

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2018.0114

## Maroteaux-Lamy 综合征的 ARSB 基因分析及新突变的致病性鉴定

郭东炜<sup>1,2</sup>, 谢杰<sup>1</sup>, 潘伟绵<sup>3</sup>, 唐佳<sup>1</sup>, 艾阳<sup>1</sup>, 李荣<sup>1</sup>, 杜敏联<sup>4</sup>, 郭奕斌<sup>1</sup>

(1.中山大学中山医学院遗传室MPS科研组,广东广州510080;2.厦门大学医学院临床医学专业2014级,福建厦门361102;3.福建医科大学附属二院免疫血液科,福建泉州362000;4.中山大学附属第一医院儿科,广东广州510080)

**摘要:**【目的】对7家拟诊为 Maroteaux-Lamy 综合征(MPS VI)的患儿及其父母进行 ARSB 基因的突变检测和新突变的致病性鉴定,以揭示其分子发病机制,为将来的产前/植入前基因诊断等创造前提条件。【方法】在临床初诊及 GAG 尿检和 MPS 酶检的基础上,抽取患儿及其父母 EDTA 抗凝血,进行 ARSB 基因的 PCR 扩增和 Sanger 测序。对所发现的新突变,在经 HGMD、1000G 和 ExAC 等数据库核实排查后,首先用 SWISS-MODEL 软件分析、比对突变蛋白和正常蛋白的空间构象,然后用 Clustal X 软件分析跨物种氨基酸的保守性,用 PROVEAN、SIFT、PolyPhen-2 软件预测新突变的致病性,最后用 ACMG 标准对新突变的致病性进行综合分析鉴定。【结果】1)7 个家系先证者的基因检测结果分别为:No1:c.574T>C,p.C192R 纯合错义突变;No2:c.160G>A/p.D54N(来自其母)和 c.1197C>G/p.F399L(来自其父)的复合杂合子;No3:仅检出 c.1072G>A/p.V358M 和 IVS5 as(-27)A>C 变异,但酶检和临床表型符合 VI 型;No4:为 c.281C>T,p.S94L(新突变,来自其母)和 IVS5 as(-27)A>C(来自其父)的复合杂合子;No5:为 c.1197C>G,p.F399L 纯合错义突变;No6:为 c.1197C>G,p.F399L(来自其母)和 c.1379C>T,p.S460F(新突变,来自其父)的复合杂合子;No7:为 c.499G>A,p.G167R(来自其父)和 c.1325C>T,p.T442M(来自其母)的复合杂合子。2)新突变鉴定结果:对正常 ARSB 酶蛋白和 p.S94L 突变酶蛋白的空间构象的预测比对结果显示,两者有明显区别;跨物种保守性分析结果显示,p.94 突变点所在氨基酸(S)在物种进化过程中具有高度保守性;PROVEAN、SIFT 和 PolyPhen-2 软件对 p.S94L 预测结果分别为:Deleterious、Damaging 和 Probably damaging。用上述方法对 p.S460F 的预测结果及 ACMG 的综合分析结果也显示该突变可能是致病性的。【结论】1)家系 4 的 p.S94L 和家系 6 的 p.S460F 新突变可能都是新的致病性突变,有可能都是引起患儿发病的内在原因之一。2)家系 1,2,5,6,7 可以确诊为 MPS VI 型,其基因型和表现型具有显著的相关性,家系 3 虽经酶检确诊,临床症状和尿检结果也都与 MPS VI 型符合,但却未能在 DNA 水平查到明确的突变类型,其表现型与基因型的相关性还有待进一步证实。

**关键词:** Maroteaux-Lamy 综合征; ARSB 基因; 新突变; 致病性鉴定

中图分类号: R394.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2018)06-0844-10

### ARSB Gene Analysis and Novel Mutation Pathogenicity Identification of Maroteaux-Lamy Syndrome

GUO Dong-wei<sup>1,2</sup>, XIE Jie<sup>1</sup>, PAN Wei-mian<sup>3</sup>, TANG Jia<sup>1</sup>, AI Yang<sup>1</sup>, LI Rong<sup>1</sup>, DU Min-lian<sup>4</sup>, GUO Yi-bin<sup>1</sup>

(1.MPS Team, Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080;2.Clinical Medicine, Grade 2014, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361102;3.Department of Immune Hematology, The Second Affiliated Hospital, Fujian University of Medical Science, Quanzhou 362000;4.Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510620, China)

Corresponding to: GUO Yi-bin, E-mail: aguoabin@qq.com

收稿日期: 2018-07-01

基金项目: 国家自然科学基金(30772069); 闽粤合作科研基金(71010025 和 71020010)

作者简介: 郭东炜, 本科毕业生, 研究方向: 遗传性骨病的分子诊断, E-mail: 495521614@qq.com; 郭奕斌, 通信作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: aguoabin@qq.com; 郭东炜, 谢杰, 潘伟绵为并列第一作者

**Abstract:** 【Objective】 To reveal the molecular genetic mechanism of 7 cases that suspected Maroteaux-Lamy syndrome (MPS VI), we analyze the *ARSB* gene of proband and their parents and identify the pathogenicity of novel mutation, which lay foundation for prenatal diagnosis or preimplantation genetic diagnosis (PGD) in the future. 【Methods】 On the basis of clinical preliminary diagnosis, GAG urine test and the detection of MPS enzyme activity, and the EDTA anti-coagulated blood was collected from proband and their parents then perform PCR amplification and Sanger sequencing of the *ARSB* gene. After the novel mutations were detected and verified by databases such as HGMD, 1000G and ExAC. At first, spatial conformation of mutant protein and normal protein were analyzed and compared by SWISS-MODEL. Then conservation analysis of cross-species amino acids by Clustal X. What's more, pathogenicity prediction methods including PROVEAN, SIFT and PolyPhen-2 were applied. Finally, the pathogenicity of the novel mutation was comprehensively analyzed and identified by ACMG standard. 【Results】 1) The genetic test results of the 7 family proband were as follows. Family 1, c.574T > C/p.C192R homozygous missense mutation. Family 2, c.160G > A/p.D54N (from mother) and c.1197C > G/p.F399L (from father) compound heterozygote. Family 3, except for c.1072G>A/p.V358M and IVS5 as (-27)A > C, no other mutations were found in the rest exons but the enzymatic and clinical phenotypes were in accordance with MPS type VI. Family 4, c.281C > T/p.S94L (novel mutation, from mother) and IVS5 as (-27)A > C (from father) compound heterozygote. Family 5, c.1197 C > G/. F399L homozygous missense mutation. Family 6, c.1197C > G/p.F399L (from mother) and c.1379C > T/p.S460F (novel mutation, from father) compound heterozygote. Family 7, c.499 G > A/p.G167R (from father) and c.1325C > T, p.T442M (from mother) compound heterozygote. 2) Identification results of novel mutation. The spatial conformation predictions for normal *ARSB* enzyme protein and p.S94L mutant enzyme protein show that there is a clear difference between them, cross-species conservation analysis results show that the amino acid at the mutation point has a high degree of evolution in the species conservatism. PROVEAN, SIFT and PolyPhen-2 predictions results are Deleterious, Damaging and Probably damaging. The predicted results of above methods for p.S460F and the analysis results of ACMG also indicate that the mutation may be pathogenic. 【Conclusion】 1) The new mutation in p.S94L in family 4 and p.S460F in family 6 may be novel pathogenic mutations, which may be one of the intrinsic causes of children with disease. 2) Family 1, 2, 5, 6, 7 can be diagnosed as MPS type VI, and its genotype and phenotype have significant correlation. Although family 3 was diagnosed as MPS type VI by enzymatic examination, clinical symptoms and urine test results. We failed to find clear mutations at DNA level in *ARSB* gene, so the correlation between its phenotype and genotype remains to be further confirmed.

**Key words:** maroteaux\_lamy syndrome; *ARSB* gene; novel mutation; pathogenicity identification

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(6): 844-853]

Maroteaux-Lamy 综合征 (OMIM 253200), 即黏多糖贮积症 VI 型 (mucopolysaccharidosis type VI, MPS VI), 分为轻、重两型, 均为常染色体隐性 (autosomal recessive, AR) 遗传, 近婚会大大增加再发风险<sup>[1-2]</sup>。重型 MPS VI 是一种严重致残致死性的遗传性骨病/代谢病, 发病率约为 1/10<sup>5</sup><sup>[3]</sup>。本病主要是由于 *ARSB* 基因发生病理性突变, 导致其所编码的芳香基硫酸酯酶 B (arylsulphatase B, *ARSB*) 缺乏或活性降低, 进而影响到黏多糖, 即糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 及其中间代谢产物硫酸皮肤素 (dermatan sulfate, DS) 和硫酸角质素 (keratan sulfate, KS) 的降解, 导致这些产物在体内各组织器官大量堆积, 致使患儿表现出个头矮小, 发育迟缓, 特殊面容 (头大、额凸、鼻梁凹、嘴唇肥

厚、牙齿稀疏、脖子短), 骨骼畸形, 肝脾肿大, 先心病, 脐疝, 桡尺骨僵硬, 爪形手, 体表多毛, 背部、臀部有多块或呈片状的蒙古斑, 尿检通常呈强阳性<sup>[1]</sup>。MPS VI 型具有广泛的表型异质性和遗传异质性, 不同种族、不同民族、不同家族的突变类型和临床症状往往存在差异<sup>[4-9]</sup>。在各种 MPS 类型中, VI 型的临床表现与 I 型最为相似, 但前者智力正常, 而后者智力中度至重度受损<sup>[2]</sup>。本病至今仍无切实有效的根治疗法, 查清病因, 然后对再次孕育的高危胎儿 (或胚胎) 实施产前 (或植入前) 基因诊断, 防止患胎出生 (或患胚孕育) 仍是目前防治本病的最佳应对策略<sup>[10]</sup>。本研究旨在探索 MPS VI 患者的分子遗传学发生机制, 从而为今后的防治工作奠定良好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

家系1先证者:男,6岁,汉族,福建籍,因个矮、发育迟缓、角膜混浊、视力差等症到我室就诊。父母离异,母亲表型正常,父亲未就诊。

家系2先证者:男,就诊时1岁4个月,汉族,香港籍。头大,前额突出,浓眉,角膜浑浊明显,鼻梁凹,嘴唇肥厚;漏斗胸,肋骨外翻,有脐疝;背、腰、臀部有大片蒙古斑,智力正常。父母身康健,非近婚,无家族史。

家系3先证者:女,12岁3个月,汉族,广东籍。头大,脖子短,角膜浑浊,鼻梁凹,嘴唇肥厚;盾状胸,肋骨外翻,有脐疝;腰、臀有蒙古斑,桡尺骨僵硬,爪形手;智力正常。父母表型正常,非近婚,无家族史。

家系4先证者:女,4岁1个月,汉族,福建籍。角膜混浊,有脐疝,腰、臀有蒙古斑,智力正常。父母表型正常,非近婚,无家族史。

家系5先证者:男,8岁1个月,汉族,广西籍。个矮,头大,颈短,前额凸出,角膜混浊,胸骨凸起,桡尺骨僵硬,爪形手,有脐疝,智力正常。父母表型正常,非近婚,无家族史。

家系6先证者:女,2岁3个月,汉族,广东籍。鼻梁凹,腹大,有脐疝,腰、臀有蒙古斑,智力正常。父母表型正常,非近婚,无家族史。

家系7先证者:女,5岁9个月,汉族,广东籍。智力正常,个矮,近视,角膜混浊,漏斗胸,肋骨外翻,桡尺骨僵硬,爪形手,膝内翻;有脐疝,腰、臀有蒙古斑。父母表型正常,非近婚,无家族史。

正常对照组:由中山大学附属第一医院妇产科提供的表型正常、无亲缘关系的夫妇组成,年龄在22~30岁不等。抽其外周静脉血2~4 mL, EDTA抗凝。

本论文研究已得到中山大学伦理委员会的批准,所有受检者均完全知情同意。

### 1.2 尿GAG定性检测

取待检者清晨中段尿适量,按我室已建立的方法对尿GAG含量进行定性/半定量检测<sup>[11]</sup>。按含量的低高,依次分为阴性(-)、弱阳性(±)、阳性(+),强阳性(++)和超强阳性(+++)五级<sup>[1]</sup>。

### 1.3 ARSB酶活性测定

由外院测定和提供酶检结果。ARSB测定首选荧光分析法<sup>[12]</sup>,若该法测定的酶活性低于正常平均值50%者,则再用比色法<sup>[13]</sup>测定。

### 1.4 ARSB基因的突变检测

EDTA抗凝血的制备,DNA的提取、ARSB基因8个外显子引物的设计、各对引物的PCR扩增均用我室建立的方法进行<sup>[1]</sup>。扩增产物送深圳华大基因公司或上海美吉公司用3730型测序仪完成双向测序。

### 1.5 新突变的致病性鉴定

家系4患儿所携带的突变类型c.281C>T,p.S94L和家系6的c.1379C>T,p.S460F经在HGMD、NCBI dbSNP、1000 Genomes Project和Exome Aggregation Consortium数据库检索,均未见报道,故需进行致病性鉴定,才能揭示患儿发病的内在原因,也才能为将来的产前/植入前诊断等创造前提条件。

1.5.1 三级结构预测和比对 利用生物信息学软件SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)预测并分析突变序列、正常序列所组成的蛋白质的三级结构的异同点<sup>[14]</sup>。

1.5.2 跨物种保守性分析 利用生物信息学软件Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)在线预测,随机选择不同进化等级的物种:猫头鹰猴(*Aotus nancymae*),食蟹猴(*Macaca fascicularis*)、牛(*Bos taurus*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、小家鼠(*Mus musculus*)、非洲爪蟾(*Xenopus*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、家犬(*Canis familiaris*)、家猫(*Felis catus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、原鸡(*Gallus*)和人(*homo sapiens*)共12个,对突变点所在的氨基酸的保守性进行分析,根据保守性的强弱来判断突变致病性的大小<sup>[1]</sup>。

1.5.3 PROVEN、SIFT和PolyPhen-2软件预测 利用在线生物信息学软件PROVEN(<http://provean.jcvi.org/index.php>)、SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)和PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>)对新错义突变的危害性进行预测,以此判断该突变的致病性<sup>[1]</sup>。

1.5.4 用ACMG标准对新突变的致病性进行分析 评定 根据美国医学遗传学与基因组学学会(The American College of Medical Genetics and Genomics, ACMGG或ACMG)评判标准,对两种新突变的致病性进行综合分析、打分评定。

## 2 结 果

### 2.1 尿检结果

7个家系的先证者及其父母的尿检结果如表1。

表 1 七个家系的尿检结果

Table 1 Urine test results of seven pedigrees

Pedigree	Normal controls	Father	Mother	Proband
No1	-	-	-	+
No2	-	-	-	+++
No3	-	-	-	+++
No4	-	-	-	++
No5	-	-	-	++
No6	-	-	-	++
No7	-	-	-	++

### 2.2 酶检结果

由外院负责测定和提供结果,7个家系的 ARSB 酶检结果如表2所示。可以判断:7个家系的先证者均为 MPS VI 型患者,而其已检的父、母的酶活性均在正常值的一半左右,故均诊断为 MPS VI 型携带者。

表 2 七个家系的 ARSB 酶检结果

Table 2 Enzyme test results of seven pedigrees

Pedigree	ARSB activity in white blood cells[nmol/(h·mg)]			
	Normal controls	Father	Mother	Proband
No1	62.5±21.0(from GZ)	-	-	23.5
No2	>121(from HK)	-	-	3.53
No3	108.1~261.9(from BJ)	41.8	49.2	2.67
No4	50.4~175(from GZ)	-	-	19.6
No5	108.1~261.9(from BJ)	48.2	50.2	18.7
No6	50.4~175(from GZ)	-	-	20.9
No7	108.1~261.9(from BJ)	56.3	64.5	21.4

GZ: Guangzhou; HK: Hogkong; BJ: Beijing

### 2.3 DNA 测序结果

根据上海美吉公司测序部提供的各家系 ARSB 基因各外显子以及外显子与内含子交界部位数十至上百碱基对的测序结果,发现家系1~7的突变结果如表3及图1所示。

### 2.4 新突变鉴定结果

2.4.1 正常蛋白和突变蛋白三级结构的预测 通过三级结构预测,可以看出 p.S94L 突变蛋白与正常蛋白在空间构象上发生了明显变化[图2,右边

表 3 七个家系的测序结果

Table 3 Sequencing results of seven pedigrees

Pedigree	Father	Mother	Proband	Mutation report
1	Not be checked	No mutation found	c.574 T>C/p.C192R, Homozygous	Have been reported
2	c. 1197C>G / p. F399L, Heterozygous	c. 160G>A /p. D54N Heterozygous	c.160G>A /p.D54N and c.1197 C>G/p. F399L, Compound heterozygote	Have been reported
3	c.1072G>A/p.V358M, Heterozygous	IVS5as(-27)A>C Heterozygous	c.1072G>A/p.V358M and IVS5 as(-27) A>C, Compound heterozygote	Has been reported as SNP
4	IVS5 as(-27)A>C, Heterozygous	c. 281C>T /p. S94L Heterozygous	c. 281C>T/p.S94L and IVS5 as(-27)A>C, Compound heterozygote	p. S94L is a Novel mutation
5	c. 1197C>G / p. F399L, Heterozygous	c. 1197 C>G / p. F399L Heterozygous	c.1197 C>G/p.F399L, Homozygous	Have been reported
6	c. 1379C>T / p. S460F, Heterozygous	c. 1197 C>G / p. F399L Heterozygous	c.1197 C>G/p.F399L and c.1379 C>T/ p.S460F, Compound heterozygote	p. S460F is a Novel mutation
7	c. 499G>A / p. G167R, Heterozygous	c.1325C>T/p.T442M Heterozygous	c.499G>A/p.G167R and c.1325 C>T/p. T442M, Compound heterozygote	Have been reported

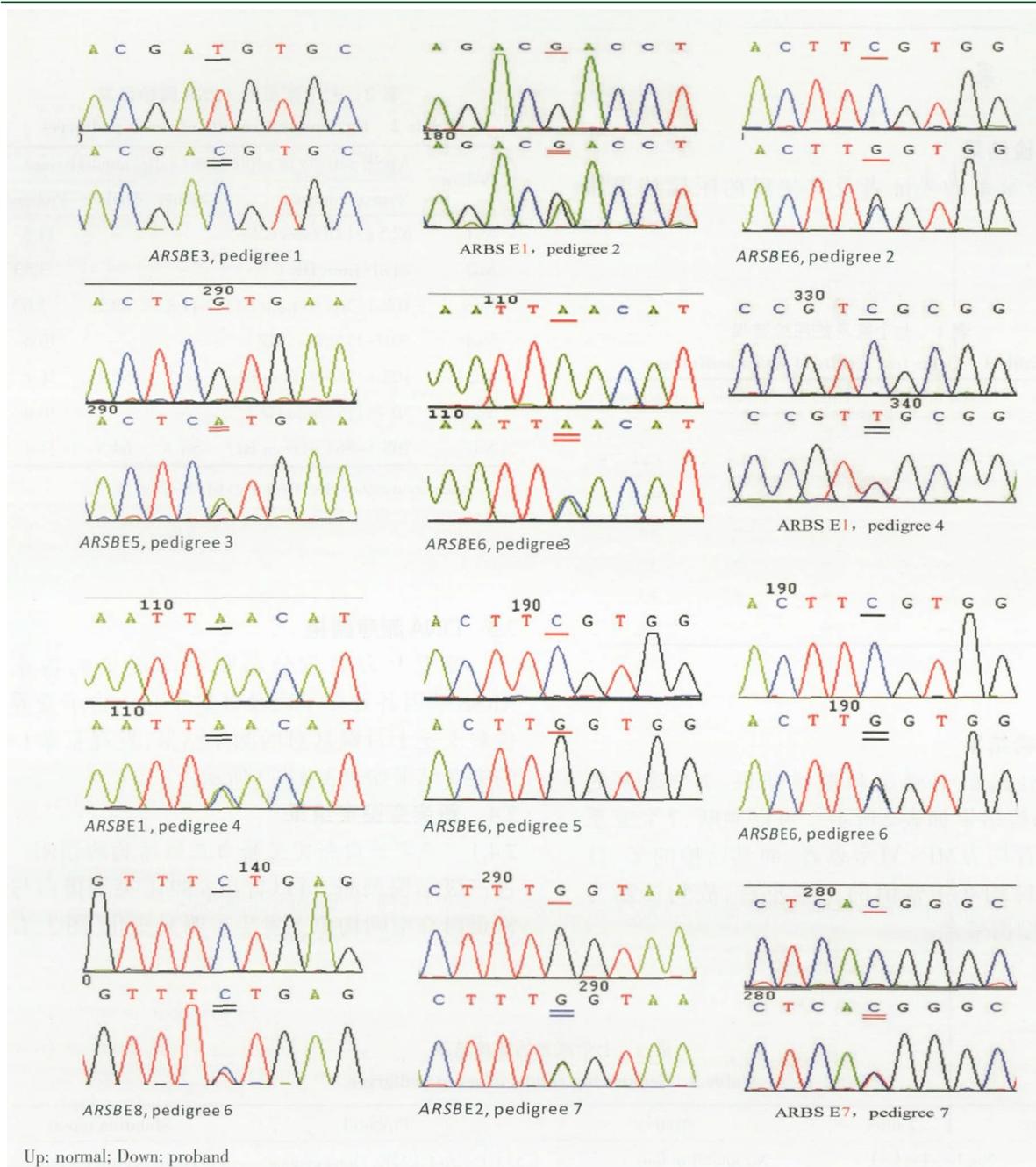


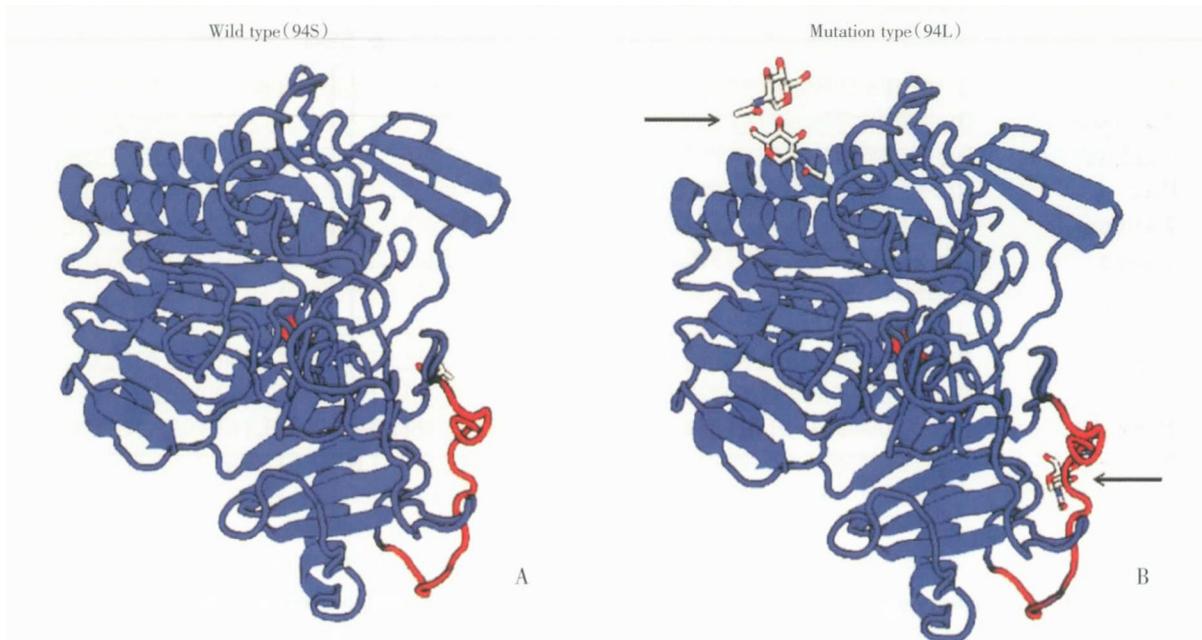
图1 家系1-7 ARSB 比对图

Fig.1 Comparison of ARSB in pedigree 1-7

突变型三维结构中多出2个NAG结构(*N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖),中间红色部分为第94位氨基酸的位置。同理,可以看出,p.S460F突变蛋白与正常蛋白在空间构象上发生了局部的改变[图3,右边突变型三维结构中右下部(405~420的氨基酸)无规卷曲发生了较明显的改变],由此推测该此两处新突变很可能导致 ARSB 酶活性改变,最终导致 MPS VI 的发生,所以是一种新的致病性突变。

2.4.2 跨物种保守性分析结果 ARSB 酶蛋白第

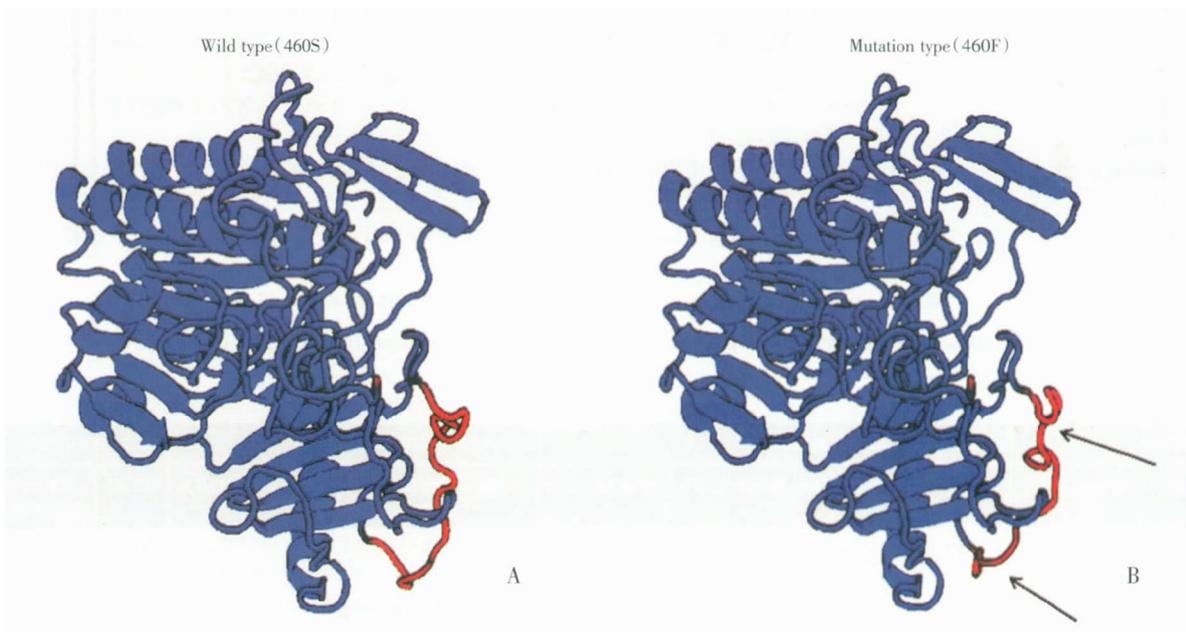
94位氨基酸,即新突变所在位置,在12个不同来源的物种中均为丝氨酸“S”(图4)。ARSB 酶蛋白第460位氨基酸,即新突变所在位置,在12个不同来源的物种中有10个均为丝氨酸“S”(图5)。这说明该两个位点在进化过程中保守性相当高,也说明94和460位点的丝氨酸都具有重要功能,一旦发生突变,很有可能影响 ARSB 酶的结构,导致酶缺陷或活性降低,所以分析该两个突变很可能都是一种新的病理性突变。



A: Normal *ARSB* zymoprotein; B: p.S94L mutational *ARSB* zymoprotein

图2 p.S94L 突变蛋白和正常蛋白的三级结构预测图

Fig.2 The spatial structure forecast figure of p.S94L mutational *ARSB* and normal *ARSB*



A: Normal *ARSB* zymoprotein; B: p.S460F mutational *ARSB* zymoprotein

图3 p.S460F 突变蛋白和正常蛋白的三级结构预测图

Fig.3 The spatial structure forecast figure of p.S460F mutational *ARSB* and normal *ARSB*

2.4.3 PROVEAN、SIFT 和 PolyPhen-2 软件的预测结果 PROVEAN 和 SIFT 软件预测 p.S94L 的结果分别为“有害的 (Deleterious)”和“具有破坏性的 (Damaging)” (图 6)。PolyPhen-2 预测 p.S94L 的结

果为“很可能损害 (PROBABLY DAMAGING)” (图 7)。可见 p.94 位的丝氨酸“S”被亮氨酸“L”替代确实是有损的, 从而进一步证实 p.S94L 突变是一种新的致病性突变。



图4 ARSB 酶蛋白 p.S94 氨基酸在 12 个跨物种中的保守性分析

Fig.4 The conservatism analysis of p.S94 amino acid in ARSB zymoprotein from 12 cross-species

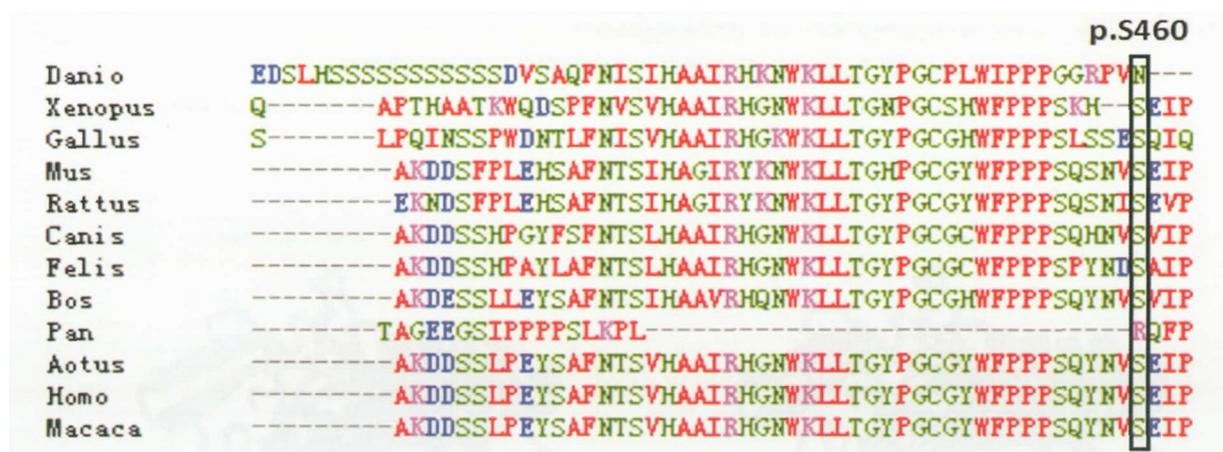


图5 ARSB 酶蛋白 p.S460 氨基酸在 12 个跨物种中的保守性分析

Fig.5 The conservatism analysis of p.S460 amino acid in ARSB zymoprotein from 12 cross-species

VARIATION		PROTEIN SEQUENCE CHANGE				PROVEAN PREDICTION				SIFT PREDICTION	
ROW_NO.	INPUT	PROTEIN_ID	POSITION	RESIDUE_REF	RESIDUE_ALT	SCORE	PREDICTION (cutoff=-2.5)	#SEQ	#CLUSTER	SCORE	PREDICTION (cutoff=0.05)
1	P15848 94 SL	P15848	94	S	L	-4.70	Deleterious	152	30	0.001	Damaging

图6 PROVEAN 和 SIFT 软件预测 p.S94L 的结果

Fig.6 Predicted result of p.S94L with PROVEAN and SIFT softwares

PROVEAN 和 SIFT 软件预测 p.S460F 的结果分别为“中性的(Neutral)”和“耐受的(Tolerated)”(图8)。PolyPhen-2 预测 p.S460F 的结果为“良性的(BENIGN)”(图9)。可见 p.460 位的丝氨酸“S”被苯丙氨酸“F”替代产生的致病性较弱,但由于患儿的另一个杂合突变是很明确的致病性突变并

且是突变热点,且患儿的症状和酶检结果也都与 MPSVI 相符,所以分析 p.S460F 错义突变仍很可能是一种新的致病性突变。

2.4.4 ACMG 分析结果 p.S94L 的 ACMG 分析结果为:1 个中等(PM2)和 3 个支持(PP1、PP3、PP4),显示该突变为 VUS 类型。p.S460F 的 ACMG



图7 PolyPhen-2 软件预测 p.S94L 的结果

Fig.7 Predicted result of p.S94L with PolyPhen-2 software

VARIATION		PROTEIN SEQUENCE CHANGE				PROVEAN PREDICTION				SIFT PREDICTION	
ROW_NO.	INPUT	PROTEIN_ID	POSITION	RESIDUE_REF	RESIDUE_ALT	SCORE	PREDICTION (cutoff=-2.5)	#SEQ	#CLUSTER	SCORE	PREDICTION (cutoff=0.05)
1	P15848 460 S F	P15848	460	S	F	-1.79	Neutral	152	30	0.532	Tolerated

图8 PROVEAN 和 SIFT 软件预测 p.S460F 的结果

Fig.8 Predicted result of p.S460F with PROVEAN and SIFT softwares

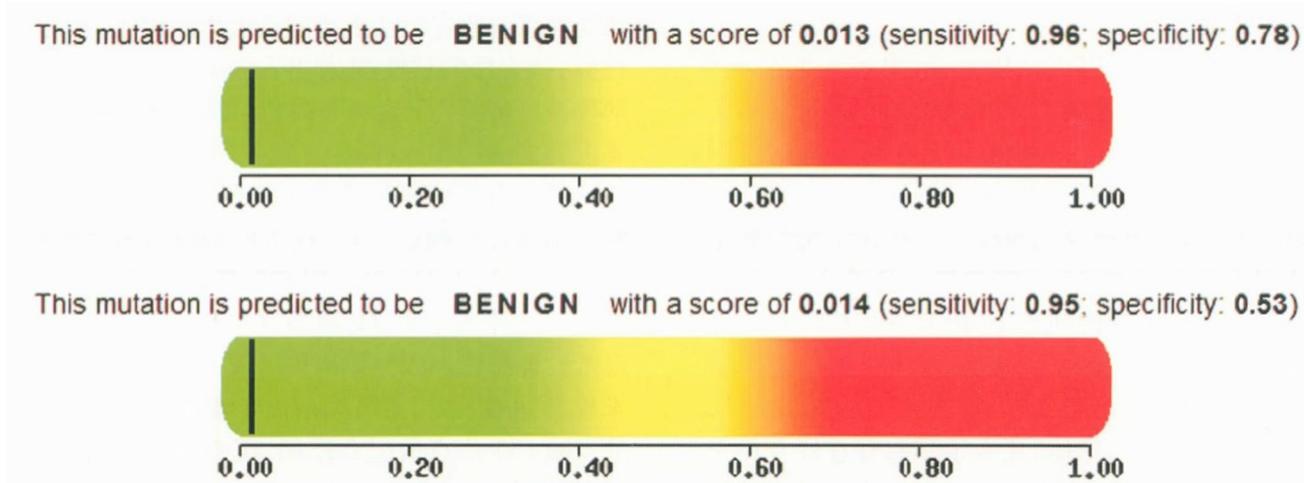


图9 PolyPhen-2 软件预测 p.S460F 的结果

Fig.9 Predicted result of p.S460F with PolyPhen-2 software

分析结果为:人群数据库排查人群频率为0,患儿另一个突变p.F399L为已知的致病性突变,跨物种保守性分析结果为保守性较高,这三点均支持p.S460F为致病性突变。但PROVEAN在线软件预测结果为-1.79(中性),SIFT预测结果为0.532(耐受),PolyPhen-2预测结果为0.013和0.014(均为良性)。根据ACMG评判标准,PROVEAN,SIFT和PolyPhen-2三个预测软件只能说明一个问题。这

一点似乎又不太支持p.S460F为致病性突变。但综上所述,结合患儿临床症状和酶检结果,虽然p.S460F的致病性不如p.S94L强,但仍很可能是一个新的致病性突变。

### 3 讨论

Maroteaux-Lamy 综合征是一种跟DS和KS代

谢有关的MPS,属罕见的遗传性酶病。本病呈世界性分布,具有广泛的表型异质性和遗传异质性<sup>[4]</sup>。如前所述,其病因主要是由于ARSB基因突变引起相应的ARSB酶缺陷导致GAG代谢发生异常,从而致使代谢中间产物在体内各组织器官大量储积而引起全身各组织器官发生病变。本病与MPS I型有诸多相似之处,尿GAG定性检测结果也很相近,所以仅凭症状、体征观察和影像学检查通常只能初诊,确诊需通过酶活性测定特别是基因突变检测方能实现<sup>[1]</sup>。本病目前虽可通过酶替代疗法(ERT)和骨髓移植(BMT)得到治疗<sup>[15-16]</sup>,但费用昂贵且需在症状出现前治疗才有效果,而且ERT用多了还会产生抗体排斥,大大限制了它的应用和推广。因此,查清病因,防止患胎出生仍是目前防治该病发生的最佳应对策略。本文在临床初诊和鉴别诊断以及尿GAG定性/半定量检测基础上,通过对患儿ARSB基因进行突变检测,就是为了揭示疑似MPS VI型患儿的发病内因,从而揭示各病例的基因型与表现型的相关性,为今后的产前特别是PGD以及基因定点靶向治疗奠定坚实基础。

从本论文的研究结果来看,家系1、2、5、6、7病因很明确,其基因型和表现型具有显著的相关性,且c.1197C>G, p.F399L错义突变为ARSB基因的突变热点,从我们多年来已确诊病例的统计结果来看,其突变率高达50%。当然这个统计数字还有待于通过增加病例数来进一步确认。家系1患儿为致病突变的纯合子,但其母相应位点未发现突变,其父虽未检,但这种情况下生出纯合突变,理论上分析仍很少见,推测要么是非亲生子,要么发生单亲二倍体,要么生殖腺存在嵌合体突变。家系3虽经酶检确诊,临床症状和尿检结果也都与MPS VI型符合,但却未能在DNA水平查到明确的致病突变,其基因型与表现型的相关性还有待进一步证实。

对于新突变,为了阐明患儿发病的真正病因,

有必要对其致病性进行鉴定,因为只有阐明病因后,才能用于产前/植入前诊断,才能保证产检不出差错。目前,比较常用的、也是比较简便可行的做法是采用生物信息学的方法包括针对突变点所在氨基酸在不同进化等级的跨物种中同源序列的保守性分析,对新突变危害性的预测,正常对照组与病例组的比较分析,正常蛋白与突变蛋白高级结构的比对等。家系4检出的c.281C>T/p.S94L新突变,经上述多种方法验证,Mutation taster预测结果为有害;跨物种保守性分析结果为高度保守;人群数据库统计突变发生频率为0;PolyPhen-2预测结果为有害(0.999);SIFT预测结果为影响蛋白质功能(0.00)。据此可判定p.S94L为有害突变,是一新的致病性突变。由于家系4的另一个新突变IVS5 as(-27)A>C的致病性仍未明了,所以患儿是否为VI型MPS,现仍无法定论,推测另一致病突变有可能是发生于未被检测到的其他内含子或侧翼序列中。

但由于这些方法都不是直接的证据,所以,在样品保证、条件具备的情况下,还必须进行生物学功能的系统鉴定包括表达型重组体的构建、鉴定、转染,诱变酶的活性测定,Western blot分析,建立动物模型等<sup>[17-18]</sup>。这将是后续工作要做的主要内容之一。

对于有些病例如家系3的患儿,虽然表型和酶检结果都已确诊,但仍找不到明确的病理性突变这种现象,不但是我们时有发现,而且文献也有报道。这种情况可能是因为突变发生于内含子的隐蔽性剪接位点或5'端调控区或3'端非翻译区而未检测到的原因,也可能是由于发生CNV杂合性缺失或SNP位点的组合作用,还有可能是调控基因、修饰基因以及多基因之间的相互作用。由于患儿已不在人世,所以这些推测目前仍是个谜,这都有待于今后收集更多的病例、做更深入的研究方有可能揭开谜底。

## 参考文献

- [1] 姜煜,郭源平,艾阳,等.黏多糖贮积症VI型表现型和基因型的相关性研究[J].热带医学杂志,2017,17(2):142-147.

Jiang Y, Guo YP, Ai Y, et al. The correlation study of phenotype and genotype of mucopolysaccharidosis type VI [J]. J Trop Med, 2017, 17(2): 142-147.

- [2] 郭奕斌.二十多种遗传性骨病的快速鉴别诊断

- [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(2): 73-76.
- Guo YB. Fast differential diagnosis of over twenty kinds of genetic skeletal disorders [J]. J Mol Diagn Ther, 2013, 5(2): 73-76.
- [3] Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, et al. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany [J]. Inherit Metab Dis, 2005, 28(6): 1011-1017.
- [4] Al-Sannaa NA, Al-Abdulwahed HY, Al-Majed SI, et al. The clinical and genetic Spectrum of Maroteaux-Lamy syndrome (Mucopolysaccharidosis VI) in the Eastern Province of Saudi Arabia [J]. J Comm Genet, 2018, 9(1): 65-70.
- [5] Uttarilli A, Pasumarthi D, Ranganath P, et al. Functional characterization of arylsulfatase B mutations in Indian patients with Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI) [J]. Gene, 2017, 599(01): 19-27.
- [6] Ittiwut C, Boonbuamas S, Srichomthong C, et al. Novel mutations, including a large deletion in the *arsb* gene, causing mucopolysaccharidosis type VI [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2017, 21(1): 58-62.
- [7] Kaissi AA, Hofstaetter J, Weigel G, et al. The constellation of skeletal deformities in a family with mixed types of mucopolysaccharidoses: Case report [J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(32): e4561.
- [8] Giraldo GA, Ayala-Ramirez P, Prieto JC, et al. Molecular findings of Colombian patients with type VI mucopolysaccharidosis (Maroteaux-Lamy syndrome) [J]. Meta Gene, 2016, 7(1): 83-89.
- [9] Kantaputra PN, Kayserili H, Guven Y, et al. Clinical manifestations of 17 patients affected with mucopolysaccharidosis type VI and eight novel *ARSB* mutations [J]. Am J Med Genet A, 2014, 164A(6): 1443-1453.
- [10] 郭奕斌. 黏多糖病的诊断及防治策略[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2009, 3(10): 1620-1627.
- Guo YB. Mucopolysaccharides disease diagnosis and prevention strategies [J]. Chin J Clin (E Ed), 2009, 3(10): 1620-1627.
- [11] 黄艳, 孟亚仙, 郭奕斌. 微量快速检测尿 GAG 方法的建立 [J]. 中山大学学报论丛, 2007, 27(3): 138-140.
- Huang Y, Meng YX, Guo YB. The establishment of method of rapid detection of trace urinary GAG [J]. Sun Yat-sen Univ Forum, 2007, 27(3): 138-140.
- [12] Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, et al. Hurler-like phenotype: Enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper [J]. Clin Chem, 2001, 47(12): 2098-2102.
- [13] 郭玉凤, 施惠平, 张为民, 等. 黏多糖贮积症 VI 型的病例诊断与产前诊断 [J]. 中国优生与遗传杂志, 1995, 3(2): 21-24.
- Guo YF, Shi HP, Zhang WM, et al. Case diagnosis and prenatal diagnosis of mucopolysaccharidosis type VI [J]. Chin J Birth Health Hered, 1995, 3(2): 21-24.
- [14] Tang J, Pan JX, Guo YB. Mucopolysaccharidosis type IIIB mutations in Chinese patients: identification of two novel *NAGLU* mutations and analysis of two cases involving prenatal diagnosis [J]. Clinica Chimica Acta, 2013, 41(9): 33-38.
- [15] Franco JF, Soares DC, Torres LC, et al. Impact of early enzyme-replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: results of a long-term follow-up of Brazilian siblings [J]. Genet Mol Res, 2016, 15(1). doi: 10.4238/gmr.15017850.
- [16] Harmatz P, Shediach R. Mucopolysaccharidosis VI: pathophysiology, diagnosis and treatment [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2017, 22(8): 385-406.
- [17] Petry ME, Nonemacher K, Sebben JC, et al. Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients [J]. Inherit Metab Dis, 2005, 28(6): 1027-1034.
- [18] Garrido E, Cormand B, Hopwood JJ, et al. Maroteaux-Lamy syndrome: functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the arylsulfatase B gene [J]. Mol Genet Metab, 2008, 94(3): 305-312.

(编辑 刘清海)