

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.07.009

论著·临床研究

新生儿难治性惊厥 STXBP1 基因突变的研究

刘黎黎 侯新琳 周丛乐 汤泽中 包新华 姜毅

(北京大学第一医院儿科, 北京 100034)

[摘要] **目的** 探讨 STXBP1 基因突变与不明原因新生儿难治性惊厥的关系。**方法** 应用直接测序法对 11 例原因不明的新生儿难治性惊厥患儿进行 STXBP1 编码区的突变检测。**结果** 11 例患儿中, 1 例检测到 STXBP1 基因突变。突变类型为错义突变, 突变位点 c.1439C>T (p.P480L)。**结论** 在新生儿难治性惊厥患儿中, 可检测到 STXBP1 基因突变, 为该类疾病的深入研究提供了新的思路。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(7): 701-704]

[关键词] 难治性惊厥; STXBP1; 基因突变; 新生儿

STXBP1 gene mutation in newborns with refractory seizures

LIU Li-Li, HOU Xin-Lin, ZHOU Cong-Le, TANG Ze-Zhong, BAO Xin-Hua, JIANG Yi. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China (Hou X-L, Email: houxinlin66@sina.com)

Abstract: Objective To study the relationship between STXBP1 gene mutations and refractory seizures with unknown causes in newborns. **Methods** The coding region of STXBP1 gene was detected using direct Sanger sequencing in 11 newborns with refractory seizures of unknown causes. **Results** STXBP1 gene mutation was found in 1 out of 11 patients. It was a missense mutation: c.1439C>T (p.P480L). **Conclusions** STXBP1 gene mutation can be found in neonatal refractory seizures of unknown causes, suggesting a new approach of further research of this disease.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(7): 701-704]

Key words: Refractory seizure; STXBP1; Gene mutation; Newborn

新生儿难治性惊厥以新生儿期起病的反复惊厥发作, 止惊药物难以控制为特点, 常遗留癫痫、发育落后等神经系统后遗症^[1]。结合儿童难治性癫痫的定义和文献报道将需长期应用 2 种以上止惊药物控制惊厥发作, 或仍不能控制惊厥发作的一类新生儿惊厥称为难治性惊厥^[1-4]。这类疾病常见的病因是严重围产期脑损伤、先天遗传代谢性疾病及脑发育畸形等, 但在实际临床工作中有相当一部分患儿难以找到明确病因。STXBP1 基因突变是近年来发现的早发癫痫脑病的致病突变之一, 存在该突变的患儿常以新生儿期出现的难治性惊厥起病, 部分病例表现为大田原综合征或在新生儿期后发展为婴儿痉挛症及其他类型难治性癫痫, 遗留发育落后等神经系统后遗症^[5], 国内尚无新生

儿惊厥患儿存在该基因突变的报道。本研究对病因不明的新生儿难治性惊厥患儿进行 STXBP1 基因突变的检测, 探讨该类疾病与 STXBP1 基因突变的关系, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

我院新生儿病房于 2012 年 1 月 1 日至 2013 年 2 月 1 日收治的不明原因的难治性惊厥新生儿。入组标准: (1) 临床诊断符合新生儿难治性惊厥: 新生儿期起病的惊厥发作, 应用 2 种以上止惊药物维持治疗; (2) 病因不明。对每例患儿进行血电解质、血糖、头颅磁共振、血和尿代谢筛查的

[收稿日期] 2013-12-17; [接受日期] 2014-04-09

[作者简介] 刘黎黎, 女, 博士, 住院医师。

[通信作者] 侯新琳, 女, 副教授。

检查,除外围产期脑损伤、脑结构发育异常及先天性代谢性疾病等引起新生儿难治性惊厥的常见病因。符合入组条件的患儿共11例。本研究获得我院伦理委员会批准及家长书面知情同意。

1.2 DNA 提取

对患儿及其父母采集外周血各2 mL, EDTA抗凝,采用试剂盒法提取淋巴细胞基因组DNA。

1.3 PCR 扩增

STXBP1 共有20个外显子,其DNA序列来自 GenBank, NM_003165.3。参考文献^[6]并应用 Primer 3.0 设计引物,引物由诺赛基因公司合成。PCR 扩增编码区,反应在20 μL 的反应体系中进行:2×GC 缓冲液 10 μL, dNTPs (10 Mm) 1 μL, DNA (100~200 ng/μL) 1 μL, primer-F (10 μM) 1 μL, primer-R (10 μM) 1 μL, Taq DNA 聚合酶 (2 U/μL) 1 μL, 去离子水 5 μL。反应条件采用 Touch Down PCR。

1.4 基因测序及结果分析

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后送北京诺赛基因组研究中心有限责任公司进行测序,应用 ABI3100 测序仪正向测序。测序结果应用 DNASTar 软件及 Chromas 2 进行分析。如发现突变,对突变外显子进行二次反向测序以核实,通过数据库检索突变是否引起氨基酸改变、是否为单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs)、是否为已报道的致病突变。如发现致病突变,需对突变患儿父母进行该基因检测,以明确突变来源及是否为新发突变。

2 结果

2.1 基因检测结果

本研究收集的不明原因难治性新生儿惊厥患儿11例中,发现1例患儿存在STXBP1基因突变,该突变为杂合突变,突变位点位于STXBP1基因的第16外显子,双链DNA之一的编码序列第1439位碱基由胞嘧啶(C)变为胸腺嘧啶(T)引起氨基酸改变,第480个氨基酸由脯氨酸(密码子CCG,简写P)变为亮氨酸(密码子CTG,简写L),为错义突变:c.1439C>T (p.P480L) (图1)。经文献查询该突变为已报道致病突变^[5]。对该患儿父母进行STXBP1基因检测,未发现该位点

存在突变(图1),证实该患儿突变为新生突变。其他10例患儿应用PCR直接检测STXBP1编码区突变未发现阳性结果。

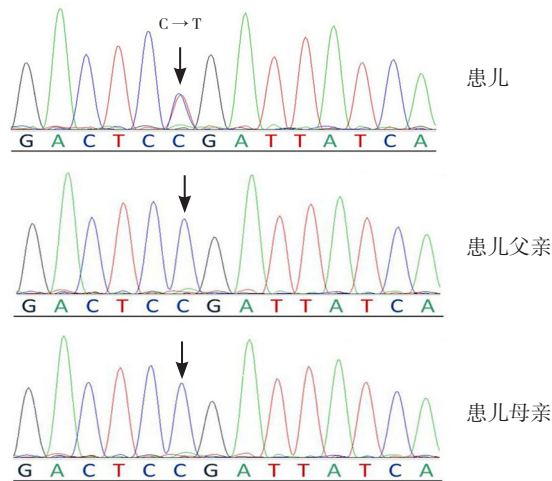


图1 STXBP1 基因突变 c.1439C>T (p.P480L)

患儿DNA双链之一编码序列第1439位碱基由C变为T,发生氨基酸改变,为错义突变。患儿父母该位点未发现突变。

2.2 临床表现

存在STXBP1突变患儿为第2胎第1产,胎龄39⁺₁周顺产娩出,出生体重3350 g,无产前宫内窘迫及生后窒息。母亲孕期规律产检,无不良产史,第1胎为人工流产。否认妊娠期高血压及妊娠期糖尿病病史,否认类似疾病家族史。患儿生后第2天起病,发作表现为双眼凝视、头部及四肢抖动,数秒后缓解,每日1~3次。生后20余天发作频繁,出现成串痉挛发作,每日10余串,每串10余次,生后40余天就诊于外院行脑电图检查示“高度失律?”,头颅CT未见脑结构异常及颅内钙化点,考虑“癫痫?”,予维生素B6静滴、肌注鲁米那及静推安定止惊治疗仍抽搐频繁,于生后46 d收入我院治疗。患儿喂养困难,体重较出生体重下降20 g。入院体查:精神差,中度营养不良,心肺腹未见异常,双下肢肌张力增高、腱反射活跃、不能逗笑。辅助检查:V-EEG结果显示高度失律,部分暴发-抑制;头颅磁共振、血尿代谢筛查、脑脊液常规及生化检查均未见异常,血巨细胞病毒(CMV) IgM及尿CMV-DNA阳性。诊断为癫痫、痉挛发作、大田原综合征。入院后应用托吡酯抗癫痫治疗,剂量加至每日8 mg/kg发作无好转,由于存在CMV感染,未予应用

ACTH, 建议行生酮饮食治疗, 家长放弃治疗出院, 患儿于生后4个月死亡。

另外10例未发现该基因突变的新生儿难治性惊厥患儿中婴儿痉挛症2例, 其中1例经托吡酯、左乙拉西坦、ACTH治疗后已4个月无临床发作, 脑电图有所改善, 为局限性脑电图表现, 发育同同龄儿; 大田原综合征患儿3例, 1例转为婴儿痉挛症, 应用托吡酯、ACTH、生酮饮食治疗抽搐仍频繁, 1例放弃治疗, 1例临床发作减少, 应用托吡酯、ACTH抽搐未完全控制, 3例患儿均存在发育落后; 非综合征型的早发型癫痫脑病1例, 部分性发作, 脑电图表现为高度失律, 患儿起病时即伴随发育落后, 院外应用苯巴比妥治疗, 入院监测苯巴比妥血药浓度在有效范围内, 予逐渐减量并加用托吡酯患儿抽搐未控制, 未同意用ACTH; 其它类型癫痫4例, 其中2例为痉挛发作, 但脑电图无高度失律或暴发-抑制表现, 1例脑电图为高度失律, 但仅表现为部分性发作, 另外1例脑电图为高度失律, 部分暴发-抑制, 临床表现为痉挛发作和部分性发作, 单用一种抗癫痫药物均未控制临床发作。

3 讨论

新生儿难治性惊厥的患儿中有相当一部分病因不明, 为临床诊治带来了很大的困难。本研究尝试对不明原因的新生儿难治性惊厥患儿进行STXBP1基因突变的检测, 初步探讨该类疾病与STXBP1基因突变的关系, 为不明原因的难治性惊厥患儿的病因诊断提供新的思路。

STXBP1基因位于9号染色体长臂, 其遗传方式为常染色体显性遗传。STXBP1基因编码的蛋白质为突触融合蛋白, 对可溶性NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, NSF, N-乙基马来酰肼敏感因子蛋白) 附着蛋白受体的形成、钙通道感受器的敏感性和突触囊泡与突触前膜的快速融合有调节作用, 负责突触间神经递质的释放。所以STXBP1基因突变会引起神经递质释放的异常, 改变神经元的兴奋性, 导致惊厥发作^[7-10]。自2008年Saito等^[10]第1次报道STXBP1的基因突变存在于大田原综合征的日本患儿中, 现已发现该基因突变与婴儿痉挛症、早发肌阵挛脑病、婴

儿游走性部分性癫痫等癫痫综合征、智力运动发育落后和孤独症相关^[11-17]。

结合既往文献报道, 对存在STXBP1基因突变的难治性惊厥患儿的临床特点进行总结发现, 存在该基因的惊厥患儿起病早, 大部分病例在生后6个月内起病; 现有临床检查手段未发现病因; 大田原综合征和婴儿痉挛症是该基因突变引起的两类常见的癫痫综合征; 需应用多种抗癫痫药物治疗; 新生儿期惊厥不易控制, 但经止惊药物积极治疗, 临床发作会在短时间内很快减少, 多在2岁以内抽搐停止, 脑电图改善明显, 极少数会在停止抽搐多年后复发; 起病时甚至起病前即伴有发育落后, 即使惊厥很快控制仍难以避免地出现发育落后的表现; 后期临床发作已控制, 脑电图恢复正常后, 仍可出现一些行为异常的动作, 如肌张力异常、手足徐动、震颤、舞蹈样动作、啃咬手指的刻板动作等^[5,6,11-15]。而本研究重点讨论的新生儿难治性惊厥患儿临床特点表现为新生儿期起病, 惊厥难以控制, 病因不明, 且多预后不良, 大田原综合征是起病时常见的癫痫综合征类型, 还有一部分患儿会在新生儿期后转变为婴儿痉挛症, 这些临床特点与前述文献所报道的部分临床特点一致, 故考虑存在对新生儿难治性惊厥患儿进行STXBP1基因突变检测的可能性。目前已发现STXBP1基因存在32个突变类型, 均为杂合突变, 尚未发现人群中的热点突变。20个外显子除第1、2、12、17、20外显子外均有突变的报道, 突变类型包括错义突变、无义突变、剪切突变和缺失突变, 还有4例患儿表现为染色体微缺失^[5,6,11-15,18]。

本研究发现的存在STXBP1突变患儿的基因位点与Milh等^[5]在2011年发表的文章中报告1例大田原综合征患儿一致。本患儿临床特点为典型的大田原综合征表现, 新生儿早期起病的难治性惊厥, 发作形式为痉挛发作, 脑电图呈现暴发-抑制的波形, 并在起病初期就存在发育落后。但文献报道存在该突变的患儿在应用止惊治疗后惊厥得以缓解, 而本例患儿的惊厥未控制。由于本例患儿因放弃治疗死亡, 不能对止惊药物的疗效进行正确评估, 故对于存在STXBP1基因突变患儿的特征性临床表现, 尤其是对抗惊厥药物的反应还有待继续研究。

目前与早发难治性癫痫相关的突变基因热点

研究除 STXBP1 外, 还有 CDKL5 和 ARX, 对于这两者的研究起步要早于 STXBP1。这两个基因均位于 X 染色体短臂, X 连锁遗传使其发病率有性别差异。CDKL5 突变主要累及女婴, 也以新生儿期起病的难治性惊厥为特点, 但随年龄增加可伴有 Rett 样表现, 如啃咬手指的刻板动作、孤独症等^[19-24]。ARX 突变主要发生在男性患儿, 患儿可伴有生殖器的异常^[24-26]。对于不存在 STXBP1 基因突变的新生儿难治性惊厥患儿可以考虑进行 CDKL5 和 ARX 基因突变的检测, 以发现可能存在的病因。

本研究对临床未找到明确病因的新生儿难治性惊厥患儿进行 STXBP1 基因突变的检测, 并发现 1 例患儿存在该基因突变, 其突变率和临床表现与现有文献报道一致, 为该类疾病的临床诊治和预后判断提供了依据, 同时为进一步深入研究提供了新的思路。

【参 考 文 献】

- [1] 刘黎黎, 周丛乐, 侯新琳. 新生儿难治性惊厥的研究进展 [J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(1): 77-81.
- [2] Bassan H, Ental Y, Shany E, et al. Neonatal seizures: dilemmas in workup and management[J]. *Pediatr Neurol*, 2008, 38(6): 415-421.
- [3] Garcias Da Silva LF, Nunes ML, Da Costa JC. Risk factors for developing epilepsy after neonatal seizures[J]. *Pediatr Neurol*, 2004, 30(4): 271-277.
- [4] Ramos LJ, Aguilera LP, Aguirre R, et al. Early prediction of refractory epilepsy in childhood[J]. *Seizure*, 2009, 18(6): 412-416.
- [5] Milh M, Villeneuve N, Chouchane M, et al. Epileptic and nonepileptic features in patients with early onset epileptic encephalopathy and STXBP1 mutations[J]. *Epilepsia*, 2011, 52(10): 1828-1834.
- [6] Saitsu H, Kato M, Okada I, et al. STXBP1 mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(12): 2397-2405.
- [7] Rizo J, Rosenmund C. Synaptic vesicle fusion [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(7): 665-674.
- [8] Wojcik SM, Brose N. Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: speed and accuracy matter[J]. *Neuron*, 2007, 55(1): 11-24.
- [9] Burkhardt P, Hattendorf DA, Weis WI, et al. Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide[J]. *Embo J*, 2008, 27(7): 923-933.
- [10] Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(6): 782-788.
- [11] Shen J, Tareste DC, Paumet F, et al. Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins[J]. *Cell*, 2007, 128(1): 183-195.
- [12] Deprez L, Weckhuysen S, Holmgren P, et al. Clinical spectrum of early-onset epileptic encephalopathies associated with STXBP1 mutations[J]. *Neurology*, 2010, 75(13): 1159-1165.
- [13] Hamdan FF, Piton A, Gauthier J, et al. De novo STXBP1 mutations in mental retardation and nonsyndromic epilepsy[J]. *Ann Neurol*, 2009, 65(6): 748-753.
- [14] Otsuka M, Oguni H, Liang JS, et al. STXBP1 mutations cause not only Ohtahara syndrome but also West syndrome—result of Japanese cohort study[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(12): 2449-2452.
- [15] Mignot C, Moutard ML, Trouillard O, et al. STXBP1-related encephalopathy presenting as infantile spasms and generalized tremor in three patients[J]. *Epilepsia*, 2011, 52(10): 1820-1827.
- [16] Chelly J, Khelfaoui M, Francis F, et al. Genetics and pathophysiology of mental retardation[J]. *Eur J Hum Genet*, 2006, 14(6): 701-713.
- [17] Zoghbi HY. Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse?[J]. *Science*, 2003, 302(5646): 826-830.
- [18] Hamdan FF, Gauthier J, Dobrzaniecka S, et al. Intellectual disability without epilepsy associated with STXBP1 disruption [J]. *Eur J Hum Genet*, 2011, 19(5): 607-609.
- [19] Archer HL, Evans J, Edwards S, et al. CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients [J]. *J Med Genet*, 2006, 43(9): 729-734.
- [20] Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, et al. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation [J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(6): 1079-1093.
- [21] Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greife M, et al. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation[J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(6): 1149-1154.
- [22] Scala E, Ariani F, Mari F, et al. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms[J]. *J Med Genet*, 2005, 42(2): 103-107.
- [23] Rosas-Vargas H, Bahi-Buisson N, Philippe C, et al. Impairment of CDKL5 nuclear localization as a cause for severe infantile encephalopathy [J]. *J Med Genet*, 2008, 45(3): 172-178.
- [24] Pavone P, Spalice A, Polizzi A, et al. Ohtahara syndrome with emphasis on recent genetic discovery [J]. *Brain Devel*, 2012, 34(6): 459-468.
- [25] Kato M, Saitoh S, Kamei A, et al. A longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene causes early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern (Ohtahara syndrome)[J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(2): 361-366.
- [26] Kato M, Das S, Petras K, et al. Polyalanine expansion of ARX associated with cryptogenic West syndrome[J]. *Neurology*, 2003, 61(2): 267-276.

(本文编辑: 王庆红)