

• 论 著 •

多重连接探针扩增技术对 1 个假肥大型中国汉族肌营养不良症家系的遗传学研究*

杨佳良¹, 罗怀超^{1,2}, 马 誓¹, 郝 芳¹, 朱世凯³, 周 玉^{1△}

(1. 电子科技大学附属四川省人民医院检验科, 成都 610072; 2. 泸州医学院临床检验系, 四川泸州 646000; 3. 电子科技大学附属四川省人民医院器官移植中心, 成都 610072)

摘 要:目的 拟通过多重连接探针扩增技术 (MLPA) 对 1 个假肥大型进行性肌营养不良 (DMD) 家系进行检测以明确 DMD 的诊断, 结合患者临床表现进行分析并对 MLPA 技术用于 DMD 临床诊断进行探讨。方法 收集 1 个 DMD 患者家系, 该家系共 12 人, 男性患者 2 例。分离外周血并提取 DNA, 用 MLPA 的方法对其进行基因诊断。结果 先证者符合 DMD 诊断。基因检测提示先证者和其弟弟携带抗肌萎缩蛋白基因缺失突变 DMD (Exon3-11)。先证者母亲为致病基因携带者。结论 通过 MLPA 检查技术明确了一个中国汉族 DMD 家系的致病基因, MLPA 技术能够用于 DMD 疾病的诊断。

关键词:假肥大型肌营养不良; 家系; 基因分析; 多重连接探针扩增技术; 抗肌萎缩蛋白基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.12.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)12-1624-03

Genetic study of Duchenne Muscular Dystrophy in a Chinese family by Multiplex ligation dependent probe amplification technique*

YANG Jialiang¹, LUO Huaichao^{1,2}, MA Shi¹, HAO Fang¹, ZHU Shikai³, ZHOU Yu^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Sichuan Provincial People's Hospital Affiliated to University of Electronic Science and Technology, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. Inspection Department, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. Organ Transplant Center, Sichuan Provincial People's Hospital Affiliated to University of Electronic Science and Technology, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: Objective To diagnosis for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) in a pedigree by multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA), and to analyze on the basis of clinical manifestations, to explore the application value of MLPA technology in diagnosis for DMD. **Methods** A pedigree of DMD patients were recruited in this study, 12 person in this pedigree including 2 DMD patients. All the person in this pedigree were isolated peripheral blood and extracted DNA, conducted genetic diagnosis using MLPA. **Results** The proband was confirmed as a DMD patients. Genetic testing prompted the proband and his brother carrying dystrophin gene deletion mutation DMD (Exon3-11). Proband's mother was pathogenic gene carrier. **Conclusion** The disease gene is confirmed in a pedigree with DMD by MLPA, and MLPA technique could be used to diagnose DMD disease.

Key words: Duchenne Muscular Dystrophy; pedigree; gene analysis; multiplex ligation dependent probe amplification; dystrophin gene

假肥大型进行性肌营养不良 (DMD) 为 X-连锁隐性遗传性肌肉疾病, 男性多发, 女性多为致病基因的携带者。阳性患者的特点为进行性对称性肌无力, Gower 征阳性, 腓肠肌假性肥大。一般 5 岁前发病, 6 岁后出现行走困难, 13 岁丧失行走能力而依靠轮椅生活, 20 岁左右因心力衰竭而死亡。根据目前的研究, DMD 发病多与遗传因素有关。多重连接探针扩增技术 (MLPA) 于 2002 年由 Schouten 等首先报道, 是近几年发展起来的一种针对 DNA 序列进行定性和半定量分析的新技术。该技术高效、特异, 在一次反应中可以检测 45 个核苷酸序列拷贝数的改变, 目前已经应用于多个领域、多种疾病的研究。近年来报道 DMD 是位于 X 染色体短臂 Xp21 的抗肌萎缩蛋白基因 (又称 dystrophin 基因、DMD 基因) 突变所致。目前, 在众多确定与肌营养不良发生有关的致病基因中, 抗肌萎缩蛋白基因备受关注。它是目前已知的人类最长的基因, 包括 79 个外显子。根据国外报道, 其主要突变类型为基因部分缺失, 占全部

突变类型的 60%~65%^[1-3]。本研究对一个 DMD 家系采用多重连接基因探针扩增技术进行基因诊断和临床研究, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2015 年四川省人民医院临床初诊为 DMD 的先证者和此家系其他成员, 共 3 代 12 人。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 在征得先证者及家属知情同意后, 采集 5% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝静脉血, -80℃ 保存, 用试剂盒提取 DNA, -20℃ 保存待用。选择健康男性对照, 健康女性对照, 且对照均无心脏病、肌无力、肌萎缩和血清肌酶升高, 无遗传病家族史。家庭成员需签署知情同意书。

1.2.2 检测方法 (1) 对所有研究对象进行外周血 DNA 的提取。(2) MLPA 的方法对先证者及家系成员进行基因突变的研究和分析。MLPA 即探针与靶序列 DNA 杂交, 之后通过

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81400437)。

作者简介: 杨家良, 女, 硕士研究生, 主要从事遗传学研究。△ 通讯作者, Email: zhouyu422@yahoo.com。

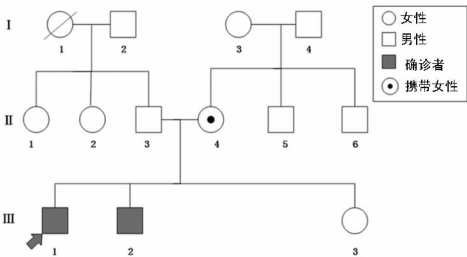
连接,PCR 扩增,产物通过毛细管电泳及数据收集进行分析最后得出结论。通过每个探针的相对峰值比(RPR)来判断标本 DMD 目的片段的拷贝数。正常: $0.7 < RPR < 1.3$;缺失: $RPR < 0.7$;重复: $RPR > 1.3$ 。Coffalyser9.4 软件分析扫描数据得到柱形图。对于单个外显子缺失的情况,要用 PCR 和测序对其进行验证。

1.3 治疗与随访 对通过基因诊断确诊的患者进行适当的治疗和随访。

1.4 统计学处理 Coffalyser9.4 软件进行数据处理及统计分析。

2 结 果

2.1 患者及家系 该家系来自四川省,家系图见图 1,该家系中共有 12 人(不含先证者)。先证者的弟弟 1993 年 2 月出生,也出现双下肢无力,双侧腓肠肌代偿性肥大,于当地医院诊断为 DMD。另外先证者的妹妹 2004 年出生,未出现 DMD 的临床表现。DMD 的病因和发病机制复杂多变,结合该家系的特点,可归纳如下:(1)多在男性身上发病,且多在 5 岁前发病;(2)首发症状通常会表现为行走慢、足尖着地、登梯困难、不能正常跑步,容易跌倒;肌无力自躯干和四肢近端开始缓慢进展,下肢重于上肢;步态呈鸭步;攀登起立征(Gower 征)阳性,为本病特征性表现;(3)随着病情的进一步发展,近端肌肉有所萎缩,腓肠肌代偿性肥大;(4)晚期患者的四肢、躯干、肩部肌肉均见明显萎缩,最后因呼吸肌萎缩而出现呼吸困难、咳嗽无力,心律失常等,多在 25~30 岁以前死于呼吸道感染、心力衰竭或消耗性疾病。(5)辅助检查:实验室检查较特征性的改变为显著升高的血清肌酸激酶(CK)水平,患儿出生后其 CK 水平即可显著升高,随年龄的增长而逐渐上升,最高可达正常上限的 100 倍以上,到疾病中后期,因大部分肌纤维已被破坏,CK 水平则逐渐下降。



注:箭头所示为先证者。

图 1 家系图

2.2 临床资料 先证者,男,24 岁,因“呼吸困难,双下肢乏力”入院,血压 135/64 mm Hg,脉搏 121 次/分,呼吸 18 次/分,平车推入病房,呼叫睁眼,不发音,四肢迟缓。头颅五官无畸形,全身皮肤黏膜无黄染,浅表淋巴结无肿大,巩膜无黄染,双侧瞳孔等大等圆,对光反射灵敏。颈软,无抵抗,颈静脉无充盈怒张,已行气管切开术,人工气道通畅,甲状腺未扪及肿大,胸廓漏斗状,听诊双肺呼吸音清晰,未闻及湿啰音及哮鸣音。心界不大,心率 121 次/分,律齐,各瓣膜区听诊未闻及病理性杂音,全腹平软,无压痛,无肌紧张及反跳痛,肝脾肋下未触及,未触及包块,肝颈静脉回流征(一),移动性浊音(一),膀胱叩诊(一),肠鸣音无增强及减弱。已行导尿管,尿管在位、通畅,双下肢无水肿。四肢肌力 0 级,生理反射及病理反射均未引出。

先证者经心肺复苏后,因缺血缺氧性脑病于 2015 年 5 月 25 日死亡,死亡年龄 24 岁。

2.3 DNA 序列分析 先证者Ⅲ-1 和家系成员Ⅲ-2、Ⅱ-4 均携带抗肌萎缩蛋白基因缺失突变 DMD(Exon3-11),见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。从图中可以看出携带该基因缺失突变的男性外显子 DMD(3-11)全部缺失,其母亲因为有两条 X 染色体而表现出约 50%的缺失。每个探针的 RPR 见表 3,所有患者在外显子 3-11 的 RPR 都为 0,表明这些区域完全缺失并表现出 DMD 的典型临床症状。其母亲为携带者,RPR 在 0.5 左右,并不表现出 DMD 的典型临床表现。其他成员及正常男性和女性 RPR 在 0.7~1.3 为正常,未检出携带此突变。

表 3 MLPA 探针的 RPR

外显子缺失序号及缺失 RPR	先证者	Ⅲ-2	Ⅱ-4	女性健康对照	男性健康对照
DMD3	0	0	0.51	0.94	1.00
DMD4	0	0	0.60	1.03	1.27
DMD5	0	0	0.59	1.10	1.20
DMD6	0	0	0.67	1.16	1.00
DMD7	0	0	0.63	1.16	1.00
DMD8	0	0	0.59	1.07	1.04
DMD9	0	0	0.57	0.93	1.00
DMD10	0	0	0.56	0.97	1.00
DMD11	0	0	0.76	1.00	1.14

注:MLPA 显示家系中先证者Ⅲ-1,以及家系成员Ⅲ-2、Ⅱ-4 均携带抗肌萎缩蛋白基因缺失突变 DMD 外显子(3~11),其他家系成员及健康男女对照均未发现此突变。

3 讨 论

DMD 是最常见的一类 X 连锁隐性遗传病,以进行性肌营养不良症为主要临床表现。主要是男性发病,女性为致病基因的携带者。本病的发生是由于编码抗肌萎缩蛋白基因的突变所引起,该基因位于 X 染色体 p21 上,是人体最大的基因,长达 2.3 Mb,含 79 个外显子,79 个内含子,编码约 14×10^3 的 RNA,翻译产物为抗肌萎缩蛋白,它于肌细胞膜脂质中,对稳定细胞膜、防止细胞坏死自溶起重要作用。定量分析表示,DMD 患者肌细胞内抗肌萎缩蛋白近乎完全缺失,故该病通常 5 岁左右发病,肌进行性萎缩,预后差。没有切实有效的临床治疗方法。有约 1/3 病例为散发,没有家族史,是由基因新突变造成。

本研究通过 MLPA 的方法对 1 例 DMD 家系进行抗肌萎缩蛋白基因的全外显子检测,发现其母为 DMD 外显子 3~11 缺失突变携带者,其所生两个儿子也都为 DMD 外显子(3~11)基因缺失,并有典型的 DMD 临床表现,在本医院通过基因分析和一系列临床检查确诊为 DMD 患者。其女并未检出基因突变,也没有 DMD 的典型临床症状及实验检查结果。

张晓^[4]提出本病无明显种族和地域的差异。但杜青^[5]则通过单链构象多态性分析(SSCP)筛查确诊患者第 48 号外显子存在明显的异常,而提出中国人种 DMD 疾病的基因突变位点可能和外国种族存在着区别。而本研究通过 MLPA 的方法

对 DMD 家系进行抗肌萎缩蛋白基因的全外显子研究,发现其母为 DMD 外显子 3~11 缺失突变携带者,其所生两个儿子也为 DMD 外显子(3~11)基因缺失,并有典型的 DMD 临床表现,在本医院通过基因分析和一系列临床检查确诊为 DMD 患者,且先证者因心肺复苏术后,缺血缺氧性脑病于 2015 年 5 月 25 日死亡,死亡年龄 24 岁。先证者妹妹并未检出基因突变,也没有 DMD 的典型临床及实验检查的表现,也没有发现 48 号外显子的突变。正如目前已知的抗肌萎缩蛋白基因突变类型中最为常见的为缺失,存在 2 个缺失热区。一个位于中央区域,多包括 45~55 号外显子,另一个缺失热区位于基因的 5' 端,多包括 2~20 号外显子^[6-7]。而本研究显示 3~11 号外显子丢失,符合上诉者的 5' 端的缺失热点区。上述两个缺失热区中的外显子缺失约占全部缺失突变的 98%。有研究显示于 1~20 号外显子,21~40 号外显子,41~60 号外显子,61~79 号外显子上的点突变率分别为 30.4%、30.4%、24.6% 及 14.5%^[8]。所以,DMD 发病的表现形式及基因突变的位置因人而异,在检测 DMD 时只检测热点区域,或只查其中的一种突变是不够的。

目前检测 DMD 的方法主要有 Southern 印迹杂交、DMD 基因多重 PCR、短串联重复序列 PCR 及反转录 PCR。Chamberlain 等^[9]设计了 9 对引物(针对外显子 4、8、12、17、19、44、45、48、51)的 PCR;Beggs 等^[10]增设了另外 9 对引物(针对外显子 3、6、13、43、47、50、52、60、49),这 18 对引物可检出大部分的 DMD 基因缺失患者。但这种方法不能检测 DMD 基因缺失型和重复型杂合子携带者。而 MLPA 技术可以全面地检测抗肌萎缩蛋白基因 79 个外显子的全部缺失和重复突变。该方法灵敏、特异,广泛用于 DMD 患者和携带者的检测^[11-13]。但 MLPA 也有其自身的缺点,即邻近探针连接位点的微小突变或多态会影响探针杂交及连接,导致扩增失败;MLPA 也无法检测出 X 染色体的平衡易位及抗肌萎缩蛋白基因内的微小突变^[14]。因此对于单个外显子缺失的情况,要用 PCR 和测序对其进行验证。但对于 DMD 的诊断还应结合临床表现、病理肌电、实验室检查等综合地来诊断该病。由于该病尚无更好的治疗方法,所以切实有效的产前诊断和遗传咨询显得尤为必要。

该家系中其母亲为致病基因的携带者,而其所生两个儿子均患 DMD,且临床表现非常典型;进行性对称性肌无力和腓肠肌代偿性肿大。肌电图、肌肉病理及实验室的检查都符合 DMD 的诊断,与 MLPA 所得结果是一致的。且先证者的妹妹用 MLPA 的方法没有检测到基因突变,其也没有 DMD 的临床表现,这更好地说明了 MLPA 是一种可以用于临床 DMD 诊断和产前筛查的简单、灵敏、特异的方法。正如上面所说 MLPA 也有其自身局限性。所以期待更多的家系报道,基因位点和突变类型的报导及基因相关功能的研究,更多的诊断及治疗方法被发现,为 DMD 的预防、诊断和治疗开拓新篇章。

参考文献

- [1] Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes[J]. *Lancet Neurol*, 2003, 2(12): 731-740.
- [2] Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy[J]. *J*

Mol Diagn, 2005, 7(3): 317-326.

- [3] Hu XY, Ray PN, Murphy EG, et al. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype/genotype correlation[J]. *Am J Hum Genet*, 1990, 46(4): 682-695.
- [4] 张晓. 假肥大型肌营养不良症 7 例临床特征分析[J]. *中国社区医师(医学专业)*, 2011, 13(278): 133.
- [5] 杜青. 一个中国家系假肥大型肌营养不良相关基因 dystrophin 的突变位点的检测[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [6] Lai PS, Takeshima Y, Adachi K, et al. Comparative study on deletions of the dystrophin gene in three Asian populations[J]. *J Hum Genet*, 2002, 47(10): 552-555.
- [7] Danieli GA, Mioni F, Müller CR, et al. Patterns of deletions of the dystrophin gene in different European populations[J]. *Hum Genet*, 1993, 91(4): 342-346.
- [8] Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y, et al. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center[J]. *J Hum Genet*, 2010, 55(6): 379-388.
- [9] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(1): 11141-11156.
- [10] Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, et al. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction[J]. *Hum Genet*, 1990, 86(1): 45-48.
- [11] Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA) [J]. *Hum Genet*, 2005, 117(1): 92-98.
- [12] Li H, Ding J, Wang W, et al. Combining approach with multiplex PCR and MLPA to detect deletion and duplication in DMD patients, carriers, and prenatal diagnosis[J]. *Chin J Med Genet*, 2009, 26(3): 318-322.
- [13] Marzese DM, Mampel A, Gomez IC, et al. Detection of deletions and duplications in the Duchenne muscular dystrophy gene by the molecular method MLPA in the first Argentine affected families[J]. *Genet Mol Res*, 2008, 84(3): 223-233.
- [14] Kozłowski P, Jasinijska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(23): 4627-4636.

(收稿日期: 2016-01-11 修回日期: 2016-03-18)

