

· 临床研究 ·

肌萎缩侧索硬化症 SOD1 基因突变特点

卢锡林¹, 姚晓黎¹, 张成^{1,2}, 李洵桦¹

(中山大学 1. 附属第一医院神经内科, 2. 干细胞与组织工程研究中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨中国南方人群肌萎缩侧索硬化症铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn superoxide dismutase; SOD1) 基因突变的特点。【方法】采用 SOD1 基因的 5 对引物对 4 个家系的 15 例家族性肌萎缩侧索硬化症(FALS)患者、56 例散发性肌萎缩侧索硬化症(SALS)患者和 46 例正常对照 DNA 进行 PCR 扩增, 重复三次应用单链构象多态性方法分析各外显子的多态性。【结果】SOD1 基因的 5 个外显子未发现异常泳动。【结论】中国南方人群肌萎缩侧索硬化症患者可能不存在 SOD1 基因第 1~5 号外显子突变或突变率极低, 可能存在其他位点的基因突变。

关键词: 肌萎缩侧索硬化症; 铜锌超氧化物歧化酶基因; 基因突变

中图分类号: R394; R741

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0080-03

Feature of Mutation of SOD1 Gene in Amyotrophic Lateral Sclerosis

LU Xi-lin¹, YAO Xiao-li¹, ZHANG Cheng^{1,2}, LI Xun-hua¹

(1.Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, 2.The Center for Stem Cells and Tissue Engineering, SUN Yat-sen University, Guangzhou, 510080, China)

Abstract:【Objective】To determine the mutation of SOD1 gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients of South Chinese.【Methods】Subjects were South Chinese ALS patients including 15 patients from 4 ALS families, 56 SALS patients, and 46 normal adults. Their exon1 to 5 of SOD1 gene were amplified by PCR. The polymorphism of exons was analyzed by PCR- single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP).【Results】No abnormal bands were found in the electrophoresis of the five exons of PCR products.【Conclusion】There may exist no mutation in exon 1 to 5 of SOD1 gene in all ALS patients and control in South Chinese, indicating that it may present some new gene mutation caused the ALS in South Chinese.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis; Cu/Zn; superoxide dismutase; gene mutation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):80-82]

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种选择性侵犯上、下运动神经元的致命性、进行性神经系统变性疾病。男性患者多见, 一般在 40~50 岁起病, 发病后 3~5 年死亡。主要表现为脊髓和脑干所支配的肌肉无力、萎缩、肌束震颤、球麻痹和锥体束征; 感觉系统一般不受侵犯。ALS 可分为家族性肌萎缩侧索硬化症 (familial amyotrophic lateral sclerosis, FALS) 和散发性肌萎缩侧索硬化症 (sporadic amyotrophic lateral sclerosis, SALS)。其发病机制尚未完全清楚, 也无特效治疗。1993 年发现 FALS 与铜锌超氧化物歧化酶 (Cu/Zn

superoxide dismutase, SOD1) 基因突变有关^[1]。之后欧洲和北美许多国家陆续发现 SOD1 基因点突变引起 FALS。目前世界上已发现 100 多种点突变^[2], 约 25% 的 FALS 和少量 SALS 是由 SOD1 基因突变所致^[3]。但是, 几乎所有的 SOD1 突变的报道均来自欧美, 亚洲只有日本和韩国有报道^[4,5], 国内仅报道一例 SOD1 突变^[6]。为了了解中国 FALS 和 SALS 患者 SOD1 基因点突变的情况, 我们应用聚合酶链反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 分析技术对 4 个家系的 15 例 FALS 患者, 以及 56 例 SALS 患者和 46 例正常对照的 SOD1 基因第 1~5 号外显子进行

收稿日期: 2005-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370510); 广东省自然科学基金资助项目 (30693); 广东省科技计划项目 (ZKM05501S)

作者简介: 卢锡林 (1967-), 男, 广东封开人, 在职硕士生, 主管技师; 张成, 教授, 导师, 通讯作者。E-mail: czym@gzsums.edu.cn

分析, 试图了解其突变频率, 以明确病因和确定非 SOD1 基因突变家系, 为寻找新的 FALS 基因打下基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1998-2004 年在中山大学附属第一医院神经内科收集 ALS 患者 71 例, 包括 4 个家系 15 例 FALS 患者。所有患者均由两个副教授以上职称的神经科专家收集病史、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 Escorial ALS 诊断标准进行诊断^[7]。无神经系统变性疾病的正常人 46 例作为对照组。

1.2 DNA 提取

采取所有患者和正常对照外周静脉血 10 mL, 用常规酚/氯仿抽提法提取 DNA。

1.3 SOD1 基因第 1~5 号外显子的 PCR 扩增

参考文献[1]设计 SOD1 基因第 1~5 号外显子的 PCR 扩增引物。引物的序列如下 1F: 5 - ttccgttgacagtcctcggaa-3, 1R: 5 - gccgcctcgcaacaagcct-3, 扩增产物 158 bp; 2F: 5 - ttcagaaactctctc caact-3, 2R: 5 - cgttaggggctactctactg-3, 扩增产物 208 bp; 3F: 5 - ttctgtccctctcactgt-3, 3R: 5 - tcccct ttggcactgtatt-3, 扩增产物 498 bp; 4F: 5 - catcagcc ctaatccatctga-3, 4R: 5 - cgcgactaacaatic aaagtga-3, 扩增产物 235 bp; 5F: 5 - gtattgtggga ggagtagtgat-3, 5R: 5 - gcaggataacagatgatgaagg-3, 扩增产物 222 bp。

PCR 扩增条件: 反应体积为 25 μ L, 含 25 ng 模板 DNA, dNTP 各 200 μ mol/L, 2.5 mmol/L MgCl₂, 引物各 0.2 μ mol/L, Taq 酶 0.5 U。预变性 94 2 min; 循环, 变性 94 30 s, 退火 55 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 35 个循环, 最后 72 延伸 8 min。将 PCR 扩增产物 6 μ L 于 12 g/L 琼脂糖凝胶与标准分子量参照稳压共电泳, 确认成功扩增目的片段。

1.4 PCR 扩增产物的单链构象多态性分析

取 PCR 产物 8 μ L, 加 8 μ L 甲酰胺变性剂(950 g/L 去离子甲酰胺、5 g/L 溴酚蓝、5 g/L 二甲苯晴蓝), 97 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 骤冷。10 min 后上样于用 80 g/L 聚丙烯酰胺系列胶(丙烯酰胺与甲叉丙烯酰胺比为 49:1), 垂直电泳(胶长 18 cm), 200 V 恒压, 20 mA 电流条件下电泳 24 h, 银染。观察变性后的二条单链电泳迁移率, 比较 FALS 患者、SALS 患者

和正常对照者有无不同。所有患者和正常对照均重复三次单链构象多态性分析。

2 结果

SOD1 基因第 1 号外显子的 PCR 扩增产物长度为 158 bp, 2 号外显子的 PCR 扩增产物长度为 208 bp, 3 号外显子的 PCR 扩增产物长度为 498 bp, 4 号外显子的 PCR 扩增产物长度为 235 bp, 5 号外显子的 PCR 扩增产物长度为 222 bp (图 1)。SOD1 基因的 5 个外显子, 经 SSCP 分析未发现异常泳动(图 2)。

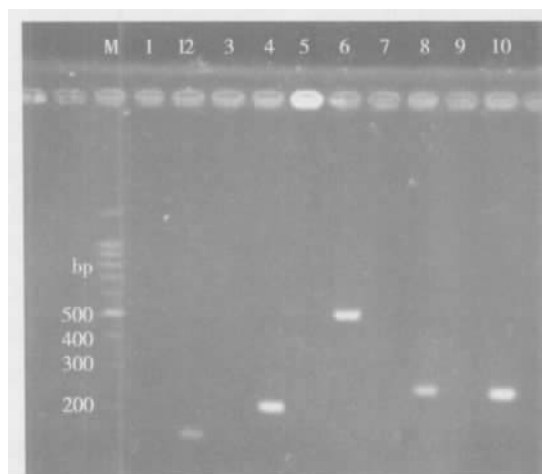


图 1 SOD1 基因第 1-5 号外显子 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification results of SOD1 gene of exons 1-5

M:100 bp DNA marker; Lane1,3,5,7,9: blank control; Lane 2: exon 1; Lane 4: exon 2; Lane: 6: exon3; Lane 8: exon 4; Lane 10: exon 5

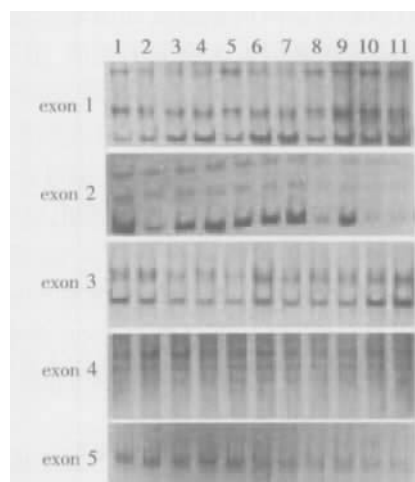


图 2 SOD1 基因第 1-5 号外显子 SSCP

Fig.2 SSCP results of SOD1 gene of exons 1-5

Lane1: Normal; Lane 2- 11: ALS patients

3 讨论

SOD1 基因组 DNA 长 12 kb, 含有 5 个外显子编码 153 个氨基酸, 组成 33 ku 的金属酶蛋白, 具有清除自由基和抗氧化的功能。在欧美一些国家, 大约 20% 的 FALS 患者是由 SOD1 基因编码区的点突变所致^[9], 这提示约 80% 的 FALS 是由其他基因突变引起。本研究对 4 个 FALS 家系 15 名患者进行了 SOD1 基因第 1~5 号外显子 PCR-SSCP 分析, 没有发现异常。这表明本组 FALS 患者可能不存在 SOD1 基因突变或突变率极低, 提示可能存在其他位点的基因突变。本研究结果为在中国 FALS 家系中寻找新的致病基因提供了依据。

关于 SALS, Jackson 等^[9]在 155 例英国的 SALS 患者中发现 4 名患者存在 SOD1 基因突变, 其中之一为新发现的一种插入突变, 但 Malaspina 等^[10]在意大利检测了 30 例 ALS 患者(包括 1 例 FALS)的 SOD1 基因 5 个外显子突变情况, 没有检出 SOD1 基因突变。我们对 56 例中国南方 SALS 患者的 PCR-SSCP 分析均未发现异常, 其原因可能是黄种人的 SALS 患者很少有 SOD1 基因的突变, 可能有新的致病基因或其他致病机制。

本研究所采用的 PCR-SSCP 分析技术, 是本实验室常规检测方法, 与 Maspina, Jackson 等所用的方法一致, 是根据形成不同构象高级结构的等长 DNA 单链在中性聚丙烯酰胺凝胶中迁移率变化来检测基因变异的。因为单链 DNA 的迁移率除与 DNA 链的长度有关外, 更主要的是取决于 DNA 单链所形成的构象。当 DNA 有碱基置换、插入或缺失时, 因单链 DNA 的空间构象改变而出现泳动异常, 它虽不能直接反映基因发生突变的性质, 但可以初步判断靶 DNA 片段是否存在未知变异。SSCP 技术是一种比较可靠和有效的发现基因突变的新方法。对于长度小于 300 bp 的片段, 其检出率可达 70%-80%。对于长度小于 200 bp 的片段, 检出率几乎可达 100%。其特点是设备要求简单, 基本无假阳性结果。根据 SSCP 初筛结果, 将发生异常泳动的标本再进行 DNA 序列测定, 即可确定 DNA 突变的性质。由于 SSCP 分析技术简单快捷, 因而被广泛应用于基因的突变分析^[11,12]。

本研究虽然未发现 FALS 和 SALS 患者的 SOD1 基因的突变, 但从另一个角度反映出在我国的 FALS 家系中有可能克隆出新的 FALS 基因, 这为筛查新的 FALS 基因打下了基础。

参考文献:

- [1] ROSENBERG D R, SIDDIQUE T, PATTERSON D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Nature*, 1993, 362(6415):59-62.
- [2] JACOBSSON J, JONSSON P A, AANDERSEN P M, et al. Superoxide dismutase in CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients with and without Cu/Zn superoxide dismutase mutations[J]. *Brain*, 2001, 124 (Pt 7):1461-1466.
- [3] PRAMATAROVA A, FIGLEWICA D A, KRIZUSA, 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(3):592-596.
- [4] OHI T K, SAITA K, TAKECHI S, et al. Clinical features and neuropathological findings of familial amyotrophic lateral sclerosis with a His46Arg mutation in Cu/Zn superoxide dismutase[J]. *J Neurol Sci*, 2002, 197(1-2):73-78.
- [5] KIM N H, KIM H J, KIM M, et al. A novel SOD1 gene mutation in a Korean family with amyotrophic lateral sclerosis[J]. *J Neurol Sci*, 2003, 206 (1): 65-69
- [6] 史树贵, 李露斯, 陈康宁, 等. 一个肌萎缩侧索硬化家系 SOD1 基因突变的发现 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2004, 21(2): 149-152.
- [7] WILBOURN A J. Clinical neurophysiology in the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: The Lambert and El Escorial criteria[J]. *J Neurol Sci*, 1998, 160 (Suppl 1): S25-S29.
- [8] ORRELL R W, HABGOOD J J, GARDINER I, et al. Clinical and functional investigation of 10 missense mutations and a novel frameshift insertion of the gene for copper-zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Neurology*, 1997, 48 (3): 746-751.
- [9] JACKSON M, AL-CHALALABI A, ENAYAT Z E, et al. Copper/zinc superoxide dismutase 1 and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: analysis of 155 cases and identification of a novel insertion mutation [J]. *Ann Neurol*, 1997, 42(5):803-807.
- [10] MALASPINA A, ZAMAN R, MAZZINI L, et al. Heterogeneous distribution of amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 gene mutations: preliminary data on an Italian survey[J]. *J Neurol Sci*, 1999, 162(2): 201-204.
- [11] 唐焕文, 庄志雄, 梁海荣, 等. 中国汉族、布依族和壮族群体中聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 基因多态性[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003, 9, 24(5): 432-434.
- [12] 张敏, 马虹, 王伯松, 等. 广东人 AGTR2 突变热区的 SNPs 位点分析 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(3): 221-224.

(编辑 刘清海)