

论著·临床研究

## 13例早发型腓骨肌萎缩症的基因分型研究

徐佳露 章毅 赵聪颖 江佩芳 袁哲锋 余永林 夏哲智 高峰

(浙江大学医学院附属儿童医院神经内科, 浙江 杭州 310052)

**[摘要]** **目的** 探讨早发型腓骨肌萎缩症(CMT)的临床特征及遗传变异分析。**方法** 以临床诊断为早发型CMT的患儿为研究对象,收集相关临床资料,进行肌电图及CMT相关基因检测并分析。**结果** 早发型CMT病例共13例,男9例(69%),女4例(31%),平均就诊年龄 $4.0 \pm 2.1$ 岁,其中12例(92%)患儿起病年龄 $<2$ 岁。9例(69%)诊断为CMT1型(其中Dejerine-Sottas综合征6人),1例(8%)为中间型,3例(23%)为CMT2型。13例患儿的基因检测结果显示6例(46%)患儿存在外周髓鞘蛋白22(PMP22)基因重复突变、3例(23%)髓鞘蛋白零(MPZ)基因插入突变及点突变、3例(23%)线粒体融合蛋白2(MFN2)基因点突变、1例(8%)人轻肽神经丝蛋白(NEFL)基因点突变,其中11例(85%)为已知致病突变,2例(15%)为新变异。MPZ基因新变异c.394C>G(p.P132A)评级为“可能致病的”及MFN2基因新变异c.326A>G(p.K109R)评级为“致病的”。**结论** 早发型CMT以PMP22基因重复突变及MPZ基因突变为主,临床分型以CMT1型为主,其中Dejerine-Sottas综合征占有相当比例。**[中国当代儿科杂志, 2019, 21(7): 670-675]**

**[关键词]** 腓骨肌萎缩症;外周髓鞘蛋白22基因;髓鞘蛋白零基因;线粒体融合蛋白2基因;人轻肽神经丝蛋白基因;高通量测序;儿童

### A genotyping study of 13 cases of early-onset Charcot-Marie-Tooth disease

XU Jia-Lu, ZHANG Yi, ZHAO Cong-Ying, JIANG Pei-Fang, YUAN Zhe-Feng, YU Yong-Lin, XIA Zhe-Zhi, GAO Feng. Department of Neurology, Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, China (Gao F, Email: epilepsy@zju.edu.cn)

**Abstract: Objective** To study the clinical characteristics and genetic variation of early-onset Charcot-Marie-Tooth disease (CMT). **Methods** Children with a clinical diagnosis of early-onset CMT were selected for the study. Relevant clinical data were collected, and electromyogram and CMT-related gene detection were performed and analyzed. **Results** A total of 13 cases of early-onset CMT were enrolled, including 9 males (69%) and 4 females (31%). The mean age at consultation was  $4.0 \pm 2.1$  years. Among them, 12 children (92%) had an age of onset less than 2 years, 9 children (69%) were diagnosed with CMT type 1 (including 6 cases of Dejerine-Sottas syndrome), 1 child (8%) with intermediate form of CMT, and 3 children (23%) with CMT type 2. The genetic test results of these 13 children showed 6 cases (46%) of PMP22 duplication mutation, 3 cases (23%) of MPZ gene insertion mutation and point mutation, 3 cases (23%) of MFN2 gene point mutation, and 1 case (8%) of NEFL gene point mutation. Eleven cases (85%) carried known pathogenic mutations and 2 cases (15%) had novel mutations. The new variant c.394C>G (p.P132A) of the MPZ gene was rated as "possibly pathogenic" and the new variant c.326A>G (p.K109R) of the MFN2 gene was rated as "pathogenic". **Conclusions** Early-onset CMT is mainly caused by PMP22 gene duplication mutation and MPZ gene mutations. The clinical phenotype is mainly CMT type 1, among which Dejerine-Sottas syndrome accounts for a considerable proportion. **[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(7): 670-675]**

**Key words:** Charcot-Marie-Tooth disease; PMP22 gene; MPZ gene; MFN2 gene; NEFL gene; High-throughput sequencing; Child

[收稿日期] 2019-01-09; [接受日期] 2019-04-30

[基金项目] 国家青年科学基金(81501084)。

[作者简介] 徐佳露,女,博士,主治医师。

[通信作者] 高峰,男,主任医师。Email: epilepsy@zju.edu.cn。

腓骨肌萎缩症 (Charcot-Marie-Tooth disease, CMT), 又称遗传性运动感觉神经病 (hereditary motor and sensory neuropathy, HMSN), 是一组具有高度临床和遗传异质性的周围神经单基因遗传病, 发病率约为 1/2500<sup>[1]</sup>。CMT 的遗传模式有常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传及 X-连锁遗传。目前发现 80 余个基因的 1000 余个突变均可导致 CMT 的发生<sup>[2-3]</sup>, 其中外周髓鞘蛋白 22 (peripheral myelin protein 22, PMP22)、间隙连接蛋白  $\beta$  1 (gap junction protein beta 1, GJB1)、髓鞘蛋白零 (myelin protein zero, MPZ)、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, MFN2) 四个基因的突变占总突变的近 95%<sup>[4]</sup>。随着多重连接探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 及二代基因测序技术, 如基因 panel、全外显子组测序技术等的发展及应用, 对于 CMT 的认识不再局限于传统的临床分型。如何确定突变基因, 特别是新变异的致病性, 确定基因分型, 成为了当今分子诊断的难点所在。而美国医学遗传学与基因组学学会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 于 2015 年重新修订的序列变异解读标准和指南<sup>[5]</sup>, 基于人群数据、计算数据、功能数据、共分离数据等, 对基因的变异进行分级, 为解读工作提供了指向。本文通过对 13 例早发型 CMT 患儿的临床特征、家族史及基因检测结果进行分析, 最终确定患儿的基因分型。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

以 2014 年 4 月至 2018 年 3 月在浙江大学医学院附属儿童医院临床诊断为早发型 CMT 的 13 例患儿为研究对象, 其中男 9 例 (69%), 女 4 例 (31%), 其中 12 例 (92%) 患儿起病年龄 <2 岁, 平均就诊年龄  $4.0 \pm 2.1$  岁。

对于早发型 CMT 采用诊断标准<sup>[6-7]</sup>: (1) 发病年龄 <10 岁; (2) 慢性起病, 缓慢进展的肢体远端尤其是双下肢远端的肌无力和肌萎缩, 典型者成鹤腿畸形; (3) 肌电图显示周围神经性受损; (4) 神经活检证实周围神经损害; (5) 家族史阳性; (6) 弓形足或脊柱侧凸; (7) 排除以下疾病:

慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病、糖尿病性周围神经病、酒精中毒性周围神经病、周围神经淀粉样变性、进行性脊髓性肌萎缩症、脊髓亚急性联合变性等。

患儿须具备上述第 (1)、(2)、(3)、(7) 四条及第 (4)、(5)、(6) 中任何一条。若家族中已有确诊者, 再具备第 (1)、(2) 条即可诊断。

### 1.2 CMT 临床分型

基于神经电生理和病理特点, CMT 的临床分型可初步分为 (1) 脱髓鞘型 (CMT1 型): 正中神经运动传导速度 (motor nerve conduction velocity, MNCV) <38 m/s, 神经活检示显著的节段性脱髓鞘, 施万细胞增生, 呈“洋葱头”样改变; 其中正中神经 MNCV <12 m/s 者亦称 Dejerine-Sottas 综合征 (Dejerine-Sottas syndrome, DSS); (2) 轴索型 (CMT2 型): 正中神经 MNCV >38 m/s, 神经活检示慢性轴索变性和再生, 有髓纤维减少, 神经再生簇形成; (3) 中间型: 正中神经 MNCV 介于 25~45 m/s, 神经病理兼具脱髓鞘和轴索变性特点。

### 1.3 资料采集

收集患儿相关临床资料: 性别、就诊年龄、起病年龄、起病症状、家族史及神经系统体征。

### 1.4 周围神经病相关基因高通量测序

抽取患儿外周静脉血 3 mL, 放置 EDTA 抗凝管中, 送至北京金准基因科技有限责任公司, 采用周围神经病相关 106 个基因 panel 检测。发现基因点突变时, 根据选取位点的位置用 Primer 5 设计、合成引物, 进行 PCR 扩增, 对高通量测序结果中的变异位点进行 Sanger 测序验证; 发现基因重复突变时, 对捕获区域进行覆盖度计算及均一化处理, 检测出可能发生拷贝数变异的区域, 经 MLPA 检测基因 (主要针对 PMP22 基因), 确认重复范围; 对亲属进行 Sanger 测序突变位点验证, 根据家系共分离结果进一步判断其致病性。

应用人类基因突变数据库 (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>) 确认已报道的致病基因位点。对于新变异位点, 应用 ESP 数据库 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>)、千人数据库 (<http://browser.1000genomes.org>)、ExAC 数据库 (<http://exac.broadinstitute.org>) 进行正常对照人群变异比对, 应用 ACMG 指南标准对新变异进行评级。

## 2 结果

### 2.1 临床表现

5例(38%)患儿存在运动发育落后,独走年

龄>18月,伴行走不稳、平衡能力差、易摔倒、步态异常。13例(100%)患儿均存在远端肢体无力,4例(31%)伴远端肢体萎缩,6例(46%)伴上肢受累,1例(8%)伴脊柱侧凸。见表1。

表1 13例早发型CMT患儿基本信息及临床表现

病例	性别	就诊年龄(岁)	起病年龄(岁)	起病症状	临床表现					
					足畸形	远端肢体无力	远端肢体萎缩	上肢受累	感觉症状	脊柱侧凸
1	女	2.3	<2	20月独走,下肢无力	鹤腿	+	-	-	未评	-
2	男	3.3	<2	24月独走,下肢无力	弓形足	+	+	+	未评	+
3	女	1.8	<2	16月独走,步态异常	弓形足	+	-	-	未评	-
4	男	6	<2	15月独走,步态异常,走路易摔跤	弓形足、鹤腿	+	+	+	+	-
5	男	5.4	<2	13月独走,走路易摔跤	弓形足、鹤腿	+	-	-	-	-
6	男	4	<2	20月独走,步态异常,走路易摔跤	弓形足	+	-	+	未评	-
7	男	5	<2	12月独走,步态异常	马蹄内翻足	+	+	-	+	-
8	女	9	8	13月独走,8岁出现下肢无力,步态异常	弓形足、鹤腿	+	+	-	+	-
9	男	4.7	<2	15月独走,下肢无力	弓形足、鹤腿	+	-	+	未评	-
10	男	1.3	<2	16月尚不能独走	鹤腿	+	-	+	未评	-
11	男	3.2	<2	18月独走,步态异常	鹤腿	+	-	-	未评	-
12	男	2.5	<2	20月独走,上楼梯步态异常	鹤腿	+	-	+	未评	-
13	女	4.2	<2	12月独走,15月出现步态异常,走路易摔跤	弓形足	+	-	-	未评	-

注: + 示阳性症状; - 示阴性症状。

### 2.2 肌电图结果

肌电图显示正中神经MNCV<25 m/s者9人,介于25~45 m/s者1人,>45 m/s者3人,可分为CMT1型9人(69%),中间型1人(8%),CMT2型3人(23%)。9例CMT1型患儿中,有6例正中神经MNCV<12 m/s,即DSS;有5例(病例1、2、4、8、13)正中神经复合肌肉动作电位(compound muscle action potential, cMAP)均降低,提示合并轴索损害;且正中神经感觉神经传导速度(sensory nerve conduction velocity, SNCV)及感觉神经动作电位(sensory nerve action potential, SNAP)均未能引出。见表2。

### 2.3 基因诊断

13例患儿的基因检测结果显示11例(85%)为已知致病突变,2例(15%)为新变异,其中5例(38%)存在家族史。突变基因包含PMP22重复突变(6例,46%)、MPZ基因插入突变及点突变(3例,23%)、MFN2基因点突变(3例,23%)及人轻肽神经丝蛋白(NEFL)基因点突变(1

例,8%)。2例新变异分别为MPZ基因c.394C>G(p.P132A)及MFN2基因c.326A>G(p.K109R)。见表3。

表2 13例早发型CMT患儿的肌电图结果

病例	正中神经				临床分型
	MNCV(m/s)	cMAP(mV)	SNCV(m/s)	SNAP(μV)	
1	4.9	0.68	NP	NP	CMT1/DSS
2	8.8	0.38	NP	NP	CMT1/DSS
3	9.4	1.5	NP	NP	CMT1/DSS
4	9.2	0.2	NP	NP	CMT1/DSS
5	51.3	2.9	51.3	9.0	CMT2
6	25.5	2.6	30.1	1.63	中间型CMT
7	51.4	3.6	41.1	4.5	CMT2
8	23.3	1.3	NP	NP	CMT1
9	11.4	3.0	NP	NP	CMT1/DSS
10	6.1	2.8	NP	NP	CMT1/DSS
11	52.3	6.1	NP	NP	CMT2
12	18.6	3.0	NP	NP	CMT1
13	15.3	1.05	NP	NP	CMT1

注: [NP] 未引出。

表3 13例早发型CMT患儿突变基因、核苷酸及氨基酸改变信息

病例	临床分型	突变基因	核苷酸改变	氨基酸改变	父母有无变异	是否为新变异
1	CMT1/DSS	MPZ	c.394C>G	p.P132A	无	是
2	CMT1/DSS	MPZ	c.90C>G	p.I30M	无	否
3	CMT1/DSS	PMP22	PMP22 基因整体重复	-	父	否
4	CMT1/DSS	PMP22	PMP22 基因整体重复	-	无	否
5	CMT2	MFN2	c.326A>G	p.K109R	无	是
6	中间型CMT	NEFL	c.293A>G	p.N98S	无	否
7	CMT2	MFN2	c.280C>T	p.R94W	无	否
8	CMT1	PMP22	PMP22 基因整体重复	-	无	否
9	CMT1/DSS	PMP22	PMP22 基因整体重复	-	父	否
10	CMT1/DSS	MPZ	c.293C>T	p.R98C	无	否
11	CMT2	MFN2	c.1090C>T	p.R264W	母	否
12	CMT1	PMP22	PMP22 基因整体重复	-	母	否
13	CMT1	PMP22	PMP22 基因整体重复	-	母	否

### 2.4 新变异分析

病例1携带MPZ基因c.394C>G(p.P132A)杂合变异，病例5携带MFN2基因c.326A>G(p.K109R)杂合变异。Sanger测序验证两位患儿的父

母均未携带相应变异，该患儿为新发(de novo)变异。两个基因变异位点在哺乳动物中高度保守。见图1~2。

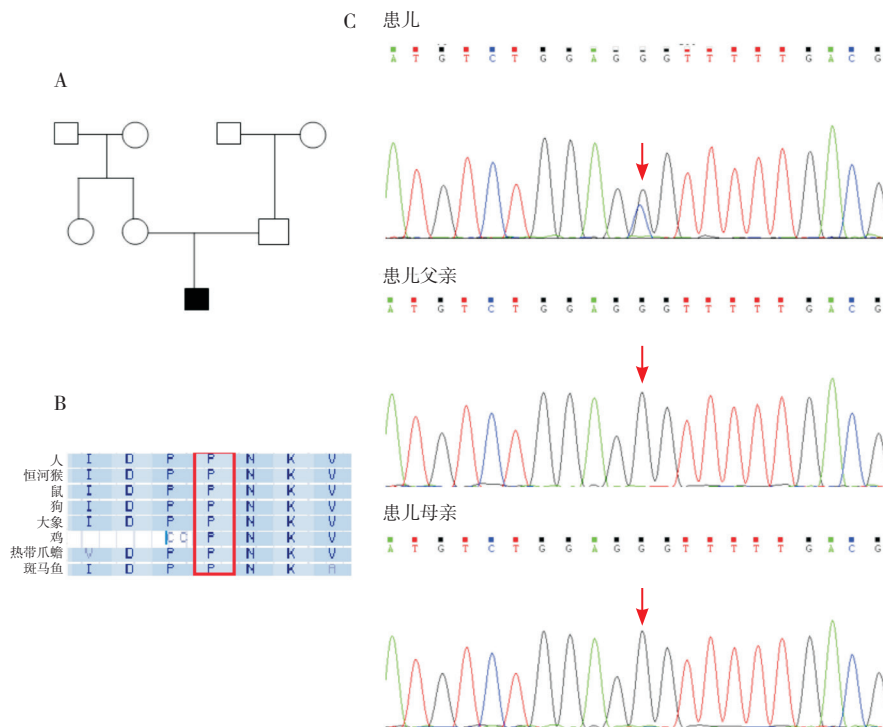


图1 病例1家系图、Sanger测序图及保守序列分析 图A示病例1家系图，■为先证者，○为健康女性，□为健康男性；图B示MPZ蛋白第132号氨基酸位点在哺乳动物中高度保守；图C示患儿存在MPZ基因c.394C>G(p.P132A)杂合突变，父母在该位点均未携带突变(箭头所示)。



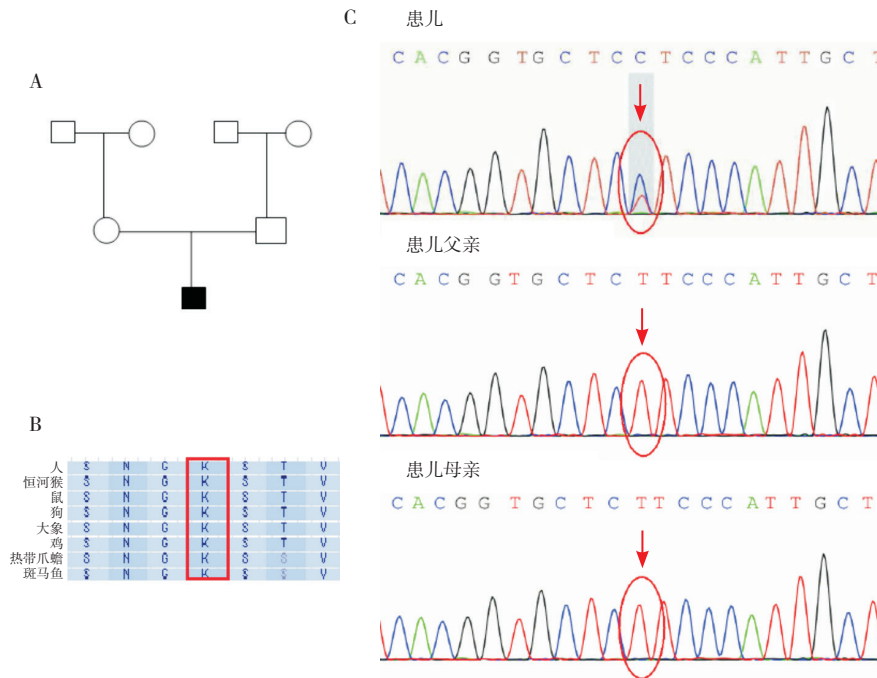


图2 病例5家系图、Sanger测序图及保守序列分析 图A示病例5家系图，■为先证者，○为健康女性，□为健康男性；图B示MFN2蛋白第109号氨基酸位点在哺乳动物中高度保守；图C示患儿存在MFN2基因c.326A>G(p.K109R)杂合突变，父母在该位点均未携带突变（箭头所示）。

应用ACMG序列变异解读标准对2个新变异进行评级。MPZ基因c.394C>G(p.P132A)杂合变异，为新发变异，无家族史，符合PS2；该变异为ESP数据库、千人数据库、ExAC数据库正常对照人群中未发现的变异，符合PM2；SIFT、PolyPhen-2、PROVEAN软件的生物信息数据分析预测提示“有害的”，MutationAssessor预测提示“致病性中等”；因此该变异被判定为“可能致病的”。MFN2基因c.326A>G(p.K109R)杂合变异，也为新发变异，

无家族史，符合PS2；MFN2蛋白第107~111号氨基酸为核苷酸结合域，影响GTP的结合<sup>[8-9]</sup>，符合PS3；该变异为ESP数据库、千人数据库、ExAC数据库正常对照人群中未发现的变异，符合PM2；经SIFT、PolyPhen-2、PROVEAN、MutationAssessor软件的生物信息数据分析预测，均提示为“有害的”，符合PP3；因此该突变被判定为“致病的”。见表4。

表4 新变异的ACMG致病性分级

病例	突变基因	SIFT	PolyPhen-2	PROVEAN	Mutation-Assessor	ACMG致病性分级			致病性判定
						强	中等	支持证据	
1	MPZ	0.01	0.93	-6.97	2.37	PS2	PM2	-	可能致病的
5	MFN2	0	1.00	-2.66	4.07	PS2, PS3	PM2	PP3	致病的

注：-示无支持证据。

### 3 讨论

CMT是一组具有高度临床和遗传异质性的周围神经系统遗传病，诊断需结合临床分型及基因分型。二代测序技术的发展正改变着CMT基因诊断的方式。包含所有已知CMT相关基因的基

因panel检测是如今最经济、最高效、最直接的基因检测方式，这能让临床医生在第一时间对所有CMT基因的突变情况有一个整体的了解。它能很好的体现基因型-表型的对应关系，为临床的治疗、随访提供可靠保障。但新变异的临床意义解读是临床工作的一个难点所在。2015年，ACMG提出

了适用于所有孟德尔基因变异,包括单基因、多基因包、外显子组和基因组测序发现的遗传变异的解读标准与指南<sup>[5]</sup>。

本研究共确诊13例早发型CMT患儿,6例(46%)PMP22基因重复突变,3例(23%)MPZ基因点突变,3例(23%)MFN2基因点突变及1例(8%)NEFL基因点突变,这与之前Cornett等<sup>[10]</sup>报道的CMT患儿前三位的突变基因一致。而对于占总体CMT人群突变第二位的GJB1基因,却并非CMT患儿的主要突变基因。这是由于在脱髓鞘型中,PMP22基因重复突变、MPZ、NEFL基因突变的患者多表现为早发型;而在轴索型中,几乎所有的MFN2基因突变的患者表现为早发型,而GJB1基因突变患者无论表现为脱髓鞘型或轴索型,起病年龄均相对较晚<sup>[11]</sup>。

本研究中6例患儿起病年龄早,且正中神经MNCV<12 m/s,符合DSS的诊断标准。突变基因包括3例MPZ基因突变和3例PMP22基因重复突变,与之前文献报道的DSS多数为MPZ及PMP22(包括整体重复及点突变)相一致<sup>[12]</sup>。近年来,DSS更被看做是一个临床综合征,尽管DSS患儿起病年龄早,且MNCV显著降低,提示着严重的脱髓鞘或者无髓鞘形成,但Gabreëls-Festen等<sup>[12]</sup>对25例DSS患者进行随访发现,仍有1/3的患者在平均年龄39.9岁时尚可独立行走1 km以上。DSS的出现并非预示着成人期的严重残疾及轮椅依赖的可能。

近年来,多项研究均提示MNCV虽能作为临床分型的主要指标,但却与疾病的进展不相平行。而cMAP尽管与起病年龄不相关,却关乎病程长短及疾病的严重程度,特别是在PMP22基因重复突变及MPZ基因突变的患者中,cMAP与远端肌力密切相关<sup>[13-14]</sup>。文中CMT1型患儿中有5人cMAP低于同龄儿,表明该型患儿除脱髓鞘病变外尚还存在轴索病变,且也预示着患儿相对预后不良。

综上,本研究依据患儿的临床表现、神经肌肉电生理特征、遗传模式、二代测序结果,结合临床分型及基因分型,采用ACMG标准对新变异致病性进行分析,共确诊早发型CMT 13例,为临

床CMT的诊断确定基础。

#### [参 考 文 献]

- [1] Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease[J]. Clin Genet, 1974, 6(2): 98-118.
- [2] Gutmann L, Shy M. Update on Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Curr Opin Neurol, 2015, 28(5): 462-467.
- [3] Timmerman V, Strickland AV, Züchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease within the frame of the Human Genome Project success[J]. Genes (Basel), 2014, 5(1): 13-32.
- [4] DiVincenzo C, Elzinga CD, Medeiros AC, et al. The allelic spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease in over 17,000 individuals with neuropathy[J]. Mol Genet Genomic Med, 2014, 2(6): 522-529.
- [5] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. Genet Med, 2015, 17(5): 405-424.
- [6] Chung KW, Kim SB, Park KD, et al. Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations[J]. Brain, 2006, 129(Pt 8): 2103-2118.
- [7] 陈嵘,梁秀龄. 腓骨肌萎缩症的临床表现和分型及遗传学[J]. 中山医科大学学报, 1997, 18(3): 213-215, 255.
- [8] Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 5): 867-874.
- [9] Rojo M, Legros F, Chateau D, et al. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 8): 1663-1674.
- [10] Cornett KMD, Menezes MP, Shy RR, et al. Natural history of Charcot-Marie-Tooth disease during childhood[J]. Ann Neurol, 2017, 82(3): 353-359.
- [11] Abe A, Numakura C, Kijima K, et al. Molecular diagnosis and clinical onset of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan[J]. J Hum Genet, 2011, 56(5): 364-368.
- [12] Gabreëls-Festen A. Dejerine-Sottas syndrome grown to maturity: overview of genetic and morphological heterogeneity and follow-up of 25 patients[J]. J Anat, 2002, 200(4): 341-356.
- [13] Kim YH, Chung HK, Park KD, et al. Comparison between clinical disabilities and electrophysiological values in Charcot-Marie-Tooth 1A patients with PMP22 duplication[J]. J Clin Neurol, 2012, 8(2): 139-145.
- [14] Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, et al. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients[J]. Brain, 2003, 126(Pt 1): 134-151.

( 本文编辑: 王颖 )