

• 临床论著 •

层黏连蛋白 $\alpha 2$ 缺失型先天性肌营养不良
患儿一例 LAMA2 基因突变分析

朱艳慧 喻长顺 王晓春 朱庆义 胡朝晖

【摘要】 目的 对一例层黏连蛋白 $\alpha 2$ 缺失型先天性肌营养不良(MDC1A)患儿 LAMA2 基因突变(c. 7147C > T/p. Arg2383X, c. 6513_6515delTGT/p. 2172delVal) 进行报道和分析。**方法** 提取一例 MDC1A 患儿与其父母的外周血 DNA, PCR 扩增 LAMA2 基因的全部 65 个外显子, 以琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, PCR 产物纯化后进行直接基因测序。**结果** 检测到先证者 LAMA2 基因的多种突变, 其中 c. 7147 C > T (杂合) 为无义突变(p. Arg2383X); 另一个突变 c. 6513_6515delTGT (杂合) 引起编码产物缺失单个氨基酸残基(p. 2172delVal), 其余突变均发生于多态性位点或内含子区, 仅有较小可能影响 LAMA2 基因的功能。先证者母亲被检出携带了 c. 6513_6515delTGT 杂合突变; 父亲被检出携带了 c. 7147C > T 杂合突变。**结论** 先证者一个 LAMA2 等位基因发生 c. 7147 C > T 杂合突变, 另一个等位基因发生 c. 6513_6515delTGT 杂合突变, 两个突变位点均位于编码蛋白 laminin-2 的 G 区域, 突变导致 G 区域功能丧失, 引起 MDC1A 的表现型。

【关键词】 肌营养不良; MDC1A; LAMA2 基因; 基因测序

A report of LAMA2 gene mutation in a patient of merosin-deficient congenital muscular dystrophy type 1A (MDC1A) ZHU Yan-hui, YU Chang-shun, WANG Xiao-chun, ZHU Qing-yi, HU Zhao-hui. Guangzhou Kingmed Center for Clinical Laboratory, Guangzhou 510330, China

Corresponding author: HU Zhao-hui, Email: huzh@kingmed.com.cn

【Abstract】 Objective To report a LAMA2 gene mutation (c. 7147C > T/p. Arg2383X, c. 6513_6515delTGT/p. 2172delVal) in a patient of merosin-deficient congenital muscular dystrophy type 1A (MDC1A). **Methods** Extract DNA in the peripheral blood of a MDC1A patient and her parents, PCR was used to duplicate all the 65 exons of LAMA2 gene, Agarose gel electrophoresis (AGE) was used to identify the product of PCR, after purification, the product of PCR was sequenced rightly. **Results** Many mutations of LAMA2 gene were identified in the proband, among them, c. 7147 C > T (heterozygosis) was a nonsense mutation (p. Arg2383X). Another mutation c. 6513_6515delTGT (heterozygosis) result in lost of a single amino acid residues (p. 2172delVal), the other mutations all occurred in the polymorphic site or intron area, only have a small possibility to influence the function of LAMA2 gene. The father of proband is identified mutation c. 7147 C > T (heterozygosis), mother was identified mutation c. 6513_6515delTGT (heterozygosis). **Conclusions** One allele of the proband is identified mutation c. 7147 C > T (heterozygosis), the other allele is identified mutation c. 6513_6515delTGT (heterozygosis), both the mutations occurred in the area of G function area of the encoding protein laminin-2, result in the phenotype of congenital muscular dystrophy.

【Key words】 Muscular dystrophies; MDC1A; LAMA2; Gene sequencing

先天性肌营养不良(congenital muscular dystrophy)是指出生时或出生后数月内出现的原发性、进行性疾病,早期即可有关节挛缩,是一类常染色体隐性遗传性疾病。肌肉病理表现为肌营养不良的特征性改变,即肌纤维大小不等,可见小而圆的肌纤维,肌间质增生等。在先天性肌营养不良患者中,有 40% 为层黏连蛋

白 $\alpha 2$ 缺失型先天性肌营养不良(merosin-deficient congenital muscular dystrophy type 1A, MDC1A), 欧美国家较多见^[1]。

层黏连蛋白为一组糖蛋白,是形成人和动物基膜的骨架蛋白,参与细胞的黏连、分化、生长、成型和移行。每一种层黏连蛋白均由一条 α 重链和两条 β 、 γ 轻链组成,层黏连蛋白 2 (又称 merosin 或 laminin-2) 是所有层黏连蛋白亚型中最重要的一种,由 $\alpha 2$ 重链、 $\beta 1$ 和 $\gamma 1$ 轻链组成。编码 laminin-2 的 LAMA2 基因定位于 6q22 ~ 23^[2], 含有 65 个外显子。MDC1A 与 laminin-2

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.13.100

作者单位: 510330 广州金域医学检验中心(朱艳慧、喻长顺、朱庆义、胡朝晖); 中南大学湘雅医学院医学检验系(朱艳慧、王晓春)

通讯作者: 胡朝晖, Email: huzh@kingmed.com.cn

的3个亚单位之一 $\alpha 2$ 链(laminin- $\alpha 2$)缺陷有关,层黏连蛋白2(laminin-2)缺乏可造成细胞骨架与细胞外基质之间的连接破坏,导致肌纤维变性、坏死。

对象与方法

一、对象

先证者女,足月生产,自出生后,哭声弱,肌张力低,四肢松软,运动发育迟缓。3岁时就诊,不会爬,不会站,四肢肌张力低,膝腱反射未引出,膝关节略挛缩,神志清楚。经相关辅助检查初步诊断为MDC1A后,对其LAMA2基因进行测序来确诊。对先证者随访,现5岁,仍不会爬,不会站立和行走,智力正常,手部精细活动基本正常,可用勺子吃饭。先证者父母非近亲结婚,身体健康,无家族史,先证者父母后生育了一个3岁的健康小孩。

二、方法

1. DNA提取:采集先证者和父母的EDTA- Na_2 抗凝静脉血,采用德国QIAGEN公司的DNA提取试剂盒(QIAamp DNA blood mini kit)提取外周血DNA。

2. PCR反应:根据GenBank上LAMA2基因序列NG_008678.1,用Primer premier 5.0软件设计引物,扩增LAMA2基因全部65个外显子的基因序列,引物由上海英骏生物技术公司合成。PCR反应容积为10 μl ,每一反应体系中含10 \times PCR buffer II 1.0 μl , 3.2 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各1.0 μl , 2.5 mmol/L的dNTP Mixture 0.35 μl , 5.6 U/ μl 的Actitaq Polymerase 0.07 μl ,模板DNA 1.0 μl 。反应条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 12 min (94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) 35个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增完成后取5.0 μl PCR产物, DNA Marker(TIANGEN公司的MD101-Marker I)标记,于2.0%琼脂糖凝胶,电压120 V,电泳大约30 min, BIO-RAD凝胶成像系统观察结果,显示各上样孔扩增条带清晰,结果可靠,可用于基因测序检测。

3. 基因测序检测:(1)测序PCR反应:PCR反应体积为10 μl ,每一反应体系中含1 μl 的纯化PCR产物, 1 μl Primer(3.2 pmol/ μl), 2 μl H_2O , 1 μl 5 \times Sequencing buffer和0.35 μl BigDye Terminator v3.1。PCR反应条件为:96 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (96 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 50 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 4 min) 25个循环, 25 $^{\circ}\text{C}$ infinite。(2)毛细管电泳:对测序PCR反应产物进行纯化后,每个样本加10 μl Hi-Di, 94 $^{\circ}\text{C}$ 加热4 min后置于冰上5 min。在ABI genetic analyzer 3130xl上进行毛细管电泳。(3)结果分析:使用Mutation Surveyor软件和Blast软件进行结果分析。

结 果

先证者LAMA2基因被检测出多种突变,大多数突

变发生于多态性位点或内含子区,仅有较小可能影响LAMA2基因功能。在所有突变位点中,仅两个发生于外显子区域的突变有意义:(1)先证者46号外显子区域杂合突变c. 6513_6515delTGT,引起编码产物缺失单个氨基酸残基(p. 2172delVal),此突变为国际上尚未报道的新发突变。其父亲46号外显子区域没有检测到突变,母亲46号外显子区域被检测出杂合突变c. 6513_6515delTGT,推测先证者这一突变来自母亲(图1);(2)先证者50号外显子区域杂合突变c. 7147 C>T,为无义突变(p. Arg2383X),引起编码产物氨基酸序列提前终止,此突变为已报道的治病突变。其母亲50号外显子区域没有检测到突变,父亲50号外显子区域被检测出杂合突变c. 7147 C>T,推测先证者这一突变来自父亲(图1)。

讨 论

MDC1A是欧美国家较常见的常染色体隐性遗传先天性肌营养不良。患者多于出生后一个月内即出现严重的肌力、肌张力低下,近端和远端肌肉均受累,以近端肌力低下为著,早期即可出现关节挛缩。本例先证者于出生后起病,临床症状基本符合先天性肌营养不良的特点,经相关辅助检查初步诊断为MDC1A后,对其与父母进行LAMA2基因测序来确诊和遗传学分析。

MDC1A的致病基因是LAMA2基因,含有65个外显子,编码3088个氨基酸的层黏连蛋白 $\alpha 2$ 重链^[3]。层黏连蛋白为一组糖蛋白,是形成人和动物基膜的骨架蛋白,人类骨骼肌中存在7种层黏连蛋白亚型,其中最重要的是层黏连蛋白2(merosin或laminin-2),由 $\alpha 2$ 重链, $\beta 1$ 及 $\gamma 1$ 轻链组成。到目前为止,人类仅编码层黏连蛋白 $\alpha 2$ 链的LAMA2基因突变被确定可致肌营养不良的表现型。LAMA2基因有多种突变形式,包括无义突变、错义突变、剪接突变和缺失突变,突变可发生在全长的LAMA2基因上,导致laminin- $\alpha 2$ 链部分或全部缺失^[4]。laminin-2不仅丰富地表达于横纹肌的基膜,同时也表达于脑血管的基膜及雪旺细胞,这种表达方式正是MDC1A心脏、脑及周围神经系统病理改变的基础。在骨骼肌、心肌及周围神经系统中,laminin-2通过laminin- $\alpha 2$ 链的羧基端与 α -dystroglycan(α -DG)紧密相连,从而与dystrophin-dystroglycan复合体(DGC)相连,这一相互连接的过程依赖于 α -DG的糖基化糖类部分。缺少laminin- $\alpha 2$ 的骨骼肌将直接导致细胞骨架和细胞外基质之间的联系被破坏,同时导致肌细胞的产生、突触的形成、力量的产生及肌细胞机械稳定的障碍^[5]。

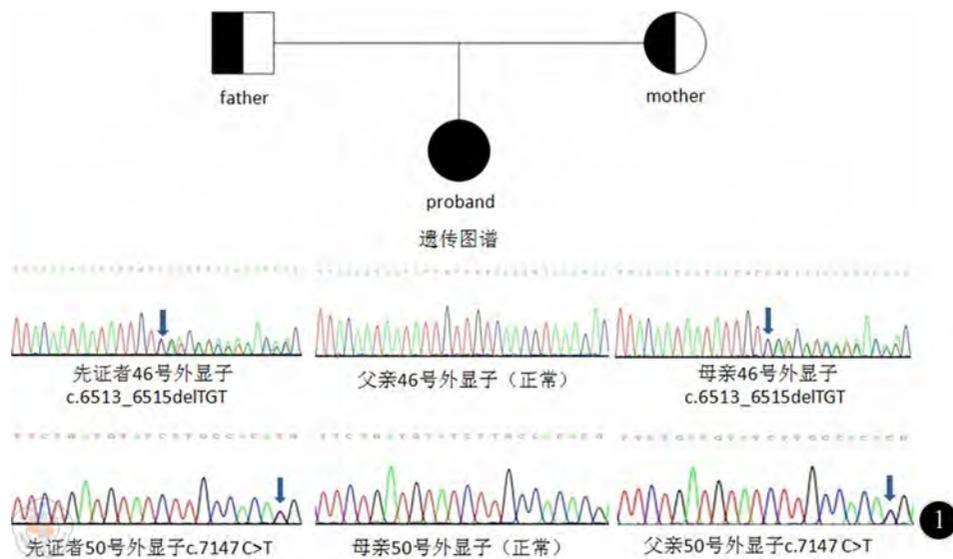


图1 遗传图谱及测序电泳图

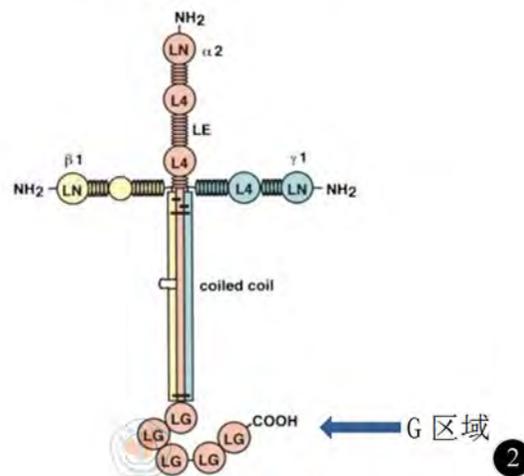


图2 laminin-2结构图

本例 MDC1A 先证者分别继承了父母含有致病突变的染色体,两条染色体 LAMA2 基因发生突变的位置不在同一位点,但导致了先天性肌营养不良的表现型,从广义上来说还是属于常染色体隐性遗传,这种遗传表现形式在其他的一些疾病如 Gitelman 综合征中也有报道^[6]。本例患者虽然不是在一对 LAMA2 等位基因的两个相同位点上发生的纯合突变,但两个杂合致病突变的位置均位于编码蛋白 laminin-2 的 G 区域^[7]。laminin-2 的 G 区域是通过 Ca^{2+} 介导的,结合类固醇激素、 $\beta 1$ 整合素、肝素、磷脂类和 α -DG 的位点,在细胞信号转导、表面黏附、迁移和分化的过程中起着重要作用。laminin-2 的分子结构呈十字架状(图 2),有 6 个结构域,laminin- $\alpha 2$ 链的羧基端形成特征性的 5 个串联排列的 G 样结构,组成 G 区域^[8]。G 区域与 α -DG 的结合依赖 Ca^{2+} 介导, Ca^{2+} 首先通过 G 区域的保守氨基酸残基与 laminin-2 结合,然后再与 α -DG 上相应的位点

结合^[9]。

先证者检出的 c. 7147C > T/p. Arg2383X 突变为已报道的致病突变,首先在意大利人中被发现,由 E. Pegoraro 于 2000 年最先报道^[9],c. 6513_6515delTGT/p. 2172delVal 为国际上尚未报道的新发突变。c. 7147C > T(杂合)为无义突变(p. Arg2383X),导致编码蛋白 laminin-2 羧基端 705 个氨基酸残基缺失,G 区域被截断,导致 laminin-2 与 α -DG 的结合被阻断。另外一些临床症状相似的 MDC1A 病例也被报道过发生在 laminin-2 G 区域的无义突变,如有学者报道的 p. Arg2578X^[10]和 c. Trp2316X^[11]。另一个突变 c. 6513_6515delTGT(杂合)引起编码产物缺失单个氨基酸残基(p. 2172delVal),通过对多个物种该基因的比较,发现该位点相对较为保守,提示其对生物的基本功能可能有较为重要的作用^[7]。结合 laminin-2 与 α -DG 的结合机制,推测该位点单个氨基酸残基的缺失可能影响

Ca²⁺与 laminin-2 的结合,从而导致 laminin-2 与 α-DG 结合受阻,进而引起先天性肌营养不良的表现型。本例先证者分别遗传了来自父亲和母亲的致病基因,遗传方式符合常染色体隐性遗传(遗传图谱见图 1)。MDC1A 虽然尚无有效的治疗方法,但通过基因检测的遗传咨询和产前诊断可以有效地预测胎儿患病的风险值,降低 MDC1A 的发病率。

参 考 文 献

[1] Muntoni F, Voit T. The congenital dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord*, 2004, 14: 635-649.

[2] Dalkilic I, Kunkel LM. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr Opin Gen Dev*, 2003, 13: 231-238.

[3] Oliveira J, Santos R, Soares-Silva, et al. LAMA2 gene analysis in a cohort of 26 congenital muscular dystrophy patients. *Clin Genet*, 2008, 74: 502-512.

[4] Allamand V, Guicheney P. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A, LAMA2 gene coding for α2 chain of laminin). *Eur J Hum Genet*, 2002, 10: 91-94.

[5] 王硕,熊晖,罗静,等. 一个先天性肌营养不良 1A 型家系的临床、

分子病理及遗传学研究. *中华医学遗传学杂志*, 2010, 27: 13-17.

[6] Maki N, Komatsuda A, Wakui H, et al. Four novel mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl co-transporter gene in Japanese patients with Gitelman syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19: 1761-1766.

[7] Hohenester E, Tisi D, Talts JF, et al. The Crystal Structure of a Laminin G-like Module Reveals the Molecular Basis of-Dystroglycan Binding to Laminins, Perlecan, and Agrin. *Molecular Cell*, 1999, 4: 783-792.

[8] Pegoraro E, Fanin M, Trevisan CP, et al. A novel laminin 2 isoform in severe laminin 2 deficient congenital muscular dystrophy. *Neurology*, 2000, 55: 1128-1134.

[9] Ramon M, Haydee RV, Pedro ME, et al. Severe congenital muscular dystrophy in a Mexican family with a new nonsense mutation (R2578X) in the lamininα2 gene. *J Hum Genet*, 2003, 48: 91-95.

[10] Guicheney P, Vignier N, Nissinen M, et al. Genetics of lamininα2 chain (or merosin) deficient congenital muscular dystrophy: from identification of mutations to prenatal diagnosis. *Neuromuscul Disord*, 1997, 7: 180-186.

[11] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>.

(收稿日期:2013-03-26)
(本文编辑:戚红丹)

朱艳慧,喻长顺,王晓春,等. 层黏连蛋白 α2 缺失型先天性肌营养不良患儿一例 LAMA2 基因突变分析[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013, 7 (13): 5871-5874.

