

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00309

一个型神经纤维瘤家系的基因突变分析

黄颖浩^{1,2}, 杨琴波¹, 邓云华³, 余念文¹, 王擎¹, 刘木根¹

1. 华中科技大学人类基因组研究中心, 生命科学与技术学院分子生物物理教育部重点实验室, 武汉 430074;
2. 湖北职业技术学院, 孝感 432000;
3. 华中科技大学同济医院皮肤科, 武汉 430022

摘要: 鉴定了一个中国家庭中的常染色体显性遗传病—型神经纤维瘤, 通过连锁分析和 *NF1* 基因测序, 发现该家系中 *NF1* 疾病的致病基因与 *NF1* 基因连锁, 并在 *NF1* 基因上发现了一个无义突变 G1336X, 该突变导致神经纤维蛋白从 C 末端截断 1 483 个氨基酸残基。G1336X 突变在该家系中与疾病共分离, 但家系中的正常成员未能检出, 表明 *NF1* 基因的 G1336X 的突变是引起该家族患 *NF1* 疾病的原因。该突变是第一次在中国 *NF1* 疾病人群中报道。

关键词: 神经纤维瘤; 连锁分析; 测序; 无义突变

NF1 mutation analysis in a Chinese family with neurofibromatosis type

HUANG Ying-Hao^{1,2}, YANG Qin-Bo¹, DENG Yun-Hua³, YU Nian-Wen², WANG Qing¹, LIU Mu-Gen¹

1. Key Laboratory of Molecular Biophysics of the Ministry of Education, College of Life Science and Technology, and Center for Human Genome Research, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;
2. Hubei Vocational Technical College, Xiaogan 432000, China;
3. Department of Dermatology, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract: A Chinese family affected with autosomal dominant disorder—neurofibromatosis type was identified in this study. Linkage analysis was performed, and DNA sequencing for whole coding region of *NF1* was carried out to identify the disease-causing mutation. The disease gene of the Chinese *NF1* family was linked to *NF1* locus, and a nonsense mutation, G1336X in the *NF1* gene was identified. This mutation truncates the *NF1* protein by 1 483 amino acid residues at the C-terminus, and is co-segregate with all the patients, but not present in unaffected individuals in the family. The present study demonstrated that G1336X mutation in the *NF1* gene cause Neurofibromatosis type in the family. To our knowledge, this mutation is firstly reported in Chinese population.

Keywords: neurofibromatosis; linkage; sequence; nonsense mutation

收稿日期: 2007-09-20; 修回日期: 2007-12-12

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30571677)资助[Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30571677)]

作者简介: 黄颖浩(1970-), 男, 在职硕士, 讲师, 研究方向: 分子医学遗传学。E-mail: ianhawh@163.com

杨琴波(1982-), 女, 博士研究生, 研究方向: 分子医学遗传学。E-mail: xiaoqin813@163.com

黄颖浩、杨琴波为共同第一作者。

通讯作者: 刘木根(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 分子医学遗传学。Tel: 027-87794549; E-mail: lium@mail.hust.edu.cn

型神经纤维瘤病(Neurofibromatosis type 1, NF1)又称Von Recklinghausen病,是一种周围神经及其间质异常。临床上主要表现为皮肤咖啡斑、多发性皮肤软纤维瘤;也可累及多个器官和系统,如眼、骨骼、血管、内分泌系统、中枢及外周神经系统,并可伴有智力发育障碍、先天性发育不良;极罕见恶变者^[1,2]。该病以常染色体显性方式遗传,由17号染色体上的*NF1*基因发生突变引起^[3]。

*NF1*是最早发现的人类疾病致病基因之一,该基因位于染色体17q11.2^[4],含61个外显子,编码由2818个氨基酸组成的神经纤维蛋白。根据HGMD的数据,目前发现的该基因突变已超过700个突变(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=NF1>),包括碱基的转换、颠换、插入、缺失及染色体平衡易位等^[5-8],但缺乏明显的突变热点,在发现的这些突变中,约有82%都造成神经纤维素的截短^[9]。提示剂量不足可能是引起患者与其家庭成员患病的原因。

尽管国外对神经纤维瘤的分子遗传学有广泛的研究,但国内有关*NF1*基因突变引起该病的报道还较缺乏。我们对一个湖北省孝感市的神经纤维瘤家系进行研究,通过连锁分析,*NF1*基因突变检测,明确*NF1*基因突变与中国人神经纤维瘤发病的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

先证者(Ⅰ),男,8岁,3年前不明原因在肩背及大腿内侧出现散在的圆形或椭圆形淡褐色斑,随年龄增大而稍有增大;智力正常;7岁时由于尿道结石而做过取石手术,其他系统检查无异常;胸背腹及大腿内侧出现直径约1~2厘米圆形或椭圆形淡褐色斑15处,边界清晰。

该家族共有3代11人,男5人女6人;患者6人,男4人女2人。其中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ(图1)为*NF1*患者,非近亲结婚。该病在本家族连续3代相传,皆在幼年出现多个淡褐色斑,成年后女性多呈囊性软结节,男性一般为条索状实性肿块,随年龄增大症状加重。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取

该家系10人,经书面同意后,其中患者6人参加分子遗传学研究,EDTA-Na抗凝采集外周血样品

各5 mL,应用Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA),按产品说明书介绍的方法提取基因组DNA, DNA浓度调至25 ng/μL备用。

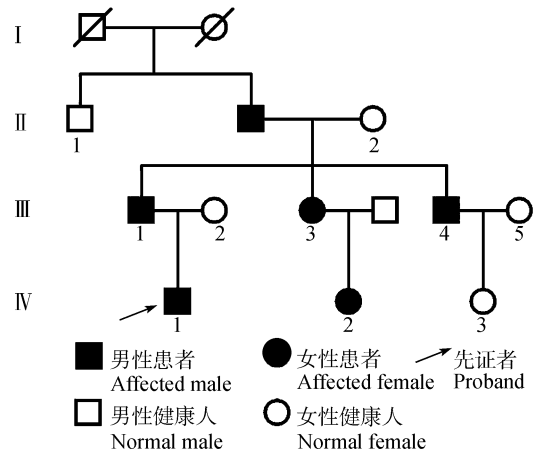


图1 1型神经纤维瘤家系图谱

Fig. 1 Pedigree of a Chinese family affected with NF1

1.2.2 连锁分析

根据*NF1*基因在染色体上的物理位置,选取PRISM LMS-MD10(ABI, USA)中的微卫星多态标记:D17S798、D17S1857。这两个标记分别位于*NF1*基因的两侧。应用ABI-LMS2程序,在PE9700PCR仪(ABI, USA)上对家系成员DNA进行PCR扩增。PCR产物在3100 Genetic Analyzer(ABI, USA)上,通过Genemapper 2.5软件,进行微卫星片段长度的基因型分析。

1.2.3 基因测序分析

应用Primer Designer设计引物序列,用于*NF1*基因的扩增。扩增产物包括全部的编码序列,以及外显子与内含子交接序列。先以先证者(Ⅰ:1)的DNA为模板进行扩增,25 μL PCR体系;1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.5 μmol/L引物,1 U Taq酶,25 ng DNA,补充去离子水至25 μL。PCR反应条件:94℃预变性3 min,94℃30 s,50~60℃30 s,72℃45 s,共扩增35个循环,再以72℃延伸10 min。

扩增产物经2%的琼脂糖凝胶电泳回收,应用华舜DNA回收试剂盒进行纯化,检测纯化产物后,应用BigDye3.1(ABI, USA)测序试剂盒进行测序反应。在3100 Genetic Analyzer上分析,通过Sequence 2.0软件读取序列,并将测得的序列与正常人的序列进行比对。发现突变后,通过直接测序法,对家系全体成员均进行*NF1*基因的突变验证。

2 结果

该家系临床诊断为 型神经纤维瘤, 由家系图分析, 3 代中均有患者, 疾病连续传递, 且存在男性到男性间的传递, 推测为常染色体显性遗传(图 1)。连锁分析表明 *NF1* 基因与该家系连锁, 推测该家系的致病基因可能是 *NF1*。对该家系中的先证者进行 *NF1* 基因整个编码区的测序, 发现在 cDNA 的

4339 位一个碱基 C 突变为 T(GenBank No.: NM_001042492), 导致 NF1 蛋白的 1336 位编码谷氨酰胺的密码子 CAG 变为编码终止密码子的 UAG (G1366X) (图 2)。进一步的测序表明该家系的所有患者都具有 G1336X 突变, 而家系中其他成员皆未发现这一 *NF1* 突变。提示这一无义突变可能是引起本家系成员患有神经纤维瘤的原因所在。

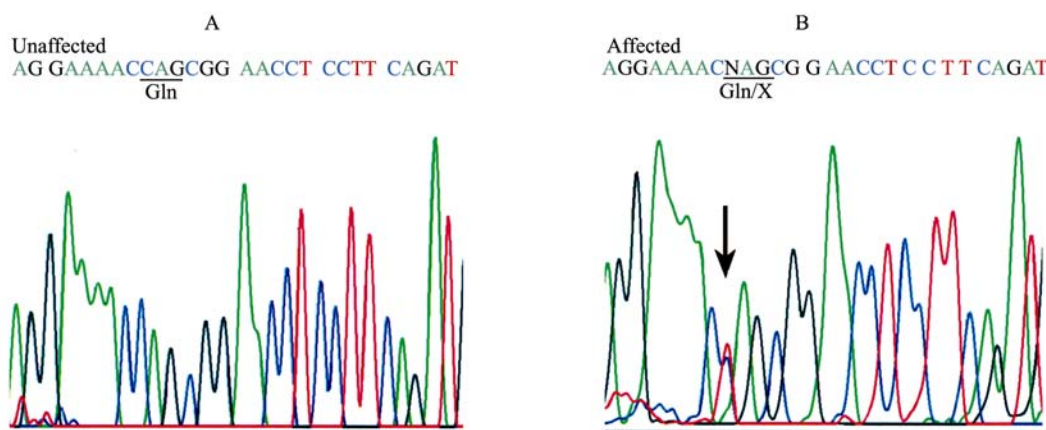


图 2 *NF1* 基因测序图

A: 家系中正常人 3 *NF1* 基因的测序图; B: 家系中先证者 1 *NF1* 基因的测序图。

Fig. 2 Sequence analysis of *NF1* gene in the Chinese family with NF1

A: Forward sequence analysis for an unaffected family member 3; B: Forward sequence analysis for the proband 1.

3 讨论

在本研究中, 我们鉴定了一个 型神经纤维瘤家系, 通过连锁分析和对 *NF1* 基因的整个编码区的突变分析, 我们发现 *NF1* 的 G1336X 突变是该家系成员患病的遗传学基础。

型神经纤维瘤是一种得到广泛研究的常染色体显性遗传病, 是一种生长缓慢的良性肿瘤, 但约有 30% 的可转化为较严重的丛状神经纤维瘤 (Plaxiform neurofibromatosis), 主要是由于神经系统结缔组织增生所引起的各种肿瘤。该病由抑癌基因 *NF1* 的突变引起。 *NF1* 位于 17 号染色体长臂, 在基因组中约横跨 350 kb, 含 61 个外显子。国内外研究发现了 700 多个致病的突变。Fahsold 等^[10]研究了 500 个德国和土耳其裔的神经纤维瘤病人, 发现 278 个突变, 其中 224 个突变(占总数的 80.2%), 产生截短的 NF1 蛋白, 其中包括 84 个无义突变, 78 个缺失突变, 32 个插入突变, 以及 30 剪切位点改变而引起的移码突变, 而错义突变则多发生于 GRD 结构域和

ATP 结合序列, 值得注意的是, 该基因的突变几乎存在于每一个外显子, 似乎缺乏突变热点, 大多数的突变仅在一个病人中被检测到。

Lee 等^[11]研究 107 个台湾的中国神经纤维瘤病人, 发现 68 个突变, 其中 45 个为世界上首次发现, 国内 Cai 等^[12]对 3 个神经纤维瘤家系进行研究, 对 3 个家系 8 个病人进行 *NF1* 的突变检测, 结果发现 3 个错义突变, 周列民等^[13]也发现 *NF1* 的 G3918T 颠换, 导致 *NF1* 的 R1306L 错义突变, 我们在湖北 NF1 家系中检测到的 G1336X 突变, 是在中国人群中的首次发现。

NF1 蛋白的功能非常复杂, 涉及多条细胞信号传导通路。可能通过其 GRD 结构域, 加速 GTP 的水解, 降低癌基因 p21ras 的活性, 进而起到抑癌基因的作用^[14,15]。p21ras 可以通过 PI3K/Akt, Rac, Ral-GDS 途径促进细胞的增殖, 也可以通过 MEK/ERK/RSK/CREB 的途径激活靶基因的表达。NF1 还可以促进 ATP 到 cAMP 转变, 进而通过 CREB 来调控细胞的分裂与增殖。

尽管 *NF1* 基因的突变引起神经纤维瘤得到广泛的报道,但目前还未良好的基因突变型和临床表现型的相关性,而一种外显率完全的常染色体显性遗传病,为何只有局部区域发病尚没有很好的解释,一般认为,神经纤维瘤发病可能需要二次打击,即生殖细胞的突变和体细胞的双重突变,有研究表明在嵌合体动物中, $NF^{-/-}$ 的组织相对于 $NF^{+/-}$ 组织容易发生更严重的从状神经纤维瘤^[16],而 $NF^{-/-}$ 的雪旺氏细胞比 $NF^{+/-}$ 细胞具更强的增殖活性。但也有人认为在某些特定的组织中,基因剂量的不足可能不足以抑制某些癌基因的生化活性,从而引起肿瘤发生^[17],而迄今发现的突变大多为无义突变或产生截短的无正常活性的 *NF1* 蛋白。

参考文献(References):

- [1] Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, Rubenstein A, Viskochil D. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA*, 1997, 278(1): 51–57. [\[DOI\]](#)
- [2] Origone P, Bonioli E, Panucci E, Costabel S, Ajmar F, Coviello DA. The Genoa experience of prenatal diagnosis in *NF1*. *Prenat Diagn*, 2000, 20(9): 719–724. [\[DOI\]](#)
- [3] Andrews JD, Mancini DN, Singh SM, Rodenhiser DI. Site and sequence specific DNA methylation in the neurofibromatosis (*NF1*) gene includes C5839T: the site of the recurrent substitution mutation in exon 31. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(4): 503–507. [\[DOI\]](#)
- [4] O Connell P, Leach RJ, Ledbetter DH, Cawthon RM, Culver M, Eldridge JR, Frej AK, Holm TR, Wolff E, Thayer MJ. Fine structure DNA mapping studies of the chromosomal region harboring the genetic defect in neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet*, 1989, 44(1): 51–57.
- [5] Leppig KA, Kaplan P, Viskochil D, Weaver M, Ortenberg J, Stephens K. Familial neurofibromatosis 1 microdeletions: Cosegregation with distinct facial phenotype and early onset of cutaneous neurofibromata. *Am J Med Genet*, 1997, 73(2): 197–204. [\[DOI\]](#)
- [6] Wu BL, Schneider GH, Korf BR. Deletion of the entire *NF1* gene causing distinct manifestations in a family. *Am J Med Genet*, 1997, 69(1): 98–101. [\[DOI\]](#)
- [7] Riva P, Corrado L, Natacci F, Castorina P, Wu BL, Schneider GH, Clementi M, Tenconi R, Korf BR, Larizza L. *NF1* microdeletion syndrome: refined FISH characterization of sporadic and familial deletions with locus-specific probes. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(1): 100–109. [\[DOI\]](#)
- [8] Park KC, Choi HO, Park KH, Kim KH, Eun HC. A non-sense mutation at Arg-1947 in the *NF1* gene in a case of neurofibromatosis type 1 in a Korean patient. *J Hum Genet*, 2000, 45(2): 84–85. [\[DOI\]](#)
- [9] Welti S, Fraterman S, D Angelo I, Wilm M, Scheffzek K. The sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: mass spectrometry and structure of a lipid complex. *J Mol Biol*, 2007, 366(2): 551–562. [\[DOI\]](#)
- [10] Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kucukceylan N, Abdel-Nour M, Gewies A, Peters H, Kaufmann D, Buske A, Tinschert S, Nurnberg P. Minor lesion mutational spectrum of the entire *NF1* gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(3): 790–818. [\[DOI\]](#)
- [11] Lee MJ, Su YN, You HL, Chiou SC, Lin LC, Yang CC, Lee WC, Hwu WL, Hsieh FJ, Stephenson DA, Yu CL. Identification of forty-five novel and twenty-three known *NF1* mutations in Chinese patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mutat*, 2006, 27(8): 832–842. [\[DOI\]](#)
- [12] Cai Y, Fan Z, Liu Q, Li J, Du J, Shen Y, Wang S. Two novel mutations of the *NF1* gene in Chinese Han families with type 1 neurofibromatosis. *J Dermatol Sci*, 2005, 39(2): 125–127. [\[DOI\]](#)
- [13] Zhou LM, Ning YP, Zhou JQ, Liu ZHL. A study on mutation in GAP related domain of neurofibromatosis type 1 gene. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2001, 27(4): 254–256.
- [14] Cichowski K, Jacks T. *NF1* tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell*, 2001, 104(4): 593–604. [\[DOI\]](#)
- [15] Scheffzek K, Ahmadian MR, Wiesmuller L, Kabsch W, Stege P, Schmitz F, Wittinghofer A. Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. *EMBO J*, 1998, 17(15): 4313–4327. [\[DOI\]](#)
- [16] Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T. Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science*, 1999, 286(5447): 2172–2176. [\[DOI\]](#)
- [17] Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF. Neurofibromas in *NF1*: schwann cell origin and role of tumor environment. *Science*, 2002, 296(5569): 920–922. [\[DOI\]](#)