

酪氨酸羟化酶基因新突变导致多巴反应性肌张力障碍家系分析

段丽芬¹, 王惠萍¹, 孙莹¹, 王春霞¹, 王左华¹, 张霞¹, 沈茹²
(昆明市儿童医院 1. 神经内科 2. 检验科 云南 昆明 650228)

摘要:【目的】研究多巴反应性肌张力障碍(DRD)家系 *TH* 基因突变特点。【方法】提取先证者及其父母和两个姐姐外周血基因组DNA,使用高通量测序(NGS)的方法对已知肌张力及运动障碍相关的256个致病基因进行检测。【结果】家系中2例患者(先证者及其大姐)的酪氨酸羟化酶(*TH*)基因外显子14、9存在c.1481C>T(p.Thr494Met)、c.943G>A(p.Gly315Ser)复合杂合突变,父母分别携带一个杂合突变,其表型正常的二姐和50名正常对照者均未检测到该突变。【结论】*TH*基因c.1481C>T(p.Thr494Met)、c.943G>A(p.Gly315Ser)突变导致了该DRD家系的基因异常,并且发现了新的*TH*基因突变,扩展了DRD基因型与临床表型的关系谱,对DRD的早期精准诊断和治疗是改善预后的关键。

关键词:多巴反应性肌张力障碍;酪氨酸羟化酶基因;高通量测序;三磷酸鸟苷环化水解酶1
中图分类号:R725 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2019)04-0598-06

Analysis of a Pedigree with Dopa-responsive Dystonia Caused by Novel Mutation of *TH* Gene

DUAN Li-fen¹, WANG Hui-ping¹, SUN Ying¹, WANG Chun-xia¹, WANG Zuo-hua¹,
ZHANG Xia¹, SHEN Ru²

(1.Department of Pediatric neurology, 2. Department of laboratory, Kunming Children's Hospital, Kunming 650228, China)

Correspondence to: SHEN Ru; E-mail: shenru2009@163.com

Abstract: 【Objective】 To study the mutation characteristics of Tyrosine hydroxylase (*TH*) gene in a pedigree with dopa-responsive dystonia (DRD). 【Methods】 Extraction of genomic DNA from peripheral blood of a proband and his parents and two sisters using high-throughput sequencing (NGS) method were detected on 256 known pathogenicity genes associated with dystonia and dyskinesia. 【Results】 Mutations on tyrosine hydroxylase (*TH*) gene in the exon 14 and exon 9 were detected in the proband and his eldest sister in this pedigree. They had a complex heterozygosity of c.1481C>T (p.Thr494Met) and c.943G>A (p.Gly315Ser), and one heterozygous mutation was carried by parents respectively. The mutation was not detected in his second sister and 50 people with normal phenotype controls. 【Conclusion】 The mutations of *TH* gene c.1481C>T (p.Thr494Met) and c.943G>A (p.Gly315Ser) led to the gene abnormality in DRD family, and a new mutation of *TH* gene was found, which expanded the relationship between DRD genotype and clinical phenotype. It is vital that early accurate diagnosis and treatment of DRD is the key to improve prognosis.

Key words: dopa-responsive dystonia; tyrosine hydroxylase gene; next generation sequencing; guanosine triphosphate cyclohydrolase I

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(2): 598-603]

收稿日期:2018-11-28

基金项目:云南省科技厅重点研发计划-国际科技合作专项(2018IA047);昆明市卫生科技人才培养项目(SW后备-86);昆明市科技保障民生发展计划项目(2019KJH147)

作者简介:段丽芬,副主任医师,研究方向:儿童神经系统遗传代谢性疾病,E-mail: duanlifeng@etyy.cn;沈茹,通信作者,研究方向:儿童遗传病的分子诊断,E-mail: shenru2009@163.com

多巴反应性肌张力障碍(dopa-responsive dystonia, DRD)又称Segawa病,或伴有明显昼夜波动的遗传性进行性肌张力障碍,由日本学者Segawa发现并报道。DRD的主要临床表现为肌张力障碍、症状多有晨轻暮重现象、小剂量多巴制剂有显著持久的疗效^[1]。DRD可分为常染色体显性遗传(autosomal dominant, AD)和常染色体隐性遗传(autosomal recessive, AR),AD-DRD的致病基因有三磷酸鸟苷环化水解酶1(guanosine triphosphate cyclohydrolase 1, *GCH-1*)基因以及*DYT14*基因,*GCHI*基因为最常见的致病基因^[2]。AR-DRD的致病基因为*TH*基因和*SPR*基因,均较为少见,*TH*基因突变所致的DRD是一种罕见但可治的神经系统遗传病,因此对携带有该基因突变的家系进行遗传分析尤为重要,目前国内鲜有*TH*基因致病的DRD家系报道,现将我院神经内科诊断的一个家系中2例隐性遗传的DRD患者进行报道。

1 材料与方法

1.1 临床资料收集

研究对象为2016年2月就诊于我院,来自云南省曲靖市白水镇一山区的家系(图1,表1)。病例经小儿神经内科专家进行病史详细询问和详细体格检查,临床诊断标准符合Nygaard等提出的DRD诊断标准。家系中2例患者和1例无症状姐姐的临床表现见表1,I1、I2、I3、I4未能进行基因检测。本研究经医院医学伦理委员会批准,所有受试患儿及家属均知情同意并签署知情同意书。

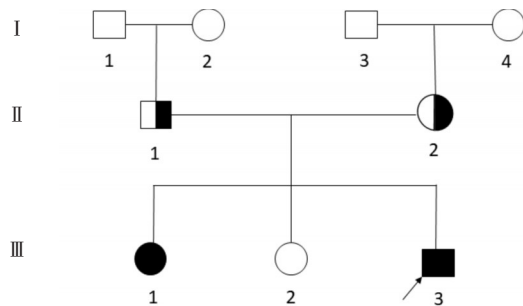


图1 DRD患者家系图

Fig.1 Pedigree of DRD patients

1.2 研究方法

1.2.1 样本采集与DNA提取 抽取患者及亲属外周血各2 mL置于带有EDTA抗凝的采血管中,采用QiagenFlexiGene DNA Kit提取试剂盒(德国, Qiagen公司)提取血液样本的基因组DNA。提取的DNA采用Nanodrop2000超微量分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司)测定其含量。确保样本基因组DNA的 $A_{260/280}$ 范围在1.8~2.0, $500 \text{ ng}/\mu\text{L} > \text{DNA 浓度} > 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$,基因组总量大于 $3.5 \mu\text{g}$,同时进行琼脂糖电泳检测基因组完整性。

1.2.2 二代测序检测 对已经提取的DNA构建DNA样本文库,文库共包含31 654条捕获探针,总大小为1.035 Mbp。然后进行肌张力及运动障碍的已知致病基因包检测(共含256个),同时随机选取我院体检的50名健康儿童外周血作为对照(男性27名,女性23名,平均年龄5岁,最小4个月,最大14岁,中位数:4岁,汉族44例,少数民族6例,昆明市籍20例,地州籍30例)。测序平台产生的原始数据Fastq文件,经生物信息学软件分析、注释获得初步检测结果,经数据筛选及临床比对,筛选出*TH*基因c.1481C > T(p.Thr494Met)、c.943G > A(p.Gly315Ser)两个位点,作为可疑位点进行验证。

1.2.3 一代测序验证 对先证者及其家系出现的位点进行一代测序验证。在人类基因组数据库GenBank中获得上述突变位点基因序列,运用Primer Z设计引物并合成(表2)。反应条件为预变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min后, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s,循环35个周期,最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸5 min PCR扩增后,对突变位点进行一代测序验证(ABI 3730一代测序仪),将获得序列与之前的序列进行比对,排除掉二代测序中假阳性的位点。

2 结果

2.1 基因突变分析

测序结果(图2)显示家系中2例患者*TH*基因外显子14、外显子9存在c.1481C > T(p.Thr494Met)、c.943G > A(p.Gly315Ser)复合杂合突变,导致蛋白功能受影响,两个杂合突变中前者来源于母亲,后者来源于父亲,先证者二姐和50名正常对照者均未检测到该突变。

表1 多巴反应性肌张力障碍一家系2例患者和1例无症状亲属的临床特点

Table 1 Clinical characteristics of 2 patients and 1 asymptomatic relationship in a family with dopa reactive dystonia

Projects	Ⅲ ₃ (Proband)	Ⅲ ₁ (The eldest of proband)	Ⅲ ₂ (The 2 nd sister of proband)
Gender	Male	Female	Female
Age	4 years and 8 months	11 years and 9 months	8 years
Age of onset	4 years	Postnatal	No
Duration of disease	8 months	11 years 9 months	No
Symptom	Lower limbs weak for 8 months, aggravated with claudication on the left lower limbs for half a month	She has been bedridden since childhood, unable to stand up, sit or stand, can only move her limbs, cannot hold objects, with normal development of intelligence and language, and she has once been diagnosed as "cerebral palsy".	No
Diurnal fluctuation	Yes	No	No
Positive characteristics	Shambling gait, landing on the toes when walking, movement slightly limited on the right ankle joint, slight foot ptosis of the left lower extremity, muscle strength level 4 on the double lower limbs	Normal verbal responses, severe contracture of the joints of the arms and legs, significant reduction in muscle volume, grade II muscle strength of the arms and legs, and severe lateral curvature of spine	No
Copper-protein	Normal	Normal	Not checked
EEG, Nerve conduction and MRI	Normal	Normal	Not checked
Medication	Levodopa 60 mg/d	Levodopa 375 mg/d	No
Current situation	The symptoms were relieved on the day of medication, and completely controlled in 1 month.	The symptoms were significantly relieved after 2 years and 7 months of follow-up. She can now walk, run, do housework, go to school, and her scoliosis and joint contracture were significantly improved	Normal

表2 反应体系引物的碱基序列

Table 2 Primer sequence of reaction system

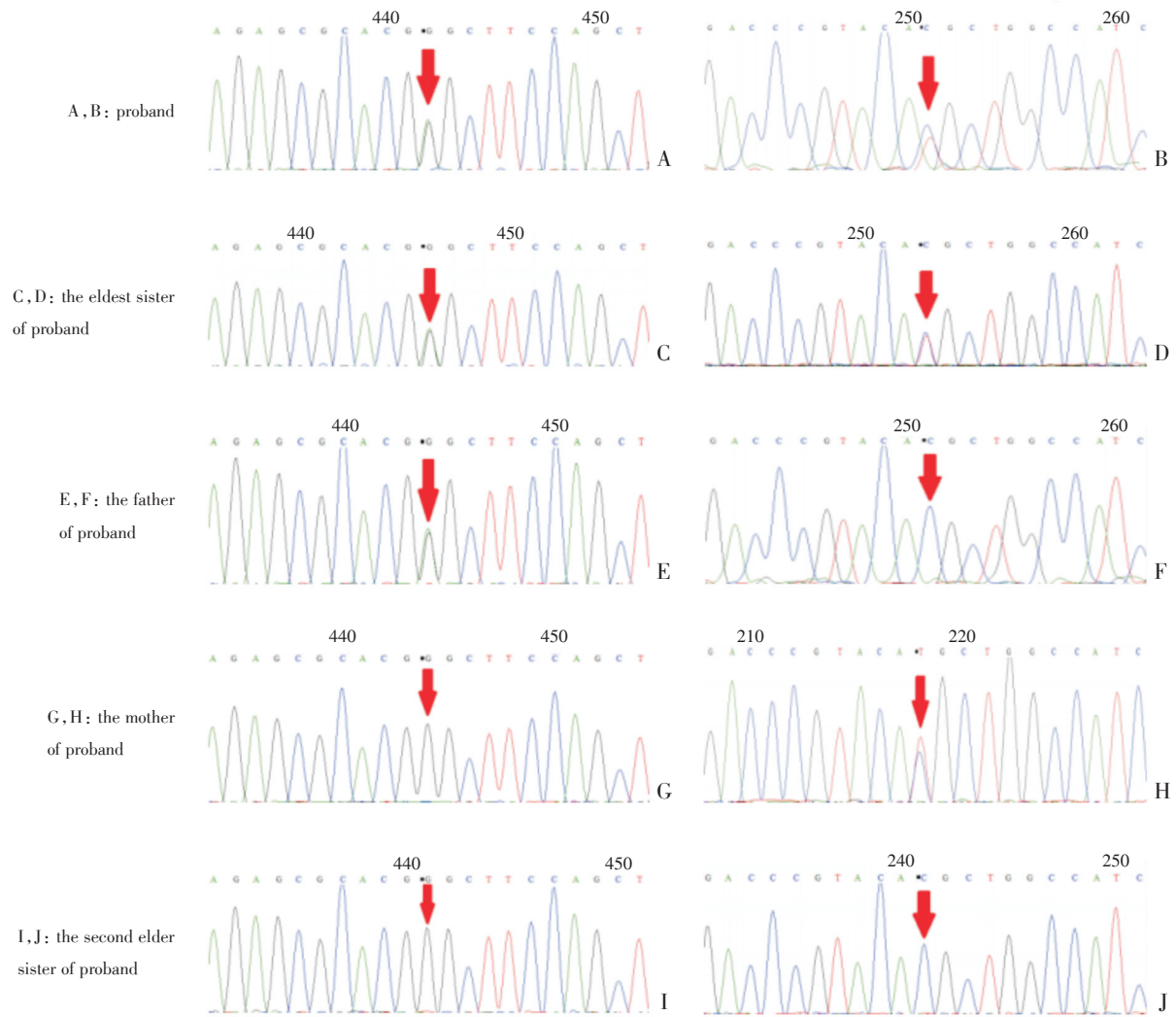
Object	Gene	Transcript	Nucleotide changes	Site	Information of primer
Ⅱ1, Ⅱ2, Ⅲ1, Ⅲ2, Ⅲ3, 50 cases for Normal controls	TH	NM_199292	c.1481C>T	chr11:2185569	F:GCACCTAGCCAATGGCACTC R:GAGGGGAGCAAAGCCCTCTA
			c.943G>A	chr11:2187990	F:AGCAGGCAGCACACTTCAC R:CTAAAGCCACCAGCAAAGC

2.2 蛋白功能软件预测结果

对上面提到的两个错义突变分别进行 Polyphen2、Sift 和 Mutationtaster 蛋白功能软件预测, 预测结果提示 c.1481C > T(p.Thr494Met)、c.943G > A (p.Gly315Ser) 突变位点可能对蛋白质功能产生损害(图3)。

3 讨论

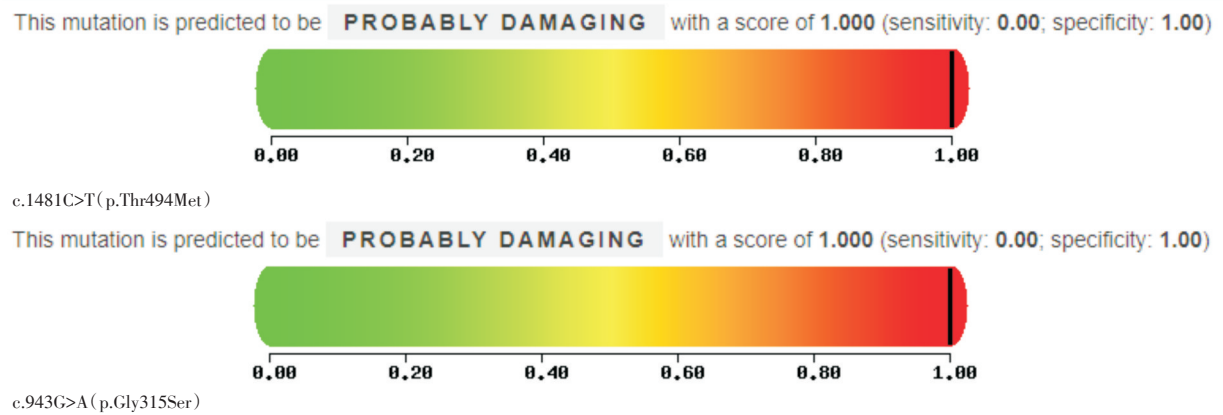
DRD 是一种罕见的常染色体遗传性疾病, 它是由于基因缺陷导致多种酶合成不足而使多巴胺生物合成受阻引起的临床症状, 因遗传异质性



The red arrow indicates a mutation site. A, C, E, G and I were the family variation of 943G>A site, respectively; B, D, F, H and J were the family variation at the t-site of > of c.1481C, respectively.

图2 该家系 TH 基因测序结果

Fig.2 The results of sanger sequencing of the TH gene from III3, III1, II1, II2 and III2 samples were as follows



The black line illustrating the strength of the possible damaging for the mutation.

图3 PolyPhen-2 软件对致病性的预测

Fig.3 Prediction of pathogenicity by PolyPhen-2 software

导致 DRD 有不同临床表型,典型表现为儿童期或青少年起病,多以下肢肌张力障碍或步态异常为首发症状,之后逐渐出现全身进行性肌张力障碍,临床症状有显著晨轻暮重,对小剂量左旋多巴有戏剧性和持续性的效果。DRD 部分患者会出现下肢反射亢进、肢体痉挛等,极易误诊为脑性瘫痪、少年帕金森、足下垂、遗传性痉挛性截瘫等,长期得不到正确医治可能会带来肢体畸形或废用性改变,Tadic^[3]统计了1952年至2011年间576例DRD患者起病中位数年龄为11.6岁,从起病到延误诊断的中位数为13.5年,DRD在全球范围内误诊率极高,特别是在症状不典型的婴儿和幼儿中。

在DRD患者中首先发现的基因为*GCHI*基因也是目前报道最多的基因^[4],其次为*TH*、*SPR*、*PTS*、*PCBD*、*QDPR*和*PARK2*基因^[5]。*TH*由*TH*基因编码,*TH*基因定位于11p15.5,含14个外显子,目前已经有文献报道的*TH*基因变异位点共有67个(来自HGMD数据库),其中*TH*基因突变类型有错义突变、无义突变、剪切位点突变,小的缺失和插入,临床常见为错义突变,本次家系检测结果为错义突变,和已经报道过的*TH*基因的突变类型多为错义突变是一致的。*TH*是儿茶酚胺(多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素)合成的关键限速酶,以分子氧和酪氨酸为底物,BH₄为辅因子,催化左旋酪氨酸转变为左旋多巴,该酶缺陷导致基底节突触间的多巴胺耗竭,患者出现运动障碍或非运动功能障碍如:情绪波动、语言记忆缺陷和专注困难等^[6],本次研究检测出*TH*基因的两个突变位点,其中一个位点为已报道过的c.1481C>T(p.Thr494Met)突变位点^[7],为致病性突变,另外一个为新发现的位点c.943G>A(p.Gly315Ser),检索HGMD、NCBI数据库该突变为未报道过的新突变。患儿父母均为携带者,符合常染色体隐性遗传方式。正常家系成员及50名正常对照个体未检测到该突变,说明这两个突变可能是该家系的致病性突变。运用Ployphe2、Sift和Mutationtaster蛋白功能软件预测,均证实突变位点很可能对蛋白质功能造成损害,两例患儿临床症状符合DRD的诊断同时也通过良好疗效验证了该诊断,进一步说明该突变为致病性突变的可能性较大。

*TH*基因缺陷的DRD较*GCHI*基因突变所致

的DRD起病早、临床症状重,多在出生后数周到5岁间起病,常为下肢起病的部分或全身性肌张力不全,70%在15岁前即可出现严重症状,可表现为运动迟滞的多巴反应性婴儿帕金森或严重进展性脑病表现等^[8]。本家系中先证者为下肢起病,早期晨轻暮重现象明显,符合该病特点,*TH*缺陷的DRD晚期昼夜波动性可消失,先证者大姐病程长,症状严重无昼夜波动性,曾被误诊为脑性瘫痪十余年。*TH*基因突变的DRD分为3个表型^[9]:①婴幼儿进行性脑病:表现为运动发育迟滞、波动性的锥体外系症状、视觉和植物神经症状,左旋多巴治疗症状会有所改善但不持续不常久。②左旋多巴敏感的婴幼儿帕金森综合征:婴儿起病的严重运动障碍但对左旋多巴有较好的敏感性,先证者大姐出生后既有严重运动障碍,无晨轻暮重现象,小剂量左旋多巴疗效显著故考虑为该类型。③典型的DRD:下肢起病的肌张力不全,多有晨轻暮重表现,小剂量左旋多巴治疗疗效显著,先证者为该类型。本研究中两例患者基因突变位点完全相同,然而先证者表现为典型的DRD表现,先证者大姐则为左旋多巴敏感的婴幼儿帕金森综合征,两者临床严重程度和起病年龄均不同,考虑可能为基因的遗传异质性导致酶缺陷程度不同而出现不一样的临床表现。鉴于DRD的罕见性及缺乏临床症状特异性,临床医生单凭临床表现很难早期识别,可提供的可靠诊断依据少导致临床能确诊的病例数更少。目前基因检测可以作为一种可靠的手段进一步明确诊断,将来随着测序成本的降低,可望采用基因测序的方法作为肌张力障碍的常规诊断筛查方法。虽然DRD具有高误诊率和致残率,但是治疗和改善预后却有良好的临床疗效,有望未来能列入新生儿基因筛查的疾病谱中。

DRD需与运动障碍性疾病如:脑性瘫痪相关肌张力障碍、少年型帕金森病、肝豆状核变性、痉挛性截瘫、脊髓性肌肉萎缩症等鉴别。其晨轻暮重现象应与重症肌无力相鉴别,但昼夜波动不是DRD特异性的表现,其它神经系统疾病如帕金森病等也可能出现昼夜波动性^[10],而对左旋多巴的显著和持久的反应性是鉴别DRD和其他肌张力不全和帕金森病的重要特征^[9]。左旋多巴是DRD最首选的治疗,大部分患者对小剂量左旋多巴有戏剧性和持久性的疗效,有报道0.4 mg/kg起

始既能显著改善临床症状^[11],有治疗了30年疗效仍持续有效的报道^[7],本研究家系中先证者服用左旋多巴每千克体质量1.5 mg当天既有明显效果,先证者大姐卧床11年,经治疗后取得扭转性效果,现已能基本正常生活,左旋多巴副作用小,故怀疑DRD的患者均可试验性治疗以免漏诊DRD贻误治疗时机。Wijemanne等^[12]的研究建议疑似DRD的病例均可进行左旋多巴试验,假如1个月后仍无反应试验终止。一旦试验有反应,立即进行下一步检查,基因诊断将有助于DRD的尽早诊断。

DRD是一种有较好治疗效果的常染色体遗传病,遗憾于目前其漏诊率和误诊率极高,如患儿未得到及时有效治疗可导致严重肢体残障。

*TH*基因突变DRD病例相对少见容易遗漏,我们对*TH*基因家系进行遗传分析,发现了一种新的*TH*基因突变位点,扩展了DRD的基因型与临床表型的关系谱。疑似DRD病例可常规进行左旋多巴试验或小剂量左旋多巴实验性治疗,如试验阳性、起病早、临床症状重的患儿需尽早完善*TH*基因检测协助诊断。应增强儿科、康复医疗人员对DRD的认识,在临床、基因分析基础上进行遗传咨询实现优生优育,诊断病例及早治疗,降低致残率。

(致谢:康旭医学检验所在基因检测分析过程中给予的技术指导。)

参考文献

- [1] Randby H, Salvador CL, Oppebøen M, et al. Dopa-responsive dystonia [J]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2018, 138(19): 1-10.
- [2] Malek N, Fletcher N, Newman E. Diagnosing dopamine-responsive dystonias [J]. Pract Neurol, 2015, 15(5): 340-345.
- [3] Tadic V, Kasten M, Brüggemann N, et al. Dopa-responsive dystonia revisited: diagnostic delay, residual signs, and nonmotor signs [J]. Arch Neurol, 2012, 69(12): 1558-1562.
- [4] Lee WW, Jeon B, Kim R. Expanding the Spectrum of Dopa-Responsive Dystonia (DRD) and Proposal for New Definition: DRD, DRD-plus, and DRD Look-alike [J]. J Korean Med Sci, 2018, 33(28): e184.
- [5] Clot F, Grabli D, Cazeneuve C, et al. Exhaustive analysis of BH4 and dopamine biosynthesis genes in patients with Dopa-responsive dystonia [J]. Brain, 2009, 132(Pt7): 1753-1763.
- [6] Arrabal L, Teresa L, Sánchez-Alcudia R, et al. Genotype-phenotype correlations in sepiapterin reductase deficiency. A splicing defect accounts for a new phenotypic variant [J]. Neurogenetics, 2011, 12(3): 183-191.
- [7] Swaans RJ, Rondot P, Renier WO, et al. Four novel mutations in the Tyrosine Hydroxylase gene in patients with infantile parkinsonism [J]. Ann Hum Genet, 2000, 64, 25-31.
- [8] Katus LE, Frucht SJ. An unusual presentation of tyrosine hydroxylase deficiency [J]. J Clin Mov Disord, 2017, 4:18.
- [9] Lee WW, Jeon BS. Clinical spectrum of dopa-responsive dystonia and related disorders [J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2014, 14(7): 461-474.
- [10] Chung SJ, Park HK, Ki CS, et al. Marked diurnal fluctuation and rest benefit in a patient with Parkinson mutation [J]. Mov Disord, 2008, 23(4): 624-626.
- [11] Jain R, Shukla B, Mittal M. Delayed Diagnosis of Dopa responsive Dystonia in Two Siblings [J], Indian Pediatr, 2016, 53(5):427-428.
- [12] Wijemanne S, Jankovic J. Dopa-responsive dystonia-clinical and genetic heterogeneity [J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(7): 414-424.

(编辑 余菁)