



脊髓小脑性共济失调7型的分子遗传学诊断及临床分析

遗传性脊髓小脑性共济失调(spino-cerebellar ataxia, SCA)是临床常见的一种神经系统变性疾病[1],在神经遗传病门诊中位居第三[2]。SCA包括多种由不同位点突变而致的基因亚型,其中第7型(SCA7)在我国并不十分常见,它属于常染色体显性小脑性共济失调II型(autosomal dominant cerebellar ataxia II, ADCA II),临床表现以小脑性共济失调、视力减退、眼肌麻痹及视网膜色素脱失变性为特征[3]。我们对36个SCA家系的43例患者、38例散发SCA患者、60名家系“健康”个体及44名正常对照人员进行了SCA7基因(CAG)_n三核苷酸重复扩增检测,分析了SCA7的临床表现以及(CAG)_n动态突变的特点。

1 材料和方法

1.1 临床资料

共收集36个SCA家系43例患者和38例散发SCA患者,为广东、湖南、广西、安徽、江西等地区汉族人。SCA患者临床诊断按Harding标准[4]。43例有阳性家族史的SCA患者,男26例,女17例,年龄22~54岁,平均36岁,病程3~7年;38例散发SCA患者,男24例,女14例,年龄16~58岁,平均45岁,病程2~8年。60名家系中“健康”个体同时进行检测,其中男28例,女32例,年龄27~64岁,平均47岁。44名无血缘关系的健康人作对照组,其中男23例,女21例,年龄22~59岁,平均32岁。

1.2 实验方法

1.2.1 全血基因组DNA提取 抽取SCA患者、家系成员、正常人的外周静脉血10 ml,采取标准酚-氯仿抽提法提取基因组DNA作为PCR模板。

1.2.2 SCA7基因(CAG)_n重复片段扩增 SCA7的检测在PCR扩增、基因诊断排除SCA3、SCA2、SCA1、SCA6之后进行,根据文献[3]设计合成PCR引物。4U1024: 5'-TGT TAC ATT GTA GGA GCG GAA-3'; 4U716: 5'-CAC GAC TGT CCC AGC ATC ACT T-3'。PCR反应体系:模板DNA 200 ng,引物各15 pmol,加三磷酸脱氧核苷(dNTP)至终浓度400 μmol/L, Taq DNA聚合酶2.5 U, 2×Buffer 25 μl, Mg²⁺至终浓度1.5 mmol/L,加双蒸去离子水至总体积50 μl。PCR反应条件:95℃预变性3 min,95℃45 s,57℃30 s,72℃45 s,35个循环。最后72℃延伸8 min,在PE9600 PCR反应仪中进行PCR扩增。

1.2.3 PCR产物检测 取5 μl PCR扩增产物与5 μl 2×变性上样缓冲液混合,99℃变性9 min。置冰上5 min,加样于8%(m/V)含8 mol/L尿素、25%(V/V)甲酰胺的聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Bis=19:1),1×TBE,200 V,电泳18 h,银染显色。

1.2.4 PCR产物的相对分子质量估算和CAG拷贝数的确定 根据已知DNA相对分子质量标记的长度,利用计算机图像处理分析软件(Quantity one 4.4.0)测量目的DNA分子片段的迁移率,拟合标准曲线lgY=a+blgX。将各条电泳带的迁移率代入标准曲线,求得待测DNA片段的长度,CAG重复的拷贝数为DNA片段长度减去CAG重复序列侧翼区的长度的1/3[5]。

1.2.5 异常扩增片段测序 异常等位基因片段经琼脂糖电泳、DNA凝胶回收试剂盒(DNA Gel

Extraction Kit, 上海Sangon)回收后,用DNA测序试剂盒(DNA Sequencing Kit, PE公司)作测序反应,于ABI373自动测序仪上测序。

2 结果

2.1 SCA7 (CAG)_n重复序列检测

检出2个家系2例患者和1例散发患者,均为杂合子。1条等位基因扩增正常,CAG重复分别为12、12、11次,另1条等位基因扩增异常,经DNA测序CAG重复65、65、63次,对应产物449 bp左右,证实为SCA7患者。其余35个SCA家系42例患者、37个散发性SCA患者、60例有血缘关系的“正常人”及44例正常对照的等位基因扩增片段长度在280 bp左右,CAG重复9~19次。

2.2 临床资料分析

家族性患者之一,女性,29岁,因进行性走路不稳、视力下降13年就诊。查体见智能正常,视力0.1~0.2。双眼上视、外展困难,慢眼动(+),无眼震,眼底见视乳头苍白,双眼黄斑变性,左侧可见色素沉着。构音不清,言语迟缓,吞咽困难。肌力、肌张力基本正常,腱反射活跃,踝阵挛(+)。指鼻不准,轮替动作笨拙,跟膝胫试验(+)。宽基底步态,昂白氏征(+)。霍夫曼征(+),巴彬斯基征(-),罗索里莫征(+)。多汗,大小便正常。患者姨妈、外婆有类似病史(图1)。

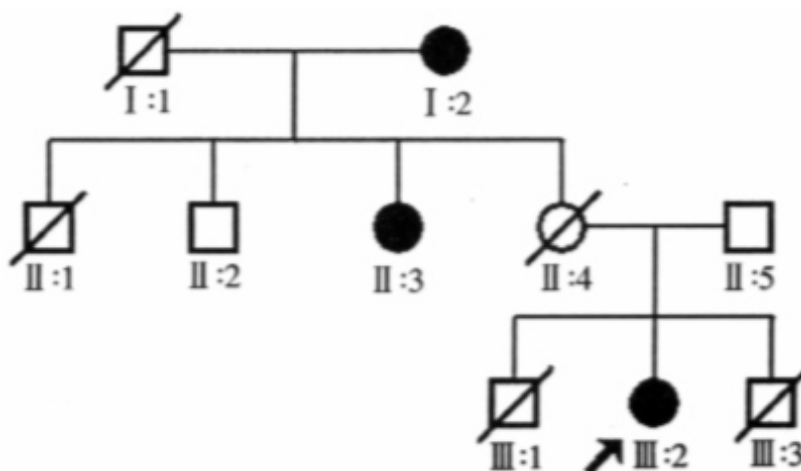


图1 SCA7患者家系系谱-1
Fig.1 The pedigree of SCA7-1
III-2: Proband (arrow)

家族性患者之二,男性,14岁,因患者父亲、叔叔(图2)有走路不稳、视力下降病史,结合患儿有进行性视力下降1年余、眼科临床及染色体检查排除Leber遗传性视神经病而怀疑为SCA被告来我科就诊。查体双眼视力0.1,眼底见双侧视乳头色浅,外院多焦点视网膜电流图示双眼黄斑中心反应峰显著降低,视网膜断层扫描示双黄斑区水肿指数增高(图3、4)。双下肢腱反射稍活跃,其他未见明显异常。临床发现该家系存在遗传早现现象,即在一个家系中发病年龄逐代提前,病情程度逐代加重。其父36岁以行走不稳起病,叔叔则20岁起病且症状较哥哥重,患儿发病年龄较亲代明显提前。

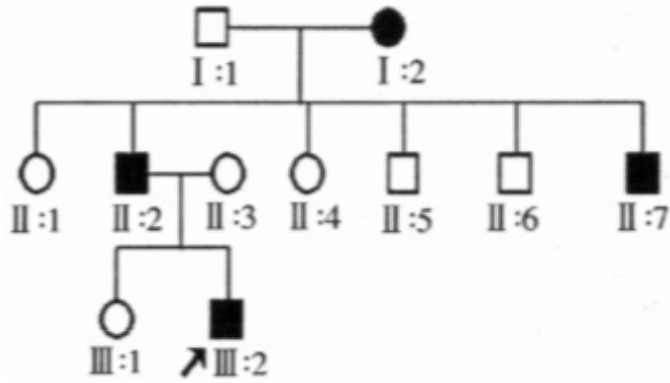


图2 SCA7患者家系系谱-2
Fig.2 The pedigree of SCA7-2
III-2: Proband (arrow)

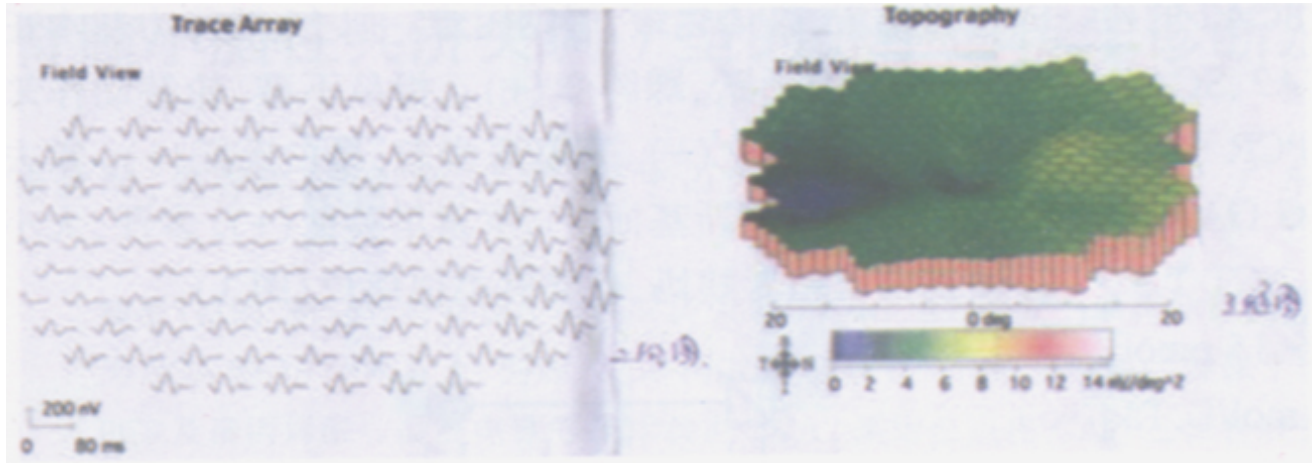


图3 m-ERG示双侧黄斑中心反应峰显著降低
Fig.3 m-ERG showing significant fall-off of the reaction peak on the bilateral macula lutea

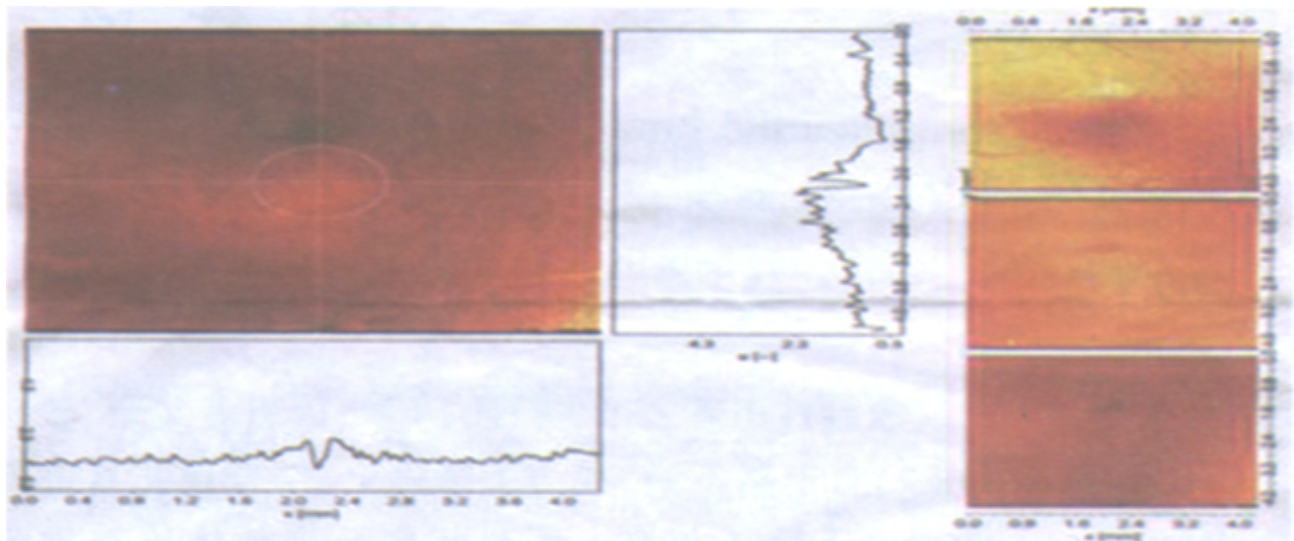


图4 HRT示双黄斑区水肿指数增高
Fig.4 HRT showing increased edema index of the bilateral macula lutea

散发患者，女性，32岁，因行走不稳、视力下降3年余就诊。患者首发症状为走路不稳，继而出现视物不清，言语含糊，饮水呛咳，呈进行性发展，就诊时已不能独立行走。查体见智能正常。双瞳孔等大等圆，对光反射迟钝。视力下降明显，右眼30 cm指数，左眼前指数，眼底见双侧视乳头色淡，血管细，黄斑色素骨细

胞样沉着、紊乱。双眼上视受限，未见眼震，慢眼动(+)。面肌颤搐，构音不清，吟诗状语言。双下肢轻度肌萎缩，四肢肌张力明显增高，肌力V-级，四肢腱反射亢进，双侧踝阵挛(+)，双侧巴氏征(+)，双侧罗索里莫征(+)。深浅感觉未见异常。指鼻、跟膝胫试验不准，轮替动作笨拙，昂白氏征(+)。头颅MRI示：橄榄桥脑小脑萎缩。眼底荧光素血管造影显示视网膜色素变性。患者无阳性家族史。

上述患者先后给予氯硝安定、哈伯因、氨酪酸、胞二磷胆碱、丁螺环酮治疗，症状变化不明显。

3 讨论

SCA7即橄榄桥脑小脑萎缩伴视网膜变性，是一种常染色体显性遗传的神经系统变性病，以小脑性共济失调、进行性视网膜色素斑营养不良为特征，临床表现包括视觉丧失、痴呆、听力减退、幻听、严重的肌张力减低。在SCA7中，显著的神经元丢失发生在小脑、下橄榄、某些颅神经核。视觉传导路脱髓鞘、外侧膝状体及视皮质神经胶质增生。同样SCA7具有其他(CAG)_n三核苷酸重复疾病的特点：(1)重复次数与发病年龄呈负相关，且与疾病严重程度有一定关系，在SCA7和SCA3中这种相关关系最显著。(2)遗传早现现象，除了SCA6，遗传早现现象可见于所有与CAG扩增有关的SCA，尤以SCA7最明显。(3)遗传印迹：突变序列在传代过程中存在性别偏向现象。在SCA7以及SCA1、2、3基因，通过父系遗传时CAG重复序列更易发生进一步扩增，而SCA8则在母系遗传时容易发生扩增。这是由于来自父母双方的同源染色体或等位基因存在功能上的差异。因此，一些单基因遗传病的表现度和外显率受突变基因的亲代来源影响而产生亲缘效应。(4)染色体嵌合：三核苷酸重复在有丝分裂和减数分裂中是不稳定的，表现为不同组织中的体细胞中存在染色体不完全相同的现象。

1995年，临床以共济失调伴视网膜色素变性为主要表现的SCA亚型的致病基因被定位于3p12-21[6][7][8]。1997年，David等[3]将此致病基因定位于3 p并克隆了该基因，称为SCA7基因，发现了其N'末端1号外显子中含一多态的CAG重复序列，正常人重复7-17次，75%为10次，没有任何中断。患者重复38~130次。SCA7基因长3 969 bp，含有1个2 727 bp的开放阅读框架，推测编码1个含892个氨基酸残基的蛋白，称为ataxin-7，相对分子质量约130 000~180 000，内含一段由CAG重复序列编码的Poly Qs。此外，预测SCA7基因第378~394位密码子编码细胞核定位信号，从而使ataxin-7成为一种核蛋白。与其他SCA不同的是，SCA7(CAG)_n重复的不稳定性更加突出，并可观察到明显的染色体合嵌现象，即不同体细胞、生殖细胞中(CAG)_n重复数不同，尤其在生殖细胞中[9]。

Jonasson等[10]通过流行病学研究发现，SCA7并不多见，在世界范围内的发病率是4.5%~11.6%，但在北欧的瑞典和芬兰SCA7是最常见的ADCA。本课题研究组曾首次在国内报道散发性SCA患者的SCA7基因突变[5]。本文3例患者包括2例家族1例散发病例，临床表现典型，即疾病早期出现小脑性共济失调症状，伴有或逐步出现视力下降，视网膜变性，可伴面肌颤搐、眼肌麻痹、慢眼动等，与国内外报道的SCA7患者临床表现相近[11][12]。

随着分子遗传学的发展，SCA多个亚型的基因已被定位[11]，SCA1、2、3、6、7、8、10、12、17、DRPLA基因已被克隆，连锁分析可以确定SCA3、4、5、11、13、14、15、16、18、19、21、22，这使基因诊断、症状前诊断成为可能。在本研究中，SCA3为42%，SCA2为7%，SCA1为5%，SCA6为2%，SCA12为1%，SCA7约为3.7%，未检出SCA8、SCA10、SCA17、DRPLA、Friedreich共济失调(FRDA)患者，与国内其他报道接近[12][13]。

由于SCA各亚型临床表现复杂多样，各型之间症状重叠，单纯依据临床特征难以对其作出诊断及分型。较之其他SCA亚型，SCA7具有自己的特征性表现——小脑性共济失调、视觉障碍、视网膜色素变性，较易鉴别。SCA7在我国有较高的发病频率，需要提醒的是共济失调与视觉损害并非总是平行出现[14]，值得临床诊断时重视。同时SCA7需要与Leber遗传性视神经病以及糖尿病性视网膜变性、老年黄斑变性、多发性硬化等合并共济失调、视力下降等鉴别，考虑散发性SCA7须经分子遗传学诊断确诊。

目前普遍认为，包括SCA7在内的多种三核苷酸疾病如SBMA、HD、SCA1、2、3、17、DRPLA等，由于CAG重复扩增发生在未知功能的蛋白基因内，这种突变使得目的蛋白获得了某种功能，导致含有多聚谷氨酰胺链的蛋白在核内吸引多种成分形成包涵体，而致中枢神经退化和变性。含多聚谷氨酰胺链的突变蛋白在神经元细胞核

内形成包涵体并过度沉积, 曾被认为是致神经元死亡的原因[13]。后者导致多种细胞因子及代谢通路激活, 最终出现细胞凋亡, 神经元变性脱失。免疫组化发现, 核内包涵体中有蛋白水解酶、分子伴侣、半胱氨酸天冬氨酸等多种成分沉积聚集, 因而推测蛋白水解酶通路、凋亡途径均参与了该类疾病的发病机制[15]。但是, 导致CAG三核苷酸重复序列不稳定性和异常扩增的分子机制及多聚谷氨酰胺链的突变蛋白如何影响中枢神经系统并最终致病, 目前尚不清楚。目前我们进行了各亚型SCA患者DNA标本建库、基因诊断与分型等工作, 并且正在对SCA3分子发病机制作系列研究, 这对于产前诊断(包括植入前遗传学诊断)、遗传咨询十分必要, 并可作为以后可能的基因治疗创造必要的条件。

参考文献:

- [1]梁秀龄. 神经病学·神经系统遗传性疾病[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001. 79-108, 337-44.
- [2]李洵桦, 梁秀龄, 刘焯霖. 957例神经系统遗传病临床分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 1994, 11(6): 372.
- Li XH, Liang XL, Liu ZL. Clinical analysis of 957 cases with neuro-genetic diseases [J]. Chin J Med Genet, 1994, 11(6): 372.
- [3]David G, Abbas N, Stevanin GD, et al. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion[J]. Nat Genet, 1997, 17(1): 65-70.
- [4]Harding AE. Clinical features and classification of inherited ataxias[J]. Adv Neurol, 1993, 61(1): 1-14.
- [5]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[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2002, 28(3): 248-51.
- Huang ZH, Xu PY, Liang XL. Study on the gene mutation of spinocerebellar ataxias in Guangdong Hans[J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2002, 2(3)8:248-51.
- [6]Benomar A, Krols L, Stevanin G, et al. The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21.1[J]. Nat Genet, 1995, 10(1): 84-8.
- [7]Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH, et al. Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p[J]. Nat Genet, 1995, 10: 89-93.
- [8]Holmberg M, Johansson J, Forsgren L, et al. Localization of autosomal dominant cerebellar ataxia associated with retinal degeneration and anticipation to chromosome 3p12-p21.1[J]. Hum Mol Genet, 1995, 4(32): 1441-5.
- [9]Monckton DG, Cayuela ML, Gould FK, et al. Very large (CAG)(n) DNA repeat expansions in the sperm of two spinocerebellar ataxia type 7 males[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(5): 473-8.
- [10]Jonasson J, Juvonen V, Sistonen P, et al. Evidence for a common Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) founder mutation in Scandinavia[J]. Eur J Hum Genet, 2000, 8(9): 918-22.
- [11]Enevoldson TP, Sanders MD, Harding AE, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy: a clinical and genetic study of eight families [J]. Brain, 1994, 117(5): 445-60.
- [12]顾卫红, 王国相, 王燕琪, 等. 橄榄-桥脑-小脑萎缩伴视网变性的临床及分子生物学研究[J]. 中华神经科杂志, 2000, 33(2): 93-7.
- Gu WH, Wang GX, Wang YQ, et al. Clinical and molecular biological study on olivopontocerebellar atrophy with retinal degeneration[J]. Chin J Neurol, 2000, 33(2): 93-7.
- [13]Hulmberg M, Duyckaerts C, Cancel G, et al. Spinocerebellar ataxia type 7(SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions[J]. Hum Mol Genet, 1998,

[14]Kim BC, Kim MK, Cho KH, et al. Spinocerebellar ataxia type 7 without retinal degeneration: a case report[J]. J Korean Med Sci, 2002, 17(4): 577-9.

[15]Chai YH, Wu LZ, Griffin JD, et al. The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease[J]. J Bio Chem, 2001, 276: 44889-97.

参考文献:

[1]梁秀龄. 神经病学·神经系统遗传性疾病[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001. 79-108, 337-44.

[2]李洵桦, 梁秀龄, 刘焯霖. 957例神经系统遗传病临床分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 1994, 11(6): 372.

Li XH, Liang XL, Liu ZL. Clinical analysis of 957 cases with neuro-genetic diseases [J]. Chin J Med Genet, 1994, 11(6): 372.

[3]David G, Abbas N, Stevanin GD, et al. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion[J]. Nat Genet, 1997, 17(1): 65-70.

[4]Harding AE. Clinical features and classification of inherited ataxias[J]. Adv Neurol, 1993, 61(1): 1-14.

[5]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[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2002, 28(3): 248-51.

Huang ZH, Xu PY, Liang XL. Study on the gene mutation of spinocerebellar ataxias in Guangdong Hans[J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2002, 2(3)8:248-51.

[6]Benomar A, Krols L, Stevanin G, et al. The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21.1[J]. Nat Genet, 1995, 10(1): 84-8.

[7]Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH, et al. Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p[J]. Nat Genet, 1995, 10: 89-93.

[8]Holmberg M, Johansson J, Forsgern L, et al. Localization of autosomal dominant cerebellar ataxia associated with retinal degeneration and anticipation to chromosome 3p12-p21.1[J]. Hum Mol Genet, 1995, 4(32): 1441-5.

[9]Monckton DG, Cayuela ML, Gould FK, et al. Very large (CAG)(n) DNA repeat expansions in the sperm of two spinocerebellar ataxia type 7 males[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(5): 473-8.

[10]Jonasson J, Juvonen V, Sistonen P, et al. Evidence for a common Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) founder mutation in Scandinavia[J]. Eur J Hum Genet, 2000, 8(9): 918-22.

[11]Enevoldson TP, Sanders MD, Harding AE, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy: a clinical and genetic study of eight families [J]. Brain, 1994, 117(5): 445-60.

[12]顾卫红, 王国相, 王燕琪, 等. 橄榄-桥脑-小脑萎缩伴视网变性的临床及分子生物学研究[J]. 中华神经科杂志, 2000, 33(2): 93-7.

Gu WH, Wang GX, Wang YQ, et al. Clinical and molecular biological study on olivopontocerebellar atrophy with retinal degeneration[J]. Chin J Neurol, 2000, 33(2): 93-7.

[13]Hulmberg M, Duyckaerts C, Cancel G, et al. Spinocerebellar ataxia type 7(SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions[J]. Hum Mol Genet, 1998,

7(10): 913-8.

[14]Kim BC, Kim MK, Cho KH, et al. Spinocerebellar ataxia type 7 without retinal degeneration: a case report[J]. J Korean Med Sci, 2002, 17(4): 577-9.

[15]Chai YH, Wu LZ, Griffin JD, et al. The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease[J]. J Bio Chem, 2001, 276: 44889-97.

[回结果列表](#)