

中国西北地区 102 例儿童 Duchenne 型肌营养不良 基因突变及家系分析研究

杨 乐, 赵斯钰, 郑妍妍, 李桃利, 宋西晓, 王 燕 (西安市儿童医院神经内科, 西安 710002)

摘要:目的 了解西北地区 Duchenne 型肌营养不良症 (DMD) 患者基因突变特点。方法 收集 2014 年 7 月~2020 年 6 月的 102 例 DMD 患者作为研究对象, 采用多重连接依赖探针扩增 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 技术、二代基因测序 (next-generation sequencing, NGS) 技术及 Sanger 测序方法进行基因检测, 分析西北地区 DMD 患者基因缺失突变、重复突变、点突变的分布区域特点, 并对 2 个 DMD 家系基因特点进行分析。结果 102 例 DMD 患者, 72.5% 来源于遗传, 27.5% 为新发突变。基因突变类型中, 85.3% 为片段缺失, 6.9% 为片段重复, 7.8% 为点突变。片段缺失突变中, ≤ 5 个数目的外显子缺失最为常见, 占比为 66.6%; 外显子 44~54 是最常见的缺失区域, 外显子 2 是最常见的重复区域。2 个家系研究, 家系 1 中突变位点为缺失突变的热点区域, 外显子 45~51 区域; 家系 2 中主要是重复突变, 集中在外显子 2 和 17~18 区域。结论 大样本对西北地区 DMD 患者及家系的基因分析, 可以进一步了解 DMD 患者基因谱, 为基因治疗建立基础。

关键词: Duchenne 型肌营养不良; 基因; 突变; 家系

中图分类号: R746.2; Q754 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 05-012-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.05.003

102 Cases of Duchenne Muscular Dystrophy in Children in Northwest China Study on Gene Mutation and Family Analysis

YANG Le, ZHAO Si-yu, ZHENG Yan-yan, LI Tao-li, SONG Xi-xiao, WANG Yan

(Department of Neurology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the genotype characteristics of Duchenne muscular dystrophy (DMD) in Northwest China. **Methods** A total of 102 patients with DMD from July 2014 to June 2020 were collected as the research subjects. MLPA, NGS and Sanger sequencing were used for gene detection to analyze the regional characteristics of gene detection mutation, repeated mutation and point mutation in DMD patients in Northwest China, and the genetic characteristics of two DMD families were analyzed. **Results** Of the 102 patients with DMD, 72.5% were genetic and 27.5% were new mutations. Among the mutant types, 85.3% were fragment deletion, 6.9% were fragment duplication and 7.8% were point mutations. Among the fragment deletion mutations, the deletion of exon with ≤ 5 numbers was the most common, accounting for 66.6%. Exon 44~54 was the most common missing region, and exon 2 was the most common repeating region. Two families were studied. In family 1, the mutation site was the hot spot of deletion mutation, in the exon 45~51 region. Family 2 was dominated by repeated mutations, concentrated in exon 2 and the 17~18 region. **Conclusion** Genetic analysis of large samples of DMD patients and their families in Northwest China could further understand the gene profile of DMD patients, and lay a foundation for gene therapy.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; gene; mutation; family

Duchenne 型肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是最常见的 X 连锁隐性遗传肌肉病, 中国大陆发病率约为 1/4 560^[1]。该病多于 3~5 岁隐匿发病, 进行性加重的肌萎缩及肌无力, 临床表现运动发育落后或运动障碍、Gower 征阳性、双下肢近端无力, 走路缓慢, 易摔跤, 大多数的患儿存在腓肠肌假性肥大及心肌损害, 少数有智力障碍。多于 20 岁前死于呼吸、循环衰竭^[2]。目前 DMD 缺乏有效的治疗措施, 因此对 DMD 基因突

变的检测是控制和降低 DMD 发病率的关键。本研究分析了就诊于西安市儿童医院的 102 例 DMD 患者基因特点, 旨在了解西北地区 DMD 患者基因谱, 为 DMD 的早期诊断及有效治疗措施提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集 2014 年 7 月至 2020 年 6 月之间在本院神经内科门诊的 102 例临床诊断为 DMD 患儿, 父母否认近亲结婚, 所有 DMD 患者均来自西北地区, 包括陕西、甘肃、青海、宁夏和新疆,

基金项目: 陕西省社会发展科技攻关项目, 编号 2015SF214。

作者简介: 杨乐 (1987-), 女, 硕士, 主治医师, 专业: 儿童神经系统疾病, E-mail: yler-428@126.com。

通讯作者: 王燕 (1980-), 女, 在读博士, 副主任医师, 专业: 儿童神经系统疾病, E-mail: wy800709@163.com。

就诊年龄1月~14岁,平均年龄为 4.60 ± 3.59 岁。

入组标准:①多数婴幼儿时期运动发育较正常同龄儿落后;②隐匿起病,临床表现进行性加重,乏力,上楼困难,肌无力,下肢重于上肢,鸭步,Gower征阳性,腓肠肌假性肥大;③血清肌酸激酶显著增高,高于正常数十到数百倍;④肌活检免疫组织化学染色提示抗肌萎缩蛋白缺失;⑤肌电图提示为肌源性损害;⑥排除其它神经肌肉系统疾病等。

1.2 仪器和试剂 主要仪器有扩增产物采用的遗传分析仪(ABI 3500 XL, MRC-Holland公司),主要试剂有SALSA MLPA P034和P035探针组(MRC-Holland公司),高通量测序仪(Illumina)。

1.3 方法

1.3.1 基因组DNA提取:经知情同意后抽取102例患儿及患儿母亲静脉血各3ml装入EDTA-K₂抗凝试管中,使用全血基因组DNA提取试剂盒,进行基因组DNA提取。

1.3.2 多重连接依赖探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)检测:MLPA技术是检测DMD基因缺失/重复突变的主要方法^[3-4]。利用SALSA MLPA P034和P035探针组进行DMD基因79个外显子拷贝数变异检测。数据采用Coffalyser软件(MRC Holland)分析。结果判断标准:对应峰值在0.7~1.3提示拷贝数正常,0.3~0.7提示杂合性缺失,1.3~1.7提示杂合性重复,0提示纯合缺失,1.7~2.3提示重复突变^[5]。

1.3.3 二代基因测序(next-generation sequencing, NGS)检测:可以检测DMD基因点突变、微小缺失或插入突变等突变^[6],使用高通量测序仪测序。测序数据采用Next Gene V2.3.4软件与UCSC hg19人类参考基因组序列进行比对和鉴别遗传变异,并收集目标区域的覆盖度和平均测序深度等质量参数。神经肌肉病相关基因测序目标区域平均测序深度为150X,其中目标序列的98%测序深度达20X以上。

1.3.4 Sanger测序方法:用于验证DMD患者和携带者中致病性点突变^[7]。

1.3.5 根据患者基因突变类型选择相应的检测方法对其母亲及家系成员进行基因检测。

2 结果

2.1 DMD基因一般情况 102例DMD患儿经MLPA检测94例患者存在DMD基因致病性变异,包括片段缺失87例(85.29%),片段重复7例(6.86%)。MLPA检测阴性的8例(7.84%)患者进行NGS检测,均为点突变。对所有患者母亲进行验证,74例(72.55%)患儿母亲携带该基因突变,28例(27.45%)为新发。14.9%的患者存在阳性

家族史。

2.2 DMD基因缺失/重复分析 见表1。87例DMD基因片段缺失中,19例为单外显子缺失,45号外显子缺失最常见;18例为3个外显子缺失,最常见为48~50区;29例为大片段缺失(≥ 6 个外显子),其中央区存在一个缺失的热点区域,外显子44~54区,且存在1例79个外显子全部缺失患者。

表1 87例DMD基因缺失区域

缺失个数	n	常见缺失区域	构成比(%)
1	19	45	21.84
2	10	49~50	11.49
3	18	48~50	20.69
5	11	46~50	12.64
≥ 6	29	44~54	33.33

7例DMD基因片段重复中,3例为外显子2重复,2例为外显子16重复,1例为外显子44~60区域重复,1例同时存在2个重复区域,包括外显子44~47区域与61~65区域重复,2号外显子为大片重复突变的热点区域。见图1、图2。

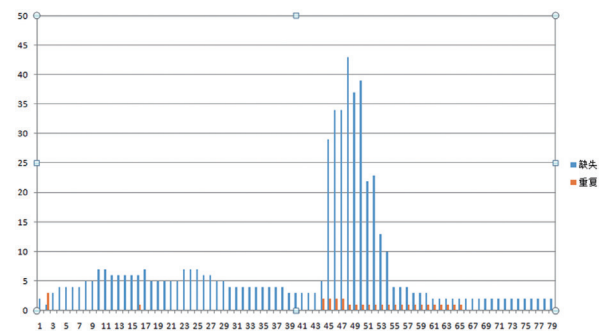


图1 94例DMD基因缺失/重复频率

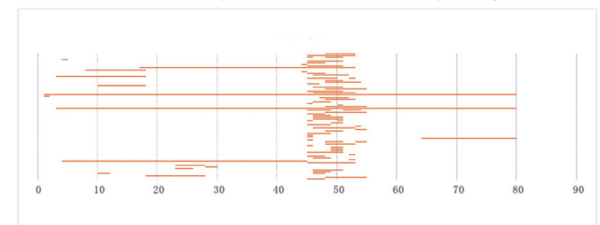


图2 94例DMD基因缺失/重复定位

2.3 DMD基因点突变分析 见表2、表3。8例DMD基因点突变,4例为无义突变,1例为插入突变,1例为缺失突变,2例为剪切突变,且其中3例为新发突变,而且这8例突变均为致病突变。

2.4 DMD基因家系 见图3。本研究进行了2个DMD家系的基因检测,家系1先证者为第Ⅲ代男性,DMD基因为45~51号外显子大片段缺失突变,第Ⅰ代男性DMD基因为45号外显子缺失,第Ⅱ代女性为携带,位于45~47号外显子缺失,该家系突

变位点为缺失突变的热点区域。家系2先证者为第Ⅲ代男性，DMD基因为17~18号外显子重复，第Ⅰ代男性DMD基因为17~18号重复，第Ⅱ代2位

女性均为携带，分别位于2号重复和17~18号缺失，该家系突变主要以重复突变为主，且存在片段的重复和缺失。

表2 DMD基因8例点突变一览表

病例	年龄	突变	类型	遗传方式
1	2岁	c.1929G>A	无义突变	新发
2	1岁3月	c.4519-7A>G	剪切突变	新发
3	12岁	c.4518+1G>A	剪切突变	遗传
4	4岁6月	c.4838G>A	p.W1613X 无义	新发
5	3岁2月	c.5563C>T	Nonsense 无义	遗传
6	3岁9月	c.6986delA	Deletion	遗传
7	6岁	c.10108C>T	Nonsense 无义	遗传
8	2岁10月	c.3009dupTG	Duplication	遗传

表3 DMD基因3例新发突变

基因	染色体坐标 (GRCh37/hg19)	NM号	核苷酸改变	纯合/ 杂合	变异 位置	致病性 分析	疾病/表型	遗传 方式	变异来源
DMD	ChrX:32583882	NM_001399.4	c.1929G>A	半合子	E16	致病性变异	贝/杜氏肌营养不良	XR	新生变异
DMD	ChrX:32404589	NM_004006.2	c.4519-7A>G	半合子	Intron32	疑似致病性变异	贝/杜氏肌营养不良	XR	新生变异
DMD	ChrX:32398634	NM_004006.2	c.4838G>A	半合子	CDS34	致病性变异	贝/杜氏肌营养不良	XR	新生变异

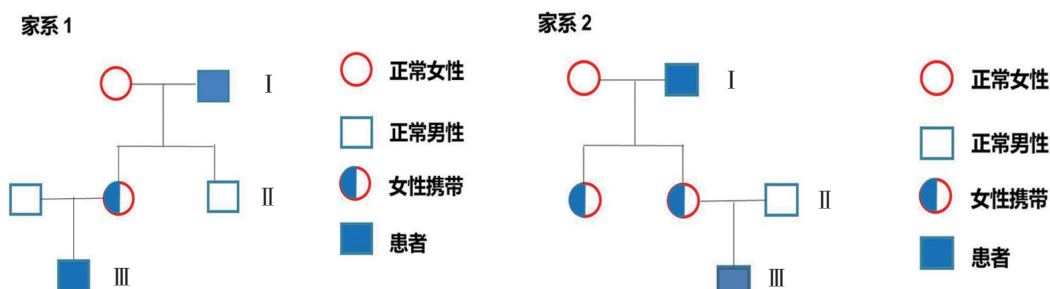


图3 2例先证者家系图

3 讨论

DMD以缓慢进行性加重的对称性肌无力和肌萎缩为特征，主要累及骨骼肌，可伴智力障碍^[8]和心肌损害，预后不良^[9]。

DMD基因是目前人类已知的最大的基因，有79个外显子，全长约2.4Mb^[10]。DMD患者抗肌萎缩蛋白(dystrophin)表达缺陷导致细胞膜不稳定^[11, 4]，细胞内的肌酸激酶等外漏，肌细胞坏死，导致脂肪组织和纤维结缔组织增生。DMD基因突变主要分为三种类型：外显子缺失或重复突变、点突变(包括碱基的置换、重复、缺失或插入)和剪切区突变^[12]。

本研究收集西北地区DMD患者102例，72.5%为母系遗传，与既往研究比例相似。但需要注意的是：本研究中阳性家族史比例较高，考虑这些患者多居住在偏远或贫困地区，缺乏优生优育的相关知识，因此需加强对西北地区健康教育、遗传咨询工

作，同时进行有效的产前诊断，以优化DMD患者的出生，提高西北地区的人口质量。

文献报道，DMD基因片段缺失为65%~70%，重复为6%~10%，两者共约80%，而点突变约为20%^[13]。本研究中片段缺失为85.29%，较相关研究比例多，而点突变比例少，是否和地域有相关性，有待样本数量扩增后进一步验证。在片段缺失的类型中，MAGRI等^[14]人研究发现DMD基因的单外显子缺失占24%，YANG等^[15]人发现，中国人群中最普遍的单外显子缺失为45和51，本研究单外显子缺失占21.84%，外显子45是缺失最频繁的，与文献报道基本一致。

既往研究发现DMD缺失突变集中在两个热点区域，最常见的为中心结构区，即外显子45~54区域，第二个为5'端区域，即外显子3~22区域。重复热点常涉及5'端区域^[16]，即外显子2~22区域和

外显子2区域^[17]。本研究发现缺失与重复突变分别存在一个热点区域,外显子44~54区域和外显子2区域,与既往研究略有偏差,可能与地域分布有关。本研究中的8例点突变,50%为无义突变,且C>T是最常见的碱基替换,与钟京梓^[18]报道的基本一致。

在DMD家系报道中,陆盈等^[19]报道了一例DMD家系,先证者及单卵双生胞弟均为外显子45~50区域缺失突变,考虑为新发突变所致。洪莎等^[20]报道了2例家系,家系1属于框外突变,属于DMD的可能性大,家系2属于框内突变,属于BMD的可能性大。本研究中2个家系,第Ⅰ代男性临床症状轻,均为框内突变。第Ⅲ代男性为大片段缺失/重复突变,该突变破坏了阅读框的完整性,故临床症状较重。

基因检测已成为DMD最新诊治指南中的新金标准^[21],故进行全面性基因检测,扩大西北地区DMD疾病基因谱,可以为患者带来新的治疗希望。

参考文献:

- [1] KE Qing, ZHAO Zhengyan, GRIGGS R, et al. Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy in China: follow-up diagnosis and subsequent treatment[J]. World Journal of Pediatrics, 2017, 13(3): 197-201.
- [2] 张瑶, 汤颖, 张成. Duchenne型肌营养不良心脏损害研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2013, 13(5): 453-456.
ZHANG Yao, TANG Ying, ZHANG Cheng. Progress study of the cardiac damage in Duchenne muscular dystrophy [J]. Chinese Journal of Contemporary Neurology and Neurosurgery, 2013, 13(5): 453-456.
- [3] LAING N G, DAVIS M R, BAYLEY K, et al. Molecular diagnosis of duchenne muscular dystrophy: past, present and future in relation to implementing therapies[J]. The Clinical Biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists, 2011, 32(3): 129-134.
- [4] ABBS S, TUFFERY-GIRAUD S, BAKKER E, et al. Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies[J]. Neuromuscular Disorders, 2010, 20(6): 422-427.
- [5] 王皖骏, 朱海燕, 朱瑞芳, 等. 假肥大型肌营养不良症家系的基因检测与产前诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(1): 45-48.
WANG Wanjun, ZHU Haiyan, ZHU Ruifang, et al. Mutation analysis and prenatal diagnosis of families affected with Duchenne and Becker muscular dystrophy [J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2013, 30(1): 45-48.
- [6] 何展文, 陈启慧, 李平甘, 等. 多重连接探针扩增和二代测序技术检测 Duchenne 型肌营养不良基因分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2020, 23(14): 1209-1212.
HE Zhanwen, CHEN Qihui, LI Pinggan, et al. Genetics analysis of patients with Duchenne muscular dystrophy using multiplex ligation-dependent probe amplification and next-generation sequencing [J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2020, 23(14): 1209-1212.
- [7] 李双, 白莹, 赵振华, 等. 81例假肥大型肌营养不良症患者基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33(6): 762-776.
LI Shuang, BAI Ying, ZHAO Zhenhua, et al. Mutation analysis of 81 cases with Duchenne/Becker muscular dystrophy [J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2016, 33(6): 762-776.
- [8] NARDES F, ARAUJO A P, RIBEIRO M G. Mental retardation in Duchenne muscular dystrophy[J]. Journal de Pediatria, 2012, 88(1): 6-16.
- [9] BEYTÍA M L, VRY J, KIRSCHNER J. Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives[J]. Acta Myologica, 2012, 31(1): 4-8.
- [10] KOENIG M, HOFFMAN E P, BERTELSON C J, et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy(DMD)cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals[J]. Cell, 1987, 50(3): 509-517.
- [11] 韩春锡, 林婧娴, 吴维青, 等. 婴幼儿杜氏型肌营养不良临床表现及其基因和骨骼肌病理特征[J]. 中国循证儿科杂志, 2013, 8(4): 290-294.
HAN Chunxi, LIN Jingxian, WU Weiqing, et al. Clinical, genetic and pathologic features of infant Duchenne muscular dystrophy [J]. Chinese Journal of Evidence Based Pediatrics, 2013, 8(4): 290-294.
- [12] WEIN N, ALFANO L, FLANIGAN K M. Genetics and emerging treatments for Duchenne and Becker muscular dystrophy[J]. Pediatric Clinics of North America, 2015, 62(3): 723-742.
- [13] SARDONE V, ZHOU Haiyan, MUNTONI F, et al. Antisense oligonucleotide-based therapy for neuromuscular disease[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2017, 22(4): 563.
- [14] MAGRI F, DEL BO R, D'ANGELO M G, et al. Clinical and molecular characterization of a cohort of patients with novel nucleotide alterations of the Dystrophin gene detected by direct sequencing[J]. BMC Medical Genetics, 2011, 12(1): 37.
- [15] YANG Juan, LI Shaoyin, LI Yaqin, et al. MLPA-based genotype-phenotype analysis in 1 053 Chinese patients with DMD/BMD[J]. BMC Medical Genetics, 2013, 14(1): 29.
- [16] 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]. Journal of Human Genetics, 2010, 55(6): 379-388.
- [17] MA Peipei, ZHANG Shu, ZHANG Hao, et al. Comprehensive genetic characteristics of dystrophinopathies in China[J]. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2018, 13(1): 109.
- [18] 钟京梓. 肌营养不良基因诊断及新突变致病性研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2018.