

国内第二例 *WDR62* 基因复合杂合突变导致的小头畸形病例报道

余丽华^{1,2} 丁红珂^{1,2} 周伟宁^{1,2} 张彦^{1,2} 曾玉坤^{1,2} 刘玲^{1,2} 尹爱华^{1,2*}

1. 广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442;
2. 广东省妇幼保健院 妇幼代谢与遗传病重点实验室, 广东 广州 511442)

【中图分类号】 R714.55 【文献标识码】 B

小头畸形 2 型(MIM# 604317)主要由 *WDR62* 基因(NM_001083961)突变引起,属于常染色体隐性遗传的神经发育障碍性疾病。*WDR62* 基因位于 19 号染色体长臂 1 区 3 带,包含 32 个外显子和 31 个内含子,编码 1523 个氨基酸的蛋白质,含有 15 个 WD 重复元件。*WDR62* 基因突变已被公认是造成小头畸形的第二大主要因素,这类患者主要以头围减少、轻度至重度精神发育迟滞为特征,但有部分临床症状表现差异较大,如大脑皮质畸形、性格行为、皮肤问题等^[1-3]。

目前,*WDR62* 基因突变导致小头畸形的案例较有限,并且其致病机制也尚不清楚。本次研究对广东地区 1 例小头畸形、精神发育迟滞的女性患儿应用高通量测序方法进行基因突变分析,为临床医生认识该疾病提供了更多的疾病临床表型和基因诊断线索,也为罹病家庭提供遗传咨询信息及产前诊断方向。

1 资料与方法

1.1 研究对象 患儿,女,现 14 岁,中国广东省汉族人,在 12 岁时因小头畸形、精神发育迟缓首次来广东省妇幼保健院医学遗传中心就诊。患儿父母为非近亲结婚且均表型正常,家族无类似病史。患儿母亲妊娠期间内无抽烟、嗜酒史,无服用药物及射线接触史。本研究经医院学术伦理委员会讨论通过,

受检者监护人签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 染色体核型分析 常规 G 显带(320400 条带)检测。

1.2.2 基因组 DNA 提取 抽取患儿及父母外周静脉血各 2ml,以乙二胺四乙酸二钾抗凝。使用 QIAGEN 公司生产的 Qiamp DNA Blood Mini Kit 对受检者外周血进行基因组 DNA 的提取,并用 Thermo NANO DROP 2000 分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度,要求 DNA 样本纯度 OD A260/A280 介于 1.8~2.0 之间。

1.2.3 染色体微阵列分析(CMA) 使用美国昂飞公司生产的 cyto750k 芯片进行 CMA 检测。检测结果使用 Chromosome Analysis Suite(ChAS; version2.1)软件进行分析。

1.2.4 疾病相关基因的高通量测序分析 将提取的患儿外周血全基因组 DNA 送至北京德易东方转化医学研究中心进行与脑发育异常相关的所有已知基因全外显子及相应剪切位点的高通量测序分析。

1.2.5 Sanger 测序验证 根据 NCBI 网站上 *WDR62* 基因的参考序列(NM_001083961.1),应用 Primer 3 软件对 *WDR62* 基因的第 9、30 号外显子设计 PCR 扩增引物,引物序列为:*WDR62-9F*: 5'-GGGTTGGGTGAAATGATGGG-3', *WDR62-9R*: 5'-AGCTTGTTAAGGGCAGGGAT-3', *WDR62-30F*: 5'-GCCATCAGTTCTGTGTGGTGGAG-3', *WDR62-30R*: 5'-GGACAGTCCTTGCTCCAGGG-3'。引物由天

一辉远广州基因科技有限公司合成。用 Sanger 测序对患儿及父母进行突变检测和验证。PCR 扩增体系如下: LA Taq 预混液 12.5 μl , 5mM betaine 5 μl , 正、反向引物各 1 μl , 模板 DNA 1 μl , 补 ddH₂O 至总体积 25 μl 。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 分钟; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 秒, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 秒, 共 40 个循环; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 分钟。PCR 产物送至天一辉远广州基因科技有限公司进行 Sanger 测序。

1.2.6 蛋白保守性分析 使用 <https://www.ebi.ac.uk> 网站上提供的多序列比对工具 Clustal Omega 对果蝇、斑马鱼、老鼠、大象、猪、苏门达腊猩猩、人类、黑猩猩共 8 个物种的 WDR62 蛋白进行保守性分析, 判断患儿携带 WDR62 基因的突变位点对应的蛋白在物种间是否保守。

2 结果

2.1 患儿临床表现 患儿在 12 岁时因小头畸形、精神发育迟缓首次来本院医学遗传中心就诊。据患儿母亲描述, 患儿 1 岁可独坐, 3 岁 6 个月可独行, 7 岁时首次出现癫痫症状, 随后平均每月发作一次。体格检查显示该头围小, 眼距宽, 前额倾斜, 大耳, 流涎, 左眼斜视, 皮肤白皙, 头发密度正常; 脾气暴躁, 情绪不稳定; 只能听懂简单的词, 不能说话, 无法正常沟通。头颅 MRI 提示患儿双侧大脑半球脑沟较少而浅, 呈巨脑回畸形, 灰质增厚, 双侧半卵圆中心少许小条状异常信号影, 胼胝体压部发育欠佳, 双侧

侧脑室体部轻度变大, 右侧上颌窦囊肿, 既往有癫痫病史。因其父母拟再次生育, 携患儿再次来本中心就诊。患儿现 14 岁, 身高 153cm, 体重 37kg, 头围 47cm, 月经初潮年龄 13 岁。月经初潮前, 患儿服用利必通(50mg, 一日三次)可减缓癫痫症状; 月经初潮后, 癫痫症状加重, 需同时加服德巴金(0.25g, 早晚各一次)。

2.2 染色体与微阵列分析 该患儿外周血染色体核型与微阵列分析检测均未发现异常。在充分知情同意后, 应用高通量测序方法对其进行疾病相关基因突变分析。

2.3 高通量测序的结果 对患儿的外周血 DNA 进行高通量测序, 发现患儿 WDR62 基因存在 2 个杂合突变, c. 1128C>A (C376 *, rs377726144) 和 c. 3620_3621delAG (Q1207Rfs * 29)。前者位于第 9 号外显子, 为无义突变, 使第 376 位半胱氨酸密码子 TGC 突变为终止密码子 TGA; 后者位于第 30 号外显子, 为缺失移码突变, 它们均导致编码的肽链提前终止。

2.4 患儿及其家系成员的 Sanger 测序验证 患儿父亲检测到 WDR62 基因 c. 1128C>A 突变, 患儿母亲检测到 c. 3620_3621delAG 突变(图 1)。可见患儿 WDR62 基因存在的 2 个杂合突变分别来源于患儿父亲和母亲。该家系符合常染色体隐性遗传规律。同时, 我们对 100 个正常人进行了突变筛查, 均未发现携带 WDR62 基因 c. 1128C>A 或 c. 3620_3621 delAG 突变。通过 NCBI 数据库查询发现

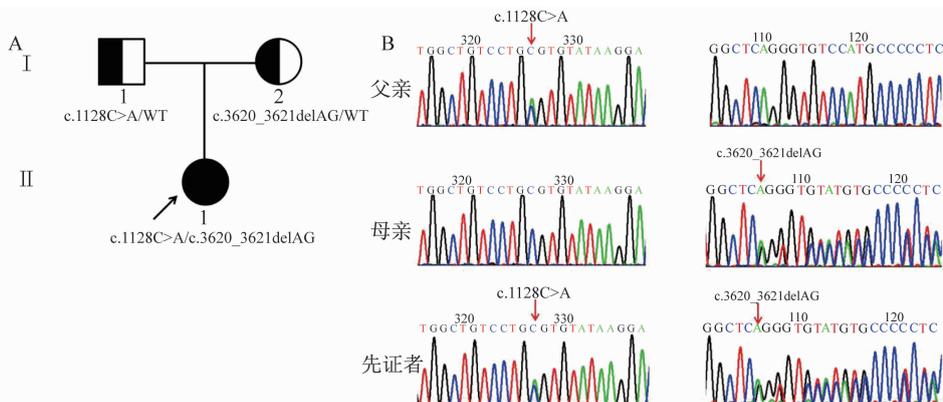


图 1 家系图及 Sanger 测序结果

A: 小头畸形患儿家系图; B: 患儿及父母 WDR62 基因突变位点 Sanger 测序结果, 箭头表示 c. 1128C>

A 突变位置及 c. 3620_3621delAG 缺失杂合峰开始的位置

c. 1128C>A 突变人群携带率小于万分之一,而 c. 3620_3621delAG 突变及携带率都未查出有相关文献报道,为首次报道的新突变。提示这 2 个位点在中国乃至世界突变频率都极低。

2.5 保守性分析 通过多序列比对发现果蝇、斑马鱼、老鼠、大象、猪、苏门达腊猩猩、人类、黑猩猩共 8 个物种的 WDR62 蛋白,发现患儿携带的 2 个 WDR62 基因突变位点所对应的蛋白 C376 及 Q1207 在物种间具有较高保守性(图 2)。

低等症状。而本案例患儿双侧大脑半球呈巨脑回畸形,灰质增厚,第三脑室和第四脑室无扩大和增宽,1 岁可独坐、3 岁可独行,7 岁出现癫痫症状且平均每月发作一次,皮肤白皙,无不寻常皮肤损伤以及头发密度正常,与 Banerjee 报道的患儿临床特征存在差异。Bhat 等^[4]于 2011 年报道了三个来自印度的近亲结婚家系共 6 位 WDR62 基因纯合突变患儿。这些患儿能独走,言语不佳,有癫痫发作史,前额倾斜,出现了有攻击性、冲动、容易发脾气,暴躁等行为问题,与本案例患儿临床特征较为相似。

WDR62 蛋白主要由 15 个重要的 WD 重复结构组成,我们使用 Clustal Omega 行多序列比对,发现这 15 个 WD 重复结构在不同物种间均呈高度保守。由于患儿携带的 WDR62 基因 c. 1128C>A (C376*)和 c. 3620_3621delAG(Q1207Rfs*29)突变,均导致编码的肽链截短,严重破坏了 WDR62 蛋白的 WD 重复结构,使 WDR62 蛋白无法行使其功能。此外,结合患儿出现精神发育迟缓、小头畸形等临床表型、国内外文献报道,强烈提示这 2 个突变位点为导致该病例患儿发病的主要遗传学因素。

有关 WDR62 在大脑发育过程中的功能和作用机制研究,以及 WDR62 基因突变如何导致小头畸形的致病机制尚不清楚。现有研究认为 WDR62 通过调控 JNK1 的活性参与脑发育过程中神经干细胞发育,敲除 WDR62 或 JNK1 的表达可引起神经干细胞发育的提前分化,神经元谱系建立及神经元迁移异常^[5,6]。

目前,小头畸形 2 型在治疗上主要以对症治疗、预防严重症状的出现为主,尚无有效的治愈手段。由于其临床表型差异大,也无法准确预测其严重程度,因此,做好遗传咨询和产前诊断工作,通过有效的分子遗传学检测避免受累家庭再生育患儿尤为重要。本研究丰富了常染色体隐性遗传的原发性小头畸形 2 型疾病的基因突变谱,并为临床医生认识该疾病提供了更多的遗传学信息及对应的疾病临床表型,也为该家庭的再次妊娠时的产前基因诊断提供了遗传咨询信息。

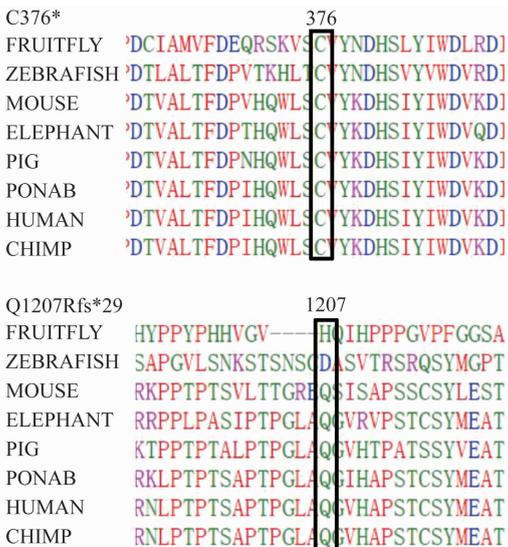


图 2 野生型 WDR62 蛋白在不同物种间的保守性分析
对果蝇、斑马鱼、老鼠、大象、猪、苏门达腊猩猩、人类、黑猩猩共 8 个物种的 WDR62 蛋白进行保守性分析,黑色框分别表示患儿 c. 1128C>A 及 c. 3620_3621delAG 突变对应第 376、1207 个氨基酸残基的位置

3 讨论

迄今为止,WDR62 基因突变导致小头畸形 2 型的国外案例较有限,而国内仅有一篇文献报道。根据现有文献报道可知小头畸形 2 型患者均有头围减少、精神发育迟滞,但其余临床表型差异大。Banerjee 等^[2]于 2016 年报道了第一例携带 WDR62 基因 c. 28G>T(A10S)及 c. 189G>T(E63D)突变的中国女患儿,该患儿除了头围减少、精神发育迟滞、胼胝体变薄外,还表现出第四脑室明显扩张,白质发育不良,不能独坐、独走,暂未有癫痫发作,皮肤上有多处散在的水疱,躯干色素沉着和头发密度降

参 考 文 献

[1] Nicholas AK, Khurshid M, Désir J, et al. WDR62 is associ-

ated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(11):1010-1014.

- [2] Banerjee S, Chen H, Huang H, et al. Novel mutations c. 28G>T (p. Ala10Ser) and c. 189G>T (p. Glu63Asp) in WDR62 associated with early onset acanthosis and hyperkeratosis in a patient with autosomal recessive microcephaly type 2[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48):78363-78371.
- [3] Kousar R, Hassan MJ, Khan B, et al. Mutations in WDR62 gene in Pakistani families with autosomal recessive primary microcephaly[J]. *BMC Neurol*, 2011, 11:119.
- [4] Bhat V, Girimaji SC, Mohan G, et al. Mutations in WDR62, encoding a centrosomal and nuclear protein, in Indian primary microcephaly families with cortical malformations[J]. *Clin Genet*, 2011, 80(6):532-540.

- [5] Zhang F, Yu J, Yang T, et al. A Novel c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling Complex Involved in Neuronal Migration during Brain Development[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(22):11466-11475.
- [6] Xu D, Zhang F, Wang Y, et al. Microcephaly-Associated Protein WDR62 Regulates Neurogenesis through JNK1 in the Developing Neocortex[J]. *Cell Rep*, 2014, 6(6):1176-1177.
- [7] Jamieson CR, Fryns JP, Jacobs J, et al. Primary autosomal recessive microcephaly: MCPH5 maps to 1q25-q32[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67(6):1575-1577.

(收稿日期:2018-07-21)

编辑:宋文颖