

综述 ·

儿童型脊髓性肌萎缩症致病基因的研究进展

丁华新,杨晓苏 综述,肖波 审校

(中南大学湘雅医院神经内科,湖南 长沙 410008)

[中图分类号] R746 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2003)03-0285-04

脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA) 是一组以脊髓前角细胞 (有时也累及脑干运动神经元) 变性和缺失的遗传性疾病, 临床表现为肌无力和肌萎缩, 人群发病率为 1/6 000 ~ 1/10 000, 携带者频率为 1/40 ~ 1/60, 是儿童期常染色体隐性遗传性疾病。

根据 SMA 起病年龄和病程, 国际脊髓性肌萎缩症协会将其分为常见的 ~ 型, 其中 ~ 型为儿童型。1995 年后, 儿童型 SMA 基因定位于 5q13, 该区由一个复杂的基因组组成, 包括 500 KB 的重复与转换序列。已证实的 4 个候选基因 SMN (survival motor neuron, 存活运动神经元)、NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein, 神经细胞凋亡抑制蛋白)、BTF2P44 和 H4F5, 每个至少有二个拷贝, 分别位于着丝粒侧和端粒侧^[1,2] (图 1)。SMA 病人中均发现上述四个基因存在端粒侧的纯合缺失, 但以 SMN-T 发生频率最高, 达 87% ~ 100%^[1,3], 从而确定为致病基因; NAIP 在 SMA 型中纯合缺失占 17% ~ 87.5%, 型占 0 ~ 42.8%, 型占 0 ~ 13%^[4]; P44T 在 SMA I 型中纯合缺失

73%, 型缺失率为 15%^[2]; H4F5 型缺失尚无确切统计报道。本文就 SMA 的致病基因 SMN 的研究进展综述如下。

1 SMN 特征

SMN 基因包括 8 个外显子, 同一条染色体上有二个非常相似的拷贝, 根据所居位置命名为端粒侧 SMN (SMN-T) 和着丝粒侧 SMN (SMN-C 或 C-BCD541), 二个拷贝之间仅在各自的 3' 端有 5 bp 不同, 其中 2 bp 在外显子 7 和 8, 利用这一碱基差异可区分 SMN-T、SMN-C 及用作 SMA 的分子学诊断^[1,5]。二个拷贝几乎均表达 1.7 KB 转达物, 选择性剪接产生差异较小的 SMN 蛋白异构体。SMN-T 转录产生 90% 的全长转录物, 另外 10% 的缺少外显子 5; SMN-C 转录产生许多异构体, 包括缺少外显子 5 或 7, 或 2 个外显子以及全长转录物, 其中全长转录物占 20% ~ 30%^[1,6]。SMN-T 在正常人存在 2 个等位基因, 但 SMN-C 在正常人、携带者及病人中拷贝数变异较大^[7] (图 2)。

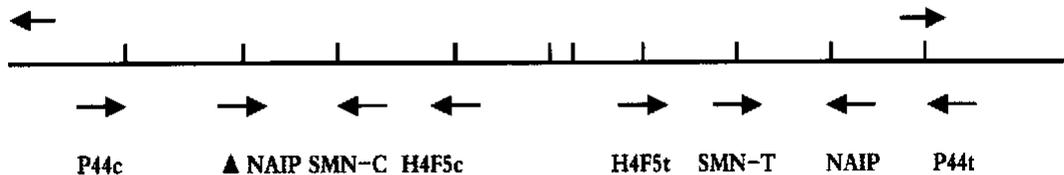


图 1 SMN-T, SMN-C, NAIP, P44 及 H4F5 在 5q13 区排列模式图

[收稿日期] 2002-08-10; [修回日期] 2003-01-03
[基金项目] 国家自然科学基金(No. 30170330), 湖南省自然科学基金(02JJ Y3016)
[作者简介] 丁华新(1963-), 男, 硕士, 副主任医师, 科主任。主攻方向: 神经系统疾病。现在湖南省常德市第四人民医院内科。
[通讯作者] 杨晓苏, 湖南省长沙市湘雅路 141 号湘雅医院神经内科, 邮编: 410008。

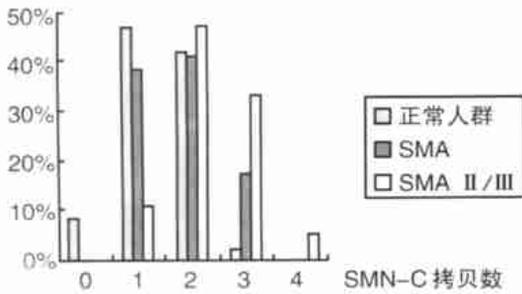


图2 SMN-C 拷贝数在正常人群及 SMA 病人中的分布图

2 SMN 与 SMA

自 1995 年 Lefebvre 等^[1]首次证实 SMA 病人 SMN-T 纯合缺失后,不同作者及不同地区相继报道了 SMN-T 在儿童型 SMA 病人中的纯合缺失,缺失

率为 87% ~ 100%,但与 SMA 表型无明显关系,而个别报道 SMA 型 SMN-T 纯合缺失率低(33.3%)^[8]。另外,也证实杂合缺失的 SMA 病人中保留的 SMN-T 存在点突变,包括误译、倒位和框移,现已发现约 19 种形式(表 1)^[9],并且临床表型可能与点突变的位置有关,这从另一个角度证实了 SMN 与 SMA 发病有着直接关系。Wirth^[10]根据目前统计学资料及 SMN 表达产物生物学行为研究认为,三型均由 SMN 突变引起,其突变方式有多种形式,并且 SMA 中的 96% 属于 SMN-T 突变,而 4% 不与 5q13 区相关;其中 5q13 区的 SMA 病人中,96.4% 属于 SMN-T 纯合缺失,3.6% 属于杂合缺失,即其中一条染色体上 SMN-T 存在微小突变,另一条染色体 SMN-T 缺失或转换;只有 SMN-T 纯合缺失才导致发病,而大约 5% 的正常人群可发现 SMN-C 纯合缺失。

表 1 SMN-T 点突变总结表

编号	位置	核苷酸置换	翻译作用	SMA 类型
1	Exon1	38C G	Ala Gly(A2G)	II,III
2	Exon3	430DEL4	Frameshift	I,II,III
3	Exon3	472del5	Frameshift	I
4	Exon4	542del GT	Frameshift	I,II
5	Exon6	767C T	Pro Leu(P245L)	III
6	Exon6	800ins 11	Frameshift	I,II
7	Exon6	818G T	Ser Ile(S262I)	III
8	Exon6	848A G	Tyr Cys(Y272C)	I
9	Exon6	854C T	Thr Ile(T274I)	II,III
10	Exon6	856G A	Gly Ser(G275S)	III
11	Intron6	868-10del 7	Splicing defect	—
12	Exon7	869G T	Gly Val(279V)	I
13	Intron7	921 + 4del 4	Splicingdefect	—
14	Exon1	78C T	Q15X	I,III
15	Exon2a	124insT	—	II
16	Exon2b	241-242ins4	—	III
17	Exon4	591del A	—	II
18	Intron7	c. 922 + 6T G	—	III
19	Exon1	末端插入核苷酸 G	—	I

3 SMN 致病机制

已知 SMN 的两种基因型编码相同氨基酸序列的蛋白质—SMN 蛋白,SMN-T 与 SMN-C 之间仅有

5 个核苷酸的差异,但仅仅只有纯合缺失 SMN-T 才导致 SMA。Monani 等^[11]通过测序和比较包含有 SMN 基因的基因组克隆,发现二者之间的关键区别在各自的 32 KB 区的外显子 7 内 C T 碱基发生了改变,这一改变影响了外显子剪接增强子的活性,从

而影响了基因的剪接,而只有 SMN-T 的转录物才是全长转录物,而 SMN-C 位点的转录物缺乏外显子 7^[11]。这为 SMN-C 不能完全代替 SMN-T 提供了分子学基础。但最近有 SMN-C 纯合缺失导致 SMA 的报道^[12]。足够量的全长 SMN 蛋白质对剪接体 U snRNPS 的装配及其有关因子的再生和前 mRNA 的剪接具有重要作用;而 SMN-C 基因表达不稳定的截短 SMN 蛋白或 SMN 蛋白异构体,影响了 SMN 蛋白正常功能的发挥,从而发病,这从蛋白质水平证实了 SMN-T 在发病中的决定性作用^[13]。研究发现,在 SMA 型和 SMA 型病人中,既使他们有相同数量的 SMN-C 拷贝数,但 SMN-C 蛋白水平和一种新的核结构-Gems 数不同,而由 SMN-T 转化产生的 SMN-C 基因虽然蛋白产生量减少,但足以维持 Gems 的形成,则产生 SMA / SMA 型,但在 SMA 型的病人中的 SMN-C 基因不能产生足够量的 SMN 蛋白质以形成 Gems,从而导致严重型 SMA^[14]。

SMN 蛋白与 mRNA 的生物合成有着密切关系,但这一灾难性效应仅针对脊髓前角运动神经元,而对其它神经组织及非神经组织没有影响,因而有作者^[15]提出三种假说:Battaylia 提出“阈值效应假说”,认为运动神经元更敏感地依赖 SMN 蛋白的表达,并且需要大量的 SMN 蛋白来维持其生存;当运动神经元细胞所需要的 SMN 蛋白量下降到低于运动神经元生存的阈值,就可以导致运动神经元变性和凋亡调节障碍,而 SMN 蛋白下降到运动神经元生存阈值水平以下时,可能仍能够维持其它神经细胞和非神经细胞的生存。Mattaj 则认为,SMN 蛋白与 U snRNPS 中大多数共有蛋白的 Sm 蛋白结合,而这些 Sm 蛋白中有二个特异性地位于神经元——SmN 蛋白,因而认为这种 Sm 蛋白分布的差异导致 SMN 的组织特异性作用。第三种解释则认为 SMN 蛋白本身具有弱的抗凋亡作用,当和 Bcl-2 共同表达时,具有协同抗凋亡作用,Bcl-2 与 SMN 结合抑制 Bax(前凋亡蛋白)诱导的凋亡,Bax 对于交感神经元和运动神经元的死亡是必备的;而带有 Y272C 误译突变的 SMN 蛋白与 Bcl-2 不具有协同作用。

最近有作者发现^[16,17],SMN 蛋白在肌细胞的发育和肌小管的成熟中具有重要作用,在 SMA I 型和 SMA II 型病人的肌细胞融合期,通过对 myf-5 肌纤维特异性转录因子研究发现,它的表达被损害;SMN 外显子 7 缺失鼠可导致严重肌营养不良,以致肌肉瘫痪、甚至死亡,并且肌营养不良的程度与肌酸激酶升高水平相关。因而认为: SMN 存在肌肉特

异性表达方式; SMN 可能通过保证肌细胞的正常分化和运动神经元的生存,从而在维持运动功能单位中具有重要作用。

4 展望

目前,SMN 基因及其发病机制的研究正愈来愈深入。Hofmann 等^[18]在果蝇体内发现一种称为 Htra2-B1 的调节因子能够恢复 SMN-C 基因表达全长的 SMN 蛋白,且该因子无种属特异性。最近 Young 等^[19]又证实了一种 SR 样外显子剪接因子-hTra-2-6-1,通过与外显子 7、并富有 AG 的外显子剪接增强子的相互作用,刺激来源于 SMN-C 包含有外显子 7 的微小基因转录,并且发现另一个剪接因子-SRp30c 亦具有类似作用。另外,还有研究发现:IFN(干扰素)诱导 SMN-C 基因的表达,恢复蛋白的缺失^[20]。这些研究鼓舞人心,它提示:进一步研究可能刺激 SMN-C 基因表达的药物,也许可为治疗 SMA 开辟一条新途径。

[参 考 文 献]

- [1] Lefbvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy determining gene [J]. Cell, 1995, 80(1): 155 - 165.
- [2] Burglen L, Seroz T, Miniou P, et al. The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletion associated with werdnig - Hoffmann disease [J]. Am J Hum Genet, 1997, 60(1): 72 - 79.
- [3] Simard LR, Rochette C, Semionov A, et al. 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.
- [4] Chen Q, Baird SD, Mahadevan M, et al. Sequence of a 131 - kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP [J]. Genomics, 1998, 48(2): 121 - 127.
- [5] Van der Steege G, Draaijers TG, Grootsoorten PM, et al. A provisional transcript map of the spinal muscular atrophy (SMA) critical region [J]. Eur J Hum Genet, 1995, 3(2): 87 - 95.
- [6] Gennarelli M, Lucarelli M, Caon F, et al. Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 213(1): 342 - 348.
- [7] Burghes AHM. When is a deletion not a deletion - When it is converted [J]. Am J Hum Genet, 1997, 61(1): 9 - 15.
- [8] 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.
- [9] Skordis LA, Dunckley MG, Burglen L, et al. Characterisation of

novel point mutations in the survival motor neuron gene SMN, in three patients with SMA [J]. *Hum Genet*, 2001, 108(4): 356 - 357.

[10] 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.

[11] Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMA1 from the copy gene SMN2 [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(7): 1177 - 1183.

[12] Srivastava S, Mukherjee M, Panigrahi I, et al. SMN - deletion in childhood - onset spinal muscular atrophy [J]. *Am J Med Genet*, 2001, 101(3): 198 - 202.

[13] Jablonka S, Rossoll W, Schrank B, et al. The role of SMN in spinal muscular atrophy [J]. *J Neurol*, 2000, 247(Suppl 1): 137 - 42.

[14] Schmalbruch H, Haase G. Spinal muscular atrophy: present state [J]. *Brain Pathol*, 2001, 11(2): 231 - 247.

[15] Biros I, Susan Forrest. Spinal muscular atrophy: untangling the

knot [J]. *J Med Genet*, 1999, 36(1): 1 - 8.

[16] Guettier - Sigrist S, Coupin G, Braun S, et al. On the possible role of muscle in the pathogenesis of spinal muscular atrophy [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2001, 15(1): 31 - 40.

[17] Cifuentes - Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, et al. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy [J]. *J Cell Biol*, 2001, 152(5): 1107 - 1114.

[18] Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, et al. Htra2 - beta 1 stimulates an esonic splicing enhancer and can restore full - length SMN expression to survival motor neuron 2(SMN2) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(17): 9618 - 9623.

[19] Young PJ, Didonato CJ, Hu D, et al. SRp30c - dependent stimulation of survival motor neuron(SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2beta1 [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(5): 577 - 587.

[20] Baron - Delage S, Abadie A, Echaniz - Laguna A, et al. Interferons and IRF - 1 induce expression of the survival motor neuron(SMN) genes [J]. *Mol Med*, 2000, 6(11): 957 - 968.

(本文编辑:吉耕中)

(上接第 284 页)

果^[3]。因此,近年来又开始研究糖皮质激素对表面活性蛋白的影响。王晓川等^[4]研究表明,地塞米松具有明显促进表面活性蛋白 B 基因表达的作用,随时间延长、地塞米松剂量的增加,效果越显著。

我们以前对胎粪吸入幼兔肺表面活性物质相关蛋白 B 研究表明^[1],MAS 及其并发的 PPHN 伴有明显的表面活性蛋白 B 降低。为此我们利用幼兔胎粪吸入模型在幼兔轻度胎粪吸入同时给予地塞米松治疗,重度胎粪吸入提前 3 d 预防用药。研究结果显示,应用地塞米松治疗轻度胎粪吸入组 16 h SP-B 的 mRNA 表达量有增加,但与对照组比较无统计学意义,24 h 有明显表面活性蛋白 B mRNA 表达增加,直到 72 h 仍明显高于对照组。表明地塞米松可能主要作用于 SP-B 基因转录过程,与 Weaver 等^[5]报道一致。并发现对重度胎粪吸入幼兔预防用药 3 d,也能显著增加 SP-B mRNA 表达,与对照组比较有极显著性意义。

Soukka^[6]报道了在猪胎粪吸入前,用甲基强的松龙预防可降低肺高压,减轻肺水肿并提高氧合。我们研究表明在轻度幼兔胎粪吸入治疗组 16 h 右心室压力无变化,在 24 h 至 48 h 右心室压力明显低于对照组。重度胎粪吸入预防用药组右心室压力明显低于未预防用药的对照组,此时 SP-B mRNA 表达明显增加,提示地塞米松通过促进肺表面活性相关蛋白 B 基因表达增加对 MAS 肺损伤和 MAS 并发的

PPHN 有预防和减轻作用。但对糖皮质激素的使用,临床上一直存在不同的看法,主要是糖皮质激素的作用广泛,有可能造成免疫抑制及二重感染等副作用,从本研究的结果来看,我们认为糖皮质激素在 MAS 治疗中,特别是早期、短期应用可能有积极的治疗作用。

[参 考 文 献]

[1] 吴红敏,李玖军,魏克伦,等. 幼兔胎粪吸入后肺表面活性蛋白 B 动态改变及与右心室压力关系的探讨 [J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38(11): 699 - 701.

[2] Gerard M, Michael J, Deborah A, et al. Exudative lung injury is associated with decreased levels of surfactant proteins in a rat model of meconium aspiration [J]. *Pediatrics*, 1997, 100(6): 998 - 1003.

[3] 吴静怡,徐志信,沈慧卿,等. 肺表面活性蛋白质分离和生物活性作用 [J]. *上海医科大学学报*, 1991, 18(3): 421 - 424.

[4] 王晓川,金勤立,沈惟堂,等. 早产大鼠肺表面活性物质蛋白 B 基因表达的调节 [J]. *中华儿科杂志*, 1996, 34(6): 380 - 382.

[5] Weaver TE, Whitsetl JA. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant associated proteins [J]. *Biochem J*, 1991, 273(Pt2): 249 - 264.

[6] Soukka H, Halkola L, Aho H, et al. Methylprednisolone attenuates the pulmonary hypertensive response in porcine meconium aspiration [J]. *Pediatr Res*, 1997, 42(2): 145 - 150.

(本文编辑:吉耕中)