

· 论著 · 罕见病 ·

PKD1 c.9977G>A变异致多囊肾病1型家系分析*

穆艳超^{1,2,*} 李 杨² 狄 华² 程元平³ 严 凯³

1.安阳市妇幼保健院检验科(河南 安阳 455000)

2.安阳市妇幼保健院产前诊断中心,安阳市产前诊断重点实验室(河南 安阳 455000)

3.安阳市妇幼保健院超声科(河南 安阳 455000)

【摘要】目的 对一个三代七人患有肾脏疾病的家族进行基因分析和调查。方法 采集先证者外周血、羊水细胞、丈夫外周血,提取基因组DNA进行二代测序。采集家系成员口腔脱落细胞提取DNA,使用Sanger测序对突变位点进行验证,分析检测异常结果。结果 全外显子组测序分析先证者存在遗传型多囊肾病1基因(PKD1)(NM_001009944.3)c.9977G>A(p.Gly3326Asp)杂合变异;羊水细胞检测胎儿PKD1 c.9977G>A(p.Gly3326Asp)杂合变异,验证变异来源于先证者;先证者母亲、表舅、表姨、姥爷、二姑姥姥、三姑姥姥均为PKD1 c.9977G>A(p.Gly3326Asp)杂合变异,其他家系成员为野生型;生物信息学分析该位点变异可致PKD1蛋白结构改变。结论 先证者及其家系成员PKD1 c.9977G>A(p.Gly3326Asp)变异可能是造成家族多个成员多囊肾病的原因,该变异的检出有助于进一步认识多囊肾病1型的致病机制。

【关键词】多囊肾病1型;基因;杂合变异;家系;测序

【中图分类号】R692

【文献标识码】A

【基金项目】安阳市重点研发与推广专项(2023C01SF156);安阳市产前诊断重点实验室(2023E02JC003)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2026.4.002

Pedigree Analysis of Polycystic Kidney Disease 1 Caused by PKD1 c.9977G>A Variation*

MU Yan-chao^{1,2,*}, LI Yang², DI Hua², CHENG Yuan-ping³, YAN Kai³.

1.Clinical Laboratory,Anyang Maternal and Child Health Hospital, Anyang 455000, Henan Province,China

2.Prenatal Diagnosis Center, Anyang Key Laboratory of Prenatal Diagnosis, Anyang Maternal and Child Health Hospital, Anyang 455000, Henan Province, China

3.Ultrasound department, Anyang Maternal and Child Health Hospital, Anyang 455000, Henan Province, China

Abstract: Objective Analyze a family with kidney disease spanning three generations and seven individuals. **Methods** DNA was collected from peripheral blood, amniotic fluid cells, and the husband's blood for next generation sequencing. Oral shedding cells from family members were also tested for mutations using Sanger sequencing. Abnormal results were analyzed and detected. **Results** A c.9977G>A(p.Gly3326Asp)heterozygous mutation in the PKD1 (NM_001009944.3) gene was found in the proband through whole exome sequencing. The same mutation was also detected in the fetus through amniotic fluid cells, confirming it came from the proband. The proband's mother, cousin, aunt, grandfather, second great-aunt and third great-aunt, also had this mutation, while others were wild type. **Conclusion** Analyzing the variation of this site could lead to structural changes in the PKD1 protein, potentially causing polycystic kidney disease in multiple family members. Detection of the c.9977G>A(p.Gly3326Asp)variation may enhance understanding of the disease's pathogenesis.

Keywords: Polycystic Kidney Disease 1; Gene; Heterozygous Variation; Pedigree; Sequence

多囊肾病(polycystic kidney disease, PKD)是由常染色体基因变异导致的遗传性肾病,有显性遗传和隐性遗传两种。常染色体隐性遗传多囊肾病发病率低,约1/20000,临床表现比常染色体显性遗传多囊肾病重,发病于胎儿期或婴幼儿期;常染色体显性遗传多囊肾病患者率约1/1000,主要于成年期发病^[1]。常染色体隐性遗传多囊肾病的致病基因主要是多囊肾/多囊肝病1基因(polycystic kidney and hepatic disease 1, PKHD1)和DAZ相互作用锌指蛋白1(DAZ-interacting zinc finger protein 1, DZIP1L),常染色体显性遗传多囊肾病的主要致病基因为多囊肾病1基因(polycystic kidney disease 1, PKD1)和多囊肾病1基因(polycystic kidney disease 2, PKD2)^[2]。基因的变异与管状细胞增殖和凋亡平衡紊乱、细胞外基质缺陷、膜蛋白细胞极性改变、纤

毛功能紊乱等相关,这是导致肾脏增大和间质纤维化的重要机制^[3]。本研究采用高通量测序发现先证者家族患有肾脏疾病的成员均携带PKD1基因变异位点,通过家系病史、生物信息与文献分析,确定PKD1基因变异位点为致病原因。

1 资料与方法

1.1 一般资料 先证者,女,24岁,孕期产检发现双侧成人型多囊肾,无不适感。家族史:外祖父因肾衰竭过世;二姑姥姥与三姑姥姥肾衰竭行透析治疗;母亲、表舅、表姨三人均偶有腰酸不适感,每月监测肾功能和尿常规均正常。否认近亲结婚,孕1产0,为探明家族肾病致病原因,避免生育严重遗传性肾病后代,经安阳市妇幼保健院伦理委员会审查(20230225014),先证者及其丈夫、母亲、父亲、二姑姥

【第一作者】穆艳超,男,主管技师,主要研究方向:遗传性疾病分子诊断。E-mail: muyanchao@tmu.edu.cn

【通讯作者】穆艳超

姥、三姑姥姥、舅舅、姨、表舅、表姨均签署知情同意书,采集外周血,并采集先证者羊水。先证者、丈夫外周血标本和先证者羊水标本送检至郑州大学第三附属医院行全外显子组测序,其余人员标本留作验证使用。

1.2 仪器与试剂 血液采集使用EDTA-K2(郑州山山医疗用品有限公司)抗凝负压采血管,羊水采集使用15mL无菌离心管(无锡耐思生命科技股份有限公司),基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司],二代测序使用Illumina Novaseq6000测序仪[因美纳(中国)科学器材有限公司],一代测序使用T2400 Sanger测序仪(宁波海尔施基因科技股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 全外显子组测序 使用基因组DNA提取试剂盒[凯杰中国(上海)有限公司],按照试剂盒操作说明书提取血液和羊水细胞DNA,纯化后的DNA打断至200bp左右,进行末端修复和3'端加A实验,修复后的DNA片段连接barcode测序接头,纯化连接产物。参照NanoWES芯片(北京贝瑞和康生物技术有限公司)说明书操作流程,进行液相杂交捕获操作,洗脱和收集杂交产物,行PCR扩增与纯化,获得外显子文库,文库定量后采用Illumina Novaseq6000平台进行高通量测序,使用CASAVA v1.82软件处理测序数据。根据美国医学遗传学和基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)指南^[4]对变异位点的致病性进行评级。

1.3.2 Sanger测序 根据变异位点设计PKD1基因验证反应引物,PKD1基因正向引物为5'-CTCTGCCTACAGCAC-3',反向引物5'-GGATGGCCAGGTAGAC-3'。扩增先证者血液DNA、先证者羊水细胞DNA、先证者家属成员中患有肾病者和无肾病表现者血液DNA,使用T2400 Sanger测序仪进行Sanger测序,由金域医学检验所实验室完成。

1.3.3 蛋白结构分析 蛋白三维结构建模使用PyMol软件。依次点击软件界面的Wizard-Mutagenesis,进入Protein突变操作面板,选择突变的氨基酸代码,点击Mutagenesis菜单中的No mutation,选择突变后氨基酸代码,点击Apply和done完成突变蛋白建模。选择Wizard中的Sculpting优化残基构象,点击Sculpting选择突变氨基酸末端原子,即可实现优化过程展示。

2 结果

2.1 辅助检查结果 孕期产检首先发现孕妇肾脏彩色多普勒检查结果异常,孕妇自述家庭成员患有肾病,行胎儿肾脏彩色多普勒检查。孕妇彩色多普勒超声提示:双肾回声增强(见图1A),宫内妊娠31周5天;胎儿双肾回声增强(见图1B)。孕妇肾功能生物化学检验结果正常,血压正常,其他脏器检查未见异常。

2.2 分子遗传实验结果 外周血全外显子组测序显示,先证者(孕妇)存在PKD1 c.9977G>A(p.G3326D)杂合变异;先证者丈夫PKD1基因为野生型;胎儿羊水全外显子组测序显示,胎儿存在PKD1 c.9977G>A(p.G3326D)杂合变异,变异遗传自母亲。该变异为常染色体显性遗传致病性,调查先证者家系,家系中多人有肾病表现,家系图见图2。

征得先证者及其家庭成员同意后,对其家庭成员中肾脏透析治疗的二姑姥姥(Ⅱ4)与三姑姥姥(Ⅱ6),表现有腰痛的母亲(Ⅲ3)、表舅(Ⅲ4)、表姨(Ⅲ5),无症状的父亲和大舅(Ⅲ1),分别采集外周血,利用一代测序检测PKD1基因编码区9977位碱基变异情况。一代测序检测结果提示,先证者、胎儿、二姑姥姥(Ⅱ4)、三姑姥姥(Ⅱ6)、母亲(Ⅲ3)、表舅(Ⅲ4)、表姨(Ⅲ5)均存在PKD1 c.9977G>A(p.G3326D)杂合变异;先证者丈夫、父亲、大舅(Ⅲ1)PKD1基因为野生型,测序峰图见图3。

2.3 变异对蛋白结构的影响 PKD1 c.9977G>A变异导致PKD1蛋白3326位甘氨酸变异为天冬氨酸,经REVEL和MutationTaster数据库计算该变异对蛋白产物产生可造成有害影响,该变异在参考人群千人基因组(1000G)、人类外显子数据库(ExAC)、神州基因组数据库、人群基因组突变频率数据库(gnomAD)中均为发现,提示该突变的致病性强。可视化分析显示,突变后PKD1蛋白有氢键相互作用的改变,野生型PKD1蛋白3326位甘氨酸主链与3322位苏氨酸和3330位丝氨酸形成氢键,其氢键距离分别为3.0埃和3.3埃,p.G3326D导致第3326位不带电的甘氨酸突变为带负电荷的天门冬氨酸,突变型3326位天门冬氨酸主链与3323位缬氨酸、3322位苏氨酸和3330位丝氨酸形成氢键,其氢键的距离分别为2.7埃、3.0埃和3.4埃,野生型和突变型氨基酸的性质和相互作用改变,进而导致蛋白功能的改变,见图4。

蛋白保守性分析发现,PKD1蛋白3326位氨基酸在人类、恒河猴、家鼠、家鸡、河豚、线虫等不同等级物种中具有高度保守性,见图5。

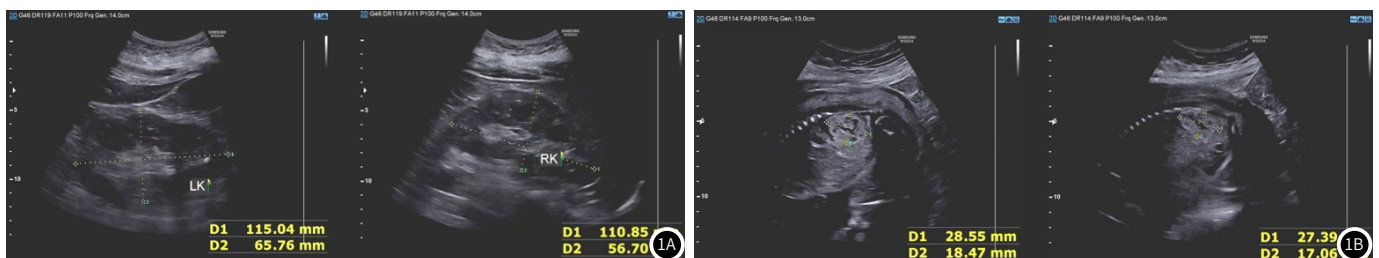


图1 孕妇与胎儿肾脏彩色多普勒超声检查结果。图1A: 孕妇双肾彩色多普勒超声图; 图1B: 胎儿双肾彩色多普勒超声图。

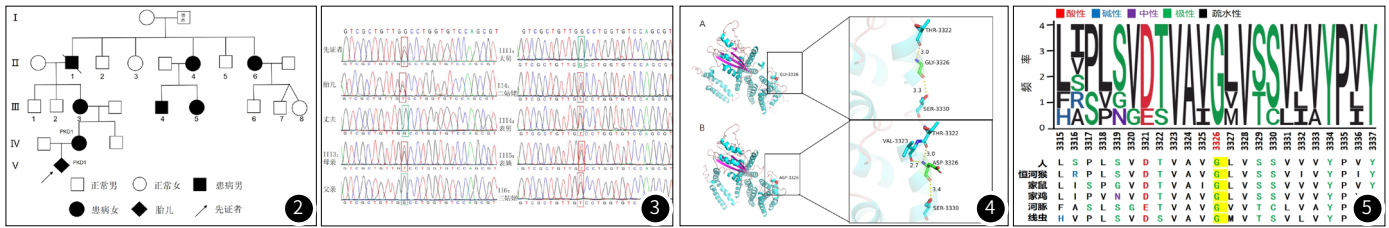


图2 家系图。图3 一代测序结果。注：红色方框标注PKD1 c.9977G>A杂合变异；绿色方框标注PKD1基因9977位碱基为野生型。图4 PKD1蛋白结构与可视化分析。注：为野生型，c.9977G>A突变型。图5 氨基酸序列保守性分析。

3 讨论

多囊肾病是一种迟发性多系统异常疾病，典型的临床特征包括双侧肾囊肿^[5]、肝囊肿^[6]，患者可伴发颅内动脉瘤^[7]、胰腺囊肿^[8]、蛛网膜囊肿^[8-9]、主动脉扩张^[9]、主动脉夹层^[9]、二尖瓣脱垂^[9]等。约50%的患者在60岁以后可出现终末期肾病，肝囊肿的发生随着年龄增长而增加，少数患者可出现严重的肝囊肿^[10]。PKD1、PKD2、ALG5、ALG9、DNAJB11、GANAB、IFT140等基因的变异可导致多囊肾病^[10]，基因测序技术在临床中的应用日益普遍，多囊肾病致病基因的新发变异位点不断被揭晓^[1]。在基层医疗机构，基因测序在临床中的应用尚未完全普及，临床中诊断肾病主要依靠超声检查^[11]。本研究发现先证者彩色多普勒超声检查提示成人型多囊肾，胎儿双肾回声增强，基因检测患者存在PKD1 c.9977G>A(p.G3326D)杂合变异，结合数据库收录的致病基因分析，初步诊断患者为多囊肾病。

PKD1基因定位于16号染色体短臂1区3带3亚带(16p13.3)，编码具有4303个氨基酸的PKD1蛋白，PKD1是形成异质钙渗透离子通道的组成部分，PKD1参与多个重要生理活动的调控，如肾小管的形成^[12]、肾上皮初级纤毛的流体机械感觉^[13]、纤毛机械信号转导^[13]、衰老线粒体的识别^[14]、胞吐^[15]等。PKD1基因变异影响蛋白结构和功能时，将影响多个生理功能，出现相应临床症状。本研究中先证者存在PKD1 c.9977G>A(p.G3326D)杂合变异以往被报道出现在多囊肾病患者中^[16]，该变异已被OMIM^[17]、HGMD^[18]和dbSNP^[19]数据库收录，有害性预测结果为有害。蛋白结构分析提示，PKD1 c.9977G>A(p.G3326D)变异导致蛋白结构改变，该位点在不同的物种间具有高度保守性。先证者家系中肾脏多普勒彩色超声检查异常的胎儿、二姑姥姥(II 4)、三姑姥姥(II 6)、母亲(III 3)、表舅(III 4)、表姨(III 5)均存在PKD1 c.9977G>A(p.G3326D)杂合变异；临床表现正常的丈夫、父亲、大舅(III 1)PKD1基因均正常。这与以往报道的PKD1基因突变导致疾病为显性遗传相一致^[20]。此外，PKD1基因变异也有良性的结局，ClinVar数据库中收录了约290个位点变异被多项研究证实是良性的，收录了694个位点的变异被证实为可能良性的结局。HGMD数据库还收录了PKD1基因其它类型的变异，如单碱基缺失、微缺失、插入、剪接位点变异等^[18]。

综上所述，本研究调查家系成员中肾脏多普勒彩色超声检查异常者携带有PKD1 c.9977G>A(p.G3326D)杂合变异，为明确诊断家系多人多囊肾病提供了实验结果支持，为临床工

作中发现疑似多囊肾病管理和家系调查提供借鉴，有利于进一步佐证PKD1 c.9977G>A(p.G3326D)变异可致病。

参考文献

- [1] 沙艳伟. 靶向序列捕获联合高通量测序鉴定成人型多囊肾PKD1基因新突变[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(1): 12-14.
- [2] 周礼涛, 张春丽, 丁秋兰, 等. 一个家族性多囊肾纤维蛋白原缺陷症家系的基因诊断、临床特征及文献回顾[J]. 内科理论与实践, 2023, 18(5): 328-333.
- [3] Roediger R, Dieterich D, Chanumolu P, et al. Polycystic kidney/liver disease[J]. Clin Liver Dis, 2022, 26(2): 229-243.
- [4] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory quality assurance committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. Genet Med, 2015, 17(5): 405-424.
- [5] 中华医学会医学遗传学分会遗传病临床实践指南撰写组. 多囊肾病的临床实践指南[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, 37(3): 277-283.
- [6] 龙喜贵, 田矛, 李颖, 等. 两次妊娠胎儿颈项透明层增厚伴孕妇多囊肾家系的产前遗传学诊断[J]. 中华围产医学杂志, 2023, 26(10): 858-861.
- [7] 闵杰, 吴明灿, 姚远, 等. 多囊肾合并颅内动脉瘤性蛛网膜下腔出血2例临床分析并文献复习[J]. 临床神经外科杂志, 2017, 14(2): 142-144.
- [8] 郑建明, 冯钢, 付迎欣, 等. 多囊肾尿毒症患者肾移植时同期切除多囊肾的临床分析[J]. 中华器官移植杂志, 2009, 30(5): 278-280.
- [9] 邓美丽, 田茂青, 翟转, 等. 103例常染色体显性遗传多囊肾病患者临床特点分析[J]. 中华肾脏病杂志, 2022, 38(8): 685-692.
- [10] Corneec-Le Gall E, Alam A, Perrone RD. Autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. Lancet, 2019, 393(10174): 919-935.
- [11] 王雅娟, 范淑玉, 卢晓雪. 彩色多普勒超声对移植肾动脉狭窄的临床应用价值[J]. 河南医学研究, 2023, 32(23): 4262-4266.
- [12] Kimura T, Kawano H, Muto S, et al. PKD1 mutation is a biomarker for autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. Biomolecules, 2023, 13(7): 1020.
- [13] 徐子晴. 单中心肾脏纤维病患儿相关基因型及临床特征分析[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2023.
- [14] 郭燕, 徐爽, 王亭. PKD1抑制剂CID755673通过诱导线粒体功能障碍加重急性肾损伤[J]. 临床与实验病理学杂志, 2023, 39(2): 206-211, 215.
- [15] 刘志春. 运动诱发运动障碍患者PRRT2基因检测及静息态功能磁共振研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2014.
- [16] Wilson PC, Love-Gregory L, Corliss M, et al. Beyond panel-based testing: exome analysis increases sensitivity for diagnosis of genetic kidney disease[J]. Kidney, 2020, 1(8): 772-780.
- [17] Song X, Di Giovanni, He N, et al. Systems biology of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): computational identification of gene expression pathways and integrated regulatory networks[J]. Hum Molec Genet, 2009, 18: 2328-2343.
- [18] Neumann HP, Jilg C, Bacher J, et al. Epidemiology of autosomal-dominant polycystic kidney disease: an in-depth clinical study for south-western Germany[J]. Nephrol Dial Transplant, 2013, 28(6): 1472-87.
- [19] Miao Y, Xiong J, Zhang X, et al. Genetic diagnosis of polycystic kidney disease, Alport syndrome, and thalassemia minor in a large Chinese family[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(19): 2427-2438.
- [20] 陈丹娜, 刘国辉, 朱梓年, 等. 常染色体显性多囊肾病家系PKD1基因突变分析[J]. 中华医学杂志, 2022, 102(31): 2441-2445.

(收稿日期: 2024-05-30)

(校对编辑: 姚丽娜)

(排版编辑: 刘维嘉)