

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.17.007

文章编号: 1005-8982(2017)17-0035-05

临床研究·论著

SCN1A 基因突变阴性热性惊厥患者 SCN3A 基因突变的特点*

陈勇军¹, 刘稀金¹, 廖卫平², 郭静³, 李欣¹, 易毅利¹

(1. 南华大学附属南华医院 神经内科, 湖南 衡阳 421002; 2. 广州医科大学附属第二医院 神经科学研究所, 广东 广州 510120; 3. 广东省佛山市第一人民医院 神经内科, 广东 佛山 528000)

摘要:目的 对 SCN1A 基因突变阴性的热性惊厥(FS)患者进行 SCN3A 基因突变筛查, 并分析其突变特点。**方法** 应用聚合酶链反应扩增和 Sanger 测序方法对 38 例入组患者筛查 SCN3A 基因突变, 采用生物软件分析突变特点。**结果** 2 例错义突变(c.956T>C/p.I319T, c.5179G>A/p.D1727N); 同源性比对分析提示 2 例突变均高度保守, 在千人基因组计划数据库和 100 例正常人中未发现相应的位点改变。**结论** 在 SCN1A 基因突变阴性的 FS 患者中, 发现 2 例 SCN3A 基因突变错义突变, 该突变可能具有致病性。

关键词: 热性惊厥; SCN1A 基因; SCN3A 基因; 筛查

中图分类号: R742.1

文献标识码: A

Screening of SCN3A gene mutations in SCN1A mutation negative patients with febrile seizures*

Yong-jun Chen¹, Xi-jin Liu¹, Wei-ping Liao², Jing Guo³, Xin Li¹, Yi-li Yi¹

(1. Department of Neurology, Nanhua Hospital Affiliated to University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China; 2. Institute of Neuroscience, the Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 3. Department of Neurology, the First People's Hospital of Foshan City, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: Objective To screen SCN3A gene mutations in patients with febrile seizures but no SCN1A mutation, and to analyze the genetic characteristics. **Methods** The mutations of SCN3A gene were screened in 38 patients by PCR amplification and Sanger sequencing, and the genetic characteristics of the mutations were analyzed using the biological software. **Results** Two missense mutations (c.956T>C/p.I319T, c.5179G>A/p.D1727N) were found. And homology comparison analysis suggested that the mutations were highly conserved, and no corresponding locus changes were found in the thousand human genome project database or in 100 normal people. **Conclusions** There are two missense mutations of SCN3A gene in patients with negative SCN1A mutation, and the SCN3A gene mutations may be pathogenic.

Keywords: febrile seizures; SCN1A gene; SCN3A gene; screening

热性惊厥(febrile seizures, FS)是儿童期很常见和具有代表性的癫痫发作,与发热及年龄相关,多在体温 >38.5℃发作,一般 3 个月~6 岁发病,患病率

为 3%~5%,发作形式多为强直阵挛发作。电压门控钠离子通道基因突变是热性惊厥的最常见病因,在家族性患者中更为多见^[1]。癫痫是由于脑部神经元电

收稿日期:2017-03-02

* 基金项目:湖南省教育厅高校科研一般项目(No:15C1206)

活动异常而导致的短暂、发作性疾病。离子通道基因突变能够导致神经细胞动作电位的产生和传播发生改变,因而与癫痫的发生密切相关。*SCN1A* 基因是与热性惊厥关系最为密切的基因,国内外研究最多,迄今发现突变位点最多,已经 >1 000 个^[2-6]。*SCN1A* 和 *SCN3A* 基因为钠通道的不同亚型,基因定位相似,主要分布在大脑神经元的胞体部位,功能特性上具有相似性,然而对于 *SCN3A* 与热性惊厥或相关性癫痫关系的报道仍然很少^[7-11]。对于 *SCN1A* 基因突变阴性的患者,可能存在其他致病基因的突变,本文拟收集 *SCN1A* 基因突变阴性的热性惊厥患者,进行 *SCN3A* 基因筛查,并初步分析其致病性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2013 年 6 月 -2016 年 6 月南华大学附属南华医院神经内科和小儿科就诊的 FS 患者 38 例。纳入标准:①起病年龄 3 个月 ~ 6 岁,急性发热(体温 $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$)而诱发的全面性强直阵挛发作;②热性惊厥持续到 6 岁后,或出现无热惊厥,发作形式为部分性和或全面性发作;③性别及就诊年龄不限;④排除颅内感染、脑损伤等疾病;⑤已行 *SCN1A* 基因筛查未见突变。选取 100 例健康志愿者作为正常对照组。本研究经医学伦理委员会批准,入组对象签署知情同意书。参照 BAULAC^[12]和 LIAO 等^[13]的描述对入组患者进行分类诊断。热性惊厥:3 个月 ~ 6 岁,只在发热时出现惊厥发作,无热时无发作,未用药物或简单少量的抗癫痫药即能完全控制发作,6 岁后不再发作,智能发育无异常;热性惊厥附加征(febrile seizures plus, FS+):3 个月 ~ 6 岁有 FS 或无热惊厥,6 岁后仍有热性或非热性发作;部分性癫痫伴热性惊厥附加征(partial epilepsy with febrile seizures plus, PEFS+):符合 FS+ 患者,发作形式只有部分性或部分继发全面性发作,脑电图表现多为局灶性异常;全面性癫痫伴热性惊厥附加征(generalized epilepsy with febrile seizures plus, GEFS+):符合 FS+ 患者,临床表型只有全面性发作;婴儿重症肌阵挛性癫痫(severe myoclonic epilepsy in infancy, SMEI):1 岁内起病,起病前精神运动发育无异常,起病时表现为热性和无热的单侧或双侧阵挛或强直阵挛发作,起病后出现肌阵挛发作等多种发作形式,但以部分性发作为主,且伴精神运动发育迟滞,脑电图表现为局灶性、多灶性甚至广泛的异常,治疗效果不好,预后差。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 收集患者和健康志愿者的外周静脉血 4 ml,采用美国傲锐基因技术有限公司提供的 Quick-Gene-610L 和 Quick Genen Mini 80 基因组 DNA 快速提取试剂盒抽提 DNA,置入 -20°C 冰箱冷冻保存备用。

1.2.2 引物合成 参照文献[7]合成引物,序列覆盖所有外显子编码区和内含子 - 外显子剪切区,由上海生工生物工程股份有限公司合成,转录本号为 NM066922。

1.2.3 筛查方案 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增 *SCN3A* 基因全部外显子,使用广州东盛生物科技有限公司的 Taq DNA 酶和 $2 \times \text{HS}^{\text{TM}}$ Reaction Mix 冰上配置 PCR 体系(基因组 200 ng+ 正反向引物各 $5 \mu\text{l}$ +Mix $25 \mu\text{l}$ +Taq 酶 $0.5 \mu\text{l}$ +ddH₂O 至 $50 \mu\text{l}$,引物工作浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$),取 $3 \mu\text{l}$ PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,若电泳条带单一且清晰,取剩余 PCR 产物连同引物送至深圳华大基因有限公司测序。采用 Vector-NTI-V8.0 生物软件进行序列比对,若发现突变位点则扩增 100 例正常人同一片段进行测序对照,为判断突变来源,收集患者双亲血液验证。

1.2.4 生物软件分析 对于发现的突变位点,采用 Clustalx1 行保守性分析及 Mutation Taster 软件预测其致病性(网址 <http://www.mutationtaster.org>,输入 *SCN3A* 基因名称,选择转录本 NM_006922,输入突变后的碱基及位置,点击进入,了解在千人基因组计划数据库中的突变情况,初步判断其致病性)。

2 结果

2.1 突变位点及致病性分析

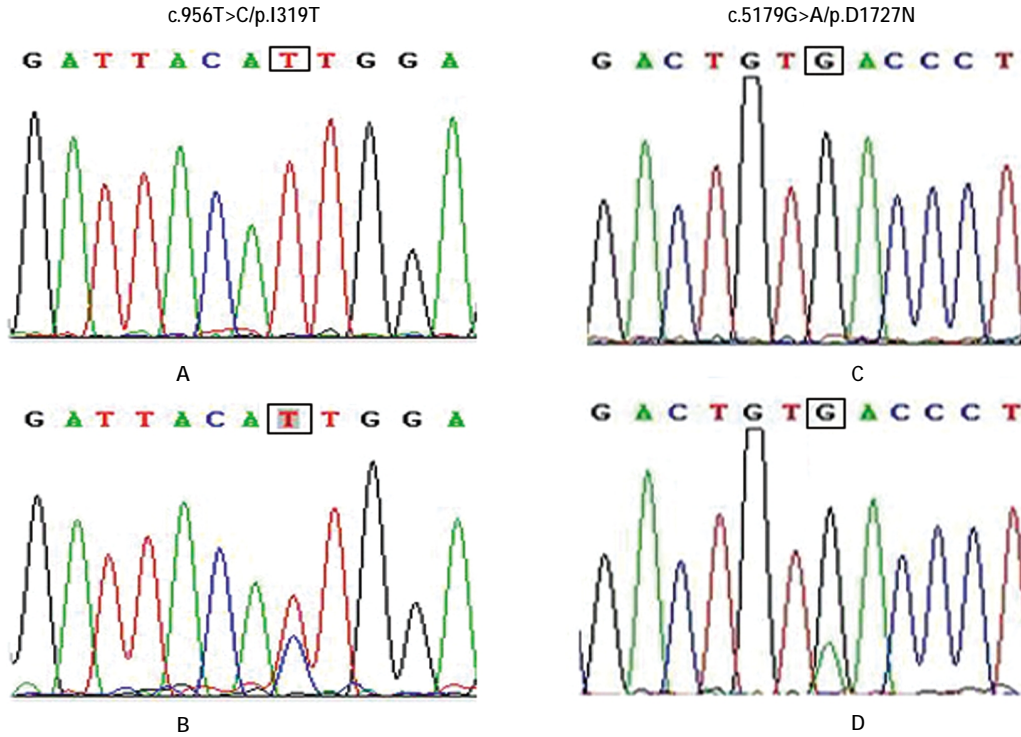
纳入 38 例 *SCN1A* 基因阴性的热性惊厥患者,发现 2 例杂合错义突变(c.956T>C/p.I319T, c.5179G>A/p.D1727N)。c.956T>C 导致第 319 位的氨基酸残基遗传密码子上第 2 个碱基胸腺嘧啶被胞嘧啶取代(ATT→ACT),导致异亮氨酸变为苏氨酸。该突变位于第 6 号外显子上,双亲 DNA 验证来源于父亲。c.5179G>A 导致 1727 位氨基酸残基遗传密码子上第 1 个碱基鸟嘌呤被腺嘌呤取代(GAC→AAC),导致天冬氨酸变为天冬酰胺,位于第 26 号外显子上,父母亲中未发现相同位点改变,提示为新生突变。2 个错义突变都位于在钠离子通道的孔区,前者在 DI S5-S6,后者在 DIV S5-S6。在人的分布于神经系统钠通

道亚型中(如 SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN4A、SCN8A、SCN9A、SCN10A),以及哺乳动物狗、大鼠小鼠中序列一致。同源性分析提示保守性高,两者在 100 例正常对照组中未发现同样的变异, Mutation Taster 软

件分析在千人基因组计划中未发现相应的突变位点,提示两者都可能具有致病性。见图 1、2。

2.2 临床资料

纳入 38 例患者,其中男性 24 例,女性 14 例首



A: 正常对照组; B: c.956T>C/p.I319T 突变; C: 正常对照组; D: c.5179G>A/p.D1727N 突变。方框示突变碱基

图 1 SCN3A 基因突变位点测序图

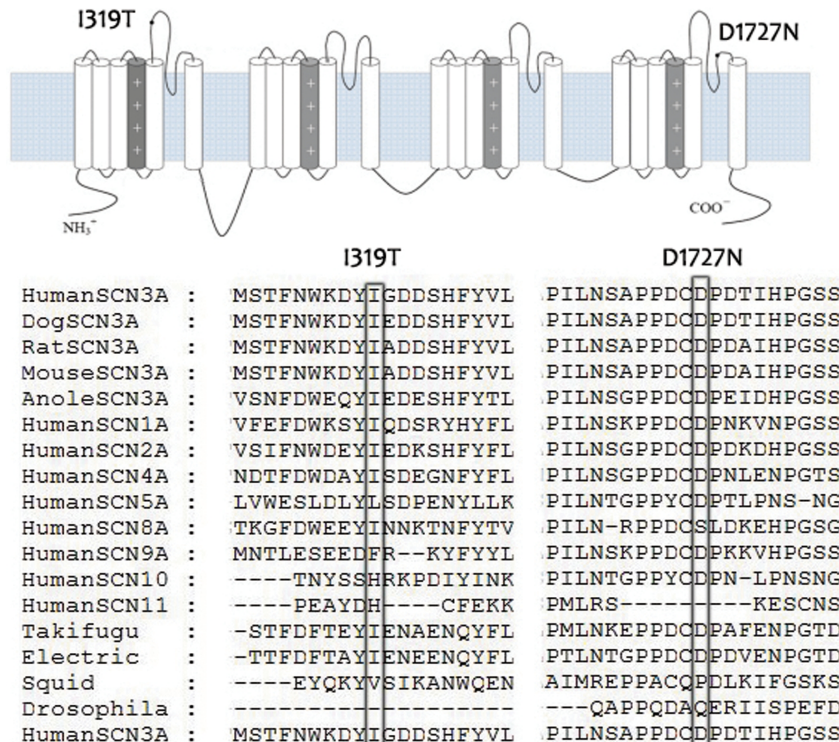


图 2 SCN3A 突变位点位置示意图及保守性分析

发年龄(3.6 ± 0.5)岁,5 例有 FS 家族史,33 例为散发,27 例智能发育差,11 例智能正常。1 例患者可能表现出多种发作形式,统计发作形式如下:复杂部分性发作(complex partial seizure,CPS)14 例,全面性强直阵挛发作(generalized tonic-clonic seizure,GTCS)15 例,继发性 GTCS(secondary gtcs,sGTCS)7 例,失神 3 例,肌阵挛 4 例,强直 8 例,阵挛 5 例,3 例有癫痫持续状态等。脑电图有局灶性棘慢波发放的 12 例,全面性棘慢复合波 15 例,未见放电的 7 例,其他 4 例。影像学有异常提示 10 例,表现为大脑皮质发育不良、皮质局灶性低密度影、海马萎缩等。药物以丙戊酸钠口服液使用最多,其次奥卡西平、卡马西平、拉莫三嗪、托吡酯及氯硝西泮等,单药治疗控制较好的 12 例,其余使用二联或 >3 种药物。分类诊断 FS 4 例,FS+ 7 例,PEFS+ 9 例,GEFS+ 8 例,SMEI 10 例。

2 例突变患者病史如下:1 例为男性,3 岁时在体温 39℃首次发作,表现为全面性大发作,此后发热就有发作,6 岁以后不发热也有发作,脑电图提示为全面性慢波,MRI 未见异常,诊断为 GEFS+,服用过苯妥英钠、卡马西平效果差,加丙戊酸钠后发作减少,其父亲 2 岁时有 FS,此后未有再发;另外 1 例为女性,3.5 岁首发,体温 38.5℃,表现为部分性发作为主,间断全面性发作,此后多次发作。6 岁仍然有发作,与发热无关,其姑妈 2~5 岁时有 FS,此后未再发。MRI 提示左侧海马信号略高,脑电图示局灶性慢波发放,临床诊断 PEFS+,服用奥卡西平、左乙拉西坦、拉莫三嗪等药物发作减少。2 例患者智商分别为 45 和 27 分,提示存在中度或重度智能障碍,尤其是语言功能明显受损。

3 讨论

大家系连锁分析揭示 FS 是常染色体显性遗传模式,目前已经将 FS 相关基因定位扩大到 11 个染色体位点上,命名为 FEB1~FEB11,其中位点 FEB3(2q23~24)与 SCN1A 和 SCN3A 基因在 2 号染色体上的簇集位置一致^[9]。SCN1A 基因突变已明确是 FS 相关性癫痫的主要致病原因,SCN3A 基因与 SCN1A 的位置相近,都分布于中枢神经系统,亚细胞定位于神经元的胞体和树突,但是 SCN3A 突变与 FS 的相关性未引起重视,研究报道很少。2009 年国内王鹏^[6]首先在伴有智能障碍的热性惊厥患者中发现 2 例 SCN3A 基因突变(A463V,D998E),其后郭静^[7]发现 4 例突变(A201V、N302S、R520T 及 D530G),其中

D530G 是在 27 例 SCN1A 基因突变阳性患者中发现,提示 SCN3A 基因突变率与 SCN1A 相比较非常低。VANOYE 等^[8]在局灶性癫痫患儿发现 M1323V 突变,该突变可能是国外第 1 个报道 SCN3A 基因与 FS 相关的突变位点,患者 16 个月大时仅表现为单纯性 FS 发作。

不管是 FS 患者还是其他遗传性疾病患者,同时存在 ≥2 种基因突变的情况极为少见,其发病机制可能也更为复杂,其致病性可能以其中一种为主,另一种起修饰作用,加强或者减弱前者的致病性。SCN1A 基因突变阴性的 FS 患者可能存在其他基因突变,本文对 38 例患者施行 SCN3A 筛查,发现 2 例错义突变,突变率仅为 5.26%(2/38),100 例正常对照组未发现相同位点改变。生物软件分析表明,2 个突变点保守性高,在千人基因组计划数据库和 100 例正常人中未发现相应的突变,提示可能为致病性突变,SCN3A 基因缺陷容易导致癫痫易感性增加^[15]。VECCHI 等^[16]利用阵列比较基因组杂交技术,发现 1 例癫痫患儿的 2 号染色体上存在 12 Mb 长度的钠通道集群的缺失,该缺失片段覆盖 SCN3A 基因,该患者同时存在 FS 发作和智能障碍。本研究发现的 2 例突变患者都存在智能障碍,即智能障碍的 FS 患者中 SCN3A 的突变率为 7.41%(2/27),而在 11 例智能正常的患者中无一例突变发现,表明在伴有智能障碍者中的突变率高于总突变率,提示 SCN3A 突变可能与智能障碍相关。

FS 具有明确的遗传易感性,家族性发病常见,患者同胞的患病率较普通人群高 19.9%~24.9%^[17]。本研究纳入患者多为散发病例,样本量较小,突变率低可能还不能反映实际情况,如果能够进一步扩大样本量、尽量收集到家系病例,突变率可能增高。钠离子通道基因发生突变后如何导致癫痫的发生,其发病机制是非常复杂的问题。突变后通道的功能发生改变,导致神经元细胞电活动异常,可能是癫痫发生的分子机制,膜片钳电生理功能研究亦是进一步研究的方向^[18]。

参 考 文 献:

- [1] ASSOGBA K, BALAKA B, TOUGLO F A, et al. Febrile seizures in one-five aged infants in tropical practice: frequency, etiology and outcome of hospitalization[J]. J Pediatr Neurosci, 2015, 10(1): 9-12.
- [2] NAKAYAMA J, ARINAMI T. Molecular genetics of febrile

- seizures[J]. *Epilepsy Res*, 2002, 43 (Supplement s9): 32-35.
- [3] NAKAYAMA J. Progress in searching for the febrile seizure susceptibility genes[J]. *Brain Dev*, 2009, 31(5): 359-365.
- [4] 吴光声,高峰,沈征,等. 10 个全面性癫痫伴热性惊厥附加症家系的 SCN1A 基因突变筛查研究[J]. *解放军医学杂志*, 2014, 10: 804-807.
- [5] 郭嘉诚,赵武. SCN1A 基因变化在家族性热性惊厥发病中的作用[J]. *临床儿科杂志*, 2017, 2: 133-137.
- [6] SCHUTTE S S, SCHUTTE R J, BARRAGAN E V, et al. Model systems for studying cellular mechanisms of SCN1A-related epilepsy[J]. *J Neurophysiol*, 2016, 115(4): 1755-1766.
- [7] WEISS L A, ESCAYG A, KEARNEY J A, et al. Sodium channels SCN1A, SCN2A and SCN3A in familial autism[J]. *Mol Psychiatry*, 2003, 8(2): 186-194.
- [8] 王鹏. 精神智能发育迟滞的癫痫伴热性惊厥附加症患者 SCN3A 基因筛查[D]. 广州: 广州医学院, 2009: 3-6.
- [9] 郭静. 伴精神智能发育迟滞癫痫患者 SCN3A 基因突变筛查及 SCN3A 与 SCN1A 相关性分析[D]. 广州: 广州医学院, 2012: 3-7.
- [10] VANOYE C G, GURNETT C A, HOLLAND K D, et al. Novel SCN3A variants associated with focal epilepsy in children[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 62: 313-322.
- [11] HOLLAND K D, KEARNEY J A, GLAUSER T A, et al. Mutation of sodium channel SCN3A in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 433(1): 65-70.
- [12] BAULAC S, GOURFINKEL-AN I, NABBOU R, et al. Fever, genes, and epilepsy[J]. *Lancet Neurol*, 2004, 3(7): 421-430.
- [13] LIAO W P, SHI Y W, LONG Y S, et al. Partial epilepsy with antecedent febrile seizures and seizure aggravation by antiepileptic drugs: associated with loss of function of Na (v) 1.1[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(9): 1669-1678.
- [14] SAGHAZADEH A, MASTRANGELO M, REZAEI N. Genetic background of febrile seizures [J]. *Rev Neurosci*, 2014, 25 (1): 129-161.
- [15] LAMAR T, VANOYE C G, CALHOUN J, et al. SCN3A deficiency associated with increased seizure susceptibility[J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 102: 38-48.
- [16] VECCHI M, CASSINA M, CASARIN A, et al. Infantile epilepsy associated with mosaic 2q24 duplication including SCN2A and SCN3A[J]. *Seizure*, 2011, 20(10): 813-816.
- [17] IWASAKI N O, NAKAYAMA J U. Molecular genetics of febrile seizures[J]. *Epilepsia*, 2002, 43(S9): 32-35.
- [18] CHEN Y J, SHI Y W, XU H Q, et al. Electrophysiological differences between the same pore region mutation in SCN1A and SCN3A[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51 (3): 1263-1270.

(童颖丹 编辑)