

# 河南省致死性家族性失眠症家系的流行病学调查及遗传规律研究

张锦 韩俊 史晓红 郭万申 夏胜利 石琦 陈建明 赵伟秦 谢志强  
申晓靖 李孟磊 雷艳军 石崧 周伟 张保云 高晨 单冰 郭燕军  
王得新 许汴利 董小平

**【摘要】** 目的 调查致死性家族性失眠症(FFI)家系谱特征及家族发病史;分析病例的临床特点和病理学改变;研究FFI家系的流行病学特征及相关基因遗传规律。方法 通过7代135名家族成员的流行病学调查,了解家族史、家族迁徙史及发病史;对患者及部分家族成员抽取静脉血进行PRNP基因PCR扩增,序列测定和Nsp I 酶切鉴定;尸检采集脑组织进行神经病理学检测和Western blot法PrP<sup>Sc</sup>蛋白检测。结果 2例确诊患者临床症状典型;11名家族成员死于相似的神经性疾病;32名家族成员血标本检测,其中11人出现PRNP基因178位密码子点突变(D178N),突变检出率34.38%,第129位密码子为甲硫氨酸;病例脑组织海绵样变性和神经元缺失,可检测到PrP<sup>Sc</sup>蛋白。结论 该家系为FFI家系,病例临床症状典型,病理特征明显。流行病学调查、基因特征分析、神经病理学和Western blot法检测对确立FFI病例和家系有至关重要的作用。

**【关键词】** 朊病毒病;致死性家族性失眠症;家系调查;基因突变

## Studies on heredity rule of the first genealogy regarding fatal familial insomnia in Henan province

ZHANG Jin, HAN Jun, SHI Xiao-hong, GUO Wan-shen, XIA Sheng-li, SHI Qi, CHEN Jian-ming, ZHAO Wei-qin, XIE Zhi-qiang, SHEN Xiao-jing, LI Meng-lei, LEI Yan-jun, SHI Song, ZHOU Wei, ZHANG Bao-yun, GAO Chen, SHAN Bing, GUO Yan-jun, WANG De-xin, XU Bian-li, DONG Xiao-ping. Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China

Corresponding author: XU Bian-li, Email: xubl@hncdc.com.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the epidemiological, genealogic characteristic, familial history of the families with fatal familial insomnia, its clinical and pathological features as well as the heredity rule of related genes. **Methods** 135 familial members of 7 eras were studied. Vein blood samples from patients as well as from some familial members were collected. PRNP gene was studied with PCR, its serial was determined and then authenticated with Nsp I. Brain tissue was obtained for neuropathological test and PrP<sup>Sc</sup> test with Western blot method. **Results** Clinical symptoms of the 2 diagnosed cases were typical. 11 familial members died of similar neural disease. 32 samples of their familial members, codon at D178N of PRNP of 11 members was mutated, with mutation rate as 34.38% while D129N showed as methionine. Brain tissue of both probands denaturalized into spongiform and the nerve fiber was absent but PrP<sup>Sc</sup> protein was identified. **Conclusion** Genealogy was described in the family with fatal familial insomnia since the patients had typical clinical symptoms and pathological characteristics. It seemed necessary to confirm cases of fatal familial insomnia and their genealogy with epidemiological data and to investigate its gene characteristics as well as with neuropathological and Western blot tests.

**【Key words】** Prion disease; Fatal familial insomnia; Genealogical investigation; Gene mutation

致死性家族性失眠症(fatal familial insomnia, FFI)是一种常染色体显性遗传的朊病毒病,以进展性睡眠紊乱、家族性自主神经异常、运动神经功能障碍

碍以及成年后发病为临床特征<sup>[1]</sup>。FFI的发生源于人第20号染色体短臂上的PRNP基因178位错义突变,使天冬氨酸变成天冬酰胺(GAC→AAC)且同时伴有129位密码子为甲硫氨酸(Met),致使PRNP基因编码的正常蛋白PrP<sup>C</sup>(cellular prion)结构不稳,发生构象变化转变为异常的朊病毒蛋白PrP<sup>Sc</sup>(scrapie-associated prion)<sup>[2,3]</sup>。PrP<sup>Sc</sup>进入中枢神经系统后可使存在于神经细胞的PrP<sup>C</sup>转变为PrP<sup>Sc</sup>,产生连锁反应,从而在中枢神经系统尤其是丘脑大量沉

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.01.001

作者单位:450016郑州,河南省疾病预防控制中心(张锦、郭万申、夏胜利、谢志强、申晓靖、李孟磊、许汴利);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(韩俊、石琦、陈建明、雷艳军、石崧、周伟、张保云、高晨、单冰、董小平);河南省人民医院(史晓红);北京友谊医院(赵伟秦、郭燕军、王得新)

通信作者:许汴利,Email: xubl@hncdc.com.cn

积,出现神经元变性、空泡形成和胶质反应性增生,致使患者临床失眠症状突出。FFI具有家族聚集性的特点,一个家族中常有多人发病。FFI家族在澳大利亚、美国、奥地利、英国、法国、日本、德国、意大利、西班牙、中国均有报道<sup>[4-9]</sup>。2006年8月在河南省(河南省人民医院,史晓红发现首例患者)发现我国第二个FFI家族。2006—2007年对分散居住各地的相关家族人员进行流行病学调查及基因检测,调查涉及7代共135人,为目前世界上报道的调查涉及人数最多的FFI家系。现将流行病学调查、家系调查、实验室检测结果报告如下。

### 对象与方法

1.调查对象:河南FFI家系中FFI患者、有FFI疑似症状家族成员及无症状家族成员。

2.调查方法:通过翻阅家谱及与家族成员座谈回顾家族迁徙史,完成家系表;对家系表中涉及的135人进行回顾调查或直接调查。对所有的疑似病例开展流行病学个案调查,主要进行病例及疑似病例的相关资料包括居住习俗、旅居信息、饮食习惯、职业暴露、既往病史和家族史的调查。调查中尽可能直接对病例、疑似病例和家族进行访视和询问。如因患者病情较重、死亡或其他原因无法直接调查,或当患者提供的资料不详或有疑问时,通过其亲友、医生或其他知情者进行调查或核实。对患者的直系血亲及四代内旁系血亲家族成员共32人抽取静脉血进行实验室检测。2例确诊患者死亡后24 h内进行尸检并采集脑组织,对脑组织不同分区进行神经病理学检测及Western blot法检测PrP<sup>Sc</sup>蛋白。

#### 3.实验室检测方法:

(1) PRNP基因检测:用Qiagen试剂盒提取外周全血基因组DNA,操作方法按试剂盒说明书。参照文献<sup>[10]</sup>PCR扩增PRNP基因的编码区,扩增产物经限制性内切酶Nsp I酶切鉴定PRNP基因129位氨基酸多态性。人类PRNP基因129位氨基酸呈多态性分布,由甲硫氨酸(Met)和缬氨酸(Val)组合成三种基因型:Met/Met(M/M)纯合子、Met/Val(M/V)杂合子和Val/Val(V/V)纯合子。129位氨基酸多态性与疾病易感性有关,同时参与决定疾病神经病理变化、临床病程等。核酸内切酶Nsp I在人PRNP基因序列上有两个酶切位点:155密码子和呈Met的129密码子。PCR产物长度为956 bp,酶切鉴定结果判定标准:V/V纯合子:567 bp、389 bp;M/V杂合子:567 bp、492 bp、389 bp、75 bp;M/M纯合子:492 bp、

389 bp、75 bp。PCR扩增产物直接测序进行序列分析。FFI具有178密码子特异性点突变(D178N)。

(2)神经病理学检测:FFI患者脑组织的左半球做冠向分割,右半球干冰冻冻以备后用。甲醛固定的脑组织各分区制片HE染色。

(3) PrP<sup>Sc</sup>蛋白的Western blot检测:脑组织标本用裂解缓冲液(100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% 去氧胆酸钠, 10 mmol/L Tris, pH值7.5)制备10%的脑组织匀浆并加入蛋白酶抑制剂。上述混合液4℃、2000 r/min低速离心10 min去除组织碎片,取上清用蛋白酶K水解并行SDS-PAGE电泳,蛋白电泳条带电转到硝酸纤维素膜。以PrP特异性单克隆抗体为一抗、辣根过氧化物酶标记的抗鼠IgG为二抗进行蛋白印迹反应。具有蛋白酶抗性的蛋白条带显色后,分子量约为 $17 \times 10^3 \sim 27 \times 10^3$ 。

4.诊断标准:FFI病例遵循严格的诊断程序被定义为确诊病例、临床诊断病例、疑似病例和致病基因健康携带者。

(1)确诊病例:①具有典型的临床表现;②具有典型/标准的神经病理学改变和/或免疫细胞化学和/或Western blot确定为蛋白酶耐受性PrP;③临床诊断病例具有本病特异的PrP基因突变。

(2)临床诊断病例:①进行性睡眠减少,非快相眼动睡眠纺锤波和 $\sigma$ 波消失;②催眠药无任何帮助;③伴有交感神经兴奋性增高、内分泌改变、运动障碍;④家族中有确诊病例。

(3)疑似病例:直系亲属中有确诊FFI病例,出现和确诊病例相似的临床症状,但是无法进行病理和基因诊断。

(4)致病基因健康携带者:具有FFI特异的PrP基因突变,但没有发病。

### 结果

#### 1. 流行病学资料:

(1)一般情况:河南FFI家族主要居住在河南省X县内的几个村,另有几个分支居住在外县甚至外省。X县以农业为主,交通便利,水资源丰富。先证者居住的A村位于镇东北4 km。全村总人口约5100人,与先证者同姓家族成员约2200余人,占全村人口的43%。村民以农为主,兼有运输、加工业和经商等,人均年收入约3000元。饮食以小麦为主,家禽以鸡为主,无家畜。饮用水源为自建压水井,井深约15 m;家家建有厕所,卫生厕所约占30%;居住宽敞,同其

他地区相比,卫生条件较好,居民有一定的卫生意识。

(2)家族迁徙史:据家谱记载,明朝末年(公元 1368—1644 年)此家族从河北省宝安(旧地名)迁置该村,居住 5 代后,兄弟 9 人分家,7 人分别迁至外村和外县居住。二弟、三弟在本村落户,在此延续第 18 代。二弟家族现有 1900 余人,三弟家族 300 余人,先证者系三弟第 16 代孙。

(3)家系:本次调查该家族 7 代共 135 名成员(有 3 人为养子女)。此家系中有 2 例确诊病例(包括先证者),9 名疑似病例,9 名 PRNP 基因 178 位突变携带者(图 1、表 1)。

表 1 河南省 FFI 家族各代 FFI 调查及检测情况

辈次	同辈成员人数	死于相似症状成员	检出 D178N 突变成员
I (先证者曾祖父辈)	1	不详	未能检测
II (先证者祖父辈)	2	不详	未能检测
III (先证者父辈)	10	6 (III:2, III:3, III:4, III:5, III:8, III:9)	未能检测
IV (先证者辈)	32	4 (IV:7, IV:9*, 3(IV:8, IV:9*, IV:30) IV:22, IV:28)	
V (子辈)	50	1 (V:20*)	5 (V:17, V:18, V:19, V:20*, V:21)
VI (孙辈)	34	无死亡成员	3 (VI:27, VI:29, VI:30)
VII (曾孙辈)	6	无死亡成员	0
合计	135	11(男 6/女 5)	11(男 6/女 5)

注:\*为确诊病例

2. 临床特点:

(1)疑似病例:调查前逝去的 19 人中 9 人出现与先证者相同的临床症状,主要表现包括睡眠的紊乱以及自主神经功能紊乱,依据诊断标准定为疑似病例。所有疑似病例早期均有轻微入睡障碍以及周期性运动障碍,发病年龄从 20 多岁到 70 多岁,持续数月,最终进展为失眠、肌阵挛、交感神经功能亢进和痴呆,临床病程从 10 个月到 2 年。

(2)确诊病例:2 例确诊病例,PRNP129M/M, 178D/N,脑组织海绵样变性发现于丘脑。病例 1(先证者)男性 48 岁,汉族,农民。2006 年 2 月出现发热、多汗,睡眠时伴有肢体不自主运动,逐步出现睡眠异常、构音障碍、植物神经功能紊乱、出现锥体系症状,8 个月后病情逐渐加重,难以行走(出现后退步伐),语言模糊,患者饮食差,明显消瘦,体力衰竭、咳无力,于 2006 年 10 月 2 日死亡,病程 8 个月。病例 2(先证者二姐的次女)女性。2006 年 3 月因情绪受到强烈不良刺激,出现失眠、焦虑、恐惧情绪,并有四肢不自主抖动,动作迟缓不灵活,记忆力下降,后期可见四肢肌阵挛,共济失调。2007 年症状逐渐加重,于 6 月 12 日死亡,病程 16 个月。

至今已调查出河南省 FFI 家族确诊病例和疑似病例共 11 例,其中男性 6 例,女性 5 例(表 2)。

表 2 河南省 FFI 家族确诊和疑似病例基本情况

确诊或疑似病例	性别	发病年龄(岁)	死亡年龄(岁)	病程	痴呆症状	居住地
III:2	男	50	52	约 2 年	无	X 县 A 村
III:3	男	不详	20~29	<2 年	先天痴呆	X 县 A 村
III:4	男	60	62	<2 年	先天痴呆	X 县 A 村
III:5	女	不详	50~59	<2 年	无	X 县 J 村
III:8	女	72~74	74	<2 年	无	X 县 I 村
III:9	女	不详	50~59	<2 年	无	Y 县
IV:7	男	47	47	6~7 月	无	X 县 A 村
IV:9*	男	48	49	10 月	无	X 县 A 村
IV:22	女	不详	36	<2 年	痴呆	Y 县
IV:28	男	不详	30~39	<2 年	痴呆	X 县 H 村
V:20*	女	26	27	9 月	无	X 县 E 村

注:\*为确诊病例,余为疑似病例

3. 实验室检查:

(1)PRNP 基因检测及测序分析:采集 32 人(包括 2 例确诊患者)静脉血进行 PRNP 基因扩增,产物长度 956 bp(图 2)。PCR 产物经 Nsp I 酶切鉴定,所有检测样品酶切产物为 492 bp、389 bp、75 bp,均显示 PRNP

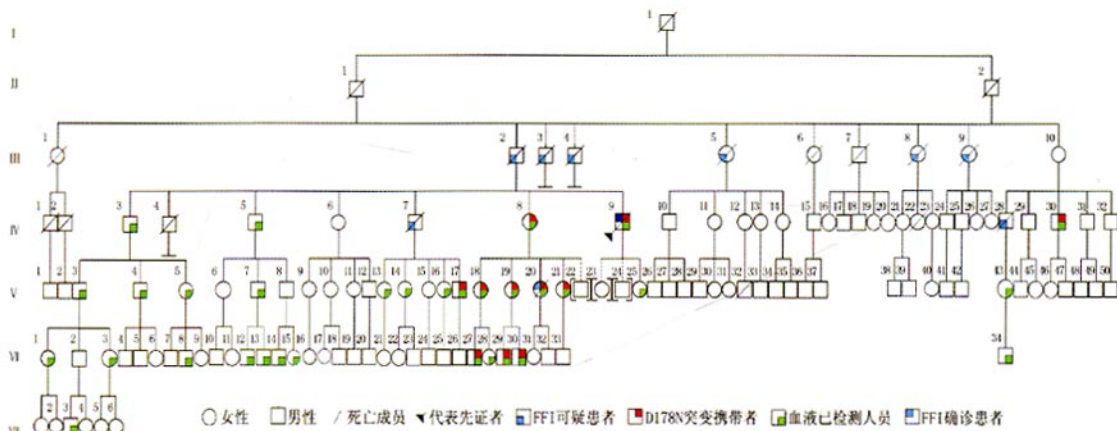
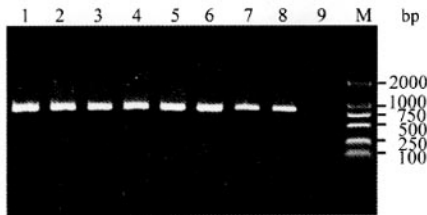


图 1 河南省 FFI 家族家系调查

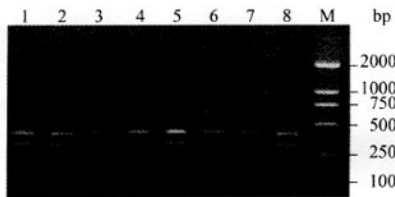
基因129位氨基酸为Met/Met(M/M)纯合子(图3)。

Western blot,结果显示FFI患者的PrP<sup>res</sup>含量较低。



注: M: DNA Marker; 1~5: 家族成员血液样品PCR扩增产物; 6: 病例1血液样品PCR扩增产物; 7: 病例2血液样品PCR扩增产物; 8: 阳性对照; 9: 阴性对照

图2 PRNP基因PCR扩增结果



注: M: DNA Marker; 1~5: 家族成员PCR产物酶切结果; 6: 病例1 PCR产物酶切结果; 7: 病例2 PCR产物酶切结果; 8: 阳性对照

图3 PRNP基因Nsp I 酶切129位多态性分析

先证者及其外甥女PRNP基因178位氨基酸密码子突变(D178N),另有9名家族成员为PRNP基因178位氨基酸密码子突变携带者,其中男性6人,女性5人(表3)。

表3 河南省FFI家族中D178N密码子突变成员

成员	年龄(岁)	性别	生存状态	现居住地
IV8	53	女	健康	B村
IV9*	48	男	死亡	A村
IV30	44	男	健康	H村
V17	20	男	健康	A村
V18	30	女	健康	C村
V19	28	女	健康	D村
V20*	26	女	死亡	E村
V21	23	女	健康	F村
VI27	6	男	健康	C村
VI29	6	男	健康	D村
VI30	3	男	健康	D村

注: \*为确诊病例

(2)患者脑组织神经病理学检查:2例确诊病例死亡后尸检取脑组织。脑组织外观无明显病理改变。HE染色丘脑部位有萎缩,小脑海绵样改变,神经元丢失及星状胶质细胞增生(图4)。

(3)患者脑组织PrP<sup>sc</sup>特异性Western blot检测:图5显示2例确诊病例的脑组织匀浆在用蛋白酶K水解前后分别进行PrP<sup>sc</sup>特异性Western blot的结果。病例1已检测的各部分脑组织中未发现蛋白酶耐受性PrP(PK-resistant PrP, PrP<sup>res</sup>),病例2的脑组织各部分可重复检测到PrP<sup>res</sup>,尤其在丘脑部分更明显。图5B为将相同量病例2脑组织各部分的10%匀浆与散发性克雅氏病(sporadic CJD, sCJD)病例的脑组织匀浆同时进行蛋白酶K水解和PrP<sup>sc</sup>特异性

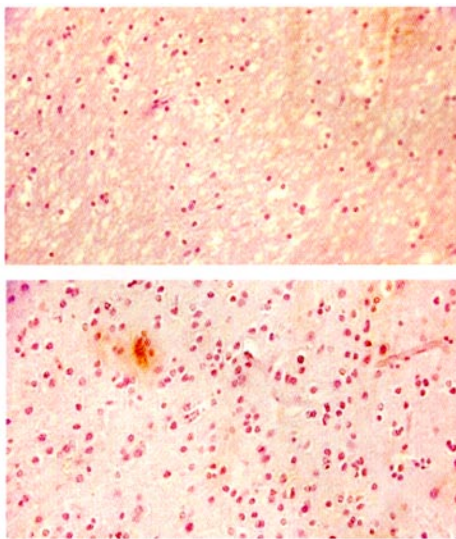


图4 河南省FFI家族中确诊病例小脑海绵样变性和神经元丢失及星状胶质细胞增生

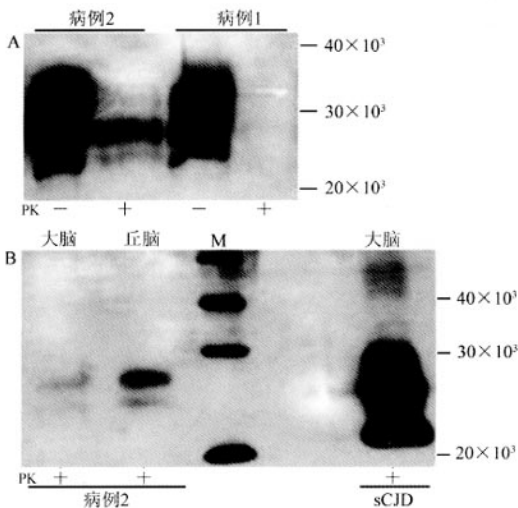


图5 2例FFI死者脑组织PrP<sup>sc</sup>特异性Western blot检测

### 讨论

自1986年意大利发现第一例FFI至今,国外报道了约26个家系81例患者<sup>[4]</sup>。近年来,我国FFI病例的报道逐渐增多。华中科技大学同济医科大学附属协和医院于2004年和2007年分别报道了1例临床患者,经检测均为PRNP基因178位氨基酸密码子突变<sup>[11,12]</sup>。河南省FFI病例及家系为2006年8月发现,如此庞大的FFI家族,在我国还未见报道,世界上也非常罕见。

本文报道的2例FFI确诊病例具有相似的临床特

征,以进展性失眠和交感兴奋为主要表现的症状持续整个病程,与国际上报道FFI病例症状相符,其他的神经系统异常包括肌阵挛和小脑功能障碍随病情发展逐渐严重。可疑病例中有2例发病后有痴呆症状,另2例为先天性痴呆,但2例确诊患者痴呆症状到病程晚期也不明显。2例确诊患者均出现可能与进展性睡眠减少有关的持续且进行性的呼吸紊乱,如呼吸障碍、呼吸不规律和睡眠呼吸暂停。病例1死于睡眠时,可能是呼吸障碍导致;病例2死亡前住院期间多导睡眠呼吸监测也显示睡眠时呼吸障碍。该两例FFI患者显示的交感兴奋和中枢性呼吸紊乱与在病例1下丘脑观察到的神经系统病理改变相吻合。

FFI发病年龄20~72岁,平均约49岁;病程8~72个月,平均18个月。D178N点突变发生的概率没有性别差异,男女发病比例1:1,病死率100%<sup>[4,13]</sup>。本文中该家族所有调查到的上下7代共135人因相似神经症状死亡的11人(包括2名确诊病例)中,男女性别比为6:5,接近于1:1;其中6人发病年龄在20多岁至74岁之间,病程6个月至2年;另5人发病年龄及病程无法确定,但据家族成员回忆,发病后存活均未超过2年。进行PRNP基因检测的32名家族成员中有11人(包括2例确诊病例)显示D178N突变。D178N点突变发生的男女性别比为6:5,没有性别差异。调查结果基本与文献相符。

病例1丘脑检测出海绵状变形和神经元缺失,但未发现PrP<sup>sc</sup>;而在病例2的脑组织各部分可重复检测到PrP<sup>sc</sup>。FFI患者脑组织中的PrP<sup>sc</sup>主要存在于丘脑和颞叶。一般情况下,FFI患者脑组织中的PrP<sup>sc</sup>含量较sCJD低<sup>[4,15]</sup>。

本文中FFI具有家族聚集性的特点非常明显。病例2是病例1的侄女,而病例1的父亲、2个叔叔、1个姑姑和1个长兄均因相似的症状而死亡。本研究检出9名PRNP基因D178N突变健康携带者中,1人为病例1的侄子(V17),另7名分别是病例2的母亲(IV8)及有血缘关系的3个姐妹(V18、V19、V22)和2个姐姐的儿子(VI28、VI30、VI31),其中年龄最大的53岁,最小的仅3岁。表1和表2显示河南省FFI家族的病例、疑似病例及PRNP基因D178N突变健康携带者分散居住在多个村镇,且文献报道证实FFI的家族聚集性主要由遗传所致,地理环境及生活习惯对FFI的发病及遗传的影响不明显。家族聚集性资料显示,病例1惟一亲生女儿检测PRNP基因未发生D178N突变。病例1的大哥、三哥及他们的后代经检测证实均无PRNP基因D178N突变遗传。另外,病

例2于26岁表现出FFI临床症状,其母亲在调查时53岁也携带PRNP突变基因至今未表现出任何异常症状。同一FFI家族中表现出的突变基因的遗传强度、遗传概率及FFI发病年龄的不同及导致这些差异出现的影响因素尚待进一步研究。

FFI是人类朊病毒病的一种,已被实验证实具有传染性。而又和其他的传染性疾病不同,主要因遗传而传播并与PRNP基因的特异性突变密切相关。FFI与其他家族遗传性克雅氏病一样,患者可能通过常规医疗如外科手术、牙科治疗或捐献血与器官移植而将致病原传播给他人。因此,该病的预防控制存在着特殊的公共卫生和伦理学争议,给预防医学工作者提出了新的挑战。如何保证PRNP基因特异性突变携带者的生活医疗质量,并阻止致病基因及朊病毒通过遗传和医疗途径传播,这仍需有相关的政策及法规给予指引和支持。

#### 参 考 文 献

- [1] Lugaresi E, Medori R, Montagna P, et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med*, 1986, 315(16):997-1003.
- [2] Medori R, Ritschler HJ, LeBlanc A, et al. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med*, 1992, 326(7):444-449.
- [3] Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*, 1992, 258(5083):806-808.
- [4] Harder A, Gregor A, Win II T, et al. Early age of onset in fatal familial insomnia. Two novel cases and review of the literature. *J Neurol*, 2004, 251:715-724.
- [5] Thomas AV, Klein JC, Brockhaus-Dumke A, et al. Fatal familial insomnia: case presentation and discussion of typical clinical and imaging findings. *Nervenarzt*, 2006, 77(6):711-715.
- [6] Montagna P. Fatal familial insomnia: a model disease in sleep physiopathology. *Sleep Med Rev*, 2005, 9(5):339-353.
- [7] Sasaki K, Doh-ura K, Wakisaka Y, et al. Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005, 31(1):80-87.
- [8] Dauvilliers Y, Cervena K, Carlander B, et al. Dissociation in circadian rhythms in a pseudohypersomnia form of fatal familial insomnia. *Neurology*, 2004, 63(12):2416-2418.
- [9] Benito LJ. Combined quinacrine and chlorpromazine therapy in fatal familial insomnia. *Clin Neuropharmacol*, 2004, 27(4):201-203.
- [10] Wang XF, Guo YJ, Zhang BY, et al. Creutzfeldt-Jakob disease in a Chinese patient with a novel seven extra-repeat insertion in PRNP. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2007, 78(2):201-203.
- [11] 张敏, 梅元武, 魏桂荣, 等. 致死性家族性失眠症一例临床及基因特征. *中华神经科杂志*, 2005, 38(10):628-631.
- [12] 骆翔, 贾清, 霍江涛, 等. 家族性致死性失眠症临床及相关特征. *卒中与神经疾病*, 2007, 14(6):353-356.
- [13] Montagna P, Cortelli P, Avoni P, et al. Clinical features of fatal familial insomnia: phenotypic variability in relation to a polymorphism at codon 129 of the prion protein gene. *Brain Pathol*, 1998, 8:515-520.
- [14] Parchi P, Castellani R, Cortelli P, et al. Regional distribution of protease-resistant prion protein in fatal familial insomnia. *Ann Neurol*, 1995, 38:21-29.
- [15] Friedrich M, Körte R, Portero C, et al. Fatal familial insomnia—a rare differential diagnosis in dementia. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2008, 76(1):36-40.

(收稿日期:2008-08-22)

(本文编辑:张林东)