

## 1例成骨不全患者致病基因鉴定

赵强, 黄泳华, 冯穗华, 冼诗瑶, 潘焯仪, 吴欣新, 张妙莲, 吴海涛 (广东省江门市中心医院, 广东江门 529000)

**摘要:** 目的 鉴定1例成骨不全患者致病基因。方法 提取1例成骨不全患者及父母外周血DNA, 先用成骨不全相关基因芯片进行捕获测序, 再用Sanger测序验证。结果 患者鉴定出*P3HI*基因复合杂合突变c.2164C>T(p.Q722\*)和c.466-7T>G, 分别来源于父母; c.2164C>T(p.Q722\*)为已报道致病性突变, 而c.466-7T>G位为新突变。结论 该例成骨不全患者的致病基因为*P3HI*基因复合杂合突变。

**关键词:** 成骨不全; *P3HI*基因; 杂合突变

中图分类号: Q 344

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)01-0035-05

### Identification of pathogenic gene in a patient with osteogenesis imperfecta

ZHAO Qiang, HUANG Yong-hua, FENG Sui-hua, XIAN Shi-yao, PAN Zhuo-yi, WU Xin-xin, ZHANG Miao-lian, WU Hai-tao (Jiangmen Central Hospital, Jiangmen 529000, China)

**Abstract:** Objective To identify the pathogenic gene in a patient with osteogenesis imperfecta (OI). Methods Peripheral blood DNA was extracted from an OI patient and her parents and underwent target exome capture using OI-associated gene chip. The candidate pathogenic mutations were validated using Sanger sequencing. Results The compound heterozygous mutations of *P3HI* gene including c.2164C>T (p.Q722\*) and c.466-7T>G were identified and inherited from her father and mother, respectively. The c.2164C>T (p.Q722\*) was a reported pathogenic mutation, while c.466-7T>G was a novel mutation. Conclusion The compound heterozygous mutations of *P3HI* gene are the pathogenic mutation in the present case of OI.

**Key words:** osteogenesis imperfecta; *P3HI*; heterozygous mutation

成骨不全(OI)是一种以骨量降低、骨骼脆性增加、反复骨折及蓝巩膜为主要特征的单基因遗传病, 在新生儿中发生率约为1/20 000<sup>[1-2]</sup>。成骨不全临床表型异质性和遗传异质性都非常强, 临床表型谱非常丰富, 不同患者临床表现差异非常大, 可以仅表现为骨密度稍低, 也可有严重骨骼异常, 甚至出现婴儿期致死<sup>[3-4]</sup>。1979年Silence根据临床表现和遗传方式将其分为4种亚型<sup>[5]</sup>, 随着基因检测技术的发展, 成骨不全相关致病基因被陆续鉴定发现<sup>[6]</sup>, 目前按致病基因分类已达十余种。通过检索OMIM及Pubmed数据库可发现, 目前已报道与成骨不全临床表现明确相关基因已有10余个, 其中大多数已报道病例均是由常染色体显性基因*COL1A1*和*COL1A2*所引起<sup>[7]</sup>, *COL1A1*和*COL1A2*为I型胶原蛋白编码

基因。近年来不断有报道由常染色体隐性基因突变所导致的成骨不全病例<sup>[8]</sup>, 这些基因可调节I型胶原蛋白的转录后修饰、分泌及加工<sup>[2]</sup>。由于各亚型在临床表现及影像学特征上的重叠, 成骨不全的临床诊断及分类一直都比较困难<sup>[9]</sup>。随着近年高通量基因测序技术在临床诊断上广泛应用, 尤其适应于成骨不全这类临床表现度及遗传异质性均较复杂的疾病分子诊断。在本研究中, 我们对1例疑似成骨不全的家系使用相关基因捕获测序方法, 对测序数据进行生物信息学过滤、筛选及分析, 鉴定该成骨不全家系致病性基因突变, 并对基因突变进行家系遗传机制分析及相关功能学预测研究, 以期为其临床诊断、预防及后续生育阻断提供有效的分子诊断信息。

### 1 病例资料

#### 1.1 研究对象

患儿为10岁女孩, 自4岁起反复骨折, 查体及X线检查显示双下肢及前臂弯曲畸形, 胸骨畸形, 双下肢及肱骨多处骨折(图1), 无明显压痛, 伴有牙发

**基金项目:** 广东省自然科学基金资助项目(No. 2018A030310050); 江门市科技计划项目(No. 2018020100680004241)

**收稿日期:** 2020-04-21; **修订日期:** 2020-10-18

**作者简介:** 赵强(1988-), 男, 博士, 主管技师

育不良,蓝色巩膜(图2),听力正常。临床诊断为疑似成骨不全,但一直未进行相关基因检测。患儿父母均无类似临床表现,自述无家族史。本研究采集患儿及父母外周血,并采用本地50名正常个体外周血作为对照。本研究获得医院伦理委员会审核批准,所有研究对象均征得本人或监护人同意,并签署知情同意书。



A. 因骨折导致肱骨不规则弯曲的愈合; B. 严重的骨质减少正持续进展,手的前后位影像显示指骨增长

图1 患儿X射线照



A. 异常的牙釉质发育; B. 蓝色巩膜

图2 患儿巩膜及牙齿发育临床表现

## 1.2 标本处理

使用5 mL EDTA抗凝管采集患儿及其父母外周血,使用DNA提取商品化试剂盒(QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Germany),按产品说明书提取各研究对象DNA。

## 1.3 成骨不全相关基因捕获测序

使用超声波仪将提取的基因组DNA打断为约100~500 bp小片段,然后通过磁珠筛选打断后DNA片段,筛选出主片段大小为150~200 bp,末端补平后在3'端加碱基“A”采用华大基因(BGI, Shenzhen, China)定制芯片与患者DNA库于47℃杂交16~24 h,

该芯片包含13个成骨不全目标基因编码区及临近剪接位点捕获探针(表1),杂交结束后进行探针洗涤和洗脱反应。文库经片段大小、浓度检测,合格后各文库进行pooling、定量,然后行单链环化。环化后的文库经过制备形成DNA纳米球,利用高通量测序仪BGISEQ-500(BGI, Shenzhen, China)连续双向测序。

## 1.4 测序下机数据分析

下机原始数据(Raw reads)进行测序质量评估,去除低质量以及被接头污染的reads<sup>[10]</sup>。随后用BWA软件(Burrows Wheeler Aligner)与HG19人类基因组数据库进行序列比对<sup>[11]</sup>,GATK软件进行SNV(single nucleotide mutation)和Indel(insertion and deletion)鉴定,生成目标区域碱基多态性结果,随后进行数据库(NCBI dbSNP, HapMap, 1 000 human genome dataset和 database of 100 Chinese healthy adults)比对,并对鉴定出的可疑突变进行注释及筛选,突变致病性评估是基于ACMG流程<sup>[12]</sup>。

## 1.5 Sanger测序验证

使用Oligo7软件针对疑似致病突变及周边区域设计扩增引物,对患儿及其父母基因组DNA进行突变区域特异性PCR扩增,扩增产物经纯化后,进行Sanger测序反应,判断二代测序鉴定出的疑似致病突变是否真实,且突变是否符合遗传规律。

## 1.6 基因突变生物功能分析和预测

通过国内外文献检索、致病突变数据库(HGMD和Clinvar)及突变后对基因表达翻译的影响判断突变功能影响。通过Human Splicing Finder、Maxant Scan及NNSplice软件预测内含子突变对mRNA剪接的影响及产生新剪接位点可能性。

## 2 结果

### 2.1 基因捕获高通量测序及数据过滤

患儿经过13个成骨不全致病基因捕获测序,获得了相关基因外显子区及邻近15个碱基的内含子区域的碱基序列片段,经一系列生信过滤分析,测序数据各质量参数均合格见表1。

### 2.2 候选基因突变过滤筛选

鉴定出单碱基突变及20个碱基以下缺失插入突变共22个,经过分析筛选流程,最终筛选出P3H1基因中一对复合杂合突变为患儿疑似致病突变,分别为c.2164C>T(p.Q722\*)和c.466-7T>G,其中突变c.466-7T>G未有文献及数据库报道,属于新突变,见表2。

表1 测序数据质量参数值

检测参数	结果数值
目标基因数(基因名)	13 ( <i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i> , <i>IFITM5</i> , <i>PPIB</i> , <i>CRTAP</i> , <i>P3H1</i> , <i>SERPINF1</i> , <i>FKBP10</i> , <i>SP7</i> , <i>BMP1</i> , <i>SERPINH1</i> , <i>WNT1</i> , <i>TMEM38B</i> )
目标区长度/bp	23 676
目标区覆盖度	100.0%
目标区平均深度(X)	185.98
目标区平均深度>30X位点所占比例	98.05%

表2 候选致病变异筛选流程

筛选条件	剩余变异的数目
13个候选基因中的变异	22
在千人基因组数据库中次要等位基因频率<0.01	5
排除同义突变	4
排除与遗传模式不相符的变异	3
预测为有害性的变异	2
符合家系共分离的变异	c.466-7T>G and c.2164C>T (p.Q722*) in <i>P3H1</i>

### 2.3 家系Sanger测序验证

针对c.2164C>T(p.Q722\*)和c.466-7T>G位点设计PCR扩增引物,对患儿及其父母行PCR扩增,扩增产物进行Sanger测序验证,其中突变c.2164C>T(p.Q722\*)来源母亲,突变c.466-7T>G来源于父亲,见图3。

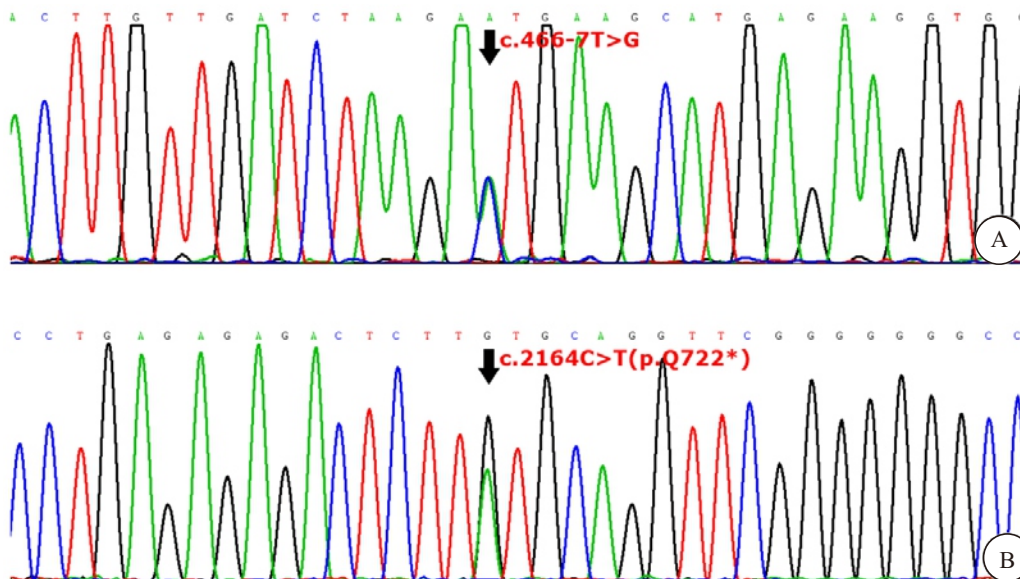
### 2.4 生物信息分析及预测

突变c.2164C>T(p.Q722\*)为无义突变,导致722

位氨基酸提前产生终止密码子,使得722位及后续氨基酸无法翻译,P3H1蛋白发生截断。而突变c.466-7T>G位于内含子区域,经预测该突变导致新剪接位点产生及原剪接位点破坏可能性较大。其中Human Splice Finder软件评估野生型和突变后的CV (consensus value)分别为56.84和85.79(阳性阈值为65), $\Delta CV$ 为+50.93%(阳性阈值为+10%)。其中Maxant Scan软件评估野生型和突变CV(consensus value)分别为-2.32和6.26(阳性阈值为3), $\Delta CV$ 为+369.83%(阳性阈值为+30%),见图4。

### 3 讨论

*P3H1*基因编码脯氨酰-3-羟化酶-1,该蛋白属于参与胶原生物合成、折叠及组装的胶原羟化酶家族成员,它与CRTAP蛋白、PPIB蛋白组成胶原蛋白翻译后修饰复合体,负责对I型胶原蛋白单个脯氨酸残基进行羟基化<sup>[13-14]</sup>。*P3H1*是一个常染色体隐性致病基因,该基因纯合突变或复合杂合突变可导致成骨不全VIII型,通过检索HGMD及Pubmed数据库,



A. 箭头所指的碱基为c.466-7T>G杂合变异; B. 箭头所指的碱基为c.2164C>T (p.Q722\*)杂合变异

图3 家系中*P3H1* c.466-7T>G和 c.2164C>T (p.Q722\*) Sanger测序图





- Fracture rates and fracture sites in patients with osteogenesis imperfecta: A nationwide register-based cohort study [J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32: 125-134.
- [2] FORLINO A, MARINI J C. Osteogenesis imperfecta[J]. *Lancet*, 2016, 387: 1657-1671.
- [3] LIM J, GRAFE I, ALEXANDER S, et al. Genetic causes and mechanisms of osteogenesis imperfecta[J]. *Bone*, 2017, 102: 40-49.
- [4] SHAPIRO J R, ROWE D W. Imperfect osteogenesis and osteoporosis[J]. *N Engl J Med*, 1984, 310: 1738-1740.
- [5] SILLENCE D O, RIMOIN D L. Classification of osteogenesis imperfect[J]. *Lancet*, 1978, 1: 1041-1042.
- [6] VALADARES E R, CARNEIRO T B, SANTOS P M, et al. What is new in genetics and osteogenesis imperfecta classification?[J]. *J Pediatr (Rio J)*, 2014, 90: 536-541.
- [7] RAUCH F, GLORIEUX F H. Osteogenesis imperfecta[J]. *Lancet*, 2004, 363: 1377-1385.
- [8] CAPARROSMARTIN J A, VALENCIA M, PULIDO V, et al. Clinical and molecular analysis in families with autosomal recessive osteogenesis imperfecta identifies mutations in five genes and suggests genotype-phenotype correlations[J]. *Am J Med Genet A*, 2013, 161A: 1354-1369.
- [9] HUANG Y, MEI L, LV W, et al. Targeted exome sequencing identifies novel compound heterozygous mutations in P3H1 in a fetus with osteogenesis imperfecta type VIII[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 464: 170-175.
- [10] WEI X, JU X, YI X, et al. Identification of sequence variants in genetic disease-causing genes using targeted next-generation sequencing[J]. *Plos One*, 2011, 6: e29500.
- [11] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1754-1760.
- [12] 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]. *Genet Med*, 2015, 17: 405-424.
- [13] CABRAL W A, CHANG W, BARNES A M, et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta [J]. *Nat Genet*, 2007, 39: 359-365.
- [14] MORRILLO R, BERTIN T K, CHEN Y, et al. CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta[J]. *Cell*, 2006, 127: 291-304.
- [15] CHANG W, BARNES A M, CABRAL W A, et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 and CRTAP are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19: 223-234.
- [16] BALDRIDGE D, SCHWARZE U, MORELLO R, et al. CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta[J]. *Hum Mutat*, 2008, 29: 1435-1442.
- [17] ZHANG Z L, ZHANG H, KE Y H, et al. The identification of novel mutations in COL1A1, COL1A2, and LEPRE1 genes in Chinese patients with osteogenesis imperfecta[J]. *J Bone Miner Metab*, 2012, 30: 69-77.
- [18] WILLAERT A, MALFAIT F, SYMOENS S, et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation[J]. *J Med Genet*, 2009, 46: 233-241.

~~~~~  
 (上接第13页)

- [36] XIONG J, SUN Q, JI K H, et al. Epidermal growth factor promotes transforming growth factor- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in HK-2 cells through a synergistic effect on Snail[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(1): 241-250.
- [37] YANG M H, WU M Z, CHIOU S H, et al. Direct regulation of twist by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(3): 295-305.
- [38] IMAI T, HORIUCHI A, WANG C J, et al. Hypoxia attenuates the expression of e-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(4): 1437-1447.
- [39] SULLIVAN N J, SASSER A K, AXEL A E, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28(33): 2940-2947.