

MITF 基因在瓦登伯格综合征 II 型中的突变分析

郭青^{1,2}, 刘梦潇³, 李志祥³, 张玉婷³,
储九圣¹, 孔旭辉¹, 庞秀红¹

(1. 扬州大学附属泰州市人民医院 耳鼻咽喉-头颈外科, 江苏 泰州, 225300;
2. 扬州大学 医学院, 江苏 扬州, 225000; 3. 大连医科大学, 辽宁 大连, 116000)

摘要: **目的** 探讨 1 例瓦登伯格综合征 (WS) 家系遗传性致病因素, 以期通过遗传咨询而实现 WS 型耳聋的一级预防。**方法** 纳入三代 5 名家系成员 (汉族) 为研究对象, 详细询问病史, 采集外周静脉血并抽提 DNA, 采用 Sanger 测序对 3 大常见耳聋基因和瓦登伯格综合征候选基因进行全序列筛查。**结果** MITF 基因截短突变 c. C763T (p. R255X) 在该家系内呈现基因型-表型共分离。**结论** 截短突变 c. C763T 导致第 255 位精氨酸密码子突变为终止密码子, 蛋白质合成提前终止, 很可能为该家系的遗传性致病因素。MITF 蛋白正常功能丧失所致的单倍体剂量不足很可能为该突变的致病机制。遗传咨询、婚育指导和产前诊断技术的应用, 可避免由该突变导致的后代耳聋。

关键词: MITF 基因; 截短突变; 瓦登伯格综合征; 单倍体剂量不足; 遗传咨询

中图分类号: R 764.2; R 764.3 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2021)16-022-05 DOI: 10.7619/jcmp.20212187

Analysis in mutation in MITF gene in type II Waardenburg syndrome

GUO Qing^{1,2}, LIU Mengxiao³, LI Zhixiang³, ZHANG Yuting³,
CHU Jiusheng¹, KONG Xuhui¹, PANG Xiuhong¹

(1. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Taizhou People's Hospital
Affiliated to Yangzhou University, Taizhou, Jiangsu, 225300;
2. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225000;
3. Dalian Medical University, Dalian, Liaoning, 116000)

Abstract: Objective To explore the genetic factors of a hereditary disease named Waardenburg syndrome (WS) in one case so as to achieve the goal of its prevention by genetic counseling. **Methods** Five family members (Han nationality) of three generations were included in the study. Peripheral venous blood samples were collected and DNA was extracted after a detailed medical history inquiry. Mutation screening of all exons for three common deaf genes and six WS candidate genes was performed by Sanger sequencing. **Results** The c. C763T (p. R255X) in MITF truncated mutation segregated with the phenotypes within the family. **Conclusion** The truncated mutated p. R255X results in the mutation of the 255th arginine codon into termination codon, leading to premature termination of protein synthesis, which is probably the hereditary pathogenic factor of this family. The lack of haploid dose caused by the normal function loss of MITF protein is likely to be the pathogenic mechanism of this mutation. Genetic counseling, marital guidance and prenatal diagnostic techniques can prevent deafness in offspring caused by the mutation.

Key words: MITF gene; truncated mutation; Waardenburg syndrome; haplo-insufficiency; genetic counseling

收稿日期: 2021-05-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(81700920); 江苏省基础研究计划(自然科学基金)面上项目(BK20191229); 江苏省第五期“333工程”科研项目(BRA2019192); 江苏省泰州市科技支撑(社会发展)项目(TS201733); 江苏省卫生计生委科研课题项目(H201666)

通信作者: 庞秀红, E-mail: pxhzy@163.com; 孔旭辉, E-mail: kongxuhui1966@163.com

瓦登伯格综合征 (WS) 是一种常染色体显性遗传综合征性耳聋, 感音神经性聋及色素异常为其特征性表型^[1]。该病的主要发病机制为来源于神经嵴的黑色素细胞缺失, 进而引起一系列的相应症状^[2]。WS 发病率在全部耳聋中占 0.9% ~ 2.8%, 在先天性耳聋中占 2% ~ 5%^[1]。根据是否伴有额外的临床表型, WS 可分为 I 型、II 型、III 型、IV 型 4 种亚型^[3-4]。I 型和 II 型最为常见^[5-6], II 型患者内眦间距正常^[7], 临床通常采用 W 指数鉴别 I 型和 II 型 (W 指数 ≥ 1.95 为 I 型, W 指数 < 1.95 为 II 型)^[8]。III 型除了具有 I 型表型外, 还常伴有肌肉骨骼系统异常, 如上肢骨骼肌肉发育不良或上臂畸形等。IV 型除了具有 II 型表型外, 还伴有先天性巨结肠病 (HD)^[9] 或慢性假性肠梗阻^[10]。

迄今为止, 临床研究^[11] 已报道 6 个基因与 WS 相关, 分别为 *SOX10*、*SNAI2*、*PAX3*、*MITF*、*EDNRB* 和 *EDN3*。其中, *MITF* 基因 (NM_000 248.4) 全称为小眼畸形相关转录因子, 含有 9 个高度保守的外显子。约 15% 的 WS II 型由 *MITF* 基因突变引起^[11], 这些突变主要集中在 *MITF* 基因的 6 ~ 9 号外显子之间, 对应于 *MITF* 蛋白的 bHLH-Zip 结构域。近年来, 相关研究^[12-14] 发现 *MITF* 基因纯合突变还可能分别与多发性原发性黑色素瘤和 WS IV 型相关。因此, *MITF* 基因的基因型和表型异质性高, 有待进一步探索。本课题组前期收集到 1 例疑似 WS 家系成员样本, 并拟用遗传性疾病常用检查手段探寻该家系遗传性病因, 旨在通过遗传咨询及婚育指导实现耳聋的一级预防。

1 资料与方法

1.1 病例资料

本研究纳入 WS 家系由江苏省泰州市人民医院耳鼻咽喉-头颈外科门诊招募, 共三代 5 名家系成员 (汉族), 其中患者 3 名 (III-1、II-2、I-2), 正常家系成员 2 名 (II-1 和 I-1)。征得家系成员同意并签署知情同意书 (未成年人由其法定监护人代理) 后, 研究人员对该家系成员进行详细病史询问及体格检查, 绘制家系图, 采集静脉全血样本。本研究获得泰州市人民医院伦理委员会审核批准, 符合《赫尔辛基宣言》。

详细询问家系成员病史, 排除外伤、中耳炎、耳毒性药物等因素导致的耳聋或者伴有其他特殊临床表型的综合征性遗传性耳聋, 如 Pendred 综

合征、Alport 综合征、Usher 综合征等。对所有家系成员进行耳科、眼科、毛发、皮肤色素、腹部、肌肉骨骼和四肢关节等全面体格检查, 并行智力评估。采用听力学检查方法评估听力损伤程度, 包括电测听、声导抗、耳声发射、多重听觉稳态诱发反应测验等。采用影像学检查方法如内耳核磁共振 (MRI) 评估家系成员是否有内耳畸形, 同时特别关注毛发、虹膜及皮肤色素的变化, 以及与 WS 相关的其他发育缺陷 (如内眦外移、肢体畸形、胃肠道症状等)。测量相关数据, 计算并比较家系成员的 W 指数^[8]。W 指数计算方法: 测量内眦间距 (A)、双瞳间距 (B)、外眦间距 (C), $W \text{ 指数} = (2A - 0.211 9C - 3.909) / C + (2A - 0.247 9B - 3.909) / B + A / B$, 其中 W 指数 ≥ 1.95 表示内眦外移。本研究涉及到的全部检查均在江苏省泰州市人民医院相应科室中由专科医生完成。

1.2 方法

1.2.1 采集静脉血抽提 DNA: 抽取家系成员外周静脉血 2 mL, 采用天根生化科技 (北京) 有限公司生产的离心柱型血液全基因组 DNA 抽提试剂盒 (TIANamp Blood DNA Kit; DP318-03) 提取基因组 DNA, 使用核酸检测仪 (Thermo NANODROP 2000) 对 DNA 原液进行定量和纯度分析, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 3 大常见耳聋基因全序列筛查: *GJB2*、*SLC26A4*、*MT-RNR1* 基因引物序列及扩增条件参考文献^[15]。

1.2.3 WS 相关候选基因全序列筛查: *PAX3*、*MITF*、*SNAI2*、*EDN3*、*EDNRB* 和 *SOX10* 基因扩增引物参考相关研究^[5]。所有 PCR 反应均在 ABI2720 热循环仪上完成, 上述基因的第 1 轮和第 2 轮 PCR 扩增条件相同, 即 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s, 变性、退火和延伸 3 个步骤重复 35 个循环, 循环结束后 $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, PCR 产物于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。将通过凝胶电泳鉴定合格的巢式 PCR 产物送测序公司进行双向测序, 并采用 Sequencher 5.4.6 软件对测序结果进行分析。

1.2.4 家系内验证: 利用家系成员样本对可疑突变进行进一步验证, 以寻找基因型-表型共分离位点。

1.2.5 评估可疑突变可能的致病效应: 利用 Exome Variant Server、ExAC Browser、Mutation

Taster、Polyphen-2、PROVEAN (阈值 < 1. 3) 和 SIFT(阈值 < 0. 05) 等软件评估可疑错义突变位点进行致病性预测。

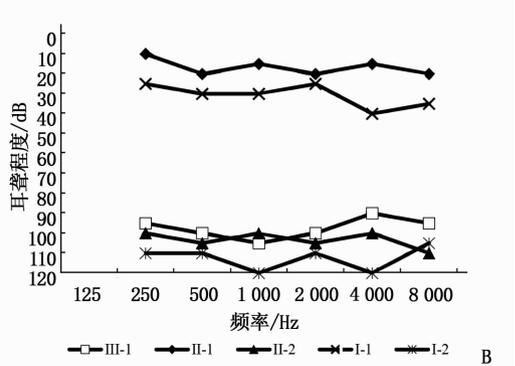
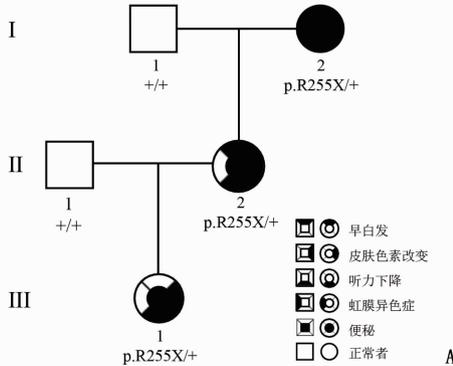
1.2.6 遗传咨询和婚育指导：WS 主要为常染色体显性遗传，找到该家系遗传学病因后，根据孟德尔遗传定律，对该家系成员进行遗传咨询和婚育指导。

2 结果

2.1 临床结果

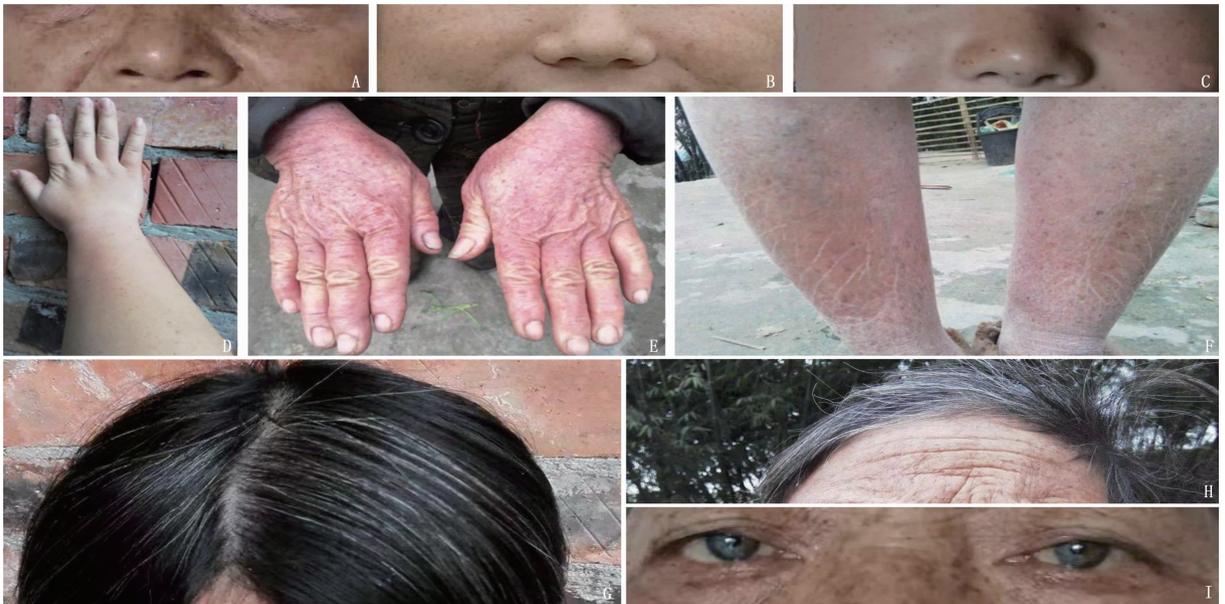
该家系所有成员无慢性中耳炎、耳外伤等病

史和耳毒性药物使用史。先证者(III-1) 表现为双侧极重度感音神经性聋、日益增多的面部暗褐色斑点和偶发便秘。先证者母亲(II-2) 表现为右侧极重度感音神经性聋、早白发、偶发便秘和面部、全身大量暗褐色斑点。先证者外婆(I-2) 表现为双侧极重度感音神经性聋、双侧虹膜异色、早白发、面部及全身大量暗褐色斑点、肠道功能紊乱。先证者已适龄行右侧人工耳蜗植入，日常生活中交流基本正常。先证者、先证者母亲及先证者外婆的 W 指数均 < 1. 95，视力和智力正常，无其他系统异常。见图 1、2。



A: 家系图、基因型-表型图(正方形表示男性,圆形表示女性,黑色表示表型,白色表示正常); B: 家系内成员听力图。

图 1 家系图、基因型-表型图和听力图



A: I-2 面部斑点; B: II-2 面部斑点; C: III-1 面部斑点; D: II-2 右手斑点; E: I-2 双手斑点; F: I-2 双腿斑点; G: II-2 早白发; H: I-2 早白发; I: I-2 虹膜异色。

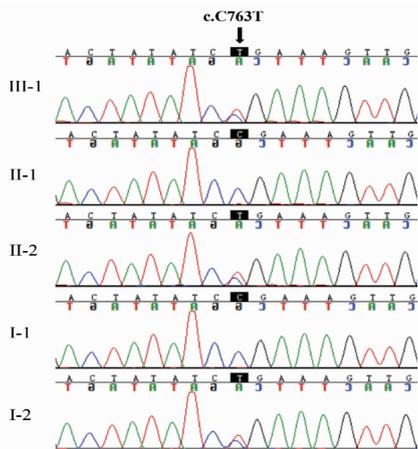
图 2 色素异常表型

2.2 突变分析

3 大常见耳聋基因 *GJB2*、*SLC26A4*、*MT-RNR1* 全序列筛查未见致病突变。WS 相关候选基因 *PAX3*、*MITF*、*SNAI2*、*EDN3*、*EDNRB*、*SOX10* 全序

列筛查发现 *MITF* 基因第 8 个外显子发生杂合突变 c. C763T (p. R255X)，见图 3。该突变第 763 编码碱基 C 变为 T，导致第 255 个编码精氨酸的密码子变成终止密码子，MITF 蛋白于 255 位点

终止编码。家系内成员样本验证发现,该突变在家系内呈基因型-表型共分离,即患病的先证者(Ⅲ-1)、先证者母亲(Ⅱ-2)及先证者外婆(Ⅰ-2)均携带该突变,而未患病的家系成员则未携带。



Ⅲ-1、Ⅱ-2 和 Ⅰ-2 为杂合突变,Ⅰ-1 和 Ⅱ-1 为野生型。

图 3 突变峰图

3 讨论

本研究筛查所发现 *MITF* 基因截短突变 p. R255X 为既往研究^[16]已报道的突变。该研究^[16]报道,患病家系成员 Ⅱ-7 表现为双侧完全虹膜异色、左耳中度感音神经性聋、右耳重度感音神经性聋以及面部、躯干、四肢大量雀斑,Ⅲ-21 表现为双眼部分虹膜异色、左耳重度感音神经性聋以及面部、躯干、四肢大量棕色雀斑,Ⅳ-15 表现为双眼蓝色虹膜、双耳重度感音神经性聋,而面部、躯干和四肢未见雀斑。尽管该家系内患病成员基因型一致,但表型却不尽相同。CHEN H 等^[17]报道的 p. R255X 突变相关 WS Ⅱ型家系中,Ⅳ-16 仅表现为单眼部分虹膜异色;Ⅳ-15 表现为先天性极重度感音神经性聋及单眼部分虹膜异色;Ⅲ-20除了左耳中度感音神经性耳聋和面部、肢体棕褐色雀斑以外,还在 10 岁后逐渐出现单侧部分虹膜异色;Ⅱ-12、Ⅱ-3、Ⅱ-7 及 Ⅲ-10 均在 30 岁前出现白发和面部、肢体雀斑;Ⅰ-2 表现为早白发、面部雀斑。该家系同样体现出该突变表型的异质性极大。本研究家系内患者的表型各异,更加证实了既往研究提出的 *MITF* 基因突变表型异质性大的研究结论。

人类 *MITF* 基因定位于 3p12 ~ p14 区间^[18-19],编码螺旋-环-螺旋碱性亮氨酸拉链结构的转录因子^[20],通过 bHLH-Zi 结构域从而形成同源或异源二聚体,与 DNA 结合进而参与多种生

长发育过程的调控,尤其是黑色素细胞的存活、增殖和分化。*MITF* 基因在神经嵄来源的黑素细胞和视网膜色素上皮细胞的发育中起关键作用^[21-23],其构建了调节黑素细胞发育的转录因子和信号通路之间的联系,包括 *PAX3* 和 *SOX10*^[24-25]。因此,黑色素细胞缺乏将会影响皮肤、头发、眼睛的色素形成以及耳蜗的听觉功能。本研究发现,该家系 *MITF* 基因第 8 个外显子杂合突变 c. C763T (p. R255X),使编码精氨酸密码子变成终止密码子,蛋白编码提前终止。*MITF* 蛋白单倍体剂量不足使其与 DNA 结合数量减少,从而转录激活色素基因能力下降,导致耳聋、早白发、色素斑点等色素异常临床表型^[26-28],因此,该突变致病机制很可能与单倍体剂量不足相关。

本研究利用 Sanger 测序对 6 个 WS 候选基因 (*PAX3*、*MITF*、*SNAI2*、*EDN3*、*EDNRB* 和 *SOX10*) 进行全序列筛查,需要扩增的片段只有 39 个,2 ~ 3 d 便可以出具结果,相对于二代测序来说,其准确、省时、经济。因此,对于具有典型 WS 表型的家系来说,对候选基因进行一代测序筛查是性价比最高的首选策略。

WS 为常染色体显性遗传,患者后代有 50% 概率患病,因此明确患者家系的遗传学病因将为该家系的产前诊断提供理论依据。本研究筛查发现, *MITF* 基因 p. R255X 在家系中呈基因型-表型共分离,结合既往研究中对该位点致病性的报道分析,该突变很可能为本研究该家系遗传性致病因素。给予遗传咨询及婚育指导,应用羊水穿刺、无创产前诊断及胚胎植入前诊断等技术,可以避免该家系后代因为该位点致聋,从而实现耳聋的一级预防。

综上所述, *MITF* 基因 p. R255X 截短突变很可能为本研究 WS 家系的遗传性致病因素。遗传咨询、婚育指导和羊水穿刺、无创产前诊断及胚胎植入前诊断等技术的应用,可以实现该位点所致耳聋的一级预防。

参考文献

- [1] SONG J, FENG Y, ACKE F R, et al. Hearing loss in Waardenburg syndrome: a systematic review [J]. Clin Genet, 2016, 89(4): 416-425.
- [2] WANG L, QIN L, LI T, et al. Prenatal diagnosis and genetic counseling for Waardenburg syndrome type I and II in Chinese families [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 172-178.
- [3] YANG S, WANG C, ZHOU C, et al. A follow-up study of a

- Chinese family with Waardenburg syndrome type II caused by a truncating mutation of *MITF* gene[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(12): e1520.
- [4] ALEHABIB E, ALINAGHI S, POURFATEMI F, *et al.* Incomplete penetrance of *MITF* gene c. 943C > T mutation in an extended family with Waardenburg syndrome type II[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2020, 135: 110014.
- [5] CHEN D L, LI S X, LI S R, *et al.* Novel mutations of *SOX10* gene in Chinese patients with type II Waardenburg syndrome[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2020, 136: 110172.
- [6] HU Q, MA H, SHEN J, *et al.* Case report: a novel *PAX3* mutation associated with waardenburg syndrome type 1[J]. *Front Genet*, 2021, 12: 609040.
- [7] LIU X Z, NEWTON V E, READ A P. Waardenburg syndrome type II: phenotypic findings and diagnostic criteria[J]. *Am J Med Genet*, 1995, 55(1): 95–100.
- [8] MA J, ZHANG T S, LIN K, *et al.* Waardenburg syndrome type II in a Chinese patient caused by a novel nonsense mutation in the *SOX10* gene[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2016, 85: 56–61.
- [9] KHAN T A, SAFDAR C A, ZAMEER S, *et al.* Waardenburg-Shah syndrome (WS type IV): a rare case from Pakistan[J]. *Perioper Med: Lond*, 2020, 9: 4.
- [10] HOGAN A R, RAO K A, THORSON W L, *et al.* Waardenburg syndrome type IV de novo *SOX10* variant causing chronic intestinal pseudo-obstruction[J]. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 2019, 22(5): 487–492.
- [11] PINGAULT V, ENTE D, DASTOT-LE MOAL F, *et al.* Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome[J]. *Hum Mutat*, 2010, 31(4): 391–406.
- [12] PANG X, ZHENG X, KONG X, *et al.* A homozygous *MITF* mutation leads to familial Waardenburg syndrome type 4[J]. *Am J Med Genet A*, 2019, 179(2): 243–248.
- [13] RAUSCHENDORF M A, ZIMMER A D, LAUT A, *et al.* Homozygous intronic *MITF* mutation causes severe Waardenburg syndrome type 2A[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2019, 32(1): 85–91.
- [14] BASSOLI S, PELLEGRINI C, LONGO C, *et al.* Clinical, dermoscopic, and confocal features of nevi and melanomas in a multiple primary melanoma patient with the *MITF* p. E318K homozygous mutation[J]. *Melanoma Res*, 2018, 28(2): 166–169.
- [15] 韩明显, 黄莎莎, 王国建, 等. 43 例耳聋家庭再生育前的遗传学分析与指导[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 46(11): 909–913.
- [16] YANG S, DAI P, LIU X, *et al.* Genetic and phenotypic heterogeneity in Chinese patients with Waardenburg syndrome type II[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77149.
- [17] CHEN H, LIAO X, LIU Y, *et al.* Study of gene mutation and pathogenetic mechanism for a family with Waardenburg syndrome[J]. *Chin J Med Genet*, 2017, 34(4): 471–475.
- [18] TASSABEHJI M, NEWTON V E, READ A P. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (*MITF*) gene[J]. *Nat Genet*, 1994, 8(3): 251–255.
- [19] HUGHES A E, NEWTON V E, LIU X Z, *et al.* A gene for Waardenburg syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12-p14.1[J]. *Nat Genet*, 1994, 7(4): 509–512.
- [20] CHEN Y, YANG F W, ZHENG H X, *et al.* Clinical and genetic investigation of families with type II Waardenburg syndrome[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 1983–1988.
- [21] SHI Y, LI X, JU D, *et al.* A novel mutation of the *MITF* gene in a family with Waardenburg syndrome type 2: a case report[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(4): 1516–1518.
- [22] MICHAEL H T, GRAFF-CHERRY C, CHIN S, *et al.* Partial rescue of ocular pigment cells and structure by inducible ectopic expression of *MITF-M* in *MITF*-deficient mice[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(15): 6067–6073.
- [23] ALBARRY M A, LATIF M, ALREHELI A Q, *et al.* Frameshift variant in *MITF* gene in a large family with Waardenburg syndrome type II and a co-segregation of a *C2orf74* variant[J]. *PLoS One*, 2021, 16(2): e0246607.
- [24] GODING C R, ARNHEITER H. *MITF*-the first 25 years[J]. *Genes Dev*, 2019, 33(15/16): 983–1007.
- [25] PHELEP A, LAOUARI D, BHARTI K, *et al.* *MITF-A* controls branching morphogenesis and nephron endowment[J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(12): e1007093.
- [26] HODGKINSON C A, NAKAYAMA A, LI H, *et al.* Mutation at the anophthalmic white locus in Syrian hamsters: haploinsufficiency in the *MITF* gene mimics human Waardenburg syndrome type 2[J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(4): 703–708.
- [27] WANG X P, LIU Y L, MEI L Y, *et al.* Wnt signaling pathway involvement in genotypic and phenotypic variations in Waardenburg syndrome type 2 with *MITF* mutations[J]. *J Hum Genet*, 2018, 63(5): 639–646.
- [28] SUN J, HAO Z, LUO H, *et al.* Functional analysis of a non-stop mutation in *MITF* gene identified in a patient with Waardenburg syndrome type 2[J]. *J Hum Genet*, 2017, 62(7): 703–709.

(本文编辑: 陆文娟)