

· 论 著 ·

SCN1A 基因多态性与全面性癫痫伴热性惊厥附加症临床表型的关系

王波¹, 马启玲¹, 陈光福¹, 黄建林², 操德智³

1. 深圳大学第一附属医院儿科, 广东 深圳 518035;

2. 深圳大学第一附属医院中心实验室, 广东 深圳 518035;

3. 深圳市儿童医院, 广东 深圳 518038

摘要: **目的** 探讨 SCN1A 基因 rs3812718 位点单核苷酸多态性(SNP)与全面性癫痫伴热性惊厥附加症(GEFS+)临床表型间的相关性。**方法** 选择 2015 年 5 月至 2017 年 9 月符合 GEFS+ 诊断标准的患儿 50 例(观察组),选择体检正常健康儿童 50 例作为对照组。应用 MassARRAY 质谱分析技术检测 SCN1A 基因 rs3812718 位点的基因多态性,并收集 GEFS+ 患儿的临床资料包括家系情况、起病年龄、发作类型、头颅影像学资料及脑电图检查结果。**结果** 观察组患儿的 SCN1A 基因 rs3812718 位点的基因型(CC、CT、TT)分布与对照组相比差异有统计意义($P < 0.01$),且等位基因(C、T)频率差异亦存在统计学意义($P < 0.01$),提示 T 等位基因为 GEFS+ 的风险因子。SCN1A rs3812718 位点 TT 基因型的患儿热性惊厥(FS)及热性惊厥附加症(FS+)表型、早起病及阳性家族史的比例均高于 CC+CT 型患儿,差异具有统计学意义(P 均 < 0.05)。rs3812718 位点基因多态性与头颅影像学异常、脑电图异常等无关(P 均 > 0.05)。**结论** SCN1A 基因的 rs3812718 位点多态性与 GEFS+ 的易感性及部分临床表型有关,T 等位基因为 GEFS+ 患儿发病的风险因子。

关键词: 全面性癫痫伴热性惊厥附加症; SCN1A 基因; 单核苷酸多态性; 基因型分布; 等位基因频率

中图分类号: R 742.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)05-0581-04

Relationship between SCN1A gene polymorphism and clinical phenotype of generalized epilepsy with febrile seizures plus

WANG Bo*, MA Qi-ling, CHEN Guang-fu, HUANG Jian-lin, CAO De-zhi

* Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518035, China

Corresponding author: MA Qi-ling, E-mail: qilingsz@aliyun.com

Abstract: Objective To explore the clinical relationship between SCN1A gene rs3812718 locus single nucleotide polymorphism(SNP)and clinical phenotype of generalized epilepsy with febrile seizures plus(GEFS+). **Methods** Fifty children conformed with the diagnostic criteria of GEFS+ (observation group) and 50 healthy children for physical examination (control group) were selected. MassARRAY mass spectrometry analysis technique was used to detect SCN1A rs3812718 locus gene polymorphisms. The clinical data including family situation, age of onset, seizure type, cranial imaging data and electroencephalogram(EEG) finding were collected. **Results** There was significant difference in genotype(CC, CT, TT) distribution of SCN1A rs3812718 locus between observation group and control group($P < 0.01$), and there also was significant difference in the allele (C, T) frequency between observation group and control group ($P < 0.01$), indicating that the allele T was a risk factor of GEFS+. The proportions of phenotype of febrile seizure (FS) and febrile seizure plus(FS+), early onset and positive family history in children with TT genotype at SNP rs3812718 locus were all higher than those in children with CC+CT genotypes (all $P < 0.05$). The rs3812718 locus gene polymorphism was not correlated with cranial imaging abnormality and EEG abnormality (all $P > 0.05$). **Conclusion** SCN1A rs3812718 locus gene polymorphism is correlated with susceptibility of GEFS+ and partial clinical phenotype, and allele T is a risk factor of onset for GEFS+ patients.

Key words: Generalized epilepsy with febrile seizures plus; SCN1A gene; Single nucleotide polymorphism; Genotype

distribution; Allele frequency

全面性癫痫伴热性惊厥附加症(GEFS+)属于家族遗传性癫痫综合征,1997年由Scheffer和Berkovic^[1]首先报道,在2010年作为一种新的综合征被国际抗癫痫联盟列入癫痫综合征分类中^[2]。既往的研究已经表明GEFS+属于离子通道病,而目前对其的研究主要集中在致病基因上,已经证实的相关致病基因有5种离子通道蛋白亚单位基因,分别为编码电压门控钠离子 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 亚单位的SCN1A、SCN2A、SCN1B基因和编码配体门控氯离子通道的GABAA受体 $\gamma 2$ 、 δ 亚单位的GABRG2、GABRD基因。其中以SCN1A基因的突变最为多见^[3-5]。研究表明,SCN1A基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是发热相关性癫痫(EFS)的危险因素^[3],但该SNP与GEFS+及其临床表型间的相关性则未见报道。本研究通过对50例诊断GEFS+的患儿SCN1A基因rs3812718位点的基因多态性进行检测,分析临床表型与该基因位点的关系,进一步探讨SCN1A基因多态性在GEFS+发病机制中的作用。报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 根据2001年国际抗癫痫联盟关于GEFS+癫痫综合征的诊断标准^[2],将2015年5月至2017年9月在深圳大学第一附属医院和深圳市儿童医院癫痫门诊和病房的50例患儿作为观察组,其中男31例,女19例,年龄1~10岁,病程2个月~3年。另以同期深圳大学第一附属医院体检正常的50例健康儿童为对照组,无癫痫病史及家族史,个体间无亲缘关系,男35例,女15例,年龄3~13岁。本研究经医院医学伦理委员会批准并得到入组儿童家属的知情同意。

1.2 临床资料收集 收集GEFS+患儿的家系情况、起病年龄、发作类型、头颅影像学资料及脑电图检查结果。

1.3 SCN1A基因多态性分析 抽取研究对象外周静脉血2 ml EDTA抗凝,用MagCore全自动核酸仪器提取EDTA抗凝全血DNA, Nanodrop检测系统检测待检基因组DNA浓度,使用Agena官网的Assay Designer在线设计软件设计rs2812718的引物与产物相关信息T:CCT ATC CTT TAC TCT AAT CAC TTT;C:CCT ATC CTT TAC TCT AAT CAC TTC。PCR反应体系包括0.5 μ l(10XPCR Buffer with 20 mM $MgCl_2$), 0.4 μ l(25 mM $MgCl_2$), 0.1 μ l(25 mM dNTP Mix),

0.5 μ l(1 μ M Primer Mix), 0.2 μ l(5 M/ μ l PCR Enzyme), 1.3 μ l(灭菌的HPLC级水)。反应条件:95 $^{\circ}C$ 2 min, 95 $^{\circ}C$ 30 s, 56 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 60 s,此步骤45个循环。SAP反应:PCR扩增后剩余的dNTP将被去磷酸化降解,SAP反应体系包括1.53 μ l灭菌的HPLC级水,0.17 μ l SAP Buffer, 0.30 μ l SAP Enzyme。SAP反应条件:37 $^{\circ}C$ 40 min, 85 $^{\circ}C$ 5 min, 4 $^{\circ}C$ 保温。延伸反应:延伸反应体系包括0.619 μ l灭菌的HPLC级水,0.2 μ l iPLEX Buffer, 0.2 μ l iPLEX Termination mix, 0.94 μ l Extend Primer Mix, 0.041 μ l iPLEX Enzyme。延伸反应条件:94 $^{\circ}C$ 30 s, 94 $^{\circ}C$ 5 s, 52 $^{\circ}C$ 5 s, 80 $^{\circ}C$ 5 s,后两条件进行5个循环,此大步骤40个循环。最后将延伸后的产物均匀的填充阳离子交换树脂脱盐,混合后加41 μ l的灭菌HPLC级水,混合后在旋转器上颠倒摇匀15 min,以3 200 g(标准板离心机的4 000 rpm)将板离心5 min。将纯化后的产物进行质谱点样检测,使用MassARRAY Typer 4.0软件分析结果。

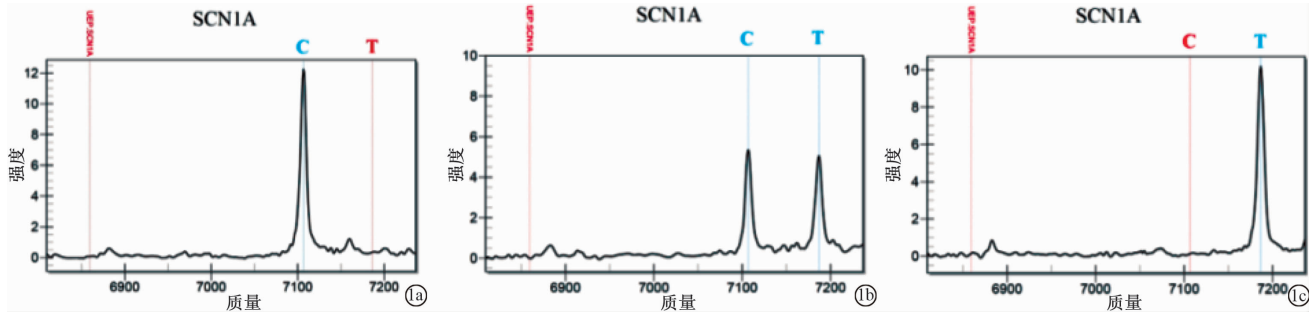
1.4 统计学分析 运用SPSS 22.0软件进行数据分析,应用 χ^2 检验分析观察组与对照组基因型分布是否符合Hardy-Weinberg定律。基因型分布和等位基因频率采用频数和百分数表示,比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象临床资料 观察组患儿的临床表现有典型的热性惊厥(FS)24例(48.0%),热性惊厥附加症(FS+)20例(40.0%),FS+伴肌阵挛3例(6.0%),FS+伴颞叶癫痫1例(2.0%),FS+伴失神发作1例(2.0%),FS+伴失张力发作1例(2.0%),无失神伴肌阵挛、FS+伴不典型失神发作以及GEFS+的严重表型如肌阵挛-失张力癫痫(MAE)和婴儿严重肌阵挛癫痫(SMEI)。

2.2 SCN1A基因rs3812718位点基因型和等位基因的频率分布 利用Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验观察组和对照组,均符合该定律,说明两组人群均具有群体代表性。两组SCN1A基因rs3812718位点的三种基因型(CC、CT、TT)和等位基因(C、T)的频率比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。见表1。SCN1A基因rs3812718位点各基因型判别图见图1。

2.3 SCN1A基因多态性与GEFS+临床特点的关系 SCN1A基因SNP位点(rs3812718)在TT基因型的GEFS+患儿FS及FS+的比例高于CC+CT型患儿,



注:1a:CC 型;1b:CT 型;1c:TT 型。

图 1 SCN1A 基因 rs3812718 位点各基因型质谱分析判别图

表 1 观察组和对照组 rs3812718 位点基因型及等位基因频率比较

组别	例数	基因型[例(%)]			等位基因(%)	
		CC	CT	TT	C	T
观察组	50	3(6.0)	20(40.0)	27(54.0)	26.0	74.0
对照组	50	17(34.0)	28(56.0)	5(10.0)	62.0	38.0
χ^2 值		26.258			26.299	
P 值		0.000			0.000	

表 2 SCN1A 基因多态性与 GEFS + 临床特点的关系例 (%)

临床特点	CC + CT	TT	χ^2 值	P 值
FS	9(18.0)	15(30.0)	7.298	0.026
FS +	14(22.0)	6(12.0)	7.638	0.022
FS + 伴其他发作类型	1(2.0)	5(10.0)	0.068	0.794
起病年龄早(≤3 岁)	8(16.0)	17(34.0)	3.945	0.047
家族史阳性	5(10.0)	15(30.0)	5.368	0.021
头颅影像学异常	1(2.0)	2(4.0)	0.206	0.650
脑电图异常	3(6.0)	8(16.0)	1.991	0.158

且 TT 基因型患儿起病年龄明显早于 CC + CT 基因型患儿,家族史阳性率也明显高于 CC + CT 型,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),但在头颅影像学异常及脑电图异常方面则 TT 基因型与 CC + CT 型无统计学差异($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨论

癫痫是人类第二常见的慢性神经系统症状,其特征是一个或多个癫痫的发作,全世界有超过百万人患有各种类型的癫痫,各种环境因素都可能对癫痫易感性产生影响,其中遗传因素起着关键作用。GEFS + 在癫痫分类中属于家族遗传性癫痫综合征,在家系分析的基础上,目前 GEFS + 的遗传学研究主要集中在基因定位方面,以 SCN1A 基因的研究最受关注。SCN1A 是电压门控钠离子通道,在膜兴奋性中起关键作用,其突变显示不完全的外显率和可变表达性,所致癫痫的严重程度可能取决于突变的位置和类型、突变是自发的还是遗传的以及修饰等位基因的作用,而新型致病性 SCN1A 突变的鉴定可能最终提高癫痫治疗的发展和预后能力^[5]。常见的 SCN1A IVS5-91G

> A(rs3812718) 基因多态性被认为是癫痫易感性和治疗反应的可能修饰因子。rs3812718 位于一个保守的剪接位点的供体区域内^[6],其主要等位基因 A 可通过破坏 5' 剪接供体部位外显子的新生副本,从而降低这种外显子相对于成人外显子的表达,新生的外显子在早期发育阶段优先表达,癫痫发作后可上调。研究认为 SCN1A 基因 rs3812718 基因多态性可能促进 GEFS + 的发生,在 SCN1A 基因中,rs3812718 最初被发现于 SMEI 患者中,其后证明是一多态性位点,通过将不带电荷的极性 R 基氨基酸苏氨酸转为非极性 R 基氨基酸丙氨酸,从而改变 SCN1A 蛋白的空间构型,进而改变钠通道的通透性及导电性。本研究发现,SCN1A 基因 rs3812718 位点观察组 CT、TT 基因型频率及观察组 T 等位基因频率均高于对照组,提示 SCN1A 基因 rs3812718 位点多态性与 GEFS + 易感性可能有关联,携带 T 等位基因人群 GEFS + 发病风险可能会增加,与国外报道一致^[6]。

GEFS + 的发作形式具有显著的异质性^[7-8],最常见的表型是典型 FS,其次是 FS +,其他少见的表型包括 FS + 伴失神发作、FS + 伴肌阵挛发作、FS + 伴失张力发作或 FS/FS + 伴部分性发作;最严重和少见的表型为癫痫性脑病,包括肌阵挛站立不能性癫痫和婴儿严重肌阵挛癫痫。有研究对 600 多例 GEFS + 和 30 多个家系的研究显示,无论是没有亲缘关系还是同一家系的患者,具有相同 SCN1A 突变位点的不同患者发病类型差距很大,认为 SCN1A 基因多态性的表象差异与基因缺失、单核苷酸多态性、基因重复等导致癫痫相关基因的个体差异有关,使得 GEFS + 个体在癫痫易感性上有不同的结局^[9-10]。对 164 例白种人 EFS 的等位基因和基因型频率的比较显示 SCN1A rs3812718 与 EFS 具有相关性^[8]。此外,通过对成人癫痫患者 SCN1A 基因 SNP 的多个位点的研究,认为 SCN1A 基因 rs3812718 位点基因多态性可能促进局灶性癫痫的易感性^[11]。本文通过对 GEFS + 患儿的临床特征分析发现,SCN1A SNP 位点

(rs3812718)的多态性与某些临床特征相关,TT 基因型的患儿 FS 及 FS + 表型的比例明显高于 CC + CT 基因型的患儿,TT 基因型患儿的起病年龄明显早于 CC + CT 型的 GEFS + 患儿,且 TT 基因型患儿的家族史阳性率亦明显高于 CC + CT 基因型患儿,表明 T 等位基因与 GEFS + 的临床表型相关,但与头颅影像学及 EEG 异常之间无相关性。

本研究发现,SCN1A 基因的 SNP 位点(rs3812718)多态性与 GEFS + 的易感性相关,T 等位基因为风险因子;且发现携带 TT 基因型的患儿 FS 及 FS + 表型的比例高于其他基因型的患儿,并具有早起病及家族史阳性率高的特点。但本研究也存在一些不足之处,如样本数量太少,未对每例患儿进行家系分析,未检测患儿体内的 SCN1A 基因,以及比较不同患儿 SCN1A 基因突变的是否存在差异。今后将继续收集 GEFS + 患儿标本及家系情况,分析 SCN1A 变异情况及不同基因变异情况下的临床表型分析等,以期为进一步认识 GEFS + 的致病机制提供一定依据。

参考文献

[1] Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes[J]. *Brain*, 1997, 120(Pt 3): 479-490.

[2] Engel J Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and terminology[J]. *Epilepsia*, 2001, 42(6): 796-803.

[3] Tang L, Lu X, Tao Y, et al. SCN1A rs3812718 polymorphism and susceptibility to epilepsy with febrile seizures: a Meta-analysis[J]. *Gene*, 2014, 533(1): 26-31.

[4] Kivity S, Oliver KL, Afawi Z, et al. SCN1A clinical spectrum includes the self-limited focal epilepsies of childhood[J]. *Epilepsy Res*, 2017, 131: 9-14.

[5] Gauthier AC, Manganas LN, Mattson RH. A novel inherited SCN1A mutation associated with GEFS+ in benign and encephalopathic epilepsy[J]. *J Clin Neurosci*, 2017, 40: 82-84.

[6] Le Gal F, Salzmann A, Crespel A, et al. Replication of association between a SCN1A splice variant and febrile seizures[J]. *Epilepsia*, 2011, 52(10): 135-138.

[7] Kumari R, Lakhan R, Kumar S, et al. SCN1A IVS5-91G > A polymorphism is associated with susceptibility to epilepsy but not with drug responsiveness[J]. *Biochimie*, 2013, 95(6): 1350-1353.

[8] Reid CA, Berkovic SF, Petrou S. Mechanisms of human inherited epilepsies[J]. *Prog Neurobiol*, 2009, 87(1): 41-57.

[9] Barela AJ. An Epilepsy Mutation in the Sodium Channel SCN1A That Decreases Channel Excitability[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(10): 2714-2723.

[10] Myers KA, Burgess R, Afawi Z, et al. De novo SCN1A pathogenic variants in the GEFS+ spectrum: Not always a familial syndrome[J]. *Epilepsia*, 2017, 58(2): 26-30.

[11] Balan S, Vellichirammal NN, Banerjee M, et al. Failure to find association between febrile seizures and SCN1A rs3812718 polymorphism in south Indian patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis[J]. *Epilepsy Res*, 2012, 101(3): 288-292.

收稿日期:2017-11-22 修回日期:2017-12-22 编辑:王国品