

山东医药 2019 年第 59 卷第 23 期

1 例马凡综合征患者原纤维蛋白 1 基因突变分析

倪二茹^{1,2} 肖晶晶³ 吴少鸿³ 李欣³ 谢华斌¹ 姜萍萍³

(1 厦门大学附属心血管病医院 福建厦门 361004; 2 厦门大学医学院; 3 深圳美因医学检验实验室)

摘要:目的 探讨 1 例马凡综合征患者原纤维蛋白 1(FBN1) 基因突变情况。方法 收集 1 例临床确诊马凡综合征患者的临床资料, 提取基因组 DNA 进行目标区域捕获测序确定突变基因的位点; 对候选的突变位点采用 Sanger 测序进行验证, 同时在家系中进一步验证; 分析 FBN1 基因突变对蛋白结构的影响。结果 目标区域捕获测序结果显示先证者携带 FBN1 基因 c. 2023_2026delTTTG 突变, 该突变导致 FBN1 基因生成缩短并变异的 RNA 以及蛋白。家系验证显示患者父母不具有该突变, 判断该突变为新生突变(de novo 突变)。结果 该例马凡综合征患者出现 FBN1 基因 c. 2023_2026delTTTG 突变, 可能是引起马凡综合征的致病原因。

关键词: 马凡综合征; FBN1 基因; 移码突变; 基因突变

doi: 10. 3969/j. issn. 1002-266X. 2019. 23. 013

中图分类号: R542. 2 文献标志码: A 文章编号: 1002-266X(2019) 23-0057-04



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

马凡综合征(MFS) 是一种常染色体显性遗传性结缔组织疾病^[1], 它的发生与多种基因的突变密切相关^[2], 主要是人原纤维蛋白 1 基因(FBN1)^[3] 和转化生长因子 β 受体(TGFBR) 基因^[4]。其中, 以 FBN1 基因突变与马凡综合征相关性的研究最多^[5]。FBN1 基因突变的类型多样, 新的突变位点仍不断被发现, 目前已报道的 FBN1 突变超过 1 800 种^[6]。FBN1 基因突变的类型和位点与临床表型有直接的关系, 通过基因测序的方法分析 FBN1 基因的突变情况, 有助于马凡综合征的分子诊断和家系遗传分析, 同时可以研究 FBN1 基因突变与临床表

型之间的关系^[7,8]。2018 年 11 月 我们对 1 例临床确诊马凡综合征患者的 FBN1 基因进行检测和分析, 在分子水平上探讨该患者致病的可能原因。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择同期厦门大学附属心血管病医院收治的 1 例患有马凡综合征的先证者及其所有家系成员。先证者男性, 18 岁, 于 12 岁时体检发现心脏杂音, 无明显不适, 身高体长且明显高于同龄人, 胸部外凸畸形, CT 检查发现主动脉根部增宽, 心脏超声提示二尖瓣、三尖瓣脱垂并关闭不全(见图 1), 临床诊断为马凡综合征, 未予特殊处理。后患者定期复查, 瓣膜反流逐渐加重。14 岁时先证者心脏超声检查示左心室内径(LVD) 63 mm, 左心室射血分数(EF) 70%, 二尖瓣叶脱垂合并重度关闭不全, 三尖瓣叶脱垂合并轻度关闭不全。后先证者于 14

基金项目: 福建省卫生计生青年科研课题(2017-2-408); 厦门市科技局科技惠民项目(3502Z20174009)。

通信作者: 谢华斌(E-mail: xmsccl@126.com); 姜萍萍(E-mail: jian-gpp@meigene.cn)

[11] Ito H, Tomooka T, Sakai N, et al. Lack of myocardial perfusion immediately after successful thrombolysis. A predictor of poor recovery of left ventricular function in anterior myocardial infarction [J]. *Circulation*, 1992, 85(5): 1699-1705.

[12] Kumbhani DJ, de Lemos J, James A. Finding an effective treatment for microvascular obstruction in STEMI: a road to perdition [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(24): 1920-1922.

[13] S derberg KC, Andersson ML, Gustafsson LL. Cytochrome P450-mediated changes in oxycodone pharmacokinetics/pharmacodynamics and their clinical implications [J]. *Drugs*, 2013, 73(6): 533-543.

[14] 董国明. 强效镇痛药羟考酮复方的研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 24(5): 758-764.

[15] 高玉蓓, 李寿春, 翁浩. 羟考酮对全凭静脉麻醉苏醒期血流动力学和应激反应的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 23(5): 548-550.

[16] 武春银, 王瑞婷, 疏树华. 不同剂量羟考酮预处理对体外循环心脏手术患者血流动力学及围术期炎症因子的影响 [J]. *山东医药*, 2017, 57(20): 65-68.

[17] 冷玉芳, 叶元梅. 羟考酮与吗啡对大鼠心肌缺血再灌注损伤影响的比较 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2017, 37(9): 1142-1144.

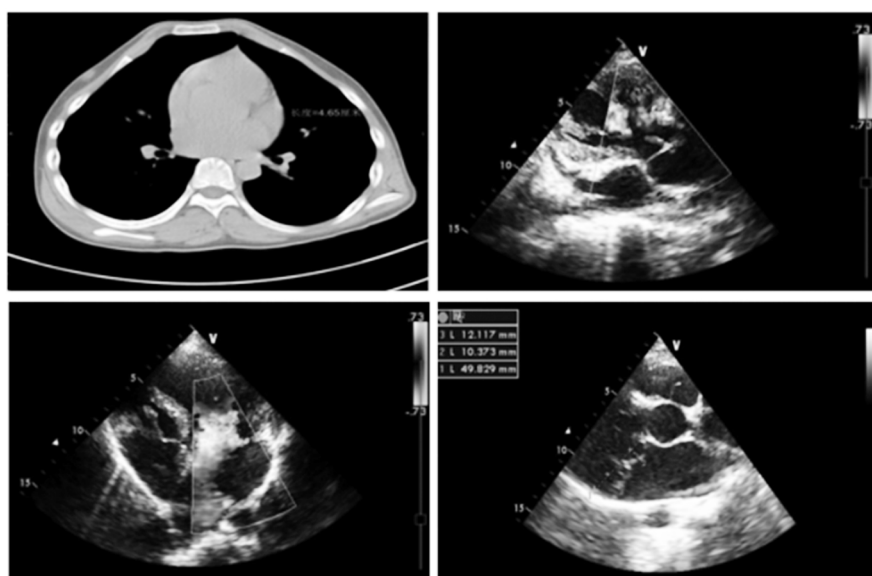
[18] Kontos MC, Lanfear DE, Gosch K, et al. Prognostic value of serial n terminal-pro brain natriuretic peptide testing in patients with acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiol*, 2017, 120(2): 181-185. (收稿日期: 2019-02-17)

岁时接受全麻下二尖瓣替换手术,术中探查见二尖瓣瓣叶增厚,腱索纤细延长,二尖瓣瓣叶脱垂,瓣环扩张,瓣口对合不严。术中进行了双叶机械瓣间断缝合,完成二尖瓣置换术。测试瓣膜启闭良好。术后患者恢复良好,复查未见异常。本研究符合赫尔辛基宣言,并得到了厦门大学附属心血管病医院伦理委员会的批准。先证者及其所有家系成员均签署了知情同意书。先证者及其所有家系成员的个人均得到严格的保密。

1.2 家系情况 该先证者家系成员 2 代共 3 人,其中患病者 1 例(即先证者,男性),见图 2。先证者的父母无马凡综合征的临床症状,先证者无兄弟姐妹,父母双方无相关症状的亲属。

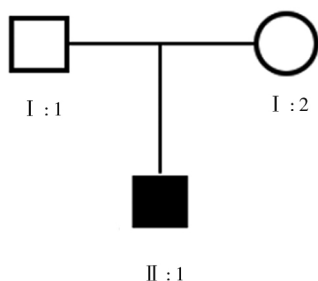
1.3 基因组 DNA 提取 经先证者及其所有家系成员同意,取先证者及其父母外周静脉血 4 mL,利用全血基因组提取试剂盒(HiPure Tissue & Blood DNA Kit,美基生物)提取基因组 DNA,并测定浓度。

1.4 目标区域捕获测序 采用目标区域捕获测序技术对先证者进行基因检测。具体步骤如下:采用 Agilent 定制化探针试剂盒(瑞士 Roche 公司)建立含目标基因的全基因文库,包括已知的 13 种遗传性心源性猝死相关疾病的 88 个基因,其中包括马凡综合征相关基因(FBN1、TGFBRI 和 TGFBRI2)。采用 Illumina HiSeq2500 测序仪(美国 Illumina 公司)进行高通量测序。



注:左上为 CT 示主动脉根部宽度为 4.46 cm;右上为心脏彩超示三尖瓣反流;左下为心脏彩超示二尖瓣反流;右下为心脏彩超示二尖瓣脱垂。

图 1 先证者心脏超声表现



注: I:1、I:2 分别为先证者的父母; II:1 为先证者。

图 2 先证者的家系图

1.5 生物信息学分析 对上述测序获得的原始数据采用 BWA 软件(<http://biobwa.sourceforge.net>)与 hg19 人基因组数据库(<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/>)进行比对,之后使用 GATK 软件(<https://software.broadinstitute.org/gatk/>)进行变异分析,变异位点经深圳美因临床检验实验室自研的软件进行注释。变异注释工作包括:识别单核苷酸变

异(SNV)、插入和缺失变异(INDEL)是否引起蛋白质编码或者是氨基酸改变,识别变异是否在保守区域;识别变异在人群数据库中的频率,数据库包括国际千人基因组计划(<http://browser.1000genomes.org/>)、美国国家心肺和血液研究所外显子组测序计划(<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>)、外显子组整合联合数据库(ExAC,<http://exac.broadinstitute.org/>)和 Dbsnp 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)等;计算突变有害性分数;查找变异与疾病之间的关系,用到的数据库包括 HGMD(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/index.php>)、OMIM(<https://omim.org/>)、NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 CGD(<http://www.candidagenome.org/>)。对数据库中的纯合变异以及最小等位基因频率(MAF)大于 0.01 进行过滤,进一步筛选先证

者样本中的 DNA 变异。

1.6 位点解读 数据解读规则参考美国医学遗传学和基因组学学院(ACMG)相关指南。

1.7 Sanger 测序 经目标区域捕获测序筛选的候选变异位点采用 Sanger 测序进行验证,同时先在证者父母中进一步验证。具体操作步骤如下:聚合酶链反应(PCR),反应条件为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 45 s, 72 °C 60 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min; 将 PCR 产物送至赛默飞世尔科技(中国)有限公司进行 Sanger 测序。

1.8 蛋白结构分析 将突变后的 DNA 序列进行氨基酸序列预测,之后使用 SWISS-MODEL 找到与目标序列一致度 ≥30% 的已知结构作为模板。

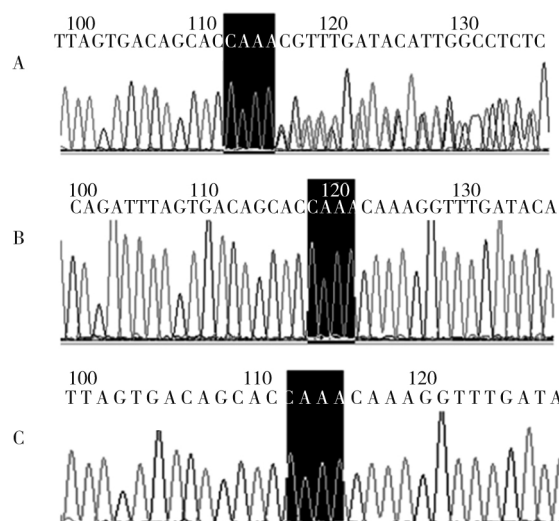
2 结果

2.1 目标区域捕获测序 经目标区域捕获测序,共产出 773.80 Mb 数据,对比率达 99.83%,目标区域平均测序深度为 523.53x,覆盖度为 99.90%。其中 FBN1 TGFBR1 和 TGFBR2 基因的测序深度分别达 542x、516x、593x,覆盖度均为 100%。共检测出单核苷酸变异位点(包括错义突变和同义突变)124 个;插入和缺失变异 2 个。通过对公共数据库过滤,频率小于 0.01 的罕见突变有 3 个。

2.2 生物信息学分析 生物信息学技术分析发现先证者携带 FBN1 基因 c. 2023_2026delTTTG 突变。转录本 NM_000138.4,氨基酸变异 p. F675Vfs* 42,杂合突变,未在千人基因组数据库及 EXAC 数据库中发现突变频率。该突变位于 17 号外显子区,属于移码突变,导致了 675 位的苯丙氨酸变成了缬氨酸,并产生新的阅读框架,终止于第 675 位密码子下游 42 位密码子处,因此会生成一个缩短并变异的 RNA 以及蛋白。

2.3 Sanger 测序 采用 Sanger 测序对 FBN1 基因移码突变的先证者及其父母进行验证,结果显示,先证者为 FBN1 (c. 2023_2026delTTTG, p. F675Vfs* 42) 的杂合移码突变,与目标区域捕获测序发现的 FBN1 基因突变一致,而其父母不具有该突变,因此该突变为新生突变(denovo 突变)。见图 3。

2.4 蛋白结构分析 建立 FBN1 基因 p. F675Vfs* 42 突变翻译的异常蛋白 3D 构象后,显示移码突变导致了 675 位的苯丙氨酸变成了缬氨酸,并产生新的阅读框架,终止于第 675 位密码子下游 42 位密码子处。FBN1 编码的正常的 FBN1 前体由 2871 个氨基酸组成,而 p. F675Vfs* 42 突变编码的只有 716 个氨基酸,缺失了大部分的原 FBN1 正常结构,彻底改变了蛋白质的构象,损坏了蛋白质的功能,不能转



注: A 为患者 Sanger 测序结果,存在 c. 2023_2026delTTTG 突变,杂合缺失; B 为患者父亲 Sanger 测序结果,无突变; C 为患者母亲 Sanger 测序结果,无突变。

图 3 先证者及其父母 FBN1 基因的 Sanger 测序峰图化成正常的 FBN1。

3 讨论

马凡综合征是一种常染色体显性遗传的疾病,常表现为蜘蛛指(趾)病、细长肢体病、长肢病、指(趾)过长综合征、长瘦、抑郁症、蜘蛛手合并晶状体脱位等^[1]。在遗传学上,马凡综合征具有外显率高、表现度不一等特点,故临床表现多种多样^[9,10],主要表现为骨损坏、眼损害及心血管病变三联征。该病属于结缔组织遗传缺陷疾病,其病变可累及全身各个系统,而严重的心血管并发症是患者的主要致死因素^[11]。根据修订版 Ghent 诊断方案^[12],若患者无马凡综合征家族史,但主动脉根部直径 Z 值 ≥2,合并晶状体脱位、FBN1 基因突变,系统评分 >7 分,三者之一;或晶状体脱位合并 FBN1 基因突变并主动脉病变,马凡综合征诊断成立。本文先证者临床症状表现胸廓畸形、臂展和身高均过大,心脏彩超检查示主动脉根部增宽,二尖瓣、三尖瓣脱垂并关闭不全,具有典型的马凡综合征的临床表现。

FBN 基因家族和 TGFBR 基因家族是马凡综合征的主要致病原因。FBN 基因家族中 FBN1 基因编码的人 FBN1 位于 15 号染色体的长臂(15q15 ~ q21.1),包含 65 个外显子,将近 10 000 个核苷酸,编码的蛋白质相对分子量约为 350 kDa。该蛋白含有 47 个表皮生长因子样结构域,7 个 8-半胱氨酸结构域,2 个杂交结构域和 1 个富脯氨酸结构域。FBN1 蛋白与其他细胞外基质形成弹性纤维,维持组织的弹性。本文在对先证者的基因组 DNA 进行

目标区域捕获测序后,分析了马凡综合征相关的 FBN1、TGFB1 和 TGFB2 基因的突变情况。经过生物信息学技术的分析,发现先证者携带了 FBN1 基因 c. 2023_2026delTTTG 突变。该突变位于 17 号外显子区,由于移码突变,导致了 675 位的苯丙氨酸变成了缬氨酸,并产生新的阅读框架,终止于第 675 位密码子下游 42 位密码子处,因此会生成一个缩短并变异的 RNA 以及蛋白。进一步的蛋白结构分析发现正常 FBN1 基因编码的 FBN1 蛋白有 2 871 个氨基酸,而 FBN1 基因 c. 2023_2026delTTTG 突变编码的 FBN1 蛋白只有 716 个氨基酸,缺失了大部分的 FBN1 蛋白的正常结构,彻底改变了蛋白质的构象,损坏了蛋白质的功能,不能转化成正常的 FBN1 蛋白。根据 ACMG 评估指南,定义该位点为疑似致病突变的变异,而 GeneDx 基因检测公司认为该位点为致病突变。Howarth 等^[13]在 2007 年首次报道了该突变,其在两个非亲属关系的马凡综合征的患者中检测到了该突变;并且在家系验证中,10 个未患病人员未检测到该突变,而在 5 例患病人员中均检测到了该突变;且未在各大数据库中报道。除此之外,FBN1 基因 c. 2023_2026delTTTG 突变尚未在其他文献中报道过。

本文的先证者父母没有携带相同的突变,而先证者没有兄弟姐妹,故无法对该基因型与临床表型的关系进行验证。虽然没有该位点与马凡综合征的表型关联的文献研究报道,但是在与马凡综合征相关的 FBN1 基因突变中,提早终止密码突变(PTC)以及移码突变是 FBN1 突变中的最主要的两种类型^[14],PTC 突变与严重的骨骼和皮肤表型相关^[15],很少出现眼部的病变。

综上所述,本文通过对 1 例临床确诊马凡综合征的先证者及其父母进行 FBN1 基因的检测,发现先证者携带的 FBN1 基因 c. 2023_2026delTTTG 突变会产生一个截短的 FBN1 蛋白,可能是马凡综合征的一个致病突变。

参考文献:

[1] Steindl K. Marfan syndrome and related connective tissue disorders [J]. Praxis (Bern 1994), 2013, 102(24): 1483-1488.

- [2] Verstraeten A, Alaerts M, Van Laer L, et al. Marfan syndrome and related disorders: 25 years of gene discovery [J]. Hum Mutat, 2016, 37(6): 524-531.
- [3] Sakai LY, Keene DR, Renard M, et al. FBN1: The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders [J]. Gene, 2016, 591(1): 279-291.
- [4] De Cario R, Sticchi E, Nistri S, et al. Role of TGFB1 and TGFB2 genetic variants in Marfan syndrome [J]. J Vasc Surg, 2018, 68(1): 225-233.
- [5] Groth KA, Von Kodolitsch Y, Kutsche K, et al. Evaluating the quality of Marfan genotype-phenotype correlations in existing FBN1 databases [J]. Genet Med, 2017, 19(7): 772-777.
- [6] 余昕宇,魏翔. 马方综合征相关 FBN1 突变的研究进展 [J]. 临床心血管病杂志, 2018, 34(11): 1050-1053.
- [7] Bolan N, Van Laer L, Loeys BL, et al. Marfan syndrome: from gene to therapy [J]. Curr Opin Pediatr, 2012, 24(4): 498-504.
- [8] Semyachkina AN, Adyan TA, Khabadze MN, et al. clinical and genetic characteristics of russian marfan patients [J]. Genetika, 2015, 51(7): 812-820.
- [9] Laffargue F, Lienhardt-Roussie A, Lacombe D, et al. Clinical signs of Marfan syndrome in children under 10 years of age [J]. Arch Pediatr, 2013, 20(11): 1193-1200.
- [10] Lim AY, Song JS, Kim EK, et al. Clinical characteristics of Marfan syndrome in Korea [J]. Korean Circ J, 2016, 46(6): 841-845.
- [11] Franken R, Teixido-Tura G, Brion M, et al. Relationship between fibrillin-1 genotype and severity of cardiovascular involvement in Marfan syndrome [J]. Heart, 2017, 103(22): 1795-1799.
- [12] Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, et al. The revised ghent nomenclature for the Marfan syndrome [J]. J Med Genet, 2010, 47(7): 476-485.
- [13] Howarth R, Yearwood C, John FH, et al. Application of dHPLC for mutation detection of the fibrillin-1 gene for the diagnosis of Marfan syndrome in a National Health Service Laboratory [J]. Genet Test, 2007, 11(2): 146-152.
- [14] Collod-Beroud G, Le Bourdelles S, Ades L, et al. Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphism database [J]. Hum Mutat, 2003, 22(3): 199-208.
- [15] Faivre L, Collod-Beroud G, Loeys BL, et al. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study [J]. Am J Hum Genet, 2007, 81(3): 454-466.

(收稿日期: 2019-04-06)