DOI:10.16016/j.1000-5404.202104203

3个常染色体显性遗传多囊肾病家系的遗传学分析

娄桂予[1],田向永[2],张玉薇[1],杨 科[1],刘红彦[1],张晓梅[1],曹慧霞[3],王 斌[4] 450002 郑州,河南省人民医院,河南大学人民医院,郑州大学人民医院:医学遗传研究所,河南省遗传性疾病功能重点实验室[1],泌尿外科[2],肾内科[3],神经外科[4]

[摘要] **目的** 对3个常染色体显性遗传多囊肾病家系进行基因检测,明确其致病性突变,为防治方法及产前诊断提供指导。**方法** 收集2017-2020年在河南省人民医院泌尿外科就诊的3个多囊肾家系的病史及临床资料;采集家系成员外周血样品提取DNA,利用靶向扩增高通量测序方法对先证者进行检测,筛查可疑致病位点;Sanger测序法对先证者及家系其他成员进行验证及分析,结合生物信息学分析及美国医学遗传与基因组学会制定的基因变异致病性评估标准,分析变异的致病性。**结果** 家系1、2、3先证者超声结果诊断均为多囊肾,临床分期分别为G1、G3a和G5,在*PKD*1(polycystic kidney disease 1)基因分别发现c.5933delA(p.Asn1978fs)缺失移码突变、c.6871C>T(G2291X)无义杂合突变和c.894_897delCCCT(p.299Sfs*34)缺失移码变异。3个家系的以上变异符合表型-基因型相分离。**结论** 明确了遗传多囊肾病3个家系的致病变异位点,其中c.5933delA和c.894_897delCCCT为新突变,c.6871C>T为已知致病性突变。

[关键词] 常染色显性;多囊肾;PKD1基因;基因变异

[中图法分类号] R394.3; R596.1; R692 [文献标志码] A

Genetic analysis of 3 pedigrees with autosomal dominant polycystic kidney disease

LOU Guiyu[1], TIAN Xiangyong[2], ZHANG Yuwei[1], YANG Ke[1], LIU Hongyan[1], ZHANG Xiaomei[1], CAO Huixia[3], WANG Bin[4] [1]Institute of Medical Genetics, Henan Provincial Key Laboratory of Genetic Diseases and Functional Genomics, [2]Department of Urology, [3]Department of Nephrology, [4]Department of Neurosurgery, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Henan University, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450002, China

[**Abstract**] **Objective** To clarify the pathogenic mutations and provide references for prevention and treatment strategies and prenatal diagnosis by gene detection in 3 pedigrees with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). **Methods** The family history and clinical data of 3 ADPKD pedigrees who admitted to our department of urology during 2017 and 2020 were collected in this study. The peripheral blood samples of these family members were harvested for DNA extraction. Targeted amplification and high-throughput sequencing was used to screen suspected pathogenic mutations in probands, and then these obtained mutations were verified and analyzed in the probands and their family members by Sanger sequencing. The pathogenicity of these mutations was analyzed with bioinformation analysis and the evaluation criteria of the American Society of Medical Genetics. **Results** Ultrasound examination showed that all the probands from the 3 families had polycystic kidneys, at the clinical stages of G1, G3a, and G5 respectively.

[通信作者] 王 斌,E-mail:wb201166@sina.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

The deletion frameshift mutation c.5933delA (p.Asn1978fs), nonsense heterozygous mutation c.6871C>T (G2291X) and deletion frameshift mutation of c.894_897delCCCT (p.299Sfs*34) in polycystic kidney disease 1 (*PKD*1) gene were detected in pedigrees 1, 2 and 3, respectively. The above variants in the 3 families were in line with phenotype-genotype separation. **Conclusion** We identify the pathogenic variants in the 3 pedigrees of hereditary polycystic kidney disease, among which c.5933delA and c.894_897delCCCT are new mutations, and c.6871C>T is a known pathogenic mutation.

[**Key words**] autosomal dominant; polycystic kidney; *PKD*1 gene; gene variation

Corresponding author: WANG Bin, E-mail: wb201166@sina.com

常染色体显性遗传多囊肾病(autosomal dominant polycystic kidney disease,ADPKD,MIM#613095)是一种常见的遗传性疾病,全球患病率为1/1 000~1/400,主要表现为肾部囊肿渐进性增多,肾脏结构和功能不可逆受损,部分患者还伴有肝脏、胰腺囊肿[1-3]。由于缺乏有效的治疗手段,50%的患者会进展为终末期肾病[4],需要靠透析或肾移植维持生命,患者生活质量较差,经济负担加重,仅在我国就有150万ADPKD患者[5]。

ADPKD的主要致病基因是*PKD*1(polycystic kidney disease 1)和*PKD*2[6],对常染色显性遗传多囊肾病家系成员进行致病基因检测,明确致病遗传因素,通过植入前基因检测或产前指导,阻断疾病的传递,可从根本上降低ADPKD的发病率。本研究利用靶基因高通量测序技术,对3个ADPKD家系的先证者进行基因检测,分析可疑致病位点,并对家系成员进行测序验证,为3个ADPKD家系明确分子诊断,对于指导患者进行早期干预,延缓疾病进展,阻断下一代传递具有重要的意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

3个家系来自2017-2020年河南省人民医院泌尿外科就诊的多囊肾患者。根据患者家族史及临床表现,首先对先证者行超声检查、肾功能检测,并询问病史及家族史,初步诊断为常染色体显性遗传多囊肾病,本研究经河南省人民医院伦理委员会批准(HNEECKY-2019-15-03),患者及家属知情同意,采集3个家系多名成员的外周血2~3 mL,放置在4 ℃冰箱,供基因检测,同时采集晨尿,进行尿蛋白、肾小球滤过率检测。

家系1,先证者,女性,35岁,有肾脏病家族史,超声结果显示,右肾大小约127 mm×62 mm×53 mm,左肾体积大,大小约132 mm×86 mm×62 mm,轮廓清晰,包膜完整,双肾可见多个大小不等的囊性回声(图1A);肾功能正常,肾小球滤过率(eGFR):101 mL·min^{-1}·1.73 m^{-2},尿微量白蛋白肌酐比(ACR):25 mg/g。根据主述,家中连续4代均有多囊肾患者,呈典型的常染色体显性遗传方式。

家系2,先证者,男性,42岁,有肾脏病家族史,超声结果显示,双侧肾体积增大,右肾大小约235 mm×199 mm×109 mm,左肾大小约216 mm×157 mm×101 mm,形态饱满,包膜光滑,双侧可见多个大小不等的囊性回声(图2A)。肾功能中度受损,eGFR:56 mL·min^{-1}·1.73 m^{-2},ACR:30 mg/g。

家系3,先证者,女性,42岁,尿毒症后期,有肾脏多囊家族史,双肾体积增大,右肾长约157 mm,左肾长约166 mm,形态失常,正常结构消失,代之多个大小不等的囊性回声(图3A),肝内布满大小不等囊性回声,以小囊为主。肾功能严重受损,eGFR:4.4 mL·min^{-1}·1.73 m^{-2},ACR:400 mg/g。

1.2 研究方法

1.2.1 先症者靶基因高通量测序 根据德国QIAGEN公司的QIAmp DNA mini kit(QIAGEN,德国)试剂盒操作说明书,从外周血中提取基因组DNA;按照Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0试剂盒的操作方法,构建包括*PKD*1和*PKD*2基因全部外显子及剪切区域的文库,并对文库进行扩增及富集;使用Ion PGM Hi-Q View Sequencing 200 Kit v2(Catalog No. A30043;美国Life Technologies公司)在Ion Torrent PGM平台上进行测序反应。采用the Ion Torrent Suite TM v3.6分析系统对测序结果进行分析。检测出的变异,去除同义突变,去除基因携带频率>5%的突变(参考数据库为dbSNP138,1000 Genomes,ExAC东亚人群基因突变频率)后,并用Mutation Taster(http://www.mutationtaster.org)、Polyphon、Shift软件预测其功能。

1.2.2 Sanger测序验证 针对高通量测序结果检

出的可疑致病突变设计引物,进行 PCR 扩增:每 25 μL 含 0.25 μL Primer STAR® HS DNA Polymerase, 1.25 μL 上下游引物,2.5 μL PCR 缓冲液,1 μL GCBuffer,1 μL 基因组 DNA 50~100 ng,2.5 μL dNTP,去离子水补至 25 μL。扩增条件:95 ℃预变形 5 min;95 ℃变性 5 min,60 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 40 s,共 35 轮循环,最后 72 ℃延伸 5 min。反应产物纯化后,在 ABI3730 测序仪上测序,并用 Sequencher 4.9 进行序列比对分析。

1.2.3　变异致病性分析　　根据美国医学遗传与基因组学会(The American College of Medical Genetics and Genomics,ACMG)制定的遗传变异分类标准与指南对变异进行分级。

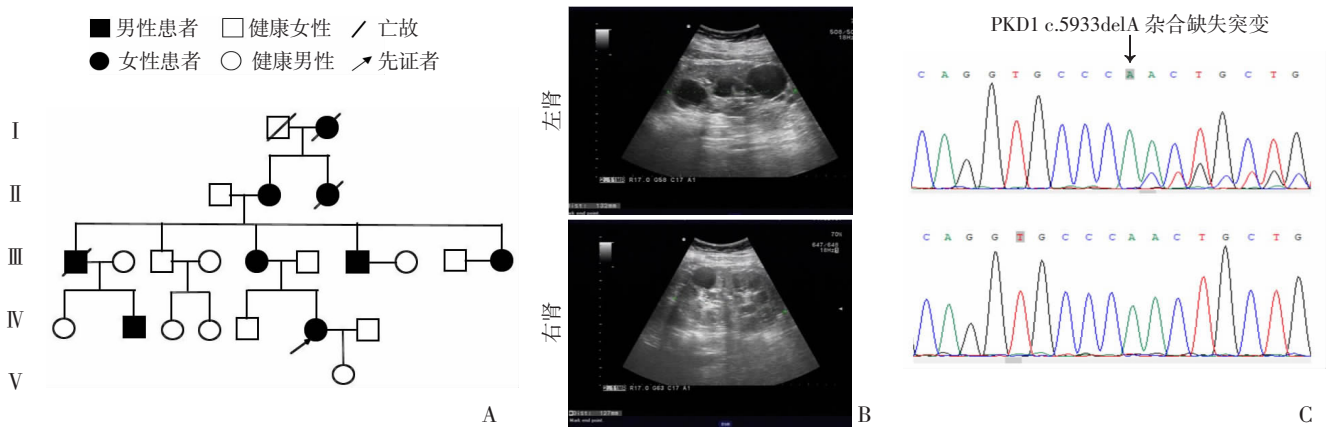
2　结果

2.1　家系临床表型分析

根据先证者主述,家系 1 有 9 人患有多囊肾病,其中男性 3 人,女性 6 人;家系 2 有 11 人患有多囊肾病,男性 4 人,女性 7 人;家系 3 有 9 人患病,男性 4 人,女性 5 人,3 个家系均符合常染色体显性遗传模式(图 1A、2A、3A)即多代遗传,与性别无关。超声结果显示,3 个家系的先证者双侧肾均有不同程度的多囊(图 1B、2B、3B)。根据慢性肾脏病分期标准,家系 1 先证者肾功能正常;家系 2 先证者双侧肾体积增大,肾功能中度受损,属 G3a 期;家系 3 先证者肾功能严重受损,属 G5 期(表 1)。

2.2　靶基因测序结果分析

对来自 3 个家系的先证者进行靶基因测序分析,发现家系 1 先证者 *PKD*1 基因 15 号外显子存在 c.5933delA(N1978fs*36)杂合缺失突变,家系 2 先证者 *PKD*1 基因 15 号外显子存在 c.6871C>T(G2291X)杂合无义突变,家系 3 先证者的 *PKD*1 基因 5 号外显子存在 c.894_897delCCCT(P299fs*34)杂合缺失变异(表 1)。检索 NCBI、人类遗传疾病突变数据库(Human Gene Mutation Database,HGMD)和常染色体显性遗传多囊肾数据库(ADPKD Mutation Database)表明,c.6871C>T(Glu2291X)位点的无义变异为已知致病突变,c.894_897delCCCT 和 c.5933delA 未见相关报道。Mutation Taster 预测 *PKD*1 基因 c.894_897delCCCT 和 c.5933delA 两个位点杂合缺失变异致病可能性大。

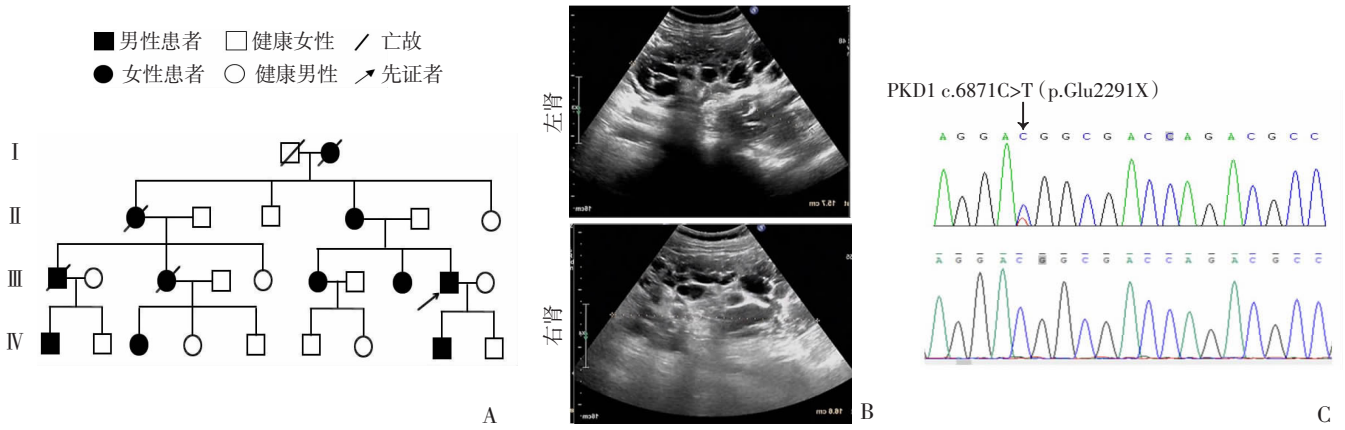


A:家系图; B:先证者超声图　示双侧多囊;C:Sanger 测序图　上图为家系 1 患者测序代表图,下图为家系正常成员测序代表图,箭头示核苷酸缺失位置

图 1　家系 1 的临床资料及 Sanger 测序图

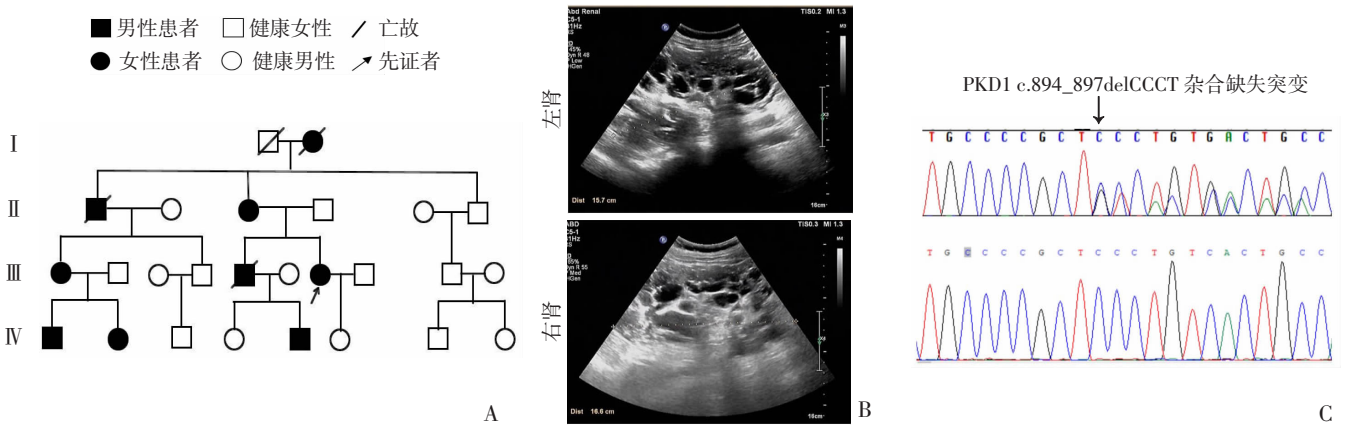
表 1　3 个家系先证者 *PKD*1 基因(NM_001009944.2)表型、基因型信息

先证者	年龄/岁	性别	临床分期	变异在外显子的位置	核苷酸变化	氨基酸变化	变异类型	纯合/杂合	ACMG 分级
家系 1	35	女	G1	15	c.5933delA	p.N1978fs*36	移码	杂合	可能致病
家系 2	42	男	G3a	15	c.6871C>T	p.Gln2291X	无义	杂合	致病
家系 3	42	女	G5	5	c.894_897delCCCT	p.P299fs*34	移码	杂合	可能致病



A:家系图; B:先证者超声图　示双侧多囊;右肾长约 157 mm,左肾长约 166 mm,形态失常,正常结构消失,双侧多囊;C:Sanger 测序图　上图为家系 2 患者测序代表图,下图为家系正常成员测序代表图,箭头示突变位点

图 2　家系 2 的临床资料及 Sanger 测序图



A:家系图; B:先证者超声图　示双侧多囊;C:Sanger 测序图　上图为家系 3 患者测序代表图,下图为家系正常成员测序代表图,箭头示变异核苷酸

图 3　家系 3 的临床资料及 Sanger 测序图

2.3　家系成员致病位点分析

对家系 1、2、3 的先证者及其家系成员的 *PKD1* 基因相应突变进行 Sanger 测序分析。结果显示:家系 1 患者(Ⅱ-1、Ⅲ-1、Ⅲ-7、Ⅳ-1、Ⅳ-2、Ⅳ-5,图 1C)均检测到 c.5933delA 缺失变异;家系 2 患者(Ⅱ-4、Ⅲ-6、Ⅲ-8、Ⅲ-9、Ⅳ-1、Ⅳ-3、Ⅳ-8,图 2C)样本中检测到 c.6871C>T(G2291X)无义突变;家系 3 患者(Ⅱ-3、Ⅲ-1、Ⅲ-7、Ⅳ-1、Ⅳ-2、Ⅳ-5,图 3C)样本检测到 c.894_897delCCCT 缺失变异,3 个家系的无症状者成员均不携带此变异,符合表型和基因型相分离的特点。

根据美国医学遗传学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)关于遗传变异分类标准,我们认为其中 2 个移码突变可能为致病性变异,依据如下:经检索 ExAC 和 1000G 数据库,均未发现该变异,符合 PM2;该 2 个缺失变异均导致其编码的蛋白质长度发生截断,符合 PM4;家系多个患者中检测到此变异,变异与疾病在家系中共分离,符合 PP1;Mutation Taster 软件预测,该 2 个缺失移码变异具有致病性,属于 PP3;家系患者符合 ADPKD 的临床表现,提供支持致病性证据 PP4。综合以上分析,该 2 个突变为 PM2+ PM4+PP1+ PP3+PP4,符合可能致病性突变的诊断标准(表 1),很可能是家系 1 及家系 3 的致病突变。经查阅文献和数据库,该 2 个变异未见报道,为新突变。

3　讨论

遗传性多囊肾病(APKD)主要有两种遗传模式,即常染色体显性遗传(ADPKD)多囊肾病和常染色体

隐性遗传(ARPKD)多囊肾病。ARPKD 主要致病基因是 *PKDH*1[7],发病率只有 1/40 000~1/20 000,多数早年夭折,很少存活至成年;ADPKD 发病率相对较高,有明显的家族发病特征,发病时间较晚,主要致病基因是 *PKD*1 和 *PKD*2。其中约 85% ADPKD 患者是由 *PKD*1 基因突变导致的,仅有约 15% 的 ADPKD 是由 *PKD*2 基因突变引起的[8-9]。患有这种疾病的人大约有一半会发展为终末期肾脏疾病,需要进行透析或肾移植。患者进展为终末期肾病通常发生在 40~60 岁之间[10]。治疗方面,有临床研究发现,血管加压素 V2 受体抑制剂托伐普坦,能降低细胞内 cAMP 的水平,可延缓 ADPKD 进展,但不良反应发生率高,因此至今尚没有理想的控制 ADPKD 进展的药物[11]。目前,临床上尚无有效的治疗方法,只能对症处理。由于该病发病晚,早发现、早预防或避免致病基因向下一代传递都依赖于致病基因的明确诊断。

本研究在 2 个 ADPKD 家系中分别发现了 *PKD*1 基因的 2 个新缺失移码突变,即 c.894_897delCCCT(p.299Sfs * 34)和 c.5933delA(p.N1978Tfs * 138)。据梅奥多囊肾数据库(ADPKD Mutation Database)统计,移码突变(449 个)占收录的 1 273 个 PKD1 致病变异的 35.3%,是 *PKD*1 突变的常见类型。PKD1 编码多囊蛋白 PC1,属于跨膜蛋白,由 4 303 个氨基酸组成,结构类似 G 粘连蛋白偶联受体(GPCRs)[12-13],PC1 和 PC2(PKD2 编码蛋白)的羧基端在胞内形成异二聚体,调控胞内液体和 Ca^{2+} 的流入。研究表明,PC1 和 PC2 结构变化可能影响 G 蛋白和 cAMP 信号通路从而导致囊肿生成[14]。该 2 个移码突变均位于 *PKD*1 基因编码的 PC1 蛋白胞外 N 端区域,其对蛋白功能的影响,尚需要进一步功能实验进行分析。

研究报道,PKD1 截断、PKD1 框内插入/删除、PKD1 非截断发生率分别为 38.3%、4.3%、27.1%[15],并且相关研究显示 *PKD*1 突变类型与肾脏表型之间具有较强的相关性,*PKD*1 基因突变的男性患者会更早进展到 ESRD,与 PKD1 截断突变的患者相比,PKD1 框内插入/缺失、PKD1 非截断的患者具有较小的 ESRD 风险。在 3 个家系中,家系 1 和家系 3 为移码后发生的截断,家系 2 为无义突变导致的 PKD1 截断,符合多数突变类型为 PKD1 截断的报道。目前,家系 2 和家系 3 的肾脏病分期为 G3a 和 G5 期,表现为较严重的肾脏功能损害。家系 1 虽然也是 PKD1 截断突变,其肾脏功能尚无明显影响,鉴于本研究只有 3 例家系,尚需要更多的基因型-表型的数据来支持以上结论。

此外,*PKD*1 和 *PKD*2 存在单个或多个外显子缺失或重复类型,基于高通量测序的基因检测不能检出该种突变,需要应用多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)针对 *PKD*1 和 *PKD*2 进行检测,进而发现该种变异。我们建议,对于临床表现符合多囊肾诊断,而高通量测序检出阴性的病例,应利用后者对阴性病例进行筛查,以排除微重复和微缺失所导致的 ADPKD。

总之,本研究丰富了 *PKD*1 的突变谱,也为 3 个多囊肾家系后续进行遗传咨询、家系中未发病患者的早期预防和治疗,以及产前诊断提供了有力的实验室证据。

参考文献:

[1] CORNEC-LE GALL E, AUDRÉZET M P, LE MEUR Y, *et al*. Genetics and pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease: 20 years on[J]. Hum Mutat, 2014, 35(12): 1393-1406. DOI:10.1002/humu.22708.

[2] BERGMANN C, GUAY-WOODFORD L M, HARRIS P C, *et al*. Polycystic kidney disease[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 50. DOI: 10.1038/s41572-018-0047-y.

[3] NOBAKHT N, HANNA R M, AL-BAGHDADI M, *et al*. Advances in autosomal dominant polycystic kidney disease: a clinical review[J]. Kidney Med, 2020, 2(2): 196-208. DOI: 10.1016/j.xkme.2019.11.009.

[4] BRAUN W E. Autosomal dominant polycystic kidney disease: emerging concepts of pathogenesis and new treatments[J]. Cleve Clin J Med, 2009, 76(2): 97-104. DOI: 10.3949/ccjm.76a.gr001.

[5] 徐德超,马熠熠,梅长林. 托伐普坦治疗快速进展型常染色体显性多囊肾病的临床实践指南解读[J]. 中华肾脏病杂志, 2019, 35(5): 387-392. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2019.05.011.
XU D C, MA Y Y, MEI C L. Interpretation of the clinical practice guideline for treatment of rapidly progressive autosomal dominant polycystic kidney disease with tolvaptan[J]. Chin J Nephrol, 2019, 35(5): 387-392. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2019.05.011.

[6] TORRES V E, HARRIS P C. Progress in the understanding of polycystic kidney disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(2): 70-72. DOI: 10.1038/s41581-018-0108-1.

[7] PALYGIN O, ILATOVSKAYA D V, LEVCHENKO V, *et al*. Characterization of purinergic receptor expression in ARPKD

cystic epithelia[J]. Purinergic Signal, 2018, 14(4): 485-497. DOI: 10.1007/s11302-018-9632-5.

[8] LEUNG J. Inherited renal diseases[J]. Curr Pediatr Rev, 2014, 10(2): 95-100. DOI: 10.2174/15733963100214051 3101755.

[9] XUE C, ZHOU C C, WU M, *et al*. The clinical manifestation and management of autosomal dominant polycystic kidney disease in China[J]. Kidney Dis (Basel), 2016, 2(3): 111-119. DOI: 10.1159/000449030.

[10] 胡胜, 李东杰, 谭新骥, 等. 常染色体显性遗传多囊肾病的研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(10): 1179-1187. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180110.
HU S, LI D J, TAN X J, *et al*. Research progress in autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. J Central South Univ Med Sci, 2019, 44(10): 1179-1187. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180110.

[11] GRANTHAM J J, CHAPMAN A B, BLAIS J, *et al*. Tolvaptan suppresses monocyte chemotactic protein-1 excretion in autosomal-dominant polycystic kidney disease[J]. Nephrol Dial Transplant, 2017, 32(6): 969-975. DOI: 10.1093/ndt/gfw060.

[12] GRANTHAM J J. Autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. N Engl J Med, 2008, 359(14): 1477-1485. DOI: 10.1056/nejmcp0804458.

[13] SU Q, HU F Z, GE X F, *et al*. Structure of the human PKD1-PKD2 complex[J]. Science, 2018, 361(6406): eaat9819. DOI: 10.1126/science.aat9819.

[14] 王秋菊, 沈亦平, 邬玲仟, 等. 遗传变异分类标准与指南[J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47(6): 668-688.
WANG Q J, SHEN Y P, WU L Q, *et al*. Classification criteria and guidelines for genetic variation[J]. Sci Sin Vitae, 2017, 47(6): 668-688.

[15] HWANG Y H, CONKLIN J, CHAN W, *et al*. Refining genotype-phenotype correlation in autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(6): 1861-1868. DOI: 10.1681/ASN.2015060648.

(**收稿**:2021-04-30;**修回**:2021-07-06)

(编辑 汪勤俭)