

致心律失常性右室心肌病 DSP 基因突变与表现型的关系

张黔桓, 邓春玉, 黄峻, 陈春晖, 饶芳, 朱杰宁, 谭虹虹, 吴书林*
(广东省人民医院//广东省心血管病研究所, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】在 ARVC 患者中筛选 DSP 基因突变, 并与患者的表现型进行对比分析。【方法】收集 ARVC 患者 40 例, 评估患者的临床指标, 并随访心脏事件(室性心律失常、心衰和猝死)的发生。对其中 32 例 ARVC 患者的 DSP 基因突变进行筛选。【结果】患者出现症状的时间为 32.2 ± 12.7 岁, 男性患者的比例较高(85.0%), 最常见的症状是心悸(82.5%), 其次是胸痛(25.0%)和晕厥(22.5%)。T 波倒置(75.0%)是最常见的心电图表现, 随后 QRS 波时限延长(45.0%)和 Epsilon 波(35.0%)。伴左束支传导阻滞的室性心动过速有 28 例(70.0%)。32 例 ARVC 患者中共 7 例(21.9%)患者发现了 DSP 突变, 共检测出 6 个突变位点, 对照组染色体($n = 200$)上并未发现这几个位点有改变。比较 DSP 和非 DSP 突变患者的临床特征, 结果发现右室与左室容积之比两组之间的比较有意义(1.33 ± 0.24 vs. 1.28 ± 0.14 , $P < 0.05$)。研究期间, 共有 3 例患者死亡, 平均死亡率是 7.5%, DSP 突变组有 1 例死亡, 而非 DSP 突变组有 2 例死亡患者死亡。比较两组的生存时间无差别(19.43 ± 2.38 vs. 28.65 ± 0.90 , $P > 0.05$)。【结论】DSP 基因突变的检出率为 21.9%, 与国外的研究结果基本一致, 但中国 DSP 突变患者的右室扩大较为明显, 左室累及较少。

关键词: 致心律失常性右室心肌病; 桥粒基因; 基因突变

中图分类号: R542.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)05-0727-07

Clinical Feature and Profile of Desmoplakin Gene Mutation in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy

ZHANG Qian-huan, DENG Chun-yu, HUANG Jun, CHEN Chun-hui, RAO Fang, ZHU Jie-ning,
TAN Hong-hong, WU Shu-lin*

(Department of Cardiology, Guangdong General Hospital//Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 The purpose of this study was to evaluate the long-term clinical outcomes and genetics of ARVC in China. 【Methods】 Forty subjects fulfilling modified task force criteria were included. Information on clinical presentation, electrocardiographic and cardiac imaging findings, and outcome of cases were underwent investigation. Genomic DNA was screened for mutations in DSP gene. 【Results】 The mean age at onset of symptoms (32.2 ± 12.7 years) and male predominance (85.0%) were similar to that reported in other studies. Palpitations were the most frequent symptom (82.5%), followed by syncope (22.5%). T-wave inversion was the most common presenting abnormality on resting 12-lead ECG (75%), followed by localized QRS prolongation (45%) and epsilon waves (35%). Ventricular tachycardia with left bundle branch block morphology was subsequently documented in a total of 28 (70%) subjects during a study period. The cumulative mortality rate was 7.5%. Six DSP gene mutations were found in 7/32 (21.9%) unrelated participants, three being novel. Compound heterozygotes exhibited a severe phenotype in three patients. The right ventricular volume and left ventricular volume ratio (RV/LV ratio) was significant increased in the patients with DSP mutation compared to other ARVC patients (1.33 ± 0.24 vs 1.28 ± 0.14 , $P < 0.05$). Survival time in patients with DSP mutation was similar to other ARVC patients. 【Conclusion】 ARVC is associated with early mortality that is different to other countries population. Patients with DSP gene mutation have lager RV/LV ratio.

Key words: arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; desmoplakin; mutation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(5): 727-733]

收稿日期: 2013-05-20

基金项目: 广东省自然科学基金(10151008002000011)

作者简介: 张黔桓, 博士, 副主任医师, E-mail: ruyuzhang@hotmail.com; * 通信作者: 吴书林, 博士, 主任医师, E-mail: wushulind@gmail.com

致心律失常性右心室心肌病(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC)是一种遗传性心肌病,发病率约为 1/5 000,但在年轻人和运动员猝死的病因中却高达 20%^[1-2]。对 ARVC 候选基因的筛选发现其为编码细胞与细胞间连接蛋白特别是桥粒蛋白的基因发生突变。在西方国家,5 个桥粒基因的检出率在 20%~40%之间,其中 plakophilin-2 (PKP2)、desmoplakin (DSP) 和 desmoglein-2 (DSG2) 是主要的桥粒基因突变。DSP 是最大的桥粒蛋白,其 N 末端与其它桥粒蛋白相连,C 末端则与中间丝相连,它在维持心肌细胞之间的结构和功能完整性方面发挥重要的作用。本研究是在 ARVC 患者中筛选 DSP 基因突变,并与患者的表现型进行对比分析。

1 材料与方法

1.1 临床指标的评估

1.1.1 临床资料的收集 根据 1994 年欧洲心脏病协会制定的 ARVC 诊断标准收集 ARVC 患者 40 例。询问患者病史,对每个患者行 12 导联心电图,平均信号心电图,标准二维超声心动图,运动试验和动态心电图检查,必要时行心脏核磁共振检查,并随访心脏事件(室性心律失常、心衰和猝死)的发生。

1.1.2 评估指标 病史和随访的指标 评估有无心悸、晕厥和晕厥前期等症状,调查患者家族成员并进行随访,了解有无室性心律失常、心衰和猝死的发生。仪器检查指标: Epsilon 波、QRS 时限和 QT 间期;心室结构和功能的相关指标;心室晚电位;室性心律失常及其形态。

1.2 DSP 基因突变的筛选

1.2.1 DNA 提取 获取 ARVC 患者的外周血样本,如患者检测出 DSP 基因突变,那对 DSP 突变患者的家族成员也收集外周血样本,用 TIA Namp Blood DNA kit (TIANGEN, 北京)试剂盒提取白细胞中的 DNA, DNA 产物应保存在 -20 ℃。

1.2.2 PCP 扩增 根据 NCBI 公布 DNA 序列(基因号: NM_004415)对 DSP 基因的 24 个外显子及邻近的内含子的设计引物,扩增的 PCR 反应体系(25 μL): 正义引物(20 μmol/L) 2 μL, 反义引物

(20 μmol/L) 2 μL, 模板 DNA 2 μL, RNase Free dH₂O 6.5 μL, GoTaq Green Master Mix 12.5 μL。反应条件为: 预变性 95 ℃ 2 min, 变性 95 ℃ 30 s, 退火 58 ℃ 30 s, 延伸 72 ℃ 1 min, 最后延伸 72 ℃ 5 min, 共 35 个循环, 反应产物在 1.5% 的琼脂凝胶中电泳。

1.2.3 DNA 测序 扩增产物用 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 试剂盒纯化将洗脱出的 DNA 于 -20 ℃ 保存。用 ABI PRISM 3730 DNA Sequencer 测序仪器直接测序, 结果用 BioEdi 软件进行分析, 对照组(100 例健康志愿者)采用 SNPshot 多通道技术(Invitrogen)分析 ARVC 患者中发现的突变位点。

1.3 统计学方法

计量资料用均数 ± 标准差表示, 计数资料用频数表示。计量资料的比较用独立样本的 *t* 检验, 计数资料的比较用多个独立样本的非参数检测。研究患者从开始出现症状就诊到死亡的中位数时间用 Kaplan-Meier 分析方法, 根据有无 DSP 突变把患者分为两组, 比较两组生存时间的差别用 χ^2 检验。用 SPSS 16.0 统计软件分析, 检验为双侧, 以 $P \leq 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 ARVC 患者的临床特点

2008 年 1 月至 2012 年 6 月本研究共收集到 70 例疑是 ARVC 患者, 其中确诊为 ARVC 的患者 40 例(住院 8 例, 门诊 32 例)。与国外 2 个大的研究结果相对比, 本研究中 ARVC 患者年龄, 性别, 症状特征见表 1。从表 1 可以看出 ARVC 患者出现症状的时间为(32.2 ± 12.7)岁, 男性患者的比例较高(85.0%), 最常见的症状是心悸(82.5%), 其次是胸痛(25.0%)和晕厥(22.5%), 1 例患者无症状, 无猝死未遂的患者。

入选患者行仪器检查包括右室造影(5.0%), 冠状动脉造影(15%), 超声心动图检查(100%), 24 小时动态心动图(62.5%)、信号平均心电图(90.0%), 心脏 MRI(55.0%), 1 例(2.5%)患者因心脏移植行心肌病理检查。

根据 1994 年诊断标准出现的临床特征, T 波

表1 ARVC 患者的年龄、性别和症状特征

Table 1 Baseline clinical characteristics of 40 patients with ARVC

Characteristic	Our study (n = 40)	France (n = 130) ^[4]	North America (n = 100) ^[5]
Age / years	37.9 ± 12.5	–	–
Age at onset of symptoms / years	32.2 ± 12.7	31.8 ± 14.4	29 ± 13
Male	34(85)	100(76.9)	51(51)
Presenting symptom			
Palpitations	33(82.5)	87(66.9)	27(27)
Dizziness	3(7.5)	–	14(14)
Chest pain	10(25.0)	35(26.9)	2(2)
Syncope	9(22.5)	42(32.3)	26(26)
Dyspnea	2(5.0)	14(10.8)	9(9)
Sudden cardiac death, resuscitated	0(0)	17(13.0)	1(1)
Asymptomatic	1(2.5)	8(6.2)	15(15)

Values are given as mean ± SD or number(%).

表2 ARVC 患者 DSP 基因突变

Table 2 DSP mutations found in unrelated index cases in ARVC patients

Patients number	Exons	Nucleotide change	Amino acid change
1	11 c.1347A>G	M449I	Y494F
13, 49, 51, 53	12	c.1481A>T	S2024Y
7	24	c.6071A>C	T2267S
49	24	c.6799T>A	D2580E
41, 53	24	c.7740 T>A	I2869V
51	24	c.8605A>G	

倒置(75.0%)是最常见的心电图表现,随后 QRS 波时限延长(45.0%)和 Epsilon 波(35.0%)。在 36 例行平均信号心动图的患者中检出晚电位 28 例,敏感性为 77.8%。伴左束支传导阻滞的室性心动过速有 28 例(70.0%)。根据修正的诊断标准^[3],有 6 例(15.0%)家族成员诊断为 ARVC。

2.2 DSP 基因突变

在 40 例患者中对 32 例患者 DNA 进行了分析,8 例未获得血样本,共 7 例(21.9%)患者发现了 6 个突变位点(表 2 和图 1),对照组染色体(n = 200)上并未发现这几个位点有改变,提示这几个突变是可能是致病突变。49 号患者共发现两个突变位点 c.1481A>T 和 c.6799T>A,其家族成员中有 3 例(一个哥哥和两个妹妹)也发现这两个位点的基因突变,但这几个成员无症状,仪器检查也无异常发现,提示其成员是基因携带者。53 号患者同

时也发现两个位点突变 c.1481A>T 和 c.7740 T>A,有猝死家族史,但对其家族中一级成员的 DSP 基因的筛选并未发现突变位点。该患者有阵发性室性心动过速,心脏 MRI 提示右室局限性膨隆,左室延迟性后增强,心脏超声心电图也提示右室扩张,室壁搏动减弱(图 2)。51 号患者发现 c.1481A>T 和 c.8605A>G 突变,其主要的临床表现主要是心力衰竭。41 号患者发现 c.7740 T>A 突变,该患者 14 岁发病,由于左心累及导致全心扩大,15 岁时进行了心脏移植(图 3)。1 号患者存在 c.1347A>G 突变,在随访期间死亡。

2.3 DSP 突变基因型与表现型的关系

32 例患者性 DSP 突变的筛选,其中 7 例患者有 DSP 突变,比较 DSP 和非 DSP 突变患者的临床特征(表 3),结果发现只有右室与左室容积之比两组之间的比较有意义(1.33 ± 0.24 vs 1.28 ±

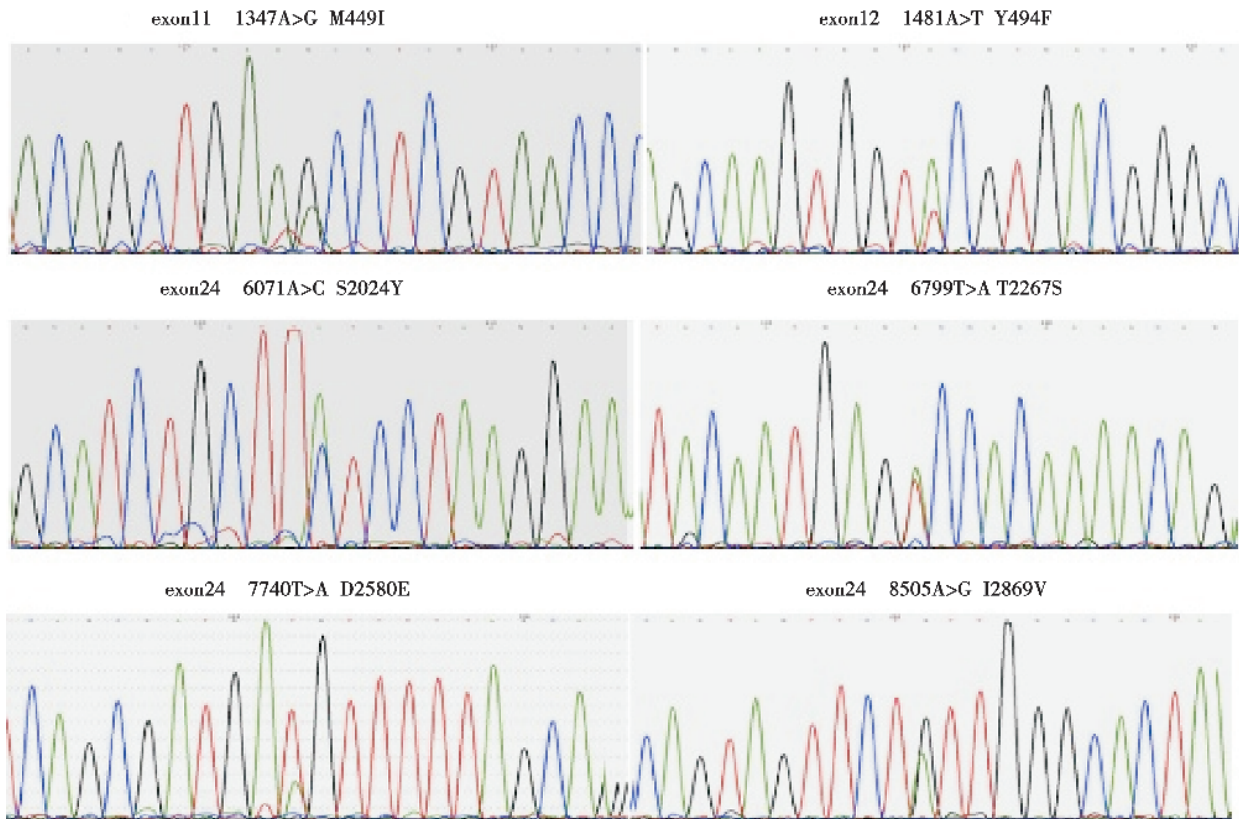


图 1 DSP 基因突变位点
Fig.1 DSP mutation in ARVC patients

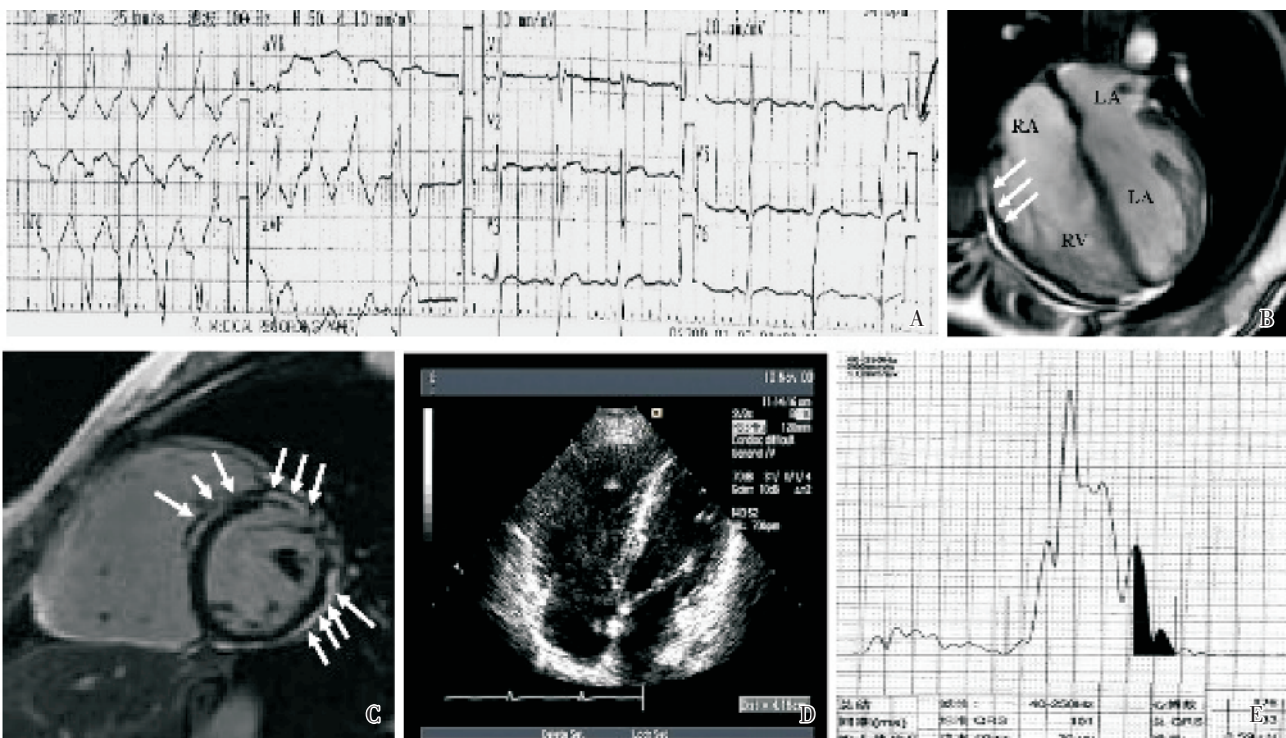


图 2 53 号患者(c.1481A>T 和 c.7740 T>A)仪器检查结果

Fig.2 The clinical features of patient 53

A: 12-lead ECG showed non-sustained ventricular tachycardia. B and C: RV dilation and localized RV aneurysms in MR (white arrows). D: Right ventricle enlarged was found in echocardiographic image. E: Late potential was observed in signal-averaged ECG.

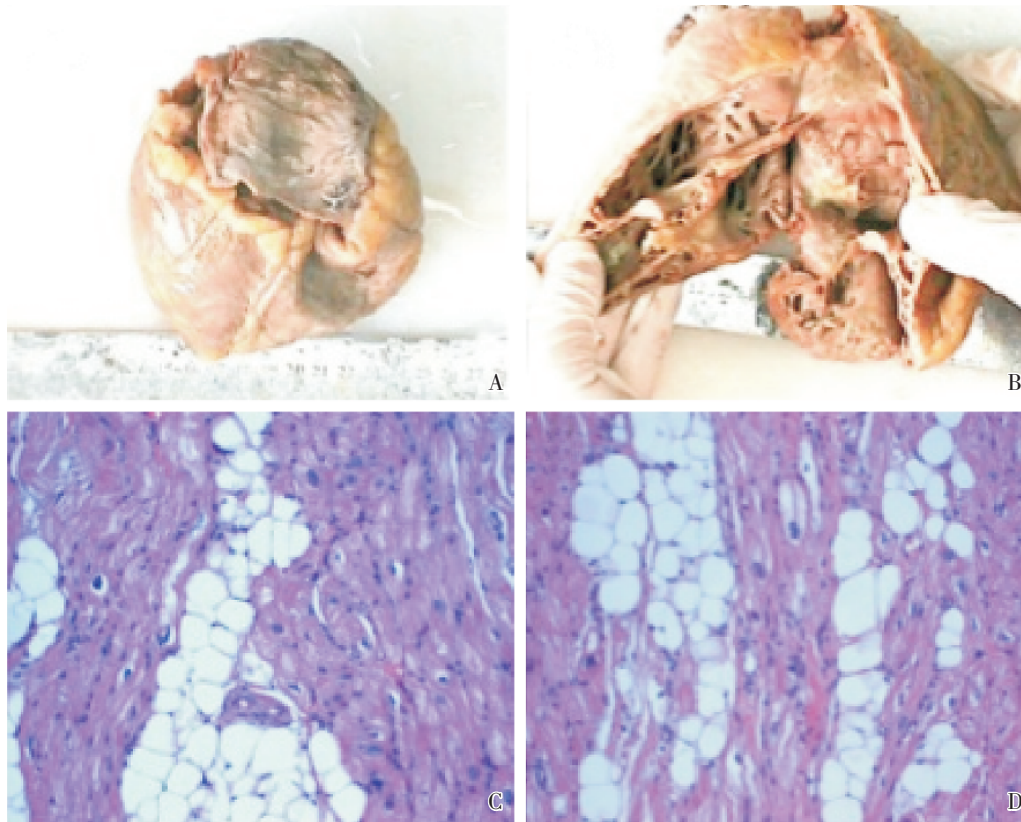


图 3 41 号患者 (c.7740 T>A) 心脏病理检查结果

Fig.3 Representative histologic features in patient 41

A and B: Panoramic histologic view of the cardiac ventricles showed the wall thick thinning. C and D: Fibro-fatty replacement was observed in both ventricular walls ($\times 20$)

表 3 DSP 突变患者与非突变患者临床特征的比较

Table 3 Comparison clinical features in DSP mutations with non-mutated patient

	DSP mutation (n = 7)	Non-DSP mutation (n = 25)	P
Age at onset of symptoms/years	26.29 \pm 9.16	32.80 \pm 13.68	0.226
Presenting symptom	7(100)	25(100)	1.000
Syncope	2(28.6)	4(16.0)	0.458
Family history	2(28.6)	4(16.0)	0.458
Right ventricular end diastolic volume/mm	58.14 \pm 4.52	58.08 \pm 7.02	0.148
Right ventricular ejection fraction/%	38.28 \pm 8.62	40.00 \pm 8.83	0.860
Left ventricular end diastolic volume/mm	43.42 \pm 5.00	45.00 \pm 5.34	0.653
Left ventricular ejection fraction/%	67.00 \pm 7.02	61.52 \pm 12.61	0.200
Right ventricular/left ventricular end diastolic volume ratio	1.33 \pm 0.24	1.28 \pm 0.14	0.046
Ventricular arrhythmias	6(57.1)	16(64.0)	0.281
Sustained ventricular tachycardia.	1(14.2)	8(32.0)	0.364
Ventricular tachycardia with RBBB	1(14.2)	2(8.0)	0.620
T-wave inversion	4(57.1)	21(84.0)	0.135
Epsilon waves	2(28.5)	9(36.0)	0.719
Late potentials	6(85.7)	18(72.0)	0.466

Values are given as mean \pm SD or number(%).

0.14, $P < 0.05$), 提示 DSP 患者的右室与左室容积之比大于非 DSP 突变的患者。

2.4 DSP 突变患者的生存分析

患者根据有无 DSP 突变分为两组, DSP 突变组 7 例, 无 DSP 突变组 25 例。研究期间, 共有 3 例患者死亡, 2 例患者原死于猝死, 1 例患者死于心力衰竭, 平均死亡率是 7.5%, DSP 突变组有 1 例死亡, 而非 DSP 突变组有 2 例死亡患者死亡。比较两组的生存时间无差别 (19.43 ± 2.38 vs 28.65 ± 0.90 , $P > 0.05$)。研究者中有 6 例 (15.0%) 植入 ICD, 其中 1 例死于心力衰竭。

3 讨论

本研究首次在中国 ARVC 患者中进行 DSP 基因突变的筛选, 结果显示 ARVC 患者的发病年龄为 (32.2 ± 12.7) 岁, 男性占 85%, 就症状而言, 除心悸 (82.5%) 外, 其它与西方的研究结果基本一致^[4-5]。本研究人群主要临床表现是以室性心律失常为主, 因此心悸出现的比例较高。研究期间, 有 3 例患者死亡, 2 原因为猝死, 1 例死于心力衰竭。平均死亡率为 7.5%, 比既往报道的比例 (2% ~ 4%)^[6-7] 要高, 这可能是由于 ARVC 患者早期诊断较为困难, 明确诊断时患者已有明显症状 (97.5% 的患者有症状)。

3.1 ARVC 与桥粒 DSP 基因突变

DSP 是心肌最大的桥粒蛋白, 在 N 末端与其它桥粒蛋白如 PKP2 和 PG 相连, C 末端则与中间丝相连, 它在维持心肌细胞之间的结构和功能完整性方面发挥重要的作用。最初在 Carvajal 综合征中检出 DSP 基因突变, 该综合征患者不仅心脏明显扩大, 而且伴有毛发和皮肤的变化^[8]。在西方国家, DSP 的检出率在 16% ~ 20% 之间^[9-10], 突变位点较为分散, 从 DSP 的 C 末端到 N 末端都有突变, 缺乏所谓的“热点”突变位点^[11-12]。目前, 有关亚洲人群中检出 DSP 突变的报道较少, 最近在印度人中检测出 c.3901C>T (p.Gln1301X) 突变, 该突变点位于 DSP 基因的第 23 外显子上^[13]。本研究患者的 DSP 基因突变检出率为 21.9%, 这与国外的研究报道基本一致。本研究检出 6 个突变位点的患者仅只有心脏受累, 而无皮肤和毛发的改

变。这几个位点的致病机制尚不清楚, 其中有 4 个位点位于第 24 外显子上, 其编码的蛋白区域是 DSP 的 C 末端, 检出这几个突变位点的 ARVC 患者右室明显扩张。在抑制 DSP 蛋白 C 末端的转基因小鼠中也发现其心室腔明显扩大^[14]。另外 2 个突变位点位于第 11 和 12 外显子上, 其编码 DSP 蛋白的杆状部分。在 7 例突变患者中有 4 例检测出 c.1481A > T 突变, 并且 41 号患者的 3 个家族成员也发现了该突变位点, 提示该突变点可能是中国 ARVC 患者的热点突变。本研究发现有两个同义突变 c.741T > G 和 c.8472G > C 在 ARVC 患者中的检出率较高, 但同义突变并未引起氨基酸改变, 因此其是否与 ARVC 有关有待进一步证实。

3.2 DSP 基因突变患者的临床特征

由于 ARVC 的发病率在 1/5 000 左右, 其中约有 40% 的患者检测出桥粒基因突变, 目前各中心有关 ARVC 患者基因型与表现型关系的临床研究结果不一, 仍缺大规模的临床试验^[15]。本研究发现除右室容积与左室容积之比外, DSP 突变和非 DSP 突变患者的其它临床特征如晕厥、持续性室速、家族史和 Epsilon 波等指标的对比无统计学差异。典型的 ARVC 患者右室容积与左室容积之比大于 1, 随着年龄的增加, 此比例也逐渐增大。本研究结果提示 DSP 基因突变患者的右室容积与左室容积之比大于非 DSP 基因突变的患者 (1.33 ± 0.24 vs 1.28 ± 0.14 , $P < 0.05$), 左室累及的患者比例较小, 提示 DSP 突变的患者右室受累较左室明显。而 Sen-Chowdhry 等^[10]人研究发现 DSP 突变患者的右室容积与左室容积之比约为 1.12 ± 0.32 , 有 35% 的患者左室累及, 而 Bauce 等^[9]人也发现 DSP 突变的家族中左室累及的病例较多, 这些研究结果与本研究不一致, 这可能是由于前述的两个研究检出的 DSP 突变患者其突变位点多位于 N 末端, 而本研究的 DSP 突变位点多位于 C 末端。

3.3 DSP 基因突变患者的生存分析

本研究患者平均死亡率为 7.5%, DSP 突变患者有 1 例死亡, 非 DSP 突变患者有 2 例死亡, 比较两组生存时间无明显差别, 提示 DSP 突变并不影响患者的生存时间。有研究表明 ARVC 患者猝死的危险因素包括较年轻的发病年龄、严重的右室病变、左室累及、晕厥和持续性室速等^[6], 但是本

研究对 DSP 突变患者生存时间进行 Cox 回归模型的分析,并未得到有意义的结果,这可能是由于样本例数较少,需要扩大样本量进一步研究。本研究中有 6 例患者置入 ICD(15.0%),随访期间 1 例死于心力衰竭,提示 ICD 能有效预防高危 ARVC 患者的猝死。目前已有不少研究报道提示 ICD 可有效改善 ARVC 高危患者的长期预后^[5,16]。

参考文献:

- [1] Corrado D, Thiene G, Nava A, et al. Sudden death in young competitive athletes: Clinicopathologic correlations in 22 cases[J]. *Am J Med*, 1990, 89(5): 588-596.
- [2] Thiene G, Nava A, Corrado D, et al. Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people[J]. *N Engl J Med*, 1988, 318(3): 129-133.
- [3] Hamid MS, Norman M, Quraishi A, et al. Prospective evaluation of relatives for familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia reveals a need to broaden diagnostic criteria [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40(8): 1445-1450.
- [4] Hulot JS, Jouven X, Empana JP, et al. Natural history and risk stratification of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2004, 110(14): 1879-1884.
- [5] Dalal D, Nasir K, Bomma C, et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: A united states experience [J]. *Circulation*, 2005, 112(25): 3823-3832.
- [6] Herren T, Gerber PA, Duru F. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: A not so rare "disease of the desmosome" with multiple clinical presentations[J]. *Clin Res Cardiol*, 2009, 98(3): 141-158.
- [7] Watkins DA, Hendricks N, Shaboodien G, et al. Clinical features, survival experience, and profile of plakophylin -2 gene mutations in participants of the arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy registry of south africa[J]. *Heart Rhythm*, 2009, 6(11 Suppl): S10-S17.
- [8] Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, et al. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin -intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(18): 2761-2766.
- [9] Bauce B, Basso C, Rampazzo A, et al. Clinical profile of four families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by dominant desmoplakin mutations[J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(16): 1666-1675.
- [10] Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, et al. Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression [J]. *Circulation*, 2007, 115(13): 1710-1720.
- [11] Bauce B, Nava A, Beffagna G, et al. Multiple mutations in desmosomal proteins encoding genes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia[J]. *Heart Rhythm*, 2010, 7(1): 22-29.
- [12] Christensen AH, Benn M, Bundgaard H, et al. Wide spectrum of desmosomal mutations in danish patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [J]. *J Med Genet*, 2010, 47(11): 736-744.
- [13] Krishnamurthy S, Adhisivam B, Hamilton RM, et al. Arrhythmogenic dilated cardiomyopathy due to a novel mutation in the desmoplakin gene[J]. *Indian J Pediatr*, 2011, 78(7): 866-869.
- [14] Noorman M, van der Heyden MA, van Veen TA, et al. Cardiac cell-cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(1): 23-31.
- [15] Teske AJ, Cox MG, Te Riele AS, et al. Early detection of regional functional abnormalities in asymptomatic arvd/c gene carriers[J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2012, 25(9): 997-1006.
- [16] Wichter T, Paul M, Wollmann C, et al. Implantable cardioverter/defibrillator therapy in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Single-center experience of long-term follow-up and complications in 60 patients [J]. *Circulation*, 2004, 109(12): 1503-1508.

(编辑 孙慧兰)