

IV型胶原 $\alpha 5$ 链基因突变致奥尔波特综合征两家系遗传学分析

叶青¹, 张莹莹², 王晶晶², 毛建华²

1. 浙江大学医学院附属儿童医院实验检验中心, 浙江 杭州 310052

2. 浙江大学医学院附属儿童医院肾内科, 浙江 杭州 310052

[摘要] **目的:**分析奥尔波特(Alport)综合征的遗传学特征。**方法:**对原因不明的反复尿检异常的2名先证者进行基于高通量测序技术的全外显子组测序,通过基因突变的致病性、孟德尔遗传规律和临床表型的综合分析,筛选出致病的基因突变,最后通过Sanger测序在家系成员中验证基因突变。**结果:**两个家系中分别鉴定出COL4A5基因上的2个杂合性剪接位点突变:c.2147-2A>T(IVS27)和c.646-2A>G(IVS11)(NM_033380),且这2个杂合突变分别与2个家系的患病成员呈现共分离关联。**结论:**Alport综合征主要通过女性直系患者遗传,临床上可以通过有效的遗传咨询进行产前诊断。



[关键词] 肾炎,遗传性/遗传学;胶原IV型/遗传学;染色体,人,X;外显子;突变;系谱;基因检测;表型

[中图分类号] R349.3; R725 **[文献标志码]** A

Analysis of Alport syndrome induced by type IV collagen alpha 5 gene mutation in two families

YE Qing¹, ZHANG Yingying², WANG Jingjing², MAO Jianhua² (1. Clinical Laboratory, the Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, China; 2. Department of Nephrology, the Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, China)

Corresponding author: MAO Jianhua, E-mail: maojh88@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-6076-3806>

[Abstract] **Objective:** To investigate genetic characteristics of Alport syndrome. **Methods:** High-throughput sequencing-based whole exome sequencing was performed in two patients with recurrent unexplained abnormal urinalysis. The pathogenicity of the genetic variations, type of Mendelian genetics, and clinical phenotypes were analysed,

收稿日期:2019-07-20 接受日期:2019-08-14

基金项目:国家自然科学基金(81501760,81470939,81770710)

第一作者:叶青(1983—),男,博士,副主任技师,主要从事儿童疾病致病机制研究;E-mail: qingye@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-5614-2695>

通信作者:毛建华(1969—),男,博士,主任医师,博士生导师,主要从事小儿肾脏疾病研究;E-mail: maojh88@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-6076-3806>

and the disease-cause mutations were confirmed in the family members using Sanger sequencing. **Results:** Two heterozygous splice site mutations of *COL4A5* gene c.2147-2A > T (IVS27) and c.646-2A > G (IVS11) (NM_033380) were found in patients of the two families, which showed a co-segregation association with the affected members of the families. **Conclusion:** Alport syndrome is mainly inherited from direct female patients, and prenatal genetic screening based on amniotic fluid testing can effectively prevent birth defects in patients with a family history of this characteristic phenotype.

[**Key words**] Nephritis, hereditary/genetics; Collagen type IV/genetics; Chromosomes, human, X; Exons; Mutation; Pedigree; Genetic testing; Phenotype

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2019,48(4):384-389.]

奥尔波特 (Alport) 综合征是一种以进行性肾衰竭、听力丧失和眼部异常,包括角膜瘢痕、圆锥形晶状体、视网膜变薄和斑点视网膜病为特征的遗传性肾病^[1-3],发病率为 1/5 000 ~ 1/10 000。Alport 综合征患者具有多样的表型特征和遗传异质性,80% ~ 85% 的患者以 X 连锁显性遗传为特征,致病基因为 IV 型胶原 $\alpha 5$ 链 (*COL4A5*); 其他为常染色体的显性或隐性遗传,由基因 *COL4A3* 和 *COL4A4* 突变引起,约占 15%^[4]。因此,基因检测在该疾病的临床诊断、预后判断和遗传咨询方面有很大的价值^[5]。由于发病率低,Alport 综合征相关报道少见。本文报道了 2 例典型的 *COL4A5* 基因突变引起的 Alport 综合征家系,并复习相关文献,以提高对本病的认识。

1 对象与方法

1.1 对象

选择 2018 年在浙江大学医学院附属儿童医院肾内科临床诊断为 X 染色体连锁 Alport 综合征的两个家系。本研究经浙江大学医学院附属儿童医院伦理委员会批准 (2018-IEC-026), 所有参与者均签署了知情同意书。

1.2 实验材料和仪器

QIAamp 血液 DNA 提取试剂盒为德国 QIAGEN 公司产品; Seq EZ Exome Enrichment Kit V2.0 捕获探针为瑞士 Roche 公司产品; NovaSeq 6000 测序仪为美国 Illumina 公司产品; PCR 仪为珠海黑马医学仪器有限公司产品; ABI 3730XL 测序仪、Qubit 2.0 仪器、超微量分光光度计为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; 超声波破碎仪为昆山舒美超声仪器有限公司产品。

1.3 样本采集和 DNA 提取

采集先证者及其家系成员外周血各 3 mL 于 EDTA 二钾真空采血管中。使用血液 DNA 提取试剂盒提取样本 DNA, 用超微量分光光度计测定 DNA 浓度, 冻存于 -20 °C 备用。

1.4 全外显子组测序和数据分析确定致病基因突变

采用 Seq EZ Exome Enrichment Kit V2.0 捕获探针进行人全外显子组捕获。V2.0 捕获探针覆盖人基因组中 19 119 个基因的编码区, 总共捕获区间大小为 40 Mb。超声破碎, 使 DNA 片段的主峰在 150 ~ 200 bp。在 Illumina 测序平台上采用 PE150 测序策略进行全外显子组测序, 平均覆盖深度超过 80 ×, 覆盖率为 99.8%, 总数据输出为 8 ~ 10 G, 与 hg19 比对得到所有突变的文件。根据美国医学遗传学与基因组学学会 (ACMG) 的遗传突变分析指南对遗传突变进行分析。使用 SAMtools 进行单核苷酸多态性 (SNP) 测定, 使用 Pindel 进行得失位 (Indel) 测定。根据 SNP 和 Indel 在基因上的位置, 分析其对氨基酸变化、mRNA 剪切、非翻译区及内含子突变的影响等。参考数据库 dbSNP、千人基因组-中国、千人基因组-南方、千人基因组-北方、ExAC 东亚人群数据库, 将最小等位基因频率 (MAF) 大于 0.05 的突变以及不影响剪接的同义突变、内含子突变等良性突变进行过滤。参考遗传病致病数据库在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM)、人类基因突变数据库 (HGMD)、SwissVar 和 Clinvar 筛选出 MAF 小于 0.05 或有致病相关报道的突变, 或经典剪切位点突变、终止突变、移码突变等明显改变蛋白结构的突变。参考 PROVEAN、SIFT、PolyPhen2_HDIV、

PolyPhen2_HVAR、MutationTaster、M-Cap 和 REVEL 软件的蛋白危害性预测结果以及 MaxEntScan 软件的 mRNA 剪切危害性预测结果筛选出可能有 害的突变。结合遗传方式以及受检者突变情况筛 选出满足遗传方式以及家系共分离的突变位点。 结合受检者的临床特征筛选出与受检者临床特征 最匹配的疾病的致病突变。

1.5 PCR 扩增和 Sanger 测序验证

根据全外显子组筛查得到的先证者样品中的 可疑致病突变的位置,使用 Primer 3 设计引物,并 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。c. 2147-2A > T 引物序列:上游 5'-CCTAAGTAG- TAGAATGTCATTGTGC-3',下游 5'-TGGACTATTA- AAGATGATTTGGGGTT-3';c. 646-2(IVS11) A > G 引物序列:上游 5'-TCTTGCCCATTCTATTTTGTG- ATCAG-3',下游 5'-TTTCAGCTTTATTGAGGTATA- ACTGAC-3'。用 PCR 进行相应 DNA 片段的扩 增,PCR 条件为:95 °C 预变性 5 min,95°C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 链延伸 30 min,扩增 35 个循环;最后 72 °C 补充延伸 10 min。PCR 体系均 为 50 μL,PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检 测和纯化,之后进行双向测序,测序结果采用 Sequencing Analysis 5.1.1 软件分析。先证者的 其他家系成员均采用相同的方法进行同一可疑致 病突变检测。

2 结 果

2.1 Alport 综合征两家系临床表现

家系 1(图 1)中的先证者(Ⅲ₆)是一名 4 岁 男性,患有反复水肿和尿检结果异常 2 年以上,听 力和双眼视力正常。常规尿检结果显示尿隐血试 验阳性(+++),尿蛋白阳性(+),尿蛋白定量 为 2210.2 mg/24 h,尿微量总蛋白为 1468.1 mg/L, 尿肌酐为 2815 μmol/L,尿蛋白和肌酐比为 2.46。

如图 2 所示,肾活检病理报告显示肾小球基底膜 中Ⅳ型胶原的 α5 链免疫荧光染色为阴性,而包 曼囊(Bowman's)为连续阳性;透射电镜检查显示 基底膜厚度明显变薄,厚度在 500 nm 左右。先证 者的母亲(Ⅱ₅)28 岁时被诊断为“肾小球肾炎”, 患者外祖母(Ⅰ₂)21 岁时被诊断为“肾小球肾炎”,其他家庭成员尿检无异常。该家系患病成 员的其他临床资料和实验室检查结果见表 1。

家系 2(图 1)中的先证者(Ⅲ₅)是一名 10 岁 女性,尿常规持续异常超过 6 年,听力和双眼 视力正常。常规尿检结果显示尿隐血试验阳性 (+++),尿蛋白阳性(++),尿蛋白定量为 1247.5 mg/24 h,尿微量总蛋白为 1031 mg/L,尿 肌酐为 5103 μmol/L,尿蛋白和肌酐比为 1.77。 如图 2 所示,肾活检病理报告显示肾小球基底膜 中的Ⅳ型胶原 α5 链免疫荧光染色具有节段 性缺陷;透射电镜检查显示基底膜厚薄不均,为 200~400 nm。该患者的外祖母(Ⅰ₂)患有“肾 小球肾炎”,患者母亲(Ⅱ₅)确诊为尿毒症,同时 患者同胞妹妹(Ⅲ₆)尿隐血试验也呈阳性,其他 家庭成员尿检无异常。该家系患病成员的其他 临床资料和实验室检查结果见表 1。

2.2 Alport 综合征两家系突变基因及家系验证

全外显子组测序发现家系 1 中的先证者(Ⅲ₆) COL4A5 基因的典型剪接位点突变 c. 2147-2A > T (IVS27,参考变体 NM_033380),Sanger 测序结果表 明该突变与患病的家系成员呈现共分离(图 1, 3A)。全外显子组测序发现家系 2 中的先证者 (Ⅲ₅) COL4A5 基因上剪接位点杂合性突变 c. 646-2A > G(IVS11,参考变体 NM_033380),并 且该突变与该家系患病成员存在共分离关联(图 1,3B)。对检出的 2 个 COL4A5 基因突变进行数据 库的检索,其中 c. 2147-2A > T(NM_033380)是一个 已报道的致病性突变(ClinVar:rs104886344)^[6],同

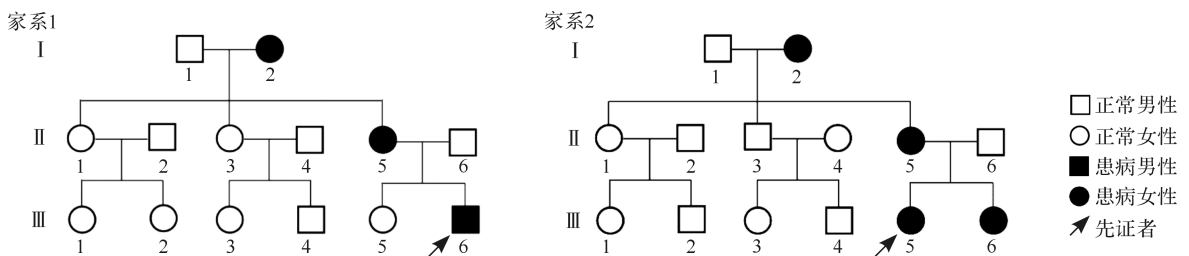
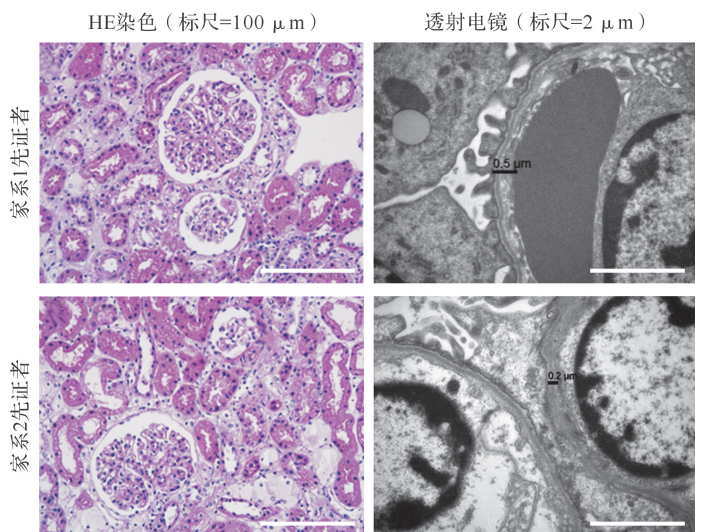


图 1 X 染色体连锁 Alport 综合征家系图

Figure 1 Pedigree of the families with X-linked Alport syndrome



HE染色表明肾小球发育不良,泡沫细胞增多,出现幼稚肾小球;透射电镜检查显示基底膜明显厚薄不均,厚度变薄。

图2 X染色体连锁Alport综合征家系先证者肾组织HE染色和透射电镜图

Figure 2 Pathological changes in renal tissue of proband of X-linked Alport syndrome

时 c. 646-2A > G (NM_033380) 也见于 Alport 综合征患者的报道^[7];此外,通过剪接位点预测软件分析,这两个突变均为有害突变。通过以上突变分析,依照 ACMG 临床实践指南鉴定这两个突变均为致病突变。

3 讨论

Alport 综合征是由编码IV型胶原 α 链的基因突变所致。IV型胶原是肾脏基底膜中主要的细胞外基质蛋白,由三条异三聚体三螺旋的 α 链($\alpha 3$, $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$)组装而成,形成肾小球基底膜的主要三维网络^[8-9]。 $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$ 链分别由COL4A3和

COL4A4 基因编码,位于2号染色体上^[10],而 $\alpha 5$ 链由染色体X上的COL4A5基因编码^[11]。 $\alpha 5$ 链包含1685个氨基酸,由氨基末端的26个氨基酸信号肽,1430个富含甘氨酸的氨基酸构成的三个关节结构的中间胶原区域(Gly-X-Y)以及羧基末端的229个氨基酸组成^[12-13]。 $\alpha 5$ 链缺乏会引起X染色体连锁Alport综合征(X-linked Alport syndrome, XLAS),其主要临床表现是以血尿为特征的进展性肾功能不全,伴或不伴有感音性耳聋和表现多样的眼部异常。以往临床上确诊有赖于肾小球基底膜的病理学改变,随着分子遗传学的进展,目前已知XLAS是由COL4A5基因缺陷导致的遗传性疾病。

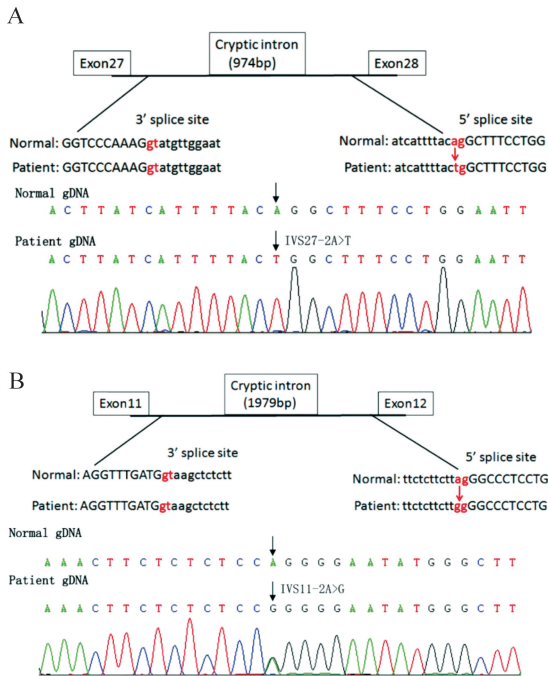
本研究中2个家系均检出COL4A5的典型剪接位点致病性突变,并且与患病成员分别存在共分离的关联,病理学检测结果也支持Alport综合征的诊断。目前已知剪切突变可能改变DNA转录或RNA前体的剪接方式,使得产生的成熟RNA中含有内含子或缺失外显子序列的一类突变体,从而影响相应蛋白的表达。COL4A5基因相关的Alport综合征为X染色体连锁遗传。在XLAS家庭中,携带有COL4A5基因杂合突变的母亲有50%的概率将该致病突变传给下一代。而理论上,受累男性会将致病突变传给他们所有的女儿,他们的儿子则不会患病。此外,男性患者的病情常常更为严重,发病年龄更小、进展更为迅速,在幼龄便可进展为

表1 Alport综合征两家系患病成员临床资料和实验室检查结果

Table 1 Clinical data and laboratory examination of two families with Alport syndrome

序号	听力	视力	血压 (mmHg)	尿红 细胞	尿蛋白	尿素 (mmol/L)	肌酐 (μ mol/L)	血白蛋白 (g/L)	血球蛋白 (g/L)	总胆固醇 (mmol/L)	三酰甘油 (mmol/L)	
家系1	I ₂	正常	正常	142/90	++	++	5.2	78	39	28	6.2	2.3
	II ₅	正常	正常	正常	++	++	3.2	62	34	21	5.7	1.9
	III ₆	正常	正常	正常	+++	+	4.1	68	42	31	3.2	1.5
家系2	I ₂	正常	正常	正常	++	++	4.8	54	37	24	5.9	3.2
	II ₅	正常	正常	正常	+	+	12.5	782	41	30	6.3	1.4
	III ₅	正常	正常	正常	+++	++	5.7	73	35	22	4.5	1.1
	III ₆	正常	正常	正常	+++	+	4.9	41	43	34	4.2	1.6

1 mmHg = 0.133 kPa.



A:家系1先证者 c. 2147-2A > T (IVS27-2A > T) 位点突变测序图;B:家系2先证者 c. 646-2A > G (IVS11-2A > G) 位点突变测序图(箭头指示碱基突变位置)。

图3 X染色体连锁Alport综合征家系中的先证者COL4A5基因突变位点Sanger测序图

Figure 3 Sanger sequencing of COL4A5 gene variation locus in proband of X-linked Alport syndrome

终末期肾病^[14-15]。这表明单倍剂量不足(haploinsufficiency)对Alport综合征表型严重程度存在很大的影响,同时也暗示在以往的Alport综合征案例报道中为什么少见男性携带者的Alport综合征家系。可能是因为男性患者在生命早期即表现出较严重的Alport综合征表型,对其生育造成了很大的影响。病理学证据也支持单倍剂量不足的可能,男性患者通常在肾小球基底膜和Bowman's囊中完全没有 $\alpha 5$ 链,而女性患者则多表现为马赛克表达模式^[5]。有研究表明,男性XLAS患者的中位肾存活时间为25年,30岁和40岁发生终末期肾病的风险分别为70%和90%^[16]。然而只有12%的女性患者在40岁时发生终末期肾病^[17],发生终末期肾病的中位数年龄为65岁^[18]。XLAS患者的听力损害通常在儿童期的后期才开始出现,到40岁时90%的男性患者和约12%的女性患者会出现听力损害^[17,19],眼部异常则较少发生^[20]。这种性别差异可能是由于女性患者有两条X染色体,并且为了平衡基因表达,其中一条X染色体随机失活,另一条正常X染色体起

一部分的补偿作用。然而,男性患者仅有一条X染色体,因此通常表现出更严重的疾病状态^[21]。

综上所述,Alport综合征患者具有显著的分子遗传学特征,结合基因检测技术的遗传咨询和产前的基因筛查能够减少Alport综合征患儿的出生。

参考文献

- [1] XIU X, YUAN J, DENG X, et al. A novel COL4A5 mutation identified in a Chinese Han family using exome sequencing[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014(10):186048.
- [2] GUBLER M, LEVY M, BROYER M, et al. Alport's syndrome: A report of 58 cases and a review of the literature[J]. *Am J Med*, 1981, 70(3):493-505.
- [3] HABIB R, GUBLER M C, HINGLAIS N, et al. Alport's syndrome: experience at Hôpital Necker[J]. *Kidney Int Suppl*, 1982, 11:S20-S28.
- [4] HERTZ J M. Alport syndrome. Molecular genetic aspects[J]. *Dan Med Bull*, 2009, 56(3):105-152.
- [5] SAVIGE J, GREGORY M, GROSS O, et al. Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(3):364-375.
- [6] NAGEL M, NAGORKA S, GROSS O. Novel COL4A5, COL4A4, and COL4A3 mutations in Alport syndrome[J]. *Hum Mutat*, 2005, 26(1):60.
- [7] YAMAMURA T, NOZU K, FU X J, et al. Natural history and genotype-phenotype correlation in female X-linked Alport syndrome [J]. *Kidney Int Rep*, 2017, 2(5):850-855.
- [8] HUDSON B G, TRYGGVASON K, SUNDARAMOORTHY M, et al. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(25):2543-2556.
- [9] HAAS M. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, 133(2):224-232.
- [10] MOCHIZUKI T, LEMMINK H H, MARIYAMA M, et al. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome [J]. *Nat Genet*, 1994, 8(1):77-81.
- [11] BARKER D F, HOSTIKKA S L, ZHOU J, et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome [J]. *Science*, 1990, 248(4960):1224-1227.
- [12] CROCKETT D K, PONT-KINGDON G, GEDGE F,

- et al. The Alport syndrome COL4A5 variant database [J/OL]. **Hum Mutat**,2010,31(8):E1652-E1657.
- [13] KROL R P, NOZU K, NAKANISHI K, et al. Somatic mosaicism for a mutation of the COL4A5 gene is a cause of mild phenotype male Alport syndrome[J]. **Nephrol Dial Transplant**, 2008, 23(8):2525-2530.
- [14] ALPORT A C. Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis [J]. **Br Med J**, 1927, 1(3454):504-506.
- [15] HASSTEDT S J, ATKIN C L, SAN JUAN AC J R. Genetic heterogeneity among kindreds with Alport syndrome[J]. **Am J Hum Genet**, 1986, 38(6):940-953.
- [16] JAIS J P, KNEBELMANN B, GIATRAS I, et al. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males[J]. **J Am Soc Nephrol**, 2000, 11(4):649-657.
- [17] GROSS O, LICHT C, ANDERS H J, et al. Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy[J]. **Kidney Int**, 2012, 81(5):494-501.
- [18] WEBB N J, LAM C, SHAHINFAR S, et al. Efficacy and safety of losartan in children with Alport syndrome-results from a subgroup analysis of a prospective, randomized, placebo- or amlodipine-controlled trial [J]. **Nephrol Dial Transplant**, 2011, 26(8):2521-2526.
- [19] KASHTAN C E, DING J, GREGORY M, et al. Clinical practice recommendations for the treatment of Alport syndrome: a statement of the Alport Syndrome Research Collaborative[J]. **Pediatr Nephrol**, 2013, 28(1):5-11.
- [20] SAVIGE J, SHETH S, LEYS A, et al. Ocular features in Alport syndrome: pathogenesis and clinical significance[J]. **Clin J Am Soc Nephrol**, 2015, 10(4):703-709.
- [21] ALLRED S C, WECK K E, GASIM A, et al. Phenotypic heterogeneity in females with X-linked Alport syndrome[J]. **Clin Nephrol**, 2015, 84(11):296-300.

[本文编辑 余方沈敏]

· 学术动态 ·

周民研究员团队实现 MRI 引导下激光诱导形变增强肿瘤放疗及光热协同治疗效果

2019年7月18日,《生物材料》(*Biomaterials*)在线发表了周民研究员团队研究成果论文“Laser-triggered aggregated cubic α -Fe₂O₃@ Au nanocomposites for magnetic resonance imaging and photothermal/enhanced radiation synergistic therapy”(https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119369),实现MRI引导下的肿瘤光热协同增强放射的治疗效果。

研究人员设计并合成了一种“激光诱导形变的立方状金磁纳米材料”。该方案利用立方状的纳米三氧化二铁(α -Fe₂O₃)作为基底,在其表面修饰大量超小尺寸的金纳米团簇,产生了较宽的近红外吸收带,可用于近红外激光激发产出光热效应。该复合材料可实现肿瘤的T2加权MRI,并表现出较强的光热治疗效果。此外,该纳米颗粒在近红外激光的激发下,基底产生形变的同时表面金纳米颗粒能够发生聚集,形成较大尺寸的具有更强放疗增敏效果的金纳米粒子,从而增强了放疗增敏的能力。该激光诱导金纳米颗粒聚集的复合材料能利用光热反应引入更强的放射治疗效果,不仅可以作为MRI造影剂,还能实现精准成像引导下的肿瘤光热与放疗协同治疗效果,该项工作为金纳米颗粒在肿瘤诊疗的高效应用方面提供了一种新的思路。

博士研究生钟丹妮是论文第一作者。研究得到浙江大学交叉学科项目、国家重点研发计划、国家自然科学基金、浙江大学现代光学仪器国家重点实验室基金等资助。