文章编号:1000-5404(2013)11-1167-03

论著

脊髓小脑性共济失调合并房间隔缺损家系的遗传学研究

周 丹[1],郭 洪[2],白 云[2],迟路湘[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所[1],基础医学部医学遗传学教研室[2])

[摘要] **目的** 对本科收治的1个脊髓小脑共济失调(spinocerebellar ataxias,SCA)合并先天性房间隔缺损(atrial septal defects,ASD)家系进行临床资料分析和分子遗传学研究。**方法** 分别对SCA和ASD两个疾病表型进行临床诊断、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分别进行SCA和ASD相关致病基因进行突变检测和共分离分析。**结果** 该家系4代共有SCA患者15例,其中已故患者5例,呈常染色体显性遗传模式,病史回顾示家系患者均无明确诱因出现行走不稳、饮水呛咳、言语不清等共济失调的临床特征,基因诊断发现该家系患者SCA3致病基因CAG异常扩增。此外,在家系中还发现包括先证者在内的5例先天性ASD患者,对ASD相关基因进行突变筛查发现3例ASD患者均携带有MYH6基因编码区的1个错义突变c.1154C>T,导致第385位氨基酸由丝氨酸变为亮氨酸(Ser385Leu),其余家系成员无此突变。**结论** 该家系中SCA和ASD 2种独立的疾病表型都分别以常染色体显性遗传的方式传递,并且分别由SCA3的致病基因和MYH6基因的突变导致。

[关键词] 脊髓小脑性共济失调;房间隔缺损;突变;家系
[中图法分类号] R394.5; R541.1; R744.7 [文献标志码] A

Genetic analysis of a spinocerebellar ataxia family combined with atrial septal defects

Zhou Dan[1], Guo Hong[2], Bai Yun[2], Chi Luxiang[1] ([1]Department of Cardiology, Southwest Hospital, [2]Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Science, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To make a genetic and clinical analysis in an autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA) family combined with congenital atrial septal defect (ASD). **Methods** Family investigation, pedigree analysis and clinical diagnosis were performed on the 2 disease phenotypes respectively. Mutation detection of the disease genes associated with SCA and ASD by polymerase chain reaction (PCR) with direct DNA sequencing. **Results** There were 15 SCA familial patients of 4 generations, including 5 having dead. Both SCA and ASD were inherited in an autosomal dominant mode in this family. They presented walking instability, dysphagia and slurred speech after being 30 years old. Genetic diagnosis demonstrated the CAG repeat sizes of SCA3 causative gene were abnormally expanded. There were 5 ASD patients among these SCA patients, including the proband. Mutation screening of the ASD associated genes also revealed a coding mutation of MYH6 (c.1154C>T) in the 3 ASD patients, which leading Ser385Leu. No such mutation was found in other family members. **Conclusion** There are 2 independent diseases in this family inherited as an autosomal dominant mode, which result from different pathogenic mutation of different disease genes.

[**Key words**] spinocerebellar ataxias; arial septal defects; dynamic mutation, pedigree

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81100068). Corresponding author:Chi Luxiang,E-mail: chi68754271@126.com

遗传性脊髓小脑性共济失调(spinocerebellar ataxias,SCA)是一类具有高度的临床异质性和遗传异质性的神经系统退行性疾病,多为常染色体显性遗传(ADSCA),也有常染色体隐性遗传(SCARs)和X连锁隐性遗传(SCAXs)。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、吞咽困难等复杂的锥体系及锥体外系症状。目前已经定位了33个SCA亚型的染色体位置,克隆了21个SCA亚型的致病基因,其中与动态突变有关的亚型主要有SCA1、SCA2、SCA3、SCA6、SCA7、SCA17(编码区CAG扩增)、SCA8(5′UTR的CTG扩增)、SCA12(5′UTR的CAG扩增)、SCA10(内含子ATTCT扩增)、SCA31(内含子TGGAA扩增)和SCA36(内含子GGCCTG扩增)[1]。

先天性房间隔缺损(atrial septal defect,ASD)是指心房在发育过程中房间隔吸收和融合出现异常,左右心房之间残留未关闭的房间隔,是先心病中最常见的

[基金项目] 国家自然科学基金(81100068)
[通信作者] 迟路湘, E-mail:chi68754271@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130327.1445.006.html(2013-03-27)

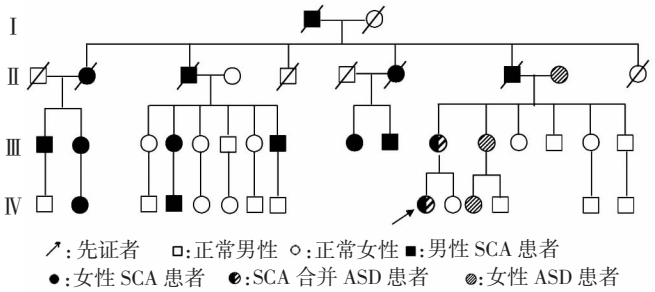
病变。ASD可单独存在,也可与其他心血管畸形合并存在,绝大部分由遗传因素和环境因素共同作用引起,但也有单基因遗传的ASD家系。

本研究从就诊于我科的1例SCA合并ASD两个系统异常的患者入手进行家系调查和临床特征分析,并通过分子遗传学手段对家系成员进行相关致病基因检测,明确其基因诊断,探讨2种疾病表型在家系中的传递情况。

1 资料与方法

1.1 家系调查

该家系来自重庆市某区县,先证者因心脏病就诊于本科。调查发现该家系4代成员中共有15例患有SCA,其中5例已去世,呈常染色体显性遗传。ASD表型自Ⅱ9开始出现,共5例患病,同样以显性方式遗传。见图1。



↗:先证者 □:正常男性 ○:正常女性 ■:男性SCA患者
●:女性SCA患者 ◐:SCA合并ASD患者 ◍:女性ASD患者

图1 脊髓小脑性共济失调合并房间隔缺损家系系谱图

1.2 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,获得本院伦理委员会批准后,收集家系中SCA患者(Ⅲ1、Ⅲ2、Ⅲ4、Ⅲ8、Ⅲ10、Ⅲ11、Ⅳ2、Ⅳ4、Ⅳ9)、ASD患者(Ⅱ9、Ⅲ11、Ⅲ12、Ⅳ9、Ⅳ11)、正常对照(Ⅲ6、Ⅲ14、Ⅲ15、Ⅲ16、Ⅳ1、Ⅳ6、Ⅳ8、Ⅳ10、Ⅳ12、Ⅳ13、Ⅳ14)及50名健康对照的抗凝外周血各2 mL,采用全血基因组DNA抽提试剂盒(北京天根)提取基因组DNA。

50 μL体系进行PCR反应,筛查SCA患者在中国人群中最常见的SCA1、SCA2、SCA3 3个亚型,引物序列和反应条件参考文献[2];筛查ASD患者GATA4、MYH6、NKX2-5、ACTC1 4个家族性ASD候选基因的编码区以及外显子-内含子交界区,利用NCBI的Primer-BLAST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)自行设计引物序列并由北京华大基因公司合成(引物序列和反应条件可向作者索取)。PCR扩增反应后,2%琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收PCR产物(DNA胶回收试剂盒,北京天根),对回收后的PCR产物直接测序(ABI 3130遗传分析仪)。

2 结果

2.1 该家系的临床表现

该家系共有4代,存在血缘关系的SCA患者共15例,其中男性7例,女性8例(其中5例已因该病去世),均表现为行走不稳、肌肉萎缩、言语模糊、饮水呛咳、眼球震颤等共济失调症状,无色盲、视力下降、精神障碍或痴呆等其他表现。家系中SCA患者发病年龄呈现代代提前和逐渐加重的趋势。

先证者Ⅳ9,女性,现21岁,19岁时发病,开始时出现行走不稳,后来逐渐出现肌肉萎缩,伴有言语不清、饮水呛咳以及双手不自主运动,1年来病情进展迅速,目前已丧失行动能力,生活几乎无法自理。患者不伴有视力下降、癫痫、痴呆等其他神经系统症状。神经系统查体:患者神志清楚,消瘦,需搀扶行走,语速缓慢,有轻微突眼,可诱发水平方向眼球震颤,四肢肌力明显降低,肌张力增高,腱反射亢进,肌电图发现双下肢呈神经源性损害。双手姿势性细震颤,指鼻试验和跟-膝-胫试验缓慢欠准确,髌阵挛、踝阵挛阳性,感觉系统未见异常。

先证者心脏彩超检查显示:单纯性继发孔中央型ASD,三尖瓣轻度返流,继发中度肺动脉高压,右房右室增大,不伴有心血管系统其他发育异常。其余系统未见异常。家族史回顾发现,其母亲Ⅲ11和姨妈Ⅲ12曾患有先天性ASD。对其他相关家系成员进行了心脏彩超筛查,结果发现先证者外婆Ⅱ9以及表妹Ⅳ11均患有先天性ASD。系谱分析发现,该ASD表型在家系中同样呈显性遗传方式传递。其余家系成员经全身查体,未见异常。

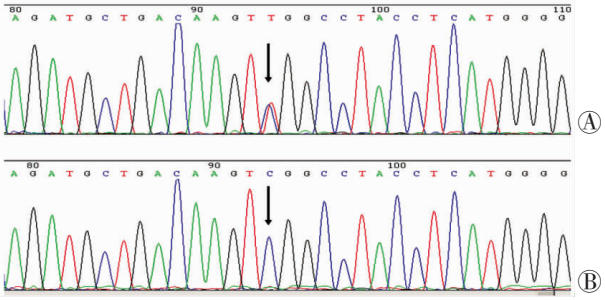
2.2 SCA1、SCA2和SCA3致病基因的检测

2.2.1 PCR扩增 对家系中的SCA患者进行了SCA1、SCA2和SCA3致病基因的突变检测。结果显示,SCA1和SCA2致病基因均无异常,而所有家系患者有SCA3致病基因ATXN3的异常扩增条带,家系中正常人和家系外健康对照只有1条条带。

2.2.2 测序计数CAG重复序列扩增数目 对PCR扩增后的异常条带进行切胶回收,并进行测序,根据测序结果计数SCA3致病基因CAG三核苷酸重复次数。家系中患者Ⅲ1、Ⅲ2、Ⅲ4、Ⅲ8、Ⅲ10、Ⅲ11的CAG重复次数分别为73、75、78、76、78次和71次,Ⅳ2、Ⅳ4、Ⅳ9的CAG重复次数分别为78、81次和89次,呈现出子代较亲代重复次数增加的趋势,从遗传学上解释了临床症状代代加重的现象,尤其是Ⅲ11和Ⅳ9母女,女儿Ⅳ9目前的SCA症状与病情进展趋势明显重于其母亲Ⅲ11。

2.3 ASD致病基因突变检测

对家系中的ASD患者进行4个家族性ASD候选基因的突变筛查,结果显示,所有患者的MYH6基因第17外显子发生了杂合突变c.1154C>T,导致第385位氨基酸由丝氨酸变为亮氨酸(Ser385Leu)。而家系中非ASD患者以及家系外健康对照中均未检测到该突变位点。见图2。



A:家系中ASD患者 ↑:突变位点c.1154C>T;B:正常对照 ↑:野生型纯合子CC

图2 脊髓小脑性共济失调合并房间隔缺损家系MYH6基因第27号外显子部分测序结果

3 讨论

SCA主要以家系形式存在,也有散发病例,从遗传

方式来看,SCA多为ADSCA,但也有SCARs和SCAXs。目前已经定位了33个SCA亚型的染色体位置,克隆了21个SCA亚型的致病基因。值得一提的是,湘雅医院的唐北沙教授通过连锁分析结合外显子测序的方法克隆了1个常染色体显性遗传SCA35家系的致病基因TGM6,为我们克隆鉴定SCA致病基因提供了1条可行的思路[3]。

有研究发现,不同国家、不同种族SCA的发病率和类型分布存在较大的差异,但SCA3在全世界范围都是最常见的一种亚型,占到ADSCA的30%左右[4]。在我国,SCA3同样是最常见的亚型,其次为SCA1和SCA2,这3型合计占到所有SCA亚型的60%~70%[4]。SCA1、SCA2、SCA3是ADSCA中以动态突变为特征的特殊类型,这一类SCA家系的患者往往会出现代代提前和逐渐加重的趋势,因此通过对致病基因重复序列异常扩增的检测是SCA诊断的首选方法[5]。

本研究通过家系患者的主要临床表现确定其为SCA,随后经过遗传方式、系谱特点的分析,并通过分子遗传学的手段将其明确为SCA3。家系中SCA患者的临床表现符合SCA3典型的特点。对所有家系成员进行ATXN3基因的突变筛查,不仅确认了现症患者的诊断,还可以确认或者排除家系中的症状前患者,对家系成员的生育指导也有重要意义。

SCA3比其他的SCA家系存在更多、更明显的临床变异,这在本家系中也非常明显,其原因还不清楚。目前已有明确的证据认为CAG重复数目是重要的调控因素,重复次数越多,发病年龄越早且临床症状越严重。此外,还有包括修饰基因、ATXN3基因的多态性改变、拷贝数变异、遗传印记或者环境因素等参与SCA3的表型修饰[6]。

先天性ASD是最常见的出生缺陷之一,多伴有其他的心血管畸形,如室缺、心肌病、传导异常等,还可伴发于一些全身性的综合征如Holt-Oram综合征等。从发生学上,ASD又分为原发孔型ASD(又称Ⅰ型ASD)和继发孔型ASD(又称Ⅱ型ASD)。目前的研究认为,ASD是由遗传因素和环境因素共同作用引起的复杂疾病,遗传度为55%~65%,但部分罕见的先天性家族性ASD可以形成单基因ASD家系[7]。本研究中的ASD就是以单基因的方式在家系中传递。

目前已知与ASD相关基因主要有:ASD2[8]、ASD3[9]、ASD4[10]、ASD5[11]、ASD6[12]、ASD7[13]、ASD8[14]、ASD9[15],而到目前为止,第1个定位到染色体5p的ASD位点ASD1尚未鉴定到相关的致病基因。在本家系中,通过对4个家族性单纯性ASD相关基因的筛查,所有ASD患者发现MYH6基因存在1个杂合致病突变c.1154C>T,导致第385位氨基酸由丝氨酸变为亮氨酸(Ser385Leu),因此从遗传学上确定该家系是1个ASD3家系。

本研究涉及的家系中,仅有2例患者合并有SCA和ASD2种疾病表型,从整个家系来分析,SCA和ASD又是分开传递的,各自符合常染色体显性遗传模式,并与各自的致病突变呈现共分离状态,因此可以说该家系是2种表型的重叠,而非一种新的综合征。

参考文献:

[1] Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, *et al*. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement[J]. Am J Hum Genet, 2011, 89(1): 121-130.

[2] 刘丹, 郭洪, 王凯, 等. 脊髓小脑性共济失调一家系的遗传学研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 1152-1154.

[3] Wang J L, Yang X, Xia K, *et al*. TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing[J]. Brain, 2010, 133(Pt 12): 3510-3518.

[4] Hersheson J, Haworth A, Houlden H. The inherited ataxias: genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in research and clinical diagnostics[J]. Hum Mutat, 2012, 33(9): 1324-1332.

[5] Whaley N R, Fujioka S, Wszolek Z K. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: a review of the phenotypic and genotypic characteristics[J]. Orphanet J Rare Dis, 2011, 6: 33.

[6] McGurk L, Bonini N M. Protein interacting with C kinase (PICK1) is a suppressor of spinocerebellar ataxia 3-associated neurodegeneration in Drosophila[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(1): 76-84.

[7] Posch M G, Perrot A, Berger F, *et al*. Molecular genetics of congenital atrial septal defects[J]. Clin Res Cardiol, 2010, 99(3): 137-147.

[8] Garg V, Kathiriya I S, Barnes R, *et al*. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5[J]. Nature, 2003, 424(6947): 443-447.

[9] Posch M G, Waldmuller S, Muller M, *et al*. Cardiac alpha-myosin (MYH6) is the predominant sarcomeric disease gene for familial atrial septal defects[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28872.

[10] Posch M G, Gramlich M, Sunde M, *et al*. A gain-of-function TBX20 mutation causes congenital atrial septal defects, patent foramen ovale and cardiac valve defects[J]. J Med Genet, 2010, 47(4): 230-235.

[11] Matsson H, Eason J, Bookwalter C S, *et al*. Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects[J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(2): 256-265.

[12] Stanczak P, Witecka J, Szydlo A, *et al*. Mutations in mammalian tolloid-like 1 gene detected in adult patients with ASD[J]. Eur J Hum Genet, 2009, 17(3): 344-351.

[13] Liu X Y, Wang J, Yang Y Q, *et al*. Novel NKX2-5 mutations in patients with familial atrial septal defects[J]. Pediatr Cardiol, 2011, 32(2): 193-201.

[14] Guo Y, Shen J, Yuan L, *et al*. Novel CRELD1 gene mutations in patients with atrioventricular septal defect[J]. World J Pediatr, 2010, 6(4): 348-352.

[15] Lin X, Huo Z, Liu X, *et al*. A novel GATA6 mutation in patients with tetralogy of Fallot or atrial septal defect[J]. J Hum Genet, 2010, 55(10): 662-667.

(**收稿**:2013-01-13;**修回**:2013-03-13)

(编辑 栾 嘉)