

1 例胎儿羊水过少的基因诊断及植入前诊断

丁红珂 余丽华 曾玉坤 刘玲 卢建 张彦 尹爱华*

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

【摘要】 目的 通过高通量测序的方法,检测超声发现的 1 例孕 25⁺周双肾回声增强、羊水过少的胎儿遗传学致病因素。并对该家系进行下一胎的遗传风险评估及再生育指导。**方法** 采用父母胎儿核心家系医学外显子测序技术分析可能的致病突变,并针对发现的突变位点进行植入前诊断。**结果** 发现异常胎儿 *ACE* 基因复合杂合变异 c. 1028G>A(p. W343*)和 c. 2948T>C(p. L983P),分别来自父亲和母亲。c. 1028G>A 变异可导致肽链合成提前终止,生成比野生蛋白少 963 个氨基酸的截断蛋白,且在相关病例中报道过。c. 2948T>C 变异为错义突变,生物信息学预测提示为有害突变,为本研究发现的突变。植入前诊断结果提示第三次妊娠胎儿未携带父母双方的变异位点,且超声提示未见肾脏和羊水量的异常。**结论** 通过核心家系的高通量测序,本研究发现了 *ACE* 基因 1 个已报道突变,1 个没有临床病例报道过的单碱基变异,结合 *ACE* 基因已知的功能学研究和该家系临床表现、遗传规律及后续的植入前诊断结果,提示这 2 个变异位点很可能是该家系的致病原因。

【关键词】 羊水过少;*ACE* 基因;高通量测序;植入前诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To detect the fetal genetic factors of double kidney echo enhancement and oligohydramnios by high throughput sequencing. Genetic risk assessment and reproduction guidance for the next child were carried out in the family. **Method** We performed exome sequencing of the proband-parent trio for molecular genetic analyses to find pathogenic mutation, and the preimplantation diagnosis was carried out for the mutation sites found. **Results** We identified the compound heterozygous variations of abnormal fetal in *ACE* gene, c. 1028G>A(p. W343*) and c. 2948T>C(p. L983P), which were derived from father and mother respectively. The reported variant c. 1028G>A was nonsense mutation resulted in the premature termination of peptide chain synthesis and the production of a truncated protein with 963 amino acids less than the wild type. The missense variant c. 2948T>C was the novel mutation, the bioinformatics prediction indicated that it was deleterious. The prenatal diagnosis indicated that the PDG embryo did not carry the mutation sites of both parents, and the second trimester ultrasound showed no abnormalities in the fetal kidney and amniotic fluid. **Conclusions** Through high-throughput sequencing of nuclear families, two point mutations without clinical case reported in the *ACE* gene were found in this study. Combined with known functional studies of *ACE* gene and clinical manifestations, genetic rules and PGD results of the family, it is suggested that these two mutations may be the causal factor in this family.

【Key words】 oligohydramnios;*ACE* gene;high-throughput sequencing;preimplantation diagnosis

羊水过少是妊娠常见并发症,发病率约 0.5%~5.5%^[1],常见于妊娠晚期。在没有泌尿生殖系统

结构异常的情况下,中孕期晚期超声检查显示羊水过少,应考虑肾小管发育不良(renal tubular dysplasia, RTD, OMIM: #267430)的可能^[2]。RTD 是一种以围产期死亡为主要特征的常染色体隐性遗传性疾

病,是由于肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)的任何一种基因失活所致,其中血管紧张素 I 转换酶(ACE)就是其中之一^[3]。ACE 是一种金属肽酶,属于谷胱甘肽金属蛋白酶家族^[3]。人类循环和组织中的 ACE 水平部分由 ACE 基因多态性决定^[4]。

在小鼠中,ACE 基因完全失活是可存活的,而在人类则导致严重低血压、肾灌注不足和 RTD,这是一种以出生时无尿或严重肾功能不全、缺乏肾近端小管分化和常见的围产期死亡为特征的严重肾脏疾病^[5]。目前人类 ACE 基因突变的临床病例致病性报道比较有限。有报道称 ACE 基因的纯合突变或复合杂合突变会导致 RTD 的发生,临床表现主要为严重的羊水过少、出生时的肾功能不全及出生后短时间内的死亡^[6]。在某些情况下,肾功能不全者需要出生之后的长期腹膜透析,例如发生 Q1069R 错义突变,导致 ACE 活性完全缺乏^[7,8]。

本研究在 1 例两次妊娠均出现胎儿双肾回声增强、羊水过少的家系中,通过对核心家系的高通量测序发现胎儿 ACE 基因复合杂合突变 c. 1028G>A (p. W343*) 和 c. 2948T>C (p. L983P),分别来自父母双方。其中 c. 2948T>C 至今未在相关病例中报道过,为新发现的突变。2 个位点在物种间均保守,其中 c. 1028G>A 人群频率非常低,可导致蛋白截断,并在 RTD 病例中被报道过^[6];c. 2948T>C 尚无人数据,生物信息学预测为有害突变。针对发现的 ACE 基因突变该家系进行了 PGD,植入不含这 2 个突变的胚胎,并于妊娠 18 周抽取羊水进行基因确诊,证实胎儿未携带父母突变,同时超声监测也未发现胎儿羊水和肾脏的异常。据此判断,本研究发现的 2 个突变位点很可能就是导致胎儿异常的原因,扩充了 ACE 基因的突变谱。

1 对象与方法

1.1 研究对象 33 岁孕妇,停经 25⁺ 周时,外院超声发现胎儿双肾回声增强,羊水极度过少(最大羊水深度<20mm)来本院产前诊断中心就诊,分析胎儿预后不良可能,孕妇及家属决定终止妊娠,并对胎儿进行相关遗传学分析。既往史:曾因孕 29 周发现胎

儿双肾回声增强、羊水过少引产 1 次。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 经孕妇及家属知情同意,终止妊娠时抽取胎儿脐带血 1ml 及父母外周血 2ml(ED-TA-Na 抗凝)进行相关遗传学检测,包括常规染色体及微阵列检测和必要时的高通量测序。PGD 术后,孕 18 周时在超声引导下行羊膜腔穿刺术抽取胎儿羊水 5~8ml,羊水 DNA 提取使用德国 Qigen 公司生产的 Qiamp DNA Blood Mini Kit 提取试剂盒进行基因组 DNA 提取。

1.2.2 染色体核型分析 采用 G 显带制备技术对脐血及外周血进行常规 G 显带(500~550 条带)检测。

1.2.3 染色体微阵列分析(CMA) 使用美国 Afymetrix 公司生产的 CytoScan 750k 芯片和扩增、杂交试剂盒进行 CMA 检测。参照 Infinium HD Assay 标准操作流程进行操作,检测结果使用 Chromosome Analysis Suite(Ch AS;version 2.1)软件进行分析。结果判读参照 DGV、ISCA、OMIM、DECIPHER 等数据库。

1.2.4 高通量测序 进行医学外显子(目前与人类疾病相关的 4000 个基因)父母胎儿(第二胎)核心家系高通量测序,包括 50 584 个编码区对应 8 421 879 个碱基,包含外显子与内含子交界区。使用 HiSeq2000 测序仪(Illumina, Inc., San Diego, CA)。

1.2.5 Sanger 测序 针对高通量测序发现的疑似致病位点进行一代验证。同时该方法也用于 PGD 术后胎儿羊水 DNA 检测确定基因型。

1.2.6 序列比对 参考序列数据来自 UCSC Genome Browser(<http://genome.ucsc.edu>)数据库,序列版本号:GRCh37/hg19。

1.2.7 植入前诊断 第二次妊娠异常胎儿发现基因突变后,告知单基因病致病位点意义不明确的相关遗传学再发风险,家属要求进行 PGD。首先针对父母及第二次有问题的胎儿进行家系单倍型构建,以 ACE 基因(NM_000789.3 chr17:61554422-61575741 正向转录)编码区为目标区域,并在基因上下游选择若干 SNP 位点作为遗传标记,高通量测

序,检测 SNP 位点基因型,选择其中相应位点构建单体型,进行连锁分析。通过分析父母来源的疑似致病位点单倍型间接判断胚胎基因型,选择未携带父母疑似致病位点的胚胎移植。移植成功后,孕 18 周行羊膜腔穿刺进行基因确诊。

2 结果

2.1 常规遗传学检测 第一胎外院检测提示胎儿染色体、比较基因组杂交(CGH)结果未见异常,未做进一步基因检测。第二胎胎儿脐血染色体核型及染色体微阵列分析未见异常。

2.2 高通量测序及致病性分析 父母胎儿(第二胎)外显子测序发现胎儿 ACE 基因(NM_000789.3)复合杂合疑似致病突变 c. 1028G>A(p. W343*,rs200225958)和 c. 2948T>C(p. L983P),分别遗传自父亲(c. 1028G>A)和母亲(c. 2948T>C)。其中 c. 1028G>A 位点,数据库收录的人群频率为: A=0.0002/1(1000 Genomes)和 A=0.00002/3(TOPMED)。该位点突变属于无义突变,可导致第 343 位氨基酸密码子变为终止密码子,从而使肽链合成提前终止,最终形成比野生型蛋白少了 963 个

氨基酸的截断蛋白,预测可严重影响蛋白功能。c. 2948T>C 位点数据库未见报道,该位点变异属于错义突变,可导致第 983 位氨基酸从亮氨酸(L)变为脯氨酸(P),生物信息学软件预测提示为有害突变(<http://provean.jcvi.org/index.php>)。

2.3 一代验证 分别针对 ACE 基因 c. 1028G>A 和 c. 2948T>C 位点进行父母胎儿的 Sanger 测序(图 1)提示,胎儿复合杂合,父母均为杂合携带。

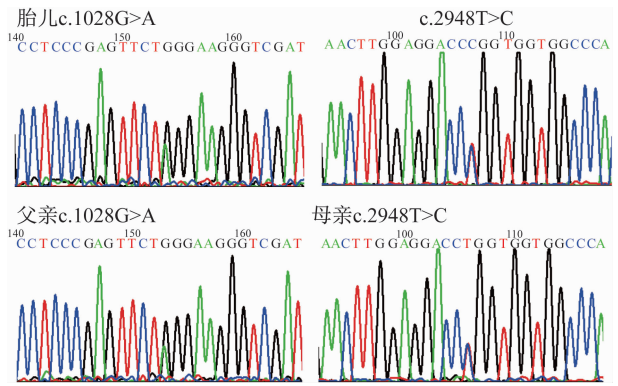


图 1 家系一代验证测序图

2.4 位点保守性分析 ACE 基因 c. 1028G>A 和 c. 2948T>C 位点的物种间较保守性序列比对(图 2),提示两位点在不同物种间高度保守。

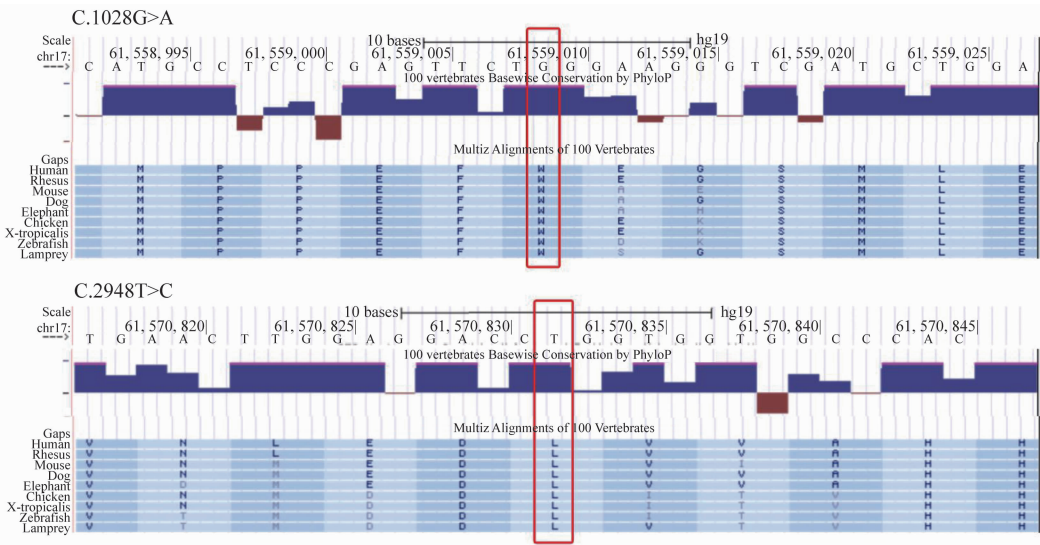


图 2 物种间保守性序列比对

2.5 PGD 术前单倍型构建 选取其中 8 个 ACE 基因上下游 SNP 位点进行单倍型图绘制(图 3,其余 SNP 位点未显示),红色(GCCTCTGT)和紫色

(GCCTCTGT)分别代表来自父亲和母亲的致病单倍型。选取不含 GCCTCTGT 单倍型的胚胎植入(胚胎单倍型未画出)。

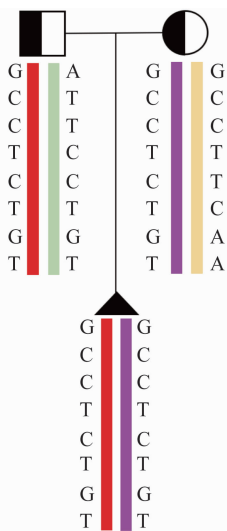


图 3 家系单倍型构建

2.6 PGD 术后胎儿羊水 DNA 检测 第三次妊娠胎儿未携带父母双方的疑似致病位点(图 4 箭头所指)。超声监测未发现胎儿肾脏和羊水量异常。

3 讨论

本研究在 1 例超声提示肾脏增大、羊水严重过少的胎儿中检测到 *ACE* 基因复合杂合变异,分别遗传自父母双方,符合常染色体隐性遗传规律。发现的 c. 2948T>C 变异位点未见与疾病相关性报道,为本次研究新发现的变异位点,通过生物信息学及家系遗传学分析提示可能与疾病相关。在告知了单基因病致病位点意义不明确的相关遗传学风险之后,家属要求进行 PGD,并对 PGD 术后妊娠胎儿进行基因检测,提示未携带父母双方变异位点,且超声未见肾脏和羊水量的异常情况,间接提示本研究发现的位点很可能就是导致该家系第一胎和第二胎发育异常的原因。

RAS 表达于人类肾脏发育的早期,人类早在孕 30~35 天时就能检测到 ACE 及其他组成部分^[9-11]。RAS 在人类肾脏发育中的作用进一步被遗传性 RTD 的报道所证实,RAS 组分中的任何一个主要基因失活均可能导致 RTD^[5]。Gribouval 等^[6]报道了 17 个 RTD 家系,其中由 7 个不同的 *ACE* 基因突变引起的 RTD 病例中,除 1 例外所有病人均有严重的羊水过少及出生后几小时内死亡,其中 9 个病例是 *ACE* 基因的纯合突变,3 个病例是复合杂合突变。存活的个体出生时出现羊水过少和严重的肾功能不全(血浆肌酐为 370 mmol/L),后肾功能出现自发性恢复,在出生后 3 周内血肌酐处于正常范围(45 mmol/L)^[6]。本研究家系两次妊娠均出现胎儿羊水过少的情况,符合 RTD 的胎儿期临床表现,因胎儿均被引产未出生,无法准确评估胎儿的肾功能,且两次引产的胎儿家属拒绝行尸解及病理检测,我们并未了解胎儿肾小管发育情况,但根据超声提示胎儿双肾回声增强,不排除存在肾小管发育不良的可能,因为肾小管发育不良的个体中会有一部分病例表现为超声下肾实质回声增强^[12]。该家系两次妊娠均表现为羊水过少,且超声未发现胎儿肾脏的明显结构异常,提示 RTD 可能性大,现有临床表现符合 RTD 文献描述。

本次实验发现的两个变异位点,c. 1028G>A 属于无义突变,已在 RTD 病例中被报道,在一个土耳其家系中发现该位点纯合突变,在一个挪威家系中发现了该位点与其他位点的复合杂合突变^[6]。该突变可以使肾素表达明显增加,这可能是由于 ACE 的功能缺乏,以及血管紧张素 II 的产生及其对肾素产生的负性调控所致^[6]。c. 2948T>C 为错义突变,尚无人群频率数据,L983P 位于 ACE 蛋白的 C 端

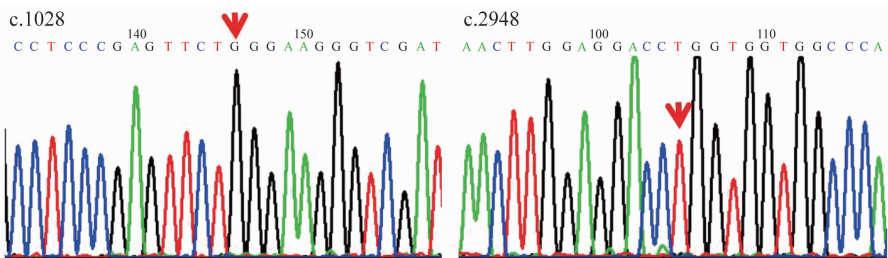


图 4 植入胚胎产前诊断

结构域(L613-P1193),且距离催化中心位置(H959-H963)^[3]非常近,推测 L983P 可能通过空间构象的改变影响 ACE 蛋白的催化功能,但以上两个变异位点如何真正影响蛋白功能仍需要进一步的功能验证和分析。

参 考 文 献

[1] 杨慧霞,武海荣. 关于 2008 年美国儿童健康与人类发展研究院电子胎儿监护定义、解释的解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010,26(02):81-84.

[2] Allanson JE, Hunter AG, Mettler GS, et al. Renal tubular dysgenesis; a not uncommon autosomal recessive syndrome; a review[J]. Am J Med Genet,1992,43(5):811-814.

[3] Michaud A, Acharya KR, Masuyer G, et al. Absence of cell surface express of human ACE leads to perinatal death[J]. Hum Mol Genet, 201, 23(6):1479-1491.

[4] Soubrier F. From an ACE polymorphism to genome-wide searches for eQTL[J]. J Clin Invest, 2013, 123(1):111-112.

[5] Gribouval O, Gonzales M, Neuhaus T, et al. Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis[J]. Nat Genet, 2005, 37(9):964-968.

[6] Gribouval O, Morinière V, Pawtowski A, et al. Spectrum of mutations in the renin-angiotensin system genes in autosomal recessive renal tubular dysgenesis[J]. Hum Mutat, 2012, 33(2):316-326.

[7] Danilov SM, Kalinin S, Chen Z, et al. Angiotensin I-converting enzyme Gln1069Arg mutation impairs trafficking to the cell surface resulting in selective denaturation of the C-domain[J]. PLoS One, 2010, 5(5):e10438.

[8] de Oliveira RM, Marijanovic Z, Carvalho F, et al. Impaired proteostasis contributes to renal tubular dysgenesis[J]. PLoS One, 2011, 6(6):e20854.

[9] Schütz S, Le Moullec JM, Corvol P, et al. Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development[J]. Am J Pathol, 1996, 149(6):2067-2079.

[10] Pringle KG, Tadros MA, Callister RJ, et al. The expression and localization of the human placental prorenin/renin-angiotensin system throughout pregnancy: roles in trophoblast invasion and angiogenesis? [J]. Placenta, 2011, 32(12):956-962.

[11] Marques FZ, Pringle KG, Conquest A, et al. Molecular characterization of renin-angiotensin system components in human intrauterine tissues and fetal membranes from vaginal delivery and cesarean section[J]. Placenta, 2011, 32(3):214-221.

[12] 周志强,覃远汉,黄韦芳,等. 29 例儿童肾发育不良的临床特点及治疗预后分析[J]. 海南医学杂志, 2015, 26(9):1358-1359.

(收稿日期:2018-07-25)
编辑:宋文颖