

少年型亨廷顿病临床与基因突变分析

郝莹 陈园园 顾卫红 王国相 马惠姿 李丽林 王康 金森 段晓慧

【摘要】 研究背景 亨廷顿病是一种常染色体显性遗传性神经系统退行性疾病,临床主要表现为舞蹈样动作、进行性认知功能减退及精神症状,神经影像学检查显示尾状核和大脑皮质萎缩。其致病基因 *IT15* 定位于 4p16.3,由 67 个外显子组成编码亨廷顿蛋白,在其第 1 个外显子内存在一段多态胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)三核苷酸重复序列,正常范围为 6~35 次、异常 36~250 次。亨廷顿病多于成年期发病,具有外显不完全和延迟外显现象,而青少年型亨廷顿病临床较为少见。本研究针对一例少年期发病的亨廷顿病患者临床表型及其家系 *IT15* 基因 CAG 重复动态突变特征进行细致分析。**方法** 采用聚合酶链反应结合荧光标记毛细管电泳片段分析方法,对 115 例临床拟诊为亨廷顿病家系的先证者进行 *IT15* 基因 CAG 重复次数分析,经 pMD18-T 载体克隆测序验证部分阳性或携带中间重复等位基因的样本。**结果** 经基因分析共发现 109 例患者携带异常扩展的 *IT15* 基因 CAG 重复序列,其中一例为少年期发病患者,临床以认知功能障碍和运动功能减退为首发症状,其父母临床表型正常。基因片段分析显示,患者 *IT15* 基因 CAG 重复次数为 15/68 次;其父母分别为 17/37 次和 15/17 次。**结论** (1)少年期发病的亨廷顿病与成年型临床表型不同,后者临床表现以舞蹈样运动、智能减退和精神异常为主,而少年型患者大多以认知功能障碍发病。(2)*IT15* 基因扩展 CAG 重复序列在代间传递过程中会出现动态突变,引起发病年龄逐代提前,症状加重,即遗传早现。该家系患者之父携带中间等位基因 37 次重复,遗传给患者成为 68 次重复,在代间传递过程中发生了大幅度扩展,使 CAG 三核苷酸重复次数增加了 31 次,提示重复序列在父系遗传更不稳定。

【关键词】 多态现象,遗传; 杭廷顿病; 核苷酸类; 重复序列,核酸; 青少年

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.03.011

Clinical and genetic study of a juvenile-onset Huntington disease

HAO Ying¹, CHEN Yuan-yuan¹, GU Wei-hong¹, WANG Guo-xiang¹, MA Hui-zi², LI Li-lin², WANG Kang¹, JIN Miao¹, DUAN Xiao-hui¹

¹Movement Disorder & Neurogenetics Research Center, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

²Department of Neurology, Beijing Tiantan Hospital, Beijing 100050, China

Corresponding author: GU Wei-hong (Email: jane55.gu@vip.sina.com)

【Abstract】 Background Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant hereditary progressive neurodegenerative disorder with a distinct phenotype characterized by chorea, dementia, cognitive and affective impairment. There are selective neural cell loss and atrophy in the caudate and putamen. Dr. George Huntington firstly described the disease accurately and insightfully, which led to a widespread recognition of the inherited chorea that now bears his name. Huntington disease gene (*IT15*) locus on chromosome 4p16.3, and encompasses 67 exons with a trinucleotide repeat (CAG) in the first exon. The CAG repeat length is highly polymorphic in the population and expanded on at least one chromosome of individuals with HD. Clinically, patient with HD are often onset in adulthood. Juvenile-onset HD is relatively rare. Adult-onset HD patients usually have a CAG expansion from 40 to 55 whereas those with juvenile-onset greater than 60 which are often inherited from the father. We investigated the clinical features of a juvenile-onset case with Huntington disease and dynamic mutation of his family. **Methods** The CAG repeats of *IT15* gene were detected using polymerase chain reaction and capillary electrophoresis in 115 individuals with preliminary diagnosis as Huntington disease. The repeat numbers of some samples

基金项目:2010-2012 年度卫生部属(管)医院临床学科重点项目

作者单位:100029 北京,卫生部中日友好医院运动障碍与神经遗传病研究中心(郝莹,陈园园,顾卫红,王国相,王康,金森,

段晓慧);100050 首都医科大学附属北京天坛医院神经内科(马惠姿,李丽林)

通讯作者:顾卫红(Email:jane55.gu@vip.sina.com)

carried expanded or intermediate alleles were verified by the pMD18-T vector clone sequencing. **Results** Fragment analysis showed that one juvenile-onset case presenting with cognitive dysfunction and hypokinesia carried 15/68 CAG repeats of *IT15*. His father carried 17/37 and mother carried 15/17. **Conclusion** 1) The juvenile-onset case of HD presented with different clinical features compared with adult-onset cases. The typical signs of adult-onset cases include progressive chorea, rigidity and dementia. The most common sign of juvenile-onset Huntington disease is cognitive decline. 2) The dynamic mutation of *IT15* gene expansion of the CAG repeats in the intergenerational transmission may lead to anticipation, which is a phenomenon characterized by increasing severity and earlier onset in successive generations. The abnormal allele of the patient inherited from his father and substantially expanded between generations, which indicates the CAG repeats is more unstable in the paternal inheritance.

[Key words] Polymorphism, genetic; Huntington disease; Nucleotides; Repetitive sequences, nucleic acid; Adolescent

Fund Project: Grant Awarded 2010–2012 from Ministry of Health Foundation of China

亨廷顿病(HD)是一种常染色体显性遗传性神经退行性疾病^[1],临床上主要表现为舞蹈样动作、进行性认知功能减退及精神症状,神经影像学检查显示尾状核和大脑皮质萎缩^[2]。1872年该病因美国医生George Huntington的系统描述而命名为亨廷顿病^[3]。亨廷顿病的致病基因*IT15*于1993年被克隆成功^[4],在其第1个外显子内存在一段多态胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)三核苷酸重复序列^[5],正常范围为6~35次^[6-7],异常范围36~250次^[8-9]。亨廷顿病多于成年期发病^[10],具有明显的外显不完全和延迟外显,而青少年型亨廷顿病临床较为少见。本研究针对一例少年期发病的亨廷顿病患者的临床表型及其家系*IT15*基因CAG重复动态突变特征进行细致分析。

对象与方法

一、研究对象

研究对象均来自2005–2011年卫生部中日友好医院神经内科运动障碍与神经遗传性疾病研究中心收集的115例不同家系、临床拟诊为亨廷顿病患者,男73例,女42例;年龄7~68岁,平均38.90岁。所有受试者均获得知情同意。

二、研究方法

1. 样本采集 空腹采集受试者外周血5 ml,以质量浓度为3.8%枸橼酸钠进行抗凝,标准酚氯仿DNA提取法提取基因组DNA。

2. 聚合酶链反应(PCR)和琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物 根据HD基因第1号外显子CAG重复片段两侧的序列设计引物,由北京赛百盛基因技术有限公司合成,正向引物(F引物)序列:5'-AGT AAG

GCC TTC GAG TCC CTC AAG TCC TCC-3';反向引物(R引物)序列:5'-AAA CTC ACG GTC GGT GCA GCG GCT CCT CAG-3'。PCR反应体系制备方法:依次加入dNTPs 2.50 mmol、2×GC Buffer I 12.50 μl、引物各5 pmol、模板DNA 100 ng和r-Taq 1 U,加灭菌去离子水补充至25 μl;反应条件为95℃预变性5 min,以95℃ 1 min 30 s、62.50℃ 1 min、72℃ 2 min,共循环35次,72℃延伸10 min。PCR扩增产物采用质量浓度为1.5%琼脂糖凝胶,150 V电压电泳20 min,对于出现2个电泳条带的样本进行基于毛细管电泳的片段分析。

3. 基于毛细管电泳的片段分析 对上述电泳中出现的2个电泳条带样本进一步行毛细管电泳。采用荧光标记M13末端加尾法进行PCR扩增反应,引物序列包括M13-F引物(正向引物5'端加M13序列为5'-AGT AAG GCC TTC GAG TCC CTC AAG TCC TCC-正向引物序列-3')和经D4荧光标记的M13引物序列(5'-CAC GAC GTT GTA AAA ACG AC-3'),以及上述引物的反向引物(R引物),均由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR反应体系的制备:依次加入dNTPs 2.50 mmol、2×GC Buffer I 12.50 μl、Primer-R 5 pmol、Primer-M13 2 pmol、Primer-F-M13 1.50 pmol、模板DNA 100 ng和r-Taq 1U,加入灭菌去离子水补充至25 μl。采用美国贝克曼库尔特有限公司生产的CEQ-8000核酸分析仪对PCR扩增产物进行片段分析:20 μl甲酰胺,以0.25 μl CEQ DNA Size Standard Kit-600片段作为标准内标,1 μl HD-PCR扩增产物混匀、上样;预设程序进行电泳分离,分离条件为毛细管温度达50℃时,90℃变性120 s,2.00 kV电压下注入样本

30 s, 然后 4.80 kV 电压下电泳 70 min, 以预设的分析参数进行片段分析。

4. 克隆测序 切胶分别回收琼脂糖电泳的长片段和短片段(阳性样本), 由大连宝生物工程有限公司通过 pMD18-T 载体对长片段和短片段进行克隆测序。pMD18-T 载体含有 EcoR V 酶切位点, 酶切后在两侧的 3' 端添加“T”, 从而提高 PCR 产物的连接及克隆效率。

结 果

经基因检测显示, 在 115 例临床拟诊为亨廷顿病的家系中, 109 例携带异常扩展的 *IT15* 基因 CAG 重复序列, 其中一例为少年期发病患者。

一、临床特征描述

男性患者 16 岁。祖籍北京。主因运动能力下降伴智力减退 2 年, 于 2009 年 9 月 8 日于我院就诊。该患者于 2007 年初无明显诱因出现动作笨拙、运动能力下降, 智力减退等症状与体征, 并呈渐进性加重。神经系统检查: 神志清楚, 言语欠流利, 反应迟钝。双眼上下视不能, 慢眼动, 未见明显眼震。四肢肌力 5 级, 肌张力增高, 腱反射亢进(++), 双侧 Babinski 征和 Hoffman 征未引出。指鼻动作缓慢, 但尚稳、准; 快速轮替动作笨拙, 行走时可见肌张力障碍姿势, 颈、肩部歪斜。头部 MRI 检查显示, 尾状核头轻度萎缩(图 1)。无明确家族遗传史。患者之父现年 38 岁, 其母 40 岁, 均无不适主诉, 神经系统检查未见明显异常。

二、患者及其家系 *IT15* 基因内 CAG 重复片段分析

1. 琼脂糖凝胶电泳 对患者及其父母进行 *HD* 基因 CAG 重复突变检测, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 患者及其父亲的样本均出现 2 个电泳条带, 患者的扩展条带长于其父, 患者之母的样本仅出现 1 个电泳条带(图 2)。

2. 基因片段分析 对上述 3 例受试者的样本基因片段的分析结果显示, 患者 *HD* 基因 CAG 重复数目分别为 15 和 68 次, 其父为 17 和 37 次, 其母为 15 和 17 次(图 3)。由基因片段分析结果可知, 患者 CAG 重复数目中 15 次重复来自其母, 且代间未发生扩展, 68 次重复是由其父的 37 次重复扩展而来, 代间共扩展 31 次。

3. 克隆测序 克隆测序结果显示, 患者 CAG 重复次数分别为 19 和 72 次, 其父 CAG 重复次数分别

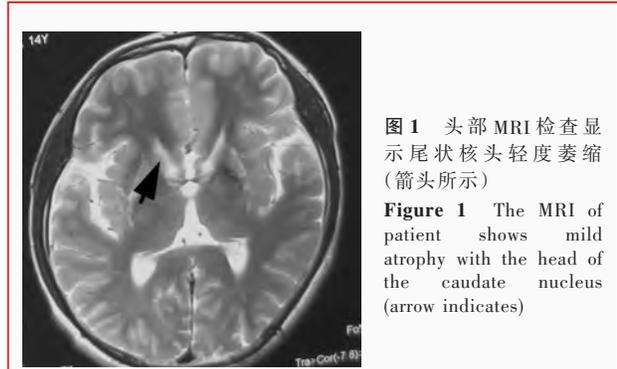


图 1 头部 MRI 检查显示尾状核头轻度萎缩(箭头所示)
Figure 1 The MRI of patient shows mild atrophy with the head of the caudate nucleus (arrow indicates)

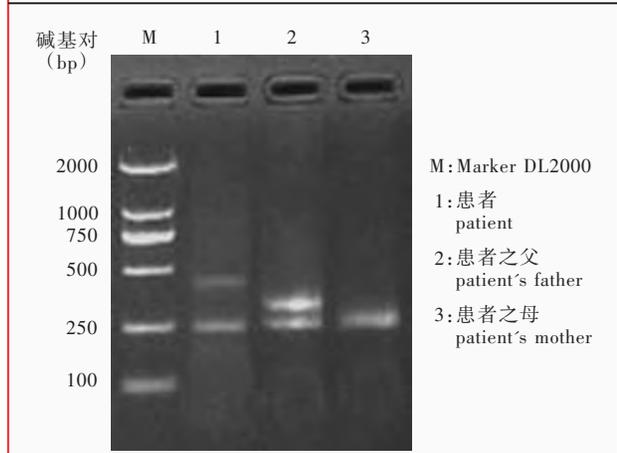


图 2 质量浓度为 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测显示, 第 1、2 泳道样本均出现 2 个电泳条带, 表明患者与其父存在扩展条带; 第 3 泳道样本仅有 1 个电泳条带, 不存在扩展条带。而且第 1 泳道的扩展条带最长, 接近 500 bp
Figure 2 PCR amplification for the *IT15* gene. Lane 1 and 2 appear two electrophoresis bands, Lane 3 only appears one electrophoresis band and Lane 1 carried the longest expansion

为 19 和 43 次(图 4)。

讨 论

目前已发现 9 种因其致病基因编码区 CAG 重复扩展突变导致编码蛋白中的多聚谷氨酰胺 (polyQ) 链延长而致病的神经系统变性疾病, 分别为脊髓小脑共济失调 (SCA) 1~3、6、7、17 型, 以及亨廷顿病、齿状核红核苍白球路易体萎缩症 (DRPLA) 和 X-连锁脊髓小脑肌萎缩症 (SBMA), 后者亦被称为 polyQ 病^[11]。其中, 亨廷顿病以慢性进行性舞蹈样动作和痴呆为主要特征, 其临床表现除舞蹈样不自主动作、精神异常和进行性痴呆“三联征”外, 还可伴有共济失调、吞咽困难和构音障碍^[12], 主要受累于尾状核及壳核。1872 年, 该病由美国医生 George Huntington 系统描述而得名。1993 年 *HD* 基因被克隆, 定位于 4p16.3, 由 67 个外显子组成, mRNA 具有 13 474 个核苷酸, 编码一个有 3142 氨基酸残基的蛋

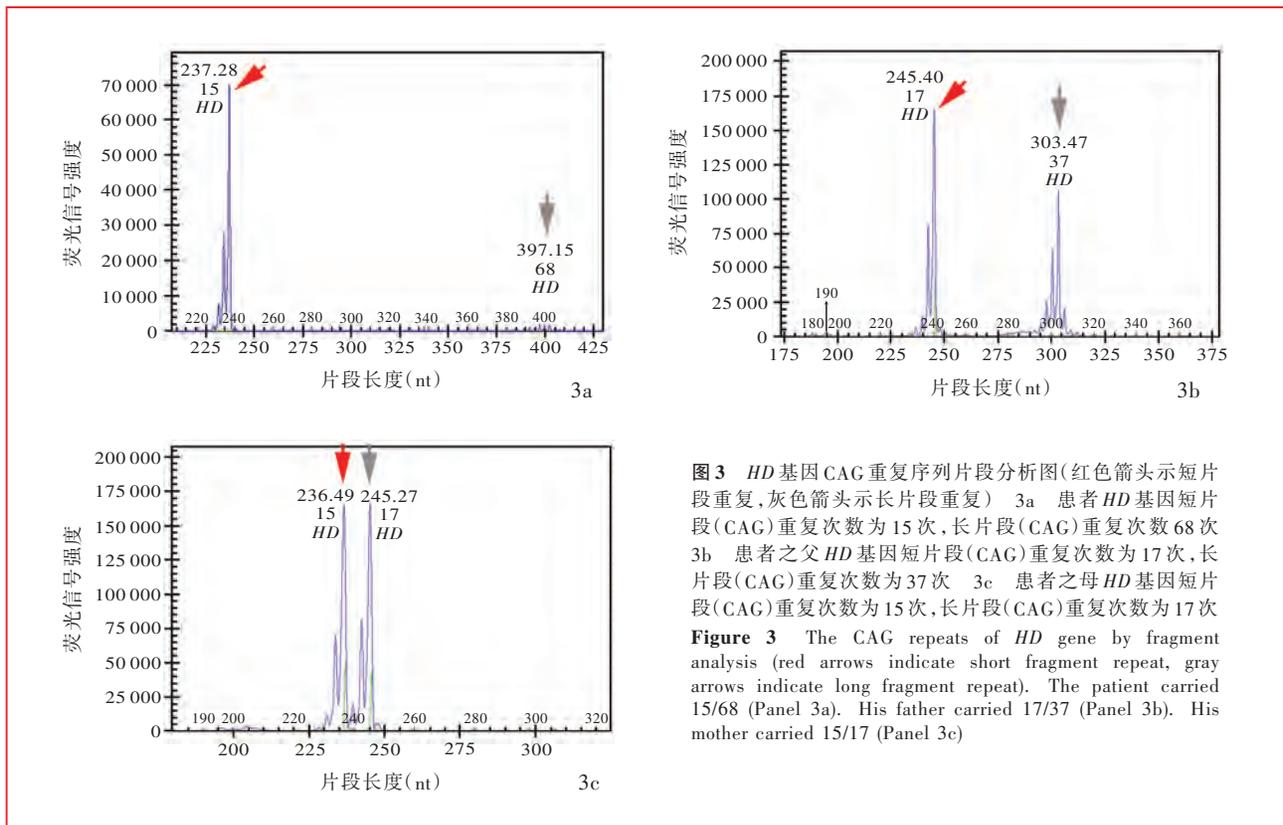


图3 HD基因CAG重复序列片段分析图(红色箭头示短片段重复,灰色箭头示长片段重复) 3a 患者HD基因短片段(CAG)重复次数为15次,长片段(CAG)重复次数68次 3b 患者之父HD基因短片段(CAG)重复次数为17次,长片段(CAG)重复次数为37次 3c 患者之母HD基因短片段(CAG)重复次数为15次,长片段(CAG)重复次数为17次

Figure 3 The CAG repeats of HD gene by fragment analysis (red arrows indicate short fragment repeat, gray arrows indicate long fragment repeat). The patient carried 15/68 (Panel 3a). His father carried 17/37 (Panel 3b). His mother carried 15/17 (Panel 3c)

白质即亨廷顿(Htt)蛋白^[4]。在其第1号外显子内存在CAG三核苷酸重复序列,该重复序列的异常扩增是导致亨廷顿病发生的原因。亨廷顿病在白种人的患病率为3~7/10万,某些西欧国家可达15/10万,日本、中国、芬兰和非洲人群患病率较低^[13]。该病的发病年龄为(35.80±11.80)岁,病程(11.60±5.60)年^[10],约有25%的患者于50岁甚至70岁后发病,临床症状较轻^[14]。成年型亨廷顿病的临床表现多以运动异常、智能减退和精神异常为主,全球发病率为4~7/10万(OMIM:143100);而青少年型较为少见,多为父系遗传,20岁前发病,临床表现与成年型有所不同,主要表现为运动减少、肌强直、腱反射亢进、眼动异常、严重智力衰退,其发病率约为0.50~1.00/10万,仅为成年型的1/10^[15]。亨廷顿病外显不完全现象在polyQ病中最为明显,有文献报道IT15基因CAG三核苷酸重复次数于36~40次者易发生外显不完全^[16],其根本原因是代间遗传的不稳定性,使后代重复发生明显扩展。

我们通过对IT15基因CAG重复序列进行检测,在已确认的109个亨廷顿病家系中,绝大多数患者为成年期发病,仅一例为青少年期发病患者,其CAG重复次数分别为15和68次。该患者于14岁时出现

动作笨拙,运动能力下降,智力减退,症状与体征呈渐进性加重,神经系统检查提示:眼动异常,锥体束征,动作迟缓,行走时呈肌张力障碍姿势。头部MRI检查显示,尾状核头轻度萎缩。该患者无明确的家族遗传史,父母临床表型正常。患者之父的长片段CAG重复次数为37次,属于中间范围。曾有文献报道过青少年发病的亨廷顿病的临床表型特征,Ribai等^[17]曾报告一组29例青少年期发病的法国亨廷顿病患者,约65.50%以严重认知损害症状和精神异常为主要临床表现,包括酒精和药物依赖,以及精神障碍;平均发病6年后即可出现认知和精神症状,其中3例还伴有肌阵挛性头部震颤、3例呈舞蹈样动作、1例表现为进行性小脑共济失调;所有10岁前发病的患儿均为父系遗传。2006年,Yoon等^[18]报告3例10岁前发病的亨廷顿病患者,其基因扩展片段的重复次数分别为120次、100次和93次,早期临床表现为精神异常、烦躁、多动、共济失调步态和易跌倒;后期均出现严重的构音障碍。本文青少年期发病患者的临床表型以认知功能障碍和运动功能减退为首发症状,与国外文献报道相似,但不同年龄发病者仍存在临床变异,原因尚待进一步分析。青少年型亨廷顿病大多以认知功能障碍发病,可能与该

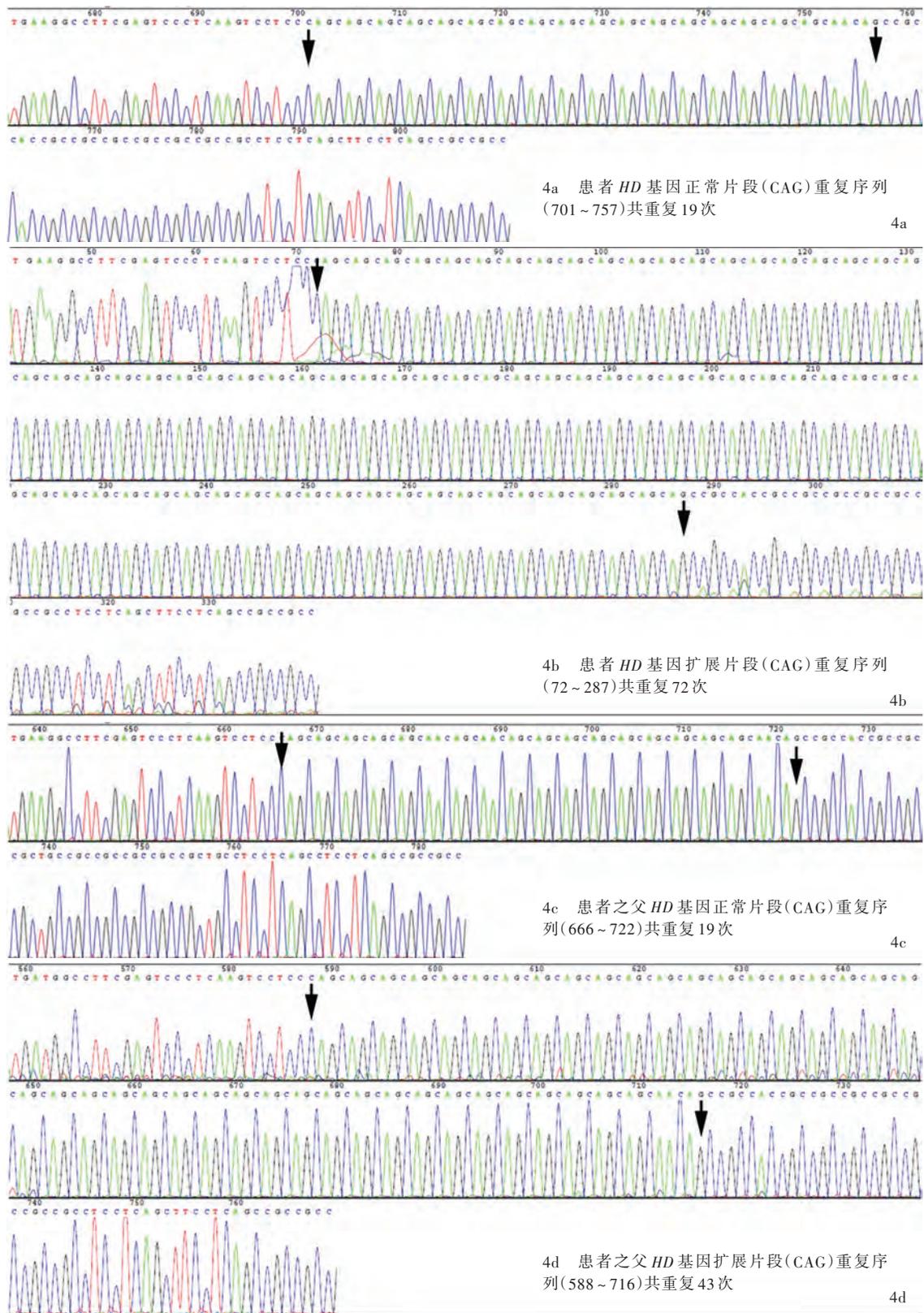


图4 克隆测序(两箭头之间的片段即为CAG重复序列)

Figure 4 Clone sequencing encompassing the (CAG)_n repeats of the *IT15* (arrows indicate). The patient carried a normal allele with a 19-repeat (Panel 4a). The patient carried an expanded allele with a 72-repeat (Panel 4b). The patient's father carried a normal allele with a 19-repeat (Panel 4c). The patient's father carried an expanded allele with a 43-repeat (Panel 4d)

年龄处于上学阶段易被家人发现有关。

在亨廷顿病的代间传递过程中,其 CAG 重复扩展序列具有不稳定性,并存在逐代延长之趋势,因而造成遗传早现现象。遗传早现在父系遗传时尤为明显,推测可能是由于重复序列在精子发生过程中高度不稳定性造成的,亨廷顿病家系的延迟外显或外显不完全现象的本质是发病年龄与致病等位基因 CAG 重复次数的负相关^[10],这种现象的产生主要是患者的父代发病年龄较晚,尚未发病即因其他原因去世,或父代携带 CAG 中间重复次数的等位基因,在世代相传过程中发生扩展达到异常范围而致病,因而表现为散发型。本文一家系中父亲携带中间等位基因 37 次重复,其子为 68 次重复,在代间传递过程中发生了大幅度扩展,使 CAG 三核苷酸重复次数增加了 31 次,我们将对患者及其父亲进行长期随访。目前动态突变的正常范围和异常范围均来自于国内外研究者不同报道的总结,随着被研究家系数量的不断增多,此范围也在不断修正,正常范围的高限仅为一项参考值。类似亨廷顿病这种易出现延迟外显或外显不完全的疾病,应将 CAG 重复次数结合患者临床表型分析方能明确诊断;对于散发型病例,需对其父母进行基因检测,以免漏诊。

在本研究中,我们采用荧光标记的毛细管电泳法对该患者及其父代样本进行基因片段分析和克隆测序,结果显示:患者 CAG 重复次数经基因片段分析为 15 和 68 次,克隆测序结果为 19 和 72 次;其父基因片段分析结果为 17 和 37 次,克隆测序结果为 19 和 43 次。基于我们既往在三核苷酸重复突变检测中所做的大量基因片段分析,以及部分克隆测序结果,提示:采用克隆测序和基因片段分析进行动态突变检测均会出现产物不均一,因此两种方法所获得的重复次数需相互验证,同时需要结合患者及其家系的临床表型进行分析以准确解读基因检测结果。

综上所述,我们采用基因片段分析确认了一例少年型亨廷顿病患者,对其临床表型、神经影像学特征,以及家系特点进行了细致的分析,显示该患者临床主要表现为肌张力障碍和智力减退,但无舞蹈样动作。患者的致病等位基因来自其父,CAG 重复序列在代间发生了大幅度扩展。由此提示:具有认知功能障碍和运动功能减退表现的少年型患者应考虑亨廷顿病的可能,需对患者及其家属进行相

应的基因检测,并结合临床表型进行分析,以免漏诊,同时需对检测及测序次数为中间重复的个体进行长期随访。

参 考 文 献

- [1] Ciarmiello A, Giovacchini G, Orobello S, et al. (18)F-FDG PET uptake in the pre-Huntington disease caudate affects the time-to-onset independently of CAG expansion size. *Eur J Nucl Mol Imaging*, 2012, 39:1030-1036.
- [2] Roos RA. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis*, 2010, 5:40.
- [3] Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, et al. Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene and osteoporosis. *Bone*, 2003, 32:297-310.
- [4] Johri A, Beal MF. Antioxidants in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822:664-674.
- [5] Ramaswamy S, Kordower JH. Gene therapy for Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 2011. [Epub ahead of print]
- [6] Lin MT, Gan SR, Chen WJ, et al. Gene analysis of two families with Huntington disease. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2008, 8:124-128. [林珉婷, 甘世锐, 陈万金, 等. Huntington 病两家系基因分析. *中国现代神经疾病杂志*, 2008, 8:124-128.]
- [7] Liu ZG, Wang WA. Clinical characteristics and progress in treatment of Huntington disease. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2007, 7:25-28. [刘振国, 王文安. 慢性进行性舞蹈病的临床特点及治疗进展. *中国现代神经疾病杂志*, 2007, 7:25-28.]
- [8] Hunter JM, Crouse AB, Lesort M, et al. Verification of somatic CAG repeat expansion by pre-PCR fractionation. *J Neurosci Methods*, 2005, 144:11-17.
- [9] Yan YP, Zhang BR. The molecular mechanisms of Huntington's disease and its advances in therapeutic strategies. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2011, 11:30-35. [严雅萍, 张宝荣. 亨廷顿病的发病机制和治疗进展. *中国现代神经疾病杂志*, 2011, 11:30-35.]
- [10] Zheng Z, Burgunder JM, Shang H, et al. Huntington's like conditions in China, a review of published Chinese cases. *Plos Curr*, 2012, 4:RRN1302.
- [11] Orr HT, Zoghbi HY. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci*, 2007, 30:575-621.
- [12] Smith MA, Brandt J, Shadmehr R. Motor disorder in Huntington's disease begins as a dysfunction in error feedback control. *Nature*, 2000, 403:544-549.
- [13] Sturrock A, Leavitt BR. The clinical and genetic features of Huntington disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 2010, 23:243-259.
- [14] Reyes Molón L, Yáñez Sáez RM, López-Ibor Alcocer MI. Juvenile Huntington's disease: a case report and literature review. *Actas Esp Psiquiatr*, 2010, 38:285-294.
- [15] Nance MA, Myers RH. Juvenile onset Huntington's disease-clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2001, 7:153-157.
- [16] Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*, 2007, 369:218-228.
- [17] Ribai P, Nguyen K, Hahn-Barma V, et al. Psychiatric and cognitive difficulties as indicators of juvenile Huntington disease onset in 29 patients. *Arch Neurol*, 2007, 64:813-819.
- [18] Yoon G, Kramer J, Zanko A, et al. Speech and language delay are early manifestations of juvenile - onset Huntington disease. *Neurology*, 2006, 67:1265-1267.

(收稿日期:2012-05-17)