

一 Peutz-Jeghers 综合征家系致病位点分析及 产前基因检测

赵亚松¹, 吕远², 李闯², 张志涛², 陈浩暘^{1*}

基金项目: 国家自然科学基金(项目编号: 81701462); 辽宁省产科疾病临床医学研究中心及协同网络建设(项目编号: 2016007014)

作者单位: 110004 辽宁 沈阳, 中国医科大学附属盛京医院, 1. 第一分娩室; 2. 妇产科, 辽宁省母胎医学重点实验室

作者简介: 赵亚松, 毕业于中国医科大学, 本科, 护师, 主要研究方向为助产、异常胎儿的诊断及处理, 产妇护理, 新生儿护理

* 通信作者, E-mail: chenhy@sj-hospital.org

【摘要】目的 通过高通量测序技术明确 Peutz-Jeghers 综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)家系的基因突变位点, 并根据该突变位点进行产前基因检测。**方法** 详细询问先证者临床表现及家族史, 抽取先证者外周血行全外显子测序筛查相关基因变异位点, 并应用 Sanger 测序对变异位点进行验证。于妊娠中期抽取先证者妻子羊水并提取胎儿游离 DNA, 应用 Sanger 测序明确胎儿是否携带与先证者一致的基因变异。**结果** 先证者携带 STK11 基因 c.95delC (p. Thr32fs) 杂合突变, Sanger 测序验证结果与高通量测序结果一致, 该突变位点为该家系致病原因。先证者妻子羊水检测结果提示胎儿携带有与先证者相同的基因突变位点。**结论** 本研究通过高通量测序技术明确了一 PJS 家系的致病位点, 为先证者及其家属的遗传咨询及产前基因诊断提供了依据。

【关键词】 全外显子测序; STK11 基因; Peutz-Jeghers 综合征; 产前基因检测

【中图分类号】 R 596 **【文献标志码】** B **【文章编号】** 1674-4020(2021)07-094-03

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2021.07.27

The pathogenetic sites analysis and prenatal gene testing of the family with Peutz-Jeghers syndrome

Zhao Yasong¹, Lyu Yuan², Li Chuang², Zhang Zhitao², Chen Haoyang^{1*}

1. The First Delivery Room; 2. Department of Gynecology & Obstetrics, Key Laboratory of Maternal-Fetal Medicine of Liaoning Province, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang Liaoning 110004, P. R. China

* Corresponding author, E-mail: chenhy@sj-hospital.org

【Abstract】Objective Identify the gene mutation site in the family with Peutz-Jeghers syndrome (PJS) by high-throughput sequencing technology, and perform prenatal genetic testing according to the mutation sites. **Methods** The clinical manifestations and family history of the proband were asked in detail. The genes mutation sites were screened by the whole-exon sequencing, and the mutation sites were verified by Sanger sequencing. Amniotic fluid of the wife of the proband was extracted in the second trimester of pregnancy then fetal free gene DNA was extracted. **Results** The proband carried the heterozygous mutation; c.95delC (p. thr32fs) in STK11 gene. The Sanger sequencing results were consistent with the high-throughput sequencing results, the mutation site was the cause of the disease in the family. Amniotic fluid test of the wife of the proband suggested that the fetus carried the same genetic mutation site as the proband. **Conclusion** This study identified the pathogenic sites of the family with PJS by high-throughput sequencing technology which provided the basis for genetic counseling and prenatal gene diagnosis of proband and their families.

【Key words】 the whole exon sequencing; STK11 gene; Peutz-jeghers syndrome; prenatal gene testing

Peutz-Jeghers 综合征 (Peutz-Jeghers syndrome, PJS) 又称为家族性黏膜皮肤色素沉着胃肠道息肉病, 简称为黑斑息肉综合征, 是一种罕见的常染色体显性遗传病, 其发生率在新生儿中约为 1/50 000-1/200 000^[1-2]。PJS 主要的临床表现为口唇、黏膜等皮肤特定部位散在的色素沉着斑及多发性胃肠道息肉, 部分 PJS 患者也存在有胆囊、支气管、膀胱等肠道外位置的息肉^[3-4]。PJS 患者经常并发多种相关疾病如肠道出血、肠套叠及肠梗阻等, 同时罹患多种肠道及肠外肿瘤的风险较正常人也大大增加, 有研究显示其中最常见的肿瘤是结直肠癌, 其次为乳腺癌、小肠癌、胃癌及胰腺癌等^[5]。PJS 主要由 STK11 基因突变引起, 该基因定位于染色体 19p13.3, 由 10 个外显子组成, 编码区全长为 10kb, 编码丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员, 其生物学功能十分复杂。

本研究对一临床表现为 PJS 的家系患者进行遗传学检测, 明确其致病基因位点, 并根据结果对先证者妻子进行羊水基因检测, 为其后续的诊疗提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

先证者就诊于中国医科大学附属盛京医院妇产科, 临床诊断为 PJS 患者, 先证者发病年龄为 12 岁, 临床特征为面部、嘴唇、指趾散在黑色素沉着斑点, 肠镜检查发现多发大肠及小肠息肉并经手术切除 (见图 1)。询问家族史发现其父亲也有相似症状, 但已经去世。先证者妻子已妊娠, 就诊于本院产科遗传咨询门诊并进行羊水穿刺。本研究取得先证者及其家属知情同意, 并通过本院伦理委员会论证。



图 1 先证者面部、嘴唇散在黑色素沉着斑点

1.2 方法

1.2.1 全外显子检测及 Sanger 测序验证 抽取先证者外周血 2 mL 并经 EDTA 抗凝作为检测样本, 使用 DNA 提取试剂盒 (中国天根公司) 提取外周血白细胞基因组 DNA。将基因组 DNA 打断片段化并制备文库, 使用高通量测序技术进行全外显子检测筛查可疑突变位点, 并结合先证者临床表型分析, 挑选出与患者临床特征相关的基因突变位点。针对可疑致病位点进行引物设计, 并对相应基因组 DNA 区域进行聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增, 扩增结束后对产物进行纯化定量, 使用 ABI3130xl 测序仪进行 Sanger 测序验证。检索 ClinVar、HGMD、OMIM、Pubmed 等数据判断该

基因突变位点是否为已知致病性变异, 并通过 ACMG 遗传变异分类标准与指南^[6]对该突变位点进行分类。

1.2.2 孕中期羊水检测及 Sanger 测序 于先证者妻子孕中期行羊膜腔穿刺抽取羊水 20 mL 作为检测样本, 提取羊水中胎儿游离 DNA 并进行纯化。针对与先证者一致的基因突变位点设计引物, 使用 PCR 核酸扩增仪对目的基因片段进行扩增, 并将获得目的基因片段序列与人类正常基因组序列进行比对, 明确胎儿是否携带有与先证者一致的基因突变位点。

2 结果

2.1 先证者全外显子组测序结果

结合先证者临床表型分析, 先证者携带 STK11 基因 c. 95delC (p. Thr32fs) 杂合突变 (见图 2), 为移码突变。通过对比该位点突变在 ClinVar 数据库有收录, 在 HGMD 数据库中记录为致病性变异; 在 ExAC 数据库、gnomAD 数据库等东亚正常对照人群中无记录。根据 ACMG 致病变异分级标准^[6], 判断该位点为致病性。

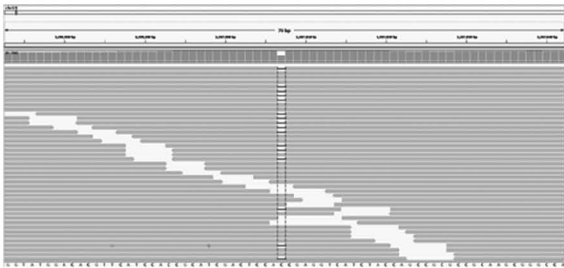


图 2 先证者全外显子测序结果

2.2 先证者 Sanger 测序结果

提示与高通量测序结果一致, 进一步明确先证者携带 STK11 基因 c. 95delC (p. Thr32fs) 杂合突变 (见图 3)。

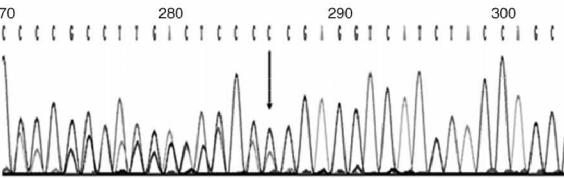


图 3 先证者 Sanger 测序结果

2.3 先证者妻子羊水检测结果

先证者妻子羊水检测结果提示胎儿携带有与先证者一致的基因突变位点即 STK11 基因 c. 95delC (p. Thr32fs) 杂合突变 (见图 4)。

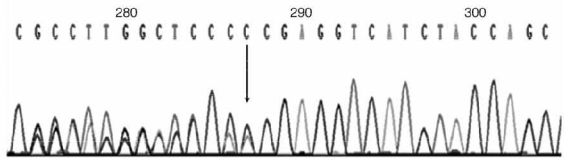


图 4 先证者妻子羊水检测结果

3 讨论

PJS 作为罕见的遗传性疾病,其诊断主要依赖于患者的临床特征及遗传学检测。为了更好地在临床上识别出 PJS 患者,临床诊断标准如下,当患者符合下列任一条件时即可被临床确诊为 PJS:① 经病理诊断明确的 2 个或 2 个以上的 PJ 息肉;② 任意数目的 PJ 息肉结合 PJS 家族病史;③ 典型的皮肤黏膜色素沉着斑结合 PJS 家族病史;④ 任意数目的 PJ 息肉结合典型的皮肤黏膜色素沉着斑^[7-8]。该家系先证者临床特征为面部、嘴唇、指趾散在黑色素沉着斑点,肠镜检查发现多发小肠息肉,并且先证者父亲亦有相似症状,符合 PJS 的临床诊断。基于目前的基因检测水平,STK11 基因突变被认为是 PJS 的主要致病原因,然而其基因变异类型是否与 PJS 的临床异质性相关尚无明确解释,Amos 等^[9]经研究认为 STK11 基因无义突变患者可能相较于其他变异类型患者临床症状迟发。Mehenni 等^[10]发现基因突变发生于 STK11 第 6 个外显子可能导致 PJS 患者具有更高的癌症发生率。而 Hearle 等^[11]基于 419 例 PJS 患者的临床研究表明不同的基因变异类型并不导致 PJS 患者具有更高的癌症发生风险,因此针对 PJS 的临床型-基因型相关性仍有待进一步研究确认。

STK11 基因生物学功能十分复杂。STK11 可通过 G1 细胞阻滞、WAF1 信号及 p53 介导的细胞裂解来调控细胞增殖^[12-13]。并且在调节细胞极性、细胞增殖及能量平衡等方面也起着重要作用,STK11 作为 AMP 活化蛋白激酶上游调节因子,可进一步作用于 TSC 及 mTOR 信号通路^[14-15]。因此当 STK11 蛋白失去功能时将导致息肉甚至癌症的发生。

本研究中先证者经临床诊断为 PJS,遗传学检测结果提示其携带 STK11 基因 c. 95delC (p. Thr32fs) 杂合突变,为移码突变,导致蛋白编码在 32 位苏氨酸处发生改变,并在新阅读框的 3 位过早产生终止密码子,导致产生截短蛋白,预测蛋白质功能丧失,从而导致患者临床表型的发生。同时经 Sanger 测序验证结果提示其胎儿携带与先证者相同的基因突变位点,为孕期的诊疗提供了证据。充分知情同意后,该家庭选择终止妊娠,引产后胎儿皮肤未见任何色素沉着斑。该家系选择再次妊娠,鉴于 PJS 为常染色体显性传染病,其后代患病率为 50%,因此建议其可选择辅助生殖并经胚胎植入前遗传学检测选择正常胚胎植入子宫从而获得健康后代。或选择经正常方式妊娠,但应于孕中期常规进行有创产前检测如羊膜腔穿刺检查或绒毛膜活检明确胎儿是否携带有 STK11 基因 c. 95delC (p. Thr32fs) 致病变异。

本研究通过临床表型分析及遗传学检测明确了一 PJS 家系致病原因,为该家系的产前基因检测及遗传咨询提供了依据,并进一步补充了表型谱与基因变异数据库,加强了该病的表型与基因型的联系。

【参考文献】

- [1] Tomas C, Soyer P, Dohan A, et al. Update on imaging of Peutz-Jeghers syndrome [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20 (31):10864-10875.
- [2] Giardiello FM, Trimboth JD. Peutz-Jeghers syndrome and management recommendations [J]. Clinical Gastroenterology and Hepatology; the Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association, 2006, 4(4):408-415.
- [3] Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF, et al. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management [J]. Gut, 2010, 59(7):975-986.
- [4] Vogel T, Schumacher V, Saleh A. Extraintestinal polyps in Peutz-Jeghers syndrome: presentation of four cases and review of the literature [J]. Int J Colorectal Res, 2000, 15(2):118-123.
- [5] Van Lier MG, Wagner A, Mathus-Vliegen EM, et al. High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations [J]. The American Journal of Gastroenterology, 2010, 105(6):1258-1265.
- [6] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology [J]. Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics, 2015, 17(5):405-424.
- [7] Aaltonen LA. Hereditary intestinal cancer [J]. Seminars in Cancer Biology, 2000, 10(4):289-298.
- [8] Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, et al. High proportion of large genomic STK11 deletions in Peutz-Jeghers syndrome [J]. Human Mutation, 2005, 26(6):513-519.
- [9] Amos CI, Keitheri-Cheteri MB, Sabripour M, et al. Genotype phenotype correlations in Peutz-Jeghers syndrome [J]. J Med Genet, 2004, 41:327-333.
- [10] Sarret C, Oliver PI, Tonduti D, et al. Molecular and clinical characteristics in 46 families affected with Peutz-Jeghers syndrome [J]. Digestive Diseases and Sciences, 2007, 52(8):1924-1933.
- [11] Hearle N, Schumacher V, Menko FH, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome [J]. Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2006, 12(10):3209-3215.
- [12] Tiainen M, Ylikorkala A, Makela TP. Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(16):9248-9251.
- [13] Karuman P, Gozani O, Odze RD, et al. The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death [J]. Molecular Cell, 2001, 7(6):1307-1319.
- [14] Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways [J]. Annual Review of Biochemistry, 2006, 75:137-163.
- [15] Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, et al. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome [J]. Genes & Development, 2004, 18(13):1533-1538.