



电子、语音版

· 论 著 ·

## TWNK 基因突变致慢性眼外肌麻痹一家系的临床及遗传学分析

李楠, 胡静, 赵哲, 沈宏锐, 郝琪, 郭璇

河北医科大学第三医院神经内科二病区(神经肌肉病科), 河北 石家庄 050000

**摘 要:**慢性进行性眼外肌麻痹是线粒体病的一种表型,以上睑下垂或眼球活动障碍为特征。该文报道一个 TWNK 基因突变导致的线粒体病家系的临床和遗传学分析。先证者为 32 岁女性,因“双眼睑下垂 10 余年”就诊于河北医科大学第三医院神经肌肉病科,仅表现为眼睑下垂、轻度眼外肌麻痹。临床诊断为“慢性进行性眼外肌麻痹”。其家族中也存在类似病例。为明确致病基因,对先证者进行高通量测序及致病变异筛查。根据临床表型与基因测序结果,确定了 TWNK 基因的一个杂合突变位点(c.1411T>G, p.Y417D)作为候选致病基因。进一步采用 Sanger 测序法对先证者及其家系成员进行验证,确认了该突变位点的存在。根据美国医学遗传学与基因组学学会遗传变异分类标准与指南,该变异判定为致病变异(PVS1+PM2+PP3),且该位点在国内尚无报道。该研究不仅拓展了 TWNK 基因的变异谱,还为线粒体病家系的遗传咨询与分子诊断提供了参考依据。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2024, 51(3): 18-21]

**关键词:**眼外肌麻痹;常染色体显性遗传;TWNK 基因;线粒体病

中图分类号:R746

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2024.03.003

### Clinical and genetic analyses of a family with chronic external ophthalmoplegia due to TWNK gene mutation

LI Nan, HU Jing, ZHAO Zhe, SHEN Hongrui, BING Qi, GUO Xuan

Second Ward of Neurology Department (Department of Neuromuscular Disease), The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China

Corresponding author: HU Jing, Email: jinghu5510@163.com

**Abstract:** Chronic progressive external ophthalmoplegia is a phenotype of mitochondrial disease and is mainly characterized by ptosis or eyeball movement disorder. This article reports the clinical and genetic analyses of a family with mitochondrial disease due to TWNK gene mutation. The proband was a woman aged 32 years, and she attended Department of Neuromuscular Disease, The Third Hospital of Hebei Medical University, due to blepharoptosis of both eyes for more than 10 years, with the manifestations of blepharoptosis and mild external ophthalmoplegia. She was diagnosed with chronic progressive external ophthalmoplegia, and similar cases were observed in her family. High-throughput sequencing and pathogenic mutation screening were performed for the proband to identify the pathogenic gene, and based on the clinical phenotype and sequencing results, the heterozygous mutation site (c.1411T>G, p.Y417D) of the TWNK gene was identified as a candidate pathogenic gene. Furthermore, Sanger sequencing was used for the validation of the proband and her family members, and the results confirmed the existence of this mutation site. According to the American College of Medical Genetics and Genomics guidelines, this mutation was determined as a pathogenic mutation (PS1+PM2+PP3), with no previous reports in China. This study further expands the spectrum of TWNK gene mutations and provides a reference for the genetic counseling and molecular diagnosis of families with mitochondrial disease.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2024, 51(3): 18-21]

收稿日期:2023-10-05;修回日期:2024-02-21

作者简介:李楠(1985—),女,博士,主要从事神经肌肉病及相关疾病的研究。Email:nannan19850305@126.com。

通信作者:胡静(1963—),博士,河北医科大学神经病学学术带头人。Email:jinghu5510@163.com。

**Keywords:** external ophthalmoplegia; autosomal dominant inheritance; *TWINK* gene; mitochondrial diseases

慢性进行性外眼肌麻痹(chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO)是线粒体病的一种表型,以上睑下垂或眼球活动障碍为特征。线粒体病是由线粒体脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)自身突变或维持线粒体DNA完整性和稳定性的核基因的致病性突变所导致的。致病基因可分为线粒体基因和线粒体相关核基因,遗传方式包括母系遗传、孟德尔遗传及散发性遗传<sup>[1-2]</sup>。本研究对一个包含10例表现出眼睑下垂特征的常染色体显性遗传家系进行了临床与遗传学分析,揭示了*TWINK*基因的杂合突变为该家族遗传性眼睑下垂的主要病因。这一发现不仅让我们深入理解了该疾病的遗传机制,同时也为临床诊断提供了帮助。

## 1 研究对象

先证者,女,32岁。因“双眼睑下垂10余年”就诊于河北医科大学第三医院神经肌肉病科。患者10余年前无明显诱因出现双眼睑下垂,用力睁眼时双眼睑不能完全抬起,无明显复视。自觉晨起时症状稍减轻。无吞咽费力、饮水呛咳、肢体活动无力等情况,病情缓慢进展,自觉双眼较前变小,需仰头视物。曾于眼科就诊,查眼眶CT、

胸腺CT、眼眶磁共振成像、新斯的明试验等未发现异常来诊。

体格检查:双眼睑下垂,眼裂3 mm。双眼球左视不到位,余各方向活动度基本到位。余神经系统检查未见明显阳性体征。疲劳试验阴性。

辅助检查:血常规、红细胞沉降率、术前8项检查未见异常;肝肾功能、空腹血糖、甲状腺功能未见异常;重症肌无力相关抗体阴性;肌电图未见神经源性或肌源性损害;重复电刺激未见低频递减或高频递增。

入院后再次进行新斯的明试验,未见症状减轻或加重,双下肢骨骼肌磁共振成像未见明显异常。胸部CT未见胸腺异常改变。病程中患者曾口服溴比斯的明1个月,症状无明显变化。

先证者的母亲、胞姐、外祖母、姨母及表兄等也有类似表现,家系图见图1。家系中先证者症状最重,出现眼睑下垂时间较早,其胞姐症状较轻,仅劳累后出现视物成双。

本研究获河北医科大学第三医院医学伦理委员会批准(W2020-035-1)。

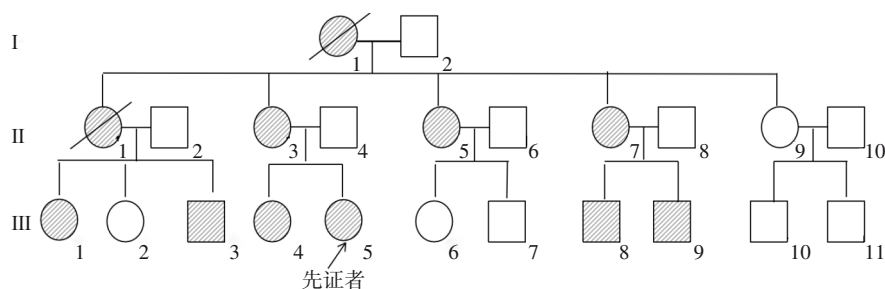


图1 家系图

## 2 研究方法

### 2.1 骨骼肌病理检查

患者签署知情同意后,使用2%利多卡因局部浸润麻醉,进行开放式肱二头肌活检,标本经液氮迅速冷冻固定,7 μm冷冻连续切片备用。组织化学染色:苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、改良 Gomori 三原色(modified Gomori trichrome stain, MGT)染色、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)染色、细胞色素C氧化酶(cytochrome c oxidase, COX)染色、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸四氮唑还原酶(reduced nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase, NADH+TR)染色。

### 2.2 线粒体病基因测序

线粒体病相关基因高通量测序委托北京迈基诺医学检验所完成。其主要步骤为:取先证者活检骨骼肌组织,

由DNA提取试剂盒提取DNA,并进行质检,靶向性捕获线粒体环基因全长及相关核基因的外显子及其比邻20个碱基区域,构建高通量测序文库。采用Illumina NovaSeq测序平台进行高通量测序,所得测序数据经过质控,对所得数据进行去杂及筛选,得到可疑的致病位点,进行致病性和保守性预测,结合患者临床表现进行分析、筛选。根据美国医学遗传学和基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)分类指南<sup>[3]</sup>,选出可能的变异位点。

### 2.3 Sanger测序验证及致病性分析

对家系中能参与研究的成员进行一代验证,包括II 3、II 4、II 5、II 7、II 9及III 4等6位成员,对*TWINK*基因2号外显子及邻近内含子片段进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,正向引物序列5' -

CCAACAGGCAGTGGAAAGAC, 反向引物序列 5'-AAATCCCTGGGCTCAAGTGA。扩增程序: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 10 s, 65℃退火 20 s, 72℃延伸 20 s, 10 个循环; 94℃变性 10 s, 55℃退火 20 s, 72℃延伸 20 s, 25 个循环; 72℃最终延伸 5 min。PCR 完成后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。对 PCR 产物进行回收和纯化后, 使用 ABI 3730 测序仪进行测序分析。采用 Chromas 2.0 进行对比分析。在 HGMD、ClinVar、1000 Genomes、ExAC 等数据库中明确目标变异位点的收录情况, 并应用 ACMG 指南进

行致病性分析。

### 3 结果

#### 3.1 骨骼肌病理结果

肌纤维直径范围在 80~100 μm, 偶见变性肌纤维, 未见典型坏死肌纤维, 结缔组织大致正常。NADH 染色酶活性正常, SDH 染色散在破碎红纤维 (ragged red muscle fiber, RRF), RRF 在 COX 染色中显示酶活性消失。腺苷三磷酸环化酶反应正常, 慢肌纤维和快肌纤维分布正常, 肌纤维中糖、脂成分未见异常。见图 2。

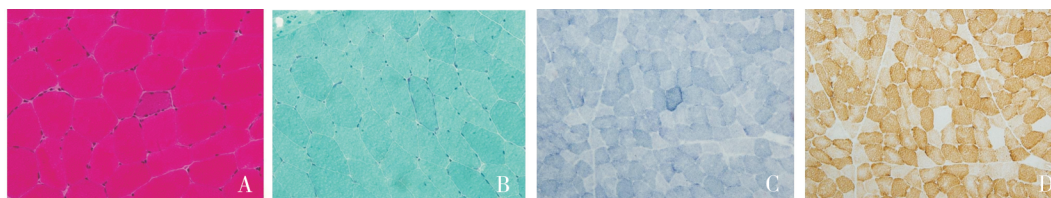


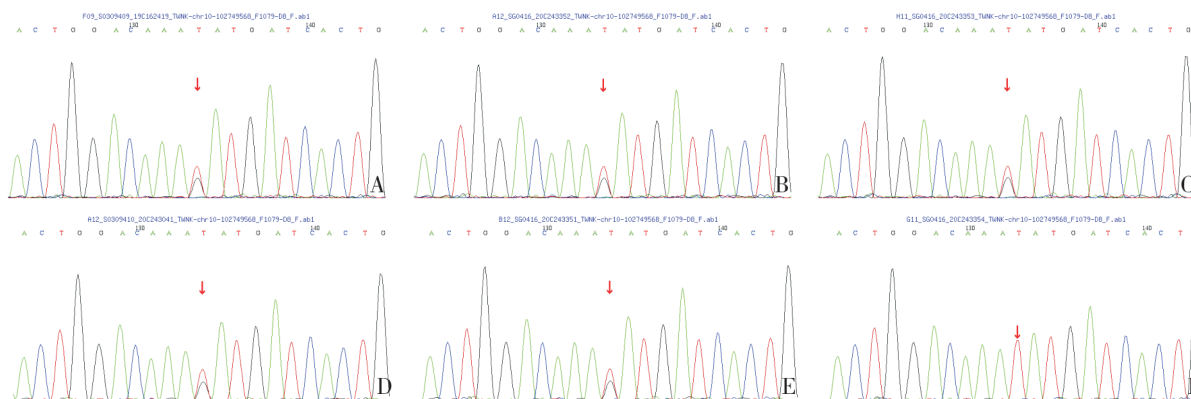
图 2 骨骼肌活体组织检查病理染色  
A: HE 染色 RRF 肌纤维膜下呈深紫红染 (×200); B: MGT 染色中, 肌纤维胞浆被大小不等、不均匀分布的紫红色颗粒填充, 肌膜下似有紫红色边缘 (×200); C: SDH 染色肌膜下线粒体聚集, 酶活性增高, 肌纤维周边呈深蓝紫染, 边界不规则, 胞浆中颗粒粗糙, 较非 RRF 胞浆深染 (×100); D: COX 染色中酶活性缺失, 不着色 (×100)。

图 2 骨骼肌活体组织检查病理染色

#### 3.2 高通量测序及 Sanger 测序结果

先证者 (Ⅲ5) 目标外显子组测序目标区域平均测序深度为 90X, 其中目标序列的 95% 测序深度达 20X 以上,

发现了 *TWNK* 基因 c.1411T>G (p.Y471D) 杂合错义突变。家庭成员 Ⅱ3、Ⅱ5、Ⅱ7 及 Ⅲ4 均存在相同基因突变, Ⅱ9 未发现该基因突变。见图 3。



A 为先证者; B~F 分别为家庭成员 Ⅱ3、Ⅱ5、Ⅱ7、Ⅲ4、Ⅱ9。箭头所指为突变位点。

图 3 *TWNK* 基因 Sanger 测序结果

#### 3.3 致病性分析

*TWNK* 基因 c.1411T>G (p.Y471D) 杂合错义突变, 文献数据库已有该位点的相关性报道<sup>[4]</sup>, 是 1 个强的致病性证据, 同时该突变存在 2 个中等的致病性证据 (位于 *TWNK* 基因的解旋酶结构域, 编辑蛋白的重要功能结构域; 在正常人群数据库中频率为 0); 3 个支持性致病证据 (突变与疾病呈家系共分离; PolyPhen\_2、MutationTaster、SIFT、GERP+ 多项计算机模拟预测有害; 突变相关疾病与

患者临床表型高度符合), 根据 ACMG 遗传变异分类标准与指南判定 c.1411T>G (p.Y471D) 为致病性变异 (PS1+PM2+PP3)。

### 4 讨论

*TWNK* 基因大小约 77 kDa, 含有 684 个氨基酸, 其 N 端具有线粒体靶向序列, 编码线粒体内呈六聚体样结构的 twinkle 蛋白, 具有 5'-3' DNA 解旋酶的功能, 是 mtDNA 复制的关键酶, 由通过连接区连接的引物酶结构域和解



旋酶结构域组成。引物酶结构域的突变会影响腺苷三磷酸酶的活性,是单链DNA与解旋酶的耦结合障碍,影响mtDNA的复制<sup>[5]</sup>。连接区的突变会破坏单个解旋酶亚基的自由旋转度,单体六聚化功能障碍,降低腺苷三磷酸水解能力,影响DNA解旋酶活性<sup>[6]</sup>。解旋酶结构域的突变除了影响解旋酶活性本身外,还影响DNA聚合酶的活性从而致病<sup>[7]</sup>。

*TWINK* 基因突变临床表现多样,轻重不一,包括常染色体隐性线粒体耗竭综合征7(肝脑型)、Perrault综合征、常染色体显性进行性眼外肌麻痹<sup>[8]</sup>。临床表现的多样性主要源于基因突变引起的不同蛋白功能障碍类型。体外实验已明确显示,异常非活化单体的过度表达会导致mtDNA(线粒体DNA)复制过程的中断,dsDNA(双链DNA)合成受到阻碍,以及异常复制中间体<sup>[9]</sup>的累积。这些发现为我们理解CPEO的常染色体显性遗传机制提供了基本解释。同时,其他两种临床表型则主要归因于twinkle蛋白功能在突变后受到严重损害的影响<sup>[10]</sup>。既往文献报道,*TWINK* 基因 c.1411T>G(p.Y471D)位点突变患者临床呈眼外肌麻痹合并颈肌、四肢近端肌无力,以及构音、吞咽障碍等咽喉肌受累表现,临床症状相对严重<sup>[4]</sup>。本文报道的家系患者临床症状相对较轻,仅表现为眼睑下垂、轻度眼外肌麻痹。导致临床症状轻重不一可能与该位点突变所位于的解旋酶结构域不同,不同个体DNA结合酶的活性差异,不同人种的各肌肉组织中twinkle蛋白的表达不同等有关。

与CPEO相鉴别的疾病主要包括以下几种:①以眼部症状为主的重症肌无力,两者在起病方式、病程演变、相关抗体以及电生理等方面存在差异,可与CPEO相鉴别。②先天性肌无力综合征,其致病基因复杂,常见的有*COLQ*、*LRP4*、*Dok-7*等。两者均具有广泛的临床异质性。先天性肌无力综合征最常见的是眼外肌和其他面肌,以及肢带肌和呼吸肌受累,临床表现轻重不一<sup>[11-12]</sup>。与CPEO临床表现类似,且疲劳试验阴性、存在高肌酸激酶血症及COX染色阴性等的患者,鉴别诊断的关键是重复电刺激,基因检测是明确诊断的重要手段<sup>[13]</sup>。③眼咽型肌营养不良,该病同样呈常显遗传,常见的致病基因为*PABPN1*,以眼睑下垂、吞咽困难为主要表现,骨骼肌活检可明确鉴别诊断:肌营养不良病理表现及边缘空泡的存在,提示眼咽型肌营养不良;以线粒体功能障碍为主,则提示CPEO。

综上所述,详细的病史、准确的体格检查,以及电生理、影像、病理检查为诊断及鉴别诊断提供了依据。骨骼肌活检是诊断CPEO的重要手段,其可发现线粒体相关的病理表现(RRF、COX染色缺失、慢性肌病表现等)。基因检测可为最终诊断提供充足的证据。

## 参 考 文 献

- [1] EL-HATTAB AW, CRAIGEN WJ, SCAGLIA F. Mitochondrial DNA maintenance defects[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(6): 1539-1555.
- [2] PETER B, FALKENBERG M. TWINKLE and other human mitochondrial DNA helicases: structure, function and disease[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(4): 408.
- [3] LI MM, DATTO M, DUNCAVAGE EJ, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the association for molecular pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists[J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(1): 4-23.
- [4] BERMEJO-GUERRERO L, DE FUENMAYOR-FERNÁNDEZ DE LA HOZ CP, SERRANO-LORENZO P, et al. Clinical, histological, and genetic features of 25 patients with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia (ad-PEO)/PEO-plus due to *TWINK* mutations[J]. *J Clin Med*, 2021, 11(1): 22.
- [5] HOLMLUND T, FARGE G, PANDE V, et al. Structure-function defects of the twinkle amino-terminal region in progressive external ophthalmoplegia[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(2): 132-139.
- [6] ARIZA A, RICHARD DJ, WHITE MF, et al. Conformational flexibility revealed by the crystal structure of a crenarchaeal Rad A[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(5): 1465-1473.
- [7] LEE SJ, MARINTCHEVA B, HAMDAN SM, et al. The C-terminal residues of bacteriophage T7 gene 4 helicase-primase coordinate helicase and DNA polymerase activities[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(35): 25841-25849.
- [8] 陈子慧,唐少华,李焕铮,等. 一个Perrault综合征家系*TWINK*基因的变异分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(7): 739-742.
- [9] GOFFART S, COOPER HM, TYNNISMAA H, et al. Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and *in vivo* mtDNA replication stalling[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(2): 328-340.
- [10] SARZI E, GOFFART S, SERRE V, et al. Twinkle helicase (PEO1) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion[J]. *Ann Neurol*, 2007, 62(6): 579-587.
- [11] CIAFALONI E. Myasthenia gravis and congenital myasthenic syndromes[J]. *Continuum (Minneapolis)*, 2019, 25(6): 1767-1784.
- [12] ENGEL AG, SHEN XM, SELCEN D, et al. Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(5): 461.
- [13] OSTOS F, ALCANTARA MIRANDA P, HERNÁNDEZ-LAÍN A, et al. Congenital ophthalmoplegia and late-onset limb weakness caused by *MuSK* mutations[J]. *J Clin Neuromuscul Dis*, 2020, 21(4): 222-224.

责任编辑:龚学民