

应用全外显子组测序技术筛查罕见石骨症致病基因*

欧明林¹, 薛 雯¹, 邹同祥¹, 朱 鹏², 张若菡¹, 陈洁晶¹, 戴 勇², 代成甫^{2△}

(1. 中国人民解放军第一八一医院中心实验室/广西代谢性疾病研究重点实验室, 广西桂林 541002;

2. 暨南大学第二临床医学院/深圳市人民医院, 广东深圳 518020)

摘要:目的 筛查石骨症患者的致病基因, 为疾病的基因诊断及预后提供参考。方法 收集石骨症患者临床资料及外周血标本, 提取 DNA, 构建全外显子测序文库, 进行高通量测序并结合生物信息学技术筛查石骨症致病基因。结果 对 2 例石骨症患者的全外显子进行了分析, 平均测序深度分别为 169.38X、231.06X, 其中患者 1 携带罕见突变 TCIRG1(c.1305+2T>C)、TCIRG1(c.2008C>T) 和 CLCN7(c.1116C>T); 患者 2 携带罕见突变 CLCN7(c.857G>A), 生物信息学分析表明患者携带的罕见突变均对基因产物的结构和功能具有不同程度的影响。结论 全外显子测序可一次性筛查已知石骨症致病突变, 是石骨症致病突变筛查的有效工具, 2 例石骨症患者的临床病征可能与患者携带的 TCIRG1 和 CLCN7 突变密切相关。

关键词:石骨症; 致病基因; 全外显子测序

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.01.003

中图法分类号:R394.1

文章编号:1673-4130(2018)01-0010-04

文献标识码:A

Application of whole exome sequencing technique for the pathogenic gene screening of rare osteopetrosis*

OU Minglin¹, XUE Wen¹, ZOU Tongxiang¹, ZHU Peng², ZHANG Ruohan¹,CHEN Jiejing¹, DAI Yong², DAI Chengfu^{2△}

(1. Central Laboratory, 181 Hospital of PLA/Guangxi Key Laboratory of Metabolic Diseases

Research, Guilin, Guangxi 541002, China; 2. Second Clinical Medical College of Ji'nan

University/Shenzhen Municipal People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

Abstract: Objective To screen the pathogenic gene of osteopetrosis to provide reference for its genetic diagnosis and prognosis. **Methods** The clinical data and peripheral blood samples were collected from the patients with osteopetrosis, DNA was extracted, the whole exome sequencing library was built, then the high throughput detection was performed and the pathogenic gene was screened by combining with the bioinformatics technology. **Results** The whole exomes in 2 cases of osteopetrosis were analyzed, the average sequencing depth of the two samples were 169.38X and 231.06X respectively, in which the case 1 carried rare mutation TCIRG1(c.1305+2T>C), TCIRG1(c.2008C>T) and CLCN7(c.1116C>T); the case 2 carried a rare mutation CLCN7(c.857G>A). The bioinformatics analysis indicated that the rare mutations carried by these cases all had different degrees of influence on the structure and function of gene products. **Conclusion** The whole exome sequencing can once screen the known pathogenic mutations of osteopetrosis, is an effective tool for pathogenic mutation screening of osteopetrosis, the clinical disease in 2 cases of osteopetrosis may be closely related with the patient's carrying TCIRG1 and CLCN7 mutation.

Key words: osteopetrosis; disease gene; exome sequencing

石骨症是一类以破骨细胞活性异常、骨吸收缺陷和骨硬化等骨代谢异常为特征的罕见遗传性疾病^[1]。根据遗传方式的不同, 该病可以分为常染色体显性遗传石骨症、常染色体隐性遗传石骨症和 X 连锁石骨症这 3 种亚型, 其中常染色体显性遗传石骨症较常见^[2]; 根据临床表现的不同, 石骨症又可分为成年型

和婴儿型两种, 其中成年型石骨症多属良性, 婴儿型石骨症多属恶性, 后者预后较差, 一般夭折于婴儿期^[3]。迄今为止, 人们通过动物模型及临床患者测序分析已经发现了数十个石骨症致病基因, 且致病突变位点众多、不少致病基因 DNA 序列相对较长, 给石骨症的基因诊断带来了挑战。为了筛查患者是否携带

* 基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金项目(2015GXNSFBA139176); 深圳市科技计划项目(JCYJ20150403101146277)。

作者简介: 欧明林, 男, 助理研究员, 主要从事遗传学研究。△ 通信作者, E-mail: daicfu@126.com。

本文引用格式: 欧明林, 薛雯, 邹同祥, 等. 应用全外显子组测序技术筛查罕见石骨症致病基因[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 10-13.

石骨症致病突变,本研究利用全外显子组测序技术对 2 例石骨症患者的全外显子信息进行了分析,现将相关实验结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者 1,女,月龄 25 个月,临床表现主要包括贫血貌,肝脾明显肿大,生长发育明显迟缓,反复感染,眼球相对突出,X 线检查可见全身骨密度异常增高,骨髓腔狭窄、闭塞,长骨成型不良,颅底骨硬化、骨塑形障碍,符合婴儿型石骨症诊断;患者 2,女,年龄 24 岁,临床表现主要包括长期头疼,有贫血史,X 线检查可见颅板硬化明显,板障几乎消失,椎骨出现典型的“骨中骨”样改变,骨盆骨硬化明显,可见如扇形分布的大小不等的致密骨岛影,符合成人型石骨症诊断。

1.2 方法

1.2.1 全外显子文库构建及测序 抽取受试者外周血标本(乙二胺四乙酸抗凝)2~3 mL,提取标本基因组 DNA,全外显子组测序主要按照华大基因 BGISEQ-500 WES 技术规范进行,主要步骤如下:(1)基因组 DNA 样品通过超声波高性能样品处理系统随机打断,经过片段选择后得到 150~250 bp 左右的片段;(2)DNA 片段末端修复,3'端加上“A”碱基,两端加上文库接头,线性扩增制备成杂交文库;(3)杂交文库与外显子芯片进行捕获富集,洗脱未富集片段后进行扩增;(4)扩增产物进行单链分离和环化处理,环化文库经过滚环复制生成 DNA 纳米球,质控合格后上机测序;(5)采用 BGISEQ-500 平台,对文库进行高通

量测序;(6)测序得到的原始图像数据,经 BGISEQ-500 碱基识别软件转化为原始序列数据。

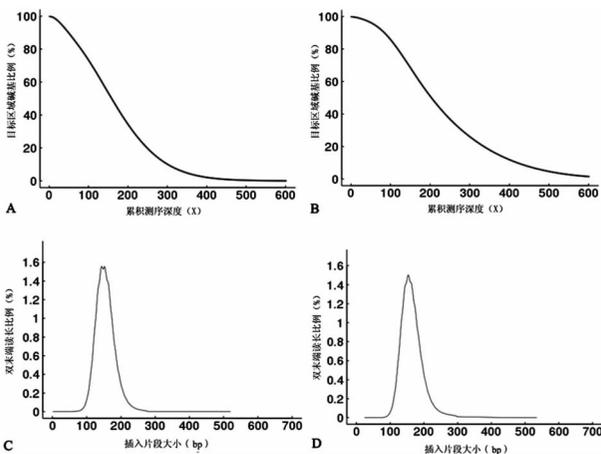
1.2.2 测序结果分析 测序结果分析主要包含以下几个步骤:(1)对原始下机数据进行过滤得到有效数据;(2)使用比对软件将每个样品的有效数据比对到人的参考基因组(GRCh37/HG19),得到 BAM 格式的最初的比对结果文件;(3)利用基因组比对工具进行比对,去除重复的读长,并进行局部重比对和碱基质量值重校正的处理;(4)基于比对结果,对样本测序深度、覆盖度、比对率等评价指标进行统计;(5)对变异结果进行注释及影响预测;(6)将变异结果与已知石骨症致病基因进行比对,筛查石骨症患者的致病突变点^[4-5]。

2 结果

2.1 测序数据产出 在 2 个样本的全外显子测序中,平均每个样本测序得到 25 909.95 Mb 原始数据。在去除低质量的读长后,平均每个样本得到 25 856.06 Mb 有效数据。每个样本均具有较好的测序质量,平均的 GC 比率为 46.57%,外显子测序数据统计结果见表 1。在目标区域上约有 50.39 Mb 的目标区域被芯片捕获,BWA 比对结果表明平均 99.55%的读长可以比对上参考基因组。目标区域的平均测序深度约为 200.22X,每个样本有 99.88%的目标区域被至少 1 条读长覆盖,99.31%的目标区域被至少 10 条读长覆盖。此外,各样本在目标区域上的累积测序深度分布情况见图 1A、B。成对测序读长的插入片段长度即测序的 DNA 片段长度分布,见图 1C、D。

表 1 外显子测序数据统计结果

受试者	原始数据(Mb)	有效数据(Mb)	GC 比率(%)	捕获的目标序列(Mb)	平均测序深度(X)	测序深度≥1X(%)	测序深度≥10X(%)
患者 1	28 592.62	28 559.59	46.86	50.39	169.38	99.79	99.31
患者 2	23 227.28	23 152.53	46.27	50.39	231.06	99.88	99.82



注:A 患者 1 测序深度分布;B 患者 2 测序深度分布;C 患者 1 测序长度分布;D 患者 2 测序长度分布

者 1 外显子区域发现高质量可信 SNP 20 814 个,InDel 15 499 个;患者 2 外显子区域发现高质量可信 SNP 20 610 个,InDel 16 954 个。DNA 变异进一步与已知石骨症致病基因比对后,发现 2 例患者携带的位于已知石骨症致病基因上的变异位点分别是 11 个和 5 个,见表 2。

为了筛查疾病密切相关的致病基因突变,对筛选到得变异位点进行滤过,步骤如下:(1)去除千人基因组(1KG)数据库中最小等位基因频率≥1%的变异;(2)去除 NHLBI-ESP6500 群体数据库中最小等位基因频率≥1%的变异;并利用 SIFT/PolyPhen2/Mutation assessor/MutationTaster/FATHMM 分析 DNA 变异对基因产物的结构和功能带来的影响,结果发现患者 1 携带罕见突变 TCIRG1(c. 1305+2T>C)、TCIRG1(c. 2008C>T)和 CLCN7(c. 1116C>T);患者 2 携带罕见突变 CLCN7(c. 857G>A)。其中

2.2 外显子区域 DNA 变异情况

在 2 例患者中,患

TCIRG1(c. 2008C>T) 和 CLCN7(c. 857G>A) 为已报道的与石骨症密切相关的突变位点, 其中功能预测分析软件表明 TCIRG1(c. 1305+2T>C) 和 TCIRG1(c. 2008C>T) 对基因产物的结构和功能具有高度影

响, CLCN7(c. 1116C>T) 和 CLCN7(c. 857G>A) 对基因产物的结构和功能具有中度影响, TCIRG1(c. 2008C>T) 和 CLCN7(c. 857G>A) 为国内外文献已报道的与石骨症密切相关的基因突变位点^[6-8]。

表 2 患者携带的位于已知石骨症致病基因上的变异位点信息

受试者	基因	变异位点	变异类型	变异频率		变异影响程度
				1KG	ESP6500	
患者 1	TCIRG1	NM_006019.3:p. Leu415Leu/c. 1245G>C	纯合型	0.97	0.97	较低
	TCIRG1	NM_006019.3:c. 1305+2T>C	杂合型	—	—	高度
	TCIRG1	NM_006019.3:p. Arg670*/c. 2008C>T	杂合型	—	—	高度
	CLCN7	NM_001287.5:p. Ala390Ala/c. 1170A>T	纯合型	0.56	0.51	较低
	CLCN7	NM_001287.5:p. Ile372Ile/c. 1116C>T	杂合型	—	—	较低
	CLCN7	NM_001287.5:p. Pro42Pro/c. 126T>C	纯合型	0.65	—	较低
	TNFRSF11B	NM_002546.3:p. Asn3Lys/c. 9C>G	纯合型	0.67	0.59	中度
	TNFRSF11A	NM_003839.3:p. Ala192Val/c. 575C>T	杂合型	0.59	0.55	中度
	TNFRSF11A	NM_003839.3:p. Thr311Thr/c. 933A>G	纯合型	0.98	0.95	较低
	CTSK	NM_000396.3:p. Ala277Ala/c. 831A>G	纯合型	0.96	0.98	较低
患者 2	LEMD3	NM_014319.4:p. Ser126Ser/c. 378C>T	纯合型	0.05	0	较低
	CLCN7	NM_001287.5:p. Ala390Ala/c. 1170A>T	纯合型	0.56	0.51	较低
	CLCN7	NM_001287.5:p. Arg286Gln/c. 857G>A	杂合型	—	—	中度
	CLCN7	NM_001287.5:p. Pro42Pro/c. 126T>C	杂合型	0.65	—	较低
	TCIRG1	NM_006019.3:p. Leu415Leu/c. 1245G>C	纯合型	0.97	0.97	较低
	TNFSF11	NM_003701.3:p. Pro42Pro/c. 126T>C	纯合型	0.47	0.39	较低

注: — 表示无数据

3 讨 论

石骨症又称原发性脆性骨硬化、大理石骨和硬化性增生性骨病等, 该病的病因尚未完全阐明, 但不少研究表明破骨细胞缺乏或功能缺陷是石骨症发病的根本原因之一。近年来, 国内外研究已发现了 30 余个与破骨细胞发育成熟相关的基因, 其中至少已有 15 个基因可见于不同亚型石骨症患者^[9]。由此可见, 如何全面和高效地筛查石骨症等人类罕见遗传疾病致病基因, 可能是目前临床检验诊断中需要解决的重要挑战之一。随着第 2 代测序技术的成熟, 全外显子组测序为代表的靶向捕获测序等技术为具有多种临床亚型及众多致病基因的石骨症病因筛查提供了新的途径。

婴儿期石骨症是一种严重危及生命的石骨症亚型, 患者 1 即为该亚型患儿, 据随访获知患儿夭折于 4 周岁。目前, 研究表明 TCIRG1、CLCN7、OSTM1、SNX10、PLEKHM1、TNFRSF11A 和 TNFSF11 是婴儿期石骨症最为常见的致病基因^[5]。在与上述已知婴儿期石骨症致病基因进行比对后, 本研究在患者 1 全外显子组发现了多个 TCIRG1 和 CLCN7 变异位点。早在 1999 年有研究者利用 Tcirg1loc/oc 缺陷小鼠研究发现该动物模型破骨细胞 V-ATPase 存在严重的缺陷, 初步证实 TCIRG1 突变可能是导致破骨细胞功能障碍的主要原因之一^[10]; 破骨细胞褶皱缘上的 V-ATP 酶是一个多聚体蛋白, 具有 V0 和 V1 两个功

能域, TCIRG1 的基因产物为 V0 功能域的 α3 亚基, TCIRG1 突变可能会导致破骨细胞囊泡形成和运输障碍^[11]。随后, FRATTINI 等^[12]对 9 例婴儿期石骨症患儿的致病基因进行了分析, 进一步证实了 TCIRG1 突变是人类石骨症的致病原因之一; 迄今为止, 一些研究表明 50%~60% 婴儿期石骨症可能是由于 TCIRG1 突变引起的^[13]。在患者 1 基因组中, TCIRG1(c. 2008C>T) 和 TCIRG1(c. 1305+2T>C) 为罕见突变, 其中前者为已报道的存在于婴儿期石骨症患儿的致病突变之一, 两种突变均不存在于千人基因组及 NHLBI-ESP 6500 外显子组中, 说明该突变频率远远小于 1%, 且基于生物信息学理论的预测结果表明该两突变会对基因产物的结构产生重要的影响, 因此基于全外显子测序、生物信息学分析结果及文献资料可以推测 TCIRG1(c. 2008C>T) 和 TCIRG1(c. 1305+2T>C) 是本研究患者 1 发病的关键致病突变^[11]。

成人型石骨症是相对于婴儿期石骨症较为常见的石骨症亚型, 该病多见于成年人, 发病年龄相对较晚, 本研究患者 2 即为该亚型石骨症患者。CLCN7 是石骨症最为常见的基因之一, 该基因异常不仅可见于婴儿期石骨症, 也常见于成人型石骨症。该基因产物为氯离子通道蛋白 7, 该蛋白是一种跨膜蛋白, 在细胞膜内外氯离子和氢离子转运等方面具有十分重要的作用, 迄今为止, 国内外研究人员已发现了 50 多个

与石骨症密切相关的突变位点,其中包括存在于我国石骨症家系患者的 CLCN7(c. 296A>G)突变^[14]。与已知石骨症致病基因比对后,发现患者 2 携带 CLCN7(c. 857G>A)致病突变。该突变未见存在于千人基因组及 NHLBI-ESP 6500 外显子组中,说明该突变频率远远小于 1%,为罕见突变;与患者 1 类似,利用基于生物信息学理论的预测结果表明该突变氯离子通道蛋白 7 的结构会相对较大的影响。此外,更为重要的是该突变位点已有不少文献报道,可见于高达 42% 的成人型石骨症患者^[8]。因此,基于全外显子组测序及文献报道结果,可以推测 CLCN7(c. 857G>A)是患者 2 致病的关键突变^[2]。

人类基因中大约有 180 000 个外显子,仅占人类基因组的 2%,靶向捕获筛查疾病相关的 SNP 和 InDel 对临床罕见病、复杂疾病、疑难疾病,尤其是孟德尔遗传病的诊断具有重要的应用价值^[15-16]。然而,全外显子组测序在临床中的应用仍然面临较多的挑战,比如尽管全外显子组测序对于 SNP 及小数目 InDel 检测具有优势,而对于基因拷贝数变异、非整倍体、染色体易位和倒位等形式的异常检测相对较难实现;人类致病突变并不仅仅存在于外显子区域,全外显子组测序具有覆盖率局限性,尽管本研究覆盖目标序列高达 99.88%,仍然存在致病性突变漏检的可能;此外,尽管捕获全外显子测序只占人类基因组的 1%~2%,SNP 和 InDel 检出数量仍然十分巨大。在本研究中,2 例受试者检出的变异位点均超过 2.5 万个,如何解释这些变异位点的临床意义仍存在较大的挑战。为了进一步筛查石骨症致病位点信息,本研究利用公共数据库,包括千人基因组数据库和 NHLBI-ESP 6500 群体数据库对相关变异位点进行了过滤,减少了绝大多数 DNA 变异位点,该结果表明公共数据库在人类高频变异位点滤过方面具有不可替代的作用。

综上所述,全外显子组测序是一种高效的人类 DNA 变异检测手段,综合运用人类基因组变异相关公共数据库及生物信息学功能预测工具,可以为石骨症致病基因的筛查提供新的解决途径。结合全外显子组测序信息及相关石骨症致病信息,本研究认为患者 1 携带的 TCIRG1(c. 2008C>T)和 TCIRG1(c. 1305+2T>C),以及患者 2 携带的 CLCN7(c. 857G>A)可能在石骨症发病过程中具有重要的作用。

参考文献

[1] DEL FA, CAPANNOLO M, TETI A. New mechanisms of osteopetrosis[J]. *IBMS Bonekey*, 2009, 6(1): 16-28.
[2] PANGRAZIO A, PUSCH M, CALDANA E, et al. Molec-

ular and clinical heterogeneity in CLCN7-dependent osteopetrosis; report of 20 novel mutations[J]. *Human mutation*, 2010, 31(1): 1071-1080.

- [3] PETRYK A, POLGREEN L, DEFOR T E, et al. Bone mineral density, growth and endocrine function in children with infantile osteopetrosis after HCT[J]. *Bio Blood Marrow*, 2016, 22(3): 257-258.
[4] STARK ZR. Osteopetrosis[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2009, 4(1): 5.
[5] SOBACCHI C, SCHULZ A, COXON F P, et al. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2013, 9(9): 522-536.
[6] YU T, YU Y, WANG J, et al. Identification of TCIRG1 and CLCN7 gene mutations in a patient with autosomal recessive osteopetrosis[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(4): 1191-1196.
[7] NOUR M L. Infantile malignant osteopetrosis[J]. *J Pediatr*, 2013, 163(4): 1230.
[8] WAGUESPACK S G, HUI S L, DIMEGLIO L A, et al. Autosomal dominant osteopetrosis: clinical severity and natural history of 94 subjects with a chloride channel 7 gene mutation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(3): 771-778.
[9] 欧明林. 石骨症发病的分子机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
[10] LI Y P, CHEN W, LIANG Y, et al. ATP6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification[J]. *Nature Genet*. 1999, 23(4): 447-451.
[11] ROUSSELLE A D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption[J]. *Bone*, 2002, 30(4): 533-540.
[12] FRATTINI A, ORCHARD P J, SOBACCHI C, et al. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(3): 343-346.
[13] CONWAY R R. A patient with TCIRG1-related infantile osteopetrosis presenting with congenital anomalies; chance association or a case for pleiotropy[J]. *Am J Med Genet A*, 2007, 143(24): 3140-3143.
[14] SUI W, OU M, LIANG J, et al. Rapid gene identification in a Chinese osteopetrosis family by whole exome sequencing[J]. *Gene*, 2013, 516(2): 311-315.
[15] 睦维国, 李丽萍, 车文体, 等. 人类遗传疾病中常见变异和罕见变异的研究策略[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(16): 1847-1850.
[16] 王晓珠, 周华友, 吴绪华, 等. 先证者为 Rh 阴性汉族家系 RHD 基因遗传方式研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(2): 103-106.

(收稿日期: 2017-06-20 修回日期: 2017-09-16)