

中国烟雾病患者主动脉平滑肌肌动蛋白 $\alpha 2$ 基因编码区的研究*

张 谦 刘雅萍^① 张 东 王 嵘 张 岩 于兰冰 张 学^① 赵继宗**

(首都医科大学附属北京天坛医院神经外科, 北京 100050)

【摘要】 目的 探讨主动脉平滑肌肌动蛋白 $\alpha 2$ (actin alpha 2, ACTA2) 编码区基因多态性/突变与中国烟雾病患者遗传易感性的关系。**方法** 我院 2012 年 6 月~2013 年 5 月经脑血管造影或磁共振血管造影检查明确诊断 132 例烟雾病, 抽取患者的静脉血, 通过聚合酶链式反应 Sanger 方法对外显子 2~9 进行直接测序分析 ACTA2 编码区多态性及罕见突变, 对比分析人类基因突变数据库中报道的 ACTA2 基因突变。**结果** 132 例中国烟雾病 ACTA2 基因编码区未检测到突变。**结论** ACTA2 基因不是中国烟雾病患者的主要易感基因。

【关键词】 烟雾病; ACTA2 基因; 易感基因

中图分类号: R743

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2015)11-1041-04

doi: 10.3969/j.issn.1009-6604.2015.11.024

Analysis of Coding Exon of ACTA2 in Chinese Patients with Moyamoya Disease Zhang Qian*, Liu Yaping, Zhang Dong*, et al. * Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital of Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: Zhao Jizong, E-mail: zhaojz205@163.com

【Abstract】 Objective To study variations of the coding exons of ACTA2 (actin alpha 2) and to investigate the genetic susceptibility in Chinese patients with moyamoya disease. **Methods** A total of 132 blood samples from Chinese patients with moyamoya disease were collected. The eight coding exons and flanking intronic regions of ACTA2 were amplified and sequenced. Pathogenic mutation of ACTA2 reported in the Human Gene Mutation Database was summarized. **Results** We were not able to detect any previously described mutations in ACTA2 in 132 Chinese patients with moyamoya disease. **Conclusion** ACTA2 is not a major genetic susceptible gene for Chinese patients with moyamoya disease.

【Key Words】 Moyamoya disease; Actin alpha 2 (ACTA2); Susceptible gene

烟雾病是一种病因不明的以双侧颈内动脉末端及大脑前动脉、大脑中动脉起始部动脉内膜缓慢增厚, 动脉管腔逐渐狭窄以至闭塞, 脑底穿通动脉代偿性扩张为特征的疾病^[1]。烟雾综合征为脑血管造影表现与烟雾病类似, 但该类患者合并基础病, 包括动脉粥样硬化、自身免疫性疾病、神经纤维瘤病、头部外伤、放射性损伤、甲状腺功能亢进等。烟雾病患者早期临床症状不明显, 就诊时常存在严重的神经功能障碍, 早期诊断和及时手术可以降低患者卒中风险, 改善预后。烟雾病致病基因的研究不仅有助于揭示疾病的发病机制, 而且为疾病的早期诊断和治疗提供依据。主动脉平滑肌肌动蛋白 $\alpha 2$ (actin alpha 2, ACTA2) 基因, 位于 10 号染色体长臂 (10q23.31), 为家族性胸主动脉瘤和胸主动脉夹层

的致病基因。2009 年 Guo 等^[2]进行的连锁分析和关联研究显示, ACTA2 基因突变不仅可引起胸主动脉瘤和胸主动脉夹层, 还可能引起烟雾病。携带 ACTA2 基因突变的家族成员可出现多种血管性疾病, 包括烟雾病和脑卒中。本研究检测 132 例中国烟雾病 ACTA2 基因编码区外显子, 旨在探讨 ACTA2 基因是否有突变, 及其与中国烟雾病患者遗传易感性的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究选取我院 2012 年 6 月~2013 年 5 月经脑血管造影或磁共振血管造影检查明确诊断的 132 例烟雾病。女 78 例, 男 54 例。年龄 3~59 岁, (25.2 \pm 13.4) 岁, 儿童 45 例 (年龄 \leq 15 岁)。临床

* 基金项目: 首都临床特色应用研究 (项目编号: Z13110200680000)

** 通讯作者, E-mail: zhaojz205@163.com

① (中国医学科学院基础医学研究所医学遗传学系, 北京 100005)

表现为脑缺血 101 例,脑出血 31 例。有家族史 18 例,散发病例 114 例。

纳入标准:①脑血管造影或磁共振血管造影检查符合烟雾病的诊断标准^[3];②患者或监护人签署知情同意书。排除标准:合并动脉粥样硬化、自身免疫性疾病、脑膜炎、脑肿瘤、唐氏综合征等可能导致继发性脑血管病变引起烟雾综合征的患者。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组提取 采集患者静脉血 2~4 ml,乙二胺四乙酸抗凝,采用基因组 DNA 提取试剂盒(QIAGEN),根据说明书提取基因组 DNA。

1.2.2 基因检测 选取 ACTA2 基因编码区外显子

序列(-NM_001141945),应用生物软件 Primer 3.0 online 进行引物设计,经 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 将引物序列与基因组 DNA 序列进行比对,确定其特异性后由 Invitrogen 公司合成部合成引物。引物序列见表 1。

PCR 扩增:反应体系为 50 μl,其中含 2 μl DNA 模板(20 ng/μl),上游、下游引物(浓度:20 μmol/L)各 1 μl, Premix La Taq (TaKaRa)溶液 25 μl,补齐 ddH₂O 至 50 μl。PCR 条件:94℃预变性 5 min 后进入主循环,94℃变性 30 s,59~62℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,35 个循环后置 72℃再 7 min。扩增产物由北京梓熙生物基因有限公司进行测序。

表 1 PCR 扩增使用引物

外显子	基因引物序列	产物长度(bp)	退火温度(℃)
外显子 2-F	ACACATGATATGCCGGTCACT	563	60
外显子 2-R	TGGCATTTACTCTGGACCTT		
外显子 3-F	ACTTTCCCCAACATCTCCT	504	59
外显子 3-R	GGGTAATAACCCAGAATGAACA		
外显子 4-F	ATAAAACCATGGACACATGCATGAG	426	62
外显子 4-R	GATGCAAGTACTTTCAAGCTGTTCC		
外显子 5-F	CTGTCAGGCCATTGATGTGAT	460	60
外显子 5-R	GAGATCAAGGGCTTATTTTGAACAC		
外显子 6-F	CTGAACCCAGCCCTAAAAGAT	655	60
外显子 6-R	GGGTGCTCTATAACTGTTCTCCTCAA		
外显子 7-F	GGGCCTACTATGCATGAGACA	683	60
外显子 7-R	GTCTCCAAAGCACAGGCATTA		
外显子 8-F	ATTAGAAGGCAGGCAGGAAGA	642	60
外显子 8-R	GTGGGGAGCTCTGTTGACTTT		
外显子 9-F	GCTGAGAAAAACGAATGTGCT	840	60
外显子 9-R	AATCACTTTCAAAGTTGTGAGG		

F 代表上游引物,R 代表下游引物,ACTA2 外显子 1 为非编码外显子

1.2.3 ACTA2 突变表型检索 检索人类基因突变数据库(Human Gener Mutation Database, HGMD),网址:<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>,获得已知 ACTA2 基因突变情况。

2 结果

截止 2014 年 12 月 20 日,HGMD 收录 45 种 ACTA2 基因突变,包括 41 种错义突变,1 种无义突变,2 种剪切位点突变和 1 种微缺失。致病突变可以引起胸主动脉疾病、冠状动脉疾病、脑血管病、精神分裂症等,这些突变包括 p. D26Y, p. G38R, p. R39C, p. R39H, p. H42N, p. V45L, p. M49V, p. Q61R, p. P72Q, p. D82E, p. T108M, p. N113T, p. N117T, p. R118Q, p. Y135H, p. A140V, p. Y145C, p. R149C, p. V154A, p. G160D, p. V161A, p. R179C, p. R179H, p. R179L, p. R185Q, p. V203I, p. R212Q, p. E243K, p. P245H, p. I250L, p. R258C, p. R258H, p. G270E, p. G275A, p. P292G, p. S302A, p. G304R, p. R314*, p. T326N, p. K328N, p. T353N, p. G368R, c.369+1G>A, c.616+1G>

T, c.1019_1020delCT。在这些突变中,9 种错义突变,包括 p. R39H、p. R179C、p. R179H、p. R179L、p. R212Q、p. P245H、p. I250L、p. R258H、p. T326N 与脑血管病有关,见表 2。

132 例烟雾病 ACTA2 基因编码区外显子直接测序未发现突变,包括先前报道的可能引起脑卒中的突变^[2,4~7],即本研究 132 例烟雾病中,ACTA2 基因编码蛋白 p. R39、p. R179、p. R212、p. P245、p. I250、p. R258、p. T326 均未改变,见图 1~7。

3 讨论

本研究通过对 132 例中国烟雾病患者进行 ACTA2 基因编码区外显子的检测,未发现中国烟雾病患者 ACTA2 基因编码外显子任何突变。1969 年 Suzuki 和 Takaku 正式命名烟雾病^[9]。烟雾病的病因至今仍不明确,遗传学研究已发现了多个烟雾病相关基因位点,包括 3p24.2-26、6q25、8q23、12p12 和 17q25 等^[10],RNF213、ACTA2、BRCC3、GUCY1A3 等基因与烟雾病和烟雾综合征发病相关^[2,11~13]。

表 2 ACTA2 基因 9 种与脑血管病相关的突变

参考文献	核苷酸改变	氨基酸改变	临床表型
Guo 等 (2009) [2]	CGT - CAT	p. R39H	胸主动脉疾病, 冠状动脉疾病, 脑卒中
Meuwissen 等 (2013) [4]	CGT - TGT	p. R179C	心血管疾病, 自主神经和脑部疾病
Milewicz 等 (2010) [5]	CGT - CAT	p. R179H	多系统平滑肌功能障碍 (包括脑血管)
Munot 等 (2012) [6]	CGT - CTT	p. R179L	脑血管病
Moller 等 (2012) [7]	CGT - CTT	p. R179L	脑血管病
Guo 等 (2009) [2]	CGG - CAG	p. R212Q	胸主动脉瘤, 冠状动脉疾病, 脑卒中
Guo 等 (2009) [2]	CCT - CAT	p. P245H	胸主动脉疾病, 脑卒中
Guo 等 (2009) [2]	ATC - CTC	p. I250L	胸主动脉疾病, 脑卒中
Guo 等 (2009) [2]	CGC - CAC	p. R258H	胸主动脉疾病, 脑卒中
Kathiravel 等 (2013) [8]	CGC - CAC	p. R258H	胸主动脉疾病, 脑卒中
Guo 等 (2009) [2]	ACC - AAC	p. T326N	胸主动脉疾病, 冠状动脉疾病, 脑卒中

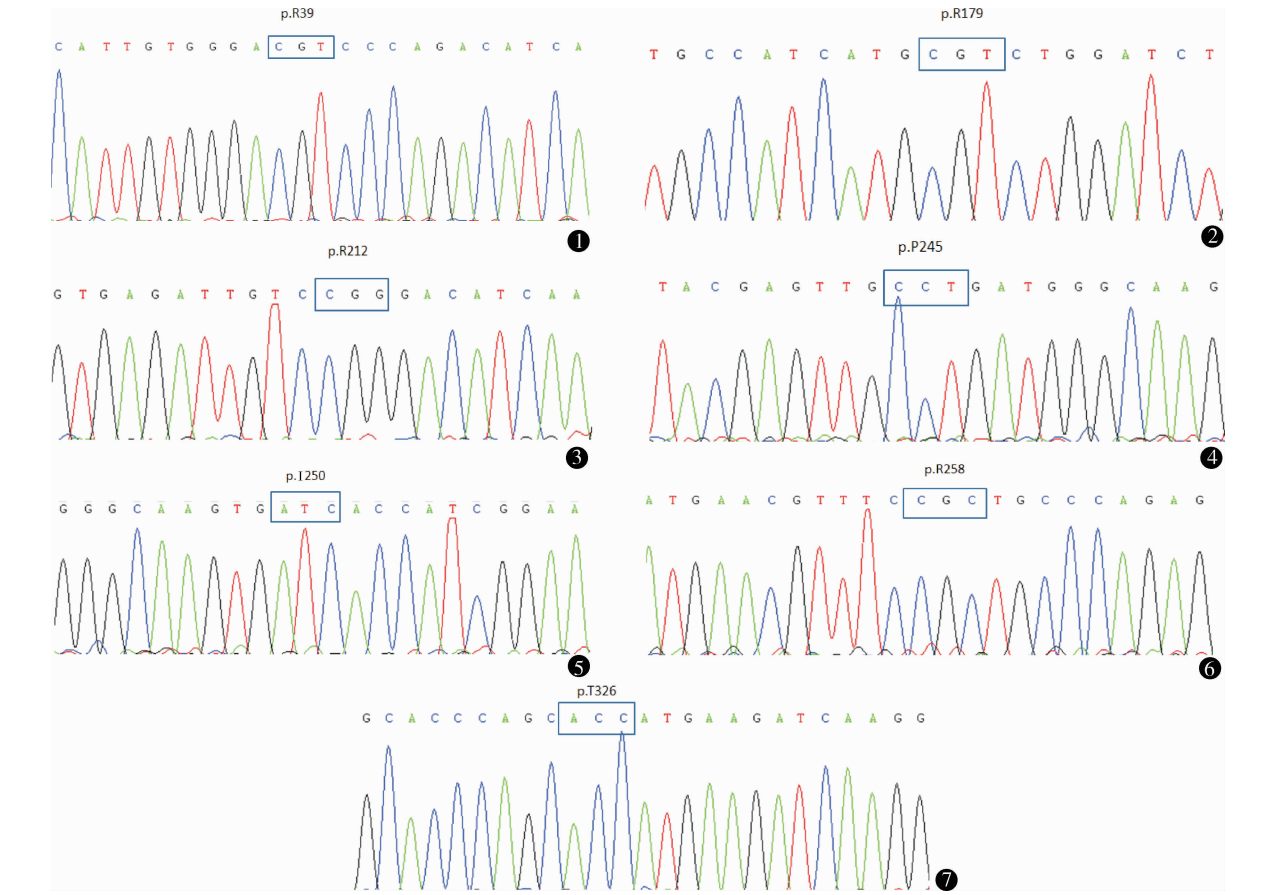


图 1~7 ACTA2 基因直接测序结果显示, p. R39、p. R179、p. R212、p. P245、p. I250、p. R258、p. T326 均未发现突变, 方框内 3 个核苷酸编码对应的氨基酸

烟雾病起病隐匿, 临床表现复杂, 轻者可无明显临床症状或仅以头痛为主要表现, 随着疾病进展, 可出现短暂性脑缺血发作、脑梗死、癫痫和脑出血等表现。缺血型烟雾病多见于儿童, 发病高峰为 10 岁以前; 出血型烟雾病多见于成年人, 发病高峰在 40 岁左右, 是我国儿童和青壮年脑卒中常见的病因之一。目前, 尚无有效药物。治疗以脑血运重建手术为主, 包括直接搭桥术、多种间接搭桥术及联合搭桥术等。对有脑缺血表现的烟雾病患者行血管重建术可以降低短暂性脑缺血发作频率以及脑梗塞的风险, 提高

生活质量和改善脑功能的长期预后^[1]。
Liu 等^[11]发现 *RNF213* 基因是日本烟雾病患者的主要致病基因。p. R4810K 突变 (rs112735431) 明显增加了日本烟雾病患者的发病风险, 同时发现约 23% 的中国烟雾病患者存在 p. R4810K 突变, 明显低于日本烟雾病患者 (23% vs. 90%)。Wu 等^[14]在 170 例中国烟雾病患者的验证研究中发现 13% 的中国烟雾病患者存在 *RNF213* 基因 p. R4810K 突变。以上 2 项研究均提示 *RNF213* 基因之外的其他遗传因素或环境因素可能与中国烟雾病的发病有关。

ACTA2 基因位于 10 号染色体长臂 -10q23.31, 为家族性胸主动脉瘤和胸主动脉夹层的致病基因, *ACTA2* 基因 (NM_001141945) 由 9 个外显子组成, 编码肌动蛋白 $\alpha 2$, 是哺乳动物中存在的 6 种肌动蛋白亚类之一, 主要分布于肌细胞, 是收缩器的主要成分。2009 年 Guo 等^[2] 进行的连锁分析和关联研究显示, *ACTA2* 基因突变不仅可引起胸主动脉瘤和胸主动脉夹层, 还可能引起脑卒中和烟雾病。可能的遗传学机制是 *ACTA2* 基因突变, 引起血管平滑肌细胞异常迁移, 从而导致烟雾病的发生。Milewicz 等^[5] 报道 5 例有 p. R179H 突变的患者存在心血管系统疾病, 同时合并颈内动脉海绵窦段至床突段扩张、颈内动脉末端狭窄、脑梗死等类似烟雾病的脑血管改变。Roder 等^[15] 对欧洲中部 68 例散发性烟雾病 *ACTA2* 基因 9 个外显子的测序研究显示, 1 例烟雾病患者存在 6 号外显子 p. R179H 突变 (杂合子)。

Shimajima 等^[16] 对 53 例日本烟雾病的验证研究显示未发现 *ACTA2* 基因是烟雾病的主要易感基因。Hu 等^[17] 对 56 例中国散发烟雾病的 *ACTA2* 基因进行检测, 未发现 *ACTA2* 基因外显子突变。Hu 等的研究不包括家族性烟雾病患者, 而 Guo 等报道的 *ACTA2* 基因突变引起胸主动脉瘤、烟雾病和脑卒中主要见于家族性患者。为进一步发现中国烟雾病患者 *ACTA2* 基因编码区外显子突变, 我们选取 132 例烟雾病, 其中包括 18 例家族性和 114 例散发性烟雾病, 包括儿童和成人患者, 以及缺血型和出血型烟雾病患者。全部患者 *ACTA2* 基因编码区外显子均未发现任何突变, 提示 *ACTA2* 基因不是中国烟雾病患者的主要致病基因, 表明亚洲和欧美烟雾病患者存在遗传异质性。中国和欧美烟雾病患者的流行病学和临床特点存在明显差异^[1], 这种临床表型的差异可能与遗传异质性有关。随着烟雾病和烟雾综合征致病基因和易感基因的深入研究, 未来可能依据分子遗传学标记将此类疾病进行新的分类, 为不同基因突变导致的烟雾病和烟雾综合征手术方式选择和预后评估提供新的依据。

本研究存在的不足之处: 第一, 本研究仅对 *ACTA2* 基因编码区外显子进行了测序, 非翻译区外显子、启动子区域及内含子的改变并没有检测; 第二, 本研究样本量较小, 检验效能不高。

总之, 对 *ACTA2* 基因编码区直接测序研究结果提示 *ACTA2* 基因不是中国烟雾病患者的主要易感基因, 这与高加索人群有所不同, 我们的结果需要进一步在各种族、多中心、大样本人群中验证。

参考文献

- 1 Scott RM, Smith ER. Moyamoya disease and moyamoya syndrome. *N Engl J Med*, 2009, 360(12):1226-1237.
- 2 Guo DC, Papke CL, Tran-Fadulu V, et al. Mutations in smooth

- muscle alpha-actin (*ACTA2*) cause coronary artery disease, stroke, and moyamoya disease, along with thoracic aortic disease. *Am J Hum Genet*, 2009, 84(5):617-627.
- 3 Research Committee on the Pathology and Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis, Health Labour Sciences Research Grant for Research on Measures for Infractable Diseases. Guidelines for diagnosis and treatment of moyamoya disease (Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis). *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2012, 52(5):245-266.
- 4 Meuwissen ME, Lequin MH, Bindels-de Heus K, et al. *ACTA2* mutation with childhood cardiovascular, autonomic and brain anomalies and severe outcome. *Am J Med Genet A*, 2013, 161A(6):1376-1380.
- 5 Milewicz DM, Østergaard JR, Ala-Kokko LM, et al. De novo *ACTA2* mutation causes a novel syndrome of multisystemic smooth muscle dysfunction. *Am J Med Genet A*, 2010, 152A(10):2437-2443.
- 6 Munot P, Saunders DE, Milewicz DM, et al. A novel distinctive cerebrovascular phenotype is associated with heterozygous Arg179 *ACTA2* mutations. *Brain*, 2012, 135(Pt 8):2506-2514.
- 7 Møller HU, Fledelius HC, Milewicz DM, et al. Eye features in three Danish patients with multisystemic smooth muscle dysfunction syndrome. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(9):1227-1231.
- 8 Kathiravel U, Keyser B, Hoffjan S, et al. High-density oligonucleotide-based resequencing assay for mutations causing syndromic and non-syndromic forms of thoracic aortic aneurysms and dissections. *Mol Cell Probes*, 2013, 27(2):103-108.
- 9 Suzuki J, Takaku A. Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch Neurol*, 1969, 20(3):288-299.
- 10 Houkin K, Ito M, Sugiyama T, et al. Review of past research and current concepts on the etiology of moyamoya disease. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2012, 52(5):267-277.
- 11 Liu W, Morito D, Takashima S, et al. Identification of *RNF213* as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One*, 2011, 6(7):e22542.
- 12 Miskinyte S, Butler MG, Hervé D, et al. Loss of *BRCC3* deubiquitinating enzyme leads to abnormal angiogenesis and is associated with syndromic moyamoya. *Am J Hum Genet*, 2011, 88(6):718-728.
- 13 Hervé D, Philippi A, Belbouab R, et al. Loss of $\alpha 1\beta 1$ soluble guanylate cyclase, the major nitric oxide receptor, leads to moyamoya and achalasia. *Am J Hum Genet*, 2014, 94(3):385-394.
- 14 Wu Z, Jiang H, Zhang L, et al. Molecular analysis of *RNF213* gene for moyamoya disease in the Chinese Han population. *PLoS One*, 2012, 7(10):e48179.
- 15 Roder C, Peters V, Kasuya H, et al. Analysis of *ACTA2* in European Moyamoya disease patients. *Eur J Paediatr Neurol*, 2011, 15(2):117-122.
- 16 Shimajima K, Yamamoto T. *ACTA2* is not a major disease-causing gene for moyamoya disease. *J Hum Genet*, 2009, 54(11):687-688.
- 17 Hu FY, Zheng HB, Xu YM, et al. *ACTA2* is not a major genetic risk gene for Chinese patients with moyamoya disease. *Int J Stroke*, 2013, 8(6):E35.

(收稿日期:2015-02-13)

(修回日期:2015-06-14)

(责任编辑:李贺琼)