

# 应用高分辨率熔解曲线分析技术快速产前诊断致死性骨发育不良 I 型 2 例报告

刘颖娜 李东至\*

(广州医学院附属广州市妇女儿童医疗中心 产前诊断中心, 广东 广州 510623)

致死性骨发育不良(Thanatophoric dysplasia, TD)是常见的致死性骨骼发育不良疾病,属常染色体显性遗传病,发生率约为活产的(0.21~0.30)/10 000<sup>[1]</sup>。主要表现为严重短肢、短指/趾、头大、前额突出、鼻梁塌陷、胸廓狭窄、小肋、腹膨隆、扁平椎及躯干长度正常等<sup>[2,3]</sup>。TD属于致死性疾病,患者大多在围产期死亡,存活者生存期很少超过6个月,死因多是由于胸腔狭窄导致的肺发育不全或枕骨大孔狭窄导致的中枢性呼吸抑制<sup>[4]</sup>。

TD患儿多在产前经超声检查发现。TD可分为2型,I型(TD I)更常见。典型超声特点为<sup>[2]</sup>:长骨显著缩短、股骨短小如“电话听筒”状、胸腔狭窄、肋骨缩短等。但仅靠超声检查不易与其他骨发育异常疾病鉴别,分子诊断有助于确诊。本文报告2例应用高分辨率熔解曲线分析技术(high-resolution melting analysis, HRM)快速产前诊断TD I。

## 1 临床病例报告

1.1 病例1 孕妇23岁,G1P0,妊娠20周超声检查发现:双顶径49.2 mm,胸围113.6 mm,股骨长15.9/13.1 mm,形状似“电话听筒”(图1A)。胎儿双顶径与孕周相符,胸廓狭小、股骨短而弯曲,考虑TDI,遗传咨询后孕妇决定行羊膜腔穿刺术,抽取羊水行细胞遗传学和成纤维细胞生长因子受体3(FGFR3)基因突变检查。

1.2 病例2 孕妇30岁,G2P0,妊娠27周超声检查发现:双顶径68.4 mm,头围249.5 mm,胸围141 mm,腹围201.5 mm,股骨长16.1/14.2 mm,

“电话听筒”特征不典型(图1B)。胎儿双顶径、头围与孕周相符,胸廓狭小、股骨短而弯曲,首先考虑TD I。遗传咨询后孕妇接受脐带血管穿刺术,取胎血行细胞遗传学和成纤维细胞生长因子受体3(FGFR3)基因突变检查。

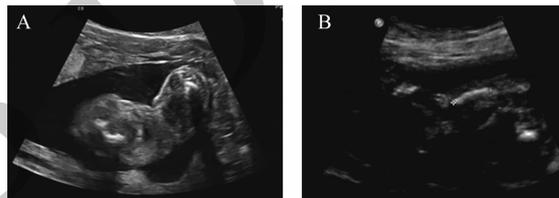


图1 2例胎儿股骨的超声图像(A:病例1;B:病例2)

## 2 实验室检测方法

2.1 染色体核型分型 采用细胞遗传室常规的羊水细胞和脐带血淋巴细胞染色体制备技术。

### 2.2 HRM 检测

2.2.1 DNA 提取 羊水和胎血标本采用 Qiagen DNA Mini kit (Qiagen, Germany) 试剂盒提取DNA,按使用说明操作。

2.2.2 PCR 扩增 设计引物扩增 FGFR3 基因第7外显子包含 c.742 位点的区域,引物序列分别为:正向 5'-CCCTGAGCGTCATCTGCC-3',反向 5'-GCACCGCCGTCTGGTTG-3' (NCBI reference sequence NC\_000004.10)。PCR 反应总体积为 10  $\mu$ L,包括: dNTP 各 200  $\mu$ M、正反向引物各 1.6 pM、0.5U Taq DNA 聚合酶 (Promega)、5  $\mu$ L 2 $\times$ GC buffer I (TakaRa)、20 ng 基因组 DNA 模板、1  $\mu$ L 10 $\times$  LCGreen Plus。用 LightScanner (Idaho Technology) 专用的 96 孔板在热循环仪 (Tprofessional, biometra) 上扩增模板。PCR 反应

基金项目:广东省科技厅一般项目(2008B080702011)

\* 通讯作者:李东至. E-mail: dongzhi3@yahoo.com.cn

条件: 94 ℃ 预变性 3 分钟; 随后 94 ℃ 变性 20 s, 65 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 共 40 个循环; 最后 94 ℃ 30 s, 25 ℃ 30 s 形成异源双链。PCR 扩增产物片段长度为 85 bp。

2.2.3 HRM 分析 PCR 扩增完成后, 将 96 孔板移至 LightScanner (Idaho Technology) 进行熔解曲线分析。LightScanner 温度范围设置为 70~98 ℃, 温度变化速度 0.1 ℃/s。持续监测荧光变化, 采集数据, 获得熔解曲线, 整个过程大概 5 分钟。应用 LightScanner Software with Call-IT 2.0 软件分析数据。整个 PCR 反应和 HRM 分析过程不超过 2 个小时。

2.3 DNA 序列测定 对 HRM 分析阳性样本进行 DNA 测序验证, PCR 扩增产物委托上海英骏生物技术有限公司测序分析。

### 3 结果

3.1 病例 1 羊水细胞核型分型结果正常 (46, XX), HRM 检测 FGFR3 基因第 7 外显子示为 c. 742C>T (p. R248C) 杂合突变, 其 HRM 熔解曲线与 c. 742C>T 杂合突变阳性对照样本的熔解曲线集成一簇, 与野生型明显区分开 (图 2A)。结果被基因测序证实 (图 3A)。

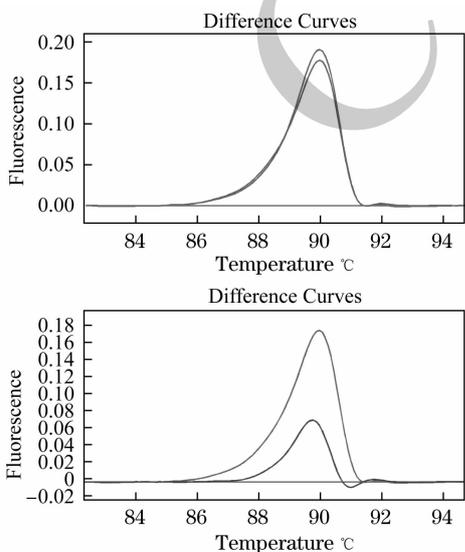


图 2 FGFR3 基因第 7 外显子的 HRM Difference Curves 分析结果, 灰色为野生型 (阴性对照), 红色为 c. 742C>T 杂合突变型, 蓝色为 c. 746C>G 杂合突变型 (A: 病例 1; B: 病例 2)

3.2 病例 2 脐血细胞核型分型结果正常 (46, XY), HRM 分析 FGFR3 基因第 7 外显子显示存在碱基变异, 但非 c. 742 C>T 突变, 其 HRM 熔解曲线与 c. 742 C>T 杂合突变阳性对照样本和野生型样本的熔解曲线都明显区分开 (图 2B)。推测其为第 7 外显子上另一种较常见的 c. 746 C>G (p. S249C) 杂合突变。结果被基因测序证实 (图 3A)。

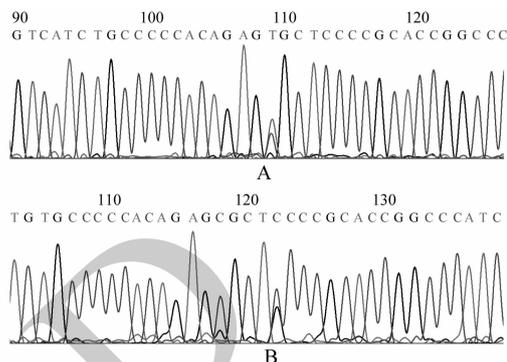


图 3 FGFR3 基因第 7 外显子测序结果  
A (病例 1) 示 c. 742 位点, 碱基为 C/T 杂合突变  
B (病例 2) 示 c. 746 位点, 碱基为 C/G 杂合突变

### 4 讨论

既往研究已证实 FGFR3 基因的突变与致死性骨发育不良 I 型的发生密切相关。成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3) 属酪氨酸激酶受体家族, 是一种发育调节跨膜受体。人类 FGFR3 基因位于 4p16.3, 包括 19 个外显子和 18 个内含子, 共 16.5 kb, FGFR3 蛋白由 3 个细胞外免疫球蛋白样的 FGF 结合域 (Ig I, Ig II, Ig III)、跨膜区 (TM) 和 2 个胞内酪氨酸激酶区 (TK1 和 TK2) 组成。人类 FGFR3 基因的突变会引起一系列骨骼发育缺陷性疾病, 如软骨发育不全 (achondroplasia, ACH)、软骨发育低下 (hypochondroplasia, HCH) 和 TD 等。TD I 患者中已发现多种不同的点突变类型, 大多数为单个氨基酸突变成 Cys, 突变分部于 FGFR3 基因 3 种不同的结构域, 主要集中在 Ig II 和 Ig III 结构域的连接区 (Arg248Cys 和 Ser249Cys)、近膜区 (Gly370Cys、Ser371Cys 和 Tyr373Cys) 和羧基端 (stop807Gly、stop807Cys 和 stop807Arg)<sup>[5]</sup>。其中, 73% 的 TD

I 是由 p. R248C、p. S249C 和 p. Y373C 3 种错义突变所致<sup>[6]</sup>。

本研究对 2 例超声发现疑为 TDI 的胎儿进行快速诊断,采用 HRM 技术检测 FGFR3 基因第 7 外显子 p. 248 突变热区。病例 1 羊水样本的 HRM 熔解曲线与 p. R248C 阳性对照样本一致,诊断为 TD I;病例 2 脐血样本的 HRM 熔解曲线与野生型和 p. R248C 阳性对照样本的熔解曲线均不同,考虑该患儿 FGFR3 基因第 7 外显子存在突变,但并非最常见的 p. R248C,可能为该区域另一常见突变 p. S249C。直接测序检测 FGFR3 基因第 7 外显子,证实为 p. S249C 杂合突变。在以前的研究中我们报告了中国人 TD I 病例几乎均为 p. R248C 突变<sup>[7]</sup>,此例 p. S249C 突变为国内首次报道,也进一步证实了 HRM 是一种快速、简便、高敏感性和高特异性的分子诊断方法。

对产前超声检查疑为 TD I 的病例,产前取材排除染色体疾病的同时应行基因检查。应用 HRM 分析法基因检测 FGFR3 基因的常见突变,可快速明确诊断,产前取材后 24 小时内即可得出诊断报告。确诊者在临床可及时终止妊娠,减轻孕妇等待结果的精神压力和晚期引产的不良影响,并有助于疾病再发风险的遗传咨询。

#### 参考文献

- [ 1 ] Waller DK, Correa A, Tuan MVO, et al. The Population-Based Prevalence of Achondroplasia and Thanatophoric Dysplasia in Selected Regions of the US [J]. American Journal of Medical Genetics Part A, 2008, 146A:2385-2389.
- [ 2 ] Schramm T, Gloning KP, Minderer S, et al. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2009, 34:160-170.
- [ 3 ] Martinez-Frias ML, Frutos CA, Bermejo E, et al. Review of the recently defined molecular mechanisms underlying thanatophoric dysplasia and their potential therapeutic implications for achondroplasia [J]. Am J Med Genet Part A, 2010, 152A:245-255.
- [ 4 ] Baker KM, Olson DS, Harding CO, et al. Long term survival in typical thanatophoric dysplasia type 1 [J]. Am J Med Genet, 1997, 70:427-436.
- [ 5 ] Zoltan VAJO, Clair A, Francomano, et al. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, muenke craniosynostosis, and crouzon syndrome with acanthosis nigricans [J]. Endocrine Reviews, 2000, 1: 23-39.
- [ 6 ] Rousseau F, El Ghouzi V, Delezoide AL, et al. Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1) [J]. Hum Molec Genet, 1996, 5: 509-512.
- [ 7 ] Yang Y, Li DZ. FGFR3 gene mutations in Chinese cases of thanatophoric dysplasia type 1 [J]. Fetal Diagn Ther, 2009, 26:90-92.

编辑:熊诗诣

(收稿日期:2011-03-01)

#### 读者 · 作者 · 编者

#### 本刊对作者署名的要求

作者姓名在文题下依次排列,在编排过程中不应再做更动;作者单位按照邮政编码、所在省市县、单位全称、具体科室的顺序列于文题下方。作者应是:① 参与选题和设计,或参与资料的分析和解释者;② 起草或修改论文中主要观点或其他主要内容者;③ 能对编辑部的修改意见进行核修,在学术方面进行答辩,并最终同意该文发表者。以上 3 条均需具备。作者中如有外籍作者应征得本人同意,并附证明信。

中国产前诊断杂志(电子版)编辑部