

论著·临床研究

中国脊髓性肌萎缩症患儿的 SMN 基因学研究

刘维亮¹ 李芳² 麻宏伟³ 李海燕³

(贵阳医学院附属医院, 1. 儿科; 2. 眼科, 贵州 贵阳 550004;
3. 中国医科大学附属盛京医院发育儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 明确中国人各型脊髓性肌萎缩症(SMA)患儿 SMN1 基因外显子 7 和 8 缺失, SMN 基因转变及微小突变情况。方法 对 106 例患者, 采用 PCR-RFLP 检测基因缺失, RFLP 筛查基因转变, 并对 PCR 产物进行测序分析。基因转变率比较采用 Fisher 精确检验法进行统计学分析。结果 SMA 患儿纯合 SMN1 外显子 7 和/或 8 缺失比率为 91.5%, 发现 1 例 SMA 中存在 SMN1 外显子 7 保留, 而 SMN1 非编码外显子 8 缺失。在 SMN1 外显子 7 缺失而无外显子 8 缺失的患者中, 各型间基因转变率差别无统计学意义, 在 SMN1 外显子 7 缺失的 SMA 中, 其基因转变率为 8.3%。SMN 第 7 外显子附近未发现基因微小突变。结论 SMN1 基因外显子 7 和/或 8 缺失为中国 SMA 患儿的主要病因。SMA 中存在 SMN 基因转变现象。SMN1 基因外显子 8 的单独缺失可能致病。SMN1 基因外显子 7 附近可能不是此病微小突变的热点区域。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(7): 539-543]

[关键词] 脊髓性肌萎缩; SMN 基因缺失; 基因转变; 微小突变; 儿童
[中图分类号] R746.4 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)07-0539-05

Study of SMN gene in Chinese children with spinal muscular atrophy

LIU Wei-Liang, LI Fang, MA Hong-Wei, LI Hai-Yan. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China (Ma H-W, Email: mahongwei1960@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the incidence of homozygous absence of SMN1 exons 7 and 8, SMN gene conversion frequency and SMN subtle mutations in children with spinal muscular atrophy (SMA). **Methods** The homozygous deletion was detected by PCR-RFLP in 106 Chinese children with SMA, gene conversion by RFLP and subtle mutations by sequencing. **Results** The rate of deletion of SMN1 exons 7 and/or 8 was 91.5%. Deletion of SMN1 exon 8 but existence of exon 7 was noted in one child with SMA. There were no significant differences in the gene conversion frequency among children with different types of SMA and who had homozygous deletion of SMN1 exon 7 but existence of exon 8. The gene conversion frequency was 8.3% in children with homozygous deletion of SMN1 exon 7. No subtle mutations were found around SMN1 exon 7. **Conclusions** Deletion of SMN1 exons 7 and/or 8 is the main cause of SMA in Chinese children. There exists a SMN gene conversion phenomenon in SMA. Deletion of exon 8 might lead to SMA. The hot area of subtle mutations of this disease might not be around SMN1 exon 7. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (7): 539-543]

Key words: Spinal muscular atrophy; Deletion of SMN gene; Gene conversion; Subtle mutation; Child

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)是婴幼儿时期最常见的神经肌肉病之一, 为常染色体隐性遗传, 发病率约 1/6 000, 携带者频率约 1/35^[1]。其特征主要是脊髓前角的 α 运动神经元退化变性, 表现为进行性、对称性肢体近端和躯干肌肉无力、瘫痪和萎缩。儿童型 SMA 有 3 个(I-III 型)临床型^[2]。1995 年 SMN1 基因被定为 SMA 决定基因^[3]。SMN 基因存在两个高度同源的拷贝, 端粒拷贝(SMN1)和着丝粒拷贝(SMN2)^[4]。本研究通过较大样本对临床诊断为 SMA 患儿进行

SMN1 基因外显子 7 和 8 缺失检测, 明确中国人各型 SMA 患儿基因缺失情况。由于在部分 SMA 患儿中有 SMN1 基因外显子 7 缺失而保留其外显子 8, 可能存在 SMN 基因转变, 通过对未发生 SMN1 基因外显子 8 缺失的患儿进行 SMN 基因转变研究, 明确其基因转变情况。并对 SMN1 基因外显子 7 和 8 均未缺失的患儿在含外显子 7 的 SMN 基因末端筛查基因内微小突变。通过对 SMA 患儿的 SMN 基因特征研究, 可进一步明确致病 SMN 基因区域的结构和功能, 为深入探讨 SMA 的病因及治疗研究奠定基础。

[收稿日期]2009-12-24;[修回日期]2010-02-19
[作者简介]刘维亮,男,博士,医师。
[通信作者]麻宏伟,教授。

1 对象与方法

1.1 对象

收集1996~2008年间在儿科门诊诊断的儿童SMA患者共106例,男52例,女54例,其中I型47例,II型33例,III型26例,起病年龄为生后4d至6.2岁。并有30例随机正常对照儿童,其年龄、性别与研究病例匹配,直系亲属中无SMA患者。患儿临床诊断及分型符合国际SMA协会依靠起病年龄和获得的运动能力将儿童SMA定义的临床型^[2],并且辅助检查:①酶学检测血清肌酸磷酸激酶正常或稍高;②肌电图或肌活检通常为神经源性损害。通过*SMN1*基因外显子7和8缺失检测,在SMA患儿中,选取已发现有*SMN1*基因外显子7缺失而无外显子8缺失及外显子7和8均未缺失的患者。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 本研究得到了中国医科大学附属盛京医院伦理委员会的批准,基因分析获取了患儿家长的知情同意。留取患儿外周静脉血1~3 mL,EDTA抗凝,酚-氯仿法提取基因组DNA,于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 检测SMA患儿的*SMN*基因缺失 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技术检测SMA的*SMN1*基因缺失。*SMN1*和*SMN2*基因间外显子7存在第七位碱基C→T的差异,该差异在引物中临近碱基差异处引入一个错配碱基,在*SMN2*外显子7内造成Dra I酶切位点,而*SMN1*无此酶切位点。*SMN1*和*SMN2*基因间外显子8存在第245位碱基G→A的差异,在*SMN2*外显子8存在Dde I的酶切位点,而*SMN1*无此酶切位点。因此SMA患儿中*SMN1*基因缺失者PCR产物酶切后为完全酶切片段。*SMN*基因外显子7、8的PCR扩增引物设计参考文献^[3], Exon7 F: 5'-AGA CTA TCA ACT TAA TTT CTG ATCA-3', Exon7 R: 5'-CCT TCC TTC TTT TTG ATT TTG TTT-3'; Exon8 F: 5'-GTA ATA ACC AAA TGC AATGTG AA-3', Exon8 R: 5'-CTA CAA CAC CCT TCT CAC AG-3'。PCR反应条件均为95℃预变性5 min,95℃45 s,55℃45 s,72℃1 min,循环35次,最后在72℃延伸10 min(PCR仪为美国PE公司9600型PCR扩增仪)。PCR产物长度均为188 bp。*SMN*基因外显子7、8的PCR产物分别加入Dra I与Dde I酶切消化。终止酶切反应后行2%琼脂糖凝胶电泳检测酶

切产物。

1.2.3 筛查*SMN*基因转变及微小突变 发生转变的杂合*SMN*基因含有*SMN2*基因的外显子7(或伴其内合子7),针对*SMN*基因内合子6-外显子8进行PCR扩增,因*SMN1*与*SMN2*基因外显子8仅有一处碱基不同,即245G→A,故采用识别*SMN2*基因外显子8的Dde I酶切鉴定基因转变,含有部分被酶切的片段为转变基因片段。*SMN1*基因外显子7为SMA常见缺失突变区,针对*SMN1*基因外显子7、8保留的患者在*SMN*基因末端第7外显子附近筛查*SMN*基因微小突变,即针对*SMN*基因内合子6至外显子8间的区域进行PCR扩增测序。PCR扩增引物设计参考文献^[5],引物上游5'-AGAC-TATCAACTTAATTTCTGATCA-3',下游5'-CTA CAA CAC CCT TCT CAC AG-3'。PCR扩增条件为94℃预变性7 min,94℃45 s,56℃45 s,72℃1 min,循环30次,最后在72℃延伸10 min。PCR产物长度均为1 010 bp,Dde I酶切筛查*SMN*基因转变,2%琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。测序用PCR产物应用双脱氧末端终止法进行测序(美国ABI公司3730XL测序仪)。

1.3 统计学分析

在SMA II及III型患儿中,*SMN*基因转变率比较采用Fisher精确检验法进行统计学分析。数据处理采用SPSS 13.0软件包,以P<0.05作为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 检测SMA患儿的*SMN1*基因缺失结果

*SMN*基因外显子7的PCR扩增片段酶切后,正常对照者及无缺失的SMA患儿结果为部分酶切产物,出现188 bp、164 bp和24 bp 3条带(24 bp片段较短,已跑出胶),缺失外显子7者为完全酶切产物有164 bp和24 bp两条带,见图1;*SMN*基因外显子8的PCR扩增片段酶切后,正常对照者及无缺失的SMA患儿结果为部分酶切产物,出现188 bp、120 bp和68 bp 3条带(由于电泳时间较长,68 bp带很弱),而外显子8缺失者为完全酶切产物呈120 bp和68 bp两条带,见图2。

对106例各型SMA患儿和30例正常儿童进行*SMN1*基因外显子7和8缺失检测,显示SMA患儿纯合*SMN1*外显子7和/或8缺失比率为91.5%,另外8.5%患儿皆未发现*SMN1*外显子7或8缺失,1例III型SMA患儿发现*SMN1*基因外显子8的单独

缺失。30例正常儿童未发现SMN1外显子7或8缺失。具体各型SMA患儿SMN1基因外显子7和8缺失检测结果见表1。

表1 各型SMA患儿SMN1基因外显子7和8缺失检测结果 [例(%)]					
例数	外显子7 缺失	外显子7、外显子8 缺失	外显子7缺失和 外显子8保留	外显子7保留和 外显子8缺失	外显子7,8 保留
I型 47	46(97.9)	46(97.9)	0(0)	0(0)	1(2.1)
II型 33	31(94.0)	27(81.8)	4(12.1)	0(0)	2(6.1)
III型 26	19(73.1)	10(38.5)	9(34.6)	1(3.8)	6(23.1)
总计 106	96(90.6)	83(78.3)	13(12.3)	1(0.9)	9(8.5)

2.2 筛查SMN基因转变及微小突变结果

当发生SMN基因转变时,PCR产物经Dde I酶切后为部分消化产物出现1 010 bp、887 bp和123 bp3个片段,在凝胶电泳图上显示3条电泳带(由于电泳时间长,123 bp电泳带可能较弱);当未发生SMN基因转变时,可见PCR产物为被完全酶切消化的片段(887 bp、123 bp),在凝胶电泳图上显示两条电泳带(由于电泳时间长,123 bp电泳带可能较弱)。见图3。发现13例SMN1基因外显子7缺失而无外显子8缺失的患者中,II型中有2例(50%)发生基因转变,III型中有6例(67%)发生基因转变,在无SMN1外显子8缺失的情况下,II型与III型基因转变率差异无统计学意义(Fisher精确检验, $P>0.05$),在所有SMN1基因外显子7缺失的SMA患儿中,其基因转变率为8.3%(8/96)。对9例SMN1基因外显子7、8保留的SMA患儿进行SMN基因内合子6至外显子8区基因点突变扫描,SMN基因末端第7外显子及其上下游未发现SMN基因内微小突变,见图4。

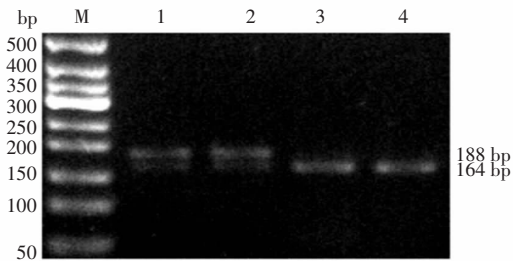


图1 SMN1基因外显子7的PCR扩增片段酶切消化产物电泳图 泳道1,2为正常对照;泳道3,4为外显子7缺失患者电泳带。

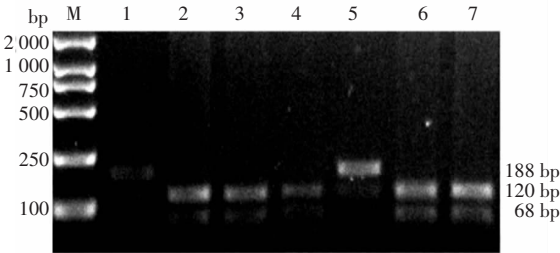


图2 SMN1基因外显子8的PCR扩增片段酶切消化产物电泳图 泳道1,5为正常对照;泳道2,3,4,6,7为外显子8缺失患者电泳带。

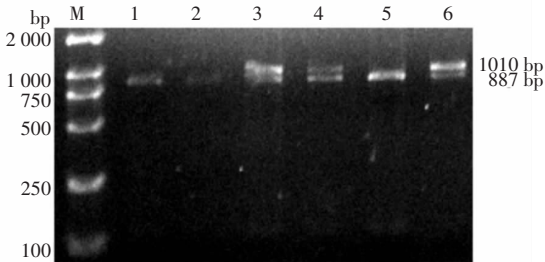


图3 筛查SMN基因转变的PCR扩增片段酶切消化产物电泳图 泳道3,4,6为部分酶切消化产物;泳道1,2,5为完全酶切消化的片段。

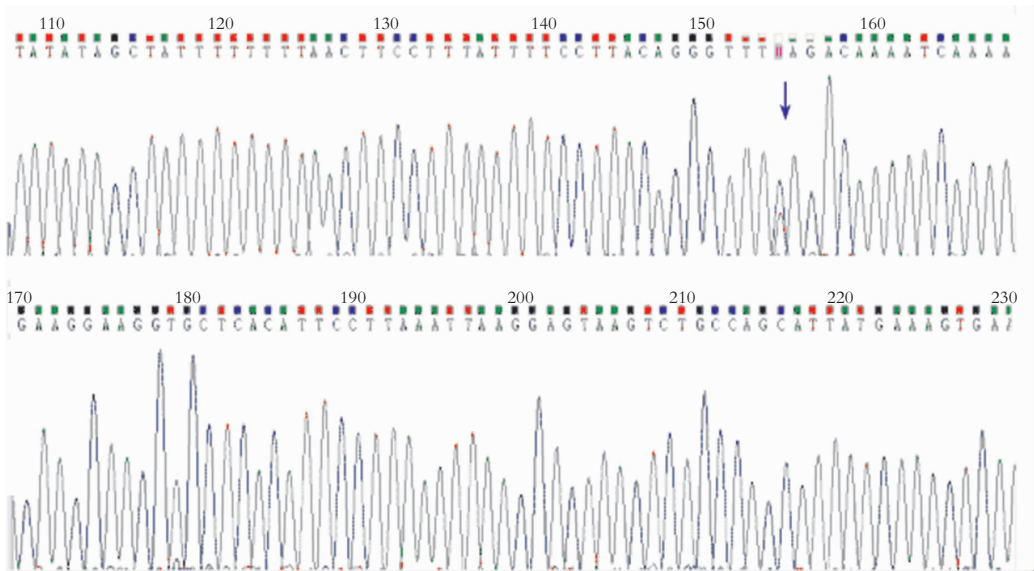


图4 SMN1基因第七外显子附近微小突变测序图 154位点为两SMN外显子7正常的C→T,无异常突变。

3 讨论

目前认为 *SMN1* 基因外显子 7 和/或 8 缺失突变是 SMA 发病的主要原因,国外报道约有 90% 的 SMA 病人显示纯合 *SMN1* 外显子 7 和/或 8 缺失^[3,6-7],本研究采用 PCR-RFLP 法通过较大样本对各型临床诊断为 SMA 患儿进行 *SMN1* 基因外显子 7 和 8 缺失检测,发现 91.5% 的 SMA 患儿有纯合 *SMN1* 外显子 7 和/或 8 缺失,本研究结果与国外报道基本一致,证实中国 SMA 患儿的发病与 *SMN1* 基因高度相关。纯合 *SMN1* 基因外显子 7 和/或 8 缺失在 I 型为 97.9%, II 型为 94.0%, III 型为 76.9%,提示在 I、II 型患儿中 *SMN1* 基因外显子 7 和/或 8 缺失的发生频率较 III 型患儿更多。

本研究发现在 SMA 各型患儿中,*SMN1* 基因外显子 7 和 8 均未缺失的比率为 8.5%,分析原因可能有以下几个方面:①*SMN1* 基因存在其他微小突变,除了 *SMN1* 同源缺失,少数 SMA 病人有 *SMN1* 基因内微小突变(细微或非缺失突变),这些病人为杂合缺失 *SMN1* 基因,另一条未缺失的 *SMN1* 等位基因有微小突变^[8]。②遗传异质性的存在。国外报道在没有检测出 *SMN1* 基因的任何突变的患者中,可能为遗传异质性,Banyer 等^[9]发现在 6p 21.3 上有 1 个和 5q 13.1 上 SMA 基因区相似的区域,此区域的 9 个序列的部分特征和 5q 13.1 区域 SMA 基因的 DNA 序列高度同源,故 6p 21.3 区域可能包含有和 5q 13.1 区域 SMA 基因相关的基因,可能为同一基因家族,这也为 SMA 的遗传机制研究提供了一条新的思路。但直到目前为止,此区域和 SMA 之间直接的关联尚未见报道。最近有研究表明部分不伴有 *SMN1* 基因外显子 7 和 8 缺失的 I 型患儿的发病可能与基因定位于 11q 13 的伴 I 型呼吸衰竭的脊髓性肌萎缩症(SMA with respiratory distress type I, SMARD1)相关。SMARD 1 发病机制与婴儿型完全不同,临床表现和辅助检查与婴儿型相似,但肌萎缩主要累及四肢末端和膈肌。提示对患儿的神经系统检查中,特别注意呼吸肌受累情况和四肢肌肉受累的部位^[10]。因此,除了纯合 *SMN1* 基因外显子 7 和/或 8 缺失为 SMA 发病的主要原因外,应继续深入研究其他 SMA 的发病机制。

通过对 *SMN1* 基因外显子 7 和 8 缺失检测,发现在 1 例 III 型 SMA 中存在 *SMN1* 基因外显子 7 保留,而 *SMN1* 基因非编码外显子 8 缺失,患者可能因 *SMN1* 基因外显子 8 单独缺失致病,国外报道 *SMN1*

基因非编码外显子 8 单独缺失也可导致 III 型 SMA^[11]。推测在 *SMN1* 基因外显子 8 内,尤其是外显子 8 的 *SMN1* 与 *SMN2* 基因不同的核苷酸(+245G→A)附近存在较温和的阳性顺式作用元件即外显子剪接增强子(exonic splicing enhancer, ESE),或 *SMN2* 基因此处存在外显子剪接沉默子(exonic splicing silencer, ESS)。在 α 球蛋白基因族中发现了可结合聚合酶 α 的 TGGGGTGGGGGT 串联重复序列^[12],其与外显子 8 的 *SMN1* 与 *SMN2* 基因不同的核苷酸(+245G→A)附近处序列 TGG*SMN1*/ASMN2GGTGGGGGT 极为相似,故在此区寻找顺式作用元件和相应剪接蛋白的研究值得进一步深入开展。当在患者中发生 *SMN1* 基因外显子 8 单独缺失情况下,原被屏蔽的 *SMN2* 基因外显子 8 发挥了作用,致使相应的反式作用剪接蛋白不能去识别 ESE 或 ESS 生效,结果使 *SMN1* 基因其他外显子不能被剪接机制识别或剪接效率降低,使 *SMN1* 基因的全长转录物相应减少,产生 SMA 症状。另外此患者也可能因并存 *SMN1* 基因其他区域微小突变而致病。

SMA 临床各型间病情差异很大, I 型是致命的,而 II、III 型病情相对较轻。与 SMA 表型相关的很重要的一个因素是 *SMN2* 拷贝数^[1],其拷贝数通常变化在 1~4 之间。由于每个 *SMN2* 拷贝产生约 10% 的全长 *SMN2* 转录物,*SMN2* 基因数目的增加对 SMA 病人有益,且影响 SMA 严重性^[4],产生 *SMN2* 拷贝数增加和 *SMN1* 还原或缺失的潜在机制之一是基因转变^[13]。已证实在 SMA 中,可发生 *SMN1* 至 *SMN2* 的 *SMN* 基因转变,缺乏双拷贝 *SMN1* 基因外显子 7 的个体至少保持一个拷贝 *SMN1* 基因外显子 8 序列已被描述,在这些个体中一些发现 *SMN1* 基因外显子 8 是并列于 *SMN2* 基因外显子 7 的,符合一个 *SMN1* 至 *SMN2* 基因转变事件,其包含了功能性重要的外显子 7 序列的不同。以前报道在 II、III 型中发现了基因转变现象^[13]。转变后的基因可能在转录后明显减少外显子 7 排除剪切,含转变的杂合基因可在一定程度上弥补 *SMN1* 基因缺失的影响,*SMN* 基因量的增加可使 *SMN* 转录物大为提高,使 SMA 病人症状相对较轻;且由于含有的 *SMN1* 基因内含子 7 的杂合转变基因,可使全长转录产物大为提高(由 29% 提高到 92%)^[14]。

Hahnen 等^[13]报道在 *SMN1* 基因外显子 7 缺失情况下,不同国家 SMA 患者的基因转变率在 3%~28% 之间。本研究发现, SMA 患儿在 *SMN1* 基因外显子 7 缺失情况下,其基因转变率为 8.3%,在无 *SMN1* 外显子 8 缺失的情况下, II 型与 III 型基因转变

率均比较高,基因转变可能与 SMA II、III 型分型无关,与基因特殊结构有关。由于样本量较少,以后应增加样本进一步研究 SMA II、III 型中未发生 *SMN1* 基因外显子 8 缺失时的 *SMN* 基因转变率。

关于 *SMN1* 基因内的微小突变,国外最常报告的 3 个微小突变是 *SMN1* 基因外显子 6 的 Y272C 错意突变(815A>G),768_778dupTGCTGATGCTT 移码突变及外显子 3 的 399_402delAGAG 移码突变^[8]。因 *SMN1* 与 *SMN2* 基因只有 5 个核苷酸不同,仅外显子 7(+6C→T)发生在编码区上,故选外显子 7 附近做测序研究。虽然 *SMN1* 基因外显子 7 附近为 SMA 常见缺失突变区,但可能不是 *SMN1* 基因内微小突变的热点区域,应进一步筛查中国人 *SMN1* 基因微小突变的热点区域。

总之,本研究通过较大样本明确了中国人各型 SMA 患儿 *SMN1* 基因缺失情况及比率。*SMN1* 基因外显子 7 和 8 缺失检测可作为 SMA 患儿确诊、鉴别诊断的重要有效手段。SMA 患中 *SMN1* 基因外显子 8 的单独缺失可能致病。*SMN1* 基因外显子 7 附近可能不是此病 *SMN1* 基因微小突变的热点区域。本研究首次在中国人 SMA II 型与 III 型患儿中发现了 *SMN* 基因转变现象,通过对此现象的深入研究,可以了解 SMA 患儿不同临床表型的发生机制,指导进一步治疗研究。对中国脊髓性肌萎缩症患儿的 *SMN* 基因学研究,对进一步探讨 SMA 的发病机制及临床治疗研究将有重大指导意义。

[参 考 文 献]

[1] Prior TW. Spinal muscular atrophy diagnostics[J]. J Child Neurol, 2007, 22(8):952-956.
[2] Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting[J]. Neuromuscul Disord, 1992, 2(5-6):423-428.

[3] Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene[J]. Cell, 1995, 80(1):155-165.
[4] 卢丽萍,麻宏伟,姜俊,王涛,胡斌. 脊髓性肌萎缩临床表型与 *SMN2* 基因拷贝数变化的相关性研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 24(2): 144-147
[5] Mazzei R, Gambardella A, Conforti FL, Magariello A, Patitucci A, Gabriele AL, et al. Gene conversion events in adult-onset spinal muscular atrophy[J]. Acta Neurol Scand, 2004, 109(2): 151-154.
[6] Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (*SMN1*) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA) [J]. Hum Mutat, 2000, 15(3):228-237.
[7] Derakhshandeh-Peykar P, Esmaili M, Ousati-Ashtiani Z, Rahmani M, Babrzadeh F, Farshidi S, et al. Molecular analysis of the *SMN1* and *NAIP* genes in Iranian patients with spinal muscular atrophy[J]. Ann Acad Med Singapore, 2007, 36(11):937-941.
[8] Zapletalová E, Hedvicáková P, Kozák L, Vondráček P, Gaillyová R, Maríková T, et al. Analysis of point mutations in the *SMN1* gene in SMA patients bearing a single *SMN1* copy[J]. Neuromuscul Disord, 2007, 7(6):476-481.
[9] Banyer JL, Goldwurm S, Cullen L, van der Griend B, Zournazi A, Smit DJ, et al. The spinal muscular atrophy gene region at 5q 13.1 has a paralogous chromosomal region at 6p21.3[J]. Mamm Genome, 1998, 9(3):235-239.
[10] Kaindl AM, Guenther UP, Rudnik-Schöneborn S, Varon R, Zerres K, Schuelke M, et al. Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (*SMARD1*) [J]. J Child Neurol, 2008, 23(2): 199-204.
[11] Ogino S, Wilson RB. Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2004, 4(1):15-29.
[12] Roy D, Yu K, Lieber MR. Mechanism of R-loop formation at immunoglobulin class switch sequences[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(1):50-60.
[13] Hahnen E, Schönling J, Rudnik-Schöneborn S. Hybrid survival motor neuron genes in patients with autosomal recessive spinal muscular atrophy: new insights into molecular mechanisms responsible for the disease[J]. Am J Hum Genet, 1996, 59(5):1057-1065.
[14] Kashima T, Rao N, Manley JL. An intronic element contributes to splicing repression in spinal muscular atrophy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(9):3426-3431.

(本文编辑:黄 榕)