

## • 临床检验研究论著 •

DMD 基因外显子缺失导致进行性肌营养不良<sup>\*</sup>

王银龙,潘秀兰,王友明,闫纪琳,魏东敏,耿建芳,单铁英

(河北工程大学附属医院,河北邯郸 056002)

**摘要:**目的 通过基因分析对 DMD 患者做出准确诊断,以便检出携带者和进行产前诊断。方法 运用多重 PCR 技术对来该院就诊临阵上诊断为 DMD/BMD 患者进行 DMD 基因突变分析。结果 11 例诊断为 DMD/BMD 患者中发现 5 例有 DMD 基因外显子缺失,分别是外显子 45、48、51 各 1 例,外显子 4 有 2 例。结论 DMD 基因外显子缺失导致进行性肌营养不良。

**关键词:**肌营养不良; 聚合酶链反应; 基因**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.010**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2013)10-1223-02Deletion of exons of DMD gene lead to progressive muscular dystrophy<sup>\*</sup>

Wang Yinlong, Pan Xiulan, Wang Youming, Yan Jilin, Wei Dongmin, Geng Jianfang, Shan Tieying

(The Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056002, China)

**Abstract: Objective** To specific diagnose DMD patient by using gene analysis, further more for carrier and pregnant diagnosis.

**Methods** Multi-PCR method was conducted to analyze DMD gene mutation in DMD/BMD patients. **Results** Five of eleven patients were found deletion of exons of DMD gene. The deletions are exon 45, 48, 51 and two exon 4. **Conclusion** Deletion of exons of DMD gene lead to progressive muscular dystrophy.

**Key words:**muscular dystrophies; polymerase chain reaction; genes

进行性肌营养不良症(PMD)是一组遗传性肌肉变性疾病,其临床特征主要为缓慢进行性加重的对称性肌肉无力和萎缩,无感觉障碍;电生理表现主要为肌源性损害<sup>[1]</sup>。临阵上分 Duchenne 型(DMD)、Bker 型(BMD)、肢带型、面肩肱型例、远端型和眼咽型。其中以 DMD/BMD 最常见,它是同一基因的不同类型突变造成的肌肉神经系统中最常见的 X 连锁隐性遗传病,因此患者大多为男性。发病率分别为活产男婴的 1/3500。女性为携带者,但有约 2.5% 的女性杂合子患者因携带正常基因的 X 染色体在胚胎早期被灭活而导致发病。DMD 基因位于 Xp21,基因组 DNA 由 79 个外显子组成,cDNA 长约 14 kb 在 DMD 基因内存在许多重复序列,形成许多断裂和交换热点,容易导致基因缺失、重复和突变发生<sup>[2]</sup>。随着分子生物学技术的快速发展,基因诊断已经被广泛应用到 DMD/BMD 的临床研究中,研究者运用多重 PCR 技术对来本院就诊临阵上疑诊为 DMD/BMD 患者进行了基因诊断,报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 11 例检测对象均为男性,其中最小发病年龄为 2.5 岁。首发症状肢体无力,走路呈现鸭步态,腓肠肌肥大。5 例肌电图检测呈肌源性损害,7 例血清酶学检测肌酸激酶 CK 明显升高,高达 1 760 IU/L。经本院神经科临床诊断为 DMD。2 例有家族患病史,其余为散发。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 人基因组 DNA 提取** 抽取 EDTA 抗凝静脉血 1 mL,取 0.2 mL 加入等体积裂解液和蛋白酶 K 混匀,37 °C 孵育 10 min,加入 0.2 mL DNA 结合液和 0.2 mL 乙醇充分混匀,

过柱离心,再加入洗液离心清洗 2 次,加 30 μL TE 缓冲液于柱上,10 000 r/min 离心 1 min 收集 DNA。Nanodrop 测定 DNA 的量和纯度,0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 是否有降解。

**1.2.2 多重 PCR 检测 DMD/BMD 基因突变** 选择 DMD 5' 端缺失热点区和中央缺失热点区,设计 9 对引物。分成 5 对引物和 4 对引物两组,25 μL 反应体系中加入:模板 100 ng,10× buffer 2.5 μL,dNTP(25 mM,each) 2 μL,5 对/4 对引物混合物 2 μL(引物终浓度为 0.1 nmol/L),最后加水至 25 μL,混匀后离心数秒,至 95 °C 预变性 10 min,离心 15 s,迅速置冰上,加入 Tag 酶 2.5 U,混匀后放入 PCR 仪中按照:94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 60 s,30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。

**1.2.3 结果判定** 取 10 μL 扩增产物加入溴酚蓝载样缓冲液 2 μL,2.5% 琼脂糖凝胶电泳,100V 电压 0.5 h,经溴化乙锭染色后,在凝胶成像检测仪上观察 DNA 条带并照相记录。以正常男性模板扩增产物为对照,4 条或 5 条扩增带都存在为正常,缺失任何一条带,经单一引物再扩增确认结果相同后,诊断为基因缺失型 DMD/BMD。

## 2 结 果

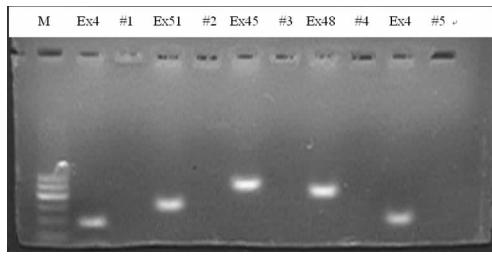
11 例临床诊断 DMD 患者外周血 DMD 外显子基因分别经多重 PCR 扩增和单一引物重复扩增确认发现共 5 例有缺失,见表 1,分别是外显子 45、48、51 各 1 例,外显子 4 有 2 例。检出缺失的外显子片段最长者为 45 号(547 bp),最短者为 4 号外显子 191 bp,见图 1。缺失的外显子分布情况为累及中央缺失热区(44~53 号外显子区)者检出率 60%(3/5);5' 端缺失热区(3~19 号外显子区)为 40%(2/5),且 2 例均为外显子 4

\* 基金项目:2011 年度河北省邯郸市科学技术局资助项目(1123108078)。作者简介:王银龙,男,副主任医师,主要从事神经内科研究工作和遗传性神经肌肉疾病研究。

缺失。

表1 5例DMD患者外显子缺失分布

病例序号	临床诊断	发病年龄	外显子	长度(bp)
#1	DMD	5	4	191
#2	DMD	11	51	388
#3	DMD	9	45	546
#4	DMD	4	48	506
#5	DMD	8	4	191



M:标记物,100 bp ladder;Ex:extron。

图1 5例DMD患者外显子缺失单一引物确认电泳图

### 3 讨 论

1987年由Kunkel克隆出DMD/BMD的致病基因——抗肌萎缩蛋白基因(dystrophin gene)。Dystrophin基因由79个外显子和78个内含子组成长约213 Mb,cDNA约2 300 kb<sup>[3]</sup>。迄今为止,分子遗传学研究发现抗肌营养不良蛋白基因是人类分离到的最大的基因。正是由于此基因如此巨大,才使其具有高度的突变率,在多种突变中,大多数为基因缺失,约占2/3,缺失的基因主要分布在两个区域,即中央缺失热区(约占70%)和5'端缺失热区(约占20%)<sup>[4]</sup>。作者研究分析临床诊断为DMD/BMD患者11例,发现5例具有外显子基因缺失,总基因突变检出率45.5%,其中60%在中央缺失区(外显子45、48、51),40%在5'端缺失热区(外显子4),缺失分布基本符合上述病变特点。5例外显子缺失患者临床诊断均为DMD,但临床表现不尽相同,2例4号外显子缺失临床症状较重,走路呈现鸭步态,患者会出现上楼困难、蹲下再起来困难,腓肠肌肥大;肌电图检测呈肌源性损害;血清酶学检测肌酸激酶CK明显升高。目前,本病尚无根治办法,新的治疗方法处于试验阶段,如腺相关病毒为载体介导的小基因(含肌萎缩蛋白编码中央重复区和羧端区约基因全长的1/3)转染治疗,在mdx小鼠实验中取得良好治疗效果,并已进入I期临床试验<sup>[5]</sup>;还有针对上调与dystrophin蛋白高度同源的utrophinA基因表达

的研究,以替代dystrophin的部分功能<sup>[6]</sup>。所以,孕前遗传咨询、携带者的家谱分析,通过检出致病基因携带者和鉴别妊娠携带者的胎儿性别及其基因型,进行产前诊断是预防本病发生的重要措施。

分子生物学技术的快速发展使得DMD/BMD的基因诊断方法不断增加,如从PCR、限制性片段长度多态性(RFLPs)连锁分析检测已知的有限的缺失和突变,到可检测微小突变的高灵敏度探针连接多重扩增(MLPA)技术<sup>[7]</sup>、探索未知突变的比较基因组方法<sup>[8]</sup>。以及检测dystrophin mRNA的反转录PCR和用抗dystrophin-N,-C,-R单克隆抗体进行免疫组化染色、免疫印迹检测dystrophin蛋白表达是否完整等,对DMD/BMD的诊断更加准确和精确。相信,DMD/BMD的基因更精细全面的诊断和基因治疗技术的不断成熟将会给DMD/BMD疾病患者的诊断和治疗带来新的福音。

### 参考文献

- [1] 王维治,罗祖明,丁新生. 神经病学[M]. 4版. 北京:人民军医出版社,2000:291-294.
- [2] 申本昌,张成,黄文,等. 非缺失/重复型肌营养不良症患者的致病点突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2006,23(4):392-396.
- [3] Kenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, et al. DMDComplete 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.
- [4] 潘速跃,张成,盛文利,等. 中国人抗肌营养不良蛋白基因缺失的分布特点[J]. 中华神经科杂志,1999,32(1):22-24.
- [5] Reay DP, Niizawa GA, Watchko JF, et al. Effect of NF-κB inhibition on AAV9 minidystrophin gene transfer to the mdx mouse [J]. Mol Med, 2012,18(13):466-476.
- [6] Sonnemann KJ, Heun-Johnson H, Turner AJ, et al. Functional substitution by TAT-utrophin in dystrophin-deficient mice[J]. PLoS Med, 2009,6(5):e1000083.
- [7] Wang Q, Li LJ, Lin C, et al. Characteristics of dystrophin gene mutations among Chinese patients as revealed by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2009,13(1):23-30.
- [8] Hegde MR, Chin EL, Mulle JG, et al. Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene[J]. Hum Mutat, 2008,29(9):1091-1099.

(收稿日期:2013-01-11)

(上接第1222页)

[11] J Am Coll Cardiol, 1998, 31(7):1460-1465.

[11] 王莉,张帆,陈飞. 血清超敏C反应蛋白、血脂水平与颈动脉斑块和脑梗死的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(21):2438-2439.

[12] 彭瑛,邓剑,邓正华,等. 超敏C反应蛋白与冠心病相关性分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(5):456-457.

(收稿日期:2013-01-18)