

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.04.017

论著·临床研究

Rett 综合征的临床特点及 MECP2 基因突变分析

赵培伟¹ 何学莲¹ 林俊² 吴革菲³ 乐鑫¹ 毕博² 胡家胜³ 刘智胜³

(武汉市儿童医院 1. 中心实验室; 2. 康复科; 3. 神经内科, 湖北 武汉 430016)

[摘要] **目的** 分析典型的 Rett 综合征患者的临床特点, 并对患儿甲基化 CpG 结合蛋白-2 (MECP2) 基因进行突变分析。**方法** 使用 PCR 扩增和测序的方法对近期诊断的 9 例 RETT 综合征患儿及其父母 MECP2 基因的 3 个外显子进行检测。**结果** 在 9 例患儿中发现 5 例存在 MECP2 基因的杂合突变, 突变率超过 50%, 其中 1 例为碱基插入导致的移码突变(c.913insT); 其余 4 例为点突变, 分别为位于外显子 3 的 c.316C>T (R106W), 位于外显子 4 的 c.502C>T (R168X)、c.808C>T (R270X) 和 c.1126C>T (P376S), 其中 c.913insT 为首次发现的突变, 这些患儿父母均未检测到突变。2 例患儿 MECP2 基因突变位于转录抑制区域, 与其他患儿相比, 这 2 个患儿语言功能几乎丧失, 且发育明显落后。**结论** 该研究确诊的 5 例 Rett 综合征的患儿存在 MECP2 基因突变, 且多数位于外显子 4 上; MECP2 蛋白转录抑制区域突变可能影响患儿语言功能及发育明显落后。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(4): 393-396]

[关键词] Rett 综合征; MECP2 基因; 突变; 儿童

Clinical features and MECP2 mutations in children with Rett syndrome

ZHAO Pei-Wei, HE Xue-Lian, LIN Jun, WU Ge-Fei, YUE Xin, BI Bo, HU Jia-Sheng, LIU Zhi-Sheng. Clinical Research Center, Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430016, China (Liu Z-S, Email: liuzsc@126.com)

Abstract: Objective To study the clinical features and mutations in methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) gene among children with classical Rett syndrome in China. **Methods** PCR and direct sequencing were employed to analyze the three exons of MECP2 gene in 9 children recently diagnosed with Rett syndrome and their parents. **Results** Heterozygous mutations were identified in 5 out of 9 patients, with a mutation rate of over 50%; there was one case of insert mutation (c.913insT) and 4 cases of missense mutation (exon 3: c.316C>T (R106W); exon 4: c.502C>T (R168X), c.808C>T (R270X), and c.1126C>T (P376S)). A new mutation (c.913insT) was found. No mutations were detected in their parents. Two patients had MECP2 mutations in the transcriptional repression domain (TRD). They had almost lost language functions and were found to have significantly delayed development compared with other patients. **Conclusions** Mutations in MECP2 gene were detected in 5 confirmed cases of Rett syndrome, and most of them were on exon 4. Mutations in the TRD of MECP2 protein may affect the language ability and development in children with Rett syndrome.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(4): 393-396]

Key words: Rett syndrome; MECP2 gene; Mutation; Child

Rett 综合征 (Rett syndrome, RTT) 是一种严重影响儿童精神运动发育的疾病, 由 Rett 于 1966 年首次报道, 是女性严重智力低下的重要原因; 女性的发病率为 1/10 000~1/15 000^[1]。1999 年 Amir 等^[2] 用定位候选基因的方法确定 RTT 的致病基因是位于染色体 Xq28 区域的甲基化 CpG 结合蛋白-2 (MECP2) 基因, 随后研究人员开始对 RTT 进行

MECP2 基因检测, 目前世界范围内已经报道了超过 780 多种突变类型 (The Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.org>)。研究发现大约在 90%~95% 的典型 RTT 及 40%~50% 的非典型 RTT 患者中可检测到 MECP2 基因突变^[3], 我国总的突变检出率约为 84%^[4]。本研究通过对 9 例散发 RTT 患儿的临床特点及 MECP2 基因测序分析, 了解这

[收稿日期] 2013-09-27; [接受日期] 2014-02-21

[作者简介] 赵培伟, 男, 硕士, 技师。

[通信作者] 刘智胜, 男, 主任医师。

些 RTT 患儿突变情况，为临床诊断在分子水平提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2012 年至今在本院神经内科和康复科诊断的 9 例 RTT 患儿为研究对象，均为女孩，发病年龄 5~42 个月。临床诊断符合 2001 年欧洲小儿神经会议制定的国际 RTT 诊断标准^[5]。本研究得到武汉市儿童医院伦理委员会的批准。

1.2 基因突变检测

取患儿及其父母外周静脉抗凝血 2 mL，分离白细胞后用酚-氯仿方法提取基因组 DNA。扩增 MECP2 编码区所需要的引物由上海生工公司合成，3 个外显子序列分别为：1F：5'-GCTAGGTAAGCTGGGAAATAGC-3'，1R：5'-CACAGTTTGGCACAGTTATGTC-3'；2F：5'-AAGATCTGAGTGTATGATGGCC-3'，2R：5'-GCACATACATTTTCCTGCTCC-3'；3F：5'-GTTTGTGTCAGAGCGTTGTCAC-3'，3R：5'-AAGCTTTGTGTCAGAGCCCTAC-3'。PCR 总反应体系为 25 μL，其中含 100 ng DNA 1 μL，50 pmol/L 上下游引物各 1 μL，200 μmol/L dNTP 2 μL，1U Taq DNA 聚合酶（TAKARA 公司 5U/μL）0.2 μL，用无菌蒸馏水补到 25 μL。在 Bio-rad PCR 仪器上进行

扩增，PCR 条件为 94℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，循环 32 次。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳合格后进行测序分析。

2 结果

9 例患儿均具有 RTT 的症状：即语言功能降低或者丧失；手的技能降低，且部分患儿存在单一模式手的刻板动作；坐和走的功能受限；多数患者脑电图显示异常；发育落后于同龄儿童。这 9 例患儿中发现 5 例存在 MECP2 基因突变，1 例为碱基插入造成的移码突变（c.913insT），该突变导致 MECP2 基因所编码的蛋白从第 305 位氨基酸起序列发生改变，且在第 330 位氨基酸处提前终止，该突变未见报道，为新发现突变；2 例为错义突变（R106W 和 P376S）；2 例为无义突变（R168X 和 R270X）。在这些突变中，1 例突变位于外显子 3 上（R106W），其余几个突变均位于外显子 4 上（表 1~2）。所有患儿父母均未检测到突变。

9 例患儿中，1 个突变位于甲基化 CpG 结合区（MBD），2 个突变位于转录抑制区（TRD），1 个位于蛋白 C 末端区域（CTS），还有 1 个突变位于功能区以外的区域，突变在 MeCP2 蛋白上的分布如图 1 所示。通过分析发现 2 例（D、G）TRD 功能区有突变的患儿均表现出不说话、脑电图痫性放电以及发育明显落后的临床特点。

表 1 RTT 患者的临床特点

患者	年龄(月)	语言功能	坐和走	手的功能	手的刻板动作	脑电图	发育	MECP2 突变
A	27	几个字语言	可独立坐和行走	部分丧失	玩手指	异常脑电图	落后	Y
B	12	—	能独坐	未见明显异常	未见明显单一动作	多种形式痫性放电	落后	Y
C	18	几个字语言	能独坐	部分丧失	未见明显单一动作	异常脑电图	落后	ND
D	23	几乎不说话	可坐，不能独立行走	部分丧失	抓头发	多种形式痫性放电	明显落后	Y
E	42	几个字语言	可独坐和行走	未见明显异常	未见明显单一动作	异常脑电图	落后	ND
F	21	几个字语言	可独坐不能独站，扶墙可行走	部分丧失	扳手指	大量痫性放电	落后	Y
G	35	几乎不说话	可坐，不能独立行走	部分丧失	玩手指	大量痫性放电	明显落后	Y
H	5	—	—	未见异常	未见明显单一动作	基本正常	落后	ND
I	18	几个字语言	可独坐和行走	部分丧失	频繁挠头	异常脑电图	落后	ND

注：Y 表示有突变；ND 表示未见突变；—表示信息不详。

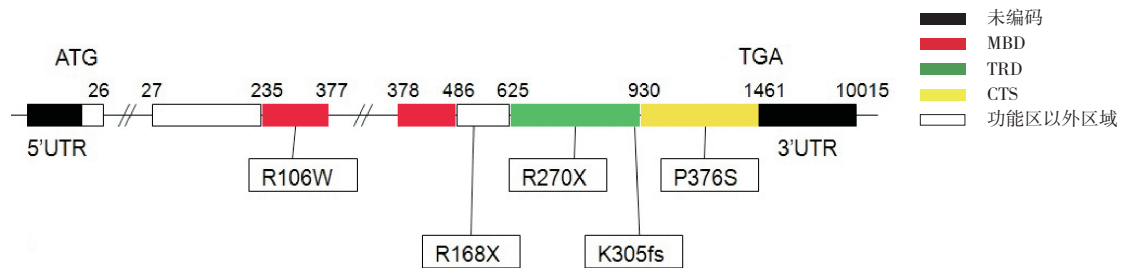


图1 MECP2蛋白的结构与功能区分^[6]及患者MECP2基因突变的位置分布

表2 RTT患者MECP2基因突变情况

患者	突变类型	外显子	核苷酸改变	氨基酸改变	功能区
A	错义突变	3	c.316C>T	R106W	MBD
B	错义突变	4	c.1126C>T	P376S	CTS
D	无义突变	4	c.808C>T	R270X	TRD
F	无义突变	4	c.502C>T	R168X	—
G	移码突变	4	c.913insT	K305fs	TRD

注：MBD为甲基化CpG结合区；TRD为转录抑制区；CTS为C末端区；—表示功能区以外的区域。

3 讨论

RTT是引起女孩智力低下最常见的原因之一，多数为散发，临床上分为典型和非典型两类。RTT患儿一般在6~18个月之前表型基本正常，之后会逐渐表现出智力低下等临床症状^[7]。

该病的致病基因MECP2编码X连锁的甲基化CpG结合蛋白-2，是一种高丰度的染色质结合蛋白^[8]。该蛋白共有486个氨基酸，包含2个主要功能区：即MBD和TRD^[9]。MECP2不仅可以通过调节DNA甲基化途径影响甲基化过程，还可以作为转录抑制因子调节基因转录，从而维持与修饰神经元成熟。因此，如果MECP2基因产生突变导致其编码的蛋白功能异常，可能对神经系统的生长和发育造成损害^[10]。

本研究的9例患儿中5例MECP2基因发生突变，其中4例为C突变为T，与国外报道的80%以上的点突变为C突变为T一致^[11]。

患者A突变位于MBD区域，该区含有85个氨基酸，为蛋白质染色质定位所需^[2,9]，该突变可能改变蛋白的二级结构，导致MECP2蛋白与5-甲基胞嘧啶的结合能力下降。患者D和G突变位于TRD功能区，该区由104个氨基酸组成，它与组蛋白乙酰化酶和转录因子SIN3A相互作用发挥

转录抑制作用^[2,9]。患儿D的MECP2基因突变以后使得第270位氨基酸由精氨酸变为终止密码子；而患儿G的MECP2基因外显子4插入一个碱基，产生移码突变使从第305位氨基酸（赖氨酸）起氨基酸序列改变，并在第330位氨基酸处提前终止，这2例患儿均产生截短的MECP2蛋白。这两个突变可能改变了TRD的结构，影响了其转录抑制功能。患儿B突变位于CTS区域，推测该区域的突变影响TRD的功能。患者F突变虽不在这几个功能区内，但是该突变使MECP2蛋白截短，在TRD区域前表达终止，因此F患者的MECP2蛋白功能部分或者全部丧失。

有研究对北美国际Rett数据库（IRSA, <http://MECP2.chw.edu.au>）中的病例统计分析发现超过80%的RTT患者存在MECP2基因突变，剩余的近20%突变检测阴性；因此推测可能有其他致病基因。研究发现一些RTT患者中细胞周期依赖性激酶样5蛋白（CDKL5）存在突变^[11]。接下来本课题组将对MECP2突变阴性的患者进行CDKL5致病基因的检测。

国内外都有MECP2基因突变和RTT患儿表型的研究，包括突变类型以及突变位置的不同对患者的影响，但是结论不一致^[12-13]，可能原因是病例数较少及对临床症状的评分标准不同。本研究发现位于TRD区域的突变表现出不说话、脑电图痫性放电以及发育明显落后的临床特点，但是本研究病例较少，不能得出肯定结论，将收集更多病例进行统计分析，明确基因型和表型的关系。

综上所述，本研究结果和国内外其他研究组基本一致，MECP2基因检测可帮助临床进行诊断，特别是对于临床症状未显现出来的患儿可以尽早确诊，从而做到早诊断、早干预。

[参 考 文 献]

- [1] Abhishek B, Jorge C, Mriganka S. Rett syndrome: genes, synapse, circuits, and therapeutics[J]. Front Psychiatry, 2012, 3(3): 1-13.
- [2] Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2[J]. Nat Genet, 1999, 23(2): 185-188.
- [3] Weaving LS, Ellaway CJ, Gecz J, et al. RETT syndrome: clinical review and genetic update[J]. J Med Genet, 2005, 42(1): 1-7.
- [4] 张晶晶, 包新华, 曹广娜, 等. 中国 Rett 综合征患儿突变基因的亲缘分析 [J]. 中国医学遗传学杂志, 2010, 27(2): 121-124.
- [5] Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, et al. An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome[J]. Eur J Paediatr Neurol, 2002, 6(5): 293-297.
- [6] Mimi Wan, Stephen SJ, Zhang XY, et al. Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots[J]. Am J Hum Genet, 1999, 65(6): 1520-1529.
- [7] 李颖杰, 朱金玲, 张淑红, 等. Rett 综合征的研究进展 [J]. 国际遗传学杂志, 2007, 30(3): 229-233.
- [8] 潘虹, 王艳萍, 孟洪第, 等. Rett 综合征 MECP2 基因突变分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(4): 276-280.
- [9] Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin[J]. Cell, 1997, 88(4): 471-481.
- [10] Van den Veyver IB, Zoghbi HY. Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome[J]. Curr Opin Genet Dev, 2000, 10(3): 275-279.
- [11] Zhang XY, Bao XH, Zhang JJ, et al. Molecular characteristics of Chinese patients with Rett syndrome[J]. Eur J Med Genet, 2012, 55(12): 677-681.
- [12] 李美蓉, 潘虹, 包新华, 等. Rett 综合征患儿 MECP2 基因型和表型关系研究 [J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(2): 124-128.
- [13] Schanen C, Houwink EJ, Dorrani N, et al. Phenotypic manifestations of MECP2 mutation in classical and atypical Rett syndrome[J]. Am J Med Genet, 2004, 126(2): 129-140.

(本文编辑: 万静)