

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.11.007

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200422.1640.022.html\(2020-04-22\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200422.1640.022.html(2020-04-22))

X 连锁隐性遗传性肾上腺脑白质营养不良家系遗传学分析*

吕雪¹,李涛^{2#},刘红彦³,李昊^{4△}

(1.河南省人民医院健康管理科,郑州 450003;2.郑州大学华中阜外医院检验科,郑州 451478;

3.河南省人民医院医学遗传研究所,郑州 450003;4.河南省人民医院干部保健部,郑州 450003)

[摘要] **目的** 对 X 连锁隐性遗传性肾上腺脑白质营养不良(X-ALD)家系进行基因诊断及产前诊断,为临床遗传咨询提供依据。**方法** 利用 PCR-外显子测序分析家系先证者 ABCD1 基因突变,然后检测 100 名健康男性 ABCD1 基因在患者突变位点的碱基序列以排除多态性,同时 PCR-外显子测序分析家系成员 ABCD1 基因该突变位点的碱基序列,明确家系 X-ALD 携带者,并对携带者进行产前诊断。**结果** 先证者 ABCD1 基因存在 c.796 位 G>A 突变,使 ABCD1 基因第 266 位密码子由甘氨酸密码子 GGG 突变为精氨酸密码子 AGG。100 名健康男性、先证者父亲、哥哥及其妹妹此位点未见该突变,先证者母亲及其姐姐此位点为杂合突变。双胞胎胎儿 1 标本 SRY 阳性,ABCD1 基因 c.796 位未见突变,胎儿 2 标本 SRY 阴性,ABCD1 基因 c.796 位 G>A 杂合突变。**结论** 明确了该 X-ALD 家系 ABCD1 基因的致病性突变,为该家系双胞胎胎儿提供 X-ALD 产前诊断。

[关键词] 肾上腺脑白质营养不良;ABCD1 基因;基因诊断;产前诊断**[中图分类号]** R394-33**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)11-1750-04

Genetic analysis for an X-linked adrenoleukodystrophy family*

LYU Xue¹,LI Tao^{2#},LIU Hongyan³,LI Hao^{4△}

(1. Department of Health Management, Henan Provincial People's Hospital,

Zhengzhou, Henan 450003, China; 2. Medical Laboratory, Central China Fuwai Hospital of

Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 451478, China; 3. Medical Genetic Institute, Henan Provincial

People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China; 4. Department of Cadre Health

Manage Center, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China)

[Abstract] **Objective** To conduct genetic diagnosis and prenatal diagnosis for a X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) family, to provide a basis for clinical genetic counseling. **Methods** Potential mutation of ABCD1 gene was analyzed in the family proband, suspected mutation was identified in 100 healthy males to eliminate polymorphism. At the same time, PCR-exon sequencing was performed on the base sequence of the ABCD1 gene mutation site, to identify the X-ALD carriers in the family. Prenatal diagnosis was performed on the carriers. **Results** Sequence analysis showed that there was a c.796 site G>A mutation of ABCD1 gene in the family proband, which has replaced the 266th glycine codon (GGG) to arginine codon (AGG). The same mutation did not be found in 100 healthy males, the proband's father, elder brother and little sister, but the proband's mother and sister had the heterozygous mutation. Upon prenatal diagnosis, the fetus 1 was a male and did not harbor the same mutation, fetus 2 was a female and carried the c.796 site G>A heterozygous mutation of ABCD1 gene. **Conclusion** The pathogenic mutation of the ABCD1 gene in the X-ALD family was clarified, and X-ALD prenatal diagnosis was provided for the family.

[Key words] adrenoleukodystrophy; ABCD1 gene; Genetic diagnosis; prenatal diagnosis

X 连锁隐性遗传性肾上腺脑白质营养不良(X-ALD)是一种主要侵犯脑白质、肾上腺等组织器官的

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2018020390);河南省科技攻关计划项目(162102310294);河南省卫生计生科技英才海外研修工程项目(2018151)。作者简介:吕雪(1986-),主治医师,硕士,主要从事慢性病、遗传性疾病等人群健康管理、健康干预研究。# 共同第一作者简介:李涛(1985-),主管技师,硕士,主要从事遗传性疾病基因诊断产前诊断工作。△ 通信作者,E-mail:hzwfwt@163.com。

先天性基因缺陷引起的伴 X 染色体隐性遗传过氧化物酶体病,男性发病,女性多为携带者。X-ALD 临床主要表现为极长链脂肪酸(VLCFAs)在组织和体液中大量蓄积而引发的中枢神经系统脱髓鞘和肾上腺功能减退^[1]。根据发病年龄和主要受累器官等主要分为 6 种临床表型,其中儿童脑型肾上腺脑白质营养不良(CCALD)临床表现最为严重,患儿多于 4~10 岁起病,表现为听、视觉损害,疾病进展快、预后不良,且缺乏特异性的治疗手段,因此对 CCALD 家系及早进行基因诊断并筛查携带者,为携带者提供产前诊断以预防出生缺陷尤为重要。

X-ALD 的致病基因为 ABCD1 (ATP binding cassette subfamily D member 1) 基因,定位于 Xq28 区,编码由 745 个氨基酸组成的肾上腺脑白质营养不良蛋白(ALDP)。ABCD1 基因突变导致 ALDP 异常进而引起 VLCFAs 代谢障碍是 X-ALD 发病的根本原因。因此本研究利用 PCR-外显子测序分析技术对一 X-ALD 家系进行基因诊断和产前诊断,为临床遗传咨询提供依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2013 年 1 月来河南省人民医院咨询,要求进行 X-ALD 基因诊断及产前诊断的 1 个家系(图 1),其中先证者(II 4),男,8 岁,其父亲口述患儿渐进性视力下降,学习成绩下降,且偶尔行走跌倒,于当地医院进行 MRI 检查显示双侧脑室后角周围对称性异常信号,呈蝶翼状向枕叶及顶枕交界白质区蔓延,查 VLCFA C26:0 为 1.47(参考值 0.24±0.14)。依据 X-ALD 诊断标准^[2],临床诊断为 CCALD,家系中其他成员未见异常。家系中孕妇(II 2),女,23 岁,为患儿姐姐,首次咨询时孕 10 周,B 超提示双囊双胞胎。本研究获得家系成员知情同意及河南省人民医院伦理委员会批准。

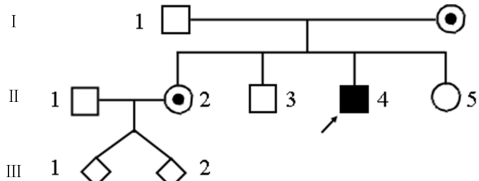


图 1 X-ALD 家系图

1.2 方法

1.2.1 标本获取及 DNA 提取

采集家系成员外周血 3~5 mL, EDTA-K₂ 抗凝;在超声引导下对孕中期孕妇行羊膜腔穿刺获取胎儿脱落细胞。Qiagen 基因组 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取外周血及胎儿脱落细胞 DNA,具体操作见说明书。NANODROP 2000(美国 Thermo 公司)定量待测标本及健康男性基因组 DNA, -20 °C 保存。

1.2.2 PCR-外显子测序分析该家系成员 ABCD1 基因突变情况

设计 ABCD1 基因 10 个外显子序列引物,PCR 扩增先证者 ABCD1 基因全外显子及侧翼序列,PCR 扩增产物送上海生工股份有限公司测序。根据家系中患者 ABCD1 基因突变位点,PCR-外显子测序分析该家系成员和 100 名健康男性 ABCD1 基因此位点碱基情况,以排除多态性和明确家系成员 X-ALD 携带者。

1.2.3 羊水标本质量检测

按照 PowerPlex[®] 21 HS 基因分型系统(美国 Promega 公司)说明书扩增孕妇及其羊水标本 DNA,借以排除母体污染,确保结果准确性,具体方法参考文献^[3]及说明书。

1.2.4 胎儿性别鉴定

设立健康男性、女性和空白对照,PCR 扩增胎儿 SRY 基因,引物序列如下:5'-GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA-3', 5'-GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG-3';独立重复 3 次,具体方法参考文献^[4]。

1.2.5 PCR-外显子测序分析胎儿 ABCD1 基因突变情况

PCR-外显子测序分析胎儿 ABCD1 基因上述突变位点碱基情况,PCR 产物送上海生工股份有限公司测序,独立重复检测 3 次。

2 结果

2.1 家系成员 ABCD1 基因检测结果

PCR-外显子测序分析结果显示,先证者 ABCD1 基因存在 c.796 位 G>A 突变,使 ABCD1 基因第 266 位密码子由甘氨酸密码子 GGG 突变为精氨酸密码子 AGG。100 名健康男性,先证者父亲、哥哥、妹妹及孕妇丈夫此位点未见该突变(G/G),为健康者;先证者母亲及其姐姐此位点为杂合突变(G/A),为 X-ALD 携带者,见图 2。

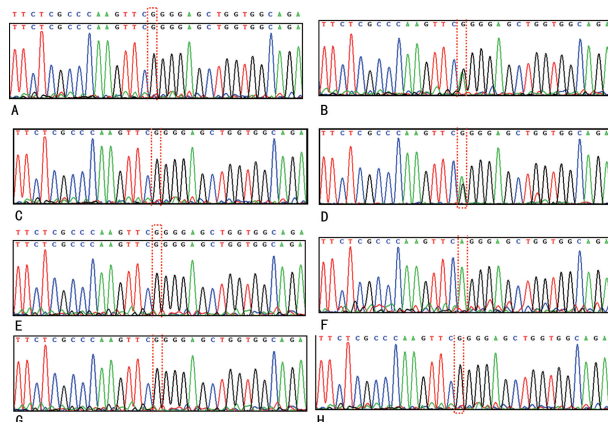
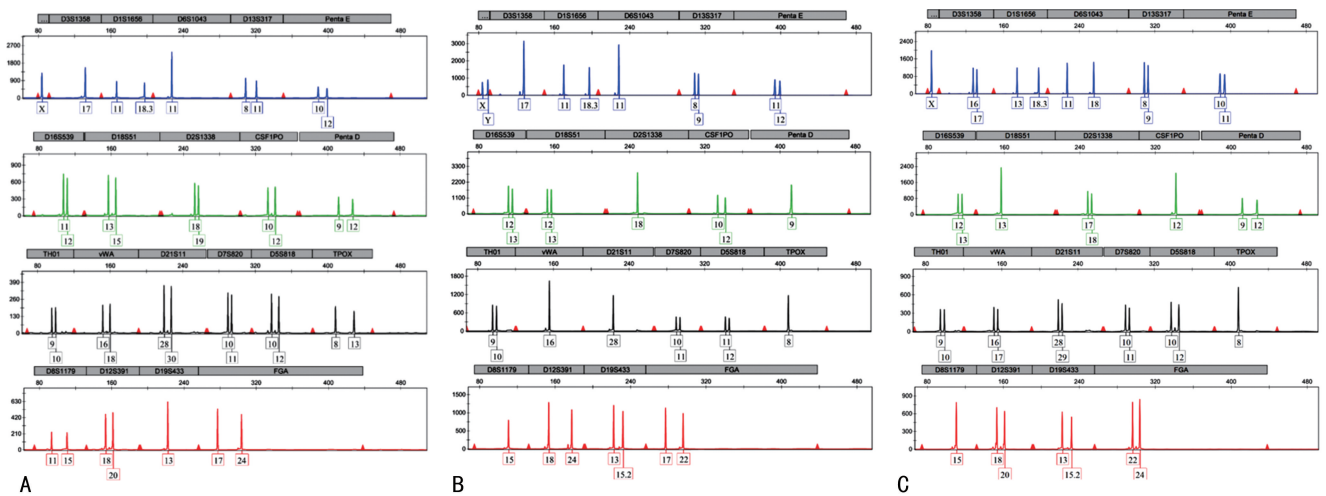


图 2 X-ALD 家系 ABCD1 基因测序结果
A:先证者父亲(I 1);B:先证者母亲(I 2);C:孕妇丈夫(II 1);D:先证者姐姐(II 2);E:先证者哥哥(II 3);F:先证者(II 4);G:先证者妹妹(II 5);H:健康男性。

图 2 X-ALD 家系 ABCD1 基因测序结果

2.2 羊水标本质量检测结果

PowerPlex[®] 21 HS 系统检测结果显示,两个胎



A: 孕妇(Ⅱ2)DNA分型; B: 胎儿1(Ⅲ1)DNA分型; C: 胎儿2(Ⅲ2)DNA分型。

图3 羊水标本质量检测

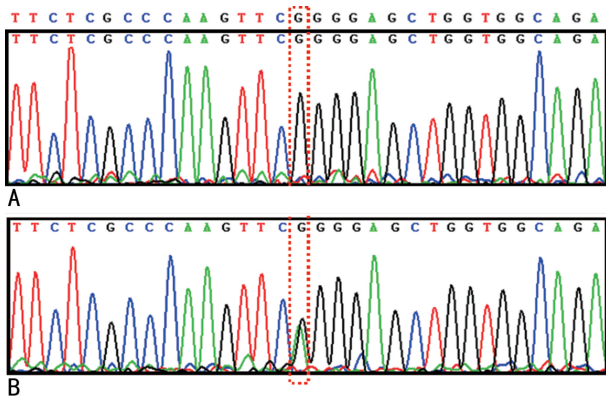
儿的DNA分型中均未见母源性的分型,同时可以看到胎儿1是男性胎儿(性染色为XY)、胎儿2女性胎儿(性染色体XX),且与孕妇的分型符合母子/女关系,表明羊水标本无母体污染,且羊水标本无误,可进行后续检测,见图3。

2.3 SRY基因检测结果

经过琼脂糖电泳分析,胎儿1标本扩增出SRY条带,SRY阳性,为男性胎儿;胎儿2未扩增出SRY条带,SRY阴性,为女性胎儿。SRY基因检测结果与PowerPlex® 21 HS系统检测结果一致。

2.4 胎儿标本ABCD1基因检测结果

胎儿1ABCD1基因c.796位未见突变(G/G),为非X-ALD;胎儿2ABCD1基因c.796位G>A杂合突变(G/A),为X-ALD携带者。独立重复3次结果一致,见图4。



A: 胎儿1(Ⅲ1); B: 胎儿2(Ⅲ2)。

图4 胎儿标本ABCD1基因检测结果

3 讨论

X-ALD是一种临床表现多样的脑白质变性病,呈X连锁隐性遗传,男性受累,发病率约1/21 000,女性多为携带者,携带率约为1/14 000。目前研究认为,X-ALD的致病基因为ABCD1基因,于1993年被克隆,其编码的ALDP为ABC(ATP-binding cas-

sette)转膜转运子超家族D亚家族成员,为一个半转运子,在体内以异源二聚体或同源二聚体形式形成有功能的ABC转运子,在VLCFAs的体内转运代谢中具有重要作用。ABCD1基因突变导致ALDP功能异常,致使VLCFAs在组织、血浆,尤其是肾上腺、脑白质大量蓄积,引起肾上腺皮质激素释放激素受体的活性降低和脑白质髓鞘稳定性下降是X-ALD发病的根本原因。临床上对X-ALD的基因诊断即检测ABCD1基因突变情况,结合X-ALD专业网站(<http://www.x-ald.nl>)提供的ABCD1基因突变数据,可方便地找出X-ALD家系ABCD1基因致病性突变。截至2018年12月29日,X-ALD专业网站已记录ABCD1基因突变共2 681个,其中错义突变占61%、无义突变占10%、移码突变占17%、碱基的插入/缺失占4%,其余为剪切位点突变或是大片段的缺失,大量的基因突变相关数据可方便研究者和临床实验室诊断医生查询突变相关资料,明确突变是否为致病性突变,为临床实验室检验提供数据支持。

根据发病年龄、受累部位及神经系统症状等,主要分为6种表型,其中CCALD是临床上较为常见的,也是临床症状较重的X-ALD。CCALD发病较早,4~10岁以进行性的视力、听力、运动能力障碍起病,病程进展较快,大部分患儿在发病2~4年后成为植物人状态或死亡,给患者及家庭带来巨大的身心伤害和经济负担。然而目前对CCALD尚缺乏有效的治疗手段,尽管激素替代治疗可改善患儿内分泌的状态,但不能改善神经系统症状;尽管造血干细胞移植对疾病早期脑型患者有治疗效果,但对疾病快速进展阶段的脑型患者却不适用^[5]。因此,及早对X-ALD家系高危人群进行基因检测,明确患者后及早治疗,发现携带者后进行有效的产前诊断对尽量延缓患者临床症状进程和预防X-ALD出生缺陷发生具有重要意义。

本研究利用 PCR-外显子测序分析技术对一 X-ALD 家系进行基因诊断,发现该家系先证者 ABCD1 基因存在 c. 796 位 G>A 突变,使其 ABCD1 基因第 266 位密码子由甘氨酸密码子 GGG 突变为精氨酸密码子 AGG,经与数据库比对,发现该突变为致病性突变。在 X-ALD 突变数据库中(截至 2018 年 12 月 29 日),c. 796 位 G>A 突变报道次数在所有突变中占第 9 位,这表明该突变为 ABCD1 基因一个突变热点。亚洲人突变被报道的最多,其中印度有 3 例^[6]、日本 4 例^[7-9]、中国 5 例^[10],占比近 70%,该突变是否易在亚洲人群,尤其是中国人群中高发,尚需要更多该突变在亚洲及中国人群中的报道来证实。对该家系成员和 100 名健康男性 ABCD1 基因进行检测发现,100 名健康男性、先证者父亲(I 1)、孕妇丈夫(II 1)、先证者哥哥(II 3)及先证者妹妹(II 5) ABCD1 基因均未见突变,先证者母亲(I 2)和先证者姐姐(II 2) ABCD1 基因存在 c. 796 位 G>A 杂合突变(G/A),排除了基因多态性并明确此突变在该家系存在突变与疾病共分离现象,同时结合数据库中的报道,依据美国医学遗传学与基因组学会(ACMG)2015 年发表的序列变异临床意义判读标准和指南中对致病性突变判读要求^[11],该家系 ABCD1 基因 c. 796 位 G>A 突变符合 PS1+PS4+PM2+PP1+PP4 致病性突变判读规则。因此,笔者认为 ABCD1 基因 c. 796 位 G>A 突变是该家系先证者患病的根本原因。本研究于孕妇(II 2)孕 19 周时对其进行 X-ALD 产前诊断,在抽取其双胎羊水时分别标记为胎儿 1、胎儿 2。在产前诊断中,笔者利用 PowerPlex[®] 21 HS 基因分型系统来检测胎儿标本中是否含有母体成分,同时明确所取的两份标本为两个胎儿的而非 1 个胎儿取两份标本,以保证产前诊断结果的准确性。本研究发现两份胎儿标本均未含母源性成分,且 DNA 分型不同,与孕妇为母子/女关系,证明所取标本正确且无污染,可进行后续检测。该检测系统可明确各标本的 DNA 分型,笔者建议在产前诊断检测羊水标本有无污染尤其是在双胎产前诊断中检测羊水抽取是否正确时使用,以保证所取标本准确无误,保证产前诊断结果准确。产前诊断结果显示胎儿 1 SRY 阳性,ABCD1 基因未见突变,为健康男性胎儿;胎儿 2 SRY 阴性,ABCD1 基因存在 c. 796 位 G>A 杂合突变,为女性 X-ALD 携带者。

X-ALD 患者的临床表现复杂多样,与基因突变类型、VLCFAs 水平无明显关系,且有研究发现,同样的突变在不同的患者中,即使同一家系相同的基因突变类型,其临床表现仍可相差较远,可表现为临床症状严重的 CCALD,也可表现为发病较晚、症状偏轻的肾上腺脊髓神经病型等。此外,约 60% 的 X-ALD 女性携带者在 40 岁后会有一定的临床症状,以肾上腺脊髓神经病型为主^[12]。因此,在根据产前诊断结果

进行遗传咨询时,尽管该家系中先证者母亲及其姐姐作为 X-ALD 携带者目前均无临床症状,但笔者仍将胎儿 2 作为 X-ALD 携带者各种可能出现的情况予以详细告知,孕妇决定继续妊娠。产后随访,孕妇孕 37⁺2 周剖宫产 1 名男婴、1 名女婴,Apgar 评分均 10 分,至 2018 年 11 月 1 日两幼儿 4 岁 9 个月,随访未见异常,笔者会继续随访至其成年。

综上所述,本研究对一双胞胎 X-ALD 家系进行了基因诊断及产前诊断,为该家系提供了可靠的临床实验室诊断和遗传咨询,同时对 X-ALD 家系双胞胎产前诊断进行报道^[12],为 X-ALD 双胞胎产前诊断流程提供参考,对探讨 X-ALD 遗传异质性提供数据支持。

参考文献

- [1] LIBERATO A, MALLACK E J, AZIZ-BOSE R, et al. MRI brain lesions in asymptomatic boys with X-linked adrenoleukodystrophy[J]. *Neurology*, 2019, 92(15):e1698-1708.
- [2] NATARAJAN A, CHRISTOPHER R, NETRAVATHI M, et al. Flow injection ionization-tandem mass spectrometry-based estimation of a panel of lysophosphatidylcholines in dried blood spots for screening of X-linked adrenoleukodystrophy[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 495:167-173.
- [3] LI T, ZHANG Z J, MA X, et al. Prenatal diagnosis for a Chinese family with a de novo DMD gene mutation: A case report [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(50):e8814.
- [4] 李涛,侯巧芳,刘红彦,等. F8 基因新发双突变甲型血友病家系的基因及产前诊断[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2017, 34(4):486-489.
- [5] YEON G B, SO D, KANG P J, et al. Generation of an induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 42-year-old adult cerebral type X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) patient [J]. *Stem Cell Res*, 2019, 36:101425.
- [6] KUMAR N, TANEJA K K, KALRA V, et al. Genomic profiling identifies novel mutations and SNPs in ABCD1 gene: a molecular, biochemical and clinical analysis of X-ALD cases in India[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e25094.
- [7] SAKURAI K, OHASHI T, SHIMOZAWA N, et al. Characteristics of Japanese patients with X-linked adrenoleukodystrophy and concerns of their families from the 1st registry system [J]. *Brain Dev*, 2019, 41(1):50-56. (下转第 1758 页)

- [17] 葛俊辰, 陈志彪. 现代医学中粪菌移植的历史溯源[J/CD]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 2(12):2453.
- [18] 曾雪芹, 陈悦, 张湘卓, 等. 粪菌移植治疗肠道微生态失调所致疾病的研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(1):127-131.
- [19] SURAWICZ C M, BRANDT L J, BINION D G, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(4): 478-498.
- [20] BORODY T J, WARREN E F, LEIS S, et al. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2003, 37(1):42-47.
- [21] ANDERSON J L, EDNEY R J, WHELAN K. Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 36(6):503-516.
- [22] ZHANG F M, WANG H G, WANG M, et al. Fecal microbiota transplantation for severe enterocolonic fistulizing Crohn's disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(41):7213-7216.
- [23] CUI B, XU F, ZHANG F. Methodology, not concept of fecal microbiota transplantation, affects clinical findings [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(1):285-286.
- [24] 张发明. 将标准化粪菌移植推向主流[J]. 中华消化内镜杂志, 2014, 31(2):61-63.
- [25] D'ODORICO I, DI BELLA S, MONTICELLI J, et al. Role of fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease[J]. *J Dig Dis*, 2018, 19(6):322-334.
- [26] 曾雪芹, 陈悦, 张湘卓, 等. 粪菌移植治疗肠道微生态失调所致疾病的研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(1):127-131.
- [27] HEDIN C R, STAGG A J, WHELAN K, et al. Family studies in crohn's disease: new horizons in understanding disease pathogenesis, risk and prevention[J]. *Gut*, 2012, 61(2):311-318.
- [28] 张维兰, 罗和生. 粪菌移植治疗炎性肠病的研究进展[J]. 疑难病杂志, 2019, 18(1):101-106.
- [29] 郭悦承, 黄春兰, 陆颖影, 等. 粪菌移植治疗现状及其在炎症性肠病中的应用[J]. 国际消化病杂志, 2018, 38(5):294-296.
- [30] ISHILAWA D, SASAKI T, OSADA T, et al. Changes in intestinal microbiota following combination therapy with fecal microbial transplantation and antibiotics for ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23(1):116-125.
- [31] PARAMSOTHY S, KAMM M A, KAAKOUSH N O, et al. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2017, 389(10075):1218-1228.

(收稿日期:2019-10-28 修回日期:2020-02-22)

(上接第 1753 页)

- [8] MATSUKAWA T, ASHEUER M, TAKAHASHI Y, et al. Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes[J]. *Neurogenetics*, 2011, 12(1):41-50.
- [9] OHKUMA Y, HAYASHI T, YOSHIMINE S, et al. Retinal ganglion cell loss in X-linked adrenoleukodystrophy with an ABCD1 mutation (Gly266Arg) [J]. *Neuroophthalmology*, 2014, 38(6):331-335.
- [10] MENG Q, ZHANG S P, SHI H R, et al. A novel missense mutation in the ABCD1 gene of a Chinese boy diagnosed with X-linked adrenoleukodystrophy: case report [J]. *Neurol Sci*, 2019, 40(5):1093-1096.
- [11] 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.
- [12] CHEN Y H, LEE Y C, TSAI Y S, et al. Unmasking adrenoleukodystrophy in a cohort of cerebellar ataxia[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177296.

(收稿日期:2019-10-11 修回日期:2020-03-09)