论著

文章编号:1000-5404(2011)11-1152-03

脊髓小脑性共济失调一家系的遗传学研究

刘 丹,郭 洪,王 凯,白 云 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室)

【摘要】 **目的** 对一个常染色体显性遗传的脊髓小脑共济失调家系(spinocerebellar ataxias,SCA)进行基因诊断并探讨其临床特点。**方法** 完成家系调查和系谱分析,通过聚合酶链式反应和直接测序的方法对收集到的家系成员进行脊髓小脑性共济失调致病基因 CAG 三核苷酸重复数目的检测。**结果** 该家系呈常染色体显性遗传模式,家系中 3 名患者均于 30 岁后逐渐表现为行走不稳、饮水呛咳、言语不清等共济失调的临床特征。对所有家系成员进行基因诊断,结果发现,SCA2 和 SCA3 致病基因的 CAG 重复数目均在正常范围内;而家系中 3 名患者 SCA1 致病基因出现异常等位基因,CAG 扩增次数分别为 43、48 和 51 次,另有 2 名成员 GAG 重复次数分别为 53 次和 50 次,诊断为症状前患者。**结论** 该家系为三核苷酸重复序列(CAG)动态突变引起的常染色体显性遗传脊髓小脑共济失调Ⅰ型,基因诊断还发现家系中 2 名症状前患者。

【关键词】 脊髓小脑性共济失调;动态突变;基因诊断

【中图法分类号】 R394.3;R596.102 【文献标志码】 A

Genetics of a Chinese family with spinocerebellar ataxia

Liu Dan, Guo Hong, Wang Kai, Bai Yun (Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Science, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To do genetic diagnosis of an autosomal dominant spinocerebellar ataxia family and discuss its clinical characteristics. **Methods** Familial investigation and pedigree analysis were performed. The duplicate number of tri-nucleotides in pathogenic CAG was detected by polymerase chain reaction (PCR) and direct DNA sequencing in the family members. **Results** Autosomal dominant heredity was found in this family. Clinical symptoms such as gait, dysphagia and slurred speech occurred in three spinocerebellar ataxia patients of the family at the age of over 30 years. Genetic diagnosis of spinocerebellar ataxia showed that the CAG duplicate number of SCA2 and SCA3 was normal in all the family members of spinocerebellar ataxia patients, and abnormal allelic gene SCA1 was detected in 3 spinocerebellar ataxia patients. The CAG was amplified 43, 48, and 51 times, respectively, and amplified 53 and 50 times for another 2 members of the family who were diagnosed as presymptomatic SCA1. **Conclusion** Type 1 spinocerebellar ataxia can be diagnosed in the family members of spinocerebellar ataxia patients according to their autosomal dominant heredity caused by dynamic mutations. Genetic diagnosis can be established in 2 presymptomatic SCA1 patients of the family.

【**Key words**】 spinocerebellar ataxias; dynamic mutation; genetic diagnosis

Corresponding author: Bai Yun, Tel: 86-23-68752258, E-mail: baiyungene@gmail.com

脊髓小脑性共济失调(spinocerebellar ataxias,SCAs)旧称常染色体显性遗传性小脑共济失调(autosomal dominant cerebellar ataixas, ADCAs),是一种由遗传因素引起的神经系统退行性疾病,具有高度的临床和遗传异质性,占神经系统遗传病的 10% ~15%。该病主要累及脊髓、小脑和脑干,临床表现为小脑性共济失调,伴有构音障碍、意向性震颤、锥体系及锥体外系等症状。

1983 年 Harding 等根据 ADCAs 的临床表现和遗传方式将其分为 3 类,即 ADCA Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型。ADCA Ⅰ型除小脑性共济失调的特征外,还包括慢眼动、眼球运动障碍、周围神经病变、肌肉萎缩和痴呆等症状;ADCA Ⅱ型主要是表现为小脑共济失调特征,同时伴有视网膜色素变性;而 ADCA Ⅲ型表现为单纯性的小脑性共济失调,肌张力增强、面肌痉挛,很少出现眼肌麻痹和四肢痉挛。这种分类方法在临床中应用比较广泛,但由于该类疾病存在明显的遗传异质性和基因多效性,使得患者的临床表现错综复杂,因此临床分

【通信作者】 白 云,电话:(023)68752258,E-mail:baiyungene@gmail.com

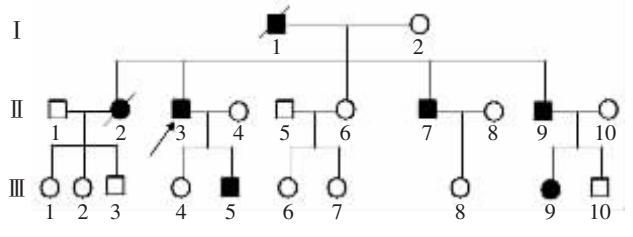
型很难描述各型之间的特点。随着分子遗传学的发展,Rosenberg 等提出了 SCAs 的遗传学分型,这种分类方法可以较好的对 SCAs 各亚型进行诊断。因此,建立在基因诊断基础上的 SCAs 分类目前已成为诊断和鉴别遗传性小脑性共济失调亚型的标准。随着 SCA1 第一个亚型致病基因被定位克隆后,目前已有 30 多种[1] SCAs 的致病基因被定位,按照各亚型被发现的顺序依次被命名。其中 SCA1, SCA2, SCA3 /MJD, SCA6, SCA7, SCA17 及齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩(dentatorubral-pallidoluy-sian atrophy, DRPLA) 7 种亚型是由于其致病基因编码区内 CAG 三核苷酸重复扩增使其编码的多聚谷氨酰胺链异常扩展而引起的。

本研究主要对一个临床表现为行走不稳、言语含糊、饮水呛咳的家系进行致病基因的突变检测明确其基因诊断,并探讨其临床特点。

1　材料与方法

1.1　家系调查

该家系来自重庆市奉节县,汉族,3 代成员中共有 5 名已发病(Ⅰ1,Ⅱ2, Ⅱ3, Ⅱ7 和Ⅱ9),其中Ⅰ1 和Ⅱ2 已去世。第 3 代中,目前未有成员发病。系谱图见图 1。



↗ 为先证者(Ⅱ3),□为正常男性,○为正常女性,■为男性患者,●为女性患者,/ 为已逝者

图 1　脊髓小脑性共济失调患者家系系谱图

1.2　SCA1,SCA2 和 SCA3 致病基因检测

在取得家系成员知情同意并签署知情同意书,获得第三军医大学伦理委员会批准后,收集该家系中患者、家系中正常人共 8 名成员(Ⅱ3、Ⅱ6、Ⅱ7、Ⅱ9、Ⅲ4、Ⅲ5、Ⅲ9 和Ⅲ10)及 50 名健康对照者的外周静脉血各 2 ml,EDTA 抗凝, 采用全血基因组 DNA 抽提试剂盒(Promega)提取基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板。健康对照入选标准:与该家系无血缘关系,均为汉族,身体健康,无家族性遗传病史。

利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计了 SCA1、SCA2、SCA3 致病基因引物(表 1)。送至上海生工公司合成。50 μl 体系进行 PCR 反应,反应条件:95 ℃ 5 min 预变性,然后 94 ℃ 30 s 变性,62 ℃/58 ℃/58 ℃ 30 s 退火,72 ℃ 30 s 延伸,35 个循环,最后 72 ℃ 5 min。PCR 产物采用2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,对电泳有异常的条带进行切胶回收(SnaPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒,上海生工)。对回收后的 PCR 产物采用反向引物直接测序(ABI 3130 遗传分析仪),计数 CAG 三核苷酸重复次数。

表 1　SCA1、SCA2、SCA3 致病基因扩增引物序列及其退火温度

疾病	致病基因	引物序列(5′-3′)	退火温度(℃)
SCA1	ATXN1	上游 CAACATGGGCAGTCTGAG	62
		下游 AACTGGAAATGTGGACGTA	
SCA2	ATXN2	上游 GGGCCCCTCACCATGTCG	58
		下游 CGGGCTTGCGGACATTGG	
SCA3	ATXN3	上游 CCAGTGACTACTTTGATTCG	58
		下游 CTTACCTAGATCACTCCCAA	

2　结果

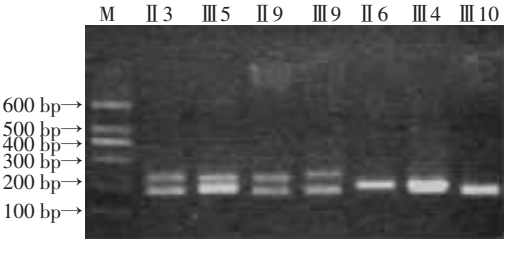
2.1　该家系的临床表现

该家系共有 3 代,存在血缘关系的患者共 7 名,其中男性 5 名,女性 2 名(其中Ⅰ1 和Ⅱ2 均已因该病去世),均表现为行走不稳、言语模糊、饮水呛咳、肌肉萎缩等共济失调症状,无色盲、视力下降、精神障碍或痴呆等其他表现。先证者(Ⅱ3)的父亲(Ⅰ1)在 36 岁时发病,而第 2 代成员Ⅱ2、Ⅱ3、Ⅱ7 和Ⅱ9 的发病年龄分别为 34、33、32 和 30 岁,呈现发病年龄提前的趋势,目前第 3 代尚无成员表现出明显的共济失调临床症状。

先证者Ⅱ3,男性,33 岁时发病,36 岁时症状加重。开始时出现行走不稳,后来逐渐出现执筷、写字等精细动作不稳,饮水呛咳、言语模糊、双手不自主运动,肌肉萎缩,不伴有视力下降、癫痫、痴呆等其他症状。神经系统查体:患者神志清楚,无智力障碍和精神症状,具有爆破性小脑语言,无慢眼动、眼肌震颤,眼底检查视网膜未见椒盐样色素沉着。四肢肌张力增高,腱反射亢进,双侧踝阵挛阳性,双侧病理征阳性,可见部分肌肉萎缩。双手姿势性细震颤, 指鼻试验和跟-膝-胫试验欠准确, Romberg 征睁眼和闭眼均呈阳性, 串联步态不能完成, 感觉系统未见异常。

2.2　SCA1,SCA2 和 SCA3 致病基因的检测

2.2.1　PCR 扩增反应　　对家系中的患者、正常人及所选取的健康对照人进行了 SCA1、SCA2 和 SCA3 致病基因的突变检测。结果发现,SCA2 和 SCA3 致病基因无异常,而在 SCA1 致病基因突变检测时发现,家系中的患者(Ⅱ3, Ⅱ7 和Ⅱ9)及第 3 代家系成员Ⅲ5 和Ⅲ9 PCR 扩增之后出现 2 条带,而家系中正常人(Ⅱ6, Ⅲ4 和Ⅲ10)只有 1 条带(图 2)。对 PCR 扩增后的异常条带进行切胶回收,做进一步测序。



M:标准;Ⅱ3、Ⅲ5、Ⅱ9、Ⅲ9:家系中的患者;Ⅱ6、Ⅲ4、Ⅲ10:家系中的健康人

图 2　部分家系成员 PCR 扩增产物 2%琼脂糖凝胶电泳结果

2.2.2　测序计数 CAG 重复序列扩增数目　　回收后片段采用 SCA1 反向引物(R 5′AACTGGAAATGTGGACGTA 3′)进行测序,根据测序结果计数 SCA1 致病基因 CAG(反向为 CTG)三核苷酸重复次数。家系中患者Ⅱ3、Ⅱ7 和Ⅱ9 的 CAG 重复次数

分别为43次、48次和51次，Ⅲ5和Ⅲ9的CAG重复次数分别为53次和50次。

3 讨论

3.1 SCAs的临床诊断思路

脊髓小脑性共济失调(SCAs)是一种神经系统遗传性疾病，表现为进行性脊髓、小脑和脑干变性。大部分的SCAs具有相似的临床和病理特点，但各亚型又具有各自的临床特征。SCAs特征性的临床症状有助于基因分型，并可为临床诊断提供思路。

SCA1多在30～40岁之间发病，病程进展缓慢，早期出现共济失调步态，进而出现进行构音障碍、吞咽困难、腱反射亢进等症状，同时还可伴有舞蹈样症状，最为典型的是慢眼动及眼肌麻痹[2]。头颅CT或MRI提示小脑和脑干萎缩。该型在南非、印度、意大利和德国发病率较高[3-4]，在我国该型由唐北沙等[5]在1997年最早发现并报道。其余几种与SCA1临床症状相似的SCAs有SCA2、3、6、7、17以及DRPLA。SCA2主要表现为早期周围神经病变、腱反射减弱或消失，常伴有智力障碍。SCA3典型的临床表现为突眼、腱反射亢进、眼肌麻痹、肌痉挛等锥体系及锥体外系症状[6]。SCA6发病年龄较晚，一般没有家族史，临床主要表现为单纯性的小脑综合征[6]。SCA7的特点是儿童期发病，特征性的病变为椒盐样色素沉着的视网膜改变[6]。SCA17多伴有运动迟缓和痴呆[6]。DRPLA表现为不同年龄的共济失调伴肌阵挛癫痫、舞蹈病、痴呆。

本研究首先确定该家系的临床表现符合性小脑性共济失调，随后对该家系进行调查及系谱分析后，发现该家系呈常染色体显性遗传模式。在排除非遗传因素后，通过分子遗传学的方法进行致病基因的检测以明确其基因诊断。家系中的成员均在30～40岁之间发病，可排除SCA6的诊断，该家系中所有的患者均未出现智能障碍和痴呆，可以排除SCA2、SCA17和DRPLA。同时家系中的患者未有视力的改变及典型的视网膜病变，可以排除SCA7的诊断。但由于SCAs存在明显的临床和遗传异质性[7]，该家系的诊断最终采用分子遗传学方法，这也是诊断脊髓小脑型共济失调的金标准。由于该家系中存在发病在下一代比上一代提前并严重的现象，我们推测可能由于致病基因三核苷酸重复序列动态突变引起的，通过对SCA1、SCA2、SCA3致病基因的筛查，最终确定该家系符合SCA1的诊断。

3.2 SCA1致病基因CAG重复数目的分析以及应用

1993年，SCA1致病基因定位于6p22～23[8]，正常人SCA1致病基因CAG重复数为17－36，对应产物大小在164～221 bp，而SCA1患者致病基因CAG重复数扩展为43～91次，对应产物242～356 bp。SCAs中多数亚型具有遗传早现的现象，即CAG重复次数与发病年龄成反比，与病情程度呈正比[9]。在我们的研究中也发现了该现象，Ⅰ1的发病年龄在36岁，Ⅱ2、Ⅱ3、Ⅱ7和Ⅱ9发病年龄分别在34、33、32和30岁。测序后计数Ⅱ3、Ⅱ6和Ⅱ7的CAG重复次数为分别为43、48和51次。由此可以看出，该家系符合本病的发病特点。对Ⅲ5和Ⅲ9测序后发现CAG的重复数目分别为53次和50次，可以诊断他们为症状前患者，估计Ⅲ9的发病年龄可能在30～32岁之间，而Ⅲ5可能在30岁之前发病。

SCAs致病基因的检测为症状前诊断、产前诊断提供了可靠依据，已经成为目前预防、阻止该病发生首选策略。因此，在有患者的家系中，通过基因诊断预防患儿出生显得非常重要。目前对于SCA的患者，尚无针对病因的有效治疗方法，只能通过对症治疗缓解症状。随着对SCA研究的深入，文献[10]报道，可以在细胞或动物模型上通过沉默基因的表达、增加异常蛋白的清除、降低毒性蛋白质等方法改善症状，但能否用于SCA患者的临床治疗仍有待进一步研究。

参考文献：

[1] Duenas A M, Goold R, Giunti P. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias[J]. Brain, 2006, 129(Pt 6): 1357－1370.

[2] Matilla-Duenas A, Goold R, Giunti P. Clinical, genetic, molecular, and pathophysiological insights into spinocerebellar ataxia type 1[J]. Cerebellum, 2008, 7(2): 106－114.

[3] Bryer A, Krause A, Bill P, *et al*. The hereditary adult-onset ataxias in South Africa[J]. J Neuron Sci, 2003, 216 (1): 47－54.

[4] Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, *et al*. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families[J]. Arch Neurol, 2004, 61(5): 727－733.

[5] 唐北沙，刘春宇，夏家辉，等. 遗传性脊髓小脑型共济失调患者SCA1基因突变检测分析[J]. 中华神经科杂志，1997，30(2)：110－113.

[6] Teive H A. Spinocerebellar ataxias[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2009, 67(4): 1133－1142.

[7] Manto M U. The wide spectrum of spinocerebellar ataxia[J]. Cerebellum, 2005, 4(1): 2－6.

[8] Orr H T, Chung M Y, Banfi S, *et al*. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1[J]. Nat Genet, 1993, 4(3): 221－226.

[9] Schols L, Bauer P, Schmidt T, *et al*. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis[J]. Lancet Neurol, 2004, 3(5): 291－304.

[10] Underwood B R, Rubinsztein D C. Spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions: a review of therapeutic strategies[J]. Cerebellum, 2008, 7(2): 215－221.

(收稿 2010-11-26 修回 2010-12-07)

(编辑 汪勤俭)