

论著·临床研究

SCN1A 基因 rs3812718 多态性与全面性 癫痫伴热性惊厥附加症的关系

马启玲¹ 王波¹ 陈光福¹ 黄建林² 李赞² 操德智³ 刘荣添¹

(1. 深圳市第二人民医院儿科, 广州 深圳 518035;
2. 深圳市第二人民医院中心实验室, 广州 深圳 518035;
3. 深圳市儿童医院神经内科, 广州 深圳 518000)

[摘要] **目的** 探讨SCN1A基因rs3812718基因多态性与全面性癫痫伴热性惊厥附加症(GEFS+)的相关性, 以为GEFS+的诊治提供潜在的分子靶点。**方法** 采用MassARRAY阵列基因分析系统的iPLEX技术检测50例GEFS+患者和50例健康对照的SCN1A基因rs3812718位点多态性、基因型频率、等位基因频率。**结果** 将SCN1A基因rs3812718位点的CC、CT、TT基因型频率在GEFS+组和对照组进行比较, TT基因型频率的差异有统计学意义; 等位基因T的频率在GEFS+组和对照组间的差异有统计学意义($P<0.05$)。在三种遗传模式下(CT/CC、TT/CC、T/C), GEFS+的发病风险分别是对照组的4.05倍(95%CI: 1.04~15.69)、30.60倍(95%CI: 6.46~144.85)和4.64倍(95%CI: 2.54~8.48)。**结论** SCN1A基因rs3812718基因多态性是GEFS+的危险因素, 携带T等位基因人群的GEFS+发病风险可能增加。 [中国当代儿科杂志, 2018, 20(2): 130-133]

[关键词] 钠通道 α -1亚基基因; rs3812718; 单核苷酸多态性; 全面性癫痫伴热性惊厥附加症; 儿童

Association between SCN1A rs3812718 polymorphism and generalized epilepsy with febrile seizures plus

MA Qi-Ling, WANG Bo, CHEN Guang-Fu, HUANG Jian-Lin, LI Yun, CAO De-Zhi, LIU Rong-Tian. Department of Pediatrics, Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518035, China (Chen G-F, Email: szchengf@163.com)

Abstract: Objective To investigate the association between SCN1A rs3812718 polymorphism and generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+), and to provide potential molecular targets for the diagnosis and treatment of GEFS+. **Methods** The iPLEX technique in the MassARRAY system was used to determine SCN1A rs3812718 polymorphism, genotype frequency, and allele frequency in 50 patients with GEFS+ and 50 healthy controls. **Results** As for the frequencies of CC, CT, and TT genotypes in SCN1A rs3812718, there was a significant difference in the frequency of TT genotype between the GEFS+ group and the control group ($P<0.05$). There was also a significant difference in the frequency of T allele between the two groups ($P<0.05$). Compared with those carrying CC genotype or C allele, the individuals with CT genotype, TT genotype or T allele had a higher risk of developing GEFS+ (CT/CC: $OR=4.05$, 95%CI: 1.04-15.69; TT/CC: $OR=30.60$, 95%CI: 6.46-144.85; T/C: $OR=4.64$, 95%CI: 2.54-8.48). **Conclusions** SCN1A rs3812718 polymorphism is a risk factor for GEFS+, and the population carrying T allele may have an increased risk of GEFS+. [Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(2): 130-133]

Key words: Voltage gated sodium channel α 1-subunit; rs3812718; Single nucleotide polymorphism; Generalized epilepsy with febrile seizures plus; Child

[收稿日期] 2017-10-20; [接受日期] 2017-12-21
[作者简介] 马启玲, 女, 学士, 主任医师。
[通信作者] 陈光福, 男, 主任医师。

全面性癫痫伴热性惊厥附加症 (generalized epilepsy with febrile seizure plus, GEFS+) 是 Scheffer 等^[1]于 1997 年首先报道的一种临床表型多样并具有显著遗传异质性的癫痫综合征。2001 年国际抗癫痫联盟正式将 GEFS+ 纳入新的癫痫综合征分类, 其临床特征为具有高热惊厥家族史, 首次热性惊厥 (febrile seizure, FS) 后出现无热惊厥, 或 6 岁以后仍有热性惊厥, 或兼有其他发作形式的全面性癫痫综合征, 并排除了症状性癫痫。GEFS+ 最常见的表型为 FS 和热性惊厥附加症 (febrile seizure plus, FS+), 少见表型包括 FS+ 伴失神发作、FS+ 伴肌阵挛发作、FS+ 伴失张力发作或 FS/FS+ 伴局限性发作、FS+ 伴颞叶癫痫, 最严重和少见的表型为癫痫性脑病。GEFS+ 部分患儿可出现智力运动发育落后或倒退, 伴或不伴共济失调和锥体束征。目前研究表明编码钠通道 $\alpha 1$ -亚基 (voltage-gated sodium channel $\alpha 1$ -subunit, SCN1A) 的基因突变是导致 GEFS+ 最常见的原因^[2]。由于 GEFS+ 有遗传外显率不全、表型异质和遗传异质的特点, 其癫痫表型除了与 SCN1A 基因突变的类型和位置有关外, 也与 SCN1A 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 相关, 国外有研究表明 SCN1A 基因 rs3812718 位点 SNP 是热性惊厥相关性癫痫的危险因素^[3]。但有关 SCN1A 基因 rs3812718 位点与 GEFS+ 易感的相关性尚未见报道。本研究采用 MassARRAY 阵列基因分析系统的 iPLEX 技术检测 SCN1A 基因 rs3812718 位点的基因型频率及等位基因的分布情况, 分析 SCN1A 基因 rs3812718 位点

与 GEFS+ 的关系, 探讨 GEFS+ 的遗传易感性, 为 GEFS+ 的诊断和治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

50 例 GEFS+ 患者来自深圳市第二人民医院和深圳市儿童医院, 其中男 31 例、女 19 例, 年龄 1~10 岁, 病程 2 个月~3 年, 所有病例均符合 2001 年国际抗癫痫联盟 (international league against epilepsy, ILAE) 有关 GEFS+ 癫痫综合征诊断标准^[4]。对照组 50 例来自深圳市第二人民医院健康体检儿, 无癫痫病史或癫痫家族史, 个体间无亲缘关系, 其中男 67 例、女 33 例, 年龄 3~13 岁。

1.2 基因组 DNA 提取

采集研究对象外周静脉血 2 mL (EDTA 抗凝), 提取 DNA, 检测 DNA 浓度, 确保浓度控制在 10 ng/ μ L 以上、核酸纯度控制在 1.6~2.0 之间, 每一个反应的上样浓度控制在 5~100 ng。

1.3 iPLEX 技术检测 SCN1A 基因 rs3812718 多态性

使用 Assay Designer 在线设计软件设计引物 (表 1)。PCR 反应体系: 0.5 μ L 10 \times PCR buffer (with 20 mmol/L MgCl₂), 0.4 μ L 25 mmol/L MgCl₂, 0.1 μ L 25 mmol/L dNTP Mix, 0.5 μ L 1 μ mol/L Primer Mix, 0.2 μ L 5 mol/L PCR Enzyme, 1.3 μ L 灭菌 HPLC 级水。将 2 μ L DNA 样本与 3 μ L PCR 反应体系混合进行 PCR 反应。

表 1 rs3812718 的引物与产物相关信息

位点与基因型	PCR 扩增引物与延伸引物	分子量 (Dalton)
rs3812718	F: 5'-ACGTTGGATGTAGGTACAAAGAGCCTATCC-3' R: 5'-ACGTTGGATGCGCACTTTCAGAGTCTTGAG-3' E: 5'-CCTATCCTTTACTCTAATCACTT-3'	
T	CCTATCCTTTACTCTAATCACTTT	7186.6
C	CCTATCCTTTACTCTAATCACTTC	7106.7

PCR 扩增后剩余的 dNTP 去磷酸化降解。SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) 反应体系包括 1.5 μ L 灭菌 HPLC 级水、0.2 μ L SAP buffer 和 0.3 μ L SAP Enzyme。SAP 反应程序为: 37 $^{\circ}$ C 40 min (水解对硝基苯磷酸盐), 85 $^{\circ}$ C 5 min (酶失活), 4 $^{\circ}$ C 保温 (防止核酸降解)。

延伸反应体系: 0.6 μ L 灭菌 HPLC 级水、0.2 μ L iPLEX Buffer、0.2 μ L iPLEX Termination mix、0.9 μ L Extend Primer Mix 和 0.041 μ L iPLEX Enzyme。延伸反应程序包括 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; PCR 扩增: 94 $^{\circ}$ C 5 s、52 $^{\circ}$ C 5 s、80 $^{\circ}$ C 5 s, 扩增 40 个循环 (后两个条件 5 个循环); 延伸 72 $^{\circ}$ C 3 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。

将延伸后的产物均匀地填充阳离子交换树脂脱盐。纯化并进行质谱点样检测。使用MassARRAY Typer 4.0 软件分析结果。

1.4 统计学分析

运用SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理。基因型和等位基因频率采用基因计数法，等位基因和基因型分布的比较采用 χ^2 检验。以优势比(OR)及95%可信区间(95%CI)表示相对危险度。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质谱检测图谱与基因型结果

检测到SCN1A 基因rs3812718 位点的野生型、杂合型、突变型的质谱峰图，延伸引物峰仅于分子量7106.7 Da 处出现的为野生型(CC 型，如图1A)，在分子量7106.7 Da 和7186.6 Da 处均出现峰的为杂合型(CT 型，如图1B)，仅在分子量7186.6 Da 处出现的为突变型(TT 型，如图1C)。

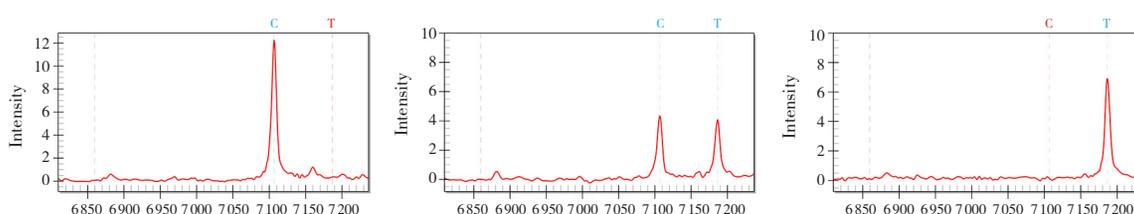


图1 SCN1A 基因rs3812718 位点的基因型 A: SCN1A 基因rs3812718 位点CC型; B: SCN1A 基因rs3812718 位点CT型; C: SCN1A 基因rs3812718 位点TT型。红色虚线表示该位点延伸引物峰的位置，蓝色字母表示检测到的等位基因，红色字母表示未检测到的等位基因。

2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

对GEFS+ 组与对照组SCN1A 基因rs3812718 的基因型分布频率进行Hardy-Weinberg 遗传平衡检验，差异无统计学意义($P > 0.05$)。

以CC 型作为参照，SCN1A 基因rs3812718 位点的CC、CT、TT 基因型频率在GEFS+ 组和对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$)；以等位基因C

作为参照，等位基因C、T 频率在观察组和对照组间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。在三种遗传模式下(CT/CC、TT/CC、T/C)，GEFS+ 的风险分别是对照组的4.05 倍(95%CI: 1.04~15.69)、30.60 倍(95%CI: 6.46~144.85) 和4.64 倍(95%CI: 2.54~8.48)，提示T 等位基因为GEFS+ 发病的危险因素。见表2。

表2 两组SCN1A 基因rs3812718 基因型频率的比较 [例(%)]

基因型及等位基因	例数	基因型			等位基因	
		CC ^a	CT	TT	C ^a	T
对照组	50	17(34)	28(56)	5(10)	62(62)	38(38)
GEFS+ 组	50	3(6)	20(40)	27(54)	26(26)	74(74)
OR 值(95%CI)			4.05(1.04~15.69)	30.60(6.46~144.85)		4.64(2.54~8.48)
χ^2 值			4.485	24.269		26.299
P 值			0.034	<0.001		<0.001

注：a 示作为参照。

3 讨论

癫痫的发生是多种因素引起的，不同个体在相同致病环境作用下并非都发生癫痫，这种差异被称为癫痫易感性。不同个体基因型的差异性可

导致癫痫易感性的不同。GEFS+ 属于离子通道病，研究^[5]表明，GEFS+ 家系里有四种基因被确认与GEFS+ 发病有关，即SCN1A、SCN2A、SCN1B 和GABAA，这四种基因定位于染色体2q24~q33 上，分别编码钠通道的 $\alpha 1$ 亚基、 $\alpha 2$ 亚基、 β 亚基和

GABA受体 $\gamma 2$ 亚基,这些基因的突变可导致相应通道蛋白的结构和功能改变,使启动和传播神经元的动作电位异常而导致癫痫发作。与热性惊厥相关的各种癫痫综合征病例中,包括GEFS+、婴儿重症肌阵挛性癫痫和顽固性儿童强直-阵挛癫痫等疾病均发现SCN1A基因有多个点突变^[6-7],而且SCN1A是与GEFS+相关的最为重要的钠通道基因,其突变数量最多。郭嘉诚等^[8]发现FS与SCN1A基因的c.2650GA错义突变有关。意大利学者^[9]发现FS患者存在SCN1A基因外显子16的3169G>A变异。

GEFS+具有表型异质性和遗传异质性,有学者^[10]对600多例GEFS+和30多个家系的GEFS+进行研究显示,无论有无亲缘关系,相同SCN1A突变患者的临床表型差异大,认为SCN1A基因多态性的表象差异及基因缺失、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,使得GEFS+个体在癫痫易感性方面有不同的结局。韩剑虹等^[11]关于成人局灶性癫痫的研究表明,SCN1A基因rs3812718基因多态性可能促进局灶性癫痫的发生。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基的苏氨酸转为非极性R基的丙氨酸,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。Kumari^[12]发现,印度北部白种人SCN1A rs3812718多态性与癫痫易感性相关。Tang^[13]的研究显示,高加索白种人SCN1A rs3812718多态性是成年局灶性癫痫的危险因素。Le Gal^[3]对164例白种人癫痫伴热性惊厥(EFS)的等位基因和基因型频率进行比较,SCN1A rs3812718与EFS具有相关性。本研究发现,GEFS+组的SCN1A基因rs3812718位点TT基因型频率、T等位基因频率均高于对照组,且TT/CC型遗传模式的风险值是对照组的30.6倍。提示SCN1A基因rs3812718位点多态性与GEFS+易感性可能有关联,携带T等位基因人群的GEFS+发病风险可能增加,而TT型的人群GEFS+发病风险更高,与国外报道^[3]一致。

综上所述,SCN1A基因rs3812718位点TT基因型在GEFS+患者中检出率高,其多态性可能与GEFS+易感性有关。

[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(Pt3): 479-490.
- [2] 吴光声, 高峰. SCN1A基因突变和全面性癫痫伴热性惊厥附加症相关研究进展[J]. 浙江医学, 2014, 36(17): 1499-1503.
- [3] 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): e135-138.
- [4] Wieser HG, Blume WT, Fish D, et al. ILAE Commission Report. Proposal for a new classification of outcome with respect to epileptic seizures following epilepsy surgery[J]. Epilepsia, 2001, 42(2): 282-286.
- [5] Camfield PJ, Camfield CL. Febrile seizures and genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+)[J]. Epileptic Disord, 2015, 17(2): 124-133.
- [6] 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.
- [7] Binini N, Sancini G, Villa C, et al. Identification of two mutations in cis in the SCN1A gene in a family showing genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) and idiopathic generalized epilepsy (IGE) [J]. Brain Res, 2017, 1677: 26-32.
- [8] 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, 35(2): 133-137.
- [9] Malacarne M, Madia F, Gennaro E, et al. Lack of SCN1A mutations in familial febrile seizures[J]. Epilepsia, 2002, 43(5): 559-562.
- [10] Barela AJ, Waddy SP, Lickfett JG, et al. An epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A that decreases channel excitability[J]. Neurosci, 2006, 26(10): 2714-2723.
- [11] 韩剑虹, 熊静, 张婕, 等. 云南省临沧市四种少数民族癫痫SCN1A基因和单核苷酸多态性的研究[J]. 医学信息, 2014, 27(12): 16-17.
- [12] Kumari R, Lakhani 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.
- [13] Tang L, Lu X, Tao Y, et al. SCN1A rs3812718 polymorphism and susceptibility to epilepsy with febrile seizures: a meta-analysis[J]. Gene, 2014, 1533(1): 26-31.

(本文编辑: 俞燕)