

文章编号 1006-8147(2018)06-0552-04

经验交流

腓骨肌萎缩症患者基因突变研究

屈金辉, 白雪, 官士珍, 黄海晶, 王毅
(天津市天津医院检验科, 天津 300211)

关键词 腓骨肌萎缩症; MLPA 技术; PMP22 大片段重复变异; 碱基替换
中图分类号 R394 文献标志码 B

腓骨肌萎缩症 (Charcot-Marie-Tooth, CMT) 是最常见的遗传性周围神经病, 具有高度临床变异性和遗传异质性。发病率在人群中为 1/2 500^[1]。此病可累及运动及感觉神经, 故临床常表现为进行性远端肌无力和肌萎缩、感觉减退, 又称为遗传性运动感觉性神经病 (hereditary moter and sensory neuropathy HMSN)^[2]。该病在幼儿期及青少年期最容易发病。肌无力和肌萎缩最先出现在肢体远端, 这与其最先累及长的、粗的神经纤维有关, 可出现不同程度足畸形, 进而进展累及上肢及四肢近端, 影响四肢的运动功能。我院近期收治 2 例疑似病例, 经基因检测并结合临床症状确诊为 CMTI 型和 CMTII 型, 现就这 2 例的基因型及临床特征做一探讨。

1 资料与方法

1.1 病例资料 患者 I: 男性, 15 岁, 因双侧高弓足畸形 5 年余, 逐渐加重 1 年余入院。患者于入院前 5 年余发现双足高弓足畸形, 在我院门诊就诊, 于入院前 1 年发现高弓足畸形明显加重, 且出现行走疼痛, 再次于我院门诊就诊, 本次入院准备行畸形矫正术。查体: 体温 36.4 °C, 脉搏 88 次/min, 呼吸 23 次/min, 血压 125/68 mmHg。神志清楚, 查体合作。心、肺、骨盆和脊柱阴性, 双足高弓足畸形, 仰趾畸形, 跖趾关节跖侧胼胝形成, 双侧胫前及胫后肌群肌力正常, 足趾活动、感觉及血运好, 足背动脉搏动可触及。

患者于入院后完善各项术前检查。影像显示: 双侧高弓足畸形。左右跟骨轴位显示其跟骨骨质形态完整, 骨皮质连续, 周围软组织内未见明显异常密度影。实验室检查: 血尿常规、生化免疫常规及凝血常规均未提示异常。肌电图示: 上下肢周围神经源性损害(运动感觉纤维受累, 髓鞘损害为重, 四肢 SSR 异常)。患者的父亲及祖父均具有双侧高弓足畸形, 并且均存在脊柱侧弯症状。患者母亲未见异

常。诊断此患者疑似腓骨肌萎缩症 CMTI 型, 建议做 CMT 基因筛查。

患者 II: 男, 24 岁, 以下肢为重的肢体远端肌肉萎缩和无力 1 年, 中度感觉障碍。肌电图检查可见, 神经传导速度轻度减慢, 巨大运动单元电位、纤颤电位和正锐波, 轴突变性。进行了 CMT 基因筛查。由于患者未住院进一步诊治, 未做其他检查。患者 II 是否有家族史不清楚。

1.2 基因检测

1.2.1 标本采集及 DNA 提取 采集患者及其父母的外周静脉血 2 mL, EDTA 抗凝。使用 AxyPrep 血基因组试剂盒提取基因组 DNA, NanoDrop2000 核酸定量分析仪检测 DNA 浓度及纯度, 放置 -80 °C 保存备用。所有研究对象均签署知情同意书。

1.2.2 基因检测方法 采用多重连接探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 主要检测 17 号染色体短臂 1 区 2 带 (17p12) 上的大片段重复变异 (包括 PMP22 基因), 荧光信号强度介于 0.7 到 1.33 之间认定为正常, 重复变异的荧光信号强度高于 1.33。本试剂盒中 17p12 区域 (针对范围) 上的基因有 PMP22、TEKT3、COX10、ELAC2, 其中 DRC3 (别名 LRRRC48) 是在 17p11.2 区域上, 而 ELAC2、DRC3 均在 CMT1 区域范围外。同时采用二代测序检测 + 一代验证的模式, 筛选了与此疾病相关的基因包括 DYNC1H1、MA RS、MFN2、MPZ、KIF1B、LITAF、GJB1 等基因变异, 基因检测由北京康旭医学检验所有限公司完成。

2 结果

2.1 患者 I 家系基因检测 MLPA 检测发现患者 I 染色体 17p12 区域大片段重复变异 (包括 PMP22 基因), 见图 1。患者 I 其父染色体 17p12 区域大片段重复变异 (包括 PMP22 基因), 见图 2。未发现患者 I 其母染色体 17p12 区域大片段重复变异 (包括 PMP22 基因), 见图 3。

作者简介 屈金辉 (1985-), 女, 检验医师, 硕士, 研究方向: 实验诊断学; 通信作者: 王毅, E-mail: 13820209817@163.com。

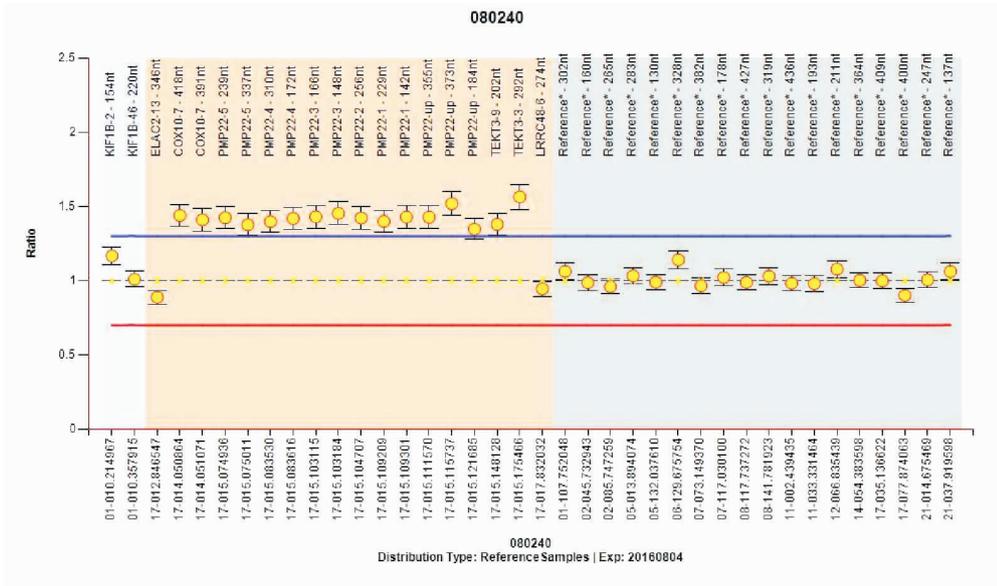


图 1 受检者 IDNA 测序结果

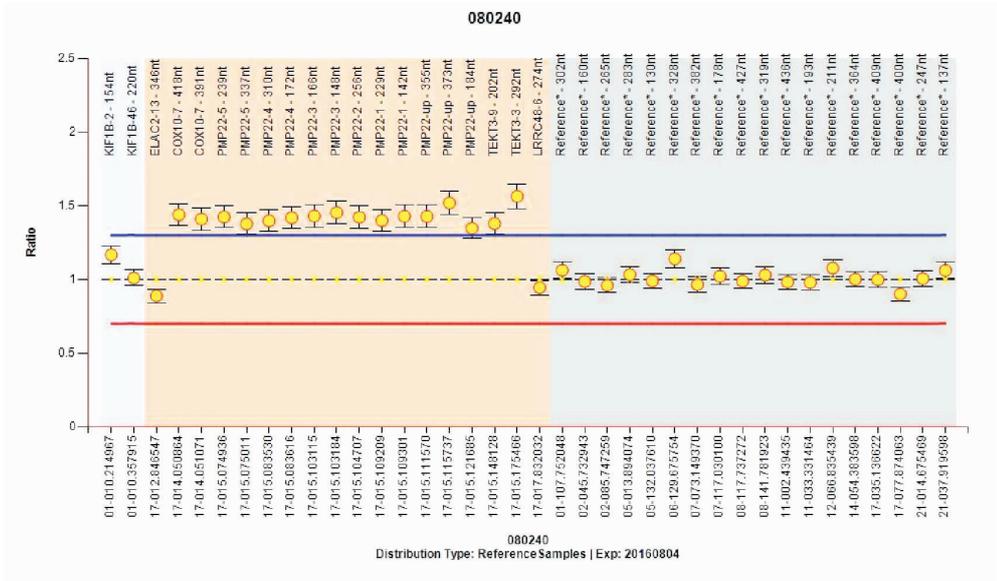


图 2 受检者 I 其父 DNA 测序结果



图 3 受检者 I 其母 DNA 测序结果

2.2 患者 II 基因检测 MLPA 检测未发现患者 II 染色体 17p12 区域大片段重复变异(包括 PMP22 基因),见图 4。通过二代测序检测及一代测序

证发现患者 II 基因 *DYNC1H1* c.10198-4C>A 和基因 *MARS* c.238C>T 的杂合核苷酸变异,测序图见图 5。

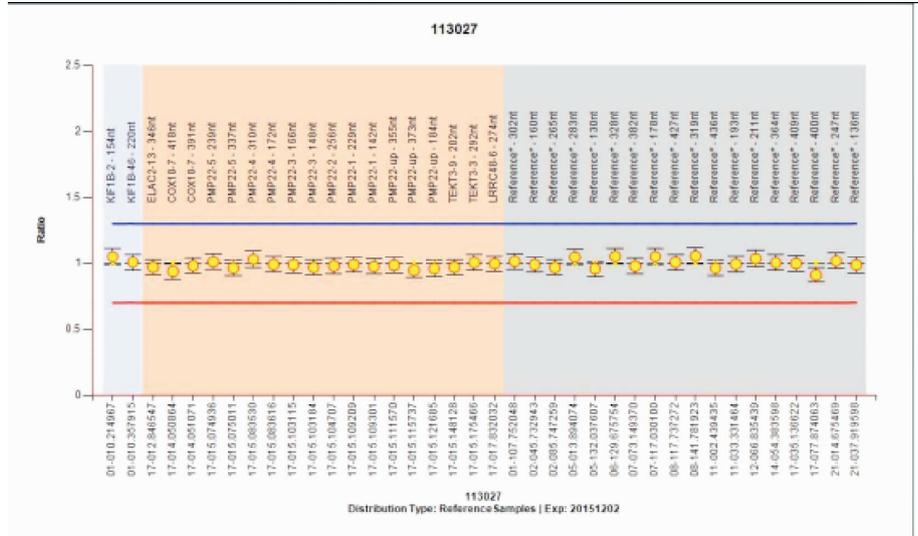


图 4 受检者 II DNA 测序结果

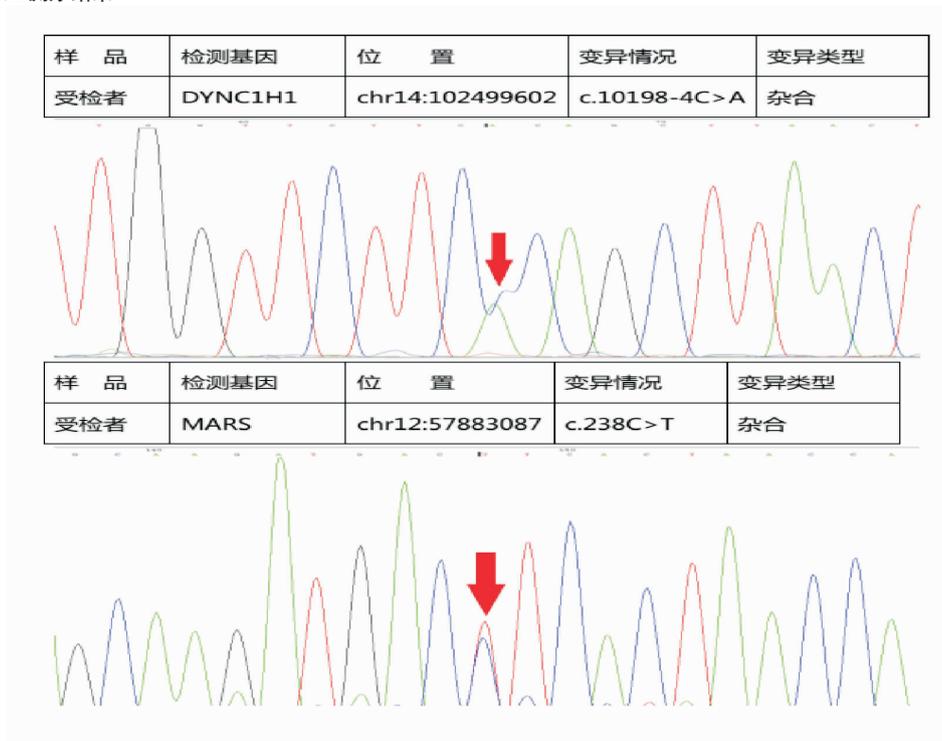


图 5 受检者 II DNA 变异结果

3 讨论

CMT 是一种常见的外周神经退行性遗传病,它的遗传方式包括常染色体显性遗传(Autosomal dominant, AD)、常染色体隐性遗传(Autosomal recessive, AR) 和 X 连锁显性和隐性遗传(X-linked dominant/recessive, XD/XR)。根据运动神经传导速度(Motor nerve conduction velocity, MNCV) 和复合肌肉

动作电位振幅可将该病分为 3 种类型:即脱髓鞘型、轴突型和中间型。脱髓鞘型除了神经活检示显著的髓鞘异常外,患者上、下肢 MNCV 低于正常值;轴突型神经活检示轴突变性,而 MNCV 未见异常变化或轻度减慢;中间型神经活检兼有脱髓鞘及轴索变性^[3]。另外,根据遗传方式和神经病变的不同,将 CMT 分为:脱髓鞘型(也称 CMTI),起病较早,平均年

龄为10岁;轴突型(也称CMTII),起病较晚,平均年龄为23.9岁^[4]。本例患者I 10岁发病,运动、感觉传导速度减慢,髓鞘损害严重,符合CMTI型。患者II 23岁发病,以下肢为重的肢体远端肌肉萎缩和无力,神经传导速度轻度减慢,纤颤电位和正锐波,轴突变性,符合CMTII型。

人类外周髓鞘蛋白基因22(PMP22)的1.5Mb正向串联重复突变导致过量表达使Schwann细胞增殖减少,临床上表现为CMT1A型。PMP22基因重复突变导致的CMT1A为CMTI最常见的亚型^[5]。据报道,70%以上无血缘关系的CMT1家系及90%以上的散发患者多由17p11.2-12区(包含PMP22基因)的1.5Mb的正向串联重复突变所致,针对CMT1A型患者在该区域的断裂点设计特定引物进行扩增,再进行酶切获得特异性酶切片断即可诊断为基因重复异常^[6-7]。

MLPA技术主要用于基因的重复和缺失检测。本研究采用MLPA的探针主要针对17号染色体短臂1区2带(17p12)上的PMP22基因变异情况而设计。采用二代测序+一代测序(Sanger测序)验证的模式,筛选了与此疾病相关的包括DYNC1H1、MARS、MFN2、MPZ、KIF1B、LITAF、GJB1等在内的基因突变,涉及疾病包括:腓骨肌萎缩症、痉挛性截瘫、周围神经病变和先天性无痛无汗症等。涵盖了CMTI、CMTII、CMTX和CMT4型的主要致病基因,分别为PMP22、KIF1B、GJB1和GDAP1。测序发现了患者I及其父亲染色体17p12区域大片段重复变异(包括PMP22基因),未发现受检者母亲染色体17p12区域大片段重复变异,说明患者I致病基因来源于其父亲的遗传,符合常染色体显性遗传的特点。患者I其他筛选基因未见异常突变。在患者II

的基因检测中未发现PMP22基因的重复变异,非CMTI型。但发现了2个基因的碱基替换:基因DYNC1H1 c.10198-4C>A和基因MARS c.238C>T的杂合核苷酸变异,前者为剪切突变,后者为错义突变,不属于多态性变异,在人群中发现的频率极低,均可导致蛋白质功能受到影响,前者为CMT2O型的致病基因,后者为CMT2U型的致病基因,均为CMTII型的亚型,均为常染色体显性遗传方式,这种遗传方式的杂合变异可能导致发病。但患者II是否有家族史不清楚,还需通过其父母基因检测来验证。患者II的其他筛选基因亦未见异常突变。

目前CMT尚无有效的治疗手段,主要是对症和支持疗法。由于本病病程进展缓慢,及时诊断和治疗可延缓疾病的发展,提高患者的生活质量。另外,基因检测对于患者的确诊、遗传咨询及优生优育具有重要的临床价值,值得推广应用。

参考文献:

- [1] 李旭宁.59例中国汉族患者临床、电生理和分子遗传学特征[D].湖南:中南大学湘雅三院,2013
- [2] 侯池.儿童腓骨肌萎缩症功能障碍评估及遗传学研究[D].首都医科大学,2014
- [3] Rossor A M, Polke J M, Houlden H, et al. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2013, 9(10):562
- [4] 许焯,张嘉莹,杨博宇.腓骨肌萎缩症4型遗传学研究进展[J]. *遗传*, 2015, 37(6):502
- [5] 郭司文,安英俊,李平.腓骨肌萎缩症导致呼吸衰竭1例[J]. *中国实用医药*, 2016, 11(24):215
- [6] 刘灵月.24例儿童腓骨肌萎缩症的临床回顾性分析[D].重庆:重庆医科大学,2016
- [7] Tazir M, Hamadouche T, Nouioua S, et al. Hereditary motor and sensory neuropathies or Charcot-Marie-Tooth diseases: An update[J]. *J Neurol Sci*, 2014, 347(1/2):14

(2017-08-05 收稿)