

· 论著 ·

MCPH1基因变异致原发性小头畸形患儿的表型及遗传学分析*

吴婉悦¹ 刘 毓¹ 陈 凯² 文 静¹ 马春元¹ 杨 莹^{1,*}

1.贵阳市妇幼保健院罕见病中心内分泌遗传代谢科(贵州 贵阳 550001)

2.贵州省职工医院消化内科(贵州 贵阳 550025)

【摘要】目的 对1例原发性小头畸形患儿进行临床分析和基因检测,以明确致病原因。**方法** 对1例原发性小头畸形患儿的临床资料进行回顾性分析。采用下一代测序(NGS)技术对患儿进行全外显子基因检测,对变异位点采用Sanger测序法进行验证。对变异位点进行生物信息学分析。**结果** 患儿主要的临床表现为小头畸形、下颌稍小、高腭弓、眼眦稍上斜、运动及认知发育落后。基因结果显示,患儿MCPH1基因存在第6外显子c.445G>A (Val149Leu)及第13外显子c.2312C>G (Pro771Arg)复合杂合变异。患儿父亲携带MCPH1基因c.445G>A杂合变异,母亲携带MCPH1基因c.2312C>G杂合变异,姐姐未检测到该变异。HGMD Pro、PubMed和ClinVar数据库无关于MCPH1基因c.445G>A和c.2312C>G变异的报道。ExAC数据库和千人基因组数据库中未收录MCPH1基因c.445G>A变异和c.2312C>G变异。Polyphen_2、SIFT、Mutation Taster在线软件预测MCPH1基因c.445G>A变异为良性(BH4),MCPH1基因c.2312C>G变异为有害。根据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)指南评估2个变异均为可能致病的变异。**结论** 患儿临床表型高度符合小头畸形的诊断,但基因检测致病证据不充分。因此除MCPH1基因(8p23.1)区域突变外,可能还存在影响功能内含子区域的突变。

【关键词】 MCPH1基因;原发性小头畸形;基因变异**【中图分类号】** R744**【文献标识码】** A**【基金项目】** 深圳市工程研究中心(工程实验室)组建项目(F-2020-Z99-502615);贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwmkj2019-1-048)**DOI:**10.3969/j.issn.1009-3257.2024.3.001

Phenotypic and Genetic Analysis of Children with Primary Microcephaly Caused by MCPH1 Gene Mutation*

WU Wan-yue¹, LIU Yu¹, CHEN Kai², WEN Jing¹, MA Chun-yuan¹, YANG Ying^{1,*}

1.Department of Endocrinology, Genetics and Metabolism, Rare Diseases Center of Guiyang Maternal and Child Health Hospital, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

2.Department of Gastroenterology, Guizhou Staff Hospital, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

Abstract: Objective To analyze the clinical features and detect the gene of a child with primary microcephaly, so as to identify the cause of the disease. **Methods** The clinical data of a child with primary microcephaly were analyzed retrospectively. Next generation sequencing (NGS) technology was used to detect the whole exon gene of children, and Sanger sequencing method was used to verify the mutation sites. Bioinformatics analysis was carried out on the mutation sites. **Results** The main clinical manifestations of the children were microcephaly, slightly smaller mandible, high palatal arch, slightly inclined canthus, and poor motor and cognitive development. Gene results showed that there was a compound heterozygous variation of exon 6 c.445G>A (Val149Leu) and exon 13 c.2312C>G (Pro771Arg) in MCPH1 gene. The father of the child carries c.445G>A heterozygous variation of MCPH1 gene, and the mother carries c.2312C>G heterozygous variation of MCPH1 gene. The sister does not detect this variation. HGMD Pro, PubMed and ClinVar databases have no reports on the c.445G>A and c.2312C>G variants of MCPH1 gene. The exAC database and the 1000 person genome database did not include the c.445G>A variation and c.2312C>G variation of MCPH1 gene. Polyphen_2、SIFT、Mutation Taster The online software predicts that the c.445G>A mutation of MCPH1 gene is benign (BH4), and the c.2312C>G mutation of MCPH1 gene is harmful. According to the guidelines of the American Society of Medical Genetics and Genomics (ACMG), the two variants were evaluated as possible pathogenic variants. **Conclusion** The clinical phenotypes of the children are highly consistent with the diagnosis of microcephaly, but the evidence of genetic detection is insufficient. Therefore, in addition to the mutations in the MCPH1 gene (8p23.1) region, there may also be mutations that affect the functional intron region.

Keywords: MCPH1 Gene; Primary Microcephaly; Genetic Variation

原发性小头畸形(congenital microcephaly)又称为真性小头畸形或常染色体隐性遗传小头畸形,是以头围小、面部畸形和智力障碍为特征的神经系统发育性的罕见遗传性疾病^[1]。患儿的智商值取决于原发性小头畸形的严重程度,一般为正常人平均值的30%~80%。不同地区的原发性小头畸形发病率不同,为1/30 000~1/250 000,在近亲结婚的人群中普遍较高^[2]。目前已发现29个基因位点与原发性小头畸形有关。MCPH1是第1个被鉴定的原发性小头畸形致病基因^[3-4]。本研究拟对1例小头畸形、精神运动及认知发育落后患儿进行临床分析和基因检测,以明确病因。

1 材料和方法

1.1 研究对象 患儿,男,2岁8个月,因发现头小、运动及认知发育落后2年多就诊。患儿3月龄时抬头不稳,4月龄时家长发现患儿头较同龄儿小伴运动及认知发育落后,表现为4月龄时竖颈

不稳,喜欢打挺,不能逗笑,6月龄能翻身,8月龄双手拇指内收握拳,视物主动抓物差,不能换手,不能独坐,1岁时不能坐稳,不会发“爸爸妈妈”音,1岁10个月时会站立,2岁1个月会行走。现会喊“爸爸妈妈”,不会说短句,会拿勺吃饭,能独立上下楼梯,不会单脚跳,不会跑。无抽搐、不自主抖动,无头痛、视物模糊,无尖叫、双目凝视等不适。曾就诊于重庆医科大学附属儿童医院,诊断为“全面性发育迟缓、原发性小头畸形”,现予持续康复治疗中。患儿系第3胎第2产,孕38+5周,剖宫产,出生体重3.1 kg,出生后无窒息及抢救史。母亲为高龄产妇(36岁),孕早期有甲状腺功能减退,予“左旋甲状腺素片”口服,甲状腺功能维持正常,现复查甲状腺功能正常。第1胎因个人原因人工流产,第2胎5岁,姐姐,健康。父母体检,非近亲婚配,否认家族其他成员有类似病史。

1.2 方法

【第一作者】吴婉悦,女,住院医师,主要研究方向:儿童内分泌遗传代谢专业。E-mail: 841566930@qq.com

【通讯作者】杨 莹,女,主任医师,主要研究方向:儿童内分泌遗传代谢专业。E-mail: 2607919765@qq.com

1.2.1 样本采集 经患儿父母签署知情同意后,采集先证者及其直系亲属(父亲,母亲,姐姐)静脉血各2 mL于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中(紫色),4℃冷藏。本研究经患儿监护人知情同意,医院医学伦理委员会批准(CN31-1915/R)。

1.2.2 DNA抽提 采用FlexiGene DNA Kit(Qiagen, Germany)提取受试者血液样本基因组DNA。

1.2.3 突变检测 DNA样品送北京康旭医学检验所检测。采用IDT xGen Exome Research Panel V1.0 探针试剂盒(覆盖人类基因组39 M)进行全外显子捕获,运用NovaSeq 6000平台(Illumina, USA)进行测序,平均测序深度为100X,目标序列测序覆盖度≥99%。获得fastq 格式原始数据后,使用工具BWA(v0.7.15)将测序序列比对到人类参考基因组(Homo sapiens GRCh37)。参考1000G, dbSNP, ESP6500, ExAC等数据库注释患者变异在人群当中的频率。使用GATK (v4) 分析 SNV(单核苷酸变异)和InDel(小的插入缺失变异)。使用 CODEX, XHMM(v1.0), EXOMEDEPTH, CLINCNV 和 KSCNV(康旭, 北京)分析CNV(拷贝数变异),根据患儿的临床表征寻找可疑致病性变异在HGMD Pro、PubMed和ClinVar数据库中检索变异的相关报道。采用Polyphen_2 (Polymorphism Phenotyping v2)、SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant)、Mutation Taster预测变异的致病性。根据美国医学遗传学和基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)指南^[8]对变异进行致病性评级。针对符合患儿表征的致病变异,使用ABI 3730测序系统(ABI, USA)在家系中验证。

2 结果

2.1 患儿一般临床资料分析 特殊面容:小头畸形、下颌稍小、高腭弓、眼眦稍上斜,见图1。体格检查:体质量9.7 kg[低于同年龄、同性别、同地区幼儿平均体质量2个标准差(-2 sd)],身高83.2 cm[低于同年龄、同性别、同地区幼儿平均身高2个标准差(-2 sd)],头围46.0 cm[低于同年龄、同性别、同地区幼儿平均头围2个标准差(-2 sd)],Tanner分期G1PH1,双上肢肌力正常,双下肢肌力IV级。双下肢肌张力增高,紧张或哭吵时有角弓反张样表现,左膝关节有弹响。膝反射:左侧++、右侧++。腹壁

反射引出,巴氏征(-)、克氏征(-)、布氏征(-)。

头颅电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)示脑白质密度稍减低,双侧额叶脑沟、基底节区高密度。头颅磁共振成像、头颅磁共振弥散加权成像正常,脑电图正常。Gesell发育诊断量表:个人社交相当于16.9周(发育商development quotient, DQ 48.4分),适应性相当于16周(DQ 45.8分),粗大运动相当于16周(DQ 45.8分),精细运动相当于12.0周(DQ 34.4分)语言能力相当于10.7周(DQ 30.7分)。儿童运动发育评估量表(粗大运动功能评估 Gross Motor Function Measure, GMFM):患儿粗大运动相当于4月龄水平,建议加强粗大运动功能训练。儿童运动发育评估量表(精细运动能力评定表 Fine motorfunction measure, FMFM):患儿精细运动功能发育水平较同龄儿落后,相当于3月龄水平,建议加强精细运动功能训练。

2.2 突变检测及验证结果 全外显子测序(WES)结果显示,在先证者MCPH1基因第6外显子上发现错义突变c.445G>A,该突变会使缬氨酸被异亮氨酸替换(Val149Ile);第13外显子上发现另一错义突变c.2312C>G,同样会导致脯氨酸被精氨酸替换(Pro771Arg)。对先证者及其父母和姐姐进行Sanger 验证,结果见表1及图2。先证者父亲携带MCPH1基因c.445G>A变异,未检测到c.2312C>G。母亲则携带MCPH1基因c.2312C>G变异,未检测到c.445G>A;2个变异姐姐均未检测到。至此,推测先证者MCPH1基因上发现的2个错义突变(c.445G>A, c.2312C>G)可能分别源自父亲和母亲,遗传模式如图3所示。

2.3 变异位点致病性分析 检索HGMD Pro、PubMed和ClinVar数据库,未发现MCPH1基因c.445G>A和c.2312C>G变异的报道(PM1)。ExAC数据库和千人基因组数据库中未见MCPH1基因c.445G>A变异和c.2312C>G变异被收录(PM2)。根据OMIM数据库描述,先证者表型高度符合MCPH1基因变异引起的MCPH(PP4)。采用Polyphen_2、SIFT、Mutation Taster预测变异致病性在线软件预测MCPH1基因c.445G>A变异为良性(BH4),MCPH1基因c.2312C>G变异为有害(PP3)。根据ACMG指南,综合判断MCPH1基因c.445G>A为可能致病变异(PM1+PM2+PP4+BP4),MCPH1基因c.2312C>G亦为可能致病变异(PM1+PM2+PP4+PP3)。

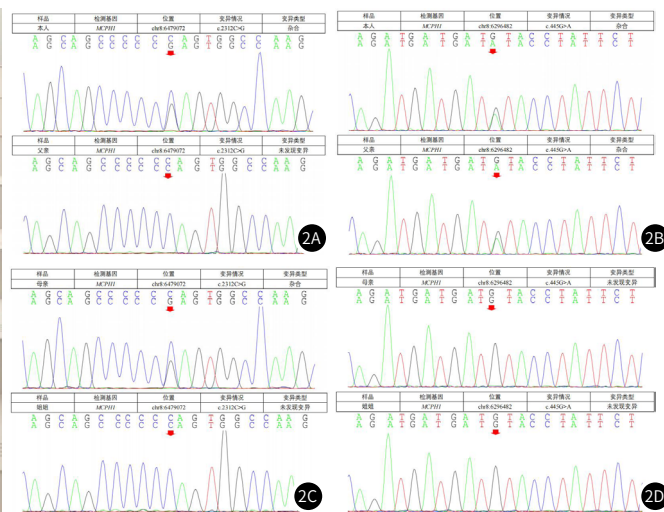


图1 患儿特殊面容、图2 全外显子测序与Sanger测序结果。图2A:先证者c.2312C>G杂合突变在父亲基因组中未检测到;图2B:先证者c.445G>A杂合突变在父亲基因组中验证;图2C:先证者c.2312C>G杂合突变在母亲基因组中验证,姐姐基因组未验证;图2D:先证者c.445G>A杂合突变在母亲和姐姐基因组中均未验证。

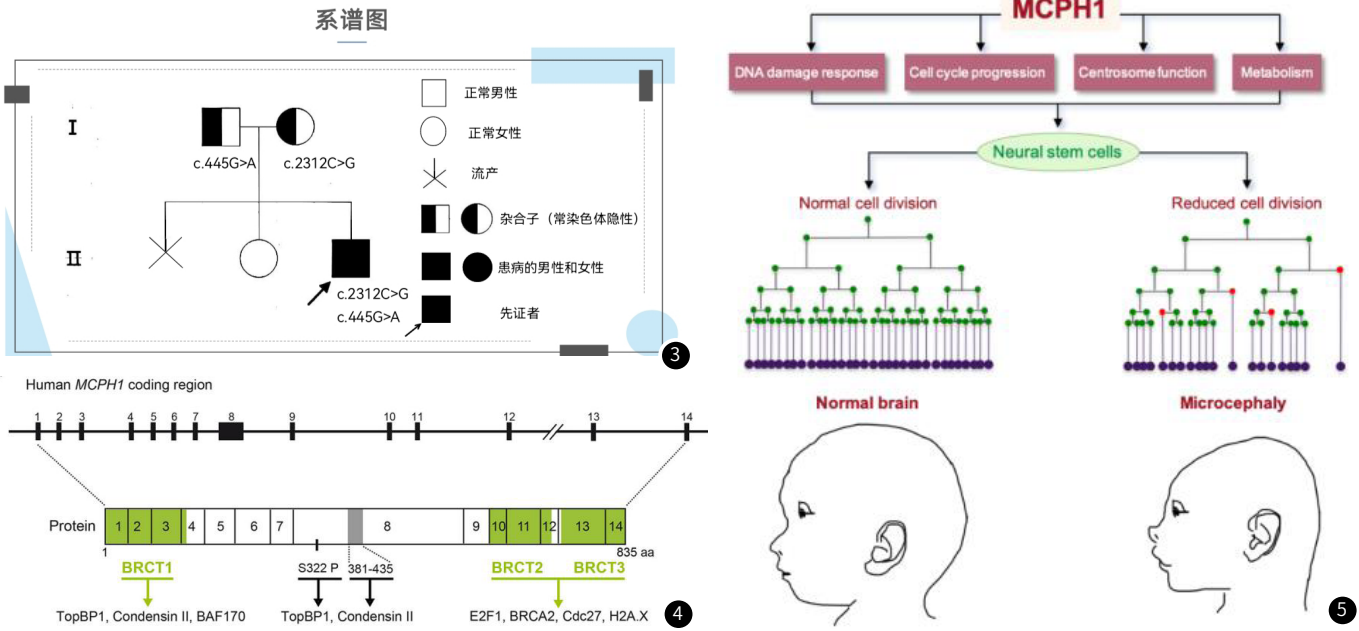


图3 家系图谱。图4 MCPH1基因编码序列结构示意图。图5 MCPH1 在大脑皮层发育中对神经祖细胞的调控示意图。

表1 突变检测

亲缘关系	基因	染色体位置	转录本	核苷酸变化	氨基酸变化	基因型	变异分类	ACMG评级
先证者	MCPH1	Chr8:6479072	NM_024596	c.2312C>G	p.Pro771Arg	Het	MS	VUS
	MCPH1	Chr8:6296482	NM_024596	c.445G>A	p.Val149Ile	Het	MS	VUS
父亲	MCPH1	Chr8:6296482	NM_024596	c.445G>A	p.Val149Ile	Het	MS	VUS
母亲	MCPH1	Chr8:6479072	NM_024596	c.2312C>G	p.Pro771Arg	Het	MS	VUS
姐姐	MCPH1	---	---	---	---	---	---	---

注：杂合型；MS:missense mutation，错义突变；VUS：临床意义不明。

3 讨论

小头畸形分为原发性小头畸形和继发性小头畸形。原发性小头畸形疾病是一种罕见的神经分裂异常引起的脑发育疾病，病人主要临床特征为头围减小并伴随不同程度的智力衰退，疾病分型较多，OMIM数据库收录原发性小头畸形共29个分型，其中原发性小头畸形(1型)属于常染色体隐性遗传(AR，OMIM: 251200)，占比约19%。该疾病的致病基因是MCPH1(8p23.1)^[3-4]。MCPH1基因编码的MCPH1蛋白是一种神经发育系统疾病的相关蛋白，与细胞分裂有关，常见于神经系统中。当MCPH1基因突变，编码蛋白受阻，干扰中心体或纺锤体的正常形成，影响细胞周期及DNA损伤修复等过程，进而影响神经前体细胞的增殖、分化和凋亡等过程，最终导致神经元数量减少并形成偏小的大脑^[5-8]。

MCPH1基因含14个外显子(图4)，其编码蛋白含有3个BRCT结构域，N端含有1个BRCT结构域，C端含有2个串联BRCT结构域，分别为BRCT2和BRCT3，第8外显子编码的376-485个氨基酸形成的结构域可以与凝缩蛋白II相互作用^[7,9]。MCPH1通过结合不同的因子在细胞周期和DNA损伤修复中发挥作用。MCPH1基因调节大脑大小，在胚胎大脑发育过程中用于调节神经干细胞分裂模式相关的许多细胞功能。由于神经干细胞的过早分化(图五，红点表示)和自我更新分裂的减少(图五，绿点表示)以及功能受损导致神经元生成不足(图五，深紫色点表示)，受影响的个体会出现小头畸形^[8,10](图5)。本例报告患儿基因致病证据不充分，生物信息学蛋白质功能预测MCPH1基因c.445G>A变异为良性，MCPH1基因c.2312C>G变异为有害。但与患儿临床表型高度符合，故考虑除MCPH1基因(8p23.1)区域突变可导致原发性小头畸形疾病，是否存在影响功能内含子区域的突变，还需进一步验证。

参考文献

[1] Tran TH, Diep QM, Cao MH, et al. Microcephaly primary hereditary (MCPH): report of novel ASPM variants and prenatal diagnosis in a Vietnamese family[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2021, 60(5): 907-910.

[2] Woods CG, Bond J, Enard W. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings[J]. Am J Hum Genet, 2005, 76(5): 717-728.

[3] Siskos N, Stylianopoulou E, Skavdis G, et al. Molecular genetics of microcephaly primary hereditary: an overview[J]. Brain Sci, 2021, 11(5): 581.

[4] Jean F, Stuart A, Tarailo-Graovac M. Dissecting the genetic and etiological causes of primary microcephaly[J]. Front Neurol, 2020, 11: 570830.

[5] Lin SY, Liang Y, Li K. Multiple roles of BRIT1/MCPH1 in DNA damage response, DNA repair, and cancer suppression[J]. Yonsei Med J, 2010, 51(3): 295-301.

[6] Jackson AP, Eastwood H, Bell SM, et al. Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain[J]. Am J Hum Genet, 2002, 71(1): 136-142.

[7] Kristofova M, Wang ZQ. MCPH1, beyond its role deciding the brain size[J]. Aging, 2021, 13(20): 23437-23439.

[8] Kristofova M, Ori A, Wang ZQ. Multifaceted microcephaly-related gene MCPH1[J]. Cells, 2022, 11(2): 275.

[9] Houliard M, Cutts EE, Shamim MS, et al. MCPH1 inhibits Condensin II during interphase by regulating its SMC2-Kleisin interface[J]. Elife, 2021 Dec 1; 10: e73348.

[10] Gruber R, Zhou Z, Sukchev M, et al. MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway[J]. Nat Cell Biol, 2011 Sep 25, 13(11): 1325-34.

(收稿日期：2023-04-25)
(校对编辑：姚丽娜)