

I型神经纤维瘤一家系的基因检测及产前诊断

刘蓓, 杨艳梅, 严恺, 陈敏, 王丽雅, 黄颖之, 钱叶青, 董旻岳
浙江大学医学院附属妇产科医院生殖遗传科 生殖遗传教育部重点实验室,
浙江 杭州 310006

[摘要] **目的:** 对一个 I 型神经纤维瘤家系进行遗传学病因分析及产前诊断。**方法:** 应用目标捕获高通量测序和 Sanger 测序技术, 对一个散发的 I 型神经纤维瘤家系进行基因突变分析。提取先证者及其父母外周血淋巴细胞 RNA, 行 RT-PCR 及扩增产物测序分析。明确突变致病性后, 抽取羊水标本对胎儿行产前基因诊断。**结果:** 先证者 *NFI* 基因存在 c.1260+4A>T 杂合剪接突变, 为新发突变。RNA 剪接分析提示先证者 *NFI* 基因发生转录时, 11 号外显子 3' 端发生相邻内含子区 13 个碱基的插入, 理论上可导致蛋白编码提前终止, 产生截短蛋白, 影响蛋白功能。产前基因检测结果显示胎儿未携带该突变。**结论:** *NFI*: c.1260+4A>T 杂合剪接突变是该 I 型神经纤维瘤患者的致病原因, 本研究结果为该家系遗传咨询和产前诊断提供了理论依据。



[关键词] 神经纤维瘤/遗传学; 基因, 神经纤维瘤病 1 型; 羊水; 产前诊断; 基因检测; 系谱; 突变; 外显子; 聚合酶链反应

[中图分类号] R394.3 **[文献标志码]** A

Genetic analysis and prenatal diagnosis of a sporadic family with neurofibromatosis type 1

LIU Bei, YANG Yanmei, YAN Kai, CHEN Min, WANG Liya, HUANG Yingzhi, QIAN Yeqing, DONG Minyue (Key Laboratory of Reproductive Genetics, Ministry of Education, Department of Reproductive Genetics, Women's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China)

Corresponding author: DONG Minyue, E-mail: dongmy@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-4344-7924>

[Abstract] **Objective:** To identify pathogenic mutation for a family with

收稿日期: 2019-03-28 接受日期: 2019-04-26

基金项目: 浙江省重点研发计划(2019C03025); 浙江省自然科学基金(LQ19H090019); 浙江省医药卫生科技计划(2018PY022)

第一作者: 刘蓓(1987—), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事单基因遗传病的基因检测与产前诊断研究; E-mail: liubei@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-8687-2277>

通信作者: 董旻岳(1964—), 男, 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事生殖遗传学研究; E-mail: dongmy@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-4344-7924>

neurofibromatosis type 1 (NF1) and provide prenatal diagnosis for them. **Methods:** Mutation analysis of the sporadic family with NF1 was performed with target captured next generation sequencing and Sanger sequencing. RNA samples were extracted from the lymphocytes of NF1 patient and her parents. RT-PCR and Sanger sequencing were performed to analyze the relative mRNA expression in the samples. Prenatal diagnosis of the pathogenic mutation was offered to the fetus. **Results:** A novel splicing mutation c. 1260 +4A >T in the *NF1* gene was found in the proband of the family, but was not found in her parents. cDNA sequencing showed that 13 bases inserted into the 3' end of exon 11 in the *NF1* gene lead to a frameshift mutation. Prenatal diagnosis suggested that the fetus did not carried the mutant. **Conclusion:** The *NF1*: c. 1260 +4A >T mutation found in the NF1 patient is considered to be pathogenic, which provides information for family genetic counseling and prenatal diagnosis.

[**Key words**] Neurofibroma/genetics; Genes, neurofibromatosis 1; Amniotic fluid; Prenatal diagnosis; Genetic testing; Pedigree; Mutation; Exons; Polymerase chain reaction

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2019,48(4):367-372.]

I型神经纤维瘤(neurofibromatosis type I, NF1, OMIM 162200)是一种常见的常染色体显性遗传病,发病率为1/2500~1/3000^[1],其主要临床特征为多发性的牛奶咖啡斑、腋窝和腹股沟雀斑、多发性皮肤神经纤维瘤、虹膜错构瘤和(或)特殊骨骼异常,如蝶骨嵴或胫骨发育不良等^[2]。*NF1*基因(NM_000267.2)位于染色体17q11.2,基因总长度约350 Kb,包含60个外显子,其编码的神经纤维瘤蛋白包含2818个氨基酸,是RAS-MAPK信号通路的关键成分,可促进Ras-GTP失活^[3,4]。*NF1*基因突变导致神经纤维瘤蛋白功能丧失,从而引起下游细胞生长激活^[5-6]。至少78%符合美国国立卫生研究院(NIH)诊断标准的患者可以发现*NF1*基因突变^[1]。迄今,人类基因突变数据库(HGMD)报道的*NF1*基因突变超过3000种。*NF1*基因新发突变率较高,约50%的NF1患者无家族史^[7]。本研究中,我们应用目标捕获高通量测序技术对一例散发的NF1患儿进行基因检测,明确了其遗传学病因,为家系遗传咨询和产前诊断提供了理论依据。

1 对象与方法

1.1 对象

先证者,女,11岁,全身牛奶咖啡斑,腹部最多;椎骨神经纤维瘤,手术切除后臀部又出现纤维

瘤;双下肢长度不一。根据NIH的诊断标准^[8],该患者明确诊断为NF1,其父母未见明显临床表型。其母亲就诊时已再次妊娠,孕16周+,要求对胎儿行产前基因诊断。

本研究经浙江大学医学院附属妇产科医院伦理委员会审查通过[(2019)伦审科第(038)号],家系成员均签署了知情同意书。

1.2 试剂和仪器

QIAamp DNA Blood Mini Kit为德国QIAGEN公司产品;2×GoldStar MasterMix为北京康为世纪生物科技有限公司产品;RNAiso Blood试剂和PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit为宝日医生物技术(北京)有限公司产品;AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit为美国Applied Biosystems公司产品。

NanoDrop 2000分光光度计为美国Thermo Fisher Scientific公司产品;BGISEQ-500高通量测序仪为深圳华大基因股份有限公司产品;ABI3730全自动测序仪为美国Applied Biosystems公司产品;PCR扩增仪为美国Bio-Rad公司产品。

1.3 外周血DNA、RNA提取及cDNA合成

采集外周血5 mL,置于EDTA二钾抗凝管中,-20℃冻存。取200 μL抗凝血,按照QIAamp DNA Blood Mini Kit说明书进行DNA提取。孕20周经腹超声引导下羊膜腔穿刺抽取羊

水 30 mL,其中 20 mL 用于胎儿染色体核型分析,10 mL 用于胎儿基因检测。羊水培养 2 周后收集细胞,利用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 提取基因组 DNA,测定浓度后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取先证者及其父母 250 μL 新鲜外周血,采用 RNAiso Blood 试剂提取外周血总 RNA,定量后 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。以 RNA 为模板,采用 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 合成第一链 cDNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 高通量测序检测基因突变

构建 DNA 文库,通过芯片捕获先证者遗传性神经纤维瘤病相关基因外显子及其邻近 $\pm 10\text{ bp}$ 内含子区突变(包括点突变,20 bp 以内的缺失插入突变),通过 BGISEQ-500 高通量测序仪进行测序,目标区覆盖度达 100.00%,平均深度 633.88 \times ,平均深度 $>30 \times$ 位点所占比例达 99.91%。高通量测序由深圳华大临床检验中心完成。

1.5 Sanger 测序验证基因突变

根据高通量测序结果,使用 Primer 5.0 软件设计引物。*NFI* 基因参考转录本 NM_000267。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以先证者及其父母基因组 DNA 为模板,分别扩增突变位点所在的第 11 号外显子及邻近内含子片段,片段大小为 250 bp,扩增引物序列:F1 5'-AC-TGCCTTGTTCCTTGCCTTTCGTAT-3',R1 5'-TATGG-TCCCTTCGGTCAAGACTTAA-3'。PCR 总体积为 50 μL :2 \times GoldStar MasterMix 25 μL 、上下游引物(20 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、DNA 模板 2 μL 、去离子水 21 μL 。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,35 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物送上海华大医学检验所进行 Sanger 测序。

1.6 生物信息学软件分析基因突变和致病性

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载 *NFI* 基因参考序列,应用 Mutation Surveyor 软件分析测序结果。查询 ClinVar 和 HGMD 数据库有无该突变的致病性报道,应用 Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/index.html>) 预测可能存在的隐匿剪接位点及基因突变对剪接位点的改变。通过 ExAC browser (<http://exac.broadinstitute.org/>) 和 gnomAD browser (<http://gnomad.broadinstitute.org/>) 查询该突变在正常人群中的发生频率。

1.7 RT-PCR 检测 RNA 剪接产物

以先证者及其父母的 cDNA 为模板,扩增 *NFI* 基因编码区,大小 840 bp,PCR 产物直接进行 Sanger 测序。扩增引物序列为:F2 5'-AAAGC-AGCAGTTTGGCCACTACA-3',R2 5'-AAGAACCAG-CAGAGCCTCCATTG-3'。

1.8 根据基因突变位点对胎儿进行产前诊断

基因突变确定后,对胎儿基因组 DNA 进行针对性突变位点 PCR 扩增,并行 Sanger 测序,检测羊水标本是否存在致病突变。运用 AmpFLSTRTM IdentifilerTM PCR Amplification Kit 对胎儿羊水细胞基因组 DNA 及其父母外周血基因组 DNA 进行扩增,对 15 个短串联重复序列位点进行分析,以排除母体 DNA 的污染。

1.9 妊娠结局及新生儿随访

对孕妇妊娠结局和新生儿出生 1 个月后的体格发育、皮肤情况进行电话随访。

2 结果

2.1 基因检测结果

高通量测序结果显示,先证者存在 *NFI*:c.1260+4A>T 杂合突变。Sanger 测序结果提示,先证者存在 *NFI*:c.1260+4A>T 杂合突变,未见其父母存在该突变(图 1)。

2.2 *NFI*:c.1260+4A>T 突变对 *NFI* 基因表达剪接产物的影响

Human Splicing Finder 预测 *NFI*:c.1260+4A>T 突变可能影响正常剪接,因此本文应用 RT-PCR 及 Sanger 测序进行验证。先证者的 cDNA 测序结果提示杂合,结果分析显示存在两种剪接产物,一种与参考序列一致,另一种则由于该突变产生新的剪接位点,引起 11 号外显子 3'端发生相邻内含子区 13 个碱基的插入,导致 421 位后的编码氨基酸发生移码,并在第 432 位引入终止密码,使 *NFI* 编码的全长 2818 个氨基酸组成的蛋白质缩减至由 432 个氨基酸组成的截短型蛋白(图 2),健康对照(父母)仅有一个剪接产物。

2.3 突变位点致病性分析预测结果

先证者存在 *NFI*:c.1260+4A>T 杂合突变,ClinVar 和 HGMD 数据中未见报道,且未见该突变致病性的相关文献报道,因此根据美国医学遗传学和基因组学学会(ACMG)2015年指南^[9]对

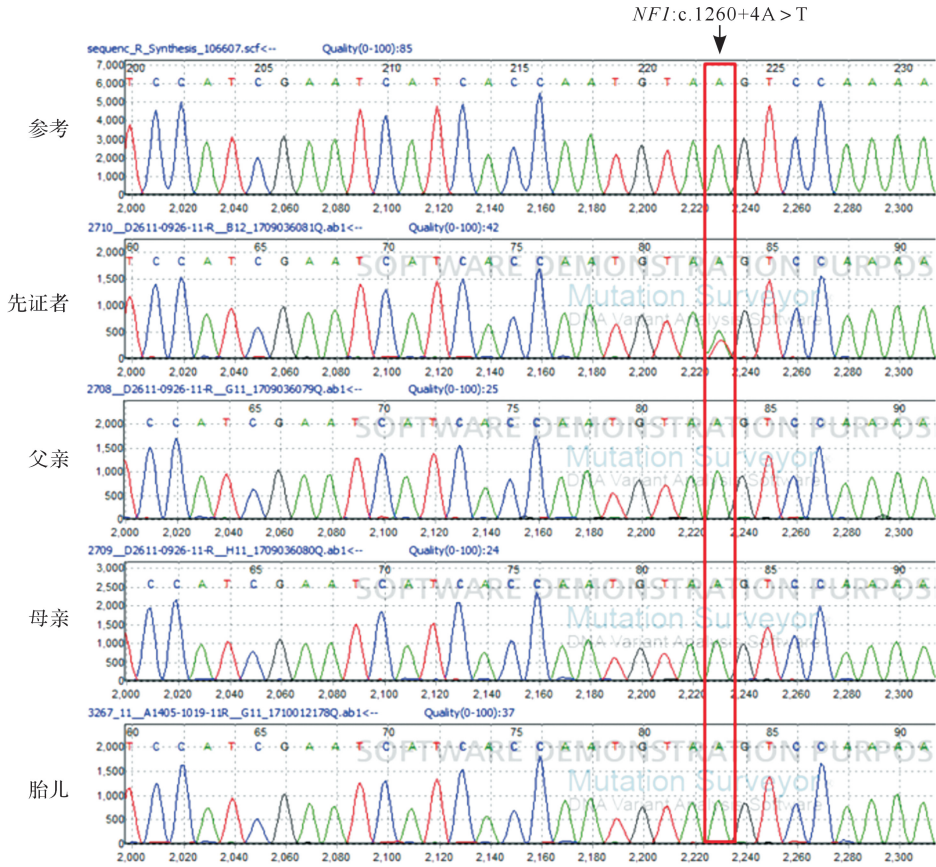


图1 本组 I 型神经纤维瘤家系 *NFI* 基因测序结果

Figure 1 Sequencing results of *NFI* gene

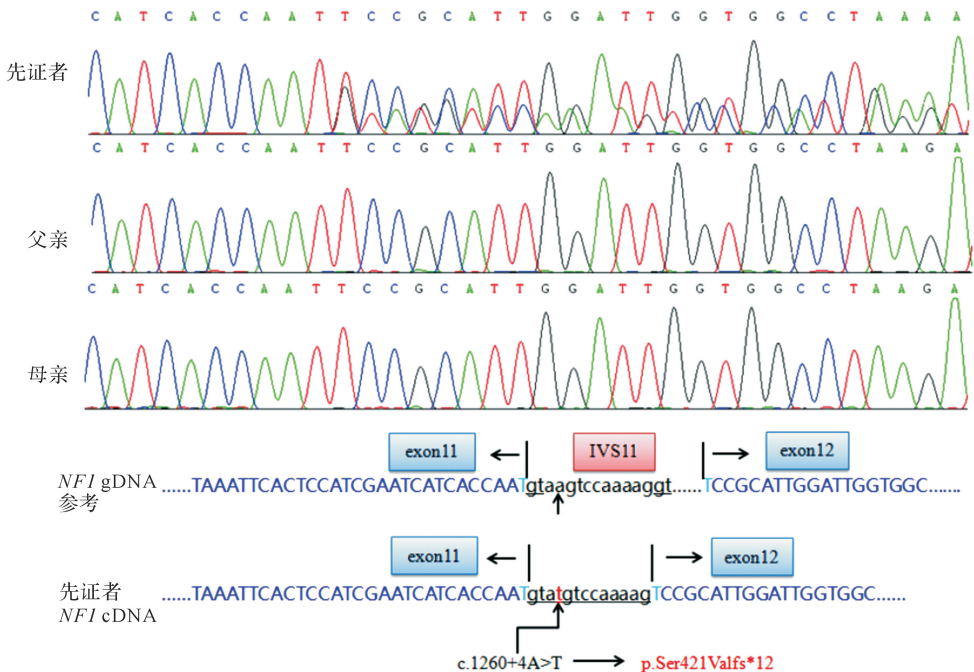


图2 本组 I 型神经纤维瘤家系 cDNA 测序结果和剪接分析

Figure 2 Sequencing results of cDNA and splice analysis

该突变进行分析:先证者的新发突变,无家族史[PS2:患者的新发突变,且无家族史(经双亲验证)];RNA 剪接分析提示产生新的剪接位点,可能影响蛋白功能(PS3:功能实验已明确会导致基因功能受损);ExAC 和 gnomAD 数据库中未见该突变在健康人群中的发生频率,为较强的致病证据(PM2:数据库中健康对照人群中未发现的突变);该突变导致患者表型高度符合 NF1 (PP4:突变携带者的表型或家族史高度符合某种单基因遗传疾病)。根据 ACMG (2015) 指南,将该突变评级为“致病”。

2.4 胎儿产前诊断结果

对羊水基因组 DNA 行测序分析,结果显示胎儿未携带与先证者相同的突变(图 1D)。短串联重复序列位点检测结果排除羊水标本母源污染。

2.5 新生儿随访情况

先证者母亲妊娠足月后自然分娩一女活婴,皮肤未见异常;产后 1 个月再次电话随访,婴儿体格发育正常,皮肤未见牛奶咖啡斑。

3 讨论

NF1 是由于生殖细胞系 *NF1* 基因失活导致的一种肿瘤易感性综合征^[4],主要临床表现为牛奶咖啡色斑、腋窝或腹股沟雀斑、神经纤维瘤、视神经胶质瘤、虹膜结节和(或)特异性骨质缺陷,如蝶骨发育不良或长骨骨质偏薄。根据 NIH 的诊断标准,只要存在两个及以上的主要临床症状(或一个临床症状伴一级亲属为 NF1 患者)就可以临床诊断为 NF1^[10]。NF1 虽然外显率达 100%,但其临床异质性大,在无亲缘关系患者之间存在明显的表现性差异,即使同一家系患者间甚至同一患者不同年龄段也会有不同的表现^[11-12]。

NF1 基因是人体中突变率最高的基因之一,比一般的基因突变率高出十倍左右,因此大约一半的病例由新发突变引起^[13-14]。对于生育过 NF1 患者的夫妻,尽管无家族病史,但不能排除夫妻双方可能存在生殖腺细胞嵌合突变,故再次妊娠时仍存在生育 NF1 患儿的风险,建议行产前诊断。HGMD 报道的 *NF1* 突变目前已超过 3000 种,突变类型包含错义突变、无义突变、剪接突变、缺失/插入突变、复杂重排等,尚未发现明确的突变热点。大约 2% 的深部内含子突变可产生新的受体/供体剪接位点,使转录 mRNA 包含一个新的隐匿

外显子,导致异常的神经纤维瘤蛋白产生^[15]。此外大约 30% 的 *NF1* 基因突变预测可引起异常剪接,因此基因筛查时分析患者的 RNA 和 DNA 十分必要^[16]。

本研究搜集到一个散发的 NF1 家系,通过目标区域捕获高通量测序和 Sanger 测序家系验证分析发现,先证者 *NF1* 基因存在一个新的杂合剪接突变 c. 1260 + 4A > T,其父母不存在该突变。推测先证者 *NF1*:c. 1260 + 4A > T 突变为新发突变的可能性大,但不能排除其父母存在生殖腺嵌合或体细胞低比例嵌合的可能。RNA 剪接分析提示该突变导致 11 号外显子后插入 13 个碱基,使突变 mRNA 阅读框移码,理论上造成氨基酸编码提前终止,产生截短蛋白,从而影响蛋白功能。根据 ACMG (2015) 指南综合分析,该突变可评级为致病突变。突变致病性的明确为产前诊断提供了理论依据。产前诊断结果提示胎儿不存在该突变,从基因水平推测胎儿发生 NF1 的可能性不大。

综上所述,本研究在一个散发的 NF1 家系中发现 *NF1* 基因新的剪接突变 c. 1260 + 4A > T,且从 RNA 水平明确该突变可导致剪接异常。这一发现不仅丰富了 *NF1* 基因引起 NF1 的突变谱,同时为该家系的遗传咨询和产前诊断提供了理论依据。

参考文献

- [1] XU W, YANG X, HU X, et al. Fifty-four novel mutations in the NF1 gene and integrated analyses of the mutations that modulate splicing [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(1): 53-60.
- [2] KEHRER-SAWATZKI H, MAUTNER V F, COOPER D N. Emerging genotype-phenotype relationships in patients with large NF1 deletions [J]. *Hum Genet*, 2017, 136(4): 349-376.
- [3] HINMAN M N, SHARMA A, LUO G, et al. Neurofibromatosis type 1 alternative splicing is a key regulator of Ras signaling in neurons [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(12): 2188-2197.
- [4] CUI Y, MORRISON H. Construction of cloning-friendly minigenes for mammalian expression of full-length human NF1 isoforms [J]. *Hum Mutat*, 2019, 40(2): 187-192.
- [5] PELTONEN S, KALLIONPÄÄ R A, PELTONEN J. Neurofibromatosis type 1 (NF1) gene: Beyond café au lait spots and dermal neurofibromas [J]. *Exp Dermatol*, 2017, 26(7): 645-648.
- [6] BANERJEE S, LEI D, LIANG S, et al. Novel

- phenotypes of NF1 patients from unrelated Chinese families with tibial pseudarthrosis and anemia [J]. **Oncotarget**,2017,8(24):39695-39702.
- [7] GUTMANN D H, FERNER R E, LISTERNICKR H, et al. Neurofibromatosis type 1 [J]. **Nat Rev Dis Primers**,2017,3:17004.
- [8] LISTED N A. Nationalinstitutes of health consensus development conference statement on neurofibromatosis [J]. **Arch Neurol**,1988,45:575-578.
- [9] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology [J]. **Genet Med**,2015,17(5):405-424.
- [10] JETT K, FRIEDMAN J M. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1 [J]. **Genet Med**, 2010,12(1):1-11.
- [11] TSIPI M, POULOU M, FYLAKTOU I, et al. Phenotypic expression of a spectrum of neurofibromatosis type 1 (NF1) mutations identified through NGS and MLPA [J]. **J Neurol Sci**,2018, 395:95-105.
- [12] PALMA MILLA C, LEZANA ROSALES J M, LÓPEZ MONTIEL J, et al. Neurofibromatosis type I: mutation spectrum of NF1 in spanish patients [J]. **Ann Hum Genet**,2018,82(6):425-436.
- [13] KOCZKOWSKA M, CHEN Y, CALLENS T, et al. Genotype-phenotype correlation in NF1: evidence for a more severe phenotype associated with missense mutations affecting NF1 codons 844-848 [J]. **Am J Hum Genet**,2018,102(1):69-87.
- [14] UPADHYAYA M, KLUWE L, SPURLOCK G, et al. Germline and somatic NF1 gene mutation spectrum in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) [J]. **Hum Mutat**,2008,29(1):74-82.
- [15] PROS E, GÓMEZ C, MARTÍN T, et al. Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutations: focus on splicing alterations [J/OL]. **Hum Mutat**, 2008,29(9):E173-E193.
- [16] PHILPOTT C, TOVELL H, FRAYLING I M, et al. The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers [J]. **Hum Genomics**,2017,11(1):13.

[本文编辑 沈敏余方]

· 学术动态 ·

王福倮教授团队和闵军霞教授团队合作研究发现补锌可以有效防治糖尿病

2019年6月4日,《美国临床营养学杂志》(*The American Journal of Clinical Nutrition*)在线发表王福倮教授团队和闵军霞教授团队最新研究成果论文“Zinc supplementation improves glycemic control for diabetes prevention and management: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials”(https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz041),肯定补锌可用于2型糖尿病和妊娠期糖尿病预防及治疗,为糖尿病防控提供了新的视角和策略。

已有研究提示膳食锌摄入或机体锌水平降低与糖尿病发病率升高相关,但对于补锌是否有助于糖尿病患者及风险人群的血糖控制仍存在争议。研究团队针对1700例2型糖尿病、妊娠期糖尿病及糖尿病高风险受试者的随机对照临床数据开展深度分析,数据来自14个国家的32项补锌干预试验。结果发现补锌对空腹血糖、餐后2h血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数、糖化血红蛋白及超敏C反应蛋白等血糖控制和慢性炎症指标均有改善作用。亚组分析结果提示,补锌对糖尿病患者空腹血糖控制效果较高风险个体更好。该项研究发现补锌对血糖控制、胰岛素敏感性及慢性炎症改善均有良好效果,为“补锌能否有效防治糖尿病”这一谜团提供了循证医学证据和答案。

论文第一作者为王鑫慧博士和硕士研究生武文慧。研究得到国家自然科学基金、国家重点研发计划等资助。