

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.07.016

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1097.R.20221226.1900.014.html\(2022-12-27\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1097.R.20221226.1900.014.html(2022-12-27))

全外显子组测序鉴定盐酸氢吗啡酮镇痛引发呼吸抑制反应相关联的基因变异位点

李妮,张媛媛,杨晓英,王正林[△]

(重庆市九龙坡区人民医院肿瘤科 400050)

[摘要] **目的** 探索与盐酸氢吗啡酮镇痛后出现呼吸抑制反应相关联的基因变异位点。**方法** 采用病例-对照研究,选取 10 例癌症患者作为研究主体,给予盐酸氢吗啡酮镇痛,记录患者是否存在呼吸抑制反应,并采用全外显子组测序(WES)技术分析他们的基因变异位点。**结果** 10 例患者中有 4 例在使用盐酸氢吗啡酮镇痛后出现呼吸抑制反应;WES 结果表明,在 4 例阳性病例中同时检测出的基因变异有 5 871 种,包括 5 570 个单核苷酸多态性(SNP)和 301 个小片段的插入或缺失(Indel)。通过差减法扣除在 6 个阴性病例中出现的 SNP 和 Indel,最终得到与盐酸氢吗啡酮镇痛后出现呼吸抑制反应密切相关的 5 个 SNP (rs6780995、rs17136118、rs1048445、rs12931472 和 rs72981971)。**结论** 成功鉴定出 5 个可能与盐酸氢吗啡酮镇痛后出现呼吸抑制反应相关联的差异性 SNP,需进一步研究证实其临床意义。

[关键词] 氢吗啡酮;全外显子组测序;基因变异位点;呼吸抑制**[中图分类号]** R614**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)07-1035-05

Identification of gene mutation sites associated with respiratory inhibition induced by hydromorphone hydrochloride analgesia by total exon sequencing

LI Ni,ZHANG Yuanyuan,YANG Xiaoying,WANG Zhenglin[△]

(Department of Oncology,Jiulongpo District People's Hospital,Chongqing 400050,China)

[Abstract] **Objective** To explore the gene mutation sites associated with respiratory inhibition after hydromorphone hydrochloride analgesia. **Methods** Case-control study was performed. Ten cancer patients were selected as the subjects of the study,they were given hydromorphone hydrochloride analgesia,and the respiratory inhibition was recorded. Whole exon sequencing (WES) was used to detect gene mutation sites. **Results** Among the 10 patients,4 patients had respiratory inhibition after hydromorphone hydrochloride analgesia. The results of WES showed that 5 871 gene variants were detected simultaneously in the 4 positive cases,including 5 570 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 301 small fragment insertions or deletions (Indels). SNPs and Indels in 6 negative cases were deducted,and 5 SNPs (rs6780995,rs17136118,rs1048445,rs12931472 and rs72981971) that may be closely related to the respiratory inhibition after hydromorphone hydrochloride analgesia were finally obtained. **Conclusion** Five SNPs that may be associated with respiratory inhibition after hydromorphone hydrochloride analgesia were successfully identified,and further study is needed to confirm their clinical significance.

[Key words] hydromorphone;whole exon sequencing;gene variants;respiratory depression

盐酸氢吗啡酮是一种具有良好镇痛效果的半合成阿片类药物,广泛用于术后镇痛、癌性疼痛及软组织创伤镇痛等临床治疗中^[1-2],但部分患者注射盐酸氢吗啡酮后,可能会引发呼吸抑制等不良反应^[3]。研究表明,麻醉镇痛不良反应的发生与患者体内的基因多态性密切相关^[4-7]。全外显子组测序(whole exome sequencing,WES)是近年发展起来检测人遗传突变的一种技术,已被广泛应用于产前检测和癌症的基因组研究和遗传疾病致病基因挖掘^[8-11]。目前 WES 尚未

应用于鉴定盐酸氢吗啡酮镇痛后不良反应相关联的基因多态性。本研究选取 10 例中重度癌症疼痛患者为观察对象,记录他们在使用盐酸氢吗啡酮后的不良反应,并进行血液 DNA WES 分析,旨在寻找与使用盐酸氢吗啡酮而引发的呼吸抑制反应相关联的基因变异位点,为后续个性化用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择本院 2020 年 7 月至 2022 年 1 月收治的 10

例癌症患者作为研究对象,其中男 4 例,女 6 例,年龄 55~75 岁。患者一般资料见表 1。本研究通过本院伦理委员会审批。研究遵循《赫尔辛基宣言》和良好临床实践的道德原则进行。

表 1 患者一般资料

病例序号	年龄(岁)	性别	临床诊断疾病	盐酸氢吗啡酮剂量(mg)	镇痛方式	有无呼吸抑制反应
病例 1	55	女	骨肉瘤	2	皮下注射	有
病例 2	71	女	肺癌	2	皮下注射	有
病例 3	66	男	直肠癌	1	皮下注射	有
病例 4	75	女	卵巢癌	1	皮下注射	有
病例 5	60	男	肺癌	1	皮下注射	无
病例 6	61	男	结肠癌伴肝转移	2	皮下注射	无
病例 7	64	女	阴道鳞癌	2	皮下注射	无
病例 8	74	女	多发性骨髓瘤	1	皮下注射	无
病例 9	65	男	肺癌	2	皮下注射	无
病例 10	66	女	子宫恶性肿瘤	2	皮下注射	无

1.2 镇痛方法

患者进行皮下注射盐酸氢吗啡酮镇痛:1~2 mg。

1.3 呼吸抑制反应判定标准

研究者根据国际临床试验标准 CTCAE V5.0 对不良反应进行评估。呼吸抑制反应主要表现为患者自觉吸气困难、呼吸加速,伴随冷汗、烦躁、胸闷、张口呼吸,甚至有窒息、濒死感等反应。

1.4 全血标本收集和基因组 DNA 提取

全血标本收集:所有患者于镇痛前采取全血标本 3 mL 于抗凝剂乙二胺四乙酸(EDTA,1 mg/mL)中,放入超低温冰箱备用。按照 BIOG Blood DNA Isolate Kit(51018)说明书进行基因组 DNA 提取,使用 NanoDrop 1000(Nanodrop 型,美国 Thermo Scientific 公司)超微量分光光度计测定 DNA 浓度并判断质量。

1.5 WES 建库及测序

取 0.5 μ g 样品 DNA 用 Bioruptor NGS 超声仪(德国 Diagenode 公司)随机打断成 200~350 bp 的片段,分别用 Truseq Nano DNA Library Prep 试剂盒(美国 Illumina 公司)和 SeqCap EZ Exome + UTR Library (96M) 试剂盒(瑞士 Roche 公司)进行建库和全外显子组捕获,经 PCR 线性扩增后,将质检合格文库进行测序。测序平台为 Illumina Novaseq™ 6000,测序模式为 PE150。WES 实验委托杭州联川生物技术股份有限公司完成。

1.6 数据分析及筛选

获得原始测序序列后,过滤掉接头序列,将过滤后的测序数据通过 BWA 比对到参考基因组(GRCh37.1/h919)。然后用 Samtools 对比对结果进行排序,再用 Picard 标记重复序列。预处理后的序

列,根据 GATK 的分析流程,对突变位点进行鉴定,得到各样本中存在的单核苷酸多态性(SNP)位点和小片段的插入或缺失(Indel)信息。将全部变异位点与 1000Genome、ExAC、GnomAD 等数据库进行比对分析,筛选出低频突变和新生突变。使用 Variant Effect Predictor (VEP)等软件,根据 Ensembl Variation 和 Ensembl Regulatory Build 等数据库中的注释对突变的位置及突变影响程度进行打分评判,只选择评判为高影响(High)和中等影响(Moderate)的突变位点。筛选出 4 例阳性患者(即出现呼吸抑制反应,包括病例 1~4)同时存在的变异位点,认定为候选位点,在此基础上减去另外 6 例阴性患者(未出现呼吸抑制反应)中任意一例出现的变异位点,最终获得密切相关联的变异位点。

2 结果

2.1 WES 数据质量评估

10 个样本测序原始 Reads 数目在 70 835 464~114 780 836,过滤之后质量合格的测序 Reads 数目和可以比对上参考基因组的 Reads 数目占测序原始 Reads 数目的 99%以上,平均插入片段的长度大于 149 bp(理论值为 150 bp),外显子捕获区平均测序深度 $>100\times$, $\geq 10\times$ 测序深度下的覆盖度 $>96\%$ 。见表 2。表明这 10 个样本全外显子组建库和测序质量优良,满足后续分析要求。

2.2 SNP 和 Indel 的鉴定与筛选

预处理后的序列,根据 GATK 的分析流程,对突变位点进行分析,得到全部的突变位点(SNP 和 Indel)信息,并采用 VEP 等软件,对突变位点进行注释,并对突变的位置及突变对基因的影响程度进行打分评判,筛选出打分为“高影响”和“中等影响”的突变位点,如无义突变、移码突变、剪切位点突变、终止密码子获得/丢失、错义突变等对蛋白功能影响较大的变异位点。最终筛选到的 SNP 数目在 5 609~11 729 个,平均包含 9 838 个,见表 3。其中打分评判为“高影响”的 SNP 占比为 1.5%~1.9%,新鉴定到的 SNP 占比为 1.8%~6.0%。筛选到的 Indel 数目在 652~714 个,平均包含 681 个,见表 4。其中打分评判为“高影响”的 Indel 占比为 42.9%~47.0%,新鉴定到的 Indel 占比为 34.4%~38.2%。

2.3 与注射盐酸氢吗啡酮后出现呼吸抑制反应相关联的突变位点筛选

筛选在 4 例阳性患者中同时鉴定到的 SNP 和 Indel,最终获得 5 570 个 SNP 和 301 个 Indel。将 6 例阴性病例中鉴定的 SNP 和 Indel 取并集,最终获得 22 235 个 SNP 和 1 446 个 Indel。将阳性病例中共有的 SNP 和 Indel,扣减阴性病例中存在的 SNP 和 Indel,最终得到与注射盐酸氢吗啡酮后出现呼吸抑制反应相关联的 SNP 数目为 5 个,Indel 为 0。5 个 SNP 均为数据库中存在的 SNP,它们依次为:rs6780995、

rs17136118、rs1048445、rs12931472 和 rs72981971,见 发生错译突变。
表 5。这 5 个 SNP,均可导致相应基因所编码的蛋白

表 2 外显子组测序数据统计

病例序号	原始测序 Read 数目	质量合格的 Read 数目 及比例[n(%)]	可比对上基因组的 Read 数目 及比例[n(%)]	≥10×测序深度 下的覆盖度(%)
病例 1	94 416 920	93 475 254(99.00)	93 315 320(99.83)	97.21
病例 2	94 050 638	93 122 652(99.01)	92 995 328(99.86)	97.27
病例 3	105 007 826	104 074 346(99.11)	103 934 440(99.87)	97.52
病例 4	70 835 464	70 244 042(99.17)	70 150 925(99.87)	96.81
病例 5	107 741 330	106 797 606(99.12)	106 609 566(99.82)	97.74
病例 6	87 628 000	86 926 042(99.20)	86 758 640(99.81)	97.62
病例 7	89 108 566	88 340 770(99.14)	88 203 472(99.84)	97.40
病例 8	87 870 412	87 164 856(99.20)	87 013 135(99.83)	97.03
病例 9	78 056 710	77 365 962(99.12)	77 211 130(99.80)	97.36
病例 10	114 770 836	113 627 952(99.00)	113 449 449(99.84)	97.44

表 3 本研究鉴定到的 SNP 统计

病例序号	总 SNP 数目(n)	“高影响” SNP[n(%)]	“中等影响” SNP[n(%)]	数据库中已经存在 的 SNP[n(%)]	本研究新鉴定到 的 SNP[n(%)]
病例 1	11 729	227(1.9)	11 502(98.1)	11 038(94.0)	691(6.0)
病例 2	5 615	86(1.5)	5 529(98.5)	5 516(98.2)	99(1.8)
病例 3	5 610	86(1.5)	5 524(98.5)	5 511(98.2)	99(1.8)
病例 4	5 609	86(1.5)	5 523(98.5)	5 509(98.2)	100(1.8)
病例 5	11 704	219(1.9)	11 485(98.1)	11 080(94.7)	624(5.3)
病例 6	11 632	199(1.7)	11 433(98.3)	11 010(94.7)	622(5.3)
病例 7	11 549	209(1.8)	11 340(98.2)	10 959(94.9)	590(5.1)
病例 8	11 641	200(1.7)	11 441(98.3)	11 031(94.8)	610(5.2)
病例 9	11 637	201(1.7)	11 436(98.3)	10 938(94.0)	699(6.0)
病例 10	11 657	214(1.8)	11 443(98.2)	11 016(94.5)	641(5.5)

表 4 本研究鉴定到的 Indel 统计

病例序号	总 Indel 数目(n)	“高影响” Indel [n(%)]	“中等影响” Indel[n(%)]	数据库中已经存在 的 Indel[n(%)]	本研究新鉴定到 的 Indel[n(%)]
病例 1	652	372(57.1)	280(42.9)	421(64.6)	231(35.4)
病例 2	714	403(56.4)	311(43.6)	442(61.9)	272(38.2)
病例 3	705	387(54.9)	318(45.1)	422(59.9)	283(40.1)
病例 4	672	365(54.3)	307(45.7)	423(62.9)	249(37.1)
病例 5	690	387(56.1)	303(43.9)	429(62.2)	261(37.8)
病例 6	674	370(54.9)	304(45.1)	424(62.9)	250(37.1)
病例 7	668	353(52.8)	315(47.2)	438(65.6)	230(34.4)
病例 8	679	375(55.2)	304(44.8)	426(62.7)	253(37.3)
病例 9	706	374(53.0)	332(47.0)	439(62.2)	267(37.8)
病例 10	652	349(53.5)	303(46.5)	408(62.6)	244(37.4)

表 5 与盐酸氢吗啡酮镇痛后出现呼吸抑制反应相关联的 5 个 SNP

基因编号	基因名称	SNP 编号	SNP 位置	核苷酸变化	氨基酸变化
ENSG00000144730	IL17RD	rs6780995	chr3:57138419	G>A	T>M
ENSG00000161040	FBXL13	rs17136118	chr7:102495249	T>C	Y>C

续表 5 与盐酸氢吗啡酮镇痛后出现呼吸抑制反应相关联的 5 个 SNP

基因编号	基因名称	SNP 编号	SNP 位置	核苷酸变化	氨基酸变化
ENSG00000052749	RRP12	rs1048445	chr10:99116903	C>T	R>Q
ENSG00000091262	ABCC6	rs12931472	chr16:16281007	A>G	V>A
ENSG00000167769	ACER1	rs72981971	chr19:6312290	T>C	M>V

3 讨 论

盐酸氢吗啡酮广泛运用于肿瘤患者癌症疼痛控制治疗,部分患者用药后会出现呼吸抑制、皮肤瘙痒、胃肠道及神经系统等不良反应^[1-3]。其中,最常见的不良反应是发生中枢抑制作用,引发呼吸抑制,如不能及时干预,往往会造成不可逆的中枢神经损伤并危及生命^[1-3]。现有研究表明,盐酸氢吗啡酮注射人体后,分别由细胞中的 OPRM1 和 ABCB1 基因编码的蛋白负责识别和转运,其最终在肝脏中通过葡萄糖醛酸代谢随尿液排出体外^[12]。参与盐酸氢吗啡酮代谢的基因主要包括细胞色素 P450 家族蛋白基因如 CYP2D6、CYP3A4 和葡萄糖醛酸基转移酶基因 UGT2B7^[12]。因此与盐酸氢吗啡酮镇痛相关的基因多态性主要表现为受体蛋白编码基因、转运蛋白编码基因和代谢酶编码基因的多态性,如 OPRM1(rs1799971)、ABCB1(rs1045642)、CYP2D6(rs16947)和 UGT2B7(rs7438135)等^[4-7]。但由于阿片类药物镇痛后不良反应的发生机制复杂多样,只有鉴定更多的基因多态性,才可以更加有效地预估不良反应的发生。

随着基因测序技术的迅速发展,WES 成为现阶段研究疾病遗传学的热点方法,其通过捕获外显子区域的 DNA 序列,富集后进行高通量测序,并结合公共数据库提供的外显子组数据,识别和研究与疾病相关的遗传突变,寻找编码蛋白功能区的遗传突变,从而更好地解释变异信息之间的关联和疾病的致病机制^[8]。该技术准确性高、可重复性好、定位精确,其可以在基因组水平检测患者的外显子区域的 SNP 和 Indel,可以探寻复杂疾病的罕见突变,从而为疾病的早期分子诊断、预防甚至治疗提供遗传学基础^[8-11]。例如 2020 年美国华盛顿大学医疗中心神经外科主任 BACKMAN 等^[10]的一项研究,通过对 454 787 名英国人的 WES 和分析,研究人员共鉴定到 1 200 万个基因变异位点,包括约 100 万个基因功能丧失的变异和约 180 万个有害变异。将鉴定的变异位点与 3 994 个与健康相关的性状指标进行关联分析时,研究人员发现了 564 个与健康性状高度相关联的基因。

本研究选择 10 例癌症患者为研究主体,记录他们在使用盐酸氢吗啡酮镇痛后的不良反应,并进行 WES 和分析,最后筛选与不良反应呼吸抑制反应相关联的基因变异位点,结果发现了 5 个密切相关的 SNP 位点,它们均导致所在基因的编码蛋白发生错义突变。rs6780995 突变位于 ENSG00000144730 上,该基因编码白细胞介素-17A(IL-17A)受体蛋白

(IL17RD),IL17RD 参与介导 IL-17A 下游的炎症促进相关基因的表达^[13]。rs17136118 突变所在的基因 ENSG00000161040 编码一种 SCF(SKP1-CUL1-F-box)-家族 E3 泛素连接酶的结合决定簇蛋白 FBXL13,该基因的缺失导致中心体中 CEP192 和 γ -微管蛋白的积累,引发细胞运动缺陷并可能促进癌症的发生^[14]。rs1048445 突变所在的基因 ENSG00000052749 编码一个核仁蛋白 RRP12,其通过抑制 p53 的稳定性,在细胞毒性应激期间对细胞存活起至关重要的作用^[15]。rs72981971 突变所在的基因 ENSG00000161040 编码一个碱性神经酰胺酶 ACER1,其催化长链神经酰胺水解生成鞘氨醇,在钙离子诱导的人表皮角质形成细胞生长停滞和分化中发挥重要作用^[16]。而 rs12931472 突变所在的基因 ENSG00000091262 编码一个 ATP-结合转运蛋白 ABCC6,又名多药物抗性蛋白 6(MRP6),其已经被证实与多种药物的抗性及多种疾病的发生有关^[17-21]。例如 ABCC6 基因突变会导致弹性假黄瘤和婴儿全身动脉钙化等疾病的发生^[19-21]。现有的研究表明,与盐酸氢吗啡酮镇痛相关的基因多态性主要表现为受体蛋白编码基因、转运蛋白编码基因和代谢酶编码基因的多态性^[4-7],ABCC6 为 ATP-结合转运蛋白^[18],推测其可能和 ABCB1 功能类似,参与盐酸氢吗啡酮的转运而影响镇痛后不良反应的发生。后续研究将进一步验证这些 SNP 位点对相应蛋白功能的影响,及它们在盐酸氢吗啡酮镇痛后出现呼吸抑制反应中的作用。

本文首次采用 WES 技术鉴定与镇痛药不良反应相关联的基因突变位点,获得 5 个高度可能的基因变异位点。本研究存在一些局限性,主要表现为收集的样本数量偏少,特别是临床观察到的镇痛后出现呼吸抑制反应患者较少,且不同患者的疾病类型和年龄差异较大。但通过严格的关联分析筛选,本研究鉴定到了 5 个 SNP,可以为后续研究和临床治疗提供一定的参考。

参考文献

- [1] NIE Z B, LI Z H, LU B, et al. Hydromorphone vs sufentanil in patient-controlled analgesia for post-operative pain management: a meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101(3): e28615.
- [2] REED R, TRENHOLME N, SKRZYPCZAK H, et

- al. Comparison of hydromorphone and butorphanol for management of pain in equine patients undergoing elective arthroscopy: a randomized clinical trial [J]. *Vet Anaesth Analg*, 2022, 49(5): 490-498.
- [3] SPÉNARD S, GÉLINAS C, D TROTTIER E, et al. Morphine or hydromorphone; which should be preferred? A systematic review [J]. *Arch Dis Child*, 2021, 106(10): 1002-1009.
- [4] XIA S, PERSAUD S, BIRNBAUM A. Exploratory study on association of single-nucleotide polymorphisms with hydromorphone analgesia in ED [J]. *Am J Emerg Med*, 2015, 33(3): 444-447.
- [5] YEE M M, JOSEPHSON C, HILL C E, et al. Cytochrome P450 2D6 polymorphisms and predicted opioid metabolism in African American children with sickle cell disease [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2013, 35(7): e301-305.
- [6] CAMPA D, GIOIA A, TOMEI A, et al. Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2008, 83(4): 559-566.
- [7] DARBARI D S, VAN SCHAIK R H, CAPARELLI E V, et al. UGT2B7 promoter variant-840G>A contributes to the variability in hepatic clearance of morphine in patients with sickle cell disease [J]. *Am J Hematol*, 2008, 83(3): 200-202.
- [8] CHOI M, SCHOLL U I, JI W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(45): 19096-19101.
- [9] JELIN A C, VORA N. Whole exome sequencing: applications in prenatal genetics [J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2018, 45(1): 69-81.
- [10] BACKMAN J D, LI A H, MARCKETTA A, et al. Exome sequencing and analysis of 454, 787 UK Biobank participants [J]. *Nature*, 2021, 599(7886): 628-634.
- [11] HU Z, LI Z, MA Z, et al. Multi-cancer analysis of clonality and the timing of systemic spread in paired primary tumors and metastases [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(7): 701-708.
- [12] HUTCHINSON M R, MENELAOU A, FOSTER D J, et al. CYP2D6 and CYP3A4 involvement in the primary oxidative metabolism of hydrocodone by human liver microsomes [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2004, 57(3): 287-297.
- [13] SU Y, HUANG J, ZHAO X, et al. Interleukin-17 receptor D constitutes an alternative receptor for interleukin-17A important in psoriasis-like skin inflammation [J]. *Sci Immunol*, 2019, 4(36): eaau9657.
- [14] FUNG E, RICHTER C, YANG H B, et al. FBXL13 directs the proteolysis of CEP192 to regulate centrosome homeostasis and cell migration [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(3): e44799.
- [15] CHOI Y J, LEE H W, LEE Y S, et al. RRP12 is a crucial nucleolar protein that regulates p53 activity in osteosarcoma cells [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 4351-4358.
- [16] SUN W, XU R, HU W, et al. Upregulation of the human alkaline ceramidase 1 and acid ceramidase mediates calcium-induced differentiation of epidermal keratinocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(2): 389-397.
- [17] PARREIRA B, CARDOSO J C R, COSTA R, et al. Persistence of the ABCC6 genes and the emergence of the bony skeleton in vertebrates [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6027.
- [18] LE SAUX O, MARTIN L, AHERRAHROU Z, et al. The molecular and physiological roles of ABCC6: more than meets the eye [J]. *Front Genet*, 2012, 3: 289.
- [19] BERGEN A A, PLOMP A S, SCHUURMAN E J, et al. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(2): 228-231.
- [20] RINGPFEIL F, LEBWOHL M G, CHRISTIANO A M, et al. Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(11): 6001-6006.
- [21] NITSCHKE Y, BAUJAT G, BOTSCHEN U, et al. Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6 [J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(1): 25-39.