

一排骨肌萎缩症家系临床及基因分析

陈祖芝¹, 梅文丽², 尹昌林¹, 张彦¹, 张永辉¹, 陈俞余¹

1. 陆军军医大学第一附属医院重症医学科(原第三军医大学第一附属医院), 重庆市 400038

2. 郑州大学人民医院神经电生理科, 河南省郑州市 450003

摘要: **目的** 分析一排骨肌萎缩症家系的临床表现及不同基因检测方法的特点。 **方法** 收集一 CMT 家系 8 名成员临床资料, 并应用等位基因特异性 PCR - 双酶切方法及多重连接依赖的探针扩增技术 (MLPA) 检测 PMP22 基因突变情况, 同时选择 60 名性别、年龄无明显差异的健康人做为对照组。 **结果** 该家系中患病者以行走不稳、跨阈步态, 伴有弓形足为主要临床表现。该家系中 5 名成员经等位基因特异性 PCR - 双酶切及 MLPA 方法均检测出 PMP22 基因重复序列, 其中出现临床症状的有 4 名 (II 3、II 9、II 11、III 7), 未出现临床症状但基因检测结果示 PMP22 基因重复序列的为携带者有 1 名 (III 5), 家系中余 3 名成员及对照组 60 名均未见重复序列。 **结论** 基因检测在明确 CMT 诊断中起重要作用, 且 MLPA 法筛查基因时操作更简便、灵敏度更高、特异性更好。

关键词: 排骨肌萎缩症; PMP22 基因重复突变; PCR - 双酶切法; 多重连接依赖的探针扩增法; 临床表现

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.01.013

Clinical and genetic analyses of a family of Charcot-Marie-Tooth disease

CHEN Zu-Zhi¹, MEI Wen-Li², YIN Chang-Lin¹, ZHANG Yan¹, ZHANG Yong-Hui¹, CHEN Yu-Yu¹. 1. Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Electrophysiology Method, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: CHEN Yu-Yu, E-mail: 15893818552@163.com

Abstract: Objective To investigate the clinical manifestations of a family of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease and the features of different gene detection methods. **Methods** Related clinical data were collected from 8 members of a family of CMT disease, and allele-specific PCR/double-enzyme digestion and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) were used to detect PMP22 gene mutation. A total of 60 healthy volunteers with no significant differences in sex and age were enrolled as control group. **Results** Ataxia, steppage gait, and clawfoot were the major clinical manifestations in this family. Five members of this family were found to have repeated sequence in the PMP22 gene by allele-specific PCR/double-enzyme digestion, among whom four members had clinical symptoms (II3, II9, II11, and III7) and one (III5) had no clinical symptoms but was found to carry repeated sequence in the PMP22 gene by gene detection. No repeated sequence was observed in the other three members and the control group. **Conclusions** Gene detection has an important value in clarifying the diagnosis of CMT disease, and MLPA for gene screening has the advantages of convenient and simple operation, high sensitivity, and good specificity.

Key words: Charcot-Marie-Tooth disease; PMP22 repeat mutation; polymerase chain reaction-double enzymedigestion; multiplex ligation-dependent probe amplification; clinical manifestation

排骨肌萎缩症 (Charcot-Marie-Tooth, CMT) 是具有高度的临床和遗传异质性的周围神经病变之一, 最早于 1886 年首先报道, 发病率 1/2500^[1]。而其中 CMT1A 型是由于 PMP22 重复突变导致过度编码蛋白, 从临床表现方面, 主要表现为进行性

肢体远端无力、双下肢肌肉萎缩、手脚畸形、远端肢体感觉障碍。从遗传学方面, CMT 常见遗传方式为常染色体显性遗传, 少数是常染色体隐性遗传、X - 性连锁显性遗传以及 X - 性连锁隐性遗传^[2]。既往研究中报道超过 70 个基因与 CMT 疾

收稿日期: 2019 - 08 - 30; 修回日期: 2019 - 12 - 03

作者简介: 陈祖芝 (1990 -), 女, 硕士, 主要从事重症神经遗传病的研究。

通信作者: 陈俞余 (1987 -), 女, 本科, 主要从事重症神经遗传病的研究。E-mail: 15893818552@163.com。

病相关^[3]。本研究为在我院收集一家系患者相关资料,并用 PCR-双酶切方法(Polymerase Chain Reaction-double enzyme digestion)及多重连接依赖的探针扩增技术(multiples ligation dependent probe amplification, MLPA)检测等不同的基因检测方法确诊为 CMT1A 家系。

1 研究对象及方法

1.1 研究对象

该家系共 4 代共 5 例发病者,均来自郑州,并同时收集 60 例性别、年龄与该家系无明显差异的健康人作为对照。所有研究对象的纳入标准参考 Dyck1993^[4]。其家系图见图 1。

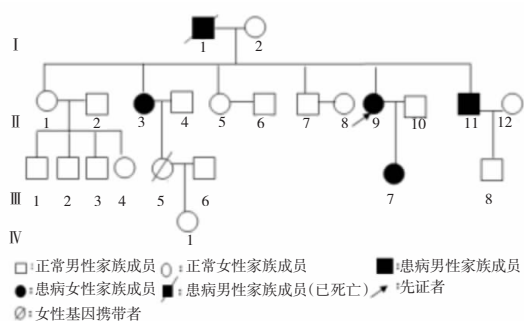


图 1 家系图

1.2 收集标本

收集该家系 8 名成员(因客观因素只收集到该家系的 8 名成员,其中包括 5 例发病者)和 60 名对照组成员的外周血液标本各 5 mL。

1.3 PCR-双酶切法

引物由生工生物工程股份有限公司合成。引物设计原理见[Kon-Ping Lin2006]^[5]。引物名称分别是 F1、R1、F2、R2;序列分别为 5'-TTGGAT TCAAAGATATTAGTGTAT-3';5'-TAGTAGAGCTCACTCT ACAG-3';5'-TTGGATTACAGAGACATTAGTTAC-3';5'-TAGTAGAGTGAGTACAGTGGAC-3。

取血液标本 5 ml,运用血液基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。50 μ L PCR 反应体系中分别加入 DNA 5 μ L, dNTPs 5 μ L, 2XGC BufferI 25 μ L, TaqDNA 多聚酶 0.5 μ L, F1 和 R2 各 2.5 μ L, 加灭菌水至 50 μ L。循环参数:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 PCR 产物 10 μ L, 分别加 buffer3.1 2.5 μ L, EcoRI 0.5 μ L, NsiI 1 μ L, 灭菌水 6 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切过夜, 80 $^{\circ}$ C 失活 3 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 同时参照 2 000 bp Marker 相对分子质量标准, 1 760 bp 条带为特异性酶切片段, 有此片段可诊断为 PMP22 基因重复。

1.4 多重连接依赖探针扩增法

1.4.1 变性、杂交

1.4.2 连接 上下游杂交探针彼此相邻, 由热稳定的连接酶连接。

1.4.3 PCR 所有连接产物均由同一对引物进行 PCR 扩增。

1.4.4 毛细管电泳分析扩增产物 通过与对照 DNA 标本比较相同片段长度峰高的不同来确定目标序列的对拷贝数变化。

2 结果

2.1 临床资料

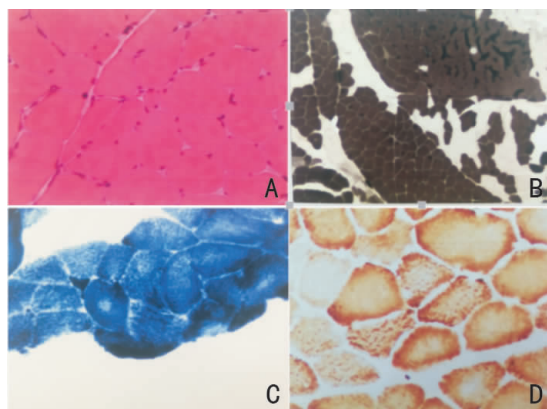
患者 II9(先证者)现 52 岁,自幼有弓形足,平素易疲劳,30 岁时逐渐出现行走不稳,呈跨阈步态;双下肢自觉无力,表现为上楼梯需扶扶手。患者 II3 现 62 岁,自幼有弓形足,40 岁出现行走不稳,逐渐加重,现已无法行走。

患者 II11 和 III7 自幼体育较差,且有弓形足,上下楼梯时呈跨阈步态。患者 I1 自幼有弓形足,现已故,死因不详。

体格检查:所有患者均有弓形足,双下肢腱反射消失或减弱,双上肢腱反射对称存在,均无感觉障碍、无肌肉萎缩、无自主神经功能障碍。

2.2 肌肉病理活检结果

该家系中先证者的腓肠肌病理活检结果提示神经源性肌病(图 2)。而该家系中其余成员因经济原因未同意进行此检查。

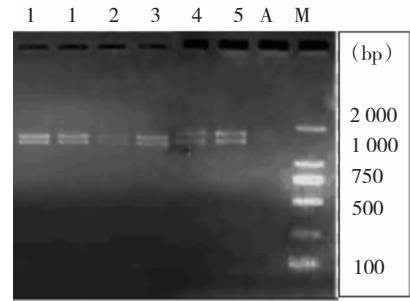


注:A:HE \times 200,腓肠肌肉活检组织 2 块,部分肌纤维肥大,散在小角化肌纤维;B:ATP4.35 \times 40, I 型肌纤维多于 II 型肌纤维,小角化纤维以 II 型为主,同型肌纤维群组化分布可见;C:NADH \times 200,小角化肌纤维浓染,个别肌纤维可见中央轴空;未见靶纤维或靶样纤维;D:COX,部分肌纤维胞浆染色不均匀,呈颗粒状

图 2 先证者的腓肠肌病理活检图

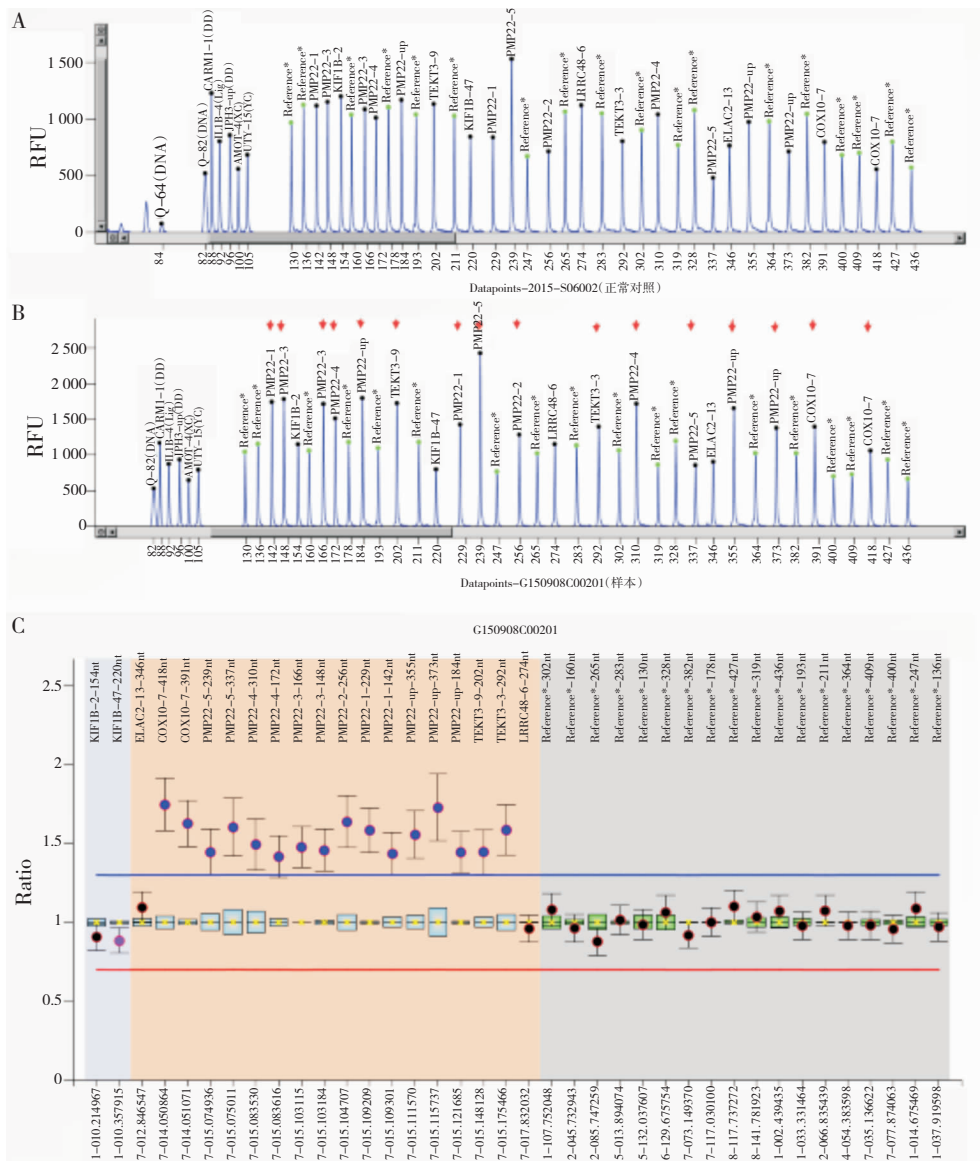
2.3 遗传分子学结果

该家系 8 名成员运用 PCR - 双酶切法检测出 5 名成员有 PMP22 基因的重复突变 (即 1 760 bp 片段) (图 3), 其中出现临床症状的有 4 名成员 (Ⅱ 3、Ⅱ 9、Ⅱ 11、Ⅲ 7), 其基因携带者有 1 名 (Ⅲ 5)。该家系 8 名成员运用 MLPA 方法筛查出 5 名成员 (Ⅱ 3、Ⅱ 9、Ⅱ 11、Ⅲ 5、Ⅲ 7) PMP22 基因区域发生基因拷贝数增加, 存在重复突变序列 (图 4)。运用 PCR - 双酶切方法及 MLPA 方法检测该家系基因突变结果是一致的。



注:1,2,3,4,5 为 PMP22 基因序列重复者;
A 为正常对照;M 为 DNA Marker DL2000

图 3 PCR - 双酶切法检测 PMP22 基因的重复突变



注:A:正常对照者;B:该家系的先证者;C:通常认定荧光信号强度介于 0.75 - 1.25 之间为正常。MLPA 提示 PMP22 基因区域检测到基因拷贝数增高, 存在重复突变

图 4 MLPA 方法筛查 PMP22 基因的重复突变

2.4 神经电生理检查结果

该家系中 4 例患者(Ⅱ3、Ⅱ9、Ⅱ11、Ⅲ7)双侧正中神经运动神经传导速度平均 19 m/s,均 <38 m/s,感觉神经传导速度均无波形;双胫后神经、腓总神经运动传导潜伏时延长、速度明显减慢、波幅低,双腓肠神经感觉传导未引出;右胫后神经 F 波、双下肢 H 反射未引出;双胫前肌、腓肠肌内头、股直肌肌电图静息期未见异常自发电位,胫前肌 MUAP 时限宽,主动收缩募集减少,股直肌 MUAP 时限正常,主动收缩募集正常。1 例基因携带者(Ⅲ5)双侧正中神经运动神经传导速度 25 m/s、感觉神经传导速度均无波形。60 例对照组成员神经传导和肌电图均未见明显异常。

3 讨论

CMT 是一组常见的具有临床和遗传异质性的周围神经遗传病,大多数在儿童期或青春期发病,少数发病在成年后^[6]。该家系中所有患病者均在儿童期开始发病,表现为出现弓形足畸形,这符合既往文献报道内容。CMT 病程通常在 20~30 年,甚至更长周期,且下肢症状较上肢症状出现得早、程度更严重^[7]。主要临床表现为进行性、对称性肢体远端无力和肌肉萎缩,而该家系患者主要表现双下肢无力,行走不稳,呈“跨阈步态”,伴弓形足畸形,均未见明显的肌肉萎缩(如未见典型“鹤腿”、“香槟腿”),这与国内外文献报道有一定差异,这可能是 CMT 相对少见的临床表现型,在临床上应重视,有必要时进行基因筛查,从而明确诊断^[8]。该家系患者今后是否出现“鹤腿”或“香槟腿”,还需我们长期随访。

初步根据先证者临床表现、肌肉神经病理检查结果及电生理特点考虑为 CMT1 型,故运用 PCR-双酶切及 MLPA 方法检测 PMP22 基因重复突变情况,结果发现先证者 PMP22 基因存在重复突变。同时对家系中其余 7 名成员运用上述两种基因检测法进行该基因筛查,检测出余 4 名成员存在

PMP22 基因重复突变序列,其中 1 名为携带者,余 3 名成员及 60 名健康人均未发现异常重复突变序列。上述两种基因检测方法检测基因突变结果是一致的,但相比较 MLPA 方法更具有优势:操作简便、灵敏度高、特异性好、精确度高、重复性强,而传统的 PCR-双酶切法实验操作时易受 DNA 标本浓度、引物浓度、PCR 条件及酶切温度等影响,故在临床中条件具备者尽量选择 MLPA 方法筛查 CMT1 型的 PMP22 基因重复突变情况。

参 考 文 献

- [1] Braathen GJ. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease [J]. Acta Neurol Scand Suppl, 2012, (193): iv-22.
- [2] Shin JS, Chung KW, Cho SY, et al. NEFL Pro22 Arg mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 [J]. J Hum Genet, 2008, 53(10): 936-940.
- [3] Rossor AM, Polke JM, Houlden H, et al. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease [J]. Nat Rev Neurol, 2013, 9(10): 562-571.
- [4] Dyck PJ, Chance P, Lebo R, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy [M]. Philadelphia: WB Saunders, 1993, 1094-1132.
- [5] Lin KP, Chou CH, Lee HY, et al. Allele-specific all-or-none PCR product diagnostic strategy for Charcot-Marie-Tooth 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies [J]. J Chin Med Assoc, 2006, 69(2): 68-73.
- [6] Jani-Acsadi A, Krajewski K, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth neuropathies: diagnosis and management [J]. Semin Neurol, 2008, 28(2): 185-194.
- [7] Colomban C, Micallef J, Lefebvre MN, et al. Clinical spectrum and gender differences in a large cohort of Charcot-Marie-Tooth type 1A patients [J]. J Neurol Sci, 2014, 336(1): 155-160.
- [8] Jones EA, Brewer MH, Srinivasan R, et al. Distal enhancers upstream of the Charcot-Marie-Tooth type 1A disease gene PMP22 [J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(7): 1581-1591.