

· 临床研究 ·

儿童型脊肌萎缩症 *SMN* 基因缺失与微突变检测

杨晓苏, 邓益东, 肖波, 罗新明

(中南大学湘雅医院神经内科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 研究儿童型脊肌萎缩症(SMA)患者中运动神经元生存基因缺失与微突变情况。方法 收集经临床和肌肉活检确诊的 SMA I~III 型 25 例, 其中 I 型 5 例, II 型 3 例, III 型 17 例及直系亲属 24 例。采用 PCR-RFLP 检测 *SMNt* 缺失情况, 对无 *SMNt* 缺失的患者及 SMA 直系亲属, 应用 PCR-SSCP 结合 DNA 序列分析的方法, 进行 *SMN* 基因微突变分析。结果 5 例 I 型和 3 例 II 型 SMA 患者均见 *SMNt* 缺失, 缺失率 100%, 6 例 III 型见缺失, 缺失率 35% (6/17)。11 例无缺失的 SMA III 型患者的 gDNA 编码区域未发现微突变; 24 例 SMA 的直系亲属中未发现 *SMN* 基因缺失及突变。结论 ①检测到 *SMNt* 外显子 7 缺失可作为 SMA 的确诊手段, 有望替代肌电图和肌活检等有创检查; ②对无 *SMNt* 外显子 7 缺失的 III 型 SMA 患者, 要结合临床进行诊断; ③该组无 *SMNt* 缺失的 III 型患者未发现微突变, 提示存在遗传异质性。 [中国当代儿科杂志, 2005, 7(6): 489-492]

[关键词] 脊肌萎缩症; 运动神经元生存基因; 缺失; 微突变; 儿童

[中图分类号] R741 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)06-0489-04

Detection of deletion and subtle mutations of *SMN* gene in children with spinal muscular atrophy

Xiao-Su YANG, Yi-Dong DENG, Bo XIAO, Xin-Ming LUO. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Email: neurogxm@public.cs.hn.cn)

Abstract: Objective This study examined the prevalence of deletion and subtle mutations of survival motor neuron (*SMN*) gene in children with spinal muscular atrophy (SMA). **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the deletion of *SMNt* exon 7 in 25 children with SMA (type I 5 cases, type II 3 cases, and type III 17 cases) and in 24 healthy relatives of these patients. SMA was diagnosed clinically and pathologically. The subtle mutations of *SMN* in encode regions were screened by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) combined with DNA direct sequencing in the patients without *SMNt* deletion and their relatives. **Results** Deletion of exon 7 of the *SMNt* gene was found in 5 cases of SMA type I (100%), 3 cases of type II (100%) and 6, type III (35%). No subtle mutation of *SMN* was found in encoded regions in 11 cases of type III SMA without *SMNt* deletion. The 24 relatives of SMA patients did not show the deletion and subtle mutation of *SMN*. **Conclusions** ①Detection of *SMNt* gene exon 7 deletion can be recommend as a definitive diagnostic method for SMA, and showed promise to replace invasive examinations, such as electromyogram and muscular biopsy. ②In patients with type III SMA without *SMNt* deletion, diagnosis is still made clinically. ③No subtle mutation of *SMN* was found in SMA type III patients without *SMNt* deletion, suggesting genetic heterogeneity might exist.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(6): 489-492]

Key words: Spinal muscular atrophy; Survival motor neuron gene; Deletion; Subtle mutation; Child

儿童型脊肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA) 是一组常染色体隐性遗传性神经肌肉疾病, 由于脊髓前角细胞变性导致了肌无力和萎缩。本病根据临床特点、起病年龄及所能达到的最佳运动功能分为常见的 I~III 型。1995 年 SMA 的致病基因被克隆, 命名为运动神经元生存 (survival motor neu-

ron, *SMN*) 基因。该基因定位于 5q13 区, 在同一条染色体上有二个拷贝, 分别命名为端粒侧 *SMN* (telomeric *SMN*, *SMNt*) 和着丝粒侧 *SMN* (centromeric *SMN*, *SMNc*), 二者间仅有 5 个碱基的差别, 其中 2 bp 在外显子 7 和 8, 利用这一碱基差异可区分 *SMNt*、*SMNc*。研究发现^[1~3], 在 SMA 患儿中 *SMNt*

[收稿日期] 2005-01-30; [修回日期] 2005-04-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (No30170330); 湖南省自然科学基金 (02JJY3016)

[作者简介] 杨晓苏 (1956-), 女, 大学, 教授, 副主任。主攻方向: 小儿神经系统疾病。

外显子7的纯合缺失率达87%~100%,而且还显示杂合缺失的部分SMA患者中保留的SMN₁存在微突变,其中微突变的检测有助于明确SMN₁基因的关键区域。

目前国内除台湾省外,尚未见SMN基因突变分析的报道。为探索SMN基因在我国儿童型SMA患者中的突变情况,我们采用了聚合酶链反应-限制性片断长度多态性分析(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)检测SMN₁缺失情况,同时利用聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)结合DNA序列分析的方法,对筛选出无SMN₁缺失的SMA患者及其直系亲属进行SMN基因编码区微突变分析,以探讨基因型和表型的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集中南大学湘雅医院神经内科1997年3月至2003年7月经临床和肌肉活检确诊的SMA患者25例及其表型正常的一级直系亲属24例。SMA患者中I型5例(男3例、女2例,年龄4~22月,起病年龄0~4月),II型3例(男1例、女2例,年龄2~9岁,起病年龄分别为6月、12月和18月),III型17例(男9例、女8例,年龄5~23岁,起病年龄为18月~16岁),所有病例均符合1992年国际SMA协会第四届会议制定的SMA诊断及分型标准^[4](见表1)。

表1 儿童型SMA分型

分型	起病年龄	运动功能	病程	遗传方式
I	<6月	无帮助不能坐	2岁内死亡	AR
II	<18月	无帮助不能站、行走	>2岁	AR
III	>18月	可站立与行走	可生存至成年	AR

1.2 方法

1.2.1 SMN基因缺失检测 所有患者和直系家属取外周血5 mL(肝素抗凝),采用酚-氯仿法提取DNA。参考van der Steege等^[5]的设计合成SMN基因外显子7的引物:Exon7 F 5'AGACTATCAACTTA-ATTTCTGATCA3'; Exon7 R 5'CCTT CCTTCTTTT-GATTTTGTGTT3'。PCR扩增片段长度为188 bp,继以限制性内切酶Dra I酶切、2%琼脂糖凝胶电泳,EB染色后图像分析仪照相、观察结果。

1.2.2 SMN微突变检测 对无SMN₁基因缺失的SMA患者及其直系亲属进行编码区域微突变检测。在参考国外研究^[6]的基础上,设计Exon 1, Exon 2A, Exon 2B~Exon 7的引物(见表2);PCR扩增后行SSCP分析,如出现异常单链构象带,则检测80~100名正常对照,排除多态性后,按常规方法回收经SSCP分析有异常单链构象带的PCR产物,经正反向测序,测序结果与人类基因组SMN基因序列比较(GeneID: 6606, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。若发现外显子7以外的微突变,则需进一步证实其属于SMN₁拷贝还是SMN₂拷贝,即采用RT-PCR合成SMN cDNA作为模板,以微突变所在外显子的前向引物和外显子7的反向引物扩增、测序,根据外显子7内的碱基差异鉴别微突变的准确位置。

表2 SMN基因 exon1、2A、2B~exon7 PCR引物序列

引物名	引物序列(5'→3')	扩增片段大小	退火温度(℃)
Exon1 F	GCCGGAAGTCGTCACCTCTT	189	56
Exon1 R	GGGTGCTGAGAGGCTAATA		
Exon2A F	CTGATTAAACCTATCTGAACATG	203	55
Exon2A R	CGTATGTTATCAATTCCTTTTCCA		
Exon2B F	CTGTGCACCACCCTGTAACATG	218	56
Exon2B R	AAGGACTAATGAGACATCC		
Exon3 F	CGAGATGATAGTTTGCCCTC	300	56
Exon3 R	CTCATCTAGTCTCTGCTTCC		
Exon4 F	CACCCCTTATAACAAAAACCTGC	252	56
Exon4 R	GAGAGGTTAAATGTCCCGA		
Exon5 F	TGAGTCTGTTTGACTTCAGG	314	56
Exon5 R	TATCAAATTTGATGTGAAAGCA		
Exon6 F	CTCCCATATGTCCAGATTCTCTT	246	56
Exon6 R	AAGAGTAATTTAAGCCTCAGACAG		
Exon7 F	AGACTATCAACTTAATTTCTGATC	245	55
Exon7 R	GTAAGATTCACCTTCATAATGCTG		

2 结果

2.1 SMN基因外显子7缺失检测

SMN基因外显子7经酶切后,因为Dra I的酶切位点在SMN₂,SMN₂被分为164 bp、24 bp两个片段(24 bp片段将电泳出凝胶范围),而SMN₁仍为188 bp的条带;无SMN₁缺失的个体,电泳见188 bp、164 bp二条带,缺失SMN₁外显子7者仅164 bp一条带(图1)。本组5例I型和3例II型SMA患者均见SMN₁外显子7纯合缺失(100%),III型中6/17例(35.2%)见缺失,I~III型总缺失率为78%(14/25),未见SMN₂缺失。24例直系亲属中未发现外显子7缺失。

2.2 SMN 编码区域微突变检测

本组患者及其直系亲属的 SMN 编码区各外显子经 PAGE 胶电泳后均未见异常条带(图2),即未见微突变。

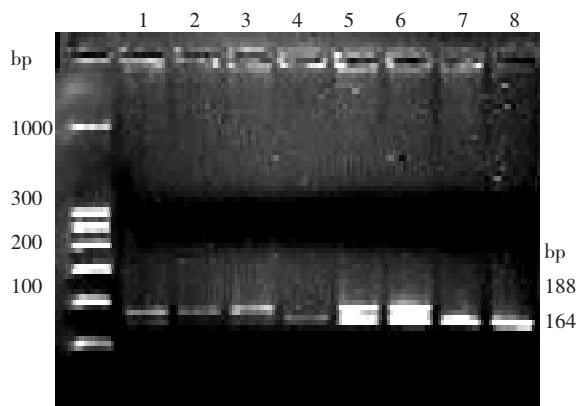


图1 SMN 外显子7 酶切图。4为I型;1,2,3,7与8为III型;5,6为家属

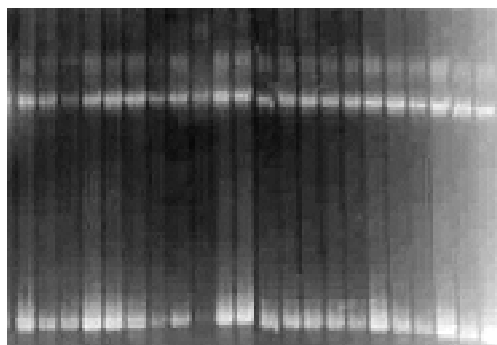


图2 SMN 外显子6 电泳图。患者及直系亲属的 SMN 外显子经 PAGE 胶电泳后,均无异常条带出现。

3 讨论

自从发现儿童型 SMA 的致病基因后,目前 PCR 定性检测 *SMNt* 基因外显子7的纯合缺失已作为儿童型 SMA 的分子学诊断方法。本组资料显示 I, II 型 SMA 患者 *SMNt* 基因外显子7缺失率为 100%,与国内外研究一致。目前文献报道国外为 91%~100%,平均为 94%;国内为 90%。可见以外显子7有无缺失作为 I, II 型 SMA 的基因诊断标准是非常有效的,有望替代肌电图和肌活检等有创检查,在临床上具有较高的使用价值。而 SMA III 型患者 *SMNt* 的缺失率,多数研究显示与 I, II 型类似,但少数研究显示低于 I, II 型,仅 76%;本组研究也显示明显低于国外大样本研究,仅 35.2%,但与日本 Fujii 等^[7] 研究结果类似,这是否与种族、地理分布有关,还有待于进行大样本研究。

我们在 24 例 SMA 患者直系亲属中未发现

SMNt 或 *SMNc* 的纯合性缺失,前者与国内外结果一致,后者在有的研究中发现,3%~5%的正常人群包括患者家属,存在 *SMNc* 的缺失,提示 *SMNc* 不是 SMA 的主要致病基因;但研究发现 *SMNc* 拷贝数与病情程度有关,拷贝数越多,病情越轻;如 *SMNt* 和 *SMNc* 联合缺失,则提示这种情况是胚胎致死性的,最近的动物模型已证实这点。

目前,微突变检测主要有全基因 gDNA 片段测序、cDNA 直接测序和 SSCP 结合序列分析等方法。不同的方法均存在一定的优缺点,PCR-SSCP 加测序的方法相对费时,而且仅能检测编码区域的突变,但由于操作简单,费用低廉,对 <200 bp 的片段内的突变检出率为 100%,且无假阳性结果,不失为突变检测的较好方法。而 *SMN* 基因的编码区域虽然只占全基因的 2% 左右,但集中着绝大多数的遗传信息,目前已检出的微突变多集中在编码区域,因此在此区域的检测对基因的研究有重要意义。故本研究采用 PCR-SSCP 的方法对编码区域进行微突变检测。

通过各种突变检测方法,目前在 *SMNt* 内已发现 40 种突变形式,包括点突变(错义、无义)、微缺失或大片段缺失、插入等,其中微突变 27 种,而 *SMNc* 内仅发现外显子7,8联合缺失一种突变。在我们所收集的 SMA 病例中,通过 PCR-SSCP 的方法,检测 *SMN* 基因的编码区,但未发现微突变,可能与以下等原因有关:① 启动子区域、内含子在基因表达调控,疾病的发生中可能发挥作用。这些区域可能存在突变而本检测方法不能测出。如 Martín 等^[8] 学者发现一 II 型患者保存一 *SMNt* 拷贝,但似乎无功能,经检测无全长或截短的 RT-PCR 产物,但在编码区域未发现突变。目前尚未发现某一突变可导致 *SMNt* 转录完全缺失,提示除已发现的基因突变外尚有其它影响因素存在。YY1 作为一多功能转录因子,具有活化、抑制或启动转录的功能。在上述患者启动子区域聚 A(腺嘌呤)序列内发现 YY1 结合位点为 9~10A,而非常见的 8A,推测这可能是该 *SMNt* 拷贝无功能的原因^[8]。② 整个外显子的重复或缺失不破坏阅读框,而本方法不能鉴别。③ 遗传异质性的存在。研究发现,约 3%~7% 的 SMA 患者中可发现有两个 *SMNt* 拷贝,进一步进行连锁分析或基因测序时均没发现突变,提示 *SMNt* 基因未在这部分患者的发病机制中发挥作用^[8~11]。在两个基因型分别为 Y272C/Δ7*SMNt*、Y244I/Δ7*SMNt* 的家系研究中发现,患者具有相同 *SMNc* 拷贝数而表型不同,提示除 *SMN* 基因外,尚有其他

影响因素存在^[9]。Tarnopolsky等^[11]在临床和病理表现为SMA I型的患者中发现细胞色素氧化酶2 (cytochrome oxidase 2, SCO₂) 基因突变, 且此患者具有2个SMN_t拷贝, 全基因组测序亦未发现突变, 进一步证实存在遗传异质性, 同时提示SCO₂可能作为本病的另一致病基因, 从而为我们进一步研究提供了线索。

[参 考 文 献]

- [1] Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Violette L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene[J]. Cell, 1995, 80(1):155-165.
- [2] Simard LR, Rochette C, Semionov A, Morgan K, Vanasse M. SMN-t and NAIP mutations in Canadian families with spinal muscular atrophy (SMA): genotype/phenotype correlations with disease severity[J]. Am J Med Genet, 1997, 72(1):51-58.
- [3] Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernandez-Chico C. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype[J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(2):257-263.
- [4] Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting [J]. Neuromuscul Disord, 1992, 2(5-6):423-428.
- [5] van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, et al. PCR-based DNA test to confirm

- clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy [J]. Lancet, 1995, 345 (8955):985-986.
- [6] Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, et al. Quantitative analysis of survival motor neuron copies; identification of subtle SMN1 mutation in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation and implications for genetic counseling[J]. Am J Hum Genet, 1999, 64(5):1340-1356.
 - [7] Fujii T, Miyajima T, Ito M, Okuno T, Mitsuyoshi I. Utility and intricacy of molecular diagnosis of spinal muscular atrophy[J]. No To Hattatsu, 1999, 31(6):505-510.
 - [8] Martín Y, Valero A, Samuel ICS, Hernandez-Chico C. Genetic study of SMA patients without homozygous SMN1 deletions; identification of compound hetero-zygotes and characterization of novel intragenic SMN1 mutations [J]. Hum Genet, 2002, 110(3):257-263.
 - [9] Chen KL, Wang YL, Rennert H, Joshi I, Mills JK, Leonard DG, et al. Duplications and de novo deletions of the SMN_t gene demonstrated by fluorescence-based carrier testing for spinal muscular atrophy[J]. Am J Med Genet, 1999, 85(5):463-469.
 - [10] Saugier-Verber P, Drouot N, Lefebvre S, Charbonnier F, Vial E, Munnich A, et al. Detection of heterozygous SMN1 deletions in SMA families using a simple fluorescent multiplex PCR method [J]. J Med Genet, 2001, 38(4):240-243.
 - [11] Tarnopolsky MA, Bourgeois JM, Fu MH, Kataeva G, Shah J, Simon DK, et al. Novel SCO₂ mutation (G1521A) presenting as a spinal muscular atrophy type I phenotype [J]. Am J Med Genet A, 2004, 125(3):310-314.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

2006年全国儿科热点研讨会征文通知

由中国当代儿科杂志社和全军儿科学会联合举办的“全国儿科热点研讨会”拟定于2006年4月中旬在杭州市召开,大会将采取专家讲座和大会交流相结合的形式。专家讲座热点内容有:①新生儿(用氧、感染与抗生素应用);②遗传代谢与神经病(小儿遗传代谢病诊治、PKU研究近况与串联质谱仪、遗传代谢病相关癫痫、小儿头颅CT与MRI);③风湿与免疫(川崎病和JRA诊治近况、免疫缺陷病、骁悉的临床应用);④临床科研(循证医学与医学伦理、临床研究设计与医学统计、医学论文写作中常见问题)。由国内著名儿科专家作专题讲座。现征集会议论文,主要内容为儿科及新生儿疾病的基础与临床研究,临床诊断与治疗体会。要求为未公开发表过的学术论文摘要,500字左右(包括目的、方法、结果、结论)。被录用的论文将编入“会议论文集”,其中优秀的稿件可在中国当代儿科杂志上发表。稿件上请注明作者姓名、单位、邮编、电话、传真。推荐Email投稿,“主题”请写“会议征文”。亦接受邮寄投稿,请在信封上注明“会议征文”。无需寄审稿费。无论文者亦欢迎参加会议。

投稿截止日期为2006年2月28日。

联系及投稿地址:湖南省长沙市湘雅路87号中国当代儿科杂志编辑部吉耕中收,邮编410008。

电话:0731-4327402;传真:0731-4327922;Email:ddek7402@163.com或ddek@vip.163.com

中国当代儿科杂志社

中国人民解放军医学会小儿科专业学会

2005年8月