

肌萎缩侧索硬化家系致病基因 *SOD1* 的突变检测

马竞^{1,2} 刘飞² 麦光兴¹ 梁卉¹ 熊礼宽¹ 马端²

(1. 深圳市宝安区妇幼保健院, 广东 深圳 518000; 2. 复旦大学出生缺陷研究中心, 上海 200032)

【摘要】 目的 检测一个香港肌萎缩侧索硬化(ALS)家系的铜、锌超氧化物歧化酶基因(*Cu/Zn superoxide dismutase, SOD1*)的突变位点。**方法** 对先证者 *SOD1* 的 5 个外显子进行 PCR 扩增后进行 sanger 测序。**结果** 在先证者的 *SOD1* 第 5 外显子发现一个已知的致病性错义突变 c. (449 T>C) (p. Ile150Thr)。对家系中其他患者和未发病者进行验证, 发现此突变在该家系中与疾病共分离。**结论** *SOD1* 错义突变 c. (449T>C) (p. Ile150Thr) 是该肌萎缩侧索硬化家系患者发病的原因。

【关键词】 肌萎缩侧索硬化; *SOD1*; 错义突变

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To screen the mutation of copper, zinc superoxide dismutase (*SOD1*) gene in a Hong Kong amyotrophic lateral sclerosis (ALS) family. **Method** All the 5 exons of *SOD1* gene from the proband were amplified by PCR and then sequenced by Sanger's method. **Results** A known pathogenic missense mutation c. (449 T>C) (p. Ile150Thr) in exon 5 of *SOD1* was found in the proband and this mutation was cosegregated with the disease in this pedigree. **Conclusions** The missense mutation (449 T>C) (p. Ile150Thr) of *SOD1* was the cause of the amyotrophic lateral sclerosis in the Hongkong family.

【Key words】 ALS; *SOD1*; missense mutation

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是最常见的运动神经元疾病, 发病率约每年 (1~3)/10 万, 患病率为每年 (4~8)/10 万^[1]。病变主要累及大脑皮质、脑干、脊髓前角等处的运动神经元, 导致运动神经元细胞死亡。临床上以上、下运动神经系统受累为主要表现, 包括肌肉无力、肌肉萎缩、肌束震颤及肌张力增高、腱反射亢进等, 一般无感觉异常及大小便障碍。80%~90% 的患者于发病后 3~5 年死亡, 其病因与发病机制尚不明确^[2]。

ALS 可分为家族性肌萎缩侧索硬化症和散发性肌萎缩侧索硬化症。家族性 ALS (FALS) 主要有 12 个亚型: ALS1-ALS8、合并 ALS 的额颞叶痴呆综合征、X 性连锁遗传的 ALS、关岛型 ALS-Parkinson-痴呆综合征、进行性下运动神经元疾病等。按照遗传方式, FALS 可分为常染色体显性遗传 (AD)

和常染色体隐性遗传 (AR), 前者占绝大多数, 后者罕见。按照起病年龄可分为两种: 成年型 FALS 和青少年型 FALS, 二者以 25 岁为界线。成年型 FALS 有很多种类, 其中以 ALS1 最常见, 呈 AD 遗传, 致病基因为铜/锌超氧化物歧化酶 1 基因 (*Cu/Zn superoxide dismutase, SOD1*)^[3]。

目前在 FALS 患者中发现了 100 余种 *SOD1* 的致病性突变, 大多数为错义突变, 第 1 外显子中第 4 个密码子由丙氨酸 (Ala) 突变为缬氨酸 (Val) 为最常见的突变, 约占所有突变的 40%~50%^[4]。尚无资料显示临床表型的严重程度、进展以及病程长短与突变类型之间有相关性。

本研究针对一个香港 ALS 家系进行系统的临床观察和 *SOD1* 测序, 以期确定 *SOD1* 某种突变类型与临床表现之间的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2012 年在深圳宝安区安妇幼保健院收集到 1 个香港 ALS 家系,家系图见图 1。所有患者均由两个副教授以上职称的神经科医生收集病史

并查体。每个患者均做肌电图、颈椎磁共振和常规生化检查。全部病例均按照国际诊断标准进行诊断。家系中所有收集到的患者和正常人均签署了知情同意书。该研究经深圳宝安区妇幼保健院医学伦理委员会批准。

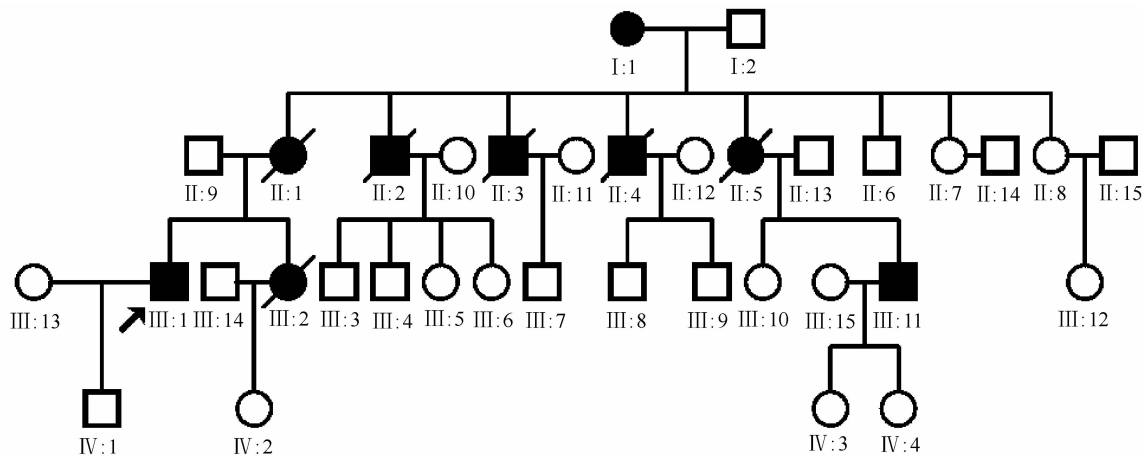


图 1 ALS-HK 家系图

■:男性发病;●:女性发病;□:男性未发病;○:女性未发病/死亡;箭头所示为先证者

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 的提取 采集外周静脉血 2 ml,2% EDTA 1:9抗凝后-80℃分装保存。取 200 μl 血样,用 QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Germany)试剂盒进行 DNA 抽提,双蒸水洗脱。应用 Primer3 软件设计 SOD1 5 个外显子的引物,引物序列见表 1,包含全外显子部分及其侧翼 100 bp 序列碱基。

表 1 SOD1 5 个外显子引物序列

Exon	Primer Sequence length (bp)	
1F: 5'-GAGACGGGGTGCTGGTFTTGC-3';	174 bp	
1R: 5'-GCCCTTGCCTTCTGCTCGAA-3'		
2F: 5'-CAGCTGTTTTCTTTGTTTCAG-3';	168 bp	
2R: 5'-CACCTGCTGTATTATCTCCAA-3'		
3F: 5'-TATAAATAGGCTGTACCACTGC-3';	227 bp	
3R: 5'-TGGGAGCAGGGTTTCACATGAG-3'		
4F: 5'-GGCATGTGFGAGACTTGGGCA-3';	213 bp	
4R: 5'-TGGATCTTTAGAATTGCGAC-3'		
5F: 5'-GTAGTGATTACTTGACAGCCCA-3';	200 bp	
5R: 5'-AACAGATGAGTTAAGGGCCT-3'		

1.2.2 PCR 扩增 反应体积为 25 μl,含 25 ng 的模板 DNA, dNTP 各 200 μmol/L, 2.5 mmol/L

MgCl₂,正向反向引物各 0.5 μmol/L。Touch-down PCR 条件:95℃预变性 3 分钟;95℃变性 30 秒,68℃复性 30 秒,72℃延伸 1 分钟,2 个循环;95℃变性 30 秒,66℃复性 30 秒,72℃延伸 1 分钟,2 个循环;95℃变性 30 秒,64℃复性 30 秒,72℃延伸 1 分钟,2 个循环;95℃变性 30 秒,62℃复性 30 秒,72℃延伸 1 分钟,2 个循环;95℃变性 30 秒,60℃复性 30 秒,72℃延伸 1 分钟,2 个循环;95℃变性 30 秒,58℃复性 30 秒,72℃延伸 1 分钟,2 个循环;95℃变性 30 秒,56℃复性 30 秒,72℃延伸 1 分钟,2 个循环;95℃变性 30 秒,55℃复性 30 秒,72℃延伸 1 分钟,28 个循环;72℃充分延伸 10 分钟;4℃保存。

1.2.3 Sanger 法测序 SAP 酶纯化后,用 ABI 3730XL 测序,Mutation Surveyor V4.0.5 (Softgenetics, USA)查看测序结果。

2 结果

2.1 患者临床表现 III:1:先证者,43 岁,2011 年 5 月发病,主诉肌束震颤、手麻痹、四肢无力,夜间脚

和小腿抽筋,难以入睡,腰痛。病情呈进行性加重。2012年10月来本院就诊。根据临床表现,通过神经电生理检查和影像学等辅助检查,最终诊断为肌萎缩侧索硬化症。

2.2 遗传分析 由家系图分析,3代中均有患者,疾病连续传递,推测为常染色体显性遗传(图1)。对家系中的先证者Ⅲ:1进行SOD1所有编码区进行测序,发现cDNA的第449位T突变为C(GeneBank No.:NM_000454.4),导致SOD1蛋白第150位异亮氨酸密码子ATT变为苏氨酸密码子ACT(图2)。进一步的测序表明该家系的所有患者都具有Ile150Thr突变,而家系中其他正常成员皆未发现这一SOD1突变。提示这一错义突变是引起本家系成员患有肌萎缩侧索硬化症的原因所在。HGMD数据库显示,1995年Pramatarova等发现该突变位点是引起肌萎缩侧索硬化症的致病位点^[5]。

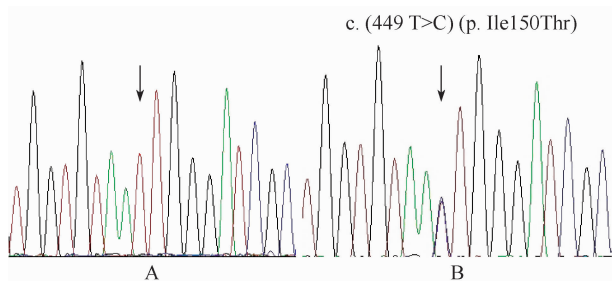


图2 SOD1测序图

A:家系中正常人SOD1测序图;B:家系中先证者Ⅲ:1SOD1基因的测序图

3 讨论

SOD1基因位于21q22,长11Kb,含5个外显子,编码的铜/锌超氧化物歧化酶1(SOD1)含153个氨基酸,大小为32KD。SOD1属于金属酶,包含两个方向相反的亚基,每个亚基均含有一个 Cu^{2+} 和一个 Zn^{2+} ^[6]。SOD1是SOD家族中最重要的一种抗氧化酶,其基本功能是维持细胞内活性氧内稳态的平衡,以达到解毒的目的。最初认为SOD1突变体导致ALS的原因可能与酶失活有关,然而大量研究表明,SOD1突变体导致ALS的原因是突变产生的获得性毒性新功能,机制尚不清楚^[7]。

中国人群也广泛存在SOD1基因突变。2006年,Fong GC等^[7]在一个香港家系发现了SOD1基

因突变p. Ile150Thr,此错义突变影响了SOD1的亚基与铜离子的结合部位,从而导致了酶功能发生改变。2012年,Jinyu Wu等^[3]在一个中国北方家系发现了SOD1基因突变p. Cys146X,该突变造成SOD1发生截短突变,使重要的功能结构域丢失,导致蛋白质功能异常,从而影响了清除自由基的能力。

HGMD数据库最新数据显示,迄今共发现SOD1基因致病突变180种,与家族性ALS发病有关的突变150种,其中包括错义和无义突变126种,剪接位点突变6种,缺失突变14种,插入突变4种,多集中在欧美国家,在亚洲人群鲜有报道^[8]。尽管SOD1几乎表达于所有组织,但突变后的临床表现仅累及运动神经元,且大多为成年起病。不同的SOD1突变导致的ALS临床表型上也有差别,包括外显率、红细胞SOD1活性、起病年龄、生存期、组织病理学等。不同的SOD1突变对ALS病程也有影响,如A4V突变平均病程为1~2年,E100G突变为4.7年,而H46R和G37R为18~20年^[9]。家族遗传性ALS约占所有ALS的20%,家系成员多在40~50岁起病,发病后2~5年死亡。

我们对收集到的一个香港ALS家系进行了SOD1基因所有5个外显子测序,结果发现先证者及家系中所有患者均存在SOD1第5外显子一个错义突变c. (449 T>C) (p. Ile150Thr),该突变在家系中与疾病共分离,因此可以判断此错义突变是该ALS家系的致病突变。

尽管p. Ile150Thr突变之前已经被报道过,但每一个ALS家系SOD1致病位点的确认,都会丰富SOD1的基因突变谱,从而为ALS的基因诊断提供更多数据。

参考文献

- [1] Zou ZY, Peng Y, Feng XH, et al. Screening of the FUS gene in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients of Chinese origin[J]. Eur J Neurol, 2012, 19: 977-983.
- [2] Bunton-Stasyshyn RK, Saccon RA, Fratta P, et al. SOD1 function and its implications for amyotrophic lateral sclerosis pathology: new and resurgent themes[J]. Neuroscientist, 2015, 21: 519-529.

(下转第34页)

$\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$)。在此,我们同时要强调在进行地中海贫血基因诊断时,一定不能忽略地中海贫血的筛查。

我们通过对这3个家系的总结,丰富了罕见缺失型 α 地中海贫血的资料。泰国缺失型 α 地中海贫血的准确检测对于遗传咨询和产前基因诊断具有重要的意义。

参考文献

- [1] So CC, So AC, Chan AY, et al. Detection and characterization of beta-globin gene cluster deletions in Chinese using multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. J Clin Pathol, 2009, 62(12): 1107-1111.
- [2] 陈碧艳. 3例罕见地中海贫血家系分子诊断和产前诊断[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(4): 452-456.
- [3] 阙婷, 张强, 唐燕青, 等. 广西地区泰国缺失型 α 地中海贫血的调查研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(13): 1703-1706.
- [4] 唐燕青, 何升, 张强, 等. 泰国缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血临床血液学表型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(22): 2965-2966.
- [5] 玉晋武, 李东明, 韦媛, 等. 血红蛋白H病筛查与基因型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(8): 24-25.
- [6] 黄海龙, 林娜, 徐两蒲, 等. 产前诊断泰国缺失型 α 地中海贫血引起的胎儿巴氏水肿[J]. 中华妇产科杂志, 2010, 45(4): 533.
- [7] Yang Y, Li DZ. Early onset of fetal hydrops associated with the α -thalassemia-(THAI) deletion [J]. Hemoglobin, 2014; 38(6): 431-434.
- [8] 尹爱华, 张畅斌, 梁驹卿, 等. 应用复合荧光标记 STR-PCR 排除绒毛取材中母体细胞污染[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2007, 28(S3): 203-205.
- [9] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 2011: 88-92.
- [10] Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia[J]. Orphanet J Rare Dis, 2010, 5: 13.

(收稿日期: 2015-08-11)

编辑: 宋文颖

(上接第30页)

- [3] Wu J, Shen E, Shi D, et al. Identification of anovelCys146XmutationofSOD1infamilialamyotrophic lateral sclerosis by whole-exome sequencing[J]. Genet Med, 2012, 14: 823-826.
- [4] Ajroud-Driss S, Siddique T. Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS)[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852: 679-684.
- [5] Pramatarova A, Figlewicz DA, Krizus A, et al. Identification of new mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. Am J Hum Genet, 1995, 56: 592-596.
- [6] Heiman-Patterson TD, Blankenhorn EP, Sher RB, et al. Genetic background effects on disease onset and lifespan of the mutant dynactin p150Glued mouse model of motor neuron disease[J]. PLoS One, 2015, 10: e0117848.
- [7] Fong GC, Kwok KH, Song YQ, et al. Clinical phenotypes of a large Chinese multigenerational kindred with autosomal dominant familial ALS due to Ile149Thr SOD1 gene mutation[J]. Amyotroph Lateral Scler, 2006, 7: 142-149.
- [8] Vehviläinen P, Koistinaho J, Gundars G. Mechanisms of mutant SOD1 induced mitochondrial toxicity in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 126.
- [9] Su XW, Broach JR, Connor JR, et al. Genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical practice and research[J]. Muscle Nerve, 2014, 49: 786-803.

(收稿日期: 2015-09-30)

编辑: 宋文颖