文章编号:1000-5404(2010)19-2115-03

论著

dHMN-V型家系BSCL2基因和GARS基因突变分析

李清华,刘承伟,林剑锋,林小慧,陈梅玲,吴 岚 (541001 广西 桂林,桂林医学院附属医院神经内科)

【摘要】 目的 报告1个远端型遗传性运动神经病V型(distal hereditary motor neuronopathy V, dHMN-V)家系,并探讨与BSCL2(berardinelli-seip congenital lipody- strophy 2)基因和GARS基因(glycyl tRNA synthetase)突变的关系。方法 对该家系进行临床及电生理检查,并应用PCR直接测序法对先证者及其部分家系成员进行GARS基因全部17个外显子和BSCL2基因3号外显子突变检测。结果 该家系5代共13例患者,临床主要表现为成年起病,开始为单或双手大鱼际肌萎缩,逐渐出现小鱼际肌、手部骨间肌萎缩,遇冷挛缩,继而出现足趾骨间肌萎缩;肌电图提示运动神经神经传导速度降低,而感觉神经神经传导速度基本正常;突变分析结果显示该家系BSCL2基因3号外显子糖基化位点无突变,在GARS基因也未发现致病突变,仅在内含子区和外显子非编码区发现3个多态,分别为IVS18+136G→A, IVS17-6C→T和C.-39G>C,其中IVS18+136G→A, IVS17-6C→T为新发现的2个多态。结论 dHMN-V具有临床和遗传异质性,其可能存在除BSCL2基因和GARS基因外的新的基因位点。

【关键词】 远端型遗传性运动神经病V型;GARS基因;BSCL2基因;基因突变
【中图法分类号】 R744.802;R394-33;R394.3 【文献标志码】 A

Mutations of BSCL2 and GARS genes in a Chinese family with distal hereditary motor neuronopathy V

Li Qinghua, Liu Chenwei, Lin Jianfeng, Lin Xiaohui, Chen Meilin, Wu Lan (Department of Neurology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Cuilin, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 541001, China)

【Abstract】 Objective To report a Chinese family with distal hereditary motor neuronopathy V (dHMN-V) and to study its relation with mutations of Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (BSCL2) and glycyl tRNA synthetase (GARS) genes. Methods Clinical and electrophysiological examination was performed for the family members with dHMN-V. Mutations of 17 extrons in BSCL2 gene and 3 extrons in GARS gene were detected by direct PCR sequencing. Results The main clinical symptom of 13 members in in this family including 5 generations was the disease occurred at adult age, which was first manifested as atrophy involving the greater thenar muscle in one or two hands, followed by the lesser thenar and dorsal interosseus muscles of hands and interosseus muscles of feet. The hands cramped when they were exposed to cold. Electrophysiolography showed that the motor nerve conduction velocity was decreased while the sensory nerve conduction velocity was basically normal. Mutation analysis showed that no pathogenetic mutations but 3 GARS polymorphisms (IVS18+136G→A, IVS17-6C→T and C.-39G>C) were detected in the BSCL2 and GARS genes of this family. IVS18+136G→A and IVS17-6C→T were found to be new polymorphisms. Conclusion dHMN-V is of clinical and genetic heterogeneity and may have locations of new gene besides BSCL2 and GARS genes.

【Key words】 dHMN-V; GARS gene; BSCL2 gene; gene mutation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30960112) and the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (0991259 and 0899014). Corresponding author: Li Qinghua, Tel: 86-773-5895295, E-mail: qhli1999@yahoo.com.cn

远端型遗传性运动神经病(distal hereditary motor neuronopathy, dHMN)又称远端型脊肌萎缩症(distal spinal muscular atrophy, dSMA)或脊髓型腓骨肌萎缩症(spinal charcot-marie-tooth disease, spinal CMT),是一组由于脊髓前角运动神经元退行性变导致的,临床表现为肢体远端肌肉进行性萎缩、乏力的神经肌肉疾病。根据Harding分类标准,目前共分7个亚型,其中

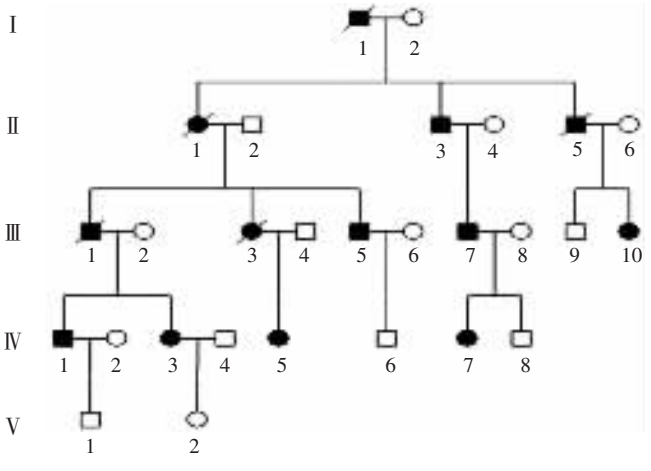
【基金项目】 国家自然科学基金(30960112);广西自然科学基金(0991259, 0899014)
【通信作者】 李清华,电话:(0773)5895295,E-mail:qhli1999@yahoo.com.cn

远端型遗传性运动神经病V型(dHMN-V)以常染色体显性遗传(AD),常自一侧或双侧上肢起病,以手部肌肉如大鱼际肌,手背骨间肌等肌肉萎缩无力及遇冷挛缩为主要临床表现,累及或不累及下肢远端[1]。dHMN-V具有遗传异质性,目前发现先天性脂肪营养不良基因2(berardinelli-seip congenital lipodystrophy 2, BSCL2)糖基化位点突变和甘氨酰-tRNA合成酶基因(glycyl tRNA synthetase, GARS)突变均可导致dHMN-V[2,3]。我们最近发现了1个dHMN-V大家系,并对该家系进行了BSCL2和GARS基因突变检测,现报告如下。

1　对象与方法

1.1　研究对象

本科于2009年10月收治了广西桂林地区1个以上肢起病,主要表现为四肢远端肌肉萎缩的大家系,共5代13例患者(图1),其中男性7例,女性6例,平均发病年龄36岁。先证者(IV_1),31岁时开始出现双手大鱼际肌萎缩,天气寒冷或早晨起床时常出现双手挛缩,不能伸直,寒冷时握笔困难,活动后能逐渐缓解,双下肢及其他部位目前无不适;查体示双手大鱼际肌外侧部分轻度萎缩(图2),肌张力正常,四肢腱反射迟钝,未引出病理征,深浅感觉正常;先证者之妹IV_3有类似的症状,目前也仅有双手受累。先证者之父$\mathrm{III}_1$35岁左右开始出现双手大小鱼际肌、手背肌肉萎缩,双手屈曲、伸直困难,大约3年后累及双足,出现足趾屈曲畸形,52岁因尿毒症死亡。先证者之姑III_3症状与其父类似,55岁时死于肺癌,其女IV_5目前也出现双手大鱼际肌萎缩。先证者之叔$\mathrm{III}_5$40岁左右时出现右手麻胀,右侧大鱼际肌萎缩,约3年后出现双足足背肌肉萎缩,进展非常缓慢;查体示右侧大鱼际肌轻度萎缩,左侧正常,双足足趾背侧骨间肌明显萎缩(图2),但双下肢胫前肌、腓骨肌无萎缩,双下肢膝腱反射活跃。先证者的奶奶及其他亲属如I_1, II_3, II_5, III_7, III_{10}, IV_7均有不同程度的双手及足背肌肉萎缩,但具体情况因故未能详细调查。



□:男性;○:女性;●:患者;/:已去世

图1　dHMN-V患者家系图



A,B:先证者IV_1　仅双手大鱼际肌萎缩;C,D:患者III_5　右手大鱼际肌及双足足趾背侧骨间肌萎缩

图2　先证者(IV_1)及患者III_5四肢远端肌肉萎缩情况

1.2　方法

1.2.1　电生理检查　对该家系III_5, $\mathrm{IV}_1$2例患者进行双侧正中神经、胫神经及腓总神经的运动和感觉神经传导速度检测,所有正常值以本院肌电图室正常值为参考值。

1.2.2　分子遗传学分析

1.2.2.1　基因组DNA提取　在知情同意并签署知情同意书后,采集先证者及该家系部分成员外周静脉血5 ml,按常规酚-氯仿法抽提其基因组DNA。

1.2.2.2　引物设计与合成　用Primer3软件进行引物设计,引物扩增序列覆盖了BSCL2基因3号外显子和GARS基因所有编码区及外显子与内含子交界区,PCR引物序列见表1,引物由上海生工公司合成。

表1　GARS基因和BSCL2基因3号外显子PCR引物碱基序列

外显子	引物5′→3′(正义,反义)	片段大小(bp)
GARS-1	CATCGGCGGACCAAGAAT, TGAAGGGAAAGAAAGGGGTA	897
2	GGCCTGAATTGCATCATTCT, AGGTCTCTCCCATCCAAAGA	298
3	CGCACCTGGTCAAGCTTAGT, GGCAAGCCATGTTCTTGATT	437
4	TGTCTCCTTGCCTTCATTTG, CATAGCTATCTGTGAGCAGAAGG	385
5-6	GAATGTGGGAGAGGGTGAGA, CAGCATAATGGGAAATGCAA	831
7	GCAGTGGATGGCTAGGGTTA, CCATTCTTCAACTGTCCCTTC	525
8	AGGGCCTGTTCAACTTTGTT, GCAGAATTGCTTCAAAACAGC	363
9	CCATTCCCTTAGGAAACCAA, AATTGCTGCAAACCCTGAAC	379
10	CCGATATCTTGGCTTTGAAGA, GGAGGCAACTGCTTTTTCTG	392
11	CTGCATGCATTTGTGAATGA, CCATAGAACAAGGTAAAGACTTGGA	271
12	TGATTGATTGTTCTCAGGCTCA, TTTCAGAACCTGGCAGATGA	289
13	CTTTTTGGTGCCATTGTTAGA, GCCAAAGAAGACAGGGAATG C	638
14	CGCAGCTGGTGAATTGTTTA, GCACCAGGCAACTAAAACAA	424
15	CTGGCATTTTGGTAATGACG, TGAGCAAGCATATCCTCTCG	399
16	TGGTCCCATTTATAAGTCTCC, AAGGAAAGGGAGCATAAACACA TG	391
17	GGCATGACATTGTTTGGCTCT, GAGGTTAGAATGGGAGTGAGGT	702
BSCL2-3	CTCAAAGCCAGTCCAGTAAGC, CTTGGGCTGTGAAAGTTGAG	544

1.2.2.3　PCR反应　反应条件为在ABI9700 PCR扩增仪上进行95 ℃预变性10 min,然后95 ℃变性30 s,58 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,30个循环,最后72 ℃延伸5 min。

1.2.2.4　DNA序列分析　PCR产物按常规方法回收纯化后用ABI3700 DNA自动测序仪进行DNA序列测定(上海生工),DNAstar序列分析软件分析结果。

2 结果

2.1 电生理检查

神经肌电图检查示$Ⅲ_5$左右两侧正中神经运动神经传导速度(MNCV)分别为36、34 m/s,平均为35 m/s;$Ⅳ_1$为38、38 m/s,平均为38 m/s。$Ⅲ_5$,$Ⅳ_1$双侧正中神经感觉神经传导速度(SNCV)和远端潜伏期均正常。$Ⅲ_5$双侧胫神经和腓总神经的MNCV分别为41、37 m/s,而$Ⅲ_5$,$Ⅳ_1$胫神经和腓总神经的SNCV均正常。

2.2 分子遗传学分析

先证者BSCL2基因3号外显子DNA序列分析未发现致病突变;GARS基因17个外显子及内含子和外显子交界处均未发现致病突变,仅在1号外显子开放阅读框前非编码区和17、18号内含子发现碱基改变,分别为IVS18+136G→A,IVS17-6C→T和C.-39G>C。此3个碱基改变在该家系中与疾病不共分离,因此均考虑为多态。

3 讨论

dHMN-V又称远端型脊肌萎缩症5型(distal spinal muscular atrophy type V,DSMAV),是一类罕见的以上肢远端起病的,以手部症状为主的远端型遗传性运动神经病,进展十分缓慢,目前在国际上仅有少数几个家系报道,在国内也仅有陈彬等[4]证实了1个家系。本研究报道了1个单侧或双侧大鱼际肌首先萎缩,逐渐累及手背骨间肌,部分患者出现双足趾背骨间肌萎缩的家系,该家系患者运动神经传导速度减慢,而感觉神经传导速度正常,根据Harding分类标准,符合dHMN-V型[3]。dHMN-V最初于1998年由Sambuughin等定位于7p15,后来通过更精细的定位发现其基因位点与已知CMT2D基因位点重叠,后者与dHMN-V症状类似,但一般有肢体远端感觉障碍,因而认为dHMN-V与CMT2D可能为同一种基因突变所致[5]。2003年在某些dHMN-V家系、CMT2D家系以及兼有dHMN-V与CMT2D症状的家系中均发现GARS基因突变,这些突变造成甘氨酰-tRNA合成酶产量降低,从而影响细胞蛋白合成的能力[5],截至目前,共发现10余个GARS基因的不同突变。另一方面,2004年,Windpassinger发现一澳大利亚dHMN-V大家系存在BSCL2基因3号外显子N88S或S90L突变[6],此后N88S或S90L突变陆续在其他不同种族dHMN-V家系中得到证实[7,8]。目前与dHMN-V有关的BSCL2基因突变均发生在糖基化位点,即N88S和S90L突变,突变影响了BSCL2基因编码蛋白seipin的糖基化,突变的seipin蛋白产生错误折叠,导致细胞凋亡、聚集物形成,从而导致神经元变性[2],而BSCL2基因糖基化位点外的其他位点的突变却导致了与dHMN-V或Silver综合征症状完全不同的先天性全身脂肪营养不良[9]。

根据dHMN-V上述临床和遗传特点,本研究对该家系先证者及部分患者进行了BSCL2基因3号外显子以及GARS基因17个外显子及内含子与外显子交界处进行PCR扩增后直接DNA测序,没有发现BSCL2基因和GARS基因存在致病突变,但发现3个GARS基因多态,分别在开放阅读框前非编码区以及内含子区,其中IVS18+136G→A和IVS17-6C→T为新发现的多态,这些多态与该家系患者没有共分离,但目前GARS基因的多态位点是否为患病危险因素仍不清楚。

dHMN-V具有明显的临床和遗传异质性。在同一个dHMN-V家系中,不同患者的症状往往也不相同,或类似CMT2D,或类似Silver综合征[10]。本研究中,该家系患者之间临床症状也有很大差异,如先证者症状类似CMT2D,而患者$Ⅲ_5$则类似Silver综合征,而且即使是同胞兄妹,$Ⅲ_5$的临床症状较其兄$Ⅲ_1$、姐$Ⅲ_3$轻得多,说明dHMN-V具有明显的临床异质性。该家系GARS基因和BSCL2基因突变检测结果阴性,进一步说明dHMN-V具有明显的遗传异质性,提示dHMN-V或许存在除GARS基因和BSCL2基因外别的基因位点。我们下一步将对该家系进行其他dHMN基因的突变分析,若仍未发现致病突变,将进一步进行全基因组扫描。

参考文献:

[1] Ito D, Suzuki N. Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease[J]. Brain, 2009, 132(Pt 11): 8-15.

[2] Rohkamm B, Reilly M M, Lochmuller H, *et al*. Further evidence for genetic heterogeneity of distal HMN type V, CMT2 with predominant hand involvement and Silver syndrome[J]. J Neurol Sci, 2007, 263(1/2): 100-106.

[3] Dierick I, Baets J, Irobi J, *et al*. Relative contribution of mutations in genes for autosomal dominant distal hereditary motor neuropathies: a genotype-phenotype correlation study[J]. Brain, 2008, 131(Pt 5): 1217-1227.

[4] 陈彬, 郑日亮, 栾兴华, 等. 远端型遗传性运动神经病V型一家系[J]. 中华神经科杂志, 2008, 41(10): 670-673.

[5] Sambuughin N, Sivakumar K, Selenge B, *et al*. Autosomal dominant distal spinal muscular atrophy type V (dSMA-V) and Charcot-Marie-Tooth disease type 2D (CMT2D) segregate within a single large kindred and map to a refined region on chromosome 7p15[J]. J Neurol Sci, 1998, 161(1): 23-28.

[6] Hamaguchi A, Ishida C, Iwasa K, *et al*. Charcot-Marie-Tooth disease type 2D with a novel glycyl-tRNA synthetase gene (GARS) mutation[J]. J Neurol, 2010, 257(7): 1202-1204.

[7] Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, *et al*. Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome[J]. Nat Genet, 2004, 36(3): 271-276.

[8] Cho H J, Sung D H, Ki C S. Identification of de novo BSCL2 Ser90Leu mutation in a Korean family with Silver syndrome and distal hereditary motor neuropathy[J]. Muscle Nerve, 2007, 36(3): 384-386.

[9] Magre J, Delepine M, Khallouf E, *et al*. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13[J]. Nat Genet, 2001, 28(4): 365-370.

[10] Sivakumar K, Kyriakides T, Puls I, *et al*. Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyl-tRNA synthetase mutations[J]. Brain, 2005, 128(Pt 10): 2304-2314.

(收稿:2010-05-04 修回:2010-07-07)
(编辑 王 红)