

0.802,血清 HE4 用于卵巢癌诊断的 AUC 为 0.889, HE4 和 CA125 联合用于卵巢癌诊断的 AUC 为 0.949。说明联合检测 HE4 和 CA125 对卵巢肿瘤实验室诊断有一定的临床价值,可以作为卵巢癌的肿瘤标志物应用于临床。

参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer statistics 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300
- 2 Kang WD, Choi HS, Kim SM. Value of serum CA125 levels in patients with high-risk, early stage epithelial ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2010, 116(1): 57-60
- 3 Ruggeri G, Bandiera E, Zanotti L, et al. HE4 and epithelial ovarian cancer: comparison and clinical evaluation of two immunoassays and a combination algorithm [J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(15-16): 1447-1453
- 4 Cramer DW, Bast RC Jr, Berg CD, et al. Ovarian cancer biomarker per-

formance in prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial specimens [J]. Cancer Prev Res, 2011, 4(3): 365-374

- 5 Nicole U, Thorpe JD, Bergan LA, et al. Potential role of HE4 in multimodal screening for epithelial ovarian cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103: 1630-1634
- 6 Andersen MR, Goff BA, Lowe KA, et al. Use of a symptom index, CA125, and HE4 to predict ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2010, 116(3): 378-383
- 7 Urban N, Thorpe J, Karlan BY, et al. Interpretation of single and serial measures of HE4 and CA125 in asymptomatic women at high risk for ovarian cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012, 21(11): 2087-2094
- 8 Kalapotharakos G, Ascitto C, Henic E, et al. High preoperative blood levels of HE4 predicts poor prognosis in patients with ovarian cancer [J]. J Ovarian Res, 2012, 5(1): 20

(收稿日期: 2014-01-25)

(修回日期: 2014-03-05)

全外显子组测序技术检出 Kallmann syndrome 患者 KAL1 基因新突变

李 斌 徐洪丽 段 婧 陈蓉蓉 聂 敏 张宏冰 伍学焱

摘要 目的 分析 Kallmann syndrome 家系患者的分子遗传机制。方法 利用全外显子组测序技术对先证者进行测序分析,按照 ACMG 解读规则筛选致病性突变, Sanger 测序对所有家系成员验证突变结果。结果 捕获且比对到目标区的碱基量为 3418.98Mb,平均测序深度为 77.66X,覆盖度为 99.23%,共检出 5056 个变异,3174 为罕见变异(RSV), KAL1 基因 c.1735_1736insT 突变为疑似致病性突变,且满足家系共分离。结论 KAL1 基因 c.1735_1736insT 框移突变为新的疑似致病性突变。

关键词 Kallmann syndrome KAL1 全外显子组测序

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Whole-exome Sequencing Identified a Novel KAL1 Mutation in a Pedigree with Kallmann Syndrome. Li Bin, Xu Hongli, Duan Jing, et al. Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences CAMS, School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005, China

Abstract Objective To examine the molecular genetic pathogenesis in a pedigree with Kallmann Syndrome. **Methods** Whole-exome sequencing was performed on the proband, and the interpretations of variations were finished according the ACMG recommendation. Identified mutations were validated in all family members available by Sanger sequencing. **Results** A total of 3418.98Mb bases were captured and mapped to targeted region. The mean depth of targeted region was 77.66X with 99.23% coverage. 5056 sequencing variations were detected, including 3174 rare sequencing variations. A novel mutation c.1735_1736insT in KAL1 gene were identified as likely pathogenic, which is co-separated in the pedigree. **Conclusion** c.1735_1736insT in KAL1 gene was likely a novel pathogenesis in Kallmann Syndrome.

Key words Kallmann syndrome; KAL1; Whole-exome sequencing

作者单位: 100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学、医学分子生物学国家重点实验室(李斌、段婧、陈蓉蓉、张宏冰); 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院内分泌科(徐洪丽、聂敏、伍学焱)

通讯作者: 伍学焱, 电子信箱: wsheyan@vip.sina.com

Kallmann syndrome 又名促性腺激素分泌不足性腺功能减退伴嗅觉丧失症,是由下丘脑促性腺激素释放激素 (GnRH) 合成与分泌不足或其行为异常导致的遗传性疾病^[1,2]。其主要临床表现为性腺功能障碍与嗅觉的缺失或减退,也可伴有各种躯体异常,包括面中线发育缺陷,如唇裂、腭裂、肾脏发育异常,以及神经系统功能异常,如感觉性听力下降,镜像运动,眼球运动异常及小脑共济失调等。GnRH 神经元缺失或迁移异常导致 GnRH 激素分泌不足,引起下丘脑-垂体-性腺轴功能低下,从而无法启动青春期发育,导致性腺功能减退^[3]。GnRH 神经元在胚胎发育的过程中起源于嗅板,在鼻腔沿嗅神经上行定位于下丘脑的弓形核,并在此合成分泌 GnRH 激素^[4,5]。因此 GnRH 缺失通常因嗅球与嗅束不发育或发育不全而伴有嗅觉功能障碍。

Kallmann syndrome 在男性中的发生率约为 1:8000,而在女性中的发生率仅为男性的 1/5,其具有高度的遗传异质性,患者多为散发,也可呈家族性遗传,其遗传方式多样,包括常染色显性遗传、常染色体隐性遗传、X 染色体连锁遗传,也可能呈双基因或寡基因遗传^[6-12]。目前已鉴定了 20 多个基因的突变可导致疾病的发生,包括 KAL1 (MIM 300836)、NR0B1 (MIM 300473)、GNRHR (MIM 138850)、FGFR1 (MIM 136350)、KISS1R (MIM 604161)、TACR3 (MIM 162332)、TAC3 (MIM 162330)、FGF8 (MIM 600483)、CHD7 (MIM 608892)、PROKR2 (MIM 607123)、PROK2 (MIM 607002)、GNRH1 (MIM 152760)、NELF (MIM 608137)、WDR11 (MIM 606417)、PCSK1 (MIM 162150)、LEP (MIM 164160)、LEPR (MIM 601007)、KISS1 (MIM 603286)、HS6ST1 (MIM 604846)、SEMA3A (MIM 603961) 等。传统基因检测多采用单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP)、变性高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography, DH-PLC) 及 Sanger 测序等方法来实现,其通量低,耗时且费用昂贵,而随着新一代测序技术的日臻完善及测序成本的不断降低,高通量测序技术越来越多地应用到人类疾病的临床与基础研究中来。本研究采用全外显子组测序技术完成先证者的变异检测,按照美国医学遗传学和基因组学学院 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 解读规则筛选致病性突变,并在家系中进行 Sanger 验证,旨在探究 Kallmann syndrome 家系患者的分子遗传学机制^[13,14]。

材料与方法

1. 材料:(1)血液标本来源:用于测序分析的血液样本取自北京协和医院 2011 年收治的 Kallmann syndrome 患者, Sanger 测序用的血液样本取自该患者及其家属。(2)试剂:全基因组 DNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司,序列捕获洗脱、杂交试剂盒购自 ROCHE 公司, Nimblegene 44M 全外显子芯片购于 ROCHE 公司。T4 DNA 连接酶、T4 多核苷酸激酶、Klenow 大片段酶购自 ENZYMATICS 公司, Taq 酶、LA Taq 酶购自 TaKaRa 公司, DNA marker D2000 购自 TIANGEN 公司, Hiseq2000 双向测序及生物信息学分析在华大基因完成。

2. 方法:(1)全基因组 DNA 提取:抽取先证者及其家属外周血 5ml 置于 EDTA-K2 真空抗凝管中,采用全基因组 DNA 提取试剂盒 (QIAamp DNA Blood MiDi Kit) 提取 DNA, NanoDrop 与琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。(2)全外显子芯片捕获测序:取 5 μ g 质量合格的 DNA 样品, Covaris 超声仪随机打断, Ampure Beads 磁珠纯化 200bp 左右的 DNA 片段。修复 DNA 末端、添加“A”碱基及测序接头,纯化后进行 Pre-LMP-PCR 反应。产物与芯片经 Thermomixer 仪 42℃ 恒温杂交 64~72h, 洗脱、回收、扩增目的片段。Agilent2100 与 QPCR 检测文库片段大小与富集度,质检合格后由 Hiseq2000 完成双向测序。(3)生物信息学分析:下机数据经质控去除低质量、被污染的 reads, BWA 软件将 reads 比对到参考基因组 (HG19), Picard 软件标记重复 reads, Realigner Target Creator 与 IndelRealigner 软件局部比对, Base Recalibrator 软件校正碱基质量值, Haplotype Caller 软件检测 SNP、InDel 变异, Bedanno 软件注释编码区 (NM_000216.2) 及其侧翼序列的变异结果,通过千人基因组数据库 (1000Genome)、组单体型数据库 (HapMap)、寡核苷酸多态性数据库 (dbSNP) 及人类基因突变数据库 (human gene mutation database, HGMD) 注释变异频率等相关信息。(4)变异数据解读:按照 ACMG 解读规则筛选致病性突变。(5)Sanger 测序验证候选突变:PCR 引物序列为 F:5'-GCT CTC CTG CCT CCA TCT CA-3', R:5'-CAG TAG ATA CCA ATG ACA CAG ACA TAG TAC-3', 95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 58℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 35 个循环, 72℃ 延伸 10min; PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳检测后由 ABI 3730 完成 Sanger 测序; SeqMan 软件分析 Sanger 测序峰图结果。

3. 统计学方法:采用 R 软件完成测序下机质控数据及测序数据量的统计, 计算均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 并绘图。

结 果

1. 高通量测序数据质控:先证者样本 (KS12) DNA 文库插入片段大小取其众数为 184bp, reads1 中碱基平均测序错误率为 0.44%, reads2 中碱基平均测序错误率为 0.53%。reads1 中 GC 碱基含量均值为 45.00%, reads2 中 GC 碱基含量均值为 45.01%, reads1 中碱基质量值 ≥ 20 (Q20) 比例为 97.09%, 碱基质量值 ≥ 30 (Q30) 比例为 91.98%, reads2 中碱基

质量值 ≥ 20 (Q20) 为比例 95.82%, 碱基质量值 ≥ 30 (Q30) 比例为 90.00%, 质控数据合格。

2. 高通量测序数据产出量: Hiseq2000 PE91 + 8 + 91 双向测序共得到 73 055 374 条 reads 比对到基因组 HG19, 48 236 690 条 reads (66.03%, 3418.98Mb) 比对到目标区域, 58 562 817 条 reads 比对到侧翼序列区, 目标捕获区平均测序深度为 77.66X。覆盖度为 99.23%, $\geq 4X$ 测序深度下的覆盖度为 98.05%, $\geq 10X$ 测序深度下的覆盖度为 95.50%, $\geq 20X$ 测序深度下的覆盖度为 89.55%, 数据量正常, 符合实验设计要求。

3. 基因突变结果: 样本 KS12 测序结果共检出 5056 个变异位点, 3174 个为罕见变异 (MAF $\leq 1\%$), 按照 ACMG 解读规则筛选出 KAL1 基因 c.1735_1736insT (p.Y579LfsX13) 框移突变, 经判定其为疑似致病突变。该突变发生在 KAL1 基因第 12 号外显子区, 可导致其编码产物 anosmin-1 在第 579 位氨基酸位点发生移码, 并在第 592 位氨基酸终止编码, 产生截短的蛋白, 导致其第 4 个纤维连结蛋白 3 (fibronectin III) 结构域的缺失 (图 1), 从而影响 anosmin-1 蛋白功能。Sanger 验证结果表明, 该家系包括先证者在内的 3 名男性患者 (KS12、KS11、KS03) 均为 c.1735_1736insT 纯合突变, 3 名女性携带者 (KS01、KS002、KS10) 为 c.1735_1736insT 杂合突变, 其他家系成员 (KS04、KS05、KS06、KS07) 均无此突变 (图 2、图 3), 符合 X 连锁隐性遗传共分离规律, 据此推测, KAL1 基因 c.1735_1736insT (p.Y579LfsX13) 突变为该家系患者的致病性突变。

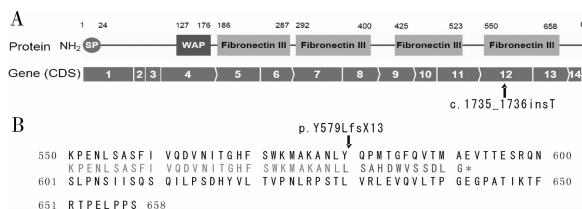


图 1 KAL1 基因结构与其编码产物蛋白结构图

A. KAL1 基因及 anosmin-1 蛋白结构图; B. anosmin-1 第 4 个纤维蛋白结构域氨基酸序列

讨 论

应用全外显子测序技术并按照 ACMG 解读规则, 笔者成功检出该家系患者的疑似致病突变, 即 KAL1 基因 c.1735_1736insT (p.Y579LfsX13) 框移突变。

KAL1 是第 1 个被鉴定出来的 Kallmann Syndrome 致病基因, 为 X 连锁隐性遗传的家系患者最主要的致病基因。1992 年 Bick 等^[15]首次在 Kallmann

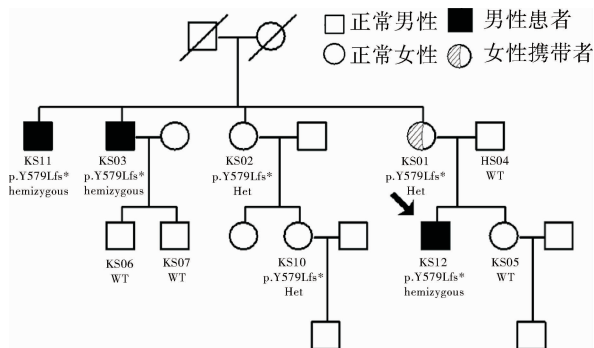


图 2 Kallmann syndrome 家系图

Het. 杂合突变; WT. 野生型; hemizygous. 半合子; 箭头所示为先证者

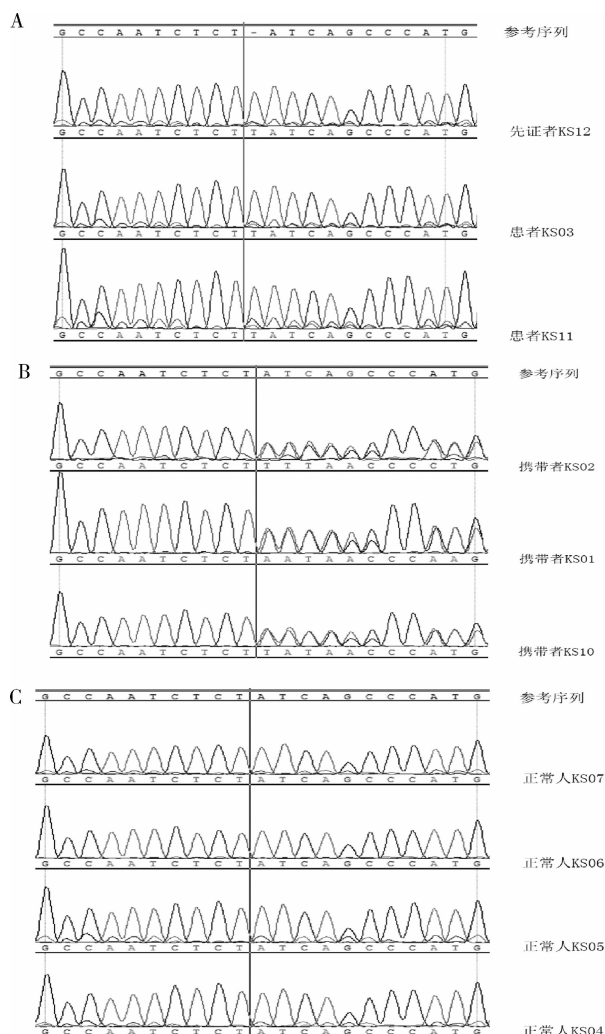


图 3 Sanger 验证结果

A. 患者验证结果; B. 携带者验证结果; C. 正常人验证结果

syndrome 家系中鉴定出 KAL1 基因上 3300bp 的缺失突变。1993 年 Hardelin 等^[16]采用 Southern blot 的方法在 2 个家系患者中检出 KAL1 基因大片段缺失突变, 并通过直接测序的方法在另 19 例患者中检出 9

个 KAL1 基因的点突变。后续有多项研究报道了 KAL1 基因在 Kallmann syndrome 患者中的突变谱,但在国内相关报道很少,其在人群中的突变谱也极为少见。

本研究在 Kallmann syndrome 家系患者中检出 KAL1 基因 12 号外显子区 c. 1735_1736insT (p. Y579LfsX13) 框移突变,该突变使其编码产物 anosmin-1 产生截短的蛋白,经 Sanger 验证该突变符合 X 连锁隐性遗传共分离规律。2001 年 Oliveira 等^[17]对 59 例 Kallmann syndrome 和 42 例特发性低促性腺激素性腺功能减退症 (nIHH) 先证者进行分子遗传学研究,在其中 1 对患有 Kallmann syndrome 的兄弟中检出 KAL1 基因 12 号外显子区单碱基缺失突变,导致其编码的 anosmin-1 在第 600 位氨基酸发生移码,并在第 618 位终止编码。本研究检出的 p. Y579LfsX13 突变与该突变发生在相同的结构域内,均可导致 anosmin-1 第 4 个纤连蛋白重复结构域的缺失,且 p. Y579LfsX13 突变在第 592 位即终止编码,按照 ACMG 解读规则,可判定为疑似致病突变,为新的致病突变位点。本研究结果是对 KAL1 基因突变谱的有效补充。

本研究采用全外显子组测序技术进行 SNP 和 InDel 的突变分析,因技术本身的局限性未对染色体结构,基因复制数变异及大片段缺失重复变异进行检测分析,而变异数据的解读是基于突变类型、突变频率、核酸/氨基酸保守性、现有突变图谱并结合多种预测软件来综合判定突变对蛋白功能的影响,并未通过细胞生物学实验及动物模型对突变位点进行功能验证,因此其致病性仍有待更进一步的验证。

新一代测序技术以其高效、快捷、准确的特点,及其不断降低的测序成本,正受到越来越多的临床及基础科研工作者的青睐。该技术不仅能为基础科研提供便捷,也可对疾病的临床诊断与筛查提供高效可靠的技术支持。本研究利用新一代测序技术研究 Kallmann syndrome 家系患者的分子遗传机制,将临床与基础研究有效结合。通过本研究可进行有效拓展,即利用目标区域捕获测序在大量散发样本中实现多基因突变检测及分析,探究其发病机制,绘制基因突变图谱,为临床诊断、遗传咨询及孕前、产前筛查提供依据。

参考文献

- Achermann JC, Weiss J, Lee EJ, *et al.* Inherited disorders of the gonadotropin hormones[J]. *Molecular Cellular Endocrinology*, 2001,179(1):89-96
- Schwanzel - Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. Luteinizing hormone - releasing hormone (LHRH) - expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome [J]. *Molecular Brain Research*, 1989,6(4):311-326
- Crowley WF Jr, Filicori M, Spratt DI, *et al.* The physiology of gonadotropin - releasing hormone (GnRH) secretion in men and women[J]. *Recent Progress in Hormone Research*, 1985,41:473
- MacColl G, Quinton R, Bouloux PM. GnRH neuronal development: insights into hypogonadotropic hypogonadism[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2002,13(3):112-118
- Wray S, Grant P, Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone - releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989,86(20):8132-8136
- Dodé C, Teixeira L, Leveilliers J, *et al.* Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2[J]. *PLoS Genetics*, 2006,2(10):e175
- Mitchell AL, Dwyer A, Pitteloud N, Quinton R. Genetic basis and variable phenotypic expression of Kallmann syndrome: towards a unifying theory[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2011,22(7):249-258
- Layman LC. Genetics of human hypogonadotropic hypogonadism[J]. *American Journal of Medical Genetics*, 1999,89(4):240-248
- Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, *et al.* Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2007,117(2):457-463
- Sykietis GP, Plummer L, Hughes VA, *et al.* Oligogenic basis of isolated gonadotropin - releasing hormone deficiency[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010,107(34):15140-15144
- Quaynor SD, Kim HG, Cappello EM, Williams T, *et al.* The prevalence of digenic mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome[J]. *Fertility and Sterility*, 2011,96(6):1424-1430,e6
- Miraoui H, Dwyer AA, Sykietis GP, *et al.* Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2013,92(5):725-743
- Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, *et al.* ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: revisions 2007[J]. *Genetics in Medicine*, 2008,10(4):294-300
- Ng D, Johnston JJ, Teer JK, *et al.* Interpreting secondary cardiac disease variants in an exome cohort[J]. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2013,6(4):337-346
- Bick D, Franco B, Sherins RJ, *et al.* Intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome[J]. *New England Journal of Medicine*, 1992,326(26):1752-1755
- Hardelin JP, Leveilliers J, Blanchard S, *et al.* Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome - linked Kallmann syndrome [J]. *Human Molecular Genetics*, 1993,2(4):373-377
- Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, *et al.* The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype - phenotype correlations and neuroendocrine characteristics[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001,86(4):1532-1538

(收稿日期:2014-04-28)

(修回日期:2014-04-30)