

1例胎儿X连锁隐性遗传点状软骨发育不良病例分析

王寅兰 安莉娜 潘丽华* 李楨 马辉芳

(宁夏医科大学总医院 产前诊断中心,宁夏 银川 750000)

【摘要】 目的 对1例3级产前超声筛查发现面部及脊柱发育异常的胎儿行全基因组染色体拷贝数变异检测(copy number variation sequencing, CNV-seq)及全外显子测序(whole exome sequencing, WES),明确其致病原因。方法 通过羊膜腔穿刺术获取胎儿羊水样本后行CNV-seq及WES检测,并对WES阳性结果行一代测序验证其变异来源。结果 胎儿CNVs未检出明确致病性变异,WES结果显示ARSL基因(NM_000047)c.1336 C>T(p. Q446X)的半合子变异,Sanger测序验证显示胎儿母亲该位点杂合变异,父亲为野生型。结合胎儿表型与基因型分析,该变异相关疾病为X连锁隐性点状软骨发育不良1型(CDPX1)。结论 对产前超声发现胎儿结构异常,CNVs未检出的进一步行WES,有可能发现胎儿发育异常的致病位点,明确其产前诊断;结合一代父母验证,发现致病位点来源,可避免再发风险,协助该夫妇做出最佳的妊娠决策并提供再生育及优生优育指导。

【关键词】 ARSL基因;全外显子测序;X连锁隐性点状软骨发育不良I型

【中图分类号】 R715.5 **【文献标识码】** B

X连锁隐性遗传点状软骨发育不良1型(chondrodysplasia punctata 1, X-linked recessive, CDPX1)(OMIM:302950)是一种X染色体连锁遗传的斑点状软骨发育异常疾病,其临床表型多样,具有很强的临床和遗传异质性^[1]。CDPX1会造成矮小身材并伴有骨骼畸形、白内障、耳聋。此外还引起上颌骨发育不全(扁平鼻或影响鼻柱),手指尖或脚趾的短端的骨骼在X光下可以看到点状斑,还包括皮肤和毛发相关的疾病。60%~75%的CDPX1患儿的致病基因是位于X染色体短臂上22.3区域的ARSL基因^[1]。本文报道了1例3级产前超声发现胎儿有面中部凹陷,脊椎椎管狭窄等的类似点状软骨发育不良疾病并应用CNV-seq技术和WES技术对胎儿进行分子遗传学分析,最后检出ARSL基因c.1336C>T(p. Q446X)半合子变异,确诊为CDPX1,经遗传咨询和产前诊断后孕妇及家属决定放弃胎儿,终止妊娠的案例。

1 对象与方法

1.1 对象 33岁初产妇,孕期合并甲状腺功能减退症,规律口服左甲状腺素钠片至终止妊娠前,孕13+周于宁夏医科大学总医院产前诊断中心产检行胎儿颈项透明层(nuchal translucency, NT)B超发现NT厚度为3.2mm,我院无创DNA检测示:21、18、13号染色体的三体综合征均为低风险。孕24⁺周,该孕妇因外院四维彩超怀疑胎儿中面部发育不良,以胸段为主的脊柱椎管细窄转诊我院,予以复查3级产前超声加胎儿心脏彩超提示:宫内单活胎,胎儿面中部凹陷,鼻梁扁平,双侧鼻骨可见但回声减低(考虑中面部发育不良可能)(如图1)、脊椎椎管狭窄(脊柱生理曲度略僵硬,可见广泛椎间隙狭窄,以胸腰段为著,横断面显示椎孔较小)(如图2)、羊水偏多(羊水最大深度8.0cm)、左心室强回声斑。孕妇与丈夫非近亲婚配,否认家族遗传病史,孕妇孕期无不良接触史、无慢性病史。夫妻双方要求遗传咨询及产前诊断,探查病因,要求多学科会诊(新生儿科、脊柱骨科、耳鼻喉科、超声科)详细讨论胎儿预后。孕妇及家属商议后要求终止妊娠,并于孕29⁺周

引产, 研究内容已获宁夏医科大学总医院医学伦理委员会审批。



图1 胎儿颅面部超声图像



图2 胎儿脊柱超声图像

1.2 方法

1.2.1 样本取材 夫妻签署知情同意书后, 行羊膜腔穿刺术, 抽取羊水送 CNV-seq 和 WES 检测。抽取孕妇及丈夫外周血于 EDTA 抗凝管, 4℃ 冷藏保存, 用于一代测序和家系分析。

1.2.2 CNV-Seq 检测及分析 将羊水样本外送至北京贝瑞和康医学检验实验室进行 CNV-seq 检测, 使用 Qiagen DNA Mini Kit 试剂盒提取基因组 DNA 后通过 Nanodrop 2000 对 DNA 进行质检, 将质控合格后的基因组 DNA 片段化至平均 150 bp 大小, 制备样本 DNA 文库, 流程包括末端修复、接头连接和 PCR 扩增。使用骨骼疾病相关基因捕获试剂盒对样本 DNA 文库进行捕获(MyGenostics Inc, 中国, 北京), 捕获实验按照操作手册进行。文库在 DNBSEQ 上进行双端测序后, 将原始数据保存为 FASTQ 格式, 并通过 Cutadapter 软件过滤低质量序列。使用 Sentieon 软件, 将干净的读数映射到 UCSC hg19 人类参考基因组。然后使用 CNVkit 软件获取拷贝数变化信息。

1.2.3 WES 检测及数据解读 WES 测序具体步骤如下:

(1) DNA 提取及质检: 基因组 DNA 提取试剂盒对样本 DNA 进行核酸提取后利用 Nanodrop2000 对 DNA 进行质检。

(2) 基因组文库构建: 对质检合格的基因组 DNA 行①片段化/末端修复/A 尾添加; ②接头连接; ③连接产物纯化; ④文库扩增 PCR 及产物纯化; ⑤文库质检。

(3) 目标区域捕获: 将生物素标记的探针与文库 DNA 杂交后, 利用与磁珠共价结合探针抓取目的基因, 最后吸附携带目的基因的磁珠, 完成洗脱纯化, 富集目的基因。

(4) 上机测序: 利用 Illumina 公司的 NextSeq 500 平台进行高通量测序。

(5) 生物信息分析: ①数据预处理; ② Mapping; ③去除 duplication; ④碱基值校正; ⑤ Call SNP 和 INDEL; ⑥ annovar 注释(关联多个数据库, 如千人基因组、ESP6500、dbSNP、EXAC、内部数据库(Mygenotics)、HGMD; ⑦用 REVEL、SIFT、PolyPhen-2、MutationTaster、GERP++ 进行变异有害性预测。

2 结果

2.1 CNV 结果 未检出染色体非整倍体或 100Kb 以上已知的、明确致病的基因组拷贝数变异(CNVs)。

2.2 WES 结果 胎儿 ARSL 基因 c. 1336 C>T (p. Q446X) 半合子变异(如图 3), 参考基因组版本为 GRCh/hg19, 提示疾病为 X 连锁点状软骨发育不良 1 型。参考 ACMG 指南^[2], 该变异初步判定为疑似致病性变异(Likely pathogenic), 致病性证据为 PVS1+PM2_Supporting。

PVS1: 该变异为无义突变, 可能导致基因功能丧失; PM2_ 支持证据: 在正常人群数据库中的频率暂未发现; 已知文献数据库尚未报道过该位点, ClinVar 数据库亦无该位点相应的致病性分析结果; 经家系分析, 胎儿父亲该位点无变异, 胎儿母亲该位点杂合变异, 考虑该变异来源于胎儿母亲。

2.3 引产胎儿外观 死男胎, 眼距增宽, 面部扁平, 鼻翼扁平, 脊柱及全身其他部位外观未见明显异常。

3 讨论

先天性点状软骨发育不良(chondrodysplasia punctata, CDP) 是首次报道于 1914 年的一组罕见

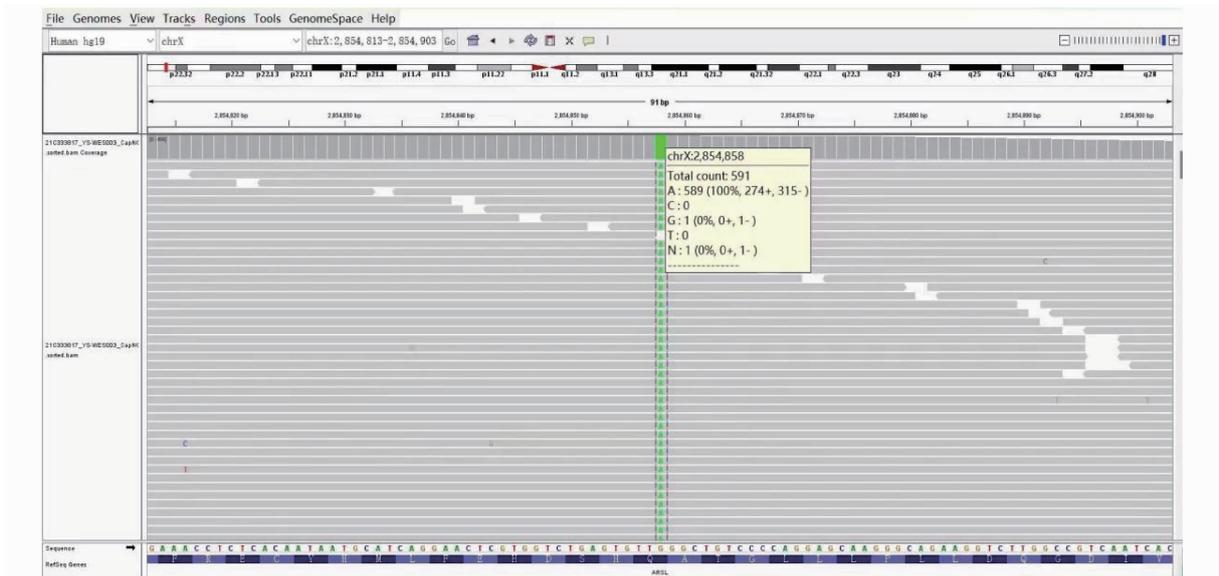


图3 胎儿 ARSL 基因 c.1336 C>T(p.Q446X) 半合子变异图

且复杂的骨骼系统疾病^[3]。根据其遗传模式及临床表型的多样性,将其分为五种不同类型:包括发病机制不明的常染色体显性遗传型,即非肢根型 conradi-hunermann 病、预后最差的由多种过氧化物酶缺乏所致的常染色体隐性遗传型,即肢根型 RCDP (rhizomelic chondrodysplasia punctata)、ARSL 基因突变所导致的 X 连锁隐性遗传型 (CDPX1 型)、Emopamil 结合蛋白 (EPB) 基因突变所致的 X 连锁显性遗传型 (CDPX2 型或 conradi-hunermann-happle 型) 以及发病机制和遗传方式均不明确 Sefield 型。其中 CDPX1 大部分是由定位于 Xp22.3 的 ARSL 基因异常造成的,ARSL 基因具有高度同源的序列,可逃避 X 染色体失活,它有相关基因的伪基因位于 Y 染色体上,故当一条 X 染色体携带 ARSL 基因变异位点时,男性因只有一条 X 染色体,几乎都为患者,女性往往因一条染色体正常,常为致病基因携带者。

ARSL 基因属于硫酸酯酶家族的一员,其在细胞内定位于高尔基体膜上,主要负责编码芳香基硫酸酯酶 L。其变异形式多样,包括点突变、错义突变、无义突变、移码突变或剪接位点等、单一或多个外显子的缺失、整个基因的缺失、以及包含了 ARSL 基因的 X 染色体的易位、缺失等。有研究做过统计,在 ARSL 基因多个类型的变异中,点突变最常发生,且近 1/3 的点突变发生于 Xp22.3 的 5 号和

11 号外显子区域^[5]。ARSL 基因变异位点繁多,既往研究^{[4],[6-13]}显示 c.1743G>A 突变相对常见。且尽管检出基因变异位点相同,其临床表型却不尽相同,表明基因型与表型之间没有显著相关性。目前为止,已报道的 ARSL 基因变异位点均传递自患儿母亲^[4]。本案例检出 ARSL 基因同样为母源性,是发生于 10 号外显子区域的 c.1336 C>T (p.Q446X) 的无义突变,其所编码蛋白质的第 446 位的谷氨酰胺的密码子突变为终止密码子,终止编码。根据 ACMG 指南,该变异初步判定为疑似致病性变异 (PVS1+PM2_Supporting)^[2]。基因 ARSL 的突变会导致 X 连锁点状软骨发育不良 1 型 (OMIM:302950)。主要表现为:鼻梁凹陷;鼻中隔短小;短鼻;脊柱异常;骨骺点状钙化;全面发育迟缓;身材矮小;性腺功能减退症;小头畸形;手指短末节指骨;听力障碍;嗅觉丧失;白内障;鱼鳞病。本案例的胎儿在我院行超声提示:面中部凹陷,鼻梁扁平,双侧鼻骨可见但回声减低,脊椎椎管狭窄、羊水偏多、左心室强回声斑,引产胎儿外观见眼距增宽,面部扁平,鼻翼扁平,与上述临床表现基本符合,胎儿引产后因家属拒绝对死胎行 X 线检查,故胎儿是否存在点状软骨发育不良、脊柱是否存在异常以及是否合并其他系统异常等无法得知。

CDPX1 的病因部分也与多个遗传代谢性疾病有关,包括维生素 K 代谢异常、溶酶体酶代谢障碍、

过氧化物酶代谢异常以及胆固醇生物合成代谢紊乱等^[14]。也有研究指出母体自身免疫性疾病是点状软骨发育不良的病因之一,包括混合型结缔组织病、系统性红斑狼疮等^[10]。

X线是诊断 CDPX1 的可靠方法,但仅适用于产后或引产后患儿。对于宫内胎儿,产前超声是其首选的诊断方法,此外还可行 MRI 检查进一步确诊,但二者均是针对胎儿表型进行诊断。其基因分型主要依靠分子遗传学检测,是诊断 CDPX1 的金标准。染色体核型分析可检出约 25% 的患者在 X 染色体短臂上发生缺失或重组^[1],对于胎儿骨骼系统发育异常,单基因变异是其主要病因,WES 是其检测金标准,可检出约 88% 致病性变异病例^[7]。故当产前超声发现疑似 CDPX1 等胎儿骨骼发育异常时,应直接建议行 WES 检测以缩短检测周期,提高检出病因的可能性,也可为夫妻双方提供更加准确的产前诊断和遗传咨询,为其再生育提供了重要的优生优育指导,降低出生缺陷率。

大多数 CDPX1 预后较好,但若存在脊椎稳定性异常或上呼吸道狭窄致呼吸困难,则预后较差。由于该疾病常引起多器官功能损害,因此需要多学科的联合诊断及治疗,本案例多学科会诊结论示:目前超声发现胎儿一系列非致死性异常,如选择继续妊娠,后续需 B 超严密观察,并完善胎儿磁共振成像检查,出生后行 X 线进一步确诊,并于相应科室严密随访观察,对症支持治疗,必要时手术治疗,但后续妊娠及过程中,但不除外患儿随时胎死宫内及出生后猝死可能。但目前该病尚无针对性的治疗方案,只能以对症支持治疗为主,对于临床上怀疑该病的胎儿,应尽快完善全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)以明确病因,判断预后,为妊娠结局提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] MATOS-MIRANDA C, NIMMO G, WILLIAMS B, et al. A prospective study of brachytelephalangic chondrodysplasia punctata: identification of arylsulfatase E mutations, functional analysis of novel missense alleles, and determination of potential phenocopies[J]. *Genet Med* 2013, 15(8):650-657.
- [2] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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.
- [3] SHERER D M, GLANTZ J C, ALLEN T A, et al. Prenatal sonographic diagnosis of non-rhizomelic chondrodysplasia punctata[J]. *Obstet Gynecol*, 1994, 83(5 Pt 2):858-860.
- [4] 李林, 杜开先, 张晓莉, 等. ARSE 基因突变导致 X-连锁隐性遗传点状软骨发育不良的临床表型及基因型分析[J]. *中国全科医学*, 2021, 24(14):1831-1836, 1840.
- [5] KENNEDY J, JACKSON GC, BARKER FS, et al. Novel and recurrent mutations in the C-terminal domain of COMP cluster in two distinct regions and result in a spectrum of phenotypes within the pseudoa chondroplasia : Multiple epiphyseal dysplasia disease group[J]. *Hum Mutat*, 2005, 25(6):593-594.
- [6] 宋筱, 汪雪雁, 张雪萍, 等. 胎儿 X-连锁隐性点状软骨发育不良的产前诊断[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2024, 32(1):140-144.
- [7] 朱海燕, 陈媛媛, 牛艳艳, 等. X 连锁隐性点状软骨发育不良胎儿超声影像与基因变异分析[J]. *现代妇产科进展*, 2022, 31(5):360-362, 366.
- [8] BRUNETTI-PIERRI N, ANDREUCCI MV, TUZZI R, et al. X-linked recessive chondrodysplasia punctata: spectrum of arylsulfatase E gene mutations and expanded clinical variability[J]. *Am J Med Genet A*, 2003, 117A:164-168.
- [9] ZHANG L, HU H, LIANG D, et al. Prenatal diagnosis in a fetus with X-linked recessive chondrodysplasia punctata: identification and functional study of a novel missense mutation in ARSE[J]. *Front Genet*, 2021, 12:722694.
- [10] 刘太祥, 马晓路, 施丽萍. 新生儿 X 连锁隐性遗传点状软骨发育不良 1 例病例报告[J]. *中国循证儿科杂志*, 2019, 14(5):387-388.
- [11] 刘春英, 刘莲花, 赖华. 新生儿点状软骨发育不良一例[J]. *放射学实践*, 2022, 37(1):137-138.
- [12] 王彩君, 张耀东, 康文清, 等. 总结点状软骨发育不良临床特点及文献复习[J]. *临床研究*, 2019, 27(2):9-12.
- [13] 成胜权. 儿童常见遗传性骨病的临床及分子遗传学研究[J]. *中国儿童保健杂志*, 2022, 30(9):933-940.
- [14] JURKIEWICZ E, MARCINSKA B, BOTHUR-NOWACKA J, et al. Clinical and radiological pictures of two newborn babies with manifestations of chondrodysplasia punctata and review of available literature[J]. *Pol J Radiol*, 2013, 78(2) : 57-64.

[15] ZHUANG J, CHEN C, CHEN Y, et al. Identification of a Rare Variant of c. 1777G>A (p. G593S) in the COL1A1 Gene as the Etiology of Recurrent Osteogenesis Imperfecta by Whole-Exome Sequencing[J]. Front Pediatr, 2022,10:816090.

(收稿日期:2024-03-06)

编辑:姚红霞

· 视频导读 ·

胎儿骨骼系统发育不良的宫内诊断与干预及预后评估

魏瑗

(北京大学第三医院,北京 100191)



作者分享了国家重点研发课题“胎儿骨骼系统发育不良的宫内诊断与干预及预后评估”的主要科研成果。①建立给予超声数据的中国胎儿宫内生长曲线、胎儿生长的影响因素、胎儿生长速度曲线及个性化胎儿生长曲线。②探究胎儿骨发育异常的遗传学病因及预后。主要发现的新基因包括:FGFR3、COL1A1和COL1A2。非孤立性鼻骨发育异常胎儿染色体异常风险升高,最常见的核型异常为染色体数目异常,最常见为3号染色体微重复。对30例“三明治融合”畸形(一种Klippel-Feil综合征亚型)进行外显子测序,结果发现PAX1、MYO18B和FGFR2基因的突变与该疾病的发病相关。其中FGFR2(c.1750A>G)致病性变异可能性大。③对一例先天性挛缩蜘蛛指(congenital contractural arachnodactyly, CCA)有生育要求的患者进行了胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD),成功进行了遗传阻断,最后分娩了健康的婴儿。④通过对43个反复胎儿畸形家庭(其中骨发育异常家庭占比30.22%,13/43)进行遗传学分析,鉴定出和骨发育异常相关的基因有7个:DLL3、MATN3、GLDN、DYNC2H1、C2CD3、COL11A2、CHRNG。⑤通过线上讨论会,初步制定了骨骼系统发育不良疾病宫内诊断技术路线及专家共识。

最后,总结了课题成果的创新性:①首次建立了国内宫内生长速率曲线,包括EFW、AC、FDL、HC、BPD。②建立骨骼系统疾病基因筛查平台,筛选出骨骼发育异常新发突变基因如FGFR3、COL1A1、COL1A2以及KFS特殊亚型“三明治融合”致病基因FGFR2新的突变位点(c.1750A>G)。③课题组撰写的《母胎骨骼系统发育不良评估和管理专家共识》为国内首个针对胎儿骨骼系统发育异常的参考。④课题组成员首次在国内应用纳米孔三代测序技术检测人类染色体非整倍体样本,有望在24h内完成对染色体整倍性异常样本的快速检测和分析。

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2024.02.013