

# 齿状核红核苍白球路易体萎缩一例： 临床表型与基因突变分析

郝莹 顾卫红 王国相 王康 金森 段晓慧 杨斯柳

**【摘要】** 目的 报告 1 例齿状核红核苍白球路易体萎缩(DRPLA)患者的临床特征和基因突变特点。方法 采用聚合酶链反应对 388 例脊髓小脑共济失调患者(234 例常染色体显性遗传家系先证者和 154 例散发病例)进行初步筛查,对琼脂糖凝胶电泳中出现 2 条电泳条带的样品应用荧光标记毛细管电泳基因片段分析方法进行脊髓小脑共济失调致病基因三核苷酸(CAG)重复序列突变检测并精确计数,最后经 pUC18-T 载体克隆测序验证重复次数达异常范围的样本。结果 仅发现 1 例表现为轻度脊髓小脑共济失调和可疑癫痫发作的女性患者具有 DRPLA 基因 CAG 重复扩展突变。基因片段分析 2 个等位基因的 CAG 重复次数分别为 14 和 54 次,克隆测序重复次数为 15 和 58 次。其家系另 2 例成员均有癫痫发作史,但无明显共济失调表现。19 例无异常扩展样本基因片段分析显示 CAG 重复次数为 7~20 次,其中 9 次重复最为常见。结论 DRPLA 可能存在临床变异。388 例脊髓小脑共济失调患者中仅发现 1 例 DRPLA,说明该病在中国共济失调患者中相对罕见。在重复突变检测过程中,由于高度重复序列可产生局部二级结构,在复制过程中可能会出现 DNA 聚合酶的滑动,从而导致扩增产物的不忠实,这一问题在基因片段分析和克隆测序中均存在,且后者在操作过程中还可能出现克隆过程的不稳定,因此基于这两种方法的结果需要相互验证。

**【关键词】** 基因; 三核苷酸重复; 突变; 脊髓小脑共济失调

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2010.06.012

**Clinical and genetic study of one DRPLA case** HAO Ying, GU Wei-hong, WANG Guo-xiang, WANG Kang, JIN Miao, DUAN Xiao-hui, YANG Si-liu. Movement Disorder & Neurogenetics Research Center, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Corresponding author: GU Wei-hong (Email: jane55.gu@vip.sina.com)

**【Abstract】 Objective** To investigate the clinical and genetic features of dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). **Methods** The trinucleotide repeats of spinocerebellar ataxia (SCA) disease genes were detected by polymerase chain reaction (PCR) initially in 388 SCA cases which included 234 cases with autosomal dominant inheritance and 154 sporadic cases. Fragment analysis with laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis was performed for the samples with 2 bands detected by agarose gel electrophoresis (AGE). The repeat numbers of the positive or suspicious samples were verified by the pUC18-T vector cloning and sequencing. **Results** Based on the 2 methods, the cytosine-adenine-guanine (CAG) repeat expansion of DRPLA gene was detected in one female case with mild ataxia and suspected seizure. The repeat numbers of the 2 alleles were 14 and 54 by fragment analysis, and 15 and 58 by cloning sequencing. The 2 members of her family had a history of seizure, but no obvious ataxia. The CAG repeat numbers of the other 19 cases without abnormal expansions ranged from 7 to 20, of which 9 was common. **Conclusion** The patient's atypical manifestations suggests that clinical variation may exist in DRPLA. Only one case of DRPLA is found in 388 SCA cases, indicating that DRPLA may be a relatively rare subtype of SCA in Chinese population. The secondary structure of DNA owing to the highly repetitive sequences will induce DNA polymerase sliding during the amplification, which will reduce the fidelity in DNA replication. This problem exists in both fragment analysis and cloning sequencing. For the latter method, the instability also appears in the process of cloning. Therefore, the repeat numbers need to be mutually verified by the 2 methods.

**【Key words】** Genes; Trinucleotide repeats; Mutation; Spinocerebellar ataxias

基金项目:卫生部临床学科重点项目

作者单位:100029 北京,卫生部中日友好医院运动障碍与神经遗传病研究中心

通信作者:顾卫红(Email:jane55.gu@vip.sina.com)

齿状核红核苍白球路易体萎缩(DRPLA)为常染色体显性遗传性神经系统变性疾病,是遗传性脊髓小脑共济失调(SCA)的一种亚型。临床表现为不同程度的共济失调、智力衰退、语言障碍、癫痫发作和自主运动(包括舞蹈样动作、震颤和肌阵挛等),因其病理表现为齿状核红核苍白球路易小体变性萎缩而得名<sup>[1]</sup>。DRPLA 基因定位于 12p13.31, 编码 atrophin-1 蛋白(ATN1 基因),其第 5 号外显子内存在一胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)重复序列, Koide 等<sup>[2]</sup>于 1994 年首次发现 DRPLA 患者存在 CAG 三核苷酸重复序列(TRS);后经研究证实,其正常重复序列范围为 3~36 次<sup>[3]</sup>,异常重复序列范围为 48~93 次<sup>[4,5]</sup>。迄今报道的 DRPLA 家系绝大部分来自日本,2004 年 Shimizu 等<sup>[6]</sup>报告日本长野地区常染色体显性遗传性共济失调患病率约 22/10 万,在 86 个家系中以动态基因突变引起的脊髓小脑共济失调患病率最高,约占 36%,其次为 DRPLA,约占 10%;在其他种族如高加索人和非洲人中仅有少数报道<sup>[7]</sup>,在中国共济失调患者中亦相对罕见<sup>[8,9]</sup>。在本研究中,我们对 388 例无血缘关系、临床拟诊为脊髓小脑共济失调的患者进行脊髓小脑共济失调致病基因的三核苷酸重复序列突变检测,仅发现 1 例 DRPLA 基因突变患者,现对其临床特征和基因突变特点进行分析。

## 临床资料

### 一、研究对象

研究对象为 2005-2009 年卫生部中日友好医院运动障碍与神经遗传病研究中心收集的 388 例临床拟诊为脊髓小脑共济失调病例,其中包括 234 例常染色体显性遗传家系先证者和 154 例散发病例,男 236 例,女 152 例;年龄 2~70 岁,平均 35.20 岁。所有受试者均知情同意。

### 二、研究方法

1. 样本采集 空腹采集外周血标本 5 ml,标准酚氯仿 DNA 提取法提取基因组 DNA。

2. 聚合酶链反应和琼脂糖凝胶电泳 根据 DRPLA 基因第 5 号外显子 CAG 重复片段两侧的序列,由北京赛百盛基因技术有限公司设计引物序列,正向引物(F 引物)序列:5'-CACCAGTCTCAACACATCACCATC-3';反向引物(R 引物)序列:5'-CCTCCAGTGGGTGGGAAATGCTC-3'。聚合酶链反应(PCR)体系共 25  $\mu$ l,依次加入

dNTPs 2.50 mmol, 2  $\times$  GC Buffer I 12.50  $\mu$ l,正、反向引物各 5 pmol,模板 DNA 100 ng, r-Taq 1 U,加水补充至 25  $\mu$ l;反应条件为 96  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 96  $^{\circ}$ C 1 min, 62  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min,共循环 30 次,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物采用质量分数为 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,150 V 电压电泳 20 min。

3. 基于毛细管电泳的基因片段分析 对上述电泳中出现 2 条电泳条带的样品进一步行毛细管电泳。采用荧光标记 M13 加尾引物法进行 PCR 检测,引物序列包括 F-M13 引物(正向引物 5'端加 M13 序列,该序列为 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-正向引物序列-3'),经 D4 荧光标记的 M13 引物序列为 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成,以及上述反向引物(R 引物)序列。PCR 反应体系共 25  $\mu$ l,该体系中依次加入 dNTPs 2.50 mmol, 2  $\times$  GC Buffer I 12.50  $\mu$ l, Primer-R 5 pmol, Primer-M13 2 pmol, Primer-F-M13 1.50 pmol,模板 DNA 100 ng, r-Taq 1 U,加水补充至 25  $\mu$ l。采用 CEQ-8000 核酸分析仪对 PCR 扩增产物进行片段分析:取 20  $\mu$ l 甲酰胺,0.25  $\mu$ l CEQ DNA Size Standard Kit-600 片段标准内标,1  $\mu$ l DRPLA-PCR 扩增产物混匀后上样。通过预设的程序进行电泳分离,分离条件为毛细管温度达 50  $^{\circ}$ C 时,90  $^{\circ}$ C 变性 120 s,于 2 kV 电压下注入样本 30 s,然后于 4.80 kV 电压下电泳 70 min,采用预设的分析参数进行基因片段分析。

4. 克隆测序 切胶回收阳性样品长片段和短片段,由宝生物工程(大连)有限公司对 pUC18-T 载体分别进行克隆测序。

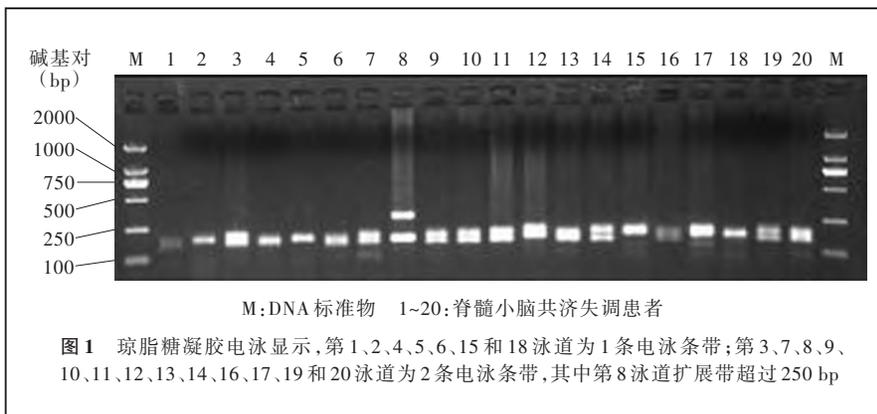
## 结 果

### 一、基因片段分析和克隆测序结果

1. 琼脂糖凝胶电泳 对 388 例患者进行 DRPLA 基因 CAG 重复突变检测,共发现 13 例样本出现 2 条电泳条带,其中 1 例扩展带超过 250 bp(图 1)。

2. 基因片段分析 上述基因片段分析结果显示,扩展带超过 250 bp 的样本 2 个等位基因 CAG 重复次数分别为 14 和 54 次(图 2)。另外 19 例无异常扩展样本的基因片段分析,CAG 重复次数 7~20 次,其中 9 次重复较为常见。

3. 克隆测序 对扩展带超过 250 bp 的样本进行克隆测序,其结果显示,CAG 重复次数分别为 15 和 58 次(图 3)。



## 二、临床特征

患者为女性,48 岁,汉族,祖籍山西省。主因骑车不稳 10 年,行走不稳 4 年,加重 3 年,梦中偶有肢体不自主运动,于 2008 年 11 月至卫生部中日友好医院运动障碍与神经遗传病专病门诊就诊。患者于 1998 年开始出现骑车时易摔倒现象,2004 年曾出现一次“虚脱”,自觉全身血液上涌,双手呈“助产士”样痉挛,2 h 后自然好转,当地医院诊断为“心肌缺血”。2006 年出现走路摇晃并逐渐加重、字迹改变现象,2008 年 5 月在上班途中滑倒,磕掉门牙。我院门诊神经系统检查显示:理解力、计算力、定向力基本正常,轻度构音障碍,眼球运动充分、平滑跟踪分裂,头部不自主轻微晃动,肌力正常、肌张力明显减低,腱反射活跃,病理征可疑;步基宽,指鼻试验不稳,跟-膝-胫试验欠稳准,快速轮替动作笨拙。头部 MRI 检查显示脑桥、小脑轻度萎缩(图 4)。蒙特利尔认知评价量表(MoCA)评分为 22 分。家系谱调查可追溯 4 代共 18 例(图 5),据先证者描述 III<sub>6</sub>和 IV<sub>2</sub>均有癫痫发作史,但无明显共济失调表现,其中, III<sub>6</sub>现年 51 岁,于 13 岁时癫痫发作一次; IV<sub>2</sub>现年 18 岁,分别于 4 岁和 6 岁时癫痫发作。

## 讨 论

DRPLA 作为一种常染色体显性遗传性共济失调症,具有特殊的临床表型,除了共济失调之外,大多数患者还表现有舞蹈手足徐动、肌阵挛癫痫和智力衰退,而且发病年龄较晚。1994 年, Koide 等<sup>[2]</sup>克隆了该病致病基因,定位于 12p13.31,跨越约 20 kb,由 10 个外显子和 9 个内含子所组成,编码中枢神经系统广泛表达的蛋白 atrophin-1。在其第 5 号外显子内存在一段 CAG 重复序列,编码多聚谷氨酰胺,在群体中存在多态性,异常扩展后致病。目前已发

现,有 9 种神经系统遗传性疾病属于多聚谷氨酰胺疾病,均可见异常蛋白质在神经元内聚集,这种异常扩展的多聚谷氨酰胺链使编码蛋白产生毒性而致病<sup>[10,11]</sup>,但具体发病机制尚未阐明,可能与蛋白质翻译后加工<sup>[12,13]</sup>、蛋白质折叠<sup>[14]</sup>、泛素蛋白酶系统<sup>[15]</sup>、Caspases 裂解<sup>[16]</sup>或蛋白-蛋白之间的相互作用<sup>[17]</sup>

等有关。自 2005 年至今,我们共检测了 388 例无血缘关系、临床拟诊为脊髓小脑共济失调患者,仅发现 1 例为 DRPLA 基因突变,提示 DRPLA 在中国大陆人群中的发病率极低。

本组检出的阳性患者于 38 岁发病,临床表现为轻度共济失调,仅有一次可疑为癫痫发作,经反复询问病史及细致的神经系统检查并未发现手足舞蹈徐动和明显的智力减退症状与体征。神经影像学检查显示小脑轻度萎缩,可疑齿状核萎缩。家系中 III<sub>6</sub>和 IV<sub>2</sub>曾出现过癫痫发作但无共济失调,由于该家系均居住在边远地区且不愿就诊,因此无法检测 DRPLA 基因,是否在同一家系中存在临床变异尚有待确认。国外曾有文献报道 DRPLA 的临床变异型,据 Burke 等<sup>[18]</sup>报告, Haw River 综合征(HRS)患者具有 ATN1 基因 CAG 重复扩展突变。Saitoh 等<sup>[19]</sup>报告一 DRPLA 家系存在家系内临床变异。在脊髓小脑共济失调系列中,其他类型也存在临床变异,以脊髓小脑共济失调 3 型(SCA3)最为明显<sup>[20]</sup>。

本研究采用荧光标记的毛细管电泳方法,对琼脂糖凝胶电泳显示为 2 条电泳条带的 13 例样本和另 7 例为 1 条电泳条带的样本进行基因片段分析,结果显示,39 例正常等位基因 CAG 重复次数为 7~20 次,其中 9 次重复较为常见。对本组 DRPLA 基因突变患者的基因片段进行分析表明,CAG 重复次数分别为 14 和 54 次,克隆测序重复次数为 15 和 58 次。基于我们既往在三核苷酸重复序列突变检测中所做的大量基因片段分析,以及部分克隆测序结果,提示克隆测序所获得的重复次数较基因片段分析多 5 次左右。但由于这两种方法均基于聚合酶链反应,模板中所包含的大量重复序列可导致 DNA 聚合酶的滑动,从而出现扩增产物的不忠实。而克隆测序过程涉及到的质粒在大肠杆菌中扩增,高度

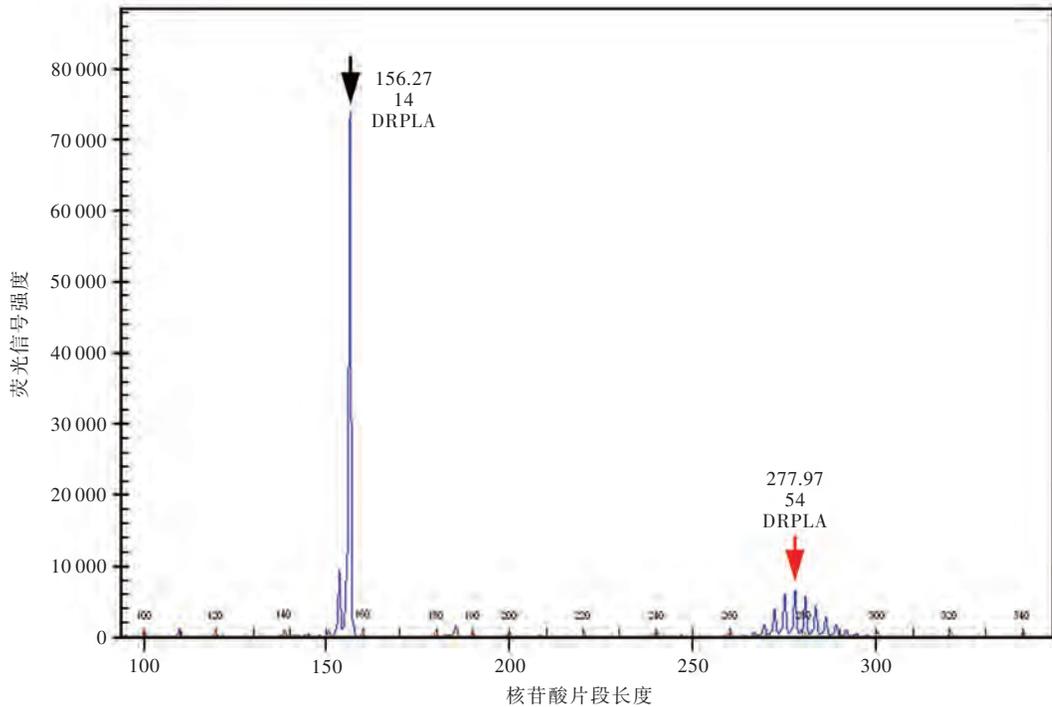


图 2 扩展带超过 250 bp 样本的基因片段分析显示,短片段(CAG)重复次数为 14 次(黑箭头所示),长片段(CAG)重复次数为 54 次(红箭头所示)

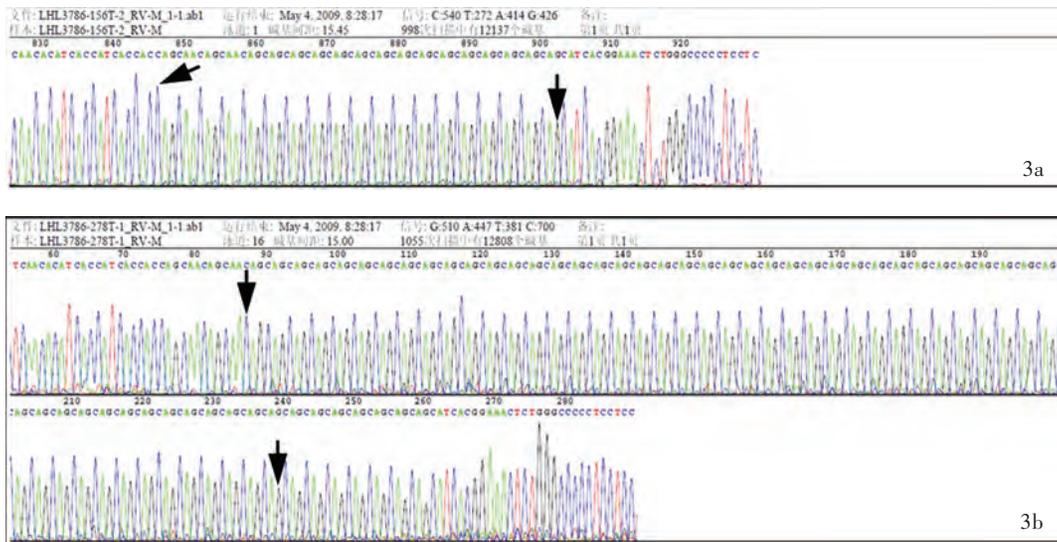


图 3 扩展带超过 250 bp 的样本克隆测序结果所见(两个箭头之间即为重复序列) 3a 正常片段(CAG)重复序列(第 859~903 位),重复次数为 15 次 3b 扩展片段(CAG)重复序列(第 88~261 位),重复次数为 58 次

重复序列属于真核生物基因组的特征,这种序列在原核生物中克隆会出现不稳定现象<sup>[21]</sup>。因此,基因片段分析或克隆测序的结果很难确认哪一种更接近真实情况,需相互验证。

综上所述,本研究采用基因片段分析结合克隆测序发现 1 例 DRPLA 基因突变患者,对其临床表现

和神经影像学特征,以及家系特点进行了细致地分析,结果显示,患者表现为轻度共济失调,但无认知功能障碍、癫痫发作和不自主运动,表明其并不具备典型的 DRPLA 表型特征。由此提示:神经内科医师对于具有共济失调表现的患者应考虑到 DRPLA 的可能性,需进行相应的基因检测,以免漏诊。

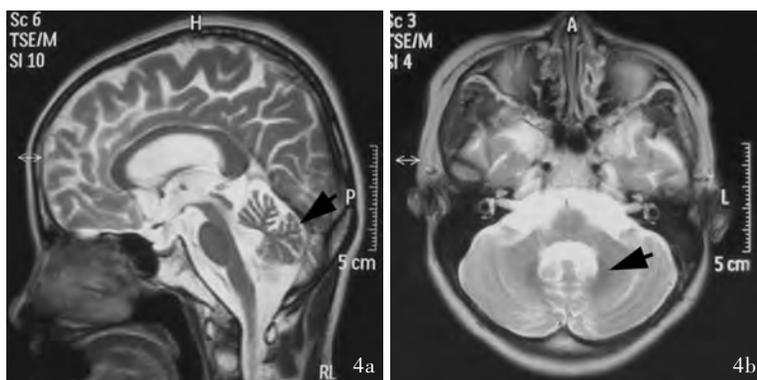


图 4 头部 MRI 检查所见 4a 矢状位 T<sub>2</sub>WI 显示轻度小脑萎缩(箭头所示) 4b 横断面 T<sub>2</sub>WI 显示双侧可疑齿状核萎缩(箭头所示)

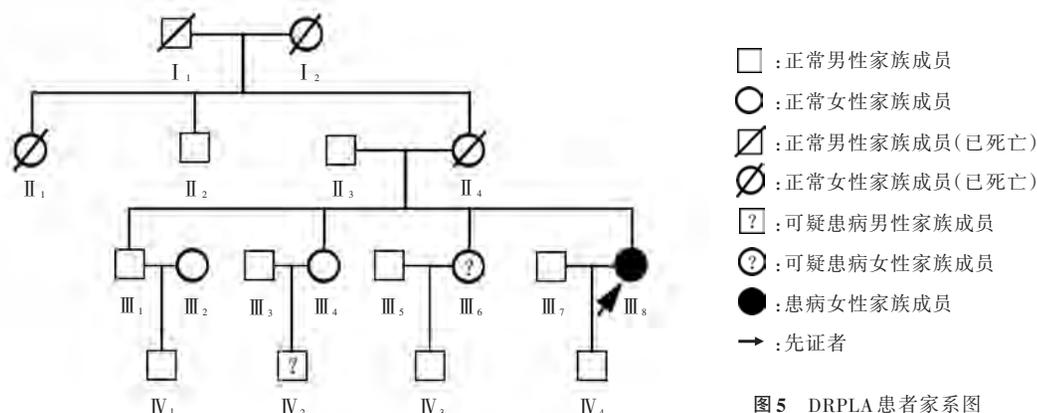


图 5 DRPLA 患者家系图

参 考 文 献

[1] Tsuji S. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy: clinical aspects and molecular genetics. *Adv Neurol*, 2002, 89:231-239.

[2] Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, et al. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet*, 1994, 6:9-13.

[3] Schöls L, Bauer P, Schmidt T, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*, 2004, 3:291-304.

[4] Alford RL, Margolis RL, Ross CA, et al. Southern analysis for detection of CAG repeat expansions associated with dentatorubral pallidoluysian atrophy. *Hum Genet*, 1997, 99:354-356.

[5] Shimojo Y, Osawa Y, Fukumizu M, et al. Severe infantile dentatorubral pallidoluysian atrophy with extreme expansion of CAG repeats. *Neurology*, 2001, 56:277-278.

[6] Shimizu Y, Yoshida K, Okano T, et al. Regional features of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Nagano: clinical and molecular genetic analysis of 86 families. *J Hum Genet*, 2004, 49: 610-616.

[7] Vinton A, Fahey MC, O'Brien TJ, et al. Dentatorubral - pallidoluysian atrophy in three generations, with clinical courses from nearly asymptomatic elderly to severe juvenile, in an Australian family of Macedonian descent. *Am J Med Genet A*, 2005, 136:201-204.

[8] 宋兴旺, 唐北沙, 江泓, 等. 中国大陆南方汉族正常人群齿状核红核苍白球路易体萎缩基因三核苷酸重复变异研究. *中华神经医学杂志*, 2006, 5:915-917.

[9] 张爱娟, 杨利丽, 钟池, 等. 齿状核红核苍白球丘脑下部萎缩一家系临床与基因特征. *中华神经科杂志*, 2007, 40:479-481.

[10] Lin X, Cummings CJ, Zoghbi HY. Expanding our understanding

of polyglutamine diseases through mouse models. *Neuron*, 1999, 24: 499-502.

[11] Zoghbi HY, Orr HT. Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation. *Curr Opin Neurobiol*, 1999, 9:566-570.

[12] Warby SC, Chan EY, Metzler M, et al. Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo. *Hum Mol Genet*, 2005, 14:1569-1577.

[13] Isogai S, Shirakawa M. Protein modification by SUMO. *Seikagaku*, 2007, 79:1120-1130.

[14] Ross CA, Ross CA, Poirier MA, et al. Opinion: what is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6:891-899.

[15] Finkbeiner S, Mitra S. The ubiquitin - proteasome pathway in Huntington's disease. *Scientific World Journal*, 2008, 8:421-433.

[16] Berke SJ, Schmied FA, Brunt ER, et al. Caspase - mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin - 3. *J Neurochem*, 2004, 89:908-918.

[17] Riley BE, Orr HT. Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev*, 2006, 20:2183-2192.

[18] Burke JR, Wingfield MS, Lewis KE, et al. The Haw River syndrome: dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) in an African-American family. *Nat Genet*, 1994, 7:521-524.

[19] Saitoh S, Momoi MY, Yamagata T, et al. Clinical and electroencephalographic findings in juvenile type DRPLA. *Pediatr Neurol*, 1998, 18:265-268.

[20] 顾卫红, 王国相, 王康, 等. 脊髓小脑共济失调 3 型临床变异型特征及突变分析. *中国现代神经疾病杂志*, 2008, 8:134-138.

[21] Strachan T, Read AP. *Human molecular genetics*. 3rd ed. New York: Garland Science, 2004: 142-143.

(收稿日期:2010-08-31)