

COL4A5 基因 c.3667G>C (p.G1223R) 突变致 X 连锁 Alport 综合征家系的分子生物学实验诊断研究

侯思南¹, 曾 健¹, 顾芸芸¹, 商秀娟¹, 叶红玲²

(1. 南京中医药大学连云港附属医院检验科, 江苏连云港 222002; 2. 南京医科大学康达学院附属连云港市第二人民医院检验科, 江苏连云港 222002)

摘要: 目的 探讨外显子捕获高通量测序技术对 X 连锁 Alport 综合征 (X-linked Alport syndrome, XLAS) 的分子生物学实验诊断作用。方法 应用外显子捕获高通量测序技术对家系先证者进行基因检测, 然后对检测到的变异进行生物信息学分析及家系验证, 并综合分析患者临床特征和患者肾脏病理资料。结果 此家系先证者 (III-1) 和舅舅 (II-3) 携带 COL4A5 c.3667G>C (p.G1223R) 基因突变, 先证者母亲 (II-2) 为此基因突变的杂合子。生物信息学分析结果显示此突变是致病的且在家系中呈共分离。结论 此研究明确了 XLAS 家系的致病机理并发现一新突变 COL4A5 c.3667G>C (p.G1223R), 扩大了非典型 AS 患者 COL4A5 基因突变谱, 对患者的诊疗选择和临床管理具有重要意义。

关键词: Alport 综合征; COL4A5 基因; 高通量测序

中图分类号: R692.39; Q754 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 05-117-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.05.026

Molecular Biological Experimental Diagnostic Study of A Novel COL4A5 Gene Mutation c.3667G>C (p.G1223R) Result in X-linked Alport Syndrome in A Chinese Family

HOU Si-nan¹, ZENG Jian¹, GU Yun-yun¹, SHANG Xiu-juan¹, YE Hong-ling²

(1. Department of Clinical Laboratory, Lianyungang Traditional Chinese Medicine Hospital, Jiangsu Lianyungang 222002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Lianyungang, Jiangsu Lianyungang 222002, China)

Abstract: Objective To explore molecular biological experimental diagnostic role of targeted exome-based next generation sequencing for X-linked Alport syndrome(AS). **Methods** Targeted exome-based next generation sequencing were used to detect the gene variation of the proband in the pedigree, and then the detected variations were analyzed by bioinformatics analysis and pedigree verification. The clinical characteristics and pathological data of the patients were analyzed comprehensively. **Results** The proband (III-1) and uncle (II-3) in the pedigree carried COL4A5 c.3667G>C (p.G1223R) gene mutation, the mother of the proband (II-2) was a heterozygote with this mutation. Bioinformatics analysis showed that the mutation was pathogenic and cosegregate in this family. **Conclusion** This study clarified the pathogenic mechanism of XLAS family and found a novel mutation COL4A5 c.3667G>C (p.G1223R). It also expanded the mutation spectrum of COL4A5 gene in atypical AS patients, which is great significance for the diagnosis and treatment selection and clinical management of patients.

Keywords: Alport syndrome; COL4A5 gene; next generation sequencing technology

Alport 综合征 (Alport syndrome, AS) 是以血尿、蛋白尿、进行性肾损伤伴或不伴高频感音性耳聋及视力异常为临床特征的遗传性肾炎^[1-2]。典型的病理变化为电镜下肾小球基底膜出现花篮状改变^[3]。AS 已被证实是由 COL4A3, COL4A4 和 COL4A5 基因突变导致^[4]。遗传方式上, X 连锁 AS (X-linked Alport syndrome, XLAS) 是最为常见的 AS 类型, 约占 80%~85%, 其次为常染色体隐性遗传 AS 和常染

色体显性遗传 AS^[5]。临床上, 患者的诊断主要依据典型的临床症状和病理变化。然而, 患者临床异质性较大, 病理特征常不典型, 容易造成临床误诊^[6-8]。另外在缺乏有效治疗的情况下, 肾病逐渐从最初的镜下血尿发展为蛋白尿和肾功能不全, 最终导致终末期肾病。随着分子生物学技术的快速发展, 外显子捕获测序技术应运而生, 已成为单基因遗传病致病基因研究的主要手段。本研究拟探讨外显子捕获

基金项目: 连云港市“521 高层次人才培养工程”(编号 LYG52105-2018082)。

作者简介: 侯思南 (1982-), 男, 在职研究生, 研究方向: 临床检验诊断学, E-mail:housinan0772666@163.com。

通讯作者: 叶红玲, 女, 主管技师, E-mail:yehongling1112@163.com。

高通量测序技术对 AS 病因诊断及明确遗传方式的应用价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2019 年 12 月来我院就诊的一遗传肾病家系。根据肾活检和免疫荧光检测结果,先证者初步诊断为 IgA 肾病。连云港市中医院伦理委员会根据《赫尔辛基原则宣言》审查并批准了我们的研究方案。经患者签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 基因组 DNA 提取试剂 (Qiagen, Germany); 全外显子组捕获芯片 (NimbleGen, Roche); 高通量测序平台 Illumina Hiseq 2500; ABI DNA 一代测序仪。

1.3 研究方法

1.3.1 外显子捕获高通量测序: 抽取先证者及家系成员 EDTA 抗凝外周血 4ml, 按 DNA 提取试剂盒步骤进行 DNA 提取。捕获芯片 (NimbleGen, Roche) 覆盖了 355 个基因的所有外显子以及侧翼 10bp。根据标准流程进行目标序列捕获、富集、建库和高通量测序。双端测序由天津华大基因股份有限公司 Illumina Hiseq2500 平台完成。

1.3.2 生物信息学分析: 由 Illumina Pipeline version(1.3.4) 软件处理测序获得的原始数据, 然后使用 BWA (Burrows Wheeler Aligner) 软件包比对干净读数^[9]。由 SOAP snp 软件确定 snp, GATK indelGenotyper 确定插入和缺失变异^[10]。在分析流程中, 使用千人基因组数据库、dbSNP 数据库和华大内部数据库作为对照人群数据库、采用 SIFT^[11] 和 Polyphen-2^[12] 算法来预测错义突变对基因功能的影响, 变异位点的保守性由 PhyloP(phyloP46wayPlacental) 软件计算得来。

1.3.3 Sanger 测序验证: 针对检测出可能致病的突变位点, 应用 Primer Premier 5 软件设计该位点的特异性引物, PCR 扩增先证者及家系成员的相应位点, 扩增产物采用 ABI3730x1 DNA 测序仪进行双端测序并分析测序结果。

2 结果

2.1 先证者临床表型及病理特征 先证者 (III-1), 男, 7 岁, 临床表现为血尿、蛋白尿、正常肾功能, 无肾外表现。电镜下基底膜厚薄不一, 基质有轻度至中度增生, 并有电子致密物质沉积于基质中。免疫荧光显示大量 IgA 和 IgM 沉积, IV 型胶原免疫荧光检测结果显示 $\alpha 3$ 和 $\alpha 5$ 染色正常, 先证者被初步诊断为 IgA 肾病。有报道显示大剂量的泼尼松能显著提高 IgA 肾病预后并有效控制蛋白尿^[13]。患者每天给予口服泼尼松 60mg 维持 4 周, 每 4 周减少剂量 5~10mg, 并与吗替麦考酚酯联用 0.5g/次, 每天 2 次。经过 16 周的治疗, 患者仍然有大量的

蛋白尿, 显示治疗效果不佳。

2.2 NGS 测序结果及生物信息学分析结果 见图 1, 表 1。通过高通量测序, 检测到先证者 (III-1) 携带 COL4A5 c.3667G>C (p.G1223R) 基因突变。此突变为甘氨酸置换突变。在千人基因组数据库、dbSNP 数据库及华大本地数据库均无记录, PolyPhen-2 和 SIFT 算法预测此变异有害。PhyloP 软件预测此变异高度保守, 根据美国医学遗传学和基因组学学院 (ACMG) 的标准^[14], 该变异归为可能导致致病性突变。

2.3 Sanger 测序家系验证结果 见图 2。此家系先证者 (III-1) 携带 COL4A5 基因突变 c.3667G>C (p.G1223R), 先证者母亲 (II-2) 为此突变的杂合子, 先证者舅舅 (II-3) 亦携带此突变。

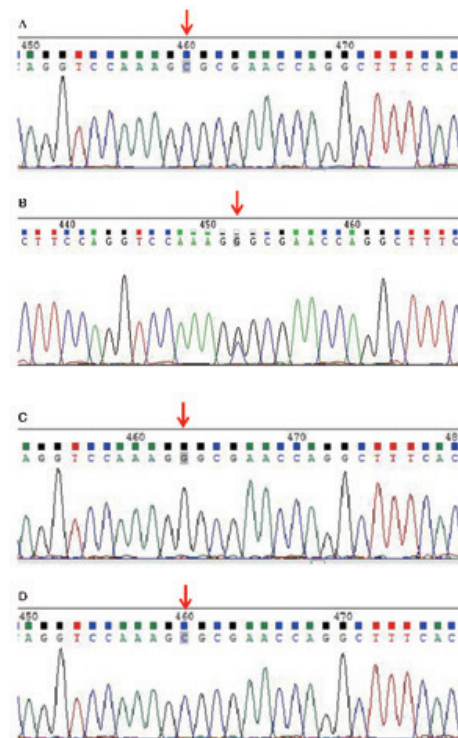


图 1 Sanger 测序验证 COL4A5 c.3667G>C (p.G1223R) 突变

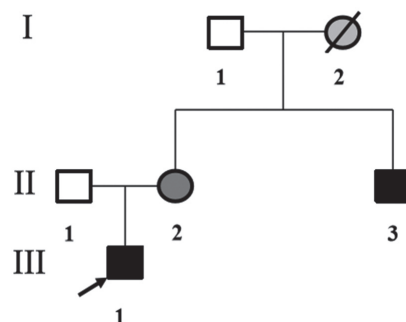


图 2 先证者家系图

表1 AS家系成员临床资料和基因突变结果

| 编号 | 性别 | 年龄 | 血尿 | 蛋白尿 | 肾功能 | 视力/听力 | 致病突变 |
|-------|----|----|----|-----|-----|-------|------------------|
| II-2 | 女 | 33 | 有 | 无 | 正常 | 无异常 | COL4A5 c.3667G>C |
| II-3 | 男 | 30 | 有 | 有 | 正常 | 无异常 | COL4A5 c.3667G>C |
| III-1 | 男 | 7 | 有 | 有 | 异常 | 无异常 | COL4A5 c.3667G>C |

3 讨论

AS是一种进行性遗传性肾病,以血尿、蛋白尿伴或不伴肾外表现(如高频感音性耳聋及视力下降)为临床特征^[2]。通常情况下患者临床异质性较大,缺乏特异性临床表现及病理变化^[2,8]。因此通过临床特征和病理变化很难与其他肾脏疾病进行鉴别诊断。在我们的研究中,先证者临床表现为血尿和蛋白尿,通过肾活检和免疫荧光检测初步诊断为IgA肾病。先证者及其家系其他成员未见典型AS样病变,不符合FLINTER等^[15]AS的诊断标准。以往的研究表明大剂量泼尼松龙能有效地减轻IgA患者尿蛋白的水平并改善患者预后^[13]。经过16周的治疗,患者仍然有大量的蛋白尿,显示治疗效果不佳。因此,我们猜测可能有其他的因素影响治疗效果。通过外显子捕获高通量测序,我们检测到COL4A5 c.3667G>C (p.G1223R)突变,明确了AS的临床诊断及致病机理。可见基因诊断在精准诊疗中具有重要作用。

外显子组测序在米勒综合症的研究中首次得到成功的应用,随后通过外显子组测序发现了局灶节段性肾小球肾炎、多囊肾等孟德尔疾病的新的致病基因突变^[16-17]。随着分子生物学的发展,外显子捕获测序技术已成为单基因病遗传病致病基因研究的主要手段。我们的研究数据表明,外显子捕获测序技术能够在较短时间对AS进行病因诊断及明确遗传方式。基因检测相对于传统方法有较大优势。与肾活检相比,基因检测使用外周血DNA对患者进行基因分析,其侵入性要小得多。

总之,我们的研究明确了此XLAS家系的致病机理并发现一新突变COL4A5 c.3667G>C (p.G1223R),拓宽了非典型Alport综合征患者COL4A5基因突变谱。同时也为研究XLAS患者与IgA患者的鉴别诊断提供思路 and 参考。

参考文献:

- [1] SAVIGE J, ARIANI F, MARI F, et al. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome[J]. Pediatric Nephrology (Berlin, Germany), 2019, 34(7): 1175-1189.
- [2] NOZU K, NAKANISHI K, ABE Y, et al. A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome[J]. Clinical and Experimental Nephrology, 2019, 23(2): 158-168.
- [3] FUNK S D, LIN M H, MINER J H, et al. Alport syndrome and Pierson syndrome: Diseases of the

glomerular basement membrane(Review)[J]. Matrix Biology, 2018, 71-72:250-261.

- [4] CHEONG H I. Genetic diagnosis of Alport syndrome[J]. Korean Journal of Pediatrics, 2019, 62(5): 164-165.
- [5] LIU Jianhong, WEI Xiuxiu, LI Ang, et al. Novel mutations in COL4A3, COL4A4, and COL4A5 in Chinese patients with Alport syndrome[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177685.
- [6] YAMAMURA T, NOZU K, XUE Junfu, et al. Natural history and genotype-phenotype correlation in female X-linked Alport syndrome[J]. Kidney International Reports, 2017, 2(5): 850-855.
- [7] ZHANG Xiao, ZHANG Yanqin, ZHANG Yanmei, et al. X-linked Alport syndrome: pathogenic variant features and further auditory genotype-phenotype correlations in males[J]. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2018, 13(1): 229.
- [8] SHANG Shunlai, PENG Fei, WANG Tao, et al. Genotype-phenotype correlation and prognostic impact in Chinese patients with Alport syndrome[J]. Molecular Genetics & Genomic Medicine, 2019, 7(7): e00741.
- [9] LI Heng, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics (Oxford, England), 2009, 25(14): 1754-1760.
- [10] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. Genome Research, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [11] NG P C, HENIKOFF S. Predicting deleterious amino acid substitutions[J]. Genome Research, 2001, 11(5): 863-874.
- [12] ADZHUBEI I A, SCHMIDT S, PESHKIN L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations[J]. Nature Methods, 2010, 7(4): 248-249.
- [13] LÜ Jicheng, XU Damin, PERKOVIC V, et al. Corticosteroid therapy in IgA nephropathy[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2012, 23(6): 1108-1116.
- [14] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. Genetics in Medicine, 2015, 17(5): 405-424.
- [15] FLINTER F A, CAMERON J S, CHANTLER C, et al. Genetics of classic Alport's syndrome[J]. The Lancet, 1988, 2(8618): 1005-1007.
- [16] PEI Y, WATNICK T. Diagnosis and screening of autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. Advances in Chronic Kidney Disease, 2010, 17(2): 140-152.
- [17] GUBLER M C. Inherited diseases of the glomerular basement membrane[J]. Nature Clinical Practice. Nephrology, 2008, 4(1): 24-37.

收稿日期: 2021-01-09 修回日期: 2021-03-16