

# 中国南方人群遗传性痉挛性截瘫 *SLC33A1* 基因的突变检测

袁萍<sup>1</sup>, 潘启豪<sup>2</sup>, 郑灵燕<sup>1</sup>, 徐评议<sup>3</sup>, 胡彬<sup>2</sup>, 李洵桦<sup>3\*</sup>

(中山大学 1.孙逸仙纪念医院生殖中心, 广东 广州, 510120; 2. 中山医学院遗传教研室, 广东 广州, 510080;  
3. 附属第一医院神经内科, 广东 广州, 510080)

**摘要:**【目的】*SLC33A1* 基因已被报道是我国北方一个 HSP 家系的致病基因, 但研究未发现在欧洲的 HSP 患者中有该基因的突变。本研究的目的是检测 *SLC33A1* 是否为中国南方人群中遗传性痉挛性截瘫患者的致病性基因之一。【方法】对收集到的 70 例中国南方散发遗传性痉挛性截瘫的患者, 提取基因组 DNA, 并进行 *SLC33A1* 基因所有编码外显子及外显子-内含子交界区域的直接测序; 鉴定所发现的遗传变异, 并同我们所收集到的 57 例无血缘关系的正常人进行比对, 以及生物信息学分析。【结果】我们只发现 *SLC33A1* 基因区域的 8 个已存在于数据库中的单核苷酸多态性, 未发现任何致病性突变。【结论】与国外学者的报道相符合, 我们的 70 例中国南方 HSP 病人中没有 *SLC33A1* 所导致的病人, 故 *SLC33A1* 对 HSP 的致病性需要进一步的核实、研究。

**关键词:** 遗传性痉挛性截瘫; *SLC33A1*; 突变; 单核苷酸多态性

**中图分类号:** R394.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2014)04-0512-04

## Mutation Detection of *SLC33A1* in Southern Chinese Hereditary Spastic Paraplegias Patients

YUAN Ping<sup>1</sup>, PAN Qi-hao<sup>2</sup>, ZHENG Ling-yan<sup>1</sup>, XU Ping-yi<sup>3</sup>, HU Bin<sup>2</sup>, LI Xun-hua<sup>3\*</sup>

(1.Center for Reproductive Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;  
2.Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;  
3.Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】*SLC33A1* has been reported to be the causal gene in a Northern Chinese hereditary spastic paraplegias family. However the gene's causality has not been confirmed, as a group of German scientists has ruled it out in their cohort. The aim of this study is to detect the possible mutation(s) of the *SLC33A1* gene in a cohort of the Southern Chinese. 【Methods】Genomic DNA was extracted from 70 independent HSP patients and 57 healthy unrelated healthy subjects. Direct sequencing was performed in the coding regions and intron-exon boundaries of the *SLC33A1* gene on the PCR products. Variations identified were compared with the results from the control subjects and our bioinformatics searched in the dbSNP and 1000 genome project. 【Results】Besides the eight known single nucleotide polymorphisms already deposited in the databases, we did not find any mutation in our patients. 【Conclusions】The causality of *SLC33A1* in HSP needs further investigation and confirmation.

**Key words:** hereditary spastic paraplegias; *SLC33A1*; mutation; single nucleotide polymorphism

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(4):512-515]

遗传性痉挛性截瘫(hereditary Spastic Paraplegias, HSP), 又称为痉挛性截瘫(spastic paraplegias, SPG), 是一组具有高度异质性的神经系统退行性单基因遗传疾病。根据其临床表现可分为单纯型

和复杂型 HSP, 单纯型 HSP 临床表现主要以双下肢进行性无力、痉挛步态为特征, 偶伴有感觉异常或尿急等症状, 体查可有肌张力增高、腱反射亢进、病理征阳性; 复杂型 HSP 除此之外, 还伴有其

收稿日期: 2014-01-22

基金资助: 国家自然科学基金(81171070)

作者简介: 袁萍, 博士, 研究实习生, 医学遗传学, E-mail: kekeyp1983@163.com; \* 通信作者: 李洵桦, 主任医师, 博士生导师, E-mail: lxh59xyh@sina.com

他神经系统和非神经系统症状,如小脑共济失调、周围神经变性、认知障碍、视神经萎缩、白内障、脊柱侧弯等临床表现<sup>[1-3]</sup>。HSP除了表现型的多样性外,还具有高度的遗传异质性<sup>[3-4]</sup>,目前国际上共报道了的57个SPG位点,其中有19个为常染色体显性遗传(ADHSP)模式,32个为常染色体隐性遗传(ARHSP),5个X连锁遗传以及1个线粒体遗传<sup>[3]</sup>(<http://neuromuscular.wustl.edu/spinal/fsp.html>)。其中,Spastic paraplegias type 42 (SPG42, MIM#612539)是近年来由中国学者首次报道的一个单纯型的ADHSP大家系,其致病基因 *SLC33A1* 位于3q24-26,含6个编码外显子区域,其编码的乙酰辅酶A转运蛋白<sup>[5]</sup>,作为载体转运乙酰辅酶A至高尔基体,以修饰神经节苷脂和糖蛋白的唾液酸残基<sup>[6]</sup>。通过斑马鱼的基因敲除实验,其初步推测 *SLC33A1* 所编码的乙酰辅酶A转运蛋白对于神经节苷脂和糖蛋白的乙酰化作用,可能对运动神经元的生长发育有重要作用<sup>[5]</sup>。随后,德国学者于2010年对收集的220例欧洲人群的ADHSP患者进行了 *SLC33A1* 基因的突变检测,并未找到任何致病性突变<sup>[7]</sup>。他们分析可能存在两种原因,一是 *SLC33A1* 突变属于ADHSP中极为罕见变异,至少在欧洲人群中;二是中国学者所报道的 *SLC33A1* 可能并不是SPG42真正的致病基因<sup>[7]</sup>。为了进一步了解中国人群 *SLC33A1* 基因与HSP的致病关系,我们对已收集到的70例HSP散发病例进行该基因的突变检测,并对所得遗传变异进行鉴定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象

我们的研究对象为2005年至今收集的来自中国南方汉族人群的70例无血缘关系的HSP散

发病例,均由中山大学附属医院的具有丰富临床经验的神经内科医生诊断。且此70例HSP病例在前期研究中均已排除了三个常见HSP致病基因(*SPASTIN*、*ATL1*、*REEPI*)的突变。同时我们还收集了57例无血缘关系且经检查无HSP的个体作为正常对照。在获得参与者的知情同意后,采集外周血进行后续的DNA分析。

### 1.2 全基因组DNA的提取

取外周血200  $\mu$ L,严格按照Qiagen血液基因组小提试剂盒(Qiagen,德国)说明书要求进行全基因组DNA提取。

### 1.3 引物设计及PCR扩增

利用UCSC数据库(<http://genome.ucsc.edu/>,人类参考序列选自Mar. 2006, NCBI36/hg18)获取 *SLC33A1* 基因的序列信息,其Genbank cDNA序列是NM\_004733。利用Oligo 6.0软件(<http://www.oligo.net/downloads.html>)设计PCR引物。PCR引物扩增的序列包含所有编码外显子区域(即外显子1至外显子6)及内含子-外显子交界区。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司(上海生工)合成,引物序列见表1。进行PCR扩增,反应为30  $\mu$ L体系:含10 $\times$ PCR缓冲液3  $\mu$ L,2 mmol dNTP 3  $\mu$ L,25 mmol MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L,3.2  $\mu$ mol/L上、下游引物各1  $\mu$ L,1 U *Taq* 酶1  $\mu$ L(Fermentas, 立陶宛),DNA模板2  $\mu$ L,灭菌ddH<sub>2</sub>O补足体积至30  $\mu$ L。反应条件为:95  $^{\circ}$ C预变性3 min;95  $^{\circ}$ C变性30 s,引物特异性温度(表1)退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸1 min,36个循环;72  $^{\circ}$ C延伸10 min。

### 1.4 PCR产物的测序及遗传变异的鉴定

PCR产物的直接测序,(1)测序预反应:反应体系为*SAP*酶(Fermentas, 立陶宛)0.6  $\mu$ L,*Exo I*酶(Fermentas, 立陶宛)0.15  $\mu$ L,*Exo I* Buffer 0.3  $\mu$ L,PCR产物1  $\mu$ L,灭菌ddH<sub>2</sub>O补足体积至3  $\mu$ L;反

表1 *SLC33A1* 基因的引物及对应的测序外显子区

Table 1 Sequencing exon regions and primers of *SLC33A1* gene

Gene	Exon	Forward primer sequence 5'-3'	Reverse primer sequence 5'-3'	Temperature of annealing/ $^{\circ}$ C
<i>SLC33A1</i>	1	CCTCAGGCTCTTTGACGC	GTTGTGTTATTTGATGGGTTGC	54
	2	GGATTACAGGCATGAGCAC	ACTAACAGTCTCCAATGGACA	55
	3	TGGATTTTTGACCCCGTTTA	ACCAAACCAGTAGGGCATATTCT	54
	4	CAATACCACTAATATCTGAGCGT	CTAAGCCAGAACTAAGACCAATA	54
	5	TTTATGCCCCAGTAACACA	GACATTCCTTTTTCTATCACTAC	54
	6	GGCTCACACCCGTAATTC	ATGGTTACCACCCGTGACTA	56

应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 15 min。(2) 测序反应:用 Applied Biosystems(ABI)公司的 96 孔板,在 GeneAmp 9700 PCR 仪上进行。反应体系为 5×Seq Buffer 2 μL, BigDye Terminator v3.1 Kit(ABI, 美国) 1 μL, 测序引物 (3.2 μmol/L) 1 μL, 预反应混合液 3 μL, ddH<sub>2</sub>O 3 μL; 反应条件:98 °C 2 min; 96 °C 10 s, 50 °C 5 s, 60 °C 4 min, 30 个循环。(3) 测序产物经无水乙醇及 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2) 纯化后, 加入 Hi-Di 10 μL, 经 95 °C 5 min 变性上机。利用 ABI 3730XL DNA Analyzer 仪, 按标准程序进行毛细管电泳、数据收集和序列分析。

遗传变异的鉴定, ①运用 Chromas v2.0 软件对测序结果进行分析。将测序结果与上述从 UCSC 数据库中获取的 *SLC33A1* 基因的序列进行比对分析。②通过查询 dbSNP 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), 鉴定数据库中已报导的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点。③遗传变异命名: 按照人类基因组变异组织 (human genome variation society, HGVS; <http://www.hgvs.org/mutnomen/>) 所制定的变异命名法则, 以 Genbank cDNA 序列 NM\_004733 中起始密码子 ATG 的 A 为第+1 位核苷酸, 对测序所得变异进行命名。④初步生物信息学分析: 对于错义突变的位点, 利用 PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>) 及 SIFT (<http://sift.jevl.org/>) 软件进行功能学预测。

### 1.5 基因型频率及等位基因频率计算

基因型频率及等位基因频率按照以下公式进行计算: 基因型频率=某一基因型例数/该组总例数; 等位基因频率=(纯合子例数×2+杂合子例数)/(总例数×2)<sup>[8]</sup>。

## 2 结 果

我们对 70 例 HSP 病例进行 *SLC33A1* 基因编码区、内含子-外显子区及部分内含子区进行直接测序, 共找到 8 个遗传变异 (表 2)。这 8 个遗传变异均存在于 dbSNP 数据库中, 其中 1 个位于基因编码区, 另 7 个位于内含子区。在基因编码区的这 1 个遗传变异位于 *SLC33A1* 基因的第二个外显子区域, 为第 512 位碱基发生 A>G 的替换 (c.512A>G), 导致由天冬氨酸到甘氨酸的改变 (p. Asp171Gly)。上述变异在我们所检测的 HSP 患者

中存在 24 个 A/G 杂合改变和 3 个 G/G 纯合改变 (图 1), 该位点存在于 dbSNP 数据库中 (rs3804769) (表 2)。同时, 通过测序检测所收集的 57 例无血缘关系的正常对照中发现有 15 例对照为 A/G 杂合改变 (等位基因频率为 A/G: 0.868/0.132), 说明该位点为一个 common SNP 位点。经 PolyPhen2 和 SIFT 软件预测该变异均显示为良性变异。综上所述, 我们所检测的遗传变异 c.512A>G 为一非致病性的变异。除此之外, 在我们的 70 例散发 HSP 研究群体中, 未发现 *SLC33A1* 基因存在其它的点突变和小的插入/缺失。

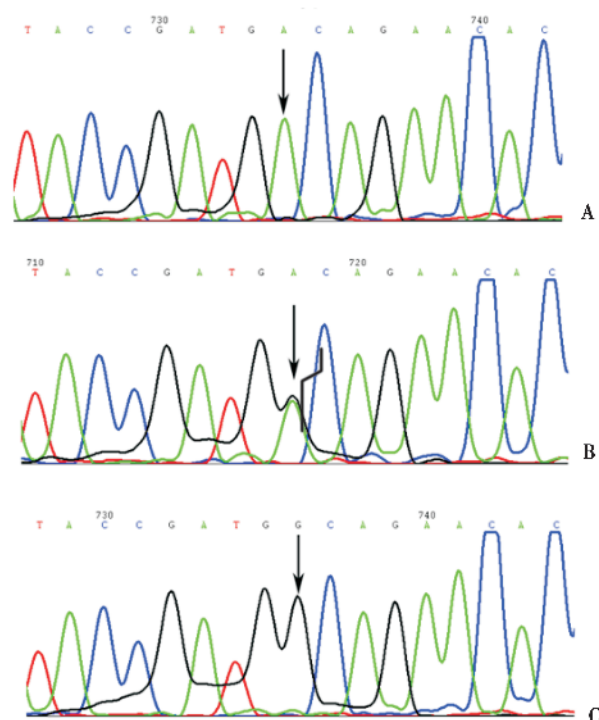


图 1 *SLC33A1* 基因外显子 1 的部分测序图

Fig.1 Partial nucleotide sequences of the exon 1 in *SLC33A1* gene

A: wide-type; B: heterozygote; C: homozygote. Arrow showed C. 512A > G

## 3 讨 论

遗传性痉挛性截瘫是一类具有高度临床和遗传异质性的神经系统疾病, 此病起病隐匿, 病情进展相对缓慢, 且复杂型 HSP 常伴有其它系统的临床症状, 因而对于此病的诊断还需要结合分子遗传学的检测, 找到其致病性突变。林鹏飞等<sup>[5]</sup>于 2008 年首次报道了一个来自中国的 ADHSP 大家

表2 HSP患者中 *SLC33A1* 基因的遗传变异所在的位置、基因型及等位基因频率Table 2 Characters of *SLC33A1* genetic variations in HSP patients

Region	Genetic variation	Genotype frequency	Allele frequency	Identity in dbSNP
Exon-1	c.512A>G	AA/AG/GG; 0.614/0.343/0.043	A/G; 0.786/0.214	rs3804769
Intron-1	c.776-149C>T	CC/CT/TT; 0.986/0.014/0	C/T; 0.993/0.007	rs116284338
Intron-2	c.964-64T>C	TT/TC/CC; 0.557/0.386/0.057	T/C; 0.750/0.250	rs422497
Intron-2	c.964-59A>G	AA/AG/GG; 0.957/0.029/0.014	A/G; 0.971/0.029	rs2270754
Intron-3	c.1148+136T>A	TT/TA/AA; 0.957/0.043/0	T/A; 0.979/0.021	rs145075455
Intron-3	c.1149-133A>G	AA/AG/GG; 0.943/0.057/0	A/G; 0.971/0.029	rs139755873
Intron-4	c.1266+51G>A	GG/GA/AA; 0.472/0.414/0.114	G/A; 0.679/0.321	rs7649631
Intron-5	c.1482+203G>A	GG/GA/AA; 0.743/0.17/0.03	G/A; 0.857/0.143	rs382534

系是由 *SLC33A1* 基因的错义突变(p.Ser113Arg)所致。随后,德国学者在 220 例欧洲人群中进行了 *SLC33A1* 基因的突变筛查,但未发现任何致病性突变<sup>[7]</sup>。2012 年 Huppke 等<sup>[9]</sup>报道了一个致死性常染色体隐性疾病,临床表现为先天性白内障、耳聋、低铜和血浆铜蓝蛋白,是由 *SLC33A1* 基因的纯合突变所致。但患者没有表现出 HSP 症状,作为其携带者的父母也并没有 HSP 的表现。

本研究在长期积累的 HSP 散发病例中,首先排除了三个常见的 HSP 致病基因的突变后,进行了 70 例患者的 *SLC33A1* 基因的突变检测。对 *SLC33A1* 基因的全部编码外显子区域进行了直接测序,除了发现了 8 个已存在于数据库中 SNP 外,未找到任何致病性突变。其中,在我们中国 HSP 患者中发现的一个 cSNP(rs3804769)同德国学者在 220 例患者中所筛查到的一致<sup>[7]</sup>,但该位点次要等位基因频率我们发现的(30/140=0.214)高于德国(16/440=0.036)。此外,尽管德国学者通过设计 *SLC33A1* 基因的 MLPA(multiplex ligation-dependent probe amplification)探针,进行该基因区域拷贝数目变异的检测,但并未找到任何重复或缺失片段<sup>[7]</sup>。

至今为止,除了中国的一个大家系外,国际上尚未证实 *SLC33A1* 基因突变可以引至任何其他患者/家系的 HSP。我们也得到了和德国学者同样的结果,这些结果表明 *SLC33A1* 对 HSP 的致病性仍须进一步的研究及核实。

#### 参考文献

[1] Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias[J]. Lancet, 1983, 1(8334): 1151-1155.

- [2] Fink JK. Hereditary spastic paraplegia overview[M/OL] //Pagon RA, ed. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington;1993-2013. (2014-02-06) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1509/>.
- [3] Finsterer J, Löscher W, Quasthoff S, et al. Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance[J]. J Neurol Sci, 2012, 318(1-2): 1-18.
- [4] McCorquodale DS 3rd, Ozomaro U, Huang J, et al. Mutation screening of spastin, atlastin, and REEP1 in hereditary spastic paraplegia[J]. Clin Genet, 2011, 79(6): 523-530.
- [5] Lin P, Li J, Liu Q, et al. A missense mutation in SLC33A1, which encodes the acetyl-CoA transporter, causes autosomal-dominant spastic paraplegia (SPG42) [J]. Am J Hum Genet, 2008, 83(6): 752-759.
- [6] Hirabayashi Y, Kanamori A, Nomura KH, et al. The acetyl-CoA transporter family SLC33[J]. Pflugers Arch, 2004, 447(5): 760-762.
- [7] Schlipf NA, Beetz C, Schüle R, et al. A total of 220 patients with autosomal dominant spastic paraplegia do not display mutations in the SLC33A1 gene (SPG42) [J]. Eur J Hum Genet, 2010, 18(9): 1065-1067.
- [8] 李璞. 医学遗传学[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 157-159.
- [9] Huppke P, Brendel C, Kalscheuer V, et al. Mutations in SLC33A1 cause a lethal autosomal-recessive disorder with congenital cataracts, hearing loss, and low serum copper and ceruloplasmin[J]. Am J Hum Genet, 2012, 90(1): 61-68.

(编辑 孙慧兰)