

遗传性多发性外生骨疣家系的 *EXT* 基因突变检测

Screening of *EXT* Gene Mutation in A Pedigree with Hereditary Multiple Exostoses
JIANG Mei, QIAO Fa-min, HE Zhan-hua, YANG Xiao-qing

江梅, 乔法敏, 和占华, 杨小庆
(焦作市第二人民医院, 河南理工大学第一附属医院, 河南 焦作 454001)

摘要: [目的] 对遗传性多发性骨疣 (hereditary multiple exostoses, EXT) 也称遗传性多发性骨软骨瘤 (HME) 家系的 *EXT1* 和 *EXT2* 基因编码序列进行突变检测, 寻找引起该家系 EXT 的致病基因突变。[方法] 利用与 *EXT1*、*EXT2* 紧密连锁的短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 对该家系进行连锁分析, 确定候选基因, 然后对候选基因的编码区及外显子与内含子交界处进行 PCR-测序法进行突变分析。[结果] DNA 测序分析发现, 先证者致病基因 *EXT2* 第三外显子有一新的 637G>A 无义突变, 致使编码第 192 位的氨基酸的密码子, 提前出现终止密码, 使编码蛋白成为只有 191 个氨基酸的截断型蛋白。突变与疾病共分离, 其余外显子未发现突变。家系调查发现, 该突变来自于先证者父亲, 先证者 *EXT1* 基因未发现变异。[结论] *EXT2* 基因 637G>A 突变是导致该家系发生多发性骨疣的分子机制。

关键词: 遗传性多发性骨疣; *EXT* 基因; 连锁分析
中图分类号: R738 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2019)02-0162-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.02.B016

遗传性多发性外生骨疣 (hereditary multiple exostoses, EXT) 是一种累及人软骨化骨, 以骨骼系统的多发性外生骨疣为特征的单基因常染色体显性遗传病^[1], 外显率为 100%。EXT 的临床表现在不同的家系之间及同一家系不同患者之间有明显差别, 骨疣可发生于所有骨骼, 以股骨下端及胫骨上端最常见, 可因疼痛或骨疣压迫邻近血管神经而引起肢体功能障碍、骨骼发育畸形或肿块大影响关节活动, 严重者发生肢体畸形。多发性外生骨疣易恶变, 国内外学者统计的恶变率为 15%~20% 不等。本组病例中先证者具有典型的 X 线改变及多发性外生骨疣特点, 有明显的家族遗传性, 符合遗传性多发性外生骨疣的诊断。近期研究表明, EXT 发生可能与分别位于人类染色体 8q24.11~24.13、11p12~p11 和 19p 的 *EXT1*、*EXT2* 和 *EXT3* 基因有关, 其中 *EXT1* 和 *EXT2* 已被克隆, 并且 90% 患者此病是由这两个基因突变导致, 此外三种 EXT 类似基因 (*EXTL*) 也被发现可能与 EXT 有关。临床上 *EXT1*、*EXT2* 基因型很难准确

区分, 科研领域针对此类基因变异的检测方法存在费时、费力等诸多问题。本研究为了明确一个 EXT 家系的致病突变, 通过构建单体型进行连锁分析, 用 PCR 扩增候选基因, 最后对产物纯化后通过基因分析仪进行测序分析, 发现了该家系患者中的 *EXT2* 基因突变位点, 有利于阐明 EXT 的基因型与表现型之间的内在联系, 为预防该类疾病个体发病及基因治疗提供依据, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

EXT 家系来自焦作武陟, 已遗传了四代, 家系内患者均经过我院 X 线、病理等相关检查并确诊为多发性外生骨疣。本家系中先证者父母是非近亲结婚, 表现为经父遗传, 家系共有 4 代 21 人, 采集家系样本 15 份, 其中患者 11 例, 男性 8 例, 女性 3 例。另外搜集 15 名健康体检者标本作为正常对照组。所有人员在签署书面知情同意后, 采集外周血。家系见图 1。

通信作者: 江梅, 主任, 副主任检验技师, 硕士; 河南省焦作市第二人民医院核医学科, 河南省焦作市解放区民主南路 17 号 (454001); E-mail: jm905964@sohu.com
收稿日期: 2018-03-26; **修回日期:** 2018-07-22

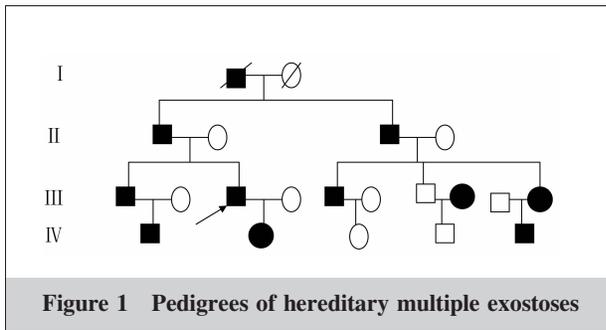


Figure 1 Pedigrees of hereditary multiple exostoses

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

所有个体均通过抗凝管采集外周血 2~3ml, 使用 Chelex 法提取淋巴细胞 DNA。

1.2.2 连锁分析

分别选取与 *EXT1*、*EXT2* 紧密连锁的 STR 位点: D8S1694、D8S522、D11S986、D11S1355, 引物设计参照 NCBI- UniSTS。根据 *EXT1* 基因序列 (GenBank 号 NC000008), 用在线 Primer3 软件 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3-www.cgi>) 设计覆盖该基因 11 个编码外显子及其侧翼序列的引物共 12 对 (其中 *EXT1* 基因第一外显子分两段扩增)。根据 *EXT2* 基因序列 (GenBank 号 NC000011), 用同样软件设计覆盖该基因 2~14 编码外显子及其侧翼序列的引物共 13 对。PCR 扩增反应的总体积为 25 μ l, dNTP 终浓度为 0.2 μ mol/L、引物终浓度为 0.5 μ mol/L、Mg²⁺终浓度为 2.5mmol/L, DNA 聚合酶 (Taq 酶) 1U (上海 promega 公司) 模板量为 100ng 基因组 DNA。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 57 $^{\circ}$ C 复性 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 5min。PCR 产物经 6% 的非变性聚丙烯酰胺电泳分型, 电压 500V, 时间 90min, 常规银染。构建单体型进行连锁分析。引物序列见 Table 1。

1.2.3 候选基因 PCR 扩增

PCR 扩增扩增候选基因 *EXT1* 及 *EXT2*, PCR 反应体系同上, PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1min, 62 $^{\circ}$ C 复性 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 10 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 40s, 55 $^{\circ}$ C 复性 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 6% 非变性聚丙烯酰胺电泳检测。

1.2.4 PCR 产物纯化及 DNA 测序分析

PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒纯化, 采用

Table 1 Primers and sequence of *EXT1* and *EXT2* genes

Gene	Primer	Sequence
<i>EXT1</i>	<i>EXT1E01F1</i>	5'-GGAAAGGCATCCAGAGAAGGT-3'
	<i>EXT1E01R1</i>	5'-GCACATACTGAGGTGACAACTGG-3'
	<i>EXT1E01F2</i>	5'-ATCGAGGGCTCCAGGTTCTAC-3'
	<i>EXT1E01R2</i>	5'-ATTTGCTCAGTTCAGGCTCA-3'
	<i>EXT1E02F</i>	5'-ACTGGGCAAACCAAATGTTG-3'
	<i>EXT1E02R</i>	5'-TAGGCCAAGCTGGCAATTAGA-3'
	<i>EXT1E03F</i>	5'-CAAGGCCACTCGTCTCTATGG-3'
	<i>EXT1E03R</i>	5'-GCTCCCATTTCTTACCTGCAA-3'
	<i>EXT1E04F</i>	5'-GGTTGTTTCATGTGCAAGGTCA-3'
	<i>EXT1E04R</i>	5'-CCATGGCAAAGCAGCTAAAAG-3'
	<i>EXT1E05F</i>	5'-TTTTGGAATGAGCATGGACTC-3'
	<i>EXT1E05R</i>	5'-TGCAATGCTCTGCTCTGTTTT-3'
<i>EXT1E06F</i>	5'-GGCAAAGGATGTCAAAGCAAAG-3'	
<i>EXT1E06R</i>	5'-AACGAGGCAGGATGAATGAAA-3'	
<i>EXT1E07F</i>	5'-CCGGACACAGTTGGTTTTGTT-3'	
<i>EXT1E07R</i>	5'-TCAAGACCCAGATTTCCCTGA-3'	
<i>EXT1E08F</i>	5'-GTTGCTCCATCCTGTGGTCTC-3'	
<i>EXT1E08R</i>	5'-GCAAGGTGCTAACAGGAATCC-3'	
<i>EXT1E09F</i>	5'-TTATGGGGCAAATGTCAAGC-3'	
<i>EXT1E09R</i>	5'-TGCCAAGAGGTTTCACTGGTT-3'	
<i>EXT1E10F</i>	5'-CCTGCCTTGTAGGCTCCTTATG-3'	
<i>EXT1E10R</i>	5'-TGGGTGGAACAGCTAGAGGAA-3'	
<i>EXT1E11F</i>	5'-CTTGGTCCCAAGTGCAAAGAG-3'	
<i>EXT1E11R</i>	5'-CACAATCTGGCTCTGCTGATG-3'	
<i>EXT2</i>	<i>EXT2E02F</i>	5'-TTCAAGTGTCAATTTGCCATCC-3'
	<i>EXT2E02R</i>	5'-CCCTTCCCTTTAGTTCCCTGA-3'
	<i>EXT2E03F</i>	5'-GCAGGTCTGTATGGGACAAGC-3'
	<i>EXT2E03R</i>	5'-GCACAATCCAGAGTGGGAAAA-3'
	<i>EXT2E04F</i>	5'-GGGAGGTAGCAGAGAGGCTGT-3'
	<i>EXT2E04R</i>	5'-CTCACTGCCTCAAGGACCCTA-3'
	<i>EXT2E05F</i>	5'-CATGCGCTCTCAGCTTAGCAT-3'
	<i>EXT2E05R</i>	5'-TTCGCTGGGCTCAATTTTAAAG-3'
	<i>EXT2E06F</i>	5'-TTTCAGAAGGCCAACAGTGGT-3'
	<i>EXT2E06R</i>	5'-GCCTTGGTTTGTGAAGTCTC-3'
	<i>EXT2E07F</i>	5'-TGGAGGCAGGGTGAAAGATTA-3'
	<i>EXT2E07R</i>	5'-CATTCACTCCTGTCCCTCTG-3'
	<i>EXT2E08F</i>	5'-CACCCCATCCCTACAACCTT-3'
	<i>EXT2E08R</i>	5'-AAGTCACCGGATGTCTTTGA-3'
<i>EXT2E09F</i>	5'-GCAAATTTGAGGAGGGGAAG-3'	
<i>EXT2E09R</i>	5'-GAGAAAAATGGAGGCATGCTG-3'	
<i>EXT2E10F</i>	5'-AGAGCCGTGGATACAAGCTGA-3'	
<i>EXT2E10R</i>	5'-GCACAGTTGCCATTTTGAAT-3'	
<i>EXT2E11F</i>	5'-GGAACATCTCCAGAATCCATT-3'	
<i>EXT2E11R</i>	5'-GCAAGCTGGAATAGCACCTG-3'	
<i>EXT2E12F</i>	5'-GGTCACTTGACAAAAGCATT-3'	
<i>EXT2E12R</i>	5'-CAATGTGACCGCATCAATCAT-3'	
<i>EXT2E13F</i>	5'-TCGCCCTTATGGCTACAAGAA-3'	
<i>EXT2E13R</i>	5'-TGCACATGGAGGTGACTATGG-3'	
<i>EXT2E14F</i>	5'-AGAACCTGGGAGCAGACTGTG-3'	
<i>EXT2E14R</i>	5'-CTTCCACTTGGCATTTTCGAG-3'	

ABI3130XL 型基因分析仪对所有 PCR 片段进一步测序分析,所有患者及正常对照均进行双向测序。

2 结果

2.1 连锁分析

根据 D8S1694、D8S522、D11S986、D11S1355 分型结果及家系成员之间的关系构建单体型图,进行分析,将等位基因片段填入同一张家系图中,得到每个个体的染色体单体型。在 D11S986、D11S1355 构建的单体型中,所有患者都继承同一单体型,而非患者没有;而在 D8S1694、D8S522 构建的单体型中,患者间没有共同的单体型。

2.2 候选基因的扩增

对 *EXT1* 和 *EXT2* 基因进行 PCR 扩增所有片段均得到较好扩增,6%非变性聚丙烯凝胶电泳检测,未发现大片段缺失。

2.3 测序分析

基因测序结果:先证者 *EXT1* 基因测序分析未发现杂合突变。

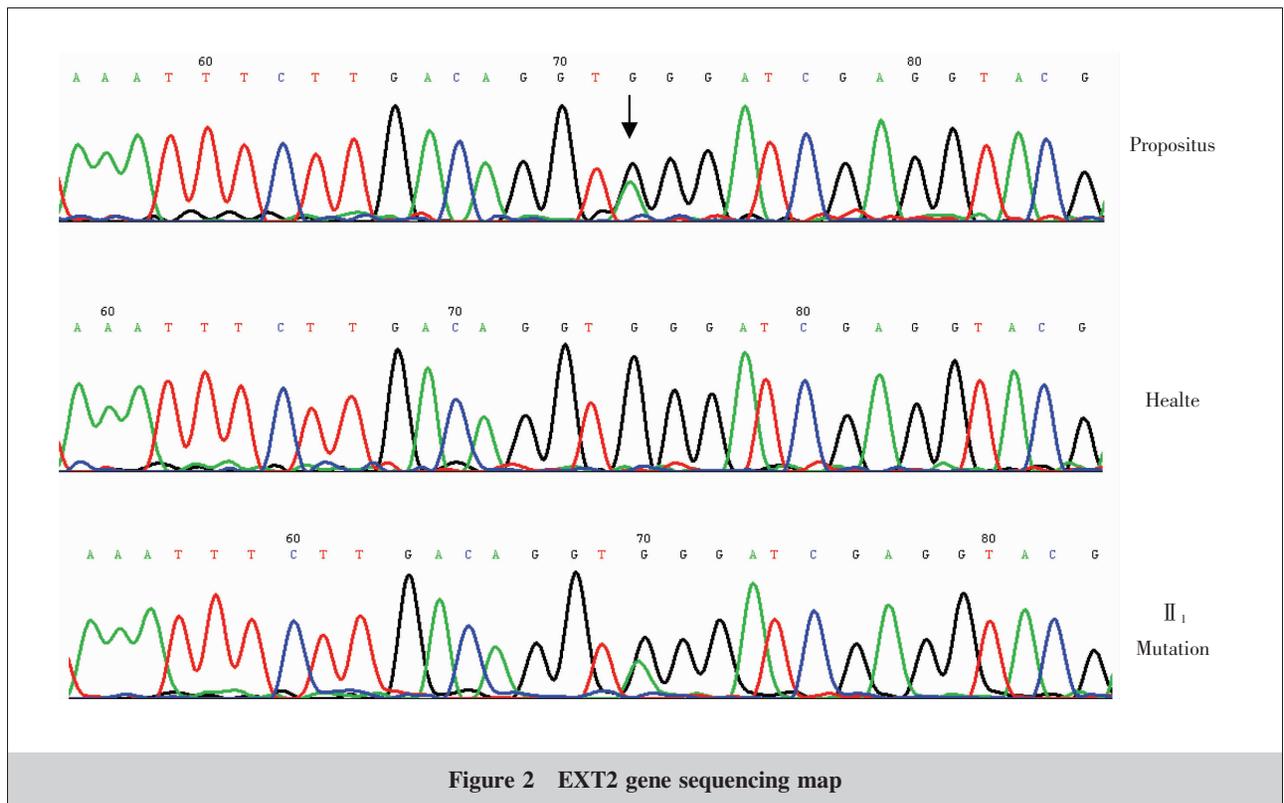
对 *EXT2* 基因所有 PCR 片段进行测序,发现一个 637G>A 杂合突变(Figure 2)。对该家系所有患者

及 6 例正常对照进行双向测序,发现该突变存在于所有患者中,而不存在于正常对照中。选取家系外正常对照 15 人进行测序,亦未发现该突变。其余外显子测序未发现突变及多态性。

3 讨论

遗传性多发性骨软骨瘤(hereditary multiple osteochondromas, HEM) 又称遗传性多发性外生骨疣、遗传性外生骨软骨瘤病、遗传性畸形性软骨发育异常等。遗传性多发性骨软骨瘤虽然是一种良性肿瘤,然而肿瘤本身产生的症状困扰着患者及其家庭。由于肿瘤累及骨骺,因此患者大多身材矮小,临床均有两处以上骨疣,几乎所有患者骨疣均累及膝关节,其次是踝关节、肘关节、腕关节,部分累及肩关节、髋关节、骨、指关节等未见累及颅面骨,与文献报道一致。本例先证者发病年龄 35 岁,家族史明显,X 线检查发现患者尺/桡骨等多处均有软骨瘤并有右前臂畸形,临床明确诊断为 HME。

HME 具有遗传异质性,目前的研究认为至少与 3 个基因即 *EXT1*、*EXT2*、*EXT3* 有关,但从临床表现无法区分。大多数 HME 患者与 *EXT1* 和 *EXT2* 有



关,HME患者中未发现 *EXT1* 或 *EXT2* 突变者比例 <15%。Clement 等^[2]的报道也证实了这一观点。*EXT1*、*EXT2* 均为抑癌基因,广泛表达,*EXT1* 基因包含 11 个外显子,编码 746 个氨基酸;*EXT2* 基因包含 14 个外显子,第 2~14 外显子形成一个开放阅读框,编码含 718 个氨基酸^[3]。且两基因在氨基酸水平上高度相似,特别是羧基端区域。*EXT1*、*EXT2* 基因编码一种 II 型跨膜蛋白,这些蛋白质与硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans,HSPG)密切相关,而 HSPG 是软骨的组成成分,*EXT1*、*EXT2* 基因突变导致 HSPG 合成障碍。细胞增殖、成熟的负反馈破坏,使软骨细胞过早分化,使邻近区域的骨骼生长异常,从而引起多发性外生性骨疣。基因突变引起的信号通路异常导致部分软骨膜软骨细胞分化成为肥大细胞,但这些软骨细胞并非纵向排列,而是以与生长板形成约 90°的夹角生长并逐渐形成骨软骨瘤^[4]。本实验通过构建单倍型连锁分析将该家系的致病基因确定为 *EXT2*,进一步对 *EXT2* 所有片段测序发现 637G>A 无义突变。有文献研究 *EXT2* 出现 6 种内含子和 1 种外显子突变,可见突变集中在内含子上^[5],周永安等^[6]和杨慧芳等^[7]报道的突变位于内含子。该家系的突变位于 *EXT2* 基因外显子三区,将引起编码蛋白 192 位的密码子形成终止密码,使编码蛋白成为只有 191 个氨基酸的截断型蛋白,截断型蛋白高度不稳定,在细胞内会迅速降解。该突变未在 *EXT* 基因突变数据库检索到且无相关文献报道。家系中 II₁ 经全身体格检查及骨疣好发部位 X 线检查均发现病变,其后代存在患者,连锁分析发现其单体型同所有患者,且测序发现其有此突变,有明显的家族遗传性,符合遗传性多发性骨疣的诊断。先证者家系调查发现,该突变来自于先证者的父亲。

由于 HME 具有遗传异质性,临床无法区分,*EXT1* 和 *EXT2* 基因编码区片段较长,且其基因突变不仅涉及编码区,相当一部分位于剪接位点甚至调控区,故直接检测费时费力。本研究首先利用与 *EXT1*、*EXT2* 基因紧密连锁的 STR 位点进行连锁分析,所选四个 STR 与候选基因的遗传距离均小于 1cm,重组率小于 1%,且杂合率高、多态性好,因此能够快速准确确定候选基因。然后再对候选基因进行直接检测,这样节省了直接检测成本。

本研究证实 *EXT2* 基因 637G>A 无义突变,是导致该家系 HME 的分子机制。总之,HME 病因及发

病机制目前虽已取得一定进步,但仍有许多关键问题未解决。此例患者资料的收集及整理,为今后的外周血样本提取 DNA 及 PCR 扩增测序,寻找该家系致病基因并与国内其他患者比较有重要意义。在今后的研究中,还可以将其与临床表现及放射学特征联系,从而阐明 EXT 的基因型与表现型之间的内在联系,为预防该疾病发生、家系成员的遗传咨询和产前基因诊断,同时也为进一步研究 HME 发病的分子机制提供依据。

参考文献:

- [1] Li YC,Tang JY. Research progress in hereditary multiple exostoses [J]. Journal of Clinical Pediatric,2016,34(3): 232-236.[李玉婵,汤静燕.遗传性多发性骨软骨瘤研究进展[J].临床儿科杂志,2016,34(3):232-236.]
- [2] Clement ND,Porter DE. Hereditary multiple exostoses: anatomical distribution and burden of exostoses is dependent upon genotype and gender [J]. Scottish Med J, 2014,59(1):35-44.
- [3] Fang W,Pei YY,Huang WJ,et al. Investigation of polymorphisms in causal genes of HME:EXT1 and EXT2[J]. Journal of Sun Yet-sen University (Medical Sciences),2011,32(2):263-278.[房玮,裴元元,黄玮俊,等.遗传性多发性骨软骨瘤致病基因 EXT1 和 EXT2 的多态性研究 [J]. 中山大学学报(医学科学版),2011,32(2):263-278.]
- [4] Ryckx A,Somers JFA,Allaert L. Hereditary multiple exostosis[J]. Acta Orthopaedica Belgica,2013,79(6):597-607.
- [5] Zeng HY,Zhou YA,Guo W,et al. Screening for EXT gene mutations in a pedigree with hereditary multiple exostoses [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity,2016,24(2):33-38.[曾红艳,周永安,郭伟,等.遗传性多发性骨软骨瘤患者 EXT 基因突变检测一例[J].中国优生与遗传杂志,2016,24(2):33-38.]
- [6] Zhou YA,Ma YX,Zhang YH,et al. Screening for EXT1 and EXT2 gene mutations in a ethnic Han Chinese family from Shanxi with hereditary multiple exostoses[J]. Chinese Journal of Medical Genetics,2013,30(1):95-98. [周永安,马云霞,张永红,等.山西汉族遗传性多发性骨软骨瘤家系 EXT1 及 EXT2 基因突变研究[J].中华医学遗传学杂志,2013,30(1):95-98.]
- [7] Yang HF,Zhou YA,Zhao XL,et al. Analysis of gene mutation in a patient with hereditary multiple exostoses[J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity,2015,23(1): 21-22,118. [杨慧芳,周永安,赵晓丽,等.一例遗传性多发性骨软骨瘤患者的基因突变分析 [J].中国优生与遗传杂志,2015,23(1):21-22,118.]