重复次数分别为 78、81 次,也在致病重复次数内,并且超过了 4 例患者的异常重复次数。SCAs 病程进展缓慢,机体病变常累积到一定程度才出现相关临床症状,所以,患者多在中年发病,病情逐渐加重^[10]。先证者的 2 位侄子 SCA3 基因存在 CAG 片段异常重复扩增,但无相关临床表现,可能由于目前年龄较小,还未到发病年龄。以上表明本家系的致病 SCAs 亚型为 SCA3 亚型,先证者的 2 位侄子(Ⅳ 16、Ⅳ 20)可能为症状前患者。这也证实了在我国的 SCAs 发病亚型多为 SCA3 亚型。为了尽可能降低该病对健康的影响,避免携带致病基因患儿的出现,作者对先证者的 2 位侄子进行了 SCAs 的宣教和生育健康指导,加强其对疾病的认识。

根据其临床表现及基因诊断特点,本家系的疾病遗传学特征与其他文献报道^[11]的 SCA 家系有以下共同点:(1)常染色体显性遗传:家系中基本每代

均会出现患病个体,且无性别差异。(2)延迟显性:早期一般不发病,达到一定年龄才表现出明显的临床症状。家系前 3 代均有人在 50 岁左右发病,第 4、5 代均未发病,可能由于年龄较小。(3)动态突变:CAG 异常重复拷贝数的遗传不稳定,一般呈现子代增多的趋势。先证者的 2 位侄子 SCA3 基因的异常等位基因 CAG 重复次数均大于家系患者。(4)遗传早现:发病年龄逐代提前,病情发展速度逐代加快。

临床上对 SCAs 治疗措施多为药物对症治疗和康复治疗,尽可能减缓疾病恶化速度,干细胞移植目前研究较为热门^[12-13],但尚无完全治愈的方法。此类疾病的预防措施主要为产前基因诊断,尽可能减少携带致病基因患儿的出生。随着分子生物学、遗传学及医学技术的不断进步和发展,人类对此类疾病的认识一定会更加深入和清楚。

参考文献:

[1] WANG C R, CHEN Z, YANG F, *et al.* Analysis of the GGGGCC repeat expansions of the C9orf72 gene in SCA3/MJD patients from China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130336.

[2] 中华医学会神经病学分会神经遗传学组. 遗传性共济失调诊断与治疗专家共识[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(6): 459-463.

[3] 李雅轩, 赵瑞英, 宋书娟. 汉族正常人群脊髓小脑性共济失调 6 种亚型 CAG 重复次数的研究与分析[J]. 广东医学, 2012, 33

(11): 1620-1621.

[4] 张瑾, 郝莹, 顾卫红, 等. 脊髓小脑共济失调 17 型临床特征和基因突变分析[J]. 中华神经科杂志, 2012, 45(12): 861-865.

[5] JACOBI H, DU MONTCEL S T, BAUER P, *et al.* Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: a longitudinal cohort study[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(11): 1101-1108.

[6] STEFANESCU M R, DOHNALEK M, MADERWALD S, *et al.* Structural and functional MRI abnormalities of cerebellar cortex and nuclei in SCA3, SCA6 and Friedreich's ataxia[J]. *Brain*, 2015, 138(5): 1182-1197.

[7] STOREY E. Genetic cerebellar ataxias[J]. *Semin Neurol*, 2014, 34(3): 280-292.

[8] 崔海燕, 李旭光, 朱敏霞, 等. 脊髓小脑性共济失调的研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(19): 2958-2960.

[9] 刘钰鹏. 脊髓小脑性共济失调的基因研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(15): 2722-2725.

[10] 曾爱源. 线粒体与脊髓小脑性共济失调 3 型[J]. 华夏医学, 2015, 28(1): 181-184.

[11] 俞立强, 何晓辉, 方琪, 等. 脊髓小脑性共济失调症状前诊断初探[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2013, 20(3): 197-199.

[12] 白瑞樱, 张艳, 朱涵. 人骨髓间充质干细胞分离培养及其向神经细胞分化的研究[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(2): 104-106.

[13] 刘莹莹, 刘晶晶, 刘志华. 外加直流电场对脑卒中大鼠侧脑室室管膜下区神经干细胞增殖与迁移的影响[J]. 新乡医学院学报, 2015, 32(12): 1086-1090.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月)

《新乡医学院学报》2017 年征订启事

《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University)创刊于 1984 年,是新乡医学院主管主办、国内外公开发行的综合性医学学术期刊。国际标准连续出版物号:ISSN 1004-7239,国内统一连续出版物号:CN 41-1186/R。现为月刊,每月 5 日出版。本刊设有专家论坛、专题报告、国家自然科学基金专题评述、基础研究、临床研究、技术与方法、护理研究、综述、医学教育研究、名院·名科·名医等栏目。编辑部对来稿审理及时并严格执行“三审制”,对国家级、省部级科研基金项目资助的研究性论文优先发表。

本刊为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、中国精品科技期刊、河南省一级期刊,目前被《中国学术期刊(光盘版)全文检索数据库》、《万方数据-数字化期刊群》等重要数据库和美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《中国医学文摘》、《中国药学文摘》等国内外权威性文摘期刊收录,标志着在本刊发表的论文将有机会被国内外著名检索系统收录,这对提高作者知名度及论文的影响力不无裨益。欢迎国内外医药工作者踊跃投稿。欢迎广大订户前往当地邮局订阅,邮发代号:36-145,每期定价 10.00 元,全年 120.00 元。编辑部地址:河南省新乡市金穗大道东段新乡医学院学报编辑部,邮政编码:453003。电话:0373-3029086,传真:0373-3831371,网址:www.xxyxyxb.com, E-mail:xxyxyxb@163.com。

本刊编辑部