

论著·临床研究

2例X-连锁低血磷性佝偻病患者 PHEX基因新发突变的研究

冉情¹ 熊丰¹ 朱岷¹ 邓蕾丽¹ 雷培芸² 罗雁红¹ 曾燕¹ 朱高慧¹ 宋萃¹

(重庆医科大学附属儿童医院 1. 内分泌科; 2. 核医学科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 儿童肿瘤研究室, 重庆 400014)

[摘要] **目的** 研究2例X-连锁低血磷性佝偻病(XLH)患儿及家系磷酸盐调节基因(PHEX)的突变类型, 以明确其遗传学病因。**方法** 回顾性分析2例XLH患者临床资料, 应用高通量测序技术从基因组水平对先证者的XLH致病基因PHEX进行检测, 并应用PCR-Sanger测序法对突变基因的家系分布进行验证。**结果** 2例患儿均检测到PHEX基因新发突变, 1例为移码突变c.931dupC, 导致翻译提前终止, 产生截短蛋白p.Gln311Profs*13; 另1例为剪接位点突变IVS14+1G>A, 导致外显子15跳跃, 产生不完整的氨基酸链。2例患儿父母的基因表型均正常。**结论** c.931dupC和IVS14+1G>A是PHEX基因的两个新突变, 可能是XLH新的致病性突变。
[中国当代儿科杂志, 2017, 19(5): 534-538]

[关键词] 低血磷性佝偻病; 磷酸盐调节基因; 突变分析; 儿童

Novel PHEX gene mutations in patients with X-linked hypophosphatemic rickets: an analysis of 2 cases

RAN Qing, XIONG Feng, ZHU Min, DENG Lei-Li, LEI Pei-Yun, LUO Yan-Hong, ZENG Yan, ZHU Gao-Hui, SONG Cui. Department of Endocrinology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Xiong F, Email: xiongfengw@163.com)

Abstract: Objective To investigate PHEX gene mutations in 2 patients with X-linked hypophosphatemic rickets (XLH) and their families and to clarify the genetic etiology. **Methods** A retrospective analysis was performed for the clinical data of two patients with XLH. High-throughput sequencing was used to detect the PHEX gene, a pathogenic gene of XLH. PCR-Sanger sequencing was used to verify the distribution of mutations in families. **Results** Both patients had novel mutations in the PHEX gene; one patient had a frameshift mutation, c.931dupC, which caused early termination of translation and produced the truncated protein p.Gln311Profs*13; the other patient had a splice site mutation, IVS14+1G>A, which caused the skipping of exon 15 and produced an incomplete amino acid chain. Their parents had normal gene phenotypes. **Conclusions** c.931dupC and IVS14+1G>A are two novel mutations of the PHEX gene and might be the new pathogenic mutations of XLH.
[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(5): 534-538]

Key words: Hypophosphatemic rickets; PHEX gene; Mutation analysis; Child

X-连锁低血磷性佝偻病(X-Linked hypophosphatemic rickets, HYP或XLH, OMIM #307800)是低血磷性佝偻病中最常见的一种, 发病率约为1/20000^[1-2]。XLH症状多于1岁以后症状明显, 多为X-连锁显性遗传, 发病机制为磷酸盐调节基因(phosphate regulating gene with homologies to

endopeptidases on the X-chromosome, PHEX)突变导致血清成纤维生长因子23(FGF23)水平升高, 影响肾小管对磷的重吸收, 导致尿磷排泄增多、血磷水平下降^[3-4]。XLH早期表现为骨骼和牙不同程度的损害, 如方颅、鸡胸、漏斗胸、肋骨串珠、肋外翻、手足镯, 出牙延迟、易脱落、牙痛, 直

[收稿日期] 2016-11-17; [接受日期] 2017-02-03

[作者简介] 冉情, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 熊丰, 女, 教授。

立行走后出现下肢骨软化症状：“X”或“O”型腿，骨骼疼痛、生长迟缓等^[5-6]；后期可出现牙脓肿、关节活动障碍^[6-7]。补充磷制剂可改善其临床症状。

国内外已报道444例PHEX基因突变所致的XLH患者，多发生于外显子(约占79%)，包括缺失、插入、错义及无义突变等；部分发生于内含子(约占19%)，包括剪接位点突变；极少数发生于非翻译区(untranslated regions, UTR)^[8-9]。XLH的基因变异具有明显的异质性，多种突变形式可引起相似的临床表现。本研究采用PCR-Sanger测序方法，分析2例低血磷性佝偻病患儿的PHEX基因，发现2种未见报道的PHEX基因新突变。

1 资料与方法

1.1 研究对象

先证者1，男，3岁4个月，发现“O型腿”2年。不伴骨痛。第一胎第一产、足月顺产出生，出生时身长、体重不详，出生时无窒息。母乳喂养，10月龄添加辅食，无偏食挑食。7月龄能独坐、10月龄独站、1岁2个月能独立行走。既往体健。患儿父母健康，否认近亲结婚，家族中无类似患者。体格检查：身高82 cm(-4.34 SD)，体重11 kg，前额突出，无方颅，无鸡胸，无肋骨串珠，无郝氏沟，无手足镯，心肺腹部查体未见异常，“O型腿”、膝间距9 cm。实验室检查：血钙正常，血磷1.04 mmol/L(参考值：1.3~2.1 mmol/L)，ALP 792.8 U/L(参考值：95~405 U/L)，25(OH)D₃正常，PTH正常。血气分析无异常。下肢骨片(见图1)：双膝关节骨骺端稍膨大，临时钙化带模糊。肾脏B超无异常。



图1 先证者1的髋关节、下肢X片 股骨远端及近端钙化带模糊，如箭头所示。

先证者2，女，7岁4个月，发现“X型腿”伴双下肢间断性疼痛5年。第一胎第一产、足月顺产出生，出生身长、体重不详，出生时无产伤、无窒息。喂养史、生长发育史无特殊。既往体健。患儿父母体健，否认近亲结婚，家族中无类似患者。体格检查：身高111.2 cm(-2.61 SD)，体重22.5 kg，无方颅，无鸡胸，无郝氏沟，无肋串珠，无手足镯，心肺腹部查体未见明显异常，“X型腿”、踝间距12 cm。实验室检查：血钙正常，血磷0.5 mmol/L(参考值：1.3~2.1 mmol/L)，ALP 428 U/L(参考值：95~405 U/L)，PTH 110 pg/mL(参考值：10~69 pg/mL)。肾脏B超：双肾皮质回声稍增强，双侧肾椎体见少许钙质成分沉着。

1.2 高通量捕获测序、突变验证及家系分析

通过重庆医科大学附属儿童医院伦理审查及患儿家属知情同意后，采集患儿及其父母空腹EDTA抗凝静脉血各2 mL，提取基因组DNA。DNA浓度>10 ng/ μ L，体积>100 μ L；纯度应达到A260/280>1.8，A260/230>1.2。

取先证者基因组，对PHEX基因的外显子区及两侧的剪接位点序列进行高通量测序，并利用PCR-Sanger测序对先证者及家系进行突变验证和分析(中国人民解放军空军医学研究所附属医院病理检验中心完成)。引物设计根据GeneBank人类PHEX基因序列(NG_007563.2)，见表1。PCR扩增，取PCR样品用ABI遗传分析仪进行测序。阳性突变者用另一份备用样品进行复测。

2 结果

2.1 基因测序结果

经高通量捕获测序，发现先证者1在PHEX基因第14号内含子剪切位点发生单碱基置换：IVS14+1G>A；运用PCR-Sanger测序进行突变验证及家系分析，证实患儿父母该基因位点正常。见图2。先证者2的PHEX基因检测到1个杂合突变：位于8号外显子的移码突变c.931dupC；运用PCR-Sanger测序进行突变验证及家系分析，发现患儿父母该基因位点正常。见图3。

表 1 PHEX 基因引物序列

扩增位置	上游	引物片段	下游	引物片段
外显子 1	PHEX-1F	AGATTCCTGACGGCAGTTT	PHEX-1R	CACTTTGCCTTCTGGACTATACATT
外显子 2	PHEX-2F	GTTTTGGAATACCGTGTCAAGACT	PHEX-2R	CTTCAAAATTCATTTTCGTACTTG
外显子 3	PHEX-3F	TATAAATGCCAAGGCTTGGAAACT	PHEX-3R	GTCATGCTTCAAATCCCAAACATAT
外显子 4	PHEX-4F	TTGTCTTTTCCAGGGTTGTCTGTC	PHEX-4R	TTTCTCCACCAAGCCAGTAAC
外显子 5	PHEX-5F	CTCATCCCACCCACCTCTTT	PHEX-5R	CACTAAGGCAGCATGAGTCTC
外显子 6	PHEX-6F	AAAGTGCCTATTTGCATGTAATTC	PHEX-6R	AATAAAGAAGCAGCGGCCTTAG
外显子 7	PHEX-7F	CATAATGCCTGCACCATACTTT	PHEX-7R	CAATGGGCAATGACACAAAAC
外显子 8	PHEX-8F	CACACCAAAGCCTTGAAAAAC	PHEX-8R	GTAACAGAAGGCATCCCAATACAC
外显子 9	PHEX-9F	GTCTGGATGGCAATGATCAGGAGT	PHEX-9R	GACACCGGGATTTTCCCTATG
外显子 10	PHEX-10F	CTGAGGGCTGGAGCTGGAATC	PHEX-10R	AATAGAGCTGGGCTACAAACTC
外显子 11	PHEX-11F	ATATAATGGGGACAAGCAGAATTT	PHEX-11R	GACAATACCACAGGCCACTACC
外显子 12	PHEX-12F	CTGAAAGAACCCCTTACTTACCAT	PHEX-12R	ATGTATTTCATCCAAAAGCAGACAG
外显子 13	PHEX-13F	TCTATATATTTTTGCCTTCACAGT	PHEX-13R	GTTTTCTGGCATCACCAGTTTTT
外显子 14	PHEX-14F	TGTGACTTCTGGGTCAACTGATAAC	PHEX-14R	AGTTAACTGGCAAGCCAGCTACTCT
外显子 15	PHEX-15F	TTTCCCCTCATGTCCAACAT	PHEX-15R	CCACTTTTGGGGAAATAAG
外显子 16	PHEX-16F	AGTGCCAGGAGGAGTGCCTTTC	PHEX-16R	CATACACCTGGTAACAAGGATC
外显子 17	PHEX-17F	TTTACAGCTTTATGGGTATGTTAT	PHEX-17R	CAATCATATTGCTTTGATAATCTT
外显子 18	PHEX-18F	AAGAGTGTCCCTGCTGTTATG	PHEX-18R	ATCTTGTA AACACCGCTTTGAGAAC
外显子 19	PHEX-19F	GGATAGTTTGCCATCTTTCTTACAAT	PHEX-19R	TGTAATAGGGTCAATGGGGAGAC
外显子 20	PHEX-20F	TGTACCTGCCTCACTGTAAG	PHEX-20R	AAAATCAAAGTCATGCCATTAAAC
外显子 21	PHEX-21F	CAGATGACGCTTTTATTTGATCTT	PHEX-21R	CACAATGTGGGATTTTTTTCAGAT
外显子 22	PHEX-22F	AATCATTTTGGGCTTTAGTTGTCTC	PHEX-22R	TCTAGATCCAAGCAGGTCACCTAC

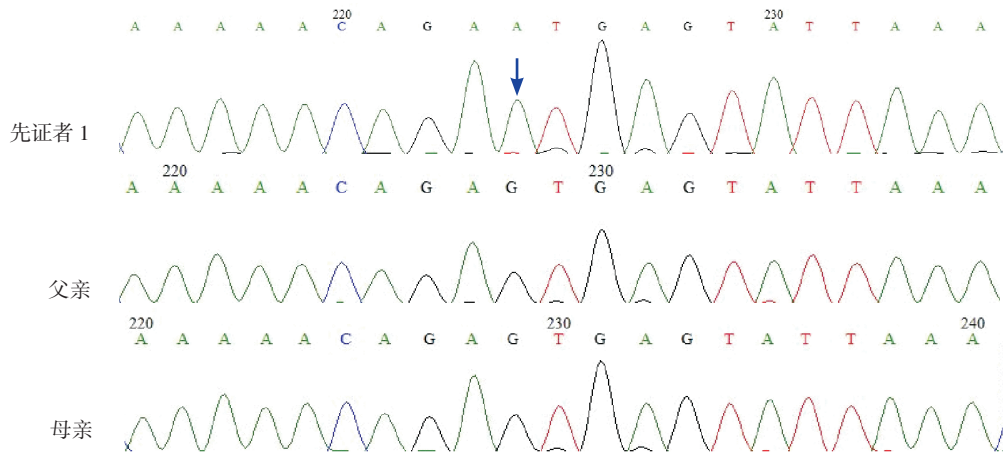


图 2 先证者 1 及家系的 PHEX 基因测序图 先证者 1 在第 14 号内含子发生单碱基置换：IVS14+1G>A，突变位点如箭头所示；其父母该位点正常。

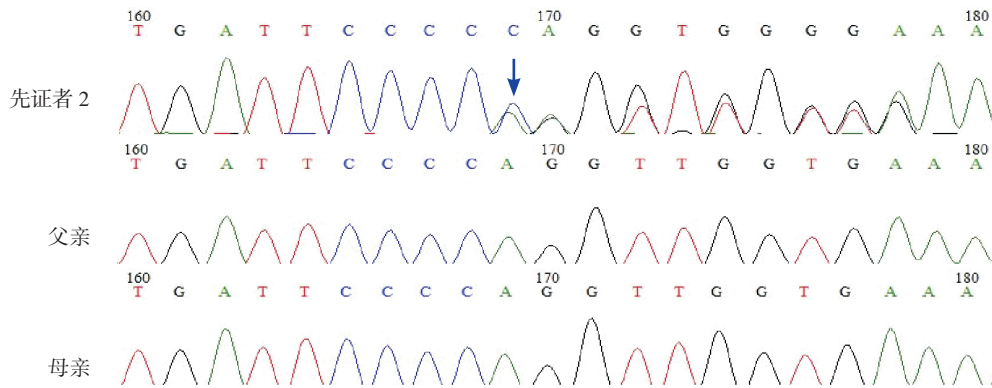


图3 先证者2及家系的PHEX基因测序 先证者2在第8号外显子发生碱基插入突变：c.931dupC，突变位点如箭头所示；其父母该位点正常。

经查询 Locus Database 数据库，PHEX 基因的 c.931dupC 和 IVS14+1G>A 两个突变均未见报道。查阅 PUBMED (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) 和 CNKI (<http://www.cnki.net/>) 及万方 (<http://www.wanfangdata.com.cn/>) 文献数据库，均无该基因突变的文献报道。因此，本文检测到的 2 种 PHEX 基因突变为新突变。经 MUTATION TASTER (www.mutationtaster.org/) 生物信息学分析，2 例突变均为致病性突变，但未行相关基因功能学研究。

3 讨论

至 2016 年 11 月，PHEX database 数据库已报道 444 例 XLH 患者，共计 338 种 PHEX 基因突变，其中由中国人报道的突变共计 13 种。PHEX 基因突变中移码突变约占 27%，错义突变占 21%，剪接位点突变占 19%。但中国人群中最多见的 PHEX 基因突变类型是无义突变（约占 30%），其次为错义突变（约占 22%），剪接位点突变约占 21%。本研究 2 例 XLH 患儿检测到 PHEX 基因突变，分别为移码突变 c.931dupC 和剪接位点突变 IVS14+1G>A，均为国际上首次报道的新突变。在我国已报道的 XLH 病例中^[9-14,16-17]，PHEX 基因突变以 E18、E22 外显子突变更为多见；而在 PHEX 数据库中，以 E09、E22 外显子突变较为常见。这提示 PHEX 基因突变呈散在分布，可能与种族、性别、地区等因素相关。

本研究先证者 1 的 IVS14+1G>A 突变位于 14 号内含子，MUTATION TASTER ([www.](http://www.mutationtaster.org/)

[mutationtaster.org/](http://www.mutationtaster.org/)) 生物信息学分析提示突变“GA-A-GA”为经典的剪切位点突变方式，可影响外显子的剪切，导致外显子跳跃，产生不完整的氨基酸链，合成异常蛋白。PHEX 数据库中共报道了 4 种类型的内含子 14 (I14) 基因突变，其中 3 例为碱基缺失 (IVS14, c.1584+3delGAGT; IVS14+1, c.1586+1delGA; IVS14+3, c.1586+3delGAGT)，另 1 例为同区域剪接位点碱基突变 (IVS14-1, c.1587-1G>C) 导致剪接位点异常^[8,18-20]。2012 年 Beck-Nielsen 等^[8]报道 1 例 31 岁的女性低血磷性佝偻病患者在 PHEX 基因内含子 14 位置上发生突变：IVS14-1, c.1587-1G>C，引起内含子保留和外显子跳跃，患者身高 157 cm (-1.8 SD)，表现为轻微骨骼畸形，严重牙病变，无骨折史；血磷低，1,25(OH)₂D₃ 水平正常，PTH 轻度升高，骨密度正常。本研究先证者 1 发生的 IVS14+1G>A 突变，影响了外显子剪切，可能导致外显子 15 的跳跃而产生不完整的氨基酸链。本研究与 Beck-Nielsen 等报道的患者相比，血生化表现一致，但尚无牙病变，下肢畸形较严重，身高较正常同龄儿减低。这可能与种族、年龄或性别不同有关，也可能 PHEX 基因突变即使发生在同一内含子不同位置，疾病的表现也可不一致。2013 年，Yue 等^[14]发现 3 例患儿分别在内含子 I10 (c.1174-1G>A)、I15 (c.1646-2A>T)、I17 (c.1768+2T>G) 发生突变，这 3 例患儿均为男性，起病年龄 0.75~5 岁，2 例有家族史、1 例为散发，均有“O 型腿”表现，无牙龈病变，与本研究的患儿表现一致。这表明基因突变的类型与表型不一定有明显的相关性。

本研究先证者 2 检测到 PHEX 基因位于 8 号

外显子的 c.931dupC 移码突变: p.Gln311Profs*13, MUTATION TASTER (www.mutationtaster.org/) 生物信息学分析提示, 它可导致 311 位的氨基酸由 Gln (谷氨酰胺) 转变为 Pro (脯氨酸), 在 323 位出现终止密码“UGA”, 编码的氨基酸序列转变为 P PVRLA GLHQE GH*, 导致编码氨基酸提前终止、PHEX 蛋白结构及功能异常, 为致病性突变。该患儿骨骼畸形明显, 提示移码突变产生的截短蛋白可能导致严重的表型。目前 PHEX database 数据库已报道 6 例外显子 8 突变 (C.871C>T, c.931C>T, c.888+2G>T, c.904A>G, c.914T>C, c.897_898del), 其中 5 例点突变 (2 例错义突变、3 例无义突变), 1 例为缺失突变^[1,18,20-23]。目前 PHEX 数据库中尚无 8 号外显子插入突变的报道。

本研究 2 例 XLH 患儿检测到 2 个国际上首次报道的 PHEX 基因新突变, 丰富了 XLH 的致病基因谱, 有助于深入认识 PHEX 基因的异质性。

[参 考 文 献]

- [1] Francis F, Strom TM, Hennig S, et al. Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets[J]. *Genome Res*, 1997, 7(6): 573-585.
- [2] Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, et al. FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(4): 977-981.
- [3] Xia WB, Jiang Y, Li M, et al. Levels and dynamic changes of serum fibroblast growth factor 23 in hypophosphatemic rickets/osteomalacia[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2010, 123(9): 1158-1162.
- [4] Liu S, Zhou J, Tang W, et al. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291(1): E38-E49.
- [5] Thakker RV, O'Riordan JL. Inherited forms of rickets and osteomalacia[J]. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1988, 2(1): 157-191.
- [6] Clausmeyer S, Hesse V, Clemens PC, et al. Mutational analysis of the PHEX gene: novel point mutations and detection of large deletions by MLPA in patients with X-linked hypophosphatemic rickets[J]. *Calcif Tissue Int*, 2009, 85(3): 211-220.
- [7] Whyte MP, Schranck FW, Armamento-Villareal R. X-linked hypophosphatemia: a search for gender, race, anticipation, or parent of origin effects on disease expression in children[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(11): 4075-4080.
- [8] Beck-Nielsen SS, Brixen K, Gram J, et al. Mutational analysis of PHEX, FGF23, DMP1, SLC34a3 and CLCN5 in patients with hypophosphatemic rickets[J]. *J Hum Genet*, 2012, 57(7): 453-458.
- [9] 宋莹, 麻宏伟, 黎芳, 等. X-连锁低磷性佝偻病的基因突变分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(11): 928-931.
- [10] 许莉军, 夏维波. 低血磷性佝偻病的分子遗传学研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- [11] 王静, 金春莲. 抗维生素 D 佝偻病 PHEX 基因诊断研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2007.
- [12] 唐佳, 潘敬新, 蒋玮莹, 等. 一例抗维生素 D 佝偻病的基因诊断和新突变的致病性鉴定[J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 6(5): 1226-1230.
- [13] Yuan L, Wu S, Xu H, et al. Identification of a novel PHEX mutation in a Chinese family with X-linked hypophosphatemic rickets using exome sequencing[J]. *Biol Chem*, 2015, 396(1): 27-33.
- [14] Yue H, Yu JB, He JW, et al. Identification of two novel mutations in the PHEX gene in Chinese patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia[J]. *PLoS One*, 2013, 9(5): e97830.
- [15] Holm IA, Nelson AE, Robinson BG, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of the PHEX gene in X-linked hypophosphatemic rickets[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(8): 3889-3899.
- [16] Kang QL, Xu J, Zhang Z, et al. Three novel PHEX gene mutations in four Chinese families with X-linked dominant hypophosphatemic rickets[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423(4): 793-798.
- [17] Zhu X, Li M, Pan H, et al. Analysis of the parental origin of de novo MECP2 mutations and X chromosome inactivation in 24 sporadic patients with Rett syndrome in China[J]. *J Child Neurol*, 2010, 25(7): 842-848.
- [18] Gaucher C, Walrant-Debray O, Nguyen TM, et al. PHEX analysis in 118 pedigrees reveals new genetic clues in hypophosphatemic rickets[J]. *Hum Genet*, 2009, 125(4): 401-411.
- [19] Filisetti D, Ostermann G, von Bredow M, et al. Non-random distribution of mutations in the PHEX gene, and under-detected missense mutations at non-conserved residues[J]. *Eur J Hum Genet*, 1999, 7(5): 615-619.
- [20] Holm IA, Huang X, Kunkel LM, et al. Mutational analysis of the PHEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets[J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(4): 790-797.
- [21] Sato K, Tajima T, Nakae J, et al. Three novel PHEX gene mutations in Japanese patients with X-linked hypophosphatemic rickets[J]. *Pediatr Res*, 2000, 48(4): 536-540.
- [22] Rowe PS, Oudet CL, Francis F, et al. Distribution of mutations in the PEX gene in families with X-linked hypophosphatemic rickets (HYP)[J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(4): 539-549.
- [23] Raeder H, Shaw N, Netelenbos C, et al. A case of X-linked hypophosphatemic rickets: complications and the therapeutic use of cinacalcet[J]. *Eur J Endocrinol*, 2008, 159(Suppl 1): S101-S105.

(本文编辑: 俞燕)