

两个Ⅱ型神经纤维瘤病家系的临床表现及其与 *NF2* 基因突变的关系

曲喆,王兴杰,王玉芝

(聊城市第二人民医院 耳鼻咽喉科,山东 聊城 252600)

摘 要: **目的** 报告两个Ⅱ型神经纤维瘤病家系的 *NF2* 基因突变,并探讨基因型与表型的关系。**方法** 提取两个家系中的先证者或先证者之子及其家族成员与 100 名无血缘关系的健康对照者的血液 DNA,对先证者的 *NF2* 基因的 15 个外显子(从外显子 1 到 15)及邻近的内含子序列进行聚合酶链反应(PCR),使用直接测序的方法对 PCR 产物进行检测;对家系 1 的家族成员内含子 2 剪接受体处进行 PCR 及测序;对家系 2 的家族成员内含子 7 剪接受体处进行 PCR 及测序;对 100 名无血缘关系的健康对照者的内含子 2 剪接受体和内含子 7 剪接受体处进行 PCR 及测序。**结果** 家系 1 中先证者及其余患者中均存在内含子 2 剪接受体位点 g>t 的突变。家系 2 中患者存在内含子 7 剪接受体位点 a>g 的突变。家系中未患病者及对照者中无此突变,并排除了 2 个位点基因多变性的可能性。**结论** 家系 1 和 2 中存在的剪接受体位点突变,导致了 mRNA 的剪接受异常,影响了 Merlin 蛋白的生物学功能,使其失去对正常神经细胞生长的调控,进而导致了神经纤维瘤病的发生。

关 键 词: 听力下降;Ⅱ型神经纤维瘤病;*NF2* 基因;基因诊断;基因突变

中图分类号:R764.4

Mutation analysis of *NF2* gene and clinical investigation in two families with neurofibromatosis type Ⅱ

QU Jie, WANG Xingjie, WANG Yuzhi

(Department of Otolaryngology, the Second People's of Liaocheng City, Liaocheng 252600, China)

Abstract: **Objective** To report mutations of neurofibromatosis 2 (*NF2*) gene in 2 families of NF2 and investigate the genotype-phenotype correlations. **Methods** The blood DNA samples of the probands or their sons and theirs family members in 2 families with NF2 and 100 healthy controls without kinship were extracted. Polymerase chain reaction (PCR) was performed on 15 exons (exons 1 ~ 15) and adjacent intron sequences of the *NF2* gene of the probands, and the PCR products were detected by direct sequencing. PCR and sequencing were performed at splice donor site of intron 2 in members of family 1, and splice receptor site of intron 7 in family 2, as well as both the splice donor site of intron 2 and receptor site of intron 7 in the controls. **Results** Mutation of intron 2 splice donor site g>t was found in the proband and other patients in family 1. Mutation of intron 7 splice receptor site a>g was found in patient in family 2. There were no such mutations in the unaffected or control ones and the possibility of gene variability at both sites was ruled out. **Conclusion** Splice site mutations in lineages 1 and 2 lead to abnormal mRNA splicing, which affect the biological function of Merlin protein to lose its control over the growth of normal nerve cells and lead to development of neurofibromatosis.

Keywords: Hearing loss; Neurofibromatosis type 2; *NF2* gene; Gene diagnosis; Gene mutation

Ⅱ型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 2, NF2)是由位于 22 号常染色体上的 *NF2* 基因突变导

致的常染色体显性遗传的肿瘤易感综合征,发病率是 1:25 000^[1]。NF2 以神经系统肿瘤、皮肤肿瘤、晶

第一作者简介:曲喆,女,硕士,主治医师。Email:quzherlele@163.com

体损害为临床特征。双侧听神经瘤为患者的特征性表现,见于90%的患者,患者会表现出耳鸣、听力下降、平衡功能异常等症状,颅内脑膜瘤、脊髓肿瘤、周围神经肿瘤和白内障亦常见^[2-3]。近年来NF2的早期诊断越来越受重视,本病的早期诊断很大程度上依赖于基因诊断。

本实验对所掌握的两个NF2家系,收集家族成员的血液标本及临床资料,提取先证者的血液DNA,对NF2基因的15个外显子(从外显子1到15)及邻近的内含子序列进行聚合酶链反应(PCR),对扩增产物进行直接测序,发现2个突变位点,对家族其他成员进行筛查,同期选取100名无血缘关系的健康者的血液DNA作为对照,从而确定突变基因携带者,对其进行监管。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 家系1 前往先证者居住地进行家系调查,对其家族成员进行现场体格检查和家系调查,绘制系谱图见图1。先证者为49岁女性,41岁时出现右耳耳鸣伴听力下降,43岁时出现左耳耳鸣伴听力下降,45岁时出现右侧头部钝痛伴走路不稳感。查体:营养中等,体表未见牛奶咖啡斑,闭眼露白,呲牙不可,鼓腮漏气,抬眉不能,H-B评级Ⅲ级。2007年患者于北京同仁医院行中颅窝入路右侧听神经瘤切除术,2009年于解放军四六三医院行左侧听神经瘤伽马刀治疗。内听道核磁检查见图2,示双侧听

神经瘤,符合NF2临床表现。家族中其他成员的临床表现见表1。

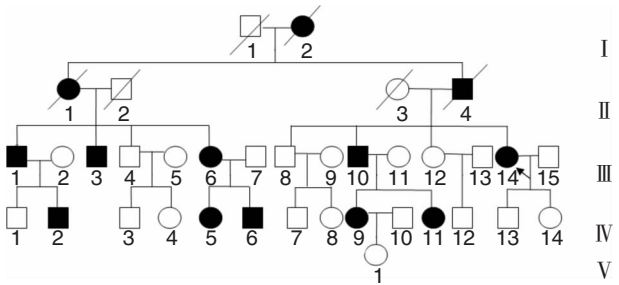


图1 家系1系谱图 ■和●分别代表家系男、女患者;□和○分别代表家系健康男性、女性;箭头指示为先证者,斜杠代表死亡者

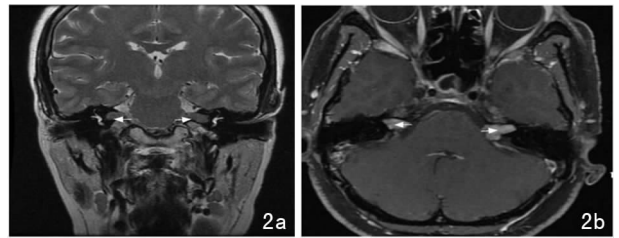


图2 家系1先证者内听道MRI 2a:冠状位T2WI显示双侧内听道及桥脑小脑角区内不均匀等信号肿块影;2b:水平位增强后T1WI显示双侧内听道及桥脑小脑角区内肿块明显不均匀强化

1.1.2 家系2 前往先证者居住地进行家系调查,对其家族成员出进行现场体格检查和家系调查,绘制系谱图见图3。

表1 家系中其他患者的临床表现

患者	性别	年龄(岁)	耳聋	其他	临床诊断	基因测序
Ⅲ6	女	44	+	脑膜瘤	双侧听神经瘤	内含子2 剪接供体 g>t
Ⅲ10	男	60	+	脑膜瘤	双耳听神经瘤	内含子2 剪接供体 g>t
Ⅳ9	女	30	+	皮下包块		内含子2 剪接供体 g>t
Ⅳ11	女	28	+		双侧听神经瘤	内含子2 剪接供体 g>t
Ⅲ1	男	50	+	脑膜瘤	双侧听神经瘤	内含子2 剪接供体 g>t
Ⅲ3	男	47	+	脑膜瘤	双侧听神经瘤	内含子2 剪接供体 g>t
Ⅳ2	男	25	-			内含子2 剪接供体 g>t
Ⅳ5	女	22	-			内含子2 剪接供体 g>t
Ⅳ6	男	18	-			内含子2 剪接供体 g>t

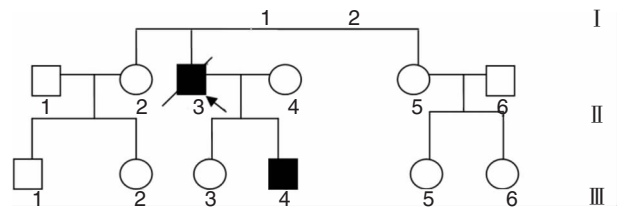


图3 家系2系谱图 ■和●分别代表家系男、女患者;□和○分别代表家系健康男性、女性;箭头指示为先证者,斜杠代表死亡者

先证者于北京同仁医院 2000 年行经迷路进路左侧听神经瘤切除术,2001 年行扩大经迷路进路右侧听神经瘤切除术,第 1 次术后预后良好,第 2 次术后死亡,未获得先证者血液标本。

Ⅲ4 为 21 岁男性青年,于 17 岁时出现左耳听力下降、耳鸣、声音嘶哑,2008 年行内耳 MRI 检查示双侧内听道、桥脑小脑角区、三叉神经走行区、海绵窦内、延髓两侧迷走神经、副神经、舌下神经走行区及颈椎椎管内占位性病变,脑干及小脑受压变形,影像见图 4。

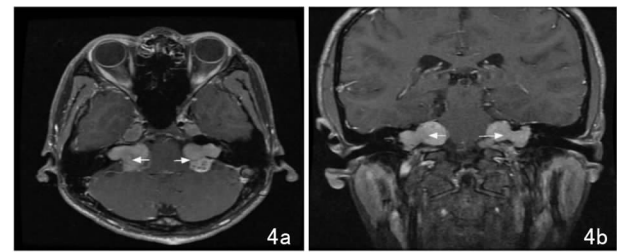


图4 家系2Ⅲ4 内耳 MRI 4a:水平位增强后 T1WI 显示双侧内听道及桥脑小脑角区肿块不均匀强化;4b:冠状位 T2WI 显示双侧内听道及桥脑小脑角区内不均匀高信号肿块影(箭头所示)

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 5 mL 静脉血加 K2EDTA 抗凝,使用 TIANGEN 血液基因组 DNA 提取试剂盒(非离心柱型)提取 DNA。经紫外光光度计进行纯度测定 OD260/OD280 为 1.8 - 2.0。

1.2.2 PCR 扩增反应 PCR 反应体系 25 μ L,含模板 DNA 2.0 μ L,正反引物各 1.5 μ L,PCRMIX 12.5 μ L,过滤水 7.5 μ L,在 PCR 仪上扩增 30 个循环,变性温度 94 $^{\circ}$ C 3 min,退火温度(45 ~ 60) $^{\circ}$ C 30 s,延伸温度 72 $^{\circ}$ C 1 min,最后一次反应结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应结束后取 5 μ L 反应产物,琼脂糖凝胶电泳检测。15 对引物使用 Primer 5.0 软件设计,扩增片段包括每个外显子及两端部分内含子。引物合成由北京赛百盛基因技术有限公司完成。

1.2.3 DNA 序列分析 将合格的 PCR 扩增产物送至北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。

2 结果

2.1 家系 1

对先证者的 *NF2* 基因的 1 - 15 外显子及临近内含子做直接测序,发现内含子 2 剪接供体位点 g > t 杂合性碱基点突变。对外显子 2 的突变为反向测序,因此直接测序图上可见 c > a 突变(图 5)家系中患病的Ⅲ6、Ⅲ10、Ⅳ9、Ⅳ11、Ⅲ1、Ⅲ3 及尚未发病Ⅳ2、Ⅳ5、Ⅳ6 均发现与先证者相同突变,家系中的其他成员及 100 名无血缘关系健康对照者均未发现此突变,与临床诊断一致。

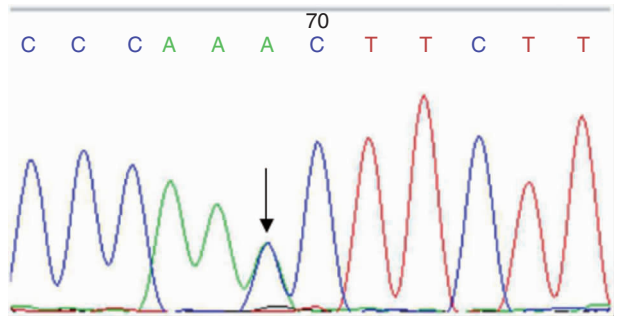


图5 家系1 *NF2* 基因测序结果反向测序可见 c > a 突变,箭头指向点突变

2.2 家系 2

对先证者之子Ⅲ4 的 *NF2* 基因的 1 - 15 外显子及临近内含子做直接测序,发现内含子 7 剪接受体位点 a > g 的杂合性碱基点突变。对外显子 8 的直接测序为正向测序,因此直接测序图谱上可见 a > g 突变及反向 t > c 突变(图 6)。先证者之女Ⅲ3 未携带此突变。

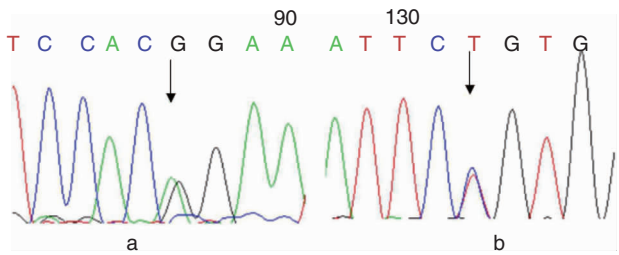


图6 家系2 *NF2* 基因测序结果 a:直接测序图谱上可见 a > g 突变,箭头指向点突变; b:反向测序图谱上可见 t > c 突变,箭头指向点突变

3 讨论

NF2 基因为肿瘤抑制基因,在 1993 年被定为在染色体 22q12 上^[4-5],长度大约 110 Kb,包括 17 个编码外显子。与 Alfred Knudson's 的肿瘤形成 2 次打击学说相一致,即 2 个等位基因均失活才引发肿瘤^[6-7]。第 1 次突变源自遗传或源自胚胎期新发生的突变,第 2 次突变发生在敏感靶器官细胞中另一个等位基因突变失活,继而肿瘤发生。*NF2* 基因编码含有 595 个氨基酸的 Merlin 蛋白,被认为是一种肌动蛋白相关蛋白,在细胞骨架和细胞膜之间起连接作用,merlin 蛋白存在 2 种亚基,但只有亚基 1 能够形成肿瘤抑制作用的折叠蛋白^[8]。*NF2* 基因在胚胎和成人的 Schwann 细胞、脑脊膜的细胞、晶体和神经中高水平表达。因此突变时以神经系统、晶体损害和皮肤肿瘤为特征。神经系统的肿瘤主要表现为双侧听神经瘤,其他为脑神经的神经鞘瘤、脑脊膜瘤、脊髓的髓内髓外肿瘤、周围神经病变等。眼睛的损害以白内障、视网膜错构瘤为主要表现。皮肤的主要表现为皮肤神经纤维瘤、皮肤咖啡斑。

NF2 基因突变的位点和方式,与 *NF2* 患者的临床症状、疾病严重程度关系密切。同一家族的患者之间,临床表现存在一定的相似性,但不同家族之间的患者临床表现存在较大差异^[9]。当 *NF2* 基因出现错义突变、框架内缺失突变或大片段缺失时,会造成 Merlin 蛋白功能部分缺失,临床症状相对较轻;而当 *NF2* 基因发生无义突变或移码突变时,会导致 Merlin 蛋白功能完全丧失,使患者出现更加严重的临床表现^[10]。此外,1-5 号外显子区域突变比 11-15 号外显子突变的患者发病更严重,但不同区域剪接位点突变的病情轻重不一^[11-12]。

本研究对 *NF2* 基因的编码区及其邻近内含子序列进行了 PCR 扩增和 DNA 测序,在两个家系中发现了两个突变位点,分为内含子 2 剪接供体位点 g>t 的突变和内含子 7 剪接受体位点 a>g 的突变。该突变在国内外均未见报道,属于新的突变位点,进一步显示 *NF2* 基因突变谱的多样性。在家系内突变与表型存在一一对应关系,即与疾病表现型共分离现象。对 100 名无血缘关系的健康对照者的内含子 2 剪接供体和内含子 7 剪接受体处进行测序,未发现该突变,使得检查结果的可靠性、可信度增加,并且排除了该基因位点多态性的可能。外显子和内含子的相邻序列很保守,外显子 3' 端与内含子 5'

端交界处,内含子的两个碱基通常为 GT,为剪接供体位点;外显子 5' 与内含子 3' 端交界处,内含子的两个碱基通畅为 AG,为剪接受体位点。成熟的 mRNA 需经过剪接、拼接等步骤除去基因中的内含子成分,保留有编码功能的序列。Ahronowitz 等^[13]将发生在 -2 到 -1 和 +1 到 +5 位点的突变归为剪接位点突变。大多数(91/99)的突变落在上述的 GT-AG 序列中,86% 的剪接位点的改变位于内含子序列,相反只有 14% 位于外显子。内含子内的突变,通常被归为有未知作用的突变,除非有明确的 RNA 证据来证明。目前 cDNA 分析的缺乏可能会使得发生在 GT-AG 序列外的剪接位点突变被低估。

通过此实验,发现 *NF2* 基因的致病突变必然引起 *NF2* 的发生,同一家族发病年龄接近。对于此研究中的两个家系,找到了 *NF2* 基因的突变位点,针对此突变对家族内成员进行筛查,分出了突变携带者和未携带者。对突变未携带者,排除了其患病可能,解除其沉重的精神负担及进行医学检查的经济负担。对未发病的携带者,每年定期 MRI 及听力学检查,使其早期诊断,得到及时正确的治疗,改善疾病预后。另外,分子遗传学诊断的另一个重要意义就是将来对家系中有需求的患者进行产前诊断,以避免相同疾病的再发。

参考文献:

- [1] Evans DG, Moran A, King A, et al. Incidence of vestibular schwannoma and neurofibromatosis 2 in the north west of England over a 10 year period: higher incidence than previously thought [J]. Otol Neurotol, 2005, 26(1): 93-97.
- [2] Asthagiri AR, Parry DM, Butman JA, et al. Neurofibromatosis type 2 [J]. Lancet, 2009, 373(9679): 1974-1986.
- [3] Evans DG, Sainio M, Baser ME. Neurofibromatosis type 2 [J]. J Med Gene, 2000, 37(12): 897-904.
- [4] Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2 [J]. Nature, 1993, 363(6429): 515-521.
- [5] Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, et al. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor [J]. Cell, 1993, 75(4): 826.
- [6] Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971, 68(4): 820-823.
- [7] 高旦华,蔡汉固,蒋红芳,等. 2 型神经纤维瘤病的分子遗传学研究进展 [J]. 浙江临床医学, 2017, 19(10): 1973-1975.
- [8] Sestini R, Provenzano A, Bacci C, et al. NF2 mutation screening

by denaturing high-performance liquid chromatography and high-resolution melting analysis[J]. Genet Test, 2008, 12(2): 311 - 318.

[9] Evans DG, Baser ME, O'Reilly B, et al. Management of the patient and family with neurofibromatosis 2: a consensus conference statement[J]. Br J Neurosurg, 2005, 19(1): 5 - 12.

[10] Selvanathan SK, Shenton A, Ferner R, et al. Further genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis 2[J]. Clin Genet, 2010, 77(2): 163 - 170.

[11] Baser ME, Kuramoto L, Woods R, et al. The location of constitutional neurofibromatosis 2 (NF2) splice site mutations is associated with the severity of NF2[J]. J Med Genet, 2005, 42(7): 540 - 546.

[12] 赵斌, 李朋, 张晶等. 遗传性 2 型神经纤维瘤病家系基因突变及临床特点分析[J]. 中华神经外科杂志, 2016, 32(1): 3 - 7.

[13] Ahronowitz I, Xin W, Kiely R, et al. Mutation spectrum of the NF2 gene: a meta-analysis of 12 years of research and diagnostic laboratory findings[J]. Hum Mutat, 2007, 28(1): 1 - 12.

(收稿日期: 2020 - 08 - 05)

本文引用格式: 曲喆, 王兴杰, 王玉芝. 两个 II 型神经纤维瘤病家系的临床表现及其与 NF2 基因突变的关系[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2021, 27(1): 52 - 56. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007 - 1520. 202103178

Cite this article as: QU Jie, WANG Xingjie, WANG Yuzhi. Mutation analysis of NF2 gene and clinical investigation in two families with neurofibromatosis type II [J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2021, 27(1): 52 - 56. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007 - 1520. 202103178

· 消息 ·

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》2021 年征订启事

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》是中华人民共和国教育部主管、中南大学及中南大学湘雅医院主办、国内外公开发行的医学学术性期刊, 是中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)。本刊以耳鼻咽喉颅底外科工作者为主要读者对象, 重点报道耳鼻咽喉颅底外科领域内领先的科研成果、基础理论研究及先进的临床诊疗经验。本刊设有述评、专家论坛、专家笔谈、论著、临床报道、病案报道、技术与方法、教学园地、综述等栏目。本刊为双月刊, 定价 20.00 元, 全年 120.00 元, 全国各地邮局均可订阅, 邮发代号 42 - 171。本刊编辑部可免费为读者代办邮购。通讯地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号中南大学湘雅医院《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》编辑部(湘雅医院内), 邮编: 410008, 投稿网址: [http://www. xyosbs. com](http://www.xyosbs.com), Email: [xyent@126. com](mailto:xyent@126.com), 电话: 0731 - 84327469; 0731 - 84327210。欢迎踊跃投稿、积极订阅。