DOI:10.16016/j.1000-5404.201508095

智力障碍小家系中致病基因的研究

郭 辉[1],刘富华[2],欧明林[2],林琳华[1],任景慧[1],曾 君[1],李启运[1],林秀华[1],梁灼健[1],戴 勇[1] (518020 广东深圳,深圳市人民医院遗传病诊断和产前诊断中心[1];541002 广西 桂林,桂林 181 医院中心实验室[2])

[摘要] **目的** 研究一个智力发育障碍家系中的致病基因突变。**方法** 染色体核型 G 显带方法分析先证者染色体核型,用全基因组外显子测序的方法探究致病基因,并在先证者家系中用 Sanger 测序法进行验证。**结果** G 显带核型分析未显示先证者染色体核型的数目和结构异常。全基因组外显子测序的方法共从先证者外显子基因中鉴别出 1 455 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms,SNPs)和 187 个 indels,结合家系信息筛选出 X 染色体上 ARHGAP4 基因突变与智力障碍表型相关,Sanger 测序法验证结果一致,符合孟德尔家系遗传。**结论** X 染色体上 ARHGAP4 的 C2822T 突变位点可能与家系中的智力障碍疾病表型相关。

[关键词] X 染色体连锁智力障碍;ARHGAP4;外显子测序
[中图法分类号] R394-33;R394.5;R596.1 [文献标志码] A

Disease-causing gene in a family with mental retardation

Guo Hui[1], Liu Fuhua[2], Ou Minglin[2], Lin Linhua[1], Ren Jinghui[1], Zeng Jun[1], Li Qiyun[1], Lin Xiuhua[1], Liang Zhuojian[1], Dai Yong[1] ([1]Center of Genetic Disease Diagnosis and Prenatal Diagnosis, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong Province, 518020; [2]Central Laboratory, No. 181 Hospital of PLA, Guilin, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 541002, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the candidate disease-causing gene in a mental retardation family. **Methods** The proband's chromosome karyotype was analyzed, and whole-exome sequencing was performed to screen the candidate gene. Sanger sequencing was used to check the result of whole-exome sequencing and investigate the genotypes in the patient's family. **Results** The proband's karyotype was normal (46, XY) in G-banding level. Using whole-exome sequencing method, 1 455 single nucleotide polymorphisms and 187 indels were identified in the proband. Combined with the family information and the result of Sanger sequencing, ARHGAP4 gene with C2822T mutation in X chromosome was screened from the data and identified as disease-causing gene in the family. **Conclusion** C2822T mutation in ARHGAP4 gene on X chromosome may be related with the phenotype of mental retardation in this family.

[**Key words**] X-linked mental retardation; ARHGAP4 gene; whole-exome sequencing

Supported by the Project of Science and Technology Plan of Shenzhen (201302005). Corresponding author: Guo Hui, E-mail: guohui600@163.com

由于各种原因造成患者在发育期间一般智力功能明显低于同一年龄平均水平,同时对社会环境日常要求的适应能力有明显缺陷称之为智力障碍(mental retardation,MR),患者通常在 18 岁之前发病[1]。智力障碍是一种严重危害儿童身心健康的综合征,在全世界的发病率为 2% ~3%,患者中约有 2/3 与遗传因素相关。国外智力低下流行病学研究结果显示,智力低下有性别的差异,男性患者比女性患者多 30% ~50%,可能由于这些多出的男性患者患有 X 连锁的智力低下(X -linked mental retardation,XLMR)。目前已经发现 200 余种 X 染色体上基因突变与 MR 相关,约占所有先天性 MR 的 25%,男性人群中 XLMR 发生率为 1/600 ~1/1 000[2]。全基因组外显子测序是指目标序列捕获技术将全基因组中外显子区域 DNA 捕获

[基金项目] 深圳市科技计划项目(医疗卫生类,201302005)
[通信作者] 郭 辉,E-mail:guohui600@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151203.1513.027.html(2015-12-03)

并富集后进行高通量测序的基因组分析方法,外显子测序方法已被应用于单基因病、癌症、复杂疾病的致病基因筛查[3-4]。我们用全基因组外显子测序方法研究一个表现为 X 连锁遗传的 MR 家系,探究在此家系中导致患儿智力障碍的基因。

1 对象与方法

1.1 研究对象

家系中先证者,男性,22 岁,汉族,175 cm,66 kg,出生时无异常。3 岁开始走路,5 岁开始说话,脑电图及脑部核磁共振未见异常,神经系统检查病理反射(-),精神发育迟滞根据国际疾病分类第十版(ICD-10)诊断标准评定为F71.851,中度精神发育迟缓,F79.902,智力低下。追踪家系资料,该先证者的两个舅舅和一个表兄也有 MR 表型。根据叙述,先证者母亲的两个舅舅也是 MR 患者,已去世。家系中连续 3 代都出现 MR 患者,均为男性,家系描述显示疾病遗传方式基本符合 X 连锁遗传(图 1),但因样本采集的局限,只采集到其中一个核心家系,包括先证者(Ⅳ8)及其父(Ⅲ6)母(Ⅲ5)、姐姐(Ⅳ6)和弟弟(Ⅳ9)的 EDTA 抗凝外周血。该小家系样本无法进行连锁分析,因此本研究采用全基因组外显子测序方法进行该家系致病基因的分析。以 50 例正常人作为人群对照。

1.2 染色体 G 显带核型分析

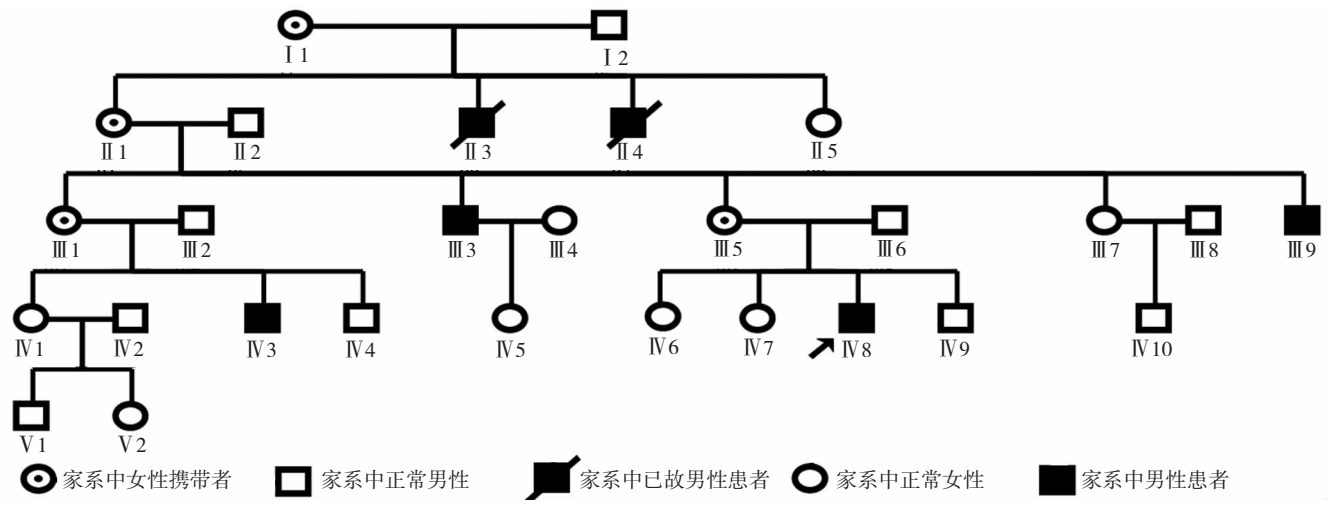
外周血淋巴细胞染色体检查采用含有植物血凝素(phytohaemagglutinin, PHA)和小牛血清的人工液体培养基对外周血淋巴细胞进行体外培养 72 h,加入秋水仙素使淋巴细胞转化停留在中期以获得更多的中期分裂象,提取淋巴细胞制片,经胰蛋白酶消化、吉姆萨染色后,于显微镜下检查染色体数目和形态。

1.3 全基因组测序

全基因组 DNA 根据说明用 QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen,Hilden,Germany)从研究对象外周血中提取出来。根据操作说明用 NimbleGen SeqCap EZ HumanExome Library v2.0 kit (Roche NimbleGen Inc., Wisconsin, USA)对外显子进行捕获。将所捕获的外显子 DNA 随机打断成 150 ~ 200 bp 的片段,随后在片段两端分别连接上接头制备杂交文库。文库经纯化后经过 LM-PCR 的线性扩增与 SureSelect Biotinylated RNA Library (BAITS)进行杂交富集,再经过 LM-PCR 的线性扩增,文库检测合格后即可上机测序(Hiseq2000 测序仪)。对每个捕获文库进行高通量测序并保证测序深度达到要求,原始图像文件经过 Illumina base-calling Software 1.7 进行碱基读取,获得读长为 90 bp 双末端序列(reads)。

1.4 全基因组测序数据处理

所得的序列结果用 SOAPaligner (SOAP2.20)与 NCBI 的参考基因相比较。共有序列和每个等位基因的质量通过用 SOAPsnp 系统设定参数进行分析。所预测的 SNPs 应该满足以下标准:①SNP 质量值≥20;②测序深度应在 4×到 10 000 000×之间;③所预测的拷贝数 < 2;④两个 SNPs 之间的距离应 > 5 bp。用 SIFT(sorting intolerant from tolerant)对 SNPs 进行分析评分,当评分值 > 0.05 时标记为“tolerated”,表示这个突变对蛋白质功能没有影响或者影响较小;当≤0.05 的时候则标记为“damaging”,提示这个突变对蛋白质功能有较大影响,所选出的突变基因应是“damaging”。



Ⅳ8:先证者;Ⅲ5 和Ⅲ6:分别是先证者母亲和父亲

图 1 先证者家系

1.5 Sanger 测序验证

在用全基因组测序方法确定致病基因后,用 Sanger 测序法对全基因组外显子测序结果进行验证。我们利用 Sanger 测序法对先证者及其家人(父亲、母亲、姐姐及弟弟)进行 ARHGAP4 基因测序。所用引物为 ARHGAP4-上游引物:5′-CTCTCTGCACAGGGTGA-AGT-3′,ARHGAP4-下游引物:5′-GTGGCACAGAACA-TGGACTC-3′。PCR 扩增在 PCR 仪(Bio-Rad, Hercules, California, USA)标准条件下进行。PCR 产物用 3 730 测序分析仪(Applied Biosystems, Foster City, California, USA)进行分析,并在先证者的家人及正常人群中探究该基因的表达情况。

2 结果

2.1 先证者染色体核型分析

G 显带核型分析证明先证者的染色体核型为 46,XY(图 2),FISH 实验证实先证者无三体情况。从该家庭的家系图可见,先证者父母、姐姐和弟弟均为正常表型,可判断在此家庭中的智力发育障碍属于伴 X 染色体隐性遗传疾病。先证者中度精神发育迟缓,智力低下,IQ50 符合智力发育障碍评定标准。

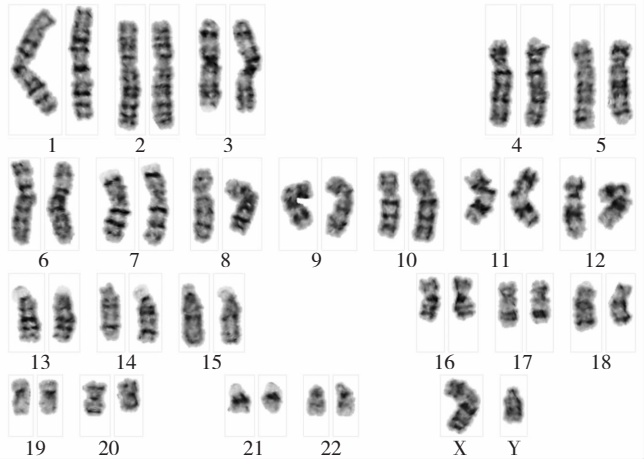


图 2 先证者染色体核型

2.2 全基因组外显子测序结果

用高通量外显子测序对先证者进行外显子测序,目标区域共计 46 036 367 bp,目标区域的平均测序深度为 141 ×,平均读长为 89.88 bp,chrX 的测序深度为 101.92 ×,测序数据与 NCBI 人类参考基因序列(NCBI build 37)、NCBI dbSNP Build 132、千人基因组、hapmap、YH 数据库进行比对。共从先证者外显子基因中鉴别出 1 642 个突变,含 1 455 个 SNPs(包括无义突变、通读和拼接突变)和 187 个 indels。这些鉴别出来的突变基因用 SIFT 进行进一步评估,共有 255 个基因突变可能对生物体有致病性(damaging),对 255 个基因进行分析,发生在 X 染色体上的突变只有 ARHGAP4[chrX:153173202(g.153173202G>A; p.Thr941Met)]。

2.3 Sanger 测序法验证结果

Sanger 测序所得父亲在 ARHGAP4 153173202 的等位基因型为 XG/Y,母亲为 XA/XG,姐姐为 XG/XG,弟弟为 XG/Y,先证者为 XA/Y(图 3)。50 例男性正常对照中未见 XA/Y 基因型。

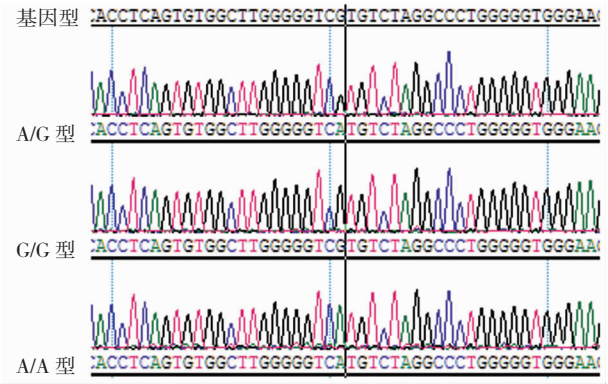


图 3 不同基因型测序结果

3 讨论

小家系样本的遗传性疾病由于研究家系中患者以及携带者少,不足以支持采用连锁分析的策略,以往对小家系中治病基因的研究只能采用候选基因的逐个筛选验证,繁琐而且费时。近年来遗传学研究技术的发展,高通量测序技术的应用,给遗传性疾病家系和散发病例的致病基因鉴定研究提供了可行性[5-7]。本研究对象为小家系样本,应用常规染色体核型分析方法寻找此家系的 MR 致病因素的结果也并不理想,从家系的背景调查推测该疾病属于 X 连锁隐性遗传模式,因此考虑用外显子测序方法来寻找其致病基因。从外显子测序结果和 Sanger 测序验证结果可见,153173202 位点的参考碱基为 G,家系中患者该位点突变为 A,而其母亲为 G/A 杂合子,其余正常表型成员该位点均为碱基 G,考虑 ARHGAP4 基因的 C2822T 突变可能为家系中的疾病相关位点。后续工作中需要对 ARHGAP4 基因编码蛋白的功能验证以证实其在该家系 MR 中致病性。本研究也证实了全基因组外显子测序对疾病的致病基因筛选是可行的。

ARHGAP4 基因与大脑的发育相关。ARHGAP4 位于 Xq28,基因坐标为 X:153172829-153191776(NCBI),最早是 Tribioli 等[8]于 1996 年在构建 Xq28 上的转录图时发现的,长约 200 kb,共编码 3.5 kb mRNA,翻译的蛋白共计 946 个氨基酸。Demura 等[9]和 Schoneberg

等[10]曾报道该基因与尿崩症(nephrogenic diabetes insipidus,NDI)相关,Huang 等[11]认为 ARHGAP4 对大脑发育有重要作用,他们报道了在婴儿时期发育不好,在 27 个月时诊断为尿崩症并且都表现出精神发育障碍的一对异卵双胞胎,这对双胞胎缺失了 Xq28 上的 17.9 kb 基因(包括 AVPR2 和 ARHGAP4 部分基因),而他们的母亲为基因缺失的携带者,与本研究情况相吻合。Wong 等[12]对中国汉族人群中 498 例精神分裂症病例和 2 025 例对照的 GWAS 研究显示,含有 RENBP、MECP2 和 ARHGAP4 基因的 Xq28 区域是与精神分裂症相关的遗传易感位点。ARHGAP4 转录的 mRNA 在发育过程和成人的中枢神经系统中高表达,而其蛋白质则被限定在特定区域,包括海马区 CA3 区、脑干腹侧区域和纹状体的神经元纤维,还有小脑颗粒细胞[13-14]。这些研究都说明 ARHGAP4 与精神发育相关。ARHGAP4 基因突变的临床表型并不十分清楚,而本研究结果显示 ARHGAP4 中的一个碱基突变可能与家系中 MR 的致病有关。对该基因编码蛋白的功能在智力精神发育中的作用需要在后续的工作中进一步完善。

据国家人口计生委数据统计,我国每年出生的新生儿约 2 000 万,而出生缺陷儿占总新生儿人数的 4% ~6%,即每年有 80 万 ~120 万的缺陷儿出生,由此推算我国平均每 30 秒钟就有 1 名缺陷儿出生[15],及时、有效地查找出生缺陷的病因,以采取积极、有效的措施减少或避免缺陷儿出生,是我国及世界各国面临的一个巨大难题。XLMR 对人群健康具有危害性,在男性人群中的发生率为 1/600 ~1/1 000,探寻和确定 XLMR 的致病基因,可使其有效地应用于产前诊断和筛查,有助于减轻家庭和社会的压力,提高出生人口的健康素质。

参考文献:

[1] Luckasson R, Borthwick-Duffy S, Buntinx W H E, *et al*. Mental retardation: Definition, classification, and systems of supports [M]. 10th ed. Washington: American Association on Mental Retardation, 2002.

[2] Chiurazzi P, Schwartz C E, Gecz J, *et al*. XLMR genes: update 2007[J]. Eur J Hum Genet, 2008, 16(4): 422 -434.

[3] 张鑫, 李敏, 张学军. 全基因组外显子测序及其应用[J]. 遗传, 2011, 33(8): 847 -856.

[4] 马丁艾遥, 马丁艾路, 王慧君, 等. 全外显子组测序:儿童疾病诊断新思路[J]. 中国循证儿科杂志,2015,10(1): 4 -18.

[5] Grozeva D, Carss K, Spasic-Boskovic O, *et al*. Targeted Next Generation Sequencing Analysis of 1,000 Individuals with Intellectual Disability[J]. Hum Mutat, 2015, 36(12): 1197 -1204. DOI: 10.1002/humu.22901

[6] Shashi V, Xie P, Schoch K, *et al*. The RBMX gene as a candidate for the Shashi X-linked intellectual disability syndrome[J]. Clin Genet, 2015, 88(4): 386 -390. DOI: 10.1111/cge.12511

[7] Hong N, Chen Y H, Xie C, *et al*. Identification of a novel mutation in a Chinese family with Nance-Horan syndrome by whole exome sequencing[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2014, 15(8): 727 -734. DOI: 10.1631/jzus.B1300321

[8] Tribioli C, Droetto S, Bione S, *et al*. An X chromosome-linked gene encoding a protein with characteristics of a rhoGAP predominantly expressed in hematopoietic cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(2): 695 -699.

[9] Demura M, Takeda Y, Yoneda T, *et al*. Two novel types of contiguous gene deletion of the AVPR2 and ARHGAP4 genes in unrelated Japanese kindreds with nephrogenic diabetes insipidus[J]. Hum Mutat, 2002, 19(1): 23 -29.

[10] Schoneberg T, Pasel K, von-Baehr V, *et al*. Compound deletion of the rhoGAP C1 and V2 vasopressin receptor genes in a patient with nephrogenic diabetes insipidus[J]. Hum Muta, 1999, 14(2): 163 -174.

[11] Huang L, Poke G, Gecz J, *et al*. A novel contiguous gene deletion of AVPR2 and ARHGAP4 genes in male dizygotic twins with nephrogenic diabetes insipidus and intellectual disability[J]. Am J Med Genet A, 2012, 158A(10): 2511 -2518. DOI: 10.1002/ajmg.a.35591

[12] Wong E H, So H C, Li M, *et al*. Common variants on Xq28 conferring risk of schizophrenia in Han Chinese[J]. Schizophr Bull, 2014, 40(4): 777 -786. DOI: 10.1093/schbul/sbt104

[13] Foletta V C, Brown F D, Young W S 3rd. Cloning of rat ARHGAP4/C1, a RhoGAP family member expressed in the nervous system that colocalizes with the Golgi complex and microtubules[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2002, 107(1): 65 -79.

[14] Vogt D L, Gray C D, Young W S 3rd, *et al*. ARHGAP4 is a novel RhoGAP that mediates inhibition of cell motility and axon outgrowth[J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 36(3): 332 -342.

[15] Hu Yinan. Baby born with birth defects every 30 seconds [N]. China Daily, 2007-10-30 (3).

(**收稿**:2015-08-20;**修回**:2015-10-05)

(编辑 王小宴)