

论著·临床研究

糖原累积病 Ia 型 1 例及其家系的 临床和分子遗传分析

王艳¹ 吴虹林¹ 杜振兰² 刘欣¹ 李昊¹ 何玺玉¹ 王春枝¹

(北京军区总医院附属八一儿童医院 1. 临床遗传学中心; 2. 血液科 北京 100700)

〔摘要〕 目的 研究 1 例糖原累积病 Ia 型患者及其家系的基因突变情况。方法 应用聚合酶链反应扩增葡萄糖-6-磷酸酶基因(*G6PC* 基因)全部 5 个外显子,通过 DNA 直接测序的方法,对糖原累积病 Ia 型患者及其家系中父、母、姐姐的 *G6PC* 基因进行突变检测。结果 在患者 *G6PC* 基因的第 5 外显子上的第 743 碱基发生杂和突变,由 G 转变为 A,导致 G6Pase 蛋白第 222 位氨基酸由甘氨酸变为精氨酸(G222R),家系中父亲、姐姐均未发现该突变,而母亲携带与患者相同突变。结论 首次在国内报道 *G6PC* 基因的 G222R 突变,丰富了糖原累积病 Ia 型在中国人群的突变谱。
[中国当代儿科杂志,2012,14(11):856-858]

〔关键词〕 糖原累积病 Ia 型;*G6PC* 基因;基因突变
〔中图分类号〕 R596.1 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2012)11-0856-03

Clinical and molecular genetic analysis for a patient with glycogen storage disease Ia

WANG Yan, WU Hong-Lin, DU Zhen-Lan, LIU Xin, LI Hao, HE Xi-Yu, WANG Chun-Zhi. The Center of Clinical Genetics, Affiliated Bayi Children's Hospital, General Hospital of Beijing Command of the People's Liberation Army, Beijing 100700, China (WANG C-Z, Email: wcczy@126.com)

Abstract: Objective To investigate the mutation of glucose-6-phosphatase gene (*G6PC* gene) in a patient with glycogen storage disease Ia. **Methods** PCR was used to amplify all five exons of *G6PC* gene. The PCR products were directly sequenced to detect the mutations. **Results** A heterozygous 743G > A mutation was found in the patient and his mother, resulting in the substitution of glycine (G) by arginine (R) in codon 222 (G222R) in the putative membrane-spanning domain in human G6Pase, but not in his father and his sister. **Conclusions** G222R mutation in *G6PC* gene was first identified in a patient with glycogen storage disease Ia in mainland China.
[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(11):856-858]

Key words: Glycogen storage disease Ia; Glucose-6-phosphatase gene; Gene mutation

糖原累积病是一组糖原代谢障碍性疾病,其中 Ia 型是一种相对较为常见的糖原代谢障碍疾病,其活产儿发病率为 1/100000。糖原累积病 Ia 型(GSD Ia)为先天性葡萄糖-6-磷酸酶(*G6Pase*)缺陷所致的常染色体隐性遗传疾病。*G6Pase* 是糖原分解和葡萄糖生成过程的关键酶,主要在肝脏、肾脏和小肠中表达,对维持正常血糖水平发挥重要作用。GSD Ia 典型的临床表现为低血糖、肝脏肿大、生长落后和出血倾向,并伴有高脂血症、高尿酸血症、高乳酸血症,长期的并发症有痛风、肝脏腺瘤、血小板功能障碍、肾功能不全和骨质疏松等^[1-2]。
G6PC 基因位于 17 号染色体长臂 2 区 1 带,长约 12.5 kb,包含 5 个外显子^[3]。目前 *G6PC* 基因编码区在世界不同种族中至少发现 80 种基因突变。

已在中国人中鉴定的突变有:727G > T、Arg83His、Thr16Ala、Ile341Asn、His119Leu、341delG、933insAA、Gln104X 和 793G > T 等突变,其中剪接突变 727G > T 和 Arg83His 突变约占中国人突变的 80%^[4]。本研究中应用聚合酶链反应和 DNA 直接测序法对 1 例 GSD Ia 型患者及其父母的 *G6PC* 基因外显子进行全序列分析,结果发现患者及其母亲为 Gly222Arg 的杂和突变,在国内尚未见报道,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

患儿,男,2 岁 4 个月,因反复腹泻 1.5 年,腹胀

[收稿日期]2012-03-07;[修回日期]2012-05-17
[作者简介]王艳,女,博士,主管技师。
[通信作者]王春枝,主任技师。

伴慢性进行性加重 1 年来我院就诊。其父母否认近亲结婚;患儿大姐因患遗传性球形红细胞增多症于 9 岁死亡,死亡时腹大;患儿长兄出生后 3 d 不明原因死亡;患儿父亲、二姐身体健康,母亲患甲状腺功能亢进约 10 年,经手术治疗后好转。

体查:患儿体重 13 kg,轻度贫血貌;双侧颌下、左侧腹股沟可触及黄豆至蚕豆大小肿大淋巴结,质软、表面光滑、可活动;腹部膨隆,以右侧腹部为著,肝脏右侧肋缘下 12 cm,质软、边缘锐。

辅助检查:白细胞计数 $6.29 \times 10^9/L$,网织红细胞 1.06%,血红蛋白 94.0 g/L;空腹血糖 2.4 mmol/L, γ -谷氨酰转肽酶 116.0 U/L,碱性磷酸酶 153 U/L,载脂蛋白 B 1.30 g/L,低密度脂蛋白胆固醇 3.18 mmol/L,谷丙转氨酶 113 U/L,谷草转氨酶 129 U/L,甘油三酯 4.91 mmol/L,肌酸激酶同工酶 28.0 U/L,尿酸 820 $\mu\text{mol/L}$,乳酸脱氢酶 271 U/L;血二氧化碳结合力 13.20 mmol/L。腹部超声示肝脾肿大。

1.2 方法

1.2.1 外周血基因组 DNA 提取 征得研究对象知情同意后,提取了先证者及其父母、姐姐外周血,应用北京 Tiangen 公司的 TIANamp Blood 血液基因组 DNA 提取试剂盒(目录号:DP318)提取全血基因组 DNA。

1.2.2 RT-PCR 反应 选择 *G6PC* 基因的所有外显子为扩增对象,引物序列参考文献^[4]并稍加更改(表 1),引物合成由上海生物工程有限公司完成。反应体系为 20 μL ,包括 $2 \times \text{Mix}$ (Tiangen 公司) 10 μL ,引物(10 pmol/ μL)各 0.5 μL ,人基因组 DNA (50 ~ 100 ng/ μL) 1 μL ,最后由 ddH₂O 补至 20 μL 。PCR 在 GeneAmp PCR System 9700 PCR 仪 (Applied Biosystems, USA) 上完成。反应条件为:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 DNA 测序 纯化的 PCR 产物在全自动测序仪 ABI3130 (Applied Biosystems, USA) 上进行双向测序,并采用 DNAssist (version 1.0 版本) 软件比对测序结果。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物鉴定

以患者及其父母基因组 DNA 为模板,采用扩增 *G6PC* 基因 5 个外显子的引物进行目的 DNA 片段扩增,均获得目的 DNA 片段。

表 1 *G6PC* 基因外显子 PCR 引物序列

外显子	引物	引物序列(5'→3')	PCR 产物长度(bp)
1	上游	TCTGCTGACATCTTCCT	306
	下游	GCCTCTTTTCTTGCTGA	
2	上游	GCATTCATTGTAACCC	192
	下游	TCCACTCAGCTTCTGTCT	
3	上游	CACCTTTACTCCATTCTC	209
	下游	GTGGTGTGTGAGTACA	
4	上游	GCCAGGCTCCAACATTT	259
	下游	GGAGAGAAACGGAATGG	
5	上游	CTTCCTATCTCTCACAG	681
	下游	TCACTTGCTCCAAATACC	

2.2 DNA 测序

对目的基因进行双向测序发现患者 *G6PC* 基因外显子 5 上第 743 碱基发生杂和突变,由 G 转变为 A,导致第 222 位密码子由 GGA(图 1A)变为 AGA(图 1B)。

2.3 突变来源分析

为了验证上述序列结果并确定患者 *G6PC* 基因突变位点的遗传来源,对扩增出的患者父亲、母亲、姐姐的 *G6PC* 基因 5 个外显子的 PCR 产物进行测序。患者父亲、姐姐正常,母亲与患者相同,在 *G6PC* 基因外显子 5 上第 743 碱基发生杂和突变。故认为患者该位点的突变由母亲遗传而来。见图 2。

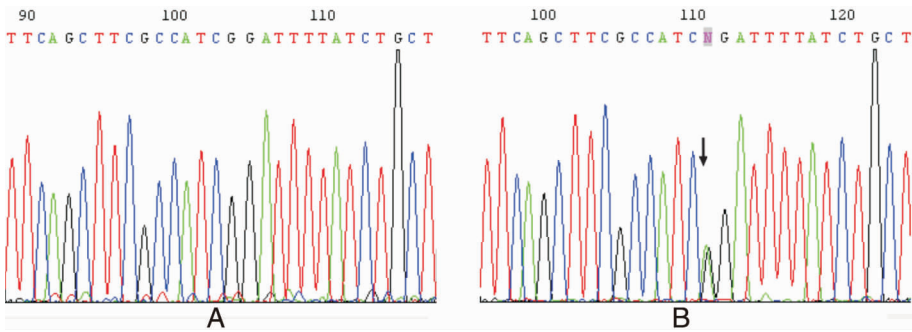


图 1 患者及正常个体(患者父亲)*G6PC* 基因测序结果 A:正常个体的 DNA 序列;B:患者 DNA 序列,箭头示错义突变 743G>A 导致 G222R 突变。

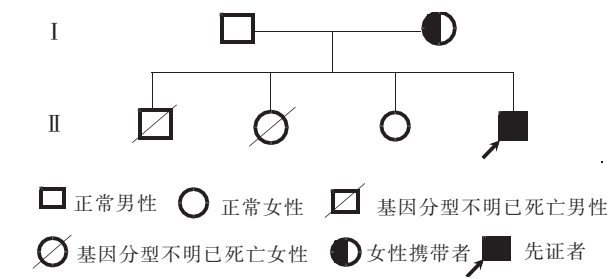


图 2 患者家系图

3 讨论

GSD Ia 型临床表现为低血糖、肝肾肿大、高脂血症、高尿酸血症、高乳酸血症及生长落后,长期的并发症表现为肝脏腺瘤、血小板减少、肾功能不全、痛风症等^[1]。本患者因腹泻、腹胀入院,住院期间发现肝脏肿大、高脂血症、高尿酸血症和高乳酸血症,疑诊为 GSD Ia 型。

对患者 *G6PC* 基因的 5 个外显子进行重新测序,结果发现外显子 5 发生单个碱基杂和突变,突变碱基位于第 743 位,由 G 转变为 A,导致第 222 位密码子由 GGA 变为 AGA,造成氨基酸由甘氨酸变为精氨酸。虽然 GSD Ia 型为常染色体显性遗传,对其进行基因诊断需发现 2 个等位基因的突变,但邱文娟等^[5]报道了 21 例该病患者的基因突变谱中有 8 例为杂和突变,他们认为携带 1 个 *D6Pase* 基因突变且具有典型 GSD Ia 临床症状的患者患有其他疾病的可能性极小,我们认为患者是杂和突变而出现疾病表型的特例。本例患者突变来源分析显示患者父亲和姐姐未发生突变,而患者母亲为杂和突变,突变位置、类型与患者相同,因此患者该位点的突变是由母亲遗传而来,患者的大哥、大姐已死亡,患者家属提供的临床资料不详细,无法判定其是否也为 GSD Ia 型患者。目前 GSD Ia 型的基因型和表型之间并没有严格的相关性,该病患者的表型具有异质性,相同基因型的患者从发病年龄到血生化指标和临床表现及临床症状的严重程度均有所不同^[6]。本例患者虽然与其母亲的基因型相同,但患者表现

出典型的 GSD Ia 临床症状,而患者母亲却没有 GSD Ia 的临床症状。

G6Pase 蛋白为细胞内质网膜蛋白,包含 357 个氨基酸,为高度疏水性蛋白,有 9 个跨膜单位,其 N 端位于内质网腔内,C 端位于质膜上。1995 年 Lei 等^[7]对 GSD Ia 的 G6Pase 的结构功能及突变导致的酶缺陷进行分析显示,第 222 位氨基酸位于第四个跨膜蛋白,当野生型甘氨酸突变为精氨酸、谷氨酰胺或天冬氨酸时,酶活性分别变为原酶活性的 4%、19.5% 和 26.3%。本例患者携带的突变导致酶活性下降 96%,下降的程度是已报道该位点其他突变中最低的^[7]。

总之,我们在国内首次报道了 *G6PC* 基因的 G222R 突变,丰富了 GSD Ia 型的突变谱,也进一步丰富了该疾病的遗传及临床数据库,为医务工作者更好的诊断 GSD Ia 型提供了资料。

[参 考 文 献]

[1] Chen NT, Burchell A. Glycogen storage disease[M]//Scriver CR, et al (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill Press, 1995: 935-965.
[2] 韩庆华,宋元宗,柳国胜. 糖原累积病 I 型并新型隐球菌性脑膜炎 1 例[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(5):439-440.
[3] Lei KJ, Shelly LL, Pan CJ, Sidbury JB, Chou JY. Mutation in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type Ia[J]. Science, 1993, 262(5133): 580-583.
[4] Wong LJ, Hwu WL, Dai P, Chen TJ. Molecular genetics of glycogen-storage disease type Ia in Chinese patients of Taiwan[J]. Mol Genet Metab, 2001, 72(2): 175-180.
[5] 邱文娟,顾学范,叶军,韩连书,张雅芬,刘晓青,等. 糖原累积病 Ia 型的基因突变和临床研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004,20(6):502-505.
[6] Hutton JC, O'Brien RM Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family[J]. J Biol Chem, 2009, 284(43): 29241-29245.
[7] Lei KJ, Pan CJ, Liu JL, Shelly LL, Chou JY. Structure-function analysis of human glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type Ia[J]. J Biol Chem, 1995, 270(20): 11882-11886.

(本文编辑:万静)