

· 论著 ·

新发杂合Asn700del变异导致的下肢明显型脊肌萎缩症家系分析*

狄 华¹ 穆艳超^{1,*} 李 杨¹ 严 凯² 李慧娟¹

1.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)

2.安阳市妇幼保健院超声科(河南 安阳 455000)

【摘要】目的 对一个超声诊断多发性关节挛缩症可能家系进行基因分析和调查。**方法** 采集流产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。使用多个数据库对检测结果进行分析。**结果** 流产胎儿组织存在BICD2 c.2100_2102delCAA (p.Asn700del)杂合缺失变异,流产胎儿父母BICD2基因均为野生型;流产胎儿和胎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BICD2 c.2100_2102delCAA(p.Asn700del)杂合整码缺失变异为新发变异,是造成下肢发育不良的原因。新发基因变异的检出丰富了遗传性下肢明显型脊肌萎缩症的致病机制。

【关键词】 BICD2; 下肢明显型脊肌萎缩症; 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: CNV-seq技术在围产期保健中的应用(2023C01SF006); 安阳市产前诊断重点实验室(2023E02JC003)**DOI:**10.3969/j.issn.1009-3257.2025.4.001

Pedigree Analysis of Spinal Muscular Atrophy Lower Extremity Predominant Caused by De Novo Heterozygote Asn700del Variation*

DI Hua¹, MU Yan-chao^{1,*}, LI Yang¹, YAN Kai², LI Hui-juan¹.

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

2.Department of Ultrasound, Anyang Maternal and Child Health Care Hospital, Anyang 455000, Henan Province, China

Abstract: Objective To analyze and investigate the gene of a pedigree with multiple arthrogryposis diagnosed by ultrasound. **Methods** Abortion 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 multiple databases. **Results** There was BICD2 c.2100_2102delCAA(p.Asn700del)heterozygosity deletion in the aborted fetal tissue, and the BICD2 gene of the aborted fetal parents was wild type. Copy number variants above 100kb that are known to be clearly pathogenic were not detected in aborted fetuses or parental samples. **Conclusion** The deletion mutation of BICD2 c.2100_2102delCAA(p.Asn700del)in fetus is a new mutation, which is the cause of lower limb dysplasia. The detection of novel gene variants has enriched the pathogenesis of spinal muscular atrophy lower extremity predominant.

Keywords: BICD2; Spinal Muscular Atrophy Lower Extremity Predominant; Malformation; Pedigree

下肢明显型脊肌萎缩症(spinal muscular atrophy lower extremity predominant, SMALED)症(OMIM: 158600)是在1962年首次被报道的一种遗传性神经肌肉疾病,其发病是由基因突变所致的脊髓前角运动神经元退行性病变,患者主要表现为下肢腱反射和踝反射消失、下肢近端肌肉无力和萎缩、消瘦、蹣跚步态,晚期可出现上肢近端无力等,呈常染色体显性遗传^[1]。该病属于罕见病,目前已报道100余例活产患者^[2]。此疾病可由DYNC1H1基因[Chromosome 14, NC_000014.9(101964573-102056443)]或BICD2基因[Chromosome 9, NC_000009.12(92711363-92764833)]突变所致^[3],DYNC1H1基因所致的称作SMALED1,BICD2基因所致的该病称作SMALED2。该病尚无有效治疗方法,研究表明,动物实验发现神经干细胞治疗主要发挥神经保护作用,CRISPR/Cas9基因编辑技术定点改造神经系统基因具有显著治疗效果^[4]。随着二代测序技术(next generation sequencing,

NGS)在临床的应用推广,越来越多的致病基因被发现,SMALED先证者诊断率将会得到提高,这将有利于家系遗传咨询和计划再生育家庭进行产前诊断。

1 资料与方法

1.1 一般资料 孕妇25岁,第一次怀孕后胎停育,现第二次怀孕,平素月经规律,既往体健,否认高血压、糖尿病、心脏病、青光眼及哮喘等慢性病史,无肝炎、结核等传染病史,否认药物食物过敏史,否认手术、外伤及输血史。孕早期查NT检查无异常,孕期末接触放射性等有毒、有害物质,孕期查传染病阴性,孕中期唐氏筛查提示21-三体综合征临界风险(风险值1/570)。孕中期胎儿超声检查报告多发异常:多发性关节挛缩症可能;足内翻;小下颌,面部畸形;未见胃泡回声,食道闭锁可能;不排除胼胝体异常。孕18周6天住院行人工流产术,流产组织进行基因检测。

【第一作者】 狄 华,女,主任医师,主要研究方向:遗传病防治。E-mail: zt0091@126.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

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(20230225002),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。文库构建后,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)。测序数据使用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、人类外显子数据库(exome aggregation consortium, ExAC)、人群基因组突变频率数据库(genome aggregation database, gnomAD)、人群千人基因组(1000 Genomes Project, 1000G),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 从NCBI查阅BICD2基因序列并合成BICD2基因(NM_015250)第5号外显子区设计引物,检测胎儿

与胎父母BICD2基因c.2100_2102delCAA位点变异。单向测序引物:5'-CGCTTATGGAGGA-3'。

2 结果

2.1 产前超声诊断结果 孕18周超声检查发现胎儿多发性关节挛缩症可能,足内翻,小下颌(见图1),症状与下肢明显型脊肌萎缩症一致。

2.2 遗传学检测结果 孕妇流产组织CNV-seq结果为seq[hg19]46,XN,未发现常染色体(1-22)和性染色体(XY)的非整倍体异常、微缺失(>500kb)及微重复(>1Mb)(见图2)。

流产组织、孕妇与丈夫外周血全外显子组测序结果显示,流产组织存在BICD2 c.2100_2102delCAA(p.Asn700del)杂合变异,该变异致病的遗传方式呈常染色体显性遗传,孕妇与丈夫全外显子组测序未发现BICD2基因异常(见表1),经Sanger测序验证变异结果与全外显子组测序一致。

2.3 BICD2 基因变异对编码蛋白功能影响分析 BICD2基因所编码的BICD2蛋白是一个衔接蛋白,参与细胞周期特异性运输并对维持高尔基体的功能紧密相关。Uniprot数据库中报道与BICD2蛋白直接发生相互作用的蛋白见表2。

本研究发现的整码缺失变异发生在第700号氨基酸,氨基酸缺失将导致蛋白质结构变化,可能会引起BICD2蛋白与其直接作用蛋白间的相互作用强度或影响其作用方式,进而影响一系列生物过程的正常进展。使用DAVID数据库进行GO分析发现,BICD2与其直接作用蛋白参与细胞内微管运动、高尔基体功能、有丝分裂等生物过程(见表3),其发生变异可能影响到以上生理功能。

2.4 变异致病性分析 BICD2基因c.2100_2102delCAA(p.Asn700del)为整码缺失变异,根据ACMG指南,该变异初步判定为疑似致病性变异(Likely_Pathogenic, PM4+PM2_Supporting+PS2)。中等致病性证据 PM4: 非重复区域的框内缺失变异引起蛋白长度改变;支持性致病证据 PM2_Supporting: 在人类外显子数据库(ExAC)、人群基因组突变频率数据库(gnomAD)、参考人群千人基因组(1000G)中均没有收录,强致病性证据 PS2: 该变异为经亲缘关系验证的新发变异。

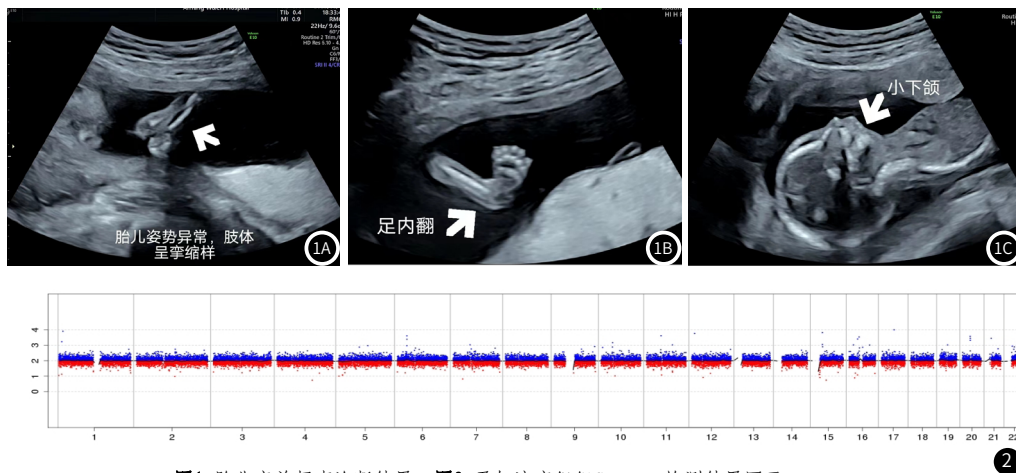


图1 胎儿产前超声诊断结果。图2 孕妇流产组织CNV-seq检测结果图示。

表1 全外显子组测序检测到疑似致病基因变异情况

检测对象	基因	转录本	核苷酸变异	变异来源	疾病	遗传方式
流产组织	BICD2	NM_015250	c.2100_2102delCAA	新发	下肢明显型脊肌萎缩症	常染色体显性遗传
孕妇	BICD2	NM_015250	野生型	无	—	—
丈夫	BICD2	NM_015250	野生型	无	—	—

表2 与BICD2蛋白直接发生相互作用的蛋白

序号	靶蛋白	直接作用蛋白	靶蛋白作用区域	文献PMID
1	BICD2	DYNLL1	p.25-398	25814576
2	BICD2	DYNC1H1	p.25-398	25512093
3	BICD2	DYNC1I2	p.25-398	25512093
4	BICD2	DCTN1	p.25-398	25814576
5	BICD2	DCTN2	p.25-398	25814576
6	BICD2	KIF1C	p.334-599	24482476
7	BICD2	RANBP2	p.590-824	20386726
8	BICD2	RAB6A	p.666-814	23664119
9	BICD2	FMRP	p.666-814	23664116
10	BICD2	CLHC	p.666-814	23664116

3 讨论

下肢明显型脊肌萎缩症的临床特征是下肢近端肌肉渐进性无力和萎缩，确诊患者常合并足畸形、关节挛缩、髋关节脱位、智力障碍等^[5]。目前认为其主要的病理机制是基因突变导致的神经系统动力蛋白功能异常，异常的蛋白导致神经细胞胞体内物质运输中断，进而在胚胎发育过程中导致脊髓前角细胞严重退行性病变，尚未有轻型症状的报道，已发现的病例症状普遍较重，且缺乏有效治疗和治愈措施^[6]。

本研究中发现流产组织存在BICD2 c.2100_2102delCAA(p. Asn700del)杂合变异，是首次发现。BICD2基因定位于9q22.31，共有8个外显子，编码蛋白参与囊泡相关的胞内部物质运输，与高尔基体和内质网功能密切相关^[7]。以往已有BICD2基因突变导致下肢明显型脊肌萎缩症的报道，且在确诊的患者中，均为BICD2基因杂合突变，尚未有BICD2基因纯合突变所致SMALED2的报道^[8]，这与BICD2基因功能有关，以往研究发现纯合突变对细胞产生致死性结局，致使在胚胎阶段无法正常发育而胎停育或者流产等^[8]。已报道的BICD2基因点突变有：c.320CT(p. Ser107Leu)、c.563AC(p. Asn188Thr)、c.565AT(p. Ile189Phe)、c.1502GC(p. Arg501Pro)、c.1523AC(p. Lys508Thr)、c.1604CT(p. Ala535Val)、c.1823GA(p. Ser608Leu)、c.2108CT(p. Thr703Leu)、c.2239CT(p. Arg747Cys)、c.2321AG(p. Glu774Gly)^[8-9]，这些均被证实为下肢明显型脊肌萎缩症的致病原因。本研究中发现的BICD2 c.2100_2102delCAA(p. Asn700del)突变位点与以往报道的c.2108CT(p. Thr703Leu)位点距离最近，仅间隔8个碱基，可能导致与其一致的病理现象，两个位点均位于BICD2蛋白的3号卷曲螺旋结构域(coiled-coil domain 3, CC3)，与该结构域直接结合的蛋白有RAB6A、RANBP2、DCTN2、FMRP、CLHC等，结构域的变异将会影响这些蛋白的识别、结合、解离等蛋白间相互作用，这对于评价新生突变具有重要价值。

SMALED2患者除下肢肌肉渐进性无力和萎缩外，常伴随其他骨骼和神经发育异常。本研究中孕妇孕18周时超声检查发现胎儿存在SMALED2典型的下肢多发性关节挛缩症，同时存在小下颌与内翻足畸形。以往研究也曾有类似报道，杨昌健等^[6]发现2例下肢明显型脊肌萎缩症患者伴关节弯曲和足畸形，1例患者合并髋关节脱位，1例患者上肢精细动作差且智力发育重度落后。BICD2蛋白在不同物种间高度保守，其最早在黑腹果蝇中被发现。在动物实验中发现，BICD2通过参与高尔基体组分、高尔基体与内质网间物质转运、微管与细胞骨架等生物过程，调控卵细胞形成和胚胎发育^[10]。小鼠实验中BICD2表达降低可导致小鼠神经发育异常和精神障碍^[8]，这与以往患者伴随神经或精神异常的现象相一致。

综上所述，本研究首次发现BICD2 c.2100_2102delCAA(p. Asn700del)突变，丰富了遗传性下肢明显型脊肌萎缩症的致病机制，尚需建立分子模型和动物模型，开展更加深入的分子机制研究加以证实。产前检查中发现下肢关节挛缩、足畸形等表现时，需考虑下肢明显型脊髓型肌肉萎缩症可能，必要时进行BICD2和DYNC1H1基因检测以明确诊断，预防出生缺陷的发生。

参考文献

[1] 邢桂荣. DYNC1H1基因突变所致下肢明显型脊肌萎缩症1例临床分析并文献复习[D]. 河北: 河北医科大学, 2020.

[2] 张泽伟, 顾舒晨, 黄昕, 等. 下肢明显型脊髓性肌萎缩症2A型伴双足皮肤反复破溃1例[J]. 中华整形外科杂志, 2022, 38 (12): 1397-1400.

[3] Koboldt DC, Waldrop MA, Wilson RK, et al. The genotypic and phenotypic spectrum of BICD2 variants in spinal muscular atrophy[J]. Ann Neurol, 2020, 87 (4): 487-496.

[4] Pena SA, Iyengar R, Eshraghi RS, et al. Gene therapy for neurological disorders: challenges and recent advancements[J]. J Drug Target, 2020, 28 (2): 111-128.

[5] 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的围术期综合护理干预[J]. 罕少疾病杂志, 2023, 30 (8): 11-12, 16.

[6] 杨昌健, 王爽, 谈丹丹, 等. DYNC1H1基因相关下肢明显型脊髓性肌萎缩症1型患儿4例分析[J]. 中华儿科杂志, 2023, 61 (2): 154-158.

[7] Heffernan LF, Simpson JC. The trials and tubule-ations of Rab6 involvement in Golgi-to-ER retrograde transport[J]. Biochem Soc Trans, 2014, 42 (5): 1453-1459.

[8] Martinez-Carrera LA, Wirth B. Dominant spinal muscular atrophy is caused by mutations in BICD2, an important golgin protein[J]. Front Neurosci, 2015, 9: 401.

[9] Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, et al. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders[J]. Science, 2014, 343 (6170): 506-511.

[10] Fagiewicz R, Crucifix C, Klos T, et al. In vitro characterization of the full-length human dynein-1 cargo adaptor BicD2[J]. Structure, 2022, 30 (11): 1470-1478.

(收稿日期: 2023-09-16)
(校对编辑: 韩敏求)