

· 论著 ·

新发杂合Ser249Cys变异导致的骨发育不良家系分析*

李 杨 狄 华 严 凯 李慧娟 穆艳超*

安阳市妇幼保健院产前诊断中心, 安阳市产前诊断重点实验室(河南 安阳 455000)

【摘要】目的 对一个超声诊断四肢短小畸形伴致死性骨发育不良可能家系进行FGFR3基因突变分析和调查。方法 采集胎儿组织与胎儿父母血液标本, 进行高通量测序, 采用Sanger测序对变异进行验证。使用多种数据库对检测结果进行分析。结果 胎儿存在FGFR3 c.746CG(p.Ser249Cys)杂合错义变异, 胎儿父母FGFR3基因均为野生型; 胎儿和父母样本均未检测到100kb以上已知明确致病的拷贝数变异。结论 胎儿所具有的FGFR3 c.746CG (p.Ser249Cys)杂合错义变异为新发变异, 是造成骨发育不良的原因。新发基因变异的检出丰富了遗传性骨发育不良的致病机制。

【关键词】FGFR3; 骨发育不良; 畸形; 家系

【中图分类号】R394.3

【文献标识码】A

【基金项目】安阳市重点研发与推广专项: 低深度测序技术在预防出生缺陷中的应用(2023C01SF156)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2025.3.003

Pedigree Analysis of Skeletal Dysplasia Caused by a Novel Heterozygous Ser249Cys Variants*

LI Yang, DI Hua, YAN Kai, LI Hui-juan, MU Yan-chao*

Prenatal Diagnosis Center, Anyang Maternal and Child Health Care Hospital, Anyang Key Laboratory of Prenatal Diagnosis, Anyang 455000, Henan Province, China

Abstract: Objective To analyze and investigate the mutation of FGFR3 gene in a possible family diagnosed by ultrasound with short limbs and fatal osteopathy. **Methods** Fetal tissue and fetal parents' blood samples were collected for high-throughput sequencing, and Sanger sequencing was used to verify the variation. The test results were analyzed using a variety of databases. **Results** There was FGFR3 c.746CG (p. Ser249Cys) heterozygous missense mutation in the fetus, and the FGFR3 gene in both fetal parents was wild type. Both fetal and parental samples had not been detected copy number variants over 100kb known to be clearly pathogenic. **Conclusion** FGFR3 c. 746CG (p. Ser249Cys) heterozygous mutation in fetuses is a new mutation, which may be the cause of skeletal dysplasia. The detection of new gene variants has enriched the pathogenesis of hereditary skeletal dysplasia.

Keywords: FGFR3; Skeletal Dysplasia; Malformation; Pedigree

骨发育不良(skeletal dysplasia, SD)是一系列因骨骼生长发育异常累及包括神经系统在内的多个系统的疾病, 可由遗传或环境因素导致, 其合并发生率约为 5%^[1]。骨骼在全身分布广泛, 不同患者骨发育异常可累及的系统和表现具有较大异质性^[2]。骨发育异常可在胎儿时期通过产前超声检查发现, 胎儿骨发育异常的种类繁多, 严重者可导致胎儿死亡或新生儿死亡^[3]。各系统的骨骼发育异常通常是隐匿的, 骨骼的形态变化和骨骼中矿物质的变化随着时间推移不断积累, 四肢畸形、疼痛、肢体僵硬和关节活动受限可由胎儿时期表现出来, 并长期不可逆发展, 严重影响患者的生活质量^[4]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 孕妇, 34岁, 教师, 平素体健, 否认家族遗传病史, 月经规律量中等, 无痛经, 末次月经时间为2022年11月1日, 停经一个月自测尿HCG阳性, 初次怀孕。孕期查NT=3.0mm, 唐氏筛查21-三体临界风险, 无创DNA检测低风险。孕23周5天查四维彩超示宫内妊娠, 臀位, 单活胎, 胎儿结构异常: 四肢严重短小, 考虑致死性发育不良可能; 颅内结构异常: 顶枕沟显示不明显, 后颅窝池显示不明显, 小脑形态欠饱满。孕23+6周, 剖宫取胎术, 术中以臀位娩出一女死婴, 进行基因检测。

孕妇丈夫平素体健, 否认近亲结婚, 否认家族遗传病史。夫妇双方为预防再孕育类似胎儿, 行进一步遗传学诊断。

本研究经安阳市妇幼保健院伦理委员会审查(20230225001), 孕妇夫妇双方均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 采集孕妇与丈夫外周血各2mL置于EDTA-K2抗凝负压采血管中, 采集流产胎儿肌肉组织20mg置于冰

PBS缓冲液中, 使用核酸提取与纯化试剂盒(安诺优达基因科技有限公司, 北京)按照厂家试剂盒说明书提取DNA。使用Qubit®4.0荧光计(赛默飞世尔科技有限公司, 美国)检测DNA浓度与纯度, A260/A280在1.8~2.0之间达到质控要求, 于-20℃保存备用。

1.2.2 高通量测序与数据分析 取200ng胎儿和胎父母基因组DNA, 根据构建文库试剂盒(安诺优达基因科技有限公司, 北京)说明书建库。使用NextSeq 550AR基因测序仪(安诺优达基因科技有限公司, 北京)进行染色体拷贝数变异和全外显子组测序(20×覆盖度99%), 检测包含全外显子组区域及剪切边界5bp范围内的单碱基变异(SNVs)和外显子区域50bp以内的插入/缺失(InDels)。使用AnnoCNV智能解读系统(安诺优达基因科技有限公司, 北京)进行数据处理, 结合胎儿表型查阅在线《人类孟德尔遗传》数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM)、临床基因组资源中心数据库(clinical genome resource, ClinGen)、NCBI ClinVar数据库、健康人群结构变异频率数据库(database of genomic variants, DGV)、DECIPHER数据库, 找出潜在的致病证据。参考美国医学遗传学与基因组学学会(american college of medical genetics and genomics, ACMG)遗传变异分类标准与指南, 对检测数据进行致病性解读。

1.2.3 Sanger测序验证 依据参考文献合成FGFR3基因(NM_000142.5)第7号外显子区设计引物^[5], 检测胎儿与胎父母FGFR3基因c.746CG位点变异。正向引物: 5'-AAGTTTGGCAGCATC-3', 反向引物: 5'-TGTGCGTCACTGTACAC-3'。

2 结 果

2.1 胎儿及胎父母临床资料 女胎, 胎龄23+6周, 710g, 四肢短小。胎母, 34岁, 平素体健, 否认家族遗传病史, 月经规律量中

【第一作者】李 杨, 女, 主治医师, 主要研究方向: 出生缺陷防控。E-mail: 80899693@qq.com

【通讯作者】穆艳超, 男, 主管技师, 主要研究方向: 产前诊断分子遗传技术应用。E-mail: muyanchao@tmu.edu.cn

等,初次怀孕。胎父,35岁,平素体健,否认近亲结婚,否认家族遗传病史。

2.2 拷贝数变异(copy number variations sequencing, CNV-seq)分析 经检测,胎儿测序结果为:seq[hg19](1-22)×2,(XN)×1;胎父亲测序结果为:seq[hg19](1-22)×2,(XY)×1;胎母亲测序结果为:seq[hg19](1-22,X)×2。胎儿及胎父母样本均为检测到染色体非整倍体或100kb以上已知明确致病的基因组拷贝数变异。

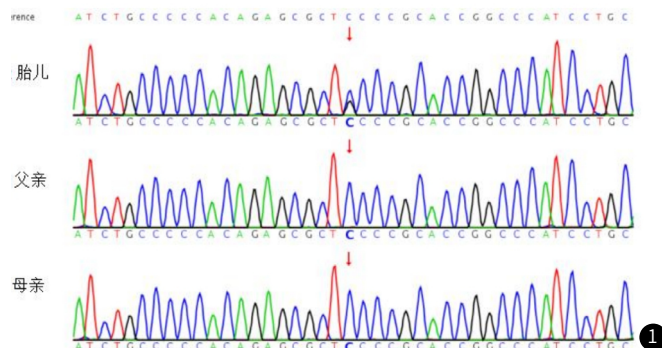


图1 胎儿与胎父母FGFR3基因c.746CG位点Sanger测序结果。

3 讨论

FGFR3基因定位于人染色体4p16.3区1 793 293-1 808 867号碱基,全长15.6kb,共19个外显子和18个内含子。该基因编码成纤维细胞生长因子受体家族的一个成员,其氨基酸序列在成员之间和不同物种之间高度保守。FGFR家族成员在配体亲和力和组织分布上彼此不同。FGFR3蛋白包括一个细胞外区域、三个免疫球蛋白样结构域、一个疏水膜跨越段和一个细胞质酪氨酸激酶结构域组成。该蛋白的细胞外部分与成纤维细胞生长因子相互作用,启动一系列下游信号,最终影响有丝分裂和分化。这个特殊的家族成员结合酸性和碱性成纤维细胞生长激素,在骨骼与神经的发育和维持中起作用。

FGFR3基因错义突变导致编码氨基酸编码发生变异,这将影响编码蛋白的三维结构,导致编码蛋白功能改变。本研究中发现,胎儿为FGFR3 c.746CG杂合子,其父母该位点为野生型,说明胎儿是新发变异,以往多项研究发现该位点变异将导致编码蛋白发生功能受损^[6-7]。经公共数据库查询,FGFR3基因突变会导致常染色体显性遗传病,可导致软骨发育不全(achondroplasia, OMIM:100800)、季肋发育不全(hypochondroplasia, OMIM:146000)、Muenke综合征(Muenke syndrome, OMIM:602849)、严重软骨发育不全伴发育迟缓和黑棘皮病(SADDAN, OMIM:616482)、致死性骨发育不全I型(thanatophoric dysplasia, type I, OMIM:187600)、致死性骨发育不全II型(thanatophoric dysplasia, type II, OMIM:187601)。

本研究中病例超声所见胎儿四肢严重短小,考虑致死性发育不良可能,顶枕沟显示不明显,后颅窝池显示不明显,小脑形态欠饱满。基因检测发现胎儿FGFR3 c.746CG杂合突变,以往鲜有文献报道FGFR3 c.746CG突变与颅脑发育不良有关。基因检测结果对于本例患胎颅脑发育不良的病因难以解释。有意义的是,该例患胎是家系中新发变异,该新发变异在多个家系中已经被检测到为家系新发变异^[8]。该变异相关的遗传性骨发育不良疾病的患者中,普遍存在神经系统的功能异常或结构异常。软骨发育不全的病例主要表现除了包括骨骼发育不良、喇叭状干骺端、椎管狭窄合并椎弓间距减少、小儿肌张力减退、肢体短缩、伸肘受限、短指畸形综合征、周身关节松弛、六腰椎等全身骨骼发育异常,还包括脑积水、脑干受压、巨脑、枕骨大孔过小、前额突出等颅脑发育异常^[9]。季肋发育不全除肢体和躯干骨骼发育异常,还存在颅缝早闭、前额突出、巨头畸形、智力残疾等颅脑和神经认知发育异常^[10]。Muenke综合征具有更多的神经认知发育异常和肢体骨骼发育异常的表现,如巨头畸形、斜视、听力障碍、癫痫发作、冠状缝早闭、下斜脸裂、全面发育迟缓、斜头畸形、眼球突出、注意力缺陷多动障碍、短头

2.3 全外显子组测序分析结果与Sanger测序验证 胎儿全外显子组检测结果为:FGFR3基因c.746CG杂合突变;胎父母全外显子组检测结果显示FGFR3基因c.746位点为野生型,Sanger测序验证以上结果(图1)。胎儿携带的FGFR3基因c.746CG为新发变异,非遗传自父母。

2.4 FGFR3基因c.746CG变异对编码蛋白的影响 FGFR3基因c.746CG变异导致编码蛋白249号氨基酸由丝氨酸变异为半胱氨酸(p.Ser249Cys),发生了错义突变。

畸形等^[10]。严重软骨发育不全伴发育迟缓和黑棘皮病所表现的颅脑和神经发育异常有中枢性呼吸暂停、胼胝体发育不良、全面发育迟缓、巨脑、听力障碍、前凶增宽、癫痫发作、重度近视、睡眠呼吸暂停等^[11]。致死性骨发育不全患者可表现出巨头畸形、极重度智力残疾、全面发育迟缓、呼吸功能不全、分叶状颅、枕骨大孔过小等颅脑和神经发育异常^[12]。

本研究发现胎儿的FGFR3 c.746CG变异,受标本取材所限,尚无法排除胎父母之一是否存在生殖腺嵌合携带者或者低比例嵌合的可能性,父母生殖腺嵌合体能够遗传给子代与自身体细胞孟德尔遗传规律不同的基因型^[13]。本研究未进行基因表达谱分析,无法排除表观遗传和多基因等所致神经系统异常和骨发育异常可能性。

综上所述,分子遗传学检测技术在产前诊断中应用具有重要意义,本研究中家系发现FGFR3 c.746CG新发变异,该变异与多种遗传性骨代谢疾病有关,且这些遗传性骨代谢疾病患者中普遍存在颅脑和神经发育异常,与本研究中家系特征相符。限于现有研究和诊断水平,尚无法完全揭示该例胎儿发病的详细分子机制,更深入的分子机制研究将有助于人们对该类病例的认识。

参考文献

- [1]徐一鸣,付晗,苏丹.系统胎儿超声联合全外显子测序技术诊断胎儿四肢骨骼发育异常的价值[J].中国计划生育学杂志,2022,30(12):2835-2839.
- [2]焦智慧,陈义兵,赵振华,等.两个锁骨颅骨发育不良家系的RUNX2基因变异分析及产前诊断[J].中华医学遗传学杂志,2019,36(12):1179-1182.
- [3]梅亚盟,傅文贞,岳华,等.22例单基因遗传性骨病家系的产前诊断分析[J].中华内分泌代谢杂志,2022,38(7):595-600.
- [4]石鑫,高艳艳,邱斐仪,等.成人脊髓性肌萎缩症(SMA)患者鞘内注射诺西那生钠注射液围术期综合护理干预[J].罕少疾病杂志,2023,30(8):11-12,16.
- [5]Tomlinson DG, Hurst CD, Knowles MA. Knockdown by shRNA identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in bladder cancer[J]. Oncogene, 2007, 26(40):5889-5899.
- [6]Mohan P, Lemoine J, Trotter C, et al. Clinical experience with non-invasive prenatal screening for single-gene disorders[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2022, 59(1):33-39.
- [7]Al-Hamed MH, Kurdi W, Khan R, et al. Prenatal exome sequencing and chromosomal microarray analysis in fetal structural anomalies in a highly consanguineous population reveals a propensity of ciliopathy genes causing multisystem phenotypes[J]. Hum Genet, 2022, 141(1):101-126.
- [8]Peng Y, Yang S, Huang X, et al. Whole Exome sequencing analysis in fetal skeletal dysplasia detected by ultrasonography: an analysis of 38 cases[J]. Front Genet, 2021, 12:728544.
- [9]孙文文,刘晶,孔德先,等.《关于软骨发育不全患者的诊断、多学科管理和终身护理的国际共识声明》要点解读[J].中国全科医学,2023,26(10):1164-1171.
- [10]李倪. Schimke免疫-骨发育不良1例[J].罕少疾病杂志,2022,29(10):6-8.
- [11]王瑞芳,余永国.软骨发育不全的指南变迁与多学科诊疗建议[J].中国实用儿科学杂志,2022,37(8):588-595.
- [12]乌云塔娜.全外显子组测序技术在骨骼系统发育异常胎儿中的应用研究[D].内蒙古医科大学,2022.
- [13]吴志强.从经典到表观:遗传学百年发展的概述[J].生物学通报,2023,58(2):1-4.

(收稿日期:2023-09-10) (校对编辑:江丽华)