**分类号：R742.1 密级: 公开**

**U D C：616.853** **编号：2012310226**

**广州医科大学博士学位论文**

***SCN1A* 基因突变导致部分性癫痫伴热性惊厥附加症： 分子特征与表型-抗癫痫药物反应及其分子致病机制**

**研究生：余 璐**

**导** **师：廖卫平教授**

**申请学位级别：医学博士** **年级：二零一二级 学 科 专 业： 神经病学** **研究方向：癫痫**

**论文提交日期：2015 年 5 月 论文答辩日期：2015 年 5 月学位类型：医学科学学位** **学位授予单位：广州医科大学**

**答辩委员会主席： 评** 议 人：

**二 0 一五年五月**



博士学位论文



***SCN1A* 基因突变导致部分性癫痫伴热性惊厥附加症： 分子特征与表型-抗癫痫药物反应及其分子致病机制**

***SCN1A* mutaitons cause partial epilepsy with febrile seizure plus: molecular characteristic, phenotype-antiepileptic drugs response and pathogenic mechanism**

专业名称： 神经病学学位申请人：余 璐 导 师： 廖卫平 教授

本课题受国家自然科学基金(No. 81271434)、羊城学者首席科学家项目(No.

12A016S)、广东省教育厅项目(No. 2013CXZDA022)、2013年高等教育“创新强校工程”高水平大学及特色高校建设、2014年中央财政支持地方高校专项资金“面上项目”神经致病基因与离子通道病研究平台与实践基地类项目资助

广州医科大学·广州

2015 年 5 月

目 录

**[Abstract](#_Toc686484221)** 9

[前 言](#_Toc686484222) 11

[第一章](#_Toc686484223) **[PEFS+](#_Toc686484223)**[相关](#_Toc686484223)***[SCN1A](#_Toc686484223)***[突变分子特征与表型特点](#_Toc686484223)**[-](#_Toc686484223)**[抗癫痫药物反应](#_Toc686484223) 13

[第二章](#_Toc686484224) **[PEFS+](#_Toc686484224)**[相关](#_Toc686484224)***[SCN1A](#_Toc686484224)***[基因剪切位点突变的对剪切影响的体外研究](#_Toc686484224) 47

[结论](#_Toc686484225) 67

[参考文献](#_Toc686484226) 67

[附录](#_Toc686484227) 69

**缩略词表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| AMP | Ampicilin | 氨苄青霉素 |
| DEPC | Diethyloxydiformate | 焦碳酸二乙酯 |
| DMSO | Dimethylsufoxide | 二甲基亚砜 |
| EB | Ethium bromide | 溴化乙锭 |
| EDTA | Ethylene diamine tetraacetic acid | 乙二胺四乙酸二钠 |
| dNTP | Deoxynucleotide triphosphate | 脱氧三磷酸核苷 |
| mRNA | Messenger Ribonucleic acid | 信使核糖核酸 |
| cDNA | Complementary DNA | 互补脱氧核糖核酸 |
| DHPLC | Denaturing high-performance liquid  chromatography | 变性高效液相色谱法 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链反应 |
| RT-PCR | Reverse transcription-Polymerase chain reaction | 逆转录聚合酶链反应 |
| Q-PCR | Quantitative-Polymerase chain reaction | 定量聚合酶链反应 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| *SCN1A* | Voltage-gated sodium channel α1 subunit gene | 电压依赖性钠通道 α1 基因 |
| SNP | Single nucleotide polymorphisms | 单核苷酸多态性 |
| FS | Febrile seizure | 热性惊厥 |
| FS+ | Febrile seizure plus | 热性惊厥附加症 |
| GEFS+ | Genetic epilepsy with febrile seizures plus | 遗传性癫痫伴热性惊厥附加  症 |
| PEFS+ | Partial epilepsy with febrile seizures plus | 部分性癫痫伴热性惊厥附加  症 |
| DS | Dravet syndrome | Dravet 综合症 |
| SMEI | Severe myoclonic epilepsy in infancy | 婴儿重症肌阵挛性癫痫 |
| SMEB | Severe myoclonic epilepsy in infancy  borderline | 边缘型婴儿重症肌阵挛性癫痫 |

1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| CPS | Complex partial seizure | 复杂部分性发作 |
| SPS | Simple partial seizure | 单纯部分性发作 |
| HC | Hemi-convulsion | 半侧抽搐 |
| GTCS | Generalized tonic-clonic seizure | 全面强直阵挛发作 |
| sGTCS | Secondary generalized tonic-clonic seizure | 继发性全面强直阵挛发作 |
| SE | Status epilepticus | 癫痫持续状态 |
| ILAE | International League Against Epilepsy | 国际抗癫痫联盟 |
| EEG | Electroencephalogram | 脑电图 |
| MRI | Magnetic resonance imagine | 磁共振成像 |
| AEDs | Antiepileptic drugs | 抗癫痫药物 |
| VPA | Valproic acid | 丙戊酸 |
| PB | Phenobarbital | 苯巴比妥 |
| TPM | Topiramate | 托吡酯 |
| LTG | Lamotrigine | 拉莫三嗪 |
| CBZ | Carbamazepine | 卡马西平 |
| OXC | Oxcarbazepine | 奥卡西平 |
| CNZ | Clonazepam | 氯硝安定 |
| LEV | Levetiracetam | 左乙拉西坦 |
| MR | Mental retardation | 精神运动迟滞 |
| IQ | Intelligence quotient | 智商 |
| DQ | Developmental quotient | 发育商 |
| C-WISC | Chinese Wechsler Intelligence Scale for Children | 中国儿童韦氏智力量表 |
| DSM-IV | Diagnostic and Statistical Manual of Mental  Disorders, 4th edition | 精神疾病诊断与统计手册第 4  版 |
| ICD-10 | International Classification of Diseases, 10th  edition | 国际疾病分类，第 10 版 |
| ABC | Autism behavior checklist | 孤独症行为量表 |
| CARS | Childhood autism rating scale | 儿童期孤独症评定量表 |

2

***SCN1A*基因突变导致部分性癫痫伴热性惊厥附加症：分子特征与表型-抗癫痫药物反应及其分子致病机制**

**中文摘要**

**【目的】**

热性惊厥相关癫痫是涵盖了由一系列由轻到重表型的复杂癫痫谱系，并与

*SCN1A*基因突变密切相关。既往曾报道热性惊厥相关部分性癫痫的患者，其表型相对温和，但临床上具有钠通道阻滞类抗癫痫药物（AEDs）加重发作的现象，基因检测发现*SCN1A*基因突变。这类癫痫被称之为部分性癫痫伴热性惊厥附加症（PEFS+）。然而，有关PEFS+的临床特征、*SCN1A*基因突变特征以及抗癫痫药物反应目前尚未明晰。为此，本研究将对PEFS+中*SCN1A*基因检测阳性的患者进行临床特征、药物疗效和突变分子特征的分析，并与在Dravet综合征（DS）和遗传性癫痫伴热性惊厥附加症（GEFS+）*SCN1A*筛查阳性的患者进行比较分析，从而探讨*SCN1A*突变相关PEFS+基因型-表型-AEDs反应之间的关系及其独特性。结果将丰富热性惊厥相关癫痫的临床诊治体系，为临床基因个体化诊治提供有力证据。此外，*SCN1A*剪切位点突变绝大多数发生于DS等严重表型中，但在表型温和的PEFS+患者中也被报道，但其对PEFS+潜在分子致病机制仍未清楚。本研究通过异源细胞体minigene体外报告的方法，研究PEFS+相关*SCNA*剪切位点突变体的体外mRNA剪切模式，并与Dravet综合征等严重表型比较，探讨其潜在的分子致病机制，以及剪切模式与表型-基因型-遗传模式间的关系。其结果将从分子水平为*SCN1A*基因对癫痫的致病机制及其他基因的功能研究提供有效的研究方法和证据支持。

**【方法】**

一、PEFS+相关*SCN1A*基因突变的基因型-表型-AEDs反应关系

1. 直接测序和焦磷酸测序进行*SCN1A*基因点突变和嵌合突变筛查；

2. 生物信息学技术分析PEFS+相关*SCN1A*基因突变致病性；

3. 与本研究在Dravet综合症（DS）、遗传性癫痫伴热性惊厥附加症（GEFS+）

3

&热性惊厥附加征（FS+）上筛查到的SCN1A突变进行突变类型、遗传方式和错义突变氨基酸置换差异值（D值）的比较；

4. 与*SCN1A*突变数据库有关DS、GEFS+& FS+/FS的数据进行上述突变分子特征的比较；

5. 分析*SCN1A*突变PEFS+的表型特征，并与本研究的*SCN1A*突变DS、GEFS+&

FS+/FS患者的临床特征进行比较；

6. 分析*SCN1A*突变相关PEFS+的AEDs治疗反应，探讨表型-基因型-药物反应关系。

二、PEFS+相关*SCN1A*基因剪切位点突变的体外剪切分析

1. 运用报告minigene，构建pTragetE2-3-4-5及E24-25-26野生型质粒载体，对

PEFS+及对照的Dravet综合征相关剪切位点突变进行分子克隆；

2. 运用HENK293细胞体外表达和RT-PCR法，分析各突变体的体外剪切形式；

3. Q-PCR分析*SCN1A*基因突变后mRNA转录本的相对表达量。

**【结果】**

一、*SCN1A*基因突变相关PEFS+的基因型-表型-AEDs反应关系：

1. 238例PEFS+患者有26例（10.9%）发现了*SCN1A*基因杂合突变，共27个突变位点，其中各有3人为截短突变（11.5%）和剪切位点突变（11.5%）；19个患者为错义突变（73.1%），其中1人携带2个突变；余1人为框内缺失（3.8%）。

25个验证父母来源的突变中，64%为新生突变；遗传突变（36%）中2个来自父亲的嵌合突变。

2. PEFS+相关截短突变均位于远离*SCN1A*基因终止密码子的序列上游；剪切位点突变经剪切分析软件提示可能导致不同程度的mRNA异常剪切；错义突变和框内缺失突变位点85%处于高度保守序列。错义突变中11个位于Nav1.1通道的关键功能区（55%），其中孔区10个（50%），具有较低的D值，与9个（45%）位于非关键功能区的错义突变D值相比，差异有统计学意义（*P*=0.019）；框内缺失突变也位于孔区。

3. 与本研究DS和GEFS+ & FS+/FS的突变特征相比，PEFS+在突变类型、遗传特征以及错义突变的分子特征上均介于二者之间，虽差异无统计学意义，但相关分析提示表型的严重程度与错义突变在关键功能区的比例及新生突变的比例呈

4

正相关。

4. 与*SCN1A*突变数据库数据比较再次确认，PEFS+在突变类型的分布、遗传特征以及错义突变的分子特征上均介于DS和GEFS+之间，且在错义突变和截短突变的比例、错义突变关键功能区D值上，PEFS+与DS比较差异有统计学意义

（*P*<0.01）；在遗传突变的比例上，PEFS+与DS和GEFS+ & FS+/FS比较差异均有统计学意义（*P*<0.01）。

5. *SCN1A*突变PEFS+患者平均起病年龄于9±3.0月（FS：9±5.7月，无热发作：

24±21月），发作频率FS和aFS(GTCS)分别为5.5±2.5和4.5±2.0次/年，所有患者恰当AEDs治疗均获得发作缓解，其中23.1%无发作，53%患者可出现轻-中度智能发育迟缓。在起病年龄、发作频率、发作预后及发育预后方面PEFS+均介于

DS和GEFS+ & FS+/FS之间，且不论与典型或边缘型DS相比差异均有意义。

6. *SCN1A*突变的PEFS+患者AEDs的治疗效果与DS相似，15例患者曾使用钠通道阻滞类AEDs，治疗效果均不佳，70%患者发作加重。这些患者中86.7%携带致病性较强的突变。

二、PEFS+相关*SCN1A*基因剪切位点突变的体外剪切分析

1. RT-PCR显示相比对照组DS突变体均外显子删除，PEFS+突变体出现2种类型的mRNA异常剪切，即外显子删除和内含子插入；相比DS突变体未见明确正常mRNA转录本，PEFS+突变体的正常和异常mRNA转录共存。

2. 定量PCR显示PEFS+突变体c.473+5G> A和c.473+5G> C异常和正常转录

mRNA 相对量（RQ）分别为（4.92±1.05%, 6.10±0.21%）和（7.97±1.12%，

3.94±1.25%），与对照组DS突变体c.602+1G>A比较（异常和正常mRNA 的

RQ分别为60.51±1.81 %和0.06±0.022 %），差异有统计学意义（*P*<0.01）；PEFS+

突变体c.4853-25T> A正常与异常转录mRNA的RQ分布为71.22±11.92%和

7.38±1.61%，与对照组DS突变体c.4853-1G>C比较（正常和异常mRNA相对量分别为0.08±0.01 %和22.11±2.83 %），差异有统计学意义（*P*<0.01）。

3. 结合剪切突变点的位置进行分析，深部内含子区的突变为遗传突变，异常剪切方式为内含子插入，正常mRNA转录本量远高于异常转录本，为临床表现最轻的PEFS+；可变剪切位点和固有剪切位点突变均为新生突变，异常剪切方式均为外显子删除，但前者正常转录本量与异常转录本近似，临床为相对温和的

5

PEFS+，后者则异常转录本量远高于正常转录本，临床对应严重表型DS。

**【结论】**

1. *SCN1A*基因是PEFS+的重要致病基因，并表现出与PEFS+温和表型相关的弱致病性。

2. PEFS+无论在临床特征，还是*SCN1A*基因突变分子特征、遗传模式上，都是介于DS和GEFS+之间的独立中间型。

3. 钠通道阻滞类AEDs可加重PEFS+的发作，*SCN1A*基因突变引起钠通道功能丧失是造成这一现象的可能潜在分子机制。

4. PEFS+相关*SCN1A*基因剪切突变具有特殊的突变位置和剪切模式，是其较弱致病性，及引起较温和临床特征的潜在分子机制。

**【关键词】**

*SCN1A*基因；部分性癫痫伴热性惊厥附加症；抗癫痫药物；剪切位点突变；体外剪切分析

6

***SCN1A* mutaitons result in partial epilepsy with febrile seizure plus: molecular pathogenicity and phenotype-antientileptic drugs response**

**Abstract**

**Purpose**

Febrile seizure related epilepsy is a complex spectrum of epilepsy, ranging from mild to severe phenotypes and closely associates with *SCN1A* mutations. Some isolated patients with moderate phenotype which markely featured by partial seizures and febrile seizure have been reported previously, in whome *SCN1A* mutations were indentified and their seizures could be worsen by anti-epileptic drugs (AEDs) with soudium channel blocking (SCB). It was therewith named partial epilepsy with febrile seizure plus (PEFS+). However, the clinical features, characteristic of *SCN1A* mutations and AEDs responses associated with PEFS+ remain unclear. Therefore, the *SCN1A* mutations will be screened in individuals with PEFS+, and the analysis will be performed regarding to the clinical features, characteristic of *SCN1A* mutations and AEDs responses in those with *SCN1A* positive-mutations and compared to those of patients with SCN1A mutation-positve Dravet syndrome (DS) and genetic epilepsy with febrile seizure plus (GEFS+), aiming to explore the association among genotype, phenotype and AEDs response in PEFS+. Additionally, *SCN1A* splice site mutiations, which occur predominantly in severe phenotypes of EFS, such as DS, were recently reported to be detected in patients with milder phenotypes like PEFS+. The underlying molecular pathogenisis of *SCN1A* splice site mutiation associated with PEFS+ remain unknown. Further in vitro minigene splicing assay was applied to investigate the consequences of mutations at or adjacent to splice-sites of *SCN1A*, and compared with those in severe phenotype of DS, for the purpose of exploring the potential molecular pathogenesis of *SCN1A* splice site mutation associated with PEFS+ and the relationship between splicing pattern and

7

Phenotype-genotype-inherited pattern.

**Method**

1. The relationship of genotype-phenotype-AEDs response in *SCN1A* mutation associated with PEFS+

(1) Sequencing and pyrosequencing for point and mosaic mutations of *SCN1A*；

(2) Bioinformatics analysis for pathogenisis of *SCN1A* mutation；

(3) Comparison of mutation types, inherited pattern and Grantham's difference values (D value) of single amino acid substitution in missense mutations among PEFS+, DS and GEFS+ & FS+/FS in our cohort of febrile seizure related epilepsy；

(4) Comparison of mutation types, inherited pattern and D values in missense mutations among PEFS+, DS and GEFS+ & FS+/FS by reviewing the informantion in *SCN1A* mutation database；

(5) Analysis for the clinical features in *SCN1A* mutation-positive patients with PEFS+, then compared them with *SCN1A* mutation-positive patients with DS and GEFS+ & FS+/FS in our cohort.

(6) Analysis for the AEDs response to investigate the relationship of phenotype-genotype-AEDs response.

1. Analysis of in vitro minigene splicing assay for *SCN1A* spilce stie mutation associated with PEFS+

(1) PTARGET-mut or pTARGET-wt minigene constructs for cloning the spilce site mutations associated with PEFS+, and the classical spilce site mutations associated with DS were selected as control；

(2) HEK293T cells were transfected with pTARGET-mut or pTARGET-wt minigene constructs. Total RNA was subsequently extracted and analyzed for spilcing patterns by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)；

(3) All the splice-site mutations were analyzed quantitatively by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR).

**Result**

1. The relationship of genotype-phenotype-AEDs response in PEFS+ associated with

8

*SCN1A* mutation：

(1) Of 238 patients with PEFS+, 27 heterozygous *SCN1A* mutations in 26 cases (10.9%) were found, including truncating and spilice stie mutations in 3 each (11.5%), missense mutation in 19 (73.1%) as one chid had 2 changes, and one in-frame deletion in the remaining (3.8%). DNA was available from 24 sets of parents and 16/25 (64.0%) were de novo mutations. Inherited mutations were found in 9 (7/24, 37.5%) patients, in which 2 mutations were mosaic origin.

(2) All 3 truncation mutations are located further upstream of *SCN1A* sequence that could drive NMD, potentially suggested their interpretation as milder clinical manifestations. Three spice site mutations were predicted to effect on *SCN1A* splicing. one in-frame deletion which was classified as a mutation on the basis that was occurred *de novo* in the patient and positioned in the pore region of Nav1.1 channel, although it was no predicted effect on *SCN1A* splicing. Eighty-five percent of Amino acid alignments of the missense mutations altered a highly conserved amino-acid of

The Nav1.1 family from various species. eleven out of 20 (55%) missense mutations

Were located on key-functional regions of Nav1.1(including 10 in pore region (50%)) with lower D valuses, and nine (45%) were distributed on non-functional regions with higher D values than those in key-functional regions (*P*=0.019).

(3) In comparison with DS and GEFS+ & FS+/FS in our cohort, the frequency of PEFS+ with regard to the mutation types, inherited mutations and missense mutations on key-functional regions and the D values of missense mutations were inthermediate between these two phenotypes. Although no statictical difference was found, there was positieve correlation between phenotype severity and the frequency of missense mutations in key-functional region and inherited mutations.

(4) In comparison with DS and GEFS+ & FS+/FS on *SCN1A* mutation database, the frequency of PEFS+ with regard to the mutation types, inherited mutations and missense mutations on key-functional regions and the D values of missense mutations were comfirmed to be inthermediate between these 2 phenotypes. Compared with DS, the frequency of PEFS+ regarding to missense and truncating mutations, as well as D

Valuses in functional regions had statistical difference (*P*<0.01). Comparing PEFS+

9

With DS and GEFS+ at the aspect of the frequency of inherited mutations, a statistical difference was found (*P*<0.01).

(5) The median age of seizure onset was 9±3.0m ((FS: 9.0±5.7m, aFS ：

24.0±21.0m）), and seizure frequency were 5.5±2.5 times/year in FS and 4.5±2.0 in times/year in aFS(GTCS) in *SCN1A* positive*-*mutation patients with PEFS+. All patients had better seizure outcome as 23.1% obtained seizure freedom. Fifty-three percentage of patients presented milder mental retardation. In comparison with *SCN1A* mutation-positive patients with DS and GEFS+ & FS+/FS in our cohort, PEFS+ emerged to be inthermediate between these 2 phenotypes with regard to age of seizure onset, seizure frequency, seizure outcome and clinical prognosis, and had

Statistical difference compared with DS-C as well as DS-B.

(6) Efficacy of AEDs in *SCN1A* mutation-positive patients with PEFS+ was similar with DS. A poor medication responses of were SCB-AEDs presented in PEFS+, where 70% of individuals who ever administrated SCB-AEDs presented seizure aggravation and 86.7% of them carried destructive *SCN1A* mutations.

2. In vitro splicing assay for *SCN1A* spilce stie mutation associated with PEFS+

(1) Using RT-PCR, PEFS+ mutants showed 2 types of spicing, including exon skipping and intronic insertion other than DS mutants. Coexistence of normal and aberrant mRNA transcripts were found in PEFS+ mutants, while no significant normal mRNA transcripts were identified in DS mutants.

(2) Using Q-PCR, there were significant statistical differences between relative quantity (RQ) of aberrant and normal mRNA transcripts in PEFS+ mutants [c.473+5G> A (6.92±0.77%, 3.98±1.36%) and c.473+5G> C (2.13±0.33% ，

0.51±0.06%)] and that of in DS mutant c.602+1G> A (27.56±3.96%, 0.03±0.003%)

(*P*<0.01). Similarly, there was significant statistical differences between relative RQ of aberrant and normal mRNA transcripts in PEFS+ mutant c.4853-25T> A (7.33±2.33%, 64.50±16.33%%) and those of in DS mutant c.4853-1G> C

(25.4±2.99%, 0.06±0.01%) (*P*<0.01).

(3) Combined analysis showed that mutation in deep intronic area (c.4853-25T> A) is inherited, leading to aberrant intronic insertion in mRNA transcripts with

10

Significant RQ than normal mRNA transcripts and corresponding to the milder manifestation of PEFS+. Mutations in variable splice site (c.473+5G> A and c.473+5G> C) and canonical splice junction (c.602+1G> A and c.4853-1G> C) were both de novo, causing to whole exon skipping. the RQ of aberrant mRNA transcripts were approximate as the normal ones in mutations of variable splice site,

Corresponding to modreat phenotype of PEFS+, whereas the RQ of aberrant mRNA

Transcripts were far more higher than the normal ones in mutations of canonical splice junction, corresponding to severe phenotype like DS.

**Conclusion**

1. *SCN1A* is important disease-causing gene in PEFS+ with a less impairment associated with moderate phenotype of PEFS+.

2. PEFS+ is of isolated and intermediate type between DS and GEFS+ with regard to clinical features, molecular characteristic of *SCN1A* mutations and inherited pattern.

3. Seizure aggravations could be induced by SCB-AEDs in patients with PEFS+, and it was potentially related with dysfunction of Nav1.1 resulted from *SCN1A* mutations.

4. A special feature of mutation positions and splicing pattern is potentially molecular pathogenesis that *SCN1A* splice site mutaitons caused moderate phenotype of PEFS+ that differed from others.

**KEy words**

*SCN1A* gene; Partial epilepsy with febrile seizure plus; Anti-epilepstic drugs; In vitro splicing assay

11

前 言

热性惊厥（febrile seizure, FS）是人类婴儿及儿童期最常见的惊厥事件，7岁之前的儿童热性惊厥的发生率约3～8% (Cross JH, 2012)。遭遇热性惊厥的儿童日后发生癫痫的几率增高（Pavlidou E, et al.,2013）。而与热性惊厥密切相关的癫痫被称为热性惊厥相关癫痫或癫痫伴热性惊厥附加症（epilepsy with febrile seizures plus, EFS+）（ito M, et al.,2006），是一个临床上涵盖了多种不同类型的癫痫和癫痫综合征的疾病谱系。

**一、热性惊厥相关癫痫疾病谱系和部分性癫痫伴热性惊厥附加症（PEFS+）** 在EFS+内，不论其癫痫类型如何，大多以婴儿或儿童期起病，热敏感性，

以及由热性发作逐渐演变为无热发作为其最主要和突出的临床特征。但各个类型又各自具有不同的特点，临床表现复杂，差异巨大。从疾病严重程度而言，EFS+跨越了一系列由轻至重的癫痫类型，从临床表型较轻、预后良好的热性惊厥附加症（febrile seizures plus, FS+）、遗传性癫痫伴热性惊厥附加症（genetic epilepsy with febrile seizures plus, GEFS+）(Gambardella A, et al.,2009)，到相对温和的FS+相关性颞叶癫痫(Scheffer IE, et al.,2007)、部分性癫痫伴热性惊厥附加症（partial epilepsy with febrile seizures plus, PEFS+）（Liao WP, et al.,2010），直至一些预后不良的严重癫痫脑病，如顽固性儿童强直-阵挛性癫痫[2]、肌阵挛猝倒发作性癫痫

（myoclonic-astatic epilepsy, MAE）以及严重婴儿肌阵挛癫痫（severe myoclonic epilepsy in infancy, SMEI），也称Dravet综合征（Dravet syndrome, DS）(Dravet C, et al.,2011-1)等。

在EFS+谱系中，被人熟知且研究较为深入的表型主要为GEFS+和Dravet综合征。前者由Scheffer等人于1997年在一个热性惊厥大家系研究中首先总结并命名（Scheffe IE, et al.,1997），随后的研究证实，GEFS+是一种家系遗传的，临床表型多样，具有常染色体显性遗传并显著遗传异质性特点的癫痫综合征，临床上多为儿童期起病，受累成员的发作以热性惊厥、热性惊厥伴肌阵挛、失神等

12

多种全面性发作为主要特征，总体预后良好。与其相反的，Dravet综合征是一种难治性的癫痫脑病，于1978年由Dravet最早报道和命名，该综合征绝大多数为散发病例，典型患者于一岁前起病，显著的热敏感性，具有肌阵挛、失神、阵挛等全面性发作和部分性发作等多种发作类型，起病后逐渐出现精神运动发育迟滞而无伴神经系统器质性病变，治疗上对多种抗癫痫药耐药，预后不良；对于临床上缺乏肌阵挛或失神发作，或脑电图缺乏全面性放电这几个Dravet综合征典型核心特征多个或之一的，被与典型Dravet综合征（classical Dravet syndrome, DS-C）区分开来，称为Dravet综合征边缘型（borderline Dravet syndrome, DS-B），或边缘型SMEI(SMEI borderline, SMEB)(Dravet C, et al., 2011-2)。近年的研究发现，GEFS+虽然以全面性发作为主，但FS+相关部分性发作比率占其中的10%左右，而在Dravet综合征的边缘型中，部分性发作的比例更可高达70%. Liao等发现，临床上不乏一些散发的单纯部分性癫痫的患者，其临床上不符合GEFS+及DS的诊断，但同样具有热敏感性，以及从热性发作到无热发作的演变，发作总体预后相对良好，因此命名为部分性癫痫伴热性惊厥附加症，即PEFS+，并由此推测，无论从临床角度或病因本质，PEFS+可能为介于GEFS+和Dravet综合征之间的中间过渡型。目前，这类FS+伴部分性发作在国际上仅有少数的报道

（Kumakura A, et al., 2009; Kim YO, et al., 2013）。由于表型的特殊性，部分性癫痫伴热性惊厥附加症逐渐引起众多学者的重视和关注，然而，其临床特征至今尚未明晰，有待进一步研究。

**二、*SCN1A*基因突变相关热性惊厥相关癫痫的基因型-表型-抗癫痫药物反应关系**

鉴于EFS+临床表型鲜明的特征性和复杂性，其病因日渐成为研究的热点。在EFS+中，绝大多数类型或为家族遗传性疾病，或为病因不明，缺乏器质性病变的证据而被纳入特发性癫痫的范畴。目前普遍认为特发性癫痫与遗传因素有关，即基因异常所致。

迄今已报道的与癫痫相关的易感基因有近500种(Ran, et al. 2014)，其中大部分为离子通道或离子通道调节因子的编码基因。离子通道因其特殊的离子跨膜转运功能而在神经系统的兴奋性活动中起至关重要的作用。因此，离子通道的遗

13

传缺陷势必影响离子通道的正常功能，造成神经电活动不同程度的异常而引发痫性发作。近年越来越多的研究证据已表明，许多特发性癫痫由离子通道基因突变所引起，属于离子通道病(ion channelopathies)的范畴(Kohling R, et al. 2002; Brunklaus A, et al. 2014)。在众多中枢神经系统表达的离子通道当中，I型电压依赖型钠离子通道（Nav1.1）尤为重要。作为神经系统兴奋性活动的基础，Nav1.1不但涉及复杂的生理行为活动，同时也是多种中枢神经系统药物作用的靶点。

哺乳动物的Nav1.1通道是由一个α亚基和若干β亚基组成的跨膜蛋白。α亚基是其主要结构和功能单位，由4个高度同源的跨膜结构域组成。每个结构域各含

6 个跨膜片段（S1～S6），其中由S4 片段构成的电压感受区，以及由S5 和S6 片段形成的可选择性地让离子通过的亲水性孔区是Nav1.1 的关键功能区（图1）。在人类，α亚基由*SCN1A*基因编码。由于Nav1.1在出生后人脑中的稳定表达和广泛分布，以及对神经元兴奋性活动的重要作用，使得*SCN1A*成为目前多种癫痫综合征的主要致病基因和重要的候选基因(Catterall, et al. 2010). *SCN1A*突变数据库

（[http: //www. gzneurosci. com/*SCN1A*database/](http://www.gzneurosci.com/SCN1Adatabase/)）最新的数据显示，至今已报道的与癫痫有关的*SCN1A*突变多达1200余个，涉及多种不同类型的癫痫表型。值得注

意的是，在这些多样癫痫类型中，热性惊厥相关癫痫，即EFS+占据其95% (Meng, et al.2015)，同样涵盖了EFS+由轻到重的一系列表型：从自限性的单纯热性惊厥

（FS），表型较轻的GEFS+，到相对温和的PEFS+，直至严重的Dravet综合征等。



**图1。I型钠通道（Nav1.1）结构图**

目前，对*SCN1A*突变相关的EFS+研究热点多集中于FS+、GEFS+以及表型严

14

重的Dravet综合征。从*SCN1A*突变与表型关系的角度而言，约84%的*SCN1A*突变出现在Dravet综合征患者中，4%左右存在于GEFS+/FS+患者中

（[http: //www. gzneurosci. com/*SCN1A*database/](http://www.gzneurosci.com/SCN1Adatabase/)）；Dravet综合征患者的*SCN1A*突变率高达70～80%，而GEFS+/FS+患者约10%可检测到*SCN1A*突变（Catterall, 2010）。在*SCN1A*基因的突变类型上，大量研究已证实，Dravet综合征以可造成Nav1.1蛋白截短的截短突变（即移码突变和无义突变），以及单碱基突变引起单个氨基酸置换的错义突变为主，且错义突变大多数位于Nav1.1电压感受区（S4）和孔区

（S5-S6）等关键功能区，尚有为数不少的*SCN1A*拷贝数变异（copy number variation, CNV）或大片段基因重排（genomic rearrangement）等更为严重的突变类型；而症状相对较轻的GEFS+/FS+则大多数为Nav1.1关键功能区外的错义突变(Kanai, et al. 2004; Liao, et al. 2010; Zuberi, et al. 2011)；从突变的遗传性来看，

Dravet综合征绝大多数为新生突变，而GEFS+多为遗传突变。由此可见，*SCN1A*突变与EFS+表型关系密切，且*SCN1A*突变的类型、位置和遗传模式等与其致病性有关，从而与表型的严重程度相关，这一规律也以在我们此前对*SCN1A*突变数据库的总结分析中得到验证（Meng, et al., 2015）。值得注意的是，迄今报道的有关*SCN1A*突变的PEFS+病例仅三十余例，在这些零星报道的PEFS+患者中，

*SCN1A*突变主要为新生的错义突变，部分位于Nav1.1关键功能区，由此推测

*SCN1A*突变在PEFS+等以部分性发作为特征热性惊厥附加症的致病机制中也可能起着重要作用（Kumakura A, et al., 2009; Liao WP, et al., 2010; Kim YO, et al., 2013）。

此外，钠通道是目前已知大部分抗癫痫药物（AEDs）的作用靶点。常见的

AEDs，如卡马西平(CBZ)、奥卡西平(OXC)、苯妥英钠(PHT)和拉莫三嗪(LTG)等主要通过作用于钠离子通道，抑制钠通道高频放电起治疗作用。在*SCN1A*突变相关的EFS+各表型中，一个重要的临床特征即是对抗癫痫药物的反应差异，尤其GEFS+与Dravet综合征之间的表现大相径庭。GEFS+患者对AEDs的反应绝大多数是良好的。而Dravet综合征患者常存在多种AEDs耐药，既往较多的文献报道表明，CBZ、OXC和LTG等具钠通道阻滞作用的AEDs甚至能够加重*SCN1A*突变患者的发作(Brunklaus, et al.,2012)。这一现象已成为临床工作中的棘手问题。

AEDs不良治疗反应的可能机制纷繁复杂，目前仍未明了，基因背景是造成个体

15

差异的一个重要因素(Kwan, et al.2011)。为数不多的体外功能学研究提示，对于

*SCN1A*突变相关的Dravet综合征患者，*SCN1A*突变导致钠通道功能障碍，是AEDs不良反应的可能原因（Thompson, et al.,2012）。有趣的是，我们此前的两例个案研究也发现，*SCN1A*孔区错义突变的PEFS+患者同样出现CBZ和LTG加重发作的现象。随后的功能学研究也进一步证实，由于Nav1.1主要分布于脑内抑制性中间神经元，位于Nav1.1孔区的*SCN1A*突变导致钠通道功能丧失，可能是钠通道阻滞型AEDs加重发作的分子基础（Liao, et al.,2010）。然而，CBZ和LTG等一直以来被认为是部分性发作/癫痫的常用甚至一线治疗药物，而不恰当的治疗往往是导致顽固性癫痫的重要原因。因此，从临床的角度而言，对PEFS+患者的早期识别和诊断，以及*SCN1A*突变的检测变得异常重要。但是，由于现有的临床和功能学研究都极为有限，有关PEFS+患者药物反应特征，及其与*SCN1A*突变之间关系仍未明确，有必要进一步的研究和探讨。

综合上述，据现有的为数不多的*SCN1A* 突变相关的PEFS+患者数据，其

*SCN1A*突变特征、遗传特征，结合临床表现以及药物诱发加重发作等特点，提示*SCN1A*突变可能与PEFS+关系密切；PEFS+可能是EFS+谱系内的一个独立中间型(Liao, et al., 2007, 2010; Kumakura, et al., 2009; Shi, et al., 2012)。而*SCN1A*基因不同突变类型和突变特征所具有的致病性差异，可能是导致PEFS+温和的临床表型的重要原因。由于有关PEFS+的报道稀少且以个案为主，因此，*SCN1A*突变是否PEFS+的重要致病突变？PEFS+相关的*SCN1A*突变的分子特征如何？以及*SCN1A*突变与PEFS+临床特征之间有着怎样的关系？现有的研究尚无法回答，有待进一步研究。

**三、热性惊厥相关癫痫*SCN1A*突变致病机制与PEFS+相关剪切突变分子致病性**如前所述，EFS+患者的*SCN1A*突变类型多样，以突变碱基<20bp的点突变为

主，常见包括错义突变，截短突变，以及剪切位点突变等。*SCN1A*基因截短突变发生在蛋白编码区，包括无义突变，移码突变，其突变是使代表某种氨基酸的密码子变为终止密码子(UAA, UAG, UGA)，继而引起蛋白合成的提前终止，截短的蛋白产生，从而造成其功能丧失，并由此导致单倍体剂量不足（单倍体不足是指单一拷贝正常基因翻译的蛋白质不足以维持正常功能，是人类疾病发生的一

16

个重要因素）(Meisler & Kearney, 2005; Catterall, et al., 2008)。由于截短突变对蛋白功能的干扰及影响严重，因此*SCN1A*基因截短突变几乎与严重的临床表型相关，如Dravet 综合征。鲜有*SCN1A*基因截短突变导致较轻表型的报道。我们前期已报道2例出现*SCN1A*截短突变的PEFS+患者，临床症状相对较轻，预后较好，对于*SCN1A*截短突变导致较轻表型的分子特征及机制目前尚完全未明了。

错义突变，同样发生在蛋白编码区，是基因编码外显子序列上的单碱基突变引起的氨基酸置换，其致病性体现在氨基酸置换性质改变（即疏水性或极性等变化）对蛋白高级结构的影响。此外，基因突变的位置，即氨基酸置换发生的蛋白区域也是其致病性的重要因素。*SCN1A*基因错义突变最初是在GEFS+患者中发现，随后在Dravet综合征以及PEFS+患者中也发现了错义突变(Wallace et al., 2001; Ceulemans et al., 2004; Kanai et al., 2004; Liao et al., 2010)。从突变的位置而言，大量研究已证实，在Dravet综合征等严重表型的错义突变大多位于钠通道的关键功能区，即孔区和电压敏感区；而症状相对较轻的表型，如GEFS+以非关键功能区的错义突变为主(Kanai, et al.,2004; Zuberi, et al.,2011)。在功能学研究方面，对为数不多的错义突变位点的转基因动物模型研究提示，在电生理特性上，

GEFS+突变体表现为钠通道兴奋性降低或获得功能等轻度功能障碍；PEFS+和

Dravet综合征等表型则以引起钠通道不同程度电流降低，即功能丧失为主(Escayg, et al., 2010; Liao, et al.,2010)。因此，*SCN1A*错义突变可能通过其置换的氨基酸性质的改变而导致钠通道功能不同程度的障碍，从而引起不同的癫痫类型。

与截短和错义突变不同，*SCN1A*基因剪切位点突变/变异发生在基因的非编码区，即基因的非编码内含子中。*SCN1A*基因剪切机制相当复杂，简而言之，包括5个小核[RNA](http://baike.baidu.com/view/759.htm) (small nuclear RNA, snRNA)，其长度在哺乳动物中约为100-215个核苷酸。它们在真核生物[转录后加工](http://baike.baidu.com/view/3852215.htm)过程中形成RNA剪接体(spilceosome)。通过带有剪切体的这些剪切位点序列的互动，剪切过程得到准确的执行。然后，通过2步酶促反应，内含子序列被移除，相邻的外显子连在一起。而节点(branch site)在酶促反应中扮演关键角色。当剪切供体位点和剪切受体位点，外显子剪切增强子和外显子剪切沉默子等序列发生突变，可能引起外显子丢失(exon skip)、内含子保留(intron retention)、或潜在剪切位点激活(activation of a cryptic splice site)等多种异常剪切形式，通过影响蛋白质产物的结构和功能或者减少正常产物的表达

17

导致疾病发生(Baralle and Baralle, 2005)。根据位置和剪切模式的不同，剪切位点变异可以大致分为三类亚型：第一种亚型为固有剪切位点（Canonical splice

junction，CSJ），即位于外显子上游﹣1和﹣2bp，或外显子下游+1和+2bp位置的突变，这一种亚型因破坏了固有的剪切位点而完全废除了外显子的识别；第二种亚型是在可变剪切序列(variant splice motifs, VSM, or potential splice site)，即从外显子上游﹣14～﹣3bp以及下游+3～+9bp的突变，其突变可以减弱或增强外显子识别，从而可能导致正常剪切和异常剪切共存的剪切方式；第三种亚型是远离外显子的深部内含子区域的突变（deep intronic area）。其致病性可能通过激活潜在的剪切受体或者供体位点，或破坏原有的剪切位点而导致异常外显子剪切。因此，剪切位点不同位置的突变/变异可能造成完整的外显子丢失，内含子保留或者潜在剪切位点激活，或者影响外显子选择性剪切，破坏不同剪切体生成的平衡从而导致疾病(Baralle & Baralle, 2005)。临床上已发现的*SCN1A*突变相关

EFS+患者中，绝大多数的剪切位点突变发生在固有剪切区，相对应的表型几乎为严重表型Dravet综合征，提示EFS+相关*SCN1A*基因剪切位点突变具有较强的致病性。然而，近期文献报道，在PEFS+，甚至更轻的GEFS+患者中，同样发现了*SCN1A*基因剪切位点突变(Zuberi, et al., 2011; Kumakura, et al., 2009; Selmer, et al., 2009)。携带*SCN1A*基因剪切位点突变的患者临床表型存在显著的差异，甚至在同一个突变中，不同的患者临床表型也不尽相同（Harkin，et al., 2007; Sun, et al.，

2010）. 因此，对于PEFS+这类相对较轻的表型，*SCN1A*基因剪切位点突变/变异如何影响剪切过程进而导致癫痫的发生？其分子机制尚不清楚，有待进一步研究。

综上所述，鉴于PEFS+临床表型的特殊性，以及现有研究的有限性，为了更好地理解*SCN1A*基因突变与PEFS+的关系，以及PEFS+患者相关的*SCN1A*基因突变分子致病特征与临床表型、AEDs药物反应特点，本课题对近年收集的PEFS+以及DS和GEFS+、FS+/FS患者进行*SCN1A*基因突变筛查。着重对PEFS+的筛查结果进行突变特征的分析，并（1）分别与DS和GEFS+等表型在本研究的筛查结果以及*SCN1A*突变数据库的相关数据进行突变的分子特征比较，同时（2）与突变阳性的DS和GEFS+等患者的临床特征、AEDs治疗反应进行对比，阐明

18

PEFS+的*SCN1A*基因突变分子特征和*SCN1A*突变相关PEFS+临床特征，以期为癫痫的临床基因个体化诊治策略的制订以及遗传咨询提供有价值和更有力的证据支持。另外，针对在PEFS+患者中筛查到的*SCN1A*剪切位点变异，本课题通过相应“剪切报告minigene”载体构建并异源细胞体外表达技术，以及实时荧光定量聚合酶链式反应(Q-PCR)的方法，与具有代表性的Dravet综合征的*SCN1A*基因剪切位点突变进行剪切结局上的分析比较，探讨剪切位点突变的剪切模式的差异与癫痫表型严重程度之间的关系，旨在寻找*SCN1A*基因剪切位点突变导致

PEFS+潜在的分子致病机制，以期为更深入的癫痫分子致病机制的研究提供有价值的线索。

19

# **第一章** **PEFS+**相关***SCN1A***突变分子特征与表型特点**-**抗癫痫药物反应

**研究对象与方法**

## 一、 研究对象

### **1.** 入选标准

对2005年1月-2014年12月间来我癫痫中心的2659例癫痫病人进行长期追踪并随访1年以上， 符合以下条件者入选本研究：

（1）3个月至6岁间起病，由于急性发热而诱发的全面性强直阵挛发作，并无中枢神经系统感染和损伤等病变证据；

（2）热性发作持续到6岁以后、或者（和）出现无热惊厥，其发作形式包括部分性发作，可同时并发其他全面性发作形式；

（3）出生及居住在中国境内的中国人，患者性别及就诊年龄不限。

随后，根据国际抗癫痫联盟（ILAE）2001年关于癫痫和癫痫综合征的分类标准，并参照Liao描述的特征筛选PEFS+患者，**PEFS+的具体标准**如下：

（1）3个月至6岁间有热性惊厥/或无热惊厥，6岁后仍有热性或无热发作；

（2）临床发作类型只有部分性发作或部分继发全面性发作，除全面性强直阵挛发作外，无其他任何形式的全面性发作；

（3）起病前精神运动发育正常；

（4）脑电图（electroencephalogram, EEG）表现局灶性或多灶性异常，病程中所有监测的脑电图除背景慢活动外，无其他任何形式的全面性发放；

（5）影像学无与癫痫相关的特异性病变；

（6）家族性病例，其家族中的其他患者无除FS、PEFS+或部分性癫痫之外其他全面性癫痫表型。

根据ILAE 2001年关于癫痫和癫痫综合征的分类标准，并参照Dravet C 和

Shaffer描述的特征筛选Dravet综合征、GEFS+、FS+和FS患者，各表型具体标准如下：

（1）**Dravet综合征**：

1）有或无热性惊厥和癫痫家族史；

20

2）患者发病前智力运动及精神发育正常；

3）l岁以内起病，首次发作可为一侧性或全面性阵挛或强直阵挛，起病后出现肌阵挛、不典型失神、部分性发作等多种癫痫发作形式；显著的热敏感性；

4）早期脑电图正常，随后可表现为：背景差，广泛和/或局灶或多灶的棘慢波或多棘慢波；

5）起病后第二年逐渐出现精神、运动和智能发育停滞或倒退；

6）对多种抗癫痫药物的治疗反应不佳。

具备上述6条标准者可诊断为Dravet综合征。Dravet综合征又分为典型Dravet综合征（DS-C）和边缘型Dravet综合征(DS-B)。边缘型Dravet综合征指的是患儿 缺少SMEI的典型核心症状如肌阵挛和失神发作，或EEG全面性棘慢波活动，但拥有和典型Dravet综合征一样的病程和结局。

（2）**GEFS+**: 家族性发病，家族中的患者3个月至6岁间有FS或无热惊厥，

6岁后仍有热性或无热发作，临床表型只有全面性发作。

（3）**FS+**：3个月至6岁间有FS或无热的全面性强直阵挛发作（GTCS），

6岁后仍有热性或无热GTCS，病程中除GTCS外无其他类型发作。

（4）**FS**: 3个月至6岁间，只伴随发热（排除颅内病变引起）出现惊厥发作，无热时无发作，无需药物治疗或简单少量的抗癫痫药能完全控制发作，6岁后停止发作，智能发育正常。

### **2.** 排除标准

（1）临床资料及随访信息不完整

（2）发作与热敏感性的关系不明显或不确定

（3）排除肿瘤、外伤、感染、局灶性皮质发育异常等症状性癫痫

（4）影像学有与癫痫相关的特异性病变

## 二、 临床研究方法

### **1.** 患者诊断和家系资料的收集

符合以上标准的散发病例和有家族史的先证者均由癫痫中心的专科医师诊断，并建立专门的随访病历。通过与患者面谈和电话询问的方式（包括父母、配偶、同胞及其他亲属），尽可能多的追溯病史及其家族资料，并绘制较为详细的家系图。

21

### **2.** 临床信息评估

(1)对患者（或先证者）于就诊时进行详细的临床评估。临床评估方案包括：

1）记录患者一般资料：包括性别、出生年月、出生史、发育情况、家族史及其他疾病史。

2）采用David编写的《临床发作类型诊断问卷表》进行问诊，充分收集发作时的详细信息。

3）发作的相关资料：包括首次发作的年龄、首次发作类型、首次发作与发热性疾病的关系、惯常发作类型、发作频率，其他发作诱因。

4）治疗的相关资料：包括AEDs及手术治疗史。详细记录使用AEDs的种类、剂量和不良反应。

5）神经系统体格检查：主要检查有无共济失调、锥体束征等。

6）精神智能发育评估：

①对所有入组PEFS+患者均进行孤独症评估。孤独症的诊断标准根据《精神疾病诊断与统计手册，第四版》（DMS-IV）和《国际疾病统计分类，第10版》

（ICD-10）。孤独症行为评定量表（autism behavior checklist, ABC）作为筛查量表，筛查界限分为53分，诊断分为67分以上。儿童期孤独症评定量表（childhood autism rating scale, CARS）作为诊断的辅助量表，总分≥30分可诊断为孤独症。

②对所有入组的PEFS+患者均进行智力评估。对年龄≥6岁的患者使用中国

儿童韦氏智力量表评估智力；对＜6岁的儿童使用GESELL儿童发育诊断量表获得发育商。将智商（IQ）和发育商(DQ)分为5级：极重度智力落后：IQ/DQ＜25；重度智力落后：25≤IQ/DQ≤39；中度智力落后：40≤IQ/DQ≤54；轻度智力落后：55≤IQ≤70, 55≤DQ≤75；边缘或正常智力IQ＞70或DQ＞75。

7）影像学及脑电图检查。

(2)抗癫药物治疗临床疗效评估：

患者病程中所有使用的①用药信息和随访资料完全；②药物使用剂量在

ILAE推荐的AEDs治疗指南的合理、有效剂量范围内的AEDs进入本研究的评估。

以AEDs对发作的控制效果作为AEDs疗效评判标准，分为发作改善

（improvement）、无变化（no change）和加重（aggravation）三级。发作改善在程度上又可分发作减少（reduction）和无发作（seizure freedom）（即发作完全停

22

止≥1年或≥3倍最长发作间隔期，参考Kwan，et al.,2010）。发作的控制效果评估参考Guerrini等[12]和Perucca[13]定义的标准，即：

1）以ADEs给药前2个月的发作频率或强度为基线，与用药期间的原发作类型的频率和强度相比较，变化较基线> 50%判为改善或加重，<50%为无变化；

2）在基线基础上，无论原发作类型是否改善，出现：①新的发作类型；②持续状态；③无热发作/热性惊厥的比例较基线> 50%，三项中其一或多种亦判为加重。

3）发作加重的判定需同时排除：①原有失神或肌阵挛发作但错误使用已知可加重该类型发作的AEDs；②不规范的AEDs剂量增减和联合使用；③非发热性疾病、情绪、劳累和作息紊乱等非治疗因素造成的发作加重。

4）AEDs联合用药者，原有AEDs须在新药添加前及添加期间至少稳定剂量

1个月，从而排除原有药物变化对发作造成的影响。

此外，参考ILAE和Kwan 2010对耐药性癫痫的推荐定义，患者经过≥2种恰当的AEDs，且治疗从分，但仍出现发作﹥4次/年，或频繁发作且发作频率较前减少＜50%，判为“难治”（refractory）。

### **3.** 正常对照组

共110例，其中男性57例，女性53例，年龄18～40岁之间，由我院健康体检部提供血样。对照组个体间无亲缘关系。

## 三、 实验方法

***SCN1A*基因突变筛查**

### **1.** 主要实验设备

(1)台式高速离心机：TGL-16B型（上海安亭科学仪器厂）

(2)台式低速离心机：80-2B型（上海安亭科学仪器厂）

(3)漩涡混合器：XW-80A型（上海医科大学仪器厂）

（4） 微量移液器：0.5～10μl，10～100μl，20～200μl，100～1000μl（德国

Eppendorf公司)

(5)水平凝胶电泳仪：EPS－301型（北京君意东方电泳设备有限公司）

(6)紫外透射反射仪：WD-9403C型（北京六一仪器厂）

(7)凝胶成像系统：TL-2000Ultraviolet translinker(美国)

23

(8)普通PCR仪：UNOII Biometra（德国）

(9)紫外分光光度计: Lnano Drop（美国）

(10)电子天平：T-200型（美国双杰兄弟（集团）有限公司）

(11) PH计：Sartorius标准PH计PB-20

(12)电热恒温水浴箱：CU420型（上海益恒实验仪器有限公司）

(13)恒温磁力搅拌器：78HW-1型（杭州仪表电机有限公司）

(14)变性高效液相色谱仪(DHPLC): Transgenomic（美国环球基因有限公司）

(15) Sartorius超净纯水机：arium®611(德国)

### **2.** 主要实验试剂

#### **2.1**人外周血**DNA**抽提试剂

(1) QIAGEN基因组DNA快速提取试剂盒（美国基因技术有限公司）

(2)无水乙醇（广州市番禺力强化工厂）

#### **2.2PCR**扩增试剂

(1) *SCN1A*引物序列设计：见表1（上海生工科技）

(2) TaqDNA聚合酶：5u/µl（广州东盛科技有限公司）

(3) dNTP: 10mM（北京赛百胜基因技术有限公司）

(4) 10×Taq Buffer：（北京德博全基因检测技术研究所）

(5) ddH2O：（广医二院分子生物实验中心）

(6) Mgcl2:（北京德博全基因检测技术研究所）

(7) DNA Marker（美国Thermo Fisher scientist公司）

#### **2.3**琼脂糖凝胶电泳试剂

(1)琼脂糖（北京赛百胜基因技术有限公司（西班牙分装））；

(2)电泳液5×TBE(Tris 54g；硼酸27.5g; 0.5 mmol/L EDTA 20ml( PH8.0)加水定容至1000ml，PH7.8)（北京赛百胜基因技术有限公司）；0.5×TBE电泳液由

5×TBE稀释制成；

(4) 10×Loading Buffer（北京赛百胜基因技术有限公司）；

(5)溴化乙锭：10mg/ml（广州众鹏生物技术公司）

#### **2.4**变性高效液相色谱仪所需试剂

(1) TEAA (2M PH7.4) (美国环球基因有限公司)

(2) Acetouitrile (美国环球基因有限公司)

24

(3) ddH2O（广医二院分子生物实验中心）

(4) Acetonitrile（乙腈）HPLC Grade (Dima Technology Inc. USA)

(5)流动相：A液（0.1M TEAA）；B液（0.1M TEAA +25%乙腈）；D液（75%

乙腈）

(6)上样器洗涤：C液（8%乙腈）

### **3.** 实验步骤

3.1**血样的采集：**对符合诊断标准的238例PEFS+患者用EDTA抗凝管留置静脉全血6ml/人。

#### **3.2**人外周血白细胞**DNA**的提取及浓度测定

使用机器提取患者外周血白细胞DNA（配套试剂：Qiagen DNA抽提试剂盒），操作步骤如下：

(1)将2 ml的患者外周血加入5ml离心管中，加入300µL蛋白酶充分混匀；

(2)加入2 ml AL缓冲液，上下颠倒混匀5次。56℃水浴箱静置5分钟；

(3)加入AB液2 ml，56℃水浴箱静置5分钟。颠倒混匀5次；

(4)将混合物倒入离心柱管中，按机器说明程序过滤外周血白细胞基因组DNA；

(5)使用紫外分光光度计测定DNA的浓度以及OD值，使其浓度在100ng/µL

以上，OD值介于1.7至1.9之间。

(6) DNA提取产物置于-20℃冰箱保存。

#### **3.3**引物设计

(1)在[http: //asia. ensembl. org/index. html](http://asia.ensembl.org/index.html)网站上查找*SCN1A*基因的全序列；

(2)使用Primer Premier5.0软件于*SCN1A*基因内含子区设计引物，用于后续聚合酶链式反应（各分段扩增的目的片段长度、引物及其实验条件详见附表1）。

#### **3.4**聚合酶链式反应（**PCR**）

(1) PCR反应总体系：

**PCR反应体系**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| gDNA (100ng/µl) | 5 ul |
| Primer-F | 1 ul |
| Primer-R | 1 ul |
| 2.5MM dNTP | 1 ul |
| 10×buffer | 5 ul |

25

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | MgCl2 | 2 ul |  |
|  | Taq enzyme | 1 ul |  |
|  | ddH2O | 32 ul |  |
|  | Total | 50 ul |  |

(2) PCR扩增条件：94℃预变性5分钟→继之下列步骤循环32次：94℃变性30

秒、T(退火) 30秒、72℃延伸40秒→末次循环后72℃延伸10分钟。产物4℃保存。

#### **3.5**琼脂糖凝胶电泳

PCR产物5μl加入10×loading Buffer 0.5μl混匀。加样于1%琼脂糖凝胶。

0.5×TBE电泳液中室温恒压（120V）电泳30分钟。紫外反射投射仪上检测PCR

扩增产物。

#### **3.6DHPLC**筛查（半变性工作模式）

(1)上样前预处理（变性复性过程）：将预测样本与已测序证实正常片段的样本按1: 1体积比混合，置于PCR仪（M& J PTC-200 PCR仪）中依次完成以下程序：

95℃10分钟；以每秒减少0.1℃至80℃；再以相同速度递减温度时每减一度均温育一分钟直至40℃；以每秒减少0.1℃至25℃。室温放置待检。

(2)温度设定：将扩增片段的全序列输入NavigatorTM软件，得到双螺旋百分比-温度曲线、温度-碱基对曲线和双螺旋百分比-碱基对曲线。依据软件推荐的温度增加或者修改半变性温度。以最少的温度，在双螺旋百分比-温度曲线内，将全片段碱基对的双螺旋百分比包括在50%-99%之间。

(3)方法设定：以NavigatorTM软件推算的初始梯度上样，以2%/min的速度梯度增加B液（即以2%/min的速度递减A液）。将流动相流速设定为0.9ml/min。

(4)将已变性复性的PCR产物按顺序上样于DHPLC的192孔板，根据不同温度梯度以软件推荐的方法进行预实验。

(5)在原设定梯度增减的速度及流速条件下，根据预实验中各片段色谱图的

“峰型”调整温度，以“出峰时间”调整初始梯度（B液所占百分比）。各片段以半变性模式DHPLC筛查，所选用温度及梯度见附表1。

#### **3.7PCR**产物测序

(1)直接测序：经DHPLC筛查后，对于色谱图出现“双峰”或“异源峰”的片段，均送至深圳华大科技有限公司进行直接测序，以确定基因突变位点和突变形式；经与NCBI dbSNP等网上公开数据库比对以排除单核苷酸多态性，确认突变。对确认突变的患者同时进行双亲相应片段的PCR测序验证，以确认突变的遗传方

26

式。

(2)焦磷酸测序(Pyrosequencing): 直接测序未发现异常而DHPLC上有相同异常峰型者，针对其对应的已检测到突变的先证者分别设计生物素标记的上、下游和测序引物（见表3）（上海生工科技有限公司），运用PSQ 96 系统（瑞典Pyrosequencing AB公司）进行测序分析。

**焦磷酸测序引物序列**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 154 | 157 |
| F1-5' | CGCCATTATTATTTTACCATTGGA | GGTCTCCTATCAGCCAATCACTA |
| R1-3' | CTTGATTGTTTCAGCTTTCACTTT | AAGGTGGCGTCTGTAAGCA |
| S | TGGTTGTCATTCTTCTCC | GGCGTCTGTAAGCAC |

反应条件：94℃3分钟→[94℃30秒→58℃30秒→72℃30秒]，45个循环→72℃ 3

分钟。

## 四、 ***SCN1A***基因突变生物信息学分析

### **1.** 剪切突变位点生物信息软件预测分析

应用网上公开的人类基因剪切预测软件[http: //www. umd. be/HSF/](http://www.umd.be/HSF/)预测剪切突变是否可能导致异常剪切以及可能的剪切形式，为后续分子机制研究提供线索。

### **2.** 错义突变的同源序列保守性分析

采用Vector NTI 软件，将错义突变对应的氨基酸位点在在同一物种不同钠通道亚型，以及不同物种的钠通道同源序列中进行氨基酸保守性分析，以比较该位点在生物进化过程中的保守性，从而间接反应错义突变是否具有致病性。比对的同源序列包括：人类 *SCN2A*、*SCN3A*、*SCN4A*、*SCN5*、*SCN7A*、*SCN8A*、*SCN9A*、

*SCN10A*和*SCN11A*；大鼠*SCN1A*、*scn2a*和*scn3a*；豚鼠、乌贼、电鳗和果蝇钠通道基因。高度保守者提示错义突变具有致病性。

### **3.** 错义突变氨基酸置换的化学性质差异分析

对错义突变的氨基酸置换前后的极性、疏水性和所带电荷的变化进行比对；根据Grantham不相似度（Grantham's amino acid difference formula）（Grantham R，

1977）（即D值）衡量氨基酸置换在化学性质上的差异大小。D值范围5～215，其值越大，氨基酸改变的差异就越大，提示该错义突变可能的致病性越大。

## 五、 **PEFS+**相关***SCN1A***基因突变与其他热性惊厥相关癫痫的比较分析

27

### **1.** **PEFS+**与**DS**和**GEFS+ & FS+/FS**筛查的相关***SCN1A***突变特征比较

将本研究在PEFS+和DS，以及GEFS+ & FS+/FS筛查所得的*SCN1A*突变在

①突变类型，②错义突变分子特征，以及③突变的遗传特征等3方面进行比较，以了解PEFS+相关*SCN1A*突变是否具有不同于其他主要热性惊厥相关癫痫表型的分子特征。

### **2.** **PEFS+**相关***SCN1A***突变特征在***SCN1A***突变数据库的比较分析

利用*SCN1A*突变数据库([http: //www. gzneurosci. com/*SCN1A*database/](http://www.gzneurosci.com/SCN1Adatabase/))，将本研究PEFS+相关*SCN1A*突变数据与该数据库中GEFS+ & FS+/FS及Dravet综合征的数据进行比较。比较内容包括：突变类型、各类型的比例、错义突变孔区分布比例及对应D值，以及突变的遗传特征。通过比较分析，进一步验证并明确PEFS+相关*SCN1A*基因突变的特征。

## 六、 ***SCN1A***突变相关**PEFS+**患者临床特征及其比较分析

1. ***SCN1A*突变相关PEFS+临床特点总结**：对*SCN1A*突变阳性PEFS+患者的临床资料和药物反应信息进行汇总分析，总结其主要临床特点。

2. **PEFS+与*SCN1A*筛查阳性的DS和GEFS+ & FS+/FS患者的临床特点比较分析**：通过比较分析以了解PEFS+是否具有独特的临床特征。比较内容包括：

（1）临床一般信息；

（2）临床发作发作特征和脑电图特点；

（3）发作转归和临床预后。

## 七、 ***SCN1A***突变相关**PEFS+**患者**AEDs**治疗疗效评估及与***SCN1A***突变的关系和其他表型的比较分析

### **1.** ***SCN1A***突变相关**PEFS+**临床**AEDs**治疗疗效总结

通过对所有*SCN1A*突变PEFS+患者的临床AEDs治疗信息进行汇总分析，总结其AEDs治疗疗效，并着重分析AEDs治疗加重与*SCN1A*突变的关系。

### **2.** **PEFS+**与***SCN1A***筛查阳性的**DS**和**GEFS+ & FS+/FS**患者的**AEDs**治疗疗效比较分析

28

## 八、 统计学分析

采用SPSS19.0软件统计包进行数据处理。患者起病年龄、病程、随访时间、用药时长等非正态分布数据，用中位数（范围）±四分位数间距（median±semi-IQR）表示；氨基酸差异D 值均数用均数/中位数[半四分位数间距]

（mean/median [semi-IQR]）表示。正态分布数据以x±s表示。非正态分布数据的两组间差异采用两独立样本的Mann-Whitney U检验；率的比较用卡方检验， n

＜40时用Fisher确切概率法；相关性分析采用Spearman相关分析。检验标准为

a=0.05, *P*＜0.05为差异有统计学意义。

29

PEFS+ 患者突变特征分析

突变特征致病性分析

与 DS 和

GEFS+&FS+

/FS 的*SCN1A*

突变比较

与 DS 和 GEFS+

的 *SCN1A* 突变数据库汇总比较

直接测序确认突变

焦磷酸测序鉴定嵌合突变

突变 PEFS+患者AEDs 反应特征分析

结论

**技术路线**

收集 **GEFS+和**

**FS+/FS** 病例

收集 **PEFS+**

病例

收集 **Dravet** 综合征病例

*SCN1A* 基因26 个外显子及其邻近内含子突变筛查

（PCR 扩增法）

DHPLC 点突变筛查

突变 PEFS+患者临床特征分析

与突变 DS 和

GEFS+&FS+/

FS 的比较

与突变 DS 和

GEFS+

& FS+/FS 的比较

30

**结 果**

## 一、 **PEFS+**患者***SCN1A***基因筛查结果

### **1.** 人口学信息：

依据入组及排除标准，本研究共纳入PEFS+患者（或先证者）238例，所有患者均获得外周全血血样。26例患者*SCN1A*突变筛查阳性，突变阳性比例10.9%

（26/238）。突变患者中男12例，女14例（男: 女=0.86: 1）。26例患者中24例（92.3%）获得父母DNA样本进行突变遗传性验证。所有筛查获得的*SCN1A*突变均未在110例健康对照人群中被发现。

### **2.** ***SCN1A***突变特征

26例患者中共发现27个*SCN1A*基因杂合突变位点，13个突变位点为未被报道的新位点。

(1)**突变类型**：3例患者为截短突变（11.5%），包括2个为无义突变及1个为移码突变；3例患者为剪切位点突变（11.5%）19例患者为错义突变（73.1%），其中1例患者携带2个错义突变（c.2940C> A/p. N980K和c.4741A> G/p. I1581V）；框内缺失1个（3.8%）。（图2）

(2)**突变遗传方式**：27个突变中除2人未获得父母血样而遗传不明外，16个为新生突变（64.0%）。9个为遗传突变（36.0%），经焦磷酸测序，证实其中2例患者的突变来自其具有嵌合突变的父亲（c.4847T> C/p. I1616T 和

c. 8A> G/p. Q1923R），其中I1616T的父亲携带12.5%的突变，临床无症状；

Q1923R的父亲幼时有FS史，携带25%的突变（为既往研究结果，见Shi, 2012

报道）。（图2）

(3)**突变的位置分布**：

1）截短突变：3个截短突变位点均位于基因序列的较上游（分别为exon4，12和16），均远离*SCN1A*基因的终止密码子，理论上造成较短的Nav1.1截短蛋白。

（图3）

2）剪切位点突变：3个剪切位点突变的2个为外显子下游5bp的位置，属于可变剪切区；另一个位于外显子下游25bp处，属于深部内含子区。其突变造成

31

的剪切形式尚不明确。（图3）

3）错义突变：20 个错义突变位点中，11 个位于Nav1.1 通道的关键功能区

（55.0%），包括10个位于孔区（50%），1个位于电压感受区；9个位于非关键功能区（45.0%），其中S1-S3片段上5个，N/C末端4个（图2）。其中有2个错义突变位点（N980K和I1581V）来自于同一个患者，其致病性分析见后。

4）框内缺失：位于孔区。



**图2. PEFS+相关*SCN1A*基因突变在Nav1.1通道的分布及遗传方式**



**图3** **. PEFS+相关*SCN1A*截短突变和剪切位点突变在*SCN1A*基因上的分布**

32

## 二、 **PEFS+**相关***SCN1A***突变生物信息学致病性分析

**（本文的生物信息学分析仅列出PEFS+相关*SCN1A*突变的分析结果，对于DS**

**及GEFS+ & FS+/FS的*SCN1A*突变的分析结果可另询作者。）**

### 1. 截短突变致病性分析：3 个截短突变理论上可造成未成熟的终止密码子

（premature termination codon, PTC）提前出现而导致钠通道蛋白截短，使通道功能丧失，从而出现“单倍体剂量不足”的现象。

### 2. 剪切位点突变致病性分析：

根据人类基因剪切预测软件[http: //www. umd. be/HSF/](http://www.umd.be/HSF/)的分析结果，c.473+5G> A和c.473+5G> C均可能直接造成剪切供体和受体位点的破坏，导致整个外显子的丢失，同时存在正常剪切和异常剪切形式。而c.4853-25T> A则可能形成一个新的受体位点，使得外显子上游插入23bp的碱基序列，同时正常剪切和异常剪切形式共存。（图4）。进一步尚需实验研究证实。



**图4。人类基因剪切预测软件**[**http: //www. umd. be/HSF/**](http://www.umd.be/HSF/)**对PEFS+相关剪切位点突变的剪切预测**

### **3.** 单氨基酸置换或缺失突变致病性的生物信息学分析

**(1)错义突变和框内缺失突变氨基酸同源序列保守性分析：**

使用BioEdit7.0软件，对20个*SCN1A*错义突变和1个框内缺失突变位点在钠通道不同亚型及不同进化层次的物种间进行同源序列的比对，分别为：人类

*SCN2A*、*SCN3A*、*SCN4A、SCN5*、*SCN7A*、*SCN8A*、*SCN9A*、*SCN10A*和*SCN11A*；

33

大鼠*SCN1A*、*scn2a*和*scn3a*；豚鼠、乌贼、电鳗和果蝇钠通道基因。

其结果显示：17个错义突变位点（85.0%）对应的野生型氨基酸或者在物种进化过程中高度保守，或者在哺乳动物中高度保守（见红色框型部分）；余下的

3个（R1407Q、I1581V和F1620L）在哺乳动物中枢神经系统表达的钠通道家族的亚型中也是保守的。此外，框内缺失突变I1722del为单一氨基酸缺失，该氨基酸在进化过程中也呈高度保守（图5）。该结果提示本研究PEFS+相关错义突变和框内缺失突变均为致病性突变。c.2940C> A/p. N980K和c.4741A> G/p. I1581V出现在同一例患者，由于I1581V来自患者无症状的母亲，位点位于非孔区，且进化中非高度保守，因此我们推测I1581V不排除为一个少见的多态性位点的可能，而对该患者表型起主要致病作用的可能为N980K。



**图5** **. PEFS+相关*SCN1A*基因错义突变及框内缺失突变的氨基酸同源序列保守性分析**

34

**(2)错义突变的氨基酸置换差异分析**

将20个致病性错义突变的氨基酸置换性质结合其在钠通道中的位置进行分析，包括氨基酸的极性/疏水性、电荷和置换后差异D值。结果显示如表1。关键功能区（Key-functional region）（包括孔区和电压敏感区）氨基酸置换存在性质改变的占36.4%（4/11），无变化为63.6%(7/11)，D值=54.64/46[30]；非关键功能区（Non-functional region）（包括S1～S3、N/C末端和各结构域见连接区）性质有改变的占66.7%（6/9），无变化占33.3% (3/9), D值=82.11/89[31]。关键功能区与非关键功能区的D值比较，差异有统计学意义（*P*=0.042），结果提示关键功能区的氨基酸置换性质差异相对较小，而非关键功能区的氨基酸置换性质差异较大，故总体而言，PEFS+相关的错义突变致病性相对较温和。

**表1** **. PEFS+相关*SCN1A*基因错义突变的氨基酸置换性质差异分析**

| Mutation, polarity change, and chemically dissimilar amino-acid changes (Grantham's formula) | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| S1-S3/Linker | Voltage sensor | Pore region | N/C-terminal |
| Y1095H, P/O→P/+ (89) | R859H, P/+→P/+ (29) | A420V, N→N (64) | M1889R, N→P/+ (91) |
| I1581V, N→N (29) |  | R946H, P/+→P/+ (29) | P1905L, N→N (98) |
| E1587G, P/-→N (98) |  | N980K, P/O→P/+(94) | Q1923R, P/O→P/+ (43) |
| R1596C, P/+→P/O (180) |  | I1347T, P/O→N (89) |  |
| I1616T, N→P/O (89) |  | V1366I, N→N(29) |  |
| F1620L, N→N (22) |  | R1407Q, P/+→P/O (43) |  |
|  |  | P1738L, N→N (98) |  |
|  |  | F1765L, N→N (22) |  |
|  |  | S1768N, P/O→P/O (46) |  |
|  |  | A1783E, N→P/- (58) |  |

注：Voltage sensor，电压敏感区，包括S4片段及其连接；Pore region，孔区包括片段S5～S6以及远端26-35个氨基酸序列([http: //www. uniprot. org/uniprot/P35498](http://www.uniprot.org/uniprot/P35498))；N/C-terminal，氮/碳末端；Linker，各结构域之间的链接区。疏水性和极性（极性/电荷）：N，非极性；P，极性；+，正电荷；–，负电荷；O，不带电荷或非电离。以下表3同此表。

### **4.** 框内缺失突变致病性分析

本研究唯一一例框内缺失其碱基突变位于外显子序列中部，虽剪切分析软件未能提示其对外显子剪切产生影响，但做为单个氨基酸缺失的新生突变，且位于钠通道孔区高度保守序列，故认为为致病性突变。

## 三、 **PEFS+**与**Dravet**综合征及**GEFS+ & FS+/FS**相关***SCN1A***突变特征的比较

### **1.** **Dravet**综合征及**GEFS+ & FS+/FS**患者***SCN1A***基因突变筛查结果（表**2**）

35

**(1) Dravet综合征患者*SCN1A*基因突变筛查结果**

本研究共纳入Dravet综合征（DS）患者87例，41例患者*SCN1A*突变筛查阳性（41/87, 47.1%），其中典型Dravet综合征（DS-C）患者17例，边缘型

Dravet综合征（DS-B）24例。突变患者中男27例，女14例（男: 女=1.93: 1）。

40例患者获得父母DNA样本进行突变遗传性验证。

41例患者中筛查出*SCN1A*点突变35个，拷贝数变异2个。11例（26.8%）共11个突变位点为错义突变；20例（48.8%）共16个位点为截短突变；6例（14.6%）

6个位点为剪切位点突变；此外尚有1例框内缺失，1例3’非编码区（3'UTR）变异。所有突变位点已经生物信息学分析，或功能学研究（3’UTR功能学研究见本研究所曾涛论文）而被考虑为致病突变。

除2例遗传类型不明外，31例（31/39, 79.5%）为新生突变；8例（8/39，

20.5%）为遗传突变，均来自其有痫性发作史的父母，其中4例（4/8, 50%）的父母为嵌合突变，包括1例错义突变，3例无义突变。

37个突变位点中24个为新发现的突变。

**(2) GEFS+ & FS+/FS患者*SCN1A*基因突变筛查结果**

本研究共纳入GEFS+患者83例，FS+/FS患者192例，分别有8例（9.6%）GEFS+和10例（5.2%）FS/FS+患者*SCN1A*突变筛查阳性。这18例突变的轻表型患者中男11例，女7例（男: 女=1.57: 1）；12例患者获得父母DNA样本进行突变遗传性验证。

18例患者中筛查出*SCN1A*点突变15个。11例（61.1 %）共10个突变位点为错义突变；4例（22.2%）共2个位点为剪切位点突变；3例（16.7%）3个位点为同义突变。所有突变位点已经生物信息学分析，或功能学研究（同义突变功能学研究见本所蔡秀曲论文）而被考虑为致病突变。

除6例遗传类型不明外，5例为新生突变，均集中在FS+/FS表型（5/10, 50%）；

#### 7 例为遗传突变，均来来自GEFS+患者（7/8，87.5%）。

15个突变位点中11个为新发现的突变。

所有在DS和GEFS+ & FS/FS+患者中筛查获得的*SCN1A*突变均未在110例健康对照人群中被发现。

**表2. Dravet综合征及GEFS+ & FS+/FS患者*SCN1A*基因突变筛查结果一览表**

| **Feature** | **DS** | **GEFS+ & FS+/FS** |
| --- | --- | --- |

36

**B**

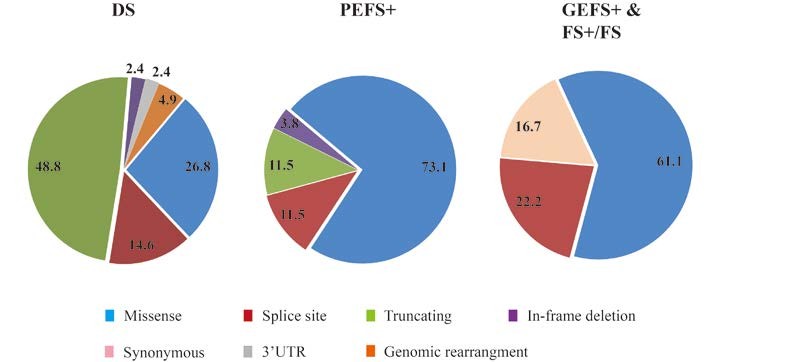
|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  | **DS-C**  n=36 | **DS-B**  n=51 | **Total**  n=87 | **GEFS+**  n=83 | **FS+/FS**  n=192 | **Total**  n=275 |
| **Positive-mutation** (%) | 17 (47.2) | 24 (47.1) | 41 (47.1) | 8 (9.6) | 10 (5.2) | 18 (6.5) |
| **Mutation type** (number/total positive-mutations %) | | | | | | |
| Missense | 4 | 7 | 11 (26.8) | 7 | 4 | 11 (61.1) |
| In-frame deletion | 1 | ﹣ | 1 (2.4) | ﹣ | ﹣ | ﹣ |
| Splice site | 4 | 2 | 6 (14.6) | ﹣ | 4 | 4 (22.2) |
| Truncating | 14 | 6 | 20 (48.8) | ﹣ | ﹣ | ﹣ |
| Synonymous | ﹣ | ﹣ | ﹣ | 1 | 2 | 3 (16.7) |
| 3'UTR | ﹣ | 1 | 1 (2.4) | ﹣ | ﹣ | ﹣ |
| Genomic arrangment. | 1 | 1 | 2 (4.9) | ﹣ | ﹣ | ﹣ |
| Total | 17 | 24 | 41 | 8 | 10 | 18 |
| **Inheritance** (number/known inheritance %) | | | | | | |
| De novo | 14 | 17 | 31 (79.5) | ﹣ | 5 | 5 (41.6) |
| Inherited | 3 | ▲  5 | 8 (20.5) | 7 | ﹣ | 7 (58.3) |
| Unknown | ﹣ | 2 | 2 | 1 | 5 | 6 |

n, 患者数；DS, Dravet综合征（Dravet syndrome）；DS-C, 经典Dravet综合征（classical Dravet syndrome）; DS-B, 边缘型Dravet综合征（Dravet syndrome bordline）；GEFS+, 全面性癫痫伴热性惊厥附加症（generalized epilepsy with febrile seizure plus）；FS+, 热性惊厥附加症（febrile seizure plus）；FS, 热性惊厥（febrile seizure）；3’UTR, 3'非编码区（3’uncoding region）；▲4人遗传至其具有嵌合突变的父亲或母亲。此后各表同此表。

### **2.** **PEFS+**与**DS**及**GEFS+ & FS+/FS**的***SCN1A***突变分子特征比较

**(1)突变类型比较**

PEFS+、DS和GEFS+ & FS+/FS在*SCN1A*突变类型上的分布见图6A，可见较之PEFS+, DS尚存在致病性更严重的基因重排和转录调控区的突变，而GEFS+等则尚存在理论上致病性较轻的同义突变。统计分析可见PEFS+在错义和截短突变的比例上较DS具有显著统计学差异（*P*<0.01）（图6B）。



**A**

**B**

37



**图6. PEFS+与Dravet综合征及GEFS+ & FS+/FS的*SCN1A*突变类型比较**

**(2)错义突变特征比较**

DS的11个错义突变中，7个（63.6%%）位于钠通道关键功能区，其中6个位于孔区，1个于电压敏感区；关键功能区D值=75.6/50[61]，非关键功能区D值=63.8/43[28.4]. GEFS+ & FS+/FS的10个错义突变中，5个（50%）位于关键功能区（4个于孔区，1个于电压敏感区）；关键功能区D值=72.7/89[17.5]，非关键功能区D值=81.25/98[34.5]（表3-1, 3-2）。较之PEFS+在关键功能区55%的错义突变率，PEFS+错义突变在钠通道的分布与其他表型相比虽均未见统计学差异，但已显示出表型严重程度与错义突变在关键功能区的发生率呈正相关，反之与非关键功能区发生率呈负相关，而PEFS+具有明显的中间型趋势（图7）；

D值的比较亦未见差异（表3-2）。

表3-1. PEFS+与Dravet综合征及GEFS+ & FS+/FS的SCN1A错义突变在Nav1.1的分布及氨基酸置换一览表

| Phenotype | Mutation, polarity change, and chemically dissimilar amino-acid changes (Grantham's formula) | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| S1-S3/Linker | Voltage sensor | Pore region | N/C-terminal |

R500Q, P/﹢→P/O (43) A1320P, N→N (27) V406F, N→N (50) P113T, N→P/O (38) T1210K, P/O→P/﹢(78) V983I, N→N (29)

E1623A, P/-→N (107) W1408G, N→N (184)

**DS**

F1415I, N→N (21)

S1768R, P/O→P/+ (110)

**PEFS+** Y1095H, P/O→P/+ (89) R859H, P/+→P/+ (29) A420V, N→N (64) M1889R, N→P/+ (91)

A1783V, N→N (64)

38

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
|  | I1581V, N→N (29) |  | R946H, P/+→P/+ (29) | P1905L, N→N (98) |
|  | E1587G, P/-→N (98) |  | N980K, P/O→P/+(94) | Q1923R, P/O→P/+ (43) |
|  | R1596C, P/+→P/O (180) |  | I1347T, P/O→N (89) |  |
|  | I1616T, N→P/O (89) |  | V1366I, N→N (29) |  |
|  | F1620L, N→N (22) |  | R1407Q, P/+→P/O (43) |  |
|  |  |  | P1738L, N→N (98) |  |
|  |  |  | F1765L, N→N (22) |  |
|  |  |  | S1768N, P/O→P/O (46) |  |
|  |  |  | A1783E, N→P/- (58) |  |
|  | R560H,P/+→P/+(29) | I1616T,N→P/O(89) | V1390M, N→N (21) |  |
|  | G803E,N→P/-(98) |  | V1481A,N→N (64) |  |
| **GEFS+ &**  **FS+/FS** | E1587G,P/-→N(98) |  | G1711D,N→P/﹣(94) |  |
|  | R1596C,P/+→P/O(180) |  | Q1719P,P/O→N (76) |  |
|  | V1612I,N→N(29) |  |  |  |

**表3-2. PEFS+与Dravet综合征及GEFS+ & FS+/FS的*SCN1A*错义突变在Nav1.1的分布及氨基酸置换的比较**

Key functional region Non-key functional region

| Phenotype | Number (%) | D value | Number (%) | D value |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| DS (N=11) | 7 (63.7) | 75.6/50[61.0] | 4 (36.3) | 63.8/43[28.4] |
| PEFS+ (N=20) | 11 (55.0) | 54.6/46[30.0] | 9 (45.0) | 82.1/89[31.0] |
| GEFS+ & FS+/FS (N=10) | 5 (50.0) | 72.7/89[17.5] | 5 (50.0) | 81.25/98[34.5] |
| 注：N，错义突变位点数 |  |  |  |  |



**图7. PEFS+与DS和GEFS+ & FS+/FS的错义突变在钠通道上的分布比较**

注：N，错义突变位点数

39

### **3.** **PEFS+**与**DS**及**GEFS+ & FS+/FS**的***SCN1A***突变遗传特征比较

DS 具有最高的新生突变率（79.5%），最低的遗传突变率（20.5%），而

GEFS+ & FS+/FS 等轻表型则以遗传突变占优势（58.4%），新生突变率最低

（41.6%）。PEFS+的新生突变率和遗传突变率虽然与二者间比较无统计学差异，但相关分析显示出表型严重程度与新生突变率呈正相关（r=0.986, *P*<0.01），与遗传突变率呈负相关（r=-0.986, *P*<0.01）；且PEFS+明显位于二者之间。



**图8. PEFS+与DS及GEFS+ & FS+/FS在突变遗传特征上的比较**

注：n，突变患者数

## **四、 PEFS+**相关***SCN1A***突变与***SCN1A***突变数据库数据的比较分析

为更深入的了解PEFS+相关*SCN1A*突变在分子特征和遗传特性上的特殊性，我们进一步将本研究的PEFS+相关*SCN1A*突变数据与*SCN1A*突变数据库进行整合分析。经对*SCN1A*突变数据库（[http: //www. gzneurosci. com/scn1adatabase](http://www.gzneurosci.com/scn1adatabase)）进行检索，截止2014年12月，全球已公布的*SCN1A*突变阳性热性惊厥相关癫痫患者

1617例，包含1146个*SCN1A*突变，点突变占绝大多数。迄今已报道的*SCN1A*突

变DS患者1502例，共1047个突变，其中点突变991个，根据类型的不同，又将DS细分为典型DS（DS-C）、边缘型DS（DS-B）和未能分型DS(DS-U)；GEFS+

（含FS和FS+，以下统称GEFS+ & FS+/FS）患者84例，共71个突变，也均为点突变。各热性惊厥相关表型*SCN1A*突变具体分布情况见附表6和7。将本研究

PEFS+的相关数与该数据库公布的GEFS+和DS（及其不同分型）数据进行比较，以进一步了解PEFS+与不同表型间的差异。结果如下：

40

①PEFS+与GEFS+和DS及其不同分型在突变类型分布上的比较（患者数）：本研究PEFS+患者中错义占绝大多数（73.1%），但比例略低于GEFS+患者

（73/84, 86.9%），明显高于DS-B(418/1055, 39.6%)、DS(U)（130/282, 46.1%）和DS-B（91/165, 55.1%）患者，差异均有统计学意义（*P*<0.01）；截短突变3例（11.5%），与DS-B(432/1055, 40.9%)、DS(U)(104/282, 57.1%)和DS-B

（55/165, 33.3%）比较差异也均有统计学意义（*P*<0.01），与GEFS+患者（6/84，

4.8 %）统计无差异；剪切位点突变3例（11.5%），则与DS各型和GEFS+比较均无差异。（见图6）



**图6. PEFS+与GEFS+和DS在*SCN1A*基因突变类型上的比较**

注：**n**：患者例数；**DS-C**：典型Dravet综合征；**DS（U）**：未能分型的Dravet综合征；**DS-B**：边缘型Dravet

综合征；**GEFS+**含FS和FS+。以下各图示同此图。PEFS+与各表型之间的两两比较使用卡方检验。

②PEFS+与GEFS+ & FS+/FS和DS错义突变在Nav1.1的分布及各区域D值比较（位点）:

本研究*SCN1A*突变相关PEFS+的20个错义突变中，11个位于关键功能区

（孔区10个，电压敏感区1个）（55%）；非关键功能区9个（45%）。在关键功能区的分布比例与DS（303/454, 66.7%）和GEFS+ & FS+/FS（30/61, 49.2%）比较均无统计学差异，但可见表型轻重程度与错义突变在关键功能区的比例呈明

41

显正相关（r=0.979, *P*=0.000），与非关键功能区的比例呈负相关（r=﹣0.979, *P*=0.000）（图7A）。PEFS+在关键功能区和非功能区错义突变的D值（分别为59.00/61 [31]和84.64/89 [27.5]）均介于DS和GEFS+ & FS+/FS之间，但只在关键功能区与DS（97.20/95 [43.5]）比较差异有统计学意义（*P*=0.019）；将PEFS+与DS不同类型进一步比较，其关键功能区D值与DS不同类型之间的差异仍具统计学意义（表4, 图7B、C）



**图7。PEFS+与GEFS+ & FS+/FS和DS错义突变(A)在钠通道蛋白的分布比较；（B）在关键功能区的D值比较；(C)非关键功能区的D值比较。**

注：N：突变位点数；Key-functional region，关键功能区（包括孔区和电压敏感区）；Non-functional region，非关键功能区（包括S1～S3片段，氮/碳末端和各结构域连接区）；PEFS+与各表型之间的两两比较使用卡方检验。以下表2同。

**表4. PEFS+与DS和GEFS+ & FS+/FS相关*SCN1A*错义突变氨基酸置换的D值比较**

42

| Phenotype | Nav1.1 region | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Key-functional region | |  | Non-functional region | |
| D valuea | P value | D valuea | P value |
| DS (N=504) | 97.2/95.0 [43.5] | 0.011\* |  | 87.4/89.0 [23.0] | 0.188 |
| DS-C (N=316) | 100.5/98.0 [49.5] | 0.006\* |  | 90.2/92.5 [27.5] | 0.131 |
| DS (U) (N=109) | 95.8/94.5 [47.0] | 0.024\* |  | 88.7/90.0 [24.5] | 0.192 |
| DS-B (N=79) | 97.5/94.0 [50.5] | 0.025\* |  | 85.3/87.0 [23.5] | 0.364 |
| PEFS+ (N=20) | 54.6/46.0[30.0] | ﹣ |  | 82.1/89.0[31.0] | ﹣ |
| GEFS+ & FS+/FS (N=61) | 47.1/43.0 [27.0] | 0.205 |  | 82.4/81.0 [43.5] | 0.313 |

注：a均值以Mean/median [semi-IQR]表示，即均数/中位数[半四位分数间距]。\* 与PEFS+相应区域D值比较，差异有统计学意义，*P*<0.05。

PEFS+与各表型之间均值的两两比较使用非参数的秩和检验；率的比较使用卡方检验；表型与突变类型的相关性采用Spearman相关分析。图7与此同。

③PEFS+与DS和GEFS+ & FS+/FS在突变遗传特征上的比较：

本研究*SCN1A*突变相关PEFS+患者中24例获得父母验证，其中64%为新生突变，遗传突变占36%. *SCN1A*突变数据库中，获得父母DNA验证的DS患者共855例，遗传性突变仅占8.8%（75/855），新生突变占绝对优势；GEFS+ &

FS+/FS患者55例，遗传突变占87.3%（48/55），仅极少数为新生突变。PEFS+

突变的遗传特征显示其新生突变和遗传性突变比例近似，其突变的遗传特征介于

DS与GEFS+之间，遗传突变与二者间的差异均有统计学意义（*P*<0.01）（图8A）。根据数据库提供的信息，DS进一步细分为DS-C、DS（U）和DS-B，将新生突变数据再次与PEFS+进行比较，仍然提示PEFS+与DS各个不同类型新生突变率之间有显著统计学差异（*P*<0.01）（图8B）。

43



**图8. A: PEFS+与DS及GEFS+ & FS+/FS在突变遗传特征上的比较；B: PEFS+与DS各类型新生突变率的比较**

综合①～③的分析结果，提示PEFS+相关*SCN1A*突变的分子特征无论突变类型、遗传特征等均处于介于DS和GEFS+ & FS+/FS的中间状态。

44

## 四、 ***SCN1A***突变相关**PEFS+**临床特征及与**DS**，**GEFS+ & FS+/FS**的比较分析

### **1.** ***SCN1A***突变相关**PEFS+**临床特征

*SCN1A*突变相关PEFS+临床特点一览见附表8，主要临床特征见表5。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Clinical feature** | **Age at onset in months**  (median±semi-IQR) | **Frequencya**  (times/year) | **Occurrence**  **number/ total (%)** |
| ***Family history*** |  |  | 11/26 (42.3) |
| ***Abnormal birth*** |  |  | 3/26 (11.5) |
| ***First seizures*** | 9±3.0 |  | 26/26 (100) |
| ≦1y |  |  | 19/26 (73.1) |
| ＞1y |  |  | 7/26 (26.9) |
| First FS | 9±5.7 |  | 26/26 (100) |
| First aFS | 24±21.0 |  | 26/26 (100) |
| ***Seizure types*** |  |  |  |
| HC seizure | 6±2.1 |  | 6/26 (23.1) |
| (s)GTCS | 9±6.0 |  | 26/26 (100) |
| CPS | 32±18.5 |  | 21/26 (80.8) |
| SPS | 48.5±40 |  | 4/26 (15.7) |
| SE | 14±6.4 |  | 8/26 (34.6) |
| Myoclonic seizure | ﹣ |  | ﹣ |
| AS/aAS | ﹣ |  | ﹣ |
| ***Seizure frequency before age of 6 years*** | | 8.5±3.0 |  |
| Febrile seizure |  | 5.5±2.5 |  |
| Afebrile GTCS |  | 4.5±2.0 |  |
| ***Seizure outcome*** |  |  |  |
| Seizure freedom |  |  | 6/26 (23.1) |
| Reduction |  |  | 20/26 (76.9) |
| Refractory |  |  | ﹣ |
| ***EEG abnormality*** |  |  | 26/26 (100) |
| Focal abnormality |  |  | 20/26 (76.9) |
| Multi-focal abnormality |  |  | 6/26 (23.1) |
| ***MRI abnormality*** |  |  | 10/26 (38.5) |
| Non-specific atrophic changes |  |  | 4/10 (40.0) |
| Temporal lobe /hippocampal |  |  | 5/10 (50.0) |
| Others |  |  | 1/10 (10.0) |
| ***Behaviour problems*** |  |  | 2/26 (7.7) |
| ***Mental retardation*** |  |  | 10/26 (38.5) |
| Mild |  |  | 5/10 (50.0) |
| Moderate |  |  | 5/10 (50.0) |
| Severe |  |  | ﹣ |
| Profound |  |  | ﹣ |
| ***Motor disorders*** |  |  | 2/26 (7.7) |

**表5** **. *SCN1A*突变阳性PEFS+患者临床特征统计（n=26）**

IQR, 四分位数间距(interquartile range)；a 以median±semi-IQR表示；n, 患者数; FS，热性惊厥

,

（febrile seizure）；aFS，无热惊厥（afebrile zeizure）；AS, 失神发作（absent seizure）；aAS, 不典型失神发作（atypical absent seizure）; SE, 癫痫持续状态（status epilepticus）；(s) GTCS, 全面或部分继发全面

45

强直阵挛发作（generalized and secondary generalized tonic-clonic seizure）；HC，半侧阵挛发作（hemi-clonic）；

CPS，复杂部分性发作（complex partial seizure）；SPS，单纯部分性发作（simple partial seizure）。以后各表同此表。

从表5的结果可见：PEFS+首次痫性发作的年龄与首次FS的年龄近似，约在9个月左右（中位数9±3.0和9±5.7月）。发作类型以全面性或部分继发全面性强直阵挛发作（sGTCS）和复杂部分性发作（CPS）最常见，且首次发作也以

GTCS最常见，但也可见半侧阵挛（HC）的发作形式（该发作类型在DS中较常见），所有患者在随访病程中均未见任何肌阵挛、失神等全面性发作，癫痫持续状态（SE）的发生率较低（34.6%）。脑电图以单一的局灶性异常为主（76.9%），少数可有多灶异常。头颅影像学可有非特异的异常（如与痫性发作无相关性的轻度皮质萎缩、皮质下轻度白质脱髓鞘改变等）。所有患者发作转归良好，23.1%获得发作停止>1年。约半数患者（53.8%）可有精神运动发育迟缓，但均为轻或中度障碍，少数可出现行为异常和运动障碍。

### **2.** ***SCN1A***突变阳性**PEFS+**、**DS**和**GEFS+ & FS+/FS**患者临床特征比较

本研究收集的SCN1A突变阳性GEFS+ & FS+/FS和Dravet综合征患者的临床特征一览分别见于附表9和附表10。

由于Dravet综合征的边缘型在临床特征上与PEFS+有相似之处，如缺乏肌阵挛和失神等全面性发作或EEG缺乏全面性放电等，因此临床上不易区分，为此，本研究在临床特征的比较分析上将细分经典DS和边缘型DS，分别与PEFS+进行比较以深入了解其临床差异。

**(1)临床一般情况特征及比较（表6-1）**

总体而言**，**与DS（无论DS-C或DS-B）及GEFS+ & FS+/FS相比，PEFS+在患者性别比、出生异常、家族癫痫或热性惊厥史、热相关的发作诱发因素，以及头颅MRI非特异性异常等方面的差异均无统计学意义，但在家族癫痫或热性惊厥史、热水澡或疫苗接种诱发发作和头颅MRI非特异性异常上呈现出中间趋势，在MRI非特异性异常上，与GEFS+等轻表型差异有统计学意义（P=0.034）。

**表6-1. PEFS+、DS和GEFS+ & FS+/FS临床一般情况比较**

| General information | GEFS+ & FS+/FS  (n=18) | PEFS+  (n=26) | DS-B  (n=24) | DS-C  (n=17) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Sex (male:female) | 1.6:1 | 0.86:1 | 1.7:1 | 2.4:1 |

46

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | |
| Age in years (median±semipIQR) | | | | |
| **Age at end of follow-up** |  |  |  |  |
| **Duration of follow-up** |  |  |  |  |
| Occurrence number/ total (%) | | | | |
| **Family history** | 11/18 (61.1) | 11/26 (42.3) | 6/24 (25.0) | 5/17 (29.4) |
| **Birth abnormality** | ﹣ | 3/26 (11.5) | 3/24 (8.3) | 2/17 (11.8) |
| **Seizure precipitated by:** |  |  |  |  |
| Fever/illness | 18/18 (100) | 26/26 (100) | 24/24 (100) | 17/17 (100) |
| Vaccination | 0/18 (0.0) | 1/26 (3.8) | 4/24 (16.7) | 2/17 (11.8) |
| Bath | 0/18 (0.0) | 2/26 (7.7) | 7/24 (29.2) | 3/17 (17.6) |
| **MRI abnormality** | 1/18 (5.6)\* | 10/26 (38.5) | 5/24 (20.8) | 2/17 (11.8) |

注：IQR，四分位数间距（interquartile range）；\* P<0.05. 之后各表与此表同

**(2)临床发作及脑电图特征比较（表6-2）**

①PEFS+的首次FS年龄和首次发作年龄相似，为9±5.7月和9±3.0月，与

GEFS+ & FS+/FS（16.0±5.5，P=0.018）以及DS-B（5±1.2，P=0.000）和DS-C

（5±1.2, P=0.001）相比，差异均具有统计学意义，且介于轻表型GEFS+等和

DS之间；在无热FS首发年龄上，PEFS+为24±21.0月，较之DS-C差异有显著意义（6.75±3.4, P=0.006），虽与GEFS+ & FS+/FS和DS-B间无差异，但仍PEFS+介于GEFS+等轻表型和DS-B之间。总体而言，PEFS+以FS发生在前，随后aFS发生，无论FS或aFS，其起病年龄均介于GEFS+等轻表型和严重表型DS之间。

②据定义，PEFS+无除GTCS外的肌阵挛、失神等全面性发作。在PEFS+常见的几种发作类型中，GTCS在GEFS+等轻表型及DS-C、DS-B中的出现率最高且无差异，但PEFS+的起病年龄（9±6月）与三者均有差异（P分别为0.028，

0.000和0.000），介于轻重表型之间；其次为CPS, DS-B和DS-C也较高，同样的，PEFS+的起病年龄（32±18.5 月）明显晚于后二者，差异有统计学意义

（P=0.013, 0.022）；在SPS上，PEFS+在发生频率（15.4%）上较DS-C（11.8%）和DS-B（8.3%）为高，与DS-B差异有统计学意义（P=0.039）；在SE, PEFS+的发生率（30.8%）较GEFS+等轻表型（0%, P=0.001）显著增高，不论发生率还是首发年龄（14±6.4月）均低于DS-B和DS-C，且与DS-C的差异有统计学意义（P=0.01和0.043）；而在HC，PEFS+的发生率（23.1%）均较DS-B（41.7%）和DS-C（41.2%）低，但首发年龄近似，差异均无统计学意义。

③在发作频率上，本研究以6岁之前的FS，以及aFS中对机体影响最大的

GTCS作为评估：无论FS或无热GTCS的发作频率，PEFS+(5.5±2.5月和4.5±2.0

47

月）均介于GEFS+等轻表型和DS-B, DS-C之间，与GEFS+等轻表型之间差异无统计学意义，而与DS-B(P=0.046和0.029)，DS-C（P=0.044和0.016）的差异有统计学意义。

④对于脑电图发作间期异常，PEFS+在1岁之前出现异常发作间期EEG的频率较低（15%），介于GEFS+等轻表型（0%）和DS-B(41.7%)、DS-C（41.2%）之间，与DS-B差异有统计学意义（P=0.039）；根定义，GEFS+ & FS+/FS仅有全面性痫性放电，PEFS+仅有部分性痫性放电，而DS-B可以仅有部分性放电，

PEFS+与DS-B的单纯局灶放电率（50%）比较，差异有显著统计学意义（P=0.000）。总而言之，PEFS+的临床发作特征介于GEFS+等轻表型和严重表型DS之间：

FS和GTCS首发年龄与GEFS+等轻表型和严重表型DS差异显著；在aFS和CPS首发年龄，以及SE发生率、6岁之前FS和无热GTCS的发作频率等，与DS二表型之间的差异明显；除上述外，在SPS发生率和发作间期局灶性EEG异常率上，与DS-B也有明显差异。

48

广州医科大学博士学位论文

**表6-2. PEFS+、DS和GEFS+ & FS+/FS临床发作及脑电图特征比较**

| Seizure feature | Occurrence number/ total (%) | | |  | Age at onset in months (median±semi-IQR) | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | GEFS+ & FS+/FS  (n=18) | PEFS+  (n=26) | DS-B  (n=24) | DS-C  (n=17) | GEFS+ & FS+/FS  (n=18) | PEFS+  (n=26) | DS-B  (n=24) | DS-C  (n=17) |
| First seizure |  |  |  |  | 16.0±5.5 \* | 9.0±3.0 | 5.0±1.2\*\* | 5.0±1.4\*\* |
| First FS | 18/18 (100) | 26/26 (100) | 24/24 (100) | 17/17 (100) | 16.0±5.5 \* | 9.0±5.7 | 5.0±1.2\*\* | 5.0±1.4\*\* |
| First aFS | 10/18 (55.6)\*\* | 26/26 (100) | 24/24 (100) | 17/17 (100) | 30.0±28.5 | 24.0±21.0 | 12.5±8.4 | 6.75±3.4\*\* |
| Seizure type |  |  |  |  |  |  |  |  |
| GTCS | 18/18 (100) | 26/26 (100) | 23/24 (95.8) | 17/17 (100) | 16.0±5.5\* | 9.0±6.0 | 6.0±1.5\*\* | 5.25±0.8\*\* |
| HC | ﹣ | 6/26 (23.1) | 10/24 (41.7) | 7/17 (41.2) | ﹣ | 6.0±2.1 | 6.0±5 | 6.0±0.5 |
| CPS | ﹣ | 21/26 (80.8) | 15/24 (62.5) | 10/17 (58.8) | ﹣ | 32.0±18.5 | 14.0±10.0\* | 12.5±9.3\* |
| SPS | ﹣ | 4/26 (15.7) | 2/24 (8.3)\* | 2/17 (11.8) | ﹣ | 48.5±40.0 | ﹣ | ﹣ |
| SE | 0/18 (0.0)\*\* | 8/26 (30.8) | 13/24 (54.2) | 14/17 (82.4)\* | ﹣ | 14±6.4 | 9.5±5.0 | 7.5±3.2\* |
| Seizure frequency before 6 years of age [times/year(median±semi-IQR)] | | | | | | | | |
| Febrile seizure |  |  |  |  | 3.0±1.5 | 5.5±2.5 | 9.0±5.5\* | 10.0±7.3\* |
| Afebrile GTCS |  |  |  |  | 1.5±0.75 | 4.5±2.0 | 8.5±6.5\* | 9.5±5.5\* |
| Abnormal interictal EEG | 15/18 (83.3) | 26/26 (100) | 24/24 (100) | 17/17 (100) | ﹣ | ﹣ | ﹣ | ﹣ |
| Present to≦1year old | 0/18 (0.0) | 4/26 (15.4) | 10/24 (41.7)\* | 7/17 (41.2) | ﹣ | ﹣ | ﹣ | ﹣ |
| GED | 8/15 (53.3) | ﹣ | 1/24 (4.2) | 0/24 (0.0) | ﹣ | ﹣ | ﹣ | ﹣ |
| FED | 7/15 (46.7)\*\* | 26/26 (100) | 13/24 (54.7)\*\* | ﹣ | ﹣ | ﹣ | ﹣ | ﹣ |
| G & FED | ﹣ | ﹣ | 10/24 (41.7) | 17/17 (100) | ﹣ | ﹣ | ﹣ | ﹣ |

注：FS，热性惊厥（febrile seizure）；aFS，无热惊厥（afebrile zeizure）; GTCS，全面强直阵挛发作（generalized tonic-clonic seizure）；HC，半侧阵挛发作（hemi-clonic）；

CPS，复杂部分性发作（complex partial seizure）；SPS，单纯部分性发作（simple partial seizure）；GED，全面性痫性发放（generalized epileptic discharge）；FED，局灶性痫性发放（focal epileptic discharge）；G & FED，全面性及局灶性痫性发放（generalized & focal epileptic discharge）；IQR, interquartile range。

\* P<0.05; \*\* P<0.01：率的比较使用卡方检验，首发年龄和发作频率的比较使用Mann-Whitney U秩和检验。之后各表同此表。

1

**(3)临床预后的比较（表6-3）**

①在治疗后的发作转归上，PEFS+与DS-C和DS-B相比，有较高的无发作率（vs. DS-B: P=0.038）和发作降低率（vs. DS-B: P=0.024; vs. DS-C: P=0.045）；相比DS-B和DS-C较高的发作难治率，PEFS+无发作难治性患者出现，差异有统计学意义（vs. DS-B或DS-C: P=0.000）。

②在智能障碍发生率方面，PEFS+（35.8%）介于其他表型之间（GEFS+等轻表型无智能障碍患者出现）的差异有显著统计学意义（vs. GEFS+ & FS+/FS: P=0.009; vs. DS-B或DS-C: P=0.000），且较之DS-B和DS-C，无严重和极重智障患者出现；相同的情况也出现在行为异常、孤独症和运动障碍的发生率上，

PEFS+的发生率明显较DS-B和DS-C为低，在行为异常和运动障碍的发生率较上，与DS-B和DS-C的差异有统计学意义（P=0.037～0.000）。

**表6-3. PEFS+、DS和GEFS+ & FS+/FS临床预后比较**

|  |  | Occurrence number/ total (%) | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Prognosis | GEFS+ & FS+/FS  (n=18) | PEFS+  (n=26) | DS-B  (n=24) | DS-C  (n=17) |
| Seizure outcome |  |  |  |  |
| Seizure freedom | 9/18 (50.0) | 6/26 (23.1) | 0/24 (0.0)\* | 0/17 (0.0) |
| Reduction | 9/18(50.0) | 20/26 (76.9) | 11/24 (45.8)\* | 8/17 (47.1)\* |
| Refractory | 0/18 (0.0) | 0/26 (0.0) | 13/24 (54.2)\*\* | 9/17 (52.9)\*\* |
| Mental retardation | 0/18 (0.0)\*\* | 10/26 (38.5) | 24/24 (100)\*\* | 17/17 (100)\*\* |
| Mild | ﹣ | 5/10 (50.0) | 7/24 (29.2) | 2/17 (11.8)\* |
| Moderate | ﹣ | 5/10 (50.0) | 10/24 (41.7) | 8/17 (47.1) |
| Severe | ﹣ | 0/10 (0.0) | 6/24 (25.0)\* | 3/17 (17.6) |
| Profound | ﹣ | 0/10 (0.0) | 1/24 (4.2) | 4/17 (23.5)\* |
| Behaviour problems | 0/18 (0.0) | 2/26 (7.7) | 5/24 (20.8)\* | 3/17 (17.6)\* |
| Autistic features | 0/18 (0.0) | 0/26 (0.0) | 3/24 (12.5) | 4/17 (23.5) |
| Motor disorders | ﹣ | 2/26 (7.7) | 13/24 (54.2)\*\* | 9/17 (52.9)\*\* |

综合表6三个子表的结果可见：PEFS+的临床特征无论在起病年龄、发作类型、脑电图改变，还是发作转归和疾病预后方面，均介于GEFS+等轻表型和严重表型DS之间。

## 五、 ***SCN1A***突变阳性**PEFS+**患者**AEDs**疗效及与***SCN1A***突变的关系，与**DS**

**和GEFS+ & FS+/FS比较分析**

### **1.** ***SCN1A***突变阳性**PEFS+**患者抗癫药物治疗疗效及药物加重与***SCN1A***突变的关系：

1

患者对丙戊酸（VPA）、托吡酯（TPM）和氯硝安定（CNZ）绝大多数发作得到改善（分别为21/26,80.8%, 16/18,88.9%和12/12,100%），无一例药物加重

（图8A）。患者对左乙拉西坦（LEV）和苯巴比妥（PB）的药物疗效不确定，发作改善（分别为4/7, 57.1%和5/9, 55.6%）和无效率（分别为3/7，42.9%和

4/9，44.4%）接近，但未发现加重发作。服用15位患者（57.7%）（共20例次）在病程中曾服用具有钠通道阻滞（sodium channel blocking, SCB）作用的AEDs，包括卡马西平（CBZ），奥卡西平（OXC）、拉莫三嗪（LTG）和苯妥英钠（PHT），其中10人14例次（70%）患者服用钠通道阻滞型AEDs后出现发作加重；6 人

6例次（30%）无效；无一例有效。（附表8和附表11，图9A）。

在曾服用SCB类AEDs的15例患者中，4例为截短和剪切位点突变，其中

3例服SCB后加重（75%）；9例为关键功能区的错义突变，其中4例加重（44.4%）；

2例为非关键功能区错义突变，1例加重（50%）（图9B）。故总体而言，15例患者有13例（86.7%）携带致病性较强的*SCN1A*突变，均出现SCB类AEDs疗效不佳，其中53.8%（7/13）发作加重。

2



**图9。(A) *SCN1A*突变阳性PEFS+患者对不同AEDs的药物疗效；（B）钠通道阻滞型AEDs疗效不佳的*SCN1A*阳性突变PEFS+患者*SCN1A*突变类型与钠通道阻滞型AEDs加重的关系。**

注：n，患者例数；KFR，关键功能区；NKFR，非关键功能区。

### **2.** ***SCN1A***突变阳性**PEFS+**与**DS**和**GEFS+ & FS+/FS**患者**AEDs**反应的比较

**（表7）**

在所有患者中使用人数≥3人的AEDs被纳入统计分析。相比GEFS+等轻表型较少的抗癫痫药物使用品种和良好的药物疗效，*SCN1A*突变阳性PEFS+患者的抗癫痫药物反应与DS-B和DS-C相似，表现为VPA、TPM和CNZ等药物疗

3

效良好，无加重发作情况；而PB和LEV则治疗效果不确切，但也无明显加重发作的情况；对于钠通道阻滞型抗癫痫药物的反应差，所有患者均无发作的改善，反而具有较高的发作加重率，尤其以LTG明显，PEFS+与DS-B和DS-C在这些药物的加重率上的比例相似，差异无统计学意义。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Medications response** | **Number/total (%)** | | | |
| **GEFS+ & FS+/FS**  (n=18) | **PEFS+**  (n=26) | **DS-B**  (n=24) | **DS-C**  (n=17) |
| **Medications identified to have improved seizures** | | | | |

**表7** ***SCN1A*突变阳性PEFS+与DS和GEFS+ & FS+/FS患者AEDs反应的比较**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  |  |  |
| Valproate | 15/15 (100) | 21/26 (80.8) | 20/24 (83.3) | 17/17 (100) |
| Topiramete | 1/1(100) | 16/18 (88.9) | 18/20 (90.0) | 13/14 (92.9) |
| Clonazepam/Nitrazepam | 1/1 (100) | 12/12 (100) | 14/14 (100) | 11/13 (84.6) |
| Phenobarbital | 1/1 (100) | 5/9 (55.6) | 4/7 (57.1) | 2/6 (33.3) |
| Levetiracetam | 1/4 (25.0) | 4/7 (57.1) | 3/9 (33.3) | 2/7 (28.6) |
| Medications identified to have aggravated seizures | | | | |
| Lamotrigine ﹣ 6/7 (85.7) | | | 5/7 (71.4) | 7/7 (100) |
| Carbamazepine ﹣ 2/5 (40.0) | | | 2/6 (33.3) | 6/6 (100) |
| Oxcarbazepine ﹣ 4/6 (66.7) | | | 0/1 (0.0) | 6/6 (100) |
| Phenytoin ﹣ 2/2 (100) | | | 1/2 (50.0) ﹣ | |

4

**讨 论**

本研究是迄今为止最大的一个针对*SCN1A*突变阳性PEFS+患者群体的分析研究。对于*SCN1A*基因突变，目前的研究绝大部分集中于表型较轻的家族性的

GEFS+，或表型严重的散发病例为主的Dravet综合征。虽然全球已有零星的对于*SCN1A*突变的PEFS+病例报道，但对于PEFS+的表型特点及其*SCN1A*突变特征尚无较为全面和深入的研究。

既往的研究发现，热性惊厥作为人类在儿童期最常见的惊厥事件，80%以上为全面强直阵挛发作，具有局灶特征的发作仍占其所有发作的4～16% (Annegers JF, et al., 1987; Berg AT, et al., 1996)。另一方面，平均5～6%的部分性癫痫患者有热性惊厥史(Hamati-Haddad A, et al., 1998; Baulac S, et al., 2004)。但这一比例随癫痫和癫痫综合征的不同而有较大差异。隐源性或症状性癫痫患者具有较高的热性惊厥史，如颞叶癫痫（25%），而难治性颞叶内侧癫痫更高达50～80%(Baulac S, et al., 2004)。由此推测，热性惊厥可能与部分性癫痫关系密切，尤其顽固性部分性癫痫，然而其潜在的致病因素或遗传因素尚未明晰。

编码Nav1.1通道蛋白的*SCN1A*基因是目前与癫痫关系最密切的基因。至今已发现超过1200个与癫痫相关的*SCN1A*突变，而其中的绝大部分（90%）出现在热性惊厥相关癫痫([http: //www. gzneurosci. com/*SCN1A*database](http://www.gzneurosci.com/SCN1Adatabase))。热性惊厥相关癫痫是一个涵盖由轻至重多种癫痫和癫痫综合征的疾病谱。该疾病谱中占据比例最大并且最具代表性的表型即是Dravet综合征和GEFS+(Scheffer IE, et al., 1997; Escayg A, et al., 2000; Harkin LA, et al., 2007)。前者占热性惊厥相关癫痫的80%以上，为一种严重的癫痫脑病，临床呈现部分性及全面性的多种发作类型，预后不良；临床绝大多数为散发病例，70～80%的患者可检测到*SCN1A*突变。GEFS+为一种常染色体显性遗传并显著的遗传异质性的儿童良性遗传癫痫综合征，以全面性发作为突出发作类型，AEDs反应良好，约10%患者存在*SCN1A*突变。部分性发作在DS中较为常见，约75%患者存在部分性发作(Dravet C et al., 2005)，尤其在一些边缘性的DS患者中；而GEFS+发作虽以全面性占优势，但仍有10%的发作为部分性发作(Baulac et al., 2004)。值得注意的是，约3.5%的*SCN1A*突变被报道与单纯的部分性癫痫和热性惊厥相关的部分性癫痫有关（Harkin LA, et al., 2007；

5

Okumura A, et al., 2007; Colosimo E, et al.,2007)，由此提示FS+相关部分性癫痫也可能与*SCN1A*突变关系密切。

我们此前曾报道过以热性惊厥附加征和部分性发作为特征的病例，在这些患者中检测到了*SCN1A*错义突变和截短突变，而这些患者的临床发作表现相对温和、发作转归和发育的预后上相对良好，总体表现出较为温和的临床特征。后继的功能研究揭示，这些患者所携带的错义突变均在孔区，在神经电生理上可导致与Dravet综合征相类似的钠通道功能丧失。但仅凭此，无法解释*SCN1A*导致的

PEFS+温和表型。此外，这些患者临床上具有钠通道阻滞作用的抗癫痫药物加重发作的特点(Yu MJ, et al., 2010; Liao WP, et al., 2010)，而这类抗癫痫药通常是控制部分性癫痫或发作的临床有效药物，根据上述功能学研究的结果，我们推测

*SCN1A*突变所致的钠通道功能障碍是钠通道阻滞型AEDs加重发作的可能潜在分子机制(Liao WP, et al., 2010)；同时，对于具有*SCN1A*突变的热性惊厥相关部分性癫痫患者，不恰当的AEDs治疗可能是临床上顽固性癫痫的一个重要来源。因此，有必要PEFS+的患者进行更全面和深入的*SCN1A*突变分子特征和临床研究。

## 一、 **PEFS+**相关***SCN1A***基因突变分子特征

本研究在26例PEFS+患者中发现了27个*SCN1A*突变，全部为点突变。这些突变以新生突变为主（64%），少数遗传突变（36%）。27个突变位点中近3/4（73.1%）为错义突变，少数为截短和剪切位点突变（各占11.5%）这类致病性相对较强的突变类型。

在错义突变中，过半数（55%, 11/27）位于钠通道孔区和电压敏感区这些关键功能区的突变，且除1个外其余均位于孔区（图1）。有趣的是，比较这些错义突变导致的氨基酸置换的化学性质差异度（以D值衡量），我们发现位于关键功能区的突变位点相对于非关键功能区的突变位点，其氨基酸置换的D值相对较低

（54.64/46[30] vs. 82.11/89[31]），差异具统计学意义。由此推测，PEFS+相关错义突变在总体上引起的氨基酸置换性质差异相对较小，是PEFS+表型相对较为温和的可能解释之一。

截短突变和剪切位点突变由于可造成编码蛋白的截短，因此既往对此类型突变的报道绝大部分集中在严重表型。然而，本研究发现它们在PEFS+这类相对较轻的表型中也并非少见，且这些患者经过恰当的治疗后获得了较为良好的预后，提示截短突变和剪切位点突变这类理论上具有高致病性的*SCN1A*突变类型并非

6

DS等严重表型所特异。但这些PEFS+相关的截短和剪切位点突变导致较轻的表型的潜在分子机制尚待进一步研究。

我们注意到，所有3个截短突变均位于远离最后一个外显子终止密码子很远的*SCN1A*基因上游（图2）。虽然截短突变的致病机制被认为与由于突变造成提前出现的终止密码子而导致截短蛋白的产生，由此引起该拷贝的钠通道功能丧失，从而引发所谓*SCN1A*单一拷贝所产生的钠通道数量不足而不能维持其在中枢神经系统的正常功能的现象，即“单倍体剂量不足”理论。但是，近期的研究发现，一些基因，如*SCN1A*基因，远离其最后一个外显子及其上游55bp处或天然的基因终止密码子的其他位置突变所产生的截短蛋白，会被无义密码子介导的mRNA降解机制（nonsense-mediated mRNA decay, NMD）（即NMD机制）所降解(Cartegni, L et al., 2002)，这些截短蛋白将被清除而不发挥作用，从而体内不会产生功能异常的蛋白，因此虽然单一拷贝钠通道剂量不足，但不会存在因异常蛋白的产生而干扰剩余正常钠通道生理功能（即显性负效应），从而可能出现相对较轻的表型(Holbrook JA, et al., 2004; Bühler M, et al., 2006; Brogna S, et al., 2009)。这一理论似乎可以解释我们这3例截短突变患者具有相对较轻表型的原因。此外，迄今仅有6个截短突变位点在轻表型的GEFS+中被报道，而这6个突变均位于*SCN1A*序列距离终止密码子较远的上游，本研究的发现与其相似，也间接提示PEFS+相关截短突变可能具有较弱的致病性。

此外，我们在PEFS+所发现的剪切位点突变均位于可变剪切位点或位于深部的内含子区，因此理论上对外显子异常剪切的作用相对较弱。我们运用生物信息学软件对这3个突变位点进行的预测分析提示，突变体内可能有异常剪切和正常剪切转录本共存的现象（图3），因此理论上其致病性相对较弱，对应较轻的临床表型。这一分析与我们的临床所见相符。但这一推测尚无相关研究证实，尚需进一步的体外功能研究分析确认。

## 二、 **PEFS+**相关***SCN1A***突变分子特征与**DS**和**GEFS+ & FS+/FS**的分析比较为了了解PEFS+相关的*SCN1A*突变在突变分子特征上是否具有独特性，及与

PEFS+温和表型产生的关系和可能的解释，我们将在PEFS+患者中发现的*SCN1A*

突变与DS和GEFS+ & FS+/FS相关的*SCN1A*突变在分子特征上进行了比较。

### **1.** 与**DS**和**GEFS+ & FS+/FS**的***SCN1A***突变筛查结果比较

本研究在DS中发现的*SCN1A*突变35个中，除绝大部分为点突变外，尚有

7

少数致病性较强的拷贝数变异和转录调控区变异。而点突变中又以截短突变比例最高（48.8%），错义突变次之（26.8%）；在遗传模式上，以新生突变占绝对优势（79.5%），少数的遗传突变中，嵌合突变占据半数（表2）。GEFS+等轻表型也均为点突变；半数以上为错义突变（61.1%），且遗传突变占绝对优势

（87.5%）（表2）。

相比之下，PEFS+在突变特征上与二者有明显的不同，表现在：（1）所有突变均为点突变，无致病性更强的拷贝数变异等；（2）错义突变为主，以位于关键功能区的突变稍多，虽然与DS和GEFS+ & FS+/FS差异无统计学意义，但其分布率明显介于二者之间（图6，表3-1）；（3）错义突变的氨基酸置换差异度（D值）非关键功能区高于关键功能区，这与GEFS+相似，但与DS相反（表3-2）；（4）新生突变为主，但遗传突变也占据一定比例，其比例均介于DS和GEFS+ & FS+/FS之间（图8）。由于孔区的错义突变，以及新生突变往往与较强的致病性有关，因此以上结果与我们不久前报道的对于*SCN1A*突变数据库的分析结果有类似之处（Meng, et al.,2015），提示PEFS+相关*SCN1A*突变的分子特征介于严重表型和轻表型的相关突变之间，其致病性相对较弱，是造成PEFS+相对温和临床表型的可能潜在原因。

### **2.** 在***SCN1A***突变数据库数据的比较分析

为验证PEFS+相关*SCN1A*突变分子特征的独特性，本研究进一步将PEFS+相关*SCN1A*突变与*SCN1A*突变数据库上报道的DS和GEFS+ & FS+/FS的数据进行比较。在大样本的背景下，PEFS+与DS和GEFS+在*SCN1A*突变特征上的差异凸显。

首先，在突变类型上，DS以截短和剪切位点突变为主要突变类型（占所有突变的49.8%），截短突变更是占至39.6%，而GEFS+中以错义突变占绝对优势

（88.2%），相比之下，PEFS+无论截短突变或错义突变，其发生率均介于DS与

GEFS+之间（分别为8.2%和81.6%）。尤其PEFS+截短突变和错义突变的发生率与DS比较均具有显著统计学差异（图5）。这一突变类型上的差异，是PEFS+介于轻重之间较为温和表型产生的原因之一。

其次，比较这3个表型都共有的主要突变类型——错义突变可发现，DS大部分的错义突变位于关键功能区（67.8%），GEFS+则主要位于非关键功能区

（56.4%），而PEFS+介于介于DS和GEFS+之间，但仍以关键功能区占优势

（61.1%）（图6A）。同时，将这3个表型的所有错义突变依据表型和突变位置

8

进行D值比较后发现，PEFS+在关键功能区的D值较DS为低，差异有统计学意义，而较GEFS+为高（图6B）；在非关键功能区的D值3者皆近似，PEFS+略微居中

（图6B）。这一分析结果与既往Zuberi（2010）的报道略有不同，其研究结果认为DS和GEFS+错义突变D值于各个区域均无差异。值得注意的是，该研究使用的是2010年前未被更新的*SCN1A*突变数据库数据，当时全球报道的*SCN1A*突变不足

700个，而本研究使用的数据已更新至2014年12月，数据量跃升至1200多个位点，因此本研究具有更大的数据量和可信度。简言之，PEFS+相关的错义突变的分子特征表现为：比例大、虽关键功能区占优但氨基酸置换差异较小。这一特点均于

DS和GEFS+等表型有明显的不同，提示其相对DS而言较弱的错义突变致病性。最后，在*SCN1A*突变的遗传特征上，与数据库比较的结果显示：DS绝大部

分为新生突变，PEFS+以新生突变为主，约1/4为遗传突变，而GEFS+以遗传突变占优势；且表型的严重程度总体上与新生突变率呈正相关，与遗传突变率呈负相关（图7）。这一结果与既往对DS和GEFS+的研究是相符的(Marini C, et al., 2011)。同时，这一发现符合遗传学的规律，即致病性越强的突变，能够遗传至下一代的几率越低，反之，遗传至下一代的几率越高。因此，从突变遗传特征的角度，亦可解释PEFS+较为温和的临床表型。

以上结果与既往对GEFS+和DS研究的报道相符，更为重要的是，肯定了前述在本研究范围内进行的比较分析所现，也与我们已报道的对于*SCN1A*突变数据库的分析结果一致（Meng, et al.,2015）。

此外，对于边缘型的DS，其临床特征与PEFS+有一些相似性。既往有研究认为边缘型DS的核心实质与经典DS是相同的（Guerrini R, et al., 2011）。本研究也发现，边缘型DS在*SCN1A*突变发生率、突变特征、遗传特征上与经典DS相似，而与PEFS+之间存在明显差异。综上所述，在*SCN1A*突变的分子特征上，无论是突变类型、突变致病性，还是遗传模式等特征上，PEFS+均为介于DS和GEFS+之间的中间类型，总体体现出其突变相对较弱的致病性。从病因及分子致病性的角度再次验证，PEFS+可能是EFS+的一种独立的中间表型。

此外，本研究26例*SCN1A*突变阳性PEFS+患者是从268例PEFS+患者群中筛查获得，其*SCN1A*突变阳性率仅为9.7%，与GEFS+的*SCN1A*突变阳性率接近，但远低于DS患者70～80%的比例。除了未能排除的部分性癫痫的隐源性病因外，我们推测，与GEFS+相似的，PEFS+的遗传背景中，可能存在其他未知的致病基因。

9

这一推测有待进一步的研究证实。

## 三、 部分性癫痫伴热性惊厥附加症的临床特征分析

总体而言，本组*SCN1A*突变阳性PEFS+患者中散发病例占大部分（65.4%，

17/26），仅少数几例家族患者（34.6%, 9/26），所有患者临床上均具有热性惊厥附加征及部分性发作的特征，虽然部分患者起病后可有轻度的认知障碍和行为异常，但总体对抗癫痫药物反应较好，发作预后相对良好（76.9%发作缓解，23.1%无发作≥1年）（表5）。值得注意的是，患者对钠通道阻滞型AEDs反应不良，甚至发作加重（图9A）。

相比本研究*SCN1A*筛查阳性的DS和GEFS+ & FS+/FS，PEFS+表现出与它们不同的鲜明临床特征（表6-1,6-2,6-3）。与GEFS+等轻表型相比，PEFS+患者（1）以散发而非家族性病例占优势；（2）显著的部分性发作而缺乏经典的全面性发作类型，如失神、肌阵挛、失张力发作等，同时脑电图仅表现为局灶异常；（3）可存在轻或中度的精神智能发育倒退；（4）最重要的是，发作能够被具钠通道阻滞（SCB）作用的AEDs所加重。比较DS，PEFS+较其临床表型温和，并具有以下的不同之处：（1）起病年龄相对较晚，病情演变相对较慢（首次热性惊厥平均在半岁之后，平均2岁之后才出现首次无热发作）；（2）病程早期发作频率较低（均值8.5±3.0）；（4）除部分性发作和GTCS外，缺乏其他多种全面性的发作类型，如DS常见的失神和肌阵挛发作等；（3）恰当的治疗可获得相对良好的预后；（4）无严重的精神智能、运动和行为等发育障碍；（5）脑电图无全面性痫性发放，头颅影像学亦无弥漫性的全脑异常。但与DS相似的是，PEFS+患者临床上同样存在钠通道阻滞型AEDs诱发加重发作现象。

此外，由于边缘型DS在临床上可以表现为缺乏肌阵挛和/或失神，或脑电图缺乏全面性放电，故与PEFS+有相似之处，极易与PEFS+混淆。如前所述，目前的文献报道，边缘型DS的核心与实质经典DS是相同的，且至今未见仅有部分性发作和EEG始终仅有局灶发放的报道。为了更为细致的区分PEFS+和DS-B的差异，并获得PEFS+不同于DS-B的独特临床特征的更为客观、确凿的证据，本研究对二者在各个主要的临床特征上也同时进行了比较，结果发现：DS-B在FS和aFS的首发年龄、发作类型和发作频率、发作控制率及远期预后方面都与DS-C相似，而同样与PEFS+存在明显差异（表6-2, 6-3）。此外，即使是CPS这类以局灶症状为特征的发作类型，以及EEG单纯局灶性发放，在其起病年龄或发生率上，

10

PEFS+与DS-B之间也仍然存在统计学差异（表6-2）。

由此可见，PEFS+的临床特征，无论是与GEFS+等轻表型，还是与典型或边缘型DS，均显示出其独特性，为介于轻重表型之间的独特中间类型，其潜在的

SCN1A突变分子特征和致病性差异是造成这一表型的可能重要机制。

## 四、 部分性癫痫伴热性惊厥附加症药物治疗疗效及与基因型**-**药物反应关系在临床治疗方面，本研究中所有的PEFS+患者均对丙戊酸（VPA）、托吡酯

（TPM）、氯硝安定（CNZ）等抗癫痫药治疗反应良好（图8A），这一现象与

DS的治疗反应相似(Kröll-Seger J, et al., 2006; Sankar R, et al., 2005)。这一结果考虑与VPA和TPM的多重、广谱作用机制，以及CNZ不通过钠通道，而经激活的氯离子通道开放，增强γ-氨基丁酸能神经元介导的突触抑制起作用等因素有关。此外，有证据显示苯巴比妥在复杂热性惊厥中有效（Offringa M, et al.,2012），作用机制上也同为多重作用的广谱AEDs，但苯巴比妥在本研究的疗效并不肯定。左乙拉西坦的抗癫痫机制与一般作用于离子通道或兴奋—抑制性神经递质系统的AEDs不同。目前认为，左乙拉西坦通过与囊泡蛋白2A结合，调节突触囊泡的分泌和突触前神经递质的释放而发挥抗痫作用。荟萃分析提示该药对药物难治的部分性发作/部分性癫痫的添加治疗能明显降低发作频率；在忽略剂量的条件下，左乙拉西坦分别对约25%的儿童和20%的成人有很好的疗效（Mbizvo GK, et

al.,2012）；但也有研究显示43%的儿童应用左乙拉西坦后出现痫性发作加重

（Nakken KO, et al.,2003）。本研究结果也表现出左乙拉西坦在*SCN1A*阳性突变

PEFS+中药物反应的不确定性，即总体发作改善与无变化的疗效近似（均为50%左右）。目前PEFS+患者左乙拉西坦治疗效果不佳的原因未明。总体而言，PEFS+患者对AEDs治疗的反应与DS相似。

钠通道阻滞型AEDs，如CBZ、OXC、LTG、PHT等，通常被认为是部分性发作或部分性癫痫的一线或主要治疗用药。临床上，虽然部分性发作在PEFS+中是占绝对优势的发作类型，然而，本研究发现，在*SCN1A*突变阳性的PEFS+患者中，曾经使用过钠通道阻滞型AEDs（如LTG、CBZ、OXC和PHT）的患者均出现治疗反应不佳的情况，甚至发作加重（图8A），这一现象也和DS相似(Korff C, et al., 2007; Guerrini R, et al., 1998)。更值得注意的是，在本研究中，与钠通道阻滞型AEDs诱导的发作加重相关的*SCN1A*突变绝大多数为致病性较强的突变类型，如截短和剪切位点突变，或位于Nav1.1关键功能区的错义突变（图8B）。

11

既往研究已发现，截短或剪切位点突变可导致钠通道功能丧失，而体外功能研究也发现，位于Nav1.1孔区的*SCN1A*错义突变在神经电生理上可引起钠通道电流不同程度的降低甚至消失，从而同样导致Nav1.1钠通道功能丧失，这些可能是钠通道阻滞型AEDs加重痫性发作的潜在机制(Liao WP, et al., 2010)。最近的研究显示，Nav1.1主要分布于中枢神经系统的抑制性中间神经元，而抑制性中间神经元在神经系统的分布具有位置的特异性，如丘脑等深部核团的分布较为集中，而在皮质的分布则相对分散(Spruston and Mcbain 2007; Meyer FF, et al., 2011)。因此，Nav1.1通道的功能丧失主要造成中间抑制性神经元的功能丧失，从而抑制性下降(Yu FH,, et al., 2006)，神经兴奋性相对增高导致痫性发作。由于LTG、CBZ、OXC和PHT等AEDs主要通过抑制钠通道电流、降低钠通道兴奋性而达到抗痫作用，因此，对于*SCN1A*突变导致的Nav1.1通道功能丧失，该类型的药物无异于雪上加霜，将进一步降低抑制性神经元的功能而导致痫性发作的加重。由于对于表型较轻的热性惊厥相关癫痫患者在临床上易被忽视，而对于部分性发作为主要特征的

PEFS+临床上对其认识不足，故而治疗上极易被忽略一些药物治疗的细节，对此类患者，早期不恰当的药物选择，如对PEFS+患者使用具有钠通道阻滞作用的

AEDs等，将会明显影响其治疗的进程和病情的发展，从而最终导致顽固性癫痫的发生。

总之，通过本研究，将有助于临床对于较轻表型的EFS+的认识，尤其对

PEFS+临床特征和基因背景的认知。对此类患者的早期识别和*SCN1A*基因筛查，将有助于正确有效的药物治疗策略的制定，而避免医源性的顽固性癫痫的发生。同时，本研究将有助于更清晰的展现PEFS+相关临床特征和突变分子特征，丰富热性惊厥相关癫痫的临床诊治体系，为临床诊治提供有价值的线索和有力证据。

12

# **第二章** **PEFS+**相关***SCN1A***基因剪切位点突变的对剪切影响的体外研究

**研究对象和方法**

## 一、 研究对象

### **1.** 研究对象：

(1)本研究先前已从PEFS+患者中筛查到的3个携带*SCN1A*基因剪切位点突变的患者，及其剪切突变（c.473+5G> A, c.473+5G> C, c.4853-25T> A）。（见第一章）

(2)相应的具有代表性的DS对比病例：本研究所先前筛查到的携带*SCN1A*基因c.602+1G> A的边缘型DS患者（该位点同时为*SCN1A*基因的热点突变，目前来自不同研究所报道的患者多达15人次，表型均为严重表型的Dravet综合征），以及文献报道的在DS 和难治性癫痫患者中发现的*SCN1A* 基因c.4853-1G> C。

### **2.** 癫痫表型及诊断标准

根据2001年国际抗癫痫联盟(ILAE)会议作出的有关癫痫综合征分类的标准，入组患者的疾病诊断标准如下：

**Dravet综合征诊断标准**：见第一章

**PEFS+诊断标准**(Liao WP, et al., 2010)**:** 见第一章

## 二、 实验设备和试剂

### 1. 主要实验设备：在第一章设备基础上，尚需：

(1)空气恒温振荡器（哈尔滨市东明医疗仪器厂）

(2)隔水式恒温培养箱（上海一恒科技有限公司）

(3)超净台（苏州净化设备有限公司）

(4)液氮储存罐（乐ft市东亚机电工贸有限公司）

13

(5) Q-PCR仪（德国QIAGENE公司）

### **2.** 主要实验试剂

#### **2.1minigene**载体片段及质粒构建所需试剂

2.1.1 **PCR扩增试剂**：

(1) Q5高保真DNA聚合酶（美国NEB公司）

(2) 5×Reaction buffer（美国NEB公司）

(3) HS Tag酶（广州东盛生物科技有限公司）

(4) dNTPMixture（日本TaKaRa公司）

(5)引物：储存液（100µmol/L），工作液（10µmol/L）

**2.1.2定点突变PCR试剂：**

(1) PCR扩增试剂：同2.1.1

(2)磷酸化和连接试剂：Blunting Kination Ligation kit (日本TaKaRa公司)

**2.1.3琼脂糖凝胶电泳试剂：**

(1)琼脂糖（赛百胜基因技术有限公司）；

(2)电泳液：储存液：5×TBE（Tris碱54 g；硼酸27.5 g；0.5mmol/LEDTA 20 ml（PH8.0）；加超纯水定容至1L)；工作液：由

5×TBE稀释10倍获得；

(3)溴化乙锭：工作液0.5 mg/ml（广州威佳生物技术公司）；

(4) 6loading buffer: （日本TAKARA公司）；

(5) DNA Marker: DL1000, DL100-6000等（日本TAKARA公司）。

2.1.4 **PCR产物回收纯化试剂：**DNA凝胶回收试剂盒（美国Thermo Fisher公司 ）

**2.1.5质粒构建试剂**

(1)限制性核酸内切酶：BamH I，NheI，Mlu I, Sma I, Kpn I，BamHI（美国

Ferments公司)；

(2) T4 DNA Ligase and 10×T4 DNA Ligase buffer（美国Ferments公司）；

(3)末端平端化试剂盒：Klenow Fragment （日本TAKARA公司）；

(4) LB培养基: Tryptone（胰蛋白胨）10g，Yeast extract（酵母提取物）5g，

NaCl 10g, 950 ml去离子水，NaOH调pH至7.0，定容至1 L，高压灭菌。固体LB

14

培养基则高压灭菌前加入琼脂至终浓度为3%；

(5)抗生素：氨苄青霉素（Ampicillin, 100 mg/ml）；

(6)感受态细胞：DH5α（日本TAKARA公司）。

2.1.6**质粒提取试剂（小提试剂盒）：**（北京天根生化科技有限公司）

#### **2.3**细胞转染的关键试剂：

(1)细胞株：HEK293细胞（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）；

(2) Tuberfect Transfection Reagent（美国Thermo Fisher公司）。

#### **2.4**细胞培养的主要试剂

(1)基础培养液：DMEM（高糖型，美国英潍捷基公司）；

(2)胎牛血清（美国GIBCO公司）；

(3)抗生素：氨苄青霉素（Ampicillin, 100 mg/ml），链霉素（streptomycin ，

100 mg/ml），工作浓度：氨苄青霉素50ug/ml、链霉素50ug/ml；

(4)细胞消化液：0.25% 胰酶＋0.02% EDTA（美国GIBCO公司）；

(5)二甲基亚砜（DMSO）（广州展晨公司）；

(6) 1PBS缓冲液（美国GIBCO公司）。

#### **2.5RNA**提取的主要试剂

(1) DEPC（生工生物工程（上海）有限公司）

(2) RNA提取试剂盒（美国ThermoFisher公司）

#### **2.6**逆转录及其**cDNA**扩增的关键试剂

(1) PrimeScript™RT Reagent Kit（Perfect Real Time）（日本TAKARA公司）

(2) DreamTaqTM Green PCR Master Mix (日本TOYOBA公司)

#### 2.7实时荧光定量**PCR**（**QPCR**）主要试剂：荧光定量PCR试剂盒（日本

TOYOBO公司)

## 三、 实验方法与步骤

### **1**.生物信息学预测分析

15

通过Ensembl网站获得*SCN1A*的完整序列，运用剪接分析软件Human Splicing Finder 2.4和Splice site strength(SS score)，对突变位点进行剪接分析预测。

### **2.** 质粒构建

根据纳入此次研究的*SCN1A*基因剪切位点突变的位置以及体外剪切报告

“minigene”方法的要求，构建2个野生型minigene质粒，分别是

pTARGET-EXON-2-3-4-5和pTARGET-EXON-24-25-26以及各自的突变质粒，其位

置及构造范围见图1。

#### **2.1**引物设计

设计方法同第一章。扩增各个野生型质粒所需片段的PCR引物以及对应突变质粒定点诱变引物序列分别见附表2和附表3。

#### **2.2**野生型质粒的构建

**2.2.1 PCR扩增各片段**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| 5Reaction buffer | 10µL |
| dNTPMixture(2.5mM) | 4µL |
| Primer-F（10uM） | 2.5µL |
| Primer-R（10uM） | 2.5µL |
| 正常人基因组DNA（100ng/µL） | 1µL |
| Q5酶 | 0.5µL |
| dH2O | 补足至50µL |
| 总体系 | 25 µL |

反应条件：98℃预变性30sec→[98℃变性10sec→退火(Tm-3) 30sec→72℃延伸，时间根据片段长度决定(30s /1kb)]循环30次→72℃延伸2min。

**2.2.2 PCR产物的胶回收与纯化**

(1)在紫外灯箱里，小心切出含DNA目的条带片段的凝胶；

(2)称出胶块的净重量；

(3)向胶块中加入溶液Ⅰ，均匀混合后，60℃加热10min直至融化胶块；

(4)用移液枪将上述溶液转移到试剂盒过滤柱，离心12, 000rpm×1min，弃

16

滤液。然后再加入溶液Ⅱ，离心12,000rpm×1min，弃滤液。空管离心12, 000rpm

×2min。

(5)将离心柱安置于干净的1.5 ml离心管上，在离心柱的中央膜上加入40µL dH2O，室温静置2min，离心12, 000rpm×2min洗脱DNA。最后测量DNA的浓度和OD值。

**2.2.3 PCR纯化产物测序验证**

PCR纯化样品送测序验证（上海美吉生物医药科技有限公司）。将测序结果与网上数据库的基因参考序列比对，明确目的片段有否序列异常和突变，并排除多态性位点后可进行下一步实验。

**2.2.4 PCR纯化产物与pTARGET载体的酶切**

根据minigene片段中相应的酶切位点，按照以下体系进行双酶切。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| PCR胶回收产物(或pTargetTM) | 25 µL |
| 内切酶1 | 2.5 µL |
| 内切酶2 | 2.5 µL |
| 10×green buffer | 5 µL |
| dH2O | 15 µL |
| 总体系 | 50 µL |

反应条件：37℃反应30～60min。

2.2.5**酶切产物的胶回收和纯化：**同2.2.2

**2.2.6片段连接反应**

**连接反应体系**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| P-targetTM质粒(酶切后) | 5 µL |
| PCR片段(酶切后) | 12 µL |
| 10×T4 DNA Ligase buffer | 2 µL |
| T4 DNA Ligase | 1 µL |
| 总体系 | 20 µL |

连接体系中载体和目的片段的摩尔数比为1: 3~10，为提高连接效率最佳比例为1: 6~7。反应条件：37℃反应≥3小时或者16℃反应过夜。

17

**2.2.7连接产物的转化**

(1)无菌吸头吸取60µL DH5α感受态细胞悬液，加入10µL连接产物，冰上静置30min。

(2) 42℃热休克90秒，立即置于冰上冰浴3min。

(3)加入LB液体培养基至1000µL，37℃恒温摇床震荡1小时。常温下4000 rpm

×4min，弃800µL上清，用剩下约200µL上清液吹打底部沉淀，使之重新悬浮，将此悬浮液涂布于含有氨苄青霉素的LB平板上。

(4)倒置培养板，37℃恒温培养箱中培养约12~16小时。

**2.2.7 质粒提取与鉴定**

(1)**质粒的提取**：

1）挑菌：挑取培养板中单克隆菌落，接种到含有氨苄青霉素的5 ml LB培养基中，37℃恒温摇床中剧烈震荡培养16～18小时；

2）取上述2 ml培养液，常温12000 rpm离心1分钟。收取沉淀。去上清 ；

3）加入250µL的溶液P1（使用之前已加入去RNA酶A）（4℃保存），在振荡器上振荡，将细胞团完全悬浮。

4）加入250µL溶液P2，温和颠倒6～8次，混合内容物；

5）再加350µL溶液P3，立即温和颠倒6～8次至白色絮状物出现；

6）离心12000rpm×10min。将上清液转至过滤柱，注意不要吸取白色絮状物，静置3min，使质粒DNA充分吸附在吸附膜上。离心12000rpm×1min，弃滤液；

7）吸附柱中加入500µL的PD去蛋白液，离心12000rpm×1min，弃滤液；

8）吸附柱中加入600µL漂洗液PW（已加入无水乙醇），离心12000rpm×1min，弃滤液，反复2次；

9）开盖室温放置5min以挥发酒精；

10）向吸附膜中央滴加35µL已65℃预热的ddH2O，静置3min，离心12000rpm

×2min；

11）DNA浓度测定后，置-20℃保存备用

**(2)质粒鉴定**

取上述提取的质粒进行双或三酶切，随后用1%琼脂糖凝胶电泳以鉴定，将初步鉴定正确的样本送测序验证。

**双酶切体系**

18

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 试剂 | 剂量 |
| 质粒 | 500～1000ng |
| 内切酶1 | 0.5 µL |
| 内切酶2 | 0.5 µL |
| dH2O | 补足至10ul |
| 总体系 | 10 µL |

#### **2.3*SCN1A***基因剪切位点突变质粒的构建

以上述测序正确的野生型质粒为模板构建相应突变质粒：

(1)突变质粒的PCR扩增

**PCR反应体系（Q5高保真酶）**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| 野生型质粒（1ng/ul） | 1 µL |
| dNTPMixture(2.5mM) | 4 µL |
| 5Reaction buffer | 10µL |
| 突变引物-F | 2.5 µL |
| 突变引物-R | 2.5 µL |
| Q5酶 | 0.5 µL |
| dH2O | 29.5 µL |
| 总体系 | 50 µL |

反应条件：同2.2.1

(2) PCR产物进行纯化回收：同2.2.2。

(3)线性PCR纯化产物自身环化和连接：

使用试剂盒Blunting Kination Ligation(BKL) kit，分两步完成：

1）PCR产物末端磷酸化反应

**Blunting Kination反应体系**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| 胶回收纯化的 PCR 产物 | 17 µL |
| 10 Blunting Kination buffer | 2 µL |
| Blunting Kination Enzyme Mix | 1 µL |
| 总体系 | 20 µL |

反应条件：37℃，10min→70℃，10min

19

2）连接反应

**Ligation反应体系**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| 上述Blunting Kination 产物 | 10 µL |
| Ligation Solution I | 10 µL |
| 总体系 | 20 µL |

反应条件：16℃反应≥3小时或连接过夜。

### **3.** 质粒转染

#### **3.1**细胞培养

（1）使用25 cm2的培养瓶培养HEK293细胞：含10%FBS的DMEM培养基，置于37℃，5% CO2的培养箱中培养；根据实验进度换液、传代或冻存。

1）换液：将培养瓶中液倒掉，向培养瓶中重新加入含有10%FBS的DMEM

培养基

2）传代：倒掉培养瓶内旧培养液，加入1ml 0.25%的胰酶适当消化；加入1ml

培养液终止消化，温柔吹打至贴壁细胞脱落；将上述混悬液移至15ml离心管中，

1000rpm离心5min，弃上清；向沉淀中加入2ml培养液，轻轻吹打混悬；分装到两至三个培养瓶中，置37℃，含5% CO2的培养箱中培养。

3）细胞冻存：取对数生长期的细胞如前述收集细胞沉淀，加入培养基重新混悬，细胞计数后，把密度调整至5×106/ml左右，加入配制好的细胞冻存液，充分混匀；按以下顺序进行梯度降温：4°C 10 min→-20°C 30 min→-80°C过夜→置液氮保存。

4）细胞复苏：从液氮中取出冻存管，迅速放入已预先加热的37℃的水浴箱摇动快速融化冻存物；将融化细胞混悬液转移到离心管中，加入10倍以上的培养液，1000rpm离心5min，弃上清，重复一次洗净DMSO；加入适当培养液，混悬细胞，转移到培养瓶中，置37°C，5％CO2温箱中培养。

#### **3.2**细胞转染

(1)铺板：转染前24小时，将HEK293细胞接种到6孔板中，每孔共约4ml培养基，37°C恒温培养箱中放置24小时，待细胞贴壁，融合度50%～60%时即可转染。

(2)转染：

1）准备足量转染质粒，使其终浓度≥1000 ng/µL，OD1.8～1.9；单独转染时，

20

加入质粒为4µg/孔；

2)转染体系：质粒体积+ Tuberfect Transfection Reagent 12µL (1:3比例) +无血清的DMEM至400µL. 充分混匀，室温静置20min使脂质体与质粒充分结合；

3）将上述混合液沿管壁轻轻加入每孔内，温和旋转混匀，置37°C、5％CO2

培养箱中孵育。转染后24小时换液，48小时提RNA。

### **4.** **RNA**的提取及逆转录**PCR**

#### **4.1**提取**RNA**

(1)弃培养瓶中培养液，1PBS缓冲液清洗一遍，去除残留的培养基；

(2)每孔加入600µL的细胞裂解液Lysis Buffer(已按Lysis 1000µL: 2M DTT

20µL比例加入DTT溶液），枪头用力吹打至细胞完全脱落、裂解，移至1.5ml

的离心管中（此步骤及以后使用的枪头，离心管均要DEPC处理过的）；

(3)加入360ul无水乙醇，吹打混匀；

(4)将上述混合液移至去RNA酶的纯化柱中，静置2min，离心12000rpm×1min，弃滤液；

(5)更换新的纯化柱收集管，向纯化柱中加入700µL wash buffer1（已加无水乙醇），离心12000rpm×1min，弃滤液；

(6)加入600µL的wash buffer2（已加无水乙醇）, 离心12000rpm×1min，弃滤液；

(7)加入250µL的wash buffer2，离心12000rpm×2min，弃滤液；

(8)空管离心12000rpm×2min，弃滤液，将纯化柱转移到新的去RNA酶的

1.5ml离心管上，开盖静置5min使乙醇挥发；

(9)向纯化柱中央滴加35µL的去核酸酶水，静置2～3min，离心12000rpm×

2min收集RNA，-80℃保存。

#### **4.2**逆转录反应**(PrimeScript RT reagent Kit)**

(1)去除基因组DNA

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| 5×gDNA Eraser Buffer | 2 µL |
| GDNA Eraser | 1 µL |
| Total RNA | 1 µg or 2µg |

21

|  |  |
| --- | --- |
| RNase-free dH2O | Up to 10µL |
| 总体系 | 10 µL |

反应条件：42℃2min

(2) RNA逆转录为cDNA

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| 5×PrimeScript Buffer 2 | 4 µL |
| PrimeScript RT Enzyme Mix I | 1µL |
| RT Primer Mix | 1µL |
| 上述反应液 | 10 µL |
| RNase-free dH2O | 4 µL |
| 总体系 | 20 µL |

反应条件：37℃15min→85℃5sec→4℃保存

#### **4.3cDNA**产物的**PCR**扩增和测序

(1) **PCR引物设计：**设计方法同前述，引物序列见附表4。

(2) **PCR扩增：**以上述4.2步骤的cDNA产物为模板，进行PCR反应扩增

**PCR反应体系**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| DreamTaq Mix | 12.5 µL |
| RT primer-F | 0.5 µL |
| RT primer-R | 0.5 µL |
| cDNA | 1 µL |
| ddH2O | 10.5 µL |
| 总体系 | 25 µL |

反应条件：94℃预变性3min→以下步骤循环34次：[94℃30sec→60℃30s→

72℃时间根据目的片段大小计算（1kb/60sec）] →72℃延伸10min

→4℃保存。

(3)取样品琼脂糖凝胶电泳；

(4)凝胶成像仪下观察PCR条带；

(5)割胶回收纯化，将纯化的产物送华大公司测序，进行序列比对分析。

### **5.** 实时荧光定量聚合酶链式反应**(Q-PCR)**

22

具体方法参照THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix、Qiagen Rotor-Gene Q荧光定量PCR仪说明书进行。

(1) **qPCR中检测的基因及引物设计**：所有扩增目的基因引物的长度为18～

24bp，正反向引物Tm 值差异<2℃，扩增的目的基因片段长度<300bp。为能在

PCR产物中准确区分开突变体正常转录mRNA及异常转录mRNA的片段，扩增异常mRNA的正反向引物则分别有一条设计在该突变体异常mRNA序列跨越正常转录序列与异常转录序列衔接处，另一条设计在它剩余的完全正常的序列处；扩增该突变体正常转录mRNA的正反向引物则根据其丢失或插入的序列所在，设计其中一条在两段正常外显子序列的拼接处，另一条则在剩余的正常序列处；为能与其对应的野生型相比较，扩增其相应野生型mRNA的引物使用与扩增突变体正常转录mRNA的引物以保证可比性。据参考文献（Nuzzo F et al., 2013）内参基因的引物设计在野生型cDNA的第一个外显子上或最后一个外显子上，内参基因引物扩增片段与目的基因片段长度基本一致，以利于PCR扩增效率的一致性。（各目的基因及其引物序列见附表5）。

将引物用双蒸水配制成10μM的母液，-20℃保存备用，取第一条链cDNA 2

μL作为模板，在冰上建立20μL PCR反应体系

(2) **qPCR反应**：

**qPCR体系**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量 |
| 2 × SYBR qPCR Mix  Primer F(10 μM) Primer R(10 μM) cDNA  ddH2O | 10 μL  0.5 μL  0.5 μL 1 μL 8 μL |

总体系20μL

反应程序：95℃1 min→按一下步骤循环45次：[95℃15 sec→60℃30 sec

→72℃20 sec]→65℃缓慢加热至95℃以制作熔解曲线，其余均为默认值。

**(3)标准曲线的制作**

每对扩增目的基因片段产物的引物以其相应的野生型或突变型cDNA为模

23

板，以5个浓度梯度（1:1、1:10、1:100、1:1000、1:10000）进行qPCR反应制作标准曲线，以确定内参引物和目的基因引物扩增效率一致（差异<0.05），且扩增效率≈1。

(4) **qPCR结果分析**：以野生型第一个外显子为内参基因，相应的野生型为对照样品，其它样品目的基因的表达以此进行标准化，之后再相互比较。

每组做3批样品，同一批样品同时做qPCR反应时，每个样品的每对引物设

3个复孔。采用∆∆Ct法计算相对定量值：

△△CT＝（CT实验组目的基因﹣CT实验组内参基因）﹣(CT对照组目的基因﹣CT对照组内参基因) RQ＝2 -△△CT

### **6.** 统计学分析

数据采用*x**s*表示，用SPSS17.0进行统计学分析，两组间的比较采用*t*检验，以*P*＜0.05为差异具有统计学意义。

24

HENK293 细

胞体外表达

**技术路线**

收集 3 例 *SCN1A* 基因剪切位点突变的 PEFS+病例

设置2 例*SCN1A* 基因剪切位点突变的

DS 病例为对照组

软件预测剪切位点突变的剪切影响

构建野生型 Minigene E2--5 及E24-26 **的**质粒

定点诱变构建剪切位点突变质粒

RT-PCR

荧光定量 PCR

PEFS+ 与 DS 剪

切突变体外剪切模式的比较分析

PEFS+相关 *SCN1A* 剪切

突变基因型-表型-遗传模式-剪切模式关系分析

25

**结果**

经系统性回顾本研究的*SCN1A*基因筛查结果，以及目前国际上所有已经报道的*SCN1A*基因剪切位点突变，对不同表型和突变位置具有代表性的突变位点进行综合性分析，选取了2个Dravet综合征相关*SCN1A*基因剪切位点突变作为PEFS+相关剪切位点体外剪切分析的比较，分别为：c.602+1G> A (本研究)；c.4853-1G> C (Mancardi MM, et al.,2006; Wang JW, et al., 2012)。

因此，此次我们研究的所有*SCN1A*基因剪切位点突变5个。其中：剪切受体位点2个和剪切供体位点3个。这5个突变位点在外显子及内含子区域上的位置、突变及各自野生型所构建的体外剪切报告“minigene”片段见图10。



**图10** **体外分析剪切突变位点、位置及其所在体外剪切报告“minigene”片段**

## 一、 ***SCN1A***基因剪切突变相关**PEFS+**与**DS**患者临床特征

本研究3例PEFS+患者（c.473+5G> A、c.473+5G> C和c.4853-25T> A）及 1

例做对对照的DS患者（c.602+1G> A）均来广州医科大学附属第二医院癫痫中心就诊的热性惊厥相关性癫痫患者，主要临床特征见表8。c.473+5G> A 和

c.473+5G> C突变患者临床特征相似，均为一岁前起病，药物反应良好，发作改善，但c.473+5G> C患者起病后出现轻度智能发育迟滞，c.473+5G> A突变患者至随访至3岁时未见明显智能发育迟滞；同时，本研究中c.473+5G> A突变还在另一个复杂FS的患儿中被发现，该患儿近2岁时首次FS，之后反复FS，随访

26

至6岁时仍无无热发作，丙戊酸钠单药治疗已1年余无发作，智能正常。c.4853-25T> A患者在剪切突变相关PEFS+患者中临床症状最轻，一岁后起病，药物反应好，发作完全控制> 3年，无精神运动发育正常。突变c.602+1G> A对照为本研究组前期发现的DS患者，一岁前起病，具全面性及部分性的多种发作类型，药物反应不佳，发作较频繁，病后运动不协调，中度智能发育迟滞；该位点同时为*SCN1A*基因的热点突变，目前来自不同研究所报道的患者多达15人次，表型都是严重表型Dravet综合征。另一个对照位点c.4853-1G> C，目前文献已报道的患者有3例，均诊断为典型DS或难治性癫痫脑病（Mancardi MM, et al.,2006; Wang JW, et al., 2012）。

**表8** **. *SCN1A*基因剪切突变相关PEFS+与DS患者临床特征**

| Mutation | Inheritance | Phenotype | Gender  / Age | Onset of FS / aFS | Seizure type | EEG | MRI | Physica l exam. | MR | Seizure outcom |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Minigene E2-3-4-5 | | | | | | | | | | |
|  | De novo | Complex FS+ | M/6y | 23m/8m | GTCS | FSW | ﹣ | ﹣ | Normal | Seizure free |
| c.473+5G>A | De novo | PEFS+ | F/3y | 7m/8m | CPS, HC, GTCS | FSW | ﹣ | ﹣ | Normal | Reduction |
| c.473+5G>C | De novo | PEFS+ | M/5y | 11m/5m | CPS, HC, (s)GTCS | FSW | ﹣ | ﹣ | Mild | Reduction |
| c.602+1G>A | De novo | DS-B | M/7y | 8m/2y | AAS, sGTCS,HC | FSW | ﹣ | ﹢ | Moderate | Refractory |
| Minigene E24-25-26 | | | | | | | | | | |
| c.4853-25T>A | Maternal | PEFS+ | M/17y | 1.5 y/5m | (s)GTCS,CPS | FSW | ﹣ | ﹣ | Normal | Seizure free |
| c.4853-1G>C\* | De novo | DS-C | NA | NA | NA | NA | NA | ﹣ | Abnormal | Refractory |

注：\*病例来自Mancardi MM, et al.2006所报道

FS, febrile seizure; aFS, afebrile seizure; SE, status epilepticus; M, male; F, female; HC, hemi-clonic; (s) GTCS, generalized and secondary generalized tonic-clonic seizure; CPS, complex partial seizure; SPS, simple partial seizure; FSW, focal spike/sharp slow waves; GSW, generalized spike/sharp slow waves; MR, mental retardation; m, month; y, year.

## 二、 ***SCN1A***基因突变患者生物信息学分析结果

通过Human Splicing Finder 2.4和Splice site strength(SS score)剪切分析软件，我们对上述的3个PEFS+相关*SCN1A*基因剪切位点突变，以及2个DS相关剪切位点突变进行更全面的分析，包括其对pre-mRNA剪接位点和剪接调控序列影响的分析。Human Splicing Finder 2.4包括Human Splicing Finder, MaxEnt，ESE Rescue和ESE Finder四个子软件。软件预测结果提示5个剪切突变位点均

27

导致了剪接受体位点的不同程度的破坏或生成（表9），即均可造成*SCN1A*基因剪切的异常。*SCN1A*基因突变c.602+1G> A和c.4853-1G> C的患者均是症状严重的DS，而c.473+5G> A、c.473+5G> C和c.4853-25T> A的患者症状较轻的PEFS+。软件分析的结果并未能明显显示各突变对剪切影响之间的差异，有待我们进一步的实验证实及分析。

**表9** **. 生物信息学软件分析预测各*SCN1A*基因剪切位点突变对剪切的影响**

| Intron | Nucleotide change | Bioinformatic splicing prediction | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 5' Splice site |  | HSF | MaxEnt | SS score |
| Inron 3 | c.473+5G>A | ATGTAGAgtaagtt  →atgtagagtaaaTT | WT site broken | 66.96-38.01  (-43.23%) | 9.35-1.19  (-87.27%) | 0.99-<0.40 |
| Inron 3 | c.473+5G>C | ATGTAGAgtaagtt  →atgtagagtaacTT | WT site broken | 66.96-38.01  (-43.23%) | 9.35-1.31  (-85.99%) | 0.99-<0.40 |
| Inron 4 | c.602+1G>A | TGCgtaagt→ TGCataagt | WT site broken | 82.15-55.31  (-32.67) | 9.73-1.55  (-84.07) | 0.98-<0.40 |
| Inron 25 | c.4853-25T>A | Cttcactggttggt→ cttcactggtagGT | New site | 53.43-82.37  (+54.18) | 4.67-8.37  (+79.23) | 0.89-<0.40 |
| Inron 25 | c.4853-1G>C | GtttattcatagGT→ gtttattcatacGT | WT site broken | 84.03-55.09  (-34.45) | 8.89-0.82  (-90.78) | 0.94-<0.40 |

## 三、 **pTarget Exon-2-3-4-5**及**pTarget Exon 24-25-26**质粒构建

在pTarget载体（图11A）基础上，分别克隆4个*SCN1A*基因片段构建pTarget Exon2-3-4-5迷你基因模型，以及3个片段构建pTarget Exon24-25-26**，**并进行了定点诱变。pTarget Exon2-3-4-5克隆片段为外显子2、3、4和5全部及其上/下游各400bp左右内含子序列；pTarget Exon24-25-26克隆片段由外显子24和26号外显子的全部及其上/下游各400bp左右内含子序列，以及26号外显子上游一部分和其上400bp左右内含子序列构成。突变点的位置如图11B标示。



**A**

B

28



**图11.** (A)进行体外剪切分析的pTARGETTM载体图谱; (B) pTarget Exon2-3-4-5和pTarget Exon24-25-26质粒构建线路及其突变位点示意图

## 四、 **PEFS+**及**DS**相关***SCN1A***基因剪切位点突变**RT-PCR**体外剪接分析结果体外剪切分析的RT-PCR结果显示：与E2-3-4-5 野生型相比，PEFS+相关

*SCN1A*基因突变c.473+5G> A和c.473+5G> A发生了相同的异常剪切，即激活了 2

号外显子的3'端新的剪切供体位点，导致2号外显子的3'端缺失8bp碱基和全部

3号外显子的缺失。此结果将最终造成Nav1.1 蛋白截 短

（p. [L126fsX135; I157fsX166]）。但电泳结果也提示，这两个突变体均未使得所有的*SCN1A*基因片段都发生异常剪切，而是正常剪切形式和异常剪切形式同存，且保留了较多的正常剪切转录本；而DS相关突变c.602+1G> A之间破坏了4号外显子下游5'端剪切供体位点，导致4号外显子的完全缺失，最终将生成Nav1.1的截短蛋白（p. E158\_A201delinsE），电泳结果未见明显正常剪切形式的转录本存在（图

12A）。与E24-25-26 野生型相比，PEFS+相关*SCN1A*基因突变c.4853-25T> A激活了25号外显子下游3'端新的剪切受体位点，使25号内含子下游最后26bp长的内含子得以保留成为编码序列，最终同样将形成Nav1.1 的截短蛋白

29

（p. D1618LfsX1629），但电泳结果提示大量正常剪切转录本的存在，而异常剪切转录本仅占少数；DS相关突变c.4853-1G> C激活26号外显子上游5'端新的剪切受体位点，使得26号外显子上游24bp长度的外显子缺失，将造成Nav1.1蛋白截短（p. D1618\_F1625del），电泳结果未见明确正常剪切转录本的存在（图12B）。各个突变体的异常剪切与正常剪切外显子的衔接区域测序结果见图12。

30

广州医科大学博士学位论文

31

**图12**。**PEFS+及DS相关*SCN1A*基因剪切位点突变RT-PCR体外剪接示意图。Minigene E2-3-4-5野生型及其相关突变体（A）及Minigene E24-25-26野生型及其相关突变体（B）的RT-PCR结果图。**A和B图的正上方均为RT-PCR琼脂糖凝胶电泳结果；下方的左半部分为各突变体相应的体外剪切结果的结构简图，灰色方块为外显子，内部的黑色部分为异常剪切产生的插入或缺失的外显子片段（具体插入或缺失片段长度标识于其下方），折线部分为内含子；下方的右半部分为野生型及其突变体相应的PCR测序结果，野生型截取片段为两个正常剪切的外显子衔接处，突变体为异常剪切的外显子与正常剪切的外显子交界区域。

## 五、 **PEFS+**及**DS**相关***SCN1A***基因剪切位点突变**Q-PCR**分析结果

以野生型正常剪切转录mRNA的Q-PCR相对量为100%，相应突变型的相对Q-PCR量与其相比较。c.473+5G>A和c.473+5G>C异常mRNA相对量分别为4.92±1.05%和7.97±1.12%，而正常mRNA 相对量分别为6.10±0.21% 和

3.94±1.25%，与同一迷你基因下DS的c.602+1G> A比较（异常和正常mRNA相对量分别为60.51±1.81%和0.06±0.022%），差异均有统计学意义（*P*<0.01）；c.4853-25T> A正常mRNA相对量为71.22±11.92%，而异常转录mRNA相对量仅7.38±1.61%，与同一迷你基因下DS的c.4853-1G> C比较（正常和异常mRNA相对量分别为0.08±0.01%和22.11±2.83%），差异有统计学意义（*P*<0.01）（图13）。



**图13. PEFS+及DS相关*SCN1A*基因剪切位点突变Q-PCR分析统计图：**A. Minigene E2-3-4-5野生型及其相关突变体（A）与Minigene E24-25-26野生型及其相关突变体（B）正常及异常剪切转录本Q-PCR相对定量值的比较。

注：\* PEFS+突变体异常剪切转录本量与DS突变体的异常剪切转录本量比较，差异有统计学意义（*P*<0.01）；▲PEFS+突变体正常剪切转录本量与DS突变体的正常剪切转录本量比较，差异有统计学意义（*P*<0.01）。

32

## 六、 ***SCN1A***基因剪切位点突变表型**-**基因型**-**遗传模式**-**剪切模式关系

根据剪切突变位点的位置，本研究的6个位点位置特征和表型的关系分别为：严重表型相关的突变c.602+1G> A和c.4853-1G> C位于固有剪切位点，均为新生突变，突变对正常剪切模式的破坏较为完全；较为温和的表型PEFS+相关突变c.473+5G> A和c.473+5G> C位于可变剪切区，也均为新生突变，突变造成正常和异常转录mRNA共存，且比例接近；c.4853-25T> A位于深部内含子区，突变源自有FS史的母亲，患者虽为PEFS+，但临床表型最轻（起病年龄晚，治疗反应良好，无发作> 1年，精神智能运动发作正常），Q-PCR结果可见突变仅造成很少量的异常转录mRNA，正常转录mRNA占绝对优势。（表8、10, 图14）

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Minigene E2-3-4-5** | |  |  | **Minigene E24-25-26** | |
| **Comeplex FS/ PEFS+** | **PEFS+** | **DS** |  | **PEFS+** | **DS** |
| Mutation | c.473+5G>A | c.473+5G>C | c.602+1G>A | | c.4853-25T>A | c.4853-1G>C |
| Type of splice site | Variant | Variant | Canonical |  | Deep-intronic | Canonical |
| Inherited pattern | De novo | De novo | De novo | | Merternal | De novo |
| Clincal severity | Moderate | Moderate | Severe | | Mild | Severe |
| Pattern of splicing | Skipping exon | Skipping exon | Skipping exon |  | Intronic insertion | Skipping exon |
| Aberrant RNA and Input (bp) | Exon2 and 3  (98 bp) | Exon2 and 3  (98 bp) | Exon 4 (129bp) |  | Intron 25  (26 bp) | Exon 26 (24bp) |
| Consequence of splicing | p.[L126fsX135  ;I157fsX166] | p.[L126fsX135  ;I157fsX166] | p.E158\_A2  01delinsE | | p.D1618LfsX1 629 | p.D1618\_F16  25del |
| RQ of aberrant RNA (%) | 4.92±1.05\* | 7.97±1.12\* | 60.51±1.81 | | 7.38±1.61\* | 22.11±2.83 |
| RQ of normal RNA (%) | 6.10±0.21▲ | 3.94±1.25▲ | 0.06±0.022 | | 71.22±11.92▲ | 0.08±0.01 |
| Level of normal (%)b | 55.35±9.33▲ | 33.08±12.23▲ | 0.01±0.004 | | 90.61± 3.35▲ | 0.36±0.11 |

**表10** **. PEFS+与DS相关*SCN1A*剪切位点突变表型-基因型-遗传模式-剪切模式关系一览**

注：RQ，relative quantity（相对量）；\* 与DS的异常量相比，差异有统计学意义（*P*<0.01）；▲与DS的正常量相比差异有统计学意义（*P*<0.01） b 以RQN/(RQN+RQA)±SD%表示

33



**图14。*SCN1A*基因剪切位点突变表型-基因型-遗传模式-剪切模式关系图**

注：N，RQN；A，RQA

34

**讨论**

*SCN1A*基因剪切位点突变/变异发生在基因的非编码内含子中。理论上，剪切位点的突变/变异可造成剪切位点的破坏或异常识别而影响前体mNRA的剪切，继而引起基因的异常转录(Baralle D & Baralle M, 2005)。迄今，通过各种基因检测方法发现并报道的与癫痫相关的*SCN1A*基因突变已超过1257个([http: //www. gzneurosci. com/*SCN1A*database/](http://www.gzneurosci.com/SCN1Adatabase/))。其中，剪切位点突变129个，占总突变的10.3%。绝大多数的剪切位点突变发生在致病性较强的固有剪切区，相对应的表型几乎均为严重的癫痫脑病，如Dravet综合征、Lennox-Gastaut综合征等。然而，近期文献报道，在PEFS+，甚至更轻的GEFS+患者中，同样发现了*SCN1A*基因剪切位点突变（Zuberi et al., 2011; Kumakura et al., 2009; Selmer et al., 2009）。本研究也在表型相对温和的PEFS+患者中发现了3个*SCN1A*基因剪切位点突变，2个（c.473+5G> C和c.4853-25T> A）为首次发现的突变，1个（c.473+5G> A）此前在DS中曾被报道。由此可见，携带*SCN1A*基因剪切位点突变的患者临床表型存在显著的差异，甚至在同一个突变中，不同的患者临床表型也不尽相同（Harkin et al., 2007; Sun et al., 2010）。因此，*SCN1A*基因剪切位点突变/变异如何影响剪切过程而导致癫痫的发生，尤其如何导致PEFS+这类相对较轻的表型？目前尚不清楚。故本研究对我们发现的PEFS+相关*SCN1A*剪切位点突变进行了体外剪切分析研究，并与DS等严重表型比较，以期探寻其潜在的分子致病机制，并进一步探讨其表型-基因型-剪切模式之间的关系。

本研究中的3例PEFS+患者均具有较为典型的PEFS+临床特征，即（1）显著的部分性发作，除了继发全面强直阵挛发作(GTCS)以外，没有失神发作等其他典型的全面性发作；（2）发作频率少，进展也相对缓慢；（3）EEG仅出现局灶性异常；（4）恰当的AEDs治疗可以明显改善发作，甚至达发作完全控制，长期随访预后良好；（5）智能发育可完全正常或仅轻度迟滞，而精神运动发育基本正常。同时，同为PEFS+的诊断，本研究的3例在表型上有似乎也有轻重之分，如c.4853-25T> A的患者就较c.473+5G> A和c.473+5G> C患者的临床表现相对轻，表现在该患者起病年龄更晚（> 1岁），药物治疗可达发作完全控制，且智能、精神运动发育均完全正常；而后二者则表型近似，皆于一岁之内起病，药物治疗可明显减少发作但始终未能获得发作完全控制，伴有轻度认知障碍。但与对照组的

35

2例Dravet综合征相比，PEFS+的临床表现明显为轻。2例DS患者一例来自于文献报道为典型DS，另一例来自本研究组的患者，临床表现边缘型DS的诊断（仅在发作上缺少肌阵挛发作）。

遗传疾病表型的改变与差异可能牵涉到遗传调节中的任何一个方面，而从转录本到蛋白功能的调节过程就是其中重要的一环。这种调节一个重要的方面就是前体mRNA的剪切。这一剪切可以把前体mRNA上内含子序列精确的去除，使得外显子能够连接在一起而形成成熟的带有完整转录阅读框的RNAs。真核生物的剪切过程要求外显子准确的识别，然后精确的分裂和再连接，这个过程由不变剪切序列的5'端和3'端外显子-内含子连接处的GU与AG二核苷酸所决定，也就是我们所说的剪切供体位点(splice donor site)和剪切受体位点(splice acceptor site)。但这个不可变区域剪切短序列并不是使外显子得以精确和有效剪切的唯一决定因素。一些少量的、靠近剪切受体位点和剪切供体位点的保守序列也参与其中(Padgett et al., 1986; Smith et al., 1989; Hastings et al., 2001)，这些序列又被称为节点(branch site)，位于剪切受体位点上游的20～50个碱基。此外，一些位于外显子及内含子序列中剪切元件也对剪切的识别起重要的调节作用，如外显子剪切增强子和外显子剪切沉默子(exonic splicing enhancers, ESE; exonic splicing silencers, ESS)、内含子剪切增强子和内含子剪切沉默子(intronic splicing enhancers, ISE; intronic splicing silencer, ISS)等。其中外显子剪切增强子和内含子剪切增强子可以促使外显子的准确识别，外显子剪切沉默子和内含子剪切沉默子可以抑制剪切位点的识别(Smith et al., 1989; Smith et al., 2000)。因此，对于*SCN1A*基因来说，其剪切位点的变异对外显子剪切的机制是复杂的。

剪切预测软件显示PEFS+相关的3个*SCN1A*剪切突变可能引起剪切供体位点的激活而出现异常外显子剪切，但仍有正常剪切形式存在。通过异源细胞体外表达进行剪切分析的结果进一步验证了软件预测的结果，同时显示了PEFS+与DS在剪切突变上不同的分子致病机制：（1）3例PEFS+患者的剪切突变体均出现了外显子的异常剪切，表型最轻的c.4853-25T> A表现为内含子片段的插入，而较为温和的c.473+5G> A和c.473+5G> C则出现相同的异常外显子删除，但是3者均不同程度的存在正常的剪切形式，而表型最轻的c.4853-25T> A突变体正常剪切转录本的保留程度最高。正常剪切转录本mRNA的存在使正常的通道蛋白得以部分保留。对于对照组的2例DS患者，其剪切突变体c.602+1G> A和c.4853-1G> C同样表

36

现为整个外显子的删除，但值得注意的是，在RT-PCR中，这2个突变体几乎观察不到正常形式剪切的存在。因此，正常形式mRNA的保留与否在一定程度上解释了表型严重程度，其结果与临床所见相符。（2）荧光定量PCR的研究使得我们对PEFS+剪切位点突变的分子致病特征有了更进一步的认识。3个PEFS+及2个DS剪切突变体随着表型的严重程度的增加，与野生型相比，其正常mRNA的相对量就越低，而异常mRNA量则不同程度的增高。在3个PEFS+突变体中，表型最轻的c.4853-25T> A正常mRNA相对量> 70%，表型温和的c.473+5G> A和c.473+5G> C则介于3～6.5%之间，严重表型的2个DS突变体其正常mRNA相对量仅0.04～

0.09%。这一结果在精确定量上进一步验证了RT-PCR所见。且表型严重程度与剪切突变引起的正常形式mRNA的保留量呈潜在的负相关关系。通过外显子的部分删除、内含子序列的插入或程序化改变可变剪切亚型的比例，剪切位点突变可以导致异常与正常剪切转录本的同时存在。同时，不同个体中正常剪切转录本的量和剪切亚型的比例都存在差异，并且都和疾病的严重程度相关。由于剪切机制元件调控的正常剪切转录本的数量决定了蛋白的功能，我们的结果则提供了这一现象的直接实验证据，同时也解释了*SCN1A*基因正常剪切转录本的量和癫痫患者严重程度的相关性。这一证据也有力的证明了*SCN1A*基因突变对于PEFS+与DS在分子致病机制上的不同，同时从分子角度阐释了PEFS+较为温和的临床表型的机制。

进一步对PEFS+和DS患者突变位点的位置、遗传模式和剪切模式的综合比较分析我们可以发现：（1）本研究3例PEFS+患者的剪切突变位点均非固有剪切位点，2个于可变剪切位点，1个更是位于深部内含子区；而2例DS患者的突变位点均处于固有剪切位点上。如前所述，根据位置和对外显子剪切效应的不同，剪切位点变异可以大致分为三个亚型：第一种亚型为位于外显子上游﹣1和﹣2bp，或外显子下游+1和+2bp位置的突变，即固有剪切位点（Canonical splice junction，

CSJ）突变，因破坏了固有的剪切位点而致外显子的完全不识别，致病性最强；第二种亚型是外显子上游﹣14～﹣3bp以及下游+3～+9bp的突变，即可变剪切序列(variant splice motifs, VSM, or potential splice site)突变，可以减弱或增强外显子识别，从而可能导致正常剪切和异常剪切mRNA的共存；第三种亚型是远离外显子的深部内含子区域的突变（deep intronic area），可能通过激活潜在的剪切受体或者供体位点，或破坏原有的剪切位点而导致异常外显子剪切。在人类很多

37

疾病中，是否累及固有剪切位点都和疾病的严重程度密切相关。如本研究作为对照的*SCN1A*基因热点突变c.602+1G> A即为典型的固有剪切位点突变，目前全球不同研究报道的携带该突变的患者多达15例，其表型均为严重的DS，这可能是由于该位点位于不可变剪切区域，本身对正常剪切的影响非常严重。因此我们推测，*SCN1A*基因剪切位点突变位置的不同造成不同类型的剪切模式是导致热性惊厥相关临床表型轻重差异的原因之一。本研究体外剪切分析的结果验证了这一推测，同时结果与临床所见相符，即位于深部内含子区的c.4853-25T> A，其异常剪切模式为内含子的插入，且正常剪切转录本的保留量最高，为临床症状最轻的

PEFS+；位于可变剪切位点的c.473+5G> A和c.473+5G> C次之，其异常剪切模式为外显子的删除，正常剪切和异常剪切转录本共存，且相对量差异不大（正常：异常=1: 3～8），临床表型相对温和，也均为PEFS+；而位于固有剪切区的

c.602+1G> A和c.4853-1G> C同样为外显子完全丢失，且保留的转录本几乎被异常mRNA占据，临床为表型严重的DS。（2）位于深部内含子区的c.4853-25T> A不但临床症状最轻，且是本研究发现的唯一一个遗传性的剪切位点突变，相比其他几个剪切位点突变，位于对剪切调节影响较小的深部内含子区，以及体外剪切分析显示的较高正常转录本保留量可能是其遗传性的解释之一。这一结果同时符合遗传学的观点和自然选择学说，即致病性越低，其遗传性越高。由此提示，*SCN1A*基因剪切突变的位置、剪切模式差异与突变遗传特征和患者表型严重程度之间存在密切的关系。

此外，本研究中发现2个有趣的现象：（1）c.4853-25T> A患者的突变为母亲来源，但其母无明确的癫痫或痫性发作史。虽然携带同样的突变，但两代之间临床表型仍差异显著。这种遗传的异质性和遗传的不全外显率在*SCN1A*相关GEFS+家系已有许多报道，已成为GEFS+的临床特征之一（Escayg A et al.2000; Gambardella A et al.,2009）。此外，*SCN1A*基因嵌合突变相关的研究显示，人体对*SCN1A*基因的依赖量约75%，即体内正常*SNCIA*基因量低于75%，或突变等原因造成异常的*SCN1A*基因在体内的量超过25%，即可导致疾病的发生（Shi et al.,2012; Meng, et al., 2015）。本研究显示c.4853-25T> A突变体正常mRNA量约为

70%，接近致病的临界值，虽然体外实验并不能完全反映人体内的真实情况，但可作为间接参考。因此，在本研究的c.4853-25T> A患者与母亲中，遗传异质性、个体基因调控的差异及后天环境因素等的作用等可能是二者之间表型差异的重

38

要原因。进一步可通过直接获得患者及其母亲血样中的mRNA测定以证实。另一方面，本研究的其他几个剪切突变体，或正转录mRNA量远低于75%，或同时异常转录mRNA量> 25%，因此，本研究的结果从剪切突变体外分析的角度，间接验证了人体对于*SCN1A*基因的依赖量值及其相关理论。（2）相同位点不同碱基突变（c.473+5G> A和c.473+5G> C）剪切模式相同，但存在正常剪切转录本表达量的差异，而且，正常转录本的表达量与临床表型的轻重程度相符，本研究中

c.473+5G> A的患者在临床表现上（主要为发作转归和精神运动发育障碍）略轻于c.473+5G> C。与错义突变不同，错义突变单碱基的突变可直接造成氨基酸置换性质的改变，从而引起钠通道蛋白高级结构的变化而致病。剪切位点突变位于非编码区，其保守序列上单碱基的改变可以影响剪切元件或重要节点的识别调控，而不同碱基的置换对这些调控因子的影响可能存在一定的差异，从而导致转录本剪切量上的差异。此外，GC碱基配对较之AT配对的结合更牢固，由此推测，G突变为A或C后碱基间结合力的差异也可能是造成剪切差异的原因。目前尚无相关研究的证据，有待进一步研究证实。

由于样本量有限，加之体外剪切报告“minigene”方法是建立在异种细胞表达体系的基础上，缺乏人体内及神经元完整环境，具有一定的局限性的局限性，本研究结果只是窥探到了PEFS+相关*SCNA*基因剪切位点突变分子致病机制的“冰ft一角”，且不能完全模拟各种不同剪切位点突变在不同病PEFS+患者体内的真实剪切情况。下一步研究将继续收集PEFS+病例并进行*SCN1A*剪切位点突变的筛查，扩大样本量；并拟提取患者及其突变传递者的外周血DNA，直接进行剪切分析，运用Q-PCR探针法测量正常及异常mRNA的表达量的绝对值，以期更精确的获知*SCN1A*基因剪切位点突变后剪切模式的改变，探讨其与癫痫严重程度的相关性，以及对于PEFS+潜在的分子致病机制。

通过本研究，我们确定了以体外剪切报告“minigene”和荧光定量PCR相结合的方法，对影响前体mRNA剪切的*SCN1A*基因突变进行定性和定量的功能研究，并对*SCN1A*基因剪切位点突变的基因型-剪切模式与表型-遗传模式的关系进行了初步但较全面的分析，探讨了PEFS+相关*SCN1A*基因剪切位点突变不同于其他表型的独特分子特征和致病机制。本研究为*SCN1A*基因剪切位点突变引起的癫痫乃至其他人类遗传学疾病的基因表达及功能的研究提供了有效的研究方法和有力的证据支持。

39

结**论**

1. *SCN1A*基因是PEFS+的重要致病基因，并表现出与PEFS+温和表型相关的弱致病性。

2. PEFS+无论在临床特征，还是*SCN1A*基因突变分子特征、遗传模式上，都是介于DS和GEFS+之间的独立中间型。

3. 钠通道阻滞类AEDs可加重PEFS+的发作，*SCN1A*基因突变引起钠通道功能丧失是造成这一现象的可能潜在分子机制。

4. PEFS+相关*SCN1A*基因剪切突变具有特殊的突变位置和剪切模式，是其较弱致病性，及引起较温和临床特征的潜在分子机制。

40

参考文献

Annegers JF, Hauser WA, Shirts SB, Kurland LT. Factors prognostic of unprovoked seizures after febrile convulsions. N Engl J Med. 1987;316(9):493-498.

Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. J Med Genet. 2005; 42(10): 737-748.

Baulac S, Gourfinkel-An I, Nabbout R, Huberfeld G, Serratosa J, Leguern E, Baulac M. Fever, genes, and epilepsy. Lancet Neurol. 2004 Jul;3(7):421-430.

Berg AT, Shinnar S. Unprovoked seizures in children with febrile seizures: short-term outcome. Neurology. 1996;47(2):562-568.

Brogna S, Wen J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. Nat Struct Mol Biol.

2009;16(2):107-113.

Brunklaus A, Ellis R, Reavey E, Forbes GH, Zuberi SM. Prognostic, clinical and demographic features in SCN1A mutation-positive Dravet syndrome. Brain. 2012;135(Pt 8):2329-36.

Bühler M, Verdel A, Moazed D. Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing. Cell. 2006;125(5):873-886.

Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nat Rev Genet. 2002;3(4):285-298.

Catterall WA, Dib-Hajj S, Meisler MH, Pietrobon D. Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases. J Neurosci. 2008;28:11768–11777.

Catterall WA, Kalume F, Oakley JC. NaV1.1 channels and epilepsy. J Physiol.

2010;588:1849-1859.

Ceulemans BP, Claes LR, Lagae LG. Clinical correlations of mutations in the SCN1A gene: from febrile seizures to severe myoclonic epilepsy in infancy. Pediatr Neurol. 2004; 30:236-243.

Colosimo E, Gambardella A, Mantegazza M, Labate A, Rusconi R, Schiavon E, Annesi F, Cassulini RR, Carrideo S, Chifari R, Canevini MP, Canger R, Franceschetti S, Annesi G, Wanke E, Quattrone A. Electroclinical features of a family with simple febrile seizures and temporal lobe epilepsy associated with SCN1A loss-of-function mutation. Epilepsia. 2007;48(9):1691-1696.

Cross JH. Fever and fever-related epilepsies. Epilepsia. 2012;53 Suppl 4:3-8.

Dravet C, Bureau M, Oguni H, Fukuyama Y, Cokar O. Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome. Adv Neurol. 2005;95:71-102.

Dravet C, Bureau M, Bernardina BD, et al. Severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome) 30 years late. Epilepsia, 2011, 52 Suppl 2: 1-2. (1)

Dravet C. The core Dravet syndrome phenotype. Epilepsia, 2011, 52 Suppl 2: 3-9. (2)

Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, Brice A, LeGuern E, Moulard B, Chaigne D, Buresi C, Malafosse A. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. Nat Genet. 2000;24(4):343-345.

41

Escayg A, Goldin AL. Sodium channel SCN1A and epilepsy: mutations and mechanisms. Epilepsia.

2010;51(9):1650-1658.

Gambardella A, Marini C. Clinical spectrum of SCN1A mutations. Epilepsia, 2009, 50 Suppl 5: 20-23.

Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution.

Science.1977;185:862-864.

Guerrini R, Dravet C, Genton P, et al. Lamotrigine and seizure aggravation in severe myoclonic epilepsy. Epilepsia, 1998, 39s: 508-512.

Guerrini R & Oguni H. Borderline Dravet syndrome: A useful diagnostic categoryEpilepsia, 2011, 52(Suppl. 2):10-12.

Harkin LA, McMahon JM, Iona X, Dibbens L, Pelekanos JT, Zuberi SM, et a. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. Brain. 2007; 130:843-852.

Hastings, M. L. and Krainer, A. R. PremRNAsplicing in the new millennium. Curr. Opin. Cell Biol.

2001;13, 302-309.

Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. Nat Genet. 2004 Aug;36(8):801-808.

Hamati-Haddad A, Abou-Khalil B. Epilepsy diagnosis and localization in patients with antecedent childhood febrile convulsions. Neurology. 1998;50(4):917-922.

Ito M, Yamakawa K, Sugawara T, et al. Phenotypes and genotypes in epilepsy with febrile seizures plus. Epilepsy Res, 2006, 70S: 199-205.

Kanai K, Hirose S, Oguni H, Fukuma G, Shirasaka Y, Miyajima T, Wada K, Iwasa H, Yasumoto S, Matsuo M, Ito M, Mitsudome A, Kaneko S. Effect of localization of missense mutations in SCN1A on epilepsy phenotype severity. Neurology. 2004;63:329-334.

Kim YO, Bellows S, McMahon JM, Iona X, Damiano J, Dibbens L, Kelley K, Gill D, Cross JH, Berkovic SF, Scheffer IE. Atypical multifocal Dravet syndrome lacks generalized seizures and may show later cognitive decline. Dev Med Child Neurol. 2014 Jan;56(1):85-90.

Köhling R. Voltage-gated sodium channels in epilepsy. Epilepsia. 2002;43(11):1278-1295.

Korff C, Laux L, Kelley K, Goldstein J, Koh S, Nordli D Jr. Dravet syndrome (severe myoclonic epilepsy in infancy): a retrospective study of 16 patients. J Child Neurol. 2007;22(2):185-94.

Kröll-Seger J, Portilla P, Dulac O, Chiron C. Topiramate in the treatment of highly refractory patients with Dravet syndrome. Neuropediatrics. 2006;37(6):325-329.

Kumakura A, Ito M, Hata D, Oh N, Kurahashi H, Wang JW, et al Novel de novo splice-site mutation of SCN1A in a patient with partial epilepsy with febrile seizures plus. Brain Dev 2009; 31:179-182.

Liao WP, Shi YW, Long YS, et al. Partial epilepsy with antecedent febrile seizures and seizure aggravation by antiepileptic drugs: associated with loss of function of Nav1.1 Epilepsia, 2010, 51: 1669-1678.

Mancardi MM, Striano P, Gennaro E, Madia F, Paravidino R. Familial occurrence of febrile

42

Seizures and epilepsy in severe myoclonic epilepsy of infancy (SMEI) patients with SCN1A mutations. Epilepsia. 2006;47(10):1629-1635.

Marini C, Scheffer IE, Nabbout R, Suls A, De Jonghe P, Zara F, Guerrini R. The genetics of Dravet syndrome. Epilepsia. 2011;52 Suppl 2:24-29.

Mbizvo GK, Dixon P, Hutton JL, et al. Levetiracetam add-on for drug-resistant focal epilepsy: an updated Cochrane Review[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 12: CD001901.

Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders.

J Clin Invest. 2005;115(8):2010-2017.

Meng H, Xu HQ, Yu L, Lin GW, He N, Su T, Shi YW, Li B, Liu XR, Tang B, Long YS, Yi YH, Liao WP. The SCN1A mutation database: updated information and analysis of the relationships among genotype, function, and phenotype. Hum Mutat.2015[doi: 10.1002/humu.22782]

Meyer FF, Louilot A. Latent inhibition-related dopaminergic responses in the nucleus accumbens are disrupted following neonatal transient inactivation of the ventral subiculum. Neuropsychopharmacology. 2011;36(7):1421-1432.

Nakken KO, Eriksson AS, Lossius R, et al. A paradoxical effect of levetiracetam may be seen in both children and adults with refractory epilepsy. Seizure, 2003, 12: 42-46.

Nuzzo F, Radu C, Baralle M, Spiezia L, Hackeng TM, Simioni P, Castoldi E. Antisense-based RNA therapy of factor V deficiency: in vitro and ex vivo rescue of a F5 deep-intronic splicing mutation. Blood. 2013;122(23):3825-3831.

Offringa M, Newton R. Prophylactic drug management for febrile seizures in children[J].

Cochrane Database Syst Rev, 2012, 18: CD003031.

Okumura A, Kurahashi H, Hirose S, Okawa N, Watanabe K. Focal epilepsy resulting from a de novo SCN1A mutation. Neuropediatrics. 2007;38(5):253-256.

Padgett, R. A. et al. Splicing of messenger RNAprecursors. Annu. Rev. Biochem. 1986;55, 1119–1150.

Pavlidou E, Panteliadis C. Prognostic factors for subsequent epilepsy in children with febrile seizures. Epilapsia, 2013, 54: 2101-2107.

Perucca E. Innovative monotherapy trial designs for the assessment of antiepileptic drugs: a critical appraisal[J]. Eur J Clin Pharmacol.1998; 54: 1-5.

Ran X, Li J, Shao Q, Chen H, Lin Z, Sun ZS, Wu J. EpilepsyGene: a genetic resource for genes and mutations related to epilepsy. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D893-9.

Sankar R. Neuroprotection in epilepsy: the Holy Grail of antiepileptogenic therapy. Epilepsy Behav. 2005;7 Suppl 3: S1-2.

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

Scheffer IE, Harkin LA, Grinton BE, et al. Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations. Brain, 2007, 130: 100-109.

43

[Selmer KK,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Selmer%20KK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19782004) [Lund C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lund%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19782004) [Brandal K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brandal%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19782004) [Undlien DE,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Undlien%20DE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19782004) [Brodtkorb E.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brodtkorb%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19782004) SCN1A mutation screening in adult patients with Lennox-Gastaut syndrome features. [Epilepsy Behav.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782004) 2009;16(3):555-557.

[Shi YW,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Shi%20YW%22%5BAuthor%5D) [Yu MJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Yu%20MJ%22%5BAuthor%5D) [Long YS,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Long%20YS%22%5BAuthor%5D) [Qin B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Qin%20B%22%5BAuthor%5D) [He N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22He%20N%22%5BAuthor%5D) [Meng H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Meng%20H%22%5BAuthor%5D), et al. Mosaic SCN1A mutations in familial partial epilepsy with antecedent febrile seizures. [Genes Brain Behav.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22151702) 2012;11(2):170-6.

Smith, C. W. et al. Alternative splicing in the control of gene expression. Annu. Rev.

Genet.1989;23, 527–577.

Smith, C. W. and Valcarcel, J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control.

Trends Biochem. Sci. 2000;25, 381–388.

Spruston, N. and C. Mcbain (2007)." Structural and Functional Properties of Hippocampus Neurons. In Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (Eds)." The Hippocampus Book. Oxford University Press, New York, pp. 133-201.

Sun H, Zhang Y, Liu X, Ma X, Yang Z, Qin J, et al Analysis of SCN1A mutation and parental origin in patients with Dravet syndrome. J Hum Genet. 2010; 55:421-427.

Thompson CH, Porter JC, Kahlig KM, Daniels MA, George AL Jr. Nontruncating SCN1A mutations associated with severe myoclonic epilepsy of infancy impairs cell surface expression. J Biol Chem. 2012;287(50):42001-42008.

Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, et al. Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. Am J Hum Genet 2001; 68:859-865.

Wang JW, Shi XY, Kurahashi H, Hwang SK, Ishii A, Higurashi N, Kaneko S, Hirose S; Epilepsy Genetic Study Group Japan. Prevalence of SCN1A mutations in children with suspected Dravet syndrome and intractable childhood epilepsy. Epilepsy Res. 2012;102(3):195-200.

Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, Spain WJ, McKnight GS, Scheuer T, Catterall WA. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. Nat Neurosci. 2006;9(9):1142-1149.

Yu MJ, Shi YW, Gao MM, Deng WY, Liu XR, Chen L, Long YS, Yi YH, Liao WP. Milder phenotype with SCN1A truncation mutation other than SMEI. Seizure. 2010;19(7):443-445.

Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH. Genotype-phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. Neurology. 2011;76:594-600.

44

附**录**

**附表1** **. *SCN1A*基因点突变筛查的引物序列、扩增片段长度及其实验条件**

| 目标片段 | 引物序列 | 扩增片段长度（bp） | PCR扩  增T(退火) | DHPLC 半  变性温度 | DHPLC 起  始梯度  （B 液百分比） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1A1 | 5'-AAAATGTGCAGGATGACAAG-3'  5'-GATATAGTAGGGGTCCAGGT-3' | 275 | 56℃ | 59.3℃ | 53.9% |
| 1A2 | 5'-CTTCTATGTTGTGTTCCTGT-3'  5'-AGTGCTTACAGATCATGTAC-3' | 200 | 56℃ | 54.3℃ | 50.7% |
| 1A3 | 5'-CTAAGCTGCAGTTTGGGCTT-3'  5'-GCCAATGAGCATTGTCCTCT-3' | 330 | 52℃ | 54.9℃ | 55.5% |
| 1A4(1) | 5'-CTATTCCACTGATGGAGTGA-3'  5'-TGGATCCCGAAGGAAAGTAA-3' | 180 | 54℃ | 54℃ | 49.6% |
| 1A4(2) | 5'-GCAAGGGGATTCTGTTTAGA-3'  5'-TGGAAGAGTGGCATATGTGA-3' | 332 | 54℃ | 54.5℃ | 55.6% |
| 1A5 | 5'-GTGTTTGTGTGTGAACTCCC-3'  5'-AATCACATGATGGGTCCGTC-3' | 160 | 56℃ | 59.5℃ | 48.4% |
| 1A6 | 5'-TTCACACGTGTTAAGTCTTC-3'  5'-ATCCAGCCCCTCAAGTATTT-3' | 400 | 54℃ | 53.8℃  57.5℃  58.8℃ | 57%  53%  52% |
| 1A7 | 5'-GAACCTGACCTTCCTGTTCT-3'  5'-TAGTTGGCTGTTATCTTCAG-3' | 243 | 56℃ | 54.5℃ | 52.8% |
| 1A8 | 5'-CTTTTACCCCACTTGCAG-3'  5'-AAATGGAGAGTGTGGCTC-3' | 190 | 54℃ | 57.5℃ | 50.2% |
| 1A9 | 5'-GTTGAAGCCACCACTTAGTG-3'  5'-CGATAAAAGGTCAGTGCCAT-3' | 305 | 52℃ | 53.5℃  56.7℃  60.2℃ | 54.9% |
| 1A10 | 5'-GTCTCTTCAGGTGCTATGTT-3'  5'-TAAACTCAGCAGTGCCATAC-3' | 348 | 54℃ | 54.5℃  58.7℃ | 56% |
| 1A11 | 5'-TGCTGAAATCTCCTTCTACA-3'  5'-GCCATGCCTGAACTATTTAA-3' | 508 | 56℃ | 55℃  59℃  60℃ | 58.7% |
| 1A12 | 5'-ACTGTGTCACCATTTGGTTG-3'  5'-ATGCACTATTCCCAACTCAC-3' | 305 | 56℃ | 53.9℃  55℃ | 54.9% |
| 1A13 | 5'-GTATACCTTTTGGTGGTTCT-3'  5'-TGGTTGAAAGACTGCTATAC-3' | 374 | 52℃ | 56℃  57.5℃ | 56.5% |
| 1A14 | 5'-GTGGGAAAATAGCATAAGCA-3'  5'-AACCCTGATTGTTAGAAAGG-3' | 325 | 56℃ | 54.2℃  55.8℃ | 55.4% |
| 1A15 | 5'-ACCATTTCTAGGTAAAGCTC-3'  5'-TGCATATCTTAAGTGGGTAC-3' | 458 | 50℃ | 51℃  57℃ | 58% |

45

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  | 61℃ |  |
| 1A16 | 5'-CTCTTCCCTACATTGGTGTA-3'  5'-CCCACACCTATAGAATCTTA-3' | 555 | 50℃ | 52℃  54.8℃  55.3℃ | 59.2% |
| 1A17 | 5'-TCTATGTCCATCTCACTTAC-3'  5'-AAGCTGCACTCCAAATGAAA-3' | 190 | 54℃ | 57.1℃  59.5℃ | 50.2% |
| 1A18 | 5'-TATTTCAACACTTTCTGCAGG-3'  5'-GTGCTGTATCACCTTTTCTT-3' | 207 | 54℃ | 58℃ | 51.1% |
| 1A19 | 5'-CCTCCTATTCCAATGAAATG-3'  5'-AGCTACCTTGAACAGAGACA-3' | 319 | 50℃ | 52℃  55.5℃  57℃ | 55.3%  55.3%  53.3% |
| 1A20 | 5'-ATTATTTTTGTGTGTGCAGG-3'  5'-GCTATATACAATACTTCAGG-3' | 180 | 48℃ | 57.6℃ | 49.6% |
| 1A21 | 5'-CCAGAGATTACTAGGGGAAT-3'  5'-CCATCTGGGCTCATAAACTT-3' | 516 | 54℃ | 52℃  55℃  56.5℃  57.5℃ | 58.8% |
| 1A22 | 5'-TGCATGTCCTTCTTAATAGG-3'  5'-GTCGTTTATGCTTTATTCGA-3' | 150 | 52℃ | 54.6℃ | 47.4% |
| 1A23 | 5'-TACAAAATATTCCCCTTTGG-3'  5'-TCTCAGTGGGAGAGAAAATA-3' | 195 | 50℃ | 54.6℃ | 50.5% |
| 1A24 | 5'-GGACACAGTTTTAACCAGTT-3'  5'-CCCCCATATCATTTGATACT-3' | 170 | 54℃ | 55.3℃ | 48.9% |
| 1A25 | 5'-AATGCACATGAGAAAACTCC-3'  5'-CTGGGATGATCTTGAATCTA-3' | 407 | 54℃ | 53.5℃  56℃  57.4℃ | 57.2% |
| 1A26(1) | 5'-TTTCGTGTCCCCTACCCTGT-3'  5'-TTATTAGGGTCACAGTCGGG-3' | 351 | 61℃ | 59.6℃ | 56% |
| 1A26(2) | 5'-ACCCATTCTCAACAGTAAGC-3'  5'-AGCTGGAGTTTGTTTGGTTG-3' | 354 | 58℃ | 58.3℃  59℃ | 56.1% |
| 1A26(3) | 5'-TGAACCGCCTCTCAATCTGC-3'  5'-AGATTAGCCCCACCTTTGA-3' | 354 | 56℃ | 55.5℃  58.4℃  59.5℃ | 56.1% |
| 1A26(4) | 5'-GGTGGGGCTAATCTTCTT-3'  5'-TGTAGGCACTGACCTTAAGG-3' | 326 | 54℃ | 53.2℃  56℃  57℃ | 55.4% |

**附表2. MinigeneE2-3-4-5及E24-25-26野生型质粒各构成片段PCR引物**

| 引物名称 | 引物序列 |
| --- | --- |
| E2-203BamHI | 5’aaaggatccGGTAAGTGGTATCATTGGA 3’ |
| E2+146NheI | 5’agagctagcGAATGAGGCTAATATGACA 3’ |
| E3-199NheI | 5’tctgctagcAATACTCAGTGAAGGTGATA 3' |
| E3+ 212MluI | 5’ tttacgcgtTTCAGGTGAACACCAGGTACA 3' |
| E4-212MluI | 5’ aacacgcgtCACACTACTCTTAAGACAC 3' |

46

|  |  |
| --- | --- |
| E4+194SmaI | 5' tatcccgggTCAACTACTGCAAAGCCT 3' |
| E5-194SmaI | 5' aagcccgggTCATACAGGTTTGTAACAGAA 3' |
| E5+197KpnI | 5' acaggtaccTGACCTCAAATTACAGTATCT 3' |
| E24F-BamHI | 5' aaaggatccTGGAGGTCAAGACATCTTTATG 3' |
| In24R-NheI | 5' agagctagcACAGCCCCATCCCAAGGTT 3' |
| In24F-NheI | 5' tctgctagcGGTCCAGCTGATCATTGGAAAG 3' |
| In25R-MluI | 5' tttacgcgtTGCTGGTGACTCCATGTCTATTC 3' |
| In25F-MluI | 5' aacacgcgtTTGTACCTATACTGTTGGGCTG 3' |
| E26R-KpnI | 5' acaggtaccCCAAAGATGGCGTAGATGAA 3' |

**附表3** **. 突变质粒定点诱变引物**

| 引物名称 | 引物序列 |
| --- | --- |
| c.473+5G>A | 正向引物：GGACAAAGAATGTAGAGTAAATTC |
|  | 反向引物：AATCAGGAGGGTTACTCATTGTCA |
| c.473+5G>C | 正向引物：GGACAAAGAATGTAGAGTAAACTC |
|  | 反向引物：AATCAGGAGGGTTACTCATTGTCA |
| c.602+1G>A | 正向引物：AACTTTTATAGTATTGAATAAAGGG |
|  | 反向引物：TGTAAGACAGGAACACAACATAGAAG |
| c.4853-25T>A | 正向引物：AGCTTGTTTTCAGATACACCTTCAC |
|  | 反向引物：TCCAAAAAATTTGATAAAGTAACAG |
| C. 4853-1G>C | 正向引物：TATGTTTCTTGCCGAGCTGATAG |
|  | 反向引物：CGTATGAATAAACAATGAGAATACCAAC |

**附表4. RT-PCR引物序列**

| 引物名称 | 引物序列 退火温度 |
| --- | --- |
| RT E2-5 F2 R2 | 正向引物：ATCTTCCGGTTCAGTGCCA Tm 48.9 |
|  | 反向引物：TAATGACAGTGAAATCGAGCCAGTT Tm 48.8 |
| RT 4853-25 F2-1 R2 | 正向引物：AACGCATGATTTCTTCACTGG Tm 56.1 |
|  | 反向引物：CAAGACGGATCACTCGGAAC Tm 53.4 |

47

附表5. qPCR引物序列

| 引物名称 |  | 引物序列 |
| --- | --- | --- |
| Qpcr-E2345-F1 R1  E23del-F1R1 (G>A/G>C) | WT | 正向引物：GCACTATTTTGACAAACTGTGTGT |
|  | 反向引物：ATATTCCTGTGAAGGTGTATTCTAC |
| Ab. | 正向引物：ACCTCTGCCCTGTACATTTTAA |
|  | 反向引物：TATTCCTGTGAAGGTGTATCAAA |
| Qpcr-E34wt-F1 R1 | WT | 正向引物：TGATTGGACAAAGAATGTAGAATAC |
|  |  | 反向引物：CATGGATCCCGAAGGAAAGTAA |
| Qpcr-(E4del)-F1 R1 | Ab. | 正向引物：TGTGCACTATTTTGACAAACTGTG |
| （602+1） |  | 反向引物：TCCACAAACTCTGTGACGTACTCTA |
| Qpcr-E25,26wt-F1 R1 | WT | 正向引物：CTGAAACTCATCTCTCTACGCCA |
|  |  | 反向引物：GCTCGGCAAGAAACATACCTAC |
| Qpcr-(IVS25-26bp)-F1 R1 | Ab. | 正向引物：TACTGAAACTCATCTCTCTACGC |
| （4853-25） |  | 反向引物：GCAAGAAACATACCTATGAATAAAC |
| QPCR4853-1 | WT | 正向引物：GTCTTTGACTTCGTAACCAGACAAG |
|  |  | 反向引物：GCAAGAAACATACCTACAATGGAGAG |
|  | Ab. | 正向引物：GTCTTTGACTTCGTAACCAGACAAG |
|  |  | 反向引物：GACACGAAATACTTTTCTACAATGGAG |
| 内参 |  |  |
| Qpcr-E2-F1 R1 |  | 正向引物：ATAGTATTGAATAAAGGGAAGGC |
|  |  | 反向引物：CCTAAGAGGATTGAAGGGAGTT |
| Qpcr-E26-F1 R1 |  | 正向引物：CCCTACCCTGTTCCGAGTGAT |
|  |  | 反向引物：CCAAAGATGGCGTAGATGAACA |

48

**附表6-1** ***SCN1A*突变数据库各表型突变类型分布（人数）**

**DS**

**GEFS+ &**

**Total (%)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Mutation** | | **DS-C** | **DS(U)** | **DS-B** | **PEFS+** | **FS+/FS** |  |
| **Point mutations** | |  |  |  |  |  |  |
| Missense | | 418 | 130 | 91 | 25 | 73 | 737 (45.6) |
| In-frame delection | | 16 | 4 | 5 | 0 | 0 | 25 (1.5) |
| compound mutation | | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 6 (0.4) |
| Start codon mutation | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (0.1) |
| Splice site | | 114 | 24 | 9 | 2 | 4 | 153 (9.5) |
| Nonsense | | 209 | 55 | 27 | 1 | 3 | 295 (18.2) |
| Frameshift | | 223 | 49 | 28 | 3 | 3 | 306 (18.9) |
| 3‘UTR mutation | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0.1) |
| synonymous | | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 (0.2) |
| **Subtotal** | | 988 | 263 | 161 | 31 | 84 | **1527 (94.4)** |
| **Genomic rearrangements** | |  |  |  |  |  |  |
| Partial genomic 56 | | | 14 | 4 | 0 | 0 | 74 (4.6) |
| whole gene deletion 11 | | | 5 | 0 | 0 | 0 | 16 (1.0) |
| whole gene duplication 0 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) |
| **Subtotal** | 67 | | 19 | 4 | 0 | 0 | **90 (5.6)** |
| **Total (%)** | 1055 (65.2) | | 282 (17.4) | 165 (10.2) | 31 (2.0) | 84 (5.2) | **1617** |

rearrangement

**DS**

**GEFS+ &**

**附表6-2** ***SCN1A*突变数据库各表型突变类型分布（位点数）**

| Mutation | DS-C | DS(U) | DS-B | Total | PEFS+ | FS+/FS |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Point mutations |  |  |  |  |  |  |  |
| Missense | 316 | 109 | 79 | 504 | 22 | 61 |  |
| pore | 169 | 52 | 42 | 263 | 11 | 20 |  |
| Volltage sensor | 44 | 19 | 14 | 77 | 3 | 10 |  |
| S1-S3 | 59 | 21 | 11 | 91 | 5 | 13 |  |
| Linker | 11 | 6 | 4 | 21 | 0 | 5 |  |
| N/C-terminal | 33 | 11 | 8 | 52 | 3 | 13 |  |
| In-frame delection | 15 | 4 | 4 | 23 | 0 | 0 |  |
| Compound mutation | 5 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 |  |
| Start codon mutation | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |  |
| Splice site | 94 | 21 | 6 | 121 | 2 | 3 |  |
| Nonsense | 96 | 36 | 19 | 151 | 1 | 3 |  |
| Frameshift | 194 | 46 | 25 | 265 | 3 | 3 |  |
| 3'UTR mutation | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |  |
| synonymous | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |  |
| Subtotal | 723 | 217 | 134 | 1074 | 28 | 71 |  |
| Genomic rearrangements |  |  |  |  |  |  |  |
| Partial genomic rearrangement | 27 | 11 | 3 | 41 | 0 | 0 |  |
| Whole gene deletion | 11 | 5 | 0 | 16 | 0 | 0 |  |
| Whole gene duplication | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |  |
| Subtotal | 38 | 16 | 3 | 57 | 0 | 0 |  |
| **Total** | 761 | 233 | 137 | 1131 | 28 | 71 |  |
|  |  |  |  |  |  |  | 49 |

**附表7** **. *SCN1A*突变数据库各表型突变遗传特征分布（人数）**

| Inherited pattern | DS | |  | PEFS+ | GEFS+ and FS+/FS | Total (%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| DS-C | DS (U) | DS-B |
| Inherited | 60 | 12 | 9 | 17 | 48 | 145 (9.0) |
| De novo | 639 | 51 | 84 | 9 | 7 | 790 (48.8) |
| Unknown | 357 | 219 | 72 | 5 | 29 | 683 (42.2) |
| **Total** | 1055 | 282 | 165 | 31 | 84 | 1617 |

50

**附表8** **. *SCN1A*突变相关PEFS+患者临床特征一览表**

**Mutation Case/ Nucleotide and protein change Inheritance Age at Age Age at type gender end of at FS aFS**

**follow-up onset onset**

**Frequency of FS**

**/afebrile GTCS#**

**Seizure type**

**EEG MRI**

**abnormality**

**outcome**

**Medication responds**

**Seizure**

**Development**

**Improvement Aggravation**

4/M c.1259C> T/p. A420V De novo 5y3m 11m 5m 4/3 HC, sGTCS, CPS Multi-FSW ﹣ VPA, CNZ, LEV, PB OXC Reduction Normal

6/Ff c.2576 G> A/p. R859H Paternal 6y1m 1y1m 2y8m 2/4 (s) GTCS, CPS FSW ﹣ VPA, TPM ﹣ Reduction Normal

7/F c.2837G> A/p. R946H De novo 22y 6m 3y 3/2 (s) GTCS, CPS, SPS FSW﹢VPA, TPM LTG, CBZ Seizure

Free c.2940C> A/p. N980K De novo 10y3m 2y5m 4y10m 9/0 (s) GTCS, CPS, SPS FSW﹢CNZ, LEV﹣Seizure

Normal

Normal

8/M

c.4741A> G/p. I1581V

free

10/F c.3283T> C/p. Y1095H Maternal 7y 4.5m 5m 12/8 (s) GTCS FSW﹣VPA﹣Reduction Mild MR

11/Ff c.4040T> C/p. I1347T De novo 6y8m 3m 2m 10/18 HC, sGTCS, CPS FSW﹢VPM, TPM, CNZ, PB﹣Reduction Moderate MR 12/Ff c.4096G> A/p. V1366I Maternal 29y 1y6m 13y 5/2 sGTCS, CPS FSW﹣VPA, TPM OXC Reduction Normal

13/Ff c.4220G> A/p. R1407Q Unknown 6y10m 8m 3y 2/10 (s) GTCS, CPS FSW﹣VPA﹣Seizure

free

Mild MR

**Missense**

14/M c.4760A> G/p. E1587G De novo 10y6m 10m 2y 4/1 (s) GTCS Multi-FSW﹣VPA﹣Reduction Normal

15/Ff c.4786C> T/p. R1596C Maternal 25y 3y 5y 5/10 (s) GTCS FSW﹢VPA, CNZ﹣Reduction Mild MR

16/Mf c.4847T> C/p. I1616T Paternal\* 14y3m 2y 4y 2/1 (s) GTCS, CPS FSW﹣VPA﹣Seizure

free

Normal

17/Mf c.4858T> C/p. F1620L Paternal 5y2m 11m 1y8m 6/4 (s) GTCS, CPS, SPS FSW﹣VPA, TPM﹣Reduction Normal

19/Ff c.5213C> T/p. P1738L De novo 14y1m 2y3m 6y 10/1 (s) GTCS Multi-FSW﹣VPA, TPM, CNZ, PB﹣Seizure

free

Normal

20/M c.5295T> A/p. F1765L De novo 15y4m 10m 3y8m 12/6 GTCS, CPS Multi-FSW﹣VPA, TPM, CNZ LTG, CBZ,

PHT

Reduction Normal

**In-frame deletion**

**Truncation**

21/F c.5303G> A/p. S1768N De novo 4y1m 6m 10m 8/2 sGTCS, CPS FSW﹣TPM﹣Reduction Normal

23/M c.5347G> A/p. A1783E De novo 8y4m 8m 6m 18/10 (s) GTCS, CPS FSW﹣ TPM, CNZ LTG, PHT Reduction Moderate MR 24/F c.5666T> G/p. M1889R Unknown 5y2m 6m 11m 12/4 sGTCS, CPS FSW﹢ LEV﹣Reduction Normal

25/F c.5714C> T/p. P1905R De novo 15y8m 8m 4y 5/12 (s) GTCS, CPS FSW﹢ VPA, TPM, CNZ LTG Reduction Moderate MR 26/Mf c.5768A> G/p. Q1923R Paternal\* 10y3m 6m 1y8m 10/8 HC, sGTCS, CPS Multi-FSW ﹢ VPA, TPM, CNZ LTG Reduction Moderate MR 22/F c.5313\_5315delCAT/p. I1772del De novo 5y6m 7m 1y 15/8 (s) GTCS FSW﹢ VPA, TPM, CNZ﹣Reduction Moderate MR

1/F c.433\_434delAT/p. M145DfsX4 De novo 9y2m 11m 4m 6/14 (s) GTCS, CPS, SPS F-slow﹢ PB, TPM, CNZ﹣Reduction Normal 5/Mf c.1985C> A/p. S662X De novo 22y 2y 7y 2/2 (s) GTCS, CPS FSW﹣ VPA﹣Reduction Normal 9/M c.3012dupT/p. D1005X De novo 3y10m 4m 8m 2/2 sGTCS, CPS Multi-FSW ﹢ VPA, TPM LTG Reduction Normal

**Intronic** 2/M c.473 +5G> C/p.? enovo 5y1m 11m 5m 5/10 HC, (s) GTCS, CPS Multi-FSW PA, TPM, CNZ OXC Reduction MildMR

51

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **variants** | 3/F | c.473+5G>A/p.? | De novo | 6y1m | 7m | 8m | 3/6 | HC,(s)GTCS,CPS | Multi-FSW | ﹣ | VPA,TPM,LEV | OXC | Reduction | Mild MR |
|  | 17/Mf | c.4853-25T>A/p.? | Maternal | 20y | 1y6m | 5y | 1/1.5 | (s)GTCS,CPS | FSW | ﹣ | VPA,PB | ﹣ | Seizure free | Normal |

FS, febrile seizure; aFS, afebrile seizure; SE, status epilepticus; M, male; F, female; HC, hemi-clonic; (s) GTCS, generalized and secondary generalized tonic-clonic seizure; CPS, complex partial seizure; SPS, simple partial seizure; FSW, focal spike/sharp slow waves; MR, mental retardation; VPA, Valproate; TPM, Topiramete; CNZ, Clonazepam; PB, Phenobarbital; LEV, Levetiracetam; LTG, Lamotrigine; CBZ, Carbamazepine; OXC, Oxcarbazepine; PHT, Phenytoin; ADHD, Attention deficit hyperactivity disorder; m, month; y, year; f Family history of seizures or epilepsy; \* Mosaic mutation; # The seizure frequency before 6 years of age or before seizure free is expressed by times/year.

**附表9** ***SCN1A*突变相关GEFS+ & FS+/FS患者临床特征一览表**

| Mutation type | Case/ gender | Nucleotide and protein change | Inheritance | Peresnt age/Age at follow-up | Age at FS  onset | Age at  AFS onset | Frequency of FS  /afebrile GTCS\* | Seizure type | SE | EEG  abnormality | MRI | Medication responds  Improvement Aggravation | Seizure outcome | Development |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | GEFS+ |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 2/M | c.1679G>A/p.R560H | Paternal | 7y4m/6y4m | 1y6m | 4y3m | 2/0.3 | GTCS | － | GSW | － | VPA,PB － | Seizure free | Normal |
|  | 3/F | c.2408G>A/p.G803E | Paternal | 3y10m/2y- | 1y1m | － | 1.5/0 | GTCS | － | Normal | － | VPA － | Reduction | Normal |
|  | 4/F | c.4168G>A/p.V1390M | Maternal | 3y6m/2y6m | 8m | 12m | 3/3 | GTCS | － | Normal | － | VPA － | Reduction | Normal |
|  | 5/M | c.4442T>C/p.V1481A | Maternal | 6y2m/2y6m | 9m | 8m | 12/1 | GTCS | － | GSW | － | VPA,TPM,CN －  Z,LEV | Reduction | Normal |
|  | 6/M | c.4834G>A/p.V1612I | Paternal | 7y6m/6y5m | 3y | － | 1/0 | GTCS | － | GSW | ﹢ | VPA － | Seizure free | Normal |
| Missense | 7/M | c.4847T>C/p.I1616T | Unknown | 20y/18y | 8m | 2y | 3/3 | GTCS | － | FSW | － | VPA － | Seizure free | Normal |
|  | 8/M | c.5132G>A/p.G1711D | Maternal | 7y/5y | 1y3m | 3y | 2.5/1 | GTCS | － | FSW | － | VPA － | Reduction | Normal |
|  | FS+/FS |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 14/M | c.4760A>G/p.E1587G | De novo | 4y5m/2y9m | 10m | ﹣ | 6/0 | GTCS,CPS | ﹣ | FSW | ﹣ | VPA － | Reduction | Normal |
|  | 15/F | c.4786C>T/p.R1596C | Unknown | 27y/26y | 2y | 10y | 8/0.5 | GTCS | ﹣ | Normal | ﹣ | ﹣ － | Seizure free | Normal |
|  | 16/M | c.4786C>T/p.R1596C | Unknown | 3y2m/2y | 1y3m | 2y | 6/3 | GTCS,Myo, AS | ﹣ | GSW | ﹣ | VPA － | Reduction | Normal |
|  | 17/F | c.5156A>C/p.Q1719P | De novo | 4y6m/3y | 12m | － | 6/0 | GTCS | － | FSW | － | VPA － | Reduction | Normal |

52

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **FS+/FS** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 9/M | c.473+5G>A | De novo | 6y6m/4y6m | 1y10m | ﹣ | 4/0 | GTCS | ﹣ | FSW | ﹣ | VPA | － | Seizure free | Normal |
| **Splice site** | 10/F | c.473+110A>G | De novo | 7y3m/5y6m | 1y1m | 4y9m | 3/2 | GTCS | ﹣ | GSW | ﹣ | VPA | － | Seizure free | Normal |
|  | 11/M | c.473+110A>G | Unknown | 25y/23y | 2y | 18y | 2/1 | GTCS | ﹣ | GSW | ﹣ | VPA | － | Reduction | Normal |
|  | 12/F | c.473+110A>G | Mother negative 5y/4y | | 1y5m | ﹣ | 2/0 | GTCS | ﹣ | ﹣ | － | － | － | Seizure free | Normal |
|  | **GEFS+** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1/M | c.1194G>A/p.T398T | Paternal | 3y7m/2y | 1y6m | ﹣ | 3/0 | GTCS | ﹣ | GSW | ﹣ | VPA | － | Reduction | Normal |
| **Synonym ous** | **FS+/FS** | | | | | | | | | | | | | | |
|  | 13/F | c.909A>G/p.T303T | Unknown | 12y/6y8m | 2y2m | ﹣ | 2/0 | GTCS | ﹣ | FSW | ﹣ | － | － | Seizure free | Normal |
|  | 18/M | c.5862T>A/p.L954L | De novo | 5y1m/3y9m | 1y7m | ﹣ | 1/0 | GTCS | ﹣ | FSW | ﹣ | VPA | － | Seizure free | Normal |

**附表10** **. *SCN1A*突变相关Dravet综合征患者临床特征一览表**

**Mutation Case/**

**type gender**

**Nucleotide and protein change**

**Peresnt**

**Age Age at**

**Inheritance age/Age at at FS aFS**

**onset onset**

**Frequency of FS**

**/afebrile GTCS\***

**Medication responds**

**Seizure**

**Seizure type**

**SE**

**EEG**

**abnormality**

**MRI**

**follow-up**

**Improvement**

**outcome Development**

**Aggravation**

**DS-B**

1/M c.337C> A/p. P113T Paternal\* 6y3m/2y10

m

11m 1y3m 12/12 GTCS, HC, CPS,

aAS

﹢FSW﹣VPA, TPM, CNZ, LEV

LTG, CBZ Reduction Severe, ADHD

8/M c.1216G> T/p. V406F Maternal\* 6y/2y9m 6m 3y5m 15/3 (s) GTCS﹢GSW﹣VPA, TPM﹣Refractory Severe, Autism

**Missense**

28/M c.4222T> G/p. W1408G De novo 7y9m/6y4m 6.5m 12m 18/24 (s) GTCS, aAS﹣FSW﹢VPA, TPM﹣Reduction Severe,

ADHD, Ataxia

35/F c.5348C> T/p. A1783V De novo 2y7m/1y1m 3m 4m 12/6 (s) GTCS, HC﹢GSW+FSW﹢VPA, TPM,

CNZ

﹣Reduction Profound, Ataxia

**DS-C**

9/M c.1499G> A/p. R500Q Pateral 1y10m/10m 4m 5m 1/12 GTCS, HC, Myo,

aAS

﹢GSW+FSW﹣VPA, CNZ OXC Refractory Mild

21/F c.2947G> A/p. V983I Pateral 8y/5y10m 1y4m 2y2m 12/36 (s) GTCS, CPS, Myo

，aAS

﹢GSW+FSW﹣VPA, TPM,

CNZ

LTG Refractory Severe, Ataxia

53

**In-frame del.**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 23/F | c.3629C>A/p.T1210K | De novo | 9y/7y3m | 6m | 6m | 18/24 | GTCS,Myo | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM, CNZ,LEV | ﹣ | Reduction | Moderate, ADHD |
| 26/F | c.3958G>C/p.A1320P | De novo | 7y/3y | 3m | 2m | 16/3 | (s)GTCS,CPS,SPS,  Myo | ﹢ | GSW+FSW | ﹢ | VPA,CNZ | LTG,OXC | Reduction | Severe,Ataxia |
| 29/M | c.4243T>A/p.F1415I | De novo | 16y/12y | 6m | 12m | 24/15 | (s)GTCS,CPS,SPS,  Myo | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM,  CNZ | ﹣ | Reduction | Profound,  Autism,Ataxia |
| 32/M | c.4868A>C/p.E1623A | De novo | 6y6m/5y | 8m | 12m | 6/12 | GTCS,Myo,aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | TPM,CNZ | LTG,OXC,  CBZ | Reduction | Mild,  ADHD,Ataxia |
| 34/M | c.5304T>G/p.S1768R. | De novo | 9y7m/3y8m | 5m | 6m | 12/16 | (s)GTCS,HC,CPS,  Myo,aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM,  CNZ | CBZ | Refractory | Moderate, Ataxia |
| **DS-B** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 7/F | c.1200\_1202delGAT/p.M  400del | De novo | 3y11m/2y6  m | 8m | 2y3m | 6/4 | (s)GTCS,CPS,aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹢ | VPA,LEV | ﹣ | Refractory | Moderate, Ataxia |
| **DS-B** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3/M | c.602+1G>A | De novo | 9y/2y7m | 8m | 2y | 6/24 | (s)GTCS,HC,aAS |  | FSW | ﹣ | VPA,TPM | ﹣ | Refractory | Moderate,ADHD |
| 20/F | c.2946+2G>T | De novo | 13y/11y | 7m | 2y | 12/24 | (s)GTCS | ﹣ | GSW+FSW | ﹢ | VPA,TPM, CNZ,PB | PHT | Refractory | Moderate |
| 30/M | c.4284+2T>C | Paternal | 8m/11y | 6m | 12m | 10/24 | (s)GTCS,HC,CPS | ﹣ | GSW+FSW | ﹢ | VPA,TPM | ﹣ | Refractory | Severe,Autism,A  taxia |
| 31/M | c.4476+5G>T | Unknown | 5y9m/7y | 4m | 2y | 6/6 | (s)GTCS,CPS,aAS | ﹢ | FSW | ﹢ | VPA,CNZ | ﹣ | Refractory | Moderate, Ataxia |
| **DS-C** | | | | | | | | | | | | | | |
| 17/M | c.2589+3A>T | De novo | 18y/17y | 2m | 8m | 8/24 | GTCS,Myo,aAS |  | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM, CNZ | LTG,CBZ | Refractory | Profound |
| 24/M | c.3705+1G>T | De novo | 4y4m/3y4m | 6m | 7m | 36/24 | GTCS,Myo |  | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM | LTG | Refractory | Moderate |
| **DS-B** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2/F | c.510delT/p.L170fsX180 | De novo | 7y/8y | 4m | 12m | 12/18 | GTCS,aAS | ﹣ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,CNZ,LEV | LTG,CBZ | Reduction | Severe |
| 4/M | c.664C>T/p.R222X | De novo | 3y6m/2y5m | 7m | 10m | 24/20 | (s)GTCS,CPS,aAS | ﹢ | FSW | ﹣ | VPA,TPM | LTG | Refractory | Mild,Ataxia |
| 10/M | c.1624C>T/ p.R542X | De novo | 7y9m/3y7m | 4.5m | 3y | 3/12 | (s)GTCS,HC,CPS,  aAS | ﹢ | FSW | ﹣ | VPA,TPM,CNZ |  | Reduction | Mild |
| 11/F | c.1738C>T/p.R580X | Maternal\* | 6y/2y1m | 5m | 7m | 12/36 | (s)GTCS,HC,CPS,  aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM,CNZ |  | Reduction | Severe,Ataxia |
| 12/F | c.1738C>T/p.R580X | Paternal\* | 4y6m/2y7m | 7m | 4m | 15/9 | (s)GTCS,CPS | ﹢ | FSW | ﹣ | TPM,CNZ | ﹣ | Reduction | Moderate,Atisum |
| 13/F | c.1837C>T/p.R613X | De novo | 2y3m/1y | 4m | 1y1m | 10/6 | (s)GTCS,CPS,aAS | ﹣ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM | LTG | Refractory | Mild,ADHD |
| 14/M | c.2134C>T/p.R712X | De novo | 1y9m/9m | 3m | 6m | 15/6 | (s)GTCS,HC,SPS | ﹢ | FSW | ﹣ | VPA,TPM, CNZ | ﹣ | Reduction | Mild |
| 15/F | c.2134C>T/p.R712X | De novo | 3y8m/2y8m | 6m | 2y8m | 3/7 | (s)GTCS,CPS | ﹣ | FSW | ﹣ | VPA,TPM,  CNZ | ﹣ | Reduction | Mild |
| 16/F | c.2134C>T/p.R712X | De novo | 11y/4y3m | 5m | 8m | 12/24 | (s)GTCS,HC,CPS,  aAS | ﹢ | FSW | ﹣ | VPA,TPM,  CNZ,PB | CBZ | Refractory | Moderate,Ataxia |

**Spice site**

**Truncating**

54

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 18/M | c.2716delG/  p.V906fsX934 | De novo | 3y3m/2y2m | 5m | 7m | 12/3 | (s)GTCS,CPS,aAS | ﹢ | FSW | ﹣ | VPA,TPM | ﹣ | Reduction | Moderate,Ataxia |
|  | 19/F | c.2782C>T/p.Q928X | De novo | 14y/13y | 5m | 1y2m | 24/24 | (s)GTCS,SPS,aAS | ﹣ | FSW | ﹣ | VPA,TPM,  CNZ,PB | PHT | Refractory | Severe,Ataxia |
|  | 22/M | C.3128del A/  p.K1043fsX1047 | De novo | 5y7m/2y2m | 7m | 4m | 6/12 | (s)GTCS,HC,CPS,  aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM,  CNZ | ﹣ | Reduction | Moderate,Ataxia,  ADHD |
|  | 25/M | c.3710delT/p.F1237fsX54 | De novo | 3y2m/2y | 3m | 11m | 6/9 | (s)GTCS,CPS,aAS |  | GSW+FSW | ﹣ | VPA,PB | ﹣ | Refractory | Mild |
|  | 27/F | c.4162G>T/p.Glu1388X | De novo | 2y/10m | 3m | 1y2m | 6/2 | (s)GTCS,CPS |  | GSW+FSW | ﹣ | VPA,PB | ﹣ | Reduction | Mild |
|  | **DS-C** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 5/F | c.664C>T/p.R222X | De novo | 6y8m/5y3m | 3m | 4m | 24/20 | (s)GTCS,CPS,Myo  ，aAS | ﹣ | GSW+FSW | ﹣ | TPM,CNZ | CBZ | Refractory | Moderate |
|  | 6/M | c.840G>A/p.W280X | De novo | 10y/4y11m | 5m | 7m | 12/12 | (s)GTCS,HC,CPS,  Myo,aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,CNZ,PB | LTG,OXC | Refractory | Moderate,Ataxia,  ADHD |
|  | 33/M | C.5280\_5281 delTG/ p.V1760fsX1793 | De novo | 2y9m/1y8m | 5m | 6.5m | 12/24 | (s)GTCS,HC,CPS,  Myo,aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM,LEV | LTG,OXC | Reduction | Moderate,Ataxia |
|  | 36/M | C.5540-5541ins.CCAG/ p.H1849fs1861X | De novo | 4y/3y | 1y5m | 5.5m | 12/36 | (s)GTCS,CPS,Myo  ，aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹢ | VPA,TPM | CBZ | Refractory | Profound,Autism  ，Ataxia |
|  | 37/M | C.5621\_5622delGG/ p.R1784fsX1944 | De novo | 4y/2y6m | 5m | 6m | 20/28 | (s)GTCS,HC,CPS,  Myo,aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM, CNZ | OXC,CBZ | Refractory | Profound,Autism  ，Ataxia |
|  | 38/M | c.5734C>T/p.R1912X | De novo | 2y6m/1y3m | 6m | 12m | 6/6 | (s)GTCS,HC,Myo,  aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | VPA | ﹣ | Reduction | Moderate |
|  | **DS-C** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **3'UTR** | 39/M | c.1794C>T | Maternal | 6y/1y6m | 1m | 5m | 18/48 | (s)GTCS,HC,Myo,  aAS | ﹢ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM, CNZ | ﹣ | Reduction | Severe,Autism,A taxia |
|  | **DS-B** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 41/F | Exon16dup (162bp) | De novo | 4y4m/3y3m | 6m | 1y1m | 3/6 | (s)GTCS | ﹣ | FSW | ﹣ | VPA,TPM | ﹣ | Reduction | Moderate,Ataxia |
| **Genomic arrang.** | **DS-C** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 40/F | Exon1-15 del | De novo | 8y5m/3y9m | 6m | 1y3m | 6/12 | (s)GTCS,CPSMyo | ﹣ | GSW+FSW | ﹣ | VPA,TPM, CNZ,PB | ﹣ | Reduction | Moderate |

55

**附表11** **. 服用钠通道阻滞型AEDs的*SCN1A*阳性PEFS+患者服药情况及药物反应一览表**

| Pat. No | Age at follow up | SCB  type | Age at beginning of SCB | EEG  Before SCB | Seizure types before SCB | Add on/ mono therapy | Associated AEDs | SCB  Onset dose (mg/kg/d) | Max SCB dose (mg/kg/d) | Duration of SCB treatment | Follow-up after SCB  discontinuation | Improved seizures | Aggravated seizures | Appearance of new seizures | Overall SCB effect |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 7.5 | 30 | 3.5m | 3.5y | No |  |  |  |
| 2 | 1y1m | OXC | 1y | FSW | CPS,sGTCS | Add on | VPA |  |  |  |  |  | sGTCS | No | Aggravation |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 8.6 | 22.5 | 4m | 3y | No |  |  |  |
| 3 | 7m | OXC | 8m | F sharp | HC,GTCS | Mono | ﹣ |  |  |  |  |  | GTCS | No | Aggravation |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 5.6 | 25.9 | 4m | 2y | No |  |  |  |
| 4 | 3y2m | OXC | 2y7m | FSW | sGTCS | Add on | VPA,LEV,PB |  |  |  |  |  | sGTCS | CPS | Aggravation |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 0.15 | 2 | 4.5m | 6y | No |  |  |  |
| 7 | 2y8m | LTG | 6y8m | FSW | sGTCS(FS) | Add on | VPA |  |  |  |  |  | SGTCS (aFS) | No | Aggravation |
|  |  | CBZ | 8y4m | FSW | sGTCS | Add on | VPA | 4 | 20 | 3y | 5y | No | sGTCS | No | Aggravation |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 8 | 28 | 5m | 2y | No |  |  |  |
| 8 | 5y4m | OXC | 7y | FSW | CPS | Add on | VPA |  |  |  |  |  | No | No | No change |
| 9 | 8m | LTG | 9m | F sharp | sGTCS,CPS | Add on | VPA | 0.14 | 4.2 | 3.5m | 2.5y | No | CPS | No | Aggravation |
| 11 | 1y1m | LTG | 2y6m | F sharp | sGTCS,CPS | Add on | VPA,TPM,CNZ | 0.15 | 2.9 | 12.5m | 2.5y | No | No | No | No change |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 0.3g/d | 0.9g/d | 10m | 2y | No |  |  |  |
| 12 | 27y | OXC | 27y | FSW | sGTCS,CPS,SPS | Mono | ﹣ |  |  |  |  |  | CPS | No | Aggravation |
| 13 | 3y3m | OXC | 4y | F sharp | CPS | Add on | VPA | 7.3 | 24 | 6m | 3y | No | No | No | No change |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 0.1g/d | 0.5g/d | 5m | 1.5y | No |  |  |  |
| 15 | 8y | CBZ | 18y | FSW | sGTCS | Mono | ﹣ |  |  |  |  |  | No | No | No change |
| 19 | 5y6m | CBZ | 5y6m | FSW | sGTCS | Add on | VPA,TPM | 4 | 13 | 4m | 1y | No | No | No | No change |
| 20 | 5y1m | LTG | 6y11m | FSW | sGTCS | Add on | TPM | 0.3 | 8 | 13m | 4y | No | sGTCS | sGTCS | Aggravation |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 3.7 | 15 | 6m | 2y | No |  |  |  |
|  |  | CBZ | 9y5m | FSW | sGTCS | Add on | VPA |  |  |  |  |  | sGTCS | sGTCSE | Aggravation |
|  |  | PHT | 10y | F sharp | CPS,sGTCS | Add on | TPM | 5 | 8.3 | 5m | 1.5y | No | sGTCS,CPS | CPSE | Aggravation |
| 23 | 5y4m | PHT | 1y4m | FSW | HC,GTCS | Add on | CNZ | 4 | 6.7 | 4m | 6y | No | GTCS | No | Aggravation |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 0.15 | 2.5 | 3m | 6.5y | No |  |  |  |
|  |  | LTG | 1y10m | FSW | HC,GTCS | Add on | VPA,CNZ |  |  |  |  |  | No | Myoclonic | Aggravation |
| 25 | 7y1m | CBZ | 6y6m | FSW | CPS,sGTCS | Add on | VPA | 5 | 19 | 4m | 2y | No | No | No | No change |
|  |  | LTG | 7y | FSW | CPS,sGTCS | Add on | VPA,CNZ | 0.13 | 3.9 | 6.5m | 2.5y | No | sGTCS | No | Aggravation |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 0.2 | 3.6 | 5.5m | 5y | No |  |  |  |
| 26 | 1y3m | LTG | 3y | FSW | CPS,sGTCS | Add on | VPA,LEV,CNZ,TPM |  |  |  |  |  | sGTCS | No | Aggravation |

AEDs, anti-epileptic drugs; SCB, sodium channel blocking

56

致**谢**

**衷心感谢我最敬爱的导师廖卫平教授。感谢您一直以来对我的指导、鼓励和鞭策！三年的时间转瞬即逝，您的谆谆教诲却历历在目！忘不了您伏案于电脑桌前一丝不苟地指导我写作的身影，忘不了您恨铁不成钢的苛责，更忘不了您看到学生有所进步时欣喜的笑容……所有的这些都将永远鞭策我在成长道路上不断前进！**

**衷心感谢易咏红教授慈母般的关怀，那一刻的幸福与感动我将永远铭记于**

**心！**

**感谢刘晓蓉教授和黎冰梅教授在我人生路上对我的指导和帮助，谢谢您们！ 感谢实验室石奕武、龙跃生、苏涛、汤斌和曾扬等各位老师在实验过程及论**

**文写作中给予我的全力支持和帮助。感谢何娜、孟珩、民福利、邱国真、徐海清、万瑞平、闫丽敏、魏峰、孙晓利、曾敏怡、蔡秀曲、王超、李斌、华立栋、范翠、吴婕等各位师兄师姐、师弟师妹在学习和工作中给予我的帮助和支持。**

**感谢我的爱人对我的支持、呵护和牵挂，和我一起分担实验的失败、工作的挫折、生活的失落！感谢我的爸爸妈妈，焉得谖草，言树之背，养育之恩，无以回报，你们永远健康快乐是我最大的心愿！**

**在论文即将完成之际，我的心情无法平静，从开始进入课题到论文的顺利完成，有多少可敬的师长、同学、朋友给了我无言的帮助，在这里请接受我诚挚的谢意！谨以此文，献给所有关心和帮助过我的亲人、同学和朋友们！**

57

**攻读学位期间论文发表及获奖情况**

**【论文发表】**

1. **Lu Yu (余璐)**, Wei-Ping Liao, Yong-Hong Yi, Guozhen Qiu. ABCB1 G2677T/A polymorphism is associated with the risk of drug-resistant epilepsy in Asians. ***Epliepsy res***. 2015. (Accepted)

2. **Yu Lu (余璐)**, Yi-Wu Shi, Mei-Mei Gao, Bing-Mei Li, Wei-Yi Deng, Na He,

Xiao-Rong Liu, Heng Meng, Yong-Hong Yi and Wei-Ping Liao. Spectrum of SCN1A Mutations in Chinese Patients with Febrile Seizures Related Epilepsy. ***Epilepsia***.2013;54 (Suppl 3) 197-198.

3. Meng H, Xu HQ, **Yu L(余璐)**, Lin GW, He N, Su T, Shi YW, Li B, Liu XR, Tang

B, Long YS, Yi YH, Liao WP. The SCN1A mutation database: updated information and analysis of the relationships among genotype, function, and phenotype. ***Human Mutation***.2015. [ doi: 10.1002/humu.22782]

4. Huang DH, Zheng JO, Chen J, **Yu L(余璐)**. Treatment gaps of epilepsy and

Retention rates of sodium valproate in rural Guangxi, China. ***Genet Mol Res***. 2014;13(3):6202-12.

5. Zhou Q, Zheng J, **Yu L(余璐)**, Jia X. Pregabalin monotherapy for epilepsy.

***Cochrane Database Syst Rev***. 2012; 10: CD009429.

6.**余璐**，何娜，刘晓蓉，黎冰梅，徐海清、石奕武，高玫梅，易咏红，廖卫平. 热性惊厥相关癫痫患者抗癫痫药物治疗疗效及与电压依赖性钠通道α1亚基基因突变的关系.2014.**中华神经科杂志**.47: 516-522.

**【获奖情况】**

2013年6月，获ILAE" Travel Bursary Award“赴加拿大蒙特利尔参加第30届国际癫痫大会。

**【参加国际学术会议】**

1. **Lu Yu(余璐),** Yi-Wu Shi, Mei-Mei Gao, Bing-Mei Li, Wei-Yi Deng, Na He, Xiao-Rong Liu, Heng Meng, Yong-Hong Yi and Wei-Ping Liao. Spectrum of SCN1A Mutations in Chinese Patients with Febrile Seizures Related Epilepsy (the 30th

58

International Epilepsy Congress, 23th–27th June, 2013. Montreal, Canada. Invited poster presentation)

2. **Lu Yu(余璐)**, Yi-Wu Shi, Mei-Mei Gao, Bing-Mei Li, Wei-Yi Deng, Na He,

Xiao-Rong Liu, Heng Meng, Yong-Hong Yi and Wei-Ping Liao. Partial epilepsy with antecedent febrile seizures associated with SCN1A mutation and seizure aggravation induced by sodium channel blocking AEDs. (The 10th Asian and Oceanian Epilepsy Congress, 7th-10th August, 2014. Singapore. Invited poster presentation)

59

**学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1．交回学校授予的学位证书；

2．学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3．本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。

4．本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名：日期：年月日

**学位论文知识产权权属声明**

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医学院及附属单位。广州医学院及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医学院及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他任何方式传播，否则，引起有碍作者的著作权益问题，将会追究相应的法律责任。

论文作者签名：日期：年月日

导师签名：日期：年月日

**关于学位论文使用授权的说明**

1、学校可以保留本论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文；

2、本人授权学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。

论文作者签名：日期：年月日

导师签名：日期：年月日

60