

综上所述,COPD 严重程度分级同 ALB 水平下降具有相关性,随着 COPD 严重程度的增加,ALB 水平下降越明显,据此可有效地预测患者预后,可以作为一种 AECOPD 急性加重期预后的重要参考指标。

参考文献

- 1 安维哨,陈绍奉.慢性阻塞性肺疾病分级与血清白蛋白水平相关性研究[J].中国基层医药,2012,19(3):335-336
- 2 徐英,王永秀.血清白蛋白与稳定期慢性阻塞性肺疾病分级关系的探讨[J].现代临床医学,2009,35(1):24-25
- 3 张益辉,王泽球,杨柯,等.营养不良与 COPD 呼吸衰竭的临床关系研究[J].临床肺科杂志,2008,13(8):968-969
- 4 彭玉维,李国明,李明毅,等.APACHE II 评分与血清白蛋白在 AE-

COPD 合并呼吸衰竭中的应用研究[J].临床合理用药杂志,2012,5(11):13-14

- 5 刘学花,吴琦.低白蛋白血症对 COPD 合并呼吸衰竭行机械通气患者预后的影响[J].天津医科大学学报,2006,12(3):447-449
- 6 朱解琳,李清,曹秀月,等.慢性阻塞性肺疾病患者营养状况与病情的相关性分析[J].中华护理杂志,2006,41(8):712-714
- 7 闫文翠,张雅芬,马秀芬,等.营养支持治疗对老年 COPD 合并呼吸衰竭患者的影响[J].中国老年学杂志,2013,33(18):4436-4437
- 8 钟松,张连东.氧合指数与 APACHE II 评分在慢性阻塞性肺疾病伴呼吸衰竭患者治疗中的应用价值[J].中国急救医学,2008,28(11):1024-1026 (收稿日期:2014-02-16) (修回日期:2014-02-27)

假肥大型肌营养不良一个核心家系 DMD 基因分析

高志杰 姜 茜 陈 倩 许克铭

摘 要 **目的** 对临床诊断的假肥大型肌营养不良 1 例患儿进行基因诊断,同时进行携带者筛查。**方法** 采用目标区序列捕获及第 2 代高通量测序技术对假肥大型肌营养不良患儿进行检测,同时采用 Sanger 测序技术对患者及其父母的基因型进行验证。**结果** 发现患儿 DMD 基因第 45 外显子存在 1 个纯合无义突变 c.6589A>T (P.Lys2197X),患儿母亲为杂合突变携带者。**结论** 本研究发现了一个尚未报道的致病性基因突变位点,同时发现第 2 代测序技术可以快速准确检测出 DMD 基因的点突变,具有一定的临床应用价值,为遗传咨询提供准确信息。

关键词 假肥大型肌营养不良 DMD 基因 基因诊断 第 2 代测序

[中图分类号] R596 [文献标识码] A

Analysis of DMD Gene in One Chinese Family with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. Gao Zhijie, Jiang Qian, Chen Qian, et al. Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Abstract Objective To explore the gene diagnosis of Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD) patients and screen the carrier. **Methods** Next-generation sequencing was used to examine patient in whom no exonic deletions were detected by multiplex PCR. Sanger sequencing were applied to confirm the results. **Results** The proband had a homozygous nonsense mutation in exon 45 - c.6589A>T (P.Lys2197X), and his mother was the heterozygous nonsense mutation carrier. **Conclusion** An unreported deleterious mutation of the DMD gene is found in an Chinese family with DMD. Next-generation sequencing technology is a simple and quick diagnostic tool for screening point mutation of DMD/BMD, and is valuable for clinical application and assisting genetic counseling.

Key words Duchenne/Becker muscular dystrophy; DMD gene; Gene diagnosis; Next-generation sequencing

假肥大型肌营养不良(duchenne/becker muscular dystrophy, DMD/BMD)是一种常见的遗传性肌肉病, DMD 病情严重,而 BMD 症状相对较轻。本病表现为缓慢进展的对称性肌无力和肌萎缩,主要累及骨骼肌,可伴不同程度的认知障碍和心肌损害^[1]。研究

证实两者均是由于抗肌萎缩蛋白基因(即 DMD 基因)突变所致,它们是同一基因的不同类型突变导致的肌肉神经系统中最常见的 X 连锁隐性遗传病,因此大多为男性患者,女性为携带者,男孩中发生率为 1/3500。本病主要的突变类型为基因的部分缺失或重复,占全部突变基因的 50%~70%^[2]。目前国内临床多采用多重连接依赖的探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)和多重 PCR 技术进行检测,但是由于检测技术本身的局限

作者单位:100020 北京,首都儿科研究所附属儿童医院神经科(高志杰、陈倩、许克铭);首都儿科研究所遗传研究室(姜茜)

通讯作者:陈倩,电子信箱:chenqianxhl@163.com

性,仍有 30% 左右的点突变未能被发现。

由于本病目前尚无根治的办法,因此通过产前诊断避免患儿出生至关重要,所以快速、准确的 DMD 致病基因的检测、携带者的检出、产前诊断及遗传咨询是预防本病的关键。本研究采用第 2 代测序的方法对 1 个 DMD 核心家系进行了基因检测,明确了患儿为点突变,且目前该突变位点国内外尚未见报道,同时为将来的产前诊断及遗传咨询提供基础,现报道如下。

资料与方法

1. 一般资料:患儿,男性,8 岁,第 1 胎第 1 产,足月顺产,围生期无异常。患儿 3 岁以前运动发育正常,自 3 岁开始出现蹲起困难、易摔倒。查体:神清,反应可,鸭步步态,Gower 征(+),双侧腓肠肌轻度肥大,触之稍硬,双上肢肌张力肌力正常,双下肢肌力 IV 级、肌张力正常,膝腱反射正常引出,病理征未引出。辅助检查:血生化:血清乳酸脱氢酶 650U/L(参考值 80~300U/L),肌酸激酶 10450U/L(参考值 50~220U/L),肌酸激酶同工酶 37U/L(参考值 0~16U/L);肌电图示肌源性损害;外院曾行 DMD 基因 79 个外显子 MLPA 检测未见重复及缺失(图 1)。患儿父母体健,非近亲结婚,家族无同类病史记载。

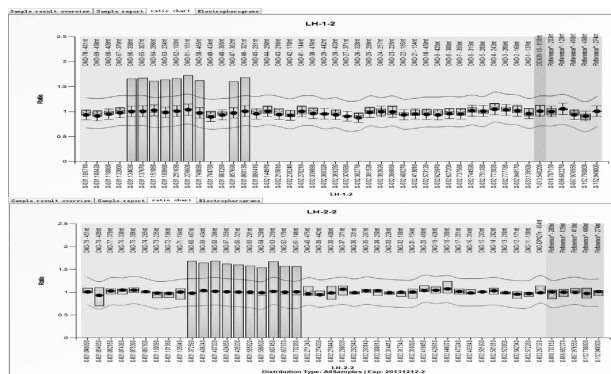


图 1 患儿 DMD 基因 MLPA 检测结果

未见外显子缺失或重复

2. 第 2 代测序(next-generation sequencing):利用目标区域捕获、测序法对 61 个遗传性肌病相关基因的外显子及外显子-内含子交接区进行检测。(1)文库构建:采集患儿及其父母的静脉血,应用 Qiagen 公司试剂盒提取基因组 DNA(the QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, Germany),将质量检测合格的基因组 DNA 随机打断(Biorupter),纯化长度为 150~250bp 的片段;然后利用 T4 DNA Polymerase、T4 phosphorylated polynucleotide kinase 和 E. coli DNA 聚合酶 Klenow 片段对纯化后的 DNA 片段进行末端修复,再按照 Illumina 公司二代测序仪的操作说明在片段两端加上 A 碱基,最后在两端加上接头(adaptor)并对其进行磁珠纯化。(2)杂交:已加接头纯化后的模板首先进行捕获前 PCR 扩增,然后

将 PCR 产物与自主设计的人类基因芯片(Roche NimbleGen, Madison, USA)在适宜条件下杂交 20~24h,此时目标片段因与芯片上的探针结合而被捕获,未杂交的片段则被洗掉,洗脱后保留在芯片上的目标片段再进行一次捕获 PCR 以显著增加待测片段的数量。(3)Sanger 测序验证:按照常规 Sanger 法对发现的 1 个点突变患者及其父母样本进行一代测序验证。(4)生物信息学分析:本实验中笔者使用的芯片捕获区包含 61 个基因的外显子及其侧翼 100bp,全长约 403.368kb。高通量测序数据使用 Illumina Pipeline(version 1.8.2)产生原始数据,去除低质量的数据后利用 BWA(Burrows wheeler aligner)将“干净的”读序与人类基因组参考序列比对(UCSC, hg19),再分别使用 SOAPsnp 软件和 GATK 软件进行 SNP 和 InDel 的收集。本实验中每个样品基因的平均测序深度约为 186 倍,捕获区覆盖度达 99% 以上,为了找出致病性的点突变,笔者参考 dbSNP 数据库、Hapmap、千人基因组数据库及 ESP(NHLBI Exome Sequencing Project)正常对照人群数据库,频率均 <0.05 的变异视为可疑。

结 果

1. 第 2 代高通量测序:患儿存在 DMD 基因第 45 个外显子的纯合无义点突变:c. 6589A > T(P. Lys2197 X)(图 2)。

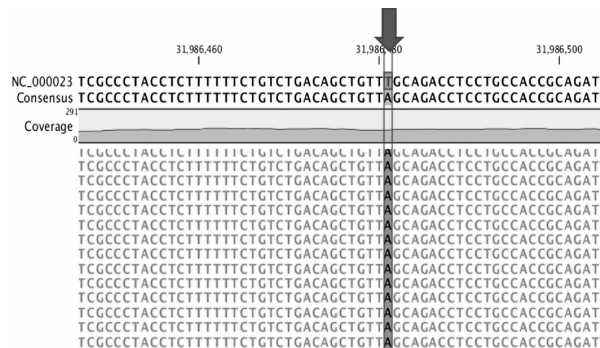


图 2 患儿第 2 代测序图

箭头所示为突变区 c. 6589A > T

2. Sanger 测序验证:Sanger 测序与第 2 代测序结果一致,患儿存在纯合点突变,其母亲为杂合点突变,即携带者(图 3)。

讨 论

DMD/BMD 是一种常见的主要累及骨骼肌的小儿神经肌肉病,呈 X 连锁隐性遗传。患者多数在 20 岁左右出现呼吸衰竭或心力衰竭,常死于呼吸道并发症和心肌病。DMD 基因是人类最大的基因之一,位于 Xp21,占整个基因组的 0.1%,编码区 79 个外显子,编码 Dystrophin 蛋白。DMD 基因按照功能划分可分为 4 部分:氨基端区域(1~8 号外显子)、中央棒状区(9~62 号外显子)、富含半胱氨酸区域(63~69 号

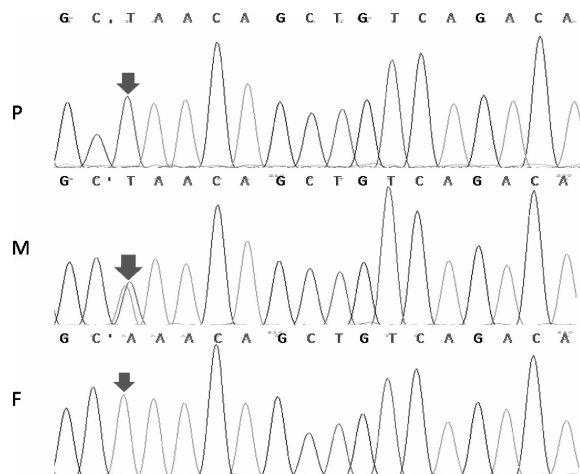


图3 患儿及其父母一代测序图

箭头所示为突变区。P. 患儿 c. 6589A > T;

M. 患儿母亲; F. 患儿父亲

外显子)、羧基端区域(70~79号外显子)。DMD基因的突变中约有1/3为新生突变,即非遗传所致。DMD患者中最常见的突变是DMD基因内部1个或多个外显子的大片段缺失,在所有突变中,基因缺失占55%~65%,重复占5%~15%,点突变占35%左右^[2,3]。目前大多数研究对于DMD的基因诊断采用多重PCR法检测患者热点区片段缺失或MLPA检测患者和携带者的片段缺失和(或)片段重复^[4,5],能解释大部分的DMD患者,但仍有约30%左右的点突变不能被发现。Magri等^[6]研究报道,对应用MLPA未见异常的41个家庭中的47例患者进行了DMD全基因测序,共发现40种致病性突变,其中16种为新发现的突变。由于DMD基因是人体最大的基因之一,传统一代测序检测费用较高,不适宜推广至临床应用。第2代高通量测序技术(next-generation sequencing technology)具有快速准确、运行成本低的优点,可同时对各种类型突变进行检测。刘敏娟等^[7]采用第2代测序技术对6例假肥大型肌营养不良患者进行检测,采用第1代测序技术、MLPA进行验证,结果发现1例为第10和11外显子缺失,1例为第16和17外显子重复,4例为点突变,共发现10种变异。Lim等^[8]应用第2代测序以及第1代测序技术、MLPA进行验证的方法对25例假肥大型肌营养不良患者进行检测,研究发现6例为外显子缺失,3例外显子重复,15例为点突变。

本研究中患儿临床表现典型,多种血清肌酶明显升高,肌电图示肌源性损害,可确诊本病,患儿曾在外院经MLPA检测DMD基因的79个外显子未见缺失

或重复。笔者采用第2代高通量测序技术对其进行DMD基因检测,发现患儿存在c. 6589A > T的纯合无义突变,同时应用Sanger测序验证,确认了第2代测序的准确性。本患儿的DMD基因的第45外显子上存在1个c. 6589A > T (P. Lys2197X)的无义突变,为致病性突变,目前该突变尚未在其他文献及DMD数据库(<http://www.dmd.nl/>)中报道。通常情况下会通过无义介导的mRNA降解机制(nonsense mediated mRNA decay, NMD)启动针对含有提前终止信号的异常mRNA的降解、清除作用,从而使截短的抗肌萎缩蛋白在肌肉中被很快降解,致使患儿出现严重临床症状。根据Monaco等^[9]提出的“阅读框架假说”,框外(out-of-frame)缺失、重复或者无义突变往往与表型较为严重的DMD相关,但是也有极少数BMD患者被发现可由上述类型的突变引起。本患儿5岁以前发病,3岁之后即开始出现足尖着地,下蹲困难,由蹲位站起时易摔倒,目前8岁,双下肢肌力IV级,双侧腓肠肌轻度肥大,考虑为DMD。

本病目前尚无特效治疗,美国神经病学会和小儿神经病学会曾在2005年发布治疗指南,推荐DMD患者使用泼尼松治疗,剂量为0.75mg/(kg·d)^[10],多项研究均表明长期激素治疗(至少3年)可延长患者的步行能力2~5年,增强心肺功能,改善DMD患者的生活质量和延长寿命^[11]。张艳芝等^[5]研究发现激素疗效欠佳,但是由于病例数少、疗程不足,仍有待于进一步研究,而其他新的治疗方法仍处于试验阶段,如腺相关病毒为载体介导的基因治疗,在动物实验中取得良好治疗效果,并已进入I期临床试验,相信不久的将来有望应用于临床,成为DMD患儿的福音^[12]。

综上所述,本研究发现了DMD基因一个尚未报道的致病性突变位点。第2代测序技术可以快速、准确地检测出DMD基因的缺失、重复和点突变,尤其是对于点突变具有高准确性、高通量、高敏感度和低运行成本的优点,并为遗传咨询以及进行产前诊断提供依据,建议推广。

参考文献

- 1 Bushby K, Finkel R, Bimkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management[J]. Lancet Neurol, 2010, 9(1): 77-93
- 2 Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, et al. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-

- flame rule[J]. Muscle Nerve, 2006, 34(2): 135-144
- 3 Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y, *et al.* Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center[J]. J Hum Genet, 2010, 55(6): 379-388
- 4 Murugan S, Chandramohan A, Lakshmi BR. Use of multiplex Ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis[J]. Indian J Med Res, 2010, 132: 303-311
- 5 张艳芝, 熊晖, 王小竹, 等. 假肥大型进行性肌营养不良患者的基因型表型分析及随访研究[J]. 北京大学学报: 医学版, 2010, 42(6): 661-666
- 6 Magri F, Del Bo R, D'Angelo MG, *et al.* Clinical and molecular characterization of a cohort of patients with novel nucleotide alterations of the dystrophin gene detected by direct sequencing[J]. BMC Med Genet, 2011, 12: 37
- 7 刘敏娟, 谢敏, 毛君, 等. 第二代测序技术在假肥大型肌营养不良基因诊断中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(3): 249-254
- 8 Lim BC, Lee S, Shin JY, *et al.* Genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing technology: comprehensive mutational search in a single platform. [J] J Med Genet, 2011, 48(11): 731-736
- 9 Monaco AP, Bertelson C J, Liechti-Gallati S, *et al.* An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus[J]. Genomics, 1988, 2(1): 90-95
- 10 Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, *et al.* Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2008, 23(1): CD003725
- 11 Moxley RT 3rd, Pandya S, Ciafaloni E, *et al.* Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management[J]. J Child Neurol, 2010, 25(9): 1116-1129
- 12 Reay DP, Niizawa GA, Watchko JF, *et al.* Effect of NF- κ B inhibition on AAV9 minidystrophin gene transfer to the mdx mouse [J]. Mol Med, 2012, 9(18): 466-476

(收稿日期: 2014-04-25)

(修回日期: 2014-04-29)

美金刚对沙鼠脑缺血后海马 PARP-1 的表达及细胞凋亡的影响分析

杨剑文 杨期明 李爱平 雷 涛

摘 要 **目的** 研究美金刚对沙鼠脑缺血后海马 PARP-1 的表达及细胞凋亡的影响。**方法** 采用夹闭双侧颈总动脉的方法制作沙鼠局灶性脑缺血模型;运用 Western blot 技术观察 PARP-1、caspase-3 的表达,在电镜下观察海马区细胞线粒体结构的变化。**结果** PARP-1、caspase-3 的表达随缺血再灌注的时间延长增强,线粒体结构损伤逐渐加重,美金刚干预组后 PARP-1、caspase-3 的表达明显减弱,线粒体结构损伤减轻,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 美金刚可能通过减弱 PARP-1、caspase-3 的表达,抑制细胞凋亡,保护神经元。

关键词 美金刚 PARP-1 Caspase-3 局灶性脑缺血

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Analysis of Effect of Memantine on Apoptosis and Expression of PARP-1 in the Hippocampus of Cerebral Ischemia in Gerbils. Yang Jianwen, Yang Qiming, Li Aiping, *et al.* Department of Neurology, The Elderly Hospital of Hunan Province, Hunan 410015, China

Abstract Objective To study the effect of memantine on apoptosis and expression of PARP-1 in hippocampus of cerebral ischemia in gerbils after Mongolia. **Methods** Focal cerebral ischemia model of gerbil was made by occluding bilateral common carotid arteries. The expression of PARP-1 and caspase-3 was observed by Western blot technology. The changes of mitochondrial structure in hippocampal at different time was observed by the electron microscope. **Results** With prolonged cerebral ischemia and reperfusion, the expression of caspase-3 and PARP-1 and mitochondrial structural injury was gradually increased in un-memantine groups. They were decreased significantly in memantine group ($P < 0.01$). **Conclusion** The memantine may inhibit apoptosis and protect neurons by reducing the expression of PARP-1 and caspase-3.

Key words Memantine; PARP-1; Caspase-3; Focal cerebral ischemia

作者单位: 410015 长沙, 湖南省老年医院神经内科/湖南省老年病研究所