

## 论著·临床研究

## 利用全外显子测序在肥胖人群中筛查致病突变

王景慧<sup>1,2</sup>, 张红<sup>3</sup>, 张蓉<sup>3</sup>, 彭丹凤<sup>3</sup>, 余海蓉<sup>3</sup>, 陈香慧<sup>3</sup>, 宣晔<sup>3</sup>, 胡承<sup>3#</sup>, 顾云娟<sup>1,4#</sup>

1. 南通大学附属医院内分泌与代谢科, 南通 226001; 2. 南通大学医学院, 南通 226019; 3. 上海交通大学医学院附属第六人民医院内分泌代谢科, 上海市糖尿病研究所, 上海市糖尿病重点实验室, 上海市糖尿病临床医学中心, 上海 200233; 4. 南通大学附属医院健康医学科, 南通 226001

**[摘要]** **目的**·利用全外显子测序技术 (whole-exome sequencing, WES) 筛查瘦素-促黑素细胞激素 (leptin-melanocyte stimulating hormone, LEP-MSH) 通路中的关键基因在肥胖人群中的突变情况。**方法**·招募2011年1月—2019年7月在上海交通大学医学院附属第六人民医院接受袖状胃切除术的119名肥胖患者: 年龄17~65岁, 体质指数 (body mass index, BMI)  $\geq 34$  kg/m<sup>2</sup>。采集研究对象的外周血, 提取全基因组DNA并进行全外显子测序, 应用生物信息学方法筛选LEP-MSH通路上16个基因 (*ADCY3*、*AGRP*、*BDNF*、*KSR2*、*LEP*、*LEPR*、*MC3R*、*MC4R*、*MCHR1*、*MRAP2*、*NTRK2*、*PCSK1*、*PHIP*、*POMC*、*SH2B1* 和 *SIMI*) 的突变。选取1000 Genomes (1000G)、Exome Aggregation Consortium (ExAC) 和 Genome Aggregation Database (gnomAD) 数据库中总人群最小等位基因频率小于0.02且东亚人群频率小于0.01的罕见变异位点用于后续分析。使用6种突变有害性预测软件来评估变异的损害程度。最后, 基于每位患者的临床信息, 并根据美国医学遗传学和基因组学学院 (America College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 指南对所有变异进行致病性判断, 仅保留“致病的”“可能致病的”“意义不明的”突变。**结果**·119名患者中有24名患者检测到了LEP-MSH通路中16个关键基因的26个22种突变, 均为杂合突变; 其中*SH2B1*基因突变7个 (占总突变数的26.92%), *MCHR1*基因突变4个 (占15.38%), *PHIP*基因突变3个 (占11.53%), *ADCY3*、*LEPR*基因突变各2个 (各占7.69%), *LEP*、*NTRK2*、*AGRP*、*KSR2*、*MC3R*、*MC4R*、*BDNF*、*PCSK1*基因突变各1个 (各占3.85%)。3名患者携带*SH2B1*基因上的相同变异位点, *LEPR*基因和*MCHR1*基因上分别有2名患者携带相同变异位点。共有12种变异在3个数据库的东亚人群中都没有被收录, 为东亚人群新发变异, 分别位于*SH2B1* (p.V209I、p.R67C、p.L149F)、*KSR2* (p.P155T)、*LEP* (p.D106N)、*LEPR* (p.W132R)、*PHIP* (p.K1461R)、*BDNF* (p.N84S)、*PCSK1* (p.R282W)、*NTRK2* (p.T732M)、*MC3R* (p.S71P) 和 *MC4R* (p.W174X)。**结论**·共检测到LEP-MSH通路上22种肥胖可能相关的罕见变异, 其中12种为东亚人群新发变异。

**[关键词]** 肥胖; 全外显子测序; 瘦素-促黑素细胞激素通路; 基因变异

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.07.010 **[中图分类号]** R589.2 **[文献标志码]** A

## Screening for pathogenic variants in obese cohort using whole-exome sequencing

WANG Jinghui<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong<sup>3</sup>, ZHANG Rong<sup>3</sup>, PENG Danfeng<sup>3</sup>, YU Hairong<sup>3</sup>, CHEN Xianghui<sup>3</sup>, XUAN Ye<sup>3</sup>, HU Cheng<sup>3#</sup>, GU Yunjuan<sup>1,4#</sup>

1. Department of Endocrinology and Metabolism, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China; 2. Medical School, Nantong University, Nantong 266019, China; 3. Department of Endocrine and Metabolic Diseases, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Diabetes Institute; Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus; Shanghai Clinical Centre for Diabetes, Shanghai 200233, China; 4. Department of Health Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

**[Abstract]** **Objective**·To screen mutations of key genes in the leptin-melanocyte stimulating hormone (LEP-MSH) pathway by whole-exome sequencing (WES) in the obese cohort. **Methods**·A total of 119 obese patients aged 17–65 years old with body mass index (BMI) $\geq 34$  kg/m<sup>2</sup>, who underwent laparoscopic sleeve gastrectomy from January 2011 to July 2019 at Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine were collected. The peripheral blood samples of the research subjects were collected, and whole genome DNA was extracted to perform WES. Bioinformatic methods were applied to detect the mutations

**[基金项目]** 上海市重点临床专科建设项目; 上海市内分泌代谢疾病研究中心 (2022ZZ01002); 上海交通大学医工交叉研究基金 (YG2021ZD20); 上海市第六人民医院院级科研基金 (ynhg202204)。

**[作者简介]** 王景慧 (1996—), 女, 硕士; 电子信箱: jh.wang12@foxmail.com。

**[通信作者]** 胡承, 电子信箱: alfaedhc@sjtu.edu.cn。顾云娟, 电子信箱: desette@ntu.edu.cn。<sup>#</sup>为共同通信作者。

**[Funding Information]** Shanghai Municipal Key Clinical Specialty Construction Project; Shanghai Research Center for Endocrine and Metabolic Diseases (2022ZZ01002); Medical-Engineering Cross Foundation of Shanghai Jiao Tong University (YG2021ZD20); Shanghai Sixth People's Hospital Grant (ynhg202204)。

**[Corresponding Author]** HU Cheng, E-mail: alfaedhc@sjtu.edu.cn. GU Yunjuan, E-mail: desette@ntu.edu.cn.<sup>#</sup>Co-corresponding authors.

in 16 genes in the LEP-MSH pathway (*ADCY3*, *AGRP*, *BDNF*, *KSR2*, *LEP*, *LEPR*, *MC3R*, *MC4R*, *MCHRI*, *MRAP2*, *NTRK2*, *PCSK1*, *PHIP*, *POMC*, *SH2B1*, and *SIMI*). Rare variants with the minor allele frequency in the total population less than 0.02 and in the East Asian population less than 0.01 in the 1000 Genome (1000G), Exome Aggregation Consortium (ExAC) and Genome Aggregation Database (gnomAD) were selected for subsequent analysis. Six pieces of prediction software were used to evaluate the deleteriousness of the mutations. Finally, based on the clinical information of each patient, the pathogenicity of all variants was determined according to the guidelines of America College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), and only the "pathogenic", "likely pathogenic", and "uncertain significance" variants were retained. **Results**·A total of 26 variants, 22 kinds of variants were detected in 24 patients from 119 subjects, all of which were heterozygous mutations. The detected variants included 7 in *SH2B1* gene (accounting for 26.92% of the total variants), 4 in *MCHRI* gene (accounting for 15.38%), 3 in *PHIP* gene (accounting for 11.53%), 2 in *ADCY3* and *LEPR* genes (accounting for 7.69%, respectively), and 1 in *LEP*, *NTRK2*, *AGRP*, *KSR2*, *MC3R*, *MC4R*, *BDNF*, and *PCSK1* genes, respectively (accounting for 3.85%, respectively). There were 3 patients having the same mutation site in *SH2B1* gene, and 2 patients having the same mutation sites in *LEPR* gene and *MCHRI* gene, respectively. In addition, among these mutations, there were 12 ones not included in the East Asian population in 3 public databases, which were novel mutations in the East Asian population, located in *SH2B1* (p.V209I, p.R67C, and p.L149F), *KSR2* (p.P155T), *LEP* (p.D106N), *LEPR* (p.W132R), *PHIP* (p.K1461R), *BDNF* (p.N84S), *PCSK1* (p.R282W), *NTRK2* (p.T732M), *MC3R* (p.S71P), and *MC4R* (p.W174X). **Conclusion**·A total of 22 kinds of rare variations possibly associated with obesity in the LEP-MSH pathway are detected, 12 of which are novel in the East Asian population.

**[Key words]** obesity; whole-exome sequencing (WES); leptin-melanocyte stimulating hormone pathway; gene mutation

肥胖的发病率在全球范围内都在增加。根据中国标准, 2015—2019年我国成年人(≥18岁)超重率为34.3%, 肥胖率为16.4%<sup>[1]</sup>。肥胖威胁着人类的健康, 增加了代谢相关疾病、心血管疾病、肿瘤的发病率以及死亡率<sup>[2]</sup>。肥胖是由于热量摄入和消耗之间的不平衡造成的, 由环境和遗传因素的共同作用导致<sup>[3-4]</sup>。单基因肥胖具有明确的遗传性, 发病年龄早、进展快、肥胖程度高且伴随多种并发症, 因此致病基因的鉴定对单基因肥胖的发病机制以及精准治疗具有重要意义。

目前研究<sup>[5]</sup>证实, 大部分单基因肥胖致病基因编码的蛋白质都是瘦素-促黑素细胞激素(leptin-melanocyte stimulating hormone, LEP-MSH)能量平衡调节通路的组成部分, 可通过改变食欲影响食物摄取和能量分配, 从而导致肥胖。此通路由脂肪分泌的LEP所介导, LEP穿过血脑屏障, 与下丘脑弓状核中的瘦素受体(leptin receptor, LEPR)结合。SH2B衔接蛋白1(SH2B adaptor protein 1, SH2B1)增强LEP信号转导, 后者诱导阿黑皮素原(proopiomelanocortin, POMC)的表达; 激素原转化酶1(prohormone convertase 1, PC1)和PC2将POMC切割成促黑素细胞激素 $\alpha/\beta/\gamma$ ( $\alpha/\beta/\gamma$ -melanocyte stimulating hormone,  $\alpha/\beta/\gamma$ -MSH)和促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH),  $\alpha$ -MSH和 $\beta$ -MSH分别与黑素皮质素3受体(melanocortin-3 receptor, MC3R)和黑素皮质素4受体(melanocortin-4 receptor, MC4R)结合, 并诱导其

活性。并且LEP也通过抑制神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)/刺鼠相关肽(agouti-related peptide, AGRP)的表达控制摄食行为<sup>[6]</sup>。

由于全外显子测序(whole-exome sequencing, WES)对常见和罕见变异均具有高灵敏度的优点, 已广泛应用于孟德尔遗传病分子病因的解析。WES在恶性血液病<sup>[7]</sup>、遗传性肾病<sup>[8]</sup>以及肿瘤<sup>[9]</sup>等疾病的基因突变检测中也有所应用, 并在单基因肥胖致病基因的鉴定方面发挥巨大的作用。在肥胖的评估中, WES已经在早发性肥胖患者的*LEPR*基因<sup>[10]</sup>、腺苷酸环化酶3(adenylate cyclase 3, *ADCY3*)基因<sup>[11]</sup>和*BBIP1*(BBSome interacting protein 1)基因<sup>[12]</sup>中鉴定出多种罕见变异。但之前的大多数研究仅报道了WES所检测单个肥胖患者的基因突变位点, 对于大规模中国肥胖人群的单基因突变检测研究十分有限。

本研究采用WES, 对减重手术的肥胖患者*ADCY3*、*AGRP*、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, *BDNF*)等16个基因进行突变检测, 并筛选罕见致病性变异, 以期对肥胖的发病机制和个体化治疗提供新的线索。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

招募2011年1月—2019年7月在上海交通大学医学院附属第六人民医院接受袖状胃切除术的119名肥胖患者, 有2名患者为同父同母的姐妹, 其余无亲属

关系; 男 35 人、女 84 人, 男女比例为 1:2.4; 年龄 17~65 岁, 平均年龄 (40.38±13.40) 岁; 体质量指数 (body mass index, BMI) ≥34 kg/m<sup>2</sup>, 平均 BMI 为 (39.34±4.70) kg/m<sup>2</sup>。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 WES** 抽取研究对象的外周血, 提取全基因组 DNA。用 NimbleGen SeqCap EZ Exome v3.0 捕获试剂 (捕获目标=64 Mb, Roche) 和 TruSeq DNA 建库试剂盒 (Illumina) 构建 DNA 文库。在 Illumina Novaseq 6000 平台上采用配对末端 150 bp 读数对样品进行高通量测序。使用 BWA 软件将测序数据与人类参考基因组 (hg19/GRCh37) 进行比对, 并用 GATK3.7 进行变异检测, 最后利用 ANNOVAR 软件对变异位点进行注释。

**1.2.2 遗传变异分析** 我们主要关注与 LEP-MSH 通路相关的 16 个基因, 详见表 1。利用 WES 检测这些基因中的罕见变异。罕见变异的定义为在 1000 Genomes (1000G)、Exome Aggregation Consortium (ExAC) 和 Genome Aggregation Database (gnomAD) 数据库中总人群最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) 小于 0.02 且东亚人群 (East Asians, EAS) 的 MAF 小于 0.01 的变异。

根据 CADD (Combined Annotation Dependent

表 1 LEP-MSH 通路上的基因及其编码蛋白和遗传模式

Tab 1 Genes in LEP-MSH pathway and their encoded proteins and genetic patterns

Gene	Protein	Inheritance
<i>ADCY3</i>	adenylate cyclase 3	AR
<i>AGRP</i>	agouti-related peptide	AD/AR
<i>BDNF</i>	brain-derived neurotrophic factor	AD
<i>KSR2</i>	kinase suppressor of Ras 2	AD
<i>LEP</i>	leptin	AR
<i>LEPR</i>	leptin receptor	AR
<i>MC3R</i>	melanocortin 3 receptor	AD
<i>MC4R</i>	melanocortin 4 receptor	AD/AR
<i>MCHR1</i>	melanin concentrating hormone receptor 1	AD
<i>MRAP2</i>	melanocortin receptor accessory protein 2	AD
<i>NTRK2</i>	neurotrophic receptor tyrosine kinase 2	AD
<i>PCSK1</i>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	AR
<i>PHIP</i>	pleckstrin homology domain interacting protein	AD
<i>POMC</i>	proopiomelanocortin	AD/AR
<i>SH2B1</i>	SH2B adaptor protein 1	AD
<i>SIM1</i>	SIM bHLH transcription factor 1	AR

Note: AD—autosomal dominant; AR—autosomal recessive.

Depletion) 分值 (≥20 为损害)、DANN (Domain-Adversarial Training of Neural Networks) 分值 (≥0.98 为损害)、MetaSVM (D 为损害)、Polyphen2 (Polymorphism Phenotyping v2) (D 为损害)、SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) (D 为损害)、M-CAP (Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity) (D 为损害) 6 种突变有害性预测软件来评估变异的损害程度。损害程度定义如下: 所有方法都预测为良性则认为这个突变为良性 (benign, B), 只有 1 个方法预测为损害则认为这个突变损害弱 (deleterious weak, DW), 有 2~4 个方法预测为损害则认为这个突变为损害 (deleterious, D), 有 5 个方法预测为损害则认为这个突变为损害较强 (deleterious strong, DS), 所有方法均预测为损害则认为这个突变为损害非常强 (deleterious very strong, DVS)。基因组进化速率分析 (Genomic Evolutionary Rate Profiling, GERP) 评分高于 2.0 的基因组位点被认为是保守的; 分值越高, 位点越保守, 那么该位点上突变的有害可能性越高。基于以上所有结果以及患者的临床信息, 根据美国医学遗传学和基因组学学院 (America College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 指南对所有变异进行致病性判断。本研究仅对 ACMG 指南鉴定为“致病的 (pathogenic)”“可能致病的 (likely pathogenic)”和“意义不明的 (variants of uncertain significance, VUS)”变异加以讨论, 那些被鉴定为“良性的”或“可能良性的”变异将直接被剔除。

## 2 结果

### 2.1 中国人群 LEP-MSH 通路基因突变及其致病性判断

我们利用 WES 在 24 名患者中对 LEP-MSH 通路上 16 个关键基因检测到 26 个 22 种致病、可能致病或意义不明的基因突变, 均为杂合突变, 其中有 12 种新发变异。3 名患者携带 *SH2B1* 基因上的相同变异位点, 在 *LEPR* 基因和 *MCHR1* 基因上分别有 2 名患者携带相同变异位点。在 6 名患者中检测到了 7 个 *SH2B1* 基因突变 (占总突变数的 26.92%), 其中 1 名患者携带 2 个突变。另外, 还检测到了 *MCHR1* 基因突变 4 个 (占 15.38%), *PHIP* 基因突变 3 个 (占 11.53%), *ADCY3*、*LEPR* 基因突变各 2 个 (各占

7.69%), *LEP*、*NTRK2*、*AGRP*、*KSR2*、*MC3R*、*MC4R*、*BDNF*、*PCSK1* 基因突变各 1 个 (各占 3.85%)。本次检测到的具体突变信息见表 2, 这些突变基因所对应的蛋白在 LEP-MSH 通路上的位置及此次检测到的致病性突变 (根据 ACMG 指南) 见图 1。

表 2 研究对象中检测到的 LEP-MSH 通路上的基因突变及其致病性判断

Tab 2 Gene mutations in LEP-MSH pathway detected in the objects and their pathogenicity judgment

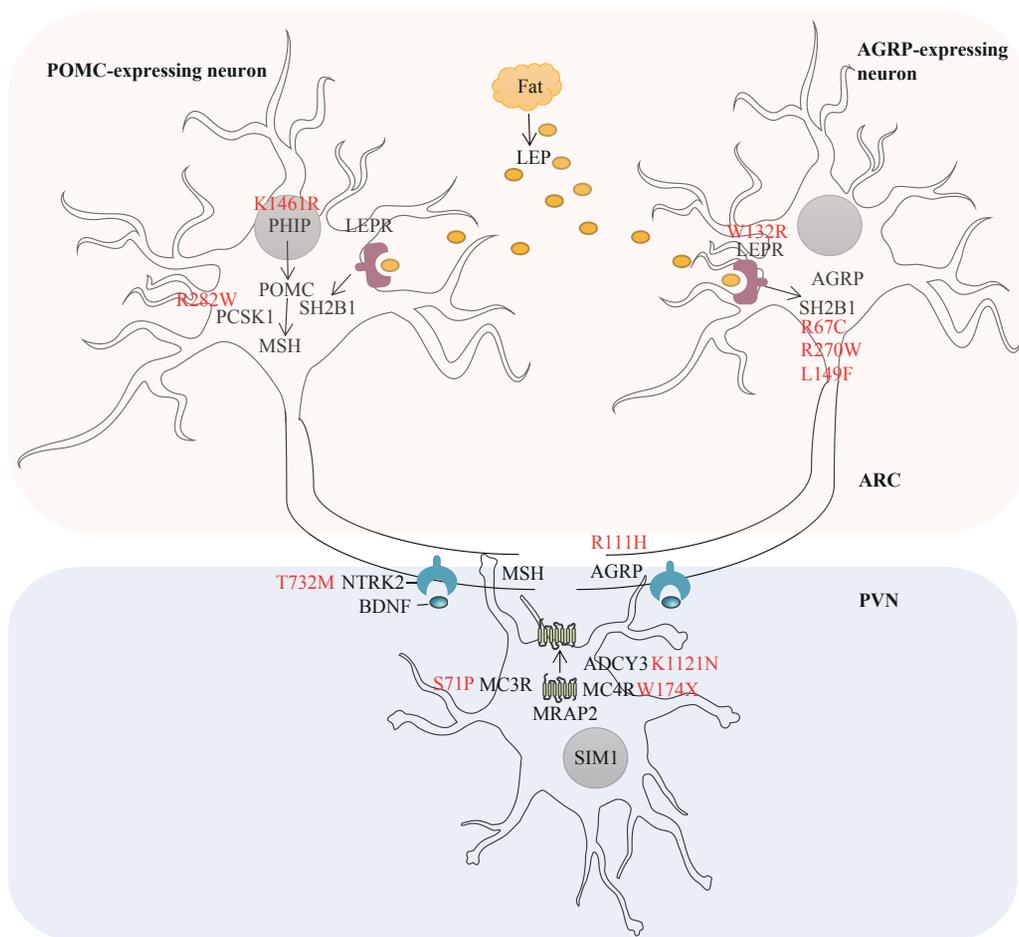
Sample ID	ACMG	Gene	Chromosome	Position	dbSNP	MAF in EAS	SNV class	DNA/AA change	Degree of damage	GERP score
1	Pathogenic	<i>NTRK2</i>	chr9	87635191	rs367769334	Novel	Nonsynonymous	c.C2195T/p.T732M	DVS	6.16
2	Likely pathogenic	<i>MCHRI</i>	chr22	41077612	rs182594063	0.001 0	Nonsynonymous	c.C949T/p.R317W	DS	4.19
3	VUS	<i>MCHRI</i>	chr22	41077832	rs190547628	0.007 4	Nonsynonymous	c.G1169A/p.R390H	D	5.40
4	VUS	<i>SH2B1</i>	chr16	28878040	–	Novel	Nonsynonymous	c.G625A/p.V209I	B	-1.84
5	Pathogenic	<i>AGRP</i>	chr16	67516606	rs199927717	0.001 0	Nonsynonymous	c.G332A/p.R111H	DS	6.17
6	VUS	<i>SH2B1</i>	chr16	28883185	rs200463987	0.005 1	Nonsynonymous	c.T386C/p.M129T	DW	5.14
7	VUS	<i>KSR2</i>	chr12	118199252	–	Novel	Nonsynonymous	c.C463A/p.P155T	B	2.72
8	Likely pathogenic	<i>LEP</i>	chr7	127894628	–	Novel	Nonsynonymous	c.G316A/p.D106N	D	3.86
9	Pathogenic	<i>LEPR</i>	chr1	66038032	–	Novel	Nonsynonymous	c.T394C/p.W132R	DS	4.17
10	Pathogenic	<i>LEPR</i>	chr1	66038032	–	Novel	Nonsynonymous	c.T394C/p.W132R	DS	4.17
11	VUS	<i>ADCY3</i>	chr2	25050847	rs78678013	0.000 6	Nonsynonymous	c.G2356A/p.A786T	DW	4.50
12	Pathogenic	<i>PHIP</i>	chr6	79655966	–	Novel	Nonsynonymous	c.A4382G/p.K1461R	D	6.17
13	Pathogenic	<i>MC3R</i>	chr20	54824110	–	Novel	Nonsynonymous	c.T211C/p.S71P	D	4.00
14	Pathogenic	<i>SH2B1</i>	chr16	28877614	rs781063312	Novel	Nonsynonymous	c.C199T/p.R67C	DS	4.71
	Pathogenic	<i>SH2B1</i>	chr16	28878223	rs561413284	0.001 9	Nonsynonymous	c.C808T/p.R270W	DS	3.96
15	Likely pathogenic	<i>MCHRI</i>	chr22	41077283	rs188147970	0.003 0	Nonsynonymous	c.C620T/p.A207V	D	5.02
16	VUS	<i>BDNF</i>	chr11	27679861	–	Novel	Nonsynonymous	c.A251G/p.N84S	B	-9.56
17	VUS	<i>SH2B1</i>	chr16	28883185	rs200463987	0.005 1	Nonsynonymous	c.T386C/p.M129T	DW	5.14
18	Pathogenic	<i>PCSK1</i>	chr5	95748060	rs773564429	Novel	Nonsynonymous	c.C844T/p.R282W	DVS	0.38
19	Pathogenic	<i>SH2B1</i>	chr16	28877860	–	Novel	Nonsynonymous	c.C445T/p.L149F	D	3.47
20	Likely pathogenic	<i>PHIP</i>	chr6	79650578	rs182783944	0.001 0	Nonsynonymous	c.G5298A/p.M1766I	D	5.92
21	VUS	<i>MCHRI</i>	chr22	41077832	rs190547628	0.007 4	Nonsynonymous	c.G1169A/p.R390H	D	5.40
22	Pathogenic	<i>MC4R</i>	chr18	58039062	rs878909905	Novel	Stopgain	c.G521A/p.W174X	D	5.85
23	VUS	<i>SH2B1</i>	chr16	28883185	rs200463987	0.005 1	Nonsynonymous	c.T386C/p.M129T	DW	5.14
24	Pathogenic	<i>ADCY3</i>	chr2	25042876	rs750100505	0.000 1	Nonsynonymous	c.G3363C/p.K1121N	DS	3.81
	VUS	<i>PHIP</i>	chr6	79655019	rs769344926	0.000 1	Nonsynonymous	c.A4826C/p.Q1609P	B	4.77

Note: AA—amino acid.

## 2.2 *SH2B1* 基因突变及临床性状

本研究检测到的 *SH2B1* 基因突变有 7 个, 其中患者 6、患者 17 和患者 23 在 *SH2B1* 基因上有相同的突变位点。患者 6, 女性, 58 岁, BMI 为 38.27 kg/m<sup>2</sup>; 患者 17, 女性, 67 岁, BMI 为 67.54 kg/m<sup>2</sup>; 患者 23, 女性, 31 岁, BMI 为 41.41 kg/m<sup>2</sup>。在 chr16: 28878040 位置发生碱基 T>C 杂合突变 (c.T386C), 导致编码的第 129 号氨基酸由甲硫氨酸变异为苏氨酸 (p.M129T)。该突变位点在 1000G、ExAC 和 gnomAD 数据库中 EAS 的 MAF 为 0.005 1。预测该突变对蛋白的损害性为 DW, 根据 ACMG 指南鉴定为意义不明的变异。

患者 14, 男性, 63 岁, BMI 为 38.75 kg/m<sup>2</sup>, 检测到其 *SH2B1* 基因上的 2 个不同的变异位点。① 在 chr16: 28877614 位置发生碱基 C>T 杂合突变 (c.C199T), 导致编码的第 67 号氨基酸由精氨酸变异为半胱氨酸 (p.R67C)。在 1000G、ExAC 和 gnomAD 数据库的 EAS 中均未检索到该突变位点, 此为 EAS 新发变异。预测该突变对蛋白的损害程度为 DS, 根据 ACMG 指南鉴定为致病的变异。② 在 chr16: 28878223 位置发生碱基 C>T 杂合突变 (c.C808T), 导致编码的第 270 号氨基酸由精氨酸变异为色氨酸 (p.R270W)。1000G、ExAC 和 gnomAD 数据库中 EAS 的 MAF 为 0.001 9, 预测该突变对蛋白的损害性为



**Note:** The red letters indicate the pathogenic mutations detected in the study according to ACMG guidelines.

图1 研究对象中检测到的LEP-MSH通路分子的致病性突变

Fig 1 Pathogenic mutations of the molecules in LEP-MSH pathway detected in the objects

DS, 根据ACMG指南鉴定为致病的变异。

还有2个在1000G、ExAC和gnomAD数据库的EAS中都未检索到的新发变异。患者4, 女性, 39岁, BMI为34.6 kg/m<sup>2</sup>。在chr16: 28878040位置发生碱基G>A杂合突变 (c.G625A), 导致编码的第209号氨基酸由缬氨酸变异为异亮氨酸 (p.V209I)。预测该突变对蛋白的伤害程度为B, 根据ACMG指南鉴定为意义不明的变异。患者19, 男性, 21岁, BMI为34.94 kg/m<sup>2</sup>。在chr16: 28877860位置检测到碱基C>T杂合突变 (c.C445T), 导致编码的第149号氨基酸由亮氨酸变异为苯丙氨酸 (p.L149F)。预测该突变对蛋白的伤害程度为D, 根据ACMG指南鉴定为致病的变异。

### 2.3 LEP与LEPR基因突变及临床性状

此队列中检测到1个LEP基因变异, 该变异位点在1000G、ExAC和gnomAD数据库的EAS中都未检索到, 为EAS新发变异。患者8, 女性, 64岁, BMI

为43.12 kg/m<sup>2</sup>。该突变伤害程度预测为D, 根据ACMG指南鉴定为可能致病的变异。

有2名患者携带LEPR基因突变, 且两者突变位点一致。经病史采集发现2名患者来自同一个家系并且为同父同母的姐妹: 患者9, 女性, 40岁, BMI为34.72 kg/m<sup>2</sup>; 患者10, 女性, 46岁, BMI为36.73 kg/m<sup>2</sup>。2名患者均在chr1: 66038032位置发生碱基T>C杂合突变 (c.T394C), 导致编码的第132号氨基酸由色氨酸变异为精氨酸 (p.W132R)。在3个数据库的EAS中未检索到该突变位点, 为EAS新发变异。预测该突变对蛋白的伤害程度为DS, 根据ACMG指南鉴定为致病的变异。因此, 两者肥胖的原因很可能都是由该突变引起的。

### 2.4 MC4R与MC3R基因突变及临床性状

检测到1个MC4R基因上的无义突变: 患者22, 女性, 35岁, BMI为34.72 kg/m<sup>2</sup>; 在chr18: 58039062位置发生碱基G>A杂合突变 (c.G521A),

使编码色氨酸的密码子 UGG 变为终止密码子 UAG (p.W174X)。1000G、ExAC 和 gnomAD 数据库 EAS 中未检索到该突变,为功能丧失性 (loss of function, LOF) 新发变异。预测该突变对蛋白的伤害程度为 D,根据 ACMG 指南鉴定为致病的变异。

检测到 1 个 *MC3R* 基因突变,该突变位点在 1000G、ExAC 和 gnomAD 数据库 EAS 中都未检索到,为新发变异。患者 13,男性,29 岁,BMI 为 41.67 kg/m<sup>2</sup>。在 chr20: 54824110 位置发生碱基 T>C 杂合突变 (c.T211C),导致编码的第 71 号氨基酸由丝氨酸变异为脯氨酸 (p.S71P)。预测该突变对蛋白的伤害程度为 D,根据 ACMG 指南鉴定为致病的变异。

### 2.5 *PHIP* 与 *PCSK1* 基因突变及临床性状

*PHIP* 基因突变的患者有 3 个。其中患者 12,女性,24 岁,BMI 为 41.1 kg/m<sup>2</sup>;在 chr6: 79655966 位置发生碱基 A>G 杂合突变 (c.A4382G),导致编码的第 1461 号氨基酸由赖氨酸变异为精氨酸 (p.K1461R),为 EAS 新发变异。预测该突变对蛋白的伤害性为 D,根据 ACMG 指南鉴定为致病的变异。

患者 18,女性,50 岁,BMI 为 43.82 kg/m<sup>2</sup>; *PCSK1* 基因突变为 chr5: 95748060 位置上碱基 C>T 的杂合突变 (c.C844T),导致编码的第 282 号氨基酸由精氨酸变异为色氨酸 (p.R282W)。该变异位点在 1000G、ExAC 和 gnomAD 数据库的 EAS 中都未检索到,为 EAS 新发变异。预测该突变对蛋白的伤害性为 DVS,根据 ACMG 指南鉴定为致病的变异。

### 2.6 *ADCY3*、*NTRK2* 及 *AGRP* 基因突变及临床性状

共检测到 2 个 *ADCY3* 基因突变,都是之前报道过的罕见错义突变。其中患者 24,女性,27 岁,BMI 为 39.04 kg/m<sup>2</sup>,在 *PHIP* 基因和 *ADCY3* 基因各检测到了 1 个突变位点: *PHIP* 基因上的突变鉴定为意义不明的变异。 *ADCY3* 基因的突变为 chr2: 25042876 位置上的 G>C 杂合突变 (c.G3363C),导致编码的第 1121 号氨基酸由赖氨酸变异为天冬酰胺 (p.K1121N),该突变在 1000G、ExAC 和 gnomAD 数据库中 EAS 的 MAF 是 0.000 1,为极罕见变异;预测该 *ADCY3* 基因突变对蛋白的伤害性为 DS,根据 ACMG 指南鉴定为致病的变异。

患者 1,男性,46 岁,BMI 为 39.28 kg/m<sup>2</sup>;在 *NTRK2* 基因检测到 1 个突变,为 chr9: 87635191 位置

上碱基 C>T 的杂合突变 (c.C2195T),导致编码的第 732 号氨基酸由苏氨酸变异为甲硫氨酸 (p.T732M)。预测该突变对蛋白的伤害程度为 DVS,根据 ACMG 指南鉴定为致病的变异。该突变在 3 个数据库 EAS 中都未检索到,为新发变异。

患者 5,女性,32 岁,BMI 为 34.01 kg/m<sup>2</sup>。在 *AGRP* 基因的 chr16: 67516606 位置发生碱基 G>A 杂合突变 (c.G332A),导致编码的第 111 号氨基酸由精氨酸变异为组氨酸 (p.R111H)。1000G、ExAC 和 gnomAD 数据库中 EAS 的 MAF 为 0.001 0。预测该突变对蛋白的伤害性为 DS,根据 ACMG 指南鉴定为致病的变异。

## 3 讨论

在 119 名接受减重手术的肥胖患者中,有 24 名患者检测到相关基因的 22 种罕见突变;其中有 12 种突变在 1000G、ExAC 和 gnomAD 数据库的 EAS 中未检索到,为东亚人群新发变异。

本研究所检测基因都在 LEP-MSH 能量平衡调节通路中发挥作用。 *PHIP* 可直接增强 *POMC* 的转录<sup>[13]</sup>。 *LEP* 基因编码的蛋白与其受体结合后抑制 NPY/*AGRP* 的合成和释放,并激活 *POMC*,进而产生  $\alpha$ -MSH 和  $\beta$ -MSH,激活 *MC3R* 和 *MC4R*<sup>[14-16]</sup>。 *MC4R* 和 *ADCY3* 特异性地共定位在室旁神经元亚群的初级纤毛中,特异性抑制 *ADCY3* 可使小鼠食物摄入量和体质量显著增加<sup>[17]</sup>。 *MC4R* 同时也可调节 BDNF 的分泌, BDNF 可与其受体 *NTRK2* 结合,影响食物摄入和能量分配。 *SIM1* 和 *MC4R* 共同存在于下丘脑室旁核中,并且 *SIM1* 的缺失导致 *MC4R* 和催产素的表达减少<sup>[18]</sup>。除了激活 *POMC*, *LEP* 与其受体的结合也可在 *SH2B1* 的协助下,激活信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, *STAT3*),后者可在 *Tubby* 二分转录因子 (*Tubby* bipartite transcription factor, *TUB*) 的帮助下迁移到细胞核,并激活其与能量平衡相关的靶基因,从而调节瘦素的食欲减退效应<sup>[19]</sup>。而黑色素聚集激素神经元直接抑制 *POMC* 神经元的电活动<sup>[20]</sup>,并通过奖赏系统促进食物的摄入<sup>[21]</sup>。另外, *KSR2* 调节 *AMPK* 的活性<sup>[22]</sup>,并直接与 *AMPK* 相互作用<sup>[23]</sup>。

*SH2B1* 是与非综合征单基因肥胖相关的候选基因。该基因编码一种参与受体酪氨酸激酶 (如 *LEP*、

BDNF和胰岛素受体)下游信号转导的细胞内衔接蛋白;这些信号通路在食物摄入控制、能量消耗和/或葡萄糖平衡中起着至关重要的作用<sup>[24]</sup>。在本队列中SH2B1基因突变频率最高,为5.88%。其中有3个与肥胖相关联的突变位点在1000G、ExAC和gnomAD数据库中未检索到,分别为p.R67C、p.L149F和p.V209I。根据软件预测以及临床表型,ACMG指南把前2个变异都评判为致病的变异;虽然p.V209I被软件预测为良性(B),但由于患者存在肥胖表型,我们建议需要进一步的功能分析来研究该突变对蛋白质的可能影响,从而判断其致病性,因此根据ACMG指南鉴定其为意义不明的变异。

LEPR广泛分布于中枢神经系统及外周组织,促进了LEP的多效性作用;通过脂肪组织和下丘脑之间的负反馈机制,LEPR在体质量调节中起着重要的作用。在一项研究<sup>[25]</sup>中,对25个疑似常染色体隐性早发性肥胖家族的个体使用靶向重测序,结果在2名患者中发现了纯合的LEPR变异体;两者都表现出早发性肥胖、食欲过盛和糖尿病,可见LEPR突变对近亲家庭中严重早发性肥胖病例的影响。巧合的是,本研究发现一对姐妹在LEPR基因上存在相同的突变位点(p.W132R),为EAS新发变异;根据软件预测,再结合2名患者的临床表型,根据ACMG指南鉴定其为致病性的变异。因此,两者肥胖的原因很可能都是由该突变引起的。

MC4R在调节人体的能量平衡中起重要的作用,与 $\beta$ -MSH结合后,食物摄取会减少,能量代谢提高,可起到控制体质量的目的<sup>[14]</sup>。本研究检测到1例未报道过的MC4R基因上的无义突变(p.W174X),目前该突变在1000G、ExAC和gnomAD数据库EAS中都未检索到,为LOF新发变异。

目前认为对于极度肥胖的患者,减重手术是最有效的方法,但其在单基因肥胖方面的有效性和安全性仍存在争议。我们之前的一项关于单基因肥胖突变减重手术后的6年随访研究<sup>[26]</sup>证明单基因突变影响减重手术的有效性。随着人们对肥胖遗传基础的深入了解,肥胖的治疗也有了新的突破。Setmelanotide是一种MC4R激动剂,用于治疗由POMC、PCSK1或LEPR缺乏引起的肥胖,已获得美国食品药品监督管理局的突破性疗法认定<sup>[27]</sup>。对于LEP基因突变导致的肥胖患者,通过皮下注射LEP可有所改善<sup>[28]</sup>。

探索肥胖的遗传因素,可为今后的精准诊疗提供

重要依据。WES对常见、罕见和低频突变均具有较高的灵敏度,能发现外显子区域绝大部分疾病相关变异,而且仅需要对约1%的基因组进行测序<sup>[29-30]</sup>,缩短了研究周期。大多数单基因肥胖都符合孟德尔遗传定律。随着基因测序的不断发展,越来越多导致肥胖的基因被发现。PAZ-FILHO等<sup>[31]</sup>对2名严重早发性肥胖的儿童进行了WES研究,发现解偶联蛋白2(uncoupling protein 2, UCP2)、活化诱导胞嘧啶核苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AICDA)、序列相似的家庭71成员E2(family with sequence similarity 71, member E2, FAM71E2)基因与肥胖相关。THAKER等<sup>[32]</sup>报道了一名ROHHAD综合征的病态肥胖儿童,应用WES发现其存在视黄酸诱导蛋白1(retinoic acid induced 1, RAI1)突变。

本研究通过WES,共筛选出了12种肥胖相关的EAS新发变异,为肥胖的发病机制和个体化治疗提供了新的线索。本课题组之前的一项研究<sup>[26]</sup>利用WES筛选减重手术患者中携带MC4R、MC3R、LEP、LEPR、PCSK1和SIM1基因突变的人群,并对突变携带者与非携带者随访6年,结果显示突变携带者代谢手术后6年的疗效比非携带者差。突变携带者术后的代谢指标,与基线相比虽然都有好转,但改善程度低于非携带者。本研究进一步完善了筛选的LEP-MSH通路基因,但由于随访时间较短,突变携带者与非携带者的术后疗效与代谢指标之间并没有显著差异。后续我们将延长随访时间,观察并比较携带者与非携带者术后的长期疗效,进一步明确我们所鉴定得到的新的致病性突变的临床意义。并且由于经济、时间等因素,目前本研究所纳入的样本量较少;本研究仅仅通过生物信息学分析预测了突变的有害性,并没有进行功能验证,因此还有待进一步的蛋白质结构分析、细胞以及动物实验来验证基因变异位点的致病性。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

本研究不存在利益冲突。

The authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究获得了上海交通大学医学院附属第六人民医院人类研究伦理委员会的批准[批件号为2022-KY-164(K)]。本研究遵循《赫尔辛基宣言》原则,所有受试者均知情同意。

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of

Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine [Approval Letter No. 2022-KY-164(K)]. The study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in *Declaration of Helsinki*, and all the research participants gave informed consent.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

王景慧负责撰写论文; 王景慧、彭丹凤、余海蓉、宣晔参与临床数据收集; 张红、张蓉参与全外显子测序; 张红负责生物信息学分

析; 陈香慧负责实验操作; 胡承和顾云娟负责论文设计、指导。WANG Jinghui wrote the manuscript. WANG Jinghui, PENG Danfeng, YU Hairong and XUAN Ye collected the clinical data. ZHANG Hong and ZHANG Rong performed the whole exome sequencing. ZHANG Hong performed the bioinformatics analysis. CHEN Xianghui completed experimental operations. HU Cheng and GU Yunjuan designed the study and directed the research.

- Received: 2023-02-17
- Accepted: 2023-06-30
- Published online: 2023-07-28

#### 参·考·文·献

- [ 1 ] PAN X F, WANG L M, PAN A. Epidemiology and determinants of obesity in China[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9(6): 373-392.
- [ 2 ] HRUBY A, HU F B. The epidemiology of obesity: a big picture[J]. *Pharmacoeconomics*, 2015, 33(7): 673-689.
- [ 3 ] GONZÁLEZ-MUNIESA P, MÁRTINEZ-GONZÁLEZ M A, HU F B, et al. Obesity[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17034.
- [ 4 ] XIA Q H, GRANT S F A. The genetics of human obesity[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1281(1): 178-190.
- [ 5 ] LOOS R J F, YEO G S H. The genetics of obesity: from discovery to biology[J]. *Nat Rev Genet*, 2022, 23(2): 120-133.
- [ 6 ] SINGH R K, KUMAR P, MAHALINGAM K. Molecular genetics of human obesity: a comprehensive review[J]. *C R Biol*, 2017, 340(2): 87-108.
- [ 7 ] HANSEN M C, HAFERLACH T, NYVOLD C G. A decade with whole exome sequencing in haematology[J]. *Br J Haematol*, 2020, 188(3): 367-382.
- [ 8 ] GULATI A, SOMLO S. Whole exome sequencing: a state-of-the-art approach for defining (and exploring!) genetic landscapes in pediatric nephrology[J]. *Pediatr Nephrol*, 2018, 33(5): 745-761.
- [ 9 ] LIU X P, WANG J G, CHEN L N. Whole-exome sequencing reveals recurrent somatic mutation networks in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 340(2): 270-276.
- [ 10 ] GILL R, CHEUNG Y H, SHEN Y F, et al. Whole-exome sequencing identifies novel *LEPR* mutations in individuals with severe early onset obesity[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2014, 22(2): 576-584.
- [ 11 ] SAEED S, BONNEFOND A, TAMANINI F, et al. Loss-of-function mutations in *ADCY3* cause monogenic severe obesity[J]. *Nat Genet*, 2018, 50(2): 175-179.
- [ 12 ] SCHEIDECKER S, ETARD C, PIERCE N W, et al. Exome sequencing of Bardet-Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit *BBIP1 (BBS18)*[J]. *J Med Genet*, 2014, 51(2): 132-136.
- [ 13 ] MARENNE G, HENDRICKS A E, PERDIKARI A, et al. Exome sequencing identifies genes and gene sets contributing to severe childhood obesity, linking *PHIP* variants to repressed *POMC* transcription[J]. *Cell Metab*, 2020, 31(6): 1107-1119.e12.
- [ 14 ] BENJANNET S, RONDEAU N, DAY R, et al. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(9): 3564-3568.
- [ 15 ] ELIAS C F, ASCHKENASI C, LEE C, et al. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area[J]. *Neuron*, 1999, 23(4): 775-786.
- [ 16 ] COWLEY M A, SMART J L, RUBINSTEIN M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 480-484.
- [ 17 ] AL-MASSADI O, QUIÑONES M, CLASADONTE J, et al. MCH regulates *SIRT1/FoxO1* and reduces POMC neuronal activity to induce hyperphagia, adiposity, and glucose intolerance[J]. *Diabetes*, 2019, 68(12): 2210-2222.
- [ 18 ] TOLSON K P, GEMELLI T, GAUTRON L, et al. Postnatal *Sim1* deficiency causes hyperphagic obesity and reduced *Mcr4r* and oxytocin expression[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(10): 3803-3812.
- [ 19 ] PIGEYRE M, YAZDI F T, KAUR Y, et al. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(12): 943-986.
- [ 20 ] TIAN Y, PENG B Q, FU X H. New *ADCY3* variants dance in obesity etiology[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(6): 361-363.
- [ 21 ] DILSIZ P, AKLAN I, SAYAR ATASOY N, et al. MCH neuron activity is sufficient for reward and reinforces feeding[J]. *Neuroendocrinology*, 2020, 110(3/4): 258-270.
- [ 22 ] COSTANZO-GARVEY D L, PFLUGER P T, DOUGHERTY M K, et al. *KSR2* is an essential regulator of AMP kinase, energy expenditure, and insulin sensitivity[J]. *Cell Metab*, 2009, 10(5): 366-378.
- [ 23 ] FERNANDEZ M R, HENRY M D, LEWIS R E. Kinase suppressor of Ras 2 (*KSR2*) regulates tumor cell transformation *via* AMPK[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(18): 3718-3731.
- [ 24 ] DA FONSECA A C P, ASSIS I S S, SALUM K C R, et al. *SH2B1* variants as potential causes of non-syndromic monogenic obesity in a Brazilian cohort[J]. *Eat Weight Disord*, 2022, 27(8): 3665-3674.
- [ 25 ] NIAZI R K, GJESING A P, HOLLENSTED M, et al. Identification of novel *LEPR* mutations in Pakistani families with morbid childhood obesity[J]. *BMC Med Genet*, 2018, 19(1): 199.
- [ 26 ] LI Y Y, ZHANG H, TU Y F, et al. Monogenic obesity mutations lead to less weight loss after bariatric surgery: a 6-year follow-up study[J]. *Obes Surg*, 2019, 29(4): 1169-1173.
- [ 27 ] MARKHAM A. Setmelanotide: first approval[J]. *Drugs*, 2021, 81(3): 397-403.
- [ 28 ] OBRADOVIC M, SUDAR-MILOVANOVIC E, SOSKIC S, et al. Leptin and obesity: role and clinical implication[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 585887.
- [ 29 ] BAMSHAD M J, NG S B, BIGHAM A W, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(11): 745-755.
- [ 30 ] VELTMAN J A, BRUNNER H G. *De novo* mutations in human genetic disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(8): 565-575.
- [ 31 ] PAZ-FILHO G, BOGUSZEWSKI M C S, MASTRONARDI C A, et al. Whole exome sequencing of extreme morbid obesity patients: translational implications for obesity and related disorders[J]. *Genes*, 2014, 5(3): 709-725.
- [ 32 ] THAKER V V, ESTEVES K M, TOWNE M C, et al. Whole exome sequencing identifies *Rall1* mutation in a morbidly obese child diagnosed with ROHHAD syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(5): 1723-1730.

[ 本文编辑 ] 瞿麟平

