

·论著·

# 儿童脊髓性肌萎缩症的基因学研究

张丽芳,杨晓苏,肖波

(中南大学湘雅医院神经内科,湖南长沙 410008)

**[摘要]** 目的 研究我国儿童型脊髓性肌萎缩症(SMA)患者的运动神经元生存(SMN)基因及神经细胞凋亡抑制蛋白(NAIP)基因外显子的缺失情况,以探讨此二种基因与SMA表型之间的关系。方法 应用PCR和PCR-酶切法检测15例~型SMA患者(型4例,型3例,型8例)、20例表型正常的SMA直系亲属及30例正常对照的SMN基因的第7,8号外显子和NAIP基因的第5,6号外显子缺失情况。结果 7例型和型SMA患者中6例纯合缺失SMN基因外显子7和8,1例纯合缺失外显子7而保留外显子8;8例型SMA患者仅1例有外显子7和8的缺失,余7例均无SMN基因的缺失;15例~型SMA患者均未检测到NAIP基因外显子5和/或6的缺失。结论 型、型SMA可通过SMN基因第7,8号外显子的检测进行确诊,方法简便可靠,型SMA患者SMN基因缺失率低,故通过检测SMN基因7,8外显子进行基因诊断尚需谨慎,NAIP基因在SMA发病中的作用尚不清楚,有待进一步研究。

**[关键词]** 脊髓性肌萎缩症;运动神经元生存(SMN)基因;神经细胞凋亡抑制蛋白(NAIP)基因;儿童  
**[中图分类号]** R744 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)01-0006-05

## Study of Genes of Spinal Muscular Atrophy in Children

ZHANG Li-Fang, YANG Xiao-Su, XIAO Bo

Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

**Abstract:** **Objective** To study the survival motor neuron (SMN) gene exon 7 and 8 and neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) gene exon 5 and 6 in Chinese patients with Type ~ SMA, and to confirm the relationship between the deletions of SMN and NAIP genes with SMA phenotype. **Methods** PCR and PCR - enzyme methods were used to detect the deletions of NAIP gene exon 5 and 6 and SMN gene exon 7 and 8 in 15 SMA ( ~ ) patients, 20 healthy relatives and 30 normal controls. **Results** Deletions of exon 7 and 8 of the telomeric SMN gene were 4/4, 2/3, 1/8 in Type , , SMA patients, respectively. One patient with Type lacked exon 7 but retained exon 8. No deletion was found in the controls (0/50). No deletion of exon 5 and 6 of the NAIP gene was detected in the patients, healthy relatives and controls. **Conclusions** Deletions of SMN gene exon 7 and 8 examined by PCR - enzyme digestion could be recommended as an accurate gene diagnostic method for SMA with Type and . However, the method was not as useful in Type as in and for the diagnosis of SMA. The frequency of NAIP deletion was lower in Chinese SMA patients.

**Key words:** Spinal muscular atrophy; Survival motor neuron gene; Neuronal apoptosis inhibitory protein; Child

儿童型脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)系指一类由于下运动神经元变性导致的进行性骨骼肌无力和萎缩的一组疾病,是婴幼儿时期常见的致死性常染色体隐性遗传病之一。

1990年SMA的致病基因被定位于5q13。1995

年以后,不同的研究小组分别报道了4个SMA候选基因。它们分别是5q13.1区域的运动神经元生存(Survival moter neuron, SMN)基因、5q13区域的神经细胞凋亡抑制蛋白(neuronal apoptosis inhibitor protein, NAIP)基因、编码P44蛋白基因

[收稿日期] 2000-07-14; [修回日期] 2000-11-27  
[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金资助课题(编号:9621)  
[作者简介] 张丽芳(1972-),硕士,讲师。现在山西长治医学院附属和平医院神经内科。

BTF2p44 及一种假定的 RNA 连结蛋白基因 H4F5<sup>[1]</sup>。近年来,众多研究表明 SMN 基因是 ~ 型 SMA 的决定基因。该基因在一条染色体上具有两个拷贝,在端粒侧称 SMNt,位于着丝粒侧称 SMNc,两者间有 5 个碱基的差别。大多数(约 98.6%) ~ 型 SMA 患者可检出 SMNt 基因(外显子 7 和 8 或单纯外显子 7)缺失,且其缺失的程度和范围与 SMA 临床表型的严重程度密切相关;位于 SMN 基因远端的 NAIP 基因(外显子 5 或 6)缺失可能与 SMA 的表型有关。我们应用 PCR-酶切及 PCR 技术对 15 例儿童型 SMA 患儿进行了 SMN,NAIP 基因分析,以探讨此两种基因与 SMA 表型之间的关系。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

收集本院神经内科门诊及病房 ~ 型 SMA 患者 15 例及表型正常的 SMA 患者直系亲属 20 例;并以性别、年龄相匹配、无亲缘关系、无遗传病家族史的正常人 30 例作为对照组。SMA 患者均符合 1992 年欧洲神经肌肉疾病中心(ENMC)确定的 SMA 临床诊断及分型标准<sup>[2]</sup>,经肌电图及肌活检确诊。其中 ~ 型患者 4 例,表型正常的直系亲属 6 例; ~ 型患者 3 例,表型正常的直系亲属 6 例; ~ 型患者 8 例,表型正常的直系亲属 8 例。

#### 1.2 方法

取外周血 5 ml(肝素抗凝),采用酚-氯仿法抽提基因 DNA。PCR 引物设计参照文献<sup>[3~5]</sup>,

Exon7F5 AGACTATCAACTTAA TTTCTGATCA3 ;  
 Exon7R5 CCTTCCTTCTTTTTGATTTTGTTT3 ;  
 Exon 8 R 5 CTACAACACCCTTCTCACAG 3 ;  
 Exon8F5 GTAA TAACCAAATGCAATGTGAA3 ;  
 Exon 5 R 5 CTCTCA GCCTGCTCTTCA GAT 3 ;  
 Exon 5 F 5 AAAGCCTCTGACGA GAGGATC 3 ;  
 Exon 6 F 5 TGCCACTGCCA GGCAATCTAA 3 ;  
 Exon 6 R 5 CATTTGGCATGTTTCCTTCCAA 3 ;  
 Exon 13F5 CCA GCTCCTA GA GAAA GAAGGA3 ;  
 Exon 13 R 5 ATGCTTGGA TCTCTAGAATGG3 。  
 PCR 扩增条件:SMN 基因 7,8 外显子扩增条件均为 95 预变性 5 min,95 45 s,55 45 s,72 1 min,循环 35 次,最后于 72 保温 10 min,PCR 扩增产物长度均为 190 bp。SMN 基因 7,8 号外显子扩增产物酶切:取外显子 7,8 的 PCR 产物各 15 μl,分别加入限制性内切酶 DraI 7 U,DdeI 3.6 U 以及相应的缓冲液、三蒸水至 30 μl 反应体积,37 孵育 5 h。NAIP 基因第 5,6 外显子扩增条件为 94 预变性 4 min,94 30 s,55 60 s,72 1 min,循环 30 次,最后于 72 保温 7 min,第 5 外显子扩增片段为 435 bp,第 6 外显子为 120 bp,13 外显子为 243 bp。PCR 扩增产物及酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测,图像分析仪观察结果,照相。均用 pUC19DNA/ MspI 作为分子量标记。

### 2 结果

#### 2.1 临床资料

各型 SMA 患者的临床资料见表 1。

表 1 ~ 型 SMA 患者临床资料

Table 1 Clinical data of Type ~ SMA patients

分型	性别		就诊年龄	起病年龄	家庭史		肌酶	EMG 神经原性	肌活检(+)	肌萎缩					
	男	女			+	-				无	四肢	双上肢	双下肢	单肢	伴舌萎缩
型	3	1	7~22 月	0~6 月	2	2	0	4	4	4	0	0	0	0	0
型	1	2	2.5~9 岁	6~18 月	0	3	0	2	3	1	2	0	0	0	0
型	5	3	5~19 岁	2~16 岁	1	7	2	6	8	0	3	2	0	3	0
总计	9	6			3	12	2	12	15	5	5	2	0	3	0

#### 2.2 SMN,NAIP 基因检测结果

SMN 基因外显子 7 的 PCR 扩增片段酶切后,正常对照组及 SMA 患者直系亲属均出现 190 bp,164 bp,24 bp 3 条带(24 bp 片段较短,已走出胶),缺失外显子 7 者仅 164 bp 1 条带,见图 1;SMN 基因外显子 8 的 PCR 扩增片段酶切后,正常对照组及

SMA 患者直系亲属均出现 190 bp,120 bp,68 bp 3 条带,而外显子 8 缺失者呈 120 bp 和 68 bp 2 条带,见图 2。NAIP 基因外显子 5 及 13 的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示出 435 bp 和 243 bp 2 条带,6 及 13 的 PCR 产物电泳显示出 120 bp 和 243 bp 2 条带,而外显子 5 或 6 缺失者均只有 243 bp 1 条带

(13 外显子作为内对照,未见缺失),见图 3,4。 ~ 型 SMA 的 SMN,NAIP 基因检测结果见表 2。

表 2 ~ 型 SMA 的 SMN,NAIP 基因检测结果

Table 2 Results of the molecular analysis of SMN and NAIP genes in Type ~ SMA patients 例(%)

临床分型	病例数	基因缺失			
		SMN	SMN	NAIP	NAIP
		Exon 7	Exon 8	Exon 5	Exon 6
型	4	4(100)	4(100)	0(0)	0(0)
型	3	3(100)	2(66.7)	0(0)	0(0)
型	8	1(12.5)	1(12.5)	0(0)	0(0)



图 1 SMN 基因第 7 号外显子 增产物的酶切电泳图谱 1-2 号: , 型 SMA 患者;3-4 号: 型 SMA 患者;5-6 号:SMA 直系亲属;7 号:正常对照;M:分子量标准 :pUCDNA/ Msp

Figure 1 Restriction enzyme mapping of amplified PCR products of exon7 of SMN gene. Lane 1- 2: Type ~ of SMA patients; Lane 3- 4: Type ; Lane 5- 6: relatives of SMA patients; Lane 7: normal controls; M: molecular weight markers: pUCDNA/ Msp

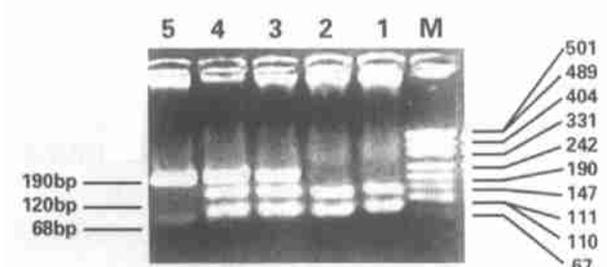


图 2 SMN 基因第 8 号外显子 PCR 扩增产物的酶切电泳图谱 1-2 号: , 型 SMA 患者;3 号: 型 SMA 患者;4 号:正常对照;5 号:未酶切的 PCR 产物;M:分子量标准 :pUCDNA/ Msp

Figure 2 Restriction enzyme mapping of amplified PCR products of exon 8 of SMN gene. Lane 1- 2: Type ~ of SMA patients; Lane 3: Type ; Lane 4: normal controls; Lane 5: undigested PCR products; M: molecular weight markers: pUCDNA/ Msp

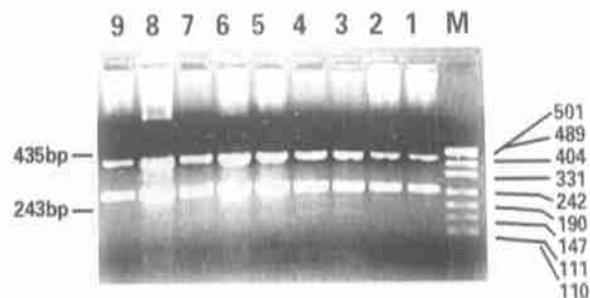


图 3 NAIP 基因第 5 号外显子 PCR 扩增产物 1-5 号: ~ 型 SMA 患者;6-7 号:患者直系亲属;8-9 号:正常对照;M:分子量标准 :pUCDNA/ Msp

Figure 3 Amplified PCR products of exon 5 of NAIP gene. Lane 1- 5: Type ~ of SMA patients; Lane 6- 7: relatives of SMA patients; Lane 8- 9: normal controls; M: molecular weight markers: pUCDNA/ Msp

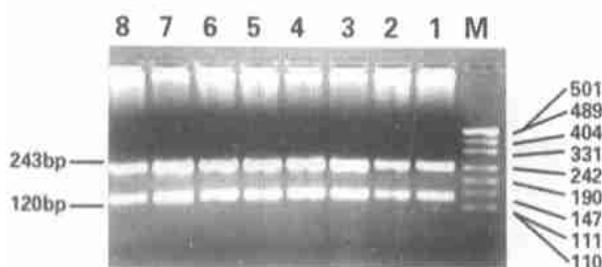


图 4 NAIP 基因第 6 号外显子 PCR 扩增产物 1-5 号: ~ 型 SMA 患者;6-7 号:患者直系亲属;8 号:正常对照;M:分子量标准 :pUCDNA/ Msp

Figure 4 Amplified PCR products of exon 6 of NAIP gene. Lane 1- 5: Type ~ of SMA patients; Lane 6- 7: relatives of SMA patients; Lane 8: normal controls; M: molecular weight markers: pUCDNA/ Msp

7 例 型和 型 SMA 患者中,6 例同时缺失 SMN 基因的第 7 和 8 号外显子,1 例仅缺失 7 号外显子。8 例 型 SMA 患者中仅 1 例同时缺失 SMN 基因第 7 和 8 号外显子,余未见缺失。SMA 直系亲属及正常对照组无 1 例缺失 SMN 基因。

15 例 ~ 型 SMA 患者及所有正常对照和直系亲属组均未见 NAIP 基因第 5,6 号外显子缺失。

### 3 讨论

儿童型 SMA 依发病时间早晚和病程分为 3 型:第 型又称 Werdnig - Hoffmann 病,通常于出生后 6 个月内起病,表现为严重的全身肌无力和肌张力不全,患儿无法坐立,通常在 2 岁以内死亡。型又称中间型,出生后 6 ~ 18 个月间起病,患儿能

坐,但无法站立和行走,大都能存活 2 年以上;第 2 型又称 Kugelberg - Welander 病,2 ~ 17 岁间发病,多数仅表现有肌力减退,可以保持独立行走和站立的能力,病情进展缓慢,可存活至成年。

1995 年法国 Necker 研究所的 Lefebvre 等<sup>[3]</sup>发现 SMN 基因与儿童型 SMA 有很高的相关性,93.0% (213/229) 的 SMA 患者该基因外显子 7 和 8 缺失或截断,另有 5.7% (13/229) 的患者外显子 7 缺失而保留外显子 8,余下 1.3% (3/229) 的患者表现为 SMN 基因内含子缺失或点突变;而正常对照组 (246 名) 和 SMA 患者的父母 (127 名) 未见 1 例缺失。随后,国外许多研究机构对 SMA 患者进行了 SMN 基因的检测,7 和 8 外显子基因同时缺失率为 90% ~ 98%,部分患者外显子 7 缺失而外显子 8 保留。国内近 3 年对儿童型 SMA 的 SMN 基因检测结果显示 SMN 缺失频率类似于国外。本组资料显示 I 型和 II 型 (共 7 例) SMA 患者的 SMN 基因的外显子 7 缺失频率达 100% (7/7),7 和 8 外显子同时缺失的频率达 85.7% (6/7),有 1 例患者外显子 7 缺失而外显子 8 保留,此结果与国内外报道的一致。8 例 III 型 SMA 患者中,仅 1 例 16 岁起病的男性患者有 7 和 8 外显子的缺失,余 7 例 (包括 2 例 5 岁以下起病者) 均未检出 7 和/或 8 外显子的缺失。此研究结果和国内外以往的结果相差甚远,国内外已有文献报道 I 型 SMA 患者 SMN 基因缺失率约等同与 II 型,而日本学者 Fujii 等<sup>[6]</sup>的研究结果为 3 例 III 型 SMA 患者中有 2 例 (66%, 2/3) 未发现 SMN 基因 7 和/或 8 外显子缺失。故我们认为对于 I 型和 II 型 SMA 患者,SMN 基因缺失频率较高,PCR—酶切法可作为 I 型患儿的可靠的基因诊断手段,对其家系的遗传咨询及产前诊断具有重要意义,有望替代肌活检等创伤性检查手段。但对于 III 型 SMA 患者,尚不能应用 PCR—酶切法检测 SMN 基因的缺失来确诊。III 型 SMA 患者 SMN 基因的缺失频率低的原因可能与以下因素有关:无 SMN 基因第 7,8 外显子缺失的患者,可能其第 6,7 内含子的共有拼接位置存在短缺失或在编码区存在点突变<sup>[7]</sup>。遗传异质性的存在。在连锁分析中曾观察到患者单体型显示 SMA 基因不连锁于 5 q,以后又检测到个别患者一级亲属中有 SMN 外显子 7 和 8 缺失,但表型正常,提示有遗传异质性存在<sup>[8]</sup>。Stevens 等<sup>[9]</sup>对 29 例南非黑色人种 SMA 患者进行 SMN 基因检测,35% 患者未发现 SMN 基因缺失,用 6 个紧密连锁的遗传标记物经过测序对这些病人进行单倍型分析,没有发现突变,也提示有遗传异质

性的存在。Banyer 等<sup>[10]</sup>发现在第 6 号染色体短臂 2 区 1 带 3 亚带 (6 p 21.3) 上有 1 个和 5 q 13.1 上 SMA 基因区域相似的区域,此区域的 9 个序列的部分特征和 5 q 13.1 区域 SMA 基因的 DNA 序列高度同源,故 6 p 21.3 区域可能包含有和 5 q 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。

国外学者大量研究报道,NAIP 基因 (外显子 5 和/或 6) 缺失可能与 SMA 表型有关,临床表型重的 I 型患者 NAIP 基因缺失的频率 (45%) 比临床表型轻的 II 型患者 (18%) 高。本研究结果表明 I ~ III 型 SMA 患者均未见 NAIP 第 5,6 号外显子缺失,结果与国外报道的不同,但与我国台北地区的研究结果类似 (5/101)<sup>[11]</sup>,此外国内对 55 名 SMA 患者 NAIP 基因 5 号外显子检测亦均未发现缺失<sup>[12]</sup>。造成这种差异的原因被认为可能是由于种族不同而使 NAIP 基因在各型 SMA 患者中的缺失率不同所致,或者为 NAIP 基因和 SMN 基因倒位、基因多态性等导致的这种差异<sup>[11]</sup>,确切原因有待进一步研究。

综上所述,I 型、II 型 SMA 可通过 SMN 基因第 7,8 号外显子的检测进行确诊,方法简便可靠;III 型 SMA 患者 SMN 基因缺失率低,故通过检测 SMN 基因 7,8 外显子进行基因诊断尚需谨慎。NAIP 基因在 SMA 发病中的作用尚不清楚,有待进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, et al. Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics [J]. *Nat Genet*, 1998, 20(1): 83 - 86.
- [2] Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting [J]. *Neuromuscular Disord*, 1992, 2(5/6): 423 - 428.
- [3] Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy determining gene [J]. *Cell*, 1995, 80(1): 155 - 165.
- [4] Roy N, Mahadevan MS, Mclean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy [J]. *Cell*, 1995, 80(1): 167 - 178.
- [5] Van der Steege G, Grootsholten PM, Van der Vlies P, et al. PCR - based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy [J]. *Lancet*, 1995, 345 (8955): 985 - 986.
- [6] Fujii T, Miyajima T, Ito M, et al. Utility and intricacy of molecular diagnosis of spinal muscular atrophy [J]. *No To Hattatsu*, 1999, 31 (6): 505 - 510.
- [7] Hahanen E, Schonling J, Rudnik-Schoneborn S, et al. Missense

- mutation in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy [J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(5): 821 - 825.
- [8] Wirth B, Herz M, Wetter A, et al. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy. genotype - phenotype correlation and implications for genetic counseling [J]. Am J Hum Genet, 1999, 64(5): 1340 - 1356.
- [9] Stevens G, Yawitch T, Rodda J, et al. Different molecular basis for spinal muscular atrophy in South African black patients [J]. Am J Med Genet, 1999, 86(5): 420 - 426.
- [10] Banyer JL, Goldwurm S, Cullen L, et al. The spinal muscular atrophy gene region at 5q 13. 1 has a paralogous chromosomal region at 6p 21. 3 [J]. Mamm Genome, 1998, 9(3): 235 - 239.
- [11] Chang JG, Jong YJ, Liu SP, et al. Molecular analysis of survival motor neuron (SMN) and neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) genes of spinal muscular atrophy patients and their parents [J]. Hum Genet, 1997, 100(5 - 6): 577 - 581.
- [12] 马素参,袁丽芳,刘天慈,等. 脊肌萎缩症患者 SMN 及 NAIP 基因的初步分析 [J]. 云南大学学报(自然科学版), 1999, 21(遗传学专辑): 336 - 337.

(本文编辑:黄榕)

## 病例报告 ·

# 川崎病误诊 1 例

冯琳,张宝玺

(河北医科大学附二院儿科,河北 石家庄 050000)

[中图分类号] R593.2 [文献标识码] E

患儿,女,1岁10个月。因“喘憋、多汗、少尿1个月”入院。查体:呼吸52次/min,端坐呼吸,精神差,不能平卧。眼睑轻度浮肿,颈静脉怒张,心前区稍隆起,心尖搏动于左侧第5肋间锁骨中线外,心界向两侧扩大,心率160次/min,心音低钝,未闻及杂音。肝肋下7cm,剑下6cm,脾肋下2.5cm。血常规:WBC  $8.8 \times 10^9/L$ , N 0.55, L 0.38, Hb 91 g/L, 血小板  $230 \times 10^9/L$ 。胸片示心脏增大。心电图示:窦性心动过速, I, aVL, V<sub>5</sub>, V<sub>6</sub> 呈异常 Q 波, ST - T 改变。心肌酶、血沉均正常。二维超声心动图:全心增大,以左心增大为主。入院诊断:慢性充血性心力衰竭。扩张型心肌病? 心内膜弹力纤维增生症? 入院后追问病史,患儿自生后至发病前无心衰表现。生后3个月时曾经发热1个月,体温波动于38~39,伴口唇干裂,无皮疹、手足硬肿、脱屑。颈部淋巴结是否肿大不详。发热1周时查血常规:WBC  $11 \times 10^9/L$ , 血小板  $330 \times 10^9/L$ 。血沉30 mm/h,当时诊断不明,抗生素治疗无效,间断予激素后退热。

因考虑川崎病,再次复查超声心动图,发现左冠状动脉起始部内径7.5 mm,右冠状动脉起始部内径6 mm,见图1。予强心、利尿、潘生丁抗血栓治疗1个月,心衰明显好转,但心电图仍存在异常 Q 波, ST - T 改变。

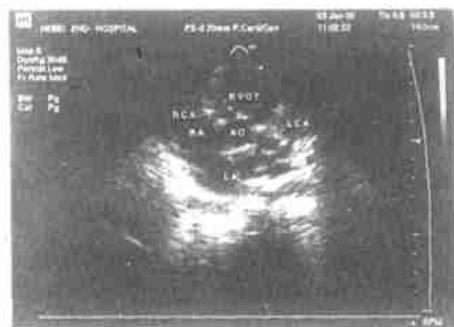


图1 主动脉根部短轴断面示扩张的左、右冠状动脉  
RVOT:右室流出道;RCA:右冠状动脉;LCA:左冠状动脉;RA:右心房;AO:主动脉;LA:左心房

本例最后诊断为川崎病,合并缺血性心肌病、冠状动脉瘤、心力衰竭。近年来报道川崎病不完全性或不典型病例增多,约为10%~20%。患儿仅具有2~3条主要症状,但有典型的冠状动脉病变。如在急性期末未能明确诊断、及时治疗,日后易发展为难治性心力衰竭,或心肌梗塞,预后差。故应对婴儿期的川崎病提高警惕,早期诊断。对不明原因的婴幼儿心力衰竭,应想到本病的可能,详细询问有无长期发热的病史,及时做超声检查,注意冠脉改变,以免漏诊、误诊。

(本文编辑:吉耕中)

[收稿日期] 2000 - 03 - 01; [修回日期] 2000 - 06 - 26  
[作者简介] 冯琳(1968 - ),女,硕士,主治医师。