12例中国胸膜肺母细胞瘤患儿的*DICER1*基因突变

蔡思雨¹, 王希思², 赵文², 伏利兵³, 马晓莉^{2*}, 彭晓霞^{1*}

1. 国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院, 临床流行病学与循证医学中心, 北京 100045;

2. 国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院, 血液肿瘤中心, 儿科学国家重点学科, 儿童血液病与肿瘤分子分型北京市重点实验室, 北京 100045;

3. 国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院病理科, 北京 100045

* 联系人, E-mail: mx11123@vip.sina.com; niuniu@ccmu.edu.cn

收稿日期: 2018-06-20; 接受日期: 2018-07-01; 网络版发表日期: 2018-09-06

北京市属高等学校高层次人才引进与培养三年行动计划青年拔尖人才培养计划(批准号: CIT&TCD201304189)资助

摘要 本研究旨在探索中国胸膜肺母细胞瘤(PPB)患者的*DICER1*基因突变携带率和家族史. 连续纳入12例PPB患者(病理分型, 6例为II型, 6例III型), 采集患者及其一级亲属的血液样本以及患者肿瘤组织样本; 患者的家族史由专人收集. 对血液样本进行*DICER1*基因突变检测; 对12例病例中的1个双胞胎家系的血液样本和患者肿瘤组织样本进行全基因组测序. 血液样本的*DICER1*基因突变检测结果显示, 12例患者中, 7例患者携带致病性*DICER1*突变, 其中6例患者携带的突变为导致蛋白截短的移码突变或无义突变; 另一个患者携带影响剪接位点的*DICER1*突变. 双生子家系的全基因组测序结果显示, 该患者的肿瘤组织携带*TDG*基因的无义突变和*DICER1*基因RNase III结构域内的错义突变. 12例患者中2例突变阳性病例在PPB确诊前曾被诊断患有肺囊肿. 此外, 1例患者具有甲状腺疾病家族史. 结果提示, 我国PPB患者的种系*DICER1*基因突变携带率与其他已有报道的国家(美国、日本和英国)所报道的突变携带率相似. 因此, 建议对PPB患者进行*DICER1*基因突变的检测, 并询问其家族史. 通过患者的遗传学特征为患者及其亲属提供相应的遗传咨询, 且患者的家族史与突变状态也能帮助临床医生鉴别PPB I型与肺囊肿.

关键词 *DICER1*, 突变, 胸膜肺母细胞瘤

胸膜肺母细胞瘤(pleuropulmonaryblastoma, PPB)是一种发病机制尚不清楚的恶性儿童肿瘤. 1988年由Manivel等人^[1]首次报道PPB为独立的病种. PPB根据病理形态学分3型: I型表现为囊壁内衬以成熟的呼吸道上皮细胞, 上皮内见原始间叶细胞; II型表现为在I型基础上出现了实性区, 病灶为囊性实性交界性; III型完全由实性区构成. I, II, III型病例确诊年龄中

位数分别为9, 36, 43^[2]. 在疾病的发展过程中, I型病变会在较短时间内进展为II型甚至恶性程度更高的III型^[3-5]. 2009年, Hill等人^[6]研究者通过11个家系的连锁分析确定*DICER1*基因是PPB的易感基因. 2011年, Slade等人^[7]研究者对823份种系DNA样本和781个肿瘤细胞系进行测序, 检测上述样本中是否携带致病性*DICER1*基因突变, 该研究将与*DICER1*突变相关的一

引用格式: 蔡思雨, 王希思, 赵文, 等. 12例中国胸膜肺母细胞瘤患儿的*DICER1*基因突变. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 1001–1006, doi: 10.1360/N052018-00097

英文版见: Cai S Y, Wang X S, Zhao W, et al. *DICER1* mutations in twelve Chinese patients with pleuropulmonary blastoma. Sci China Life Sci, 2017, 60: 714–720, doi: 10.1360/N052018-00097

系列疾病命名为*DICER1*综合征(OMIM: 601200). *DICER1*综合征的表型包括PPB、囊性肾瘤、多结节甲状腺肿、卵巢性索间质瘤、睫状体髓上皮瘤、胚胎性横纹肌肉瘤、鼻软骨间叶性错构瘤、松果体母细胞瘤和垂体母细胞瘤^[8].

*DICER1*基因编码的Dicer酶是miRNA成熟的关键酶, 其功能为将前体miRNA (pre-miRNA)剪切生成成熟的miRNA. miRNA调控约30%基因的表达, 在器官发育和抑制肿瘤等方面发挥重要作用^[9,10]. Messinger等人^[2]发现, 北美地区PPB患者*DICER1*基因突变携带率为66% (64/97), 且大部分患者携带的突变为移码突变或无义突变. 最年来, 多国研究人员均致力于探索*DICER1*突变在PPB发展中的作用. 然而, 研究所纳入的病例大多为白种人. 涉及亚洲患者的研究, 仅Seki等人^[11]研究者对日本8个PPB患者进行突变检测, 发现其中5例携带致病性*DICER1*突变. 本研究组于北京儿童医院连续纳入PPB病例, 进行突变检测和家族史的收集, 从而获得我国PPB患儿的遗传学特征.

1 材料与方法

本研究于2014年9月~2015年12月于北京儿童医院连续纳入PPB病例. 所有病例均经过病理学确诊. 使用EDTA抗凝管对患者及其一级亲属(包括父母与同胞兄弟姐妹)采血2 mL. 患者基本信息与家族史由指定临床大夫收集. 该研究获得首都医科大学附属北京儿童医院伦理委员会批准(IEC-C-028-A10-V.05), 所有患者及其亲属均签署知情同意.

利用Ion AmpliSeq Designer引物设计工具, 测序目标区域包括*DICER1*基因全长及其2 kb启动子区域. 使用试剂盒进行基因组DNA抽提. 纯化后的DNA经Qu-bit®2.0 Fluorometer和0.8%琼脂糖凝胶电泳进行质检, 质检合格的DNA可进行后续的测序实验. 对基因组DNA进行目标区域扩增, 部分消化引物序列、连接接头、富集, 完成测序样本文库构建. 所建文库使用qPCR进行定量. 在Ion OneTouch上完成乳液PCR. 准备测序试剂, 将带有文库的Ion 318™ Chips放到Ion PGM™ System上进行测序反应. 选用200 bp程序, 进行测序. 测序过程由Auto-user进行控制, 并进行实时数据分析. 对ampliseq捕获数据进行常规数据分析, 包括数据预处理、数据过滤统计、基因组mapping、数据

注释. 质控标准为目标区域平均覆盖在500×左右, 如果平均覆盖低于400×, 将进行补测. 序列比对使用PGM服务器提供的标准流程进行操作. 比对生成的比对结果为BAM文件. 由PGM服务器ampliseq官方软件处理, 进行SNV及InDel检测得到vcf结果文件, 经过文本处理和annovar/VEP/snpEFF软件注释后得到最终的结果文件. 根据数据的可信度、变异的位置、变异对蛋白质功能的影响、人群突变频率等信息对变异结果进行筛选. 用传统的Sanger方法验证所有的*DICER1*基因突变. Sanger测序由上海生工生物工程有限公司完成, 引物见网络版附表1. 使用Chromas软件分析测序结果.

对12个家系中的一个家系(双生子家系)全体成员血液样本以及患者肿瘤样本进行全基因组测序. 测序平台为illumina hiSeq x Ten. 对样本进行DNA质量检测, 质量合格者进行文库构建. 基因组DNA打断后, 经末端修复和加A尾后, 片段两端分别连接接头制备DNA文库. 文库构建后, 进行质量检测, 合格者进行上机测序. 测序结束后进行信息分析. 首先进行数据质量评估, 主要通过测序错误率、数据量、比对率进行统计, 评估建库测序是否达到标准, 符合标准则进行后续分析, 否则进行重测. 将序列进行比对, 检测样本中的变异信息, 对肿瘤成对样本检测体细胞突变. 对数据进行过滤的标准是: 含接头序列的reads; 单端read中N的碱基个数超过该条read碱基总数的10%的read; 单端read中低质量(质量值低于5)碱基数超过该条read长度比例的50%的reads. 使用VarScan (version 2.3.9)寻找体细胞突变. 保留Fisher检验的 $P < 0.01$ 的变异. 使用ANNOVAR对变异进行注释. 注释后, 通过千人基因组数据库、ExAC和TCGA过滤掉人群中频率大于0.01的变异位点.

2 结果

来自10个省的12例PPB病例的基本特征见表1. 其中8例患者为女性, 4例为男性. 患者所患PPB均为实性PPB, 其中6例为PPB II型, 6例为PPB III型. 12例PPB患者的确诊年龄(月)中位数为36个月(19~77个月). 直至2017年2月, 12例患儿中的11例存活, 仅1例在确诊4个月死亡. 大部分患者的治疗方法为手术加化疗.

表2为12例PPB患者及其一级亲属的突变信息. 7例患者(病例01, 02, 06, 07, 09, 11和12)的血液样本中

表 1 12例PPB患者基本信息^{a)}

病例	分期	性别	确诊PPB时月龄	患者所患其他相关疾病	临床结局 [#]	存活时间(月)	PPB治疗	居住地
01	II	女	38	无	存活	12	手术加化疗	陕西
02	II	女	50	无	存活	28	手术加化疗	北京
03	II	女	39	无	存活	16	化疗	辽宁
04	III	女	43	无	存活	45	手术、化疗和放疗	黑龙江
05	III	男	26	无	存活	21	手术加化疗	北京
06	II	男	32	肺囊肿	存活	21	手术加化疗	山东
07	II	女	49	肺囊肿	存活	71	手术加化疗	河南
08	III	男	77	无	确诊4个月 后死亡	4	手术加化疗	甘肃
09	III	女	34	无	存活	7	手术加化疗	河北
10	III	女	19	无	存活	53	手术加化疗	山东
11	III	男	28	无	存活	3	手术加化疗	广西
12	II	女	23	无	存活	3	手术加化疗	安徽

a) #: 随访至2017年2月

表 2 12例PPB患者及其一级亲属*DICER1*基因突变信息^{a)}

病例	<i>DICER1</i> 基因种系突变	蛋白改变	亲属突变情况		
			父亲	母亲	同胞
01	c.2296_2297insC	p.Q766fs	—	+	无
02	c.C3675A	p.Y1225X	—	+	+
03	—	—	—	—	无
04	—	—	未获得样本	—	无
05	—	—	—	—	无
06	c.C1174T	p.R392X	+	—	-
07	c.1024delA	p.R342fs	—	—	-
08	—	—	—	—	-
09	c.2987+1G>A	splicing	—	—	-
10	—	—	—	—	无
11	c.C2928A	p.Y976X	—	—	无
12	c.2867delC	p.P956fs	—	+	无

a) +: 检测到突变; —: 未检测到突变

检测到了致病性*DICER1*基因突变。如表2所示, 6个突变为移码突变(病例01, 07和12)或无义突变(病例02, 06和11), 此类突变会产生功能异常的截短蛋白。此外, 病例09携带的突变c.2987+1G>A为影响剪接位点功能的*DICER1*基因突变。图1为*DICER1*编码蛋白一级结构以及患儿*DICER1*基因突变在蛋白结构上的近似位置。图2为Sanger测序的结果。所有*DICER1*基因的突变均被

Sanger测序所验证。

4例携带突变的病例其父亲或母亲(病例01, 02, 06和12)也携带相同的突变。另外3例携带突变的病例(病例07, 09和11), 其父母均未检测到*DICER1*基因突变。两种可能的解释是: *de novo*突变或父母其一为生殖系嵌合体。此外, 4名*DICER1*突变阳性的患者有兄弟姐妹, 其中仅病例02的兄弟姐妹携带与病人同样的突变。

图 1 *DICER1*编码蛋白一级结构以及患儿*DICER1*基因突变在蛋白结构上的近似位置(网络版彩图)

图 2 Sanger测序验证结果(网络版彩图)

两个携带*DICER1*突变的病例(病例06和07)在确诊PPB前曾被诊断患有肺囊肿。病例06具有甲状腺疾病的家族史(图3)。病例06和他父亲携带突变c.C1174T, 该突变为导致R392X氨基酸改变的无义突变。先证者的祖母(I-2)和姑姑(II-2)患有甲状腺肿, 祖母的姐姐(I-3)患有甲状腺结节。病例01和她的母亲携带突变c.2296_2297insC, 该突变会导致蛋白质截断。病例01的母亲于23岁被诊断为甲状腺肿。病例02的母亲和双胞胎妹妹携带突变c.C3675A, 该突变为导致Y1225X氨基酸改变的无义突变。病例02的母亲在22岁时被诊断患有甲状腺结节。病例05未检测到*DICER1*基因突变, 其叔叔在20岁时被诊断患有慢性粒细胞白血病。

对于病例02家系的全基因组分析结果显示, 该家系中共携带6,361,526个种系突变。卵性鉴定结果显示, 孪生姐妹具有几乎相同的SNP基因型(约99%), 该双胞胎为同卵双胞胎。肿瘤组织测序结果显示, 该患儿携带135109个个体细胞突变, 包括1532个非同义突变和超过130000个同义突变或非编码区突变。非同义突变包括*TDG*基因的无义突变, 该突变可能是导致该肿瘤具有高突变率的原因。此外, 该肿瘤还携带*DICER1*基因RNase III结构域内的错义突变c. G5125A(D1709N)。肿瘤的癌症驱动基因也发生突变, 如*EGFR*, *ALK*和*FOXAI*。

3 讨论

据我们所知, 这是首次针对连续的中国PPB患者的遗传学、临床特征以及家族史的研究。本研究对12例患者进行测序, 发现其中的7例患者携带种系*DICER1*突变。6例患者携带的*DICER1*突变为导致蛋白截断的移码突变或无义突变。1例患者携带的突变为影响剪接位点的突变。中国患者的种系突变频率和突变特

征与其他国家所报道的结果相似(图4)^[2,7,11]。如图4所示, Messinger等人^[2]研究者对97例PPB患者血样进行测序,发现种系*DICER1*突变频率约66%。Seki等人^[11]报道8名日本PPB患者,其中有5例携带种系*DICER1*突变。Slade等人^[7]研究者报道14例PPB患者中的11例携带*DICER1*基因种系突变。

本研究中,约40%的患者未检测到*DICER1*基因种系突变。对于此类患者通常可能的解释是,嵌合突变或双等位基因体细胞突变^[11-14]。此外,不能排除一些病例可能携带大片段的缺失或具有某种表观遗传学变化等。因此,需要进一步探索突变阴性患者的遗传学发病机制。

Priest等人^[5,15]和Oue等人^[16]报告223例IPPBR病例中,有14%的患者有受累的家庭成员,并有10个PPB家

图3 病例06家系图

图4 PPB突变携带率的森林图

族的家庭成员患甲状腺疾病。本研究中,病例06具有甲状腺疾病的家族史。甲状腺肿和甲状腺结节常见于携带致病性*DICER1*基因突变的家系,并更易累及女性携带者。甲状腺异常,特别是多结节性甲状腺肿,可能是*DICER1*突变导致的最常见疾病。然而,发生甲状腺疾病并不意味着携带*DICER1*突变。Rio Frio等人^[17]和Foulkes等人^[18]指出甲状腺疾病并发其他*DICER1*综合征表型提示该家系很有可能携带致病性突变。

对双生子患儿家系的全基因组测序结果提示,该患儿肿瘤组织携带*TDG*突变可能是导致该肿瘤具有高突变率的原因。Pugh等人^[12]报道两例患者,其肿瘤组织具有高突变率且DNA修复基因也携带突变(*BTBD12/SLX4*和*PARP1*)。该患儿肿瘤组织还携带*DICER1*基因RNase III区域内的错义突变(c.G5125A, D1709),该突变位点为*DICER1*综合征患者最常见的突变位点,该位点编码Dicer酶的金属离子结合域。*DICER1*综合征中常见的体细胞突变位点包括D1709, E1813, E1813, D1705, D1713和G1809,上述位点均为编码金属离子结合域的位点或与之相邻的位点。此外,该患儿肿瘤组织中肿瘤驱动基因也携带突变,如*EGFR*, *ALK*和*FOXAI*^[18]。未来有望通过双生子基因序列比对,以及体细胞突变分析探索PPB的致病机制。

此外,本研究连续纳入的12例PPB患儿中,无I型PPB患者。而Messinger等人^[2]报告了350例PPB病例的信息,发现I型,II型和III型分别占33%,35%和32%。缺乏I型PPB提示我国患儿面临着高误诊率。本研究中,两个PPB突变阳性病例(病例06和07)曾在PPB确诊前被诊断患有肺囊肿。由于两例患者的肺囊肿确诊均在外院进行,所以未获得病历资料,无法判断该疾病是否为肺囊肿,还是未被识别的I型PPB。PPB的早期表现为肺囊性病变,其在临床和影像学上均难以与良性先天性肺囊肿区分^[5,19-21]。Priest等人^[4]报道称223例诊断为II型或III型的IPPBR病例中有18例(8%)在PPB诊断前曾被诊断患有肺囊肿,且肺囊肿未被切除。

Messinger等人^[2]报道,北美地区66%的PPB患者携带*DICER1*突变。此后,Feinberg等人^[22]提出通过临床和影像学特征以及*DICER1*突变状态可以区分PPB和肺囊肿。此外,IPPBR提出,了解患者*DICER1*突变状态与详细的家族史,有助于为患者提供临床管理和咨询^[8]。本研究评估了中国PPB患者的种系突变频率,研究发

现我国患儿突变携带率与美国英国和日本的所报道的结果类似^[2,7,11]。本研究表明, 将*DICER1*突变检测整合到临床诊断过程中可能有助于区分PPB与非恶性肺囊

肿, 从而降低中国PPB误诊的风险。然而, 如何将*DICER1*突变检测与其他临床特征结合起来, 有效区分PPB和肺囊肿的方法仍有待于探索。

参考文献

- 1 Manivel J C, Priest J R, Watterson J, et al. Pleuropulmonary blastoma the so-called pulmonary blastoma of childhood. *Cancer*, 1988, 62: 1516–1526
- 2 Messinger Y H, Stewart D R, Priest J R, et al. Pleuropulmonary blastoma: a report on 350 central pathology-confirmed pleuropulmonary blastoma cases by the International Pleuropulmonary Blastoma Registry. *Cancer*, 2015, 121: 276–285
- 3 Hill D A, Jarzembowski J A, Priest J R, et al. Type I pleuropulmonary blastoma: pathology and biology study of 51 cases from the International Pleuropulmonary Blastoma Registry. *Am J Surgical Pathol*, 2008, 32: 282–295
- 4 Priest J R, Hill D A, Williams G M, et al. Type I pleuropulmonary blastoma: a report from the International Pleuropulmonary Blastoma Registry. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 4492–4498
- 5 Priest J R, Williams G M, Hill D A, et al. Pulmonary cysts in early childhood and the risk of malignancy. *Pediatr Pulmonol*, 2009, 44: 14–30
- 6 Hill D A, Ivanovich J, Priest J R, et al. *DICER1* mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science*, 2009, 325: 965
- 7 Slade I, Bacchelli C, Davies H, et al. *DICER1* syndrome: clarifying the diagnosis, clinical features and management implications of a pleiotropic tumour predisposition syndrome. *J Med Genet*, 2011, 48: 273–278
- 8 Doros L, Schultz K A, Stewart D R, et al. *DICER1*-Related Disorders. In: Pagon R A, Adam M P, Ardinger H H, et al. GeneReviews®. Seattle: University of Washington, 1993
- 9 Ryan B M, Robles A I, Harris C C. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 389–402
- 10 Carthew R W. Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16: 203–208
- 11 Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, et al. Biallelic *DICER1* mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma. *Cancer Res*, 2014, 74: 2742–2749
- 12 Pugh T J, Yu W, Yang J, et al. Exome sequencing of pleuropulmonary blastoma reveals frequent biallelic loss of TP53 and two hits in *DICER1* resulting in retention of 5p-derived miRNA hairpin loop sequences. *Oncogene*, 2014, 33: 5295–5302
- 13 Doros L A, Turner J, Williams G M, et al. The *DICER1* syndrome: genotype-phenotype correlation in PPB patients. *J Clin Oncol*, 2015, 33: 10022
- 14 de Kock L, Wang Y C, Revil T, et al. High-sensitivity sequencing reveals multi-organ somatic mosaicism causing *DICER1* syndrome. *J Med Genet*, 2016, 53: 43–52
- 15 Priest J R, Watterson J, Strong L, et al. Pleuropulmonary blastoma: a marker for familial disease. *J Pediatrics*, 1996, 128: 220–224
- 16 Oue T, Inoue M, Kubota A, et al. Pediatric thyroid cancer arising after treatment for pleuropulmonary blastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 2007, 50: 901–902
- 17 Rio Frio T, Bahubeshi A, Kanellopoulou C, et al. *DICER1* mutations in familial multinodular goiter with and without ovarian sertoli-leydig cell tumors. *JAMA*, 2011, 305: 68–77
- 18 Foulkes W D, Priest J R, Duchaine T F. *DICER1*: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 662–672
- 19 Laberge J M, Puligandla P, Flageole H. Asymptomatic congenital lung malformations. *Semin Pediatric Surgery*, 2005, 14: 16–33
- 20 Papagiannopoulos K A, Sheppard M, Bush A P, et al. Pleuropulmonary blastoma: is prophylactic resection of congenital lung cysts effective? *Ann Thorac Surg*, 2001, 72: 604–605
- 21 Miniati D N, Chintagumpala M, Langston C, et al. Prenatal presentation and outcome of children with pleuropulmonary blastoma. *J Pediatric Surgery*, 2006, 41: 66–71
- 22 Feinberg A, Hall N J, Williams G M, et al. Can congenital pulmonary airway malformation be distinguished from Type I pleuropulmonary blastoma based on clinical and radiological features? *J Pediatr Surg*, 2016, 51: 33–37