

• 临床检验研究论著 •

难治性颞叶癫痫患者钠离子通道 SCN1A 基因突变分析

王志红,郭小艳,周春燕,兰风华
(南京军区福州总医院实验科,福建福州 350025)

摘要:目的 对难治性颞叶癫痫(TLE)患者钠离子通道 SCN1A 基因进行序列分析,查找突变位点。方法 采用聚合酶链反应及测序技术对 10 例难治性 TLE 患者和 50 例健康者进行 SCN1A 基因 26 个外显子和部分侧翼内含子序列分析。结果 1 例患者 SCN1A 基因外显子 10 检出 1 个同义突变 c.1410 T>C。在所有标本中另检出 4 个碱基突变,即 c.1212 A>G、c.965-21 C>T、c.1028+21 T>C 和 c.1377+52 G>A。结论 经查阅国内外相关文献及 SCN1A 突变数据库,c.1410 T>C 为新发现的突变,其他 4 个碱基突变为多态性。

关键词:癫痫,颞叶; 难治性癫痫; SCN1A 基因; 基因突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.015 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2013)01-0036-02

Mutation analysis of SCN1A gene in patients with intractable temporal lobe epilepsy
Wang Zhihong,Guo Xiaoyan,Zhou Chunyan,Lan Fenghua
(Department of Experimental Medicine,Fuzhou General Hospital,
Nanjing Military Area Command,Fuzhou,Fujian 350025,China)

Abstract:**Objective** To identify the SCN1A gene mutation in patients with intractable temporal lobe epilepsy(TLE). **Methods** Ten patients with intractable TLE and 50 healthy subjects were enrolled and detected for SCN1A mutation among twenty-six exons and the flank introns by polymerase chain reaction and sequencing. **Results** A synonymous mutation(c.1410 T>C) was identified in one patient,and four variants,including c.1212 A>G,c.965-21 C>T,c.1028+21 T>C and c.1377+52 G>A,were identified in all enrolled subjects. **Conclusion** According to the SCN1A variant database,c.1410 T>C might be a novel synonymous mutation,and other four variants could be polymorphisms.

Key words:epilepsy,temporal lobe; intractable epilepsy; SCN1A gene; gene mutation

癫痫是一种离子通道病,其发病与多基因联合作用有关。编码电压门控钠离子通道 $\alpha 1$ 亚基的 SCN1A 基因突变可改变钠离子通道的电生理功能,参与癫痫的发生,同时可能降低以钠离子通道为靶点的抗癫痫药物的敏感性,导致难治性癫痫。颞叶癫痫(TLE)是成年期难治性癫痫的主要类型,患者对各类经典的抗癫痫药物反应欠佳,需行颞叶切除术以控制频繁的发作。笔者对难治性 TLE 患者及健康者进行了 SCN1A 基因突变分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 5~11 月于本院确诊的难治性 TLE

患者 10 例,女 6 例、男 4 例,年龄 10~43 岁,病程 4~40 年,临床表现及脑电图检查结果均符合难治性 TLE 诊断标准。随机选择同期体检健康者 50 例,均无惊厥及癫痫家族史。

1.2 方法 采用碘化钾法提取受试对象外周血白细胞基因组 DNA。参照文献[1]并稍作修改设计 SCN1A 基因 26 个外显子的扩增引物(见表 1),由上海生工公司合成。聚合酶链反应(PCR)条件为 94℃ 4 min,94℃ 30 s、56~62℃ 30 s、72℃ 45 s 循环 35 次,72℃ 5 min。PCR 产物纯化后送上海生工公司进行测序分析。将测序结果与 GenBank 中 SCN1A 全基因组序列进行比对。

表 1 PCR 引物和扩增参数

外显子	引物	引物序列(5'→3')	产物片段大小(bp)	退火温度(℃)
1	E1-F	ATGTGTTGGTGCTACAACAGTCC	493	62
	E1-R	AAAACAGACTTTAAATCCTCTAGC		
2	E2-F	ATTTGATATTTAGCTATAAAGTGC	256	58
	E2-R	AGTAGATAACAGAGTTTAAGTGG		
3	E3-F	TTGCTGCGTAATTTTGCTAGG	302	60
	E3-R	AGTTTGGGCTTTTCAATGTTAGC		
4	E4-F	TATTCTACAGGTAAAGCAAACC	296	58
	E4-R	GAGTGATAAGAAATTGGTATGC		
5	E5-F	AAACACCTAGTCTTATGATTCC	271	56
	E5-R	ATAGGCTCTTTGTACCTACAGC		
6	E6-F	GGATATCCAGCCCCCAAGT	488	60
	E6-R	TGCTTCTCCACTAGCGTTGC		
7	E7-F	TAACAATGCAAATGTTTCATCATA	263	58
	E7-R	TAATCTCATACTTTATCAAAAACC		

作者简介:王志红,女,主管检验技师,主要从事遗传病分子诊断研究。

续表 1 PCR 引物和扩增参数

外显子	引物	引物序列(5'→3')	产物片段大小(bp)	退火温度(℃)
8	E8-F	GAGTAAAAAGGCAGCAGAACG	315	60
	E8-R	CAAGTCTCGTTTCAAGTTCTGC		
9	E9-F	TTGAAAGTTGAAGCCACCAC	374	60
	E9-R	TCCTCATACAACCACCTGCTC		
10	E10-F	AAGCCATGCAAATACTTCAGC	438	60
	E10-R	TTCTAATTCTCCCCCTCTCTCC		
11	E11-F	TCTGTTATGAATGCTGAAATCTCC	541	58
	E11-R	CTGGTGCAGCAATAGTGAGC		
12	E12-F	GTCACCATTTGGTTGTTTGC	299	60
	E12-R	TGCACTATTTCCCAACTCACAA		
13	E13-F	TGAAAATAAGTTTAGTGATATG	421	56
	E13-R	CAGGAAGCATGAAGGATGGT		
14	E14-F	AGAATCATTGTGGGAAAATAGC	350	62
	E14-R	ACAATGCTAATGGTTGTGTGG		
15	E15-F	ATGAGCCTGAGACGGTTAGG	537	58
	E15-R	TGCCATGCTGGTGTATTTCC		
16	E16-F	TGCTGTGGTGTTTCCTTCTC	449	56
	E16-R	TGTATTCATACCTTCCCACACC		
17	E17-F	TTGGCAGGCAACTTATTACC	247	60
	E17-R	CTGACCAACAGCTAAACAAGC		
18	E18-F	CAAGACAAGGACATTGCTAAAGG	298	58
	E18-R	AATAAGTCATCAGTATTAGAGTG		
19	E19-F	CTGCCCTCCTATTCCAATGA	325	60
	E19-R	CAAGCTACCTTGAACAGAGACAAA		
20	E20-F	AATGTCTGAACATTTATCCTCTG	349	60
	E20-R	AAGAATTTGCCATTCTTTTGC		
21	E21-F	TGGAAGACCAGAGATTACTAGGG	434	56
	E21-R	TATGTCATTATTTTGTATTATTCC		
22	E22-F	TGTCTTGGTCCAAAATCTGTG	282	58
	E22-R	TGGTCGTTTATGCTTTATTCCG		
23	E23-F	ACCAGTGACATTTCCAGCAC	271	58
	E23-R	TTTGGCAGAGAAAACACTCC		
24	E24-F	TGTACAAAAGGACACAGTTTAAACC	252	56
	E24-R	TTTTTTCTACTGGAAATGTTAGC		
25	E25-F	GCTAATGCACATGAGAAAACCTCC	397	60
	E25-R	GAATCTAATCTTGATTGTTTCAGC		
26a	E26a-F	AAAAATACATCACCTTCACAGG	408	58
	E26a-R	CCAATCCTTCCAAGGTCTCC		
26b	E26b-F	AAGCACGCTGAATAATGACAGC	528	60
	E26b-R	GCTCAGTTAAGGGGAGACTGTGG		
26c	E26c-F	GTTCAACCACAACCAGGAAGG	532	60
	E26c-R	AACGCATGATTTCTTCACTGG		

2 结 果

仅 1 例患者 SCN1A 基因外显子 10 检出 1 个同义突变 c. 1410T>C(TCT→TCC), p. Ser470Ser, 呈杂合状态, 且该突变未见报道。在 SCN1A 基因内含子 6、7 和 9 分别发现 3 个碱基改变, 包括 c. 965-21 C>T、c. 1028+21 T>C 和 c. 1377+52 G>A; 在外显子 9 发现 c. 1212 A>G 突变, 且以上 4 个碱基突变均为多态性。

3 讨 论

TLE 是较为常见的一种癫痫类型, 其中约 50%~83% 的患者伴海马硬化(HS), 称为 TLE-HS+。TLE-HS+ 多属难治性癫痫, 患者对各类经典的抗癫痫药物均反应欠佳, 需行颞叶切除术以控制频繁的发作。TLE 是遗传因素和环境因素共同导致的多因性疾病, 遗传背景在决定 TLE 病因和临床表现型上发挥重要作用。基因水平研究显示, TLE 患者 SCN1B、KC-

ND2、LGII、GABABR1 等基因均可发生突变^[2-5]。

SCN1A 基因编码电压门控钠离子通道 α1 亚基, 该基因突变可改变钠离子通道的电生理功能, 而钠离子通道活性增高或降低均可引起癫痫发作, 同时也可影响靶点的药物敏感性, 导致难治性癫痫, 更是导致全面性癫痫伴热性惊厥附加症的最重要基因^[6]。在各类型癫痫患者中已发现 700 多种 SCN1A 基因突变, 且幼儿发生该基因突变时, 可表现为重症肌阵挛癫痫, 而 SCN1A 基因突变与 TLE 的关系尚不明确。

本研究对 10 例难治性 TLE 患者及 50 例健康者进行 SCN1A 基因 26 个外显子的序列分析, 除发现 4 个已报道的多态性位点外, 仅在 1 例患者的 SCN1A 基因外显子 10 发现 1 个杂合同义突变。该位点碱基突变国内外尚无相关报道, 是新发现的突变位点。传统观念认为, 同义突变未改变氨基酸一级结构, 不会导致蛋白质高级结构的改变, 不影响蛋(下转第 39 页)

酶,当脑部神经元损伤时,CK-BB 进入脑脊液导致含量升高。CK 增高常见于心肌梗死急性发作后 2~4 h,12~48 h 达高峰,2~4 d 可恢复正常,且升高程度与心肌受损程度基本一致。CK-MB 在急性心肌梗死发病后 3~6 h 开始升高,12~24 h 达峰值,如无并发症 3 d 后恢复至正常水平^[2]。心肌梗死患者 CK 和 CK-MB 均升高,CK-MB/CK 为 4%~25%^[3]。

本研究显示,精神分裂症患者中 CK 升高者占 30.5%,部分患者 CK 水平可达 10 000 IU/L 以上(最高值 59 723 IU/L),CK-MB 达 100 U/L 以上(最高值 606 U/L),但患者无不适症状。通常认为 CK、CK-MB 升高提示心脏疾病,仅在 B 超、心电图检查无异常时考虑二者比值结果,较少考虑其他方面疾病。笔者在临床工作中发现,除心脏疾病以外的其他疾病导致 CK 升高至 500 IU/L 以上时,CK-MB 亦伴随升高,但 CK-MB/CK 为 1%~2%。因此,笔者认为 CK、CK-MB 均升高且 CK-MB/CK $\geq$ 4%时应高度怀疑心肌梗死,CK-MB/CK 为 2%~4%时应密切观察和随访,CK-MB/CK $\leq$ 2%或仅 CK 升高是不考虑心肌梗死。本研究发现 2 例精神分裂症患者 CK-MB/CK $>$ 4%,但增高幅度较低,1 例患者 CK、CK-MB 水平分别为 186 IU/L、11.8 U/L,另 1 例患者分别为 192 IU/L、13.6 U/L,经其他检查、随访和观察,均未发生心肌梗死。CK 增高除心肌梗死外,还可见于多种疾病,包括:(1)各种肌病(如进行性肌萎缩、病毒性心肌炎、多发性肌炎、蜂窝组织炎、挤压综合征等严重肌肉损伤)或手术导致肌肉损伤;(2)脑血管疾病、脑膜炎、急性脑外伤、乙醇中毒、全身性惊厥、癫痫、甲状腺功能低下及无症状性高肌酸激酶血症;(3)非疾病因素,如激烈运动、各种插管、肌内注射氯丙嗪和抗菌药物等^[2]。

精神分裂症患者 CK 水平升高的机制尚不完全清楚。有国外研究认为交感神经兴奋时功能活性增强,血液中儿茶酚胺浓度上升,血管收缩,局面组织缺血、缺氧,导致细胞能量代谢障碍,细胞膜通透性增加,CK 释放入血增多^[4]。有学者认为精神分裂症 CK 活性的生物学改变是神经内分泌-免疫学相互调节作用的结果^[5]。还有报道称精神分裂症患者刚入院时 CK 水平较高,认为 CK 有可能是精神分裂症的生物学标志^[6];兴奋状态的精神分裂症患者较非兴奋状态患者 CK 水平高^[7];精神分裂症患者血清 CK 活力大幅升高的同时,天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶水平也不同程度升高^[8]。药物导致精神分裂症患者 CK 水平增高的现象也不可忽视。有报道称典型抗精神病药对精神分裂症患者发病期 CK 水平的影响显著高于非典型抗精神病药^[9],新住院精神分裂症患者服用抗精

神病药后 CK 水平显著高于住院 3 个月以上的患者^[10]。CK、CK-MB 水平增高程度是否与药物使用时间长短有关有待进一步研究。此外,脑神经细胞受损与凋亡使 CK-BB 释放入血增多,也有可能致 CK 水平升高。但笔者发现 CK $\geq$ 3 000 IU/L 且 CK-MB/CK 为 1%~2%的精神分裂症患者主要有 3 种情况:因倦怠少动导致肌肉萎缩,躁狂、情绪激动或癫痫发作,有饮酒史或乙醇中毒史。因此不能排除患者有肌肉损伤造成 CK、CK-MB 升高或无症状性高肌酸激酶血症的可能。但精神分裂症是以精神活动异常为特征的一组异质性疾病,其发病机制及病理过程等尚未完全明确,因此有必要从各方面进行综合考虑,及早发现病因并采取干预、治疗措施,避免患者病情加重和并发症的产生。

参考文献

[1] 陈元生,邱小燕.精神分裂症、情感性精神障碍患者血清肌酸磷酸激酶的研究(附 487 例分析)[J]. 福建医药杂志,2003,25(5):60-62.

[2] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:423,447.

[3] 周新,涂植光.临床生物化学和生物化学检验[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2006:286-287.

[4] Gurrera RJ,Ronald JA. Enzyme elevations in the neuroleptic malignant syndrome[J]. Biol Psychiat,1993,34(9):634-640.

[5] 高镇松,陈政雄,林和文. 氯丙嗪与氯氮平对精神分裂症患者血清肌酸激酶影响的对比研究[J]. 临床心身疾病杂志,2003,9(1):1-3.

[6] 林展. 精神分裂症患者血清肌酸激酶的检测分析[J]. 中国热带医学,2005,5(7):1589-1589.

[7] 潘明. 精神分裂症不同兴奋状态肌酸激酶活性的实验观察[J]. 现代预防医学,2008,35(13):2597,2601.

[8] 王元彬,叶昌斌,董玲. 精神分裂症患者相关酶联合测定的意义[J]. 检验医学与临床,2007,4(4):252-254.

[9] 马建华,刘忠,李雅忠,等. 典型与非典型抗精神病药对分裂症患者肌酸激酶影响的研究[J]. 中国健康心理学杂志,2011,19(2):158-159.

[10] 隋明兰. 100 例新住院精神病患者服用抗精神病药物后肌酸激酶(CK)测定结果分析[J]. 中国现代药物应用,2010,4(17):129-129.

(收稿日期:2012-07-11)

(上接第 37 页)

白质功能,因此不会成为致病因素。然而,有研究发现基因编码区内的同义突变可由于简并密码子的翻译效率不同,或转录和剪接异常而导致蛋白质表达的改变,当这种改变达到一定程度时即可导致疾病的发生^[7]。因此,同义突变也可能通过转录、转录后翻译及翻译后加工等环节中的某些步骤而导致疾病的发生。本研究中发现的同义突变是否与患者癫痫发作有关尚待进一步研究。

参考文献

[1] Malacarne M,Madia F,Gennaro E,et al. Lack of SCN1A mutation in familial seizures[J]. Epilepsia,2002,43(5):559-562.

[2] Scheffer IE,Harkin LA,Grinton BE,et al. Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations[J]. Brain,2007,130(1):100-109.

[3] Singh B,Ogiwara I,Kaneda M,et al. A Kv4. 2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy[J]. Neurobiol Dis,2006,24(2):245-253.

[4] Berkovic SF,Izzillo P,McMahon JM,et al. LGI1 mutations in temporal lobe epilepsies[J]. Neurology,2004,62(7):1115-1119.

[5] Gambardella A,Manna I,Labate A,et al. GABA(B) receptor 1 polymorphism(G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy[J]. Neurology,2003,60(4):560-563.

[6] Meisler MH,Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders[J]. J Clin Invest,2005,115(8):2010-2017.

[7] Fortugno P,Grosso F,Zambruno G,et al. A synonymous mutation in SPINK5 exon 11 causes Netherton syndrome by altering exonic splicing regulatory elements[J]. J Hum Genet,2012,57(2):311-315.

(收稿日期:2012-08-28)