

临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002252

一例 Bainbridge-Ropers 综合征患儿遗传病因分析

白 冰,章锦曼,苏 洁,张 杰,靳婵婵,朱宝生

(云南省第一人民医院儿科,昆明 650032)

【摘要】目的:运用遗传学检测方法分析一例具有重度发育迟缓合并先天性心脏病等多发畸形的罕见病患儿的遗传学病因。**方法:**采集患儿病史、进行临床辅助检查,提取患儿及父母的外周血基因组 DNA。用 Agilent SureSelect 系统构建患儿 DNA 全外显子组测序文库,用 Illumina 平台进行测序,对检测到的疑似致病突变在患者及其父母亲血样中进行 Sanger 测序法验证。**结果:**全外显子组测序和家系验证发现患儿 *ASXL3* 基因存在 c.1349dupT;p.I450fs 杂合移码突变,为新发突变,根据 ACMG 变异解读标准与指南判定该变异为致病变异,该突变国内外未见报道。患儿具有喉骨软化、手指背屈特征,目前尚无 Bainbridge-Ropers 综合征(Bainbridge-Ropers syndrome,BRS)患者携带上述表型的报道。同时患儿 *DCHS1* 基因携带已知二尖瓣脱垂 2(mitral valve prolapse 2, MVP 2)杂合致病突变 c.G7538A;p.R2513H,该突变已经过细胞和动物试验验证。敲除 *DCHS1* 基因可导致斑马鱼房室管畸形,因此 *DCHS1* 基因 c.G7538A 突变可能与患儿房间隔缺损(asparagine, Asn)有关。*DCHS1* 基因突变遗传自患儿父亲,但其父经超声心动图和心电图检查未见心脏结构及功能异常,该致病突变在本家系中外显不全。**结论:**本研究丰富了 *ASXL3* 基因的致病突变谱和 BRS 表型谱,第一次报道了携带多个致病突变的 BRS 患者。

【关键词】Bainbridge-Ropers 综合征;房间隔缺损;全外显子组测序

【中图分类号】J596.2

【文献标志码】B

【收稿日期】2019-03-22

Identifying the genetic etiology of a child with Bainbridge-Ropers syndrome

Bai Bing, Zhang Jinman, Su Jie, Zhang Jie, Jin Chanchan, Zhu Baosheng

(Department of Pediatrics, First People's Hospital of Yunnan)

【Abstract】Objective: To analyze the genetic etiology of a child affected by severely developmental delay, atrial septal defect and a series of complicated phenotypes. **Methods:** The child has undergone history taking and physical examination. Genome DNA was extracted from peripheral blood samples of the proband and his parents. Candidate genes were captured with Agilent SureSelect and sequenced on an Illumina platform. Suspected mutation was identified and verified by Sanger sequencing. **Results:** By whole exome sequencing, we found a heterozygous frameshift mutation in proband's *ASXL3* gene (*ASXL3*; c.1349dupT; p.I450fs) and identified it as pathogenic variant according to the ACMG standards and guidelines for the interpretation of sequence variants. And our candidate has cartilaginous ossification of larynx and dorsiflexion of finger, which are never been reported in other Bainbridge-Ropers syndrome (BRS) patients. Meanwhile, we found a reported mitral valve prolapsed 2 (MVP2) pathogenic variant *DCHS1*; c.G7538A; p.R2513H. The function of this variant has been proved by cell and animal experiments. The knock-out of *DCHS1* in zebra fish resulted in a cardiac atrioventricular canal defect and the atrial septal defect in our proband could also be attributed to *DCHS1* mutation. The proband's mutant is inherited from his father, however no cardiac function and structure abnormality were observed in his father by ultrasonic cardiogram and electrocardiogram. This might be due to nonpenetrance. **Conclusion:** Our study broadened the mutant and phenotype spectrum of *ASXL3*. And we reported the first Bainbridge-Ropers patient with other pathogenic variant.

【Key words】Bainbridge-Ropers syndrome; asparagine; whole exome sequencing

Bainbridge-Ropers 综合征 (Bainbridge-Ropers syndrome, BRS, OMIM:615485) 是一种智力障碍综

作者介绍:白 冰, Email:57559597@qq.com,

研究方向:儿童发育障碍的遗传病因检测。

通信作者:朱宝生, Email:bszhu@kmust.edu.cn。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190903.1505.014.html>

(2019-09-04)

合征,起病于新生儿期或婴儿期,发病率约小于 1/100 万,属于罕见病,致病基因为 *ASXL3*^[1],目前为止国内仅有 1 例病例被报道^[2]。该疾病为常染色体显性遗传方式,患者主要表现为小头、严重喂养困难、严重的全面性发育迟缓、智力低下、肌张力低下、特殊面容等^[3]。2018 年云南省第一人民医院儿科

收治 1 名重度发育迟缓合并先天性心脏病等多发畸形的罕见病患儿,按临床症状和体征无法确诊,对患儿行全外显子组检查,检出 *ASXL3* 基因突变后确诊为 BRS。同时发现患儿 *DCHS1* 基因携带已知杂合致病突变,且有功能实验证实该突变可导致 *DCHS1* 蛋白表达水平下调 70%,*DCHS1* 基因为二尖瓣脱垂 2 (mitral valve prolapse 2, MVP 2, OMIM: 607829) 致病基因,为常染色体显性遗传模式^[4]。该疾病表现为二尖瓣脱垂、二尖瓣反流、二尖瓣叶增厚、二尖瓣小叶黏液瘤变性等^[5]。同时实验已证明 *DCHS1* 基因缺失可导致斑马鱼房室管畸形,房室管畸形属于复杂性先天性心脏病,可包括房间隔缺损 (asparagine, Asn) 体征,因此患儿携带 *DCHS1* 突变可能与其心脏 Asn 有关^[4]。由于 BRS 为罕见疾病,本研究对其致病突变谱与对应的临床表型的了解还非常有限,因此,进一步报道和研究这类病例具有重要临床意义。同时携带多个致病突变的案例极为少见。本研究报道并分析了第一例携带多个致病突变的 BRS 患者,将为深入理解这类复杂疾病的表型及分子水平遗传致病因素提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 病例资料

患者,男,2 岁,汉族,因严重生长发育迟缓合并肌张力低下、喂养困难、特殊面容、Asn 等就诊。患儿体质量 8.5 kg (参考范围 11.2~14.0 kg)、身高 78 cm (参考范围 84.3~91.0 cm)、头围 43 cm (参考范围 44.6~52.5 cm)。三项指标均低于同龄儿童第 3 百分位。6 月龄时进行 Gesell 发育量表评估,总分 7 分,大运动、精细运动、认知水平、语言、社交行为发育水平分别相当于 2.8 月龄、2.8 月龄、1 月龄、3.5 月龄、2 月龄,均低于同龄儿童第 5 百分位。现可独坐,不能行走,四肢肌张力低;语言发育迟缓,无意识叫“爸爸妈妈”;严重喂养困难,胃食管反流,呕吐,流涎,高腭弓,喉骨软化;特殊面容,细长眉,连眉,眼距宽,下唇外翻,鼻孔前倾 (图 1A);右手无名指背屈 (图 1B);易患上呼吸道感染;心脏彩超提示心脏 Asn (6 mm),心电图提示窦性心动过速;脑部核磁共振提示脑外间隙增宽;脑电图未见异常;否认自闭行为及抽搐史。患者父母属于非近亲婚配,身体健康,家系图如图 2A 所示。母亲孕史无特殊,患儿系第 1 胎第 1 产,足月顺产,出生体质量 2.8 kg,身长 47 cm,无新生儿窒息、感染史等。外院行遗传代谢筛查、染色体 400 带、微阵列比较基因组杂交检查未见明显异常。



A. 患者面部正面照,可见患者细长眉、连眉、眼距宽、下唇外翻、鼻孔前倾



B. 患者右手正面照,可见无名指背屈

图 1 患者面部及手部照片

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 本研究符合作者所在单位人体试验伦理委员会所制定的伦理学标准。获得知情同意后,在云南省第一人民医院抽取患儿及其父母的静脉血 2 mL。根据 E.Z.N.A.® 全血 DNA 试剂盒 (cat. no. D3392-02; Omega Bio-tek, Inc, USA) 操作流程提取基因组 DNA。使用 NanoPhotometer (IMPLEN, CA, USA) 对 DNA 质量进行评估,获得高纯度的 DNA ($A_{260}/A_{280} > 2.0$; $A_{260}/A_{230} > 2.0$) 约 3 μ g。

1.2.2 全外显子组测序 获得患儿的高质量 DNA 后,采用 Agilent Sure Select Human All Exon V6 外显子靶向序列富集系统对人的外显子序列进行捕获。每个样品取用 2 μ g DNA 模板,根据 TruSeq DNA Sample Preparation Guide (Illumina, 15026486 Rev.C) 方法及流程进行文库制备,而后使用 Illumina HiSeq 平台进行测序。

1.2.3 Sanger 测序验证 对全外显子组测序检测出的疑似致病位点在患者本人及其父母中进行验证,具体使用一代 ABI 3730XL 自动测序仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 检测发现的疑似致病突变,引物序列使用 Primer3 设计。使用 AmpliTaq Gold 聚合酶 (Thermo Fisher Scientific, USA) 对目标区域进行 PCR 扩增,并使用 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen, Germany) 对产物进行纯化,而后使用 ABI BigDye Terminator

v3.1 Cycle 测序试剂盒(Thermo Fisher Scientific, USA)进行测序。获得数据后用 DNASTar software(DNASTar, Inc., Madison, WI)软件进行解析。

2 结果

全外显子组检测结果(图 2A)发现患儿 *ASXL3* 基因 11 号外显子存在 c.1349dupT; p.I450fs (Chr18:31318716) 杂合单碱基插入, 属于移码突变, 破坏了第 450 密码子后的开放阅读框。上述突变在公共 SNP 数据库 genomAD、ExAC、1000 Genomes、dbSNP、ESP 等中未见报道, 不属于人群多态性位点。通过一代检测验证发现其父母均未携带该突变, 该突变为新发突变(图 2B)。根据 ACMG(American College of Medical Genetics)序列变异解读标准与指南^[6]对该变异进行分析: ①该变异为移码突变, 导致基因功能缺失(PVS1); ②新发变异, 仅有患儿携带该突变, 其父母未检出(PS2); ③该变异在 Exac、千人数据库、ESP 中的未见报道(PM2); ④患儿临床症状与 Bainbridge-Ropers 综合征表型高度相符(PP4)。综上所述, *ASXL3* 基因 c.1349dupT 突变为患儿致病突变。并且通过表型比对发现, 本研究患者所具有喉骨软化及手指背屈 2 个临床表型并未在其他的 Bainbridge-Ropers 综合征患者中被报道。

此外, 在患儿 *DCHS1* 基因 21 号外显子中检测到已知 MVP 2 致病杂合突变 c.G7538A; p.R2513H (Chr11:6645369), 在人群数据 Exac 中的频率为 0.0005 (<0.005), 属于低频突变。该突变导致 *DCHS1* 基因 2513 号密码子发生了精氨酸到组氨酸的替换, 实验证实该突变可导致 *DCHS1* 基因的蛋白产物表达量下调 70%, 并且发现人类野生型 *DCHS1* 基因可以修复 *DCHS1* 同源基因敲除斑马鱼的房室管畸形, 但 c.G7538A 突变型不具有该功能^[9]。通过一代检测验证发现该突变遗传自患儿父亲(图 2C), 但父亲经超声心动图及心电图检查未见心脏功能及结构异常, 可能为外显不全。

3 讨论

BRS 是一种罕见的、早发型遗传疾病, 严重影

响儿童的健康水平, 自 2013 年 Bainbridge 等第一次报道该疾病, 目前为止共有 28 例记录了详细表型的患者, 其中国内 1 例。所有的患者均表现为精神运动发育迟缓, 语言发育迟缓, 中到重度智力低下, 其中约 90% 的患者肌张力低下, 约 80% 的患者具有特殊面容, 包括突出的前额、高腭弓、细长眉、眼距过宽、向下睑裂、长/管型鼻、鼻桥突出、鼻孔前倾, 耳位低、下嘴唇外翻等, 50% 喂养困难, 50% 手指细长及双侧腕部尺侧屈, 约 30% 宫外发育迟缓, 约 15% 宫内发育迟缓, 约 20% 抽搐, 还可以伴有脑白质异常、胼胝体薄、自闭特征、脊柱侧凸、扁平足等多种表型^[3,7-9]。该疾病临床异质性较高。例如, 本研究患者携带的喉骨软化、手指背屈这两个临床表型在其他病例中未见报道, 并且前期的研究发现携带相同突变位点的患者也可具有不同的临床表型^[9]。目前已知的致病突变共 31 个, 均为新发突变, 其中约 95% 导致翻译提前终止(剪切突变、移码突变、终止突变), 仅有 1 个错义突变。

本研究报道的患者符合 BRS 的主要症状, 所携带 c.1349dupT 突变的致病性评估及遗传模式也与之前的报道相吻合。*ASXL3* 基因属于 *ASXL* 基因家族, 编码多梳蛋白。*ASXL3* 基因包含 1 个与植物同源的锌指功能域, 在基因转录调控中扮演重要角色, 编码蛋白通过与核激素受体结合或抑制其转录活性负向调节脂肪生成, 并可抑制组蛋白去泛素化, 是参与胚胎发育、细胞增殖等过程的重要基因^[10]。*ASXL3* 基因共包含 12 个外显子, 致病突变 *ASXL3*; c.1349dupT; p.I450fs 位于 *ASXL3* 基因 11 号外显子区, 可导致 *ASXL3* 基因转录产物的提前终止, *ASXL3* 基因的所有功能域都位于 609 号氨基酸后, 从 450 号氨基酸开始的移码突变极有可能破坏了该基因的所有功能域, 导致携带突变的等位基因无法执行正常的功能、产物剂量不足, 从而使患儿

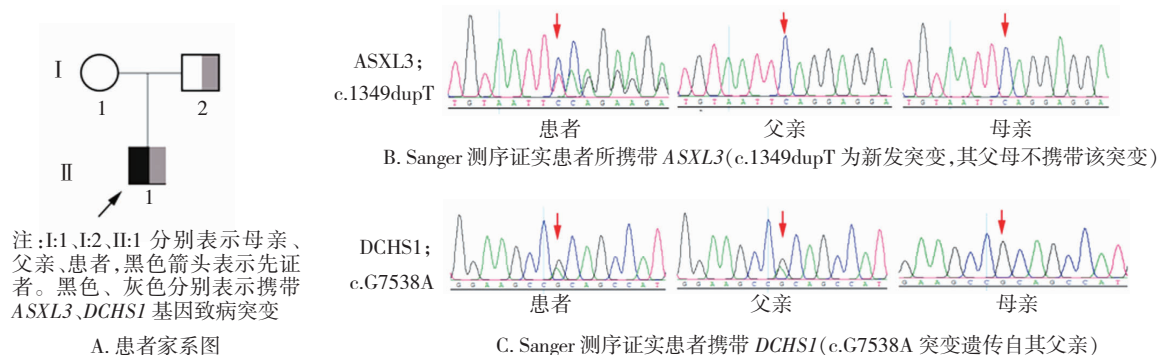


图 2 患者家系图及突变 Sanger 验证结果

发病。

在已报道的 28 例病例中,并未见合并心脏异常的患者,通过 PubMed、中国期刊全文数据库、万方数据知识服务平台库截至 2019 年 1 月进行搜索并未见 *ASXL3* 基因导致心脏发育异常的报道,且患者携带已知的二尖瓣脱垂 2 致病突变 *DCHS1*:c.G7538A;p.R2513H。*DCHS1* 基因属于钙黏素基因家族,编码钙依赖的细胞粘连分子。*DCHS1* 基因所编码的蛋白包含一个有 27 个重复的钙黏素重复区域和一个特有的细胞质区域,在二尖瓣膜形成过程中调控细胞迁徙,是参与二尖瓣形态发生的重要分子。c.G7538A 已经过细胞实验证实将导致 *DCHS1* 蛋白表达水平下调 70%,且 *DCHS1* 同源基因敲除可导致斑马鱼产生房室管畸形,人类野生型 *DCHS1* 基因可修复该表型,但 c.G7538A 突变型不具有修复功能^[4],该位点属于假阳性致病位点的可能性较小。虽然目前并未见研究明确报道 *DCHS1* 基因突变可导致人类 Asn,但房室管畸形可包括 Asn 表型,并且 *DCHS1* 基因属于细胞粘连分子,其功能的不完善很有可能导致心脏除二尖瓣外其他结构区域发生缺失。因此,患儿的心脏异常可能与其所携带的 *DCHS1*:c.G7538A;p.R2513H 突变有关。通过家系分析发现,患儿的父亲也携带该突变,但其心脏结构与功能未见异常。Durst 等^[4]在其所研究的二尖瓣脱垂 2 家系中发现并不是所有携带 *DCHS1*:c.G7538A;p.R2513H 突变的成员都会发病,部分小于 15 岁的携带者并未发病,说明 *DCHS1* 基因突变并不具有完全的外显率。因此,在本患病家系中,父亲全无表型可能属于外显不全,但与所报道家系不同的是,本患病家系中是年龄较小的突变携带者有临床表型,而年龄大的携带者完全健康。

综上所述,BRS 属于罕见病,发病率极低且临床特征异质性高,临床医师难以通过察体、实验室及影像学检查进行明确的诊断。本研究通过二代测序技术明确诊断了 1 例全面发育迟缓合并 Asn 等多发畸形的患儿的遗传病因,第一次报道了 *ASXL3*:c.1349dupT;p.I450fs 致病突变及 BRS 患者可具有喉骨软化、手指背屈的临床症状,丰富了该基因的致病突变谱和疾病的表型谱,促进了对其发病分子基础和高临床异质性的理解。但在本患者家庭中,明确诊断的 BRS 无法解释患者的心脏异常,*DCHS1* 基因致病突变已经过细胞实验验证可导致其表达

水平下调,且 *DCHS1* 基因敲除斑马鱼出现了房室管畸形,房室管畸形包括 Asn 表型,因此无法在患者家系中排除其为另一个突变致病的可能性,*DCHS1* 基因突变可能与人类的 Asn 有关。如何处理测序的额外发现,目前依然是全外显子组临床应用中的一个尚未明确的问题,但同时患有多种遗传疾病并从分子水平上获得证据支持的病例极为罕有,具有较高的临床和科研价值,将为今后开展这类复杂遗传疾病的临床分子诊断及进一步研究其发病机制提供珍贵的资料。

参 考 文 献

- [1] Bainbridge MN, Hu H, Muzny DM, et al. De novo truncating mutations in *ASXL3* are associated with a novel clinical phenotype with similarities to Bohring-Opitz syndrome[J]. *Genome Med*, 2013, 5(2): 11.
- [2] 张 锐, 贺小红, 林海英, 等. *ASXL3* 基因变异致 Bainbridge-Ropers 综合征一例并文献复习[J]. *中华儿科杂志*, 2018, 56(2): 138-141.
- [3] Balasubramanian M, Willoughby J, Fry AE, et al. Delineating the phenotypic spectrum of Bainbridge-Ropers syndrome: 12 new patients with de novo, heterozygous, loss-of-function mutations in *ASXL3* and review of published literature[J]. *J Med Genet*, 2017, 54(8): 537-543.
- [4] Durst R, Sauls K, Peal DS, et al. Mutations in *DCHS1* cause mitral valve prolapse [J]. *Nature*, 2015, 525(7567): 109-113.
- [5] Freed LA, Acierno Jr JS, Dai D, et al. A locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 11p15.4[J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(6): 1551-1559.
- [6] 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): 405-423.
- [7] Hori I, Miya F, Ohashi K, et al. Novel splicing mutation in the *ASXL3* gene causing Bainbridge-Ropers syndrome[J]. *Am J Med Genet A*, 2016, 170(7): 1863-1867.
- [8] Dinwiddie DL, Soden SE, Saunders CJ, et al. De novo frameshift mutation in *ASXL3* in a patient with global developmental delay, microcephaly, and craniofacial anomalies[J]. *BMC Med Genomics*, 2013, 6: 32.
- [9] Srivastava A, Ritesh KC, Tsan YC, et al. De novo dominant *ASXL3* mutations alter H2A deubiquitination and transcription in Bainbridge-Ropers syndrome[J]. *Human Mol Genetics*, 2016, 25(3): 597-608.
- [10] Ma RG, Zhang Y, Sun TT, et al. Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of CBX proteins[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014, 15(5): 412-428.

(责任编辑:张辉洁)