

# 成骨不全 I 型家系的基因检测和 *COL1A2* 基因新突变的致病性鉴定

李荣<sup>1</sup>, 郭源平<sup>2</sup>, 潘敬新<sup>3</sup>, 郭奕斌<sup>1</sup>

1. 中山大学中山医学院医学遗传学教研室, 广州 510080;
2. 中山大学医学遗传学业余科研小组/广州市第十六中学高二(3)班, 广州 510080;
3. 福建医科大学附属第二医院内科, 泉州 362000

**摘要:** 为了揭示成骨不全(Osteogenesis imperfecta, OI) I 型家系的分子遗传学发生机制, 文章采用 PCR-DNA 直接测序法, 对患儿 *COL1A1* 和 *COL1A2* 基因共 103 个外显子(E)进行突变检测。结果显示: 患儿 *COL1A1* 基因未发现任何病理性突变, 而在 *COL1A2* 基因 E19 内发现一新的杂合错义突变(p.G316C), 该突变来自其父, 而其母正常, 其他表型正常的 6 位亲属也均未发现该突变; 通过 DHPLC(Denaturing high performance liquid chromatography)筛检, 发现患儿与其父均有异常双峰, 而其母和所有正常对照均为正常单峰; 通过 ASA(Allele specific amplification)筛检, 患儿与其父均有 391 bp 的特异扩增带, 而其母和所有正常对照均未见特异扩增带; 保守性分析结果显示, 该突变位点所在甘氨酸在进化上具有高度保守性; SIFT 和 PolyPhen-2 软件预测结果显示, 新突变造成的结果是“有害的”和“很可能有害”。上述结果均说明 *COL1A2* 基因 c.946G>T/p.G316C 新突变是导致 OI- I 型的致病性突变, 是引起患儿发病的真正内因。患儿父母若再次孕育, 可在孕早期进行产前基因诊断或孕前期进行 PGD(Preimplantation genetic diagnosis)予以防患。

**关键词:** 成骨不全 I 型; *COL1A2* 基因; 新突变; 致病性鉴定

## Genetic screening of a pedigree with osteogenesis imperfecta type I and identification of a novel mutation in *COL1A2* pathogenic gene

Rong Li<sup>1</sup>, Yuanping Guo<sup>2</sup>, Jingxin Pan<sup>3</sup>, Yibin Guo<sup>1</sup>

1. Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Amateur Team, Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University/ Class 3, Senior 2, The 16th Middle School, Guangzhou 510080, China;
3. Department of Internal Medicine, The Second Affiliated Hospital, Fujian University of Medical Science, Quanzhou 362000, China

**Abstract:** To uncover the molecular pathogenic mechanism of congenital osteogenesis imperfecta (OI) type I, all the 103 exons of the *COL1A1* (Collagen, type I, alpha 1) and *COL1A2* (Collagen, type I, alpha 2) genes in a child with OI type I were screened using PCR-DNA direct sequencing. The results showed no pathological mutation in *COL1A1*

收稿日期: 2014-07-10; 修回日期: 2014-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30772069)和闽粤横向科研基金项目(编号: 71010025)资助

作者简介: 李荣, 硕士研究生, 专业方向: 医学遗传学。E-mail: banshou913@126.com

通讯作者: 郭奕斌, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 遗传病的分子诊断及产前/植入前基因诊断。E-mail: aguobin@qq.com

DOI: 10.16288/j.ycz.2015.01.006

网络出版时间: 2014-11-24 17:57:46

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20141124.1757.003.html>

gene, but a novel mutation c.946G>T/p.G316C in the exon 19 of *COL1A2* gene, which was inherited from her father. This mutation was not found in her mother and other six phenotypically normal relatives. By denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) screening, the abnormal double-peak was visualized in PCR products of exon 19 of *COL1A2* gene in the proband and her father, while the normal single-peak was shown in those of her mother and all the healthy controls. Using allele specific amplification (ASA) screening, a specific band of 391 bp in *COL1A2* exon 19 was amplified only in the proband and her father, but not in other samples. The amino acid encoded by the mutation site is evolutionarily highly conserved, and this mutation was a “damaging” or “probably damaging” factor to OI type I, based on the predicting results using SIFT and Polyphen-2 softwares. In conclusion, the novel c.946G>T/p.G316C mutation in *COL1A2* gene is a pathogenic mutation that could result in OI type I. If the couple wants to get pregnant again, it is necessary to screen the mutation site in *COL1A2* gene through the prenatal genetic diagnosis in the first trimester or through preimplantation genetic diagnosis (PGD) in the progestation.

**Keywords:** osteogenesis imperfecta type I; *COL1A2* gene; novel mutation; pathogenic identification

成骨不全(Osteogenesis imperfecta, OI)又称为脆骨病,是一种全身结缔组织遗传病,常见的、经典的 OI 呈常染色体显性遗传(Autosomal dominant, AD),而罕见的、新发现的呈常染色体隐性遗传(Autosomal recessive, AR)<sup>[1~3]</sup>。该病临床特征主要表现为不同程度的骨折、骨畸形、骨脆性增加、蓝巩膜、牙本质发育不全、听力下降等<sup>[4,5]</sup>。据统计,成骨不全在国外的发病率为 1/30000~1/10000<sup>[4]</sup>,而在中国人群中的发病率约为 4/10000<sup>[5]</sup>。根据最新文献报道,成骨不全可分为 ~ 型(表 1)。其中,成骨不全 型(OI-, MIM 166200)最为常见,但症状相对较轻,主要表现为轻度的身材矮小,轻度到中度的骨裂,骨质疏松,骨密度下降,易反复骨折而引起多处畸形,关节松弛以及蓝巩膜等。OI- 为 AD 遗传,表现度有差异,有的表现为反复骨折,有的仅表现为骨裂,群体发病率约 1/3 万活婴。本病是由 型胶原蛋白基因突变所致, 型胶原是由 2 条  $\alpha 1$  链和 1 条  $\alpha 2$  链组成,分别由 *COL1A1* 基因和 *COL1A2* 基因编码,其中 *COL1A1* 基因位于染色体 17q21.31~q22.05,全长 18 kb,有 51 个外显子,*COL1A2* 基因位于染色体 7q22.1,全长 38 kb,有 52 个外显子<sup>[6]</sup>。

成骨不全至今仍无切实有效的根治手段,因此,检出突变、对新突变进行鉴定、阐明病因、对再次妊娠的高危胎儿实施产前基因诊断是目前防治该病的最佳应对策略和优生手段,而阐明其分子遗传学发生机制也是开展孕早期诊断和胚胎植入前诊断的必要前提条件。

本研究对一疑似成骨不全 型的家系进行了

表 1 成骨不全分型列表

分型	OMIM	临床严重性	突变基因	遗传方式
	166200	轻度~无畸形	<i>COL1A1/2</i>	AD
	166210	围产期死亡	<i>COL1A1/2</i>	AD
	259420	严重畸形	<i>COL1A1/2</i>	AD
	166220	中等畸形	<i>COL1A1/2</i>	AD
	610967	中等畸形	<i>IFITM5</i>	AD
	613982	中等~严重畸形	<i>SERPINF1</i>	AR
	610682	中等畸形	<i>CRTAP</i>	AR
	610915	严重畸形~围产期死亡	<i>LEPRE1</i>	AR
	259440	严重畸形	<i>PPIB</i>	AR
	613848	严重畸形	<i>SERPINH1</i>	AR
	610968	严重畸形	<i>FKBP10</i>	AR
	613849	中等畸形	<i>SP7</i>	AR
	614856	中等畸形	<i>BMP1</i>	AR
	615066	中等~严重畸形	<i>TMEM38B</i>	AR
	615220	中等畸形	<i>WNT1</i>	AR

*COL1A1*、*COL1A2* 基因诊断,发现 *COL1A2* 基因存在一新的错义突变,并对该新突变进行了详细的致病性鉴定。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

先证者:女,汉族,就诊时 9 岁 7 个月,2014 年 4 月因骨骼畸形及大腿骨折复发,经外院转诊到我室进行基因诊断,以便为其父母再孕时的产前基因诊断做准备。据述,患儿从小就有反复骨折病史,

1 岁 7 个月时就因外伤发生过骨折。2 岁 1 个月时复诊: 右下肢不愿活动, 动之哭闹加剧, 拍片示右股骨下段青枝骨折。2 岁 11 个月复诊: 右股骨骨干细小, 向外弯曲畸形, 见多个新旧之骨折, 对位尚好, 右膝诸骨骨质疏松。诊断意见: 上述骨质改变考虑成骨不全。4 岁 11 个月因右下肢弯曲短缩畸形、跛行 2 年多入院检查。X 光片显示: 右侧股骨弯曲畸形为成骨不全改变, 原病理骨折已愈合。膝关节及胫骨骨骺骨质疏松。诊断: 成骨不全症; 右股骨陈旧性骨折并弯曲畸形。5 岁 8 个月因右大腿弯曲畸形, 术后 9 个月复查, 结论同 4 岁 11 个月。7 岁 1 个月入院检查, X 光片所见: 左股骨中段骨折, 骨痂较前增多, 较明显。成骨不全改变, 同前。左股骨下端外侧干骺端密度增高硬化。8 岁 2 个月因“跌倒致伤左大腿肿痛活动受限 1 d”入院检查, 大腿中上段中度肿胀, 压痛敏锐, 纵叩痛(+), 骨干力丧失, 扪及骨擦感及异常活动, 膝关节活动受限, 足背动脉搏动可触及, 趾动, 血运好。诊断: 左股骨上段骨折; 成骨不全。

先证者父亲: 小时未发生骨折, 但在 12~13 岁时, 因骑车摔倒等外伤曾发生过多次骨裂, 骨裂部位发生在双手的前臂, 也发生在双下肢的小腿, 但症状较轻, 发病年龄也比其女儿晚。根据上述临床资料, 拟诊为成骨不全 I 型, 详细病因及分型待基因检测确诊。

正常对照组: 为我室近 3 年来收集的、来自南方地区的、无亲缘关系的、表型正常的健康个体共 150 名。其中男 80 名, 年龄 24~32 岁; 女 70 名, 年龄 22~28 岁。另外, 还收集了先证者家族中表型正常的部分亲属共 6 人, 其中男、女各 3 人。

本研究已得到中山大学中山医学院伦理委员会批准, 患儿及其父母完全知情并签署“基因诊断知情同意书”。

## 1.2 方法

### 1.2.1 外周血 DNA 模板的制备

抽取先证患儿、患儿父母及正常对照组的外周血各 2~4 mL(1~2 管), EDTA 抗凝。参考文献[7]的方法或全血 DNA 提取试剂盒(Sigma 公司)制备模板 DNA, 4℃保存备用。

### 1.2.2 PCR 扩增及测序

普通引物的扩增: 参考文献[8,9]设计 COL1A1 和 COL1A2 基因的扩增引物, 引物由上海美吉公司或北京中美泰和公司合成。COL1A1 基因扩增条件参考文献[10,11]。COL1A2 基因扩增条件: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 55~65℃复性 40 s, 72℃延伸 45 s, 38 个循环; 最后再 72℃延伸 10 min, 4℃保存或直接电泳。扩增体系(30 μL): 10×Buffer 3 μL, 10 mmol/L dNTP Mix 2.8 μL, 上、下游引物各 1 μL, 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 20 μL, rTaq 酶 0.2 μL(试剂盒购自 TaKaRa 公司)。

COL1A2 基因 E19(c.946)特异引物的扩增: 根据等位基因特异性扩增(A allele-specific amplification, ASA), 即扩增阻碍突变系统(Amplification refractory mutation system, ARMS)原理, 针对新突变位点 c.946G>T, 采用 Primer premier 5.0 软件, 设计一对单碱基错配特异引物。上游引物: 5'-CCGCCGGTCCCCGT-GGTGAAG-3', 下游引物: 5'-GCCGGGAGCCCCAG-CAACGCA-3'。扩增条件: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 68℃复性 40 s, 72℃延伸 40 s, 30 个循环; 最后再 72℃延伸 10 min。扩增体系(20 μL): 2×Taq PCR StarMix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL, 上、下游引物各 1 μL, 模板 1 μL(试剂盒购自北京康润生物公司)。用 1.2%~1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。为了验证错配的碱基是否与设计的一致, PCR 扩增后将产物送测序公司进行测序。普通引物和特异引物的扩增产物, 根据需要进行正向或反向或双向测序。

### 1.2.3 新突变的致病性鉴定

对 HGMD 数据库(The Human Gene Mutation Database, 2014, <http://www.hgmd.org/>)、NCBI dbSNP 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)和近 5 年的文献进行检索, 证实先证患儿所携带的 COL1A2 基因 c.946G>T/p.G316C 突变是一新的突变类型, 故需对其致病性进行详细鉴定, 以阐明患儿发病的真正内因。鉴定步骤包括: (1)采用 DHPLC(Denaturing high performance liquid chromatography)法对由患儿和其父组成的实验组以及由其母和 150 名健康人组成的正常对照组进行突变筛查, 以统计该突变在群体中的发生频率, 从而确认或排除多态性的可能; (2)采用 ASA(A allele specific amplification)法直接将实验

组和对照组样品同时扩增,通过观察扩增结果,来鉴定待检样品是否存在突变,然后统计、确认或排除多态性的可能。(3)利用 Clustal X 软件,对人(*Homo sapiens*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、牛(*Bos taurus*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、猕猴(*Macaca mulatta*)、原鸡(*Gallus gallus*)、非洲爪蟾(*Xenopus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、叶吻银鲛(*Callorhynchus milii*)等 13 个物种该位点的氨基酸进行保守性分析,根据保守性的强弱来判断突变致病性的大小。(4)利用 SIFT 和 PolyPhen 软件对突变的危害性进行预测,以此判断该突变的致病性。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增及测序

利用 *COL1A2* 基因 E19 普通引物对正常对照、患儿父亲、患儿母亲、先证患儿进行 PCR 扩增,结果显示:4 个样品均有 372 bp 的扩增产物(图略),这与预期结果完全相符。

测序结果表明,患儿 *COL1A1* 基因 51 个外显子均未检出病理性突变,但在 *COL1A2* 基因第 19 外显子的编码区内却发现一杂合错义新突变(c.946G>T),为 G/T 杂合峰形(图 1D)。将患儿父母和正常对照的 E19 同时测序,然后用 Chromas 软件进行比对,发现患儿突变来自其父(图 1B),而其母正常(图 1C)。

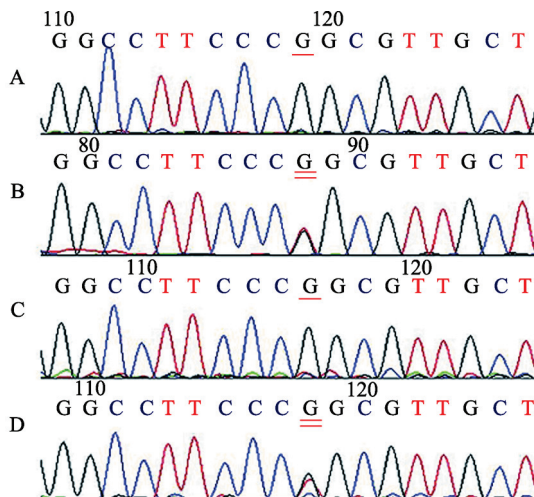


图 1 正常对照(N)、患儿父亲(F)、患儿母亲(M)、先证患儿(P)的 *COL1A2* E19 正向序列比对图

A: 正常对照的 c.946G/G 纯合子; B: 患儿父亲的 c.946G/T 杂合子; C: 患儿母亲的 c.946G/G 纯合子; D: 先证患儿的 c.946G/T 杂合子。单划线表示正常的 G, 双划线表示杂合突变的 G/T。

### 2.2 新突变的致病性鉴定结果

#### 2.2.1 *COL1A2* E19 的 DHPLC 筛检结果

患儿和其父的 *COL1A2* E19 的 DHPLC 筛检结果呈异常双峰(图 2, B 和 D), 而患儿母亲和正常对照样品均为正常单峰(图 2, A 和 C)。

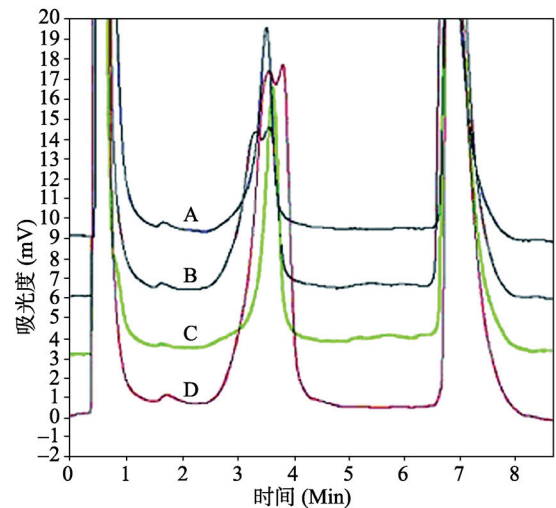


图 2 *COL1A2* E19 的 DHPLC 筛检结果

A: 正常对照; B: 患儿父亲; C: 患儿母亲; D: 先证患儿。

#### 2.2.2 *COL1A2* E19 的 ASA 筛检结果

*COL1A2* E19 特异引物的扩增产物为 391 bp。患儿父亲与患儿均扩增阳性(图 3 的泳道 2 和 4), 而母亲为阴性(图 3 的泳道 3), 2 例正常对照也全为阴性(图 3 的泳道 1 和 5)。另外, 随机选取的 148 例正常对照扩增也均为阴性。这与本文预期的结果完全一致, 说明正常组不含有 c.946G>T 突变, 从而说明该突变不是一般的多态性变异, 而是一种新的致病性突变。

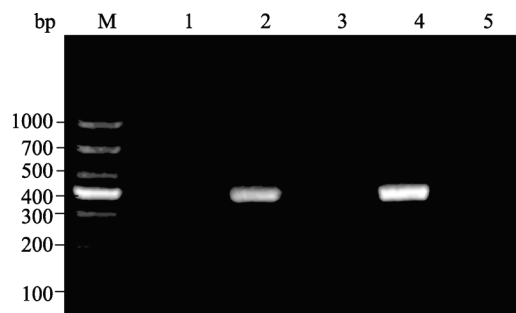


图 3 *COL1A2* E19 特异引物的扩增产物

M: 1000 bp Marker; 1: 正常对照 1; 2: 患儿父亲; 3: 患儿母亲; 4: 患儿; 5: 正常对照 2。



2.2.3 COL1A2 E19 单错配特异引物的验证结果

突变点的碱基与本文设计时引入的单错配碱基(把正常的 G 错配为 T)完全一致,进一步验证了产物的准确性、鉴定的可行性(图 4, C 和 D)。正常的纯合 G 由于无法与错配碱基 T 配对,故扩增阴性,而杂合子既含有 G,也含有 T,所以有一条模板链

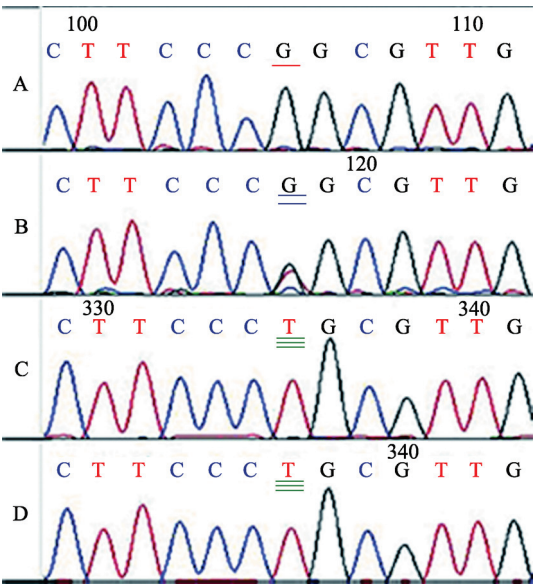


图 4 COL1A2 E19 普通引物和特异引物扩增产物的序列比较结果  
A、B: E19 普通引物产物的序列,其中 A 为正常对照, B 为患儿; C、D: E19 特异引物产物的序列,其中 C 为患儿父亲, D 为先证患儿。

扩增阳性,故有扩增产物。C 和 D 分别是患儿父亲和先证患儿,其 c.946 均为 T 纯合子(三划线所示)。

2.2.4 突变位点氨基酸的保守性分析结果

COL1A2 肽链即  $\alpha 2$  链第 316 位氨基酸即新突变所在位置,在 13 个不同来源的跨物种中均为甘氨酸(G)(图 5 红框所示部位),说明该位点在进化过程中高度保守,也说明这个氨基酸具有重要的生化功能。因此,该位点一旦发生突变,势必影响 型胶原  $\alpha 2$  链的氨基酸组成,影响其螺旋结构,进而影响其正常功能,最终导致 OI- 型的发生。由此可以推断,这个新突变很可能就是致病性突变。

2.2.5 SIFT 和 PolyPhen-2 软件对突变危害性的预测结果

SIFT 软件预测结果为“有害的”,如图 6 蓝框所示部位。PolyPhen-2 预测结果为“很可能有害”(图略)。可见 p.316 位的甘氨酸被半胱氨酸替代是有害的,因而进一步证实 p.G316C 突变是一种新的致病性突变。

3 讨 论

成骨不全(OI)类型多,症状大多相似,临床诊断只能初诊而无法确诊和分型,更无法在孕早期进行产前诊断。而基因诊断不但可以确诊,而且可以用于产前/植入前诊断。OI- 型是由于 COL1A1 基因

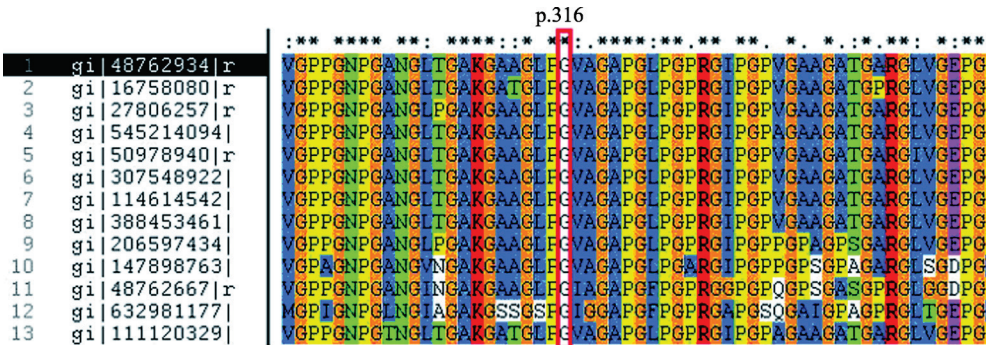


图 5 p316 甘氨酸(G)在 13 个跨物种中的保守性分析结果

PROVEAN Human Protein Batch Result (Download)

VARIATION		PROTEIN SEQUENCE CHANGE				PROVEAN PREDICTION				SIFT PREDICTION	
ROW_NO.	INPUT	PRTEIN_ID	POSOMN	RESIDUE_REF	RESIDUE_ALT	SCORE	PREDICTION (cutoff=2.5)	#SEQ	#CLUSTER	SCIRE	PREDICTION (cutoff=0.5)
1	NP_000080.2,316,G,C	NP_000080.2	316	G	C	-7.565	Deleterious	315	30	0.000	Damaging

图 6 SIFT 软件预测结果

或 *COL1A2* 基因发生突变所致, 所以找到病理性突变是确诊的关键。本文通过对先证者的 *COL1A1*、*COL1A2* 基因进行详细的检测, *COL1A1* 基因未发现任何病理性突变, 但在 *COL1A2* E19 的编码区内首次发现一个杂合错义突变(p.G316C)。这两个基因都具有高度遗传异质性, 不但种类多(截至本文发稿之时已报近千种, 其中, *COL1A1* 基因的突变种类有 614 种, *COL1A2* 的有 357 种(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)), 而且突变类型也多种多样。不同的突变类型, 其表型效应也不同, 甚至大相径庭。对于单碱基置换引起的错义突变, 情况更为复杂, 病因更难确定。因此, 对于新发现的未知突变, 必须对其致病性进行详细鉴定, 方能阐明发病的真正原因, 才能为今后的产前乃至植入前诊断创造前提条件。本文先证患儿的父母 7、8 年来一直不敢再孕就是因为基因水平的病因一直未明的缘故。

对于新突变的致病性鉴定, 目前比较常用、比较可行的方法主要有: 突变频率的统计; 突变点氨基酸的保守性分析; 生物信息学软件对突变危害性的预测; 正常蛋白与突变蛋白高级结构的比对。此外, 还可进行 RNA 水平、蛋白水平的鉴定, 如果是遗传性代谢病, 还可进行酶学鉴定。对于群体突变频率的统计, 主要是用于排除 SNP 的可能。虽然统计方法不少, 但由于样品量大、费用高, 故需采用快速特异、简便廉价、高通量的技术。DHPLC、ASA 法正好可以满足这些条件, 它们可以在短短几天之内完成对数百例样品的筛检, 既快速特异, 又容易操作, 而且成本也较低。

关于 RNA 水平、蛋白水平的鉴定, 由于 *COL1A1*、*COL1A2* 基因都不在外周血表达或表达极少, 而主要在皮肤、骨髓、脂肪细胞、PB-CD4<sup>+</sup>T 细胞、胸腺、扁桃腺、脑、睾丸、卵巢、肝、肾、肺、心脏、胰岛等组织表达(<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgNear?org=human>), 而取皮肤、骨髓等组织均为有创性检查, 加上 OI 病会导致患儿血小板明显减少, 故很难征得患儿父母的同意, 所以很难在 RNA 水平和蛋白水平进行更深入地鉴定。

关于 *COL1A1*、*COL1A2* 基因突变的分子致病机制目前主要有两种: 一是杂合无义突变、移码突变和剪切位点改变导致了 *COL1A1* 基因单倍剂量不足, 它是引起 OI- 型的主要致病机理。因为这些突变会

导致 mRNA 的不稳定, 导致约 50% 的 I 型胶原的合成减少<sup>[12]</sup>; 二是 *COL1A1*、*COL1A2* 基因突变引起甘氨酸的替代, 导致  $\alpha$  链不能正确合成, 导致 I 型胶原分子的结构异常, 从而影响到整个胶原纤维网络, 最终引起疾病的发生。而表型的多样性可能与 I 型胶原螺旋结构的破坏程度和聚集位点在蛋白质相互作用的重要性有关<sup>[12]</sup>, 因为 I 型胶原的三螺旋区都含有 338 个连续重复的 Gly-X-Y 三螺旋结构, 甘氨酸的存在对三螺旋的形成至关重要<sup>[13]</sup>。

*COL1A1* 和 *COL1A2* 基因突变导致的甘氨酸替换会引起 I 型胶原三级螺旋结构的不稳定<sup>[12]</sup>, 发生在 I 型胶原  $\alpha 1$  链上的甘氨酸的替换通常是致死的, 而由 *COL1A2* 基因突变引起的甘氨酸的替换则通常是不致死的<sup>[14]</sup>。本文所发现的新突变(c.946G>T, p.G316C), 导致了  $\alpha 2$  链上甘氨酸(G)被半胱氨酸(C)替代, 其临床症状较轻也印证了这一点。Gentile 等<sup>[15]</sup>报道, *COL1A2* 基因 c.946G>A 突变(p.G316S, “甘氨酸”被“丝氨酸”替代)会引起 OI- 型(临床症状仅表现为轻度畸形或无畸形); Marini 等<sup>[14]</sup>报道, *COL1A2* 基因 c.946G>C 突变(p.G316R, “甘氨酸”被“精氨酸”替代)则引起 OI- 型(临床表现为骨骼严重畸形), 可见相同位点被不同氨基酸替代有可能产生不同的表型, 而相同氨基酸在同一位置替换在不同的个体中也会有不同的表型, 本文中先证患女的症状较其父亲严重也印证了这一点。G316S 和 G316R 错义突变之所以会出现表型的明显差异, 很可能是因为丝氨酸 S 的化学结构、所带电荷数和等电点(Ser 的 pI=5.68)跟甘氨酸 G 的差别不大(Gly 的 pI=5.97), 故对第 316 位氨基酸所形成的立体空间构象影响不大, 故只表现为较轻的 I 型; 而精氨酸 R 正好相反, 它是一种碱性氨基酸, 其化学结构、官能团、所带电荷数和等电点(Arg 的 pI=10.76)等都跟甘氨酸有明显差别, 故突变后会造成第 316 位氨基酸所形成的空间构象发生明显改变, 进而影响到胶原蛋白  $\alpha 2$  链的正常结构和功能以及  $\alpha 1$  链的相互结合, 导致 I 型胶原蛋白合成受阻, 继而导致成骨组织合成出现明显障碍, 最终导致 OI- 型的发生。本文所发现的半胱氨酸, 其化学性质和丝氨酸很相似, 都是极性中性氨基酸, 其化学结构、所带电荷数和等电点(Cys 的 pI=5.05)和甘氨酸的差别也不大, 所以也只产生 I 型表型(从本文所研究的对象来看, p.G316C 新突

变所导致的表型效应符合 OI- 型的临床表现)。

由于 OI- 型临床症状较轻,故在临床上容易出现误诊和漏诊,此时基因诊断对该病的确诊至关重要。本研究一方面揭示了患儿发病的分子遗传学机制,另一方面进一步丰富了 HGMD 突变数据库的 COL1A2 基因突变类型,更重要的是为患儿父母今后的早期产前诊断乃至胚胎植入前基因诊断创造了必要的前提条件。

## 参考文献

- [1] 徐超, 韩金祥, 鲁艳芹. 成骨不全的分子机制. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(4): 310–315. [\[DOI\]](#)
- [2] Osteogenesis Imperfecta, Type XV; OI15. <http://omim.org/entry/615220>. [\[DOI\]](#)
- [3] Fahiminiya S, Majewski J, Mort J, Moffatt P, Glorieux FH, Rauch F. Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. *J Med Genet*, 2013, 50(5): 345–348. [\[DOI\]](#)
- [4] Byers PH, Cole WG. Osteogenesis imperfecta. In: Royce PM, Steinmann B, eds. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects*. New York: Wiley-Liss, 2002: 385–430. [\[DOI\]](#)
- [5] Gajko-Galicka A. Mutations in type collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta Biochim Pol*, 2002, 49(2): 433–441. [\[DOI\]](#)
- [6] 吴晓林, 顾鸣敏, 崔斌, 李西华, 袁文涛, 陆振虞, 宋怀东, 王铸钢. 一例 型成骨不全家系的基因定位及突变检测. 上海交通大学学报 (医学版), 2007, 27(6): 699–702. [\[DOI\]](#)
- [7] 唐佳, 潘敬新, 蒋玮莹, 郭奕斌. 一例抗维生素 D 佝偻病的基因诊断和新突变的致病性鉴定. 中华临床医师杂志 (电子版), 2012, 6(5): 1226–1230. [\[DOI\]](#)
- [8] 王卓, 徐栋梁, 胡俊勇, 廖悦华, 杨峥, 梁琼, 王连唐. 成骨不全一家系的 COL1A1 基因突变分析. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23(2): 192–194. [\[DOI\]](#)
- [9] 王熙然. 成骨不全家系临床及基因特征研究[学位论文]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2008: 20–24. [\[DOI\]](#)
- [10] 艾阳, 唐佳, 方群, 吴晓昀, 郭奕斌. 一例成骨不全型高危胎儿的产前基因诊断. 中华临床医师杂志 (电子版), 2011, 5(22): 6662–6666. [\[DOI\]](#)
- [11] 郭奕斌, 艾阳, 蒋玮莹. 一罕见成骨不全 型的基因诊断. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(1): 12–14. [\[DOI\]](#)
- [12] Vandersteen AM, Lund AM, Ferguson DJP, Sawle P, Pollitt RC, Holder SE, Wakeling E, Moat N, Pope FM. Four patients with Sillence type I osteogenesis imperfecta and mild bone fragility, complicated by left lar cardiac valvular disease and cardiac tissue ty caused by type I collagen mutations. *Am J Med Genet A*, 2014, 164(2): 386–391. [\[DOI\]](#)
- [13] Peng H, Zhang YH, Long ZG, Zhao D, Guo ZX, Xue JJ, Xie ZG, Xiong ZM, Xu XJ, Su W, Wang B, Xia K, Hu ZM. A novel splicing mutation in COL1A1 gene caused type I osteogenesis imperfecta in a Chinese family. *Gene*, 2012, 502(2): 168–171. [\[DOI\]](#)
- [14] Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, Hyland JC, Körkkö J, Prockop DJ, De Paepe A, Coucke P, Symoens S, Glorieux FH, Roughley PJ, Lund AM, Kuurila-Svahn K, Hartikka H, Cohn DH, Krakow D, Mottes M, Schwarze U, Chen D, Yang K, Kuslich C, Troendle J, Dalgleish R, Byers PH. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: Regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat*, 2007, 28(3): 209–221. [\[DOI\]](#)
- [15] Gentile FV, Zuntini M, Parra A, Battistelli L, Pandolfi M, Pals G, Sangiorgi L. Validation of a quantitative PCR–high-resolution melting protocol for simultaneous screening of COL1A1 and COL1A2 point mutations and large rearrangements: application for diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat*, 2012, 33(12): 1697–1707. [\[DOI\]](#)

(责任编辑: 谢小冬)