

单位代码: 10025  
学 号: 0603023

分类号: R725  
密 级: 非密

首都医科大学  
Capital Medical University

# 硕士学位论文

儿童抗肌萎缩蛋白基因突变及其临床相关性分析

Genetic and Clinical Characterization of Dystrophinopathies in Children

七年制学生:

徐曼婷

学科专业:

儿科学

指导教师:

方方

导师单位:

首都医科大学附属北京儿童医院

完成日期:

二〇一三年五月



## 首都医科大学 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名：  日期：2013年5月29日

导师签名：  日期：2013年5月30日

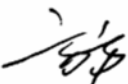
## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权首都医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于（请在以下相应方框内打“√”）：

- 1、保密□，在\_\_年解密后适用本授权书。
- 2、不保密□。

作者签名：  日期：2013年5月29日

导师签名：  日期：2013年5月30日

## 目 录

中文摘要 .....	1
英文摘要 .....	4
正文 .....	7
1.1.前 言 .....	7
1.2.资料和方法 .....	9
2.1.研究对象 .....	9
2.2.研究方法及内容 .....	9
1.3.结 果 .....	17
3.1. Dystrophin 基因突变分析 .....	17
3.2. 临床资料 .....	23
3.3. Dystrophin 基因型与临床表现型相关性: .....	33
1.4.讨 论 .....	36
4.1. Dystrophin 基因突变 .....	36
4.2. 临床特点 .....	38
4.3. 基因型与临床表现型关系 .....	41
1.5.结 论 .....	43
参考文献 .....	44
文献综述 .....	47
7.1.临床特点 .....	47
7.2.基因诊断 .....	50
7.3.呼吸管理与评价 .....	57
参考文献: .....	66
附录 1. ....	75
致 谢 .....	80
个人简历 .....	81

## 儿童抗肌萎缩蛋白基因突变特点及其与临床相关性分析

### 摘要

#### 目的:

通过对抗肌萎缩蛋白 (Dystrophin) 相关病进行 Dystrophin 基因突变检测, 了解本病基因突变特点; 总结本病临床特征, 并对确诊患儿进行心肺功能及多导睡眠监测等, 进行肺功能及睡眠相关呼吸问题评估。探讨临床表型与基因型关系。

#### 方法:

1、对 2011 年 1 月-2013 年 4 月首都医科大学附属北京儿童医院神经内科门诊疑似 Dystrophin 相关病者, 从外周血白细胞中提取基因组 DNA, 首先采用多重连接依赖探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA), 对 Dystrophin 基因缺失/重复突变进行检测; 检测阴性者, 对 Dystrophin 基因 5'UTR, 编码外显子序列以及外显子/内含子连接序列行 PCR 扩增, 所得产物行直接测序。

2、对确诊患儿进一步采集临床资料, 包括人口学信息、临床表现、体格检查及血清 CK 水平、智力测定、心电图及心脏彩超结果等。对 3-5 岁患儿行脉冲震荡肺功能检查 (impulse oscillometry, IOS)、6 岁以上应用最大呼气流量-容积曲线 (maximal expiratory flow-volume curve, MEFV) 法进行检查, 并行多导睡眠监测进行肺功能及睡眠相关呼吸问题评估。

3、总结本病临床特征, 比较缺失/重复中整码突变与移码突变的临床特征; 比较不同智力水平与 Dystrophin 蛋白亚型的关系。

#### 结果:

1、Dystrophin 基因突变分析: 共 123 例临床疑诊患儿, 120 例存在基因突变, 检出率 97.56%。拷贝数异常 75.00%, 其中外显子缺失突变 60.83%, 热点缺失 55.83%, 非热点缺失 5%; 外显子重复突变 14.17%, 热点重复 6.67%、非热点重复

占 7.5%；拷贝数异常 90 例中，移码突变 87.78%，整码突变 10.00%。其余 2 例分别为启动子区+外显子 1 缺失和 49-79 外显子缺失。致病点突变占 18.33%，其中无义突变为 46.67%、移码突变为 16.67%、剪切突变为 10.00%。此外，有 8 例为无确切致病性的错义突变。

## 2、Dystrophin 相关病临床特征：

确诊 Dystrophin 相关病 112 例。

①症状与体征：主要以双下肢无力、发现 CK 升高及发育落后就诊，所占比例分别为 65.14%、25.69%、及 9.17%；独坐、独走、跑、跳能力发育落后分别为 0.9%、22.94%、73.39%和 55.05%；38 例出现运动能力倒退，所占比例 6 岁以上为 64.41%，10 岁以上占 100%。本组共 66 例完成体检，其中鸭步步态、Gower's 征及腓肠肌肥大所占比例分别为 68.18%、89.39%和 90.91%；上肢肌力好于下肢 ( $p < 0.001$ )。

②血清 CK 水平：CK 在 2881-31150IU/L 之间，比较  $\leq 4$  岁组、5-8 岁组、 $\geq 9$  岁组 CK 水平：5-8 岁组最高， $\geq 9$  岁组最低。

③11 例患儿（6-12 岁）行 MEFV 检查，13 例患儿（4-12 岁）行 IOS 检查，患儿在病程早期，肺功能正常。

④多导睡眠监测：22 例患儿行 PSG 检查，符合阻塞性睡眠呼吸暂停/低通气综合征患儿占 22.73%，轻-中度睡眠低氧血症患儿占 40.91%。

⑤智力情况：18 例行 C\_WISC 智力测查或 Gesell 发育检查，88.89%存在不同程度的落后。

## 3. 临床表型与基因型关系：

①整码突变与移码突变：两组患儿跑、跳年龄差异有显著性；运动能力倒退情况比较，移码突变组出现能力倒退占 42.11%，出现倒退中位年龄 7 岁，整码突变组均未出现运动能力倒退；两组主要就诊原因、就诊年龄及 CK 水平方面差异有统计学意义。

②智力与蛋白亚型关系：Dp140 未受累组发育优于 Dp140 受累组，而 Dp140UTR 受累组智力受损/发育迟滞程度较 Dp140pc 受累组轻微。

**结论:**

- 1、Dystrophin 基因突变特征: 拷贝数异常为主, 呈非均匀分布; 点突变并不少见; 应首先行 MLPA, 结果阴性者有必要行直接测序。
- 2、Dystrophin 相关病 (DMD/BMD) 临床特点: 大部分 2-5 岁前起病, 主要表现为双下肢无力、大运动发育落后, Gower' s 征及腓肠肌肥大, 6 岁后渐出现运动倒退。所有患儿 CK 升高, 部分患儿存智力受损。
- 3、大部分患儿心肺功能在 10 岁前正常, 无需定期监测。10 岁前患儿睡眠相关呼吸问题以阻塞性改变为主, 建议定期监测 PSG 情况。
- 4、大部分患儿基因型与表现型符合阅读框法则, 智力受损与 Dp140 蛋白亚型有关。

**关键词:**

Dystrophin 相关病

儿童

Dystrophin 基因突变

基因型与临床关系

# Genetic and Clinical Characterization of Dystrophinopathies in Children

## Abstract

### OBJECTIVES:

To analyze the genetic and clinical features of patients with dystrophinopathies in Beijing Children's Hospital , and to improve the diagnosis and management of the disease.

### METHODS::

1. Genomic DNA was extracted using standard procedures from the peripheral blood leukocytes of clinical diagnosed patients collected from the outpatient department of our hospital between 2011.1-2013.4. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) as well as direct DNA sequencing were applied to detect mutations of dystrophin gene.
2. Clinical manifestations, physical examinations and the result of laboratory examinations, including serum concentration of CK, cardio-pulmonary function test and intelligence quotient(IQ) were collected from patients diagnosed on molecular level.
3. Clinical features were compared between patients with in-frame or out-of-frame mutation. While the correlations of mental impairment and Dp140, which was one of the seven isoforms of dystrophin, were analysed.

### RESULT:

1. Mutations of dystrophin gene:

Mutations of dystrophin gene were detected in 120 out of the 123 clinical diagnosed patients(97.56%). Large rearrangements, representing 75.00% were consisted of 73 large deletions and 17 large duplications of one or more exons representing 60.83% and 14.17%, respectively. Deletions located in the hot spot represent up to 55.83% of the identified deletions, while those affecting exclusively regions outside the two

deletional hot spots represent only 5%. Duplications of one or more exons localized in the proximal hot spot were accounted for 6.67%, while others(7.5%) located in the exclusively regions. Among the 90 cases of large rearrangements, out-of-frame mutations and in-frame mutations accounted for 87.78% and 10.00%. Another two were deletions lying in the promoter of Dp427 and exon 1, and exons 49-79. Pathogenic point mutations representing 18.33% of all mutations, were consisted of nonsense mutations(46.67%), frameshift(16.67%), splice site mutations(10.00%). While there were still eight cases with missense mutations yet considered as not pathogenic.

## 2. Clinical features:

①Symptoms and physical signs: The first symptoms identified are lower limbs weakness, asymptomatic increase in serum concentration of creatine phosphokinase (CK), accounted for 65.14% and 25.69%, respectively. Patients with delay in running or jumping could be found in 73.39% or 55.05% of affected children, respectively. 66 patients were cooperated and completed the physical examinations: flat-footedness(68.18%), Gower's manoeuvre(89.39%), calf hypertrophy(90.91%) could be seen in most of the patients. Progressive symmetric muscle weakness was more severe in lower limbs than in upper limbs.

②Serum concentration of CK: The levels of serum CK rang from 288IU/L to 31150IU/L. Patients, 5-8 years old, had the highest CK level.

③Lung functions: Correlation analysis showed lung function of the patients improved normally before 10 years old.

④Polysomnography (PSG): 22 patients progressed PSG of which 5(22.73%) were diagnosed as obstructive sleep apnoea(OSA) (mean age:  $87.40 \pm 2.41$  years) and 9 (40.91%) had some degree of hypoxemia(mean age:  $7.22 \pm 1.99$  years).

⑤Cognitive impairment: 18 cases were evaluated by Chinese Wechsler Intelligence Scale for Children(C-WISC) or Gesell Developmental Scales. The frequency of intellectual disability in this group was 88.89%.

## Phenotype-Genotype analysis

①The reading-frame rule: Patients with out-of-frame mutations have got much



severer milestones delay, including delays in running and jumping independently, and gross motor functions of out-of-frame cases decreased earlier, comparing to the cases with in-frame mutations. What's more, serum concentration of CK is much more higher in cases with out-of-frame mutations.

② Cognitive impairment and Dp140: Patients with mutations involving Dp140 isoform tend to have lower intelligence quotients than without. While cases with mutations involving coding region of the Dp140 isoform often have severer cognitive impairment.

#### **CONCLUSION:**

1. Dystrophin gene mutation: Mostly large rearrangements, deletions mainly occurs between exons 45-54, while duplications mostly at 5'-terminus. Point mutations also quite common. MLPA and direct DNA sequencing can detect mutations of dystrophin gene effectively.
2. Clinical features were symmetrical muscular weakness with typical signs of flat-footedness, Gower's manoeuvre and calf hypertrophy.
3. Cardio-pulmonary functions were normal before 10 years old. While sleep related breathing disorders were mainly OSA in the first decade.
4. The reading-frame rule can be used in most cases, while cognitive impairment tend to have some relationship with Dp140 isoform.

#### **KEY WORDS:**

Dystrophinopathies  
Children  
Dystrophin gene mutation  
Phenotype-Genotype

## 儿童抗肌萎缩蛋白基因突变特点及其与临床相关性分析

### 第一章 前言

抗肌萎缩蛋白 (Dystrophin) 相关病是因位于 Xp21 的 Dystrophin 基因突变导致的一组疾病<sup>[1]</sup>。本病为 X 连锁隐性遗传, 通常男孩发病, 女孩为致病突变携带者。其中杜氏肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 为最严重类型, DMD 是儿童常见致死性神经肌肉病, 在活产男婴中发病率约 1/3500<sup>[2]</sup>, 主要临床表现为以近端为主、对称性的肌无力和肌萎缩, 伴腓肠肌肥大、Gower's 征等典型体征, 血清磷酸肌酸激酶 (creatinine phosphokinase, CK) 显著升高。患儿通常 5 岁前起病, 进行性加重, 12-13 岁前丧失行走能力, 20 岁左右死于心肺功能并发症<sup>[2]</sup>。其中呼吸并发症普遍存在, 进行性加重, 为 DMD 患者首要死因<sup>[3]</sup>。中间型肌营养不良 (Intermediate Muscular Dystrophy, IMD) 及贝克型肌营养不良 (Becker muscular dystrophy, BMD) 均起病较晚, 临床特征与 DMD 相似但进展缓慢, IMD 患儿丧失行走能力时间为 13-16 岁, BMD 患儿病情变化多样, 16 岁后丧失行走能力, 部分 BMD 患儿在起病 15-20 年后仍可行走, 寿命接近正常人<sup>[4]</sup>。此类疾病还包括以心肌受累为首发症状的 Dystrophin 基因相关扩张性心肌病<sup>[1]</sup>, 在本文中不包括。

本病确诊须检测到 Dystrophin 基因致病突变, 或肌肉组织经免疫组织化学检查/蛋白印记分析发现蛋白水平异常<sup>[5]</sup>。Dystrophin 基因由 79 个外显子、78 个内含子和 7 个组织特异性启动子组成, 存在多种转录拼接类型<sup>[6]</sup>。编码的 Dystrophin 蛋白, 包括 3 种全长型蛋白异构体及 4 种较短形式<sup>[7, 8]</sup>。Dystrophin 蛋白参与形成 Dystrophin 糖蛋白复合体 (Dystrophin-associated glycoprotein complex, DGC), 在细胞外基质和细胞骨架间起结构支持及细胞信号转导作用<sup>[8]</sup>。致病基因突变使 Dystrophin 蛋白完全或部分缺失, 进而使骨骼肌、心肌、平滑肌以及脑中的膜骨架蛋白缺乏<sup>[8]</sup>。

由于肌肉活检为创伤性检查，近年依靠病理诊断本病的比例逐渐下降，而基因诊断逐渐成为首选<sup>[9]</sup>。目前用于检测基因拷贝数异常的多重连接依赖探针扩增技术（multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA）应用较广。对基因拷贝数无异常者，应进一步通过基因测序等方法寻找点突变。检测到明确致病基因突变，即可在分子生物学水平确诊 Dystrophin 相关病，但因仍有 2% 复杂基因重组，及内含子序列变异，无法经 DNA 测序技术检测到，这部分病人需骨骼肌活检，通过免疫组织化学或蛋白印迹检测了解 Dystrophin 蛋白改变情况<sup>[5]</sup>。

本研究对临床疑诊 Dystrophin 相关病者，首先，应用 MLPA 技术检测 Dystrophin 基因缺失/重复突变，对阴性者采用直接测序技术检测基因点突变，分析 Dystrophin 基因突变特点。对确诊病例临床特点进行总结，行智力、心肺功能评估，并进一步比较智力与 Dystrophin 蛋白亚型关系，以及基因型与临床关联性。

## 第二章 资料和方法

### 2.1. 研究对象

对 2011 年 1 月-2013 年 4 月就诊首都医科大学附属北京儿童医院神经内科门诊, 临床疑似 Dystrophin 相关病者, 行血清 CK 检查, 10 倍以上增高者, 进行 Dystrophin 基因缺失/重复突变及点突变筛查, 对确诊病例纳入研究。

### 2.2. 研究方法及内容

#### 2.2.1. 诊断标准及排除标准:

诊断标准:

临床疑诊 Dystrophin 相关病诊断标准<sup>[1, 10]</sup>: (1) 临床表现包括学步晚、易跌倒, 跑、跳、上楼困难等。(2) 逐渐进展的对称性肢体近端无力, 下肢起病且症状重。双侧腓肠肌假性肥大。不伴肌束颤动和感觉异常。(3) 血磷酸肌酸激酶(CK)水平增高 10 倍以上, 年龄较小患儿可无 (1) (2) 所述症状, 仅血清 CK 显著增高。(4) 若患儿为女孩儿, 且有阳性家族史, 血清 CK 水平可轻度升高 (< 10 倍)。

Dystrophin 相关病确诊标准<sup>[1]</sup>: 通过基因检测找到 Dystrophin 基因致病突变, 或直接通过肌肉病理免疫组织化学/蛋白印迹分析, 发现 Dystrophin 蛋白异常。

排除标准:

未完成基因检查患儿; 基因检测阴性, 未行肌活检的患儿; 肌活检免疫组织化学检查 Dystrophin 蛋白阳性患儿; 临床资料不完整的病例; 家长拒绝入组研究者。

#### 2.2.2. Dystrophin 基因检测

(1) 模板 DNA 提取: 取外周静脉 EDTA 抗凝血 2mL。采用 TIANamp BLOOD DNA Kit (TIANGEN) 试剂盒提取白细胞基因组 DNA 并质检。

(2) MLPA 反应: MLPA 检测应用天昊生物医药科技(苏州)有限公司的 DMD

基因拷贝数检测试剂盒（129 个探针分布见图 2-1），进行 2 次重复检测。首先将 100-200ng 基因组 DNA 98℃ 变性 6min，然后将基因组 DNA 和探针混合物、连接酶混合，在 60℃ 下连接 16 小时，连接反应结束后 94℃ 变性 2min，并立即加入 20ul 20mM 的 EDTA（pH = 8.0），震荡混均。最后行 PCR 扩增，PCR 反应条件为：94℃ 20s 变性，62℃ 40s 退火，退火温度每个循环降低 1℃，72℃ 1.5min 延伸，循环 5 次；94℃ 20s 变性，57℃ 40s 退火，72℃ 1.5min 延伸，循环 27 次。68℃ 1h 保证加 A 完全。用 ABI3130 Genetic Analyzer 测序仪对扩增产物进行分析，所得数据采用 Gene Mapper ID v3.1 软件进行处理，样本与正常对照相对峰面积对比进行分析。如果只有一个外显子的探针显示存在缺失/重复，对该探针所在外显子进行测序寻找点突变。

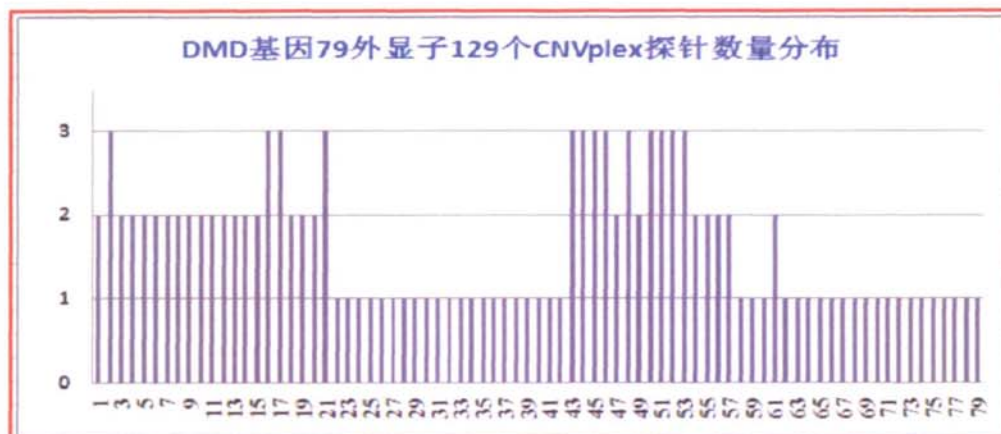


图 2-1. 129 个 MLPA 探针分布图。

(3) Sanger 测序法: 如果没有检测到外显子缺失/重复, 对 Dystrophin 基因 5'UTR, 编码外显子序列以及外显子/内含子连接序列行 PCR 扩增 (引物见附表 1), 所得产物行 Sanger 测序, 结果与 Dystrophin 基因标准序列 (NM\_004006.2) 进行比对。

(4) 所有突变均应用寡核苷酸多态性数据库 (database of single nucleotide polymorphism, dbSNP) (<http://genome.ucsc.edu>) 和 Dystrophin 基因数据库 ([www.umd.be/DMD/W\\_DMD/index.html](http://www.umd.be/DMD/W_DMD/index.html)) 进行验证。通过 [www.dmd.nl](http://www.dmd.nl) 查阅患

儿突变类型对基因阅读框架的影响（整码突变/移码突变）（图 2-2）。



图 2-2. Dystrophin 基因 79 个外显子形状。

### 2.2.3. 资料收集:

对每一例确诊患儿建立临床数据库，内容包括①一般情况：姓名、性别、出生日期、民族、就诊年龄及家族史；②临床表现：记录患儿发育里程碑、临床表现包括学步晚、易跌倒，跑、跳、上楼困难等。体格检查包括肌力、腱反射、Gower's 征及腓肠肌假性肥大；③记录血清磷酸肌酸激酶（CK）水平（血清 CK 正常值上限为 200IU/L）。

生长发育情况根据实用儿科学 7 版定义<sup>[11]</sup>：10 个月不能独坐，18 个月不能独走，24 个月不跑，36 个月不能双脚跳，提示发育异常。

肌力评价采用略作调整的英国医学研究理事会（Medical Research Council, MRC）制定的肌力评定表，计算患儿肌力得分<sup>[12]</sup>（表 2-1）。

表 2-1. 患儿肌力评定表

肌力	描述	得分
V	正常肌力	10
V-	仅存轻微减弱, 不易察觉	9
IV+	能做对抗阻力的活动, 但较 IV 级略有力	8
IV	能做对抗阻力的活动, 但较正常差	7
IV-	能做对抗阻力的活动, 但较 IV 级略差	6
III+	能短暂时间对抗阻力, 对抗重力运动完全	5
III	不能对抗阻力, 抗重力运动幅度完全	4
III-	不能对抗阻力, 抗重力运动幅度不完全	3
II	肌肉收缩可引起关节活动, 但不能对抗地心引力, 肢体不能抬离床面	2
I	肌肉可轻微收缩, 但不能活动关节, 仅在触摸肌肉时感觉到	1
0	肌肉无任何收缩现象 (完全瘫痪)	0

比较发育正常、发育落后患儿出现退步年龄有无差异: 将出现运动能力倒退的患儿分为: 独走、会跑、会跳发育正常及落后组, 应用秩和检验, 分别比较 2 组患儿出现倒退的年龄有无显著差异。

通过秩和检验比较患儿上下肢肌力间是否存在差异。

比较不同年龄组患儿血清 CK 水平差异: 按年龄将患儿分为三组,  $\leq 4$  岁组, 5-8 岁组,  $\geq 9$  岁组。将三组中患儿 CK 值取以 10 为底的对数, 均符合正态分布并具有方差齐性。应用 F 检验比较三组 CK 对数值差异有无显著性, 并应用 LSD-t 检验对三组进行两两比较。

#### 2.2.4. 心脏功能检查

采用日本光电塞维亚牌十二导联心电图机, 对确诊患儿行标准十二导联心电图检查。采用飞利浦公司 Sonos5500 彩色多普勒超声心动诊断仪, 对患儿心脏结构、心脏收缩功能进行探查。

#### 2.2.5. 肺功能检查:

对能够配合患儿，应用德国 JAEGER 公司 Master Screen 肺功能仪对患儿行肺功能检查。3-5 岁患儿行脉冲震荡肺功能检查（Impulse Oscillometry, IOS），6 岁以上患儿应用最大呼气流量-容积曲线（Maximal Expiratory Flow-Volume Curve, MEFV）法进行检查。由专门的肺功能检查工作人员进行操作，并做出分析结果。

IOS 测定指标包括:5Hz 时粘性阻力(R5)、20Hz 时粘性阻力(R20)、5Hz 时电抗值(X5)、中心阻力结构参数(Rc)、周边阻力结构参数(Rp)。MEFV 测定指标包括:深吸气量 (IC)、用力肺活量(FVC)、残气容积 (ERV)、第 1 秒用力呼气容积 (FEV1)、第 1 秒用力呼气容积占用力肺活量百分比(FEV1/FVC)、最大用力呼气峰流量(PEF) ,25%、50%、75%肺活量时最大用力呼气流量( FEF25、FEF50、FEF75) 、最大呼气中段流量(MMEF)。

分析不同肺功能指标与年龄的相关性：应用线性相关，统计本组患儿肺功能指标 VCmax、FVC、FEV1、PEF、FEV1/FVC、MMEF、R5、R20、X5、Rc、Rp 与年龄相关性。

#### 2.2.6. 多导睡眠监测检查（Polysomnography, PSG）:

应用飞利浦伟康 Alice 5 多导睡眠仪行整夜 PSG 监测。睡眠监测导联包括脑电(4 导，分别为两导中央部导联和枕部导联)、眼电、下颌肌电、鼻气流、胸部运动、腹部运动、腿动、血氧饱和度等。由睡眠中心工作人员对睡眠分期和呼吸事件进行判定，并做出分析结果。

睡眠分期使用国际通用的 R&K 睡眠分期标准。睡眠事件的判断按照美国胸科学会制定的儿童睡眠呼吸障碍标准进行判读。最低血氧饱和度（lowest oxygen saturation, L<sub>SaO<sub>2</sub></sub>）低于 92% 定义为低氧血症，阻塞性睡眠呼吸暂停（obstructive sleep apnea, OSA）指睡眠时口和鼻气流停止，但胸、腹式呼吸仍存在。中枢性睡眠呼吸暂停（central sleep apnea, CSA）指口鼻气流停止，胸、腹呼吸亦停止。混合性睡眠呼吸暂停（mixed sleep apnea, MSA）：指口鼻气流停止期间，首先出现中枢性成分，然后在口鼻气流恢复之前出现胸腹运动。低通气（hypopnea）指口鼻气流幅度较基线降低 50% 以上，并伴有 3% 以上血氧饱和度下降和（或）



觉醒。

呼吸暂停和低通气事件持续大于或等于 2 个呼吸周期定义为一次呼吸事件。根据中华医学会耳鼻咽喉科分会制定的儿童阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊疗指南草案(乌鲁木齐),以呼吸暂停/低通气指数 (apnea hypopnea index, AHI) >5 次/小时或 OAI>1 次/小时为异常,判断患儿是否存在阻塞性睡眠呼吸暂停/低通气综合征 (obstructive sleep apnea hypopnea syndrom, OSAHS)。低氧血症具体分度:LSaO<sub>2</sub> 85.0-91.0% (轻度)、75-84% (中度)、<75.0% (重度)。

使用 Compumedics 公司分析软件 ProFusion 2 对患儿各种睡眠呼吸暂停、低通气,以及血氧饱和度情况等进行分析。

通过多个独立样本比较的秩和检验比较 OSA、CSA、MSA 在患儿呼吸暂停事件中所占比例是否存在差异。

#### 2.2.7. 智力测查:

年龄<6 岁患儿应用 Gesell 儿童发育量表行发育情况评价;年龄≥6 岁患儿应用中国修订韦氏儿童智力量表 (Chinese Wechsler Intelligence Scale for Children, C\_WISC) 行智力测查,并行社会生活适应性评定及注意力测查。Gesell 儿童发育量表检查指标:综合发育商 (development quotients, DQ)、适应性 DQ、大运动 DQ、精细动作 DQ、语言 DQ、个人-社交 DQ。C\_WISC 检查指标包括:智商 (full intelligence quotient,FIQ)、言语智商 (verbal intelligence quotients, VIQ)、操作智商 (performance intelligence quotients, PIQ)。

比较患儿智力发育是否平衡:应用 t 检验比较 PIQ 与 VIQ 差异,应用 F 检验比较大运动、精细运动、言语 DQ 间有无差异,进一步经 LSD-t 检验行两两比较。

#### 2.2.8. Dystrophin 基因突变与临床相关性分析

(1) 分析基因型与临床的相关性:按基因突变对阅读框的影响情况,将缺失和重复突变患儿分为整码突变和移码突变组,比较两组患儿年龄是否具有可比性:

发育情况比较:通过秩和检验比较两组患儿在独坐、独走、会跑及双脚跳的年龄方面有无差异。

运动能力退步情况比较：通过 Fisher 精确检验比较两组患儿出现运动能力倒退的比例有无差异。

症状及年龄比较：通过 Fisher 精确检验比较两组中因无症状 CK 升高就诊患儿比例有无差异。分别通过 t 检验比较两组中，因 CK 升高、及典型症状就诊患儿就诊年龄有无差异。

血清 CK 水平：通过 t 检验比较两组患儿血清 CK 值有无差异。

(2) 智力情况及其与 Dp140 蛋白亚型关系（如图 2-3）：

根据 Dp140 亚型是否受累将患儿分为两组：(1) Dp140 未受累组，突变累及 1-43 外显子；(2) Dp140 受累组，突变累及 45-79 外显子。应用 t 检验比较两组患儿智力情况。累及 44 外显子的突变，Dp140 亚型是否受累不详，暂不入组。

根据 DP140 亚型受累区域将 Dp140 受累组进一步分为两组：(1) Dp140UTR 区受累组，突变累及 46-50 外显子及 51 号外显子上 c.7381 位点 5'端；(2) Dp140 编码区 (Dp140pc) 受累组，突变累及 51 号外显子 c.7381 位点至 79 外显子区域。应用 t 检验比较 Dp140UTR 组与 Dp140pc 组综合 DQ 有无差异。累及 45 外显子的突变，Dp140 亚型突变具体情况不详，暂不入组。

#### 2.2.9. 统计学处理：

采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,假设检验均以  $\alpha=0.05$  为检验标准。计量资料符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,不符合正态分布以中位数及四分位数表示。计数资料用例数、百分数表示。两组计量资料差异性比较,符合正态分布应用 t 检验,不符合正态分布应用秩和检验。三组计量资料差异性比较,经正态分布及方差齐性检验,应用方差分析,进一步行两两比较采用 LSD-t 检验,不符合正态分布采用多个独立样本比较的秩和检验。组间率的比较采用 Fisher 精确检验。相关性研究一元线性相关分析。

#### 2.2.10. 知情同意

本研究前充分与家长和患者沟通,详细说明研究目的和检查流程,在检查前由监护人签署知情同意书。

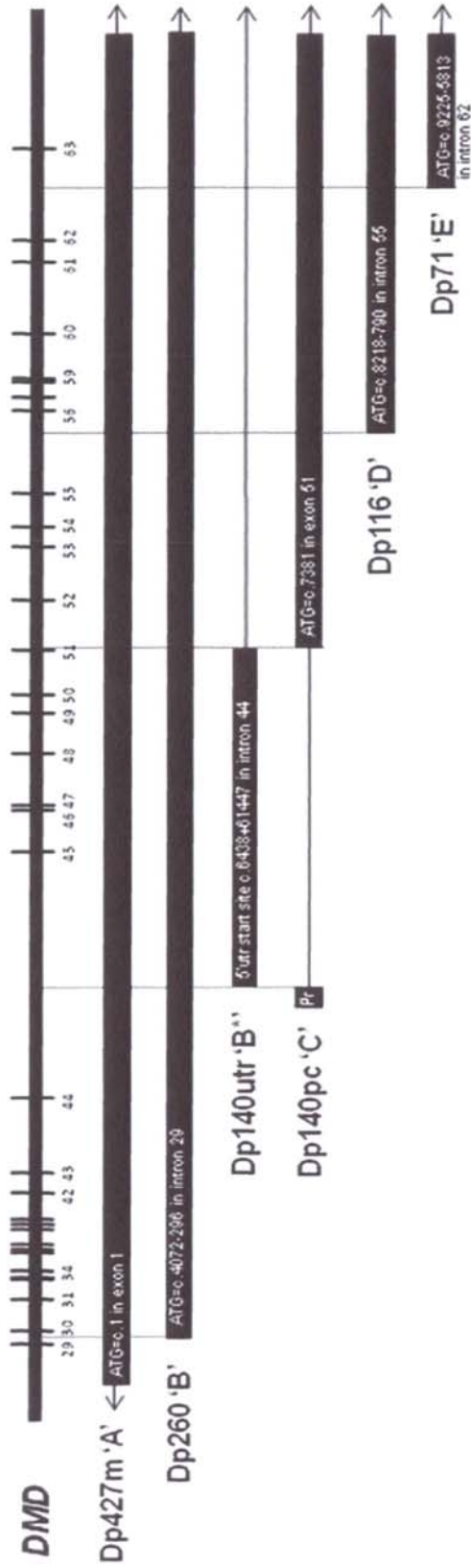


图 2-3. 不同 Dystrophin 蛋白亚型的基因编码区域

## 第三章 结果

### 3.1. Dystrophin 基因突变分析

共 123 例临床疑诊患儿, 行 Dystrophin 基因突变检测, 年龄 0.75-12 岁 ( $5.75 \pm 2.66$ ), 其中男性 117 例, 女性 6 例。检出基因突变 120 例, 检出率为 97.56%。拷贝数异常者 90 例, 占 75.00%, 其中外显子缺失突变 73 例, 占 60.83% (73/120), 热点缺失 67 例, 占 55.83% (67/120), 非热点缺失 6 例, 占 5% (6/120); 外显子重复突变 17 例, 占 14.17% (17/120), 其中热点重复 8 例, 占 6.67% (8/120)、非热点重复 9 例, 占 7.5% (9/120); 点突变 30 例, 占 25.00% (30/120)。120 例不同突变类型所占比例如图 3-1 所示。

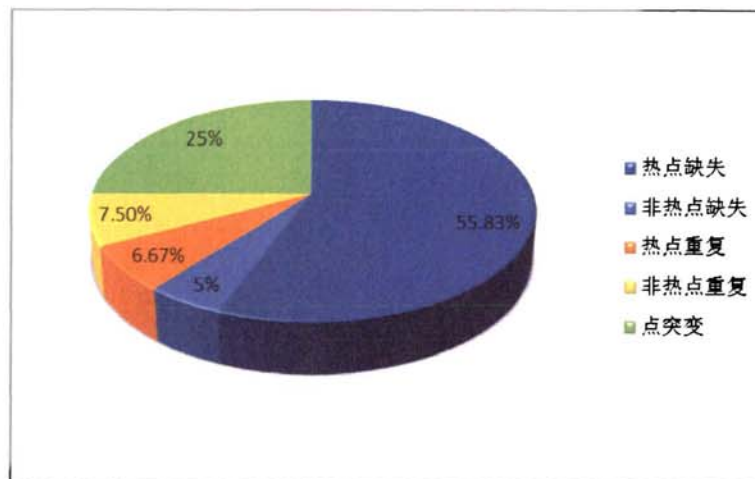


图 3-1. 120 例患儿基因突变类型分布

#### 3.1.1. 外显子拷贝数异常 (缺失/重复)

通过 MLPA 方法, 检测到外显子拷贝数异常 90 例, 具体类型及例数见表 3-1, 突变片段分布情况见图 3-2, 缺失、重复患儿应用 MLPA 探针扩增后, 经毛细管电泳分离的峰型图见图 3-3:

外显子缺失: 73 例, 占 81.11% (73/90)。位于远端热点区带 (外显子 45-55)

65 例（其中包含 3 例女性携带者），占 89.04%（65/73），近端热点区带（外显子 2-20）2 例，非热点区带 6 例。外显子 45 缺失为最常见类型，共 6 例，占 8.2%（6/73），其次为外显子 51 缺失，共 5 例，占 6.85%（5/73）。

外显子重复：17 例，占 18.89（17/90），存近端热点区突变 8 例，占 47.06%（8/17）。17 例患儿中，仅外显子 44 重复出现 2 次，余均仅出现 1 次。

拷贝数异常突变类型：90 例患儿中，移码突变 79 例（包含 3 例女性携带者），占 87.78%（79/90），整码突变 9 例，占 10.00%（9/90）。其余 2 例分别为启动子区+外显子 1 缺失和 49-79 外显子缺失。

表 3-1.90 例 缺失和重复患儿基因突变类型及例数统计

缺失突变				重复突变	
突变类型	例数	突变类型	例数	突变类型	例数
E45	6	E44-47	1	E44	2
E51	5	E45-46	1	E1-2	1
E52	4	E45-49	1	E2	1
E53	4	E45-56	1	E2-17	1
E45-50	3	E46-47	1	E2-30	1
E45-52	3	E46-49	1	E3-30	1
E45-54	3	E46-51	1	E8-11	1
E46-48	3	E46-55	1	E8-41	1
E48-50	3	E47-51	1	E13-44	1
E50	3	E48-51	1	E14-17	1
E44	2	E48	1	E14-19	1
E46-50	2	E49-54	1	E22-27	1
E48-52	2	E49-79	1	E42-43	1
E48-54	2	E53-54	1	E45	1
E49-50	2	E53-55	1	E45-67	1
E49-52	2	E55	1	E63-67	1
E51-54	2	E64-67	1		
E03-30	1	E68-71	1		
E12	1	Dp427-E01	1		
E43-52	1				

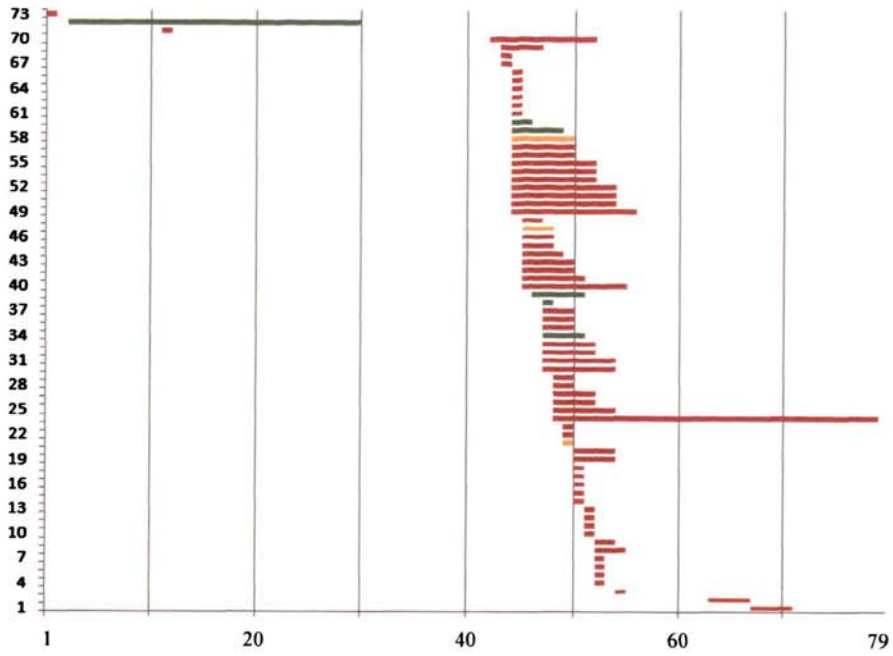


图 3-2A. 73 例患儿外显子缺失片段分布。

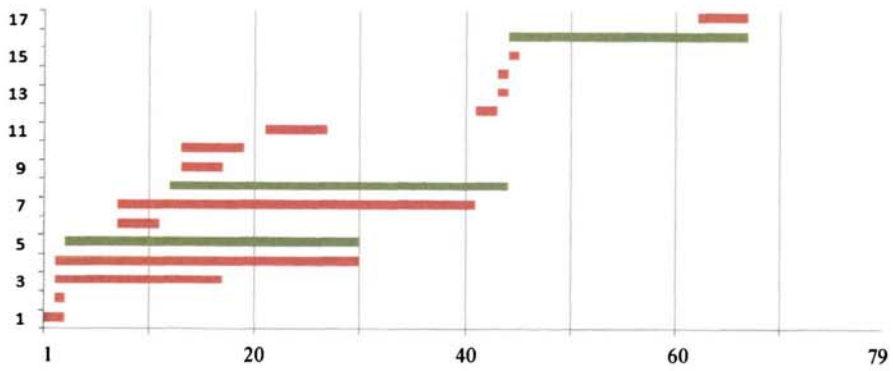


图 3-2B. 17 例患儿外显子重复片段分布。

图 3-2. 图中横轴代表 1-79 外显子，图中条带为患儿缺失/重复片段位置。绿色条带代表整码突变。其余均为移码突变患儿，橙色代表女性携带者。红色为男性患儿。

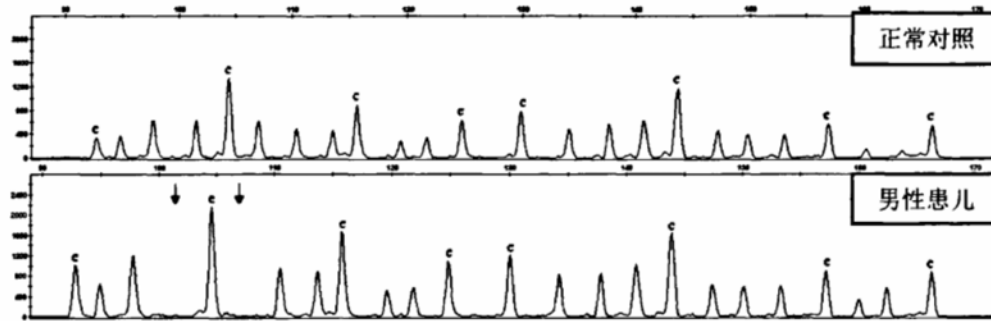


图 3-3A. 外显子 55 缺失, 箭头表示与 55 外显子杂交的 2 个探针峰型缺失。

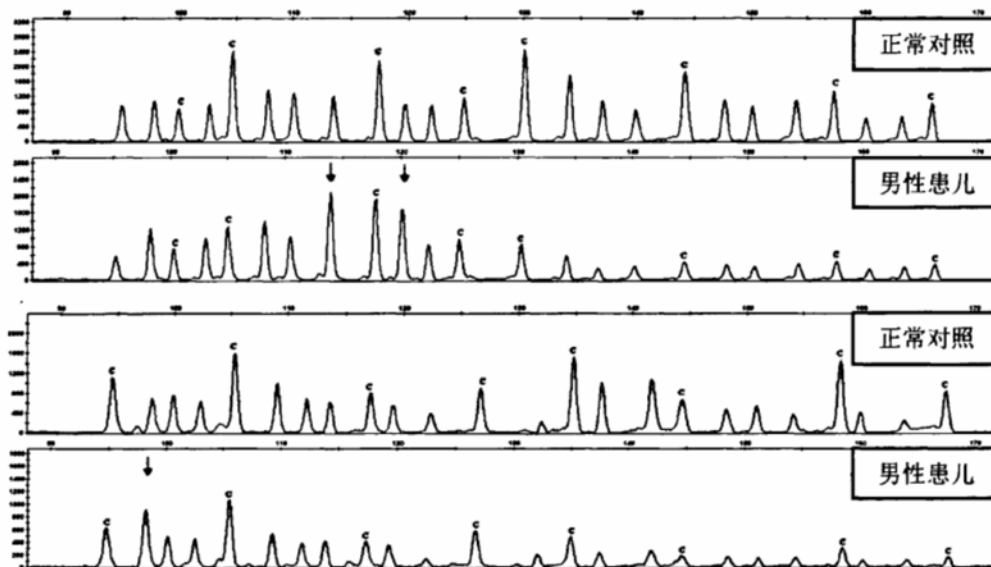


图 3.3B. 外显子 45 重复, 箭头表示与 45 外显子杂交的 3 个探针峰型异常增高。

图 3-3. 上图为 MLPA 探针扩增后, 经毛细管电泳产生的峰图。图中纵轴代表探针信号强度, 横轴代表探针片段大小。图中标注的 C 是指参照探针峰。

### 3.1.2. 点突变

点突变 30 例, 占 25% (30/120), 致病点突变 22 例, 占 18.33% (22/120) (表 3-2, 图 3-4, 3-5)。

①无义突变: 14 例, 占 46.67% (14/30), 除 1 例为碱基颠换 (c.853G>T), 其余均为 C>T 转换。70 外显子内无义突变最常见, 共 4 例, 占 28.57% (4/14),

分别为 c.10141C>T (3 次), c.10108C>T (1 次)。

②移码突变: 5 例占 16.67% (5/30), 其中微缺失 3 例 (累及碱基 1-2 个), 单个碱基插入 1 例, 单个碱基重复 1 例。

③剪切突变: 3 例占 10.00% (3/30), 3 例剪切突变均发生在内含子 5'端的 GT、3'端的 AG 2 个高度保守序列位置。

④错义突变: 8 例占 26.67% (8/30), 涉及突变点: c.2645A>G, c.5234G>A, c.8729A>T, c.8734A>G, c.8810G>A。

通过测序发现的 8 例错义突变, 已证实均为较常见单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) (表 3-3)。其中 4 例完善肌活检免疫组织化学检查, 结果示 Dystrophin 蛋白染色均为阳性, 除外 Dystrophin 相关病。

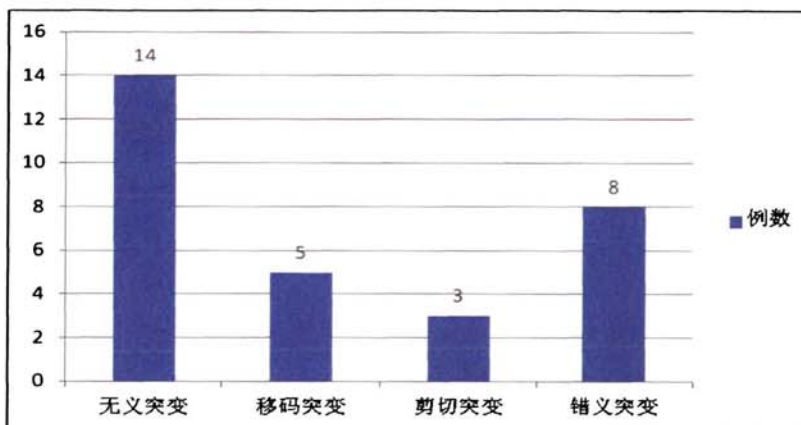


图 3-4. 不同点突变类型及例数。



表 3-2. 22 例致病点突变

无义突变			移码突变			剪切突变	
外显子	突变位点	例数	外显子	突变位点	例数	突变位点	例数
70	c.10141C>T,p.R3381X	3	52	c.7576delC, p.Q2526SfsX11	1	IVS63+1G>A	1
70	c.10108C>T,p.R3370X	1	63	c.9253delCA,p.H3085SfsX11	1	IVS67-1G>T	1
59	c.8713C>T,p.R2905X	2	67	c.9685del,p.C3229VfsX53	1	IVS69-2A>G	1
59	c.8818C>T,p.Q2940X	1	71	c.10231insA,p.T3411NfsX21	1		
09	c.853G>T,p.G285X	1	72	c.10297dupA,p.T3433NfsX5	1		
10	c.1093C>T,p.Q365X	1					
14	c.1663C>T,p.Q555X	1					
21	c.2650C>, p.Q884X	1					
37	c.5209C>T,p.Q1737X	1					
58	c.8608C>T,p.R2870X	1					
66	c.9568C>T,p.R3190X	1					

表 3-3. 8 例错义突变涉及突变点及其在 dbSNP 中编码

所在外显子	错义突变位点	SNP 编码
E21	c.2645A>G p.Asp882Gly	rs228406
E37	c.5234G>A p.Arg1745His	rs1801187
E59	c.8729A>T p.Glu2910Val	rs41305353
E59	c.8734A>G p.Asn2912Asp	rs1800278
E59	c.8810G>A p.Arg2937Gln	rs1800280

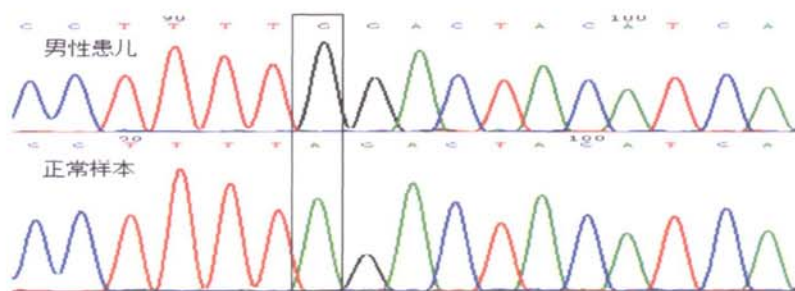


图 3-5A. 内含子 69 与外显子 70 剪接点上的剪切突变 (IVS69-2A&gt;G splicing mutation)

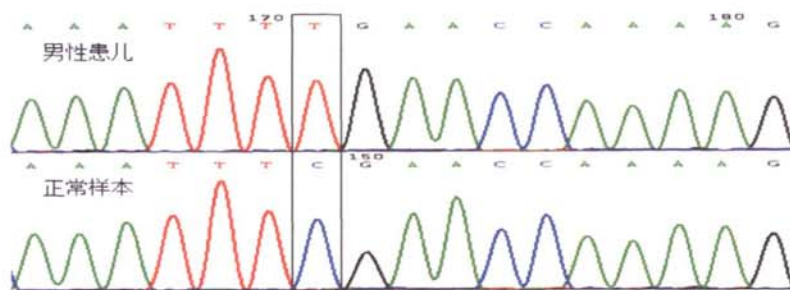


图 3-5B. 外显子 70 无义突变 (c.10141C>T,p.R3381X)

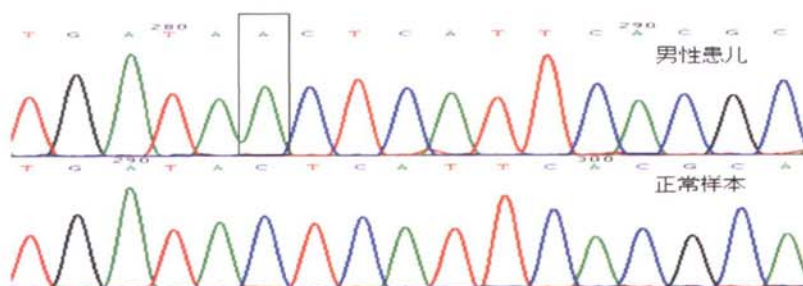


图 3-5C. 外显子 72 移码突变 (c.10297dupA,p.T3433NfsX5)

图 3-5. 不同类型点突变一代测序图。

## 3.2. 临床资料

### 3.2.1. 一般情况:

共 123 例疑似患者，确诊 Dystrophin 相关病 112 例。其中男性患儿 109 例，患儿首次就诊年龄 9 个月-8 岁 (4.2±1.45)。其中，0-1 岁就诊患儿 5 例，占 4.5%，2-5 岁间就诊患儿 84 例，占 77.06%，6 岁后就诊患儿 20 例，占 18.35% (如图 3-6)。此外，发现 3 例女性携带者，年龄 2-4 岁，因 CK 升高或家系筛查就诊，运动发育同正常同龄儿 (表 3-4)。

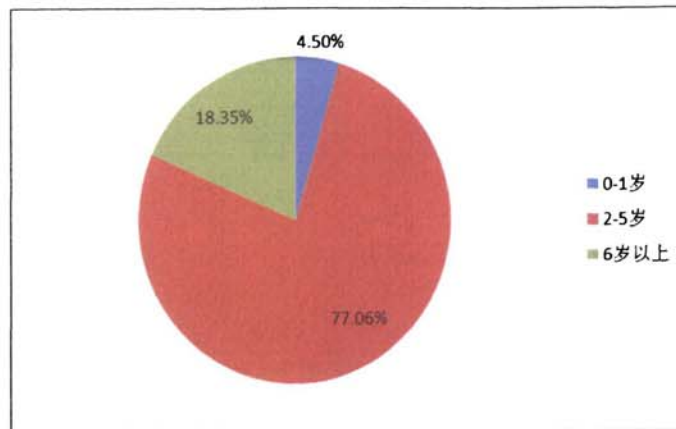


图 3-6. 不同年龄段患儿就诊比例.

表 3-4. 3 例女性携带者临床情况

编号	年龄	基因型	就诊原因	发育	CK (U/L)	家族史
1	4岁	50 杂合缺失	CK 升高	同正常	4837	无
2	3岁	46-48 杂合缺失	家系筛查	同龄儿	轻度升高 (<1000)	弟弟为患者
3	2岁	45-50 杂合性缺失	CK 升高		最高>8000	无

### 3.2.2. 临床表现:

109 例男性患者主要就诊病因及首诊年龄: 双下肢无力 71 例, 占 65.14%; 发现 CK 升高 28 例, 占 25.69%; 发育落后 10 例, 占 9.17%。双下肢无力首诊年龄为 2-8 岁, 平均为  $4.71 \pm 1.12$  岁; CK 升高首次就诊年龄为 9 个月-6 岁, 平均为  $2.94 \pm 1.35$  岁; 发育落后首诊年龄为 2-6 岁, 平均为  $4.20 \pm 1.23$  岁(见表 3-5)。主要就诊原因及年龄和例数分布见图 3-7 所示。

大运动发育情况: 独坐年龄 6 个月-13 个月, 中位年龄 7 个月; 独走年龄 12 个月~24 个月, 中位年龄 18 个月。其中独坐、独走发育落后分别为 1 例和 25 例, 分别占 0.9%和 22.94%; 会跑年龄 14 个月-54 个月, 中位年龄 28 个月; 会跳年龄 18-60 个月, 中位年龄 36 个月。其中跑、跳能力发育落后的分别为 80 例和 60 例, 分别占 73.39%和 55.05% (见表 3-6)。

运动能力倒退情况: 共 38 例, 均于 6 岁以上出现, 占 64.41%, 10 岁后出

现运动能力倒退者占 100% (见表 3-7)。

比较独走、会跑、会跳发育正常及落后组, 出现运动倒退年龄均无显著差异 ( $P_{独走}=0.40$ ,  $P_{会跑}=0.39$ ,  $P_{会跳}=0.54$ )。

体格检查情况: 本组共 66 例患儿完成体检, 体检年龄为 2-12 岁, 平均  $6.16\pm 2.45$  岁。鸭步步态 45 例, 占 68.18%, Gower's 征阳性 59 例, 占 89.39%, 腓肠肌肥大 60 例, 占 90.91%; 膝腱反射减弱 40 例, 占 60.61%、消失 10 例, 占 15.15% (见表 3-8)。上肢肌力 7-10 分, 中位数 9 分, 四分位数 7.75-9 分, 下肢肌力 4-10 分, 中位数 7 分, 四分位数 7-8 分, 比较上下肢肌力差异有显著性 ( $p<0.001$ ), 肌力随年龄变化趋势如图 3-8 所示。

表 3-5. 109 例患者主要就诊原因及年龄分布情况

	下肢无力	体检发现 CK 升高	发育落后
例数	71	28	10
比例	65.14%	25.69%	9.17%
年龄范围 (岁)	2-8	0.75-6	2-6
平均年龄 (岁)	$4.71\pm 1.12$	$2.93\pm 1.25$	$4.20\pm 1.23$

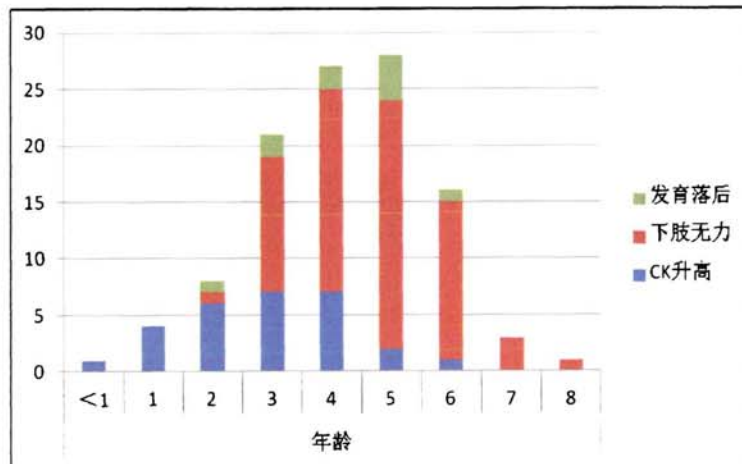


图 3-7. 总峰高为此年龄就诊患儿总例数。不同颜色代表不同就诊原因。

表 3-6. 109 例患者大运动发育情况

独坐	独走	跑	跳
----	----	---	---

年龄(月)	6-13	12-24	14-54	18-60
中位数(月)	7	18	28	36
四分位数(月)	7-8	16-18	24-30	30-40
异常例数	1	25	80	60
异常比例	0.9%	22.94%	73.39%	55.05%

表 3-7.38 例运动能力倒退患儿年龄分布及所占比例。

就诊年龄	≥6 岁	≥7 岁	≥8 岁	≥9 岁	≥10 岁
总例数	59	49	37	16	4
出现退步例数	38	35	26	12	4
出现退步比例	64.41%	71.43%	70.27%	75%	100%

表 3-8. 66 例患儿阳性体征情况。

	鸭步步态	Gower's 征	腓肠肌肥大	膝腱反射减弱	膝腱反射消失
例数	45	59	60	40	10
比例	68.18%	89.39%	90.91%	60.61%	15.15%

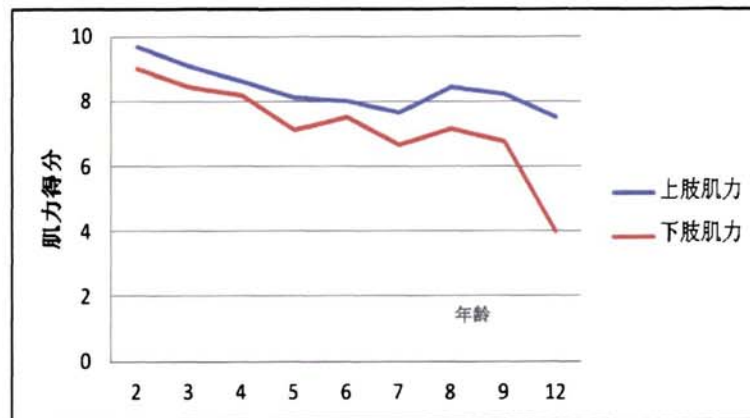


图 3-8. 66 例患儿上、下肢肌力随年龄变化情况

## 3.2.3. 血清磷酸肌酸激酶 (CK) 增高情况:

所有患儿血清 CK 均显著增高。本组患者 CK 为 2881-31150IU/L, CK 中位数为 10224.0IU/L, 四分位数为 7996.0-15338.5IU/L。所有患儿 CK 值均大于正常值 10 倍 (除 1 例女性携带者), 15 例患儿 CK 值大于正常值 100 倍, 占 13.76%, 年龄 3-8 岁 ( $5.93 \pm 1.33$ )。≤4 岁组患儿 CK 对数值为 8.31-10.35 ( $9.20 \pm 0.41$ ), 5-8 岁组患儿 CK 对数值为 8.7-10.29 ( $9.48 \pm 0.41$ ), ≥9 岁组患儿 CK 对数值为 7.97-9.64 ( $8.85 \pm 0.43$ )。比较 3 组 CK 对数值差异有显著性 ( $P < 0.001$ ), 进一步行两两比较, 差异均有统计学意义 ( $P_{1,2} = 0.002$ ,  $P_{1,3} = 0.005$ ,  $P_{2,3} < 0.001$ )。血清 CK 值随年龄变化趋势如图 3-9 所示。

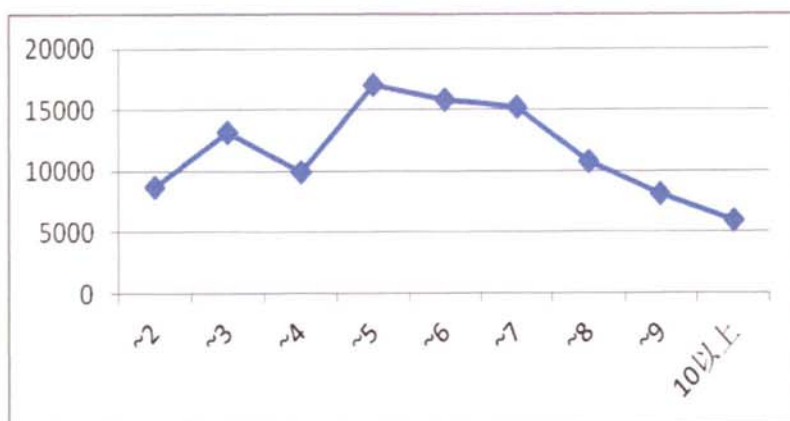


图 3-9. 不同年龄患儿血清 CK 变化趋势图。

#### 3.2.4. 心肺功能检查情况:

心脏功能: 41 例患儿行心电图及超声心动图检查, 年龄 1-12 岁 ( $6.12 \pm 2.35$ ), 心电图示左室高电压 3 例, PR 间期延长 1 例, 不完全右束支传导阻滞 2 例, 异常比例 14.63% (6/41), 余患儿心率及节律正常。超声心动图检查示左心室轻度增大 2 例, 占 4.88% (2/41), 余患儿心脏结构及心脏收缩功能正常。

肺功能: 11 例患儿 (6-12 岁) 行 MEFV 检查 (表 3-9), 3 例患儿存肺容量改变, 其中 1 例为 IC 减低, 2 例为 ERV 减低, 余患儿肺容量正常; 6 例患儿存肺通气功能改变, 其中 2 例 PEF 降低, 3 例 FEF75 降低, 1 例 FEF25-50 降低, 1 例患儿 FEV1 未测出, 余患儿肺通气功能正常。13 例患儿 (4-12 岁) 行 IOS

检查(表 3-10), 气道总阻力增高及中心气道阻力增高各 1 例, 余患儿气道阻力正常。

患儿 VCmax、FVC、FEV1、PEF 均与年龄相关性比较呈正相关 ( $r_{VC}=0.774$ ,  $p_{VC}=0.005$ ,  $r_{FVC}=0.738$ ,  $p_{FVC}=0.009$ ,  $r_{FEV1}=0.725$ ,  $p_{FEV1}=0.018$ ,  $r_{PEF}=0.72$ ,  $p_{PEF}=0.012$ ) (表 3-11)

患儿 R5、R20、Rc 均与年龄相关性比较呈负相关 ( $r_{R5}=-0.706$ ,  $p_{R5}=0.007$ ,  $r_{R20}=-0.665$ ,  $p_{R20}=0.013$ ,  $r_{Rc}=0.588$ ,  $p_{Rc}=0.034$ ), X5 与年龄呈正相关 ( $r_{X5}=0.601$ ,  $p_{X5}=0.03$ ) (表 3-12)。

表 3-9. 11 例患儿 MEFV 检查情况。

	肺容量		肺通气功能				
	VC MAX%	ERV%	FVC%	FEV1%	FEV1/FVC	PEF%	MMEF%
最小值	83.1	59	84.8	91.7	82.61	66.8	67.1
最大值	120.2	213.8	126.6	127.7	91.82	122.8	163.4
均值	96.2	125	99.9	104.5	90.2	97.5	100.4
标准差	11.8	48.1	13.9	12	4.7	17.7	27.8

注: 各参数值均为实际值/预计值比例。

表 3-10.13 例患儿 IOS 结果

	R5	R20	X5	Rc	Rp
最小值	61.4	51.8	57.4	0.26	0.25
最大值	117.9	145.1	124.3	0.67	1
平均值	93.1	100.7	90.6	0.6	0.7
标准差	21.1	22.6	23.4	0.1	0.3

注: 各参数值均为实际值/预计值比例。

表 3-11. MEFV 检查参数与年龄相关性

	VC MAX	FVC	FEV1	FEV1/FV C	PEF	MMEF
均值	1.63	1.61	1.48	90.16	3.22	1.83
标准差	0.34	0.34	0.32	4.73	0.78	0.55
与年龄相关系数	0.774	0.738	0.725		0.72	
P 值	0.005	0.009	0.018	0.625	0.012	0.087

表 3-12. 13 例患儿 IOS 参数与年龄相关性

	R5	R20	X5	Rc	Rp
均值	0.99	0.67	-0.35	0.57	0.74
标准差	0.31	0.17	0.12	0.11	0.25
与年龄相关系数	-0.706	-0.665	0.601	-0.588	
p 值	0.007	0.013	0.03	0.034	0.074

多导睡眠监测 (PSG): 22 例患儿行 PSG 检查, 年龄 3-10 岁 ( $6.82 \pm 1.76$ ), 体重指数 (BMI) 为  $13.19-27.27 \text{ kg/m}^2$  ( $17.65 \pm 2.85$ )。其中 6 例患儿合并肥胖, 1 例患儿存轻度脊柱侧弯。患儿检查中睡眠时间 305-524 分钟 ( $434.84 \pm 61.42$ )。

#### ① 呼吸紊乱事件:

呼吸暂停事件中, 阻塞性事件 0-77 次, 中位数 2 次, 四分位数 0-7.5 次, 中枢性事件 0-19 次, 中位数 0 次, 四分位数 0-2.25 次, 混合性事件 0-7 次, 中位数 0 次, 四分位数 0-2.25 次。比较 3 种呼吸暂停所占比例的差异, 有统计学意义 ( $p=0.015$ ), 两两比较示, 阻塞性事件比例明显高于中枢性、混合性事件 ( $p=0.034$ ,  $p=0.015$ ), 中枢性、阻塞性事件比例无明显差异 ( $p=0.659$ )。患儿呼吸事件相关指数如表 3-13 所示: OAI 0.00-12.2, 中位数 0.25, CAI 0.00-2.20, 中位数 0.00, HI 0.00-4.00, 中位数 0.60, AHI 0.10-17.0, 中位数 1.25。有 5 例患儿符合 OSAHS 诊断, 占 22.73%, 年龄 4-10 岁 ( $7.40 \pm 2.41$ ), 其中合并脊柱侧弯 1 例, 合并肥胖 3 例。5 例患儿 OAI 1.3-12.2 次/小时 ( $3.94 \pm 4.63$ ), AHI 3-17



次/小时 (6.82±5.91) (表 3-14)。

表 3-13. 22 例患儿呼吸事件情况。

	OAI	CAI	HI	AHI
范围	0.00-12.20	0.00-2.20	0.00-4.00	0.10-17.00
中位数	0.25	0.00	0.60	1.25
四分位数	0.00-1.08	0.00-0.33	0.10-1.13	0.38-3.02

注：以上各指数单位：次/小时。

表 3-14.5 例 OSAHS 患儿 PSG 呼吸事件结果。

序号	年龄	呼吸暂停				低通气	睡眠呼吸紊乱
		OSA	OAI	CSA	MSA	HI	AHI
1	10 §	77	12.2	3	4	4	17
2	9	17	2.1	0	0	0.3	2.4
3	8 ¶	18	2.12	0	2	3.4	5.7
4	6 §	15	2	0	7	3	6
5	4	9	1.3	4	0	1	3

§：此患儿合并肥胖，¶：此患儿合并脊柱侧弯及肥胖。

年龄单位：岁，OSA、CSA、MSA 单位：次，OAI、HI、AHI 单位：次/小时。

## ② 血氧饱和度

患儿夜间平均血氧饱和度 90.00-97.90% (95.18±1.80)，3%氧减饱和指数 0.23-10.80 次/小时 (3.06±3.00)，最低血氧饱和度 79.00-95.00% (89.52±4.72)。9 例患儿存在轻-中度睡眠低氧血症，占 40.91% (9/22)，年龄 4-10 岁 (7.22±1.99)，其中存脊柱侧弯 1 例，合并肥胖 2 例。9 例患儿血氧饱和度情况如表 3-15 所示。

表 3-15.9 例存轻度低氧血症患儿血氧饱和度情况。

序号	年龄	平均氧饱和度	最低氧饱和度	氧减饱和指数	夜间睡眠低氧血症
1	10 §	96.20	84.00	10.80	中度
2	9	96.70	84.00	2.13	中度
3	9	94.08	79.00	10.65	中度
4	8 ¶	96.60	87.00	3.09	轻度
5	7	93.00	84.00	3.10	中度
6	7	95.00	87.00	3.50	轻度
7	6	96.00	81.00	6.02	中度
8	5	93.00	89.00	3.30	轻度
9	4	90.00	86.00	3.70	轻度

§: 此患儿合并肥胖, ¶: 此患儿合并脊柱侧弯及肥胖。

年龄单位: 岁, 氧减饱和指数: 次/小时。

### 3.2.5. 智力情况:

本研究对 18 例患儿行智能方面测查, 存不同程度智力受损/智能发育落后的患儿占 88.89%。

10 例患儿 6-9 岁 ( $7.90\pm 0.88$ ) 行 C\_WISC 智力测查、社会适应能力及注意力测查: 患儿 FIQ 为 44-84 ( $62.30\pm 12.53$ ), 无智力受损患儿 2 例, 存在不同程度智力受损患儿占 80.00% (8/10), 其中轻度受损 7 例, 中度受损 1 例。PIQ 均值  $66.00\pm 11.05$ , VIQ 均值  $66.30\pm 12.94$ , 两者差异无统计学意义 ( $p=0.95$ )。此外, 患儿社会适应能力均值为  $8.00\pm 1.33$ , 注意力均值为  $52.15\pm 12.33$ , 见表 3-16。

8 例患儿 2-5 岁 ( $3.88\pm 1.13$ ) 行 Gesell 智能发育检查: 患儿综合 DQ 为 44-68 ( $55.88\pm 8.77$ ), 全部存在智能发育落后, 其中发育轻度迟滞 3 例, 发育中度迟滞 5 例。大运动 DQ 均值  $47.63\pm 13.47$ , 精细运动 DQ 均值  $62.38\pm 6.50$ , 言语 DQ 均值  $51.50\pm 10.10$ , 见表 18。比较三组 DQ 差异有显著性 ( $p=0.027$ ), 精细运动 DQ 明显高于大运动、言语 DQ ( $p_{\text{精细, 大运动}}=0.01$ ,  $p_{\text{精细, 言语}}=0.049$ ), 而大运动与言语 DQ 间无显著差异 ( $p=0.465$ ), 见表 3-17。

表 3-16. 10 例患儿韦氏智力测验结果

基因型	智商	言语	操作	受损	社会适应	注意力
E14 无义突变 Dp140 未受累	79	82	80	无	10	22
E12 缺失 Dp140 未受累	84	84	87	无	9	51
E46-49 缺失 Dp140UTR	53	51	66	轻度	8	51.375
E45-56 缺失 Dp140pc	53	52	64	轻度	7	54
E45 缺失 Dp140	62	64	68	轻度	8	71.375
E46-47 缺失 Dp140UTR	69	77	68	轻度	9	60.5
E48-50 缺失 Dp140UTR	63	72	60	轻度	8	52
E44 重复 未确定	52	56	58	轻度	8	56
E45 缺失 Dp140	64	73	61	轻度	8	51.25
E45-54 缺失 Dp140pc	44	52	48	中度	5	52
均数	62.3	66.3	66		8	52.15
标准差	12.53	12.94	11.05		1.33	12.33

表 3-17. 8 例患儿幼儿智能发育量表测验结果

基因型	大运动	精细	适应	语言	个人-社交	受损
E50 缺失 Dp140UTR	63	68	60	62	84	轻度
46-48 缺失 Dp140UTR	67	70	70	59	72	轻度
46-48 缺失 Dp140UTR	58	57	62	67	65	轻度
IVS67 点突变 Dp140pc	42	61	57	44	55	中度
E59 无义突变 Dp140pc	32	51	51	49	61	中度
E59 无义突变 Dp140pc	40	67	71	50	42	中度
45-54 缺失 Dp140pc	33	59	46	40	44	中度
43-52 缺失 Dp140pc	46	66	56	41	49	中度
均值	47.63	62.38	59.13	51.50	59.00	
标准差	13.47	6.50	8.63	10.10	14.46	

### 3.3. Dystrophin 基因型与临床表现型相关性:

#### 3.3.1. 基因突变类型与临床关系:

移码突变组患儿 76 例(除外 3 例女性携带者), 年龄 9 个月-12 岁(6.19±2.67)、整码突变组 9 例, 年龄 2-9.5 岁(5.06±2.40), 比较两组年龄有可比性 ( $p=0.228$ ), 见表 20。比较两组发育情况、就诊原因、运动倒退及 CK 升高情况比较:

两组患儿发育情况: 独坐、独走年龄差异无统计学意义 ( $P_{独坐}=0.70$ ,  $P_{独走}=0.06$ ), 跑、跳年龄差异有显著性 ( $P_{会跑}=0.02$ ,  $P_{双脚跳}=0.001$ ), 见表 3-18;

表 3-18. 整码突变、移码突变患儿发育情况比较

发育	整码突变		移码突变		P 值
	中位数	四分位数	中位数	四分位数	
独坐	7	6.5-7.5	7	7.0-8.0	0.7
独走	15	14.0-18.0	18	16.8-18.0	0.063
跑	24	20.8-27.8	28	25.0-30.0	0.021
跳	27	24.3-29.5	36	30.0-39.0	0.001

注: 表中数值单位: 月龄。

两组患儿运动能力倒退情况: 移码突变组有 32 人出现能力倒退, 占 42.11% (32/76) (不包含 3 例携带者), 出现倒退中位年龄 7 岁, 四分位数年龄 7 岁, 而整码突变组均未出现运动能力倒退。比较两组患儿出现能力倒退的比例, 差异有统计学意义 ( $p=0.012$ )。

两组患儿就诊原因: 因无症状 CK 升高就诊患儿, 移码突变组 17 例, 占 22.37%, 整码突变组 5 例, 占 55.56%, 两组因此原因就诊的比例差异有统计学意义 ( $p=0.046$ ), 两组因此原因就诊患儿的平均年龄无显著差异 ( $p=0.22$ )。因肢体无力等症状就诊患儿, 整码突变组 4 例, 移码突变组 59 例, 整码突变组因发现典型症状就诊的年龄明显晚于移码突变组 ( $p=0.01$ )。

两组患儿血清 CK 水平: 整码突变组血清 CK 值 5909-13024IU/L (9296.44±1941.87), 移码突变组血清 CK 值 2881-31150 (12401.86±6092.88), 比较两组 CK 均值差异有统计学意义 ( $p=0.003$ ), 见表 3-19。

表 3-19. 整码突变与移码突变比较

		整码突变	移码突变	p 值
总体	例数	9	76	
	年龄范围	2-9.5	0.75-12	
	平均年龄	5.06±2.40	6.19±2.67	p=0.228
能力倒退	例数	0	32	
	中位年龄	-	7	
	比例	0%	42.11%	p=0.012
无症状 CK 升高	例数	5	17	
	比例	55.56%	22.37%	p=0.046
就诊年龄均值	无症状 CK 升高	3.40±0.89	2.54±1.41	p=0.22
	具有典型症状	6.25±1.26	4.58±1.22	p=0.01
CK 水平	范围	5909-13024	2881-31150	
	均值	9296.44±1941.87	12401.86±6092.88	p=0.003

注：表中年龄单位：岁，CK 值单位：IU/L。

### 3.2.2. 患儿智力情况及其与蛋白亚型关系：

10 例行 C\_WISC 智力测查的患儿：除 1 例（外显子 44 重复）与 Dp140 关系尚不明确，Dp140 未受累组 2 例，Dp140 受累组 7 例，比较两组智力、社会生活适应性及注意力情况：FIQ、VIQ、PIQ 均值差异均有统计学意义（ $p_{FIQ}=0.009$ ， $p_{VIQ}=0.003$ ， $p_{PIQ}=0.005$ ），社会生活适应性及注意力均值无明显差异（ $p_{适应}=0.087$ ， $p_{注意力}=0.4$ ），见表 3-20。Dp140 受累组中，Dp140UTR 区受累 3 例，平均 FIQ 53-69（ $61.67\pm 8.08$ ），Dp140pc 区受累 2 例，平均 FIQ 44-53（ $48.5\pm 6.36$ ）。

8 例 Gesell 智能发育检查患儿：全部为 DP140 受累组。Dp140UTR 组 3 例，综合 DQ 均值  $65.66\pm 3.21$ ，Dp140pc 组 5 例，综合 DQ 均值  $50.00\pm 3.81$ ，比较两组综合 DQ 差异有统计学意义（ $p=0.001$ ）。分别比较两组患儿在大运动、言语、个人-社交方面发育情况，差异有显著性（ $p_{大运动}=0.001$ ， $p_{言语}=0.001$ ， $p_{个人-社交}=0.009$ ），比较两组患儿在精细运动、适应性方面发育情况，差异无统计学意义（ $p_{精细运动}=0.418$ ， $p_{适应性}=0.242$ ），见表 3-21。

表 3-20. Dp140 受累与未受累组智商、适应性、注意力比较。

	Dp140 未受累组		Dp140 受累组		p 值
	范围	均值	范围	均值	
FIQ	79-84	81.5±3.54	44-69	58.29±8.59	0.009
VIQ	82-84	83±1.41	51-77	63±11.28	0.003
PIQ	80-87	83.5±4.95	48-68	62.14±6.99	0.005
适应性	9-10	9.5±0.71	5-9	7.57±1.27	0.087
注意力	22-51	36.5±20.51	51.25-71.38	56.07±7.49	0.4

表 3-21. Dp140UTR 组和 Dp140pc 组患儿发育商比较。

DQ	Dp140UTR 组		Dp140pc 组		p 值
	范围	均值	范围	均值	
综合	62-68	65.66±3.21	44-54	50.00±3.81	0.001
大运动	58-67	62.67±4.51	32-46	38.60±5.98	0.001
精细运动	57-70	65±7	51-67	60.8±6.42	0.418
适应性	60-70	64±5.29	46-71	56.2±9.36	0.242
言语	59-67	62.67±4.04	40-50	44.8±4.55	0.001
个人-社交	65-84	73.67±9.61	42-61	50.2±7.85	0.009

## 第四章 讨论

### 4.1. Dystrophin 基因突变

Dystrophin 基因突变是 Dystrophin 相关病的分子遗传学基础。此基因定位于人类 Xp21, 长约 2.5Mbp, 占整个基因组长度 0.1%<sup>[7]</sup>。由于基因结构大, 内部复杂, 该基因突变率高, 突变类型多样。Sylvie 等<sup>[13]</sup>对 UMD-DMD 数据库中 2405 例 Dystrophin 相关病患儿基因突变类型进行统计, 约 77.7%为拷贝数异常, 其余为点突变 (22.3%)。拷贝数异常突变中包括外显子缺失和重复, 分别占 67.4%和 10.3%, 可发生于整个基因的任意外显子, 且呈非均匀分布。缺失突变位于远端热点 (45-55 外显子) 最多, 占 74%, 位于近端热点 (2-20 外显子) 占 15%, 重复突变存在于近端热点区占 64.2%。此外, 还包括 4 例复杂的、涉及 2 个区域的外显子重排及部分外显子三体。点突变中, 无义突变最常见, 占点突变的 39.8%, 其次为移码突变 (31.8%) 和剪切突变 (26.9%), 错义突变较罕见, 仅发现 7 种<sup>[13, 14]</sup>。

基因检测到明确致病突变, 即可在分子生物学上确诊 Dystrophin 相关病, 目前基因检测手段, 可检测到 96-98%左右患儿的致病突变, 已逐渐成为此病的首选诊断方法。一项多中心研究, 对近 30 年 470 名 DMD/BMD 患儿确诊模式进行回顾分析显示, 肌活检诊断比例由 66.1%降至 32.6%, 而基因诊断比例明显增高<sup>[5]</sup>。同时, 对于 Dystrophin 基因突变情况进行分析研究, 以便更好地指导临床进行诊断, 也成为研究的热点。

本研究首先采用 MLPA 技术对临床疑诊患儿 Dystrophin 基因进行检测, 共检出存在致病基因拷贝数异常患儿 90 例, 占 75.00%, 其中包含 3 例女性携带者。MLPA 检测结果阴性的患儿, 应用直接测序方法共检测到致病点突变 22 例, 占 18.33%。突变类型分布与国内外文献报道接近<sup>[13, 14]</sup>。可见, 应用 MLPA 技术进行扩增和半定量分析, 几乎可检测出所有患儿的缺失和重复突变, 同时还可准确检出女性携带者, 明显优于传统的多重 PCR 技术, 可作为 Dystrophin 基因相

关病的首选基因检测方法。其次，直接测序技术，因可有效检出各种点突变，其应用可为临床提供更多的诊断依据。

本组患儿中，缺失突变分布较集中，主要累及远端热点区，占 89.04%，而近端热点区有 2 例患儿，较国外大样本统计比例（15%）偏少<sup>[15]</sup>，考虑与本组患儿样本量较小有关。重复突变主要集中在近端，占 47.06%。缺失和重复突变分布特点可用断裂点分析解释，Sylvie 等<sup>[15]</sup>对 UMD-DMD 数据库中基因突变数据统计发现，缺失断裂点在远端热点区的少数内含子聚集，其中内含子 44（占 20.4%）为最常见位置，其次为内含子 47 和 50。而较常见重复断裂点分布在内含子 2、7、1、4 中。

此外，覆盖全部 79 个外显子的 MLPA 技术，使发现不连续缺失、重复及复杂突变、部分三体等情况成为可能。这些现象的具体情况尚不清楚，有研究表明在重复突变中较多见<sup>[15]</sup>。本组患者中，未检测到涉及两个区域的基因拷贝数异常及部分三体等罕见复杂基因重排类型。

本组患儿中，点突变占 25%。与既往大样本统计结果相符。其中无义突变（46.67%）最为常见，常发生于外显子 70，有文献报道，与 70 外显子包含较多（3 个）CpG 区（突变热点区）有关<sup>[15]</sup>。移码突变（16.67%）也较常见，包括微缺失、单个碱基插入及单个碱基重复多种类型，累及 1-2 个碱基。与 UMD-DMD 数据库相比，本组患儿剪切突变所占比例（10.00%）稍低，因本组患儿仅行外显子和外显子/内含子连接序列测序，无法检测位于内含子中的少见剪切突变。此外，8 例错义突变（26.67%）均为已报道 SNP，因此本组患儿中未发现致病错义突变。既往文献报道致病错义突变在此病中少见，仅有的几例聚集在肌动蛋白结合域（外显子 2-8）或半胱氨酸富含域（外显子 62-70）<sup>[15,16]</sup>。

在微小突变中，突变点散在分布，未发现突变热点区。有文献通过比较发现，外显子 35、66、70 等位置点突变较多，提示微小突变可能也存在一些不连续热点。但绝大多数微小突变仅出现 1 次<sup>[15]</sup>。因此在诊断过程中，有必要行整个基因测序。

此外需指出，本组中 8 例错义突变和 3 例基因未见异常的患儿，不能完全排



除 Dystrophin 相关病诊断，文献报道有 2-4%左右患儿无法通过现有基因检测手段发现致病突变，需通过肌活检病理检查进一步协助诊断<sup>[17]</sup>。但 Schwartz 等<sup>[18]</sup>报道表型为此病的散发病例，经基因检查证实部分为肢带型肌营养不良 2I 型，因此有学者主张在行肌活检等有创检查前，行 FKRP 基因直接测序。

#### 4.2. 临床特点

Emery<sup>[2]</sup>已对此病患儿临床特征做详细描述：DMD 通常 5 岁前起病，肌无力近端重于远端，进行性加重，患儿表现为跑跳、爬楼困难，绝大部分 Gower's 征阳性、腓肠肌肥大，12 岁前丧失行走能力。20 岁左右死于心肺功能衰竭。但通气支持可使患儿寿命接近 30 岁甚至更长。BMD 与之相似，仅起病较晚，病程进展缓慢。2012 年冯善伟、张成等<sup>[19]</sup>对近 6 年就诊中山大学附属第一医院的 436 例 DMD 患儿（平均 9.37 岁）发育、病程进展等情况进行详细分析：患儿起病年龄  $4\pm 2.39$  岁，习步年龄  $18.07\pm 5.49$  个月，会走年龄在 18 个月之前与之后的患儿间，丧失行走能力时间无显著差异 ( $p=0.679$ )。患儿主要就诊原因为因下肢无力造成的走路易摔倒、上楼困难及步态异常，占 81.8%，体检发现 CK 升高占 15.14%。体格检查示：患儿肌无力双侧对称、下肢重于上肢。绝大部分患儿存腓肠肌肥大(96.56%)、Gower's 征阳性(93.59%)，膝腱反射消失较晚，13.12% 的患儿 10 岁后仍存在。

本组患儿首诊年龄  $4.2\pm 1.45$ ，与既往研究相符。绝大部分在 2-5 岁间就诊 (77.06%)，主要就诊原因为下肢无力 (65.14%)、发现 CK 升高 (25.69%) 及发育落后 (9.17%)。其中 CK 升高首次就诊年龄较早 ( $2.94\pm 1.35$  岁)，下肢无力 ( $4.71\pm 1.12$  岁)、发育落后 ( $4.20\pm 1.23$  岁)。

大部分患儿存不同程度大运动发育落后：独坐年龄基本正常，少部分患儿存在 (22.94%) 独走年龄落后，而大部分患儿存在跑 (73.39%)、跳 (55.05%) 发育落后，会跑、会跳中位年龄分别为 28 个月、36 个月。

本组有 38 例患儿中出现运动能力倒退。随年龄增长，出现能力倒退的比例逐渐增加。自幼独走、跑跳发育情况与出现运动倒退的早晚无明显关系 ( $P_{独走}=0.40$ ,  $P_{会跑}=0.39$ ,  $P_{会跳}=0.54$ )。

本组 66 例患儿 (6.16±2.45 岁) 体格检查结果示, 绝大部分患儿存在鸭步步态 (68.18%)、Gower's 征阳性 (89.39%)、腓肠肌肥大 (90.91%)、膝腱反射减弱或消失 (75.76%)。但较既往研究结果偏低<sup>[19]</sup>, 考虑与部分患儿年龄较小有关, 四肢肌力均随年龄增长逐渐下降, 且下肢肌力受损程度重于上肢。

在病程早期 CK 已有显著增高, 可达到正常值数十倍甚至上百倍, 且不同年龄组患儿 CK 水平差异较大。本组肌酶升高最小年龄为 9 个月, 5-8 岁组肌酶最高, 其次为小于 4 岁组, 9 岁以后肌酶随年龄增加而递减, 考虑因病情进展, 破坏的肌纤维被结缔组织及脂肪组织取代, 运动能力逐渐丧失所致。

随年龄增长, 患儿逐渐出现心肺功能并发症, 且心肺功能衰竭均为患儿常见死因。Nigro 等<sup>[20]</sup>研究发现, 14 岁前合并心脏功能受累患儿约占 1/3, 18 岁前此比例增至 1/2, 18 岁后全部患儿存心功能受损。Tangsrud 等<sup>[21]</sup>研究显示, 在 10 岁前, 患儿肺活量可呈现增长趋势, 10 岁后经历一段平台期, 约 12 岁后, 呼吸肌力以 6-10.7%/年的速度进行性下降。以上数据均来自国外研究, 国内尚无关于 DMD 儿童心肺功能变化情况的分析。

本组患儿中, 患儿心功能均为正常, 肺功能随年龄 (4-12 岁) 增长呈现改善趋势, 肺容量及肺通气功能增加, 呼吸阻抗、粘性阻抗减少, 电抗增加, 同正常同龄儿。提示 <12 岁患儿在随访过程中, 无需频繁复查心肺功能, 但年龄较大患儿需警惕患儿心肺功能受累情况。

睡眠相关呼吸问题在 DMD 患者中发病率和致死率均较高。起初, 因患儿在十几岁后, 才逐渐出现呼吸功能不全症状, 针对此病呼吸功能的研究主要集中在大年龄组患者, Smith 等<sup>[6]</sup>报道 14 例 DMD 病人 (年龄 15-22 岁) 睡眠呼吸情况, 有 9 人存间断血氧下降, 伴低通气发作。但覆盖较小年龄 DMD 患儿的睡眠相关呼吸问题研究较少, Sadasivam 等<sup>[22]</sup>报道一组包含 1-15 岁 DMD 患儿的呼吸功能情况, 结果示患儿在 10 岁前已合并呼吸功能障碍, 且不同年龄组患儿睡眠相关呼吸问题存在差异, 其中阻塞性呼吸暂停占 30%, 发病率比正常儿童中 (2-3%) 高 10 倍左右, 且绝大部分为小年龄组患儿 (中位年龄 8 岁)。这些儿童起初出现阻塞性呼吸暂停, 可无明显低通气症状。随年龄增长, 患儿低通气