

Ⅲ型 Bartter 综合征一家系遗传学分析和 产前诊断

席惠 马娜 庞佳伦 彭莹 贾政军 王华 李浩贤*

(湖南省妇幼保健院 产前诊断中心,湖南 长沙 410008)

【摘要】 目的 联合运用多种遗传学技术对 1 例Ⅲ型 Bartter 综合征家系进行致病突变分析和产前诊断。**方法** 应用高通量捕获测序技术、MLPA、PCR-Sanger 测序法对先证者进行 Bartter 综合征相关致病基因的检测及家系分析;明确遗传学病因后对已妊娠 4 个月的先证者母亲抽取羊水应用 MLPA、PCR-Sanger 测序法进行产前诊断。**结果** 先证者 *CLCNKB* 基因存在 c. del1389(A)纯合突变合并 1-18 号外显子杂合性缺失。家系分析显示这两种突变分别源自父亲和母亲。产前诊断结果显示胎儿与先证者基因型一致。**结论** *CLCNKB* 基因的 c. del1389(A)纯合突变合并 1-18 号外显子杂合性缺失为先证者的病因,产前诊断可以预防该家系 Bartter 综合征患儿的再次出生。

【关键词】 Bartter 综合征;遗传性肾小管疾病;*CLCNKB* 基因;产前诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To analyze the pathogenic mutation and prenatal diagnosis of a family with type Ⅲ Bartter syndrome by multiple genetic techniques. **Method** High throughput capture sequencing, MLPA and PCR-Sanger sequencing were applied to diagnosis and prenatal diagnosis of a family with type Ⅲ Bartter syndrome. **Results** There was c. del1389 (A) homozygous mutation and heterozygosity deletion of exon 1-18 in *CLCNKB* gene of proband. Pedigree analysis revealed that the two mutations were derived from father and mother respectively. Prenatal diagnosis showed that the fetus' genotype was the same to the proband's. **Conclusions** The c. del1389 (A) mutation of the *CLCNKB* gene combined with the loss of heterozygosity of exon 1-18 is the pathogeny of the proband. Prenatal diagnosis can prevent the rebirth of the children of the family Bartter syndrome.

【Key words】 Bartter syndrome;inherited renal tubular disorders;*CLCNKB* gene;prenatal diagnosis

Bartter 综合征(Bartter syndrome,BS)是一组由编码离子通道或转运体的基因突变所致的常染色体隐性遗传性肾小管疾病。临床症状为多饮多尿、嗜睡、生长发育迟缓等,实验室检测可发现低钾血症、代谢性碱中毒、肾素、醛固酮水平升高,对儿童的生活质量甚至生命造成严重的影响且目前无根治方法。根据分子遗传学病因不同,Bartter 综合征分

为Ⅰ~Ⅴ型和 Gitelman 综合征 6 个亚型:编码 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ 共同转运蛋白(NACC2)的 *SLC12A1* 基因突变导致Ⅰ型 BS(MIM # 601678);编码内流性电压依从性 K^+ 通道(ROMK)的 *KCNJ1* 基因突变导致Ⅱ型 BS(MIM # 214200);编码基底膜细胞膜 Cl^- 通道(*CLC2Kb*)的 *CLCNKB* 基因突变导致Ⅲ型 BS(MIM # 607364);编码基底氯通道 β 亚基 Barttin 蛋白的 *BSND* 基因突变导致Ⅳ型 BS(MIM # 602522);编码胞外钙受体的 *CASR* 基因激活突变导致Ⅴ型 BS(MIM # 601199);编码远曲小管管腔膜上的 NaCl 同向转运体 NCCT 的 *SLC12A3* 基

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2018.03.002

* 通信作者:李浩贤,E-mail:lihaoxian861212@hotmail.com

基金项目:湖南省科技厅自然科学基金青年基金项目(2017JJ3144);湖南省科技厅重大专项(2017SK1030);湖南省科技厅重大专项(2015TP2029)

因突变导致 Gitelman 综合征(MIM #263800)。I 型和 II 型常为新生儿期起病,母亲妊娠时可出现羊水过多症状;III 型为经典型,多于学龄前起病,主要表现为多饮、多尿、嗜盐、疲劳和发育迟缓等,生化检测中以低血钾、代谢性碱中毒为常见特征,其次为低血氯和低血钠,而肾素-血管紧张素-醛固酮系统改变不一致,通常不伴肾钙化。IV 型虽由新生儿期起病,但常合并感音性耳聋。V 型 BS 为常染色体显性遗传,患儿表现出类似 II 型 BS 的症状,并伴有低血钙、高尿钙和低甲状旁腺激素。Gitelman 综合征发病年龄晚,多见于青春期或成年期,除乏力、软瘫等低钾血症的表现外,其他症状较轻,临床特征为低钾低镁血症、代谢性碱中毒、低尿钙、血压偏低或正常。

由于 Bartter 综合征表型变异较大,可从无症状生存到严重生长落后^[1],且涉及多个致病基因,各突变类型表型相互重合^[2,3],个别病例甚至存在双基因突变^[4,5],故临床鉴别诊断较为困难。在本研究中,我们采用高通量捕获测序技术结合多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA),PCR-Sanger 测序明确了基因突变类型确诊了 1 例 III 型 BS 家系,并在此基础上完成了产前诊断。

1 对象与方法

1.1 研究对象 先证者,男,孕足月分娩。出生后 7 天因高胆红素血症住院治疗,住院期间出现嗜睡、乏力、食欲差,电解质检测提示低钾血症,予对症支持治疗后好转出院。出院后出现生长发育缓慢,多饮多尿,食欲差,反复出现低钾、低氯血症及碱中毒,偶有腹泻。父母非近亲婚配,无家族疾病史。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 签署基因检测知情同意书,采集先证者及其父母亲的外周血,分别用 EDTA 抗凝。明确致病突变后,孕妇签署介入性产前诊断知情同意书,采集胎儿羊水。

1.2.2 基因组 DNA 提取 采用 QIAamp DNA Blood Mini Kit(250)试剂盒按照操作流程抽提外周血 DNA;采用 Biochain 羊水基因组 DNA 抽提试剂

盒按照操作流程抽提羊水样本 DNA。

1.2.3 高通量捕获测序和数据分析 参考文献与 OMIM 数据库信息,将与 Bartter 综合征相关致病基因(*SLC12A1*、*KCNJ1*、*CLCNKB*、*BSND*、*CASR*、*SLC12A3*)的基因组外显子区通过捕获探针进行目标基因全外显子捕获并测序分析。全外显子项目芯片采用罗氏 SeqCap EZ MedExome Enrichment Kit 探针进行,以上由智因东方检验分子遗传基因检测实验室提供技术支持。

1.2.4 MLPA 检测 采用 SALSA MLPA probemix P266-B1 *CLCNKB* 试剂盒(MRC Holland, Amsterdam, Holland)检测大片段的缺失和重复。该试剂盒包含了 29 个探针:14 个探针分别位于 *CLCNKB* 基因各个外显子上(4、7、9、12、16、20 号外显子除外),2 个探针分别位于 *CLCNKA* 基因 5 和 10 号外显子上,2 个探针位于 *CLCNKB* 基因上游区段,以及 11 个对照探针分别位于不同的常染色体区域,以上结果由迈基诺医学检验所提供技术支持。

1.2.5 突变验证及家系分析 根据 *CLCNKB* 基因突变位点所在序列设计引物,采用 PCR 方法进行扩增。PCR 反应条件为:95℃预变性 5 分钟;95℃变性 30 秒,60℃退火 30 秒,72℃链延伸 30 秒,扩增 30 个循环;最后 72℃补充延伸 10 分钟。PCR 的体系均为 50μl。同时以 *ALB* 基因为内参基因,对目标范围上下游 100bp 的基因片段(chr1:16378196-16378396)进行荧光定量 PCR 法检测拷贝数和 Sanger 测序分析。

2 结果

高通量捕获测序提示 *CLCNKB* 基因 c.1389delA 纯合突变。Sanger 测序验证父亲携带该位点杂合突变,而母亲未发现该位点突变(图 1)。MLPA 检测证实先证者与母亲均存在 *CLCNKB* 基因 1-18 号外显子杂合缺失(图 2),先证者父亲无片段缺失。明确先证者致病突变及父母来源后分别采用 Sanger 测序与 MLPA 检测羊水胎儿 DNA,发现胎儿基因型与先证者一致。

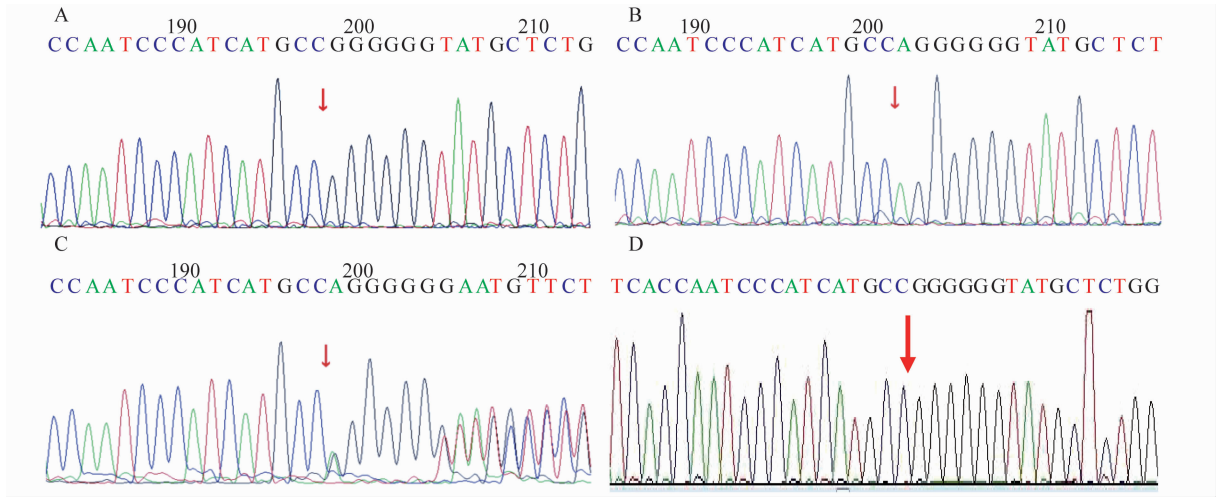


图 1 Sanger 测序结果图
A:先证者 c. 1389delA, 纯合; B:母亲, 正常; C:父亲 c. 1389delA, 杂合; D:胎儿 c. 1389delA, 纯合

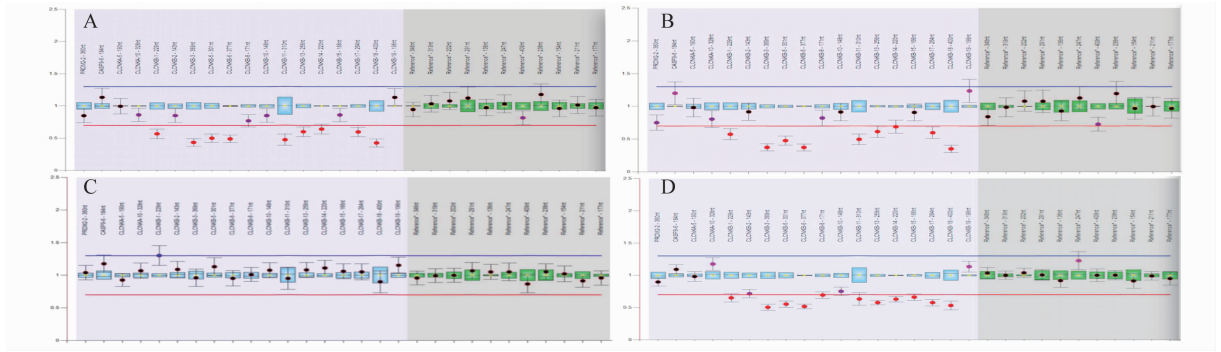


图 2 MLPA 结果图
A:先证者 1-18 外显子杂合性缺失突变; B:母亲 1-18 外显子杂合性缺失突变; C:父亲正常; D:胎儿 1-18 外显子杂合性缺失突变

3 讨论

Ⅲ型 Bartter 综合征, 又称为经典型(cBS), 是由 *CLCNKB* 基因突变导致。Simon 等^[7]于 1997 年首次报道。*CLCNKB* 基因位于 1p36.13, 包含 19 个外显子, 编码一个由 687 个氨基酸组成的电压门控氯离子通道 (CLC-Kb)。CLC-Kb 为电压门控氯离子通道(CIC)家族成员, 主要表达于肾髓袢升支粗段、远曲小管、连接小管、集合管上皮细胞的基底膜侧, 与 β 亚基 barttin 形成开放性的氯离子通道, 负责氯离子和其他电解质转运^[8,9]。*CLCNKB* 基因突变致 CLC-Kb 失活后髓袢升支粗段上皮细胞基底膜侧氯离子排出减少, 从而影响顶膜侧 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ 共转运体(NKCC2)的转运功能, 使 NaCl 重

吸收严重降低, 细胞外液容量不足, 引起高肾素-血管紧张素 II-醛固酮血症导致低钾、低氯性碱中毒^[10]。

目前人类基因突变数据库(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/search.php>)已报道的 *CLCNKB* 基因突变近 100 种, 包括无义或错义突变(61 种)、剪接突变(12 种)、小缺失(9 种)、小插入(4 种)、大片段缺失(11 种)、复杂重排(2 种)。16 个点突变(A77P、L81P、T115P、P124L、G164C、V170M、A204T、G246R、S297R、R351W、H357Q、G424E、R438H、K560M、R595X、W610X)较为常见^[11], A204T、P124L、R438H 和 W610X 偶有报道, 在西班牙 A204T 发生频率最高^[12], W610X 在韩国最常见^[13], 中国人群没有明显突变热点, 但大片段缺失

突变发生频率高达 50%^[14]。缺失发生机制主要是由于在 *CLCNKB* 基因上游 11kb 处存在 *CLCNKA* 基因,编码另一种氯离子通道 CIC-Ka,两者外显子 DNA 序列一致程度达 94%^[7],由于 *CLCNKA* 基因和 *CLCNKB* 基因紧密连锁,且拓扑构像类似,在染色体重组过程中出现不等交换或同源侧翼序列阻挡导致 *CLCNKB* 基因部分或全部缺失^[6]。本文先证者新生儿期起病,多饮多尿,生长发育落后,反复出现低钾、低氯和碱中毒,临床症状符合 Bartter 综合征。Bartter 综合征是由于编码离子通道或转运体的基因突变导致肾小管髓袢升支粗段 Na⁺ 和 Cl 的重吸收障碍,从而出现持续性酸碱失衡,电解质紊乱及肾素-血管紧张素-醛固酮异常,这些基因包括 *SLC12A1*、*KCNJ1*、*CLCNKB*、*BSND*、*CASR*、*SLC12A3*。本文通过对这些基因外显子高通量捕获测序发现先证者 *CLCNKB* 基因 c. 1389delA (p. 462)纯合突变。该突变可导致跨膜结构域 D12 提前出现终止密码子,形成截短蛋白,导致氯离子通道功能丧失,为已报道致病突变^[6]。Sanger 测序分析突变亲本来源时证实父亲携带该突变杂合状态,而母亲未发现该突变,不符合常染色体隐性遗传规律。为排除另一条等位基因缺失所致假纯合突变可能,故本文引入 SALSA MLPA probemix P266-B1 *CLCNKB* 试剂盒 (MRC Holland, Amsterdam, Holland)进一步检测该基因大片的缺失或重复突变。MLPA 提示先证者 1-18 号外显子缺失,这个缺失与母亲一致,正好覆盖 14 号外显子,形成 14 号外显子纯合突变假象,而父亲则无该基因的缺失。因 MLPA 试剂盒没有完全覆盖 *CLCNKA* 基因,故该片段缺失机制还有待设计更多探针进行验证。通过家系分析可以明确先证者为 *CLCNKB* 基因复合杂合突变所致的Ⅲ型 Bartter 综合征患者。在此基因检测基础上完成了胎儿羊水 DNA 产前诊断,遗憾的是胎儿羊水基因型与先证者一致,同样分别遗传了来自父母带有致病突变的等位基因。

本文通过多种分子遗传学检测技术明确了先证者 *CLCNKB* 基因突变类型,并在此基因检测基础

上完成了胎儿羊水 DNA 产前诊断,有效阻断了患儿的再次出生,对该家系优生优育有着重要的指导意义。

参考文献

- [1] Nozu K, Fu XJ, Nakanishi K, et al. Molecular analysis of patients with type III Bartter syndrome: picking up large heterozygous deletions with semiquantitative PCR [J]. *Pediatr Res*, 2007, 62(3):364-369.
- [2] Jeck N, Konrad M, Peters M, et al. Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype[J]. *Pediatr Res*, 2000, 48(6):754-758.
- [3] Zelkovic I, Szargel R, Hawash A, et al. A novel mutation in the chloride channel gene, *CLCNKB*, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes[J]. *Kidney Int*, 2003, 63(1):24-32.
- [4] Lee JW, Lee J, Heo NJ, et al. Mutations in *SLC12A3* and *CLCNKB* and Their Correlation with Clinical Phenotype in Patients with Gitelman and Gitelman-like Syndrome[J]. *J Korean Med Sci*, 2016, 31(1):47-54.
- [5] Nozu K, Inagaki T, Fu XJ, et al. Molecular analysis of digenic inheritance in Bartter syndrome with sensorineural deafness[J]. *J Med Genet*, 2008, 45(3):182-186.
- [6] Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, et al. Mutations in the chloride channel gene *CLCNKB* as a cause of classic Bartter syndrome[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(8):1449-1459.
- [7] Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, et al. Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III[J]. *Nat Genet*, 1997, 17(2):171-178.
- [8] Estevez R, Boettger T, Stein V, et al. Barttin is a Cl-channel beta-subunit crucial for renal Cl- reabsorption and inner ear K⁺ secretion[J]. *Nature*, 2001, 414(6863):558-561.
- [9] Kobayashi K, Uchida S, Okamura HO, et al. Human *CLCNKB* gene promoter drives the EGFP expression in the specific distal nephron segments and inner ear [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(8):1992-1998.
- [10] Koulouridis E, Koulouridis I. Molecular pathophysiology of Bartter's and Gitelman's syndromes[J]. *World J Pediatr*, 2015, 11(2):113-125.
- [11] Andriani O, Keck M, Briones R, et al. CIC-K chloride channels: emerging pathophysiology of Bartter syndrome type 3[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 308(12):F1324-

1334.

[12] Garcia-Nieto V, Flores C, Luis-Yanes MI, et al. Mutation G47R in the BSND gene causes Bartter syndrome with deafness in two Spanish families[J]. *Pediatr Nephrol*,2006, 21(5):643-648.

[13] Lee BH, Cho HY, Lee H, et al. Genetic basis of Bartter syndrome in Korea [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(4):1516-1521.

[14] Han Y, Lin Y, Sun Q, et al. Mutation spectrum of Chinese patients with Bartter syndrome [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (60):101614-101622.

(收稿日期:2018-08-27)

编辑:宋文颖