

文章编号 1006-8147(2015)01-0018-04

论 著

全外显子组测序发现 FUT6 基因在 1 例糖尿病肾病中的终止突变

王玉华¹, 蔡春友¹, 李卫东¹, 韩鸿玲²

(1.天津医科大学基础医学研究中心, 天津 300070; 2.天津医科大学总医院肾脏科, 天津 300052)

摘要 目的:检测与糖尿病肾病相关的致病基因。方法:应用外显子捕获技术和高通量测序技术对 1 例临床病理确诊的糖尿病肾病患者的全基因组外显子进行测序,将测序数据筛选出的可能对基因功能有影响的非同义突变和剪切位点突变,与公共数据库 YH、dbSNP129、8HapMapexome 和 dbSNP thousands genome 进行对比过滤,然后对筛选出的候选基因进行免疫组化染色研究其表达量的变化。结果:通过数据的对比过滤,共发现 509 个突变位点,其中包括 497 个错义突变和 12 个无义突变。发生无义突变并且在肾脏高表达的基因有 ANKRD35、ACSM2A、FUT6 和 HAAO。其中 FUT6 基因的 315TAC>TAA,氨基酸残基由酪氨酸突变为终止密码子,免疫组化证实 FUT6 在该患者的肾活检组织中表达量减少。结论:糖尿病肾病患者中发现 FUT6 基因终止突变及其表达的显著降低,提示 FUT6 可能与糖尿病肾病的发病有关。

关键词 糖尿病肾病;全基因组外显子测序;FUT6

中图分类号 R587.1+R394

文献标志码 A

Exome sequencing identified a FUT6 nonsense mutation in one diabetic nephropathy patient

WANG Yu-hua¹, CAI Chun-you¹, LI Wei-dong¹, HAN Hong-ling²

(1. Research Center of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Nephrology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To identify plausible disease causing mutations in the diabetic nephropathy (DN). **Methods:** Exome capturing and high-throughput sequencing were used to detect mutations of DN related genes in a patient confirmed by pathological diagnosis. Novel non-synonymous and splice acceptor/donor site mutations were identified after screening reported polymorphisms in public databases (YH, dbSNP129, eight HapMap exomes and 1 000 Genome variant database). Immunohistochemistry was performed in renal biopsy specimen to verify expression changes of genes with nonsense mutations. **Results:** Five hundred and nine novel mutations were identified in the DN patient, including 497 missense mutations and 12 nonsense mutations. In 12 genes with stop codon mutations, ANKRD35, ACSM2A, FUT6, and HAAO were normally highly expressed in kidney. A mutation of codon 315 TAC>TAA in the FUT6 gene, changed the amino acid sequencing from Tyr stop codon. Immunohistochemistry confirmed the decreased FUT6 expression in renal biopsies of the DN patient. **Conclusion:** This research identifies a stop codon mutation of the FUT6 gene in a DN patient, and the expression level of the FUT6 gene decreases significantly in the patient's renal biopsy. The FUT6 stop codon mutation may be associated with the etiology of DN in that patient.

Key words diabetic nephropathy; exome sequencing; FUT6

随着人们生活水平的提高、饮食结构的改变和体力劳动的减少,糖尿病发病率与日俱增。根据国际糖尿病联盟(IDF)统计,2011年全球糖尿病患者数为 3.66 亿,预计 2030 年将达到 5.52 亿。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是以糖代谢异常为主要原因所致的肾小球硬化并伴尿蛋白含量异常,是糖尿病的严重微血管并发症,亦是糖尿病患者的

主要死亡原因之一,在我国糖尿病肾病已经成为导致终末期肾病的第二大原因,有资料表明每年新发的终末期肾病中 DN 占 40%^[1]。尽管以往研究认为糖尿病病程长和控制不良是 DN 的重要危险因素,但近来大量资料表明遗传因素在 DN 的发生发展中起关键作用^[2-3],因此关于 2 型糖尿病肾病的遗传学研究成为近年来研究的热点。我们曾在 1 例无微量蛋白尿的早期 DN 患者的肾活检组织中,发现有 TGF- β_1 、TGF- $\beta R1$ 和 Smad3 表达升高,目前该患者已发展为终末期肾病。为研究该患者 DN 早期 TGF- β 途径激活的可能分子机制,进一步探寻与 2 型糖尿病肾病的相关致病基因,了解 DN 的遗传背景,我

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81070576);天津市自然科学基金重点项目(12JCZDJC24700)

作者简介 王玉华(1987-),女,硕士在读,研究方向:病理与病理生理学;通信作者:李卫东, E-mail: liweidong98@tjmu.edu.cn; 韩鸿玲, E-mail: han_hongling@163.com。

们对这例 DN 患者进行了全外显子测序。

1 资料与方法

1.1 研究对象 患者男性, 年龄 63 岁, 病程 20 年, 1994 年出现尿糖升高, 行 OGTT 检查确诊为 2 型糖尿病, 诊断标准参照 2010 年美国糖尿病协会公布的糖尿病诊断标准。2008 年尿生化检查尿蛋白升高, 诊断为 DN(DN 诊断标准为: 有糖尿病病史且尿微量白蛋白/肌酐 > 300 mg/g, 除外原发性肾小球病和其他继发性肾小球疾病), 在 DN 早期和中晚期两次行肾活检检查, 病理表现均为糖尿病肾损害, 确诊为糖尿病肾病, 行眼底镜检查发现视网膜病变, 同时伴有周围神经病变。自 2005 年起采用胰岛素治疗, 目前该患者已发展为终末期肾病, 采用血液透析治疗。本次研究调查和取样均征得受试者同意并签署了知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用高盐法(北京百泰克生物技术公司, 全血基因组 DN 提取试剂盒)提取外周血白细胞基因组 DNA, 应用 Nanodrop2000/2000c 分光光度计测定样品 DNA 浓度及 OD 值($A_{260/280}$, $A_{260/230}$), 记录样品浓度和纯度后 -80 °C 储存备用。

1.2.2 全基因组外显子测序 采用 Agilent SureSelect Human Kit 芯片对 DNA 样品进行外显子捕获, 样品外显子文库建立后通过 Hiseq2000 高通量双末端测序平台进行测序。输出的原始数据 (Reads) 用 SOAPaligner2.20 与参考基因序列 (NCBI build36.3, hg18) 比对, 通过 SOAPsnp(v1.03) 得到外显子及侧翼区域 SNP 位点数据。

1.2.3 候选基因筛选 首先筛选出非同义突变 (non-synonymous, NS) 和剪切位点 (splice acceptor and donor, SS) 突变, 将这些可能引起功能改变的突变 (NS/SS) 和公共数据库 YH、dbSNP129、8HapMap 外显子组、千人基因组计划进行逐步对比过滤, 筛选已报道的基因多态性位点。由于无义突变对基因功能的影响更加明显, 所以选出无义突变进行基因功能分析。

1.2.4 免疫组化 采用过氧化物酶标记的链霉卵白素 (streptavidin/peroxidase, SP) 法对患者肾活检组织切片进行免疫组织化学染色, 研究基因 FUT6 (Abcam) 的表达量。

2 结果

2.1 外显子测序结果 利用 Hiseq2000 新一代高通量双末端测序平台, 对 1 例病理确诊的糖尿病肾病患者的全基因组外显子进行 NS/SS 突变分析, 得

到外显子及侧翼区域 SNP 数据库, 见表 1。

表 1 样本外显子 SNP 检测结果

Tab 1 Summary of SNPs for exome capture sample

突变	数目	突变	数目
总突变数	38 914	剪切位点 ^a	296
同义突变	7 624	内含子	21 747
错义突变	6 618	5'UTRs ^b	1 035
无义突变	56	3'UTRs ^b	1 363
通读	7	基因间	168

^a 外显子和内含子接头处 4 bp; ^b 起始密码子前 200 bp, 终止密码子后 200 bp 非编码区突变

2.2 外显子滤过结果 在测序结果中选出患者的 NS 和 SS 这些突变相比同义突变和非编码区突变对基因功能的影响更为显著。NS/SS 突变经过公共数据库 YH、dbSNP129、8HapMap 外显子组和千人基因组外显子组数据逐步过滤, 排除多态性, 最后发现有 509 个突变不存在于这些数据库中 (表 2), 其中包括 497 个错义突变和 12 个无义突变。对 12 个存在无义突变的基因 (表 3) 在肾脏的表达情况进行生物信息学分析 (genome.ucsc.edu), 发现在肾脏高表达的基因有 ANKRD35、ACSM2A、FUT6 和 HAAO。

表 2 突变滤过过程和结果

Tab 2 Variant prioritization pipeline

筛选数据库	筛选后位点数
NS/SS	6 977
Not in YH	3 350
Not in YH, nor in dbSNP129	875
Not in YH, dbSNP129, nor in eight HapMapexome	664
Not in YH, dbSNP129, eight HapMapexome, nor in dbSNP thousands genome	509

表 3 样本无义突变概况

Tab 3 Summary of nonsense mutations

染色体	基因	Codon	碱基突变	氨基酸改变	Support ¹	Score ²	Expression ³
Chr1	ANKRD35	504	CGA>TGA	Arg>Stop	7/ 5	99	Yes
Chr11	MMP7	118	CGA>TGA	Arg>Stop	25/26	99	No
Chr14	C14orf39	346	TCA>TGA	Ser>Stop	16/ 7	99	No
Chr14	GSTZ1	147	CAG>TAG	Gln>Stop	5/ 3	69	No
Chr16	ACSM2A	115	CGA>TGA	Arg>Stop	11/ 5	94	Yes
Chr19	FUT6	315	TAC>TAA	Tyr>Stop	9/10	99	Yes
Chr2	HAAO	223	AGA>TGA	Arg>Stop	3/ 4	23	Yes
Chr2	LIMS3	116	CGA>TGA	Arg>Stop	3/ 2	36	No
Chr7	CCDC146	362	CGA>TGA	Arg>Stop	15/13	99	No
Chr7	MLL3	755	CAA>TAA	Gln>Stop	126/ 8	39	No
Chr9	GNAQ	101	TAC>TAA	Tyr>Stop	47/ 8	70	No
Chr9	ODF2	637	CAG>TAG	Gln>Stop	10/ 4	32	No

¹ 第一个值为最好碱基质量值 (被 reads 覆盖最多的碱基); 第二个值为次好碱基 (覆盖次数第二多) 质量值; 纯合突变时只有最好碱基质量值。² 检验到的 SNP 位点的质量值。³ 是否在肾脏表达

2.3 免疫组化结果 考虑突变位点的 Support、Score、expression 和基因功能分析,选取 FUT6 基因进行研究,免疫组化检测 FUT6 基因在该患者肾脏的表达,可以明显看出 FUT6 主要在肾小管表达,患者 FUT6 表达与正常人比较明显下降(图 1)。

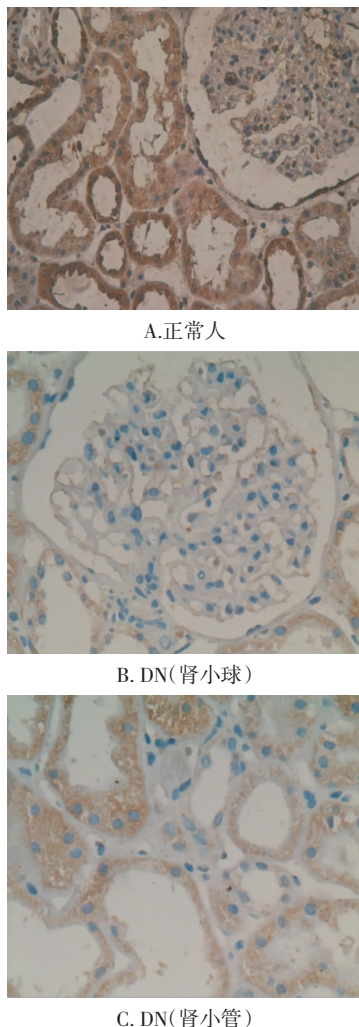


图1 DN患者与正常人肾组织 FUT6 表达水平($\times 400$)

Fig1 The expression level of FUT6 in DN patients and normal person ($\times 400$)

3 讨论

DN 不仅是糖尿病患者的主要死亡原因,同样也是导致终末期肾病的主要原因之一,大量资料表明遗传因素在 DN 的发生和发展中起关键性作用。随着人类基因组计划(Human genome project, HGP)和人类基因组单体型图计划(the international haplotypemap project, HapMap)的相继完成,高通量测序技术的飞速发展,对个体全基因组或外显子序列进行测序,可获得完整的全基因组或外显子变异位点图谱,研究与疾病相关的基因。目前多项研究显示外显子测序在孟德尔疾病的研究中取得了重大突破,证实外显子测序发现孟德尔疾病的致病基

因是有效和可行的^[4-5]。

DN 的确诊有赖于肾组织病理学检查,20 世纪 50 年代以来,许多学者致力于 DN 病理结构的研究,Tervaert 等^[6]在 2010 年将 T1DN 和 T2DN 的组织学改变进行统一的病理分级,分别对肾小球、肾小管和肾血管损害进行评估,但国际仍未形成统一的病理分级。目前临床对 DN 的诊断和分级依据尿微量白蛋白,这与糖尿病合并肾脏疾病的患者很难区分,而糖尿病患者很少做肾活检,所以目前临床对 DN 的诊断并未十分明确。本研究以 1 例 DN 早期肾组织病理未见明显异常但出现 TGF- β_1 、TGF- β_{R1} 和 Smad3 的表达升高,经临床和病理分析确诊的 DN 患者作为研究对象,对其进行全基因组外显子测序,以寻找与 DN 发病相关的致病基因,进一步较为全面的了解 DN 的遗传背景。

FUT6 (岩藻糖基转移酶-6) 基因定位于 19p13.3,编码 α -1,3-岩藻糖基转移酶的成员之一,催化岩藻糖基由 GDP- α -L-Fuc 转移至糖链外侧 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)3 位上的 FucT^[7],其主要的功能是合成 Lewis 系抗原(Lewis^a 和 Lewis^x)和唾液酸化的 Lewis 系相关抗原(sLewis^a 和 sLewis^x),在肿瘤的发生和发展中起重要作用^[8-9]。本研究中,患者 FUT6 基因的碱基发生 315TAC>TAA 突变,使得氨基酸残基由酪氨酸突变为终止密码子,翻译提前终止。Mollicone^[10]在研究血清缺乏 α -1,3-岩藻糖基转移酶的印尼人家系时也发现了该突变位点的存在,证明了 FUT6 基因发生 315Try>stop 突变时,血清 α -1,3-岩藻糖基转移酶缺乏,从而影响了其功能。有研究报道缺乏糖基化修饰的 TGF- β_{R2} 几乎不与 TGF- β_1 结合^[11],具体的调节机制并不是十分明确,但 Kim^[12]用免疫荧光的方法证明 TGF- β_{R2} 的糖基化修饰影响其在细胞表面的定位,从而影响与 TGF- β_1 的结合,进而影响其功能,这说明 TGF- β_{R2} 的糖基化修饰是 TGF- β_1 致纤维化的必要条件。Hirakawa^[13]在研究 α -1,3FUTs 对结肠癌细胞的生物学行为的影响时发现,用 siRNA 干扰 FUT6 和 FUT3 后 TGF- β_{R1} 和 TGF- β_{R2} 的岩藻糖基化修饰明显减少,Western blot 发现 E-cadherin、pHSP27 和 pP38 的表达明显下降,曾有报道 E-cadherin^[14]和 pP38^[15]在 TGF- β 介导的上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)中有重要作用,EMT 是肾脏纤维化的重要过程^[16],由此可以认为 FUT6 对 TGF- β_{Rs} 的岩藻糖基化修饰可能在肾间质纤维化过程中起到重要作用。

目前没有发现 DN 遵循一种明确的孟德尔遗传

模式,认为是多种遗传因素和环境因素共同作用的结果。本次研究对一早期还未出现肾脏功能性改变,但免疫组化证实有 TGF- β 、TGF- β R1 和 Smad3 高表达的 DN 患者的全外显子进行测序,结合基因功能学分析发现基因 FUT6 的终止突变,免疫组化证实在该患者的肾活检标本中 FUT6 的表达下降。但目前尚缺乏直接证据表明 FUT6 终止突变与早期出现的 TGF- β /Smad 信号通路的激活有直接的联系,需要进一步分子生物学实验对其致病的具体机制进行研究。另外候选致病基因还需进行相关病例疾病验证和种系突变检测,以明确其在该疾病中的发生率。

参考文献:

- [1] Kikkawa R, Koya D, Haneda M. Progression of diabetic nephropathy [J]. *AJKD*, 2003, 41(3 Suppl 1): S19
- [2] Arar N H, Freedman B I, Adler S G, et al. Heritability of the severity of diabetic retinopathy: The FIND-Eye study[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(9): 3839
- [3] Wong T Y, Klein R, Islam A, et al. Diabetic retinopathy in a multi-ethnic cohort in the United States[J]. *Am J Ophthalmol*, 2006, 141(3): 446
- [4] Ng S B, Turner E H, Robertson P D, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes[J]. *Nature*, 2009, 461(7261): 272
- [5] Walsh T, Shahin H, Elkan-Miller T, et al. Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB2 [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 87(1): 90
- [6] Tervaert T W, Mooyaart A L, Amann K. Pathologic classification of diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(4): 556
- [7] Sherwood A L, Upchurch D, Stroud M R, et al. A highly conserved His -His motif present in alpha1 -->3/4fucosyltransferases is required for optimal activity and functions in acceptor binding[J]. *Glycobiology*, 2002, 12(10): 599
- [8] Holgersson J, Lofling J. Glycosyltransferases involved in type 1 chain and Lewis antigen biosynthesis exhibit glycan and core chain specificity[J]. *Glycobiology*, 2006, 16(7): 584
- [9] Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive Oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(7): 934
- [10] Mollicone R, Reguigne I, Fletcher A, et al. Molecular basis for plasma alpha(1, 3)-fucosyltransferase gene deficiency(FUT6)[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(17): 12662
- [11] Wang X, Inoue S, Gu J, et al. Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice[J]. *PNAS*, 2005, 102(44): 15791
- [12] Kim Y W, Park J, Lee H J, et al. TGF-beta sensitivity is determined by N-linked glycosylation of the type II TGF-beta receptor[J]. *Biochem J*, 2012, 445(3): 403
- [13] Hirakawa M, Takimoto R, Tamura F, et al. Fucosylated TGF-beta receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal Cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(1): 156
- [14] Ge S A, Costa R S, Ravinal R C, et al. Mast cells, TGF-beta1 and alpha-SMA expression in IgA nephropathy[J]. *Dis Markers*, 2008, 24(3): 181
- [15] Yu L, Hebert M C, Zhang Y. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses[J]. *EMBO*, 2002, 21(14): 3749
- [16] Zhao C G, He X J, Lu B, et al. Increased expression of collagens, transforming growth factor-beta 1, and -beta 3 in gluteal muscle contracture[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11: 15

(2014-08-20 收稿)

.....

(上接第 13 页)

- ta suppression eliminates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in prostate cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(11): 1215
- [11] Mego M, Mani S A, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(12): 693
- [12] Yamamoto H, Yoo S K, Nishita M, et al. Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2[J]. *Genes Cells*, 2007, 12(11): 1215
- [13] Zhan G F, Phiel C J, Spece L, et al. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3(GSK-3)[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(35): 33067
- [14] Gould T D, Gray N A, Manji H K. Effects of a glycogen synthase kinase-3 inhibitor, Lithium, in adenomatous polyposis coli mutant mice[J]. *Pharmacol Res*, 2003, 48(1): 49
- [15] Beurel E, Kornprobst M, Blivet-Van Eggelpoël M J, et al. GSK-3beta inhibition by Lithium confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis through the repression of CD95 (Fas/APO-1) expression[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 300(2): 354

(2014-08-28 收稿)