

运用二代测序技术产前诊断 ZMPSTE24 基因突变

麦明琴¹, 王逾男¹, 赵馨¹, 丁红珂¹, 卢建¹, 尹爱华¹, 陈燕², 王文³, 易慧¹
(1. 2. 广东省妇幼保健院医学遗传中心、超声科, 广东广州 510010; 3. 禅城中心医院妇产科, 广东佛山 528000)

摘要:【目的】探讨二代测序技术结合 Sanger 测序验证法在一原发性部分性绒毛膜羊膜病理性分离家系致病基因检测的作用, 探索临床罕见胎儿疾病的产前诊断思路与方法。【方法】采用全基因外显子高通量测序方法, 在 ZMPSTE24 基因中发现两个致病突变, 随后对先证者及其父母的致病位点进行 Sanger 测序验证, 明确致病位点后, 对第 3 次妊娠胎儿行绒毛取样术实施产前诊断, 分析致病位点。【结果】检测到先证者在 ZMPSTE24 基因第 10 个外显子上发生了框移突变(c.1389 至 c.1390 缺失 AG, 来源于母亲)以及在 ZMPSTE24 基因第 8 个外显子上发生了错义突变(c.1006G>C 双重杂合改变, 来源于父亲)。再次妊娠产前诊断结果提示胎儿为基因突变(c.1006G>C)携带者, 突变来源于父亲。【结论】本研究运用全外显子测序技术成功分离出 ZMPSTE24 基因的两个新突变, 对一曾出现相同两次原发性部分性绒毛膜羊膜病理性分离的孕妇再次妊娠行早期绒毛取样术产前诊断。该 ZMPSTE24 基因突变与 mandibuloacral dysplasia with type B 相关。新突变可能是该原发性部分性绒毛膜羊膜病理性分离病例的病因。为临床上罕见疾病的病因检测及胎儿宫内诊断提供参考方法与思路。

关键词:绒毛膜羊膜分离; 二代测序技术; Sanger 测序; 产前诊断; 经腹绒毛取样术

中图分类号: R714.55

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)03-0453-06

Application of Next-Generation Sequencing in Detection of Mutation Gene in ZMPSTE24 in Prenatal Diagnosis a Chinese Pedigree with Pathological Chorioamniotic Membrane Separation

MAI Ming-qin¹, WANG Yu-nan¹, ZHAO Xin¹, DING Hong-ke¹, LU Jian¹, YIN Ai-hua¹, CHEN Yan²,
WANG Wen³, YI Hui¹

(1. Medical Genetic Center, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 510010, China; 2. Department of Ultrasound, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 510010, China; 3. Department of Gynecology and Obstetrics, Chan Cheng Central Hospital, Foshan 528000, China)

Corresponding to: MAI Ming-qin, E-mail: maimingqin@126.com

Abstract: 【Objective】 To describe a case of a rare, novel mutation causing recurrent chorioamniotic membrane separation in a Chinese family with combined next-generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing. 【Methods】 For the affected fetus, potential mutation were detected by the combined next-generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing. And the prenatal diagnosis were identified by Sanger sequencing. 【Results】 A frameshifting mutation c.1389_1390delAG (inherited from mother), and a missense mutation c.1006 G > C (inherited from mother) have been identified in the affected fetus (the second pregnancy). The prenatal diagnosis of the third fetus turns out to be a carrier, the mutation was inherited from father. 【Conclusions】 We describe a novel mutation in gene ZMPSTE24, which was considered with mandibuloacral dysplasia with type B, and that may be the cause of recurrent chorioamniotic membrane separation. This rare mutation constitutes an additional heterogeneous defect causing chorioamniotic membrane separation. And the combined next-generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing allows high resolution characterization of novel mutations that are not readily detected by present methods.

Key words: chorioamniotic membrane separation; next-generation sequencing; Sanger sequencing; prenatal diagnosis; fetal medicine; chorionic villus sampling

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(3): 453-458]

收稿日期: 2016-12-09

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金(20121018440105197311060029)

作者简介: 麦明琴, 通信作者, 医学硕士, 副主任医师。研究方向: 遗传咨询, 产前诊断, 胎儿医学, E-mail: maimingqin@126.com

病理性绒毛膜羊膜分离(chorioamniotic membrane separation, CMS)是指在孕16周后绒毛膜和羊膜两者之间仍不能完全粘附而呈分离状态,超声检查可探查羊膜与绒毛膜之间的空隙。根据病因可分为原发性CMS与继发性CMS,后者继发于介入性产前操作如羊膜腔穿刺术、胎儿宫内输血或胎儿手术后等。原发性CMS大多数表现为完全性绒毛膜羊膜完全分离,病因和发病机制尚不明确^[1]。由于CMS发病率低,相关研究不多,目前文献报道遗传相关的因素包括染色体病^[2], Ehlers-Danlos综合征(常染色体显性遗传疾病)^[3], 及限制性皮病(restrictive dermopathy, RD)(常染色体隐性遗传疾病)^[4]。由于其致病基因不明确,故Sanger测序的方法不适合对CMS进行基因诊断。在第2代测序技术(next-generation sequencing, NGS)的推动下,高通量测序技术发展较快,NGS通过反复测序同一区域的DNA片段,达到很高的灵敏度和准确度,同时自动化程度高,能在很短的时间内完成上百亿碱基的测序,为基因组分析提供了新的方法。已广泛应用于遗传性出生缺陷的诊断与预防,肿瘤的发生^[5]、发展分子机制及重大遗传病的遗传分析等^[6]。目前NGS技术尚未用于CMS的基因诊断,本研究中利用NGS技术对一病理性绒毛膜羊膜分离家系进行突变基因检测,并利用Sanger测序法对NGS结果进行验证,探讨NGS联合Sanger测序用于临床罕见疾病基因检测和产前诊断的可行性。

1 材料与方法

1.1 病例来源

陈某,26岁,孕12⁺周,因“曾引产绒毛膜与羊膜分离胎儿2次,要求产前诊断”于我院产前诊断中心就诊。既往史:G3P1A1,第1胎,2013年孕30周超声发现“胎儿绒毛膜与羊膜病理性分离、胎儿手指姿势异常、四肢长骨较孕周短”引产,引产后未行进一步检查。第2胎,2015年9月24日我院Ⅲ级超声提示:“孕24周单活胎,羊膜与绒毛膜分离,宽约18 mm,胎儿心胸比0.37,下颌骨长30 mm,胆囊内充满强回声光团。脐静脉腹内段宽约9 mm,右手呈“重叠指”状,四肢长骨小于孕周,羊水暗区28 mm”(图1)。同时孕期诊断妊娠期糖尿病,外院诊治,血糖控制欠佳。入院诊断:①孕2产1宫内妊娠27周单活胎;②胎儿绒毛膜与羊膜

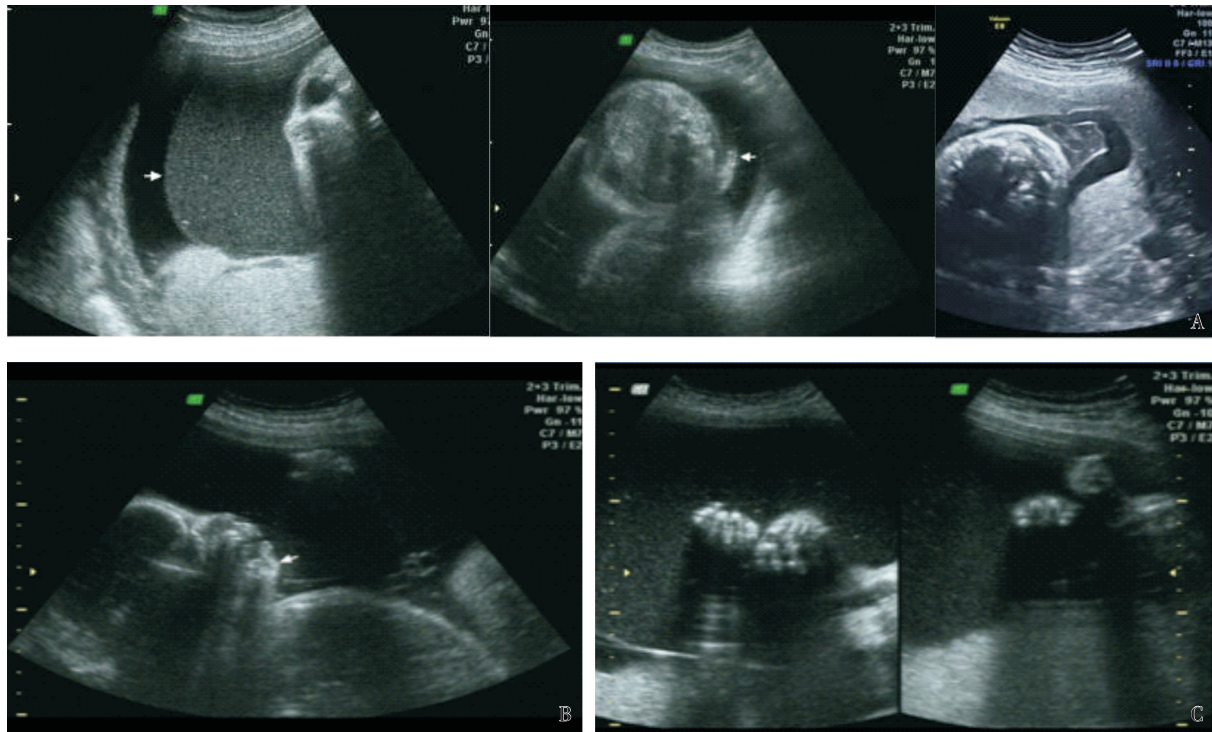
分离;③胎儿异常;④妊娠期糖尿病;⑤羊水过少。此胎超声表现与第1胎相似,经遗传咨询,夫妻双方知情选择于2015年9月25日接受经腹胎儿脐静脉穿刺术,行胎儿脐血染色体核型分析、染色体微阵列分析及全外显子测序检查;同时采集夫妻双方外周血备查。术后第2天胎心正常,无早产征象。孕妇及家人要求继续观察,并回当地医院产检。后随访得知脐静脉穿刺术后1个月胎死宫内,引产后未行尸检。脐血及夫妻双方外周血送检项目发现致病基因位点,告知其再次怀孕需行产前诊断。遂孕妇第3次怀孕后再次来我中心行遗传咨询,夫妻双方知情选择于2016年5月23日孕12⁺周在我科行经腹绒毛取样术,胎儿绒毛送检染色体核型分析、染色体微阵列分析及Sanger测序检查。本研究家系既往无遗传病家族史,非近亲婚配,夫妇双方均体健。该研究获得了广东省妇幼保健院机构审查委员会及广州医科大学伦理委员会的批准。所有样品的采集均取得了参与者的书面知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 二胎先证胎脐血及外周血DNA提取 用QIAGEN公司基因组DNA提取试剂盒QIAampDNABlood Mini Kit提取脐血及外周血DNA,实际操作按试剂盒说明书进行。使用Nanodrop 2000超微量分光光度计定量提取的DNA。

1.2.2 先证胎脐血染色体核型分析和染色体微阵列分析 常规操作进行原位培养、收获、制片和G显带,全自动扫描仪扫描、拍照。按照人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2009)标准进行G显带染色体核型分析诊断。必要时加做C显带、N显带;同时使用agilent公司生产的8司生产的芯片进行全基因组扫描检测,数据分析参照DECIPHER、ISCA、OMIM、DGV、UCSC等数据库。

1.2.3 先证胎脐血第二代测序技术 提取第2胎患儿DNA,进行染色体核型分析及微阵列分析,定制罗氏NimbleGen全外显子组捕获探针针对全外显子区域DNA捕获并富集,使用illumina HiSeq 2500进行高通量测序。数据分析:①基本信息分析:去接头污染,去低质量后进行原始数据产量统计;②使用BWA比对软件,将数据与参考序列进行比对统计;③根据测序深度、突变质量,对检测得到的SNP,Indel进行过滤筛选,得到高质量可靠的突变谱;④筛选出的变异对蛋白功能影响的



A:Chorioamniotic membrane, B:Micrognathia, C:Clenched hand

图1 第2胎III级超声影像

Fig.1 The 2nd fetus ultrasound malformations include chorioamniotic membrane separation 18 mm; micrognathia and clenched right hand

预测:使用SIFT、Plophen-2、Mutation Taster等利用基于同源比对,蛋白结构的保守性等算法,预测筛选出的变异对蛋白质的影响。

1.2.4 Sanger测序验证 根据2代测序结果用Sanger测序对先证者及父母进行突变位点的检测和验证,并对脐血细胞DNA进行突变检测。采用Primer5软件设计引物,扩增ZMPSTE24基因的第8外显子和第10外显子。引物序列为:ZMPSTE24-E8F: GAGCAGTGGTTCAGGGAATG, ZMPSTE24-E8R: GTAGCCTGGCTGTGGTGTG;

E10F: CAGTCTCAGCTCATGGAACC, ZMPSTE24-E10R: GGAACATGCTGCCAGGAC。PCR扩增条件为:95℃ 5 min,95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 5 min,72℃ 30 s,共进行38个循环反应。

1.2.5 第三胎绒毛DNA的提取 用QIAGEN公司基因组DNA提取试剂盒QIAampDNABlood Mini Kit提取绒毛DNA,实际操作按试剂盒说明书进行。使用Nanodrop 2000超微量分光光度计定量提取的DNA。

1.2.6 绒毛染色体核型分析和,染色体微阵列分

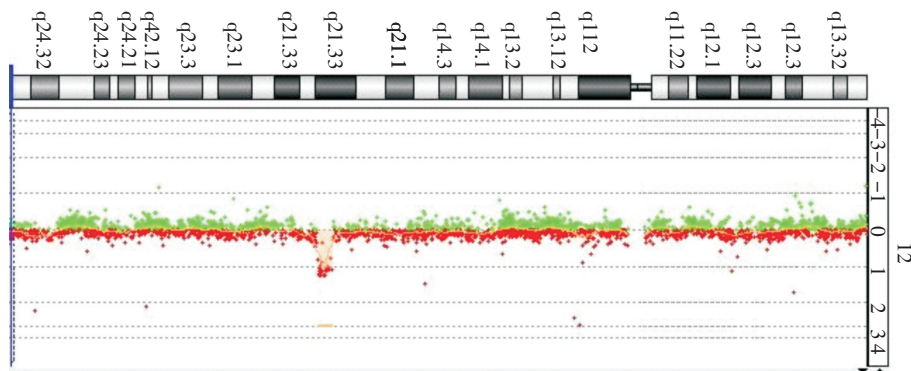


图2 脐血染色体微阵列结果

Fig.2 The array comparative genomic hybridization of umbilical cord blood

导致终止密码子丢失,氨基酸链延长,OMIM、Swissvar、HGMD、千人数据库及本地数据库无记载,为新发现的突变,Mutation Taster 预测为可能致病性, $P = 0.99$;c.1006G > C(E336Q)突变导致第336位氨基酸谷氨酰胺替换为谷氨酸,相关数据库未发现相关文献报道,SIFT、Plophen-2软件预测为可能致病性, $P = 0.99$ 。以上基因与致死性限制性真皮病有关。

2.3 Sanger 测序及验证结果

第2胎脐血 Sanger 测序确定 ZMPSTE24 基因第10个外显子上发生了框移突变(c.1389至c.1390缺失AG),以及在ZMPSTE24基因第8个外显子上发生了错义突变(c.1006G>C)。其中c.1389_1390delAG(E464Efs57)突变来源于母亲,c.1006G>C(E336Q)突变来源于父亲,为双重杂合改变(图3、4)。

2.4 第三胎绒毛染色体核型分析和染色体微阵列分析

脐血染色体核型分析,染色体微阵列分析均未见异常。

2.5 第三胎绒毛染色体 Sanger 测序结果

第3胎胎儿绒毛细胞DNA检测到ZMPSTE24基因c.1006G>C(E336Q)杂合突变,检测结果与父亲相同,突变在该家系中符合孟德尔遗传规律。孕妇及家属经遗传咨询后决定保留胎儿,并回当地医院产检,孕期无特殊,Ⅲ级超声及胎儿超声心动图未见异常(图5)。2016年12月2日足月顺产一男婴,出生体质量3.5 kg,Agpar评分9-10-10。

3 讨论

妊娠14周前由于胚外体腔的存在,绒毛膜与羊膜出现生理性分离,随着孕周的增加,胚外体腔逐渐缩小并消失,在孕14周末,绒毛膜与羊膜紧密贴附。若在孕16周后两者之间仍不能完全粘附而呈分离状态,即可诊断病理性绒毛膜羊膜分离(chorioamniotic membrane separation, CMS),超声检查可探查羊膜与绒毛膜之间的空隙。CMS发病机制至今尚不清楚,有观点提出羊水过早的泄露入胚外体腔,阻碍绒毛膜与羊膜贴附是CMS的主要因素。根据病因可分为原发性CMS与继发性CMS,后者继发于介入性产前操作如羊膜腔穿刺术、胎儿宫内输血或胎儿手术后等。自发的CMS发病率约1/187~1/4333,继发于羊膜腔穿刺

术后CMS发病率为10%,胎儿激光术后19.6%^[7]。根据分离范围大小可分为部分性和完全性分离。

原发性CMS大多数表现为完全性绒毛膜羊膜完全分离。因皮肤结缔组织与羊膜均由外胚层发育而来,部分学者提出完全性CMS与胎儿皮肤结缔组织病有关,Stoler等^[3]发现一例CMS胎儿患有经典型Ehlers-Danlos综合征,此病为常染色体显性遗传疾病,其发病机制为影响IV型胶原蛋白合成,进而影响正常羊膜功能。Kim^[4]报道了一位连续两次妊娠均在孕中期超声发现完全性CMS的病例,并发现孕妇患有限制性皮病,一种常染色体隐性遗传疾病,其发病机制为弹性胶原蛋白合成障碍,引起成纤维细胞功能异常,羊膜脆弱易破裂引起早产死胎。超声下可观察到完全性CMS、胎儿活动受限、生长发育迟缓、关节挛缩等,确诊需要胎儿皮肤活检。也有证据显示完全性CMS与胎儿染色体异常或结构畸形有关,Ulm^[2]研究60例孕14~18周超声发现CMS的孕妇,发现46%合并染色体异常,52%在后续的超声检查中发现其他结构畸形。原发性CMS大多数预后不良,合并多发畸形及染色体异常胎儿可通过产前诊断确诊,合并皮肤及结缔组织病胎儿,除外羊膜绒毛膜功能障碍,常合并皮肤、关节、生长发育等异常,胎儿及新生儿死亡率均较高。综上所述,目前原发性CMS的病因与发病机制尚未完全明确,可能与胎儿染色体异常有关,也可能是单基因遗传性疾病。环境致畸因子,化学制剂,药物、放射性电离辐射、感染等未见报道。临床中绒毛膜羊膜分离较为少见,常常导致不良妊娠结局,目前尚无有效的治疗办法。基于以上分析,当在临床上接诊此类患者,首先应建议产前诊断检查胎儿染色体核型分析及微阵列分析检查;若染色体未见异常,尤其是复发性原发性部分性CMS或家族史明确时,我们需要进一步的分子遗传学检测,如全外显子测序,以求寻找病因,提供遗传咨询。

近年来,NGS技术的进步极大地冲击和转变了人类遗传病的研究方式^[8]。自2005年开始,NGS变得更加经济、高效,随着服务价格的不断降低而逐渐得到更广泛的应用。NGS在单基因遗传病的研究中发挥着巨大的作用,大大地推动了对单基因疾病、复杂疾病及性状的分子遗传学研究。

全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)是以人类基因组中蛋白质编码序列(coding

sequence)为目标的第二代测序技术,外显子组(exome)包含的序列不到人的整个基因组的1%,但在已发现的人类单基因遗传病中,85%的致病突变位于外显子区域^[6]。全基因组外显子测序是利用序列捕获技术将全基因组外显子区DNA捕捉并富集后进行高通量测序的基因组分析方法。外显子测序针对的是与疾病最相关的“编码序列”即外显子。捕捉的是疾病的大部分致病突变信息,可以发现罕见或新发突变^[8-9]。

自从2009年全外显子捕获测序技术开展以来,已经成功发现了数百种孟德尔遗传疾病的致病基因^[10-12]。2012年,美国医学遗传学和基因组学学院针对全基因组外显子测序的适用对象提出了以下指南:首先,患者所患有的疾病被认为是遗传因素导致的,且其表现不符合目前已知的任何综合征;第二,患者的临床表现提示这种疾病具有显著的遗传异质性;第三,尽管目前关于此疾病的检查可以部分解释患者的临床表现,但是仍不能明确地由一种病因解释。本例研究对象连续两次妊娠,均在孕中晚期发现原发性的部分性CMS病例,两次妊娠超声提示胎儿异常表现基本一致,均为原发性的部分性CMS合并胎儿多发畸形。经过染色体核型分析及微阵列检测基本排除与羊膜绒毛膜发育不良相关的染色体病,导致复发性原发性部分性CMS的原因仍不明。结合指南及本病例特点,此病例适合选送全外显子测序,在成功找到突变基因后实现其生育第3胎孕早期产前诊断。

参考文献:

- [1] Wu D, Ball RH. The maternal side of maternal-fetal surgery [J]. *Clin Perinatol*, 2009, 36(2): 247-253.
- [2] Ulm B, Ulm MR, Bernaschek G. Un fused amnion and chorion after 14 weeks of gestation: associated fetal structural and chromosomal abnormalities [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1999, 13(6): 392-395.
- [3] Stoler JM, Bromley B, Castro MA, et al. Separation of amniotic membranes after amniocentesis in an individual with the classic form of EDS and haploinsufficiency for COL5A1 expression [J]. *Am J Med Genet*, 2001, 101(2): 174-177.
- [4] Kim YN, Jeong DH, Jeong SJ, et al. Complete chorioamniotic membrane separation with fetal restrictive dermopathy in two consecutive pregnancies [J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27(4): 352-355.
- [5] Mullerova Z, Muller T, Krivankova K, et al. [Molecular mechanisms of carcinogenesis of epithelial ovarian cancers] [J]. *Klin Onkol*, 2016, 29 (Supplementum 4): 46-53.
- [6] Goh G, Choi M. Application of whole exome sequencing to identify disease-causing variants in inherited human diseases [J]. *Genomics Inform*, 2012, 10(4): 214-219.
- [7] Sydorak RM, Hirose S, Sandberg PL, et al. Chorioamniotic membrane separation following fetal surgery [J]. *J Perinatol*, 2002, 22(5): 407-410.
- [8] Tanabe Y, Ichikawa H, Kohno T, et al. Comprehensive screening of target molecules by next-generation sequencing in patients with malignant solid tumors: guiding entry into phase I clinical trials [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 73-78.
- [9] Marafie MJ, Dashti M, Al-Mulla F. Identification of a rare germline NBN gene mutation by whole exome sequencing in a lung-cancer survivor from a large family with various types of cancer [J]. *Fam Cancer*, 2016, 11(2): 53-58.
- [10] Farlow JL, Robak LA, Hetrick K, et al. Whole-exome sequencing in familial parkinson disease [J]. *JAMA Neurol*, 2016, 73(1): 68-75.
- [11] Sapkota S, Horiguchi K, Tosaka M, et al. Whole-exome sequencing study of thyrotropin-secreting pituitary adenomas [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 2(5): 22-26.
- [12] Kwak S H, Jung C H, Ahn CH, et al. Clinical whole exome sequencing in early onset diabetes patients [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2016, 12(12): 71-77.

(编辑 徐杰)