

一例成骨不全Ⅱ型高危胎儿的产前基因诊断

艾阳 唐佳 方群 吴晓昀 郭奕斌

【摘要】 目的 对广东一疑似致死性侏儒症或成骨不全Ⅱ型的高危胎儿实施产前基因诊断,以阐明胎儿骨发育异常的真实病因,及时预防患胎出生。**方法** 对经超声检查初诊为致死性侏儒症或成骨不全、已孕25周的高危胎儿,在抽取脐血制备DNA模板后,采用PCR-DNA直接测序法,分别对胎儿的FGFR3基因和COL1A1基因进行突变检测,然后对所发现的突变进行分析和鉴定。**结果** FGFR3基因未发现病理性突变,而COL1A1基因发现一典型的杂合错义突变(c.3065 G>T, p.G1022V),经查HGMD数据库证实为成骨不全Ⅱ型的致病性突变。**结论** (1)此高危胎儿为成骨不全Ⅱ型患胎,应及时终止妊娠(胎儿已经引产,经复查证实与产前基因诊断结果完全一致)。(2)在超声初诊基础上,采用产前基因诊断可快速、有效对高危胎儿做出确诊,为出生缺陷的预防提供技术保障。

【关键词】 成骨不全; COL1A1基因; 产前基因诊断

Prenatal gene diagnosis of a high-risk fetus with osteogenesis imperfecta type II Ai Yang, TANG Jia, FANG Qun, WU Xiao-yun, GUO Yi-bin. Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen Medical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: GUO Yi-bin, Email: guoyibin@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Objective To clarify the real pathogeny of the dysostoses of fetuses, the prenatal gene diagnosis of a Guangdong high-risk fetus suspected with osteogenesis imperfecta type II or thanatophoric dwarfism was carried out, which stopped the birth of the suffering fetuses. **Methods** The high-risk fetus of 25 weeks was preliminarily diagnosed with thanatophoric dwarfism or osteogenesis imperfecta by ultrasonic test. The cord blood was extracted to make preparation for DNA template, PCR-DNA sequencing was used to detect the mutation of FGFR3 gene and COL1A1 gene, then the mutations were analyzed and identified. **Results** There was no pathological mutation on the FGFR3 gene. There was a c.3065 G>T, p.G1022V heterozygosity missense mutation on the COL1A1 gene, which caused osteogenesis imperfecta type II; it was already reported on the HGMD. **Conclusions** (1) The high-risk fetus suffer with osteogenesis imperfecta-II, which should be induced labour (the fetus had been induced labour already. The result of prenatal gene diagnosis was completely accordance with the result of rechecking). (2) On the basis of preliminary diagnosis of ultrasonic test, the high-risk fetuses can be quickly and effectively diagnosed by prenatal gene diagnosis, which provides the technical security for prevention of the birth defect.

【Key words】 Osteogenesis imperfecta; COL1A1 gene; Prenatal gene diagnosis

成骨不全(osteogenesis imperfecta)又称为脆骨病(brittle bone disease)、Lobstein病、Urolik病、Van der Hoere病等,多数为常染色体显性遗传病,少数为常染色体隐性遗传。据2002年Byers等统计,国外成骨不全的患病率为1/30 000~1/10 000^[1],而中国人群中的发病率约为4/10 000^[2]。临床表现主要包括不同程度的骨折、骨畸形、骨脆性增加、蓝巩膜、牙本质发育不全、听力下降等。1979年,Sillence等^[3]首次将该病分为四型,到2007年,Cabral等^[4]进一步将成骨不全分为八型,见表1。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.22.085

基金项目:国家自然科学基金(30772069)

作者单位:510080 广州,中山大学中山医学院医学遗传学教研室(艾阳、唐佳、吴晓昀、郭奕斌);中山大学附属第一医院妇产科胎儿医学中心(方群)

通讯作者:郭奕斌,Email:guoyibin@mail.sysu.edu.cn

表1 成骨不全的分型

分型	OMIM	临床严重性	突变基因	遗传方式
I	166200	轻度~无畸形	COL1A1/2	AD
II	166210	围产期死亡	COL1A1/2	AD
III	259420	严重畸形	COL1A1/2	AD
IV	166220	中等畸形	COL1A1/2	AD
V	610967	中等畸形	不清楚	AD
VI	610968	中等~严重畸形	不清楚	AR
VII	610682	中等畸形	CRTAP	AR
VIII	610915	严重畸形~围产期死亡	LEPRE1	AR

注:AD:常染色体显性遗传;AR:常染色体隐性遗传

临床最常见的是成骨不全 I 型和 II 型,它们均由 I 型胶原基因(COL1A1、COL1A2)突变所致。I 型胶原由 2 个 $\alpha 1$ 链和 1 个 $\alpha 2$ 链组成,编码 $\alpha 1$ 链和 $\alpha 2$ 链的基因 COL1A1 和 COL1A2 分别位于 17q21~22 和 7q22.1 上。COL1A1 基因长 18 kb,有 51 个外显子;COL1A2 基因长 38 kb,有 52 个外显子^[5],而与新生儿关系最密切的是 II、III 两型。

成骨不全 II 型是一种严重致残致死、常染色体显性遗传的骨发育不良病,通常在围产期死亡,本病至今仍无有效治疗措施^[6]。因此,检出突变、阐明病因,对高危胎儿实施产前基因诊断是目前防治该病的最佳应对策略和优生手段,也是开展孕早期诊断和胚胎植入前诊断的必要前提条件。本课题组在长期开展遗传性骨病的基因诊断和产前诊断工作的基础上,对近期来自广东的一成骨不全 II 型高危胎儿实施了产前基因诊断并获得成功,现报道如下。

对象与方法

1. 研究对象:孕妇:广东籍,33 岁,2010 年 8 月 13 日来我室就诊时已孕 25 周,胎儿经下列 I~III 级超声检查,初诊为致死性侏儒症或成骨不全高危胎儿。

I 级产前超声检查显示,胎儿颅骨光环钙化不明显,双顶径(BPD)约 40 mm,头围(HC)约 142 mm,腹围(AC)约 101 mm,胎心率 148 次/min,胎儿四肢短小显示欠清晰,测得股骨长约 8 mm,双足形态不自然。超声提示:宫内妊娠,单活胎,腹围如孕 16⁺ 周大小,考虑胎儿四肢短小畸形。胎盘成熟度 0。

II、III 级产前超声检查显示,其生长指标:BPD:58 mm;HC:218 mm;AC:159 mm;胸围(TC):128 mm;股骨长(FL):18 mm;肱骨长(HL):18 mm;胫骨(Tibia):9.2 mm;腓骨(Fibula):12 mm;小脑横径:29 mm。胎儿二维、彩色多普勒超声、三维超声诊断:脊椎骨颈、胸、腰、骶、尾段脊柱骨排列整齐,连续性良好,弯曲度正常;左右上肢、左右下肢可见,其内肱骨、尺骨、桡骨、股骨、胫骨、腓骨显示,双上肢、下肢长骨短、弯曲,可见骨折。胸廓狭小,肋骨短小、扁平。腹壁完整,肝胆、胃肠、双肾、膀胱可见。超声提示:宫内妊娠,胎儿存活,胎儿发育相当于 23⁻ 孕周。胎儿骨骼系统发育异常,考虑致死性骨发育障碍。

2. 研究方法:(1)脐血 DNA 模板的制备:抽取脐带血 1~2 ml,EDTA 抗凝,按我室已建立的方法进行^[7]。即采用微量快提法制备模板 DNA:取 EDTA 抗凝血 200 μ l \rightarrow 纯净水溶血 \rightarrow 打散混匀后放入 -20 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow 离心,弃上清 \rightarrow 再次加纯净水打散混匀 \rightarrow 离心,弃上清 \rightarrow 加 STE、SDS、PK \rightarrow 混匀后于 55 $^{\circ}$ C 水浴 1.5 h \rightarrow 加酚氯仿异戊醇抽提一次 \rightarrow 上清用无水乙醇沉淀 \rightarrow 离心,弃上清 \rightarrow TE 溶解 \rightarrow 打匀后直接 PCR 扩增。(2)PCR 扩增:FGFR3 基因的普通引物、内对照引物的设计和 PCR 扩增见文献^[7],COL1A1 基因的引物参照文献^[8]合成,见表 2。上述引物由上海英骏公司或北京华大公司合成。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55~65 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,38 cycles \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 保存或直接电泳。(3)琼脂糖凝胶电泳:用 1.2%~1.5% 琼脂糖凝胶电泳,0.5 mg/ml 溴乙啶染色,紫外灯下观察扩增产物。(4)直接测序:将 PCR 产物交上海英潍捷基公司(Invitrogen company)或北京华大基因公司用 ABI PRISM 3730 型测序仪完

成双向测序。

表2 COL1A1 基因各对引物的复性条件和产物大小

外显子	复性条件	产物大小(bp)
1	55 ℃ 40 s	349
2~5	60 ℃ 40 s	1000
6~7	58 ℃ 40 s	524
8~9	59 ℃ 40 s	460
10~11	55 ℃ 40 s	492
12~15	55 ℃ 40 s	784
16~17	55 ℃ 40 s	522
18~20	60 ℃ 40 s	602
21~23	62 ℃ 40 s	704
24~25	57 ℃ 40 s	515
26~29	58 ℃ 40 s	738
30~32	65 ℃ 40 s	799
33~35	55 ℃ 40 s	750
36~37	55 ℃ 40 s	441
38~39	58 ℃ 40 s	505
40~41	58 ℃ 40 s	561
42~43	59 ℃ 40 s	412
44~45	57 ℃ 40 s	481
46~47	60 ℃ 40 s	626
48~49	55 ℃ 40 s	794
50~51	62 ℃ 40 s	749

结 果

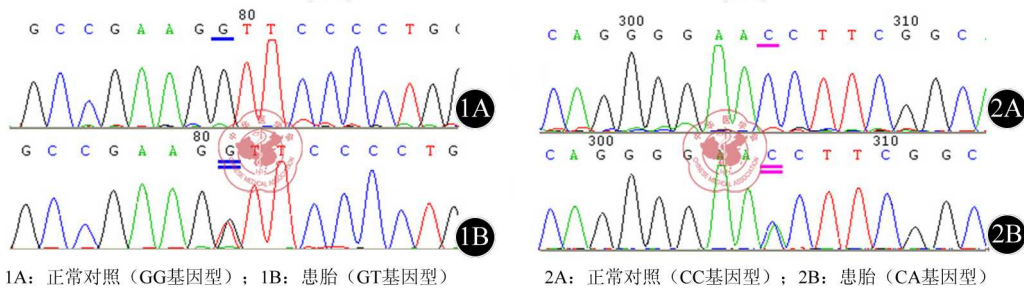
1. 测序结果:经基因检测,FGFR3 基因所有突变热区包括外显子 3,5,6,7,9,10,13,15,19 和目前国际已报的所有突变位点包括 Codons 84,200,217,248,249,250,262,268,278,279,328,346,370,371,373,375,380,381,384,391,394,513,538,540,621,650 和 807 均未发现病理性突变,而在 COL1A1 基因第 42 外显子内发现存在 c.3065 G>T,p. G1022V 杂合错义突变。此外,还发现患胎的该基因存在 IVS15 ds(+52)A>G、IVS16ds(+129)T>G、IVS24 ds(+58)T>C、IVS31 ds(+128)G>C、IVS36 ds(+71)C>G、IVS36 as(-18)C>G、IVS48 as(-35)T>C、IVS50 as(-12)G>A 杂合变异,以及存在 c.2298T>C,p. T588T 纯合同义突变和 IVS30 ds(+39)C>T 纯合变异。经查 HGMD 数据库,证实其中的 c.3065 G>T,p. G1022V 突变为真正引起成骨不全 II 型的致病性突变^[9]。应用 Chromas 软件比对的正常对照和患胎的 COL1A1 基因第 42 外显子的正、反向测序结果见图 1,2。

2. 引产后胎儿的 X 线片结果:显示双上肢、下肢长骨短、宽、弯曲,胸廓狭小,多条肋骨和长骨骨折,畸形明显,头骨密度降低,暗巩膜等,这些都与成骨不全 II 型完全相符(图 3)。

讨 论

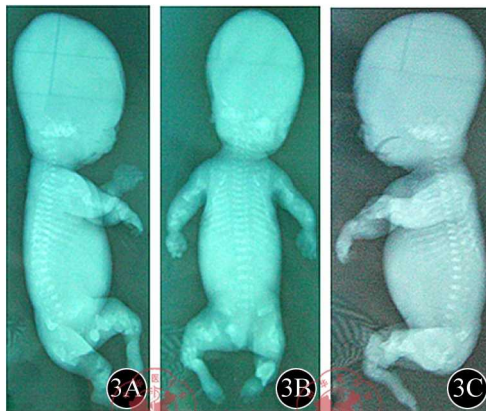
临床上,经超声检查诊断为骨软骨发育不良病特别是四肢短小的病例并不少见,其中最常见的当属软骨发育不全,如果四肢长骨特别短小、弯曲且有胸廓狭窄的则多半是致死性骨发育障碍,可以是致死性侏儒

症,也可以是成骨不全症等。如果有串珠样骨折的痕迹,则患成骨不全Ⅱ型的可能性明显增大。根据我室当时的基因检测条件,同时也为了慎重起见,我们先后对引起致死性侏儒症的FGFR3基因和引起成骨不全症的COL1A1基因进行了全面的突变检测,终于在COL1A1基因第42外显子的编码区内发现了典型的杂合错义突变,经数据库和文献检索证实是引起成骨不全Ⅱ型的致病性突变,为防止患胎降生、避免悲剧发生提供了准确可靠的科学依据。患胎随即引产,经复查证实与产前基因诊断结果完全相符。



1A: 正常对照(GG基因型); 1B: 患胎(GT基因型)

2A: 正常对照(CC基因型); 2B: 患胎(CA基因型)



3A: 左面观; 3B: 正面观; 3C: 右面观

图1 COL1A1基因exon42的正向序列对比图

图2 COL1A1基因exon42的反向序列对比图

图3 引产后X线片结果

按目前临床的分类,成骨不全主要分为两大类:(1)先天性成骨不全:属严重型,出生时就有多发性骨折,产程中或子宫内的轻微外伤就可引起骨折。肢体短,有畸形并有摩擦音,颅骨如膜状,此型患儿常因颅内出血而成死胎。(2)迟发性成骨不全:出生时表现正常,重症者在婴儿期可发生骨折,轻型发生骨折较晚,最轻者只有巩膜发蓝而不发生骨折。迟发型患儿的主诉为走路晚,一般多在骨折后才就医。先天型和后天型中的重症相同,常表现为非正常体形,骨折后肢体弯曲以及驼背、脊柱侧弯和后突等,前额宽,额骨前突,颞骨向两侧突出,枕骨后突,使颅骨增大,左右径宽而前后径短,以致面颅不成比例,呈三角形。巩膜蓝染最常见,偶有正常巩膜。由于巩膜薄而透明,可见眼内的色素从深天蓝色到浅蓝色。

诊断成骨不全Ⅱ型需与致死性侏儒症相鉴别。致死性侏儒症胎儿超声图像通常以严重短肢畸形、窄胸、头大为特征^[10],而成骨不全Ⅱ型患胎则为颅骨变薄,加压有塌陷,即所谓“膜状颅骨”。胎儿肢体短小,并呈弓形弯曲,可有多处骨折、自发骨折^[11]。本例患胎三维彩色超声结果显示:胎儿颅骨环较薄,且受压变形,虽脊椎骨颈、胸、腰、骶、尾段脊柱骨排列整齐,连续性良好,弯曲度正常,但其双上肢、下肢长骨不但短、弯曲,而且可见骨折,且胸廓狭小,肋骨短小、扁平,胎儿发育相当于孕23周。这些结果提示我们:胎儿骨骼系统发育存在异常,很有可能是致死性骨发育障碍,并且患成骨不全Ⅱ型的可能性更大。我们最终的基因检查结果也证实了这一点。

本例患胎属于成骨不全Ⅱ型,但家族无类似患者,父母非近亲婚配,表型也完全正常,母亲否认孕期服药和感染其他病史,亦无接触放射性物质及吸毒史,但其夫长期从事化工行业,分析可能发生了基因突变并在孕育时传递给了胎儿。由于成骨不全Ⅱ型是常染色体显性遗传的,只要带有一个致病基因即可发病,故发病风险非常高,这也许是本例胎儿发病的原因。另外,对于成骨不全Ⅱ型来说,新生儿的再发风险与嵌合体有关,一般来说,没有家族史的、再次生育出的患儿是嵌合体的可能性增大^[12]。

目前,对于非致死的成骨不全来说,可以通过外科手术、康复疗法及药物对症治疗来缓解病情,或者通过骨髓移植来治疗,但是具有一定风险。而对于致死性成骨不全Ⅱ型而言,多数患儿在出生后24 h内即死亡,1年存活率近似为零^[6]。因此,目前最为有效的方法就是对于有家族史的或者经超声检查疑似怀有患胎的高危孕妇进行产前基因诊断,一经查出,则立刻终止妊娠。本文对此高危胎儿产前基因诊断工作的成功实施为今后继续开展本病以及其他相关遗传病的优生与遗传咨询和产前诊断积累了宝贵的经验,也为今后开展孕早期诊断和胚胎植入前诊断等打下较好的基础。同时,对于降低其发病率和群体致病基因频率方面也起着积极的作用。

参 考 文 献

- [1] Marini JC, Forlino A, Cabral WA, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat*, 2007, 28: 209-221.
- [2] Gajko-Galicka A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 2002, 49: 433-441.
- [3] Sillence DO, Senn A, Danks DM. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *Med Genet*, 1979, 16: 101-116.
- [4] Cabral WA, Chang W, Barnes AM, et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat Genet*, 2007, 39: 359-365.
- [5] 吴晓林, 顾鸣敏, 崔斌. 一例Ⅰ型成骨不全家系的基因定位及突变检测. *上海交通大学学报: 医学版*, 2007, 27: 699-702.
- [6] Monti E, Mottes M, Fraschini P, et al. Current and emerging treatments for the management of osteogenesis imperfecta. *Ther Clin Risk Manag*, 2010, 6: 367-381.
- [7] 郭奕斌, 潘宏达, 郭春苗, 等. 双错配碱基 ARMS 结合 RE 法快速检测 FGFR3 基因的突变超热点. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2: 5-8.
- [8] 王熙然, 窦京涛, 陆菊明. 成骨不全家系临床及基因特征研究. 北京: 中国人民解放军军医进修学院硕士学位论文, 2008.
- [9] Korkko J, Kuivaniemi H, Paassilta P, et al. Two new recurrent nucleotide mutations in the COL1A1 gene in four patients with osteogenesis imperfecta; about one-fifth are recurrent. *Human Mutation*, 1997, 9: 148-156.
- [10] 赵立梅, 陈小英, 潘玲. 超声诊断胎儿成骨不全一例[J/CD]. *中华医学超声杂志: 电子版*, 2010, 7: 1251-1252.
- [11] 徐忠建, 丁海霞, 鲁植艳, 等. 成骨不全的影像学表现与诊断. *武汉大学学报: 医学版*, 2010, 31: 691-694.
- [12] Morgan JA, Marcus PS. Prenatal diagnosis and management of intrauterine fracture. *Obstet Gynecol Surv*, 2010, 65: 249-259.

(收稿日期: 2011-08-03)

(本文编辑: 戚红丹)

艾阳, 唐佳, 方群, 等. 一例成骨不全Ⅱ型高危胎儿的产前基因诊断[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(22): 6662-6666.