

# CTCF 基因突变致胎儿不良妊娠结局的遗传学分析

谢潇潇<sup>1</sup> 蒋晓莹<sup>2</sup> 胡凌云<sup>1</sup> 周红辉<sup>3</sup> 汪龙霞<sup>4</sup> 游艳琴<sup>1</sup> 卢彦平<sup>1\*</sup>

(1. 解放军总医院 第一医学中心妇产科, 北京 100853; 2. 解放军医学院, 北京 100853; 3. 解放军总医院 第一医学中心创新医学部, 北京 100853; 4. 解放军总医院 第一医学中心超声科, 北京 100853)

**【摘要】** 目的 探讨 CTCF 基因致病突变的产前遗传学分析及咨询。方法 运用染色体核型分析、荧光原位杂交技术(FISH)、染色体微阵列分析(CMA)及全外显子组测序技术(WES)对一例产前超声发现双侧肾脏回声增强结构模糊的胎儿进行产前遗传学检测。结果 核型分析、荧光原位杂交技术、染色体微阵列分析未见异常,家系全外显子组测序检测到胎儿 CTCF 基因存在新发变异 c. 944\_951dup, 为移码突变,导致 318 位甘氨酸密码子(GGT)被替换为组氨酸密码子(CAC),并在第 18 个密码子后终止(p. Gly318Hisfs \* 18),产生截短蛋白质。CTCF 基因突变可致罕见常染色体显性智力障碍 21 型,胎儿期尚未见报道。结论 本例为首次在胎儿期检出 CTCF 基因致病突变,推测双肾回声增强结构模糊为该基因突变相关的一种新的胎儿期表型。全外显子组测序技术在产前检测出罕见致病突变的病例需重视检测前后的咨询。

**【关键词】** CTCF 基因; 双肾回声增强; 全外显子组测序; 胎儿

**【中图分类号】** R715.5 **【文献标识码】** A

## Genetic analysis of a case of CTCF gene mutation in fetus associated with adverse outcome

Xie Xiaoxiao<sup>1</sup>, Jiang Xiaoying<sup>2</sup>, Hu Lingyun<sup>1</sup>, Zhou Honghui<sup>1</sup>, Wang Longxia<sup>1</sup>, You Yanqin<sup>1</sup>, Lu Yanping<sup>1\*</sup>

(1 The first medical center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2 Medical school of Chinese PLA, Beijing 100853, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the genetic analysis and counseling of pathogenic CTCF mutation in fetus. **Methods** Chromosome karyotype analysis, Fluorescence in situ hybridization (FISH), chromosome microarray analysis (CMA) and whole exome sequencing (WES) were used to detect the fetus with poorly structured bilateral hyperechogenic kidneys. **Results** Karyotype analysis, FISH and CMA were normal. A de novo frameshift mutation c. 944\_951dup (p. G318Hfs \* 18) of CTCF was detected by WES resulting truncated protein. It can cause "Mental retardation, autosomal dominant 21", which has not been reported in fetuses. **Conclusion** In this case, the pathogenic mutation in CTCF was first detected in fetus. The poorly structured bilateral hyperechogenic kidneys may be a novel fetal clinical feature associated with the mutation in CTCF. Pretest and protest counseling should be well done, especially when the rare pathogenic mutations are detected by WES.

**【Key words】** CTCF; Bilateral hyperechogenic kidneys; Whole exome sequencing; Fetus

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.01.004

\* 通信作者: 卢彦平, Email: luy301@163.com

基金项目: 1. 国家重点研发计划(2021YFC1005300); 2. 军队育龄家庭出生缺陷的遗传病学研究(19JSZ16)

*CTCF* 基因是脊椎动物体内染色质结构组成和调控的重要参与者之一,位于染色体 16q22.1 区域,对于染色体三维立体结构的形成和协调起着重要的作用,同时还参与许多基因调控,其编码的蛋白含有 11 个高度保守的锌指结构,通过这些锌指结构绑定多种 DNA 从而发挥多元调控作用,在人类基因中其 DNA 的绑定位点超过 30000 个,所发挥的作用包括基因调节、阻断异染色质的传播、基因印记、X 染色体失活等<sup>[1,2]</sup>。最早在 2013 年,由 Gregor 等<sup>[3]</sup>报道了 4 例 *CTCF* 基因新发突变的患儿,智力不同程度低下,生长发育缓慢,伴有小头畸形等其他一些器官畸形,但均未在孕期发现明显的超声结构异常。在此之后陆续有一些病例的报道,但都是儿童期或成人期病例,没有在产前诊断中检出该基因致病性突变的报道。本文报道一例胎儿期首次发现 *CTCF* 基因新发突变的家系遗传学分析。

## 1 对象与方法

1.1 对象 孕妇 40 岁, G2P0, 否认家族遗传病史。2015 年人工流产 1 次, 本次为自然妊娠。NT 超声未见异常, 超声孕周与实际孕周相符。孕 19<sup>+</sup>4 周因高龄行羊水穿刺查染色体核型及荧光原位杂交技术检测(FISH)未见异常。停经 22<sup>+</sup>6 周排畸超声(图 1A、B、C)提示:双顶径(BPD) 5.3cm, 股骨长(FL) 3.6cm, 腹围(AC)18cm, 头围(HC)19.1cm, 胎儿双肾大小形态尚可, 实质回声稍增强, 结构模糊。再次行羊水穿刺查染色体微阵列分析(CMA), 未发现异常, 剩余羊水送家系全外显子组测序, 并超声随诊。停经 30 周超声提示:胎儿双肾实质回声稍增强, 结构模糊, 羊水指数 8cm。停经 32<sup>+</sup>6 周复查超声(图 1D)提示: BPD8.1cm, FL6.0cm, AC28.3cm, HC28.5cm, 胎儿双肾实质回声增强, 羊水少(羊水指数 6.1cm), 余结构未见异常。

本研究符合医院伦理学委员会制定的伦理学标准并获得伦理委员会批准, 取得孕妇及家属的知情同意。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 先证者父母的外周血样品全基因组 DNA 采用 QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit 提

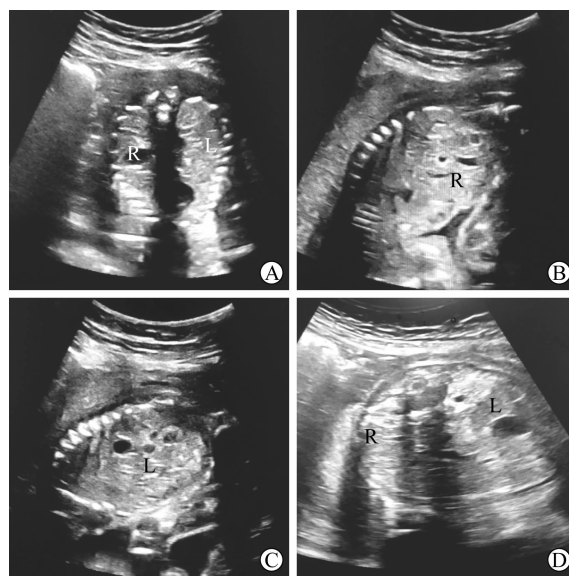


图 1 A: 22<sup>+</sup>6 周胎儿双肾实质回声稍增强, 结构模糊; B: 22<sup>+</sup>6 周胎儿右肾; C: 22<sup>+</sup>6 周胎儿左肾; D: 32<sup>+</sup>6 周胎儿双肾实质回声增强

取试剂盒(QIAGEN, 德国)按照标准步骤提取。先证者羊水 DNA 采用 QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit 提取试剂盒(QIAGEN, 德国)按照标准步骤提取。将提取的 DNA 用 TE 缓冲液溶解至约 50 ng/ $\mu$ l。质控合格样品用于后续染色体微阵列分析及全外显子组测序。

1.2.2 传统细胞遗传学 在进行全外显子组测序之前, 该羊水样本已按照各平台标准流程进行了核型、FISH 和 CMA 检测。核型分析每例镜下观察 20 个分裂相, 分析不少于 5 个细胞, 分辨率为 400~550 条带水平, 核型按照人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2020)描述。FISH 采用 13/21 染色体特异性探针及 18 号/X/Y 染色体着丝粒特异性探针进行杂交, 并分析计数至少 50 个细胞。CMA 所用平台为 Affymetrix CytoScan<sup>®</sup> 750K (Affymetrix, 美国), 将数据导入 ChAS 4.0 (Affymetrix) 软件中进行分析, 参考基因组为 hg19/GRCh37, 参考数据库包括 UCSC、OMIM、DECIPHER、DGV 和 PubMed。

1.2.3 全外显子组测序及数据分析 对胎儿及父母样本进行全外显子组测序, 首先利用 Agilent SureSelect Human All ExonV6 捕获试剂盒(60M, Agilent Technologies, 美国)进行捕获, 捕获的 DNA 片段应用 NovaSeq 6000 (Illumina, 美国)测序仪进行双端测序, Reads(读长)长度为 150 bp, 测序深度不低于 100 $\times$ , 数据质量 Q20 $\geq$ 85%, Q30 $\geq$ 80%。

下机数据进行生物信息学分析,以 GRCh37 (hg19)基因组版本为依据进行变异检测以及注释。流程如下:①应用 Trimmomatic 软件(Trimmomatic-0.39)进行原始数据的过滤和质控,得到 Clean reads。②应用 Burrows-Wheeler-Aligner (BWA) 软件将 Clean reads 比对至参考基因组。③应用 Genome Analysis Toolkit (GATK) 软件进行变异检测,获得高置信度 VCF 文件。④利用 ANNOVAR 和 InterVar 软件进行位点注释,注释数据库包括人群频率数据库(gnomAD、1000 Genome Project、ExAC等)、生物信息预测工具(SIFT、MutationTaster、PolyPhen-2等)、疾病与表型数据库(OMIM、Clinvar、HPO等)。变异位点根据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)发布的指南分为致病性(pathogenic, P)、可能致病性(likely pathogenic, LP)、意义不明确(variants of uncertain significance, VUS)、可能良性(likely benign, LB)和良性(benign, B)。同时,采用 NxClinical v5.0 (BioDiscovery, 美国)作为并行方法,同时检测单核苷酸变异(single nucleotide variants, SNVs)、拷贝数变异(copy number variations, CNVs)、杂合性缺失(absence of heterozygosity, AOH)等。

变异注释后,先进行初步过滤以缩小分析范围,过滤的流程大致如下:在保留复合杂合、新发、纯合/半合子、Clinvar 数据库注释为 P/LP、InterVar 注释为 P/LP、spliceAI 等软件预测可能影响可变剪切位点的前提下,①去掉没有 HPO 表型且未被 OMIM 数据库收录的位点。②去掉同义突变及位于深度内含子区(不包含剪切区域)的位点。③去掉 gnomAD、1000 Genome Project、ExAC 人群数据库中位点基因频率 $\geq 5\%$ 的位点。④去掉 InterVar 注释为良性/可能良性的位点。缩小范围后,综合患者表型(肾脏回声增强(HPO:0004719))、基因遗传模式、基因致病机制、基因-疾病的相关性、蛋白质结构/功能等信息,逐个分析,获得最终的致病性变异位点。

1.2.4 Sanger 测序 对可疑致病位点进行胎儿及父母的 Sanger 测序验证,CTCF 基因检测引物序列为 F-5' TCCAGTGTGAGCTTTGCAGT3', R-

5' AGGCATCTATTGCCTGAGACT3'。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,扩增 30 个循环;最后 72℃补充延伸 10 min。对 PCR 产物进行测序。

## 2 实验结果

2.1 染色体核型分析、FISH 及染色体微阵列分析结果 染色体核型分析结果为 46, XN; FISH 结果显示 21、18、13 号染色体及性染色体数目未见异常;染色体微阵列分析结果显示胎儿在全基因组范围内未发现染色体片段拷贝数的异常变化。

2.2 家系全外显子组测序结果 对先证者及其父母进行全外显子组测序,先证者、母亲、父亲样本的平均覆盖深度分别为 97.05 $\times$ 、116.43 $\times$ 和 111.92 $\times$ ,大于 20 $\times$ 覆盖区域占比分别为 92.00%、93.25%和 93.09%。按照生物信息学分析流程进行数据分析,结果显示先证者 CTCF 基因(NM\_006565.4)在第 4 外显子存在一个新发的变异 c.944\_951dup,为移码突变,导致 318 位甘氨酸密码子(GGT)被替换为组氨酸密码子(CAC),并在第 18 个密码子后终止(p. Gly318Hisfs\*18),产生截短蛋白质(图 2),并预测发生无义介导的 mRNA 降解(NMD)。Decipher 数据库显示该基因为明确的单倍剂量不足基因(haploinsufficiency Score: 3),已有文献报道该基因的功能缺失(loss-of-function)变异是致病的(PMID:23746550; 28619046),因此依据美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)遗传变异分类标准与指南,该变异符合 PVS1 证据;该变异位于重要的蛋白锌指结构域(Zinc finger, C2H2 type)(PM1);该变异在正常参考人群基因数据库中未见报道(等位基因频率 ExAC; 1000 Genome; gnomAD)(PM2\_supporting)。依据 ACMG 遗传变异分类标准与指南(PMID:25741868),此变异为致病性变异(PVS1, PM1, PM2\_supporting)。与该基因变异相关的疾病为常染色体显性智力障碍 21 型(MIM:615502)。该基因变异主要在儿童及成人智力障碍患者中检出,临床表现为智力障碍、身材矮小、发育迟缓。胎儿期尚未见报道。

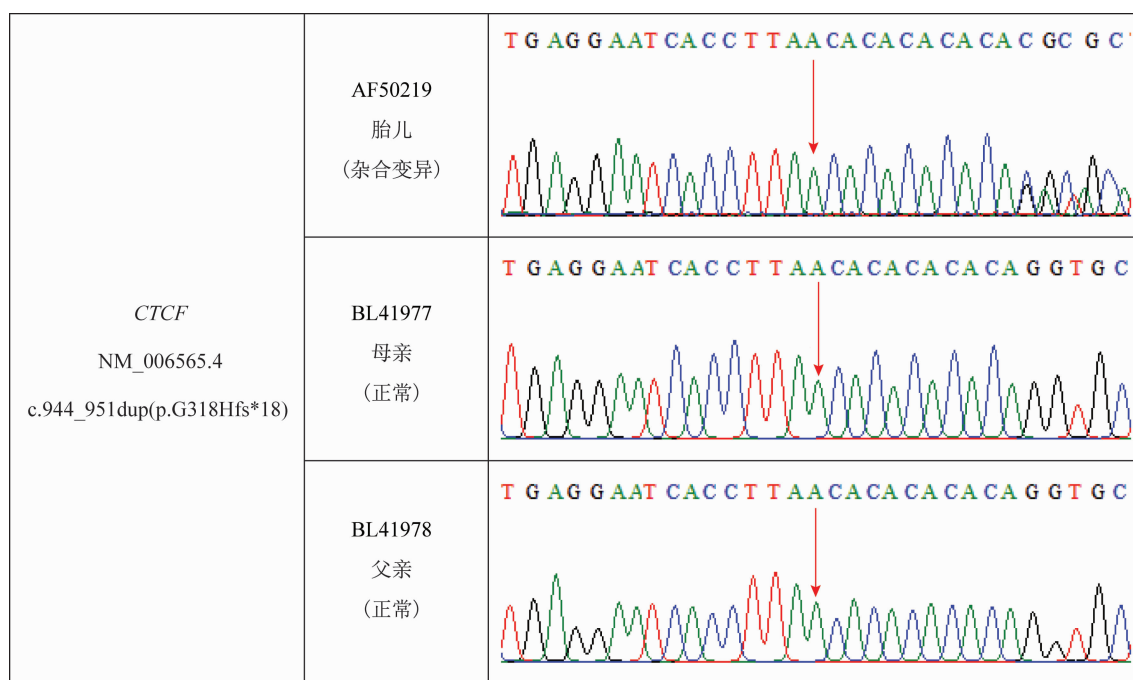


图 2 本例胎儿 *CTCF* 基因新发移码突变, 箭头处为突变起始碱基位点

2.3 Sanger 验证结果 Sanger 测序结果与 WES 结果一致, 显示先证者 *CTCF* 基因上存在该变异, 并且父母中未检测到。

### 3 讨论

二代测序技术是遗传病检测领域的一项革新性技术。全外显子组测序目前已作为产前诊断中超声异常胎儿明确病因的检测手段之一, 将此类胎儿的诊断率提高了 8%~10%<sup>[4, 5]</sup>。但是, 全外检测的数据分析是表型驱动, 即根据胎儿异常表型进行针对性分析, 以发现致病基因。而胎儿期表型的发现完全依赖于影像学检查的间接评估, 不如成人或儿童容易获得, 尤其是一些伴有神经系统发育障碍的罕见疾病, 有限的表型可能无法为基因变异的致病性提供充足的证据, 使得检测结果存在不确定性, 使遗传咨询难度增加, 也给家庭带来焦虑。这是全外检测在产前诊断应用中的最大挑战。

本文报道的病例是位高龄孕妇, 生育愿望强烈, 因胎儿双侧肾脏回声增强结构模糊, 进行了核型及 SNP array 检测, 结果未见异常。但是考虑胎儿肾脏结构模糊, 羊水偏少, 肾功能可能已经受到损害, 因此推荐进行家系的全外显子组测序。检测结果首次在胎儿时期检出了 *CTCF* 基因致病突变。*CTCF* 基因是脊椎动物体内重要的基因, 具有 12 个外显

子, 编码一种含有 11 个高度保守的锌指结构的转录调节蛋白, 此蛋白通过不同的锌指结构绑定不同的 DNA 目标序列和蛋白。该基因的体细胞突变参与多种肿瘤的发生和发展, 而生殖细胞突变与人类疾病有关, 将对神经元和骨骼肌肉组织产生影响。在果蝇的研究中发现, *CTCF* 基因突变具有单倍剂量不足效应, 剂量改变将导致严重的神经功能受损和学习记忆缺陷<sup>[6]</sup>。在成人及儿童中报道的 *CTCF* 基因突变的病例中, *CTCF* 基因新发移码突变、错义突变或是发生了基因断裂的患者, 最常见的临床表型有不同程度的智力障碍、喂养困难、发育迟缓, 可能伴有小头畸形、先天性心脏病、听力视力的异常、特殊面容或是身材矮小等表型, 临床表型变异程度较大。这些病例的突变位点均分布于该基因的 3~11 号外显子区域, 突变所致疾病为常染色体显性智力障碍 21 型 (MIM: 615502), 被 orphanet 命名为“智力低下-喂养困难-发育迟缓-小头畸形综合征”<sup>[3, 7]</sup>。

本文病例中 *CTCF* 基因移码突变的突变位点位于 4 号外显子区域, 为该基因重要的蛋白质结构功能区域, 最终产生截短的蛋白质, 判定为致病性变异。孕妇年龄大, 胎儿宝贵, 但难以接受患有遗传疾病的胎儿。由于未发现与 *CTCF* 基因相关的小头畸形、生长受限、先天性心脏病等超声可发现的异常

表型,且已进入围产期,给遗传咨询造成了不小的困境,同时也使得孕妇及其家庭焦虑担忧,难以决策。

胎儿肾脏的异常表现是否与 *CTCF* 基因致病性突变有关,成为该病例咨询和决策中的关键。孕20周后肾实质回声高于肝脏或脾脏,判定为双侧肾脏回声增强<sup>[8]</sup>。单纯双侧肾脏回声增强最常见的病因是常染色体显性或隐性的多囊肾,也有染色体17q12微缺失综合征的病例报道<sup>[9]</sup>。目前的文献报道中尚未发现 *CTCF* 基因变异与肾脏异常直接相关的证据,但有研究发现 *CTCF* 能够增强启动子和增强子之间的相互作用,激活多囊肾相关基因 *PKD2* 基因的表达<sup>[10]</sup>。在小鼠模型的研究中,肾素细胞中 *CTCF* 缺失将导致肾素细胞衰竭,伴随着循环中肾素合成释放减少、低血压和严重的肾脏形态学异常,肾脏结构紊乱,皮质-髓质分界不清,组织增生,小动脉分支缺陷,最终导致肾功能衰竭<sup>[11]</sup>。

由于神经系统发育障碍表型出生后才能发现,在文献阅读分析的基础上与孕妇及家属进行反复沟通咨询,推测本例 *CTCF* 基因表达异常与胎儿肾脏病变存在相关性,双侧肾脏回声增强结构模糊或为 *CTCF* 基因致病突变相关的一种新的胎儿期表型。无论病因为何,对于双侧肾脏回声增强的病例,肾脏体积和羊水量均是可靠的预测胎儿预后的因素,肾脏增大同时伴有羊水过少是预后不良的征象<sup>[9]</sup>。最终该孕妇选择了终止妊娠。胎死宫内1周后胎儿才娩出,外观未见畸形,遗憾的是,孕妇拒绝行尸检,也未能进行进一步的基因功能验证。因本次不良孕史不排除由生殖细胞嵌合突变引起,建议孕妇下一次妊娠于孕中期行介入性产前诊断。

本病例的咨询过程反应了目前全外显子组测序在产前诊断中应用所面临的困难和挑战。且孕妇及其家庭接受全外检测结果的这种独特的心理、情感和伦理问题也同样需要获得关注<sup>[5, 12]</sup>。因此,检测前需要专业人员对检测目的和意义以及可能出现的偶然或次要发现对家庭带来的影响进行充分的讨论。对于正在进行的妊娠中检测到明确的遗传变异,但胎儿表型有限,结果解释存在不确定性的情况,则需要多学科专业团队提供更专业、更深入的遗传咨询来帮助家庭进行决策。

#### 参 考 文 献

[1] WU Q, LIU P, WANG L. Many facades of CTCF unified by

its coding for three-dimensional genome architecture [J]. *J Genet Genomics*. 2020. 47(8): 407-424.

[2] KLENOVA EM, NICOLAS RH, PATERSON HF, et al. CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken *c-myc* gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms [J]. *Mol Cell Biol*. 1993. 13(12): 7612-7624.

[3] GREGOR A, OTI M, KOUWENHOVEN EN, et al. De novo mutations in the genome organizer CTCF cause intellectual disability [J]. *Am J Hum Genet*. 2013. 93(1): 124-131.

[4] GREENBAUM L, PODE-SHAKKED B, EISENBERG-BARZILAI S, et al. Evaluation of Diagnostic Yield in Fetal Whole-Exome Sequencing: A Report on 45 Consecutive Families [J]. *Front Genet*. 2019. 10: 425-433.

[5] ABOU TAYOUN AN, SPINNER NB, REHM HL, et al. Prenatal DNA Sequencing: Clinical, Counseling, and Diagnostic Laboratory Considerations [J]. *Prenat Diagn*. 2018. 38(1): 26-32.

[6] KONRAD E, NARDINI N, CALIEBE A, et al. CTCF variants in 39 individuals with a variable neurodevelopmental disorder broaden the mutational and clinical spectrum [J]. *Genet Med*. 2019. 21(12): 2723-2733.

[7] CHEN F, YUAN H, WU W, et al. Three additional de novo CTCF mutations in Chinese patients help to define an emerging neurodevelopmental disorder [J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2019. 181(2): 218-225.

[8] YULIA A, NAPOLITANO R, AIMA A, et al. Perinatal and infant outcome of fetuses with prenatally diagnosed hyperechogenic kidneys [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2021. 57(6): 953-958.

[9] SHUSTER S, KEUNEN J, SHANNON P, et al. Prenatal detection of isolated bilateral hyperechogenic kidneys: Etiologies and outcomes [J]. *Prenat Diagn*. 2019. 39(9): 693-700.

[10] MOISAN S, LEVON S, CORNEC-LE GALL E, et al. Novel long-range regulatory mechanisms controlling *PKD2* gene expression [J]. *BMC Genomics*. 2018. 19(1): 515-527.

[11] MARTINEZ MF, MARTINI AG, SEQUEIRA-LOPEZ M, et al. Ctf is required for renin expression and maintenance of the structural integrity of the kidney [J]. *Clin Sci (Lond)*. 2020. 134(13): 1763-1774.

[12] WOU K, WEITZ T, MCCORMACK C, et al. Parental perceptions of prenatal whole exome sequencing (PPPWES) study [J]. *Prenat Diagn*. 2018. 38(11): 801-811.

(收稿日期:2022-06-11)

编辑:陈光全