

全基因组外显子测序捕获黏多糖贮积症Ⅶ型的致病基因 GUSB*

孙玲玲¹, 喻祥奇², 朱 鹏³, 戴 勇³, 韦晓莲³, 任景慧⁴, 袁 红^{4△} (1. 广东省深圳市坪山新区妇幼保健医院妇产科 518118; 2. 广东省深圳市人民医院/暨南大学第二临床医学院临床医学研究中心 518020; 3. 广东省深圳市坪山新区人民医院中心实验室 518118; 4. 广东省深圳市人民医院妇产科 B 超室 518020)

【摘要】 目的 鉴定黏多糖贮积症Ⅶ型患者的致病基因, 为产前诊断提供新的方法。方法 应用全基因组外显子组技术捕获该患者致病基因, 结合现代生物信息学方法, 采用 Sanger 测序验证基因突变位点是否存在该患者家系成员和健康人基因组内。结果 发现该患者基因 β -葡萄糖醛酸酶(GUSB) (g. 65444706G>A) 突变, 健康人未见该突变, 该碱基的突变导致苏氨酸变成丝氨酸, 从而导致 GUSB 活性缺乏或 GUSB 量的不足。结论 基因 GUSB (g. 65444706G>A) 突变是该患者的致病基因, 全基因组外显子测序能解决传统定位克隆技术常常面临该病家系患者太少、病例散发、基因位点的异质性、外显不全及候选基因太多等难题, 为该病产前诊断提供了新的途径。

【关键词】 Ⅶ型黏多糖贮积病; 致病基因; 全基因组外显子测序

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 07. 008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)07-0883-02

Whole genome exome sequencing for capturing GUSB pathogenic gene of mucopolysaccharidosis Ⅶ* SUN Ling-ling¹, YU Xiang-qi², ZHU Peng³, DAI Yong³, WEI Xiao-lian³, REN Jing-hui⁴, YUAN Hong^{4△} (1. Pingshan New District Maternal and Child Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518118, China; 2. Clinical Medicine Research Center, Shenzhen Municipal People's Hospital/Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen, Guangdong 518020, China; 3. Central Laboratory, Pingshan New District Maternal and Child Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518118, China; 4. B-type Ultrasound Room, Department of Gynecology and Obstetrics, Shenzhen Municipal People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

【Abstract】 Objective To identify the pathogenic gene of the patients with mucopolysaccharidosis Ⅶ (MPS Ⅶ) to provide a new method for the prenatal diagnosis. Methods The whole genome exome technology was applied to capture the pathogenic gene of the patients; by combining with the methods of modern bioinformatics, the Sanger sequencing was used to verify whether the gene mutation locus existing in the genome of the patient's family members or the normal people. Results The β -glucuronidase (GUSB) (g. 65444706G>A) gene mutation existed in the patients, but the normal ones had no this mutation. The mutation of the base caused threonine changing to aserine, and thus led to the absence of GUSB activity or the insufficiency of GUSB amount. Conclusion The GUSB gene (g. 65444706G>A) mutation is the pathogenic gene in this patients. The whole genome exome sequencing can solve many problems of the traditional positional cloning technology, such as too few of the patients in the family members of this disease, sporadic cases, heterogeneity of the genetic locus, incomplete exon and too many candidate genes, which provides new approach in the prenatal diagnosis of this disease.

【Key words】 mucopolysaccharidosis Ⅶ; pathogenic gene; whole genome exome sequencing

黏多糖贮积症Ⅶ型(MPS Ⅶ)是溶酶体贮积症中非常重要的一类, 是一种先天性常染色体隐性遗传病, 发病率为 1/84 000~1/130 000^[1]。MPS Ⅶ是由于人体细胞的溶酶体内降解黏多糖的水解酶发生突变导致其活性丧失, 黏多糖不能被降解代谢, 最终贮积在体内而发生的疾病^[1]。最常见的表型为生长缓慢、智力低下、活动障碍、复合性骨发育不良、身材矮小、面部畸形、肝脾肿大、角膜混浊、心瓣膜异常等^[2-3]。MPS Ⅶ临床表现多样, 病情的发展具有进行性加重的特点。其中因黏多糖积聚于心瓣膜引发的心脏病是 MPS Ⅶ患者死亡的最主要

病因。酶替代治疗可用 MPS Ⅶ的治疗, 但费用高昂难以普及, 早期产前诊断、宫内干预是减少 MPS Ⅶ患儿出生的关键, 现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 先证者, 男, 8 岁, 智力低下, 发育迟缓, 走路不稳, 前额凸眉毛厚重, 眼眶较宽, 鼻梁低, 呼吸粗, 睡眠打呼噜, 角膜稍混浊, 目光呆滞, 视力较弱, 口型宽大, 牙齿稀疏, 颈短脖粗。心瓣膜异常, 肝脾肿大。经询问其父母身体健康, 近亲结婚, 妊娠期无感染和药物接触史, 家族中无类似病史。临

* 基金项目: 广东省科技计划资助项目(2013B060400011); 广东省深圳市科技创新委员会资助项目(JCYJ20140415114652629); 广东省深圳市坪山新区孵化基金资助项目(201320)。

作者简介: 孙玲玲, 女, 本科, 主任医师, 主要从事出生缺陷的产前诊断及遗传咨询。 △ 通讯作者, E-mail: gdszpsrmyy@163. com。

床诊断为黏多糖贮积症Ⅶ型。

1.2 方法

1.2.1 全基因外显子组捕获及测序 提取先证者外周血 DNA 并随机打断,将片段化的 DNA 分子在酶的作用下补齐黏性末端而成为平末端,连接接头,通过商业化的外显子序列捕获芯片捕获目标外显子区域,然后对捕获的目标片段进行扩增,末端补平及加“A”碱基,连接测序接头,最后应用 Solexa HiSeq 2000 测序,样本测序深度不低于 50×。

1.2.2 信息学分析 (1)对测序结果进行图像识别,去除污染及接头序列,统计测定的序列长度、数量和数据产量;(2)比对参考基因组,并对数据进行质控、单个核苷酸的变异检测(SNP)、插入缺失位点检测(InDel),注释及统计;(3)对得到的突变进行共有突变筛选,人类单体型图(HMM)分析,氨基酸保守性预测(SIFT 软件),基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析基因功能,得到候选基因突变列表,ANNOVAR 软件预测可能有有害的突变和 GERP 软件评分对候选基因的危害性进行排名。

1.2.3 候选基因验证 选择核心家系成员 3 例、随机抽取健康人群 100 例,提取外周血 DNA,应用 Sanger 测序验证基因突变位点是否存在家系成员和健康人基因组内。

2 结果

全基因组外显子测序结果经人类基因组 dbSNP129,国际人类基因组单体型图计划(简称 HapMap 计划)外显子组数据,1 000 例基因组计划和正常对照的外显子组数据筛选后,该患者候选基因还剩 1 615 个错义突变和 297 个缺失。接下来,本研究应用 ANNOVAR 软件预测可能有有害的突变位点将候选基因的范围缩小,进一步使用 GERP 评分对候选基因的危害性进行排名,并聚焦国内外已报道的人、鼠和 MPS Ⅶ致病基因,已报道基因 β-葡萄糖醛酸酶(GUSB)与 MPS Ⅶ有关,首先推测候选基因 GUSB (Chr7:65444706;NC_000007.13:g.65444706G>A)可能与 MPS Ⅶ相关,而该基因全基因组外显子测序深度合格。采用传统 Sanger 测序进行验证,未发现候选基因 GUSB (13:g.65444706G>A)突变位点存在该家系核心成员和随机抽取的 100 例健康人群中,该碱基的突变导致苏氨酸变成丝氨酸,从而导致 GUSB 活性缺乏或 GUSB 量的不足。

3 讨论

MPS Ⅶ一种以黏多糖代谢障碍为特点的先天性性疾病,是某个或某些黏多糖降解所必需的溶酶体酶活化发生突变而引起的酶缺乏所致,最常见的是 GUSB 活性缺乏或 GUSB 量的不足^[4],可造成骨骼、内脏、角膜和智力上的异常。因缺陷的酶不同,受累的器官不同,有不同的临床表现,随着年龄增长,病情进行性加重^[5-6]。尿液黏多糖检测及外周血酶学分析可协助诊断,但这些传统方法易受其他生物化学物质的干扰,影像结果的准确性,传统酶学诊断方法存在一定局限性,对携带者还不能达到准确诊断,造成临床的误诊或漏诊。目前,有学者通过家系调查及微卫星 DNA 标记、连锁分析等方法发现了 GUSB 突变与 MPS Ⅶ有关,突变种类包括点突变、缺失和插入等,这个基因多个突变位点在不同的人种中均有发现,缺乏突变热点,其基因频率及发病率尚不清楚^[7]。但是这些传统的克隆鉴定致病基因的方法,难以发现 MPS Ⅶ小家系和散发患者的致病基因。

随着分子生物学飞速发展,尤其是全基因组外显子捕获技术在疾病中的应用,解决了传统定位克隆技术常常会面临 MPS Ⅶ家系内成员太少、病例散发、基因位点的异质性、外显不全及候选基因太多等难题。本研究发现,该患者致病基因 GUSB(g.65444706G>A)突变,该碱基的突变导致苏氨酸变成丝氨酸,从而导致 GUSB 活性缺乏或 GUSB 量的不足。有研究报道,MPS Ⅶ患者 GUSB 基因 c.155C>T,导致 GUSB 在转染细胞中缺失,出现严重的临床表型。Sinnott 团队最早鉴定出 MPS Ⅶ患者 GUSB 基因外显子 3 存在突变,导致 176 号位亮氨酸突变为苯丙氨酸,致使 GUSB 缺乏。Yamada 等^[8]发现 MPS Ⅶ患者致病基因 GUSB 第 10 号外显子 642~1679 位置缺失 38 bp,导致氨基酸改变为 Pro148Ser、Tyr495Cys、Trp507X,引起患者严重的临床表型。GUSB 的活性缺乏致使溶酶体中的糖链末端唾液酸残基不能被清除而影响硫酸皮肤素进一步水解,硫酸皮肤素在溶酶体中大量沉积,使细胞液泡化,进一步损坏细胞的功能而致病^[8]。

MPS Ⅶ常累及全身多个系统,随着年龄增长,病情进行性加重,基于 MPS Ⅶ的酶替代治疗取得了一定的进展,部分酶已用于临床治疗,干细胞移植和基因治疗目前都尚处于研究阶段,早期产前诊断、宫内干预是减少 MPS Ⅶ患儿出生的关键。建议有家族史的高危人群进行基因诊断,明确致病基因,在患儿母亲再生育时可行遗传咨询,产前基因诊断或植入前遗传学诊断,降低再生育 MPS Ⅶ患儿的风险。

参考文献

- [1] Young RD, Liskova P, Pinali C, et al. Large proteoglycan complexes and disturbed collagen architecture in the corneal extracellular matrix of mucopolysaccharidosis type Ⅶ (Sly syndrome) [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52 (9):6720-6728.
- [2] 郭奕斌. 黏多糖病的诊断及防治策略[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2009, 3(10):1620-1627.
- [3] Cubizolle A, Serratrice N, Skander N, et al. Corrective GUSB transfer to the canine mucopolysaccharidosis Ⅶ brain[J]. Mol Ther, 2014, 22(4):762-773.
- [4] Tomatsu S, Monta AM, Dung VC, et al. Mutations and polymorphisms in GUSB gene in mucopolysaccharidosis Ⅶ (Sly Syndrome) [J]. Hum Mutat, 2009, 30 (4): 511-519.
- [5] Yamada S, Tomatsu S, Sly WS, et al. Four novel mutations in mucopolysaccharidosis type Ⅶ including a unique base substitution in exon 10 of the beta-glucuronidase gene that creates a novel 5-splice site[J]. Hum Mol Genet, 1995, 4(4):651-655.
- [6] Elbecque K, Gaillez S, Schaaps JP. Histopathological diagnosis of a type Ⅶ mucopolysaccharidosis after pregnancy termination[J]. Fetal Pediatr Pathol, 2009, 28(1):1-8.
- [7] Wu BM, Tomatsu S, Fukuda S, et al. Overexpression rescues the mutant phenotype of L176F mutation causing β-glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis in two mennonite siblings [J]. J Biol Chem, 1994, 269 (38): 23681-23688.

(下转第 887 页)

泌的颗粒酶和穿孔素最终杀伤移植物靶细胞^[6-7]。同位素⁴⁵Ca²⁺ (T_{1/2}=163 d, β 射线能量为 0.25 MeV) 与生物体中的 Ca²⁺ 具有相同的生物活性, 由于⁴⁵Ca²⁺ 发出的 β 射线能被闪烁计数器探测, 因此, 只要测量⁴⁵Ca²⁺ 进入细胞内的数量变化就可快速、直接的反映 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞外的⁴⁵Ca²⁺ 摄取量^[8]。本研究测得 CD28⁺CD8⁺T 淋巴细胞外⁴⁵Ca²⁺ 摄取率及胞内 Ca²⁺ 浓度至术后第 3 天同趋势增长, 此后至第 7 天胞外⁴⁵Ca²⁺ 摄取率仍同幅度增长, 而胞内 Ca²⁺ 浓度却逐渐降低增长幅度甚至降低, 可能与引起细胞激活的钙离子浓度已达到所需的阈值范围后, 部分胞内 Ca²⁺ 填充钙池所需引起。本研究结果显示, ⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度未见明显变化, 原因可能是未能激活细胞免疫反应, 而胞内 Ca²⁺ 浓度相对于⁴⁵Ca²⁺ 摄取率的变化程度却稍明显; 手术组⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度变化关系的比较中发现, 术后第 7~9 天⁴⁵Ca²⁺ 摄取率显著下降, 而胞内 Ca²⁺ 浓度却经过“平台期”后逐渐下降; 以上均说明在心脏移植术后无论⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度在急性排斥反应所起作用的复杂性。其原因可能也包括手术创伤引起的应激反应, 即通过过氧化应激机制, 进而引起氧自由基抑制 Ca²⁺-ATP 酶活性, 影响该泵功能的修饰等相关^[9]。手术组与假手术组相比较, 无论⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度都变化显著, 除与排斥反应引起钙离子为中心的 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞激活之外, 还存在心肌缺血再灌注损伤可能。心肌缺血再灌注损伤发病机制主要是氧自由基生成、细胞凋亡和钙超载^[10]。缺血期由于缺血细胞膜去极化以及电压敏感性的慢钙通道的开放, 一部分 Ca²⁺ 会进入细胞内。这些内流的 Ca²⁺ 能否增加细胞内 Ca²⁺ 水平, 在很大程度上依赖于内流的 Ca²⁺ 量与细胞内分隔 Ca²⁺ 和排出 Ca²⁺ 能力的平衡。同时心肌细胞迅速开始无氧代谢, 出现能量代谢障碍, 进而产生大量有害代谢产物。随着 ATP 水平的下降, 细胞膜、肌浆网 Ca²⁺-ATP 酶活力及肌浆网摄钙能力下降, 使 Ca²⁺ 内流增加, 并激活膜磷脂酶, 并在此过程中产生氧自由基, 进一步引起肌浆网钙依赖性 ATP 酶失活, 导致肌浆网摄钙能力下降, 肌浆网内钙离子浓度升高, 兴奋收缩耦联受损等。在缺血再灌注损伤的过程中, 钙超载与氧自由基的作用不是孤立存在的, 而是相辅相成影响 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度变化。另外, 即使术后第 11 天, 移植物病理结果显示排斥反应已明显下降, CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度仍然维持稍高水平, 这种现象胡野等^[11] 研究认为, 同种异体心脏移植排斥反应引起的细胞凋亡在移植后 3~5 d 达到高峰, 此后逐渐减少, 但是整个急性反应期仍持续存在; 凋亡的心肌细胞孤立散在分布, 且大多分布于心肌间质; AR 时细胞凋亡可以不重, 这可能与细胞凋亡发生快而且凋亡细胞消失也快相关。虽然本实验与多个研究具有相同实验结果, 仍然有一定不足, 即未能建立与实验组相同的缺血再灌注干扰因素, 需要后续的实验深入研究钙在 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞活化过程中的重要作用。在制作假手术组实验时, 应严格对大鼠性别、体质量、品系等进行合理选择, 建立移植后无排斥反应模型。这

种探索性质的研究可能是心脏移植后 AR 的诊断和治疗研究的新领域, 如促进内质网、高尔基体、线粒体的生理钙离子缓冲作用, 也能在 AR 期使 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞钙离子水平降低, 延缓或阻断 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞的活化, 延长 AR 的发生。

相信随着研究的不断深入, CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞⁴⁵Ca²⁺ 摄取率、胞内 Ca²⁺ 浓度等在心脏手术后免疫排斥反应的快速诊断方面将拥有广阔前景。

参考文献

- [1] Akiyoshi K, Hikida S, Inoue H, et al. Extracellular Ca²⁺ uptake by T cells might help to make a diagnosis of acute rejection[J]. *Pediatr Surg Int*, 2007, 23(2): 149-153.
- [2] 涂星强, 王涛, 邹小明, 等. CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞胞外钙离子摄取与心脏移植急性排斥反应的相关性研究[J]. *岭南心血管病杂志*, 2014, 20(3): 360-363.
- [3] Fan K, Wang H, Wei H, et al. Blockade of LIGHT/HVEM and B7/CD28 signaling facilitates long-term islet graft survival with development of allospecific tolerance [J]. *Transplantation*, 2007, 84(6): 746-754.
- [4] 高旭辉, 王昊飞, 王武军, 等. 大鼠异位心脏移植动物模型制作的外科技巧[J]. *实用医学杂志*, 2004, 20(5): 492-494.
- [5] Majora M, Wittkamp T, Schuermann B, et al. Functional Consequences of Mitochondrial DNA Deletions in Human Skin Fibroblasts: Increased Contractile Strength in Collagen Lattices Is Due to Oxidative Stress-Induced Lysyl Oxidase Activity[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(3): 1019-1029.
- [6] 孙逸, 杨宝学. T 淋巴细胞离子通道的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2012, 35(2): 81-85.
- [7] Cahalan MD. How to Stimulate Calcium Channels[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 43-44.
- [8] 边原, 肖洪涛, 陈璐. 组织和细胞中 Ca²⁺ 浓度测定方法的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(9): 1253-1256.
- [9] Mishra S, Sabbah HN, Rastogi S, et al. Reduced Sarco-plasmic Reticulum Ca²⁺ Uptake And Increased Na⁺-Ca²⁺ Exchanger Expression In Left Ventricle Myocardium Of Dogs With Progression Of Heart Failure[J]. *Heart Ves-sels*, 2005, 20(1): 23-32.
- [10] Thind GS, Agrawal PR, Hirsh B, et al. Mechanisms of myocardial ischemia-reperfusion injury and the cytopro- tective role of minocycline: scope and limitations[J]. *Fu- ture Cardiol*, 2015, 11(1): 61-76.
- [11] 胡野, 凌志强, 单小云. 细胞凋亡的分子医学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 273-288.

(收稿日期: 2015-09-15 修回日期: 2015-12-08)

(上接第 884 页)

734.

- [8] Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders; the cellular impact of lysosomal dysfunction[J]. *J Cell Biol*, 2012, 199(5): 723-

(收稿日期: 2015-09-08 修回日期: 2015-12-05)