

· 临床研究 ·

常染色体隐性遗传性远端肾小管酸中毒患儿 ATP6V0A4 和 ATP6V1B1 基因突变分析

高延霞 窦以河 隋爱华 郎艳华 邵乐平

【摘要】目的 分析常染色体隐性遗传性远端肾小管酸中毒 (rdRTA) 患儿 ATP6V0A4 和 ATP6V1B1 基因的突变, 进行基因型和表型的相关性研究。 **方法** PCR 扩增基因组 DNA, 直接测序分析来自 3 个家系 3 例患儿的 ATP6V0A4 和 ATP6V1B1 基因的突变位点, 选取不相关的 100 例健康人作为对照。 **结果** 1 例患儿携带 ATP6V0A4 基因的 1 个新的纯合无义突变 (p.R194X); 1 例患儿携带 ATP6V1B1 基因 1 个新的杂合无义突变 (p.R114X) 和 1 个已经报道过的杂合突变 p.I386fsX441; 第 3 例患儿未发现以上 2 个基因的突变。 **结论** 对中国 rdRTA 患者基因突变分析有利于了解该类疾病的基因型和表型的相关性, 增强临床医生对该类疾病的认识和治疗。

【关键词】 肾小管酸中毒, 远端; 突变; ATP6V0A4; ATP6V1B1

Mutation analysis of ATP6V0A4 and ATP6V1B1 gene in autosomal recessive distal renal tubular acidosis children GAO Yan-xia, DOU Yi-he, SUI Ai-hua, LANG Yan-hua, SHAO Le-ping. Department of Nephrology, Affiliated Hospital, Qingdao University School of Medicine, Qingdao 266003, China

Corresponding author: SHAO Le-ping, Email: lepingshao@163.com

【Abstract】 Objective To analyze and identify the mutations of ATP6V0A4 and ATP6V1B1 gene in autosomal recessive distal renal tubular acidosis (rdRTA) children, and study the association of genotype and phenotype. **Methods** Genome DNA was amplified by PCR. Mutations of ATP6V0A4 and ATP6V1B1 gene in 3 children from 3 families were examined by direct sequencing. One hundred unrelated healthy subjects were selected to evaluate all mutations found in this study. **Results** A novel homozygous nonsense mutation was identified in ATP6V0A4 gene in one child, and a novel heterozygous nonsense variant and a frame-shift alteration were found in another child. No mutation of both genes was found in the third child. **Conclusions** Study of mutant genes of rdRTA in Chinese patients is helpful to understand the association in genotype and phenotype and increase the level of cognition and treatment to this disease.

【Key words】 Renal tubular acidosis, distal; Mutation; ATP6V0A4; ATP6V1B1

原发性远端肾小管酸中毒 (dRTA) 是一罕见的遗传性疾病, 与集合管 α 闰细胞泌氢功能障碍、肾脏排泄固定酸减少有关^[1-2]。dRTA 的临床

表现包括高氯性代谢性酸中毒、生长发育障碍、低血钾、肾钙质沉着、肾结石、高尿钙和佝偻病或骨软化病等。我们曾对 1 个常染色体显性遗传性 dRTA 家系进行了突变基因研究和报道^[1], 但目前尚未检索到国内常染色隐性遗传性 dRTA (rdRTA) 的报道。因此, 我们对 3 例 rdRTA 患儿进行突变基因分析研究。

对象和方法

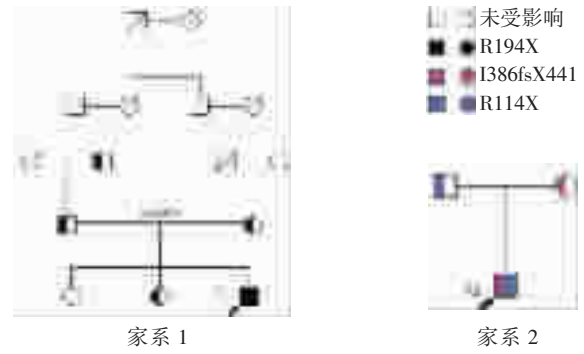
DOI: 10.3760/ema.j.issn.1001-7097.2012.01.001

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81170653); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (BS2010Y011)

作者单位: 266003 青岛大学医学院附属医院肾内科 (高延霞、郎艳华、邵乐平), 神经科 (窦以河), 中心实验室 (隋爱华)

通信作者: 邵乐平, Email: lepingshao@163.com

1. 对象：包括来自 3 个家系的 12 例，其中患儿 3 例；例 1(男)、2(男)、3(女)年龄分别为 12 岁、9 个月、2 岁；诊断时为 3 岁、2 个月、1 岁。3 例患儿均表现为阴离子间隙正常的高氯性酸中毒、低血钾、不恰当的碱性尿（血 CO₂CP<18 mmol/L 时，尿 pH>6.0），符合远端肾小管酸中毒的特点。见表 1。其中 1 例患儿来自近亲结婚家系。家系图见图 1。选取 100 例非相关的健康人作为对照组，



注：□：男性；○：女性；■：男患者；●：女患者；□：先证者

图 1 家系 1 和 2 的遗传图谱

表 1 3 例患儿生化指标

指标	例 1	例 2	例 3
血 pH	7.2	7.3	7.2
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	13.5	14.7	12
Cl ⁻ (mmol/L)	111	110	113
K ⁺ (mmol/L)	3.1	3.3	2.8
尿 pH	8.5	7.5	8.0
FEHCO ₃	4%	3.5%	5%

注：FEHCO₃：尿碳酸氢根排泄分数

评估本研究发现的所有突变位点。本研究获得青岛大学医学院附属医院伦理委员会批准，所有参与者或家属均签署知情同意书。

2. 外周血基因组 DNA 提取：抽取患儿及其家庭成员外周血，根据试剂盒（Gen Elute NA2010，美国 Sigma）要求的步骤抽提基因组 DNA。

表 2 ATP6VOA4 基因编码序列 4~23 号外显子引物序列

外显子	正向(5'→3')	反向(5'→3')	产物(bp)
4	CCTAATGGATTTTTTTCCTGT	TCTACTCCCACCCCTGCCTT	297
5	TCTATTGGCAGCTGTGCTAC	ATTGGCTTACGGAGGATTCT	142
6	GGTTTCTGGTGGGTTTTTCAT	CTTCAAGGAGACAGGCTTCA	185
7	CTTCTAATCCTCTCGTTTGCT	GCCCTTTAGTAACTCATCCCC	392
8	AAGCACAGCAGTTGGTTTGA	CCAGGGACCCATCTACACAC	345
9	TCAAGATACCAAAGAAAACAG	ATGTCTCTGGGAAGAATAAAC	590
10	AGCATCGGGAACAGGGAGC	CCAAATCACTGAAGAAAGACCA	356
11	TGTCTTAGCAGAAAAGGGGATG	TTGTATGAAAACAGCAGAGGCA	241
12	CAGCCACAGGTCAAAGGAGC	GAGGGGCTGACTCATCGGAC	387
13	CTGGGACTGTGACCTTTGTGCT	TCACCTCAGGGTCCATCTTAC	302
14	GAGAAAAGACAACCAGAAAGCT	CAAGACGGTCAAATGGACACTCA	289
15	AGCCCACTGACAATCATCCTC	GCCAGCGACTACACCATCTC	233
16	GCAAGTTCGTGACTGGTGGT	CTGTATGGAAAATGGGGCTG	385
17	GTTTGCTTAGGAAAAGTTGTCC	GTTCCAAAACCACTGGCTCT	293
18	CCCTTGATGTTCTATCTTGTGT	TAGCAGAAATACCTGATGTTTGT	274
19	TCCAGCCGTGAAGGTGAATG	AACATACTCAGGGCGGTCAG	398
20	TCCTCATTTCCCTGCTTGTT	AGACCCACCCAGCTCTACTG	239
21	TGTCTGAACAGCAAAGCCC	GCAGCCAGCCACAGAAA	390
22	AGATAATCCCACTGTTTCTCGT	CCCTTTCCCAACACCACATT	251
23	CTTCTCCTTCCCTCCACCT	TTGCCAAAAGTCTTCTCTGA	374

3. 引物设计: ATP6V0A4 基因序列来自 GenBank (NG_008145), 采用 Primer premier 5 软件自行设计 20 对引物, 扩增全部编码及其侧翼内含子序列, 见表 2。ATP6V1B1 基因扩增引物参考以往研究报道: 外显子 2-11 按文献[3]; 外显子 1, 12-14 按文献[4]。引物由上海生物工程公司合成。

4. PCR 产物扩增: 在 50 μ l 的反应体系中, 含 50 ng 基因组 DNA, TaKaRa Ex Taq 1 U (大连宝生), 10 \times Ex Taq Buffer (Mg^{2+} Plus) 5 μ l, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μ l, 上、下游引物 (20 μ mol/L) 各 1 μ l。在梯度 PCR 仪上 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54~62 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 33 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

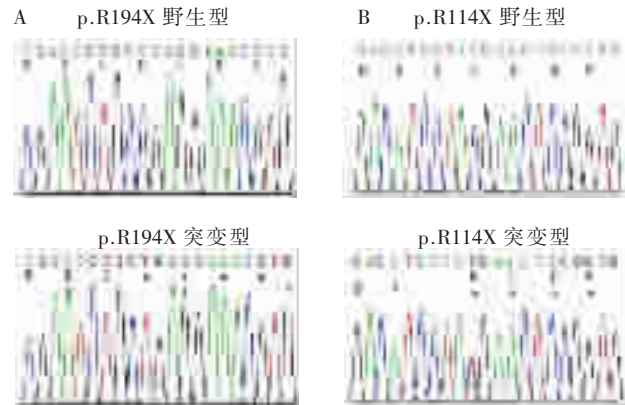
5. 测序: PCR 产物送至上海生物工程公司纯化, 并采用 ABI-PRISM 3730 测序仪双向测序。

6. DNA 测序结果分析: 采用 Chromas 2.31 和 Vector NTI 10.0 进行序列分析和比对。GenBank 入口代码 (Accession codes): ATP6V0A4 基因, NG_008145; ATP6V0A4-mRNA, NM_020632; ATP6V0A4 蛋白, NP_065683; ATP6V1B1 基因, NG_008016; ATP6V1B1-mRNA, NM_001692; ATP6V1B1 蛋白, NP_001683。

结 果

1. 临床特征和实验室检查: 除 dRTA 的一般特点外, 患儿 1 在 7 岁时出现感音神经性耳聋, 有佝偻病和(或)骨软化病, 明显生长发育障碍; 患儿 2 目前听力正常, 因早期治疗未出现生长发育障碍; 例 3 目前听力正常, 有佝偻病和(或)骨软化病, 明显生长发育障碍。经治疗(枸橼酸钾纠正血钾水平大于 3.5 mmol/L; 枸橼酸钠、枸橼酸钾和枸橼酸组成的合剂纠正血 CO_2CP 水平达 20 mmol/L 以上)后, 生长发育均很快恢复。3 例患儿均有双肾钙质沉着症。

2. 基因分析: 测序结果见图 2。通过直接测序分析发现患儿 1 ATP6V0A4 基因表达序列第 580 位碱基存在 1 个新的纯合突变 (c.C580>T), 该突变为无义突变 (CGA \rightarrow TGA), 导致翻译提前终止在 194 位密码子 (p.R194X); 未发现 ATP6V1B1 基因的突变。通过对其家系成员的进一步测序验证, 发现患儿 1 父母分别携带该位点的杂合突变, 见图 1。患儿 2 未发现 ATP6V0A4 基



注: A: ATP6V0A4 基因突变 p.R194X 野生型(上)和突变型(下); B: ATP6V1B1 基因突变 p.R114X 野生型(上)和突变型(下)

图 2 ATP6V0A4 和 ATP6V1B1 基因 2 个新突变的基因测序

因的突变, 但发现 ATP6V1B1 基因的 2 个杂合突变, 1 个是表达序列第 340 位碱基存在新的杂合无义突变 (CGA \rightarrow TGA), 该突变导致翻译提前终止在 114 位密码子 (p.R114X); 另 1 个是已报道过的杂合插入突变 (c.1155-1156insC), 该突变导致从第 386 位密码子起始的移码突变, 翻译提前终止于 441 位密码子 (p.I386fsX441)^[5-6], 2 个突变分别来自父源和母源染色体, 见图 1。患儿 3 未发现 ATP6V0A4 和 ATP6V1B1 基因的突变。

除突变外, 还发现两个基因 6 个单核苷酸多态性, 其中错义突变 2 个, 同义突变 4 个。ATP6V0A4: c.T5 >C (p.V2A)、c.T1739 >C (p.M580T)、c.T1812 >C (p.H604H)、c.C1662 >T (p.F554F)。ATP6V1B1: c.T27 >C (p.P9P)、c.T567 >C (p.A189A)。

通过测序分析, 本研究新发现的 2 个突变: p.R194X 和 p.R114X, 以及已经报道过的移码突变 (p.I386fsX441), 未在 100 例健康人中发现。

讨 论

研究证实, dRTA 与肾小管 α 闰细胞 (intercalated cell, 居间细胞) 表达的 3 个分子的功能缺陷相关, 这 3 个分子分别是碳酸酐酶 II (CA II)、 H^+ -ATP 酶和 Cl^- - HCO_3^- 交换体 (AE1)^[1]。常染色体显性遗传性 dRTA (ddRTA) 与 AE1 编码基因 SLC4A1 突变有关^[1]。rdRTA 与编码 H^+ -ATP 酶 α_4 亚单位或 B1 亚单位的 ATP6V0A4 或 ATP6V1B1 基因突变相关^[4,7]。AE1 突变导致的

dRTA 亦可按照隐性遗传方式遗传,但往往并发遗传性球形红细胞增多症,多见于东南亚地区^[8]。

本研究中,我们在 3 个常染色体隐性遗传性 dRTA 家系中,分别发现 2 个基因 1 个新的无义突变 (p.R194X 和 p.R114X) 和 1 个既往发现的 ATP6V1B1 基因突变 (p.I386fsX441),3 个突变均导致翻译提前终止,形成无功能的截短肽链,因此,3 个突变很可能均为致病性突变。在 3 个家系中,其中 1 个家系未发现以上 2 个基因的突变,发现比例为 2/3(66.7%),与文献报道的 79.5% 相近^[6]。未能确定第 3 个家系突变基因可能与以下原因有关:(1)突变位于 5' 或 3' 非翻译区,或未检测的内含子序列;(2)累计多个外显子的大片段基因重排亦难以通过本方法发现;(3)突变位于其他基因。另外,根据以往的研究,在 ATP6V0A4 和 ATP6V1B1 基因发现的大部分突变为无义突变或移码突变,导致不稳定的 mRNA 或截短的肽链。本研究结果与以往研究类似^[4-7]。

感音神经性耳聋 (SNHL) 是 ATP6V1B1 和 ATP6V0A4 基因突变的重要临床特点^[4-7]。最早的研究发现,前者突变可引起早发性 SNHL 和 dRTA,后者突变可引起不伴发耳聋或晚发性 SNHL 性 dRTA^[4,7]。Vargas-Poussou 等^[6]进一步通过 39 个 rdRTA 家系的研究发现,ATP6V1B1 基因突变的患者中 70% 伴有早发性 SNHL,ATP6V0A4 基因突变的患者中 30% 伴有早发性 SNHL。在本研究中,患儿 1 携带 ATP6V0A4 基因的纯合突变,但伴有早发性 SNHL;患儿 2 携带 ATP6V1B1 基因的复合杂合突变,目前尚未出现耳聋,这与一般的突变规律不相吻合。因此,在对 rdRTA 进行候选基因筛选研究时,不应将是否合并 SNHL 作为选择标准,而应结合基因的突变频率、SNHL 的发病年龄、研究对象的地区和种群等因素综合分析。

本研究 3 例患儿中,1 例患儿因诊断及及时并得到合理治疗,生长发育正常。另外 2 例患儿尽

管存在发育障碍,但在获得合理治疗后,生长发育恢复迅速。因此,对 dRTA 的治疗应提倡早发现、早治疗和合理治疗。甚至有学者提出,早期合理的治疗对 SNHL 的发病能起一定的预防和延迟发病的作用^[3],但尚需进一步的观察研究。

参 考 文 献

- [1] 邵乐平,陈楠,苗志敏.常染色体显性遗传性远端肾小管酸中毒一家系 SLC4A1 基因突变分析.中华肾脏病杂志,2010,26:243-247.
- [2] 王琼,陈楠.遗传性肾小管酸中毒相关基因研究进展.中华肾脏病杂志,2009,25:404-407.
- [3] Gil H, Santos F, García E, et al. Distal RTA with nerve deafness: clinical spectrum and mutational analysis in five children. *Pediatr Nephrol*, 2007, 22: 825-828.
- [4] Karet FE, Finberg KE, Nelson RD, et al. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet*, 1999, 21: 84-90.
- [5] Stover EH, Borthwick KJ, Bavalua C, et al. Novel ATP6V1B1 and ATP6V0A4 mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. *J Med Genet*, 2002, 39: 796-803.
- [6] Vargas-Poussou R, Houillier P, Le Pottier N, et al. Genetic investigation of autosomal recessive distal renal tubular acidosis: evidence for early sensorineural hearing loss associated with mutations in the ATP6V0A4 gene. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17: 1437-1443.
- [7] Smith AN, Skaug J, Choate KA, et al. Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat Genet*, 2000, 26: 71-75.
- [8] Sritippayawan S, Sumboonanon A, Vasuvattakul S, et al. Novel compound heterozygous SLC4A1 mutations in Thai patients with autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Am J Kidney Dis*, 2004, 44: 64-70.

(收稿日期:2011-06-10)

(本文编辑:李耀荣)