

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.08.014

论著·临床研究

糖原累积病 Ib 型患儿基因突变分析与临床研究

梁翠丽 刘丽 盛慧英 江敏妍 尹曦 梅慧芬 程静 张文 范莉萍

(广州医学院附属广州市妇女儿童医疗中心内分泌代谢科, 广东 广州 510623)

【摘要】 目的 糖原累积病 Ib 型 (GSDIb) 是由于 SLC37A4 基因突变引起葡萄糖-6-磷酸转移酶 (G6PT) 活性缺陷所致, 该病患者大部分有反复感染及炎症性肠病的发生, 预后较差。SLC37A4 基因的检测对 GSDIb 患者的诊断、分型、预测患者的预后尤为重要。本文旨在研究糖原累积病 Ib 型患儿 SLC37A4 基因突变的情况, 探讨基因型与临床表型的关系。**方法** 应用聚合酶链反应直接测序的方法, 对拟诊 GSDIb 型的 28 例患儿行 SLC37A4 基因外显子及其相邻区域的突变筛查。**结果** 7 例患儿检测到 SLC37A4 基因突变, 检出率为 25% (7/28 例), 包括错义突变: p.Gly149Glu (9/13, 69%)、p.Gly115Arg (1/13, 8%)、p.Pro191Leu (1/13, 8%); 移码突变: c.959-960 insT (1/13, 8%); 剪接突变: c.870+5G>A (1/13, 8%)。**结论** c.959-960 insT 为新突变, p.Gly149Glu 为本研究最常见的突变, p.Gly149Glu 突变可能与患儿的严重感染相关。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(8): 661-665]

【关键词】 糖原累积病 Ib 型; 葡萄糖-6-磷酸转移酶; SLC37A4 基因; 突变; 儿童

Gene mutations and clinical manifestations in children with glycogen storage disease type Ib

LIANG Cui-Li, LIU Li, SHENG Hui-Ying, JIANG Min-Yan, YIN Xi, MEI Hui-Fen, CHENG Jing, ZHANG Wen, FAN Li-Ping. Department of Endocrinology and Metabolism, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510623, China (Liu L, Email: liliuxia@hotmail.com)

Abstract: Objective Glycogen storage disease type Ib (GSDIb) is caused by a deficiency of glucose-6-phosphate translocase (G6PT) activity due to SLC37A4 gene mutations. Most GSDIb patients have recurrent infections and inflammatory bowel disease, with poor prognosis. Detection of SLC37A4 gene mutations is of great significance for the diagnosis, subtyping and outcome prediction of GSD patients. This study aims to analyze SLC37A4 gene mutations in Chinese GSDIb patients and to investigate the relationship between its genotypes and clinical manifestations. **Methods** All exons and their flanking introns of SLC37A4 gene in 28 Chinese children with a primary diagnosis of GSDIb were screened by PCR combined with direct DNA sequencing to detect SLC37A4 gene mutations. **Results** Five SLC37A4 gene mutations were detected in 7 (25%) of the 28 children, i.e., p.Gly149Glu (9/13, 69%), p.Gly115Arg (1/13, 8%), p.Pro191Leu (1/13, 8%), c.959-960 insT (1/13, 8%) and c.870+5G>A (1/13, 8%). **Conclusions** In this study, c.959-960 insT is a novel mutation and p.Gly149Glu is the most common mutation. p.Gly149Glu may be associated with severe infections in children with GSDIb. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(8): 661-665]

Key words: Glycogen storage disease type Ib; Glucose-6-phosphate translocase; SLC37A4 gene; Mutation; Child

糖原累积病 I 型 (glycogen storage disease type I, GSDI) 是葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase) 系统缺陷引起的一组常染色体隐性遗传代谢性疾病, 是肝糖原累积病 (liver glycogen storage diseases, LGSDs) 最常见的一种亚型, 主要分为 Ia 型和 Ib 型, 二者分别占 GSDI 的 80% 和 20%^[1-2]。

GSDIa 由葡萄糖-6-磷酸酶催化亚单位 (G6Pase catalytic subunit, G6PC) 基因突变所致^[3]。前期研究中, 本课题组对 2004 年 1 月至 2012 年 6 月在广州市妇女儿童医疗中心拟诊为 LGSDs 的 48 例患儿进行了 G6PC 基因分析, 发现 GSDIa 型患儿共 20 例。

GSDIb 是由于葡萄糖-6-磷酸转移酶 (glucose-

[收稿日期] 2013-01-08; [修回日期] 2013-03-07

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划项目 (2006BAI05A07); 广州市科技局支撑项目 (2010J-E231-1)。

[作者简介] 梁翠丽, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 刘丽, 主任医师。

6-phosphate translocase, G6PT) 基因(或称为 SLC37A4 基因)突变引起 G6PT 酶活性缺陷所致。GSDIb 患者大部分有反复感染及炎症性肠病的发生,预后较差,所以 SLC37A4 基因的检测对 GSD 患者的诊断、分型,以及预测患者的预后尤为重要。本研究中,选取本课题组前期研究中 G6PC 基因未检测突变的 28 例拟诊为 GSDIb 的患儿进行 SLC37A4 基因突变分析,并对部分存在突变的患儿的父母进行了基因突变分析,以探讨中国 GSDIb 患儿 SLC37A4 基因突变情况。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2004 年 1 月至 2012 年 6 月期间在广州市妇女儿童医疗中心内分泌代谢病区诊治,拟诊为 GSDIb 的患儿 28 例为研究对象,其中男 18 例,女 10 例,年龄 3 个月~4 岁。另在同期来我院体检的无血缘关系的儿童中随机抽取与患儿组年龄、性别相匹配的 50 例健康儿童作为正常对照组,其中男 25 例,女 25 例,年龄在 1~12 岁。GSDIb 诊断标准为:肝大、空腹低血糖,中性粒细胞减少,

高乳酸型代谢性酸中毒,高甘油三酯血症、高尿酸血症等^[4-5]。大部分患儿进行饥饿试验及胰高血糖素试验,试验具体操作参考文献^[6],禁食 6 h 内末梢血糖 <2.8 mmol/L 时视为饥饿试验阳性;注射胰高血糖素 45 min 内血糖较基础值升高 <50% 视为该试验无反应^[7]。患儿静脉血浆葡萄糖 <2.8 mmol/L 视为低血糖^[8]。本课题组前期已对本组患儿进行 G6PC 基因检测,排除 GSDIa 型的可能性。所有健康对照组患儿空腹血糖 >2.8 mmol/L,无肝大,肝、肾功能正常,无粒细胞减少,无酮症,心电图检查正常。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 抽提 取得患儿家属知情同意后,抽取患者和部分父母外周血 2 mL,采用美国 OMIGA 公司 E.Z.N.A Blood DNA Kit 试剂盒,根据小剂量血液提取基因组 DNA 方法,从全血中抽提检测对象的基因组 DNA。

1.2.2 引物设计合成 根据数据库中 SLC37A4 基因序列,及相关参考文献^[9],共设计引物 7 个片段,扩增产物包括 SLC37A4 基因的 9 个外显子(包含两端内含子)。引物由北京六合华大基因股份有限公司合成。合成的引物序列见表 1。

表 1 SLC37A4 基因 9 个外显子 7 个扩增片段引物

外显子	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物长度(bp)	退火温度(℃)
1	GGTAAAGGCAGAAATCCTCG	ATAAGCAGCCCTCCTTAGCC	664	60
2	GATGCTGAGGCAGGAGAAGT	GAGGTGGTGGGTAAGAAAGG	515	60
3	TTTTAGGAGGCTGAGAGTGG	TGCCTCTTGGGATGGATTG	579	60
4~5	ACCAGTGGGGTGAGGGAATA	TAAACACAGCAGATGCCAACC	759	60
6	GTGCTGGGATGCGCAAAGAC	AGGTATCTGAGAGCGCAAG	346	60
7	TTCTTCGCCTCTCAGATACC	AGGCAGAAGGGTAGGACAAA	241	56
8~9	TGTGTTGGGGAGTGGAAGGA	GGCCGAGAAATGGAAAGTGA	693	60

1.2.3 PCR 扩增反应体系和条件 25 μL PCR 反应体系中,10×Ex Taq buffer 2.5 μL, dNTP 2.0 μL, Ex Taq 聚合酶(日本 Takara 公司)0.725 U, 基因组 DNA(约 20~30 ng)2.0 μL, 上、下游引物各 1 μL, ddH₂O 补足体积至 25 μL。PCR(德国 Eppendorf 公司梯度 PCR 仪)热循环条件:95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s, 56~60℃退火 30 s, 72℃延伸 50 s, 35 个循环;最后 72℃延伸 8 min。扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳(北京六一仪器厂),阳性扩增产物回收,随后送公司鉴定。

1.2.4 突变分析 扩增产物送至北京六合华大基因股份有限公司进行纯化、双向测序(ABI3730 测序仪)。测序结果用 chromas 软件分析,并与 NCBI 中的正常序列进行 BLAST 比对。并对有血标

本的患者父母行相应突变检测,了解突变来源。新发突变鉴定采用 50 名无血缘关系的健康儿童的 100 个等位基因作为健康对照,以排除基因多态性。

2 结果

2.1 SLC37A4 基因测序分析

对 28 例拟诊为 GSDIb 的患儿进行 SLC37A4 基因检测,其中 7 例患儿检测到突变,检出率为 25%(7/28),6 例患儿检测到存在 2 个突变,1 例仅检测到 1 个突变。包括错义突变 3 种,移码、剪接突变各 1 种,错义突变包括:p.Gly149Glu(9/13, 69%)、p.Gly115Arg(1/13, 8%)、p.Pro191Leu(1/13, 8%),移码突变:c.959-960 insT(1/13, 8%),

剪接突变: c.870+5G>A (1/13, 8%) (表2)。50例正常对照(100个等位基因位点)中,用直接测序法检测 c.959-960 insT 突变,均未发现此突变。见图1。

2.2 临床表现

28例患儿初诊年龄均小于4岁,7例检测到突变的患儿均来自广东省。所有患儿均有肝大(肝右肋下3~12 cm)、中性粒细胞(N)减少($0.3\sim 1.9\times 10^9/L$)、高乳酸(LAC)血症

($2.8\sim 19.6\text{ mmol/L}$)、高脂血症[甘油三酯(TG), $2.9\sim 10.8\text{ mmol/L}$]、大部分患儿出现肝功能异常[丙氨酸氨基转氨酶(ALT), $28\sim 1100\text{ U/L}$]、高尿酸(UA)血症($268\sim 1059\text{ }\mu\text{mol/L}$)。1例因家属不同意未进行饥饿试验检查,其余6例进行试验的患儿中饥饿试验均为阳性,饥饿试验阳性的患儿均进行了胰高血糖素试验,其中5例患儿对胰高血糖素无反应。见表2。

表2 GSDIb型7例患儿基因型和临床资料

例号	基因型	性别	初诊年龄	肝肿大(cm)	脾肿大(cm)	反复感染	N($\times 10^9/L$)	LAC(mmol/L)	ALT(mmol/L)	TG(mmol/L)	UA($\mu\text{mol/L}$)	饥饿试验	胰高血糖素试验
1	p. Gly149Glu/p. Gly149Glu	男	4岁	12	-	+	1.2	6.2	53	8.9	502	+	-
2	p. Gly115Arg/wild type	男	2岁	3	3.0	+	1.9	2.8	336	4.6	479	+	-
3	p. Gly149Glu/p. Gly149Glu	男	1岁	10	-	+	1.7	19.6	1100	5.7	1023	+	-
4	p. Pro191Leu/c. 870+5G>A	女	3岁	4	-	-	0.5	10.4	363	4.4	857	+	-
5	p. Gly149Glu/p. Gly149Glu	女	3个月	9	-	+	0.7	4.0	192	2.9	403	+	-
6	p. Gly149Glu/p. Gly149Glu	男	3个月	6	-	+	0.3	11.2	452	10.8	1059	+	+
7	p. Gly149Glu/c. 959-960 insT	男	4个月	10	1.5	+	1.1	5.1	28	5.4	268	未做	未做

注: N: 中性粒细胞数绝对值, 参考范围 $2.5\sim 8.4\times 10^9/L$; LAC: 血乳酸, 参考范围 $0.9\sim 1.7\text{ mmol/L}$; ALT: 丙氨酸氨基转移酶, 参考范围 $5\sim 40\text{ U/L}$; TG: 甘油三酯, 参考范围 $0.23\sim 1.70\text{ mmol/L}$; UA: 尿酸, 参考范围 $90\sim 420\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。

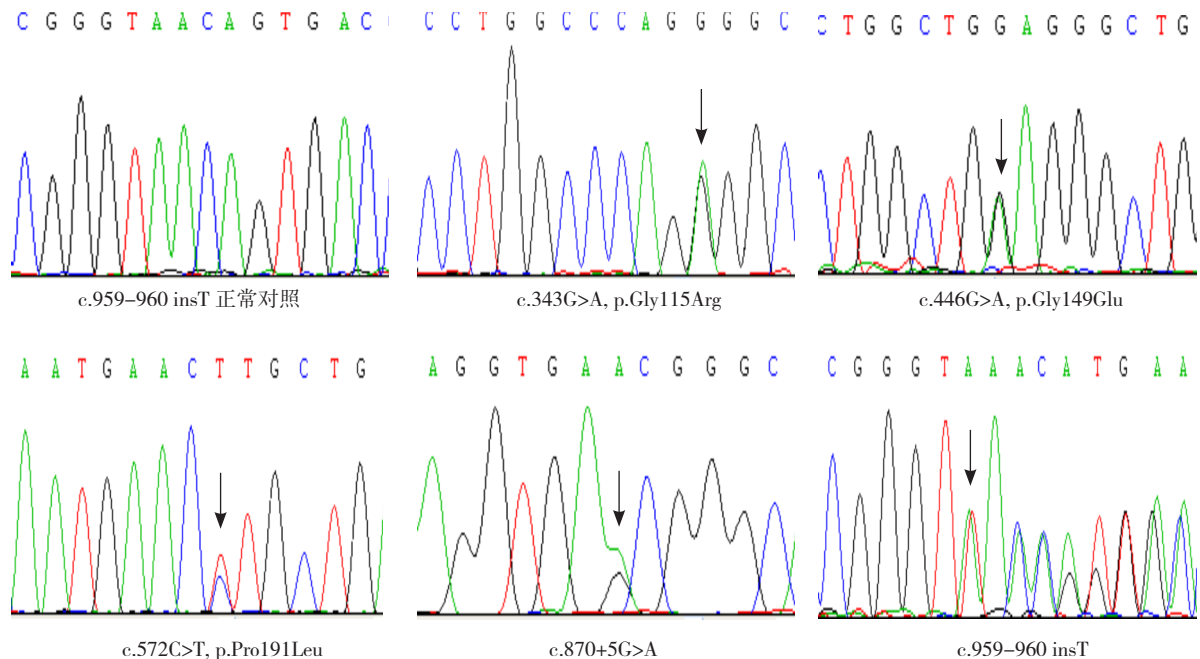


图1 SLC37A4 基因编码区不同突变类型及正常对照测序图 图中箭头所示为突变碱基。

3 讨论

糖原累积病Ib型(GSDIb, MIM232220)是由于G6PT缺乏所致的常染色体隐性遗传病。G6PT蛋白位于内质网上,负责转运葡萄糖-6-磷酸(glucose-6-phosphate, G6P),协助G6Pase催化G6P转化为葡萄糖和磷酸(Pi),维持血糖稳定^[10]。近年来有研究推断,G6PT是Pi的逆向转运体,能把Pi从内质网腔内运输至细胞浆内^[11-13]。G6PT缺陷会导致G6P转变为葡萄糖障碍,从而引起空腹时低血糖、高乳酸型代谢性酸中毒、高脂血症、高尿酸血症等。另外,G6PT缺陷引起中性粒细胞内葡萄糖内环境紊乱,导致骨髓中性粒细胞生成减少^[14-15]、中性粒细胞及白细胞功能障碍(表现为细胞趋化性、钙动员、呼吸爆发和白细胞吞噬等功能受损)^[16],患者机体免疫功能低下^[17-18],出现反复感染及炎症性肠病等。

G6PT的编码基因SLC37A4位于染色体11q23,约4.5 kb,含9个外显子,编码429个氨基酸37 KD蛋白G6PT^[17]。G6PT蛋白包括N、C末端,胞质和内质网袢环区及10个螺旋跨膜区^[11]。G6PT在肝脏、胰腺、肾脏和造血干细胞中高表达,表达受血中血糖、胰岛素和cAMP调节^[19]。若SLC37A4基因发生突变,引起G6PT蛋白变化,导致G6PT转运活性不同程度减退^[11,20]。目前为止,已发现84种SLC37A4基因突变(<http://www.hgmd.org>),大多数为错义突变,也有缺失、插入与剪接等突变。本研究发现错义突变3种,剪接、移码突变各1种。

c.959-960 insT (p.Val320fsx104)突变为本研究新发现的突变,该突变为移码突变,在959-960位核苷酸处插入T,引起编码蛋白框架改变,第325密码子GAC转变为TGA, TGA为终止密码子,使G6PC蛋白缩短104个氨基酸,G6PT转运活性下降。通过检索人类基因突变数据库(<http://www.hgmd.org>),证实上述突变未见报道。通过SNP(单核苷酸多态性, single nucleotide polymorphism)库检索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>),未见上述突变是SNP的报道;对随机抽取的50名正常健康儿童进行测序分析,也未检测到上述突变,故基本排除多态性位点的可能性,从而推断该突变为新突变可能性大。

p.Gly115Arg、p.Gly149Glu、p.Pro191Leu是本研究检测到的错义突变。c.343G>A (p.Gly115Arg), 343位核苷酸发生G→A转换,使第115密码子

由甘氨酸变为精氨酸,该突变在2011年由邱正庆等^[21]首次报道。c.446G>A (p.Gly149Glu)、c.572C>T (p.Pro191Leu)在2000年由Lam等^[22-23]报道在中国患者中检出,上述两个突变分别是由于446位核苷酸发生G→A转换使第149密码子由甘氨酸变为谷氨酸,及572位核苷酸发生C→T转换使第191密码子由脯氨酸变为亮氨酸,研究表明上述两个突变分别使G6PT酶转运G6P的活性降低为正常人的14.8%与13.1%^[12]。p.Gly149Glu为本研究最常见的突变,占检测到的异常突变69%(9/13),由于病例数有限,本研究未发现中国人SLC37A4基因突变热点。

c.870+5G>A (p.Arg 291fsx34)突变为剪接突变,由邱正庆等^[21]首次报道。该突变位于第5内含子,可造成第6外显子缺失86个碱基,同时引起编码蛋白框架改变,在1141~1143 bp处(第325密码子)产生终止密码子,导致G6PT蛋白缩短132个氨基酸,可使G6PT酶转运活性丧失。上述4种突变仅在中国人中被检出,不排除是中国人种特异性的突变可能。

本研究中7例患儿均有肝大、中性粒细胞减少、高乳酸血症、高甘油三酯血症,大部分患儿出现肝功能异常及不同程度的生长发育迟缓。酮性低血糖及高甘油三酯血症,是GSDI患者的生化诊断标记,同时也是造成患者出现生长发育迟缓的重要原因^[24]。其中4例患儿均为p.Gly149Glu纯合突变,均有明显的反复感染、口腔溃疡等表现,其中3例患儿出现炎症性肠病、反复腹泻,1例患儿曾因严重呼吸道感染入住我院危重病区。上述4例患儿感染的次数较余下3例患儿多,程度相对较重,需抗生素联合人重组粒-单核细胞集落刺激因子治疗感染,才能得到控制,不排除此基因型与严重感染相关。

14个突变等位基因中仅有1个尚未查明,不排除由于突变发生在内含子上或启动子区,也可能恰好发生在所设计的引物上,使突变的片段无法扩增或其他原因。虽然患儿仍有一个致病位点尚未能找出,但结合患儿典型的临床表现、饥饿试验及胰高血糖素试验的结果,该患儿仍考虑是GSDIb可能性大。

综上所述,我们对前期研究中未发现G6PC基因突变的患儿进行SLC37A4基因筛查,共发现7例患儿存在突变,c.959-960 insT为新突变,p.Gly149Glu为本研究最常见的突变,p.Gly149Glu突变可能与患儿的反复严重感染相关。

[参 考 文 献]

- [1] Soty M, Chilloux J, Casteras S, Grichine A, Mithieux G, Gautier-Stein A. New insights into the organisation and intracellular localisation of the two subunits of glucose-6-phosphatase[J]. *Biochimie*, 2012, 94 (3): 695-703.
- [2] Froissart R, Piraud M, Boudjemline AM, Vianey-Saban C, Petit F, Hubert-Buron A, et al. Glucose-6-phosphatase deficiency[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2011, 6: 27.
- [3] 王艳, 吴虹林, 杜振兰, 刘欣, 李昊, 何玺玉, 等. 糖原累积病 I a 型 1 例及其家系的临床和分子遗传分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14 (11): 856-858.
- [4] Davit-Spraul A, Piraud M, Dobbelaere D, Valayannopoulos V, Labrune P, Habes D, et al. Liver glycogen storage diseases due to phosphorylase system deficiencies: diagnosis thanks to non invasive blood enzymatic and molecular studies[J]. *Mol Genet Metab*, 2011, 104 (1-2): 137-143.
- [5] 刘璐. 肝糖原累积病研究进展[J]. *国际儿科学杂志*, 2011, 38 (1): 62-65.
- [6] 李秀珍, 刘丽, 梅慧芬, 赵小媛, 卢惠珍, 程静, 等. 半乳糖血症患儿饥饿试验及胰高血糖素试验结果及其意义[J]. *广东医学*, 2006, 27 (6): 816-817.
- [7] 刘丽. 低血糖症[J]. *中国循证儿科杂志*, 2008, 3 (z1): 98-99.
- [8] Cook P, Walker V. Investigation of the child with an acute metabolic disorder[J]. *J Clin Pathol*, 2011, 64 (3): 181-191.
- [9] 孙晓方, 陈适, 卢琳, 邱正庆, 肖新华. 糖原累积病 I b 型 1 例的临床和分子遗传分析[J]. *基础医学与临床*, 2011, 31(5): 529-533.
- [10] Foster JD, Nordlie RC. The biochemistry and molecular biology of the glucose-6-phosphatase system[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2002, 227 (8): 601-608.
- [11] Pan CJ, Chen SY, Lee S, Chou JY. Structure-function study of the glucose-6-phosphate transporter, an eukaryotic antiporter deficient in glycogen storage disease type Ib[J]. *Mol Genet Metab*, 2009, 96 (1): 32-37.
- [12] Chen SY, Pan CJ, Lee S, Peng W, Chou JY. Functional analysis of mutations in the glucose-6-phosphate transporter that cause glycogen storage disease type Ib[J]. *Mol Genet Metab*, 2008, 95 (4): 220-223.
- [13] Chen SY, Pan CJ, Nandigama K, Mansfield BC, Ambudkar SV, Chou JY. The glucose-6-phosphate transporter is a phosphate-linked antiporter deficient in glycogen storage disease type Ib and Ic[J]. *FASEB J*, 2008, 22 (7): 2206-2213.
- [14] Cheung YY, Kim SY, Yiu WH, Pan CJ, Jun HS, Ruef RA, et al. Impaired neutrophil activity and increased susceptibility to bacterial infection in mice lacking glucose-6-phosphatase-beta[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117 (3): 784-793.
- [15] Kim SY, Jun HS, Mead PA, Mansfield BC, Chou JY. Neutrophil stress and apoptosis underlie myeloid dysfunction in glycogen storage disease type Ib[J]. *Blood*, 2008, 111 (12): 5704-5711.
- [16] Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Neutropenia in type Ib glycogen storage disease[J]. *Curr Opin Hematol*, 2010, 17 (1): 36-42.
- [17] Annabi B, Hiraiwa H, Mansfield BC, Lei KJ, Ubagai T, Polymeropoulos MH, et al. The gene for glycogen-storage disease type Ib maps to chromosome 11q23[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62 (2): 400-405.
- [18] Garty BZ, Douglas SD, Danon YL. Immune deficiency in glycogen storage disease type 1B[J]. *Isr J Med Sci*, 1996, 32 (12): 1276-1281.
- [19] Shieh JJ, Pan CJ, Mansfield BC, Chou JY. A glucose-6-phosphate hydrolase, widely expressed outside the liver, can explain age-dependent resolution of hypoglycemia in glycogen storage disease type Ia[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (47): 47098-47103.
- [20] Soty M, Chilloux J, Casteras S, Grichine A, Mithieux G, Gautier-Stein A. New insights into the organisation and intracellular localisation of the two subunits of glucose-6-phosphatase[J]. *Biochimie*, 2012, 94 (3): 695-703.
- [21] 邱正庆, 卢超霞, 王薇, 仇佳晶, 魏珉. 糖原累积症 I b 型 15 家系 SLC37A4 基因分析研究[J]. *中华儿科杂志*, 2011, 49 (3): 203-208.
- [22] Lam C, Tong S, Lam Y, Chan B, Ma C, Lim P. Identification of a novel missense mutation (G149E) in the glucose-6-phosphate translocase gene in a Chinese family with glycogen storage disease 1b[J]. *Hum Mutat*, 1999, 13 (6): 507.
- [23] Lam CW, Chan KY, Tong SF, Chan BY, Chan YT, Chan YW. A novel missense mutation (P191L) in the glucose-6-phosphate translocase gene identified in a Chinese family with glycogen storage disease 1b[J]. *Hum Mutat*, 2000, 16 (1): 94.
- [24] Das AM, Lucke T, Meyer U, Hartmann H, Illsinger S. Glycogen storage disease type 1: impact of medium-chain triglycerides on metabolic control and growth[J]. *Ann Nutr Metab*, 2010, 56 (3): 225-232.

(本文编辑: 万静)