

腓骨肌萎缩症 1 型患儿肌电图和遗传学研究

潘晓丽¹ 张楠楠¹ 叶红莲¹ 赵月飞¹ 高红²

(中国医科大学附属盛京医院 1. 神经功能检查室; 2. 先天畸形实验室, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 探讨腓骨肌萎缩症 1 型(CMT1)儿童的肌电图和遗传学特点。方法 对 24 例 CMT1 型患儿进行常规肌电图检测,同时联合应用 PCR-双酶切分析检测 17p11.2-12 上的基因重复,对照组为 10 名健康儿童。结果 24 例患儿运动或感觉神经传导速度存在不同程度的减慢或消失,且感觉神经病变重于运动神经,下肢受累程度重于上肢。所检 24 例患儿 72 块肌肉中,40 块呈神经源性损害(56%);患儿年龄越大,肌肉受累程度越严重。24 例患儿中,PCR-双酶切法在 13 例患儿中检测出 1760 bp 片段,占 54%。正常对照组未检测到此片段。结论 CMT1 患儿肌电图改变特征明显,以周围神经传导速度减慢为主,肌肉病变多呈神经源性损害。PCR-双酶切可作为一种简单有效的 CMT1 型基因诊断方法。 [中国当代儿科杂志,2011,13(8):647-650]

[关键词] 腓骨肌萎缩症 1 型; 肌电图; 儿童
[中图分类号] R746.4 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)08-0647-04

Studies of electromyography and genetics in children with Charcot-Marie-Tooth disease type 1

PAN Xiao-Li, ZHANG Nan-Nan, YE Hong-Lian, ZHAO Yue-Fei, GAO Hong. Laboratory of Neuroelectrophysiology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email:panxl@sj-hospital.org)

Abstract: Objective To study the electromyographic and genetic characteristics in children with Charcot-Marie-Tooth disease type 1 (CMT1). **Methods** Routine electromyography and nerve conduction were performed in 24 children with CMT1. Polymerase chain reaction (PCR) combined with restriction enzyme digestion was used to detect gene duplication on chromosome 17p11.2-12. Ten healthy children served as the control group. **Results** The peripheral nerve conduction velocity slowed or disappeared in all of the 24 patients (100%). The lesions of the sensory nerves were more severe than the motor nerves, and the lesions of the lower limbs were more severe than the upper limbs. Of 72 muscles detected, 40 (56%) showed neurogenic lesions. The older the patients, the more severe the muscle lesions. Specific junction fragments (1760 bp) were identified in 13 (54%) out of 24 patients, but were not identified in the healthy controls. **Conclusions** The electromyographic changes are characterized by peripheral nerve conduction velocities slowing and neurogenic lesions of muscles in children with CMT1. The PCR combined with restriction enzyme digestion may be a simple and accurate method for gene diagnosis of CMT1. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (8):647-650]

Key words: Charcot-Marie-Tooth disease type 1; Electromyography; Child

腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT)又称遗传性运动感觉神经病(hereditary motor and sensory neuropathy, HMSN),是最常见的一组遗传性周围神经病,发病率为4/10000^[1]。其遗传方式多样,可为常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传及X连锁显性或隐性遗传。病程呈慢性进行性,致残率高。临床上根据病理和电生理特点分为两型,即脱髓鞘型(CMT1型)和轴突型(CMT2型),其中CMT1型约占70%^[1]。该病具有遗传异质性,分子遗传学研究至少已发现39个致病基因位点,其中27个已被克隆^[2]。典型的CMT临床肌电图诊断不难,但对于临床表现不典型且无家族史的患儿的肌电图改变及遗传学改变有待进一步研究。本研究对24例CMT1型患者(包括8例曾误诊为马蹄内翻足进行过矫形手术的患儿)的临床电生理和基因学研究结果进行分析,报告如下。

[收稿日期]2011-01-17;[修回日期]2011-03-06
[作者简介]潘晓丽,女,博士,教授。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2003年3月至2009年12月在中国医科大学附属盛京医院就诊的符合CMT1型诊断标准患儿24例,年龄6~14岁;男17例,女7例。正常健康对照10名,年龄8~15岁。男5例,女5例。均除外神经肌肉疾病。CMT1型确诊患者均具备下列第(1)和(2)条及第(3)、(4)、(5)、(6)中任一条,若家族中已有确诊者则具备第(1)条即可入选^[3]:(1)慢性起病、缓慢进展的肢体远端尤其是双下肢远端肌无力和肌萎缩,典型者呈“倒置酒瓶样”(或称“鹤腿”样)改变;体查有周围神经损害表现,跟腱反射消失,下肢深感觉减退;(2)肌电图示运动神经传导速度明显减低,正中神经传导速度<38 m/s;(3)神经活检有髓纤维数量减少,有髓鞘脱失,Schwann细胞节段性再生,绕轴突形成同心圆样的“洋葱球”结构;(4)家族史阳性;(5)弓形足或脊柱侧(或后)弯;(6)排除其他原因导致的周围神经病等。本研究通过了中国医科大学医学伦理委员会批准以及受试者本人或监护人知情同意。

1.2 方法

1.2.1 神经传导速度和肌电图检查 应用美国Nicolet公司的Viking IV肌电图/诱发电位仪,室温25℃,卧位,对所有患儿进行神经传导速度和肌电图检查。

神经传导速度测定:包括正中神经和腓总神经运动神经传导速度(motor nerve conduction velocity, MNCV)及正中神经及腓浅神经感觉神经传导速度(sensory nerve conduction velocity, SNCV)。判定标准:(1)神经传导速度:以低于同年龄组正常值的2.5 SD为减慢;(2)运动神经传导的远端潜伏期:以超过同年龄组正常值的2.5 SD为延长。

肌电图检查:对外展小指肌、外展拇短肌、胫骨前肌、股四头肌等用同心针电极插入肌肉行常规肌电图检查,观察肌肉静止及轻收缩时运动单位电位的平均时限、波幅、多相百分比以及重收缩时的运动电位波形及波幅。判定标准:(1)肌肉轻收缩时运动单位电位的平均时限超过同年龄组正常值的20%;(2)肌肉轻收缩时运动单位电位的波幅超过同年龄组正常值的100%;(3)静止时出现插入延长、纤颤电位、正相电位或束颤电位;(4)肌肉重收缩时运动单位电位的波形呈单纯相或混合相。患儿须具备以上第(1)条件有或不伴有第(2)、(3)、(4)

条中任何一条即表现为神经源性损害,若不具备第(1)条,但是具备第(2)条或第(3)条为可疑神经源性损害。

1.2.2 基因组DNA提取 对所有患儿和正常对照各取外周血5 mL,2% EDTA抗凝,常规法提取DNA,DNA溶于10 mmol/L Tris-HCL,1 mmol/L EDTA溶液中(pH 7.5)保存^[4]。

1.2.3 PCR反应 引物由Invitrogen英骏生物技术有限公司合成。Pmp22引物:distF为5'-GCT-CAATTTTGGTGTTTAAATCAG-3',proxR为5'-ACTCT-CTAGTTACCCCTTTATTT-3'。反应体系中DNA 5 μL,dd H₂O₂ 92.6 μL,10×缓冲液 55 μL,dNTPs 44 μL(2.5 mmol/L),TaqDNA多聚酶 4.4 μL(5 U/μL),Pmp22-F及Pmp22-P各2.2 μL。94℃预变性3 min后,进入循环。循环参数:94℃ 30 s,50℃ 60 s,72℃ 2 min,33个循环后72℃延伸10 min。取产物5 μL+EcoRI(或NsiI)12 U+缓冲液2 μL,37℃水浴酶切过夜,0.8%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,存入10Kodak成像分析系统。参照Marker分子量标准,1760 bp条带为特异性酶切片段,有此片段诊断为基因重复。

2 结果

2.1 临床特点

本组患儿发病年龄为4~12岁(平均7.4±4.5岁),检测时年龄为6~14岁(平均8.2±5.3岁)。病程为8个月至8年(平均4.8±3.4年)。21例为散发病例(88%),3例有家族史(12%)。均为慢性起病,表现为进行性双下肢或四肢对称性远端无力和肌萎缩,进展缓慢。症状局限于双下肢者20例(83%),呈跨阈步态,患儿均有不同程度弓形足,其中8例曾误诊为马蹄内翻足进行过矫形手术。前臂或手肌萎缩6例(25%)。“鹤腿样”9例(38%)均为病程大于5年的年长儿。腱反射减弱或消失16例(67%),深浅感觉减退15例(62%)。所有患者均无锥体束征,血清肌酸激酶、乳酸脱氢酶、谷草转氨酶、肌红蛋白等均在正常范围。

2.2 神经传导检测结果

24例患儿中被检的运动或感觉神经传导速度存在不同程度的减慢或消失,且感觉神经病变重于运动神经,下肢受累程度重于上肢。即使是症状局限在下肢的患儿,上肢神经传导也出现了明显的异常改变。总异常率100%,分别表现为不同神经传导速度减慢、远端潜伏期延长,波幅降低或消失。见

表 1。

表 1 神经传导检测结果 [n=24;例(%)]

	NCV 减慢	Lat 延长	Amp 降低	NCV 未引出	正常
运动神经					
正中神经	10(42)	14(58)	4(17)	7(29)	3(12)
腓总神经	13(54)	14(58)	3(12)	11(46)	0
感觉神经					
正中神经	14(58)	—	—	9(38)	1(4)
腓浅神经	16(67)	—	—	8(33)	0

注:NCV:神经传导速度;Lat:远端潜伏期;Amp:复合肌肉动作电位波幅。

2.3 肌电图检测结果

所检 24 例患儿 72 块肌肉中,40 块呈神经源性损害(56%),其中 36 块为远端肌肉,4 块为近端肌肉。24 例患者中,存在神经源性损害的有 19 例,占 79%,远端肌肉呈神经源性损害的有 19 例,其中 4 例同时伴有近端神经源性损害。

2.4 特异性片段检出率

24 例患者中 13 例检测出 1760 bp 片段,占 54%。正常对照组未检测到此片段。见图 1。

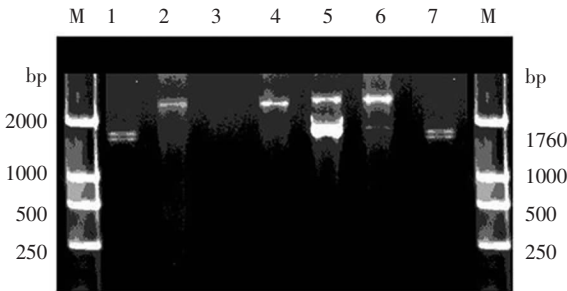


图 1 CMT1 型患儿及对照组 PCR-双酶切分析结果 (ECORI) 1,5,6,7 为基因重复的患儿;4 为已知的正常人作为阴性对照;2,3 为未检出重复的患儿;M 为 DNA Marker DL2000。

3 讨论

目前的研究认为,CMT1 型为常染色体显性遗传,多于青少年期起病,本组病例发病年龄平均为 7.4 岁,明显低于此前报道^[5-6],可能与病例来源集中在儿科有关。24 例患儿中只有 3 例有家族史,21 例为散发病例,分析可能原因:(1)与先证者双亲发病延迟或外显子不全有关;此时若仔细询问病史,有时会发现双亲或兄弟姐妹有弓形足或步态不稳的情况,进一步做肌电图检查可发现隐形病例;(2)基因突变;(3)计划生育使较少后代出生。本研究所有

患儿均符合 CMT 的临床特征,临床上不难诊断。值得一提的是,其中 8 例由于发病年龄较小并出现足部内翻畸形而误诊为马蹄内翻足进行过矫形手术,因病因未除,术后效果不佳。提示临床对马蹄内翻足患儿应常规进行术前肌电图检查,目的不仅仅是评价神经肌肉功能,更重要的是要排除 CMT。如果是 CMT 患儿,肌电图的改变有明显的特征,而且不仅局限在下肢,上肢也会有明显的异常,尤其是正中神经运动神经的传导速度 <38 m/s。

本组患儿的肌电图改变特征性明显,所检 72 块肌肉中,40 块呈神经源性损害(56%)。以远端肌肉病变严重;患儿年龄越大,肌肉受累程度越严重,相反,年龄偏小的患儿则以神经传导速度减慢为主。周围神经感觉及运动神经传导均有明显减慢,无论病程长短,运动神经传导速度均 <38 m/s。一些患儿虽然临床症状局限于下肢,但上肢的神经传导异常已经存在。说明在临床症状出现前已经有周围神经的脱髓鞘改变。肌电图是对神经肌肉功能评价最有效的检查手段,临床上应对不典型患儿进行四肢肌电图检测,这样可以早期发现 CMT 患儿,早期诊断。而且肌电图检查还可以预测患儿的疾病进展程度。

CMT 有明显的遗传异质性,目前研究发现,与其相关的基因有 39 个,确定的致病基因至少有 27 个^[2]。据报道,70% 以上无血缘关系的 CMT1 家系及 90% 以上的散发患者多由 17p11. 2-12 区(包含 PMP22 基因)的 1.5 Mb 的正向串联重复突变所致,两翼有长约 30 kb 的低拷贝重复序列称 REPs。目前已证实 CMT1 的交换热点位于 30 kb 的 CMT1A-REP 上 1.7 kb 的区域,并且 75% 以上的 CMT1 患者交换断裂点位于该区域;对断裂点设计特定的引物进行扩增酶切获得特异性酶切片段即可诊断为基因重复异常^[6]。人类 PMP22 基因是 1992 年分离克隆的,它与小鼠 11 号染色体的生长停止特异基因家族的 Gas-3 基因属同源基因。全长 40 kb,有 4 个编码外显子和两个组织特异性的非编码外显子(受相应的启动子控制),编码一含 160 个氨基酸,核心分子量为 18 kD,糖基化后为 22 kD 的蛋白质即 PMP22。PMP22 在周围神经中有高度表达,其表达受轴突调节,其功能可能为维持髓鞘结构的完整性、调节细胞周期及作为黏附分子。PCR-双酶切法的原理:大多数 CMT 病人的重组断点位于远端 CMT1-REP 特有的 EcoRI 位点和近端 REP 特有的 NsiI 位点之间。为区分 PCR 扩增,引物的选择分别为远端和近端 REP 所特有的序列,位于 1.7 kb 热点区的两侧。用 EcoRI

和 NsiI 消化后可获得特异性融合片段 1760 bp。这样来自 CMT 病人的标本且交换热点位于 1.7 kb 区域者应产生特异性融合片段,而来自对照组的标本或重组发生于热点区外者,就不应有此片段。本研究共检测 24 例病人,13 例检测出 1760 bp 片段,占 54%。正常对照组未检测到此片段,与国外文献报道不一致^[7]。可能与本组患儿基因突变特点不同于国外患者有关。本组患儿均为 CMT1 型,肌电图改变主要以周围神经传导速度减慢为主,但由于该病存在很大的遗传异质性,所以在遗传学改变上不尽相同,拟进一步对本组患儿进行其他相关基因的研究。

当前诊断 CMT 基因重复的方法有多种,包括 PCR-双酶切,限制性片段长度多态性分析(RFLP),PCR 扩增重复区域内多态性标记物(STR),脉冲场凝胶电泳(PFGE)检测特异性连接片段,有丝分裂中期染色体荧光原位杂交分析(FISH),荧光实时定量 PCR 等。每种方法各具优缺点,本研究提示 PCR-双酶切比较快速、简单、易操作,且无特殊设备限制,是一种优选方法。

[参 考 文 献]

[1] Berger P, Young P, Suter U. Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Neurogenetics, 2002, 4(1): 1-15.

[2] 张如旭,郭鹏,任志军,赵国华,刘三妹,刘婷,等. LITAF、RAB7、LMNA 和 MTMR2 基因在中国人腓骨肌萎缩症患者的突变分析[J]. 遗传,2010,32(8):817-823.

[3] Hisama FM. Familial periodic paralysis and Charcot-Marie-Tooth disease in a 7-generation family[J]. Arch Neurol, 2005, 62(1): 135-138.

[4] 刘维亮,李芳,麻宏伟,李海燕. 中国人脊髓性肌萎缩症患儿的 SMN 基因学研究[J]. 中国当代儿科杂志,2010,12(7):539-543.

[5] 邹艺,刘英,李素荣,胥勋成,高国勋. 腓骨肌萎缩症的临床及神经电生理特点分析[J]. 临床神经电生理学杂志,2008,17(5):268-270.

[6] 郭鹏,唐北沙,赵国华,刘小民,张付峰,张如旭,等. 腓骨肌萎缩症的病理学特点和基因突变[J]. 中华医学杂志,2005,85(34):2382-2385.

[7] Zamurović N, Milić V, Dacković J, Zamurović D, Culjković B, Parlović S, et al. Analysisi of mutation in the chromosome 17p11.2 region in patients with Charcot-Marie-Tooth type 1 disease and in patients with tomaculos neuropathy[J]. Srp Arh Celok Lek, 2002, 130(3-4): 59-63.

(本文编辑:邓芳明)