

· 临床研究 ·

全外显子测序技术诊断 Sheldon Hall 综合征

邵彬彬, 乔凤昌, 刘安, 王陈, 王艳, 张菁菁, 胡平, 许争峰*

南京医科大学附属妇产医院产前诊断科, 江苏 南京 210004

[摘要] 目的:应用全外显子测序技术(whole exome sequencing, WES)辅助临床诊断2例远端关节弯曲 Sheldon Hall 综合征家系,为患者遗传咨询和产前诊断提供依据。方法:收集临床资料,提取患者及家系成员外周血基因组DNA,采用外显子捕获技术进行检测,结合生物信息学软件及数据库进行分析,根据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG, 2015)标准对检测出的变异进行致病性判定,结合患者临床表型寻找致病基因及位点,最后经Sanger测序法对致病位点进行验证。结果:家系中2例患者TNNI2基因第8号外显子均存在杂合突变(c.525_c.527delGAA, p. 176delK),为常染色体显性遗传,生物信息学分析为致病性突变,Sanger测序验证结果与外显子捕获测序结果一致。结论:应用全外显子测序技术对远端关节挛缩畸形的患者进行诊断,明确致病原因,为家系遗传咨询和产前诊断提供指导。

[关键词] 全外显子测序技术;TNNI2基因;Sheldon Hall综合征;遗传咨询

[中图分类号] R715.5

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2019)12-1809-04

doi:10.7655/NYDXBNS20191224

远端关节弯曲综合征(distal arthrogyrosis, DA)是一类具有遗传异质性的常染色显性遗传病。患者临床表现高度不一致^[1-3],主要表现为叠指、屈指、2~5指尺侧偏位、摇椅足、马蹄内翻足和跟骨外翻等畸形。除此之外,还可伴有颜面部、皮肤纹理、身高和脊柱等异常。根据Bamshad等^[4]提出的分型诊断标准,可将DA分为10种类型,其中远端关节弯曲综合征1型(Distal arthrogyrosis type 1, DA1, OMIM#108120)和远端关节弯曲综合征2B型(Distal arthrogyrosis type 2B, DA2B, OMIM#601680)为最常见的类型。DA1表现为单纯的手足关节挛缩畸形^[5];DA2B即Sheldon Hall综合征,除了手足关节畸形外,可有三角脸、脸裂下斜、小颌畸形、长人中、鼻唇褶明显和脊柱侧弯等异常,表现形式多样,可呈现不同的组合方式,临床诊断困难^[6-7]。本研究利用全外显子测序技术对1个汉族家系中2例关节畸形的患者进行检测,发现患者快反应骨骼肌肌钙蛋白I2基因(troponin I2, fast skeletal type, TN-NI2)第8号外显子均存在c.525_c.527delGAA杂合

突变,报道如下。

1 对象和方法

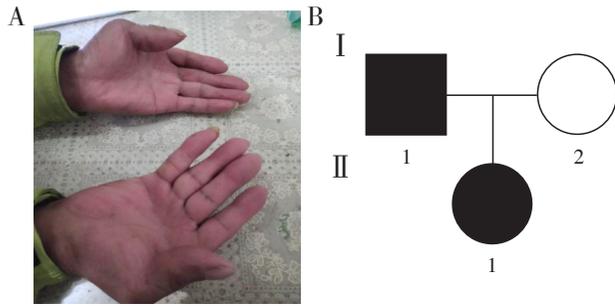
1.1 对象

先证者(I-1),男,汉族,52岁,身高168.5 cm,三角脸,脸裂下斜,鼻唇褶明显,手部畸形表现为双手曲屈指,拇指内收,腕尺侧移位,受累手指关节褶线消失(图1)。患者(II-1),女,22岁,身高160 cm,诉双手拇指内收,轻度曲屈指,已手术矫正。因患者有生育要求,遂于2018年6月来本院遗传医学中心就诊。家系中无近亲结婚,染色体微阵列检测未发现染色体结构异常和拷贝数变异。经患者知情同意,签署知情同意书,对其进行全外显子测序检测寻找致病基因及位点。本研究获得医院伦理委员会批准。

Qubit 3.0 荧光计(Thermo公司,美国);Gel Doc XR 凝胶成像系统(Bio-Rad公司,美国);Veriti 梯度PCR仪(ABI公司,美国);Covaris 超声破碎仪(S220, Covaris公司,美国);Agilent 2100 生物分析仪(Agilent公司,美国);HiSeq2500 测序仪(Illumina公司,美国);DNA提取试剂盒(QIAGEN公司,德国);杂交捕获试剂盒(SureSelect^{XT} Human All Exon V6, Agilent公司,美国);PCR扩增试剂(南京诺唯赞公司);建库试剂盒(Agilent公司,美国)。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81602300,81770236)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhengfeng_xu_nj@163.com



■:男性患者;●:女性患者;○:正常女性;I、II:世代。

图1 先证者表型(A)及家系图(B)

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取

使用EDTA抗凝管采集患者及家系成员外周静脉血2 mL,用基因组DNA提取试剂盒提取外周血基因组DNA,所得浓度均>60 ng/ μ L,总DNA量>2.0 μ g, $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 为1.8~2.0,样本-20 °C保存。

1.2.2 全外显子测序

基因组DNA经过超声打断、建库、杂交捕获和质量控制等过程后进行测序,测序结果用BWA0.6.2-r126软件与UCSC hg19参考基因组进行比对,去除重复序列及低质量数据,运用GATK软件进行碱基质量校正和局部重新比对,将得出的单核苷酸变异(single nucleotide variants, SNVs)和短插入缺失(short insertions and deletions, indels)进行注释,并对测序深度、覆盖深度及均一性等进行统计。

1.2.3 生物信息学分析

通过 dbSNP137 (<http://www.biointer.org.cn/rela-tive/dbSNP%20Home%20Page.htm>)、ExAC Browser (<http://exac.broadinstitute.org/>)、the 1000 Genomes Project (<http://www.internationalgenome.org/>)、Genome Aggregation Database (<http://gnomad-old.broadinstitute.org/>)等数据库获得变异的最小等位基因频率,运用 Mutation Taster (<http://www.mutation-taster.org>)进行危害性预测,并采用同源序列多重比对,分析突变位点在不同物种间的保守性,最后结合 OMIM、HGMD、Decipher、NCBI 等数据库,依据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG, 2015)分级标准对突变位点进行致病性判断。

1.2.4 Sanger测序验证

使用NCBI在线软件针对TNNI2(NM_001145829.2)基因的变异位点设计引物。上游引物序列:5'-TGGGCTCGAAGCACAAGG-3',下游引物序列:5'-TATTGACGCTGGTGGTGAGG-3',退火温度58 °C,产物大小为280 bp。PCR反应体系为25 μ L,

包括10 μ mol/L上、下游引物各1 μ L,1 μ L DNA模板,9.5 μ L ddH₂O,12.5 μ L mix。反应条件:95 °C 10 min;95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s,共35个循环;72 °C 5 min。扩增试剂盒购自南京诺唯赞有限公司,扩增产物送至苏州金唯智公司进行测序验证。

2 结果

2.1 外显子捕获测序结果及致病性判断

对该汉族核心家系外周血基因组DNA进行全外显子测序,发现先证者及其女儿TNNI2基因均存在c.525_c.527delGAA杂合突变,家系其他成员此位点为野生型。样本的测序深度、覆盖度及有效读数见表1,突变位点在不同物种间保守性见表2,结合遗传模式、最小等位基因频率、功能及有害性预测、基因型表型相关性及已有文献报道等分析数据,根据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG, 2015)原则进行评估,c.525_c.527delGAA(exon 8) p.176delK为致病性突变(图2),变异证据为PS1+PM1+PM2+PM4+PP3+PP4。

表1 测序数据量

ID	有效读数(Mb)	平均测序深度(X)	覆盖度(%)	>30 X目标覆盖度(%)	Q20
I-1	7.071	63.9	98.5	87.9	0.99
I-2	6.934	63.4	98.4	88.7	0.98
II-1	6.907	65.9	98.5	89.3	0.99

2.2 变异验证

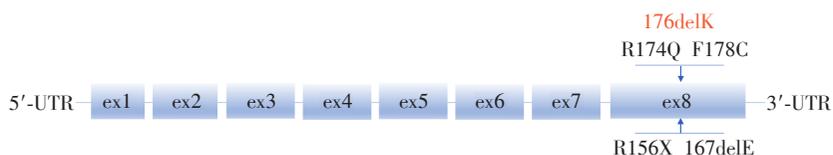
Sanger测序验证结果与全外显子测序结果一致,家系中2例患者TNNI2基因第8号外显子均存在c.525_c.527delGAA杂合缺失突变,该变异遵循常染色体显性遗传方式(图3)。

3 讨论

DA是一类以关节挛缩畸形为主要表现形式的常染色体显性遗传病,根据有无颜面等畸形将DA分为10种类型(1,2A,2B,3-5,7-10)。DA1为单纯的手足关节挛缩畸形,表现为屈指、叠指、马蹄内翻足和扁平足等^[8];DA2A除了手足关节畸形外兼有小嘴、“H”形颊窝、鼻唇沟突出,耳廓发育不良、眼距宽伴睑裂下斜、脊柱侧弯及髋关节脱位等^[9]。DA2B即Sheldon Hall综合征,表型介于DA1和DA2A之间,临床表现呈现为多种不同的组合方式,且家系内部不同的患者间表现度普遍不一致^[10]。本研究中,先证者(I-1)手部关节弯曲畸形兼有颜面异常,先证

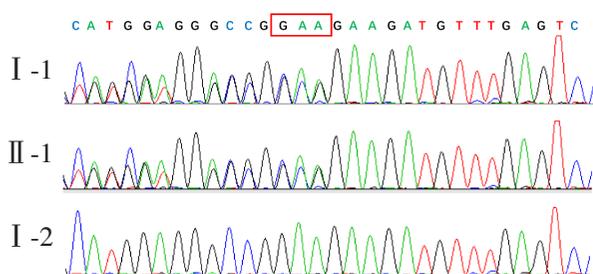
表2 不同物种 c.525_c.527delGAA (p.176delK) 氨基酸同源序列比对

物种	基因	氨基酸序列
Human	ENST00000381906	NIEEKSGMEGRKKMFEE
Ptroglydytes	ENSPTRG00000003161	NIEEKSGMEGRKKMFEE
Mmulatta	ENSMUG0000004838	NIEEKSGMEGRKKMFEE
Ggallus	ENSGALG00000006591	NIEEKSGMEGRKKMFEE
Drerio	ENSDARG00000045592	NVEDKAGMDGRKKMFEE
Dmelanogaster	FBgn0004028	G---KPGDAKVKEEVE
Mus musculus	ENSMUSG00000031097	NIEEKSGMEGRKKMFEE
Xtropicalis	ENSXETG00000004621	NIEEKSGMEGRKKMFEE



蓝色标注为已报道突变位点在TNNI2各外显子上的分布, 红色为本文中 p.176delK。

图2 突变位点定位



红色矩形框表示 c.525_c.527 突变所在位置。

图3 Sanger 测序验证患者 TNNI2 基因的杂合突变

者女儿 (II-1) 仅表现为轻微的拇指内收与曲屈指。

DA1 与 DA2B 表型高度相似, 最初认为是由不同病因引起的两种疾病。原肌球蛋白 2 (tropomyosin 2, TPM2) 和肌球蛋白重链 3 (myosin heavy chain 3, MYH3) 基因突变引起 DA1^[11], 而 TNNI2 与快反应骨骼肌肌钙蛋白 T3 (troponin T3, fast skeletal type, TNNT3) 为 DA2B 的主要致病基因^[12-13]。近年来, 随着全外显子测序技术的广泛应用, TPM2、MYH3、TNNI2 以及 TNNT3 在 DA1 和 DA2B 中均陆续被报道, 因此 Beck 等^[14]推测 DA1 与 DAB2 可能为同一种疾病的两种极端表型。

肌肉的收缩运动是依赖于钙离子浓度的粗肌纤维相对滑动所致, 肌钙蛋白复合体是钙离子浓度的感受器和调节器, 由肌钙蛋白 I (troponin I, TnI)、肌钙蛋白 T (troponin T, TnT) 和肌钙蛋白 C (troponin C, TnC) 组成。TNNI2 基因 (NM_001145829.2) 位于 11p15.5, 全长 751 bp, 有 8 个外显子, 编码 182 个氨基酸, 其编码的肌钙蛋白 I2 亚型 (TnI2), 作为肌钙蛋白复合体的重要组成部分, 主要存在于快收

缩骨骼肌纤维中, 通过抑制肌球蛋白 ATP 酶的活性, 调节肌肉收缩运动^[15]。Zhu 等^[12]的研究表明, TNNI2 表达于小鼠的长骨成骨细胞和软骨细胞中, TNNI2 基因突变的小鼠肢体发育异常且体型减小, TNNI2^{K175del} 小鼠中 Hif3a 表达量增加, 显著增加的 Hif3a 促使血管生成受损, 软骨内骨化延迟, 软骨细胞分化和成骨细胞增殖减少。目前已报道的在 DA 患者中发现的 TNNI2 基因突变均位于羧基端^[16-17], 且 Jiang 等^[18]在一个中国 DA2B 家系中发现的 TNNI2 基因 c.523_525delAAG (p.176delK) 突变与本文患者 c.525_c.527delGAA (p.176delK) 存在相同氨基酸改变, 因此推测羧基端氨基酸的替代或缺失可能引起 TnI2 对钙离子信号应答能力的下降, 从而导致远端关节挛缩畸形的发生。

目前对患者的遗传基因分析已广泛普及^[19-21], 传统的 Sanger 测序法是对每个外显子进行直接测序, 具有简便、准确等优点, 但是骨骼发育异常的致病基因众多, 使得直接测序工作量大, 成本高。全外显子测序技术使用接头进行高通量并行 PCR 及测序反应, 具有数据准确性高、测序覆盖深度深等优点, 且与人类疾病相关的 85% 基因突变都位于编码序列和剪切位点, 因此, 全外显子检测技术作为临床遗传病诊断的有效工具, 将得到更广泛的应用。

综上所述, 本研究应用全外显子测序技术在我国一个远端关节弯曲畸形的家系中发现新的 TNNI2 基因突变, 为患者的遗传学分子诊断和再生育咨询提供了依据, 进一步证实了全外显子测序技术在骨

骼系统发育障碍中的临床应用价值。

[参考文献]

- [1] Zapata-Aldana E, Al-Mobarak SB, Karp N, et al. Distal arthrogryposis type 5 and PIEZO2 novel variant in a Canadian family[J]. *Am J Med*, 2019, 179(6):1034-1041
- [2] Hedera P, Moretti P, Howard J, et al. Novel Type of complicated autosomal dominant hereditary spastic paraplegia associated with congenital distal arthrogryposis type I [J]. *Brain Sci*, 2018, 8(7):E136
- [3] Cameron-Christie SR, Wells CF, Simon M, et al. Recessive spondylocarpotarsal synostosis syndrome due to compound heterozygosity for variants in MYH3 [J]. *Am J Hum Genet*, 2018, 102(6):1115-1125
- [4] Bamshad M, Van Heest AE, Pleasure D. Arthrogryposis: a review and update [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2009, 91(Suppl 4):40-46
- [5] Kimber E. AMC: amyoplasia and distal arthrogryposis [J]. *J Child Orthop*, 2015, 9(6):427-432
- [6] Li S, You Y, Gao J, et al. Novel mutations in TPM2 and PIEZO2 are responsible for distal arthrogryposis (DA) 2B and mild DA in two Chinese families [J]. *BMC Med Genet*, 2018, 19(1):179
- [7] Xu Y, Kang QL, Zhang ZL. A MYH3 mutation identified for the first time in a Chinese family with Sheldon-Hall syndrome (DA2B) [J]. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28(5):456-462
- [8] Wang B, Zheng Z, Wang Z, et al. A novel missense mutation of TNNI2 in a Chinese family cause distal arthrogryposis type 1 [J]. *Am J Med Genet A*, 2016, 170(1):135-141
- [9] Carapito R, Goldenberg A, Paul N, et al. Protein-altering MYH3 variants are associated with a spectrum of phenotypes extending to spondylocarpotarsal synostosis syndrome [J]. *Eur J Hum Genet*, 2016, 24(12):1746-1751
- [10] Racca AW, Beck AE, McMillin MJ, et al. The embryonic myosin R672C mutation that underlies Freeman-Sheldon syndrome impairs cross-bridge detachment and cycling in adult skeletal muscle [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(12):3348-3358
- [11] Scala M, Accogli A, De Grandis E, et al. A novel pathogenic MYH3 mutation in a child with Sheldon-Hall syndrome and vertebral fusions [J]. *Am J Med Genet A*, 2018, 176(3):663-667
- [12] Zhu X, Wang F, Zhao Y, et al. A gain-of-function mutation in Tnni2 impeded bone development through increasing Hif3a expression in DA2B mice [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(10):e1004589
- [13] Zhao N, Jiang M, Han W, et al. A novel mutation in TNNI3 associated with Sheldon-Hall syndrome in a Chinese family with vertical talus [J]. *Eur J Med Genet*, 2011, 54(3):351-353
- [14] Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, et al. Spectrum of mutations that cause distal arthrogryposis types 1 and 2B [J]. *Am J Med Genet A*, 2013, 161a(3):550-555
- [15] Li KL, Methawasin M, Tanner BCW, et al. Sarcomere length-dependent effects on Ca²⁺-troponin regulation in myocardium expressing compliant titin [J]. *J Gen Physiol*, 2019, 151(1):30-41
- [16] Kimber E, Tajsharghi H, Kroksmark AK, et al. A mutation in the fast skeletal muscle troponin I gene causes myopathy and distal arthrogryposis [J]. *Neurology*, 2006, 67(4):597-601
- [17] Wang B, Zheng Z, Wang Z, et al. A novel missense mutation of TNNI2 in a Chinese family cause distal arthrogryposis type 1 [J]. *Am J Med Genet A*, 2016, 170a(1):135-141
- [18] Jiang M, Zhao X, Han W, et al. A novel deletion in TNNI2 causes distal arthrogryposis in a large Chinese family with marked variability of expression [J]. *Hum Gene*, 2006, 120(2):238-242
- [19] 王丹, 郭虎, 卢孝鹏. 先天性糖基化异常 Ia 型临床特征及基因分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(12):1797-1799
- [20] 郭红梅, 何祖蕙, 金玉, 等. IL2RG 基因突变致 X-连锁重症联合免疫缺陷病 1 例及家系突变分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(1):162-164
- [21] 王玥, 陈雪娟, 刘虎, 等. 一汉族先天性眼外肌纤维化家系 KIF21A 基因检测和影像分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(4):574-578

[收稿日期] 2019-07-23