

• 论 著 •

腓骨肌萎缩综合征患者 MFN2 基因突变检测的研究*

刘红仙¹,段丽芬^{2#},刘晓梅²,王惠萍²,王晓辉¹,褚嘉祐¹,孙浩¹,杨昭庆^{1△}
1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所,云南昆明 650118;
2. 云南省昆明市儿童医院,云南昆明 650228

摘要:**目的** 对 1 个腓骨肌萎缩综合征核心家系的致病突变进行鉴定和遗传学分析。**方法** 采用全外显子组测序技术筛选先证者中的致病突变,用 Sanger 测序技术检测核心家系中致病突变位点的基因型,并对其进行生物信息学分析。**结果** 先证者 MFN2 基因存在单碱基杂合突变 c. 1090C>T p. R364W,母亲与妹妹均为该位点单碱基杂合突变,且均呈现不同程度的肌肉萎缩,但严重程度和发病年龄有所不同,父亲表型正常且在该位点未见异常。先证者全外显子组测序结果显示未见其他报道的相关基因突变。**结论** 先证者 MFN2 基因 c. 1090C>T 为 1 个致病突变位点。

关键词:腓骨肌萎缩综合征; MFN2 基因; 全外显子组测序
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2021. 07. 011 **中图法分类号:**R682. 1+9
文章编号:1673-4130(2021)07-0816-04 **文献标志码:**A

Detection of MFN2 gene mutation in patients with peroneal muscular atrophy syndrome*

LIU Hongxian¹,DUAN Lifeng^{2#},LIU Xiaomei²,WANG Huiping²,
WANG Xiaohui¹,CHU Jiayou¹,SUN Hao¹,YANG Zhaoqing^{1△}

1. Institute of Medical Biology,Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College,Kunming,Yunnan 650118,China;2. Kunming Children's Hospital, Kunming,Yunnan 650228,China

Abstract:**Objective** To identify and genetically analyze pathogenic mutations in a core family of peroneal muscular atrophy syndrome. **Methods** The whole exome sequencing technology was used to screen the pathogenic mutations in the proband,and the Sanger sequencing technology was used to detect the genotypes of the pathogenic mutation sites in the core family,and conduct bioinformatics analysis. **Results** There was a single-base heterozygous mutation c. 1090C> T p. R364W in the MFN2 gene of the proband. Both mother and sister had single-base heterozygous mutations at this site,and all three showed varying degrees of hand and foot muscle atrophy,but severity and age of onset were different,and paternal phenotype was normal and no abnormalities were observed at this site. The proband's whole exome sequencing results showed no other reported related gene mutations. **Conclusion** The MFN2 gene c. 1090C>T of the proband is a pathogenic mutation site.

Key words:peroneal muscular atrophy syndrome; MFN2 gene; whole exome sequencing

腓骨肌萎缩综合征(CMT)是一类外周神经退行性遗传病,具有显著的临床表型和遗传异质性^[1]。CMT 在普通人群中的患病率约为 1/3 300^[2]。CMT 一般最早的症状是由足部肌肉萎缩引起,常导致足部畸形,例如高足弓、平足或卷曲脚趾,下肢腿部难以弯曲。CMT 有明显的临床异质性,常难以明确认知和诊断。CMT 通常在青春期或成年早期表现出明显症

状,但是发病时间可能是儿童早期到成年后的任何時候。即使是同一家庭的成员,CMT 症状的严重程度和发病年龄也有所不同。基于对 CMT 发生发展的认知及临床诊治的现状,本研究拟利用全外显子组测序(WES)对 1 个疑似 CMT 核心家系的致病突变进行鉴定和遗传学分析,旨在探讨引起突变的原因,进而证实该突变的致病性,为临床诊治提供参考。

* 基金项目:云南省卫生健康委员会医学领军人才培养计划项目(L-2018003);云南省科技计划项目(201901C070496);云南省科学技术厅/昆明医科大学应用基础研究联合专项项目(202001AY070001-273)。

作者简介:刘红仙,女,助理研究员,主要从事罕见疾病的遗传学相关研究。# 共同第一作者,段丽芬,女,副主任医师,主要从事儿童神经系统疾病相关研究。△ 通信作者,E-mail:zyang@imbcams.com.cn。

本文引用格式:刘红仙,段丽芬,刘晓梅,等.腓骨肌萎缩综合征患者 MFN2 基因突变检测的研究[J].国际检验医学杂志,2021,42(7): 816-818.

1 资料与方法

1.1 一般资料 1 个核心家系来自云南省,包括先证者及其父亲、母亲和妹妹。先证者,男,10 岁,表现出足部畸形,发病于 3 岁左右;先证者父亲未见四肢肌张力及功能等表型异常;先证者母亲自述 8~9 岁逐渐出现行走姿势异常及四肢肌肉萎缩,后出现下肢瘫痪,现仅能独坐,不能站立和行走,四肢纤细、消瘦,肌容积明显减少;先证者妹妹病史与先证者类似。该家系中的 3 例患者因四肢功能表现异常入院治疗,疑似肌张力障碍,但是具体原因仍需进一步检查和确诊。

1.2 方法

1.2.1 外周血全基因组 DNA 的提取 根据知情同意原则,获取该核心家系中所有成员的抗凝外周静脉血 5 mL,采用 AxyPrep™ Blood genomic DNA Miniprep Kit 试剂盒(购自江苏康宁生命科学有限公司)提取基因组 DNA。

1.2.2 WES 检测 采用 Illumina NovaSeq 高通量双端(Pair-end 150bp)测序平台(购自北京贝瑞和康生物技术有限公司)对先证者基因组 DNA 全外显子组进行 WES 检测,其简要流程如下:将 1 μg 基因组 DNA 随机打断成 150~200 bp 的片段,然后通过 PCR 扩增进行标本标记和富集 DNA,将构建好的文库与已标记的 RNA 探针进行液相杂交,利用标记磁珠捕获目标区域,构建小片段测序文库。测序检测完成后,经碱基识别转化为原始序列数据,通过变异位点检索系统和变异位点注释系统对测序数据进行数据产量统计及单核苷酸多态性、插入和缺失检测及注释。以 2015 年美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)发布的遗传变异分类标准与指南及 2016 年发布的二级发现报告指南 SFv2.0 为指导^[3],参考单核苷酸多态性数据库和人类基因突变数据库,筛选致病突变位点。根据 SIFT、Polyphen-2、Mutation Taster 软件对其突变位点进行评分并预测其致病性。SIFT 分值为该变异对蛋白质的影响,分值越小越有害;Polyphen-2 分值为 Human Div 数据库预测该变异对蛋白质序列影响的分值,适用复杂表型中罕见等位基因位点突变的诊断,分值越大越有害,表明该单核苷酸多态性导致蛋白结构或功能改变的可能性越大;Mutation Taster 分值为 Mutation Taster 软件的预测结果,分值越大结果越可靠。

1.2.3 线粒体融合蛋白 2(MFN2)位点 Sanger 测序验证 用 PCR-Sanger 测序对该核心家系 4 例患者进行突变位点的检测。在美国国立生物技术信息中心上在线合成 1 对包含 MFN2 基因(NM_014874.3)c.1090C>T p. R364W 突变位点的特异性扩增引物,其中,正向引物序列为 5'-TCC CTG GCA GTG AAA ACC AG-3',反向引物序列为 5'-CAG GGA AAG GGC TCT GGA TG-3'。40 μL 的反应体系为 40 ng

基因组 DNA 约 10 μL,10 μmol 正反向引物各 1 μL,2×PCR Master Mix 20 μL,用去离子水补足至 40 μL。PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 45 s;55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经凝胶鉴定后进行 Sanger 测序。采用 Geneious 11.1.5 生物信息学软件对测序结果进行序列比对和分析。

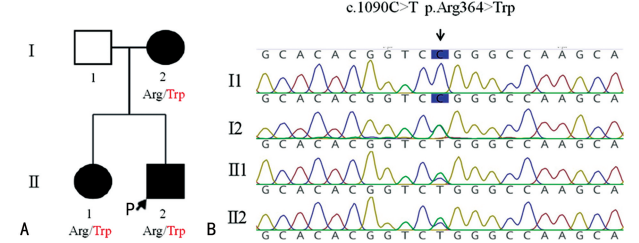
2 结果

2.1 临床表型 检测结果显示先证者四肢肌张力升高,双上肢肌力Ⅳ~Ⅴ级,双下肢肌力Ⅳ级,姿势异常:前臂内旋,马蹄内翻足,踝关节趾曲、翻转,足趾屈曲,步态蹒跚不稳,下肢无力,手指关节挛缩无法伸直。四肢多条受检神经运动、感觉传导功能异常,表现为:(1)双侧胫、腓总、正中、尺神经复合肌肉动作电位(CMAP)均未引出;双侧股、桡神经 CMAP 波幅降低;(2)各受检神经 F 波均未引出;(3)各受检神经感觉神经动作电位均未引出。神经传导检测结果提示有四肢广泛性周围神经病变,传导阻滞,轴索病变为主可能,远端重于近端。

2.2 WES 结果 本研究利用 WES 技术对先证者进行检测并分析其结果,根据 ACMG 指南,在人类外显子数据库东亚人群(ExAC_EAS)中未发现 MFN2 基因 c.1090C>T 突变;经计算机辅助药物设计和神经网络领域对抗性训练等对其进行保守性预测,结果显示该位点进化上保守,具有潜在的功能影响;该位点致病性预测皆显示有害。提示先证者 MFN2 基因 c.1090C>T 为 1 个疑似致病的突变位点。见表 1。

表 1 MFN2 基因 c.1090C>T p. R364W 突变位点致病性预测		
方法	分值(分)	致病性
SIFT	0	有害
Polyphen-2	1	很可能有害
Mutation Taster	1	有害

2.3 Sanger 测序结果 PCR-Sanger 测序结果显示先证者、母亲及妹妹均为 MFN2 基因单碱基杂合突变 c.1090C>T p. R364W,其父亲在该位点为野生型,未见碱基突变,表明 WES 预测正确,见图 1。



注:A 为 CMT 患者家系图谱,一共 4 名成员,包括 3 例患者,I 1、I 2、II 1、II 2 分别为父亲、母亲、先证者妹妹及先证者(箭头指示为先证者);Arg/Trp 为精氨酸到色氨酸的氨基酸改变;B 为 MFN2 基因 PCR-Sanger 测序结果。

图 1 CMT 患者家系及 MFN2 基因测序结果

3 讨 论

CMT 是一类周围神经遗传性感觉损伤和运动神经损伤的疾病。周围神经可以将大脑和脊髓连接到肌肉和末端感觉细胞,这些细胞可以感知触摸、疼痛、热量和声音等。周围神经轴突的异常会引起肌张力异常,腓骨进行性肌肉萎缩足部畸形,远端无力,感觉丧失和视神经萎缩等^[4]。随着疾病的发展,患者小腿的肌肉通常会萎缩,到晚期可能需要使用轮椅。CMT 患者通常对足和小腿的触摸、疼痛及热量的敏感性较低,但偶尔会感到疼痛或灼痛感。在极少数情况下,受影响的患者会失去视力或逐渐丧失听力,甚至导致患者耳聋。尽管在大多数患者中,CMT 不会影响预期寿命,较多患者仅产生中等程度的身体残疾,症状轻微,甚至可能不会出现明显的临床表型。但是,在极少数情况下,CMT 也有可能会危及患者生命^[5]。

根据遗传方式,CMT 可表现为常染色体显性和隐性,以及 X-连锁显性和隐性遗传,其中以常染色体显性遗传多见,此外还有少数纯合或复合杂合突变。根据神经病理学和电生理学标准,CMT 被分为 2 个类型:脱髓鞘型(CMT1)和轴突型(CMT2),CMT2 又包括 CMT2A、CMT2B 和 CMT2D 等^[6]。CMT2A (OMIM:608507)中最常见是 MFN2 基因突变,约占所有基因突变的 20%。MFN2 是 CMT2 主要的致病基因,突变频率为 8%~30%。MFN2 是编码线粒体 GTP 酶的核基因,与线粒体融合蛋白 1、神经节苷脂诱导分化相关蛋白 1 和视神经萎缩 1 相互作用,对线粒体的结构完整性、形态和运输至关重要^[7]。MFN2 通过影响氧化磷酸化而参与能量代谢^[8]。MFN2 与 Ca^{2+} 的吸收调节有关,促进内质网-线粒体的结合^[9]。已有研究报道了罕见的 MFN2 复合杂合或纯合突变病例^[10]。这有助于扩大与 MFN2 相关的神经疾病的遗传特征范围。在临床上,与 MFN2 相关的 CMT2A 发病特征可以从轻度的迟发性神经疾病到严重的早发性神经疾病^[11],其表型通常比单纯的周围神经疾病复杂,有听力损失、视神经萎缩或锥体束征等其他特征^[12]。有研究报道了 15 例 CMT2A 患者,他们均是 MFN2 突变的复合杂合子或纯合子携带者,具有常染色体隐性遗传或半显性遗传,这些患者通常表现出严重的早期发作性神经疾病,也有较轻的儿童期发病病例,有严重表型的患者通常会在 30 岁左右因下肢瘫痪需要乘坐轮椅,并合并其他发病特征^[13-15]。已有研究表明,MFN2 基因突变位点 c. 1090C>T 的主要临床症状是视神经萎缩等,该位点位于 MFN2 蛋白高度保守的 R3 区,是 1 个突变热点^[16]。

在本研究的核心家系中,先证者、母亲及妹妹均为 MFN2 基因 c. 1090C>T 单碱基杂合突变,其父亲在该位点为野生型,未见碱基突变。先证者主要显示出轻度的营养不良和下肢无力,发病时间为 3 岁左

右;先证者母亲 8~9 岁逐渐出现姿势异常及肌肉萎缩,后出现瘫痪,现仅能独坐,不能站立和行走,四肢纤细、消瘦,肌容积明显减少;妹妹病史与先证者类似;先证者父亲表型未见异常。先证者及其妹妹都表现出较早、较轻的儿童期发病,目前已经采用手术矫正的方法逆转其手足畸形,并配合其他方法尽量维持其肌肉的自主能力^[17]。其母亲因发病时间较长且前期未做相关检查和治疗,目前已出现下肢瘫痪,无法行进一步干预。由于目前无法采集到除该核心家系以外的先证者其他家族成员的基因,所以仅能推断先证者及其妹妹的杂合突变来源于其母亲,但是无法推断其母亲突变基因的来源,需要扩大其家庭的临床、神经生理和分子研究,从而确定致病作用和遗传模式的可能性。因此,在向患者及其家属披露基因检测结果和遗传咨询之前,需要仔细收集家族史并对健康的亲属进行分析。此外,由于外显率不完全,复发风险可能大不相同,必须将有关基因检测的不确定性充分告知患者,以便患者可以更好地了解自己的病情。

综上所述,本研究基于患者的临床表型,以 WES 和 PCR-Sanger 测序方法,在 1 个核心家系中检测并鉴定了 3 例携带 MFN2 基因单碱基杂合突变的患者。之前的报道显示此突变主要是以视神经萎缩为主要临床症状,与本研究中报道的四肢发病特征不同,也证实了 CMT 具有明显的临床异质性,常难以明确认知和诊断,需要与其他疾病正确进行区分。

参考文献

- [1] KAZAMEL M, BOES C J. Charcot marie tooth disease (CMT): historical perspectives and evolution[J]. J Neurol, 2015, 262(4): 801-805.
- [2] TIMMERMAN V, STRICKLAND A V, ZUCHNER S. Genetics of charcot-marie-tooth (CMT) disease within the frame of the human genome project success[J]. Genes (Basel), 2014, 5(1): 13-32.
- [3] RICHARDS S, AZIZ N, BAILE 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]. Genet Med, 2015, 17(5): 405-424.
- [4] 屈金辉,白雪,官士珍,等. 腓骨肌萎缩症患者基因突变研究[J]. 天津医科大学学报, 2018, 24(6): 552-555.
- [5] BOARETTO F, VETTORI A, CASARIN A, et al. Severe CMT type 2 with fatal encephalopathy associated with a novel MFN2 splicing mutation[J]. Neurology, 2010, 74(23): 1919-1921.
- [6] ZUCHNER S, MERSIYANOVA I V, MUGLIA M, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause charcot-marie-tooth neuropathy type 2A[J]. Nat Genet, 2004, 36(5): 449-451.

(下转第 823 页)

- genesis via silencing P15[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7):4552-4560.
- [7] 张义, 张擎柱, 谷锐, 等. LncRNA FOXC2-AS1 逆转骨肉瘤细胞对阿霉素耐药性的影响[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(5):385-390.
- [8] RINKE J, CHASE A, CROSS N C, et al. EZH2 in myeloid malignancies[J]. *Cells*, 2020, 9(7):1639.
- [9] 刘燕, 方芳. miR-101-3p 负向调控 EZH2 表达逆转子宫内膜癌细胞顺铂耐药的作用及机制[J]. *河北医药*, 2019, 41(22):3365-3370.
- [10] ARAN V, VICTORINO A P, THULER L C, et al. Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality[J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2016, 15(3):195-203.
- [11] BALIOU S, KYRIAKOPOULOS A M, SPANDIDOS D, et al. Role of taurine, its haloamines and its lncRNA TUG1 in both inflammation and cancer progression. On the road to therapeutics[J]. *Int J Oncol*, 2020, 57(3):631-664.
- [12] LODDE V, MURGIA G, SIMULA E R, et al. Long non-coding RNAs and circular RNAs in autoimmune diseases [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(7):1044.
- [13] 张义, 张擎柱, 谷锐, 等. lncRNA FOXC2-AS1 逆转骨肉瘤细胞对阿霉素耐药性的影响[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(5):385-390.
- [14] CHRISTOFIDES A, PAPAGREGORIOU G, DWEED H, et al. Evidence for miR-548c-5p regulation of FOXC2 transcription through a distal genomic target site in human podocytes[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(12):2441-2459.
- [15] GE J, LI J, NA S, et al. MiR-548c-5p inhibits colorectal cancer cell proliferation by targeting PGK1 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10):18872-18878.
- [16] PAN K, XIE Y. LncRNA FOXC2-AS1 enhances FOXC2 mRNA stability to promote colorectal cancer progression via activation of Ca²⁺-FAK signal pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6):434.
- [17] ASHOK C, SELVAM M, PONNE S, et al. CREB acts as a common transcription factor for major epigenetic repressors; DNMT3B, EZH2, CUL4B and E2F6 [J]. *Med Oncol*, 2020, 37(8):68.
- [18] 乔宇, 周旋, 井超, 等. 敲低 EZH2 表达抑制人舌鳞状细胞癌侵袭迁移能力的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2018, 45(9):438-444.
- [19] 庞亚梅, 王翠翠, 李岁萍, 等. miR-101、EZH2 和 MYC 调控乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖能力的机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(18):2832-2837.
- [20] FENG Y, HU S, LI L L, et al. LncRNA NR-104098 inhibits AML proliferation and induces differentiation through repressing EZH2 transcription by interacting with E2F1[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8(3):142.
- [21] 李妍, 孟凡东, 付立业, 等. 沉默 EZH2 对胃癌 MKN-28 细胞增殖和侵袭的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(9):1374-1377.
- [22] CHEN Y, GU M, LIU C, et al. Long noncoding RNA FOXC2-AS1 facilitates the proliferation and progression of prostate cancer via targeting miR-1253/EZH2 [J]. *Gene*, 2019, 686(1):37-42.

(收稿日期:2020-07-22 修回日期:2020-11-17)

(上接第 818 页)

- [7] KOSHIBA T, DETMER S A, KAISER J T, et al. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes[J]. *Science*, 2004, 305(5685):858-862.
- [8] LOISEAU D, CHEVROLIER A, VERNY C, et al. Mitochondrial coupling defect in charcot-marie-tooth type 2A disease[J]. *Ann Neurol*, 2007, 61(4):315-323.
- [9] DE-BRITO O M, SCORRANO L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria [J]. *Nature*, 2008, 456(7222):605-610.
- [10] NICHOLSON G A, MAGDELAINE C, ZHU D, et al. Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations [J]. *Neurology*, 2008, 70(19):1678-1681.
- [11] BOMBELLI F, STOJKOVIC T, DUBOURG O, et al. Charcot-marie-tooth disease type 2A: from typical to rare phenotypic and genotypic features [J]. *JAMA Neurol*, 2014, 71(8):1036-1042.
- [12] CHUNG K W, KIM S B, PARK K D, et al. Early onset severe and late-onset mild charcot-marie-tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations [J]. *Brain*, 2006, 129(8):2103-2118.
- [13] PISCOSQUITO G, SAVERI P, MAGRI S, et al. Mutational mechanisms in MFN2-related neuropathy: compound heterozygosity for recessive and semidominant mutations [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2015, 20(4):380-386.
- [14] CALVO J, FUNALOT B, OUVRIER R A, et al. Genotype-phenotype correlations in charcot-marie-tooth disease type 2 caused by mitofusin 2 mutations [J]. *Arch Neurol*, 2009, 66(12):1511-1516.
- [15] CARR A S, POLKE J M, WILSON J, et al. MFN2 deletion of exons 7 and 8: founder mutation in the UK population [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2015, 20(2):67-71.
- [16] ZUCHNER S, DE-JONGHE P, JORDANOVA A, et al. Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2 [J]. *Ann Neurol*, 2006, 59(2):276-81.
- [17] 张如旭, 唐北沙. 腓骨肌萎缩症治疗进展 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2017, 17(8):566-572.

(收稿日期:2020-07-27 修回日期:2020-12-19)