

· 临床研究 ·

一例 II 型常染色体显性骨硬化症患者 CLCN7 基因突变分析

杨鹏[#] 李灿[#] 罗小庆 莫奇非 张斌 苏楠^{*} 陈林^{*}

陆军军医大学大坪医院/战伤组织修复与康复医学研究室/全军军事训练伤防治与康复实验室/骨质疏松与骨发育中心/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042

中图分类号: R681.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 03-0405-04

摘要: 目的 探讨 1 例 II 型常染色体显性遗传骨硬化症 (autosomal dominant osteopetrosis, ADO) 患者的氯离子通道 7 基因 (chloride channel 7, CLCN7) 的突变情况。方法 纳入 1 例骨硬化青年女性患者。采用骨密度检测、X 线成像等临床手段对其临床表现进行分析;并对患者及其父亲的 CLCN7 基因进行外显子测序,从正常人 DNA 样本库中随机挑选 50 个样本进行 CLCN7 基因外显子测序来对比分析测序结果。结果 X 线片显示椎体骨密度增加,成“夹心饼”样;髌部和股骨骨密度增加,盆骨出现“骨中骨”现象。骨密度结果显示腰椎 1-4 Z 值为 13,股骨颈 Z 值为 7.8,全髌 Z 值为 10,患者骨骼呈骨硬化表现,测序结果显示 9 号外显子上发生错义突变 (纯合突变),导致 c.746C>T (p.Pro249Leu);其父亲和 50 个对照样本均无此突变。结论 此患者为 CLCN7 基因 c.746C>T (p.Pro249Leu) 纯合错义突变的 ADO II 型常染色体显性骨硬化症。

关键词: 骨硬化症; II 型常染色体显性骨硬化症;氯离子通道蛋白 7

Analysis of chloride channel protein 7 gene mutation in a patient with type II autosomal osteopetrosis

YANG Peng[#], LI Can[#], LUO Xiaoqing, MO Qifei, ZHANG Bin, SU Nan^{*}, CHEN Lin^{*}

Department of Wound Repair and Rehabilitation, Laboratory for Prevention and Rehabilitation of Military Training Related Injury, Center of Osteoporosis and Bone Development, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China

[#] Co-first author

^{*} Corresponding author: CHEN Lin, Email: linchen70@163.com; SU Nan, Email: sunansyd@163.com

Abstract: Objective To detect the mutation of chloride channel 7 (CLCN7) gene in a patient with type II autosomal osteopetrosis (ADO II). **Methods** A young woman with osteopetrosis was enrolled in this study. Bone mineral density (BMD) and X-ray were analyzed to detect the clinical features. The whole-exome sequencing of CLCN7 gene of the patient and her father was performed. Fifty samples were randomly selected from the normal human DNA sample library for CLCN7 gene exon sequencing to compare and analyze the sequencing result. **Results** X-ray of the patient showed that BMD of the vertebrae increased, with sandwich sign. BMD of the hip and the femur increased, with bone-in-bone. BMD result showed that the Z scores of the lumbar spine, the femoral neck, and total hip were 13, 7.8, and 10, respectively. The bones of the patient appeared osteopetrotic feature. Sequencing result showed that a missense mutation (homozygous mutation) occurred in exon 9 of CLCN7 gene, resulting in c.746C>T (p.Pro249Leu). No mutation occurred in her father and 50 control samples. **Conclusion** This patient is an ADO type II autosomal dominant osteopetrosis with CLCN7 gene c.746C>T (p.Pro249Leu) homozygous missense mutation.

Key words: osteopetrosis; ADO II; CLCN7

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (8187062, 81991513);
创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室优秀青年基金 [SKLZZ (III)
201601]

[#] 共同第一作者

^{*} 通信作者: 陈林, Email: linchen70@163.com; 苏楠, Email:
sunansyd@163.com

骨硬化症 (osteopetrosis), 或称原发性脆骨硬化症, 又称石骨症、大理石骨病 (Marble bone disease) 等, 该疾病是以骨代谢异常、全身性骨密度增高为主要特点的遗传性骨病^[1]。骨硬化症首次报道于 1904 年, 研究人员发现此类骨病的产生与破骨细胞

的发育异常以及破骨细胞的功能障碍存在十分紧密的相关性^[1-3]。根据临床表型及遗传学特征可分为常染色隐性遗传骨硬化症 (autosomal recessive osteopetrosis, ARO)^[4] 和常染色体显性遗传骨硬化症 (ADO)^[8], 二者的致病基因已基本阐明; 此外, 还有一种致病基因尚未明确的骨硬化症为常染色隐性遗传的中间型骨硬化症 (intermediate autosomal osteopetrosis, IAO)^[5]。其中, ADO 根据致病基因和临床表型的差异又可分为 2 种类型: I 型 (ADO I) 和 II 型 (ADO II)。自 2009 年国内首次报道至今, 多项研究表明 ADO II 类型骨硬化是一种较为常见的骨硬化类型, 通常认为其发病原因与多通道膜蛋白基因 (chloride channel, voltage-sensitive, CLCN) 中 CLCN7 的突变密切相关^[6-8]。经过近十几年研究, 关于 CLCN7 基因突变与骨硬化症关系的研究资料日渐完善, 章振林等^[9] 已对二者之间的关系做了详细总结。本研究中我们对一例 ADO II 类型骨硬化症患者的 CLCN7 基因外显子序列进行测序分析, 结合临床表型对该类型骨硬化症病例加以研究。

1 材料和方法

1.1 对象

患者, 女, 25 岁, 外院体检时发现骨量增加, 为复查来我院就诊。患者无乏力、无骨骼疼痛等症状, 否认骨折史。个人史: 无特殊。家族史: 父母非近亲婚配, 其母亲患有骨硬化症 (28 岁时去世)。查体: 步态正常; 脊柱和四肢无畸形。进一步对患者进行了双能 X 线骨密度检测; 同时, 利用 X 线对其胸腰椎、骨盆进行检查。实验室检查: 对患者进行血常规、血清钙磷、骨代谢指标 (甲状旁腺素、骨钙素、血清降钙素、骨碱性磷酸酶、25-羟基维生素 D (25OHD)、 β 胶原特殊序列、总 I 型胶原氨基端延

长肽) 等进行检测。

1.2 试剂与仪器

外周血收集管 (BD, 美国)、DNA 纯化试剂盒 (Promega, 美国)、高保真 PCR 试剂盒 (Promega, 美国)、琼脂糖 (Biowest, 西班牙)、引物 (重庆擎科兴生物技术有限公司)、PCR 仪 (BioRad, 美国)、电泳仪 (BioRad, 美国)、凝胶成像仪 (BioRad, 美国)。

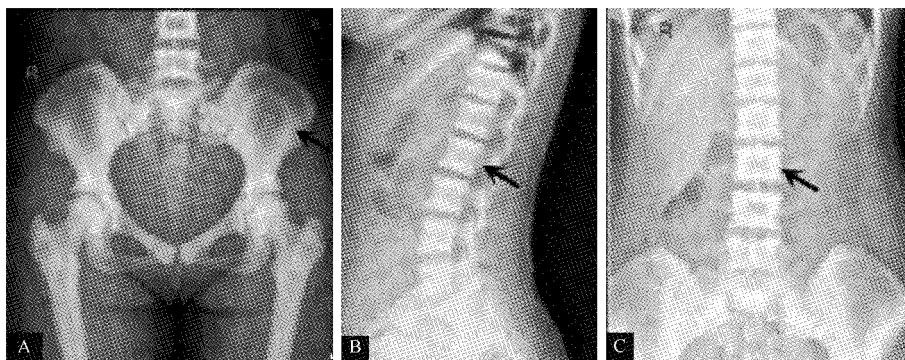
1.3 方法

征得患者及患者父亲同意之后, 签署知情同意书, 收集临床资料和空腹抽取患者及其父亲的外周静脉血样本, 分装保存于 -80°C 超低温冰箱, 取 1 mL 血液样本用 DNA 抽提试剂盒提取外周血白细胞基因组 DNA。同时从样本库中随机选取 50 个正常人的 DNA 样本作为对照。针对骨硬化症最常见致病基因 CLCN7^[8], 利用高保真 PCR 试剂盒扩增其所有外显子区域。PCR 反应体系为 50 μL , 退火温度根据不同片段大小控制在 $55\sim 65^{\circ}\text{C}$ 。产物经琼脂糖凝胶电泳确定得到条带清晰、大小正确的产物之后, 交由上海天昊生物科技有限公司对产物进行双向测序。测序后对比分析患者与正常人 CLCN7 外显子区的差异。

2 结果

2.1 影像及血清学结果

患者 X 线片显示髌部和股骨骨密度增加, 髌骨出现“骨中骨”现象 (图 1 A, 箭头所示), 椎体骨密度增加, 成“夹心饼”样 (图 1 B-C, 箭头所示)。骨密度结果显示腰椎 1~4 Z 值为 13, 股骨颈 Z 值为 7.8, 全髌 Z 值为 10 (表 1)。血常规、肝肾功等无明显异常, 骨代谢指标中除 25OHD 降低外 (表 2), 其余均在正常范围内。



注: A 患者髌部正位片显示骨密度增加, 髌骨表现为“骨中骨”现象, 长骨骨皮质增厚; B-C: 患者胸腰椎正侧位相显示广泛的骨密度增加, 椎体终板增厚, 呈“夹心饼”征。

图 1 患者骨骼 X 线表现

Fig.1 X-ray appearance of the bone in the patient

表 1 患者骨密度

Table 1 Bone mineral density of the patient

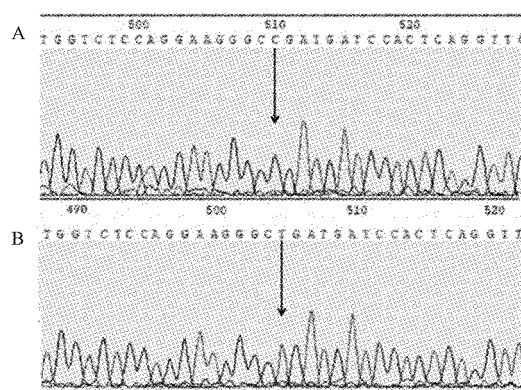
区域	BMD/ (g/cm ²)	与同龄正常人比 (%)	Z 值
腰椎 1-4(L ₁ -L ₄)	2.597	250	13.0
股骨颈(FN)	1.805	206	7.8
全髋(TH)	2.217	241	10

表 2 患者的生化指标

Table 2 Blood biochemical indexes of the patient

项目	测定值	正常值 范围	测定值 水平
甲状旁腺素(PTH)/pg/mL	33.3	12.0~88.0	N
骨钙素(OC)/ng/mL	11.7	3.0~46.0	N
血清降钙素(CT)/pg/mL	6.0	0~18.0	N
骨碱性磷酸酶(bALP)/ng/mL	11.7	<20.1	N
25-羟基维生素 D(25OHD)/ ng/mL	10.0	>30.0	L
β 胶原特殊序列(β -CTX)/ pg/mL	250.0	47.0~783.0	N
总 I 型胶原氨基端延长肽 (PINP)/ng/mL	71.4	8.5~112.8	N

通过对该患者 CLCN7 基因外显子双向测序分析发现,该患者 CLCN7 基因的 9 号外显子发生 746 位碱基 C(c.746C>T) 纯合错义突变,导致 249 位脯氨酸变为亮氨酸(p.Pro249Leu)(图 2),50 例正常人中均未发现该突变。患者父亲提供的血液样本测序该位点无此类突变。



注:A 正常人 CLCN7 基因 9 号外显子测序结果;B 患者 CLCN7 基因的 9 号外显子发生 c.746C>T 错义纯合突变。

图 2 患者 CLCN7 基因测序结果

Fig.2 CLCN7 sequencing result of the patient

3 讨论

骨硬化症的主要影像学特征为骨密度增高、骨骺增宽,该病理症状常导致不同程度的并发症,给患

者生活带来极大的影响。骨硬化症患者即使临床症状较轻也有可能骨髓腔变窄,致使骨髓腔容积降低,骨髓含量减少,进而影响造血功能,造成贫血^[10]。另一方面,骨量的异常增加,可能会压迫感觉神经,导致听力、视力减弱或异常等^[11-12];此外,骨硬化症患者还有可能出现面瘫、颅面部骨结构改变等^[13],严重者还可能导致失明^[14];恶性骨硬化或直接导致骨折^[15]。大量研究表明,骨硬化症的生成与发病与破骨细胞生理状态紧密相关,破骨细胞的发育异常以及破骨细胞的功能缺陷都会导致骨硬化症^[1-3]。

本报道病例为 II 型常染色体显性遗传骨硬化症(ADO II),又称为 Albers-Schönberg 病(OMIM 166600),该病以迟发性和临床表现多样性为主要特征。发病人群在儿童、青少年及成人中均有分布,主要影像学特征是脊柱呈“夹心饼”样和髂翼“骨中骨”表现。虽然 ADO II 是常染色体显性遗传性疾病,但是其外显率在 60%~90%之间^[16],发病率极高,对患者身心健康造成极大危害。

CLCN7 是导致 ADO II 的关键基因,人 CLCN7 基因定位于染色体 16p13.3,由 25 个外显子构成。CLCN7 基因编码的氯离子通道蛋白是一种多通道膜蛋白,该蛋白由两个同源单体构成,每个单体含 18 个 α 螺旋体,这些 α 螺旋体中的 4 个具有氯离子(Cl^-)结合位点。该通道蛋白同时也是质子泵,其主要功能是在将 Cl^- 转运到细胞内的同时将氢离子(H^+)反向转运到细胞外。CLCN7 基因的表达是破骨细胞发挥骨吸收功能的关键,氯离子通道蛋白高表达于成熟破骨细胞褶皱缘和溶酶体的隔室内,通过其转运功能向骨吸收陷窝内分泌 H^+ ,使得整个骨陷窝的 pH 值维持在 4 左右,通过形成酸性骨吸收陷窝溶解骨基质的方式来保证破骨细胞骨吸收功能的正常发挥。简言之,该蛋白可以通过离子交换的方式把 Cl^- 转运至破骨细胞的小囊泡中的同时将大量 H^+ 泵出到骨吸收陷窝中形成能够使破骨细胞发挥骨吸收功能的酸性环境^[17]。虽然 CLCN7 不直接参与溶酶体酸化的过程,但是它可能为构建溶酶体电荷平衡起关键作用^[18-19]。有研究表明,在敲除 CLCN7 基因的小鼠体内会出现骨硬化症表型,实验结果显示,虽然小鼠体内含有正常数量的破骨细胞,但其破骨细胞中的溶酶体体积蓄细胞功能异常,破骨细胞吸收陷窝内不能形成适宜的酸性环境供其发挥正常的骨吸收功能^[2,19],直接导致了破骨细胞功能降低。此外,通过 siRNA 处理的方法干扰 CLCN7 基

因的表达会使溶酶体形成酸性环境的能力减弱,并证明氯离子通道蛋白7可以通过转运 Cl^- 透过溶酶体膜进入溶酶体的方式来促进酸性环境的形成^[21]。因此 CLCN7 基因缺失可导致破骨功能缺陷,进而导致骨硬化症。

本例患者无明显临床症状,X线片显示多个骨骼部位骨密度增加,有“夹心饼”样征和“骨中骨”现象,属于较为典型常染色体显性骨硬化症中的 ADO II 型骨硬化症。实验中对 CLCN7 外显子测序显示在 9 号外显子上发生错义突变(纯合突变),导致 p-Pro249Leu,该突变位点位于构成氯离子通道蛋白的 α 螺旋体中的 4 个具有 Cl^- 结合位点的 α 螺旋体中的一个,该突变可能导致氯离子通道蛋白7的 Cl^- 结合能力降低,使得溶酶体的酸化功能异常,导致破骨细胞功能降低,进而引发骨硬化症。比较之前国内外文献中报道的 42 种与 ADO II 型骨硬化症相关的 CLCN7 突变^[8-9],该突变在国内为首次发现并报道。

致病基因的测序检测可以帮助患者及医生及时确诊病情,丰富致病基因谱,为疾病与基因型之间关系的研究提供研究素材。但是,ADO II 型骨硬化症的基因诊断及报道更是依然较少,致使医生及科研人员无法充分地对该病进行总结分析,寻找相应的预防检测及治疗措施。骨硬化症目前尚无有效的治疗方法,希望通过我们的临床诊断及研究能够为该病症的研究提供一些案例支撑和理论基础,为揭示骨硬化症的机制和治疗措施的研究提供一定的论据。

【参 考 文 献】

- [1] Sobacchi Cristina, Schulz Ansgar, Coxon Fraser P, et al. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function [J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 9(9): 522-536.
- [2] 庞倩倩,董进,夏维波.骨硬化症研究进展[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2014,7(1):82-90.
- [3] 欧明林.石骨症发病的分子机制研究[D].重庆:重庆医科大学,2014.
- [4] 柯耀华,章振林.骨硬化症致病基因研究进展[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2010,3(2):122-127.
- [5] Smahi Asma, Courtois Gilles, Rabia Smail Hadj, et al. The NF- κ B signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(20):2371-2375.
- [6] Zheng Hui, Zhang Zeng, He Jinwei, et al. Identification of two novel CLCN7 gene mutations in three Chinese families with autosomal dominant osteopetrosis type II [J]. Joint Bone Spine, 2014, 81(2):188-189.
- [7] Wang Chun, Zhang Hao, He Jinwei, et al. The virulence gene and clinical phenotypes of osteopetrosis in the Chinese population: six novel mutations of the CLCN7 gene in twelve osteopetrosis families [J]. J Bone Miner Metab, 2012, 30(3): 338-348.
- [8] 李晓刚,苏楠,李灿,等.一例 II 型常染色体显性骨硬化症患者氯离子通道蛋白7基因突变分析[J].中华医学遗传学杂志, 2014, 31(5): 612-614.
- [9] 程健豪,汪纯,章振林.氯离子通道蛋白7相关骨硬化症[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2017,10(5):491-498.
- [10] Maranda Bruno, Chabot Gilles, Décarie Jean-Claude, et al. Clinical and cellular manifestations of OSTM1-related infantile osteopetrosis [J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(2):296-300.
- [11] Phadke Shubha R, Fischer Bjoern, Gupta Neerja, et al. Novel mutations in Indian patients with autosomal recessive infantile malignant osteopetrosis [J]. Indian J Med Res, 2010, 131: 508-514.
- [12] Bollerslev J, Andersen PE. Radiological, biochemical and hereditary evidence of two types of autosomal dominant osteopetrosis [J]. Bone, 1988, 9(1):7-13.
- [13] Al-Tamimi Yahia Z, Tyagi Atul K, Chumas Paul D, et al. Patients with autosomal-recessive osteopetrosis presenting with hydrocephalus and hindbrain posterior fossa crowding [J]. J Neurosurg Pediatr, 2008, 1(1):103-106.
- [14] Felix R, Hofstetter W, Cecchini MG. Recent developments in the understanding of the pathophysiology of osteopetrosis [J]. Eur J Endocrinol, 1996, 134(2):143-156.
- [15] Sobacchi C, Villa A, Schulz A, et al. CLCN7-related osteopetrosis [M]. Seattle: Gene Reviews, 1993.
- [16] Waguespack Steven G, Koller Daniel L, White Kenneth E, et al. Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations and autosomal dominant osteopetrosis, type II [J]. J Bone Miner Res, 2003, 18(8):1513-1518.
- [17] Kornak U, Kasper D, Bösl M R, et al. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man [J]. Cell, 2001, 104(2):205-215.
- [18] Schulz P, Werner J, Stauber T, et al. The G215R mutation in the Cl^-/H^+ -antiporter ClC-7 found in ADO II osteopetrosis does not abolish function but causes a severe trafficking defect [J]. PLoS One, 2010, 5:e12585.
- [19] Del Fattore A, Cappariello A, Teti A. Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis [J]. Bone, 2008, 42:19-29.
- [20] Bollerslev Jens, Henriksen Kim, Nielsen Morten Frost, et al. Autosomal dominant osteopetrosis revisited: lessons from recent studies [J]. Eur J Endocrinol, 2013, 169(2):R39-R57.
- [21] Graves Austin R, Curran Patricia K, Smith Carolyn L, et al. The Cl^-/H^+ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes [J]. Nature, 2008, 453(7196):788-792.

(收稿日期:2020-04-26;修回日期:2020-08-23)