

论著 · 临床研究

婴儿型糖原累积病Ⅱ型一家系的临床和基因突变分析

张磊 徐晓恒 王吉 张思瑾

(吉林大学第二医院儿科, 吉林 长春 130041)

[摘要] 收集一个家系中两例婴儿型糖原累积病Ⅱ型(GSDⅡ)患儿的临床资料,采用干血片法(DBS)收集患儿外周血标本并检测患儿白细胞酸性 α -葡萄糖苷酶(GAA)活性;采用聚合酶链反应(PCR)对该家系GAA基因的编码区进行扩增,直接测序分析GAA基因突变情况。两例患儿为双胞胎,于10个月大时因喂养困难、全身肌肉无力、心脏增大、心功能不全就诊;两个患儿外周血GAA活性均明显低于正常;基因测序分析发现患儿存在2个复合杂合突变,分别为G1942A和G2214A,前者已经被证实具有致病性,后者是一个无义突变,导致GAA蛋白的第738位的色氨酸变成了终止密码。两患儿经基因检测明确诊断为糖原累积症Ⅱ型,未能给予酶替换治疗,随访结果,两患儿分别于15个月和17个月时死于家中。糖原累积病Ⅱ型是由GAA基因突变引起的GAA活性降低所致,DBS法检测外周血GAA活性及GAA基因检测是可行、有效的诊断方法。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(10): 1228-1231]

[关键词] Ⅱ型糖原累积病;酸性 α -葡萄糖苷酶;基因突变

Clinical characteristics and gene mutation analysis of one pedigree with infantile glycogen storage disease type II

ZHANG Lei, XU Xiao-Heng, WANG Ji, ZHANG Si-Jin. Department of Pediatrics, Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China (Zhang S-J, Email: sijin@jlu.edu.cn)

Abstract: The clinical data of 2 infants with infantile glycogen storage disease type II (GSD II) from one pedigree were collected. The method of dried blood spots (DBS) was applied to collect peripheral blood samples, and the activity of acid α -D-glucosidase (GAA) in leukocytes was measured. The coding region of GAA gene in this pedigree was amplified by polymerase chain reaction and then direct sequencing was used to analyze mutations in GAA gene. The two infants were twins, who were admitted to the hospital due to feeding difficulties, generalized muscle weakness and hypotonia, cardiomegaly, and cardiac insufficiency when they were 10 months old. The GAA activity in leukocytes in the two infants was significantly lower than in normal controls. Gene sequencing revealed 2 compound heterozygous mutations in the two infants, i.e., G1942A and G2214A, respectively. G1942A had been proved pathogenic, and the latter one, G2214A, was a nonsense mutation, resulting in the change of tryptophan, the 738th amino acid of GAA, into a stop codon. The two infants were diagnosed with GSD II by gene detection and no enzyme replacement therapy could be provided to them. Follow-up visits showed that the two infants died at home at the age of 15 months and 17 months, respectively. GSD II is caused by deficiency of GAA activity resulting from mutation of GAA gene. The detection of GAA activity in peripheral blood by DBS and GAA gene detection are effective and feasible methods for diagnosis of GSD II.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(10): 1228-1231]

Key words: Glycogen storage disease type II; Acid α -D-glucosidase; Gene mutation

糖原累积病Ⅱ型(glycogen storage disease type II, GSDⅡ, MIM 232300)由荷兰病理学家Pompe在1932年首次报道,是一种罕见的常染色

体隐性遗传病,是由于酸性 α -葡萄糖苷酶(acid- α -D-glucosidase, GAA, MIM 606800)基因缺陷所致。GAA是溶酶体中糖原降解所必需的酶,能够使低

[收稿日期] 2015-07-14; **[接受日期]** 2015-08-05

[基金项目] 吉林省科技厅项目(20130206002YY)。

[作者简介] 张磊,女,博士,副教授。

[通信作者] 张思瑾,女,教授。

聚糖和糖原分解成葡萄糖。该酶缺乏或者缺陷时,糖原不能被分解,引起溶酶体的破坏,从而引起骨骼肌、心肌、肝脏等多种组织的损伤。临床可表现为肌肉无力、心肌肥大、心功能不全等症状,严重者可因呼吸循环衰竭而死亡^[1]。其临床确诊需要进行酶活性测定、肌肉活检或基因检测^[2]。

本研究中,我们对一对疑诊 GSD II 的双胞胎姐妹的外周血 GAA 活性进行了检测,采取聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增和直接测序的方法,对此两个患儿及其父母进行了 GAA 基因的检测。两个患儿均携带有 G1942A 的致病突变和 G2214A 的疑似致病突变。本研究结果显示干血片法 (dried blood spots, DBS) 检测 GAA 活性可以作为 GSD II 的筛查方法,继之进行 GAA 基因测序可以明确 GSD II 患儿的基因诊断。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病例 1,女,10 个月,因口周发青 1.5 个月,反复咳嗽、流涕 17 d,加重 3 d 于 2008 年 11 月 28 日入院。患儿为第 2 胎第 2 产,为双胞胎之大,足月正常产,出生时状况良好,10 个月仍不能独坐,不能翻身,抬头困难。其姐姐在 14 个月时因“肺炎、脑瘫、先天性心脏病”死亡。入院体查:体温 36.5℃,心率 170 次/min,呼吸 70 次/min。一般状态差,眼睑轻度水肿,面色晦暗,鼻腔内见黄白色分泌物,口周发绀,舌体肥大。心音低钝,节律规整,未及杂音。双肺可闻及散在喘鸣音、痰鸣音及湿罗音。肝肋下 3 cm,质韧。双下肢肌力三级,肌张力低,腱反射未引出。辅助检查:血常规示白细胞 (WBC) $14.1 \times 10^9/L$ (参考值 $3.5 \sim 9.5 \times 10^9/L$)、淋巴细胞比例 (LYN) 37% (参考值 20%~50%)、中性粒细胞比例 (GR) 57.3% (参考值 40%~75%);血液生化示谷丙转氨酶 (ALT) 122 U/L (参考值 9~50 U/L)、谷草转氨酶 (AST) 82 U/L (参考值 15~40 U/L)、肌酸激酶 (CK) 204 U/L (参考值 25~400 U/L);胸片示双肺纹理增多、紊乱,心影向两侧扩大 (图 1);心脏超声示室间隔及左心室后壁呈向心性肥厚,心功能下降 (射血分数 38%);腹部超声示肝上界第 5 肋间、肋下平脐,剑突下脐上 1 cm。入院后临床初

步诊断为支气管肺炎、心力衰竭,给予积极抗感染、强心、对症治疗。治疗 24 h 后,患儿一般状态好转,心率降至 124 次/min,呼吸 40 次/min,排尿 1 次,进乳 2 次,面色红润,口周发绀缓解,心衰纠正。住院治疗 1 周后,患儿肺部罗音减少,肝脏肋下未触及,心影无明显减小,补充临床诊断:糖原累积症 II 型?,家属拒绝继续住院治疗,签字离院,出院随访。患儿 12 个月时吞咽困难加重,14 个月时四肢不能动,15 个月时在家中死亡。

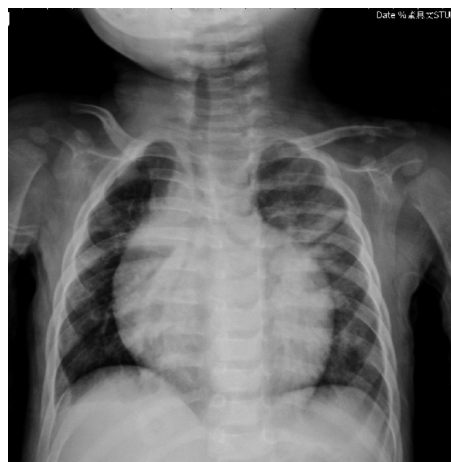


图 1 病例 1 胸部正位片 示双肺纹理增多、紊乱,心影向两侧扩大。

病例 2,女,10 个月,因咳嗽、流涕伴发热 17 d 于 2008 年 11 月 28 日入院。患儿为双胞胎之小,足月正常产,出生时状况良好,2 个月会抬头,3 个月会翻身,但随后生长发育逐渐落后,10 个月不会坐,不会翻身,不能抬头。入院体查:体温 36.8℃,心率 100 次/min,呼吸 26 次/min。舌肥大,可闻及散在干罗音及痰鸣音,以右肺为主。肝脏右肋下 2 cm。双下肢肌力三级,肌张力低,腱反射未引出。辅助检查:血常规示 WBC $9.5 \times 10^9/L$;血液生化示 AST 134 U/L,ALT 91 U/L,CK 456 U/L;胸片示双肺纹理增强,以双下肺为主;心脏超声示双心室向心性肥厚,左心增大,心功能下降 (射血分数 44%);心电图示 PR 间期缩短,QRS 波电压增高。临床诊断支气管肺炎,给予抗感染、对症、支持治疗。治疗 1 周后,患儿肺部罗音基本消失,疑诊糖原累积症 II 型,经家属要求,准予出院。患儿 12 个月时,吞咽困难加重,14 个月时四肢少动,17 个月时在家中死亡。

1.2 外周血 GAA 活性检测

DBS 法收集患儿的外周血标本。GAA 活性测定参考文献^[3]。打孔器取直径 3 mm 的血片，置于深孔板内，加入 360 μL 超纯水，震板仪上震荡 1 h，充分洗脱，取 50 μL ，加入 10 μL 80 $\mu\text{mol/L}$ 的阿卡波糖（pH 3.8，用 40 mmol/L 醋酸钠缓冲液配制）及 40 μL 70 mmol/L 的 4-甲基伞型酮- α -D-吡喃葡萄糖苷液（4-MUG），37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 20 h，加入 200 μL EDTA 缓冲液（pH 11.3，0.15 mol/L）。于免疫荧光检测仪下扫描荧光强度，每组均设空白对照。

1.3 GAA 基因检测

取两个患儿及其父母的静脉 EDTA 抗凝血标本，酚-氯仿法提取基因组 DNA，PCR 扩增患儿及其父母 GAA 基因的外显子 2~20，所用引物见相关文献^[4]。PCR 体系构成如下：LA Taq 0.5 μL 、2 \times GC buffer I 8.0 μL 、dNTP Mixture 2.0 μL （2.5 mmol/L）、正反向引物分别为 2.0 μL 和 10.5 μL 、模板 DNA（100 ng/ μL ）1 μL 。PCR 循环反应条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，58~62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30~60 s，共 30~35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5~8 min。用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物，在紫外灯下切出特异性目的条带，使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit 进行 PCR 产物的回收。纯化后的 PCR 产物送北京诺赛基因公司用 ABI3730XL 进行测序，Squencing Analysis TM 软件分析测序结果。

2 结果

2.1 外周血 GAA 酶活性检测结果

两个患儿的 GAA 活性检测结果每小时均 <0.63 nM/punch，正常人 GAA 活性每小时 >7.92 nM/punch，两个患儿的 GAA 活性均明显低于正常。

2.2 GAA 基因检测结果

经过对患儿及其父母 GAA 基因的编码区进行测序，发现两个患儿均为复合杂合突变。两个患儿 GAA 基因第 14 外显子上的第 1942 位碱基存在颠换（G1942A）（图 2 左），因腺嘌呤（A）取代鸟嘌呤（G），导致 GAA 蛋白第 648 位甘氨酸（Gly）被丝氨酸（Ser）取代（G648S）；经检测，

该突变来自患儿母亲的杂合突变，患儿父亲该位点无突变。在两个患儿第 16 外显子上同时存在一单核苷酸杂合无义突变（G2214A）（图 2 右），因腺嘌呤（A）取代鸟嘌呤（G），导致 GAA 蛋白第 738 位的色氨酸（Trp）变成了终止密码（W738X）；此突变来源于患儿父亲，也为杂合突变，患儿母亲该位点无突变。

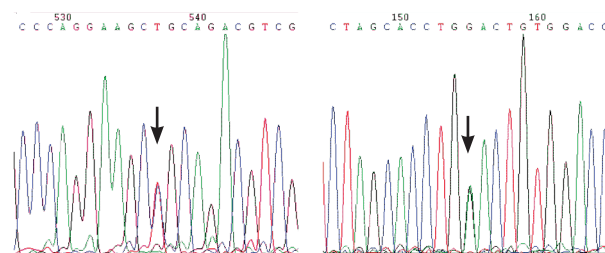


图 2 GAA 基因检测结果 左图：GAA 基因第 14 外显子上 G1942A 突变（箭头所示），导致 GAA 蛋白第 648 位甘氨酸（Gly）被丝氨酸（Ser）取代（G648S）；右图：GAA 基因第 16 外显子上 G2214A 突变（箭头所示），导致 GAA 蛋白第 738 位的色氨酸（Trp）变成了终止密码（W738X）。

3 讨论

GSD II 是由于先天性 GAA 缺陷所导致的代谢性疾病，根据发病年龄、受累器官和疾病进展速度可分为婴儿型和晚发型^[2]，病情的严重程度取决于患儿体内残留的 GAA 活性。婴儿型患者体内的 GAA 活性严重或者完全丧失，典型者于新生儿期到生后 3 个月内起病，四肢松软、运动发育迟缓、喂养及吞咽困难。体格检查可见巨舌、肌张力低下、心脏扩大、肝脏肿大，心脏超声显示心肌肥厚和心功能不全，病情进展迅速，多于 1 岁内死于左心衰或者肺部感染后的心肺功能衰竭。晚发型患者起病晚，病程进展慢，部分可仅表现为进展缓慢的全身性疾病，无器官肿大^[2,5]。本文所报道 2 例患儿在 10 个月大时症状明显，心脏增大，外周血 GAA 活性明显降低，分别在 15 个月、17 个月大时先后死亡，属于婴儿型。

皮肤成纤维细胞的 GAA 酶活性测定至今仍被认为是 GSD II 诊断的金标准^[2]，但此种方法需取皮肤活检的成纤维细胞进行培养，需要 4~6 周，明显延迟了诊断。肌肉病理和免疫组化检查可直接快速地检测肌肉组织中 GAA 活性和糖原含量，但取材部位对检测结果影响很大，且为有创性检

测,不易为患者接受,同时麻醉具有较大的风险性^[6]。因此探索新的无创性快速诊断方法非常重要。

GAA在外周血白细胞中也有表达,DBS留取血液标本,以糖元或4-MU作为底物测定GAA活性,具有无创、便于运输、敏感、准确、快速、高通量等优点,具有广泛应用前景^[3,7-8]。本研究采用上述方法,检测发现患儿的白细胞GAA活性明显下降后,经过基因检测明确诊断,进一步证实了该方法的可行性和准确性^[9]。

GAA基因位于17q25.2-q25.3,全长约28 kb,至今,已经发现了GAA基因的近300种致病突变(www.pompecenter.nl/),主要集中在基因的3个临界区域:含有起始密码子的2号外显子;含酶催化部位的10号和11号外显子以及与蛋白高度保守区域相对应的14号外显子。GAA基因突变存在明显的种族特异性,在中国台湾地区人群中14号外显子的C1935A突变是最常见的类型^[10-11]。本研究两个患儿均为复合杂合突变,第1个位于GAA突变热点区,14号外显子的G1942A,导致G648S,已经被证明具有致病性^[12];另一个突变是G2214A,导致W738X。经过检索,W738X是第2次被报道,Zeng等^[13]在1例婴儿型GSD II患儿基因上检测到E888X/W738X,该患儿生后2个月即出现喂养困难和全身肌无力,4个月发现心脏增大,6个月时死于心肺功能衰竭,患儿白细胞GAA活性仅为正常对照的17.3%。因W738X可导致GAA蛋白翻译提前终止,推测应为严重突变。

美国食品药品监督管理局于2006年4月批准上市了第一个重组GAA酶用于GSD II的治疗,早期诊断及早期酶替代治疗有望改善婴儿型GSD II的预后^[14-15]。我国台湾地区及部分欧美国家已经开展GSD II的新生儿筛查^[16-17],而实践证明,应用新生儿筛查结合酶置换治疗,能够明显改善GSD II的预后^[18]。本文使用的DBS留取外周血检测GAA活性,对阳性者进行基因检测证实了在我国进行新生儿GSD II筛查的可行性。

[参 考 文 献]

- [1] Kishnani PS, Howell RR. Pompe disease in infants and children[J]. J Pediatr, 2004, 144(5 Suppl): S35-S43.
- [2] Kishnani PS, Steiner RD, Ball D, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline[J]. Genet Med, 2006, 8(5): 267-288.
- [3] 邱文娟,王霞,王瑜,等.干血滤纸片法和白细胞酸性 α -葡萄糖苷酶活性测定平台的建立及临床应用[J].中华儿科杂志, 2010, 48(1): 55-59.
- [4] Ko TM, Hwu WL, Lin YW, et al. Molecular genetic study of Pompe disease in Chinese patients in Taiwan[J]. Hum Mutat, 1999, 13(5): 380-384.
- [5] Manganelli F, Ruggiero L. Clinical features of Pompe disease[J]. Acta Myol, 2013, 32(2): 82-84.
- [6] Ing RJ, Cook DR, Bengur RA, et al. Anaesthetic management of infants with glycogen storage disease type II: a physiological approach[J]. Paediatr Anaesth, 2004, 14(6): 514-519.
- [7] Umapathysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ, et al. Determination of acid-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease[J]. Clin Chem, 2001, 47(8): 378-383.
- [8] Goldstein JL, Dickerson G, Kishnani PS, et al. Blood-based diagnostic testing for Pompe disease: consistency between GAA enzyme activity in dried blood spots and GAA gene sequencing results[J]. Muscle Nerve, 2014, 49(5): 775-776.
- [9] Kishnani PS, Amartino HM, Lindberg C, et al. Methods of diagnosis of patients with Pompe disease: Data from the Pompe Registry[J]. Mol Genet Metab, 2014, 113(1-2): 84-91.
- [10] Er TK, Chen CC, Chien YH, et al. Development of a feasible assay for the detection of GAA mutations in patients with Pompe disease[J]. Clin Chim Acta, 2014, 429: 18-25.
- [11] Ko TM, Hwu WL, Lin YW, et al. Molecular genetic study of Pompe disease in Chinese patients in Taiwan[J]. Hum Mutat, 1999, 13(5): 380-384.
- [12] Huie ML, Tsujino S, Sklower Brooks S, et al. Glycogen storage disease type II: identification of four novel missense mutations (D645N, G648S, R672W, R672Q) and two insertions/deletions in the acid α -glucosidase locus of patients of differing phenotype[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 244(3): 921-927.
- [13] Zeng M, Qiu W, Gu X, et al. A novel nonsense mutation p.W738X of GAA gene identified in a Chinese patient with infantile glycogen storage disease type II[J]. J Clin Pediatr, 2011, 29(5): 401-406.
- [14] Chien YH, Hwu WL, Lee NC. Pompe disease: early diagnosis and early treatment make a difference[J]. Pediatr Neonatol, 2013, 54(4): 219-227.
- [15] Angelini C, Semplicini C. Enzyme replacement therapy for Pompe disease[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2012, 12(1): 70-75.
- [16] Matern D, Gavrilov D, Oglesbee D, et al. Newborn screening for lysosomal storage disorders[J]. Semin Perinatol, 2015, 39(3): 206-216.
- [17] Wittmann J, Karg E, Turi S, et al. Newborn screening for lysosomal storage disorders in Hungary[J]. JIMD Rep, 2012, 6: 117-125.
- [18] Andersson HC. Newborn screening + enzyme replacement therapy = improved lysosomal storage disorder: outcomes in infantile-onset Pompe disease[J]. J Pediatr, 2015, 166(4): 800-801.

(本文编辑: 万静)