

假肥大型肌营养不良的分子生物学和基因诊断

刘咏梅¹袁志纯¹袁振伟²第一军医大学¹珠江医院儿科袁生化教研室袁广东广州 510282 宛

摘要 假肥大型肌营养不良(Duchenne/Becker muscular dystrophy, D/BMD)是一种等位基因 X-连锁隐性遗传病。本文综述了 D/BMD 基因的定位、结构、突变和致病机理,重点阐述了目前对 D/BMD 携带者检测和产前诊断几种基因诊断方法的适用范围和各自的优缺点。

关键词 肌营养不良;分子生物学;基因诊断

中图分类号 746.2 文献标识码 文章编号 000-2588-001-0158-03

假肥大型肌营养不良(Duchenne/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 1/3500。DMD 和 BMD 约占 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,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 p21.3 与 1 号常染色体平衡易位,长达 2400kb 宛有 75 个外显子,约占整个基因组的 0.1%。占 X 染色体的 2%。Koeing 等^[1]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。随'端位于 DXS142 位点内,随'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、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 宛其中以外显子 44、45、46、47、48、49、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。^[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 宛多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。宛后者使 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、系谱分析、临床表现、临床检验、血清酶学检查,及其他辅助诊断、心电图、肌活检查等综合判断。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,宛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。由于部分 DMD 胎儿的 CPK 水平并不升高,宛其结果并不很可靠。此法只能在妊娠晚期进行,宛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。宛自从 Koeing 等^[1]1987 年完成了总长 14 kb 的 DMDcDNA 全克隆和 7 个亚克隆 cDNA 探针,并应用于 cDNA 检测以来,宛发现 60%~70% 的患者为 D/BMD 基因缺失突变,宛为基因重复。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。宛在产前诊断中检测到的缺失,宛由于不涉及重组问题,宛诊断可靠性大为增加。宛故 cDNA 探针主要用于产前诊断。宛使用 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,宛并且能够确定缺失两端的

收稿日期 000-09-20

作者简介 刘咏梅, 1962 宛女,吉林长春人, 1984 年毕业于白求恩医科大学,本科袁主治医师,现为总后中青年人才培养基金班学员。电话 020-85143731

边界类型和判断缺失类型。由于 DMD 基因庞大, 突变位点具有较高的异质性, 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, 提供的信息量高, 适合非缺失型家系产前诊断。文献报道^[56] D/BMD 基因内存在数个具有长度多态性的 CA 端启动子附近, 含有 44 个 TTGA (M-PIP) 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, Hamberlain^[57] 和 Beggs^[58] 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, 无需特别仪器, 且扩增后对结果的判定较 DNA 杂交直观和容易等优点, 很适合临床应用。但多重 PCR 仍能扩增女性携带者的基因缺失片段, 对女性携带者的检测受到一定的限制。现已发展了定量多重 PCR 以解决这一问题。

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。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, 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, 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, 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。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 (V-GE) 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, 仍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。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。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, 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。

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.

- 咱暂 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.
- 咱暂 Lisiecka D, Wigowska SJ, Kwiatkowska J. 藻藻藻 Molecular-genetic characteristics of mutations in dystrophin gene and clinical symptoms in Duchenne muscular dystrophy [J]. *Neurol Neurochir Pol*, 1998, 32(5): 1069-79.
- 咱暂 Roberts RG, Barby TF, Manners E. 藻藻藻 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.
- 咱暂 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.
- 咱暂 Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS. 藻藻藻 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.
- 咱暂 Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE. 藻藻藻 Deletions screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(23): 11141-56.
- 咱暂 Beggs AH, Koenig M, Boyce FM. 藻藻藻 Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction [J]. *Hum Genet*, 1990, 86(1): 45-8.
- 咱暂 Chen JD, Denton MJ, Morgan G. 藻藻藻 Use of field-inversion gel electrophoresis for deletion detection in Duchenne muscular dystrophy [J]. *Am J Hum Genet*, 1988, 42(5): 777-80.
- 咱0暂 Rininsland F, Hahn A, Niemann SS. 藻藻藻 Identification of a new DMD gene deletion by cDNA transcript analysis [J]. *J Med Genet*, 1992, 29(9): 647-51.
- 咱1暂 Zietkiewicz E, Sinnett D, Richer C. 藻藻藻 Single-strand conformational polymorphisms (SSCP): detection of useful polymorphisms at the dystrophin locus [J]. *Hum Genet*, 1992, 89(4): 453-6.
- 咱2暂 Prior TW. Perspectives and molecular diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies [J]. *Clin Lab Med*, 1995, 15(4): 927-41.
- 咱3暂 Pastore L, Caporaso MG, Frisso G. 藻藻藻 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.
- 咱4暂 Mansfield ES, Robertson JM, Lebo RV. 藻藻藻 Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies [J]. *Am J Med Genet*, 1993, 48(4): 200-8.
- 咱6暂 Li H, Cao Y, Berndt MC. 藻藻藻 Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 藻藻藻 *Oncogene*, 1999, 18(48): 6785-94.
- 咱7暂 Li H, Zhao LL, Funder JW. 藻藻藻 Protein phosphatase 2A inhibits nucleolar telomerase activity in human breast cancer cells 咱暂 *J Biol Chem*, 1997, 272: 16729-32.
- 咱8暂 Andrea GB, Nam WK, Rita BE. 藻藻藻 Mechanism of telomerase induction during T cell activation 咱暂 *Exp Cell Res*, 1996, 228: 58-64.
- 咱9暂 Li H, Zhao L, Yang Z. 藻藻藻 Telomerase is controlled by protein kinase C α in human breast cancer cells 咱暂 *J Biol Chem*, 1998, 273: 33436-42.
- 咱0暂 Kang SS, Kwon T, Kwon DY. 藻藻藻 Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit 咱暂 *J Biol Chem*, 1999, 274: 13085-90.
- 咱1暂 Silvia M, Simona N, Giulia F. 藻藻藻 Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells 咱暂 *Mol Cell Biol*, 2000, 20(11): 3764-71.
- 咱2暂 Kiaris H, Schally AV. Decrease in telomerase activity in U-87MG human glioblastoma after treatment with an antagonist of growth hormone-releasing hormone 咱暂 *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 226-31.
- 咱3暂 Vasa M, Breitschopf K, Zeiger AM. 藻藻藻 Nitric oxide inactivates telomerase and delays endothelial cell senescence 咱暂 *Circ Res*, 2000, 87(7): 540-2.
- 咱4暂 吴翔, 朱冰, 杨光彩, 等. 人成纤维细胞转染 HPV16 型早期蛋白基因后端粒酶的活性表达 咱暂 *第一军医大学学报*, 1999, 19: 431-4.

(上接 157 页)

- 咱暂 Sangtaek O, Young-Hwa S, Jeongbin Y. 藻藻藻 Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene 咱暂 *Oncogene*, 2000, 19: 1485-90.
- 咱暂 Scott KD, Hua-yin Y, Roger RR. 藻藻藻 Methylation of the human telomerase gene CpG island 咱暂 *Cancer Res*, 2000, 60: 537-41.
- 咱0暂 Theodora RD, Izumi H, Colleen HA. 藻藻藻 Methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene 咱暂 *Cancer Res*, 1999, 59: 6087-90.
- 咱1暂 Cong YS, Bacchetti S. Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells 咱暂 *J Biol Chem*, 2000, 275(46): 35665-8.
- 咱2暂 Kohtaro F, Satoru K, Masahiro T. 藻藻藻 Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT 咱暂 *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(13): 2557-62.
- 咱3暂 Ulaner GA, Hu JF, Vu TH. 藻藻藻 Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternative splicing of hTERT transcripts 咱暂 *Cancer Res*, 1998, 58: 4168-72.
- 咱4暂 Gary AU, Ji-Fan H, Thanh HV. 藻藻藻 Regulation of telomerase by alternative splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium 咱暂 *Int J Cancer*, 2000, 85: 330-5.
- 咱5暂 Liu K, Schoonmaker M, Levine B. 藻藻藻 Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes 咱暂 *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5147-52.