

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.10.001

• 基础研究 •

中国汉族两个马凡综合征家系 FBN1 基因的一个新插入突变
和一个复发点突变*刘 丹 田孝祥 刘艳霞 刘美丽 闫承慧[△]

(沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的:明确两个中国北方汉族马凡综合征(Marfan syndrome, MFS)家系的临床特点,并对其进行基因诊断。**方法:**对两个家系进行家系调查和系谱分析,应用聚合酶链式反应-PCR 测序方法对原纤维蛋白 1 基因(Fibrillin-1, FBN1)的所有外显子进行测序。应用 Swiss-model、Polyphen-2 和 SIFT 软件对发现的变异位点进行功能预测。**结果:**两个家系均呈常染色体显性遗传特点,在家系 1 患者中发现一个新的插入突变,即第 13 外显子 1691 位碱基处插入碱基 A(1691 ins A),导致蛋白在第 571 位氨基酸处翻译提前终止。此外,在家系 2 患者中发现一个已知的点突变,即第 27 外显子第 3463 位碱基由 G 变为 A (3463 G>A),导致第 1155 位氨基酸由天冬氨酸变为天冬酰胺。这两个变异位点在家系的健康人及 50 例健康对照中均未出现。功能预测发现这两个变异位点均可能会影响 FBN1 蛋白的结构或功能。**结论:**在两个 MFS 家系中发现一个新插入突变位点 (1691 ins A) 和一个已知点突变位点 (3463 G>A),为扩大 FBN1 基因的突变谱及进一步阐明 FBN1 基因突变在 MFS 中的作用提供理论依据。

关键词: 马凡综合征;原纤维蛋白-1;家系;变异;先证者

中图分类号: Q75; R394.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)10-1801-05

A Novel Insertion Variant and a Recurrent Point Mutation in Two Chinese
Han Marfan Syndrome Families*LIU Dan, TIAN Xiao-xiang, LIU Yan-xia, LIU Mei-li, YAN Cheng-hui[△](Cardiovascular Research Institute and Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Command,
Shenyang, Liaoning, 110016, China)

ABSTRACT Objective: To make genetic diagnosis and discuss the clinical characteristics in two Chinese Han Marfan syndrome (MFS) families. **Methods:** Family investigation and pedigree analysis was carried out in two MFS families. Variants detection for whole exons of FBN1 gene were performed by polymerase chain reaction and DNA direct sequencing. Functional significances for variants were assessed using by Swiss-model, Polyphen-2 and SIFT software. **Results:** The two families were characterized as an autosomal dominant inheritance. A de novo variant of FBN1 gene, an insertion A at 1691 base of exon 13 was identified in the patients of family 1 (1691 ins A), which resulted in the premature termination of translation at 571 amino acid. In addition, a known point mutation at exon 27 (3463 G>A) was found in the patients of family 2, which resulted in amino acid change from Asp to Asn at 1155. The two variants were absent in healthy family members and 50 healthy controls. Results of functional significance prediction indicated that these two variants might influence the structure or function of fibrillin-1 protein. **Conclusions:** A novel insertion variant (1691 ins A) and a known point mutation (3463 G>A) are found in two MFS families. The results enlarge the spectrum of FBN1 gene variants and further support the hypothesis that FBN1 gene variants are pathogenic variants for MFS.

Key words: Marfan syndrome (MFS); Fibrillin-1 (FBN1); Family; Variant; Proband

Chinese Library Classification(CLC): Q75; R394.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)10-1801-05

前言

马凡综合征(Marfan syndrome, MFS)为一种结缔组织遗传疾病,新生儿发病率为 1/5000^[1-2]。MFS 临床症状广泛,涉及骨骼肌、眼睛、心血管系统以及中枢神经系统等,具有明显的遗传

异质性和表型异质性^[3-5]。MFS 典型的临床特征表现为身材高大、四肢细长呈“蜘蛛样”、晶状体脱位、主动脉瘤或主动脉夹层等。

原纤维蛋白 1 基因(Fibrillin-1, FBN1)是 MFS 的致病基因^[6]。FBN1 基因位于 15q21.1,包括 65 个外显子^[7]。在 MFS 患者

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81500282)

作者简介:刘丹(1986-),女,博士研究生,主治医师,主要研究方向:冠心病的防治研究,电话:024-83951988, E-mail: ljmuer@sina.com

△ 通讯作者:闫承慧(1973-),女,主任技师,主要研究方向:冠心病防治研究, E-mail: hanyaling@gmail.com

(收稿日期:2016-07-08 接受日期:2016-07-31)

中发现的变异位点最常见于 FBN1 基因的第 13、15、24-28、32 和 43 外显子,大部分位于 FBN1 蛋白的钙结合表皮生长因子样结构域中 (calcium binding epidermal growth factor-like modules, cbEGF),通过影响半胱氨酸残基或与钙结合的氨基酸,进而在蛋白水平影响 FBN1 蛋白的转运或分泌^[8,9]。MFS 基因型与表型之间的关系复杂,突变位点位于 FBN1 基因第 24 和 32 外显子的 MFS 患者与新生儿严重症状以及严重的心血管系统症状有关,而位于第 59-65 外显子的 MFS 患者临床症状较轻^[10]。

本研究主要对两个中国北方汉族 MFS 家系进行家系调查及系谱分析,并进行致病基因 FBN1 变异检测。

1 材料与方法

1.1 家系调查及样本采集

两个家系均来自中国北方,汉族。进行详细的家系调查并收集临床资料。对所有家系成员均进行体格检查,包括心脏、骨骼肌及眼部系统等,同时对所有患者进行心脏超声检测。此外,选择 50 例健康人作为对照。健康对照的入选标准为:健康、汉族、与两个家系成员均无血缘关系、无家族遗传性疾病或其他复杂性疾病例如炎症性疾病和肿瘤等。本研究得到沈阳军区总医院伦理委员会的批准,所有入选者均获知情同意并签署知情同意书。

1.2 基因组 DNA 提取

所有入选者获知情同意后,抽取肘静脉血 5 mL,置于 EDTA 抗凝管中。利用基因组 DNA 提取试剂盒(Promega, USA)进行全血基因组 DNA 提取。应用 Nanodrop 1000(Thermo, USA)和 1%琼脂糖凝胶对 DNA 进行浓度和纯度鉴定。

1.3 PCR 及 DNA 直接测序

应用 Primer Premier 5.0 软件及 NCBI-Blast 对 FBN1 基因的所有外显子进行引物设计,送至上海生工公司合成。50 μ L 体系进行 PCR 反应,包括 1 μ L 基因组 DNA, 25 μ L PCR master mix, 1 μ L 引物对及 23 μ L 去离子水。反应条件:95 $^{\circ}$ C, 5 分钟 -94 $^{\circ}$ C 30 秒, 51 $^{\circ}$ C/56 $^{\circ}$ C/58 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒, 35 个循环 -72 $^{\circ}$ C 5 分钟。2%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。采用 DNA 产物纯化试剂盒(天根, 北京)对 PCR 产物进行纯化,将纯化产物送至上海生工公司进行测序。测序得到的序列与数据库中的序列进行比对,查找变异位点。

1.4 功能预测

使用在线预测软件 Sorting intolerant from tolerant(SIFT)、Polymorphism phenotyping-2 (PolyPhen-2) 和 Swiss-model 对两个家系中发现的变异位点进行功能重要性的预测。SIFT 是根据预测分值对其蛋白功能进行预测,当预测分值小于 0.05 时,变异就会影响蛋白结构^[11];Polyphen-2 软件是根据分值(0-1 分)对其严重程度进行预测,分值越接近 1,变异的损害程度越大^[12];Swiss-model 软件是基于蛋白质的同源性,对蛋白的结构进行预测^[13]。

2 结果

2.1 家系临床特征

家系 1 包括 12 例患者,患者 I 1, II 2 和 III 3 死于主动脉瘤。先证者 III 13 为 30 岁女性,表现为手指和脚趾细长,呈 " 蜘蛛样 "

蛛样 "(图 1A)。体检发现周围血管征水冲脉呈阳性,眼部专科检测发现晶状体脱位,并伴有视力障碍。心脏超声结果提示:主动脉明显增宽、严重的主动脉关闭不全、肺动脉增宽及二尖瓣狭窄。家系其他患者均表现为手指和脚趾细长,呈 " 蜘蛛样 ",临床特征见表 1。

家系 2 包括 8 例患者,患者 I 1 死于主动脉瘤。先证者 IV 3 为 12 岁男孩,表现为手指和脚趾细长,呈 " 蜘蛛样 "(图 1B)。体检未发现明显的阳性体征。心脏超声结果提示:主动增宽、主动脉关闭不全及二尖瓣狭窄。家系其他患者也表现为手指和脚趾细长,临床特征见表 2。

2.2 FBN1 基因变异检测

对两个家系的所有成员进行致病基因 FBN1 基因变异检测。结果发现,在家系 1 先证者 III 13 中发现一个新的插入突变,即在第 13 外显子第 1691 位碱基处插入碱基 A,导致蛋白翻译在第 571 位氨基酸提前终止。在家系其他患者 (II 3, III 1, III 5, III 9, III 11, IV 1, IV 6 和 IV 7)中也可发现同样的变异位点。而在家系健康人 (II 4, III 2, III 4, III 8 和 IV 2 等)及 50 例健康对照中均未发现该变异位点(图 2A)。

在家系 2 先证者 IV 3 中发现 FBN1 基因的一个已知点突变,即第 27 外显子 3463 位碱基由 G 变为 A,导致第 1155 位氨基酸由天冬氨酸变为天冬酰胺。该突变也出现在家系的其他患者中 (II 1, II 4, III 1, III 4, III 6 和 IV 2),然而在家系健康人 (II 2, III 3 和 IV 1 等)和 50 例健康者中均未发现该变异(图 2B)。

2.3 FBN1 基因变异位点功能预测

应用生物信息学网站 Polyphen-2、SIFT 和 Swiss-model 来预测这两个变异位点对 FBN1 蛋白结构和功能的影响。家系 1 中发现的插入位点(1691 ins A)位点位于 FBN1 蛋白的 cbEGF 结构域中,导致翻译提前终止,可能会影响钙与 cbEGF 结合。Swiss-model 软件预测发现该变异位点所在的结构域(489-571 位氨基酸)结构与野生型蛋白(489-653 位氨基酸)的结构明显不同(图 3A),上述结果提示该变异位点可能通过影响 FBN1 蛋白的结构或者钙与 cbEGF 结构域之间的结合进而影响蛋白功

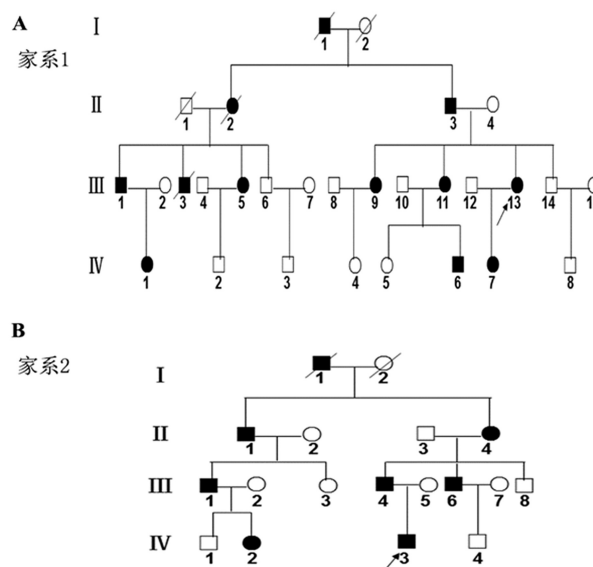


图 1 两个 MFS 家系的系谱图

Fig. 1 The pedigree of two MFS families

表 1 MFS 家系 1 患者临床特征
Table 1 Clinical features for MFS patients in family 1

Family 1	Slender limbs	Spider fingers (toes)	Impaired vision	Lens dislocation	Peripheral vascular syndrome	Aorta widened	Aortic insufficiency
II 3	+	+	+	-	+	+	-
III1	+	+	+	+	+	-	+
III5	+	+	-	-	-	+	+
III9	+	+	-	-	+	+	-
III11	+	+	-	-	-	-	-
III13	+	+	+	+	+	+	+
IV1	+	+	+	+	-	-	+
IV6	+	+	-	-	-	+	-
IV7	+	+	+	-	+	-	+

注: + 代表有该特征, - 代表无该特征。

表 2 MFS 家系 2 患者临床特征
Table 2 Clinical features for MFS patients in family 2

Family 2	Slender limbs	Spider fingers (toes)	Impaired vision	Lens dislocation	Peripheral vascular syndrome	Aorta widened	Aortic insufficiency
II 1	+	+	+	+	+	+	+
II 4	+	+	-	-	-	-	+
III1	+	+	-	-	+	-	-
III4	+	+	+	-	+	+	+
III6	+	+	+	+	-	+	+
IV2	+	+	+	-	+	+	+
IV3	+	+	-	-	-	+	+

注: + 代表有该特征, - 代表无该特征

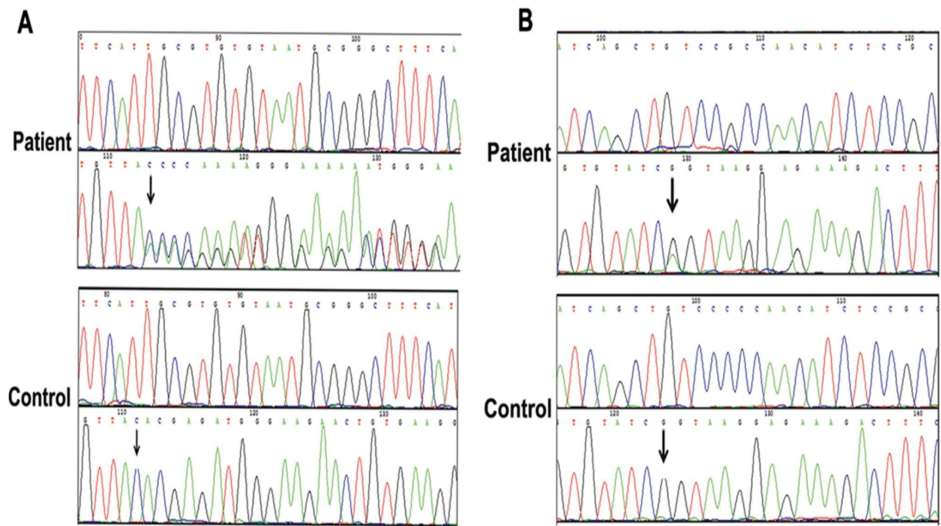


图 2 两个 MFS 家系致病基因 FBN1 变异检测
Fig. 2 Identification of the FBN1 gene variants in family 1 and family 2

能。

家系 2 中发现的点突变位于第 27 外显子 (3463 G>A), Polyphen-2 软件预测该突变的得分为 0.996, 提示该突变位点损害严重;SIFT 软件预测该突变的分值为 0.00,严重影响蛋白

功能 (图 3B)。然而,Swiss-model 预测发现该突变位点不影响 FBN1 蛋白的结构。

3 讨论

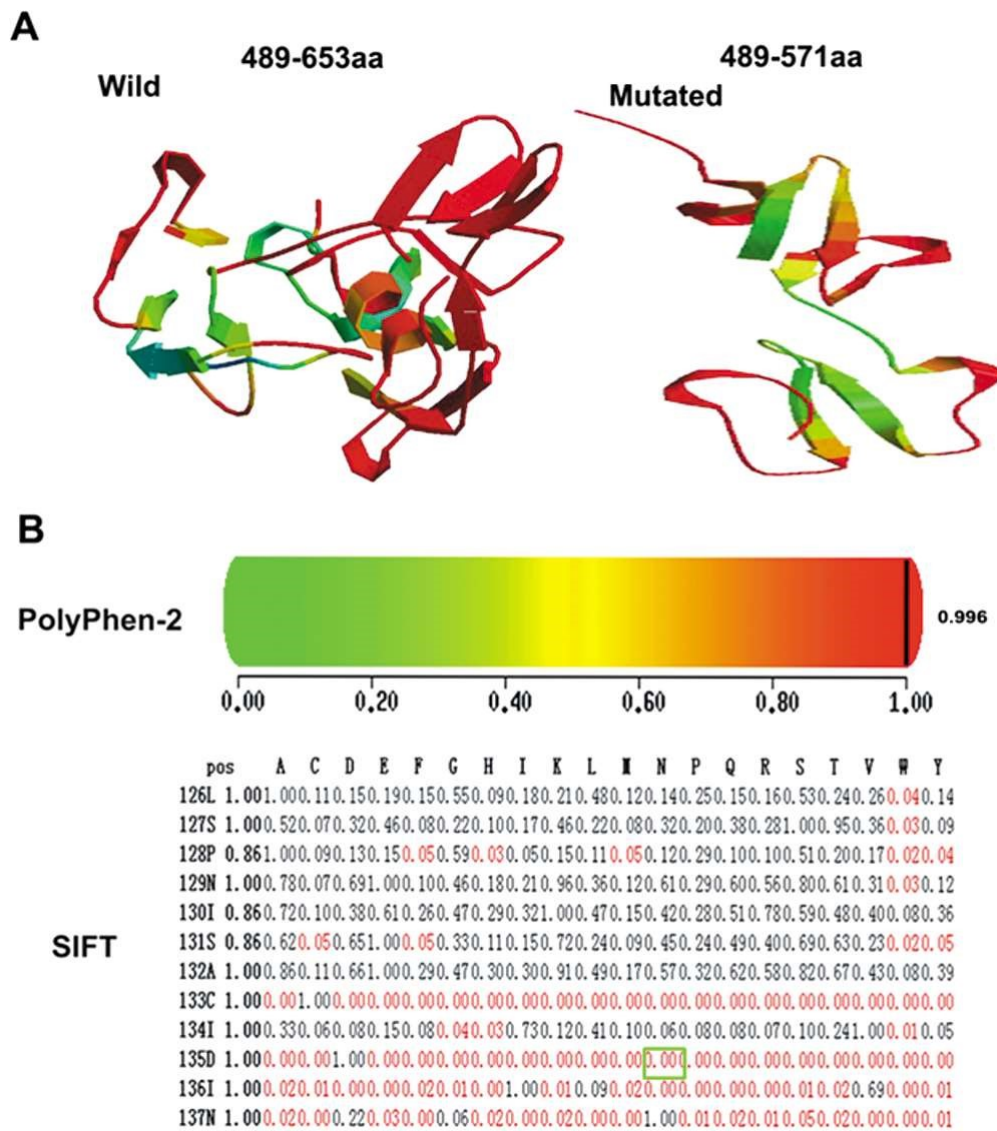


图 3 Swiss-model、Polyphen-2 及 SIFT 软件对 FBN1 基因两个变异位点结构及功能预测

Fig. 3 Predictive results for the insertion variant (1691 ins A) in family 1 by Swiss-Model and the missense mutation (3463 G>A) in family 2 by Polyphen-2 and SIFT

MFS 为一种结缔组织遗传性疾病，具有明显的遗传和临床异质性。大部分 MFS 患者死于心血管系统并发症包括主动脉夹层或者主动脉瘤破裂。若 MFS 患者不进行及时治疗，在 30-40 岁可能死于相关并发症^[4]。因此，早期诊断并进行相应治疗对 MFS 患者至关重要，不仅能改善患者预后，还能显著提高患者生存质量^[15]。

MFS 诊断主要根据 2010 年修订的 Ghent 标准^[6]，与 1996 年的诊断标准相比^[17]，该标准强调临床症状的重要性如晶状体脱位和主动脉瘤，同时也更加强调 FBN1 致病基因突变的重要性。该标准还指出，对疑似 MFS 患者应尽早进行 FBN1 基因变异检测，若发现 FBN1 存在变异，同时还具有明显的临床体征，则诊断为 MFS。本研究两个 MFS 家系的先证者具有相似的临床特征，如身材细长，手指和脚趾呈“蜘蛛样”。两个先证者心脏超声结果均提示：主动脉增宽、主动脉关闭不全以及二尖瓣狭窄。此外，FBN1 基因突变检测在先证者 1 中发现一个新的插入变异(1691 ins A)以及在先证者 2 中发现一个已知的点突变(3463 G>A)。综合以上结果，根据新修订的 Ghent 诊断标准，两

个先证者均可明确诊断为 MFS。

FBN1 基因编码的原纤蛋白 1 是由三个重复序列组成的大分子，包括 cbEGF 结构域、转化生长因子 β 结合蛋白样结构域，以及 Fib 结构域^[18]。在 MFS 患者已经发现超过 1500 多种 FBN1 基因变异位点，大部分变异位点位于 cbEGF 结构域，通过影响半胱氨酸残基或者钙与氨基酸的结合来影响蛋白功能。MFS 家系 1 患者中发现一个新的插入突变(1691 ins A)，导致翻译提前终止，该变异位点位于原纤蛋白 1 的 cbEGF 结构域，Swiss-model 预测发现该变异位点可通过影响 FBN1 蛋白结构和钙与结构域的结合进一步影响蛋白功能。家系 2 患者中发现一个已知的点突变(3463 G>A)，该突变最早发现于一个主动脉瘤患者^[19]。以往的研究表明人凝血因子 IX 包括两个 EGF 结构域，第一个结构域中包括与钙结合的位点，当天冬氨酸变为谷氨酸，钙与 EGF 结构域结合的影响明显下降，然而 EGF 结构域的二级结构不受影响。本研究家系 2 中的突变位点导致 FBN1 蛋白第 1155 位氨基酸由天冬氨酸变为天冬酰胺，且该位点所在 cbEGF 结构域高度保守，因此推测该位点可能通过降

低钙与 cbEGF 结构域结合而使 FBN1 蛋白更易水解^[20]。Polyphen-2 和 SIFT 软件预测发现该突变位点可能会影响蛋白的功能,但具体的机制尚不清楚,有待于下一步研究。

综上所述,本研究在两个 MFS 家系患者中发现 FBN1 基因一个新的插入突变 (1691 ins A) 及一个已知的点突变 (3463 G>A)。研究结果将为扩大 MFS 基因突变谱及明确 MFS 基因型与表型之间的关系提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] Li Y, Xu J, Chen M, et al. A FBN1 mutation association with different phenotypes of Marfan syndrome in a Chinese family [J]. Clin Chim Acta, 2016, 460: 102-106
- [2] Umeyama K, Watanabe K, Watanabe M, et al. Generation of heterozygous fibrillin-1 mutant cloned pigs from genome-edited foetal fibroblasts[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24413
- [3] Ma M, Li Z, Wang DW, et al. Next-generation sequencing identifies novel mutations in the FBN1 gene for two Chinese families with Marfan syndrome[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 151-158
- [4] Latasiewicz M, Fontecilla C, Millá E, et al. Marfan syndrome: ocular findings and novel mutations-in pursuit of genotype-phenotype associations[J]. Can J Ophthalmol, 2016, 51(2): 113-118
- [5] Pyeritz RE. Recent progress in understanding the natural and clinical histories of the Marfan syndrome [J]. Trends Cardiovasc Med, 2016, 26(5): 423-428
- [6] Rekondo J, Robledo-Inarritu M, Vado Y, et al. Marfan Syndrome Caused by Somatic Mosaicism in an FBN1 Splicing Mutation[J]. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2016, 69(5): 520-521
- [7] Yang H, Luo M, Chen Q, et al. Genetic testing of the FBN1 gene in Chinese patients with Marfan/Marfan-like syndrome [J]. Clin Chim Acta, 2016, 459: 30-35
- [8] Pepe G, Giusti B, Sticchi E, et al. Marfan syndrome: current perspectives[J]. Appl Clin Genet, 2016, 9: 55-65
- [9] Verstraeten A, Alaerts M, Van Laer L, et al. Marfan Syndrome and Related Disorders: 25 Years of Gene Discovery[J]. Hum Mutat, 2016, 37(6): 524-531
- [10] Peng Q, Deng Y, Yang Y, et al. A novel fibrillin-1 gene missense mutation associated with neonatal Marfan syndrome: a case report and review of the mutation spectrum [J]. BMC Pediatr, 2016, 16(1): 60
- [11] Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, et al. SIFT missense predictions for genomes[J]. Nat Protoc, 2016, 11(1): 1-9
- [12] Barbosa RH, Aguiar FC, Silva MF, et al. Screening of RB1 alterations in Brazilian patients with retinoblastoma and relatives with retinoma: phenotypic and genotypic associations [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(5): 3184-3194
- [13] Bultet LA, Aguilar-Rodríguez J, Ahrens CH, et al. The SIB Swiss Institute of Bioinformatics' resources: focus on curated databases[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(D1): D27-37
- [14] Ghanta RK, Green SY, Price MD, et al. Midterm Survival and Quality of Life After Extent II Thoracoabdominal Aortic Repair in Marfan Syndrome[J]. Ann Thorac Surg, 2016, 101(4): 1402-1409
- [15] Singh MN, Lacro RV. Recent Clinical Drug Trials Evidence in Marfan Syndrome and Clinical Implications [J]. Can J Cardiol, 2016, 32(1): 66-77
- [16] Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome [J]. J Med Genet, 2010, 47(7): 476-485
- [17] De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, et al. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome [J]. Am J Med Genet, 1996, 62(4): 417-426
- [18] Corson GM, Chalberg SC, Dietz HC, et al. Fibrillin binds calcium and is coded by cDNAs that reveal a multidomain structure and alternatively spliced exons at the 5' end [J]. Genomics, 1993, 17(2): 476-484
- [19] Milewicz DM, Michael K, Fisher N, et al. Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms [J]. Circulation, 1996, 94(11): 2708-2711
- [20] Reinhardt DP, Ono RN, Notbohm H, et al. Mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules render fibrillin-1 susceptible to proteolysis. A potential disease-causing mechanism in Marfan syndrome[J]. J Biol Chem, 2000, 275(16): 12339-12345