

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00251

# 中国人群中抗肌萎缩蛋白基因突变类型和分布特点及其与临床症状的相关性

李少英, 孙筱放, 黎青, 张慧敏, 王晓蔓

广州医学院第三附属医院妇产科研究所, 广州市生殖与遗传重点实验室, 广州 510000

**摘要:** 假性肥大型进行性肌营养不良症(Duchenne's muscular dystrophy, DMD)是源于横纹肌的一种 X-连锁隐性致死性遗传病, 由编码抗肌营养不良蛋白(dystrophin)基因突变所致。为了探讨中国人群中 DMD 患者的 dystrophin 基因突变类型和分布特点及其与临床症状的相关性, 文章采用 Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)方法对 720 例 DMD 患者及其母亲和 20 例正常成年男性进行 dystrophin 基因分析。结果显示, 检出率为 64.9%(467/720), 54.3%(391/720)的患者为基因缺失; 10.6%(76/720)的患者为基因重复。累及 Exon45-54 缺失突变型占全部缺失型患者的 71.9%(281/391); 重复突变型累及 Exon1-40 占全部重复型患者 82.9%(63/76); 检出的患者中, DMD 型和中间型营养不良症(Intermediate muscular dystrophy, IMD)型占 90.6%(423/467), Becker 型营养不良症(Becker muscular dystrophy, BMD)型占 9.4%(44/467)。表明假肥大型肌营养不良症以 dystrophin 基因缺失突变为主, 突变发生在整个基因中非均匀分布, 存在突变热区, 在缺失和重复的位置和片段长度与肌病的临床症状严重程度之间并不存在简单的相关关系。

**关键词:** 假性肥大型进行性肌营养不良症; 抗肌萎缩蛋白; 缺失; 重复; 多重连接依赖式探针扩增

## Association of mutation types and distribution characteristics of dystrophin gene with clinical symptoms in Chinese population

LI Shao-Ying, SUN Xiao-Fang, LI Qing, ZHANG Hui-Min, WANG Xiao-Man

Guangzhou Key Laboratory of Reproductive and Genetics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, China

**Abstract:** Duchenne muscular dystrophy (DMD) is X-linked disorder caused by mutations in the dystrophin gene. To investigate mutation types and distribution characteristics of dystrophin gene in Chinese DMD patients, we used Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) to analyze the dystrophin gene in 720 DMD patients, their mothers, and 20 normal adult males. Results showed that detection rate was 64.9% (467/720) in all the patients, gene deletion rate was 54.3% (391/720), and gene duplication rate was 10.6% (76/720). The rate of deletion mutant occurred in Exon 45-54 was 71.9% (281/391) in all gene deletion patients; meanwhile, the rate of gene duplication occurred in Exon 1-40 was 82.9% (63/76) in all gene duplication ones. In all the patients with gene deletion and duplication, the rate of DMD and IMD was 90.6% (423/467), and BMD, 9.4% (44/467). This indicates that the main reason of duchenne muscular dystrophy is dystrophin gene deletion mutation, which would occur in any gene unevenly with hot spots of mutation. The location and fragment length of gene deletion and duplication cannot decide the severity of clinical symptoms directly.

**Keywords:** Duchenne's muscular dystrophy; dystrophin; deletions; duplications; Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

收稿日期: 2010-06-09; 修回日期: 2010-10-10

作者简介: 李少英, 硕士, 主管技师, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 13826233200; E-mail: amyleewang@yahoo.com.cn

通讯作者: 孙筱放, 教授, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 020-81292117; E-mail: xiaofangsun@hotmail.com

假性肥大型进行性肌营养不良症(Duchenne's muscular dystrophy, DMD)是源于横纹肌的一种 X-连锁隐性致死性遗传病,男性活产婴儿的发病率为 1/3500<sup>[1]</sup>,这种致死性疾病为编码抗肌营养不良蛋白基因即 *dystrophin* 基因突变所致。*Dystrophin* 基因在基因组 DNA 上跨越约 2 500 kb,由 79 个外显子和 78 个内含子组成,在组织中存在多种转录拼接类型,可编码多种氨基酸残基数目各异蛋白。*Dystrophin* 基因突变是本病的分子遗传学基础。据报道,约 60% 的基因突变为不同程度大片段缺失,约 10% 为大片段重复,其余为常规方法难以检测的微小突变<sup>[2]</sup>。基因突变主要由女性传给后代,但约有 1/3 为新突变。DMD 患者临床症状差异较大,可依据患者因于轮椅年龄的迟早把本病分为 3 种临床亚型<sup>[3]</sup>。DMD 型:3~5 岁始表现为肌无力,12 岁前因于轮椅,20 岁左右死亡;IMD(Intermediate muscular dystrophy)型:12~16 岁因于轮椅,寿命较长;BMD(Becker muscular dystrophy)型:16 岁以后才因于轮椅,寿命较长,少数患者可结婚并生育子女,有的患者可活到 60 岁以上。至今仍无很有效治疗方法,动物实验的干细胞移植治疗有效但是它在体内的动态分布及对疾病的改善情况尚不清楚。早期诊断、早期给予糖皮质激素类药物治疗、矫形康复等治疗可使 DMD 患者的存活年龄延长和生活质量有所提高;并且及早确诊可为产前诊断提供信息避免患病家庭中新的 DMD 患儿的出生。本研究采用 Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)检测 *dystrophin* 基因的缺失和重复突变,通过基因分析了解中国人群的 DMD 基因突变特点,判断疾病的病情及推断疾病的预后和探索疾病的治病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

自 2002 年至今到本院就诊的患者,根据病史、体征,血清酶学检查、电生理和病理常规染色检查符合诊断标准的患者 720 例及其母亲。正常对照组为本院自愿者 20 名,年龄在 30~39 岁之间,正常成年男性混合静脉血。所有实验对象均知情自愿。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 模板 DNA 提取

取实验对象的静脉血 2 mL,EDTA 抗凝。采用

QIAmp DNA mini kit (QIAGEN, Germany)提取 DNA。

#### 1.2.2 MLPA 反应

MLPA 检测试剂盒购自 MRC Holland(MRC Holland, Amsterdam, Netherlands)。SALSA 引物分为两组:第 1 组 034 包括 DMD 基因的外显子 1-10、21-30、41-50 和 61-70;第 2 组 035 包括 DMD 基因的外显子 11-20、31-40、51-60 及 71-79。首先将 100 ng 的基因组 DNA 98 °C 变性 5 min,然后基因组 DNA 和 SASAL 探针混合物 034 和 035 60 °C 杂交过夜后,用连接酶(ligase 65)54 °C 15 min 链接反应,98 °C 5 min 终止反应,最后用 SALSA FAM PCR 引物(F: gggttcctaagggttgga, R: gtgccaagatccaatctaga)进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 60 s,循环 35 次,72 °C 延伸 20 min<sup>[4,5]</sup>。用 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 测序仪对扩增产物进行分析,所得数据采用 GeneMapper ID v3.1 软件进行处理,样本与正常对照相对峰面积(RPA)的比进行分析<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

我们共对 720 名 DMD 患者及其母亲和 20 名正常男性成年人采用 MLPA 方法进行基因检测。检出率 64.9%(467/720),54.3%(391/720)患者为基因缺失,其中 48.1%(188/391)基因缺失患者的母亲为携带者;10.6%(76/720)患者为基因重复,81.5%(62/76)基因重复患者的母亲都为携带者。

累及 Exon45-54 缺失突变型占全部缺失型患者的 71.9%(281/391),而该区域重复突变占全部重复型患者的 17.1%(13/76);重复突变型累及 Exon1-40 占全部重复型患者 82.9%(63/76),累及 Exon41-79 占 28.9%(27/76),结果见图 1 和图 2。

在检出的患者中,DMD 型和 IMD 型占 90.6%(423/467),BMD 型占 9.4%(44/467)。有些病例累及片段小的,可导致典型 DMD 的临床症状,亦可导致 BMD 的临床症状;也有患者为大片段的缺失,然而却表现为 BMD 的临床症状。例如,缺失较小 exon45 可导致典型 DMD 的临床症状,亦可导致 BMD 的临床症状;1 例 exon45-55、5 例 exon45-47 缺失和 5 例 exon45-53 缺失的患者,其症状均属 BMD。

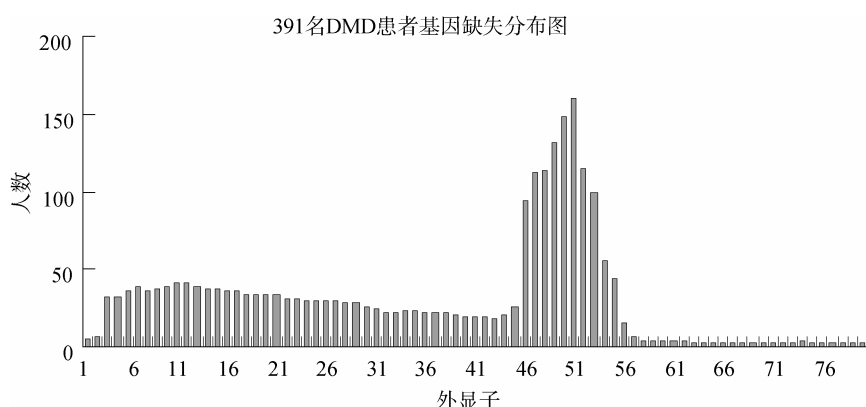


图1 391名患者基因缺失突变分布图

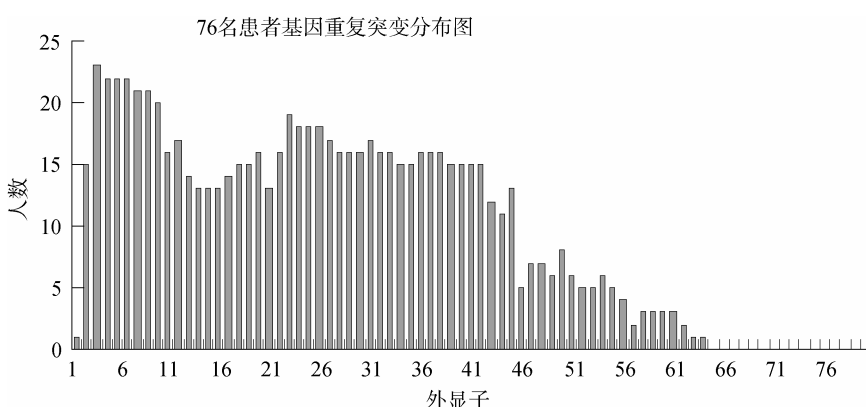


图2 76名患者基因重复突变分布图

发现两例非常罕见的涉及两个区域的复杂型基因重排, 案例1为 dupEX3-9 和 dupEX17-41, 案例2为 dupEX19-43 和 dupEX49-51, 均表现为典型 DMD 的临床症状。

### 3 讨论

我们采用 MLPA 方法对 720 名患者及其母亲的 dystrophin 基因进行检测分析。MLPA 技术可同时扫描 dystrophin 基因 79 个外显子, 几乎可检测出所有的 dystrophin 基因的缺失和重复。检出率 64.9% (467/720), 54.3%(391/720)患者为基因缺失, 其中 48.1%(188/391)基因缺失患者的母亲为携带者; 10.6% (76/720)患者为基因重复, 81.5%(62/76)基因重复患者的母亲都为携带者。与 Lee 等<sup>[2]</sup>得到的结论相近。突变发生整个基因且非均匀分布, 存在突变热区, 缺失突变型分布较集中, 主要累及 Exon45-54 之间, 占了全部缺失型患者的占 71.9%; 而重复突变型分布没有显著的分佈热区, 但靠近 5 端区较靠近 3 端区突变累及程度高(图 2, 3)。这与 Clemens 等<sup>[7]</sup>得到

的结论相符。720 名患者中, 有两名患者的基因型涉及两个区域的基因重复, 案例 1 为 dupEX3-9 和 dupEX17-41, 案例 2 为 dupEX19-43 和 dupEX49-51; 母亲为相应的携带者。这种复杂型基因重排是非常罕见的, 与 Janssen 等<sup>[8]</sup>得出的结论一致。

通过 720 个患者的基因结果与其临床症状进行分析, DMD 型和 IMD 型占 90.6%, BMD 型占 9.4%。在缺失和重复的位置和片段长度与肌病的临床症状严重程度之间并不存在简单的相关关系。与 Malhotra 等<sup>[9]</sup>得出的结论一致。有些病例累及片段小的, 可导致典型 DMD 的临床症状, 亦可导致 BMD 的临床症状; 也有患者为大片段的缺失, 然而却表现为 BMD 的临床症状; 有个别病例的基因缺失只引起肌痛和肌肉抽搐, 但不引起肌无力, 只表现为血清中肌酸激酶水平升高。例如, 缺失外显子 45~48 的患者临床表现为 DMD, 而缺失外显子 45~49 的患者临床表现为 BMD, 验证了外显子缺失的位置和大小与疾病严重程度不存在简单的相关关系。Monaco 等<sup>[10]</sup>提出了“阅读框规则”, 认为保留了阅读框的突

变通常仍可以产生有部分功能的 dystrophin 蛋白。但如果缺失或重复破坏了阅读框则引起 RNA 的不稳定, 所产生的截短蛋白量极少, 在细胞中迅速降解不能发挥功能。所以, 影响基因开放阅读框的突变会导致发病早、症状较重的 DMD; 不影响基因开放阅读框的突变会表现为 BMD<sup>[11]</sup>。因此有研究者认为, 绝大多数 DMD 患者表现的严重程度取决于缺失或重复是否影响了开放阅读框, 而不取决于缺失或重复片段的大小<sup>[12]</sup>。利用“阅读框规则”, Be'roud 等<sup>[13]</sup>采用缺失 exon45-55 相应的人工合成蛋白质可治疗超过 63% 的 DMD 患者。本次研究中, 亦发现一例患者为 exon45-55 缺失, 其症状属 BMD, 与 Be'roud 等研究相符。本研究共 5 例 exon45-47 缺失和 5 例 exon45-53 缺失的患者, 其症状均属 BMD。通过分析显示其突变与临床表现符合“阅读框规则”。但有个别病例, 例如, 缺失较小 exon45(用 MLPA 方法检测到单个基因缺失的样品均用特异性引物单独进行检测证实)可导致典型 DMD 的临床症状, 亦可导致 BMD 的临床症状, 这一现象是“阅读框规则”解释不了的, 有待我们进一步深入研究探讨。

假性肥大型进行性肌营养不良症的基因庞大、复杂, 突变类型多样。当前准确的基因诊断不仅可以避免患儿的出生, 也有利于开展 DMD 的治疗研究。近几年不断有人提出各种新的治疗方案, 但还没有一种方法能够治愈 DMD, 说明关于 DMD 的研究中仍有许多问题等待我们去揭示。我们需在各个层面对 DMD 从病因到治疗进行深入研究, 最终实现治愈 DMD 的目的。

#### 参考文献(References):

- [1] Fortina P, Cheng J, Shoffner MA, Surrey S, Hitchcock WM, Kricka LJ, Wilding P. Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy and quantitative identification of carrier status by use of entangled solution capillary electrophoresis. *Clin Chem*, 1997, 43(5): 745-751.
- [2] Lee SH, Kwak IP, Cha KE, Park SE, Kim NK, Cha KY. Preimplantation diagnosis of non-deletion Duchenne muscular dystrophy (DMD) by linkage polymerase chain reaction analysis. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4(4): 345-349.
- [3] 胡冬贵, 黄艳仪. 人类单基因病(第一卷). 广州: 华南理工大学出版社, 1999.
- [4] Schwartz M, Dunø M. Improved molecular diagnosis of dystrophin gene mutations using the multiplex ligation-dependent probe amplification method. *Genet Test*, 2004, 8(4): 361-367.
- [5] Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics*, 2005, 6(1): 29-35.
- [6] Li SY, Sun XF, Li Q, Zhang HM, Jiang YH. Multiplex Ligation-dependent probe amplification for rapid detection of deletions and duplications in the dystrophin gene. *J Med Coll PLA*, 2007, 22(6): 341-346.
- [7] Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, Andrade MD, Chakraborty R, Caskey CT. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Gene*, 1991, 49(5): 951-960.
- [8] Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics*, 2005, 6(1): 29-35.
- [9] Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NS, Bodrug SE, Burghes AH, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science*, 1988, 242(4879): 755-759.
- [10] Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*, 1988, 2(1): 90-95.
- [11] Banerjee M, Verma IC. Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene? *Am J Med Gene*, 1997, 68(2): 152-157.
- [12] Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Müller CR, Lindlöf M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Savontaus ML, Gilgenkranz H, Récán D, Chelly J, Kaplan JC, Covone AE, Archidiacono N, Romeo G, Liechti-Gallati S, Schneider V, Braga S, Moser H, Darras BT, Murphy P, Francke U, Chen JD, Morgan G, Denton M, Greenberg CR, Wrogemann K, Blondin LAJ, van Paassen HMB, van Ommen GJB, Kunkel LM. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*, 1989, 45(4): 498-506.
- [13] Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, Hamroun D, Humbertclaude V, Monnier N, Moizard MP, Voelckel MA, Calemard LM, Boisseau P, Blayau M, Philippe C, Cossée M, Pagès M, Rivier F, Danos O, Garcia L, Claustres M. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Human Mutat*, 2007, 28(2): 196-202.