

·基础研究·

中国南方一罕见迟发性脊椎骨骺发育不良家系的表型和基因型的相关性研究

黄颖¹, 谢杰^{1,4}, 郑诗瑶², 唐佳³, 郭奕斌^{1,2}

(1. 中山大学中山医学院医学遗传室, 广东广州 510080; 2. 中山大学医学院医学遗传室, 广东深圳 518107;
3. 广东省生殖科学研究所, 广东广州 510600; 4. 广州盛安精准医学研究院, 广东广州 510799)

摘要:【目的】揭示一罕见遗传性矮小症家系的分子发病机制, 阐明患者表型和基因型的相关性, 为今后的产前、植入前基因诊断奠定基础。【方法】在临床初诊、系谱分析的基础上, 首先采用高通量测序技术对先证者及其家庭核心成员的DNA样品进行全外显子组测序。通过生信分析找出候选基因, 在确定候选基因及其新变异后, 采用PCR、Sanger测序、RT-PCR、q-PCR等方法对该新变异的致病性进行系列鉴定。【结果】通过全外显子组测序、Sanger测序验证和生物信息分析, 确定 *TRAPPC2* 基因及其携带的 c.94 del G 突变为本病最可能的致病基因突变; 通过 RT-PCR, 排除了 IVS as(-1) del G 的可能; 通过 q-PCR 检测, 证实该突变导致患者和携带者的 *TRAPPC2* 基因表达量显著低于正常人群 ($P < 0.01$), 且蛋白高级结构预测分析显示正常蛋白和突变蛋白的空间结构存在明显差异。根据 ACMG 的标准, 确定为致病性突变。【结论】先证者所患疾病为 XR 型迟发性脊椎骨骺发育不良 (SEDT), *TRAPPC2* 基因的 c.94 del G, p.D32T, fsX6 是一还未报道的新致病突变, 是患者发病的内在原因, 其基因型和表型有显著的相关性。该研究进一步丰富了 *TRAPPC2* 基因的突变谱, 为今后的早期诊断和优生优育打下了良好基础。

关键词:迟发性脊椎骨骺发育不良 (SEDT); *TRAPPC2* 基因; 新突变; 鉴定

中图分类号: R394.3 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2022)03-0392-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0307

The Correlation Study of Phenotype and Genotype of a Rare SEDT Family in South China

HUANG Ying¹, XIE Jie^{1,4}, ZHENG Shi-yao², TANG Jia³, GUO Yi-bin^{1,2}

(1. Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Medical Genetics, School of Medicine, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China;
3. Guangdong Provincial Reproductive Science Institute, Guangzhou 510600, China; 4. Guangzhou Sheng'an Institute of Precision Medicine, Guangzhou 510799, China)

Correspondence to: GUO Yi-bin, E-mail: guoyibin@mail.sysu.edu.cn; TANG Jia, E-mail: tony2081129@163.com

Abstract:【Objective】To reveal the molecular pathogenesis of a family with hereditary dwarfism and the correlation between phenotype and genotype, so as to lay a foundation for prenatal and preimplantation gene diagnosis in the future.【Methods】On the basis of preliminary clinical diagnosis and pedigree analysis, the DNA samples of the proband and his family core members were sequenced by next generation sequencing. The candidate genes were identified by bioinformatics analysis. After the candidate genes and their novel variants were identified, the pathogenicity of the novel variants was identified by PCR, Sanger sequencing, RT-PCR, q-PCR and other methods.【Results】Through whole exon sequencing, Sanger sequencing and bioinformatics analysis, it was confirmed that *TRAPPC2* gene and its c.94 del G mutation were the most likely pathogenic mutations in the disease, and the possibility of IVS as (-1) del G was ruled out by RT-PCR.

收稿日期: 2022-03-07

基金项目: 中山大学同创智慧医疗交叉学科人才培养基金(76160-3090319); 闽粤合作科研基金(71010025)

作者简介: 黄颖, 硕士生, 研究方向: 遗传性骨病的分子诊断, E-mail: huangy626@mail2.sysu.edu.cn; 谢杰, 共同第一作者; 郭奕斌, 通信作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: guoyibin@mail.sysu.edu.cn; 唐佳, 共同通信作者, E-mail: tony2081129@163.com

Through q-PCR detection, it was confirmed that the *TRAPPC2* gene expression of patients and carriers was significantly lower than that of normal people ($P < 0.01$), and the advanced structure prediction analysis of protein showed that there was a significant difference in the spatial structure of normal protein and mutant protein. According to the criteria of ACMG guidelines, it was identified as pathogenic mutation.【Conclusions】The disease of the proband is delayed spondyloepiphyseal dysplasia tarda (SED_T) of XR, and the c.94 del G, p.D32T, fsX6 of *TRAPPC2* is a novel pathogenic mutation that has not been reported, which is the internal cause of the disease, and there is a significant correlation between genotype and phenotype. This study has further enriched the mutation spectrum of *TRAPPC2* gene and laid a good foundation for future eugenics and early disease prevention.

Key words: SED_T; *TRAPPC2* gene; novel mutation; identification

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(3): 392-399]

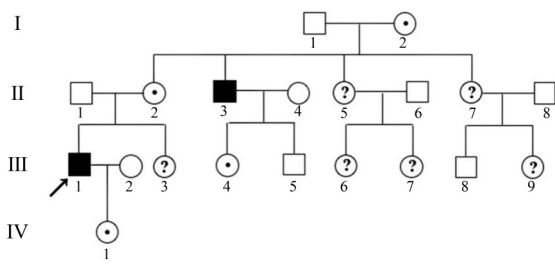
迟发性脊椎骨骺发育不良(spondyloepiphyseal dysplasia tarda, SED_T, OMIM 313400)是遗传性矮小症中发病率很低的罕见遗传性骨病^[1],分AR、AD、XR遗传3种类型,其中XR型相对常见,患者多为男性。患病男性具有典型的躯干较短,臂展长度大于身高,且身材不成比例的矮小等症状^[2],是该病临床表现中一个显著的特征。出生时,患儿的身高正常,身体比例也正常,但从6~8岁起开始出现身高增长迟缓的现象,且逐渐矮于同龄人。影像学特征包括:不规则的扁平椎体,典型的驼峰状突起和椎间隙明显变窄^[3-4]。女性携带者通常没有临床表现。Whyte等^[2]报道,女性携带者在影像学检测中仅出现细微的改变,但成年后可有轻度骨关节炎的表现。XCI(X chromosome inactivation)是雌性哺乳动物与雄性个体之间实现基因剂量补偿的一种方式。它对许多X连锁遗传病的发生及临床表现的严重程度有很大关系^[5]。女性携带者没有SED_T明显特征可能与此有关。本病的发生与*TRAPPC2*(trafficking protein particle complex subunit 2, 转运蛋白粒子复合亚基2,早期称为*SEDL*基因的致病突变密切相关^[6]。该基因定位于X染色体的短臂(Xp22.2),gDNA约22 kb,含有6个外显子。编码的蛋白质含有140个氨基酸,称为Sedlin蛋白(SED_L蛋白)^[7]。在基因组DNA中,有7个已知的和*SEDL*高度同源的假基因(*SEDLP1*~*SEDLP7*),均不含内含子。在7个假基因中,*SEDLP1*转录本的编码区与*SEDL*基因几乎相同,因此激活*SEDLP1*的表达可能成为治疗SED_T的潜在途径^[6]。SED_L蛋白是TRAPP(运输蛋白粒子)复合物的的重要组成部分,能够将原胶原三聚体(例如II型胶原)从内质网运输到高尔基体,最终将这些蛋

白质运输到细胞外基质中。它参与了细胞内物质从内质网到高尔基体间的囊泡运输的定位和膜融合的过程^[8]。*TRAPPC2*基因的多种突变均可导致SED_L蛋白的定位错误和功能缺陷^[9-10],影响其在内质网—高尔基体膜室间区的正确定位,致使细胞(尤其是软骨细胞)蛋白运输出现障碍,导致骨软骨发育不良最终引起SED_T的发生^[7,11]。本研究对来自中国南方的一遗传性矮小症家系进行详细的分子遗传学研究,最终揭示*TRAPPC2*基因(NM_001011658)所携带的c.94 del G, p.D32T, fsX6突变为该家系患者发病的真正内因,为今后的产前、植入前基因诊断等创造了必要的前提条件。

1 材料与方法

1.1 病例资料

所接诊的遗传性矮小症家系来自广东四会,系谱图如图1所示。家族中有2名男性患者,均为其各自的母亲所遗传,符合XR遗传规律。先证者(Ⅲ-1)是一名27岁的男子,于7~8岁时开始出现症状,现身高140 cm,臂展长度为151 cm。颈部短,劳累时背部出现明显疼痛,髋部和肩部也出现轻度疼痛。膝关节尚无症状,鸡胸,头围正常,无异常的面部特征,智力、外耳、心肺均正常。先证者的舅舅(Ⅱ-3)与先证者有相似的临床症状和体征,身高148 cm,臂展长度为157 cm。先证者的母亲(Ⅱ-2)共四姐弟,在确定先证者(Ⅲ-1)及其舅舅(Ⅱ-3)为患者的前提下,根据遗传规律,推测系谱中的4人即先证者的外婆(Ⅰ-2)、母亲(Ⅱ-2)、表妹(Ⅲ-4)及女儿(Ⅳ-1)应为携带者(图1),后经测序得到验证。家族中表型正常的男性和正常对照组均无此突变。



Family pedigree indicating X-linked recessive inheritance of the disease. The arrow indicates the proband. All open boxes represent healthy males and open circles represent healthy females. Black boxes represent affected males. Circles with a dot in the middle indicate the status of a carrier, and the circles with a question mark in the middle indicate the status of a suspected carrier that the lack of genetic diagnosis results.

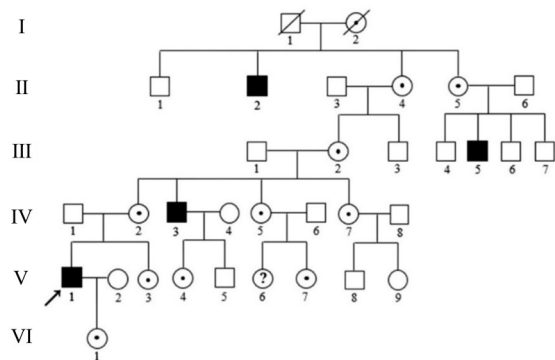
图1 广东一矮小症家系第一次遗传咨询系谱图

Fig. 1 The first genetic counseling pedigree of a dwarfism family from Guangdong

为了进一步明确基因型与表型的相关性,我们采集了家族中更多的成员资料和血样进行测序验证,系谱图见图2。本研究是在患者及其家属签署知情同意书的情况下开展的,并获得了中山大学医学院医学伦理委员会的批准(批准号:医学院医伦[2021]第57号)。

1.2 方法

1.2.1 全外显子组测序 采集先证者(III-1)及其



The arrow indicates the proband. All open boxes represent healthy males and open circles represent healthy females. Black boxes represent affected males. Boxes or circles with a diagonal line indicate that the person has already died. Circles with a dot in the middle indicate the status of a carrier, and the circles with a question mark in the middle indicate the status of a suspected carrier that the lack of genetic diagnosis results.

图2 广东一矮小症大家系的扩大系谱图

Fig. 2 Extended pedigree of a dwarfism large family from Guangdong

妻子(III-2)、女儿(IV-1)的血样,提取DNA,测定DNA纯度和浓度,进行全外显子组测序(iGeneTech, Beijing, China),重点检测跟遗传性矮小症相关的基因。超过90%的目标区域是用覆盖 $\geq 30X$ 的深度测序,通过使用带有标准参数的 Burrows-Wheeler aligner(BWA)将测序原始数据映射到 UC-SC 数据库人类参考基因组(版本:hg19)上进行比对^[12]。重复的读数由 Picard (<http://Broadststitute.github.io/picard/>)标记,通过使用基因组分析工具包(GATK)^[13]和最佳实践推荐参数进行区域比对和质量评分重新校准,以调用单核苷酸变体(SNV)和短插入/缺失变体(INDELs)。使用软件平台 KGGSeq (<http://pmglab.top/kggseq/>)^[14-15]对候选突变进行三个层次(遗传水平、变体-基因水平和知识水平)的筛选和注释,最后通过表型数据库和文献检索,筛选出与遗传性矮小症或表型相关的候选突变。

1.2.2 Sanger 测序验证 *TRAPPC2* 基因突变 采集全部受试者的外周血,提取基因组DNA,采用 Primer Premier 5.0 设计引物(参考序列 NG_011555)(表1)。按以下条件扩增 *TRAPPC2* 基因的四个外显子和与其相邻的内含子序列:95 °C 预变性 5 min,然后 94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 50 s,循环次数为 35 次,72 °C 再延伸 3 min。采用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,并对扩增产物采用 ABI PRISM 3730 型测序仪进行双向测序(上海 Invitrogen 生物技术公司)。测序结果由 Chromas 软件读取,并与参考序列进行比较分析。

1.2.3 逆转录 PCR (RT-PCR) 使用 Trizol 试剂

表1 *TRAPPC2* 基因 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences for *TRAPPC2*

Exon	Sequence (5'-3')
3	F: GAATTCTACACTTCCCATTAGTC
	R: TATCTGTCCAGATCTTCCAGTTC
4	F: GCAAATGTTAATCTGTGGTTGC
	R: TGACTGTGAAGTCTACAGACT
5	F: TACTGTATCAACGAACTGGTTG
	R: GTCGAATCCTTTCTCATCAGAA
6	F: CAGAAACTTAAGATTTGTCAGC
	R: TGACATGAGACAGAATGTACTA

PCR: Polymerase Chain Reaction; F: Forward Primer; R: Reverse primer

(Simgen 试剂盒),从受试者新鲜外周血白细胞中提取总 RNA,在 20 μ L 体积内反向转录 1 000 ng RNA (Fermentas 试剂盒)。选用 cDNA 作为逆转录 PCR 的反应模板,逆转录 PCR 的引物为:F:5'-GCG-CAAGCTTGCCATATATTGAAGACCATGTCTGGG-3';R:5'-GCGCGGATCCCGAGTATACACCATTGTGGTGACATC-3'。PCR 反应条件同 1.2.2 对逆转录 PCR 产物进行双向测序(上海 Invitgen 生物技术公司)。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (qPCR) 采用 TRIzol 法提取全部受试者的外周血中总 RNA,设计了跨越 3 号和 4 号外显子的引物(E3F:5'-GAGCTTC-TACTTTGTAATTGTTGGC-3';E4R:5'-AGT-GACAAATGCCGACACAAA-3')。由于 *TRAPPC2* 基因与假基因 *SEDLP1* 的同源性高达 98%^[6],本研究将引物 3' 端设计在两个基因的错配区,以保证只有 *TRAPPC2* 基因能扩增出来。以 β -actin 为内部参照。反应总体积为 20 μ L,包括稀释的 cDNA、引物和 SYBR Green I Master Mix (Fermentas k0222 试剂盒)。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 然后 60 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s。每个样品重复检测 3 次,应用比较 CT 法进行分析数据。

1.2.5 变异分析与致病性评估 经检索 HGMD (人类基因突变数据库, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)、dbSNP (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) 和千人基因组计划数据库,确认我们所发现的 *TRAPPC2* 基因的 c.94 del G, p.D32T, fsX6 新变异还未被报道。然后,使用 Clustal Omega 在 11 个 SEDL 蛋白质同源物的 fasta 格式文件上执行多序列比对^[16]。此外,还使用 SWISS-MODEL^[17] (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对野生型和突变型 SEDL 蛋白的三级结构进行了比对, PYMOL 软件用于可视化蛋白质的三级结构的分析,并标出突变位置。结合临床资料、分子遗传学检测结果和新变异体的一系列鉴定结果,我们参照 ACMG 指南^[18-19] 综合分析和评估 *TRAPPC2* 基因中的新变异的致病性。

2 结果

2.1 全外测序结果

首先通过计算亲缘系数,排除先证者父母三代

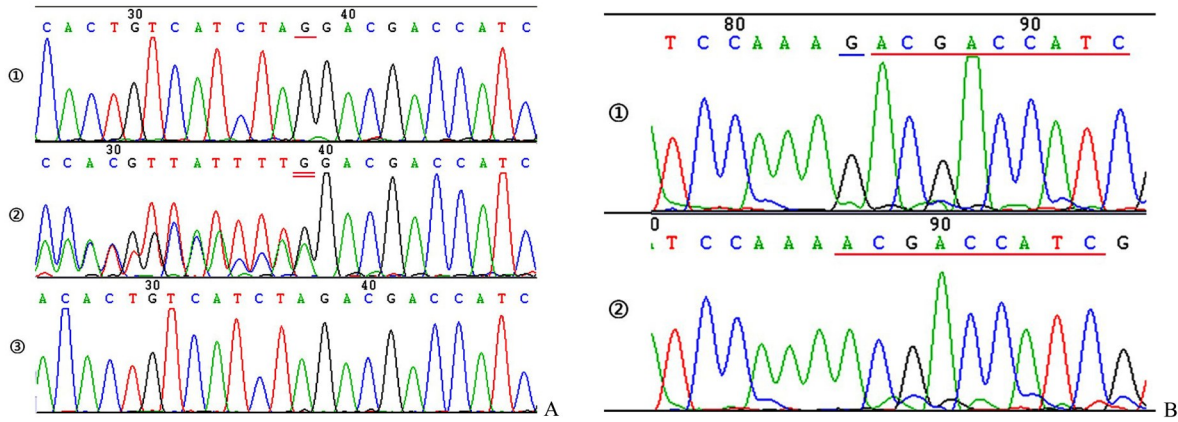
内近亲婚配的可能性。然后通过对变异的过滤注释和质控,包括过滤掉内含子区的变异和同义突变,保留次要等位基因频率(MAF)<3% 或不在突变数据库中,以及相符的遗传模式过滤,筛选与疾病相关的候选变异。使用 KGGSeq 和 VarCards 对变异的有害性进行评估,通过对候选变异相应基因的疾病种类和表型与先证者家系疾病表型的相似性进行整合分析,最终位于 *TRAPPC2* 基因(NM_001011658)的单碱基缺失变异 c.94 del G, p.D32T, fsX6 被选为候选突变,进行 Sanger 测序验证。

2.2 Sanger 测序验证结果

经 Sanger 测序验证,该家系的先证者及家族中的所有患者和肯定携带者均被证实存在上述变异(缺失单碱基 G),先证者和其他患者是半合子,先证者的女儿和母亲都是杂合子,而正常对照组无此变异(图 3A)。由于 3 号内含子的最后一个碱基和 4 号外显子的第一个碱基都是 G,所以在 DNA 水平无法确定缺失的确切位置。因为如果缺失的 G 位于 3 号内含子的最后一个位点,则突变应为 IVS3 as(-1)del G,但如果缺失的 G 是 4 号外显子中的第一个碱基,则突变为 c.94 del G。确切的变异位点需用逆转录 PCR(RT-PCR)在 RNA 水平上来鉴定。通过采集该家系更多成员的血样进行测序验证,结果与理论预测的完全相符。该家族健在的女性有 12 人,其中肯定携带者 6 人,可能携带者 6 人。男性患者 4 人。在可能携带者(图 1 打“?”者)中,检出携带致病基因的有 4 人,分别是:IV-5、IV-7、V-3、V-7。另外,V-6 未检,V-9 正常(图 2)。

2.3 RT-PCR 鉴定结果

在该家系中, RNA 样本被逆转录成 cDNA, 作为 RT-PCR 的反应模板。测序结果显示,患者的转录本中的 G 碱基被删除,并且剪接位点没有发生变化(图 3B)。因此,通过 RT-PCR 可以证实,该家系的变异是由于外显子 4 的第一个碱基 G 的缺失引起的移码突变。c.94 del G 导致 *TRAPPC2* 蛋白第 32 位的氨基酸由 D 变为 T,并在产生 5 个新的氨基酸后,出现了一个 TGA 终止密码子(c.94 del G, p.D32T, fsX6),从而导致 *TRAPPC2* 蛋白从 140 个氨基酸截断至 36 个氨基酸。



A: Mutation detection result. Sequencing of E4 in the *TRAPPC2* gene. ①Normal control and single line shows normal G/G. ②Carriers and double line show heterozygote deletion G/- (II -2). ③Patient as hemizygote shows single-base G deletion and subsequent base moves forward (III -1). B: RT-PCR result. Sequencing of E4 in the *TRAPPC2* gene from cDNA. ①Normal control and single line shows normal GACCACATC. ②Shorter lines show the single G base deleted before the normal ACGACCATC in patients (III -1).

图3 *TRAPPC2*基因 Sanger 测序的结果

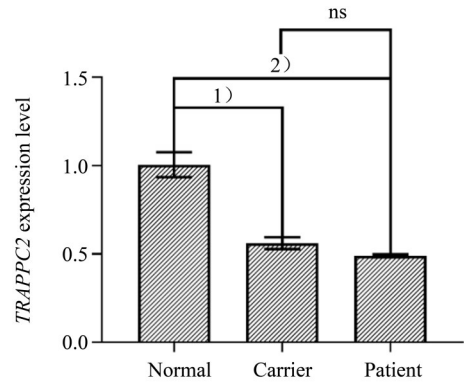
Fig. 3 The results of Sanger sequencing for *TRAPPC2*

2.4 荧光定量PCR检测结果

对正常组(Normal)、杂合子携带者组(Carriers)和半合子患者组(Patients)的 *TRAPPC2* 基因的RNA的相对表达量进行分析,三个不同分组的 *TRAPPC2* 基因相对表达量的分析结果如图4所示。以正常对照组(Normal)的“1.000”为单位,相对于β-actin 分析的表达水平,3个组的 *TRAPPC2* 基因的相对表达量分别为 1.000(Normal)、0.561(Carriers)和 0.489(Patients) (图4)。经单因素方差分析,三组间差异有统计学意义 ($F=38.31, P=0.0004$) ; 采用 Bonferroni 法作两两比较,发现患者组与携带者组比较差异无统计学意义 ($P=0.9096$),而患者组与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P=0.0006$),且携带者组与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P=0.0013$)。分析表明,患者和携带者 *TRAPPC2* 基因的表达水平均明显降低,且患者的表达水平比携带者减少得更多。

2.5 致病性鉴定结果

应用序列比对在线软件 CLUSTAL Omega 对 11 个跨物种的 *TRAPPC2* 蛋白质的氨基酸序列进行分析、比对。不同的物种包括:非洲爪蛙(*Xenopus*)、斑马鱼(*Danio*)、原鸡(*Gallus*)、褐鼠(*Rattus*)、野猪(*Sus*)、牛(*Bos*)、人(*Homo*)、类人猿(*Pongo*)、黑猩猩(*Pan*)、恒河猴(*Macaca*)、雪豹(*Mustela*)。物种保守性分析结果显示, p.32D(天冬氨酸)在 11 个跨物种中均高度保守,且后续的氨基酸序列也都高度保



1) $P<0.01$, 2) $P<0.001$, ns: no statistical significance. $n=3$

图4 *TRAPPC2*基因在正常、携带者和患者组中的相对表达水平

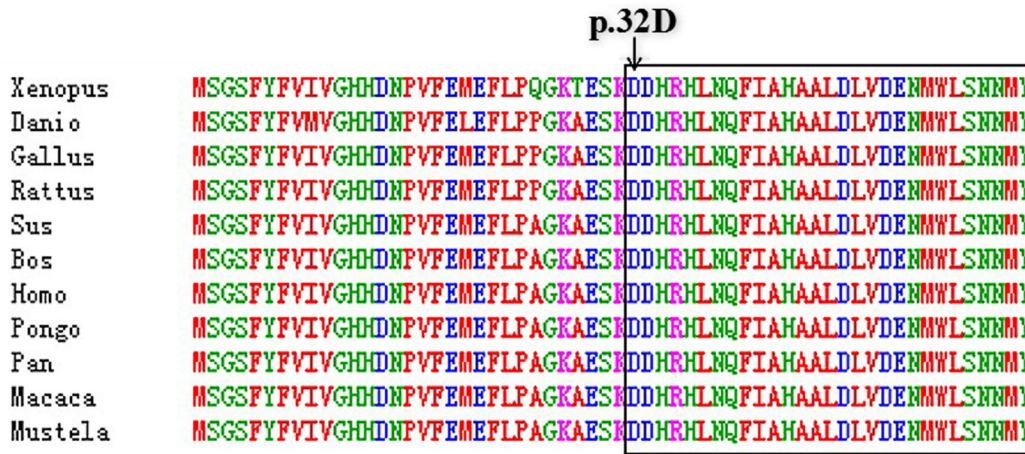
Fig. 4 Relative expression levels of *TRAPPC2* gene in Normal, Carrier and Patient group

守(图5)。提示该区域氨基酸序列可能具有重要的生化功能,新突变所带来的氨基酸的变化可能会破坏该蛋白质的正常功能。c.94 del G 突变导致 *TRAPPC2* 蛋白从第 32 个氨基酸开始产生几个新的氨基酸,导致蛋白质截短后产生了一个新的终止密码子。这些变化无疑会破坏正常 *TRAPPC2* 蛋白的原有功能,从改变蛋白的一级结构到最终影响、破坏蛋白的生化或生理功能。

通过 SWISS-MODEL 预测 *TRAPPC2* 蛋白的三级结构,我们发现单碱基缺失突变(c.94 del G, p. D32T, fsX6) 引起移码并导致翻译提前终止,肽链

明显截短,从而导致 sedlin 的功能受到严重干扰。与野生型 TRAPPC2 蛋白(图 6A)相比,突变蛋白的三级结构发生了明显改变(图 6B)。根据 ACMG 指南^[18-19]对新变异的致病性进行评估,该变异属于移码突变,与 ACMG 指南中对 PVS1(非常强的致病性证据)的描述一致。其次,在数据库群体排查中未

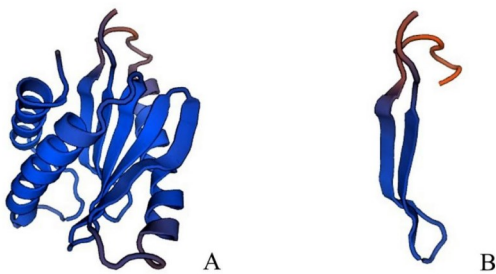
发现该变异,与 PM2_Supporting 的描述一致。第三,支持证据 PP1、PP3 和 PP4 的描述也与该变异一致。综上所述,该新变异包括 1 个非常强(PVS1)和 4 个支持性证据(PM2_Supporting, PP1, PP3, PP4)结合在一起。因此,综合上述所有分析和实验结果,该家系的新变异被鉴定为致病性突变。



c.94 del G, p.D32T, fsX6. The mutation that resulted in altered amino acids starting at position 32 was highly conserved among the 11 species.

图5 TRAPPC2 基因的 CLUSTAL Omega 分析

Fig. 5 CLUSTAL Omega analysis of TRAPPC2



A: The wild type. B: c.94 del G, p.D32T, fsX6 mutant type.

图6 TRAPPC2 蛋白的突变型和野生型三级结构

Fig. 6 The mutant type and wild type tertiary structures of TRAPPC2 protein

3 讨论

遗传性骨病种类多,危害严重,再发风险高,但发病率低,病因复杂,尤其是罕见疑难骨病。因此,揭示其分子发病机制,对高危家庭通过产前/植入前诊断实现优生具有重要意义。由于遗传性骨病具有高度的遗传异质性和表型多样性,加上刚接诊时,患者症状不是特别典型,家族成员的资料也不多,所以为了尽快查清病因,我们直接采用 NGS 测

序技术对与矮小症相关的基因包进行了比较全面的筛检,重点筛检与骨骼系统相关的基因包括 TRIP11、COL2A1、FGFR3、ARSB、PTH1、IMPAD1、TRAPPC2、EXT1、PDE4D、PRKARIA、GDF5、NOG 等 100 多个。经临床表型分析、系谱分析、生物信息分析、实验验证,最终确定 TRAPPC2 基因(NM_001011658)所携带的 c.94 del G, p.D32T, fsX6 突变为该家系患者发病的真正内因,所患疾病为迟发性脊椎骨骺发育不良(SED T)。

SED T 是一种骨软骨发育不良的疾病,其特征存在于脊柱骨的短缩,长骨骨骺端的不规则变化。该病具有高度的表型异质性^[20],很容易与其他骨病相互混淆且由于发病率很低,临床医生对该疾病的认识也不够全面,TRAPPC2 基因的致病性突变是绝大多数 SED T 发病的根本原因。TRAPPC2 蛋白在进化过程中高度保守,在脑、心、肾、肝、肺、胰腺、胎盘、骨骼肌、胎儿软骨、纤维细胞和淋巴细胞中均有表达^[20]。以往对酵母同源基因 p20 的研究发现, sedlin 蛋白构成 TRAPP(运输蛋白颗粒)的亚基,参与内质网(ER)的靶向和融合^[21]。TRAPPC2 基因突

变可能导致蛋白的定位错误和功能缺陷,导致软骨细胞蛋白复合体从内质网转运到高尔基体的障碍^[9-10]。根据HGMD和相应的文献报道^[22],迄今为止已有57种不同的突变类型,包括无义突变、错义突变、缺失、插入和剪切位点等突变类型。值得注意的是,三号内含子和四号内含子下游,很可能影响剪切位点的变异至今还没有被发现或鉴定。还有文献指出,*TRAPPC2*基因的突变距离5'端越近,其临床表型将越严重^[7]。本研究发现的移码突变(p.D32T,fsX6)是由外显子4的第一个碱基G缺失引起的,至今仍未见报道,经本研究详细的分析和致病性鉴定,证实为一种新的致病突变,从而丰富了*TRAPPC2*基因的突变谱。通过本论文研究还得到启发,对发生在外显子和内含子交界部位的单碱基新变异,通过Sanger测序和RT-PCR、q-PCR检测,从DNA、RNA等多个水平对新变异进行鉴定是很有必要的。

另据文献报道,人类基因组中至少有7个*TRAPPC2*假基因^[23]。*SEDLP1*位于染色体19q13.4,*SEDLP2*位于染色体8q13.3,*SEDLP3-SEDLP7*位于染色体Y q11.23.21。在*TRAPPC2*基因和*SEDLP1*假基因的开放阅读框上,仅有6个同义突变核苷酸存在差异。已证实*SEDLP1*在组织中转录并广泛表达,并编码一种蛋白,与*TRAPPC2*基因高度同源^[6]。因此,设计用于扩增全长*TRAPPC2*基因和Real-Time PCR的引物时,应避免*SEDLP1*的扩增。根据文献^[23]推测,*SEDLP1*基因导入细胞后可能在

细胞核周围结构中表达,我们推测由于某种补偿机制,*SEDLP1*在女性携带者在一条X染色体上发生基因突变的情况下表达取代了*TRAPPC2*的功能,从而导致*TRAPPC2*蛋白表达下降。另一方面,*TRAPPC2*基因被证实逃脱了X染色体失活(XCI)。XCI是雌性哺乳动物和雄性哺乳动物之间实现基因剂量补偿的一种方式,这与临床表现的严重程度有关^[5]。一些研究阐明,雌性携带者的野生型和突变型可同时表达,由此说明*TRAPPC2*基因逃脱了X染色体的失活,但Whyte等^[2]报道,成年女性携带者的影像检查只是轻微的异常,甚至有些人只是患有骨关节炎。

综上,*SEDLT*的潜在并发症是早发性关节炎,表现为关节痛和活动受限。对于病情严重的患者,应在成年初期实施髋部正畸治疗^[24]。目前对*SEDLT*尚无有效的治疗方法,但是,当*SEDLT*患者的骨骼在婴幼儿和儿童早期发育完全正常时,采取基因干预治疗可能是可行的^[25],但基因治疗方法目前仍处于实验阶段。因此,加强预防工作显得更为重要。由于该病发病年龄较晚,产前B超检查不能确诊,因此,在明确先证者病因的前提下,对胎儿进行产前或植入前基因诊断,从而防止患胎出生、真正实现优生是目前最有效的诊防策略。*SEDLT*患者的基因诊断不仅有利于临床诊断,也有利于女性携带者的诊断,也为预测复发风险和遗传咨询奠定了基础。这正是本研究的意义之所在。

参考文献

- [1] Wynne-Davies R, Gormley J. The prevalence of skeletal dysplasias. An estimate of their minimum frequency and the number of patients requiring orthopaedic care [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1985, 67(1):133 - 137.
- [2] Whyte MP, Gottesman GS, Eddy MC, et al. X-linked recessive spondyloepiphyseal dysplasia tarda. Clinical and radiographic evolution in a 6-generation kindred and review of the literature [J]. *Medicine (Baltimore)*, 1999, 78(1):9 - 25.
- [3] Matsui Y, Yasui N, Ozono K, et al. Loss of the *SEDL* gene product (*sedlin*) causes X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda: identification of a molecular defect in a Japanese family [J]. *Am J Med Genet*, 2001, 99(4):328-330.
- [4] Christie PT, Curley A, Nesbit MA, et al. Mutational analysis in X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(7):3233-3236
- [5] Lyon MF, Sybert VP, Ross JL, et al. X-chromosome inactivation and human genetic disease [J]. *Acta Pediatr Suppl*, 2002, 91 (439):107-112.
- [6] Gedeon AK, Tiller GE, Le Merrer M, et al. The molecular basis of X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(6):1386-1397.
- [7] Savarirayan R, Thompson E, Gecz J. Spondyloepiphyseal dysplasia tarda (*SEDL*, MIM #313400) [J]. *Eur J*

- Hum Genet, 2003, 11(9):639-642
- [8] Venditti R, Scanu T, Santoro M, et al. Sedlin controls the ER export of procollagen by regulating the Sar1 cycle[J]. Science, 2012, 337(6102):1668-1672.
- [9] Bar-Yosef U, Ohana E, Hershkovitz E, et al. X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda: a novel SEDL mutation in a Jewish Ashkenazi family and clinical intervention considerations[J]. Am J Med Genet A, 2004, 125A(1):45-48.
- [10] Guo H, Xu X, Wang K, et al. A novel RNA-splicing mutation in *TRAPPC2* gene causing x-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda in a large Chinese family [J]. J Genet, 2009, 88(1):87-91.
- [11] 崔英霞,夏欣一,杨滨,等.先天性脊柱骨骺发育不良的产前快速分子诊断[J].医学研究生学报, 2008,21(10):1049-1052
Cui YX, Xia XY, Yang B, et al. Rapid molecular prenatal diagnosis of spondyloepiphyseal dysplasia congenita by nested SSP-PCR assay [J]. J Med Grad, 2008, 21(10):1049-1052.
- [12] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14):1754-1760.
- [13] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data [J]. Genome Res, 2010, 20(9):1297-1303.
- [14] Li MX, Gui HS, Kwan JS, et al. A comprehensive framework for prioritizing variants in exome sequencing studies of mendelian diseases [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(7):e53.
- [15] Li M, Li J, Li MJ, et al. Robust and rapid algorithms facilitate large-scale whole genome sequencing downstream analysis in an integrative framework[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(9):e75.
- [16] Chenna R, Sugawara H, Koike T, et al. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(13):3497-3500.
- [17] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Web Server issue):W252-258.
- [18] Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics (ACMG) and the clinical genome resource (ClinGen) [J]. Genet Med, 2020, 22(2):245-257.
- [19] 王秋菊,沈亦平,邬玲仟,等.遗传变异分类标准与指南[J].中国科学:生命科学,2017,47(6):668-688.
Wang QJ, Shen YP, Wu LQ, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants [J]. Sci Sin (Vitae), 2017, 47(6):668-688.
- [20] Gedeon AK, Colley A, Jamieson R, et al. Identification of the gene (*SEDL*) causing X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda [J]. Nat. Genet, 1999, 22(4):400-404.
- [21] Zong M, Wu XG, Chan CW, et al. The adaptor function of *TRAPPC2* in mammalian TRAPPs explains *TRAPPC2*-associated *SEDT* and *TRAPPC9*-associated congenital intellectual disability [J]. PloS One, 2011, 6(8):e23350.
- [22] Ryu H, Park J, Chae H, et al. X-Linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda: identification of a *TRAPPC2* mutation in a Korean pedigree [J]. Ann Lab Med, 2012, 32(3):234-237.
- [23] Geetz J, Hillman MA, Gedeon AK, et al. Gene structure and expression study of the *SEDL* gene for spondyloepiphyseal dysplasia tarda [J]. Genomics, 2000, 69(2):242-251.
- [24] Mackenzie JJ, Fitzpatrick J, Babyn P, et al. X linked spondyloepiphyseal dysplasia: a clinical, radiological, and molecular study of a large kindred [J]. J Med Genet, 1996, 33(10):823-828.
- [25] 高超,王怀立,罗强,等. X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良基因逃避 X 染色体失活与临床表型的关系 [J]. 实用儿科临床杂志, 2005 (10):1009-1010.
GAO Q, WANG HK, LUO Q, et al. Relationship between spondyloepiphyseal dysplasia tarda gene escaping X chromosome inactivation and spondyloepiphyseal dysplasia tarda phenotype [J]. J Appl Clin Pediatr, 2005 (10):1009-1010.

(编辑 祁方昉)