

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00605

广西地区脊髓小脑性共济失调病人的基因诊断和 CAG 重复扩增

谭建强¹, 汪萍², 胡启平¹, 李松峰¹, 舒伟¹, 马军¹, 方玲¹, 华荣¹, 丁晔¹, 袁志刚¹

1. 广西医科大学, 南宁 530021;
2. 广西壮族自治区公安厅, 南宁 530000

摘要: 为探讨广西地区脊髓小脑性共济失调(Spinocerebellar ataxia, SCA)患者各种亚型类型特点及分布状况, 应用聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)、毛细管电泳(Capillary electrophoresis, CE)片段分析等技术检测分析遗传性共济失调患者的 SCA1、SCA2、SCA3/MJD、SCA6、SCA7 和 SCA12 (CAG)_n 突变。在 6 个 SCA 家系共检出 21 例患者和 19 例症状前患者均为 SCA3/MJD 突变, CAG 重复数分别为 59~70 次和 60~73 次。未检测到 SCA1、SCA2、SCA6、SCA7 和 SCA12(CAG)_n 突变。研究表明, 广西地区的 SCA 病人主要为 SCA3/MJD 型, 患者的 CAG 重复数低于过去的报道。

关键词: 脊髓小脑性共济失调; 基因诊断; CAG 重复扩增; 毛细管电泳

Gene diagnosis and CAG repeat analysis of spinocerebellar ataxia cases of Guangxi region

TAN Jian-Qiang¹, WANG Ping², HU Qi-Ping¹, LI Song-Feng¹, SHU Wei¹, MA Jun¹, FANG Ling¹, HUA Rong¹, DING Ye¹, YUAN Zhi-Gang¹

1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;
2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Public Security Bureau, Nanning 530000, China

Abstract: To characterize the distributions and subtypes of the spinocerebellar ataxias (SCA) in Guangxi region, the SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7 and SCA12 (CAG)_n mutations were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and capillary electrophoresis (CE). The SCA3/MJD mutation was detected in a total of 21 SCA patients and 19 presymptomatic individuals from 6 SCA families and their CAG repeat numbers were 59~70 and 60~73, respectively. No (CAG)_n mutations of SCA1, SCA2, SCA6, SCA7 and SCA12 were detected. This study showed that SCA in Guangxi region is mostly SCA3/MJD subtype and the CAG repeats are smaller than those reported in other regions previously.

Keywords: spinocerebellar ataxia; gene diagnosis; CAG repeat expansion; capillary electrophoresis

脊髓小脑性共济失调(Spinocerebellar ataxia, SCA)是一类包括 SCA3(又称马查多-约瑟夫病, Maehado-Joseph disease, MJD)等多种亚型共济失

调在内的遗传性退行性神经系统变性疾病, 与 CAG 三核苷酸异常扩增突变有关, 多为常染色体显性遗传。国外至今已报道的脊髓小脑性共济失调有

收稿日期: 2008-11-30; 修回日期: 2009-01-18

基金项目: 广西自然科学基金项目(编号: 桂科攻 0632007-1B)资助

作者简介: 谭建强(1981-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 细胞生物学与遗传学。Tel: 15977673746; E-mail: tjq198103@163.com

通讯作者: 袁志刚(1957-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 医学遗传学。Tel: 0771-5358242; E-mail: gangzhy@yahoo.com.cn

SCA1~SCA28 和 DRPLA 等类型^[1]。国内继发现 SCA1~SCA3 型外,从 2001 年开始也有了 SCA6、SCA7 和 SCA12 家系的报道^[2]。SCA 的类型众多,其中以 SCA3/MJD 是国内外最常见的类型,但不同的国家、地区或种族 SCA 发病率、各亚型的分布都有较大的差异。不同的家系和同一家系的不同患者之间也存在高度的遗传异质性,且仅靠临床表现还不能完全分开。为探讨广西地区 SCA 患者各种亚型的特点及分布,我们对广西 6 个 SCA 家系的 70 例个体及 30 例散发 SCA 患者进行了 SCA1、SCA2、SCA3/MJD、SCA6、SCA7 和 SCA12(CAG)_n 检测分析,为临床诊断提供资料。

1 材料和方法

1.1 研究对象

6 个 SCA 家系共 70 人。其中患者 21 例、家系正常人 49 例(图 1)、散发患者 30 例。全部为广西医科大学第一附属医院神经内科收集,均为汉族。SCA 患者临床诊断按照 Harding^[3] 标准。其中男 63 例,女 37 例,年龄 30~69 岁,平均(48.8±11.3)岁;发病年龄 26~50 岁,平均(42.8±6.8)岁;病程 1~19 年,平均(8.2±6.7)年。30 名无血缘关系的正常人做对照组。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

按知情同意原则抽取 SCA 患者、家系成员(图 1)及正常人外周静脉血 10 mL,采用标准酚-氯仿法抽提基因组 DNA 作为 PCR 模板。

1.2.2 PCR 扩增

根据各亚型发病率的高低、频率大小和国内外流行病学的研究,参照文献^[4-9]合成 PCR 引物(表 1)。

表 1 PCR 反应条件及引物

亚型	引物(5' 3')	复性温度及时间	循环数
SCA3	F-FAM-CCAGTGACTACTTTGATTCG R-CTTACCTAGATCACTCCAA	62 90 s	30
SCA2	F-FAM-GGGCCCTCACCATTGTCG R-CGGGCTTGCGGACATTGG	55 60 s	35
SCA1	F-FAM-CAACATGGGCAGTCTGAG R-AACTGGAAATGTGGACGT A	60 60 s	35
SCA6	F-FAM-CACGTGTCTATTCCCCTGTGATCC R-TGGGTACCTCCGAGGGCCGCTGGTG	60 60 s	35
SCA7	F-FAM-TGTTACATTGTAGGAGCGGAA R-CACGACTGTCCCAGCATCACTT	55 30 s	35
SCA12	F-FAM-TGCTGGGAAAGAGTCGTG R-GCCAGCGCACTCACCTC	60 45 s	35

PCR 反应体系: 25 μL 内含模板 DNA 100 ng, 引物各 10 pmol, 10×dNTP 1.0 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, Taq 酶 1 U(SCA2 和 SCA7 则采用 TaKaRa LA Taq 酶), 25 mmol/L 的 Mg²⁺ 1.5 μL, 二甲基亚砜 1.3 μL。反应条件: 94 预变性 2 min, 94 变性 1.5 min, 55~62 复性 1.5 min(表 1), 72 延伸 3 min, 共 35 个循环。

1.2.3 PCR 产物检测及 CAG 三核苷酸重复拷贝数的确定

取 1 μL PCR 扩增产物与 12 μL 去离子甲酰胺和 0.3 μL 分子量标准为 Rox DNA Size standard-500 内标混合, 加入 96 孔板中变性 5 min, 冰浴骤然冷却后在 ABI3100 遗传分析仪中进行毛细管电泳, 通过 Genescan 3.7 软件分析, 获得 DNA 片段的长度。CAG 重复拷贝数按 [DNA 片段长度(bp)-CAG 重复序列侧翼区长度(bp)]/3 计算。

2 结果与分析

2.1 SCA3/MJD 基因 CAG 三核苷酸重复序列异常扩增的检测

30 例正常对照人群的 SCA3 基因 CAG 重复数为 13~37 次。6 家系中的 21 例患者的 SCA3 基因 CAG 重复数为 59~70 次(表 2), 30 例散发患者的 SCA3 基因 CAG 重复数为 13~35 次。6 个家系中症状前患者有 19 人, 他们的 SCA3 基因 CAG 重复数为 60~73 次(表 3)。部分患者、症状前患者、家系正常人、散发患者以及正常对照组毛细管电泳结果(图 2)。

2.2 SCA1、SCA2、SCA6、SCA7 和 SCA12 基因 CAG 三核苷酸重复序列异常扩增的检测

6 个家系的 SCA1、SCA2、SCA6、SCA7 和 SCA12 基因的 CAG 重复数分别为 17~32、18~29、10~15、7~14、22~24 次, 均未发现异常扩增。

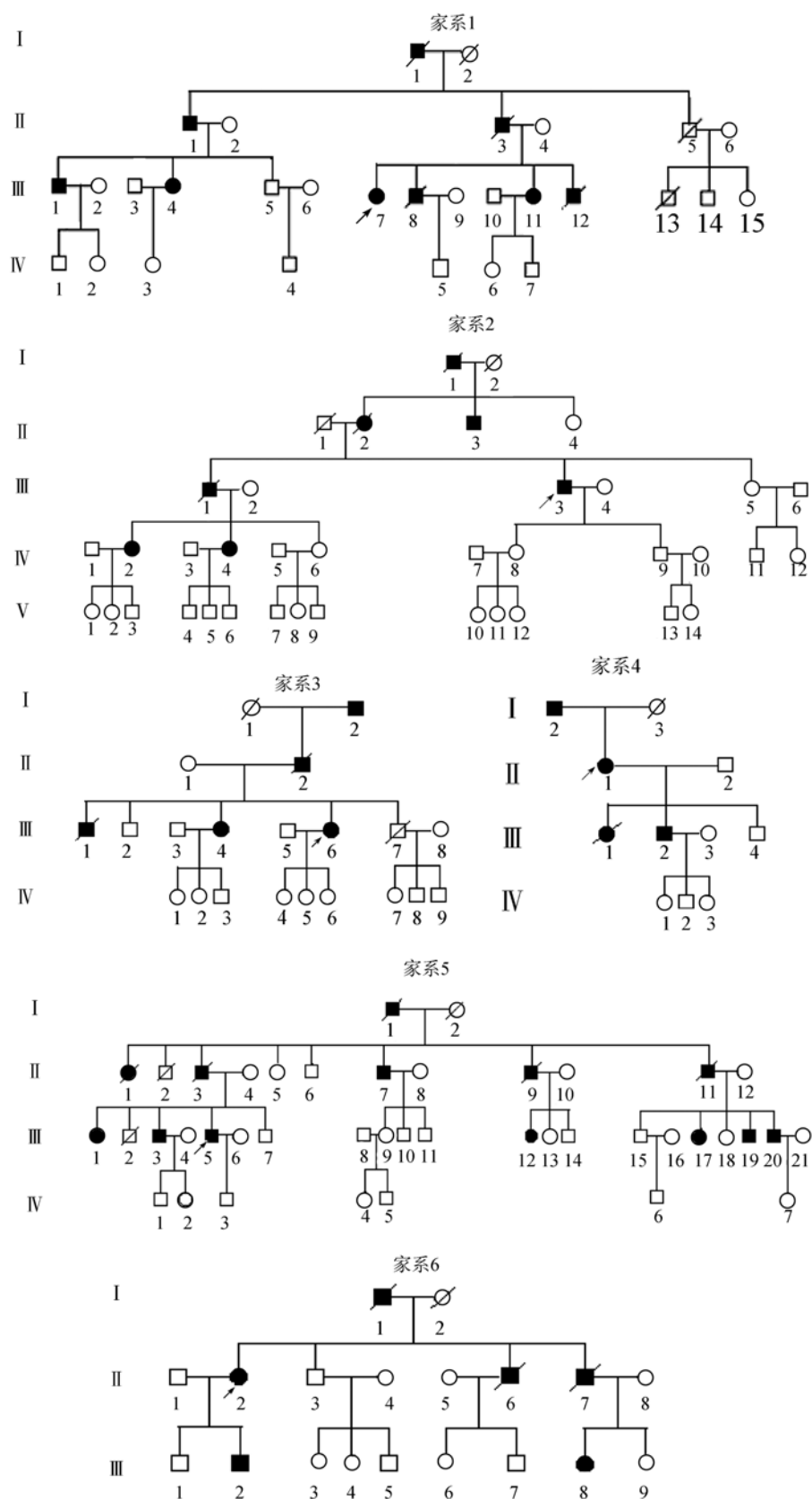


图 1 广西地区 SCA 家系系谱图

2.4 测序结果

每个家系的患者中随机选取 2 个用 ABI3100 遗传分析仪进行测序。患者的 CAG 重复数与毛细管电泳检测获得的结果相吻合(图 3)。

3 讨论

SCA 是一类遗传性退行性神经系统变性疾病,其基因突变导致 CAG 重复序列的异常扩增是致病的主要原因。病变主要累及小脑、脑干和脊髓,临床表现除了共济失调外还常常伴有帕金森综合症、肌张力障碍等。SCA 临床表现有多种亚型,现已陆续发现 20 余种 SCA 亚型,按照各亚型发现的先后顺序将 SCA 依次排列为 SCA1~SCA28 等亚型,其中有 18 种 SCA 亚型的基因突变位点已被确定,但 SCA9、SCA15、SCA18、SCA20 等基因尚未被定位或克隆,其分型诊断标准存在争议。对于基因被精确定位和克隆的亚型,以基因型作为分型依据来确切诊断和分型成为可能。尽管如此,由于遗传性共济失调的异质性、不同地区和种族人群的遗传结构差异,CAG 三核苷酸重复数有可能存在差别。Maruyama 等^[10]报道 SCA3 患者 CAG 重复数为 61~84, Laura 等^[11]报道巴西 SCA3 家系患者的重复数为 69~85 次,宋兴旺等^[12]报道 SCA3 家系的突变等位基因 CAG 重复数为 70~83 次,黄智恒等^[13]报道广东汉族 SCA3 家系患者的重复数为 74~81 次,唐北沙等^[14]报道湖南和浙江等地 SCA3 家系的患者重复数为 68~83 次,谢秋幼等^[2]报道南方人群的 SCA3 患者的重复次数为 67~85 次。本研究的广西 SCA3 家系的患者为 59~70 次,重复次数的范围低于他们的报道。姜森 等^[15]对东北地区正常汉族人群的研究中观察到 SCA3/ MJD 基因中 (CAG)_n 正常变异范围存在地区和种族差异,在患者中也存在类似的现象。SCA 基因突变是一种动态突变,可以出现在有丝分裂和减数分裂时期,且动态突变是不稳定的, CAG 重复数可随着的世代间的传递而累积^[16]。本研究的 SCA3 家系中的第 、 代的症状前患者的 CAG 重复数为 62~67 次,也低于宋兴旺等的报道。正常人的 CAG 重复数为 13~37 次,与国内的其他报道基本相同。CAG 重复数的多少和重复的长度不仅影响了发病年龄,也会直接影响到临床表型,如重复数较大的患者往往伴有明显的临床特征以及锥体束和基底节区受累的表现,

从而加快了疾病的进展^[17]。然而,具有相同或相近的 CAG 重复数的不同地区和种族的患者,他们 SCA 严重程度有何差异,值得进一步的比较和研究。

表 2 6 家系患者 SCA3 基因 CAG 重复序列异常拷贝数

家系	患者	发病年龄	CAG 重复次数
家系 1	1	55	63
	7	36	66
	11	24	70
	1	26	66
	4	27	70
家系 2	5	66	59
	3	60	62
	2	40	64
家系 3	4	38	68
	6	30	66
家系 4	4	27	67
	1	40	63
家系 5	1	35	65
	2	27	66
	7	55	64
	3	42	65
	5	34	68
家系 6	19	30	63
	20	21	63
	2	46	61
	2	30	63

表 3 6 家系症状前患者 SCA3 基因 CAG 重复序列异常拷贝数

家系	症状前患者	CAG 重复次数
家系 1	3	67
	9	67
	14	72
	1	62
	4	67
家系 2	5	73
	2	64
	10	67
	11	66
	12	69
家系 3	14	66
	4	67
	3	67
	6	66
	7	66
家系 5	11	60
	13	69
	17	68
	4	68

重复异常。散发SCA患者是根据其临床症状、按照Harding标准来确诊的,但本研究的散发病例均无这6种亚型的CAG异常重复。这与国内其他作者报道基本一致,宋兴旺等^[12-14]等研究结果也显示绝大多数散发患者无(CAG)_n异常重复。提示SCA3/MJD突变是广西地区SCA的主要类型,需要采集较大的样本量进一步揭示广西地区各SCA亚型的比例和基因频率分布的特点。SCA各亚型的基因频率分布和CAG重复次数与奠基者效应(Founder effect)有关, Takeshi等^[18, 19]在研究, *puratrophin-1* 基因时指出 16q-ADCA患者共分享一个单倍型。这些家庭有在一定的地理范围内积累的倾向。

显示奠基者效应可能是导致这些地区常染色体显性小脑性共济失调(Autosomal dominant cerebellar ataxia, ADCA)高频率的原因,进而造成遗传上的差异和基因频率分布上的不同。

本研究采用PCR结合CE,用Genescan 3.7 软件分析,可直接读出受检者的PCR扩增片段的确切碱基数,临床诊断为SCA的家系患者均被检测到(CAG)_n异常,正常对照的(CAG)_n则均在正常范围内,即我们获得的数据与临床诊断相吻合。Drusedau等^[20]采用这种方法用于产前诊断,从发育早期的胚胎中取出细胞,准确的检测到胚胎的SCA基因型。PCR结合CE,用Genescan3.7 软件处理数据,避免人工观测和读取数据的误差,也比测序省时、快捷和便宜,在遗传分析仪应用和商业服务越来越广泛的今天,完全可以在临床上推广使用这种方法来检测SCA基因突变。

参考文献(References):

- [1] Dueñas AM, Goold R, Giunti P. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*, 2006, 129(6): 1357–1370. [DOI](#)
- [2] 谢秋幼, 梁秀龄, 李洵桦. 国内南方人群遗传性共济失调不同基因亚型的分布状况. *中国临床康复*, 2006, 10(12): 161–163.
- [3] Harding AE. Clinical features and classification of inherited ataxias. *Adv neurol*, 1993, 61(1): 1–14.
- [4] Lin JX, Ishikawa K, Sakamoto M, Tsunemi T, Ishiguro T, Amino T, Toru S, Kondo I, Mizusawa H. Direct and accurate measurement of CAG repeat configuration in the ataxin-1 (ATXN-1) gene by "dual-fluorescence labeled PCR-restriction fragment length analysis". *Hum Genet*, 2008, 53(4): 287–295. [DOI](#)
- [5] Mutesa L, Pierquin G, Segers K, Vanbellinghen JF, Gahimbare L, Bours V. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2): Clinical features and genetic analysis. *Trop Pediatr*, 2008, 54(5): 350–352. [DOI](#)
- [6] Bettencourt C, Santos C, Kay T, Vasconcelos J, Lima M. Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *Hum Genet*, 2008, 53(10): 920–923. [DOI](#)
- [7] Teive HA, Munhoz RP, Raskin S, Werneck LC. Spinocerebellar ataxia type 6 in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, 2008, 66(3B): 691–694.
- [8] Lin Y, Zheng JY, Jin YH, Xie YC, Jin ZB. Trinucleotide expansions in the SCA7 gene in a large family with spinocerebellar ataxia and craniocervical dystonia. *Neurosci Lett*, 2008, 434(2): 230–233. [DOI](#)
- [9] Cho JW, Kim SY, Park SS, Jeon BS. Spinocerebellar ataxia type 12 was not found in Korean parkinsonian patients. *Can J Neurol Sci*, 2008, 35(4): 488–490.
- [10] Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, Seto M, Tsujihata M, Oh-i T, Nishio T. Molecular features of the CAG repeat and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, 1995, 4(5): 807–812. [DOI](#)
- [11] Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, do Céu Moreira M, Mendonça P, Ferreirinha F, Sequeiros J, Giugliani R. A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil-66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol*, 2001, 248(10): 870–876. [DOI](#)
- [12] 宋兴旺, 唐北沙, 江泓, 沈璐, 杨茜, 廖书胜, 李清华, 汤建光. 湖南汉族人群遗传性脊髓小脑型共济失调患者三核苷酸突变频率分布. *中南大学学报(医学版)*, 2006, 31(5): 702–705.
- [13] 黄智恒, 徐评议, 梁秀龄. 广东汉族人遗传性脊髓小脑性共济失调基因突变的研究. *中国神经精神疾病杂志*. 2002, 28(4): 248–251.
- [14] 唐北沙, 夏家辉, 王德安, 汤熙祥, 沈璐, 刘春宇, 戴和平, 严新翔, 潘乾, 肖剑峰, 张宝荣, 欧阳珊. 遗传性脊髓小脑型共济失调的 CAG 三核苷酸突变检测. *中华医学遗传学杂志*, 1999, 16(5): 281–284.
- [15] 姜森, 金春莲, 林长坤, 邱广荣, 柳宗兰, 王朝祥, 孙开来. 东北地区正常汉族人群 SCA1 及 SCA3/MJD 基因内 CAG 重复变异研究. *中华医学遗传学杂志*, 2004, 21(1): 83–85.
- [16] Basu P, Chattopadhyay B, Gangopadhyay PK, Mukherjee SC, Sinha KK, Das SK, Roychoudhury S, Majumder PP, Bhattacharyya NP. Analysis of CAG repeats in SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 and DRPLA loci in spinocerebellar ataxia patients and distribution of CAG repeats at the SCA1, SCA2 and SCA6 loci in nine ethnic populations of eastern India. *Hum Genet*, 2000, 106(6): 597–604. [DOI](#)
- [17] Bürk K, Fetter M, Abele M, Laccone F, Brice A, Dichgans J, Klockgether T. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: oculomotor abnormalities in families with SCA1, SCA2, and SCA3. *J Neurol*, 1999, 246(9): 789–797. [DOI](#)
- [18] Amino T, Ishikawa K, Toru S, Ishiguro T, Sato N, Tsunemi T, Murata M, Kobayashi K, Inazawa J, Toda T, Mizusawa H. Redefining the disease locus of 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia. *J Hum Genet*, 2007, 52(8): 643–649. [DOI](#)
- [19] Shimizu Y, Yoshida K, Okano T, Ohara S, Hashimoto T, Fukushima Y, Ikeda S. Regional features of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Nagano: clinical and molecular genetic analysis of 86 families. *J Hum Genet*, 2004, 49(11): 610–616. [DOI](#)
- [20] Drüsedau M, Dreesen JC, De Die-Smulders C, Hardy K, Bras M, Dumoulin JC, Evers JL, Smeets HJ, Geraedts JP, Herbergs J. Preimplantation genetic diagnosis of spinocerebellar ataxia 3 by (CAG)_n repeat detection. *Mol Human Reprod*, 2004, 10(1): 71–75. [DOI](#)