

全外显子测序对先天缺牙伴肿瘤家系致病基因初探

侯菲菲¹ 赵晓雪² 武京² 马腾飞² 王慧娟² 张向宇^{2*}

(1. 福建省厦门市厦门医学院附属口腔医院儿童口腔科 福建 厦门 361006;

2. 天津医科大学口腔医院儿童口腔科 天津 300070)

[摘要] 目的:研究先天缺牙和肿瘤发生之间可能存在的内在联系,为寻找早期诊断肿瘤疾病的风险指标提供参考。方法:采集先天缺牙伴肿瘤易感家系的临床资料,绘制遗传图谱分析家系遗传特征;提取家系成员静脉外周血的DNA进行全外显子测序,将符合标准的测序序列和人类基因组序列第37版参考基因组(GRCh37)进行比对,筛查、统计和注释样本中的变异信息,过滤出与疾病相关的突变位点或基因。结果:家系成员的先天缺牙为典型常染色体显性遗传,伴有明显的肿瘤易感性;先证者及其母亲在基因DSPP、AXIN-2、ZNF609上有大量相同的突变位点。结论:先天缺牙和肿瘤的发生存在内在联系;先天缺牙有望在未来肿瘤研究中成为一个极具潜力的风险指标。

[关键词] 先天缺牙 肿瘤易感 家系 全外显子测序

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-7651(2018)12-1360-04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.12.023

Whole Exome Sequencing for Pathogenic Genes in a Hypodontia and Tumor-prone Family. HOU Fei-fei¹, ZHAO Xiao-xue², WU Jing², MA Teng-fei², WANG Hui-juan², ZHANG Xiang-yu^{2*}. 1. Department of Pediatric Dentistry, Affiliated Stomatology Hospital, Xiamen Medical College, Xiamen 361006, China; 2. Department of Pediatric Dentistry, Stomatology Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China.

[Abstract] **Objective:** To provide a reference for the early diagnosis of cancer disease risk indicators by studying the intrinsic relationship between the hypodontia and tumor gene. **Methods:** The clinical data of pedigree with hypodontia and tumor-prone was collected. The pedigree genetic map was drawn to analyze the genetic characteristics. The pedigree members of whole blood genomic DNA for whole exome sequencing was extracted. The obtained sequence was compared with the Human Genome Sequence 37th Reference Gene Group (GRCh37). The sample variation information was screened, counted, and annotated to filter out the disease-associated mutations or gene. **Results:** There was an intrinsic link between abnormal tooth development and tumorigenesis. Hypodontia was expected to become an extremely important risk indicator in future tumor research. **Conclusion:** There may be an internal relationship between hypodontia and tumor-prone. Congenital absence of teeth is expected to be an important risk indicator in future cancer research.

[Key words] Hypodontia Tumor-prone Pedigree Whole exome sequencing

牙齿先天缺失是人类常见的颅面部发育性异常疾病,可导致咀嚼功能紊乱、美观、畸形、发音以及社会心理学等诸多方面的问题^[1]。研究发现,先天缺牙不仅具有很强的遗传性,还与某些肿瘤共享相同的信号通路,有较高伴发肿瘤的风险^[2]。2004年Lammi等^[3]首次报道了一个多数牙缺失伴发结直肠癌肿瘤,并具有显性遗传特征的家系。这些研究使

以牙齿缺失作为突破点,追踪并抑制肿瘤的发生成为可能。

本研究选取一个先天缺牙伴肿瘤易感家系作为研究对象,通过基因组全外显子测序,对家系先天缺牙和肿瘤致病基因初步锁定,研究二者的内在联系,为寻找早期诊断肿瘤疾病的风险指标提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 对临床发现的一个先天缺牙伴肿瘤易感家系进行口颌系统及全身状况的详细检查,拍摄全景片以明确余留及缺失牙数、是否有埋伏阻生齿等;详细询问个人既往史、家族遗传病史等资料。本研究严格遵守伦理学的各项规定,已通过天

基金项目 2016天津市卫计委重点攻关项目财政专项
(编号:kzhxy-1)

作者简介 侯菲菲(1993~),女,山西人,硕士,主要从事先天缺牙的遗传学研究及儿童口腔医学方面研究。

* 通讯作者 张向宇,电话:022-23332102

津医科大学口腔医学院伦理委员会的批准,所有受检者均签署知情同意书。

1.2 实验流程

1.2.1 临床资料获取 详细检查家族成员牙齿状况及母亲孕期情况,排除所有已知对牙发育有影响的因素;询问拔牙史;口腔曲面断层片排除埋伏牙未萌者。留取所有可联系的家系成员的检查资料,填写全身检查表,口腔检查表,绘制家系遗传图谱。在严格遵守伦理学的各项规定,所有受检者知情同意的前提下,抽取研究对象静脉外周血。

1.2.2 建库与测序 受检者的静脉全血通过琼脂糖凝胶电泳,检测所提 DNA 是否有蛋白质、RNA 等生物大分子的污染以及降解程度。Qubit 2.0 荧光定量手段对所提 DNA 浓度进行精确定量,含量在 $0.6 \mu\text{g}$ 以上的 DNA 样品被用来建库;捕获目标 DNA 序列系统采用 Agilent 的液相芯片;符合预期后,使用实时定量基因扩增荧光检测系统对文库的有效浓度 (3 nmol/L) 进行准确定量。文库质量检测合格的 DNA 样品,根据文库的有效浓度及数据产出需求运用 Illumina HiSeq 4000 测序仪平台进行高通量、高深度的测序。

1.2.3 生物信息分析 主要针对测序的数据量、比对率和错误率,对所得生物信息的数据质量进行测序评估,达到预期标准,则进行下一步的分析步骤,未达到标准的重新建库或测序;将符合标准的测序序列映射到人类基因组序列第 37 版参考基因组 (GRCh37) 进行比对,对样本中的变异信息进行筛查、统计和注释;利用已有数据库,过滤出与疾病相关的有价值的突变位点或基因。对基本分析检测到的 SNP/InDel 信息进行突变位点的筛选;比对已有基因组数据库,保留低于 0.01 频率的突变信息;保留外显子区或剪接位点区的变异;去除同义突变,保留可能会对基因表达产物有影响的变异信息;最后通过 SIFT, Polyphen, MutationTaster, CADD 4 个软件对保留下来的变异信息进行有害性预测。

2 结果

2.1 临床表现 本研究选取家系为天津常住人口,汉族,可追溯 3 代,共 15 人。从遗传图谱(图 1)可见,先天缺牙在家族中垂直传递,每代均有患者,II 代共 5 人,均有牙齿先天缺失,100% 发病。本研究的先证者 III-4 为 28 岁男性,先天缺失 7 颗恒牙(包括第三磨牙),下颌侧切牙为乳牙滞留,口腔曲面体层片如图 2 所示,未发现全身其他疾病;先证者母亲 II-7 先天缺失 5 颗恒牙(包括第三磨牙),曲面

体层片如图 3 所示。

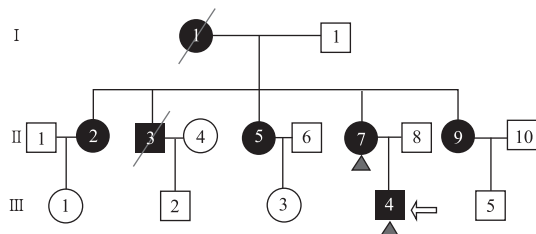


图 1 家系图谱

Fig. 1 Family map.



先证者 III-4 先天缺失 7 颗恒牙(包括第三磨牙),下颌侧切牙为乳牙滞留

图 2 III-4(先证者)口腔曲面体层片

Fig. 2 The panoramic radiograph of proband.



先证者母亲 II-7 先天缺失 5 颗恒牙(包括第三磨牙)

图 3 II-4(先证者母亲)口腔曲面体层片

Fig. 3 The panoramic radiograph of proband's mother.

2.2 变异检测结果筛选 对检测结果进行筛选,过滤出与疾病相关的突变位点,统计结果如表 1 所示。参考高通量测序数据解读的金标准对所得变异进行有害性分类,统计突变数目如表 2 所示。

2.3 与疾病相关的基因突变 筛查与牙发育相关的基因,仅发现 DSPP 基因上,先证者及其母亲有 25 个相同突变位点,其中包括 23 位于外显子区域的 9 个错义突变,错义突变位点详细注释如表 3 所示。据文献报道,位于 17 号染色体的 AXIN-2 基因与结肠直肠癌有关,且该基因为先天缺牙研究热点基因。筛查先证者及其母亲在 AXIN-2 基因上

表 1 突变位点过滤统计

Table 1 Filtering statistics of mutation sites

Total	1000G	Function	Synonymous	Deleterious
237457	23814	3306	2150	988

注:1000G:过滤千人基因组数据库,去除个体间多样性,保留真正有可能治病的罕见突变位点;Function:位于外显子和剪切位点区域的突变;Synonymous:同义突变;Deleterious:经 SIFT, Polyphen, MutationTaster, CADD 四个有害性预测软件分析,至少有两个软件支持该位点有害

表 2 有害性分类筛选结果

Table 2 Screening results of harmful classification

总数	致病性	可能致病	不确定性变异	可能良性	良性
31067	24	5	3312	21	27705

表 3 先证者及其母亲在 DSPP 基因上的错义突变注释

Table 3 Notes of the same missense mutation in the DSPP gene between the proband and his mother

优先级	dbSNP 注释 ID	突变前	突变后	氨基酸改变
L	rs3750025	G	A	exon4:c. G727A: p. D243N
L	rs111205174	G	A	exon5:c. G2548A: p. G850S
L	rs111216113	A	G	exon5:c. A2878G: p. S960G
L	rs150637282	A	G	exon5:c. A3085G: p. N1029D
L	rs142295724	A	C	exon5:c. A3249C: p. E1083D
L	rs201399566	A	G	exon5:c. A3364G: p. N1122D
L	rs140656082	A	G	exon5:c. A3418G: p. N1140D
L	rs771105671	C	A	exon5:c. C3429A: p. D1143E
L	rs200612038	A	T	exon5:c. A3447T: p. E1149D

注:Priority(优先级);H:High,表示该位点不在 genome repeat 区域,千人基因组数据库中频率小于 0.01,该位点位于 exonic 或者 splicing 区域,且该位点经 SIFT, Polyphen, MutationTaster, CADD 预测至少有一个软件预测为有害;M:Medium,表示该位点不在 genome repeat 区域,千人基因组数据库中频率小于 0.01,该位点位于 exonic 或者 splicing 区域;L:Low,表示该位点不满足 H 或 M 条件的其他所有的突变

表 4 先证者及其母亲在 AXIN-2 基因外显子区域上的相同突变注释

Table 4 Notes of the same mutation in the exonic of AXIN-2 gene between the proband and his mother

优先级	dbSNP 注释 ID	突变前	突变后	突变类型	氨基酸改变
L	rs1133683	G	A	同义 SNP	exon6:c. C1386T;p. P462P
L	rs9915936	T	C	同义 SNP	exon6:c. A1365G;p. P455P

表 5 先证者及其母亲在 ZNF-609 基因外显子区域上的相同突变注释

Table 5 Notes of the same mutation in the exonic of ZNF-609 gene between the proband and his mother

优先级	dbSNP 注释 ID	突变前	突变后	突变类型	氨基酸改变
L	rs525878	C	T	同义 SNP	exon2:c. C828T;p. P276P
H	rs375037097	T	G	错义 SNP	exon4:c. T3239G;p. I1080S

的突变位点,二人在该基因上共有的相同突变位点 6 个,其中 2 个位于外显子区域的位点注释见表 4。在 15 号染色体 15q22.31 与先天性巨结肠相关的基因 ZNF609 上,发现先证者及其母亲有 4 个相同的突变位点,表 5 所示为位于外显子区域的注释信息。

3 讨论

3.1 牙发育相关基因突变 研究证实,牙本质涎磷蛋白基因(Dentin sialophosphoprotein, DSPP)表达产物在牙本质形成和矿化,以及第三期牙本质形成过程中发挥着关键性的作用^[4]。DSPP 蛋白主要表达于正在分化的成牙本质细胞中,其产物之一牙本质糖蛋白,被证实与牙本质的生物矿化行为密切相关^[5]。DSPP 基因转基因动物实验表明,DSPP 基因敲除小鼠牙髓腔增大、前期牙本质区域增宽且矿化不足,严重可致髓腔暴露等^[4]。本研究先证者及其母亲在 DSPP 基因上有大量相同突变,结合患者口腔检查及就诊史描述,患者牙列具有髓腔钙化、根管狭窄、闭锁等特点,全口余留牙形态与正常人相比较小。推测,DSPP 基因上的突变可能导致家系成员牙本质形成异常,进而造成牙齿的先天缺失。

3.2 牙和肿瘤均相关基因突变 WNT(Wing less path way)信号传导系统是与大肠的癌变发生最为密切的信号传导系统^[6],AXIN 和 AXIN2 是该信号传导通路的主要成分,此外还有包括 β -钙连蛋白(β -catenin)。 β -钙连蛋白水平的上升可以诱导肿瘤的发生,已有研究证明 AXIN-2 的突变,可导致 β -catenin 水平的上升^[7,8],是 WNT 信号通路的抑制剂。此外,AXIN-2 已被证实是一种肿瘤抑制基因^[9],该基因的突变会导致组织癌变和肿瘤发生率的显著升高^[10,11]。已有多项研究表明,AXIN-2 基因是非综合征型先天缺牙和结直肠癌的共同致病基因^[12~14]。筛查 AXIN-2 基因的突变情况,发现先证者及其母亲有两个位于外显子区域的相同错义突

变,推测这些突变极有可能是导致先证者母亲先天性巨结肠和母子二人先天缺牙的潜在原因。

3.3 巨结肠相关基因突变 经四步筛选法,先证者及其母亲在基因 ZNF609(Zinc Finger Protein 609, 锌指蛋白 609)上发现 2 个位于外显子区域的突变位点。人体基因组基因数据库基因搜索网站(GeneCard)上关于基因 ZNF609 的描述为与巨结肠疾病相关,目前与该基因相关的研究较少。2017 年有学者报道,ZNF609 通过争夺共享 miR-150-5-p 来干扰 AKT3 的表达,从而参与巨结肠疾病的发生^[15]。结合以上分析,高度怀疑先证者母亲先天性巨结肠的发生是基因 AXIN-2、ZNF609 变异或二者共同影响作用的结果,在今后的深入研究中值得进一步探讨。

本研究对 1 例非综合征型先天性缺牙伴肿瘤易感家系进行家系遗传特征分析;全基因组外显子测序及信息分析,得出如下结论:1)本研究进一步印证了牙齿先天缺失与肿瘤的发生共享相同的信号通路。2)先天缺牙与肿瘤的关系值得深入研究,并进行双向研究加以证实。3)牙齿先天性缺失作为提示肿瘤易发的风险指标,有望在未来肿瘤研究中成为一个极具潜力的风险指标。

参考文献

- [1] 葛立宏. 儿童口腔医学[M]. 第 2 版, 北京大学医学出版社, 2013
- [2] Kuchler EC, Lips A, Tannure PN, et al. Tooth agenesis association with self-reported family history of cancer [J]. J Dent Res, 2013, 92(2): 149-155
- [3] Lammi L, Arte S, Somer M, et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer [J]. Am J Hum Genet, 2004, 74(5): 1043-1050
- [4] 张蓉. 牙本质涎磷蛋白在牙齿发育、矿化及牙髓损伤修复中作用的研究[D]. 第四军医大学, 2001
- [5] Yamakoshi Y, Hu JC, Iwata T, et al. Dentin sialophosphoprotein is processed by MMP-2 and MMP-20 *in vitro* and *in vivo* [J]. J Biol Chem, 2006, 281(50): 38235-38243
- [6] Arzoo PS, Klar J, Bergendal B, et al. WNT10A mutations account for 1/4 of population-based isolated oligodontia and show phenotypic correlations [J]. Am J Med Genet A, 2014, 164(2): 353-359
- [7] Wong S, Liu H, Bai B, et al. Novel missense mutations in the AXIN2 gene associated with non-syndromic oligodontia [J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(3): 349-353
- [8] Liu H, Ding T, Zhan Y, et al. A novel AXIN2 missense mutation is associated with non-syndromic oligodontia [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138221
- [9] Menezes ME, Mitra A, Shevde LA, et al. DNAB6 governs a novel regulatory loop determining Wnt/ β -catenin signaling activity [J]. Biochem J, 2012, 444(3): 573-580
- [10] Hadjihannas MV, Brückner M, Behrens J. Conductin/axin2 and Wnt signalling regulates centrosome cohesion [J]. EMBO Rep, 2010, 11(4): 317-324
- [11] Rauch TA, Wang Z, Wu X, et al. DNA methylation biomarkers for lung cancer [J]. Tumour Biol, 2012, 33(2): 287-296
- [12] 王凤玮, 温玲, 朱思伟, 等. 结直肠癌组织中突变型 Axin2 对 Wnt 信号转导系统的调控及其机制[J]. 癌症, 2007, 26(10): 1041-1046
- [13] Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling [J]. Cell, 2000, 103(2): 311-320
- [14] Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway [J]. Cancer Sci, 2003, 94(3): 225-229
- [15] Peng L, Chen G, Zhu Z, et al. Circular RNA ZNF609 functions as a competitive endogenous RNA to regulate AKT3 expression by sponging miR-150-5p in Hirschsprung's disease [J]. Oncotarget, 2017, 8(1): 808

[收稿日期: 2018-06-27]

(本文编辑 李四群)