

Alstrom 综合征患儿 ALMS1 基因突变分析

王丹丹,倪世宁,石 星,刘倩琦*

(南京医科大学附属南京儿童医院内分泌科,江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:采用 DNA 测序法对 Alstrom 综合征患儿进行 ALMS1 基因突变分析,同时分析患者的 ALMS1 基因突变特点。方法:收集临床资料,采用聚合酶链反应扩增 ALMS1 基因的外显子及剪切位点序列,对扩增产物进行测序和序列分析,寻找突变位点。结果:患者临床表现较典型,以婴幼儿期出现视锥-杆细胞性视网膜色素营养不良(最终导致失明)、感音神经性耳聋、躯干型肥胖、胰岛素抵抗、高胰岛素血症及 2 型糖尿病等为主要临床特征。患者的 ALMS1 基因第 9 外显子上发现 c.7664T>A (p.L2555X),理论上这种杂合无义突变会导致蛋白翻译提前终止,第 16 外显子上发现 c.10613~10619AGACdel,为杂合缺失移码突变,理论上这种框移突变导致蛋白质序列明显改变,第 8 外显子发现 c.1570~1574CTCins,纯合插入非移码突变,蛋白危害性未知,可能致病。这 3 种突变类型均未见文献报道。结论:在患者的 ALMS1 基因上发现了 c.7664T>A、c.10613~10619AGACdel 杂合突变及 c.1570~1574CTCins 纯合突变;迄今为止发现的 106 种突变类型,大部分位于 16、8 和 10 外显子,极少数报道有位于 12 和 18 外显子。本例位于第 9 外显子的基因突变,在国内外属首次报道。

[关键词] Alstrom 综合征;肥胖-视网膜-糖尿病综合征;ALMS1 基因;突变

[中图分类号] R725.8

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1378-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20141022

Alstrom 综合征(AS)为一罕见的常染色体隐性遗传病,人群普遍发病率不足百万分之一^[1],无性别差异,常见于近亲婚配^[2],临床表现复杂多样,不同年龄变化较大,但以儿童时期视锥-杆细胞视网膜色素营养不良、感音神经性耳聋、肥胖、胰岛素抵抗、高胰岛素血症、2 型糖尿病及高甘油三酯血症等为主要临床特征。1959 年 Alstrom 等首次报道^[3],迄今已有 500 余例,因对该病认识不足,我国相关报道少见。近年来,国内外学者陆续报道了 AS 患者的 ALMS1 基因突变是该病的致病原因,为该病的诊断提供了分子水平的依据。国内文献多报道其临床特征,对于其基因检测报道少见,目前基因检测验证的突变类型均为无义突变、缺失移码突变^[4],本文对本院 1 例 AS 患儿进行了 ALMS1 基因突变检测。

1 对象和方法

1.1 对象

患儿,女,8 岁 2 个月,因为肥胖、全身皮肤颜色黑就诊。患儿生后 1 周发现视力低下,后进行性加重,现已基本失明;智力发育正常,父母非近亲婚

配,足月顺产,无家族史。既往体质可。查体:BP 136/84 mmHg,体重 52 kg,身高 134 cm,腹围 76 cm,体质指数 28.9 kg/m²,全身皮肤颜色黑,以颈部、腋下、手指关节等部位明显,腋下、颈部伴有粗糙样改变,全身皮下脂肪堆积,双眼视力低下,甲状腺不肿大,双耳听力尚可,两肺呼吸音清,心率 80 次/min,肝脾肋下未及,两侧腰背部未见明显皮肤紫纹,双侧乳房 B2 期,外阴女童式,可见明显色素沉着,无阴毛腋毛生长,无并指(趾)畸形。患者行常规血、尿检查;尿常规:尿隐血 1+,尿葡萄糖 3+。血生化:丙氨酸氨基转移酶(ALT) 90 U/L,天门冬氨酸氨基转移酶(AST) 55 U/L,甘油三酯(TRIG) 2.94 mmol/L,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C):0.72 mmol/L,肾功能正常。OGTT 试验见血糖,120 min 13.65 mmol/L, > 11.1 mmol/L,支持 2 型糖尿病;胰岛素 0 min 124.10 mU/L,峰值 998.9 mU/L,120 min 504.6 mU/L,明显高于正常,提示胰岛素抵抗。皮质醇、促肾上腺皮质激素(ACTH)甲状腺功能及性激素:阴性。心脏彩超:心内结构及功能未见异常。ROP 眼底筛查:①视乳头色红,境界清,网膜血管纤细,广泛白点状改变,黄斑区见黑色素沉着;②视网膜病变。视觉诱发电位:双侧单眼全野异常闪光视觉诱发电位。听觉诱发电位:ABRV 波阈值(ABR 客观听阈):左侧 70 dBpeSPL(相当 35 dBHL);右侧 65 dBpeSPL(相当 30 dBHL)。腹

[基金项目] 南京市青年人才工程基金(QRX11051)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:18951769617@163.com

部 B 超:脂肪肝。左手骨龄:相当于 11 岁。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

在知情同意的前提下,采集患者 EDTA 抗凝血进行基因分析。

1.2.2 基因扩增

取患者新鲜全血,使用 BloodGen Midi Kit (CW-BIO,北京) 提取患者全基因组 DNA,操作按照试剂

盒说明书进行。根据 ALMS1 基因的单点序列设计引物,采用 PCR 方法进行扩增。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,50~55℃ 退火 30 s,72℃ 链延伸 1 min,扩增 30 个循环;最后 72℃ 补充延伸 10 min。PCR 的体系均为 50 μl。引物序列见表 1。

1.2.3 基因序列分析

ALMS1 基因单点的 PCR 扩增产物,用 ABI 3730XL 测序仪测序,测序引物采用原 PCR 引物。基因

表 1 ALMS1 基因单点分析引物序列

引物名称	碱基序列(5'→3')	退火温度(℃)	扩增产物大小(bp)
ALMS1-1-F	CTATAGAGCATGACTTAAGAAAATCAGAC	50	417
ALMS1-1-R	ATGCCCAAGTAAGAGATCCTAATTCCA		
ALMS1-2-F	AGTTTTACATTTCATCATCCCGTACACC	55	472
ALMS1-2-R	TTCTGAAGAATTTTACGCAAACGAT		
ALMS1-3-F	AGGCATAGCTAAAGTTACTCAATCCAA	55	547
ALMS1-3-R	AGAGGATACTGTAGGTATTCCCGTC		

序列分析采用 DNASTAR 软件进行序列分析和比对。

上述基因扩增及序列分析均由北京德易东方转化医学研究中心有限公司完成。

2 结果

采用 DNASTAR 软件进行序列分析和比对 (图

1~3),发现患儿患者的 ALMS1 基因第 9 外显子上发现杂合 c.7664T > A(p.L2555X),使第 2 555 位密码子转变为终止密码子(AAG→TAG),虽未见文献报道,但理论上这种无义突变会导致蛋白翻译提前终止;第 16 外显子上发现杂合 c.10613~10619A-GACdel 缺失移码突变,虽未见文献报道,但理论上

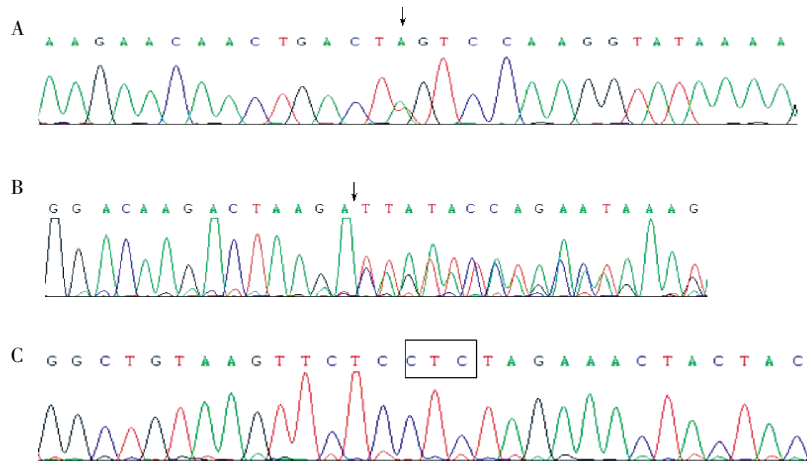


图 1 ALMS1 基因测序结果
A: 患儿位于第 9 外显子新的无义突变 c.7664T>A(箭头示突变位点);B: 患儿位于第 16 外显子缺失移码突变 c.10613~10619AGACdel(箭头示缺失位点);C: 患儿位于第 8 外显子插入非移码突变 c.1570~1574CTC ins(方框示插入片段)但蛋白危害性尚未知,可能致病。

图 1 ALMS1 基因测序结果

这种框移突变导致蛋白质序列明显改变;第 8 外显子发现纯合 c.1570~1574CTCins 插入非移码,未见文献报道,但蛋白危害性未知,可能致病。

3 讨论

AS 常累及多个系统,临床表现复杂多样,不同

年龄阶段临床特征不同,例如,儿童期主要表现为在婴儿期出现视锥-杆细胞性视网膜色素营养不良(最终导致青春期失明)、轻到中度神经感音性耳聋、肥胖、高胰岛素血症、胰岛素抵抗。在某些病例中,因为扩张型心肌病(DCM),婴儿期表现充血性心力衰竭(CHF),在青春期更多的以 2 型糖尿病、高

甘油三酯血症、青春期发病的 DCM 等为主要表型。成年后,身材矮小、脊柱侧凸、脱发、男性性腺功能减退症、女性雄激素过多症可能陆续出现。患者智力发育多正常,但有精神运动发育不良。肝脏、肺及肾脏等病变不断进展,也报道多器官出现纤维化^[5]。另外有合并尿崩症、甲状腺功能减低症、黑棘皮病等表现。

AS 初步诊断依赖于临床特征^[6],鉴于临床表现具有的共性,应除外 Bardet-Biedl 综合征^[7],又称为性幼稚-色素性视网膜炎-多指畸形综合征,以肥胖、智力低下、多指(趾)或并指(趾)畸形、色素性视网膜炎致视力进行性减退、性腺发育不良等为特征的一种罕见的常染色体隐性遗传性疾病,本例患儿无智力低下、无多指(趾)或并指(趾)畸形,为主要鉴别点,暂不支持该病。在婴幼儿期、早期儿童时期,患者出现视力低下等,容易误诊为色素性视网膜炎、Leber 先天性黑矇、全色盲,这类患者需要密切随诊,如果有其他典型临床表现出现,需重新判断病情。但 AS 确诊依赖于 ALMS1 的基因检测^[6]。

ALMS1 基因是唯一确定与 AS 发病相关的基因,定位于 2p13,包含 23 个外显子,编码由 4 169 氨基酸组成分子量大约 461 200 的蛋白质^[8]。ALMS1 广泛表达于中枢神经系统、光感受器、内分泌系统、体外循环系统及泌尿生殖系统的纤毛细胞中心体和基底部,在鞭毛运输及维持纤毛细胞功能中起着重要作用^[9]。目前为止,全球已鉴定有 106 种致病性基因突变^[10],包括无意义突变(55%)、插入缺失(42%)、复杂移码突变及剪接位点突变(3%),可导致不成熟蛋白早期截断。大部分的突变聚集在 ALMS1 基因外显子 16(41%)、10(27%)、8(25%)^[10],也有少数报道突变位于外显子 12、18^[1]。根据 50%英文报道指出,最常见的 ALMS1 突变是位于 16 外显子的 c.10775delC^[4]。此外,有报道指出 10535 ins(n)19 常见于法国的阿卡迪亚人^[10]。国内有关于 ALMS1 基因突变报道少见,首次报告^[11]突变类型是位于第 10 外显子 c.8335 C > T (Q2471X)纯合无义突变,此后又陆续报道 9 例突变类型^[4],分别为插入缺失突变、无义突变,其中 3 例位于第 8 外显子(c.7436C>G p.S2479X、c.2084C>A p.S695X、c.2064delT p.H688HfsX);3 例位于第 10 外显子(c.9448insA p.N3150Kfs2X、c.9460delGp.V3154Xfs、c.9441_9442insAATAp.Q3147Qfs2X);3 例位于第 16 外显子(c.11015delAp.N3672Ifs11X、c.11107C>Tp.R3703X、c.10883insGp.R3611Efs7X)。

本文患儿 c.7664 T > A(p.L2555 X),为无义突

变,位于第 9 外显子,导致 2 555 位密码子变为终止密码子,导致蛋白翻译提前终止,生成只包含 2 554 个氨基酸截短蛋白,位于第 9 外显子的基因突变类型报道在国内外各种族人群中首次报道。位于第 16 外显子杂合 c.10613~10619AGACdel 突变为缺失移码突变,理论上这种框移突变导致蛋白质序列明显改变,导致疾病发生。第 8 外显子发现纯合 c.1570~1574CTCins 为插入非移码突变类型,蛋白危害性未知,可能致病。这 3 种突变类型均未在文献报道中出现过,增加了 ALMS1 基因致病突变型总体数量。

根据本例患儿出现的典型临床特征,及基因检测结果,可明确诊断为 Alstrom 综合征,基因测序为患者提供明确诊断起着重要作用,同时可为遗传咨询和医学随访提供珍贵的遗传学资料。期待随着基因定位、检测等技术的进一步发展,会有新的治疗方法出现。

[参考文献]

- [1] Marshall JD, Hinman EG, Collin GB, et al. Spectrum of ALMS1 variants and evaluation of genotype-phenotype correlations in Alstrom syndrome [J]. *Hum Mutat*, 2007, 28(11):1114-1123
- [2] Aldahmesh MA, Abu-Safieh L, Khan AO, et al. Allelic heterogeneity in inbred populations; the Saudi experience with Alstrom syndrome as an illustrative example [J]. *Am J Med Genet A*, 2009, 149A(4):662-665
- [3] Alstrom CH, Hallgren B, Nilsson LB, et al. Retinal degeneration combined with obesity, diabetes mellitus and neurogenous deafness; a specific syndrome (not hitherto described) distinct from the Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome; a clinical, endocrinological and genetic examination based on a large pedigree [J]. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl*, 1959, 129(1):1-35
- [4] Liang X, Li H, Li H, et al. Novel ALMS1 mutations in Chinese patients with Alstrom syndrome [J]. *Mol Vis*, 2013, 19():1885-1891
- [5] Marshall JD, Bronson RT, Collin GB, et al. New Alstrom syndrome phenotypes based on the evaluation of 182 cases [J]. *Arch Intern Med*, 2005, 165(6):675-683
- [6] Marshall JD, Beck S, Maffei P, et al. Alstrom syndrome [J]. *Eur J Hum Genet*, 2007, 15(12):1193-1202
- [7] Kute VB, Vanikar AV, Gumber MR, et al. Bardet-biedl syndrome; a rare cause of chronic kidney disease [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2013, 28(2):201-205
- [8] Marshall JD, Maffei P, Collin GB, et al. Alstrom syndrome; genetics and clinical overview [J]. *Curr Genomics*, 2011, 12(3):225-235
- [9] Collin GB, Marshall JD, King BL, et al. The Alstrom

- syndrome protein,ALMS1,interacts with alpha-actinin and components of the endosome recycling pathway[J]. PLoS One,2012,7(5):e37925
- [10] Marshall JD,Maffei P,Beck S,et al. Clinical utility gene card for:Alstrom Syndrome-update 2013 [J]. Eur J Hum Genet, 2013,[Epub ahead of print]
- [11] Liu L,Dong B,Chen X,et al. Identification of a novel ALMS1 mutation in a Chinese family with Alstrom syndrome[J]. Eye (Lond),2009,23(5):1210-1212
- [收稿日期] 2014-04-19

(上接第 1375 页)

[参考文献]

- [1] Guo WA,Knight PR,Raghavendran K. The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. Intensive Care Med,2012,38(10):1588-1598
- [2] Christie JD,Shah CV,Kawut SM,et al. Plasma levels of receptor for advanced glycation end products,blood transfusion,and risk of primary graft dysfunction[J]. Am J Respir Crit Care Med,2009,180(10):1010-1015
- [3] Tian Z,Li Y, Ji P, et al. Mesenchymal stem cells protects hyperoxia-induced lung injury in newborn rats via inhibiting receptor for advanced glycation end-products/nuclear factor kappaB signaling[J]. Exp Biol Med (Maywood),2013,238(2):242-247
- [4] 邵肖梅,叶鸿瑁,丘小汕. 实用新生儿学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2011:628-639
- [5] Smith VC,Zupancic JA,McCormick MC,et al. Rehospitalization in the first year of life among infants with bronchopulmonary dysplasia[J]. Pediatr,2004,144(6):799-803
- [6] Vrijlandt EJ,Boezen HM,Gerritsen J,et al. Respiratory health in prematurely born preschool children with and without bronchopulmonary dysplasia[J]. Pediatr,2007,150(3):256-261
- [7] Halvorsen T,Skadberg BT,Eide GE,et al. Pulmonary outcome in adolescents of extreme preterm birth;a regional cohort study[J]. Acta Paediatr,2004,93(10):1294-1300
- [8] Vrijlandt EJ,Gerritsen J,Boezen HM,et al. Gender differences in respiratory symptoms in 19-year-old adults born preterm[J]. Respir Res,2005,6:117
- [9] Jing R,Cui M,Wang J,et al. Receptor for advanced glycation end products(RAGE) soluble form(SRAGE)a new biomarker for lung cancer[J]. Neoplasma,2010,57(1):55-61
- [10] Herold K,Moster B,Chen Y,et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone awry in the primal response to stress[J]. Leukoc Biol,2007,82(2):204-212
- [11] 田兆方,张志敏,李玉红,等. GMCSF 对高氧暴露新生大鼠肺组织 RAGE—NF— κ B 通路的影响[J]. 中华医学杂志,2011,91(30):2143-2147
- [12] Calfee CS,Ware LB,Eisner MD,et al. Plasma receptor for advanced glycation end products and clinical outcomes in acute lung injury[J]. Thorax,2008,63(12):1083-1089
- [收稿日期] 2014-07-07