

· 论 著 ·

10 例食道闭锁患儿基因变异的初探

钟龙青, 黄金狮, 陶 强, 万 颖, 段 荣, 柯江维[△]

(江西省儿童医院检验科, 江西南昌 330006)

摘要:目的 探索食道闭锁(EA)患儿基因变异情况,为进一步研究 EA 致病机制提供前期基础。**方法** 收集该院新生儿外科住院的 EA 患儿 10 例,运用高通量全外显子组测序研究患儿基因变异情况,并运用生物信息学方法分析基因变异的临床意义。**结果** 高质量的测序数据中,有效读段(Clean reads)占 85.36%,其中 97% 的 Clean reads 能与参考基因进行比对。通过比对分析共获得单核苷酸多态性位点 520 541 个,其中 149 622 个位点发生单核苷酸变异(SNV),包括同义突变、非同义突变、终止密码子获得、终止密码子缺失、插入移码突变、非插入移码突变和未知突变等;同时检测到 598 个拷贝数变异基因。功能聚类分析显示突变基因与细胞生物学密切相关。**结论** SNV 的发生可能影响体内各种蛋白质的表达及其功能,在 EA 的致病机制中可能发挥重要作用。

关键词:食道闭锁; 全外显子组测序; 致病基因**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.021**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2017)22-3131-03**Preliminary research on gene mutation in 10 children patients with esophageal atresia**ZHONG Longqing, HUANG Jinshi, TAO Qiang, WAN Hao, DUAN Rong, KE Jiangwei[△]

(Department of Clinical Laboratory, Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To explore the genetic variation in children patients with esophageal atresia(EA) to provide a prophase basis for further studying EA pathogenesis. **Methods** Ten children cases of EA were collected from the neonatal surgery department of our hospital. The high-throughput whole-exon sequencing was used to study the genetic variations, and their clinical significance was analyzed by the bioinformatics methods. **Results** In the high quality sequencing data, the effective clean reads accounted for 85.36%, in which 97% of the clean reads could participate in the comparison with the reference genes. The comparison analysis obtained 520 541 single nucleotide polymorphism sites, in which single nucleotide variation(SNV) occurred at 149 622 sites, including synonymous mutation, non-synonymous mutation, stop codon gain, stop codon loss, frameshift insertion, non-frameshift insertion, unknown mutation; meanwhile, 598 copy number variation genes were detected. The functional cluster analysis revealed that the mutant genes were closely related to cell biology. **Conclusion** The SNV occurrence may influence the expression and function of body various proteins and may play an important role in EA pathogenesis.

Key words:esophageal atresia; whole exome sequencing; pathogenic genes

食道闭锁(EA)是一种由新生儿消化道发育畸形而引起的先天性食道缺陷疾病,其发病率为 1/4 500~1/2 500^[1],大约 50% 的患儿还伴有脊椎、肛门、心血管、气管、肾脏和腹部发育不全。与其他的先天畸形相比,EA 好发于双胞胎中^[2]。胚胎学上,气管和食管同源于胚胎原始前肠;在胚胎第 3~6 周,内胚层细胞经过不断增殖、实化和空化等一系列过程形成管腔;同时管腔内壁两侧上皮细胞增生形成隔嵴将管腔分隔为食管和气管;若管腔空泡化过程发生障碍,则导致食管闭锁畸形;若管腔分隔过程异常,则导致食管气管瘘^[1]。EA 按照 Gross 分型法可分为 5 种临床类型:(1) I 型,食管上下端不连接,各成盲端;(2) II 型,食管上段与气管相通,下段呈盲端;(3) III 型,食管上段为盲端,下端与气管相通;(4) IV 型,食管上下段分别与气管相通;(5) V 型,无食管闭锁,但有瘘与气管相通。不管类型如何,业内一致认为 EA 是基因-变异-遗传复合因素相互作用引起的罕见病^[3]。由于 EA 常合并吸入性肺炎等并发症,进食后有呛咳、呼吸困难及紫绀,如不及时处理会危及患儿生命。目前,EA 的致病基因尚不明确。本文主要采用 Nextseq 500 测序平台进行双端全外显子组测序(WES),分析致病基因突变类型及遗传学特征,为 EA 发病机制的进一步研究提供基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 10 月至 2014 年 10 月本院新生儿科住院治疗的 EA 患儿 10 例作为研究对象(编号 1~10),其中男 6 例、女 4 例;I 型 1 例,II 型 1 例,III 型 8 例;先天性心脏病 7 例,双侧隐睾 1 例,过期产 1 例,早产 1 例。患儿同时存在新生儿肺炎、新生儿脐炎、新生儿皮肤感染、新生儿黄疸、新生儿贫血和新生儿脑病等的 1 种或多种并发症,经合理治疗后,除 1 例死亡外,其余均好转。

1.2 仪器与试剂 Nextseq500 测序仪(NSS500148),测序试剂盒(FC-404-2003、FC-404-2004)均购自美国 Illumina 公司,DNA 提取试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本准备 收集患儿食道组织,用蛋白酶 K 消化后经研磨器碾碎组织,用 DNA 提取试剂盒提取患儿全基因 DNA 标本,并用电泳和微量核酸定量仪检测其纯度和浓度,分装后于 -80 ℃ 冰箱保存备用,避免反复冻融。标本合格条件为:在 260 nm 和 280 nm 的吸光度比值介于 1.8~2.2,在 260 nm 和 230 nm 的吸光度比值不低于 2.0,浓度大于 200 ng/μL,DNA 总量大于 10 μg。

1.3.2 WES 与比对 DNA 标本复融后,经 1% 普通琼脂糖凝

胶电泳检测,标本应该无杂质和降解,将 DNA 标本随机片段化,然后进行末端补平,在 DNA 末端加 A 后再加接头,富集 DNA 片段之后进行杂交,捕获外显子并在 Nextseq 500 测序仪上进行高通量测序。对聚合酶链式反应(PCR)扩增循环进行严格控制,避免 PCR 扩增过度导致文库中出现大量序列完全相同的 reads。高质量的外显子组数据中有效读段(Clean reads)是指剔除了接头自连、低质量的碱基和读段(reads)后的有效 reads。将 Clean reads 通过 BWA 软件与人类参考基因组进行比对(地址:<http://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/hg19/bigZips/>)。

1.3.3 单核苷酸变异(SNP)检测与注释 在外显子区域一致性序列的基础上,将唯一比对到的 reads 片段进行 SNP 分析,获得突变位点和突变类型,分析使用的方法为基因组分析工具包(GATK)和 Samtools 软件,采用默认参数。两种方法得到变异之后,再根据质量值、深度、重复性等因素做进一步的过滤筛选,同时下载人类基因突变数据库、千人基因组计划数据库中的数据进行多级过滤,取两种分析方法所得结果的交集,并从中筛选 GATK 质量得分大于或等于 30 的变异,过滤掉基因组已经注释的变异集,并去掉已报道的在正常对照标本中出现的变异,从而获得最终的高可信度的 SNP 数据集。根据已有的基因集对检测到得变异进行注释,确定 SNP 数目及其非同义突变或同义突变数目,以及多态性位点在基因中的位置。利用 DAVID 在线平台(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)对发生终止密码子获得、终止密码子缺失和插入移码突变的基因进行功能注释聚类分析。

1.3.4 结构变异检测 利用测序个体序列与参考基因组序列进行比较基因组学研究,检测全基因组中的结构变异。数据分析使用 R 语言包 Exome Copy,参数均为默认参数。

2 结 果

2.1 外显子测序结果与文库质量 每个标本的原始读段(Raw reads)均达到 3 724 万以上,平均为 6 001 万;经过 1 端 Clean 策略和 2 端 Clean 策略筛选和有效提取后,最后获得的 Clean reads 均达到 3 252 万以上,平均值为 5 134 万,占 85.56%。PCR 复制水平为 29.5%~55.33%。Clean reads 是剔除了质量值低于 20 的碱基,测序单端读长为 151 nt,绝大部分序列的有效长度为 145~147 nt。建库平衡用随机碱基,截取掉后面低质量的碱基,获得的有效长度最长为 147 nt。所有序列从第 1~147 位碱基的质量评分大于 28。见表 1。

表 1 外显子测序结果

编号	Raw reads	Clean reads	百分比(%)
1	38 616 920	32 527 263	84.23
2	41 979 308	35 891 363	85.50
3	37 244 070	31 714 309	85.15
4	46 282 632	39 249 055	84.80
5	42 698 502	35 778 338	83.79
6	58 228 876	50 249 659	86.30
7	84 276 934	73 625 449	87.36
8	92 438 712	79 027 930	85.49
9	71 574 152	61 007 768	85.24
10	86 802 416	74 422 427	85.74
平均值	60 014 252	51 349 356	85.56

2.2 Clean reads 与参考基因组比对结果 10 例研究对象的平均总比对序列达 4 983 万,即 97% 的 Clean reads 能与参考基因进行比对,其中平均单位置比对序列达 4 041 万,约为占 81.04%,而平均多位置比对为 941 万,仅为 18.97%。Clean reads 主要分布在 Intron、CDS 和 intergenic 区,其次是 3'UTR、Nc_exon 和 5'UTR。见表 2。

表 2 Clean reads 与参考基因组比对结果

编号	输入序列	总比对序列	单位置比对序列	多位置比对序列
1	32 527 263	31 458 609	25 535 815	5 922 794
2	35 891 363	34 851 034	28 107 991	6 743 043
3	31 714 309	30 781 614	24 811 183	5 970 431
4	39 249 055	38 182 732	30 887 960	7 294 772
5	35 778 338	34 628 965	27 841 589	6 787 376
6	50 249 659	48 498 018	39 465 898	9 032 120
7	73 625 449	71 663 105	58 032 578	13 630 527
8	79 027 930	76 878 444	62 383 529	14 494 915
9	61 007 768	59 006 860	48 086 660	10 920 200
10	74 422 427	72 381 215	59 033 601	13 347 614
平均值	51 349 356	49 833 059	40 418 680	9 414 379

2.3 SNP 分析结果 总 SNP 位点为 520 541 个,其中分布在外显子区的 SNP 位点为 7 234 个,占 1.39%。在外显子区的 SNP 中,149 622 个位点发生单核苷酸变异(SNV),其中 30 572 个位点为同义突变,114 768 个位点为非同义突变,1 705 位点为终止密码子获得,861 个位点为终止密码子缺失,11 个位点为插入移码突变,8 个位点为非插入移码突变,1 697 位点发生未知突变。

2.4 SNP 基因的功能聚类分析结果 正常情况下,获得终止密码子的基因主要富集到锌指、转录调控、角蛋白丝、细胞骨架元件、表皮生长因子类似钙离子结合和细胞黏附、受体介导的内吞作用、蛋白胞外基质、层粘连蛋白 G 亚结构域和 GTP 酶调控子活性等功能类别上。而发生 SNP 后失去终止密码子的基因主要富集到角蛋白丝、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、调控水解酶活性、第二信使介导的信号、后脑发育、颅神经发育、内吞作用、转录因子结合、序列特异性 DNA 结合、磷代谢、磷酸化、磷酸酪氨酸结合、胆固醇合成和代谢过程等功能类别上。

2.5 基因组拷贝数变异(CNV)及功能聚类分析结果 对 CNV 进行统计,共检测到 598 个基因 CNV,经注释后,共得到 1 502 条注释信息。由于基因重叠等原因,注释出的基因存在重复,对这些基因利用 DAVID 在线平台进行功能通路分析,发生 CNV 的相关基因主要富集到抗原加工和呈递、免疫反应、细菌防御应答、细胞黏附、维生素 B1₂ 生物合成、认知、感知化学刺激和感知气味等功能通路。

3 讨 论

国内外学者采用临床标本和动物模型从胚胎发生学角度研究 EA 的致病基因,并发现功能异常的 Shh、Nog、Sox2、Pcsk5 基因和转录因子 p63、Nkx2.1、Tbx4 可能与 EA 的发生发展相关^[1]。最近有研究显示 EFTUD2 的突变或缺失可以引起 EA。Voigt 等^[2]运用 Sanger 测序法在患儿(同患 MFDGA 和 EA 两种缺陷疾病)中发现 EFTUD2 基因的一个新突变。

Murphy 等^[3]在 50 例 EA 患者中发现 NOG 基因编码域一个同义突变的 SNP(468, C-T)存在于其中一人。Celli 等^[4]在研究 ODED 综合征时发现在 2p23-p24 区域的基因的单倍剂量不足与 EA 相关。Shaw-Smith 等^[5]在 VACTERL 联合征的研究中发现染色体 20q13.33 的一个新缺失,位于该缺失区域的 GTPBP5 基因可能是 EA 的候选致病基因,且位于染色体 16q24.1 的 FOX 基因簇(由 FOXF1, MTHFSD, FOXC2 和 FOXL1 组成)的微小缺失与 VACTERL 相关。Winberg 等^[6]研究发现 VACTERL 患儿的 FANCB 基因存在一个杂合突变、(9;18)(p24;q12)不平衡易位及 CHD7 的一个致病性突变,这些突变可能与 EA 的发病相关。

本研究利用的 WES 技术是一种研究人类疾病致病基因的技术,与传统全基因组测序技术相比,其具有更深的覆盖度、更高的数据准确性及更低的成本优势,可更加经济、高效地发现与疾病或表型相关的个体遗传变异及罕见突变。WES 已被广泛用于罕见病的致病基因的研究,如不明原因结直肠腺瘤性息肉病的新的候选致病基因 PIEZO1 和 ZSWIM7^[7]、白塞病的罕见遗传性变异基因 NEIL1 和 LIMK2^[8]、Axenfeld-Rieger 综合征的家族性杂合错义突变基因 PRDM5^[9]、Kabuki 综合征的致病基因 MLL2^[10]和逆向性痤疮的致病基因 NCSTN^[11]等。因此,WES 是鉴定孟德尔疾病或罕见病的致病基因最有效的策略,可准确地找到罕见病的致病基因^[12-13]。

本研究运用 WES 研究 EA 患儿的致病基因,获得了高质量的测序数据,其结果显示 EA 患儿基因中存在大量的 SNP,分布在外显子区的 SNP 占 1.39%,对外显子 SNP 位点进行筛选注释发现多个位点发生 SNV。SNV 的发生可能影响体内各种蛋白质的表达及其功能,在 EA 的致病机制中可能发挥重要作用,至于具体的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Sudjud R, Bisri T, Boom CE. Anesthetic Consideration on Neonatal Patient with Esophageal Atresia[J]. Open J Anesthesiol, 2016, 6(6):128-136.
- [2] Voigt C, Megarbane A, Neveling K, et al. Oto-facial syndrome and esophageal atresia, intellectual disability and zygomatic anomalies-expanding the phenotypes associated with EFTUD2 mutations[J]. Orphanet J Rare Dis, 2013, 8(1):110-110.
- [3] Murphy AJ, Li YA, Pietsch JB, et al. Mutational analysis of NOG in esophageal atresia and tracheoesophageal fistula patients[J]. Pediatr Surg Int, 2012, 28(4):335-340.
- [4] Celli J, Beusekom V, Hennekam R, et al. Familial syndromic esophageal atresia maps to 2p23-p24[J]. Am J Hum Genet, 2000, 66(2):436-444.
- [5] Shaw-Smith S, Charles. Genetic factors in esophageal atresia, tracheo-esophageal fistula and the VACTERL association: roles for FOXF1 and the 16q24.1 Fox transcription factor gene cluster, and review of the literature[J]. Eur J Med Genet, 2010, 53(1):6-13.
- [6] Winberg J, Gustavsson P, Papadogiannakis NA, et al. Mutation screening and array comparative genomic hybridization using a 180K oligonucleotide array in VACTERL association[J]. PLoS One, 2014, 9(1):e85313.
- [7] Spier I, Kerick M, Drichel D, et al. Exome sequencing identifies potential novel candidate genes in patients with unexplained colorectal adenomatous polyposis [J]. Fam Cancer, 2016, 15(2):281-288.
- [8] Ognenovski M, Renauer P, Koetter I, et al. Whole exome sequencing identifies rare protein-coding variants in behcet's disease[J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(10):6710.
- [9] Micheal S, Siddiqui SN, Zafar SN, et al. Whole exome sequencing identifies a heterozygous missense variant in the PRDM5 gene in a family with Axenfeld-Rieger syndrome [J]. Neurogenetics, 2016, 17(1):17-23.
- [10] Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome[J]. Nat Genet, 2010, 42(9):785-790.
- [11] Liu Y, Gao M, Lv YM, et al. Confirmation by exome sequencing of the pathogenic role of NCSTN mutations in acne inversa (hidradenitis suppurativa)[J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(7):1570-1572.
- [12] Yang YP, Muzny DM, Reid JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders [J]. N Engl J Med, 2013, 369(16):1502-1511.
- [13] Yang YP, Muzny DM, Xia F, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing[J]. JAMA, 2014, 312(18):1870-1879.

(收稿日期:2017-03-18 修回日期:2017-07-07)

(上接第 3130 页)

- [8] Gürel SA. Prenatal diagnosis of congenital hallux varus deformity associated with pericentric inversion of chromosome 9[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2015, 41(4):628-630.
- [9] ?ipek AJ, Panczak A, Mihalová R, et al. Pericentric Inversion of human chromosome 9 epidemiology study in czech males and females[J]. Folia Biol, 2015, 61(4):140-146.
- [10] Lee SG, Park TS, Lim G, et al. Constitutional pericentric inversion 9 and hematological disorders:a Korean tertiary

institution's experience over eight years. [J]. Ann Clin Lab Sci, 2010, 40(3):273-7.

- [11] Wei W, Ali S, Tang Z, et al. Constitutional pericentric inversion of chromosome 9 has no impact on survival in chronic myelogenous leukemia[J]. Ann Hematol, 2016, 95(4):1-3.
- [12] 侯红瑛,李小毛,范建辉,等.习惯性流产的细胞遗传学分析[J].中山大学学报(医学科学版),2000,21(5):397-399.

(收稿日期:2017-03-16 修回日期:2017-07-05)