

婴儿期发病的腓骨肌萎缩症 家系 *PMP22* 基因突变研究

邢军卫 刘亚红 Bilal Haider SHAMSI 刘小红 谭璐 徐曼

(西安交通大学医学院第一附属医院儿科,陕西 西安 710061)

[摘要] **目的** 研究一个婴儿期发病的腓骨肌萎缩症(CMT)家系 *PMP22* 基因突变,探讨该家系 CMT 的遗传学特点。**方法** 应用 STR 结合多重 PCR 法对 2 例 CMT 患儿及该家系内 15 名表型正常的成员进行 *PMP22* 基因重复突变分析。同时选择 20 名健康人做为对照。**结果** 在 2 名 CMT 患儿及 5 名家系内表型正常的成员中发现了 *PMP22* 基因重复突变,其中 5 例突变在 STR 位点 D17S921,2 例突变在 STR 位点 D17S4A,而家系内其余 10 名成员及 20 名健康人未发现突变。**结论** 该 CMT 家系的致病基因为 17p11.2-p12 区域内包含 *PMP22* 基因的重复突变,其亚型为 CMT1A。
[中国当代儿科杂志,2011,13(10):799-803]

[关键词] 腓骨肌萎缩症;遗传;*PMP22*;突变;婴儿
[中图分类号] R596 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)10-0799-05

PMP22 mutation of an infant-onset Charcot-Marie-Tooth disease family

XING Jun-Wei, LIU Ya-Hong, Bilal Haider SHAMSI, LIU Xiao-Hong, TAN Lu, XU Man. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China (Liu X-H, Email: liuxiaoh@mail.xjtu.edu.cn)

Abstract: Objective To study the mutation of *PMP22* gene of an early-onset family with Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) and the genetic features of the disease. **Methods** Two patients with CMT, fifteen unaffected members in the family and 20 healthy controls were enrolled. STR-PCR and gene scanning were used to detect *PMP22* duplication mutation. **Results** The mutations of *PMP22* were found in the two patients and other five unaffected members in the family. The mutations were located in the STR locus D17S921 in 5 cases and in the STR locus D17S4A in 2 cases. The other members in the family and 20 healthy controls did not show the mutations of *PMP22*. **Conclusions** The gene causing CMT in the family is found in the 17p11.2-p12 region containing *PMP22* gene duplication mutation, resulting in the subtype CMT1A.
[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (10):799-803]

Key words: Charcot-Marie-Tooth disease; Genetics; *PMP22*; Mutation; Infant

腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT)是周围神经单基因遗传病,遗传方式多样,包括常染色体显性遗传,X连锁显性或隐性遗传以及常染色体隐性遗传。CMT可发生于世界范围的各个种族之中,发病率约为20/10万^[1]。发病年龄多在10~20岁之间。目前,大多数关于CMT的研究是针对高加索人种的,有关亚洲人种的研究较少^[1]。我们在临床诊治中发现了一个婴儿期起病的CMT家系,发病年龄为9个月至1岁,比较罕见。因此我们于2009年10月至2010年9月对该家系在家系调查的基础上进行了分子遗传学研究,经过

多个候选致病基因的检测,最后发现了该家系的致病基因为17p11.2-p12区域内包含*PMP22*基因的重复突变,其临床亚型为CMT1A,报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象为2008年4月于我院儿科临床诊治中发现的一个CMT家系,在病人亲属签署知情同意后,对患儿及家族成员进行调查,内容包括相关病史、体格检查、肌电图及神经传导速度检查、血液生

[收稿日期]2011-03-24;[修回日期]2011-05-09
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No. 30571597)。
[作者简介]邢军卫,男,本科,主治医师。
[通信作者]刘小红,教授。

化、血常规及血清肌酶等。依据国际上公认的 CMT 的诊断标准^[2]，并排除其他可能的神经肌肉疾病后，确诊为 CMT。选择该家系中 17 人，其中第二代 4 人(Ⅱ-2, Ⅱ-4, Ⅱ-6, Ⅱ-8), 第三代 6 人(Ⅲ-5, Ⅲ-8, Ⅲ-11, Ⅲ-12, Ⅲ-15, Ⅲ-16), 第四代 7 人(Ⅳ-3, Ⅳ-4, Ⅳ-5, Ⅳ-7, Ⅳ-11, Ⅳ-12, Ⅳ-13)进行 PMP22 基因突变检测。同时选择 20 名健康人做为

对照。

1.2 临床资料

本家系中能追溯者 4 代共 50 人, 已故 7 人, 其中 1 人是 CMT 患者, 其余 6 人是否为该疾病导致死亡尚不明确。在世成员 3 代, 每一代中至少包含 4 个个体, 明确患病者 3 人。对患者及家族成员进行调查后, 绘制系谱图(图 1)。

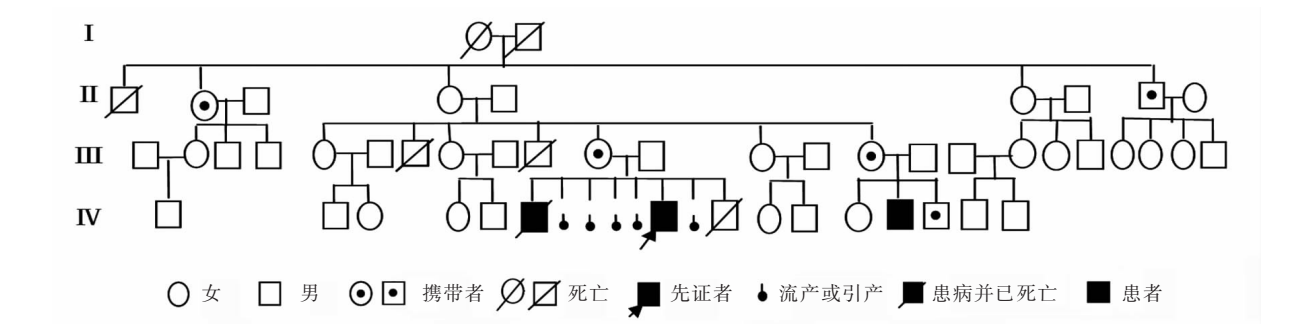


图 1 CMT 家系系谱图

本家系 3 例有临床表现的患儿中, 1 例在生后 10 个月时发病, 系先证者之兄, 足月顺产, 生后一般情况好。生后 10 个月始发现变瘦, 1 岁会坐, 1 岁 2 个月扶助下行走, 逐渐双腿变细, 步态初无异常, 逐渐变为跨阈步态, 1 岁半时双手不能握, 手掌长, 指尖变细, 不能自行起立, 不能站立, 不能行走。8 岁时因膈疝破裂夭折。现存活 2 例患儿, 均为男性。

先证者, 谱系代号 Ⅳ-7, 5 岁半, 系第 8 胎第 2 产, 胎龄 40⁺4 周, 顺产。出生无窒息, 出生体重 3 kg。自 1 岁起家长发现其双下肢进行性变细、无力, 足背屈运动不能, 行走蹲起困难、肌肉萎缩。且有双下肢出汗少, 发冷。大小便不能自理、跨阈步态。手无力, 手掌上肢远端肌力Ⅳ级。四肢远端对称性肌萎缩, 以双下肢为重, 双大腿下 1/3 以下肌肉明显萎缩呈“倒油瓶”样, 双足背屈不能, 弓形足、爪状趾。感觉未发现明显异常, 双膝腱跟腱反射消失。病理反射未引出。臀部肌肉对称。

另一存活的 CMT 患者为先证者姨表弟, 谱系代号 Ⅳ-12, 男, 2 岁。系第 3 胎第 2 产, 足月急产, 无窒息, 出生体重 3.5 kg。母乳喂养 9 个月后改人工喂养, 正常添加辅食, 8 月会独坐, 会发音。10 月可扶助下行走, 但双下肢无力, 膝部以下为著, 并且开始双下肢进行性变细。现在 2 周岁可直立, 但不能独站和独走。四肢远端对称性肌萎缩, 以双下肢为重, 呈特征性分布(倒油瓶样), 伴有腱反射消失及弓形足爪状趾。手握物差, 可拿汤勺吃饭。手指无力。

2 例患儿行相关检查, 除有轻度贫血外, 肝肾功

能、肌酶、心电图、腰椎正侧位片、头颅及脊髓 MRI、脑脊液检查均正常。肌肉活检结果为神经源性肌萎缩。肌电图检查均表现为双下肢神经源性损害, 双下肢运动传导速度基本正常, 但双侧胫神经及腓总神经运动传导动作电位波幅均明显减低, 双下肢感觉传导未见明显异常。

1.3 研究方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 签署知情同意书后, CMT 家系中患儿和家系内成员共 17 人及无血缘关系的健康人 20 人, 抽取外周静脉血 5 ~ 10 mL, (EDTA 抗凝), 应用 Chelex 100 法抽提基因组 DNA, 1 × TB 溶解, -70℃ 保存。

1.3.2 STR 标记选择及引物设计 根据国外学者实验研究结果^[3], 从现有数据库中选择在人群中多态性较好, 且易于扩增, 扩增条件相近的 17 号染色体具有高度多态性的短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 基因座, 即 D17S921、D17S9B、D17S9A、D17S918、D17S4A、D17S2230 作为遗传标记。参考文献设计引物^[3], 引物序列见表 1。

1.3.3 目的基因的扩增 按说明稀释引物, FAM 标记的引物稀释至 100 μmol/L, TET 标记的引物稀释至 200 μmol/L; 6 个分子标记分别为 D17S921、D17S9B、D17S9A、D17S918、D17S4A、D17S2230; 扩增 DNA 长度分别为 143 ~ 146 bp、114 ~ 118 bp、160 bp、235 ~ 247 bp、161 ~ 176 bp、199 bp。反应总体积为 15 μL, 其中包含 DNA 模板 0.5 μL, H₂O 12 μL, Taq 酶 1 μL, 引物混合物(含 6 条稀释后的荧

表 1 引物序列及扩增片段长度

基因座	引物名称	引物序列	引物标记	染色体定位 (kb)
D17S921	D17S921-F	GTG TTG TAT TAG GCA GAG TTC TCC	5'-FAM	14420 ~ 14357
	D17S921-R	GGC AGT AGA TGG TGA CTT TAT GGC		
D17S9A	D17S9A-F	CAA CCA TCA GTG ATT TGA TGG TTT AC	5'-TET	14460 ~ 14560
	D17S9A-R	GAG TTG TCA CTA GAA CCC TGT TC		
D17S9B	D17S9B-F	TCT CAG TCC TGA TTT CTT GAT TTT G	5'-TET	14585 ~ 14666
	D17S9B-R	CCA GAG CTA ACA CCA CAT TCA		
D17S918	D17S918-F	TGC TGT AAT CTG TCC CCA AAC GTC	5'-TET	15126 ~ 15179
	D17S918-R	TTC CTC ACA CAA CCT ATT GAT AGT C		
D17S4A	D17S4A-F	CTG TGG AGG AAA GAA AAC ACT GCC	5'-FAM	15069 ~ 15359
	D17S4A-R	GCA CTA AAG TAG CTT GTA ACT CTG		
D17S2230	D17S2230-F	AGG AAA CTG ATG TCT AAA ACT ATC C	5'-FAM	15317 ~ 15447
	D17S2230-R	GTG AAT CCA GGA GGC AGA GCT TGC		

光标标记引物, D17S921、D17S9B、D17S9A、D17S918、D17S4A、D17S2230 各 2 μL) 0. 4 μL, 10 × buffer 1. 5 μL, dNTP 0. 3 μL。反应条件为: 首先 96℃ 预变性 3 min; 然后 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 30 s、70℃ 延伸 1. 5 min, 并循环 32 次; 最后 60℃ 60 min; 4℃ 20 min 结束。

1. 3. 4 基因突变检测 扩增结束后, 取 0. 7 μL PCR 产物分别与荧光内标 GS-500ROX 0. 6 μL 及 Hi-Di™ FORMAMIDE 10 μL 混匀, 于 95℃ 变性 3 min, 冰浴 3 min, 以免复性; 将变性后的 PCR 产物加入测序上样板, 应用 3730DNA 分析仪 (ABI 公司, 美国) 检测 PCR 产物, 并用 Genescan 和 Genotyper 软件自动分析 PCR 产物的长度并确定各等位基因的基因型。

2 结果

在该家系中 2 名患儿及 5 名表型正常的成员均检测到了 *PMP22* 基因的重复突变, 其中 II-2、II-8、III-11、III-15 及 IV-7 突变位于 STR 位点 D17S921; 而 IV-12 和 IV-13 突变点位于 D17S4A; 家系内其余 10 名成员及 20 名对照均未发现额外条带。STR 位点的检测结果见图 2, 箭头示异常 DNA 扩增峰。因所选这 6 个 STR 位点可能有重叠, 故用不同颜色区分, 蓝色为 FAM 标记的 D17S921、D17S4A、D17S2230 等位基因, 绿色为 TET 标记的 D17S9B、D17S9A、D17S918 等位基因, 红色为 ROX 内标。

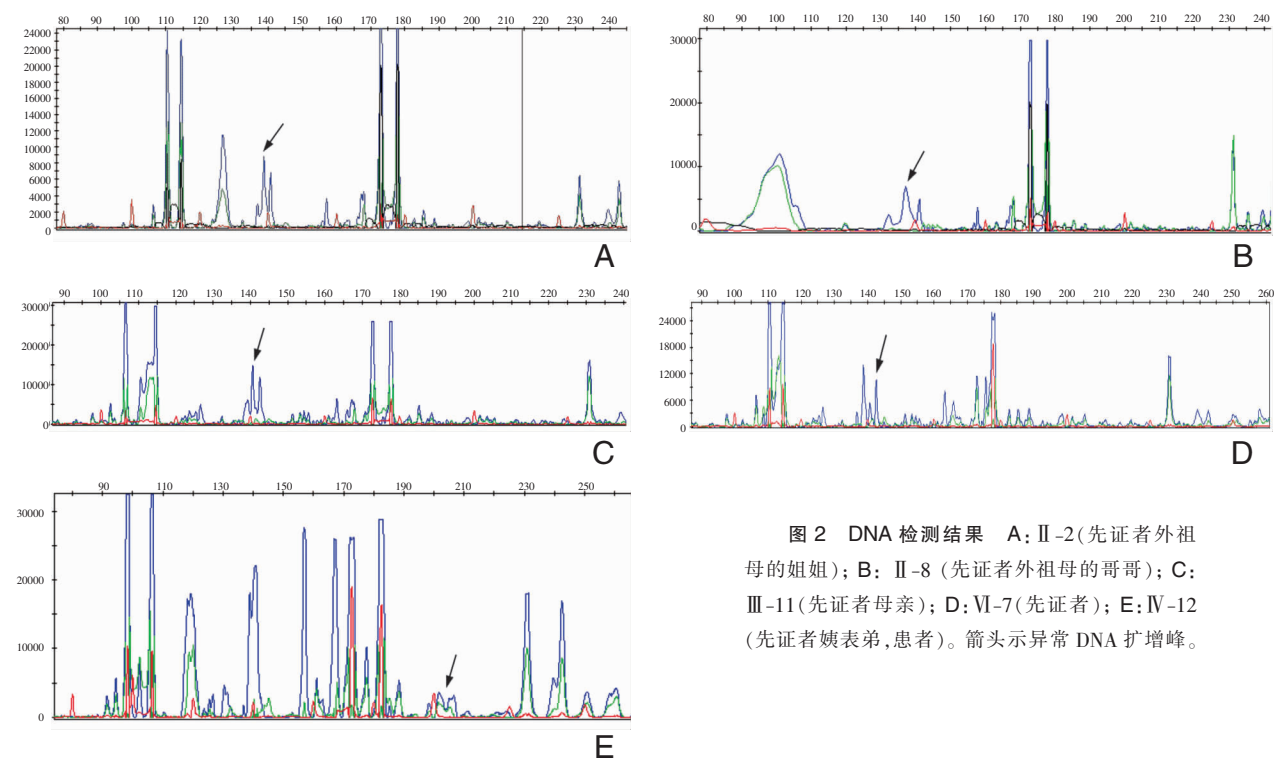


图 2 DNA 检测结果 A: II-2 (先证者外祖母的姐姐); B: II-8 (先证者外祖母的哥哥); C: III-11 (先证者母亲); D: VI-7 (先证者); E: IV-12 (先证者姨表弟, 患者)。箭头示异常 DNA 扩增峰。

3 讨论

CMT 最常见的致病基因突变为包含 *PMP22* 基因的 17p11.2-p12 区域 1.5 Mb 的重复突变,由该类突变引起的 CMT 亚型被定义为 CMT1A^[4],占 CMT 总数的 50% ~ 60%,占 CMT1 总数的 60% ~ 90%。和以往病例不同的是,本研究发现的这一 CMT1A 家系发病年龄小,患儿均在 9 个月至 1 岁起病,而大多数 CMT1A 发病年龄在 10 ~ 20 岁之间^[1]。导致该家系起病早的原因可能是遗传早现;此外,经分子学检查证实该家系内另外 5 名成员也与患儿有相同的突变基因,但截至目前,这 5 名成员还未出现任何临床异常,可能与延迟显性有关。

应用 STR-PCR 法证实该家系致病基因为 *PMP22* 基因重复,属于常染色体显性遗传,而与 X 染色体无关,因此,男女发病几率相等。由于外显率的降低及表现度的不一致,常染色体显性遗传常表现为不规则显性,故在有些常染色体显性家系中可以不出现现代发病的现象,而误以为是隐性遗传。

位于 17p11.2-12 的 *PMP22* 基因突变会引起 CMT1A、肥大性间质性多发性神经病、遗传性压迫易感性神经病等。在 CMT 疾病中 *PMP22* 基因可以发生重复突变,也可以发生点突变 *PMP22*,点突变较单个 17p11.2 重复的有更严重的临床症状,推测是由于显性负相或蛋白缺失机制所致^[4]。大多数 CMT 发病与位于 17p11.2-p12 的 *PMP22* 基因重复突变有关,约占 70% ~ 80%。

CMT 疾病具有高度的遗传异质性,不同的表型、不同的家系,甚至在同一家系内,不同的患者临床表现轻重不一^[5-6]。本研究中 2 名患儿及 5 名家系内成员均有 *PMP22* 基因的串联重复突变,尽管如此,不同的受累个体其临床症状程度完全不同。轻者完全无临床表现或仅有轻微的感觉异常,如 II-2、II-8、III-11 及 III-15 等基本无明显临床表现;而 IV-7 双下肢进行性变细、无力,足背屈运动不能,行走蹲起困难,跛行,双手虽可握物,但手指精细运动不能,双小腿明显变细,肌肉萎缩。IV-12,手指无力,握物差,下肢进行性变瘦。现手不能抓物,不能站立及行走,双小腿明显变细,全身肌肉无力、萎缩。IV-12 较 IV-7 起病早 (IV-7 1 岁起病,IV-12 在 9 个月起病),临床表现后者也较前者轻,这可能是由于他们在 17p11.2-p12 区域内重复突变的位点不同造成的 (IV-7 在 STR 位点 D17S921 突变;IV-12 突变点位于 D17S4A)。IV-13 基因检测结果显示与其兄 IV-12

一样,故其临床表现也可能会较家系内其他成员严重,但现在因其年龄较小,仅 7 个月,还未达到该家系平均起病年龄 (平均为 10.3 月),目前尚未表现出任何异常,尚需进一步随访观察。

PMP22 基因编码周围神经髓鞘蛋白 22,有 4 个跨膜区域、3 个胞内域和 2 个胞外域,在周围神经中有高度表达,主要位于致密的髓鞘部分,大约占髓鞘蛋白的 2% ~ 5%。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。CMT1A 由于 *PMP22* 基因的重复突变,使外周神经中 *PMP22* 过度表达,导致脱髓鞘和髓鞘再生。在髓鞘脱失节段,因传导时间的延长,可导致神经传导速度减慢,严重者可出现传导阻滞。在疾病早期,轻度的脱髓鞘对于神经传导速度测量并不敏感,如果进一步加重就会表现出传导速度减慢,而传导阻滞少见^[7]。CMT1 型的神经传导速度明显减慢,但相对稳定,且均匀一致,并且随着病程的延长,几乎都会继发有轴突损害,到了晚期,如果不能引出 CMT1 患者腓肠神经的复合动作电位 (compound muscle action potential, CMAP),则提示轴突严重缺失。而感觉神经动作电位 (sensory nerve action potentials, SNAPs) 也会很低甚至不能引出,并可先于 CMAP 波幅完全消失^[8]。该家系患者虽然起病年龄小,临床表现也较重,但神经传导速度减低并不明显,不符合大多数 CMT1A 患者电生理结果;复合动作电位明显减低,提示有轴突的损害。然而, CMT1A 重复的病人中,运动神经神经传导速度的异常范围与年龄或临床的严重性无关,对一个家族进行了 22 年的纵向电生理研究显示,有的 CMT1A 重复者的病程中仅有很少的神经传导速度改变^[8]。

CMT 1 型腓肠神经活检主要表现为慢性脱髓鞘病变,即有髓纤维呈脱髓鞘、薄髓鞘和髓鞘再生改变,大、中等直径纤维数量明显减少,同时伴有雪旺细胞增生,呈洋葱头样肥大,束内胶原增生。随年龄增长,有髓鞘纤维密度进行性减少,脱髓鞘加重。由于反复节段性脱髓鞘及髓鞘再生过程增强,雪旺细胞增生与神经内膜成分围绕轴索形成同心圆样“洋葱球”状结构。脊髓后索变性,其中薄束较楔束明显。间质血管改变也比较明显,主要为内皮细胞增生,吞饮小泡增多。由于患儿不能耐受、家长不同意等原因,本研究未能对该家系患儿及突变基因携带者进行腓肠神经活检。*PMP22* 由髓鞘雪旺细胞表达,因此估计该家系中患儿腓肠神经活检结果也符合上述脱髓鞘改变。但对于有致病基因突变但表型正常的成员,其生存质量并未受到很大影响,由于神

经电生理改变与患者的躯体及精神方面是有关联的^[9],故其腓肠神经或许有相似的改变。

在治疗方面,目前尚无针对 CMT 的特效疗法,有些患者使用如踝-足矫正器之类的腿部工具获得良好的支撑作用。近年来 Passage 等^[10]对于 *PMP22* 过度表达的鼠 CMT1A 模型研究发现,大剂量的维生素 C 可减少髓鞘再生并提高运动功能;另外, Kaya 等^[11]的体外研究表明,大剂量维生素 C 通过影响细胞内的环磷酸腺苷(cAMP)和腺苷酸环化酶(adenylate cyclase)活性,从而抑制 *PMP22* 基因过度表达。Verhamme 等^[12]应用随机对照临床试验(RCTs)对5名口服大剂量维生素 C(1g,bid)和6名口服安慰剂的 CMT1A 病人随访1年,结果两组在正中神经运动神经传导速度、CMAP 复合肌肉动作电位、F 波、肌力、感觉功能等方面并无明显差别。尤其最近有研究显示,CMT1A 患者给予维生素 C 1.5 g/d口服两年,并没有发现明显的受益^[13]。此外,欧那斯酮可使 CMT1A 模型鼠的病症得到明显减缓,但目前还未应用于人体^[14]。在最近的实验室研究中,已经找到了可以将干细胞转化为神经细胞和能制造出髓磷脂的细胞的有效方法^[15],未来可能被用于修复 CMT 患者的受损神经。

[参 考 文 献]

[1] Howcroft DWJ, Umar SK, Makwana N. Charcot Marie Tooth disease[J]. Orthop Trauma, 2009,23(4): 274-277.
[2] 吴江. 神经病学[M] // 贾建平, 崔丽英. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 322-325.
[3] Choi BO, Lee MS, Shin SH, Hwang JH, Choi KG, Kim WK, et al. Mutational analysis of *PMP22*, *MPZ*, *GJB1*, *EGR2* and *NEFL* in Korean Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients[J]. Human Mutat, 2004, 24(2):185-186.
[4] Padua L, Shy ME, Aprile I, Cavallaro T, Pareyson D, Quattrone

A, et al. Correlation between clinical/neurophysiological findings and quality of life in Charcot-Marie-Tooth type 1A[J]. J Peripher Nerv Syst, 2008, 13(1):64-70.
[5] Padua L, Aprile I, Cavallaro T, Commodari I, La Torre G, Pareyson D, et al. Variables influencing quality of life and disability in Charcot Marie Tooth (CMT) patients: Italian multicentre study[J]. Neurol Sci, 2006, 27(6):417-423.
[6] Pareyson D. Differential diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies[J]. Neurol Sci, 2004, 25(2):72-82.
[7] Szigeti K, Nelis E, Lupski JR. Molecular diagnostics of Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies[J]. Neuromolecular Med, 2006, 8(1-2):243-254.
[8] Carter GT, England JD, Chance PF. Charcot-Marie-Tooth disease: electrophysiology, molecular genetics and clinical management[J]. IDrugs, 2004, 7(2):151-159.
[9] Corrado G, Checcarelli N, Santarone M, Stollberger C, Finsterer J. Left ventricular hypertrabeculation/noncompaction with *PMP22* duplication-based Charcot-Marie-Tooth type 1A[J]. Cardiology, 2006, 105(3):142-145.
[10] Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, et al. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Nat Med, 2004, 10(4):396-401.
[11] Kaya F, Belin S, Bourgeois P, Micallef J, Blin O, Fontes M. Ascorbic acid inhibits *PMP22* expression by reducing cAMP levels[J]. Neuromuscul Disord, 2007, 17(3):248-253.
[12] Verhamme C, de Haan RJ, Vermeulen M, Baas F, de Visser M, van Schaik IN. Oral high dose ascorbic acid treatment for one year in young CMT1A patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial[J]. BMC Med, 2009, 7:70.
[13] Sereda MW, Nave KA. Animal models of Charco-Marie-Tooth disease type 1A[J]. Neuromolecul Med, 2006, 8(1-2):205-216.
[14] Reillya MM, Shyb ME, Muntonic F, Pareysonet D. 168th ENMC International Workshop: outcome measures and clinical trials in Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) [J]. Neuromuscul Disord, 2010, 20(12):839-846.
[15] Pareyson D, Reilly MM, Schenone A, Fabrizi GM, Cavallaro T, Santoro L, et al. Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial[J]. Lancet Neurol, 2011, 10(4):320-328.

(本文编辑:邓芳明)