doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.11.009

论著·临床研究

阵发性运动诱发性运动障碍患者的临床表现及基因诊断

朱晓明　龚育红　卢思　程首超　姚宝珍

（武汉大学人民医院儿科，湖北 武汉　430060）

［摘要］　回顾性分析 5 例阵发性运动诱发性运动障碍（PKD）患儿的临床表现，并利用高通量测序及染色体微阵列技术分析患者的基因突变。5 例患者中 4 例男性、1 例女性，发病年龄为 6~9 岁。均因突然的运动、转身、惊吓或者精神紧张等因素诱发，表现为单侧或双侧的肢体姿势异常、手足徐动、面部肌肉抽搐以及身体姿势异常等，无意识障碍。发作频率从每月 3~5 次到每天 2~7 次，每次发作持续时间不超过 30 s。脑电图均未见异常。3 例患者均有类似发作的家族史。高通量测序发现 4 例患者存在 PKD 致病基因富脯氨酸跨膜蛋白 2（PRRT2）突变，其中 2 例为 c.649_650insC（p.R217PfsX8）杂合突变，1 例为 c.436C>T（p.P146S）突变，1 例为 IVS2-1G>A 剪接位点突变，c.436C>T 与 IVS2-1G>A 是未见报道的新发突变。对于基因检测阴性的 1 例患者行基因芯片检测，发现 16 号染色体 p11.2 区域缺失，大小为 0.55 M。5 例患者予以低剂量卡马西平治疗，均有效。PKD 是一种罕见的神经系统发作性疾病，多种遗传学分析技术进行 PRRT2 基因检测有助于确诊。

［中国当代儿科杂志，2017，19（11）：1169-1173］

［关键词］　阵发性运动诱发性运动障碍；临床特点；PRRT2 基因；基因检测；儿童

Clinical manifestations and genetic diagnosis of paroxysmal kinesigenic dyskinesia

ZHU Xiao-Ming, GONG Yu-Hong, LU Si, CHENG Shou-Chao, YAO Bao-Zhen. Department of Pediatrics, Renmin Hospital of Wuhan University, Whuan 430060, China (Yao-B-Z, Email: jingfang612@163.com)

Abstract: The clinical manifestations of five children with paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD) were retrospectively analyzed and their gene mutations were analyzed by high-throughput sequencing and chromosome microarray. The 5 patients consisted of 4 males and 1 female and the age of onset was 6-9 years. Dyskinesia was induced by sudden turn movement, scare, mental stress, or other factors. These patients were conscious and had abnormal posture of unilateral or bilateral extremities, athetosis, facial muscle twitching, and abnormal body posture. The frequency of onset ranged from 3-5 times a month to 2-7 times a day, with a duration of <30 seconds every time. Electroencephalography showed no abnormality in these patients. Three patients had a family history of similar disease. The high-throughput sequencing results showed that a heterozygous mutation in the PRRT2 gene, c.649_650insC (p.R217PfsX8), was found in two patients; the mutation c.436C>T (p.P146S) was found in one patient; a splice site mutation, IVS2-1G>A, was found in one patient. The two mutations c.436C>T and IVS2-1G>A had not been reported previously. The chromosome microarray analysis was performed in one patient with negative results of gene detection, and the chromosome 16p11.2 deletion (0.55 Mb) was observed. Low-dose carbamazepine was effective for treatment of the 5 patients. PKD is a rare neurological disease. The detection of the PRRT2 gene by multiple genetic analysis can help the early diagnosis of PKD. **[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(11): 1169-1173]**

Key words: Paroxysmal kinesigenic dyskinesia; Clinical feature; PRRT2 gene; Gene detection; Child

［收稿日期］2017-05-11；［接受日期］2017-07-24
［作者简介］朱晓明，男，硕士研究生，主治医生。
［通信作者］姚宝珍，女，主任医师。

阵发性运动诱发性运动障碍（paroxysmal kinesigenic dyskinesia, PKD）属于阵发性运动障碍的一个类型，是一种罕见的神经系统发作性疾病，多在儿童和青少年早期发病，患病率约为 1/150000，男性患者多于女性患者[1-2]。有家族史的 PKD 病例约占 60%，遗传方式为常染色体显性遗传，但存在外显不全现象[3]。Chen 等[4]利用全外显子测序的方法发现 PKD 致病基因为富脯氨酸跨膜蛋白 2（proline-rich transmenbrane protein 2, PRRT2）。本文利用 DNA 测序结合染色体微阵列技术对 5 例疑似 PKD 患者进行分子诊断，分析 PKD 的临床表现及基因突变特点，进一步加深临床医师对该病的认识。

1 资料与方法

1.1 研究对象

以武汉大学人民医院儿科收治的 5 例疑似 PKD 患者为研究对象，其中 4 例男性、1 例女性。均以运动或精神紧张等诱发的突发肌张力障碍就诊。发病年龄为 6~9 岁。发作时意识清楚，单侧或双侧肢体姿势异常、手足徐动、面部肌肉抽搐以及身体姿势异常等。5 例患者的发作频率从每月 3~5 次到每天 2~7 次，每次发作的持续时间不超过 30 s。患者均非早产，均无神经系统异常，患者父母均非近亲结婚，但 3 例患者（P1、P3、P4）有类似发作家族史。患者血、尿常规及肝肾功能、血糖、血脂、电解质以及甲状腺功能均未见异常。5 例患者的临床特点详见表 1。

表 1 5 例阵发性运动诱发性运动障碍患者的临床特点

临床特点	P1	P2	P3	P4	P5
性别	男	男	男	女	男
年龄	11 岁 7 个月	6 岁 10 个月	7 岁 6 个月	7 岁 2 个月	9 岁 7 个月
发病年龄	8 岁 6 个月	6 岁 9 个月	7 岁 1 个月	7 岁 2 个月	8 岁 6 个月
诱因	突然运动、转身	突然运动	(–)	受到惊吓	突然运动、精神紧张
临床表现	肢体姿势异常	单侧肢体姿势异常，偶尔双侧发作；抽搐	身体姿势及面部肌肉异常	手足徐动，面部肌肉抽搐	肢体和躯干的肌张力不全，姿势异常
持续时间	约 20 s	10~30 s	10~30 s	约 30 s	10~30 s
发作频率	2~7 次 /d	10~20 次 / 月	5~10 次 / 月	3~5 次 / 月	1~3 次 /d
睡眠发作	偶见惊醒时发作	(–)	(–)	(–)	(–)
脑电图	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)
CT/MRI	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)
出生缺氧史	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)
家族史	父亲有类似发作	(–)	父亲有类似发作	父亲有类似发作	(–)

PKD 诊断标准[5]：特定的触发因素（如突然的运动），短促的发作持续时间（<1 min），发作时无意识障碍或疼痛，抗癫痫药物治疗有效，排除其他器质性疾病，起病年龄为 1~20 岁（有家族史的病例除外）。

研究得到医院医学伦理委员会批准及患者家属知情同意。

1.2 高通量测序及 Sanger 测序验证

取每个患儿外周血 2 mL，利用全血基因组提取试剂盒提取基因组 DNA（上海生工公司），并使用分光光度计测定其浓度。委托华大基因公司进行高通量测序。

对于高通量测序发现突变的患者及其家属取外周静脉血提取基因组 DNA，利用基因特异性引物（上海生工合成）扩增 PRRT2 基因相应外显子，引物序列见表 2。PCR 反应体系为基因组 DNA 50~100 ng、dNTP 150 μmol/L、$MgCl_2$ 1.5 mmol/L，上下游引物各 0.5 μmol/L，Taq DNA 聚合酶 0.5 U（TAKARA），补水至终体积 25 μL。PCR 反应条件：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，56 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，35 个循环；72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经电泳检测以后进行 Sanger 测序分析。

对于 DNA 测序未见 PRRT2 基因突变的患者

利用染色体微阵列技术进行全基因组水平的微缺失微重复检测。取患儿及其父母 EDTA 抗凝静脉血 2 mL，提取 DNA，并调整 DNA 浓度至 50 ng/μL。采用 Illumina SNP 芯片进行染色体微缺失 / 微重复检测，采用 KaryoStudio 软件进行数据分析。

表 2　PRRT2 基因各外显子引物

引物名称	引物序列	扩增位置	扩增片段 (bp)
1F	CCTTGCCCTCCTGCTCGTAG	exon1	566
1R	CTCCAGACACCCGCATTCC		
2F	AAACCCCAACTTTTCTTCCTC	exon2	1 271
2R	CATATCCCTCCCACCCAAAG		
3F	AACCCTCTGAGCCACCACTG	exon3	427
3R	CCTTGCCAACCCTTCCATTC		
4F	CGCTCTATAATATTTCTAAGATG	exon4	301
4R	CAGAGTAAACGGTGACGGGAG		

2　结果

2.1　基因检测结果

基因检测结果显示患者 P1（图 1）的 PRRT2 基因 2 号外显子存在 c.649_650insC 杂合突变，该突变导致编码蛋白在 217 位及之后的氨基酸序列发生改变，并在 224 位提前终止（p.R217PfsX8）。对患儿的父母、奶奶及妹妹进行相应位点的 Sanger 测序检测，发现患儿的父亲和妹妹均携带该突；患儿父亲儿童期起病，药物控制较好，35 岁以后几乎无症状；患者妹妹（7 岁）暂无临床表型。见图 1。P2 的 PRRT2 基因 2 号外显子存在 c.649_650insC 杂合突变；P3 的 PRRT2 基因存在 c.436C>T 杂合突变，其父母该位点未见异常；P4 的 PRRT2 基因存在 IVS2-1G>A 剪接位点突变。见图 2。P5 SNP 芯片染色体微缺失 / 微重复检测（图 3）显示：46,XY,del(16p11.2). seq[GRCh37/hg19](29343657-29889614)*1，即 16 号染色体 p11.2 区域存在缺失，片段的大小为 0.55 Mb，该区域包括：BOLA2，KIF22，PRRT2，SLX1B 等基因。

2.2　生物信息学分析

P3 的 436C>T 杂合突变（p.P146S）尚未见致病报道。采用 Polyphen2 软件预测其致病性，得分为 0.994；SIFT 软件预测得分为 0.01，说明该位点可能为致病性突变 。不同物种之间（人、家鼠、褐家属、家犬、山羊）突变位点的保守序列分析（图 4）提示该位点较保守，说明该位点对维持蛋白的结构和功能发挥起重要作用。患者 P4 存在 IVS2-1G>A 剪接位点突变，该位点位于剪接位点 GT-AG 的保守区域，对 PRRT2 基因的 RNA 加工成熟可能有影响，但需要从 RNA 水平进一步验证。

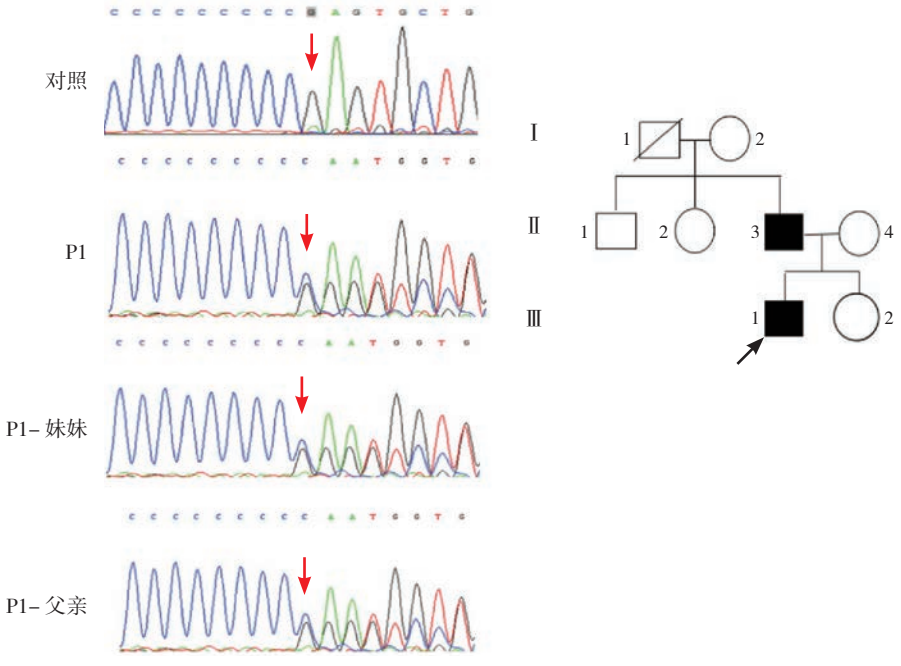

图 1　患者 1 的 PRRT2 基因突变分析及家系图　患者 P1 的 PRRT2 基因存在 c.649_650insC 突变，患者妹妹及父亲均携带该突变，突变位点如箭头所示。□示正常表型男性；○示正常表型女性；■示男性患者；⊠示其他原因死亡的男性；箭头所指为先证者。

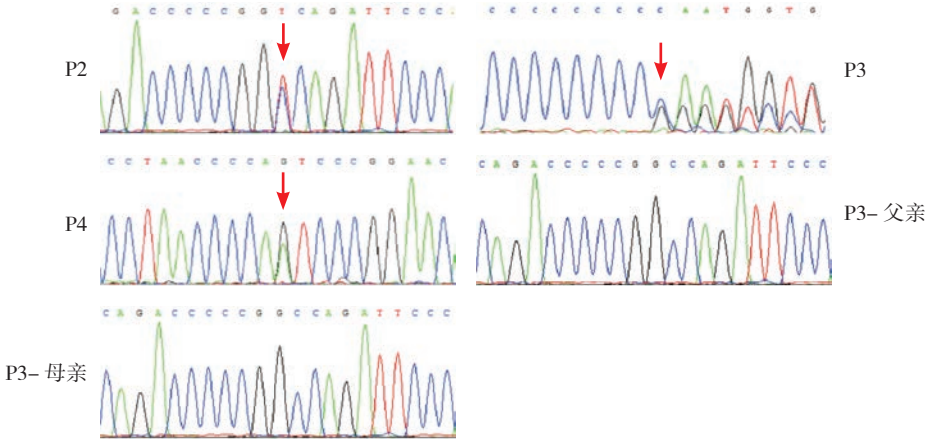

图 2　患者 P2、P3、P4 以及 P3 父母的 PRRT2 基因突变分析　患者 P2 的 PRRT2 基因存在 c.649_650insC 突变；P3 存在 c.436C>T 杂合突变，其父母该位点未见异常；P4 存在 IVS2-1G>A 剪接位点突变。突变位点如箭头所示。

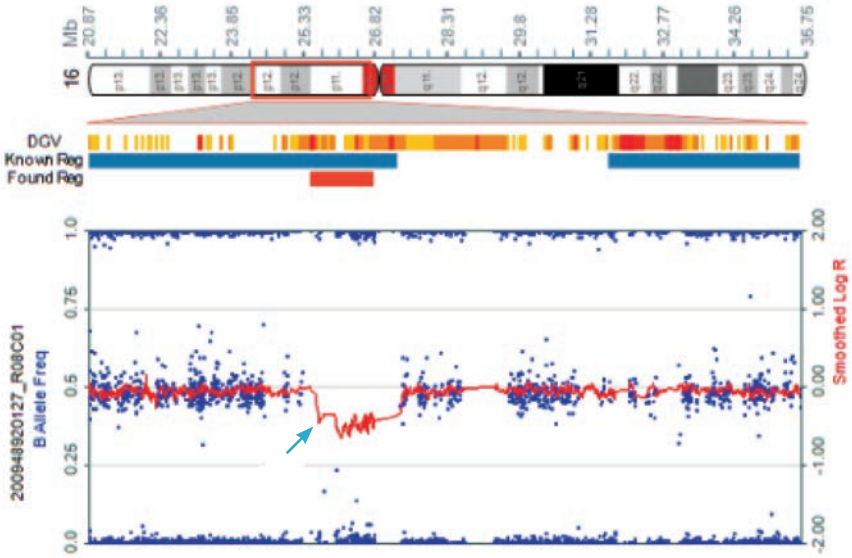

图 3　患者 P5 染色体芯片检测分析　患者 16p11.2 区域缺失 0.55 Mb。箭头所指为染色体缺失区域。

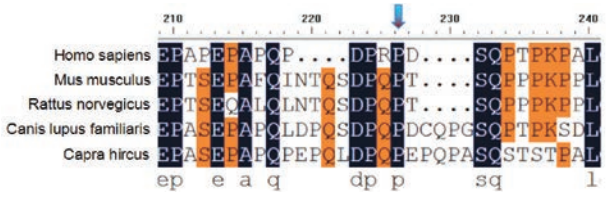

图 4　突变位点（p.P146S）的保守序列分析　突变位点 (p.P146S) 在人、家鼠、褐家属、家犬以及山羊等物种中保守。

2.3　治疗经过

5 例患者确诊后均服用卡马西平（每日 8 mg/kg），两个月后发作明显减少，5 个月后发作控制；但 P1 治疗 8 个多月后家长自行停药，症状复发，恢复用药症状控制。目前所有患者症状均控制。

3　讨论

阵发性运动障碍（paroxysmal dyskinesias, PD）是以突发性不自主的异常运动以及姿势障碍为主要表现的神经系统疾病，根据发作特点分为四类：阵发性运动诱发性运动障碍、阵发性过度运动诱发性运动障碍、阵发性非运动诱发性运动障碍以及阵发性睡眠诱发性运动障碍，以 PKD 最常见，多于儿童期发病，男性多于女性 [6]。本文 5 例患者中 4 例为男性。PKD 虽是 PD 中最常见的类型，但大多因症状较轻未能及时诊治，而且容易被误诊为癫痫；PKD 发作有随年龄增长而减少的趋势，成年后可逐渐缓解 [2]。

PKD 可为原发性，也可继发于缺氧性脑病、

基底节钙化、甲状腺功能减低等，表现为突发的运动诱发的运动障碍，即肌张力障碍、单侧或双侧面部或肢体抽搐，持续时间一般不超过 1 分钟，发作频率可从每月 1 次到每天数次或上百次 [7]。多数患者发作时意识清醒，部分患者发作之前有肢体麻木等症状，但患者的脑电图及头部磁共振多为正常。本研究 5 例患者均有运动或精神紧张等诱发因素，发作持续时间均短于 30s，发作频率存在较大差异，符合 PKD 的临床特点。

原发性 PKD 以常染色体显性遗传为主，部分存在外显不全的现象，外显率为 61%~90%[8]。2011 年，我国学者 Chen 等 [4] 首次发现 PRRT2 是 PKD 的致病基因。PRRT2 基因位于染色体 16p11.2 区域，主要在大脑组织表达 [9]。该蛋白含有两个 N 端糖基化位点（包括富含脯氨酸的保守区）、两个跨膜结构域、一个胞质区及 C 末端序列，其跨膜端高度保守具有重要生理功能 [10]。PRRT2 蛋白与突触相关蛋白 25（SNAP25）作用，在钙离子诱导的神经递质胞外分泌中发挥重要作用，PRRT2 突变或者缺失则影响该信号通路，导致临床症状产生 [11]。

PRRT2 基因已报道的突变有 90 多种，而其突变在 PKD 家系的检出率超过 90%，在散发病例中的检出率约 35%。c.649_650insC 是 PRRT2 基因的热点突变，约占检出总数的 60% 以上 [12]。本研究 2 例患者发现该突变。本研究 P1 及其父亲和妹妹均检测到该突变，但妹妹无症状。基因型相同而表型不同，可能与 PRRT2 基因外显不全有关 [8]。P3 检测到的 c. 436C>T（p.P146S）突变未见报道，该突变位于富含脯氨酸的保守区，生物信息学分析推测该位点为致病性突变；P4 存在 IVS2-1G>A 剪接位点突变，该位点对 mRNA 的加工成熟至关重要；P5 的缺失突变可能导致 PRRT2 基因单倍剂量不足，导致症状发生。

抗癫痫药物如卡马西平和苯妥英钠对 PKD 患者有效，小剂量即能控制发作，但随意停药可能导致复发 [13]。本研究的 5 例患者均使用卡马西平治疗，用药 5 个月后发作均控制。PRRT2 基因突变除导致 PKD 外，研究发现在良性家族性婴儿惊厥、热性惊厥以及 PED 等神经系统疾病中亦可发现该基因的异常，说明 PRRT2 基因突变存在表型异质性，而且这些疾病均对抗癫痫药物敏感 [14-15]。

综上所述，PKD 患者一般在儿童期起病，为运动诱发，PRRT2 基因突变是主要致病基因，低剂量抗癫痫药物治疗有效。对 PRRT2 基因进行突变筛查有助于 PKD 诊断。

［参　考　文　献］

[1] Huang XJ, Wang T, Wang JL, et al. Paroxysmal kinesigenic dyskinesia: Clinical and genetic analyses of 110 patients[J]. Neurology, 2015, 85(18): 1546-1553.

[2] 杨小玲，张月华，许小菁，等 . 阵发性运动诱发的运动障碍临床特点和 PRRT2 基因突变研究 [J]. 中华儿科杂志，2015, 53(8): 621-625.

[3] Lamperti C, Invernizzi F, Solazzi R, et al. Clinical and genetic features of paroxysmal kinesigenic dyskinesia in Italian patients[J]. Eur J Paediatr Neurol, 2016, 20(1): 152-157.

[4] Chen WJ, Lin Y, Xiong ZQ, et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia[J]. Nat Genet, 2011, 43(12): 1252-1255.

[5] Bruno MK, Hallett M, Gwinn-Hardy K, et al. Clinical evaluation of idiopathic paroxysmal kinesigenic dyskinesia: new diagnostic criteria[J]. Neurology, 2004, 63(12): 2280-2287.

[6] Demirkiran M, Jankovic J. Paroxysmal dyskinesias: clinical features and classification[J]. Ann Neurol, 1995, 38(4): 571-579.

[7] 张卉，时伟丽，肖海，等 . 一个发作性运动诱发性肌张力障碍家系的 PRRT2 基因突变研究 [J]. 中华医学遗传学杂志，2016, 33(1): 61-63.

[8] van Vliet R, Breedveld G, de Rijk-van Andel J, et al. PRRT2 phenotypes and penetrance of paroxysmal kinesigenic dyskinesia and infantile convulsions[J]. Neurology, 2012, 79(8): 777-784.

[9] Liu YT, Nian FS, Chou WJ, et al. PRRT2 mutations lead to neuronal dysfunction and neurodevelopmental defects[J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 39184-39196.

[10] Méneret A, Gaudebout C, Riant F, et al. PRRT2 mutation and paroxysmal disorder[J]. Eur J Neurol, 2013, 20(6): 872-878.

[11] Jarvis SE, Zamponi GW. Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels[J]. Cell Calcium, 2005, 37(5): 483-488.

[12] Li HF, Chen WJ, Ni W, et al. PRRT2 mutation correlated with phenotype of paroxysmal kinesigenic dyskinesia and drug response[J]. Neurology, 2013, 80(16): 1534-1535.

[13] Charlesworth G, Bhatia KP. Primary and secondary dystonic syndromes: an update[J]. Curr Opin Neurol, 2013, 26(4): 406-412.

[14] Gardiner AR, Jaffer F, Dale RC, et al. The clinical and genetic heterogeneity of paroxysmal dyskinesias[J]. Brain, 2015, 138(Pt 12): 3567-3580.

[15] Schubert J, Paravidino R, Becker F, et al. PRRT2 mutations are the major cause of benign familial infantile seizures[J]. Hum Mutat, 2012, 33(10): 1439-1443.

（本文编辑：俞燕）