

本文引用:刘旭霞,姜腾勇,张晓萍,等.高通量测序鉴定肥厚型心肌病患者致病突变[J].新乡医学院学报,2014,31(6):423-425.

【基础研究】

## 高通量测序鉴定肥厚型心肌病患者致病突变

刘旭霞<sup>1,2</sup>, 姜腾勇<sup>2</sup>, 张晓萍<sup>1,2</sup>, 刘婷婷<sup>1,2</sup>, 王绿娅<sup>1,2</sup>, 杜杰<sup>1,2</sup>

(1.首都医科大学附属北京安贞医院 北京市心肺血管疾病研究所教育部心血管重塑相关疾病重点实验室,北京 100029;2.首都医科大学附属北京安贞医院心内科,北京 100029)

**摘要:** 目的 利用目标基因靶向捕获高通量测序方法鉴定肥厚型心肌病(HCM)患者的致病突变,分析基因型与临床表型的关系。方法 对1例14岁男性HCM患者进行血液与临床资料收集。提取其全血基因组DNA、文库制备,靶向富集8个编码肌小节蛋白的HCM的致病基因,并行高通量测序。通过生物信息学分析筛选致病突变。用1代测序来验证2代测序发现的致病突变位点。结果 患者有晕厥史,左心室严重肥厚,心电图呈传导阻滞。目标基因捕获高通量测序筛查致病突变的结果经与公共数据库和内部健康人测序数据库对比,发现致病突变位点MYH7 R869C。此位点检测结果与Sanger测序结果完全一致。结论 利用目标基因捕获测序技术可筛选出HCM致病突变MYH7 R869C。携带此突变的患者临床表型严重。MYH7 R869C突变可能是我国HCM患者的突变热点。

**关键词:** 心肌病;小儿;突变;目标捕获;高通量测序

**中图分类号:** R542.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)06-0423-03

## Research of identification of pathogenic mutations in hypertrophic cardiomyopathy by high throughput sequencing technique

LIU Xu-xia<sup>1,2</sup>, JIANG Teng-yong<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-ping<sup>1,2</sup>, LIU Ting-ting<sup>1,2</sup>, WANG Lu-ya<sup>1,2</sup>, DU Jie<sup>1,2</sup>

(1. The Key Laboratory of Remodeling Cardiovascular Diseases, Ministry of Education, Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100029, China; 2. Department of Cardiology, Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100029, China)

**Abstract:** **Objective** To identify pathogenic mutations associated with hypertrophic cardiomyopathy(HCM) in a child by targeted capture and high throughput sequencing technique, and to study the genotype-phenotype correlation. **Methods** Whole blood and clinical data from a male patient of 14 years old with HCM were collected. Genomic DNA was extracted and library was prepared. Exomes of patients with 8 HCM-related genes encoding sarcomere protein were captured and sequenced. The pathogenic mutation was identified by informatics analysis and was validated by Sanger sequencing technique. **Results** The patient had the incidence of syncope, severe myocardial hypertrophy in left ventricle and conduction block. Targeted capture and sequencing technique were used to screen the pathogenic mutations associated with HCM. After the results were aligned with public database and in-house database, pathogenic mutations MYH7 R869C was found. The pathogenic mutation was accordant with the result analyzed by Sanger sequencing. **Conclusion** Pathogenic mutation MYH7 R869C can be identified in HCM by targeted capture and high throughput sequencing technique. The child with the mutation presents severe clinical phenotype. MYH7 R869C mutation might be a hot spot mutation.

**Key words:** cardiomyopathy; child; mutation; targeted capture; high throughput sequencing

小儿肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)预后差,存活者常伴有持久的心肌损害及心功能不全<sup>[1]</sup>。HCM呈常染色体显性遗传,至今已发现的致病突变绝大部分集中于8个编码肌小节蛋白的基因(MYH7、MYBPC3、TNNT2、TPM1、TNNI3、MYL2、MYL3、ACTC)<sup>[2]</sup>。传统筛查HCM致病基因的方法是Sanger测序法,其费时、费力,且成本高。本研究对临床确诊的1例HCM患者进行目标基因捕获高通量测序,快速筛查其致病突变,并结合心脏

超声及心电图结果,探讨基因突变与临床表型的关系,为我国HCM患者的基因诊断提供依据。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 研究对象为北京安贞医院心内科门诊确诊的HCM患者1例。HCM的临床诊断标准依据2011年美国心脏病学基金会/美国心脏协会诊断治疗指南<sup>[3]</sup>。该患者为男性,14岁,发病年龄12岁,主诉胸闷,有晕厥史。超声心动图显示室间隔与左心室侧壁心尖段呈现高度增厚,最厚处34 mm,左心室后壁为6 mm,左心室收缩末内径为15 mm,左心室舒张末内径为35 mm,左心房前后径为23 mm,射血分数88%,左心室流出道狭窄。心电图显示窦性心律,右束支传导阻滞。患者于发病2 a后行心肌切

DOI: 10.7683/xxyxyxb.2014.06.005

收稿日期:2014-03-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81300074)

作者简介:刘旭霞(1978-),女,山东文登人,博士,助理研究员,研究方向:心血管病病因学研究。

通信作者:杜杰(1963-),男,山东乳山人,博士,教授,研究方向:心血管重塑相关疾病病因及机制研究。

除术。本研究经首都医科大学附属北京安贞医院伦理委员会审核批准,患儿及家属签署知情同意书。

**1.2 DNA 全基因组文库的制备** 采用 DNA 提取试剂盒(美国 QIAGEN 公司)从患者抗凝全血中提取基因组 DNA,用文库样本定量检测仪 Nanodrop 2000 (美国 Thermo 公司)和琼脂糖凝胶电泳进行质量控制。将起始量为 3 μg 的 DNA 稀释,S2 超声仪(美国 Covaris 公司)行超声片段化,打断样本片段约150 bp。用 NEBNextDNA 文库制备试剂盒-Illumina(美国 NEB 公司)制备全基因组文库。片段产物采用高保真酶进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增,构建患儿全基因组文库。用 Nanodrop 2000 和琼脂糖凝胶电泳对文库质量进行检测。

**1.3 目标基因捕获及高通量测序** 利用 GenCap 基因序列捕获技术(北京迈基诺公司)将包含有 8 个 HCM 致病基因(*MYH7*、*MYBPC3*、*TNNT2*、*TPMI*、*TNNI3*、*MYL2*、*MYL3*、*ACTC*)的捕获探针(北京迈基诺公司)和患儿的全基因组文库混合,患儿疾病相关基因片段被杂交至探针上,进而通过生物素和链霉亲和素的磁珠结合被吸附至磁珠上,经洗脱处理将非目标区域的 DNA 片段洗掉,从而富集疾病基因片段,然后利用新一代测序仪 HiSeq-2000(美国 Illumina 公司)进行高通量测序。

**1.4 生物信息学分析** 目标区域测序后经过滤等处理获得的读数,去除测序数据中的接头和低质量(质量值≥20)和低覆盖度(深度≥10)的数据等,运用 SOAPaligner 软件(<http://soap.genomics.org.cn/soap.snp.html>)比对到参考基因组上,对获得的数据进行标准流程下的信息分析,得到单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms,SNPs)、插入缺失突变(insertions and deletions,InDels)等分析结果。同时进行测序深度、覆盖度及均一性等有效数据统计。

表 1 HCM 患儿高通量测序结果

Tab.1 Result of high throughput sequencing in a child with HCM

| 项目         | <i>MYBPC3</i>  | <i>MYBPC3</i>  | <i>MYH7</i>    | <i>MYH7</i>    | <i>TPMI</i>    |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 突变频率       | 100.00%        | 47.63%         | 50.18%         | 58.59%         | 100.00%        |
| 测序次数(深度)   | 93             | 760            | 283            | 99             | 9              |
| 参考碱基的测序次数  | 0              | 398            | 141            | 41             | 0              |
| 突变碱基的测序次数  | 93             | 362            | 142            | 58             | 9              |
| 染色体及位置     | chr11-47354787 | chr11-47367840 | chr14-23894052 | chr14-23902753 | chr15-63351840 |
| 突变位置       | E1096E         | I3361          | R869C          | T63T           | A151A          |
| 参考序列碱基     | C              | G              | G              | G              | C              |
| 测序序列碱基     | T              | A              | A              | A              | A              |
| 突变类型       | 纯合             | 杂合             | 杂合             | 杂合             | 纯合             |
| 测序质量       | 2 681.77       | 8 499.77       | 3 550.77       | 1 594.77       | 287.78         |
| 测序深度       | 93             | 760            | 283            | 99             | 9              |
| 突变影响       | 同义突变           | 同义突变           | 非同义突变          | 同义突变           | 同义突变           |
| snp137 编号  | rs1052373      | -              | -              | rs2069540      | rs1071646      |
| 外显子位置      | exon29         | exon12         | exon22         | exon3          | exon4          |
| cDNA 碱基的编号 | c.3288G > A    | c.1008C > T    | c.2605C > T    | c.189C > T     | c.453C > A     |
| 氨基酸残基的变化   | p. E1096E      | p. I3361       | p. R869C       | p. T63T        | p. A151A       |
| 突变数据库 HGMD | -              | -              | chr14-23894052 | -              | -              |
| 内部健康人数据库   | -              | -              | -              | chr14-23902753 | chr15-63351840 |
| 千人基因组中的突变  | chr11-47354787 | -              | -              | chr14-23902753 | chr15-63351840 |

注:“-”表示数据库无记录。

经过与公共数据库及内部健康人数据库进行对比分析,找出 HCM 相关基因的突变信息。

**1.5 1 代测序验证** 对高通量测序生物信息学分析得到的包含致病突变位点的片段进行 PCR 扩增并直接进行 DNA 测序。采用生物学软件 Primer 6.0 设计涵盖突变位点的引物。本研究对涵盖 *MYH7* R869C 突变位点的片段设计的上游引物序列为 5'-CCCAAGTAGAAAGCCTGTGC-3',下游引物序列为 5'-GACTCCCTGCTGTAATCCA-3',扩增产物长度为 469 bp。PCR 反应参照本研究室建立的 Touch down PCR 方法进行扩增<sup>[4]</sup>,试剂盒购于北京天恩泽基因科技公司。PCR 产物经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收,纯化送交北京金诺锐杰基因科技有限公司测序。

## 2 结果

**2.1 高通量测序分析** 对患儿测序统计学概况显示目标区域覆盖度达 99.7%,有 95.5%的目标区域测序深度达 20 倍以上。

对 8 个 HCM 致病基因高通量测序结果进行分析,将质量差的数据过滤之后,得到 5 个 SNPs,包括 4 个同义突变(*MYBPC3* E1096E,*MYBPC3* I3361,*MYH7* T63T,*TPMI* A151A)和 1 个非同义突变(*MYH7* R869C)。未发现 InDels 突变。高通量测序分析结果见表 1。经过与公共数据库进行比对分析,3 个同义突变(*MYBPC3* E1096E,*MYH7* T63T,*TPMI* A151A)位于千人基因组计划([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org))中,2 个同义突变(*MYH7* T63T,*TPMI* A151A)存在于内部 300 个健康人数据库中,这些同义突变被认为无致病性。而 1 例非同义突变 *MYH7* R869C 为已报道的人类基因突变数据库(human gene mutation database, HGMD)收录的致病突变位点。此例患儿的致病突变由 *MYH7* R869C 突变位点导致。

**2.2 MYH7 R869C 的 Sanger 测序验证** 对高通量测序发现的致病突变,利用“金标准”第1代测序进行验证。1代测序图谱见图1,证实该 HCM 患者存在 MYH7 R869C 突变。

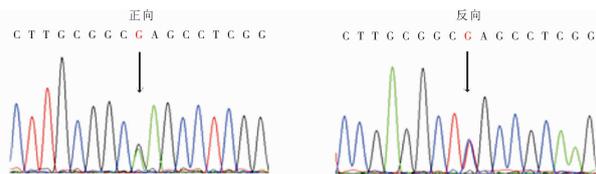


图1 HCM 患者 MYH7 R869C 突变位点的 1 代测序验证 (箭头所示为 C 到 T 杂合突变)

Fig.1 Validation of MYH7 R869C mutation by Sanger sequencing (arrow denotes C to T heterozygous C2605T mutation)

### 3 讨论

本研究采用目标基因捕获高通量测序技术对 1 例 HCM 患儿进行基因检测,该技术是将第 2 代测序技术用于 HCM 患儿致病基因的检测方法,结果发现该患儿的致病突变位点为 MYH7 R869C,该基因型导致了严重的临床表型。

HCM 的临床表型变化较大,主要包括从无症状到呼吸困难、胸痛、心律失常、心力衰竭,甚至心源性猝死<sup>[5]</sup>。各年龄段人群皆可罹患 HCM。小儿 HCM 患者发病早,临床症状重,预后差<sup>[1]</sup>。HCM 既可散发亦可呈家族性聚集,二者皆与基因突变高度相关,童年起病的散发性 HCM 病例中近一半由基因突变引起,而童年起病的家族性患者中突变检出率高达 67%<sup>[6]</sup>。不同基因型对应的临床表型不同,其中 MYH7 突变患者发病年龄相对较小,心肌肥厚程度较重。如 MYH7 基因 403 位突变是恶性突变,发病早,猝死率高;MYH7 基因 719 位突变者心力衰竭风险增加<sup>[7]</sup>。Richard 等<sup>[8]</sup>首次发现 MYH7 R869C 纯合突变,患者 10 岁左右发病,17 岁发生心房颤动,40 岁之前左心室收缩期功能失调,左心房严重膨胀。本研究中 MYH7 R869C 杂合突变携带者 12 岁发病,室间隔与左心室侧壁心尖段呈现高度增厚,左心室收缩期功能失调,心电图呈现右束支传导阻滞,患者 14 岁行心肌切除术,与 Richard 等<sup>[8]</sup>的研究相似。

HCM 是临床最常见的遗传性心脏病,推荐对 HCM 患者常规进行基因学检测<sup>[3]</sup>。然而由于 HCM 的异质性,不同的 HCM 患者可能由不同的突变引

起,这就导致用传统的测序方法进行检测不仅费时费力,且花费巨大,难以在临床推广应用。目标基因捕获高通量测序技术与传统测序方法不同,其针对整个外显子组或目标区域进行高通量测序,通过只对目标序列测序不仅降低了测序成本,还提高了测序的效率<sup>[9]</sup>。目标区域测序已成功应用于遗传性疾病的致病突变研究,如隐性非综合征型耳聋<sup>[10]</sup>。本研究也利用该前沿技术对 1 例 HCM 患儿进行检测,发现其突变位点为 MYH7 R869C。对 HCM 患儿进行遗传学诊断,将对患儿的临床治疗、病情评估及遗传咨询具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 杨作成. 小儿肥厚型心肌病的诊断与治疗[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(1):76-78.
- [2] Ho C Y. Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2010, 122 (23): 2430-2440.
- [3] Gersh B J, Maron B J, Bonow R O, et al. 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. *Circulation*, 2011, 124 (24): 2761-2796.
- [4] 王绿娅, 曹守春, 蒯洁, 等. 降落聚合酶链反应技术在低密度脂蛋白受体基因点突变研究中的应用 [J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26 (7): 403-406.
- [5] Maron B J, Maron M S. Hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Lancet*, 2013, 381 (9862): 242-255.
- [6] Morita H, Rehm H L, Menesses A, et al. Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358 (18): 1899-1908.
- [7] van Driest S L, Jaeger M A, Ommen S R, et al. Comprehensive analysis of the beta-myosin heavy chain gene in 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44 (3): 602-610.
- [8] Richard P, Charron P, Leclercq C, et al. Homozygotes for a R869C mutation in the beta-myosin heavy chain gene have a severe form of familial hypertrophic cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32 (8): 1575-1583.
- [9] Ng S B, Buckingham K J, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder [J]. *Nat Genet*, 2010, 42 (1): 30-35.
- [10] Rehman A U, Morell R J, Belyantseva I A, et al. Targeted capture and next-generation sequencing identifies C9orf75, encoding taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79 [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86 (3): 378-388.

(本文编辑:王燕 英文编辑:王燕)