



假肥大型肌营养不良的分子生物学和基因诊断

假肥大型肌营养不良(Duchenne's/Becker muscular dystrophy, D/BMD)是一种等位基因X-连锁隐性遗传病,在男婴中的发病率为1/3 500(DMD)和1/30 000(BMD)。约2/3的患者基因突变为基因内缺失,1/3为新生突变。其临床特点为全身骨骼肌进行性变性萎缩,多伴有腓肠肌假性肥大,预后不良,一般于13岁(DMD)或30岁(BMD)前丧失行走能力。迄今为止该病尚无有效的治疗办法,其预防主要依靠遗传咨询、携带者检测、产前诊断和选择性流产。因此,发展特异性好和灵敏度高的携带者检测、产前诊断方法是当务之急。

1 D/BMD的分子生物学特征

1.1 D/BMD基因定位及其结构

D/BMD相关基因定位于X染色体短臂2区1带(Xp21),与1号常染色体平衡易位,长达2 400 kb,有75个外显子,约为整个基因组的0.1%,占X染色体的2%。Koeing等[1][2]已完成对人类DMD的14 kb cDNA的完全克隆,并对DMD基因结构作了初步分析,得出了其大致结构:5'端位于DXS142位点内,3'端从DL66.6的缺失断裂点一直向染色体远端延伸。

1.2 D/BMD基因缺失的分布

D/BMD基因缺失型突变的缺失位点多分布于启动子、外显子3、4、6、8、12、13、17、19、42、43、44、45、47、48、50、51、52、60。其中以外显子44、45、47、48、50、51和52缺失最多见。基因缺失热点区主要集中在基因中心区3'端外显子44~52和5'端外显子1~19。近来对基因缺失热点区内含子44、45、49和50的研究发现其中存在许多小的重复序列,这些重复序列是基因重组的研究热点[1][2]。

1.3 D/BMD基因的表达产物及致病机制

DMD基因所表达的产物是抗肌萎缩蛋白(dystrophin),该蛋白的功能是帮助肌细胞减轻因肌纤维收缩而产生的应力,使细胞免受损伤[3]。DMD发病主要是由于DMD基因突变导致翻译读框(Translational reading frame)移位,造成该基因的编码产物抗肌萎缩蛋白功能部分或完全缺失;病情轻重取决于基因突变对阅读框架的影响,若基因突变打断或改变读框,则产生典型的DMD,若保持读框则临床表现为BMD。发生DMD基因的高频率缺失主要是同源染色体和非同源染色体不等位交换的结果。单纯的染色单体缺失也可以导致DMD基因缺失,且后者使DMD基因缺失频率明显增高[4]。由于该病致病基因庞大,结构复杂,因此体内外环境因素的变化很可能导致新的突变。事实上约有1/3的患者都属于这种类型,这些患者亲属的发病风险远较遗传型低。

2 分子生物学技术在D/BMD携带者检测和产前诊断中的应用

2.1 传统方法

在基因诊断技术开展以前，对D/BMD患者的诊断主要依靠病史、家族史(家系分析)、临床表现、临床检验(血清酶学检查)及其他辅助诊断(肌电图、肌活检)等综合判断。通过系谱分析和血清酶学方面的改变可检出携带者。虽然血清CPK测定对患者诊断和携带者的检测均有较大意义，但只有约70%的携带者有CPK活性增高，并因致病基因携带者和正常对照女性有较大的重叠，使该方法在携带者检测中的应用受到一定限制。在产前诊断方面，传统方法是劝告携带者孕妇流产所有的男孩，而导致半数正常男孩被流产。1978年开始用胎儿镜抽取胎血检查CPK活性以决定是否终止妊娠，但由于部分DMD胎儿的CPK水平并不升高，故其结果并不很可靠，且此法只能在妊娠晚期进行，对母子均有较大的风险。

2.2 基因诊断

2.2.1 Southern印迹杂交 Southern印迹杂交是最经典的基因分析方法。以往采用基因组克隆探针，对基因缺失的检出率较低。自从Koeing等[1]1987年完成了总长14 kb的DMD cDNA全克隆和7个亚克隆cDNA探针并应用于cDNA检测以来，发现60%~70%的患者为D/BMD基因缺失突变，5%为基因重复，从此发展了直接检测缺失和重复突变的诊断方法，包括用cDNA筛选和聚合酶链反应特异性筛选等，大大提高了D/BMD缺失和重复型的检出率。在产前诊断中检测到的缺失，由于不涉及重组问题，诊断可靠性大为增加，故cDNA探针主要用于产前诊断。使用7个亚克隆探针进行Southern印迹杂交即可覆盖基因的全部外显子，并且能够确定缺失两端的边界类型和判断缺失类型。由于DMD基因庞大，且突变位点具有较高的异质性，加之这些探针与DMD位点有一定的重组率，故容易因互换而引起诊断错误，操作也较复杂。

2.2.2 限制性片段长度多态性的连锁分析 应用有关D/BMD的cDNA探针，通过限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphisms, RFLPs)的连锁分析能检测出多数D/BMD携带者，是D/BMD产前诊断的有效方法。RFLPs分析也有一些缺陷，如被检测携带者的多态位点必须是杂合子，使用的探针越多，发现杂合子位点的机率就越大；减数分裂时DMD位点与多态位点间的重组将影响危险性估计的准确性；这种技术要求进行家系分析，建立有用的连锁谱，对于尚未出现患者的散发突变不能检测；RFLPs连锁分析进行产前诊断的准确性较低等。如将PCR和RFLP联合应用，对DMD携带者的检测、产前诊断和遗传咨询将会有很大益处。

2.2.3 短串联重复序列(STR)多态单体型连锁分析 STR多态单体型连锁分析以PCR为基础，快速准确，基因组DNA需要量小，可提供的信息量高，适合非缺失型家系产前诊断。文献报道[5][6] D/BMD基因内存在数个具有长度多态性的CA(5'端启动子附近，内含子44、49)或TTGA(MPIP)短串联重复序列，杂合率高，信息量大，是进行连锁分析的理想位点。选择这4个位点进行联合分析，可大大提高产前诊断的准确率，因而联合多重PCR和STR多态单体型连锁分析是缺失和重复型检测的理想方法。但仍有1/3 D/BMD的散发病例系由新生突变所致，这些病例无法用STR多态单体型连锁分析检测。

2.2.4 多重PCR 在对大量D/BMD基因缺失分析的基础上，Chamberlain[7]等和Beggs[8]等分别以9个不同的缺失热点外显子旁侧序列设计了两组引物，用这两组引物进行多重PCR可检测出缺失型突变，其准确率是用全长cDNA探针检测的98%。目前多采用9对或18对引物两步mPCR，具有节省引物、操作简便、勿需特别仪器，且扩增后对结果的判定较DNA杂交直观和容易等优点，故很适合临床推广应用。但多重PCR仍能扩增女性携带者的基因缺失片段，故对女性携带者的检测受到一定的限制。现以发展了定量多重PCR以解决这一问题[3]。

2.2.5 定量PCR 定量PCR用于缺失型和重复型携带者的检测以及产前诊断均有较高的精确度。应用多重PCR和cDNA探针Southern印迹杂交技术基本能全部检测出缺失型男性患者，但对女性携带者由于正常X染色体的干扰，仍较难诊断。用荧光定量PCR技术，在PCR对数期对其扩增产物进行荧光标记定量检测，可以检测出98%的缺失和90%的重复[13][14]。定量PCR涉及的所有过程的最终自动化可消除该方法重复性差的问题，这也是目前检测携带者最为可靠的方法之一。定量PCR的不足之处是容易受许多因素的影响，且荧光定量PCR仪器昂贵，不易普及。

2.2.6 反转录PCR 对于热点区域内的缺失型患者的诊断，多重PCR较为优越。然而多重PCR技术对重复突变和位于非热点区域内的缺失型突变以及点突变则无能为力。反转录PCR技术的应用则能解决上述问题，并在一定程度上也解决了STR多态单体型连锁分析存在的问题。反转录PCR的最大优点就是绕过了2 300 kb DMD基因的DNA序列，直接在14 kb的多重RNA编码序列上筛查DMD基因存在的各种突变类型<HZ[16]><HZ[17]

，且可用易得的外周血细胞总RNA完成RT-PCR。该方法简便、实用，利于筛查各种类型的突变，尤其有利于对缺失型杂合子携带者的诊断。由于反转录PCR 技术难度较大，故只在多重PCR和串联重复序列PCR未获得满意的诊断结果时才用来鉴定D/BMD患者的基因突变并确定其类型。该技术基于对DMD基因突变的直接鉴定，不存在假阳性和假阴性结果，因而具有独到的优势，从而为杂合子携带者的鉴定、产前诊断及遗传咨询提供了有效方法。

2.2.7 脉冲电场凝胶电泳的应用 在进行D/BMD携带者检测及产前诊断时，脉冲电场凝胶电泳(PFGE)因其分辨率高而被作为常规的技术手段，可以检出常规凝胶电泳不能检出的缺失[9]，还可通过正常和异常分子缺失的杂合片段来直接对D/BMD携带者分析。PFGE和场交变凝胶电泳(FIGE)是两种理想的分析缺失型携带者和胎儿DMD位点部分缺失的方法。

2.3 存在的问题与展望

近年来DMD分子遗传学研究迅速发展，提高了DMD携带者诊断和产前诊断的准确性。但由于DMD基因庞大，自发突变率高，还无法对此类患儿进行产前诊断，所以还需要发展更有效的基因检测手段。目前对DMD基因的完整结构及其外显子、内含子的大小、排列顺序等均已基本查清，对DMD基因的转录调节、核苷酸序列及其突变性质的阐明将很快成为可能，这将有助于开发新的检测方法[10]。DMD性腺嵌合体的存在意味着所有男胎都有发病的危险，因此，应尽量多的应用cDNA探针，以便发现更多的基因缺失。单体型风险分析除可用经典的RFLPs连锁分析外，还可用近期建立的CA 重复顺序多态性分析和单链构象多态性分析[3][11]。还有学者尝试采用直接分析基因产物抗肌萎缩蛋白进行产前诊断。可以设想，随着对D/BMD基因研究的进一步深入和更多多态位点的发现，D/BMD的基因诊断、预测、携带者筛选和产前诊断中存在的一系列问题将最终得到解决，该病的治疗策略也会应运而生[12]。

参考文献：

- [1] Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, et al. Complete 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): 509-17.
- [2] Liu Y, Liu H, Xie BD. Detection of gene deletions in chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy using cDNA probes and the polymerase chain reaction method[J]. Life Sciences, 1999, 65(9): 8648-69.
- [3] Lisiecka D, Wigowska SJ, Kwiatkowska J, et al. Molecular-genetic characteristics of mutations in dystrophin gene and clinical symptoms in Duchenne muscular dystrophy[J]. Neurol Neurochir Pol, 1998, 32(5): 1069-79.
- [4] Roberts RG, Barby TF, Manners E, et al. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes[J]. Am J Hum Genet, 1991, 49(2): 298-310.
- [5] Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM. Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA: application to the 5' region of the dystrophin gene[J]. Am J Hum Gene, 1991, 48: 621-27.
- [6] Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1991; 49: 951-60.
- [7] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(23): 11141-56.
- [8] Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, et al. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction[J]. Hum Genet, 1990, 86(1): 45-8.
- [9] Chen JD, Denton MJ, Morgan G, et al. The use of field-inversion gel electrophoresis for deletion detection in Duchenne muscular dystrophy[J]. Am J Hum Genet,

1988, 42(5): 777-80.

[10] Rininsland F, Hahn A, Niemann SS, et al. Identification of a new DMD gene deletion by ectopic transcript analysis[J]. J Med Genet, 1992, 29(9): 647-51.

[11] Zietkiewicz E, Sinnett D, Richer C, et al. Single-strand conformational polymorphisms (SSCP): detection of useful polymorphisms at the dystrophin locus[J]. Hum Genet, 1992, 89(4): 453-6.

[12] Prior TW. Perspectives and molecular diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies[J]. Clin Lab Med, 1995, 15(4): 927-41.

[13] Pastore L; Caporaso MG; Frisso G, et al. A quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay completely discriminates between Duchenne and Becker muscular dystrophy deletion carriers and normal females[J]. Mol Cell Probes, 1996, 10(2): 129-37.

[14] Mansfield ES; Robertson JM, Lebo RV, et al. Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies[J]. Am J Med Genet, 1993, 48(4): 200-8.

参考文献:

[1] Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, et al. Complete 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): 509-17.

[2] Liu Y, Liu H, Xie BD. Detection of gene deletions in Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy using cDNA probes and the polymerase chain reaction method[J]. Life Sciences, 1999, 65(9): 8648-69.

[3] Lisiecka D, Wigowska SJ, Kwiatkowska J, et al. Molecular-genetic characteristics of mutations in dystrophin gene and clinical symptoms in Duchenne muscular dystrophy[J]. Neurol Neurochir Pol, 1998, 32(5): 1069-79.

[4] Roberts RG, Barby TF, Manners E, et al. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes[J]. Am J Hum Genet, 1991, 49(2): 298-310.

[5] Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM. Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA: application to the 5' region of the dystrophin gene[J]. Am J Hum Gene, 1991, 48: 621-27.

[6] Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1991; 49: 951-60.

[7] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(23): 11141-56.

[8] Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, et al. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction[J]. Hum Genet, 1990, 86(1): 45-8.

[9] Chen JD, Denton MJ, Morgan G, et al. The use of field-inversion gel electrophoresis for deletion detection in Duchenne muscular dystrophy[J]. Am J Hum Genet, 1988, 42(5): 777-80.

[10] Rininsland F, Hahn A, Niemann SS, et al. Identification of a new DMD gene deletion by ectopic transcript analysis[J]. J Med Genet, 1992, 29(9): 647-51.

- [11] Zietkiewicz E, Sinnott D, Richer C, et al. Single-strand conformational polymorphisms (SSCP): detection of useful polymorphisms at the dystrophin locus[J]. Hum Genet, 1992, 89(4): 453-6.
- [12] Prior TW. Perspectives and molecular diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies[J]. Clin Lab Med, 1995, 15(4): 927-41.
- [13] Pastore L; Caporaso MG; Frisso G, et al. A quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay completely discriminates between Duchenne and Becker muscular dystrophy deletion carriers and normal females[J]. Mol Cell Probes, 1996, 10(2): 129-37.
- [14] Mansfield ES; Robertson JM, Lebo RV, et al. Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies[J]. Am J Med Genet, 1993, 48(4): 200-8.
-

[回结果列表](#)