

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.07.020

### 3 例杜氏肌营养不良家系基因诊断策略探讨

陈远春<sup>1,2</sup>, 代英<sup>3,4</sup>, 钟敏<sup>1,4△</sup>

(1. 重庆医科大学附属儿童医院神经内科 400014; 2. 重庆涪陵中心医院儿科 408000;

3. 重庆医科大学附属儿童医院儿童保健科 400014; 4. 儿科学重庆市重点实验室/

儿童发育疾病研究教育部重点实验室 400014)

**[摘要]** **目的** 对 3 例既往多重 PCR 基因检测阴性的杜氏肌营养不良(DMD)家系进一步进行基因诊断及家系成员遗传指导。**方法** 收集先证者及其家系成员的临床资料和基因组 DNA,多重连接依赖的探针扩增(MLPA)或第 2 代高通量测序对 DNA 样本进行 DMD 基因突变检测。**结果** 家系 1 检测到 3 名男性 Exon 7 缺失,2 名女性杂合子携带者。家系 2 先证者 chrX-32486626 的 Exon 23 发现 c.3127C>T,其母 chrX-32486626 存在 c.3127C>T 杂合突变,患儿母亲目前孕中胎儿系女孩。家系 3 先证者 chrX-32509581 的 Exon 20 发现 c.2411G>A,其母 chrX-32509581 存在 c.2411G>A 的杂合突变。**结论** MLPA 或联合第 2 代高通量测序能够有效基因确诊 DMD 患者及其家系成员,为遗传咨询及产前诊断提供依据。

**[关键词]** 肌营养不良,杜氏;基因;突变;高通量测序

**[中图分类号]** R746.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)07-0926-03

#### Gene diagnosis in 3 family members of Duchenne muscular dystrophy

Chen Yuanchun<sup>1,2</sup>, Dai Ying<sup>3,4</sup>, Zhong Min<sup>1,4△</sup>

(1. Department of Neurology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China;

2. Department of Pediatrics, the Central Hospital of Fulin, Chongqing 408000, China;

3. Department of Child Health, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China;

4. Chongqing Key Laboratory of Pediatrics/Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China)

**[Abstract]** **Objective** To perform gene diagnosis of Duchenne muscular dystrophy(DMD) in 3 family members who were negative for DMD gene detected by multiplex PCR and to provide genetic counseling for their family members accordingly. **Methods**

The clinical data and genomic DNA of patients and their family members were collected, DMD gene mutation were detected by multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) or the 2nd generation of high-throughput sequencing. **Results** In the first family, 3 male patients were detected deletion of Exon 7 and 2 female were heterozygous carriers. In the second family, it was found in the proband that point mutation of c.3127C>T in the Exon 23 of chrX-32486626 and c.3127C>T heterozygous mutations was confirmed in his mother, the mother was pregnant with a girl. In the third family, point mutation of c.2411G>A was detected in the Exon 20 of chrX-32509581 in the proband and his mother had c.2411G>A heterozygous mutation. **Conclusion** MLPA or combining with the 2nd generation of high-throughput sequencing can offer effective gene diagnosis for the patients of DMD and their family members, and provide the basis for genetic counseling and prenatal diagnosis.

**[Key words]** muscular dystrophy, Duchenne; gene; mutation; high throughput sequencing

杜氏肌营养不良(duchenne muscular dystrophy, DMD)是由位于 Xp21.2 的 DMD 基因缺陷所致的 X 连锁隐性遗传病,活产男婴发病率约 1/(3 600~6 000)<sup>[1]</sup>。该编码基因包含 79 个外显子、78 个内含子和 8 个启动子,已报道的基因突变多达 7 000 余种,突变类型多样:大片段缺失突变约 60%,大片段重复占 7%,微小缺失或插入占 7%,单碱基点突变占 20%,剪切位点突变占 2%,还包括少量复杂突变和内含子突变<sup>[2-5]</sup>。本研究中 3 例 DMD 家系既往多重 PCR 基因检测均阴性,通过多重连接探针扩增技术(MLPA)和第 2 代高通量测序最终找到致病的基因突变位点而确诊,为家系成员遗传咨询及产前诊断提供了准确依据。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 家系 1,先证者 1,男,6 岁半, G7P5,否认产伤窒息史,1 岁 3 个月会走路。自 4 岁开始渐渐出现肢体乏力,行走缓慢,鸭步,易摔跤,渐加重至蹲起困难,双小腿增粗变硬。

查体:营养中等,鸭步, Gower 征(+),双侧腓肠肌中度肥大,触之稍硬,双下肢肌力 IV 级。肌电图示肌源性损害;血肌酸激酶 4 050 U/L(参考值 50~220 U/L)。重庆医科大学附属儿童医院多重 PCR 检测 DMD 基因热点区域基因缺失未见异常。家系调查:患儿父母体健,非近亲结婚,患儿大哥幼年有类似病史,现在 19+ 岁,已经瘫痪于床,全身肌肉萎缩。Ⅲ 4(第 3 代第 4 名家系成员)现年 3+ 岁,腓肠肌轻度肥大,肌力、肌张力尚正常。家系 2,先证者 2,男,7 岁,2013 年重庆医科大学附属儿童医院临床诊断为 DMD,因患儿母亲再次怀孕 6 个月,为评估此次怀孕胎儿患病风险而来院复诊。G1P1,无产伤窒息史。1 岁半走路。近 4 岁开始渐渐出现行走乏力,渐至蹲起困难,鸭步。查体:营养尚可,心音有力,无心界扩大,鸭步步态, Gower 征(+),双侧腓肠肌中度肥大,触之稍硬,双下肢肌力 IV 级。肌电图示肌源性损害;血肌酸激酶 12 400 U/L;2013 年重庆医科大学附属儿童医院多重 PCR 基因检测未见异常。家族史无异。

家系 3, 先证者 3, 男, 5 岁, 2015 年初重庆医科大学附属儿童医院临床诊断 DMD, 为进一步了解再次生育后代患病风险而来院就诊。患儿系 G1P1, 无产伤窒息史。1 岁 2 个月走路。4 岁半渐出现行走易累, 上台阶乏力。查体: 营养尚可, 未见鸭步步态, Gower 征(±), 双侧腓肠肌轻度肥大, 单足跳稍差。肌电图示肌源性损害; 肌酸激酶 5 100 U/L; 2015 年初重庆医科大学附属儿童医院多重 PCR 基因检测未见异常。家族史无异。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 患儿监护人签署知情同意书, 所有研究经重庆医科大学附属儿童医院临床医学伦理研究委员会同意。取患儿及其父母外周血各 2 mL, 家系 1 加取其他 4 位同胞兄弟姐妹、外祖父母及祖父母外周血各 2 mL, 乙二胺四乙酸钠抗凝。用基因组 DNA 提取试剂盒(QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, Germany)提取 DNA。

1.2.2 MLPA 购买荷兰 MRC-Holland 公司检测试剂盒 SALSAP034 和 P035。根据说明书操作, 基因组 DNA 变性后与 SALSA MLPA 探针杂交, 杂交时间 16 h, 加入连接缓冲液和连接酶进行连接反应, 经 PCR 扩增后用 ABI 3130 基因分析仪进行毛细管电泳, 所得数据用 Gene Marker v1.6 软件分析, 通过计算健康对照人群平均扩增峰值, 对所扩增峰值进行标准化处理, 分析得出 MLPA 分析结果图。每次 MLPA 检测都包括一个健康对照样本, 检测结果重复 2 次。发现致病的基因突变即确诊, 未发现异常的继续进行第 2 代高通量的测序。

1.2.3 第 2 代高通量测序 利用 Covaris S220 超声波仪(massachusetts, USA)将先证者 2 和 3 基因组 DNA 打断成 200~250 bp 的片段。将 1 μg 提纯的 DNA 片段进行末端修复并连接上标记性接头, 完成单个患者的 DNA 建库。用定制的基因片段捕获芯片 SureSelect DNA Target Enrichment Baits (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), 与 2~4 个标记好的患者 DNA 库杂交 16 h, 除去未结合的片段。洗脱芯片特异性筛选的片段, 再进行杂交后扩增, 最后进行高通量测序仪 Illumina HiSeq2000 Analyzers (Illumina, San Diego, USA)连续测序 200 个循环, 并用 Illumina bcl2fastq Conversion (Version 1.8.4)读出原始测序数据。用此前经过验证的过滤原则对原

始数据进行筛选, 生成双端 100 bp 的过滤后数据。再将这些数据利用软件(Burrows Wheeler Aligner Multi. Visionsoftware package)与参考序列[the reference human genome from the NCBI database(Build 37)]进行比对, 输出测序结果。最后利用 SOAPSnp 软件和 Samtools pileup 软件找出点突变、微小缺失和插入。

1.2.4 Sanger 法验证 对于先证者 2 和 3 发现的致病突变, 在其所在片段上下游设计引物, PCR 扩增并对产物做 Sanger 测序, 所得结果与 DMD 基因标准序列(NG\_012232.1)进行比对, 从而验证基因芯片捕获和高通量测序的结果。两位先证者的父母也进行该法验证。

2 结 果

家系 1 的家系图如图 1 所示, 先证者 1 的 MLPA 检测发现 DMD 基因 Exon 7 缺失。Ⅲ 1 和 Ⅲ 4 均发现 DMD 基因 Exon 7 缺失, 结合临床均确诊为 DMD。Ⅰ 4 和 Ⅱ 2 均系该 Exon 7 基因缺失杂合子携带者。

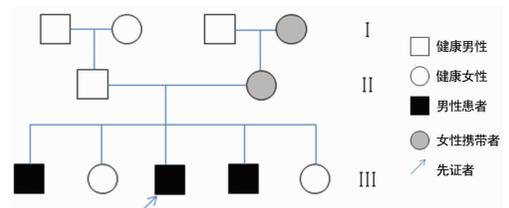
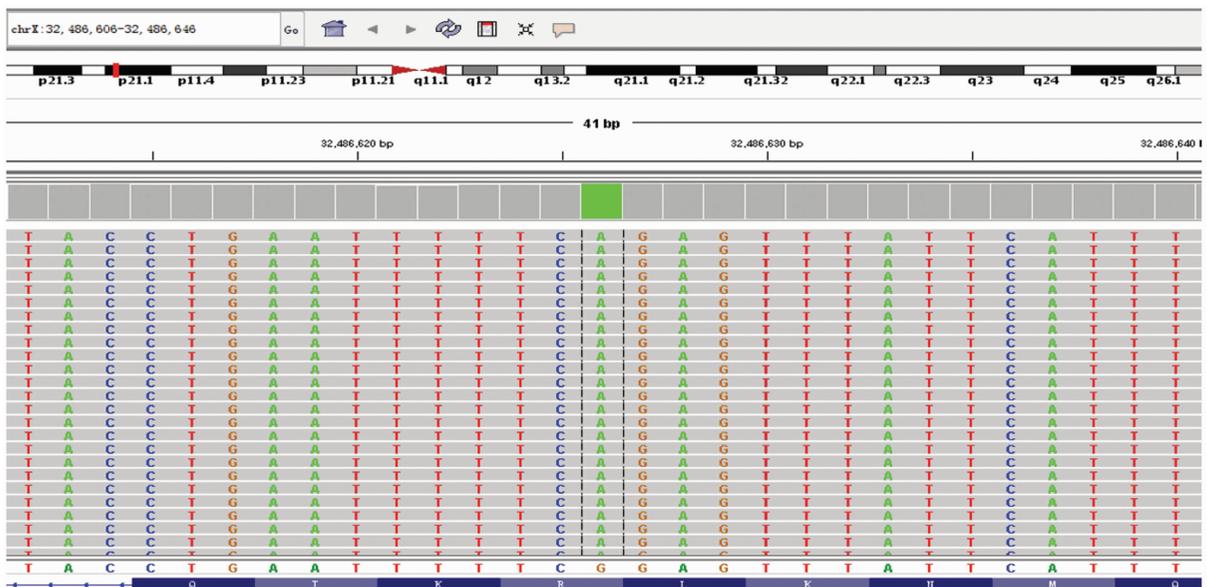


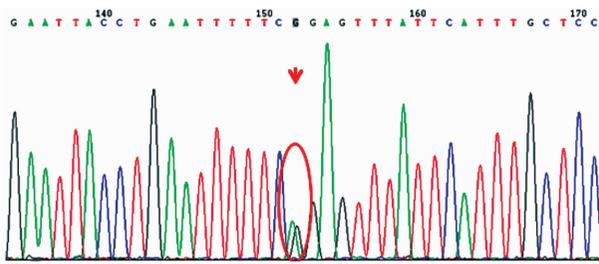
图 1 先证者 1 家系图

家系 2 和 3 MLPA 检测未见致病的基因突变, 故进行第 2 代高通量测序。先证者 2 的检测结果显示: chrX-32486626 位置 Exon 23 区域发现一处半合子突变: c. 3127C>T。家系验证结果: 其母 chrX-32486626 存在 c. 3127C>T 的杂合突变, 其父未见异常, 见图 2~3。患儿母亲到产科进行医学必要胎儿性别鉴定系女孩。先证者 3 结果: chrX-32509581 位置 Exon 20 区域发现一处半合子突变: c. 2411G>A。家系验证结果: 其母 chrX-32509581 存在 c. 2411G>A 的杂合突变, 其父未见异常。查询 HGMDpro 数据库发现先证者 2 和 3 的突变系致病突变。



突变位置用黑色虚线框出。

图 2 患儿 DMD 基因 chrX-32486626 区域 Exon 23: c. 3127C>T



突变位位置用红色实线及箭头标出。

图 3 患儿母 chrX-32486626 存在 c.3127C>T 的杂合突变

### 3 讨论

DMD 是儿科常见的遗传性神经肌肉病,发病男性占绝大多数,女性常为携带者,约 2/3 患儿的病变基因来自于母亲,近 1/3 病例系新发突变<sup>[6]</sup>。一般 3~5 岁发病,全身乏力呈进行性加重,逐渐卧床,最终因心功能不全和(或)呼吸衰竭多于 20 岁左右死亡,严重影响儿童的身心健康<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着口服激素等治疗方案的发展,患者的生存期和生活质量较以往有了一定改善。但是,本病迄今为止仍缺乏有效的根治方法。因此,高效、准确的基因诊断、携带者检测及遗传咨询对有效减少新发病例至关重要<sup>[1-2,5]</sup>。

多重 PCR 是 DMD 的主要基因检测手段,可诊断约 30%~40% 患者数的 DMD 基因外显子热点区域大片段缺失,但对于非热区的外显子缺失、非缺失突变和女性携带者不能检测<sup>[7-12]</sup>。本研究的 3 个家系多重 PCR 检测未发现致病的基因突变位点,故进行进一步的基因分析。MLPA 能有效检测大片段缺失或重复突变,使基因确诊率提高到 70% 左右<sup>[7-14]</sup>。家系 1 通过该技术确诊包括先证者在内的 3 名男孩均系 DMD 患者,同胞的 2 名姐妹均未携带致病基因,患儿母亲及外婆系突变基因携带者,为患儿家系成员的诊断及遗传咨询提供了有力证据。但是,家系 2 和 3 仍未检测到致病的基因突变位点。据报道,通过多重 PCR 结合 MLPA 检测,仍有占全部 DMD 致病突变 30% 左右的微小突变不能检测到,近年来第 2 代高通量测序使得这部分微小突变检测成为可能<sup>[7-12]</sup>。故家系 2 和 3 继续进行该 2 代测序,均发现先证者和携带者的致病基因突变位点。家系 2 的母亲此次怀孕系女婴,故可正常分娩。遗传指导家系成员的生育风险,最大程度杜绝后代中本病的发生。家系 3 的先证者母亲被证实系突变致病基因携带者,为后期的再次怀孕给产科提供了准确的依据。本研究的 3 个家系诊断过程值得临床医生高度关注。

因此,掌握本病正确的基因诊断策略对每个医务工作者都至关重要。从经济角度考虑,对临床表现和普通血生化检测疑诊 DMD 患者,先行多重 PCR 分析,阴性者再予 MLPA,仍阴性但高度疑诊患者,考虑第 2 代高通量测序。在检测成本进一步降低后,有望通过该单一检测就能涵盖几乎全部的 DMD 突变类型及其他上百种肌病的基因突变,缩短了诊断周期,为遗传咨询以及进行产前诊断提供依据,使患者及其家系成员最大程度获益。这在目前 DMD 尚缺乏有效根治手段的情况下意义尤其重大。

### 参考文献

[1] Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and

management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(1): 77-93.

- [2] Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes[J]. *Lancet Neurol*, 2003, 2(12): 731-740.
- [3] Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, et al. Entries in the leiden duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule[J]. *Muscle Nerve*, 2006, 34(2): 135-144.
- [4] Baskin B, Gibson WT, Ray PN. Duchenne muscular dystrophy caused by a complex rearrangement between intron 43 of the DMD gene and chromosome 4[J]. *Neuromuscular Disorders*, 2011, 21(3): 178-182.
- [5] Bladen CL, Salgado D, Monges S, et al. The TREAT-NMD DMD Global database: analysis of more than 7000 duchenne muscular dystrophy mutations[J]. *Hum Mutat*, 2015, 36(4): 395.
- [6] Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of duchenne muscular dystrophy[J]. *J Mol Diagn*, 2005, 7(3): 317-326.
- [7] 刘敏娟, 谢敏, 毛君, 等. 第 2 代测序技术在假肥大型肌营养不良基因诊断中的应用[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2012, 29(3): 249-254.
- [8] 王晶, 贺勇. 杜氏肌营养不良分子诊断技术的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(10): 1307-1309.
- [9] 戴毅, 姚风霞, 魏晓明, 等. 基因芯片捕获及高通量测序在迪谢内型肌营养不良基因诊断中的初步研究[J]. *中华神经科杂志*, 2013, 46(3): 188-192.
- [10] 林齐防, 陈万金, 王柠, 等. 应用多重连接依赖性探针扩增定量技术检测假肥大型肌营养不良重复突变及携带状态[J]. *中华神经科杂志*, 2011, 44(8): 568-573.
- [11] Gintjee TJ, Magh AS, Bertoni C. High throughput screening in duchenne muscular dystrophy: from drug discovery to functional genomics[J]. *Biology (Basel)*, 2014, 3(4): 752-780.
- [12] 杜文津, 万琪, 陈晋文, 等. 假肥大型肌营养不良基因突变检测方法的应用比较[J]. *卒中与神经疾病*, 2010, 17(5): 289-292.
- [13] Willis AS, van den Veyver I, Eng CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis[J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(4): 315-320.
- [14] Zimowski JG, Massalska D, Holding MA, et al. MLPA based detection of mutations in the dystrophin gene of 180 Polish families with Duchenne/Becker muscular dystrophy[J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2014, 48(6): 416-422.

(收稿日期: 2015-09-08 修回日期: 2015-11-20)