

. 经验介绍 .

2 例散发型神经纤维瘤病病人及其家系 *NF1* 基因突变的检测

马盼盼 刘芙蓉 张庆华 张 钊 郝胜菊 陈 雪 王 真 孙庆梅

**【摘要】目的** 报道 2 例 I 型神经纤维瘤病(*NF1*)病人及其家系 *NF1* 基因检测结果。**方法** 应用目标序列捕获高通量测序技术对 2 例 *NF1* 病人及其家系进行 *NF1* 基因测序,明确那不然致病基因型,并采用多重连接探针扩增技术和 Sanger 测序法进行验证。**结果** 2 例均检测到基因突变,1 例为 33 岁孕 6 周女性,*NF1* 基因整体杂合缺失,其丈夫和胎儿未检测到相同的基因突变;1 例 3 岁男孩,为移码突变,基因型为 c.6408delA,为新发突变。**结论** 我们进行高通量测序检测 *NF1* 基因变异,发现 1 个新发突变位点,扩充了 *NF1* 基因的致病性突变位点。另外,对胎儿进行 *NF1* 基因检测,可能是避免 *NF1* 患儿出生的一个措施。

**【关键词】** I 型神经纤维瘤病;*NF1* 基因;高通量测序;基因突变

**【文章编号】** 1009-153X(2022)07-0591-02 **【文献标志码】** B **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 754

I 型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 1, *NF1*)的典型特征是身体多处牛奶咖啡斑,腋下和腹股沟雀斑,多个离散的皮肤神经纤维瘤以及虹膜 Lisch 结节<sup>[1]</sup>。*NF1* 以常染色体显性方式遗传<sup>[2]</sup>。本文报道 2 例散发 *NF1* 基因检测结果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例 1 为 33 岁女性,眼睛周围和上身分布咖啡斑,已怀孕 6 周,其丈夫未见明显异常。病例 2 为 3 岁男孩,全身分布牛奶咖啡斑,背部皮下有一肿块,双侧扁桃体肿大,父母及其姐姐未见异常。

1.2 *NF1* 基因检测 抽取病例 1 及其丈夫、病例 2 及其父母外周血 2~3 ml。取 200 μl 外周血,采用全自动核酸提取仪提取 DNA,然后使用核酸浓度测定仪 NanoDrop2000 测定 DNA 浓度。保证 DNA 浓度在 50 ng/μl 左右,OD260/280 在 1.8~2.0。待测样本送至迈基诺基因检测公司进行高通量测序,平均测序深度为 1 000×,所有区域达到 20×以上的覆盖度。

1.3 验证

1.3.1 点突变验证分析 根据 GenBank *NF1* 基因序列(NC\_000017.11),应用在线 Primer 3.0(<http://primer3>。

[ut.ee](http://primer3))软件设计相应突变位点引物。对相应致病突变位点所在基因组区域进行 PCR 扩增,纯化扩增产物,使用 BigDye 测序反应试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)进行测序,然后使用 ABI 3500D Genetic Analyzer 仪器(美国 Applied Biosystems 公司)进行检测。最后,对测序结果与 *NF1* 基因参考序列(NM\_000267)进行比对。

1.3.2 外显子杂合缺失分析 使用多重探针连接扩增技术检测试剂盒(SALSA MLPA P081 及 P082 探针,荷兰 MRC 公司),包括 DNA 的变性、探针杂交、连接反应、扩增、及产物分析,检测 *NF1* 基因拷贝数变化。

2 结 果

2 例均检测出 *NF1* 基因突变。病例 1 为 *NF1* 基因整体杂合缺失突变(图 1A);病例 2 为 *NF1* 基因 c.6408delA(图 1B),导致氨基酸改变 p.L2137Yfs\*42,为移码突变,导致基因功能丧失。

病例 1 已怀孕 6 周,其丈夫和胎儿进行 MLPA 检

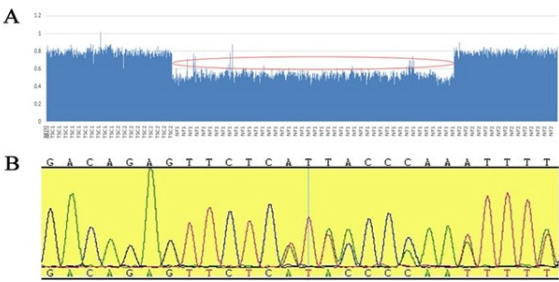


图 1 2 例 *NF1* 基因检测结果

A. 病例 1 的 *NF1* 基因整体杂合缺失;B. 病例 2 的 *NF1* 基因 c.6408delA

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.07.022  
基金项目:兰州市科技计划项目(2021-1-182);甘肃省科技计划(21JR7RA680)  
作者单位:730050 兰州,甘肃省妇幼保健院医学遗传中心/甘肃省出生缺陷与罕见病临床研究中心(马盼盼、刘芙蓉、张庆华、张 钊、郝胜菊、陈 雪、王 真),产前诊断中心(孙庆梅)  
通讯作者:孙庆梅,E-mail:372027527@qq.com

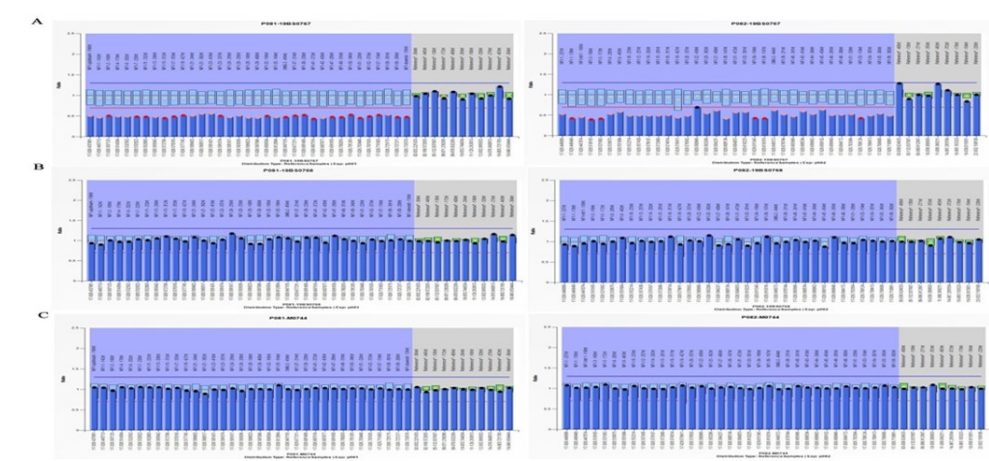


图 2 病例 1 及其家系 *NF1* 基因检测结果  
A. 病例 1 检测显示 *NF1* 基因整体杂合缺失; B. 病人丈夫 *NF1* 基因未见明显异常; C. 病人胎儿 *NF1* 基因未见明显异常 *NF1*. I 型神经纤维瘤病

测,未检测到相同的致病基因突变(图 2)。

3 讨论

*NF1* 是一种由 *NF1* 基因突变引起的常染色体显性遗传病<sup>[3]</sup>。*NF1* 基因跨越约 350 kb 的基因组 DNA, 包含 57 个组成性外显子和 3 个选择性剪接的外显子, 最常见的转录本编码 2 818 个氨基酸多肽——神经纤维蛋白<sup>[4]</sup>。*NF1* 主要是 *NF1* 基因的突变导致编码失活的神经纤维瘤蛋白<sup>[5]</sup>。*NF1* 的诊断主要依据 1988 年美国国立卫生研究院制定的诊断标准, 即皮肤存在牛奶咖啡斑, 达到 6 个以上; 腋窝或腹股沟雀斑; 两种以上神经纤维瘤或丛状神经纤维瘤; 视神经胶质瘤; 虹膜错构瘤; 骨骼的病灶和家族史, 这 7 个特征中, 达到 2 条或以上, 可以临床诊断 *NF1*<sup>[6]</sup>。本文 2 例均有不同程度的牛奶咖啡斑, 诊断为 *NF1*; 高通量测序均检测到 *NF1* 基因的突变。

据统计, *NF1* 基因自发突变率为 50%<sup>[7]</sup>。Yao 等<sup>[8]</sup>对 95 个 *NF1* 家系进行基因检测, 发现 77.9% 为自发突变。本文 2 例 *NF1* 通过高通量测序以及 Sanger 测序和 MLPA 验证, 2 例均检测到 *NF1* 基因突变, 均为自发突变, 自发突变率为 100%; 其中 1 例为 *NF1* 基因整体外显子缺失突变, 1 例为移码突变。这与现有报道的自发突变率相差较大, 可能是本文样本量过少所致, 也可能是地域性差异造成的, 这有待于进一步验证。

另外, 病例 1 已怀孕 6 周, 我们对其丈夫进行 *NF1* 基因全长检测, 未发现其丈夫 *NF1* 基因变异; 随后, 我们在孕 18 周时, 进行羊水穿刺取样, 通过提取羊水中胎儿 DNA, 进行 *NF1* 基因检测, 也未发现 *NF1* 基因外显子缺失突变。因此, 我们可以在父母明确诊断后, 对胎儿进行 *NF1* 基因突变位点的检测, 可有效避免 *NF1* 患儿出生。

总之, 我们进行高通量测序检测 *NF1* 基因变异, 发现 1 个新发突变位点, 扩充了 *NF1* 基因的致病性突变位点。对胎儿进行 *NF1* 基因检测, 可能是避免 *NF1* 患儿出生的一个措施。

【参考文献】

[1] Yao R, Wang L, Yu Y, *et al*. Diagnostic value of multiple café-au-lait macules for neurofibromatosis 1 in Chinese children [J]. J Dermatol, 2016, 43(5): 537-542.  
[2] Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation [J]. Curr Opin Genet Dev, 2009, 19(3): 230-236.  
[3] 郭昌贵, 李东海, 徐春华, 等. 神经纤维瘤病 1 型合并颅内海绵状血管瘤 1 例[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2017, 22(9): 417-418.  
[4] Jacks T, Cichowski K. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP [J]. Cell, 2001, 104(4): 593-604.  
[5] Xu W, Yang X, Hu X, *et al*. Fifty-four novel mutations in the NF1 gene and integrated analyses of the mutations that modulate splicing [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(1): 53-60.  
[6] Aylsworth A, Carey J, Korf B, *et al*. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2 [J]. Am J Ophthalmol, 1997, 124(5): 51.  
[7] Nemethova M, Bolcekova A, Ilencikova D, *et al*. Thirty-nine novel neurofibromatosis 1 (NF1) gene mutations identified in Slovak patients [J]. Ann Hum Genet, 2013, 77: 364-379.  
[8] Yao R, Yu T, Xu Y, *et al*. Clinical presentation and novel pathogenic variants among 68 Chinese neurofibromatosis 1 Children [J]. Genes (Basel), 2019, 10(11): 847.

(2020-08-05 收稿, 2020-10-19 修回)