

· 论著 ·

全外显子组测序在一例儿童Hutchinson-Gilford早老基因分析及产前诊断中的应用*

赵倩凤^{1,2} 龚珠文^{1,2,*}

1.上海交通大学医学院附属新华医院(上海 200092)

2.上海市儿科医学研究所(上海 200092)

【摘要】目的 采用全外显子组测序技术(whole exome sequencing, WES)联合Sanger测序检测儿童Hutchinson-Gilford早老症基因LMNA 1例,并对该家系进行产前诊断。方法 通过全外显子组测序,对先证者进行检测分析,检测到基因LMNA上的致病变异,对先证者及其父母进行Sanger测序,验证该变异。先证者母亲再次妊娠后,提取羊水标本DNA,应用Sanger测序检测该致病基因位点,进行产前诊断。结果 先证者LMNA基因携带c.1824C>T, p.(=)杂合变异。而其表型未见异常的父和母亲均未检出该变异。先证者母亲再次妊娠的产前诊断结果为未携带LMNA基因c.1824C>T, p.(=)变异。结论 WES可用于儿童Hutchinson-Gilford早老症家系致病变异的检出,联合Sanger测序可为患者家系的遗传咨询和产前诊断提供依据,且该方法具有准确性、快速性、经济性的优点。

【关键词】Hutchinson-Gilford早老症;全外显子组测序;LMNA基因;早衰;产前诊断

【中图分类号】R596.2

【文献标识码】A

【基金项目】上海市教委高峰高原计划研究型医师(2020001)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2025.2.001

Whole Exome Sequencing and Prenatal Diagnosis of a Family with Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome*

ZHAO Qian-feng^{1,2}, GONG Zhu-wen^{1,2,*}

1.Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University Medical College, Shanghai 200092, China

2.Shanghai Institute for Pediatric Research, Shanghai 200092, China

Abstract: *Objective* One case of Hutchinson-Gilford progeria syndrome in a child was tested by using whole exome sequencing (WES) and Sanger sequencing for the LMNA gene, and the prenatal diagnosis was performed for this family. *Methods* WES was used to find pathogenic variants of LMNA in the proband. The parental origin of variants was assessed by Sanger sequencing. DNA was extracted from the peripheral blood of the proband and parents, as well as the amniotic fluid of the mother. Sanger sequencing was used in the prenatal diagnosis based on the identified variant. *Results* A known heterozygous mutation c.1824C>T, p.(=) was detected in the LMNA gene in the proband, but not found in his unaffected parents. The prenatal diagnosis based on the amniotic fluid revealed that the fetus did not harbor LMNA c.1824C>T, p.(=) mutation. *Conclusion* WES combined with Sanger sequencing can be used to detect the pathogenic variants in the diagnose of HGPS, and prenatal diagnosis of this syndrome is feasible. This method is fast, accurate and cost-effective.

Keywords: Hutchinson-gilford; Whole Exome Sequencing; LMNA; Prenatal Diagnosis

儿童Hutchinson-Gilford早老症(HGPS)是致命的儿童遗传病,出生早期出现过早老化相关症状,包括皮下脂肪缺乏、脱发、静脉曲张、生长迟缓、老年斑、关节挛缩、骨质疏松等。本病发病率极低,约为1:800000~1:400000^[1]。研究表明,HGPS是由定位于染色体1q21.2上的LMNA基因(NM_170707.3)变异所致,LMNA基因的不同变异可引起同一类型的疾病,而同一碱基的不同替换也可导致不同的疾病。相同的LMNA变异在部分个体会导致疾病,在另一部分个体却没有表现出临床表型,这些都说明了LMNA基因的功能复杂且多样^[2-3]。儿童Hutchinson-Gilford早老症致病基因LMNA基因外显子11的c.1824C>T, p.(=)变异,为此疾病的经典变异,其致病性已有文献报告,发生在约90%的HGPS患者中^[4]。HGPS尚无有效的治疗方法,患儿平均寿命仅为14.6岁^[1]。所以对有HGPS生育史的家庭来讲,产前诊断尤为重要。目前,对HGPS的产前诊断临床上研究较少,未见有应用全外显子组测序技术以及Sanger测序技术对HGPS进行产前诊断的报告。本研究使用全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)技术,检测了1例HGPS患者,联合Sanger测序技术验证致病变异,并为先证者家系的再生育进行产前诊断,意在探究全外显子组测序在早老症家系基因分析及产前诊断中的应用价值,避免HGPS患儿出生。

1 资料与方法

1.1 对象 先证者,女,1岁时于上海交通大学医学院附属新华医院就诊,全面收集患儿症状、体征及辅助检查结果。患儿头围

46cm,身高64cm,体重6kg,头皮静脉显露,全身皮肤可见网状色素沉着,触感硬,皮下脂肪丢失,躯干部颜色偏黑。

1.2 全血样本采集 经家长知情同意后,患儿和家长分别抽取静脉血2mL、EDTA-K2抗凝血提取外周血DNA,提取的DNA保存于-20℃备用。使用仪器为厦门致善生物科技股份有限公司Lab-Aid核酸提取仪,试剂盒为厦门致善生物科技股份有限公司Lab-Aid核酸(DNA)分离试剂盒,严格遵守仪器标准操作手册规定,选定抽提程序。

1.3 WES测序 采用xGen Exome research panel v1.0(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, United States)试剂盒,按照生产商的方案完成样本基因组DNA文库的制备,并通过Illumina HiSeq 4000(美国加利福尼亚州圣地亚哥Illumina)进行150bp配对末端序列进行测序。应用比对软件Burrows-Wheeler Aligner(BWA,版本0.7.10)将原始数据与人类参考基因组(GRCh37/hg19)进行比对。采用Picard 1.124分析覆盖率、深度等QC指标。采用GATK流程(版本3.0)进行变异分析,然后使用SnPEff 4.2对变异进行注释和影响预测。最后进行数据过滤,过滤千人基因组(1000 Genomes Project)、gnomAD等在内的群体变异数据库中表现出>1%频率的变异,或在我们的内部数据库(基于150个外显子组数据库)中表现出>5%频率的变异,忽略基因非翻译区变异、非剪接相关内含子变异和同义变异,保留位于典型剪接位点的变异以及在文献中报告过的同义变异。

1.4 先证者及父母DNA验证 针对WES检测的致病基因LMNA对先证者,父母进行Sanger验证。根据人类基因组数据库GenBank获

【第一作者】赵倩凤,女,技师,主要研究方向:分子遗传。E-mail: zhaoqianfeng2557@xinhuaamed.com.cn

【通讯作者】龚珠文,女,主管技师,主要研究方向:分子遗传。E-mail: gongzhuwen@xinhuaamed.com.cn

得变异位点基因序列,采用Primer 5软件设计引物,PCR扩增变异位点。PCR反应体系50 μ L,其中Dream Taq TM Green PCR Master MIX 25 μ L,正、反向引物各2 μ L, DNA 2 μ L,无核酸酶水19 μ L。扩增参数为:95 $^{\circ}$ C, 5 min; 95 $^{\circ}$ C 40s, 50 $^{\circ}$ C-56 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 50s,共33个循环;72 $^{\circ}$ C 10min, 10 $^{\circ}$ C保存。PCR产物送上海生工生物ABI 3730xl 基因分析仪测序,测序结果用Mutation Surveyor 软件分析,并与GenBank人类LMNA基因NM_170707.3序列进行比较。依据美国医学遗传学与基因组学学会(The American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)制定的序列变异解读指南,对所发现变异的致病性进行五级分类评级。

1.5 产前诊断

1.5.1 羊水DNA提取 应用凯杰(Qiagen)基因组提取试剂盒提取羊水细胞DNA。DNA提取操作步骤严格遵循试剂盒标准操作说明书。

1.5.2 羊水DNA的Sanger测序 根据先证者的变异位点进行PCR扩增,PCR产物送上海生工生物公司ABI 3730xl 基因分析仪测序,获得的序列与先证者比对。

2 结果

2.1 病史 患儿,女,11月,因“不会走路,皮肤发黑”至我院就诊,患儿系第1胎,第1产,足月剖宫产,无宫内窘迫史及出生后无窒息,无惊厥。出生体重3.2Kg,出生身长48cm,6个月会坐,现不会走路。患儿父母否认家族遗传病史,非近亲结婚。父亲身高175cm,母亲身高170cm。

2.2 体格检查 身材矮小,营养不良貌(身高64cm<-2SD, 6kg<-2SD),头围46cm(X+1SD),神清气平,头皮静脉显露,头发、眉毛稀疏,面部皮肤细嫩光滑,眼部突出,鼻似鸟嘴,未出牙。躯干及四肢皮肤色素沉着明显伴网格状花纹,皮肤干硬,皮下脂肪菲薄,躯干部皮肤发黑。心肺查体未及异常、肝脾肋下未及,脊柱四肢曲度活动度未见异常,女婴外阴、会阴可见轻度水肿。

2.3 辅助检查 患儿血常规正常、生化检测血脂正常、肝肾功能正常、甲状腺激素正常、电解质正常。未发现血串联质谱、尿气相色谱质谱异常。

2.4 基因诊断 WES测序及Sanger测序验证结果:先证者LMNA基因发现c.1824C>T, p.(=),父亲和母亲均未检出该变异。亲子STR分型提示先证者的变异为新发变异。该变异为LMNA基因经典变异。此前有多篇文献报告该同义突变实为隐藏的剪接位点变异,将导致mRNA水平的剪接异常(PMID: 21875900, 15982412),产生截短的Progerin蛋白(PMID: 19172989, 21875900)。鼠类模型研究中也发现该变异可导致与病人相似的表现(PMID: 22893709, 24305605)。根据《ACMG遗传变异分类标准指南》,该变异可获得的证据包括PS3、PS2、PM2,致病性评级为“致病”。

2.5 产前诊断 明确致病基因位点后,当先证者母亲再次妊娠时,对其羊水标本进行LMNA基因c.1824C>T, p.(=)变异的Sanger测序,证实胎儿未携带c.1824C>T, p.(=)变异。

3 讨论

儿童HGPS早老症是一种非常罕见的疾病,与编码层粘连蛋白A和层粘连蛋白C的LMNA基因中的变异有关^[5]。LMNA基因变异类型和位置不同,可能导致11种不同的核纤层蛋白疾病,包括皮肤疾病、肌营养不良、脂肪营养不良、扩张性心肌病、神经病变以及早老综合症等。

典型儿童早老症中约90%为LMNA基因c.1824C>T, p.(=)变异引起,而LMNA其他变异c.1822G>A, p.(Gly608Ser)、c.1868C>G, p.(Thr623Ser)、c.1968+1G>A等则会引起非典型儿童早老症的发生^[6]。典型与非典型儿童早老症在临床表型上存在诸多相似,二者均呈现出脱发、头皮静脉曲张、皮肤萎缩及硬化、色素异常,患儿外观呈鸟样鼻,伴生长发育迟缓,但智力水平基本处于正常。

HGPS通常由常染色体显性遗传,2003年c.1824C>T, p.(=)被确定为显性新发位点^[7-8]。常染色体隐性变异频率较低,已报告复合杂合c.1579C>T, p.(Arg527Cys)/c.1411C>T, p.(Arg471Cys)及c.1626G>C, p.(Lys542Asn)纯合变异^[9-10]。研究发现LMNA基因遵循常染色体显性

遗传模式,先证者为LMNA基因c.1824C>T, p.(=)新发变异,其父母均未携带该变异,Sanger测序也未检测到父母中该位点的低水平嵌合现象。尽管该变异未引起编码的氨基酸发生改变,但有相关研究显示,在LMNA基因11号外显子区域,该变异极有可能形成一个全新的潜在剪切位点,剪切了lamin A蛋白前体C末端的150个核苷酸、50个氨基酸,其中涵盖了ZMPSTE24酶切位点,这一改变催生了早老蛋白。由于ZMPSTE24酶切位点的改变,早老蛋白保留了法尼半胱氨酸甲酯,进而形成了永久法尼基化的lamin A,内核膜难以释放该种早老蛋白,这一过程破坏了细胞核的结构完整性和功能,使细胞形态发生变化,导致疾病的发生^[11-12]。国外研究报告,在携带c.1824C>T, p.(=)变异的典型HGPS患者中,其皮肤成纤维细胞出现早老蛋白的表达。患者细胞核变形、细胞核膜出泡改变,伴随细胞持续老化,该情况愈发严重。除此以外,携带此变异患者多数还会并发骨骼方面的异常。此例患儿的临床表现与上述表现吻合。

一般而言,患儿的新发变异并不会由其父母遗传给其他胎儿,但是以色列一项为期10年的研究^[14]跟踪发现90个家系中仍有3个家系复现了先证者的新发变异,约占3%,与其它文献中^[15]总结的新发变异复发率一致。由于HGPS尚无有效的治疗方法^[13],且寿命较短,为避免复发,先证者母亲再次妊娠时进行产前诊断十分有价值且有必要。

本研究首先应用测序范围广、深度高的全外显子组测序来筛选并锁定先证者的致病基因及位点,随后结合高准确性的Sanger测序,验证先证者及其父母的该致病基因位点。先证者母亲再次妊娠后,抽取羊水,提取羊水细胞DNA,使用Sanger测序检测胎儿的该变异位点,从而达到产前诊断的目的。目前,WES技术凭借经济性及高效性,在快速确定单一致病基因及变异位点上展现出显著优势,已广泛应用于单基因疾病的分子诊断,凭借其强大的筛查能力,已经发现了多种遗传病背后隐藏的致病基因。随着WES检测技术的普及,越来越多的新发变异得以被发现。另一方面Sanger测序作为经典的一代测序检测技术,在检测某一单基因的位点变异、微小缺失和微小插入时具有高度的准确性。将两种方法结合应用于此疾病的基因诊断和产前诊断,不仅快速经济,而且高效便捷,可行性强。该方法针对出生缺陷实现了精准诊断、有效干预,还为未来临床遗传病的病因诊断及产前诊断提供了有价值的参考。

参考文献

- [1] Karim Harhour, Diane Frankel, Catherine Bartoli, et al. An overview of treatment strategies for Hutchinson-Gilford Progeria syndrome [J]. *Nucleus*, 2018, 9 (1): 246-257.
- [2] Sofía Rodríguez, Maria Eriksson. Low and high expressing alleles of the LMNA gene: implications for laminopathy disease development [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (9): e25472.
- [3] Corinne Vigouroux, Anne-Claire Guénant, Camille Vattier, et al. Lipodystrophic syndromes due to LMNA mutations: recent developments on biomolecular aspects, pathophysiological hypotheses and therapeutic perspectives [J]. *Nucleus*, 2018, 9 (1): 235-248.
- [4] 曹霞, 罗彦彦, 袁广之, 等. 一个儿童早老症家系临床特征分析和致病基因研究 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2015, 48 (3): 184-186.
- [5] Matthew Xing Rong Foo, Peh Fern Ong, Oliver Dreesen. Premature aging syndromes: from patients to mechanism [J]. *J Dermatol Sci*, 2019, 96 (2): 58-65.
- [6] Fabio Coppè. Mutations involved in premature-aging syndromes [J]. *Appl Clin Genet*, 2021, 14: 279-295.
- [7] De Sandre-Giovannoli, Raphaëlle Bernard, Pierre Cau, et al. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria [J]. *Science*, 2003, 300 (5628): 2055.
- [8] Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome [J]. *Nature*, 2003, 423: 293-298.
- [9] Cao H, Hegele RA. LMNA is mutated in Hutchinson-Gilford progeria (MIM 176670) but not in Wiedemann-Rautenstrauch progeroid syndrome (MIM 264090) [J]. *Med Genet*, 2003, 48: 271-274.
- [10] Plasilova M, Chattopadhyay C, Pal P, et al. Homozygous missense mutation in the lamin A/C gene causes autosomal recessive Hutchinson-Gilford progeria syndrome [J]. *J Med Genet*, 2004, 41: 609-614.
- [11] Muhammad Saad Ahmed, Sana Ikram, Nousheen Bibi, et al. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: a premature aging disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (5): 4417-4427.
- [12] Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, et al. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 8963-8968.
- [13] 余佳, 杨文利, 闫洁, 等. 儿童Hutchinson-Gilford早老症六例分析 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2020, 36 (1): 25-30.
- [14] Eyal O, Berkenstadt M, Reznik-Wolf H, et al. Prenatal diagnosis for de novo mutations: experience from a tertiary center over a 10-year period [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7 (4): e00573.
- [15] Campbell IM, Stewart JR, James RA, et al. Parent of origin, mosaicism, and recurrence risk: probabilistic modeling explains the broken symmetry of transmission genetics [J]. *Am J Hum Genet*, 2014, 95 (4): 345-359.

(收稿日期: 2023-07-25) (校对编辑: 韩敏求)