

Waardenburg 综合征 2 型家系的 临床特征分析及突变检测*

陈红胜¹ 廖新斌² 刘亚兰¹ 贺楚峰¹ 张华³ 蒋璐¹ 冯永¹ 梅凌云¹

[摘要] 目的:分析 Waardenburg 综合征(WS)2 型家系的临床表型特征,并探讨其分子病因,为 WS 家系提供遗传咨询。方法:收集 7 个 WS2 型家系和散发病例(14 例患者)的临床资料,分析其临床表型特征,均签署知情同意书并获取血样,提取基因组 DNA,聚合酶链反应扩增 MITF、SNAI2、SOX10 和 EDNRB 基因编码区全部外显子,在 ABI 自动测序仪上进行正反向测序,并进行测序结果和相关数据信息的分析。结果:WS2 型患者的临床表型特征最常见的是听力障碍(10/14, 71.4%)、雀斑(7/14, 50.0%)、虹膜异色(6/14, 42.9%)和早白发(5/14, 35.7%);耳聋表型比较一致,均表现为先天性双耳极重度感音神经性聋,雀斑表型不同于国外 WS 患者的皮肤低色素改变。突变检测发现 WS02 家系 MITF 基因第 3 号外显子 c.328C>T 杂合突变(p. R110X),其他家系和散发病例均未检测到这 4 个基因的致病性突变。结论:WS2 型患者表型特征多样,棕褐色雀斑沉着可能是国内 WS 患者皮肤色素异常表现的一种特殊形式。MITF 基因突变 R110X 是导致 WS02 家系发病的分子病因,其他家系突变检测阴性提示存在其他未知的 WS2 致病基因或者拷贝数变异的可能。

[关键词] Waardenburg 综合征;小眼畸形相关转录因子;听觉丧失,感音神经性;基因突变

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.24.011

[中图分类号] R764.43 **[文献标志码]** A

Clinical and genetic investigation of families with Waardenburg syndrome type 2

CHEN Hongsheng¹ LIAO Xinbin² LIU Yalan¹ HE Chufeng¹ ZHANG Hua³
JIANG Lu¹ FENG Yong¹ MEI Lingyun¹

(¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410008, China; ²Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital of Central South University; ³Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Renji Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University)

Corresponding author: MEI Lingyun, E-mail: entmly@163.com

Abstract Objective: To investigate the clinical chacteration and molecular pathology of Waardenburg syndrome type 2 in seven families, and provide genetic diagnosis and hereditary counseling for family members. **Method:** Clinical data of seven families with WS2(14 patients)were collected. Peripheral blood samples of the probands and related family members were collected and genomic DNA was extracted. The coding sequences of microphthalmia associated transcription factor (MITF), sex-determining region Y-box 10(SOX10), snail family zinc finger 2 (SNAI2) and endothelin receptor type B(EDNRB)were analyzed by polymerase chain reaction and DNA sequencing. Then the raw data was analyzed. **Result:** The most common manifestations of WS2 are sensorineural hearing loss(10/14, 71.4%), freckle(7/14, 50.0%),heterochromia iridis(6/14, 42.9%) and premature greying(5/14, 35.7%). All the deafness phenotype is congenital, bilateral profound sensorineural hearing loss. Freckles phenotype is different from cutaneous pigment abnormalities of WS in Westerners. The heterozygous mutation, c.328C>T in exon 3 of the MITF gene was detected in the proband and all patients of pedigree 2. However, no pathological mutation of the relevant genes (SOX10, SNAI2 and EDNRB) was detected in other pedigrees. **Conclusion:** There are obvious variations in clinical features of WS, while freckles may be a special subtype of cutaneous pigment disturbances. The MITF gene mutation, R110X, is therefore considered the disease causing mutation in pedigree WS02. However, there are novel disease causing genes or copy number variations in Waardenburg syndrome

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No: 81500803, 81301172)、国家自然科学基金面上项目(No: 81470705, 81260160)、“973”国家重大科学研究计划项目(No: 2014CB943003)、湖南省科技计划项目院士基金(No: 2013FJ4110)联合资助

¹中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科(长沙, 410008)

²中南大学湘雅医院神经外科

³上海交通大学医学院附属仁济医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:梅凌云, E-mail: entmly@163.com

type 2, which require further research.

Key words Waardenburg syndrome; microphthalmia associated transcription factor; hearing loss, sensorineural; gene mutation

Waardenburg 综合征 (Waardenburg syndrome, WS) 是最常见的综合征型耳聋之一, 又名听力-色素综合征。WS 最先报道见于欧洲人群, 临床上较少见, 人群发病率约为 1/42 000。其临床表现多样, 主要包括感音神经性聋和虹膜、皮肤、毛发和内耳色素分布异常, 依据不同的伴随表型可分为四型 (WS1 型~4 型), 最常见的是 WS1 和 WS2。目前已证实与 WS 相关的基因有 6 个, 包括配对盒 3 (paired box gene3, PAX3)、小眼畸形相关转录因子 (microphthalmia-associated transcription factor, MITF)、性别决定区域相关转录因子 10 [SRY (sex determining region Y)-box10, SOX10]、Snail 相关锌指蛋白转录因子 (snail, drosophila, homolog of 2, SNAI2)、内皮素受体 B (endothelin receptor type B, EDNRB)、内皮素 3 (endothelin-3)^[1], 主要的致病基因为 PAX3、MITF 和 SOX10, 并且不同临床亚型与不同致病基因相关联。研究^[1-3]表明至少 90% 的 WS1 和 50% 的 WS3 可检测到 PAX3 基因突变; WS2 的遗传基础相对复杂, 15%~20% 的 WS2 患者由 MITF 基因突变所致^[1,4]; SOX10 基因突变也是导致 WS2 致病的重要原因之一^[5-6], 另外, SNAI2 基因突变也与一部分 WS2 发病有关^[7]。2010 年, Pingault 等^[1]首次从 WS2 患者中检测到 1 个 EDNRB 基因杂合突变, 提示 EDNRB 基因突变也可能是导致 WS2 发病的原因之一。本研究对已收集的 7 个 WS2 型家系和散发病例进行临床特征分析和 MITF、SOX10、SNAI2、EDNRB 致病基因的突变检测。

1 对象与方法

1.1 研究对象

湖南地区 7 个 WS2 型家系, 包括大家系 2 个, 散发病例 5 例, 共计 14 例患者。我们对先证者所在核心家系进行问卷调查, 采集病史, 绘制家系图谱, 并分析家系遗传方式。所有研究对象均签署了知情同意书, 且进行了较详细的听力学检查和全面体格检查包括毛发、皮肤色素、骨骼肌肉、四肢关节、眼科、耳科等检查以及智力评估。全部检查均在相应科室由专科医生完成。排除耳外伤、中耳炎、耳毒性药物所致的听力下降。抽取研究对象 5 ml 外周静脉血, 进行基因组 DNA 的制备。110 例正常对照样本来自中国医学遗传学国家重点实验室, 其中男 65 例, 女 45 例, 年龄 3~48 岁, 均无耳科、眼科及全身疾病。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 制备

抽取研究对象 5 ml 外周血, 常规酚-氯仿法抽提 gDNA (中国医学遗传学国家重点实验室), 测量 DNA 的纯度和浓度, 抽取部分基因组 DNA 稀释至 20 ng/ μ l 备用。

1.2.2 引物设计与合成 基因信息来自 NCBI 网站: MITF, NM_000248. 3; SOX10, NM_006941. 3; SNAI2, NM_003068. 4; EDNRB, NM_001201397. 1。MITF、SOX10 和 SNAI2 基因引物序列参照作者以往研究^[8], EDNRB 基因使用 Wang 等^[9] 研究报道的引物序列。所有引物均由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。

1.2.3 MITF、SNAI2、SOX10 和 EDNRB 基因扩增及测序 首先对先证者进行这 4 个基因的 PCR 扩增, PCR 反应体系采用 20 μ l 体系, 包括 Hot Star Taq 酶 (5 U/ μ l) 10 μ l, 10 μ mol/L 的上下游引物各 0.4 μ l, DNA 模板 (50 ng/ μ l) 2 μ l, ddH₂O 7.2 μ l。

PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 62 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 每循环降 0.5 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 57 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经虾碱性磷酸酶和限制性核酸外切酶酶切纯化后, 采用 ABI3730 测序仪双向测序, 使用 DNASTAR-Lasergene SeqMan Pro 软件对测序结果进行比对分析。如果发现碱基变异, 查阅 dbSNP 数据库、在线的 WS 基因突变数据库 (<http://grenada.luinc.nl/LOVD2/ws/>)、人类基因突变数据库 (HGMD) 以及相关的文献确定是否为已报道的突变或多态。若为未报道的突变, 则进一步在家系中及正常对照人群中进行验证和鉴定。

2 结果

2.1 临床资料

WS01 家系来自湖南长沙市星沙地区, 其家系系谱图见图 1a。家系一共 4 代, 共有 6 例患者, 先证者仅 10 个月, 表现为右眼虹膜异色和极重度感音神经性聋, 已在本院行单侧人工耳蜗植入术 (图 2)。先证者外祖母及其 3 个子女均有面部、肢体雀斑和早白发, 但听力正常; 另外 1 例患者 II 7 仅表现为先天性聋哑。

WS02 家系来自湖南省怀化市, 其家系系谱图见图 1b。家系一共 4 代, 共 3 例患者, 均有先天性极重度感音神经性聋, 但无虹膜异色, 先证者还表现为面部及肢体雀斑 (图 3), 其母亲除面部及肢体雀斑外还有早白发。

另外 5 例患者均为散发病例, 均表现为先天性

极重度感音神经性聋和虹膜异色,其中 1 例还表现为面部和肢体雀斑。

所有患者 W 指数 < 1.95, 无内眦异位, 无消化系统或骨骼肌肉异常, 临床诊断为 WS2 型。

2.2 突变检测

首先对先证者进行 MITF、SOX10、SNAI2 和 EDNRB 这 4 个基因的突变筛查, 结果发现 WS02 家系 MITF 基因第 3 号外显子 c. 328C>T 杂合突变 (p. R110X) (图 4), 使编码的精氨酸变成终止密码子, 导致仅有 110 个氨基酸的截短蛋白产生。查询 WS 基因突变数据库 (<http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/>), 该突变位点为已报道致病性突变^[10]。WS02 家系中的其他患者也携带相同突变, 而正常成员不携带该突变, 说明该突变在家系中是共分离的。110 例无关正常人群均未携带该突变。WS01 家系成员及 5 例散发病例均未检测到这 4 个基因的致病性突变位点。

3 讨论

WS 临床表型复杂多样, 耳聋是 WS2 型患者最常见的临床表型, 也是患者就诊的最直接原因。Hageman 等^[11]报道 159 例 WS 患者, 其中 WS2 型患者耳聋的发生率约为 57%; Liu 等^[12]发现约 77% 的 WS2 有耳聋表型。本研究中听力障碍的发生率最高, 为 71.4% (10/14), 并且耳聋表型较一致, 均为双侧耳聋, 表现为先天性极重度感音神经性聋。其他表型依次为: 雀斑 (7/14, 50.0%)、虹膜异色 (6/14, 42.9%) 和早白发 (5/14, 35.7%)。雀斑通常表现为面颈部、四肢部位的棕褐色雀斑沉着, 这与我们既往的研究结果类似^[8], 这种雀斑样改变不同于西方 WS 人群的皮肤色素改变, 后者多表现为皮肤白斑等低色素改变^[13]。杨淑芝 (2005) 亦报道 42.9% 的 WS2 和 28.6% 的 WS1 患者伴有面颈部、四肢皮肤的棕褐色雀斑。我们推测, 这一

临床特征可能为中国人群 WS 患者一种常见的特殊的皮肤色素异常的表现形式^[8,14]。此外, 本研究中虹膜异色的发生率 (42.9%) 与国外文献报道一致, Hageman 等^[11]和 Liu 等^[12]分别报道虹膜异色的发生率约为 49.4% 和 46%, 但低于国内研究报道^[14], 这可能与本研究样本数较少有关。

MITF 属于 Myc 超级基因家族成员, 是一种含有螺旋-环-螺旋碱性亮氨酸拉链 (basic helix-loop-helix leucine zipper, bHLH-Zip) 结构的转录因子, HLH-Zip 结构域是 MITF 蛋白的重要功能域, MITF 通过 bHLH-Zip 与其他蛋白相互作用协同调控靶基因的表达^[15], 参与并调控多种 NCC 源性细胞生长发育过程, 尤其是黑素细胞的存活、增殖和分化^[16]。大量研究表明 MITF 基因突变是 WS2 发病的重要原因, 10%~15% 的 WS2 患者发病由 MITF 基因突变所致^[1,4]。目前已报道 56 种 MITF 基因突变位点 (<http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/home.php>), 这些突变大多分布在 MITF 基因的第 6~9 号外显子, 涉及 MITF 蛋白的 HLH-Zip 结构域。本研究中, WS02 家系先证者及其母亲、外公均携带相同的 MITF 基因突变 c. 328C>T, 该突变产生了仅有 110 个氨基酸的截短蛋白, 几乎丧失了所有重要的功能结构域, 不能形成同源或异源的二聚体, 因而不能启动下游靶基因 TYR、TYRP1 等的转录, 从而影响了黑色素的合成, 导致黑素细胞功能不良, 最终使皮肤、虹膜、内耳这些部位色素减少或缺失, 从而导致疾病的发生。先证者外公为该家系的首例患者, 但其仅有耳聋表型, 这可能与 MITF 基因突变不完全外显有关。由于该家系第一代表型正常, 因此, 该突变应该为先证者外公新发的致病性突变, 并将其依次传给了先证者母亲和先证者。先证者父亲表型和基因型均正常, 其母亲为杂合突变, 因此先证者及其

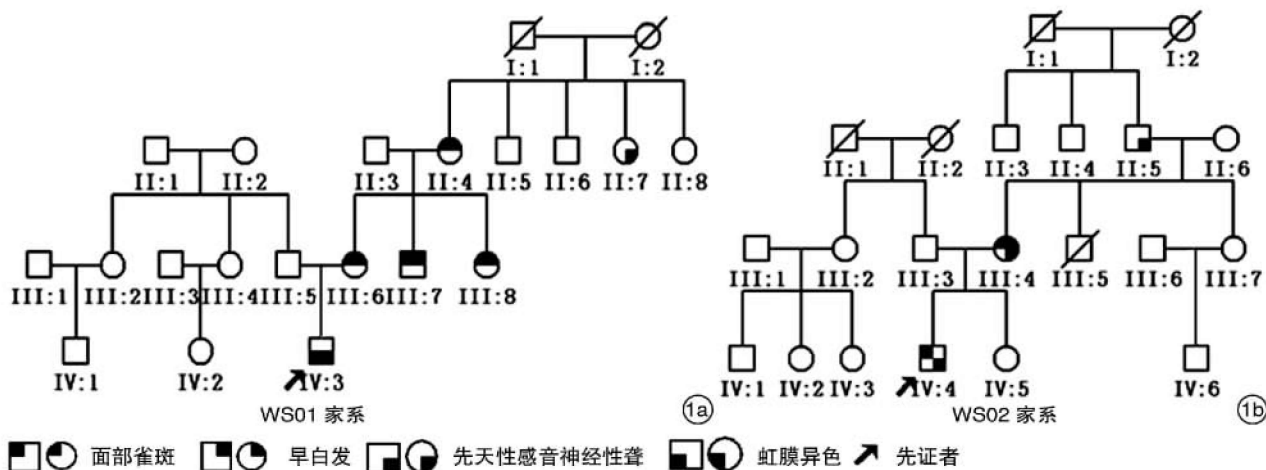


图 1 湖南长沙星沙地区 WS01 家系 (1a) 和怀化地区 WS02 家系 (1b) 系谱图

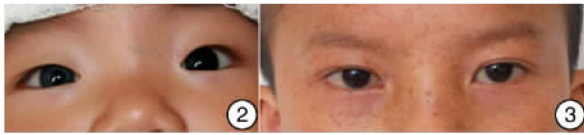
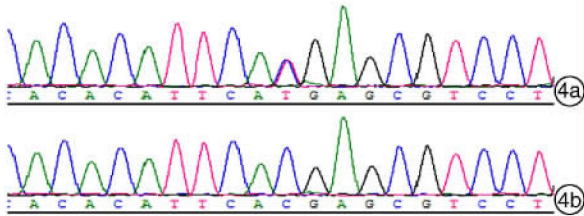


图 2 WS01 家系先证者 表现为右眼虹膜异色和极重度感音神经性聋; 图 3 WS02 家系先证者 表现为面部大量棕褐色雀斑沉着,无虹膜异色。



4a:先证者;4b:正常对照。

图 4 MITF 基因 c.328C>T 突变测序图

妹妹的患病概率为 50%。研究表明,约有 70% 的 WS2 患者仍未发现致病基因突变位点^[1]。我们的研究也有 1 个家系和 5 例散发病例未能明确分子病因,突变检出率约为 14.3%,其可能是由未知的 WS 致病基因突变所致,也可能由于大片的碱基插入、缺失和复杂的重排等,我们采用的 Sanger 测序法不能检测到这些变异。已有研究报告^[5,10,17],拷贝数变异(copy number variation, CNV)与 WS 有着密切的联系,研究者认为对 WS 进行 CNV 检测可明显增加 WS 相关基因的突变检测率,建议将 CNV 检测作为 WS 的常规分子诊断技术。因此,下一步我们将对突变检测阴性的患者进行相关致病基因的 CNV 检测,有望明确其分子病因。

参考文献

- [1] PINGAULT V, ENTE D, DASTOT-LE MOAL F, et al. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome[J]. Hum Mutat, 2010,31:391-406.
- [2] TASSABEHJI M, READ A P, NEWTON V E, et al. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene [J]. Nature, 1992,355:635-636.
- [3] HOTH C F, MILUNSKY A, LIPSKY N, et al. Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I) [J]. Am J Hum Genet, 1993,52:455-462.
- [4] TASSABEHJI M, NEWTON V E, READ A P. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene [J]. Nat Genet, 1994,8: 251-255.
- [5] BONDURAND N, DASTOT-LE MOAL F, STANCHINA L, et al. Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4[J]. Am J Hum Genet, 2007,81:1169-1185.
- [6] ISO M, FUKAMI M, HORIKAWA R, et al. SOX10 mutation in Waardenburg syndrome type II[J]. Am J Med Genet A, 2008,146A:2162-2163.
- [7] SANCHEZ-MARTIN M, RODRIGUEZ-GARCIA A, PEREZ-LOSADA J, et al. SLUG (SNAI2) deletions in patients with Waardenburg disease[J]. Hum Mol Genet, 2002,11: 3231-3236.
- [8] CHEN H, JIANG L, XIE Z, et al. Novel mutations of PAX3, MITF, and SOX10 genes in Chinese patients with type I or type II Waardenburg syndrome [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,397:70-74.
- [9] WANG H H, CHEN H S, LI H B, et al. Identification and functional analysis of a novel mutation in the SOX10 gene associated with Waardenburg syndrome type IV [J]. Gene, 2014,538:36-41.
- [10] WILDHARDT G, ZIRN B, GRAUL-NEUMANN L M, et al. Spectrum of novel mutations found in Waardenburg syndrome types 1 and 2; implications for molecular genetic diagnostics [J]. BMJ Open, 2013, 3: pii: e001917.
- [11] HAGEMAN M J, DELLEMAN J W. Heterogeneity in Waardenburg syndrome [J]. Am J Hum Genet, 1977,29:468-485.
- [12] LIU X Z, NEWTON V E, READ A P. Waardenburg syndrome type II: phenotypic finding and diagnostic criteria [J]. Am J Med Genet, 1995,55:95-100.
- [13] PÉREZ-LOSADA J, SÁNCHEZ-MARTÍN M, RODRÍGUEZ-GARCÍA A, et al. Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway [J]. Blood, 2002,100:1274-1286.
- [14] YANG S, DAI P, LIU X, et al. Genetic and phenotypic heterogeneity in Chinese patients with Waardenburg syndrome type II [J]. PLoS One, 2013, 8: e77149.
- [15] SCHEPSKY A, BRUSER K, GUNNARSSON G J, et al. The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26: 8914-8927.
- [16] GRILL C, BERGSTEINSDOTTIR K, OGMUNDSDOTTIR M H, et al. MITF mutations associated with pigment deficiency syndromes and melanoma have different effects on protein function [J]. Hum Mol Genet, 2013, 22:4357-4367.
- [17] MATSUNAGA T, MUTAI H, NAMBA K, et al. Genetic analysis of PAX3 for diagnosis of Waardenburg syndrome type I [J]. Acta Otolaryngol, 2013, 133:345-351.

(收稿日期:2016-05-30)