

临床研究

全外显子组测序证实家族性肺动脉高压骨形成蛋白受体 2 基因新突变的研究

郑亚国, 林松, 张航, 谢渡江, 周陵, 陈绍良

摘要

目的: 探讨一个中国汉族肺动脉高压(PAH)家系的致病基因及其位点。

方法: 对该 PAH 家系中的 2 例 PAH 患者与 2 名正常者作对照进行全外显子组测序, 利用生物信息学分析和组间比较, 筛选出患者特有的变异, 并对筛选出的变异使用 Sanger 测序法验证, 同时在 100 名健康志愿者中进行测序验证。

结果: 共纳入该家系成员 8 例, 有 2 位已确诊为 PAH, 其中男性 1 例(先证者), 女性 1 例, 为母子关系。先证者表现为活动后胸闷、气喘, 右心导管测量肺动脉平均压 77 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa), 心输出量 4.92 L/min, 肺小动脉阻力 13.4 Wood units。本家系中母子患病符合常染色体显性遗传模式特征。经外显子组测序、数据分析和 Sanger 测序验证后发现骨形成蛋白受体 2 (BMP2) 基因 6 号外显子 747 位点发生插入杂合突变(c.747_748insCCTTTGATGGAACATGA:p.V250fs)。另外, 在 100 名健康志愿者中, Sanger 测序没有发现该位点杂合突变。

结论: 发现了 BMP2 基因的一个新的突变位点, 扩大了 BMP2 致病基因位点谱。

关键词 肺动脉高压; 全外显子组测序; 骨形成蛋白受体 2

Whole Exome Sequencing Reveals A Novel Frameshift Mutation in the BMP2 Gene in A Chinese Family With Pulmonary Arterial Hypertension

ZHENG Ya-guo, LIN Song, ZHANG Hang, XIE Du-jiang, ZHOU Ling, CHEN Shao-liang.

Department of Cardiology, Nanjing Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing (210006), Jiangsu, China.

Corresponding author: CHEN Shao-liang, Email: chmengx@126.com

Abstract

Objectives: To investigate the genetic mutation in a Chinese family with Pulmonary Arterial Hypertension (PAH).

Methods: Whole exome sequencing was performed in two patients and two healthy family members in the PAH pedigree. Patient-specific variations were screened by bioinformatics methods and compared between groups. To further identify the association between these variations and PAH, Sanger sequencing was used to analyze the genotype of PAH patients and 100 healthy controls.

Results: Two affected persons were found among the eight family members. The patients was presented as dyspnea after exercise, and right-heart catheterization was performed to measure the mean pulmonary arterial pressure (mPAP, 77 mmHg), cardiac output (CO, 4.92 L/min), and pulmonary vascular resistance (PVR, 13.4 Wood units). The hereditary characteristic in this family presented in mother and child, suggesting an autosomal dominant patten. Exome sequencing, mutation detection and sanger variants validation revealed a novel heterozygous frameshift mutation (c.747_748 insCCTTTGATGGAACATGA:p.V250fs) in the BMP2 gene. Meanwhile, this heterozygous insertion mutation was absent in 100 ethnically matched control samples screened by direct sanger sequencing.

Conclusions: Our study revealed a novel heterozygous frameshift mutation in the BMP2 gene, expanding the BMP2 mutation spectrums.

Key words Pulmonary arterial hypertension; Whole exome sequencing; Bone morphogenetic protein receptor type 2

(Chinese Circulation Journal, 2018, 33:481.)

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划集成项目(91639303); 南京医科大学科技发展基金重点项目(2015NJMUZD051)

作者单位: 210006 江苏省南京市, 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院) 心血管内科

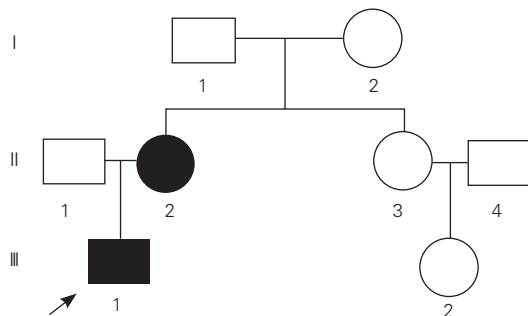
通讯作者: 陈绍良 Email: chmengx@126.com

中图分类号: R543.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3614 (2018) 05-0481-04 DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2018.05.015

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是一种以肺动脉内膜增生、中膜肥厚及丛样病变为特征的一种疾病^[1]。PAH 的发病机制与遗传因素密切相关, 目前指南把可遗传性 PAH 单独列为 PAH 的 1 个亚型。已知骨形成蛋白受体 2 (bone morphogenetic protein receptor 2, BMPR2)、活化素受体类激酶 1 (activin receptor-like kinase 1, ALK1)、Smad 蛋白 9 (SMAD9)、小窝蛋白 1 (caveolin-1, CAV-1) 和钾离子通道蛋白 3 (KCNK3) 等多种基因突变和 PAH 发病有关^[2]。目前研究发现, BMPR2 是目前已知的最主要的 PAH 致病基因, 约 70% 的可遗传性 PAH 及 26% 的特发性 PAH 患者存在 BMPR2 基因突变, 公共数据库 ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) 共计报道了超过 500 个 BMPR2 的不同突变位点^[3-5]。本研究中, 我们利用全外显子组测序方法对一个 PAH 家系进行研究, 以发现 BMPR2 基因的突变位点。

1 资料与方法

研究对象: 收集 2016-11 来本院就诊的一个中国汉族 PAH 家系的资料, 3 代共 8 人, 所有成员均为江苏籍汉族人, 有 2 位已确诊为 PAH, 其中男性 1 例 (先证者), 女性 1 例, 为母子关系 (图 1)。另选择 100 名健康志愿者作为正常对照。PAH 的诊断标准依据 2015 年欧洲心脏病学会 PAH 诊治指南^[1]。对所有家系成员进行病史采集、体格检查、心电图及超声心动图检查, 同时对先证者及超声心动图怀疑 PAH 的家系成员进行生化、免疫学检查、六分钟步行距离及右心导管检查等更为详尽的临床评估。所有入选家系成员和健康志愿者均签署知情同意书。



注: 箭头所示为先证者, 方形表示男性, 圆形表示女性, 黑色表示患者

图 1 该肺动脉高压家系图

标本采集及 DNA 提取: 选用乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝管分别收集本研究家系 8 名成员的外周静脉血 5 ml。按照 DNA 提取试剂盒 (Qiagen, 德国) 说明书提取基因组 DNA。采用紫外分光光度法测定提取 DNA 的浓度与纯度, -20℃ 分装保存。

全外显子组测序: 先证者及其母亲与先证者的父亲及姨妈 (正常者) 作对照, 进行外显子测序分析 (诺禾致源, 北京)。将基因组 DNA 经 Covaris 破碎仪随机打断成长度为 180~280 bp 的片段, 经末端修复和加 A 尾后在片段两端分别连接上接头制备 DNA 文库。带有特异 index 的文库 pooling 后与生物素标记的探针进行液相杂交, 再使用带链霉素的磁珠将基因上的外显子捕获下来, 经聚合酶链式反应 (PCR) 线性扩增后进行文库质检, 合格即可运用 Illumina 平台进行测序。

生物信息学分析: 获得原始测序序列后, 在有参考序列或参考基因组 (GRCh37/hg19) 的情况下, 进行信息分析流程, 大致包括以下三个部分: 测序数据质量评估, 变异检测, 变异筛选及与疾病相关性的预测。同时, 对数据进行质控检测, 包括测序深度、覆盖度均一性等分析。序列比对使用 Burrows-Wheeler Aligner 软件。在比对结果的基础上, 我们利用 SAMtools 识别 SNP 和 InDel 位点, 并采用国际惯用的过滤标准对这些位点进行过滤。测序结果经公共遗传数据库 dbSNP138 及千人基因数据库过滤, 去掉公共人群单核苷酸多态性突变和同义突变。剩余的突变根据 ACMG 开发的针对序列变异解读的标准和指南对突变位点有害性进行分类, 留取致病性的变异位点及可能致病性的变异位点进行分析。再取 2 例患者突变的交集。

致病基因家系样本测序验证: 将数据分析后得到的可能的致病基因 BMPR2 的突变位点, 设计引物, 在其余 4 个家系成员及 100 名健康志愿者中进行 Sanger 测序验证。采用 Primer 5 软件设计引物, 用 PCR 技术扩增 BMPR2 基因的 6 号外显子, 引物由上海生工公司合成, 引物序列为: BMPR2-EX6F: AAACACTTGCAGCTGATTGG; BMPR2-EX6R: TTACATTGGGATAGTACTCCATCAC。DNA 样本经 PCR 扩增后在自动测序仪 ABI 3730XL Genetic Analyzer (赛默飞, 美国) 上进行测序。

2 结果

临床资料: 先证者为 14 岁男性, 因为活动后胸

闷、气喘先后在三家医院就诊，查体发现肺动脉第二心音亢进，心电图示电轴右偏，肺性 P 波，右心室重度肥厚，超声心动图示右心房、右心室扩大，右心室壁增厚，室间隔左移，左心室呈“D”型，估测肺动脉收缩压 91 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)；右心导管测量右心房压 11 mmHg，肺动脉收缩压/舒张压 119/56 mmHg，肺动脉平均压 77 mmHg，肺毛细血管楔压 11 mmHg，心输出量 4.92 L/min，肺小动脉阻力 13.4 Wood units，急性肺血管扩张试验阴性，确诊 PAH 后先后给予波生坦 (125 mg, bid)、他达拉非 (10 mg, qd) 及贝前列素钠片 (60 μg, tid) 治疗。另一位确诊的 PAH 患者为先证者母亲，38 岁，活动后胸闷、气喘 10 年，目前活动耐力重度受限，心电图示频发室性早搏，电轴右偏，肺性 P 波，右心室重度肥厚，超声心动图示右心房、右心室扩大，估测肺动脉收缩压 132 mmHg，随访至 2017-03，患者母亲死于右心衰竭。

全基因组外显子测序结果：家系中 2 例患者 (Ⅱ 2, Ⅲ 1) 及两名正常者 (Ⅱ 1, Ⅱ 3) 的外显子测序结果见表 1。我们在 2 例患者的编码区发现了 23 302 及 23 021 个 SNPs 位点及 629 和 582 个编码 Indels。我们重点关注非同义突变位点、变异性剪接位点、插入和缺失的移码突变位点，并排除在 dbSNP138 数据库及 1 000 Genome Project 数据库中存在的突变位点。同时我们取 2 例患者的交集，经过一系列筛选后剩下 127 个突变位点，包括 114 个 SNPs 和 13 个 Indels。我们根据得到的结果，与已报道的遗传学 PAH 相关基因数据库中对，发现在此家系中发现 BMPR2 基因 6 号外显子 747 位点的移码突变 (BMPR2:NM_001204:exon6:c.747_748insCCTTTGATGGAACATGA:p.V250fs) 在 2 例 PAH 患者中均存在，在 2 名对照者中均不存在，很可能是该家系的致病基因。家系中的 2 例患者并不携带其他已知的与 PAH 相关的致病基因，如 CAV-1、ALK1、KCNK3、SMAD9、BMPR1B、ENG、MADH9 及 PPHR 等。

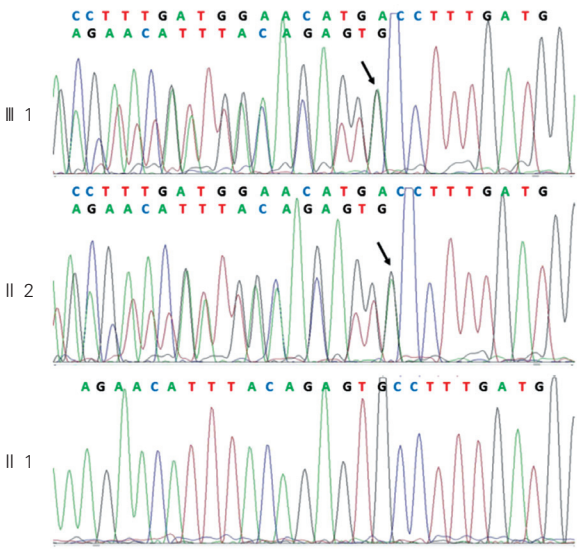
BMPR2 突变位点家系验证及扩大样本验证：为了确定 BMPR2 移码突变 (hg19 chr2: g.203383670G>GCCTTTGATGGAACATGA) 是该家系的致病基因，我们设计了针对该突变位点的引物。并用 Sanger 测序法对该家系 8 个成员的 DNA 样本进行测序验证。测序结果与人类基因组数据库进行比对分

析，发现 2 例患者均携带有 BMPR2 插入杂合突变，而家族其余成员均没有该位点插入或缺失突变 (图 2)。BMPR2 插入杂合突变 (c.747_748. insCCTTTGATGGAACATGA) 在该家系中表现出与临床表型的完全共分离。

表 1 外显子测序数据

项目	家系成员			
	Ⅱ 1	Ⅱ 3	Ⅱ 2	Ⅲ 1
总读取数 (bp)	76 630 226	74 799 994	62 533 988	66 706 788
目的区域总长度 (bp)	60 456 963	60 456 963	60 456 963	60 456 963
目的区域平均测序深度 (X)	121.91	121.45	102.91	108.47
测序覆盖度 (%)	99.9	99.7	99.6	99.9
目的区域读取长度 (bp)	60 384 487	60 248 126	60 242 255	60 377 311
目的区域覆盖超过 10X (%)	99.5	99.3	99.0	99.4
目的区域覆盖超过 20X (%)	98.6	98.5	97.1	98.2
SNP 数目 (个)	175 333	169 042	155 120	160 539
编码 SNP 数目	22 856	22 900	23 302	23 021
同义 SNP 数目	11 546	11 505	11 677	11 559
非同义 SNP 数目	10 678	10 816	10 964	10 763
Indel 数目 (个)	23 486	22 842	19 343	21 129
编码 Indel 数目 (个)	614	627	629	582
缺失	66	68	64	62
插入	53	58	66	56

注: SNP: 单核苷酸多态性



注: 箭头所指为第 6 号外显子 747 位点插入 CCTTTGATGGAACATGA/AGAACATTTACAGAGTG 杂合双峰

图 2 骨形成蛋白受体 2 基因突变位点 DNA 序列图

我们进一步在 100 名健康志愿者样本中进行验证，未发现有 BMPR2 基因 6 号外显子 747 位点的插入杂合突变。通过 CADD 软件分析，该突变致 BMPR2 的 250~256 位氨基酸发生移码突

变(p.V250fs), 并自 257 位终止; 插入突变破坏了读码框, 翻译截短蛋白, 从而造成 BMPR2 蛋白的结构和功能缺陷。因此, BMPR2 基因 6 号外显子 747 位点的插入杂合突变(c.747_748.insCCTTTGATGGAACATGA)是造成该家系患者肺动脉高压的遗传学病因。

3 讨论

目前认为 BMPR2 基因突变引起 BMPR2 的功能缺陷是 PAH 的重要发病机制。BMPR2 基因突变与 PAH 患者的临床表型及预后密切相关。携带 BMPR2 基因突变的患者临床表型更为严重, 发病时间更早, 血液动力学改变更严重, 急性肺血管扩张试验的阳性率更低, 预后更差^[6, 7]。

在本研究中, 我们利用高通量的二代测序技术对患者样本进行全外显子组测序。全外显子测序利用目标序列捕获技术将基因组的全部外显子区域 DNA 捕获后进行高通量测序, 不仅能快速发现罕见遗传病的致病基因, 也能用于多基因引起的常见疾病, 从而揭示这些疾病的遗传致病机理。目前全外显子测序用于肺动脉高压的研究发现许多和肺动脉高压发病有关的新基因^[8-10]。本研究中, 我们在一个中国汉族 PAH 家系中发现了 BMPR2 基因 6 号外显子 747 位点新的插入杂合突变位点(c.747_748.insCCTTTGATGGAACATGA)。目前 6 号外显子上的已经报道的和肺动脉高压相关的突变包括无义突变(c.631C>T)、错义突变(c.604A>T、c.794A>G、c.797G>C 及 c.806G>T)、剪接突变(c.852+1G>C、c.853-1G>C)及移码突变(c.612delA、c.690-691delAGinsT 及 c.673-679delCGTCCAG)^[4, 5]。

在此家系中, 我们认为, BMPR2 基因插入杂合突变(c.747_748.insCCTTTGATGGAACATGA)导致 PAH 表型, 主要基于以下证据:(1)该突变经过外显子测序发现同时经过 Sanger 测序验证, 并且在 100 名健康志愿者和 dbSNP 138、千人基因数据库中均未发现有该突变;(2)该突变在本家系中表现出明显的遗传共分离现象, 呈现常染色显性遗传特征, 携带 BMPR2 基因突变的 PAH 患者是杂合子, 等位基因中有一个是突变型, 另一个是野生型; 这与文献报道的 PAH 遗传特性一致;(3)BMPR2 基因是一个目前公认的 PAH 发病相关的基因, 该突变位点附近的很多突变位点已经被相关文献报道^[4, 5]。(4)

BMPR2 突变致 BMPR2 250 位缬氨酸后发生移码突变(p.V250fs), 插入突变破坏了读码框, 翻译截短蛋白, 从而造成 BMPR2 蛋白的结构和功能缺陷。因此, 我们认为该突变导致了 PAH 的发生。

该研究对于有家族史的患者, 未常规使用一代测序排查常见致病基因突变, 直接使用二代测序, 最终发现的还是 BMPR2 基因上的突变, 在一定程度上增加了科研经费支出。本研究报道了一个中国汉族人 PAH 家系, 通过全外显子组测序技术发现了 BMPR2 基因的一个新的移码突变位点(c.747_748.insCCTTTGATGGAACATGA)。该位点在该家系中表现出共性分离, 是该家系 PAH 发生的遗传学病因。本研究丰富了 BMPR2 基因的致病突变位点谱。

参考文献

- [1] Galie N, Humbert M, Vachiery J, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension[J]. Eur Heart J, 2015, 37(1): 67-119. DOI: 10. 1093/eurheartj/ehv317.
- [2] 曾绮娴, 熊长明. 肺动脉高压遗传基因研究进展 [J]. 中华医学杂志, 2017, 97(8): 632-634. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0376-2491. 2017. 08. 016.
- [3] 赵林, 袁安慧, 王晓建, 等. 肺动脉高压遗传修饰因素的研究进展 [J]. 中华心血管病杂志, 2016, 44(9): 817-820. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3758. 2016. 09. 020.
- [4] Machado RD, Southgate L, Eichstaedt CA, et al. Pulmonary arterial hypertension: a current perspective on established and emerging molecular genetic defects[J]. Hum Mutat, 2015, 36(12): 1113-1127. DOI: 10. 1002/humu. 22904.
- [5] Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(1): S32-42. DOI: 10. 1016/j. jacc. 2009. 04. 015.
- [6] Evans JD, Girerd B, Montani D, et al. BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis[J]. Lancet Respir Med, 2016, 4(2): 129-137. DOI: 10. 1016/S2213-2600(15)00544-5.
- [7] Elliott CG, Glissmeyer EW, Havlena GT, et al. Relationship of BMPR2 mutations to vasoreactivity in pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation, 2006, 113(21): 2509-2515. DOI: 10. 1161/CIRCULATIONAHA. 105. 601930.
- [8] Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, et al. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension[J]. N Engl J Med, 2013, 369(4): 351-361. DOI: 10. 1056/NEJMoa1211097.
- [9] Eyries M, Montani D, Girerd B, et al. EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension[J]. Nat Genet, 2014, 46(1): 65-69. DOI: 10. 1038/ng. 2844.
- [10] 张建华, 许小毛, 邹丽辉, 等. OR2T3 基因与动脉性肺动脉高压的关联性分析 [J]. 中华医学杂志, 2016, 96(16): 1256-1260. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0376-2491. 2016. 16. 007.

(收稿日期: 2017-09-03)

(编辑: 许菁)