

论著·临床研究

1例 Bartter 综合征的家系基因突变分析和产前诊断

李琰¹ 马娜² 李秀蓉³ 龚斐^{1,3} 杜娟^{1,3}

(1. 中南大学湘雅医学院, 湖南长沙 410008; 2. 湖南省妇幼保健院, 湖南长沙 410000;
3. 中信湘雅生殖与遗传专科医院, 湖南长沙 410008)

[摘要] **目的** 对1例 Bartter 综合征的家系进行相关致病基因突变分析和产前诊断。**方法** 应用高通量捕获测序技术、PCR-Sanger 测序法从基因组水平对先证者进行 Bartter 综合征相关致病基因的检测及家系分析; 明确遗传学病因后进一步对已妊娠5个月的先证者母亲抽取羊水进行产前诊断。**结果** 先证者编码氯通道蛋白 CLC-Kb 的 CLCNKB 基因存在 c.88C>T (p.Arg30*) 和 c.968+2T>A 复合杂合突变, 其中 c.88C>T (p.Arg30*) 为已报道的致病突变, c.968+2T>A 为新突变。家系分析显示这两个突变分别源自其母亲和父亲。产前诊断结果显示胎儿未遗传其父母的突变, 为两个位点均正常的健康个体, 随诊显示出生的婴儿健康, 证实了基因诊断及产前诊断的准确性。**结论** CLCNKB 基因的复合杂合突变 c.88C>T (p.Arg30*) 和 c.968+2T>A 为先证者的病因, 产前诊断可以预防该家系 Bartter 综合征的再发风险。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18(8): 746-750]

[关键词] Bartter 综合征; CLCNKB 基因; 突变分析; 产前诊断

Gene mutation analysis and prenatal diagnosis of a family with Bartter syndrome

LI Long, MA Na, LI Xiu-Rong, GONG Fei, DU Juan. Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410008, China (Du J, Email: 1006540087@qq.com)

Abstract: Objective To investigate the mutation of related genes and prenatal diagnosis of a family with Bartter syndrome (BS). **Methods** The high-throughput capture sequencing technique and PCR-Sanger sequencing were used to detect pathogenic genes in the proband of this family and analyze the whole family at the genomic level. After the genetic cause was clarified, the amniotic fluid was collected from the proband's mother who was pregnant for 5 months for prenatal diagnosis. **Results** The proband carried compound heterozygous mutations of c.88C>T(p.Arg30*) and c.968+2T>A in the CLCNKB gene; c.88C>T(p.Arg30*) had been reported as a pathogenic mutation, and c.968+2T>A was a new mutation. Pedigree analysis showed that the two mutations were inherited from the mother and father, respectively. Prenatal diagnosis showed that the fetus did not inherit the mutations from parents and had no mutations at the two loci. The follow-up visit confirmed that the infant was in a healthy state, which proved the accuracy of genetic diagnosis and prenatal diagnosis. **Conclusions** The compound heterozygous mutations c.88C>T(p.Arg30*) and c.968+2T>A in the CLCNKB gene are the cause of BS in the proband, and prenatal diagnosis can prevent the risk of recurrence of BS in this family. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(8): 746-750]

Key words: Bartter syndrome; CLCNKB gene; Mutation analysis; Prenatal diagnosis

Bartter 综合征 (Bartter syndrome, BS) 是一组临床表现为低钾血症、肾性失盐、代谢性碱中毒、肾素、醛固酮水平升高而血压正常的遗传性肾小管疾病, 遗传方式主要为常染色体隐性遗传^[1]。该病发病率约为 19/1 000 000, 世界各地及所有种族均有报道, 女性多于男性, 确诊最早的在胎龄 20 周,

最晚至 50 岁。本病常见于儿童, 5 岁之前出现症状者占半数以上^[2]。

符合 BS 的定义即可临床诊断^[3], 并可根据临床表现的差异及基因突变的不同而分成不同的亚型。根据临床表现的差异将其分为新生儿型 BS、经典型 BS、新生儿型 BS 伴感音性耳聋、BS 合并

[收稿日期] 2016-05-10; [接受日期] 2016-06-10

[作者简介] 李琰, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 杜娟, 女, 教授。

常染色体显性遗传性低血钙和 Gitelman 综合征 (Gitelman syndrome, GS)。根据致病基因不同,将 BS 分为 5 个亚型和 GS, 编码 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共转运蛋白 NKCC2 的 SLC12A1 基因突变导致 I 型 BS (MIM #601678); 编码钾通道 ROMK 的 KCNJ1 基因突变导致 II 型 BS (MIM #214200); 编码氯通道蛋白 CLC-Kb 的 CLCNKB 基因突变导致 III 型 BS (MIM #607364); 编码基底氯通道 β 亚基 barttin 的 BSND 突变导致 IV 型 BS (MIM #602522); 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 基因突变导致 GS (MIM #263800) [4-5]。

在临床上,各亚型 BS 存在着遗传异质性和表型异质性 [6], 基因型和表型有时并不一致,临床上鉴别诊断较困难,也有报道本病存在双基因突变致病的现象 [7]。在本研究中,我们通过高通量捕获测序技术结合 PCR-Sanger 测序对 1 例 BS 的家系进行了 BS 相关致病基因的突变检测,并在此基础上完成了产前诊断。我们发现先证者的 CLCNKB 基因存在 2 个复合杂合突变,结合临床表型明确为 BS III 型,并通过产前诊断帮助该家系生育一个健康的婴儿。

1 资料与方法

1.1 研究对象

患儿,女,1岁6个月,因外院考虑其患有 BS 且患儿母亲已宫内妊娠 4 月余,要求进行遗传咨询。患儿为第 1 胎第 1 产,足月顺产,出生体重 2.9 kg,出生 1 周后常有呕吐和腹泻,1 岁时因消瘦、乏力、多饮、多尿,生长发育落后在外院就诊。患儿父母健康,否认家族中有类似患者,否认近亲结婚。体查:身高 72 cm,体重 6 kg,头围 45.5 cm,无特殊面容。神志清楚,精神反应可。心肺腹部和神经系统查体无明显异常。实验室检查:血钾 2.41 mmol/L (正常值 3.50~5.50 mmol/L),血钠 132.5 mmol/L (正常值 135.0~145.0 mmol/L),血氯 84.9 mmol/L (正常值 96.0~108.0 mmol/L),二氧化碳结合力 33.70 mmol/L (正常值 18.00~29.00 mmol/L),血 pH 7.614, BE 19,肾素-血管紧张素活性升高;肝功能正常;尿钙 0.62 mmol/L

(正常值 2.7~7.5 mmol/L),尿磷 3.30 mmol/L (正常值 16.1~42 mmol/L);尿比重 1.010;肾活检示部分肾小球旁器细胞增生,肾小管、间质无异常发现;儿童发育量表智能评分 75 (参考值 >86)。

1.2 基因组 DNA 提取

在签署知情同意书之后,采集患儿及其父母空腹静脉血各 2 mL, EDTA 抗凝,采用 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 提取基因组 DNA。

1.3 高通量捕获测序和数据分析

取先证者基因组 DNA 5 ng, 采用 Ion-Torrent- PGM 技术对 BS 相关致病基因的外显子区及两侧的剪切位点序列进行高通量测序 (Bartter 综合征相关基因 Panel 检测)。数据分析以 NCBI 公布的人类基因组序列为参考,去除 dbSNP、Hapmap 和本地数据库等记载的 SNP 位点并优先考虑编码区点突变及剪切位点突变,结合遗传方式确定可疑致病突变。本部分内容委托金城医学检验中心完成。

1.4 突变验证及家系分析

利用 PCR-Sanger 测序对先证者及父母进行突变验证和家系分析。根据 GenBank 中人类 CLCNKB 基因序列 (NG_013079.1), 针对 CLCNKB 基因 2 号和 10 号外显子及其侧翼序列,用 Premier 5.0 软件设计引物如下: CLCNKB-2F: 5'-CTAGAGGCAGTGCCGAGGACG-3'; CLCNKB-2R: 5'-GGGCTGTATCTCCCGAAAGG-3'; CLCNKB-10F: 5'-GCTCATGTCTCCATGCTCCC-3'; CLCNKB-10R: 5'-GTGGTGTTAGGGCTCCACAT-3'。并用 NCBI 的 Primer_BLAST 软件分析其特异性,由上海生工公司合成。PCR 反应体系: 20 mmol/L 的上、下游引物各 0.2 μ L, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 1.5 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, TaqDNA 聚合酶 0.2 μ L (1 U), 基因组 DNA 1 μ L (100 ng), ddH₂O 补足至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 90 s; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 57~60 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 2 μ L PCR 产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,确定产物大小后采用 ABI 377 DNA 测序仪进行双向测序分析,测序结果参照正常序列 (NM_000085) BLAST 分析。

1.5 产前诊断及随访

签署知情同意书后,先证者母亲妊娠 5 个月时取羊水,按照上述方法提取基因组 DNA,运用

上述引物及反应条件扩增第 2 号和第 10 号外显子，然后进行测序分析。孕妇根据检测结果选择是否继续妊娠，并对继续妊娠的胎儿在出生后随诊，进一步明确基因诊断的准确性。

2 结果

2.1 基因突变分析结果

经高通量捕获测序检测，发现先证者 CLCNKB 基因存在 2 个杂合突变：位于 2 号外显子的 c.88C>T (p.Arg30*) 的无义突变和位于 10 号外显子的 c.968+2T>A 的剪切位点突变。c.88C>T (p.Arg30*) 为已报道的致病突变。针对 c.968+2T>A 突变，查阅 db SNP 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>)，人类基因突变数据库 (Human Gene Mutation Database <http://www.hgmd.org>) 和 ClinVar

数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)，均无该突变的记载。另外，经查阅 PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) 和 CNKI (<http://www.cnki.net/>) 文献数据库，均未发现该突变的文献报道。因此，c.968+2T>A 为未见报道的新突变。该突变为 10 号内含子剪切供体位点由“GT”突变为“GA”，推测可能引起 mRNA 剪切异常，产生异常蛋白，不能行使正常功能。运用 PCR-Sanger 测序进行突变验证以及家系分析，证实先证者携带这 2 个复合杂合突变，且突变分别源自母亲和父亲 (图 1)。

2.2 产前诊断结果及随访

产前诊断结果显示胎儿未携带先证者所具的 c.88C>T (p.Arg30*) 和 c.968+2T>A 两个突变 (图 1)，提示胎儿为正常个体。出生后 2 岁随访显示，生长发育和智力发育均正常，但父母拒绝对其进行再次的基因诊断验证。

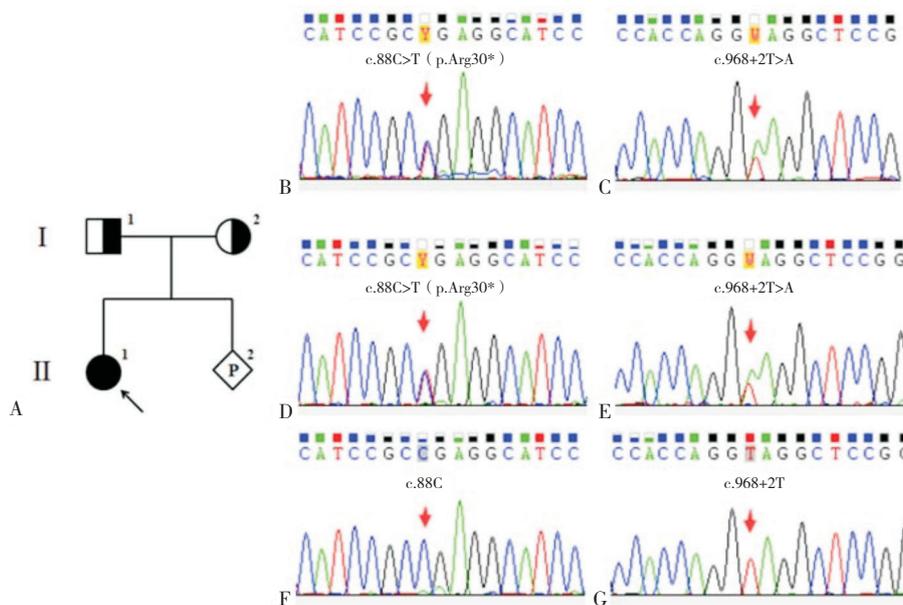


图 1 家系图及突变位点测序图 图 A 为家系图，I -1 和 I -2 分别为先证者父亲和母亲 (均为突变携带者)，II -1 为先证者，II -2 为妊娠胎儿；图 B、D、F 分别为先证者、母亲和胎儿的 2 号外显子 c.88 位测序图；图 C、E、G 分别为先证者、父亲和胎儿的 10 号外显子 c.968+2 位测序图。箭头所指为突变位点。

3 讨论

BS 根据致病基因不同可分为 5 型。I 型和 II 型多于新生儿期起病，表现为消瘦、嗜睡、多尿和喂养困难，生长发育迟缓，严重的电解质紊乱和代谢性碱中毒^[8-9]，可有母孕期羊水过多和早产史。部分 I 型患儿出现三角脸、前额突出等特殊

面容^[10]。II 型患儿症状较 I 型略轻^[11]。III 型 BS 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^[12-13]。IV 型 BS 即伴感音性耳聋的新生儿期 BS，除了与 II 型有类似的症状，还患有

- [2] 于迎, 潘晓霞, 任红, 等. 成人经典型 Bartter 综合征家系 CLCNKB 基因突变的研究[J]. 中华肾脏病杂志, 2010, 26(8): 598-602.
- [3] Akuma AO, Mittal SK, Sambo AA. Neonatal Bartter syndrome associated with ileal atresia and cystic fibrosis[J]. Indian J Nephrol, 2013, 23(1): 47-50.
- [4] Wang XM, Shen Z, Xu M, et al. A Chinese girl with Bartter Syndrome Type III due to a novel mutation and/or single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CLCNKB gene[J]. Iran J Pediatr, 2013, 23(1): 89-94.
- [5] Lee BH, Cho HY, Lee H, et al. Genetic basis of Bartter syndrome in Korea[J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27(4): 1516-1521.
- [6] Robitaille P, Merouani A, He N, et al. Bartter syndrome in two sisters with a novel mutation of the CLCNKB gene, one with deafness[J]. Eur J Pediatr, 2011, 170(9): 1209-1211.
- [7] Nozu K, Inagaki T, Fu XJ, et al. Molecular analysis of digenic inheritance in Bartter syndrome with sensorineural deafness[J]. J Med Genet, 2007, 45(3): 182-186.
- [8] Wong AC, Chan LG. Neonatal bartter syndrome[J]. Med J Malaysia, 2014, 69(5): 229-230.
- [9] Afzal M, Khan EA, Khan WA, et al. Antenatal Bartter syndrome[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2014, 24(Suppl 2): S121-S123.
- [10] Brochard K, Boyer O, Blanchard A, et al. Phenotype-genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(5): 1455-1464.
- [11] Chan WK, To KF, Tong JH, et al. Paradoxical hypertension and salt wasting in Type II Bartter syndrome[J]. Clin Kidney J, 2012, 5(3): 217-220.
- [12] Shibli AA, Narchi H. Bartter and Gitelman syndromes: Spectrum of clinical manifestations caused by different mutations[J]. World J Methodol, 2015, 5(2): 55-61.
- [13] Tajima T, Nawate M, Takahashi Y, et al. Molecular analysis of the CLCNKB gene in Japanese patients with classic Bartter syndrome[J]. Endocr J, 2006, 53(5): 647-652.
- [14] Luque de Pablos A, García-Nieto V, López-Menchero JC, et al. Severe manifestation of Bartter syndrome type IV caused by a novel insertion mutation in the BSND gene[J]. Clin Nephrol, 2014, 81(5): 363-368.
- [15] Choi KH, Shin CH, Yang SW, et al. Autosomal dominant hypocalcemia with Bartter syndrome due to a novel activating mutation of calcium sensing receptor, Y829C[J]. Korean J Pediatr, 2015, 58(4): 148-153.
- [16] 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.
- [17] Kobayashi K, Uchida S, Okamura HO, et al. Human CLC-Kb 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.
- [18] Koulouridis E, Koulouridis I. Molecular pathophysiology of Bartter's and Gitelman's syndromes[J]. World J Pediatr, 2015, 11(2): 113-125.
- [19] Garnier A, Dreux S, Vargas-Poussou R, et al. Bartter syndrome prenatal diagnosis based on amniotic fluid biochemical analysis[J]. Pediatr Res, 2010, 67(3): 300-303.
- [20] Rachid ML, Dreux S, de Ponfilly GP, et al. Prenatal diagnosis of Bartter syndrome: amniotic fluid aldosterone[J]. Prenat Diagn, 2016, 36(1): 88-91.

(本文编辑: 俞燕)