

蒙古族并指一家系临床特点及其HOXD13基因突变检测

呼斯勒^{1,2}, 喜吉日³, 杨立清^{1,2}, 曹亚宁⁴, 吴柒柱¹

(1. 内蒙古民族大学附属医院 口腔科, 内蒙古 通辽 028000; 2. 内蒙古自治区个体化用药工程技术研究中心; 3. 锡林郭勒盟蒙医医院; 4. 内蒙古大学 生命科学学院)

摘要: **目的:** 探讨先天性并指畸形一家系的临床特点及其致病基因突变分析, 为该类疾病的产前诊断以及携带者筛查提供依据。 **方法:** 通过家系调查, 对家系患者进行临床表型分析并进行手和脚部X光检查; 绘制系谱图, 整理分析家系资料; 采集家系成员外周血并提取基因组DNA; 通过外显子测序方法筛选候选基因, 将捕获的候选基因突变位点进行PCR扩增后Sanger测序验证分析。 **结果:** 该家系已传4代, 并指患者共9例, 其中男4例, 女5例, I 2、II 4、III 5, 7, 10等5例患者为单侧并指, III 16和IV 3, 6, 7等4例患者为双侧手指并指, 脚趾均为正常。先证者及其家系患者均为HOXD13基因的第二外显子917位点发生G>A的突变, 导致306位氨基酸从精氨酸到谷氨酰胺的改变, 即c.917G>A(P.R306Q)。家系正常成员均无此突变。 **结论:** 该先天性并指家系属于常染色体显性方式遗传, HOXD13, c.917G>A(p.R306Q)基因突变位点是该并指家系的致病突变。该家系III 12成员表型正常但致病基因携带者, 表明该家系存在不完全外显特点。

关键词: 家系; 并指; 临床特点; HOXD13基因

中图分类号: R764.43

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2021)05-0481-04

并指畸形(Syndactyly, SD)是指相邻指(趾)间软组织(和)骨骼不同程度的融合并肢体分化障碍导致, 发生率约为两万分之一, 其中双侧性并指占二分之一。SD为主要以常染色体显性方式遗传, 并呈现不完全外显率, 少数为常染色体隐性和X-连锁隐性方式遗传^[1,2]。SD具有明显的表型差异和遗传异质性, 具有单侧或双侧、对称或不对称等特点^[3]。HOXD13基因在肢体发育中起关键调控作用^[4]。HOXD13转录因子含有1条多聚丙氨酸链和1个同源DNA结合结构域, 前者延展突变和后者错义突变都可引起SD表型^[5]。本文报道了内蒙古地区发现的蒙古族SD一家系临床特点及HOXD13基因错义突变检测结果。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 病例 先证者(II 4), 女, 65岁, 2014-03首次在内蒙古民族大学附属医院进行遗传咨询。临床表现为先天性单侧(左手)3/4手指融合, 双脚趾正常, 无其它疾病。

1.1.2 家系资料 该家系位于内蒙古东部乡村, 已传4代, 可追溯调查38人(见图1), 其中并指患者9例(4例男性, 5例女性患者)。临床表型为II 4, III 5, 7, 10为单侧3/4手指融合, 双侧脚趾正常。III 16和IV 3, 6, 7等均为双侧3/4手指融合, 双侧脚趾正常(见图2)。其中III 16婴幼儿期在乡村传统方法进行手指分离手术, 预后效果不佳; IV 6, 7等二名患者在5~12岁之间在内蒙古民族大学附属医院手足外科做过手术, 预后良好, 临床(见图2、表1)。

对于该项目的伦理论证由内蒙古民族大学附属医院伦理委员会认可, 在所有受调查者均签署知情同意后对该家系成员进行了病史采集、X光片拍摄、身体检查和生活习惯调查等, 并抽取外周血10 mL分别两个EDTA抗凝管中保存备用。

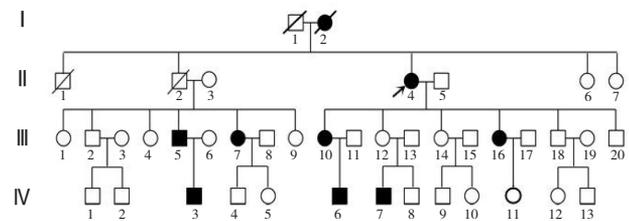


图1 并指一家系系谱图

收稿日期: 2021-07-16; 修回日期: 2021-08-11

基金项目: 内蒙古自治区个体化用药工程技术研究中心开放课题(MDK2018008); 内蒙古民族大学科学研究项目(NMDYB18076)

作者简介: 呼斯勒(1985-), 男, 内蒙古民族大学附属医院西医口腔科主治医师。

通讯作者: 吴柒柱, 主任医师, 教授, E-mail: qizhu_wu2014@163.com 内蒙古民族大学附属医院蒙医口腔科, 028007



图2 家系患者并指(趾)图片及X光片

表1 家系受累成员的临床特征

性别	家系患者	年龄	手部畸形	脚部畸形	手术
女	II ₄	65	单侧3/4手指融合	双侧脚趾正常	-
男	III ₅	50	单侧3/4手指融合	双侧脚趾正常	-
女	III ₇	53	单侧3/4手指融合	双侧脚趾正常	-
女	III ₁₀	45	单侧3/4手指融合	双侧脚趾正常	-
女	III ₁₆	39	双侧3/4手指融合	双侧脚趾正常	刚出生民间医生做手指分离手术,预后效果不好
男	IV ₃	27	双侧3/4手指融合	双侧脚趾正常	-
男	IV ₆	19	双侧3/4手指融合	双侧脚趾正常	在7岁做并指分离手术,预后良好
男	IV ₇	17	双侧3/4手指融合	双侧脚趾正常	在5和12岁分别做并指分离和修复手术,预后良好

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取 应用酚-氯仿法从血液中提取基因组DNA,应用Qubit 3.0对DNA浓度进行定量、琼脂糖凝胶电泳分析DNA降解程度以及是否有RNA、蛋白质污染。

1.2.2 家系样本外显子测序分析 外显子测序分析由诺禾基因 Illumina novaseq 平台完成。具体操作步骤为基因组DNA→文库构建→外显子捕获和富集→外显子测序→碱基识别和reads生成→序列比

对→变异识别及分析→注释→候选基因及突变的筛选。本实验选取先证者在内的6位家系成员(包括三名患者II₄、III₁₀、IV₇;两名正常人III_{2,13}和一名致病基因携带者III₁₂)进行全外显子测序并进行关联分析,捕获候选基因致病突变位点。

1.2.3 候选基因突变位点PCR扩增及Sanger测序验证 将外显子测序分析后得到的手指发育相关的6个疑似致病基因为目标,对已获得样本的所有家系成员进行PCR扩增和Sanger测序验证,确定该位点在家系患者和正常人之间的并指表型的共分离情况。HOXD13的突变位点的扩增引物序列和反应条件如下,其余5个基因引物序列及基因信息见附表1:

上游引物(HOXD13-F): 5'-CTGCACCCCTG-CAAACGCAC-3';

下游引物(HOXD13-R): 5'-GCTGTCTGTGGC-CAACCTGG-3'。

PCR扩增条件如下:

95 °C	5min	} 32 Cycles
95 °C	15 sec	
55 °C	15 sec	
72 °C	45 sec	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测后送北京六合华大基因科技有限公司进行Sanger测序。

2 结果

2.1 家系调查与临床特点

该蒙古族家系可追溯调查38人,已传4代,受累患者共9名,其中男性4例、女性5例,每代均有患者出现,男女发病概率相等,属于常染色体显性遗传模式。可追溯调查到的8名患者以及家系主要成员进行了系统的身体检查:手腕、脚踝、肘/膝关节、髋关节和颈部活动正常,五官和身高正常。临床表型为II₄、III_{5,7,10}为单侧3/4手指融合,双侧脚趾正常。III₁₆和IV_{3,6,7}等均为双侧3/4手指融合,双侧脚趾正常。

2.2 致病基因研究

2.2.1 外显子测序结果 先证者在内的6名家系成员(3名患者、1名疑似致病基因携带者和2名正常人)进行外显子测序,共筛选出6个指(趾)发育相关候选基因,即FBN2、FMN1、FREM2、HOXD13、LRP4、MYO10基因。其中,HOXD13基因第二外显子917位点发生

G>A的突变(HOXD13, c.917G>A, p.R306Q)与3名患者和1名无临床表型的携带者(Ⅲ₁₂)均有此突变,家系2名正常成员无此突变,临床表型共分离。其余5个基因突变位点在3名患者和无临床表型携带者中出现不一致,无表型共分离现象。

2.2.2 候选基因验证结果 将外显子测序分析后得到的6个疑似致病基因为目标,对该家系其他成员进行PCR扩增和Sanger测序验证,结果为该家系中所有患者和携带者均有HOXD13, c.917G>A杂合突变,正常人无此突变,显示表型共分离,表明该家系并指致病基因为HOXD13, c.917G>A, p.R306Q。其余5个基因突变在患者和携带者中出现不一致,表型无共分离现象,排除此5个基因为该家系并指致病基因。

HOXD13, c.917G>A突变位点的PCR扩增结果(图3),所有样本均得到了目的DNA片段(目的片段长度388 bp)。PCR产物经Sanger测序,结果表明HOXD13, c.917G>A在患者和携带者均出现此突变,正常人无此突变,具有共分离现象(见图4)。

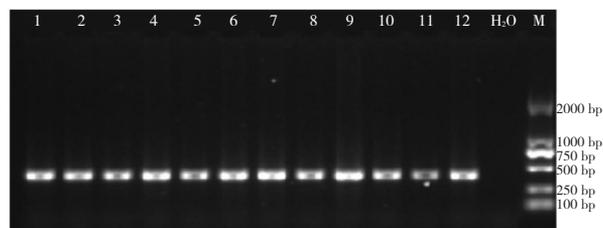


图3 2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物 1~12.subjects; H2O.Negative control; M. DL 2000 DNA marker

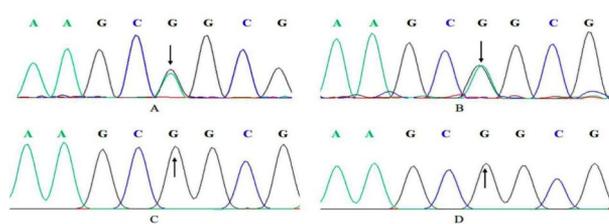


图4 Sanger测序验证结果

A. Ⅱ₄先证者,HOXD13基因917位基因型为GA杂合;B. Ⅲ₁₂不完全外显的携带者,表型正常,但基因型为GA杂合;C. Ⅲ₈正常人,基因型为GG纯合;D. 正常人,基因型为GG纯合

3 讨论

并指(趾)畸形(syndactyly, SD)是在肢体发育过程中异常导致的相邻手指或脚趾部分或完全融合。SD临床表型有很大差异,受累单侧或双侧,皮肤性融合或骨性融合。轻度表现为皮肤纹理的异常,重度为骨性融合,涉及指骨、掌骨或跖骨,更严

重的延伸到腕骨或跗骨^[5,6]。

我国2011~2017年报告的手指(趾)异常总检出率为12.93/万~16.43/万^[2,7]。本研究在内蒙古东部乡村发现了一蒙古族并指家系,该家系已传4代,每代都有患者出现,男女发病机会均等,属于常染色体显性遗传病。临床表型存在异质性,为单侧或双侧3/4手指皮肤/骨性融合,脚趾均为正常,属于并指/趾Ic型。家系患者第二代(Ⅱ₄)1人和第三代3人(Ⅲ_{5,7,10})为单侧3/4手指皮肤/骨性融合,第三代(Ⅲ₁₆)1人和第四代全部(Ⅳ_{3,6,7})为双侧3/4手指皮肤/骨性融合。患者Ⅳ₇的母亲Ⅲ₁₂没有临床表型,但检测结果显示为致病基因突变携带者,存在外显率不全特点。

研究认为SD由胚胎发育时期手板分化缺陷所致^[8]。胚胎发育中成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)引导手板伸长,而手板分化出指(趾)的数量和特征由胚胎极化活性区(Zone of polarizing activity, ZPA)细胞分泌的SHH因子与同源盒基因(Homeobox gene, Hox)表达的HOX转录因子相互作用决定,该发育过程相关基因致病性突变可导致并指(趾)畸形的发生。

根据Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM)的数据,已有287个基因突变与并指(趾)畸形相关。临床上,HOXD13基因突变与家族性并指(趾)畸形相关性最高。HOXD13基因有两个外显子:外显子1编码含15个丙氨酸残基的多聚丙氨酸链;外显子2编码含有60个氨基酸残基的同源盒结构域。HOXD13基因的第二外显子917位点发生G>A的突变,导致306位精氨酸变为谷氨酰胺(HOXD13, c.917G>A, p.R306Q),使HOXD13转录因子的同源盒结构域构象改变,不能结合特定的DNA序列,因而不能调控早期肢体前-后轴发育关键基因转录^[9-12]。这是该蒙古族家系导致并指畸形的主要原因。该家系中不同患者不规则出现FBN2、FMN1、FREM2、LRP4、MYO10等5个基因突变现象,这些基因突变也有可能与主基因互作、基因修饰以及表观遗传等因素导致家系患者具有临床表型异质性和外显率不全等现象,有待进一步基因功能研究。

本研究通过家系分析和基因检测,进一步验证了HOXD13, c.917G>A, p.R306Q突变导致并指畸形的发生,为遗传咨询和产前诊断提供了依据。

参考文献

[1]王斌,高伟阳,刘波,等.先天性并指畸形诊疗的专家共识[J].组织工程与重建外科杂志,2017;13(06):303-309+312

- [2]刘金秀,陈玮,王香荣,等. 并指(趾)畸形的分类及遗传学研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2016;35(02): 170-176
- [3]Guo X, Shi T, Lin M, et al. A Nonsense Mutation in HOXD13 Gene from A Chinese Family with Non-Syndromic Synpolydactyly[J]. The Tohoku journal of experimental medicine, 2019; 249(2): 93-100
- [4]Goodman F, Scambler P. Human HOX gene mutations[J]. Clinical genetics, 2001;59(1):1-11
- [5]温琳琼,姜萍,师秀艳. HOXD13 蛋白 N-端非多聚丙氨酸延展突变导致并多指(趾)家系表型的分析[J]. 中国医学创新, 2020;17(14):158-161
- [6]蔡凤英,马继军,潘蕊,等. 一个先天性指(趾)畸形家系的基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019(09): 890-892
- [7]刘志祥,刘雨. 2011-2017年广东省河源市多指(趾)并指(趾)流行状况分析[J]. 中国妇幼卫生杂志, 2019;10(02): 80-83
- [8]Zaib T, Ji W, Saleem K, et al. A heterozygous duplication variant of the HOXD13 gene caused synpolydactyly type 1 with variable expressivity in a Chinese family[J]. BMC Medical Genetics, 2019; 20(1): 1-9
- [9]Deng H, Tan T, He Q, et al. Identification of a missense HOXD13 mutation in a Chinese family with syndactyly type I-c using exome sequencing[J]. Mol Med Rep, 2017;16(1): 473-477
- [10]Wang B, Li N, Geng J, et al. Exome sequencing identifies a novel nonsense mutation of HOXD13 in a Chinese family with synpolydactyly[J]. Congenital Anomalies, 2017;57(1): 4-7
- [11]Li T, Dai L, Liu D, et al. Mutations in the Homeodomain of HOXD13 Cause Syndactyly Type 1-c in Two Chinese Families[J]. PLoS ONE, 2014;9(5): e96192
- [12]Sheth R, Barozzi I, Langlais D, et al. Distal Limb Patterning Requires Modulation of cis-Regulatory Activities by HOXD13[J]. Cell Reports, 2016;17(11): 2913-2926

(上接第 480 页)

综上,蒙药森登-4在RA中有着重要的治疗价值和研究前景,但本研究尚为基础动物实验,需进一步的人体及相关组织学研究乃至更重要的临床研究去确证。且蒙药目前尚有一些不足之处,今后需要对森登-4的有效成分进行进一步提炼甚至研究成为更为方便应用的剂型,是今后的研究重点。本研究为森登-4治疗RA提供了新的思路和方向。

参考文献

- [1]菲尔斯坦(美)2012.凯利风湿病学[M].9版.栗占国译.北京.北京大学医学出版社, 2015:1133
- [2]Weyand CM, Goronzy JJ. The immunology of rheumatoid arthritis[J]. Nat Immunol. 2020 Nov 30
- [3]Qing Luo, JianQing Ye, LuLu Zeng, et al. Elevated expression of PD-1 on T cells correlates with disease activity in rheumatoid arthritis[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17: 3297-3305
- [4]BaiJ, GaoZ, LiX, et al. Regulation of PD-1 / PD-L1 pathway and resistance to PD-1 / PD-L1 blockade[J]. Oncotarget, 2017; 8(66):110693-110707
- [5]Kaneko S, Kondo Y, Yokosawa M, et al. Rheumatoid arthritis and cytokines[J]. Nihon Rinsho. 2016 Jun; 74(6):913
- [6]Akram M, Daniyal M, Sultana S, et al. Traditional and modern management strategies for rheumatoid arthritis[J]. Clin Chim Acta. 2021 Jan;512:142-155
- [7]杨英慧,沈敬华. 中蒙药治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016;4(13): 149-150
- [8]那仁满都拉,卢计平,姜清秀等. 蒙药森登-4汤研究进展[J]. 中国医药, 2019;1(42): 315-320
- [9]那仁满都拉,董秋梅. 蒙药森登对胶原诱导性模型大鼠干扰素 γ 和白介素-4表达的影响[J]. 中国医药, 2015;10(10): 1485-1489
- [10]刘青海. 蒙医治疗类风湿性关节炎 63 例疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018;18(12): 148, 150
- [11]包满都拉. 蒙药内服外敷结合治疗类风湿性关节炎疗效观察[J]. 中国民族医药杂志, 2020;26(3): 4-5
- [12]Boyapati A, Schwartzman S, Msihid J, et al. Association of High Serum Interleukin-6 Levels with Severe Progression of Rheumatoid Arthritis and Increased Treatment Response Differentiating Sarilumab From Adalimumab or Methotrexate in a Post Hoc Analysis[J]. Arthritis Rheumatol. 2020 Sep; 72(9): 1456-1466
- [13]Sun WK, Bai Y, Yi MM, et al. Expression of T follicular helper lymphocytes with different subsets and analysis of serum IL-6, IL-17, TGF- β and MMP-3 contents in patients with rheumatoid arthritis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019 Jan; 23(1): 61-69
- [14]Garcia-Chagollan M, Ledezma-Lozano IY, Hernandez-Bello J, et al. Expression patterns of CD28 and CTLA-4 in early, chronic, and untreated rheumatoid arthritis[J]. J Clin Lab Anal. 2020 May;34(5):e23188
- [15]Oi K, Tokunaga T, Kuranobu T, et al. Tumour necrosis factor α augments the inhibitory effects of CTLA-4-Ig on osteoclast generation from human monocytes via induction of CD80 expression[J]. Clin Exp Immunol. 2019 Jun; 196(3): 392-402
- [16]Liu PC, Ssu CT, Tsao YP, et al. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4-Ig (CTLA-4-Ig) suppresses Staphylococcus aureus-induced CD80, CD86 and pro-inflammatory cytokine expression in human B cells[J]. Arthritis Res Ther. 2020 Mar 30;22(1):64