

本文引用:邓尧.COL3A1基因新突变c.3256G>C引起EDS IV综合征[J].湖南中医药大学学报,2018,38(2):211-215.

COL3A1基因新突变c.3256G>C引起EDS IV综合征

邓尧

(中南大学湘雅医院心脏大血管外科,湖南长沙410008)

[摘要] 目的 探查一个IV型埃勒斯-当洛斯综合征(EDS IV)家庭Ⅲ型胶原蛋白基因 $\alpha 1$ (COL3A1)的致病突变。方法 采集患者及其妻儿的外周血,并提取脱氧核糖核酸(DNA),通过Sanger测序法获取患者COL3A1基因变异,将结果与200名正常人的测序结果进行对比,并在单核苷酸多态性数据库(dbSNP)、千人基因组计划(TGP)数据库、炎黄(YH)数据库、外显子测序计划(ESP)数据库中进行检索,排除其为单核苷酸多态性(SNPs)。利用突变筛查软件(SIFT)、突变评价软件(MutationTaster)以及2代多态性表型预测软件(PolyPhen-2)对变异进行预测,最后将变异在人类基因突变数据库(HGMD)、Pubmed、万方、中国知网(CNKI)以及谷歌学术中搜索,查看其是否已被报道。结果 发现COL3A1基因变异c.3256G>C(p.G1086R)在正常人的测序结果中不存在,并且在上述各数据库中均无相关记录,谷歌学术中亦无文献报道。三大预测软件预测结果均为有害。结论 COL3A1基因上的变异c.3256G>C为一个新发现的致病突变。

[关键词] IV型埃勒斯-当洛斯综合征;Ⅲ型胶原蛋白基因 $\alpha 1$;基因突变

[中图分类号] R394;R21

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.02.024

A Novel Mutation, c.3256G>C in Collagetype III Alpha 1 Associated with Ehlers-Danlos Syndrome IV

DENG Yao

(Department of Cardiovascular Surgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

[Abstract] **Objective** To identify the causal mutation in a family with Ehlers-Danlos syndrome IV (EDS IV). **Methods** The peripheral blood of the patients and their family was collected to extract deoxyribonucleic acid (DNA). The variant was identified by Sanger sequencing of collagetype III alpha 1 (COL3A1) gene and detected in 200 normal persons. Then it was searched in database of single nucleotide polymorphisms (dbSNP), 1 000 Genomes Project (TGP) database, YanHuang (YH) database and exome sequencing project (ESP) database while the SNP was excluded. The variant was predicted by three online softwares: SIFT, Mutation Taster and PolyPhen-2. At last, it was searched in Human Gene Mutation Database (HGMD), Pubmed, Wan Fang, CNKI and Google scholar to confirm that whether it had been reported before. **Results** We found that c.3256G>C (p.G1086R) was not detected in normal persons. It was not found in all the databases mentioned above as well as Google scholar. All the three online softwares predicted this variant to be deleterious to the protein function. **Conclusion** The 3256G>C (p.G1086R) gene variation from COL3A1 is a new disease-causing mutation.

[Keywords] Ehlers-Danlos syndrome IV; collagetype III alpha 1; gene mutation

4型埃勒斯-当洛斯综合征(ehlers-danlos syndrome IV,EDS IV),又被称为血管型埃勒斯-当洛斯综合征(vascular ehlers-danlos syndrome,vEDS),是一种严重而又罕见的结缔组织疾病^[1]。本病为常染

[收稿日期] 2017-09-25

[作者简介] 邓尧,男,医师,助理研究员,研究方向:心血管外科,E-mail:dy19871108@csu.edu.cn.

染色体显性遗传,由Ⅲ型胶原蛋白基因 $\alpha 1$ (collagen-type III alpha 1, COL3A1)突变所致。埃勒斯-当洛斯综合征总的患病率为1/10 000至1/25 000之间,其中5%~10%为EDS IV患者^[2]。EDS IV患者的平均寿命约为48岁^[3],其主要症状为内脏器官或血管的脆性增加,皮肤菲薄、大片淤青以及特殊相貌等^[4],其临床表现变化多样,同一家族的不同患者间症状不尽相同^[4],某些患者的表现甚至非常少见^[5]。患者常可发现大动脉夹层或动脉瘤,可因大血管或器官的自发性破裂死亡^[3]。本病的辅助检查方法主要包括针对患者血样进行COL3A1基因测序以及对患者病变组织进行异常Ⅲ型胶原的检测。

目前通过各种测序方式已发现200多个COL3A1基因位点的突变^[6-7],但暂未见有关该基因突变的中文报道。本研究通过对一个临床表现疑似该病的男性患者进行Sanger测序,确诊了该患者,同时发现了一个新的错义突变。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与耗材

Hi-DiFormamide (Applied Biosystem 公司), 1.5 mL eppendorf管(Axygen公司), 0.2 mL PCR管(Axygen公司), pipet Tip(Axygen公司), 普通琼脂糖、低熔点琼脂糖(Bio-Rad公司), MasterMix(Cwbio公司), 96孔板(Perkin Elmer公司), Spin柱子(Qiagen公司), QIAamp DNA Blood Mini Ki(Qiagen公司), BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystem公司), DMSO (Sigma公司), GoldviewI型核酸染色剂(Solarbio公司), Tris (Solarbio公司), DNA Marker DL2000(TakaRa公司), PCR扩增引物(上海华大基因公司), 100%无水乙醇(湖南师范大学化学试剂厂), 70%乙醇(湖南师范大学化学试剂厂)。

1.2 主要仪器

3100型基因分析仪(Applied Biosystems公司), 9700型PCR仪(Applied Biosystem公司), Agilent 2100型Bioanalyzer(Agilent公司), Rotator(Appligene公司), 低电压电源电泳仪(Appligene公司), 水平电泳仪(Bio-Rad公司), Gel Doc1000型凝胶成像分析系统(Bio-Rad公司), Covaris S2(Covaris公司), Covaris microTUBE with AFA fiber

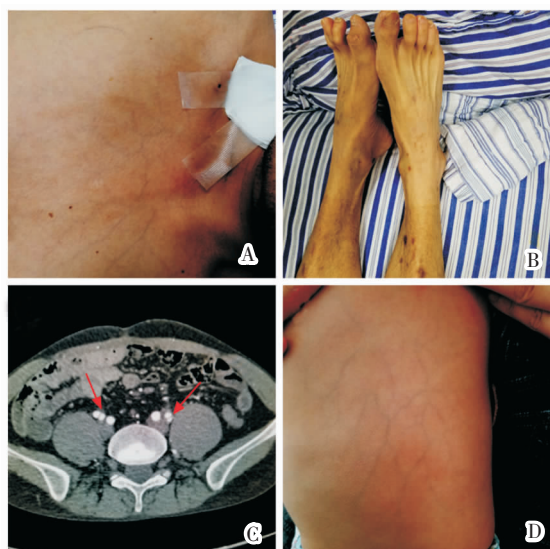
and snap cap(Covaris公司), 涡旋混匀器(Crystal公司), Heat block (Eppendorf公司), 移液器(Eppendorf公司), 超低温冰箱(Eppendorf公司), Centrifuge5804R(Eppendorf公司), Centrifuge5817R(Eppendorf公司), 低温台式离心机(Eppendorf公司), 制冰机(HOSHIZAKI公司), PTC-200型PCR仪(MJ Rsearch公司), Vacuum concentrator(Savant SpeedVac公司), NanoDrop 2000型分光光度仪(Thermo公司), 恒温水浴箱(金坛市恒丰仪器厂), 超净工作台(苏州净化工程公司), 冰箱(美菱公司), JY4001电子天平(上海精密科学仪器有限公司), 微波炉(海尔公司)。

1.3 研究对象基本资料

本文研究对象为1位32岁男性,因反复腹痛1天入中南大学湘雅医院,自诉无外伤史,疼痛为撕裂样,位于剑突下,持续无缓解,伴有恶心呕吐,呕吐物为血性液体,无畏寒发热。体查:T 36.8℃,P 125次/分,R 24次/分,BP 92/50 mmHg,神志清楚,皮肤菲薄,皮下静脉走行清晰可见(图1A),双肺呼吸音可,未及明显干湿啰音,心律齐,心音可,无杂音。腹膨隆,脐周可见一直径3 cm瘀斑,全腹压痛及反跳痛,肝脾触诊不满意,移动性浊音阳性,肠鸣音消失。双下肢可见多发陈旧性瘀斑,足趾畸形,双足轻度内翻(图1B)。辅查:腹部CT提示:急性胰腺炎;胰体尾及脾周腹腔积血;盆腹腔积液。诊断考虑腹腔内出血;失血性休克,于入院第二天行肝破裂修补+脾切除+胰腺破裂修补,术中发现患者组织脆性增加,脾门撕裂,胰包膜及肝表面可见裂口,伴活动性出血。患者术后进入重症监护室,予以呼吸机辅助呼吸、重症监护、止血、输血、抗炎等对症支持治疗,患者恢复可,痊愈出院。出院后因下肢乏力再次至我院,CTA发现双侧髂外动脉夹层(图1C),拟行手术治疗,但患者要求出院。患者就诊过程中反映其儿子亦有皮肤菲薄表现(图1D),遂将其妻儿一同纳入研究。夫妻二人均同意采血进行测序。

1.4 基因组脱氧核糖核酸(genome deoxyribonucleic acid, gDNA)提取与纯度测定^[8]

使用一次性采血针以及柠檬酸钠采血管采集先证者及其妻子、儿子的外周血2 mL/人,保存于4℃冰箱。利用由QIAGEN公司生产的试剂盒提取外周



注:(A)患者胸部皮肤及皮下静脉;(B)患者下肢瘀斑及足部畸形;(C)患者双侧肋骨外动脉夹层 CTA 结果;(D)患者儿子胸部皮肤及皮下静脉。

图1 先证者及其儿子临床表现

血中的 gDNA, 每个样本提取 600 μL , 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存。使用 NanoDrop 2000 分光光度仪对 gDNA 样品浓度以及其在 260 nm/280 nm 波长处的 OD 值进行测定。

1.5 基因引物设计与处理^[8]

登陆 Ensembl 网站 (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 查询基因的一致性编码序列 (consensus coding sequence, CCDS) 和 gDNA 序列。然后登陆 IDT 网站 (<http://www.idtdna.com/site>) 在线设计 COL3A1 基因分段外显子引物。最后利用 Primer-Blast 软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 在线对所设计的引物进行评估, 选出理想的引物送到华大基因公司合成。

1.6 聚合酶链式反应扩增 (polymerase chain reaction, PCR) 与 DNA Sanger 法测序^[8]

先取 0.2 mL 洁净的 EP 管, 将 MasterMix (2 \times PCR Master Mix 中含有 2 \times PCR Buffer, 2 \times Taq DNA Polymerase, 2 \times dNTP) 12.5 μL 、ddH₂O 11 μL 、引物工作液 1 μL 以及 gDNA 0.5 μL 分别震荡摇匀后依次加入 EP 管中, 以上试剂的摆放与加液均在冰上进行。然后使 EP 管中混合物充分震荡混匀, 并放入 PCR 仪进行 PCR 扩增。最后采用 BigDye Terminator V1.1 试剂盒以及测序仪对 PCR 扩增产物进行测序。

1.7 变异功能预测^[8]

本研究通过三种功能预测软件 SIFT ([\[jcv.org/\]\(http://jcv.org/\)\)^{\[9\]}、MutationTaster \(<http://www.mutationtaster.org/>\)^{\[10\]} 以及 PolyPhen-2 \(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>\)^{\[11\]} 对获取的变异进行预测。](http://sift.</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.8 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 检测^[8]

将检测结果在单核苷酸多态性数据库 (database of single nucleotide polymorphisms, dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)、千人基因组计划 (1000 Genomes Project, TGP) 数据库 (<http://www.1000genomes.org/>)、炎黄 (Yan Huang, YH) 数据库 (<http://yh.genomics.org.cn/>)、外显子测序计划 (exome sequencing project, ESP) 数据库 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) 中查看是否为已知正常变异。同时将该结果在 200 个正常人中进行检测, 如果发现同样的变异则说明该基因变异为正常变异。

1.9 突变查重^[8]

将突变结果在人类基因突变数据库 (Human Gene Mutation Database, HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)、Pubmed 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)、万方数据库 (<http://www.wanfangdata.com.cn/>)、中国知网 (CNKI) 数据库 (<http://www.cnki.net/>) 以及谷歌学术 (google scholar, <http://scholar.google.com/>) 中搜索, 查看既往有无文献报道该突变。

2 结果

2.1 家系图

依据患者症状、家族史结合 DNA 测序结果绘制家系图 (图 2)。

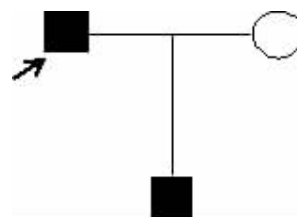


图2 EDS IV 综合症家系图

2.2 变异检测

通过对 COL3A1 基因以 Sanger 测序法测序, 发现杂合变异 c.3256G>C (CCDS 第 3256 号位置鸟嘌呤脱氧核苷酸被胞嘧啶脱氧核苷酸替换, 见图 3) 存

在于患者父子中,而其妻子(正常人)不含此突变。该变异可引起氨基酸序列第 1086 号甘氨酸发生突变成精氨酸(p.G1086R),此变异位于氨基酸序列保守区域(图 4)。

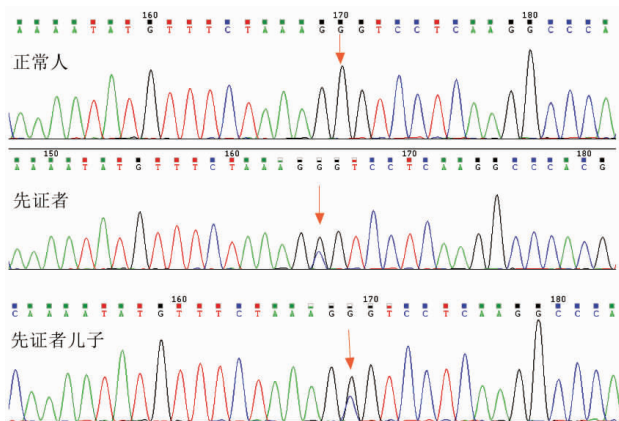


图 3 c.3256G>C 测序结果

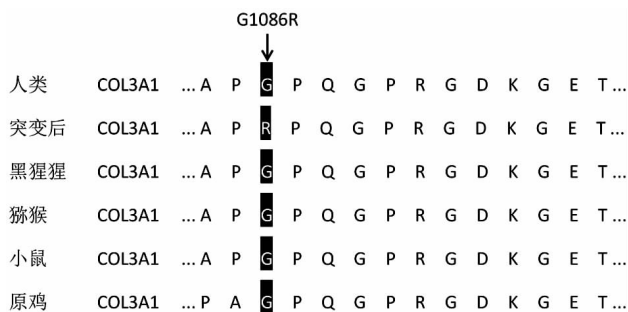


图 4 不同物种变异点附近氨基酸序列

2.3 SNP 检测

c.3256G>C 在 dbSNP 数据库、TGP 数据库、YH 数据库以及 ESP 数据库均无相关记录,且在 200 名正常对照测序结果中均未见此变异。

2.4 变异结果预测

SIFT、MutationTaster 以及 PolyPhen-2 对该突变的预测结果分别为: Damaging、disease causing 以及 PROBABLY DAMAGING。

2.5 突变查重

c.3256G>C 与 p.G1086R 在 HGMD、Pubmed、万方、CNKI 以及 google scholar 中均未见报道。

3 讨论

EDS IV 综合征是一种十分凶险的结缔组织病,常可引起大血管夹层、动脉瘤以及内脏器官自发性破裂,导致患者猝死^[3]。其临床诊断包括 4 条主要

标准以及 9 条次要标准(表 1),患者如果同时具备两条主要标准即可临床诊断该病^[1]。本文中先证者皮肤菲薄,双下肢大量瘀斑,内脏器官脆性增加,自发性破裂,双足轻度内翻,双侧髂外动脉夹层,至少同时具备 2 项主要标准与 1 项次要标准,故可临床诊断为该病。随后 DNA 测序发现 COL3A1 基因上存在一个杂合错义突变,则进一步帮助患者确诊。患者的儿子虽然目前仅具有皮肤菲薄这一条主要症状,但 DNA 测序发现其具有与父亲相同的突变,故也考虑为该病患者。由于 EDS IV 综合征为慢性病变,与时间相关,因此随着年龄的增长,是否会出现其它症状,仍需进一步观察。

表 1 EDS IV 综合症诊断标准

主要标准	次要标准
皮肤菲薄	早衰
大片淤青	小关节活动性增加
相貌特殊	肌肉或肌腱断裂
动脉、肠道或子宫脆性增加或自发性破裂	足内翻
	早期静脉曲张
	气胸
	本病家族史或家族成员猝死
	动静脉瘘或颈动脉-海绵窦瘘
	牙龈萎缩

自从 COL3A1 被发现为 EDS IV 综合征的致病基因以来^[12],目前已有 200 多个突变被报道^[6-7],其中大多数为甘氨酸的错义突变。本研究中发现的变异 p.G1086R 亦为甘氨酸错义突变,且位于氨基酸序列保守区域,提示其为致病突变的可能性大。该变异在 dbSNP 数据库、TGP 数据库、YH 数据库以及 ESP 数据库均无相关记录,只在患者及其儿子测序结果中发现,而在 200 名正常对照(包括患者妻子)测序结果中未见此变异,表明其非正常变异。利用 SIFT、MutationTaster 以及 PolyPhen-2 对该变异进行预测,结果均为有害,更进一步提示该变异为致病突变。将 c.3256G>C 与 p.G1086R 在 HGMD、Pubmed、万方、CNKI 以及 google scholar 中搜索均未见有关记录,表明该变异为新发现的突变。此外,本研究结果 c.3256G>C 与 Rana M^[13]曾报道的 c.3256G>T 位于同一位点,只是突变后的脱氧核苷酸不同,而后者已被证实为致病突变。

COL3A1 编码 III 型前胶原,该胶原由三条 α 链

构成,具有重复的三重序列结构(甘氨酸-X-Y)_n,其中 X 和 Y 可为不同氨基酸^[3]。如果甘氨酸被其他氨基酸取代,将使三条 α 链的连接受阻,导致 III 型前胶原分解或过度修饰,从而造成 III 型胶原蛋白的异常^[14]。III 型胶原蛋白为血管、皮肤以及内脏器官细胞外基质的主要成分。异常的 III 型胶原蛋白可引起皮肤、血管以及内脏器官产生一系列病变。本研究中患者 III 型前胶原氨基酸序列第 1086 号甘氨酸发生突变成精氨酸,因而出现了皮肤菲薄、肝脾自发性破裂、髂外动脉夹层等疾病。

总之,本研究通过对一个存在两名 EDS IV 综合征患者的三口之家进行 COL3A1 基因测序,发现了一个新的致病突变 c.3256G>C(p.G1086R),拓展了 COL3A1 基因的突变谱,可为 EDS IV 综合症的遗传咨询与诊断提供参考。

参考文献:

- [1] BEIGHTON P, DE PAEPE A, STEINMANN B, et al. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK) [J]. *American journal of medical genetics*, 1998,77(1): 31-37.
- [2] GERMAIN D P. Ehlers-Danlos syndrome type IV [J]. *Orphanet journal of rare diseases*, 2007, 2: 32.
- [3] PEPIN M, SCHWARZE U, SUPERTI-FURGA A, et al. Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type [J]. *The new England journal of medicine*, 2000, 342(10): 673-680.
- [4] CORTINI F, MARINELLI B, ROMI S, et al. A New COL3A1 Mutation in Ehlers-Danlos Syndrome Vascular Type With Different Phenotypes in the Same Family[J]. *Vascular and endovascular surgery*, 2017, 51(3):141-145.
- [5] ZHANG W, HAN Q, ZHOU M, et al. Identification of a missense mutation of COL3A1 in a Chinese family with atypical Ehlers-Danlos syndrome using targeted next-generation sequencing[J]. *Molecular medicine reports*, 2017, 15(2):936-940.
- [6] CORTINI F, MARINELLI B, SEIA M, et al. Next-generation sequencing and a novel COL3A1 mutation associated with vascular Ehlers-Danlos syndrome with severe intestinal involvement: a case report[J]. *Journal of medical case reports*, 2016,10(1):303.
- [7] DENG Y, WEI S, HU S, et al. Ehlers-Danlos syndrome type IV is associated with a novel G984R COL3A1 mutation [J]. *Molecular medicine reports*, 2015, 12(1):1119-24.
- [8] 邓尧.全外显子测序发现遗传性心脏传导疾病致病基因 SCN5A 新突变[D].长沙:中南大学湘雅二医院,2014:8-19.
- [9] NG P C, HENIKOFF S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function [J]. *Nucleic acids research*,2003, 31: 3812-3814.
- [10] SCHWARZ J M, RODELSPERGER C, SCHUELKE M, et al. Mutation Taster evaluates disease-causing potential of sequence alterations[J]. *Nature methods*, 2010, 7:575-576.
- [11] SUNYAEV S, RAMENSKY V, BORK P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms[J]. *Trends in genetics: TIG*, 2000, 16: 198-200.
- [12] SUPERTI-FURGA A, GUGLER E, GITZELMANN R, et al. Ehlers-Danlos syndrome type IV: a multi-exon deletion in one of the two COL3A1 alleles affecting structure, stability, and processing of type III procollagen [J]. *The journal of biological chemistry*, 1988,263: 6226-6232.
- [13] RANA M, AZIZ O, PURKAYASTHA S, et al. Colonoscopic perforation leading to a diagnosis of Ehlers Danlos syndrome type IV: a case report and review of the literature [J]. *Journal of medical case reports*, 2011, 5:229.
- [14] MIZUNO K, BOUDKO S, ENGEL J, et al. Vascular Ehlers-Danlos Syndrome mutations in type III collagen differently stall the triple helical folding[J]. *The journal of biological chemistry*, 2013, 288(26): 19166-19176.

(本文编辑 李杰)