

家族性偏瘫性偏头痛 CACNA1A 基因新突变的研究*

刘祥琴¹, 马勋泰², 杜琼¹, 晏宁^{3△}

(1. 四川省医学科学院/四川省人民医院检验科, 成都 610071; 2. 西南医科大学附属医院神经内科, 四川泸州 646000; 3. 重庆医科大学附属大学城医院神经内科 401331)

[摘要] **目的** 探索家族性偏瘫性偏头痛(FHM)与 CACNA1A 基因突变的关系。**方法** 通过提取一家系患者和健康人及 1 000 例健康对照组 DNA 进行 CACNA1A 基因测序研究, 并进行生物信息学分析。**结果** 位于 CACNA1A 基因的 8 号外显子的新突变位点(c. 1168A>G)导致天门冬酰胺替换为天冬氨酸(N390D)。**结论** CACNA1A 基因突变 N390D 是新发现的引起 FHM 的致病突变因素。

[关键词] 先兆偏头痛; 基因; CACNA1A; 点突变

[中图分类号] R277.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)10-1348-02

Study on novel mutation of CACNA1A gene in familial hemiplegic migraine*

Liu Xiangqin¹, Ma Xuntao², Du Qiong¹, Yan Ning^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Sichuan Academy of Medical Sciences / Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610071, China; 2. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. Department of Neurology, University Town Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between familial hemiplegic migraine (FHM) with the mutation of CACNA1A gene. **Methods** Total genomic DNA of a family affected members and 1 000 normal controls was extracted for conducting the CACNA1A gene sequencing research and the bioinformatics analysis. **Results** The novel mutation site c. 1168A>G of exon located in CACNA1A gene led to Asn to be replaced with Asp (N390D). **Conclusion** The mutation(N390D) of CACNA1A gene is a newly found novel pathogenic mutation lead to familial hemiplegic migraine.

[Key words] migraine with aura; genes; CACNA1A; point mutation

偏头痛是一种复杂的慢性血管紊乱性疾病, 以发作性搏动性头痛为特征, 表现为一侧或双侧头部跳痛, 伴有恶心、呕吐等植物神经症状, 是与心理、社会因素相关的常见心身疾病。家族性偏瘫性偏头痛(familial hemiplegic migraine, FHM)是一种比较少见的带有先兆性的较严重疾病, 它常呈单基因常染色体显性遗传。目前, 已报道有 CACNA1A、ATP1A2、SCN1A 3 种基因突变与该病有关。CACNA1A 基因, 定位于 19p13, 编码 P/Q 型钙离子通道的 1A 亚单位, 全世界范围内找到了 18 个不同的错义突变, 其中 T666M 与 R1347Q 突变是最常见的两种突变^[1-4], 由于 CACNA1A 基因是目前公认的与 FHM 尤其是与伴小脑功能紊乱症状相关的致病基因^[1,5-7], 本研究就在一家系样本中针对该基因进行研究, 对 CACNA1A 基因进行测序, 发现的新突变位点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究家系来源于重庆医科大学附属大学城医院神经内科收集的一个 FHM 家系, 该家系有 3 代 4 人患病, 目前有 3 例患者存活, 家系图见图 1, 所有病患表现有偶发的偏瘫性偏头痛发作, 脑脊液淋巴细胞增多, 除了先证者女儿(Ⅲ:1)外, 均有眼球震颤等小脑功能紊乱的表现。所有患者脑电图未见有明显异常, 先证者的(Ⅱ:1)还有共济失调的表现, MRI 检查提示有小脑萎缩, 其余患者未见小脑影像学改变。诊断符合 2004 年国际头痛协会头痛分类委员会制订的

《偏头痛诊断标准》, 并排除其他类型头痛、脊髓小脑型共济失调、癫痫等其他神经系统疾病^[8]。健康对照组样本采集于 2015 年 1 月至 2015 年 6 月, 在四川省人民医院健康体检中心随机选择健康体检者 1 000 例, 年龄 10~85 岁, 平均(46.5±12.1)岁, 排除偏头痛、偏瘫及脊髓小脑型共济失调、癫痫等其他神经系统疾病及这些神经系统家族史。采集标本前实验参与者均签署了知情同意书, 本研究通过四川省人民医院医学伦理委员会审查。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 抽取家系中偏头痛患者和健康对照组静脉血 5 mL, 用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝后, 采用酚氯仿抽提乙醇沉淀法提取基因组 DNA。

1.2.2 CACNA1A 基因测序 CACNA1A 基因包含 47 个外显子, 其 cDNA 包含 2 506 个氨基酸, 参考 Ophoff RA 的文献结合引物设计软件 Primer3 ([http://bioinfo. ut. ee/primer3-0.4.0/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)), 作者设计了 43 对引物^[1], 采用 Sanger 测序法进行双向测序, 测序试剂为 BigDye Terminator Cycle 测序试剂盒(Applied Biosystems), 按照试剂说明书操作, 使用测序仪为 ABI 3130xl, 序列分析软件采用 Chromas1.62, 测序结果通过 DNAMAN 8.0 软件进行比对。

1.3 生物信息学分析 通过 SIFT HOME([http://sift. jcvi. org/](http://sift.jcvi.org/))和 NCBI 的 HomoloGene 进行突变的初步生物信息学分

析,序列的比应用 DNAMAN 8.0 软件。

2 结果

2.1 测序结果 在 3 位偏头痛患者 CACNA1A 基因测序结果中均发现一新突变,该基因 8 号外显子第 1 168 核苷酸 A 突变为 G 杂合双峰(c. 1168A>G),在 1 000 例健康对照组人群及家系中健康成员则未发现此突变,见图 2。

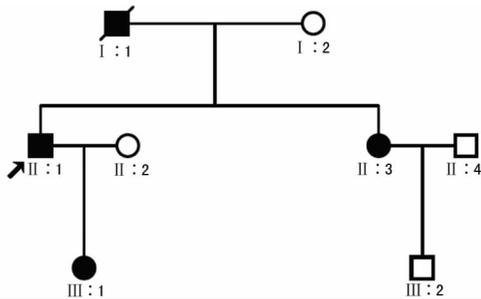
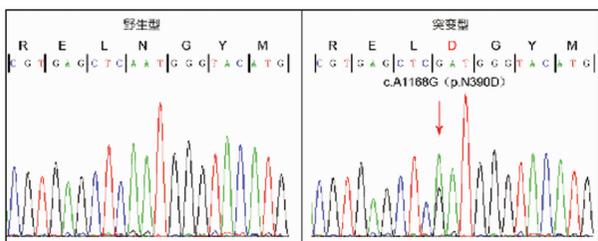


图 1 FHM 家系图



第 8 号外显子第 1 168 位核苷酸显示患者 A/G 杂合双峰(箭头所指),表示在该位点 A 突变为 G。

图 2 CACNA1A 基因突变位点 DNA 序列图

2.2 生物信息学分析结果 该 CACNA1A 基因新突变导致第 390 位氨基酸密码子由 AAT 替换为 GAT,编码氨基酸由天冬酰胺突变为天冬氨酸 N390D。该突变位置氨基酸在各物种中相当保守,通过 9 个物种比对未见该位点有变化。该突变经 SIFT 软件分析预测为“DAMAGE”突变(SIFT Score = 0.02 分),见图 3。



结果显示该段蛋白及突变点(红色框内)氨基酸序列非常保守,突变可能导致疾病的发生。

图 3 9 个物种氨基酸序列比对

3 讨论

本研究在一个偏头痛家系中发现由 CACNA1A 基因一个错义突变(c. 1168A>G,N390D)引起的一系列偏瘫性偏头痛临床表现,包括偶发的偏瘫性偏头痛发作,迟发性的小脑功能紊乱,轻度的脑脊液细胞增多。值得注意的是,虽然患者发生的偏瘫次数不多,但这也符合《偏头痛诊断标准 ICHD-II》对偏瘫性偏头痛的诊断^[8]。

在此家系中,本研究认为 CACNA1A 基因氨基酸的 390 位天门冬酰胺错义突变为天门冬氨酸,导致偏瘫性偏头痛,主要有以下证据:(1)CACNA1A 基因编码形成一个由 4 个同源亚基组成的跨膜域这是已知功能的重要通道的电压传感器^[6],CACNA1A 基因是目前公认报道的与 FHM 尤其是伴小脑功

能紊乱症状的致病基因^[1,5-7]。(2)第 390 位天门冬酰胺、天门冬氨酸突变在本研究家系中表现出明显的遗传共分离现象;(3)该突变的区域位于 CACNA1A 基因的相当稳定的区域,从 NCBI Gene Bank 中查询比对的 9 种由高级到低级的物种该区域的氨基酸都是一样的,说明该段序列在进化上是相当保守稳定的,该突变势必会导致疾病的发生^[1],在本突变附近的第 388,389 位已有错义突变导致共济失调的文献报道^[9-10]。(4)该突变区域位于同源结构域 I 和 II 之间,负责与 β 亚基结合。(5)在 1 000 个健康人未发现有 CACNA1A 基因的此种氨基酸突变,故认为此种突变有可能导致 FHM 的发生。

电压依赖的钙通道调节钙离子进入兴奋的细胞,参与激素或神经递质释放、肌肉收缩和基因表达等各种钙依赖过程。钙通道复合体由 $\alpha 1$ 、 β 、 $\alpha 2$ 、 δ 、 γ 亚基组成,其中起主要作用的是 $\alpha 1$ 亚基,其余亚基主要起调节作用。各种不同类型的钙通道主要是 $\alpha 1$ 亚基不同(包括 $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ 、 $\alpha 1C$ 、 $\alpha 1D$ 、 $\alpha 1E$ 和 $\alpha 1S$),CACNA1A 基因编码电压门控钙离子通道上的孔道形成蛋白 $\alpha 1A$ 亚基。CACNA1A 表达在与偏头痛相关的大脑皮质、三叉神经节及脑干神经核等神经组织。这个基因的突变与 FHM 和共济失调有关。神经递质的释放、神经元的兴奋都由位于神经元、突触前膜及树突通道钙离子通过电压门控钙离子通道进入突触后膜而调节。

在本研究中,该突变区域位于同源结构域 I 和 II 之间,该区域负责与 β 亚基结合,推测该突变可能会导致 $\alpha 1A$ 亚基与 β 亚基结合的调节异常,而引起 CACNA1A 蛋白这一 P/Q 型离子流的密度和门控特性的改变,致使钙通道的功能改变,从而导致神经元的过度兴奋及持续去极化,继发皮层扩布性抑制(cortical spreading depression, CSD)的阈值降低,引发偏头痛^[11-12]。该家系病患发生的迟发性进展性的小脑综合征也是偏瘫性偏头痛的临床表现之一,据报道约有 40%~50% 的 CACNA1A 突变患者有小脑综合征表现^[7]。

综上所述,本研究在一个偏头痛家系中发现 CACNA1A 基因一个新的错义突变(N390D),该突变可导致 FHM,可能还与小脑综合征的发生有关。该研究的发现不仅扩大了偏头痛致病基因突变谱,而且更加肯定了 CACNA1A 基因突变会导致 FHM、小脑功能紊乱,共济失调等神经系统疾病的发生。但该突变导致该疾病的发生机制还有待通过转基因动物的构建进行下一步的研究。

参考文献

- [1] Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4[J]. Cell, 1996, 87(3): 543-552.
- [2] Pietrobon D. Calcium channels and migraine[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1828(7): 1655-1665.
- [3] Stam AH, Vanmolkot KR, Kremer HP, et al. Cacna1a r1347q: a frequent recurrent mutation in hemiplegic migraine[J]. Clin Genet, 2008, 74(5): 481-485.
- [4] Topakian R, Pischinger B, Stieglbauer K, et al. Rare clinical findings in a patient with sporadic hemiplegic migraine: Fdg-pet provides diminished brain metabolism at 10-year follow-up[J]. Cephalalgia, 2014, 34(5): 392-396.
- [5] Ducros A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. The genetics of migraine[J]. Lancet Neurol, 2002, (下转第 1352 页)

行术中植骨融合治疗,结合术后颈托固定。1年后随访骨折均获得骨折愈合,而且拆除内固定后,颈部功能锻炼效果满意。另外,本组新鲜 II 型齿状突骨折的病例,由于患者年龄较轻,作者尝试行后路寰枢椎内固定治疗,并未行术中植骨融合治疗,1年随访齿状突骨折均获得骨折愈合,而且拆除内固定后,颈部功能锻炼效果满意,并且避免了取髂骨植骨^[13-15]。当然,对于陈旧性齿状突骨折的患者,考虑到由于骨折愈合概率较小,后路寰枢椎固定植骨融合治疗仍为首选治疗方案。

总之,后路椎弓根螺钉内固定术具有固定可靠稳定、手术难度较低,创伤小等优势,较大程度保留上颈椎的功能,能够取得良好的骨折愈合和植骨融合效果,已经在临床上逐步开展起来。但仍有一系列问题如生物力学稳定性、术后并发症有待进一步研究,而且由于本次研究样本数较少,目前缺乏大样本的临床研究报告,也限制了该技术在临床上的推广使用。由于寰枢椎毗邻解剖结构相当复杂,该手术为高风险手术,因此建议手术者有娴熟的手术技术,还应根据每例患者的具体情况来设计手术方案,即采取个体化治疗。完善术前检查,如果发现特殊的变异应该提前设计好预备方案,并能根据手术中遇到的情况选择性改变手术方案,才能避免术中血管神经根等损伤,保证手术安全有效。

参考文献

[1] 王雷,柳超,田纪伟,等.寰枢椎复合体三维有限元模型的建立与寰枢椎复合骨折机制的有限元分析[J].中国矫形外科杂志,2012,20(24):2276-2279.

[2] Resnick DK, Benzel EC. C1-C2 pedicle screw fixation with rigid cantilever beam construct: case report and technical note[J]. Neurosurgery, 2002, 50(2): 426-428.

[3] Jo KW, Park IS, Hong JT. Motion-preserving reduction and fixation of C1 Jefferson fracture using a C1 lateral mass screw construct[J]. J Clin Neurosci, 2011, 18(5): 695-698.

[4] Bransford R, Chapman JR, Bellabarba C. Primary internal fixation of unilateral C1 lateral mass sagittal split fractures: a series of 3 cases[J]. J Spinal Disord Tech, 2011, 24(3): 157-163.

[5] Ivancic PC. Atlas injury mechanisms during head-first impact[J]. Spine, 2012, 37(12): 1022-1029.

[6] Min L, Song YM, Xie XD, et al. Misdiagnosis and management of iatrogenic pseudoaneurysm of vertebral artery after Harms technique of C1-C2 fixation[J]. Chin J Traumatol, 2012, 15(6): 355-359.

[7] Sim HB, Lee JW, Park JT, et al. Biomechanical evaluations of various C1-C2 posterior fixation techniques[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(6): E401-407.

[8] Chaudhary R, Chaudhary K, Metkar U, et al. Posterior atlantoaxial dislocation without odontoid fracture[J]. Skeletal Radiol, 2008, 37(4): 361-364.

[9] Haus BM, Harris MB. Case report: nonoperative treatment of an unstable Jefferson fracture using a cervical collar[J]. Clin Orthop Relat Res, 2008, 466(5): 1257-1261.

[10] 徐荣明,赵红勇,胡勇,等.后路寰椎有限内固定治疗寰椎不稳定性骨折[J].中国脊柱脊髓杂志,2012,22(2): 118-122.

[11] Li LJ, Teng HL, Pan J, et al. Direct posterior C1 lateral mass screws compression reduction and osteosynthesis in the treatment of unstable jefferson fractures[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(15): E1046-1051.

[12] 吴李勇,王朝强,郑惠,等.寰枢椎椎弓根钉技术治疗陈旧性齿状突骨折伴可复性寰枢椎脱位[J].中国骨与关节损伤杂志,2013,28(9): 846-847.

[13] Debernardi A, D'Aliberti G, Talamonti G, et al. The craniovertebral junction area and the role of the ligaments and membranes[J]. Neurosurgery, 2011, 68(2): 291-301.

[14] Dorward IG, Wright NM. Seven years of experience with C2 translaminar screw fixation: clinical series and review of the literature[J]. Neurosurgery, 2011, 68(6): 1491-1499.

[15] 田纪伟,王雷,柳超.齿状突骨折的外科手术方式探讨[J].中国矫形外科杂志,2013,21(23): 2362-2366.

(收稿日期:2016-01-22 修回日期:2016-02-21)

(上接第 1349 页)

1(5): 285-293.

[6] Garcia Segarra N, Gautschi I, Mittaz-Crettol L, et al. Congenital ataxia and hemiplegic migraine with cerebral edema associated with a novel gain of function mutation in the calcium channel cacna1a[J]. J Neurol Sci, 2014, 342(1/2): 69-78.

[7] Freilinger T, Ackl N, Ebert A, et al. A novel mutation in cacna1a associated with hemiplegic migraine, cerebellar dysfunction and late-onset cognitive decline[J]. J Neurol Sci, 2011, 300(1/2): 160-163.

[8] The international classification of headache disorders: 2nd edition[J]. Neurol Neurochir Pol, 2004, 40(2 Suppl 1): S7-41.

[9] Mantuano E, Romano S, Veneziano L, et al. Identification of novel and recurrent cacna1a gene mutations in fifteen

patients with episodic ataxia type 2[J]. J Neurol Sci, 2010, 291(1/2): 30-36.

[10] Nikaido K, Tachi N, Ohya K, et al. New mutation of cacna1a gene in episodic ataxia type 2[J]. Pediatr Int, 2011, 53(3): 415-416.

[11] Van Den Maagdenberg AM, Terwindt GM, Haan J, et al. Genetics of headaches[J]. Handb Clin Neurol, 2010(97): 85-97.

[12] Vecchia D, Tottene A, van den Maagdenberg AM, et al. Mechanism underlying unaltered cortical inhibitory synaptic transmission in contrast with enhanced excitatory transmission in cav2.1 knockin migraine mice[J]. Neurobiol Dis, 2014(69): 225-234.

(收稿日期:2015-12-08 修回日期:2016-01-26)