

# 行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

## 台灣地區肌強直型肌肉萎縮症遺傳特性分析及其致病機轉之探討

Genetic analysis and study of pathogenic mechanism of myotonic dystrophy in Taiwan

計劃編號：NSC 88-2314-B-040-021

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：蕭光明 中山醫學院 生命科學系

Email: [kmh@mercury.csmc.edu.tw](mailto:kmh@mercury.csmc.edu.tw)

### 一、 中文摘要

肌強直型肌肉萎縮症 (Myotonic Dystrophy, DM), 是一種體染色體顯性遺傳、神經肌肉方面的疾病。造成 DM 的分子原由係因位於第十九對染色體長臂上 (19q13.3) 的一段 CTG 三聯核酸重複序列發生倍增突變所致。為研究臺灣地區 DM 的遺傳特性我們結合 FTA gene guard system 和 PCR (聚合酶連鎖反應) 方法建立起一套樣本收集、保存、DNA 純化、和分析的程序。利用此一 FTA-PCR 分析系統, 到目前為止我們分析了十一個 DM 家族共二十三位 CTG 有倍增突變之 DM 患者和帶原者。配合南方點漬法, 我們發現臺灣地區 DM allele 與存在於 DM protein kinase 基因第八個 intron 內的 Alu 1 kb insertion 有連鎖不平衡的關係。單套型分析結果顯示臺灣地區的 DM 與歐美和日本等地之 DM 可能來自同一起源。

關鍵詞：肌強直型肌肉萎縮症, FTA-PCR 分析系統, 單套型分析

### Abstract

Myotonic dystrophy (DM) is an inherited, autosomal dominant neuromuscular disease caused by an expansion mutation of a (CTG)<sub>n</sub> trinucleotide repeat sequence in the region of chromosome 19q13.3. To study the genetic characteristics of this disease in Taiwan, we

first established a sample collection, storage, DNA purification, and analysis procedure by combining the FTA gene guard system with PCR methodology. To date, we have diagnosed twenty-three DM carriers and patients who belong to 11 families using this FTA-PCR system. We observed that the CTG expanded alleles tested so far in Taiwan all contained Alu 1 kb insertion sequences in intron 8 of myotonic dystrophy protein kinase gene. The results from haplotype analysis indicate that the DM in Taiwan could have the same origin as that of European and Japanese DM.

**Keywords:** myotonic dystrophy, FTA-PCR system, haplotype analysis

### 二、 緣由與目的

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 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 等人對各大醫院之問卷調查結果顯示, 東南亞地區 DM 的流行率似比上述區域低 (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。截至目前為止, 在此一區域各個國家, 包括台灣的流行率並無確實數字之報告。由於聚合酶連鎖

反應(PCR)之方法無法有效放大 CTG 倍增突變區域，為要檢測出 CTG repeat 是否有倍增突變，傳統上用南方點漬法(Southern blot)來作分析。因此方法需大量 DNA(>5 $\mu$ g)、費時、耗力，且不易測出小片段 CTG 倍增突變，在 DM 臨床分析、遺傳諮詢、及產前診斷等應用上有其侷限性。近年來，Cheng 等人(Cheng et al. 1996)發展出用 PCR 方法來判定擴增突變後 CTG 重複序列數目。其所發表之 PCR 條件及診斷程序雖然非常靈敏且能準確偵測大範圍的 CTG 倍增突變，但是因其 PCR 產物大於 2.1kb，對於偵測小範圍的 CTG 倍增突變之解析度較差，加上不同程度的 CTG 倍增突變須加入不同濃度之 7-deaza-dGTP 於 PCR 反應液中，以及 PCR 反應效率常受到 DNA template 品質之影響，使 PCR 在 DM 診斷上的應用主要仍停留在實驗室內。因此，本研究的主要目的有，一、建立 DM 分子診斷及產前檢查技術。二、分析台灣地區 DM 疾病之遺傳特性，並提供遺傳諮詢人員及 DM 家族快速、正確資訊。三、藉由 DM 家族檢體收集及轉型 DM 淋巴細胞系建立來研究 DM 之致病機制。

### 三、 結果與討論

茲將這一年來的研究結果分述如下：

A. 肌強直型肌肉萎縮症分子診斷技術建立：我們發展出一套 FTA-PCR 分析程序來偵測正常及突變染色體內 CTG 重複序列數目(Hsiao et al., 1999)。此分析程序包括用位於 CTG 序列附近之 DNA 次序被設計當作 primer，用 Advantage GC cDNA polymerase (Clontech)來降低(G+C) ratio 過高的影響以提高 PCR 反應效率，並結合 FTA gene guard 樣品收集及 DNA 純化系統以穩定 DNA 品質。未來，我們擬利用正常人、DM 帶原者、及 DM 病人的口腔內膜細胞和羊水細胞作為分析樣本，以進一步探討此一程序在利用不同體細胞作為檢體以進行 DM 分子診斷之可

能性，希望藉此發掘 FTA-PCR 系統在遺傳諮詢和產前診斷上之應用性。

B. 臺灣地區 DM 的遺傳特性：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，我們到目前為止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 患者及帶原者。由現有台灣地區 DM 家族之資料分析發現以下數項遺傳特性：I)CTG 倍增長度與 DM 發病年齡及症狀嚴重程度之關係。表現出典型 DM 症狀之病人其血液 DNA 內 (CTG)<sub>n</sub> 的長度皆大於 200，長度介於 40-200 者則無臨床症狀。在 (CTG)<sub>>200</sub> 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)<sub>1100</sub> 之男性病人在 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)<sub>1600</sub> 之女性病人在 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)<sub>600</sub> 之病人則因肺炎併發症而去世。這些現象顯示說雖然 (CTG)<sub>n</sub> 的長度愈長大致上發病年齡愈早且症狀愈嚴重，除了 CTG 長度外，個人或環境因素在症狀的呈現上可能扮演相當重要的角色。II)Alu 多型性(Alu polymorphism)與 DM 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 *Eco*RI 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)，這個家族中 DM 患者的 CTG 倍增突變發生在 Alu-1kb 的 allele，目前已知 CTG 倍增突變皆發生在 Alu+1kb 的 allele。截至目前為止，我們的分析結果顯示台灣地區 CTG 倍增突變亦發生在 Alu+1kb 的 allele，至於其他的標幟與 DM 之連鎖關係正調查之中。III)親子代間 CTG 重複序列長度變化、DM 臨床症狀嚴重程

度、以及性別間的關係。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，所以其分佈沒有性別之分；但在十一個 DM 家族中，親子代皆有明顯症狀者((CTG)<sub>400->700</sub>，由母親傳給子女)只有一個，另有三個家族係由親代 DM 帶原者((CTG)<sub>40-200</sub>，無臨床症狀)而至子代 DM 患者((CTG)<sub>>700</sub>，皆由父親傳給兒子)，這四個家族的情形符合期望現象(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)。雖然樣本數不多，此一結果亦符合 CTG 重複次數的遺傳不穩定性與親代的性別有關之說法，即是父系傳遞(paternal transmission)中 CTG 核酸重複的擴增數比母系傳遞(maternal transmission)來得大(Ashizawa et al. 1994; Brunner et al. 1993)。其他七個家族的子代皆為正常人，這有可能是因為 CTG 擴張途變造成之男性不孕(testicular tubular atrophy)，自然流產，或者是陰性擴張(negative expansion; Abeliovich et al. 1993)等因素所造成。由於 DM 在某一特定人口中有一定之流行率，這種因臨床症狀造成家族內 DM 人數遞減之現象，可能藉由不斷的、新的 CTG 擴張途變來平衡，使 DM 之流行率維持一定。

C. DM 淋巴細胞系建立：目前已建立三個正常人、二個 DM 帶因者、十一個 DM 患者淋巴細胞系。這將有助於 CTG 長度與基因差異性表達之研究。

#### 四、 成果自評

此研究關於分子診斷技術部分成果已發表(Hsiao et al., 1999)。盛行率調查及遺傳特性部分也已接近完成，待分析更多完整之家族資料後整理發表。惟致病機轉部分仍須更多時間、人力、及物力。

#### 五、 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.
- A., Seltzer, W. K., and Richards, C. S. (1994) Effects of sex of myotonic dystrophy patients on the unstable triple repeat in their affected offspring. *Neurology* 44, 120-122.
- Ashizawa, T. and Epstein, H. F. (1991) Ethnic distribution of the myotonic dystrophy gene. *Lancet* 338, 642-643.
- 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.
- Brunner, H.G., Bruggenwirth, H. T., Nillesen, W., Jansen, G., Hamel, B. C. J., Hoppe, R. L. E., de Die C. E. M., Howeler, C. J., van Oost, B. A., Wieringa, B., Ropers, H. H., and Smeets, H. J. M. (1993) Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am. J. Hum. Genet.* 53, 1016-1023.
- Cheng, S., Barcelo, J.M., and Korneluk, R.G. (1996) Characterization of large CTG repeat expansions in myotonic dystrophy alleles using PCR. *Hum Mut.* 7, 304-310.
- 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.
- Harper P. S. (1989) Myotonic dystrophy, 2<sup>nd</sup> ed., WB Saunders, London.
- Hsiao, K.-M., Lin, H.-M., Pan, H., Li, T.-C., Chen, S.-S., Jou, S.-B., Chiu, Y.-L., Wu, M.-F., Lin, C.-C., and Li, S.-Y. (1999) Application of FTA sample collection and DNA purification system on the determination of CTG trinucleotide repeat size by PCR-based Southern blotting. *J. Clin. Lab. Anal.* 13:188-193.
- 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.