

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.08.020

## 二代测序技术在 Cardio-facio-cutaneous 综合征诊断中的应用研究\*

肖海<sup>1</sup>, 张照婧<sup>2</sup>, 吕雪<sup>3</sup>, 李涛<sup>1</sup>, 郭谦楠<sup>1</sup>, 侯巧芳<sup>1</sup>, 王红丹<sup>1</sup>, 刘红彦<sup>1</sup>, 霍晓东<sup>1</sup>, 廖世秀<sup>1△</sup>

(1. 河南省人民医院医学遗传研究所, 郑州 450003; 2. 郑州大学基础医学院医学遗传与细胞生物学系, 郑州 450003; 3. 河南省人民医院健康管理科, 郑州 450003)

**[摘要]** **目的** 探讨二代测序技术在辅助诊断 RAS 心肌病群的作用。**方法** 提取 1 例疑似 Noonan 综合征患儿及其父母外周血, 采用 aCGH、二代测序技术检测基因突变, 并用 Sanger 法进行验证。**结果** 二代测序结果显示, 患儿 BRAF 基因存在 c.1406G>A 杂合突变。患儿一代测序结果与二代测序结果一致, 父母一代测序结果显示该位点均为 G/G 野生型。**结论** 该患儿为 CFC 患者, 二代测序技术在 RAS 心肌病群的鉴别诊断中可以起到很好的辅助作用。

**[关键词]** 二代测序; 基因突变; 心面皮肤综合征; 一代测序

**[中图分类号]** R394.3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)08-1074-03

### Study on application of next-generation sequencing technology in diagnosis of cardio-facio-cutaneous syndrome\*

XIAO Hai<sup>1</sup>, ZHANG Zhaojing<sup>2</sup>, LV Xue<sup>3</sup>, LI Tao<sup>1</sup>, GUO Qiannan<sup>1</sup>, HOU Qiaofang<sup>1</sup>,

WANG Hongdan<sup>1</sup>, LIU Hongyan<sup>1</sup>, HUO Xiaodong<sup>1</sup>, LIAO Shixiu<sup>1△</sup>

(1. Medical Genetics Institute, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China;

2. Faculty of Medical Genetics and Cell Biology, School of Basic Medical Sciences,

Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450003, China; 3. Department of Health

Management, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the role of next-generation sequencing (NGS) technology in the assisted diagnosis of RASopathies. **Methods** Peripheral blood was extracted from 1 child patient with suspected Noonan syndrome and her parents, and the gene mutations were detected by adopting the aCGH and NGS. The results were verified by Sanger sequencing. **Results** The NGS results revealed that the heterozygous mutation of c.1406G>A existed in BRAF gene, and the results of Sanger sequencing in this child case was consistent with the NGS results. The Sanger sequencing results in her parents showed the locus was G/G wild type. **Conclusion** This child case was diagnosed as CFC. NGS plays a good auxiliary role in the differentiation diagnosis of RASopathies.

**[Key words]** next-generation sequencing; gene mutation; cardio-facio-cutaneous syndrome; Sanger sequencing

Cardio-facio-cutaneous 综合征 (CFC) 与 Costello 综合征 (CS)、Noonan 综合征 (NS) 一起被归类为 RAS 心肌病群<sup>[1-2]</sup>。该病群的临床表型有很多相似之处, 患者均可表现出不同程度的智力发育异常、心脏发育异常及身材矮小等临床症状。虽然该病群疾病也有各自相对特异性的表征, 但是仅仅凭借表型进行诊断还是十分困难。本文利用比较基因组杂交技术 (aCGH) 结合二代测序技术 (NGS) 对 1 例疑似 NS 患者进行检测, 并结合临床表型诊断为 CFC, 现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 患儿, 女, 1 岁 11 月, 汉族, 因生长发育迟缓就诊于河南省人民医院医学遗传研究所。患儿系 G1P1, 孕 27 周超声提示永久性右脐静脉, 羊水过多, 羊水最大深度 82 cm, 羊水指数 319 mm。足月顺产。出生后偶有抽搐发作, 1 月时磁共振 (MR) 脑部平扫未见明显异常。患儿运动发育滞后, 1 岁时头部 CT 结果提示: (1) 考虑复合脑积水征象; (2) 左顶部头皮皮下血肿。1 岁 11 月时心脏超声检查提示: (1) 左房稍大; (2) 左室壁弥漫性增厚; (3) 左室流出道流速稍增快; (4) 左室舒

张功能减低。患儿眼距稍宽, 鼻梁塌平, 外侧眼角偏下, 头发稀疏, 父母非近亲结婚, 否认遗传病家族史, 见图 1。本研究经医院伦理委员会批准, 患者及家属知情同意并签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 签署知情同意书后, 分别抽取患儿及其父母外周血各 2 mL, EDTA 抗凝。采用 DNA 提取试剂盒 (Dneasy Tissue Kit DNA, 德国 Qiagen 公司) 提取外周血 DNA, 采用 Nandrop 2000 分光光度计 (美国 Thermo 公司) 进行 DNA 定量检测。

**1.2.2 aCGH 检测分析** 应用 Human genome CGH Microarray 8X60K 芯片 (美国 Agilent 公司) 对患儿进行检测, 采用 Microarray Scanner (美国 Agilent 公司) 及其他配套软件对芯片进行扫描和初步分析, 检索 UCSC、DECIPHER、ISCA 等数据库对检测出的缺失、重复进行比对及致病性鉴定。

**1.2.3 NGS 高通量测序** 根据参考文献<sup>[3]</sup>, 取 3 μg 患者的 DNA 构建测序文库。用 Nanodrop 2000 分光光度计对文库标本进行定量检测。文库经 PCR 扩增后, 应用心肌病相关基因

\* 基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (201602249, 201702156); 河南省科技攻关计划项目 (162102310294)。作者简介: 肖海 (1988—), 实验师, 硕士, 主要从事遗传病的基因诊断研究。△ 通信作者, E-mail: xiaohai17@126.com。

检测试剂盒(北京迈基诺基因科技公司)进行检测, Illumina HiSeq2000 基因分析系统(美国 Illumina 公司)上机测序。



图 1 患儿面部图

1.2.4 Sanger 测序 按照 Sanger 法检测患儿及其父母的 BRAF 基因 c. 1406 位点。GenBank 上查找 BRAF 基因序列, 用 NCBI 上的在线软件 Primer-BLAST 设计引物, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 上游引物 5'-TTG GGA GAT TCC TGA TGG GC-3', 下游引物 5'-TTG GAG GAG TCC TGA AAC TAA TCA-3'。PCR 体系为 25.0 μL, 其中 DNA 模板 1.0 μL, 上下游引物各 0.5 μL, 2X Taq DNA mix 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。PCR 条件: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 50 s, 循环 35 次; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。所有标本的 PCR 产物经纯化后利用 ABI3130 基因分析仪进行测序。测序结果与 NCBI 上的标准序列进行 BLAST 分析。

2 结果

2.1 aCGH 检测情况 患儿染色体未发现拷贝数变化, 为一正常女性, 见图 2。



图 2 患儿 aCGH 检测情况

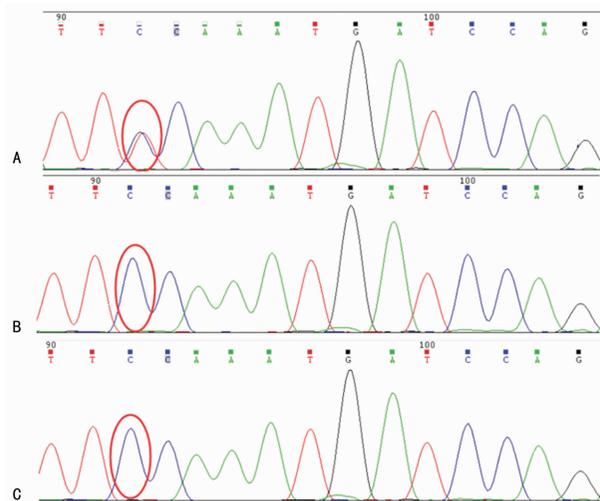
2.2 突变位点检测 二代测序结果显示, 在 chr7-140481402 位点即 BRAF 基因第 11 外显子 c. 1406 处存在 G>A 杂合突变(红色区域), 见图 3。该突变导致基因编码的第 469 位密码子由甘氨酸变为谷氨酸, 即 p. G469E。经查阅相关数据库已有该位点相关致病性报道。

2.3 Sanger 法测序 利用 Sanger 法对患儿的 NGS 结果进行验证, 发现患儿 BRAF 基因第 11 外显子存在 c. 1406 G>A 杂合突变(图 4A), Sanger 法检测患儿父母的 BRAF 基因 c. 1406

位点, 发现其父母该位点均为 G/G 野生型(图 4B, 4C)。



图 3 患儿突变位点检测



A: 患儿 BRAF 基因 c. 1406G>A 杂合突变(红圈处) B: 患儿父亲 BRAF 基因 c. 1406 位点为 G/G 野生型(红圈处); C: 患儿母亲 BRAF 基因 c. 1406 为 G/G 野生型(红圈处)

图 4 BRAF 基因 c. 1406 位点反向测序情况

3 讨论

染色体不平衡的拷贝数变异(copy number variants, CNVs)与原因不明的发育迟缓、智力低下、多种体征畸形及自闭症患者关系密切。2010 年, 国际细胞基因组芯片标准协作组推荐将 aCGH 作为这类患者的临床首选检测方法<sup>[4]</sup>。由于临床诊断不明确, 并且患儿存在先天性心脏病、生长发育迟缓、智力障碍等症状, 为了避免漏检, 笔者先用 aCGH 技术在全基因组水平对患儿进行检测, 检测是否存在 CNVs。aCGH 检测结果显示, 患儿染色体未发现拷贝数变化, 排除 CNVs 导致的先天性心脏病、生长发育迟缓、智力障碍。

RAS 心肌病群中的 3 种疾病在临床症状上有太多相似之处, 本研究中的患儿具有典型的智力发育迟缓、心脏发育异常等, 临床医生根据症状很难做出明确诊断, 疑似为 NS。虽然 3 种疾病的表型相似, 但是致病的分子机制却不同, 并且 RAS 心肌病群中的疾病具有遗传异质性的特点, 比如 CFC 主要是由 4 种基因突变导致的, 分别为 BRAF、MAP2K1、MAP2K2 和 KRAS<sup>[5]</sup>。如果利用一代测序技术对 3 种疾病的致病基因外显子逐一进行检测, 需要的工作量十分巨大。与一代测序不同, NGS 凭借其通量大、速度快等优点, 在分子生物学研究、疾病的诊断等方面发挥了重要作用, 已用于复杂性神经系统疾

病、恶性肿瘤、免疫检测及微生物学研究等领域<sup>[6]</sup>。因此本研究选择利用 NGS 技术同时对 3 种疾病的致病基因进行检测。

NGS 结果显示,患儿 BRAF 基因第 11 外显子存在 c.1406 G>A 杂合突变。该突变为错义突变,导致该基因编码的第 469 位氨基酸由甘氨酸变为谷氨酸,即 p.G469E。2006 年,NIIHORI 等<sup>[7]</sup>在 4 例 CFC 患者中检查到该突变。利用 Sanger 法对患儿的 NGS 结果进行验证,二者结果一致说明二代测序结果准确可信。甘氨酸为极性不带电氨基酸,谷氨酸为极性带负电氨基酸,氨基酸的改变会对基因编码的蛋白空间结构造成影响,进而影响蛋白的正常功能。BRAF 是 RAS-RAF-MEK-ERK 通路的关键调控因子,该通路对细胞的增殖、生长、凋亡十分重要<sup>[8]</sup>。目前研究显示,CFC 患者中近 75% 为 BRAF 基因突变导致的,近 25% 为 MAP2K1 基因和 MAP2K2 基因突变导致的,2%~3% 为 KRAS 基因突变导致<sup>[9-10]</sup>。利用 Sanger 法对患儿父母的 BRAF 基因 c.1406 位点进行检测,发现其父母该位点均为野生型,说明患儿为自发突变导致的 CFC。

CFC 是一种常染色体显性遗传病,该病于 1986 年首次报道<sup>[11-12]</sup>。目前关于 CFC 的报道特别少,在全世界范围的发病率不详,有文献报道日本 CFC 的发病率估计为 1/810 000<sup>[13]</sup>。其常见的临床表现为先天性心脏病、生长发育迟缓、智力障碍、皮肤异常等<sup>[14]</sup>。CFC 最早的临床特征为胎儿期超声提示胎儿颈部透亮度增加,有时为囊状水肿,67% 可见羊水过多<sup>[15]</sup>,50% 患儿早产。

综上所述,结合基因检测结果与临床资料,本研究患儿排除 NS,应为 CFC。在对于临床症状相似但致病基因不同的疾病诊断过程中,NGS 技术可以起到很好的辅助诊断作用。

## 参考文献

- [1] MYERS A, BERNSTEIN J A, BRENNAN M, et al. Perinatal features of the RASopathies; noonan syndrome, cardiofaciocutaneous syndrome and costello syndrome [J]. *Am J Med Genet A*, 2014, 164(11): 2814-2821.
- [2] UEDA K, YAOITA M, NIIHORI T, et al. Craniosynostosis in patients with RASopathies: accumulating clinical evidence for expanding the phenotype [J]. *Am J Med Genet A*, 2017, 173(9): 1-7.
- [3] QIN L, GUO L, WANG H, et al. A novel MIP mutation in familial congenital nuclear cataracts [J]. *Eur J Med Genet*, 2016, 59(9): 488-491.
- [4] MILLER D T, ADAM M P, ARADHYA S, et al. Consensus statement; chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(5): 749-764.
- [5] PIERPONT M E, MAGOULAS P L, ADI S A, et al. Cardio-facio-cutaneous syndrome; clinical features, diagnosis, and management guidelines [J]. *Pediatrics*, 2014, 134(4): E1149-1162.
- [6] 肖海, 张卉, 李涛, 等. 第二代测序技术在中国先天性白内障家系致病基因检测中的应用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(8): 705-709.
- [7] NIIHORI T, AOKI Y, NARUMI Y, et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(3): 294-296.
- [8] CIARA E, PELC M, JURKIEWICZ D, et al. Is diagnosing cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome still a challenge? Delineation of the phenotype in 15 Polish patients with proven mutations, including novel mutations in the BRAF1 gene [J]. *Eur J Med Genet*, 2015, 58(1): 14-20.
- [9] RAUEN K A, BANERJEE A, BISHOP W, et al. Costello and Cardio-facio-cutaneous syndromes; moving toward clinical trials in RASopathies [J]. *Am J Med Genet C*, 2011, 157(2): 136-146.
- [10] 张欢欢, 李牛, 郁婷婷, 等. Cardio-facio-cutaneous 综合征 2 例报告并文献复习 [J]. *临床儿科杂志*, 2017(4): 286-289.
- [11] REYNOLDS J F, NERI G, HERRMANN J P, et al. New multiple congenital anomalies/mental retardation syndrome with cardio-facio-cutaneous involvement--the CFC syndrome [J]. *Am J Med Genet*, 1986, 25(3): 413-427.
- [12] ELIK N, CINAZ P, BIDECCI A, et al. Cardio-Facio-Cutaneous syndrome with precocious puberty, growth hormone deficiency and hyperprolactinemia [J]. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2014, 6(1): 55-58.
- [13] ABE Y, AOKI Y, KURIYAMA S, et al. Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan; findings from a nationwide epidemiological survey [J]. *Am J Med Genet A*, 2012, 158(5): 1083-1094.
- [14] HAZAN F, KARACA E, KOKER S A, et al. A novel missense mutation in BRAF caused Cardio-facio-cutaneous syndrome [J]. *Iran J Pediatr*, 2013, 23(5): 608-609.
- [15] TEMPLIN L, BAUMANN C, BUSA T A, et al. Prenatal findings in cardio-facio-cutaneous syndrome [J]. *Am J Med Genet A*, 2016, 170(2): 441-445.

(收稿日期:2017-08-23 修回日期:2017-10-30)