

· 论 著 ·

## 3 例无家族史 Duchenne 肌营养不良患者的基因突变研究

赵慧茹, 王 莉, 廖世秀<sup>△</sup>

(河南省人民医院医学遗传研究所, 河南郑州 450003)

**摘要:**目的 探讨 3 例无 Duchenne 肌营养不良(DMD)家族史 DMD 患者的发病原因。方法 采用 17 对引物检测 dystrophin 基因外显子的缺失, 结合 45 CA、49 CA、50 CA、3' CA 和 5' CA 这 5 个短串联重复序列(STR)多态位点, 对 3 个无 DMD 家族史而只有 1 例明确患者的家系进行连锁分析。结果 STR 连锁分析显示 3 例患者的 49 CA 位点 dystrophin 基因缺失, 但其母亲 49 CA 位点均为杂合子。结论 3 个家系中的 3 位母亲均不是致病基因的携带者, DMD 是由于患者自身发生基因突变所致。

**关键词:**肌营养不良, 杜氏; 肌营养不良蛋白; 串联重复序列; 外显子; 基因缺失

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)01-0006-02

## A genetic mutation research in 3 cases of Duchenne muscular dystrophy without family history

Zhao Huiru, Wang Li, Liao Shixiu<sup>△</sup>

(Institute of Medical Genetics, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China)

**Abstract: Objective** To explore the aetiological agents of 3 cases of Duchenne muscular dystrophy(DMD) without family history. **Methods** Seventeen pairs of primers were employed to detect the exon deletion of dystrophin gene. Linkage analysis was performed on 5 polymorphic short tandem repeats(STR) loci, including 45 CA, 49 CA, 50 CA, 3' CA and 5' CA, in members of 3 families with no family history of DMD and only one definite case of DMD. **Results** STR linkage analysis demonstrated genetic deletion at 49 CA loci of dystrophin gene in 3 patients, however, the 49 CA loci of dystrophin gene of their mothers were all heterozygous. **Conclusion** Mothers from 3 families are not pathogenic gene carriers, and DMD is caused due to the patient's own gene mutation.

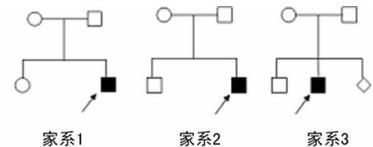
**Key words:** muscular dystrophy, duchenne; dystrophin; tandem repeat sequences; exon; gene deletion

Duchenne 肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是由于基因突变影响了抗肌萎缩蛋白(dystrophin)在横纹肌组织中的表达, 导致肢体近端骨骼肌进行性变性、坏死和小腿腓肠肌假性肥大。典型表现为运动发育迟缓, 甚至发育倒退。患者呈特殊的“鸭步”步态, 患者血清肌酸激酶(creatinine kinase, CK)活性升高, 心肌细胞受损, 大多数患者在 13 岁前失去独立行走能力, 随着病情加重, 20 岁左右死于呼吸功能衰竭和(或)心脏并发症<sup>[1]</sup>。本病主要累及男性, 发病率约占活产男婴的 1/3 500<sup>[2]</sup>, 女性大部分为携带者, 通常不发病。DMD 是一种 X 连锁的隐性遗传病, 有 1/3 为散发病例, 目前尚无有效的治疗方法。因此, 对患者和基因突变携带者进行基因诊断和遗传咨询成为降低 DMD 发病率的重要措施。编码 dystrophin 的基因是目前所知 DMD 的惟一致病基因, 定位于 Xp21.2, 全长 2.4 mb, 是迄今发现的人类最大的基因。共有 79 个外显子, 编码全长 14 kb 的 mRNA<sup>[3-6]</sup>。目前研究表明, 55%~65% 的 DMD 是因 dystrophin 基因的一个或多个外显子缺失所致, 基因缺失突变多集中在基因的 5' 端和围绕中央区 44~53 外显子<sup>[7-8]</sup>。5%~10% 的患者为重复突变, 其余为点突变和微小插入或缺失突变<sup>[9-11]</sup>。本研究对象为无 DMD 家族史的 3 个家系, 采用 dystrophin 基因 17 个外显子缺失实验及短串联重复序列(short tandem repeats, STR)连锁分析实验, 证实 3 个家系中的 DMD 均为患者自身基因突变所致。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集无 DMD 家族史的 3 个家系, 每个家系各有 1 例男性患者及 1 例正常兄弟姐妹。家系 1 中患者 7 岁, 姐姐正常; 家系 2 中患者 6 岁, 哥哥正常; 家系 3 中患者 9 岁, 哥哥正常, 且母亲处于妊娠中期。3 例患者的心肌酶谱均显示

异常, 肌电图检测结果显示为双侧腓肠肌呈神经源性损害, 经医院确诊为“进行性 DMD”。以上患者及其家系成员的外周血均由本研究所采集, 并收集其相关病历资料, 3 个 DMD 家系图谱见图 1。



○: 患者母亲; □: 患者父亲; ■: 患者; ◇: 性别未知的胎儿; 箭头: 先证者。

图 1 无 DMD 家族史的 3 个家系图谱

**1.2 基因组 DNA 的提取** 采用常规 Chelex 法提取家系成员外周静脉血的基因组 DNA。家系 3 在孕妇妊娠第 20 周时采集羊水, 提取羊水 DNA。

**1.3 外显子缺失的分析** 对 3 个家系中的先证者进行基因组 DNA 外显子缺失分析。根据文献, 针对 17 个外显子(3、4、6、8、12、13、17、19、43、44、45、47、48、50、51、52、53)及其侧翼序列设计引物<sup>[12]</sup>, 以基因组 DNA 为模板, 扩增 dystrophin 基因的 17 个外显子片段。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, 其中, 模板 50 ng, 10 $\times$ 缓冲液 2.5  $\mu$ L, 上、下游引物各为 0.4  $\mu$ mol/L, 三磷酸脱氧核糖核苷(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP) 100  $\mu$ mol/L, Taq DNA 聚合酶 0.1 U。循环参数: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50~54  $^{\circ}$ C 复性 75 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 共 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 6 min。

**1.4 STR 多态位点的单体型连锁分析** 选取平均分布的 dystrophin 基因及其侧翼序列 5 个内含子(CA)<sub>n</sub> 作为 STR 标

表 1 3 个家系 dystrophin 基因的缺失位点与心肌酶谱、肌电图检测结果

家系	年龄 (岁)	性别	基因缺失位点	心肌酶谱(IU/L)					肌电图
				AST <sup>1</sup> (0~40)	HBDH <sup>2</sup> (72~182)	CK (10~190)	CK-MB <sup>3</sup> (0~25)	LDH <sup>4</sup> (109~245)	
患者编号 1	7	男	48,50,51,52,53	218	1 086	5 901	336	1 436	双侧腓肠肌呈神经源性损害
患者编号 2	6	男	48,50	—	9 512	601	—	—	双侧腓肠肌呈神经源性损害
患者编号 3	9	男	50	155	875	9 482	421	—	双侧腓肠肌呈神经源性损害

<sup>1</sup>:天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase,AST);<sup>2</sup>:α-羟丁酸脱氢酶(alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase,α-HBDH);<sup>3</sup>:肌酸激酶 MB 同工酶(creatine kinase MB isoenzyme,CK-MB);<sup>4</sup>:乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH);—:此项目无数据。

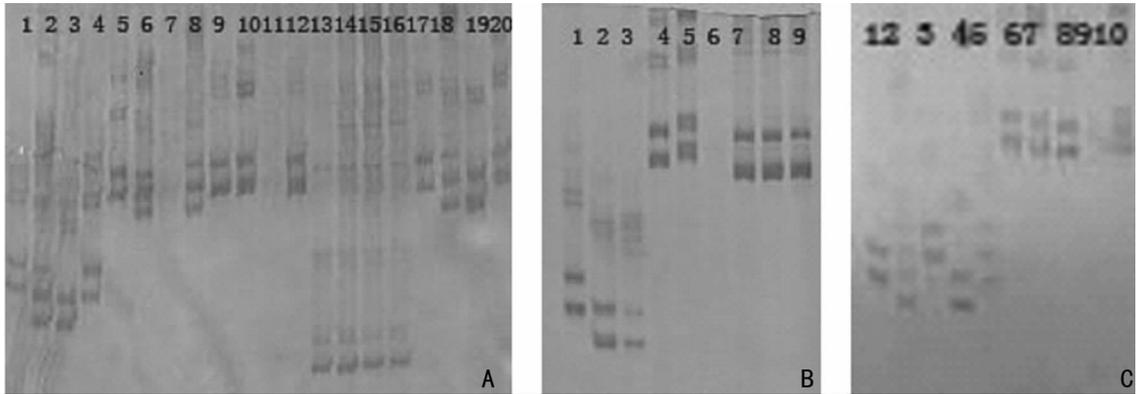


图 2 3 个家系的 STR 连锁分析聚丙烯酰胺凝胶电泳图  
A:1~4,5~8,9~12,13~16,17~20 泳道分别为采用 45 CA,49 CA,50 CA,3' CA,5' CA 引物扩增家系 1 中父、母、患者及正常姐姐的 dystrophin 基因;B:1~3,4~6,7~9 泳道分别为采用 45 CA,49 CA,50 CA 引物扩增家系 2 中父、母、患者的 dystrophin 基因;C:1~5,6~10 泳道分别为采用 45 CA,49 CA 引物扩增家系 3 中父、母、患者哥哥、患者及胎儿的 dystrophin 基因。

图 2 3 个家系的 STR 连锁分析聚丙烯酰胺凝胶电泳图

记,引物序列参照文献[13],均由生工生物工程(上海)有限公司合成。以 3 个家系成员的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL,含 50~100 ng 基因组 DNA,50 μmol/L 的引物各 0.2 μL,10×缓冲液 2.5 μL,1%小牛血清清蛋白 1 μL,2.5 mmol/L dNTP 2.5 μL,Taq DNA 聚合酶 1 U。循环参数:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 60 s,共 32 个循环,最后,72 °C 延伸 7 min。STR 标记后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,分析 STR 标记的等位基因型。

2 结 果

2.1 DMD 患者 dystrophin 基因的缺失位点分析 本研究采用 17 对外显子 PCR 引物对 3 个家系的 3 例患者的基因组 DNA 进行基因缺失位点检测,结果显示:家系 1 患者 48,50,51,52 及 53 位点的 dystrophin 基因外显子缺失;家系 2 患者 48,50 位点 dystrophin 基因外显子缺失;家系 3 患者 50 位点 dystrophin 基因外显子缺失,见表 1。

2.2 STR 位点多态性连锁分析 应用 45 CA,49 CA,50 CA,3' CA 和 5' CA 这 5 个 STR 多态位点对上述 3 个家系成员进行了连锁分析。45 CA 和 5' CA 的 STR 连锁分析表明家系 1 姐姐获得的母源 X 染色体与患者弟弟不同,且 49 CA 的 STR 连锁分析表明母亲的此位点为杂合子,但患者此位点缺失,见图 2A。STR 连锁分析表明家系 2 母亲 45 CA 和 49 CA 位点为杂合子,且患者 49 CA 缺失,见图 2B。STR 连锁分析表明家系 3 母亲 45 CA 和 49 CA 位点为杂合子,胎儿获得与患者不同的母源 X 染色单体,且患者 49 CA 缺失,见图 2C。因此,这 3 个家系中母亲均不是 DMD 携带者,DMD 患者的发病是因为自身发生了基因突变。

3 讨 论

Chamberlain 等<sup>[14]</sup>用 18 对引物进行 PCR 检测,发现 98% 的患者存在 dystrophin 基因缺失,该技术成为 DMD/Becker 肌

营养不良患者临床基因诊断及产前基因诊断的首选技术。Clemens 等<sup>[13]</sup>在 DMD 基因缺失高发区 44,45,49,50 内含子中的(CA)<sub>n</sub>重复序列上进行扩增,并进行 DMD 家系连锁分析,发现这些位点的杂合率为 72%~93%。有研究报道 dystrophin 基因 44,45,49,50 内含子 STR 位点的多态信息含量(polymorphism information content,PIC)分别为 0.864,0.892,0.907,0.713,这 4 个位点杂合率高,信息量大,完全适用于中国 DMD 患者 STR 家族的单体连锁分析。因此,应用 PCR 技术检测 dystrophin 基因缺失,同时辅助 PCR-STR 技术进行连锁分析已成为 DMD 家系检测携带者的首选技术。本实验先用 17 对引物检测 dystrophin 基因外显子的缺失,结合 45 CA,49 CA,50 CA,3' CA 和 5' CA 这 5 个 STR 多态位点进行连锁分析,进一步证明在 48 或 50 外显子位点缺失的患者在 45 CA 或 49 CA 位点缺失。尤其值得注意的是 3 个家系均无 DMD 家族史,3 位患者的母亲在 49 CA 位点处均为杂合子,而 3 位患者在 49 CA 位点处均缺失。从而推测这 3 位母亲不是致病基因的携带者,患者不是因为遗传因素致病,而是由于自身发生基因突变而致病。

参考文献:

[1] Kozlowski P,Roberts P,Dabora S,et al. Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA, and genotype-phenotype correlations [J]. Hum Genet,2007,121(3/4):389-400.  
[2] Kwiatkowski DJ. Rhebbing up mTOR:new insights on TSC1 and TSC2,and the pathogenesis of tuberous sclerosis[J]. Cancer Biol Ther,2003,2(5):471-476.  
[3] Consugar MB,Wong WC,Lundquist PA,et al. Characterization of large rearrangements in autosomal (下转第 12 页)

髓核细胞的功能,从而实现了向髓核样细胞表型的分化。

#### 参考文献:

- [1] Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation[J]. *Int Rev Cytol*, 1995, 159: 265-358.
- [2] Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, et al. The Sry-related gene SOX9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos[J]. *Nat Genet*, 1995, 9(1): 15-20.
- [3] Hering TM. Regulation of chondrocyte gene expression [J]. *Front Biosci*, 1999, 4: D743-761.
- [4] Lefebvre V, Huang W, Harley VR, et al. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(4): 2336-2346.
- [5] Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, et al. Parallel expression of SOX9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis[J]. *Dev Dyn*, 1997, 209(4): 377-386.
- [6] 许运, 陈亮, 朱雪松, 等. SOX9 基因慢病毒载体的构建及其在骨髓间充质干细胞中的表达 [J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(47): 3376-3380.
- [7] Richardson SM, Curran JM, Chen R, et al. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(22): 4069-4078.
- [8] Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 707-716.
- [9] Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(1): 85-93.
- [10] Wei A, Chung SA, Tao H, et al. Differentiation of rodent bone marrow mesenchymal stem cells into intervertebral disc-like cells following coculture with rat disc tissue[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(9): 2581-2595.
- [11] Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro; implications for cell-based transplantation therapy [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29(23): 2627-2632.
- [12] Zhang Y, Markova D, Im HJ, et al. Primary bovine intervertebral disc cells transduced with adenovirus overexpressing 12 BMPs and SOX9 maintain appropriate phenotype[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2009, 88(6): 455-463.
- [13] Sive JI, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs[J]. *Mol Pathol*, 2002, 55(2): 91-97.
- [14] Steck E, Bertram H, Abel R, et al. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(3): 403-411.
- [15] Aota Y, An HS, Imai Y, et al. Comparison of cellular response in bovine intervertebral disc cells and articular chondrocytes; effects of lipopolysaccharide on proteoglycan metabolism[J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 326(3): 787-793.
- [16] Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. L-Sox5, Sox6 and SOX9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001, 9 Suppl A: S69-75.
- [17] Bartosch B, Cosset FL. Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses [J]. *Curr Gene Ther*, 2004, 4(4): 427-443.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-09-03)

(上接第 7 页)

- [3] dominant polycystic kidney disease and the PKD1/TSC2 contiguous gene syndrome[J]. *Kidney Int*, 2008, 74(11): 1468-1479.
- [4] O'Callaghan FJ, Shiell AW, Osborne JP, et al. Prevalence of tuberous sclerosis estimated by capture-recapture analysis[J]. *Lancet*, 1998, 351(9114): 1490.
- [5] Niida Y, Lawrence-Smith N, Banwell A, et al. Analysis of both TSC1 and TSC2 for germline mutations in 126 unrelated patients with tuberous sclerosis [J]. *Hum Mutat*, 1999, 14(5): 412-422.
- [6] Ali M, Girimaji SC, Markandaya M, et al. Mutation and polymorphism analysis of TSC1 and TSC2 genes in Indian patients with tuberous sclerosis complex[J]. *Acta Neurol Scand*, 2005, 111(1): 54-63.
- [7] Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, et al. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(1): 64-80.
- [8] Green AJ, Smith M, Yates JR. Loss of heterozygosity on chromosome 16p13.3 in hamartomas from tuberous sclerosis patients[J]. *Nat Genet*, 1994, 6(2): 193-196.
- [9] Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1(TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(21): 4766-4770.
- [10] Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, et al. The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(5): 281-287.
- [11] Haddad LA, Smith N, Bowser M, et al. The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 44180-44186.
- [12] Serti J, Barisi N, Sostarko M, et al. Deletion screening of the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene in Croatian population[J]. *Coll Antropol*, 1997, 21(1): 151-156.
- [13] Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 49(5): 951-960.
- [14] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy [M]. San Diego: Academic Press, 1990.

(收稿日期: 2012-04-27 修回日期: 2012-09-12)