

R
008.8
4054-1
88

私立中山醫學院 醫學研究所

碩士論文
Master's Thesis

臺灣地區強直型肌肉萎縮症 盛行率之調查及遺傳特性之研究

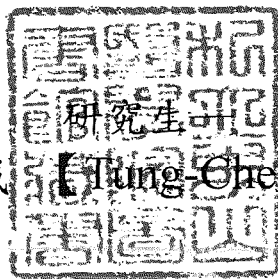
Prevalence study and Genetic Analysis
of Myotonic Dystrophy in Taiwan

指導教授—

李宣佑 博士 【Shuan-Yow Li Ph.D.】

蕭光明 博士 【Kuang-Ming Hsiao Ph.D.】

李東城 【Hung-Cheng Li】



中華民國八十八年六月
June 1999

中山醫學院圖書館



C055178

參考書恕不外借

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 大學(學院) 醫學研究所
丙 組 87 學年度第 2 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：臺灣地區強直型肌肉萎縮症盛行率之調查及遺傳特性之研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號: _____)

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：李宜佑·蕭光明

研究生簽名：李東城
(親筆正楷)

學號：R86131
(務必填寫)

日期：民國 88 年 6 月 17 日

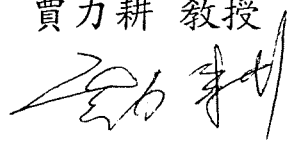
1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄 106-36 台北市和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 王淑貞。(本授權書諮詢電話:02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請內政部著作權委員會(現為經濟部智慧財產局)修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

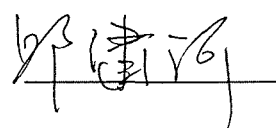
台中榮民總醫院神經內科

賈力耕 教授



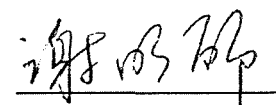
中興大學獸醫微生物研究所

邱繡河 副教授



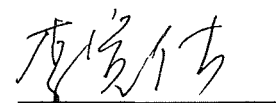
私立中山醫學院醫學研究所

謝明麗 副教授




私立中山醫學院生命科學系
(論文指導教授)

李宣佑 教授



私立中山醫學院生命科學系
(論文指導教授)

蕭光明 副教授



中華民國八十八年六月

學生 李東城論文題目為臺灣地區強直型肌肉萎縮症盛行率之調查及遺傳特性之研究，其論文已經由中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由指導教授核閱後無誤。

指導教授：

李宣佑 教授

簽名：李宣佑

蕭光明 教授

簽名：蕭光明

目錄

中文摘要	1
英文摘要	2
序論	3
材料與方法	13
結果：	
(1)非 DM 患者族群	22
(2) DM 患者及其家族	31
討論	47
參考文獻	54
問題	58



中文摘要

強直型肌肉萎縮症(Myotonic Dystrophy ; DM)是一體染色體顯性遺傳(autosomal dominant)疾病。在臨床症狀的表現上主要包括肌肉收縮後不易放鬆、肌肉(臉部、頸部、和四肢)無力及漸進性萎縮等。除此之外，亦可能影響眼睛、腦、皮膚、肺等器官及內分泌系統而出現白內障、智能障礙、禿頭、肺炎、糖尿病、和男性不孕等症狀。造成此一多系統疾病的主要原因係因位於第十九對染色體長臂(19q13.3)上一段 CTG 三聯核苷酸重複序列發生擴增突變所導致。

雖然 DM 被認為是遺傳性神經肌肉疾病中最普遍的一種，然而其分佈亦有區域性差別。目前，台灣地區沒有確切的發生率報告，由於正常人口中 CTG 重複序列數目之分佈狀況可概估 DM 盛行率，我們依實驗結果推估台灣地區之 DM 盛行率可能低於歐美及日本。同時，我們收集及鑑定出十一個 DM 家族，共二十三位 DM 患者及尚未發病者，發現有 anticipation 現象，且台灣地區 DM 的遺傳特性大致上與歐美及日本等地區類似。此外，基於 DM 與 *Alu*+/-多型性連鎖不平衡之關係，我們調查了正常範圍內 CTG 重複序列數目與 *Alu*+/-多型性之關聯性，其結果顯示不同族群中 CTG 序列數目與 *Alu*+/-多型性之連鎖不平衡關係可能並不一樣。

英文摘要

Myotonic dystrophy (DM) is an inherited, autosomal dominant disorder characterized primarily by myotonia (face, neck, and limbs), progressive muscular dystrophy, mental retardation, cardiac conduction defects, and testicular tubular atrophy. The molecular event underlying DM has been identified as an expansion mutation of a (CTG)_n trinucleotide repeat sequence in the region of chromosome 19q13.3.

Although DM is considered to be the most prevalent inherited neuromuscular disease of adults, the prevalence is different from one population to another in the worldwide. Based on our investigation, the DM prevalence in Taiwan could be much lower than that in Caucasian and Japanese population. To date, we have identified 23 DM patients and carriers who belong to 11 families by determining the CTG repeat length. The genetic characteristics of DM in Taiwanese population are very similar to those described previously, including "phenomenon of anticipation". In addition, by the study of the linkage disequilibrium between Alu^{+/-} polymorphism and CTG repeat lengths, we found that it could vary to some extent in different populations.

序 論

強直型肌肉萎縮症(Myotonic Dystrophy)是一體染色體顯性遺傳 (autosomal dominant)疾病，也是成人肌肉萎縮症中最常出現的一種。在 1909 年，首度有文獻報告描述此一疾病 (Steinert 1909 ; Batten and Gibb 1909)。其英文名稱，除了 Myotonic Dystrophy 以外亦被稱為 dystrophia myotonia(簡稱之源由；DM)、Steinert's disease 或 mytonia atrophica，而一般以 DM 作為此疾病之簡稱。根據 Ashizawa 及 Epstein (1991)之調查，DM 主要發生在白人社會的地區如歐洲及美洲，另外日本也有不少的病例報告，而東南亞、美國黑人、印度及奈及利亞的家庭，DM 病例報告較少。由於 DM 是一漸進性神經肌肉萎縮疾病，所以發病時間分佈很廣，從出生到 60 歲或更年老都有病例的報告，而且有一段無症狀(asymptomatic)時期，所以無法精確確定發病年齡。DM 的主要臨床症狀除了肌肉收縮後不易放鬆、肌肉(臉部、頸部、和四肢)無力及漸進性萎縮等，亦可能出現白內障、智能障礙、禿頭、肺炎、糖尿病、和男性不孕等，所以是一種多系統疾病(Harper 1989)，而這些臨床症狀跟發病年齡有某種程度上的關聯(Harper 1989)，所以早年依據臨床症狀和發病年齡，DM 可區分為：

(1)溫和型 DM (mild DM)：發病年齡為 50 歲以上，臨床症狀有白

內障(cataract)和輕微或無肌肉不正常(muscle abnormality)。

(2)典型 DM (classical DM)：發病年齡為青少年或成人早期(20~40

歲)，臨床症狀主要有肌肉無力(muscle weakness)和肌強直

(myotonia)，也常伴隨白內障(cataract)、性腺萎縮(gonadal atrophy)

及輕微的智能受損(minor intellectual impairment)。

(3)先天型 DM (congenital DM)：發病年齡為出生前或出生後，臨

床症狀有臉部無表情(facial weakness)、低肌張(hypotonia)、畸形

足(talipes)、運動肌發育遲緩(delayed motor development)、智能

不足(mental retardation)、新生兒呼吸困難(neonatal respiratory

distress)和哺養困難(feeding difficulties)。

在 1982 年，Whitehed 等學者用基因聯鎖(gene linkage)的方法，發現 DM 基因位在第十九對染色體，之後定位(map)出 DM 有一突變片段(約 200kb)位於第十九對染色體長臂(chromosome 19q13.3)的位置上 (Johnson et al. 1990)，然後再利用此突變片段以 radiation-reduced hybrid 切割成不同位置的小片段，製成探針(probe)，再去偵測以特殊的限制酶(restriction enzymes)作用之 DM 病人和正常人的 DNA，發現 DM 病人有一片段比正常人的同一片段還要大，且這片段大小會隨著症狀的輕重而有所變化(Harley et al. 1992; Buxton et al. 1992;

Aslanidis et al. 1992)。而造成 DNA 片段大小的主要原因係因位於第十九對染色體長臂(19q13.3)上一段 CTG 三聯核苷酸重複序列發生擴增突變所導致(Brook et al. 1992; Fu et al. 1992; Mahadevan et al. 1992)(見附圖一；Brewster et al. 1998)。在正常人的染色體內，此段 CTG 核苷酸重複次數是 5-38 次，而 DM 患者之 CTG 數目則超過 50 次，甚至可達數千次之多。若重複次數在 50-200 次之間則屬於溫和型 DM (mild DM)。隨著 CTG 核苷酸重複次數之增加，DM 患者之臨床症狀也愈加明顯；如超過 200 次以上而在 1000 以下，則是典型的 DM(classic DM)。最嚴重的 DM 型式是先天性的肌強直型肌肉萎縮症(congenital myotonic dystrophy, 簡稱 CDM)，此類患者的 CTG 核酸重複次數大多在 1000 次以上。所以 CTG 擴增重複序列的長度與患者的發病年齡和疾病的嚴重程度成正比，其 p(CTG) n 的 n 值愈大，通常發病年齡越早，而且發病症狀也越嚴重。

DM 基因座 CTG 的擴增突變可能影響至少二個基因，包括 DM protein kinase (DMPK)及 DM locus-associated homeodomain protein (DMAHP) (見附圖一) (Aslanidis et al. 1992; Boucher et al. 1995; Brook et al. 1992; Buxton et al. 1992; Fu et al. 1992; Harley et al. 1992; Harris et al. 1996; Klesert et al. 1997; Mahadevan et al. 1992; Thornton et al.

1997)。它們是座落於第十九對染色體的長臂上(19q13.3)相連的二個基因。造成 DM 疾病的 CTG 重複序列擴增突變位於 DMPK 基因的 3'端非轉譯區，此區域亦是 DMAHP 基因的驅動子區域(promoter region)。由於 CTG 重複序列位於這二個基因的不轉譯區內，因此不太可能直接影響這些基因產物之特性，而可能是由於 CTG expansion 造成 mRNA CUG repeat 之擴增，進而影響 CUG binding protein(CUG-BP)對其他 RNA 之結合(Timchenko 1999)(見附圖二；Timchenko 1999)。

DM 是成人肌肉萎縮症中最常出現的一種，在全世界分佈的範圍很廣，然而其發生率有區域性；在日本，發生率約為 1:18000(Davies et al. 1992)，西歐及北美地區約為 1:8000(Harper 1989)，而在加拿大魁北克省 Saguenay-Lac-St-Jean 區域則高達 1:475(Bouchard et al. 1989)。根據 Ashizawa and Epstein 等學者對各大醫院之問卷調查結果顯示，東南亞地區 DM 的盛行率遠比上述區域為低(Ashizawa and Epstein 1991)。由於 DM 分子診斷技術在 1992 年才被發表出來，所以此一統計資料乃基於臨床診斷結果。而根據 Tishkoff 等人對 84 位正常中國人 CTG 序列數目之分佈的調查結果顯示他們的 CTG 序列重複次數皆小於 18 (Tishkoff et al. 1998)。這些數據顯示 DM 在中國

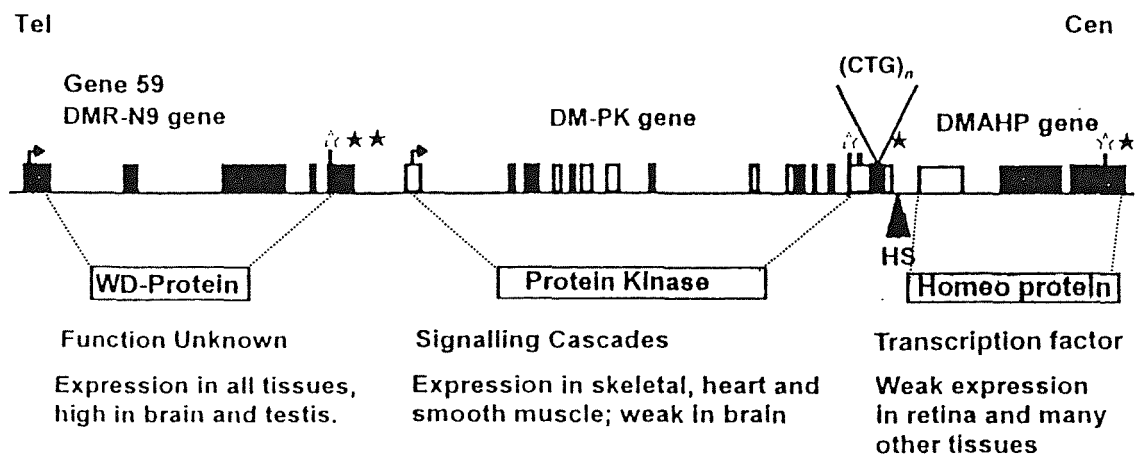
之盛行率可能非常低。然而，截至目前為止，在此一區域各個國家，包括台灣在內的 DM 盛行率並無確實數字之報告。根據臨床資料估計台灣 DM 的盛行率約為 0.5-1/100,000(高雄醫學院神經內科陳順勝教授；私人通訊)。依據此一估計，要得到在統計上有意義的盛行率調查數據的話，在實行上有其困難，而由 Goldman 等學者(1994)提出由正常人口中 CTG repeat number 之分佈狀況亦可概估 DM 盛行率，所以我們檢測了 439 位非 DM 患者之 CTG repeat number，統計不同 CTG repeat number 出現之頻率，從而概估 DM 盛行率，結果顯示台灣地區之盛行率的確遠低於歐美和日本，與 Ashizawa 和 Epstein 等學者的調查報告相符，而為了求較精確的盛行率我們也一直在收集 DM 病人及其整個家族，但也由於社會之民情，所以台灣地區 DM 家族之收集預計以較長的時間來進行，再據以推算此病在台灣之最低盛行率。目前，經由和包括高雄醫學院附設醫院、林口長庚紀念醫院、中國醫藥學院附設醫院、沙鹿光田醫院、彰化基督教醫院等醫院的神經內科合作，一年半來我們收集並鑑定出分屬十一個家族共二十三位 CTG 有擴增突變之 DM 患者及尚未發病者。由分析現有 DM 家族之臨床症狀、CTG 序列長度、Alu+/-多型性等資料試著歸納出台灣地區 DM 之遺傳特性，並與歐美和日本等民族已報告之遺

傳特性作對比，包括：(A) CTG 擴增長度與 DM 發病年齡提早及症狀嚴重程度呈正相關。表現出典型 DM 症狀之病人其血液 DNA 內 CTG 序列的長度皆大於 200，長度小於 200 者則多無肌肉方面之臨床症狀。(B) anticipation 現象(phenomenon of anticipation)，亦即子代 DM 的發病年齡比親代早而且症狀也比較嚴重(Howeler et al. 1989)。(C) DM 在遺傳上有性別(sex)的差異，患有先天型 DM (congenital DM) 的子代，其親代的 DM 患者通常是母親(Harper and Dyken 1972; Harper 1989; Morgenlander and Massey 1991)。(D) Alu+/- 多型性(Alu+/- polymorphism)與 DM 連鎖不平衡之關係。在 CTG 重複序列位置上游約 5kb，也就是 DMPK 基因第八個 intron 內有 Alu+/-1kb 多型性(見附圖三；Krahe et al. 1995)存在，如以限制酶 *EcoRI* 切出含有 CTG 重複序列的正常 DNA 長度可能是 8.6kb 或 9.6kb。除了一篇對奈及利亞 DM 家族所作的分析報告(Krahe et al. 1995)指出，這個家族中 DM 患者的 CTG 擴增突變發生在 Alu-1kb 的 allele，其他目前已知 CTG 擴增突變皆發生在 Alu+1kb 的 allele，而分析歸納的結果顯示台灣地區 DM 之遺傳特性與歐美和日本等民族大致上是類似的。

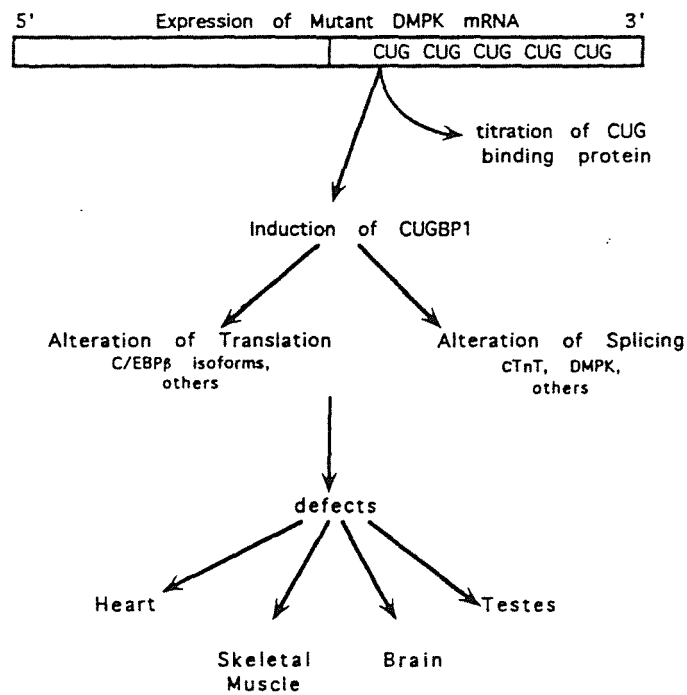
基於 DM 與 Alu+/- 多型性連鎖不平衡之關係，Imbert 等人調查正常範圍內 CTG 重複序列數目與 Alu+/- 多型性之關聯性。他們研究發

現(CTG)₅, (CTG)₁₀, 及(CTG)₁₉₋₃₀ 只出現在 Alu+1kb allele，而(CTG)₁₁₋₁₃ 則幾乎只出現在 Alu-1kb allele (Imbert et al. 1993)，所以提出 CTG 擴增突變途徑係經由(CTG)₅₋₁₀，跳過(CTG)₁₁₋₁₃，到(CTG)₁₉₋₃₀，而最後至(CTG)_{>50}。而且，當(CTG)序列變長時其突變速率(mutation rate)也變大。為調查台灣地區 CTG 擴增突變途徑是否遵循此一模式，所以我們分析了 304 位非 DM 患者 CTG 重複序列數目與 Alu+/-多型性連鎖不平衡之關係，但我們分析的結果與 Imbert 等人的調查報告有所不同，而使得我們認為台灣地區 CTG 擴增突變途徑或許並非是遵循此一跳躍式倍增模式而是遵循連續性擴增模式，這與 Tishkoff 等學者的觀點類似(Tishkoff et al. 1998)。

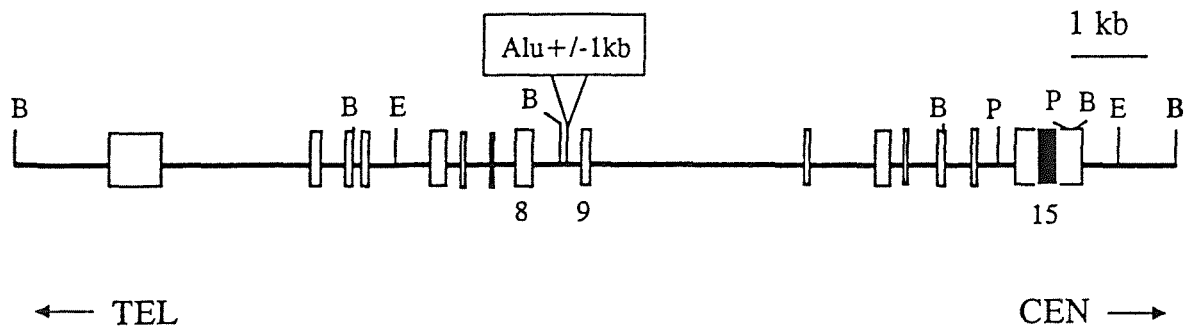
這些寶貴的資料可建立起本土性強直型肌肉萎縮症的流行率資料和 DM 遺傳特性資訊，並可進一步調查 CTG 擴增突變之途徑和研究造成 CTG 擴增突變之源由，以作為將來遺傳諮詢和探討致病機轉之依據。



附圖一 DM 基因座附近的基因組合(Brewster et al. 1998)。



附圖二 RNA CUG 重複序列在 DM 致病機轉中所扮演的角色(Timchenko 1999)。由於 CTG expansion 造成 mRNA CUG repeat 之擴增，影響 CUG binding protein(CUG-BP)對其他 RNA 之結合，進而改變含 CUG 之 mRNA 的 splicing 和 translation，且造成一些組織的異常，包括腦部、心臟、睪丸和骨骼肌肉。



附圖三 人類 DM 激酶基因的結構圖(Krahe et al. 1995)。這基因的大小為 14kb(Mahadevan et al. 1994)。圖示：B, *Bam HI*；E, *Eco RI*；P, *Pst I* 為限制酶切點所在。DM 激酶(DMPK)在 intron 8 的位置有一 *Alu +/-1kb* 多型性。圖示的黑色方塊為不穩定之 $(CTG)_n$ 區域，位於 exon 15。此基因的定位是從遠端(telomere；TEL)到著絲點(centromere；CEN)。圖示之方塊是 exon，而有標示數字者為 exons 8、9 和 15。

材 料 與 方 法

- A. 檢體的收集及淋巴球細胞的轉型：正常人血液檢體的收集係透過自願方式，每位自願者抽取約 1ml，以聚合酶連鎖反應(PCR)和南方點漬法(Southern blot analysis)進行分析。DM 病人及其家屬檢體的收集透過醫師的合作，跟病人及其家屬溝通、並取得同意後，在醫護人員陪同下到其家裡抽取約 10ml 血液或刮取少許口腔細胞以進行分析。或者，醫師取得血液後直接將血液或粹取之血液 DNA 寄給我們分析。由於檢體收集不易，於是儘可能將 DM 病人及其家屬之淋巴球細胞轉型為類淋巴母細胞(lymphoblastoid cell)，以備將來分析之用。淋巴球細胞轉型之方法係參考 Neitzel 的報告修改而來(Neitzal 1986)。詳細步驟呈述如下：將 4.5ml 含抗凝血劑(heparin: B.Braun, 5000i.u./ml)之血液，用 1xPBS 等量稀釋，同時準備 15ml 之離心管並加入欲注入之 1xPBS 稀釋後血液量 1/2 體積的 Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech)，接著緩緩加入稀釋血液，離心 1,500rpm (離心機: HITACHI O5P-21) 30 分鐘之後，取 buffy coat (離心後分四層，此為灰白色之第二層)置於新的離心管並加入 10ml 的 1x PBS 清洗(上下 pipeting 3~5 次)，離心 1,500rpm, 10 分鐘之後，倒掉上清液再重覆此一清洗步驟並離心，

倒掉上清液並視 pellet 之大小加入至少 2ml 之 transforming medium。此 medium 的成份如下: 2 μ g/ml cyclosporin A (Sandoz) + 1/7 v/v filtered Epstein-Barr virus (EBV:ATCC 1395-8) + RPMI media (RPMI 1640 + 20% FBS + 1% L-glutamine + 1% PSN)。混合均勻再取出 2ml 之 mixture 加到 24 well (直徑 16mm) 之 plate dish (NUNC) 中，放入 incubator (37°C; 5%CO₂) 培養。3 天後，加入 2~3 drops (26G needle) 的 PHA (Phytohemagglutinin; GIBCO)，每七天換一次 medium (1 μ g/ml cyclosporin A + RPMI media)，視細胞生長狀況(colony 之多寡)，2 至 4 週後將細胞換到 25cm² flask 中繼續培養。

B. Genomic DNA 的抽取：

1. 利用 Genomic DNA isolation kit (Puregene, Gentra system)。此方法較省時、簡單，可很快取得 DNA 以進行 PCR 和 Southern blot。
2. Modified standard procedures：以含有 heparin 的針筒抽血 5ml，混合均勻後加入相對量(5ml)的 solution I (10mM Tris pH7.6; 10mM KCl; 10mM MgCl₂)。然後加入 120 μ l 之 Nonidet P40 (NP-

40; Sigma), 並混合均勻。以 2000rpm 離心 10 分鐘後, 吸去上層液, 加 solution I 至 10ml。之後, 以 2000rpm 離心 10 分鐘, 吸去上層液。加入 300 μ l solution I, 混合均勻後轉換到 1.5ml 離心管。加入 350 μ l solution II (10mM Tris pH7.6; 10mM KCl; 10mM MgCl₂; 1M NaCl; 1% SDS; 4mM EDTA), 在 60°C 至 65°C 水浴中溶至澄清為止。待細胞核溶解後, 加入 700 μ l 的 phenol(含 0.2% β -mercaptoethanol)粹取一次。再以 700 μ l 的 phenol/chloroform(含 0.2% β -mercaptoethanol)粹取一次。最後以 700 μ l 的 chloroform 粹取二次。然後加入 0.8 倍體積的異丙醇以沉澱 DNA, 經 70%酒精洗一次, 乾燥後, 將 DNA 溶於 200 μ l TE buffer, 再以光度比色儀(Spectrophotometer; DU-640, Beckman)測波長 260nm 的相對吸光值及 260nm/280nm 吸光比值, 由此得知 DNA 的量與質。

C. FTA-PCR 分析系統 :

此一系統係利用 FTA gene guard system 來收集、保存檢體, 以及純化 DNA, 接著將固著在 FTA 濾紙上已純化之 DNA 作為模

版，進行聚合酶連鎖反應(PCR)以放大 CTG 三聯核苷酸重複區域。其中，FTA gene guard system (Life Technologies)包括 FTA CARD 及 FTA purification reagent。FTA CARD 內含強力的 denaturants 可防止微生物的生長，避免核酸酶、氧化、以及紫外線的傷害因而能維持 DNA 的完整。操作時，先將 1~2 μl 血液檢體或含已轉型之淋巴球細胞(lymphoblastoid cells)之溶液滴至 FTA CARD 上；室溫下，讓濾紙上的溶液乾燥至少一個小時以上。若將含檢體之 FTA CARD 覆以膠膜(plastic wrap)，在室溫下可保存至少二個月以上，若將 FTA CARD 置於乾燥器(desiccator)內，則能保存數年而不影響 PCR 分析之結果。接著，以 1.2 mm 的打洞器(HARRIS MICRO-PUNCH™ from Life Technologies)將含檢體之濾紙打出，置於 PCR amplification tube 內。用 200 μl FTA purification reagent 清洗三次後再用 200 μl Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, pH8.0; 0.1 mM EDTA)清洗三次，乾燥至少一個小時後，加入 20 μl PCR amplification mix 即可進行反應。

1.正常 alleles 內 CTG 三聯核苷酸重複數目之偵測。以 ^{32}P -

incorporated PCR 方法行之。Primer 的設計與進行方法參考

Monckton et al. (1995)及 Monckton et al. (1997)。在 20 μ l 的 PCR 反應溶液中，含有 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.5 μ M primer, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton X-100, 4 μ Ci 的 α - [^{32}P]dCTP (10 mCi/ml), 和 1 unit 的 Taq DNA polymerase。

。將此反應溶液置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 480)中，反應之條件為 96°C 5min, 96°C 45sec/62°C 45sec/72°C 1min 30sec, 35 cycles，72°C 10min。所用之 forward primer 為 primer H，5'-TCTCCGCCCAGCTCCAGTCC-3'。reverse primer 為 primer ER，5'-AAATGGTCTGTGATCCCCC-3'。PCR 反應產物經加熱 100°C 10 分鐘後 run sequencing gel，以 auto-radiography 判讀產物大小，經與 DNA marker sequence (pGEM-3Zf(-))比對之後可決定 CTG repeat 的數目。

2.DM alleles 內 CTG 三聯核苷酸重複數目之偵測。以 PCR-based Southern blot 方法行之。PCR 反應所需模版係從血液檢體或細胞抽取之 DNA，或是純化過已固定在 FTA card 上的 DNA。在 20 μ l 的 PCR 反應溶液中，含有 1 x cDNA PCR reaction buffer, 1 M GC-melt, 1 x dNTP, 0.5 μ M primers (H&ER), and 0.8 μ l Advantage-GC cDNA polymerase mix (Clontech)。將此反應溶液

置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 9600)中,反應之條件為 94°C 1min, 94°C 20sec/68°C 2 min, 35 cycles, 68°C 5min, 之後保持在 15°C。接著 PCR 產物之 Southern blotting 乃利用非放射性的 Quick-Light detection system (Life Codes)。其步驟簡述如下:首先將 PCR 產物以 1.5% agarose gel 分離, 然後轉移至 filter membrane (GeneScreen Plus, NEN™ Life Science); filter membrane 與探針 (alkaline phosphatase -coupled (CTG)₁₀)雜交後, 依 manufacturer's instructions 清洗。接著將 Lumi-Phos 480 dioxetane solution 均勻噴灑在 filter membrane 上, 用 development folder 封好, exposed to X-ray film。所得之結果再以南方點漬法(Southern blot analysis)來證實。

D. 南方點漬法(Southern blot analysis) :

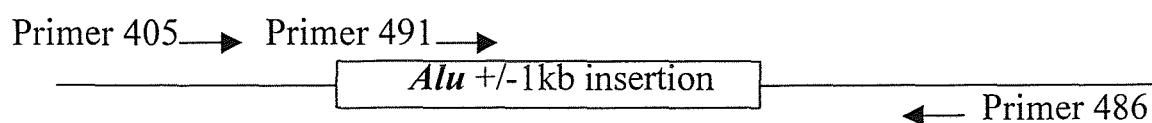
此法乃是傳統上用以偵測大範圍 CTG 序列擴增突變之用, 我們用來證實 CTG 三聯核苷酸重複數目偵測之分析結果(CTG 擴增長度)以及 *Alu*-PCR 之結果(*Alu* 多型性)。步驟詳述如下: 10μg 的 genomic DNA 以限制酶 *EcoRI* 切 16-20 小時。切過的 DNA run 0.8% agarose gel, 之後, 以 0.5M NaOH/1.5M NaCl 處理 agarose gel,

使 DNA 變性，再以 0.5M Tris (pH 7.4)/ 1.5M NaCl 中和。接著將 DNA 轉移至 nylon membrane，經 UV-cross link(1.5J/cm²)之後，置於 pre-hybridization 溶液中，在 42°C 下作用 4-6 小時。DNA probe 以 prime-a-gene kit (Promega)和 α -[³²P]dCTP 來標幟。雜交溶液 (hybridization solution)含有 50% formamide, 5x SSC, 5x Denhardt's solution, 0.02M Na₂PO₄, 10% dextran sulfate,和 100 μ g/ml single-stranded salmon sperm DNA。雜交反應在 42°C 下作用 16-20 小時。清洗的步驟分冷洗及熱洗；冷洗係在含 2XSSC 和 0.1%SDS 溶液，在室溫下清洗 2 次，每次各 15 分鐘。熱洗則在含 0.2x SSC 和 0.1% SDS 溶液，65°C 下清洗 2 次，每次各 30 分鐘。最後以 autoradiography 的結果來判定 CTG repeat 是否有擴增突變。

E. Alu +/-1kb 多型性之判定：

位於 DMPK 基因 intron 8 內有 1 kb *Alu* insertion /deletion polymorphism 之現象，為確定台灣地區 DM 患者其 CTG 之擴增突變是否發生於 *Alu*+1kb insertion 之 allele 以及 CTG 序列數目與 *Alu* 多型性之聯鎖關係，我們利用 PCR 之方法(稱為 *Alu*-PCR)。此法參考 Mahadevan 等人之作法(Mahadevan et al. 1993). 所用之

primers 包括二個 forward primers (primer 405-位於 1 kb *Alu* insertion 之 upstream, 以及 primer 491-位於 1 kb *Alu* insertion 內)和一個 reverse primer (primer 486-位於 1 kb *Alu* insertion 之 downstream)(請見下附簡圖)。在 20 μ l 的 PCR 反應溶液中, 含有 100-200 ng 的 genomic DNA, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 0.5 μ M primer, 以及 1 unit 的 Taq DNA polymerase。將此反應溶液置於迴溫反應器 (Perkin-Elmer 9600) 中, 反應之條件為 94°C 10min, 94°C 30 sec/60°C 1 min 30 sec/72°C 3 min 35 cycles, 72°C 10min。以 primers 491/486 放大 *Alu*+1kb insertion 之 allele 可得 1008 bp 的產物, 而以 primers 405/486 放大可得 1470 bp (*Alu*+1kb insertion)或 494 bp (*Alu*-1kb deletion)的產物。Primer sequence 如下: primer 405, 5'-CTGTATACTCAGCTACTAGGGT; primer 491, 5'-AAATAGGCTGGACCGCGG; primer 486, 5'-CTCAGGGGTTATCTAAAGTGCC。



F. 統計方法：利用卡方檢定法 (Chi-Square test)來檢測各族群間

(CTG)_n 分佈的差異。

$$X_c^2 = \sum \frac{(|O_i - E_i| - 0.5)^2}{E_i}$$

[X_c^2 : 卡方值 ; O_i : 實測值 ; E_i : 期望值 ; c : 葉氏連續性校正(Yate's correction for continuity) , 自由度為 1 時需要校正]

結果(Result)

非 DM 患者之檢體的來源包括正常人(中山醫學院師生及校外人士)、智能不足患者(mental retardation)、以及寡精子症(oligospermia)和無精子症(azoospermia)的患者，而 DM 病人及其家族檢體之收集方面，則透過高雄醫學院附設醫院、林口長庚紀念醫院、中國醫藥學院附設醫院、沙鹿光田醫院、彰化基督教醫院等醫院的神經內科醫師之協助。由於檢體收集的不易，所以只要有足夠量的血液檢體，我們均利用淋巴球細胞轉型(cell transformation)的方法，將淋巴球細胞轉型為類淋巴母細胞(lymphoblastoid cell)，以備將來分析之用。

本論文是針對台灣地區非 DM 患者之族群和 DM 病人及其家族這兩部份來分析其 CTG 重複序列數目的分佈及出現頻率、*Alu*+/-多型性、以及 DM 遺傳特性，所以結果也分非 DM 正常人和 DM 病人及其家族兩部份敘述：

(1) 非 DM 患者之族群：

a. CTG 重複序列數目的分佈及出現頻率：

檢體 DNA 之抽取係利用 Modified standard procedures
、 Genomic DNA isolation kit(Puregene, Gentra system)或 FTA
gene guard system(Life Technologies)。正常 alleles 內 CTG 重

複序列數目以 ^{32}P -incorporated PCR 方法行之(請見材料與方法)。如圖一所示，測得之訊號可能有兩個(異合子型；lanes 2-4, 6-11)或一個(同合子型；lane 1)。

我們分析了 439 位非 DM 患者之族群的檢體，圖二是台灣地區正常 allele 內(CTG)_n 重複序列數目之分佈範圍及其出現頻率。由圖可知，如同歐美及日本地區之情形(Brook et al. 1992, Davies et al. 1992)，正常 CTG 數目主要分佈在(CTG)₅ 以及(CTG)₁₁₋₁₃，這兩個 CTG 數目高峰群佔整體的百分之八十以上。特別值得注意的是，雖然以往華人地區正常人口中並沒有發現(CTG)_{>18} 之 allele (Tishkoff et al. 1998)，我們的調查顯示，台灣地區的確存在(CTG)_{>18} 之正常 allele。

b. 盛行率之概估：

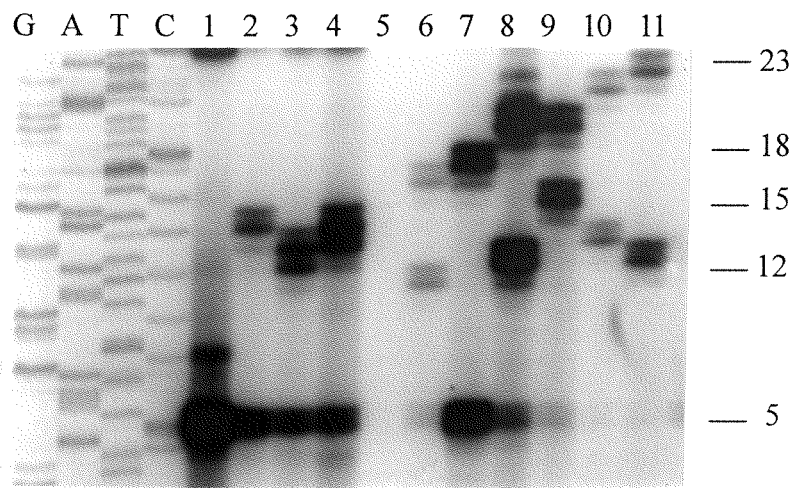
根據 Ashizawa 和 Epstein 等學者對各大醫院之問卷調查結果顯示，東南亞地區 DM 的流行率非常低。而在非洲地區流行率之更低，到目前為止，非洲地區也只在 Nigerian kindred 有一 DM 病例的報告 (Ashizawa and Epstein 1991)。依據 Goldman 等學者(Goldman et al. 1994)提出由正常人口中 CTG 重複序列數目之分佈狀況可概估 DM 盛行率。我們的結果顯

示，台灣地區正常 alleles 的 CTG 重複序列數目分佈中，發現 (CTG)_{>19} 之比例比歐洲及日本來得低(P<0.001)，而與非洲南部黑人地區相比並無差異(P>0.05)(表一)。在歐洲(CTG)_{>19} 之出現頻率為 11.54%，在日本(CTG)_{>19} 之出現頻率為 7.55% (Davies et al. 1992)，在台灣(CTG)_{>19} 之出現頻率只有 1.46%，而非洲南部黑人之(CTG)_{>19} 的出現頻率是 0.71% (Goldman et al. 1994)。已知的西歐及北美地區之 DM 發生率約為 1:8000 (Harper 1989)，在日本的發生率約為 1:18000(Davies et al. 1992)，所以預估台灣地區 DM 之盛行率可能低於日本的 1:18000，與 Ashizawa 和 Epstein 等學者的調查結果相符。此外，我們的結果顯示，正常人的 (CTG)_{>19} 之比例比無精子症患者的為低(P<0.05)(表二)。

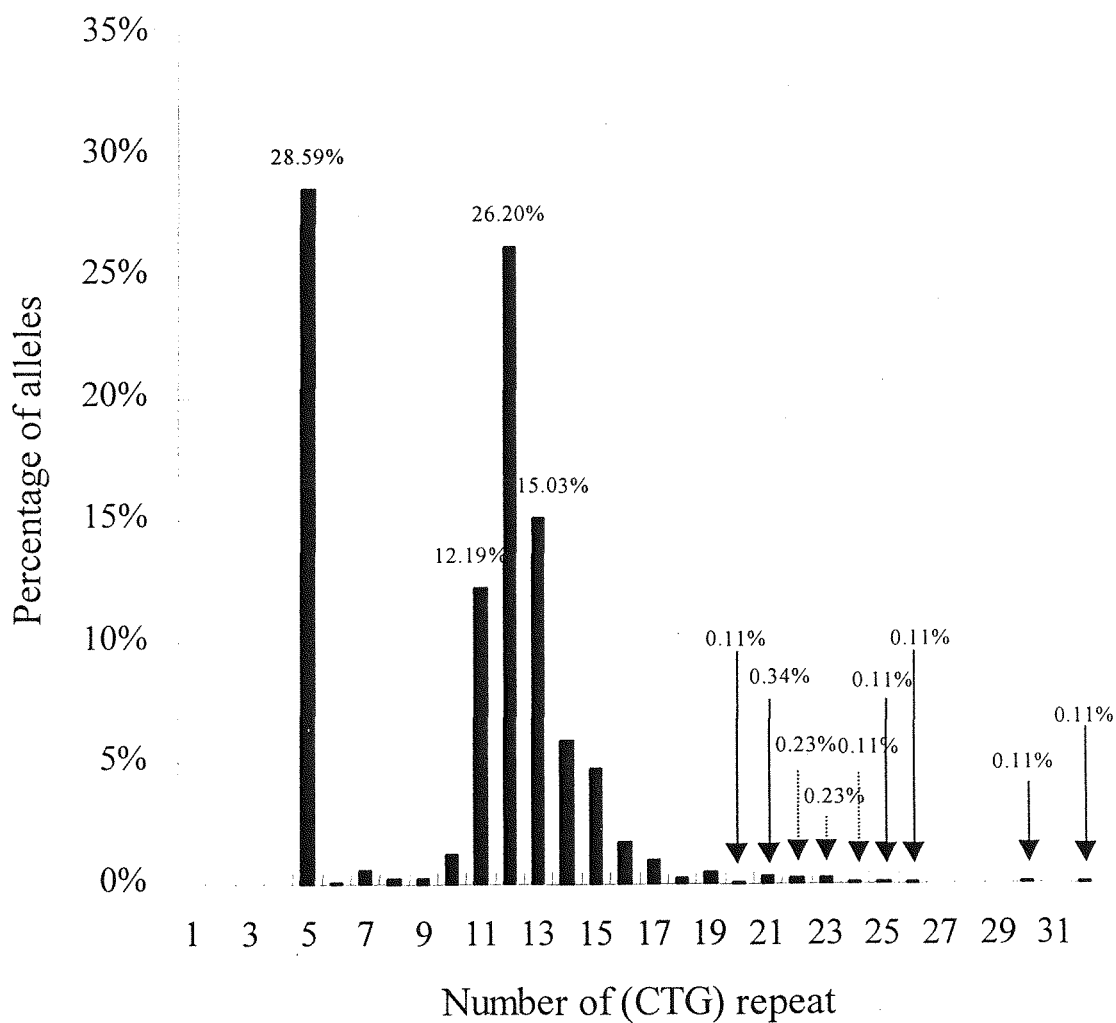
c. CTG 重複序列數目與 *Alu*+/- 多型性之關聯性：

在歐美地區，正常 alleles 中 *Alu*+1kb 與 *Alu*-1kb alleles 之比例約為 0.5:0.5(Imbert et al. 1993)，經我們調查此比例在台灣約為 0.4:0.6。這與亞洲地區其他族群中 *Alu*+/- 多型性之分佈非常類似(Tishkoff et al. 1998)。為進一步了解台灣地區具有不同 CTG 序列數目之 alleles 與 *Alu*+/- 多型性之連鎖不平衡

關係，我們共分析了 125 非 DM 患者族群且 *Alu*+/- 多型性為同合子型之檢體(即為 *Alu*+/+ 或 *Alu*-/-；見圖三)。結果發現有 36 個 (CTG)₅ alleles 為 *Alu*+1kb，有 9 個為 *Alu*-1kb，而 (CTG)₁₁、(CTG)₁₂ 及 (CTG)₁₃ alleles 雖然大部份為 *Alu*-1kb，也有部分出現在 *Alu*+1kb allele(約佔 4.4%)，且 3 個 (CTG)₁₉ alleles 全為 *Alu*-1kb(表三)。此結果與 Imbert 等人調查發現 (CTG)₅、(CTG)₁₀ 及 (CTG)₁₉₋₃₀ 只出現在 *Alu*+1kb allele，而 (CTG)₁₁₋₁₃(約則幾乎只出現在 *Alu*-1kb allele (Imbert et al. 1993)的結果不同，表示不同族群中 CTG 序列數目與 *Alu*+/- 多型性之聯鎖不平衡關係可能並不一樣。

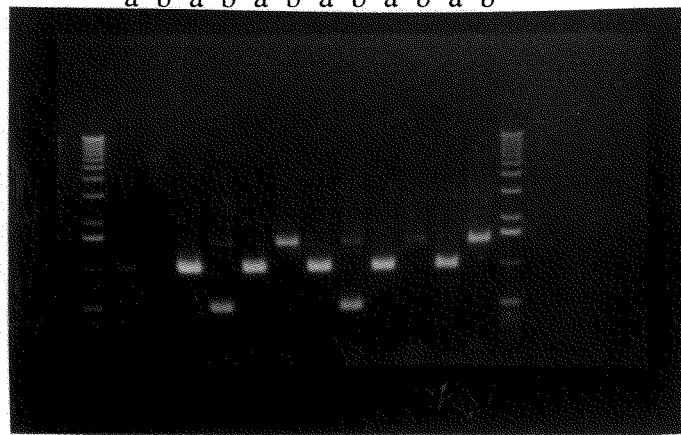


圖一 利用 ^{32}P -incorporated PCR 方法偵測正常 allele 之 CTG 重複序列數目。



圖二 不同 CTG 重複序列數目的出現頻率。總共分析了 439 非 DM 人士，計 878 個 alleles。

M 1 2 3 4 5 6 M
 a b a b a b a b a b



1.5kb
 1kb
 500bp

圖三 *Alu*+/-多型性之結果。若引子 491/486 得 1008bp 之產物而引子 405/486 沒有產物，則判定為 *Alu*-/-，如 lane 1；若引子 491/486 得 1008bp 之產物而引子 405/486 得 1470bp 及 494bp 的產物或只有 494bp 的產物，則判定為 *Alu*+/-，如 lane 2, 4；若引子 491/486 得 1008bp 之產物而引子 405/486 可得 1470bp 的產物則判定為 *Alu*+/+，如 lane 3, 5, 6。以”a“表引子為 491/486，而以”b“表引子為 405/486。

表一 臺灣、歐洲、日本及非洲南部黑人地區正常 CTG 序列數目分佈之比較。

CTG repeats	T	E	J	SA	T ∪ E	T ∪ J	T ∪ SA
(CTG) ₅₋₁₉	865	115	97	417	$X_c^2=39.21$	$X_c^2=17.8$	$X_c^2=0.838$
(CTG) _{>19}	13	15	9	3	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$

T: Taiwan(臺灣), E: European(歐洲), J: Japan(日本), SA: Southern African Negroid

表二 正常人、智能不足患者及無精子症患者正常 CTG 序列數目分佈之比較。

CTG repeats	N	MR	A	N ∪ MR	N ∪ A	MR ∪ A
(CTG) ₅₋₁₉	491	207	107	$X_c^2=0.006$	$X_c^2=6.90$	$X_c^2=1.6$
(CTG) _{>19}	5	3	5	$P>0.05$	$P<0.05$	$P>0.05$

N: 正常人, MR: 智能不足患者(mental retardation), A: 無精子症患者(azoospermia)

表三 CTG 重複序列數目與 *Alu*+/-多型性之關聯性

No. repeats	Allele 1	Allele 2
	(insertion)	(deletion)
	No. chromosomes	No. chromosomes
5	36	9
6		1
7	1	1
8	1	
9	1	1
10	1	2
11	5	33
12	4	87
13	2	32
14		16
15	2	5
16	1	3
17	1	1
18	1	1
19		3
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30	1	
31		
Total*	55	195

總共 125 位非 DM 正常人，計 250 個 alleles。其 *Alu*+/-多型性需全為 homozygous，即為 *Alu*+/+ 或 *Alu*-/-，才能精確地探討 *Alu*+ 或 *Alu*-與 CTG 重複序列數目關聯性。

(2) DM 病人及其家族：

我們利用 ^{32}P -incorporated PCR 方法偵測正常 alleles 內 CTG 重複序列數目，而在 DM alleles 內 CTG 重複數目之偵測則採 PCR-based Southern blot 方法(圖四)或 genomic Southern blot 方法(圖五)行之(請見材料與方法)。到目前為止，共收集並鑑定出分屬十一個家族共二十三位 CTG 有擴增突變之 DM 患者及尚未發病者。其中，有兩個家族，共三位 DM 患者之 CTG 重複序列數目尚待確認，所以只列出九個 DM 家族之族譜、CTG 重複序列數目以及 *Alu*+/-多型性存在之情形：

Family I：共檢測七位家族成員，包括二位 DM 患者及五位正常人，其家族圖譜見圖六。在此四代族譜中，第一代已全死亡，第二、三代各有一和兩位已出現臨床症狀之 DM 患者，而第四代經分子診斷沒有發現 CTG

序列有超過正常範圍之染色體存在。在三位 DM 患者中，我們取得其中兩位之檢體(II 6 及 III 2)，經

Southern blot 分析証實有 CTG 序列擴增突變，由 CTG 重複序列數目及 *Alu*+/-多型性之結果(表四)可知：II 6

及 III 2 DM 患者，其擴增的 CTG 數目分別為 170 及 300，而在 *Alu*+/-多型性方面，II 6、III 2 及 IV 2 是

Alu+/+，III 1、IV 1 及IV 3 為 Alu+/-。此外，我們發現III 6 的(CTG)₁₃ 出現在 Alu+1kb allele。

Family II：僅取得家族成員中一位 DM 患者之檢體，其家族圖

譜見圖七：共三代，在第二代有兩位 DM 患者，但只取得一位女性 DM 患者(II 2)的檢體作分析，而這位女性 DM 患者已有兩次流產經驗，幸運的是已產下一子了，可惜無法取得其子之檢體作分析，但據了解現在完全正常。II 2 擴增之 CTG 重複序列數目為 660，而 Alu+/- 多型性是 Alu+/-見表五。

Family III：共檢測三位家族成員，包括一位 DM 患者(兒子;III 3)

及兩位正常人(父母親;II 4、II 5)，父親(II 4)的 CTG 重複序列數目為 5,40，母親(II 5)的 CTG 重複序列數目為 11,11，而小孩(III 3)的 CTG 重複序列數目為 11,1100 且已呈現 DM 的臨床症狀，此為少見由正常 CTG 長度擴增到(CTG)_{>1000} 之突變。Alu+/-多型性

: II 4 是 Alu+/+，II 5 是 Alu-/-，而 III 3 為 Alu+/-

。其家族圖譜見圖八和 CTG 重複序列數目及 Alu+/- 多型性之結果見表六。

Family IV：共檢測三位家庭成員，包括父母親(正常人; I 1、I 2) 和兒子(DM 患者; II 1)，但父親的 CTG 重複序列數目為 5,75，雖超出正常範圍，但無 DM 的臨床症狀，而為尚未發病者，而小孩的 CTG 重複序列數目為 5,500，已出現 DM 的臨床症狀，此一子代 DM 的發病年齡比親代早而且症狀也比較嚴重的現象稱為 anticipation。此外，I 1 及 II 1 是 Alu+/+，I 2 為 Alu+/- (表七)。其家庭圖譜見圖九。

Family V：共檢測七位家族成員，包括兩位 DM 患者和五位正常人，其家族圖譜見圖十：II 12、II 14 在臨床症狀診斷及分子判斷上均確定為 DM 患者，但 II 10 據醫師的臨床症狀診斷是 DM，卻無 CTG 重複序列數目的擴增而為 14,17。II 10 及 III 10 是 Alu+/+

和III 11 為 Alu-/-，其餘都是 Alu+/-(表八)。

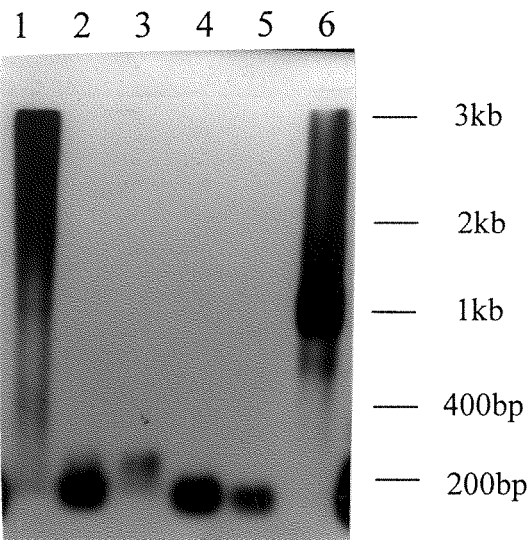
Family VI：共檢測八位家族成員，包括五位 DM 患者和三位正常人，其家族圖譜見圖十一：II 7 與III 6 是父子，而擴增之 CTG 重複序列數目分別為 800 及 1000，兒子的 CTG 擴增數目大於父親的 CTG 擴增數目(子：1000 > 父：800)且症狀較嚴重又較早發病，此為 anticipation 現象。除了III 5 是 Alu-/-和III 6 是 Alu+/+，其餘全是 Alu+/-(表九)。

Family VII：共檢測兩位家族成員，包括母親(正常人)和兒子(DM 患者)，其家族圖譜於圖十二。母親的 CTG 重複序列數目為 5,5，兒子的 CTG 重複序列數目是 5,250，而母親及兒子均為 Alu+/+(表十)。

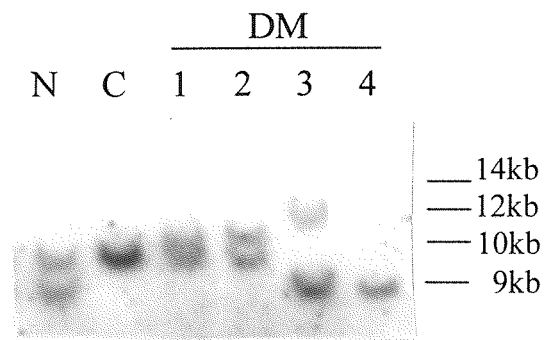
Family VIII：共檢測五位家族成員，包括父親(正常人)、母親(帶因者)及三位孩子(兩位 DM 患者和一位正常人)，母親的 CTG 重複序列數目為 5,150 超出正常範

圍，而為尚未發病者，而兩位 DM 孩子擴增之 CTG 重複序列數目分別為 500 及 600 且有 DM 的臨床症狀出現，所以有 anticipation 現象。I 1 及 II 1 是 Alu+/+，其餘全是 Alu+/+(表十一)。其家族圖譜見圖十三。

Family IX：共檢測三位家庭成員(共四人，但父親已死亡)，包括母親(正常人)和兩位 DM 的孩子，而其父親雖已死亡但據親人描述他可能也有肌肉萎縮方面的症狀。母親的 CTG 重複序列數目是 13,13，兒子擴增的 CTG 重複序列數目是 200，而女兒擴增的 CTG 重複序列數目是 1200。母親是 Alu-/-，兩位孩子都是 Alu+/- (表十二)。其家庭圖譜見圖十四。

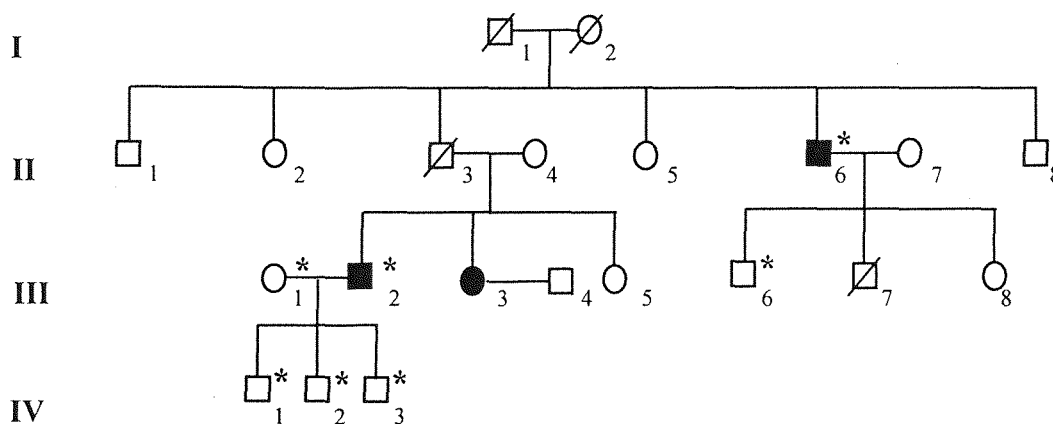


圖四 利用 PCR-based Southern blot 偵測 DM alleles 內 CTG 重複序列數目。lane1,6:DM 患者；lane2-5: 正常人。



圖五 利用南方點漬法(Southern blot) 偵測 DM alleles 內 CTG 重複序列數目。N：正常人；C：帶因者(尚未發病者)；lane1-4：DM 患者。

Family I :



圖六 Family I的家族圖譜。

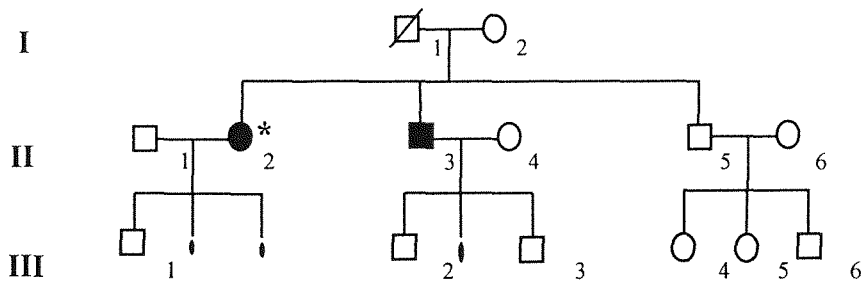
□表男性,○表女性,☐表已死亡男性,∅表已死亡女性,■表男性之DM患者,●表女性之DM患者,有"*"表已取得檢體分析

表四 Family I的CTG重複序列數目及Alu+/-多型性之結果。

Family I	檢體編號	Alu+/-	CTG 重複序列數目
II 6	DM001	+ / +	5, 170 ^a
III 1	DM032	+ / -	5, 11
III 2	DM002	+ / +	5, 300 ^a
III 6	DM003	+ / +	5, 13
IV 1	DM004	+ / -	5, 11
IV 2	DM005	+ / +	5, 5
IV 3	DM006	+ / -	5, 11

^a : 以 Southern blot 偵測

Family II :



圖七 Family II的家族圖譜。

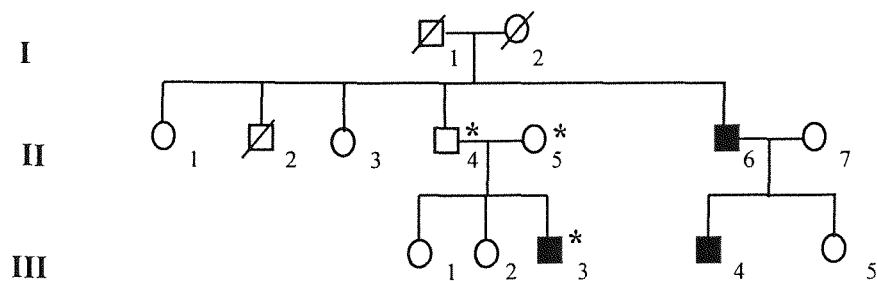
□表男性,○表女性,☐表已死亡男性,■表男性之DM患者,
●表女性之DM患者,“|”表流產,有“*”表已取得檢體分析。

表五 Family II的 CTG 重複序列數目及 Alu+/-多型性之結果。

Family II	檢體編號	Alu+/-	CTG 重複序列數目
II 2	DM007	+/-	12,660 ^a

“a”：以 Southern blot 偵測

Family III :



圖八 Family III的家族圖譜。

□表男性,○表女性,☐表已死亡男性,∅表已死亡女性,■表男性之DM患者,有"*"表已取得檢體分析

表六 Family III的 CTG 重複序列數目及 Alu+/-多型性之結果。

Family III	檢體編號	Alu+/-	CTG 重複序列數目
II 4	DM008	+ / +	5,40
II 5	DM009	- / -	11,11
III 3	DM010	- / +	11, 1100 ^a

^a“a”：以 Southern blot 偵測

Family IV :



圖九 Family IV的家庭圖譜。I 1，其 CTG 重複序列數目擴增為 75 雖已超過正常範圍(5-38)，但還沒有 DM 的臨床症狀出現，所以只能定義為尚未發病者。

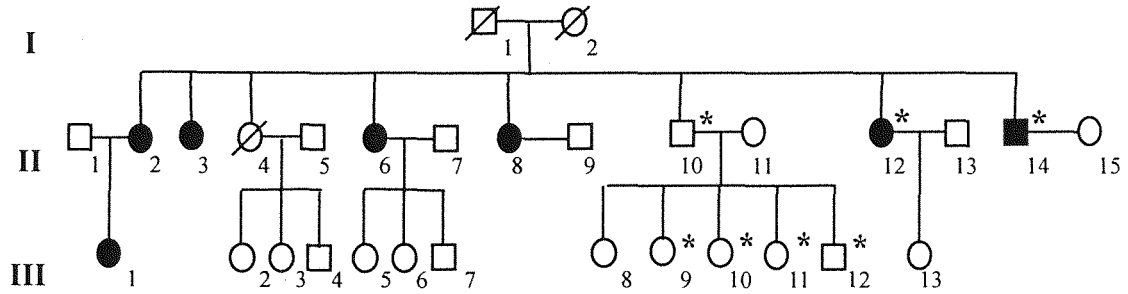
□表男性,○表女性,■表男性之 DM 患者,有"*"表已取得檢體分析

表七 Family IV 的 CTG 重複序列數目及 Alu+/-多型性之結果。

Family III	檢體編號	Alu+/-	CTG 重複序列數目
I 1	DM011	+ / +	5,75 ^b
I 2	DM012	+ / -	5,8
II 1	DM013	+ / +	5, 500 ^a

“a”：以 Southern blot 偵測；“b”：以 PCR-based Southern blot 偵測

Family V :



圖十 Family V 的家族圖譜。

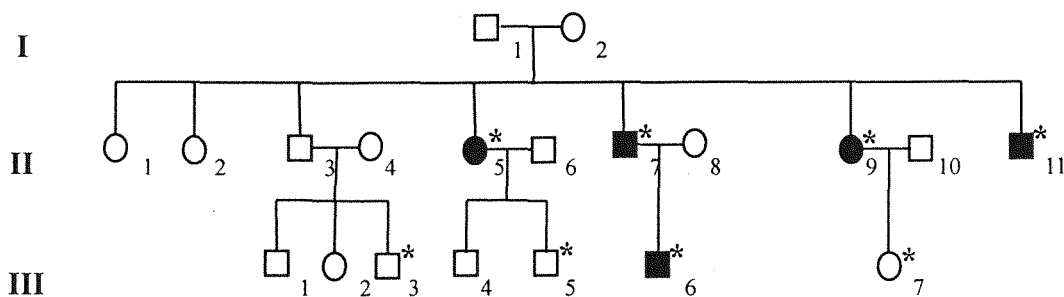
□表男性,○表女性,◻表已死亡男性,◊表已死亡女性,■表男性之 DM 患者,●表女性之 DM 患者,有"*"表已取得檢體分析

表八 Family V 的 CTG 重複序列數目及 Alu+/- 多型性之結果。

Family V	檢體編號	Alu+/-	CTG 重複序列數目
II 10	1870	+ / -	14,17
II 12	1859	- / +	13,750 ^b
II 14	1861	- / +	14,800 ^b
III 9	1866	+ / +	5,14
III 10	1867	+ / -	5,17
III 11	1868	- / -	17,17
III 12	1869	+ / +	5,14

“b”：以 PCR-based Southern blot 偵測

Family VI :



圖十一 Family VI的家族圖譜。

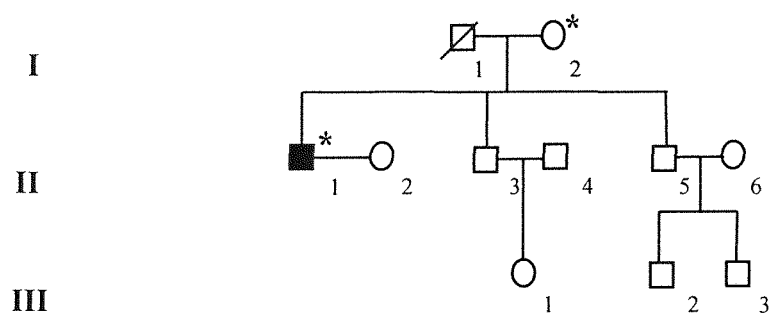
□表男性, ○表女性, ■表男性之 DM 患者, ●表女性之 DM 患者, 有"*"表已取得檢體分析

表九 Family VI的 CTG 重複序列數目及 Alu+/-多型性之結果。

Family VI	檢體編號	Alu+/-	CTG 重複序列數目
II 5	DM014	-/+	13,800 ^a
II 7	DM015	-/+	13,800 ^a
II 9	DM016	-/+	14,600 ^a
II 11	DM036	-/+	14,800 ^b
III 3	DM037	+/-	5,11
III 5	DM017	-/-	13,13
III 6	DM018	+/+	5,1000 ^a
III 7	DM019	+/-	5,13

“a”：以 Southern blot 偵測；“b”：以 PCR-based Southern blot 偵測

Family VII :



圖十二 Family VII的家族圖譜。

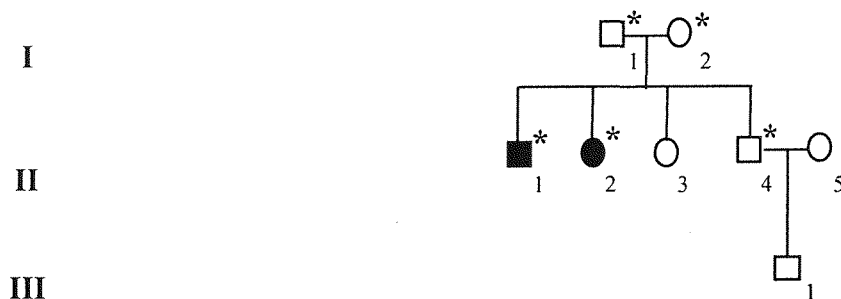
□表男性,○表女性,☐表已死亡男性,■表男性之DM患者,
有"*"表已取得檢體分析

表十 Family VII的 CTG 重複序列數目及 Alu+/-多型性之結果。

Family VII	檢體編號	Alu+/-	CTG 重複序列數目
I 2	DM020	+ / +	5,5
II 1	DM021	+ / +	5,250 ^b

“b”：以 PCR-based Southern blot 偵測

Family VIII :



圖十三 Family VIII的家庭圖譜。I2，其 CTG 重複序列數目擴增為 150 雖已超過正常範圍(5-38)，但還沒有 DM 的臨床症狀出現，所以只能定義為尚未發病者。

□表男性，○表女性，■表男性之 DM 患者，●表女性之 DM 患者，有"*"表已取得檢體分析

表十一 Family VIII的 CTG 重複序列數目及 Alu+/-多型性之結果。

Family VIII	檢體編號	Alu+/-	CTG 重複序列數目
I 1	DM022	+ / -	5,13
I 2	DM023	+ / +	5,150 ^b
II 1	DM024	- / +	13,500 ^b
II 2	DM025	+ / +	5,600 ^b
II 4	DM026	+ / +	5,5

"b"：以 PCR-based Southern blot 偵測

Family IX :



圖十四 Family IX的家庭圖譜。

□表男性,○表女性,☐表已死亡男性,■表男性之DM患者,
●表女性之DM患者,有"*"表已取得檢體分析

表十二 Family IX的CTG重複序列數目及Alu+/-多型性之結果。

Family IX	檢體編號	Alu+/-	CTG 重複序列數目
I 2	DM027	- / -	13,13
II 1	DM028	- / +	13,200 ^a
II 2	DM029	- / +	13,1200 ^a

^a : 以 Southern blot 偵測

討 論

台灣地區存在有很多種遺傳性疾病都可找到，但往往由於患者太少而難以詳細研究。如 DM，雖然被認為是遺傳性神經肌肉疾病中最普遍的一種，然而其發生率有區域性；在日本，發生率約為 1:18000(Davies et al. 1992)，西歐及北美地區約為 1:8000(Harper et al. 1989)，而在加拿大魁北克省 Saguenay-Lac-St-Jean 區域則高達 1:475(Bouchard et al. 1989)。根據 Ashizawa and Epstein 等學者對各大醫院之問卷調查結果顯示，東南亞地區 DM 的盛行率遠比上述區域為低(Ashizawa and Epstein 1991)，但並無確實的數字報告。在台灣，我們根據 Goldman 等學者(Goldman et al.1994)提出由正常人口中 CTG 重複序列數目之分佈狀況亦可概估 DM 盛行率，經實驗結果推估台灣地區之 DM 盛行率可能低於日本的 1:18000，與 Ashizawa and Epstein 等學者的調查結果相符。然而 Goldman 等人(Goldman et al.1994)也指出非洲南部黑人中尚未發現 DM 患者的存在，可是從比較台灣地區和非洲南部黑人的 $(CTG)_{>19}$ 之比例，無統計上的差異 ($P>0.05$)(表二)，但我們在台灣地區到目前為止已鑑定出 23 位 CTG 重複序列有擴增突變之 DM 患者及尚未發病者，所以我們認為非洲南部黑人應該有 DM 患者只是還未找到而已。另外，我們分別比較

了正常人和智能不足患者、正常人和無精子症患者及智能不足患者和無精子症患者之(CTG)_{>19}的比例，發現無精子症患者之(CTG)_{>19}的比例比正常人的高(P<0.05)(表三)，無精子症患者之(CTG)_{>19}出現頻率是 4.45%，正常人的(CTG)_{>19}出現頻率只有 1.00%，且無精子患者和嚴重的 DM 患者均有男性不孕的病症，而它們之間有何種的關係，我們並不知道，這可待日後繼續研究探討。

DM 患者及其家族檢體之收集，除了有助於了解台灣地區 DM 之分佈與盛行率之外，亦可藉以建立台灣地區 DM 之遺傳特性資料。由分析現有台灣地區 DM 家族之臨床症狀、CTG 序列數目、Alu+/-多型性等資料我們歸納出以下數項遺傳特性：(A)CTG 擴增長度大致上與 DM 發病年齡提早及症狀嚴重程度呈正相關。表現出典型 DM 症狀之病人其血液 DNA 內 CTG 序列的數目皆大於 200，數目小於 200 者則多無肌肉方面之臨床症狀。在(CTG)_{>200}之 DM 患者中，絕大部份發病年齡則介於 12~38 歲之間，其中一位具有(CTG)₁₁₀₀之男性病人(Family III：III 3)在 4 歲時出現四肢無力(limb weakness)現象，在 10 歲時口語不清、吞嚥困難、咬嚼無力等症狀已很明顯，是屬於 childhood-onset DM。但另有一位具有(CTG)₁₂₀₀之女性病人(Family IX：II 2)在 20 歲之前沒有明顯的 DM 症狀，其主要臨床表徵

是眼皮下垂(ptosis)及輕微顏面肌肉萎縮。有一位具(CTG)₇₅₀之病人(Family V: II 12)則在三十八歲時因肺炎併發症而去世。這些現象顯示雖然 CTG 的擴增長度與臨床症狀之嚴重性有關，但個體間之差異相當大，顯示 CTG 的擴增突變可能妨礙多個基因的表現及 RNA 的代謝，進而影響個體內一個或多個器官之功能(Korade-Mirmics et al. 1998)，或者，有一基因突變(mutator gene)發生在 DM 個體內除了促成 CTG 的擴增突變之外同時也影響到整個基因組的穩定性(Kunkel et al. 1997)，因而造成症狀的多樣性。雖然目前對 DM 的致病機轉仍不甚清楚，愈來愈多證據顯示以上二種可能性皆存在。(B)Alu^{+/-}多型性(Alu^{+/-} polymorphism)與 DM 連鎖不平衡之關係。在 CTG 重複序列位置上游約 5kb，也就是 DMPK 基因第八個 intron 內有 Alu^{+/-}1kb 多型性存在，因此限制酶 *EcoRI* 切出含有 CTG 重複序列的正常 DNA 長度可能是 8.6kb 或 9.6kb。除了一篇對奈及利亞 DM 家族所作的分析報告(Krahe et al. 1995)指出，這個家族中 DM 患者的 CTG 擴增突變發生在 Alu-1kb 的 allele，其他目前已知 CTG 擴增突變皆發生在 Alu+1kb 的 allele。我們分析現有的資料結果顯示台灣地區 CTG 擴增突變亦發生在 Alu+1kb 的 allele。因此，DM 與 Alu 多型性有非常緊密的連鎖不平衡關係。然而至目前為止，並無證據顯示 Alu insertion

sequence 與 CTG 擴增突變有直接關係。未來，我們將進一步調查其他的標幟與 DM 之連鎖關係，藉由單套型分析(Haplotype analysis)來調查正常人內具不同 CTG 序列數目之 alleles 與 DM alleles 之單套型，藉以了解 DM 可能之發生途徑並作為遺傳諮詢的參考。(C)親子代間 CTG 重複序列長度變化(intergenerational CTG length stability)、DM 臨床表徵(clinical manifestations)與性別(sex)的關係。在二十三位 CTG 有擴增突變之 DM 患者及帶原者中男性佔了十二位，女性佔了十一位，所以其分佈沒有明顯的性別之分；在十一個 DM 家族中，經檢測親子代的 CTG 序列數目皆超過 40 者有四個家庭(FamilyIII：II 4 /III 3；圖八，FamilyIV：I 1 /II 1；圖九，FamilyVI：II 7 /III 6；圖十一，FamilyVIII：I 2 /II 1&2；圖十三)。他們的 CTG 序列長度皆表現出兩代之間 CTG 重複序列長度的增加(intergenerational expansion)，而無負擴增(negative expansion)即無 CTG 重複序列長度減少 (Abeliovich et al. 1993)情形。並且，他們的臨床表徵亦顯現出 anticipation 現象，亦即子代 DM 的發病年齡比親代早而且症狀也比較嚴重(Howeler et al. 1989)。台灣地區 DM 之遺傳特性，包括 CTG 長度與症狀嚴重程度之關係、anticipation 現象、及 DM 與 Alu 多型性連鎖不平衡之關係等，與歐美和日本等民族非常

類似。此外，我們發現有分屬三個家族共五位懷疑是 DM，但並無 CTG 擴增突變之肌肉萎縮症患者(Family V: II 10, 其餘資料沒有列出)。由於約有 1~2%的 DM 患者並無 CTG 擴增突變(Brook et al. 1992; Harley et al. 1992)，這類患者有可能是由另一染色體區域發生突變所造成(Ranum et al. 1998)。此區域位於染色體 3q (between markers D3S1765 and D3S3684, about 10 cM)內，目前並不清楚是什麼基因或何種突變所造成。

由我們的強直型肌肉萎縮症家族資料顯示同一家族內病人人數有遞減之現象，此與 DM 之 anticipation 現象和嚴重 DM 病人之低生育能力有關。目前的研究證據顯示藉著 CTG 重複序列的擴增突變，新的 DM 個案會不斷產生。在台灣地區，我們發現 DM 病人分佈在很多家族(十一個 DM 家族皆屬不同姓氏)，暗示著此一疾病的分佈很廣泛。由於 CTG 重複序列之數目在正常範圍((CTG)_{n<38})時非常穩定，而正常 CTG 序列數目分佈集中在 5 以及 11-13，因此 CTG 數目之不安定性研究從未發現有發生在重複次數 30 以內者。雖然 Imbert 等人根據 CTG 數目與 Alu+/- 多型性之連鎖關係而提出 CTG 擴增突變途徑係經由(CTG)₅₋₁₀，跳過(CTG)₁₁₋₁₃，到(CTG)₁₉₋₃₀，而最後至(CTG)_{>50} 之模式(Imbert et al. 1993)。然而，由少數(CTG)₁₁₋₁₃ 之 allele

是 Alu+1kb allele 的情況(~4.4%)看來(Imbert et al. 1993 ; Hsiao et al., unpublished result), 有可能是原先存在二群主要 alleles, 一是(CTG)₅, 另一是(CTG)₁₁₋₁₃, 在人類演化過程中極少數(CTG)₅ alleles 發生擴增突變成(CTG)₁₁₋₁₃, 然後這些具有與(CTG)₅ alleles 相同 haplotype 之(CTG)₁₁₋₁₃ alleles 再擴增至(CTG)₂₀ 以上; 或者, (CTG)₁₁₋₁₃ 與 Alu+1kb marker 有聯鎖關係之 allele 只是重組(recombination)的結果, 為區分這二種可能性, 我們將會利用分佈在 Alu sequence 與 CTG region 周圍的多個 markers(Neville et al. 1994), 作聯鎖分析。此單套型分析之結果應能解釋(CTG)₁₃ 與 Alu+1kb marker 之聯鎖關係是否由重組所造成。為進一步探討 CTG 擴增突變途徑, 我們將收集具有與 Alu+1kb 有聯鎖關係之(CTG)₁₁₋₁₃ allele 的正常人, 及其家族檢體作單套型分析(haplotype analysis)。若他們(CTG)₁₁₋₁₃ allele 的單套型與(CTG)₅、(CTG)₂₀₋₃₀ 及(CTG)_{>50} allele 之單套型皆一致(稱為 DM-haplotype), 則 CTG 擴增途徑係經由(CTG)₅₋₁₀, 跳至(CTG)₁₁₋₁₃, 到(CTG)₂₀₋₃₀, 而最後至(CTG)_{>50} 之可能性大為提高。若此模式屬實, 那麼, 顯然具有 DM-haplotype 之(CTG)₁₁₋₁₃ 的 allele 遠比不具 DM-haplotype 之(CTG)₁₁₋₁₃ 的 allele 不安定, 而容易發生擴增突變; 也就是說, 除了 CTG 序列數目之外, 另有其他會影響基因組穩定性之 cis elements 存在於

基因組之中，使具有某種特別之基因組組合的人容易產生 CTG 序列擴增而造成 DM，此仍有待進一步探討。

參 考 文 獻

- Abeliovich, D., Lerer, I., Pashut-Lavon, I., Shmueli, E., Raas-Rothschild, A., and Frydman, M. (1993) Negative expansion of the myotonic dystrophy unstable sequence. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 1175-1181
- Ashizawa, T. and Epstein, H. F. (1991) Ethnic distribution of the myotonic dystrophy gene. *Lancet* 338, 642-643.
- Aslanidis, C., Jansen, G., Amemiya, C., Shutler, G., Mahadevan, M., Tsilfidis, C. et al. (1992) Cloning of the essential myotonic dystrophy region: mapping of the putative defect. *Nature* 355, 548-551.
- Batten, F.E. and Gibb, H.P. (1909) Myotonia atrophica. *Brain*, 32, 187-205.
- Bouchard, G., Roy, R., Declos, M., Mathieu, J., and Kouladjian, K. (1989) Origin and diffusion of the myotonic dystrophy gene in the Saguenay region (Quebec). *Can. J. Neurol Sci.* 116, 119-122.
- Boucher, C. A., King, S. K., Carey, N., Krahe, R., Winchester, C. L., Rahman, S., Creavin, T., Meghji, P., Bailey M. E. S., Chartier, F. L., Brown, S. D., Siciliano, M. J., and Johnson, K. L. (1995) A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)_n repeat. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1919-1925.
- Brewster B., Groenen P., Wieringa B.(1998) Myotonic Dystrophy: Clinical and Molecular Aspects. "Neuromuscular Disorders: Clinical and Molecular Genetics". edited by A. E.H. Emery JOHN WILEY & SONS PP323-364.
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J.-P., Hudson, T., Sohn, R., Zemelman, B., Snell, R. G., Rundle, S. A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Johns, C., Juvonen, V., Johnson, K., Harper, P. S., Shaw, D. J., and Housman D. E. (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at

the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member.
Cell 68, 799-808.

Buxton, J., Schelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Van Tongeren, T.,
Aslanidis, C., De Jong, P., Jansen, G., Anvert, M. et al.. (1992)
Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with
myotonic dystrophy. *Nature* 355, 547-548.

Davies, J., Yamagata, H., Shelbourne, P., Buxton, J., Ogihara, T.,
Nokelainen, P., Nakagawa, M., et al. (1992) Comparison of the
myotonic dystrophy associated CTG repeat in European and Japanese
populations. *J. Med. Genet.* 29, 766-769.

Fu, Y.-H., Pizzuti, A., Fenwick, R. G., King, J., Jr., Pajnarayan, S., Dunne,
P. W., Dubel, J., Nasser, G. A., Ashizawa, T., de Jong, P., Wieringa, B.,
Korneluk, R., Perryman, M. B., Epstein, H. F., and Caskey, C. T. (1992)
An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular
dystrophy. *Science* 255, 1256-1258.

Goldman, A., Ramsay, M., and Jenkins, T (1994) Absence of myotonic
dystrophy in southern African Negroids is associated with a
significantly lower number of CTG trinucleotide repeats. *J. Med.
Genet.* 31, 37-40.

Harley, H. G., Brook, J. D., Rundle, S. A., Crow, S., Reardon, W.,
Buckler, A. J., Harper, P. S., Housman, D. E., and Shaw, D. J. (1992)
Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in
myotonic dystrophy. *Nature* 355, 545-546.

Harper P. S. (1989) Myotonic dystrophy, 2nd ed., WB Saunders,
London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo.

Harper P. S. and Dyken, P. R. (1972) Early onset dystrophia myotonica –
evidence supporting a maternal environmental factor. *Lancet* 2, 53-55.

- Harris, S., Moncrieff, C., and Johnson, K. (1996) Myotonic dystrophy: will the real gene please step forward! *Hum. Mol. Genet.* 5, 1417-1423.
- Howeler, C. J., Busch, H. F. M., Geraedts, J. P. M., Niermeijer, M. F., and Staal A. (1989) Anticipation in myotonic dystrophy: fact or fiction? *Brain* 112, 779-797.
- Imbert, G., Kretz, C., Johnson, K., and Mandel, J.-L. (1993) Origin of the expansion mutation in myotonic dystrophy. *Nature Genet.* 4, 72-76.
- Johnson, K. J., Shelbourne P., Davies J., Buxton J., Nimmo E., Siciliano M. J., Bachinski L. L., Anvret M., Harley H., Rundle S., Miki T., Brunner H., Williamson R. (1990) A NEW Polymorphic Probe Which Defines the Region of Chromosome 19 Containing the Myotonic Dystrophy Locus. *Am. J. Hum. Genet* 46, 1073-1081
- Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D., and Tapscott, S. J. (1997) Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of *DMAHP*. *Nature Genet.* 16, 402-406.
- Korade-Mirnic, Z., Babtizke, P., and Hoffman, E. (1998) Myotonic dystrophy: molecular windows on a complex etiology. *Nucleic Acids Res.* 26, 1363-1368.
- Krahe, R., Eckhart, M., Ogunniyi, A. O., Osuntokun, B. O., Siciliano, M. J., and Ashizawa, T. (1995) De novo myotonic dystrophy mutation in a Nigerian kindred. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 1067-1074.
- Kunkel, T.A., Resnick, M.A., and Gordenin, D.A. (1997) Mutator specificity and disease: looking over the FENCE. *Cell* 88, 155-158.
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcero, J., O'Hoy, K., Leblond, S., Earle-Macdonald, J., de Jong, P. J., Wieringa, B., and Korneluk, R. G. (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253-1255.

- Morgenlander, J. C. and Massey, J. M. (1991) Myotonic dystrophy. *Semin. Neurol.* 11, 236-243
- Neitzel, H. (1986) A routine method for the establishment of permanent Growing lymphoblastoid cell lines. *Hum. Genet.* 73, 320-326.
- Neville, C.E., Mahadevan, M.S., Barcelo, J.M., Korneluk, R.G.(1994) High resolution genetic analysis suggests one ancestral predisposing Haplotype for the origin of the myotonic dystrophy mutation. *Hum. Mol. Genet.* 1, 45-51
- Ranum, L.P.W., Rasmussen, P.F., Benzow, K.A., Koob, M.D., and Day, J.W. (1998) Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nature Genet.* 19, 196-198.
- Steinert, H. (1909) Myopathologische Beitrage 1. Uber das Klinische und anatomische Bild des Muskelschwunds der Myotoniker. *Dtsch. Z. Nervenheilkd*, 37, 58-104
- Thornton C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C., and Moxley, R. T. (1997) Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking *DMAHP* gene. *Nature Genet.* 16, 407-409.
- Timchenko, L. T. (1999) Human genetic '99: Trinucleotide repeats Myotonic dystrophy: the role of RNA CUG triplet repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 360-364.
- Tishkoff, S.A., Goldman, A., Calafell, F., Speed, W.C., Deinard, A.S., Bonne-Tanir B., Kidd, J.R., Pakstis, A.J., Jenkins, T., and Kidd, K.K. (1998) A global haplotype analysis of the myotonic dystrophy locus: implications for the evolution of modern humans and for the origin of myotonic dystrophy mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1389-1402.

論文口試問題：

◇是否有其他因 CTG 重複序列擴增而導致的疾病？

Ans：據 Koob 等學者指出第八亞型小腦脊髓運動失調症候群(SCA8)也是因為 CTG 重複序列擴增突變所導致的(Koob et al. 1999, *Nature Genetics* 21, 379-384)。

◇DM 依其臨床症狀可區分成三類：溫和型 DM (mild DM)、典型 DM (classical DM)及先天型 DM (congenital DM)，若再配合發病年齡來看，則典型 DM 及先天型 DM 之間的發病年齡差距過大，是否其間有另一類 DM 的存在？

Ans：有，child-onset DM，可是這一類的病例太少了，所以一般教科書或發表的論文，還是以溫和型 DM、典型 DM 及先天型 DM 為 DM 的主要分類。