

新一代测序技术在 3 例 Waardenburg 综合征患儿中的应用

徐彬¹ 戴继任¹ 毕静¹ 付勇¹

[摘要] **目的:**应用新一代测序技术对临床确诊为 Waardenburg 综合征(WS)的 3 例患儿进行基因检测,探讨可能的分子遗传学机制。**方法:**对通过病史采集、全身及耳科查体、听力及影像学检查确诊为 WS 的 3 例患儿,采用新一代测序技术检测耳聋相关的 159 个基因的外显子区,6 个线粒体基因,3 个 miRNA,得到可能的致病基因突变位点后,再对先证者的家属进行 Sanger 测序验证。**结果:**第 1 例先证者 *MITF* 基因(NM_000248)7 号外显子出现 1 个杂合突变:c. 641_643delGAA;第 2 例先证者 *MITF* 基因(NM_001354605)10 号外显子出现 1 个杂合突变:c. 1177-1G>A;第 3 例先证者 *PAX3* 基因(NM_181457)5 号外显子出现 1 个杂合突变:c. 587_593delCCTCAGC;3 例先证者父母通过 Sanger 测序验证相应位点均无变异,以上突变均为自发突变。**结论:**新一代测序技术能够分析 WS 家庭致病基因的携带状况和遗传规律等信息,对家庭再生育进行指导。

[关键词] Waardenburg 综合征;新一代测序技术;基因

DOI:10.13201/j.issn.2096-7993.2021.10.010

[中图分类号] R764.43 **[文献标志码]** A

Application of next generation sequencing in 3 Waardenburg syndrome

XU Bin DAI Jiren BI Jing FU Yong

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Zhejiang University School of Medicine Children's Hospital, National Clinical Research Center for Health in Children, Hangzhou, 310000, China)

Corresponding author: FU Yong, E-mail: 1307022@zju.edu.cn

Abstract Objective: To test the gene sequence of 3 patients with Waardenburg syndrome(WS) using the next generation sequencing technology in order to explore the possible mechanism of molecular genetics. **Methods:** Medical histories of the family members were collected. Physical examination, audiological evaluation and CT examination were performed. Peripheral blood was collected and DNA was extracted. The exon region of 159 deafness genes, 6 mitochondrial genes and 3 miRNAs of the proband were tested by next generation sequencing. The mutation sites of the possible pathogenic genes were obtained, subsequently, Sanger sequencing verification was performed on the proband and family members. **Results:** The first proband had a heterozygous mutation in exon 7 of *MITF* gene(NM_000248): c. 641_643delGAA; The second proband had a heterozygous mutation in exon 10 of *MITF* gene(NM_001354605): c. 1177-1G>A; The third proband had a heterozygous mutation in exon 5 of *PAX3* gene(NM_181457): c. 587_593delCCTCAGC; The parents of the three probands verified by Sanger sequencing that there was no variation at the corresponding sites, and the above mutations were spontaneous mutations. **Conclusion:** Next generation sequencing can more comprehensively analyze information of the carried status and genetic rules of the disease-associated gene in WS families, and provide guidance for family reproductives.

Key words Waardenburg syndrome; next generation sequencing; gene

遗传性聋中 30% 为综合征性耳聋^[1],除听力下降表型外还伴随其他临床表现。目前已发现 400 多种伴有耳聋的综合征^[2]。其中 Waardenburg 综合征(Waardenburg syndrome, WS)是一种罕见的综合征性耳聋,又称听力-色素综合征,以感音神经性聋及虹膜、毛发和皮肤异色为主要特征^[3]。WS 的人群发病率为 1/212 000,但由于该综合征临床和遗传上的异质性,不完全外显率达 20%,故推测实际人群发病率为 1/42 000,占先天

性聋人群的 0.9%~2.8%^[4]。WS 多为显性遗传^[5],根据不同的临床表现分为 4 型^[6]:WS1 表现为先天性感音神经性聋,内眦异位、色素异常;WS2 与 WS1 相似,但无内眦异位;WS3 除了 WS1 临床表现外,常合并上肢异常;WS4 除了 WS2 临床表现外,可合并胃肠道结构畸形。4 型中以 WS1 和 WS2 最为多见。已证实有 7 种基因与 WS 有关:*PAX3*、*MITF*、*SNAI2*、*EDNRB*、*EDN3*、*SOX10* 和 *KITLG*^[7]。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2018 年 1 月—2019 年 1 月于我科确诊的 3 例

¹浙江大学医学院附属儿童医院耳鼻咽喉头颈外科 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心(杭州,310000)
通信作者:付勇,E-mail:1307022@zju.edu.cn

WS 患儿,男 1 例,女 2 例;年龄分别为 1 岁、2 岁 1 个月和 6 岁。收集先证者和家属的临床资料,完善全身相关体格检查。测量先证者内眦距离(A)、瞳孔距离(B)及外眦距离(C),计算 W 值 $\{X=[2A-(0.2119C+3.909)]/C, Y=[2A-(0.2497B+3.909)]/B, W=X+Y+(A/B)\}$ 。临床听力学检测包括行为测听、声导抗、耳声发射(OAE)、听觉脑干诱发电位(ABR)、多频稳态诱发电位(AS-SR),根据 1997 年 WHO 听力损失程度分级标准: ≤ 25 dB HL 为正常,26~40 dB HL 为轻度,41~60 dB HL 为中度,61~80 dB HL 为重度, ≥ 81 dB HL 为极重度耳聋。颞骨 CT 和头颅 MRI 检查,对 3 例患儿进行新一代测序技术,得到可能致病基因突变位点后,再对先证者家属进行 Sanger 测序验证。该研究经我院医学伦理委员会批准,基因检测取得患儿家属的同意并签署知情同意书。

1.2 基因检测流程

1.2.1 建立病例档案 详细记录患儿的一般信息,听力情况,出生情况,既往史,家族史,外伤手术史,用药史等。

1.2.2 基因测序 先证者采用新一代测序技术进行检测,发现可疑突变基因,再对其家属进行 Sanger 测序验证。①目标区域捕获测序:基因捕获策略选择已知的耳聋候选 159 个基因的外显子区,6 个线粒体基因,3 个 miRNA 进行捕获。将基因组 DNA 随机打断成片段,与 Illumina PE 接头寡核苷酸混合物链接,对产物进行链接介导的聚合酶链式反应(LM-PCR)扩增纯化后得到 DNA 文库,并对其进行质量检测,将上述 PCR 产物与目标区域捕获芯片进行杂交以富集目标区域序列,借助 Illumina Next 500 新一代测序平台对捕获的序列进行测序,并对原始数据进行图像识别和样本区分。②数据分析:去除测序数据中的接头序列和低质量数据,然后利用 BWA 软件将过滤后的序列比对到 NCBI 数据库人类基因组参考序列(hg19)上,利用 GATK 软件分析得出单核苷酸变异(SNP)和插入缺失突变(INDEL)的相关信息。通过 ANNOVAR 软件对所有的 SNP 和 INDEL 进行注释,筛选掉正常人数据库 $P < 5\%$ 的突变位点。③一代测序验证:得到的获选变异位点利用 PCR 和 Sanger 测序验证,再在家系成员中进行共分离验证。

2 结果

1 例先证者 *MITF* 基因(NM_000248)7 号外显子出现 1 个杂合突变:c.641_643delGAA;1 例先证者 *MITF* 基因(NM_001354605)10 号外显子出现 1 个杂合突变:c.1177-1G>A;1 例先证者 *PAX3* 基因(NM_181457)5 号外显子有 1 个杂合突变:c.587_593delCCTCAGC;3 例先证者父母通过 Sanger 测序验证相应位点均无变异,以上突变均为

自发突变。

3 病例报告

先证者 1 女,2 岁 1 个月。出生时听力筛查未通过,1 个月后复筛未通过,其后未进行听力检查;2 岁时仍不会诉简单词汇,就诊于我院,否认耳聋家族病史和耳聋药物服用病史。查体:双侧虹膜呈亮蓝色,头发细黄(图 1a),无内眦外移, $W < 1.95$,无鼻根宽大,四肢无畸形活动正常,双侧耳廓外形正常,外耳道通畅,鼓膜完整,标志清晰。双耳:OAE 未通过,声导抗“A”型,ABR、ASSR 示极重度感音神经性聋。头颅 MRI、颞骨 CT 及腹部 B 超无异常。散瞳验光,屈光度在正常范围,视力检查不合作。新一代测序:先证者 *MITF* 基因(NM_000248)7 号外显子出现 1 个杂合突变,核苷酸变异为 c.649_651delAGA、氨基酸变异为 p.R217del。根据 ACMG 指南,该变异初步判定为致病性变异,HGMD 数据库已有该位点 WS 的致病性报道^[8];为 ESP、1000G 或 EXAC 数据库中正常对照人群中未发现的变异;经家系验证分析,受检人父母该位点无变异,此变异为自发突变。

先证者 2 男,6 岁。发现左侧虹膜呈亮蓝色 6 年就诊于我院眼科,否认耳聋家族病史和耳聋药物服用病史。查体:面部色素沉着,左侧虹膜呈亮蓝色(图 1b),无内眦外移, $W < 1.95$,无鼻根宽大,四肢无畸形活动正常,毛发颜色大致正常,双侧耳廓外形正常,外耳道通畅,鼓膜完整,标志清晰。查视力 1.0;双耳:OAE 未通过,声导抗“A”型,纯音听阈示轻度感音神经性聋;腹部 B 超未见明显异常。新一代测序:先证者 *MITF* 基因(NM_001354605)10 号外显子有 1 个杂合突变:c.1177-1G>A,为剪接突变。根据 ACMG 指南,该变异初步判定为致病性变异,可能导致基因功能丧失;为 ESP、1000G 或 EXAC 数据库中正常对照人群中未发现的变异;经家系验证分析,受检人父母该位点无变异,此变异为自发突变。

先证者 3 女,1 岁。出生时听力筛查未通过,1 个月后复筛未通过,就诊于我院,否认耳聋家族病史和耳聋药物服用病史。查体:右侧虹膜呈亮蓝色(图 1c),内眦外移 $W > 1.95$,鼻根宽大,肢体活动正常,毛发颜色大致正常,双侧耳廓外形正常,外耳道通畅,鼓膜完整,标志清晰。双耳:OAE 未通过,声导抗“A”型,ABR、ASSR 示极重度感音神经性聋;头颅 MRI、颞骨 CT 及腹部 B 超无异常。散瞳验光,屈光度在正常范围,视力检查不合作。新一代测序:先证者 *PAX3* 基因(NM_181457)5 号外显子有 1 个杂合突变:c.587_593delCCTCAGC,导致氨基酸改变 p.A196Dfs*18,为移码突变。根据 ACMG 指南,该变异初步判定为致病性变异,可能导致基因功能丧失;为 ESP、1000G 或 EXAC

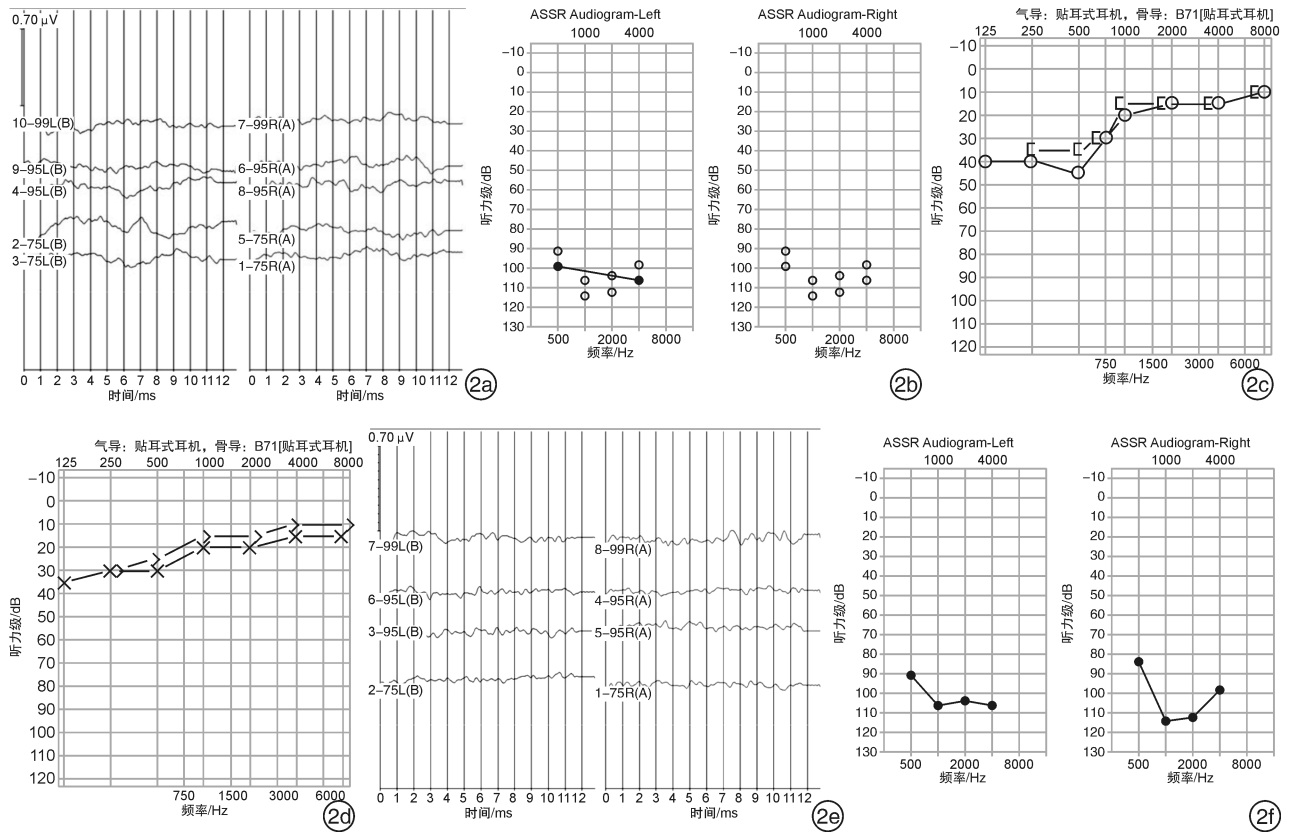
数据库中正常对照人群中未发现的变异;经家系验证分析,受检人父母该位点无变异,此变异为自发突变。

上述 3 例先证者无视力、智力障碍,其父母语言发育正常,非近亲结婚。查体:虹膜颜色正常,无内眦异位,肢体活动正常,毛发颜色正常。纯音测听提示无听力下降。



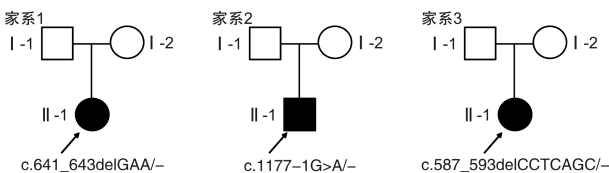
1a:先证者 1;1b:先证者 2;1c:先证者 3。

图 1 先证者外貌图



2a、2b:先证者 1;2c、2d:先证者 2;2e、2f:先证者 3。

图 2 先证者听力图



□:正常表型男性;○:正常表型女性;■:男性患者;●:女性患者;箭头所指为先证者。

图 3 3 个 WS 综合征家系遗传图谱

3 例先证者的听力情况见图 2;3 个 WS 家系遗传图谱见图 3;WS 先证者及家属的 Sanger 测序图见图 4。

4 讨论

WS 主要诊断标准包括:①先天性感音神经性聋;②虹膜色素异色;③毛发低色素改变;④内眦异位;⑤直系亲属(父母、同胞、子女)患病,同时符合

2 个主诊断标准可确诊 WS^[9]。本研究 3 例患儿均有先天性感音神经性聋和虹膜异色的临床表现,符合 2 个 WS 主诊断。先证者 1 和先证者 2 均确诊为 WS2 型,2 例患儿通过新一代测序技术均检查出 *MITF* 突变。临床上 15%~20% 的 WS2 都是由 *MITF* 基因的杂合突变引起的^[10]。*MITF* (小眼畸形相关转录因子)基因在人类染色体定位于 3p12.3-p14.1,编码的 *MITF* 蛋白由 419 个氨基酸组成,是一种含有 bHLH-Zip 结构的转录因子。*MITF* 基因通过调控信号通路和转录因子完成对听觉系统的调节,参与并调控多种神经嵴源性细胞的生长发育过程,尤其对黑色素细胞的生存、迁徙、增殖和分化有重要作用,*MITF* 基因的突变会影响黑色素细胞的发育和功能,可以降低耳蜗内淋巴液 K⁺ 浓度,从而影响毛细胞的功能引起耳聋^[11]。



图 4 WS 先证者及家属的 Sanger 测序图

先证者 1 *MITF* 基因(NM_000248)7 号外显子出现 1 个杂合突变,核苷酸变异为 c. 649_651delAGA、氨基酸变异为 p. R217del, *MITF* 基因第 217 号氨基酸在不同物种中高度保守,该氨基酸缺失可能会导致编码的蛋白缩短,该突变位点位于 7 号外显子对应于 *MITF* 蛋白的 bHLH-Zip 结构域,该变异会破坏 bHLH-Zip 结构域的完整性。该结构域由 44 个氨基酸组成,具有高度的保守性及 DNA 结合能力,其结构域的完整性和准确性对 *MITF* 蛋白发挥功能至关重要,bHLH-Zip 结构域的完整性受到破坏,从而影响 *MITF* 蛋白的功能。先证者 2 *MITF* 基因 10 号外显子 c. 1177-1G>A 变异发生在经典剪接受体位置,该变异可能导致供体-受体无法正常识别,造成 10 号外显子的异常剪接,从而产生异常蛋白。先证者 3 内眦外移,上肢无畸形,可确诊为 WS1 型,该患儿通过新一代测序技术检查出 *PAX3* 突变。临床上约 80% 的 WS1 患者可检出 *PAX3* 的突变^[12]。该先证者 *PAX3* 基因 5 号外显子 c. 587_593 缺失 7 个核苷酸 CCTCAGC,导致第 196 号氨基酸发生移码突变并提前终止,最终产生截断蛋白。该变异可能导致同源结构域的缺失,而不能与 DNA 有效结合,从而影响 *PAX3* 转录因子的功能。*PAX3* 转录因子具有高度保守性^[13],其功能异常会影响色素细胞的发育,使耳蜗血管纹暗细胞无法发育,导致耳蜗内环境的离子浓度平衡被破坏,最终导致听力下降^[14]。研究者发现临床上多数 WS 患者家长表示虹膜异色但视力未发现异常,对生活无影响,而听力下降是其最关心的问题。听力下降可能是由于黑素细胞异常使耳蜗血管纹功

能异常最终导致感音神经性聋,对于重度及极重度患儿可采取人工耳蜗植入进行干预^[15]。本组先证者 1 于 2 年前在我科行双侧人工耳蜗植入术(澳大利亚 CI 512),术中双耳 24 个电极阻抗及 22 个蜗内电极神经反应遥测 NRT 均正常,康复训练 2 年后言语识别率测试结果单音节识别率得分 91.0%,双音节识别率 94.0%;安静状态下句子识别率 97.0%,目前可以正常进行语言交流,很好地融入了普通幼儿园学习。先证者 2 轻度耳聋,平时交流无明显障碍,在长期随访观察中;先证者 3 于 2 年前在我科行右耳人工耳蜗植入术(奥地利 SONATA Ti100 F28),术中 12 对电极阻抗及神经反应遥测 NRT 均正常,开机 2 年言语识别率测试结果单音节识别率得分 85%,双音节识别率 87%,患儿能够很好地融入平常的生活,2021 年 1 月再次行左耳人工耳蜗植入术(奥地利 SONATA Ti100 F28),术中 12 对电极阻抗及神经反应遥测 NRT 均正常。

通过新一代测序技术可明确 3 例 WS 先证者的分子病因,WS 为常染色体显性遗传,根据孟德尔遗传规律,上述先证者子代有 50% 可能患病,生育后代聋儿的风险极高,建议其成年后组建家庭时行遗传咨询和产前诊断。本研究中 2 例极重度感音神经性聋患儿均行人工耳蜗植入术,术后经康复训练,均获得良好的可理解的言语能力。由于患儿数量少,目前关于 WS 相关基因突变行人工耳蜗植入术的疗效特别是远期疗效还有待进一步研究。

(下转第 919 页)

- 肉患者临床特征的比较[J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2020, 44(2): 63-68.
- [19] Turhal G, Eraslan S, Kaya İ, et al. Procalcitonin Levels in Chronic Rhinosinusitis[J]. *Turk Arch Otorhinolaryngol*, 2019, 57(3): 113-116.
- [20] Bilici S, Cinar Z, Yigit O, et al. Does procalcitonin have a role in the pathogenesis of nasal polyp? [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2019, 276(5): 1367-1372.
- [21] Hamade B, Huang DT. Procalcitonin: Where Are We Now? [J]. *Crit Care Clin*, 2020, 36(1): 23-40.
- [22] Aloisio E, Dolci A, Panteghini M. Procalcitonin: Between evidence and critical issues[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 496: 7-12.
- [23] Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis; the JESREC Study[J]. *Allergy*, 2015, 70(8): 995-1003.
- [24] Tao X, Chen F, Sun Y, et al. Prediction models for postoperative uncontrolled chronic rhinosinusitis in daily practice[J]. *Laryngoscope*, 2018, 128(12): 2673-2680.
- [25] Lou H, Meng Y, Piao Y, et al. Predictive significance of tissue eosinophilia for nasal polyp recurrence in the Chinese population[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2015, 29(5): 350-356.
- [26] 毛弈友, 陈杰, 廖敏, 等. 慢性鼻窦炎相关内在型分类及血液标志物的研究进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2020, 26(3): 338-342.
- [27] Tsybikov NN, Egorova EV, Kuznik BI, et al. Biomarker assessment in chronic rhinitis and chronic rhinosinusitis: Endothelin-1, TARC/CCL17, neopterin, and α -defensins[J]. *Allergy Asthma Proc*, 2016, 37(1): 35-42.
- [28] Tojima I, Matsumoto K, Kikuoka H, et al. Evidence for the induction of Th2 inflammation by group 2 innate lymphoid cells in response to prostaglandin D2 and cysteinyl leukotrienes in allergic rhinitis[J]. *Allergy*, 2019, 74(12): 2417-2426.
- [29] 郑铭, 王敏, 李颖, 等. 慢性鼻窦炎伴鼻窦炎的免疫炎症性标志物表达及其对术后复发的预测价值[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 54(3): 174-180.
- [30] Liao B, Liu JX, Li ZY, et al. Multidimensional endotypes of chronic rhinosinusitis and their association with treatment outcomes[J]. *Allergy*, 2018, 73(7): 1459-1469.

(收稿日期: 2021-07-06)

(上接第 913 页)

参考文献

- [1] Yang T, Guo L, Wang L, et al. Diagnosis, Intervention, and Prevention of Genetic Hearing Loss[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1130: 73-92.
- [2] 刘梦婷, 张天虹. 综合征性耳聋的诊断与治疗策略[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2021, 35(3): 285-288.
- [3] Grewal PS, Knight H, Michaelides M. Asymmetric choroidal hypopigmentation in a Son and mother with Waardenburg syndrome type I[J]. *Ophthalmic Genet*, 2020, 41(3): 284-287.
- [4] Somashekar PH, Upadhyai P, Narayanan DL, et al. Phenotypic diversity and genetic complexity of PAX3-related Waardenburg syndrome[J]. *Am J Med Genet A*, 2020, 182(12): 2951-2958.
- [5] Sil A, Panigrahi A. Visual Dermatology: Waardenburg Syndrome Type II[J]. *J Cutan Med Surg*, 2020, 24(3): 305.
- [6] Shanthini T, Balaji S, Kim U, et al. Genetic characterization of a patient with an unusual presentation of Waardenburg syndrome Type 4 and retinoblastoma[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2021, 68(1): e28553.
- [7] Alehabib E, Alinaghi S, Pourfatemi F, et al. Incomplete penetrance of MITF gene c. 943C>T mutation in an extended family with Waardenburg syndrome type II[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2020, 135: 110014.
- [8] Minami SB, Nara K, Mutai H, et al. A clinical and genetic study of 16 Japanese families with Waardenburg syndrome[J]. *Gene*, 2019, 704: 86-90.
- [9] 马静, 明澄, 林垦, 等. II型 Waardenburg 综合征患儿二例基因诊断分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2021, 56(1): 47-54.
- [10] Wang XP, Liu YL, Mei LY, et al. Wnt signaling pathway involvement in genotypic and phenotypic variations in Waardenburg syndrome type 2 with MITF mutations[J]. *J Hum Genet*, 2018, 63(5): 639-646.
- [11] Thongpradit S, Jinawath N, Javed A, et al. MITF variants cause nonsyndromic sensorineural hearing loss with autosomal recessive inheritance [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 12712.
- [12] Li W, Mei L, Chen H, et al. New Genotypes and Phenotypes in Patients with 3 Subtypes of Waardenburg Syndrome Identified by Diagnostic Next-Generation Sequencing[J]. *Neural Plast*, 2019, 2019: 7143458.
- [13] Boudjadi S, Chatterjee B, Sun W, et al. The expression and function of PAX3 in development and disease[J]. *Gene*, 2018, 666: 145-157.
- [14] 李进, 关静, 张静, 等. PAX3 基因突变相关 Waardenburg 综合征家系及散发患者基因型与表型特征分析[J]. 中华耳科学杂志, 2020, 18(2): 232-236.
- [15] Ma J, Lin K, Jiang HC, et al. A novel mutation of the PAX3 gene in a Chinese family with Waardenburg syndrome type I[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(7): e00798.

(收稿日期: 2021-06-08)