

强直性肌营养不良一家系的临床和致病基因初步分析

丁 瑶,丁美萍,尹厚民,郭 谊,张 进,赵国华,王 晶,刘志蓉
(浙江大学医学院附属第二医院神经内科,浙江 杭州 310009)

[摘 要] 目的:探讨浙江台州地区一个强直性肌营养不良(myotonic dystrophy,DM)汉族家系的临床表现和分子遗传学基础。方法:分析该家系44例成员中8例(包括先证者Ⅲ₁₃)临床确诊为DM患者的临床表现,以及5例患者和6例无症状成员的肌电图表现,并对7例DM患者(除Ⅱ₆外)的DNA样品进行DM₁和DM₂2个位点PCR扩增、琼脂糖电泳检测,对克隆产物进行测序。结果:该家系患者除有肌强直、肌萎缩等表现外;心电图检查:心脏传导阻滞(7/8);裂隙灯检查:白内障(6/7);肌电图检查:患者组有强直电位发放(5/5),无临床症状成员也存在肌源性损害(5/6);但该家系无DM₁位点(CTG)*n*和DM₂位点(CCTG)*n*的重复数增加。结论:强直性肌营养不良可能存在新的致病基因位点。

[关键词] 肌强直,营养不良性/遗传学;肌电描记术;家庭;汉族

[中图分类号] R 746.2 [文献标识码] A [文章编号] 1008-9292(2008)05-0494-05

Clinical and genetic analysis of a pedigree of myotonic dystrophy disease

DING Yao,DING Mei-ping,YIN Hou-min,GUO Yi,ZHANG Jin,ZHAO Guo-hua,WANG Jing,LIU Zhi-rong (Department of Neurology,The Second Affiliated Hospital,College of Medicine,Zhejiang University,Hangzhou 310009)

[Abstract] Objective: To investigate the clinical manifestations and to make genetic analysis in a pedigree with myotonic dystrophy disease. Methods: The proband and available family members were identified by neurological examination. The clinical manifestation of 8 patients (including the proband) was analyzed; the electromyographic data of 5 patients were compared with 6 other family members. Blood samples were obtained from the 7 patients of the family (excepting II₆). DM₁ and DM₂ gene were amplified by PCR, tested by agarose electrophoresis, then analyzed by genetic analyzer. Results: Myotonia and muscle weakness were the main manifestations associated with heart block (7/8) and cataract (6/7). Electromyogram showed myopathic abnormalities not only in patients but also in other members of the family (5/6). The CTG repeats in DM₁ and CCTG repeats in DM₂ were all in normal range. Conclusion: There likely to be new mutants in this DM pedigree and further study is needed.

收稿日期:2008-05-13 修回日期:2008-08-17

作者简介:丁 瑶(1981-),女,硕士生,从事神经病学研究;E-mail:tinady2002@sina.com.

通讯作者:刘志蓉(1978-),女,主治医师,从事神经病学研究;E-mail:lzrong007@163.com.

[Key words] Myotonic dystrophy/genet; Electromyography; Family; HAN NATIONALITY

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2008,37(5):494-498.]

强直性肌营养不良(myotonic dystrophy, DM)是多系统受累的常染色体显性遗传病,主要累及骨骼肌、心肌、晶状体、内分泌系统和皮肤等,任何年龄均可发病,目前尚无有效治疗方法。现有的分子遗传学研究认为,DM 是基因组中寡核苷酸串联重复序列存在不稳定扩增所致。到目前为止,与DM 相关的公认基因仅有2个:DM₁型(OMIM: 602668)^[1]位于 19q13. 2-13.3,编码强直性肌营养不良蛋白激酶(DMPK)。由于该基因3'端非翻译区内三核苷酸(CTG)*n*重复序列拷贝数增加而发病;DM₂型(OMIM:160900)^[2]位于 3q13. 3-24,编码锌指蛋白9(ZNF₉),由其1号内含子中的四核苷酸(CCTG)*n*重复序列拷贝数增加而发病。现对我们经治的一个临床诊断为DM 的家系,进行临床特点、电生理和致病基因分析。

1 材料与方法

1.1 家系资料 DM 汉族家系来自浙江省台州地区。该家系共4代44人(图1),其中患者8例,男性3例、女性5例。所有现存患者均由2名神经专科医师进行病史询问和体格检查。先证者(Ⅲ₁₃),女性,34岁,小学文化,无业,于2006

年7月就诊于我院。患者20年前出现双手活动不灵活,手握紧后不易松开,口齿不清,反应迟钝;15年前开始久坐后起身困难,偶尔行走中乏力摔倒,伴有双眼视力下降,月经不规则,病情进行性加重。“贫血”10余年,自然流产2次。神经系统检查:神清,反应迟钝,“斧状脸,鸭状脖”,面部表情僵硬刻板,口齿不清,抬头力弱,四肢近端肌力Ⅴ级,远端肌力Ⅳ级,腱反射减低,腓肠肌叩诊可见肌球形成,指间肌群轻度萎缩,双侧病理征阴性。MMSE 评分:19分,计算能力下降,构图能力下降明显。辅助检查:肌酸激酶(CK)339 U/L,乳酸脱氢酶(LDH)258 U/L;裂隙灯检查:双侧晶体后囊中心白色浑浊,考虑白内障;心电图检查:窦性心率,完全性右束支传导阻滞;肌电图(EMG):右第一股间背侧肌、右胫骨前肌呈部分肌源性损害表现,放松时可见肌强直电位发放(+~++)。先证者爷爷(Ⅰ₂)起病年龄不详,生前有双手握紧后不能马上松开伴行走困难、构音不清等,58岁死于心脏病,Ⅰ₂先后拥有两个配偶(Ⅰ₁和Ⅰ₃)。先证者哥哥(Ⅲ₈)18岁开始出现手握紧后不能马上松开、行走困难和构音差等,生前有明显的“斧状脸,鸭状脖”等DM 特征面容,42岁时死于车祸。

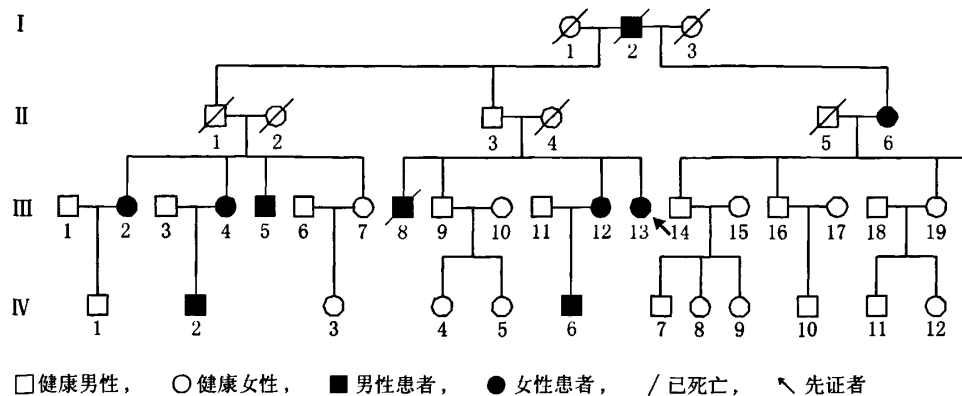


图1 DM 一家系系谱图
Fig. 1 The pedigree of a myotonic dystrophy family

1.2 肌电图检查 取家族中年龄在 18~50 岁的 5 例患者和年龄相近的 6 例无症状成员,分别作为患者组和无症状组。使用同心圆针电极观察三角肌、手第一骨间背侧肌、股四头肌内侧肌和胫骨前肌的自发电位及募集形式,记录放松时肌强直电位发放并将轻收缩时每块肌肉 20 个运动单位电位(MUAP)平均时限测定值与本院肌电图室正常值相比较,若(测定值-正常值)/正常值 $\leq 20\%$ 者为肌源性损害。

1.3 基因检测 在知情同意前提下,抽取家系成员中 7 名患者(除Ⅱ 6 外)外周静脉血 5~10 ml,酚-氯仿法提取 gDNA。PCR 法扩增 DM₁ 和 DM₂ 位点,琼脂糖电泳检测:PCR 扩增 DM₁ 位点的引物为 F: 5'-GAAGGGTCCTTGTA GCGGGAA-3' 和 R: 5'-CAGAGCAGGGGC GTCATGCACA-3'。反应程序:94 C 2 min,35 $\times$ (95 C 50 s,62 C 50 s,72 C 60 s),72 C 7 min。PCR 扩增 DM₂ 位点的引物为 F: 5'-GCCTAGGGGACAAAGTGATA-3' 和 R: 5'-GGCCTTATAACCATGCAAATG-3'。反应程序:94 C 2 min,38 $\times$ (94 C 45 s,57 C 45 s,72 C 60 s),72 C 10 min;均使用 QIAGEN 公司的 Hotstar 酶反应体系。DM₁ 和 DM₂ 的 PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖 100 V 电泳 20 min,置于紫

外分析仪鉴定扩增效果。每份样品扩增 DM₁ 和 DM₂ 位点后,采用 Invitrogen 公司的 TOPO Tacloning Kit 克隆 PCR 产物并送测序组测序。

2 结 果

2.1 临床特点 该家系遗传方式符合常染色体显性遗传,具有不完全外显率。家系中有 6 例患者(除Ⅳ 2、Ⅳ 6 外)以手握紧后不易松开起病;Ⅳ 2 和Ⅳ 6 以出生后喂养困难、发育迟缓,病情呈进行性加重;发病年龄在 0—40 岁之间,平均病程 12 年(表 1)。所有患者均有“斧状脸”、口齿不清和抬头力弱,有以远端为主的肌力下降、腱反射减弱和肌张力增高,5 例远端肌肉可见萎缩,5 例腓肠肌叩诊可见肌球,7 例有房室或束支传导阻滞,6 例白内障。2 例反复流产史,1 例糖尿病史,1 例癫痫史。所有患者都符合 Griggs^[3-4] 等的 DM 诊断标准。

2.2 肌电图 患者组 5 例受检肌肉有放松时肌强直电位发放(+~++),且均表现为肌源性损害,近端肌和远端肌受损肌肉分别占该组近端和远端受检肌肉的 50% 和 80%;无症状组 6 例均无肌强直电位发放,但 5 例有不同程度的肌源性损害表现,近端肌和远端肌受损肌肉分别占无症状组近端和远端受检肌肉的 41.7% 和 50%。

表 1 8 例强直性肌营养不良患者的临床资料

Table 1 The clinical features of the 8 patients of the pedigree

家系患者	Ⅱ 6	Ⅱ 2	Ⅱ 4	Ⅱ 5	Ⅱ 12	Ⅱ 13	Ⅳ 2	Ⅳ 6
性别	女	女	女	男	女	女	男	男
发病年龄/岁	40	30	33	35	10	10	0	0
斧状脸	+	+	+	+	+	+	+	+
口齿不清	+	+	+	+	+	+	+	+
抬头力弱	+	+	+	+	+	+	+	+
四肢近端肌力	Ⅲ 级	Ⅳ 级	V 级	V 级	V 级	V 级	V 级	V 级
四肢远端肌力	Ⅲ 级	Ⅲ 级	Ⅳ 级	Ⅳ 级	Ⅳ 级	Ⅳ 级	Ⅳ 级	Ⅳ 级
叩击肌球	+	+	—	—	+	—	+	+
远端肌肉萎缩	+	+	+	—	+	+	—	—
腱反射	减退	减退	减退	正常	减退	减退	正常	正常
肌张力增高	+	+	+	—	+	—	—	—
白内障	+	+	+	+	+	+	—	—
心脏传导阻滞	+	+	+	+	+	+	+	—
其他病史	流产 2 次, 糖尿病	—	—	—	癫痫	流产 3 次	—	—

注:—:正常;+:异常

现象。 IV_2 和 IV_6 2例均为出生后即出现喂养困难,发育迟缓,且“斧状脸,鸭状脖”和智能减低等明显,这可能是成人型向婴儿型转变^[6]。

目前DM的公认的致病基因为DM₁和DM₂。其中DM₁基因位点的(CTG) n 在正常人中有5~37个拷贝,在DM₁前突变者中有50~80个拷贝,DM₁患者则达到80~2 000个拷贝,甚至更多。DM₂基因位点的(CCTG) n 在正常人中<26个拷贝,而DM₂患者为75~11 000个拷贝,平均5 000个拷贝。研究表明,DM₁与DM₂发病机制相类似,不是异常扩增的CTG或CCTG重复序列本身,而可能是由含有该序列的DNA转录而来的含有过长的CUG或CCUG重复序列的mRNA,在细胞内堆积影响了氯离子通道、胰岛素受体等,从而导致相似的肌强直、糖尿病等表现^[7]。近年来不断有报道,发现部分DM患者头颅MRI上有脑白质异常信号^[8];同时,病理检查也在DM患者颞叶白质、皮质和海马处发现Tau蛋白,认为这可能是在转录过程中选择性剪切Tau外显子2、3的缘故^[9]。

近年来也有个别报道DM的发病可能与DM₁和DM₂不相关。Wieser等^[10]2000年曾报道一个与DM₂基因无关的近端型强直性肌营养不良(PROMM)家系。2004年赵晓萍等^[11]发现一个非CTG非CCTG重复数增加的强直性肌营养不良家系;2005年法国学者Isabelle等在分析一个伴有额叶痴呆的DM家系时发现该家系可能为X-连锁遗传,并发现该家系具有一个新的强直性肌营养不良位点DM₃,定位于15q21-24,但尚未被克隆^[12]。我们通过PCR法、电泳分析和基因检测方法,排除了已经报道的2个致病基因位点的DMPK和ZNF₉在该DM家系中的作用,从而提示该家系中可能存在与DMPK和ZNF₉致病机制相类似的新的致病基因位点,并有待进一步对其特定染色体区域基因组扫描和全基因组扫描等方法,以确定新的致病基因位点。

References:

- [1] FU Y H, PIZZUTI A, FENWICK R G, et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy [J]. *Science*, 1992, 255(5049): 1256-1258.
- [2] LIQURI C L, RICKER K, MOSELEY M L, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9 [J]. *Science*, 2001, 293(5531): 864-867.
- [3] GRIGGS R C, WOOD D S, MOXLEY R, et al. Criteria for establishing the validity of genetic recombination in myotonic dystrophy [J]. *Neurology*, 1989, 39(3): 420-421.
- [4] SHI Yu-quan (史玉泉). *Practice of Neurology (实用神经病学)* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2004: 1265-1266. (in Chinese)
- [5] KLESERT T R, CHO D H, CLARK J I, et al. Mice deficient in Six 5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 105-109.
- [6] ROIQ M, BALLIU P R, NAVARRO C, et al. Presentation, clinical course, and outcome of the congenital form of myotonic dystrophy [J]. *Pediatric Neurology*, 1994, 11(3): 208-213.
- [7] CHO D H, TAPSCOTT S J. Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(2): 195-204.
- [8] KUO H C, HSIEH Y C, WANG H M, et al. Correlation among subcortical white matter lesions, intelligence and CTG repeat expansion in classic myotonic dystrophy type 1 [J]. *Acta Neurol Scand*, 2008, 117(2): 101-107.
- [9] SERGEANT N, SABLONNIERE B, SCHRAEN-MASCHKE S, et al. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1 [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(19): 2143-2155.
- [10] WIESER T, BONDSCH D, EGER K, et al. A family with PROMM not linked to the recently mapped PROMM locus DM₂ [J]. *Neuromuscul Disord*, 2000, 10(2): 141-143.
- [11] ZHAO Xiao-ping, XIE Hui-jun, ZHENG Hui-ming, et al (赵晓萍, 谢惠君, 郑惠民, 等). A pedigree with myotonic dystrophy; non-CTG, non-CCTG repeat expansion [J]. *Chinese Journal of Medical Genetics (中华遗传学杂志)*, 2004, 21(5): 459-462. (in Chinese)
- [12] LE BER I, MARTINEZ M, CAMPION D, et al. A non-DM₁, non-DM₂ multisystem myotonic disorder with frontotemporal dementia: phenotype and suggestive mapping of the DM₃ locus to chromosome 15q21-24 [J]. *Brain*, 2004, 127(9): 1979-1992.

[责任编辑 黄晓花]