

应用扩展性携带者筛查对一个 *PRF1* 基因突变携带家系进行基因分析及产前诊断

张雯 袁慧珍 阳彦 谢康 黄淑晖 杨必成 邹永毅* 刘艳秋*

(江西省妇幼保健院 医学遗传中心,江西省出生缺陷防控重点实验室,江西 南昌 330006)

【中图分类号】 R714.55

【文献标识码】 B

携带者筛查是对无症状者进行基因检测从而评估其后代患筛查相关疾病的风险,扩展性携带者筛查(expanded carrier screening,ECS)可以同时评估个人对多种疾病的携带状态。如果夫妇携带相同基因的致病性变异,他们生育患儿的风险增加^[1]。孕前扩展性携带者筛查可以评估夫妇生育风险,通过植入前遗传学检测或产前诊断避免患儿出生,减轻家庭和社会负担。

扩展性携带者筛查涵盖多个疾病相关致病基因,其中包含 *PRF1* 基因,该基因致病性变异可导致家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症 2 型的发生^[2,3]。家族性嗜血细胞性淋巴组织细胞增多症(familial hemophagocytic lymphohistiocytosis,FHL)是由于细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)/NK 细胞功能低下,不能及时有效地清除病毒或其他抗原而持续刺激和活化免疫细胞,导致淋巴细胞和组织细胞增殖并大量释放多种细胞因子,引起多器官炎症反应和组织损伤,发病年龄常见于婴幼儿,多威胁生命。该疾病呈常染色体隐性遗传(autosomal recessive inheritance,AR)。本研究针对一对表型正常的孕早期夫妇进行单基因遗传病扩展性携带者筛查,结果显示双方均为家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症 2 型相关基因 *PRF1* 的致病性或疑似致病性杂合携带者,有 1/4 的概率生育患儿。孕 18 周行羊水穿刺,羊水 DNA 测序结果显示胎儿 *PRF1* 基因存在 c. 65delC 及 c. 503G>A 复合杂合变异,

经过遗传咨询及充分知情告知,该夫妇决定终止妊娠,避免了家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症 2 型患儿的出生。

1 对象与方法

1.1 研究对象 一对已婚孕 6 周的夫妇,双方均无遗传性疾病家族史,无不良妊娠史,非近亲婚配;胎儿孕 16 周超声检测未见明显异常。经充分知情后,该夫妇签署知情同意。该研究符合 2013 修订的《赫尔辛基宣言》(www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html)的要求,本研究通过江西省妇幼保健院伦理委员会的审批。

1.2 方法

1.2.1 样本采集及 DNA 提取 抽取该对夫妇的外周血 2ml,EDTA 抗凝,按试剂盒操作流程使用 Qiagen DNA mini kit (德国)提取 gDNA,使用 NanoDrop2000 测定 DNA 浓度。

1.2.2 单基因隐性遗传病扩展性携带者筛查 使用一套寡核苷酸探针捕获目标基因的外显子区和剪接区、部分内含子区和启动子区。检测的变异类型包括点突变、小片段插入缺失(≤ 20 bp)以及部分基因外显子的缺失/重复,包括常见的隐性单基因遗传病进行性假肥大性肌营养不良 DMD 基因连续 2 个外显子及以上的缺失/重复,脊髓性肌萎缩症 SMN1 基因 7 号外显子缺失,地中海贫血 *HBA/HBB* 基因——SEA、—37、—42、THAI 大片段缺失;文库构建、高通量测序及生物信息学分析:捕获核酸片段经文库构建后利用 MGISEQ-2000 高通量

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2022.03.011

* 通信作者:邹永毅,Email: zouyongyi@gmail.com;

刘艳秋,Email: lyq0914@126.com

测序仪进行检测,检测结果经生物信息分析后,获得致病或疑似致病突变位点,Sanger 测序方法进一步验证高通量测序结果。

1.2.3 Sanger 测序验证 针对候选变异位点,对该对夫妇 Sanger 测序验证。采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,用于扩增 *PRF1* 基因存在 c. 65delC 及 c. 503G>A 变异的引物序列为: *PRF1*-E2-F: TATCTCAGCCCCTCCCCTTC, *PRF1*-E2-R: TTCTTCCTGGTGAAGCAGC。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 的反应体系 20 μ l,反应条件 95.0 $^{\circ}$ C 预变性 5min,95.0 $^{\circ}$ C 变性 30s,62 $^{\circ}$ C (-0.5 $^{\circ}$ C/循环)退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45s,10 个循环,进一步 95.0 $^{\circ}$ C 变性 30s,57 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45s,22 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,外送擎科生物公司进行 Sanger 测序。

1.2.4 变异位点的生物信息学分析 从 UCSC 数据库中提取 *PRF1* 基因相关序列作为参考序列,查阅 HGMD 数据库以及国内外相关文献,参考《ACMG 遗传变异分类标准与指南》对所有检出变异位点进行解读,确定明确致病的变异位点。

1.2.5 产前诊断及随访 于孕 18 周行羊膜腔穿刺术抽取羊水 34ml(16ml 用于培养后染色体制备,10ml 直接提取 DNA 进行染色体微阵列检测,8ml 用于单基因遗传并检测),提取基因组 gDNA。采用广州达安基因公司多倍体检测试剂盒行短串联重复序列(short tandem repeat,STR)位点亲源性分析,排除母源性污染。针对致病变异位点,对该家系胎

儿羊水细胞基因组 DNA 进行检测,并对检测结果充分知情告知并跟踪随访。

2 结果

2.1 扩展性携带者筛查结果及变异位点致病性分析 扩展性携带者筛查结果显示,女方携带 *PRF1* 基因 c. 503G>A (p. Ser168Asn) 杂合变异,男方携带 *PRF1* 基因 c. 65delC (p. Pro22Argfs * 29) 杂合变异。*PRF1* 基因与常染色体隐性遗传的家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症 2 型发病相关。*PRF1* 基因 c. 65delC(p. Pro22Argfs * 29) 为移码变异,在一个致死性新生儿 FHL 病例中报道过^[4]。根据 ACMG 变异判读指南^[5],上述变异被判读为致病性变异(pathogenic): PVS1+PS1+PM2+PP3。*PRF1* 基因 c. 503G>A (p. Ser168Asn) 为错义变异,已有该变异位点致病性的相关文献报道^[6],该变异在千人数据库的频率无记录。根据 ACMG 变异判读指南^[5],上述变异被判读为疑似致病性变异(likely pathogenic): PS1+PM2+PP3。

2.2 羊水产前诊断结果 荧光定量 PCR 鉴定结果显示,羊水 DNA 标本排除母源性污染。PCR 联合 Sanger 测序结果显示羊水 DNA 携带 *PRF1* 基因 c. 65delC 杂合变异及 c. 503G>A 杂合变异,分别遗传自父亲及母亲(图 1),考虑该胎儿出生后患家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症 2 型概率较大,通过进一步的遗传咨询及知情同意,该夫妇最终选择终止妊娠。

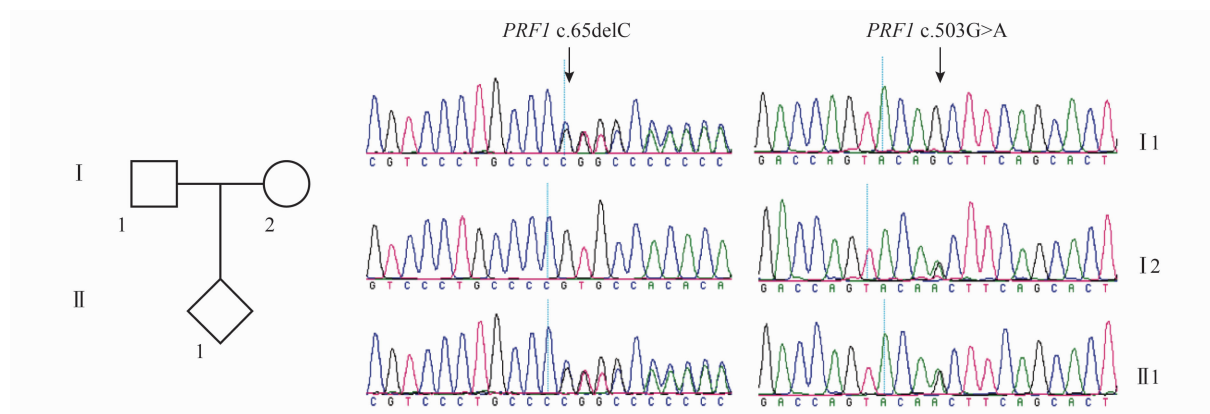


图 1 家系图及 Sanger 测序图

3 讨论

文献报道 2000 多种常染色体隐性和 X 连锁隐性遗传病,10 000 名儿童中至少 25 名受隐性遗传病影响,平均 100 对夫妇中有 1 对是同型突变携带者,有 25% 的概率生育常染色体隐性遗传病的患儿^[7]。这些父母常常不清楚自己是携带者,患儿的出生将对他们产生沉重打击^[7, 8]。传统携带者筛查只针对普通人群中隐性遗传病高发的少数人群或特定种族,如德系犹太人的 Tay-Sachs Disease (TSD) 携带者筛查^[9]。扩展性携带者筛查针对不分种族的大众人群,同一时间可检测多种疾病的携带状态。孕前扩展性携带者筛查让夫妇孕前有更多的生育选择,如植入前遗传学诊断或非携带者提供卵子或精子的辅助生殖技术等。与传统的基于种族的携带者筛查相比,扩展性携带者筛查检测成本更低,可以让更多的人获益^[7]。

本文中该夫妇通过扩展性携带者筛查检出 *PRF1* 基因存在变异,妻子携带 c. 503G>A (p. Ser168Asn) 杂合变异,丈夫携带 c. 65delC (p. Pro22Argfs*29) 杂合变异。根据 ACMG 变异判读指南,分别判读为致病性变异及疑似致病性变异,其具有 25% 的概率生育患儿。对其家系成员进行 *PRF1* 基因的检测有助于明确诊断,并指导父母及家族成员生育,尽量避免家族性噬血细胞性淋巴瘤组织细胞增多症患儿的出生,减轻家庭和社会的负担。

1999 年,穿孔素基因(*PRF1*)发生致病性变异被确定与 FHL 2 型发病相关,呈常染色体隐性遗传。这些致病性变异会影响运输、膜融合、穿孔素的胞吞作用或 NK/CTL 裂解颗粒的颗粒酶相关的蛋白质^[10]。FHL 于 1939 年被 Scott 和 Robb-Smith 首次报道,当时被称为组织细胞髓质网状变(HMR),被认为是一种非典型的霍奇金病。在具有完整免疫系统的患者中,NK 细胞和 CTL 通过穿孔素依赖性途径杀死感染的细胞和 APC。NK 细胞具有由穿孔素和颗粒酶组成的分泌性溶酶体。Jenkins 等人通过小鼠和人类细胞模型证明,当 NK 细胞识别出 APC 时会被激活,进而在两个细胞之间

形成免疫突触(IS),穿孔素和颗粒酶沿突触被转运到 APC。免疫突触释放炎性细胞因子和趋化因子,进一步促进免疫反应。颗粒酶与穿孔素一起促进 APC 或受感染细胞的凋亡,接着凋亡细胞会释放破坏免疫突触的半胱氨酸蛋白酶依赖性酶联反应,从而下调免疫应答。穿孔素或颗粒酶水平降低或缺乏将导致 HLH^[11]。

常染色体隐性遗传病是指致病基因位于常染色体上,纯合子或复合杂合才发病。FHL 是一种罕见的致命性常染色体隐性遗传病,双等位基因缺陷(纯合性和双重杂合突变)可导致 HLH^[12, 13]。该夫妇均携带 *PRF1* 基因杂合变异,羊水产前诊断结果显示胎儿 *PRF1* 基因存在 c. 65delC 和 c. 503G>A 复合杂合变异,相关文献报道,复合杂合变异可导致 FHL,经遗传咨询及充分的知情告知后该夫妇决定终止妊娠,避免了患儿的出生。

综上所述,通过孕前单基因隐性遗传病的扩展性携带者筛查可以检出夫妇双方单基因隐性遗传病的携带状态,为进一步的产前诊断、遗传咨询及生育选择提供证据,降低出生缺陷率,提高人口素质。

参考文献

- [1] DUGGER C, ANDERSON HS, MILLER CE, et al. Assessing clinical education tools for expanded carrier screening[J]. J Genet Couns, 2021,30(2):606-615.
- [2] 杜立安, 罗建明. 噬血细胞性淋巴瘤组织细胞增生症的分类、发病机制及诊治研究进展[J]. 山东医药, 2019, 59(27):90-94.
- [3] CANNA SW, MARSH RA. Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Blood, 2020,135(16):1332-1343.
- [4] KIM JY, SHIN JH, SUNG SI, et al. A novel *PRF1* gene mutation in a fatal neonate case with type 2 familial hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Korean J Pediatr, 2014,57(1):50-53.
- [5] LI MM, DATTO M, DUNCAVAGE EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists[J]. J Mol Diagn, 2017,19(1):4-23.
- [6] LU G, XIE ZD, SHEN KL, et al. Mutations in the perforin

- gene in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. Chin Med J (Engl), 2009,122(23):2851-2855.
- [7] MASTANTUONI E, SACCONI G, AL-KOUATLY HB, et al. Expanded carrier screening: A current perspective[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2018,230:41-54.
- [8] CHENG H, WONG G, CHAN YK, et al. Expanded Carrier Screening in Chinese Population-A Survey on Views and Acceptance of Pregnant and Non-Pregnant Women[J]. Front Genet, 2020,11:594091.
- [9] CHOKOSHVILI D, VEARS D, BORRY P. Expanded carrier screening for monogenic disorders: where are we now [J]? Prenat Diagn, 2018,38(1):59-66.
- [10] DEGAR B. Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2015,29(5):903-913.
- [11] ESTEBAN YM, DE JONG J, TESHER MS. An Overview of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis[J]. Pediatr Ann, 2017,46(8):e309-e313.
- [12] 苏淑芳, 李白, 魏林林, 等. 三个原发性噬血细胞性淋巴组织细胞增生症家系的临床特征和基因突变分析[J]. 国际输血及血液学杂志, 2020,43(3):233-240.
- [13] 孙舒雯, 郭霞, 朱易萍, 等. 一个家族性噬血细胞综合征家系的临床表型和基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2014,31(5):570-573.

(收稿日期:2021-11-04)

编辑:宋文颖

· 视频导读 ·

我们这十年:中国胎儿医学发展的历程与现状

段涛

(上海市第一妇婴保健院 产前诊断中心,上海 200000)

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2022.03.014



在刚刚成功闭幕的第十二届中国胎儿医学大会上,段涛教授对国内胎儿医学发展的历程及现状做了“我们这十年”主题回顾。2009 年,为填补中国胎儿医学的空白,时任上海市第一妇婴保健院院长的段涛教授,任命已完成加拿大母胎医学专科医生正规培训的孙路明教授归国组建团队,在国内首次开设了胎儿医学门诊,建立规范的胎儿医学亚专科,引入“胎儿也是病人”的理念,在无数次的“第一

次”尝试中追逐梦想。上海市第一妇婴保健院胎儿医学科通过创新型临床服务模式的构建、胎儿疾病规范诊治、大力推进胎儿医学的学科建设以及胎儿医学亚专科人才培养四个方面完成了新学科的建设与打磨。细数发展历程,无一不体现着十年前建立胎儿医学团队的初心:成立单独的产前诊断伦理委员会,重视胎儿的生命权,真正把胎儿当做人来看待;首创开设的胎儿医学心理门诊体现了胎儿疾病的人性化关怀;以胎儿为中心,创新性“一站式”服务模式实现了各种胎儿医学专病全生命周期的一站式管理;同时,创建、倡议和推广了以胎儿医学专家为主导、专病为导向的创新性多学科会诊模式。数十年来胎儿医学科团队成员们努力精进,完成了国内多个胎儿疾病的首次宫内治疗新技术应用,开展宫内干预新技术的临床及基础研究,牵头多项国家级、省部级课题,得到国际同行认可并开展国际多中心合作,取得了不俗的成绩。