

一组家族遗传性疾病全基因组测序的分析报告

孔竹青¹,倪磊²,朱森³,卢文祥³,白云飞⁴,张志群^{2*}

(¹南京市红十字医院神经内科,江苏 南京 210001;²南京医科大学附属南京儿童医院骨科,江苏 南京 210008;³南京迪康金诺生物技术有限公司,江苏 南京 210019;⁴东南大学生物科学与医学工程学院,江苏 南京 210096)

[摘要] 目的:临床上发现一组特殊病例,一个家族 4 代人中均发现有同一种神经肌肉性疾病的患者,症状具体表现为上肢肘关节有不同程度的伸直受限,下肢踝关节似马蹄样畸形,足部高弓畸形、无明显内翻内收现象。本研究拟通过全基因组测序,探讨其发病的致病基因及分子机制。方法:利用高通量测序技术,分别对患儿、具有相似症状的患儿父亲及健康母亲的血液样本进行全基因组测序。利用生物信息学分析筛选疾病相关基因突变,并进一步收集该家族中的其他患病及健康成员的血液样本,利用 PCR 技术进行验证。结果:生物信息学分析发现一系列突变基因,包括 ANXA3 基因突变[chr4,c.C820T(p.R274*)]、ATP6V1E2 基因突变[chr2,c.G136A(p.V46M)]和 HIST1H3A 基因突变[chr6,c.C205T(p.Q69*)]等。基于家族更多成员血液样本的 PCR 实验结果进一步证实,ANXA3 为该疾病潜在的致病基因,突变可导致其蛋白质高级结构的改变,可能与该疾病发生有关。结论:本研究为从分子水平上了解该家族遗传性疾病的发生提供了一定的理论参考。

[关键词] 家族遗传性疾病;全基因组测序;ANXA3 基因;突变

[中图分类号] R746

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)12-1757-04

doi:10.7655/NYDXBNS20151220

Analysis of whole-genome sequencing report of a family with genetic disease

Kong Zhuqing¹, Ni Lei², Zhu Miao³, Lu Wenxiang³, Bai Yunfei⁴, Zhang Zhiqun^{2*}

(¹Department of Internal Neurology, Nanjing Red Cross Hospital, Nanjing 210001; ²Department of Orthopaedic, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008; ³Nanjing Decode Genomics Biotechnology Co Ltd, Nanjing 210019; ⁴School of Biological Sciences and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China)

[Abstract] **Objective:** We found a special case in clinic; 4 generations in a family were detected neuromuscular disorders. The symptoms included the upper elbows had different degrees of limited straight, lower limbs showed equines deformity, and feet were talipes cavus and were not detected obvious varus and adduction. This research aimed to study genetic mutation and molecular mechanism in crucial gene using whole-genome sequencing. **Methods:** Blood samples from sick child, father with the similar symptom and healthy mother were used to perform whole-genome sequencing by high-throughput sequencing technique. Bioinformatic analysis was used to filter gene mutations associated with disease. Further PCR validations were performed using blood samples from patients and healthy relatives in the family. **Results:** A series of gene mutations were obtained based on bioinformatics, including ANXA3 gene mutation (chr4, c.C820T(p.R274*)), HIST1H3A gene mutation (chr 6, c.C205T(p.Q69*)) and MTHFR gene mutation (c.T784C(p.Y262H)). PCR validation using blood samples from the family indicated that ANXA3 may be potential causing gene, and the mutation led to change of three-dimensional structure of ANXA3 protein. **Conclusion:** These results implicated that the ANXA3 may be related with the occurrence of the disease. This study provides certain reference for further understanding the genetic disease from the molecular levels.

[Key words] inherited disease; whole-genome sequencing; ANXA3 gene; mutation

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(12): 1757-1760]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(61271054);南京医科大学科技发展基金重点项目(2013NJMU095)

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

遗传性神经肌肉病是以运动功能障碍为主要临床特征的一组遗传性疾病^[1]。临床上发现一组家族遗传性神经肌肉疾病的患者,在该家族中连续 4 代人均发现有类似症状患者,具体表现为上肢肘关节有不同程度的伸直受限,下肢踝关节似马蹄样畸形,足部高弓。这种类型的家族遗传性神经肌肉疾病国内目前尚未见相关报道。

随着基因检测技术的迅速发展,与遗传性神经肌肉病相关基因以及基因的新突变位点已逐渐被发现。比如,PMP22 基因是腓骨肌萎缩症的致病基因^[2]。该基因编码一种髓鞘蛋白,该基因的重复突变是导致腓骨肌萎缩症最常见、最主要的致病原因。MTHFR 基因突变则可能与马蹄足内翻的产生有关^[3]。根据所收集的样本情况,本研究选择了患儿、具有相似临床症状的父亲以及健康母亲的血液样本开展了全基因组测序(健康母亲和该家族无直接血缘关系,因此以其基因组作为对照,以全面扫描患者基因突变谱)。对患者基因组中所筛选的候选突变位点,进一步在其他家族成员中进行实验验证,以筛选该疾病的可能致病基因,为进一步从分子水平上了解该疾病以及为该家系提供遗传咨询与产前诊断服务提供理论参考。

1 对象和方法

1.1 对象

患者,男,12 岁,江苏句容人。患儿系第一胎第一产,足月顺产,出生时无产伤窒息史。母亲身体健康,父亲、爷爷有肘部、足部症状。患儿本人肘部症状较轻,足部症状较父亲、爷爷严重。主要表现为上肢肘关节伸肘受限约 10°,屈肘活动正常,前臂旋前、旋后无明显受限。双下肢外观主要表现为:双下肢外观呈马蹄足畸形,踝关节处跖屈位,能够主动活动踝关节,活动度背伸-20°受限,跖屈 60°受限。双足跟腱紧张,内外翻不明显,双足呈高弓畸形。双下肢肌力、肌张力正常。实验室检查显示,双下肢神经肌电图未见明显异常,足部诸骨 X 线检查未见明显骨质异常。血液检查发现丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、磷酸肌酸激酶等正常,尿素氮、尿酸、肌酐正常,血电解质钾、钠、氯、钙等均正常。该家族中,通过直接检查和口述的方法对家系中所有相关成员进行病史采集,以了解该家系中成员的患病情况。结果发现在现有 4 代人中,均有相似症状的患者(图 1),且并未有明显的性别差异(男女患者均有)。尽管一些亲属中也具有相

似症状,但症状程度不同,一些患者的临床症状非常轻微,几乎不影响正常生活。

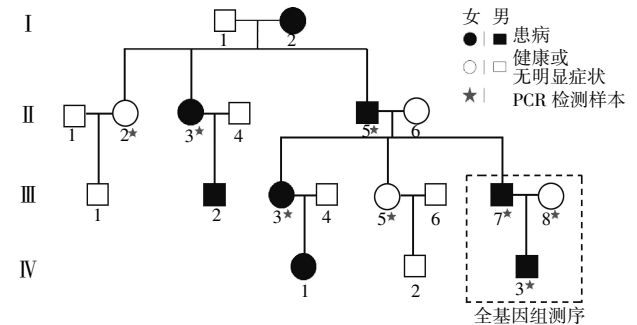


图 1 患有特殊遗传性病例的家系

Figure 1 Pedigree of the family with specific genetic disease

1.2 方法

1.2.1 样本收集及基因组 DNA 的提取

采集患儿、具有相似症状的患儿父亲、健康母亲的血样,并收集该家族其他患病及无症状成员的外周静脉血 2~5 mL(共 3 代 8 个人的血样,包括患病 5 例,无症状 3 例),加入 0.2 mL 的 ACD 抗凝,充分混匀,用于提取基因组 DNA。

利用外周血细胞基因组 DNA 提取试剂盒(Qiagen 公司,美国)提取 DNA,用 Nanodrop2000 测定的 260 nm 与 280 nm 的比值来确定 DNA 的纯度和浓度,以备测序及 PCR 检测用。

1.2.2 全基因组测序及分析

所提取的高质量的患者、患儿父亲及母亲的 DNA,在无锡药明康德进行测序,所使用测序平台为 Illumina HiSeq X10。去除低质量的测序片段后,利用 BWA v0.7.5a-r405 匹配人基因组序列 hg19 (UCSC version hg19)^[4]。以患儿健康母亲的基因组测序数据为对照,筛选患儿及患病父亲的基因突变谱,以进一步筛选疾病发生相关的候选致病基因。

1.2.3 引物设计及 PCR 验证

根据 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) 注册的候选基因序列,设计用于扩增突变位点的引物,引物序列见表 1。具体扩增条件是:95°C 预变性 4 min,30 个循环的“95°C 变性 30 s,退火 30 s,72°C 延伸 1 min;最后再 72°C 延伸 10 min。扩增产物经 QIAEX II Gel extraction kit (Qiagen 公司,美国)纯化后,进行测序分析(ABI 3730, Applied Biosystems 公司,美国)。

1.2.4 候选基因蛋白质结构预测

通过生物信息学分析及实验验证的候选致病基因,进行进一步的蛋白质结构分析,以了解突变可能

表 1 候选基因突变位点引物信息
Table 1 Primers used in the study

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
ANXA3	CTATGTTGCTTTGTGACCAATGAC	AGTAAGGAGATGGGTAGAGAAGGG
ATP6V1E2	ATTGCCAGTGAACCAAGCC	TGTGTGTAGACATGTGTACAAAAGAGG
HIST1H3A	ACTAAGGCAGCCCGCAAAG	CTCTGGAAACGCAGTCTGT

造成的结构及功能影响。利用 GenBank 数据库获得注释的候选基因序列,结合测序及 PCR 验证的具有突变位点的序列,利用在线软件 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)^[5] 和 SWISS-MODEL^[6] 在线预测候选正常基因和具突变位点基因的蛋白质高级结构,以推断突变位点对蛋白质结构的影响。

2 结果

2.1 基因突变谱概况

生物信息学分析发现,测序数据的平均覆盖度大于 38x,共检测到 80 243 个突变位点。这些突变位点可能是位于外显子区域的同义或非同义突变,或者位于 3'或 5'的非翻译区。初步过滤除去未在患儿及患病父亲基因组中共享的位点、突变纯合子、低覆盖度以及等位基因频率大于 0.1%的突变,共获得 590 个突变位点,进而筛选 288 个位点为非同义突变,19 个位点至少在两种及以上的预测工具中检测到,其中,8 个突变位点被鉴定为疾病相关的候选致病基因:ANXA3 [chr4,c.C820T (p.R274*)]; ATP6V1E2 [chr2,c.G136A (p.V46M)]; HIST1H3A [chr 6,c.C205T (p.Q69*)]; MTHFR [chr1,c.T784C (p.Y262H)]; NOL10 [chr2,c.G6C(p.Q2H)]; SLC25A12

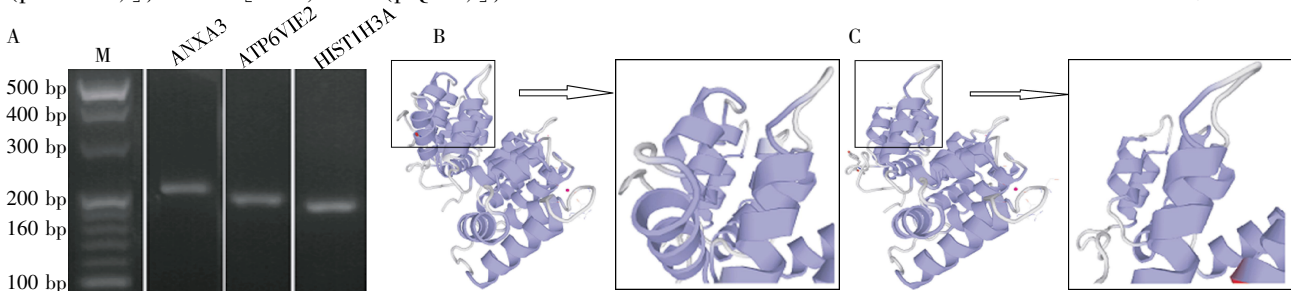
[chr2,c.C1973T (p.P658L)]; SSPO [chr7,c.C7784A (p.P2595H)]; SSPO [chr7,c.G8894A (p.C2965Y)]。选择 ANXA3、ATP6V1E2 和 HIST1H3A 基因在该家族成员中进行进一步的 PCR 验证,以确认该特殊疾病的可能致病基因。

2.2 基因突变检测结果

3 个候选致病基因突变,在该家族中的 8 个成员中进行 PCR 检测确认(图 1,图 2A),患儿母亲为健康人,其他家族成员或者是诊断为具有不同程度病症的患者,或者是不影响正常生活的潜在患病者,或者确为健康人。这些候选致病基因是基于健康母亲筛选的,在 8 个家族成员中进行验证,发现具有不同的基因型(表 2)。比如,ATP6V1E2[chr2,c.G136A (p.V46M)] 和 HIST1H3A [chr 6,c.C205T (p.Q69*)], 这两个基因突变并未在大多数患者中检测到(表 2)。

ANXA3 基因突变除了在患病者血液样本中检测到,也在一个未有明显症状的家族成员中检测到,而该成员可能也是潜在的疾病患者,只是其症状轻微不影响正常生活,因而被诊断为“健康人”。因此,推测该 ANXA3 基因突变可能与家族的遗传疾病密切相关。

2.3 候选基因 ANXA3 蛋白质三维结构分析



A: 3 个候选基因的 PCR 鉴定结果; B: 正常 ANXA3 蛋白质三维结构; C: 具突变位点 ANXA3 蛋白质三维结构。

图 2 PCR 及 ANXA3 蛋白三维结构

Figure 2 PCR identification results and protein structure of ANXA3

表 2 候选基因突变的 PCR 验证结果

Table 2 PCR validation of some candidate gene mutations

基因名称	II 2	II 3	II 5	III 3	III 5	III 7	III 8	IV 3
ANXA3[chr4, c.C820T(p.R274*)]	C/C	C/C	C/T	C/T	C/T	C/T	C/C	C/T
ATP6V1E2[chr2, c.G136A(p.V46M)]	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/T
HIST1H3A[chr6, c.C205T(p.Q69*)]	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/T	C/C	C/T

III 8 为健康人,和该家族无直接血缘关系; II 2 和 III 5 为家族中未检测到明显症状的健康人。

通过 SWISS-MODEL 构建正常 ANXA3 基因的蛋白质三维结构, 以及具有突变位点的 ANXA3 基因的蛋白质三维结构, 结果显示该突变位点存在氨基酸排列顺序有侧链-环状或环状-侧链的改变, 推测继而引起蛋白质高级结构的变异(图 2)。

3 讨论

本文所报道的患儿在出生后症状并不明显, 区别于先天性马蹄内翻足, 患儿出生后并无明显前足内收、跟骨内翻、踝关节马蹄样畸形。患儿症状随年龄增长而渐明显, 就诊时踝关节马蹄样畸形明显, 足部高弓畸形明显, 行走时双足足跟已完全不能着地。类似病例, 尤其是家族 4 代人中均有相似症状的患者(图 1), 目前临床上尚属罕见, 国内外也未见相关报道。因此, 为进一步了解该疾病的发生发展过程, 本研究利用高通量测序技术及 PCR 技术, 拟从分子遗传学角度, 发现潜在的致病基因, 为进一步从分子层面上了解该疾病的发生发展以及产前诊断等提供理论参考。

经过生物信息学分析及实验验证, 选择了 ANXA3、ATP6V1E2 和 HIST1H3A 基因利用 PCR 技术在更多的患病或健康的家族成员血样中进行验证。PCR 结果表明, ANXA3 基因是该家族所患特殊疾病的潜在的致病基因(表 2)。尽管其基因突变也在一个未有明显症状的家族成员中检测到(编号为 6 的成员), 但该成员可能是潜在的疾病患者, 只是其症状轻微, 且不影响正常生活, 因而认为是“健康人”。而该疾病具有不同程度症状的表现, 正是该家族症状最突出的表现之一。因此, 推测该 ANXA3 基因突变可能与家族的遗传疾病密切相关, 而被鉴定为潜在的该家族特殊疾病的致病基因(表 2)。膜联蛋白 A3(Annexin A3, ANXA3)为膜联蛋白家族中的一员, 属于 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 广泛分布在动植物的各种组织和细胞之中。大多数膜联蛋白属于胞内蛋白, 可参与一系列依赖于钙离子的膜性生物学活动。其异常表达与许多癌症发生发展有密切关系, 包括卵巢癌、肺腺癌、前列腺癌、肝癌及肾癌等^[7], 且在促进淋巴道转移方面发挥作用, 但是其具体机制尚不清楚。有研究表明, 膜联蛋白 A2 可对大鼠背根神经节 TRPV4 进行调控, 而 TRPV4 参与 DRG 神经元介导的疼痛信号转导过程^[8-9]。本研究发现, ANXA3 基因突变 [chr4, c.C820T(p.R274*)] 可导致相应蛋白质结构的改变(图 2), 本文推测该结构

的改变, 可能改变了该蛋白与其他分子的结合, 从而引起了相关通路的改变, 进而引发一系列肘部及足部的症状。同时, 该位点在其 DNA 及 RNA 序列上的改变, 也可能导致在调控方面的改变, 从而影响该基因的正常表达甚至蛋白质水平的富集等, 因此贡献于症状的出现及进一步发展。然而, 该突变所引致的结构改变是否在该疾病发生发展中具有重要作用, 尤其是相应功能的改变, 尚需进一步深入研究。

该突变的发现, 特别是进一步的功能研究, 使给该家系提供遗传咨询与产前诊断服务成为可能, 也为预防患儿出生缺陷及提高人口质量提供了保障。

[参考文献]

- [1] Johnson NE, Sowden J, Dilek N, et al. Prospective study of muscle cramps in Charcot-Marie-tooth disease [J]. *Muscle Nerve*, 2015, 51(4):485-488
- [2] Watila MM, Balarabe SA. Molecular and clinical features of inherited neuropathies due to PMP22 duplication [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 355(1-2):18-24
- [3] Sharp L, Miedzybrodzka Z, Cardy AH, et al. The C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR), maternal use of folic acid supplements, and risk of isolated clubfoot: A case-parent-triad analysis [J]. *Am J Epidemiol*, 2006, 164(9):852-861
- [4] Meyer LR, Zweig AS, Hinrichs AS, et al. The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2013 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D1):D64-D69
- [5] Chen Y, Yu P, Luo J, et al. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT [J]. *Mamm Genome*, 2003, 14(12):859-865
- [6] Marco B, Stefan B, Andrew W, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014(), 42(W1):W252-W258
- [7] Tong M, Fung TM, Luk ST, et al. ANXA3/JNK signaling promotes self-renewal and tumor growth, and its blockade provides a therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 5(1):45-59
- [8] Wang J, Wang XW, Zhang Y, et al. Ca^{2+} influx mediates the TRPV4-NO pathway in neuropathic hyperalgesia following chronic compression of the dorsal root ganglion [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 588:159-165
- [9] Charrua A, Cruz CD, Jansen D, et al. Co-administration of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and TRPV1 antagonists potentiate the effect of each drug in a rat model of cystitis [J]. *BJU Int*, 2015, 115(3):452-460

[收稿日期] 2015-07-29