

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00147

一个中国B1型短指家系致病基因的突变分析

李聪敏¹, 王凤羽¹, 孙伟伟², 韩淑丽³, 常明秀¹, 丰慧根²

1. 河南省人口和计划生育科学技术研究院, 河南省人口出生缺陷干预技术研究重点实验室, 郑州 450002;
2. 新乡医学院生命科学技术系, 新乡 453000;
3. 河南省滑县计划生育服务站, 滑县 456400

摘要: 文章收集了一个中国 B1 型短指家系, 通过连锁分析, 发现该家系疾病的致病基因与 *ROR2* 基因连锁。PCR 扩增 *ROR2* 基因突变热点区域后直接测序, 在家系患者中发现一个 c.2265C>A 的杂合突变, 该突变在蛋白质水平导致 p.Y755X 的改变, 从而产生缺失部分结构域的截短 *ROR2* 蛋白, 而在家系正常人以及家系外正常人中均未发现此突变。文章是国内首次报道 B1 型短指家系 *ROR2* 基因 c.2265C>A 突变, 丰富了中国人 *ROR2* 基因突变谱。

关键词: B1 型短指; *ROR2* 基因; p.Y755X; *ROR2* 蛋白

Mutation analysis of the pathogenic gene in a Chinese family with Brachydactyly type B1

LI Cong-Min¹, WANG Feng-Yu¹, SUN Wei-Wei², HAN Shu-Li³, CHANG Ming-Xiu¹, FENG Hui-Gen²

1. Henan Provincial Research Institute of Population and Family Planning, Henan Key Laboratory of Intervention Technology for Birth Defects, Zhengzhou 450002, China
2. Department of Life Science and Technology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453000, China
3. Service Station of Family Planning in Huaxian of Henan, Huaxian 456400, China

Abstract: We identified and characterized a Chinese family with autosomal dominant Brachydactyly type B1 (BDB1). Linkage analysis revealed that the disease gene of the Chinese BDB1 family was linked to *ROR2* locus. Mutational hot spot of *ROR2* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced directly. A c.2265C>A heterozygous mutation was detected in all of the patients. This mutation led to the change of p.Y755X in protein level and a truncated *ROR2* protein losing integrant domains was generated. The mutation was detected in all the patients, but not in all the normal individuals of this family and 50 normal controls. This paper for the first time reported a c.2265C>A mutation in *ROR2* gene of a family with BDB1 in China, which enriches *ROR2* gene mutation spectrum in Chinese with BDB1.

Keywords: Brachydactyly type B1; *ROR2* gene; p.Y755X; *ROR2* protein

收稿日期: 2010-07-06; 修回日期: 2010-09-03

基金项目: 河南省社会公益重大项目 “常见重大出生缺陷和遗传病综合优化干预研究及应用” (编号: 081100911100)资助

作者简介: 李聪敏, 副研究员, 研究方向: 优生遗传。E-mail: licongmin676@sohu.com

王凤羽, 博士, 助理研究员, 研究方向: 优生遗传。E-mail: rainbowwfy@yahoo.com.cn

李聪敏、王凤羽同为第一作者。

通讯作者: 常明秀, 研究员, 研究方向: 妇产科、优生遗传。E-mail: changmingxiu@163.com

短指是由于指(趾)骨、掌(跖)骨或两者皆发育异常所导致的指(趾)缩短。根据Temtamy和McKusick的分类标准,短指分为A~E型短指、IV型短跖、Sugarman短指、Kirner畸形等 8 种类型^[1]。B1 型短指(Brachydactyly type B1, BDB1)是一种表型比较严重的亚型,主要表现为: 2~5 指的末端指节发育不全或不发育,中间指节发育不全,伴有指甲的部分或完全缺失;拇指较少受累,但可呈现扁宽或末节指骨分叉畸形;足部表型与手部相似,但受累程度较轻。

BDB1 的致病基因为 *ROR2* 基因,由Oldridge等^[2]于 1999 年定位于 9q22。该基因全长 235 kb,共 9 个外显子,编码长度为 943 个氨基酸的受体酪氨酸激酶样孤独受体 2(Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2, *ROR2*)。导致BDB1 的基因突变非常稀有,到目前为止,国际上共发现 9 种致病突变,国内仅发现 2 种,均位于 *ROR2* 基因的第 8、9 外显子内,以无义突变或移码突变的形式导致截短蛋白或异常C-末端的产生。

本文收集了一个来自河南的 BDB1 家系,先用连锁分析确定致病基因,然后针对 *ROR2* 基因的第 8、9 号外显子设计引物,进行 PCR 扩增后直接测序,寻找致病基因突变,揭示导致该家系短指的分子机制,为今后家系成员的基因诊断和产前咨询提供依据。

1 对象和方法

1.1 对象

BDB1 家系来自河南滑县,汉族,4 代共 43 人,11 人出现短指症状。该家系的遗传关系均得到确认。经每位成员书面知情同意后,采集 13 个个体的外周血,其中患者 7 人,正常个体 6 人。拍摄 7 位患者的手足照片,并拍摄 IV 4 的双手 X 光片(图 1)。

家系外 50 例正常个体外周血标本由河南省人口和计划生育科学技术研究院附属医院提供。50 例正常对照均无短指症状及血缘关系,均为汉族。

1.2 方法

1.2.1 外周血基因组 DNA 的提取

抽取外周血 4 mL,常规饱和酚、氯仿抽提,乙醇沉淀提取基因组 DNA。

1.2.2 家系成员致病基因连锁分析

根据 *ROR2* 基因在染色体上的物理位置,选取 2 个位于 *ROR2* 基因两侧的微卫星多态标记 *D9S1842* 和 *D9S196*。对家系成员的这两个标记进行 PCR 扩增,PCR 产物通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,进行微卫星片段长度的基因型分析。

1.2.3 PCR 引物合成

由于已报道的 *ROR* 基因突变均集中在第 8 外显子(全长 203 bp)和第 9 外显子(全长 2 506 bp)5'端 900 bp 内,作者针对这两个区域设计 3 对引物(表 1)。其中前 2 对引物参考 Schwabe 等^[3]的设计;第 3 对是作者为扩大致病基因检测范围,使用 Primer premier 5.0 设计的引物,目的产物的位置位于第 2 对引物目的产物的下游,并且与之有重叠的部分。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.4 *ROR2* 基因 PCR 扩增及测序

25 μ L 扩增体系包括 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L(2.5 mmol/L), *Taq* 酶 0.1 μ L(5 U/ μ L),上下游引物各 0.5 μ L(50 pmol), ddH₂O 18.4 μ L, 基因组 DNA 1 μ L(100~200 ng)。PCR 条件: 97 5 min, 95 45 s, 采用各自的复性温度(表 1), 复性 30 s, 72 延伸 45 s, 共 35 个循环, 最后 72 延伸 10 min。



图 1 IV 4 双手照片及 X 光照片

表 1 *ROR2* 基因第 8、9 外显子 PCR 引物设计

外显子	引物	序列	目的产物长度(bp)	复性温度()
8	EX8	F: GGTGGTAGAGAACTTAGAGT	397	58
		R: ATAATTATGTGCTATGTATCAAG		
9	EX9-1	F: CTGTGGGTGGGCAGGCC	503	58
		R: ACGTCCGAGTGC GGCGA		
9	EX9-2	F: ACGGCGACCTCCACGAAT	685	60
		R: TAGCGGGCGTTGCTCACA		

PCR 扩增产物交由上海生工生物工程技术服务有限公司双脱氧法测序。

2 结果与分析

2.1 家系报道

先证者 9, 女性, 48 岁, 汉族。手足外观检查见双手 2~5 指中、末节指骨缩短, 中、末节指骨关节处皮肤纹理消失, 指甲小而且发黑; 大拇指表型正常; 足部无明显异常。该 BDB1 家系 4 代共 43 人, 有 11 名患者。各代均有患者且男女均有发病, 患者的父母必有一方是患者, 正常人的后代均正常, 符合常染色体显性遗传病的特点(图 2)。对该家系其他成员进行手足外观检查, 发现其他患者症状与先证者相似, 但 6、20 和 4 症状相对更加严重。20 双手 2、3 指未见指甲。6 双手 2~4 指指甲严重发育不良, 小指未见指甲; 足部 2~5 趾明显短于拇趾, 3 趾最短, 且趾甲缺失。4 为 6 的女儿, 2~4 指指甲全部缺失; 大拇指宽大, 中间可见有凹陷(图

1); 足部症状与其母亲相似。4 双手拍摄 X 光片之后发现: 双手第 1 指末节指骨呈分叉畸形改变; 2~4 指末端指骨缺失, 中节指骨短小并呈锥状; 5 指中、末节指骨缺失(图 1)。

2.2 连锁分析及*ROR2* 基因突变分析

连锁分析结果表明 *ROR2* 基因与该家系连锁(图 2), 推测该家系的致病基因可能是 *ROR2* 基因。对家系成员的 *ROR2* 基因的第 8 外显子全部以及第 9 外显子的 5' 端 971 bp 区域进行 PCR 扩增后直接正反向测序发现, 7 位患者在第 9 外显子中存在一个 c.2265C > A 的杂合突变(图 3), 6 位家系正常人未检测到此突变, 说明此突变与该家系疾病共分离。另外对该家系外 50 例正常汉族人进行相应的 PCR 扩增和测序分析, 也未发现该突变。c.2265C > A 突变导致编码酪氨酸的密码子转变为终止密码子, 从而产生一个只有 754 个氨基酸的截短 *ROR2* 蛋白(p.Y755X)(图 3)。

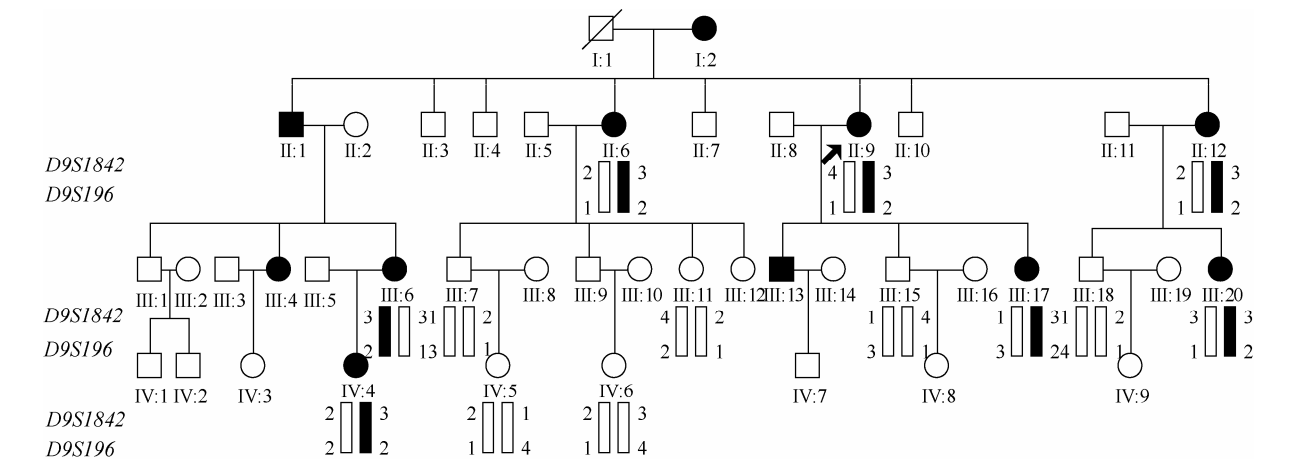


图 2 BDB1 家系图以及单倍型

II 3、II 4、II 7、II 10 的后代表型均正常, 图中未标出。采集患者 II 6、II 9、II 12、III 6、III 17、III 20、IV 4 以及正常人 III 7、III 11、III 15、III 18、IV 5、IV 6 的外周血样本。

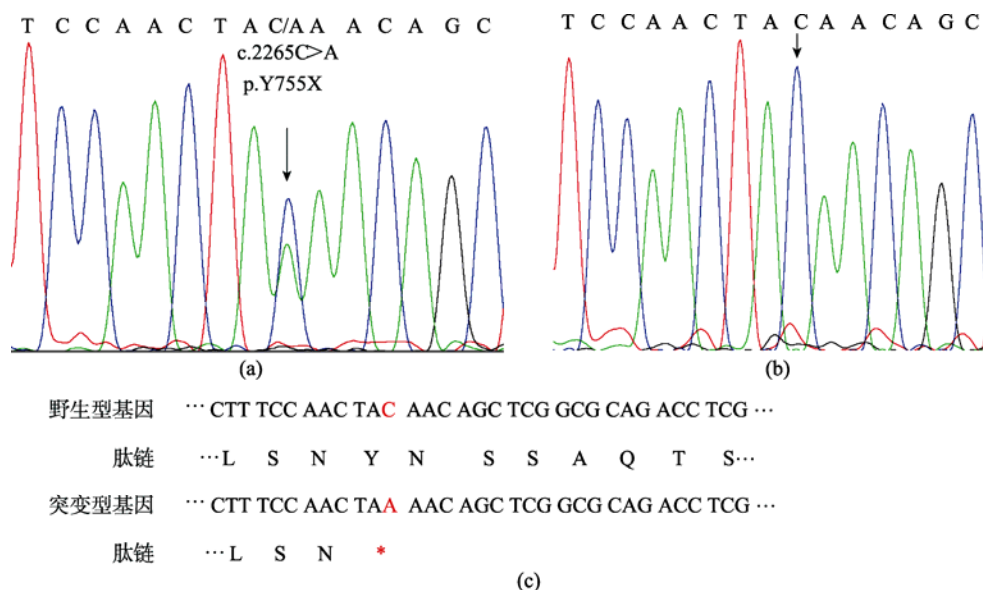


图3 *ROR2* 基因第9外显子测序结果以及野生型基因与突变型基因编码产物对比

(a): 患者测序结果; (b): 正常人测序结果; (c): 野生型基因与突变型基因编码产物对比。

我们的测序分析还发现, 所有患者均有c.2083G>A的杂合突变, 该突变导致ROR2蛋白第695位氨基酸由甘氨酸变为精氨酸(p.G695R)。查询NCBI/SNP网站, 得知该突变是1个SNP位点(rs34431454)^[4]。另外, 我们在II9、II12、6、15、18等5人的测序结果中发现SNP位点c.2088C>T(rs10992063), 其中6为纯合突变, 其余4人为杂合突变; 在17、18、4中发现杂合SNP位点c.2154C>T(rs2230577), 这两个SNP均为同义突变(p.Y696Y, p.P718P), 2000年已有报道^[3,5], 我们也在NCBI/SNP网站得到确认^[6,7]。家系外50名正常个体中发现4例c.2083G>A杂合突变, 21例c.2088C>T杂合突变, 10例c.2088C>T纯合突变, 7例c.2154C>T杂合突变。

3 讨论

本研究中, 我们鉴定了一个来自河南滑县的B1型短指家系, 通过连锁分析以及对*ROR2*基因第8、9外显子区域的突变分析, 发现该家系成员患病的遗传学基础是c.2265C>A突变(p.Y755X)。此突变导致编码酪氨酸的密码子转变为终止密码子, 从而产生一个只有754个氨基酸的截短ROR2蛋白。该突变与家系疾病共分离, 并且在50例汉族正常对照样本中未检测到。Oldridge等^[5]和Hamamy等^[8]分别已在3个英格兰BDB1家系和一个约旦BDB1家系中发现了c.2265C>A突变。

BDB1的致病基因突变很稀有, 均集中在*ROR2*基因第8、9外显子。到目前为止, 国际上共报道9种致病突变(表2), 受累家系分别来自6个国家的15个家系。中国人群中迄今只发现2种致病突变^[10,11], 本研究所发现的致病突变为国内首次报道, 使得中国人*ROR2*基因致病突变记录增至3种。

在测序结果中我们还发现了3个SNP位点: c.2083G>A、c.2088C>T和c.2154C>T。其中第1个突变在家系患者中均有发现, 且均为杂合突变, 但在家系正常人中没有发现, 推测该突变与其致病突变相连锁。

为了分析Y755及其下游序列对ROR2蛋白功能的重要性, 我们对ROR2蛋白进行了氨基酸保守分析(图4), 发现Y755以及下游近30个氨基酸在人、黑猩猩、小鼠、鸡、爪蟾、斑马鱼中高度保守, 但在果蝇、紫海胆和线虫中不保守, 推测在脊椎动物中该段氨基酸序列对于ROR2蛋白的正常功能非常重要。突变c.2265C>A导致Y755及其下游共189个氨基酸缺失, 可能会对ROR2蛋白的功能产生重大影响。

ROR2蛋白是I型跨膜蛋白酪氨酸激酶, 这类激酶的特征是它们卷曲状的半胱氨酸富集区和膜近端的带双硫键三环蛋白结构域。ROR2蛋白的细胞外区域由免疫球蛋白样结构域(Ig-like domain)、半胱氨酸富集区(Frizzled-like cysteine-rich domains, CRDs)

表 2 BDB1 致病突变统计

国家/家系数目	位置	核苷酸	蛋白质	参考文献
土耳其/1	外显子 8	c.1321_1325del	p.R441fsX15	[3]
德国/1	内含子 8	c.IVS8+3_5delins19	p.A463fsX64	[3]
土耳其/1	外显子 9	c.1366_1367insC	p.P758 fsX2	[9]
德国/2 中国/1	外显子 9	c.1398_1399insA	p.Q467fsX57	[3]、[10]
中国/1	外显子 9	c.2243delC	p.W749fsX24	[11]
德国/1	外显子 9	c.2246G > A	p.W749X	[5]
葡萄牙/1	外显子 9	c.2249delG	p.G750fsX23	[5]
英国/3 约旦/1 中国/1	外显子 9	c.2265C > A	p.Y755X	[5]、[8]、本研究
德国/1	外显子 9	c.2278C > T	p.Q760X	[3]

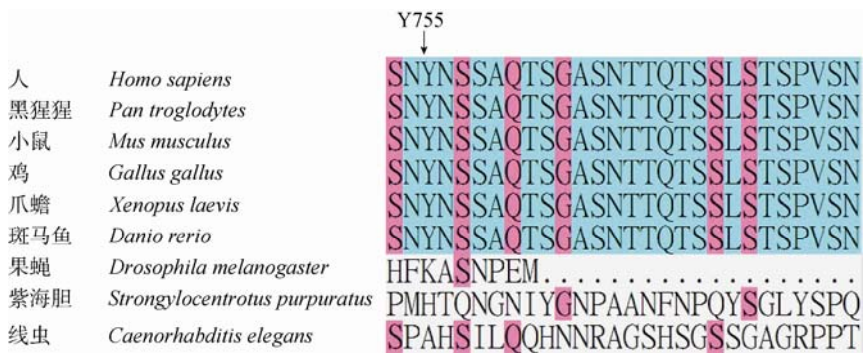


图 4 ROR2 蛋白 Y755 及其下游氨基酸保守分析

和kringle结构域(Kringle domain, KD)组成；胞质区由酪氨酸激酶结构域(Tyrosine kinase domain, TK domain)、2 个丝/苏氨酸富集区(Serine/threonine-rich domain, S/TRD1 和 2)和脯氨酸富集区(Proline-rich domain, PRD)构成。目前，多数导致BDB1 的突变型 ROR2 蛋白都是截短蛋白，截短位置集中在两个区域：其一位于近端区，蛋白质在跨膜区后终止表达，产生缺乏胞质区部分的截短蛋白质；其二位于远端区，蛋白质在TK结构域后终止表达，截短蛋白缺少胞质区C-末端的S/TRD和PRD。少数突变由于是移码突变而产生新的C-末端，但发生突变的位置亦位于紧挨TK结构域的近端或远端。研究表明，ROR2 蛋白远端区突变产生的表型更为严重，而近端区突变产生的表型更为多样^[12]。本研究所发现的无义突变位于S/TRD1 N端第 8 个氨基酸，属于远端区，该突变导致S/TRD1 部分缺失，PRD和S/TRD2 全部缺失。

ROR2 蛋白之所以被称为受体酪氨酸激酶样孤独受体，是因为最初发现ROR2蛋白时，没有找到与之相关联的配体^[13]。现在发现，Wnt5a作为ROR2 蛋白的配体，通过Wnt5a/ROR2/JNK信号通路诱导极

性细胞迁移。在此过程中，ROR2 蛋白胞外区的CRD与Wnt5a结合，而胞质区的PRD和S/TRD2 与细丝蛋白A(Filamin A, FLNa)相结合。后者的相互作用对ROR2 蛋白诱导的丝状伪足形成和Wnt5a诱导的极性细胞移动起关键性作用^[14]。

虽然目前人们对 ROR2 蛋白的功能有了一定的了解，但仍然无法解释 BDB1 形成的原因，不知道突变蛋白究竟获得了何种有害功能。不过，目前的结果可以给我们提供一些线索。已报道的导致 BDB1 形成的突变型 ROR2 蛋白中均缺少 PRD 和 S/TRD2，而这 2 个结构域又对 Wnt5a/ROR2/JNK 信号通路起关键性作用，据此推测可能是由于突变型 ROR2 蛋白改变了此信号通路的传递过程，产生对机体有害的变化，从而导致 BDB1 的发生。

参考文献(References):

[1] Temtamy SA, Aglan MS. Brachydactyly. *Orphanet J Rare Dis*, 2008, 3: 15. [\[DOI\]](#)

[2] Oldridge M, Temple IK, Santos HG, Gibbons RJ, Mustafa Z, Chapman KE, Loughlin J, Wilkie AOM. Brachydactyly type B: linkage to chromosome 9q22 and evidence for genetic

- heterogeneity. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(2): 578–585. [\[DOI\]](#)
- [3] Schwabe GC, Tinschert S, Buschow C, Meinecke P, Wolff G, Gillissen-Kaesbach G, Oldridge M, Wilkie AOM, Kömec R, Mundlos S. Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene *ROR2* cause brachydactyly type B. *Am J Hum Genet*, 2000, 67(4): 822–831. [\[DOI\]](#)
- [4] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs34431454. [\[DOI\]](#)
- [5] Oldridge M, Fortuna AM, Maringa M, Propping P, Mansour S, Pollitt C, DeChiara TM, Kimble RB, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Wilkie AOM. Dominant mutations in *ROR2*, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. 2000, *Nat Genet*, 24(3): 275–278. [\[DOI\]](#)
- [6] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs10992063. [\[DOI\]](#)
- [7] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs2230577. [\[DOI\]](#)
- [8] Hamamy H, Saleh N, Oldridge M, Al-Hadidy A, Ajlouni K. Brachydactyly type B1: report of a family with *de novo* *ROR2* mutation. *Clin Genet*, 2006, 70(6): 538–540. [\[DOI\]](#)
- [9] Kjaer KW, Tiner M, Cingoz S, Karatosun V, Tommerup N, Mundlos S, Gunal I. A novel subtype of distal symphalangism affecting only the 4th finger. *Am J Med Genet Part A*, 2009, 149A(7): 1571–1573. [\[DOI\]](#)
- [10] 杨威, 谭凤钦, 孙森, 曾瑄, 刘杰, 刘国仰, 罗会元, 张学. 中国人遗传性B型短指(趾)家系中*ROR2*基因突变的鉴定. *中华医学遗传学杂志*, 2004, 21(1): 61–63. [\[DOI\]](#)
- [11] Lv D, Luo Y, Yang W, Cao LH, Wen YR, Zhao XL, Sun M, Lo WH, Zhang X. A novel single-base deletion in *ROR2* causes atypical brachydactyly type B1 with cutaneous syndactyly in a large Chinese family. *J Hum Genet*, 2009, 54(7): 422–425. [\[DOI\]](#)
- [12] Afzal AR, Jeffery S. One gene, two phenotypes: *ROR2* mutations in autosomal recessive Robinow syndrome and autosomal dominant brachydactyly type B. *Hum Mutat*, 2003, 22(1): 1–11. [\[DOI\]](#)
- [13] Masiakowski P, Carroll RD. A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *J Biol Chem*. 1992, 267(36): 26181–26190. [\[DOI\]](#)
- [14] Minami Y, Oishi I, Endo M, Nishita M. Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases. *Dev Dynam*, 2010, 239(1): 1–15. [\[DOI\]](#)

• 科学新闻 •

能捕捉组织干细胞的胶原生物材料

随着再生医学的发展, 干细胞治疗逐步成为一些临床重要疾病的治疗手段之一。人体内存在着一定数量的组织干细胞或前体细胞, 它们具有多向分化潜能, 是参与组织再生和创伤修复的种子细胞。对于干细胞治疗而言, 利用自体干细胞修复组织损伤是最安全的。但是如何有效利用自体组织干细胞参与组织再生和创伤修复? 中国科学院遗传发育所戴建武研究员领导的再生医学实验室研制出了能捕捉组织干细胞的胶原生物材料, 并与南京市鼓楼医院心血管外科合作, 在动物模型上验证了该材料可以有效富集组织干细胞并引导组织再生。

他们制备了小鼠心肌损伤模型, 用能捕捉组织干细胞的胶原材料修补缺损的心肌组织, 发现手术后一个月该材料能有效捕捉和富集组织干细胞, 三个月时该材料可以有效促进心肌组织的再生。戴建武研究员认为利用自体干细胞修复组织损伤是最安全的干细胞应用方式, 该材料不仅适合于心肌组织损伤修复, 同样适用于皮肤, 神经, 骨等组织的再生与损伤修复。

这项工作以戴建武实验室博士研究生施春英和南京市鼓楼医院心血管外科李庆国为共同第一作者发表在 *Biomaterials*(doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.026)上。

转自中国科学院遗传发育所网站 <http://www.genetics.ac.cn/>