

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002027

2例 Cornelia de Lange 综合征病例报告 并 NIPBL 基因突变研究

龚春竹,程昕然,鄢力,苟鹏,李中会,唐芳,苏娜

(成都市妇女儿童中心医院内分泌遗传代谢科,成都 610091)

【摘要】目的:对 2 例生长发育迟缓伴有特殊面容及肢体发育异常的患儿进行基因检测,实现罕见病的精准诊断,为遗传咨询提供指导。**方法:**应用单基因检测及全外显子组高通量测序技术对临床疑似 CdLS 患儿进行致病基因突变筛查,并行一代测序验证以及患儿父母的验证。**结果:**本研究中的 2 例患儿均检测到国内外尚未报道的 NIPBL 基因突变, c.2252 dupA、p.Asn751Lysfs 以及 NM-015384.4:c.6179dupA,父母均无携带,为新生变异。**结论:**对于发育迟缓伴特殊面容及肢体异常的患儿要考虑到 Cornelia de Lang 综合征可能,采用基因检测手段实现精准诊断,为患者及家属遗传咨询提供依据。

【关键词】Cornelia de Lang 综合征;NIPBL;基因突变**【中图分类号】**R729**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-12-05

作者介绍:龚春竹,Email:308258907@qq.com,

研究方向:儿童内分泌及遗传代谢疾病的研究。

通信作者:程昕然,Email:411870716@qq.com。

基金项目:四川省科技计划资助项目(编号:2019JDPT0034)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190321.1320.002.html

(2019-03-22)

- [2] Joannidis M, Druml W, Forni LG, et al. Prevention of acute kidney injury and protection of renal function in the intensive care unit; update 2017: expert opinion of the Working Group on Prevention, AKI section, European Society of Intensive Care Medicine[J]. Intensive Care Med, 2017, 43(6): 730-749.
- [3] Weisberg A, Park P, Cherry-Bukowiec JR. Early goal-directed therapy: the history and ongoing impact on management of severe sepsis and septic shock[J]. Surg Infect, 2018, 19(2): 142-146.
- [4] Miranda M, Balarini M, Caixeta D, et al. Microcirculatory dysfunction in sepsis: pathophysiology, clinical monitoring, and potential therapies[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 311(1): H24-35.
- [5] Lu Y, Zhang H, Teng F, et al. Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock: a meta-analysis and trial sequential analysis of randomized controlled trials[J]. J Intensive Care Med, 2018, 33(5): 296-309.
- [6] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock[J]. Lancet, 2018, 392(10141): 75-87.
- [7] Kelm DJ, Perrin JT, Cartin-Ceba R, et al. Fluid overload in patients with severe sepsis and septic shock treated with early goal-directed therapy is associated with increased acute need for fluid-related medical interventions and hospital death[J]. Shock, 2015, 43(1): 68-73.
- [8] Zarbock A, Gomez H, Kellum JA. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies[J]. Curr Opin Crit Care, 2014, 20(6): 588-595.
- [9] Litton E, Morgan M. The PiCCO monitor: a review[J]. Anaesth In-

tensive Care, 2012, 40(3): 393-409.

- [10] Vlahu CA, Lemkes BA, Struijk DG, et al. Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(11): 1900-1908.
- [11] Ince C. The central role of renal microcirculatory dysfunction in the pathogenesis of acute kidney injury[J]. Nephron Clin Pract, 2014, 127(1-4): 124-128.
- [12] Prowle JR, Bellomo R. Sepsis-associated acute kidney injury: macrohemodynamic and microhemodynamic alterations in the renal circulation[J]. Semin Nephrol, 2015, 35(1): 64-74.
- [13] Newman JH, Fanburg BL, Archer SL, et al. Pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2004, 109(24): 2947-2952.
- [14] Ait-Oufella H, Bourcier S, Lehoux S, et al. Microcirculatory disorders during septic shock[J]. Curr Opin Crit Care, 2015, 21(4): 271-275.
- [15] 万小健, 于光, 李金宝, 等. 胱抑素 C 在脓毒症行管的急性肾损伤中的诊断价值[J]. 中华临床医师杂志, 2010, 4(5): 568-573.
- [16] Ostermann M, Joannidis M. Acute kidney injury 2016: diagnosis and diagnostic workup[J]. Crit Care, 2016, 20(1): 299.
- [17] Nicholls K. Diabetic nephropathy—how might we prevent, retard, or cope with it[J]. Aust Fam Physician, 2005, 34(11): 933-936.
- [18] Rauch H, Motsch J, Bottiger BW. Newer approaches to the pharmacological management of heart failure[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2006, 19(1): 75-81.

(责任编辑:唐秋姗)

Two cases of Cornelia de Lange syndrome with *NIPBL* gene mutations

Gong Chunzhu, Cheng Xinran, Yan Li, Gou Peng, Li Zhonghui, Tang Fang, Su Na

(Department of Endocrine Genetics and Metabolism, Chengdu Women and Children Central Hospital of Sichuan Province)

[Abstract] **Objective:** To perform genetic testing on two children with growth retardation, unusual facies, and limb abnormalities, and to achieve precise diagnosis of a rare disease and provide guidance for genetic counseling. **Methods:** Single-gene sequencing and high-throughput whole-exome sequencing were used to detect mutations in children with clinically suspected Cornelia de Lang syndrome (CdLS), which were also confirmed by Sanger sequencing and the sequencing results from the parents. **Results:** Two children were found to have *NIPBL* gene mutations: c.2252 dupA, p.Asn751Lysfs and NM-015384.4: c.6179dupA, which had not been reported before. These were also de novo mutations, not detected in their parents. **Conclusion:** CdLS needs to be considered in children with growth retardation, unusual facies, and limb abnormalities. Genetic testing can be used to achieve precise diagnosis and provide genetic counseling for patients and their families.

[Key words] Cornelia de Lang syndrome; *NIPBL* gene; gene mutation

Cornelia de Lange 综合征 (Cornelia de Lange syndrome, CdLS) 是一种罕见的先天发育异常综合征, 在全球范围内都有零星报道, 不存在种族特异性。该病的发病率估计为 (0.5~10)/100 000, 但由于一些轻型病例被漏诊, 故确切的患病率尚不清楚^[1]。该病典型的临床特征为严重的生长迟缓、认知障碍、特征性的面容和肢体缺陷^[1-2]。CdLS 临床表型跨度大, 可累及包括胃肠道、心脏、肾脏、听力、视力等多个组织器官的发育异常^[3]。由于 CdLS 的罕见性与临床异质性, 使得临床医生仅根据患者表型不容易做出准确诊断, 需要借助分子诊断来提高 CdLS 的诊断准确率。

目前已报道的 Cornelia de Lange 综合征相关基因有 *NIPBL*、*SMC1A*、*SMC3*、*HDAC8*、*RAD21*、*EP300* 和 *ANKRD11*, 其中 *NIPBL* 基因突变占 50%^[4-5]。本研究对 2 例临床提示 Cornelia de Lang 综合征的患儿行相关基因检测, 并应用 Sanger 测序法对突变基因的家系进行分析和验证, 发现 2 种未见报道的 *NIPBL* 基因新突变。

1 资料与方法

1.1 研究对象

患儿 1: 女, 1 岁 2 个月, 因生长迟缓, 发育落后就诊。患儿 G₂P₁, 足月顺产, 出生体质量 2.5 kg (-1.89SD), 身高 48 cm (-1SD), 无窒息史; 母孕期无特殊病史, 产前检查发现胎儿室间隔缺损。父母健康, 否认近亲婚配, 无类似家族史。生后反复因发热住院, 多次诊断为肺炎。患儿听力减低, 新生儿期喂养困难, 体质量增长缓慢。患儿来我院就诊时不会独坐, 不会站立, 不会走路, 不会说话。体格检查: 体质量 5 kg (-4.89SD),

身高 61 cm (-5.82SD), 头围 39 cm (-5.42SD)。特殊面容 (图 1A): 浓眉、连眉, 睫毛长而卷曲, 长人中且突出, 鼻短小且鼻孔前倾, 小下颌, 口唇薄而口角下垂, II 度腭裂; 躯干皮肤多毛, 四肢短小, 双手通贯掌, 心脏听诊闻及 III/VI 级杂音, 肺部听诊及腹部触诊无异常发现, 外生殖器无异常。皮肤有明显花斑纹。辅助检查: 脑干听觉诱发电位: 异常; 染色体核型 46, XX; 头颅 MRI: 双侧侧脑室周围脑白质容量略显少, 双侧侧脑室稍大; 双侧中耳乳突炎; 心脏彩超: 室间隔缺损, 右位主动脉弓; 甲功五项、肝肾功能、血常规等检查未见异常。

患儿 2: 男, 1 岁, 因生长、发育落后就诊。查体: 身高 62 cm (-5.03SD), 体质量 5 kg (-4.58SD), 头围 38 cm (-6.67SD), 特殊面容 (图 1B): 毛发浓密, 连心眉, 睫毛长且弯曲, 短鼻且鼻孔前倾、长且凸出的人中、鼻梁塌陷、小下颌、口唇薄而口角下垂、高腭弓。心肺听诊无异常, 四肢肌张力高, 脐疝, 肢体异常 (图 1C、D): 右脚第 1、2 脚趾并趾、手脚小。现不会独坐。既往史及出生史不详。



图 1 患儿特殊面容及肢体异常

1.2 方法

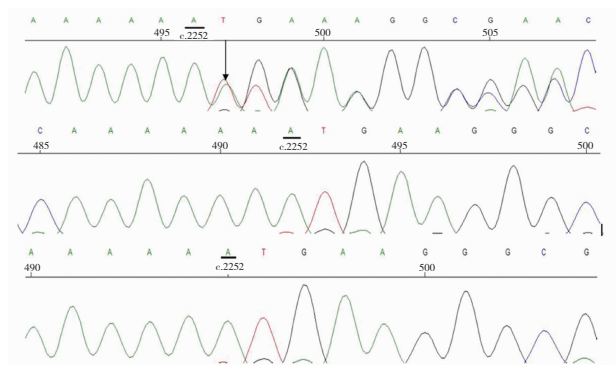
1.2.1 DNA 提取 与患儿家属充分沟通并签署知情同意书,获得成都市妇女儿童中心医院伦理委员会审批通过后,采集患儿及其父母空腹静脉血各 2 mL(EDTA 抗凝),采用天根生化基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化)来进行外周血基因组 DNA 提取,置-20℃保存。

1.2.2 基因测序、突变验证及分析 患儿 1 采用 *NIPBL* 单基因突变检测。提取患儿的基因组 DNA,引物设计根据 GenBank 人类 *NIPBL* 基因序列(NG_006987.1),采用 primer 3 在线软件设计,PCR 反应体系 50 μL,含 100 ng 模板 DNA,引物 10 pmol, dNTPs 终浓度 0.2 mol/L, *Taq* 酶 0.5 U(Takara 公司), Mg^{2+} 1.5 mmol/L。采用降落 PCR 进行扩增,PCR 反应条件为首先 95.0℃, 5 min。然后前 10 个循环:95.0℃, 30 s, 56.0℃~51.0℃, 30 s(每循环降落 0.5℃), 72℃, 2 min;后 30 个循环:95.0℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 2 min。最后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物用 ABI 3730 遗传分析仪进行检测。并对患儿父母的相应位点进行检测。

患儿 2 采用全外显子组高通量测序进行检测。提取患儿的基因组 DNA,用基于杂交的方法进行 DNA 扩增,并采用 Illumina 测序仪进行测序。测序结果参照基因组 GRCh37 进行序列比对,序列突变的检测和解读基于单一的临床相关转录本。DNA 扩增和分析集中于转录本的编码序列,外显子区域左右各 10 bp 的内含子序列,以及被证明是致病区域的特定内含子和基因间区域。对可疑候选突变的位点设计 PCR 引物进行扩增及进行 Sanger 测序验证,并对患儿父母的相应位点进行检测。所有区域的序列覆盖深度大于 50 倍。

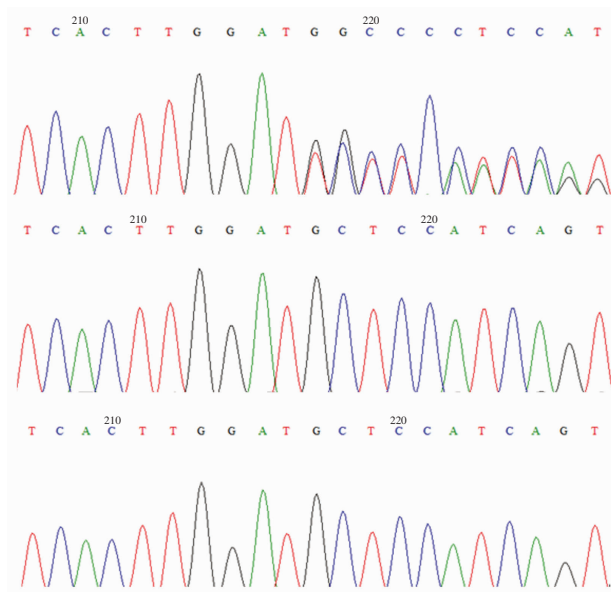
2 结果

检测发现患儿 1 在 *NIPBL* 基因第 10 外显子发生移码突变, Exon 10, c.2252 dupA, p.Asn751Lvsfs, 导致编码肽链提前终止,蛋白截短。对患儿父母进行基因突变位点验证,证实患儿父母该基因位点正常(图 2)。患儿 2 在 *NIPBL* 基因检测到一个杂合的移码突变, NM-015384.4: c.6179dupA, *IPBL* 基因 6 179 号增加碱基 A, 使得 *NIPBL* 蛋白 2060 号密码子由组氨酸移码突变为谷氨酰胺, 且其下游第 4 位密码子变为终止密码子。应用 Sanger 测序进行患儿突变验证及父母分析、检测, 患儿父母该基因位点正常(图 3)。



患儿 1 在第 10 外显子发生碱基插入: c.2252 dupA, 其父母该位点正常

图 2 患儿 1 及其父母的 *NIPBL* 基因测序



患儿 2 在 *NIPBL* 基因 6179 号增加碱基 A, 其父母该位点正常

图 3 患儿 2 及其父母的 *NIPBL* 基因测序

NIPBL 基因的 c.2252 dupA 以及 c.6179dupA 这 2 例突变经查询 ClinVar 数据库以及 ESP6500si v2_ ALL、千人基因组数据库, 均未见报道和收录。

3 讨论

CdLS 是一种累及多个器官系统的遗传异质性疾病, CdLS 与 cohesin 复合体相关蛋白编码基因发生有害变异有关。Cohesin 复合体是确保染色体在有丝分裂和减数分裂过程中正确分离的关键因素, 还可和染色体特异性结合, 参与 DNA 损伤后的修复及基因表达的调控^[6]。

目前已发现的 CdLS 由 *NIPBL* 基因突变引起者最多。*NIPBL* 基因位于 5p13.2, 编码 Nipped-B 样蛋白, 是 cohesin 复合物的重要调节因子^[5], 在胚胎发育过程中对多个器官组织的发生发育都有重要作用。*NIPBL* 基因突变使 Nipped-B 样蛋白活性或表达水平降低, 从而导致 CdLS 的发生^[4,7]。*NIPBL* 基因的突变类型包括错义突变、无义突变、框移突变、剪接位点突变以及基因内片段缺失等。截至目前, ClinVar 数据库数据库已收录 578 个 *NIPBL* 基因变异。本研究中的 2 例患儿均检测到国内外尚未报道的 *NIPBL* 基因突变, 即 c.2252 dupA 以及 c.6179dupA, 应为新型突变, 在正常人群数据库(GnomAD)中均未见到等位基因频率报道, 提示该变异人群频率极低。c.2252 dupA 变异导致编码肽链提前终止, 蛋白截短。c.6179dupA 变异使得 *NIPBL* 蛋白 2 060 位由

组氨酸移码突变为谷氨酰胺,且其下游第 4 位密码子变为终止密码子,导致蛋白截短。多个预测软件(Polyphen-2,SIFT)评估这 2 种变异可能对蛋白功能有害或可能致病。本课题组根据美国遗传学会(ACMG)发布的致病变异分级指南^[8],将本研究中的 *NIPBL* 基因的 2 个变异:c.2252 dupA 以及 c.6179dupA 分级为可能致病变异。

CdLS 的基因型与临床表型密切相关。Selicorni 等^[2]将临床诊断为 CdLS 的患者进行分类比较发现,*NIPBL* 基因突变检测阳性的患者与阴性患者相比,出生后生长发育、肢体缺陷、语言障碍等方面表现更为严重。Mehta 等^[9]发现在有基因突变的个体中,*NIPBL* 突变最容易出现肢体缺陷。Marchisio 等^[10]研究发现 *NIPBL* 截短突变的比率和 CdLS 患儿中有神经性听力损失患儿的比例类似。有研究显示 *NIPBL* 基因突变中框移突变、无义突变表型最为严重,剪接突变的表型严重程度为中度,而错义突变的表型相对较轻^[11]。

本研究中 2 例患儿均在幼儿期因生长发育迟缓就诊。婴幼儿期导致生长发育迟缓的疾病复杂多样,临床诊断存在一定困难。但本研究中 2 例患儿均具有特殊面容如毛发浓密、弓形眉、连体眉、睫毛长且弯曲,以及短鼻及小下颌。患儿 1 伴有先心病(房间隔缺损)和特殊皮纹、腭裂、多毛、小手,患儿 2 有右脚第 1、2 脚趾并趾,因此均高度提示 Cornelia de Lange 综合征。几乎所有的 CdLS 患儿表型都会累及上肢发育异常,下肢发育异常报道较为罕见^[12],本研究中病例 1 患儿仅表现为小手,病例 2 表现为右脚第 1、2 脚趾并趾,手脚小,这是国内已报道 CdLS 患者中第 2 例四肢骨骼发育异常累及下肢远端。

染色体核型分析及基因检测常常是发育迟缓伴有特殊面容及其他畸形的患儿病因诊断的常用检查手段,本研究中病例 1 临床表现典型,接诊医生对该病有丰富的诊断经验,采用单基因检测方法检测到阳性结果,减轻了家属的经济负担。赵云静等^[13]报道应用外显子组捕获高通量测序 CdLS 相关基因,检测阳性率高,可避免不必要的检查。因此,对于发育迟缓并伴特殊面容及肢体异常等特征的患儿要考虑到 Cornelia de Lange 综合征可能,可根据临床选择合适的基因检测手段,争取实现精准诊断,并为遗传咨询提供可靠的依据。

综上所述,对 2 例临床怀疑 Cornelia de Lange 综合征的患儿进行基因检测,对检测发现的 *NIPBL* 基因变异进行遗传学分析与父母验证,证实该变异为

新生变异,这 2 例变异既往未曾报道。病例 2 第 1、2 脚趾并趾,为国内第 2 例描述 CdLS 患者下肢远端的异常。本研究结果不仅丰富了 CdLS 疾病的基因谱,还丰富了该病的疾病表型谱,为 CdLS 患者及家属遗传学分子诊断与遗传咨询提供了丰富证据。

参 考 文 献

- [1] Barisic I, Tokic VM, Bianchi F, et al. Descriptive epidemiology of Cornelia de Lange syndrome in Europe[J]. Am J Med Genet A, 2008, 146A(1):51-59.
- [2] Selicorni A, Russo S, Gervasini C, et al. Clinical score of 62 Italian patients with Cornelia de Lange syndrome and correlations with the presence and type of *NIPBL* mutation[J]. Clinical Genetics, 2007, 72(2): 98-108.
- [3] Kline AD, Krantz ID, Sommer A, et al. Cornelia de Lange syndrome: clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance[J]. Am J Med Genet A, 2007, 143A(12):1287-1296.
- [4] Krantz ID, McCallum J, Descipio C, et al. Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in *NIPBL*, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B[J]. Nature Genetics, 2004, 36(6): 631-635.
- [5] Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, et al. *NIPBL*, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome[J]. Nature Genetics, 2004, 36(6):636-641.
- [6] Dorsett D. Cohesin, gene expression and development: lessons from *Drosophila*[J]. Chromosome Res, 2009, 17(2): 185-200.
- [7] Hulinsky R, Byrne J L, Lowichik A, et al. Fetus with interstitial del(5)(p13.1p14.2) diagnosed postnatally with Cornelia de Lange syndrome[J]. Am J Med Genet A, 2005, 137A(3):336-338.
- [8] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. 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.
- [9] Mehta D, Vergano S A, Deardorff M, et al. Characterization of limb differences in children with Cornelia de Lange syndrome[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2016, 172(2): 155-162.
- [10] Marchisio P, Selicorni A, Bianchini S, et al. Audiological findings, genotype and clinical severity score in Cornelia de Lange syndrome[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2014, 78(7): 1045-1048.
- [11] Mundlos S, Horn D. Limb Malformations[M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- [12] Jackson L, Kline AD, Barr MA, et al. de Lange syndrome: a clinical review of 310 individuals[J]. American Journal of Medical Genetics, 1993, 47(7): 940-946.
- [13] 赵云静, 麻宏伟. 2 例 Cornelia de Lange 综合征患儿 *NIPBL* 基因突变研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2018, 20(5):387-391.

(责任编辑:唐秋姗)