

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.11.002

遗传性疾病专题

X-连锁低磷性佝偻病的基因突变分析

宋莹¹ 麻宏伟¹ 黎芳¹ 胡曼¹ 任爽¹ 宇亚芬¹ 赵桂杰²

(1. 中国医科大学附属盛京医院发育儿科, 辽宁 沈阳 110004;
2. 辽宁省朝阳市妇幼保健院, 辽宁 朝阳 122000)

[摘要] 目的 研究X-连锁低磷性佝偻病(XLH)患儿致病基因的突变频率和突变类型,探讨存在突变热点的可能性及基因型与临床表型的关系。方法 回顾性分析10例XLH患儿的临床资料,评估其基因突变类型及其与疾病严重程度之间的关系。结果 10例XLH患儿均检测到PHEX基因突变,其中6例为错义突变,2例为拼接位点突变,1例为框移突变,1例为无义突变。还发现了两个新突变,即c.2048T>C和IVS14+1delAG。PHEX基因的突变类型与矮小程度、腿弯程度之间没有关联(分别 $P=0.571$ 、 0.467);基因的突变位置与矮小程度、腿弯程度之间也没有关联(分别 $P=0.400$ 、 1.000)。结论 错义突变是XLH患儿最常见的突变类型;c.2048T>C和IVS14+1delAG是PHEX基因的两个新突变。PHEX基因的突变类型和突变位置与疾病的严重程度无相关性。[中国当代儿科杂志, 2013, 15(11): 928-931]

[关键词] X-连锁低磷性佝偻病; PHEX基因; 儿童

Gene mutation analysis of X-linked hypophosphatemic rickets

SONG Ying, MA Hong-Wei, LI Fang, HU Man, REN Shuang, YU Ya-Fen, ZHAO Gui-Jie. Department of Developmental Pediatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China. (Ma H-W, Email: mahongwei1960@163.com)

Abstract: Objective To investigate the frequency and type of PHEX gene mutations in children with X-linked hypophosphatemic rickets (XLH), the possible presence of mutational hot spots, and the relationship between genotype and clinical phenotype. **Methods** Clinical data of 10 children with XLH was retrospectively reviewed. The relationship between gene mutation type and severity of XLH was evaluated. **Results** PHEX gene mutations were detected in all 10 children with XLH, including 6 cases of missense mutation, 2 cases of splice site mutation, 1 case of frameshift mutation, and 1 case of nonsense mutation. Two new mutations, c.2048T>C and IVS14+1delAG, were found. The type of PHEX gene mutation was not associated with the degree of short stature and leg deformity ($P=0.571$ and 0.467), and the mutation site was also not associated with the degree of short stature and leg deformity ($P=0.400$ and 1.000). **Conclusions** Missense mutation is the most common type of PHEX gene mutation in children with XLH, and c.2048T>C and IVS14+1delAG are two new PHEX gene mutations. The type and site of PHEX gene mutation are not associated with the severity of XLH. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(11): 928-931]

Key words: X-linked hypophosphatemic rickets; PHEX gene; Child

X-连锁低磷性佝偻病(X-linked hypophosphatemic rickets, XLH)是最常见的遗传性佝偻病,其临床特点主要包括身材矮小、佝偻病、低磷血症、近端肾小管重吸收磷障碍以及活性维生素D生成不足等^[1-2]。该病的遗传方式为X-连锁显性遗传^[3]。XLH的致病基因是位于X染色体上的PHEX基因^[4]。现将我院收治的10例患儿的临床资料进行总结,并对其基因测序结果进行分析,探讨基因突变类

型与临床表型的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象为我院确诊为XLH的10例患儿,其中男2例,女8例;年龄10个月至14岁,平均年龄6.23岁;5例有家族史(均为母亲患病),

[收稿日期] 2013-06-17; [修回日期] 2013-08-06

[作者简介] 宋莹,女,硕士研究生,住院医师。

[通信作者] 麻宏伟,教授,主任医师。

其中 2 例为同母异父的姐弟。

1.2 研究方法

回顾性分析 10 例患儿的临床资料, 包括一般情况、详细的体格检查(身高、膝间距和踝间距的具体数值等)及实验室检查结果等(如血钙、血磷、碱性磷酸酶及甲状旁腺激素)。目前, 国内外对 XLH 的严重程度的界定没有统一的标准, 本研究采用身高(矮小程度)和膝间距或踝间距(腿弯程度)两个指标衡量疾病的严重程度。矮小程度根据身高分为: 无矮小($-2\text{ SD} \sim +2\text{ SD}$); 轻度矮小($-3\text{ SD} \sim -2\text{ SD}$); 中度矮小($-4\text{ SD} \sim -3\text{ SD}$); 重度矮小($< -4\text{ SD}$)。腿弯程度根据膝间距或踝间距分为: 轻度($< 3\text{ cm}$); 中度($3 \sim 6\text{ cm}$); 重度($> 6\text{ cm}$)。

1.3 PHEX 基因测序

患儿家属知情同意后采集患儿外周静脉血 2 mL, 用 TaKaRa Universal Genomic DNA Extraction Kit 提取基因组 DNA。使用文献中引物扩增, 应用多聚酶链式反应(PCR)扩增 PHEX 基因 22 个外显子及外显子/内含子交界区域。PCR 反应总体积为 50 μL , 包括 Dntp (2.5 mmol/L) 8 μL , $2 \times \text{GC buffer I}$ 25 μL , 上下游引物 (10 pmol/L) 各 2.5 μL , LA Taq (5 U/ μL) 0.5 μL , 基因组 DNA 约 40 ng, 无菌水定容至 50 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 35 次后总延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果与 UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) 数据库基因组序列进行比对分析。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 14.0 统计软件进行统计分析, 计数资料用例数表示, 采用 Fisher 确切概率法计算基

因型与表型之间的关系。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特点

10 例患儿中, 以双下肢弯曲就诊 7 例, 生长迟缓就诊 2 例, 走路无力就诊 1 例。就诊时身高 $+0.23\text{ SD} \sim -3.90\text{ SD}$, 平均 -1.97 SD , 其中 5 例身材矮小($\leq -2\text{ SD}$)。“O”型腿 6 例, 膝间距 2.7~10.0 cm; “X”型腿 4 例, 踝间距 1.5~10.0 cm。见表 1。舟状头 5 例, 手、足镯 2 例, 鸡胸和肋缘外翻各 1 例。10 例患儿的血清磷明显降低 (0.54~0.74 mmol/L), 血碱性磷酸酶升高 (353~898 U/L), 所有患儿血钙均正常。其中 6 例患儿血甲状旁腺激素升高 (85.4~206.8 pg/mL)。10 例患儿左腕放大片显示活动性佝偻病征象(尺桡骨干骺端先期钙化带消失, 呈杯口、毛刷样改变, 骨皮质变薄, 骨质疏松)。血、尿常规、血气分析及肝肾功能均正常。

2.2 基因突变检测及测序结果

基因外显子测序结果表明, 10 例患儿均存在 PHEX 基因突变。10 例患儿 PHEX 基因突变涉及 6 个外显子和 2 个内含子, 突变类型包括错义突变 6 例, 拼接位点突变 2 例, 无义突变和框移突变各 1 例。其中, 病例 5 和 9 是同母异父的姐弟, 故为同一位点突变; 病例 3 和 8 为同一位点突变。另外, 在 10 例患儿中还发现 PHEX 的两个新突变, 即一个错义突变, 位于第 20 外显子上的 2048T 变为 C 引起相应的氨基酸序列由亮氨酸变为脯氨酸 (L683P); 1 个剪切位点突变, 发生在 14 内含子。10 例患儿 PHEX 基因突变检测结果及基因测序图见表 2 及图 1。

表 1 10 例患儿临床资料

编号	性别	初诊年龄	身高/长 (cm)	矮小程度	"O" 或 "X" 型腿	膝或踝间距 (cm)	腿弯程度
01	男	10 月	67.0(-0.58 SD)	无矮小	O	6.0	中度
02	女	1.8 岁	82.3(+0.23 SD)	无矮小	O	2.7	轻度
03	女	3.3 岁	98.3(-0.29 SD)	无矮小	X	1.5	轻度
04	女	6.8 岁	113.3(-1.85 SD)	无矮小	O	10.0	重度
05	男	3.7 岁	91.5(-2.33 SD)	轻度	O	5.0	中度
06	女	7.2 岁	106.3(-3.49 SD)	中度	X	3.2	中度
07	女	2.8 岁	96.0(-1.05 SD)	无矮小	X	3.5	中度
08	女	9.4 岁	116.3(-3.07 SD)	中度	O	4.0	中度
09	女	12.5 岁	130.7(-3.35 SD)	中度	X	10.0	重度
10	女	14.0 岁	136.5(-3.90 SD)	中度	O	10.0	重度

表 2 10 例患儿 PHEX 基因突变检测结果

编号	核苷酸改变	氨基酸改变	突变类型
01	I20: IVS20-1G>T	-	拼接位点突变
02	E17: c.1735G>A	G579R	错义突变
03	E21: c.2078G>A	C693Y	错义突变
04	I14: IVS14+1delAG*	-	拼接位点突变
05	E20: c.2048T>C*	L683P	错义突变
06	E22: c.2155G>A	G719S	错义突变
07	E16: c.1699C>T	P567X	无义突变
08	E21: c.2078G>A	C693Y	错义突变
09	E20: c.2048T>C*	L683P	错义突变
10	E04: c.412delC	L138FfsX6	缺失 / 框移突变

注: * 新发现突变。

2.3 PHEX 基因突变类型、位置与疾病严重程度
的关系

PHEX 基因的突变类型与矮小程度、腿弯程度之间没有关联 (分别 $P=0.571$ 、 0.467) ; 基因的突变位置与矮小程度、腿弯程度之间也没有关联 (分别 $P=0.400$ 、 1.000) 。

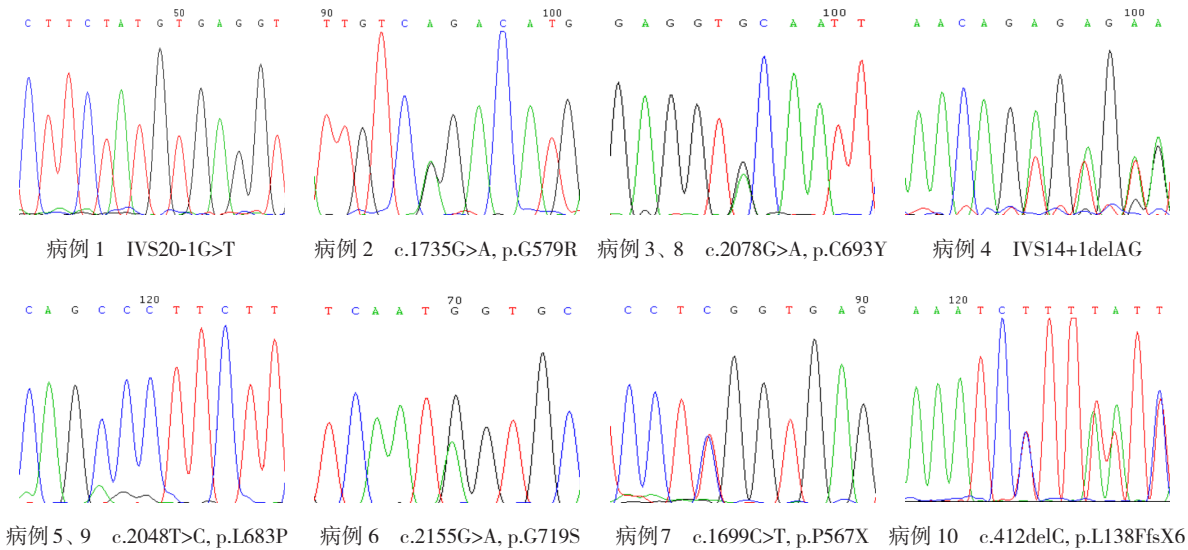


图 1 10 例患儿 PHEX 基因突变测序图

3 讨论

XLH 是一种以低磷血症导致骨发育不良为特征的遗传性骨病, 发病率约为 1:12000, 典型特征为肾小管重吸收磷减少、活性维生素 D 生成不足以及骨矿化不全。该病多发生于儿童, 主要临床表现为双下肢弯曲、走路无力、腿痛、骨质疏松、生长迟缓以及多发性骨折。该病在儿童阶段表现为佝偻病, 在成人阶段则表现为骨关节畸形。遗传方式多属 X 连锁显性遗传, 致病基因为 PHEX 基因, 该基因由 22 个外显子组成, 编码为一条由 749 个氨基酸构成的蛋白质。PHEX 基因导致低磷血症的机制目前尚不清楚, 其中一种解释为该基因突变导致另一种酶代偿性上调, 此酶的过度表达最终导致了 XLH 的表型特征^[5]。本研究的 10 例患者中, PHEX 基因的突变检测率在家系病例 (5/5) 和散发病例 (5/5) 中均为 100%。据文献报道, 芬兰地区的 PHEX 基因的突变检测率在家系病例

中为 100% (5/5), 在散发病例中为 93% (14/15); 中国台湾汉族人当中 PHEX 基因的突变检测率在家系中为 100% (3/3), 在散发病例中 (3/7) 为 43% (3/7)^[6-7]。本研究的 PHEX 基因检测率与芬兰报道的相似, 与台湾报道的不同。中国台湾汉族人 PHEX 基因在散发病例中的低检测率可能是由于该地区低磷性佝偻病主要由其他少见非 PHEX 基因引起。截至目前的报道, XLH 患者的 PHEX 基因突变共有 435 例, 突变类型 329 种, 其中错义突变占 24%, 无义突变占 23%, 框移突变占 23%, 拼接位点突变占 20%, 缺失突变占 8%, 插入突变和多态性占 2%。通过分析病例, 可以发现, 不同地区的病例总数和突变类型存在差异。在欧洲报道的 267 例中, 框移突变占 24%, 错义突变占 23%, 无义突变占 21%, 拼接位点突变占 20%, 缺失突变占 10%; 美洲共报道 10 例, 错义突变 40%, 框移突变 30%, 无义突变 20%, 多态性 10%; 亚洲报道 51 例, 无义突变 31%, 错义

突变25%，框移突变16%，拼接位点突变和缺失突变均为12%（PHEX基因库：<http://www.phexdb.mcgill.ca>）。中国共有13例报道，其中大陆3例（无义突变2例，错义突变1例），台湾10例（错义突变3例，无义突变2例，拼接位点突变2例，框移突变和缺失突变各1例）^[8-10]。本研究10例患儿中，PHEX基因存在的突变多为错义突变（6例，占60%），其次为拼接位点突变（2例，占20%），框移突变和无义突变（各1例，各占10%）。本研究中的10例患儿均来自辽宁地区，推测可能是由于辽宁地区的PHEX基因的突变特点导致突变类型所占比例上存在差异。但本研究病例较少，存在一定局限性，有待进一步深入研究。

目前，基因型与临床表型二者的关系有两种假说：第一种假说是截短突变（包括无义突变、框移突变，插入或缺失突变和剪切位点突变）的临床严重程度与非截短突变（错义突变）相比更严重；第二种假说根据突变位置提出，认为靠近5'端的基因突变与靠近3'端的相比，前者的临床表现更严重^[10]。针对上述两种假说，Holm等^[11]在2001年对31例XLH患者的PHEX基因突变进行分析，未发现疾病的严重程度与基因突变类型或突变位置之间有关联。2006年，Song等^[12]对15例XLH患者的PHEX基因分析发现，基因的突变类型与疾病的严重程度之间也没有关联，但发现突变位置位于3'端的患者临床表型更严重。本研究中，不论是基因突变类型，还是基因突变的位置，与临床严重程度之间均无关联，与Holm等^[11]报道的一致。从表1可以看出，随着年龄的增长，矮小程度和腿弯程度逐渐加重。病例5与病例9（c.2048T>C）是同母异父的姐弟，无论是矮小程度还是腿弯程度病例5均比病例9轻。病例3与病例8（c.2078G>A）为同一位点突变，由于病例3年龄小，矮小程度和腿弯程度均比病例8轻。以上结果表明疾病的严重程度可能与年龄有关。

通过对本组10例病例的研究发现，PHEX基因不论是在家系病例中还是在散发病例中都存在很高突变检测率，并且错义突变是最常见的突变类型，没有发现PHEX基因的突变热点，疾病的

严重程度与基因突变类型及突变位置之间没有联系。由于病例数较少，还需要临床的进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Zivcinkjak M, Schnabel D, Staude H, Even G, Marx M, Beetz R, et al. Three-year growth hormone treatment in short children with X-linked hypophosphatemic rickets: effects on linear growth and body disproportion[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(12): 2097-2105.
- [2] Bastepe M, Juppner H. Inherited hypophosphatemic disorders in children and the evolving mechanisms of phosphate regulation[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2008, 9(2): 171-180.
- [3] 曾畿生, 王德芬. 现代儿科内分泌学—基础与临床[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2001: 298-302.
- [4] Holm IA, Huang X, Kunkel LM. Mutational analysis of the PEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets[J]. Am J Hum Genet, 1997, 60(4): 790-797.
- [5] 任利彬, 叶玲. X连锁磷酸盐调节基因的进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2008, 35(4): 399-401.
- [6] Tyynismaa H, Kaitila I, Nanto-Salonen K, Ala-Houhala M, Alitalo T. Identification of fifteen novel PHEX gene mutations in Finnish patients with hypophosphatemic rickets[J]. Hum Mutat, 2000, 15(4): 383-384.
- [7] Jap TS, Chiu CY, Niu DM, Levine MA. Three novel mutations in the PHEX gene in Chinese subjects with hypophosphatemic rickets extends genotypic variability[J]. Calcified Tissue Int, 2011, 88(5): 370-377.
- [8] Xia W, Meng X, Jiang Y, Li M, Xing X, Pang L, et al. Three novel mutations of the PHEX gene in three Chinese families with X-linked dominant hypophosphatemic rickets[J]. Calcified Tissue Int, 2007, 81(6): 415-420.
- [9] Lo FS, Kuo MT, Wang CJ, Chang CH, Lee ZL, Van YH. Two novel PHEX mutations in Taiwanese patients with X-linked hypophosphatemic rickets[J]. Nephron Physiol, 2006, 103(4): 157-163.
- [10] Chou YY, Chao SC, Tsai SC, Lin SJ. Novel PHEX gene mutations in two Taiwanese patients with hypophosphatemic rickets[J]. J Formos Med Assoc, 2005, 104(3): 198-202.
- [11] Holm IA, Nelson AE, Robinson BG, Mason RS, Marsh DJ, Cowell CT, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of the PHEX gene in X-linked hypophosphatemic rickets[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(8): 3889-3899.
- [12] Song HR, Park JW, Cho DY, Yang JH, Yoon HR, Jung SC. PHEX gene mutations and genotype-phenotype analysis of Korean patients with hypophosphatemic rickets[J]. J Korean Med Sci, 2007, 22(6): 981-986.

（本文编辑：邓芳明）