

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.08.003

论著·临床研究

丙酮酸脱氢酶缺乏症 PDHA1 基因的一个新突变及其致病性鉴定

吴莫龄¹ 刘丽¹ 毛晓健¹ 彭敏芝¹ 刘鸿圣² 盛慧英¹ 蔡燕娜¹
梅慧芬¹ 樊春¹ 黄永兰¹ 李秀珍¹ 程静¹

(1. 广州市妇女儿童医疗中心遗传与内分泌科, 广东 广州 510623;
2. 广州市妇女儿童医疗中心影像科, 广东 广州 510623)

[摘要] **目的** 研究丙酮酸脱氢酶缺乏症发病分子遗传学机制, 从基因水平诊断丙酮酸脱氢酶缺乏症, 为遗传咨询和产前基因诊断提供依据。**方法** 对临床表现及实验室检查符合丙酮酸脱氢酶缺乏症的1例患儿采用PCR法对PDHA1基因的11个外显子及外显子交界区进行扩增, 并通过对扩增产物直接测序检测突变。采用生物信息学方法对新突变进行氨基酸保守型分析, 预测蛋白二、三级结构, 鉴定其致病性。**结果** 先症者PDHA1基因第11外显子出现小片段重复突变, 即c.1111_1158dup48bp, 为新发突变。50例正常对照直接测序均未检测到c.1111_1158dup48bp突变。蛋白质二级、三级结构预测结果显示: 新突变c.1111_1158dup48bp引起Ser371_Phe386的16个氨基酸重复, 导致蛋白质二、三级结构发生明显变化, 而正常对照无此变化。**结论** PDHA1基因c.1111_1158dup48bp重复突变不是多态性变异, 可能是一种新的致病性突变, 导致丙酮酸脱氢酶缺乏症的发病。
[中国当代儿科杂志, 2015, 17(8): 775-779]

[关键词] 丙酮酸脱氢酶缺乏症; PDHA1; 新突变; 儿童

Identification of a novel pathogenic mutation in PDHA1 gene for pyruvate dehydrogenase complex deficiency

WU Mo-Ling, LIU Li, MAO Xiao-Jian, PENG Min-Zhi, LIU Hong-Sheng, SHENG Hui-Ying, CAI Yan-Na, MEI Hui-Fen, FAN Chun, HUANG Yong-Lan, LI Xiu-Zhen, CHENG Jing. Department of Genetics and Endocrinology, Guangzhou Children and Women's Medical Center, Guangzhou 510623, China (Liu L, Email: liliuxia@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the molecular genetic mechanism and genetic diagnosis of pyruvate dehydrogenase complex deficiency (PHD), and to provide a basis for genetic counseling and prenatal genetic diagnosis of PHD. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the 11 exons and exon junction of the PDHA1 gene from a child who was diagnosed with PHD based on clinical characteristics and laboratory examination results. The PCR products were sequenced to determine the mutation. An analysis of amino acid conservation and prediction of protein secondary and tertiary structure were performed using bioinformatic approaches to identify the pathogenicity of the novel mutation. **Results** One novel duplication mutation, c.1111_1158dup48bp, was found in the exon 11 of the PDHA1 gene of the patient. No c.1111_1158dup48bp mutation was detected in the sequencing results from 50 normal controls. The results of protein secondary and tertiary structure prediction showed that the novel mutation c.1111_1158dup48bp led to the duplication of 16 amino acids residues, serine371 to phenylalanine386, which induced a substantial change in protein secondary and tertiary structure. The conformational change was not detected in the normal controls. **Conclusions** The novel duplication mutation c.1111_1158dup48bp in the PDHA1 gene is not due to gene polymorphisms but a possible novel pathogenic mutation for PHD. [Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(8): 775-779]

Key words: Pyruvate dehydrogenase complex deficiency; PDHA1; Novel mutation; Child

[收稿日期] 2014-11-27; [接受日期] 2015-02-07

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BA109804); 中医药省重点科研项目(20123013)资助。

[作者简介] 吴莫龄, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 刘丽, 女, 主任医师。

丙酮酸脱氢酶复合物缺乏症 (pyruvate dehydrogenase complex deficiency, PHD) 是一种线粒体能量代谢障碍的遗传性疾病, 是儿童原发性高乳酸血症的重要原因之一^[1]。PHD临床症状多样, 包括致命的高乳酸血症和脑病、精神运动发育迟缓、间歇性的运动失调^[2]。大部分 PHD 患者是由于 PDHA1 基因突变, 引起 E1 α 亚基功能缺陷^[3]。PDHA1 基因位于 Xp22.1-22.2, 为 X 连锁的遗传性疾病, 由于 X 染色体随机失活, 女性也可发病^[4]。国内外无明确的 PHD 发病率, 国内仅两例 E1 α 亚基功能缺陷报道^[5-6]。我们对 1 例精神运动发育迟缓患儿进行了 PDHA1 基因的突变检测, 发现一个新突变 c.1111_1158dup48bp, 经生物信息学方法预测分析, 推测可能为致病突变。

1 资料与方法

1.1 病例资料

先证者: 男, 1岁5个月, 广东省人, 汉族。因精神运动落后1年余, 乏力20余天就诊。患儿系第3胎第2产, 足月顺产, 出生体重2.9 kg, 无窒息抢救史, 生后哭声较小。精神运动发育落后, 生后9个月会抬头, 9个月会坐, 11个月能扶站, 1岁能扶走, 不能独站、独走。1岁5个月会叫妈妈。1岁5个月时咳嗽感冒后出现乏力、运动倒退, 表现为抬头、举手无力, 不能扶站, 持续20余天不能缓解, 遂至我院就诊。患儿有一哥哥, 3岁, 无明显异常。家族中无类似病史。体检: 神志清楚, 反应稍迟钝, 斜视, 呼吸平稳, 心肺腹体检未发现明显异常, 四肢无畸形, 四肢肌张力稍低, 膝反射存在。拇指内收, 精细运动可, 能独坐, 会爬, 可扶站、扶行, 不能独立独行。血乳酸波动在 5.7~12.2 mmol/L。血丙酮酸 0.5 mmol/L, 明显升高, 乳酸/丙酮酸比值正常。血氨、血糖正常。尿有机酸分析提示少量乳酸。血浆酰基肉碱检测无明显异常。MRI 扫描提示双侧苍白球对称性、片状异常信号影, MRS 提示基底节、苍白球区域乳酸峰异常升高。检测了线粒体脑肌病基因 mtDNA 上 A3243G (MELAS)、A8344G (MERRF) 和 T8993G/C (LS) 3 个位点, 结果未发现突变。给予生酮饮食, 口服三维 B 片 (1 片/d, 相当于维生素 B₁ 100 mg/d)、辅酶 Q₁₀ 片 (20 mg/d)、左卡

尼汀 (1.0 g/d) 及碳酸氢钠片等对症支持治疗。治疗 1 周后复诊, 患儿精神、反应好转, 抬头有力, 治疗 3 个月后, 患儿活动明显有力, 能扶站、扶走。

1.2 基因组 DNA 抽提

取得家属知情同意后, 抽取患儿外周静脉血 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。

1.3 PCR 引物设计、扩增及突变分析

PDHA1 基因、PC 基因序列分别参考 NM_000284 和 NM_000920, 使用 Primer 5.0 设计引物, 扩增 PDHA1 和 PC 基因外显子及两端内含子区域。PCR 扩增步骤参照文献^[5]。用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳 (北京六一仪器厂) 鉴定目的 PCR 产物。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 和 DNA man 软件进行序列分析和比对。

1.4 新突变的致病性鉴定

(1) 多态性变异排查: 本研究检测到患儿 c.1111_1158dup 48 bp 突变为国际首次报道的新突变。用第 11 外显子的 PCR 产物直接测序, 检测患儿父母及 50 名正常对照人群, 进行多态性变异排查。

(2) 跨物种突变部分氨基酸保守性分析: 为了明确突变位点的氨基酸是否具有进化上的保守性, 使用 DNA MAN 软件对人、黑猩猩、野猪、牛、大鼠、小鼠、布谷鸟、眼镜蛇、斑马鱼等 9 个具有代表性的物种的 PDHA1 蛋白的氨基酸序列进行相似性比对和保守性分析, 以期揭示突变区域是否高度保守。

(3) 正常蛋白和突变蛋白一级结构比对分析: 使用 The ExPASy 软件的 ProtParam 工具 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 计算主要理化性质。应用 TMpred 软件 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 进行蛋白质亲疏水性分析和蛋白质跨膜区分析。

(4) 正常蛋白和突变蛋白二级结构比对分析: 应用 The ExPASy (<http://www.expasy.ch/>) 和蛋白质二级结构预测软件 predictprotein (<https://www.predictprotein.org/>) 对正常蛋白和突变蛋白二级结构进行预测和比对, 以此鉴别在突变位点前后是否有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角、扩展链和无规则卷曲等结构改变, 从而推断该新突变是否为致病性突变。

(5) 正常蛋白和突变蛋白三级结构对比分析: 应用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 和 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) 对正常蛋白和突变蛋白三级结构进行预测和比对, 粗略判断突变对 PDHA1 蛋白三级结构的影响情况, 从而推测该新突变是否为致病性突变。

2 结果

2.1 测序结果

对患儿 PDHA1 基因的 11 个外显子及两端

内含子进行 PCR 扩增并直接测序 (测序图和序列比对图见图 1), 发现先证者第 11 外显子存在 c.1111_1158dup48bp 突变。经查阅人类基因突变数据库 (HGMD) 及近 2~3 年相关文献, 发现该突变为国际首次报道的新突变。对先证者 PC 基因的 20 个外显子及两端内含子进行 PCR 扩增并直接测序, 未发现突变。对患儿的父母进行 PDHA1 基因检测, 未发现突变。

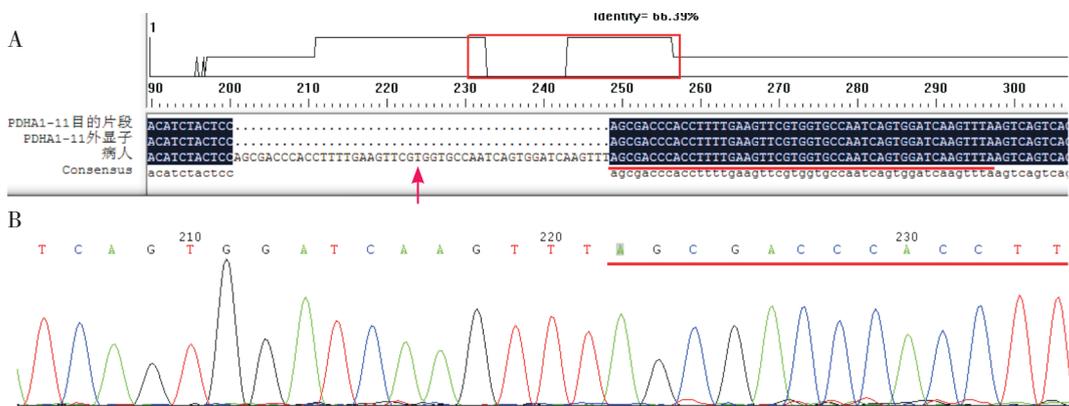


图1 本例患儿 PDHA1 基因第 11 外显子的基因序列比对图 A 为使用 DNA MAN 软件对 NCBI 中标准序列与本患儿 PDHA1 基因测序结果进行比对的图, 发现本患儿第 11 外显子插入 48 bp 碱基, 且与后面 48 bp 一致 (箭头所指为突变位点)。B 为 Chromas 软件查看本患儿的测序结果, 提示本患儿插入 48 bp 的碱基为半合插入。

2.2 新突变的致病性鉴定结果

(1) 多态性变异排查: 患儿父、母亲表型正常, 第 11 外显子测序检测未发现此突变; 50 名无亲缘关系的正常对照经第 11 外显子测序检测未发现此突变, 说明此突变不是多态性。

(2) 跨物种突变部分氨基酸保守性分析: 从

图 2 中可见 PDHA1 基因第 372~386 位氨基酸区间及其后第 387~390 位氨基酸在 9 个物种中都是中度或高度保守, 说明这些氨基酸可能具有重要的生物化学功能。此区域发生突变可能导致蛋白质结构和功能异常。因此, 这个新突变可能是致病突变, 导致 PHD。

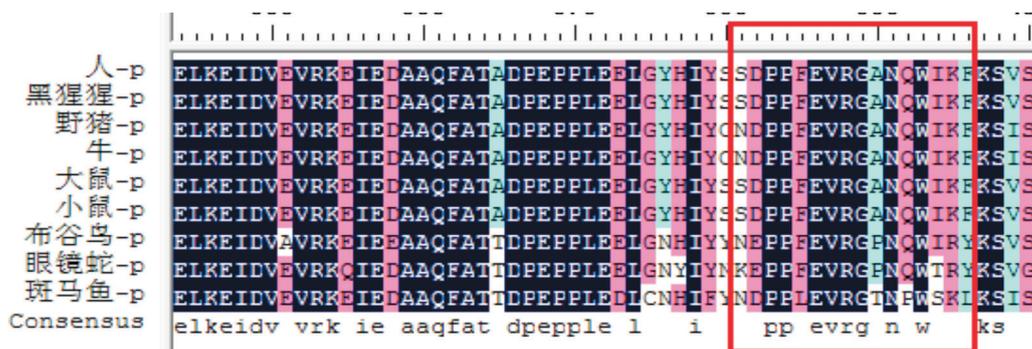


图2 同源性分析 对 9 个不同物种的 PDHA1 氨基酸序列进行相似性比对, 红色方框中为第 371~386 位氨基酸 (即本患儿出现重复突变的氨基酸序列) 的比对图。

(3) 正常的 E1 α 亚单位和缺陷的 E1 α 亚单位一级结构对比分析结果: E1 α 亚单位蛋白由 390 个氨基酸组成。发生突变后, 氨基酸序列增加了 16 个氨基酸, 分子结构发生改变, 相对分子质量增加, 消光系数增大, 蛋白总平均亲水性增强(表 1)。PDHA1 蛋白疏水性分析发现, 氨基酸第 371~386 氨基酸都是亲水残基, 而亲水残基对功能有重要

作用, 所以此段氨基酸发生变化可能会影响酶活性。预测 PDHA1 蛋白质存在两个跨膜区域, 预测分析此突变不处于跨膜区域, 发生突变后蛋白质跨膜螺旋结构未发生改变。

(4) 结构比对: 发生突变后多肽的二级、三级结构都有明显改变, 见图 3~4。

表 1 野生型与突变型的理化性质对比

组别	氨基酸数目	相对分子质量	分子式	总原子量	理论 pI 值	消光系数	总平均亲水性	脂肪系数	半衰期	不稳定性系数
野生型	390	43 295.6	C1899H3010N5400O5666S26	6 041	8.35	38 570	-0.312	77.59	30 h	33.06
突变型	406	45 168.7	C1987H3135N5630O589S26	6 300	8.34	44 070	-0.328	76.45	30 h	32.29

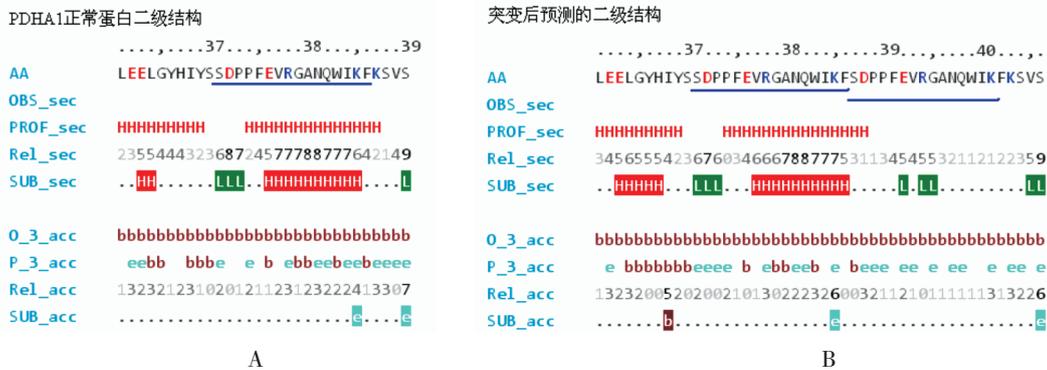


图 3 蛋白质的二级结构比对 通过与正常 PDHA1 蛋白(A)的二级结构比对发现, c.1111_1158dup 48 bp 突变后蛋白二级结构(B)的 loop 序列及螺旋结构 H 发生了变化。

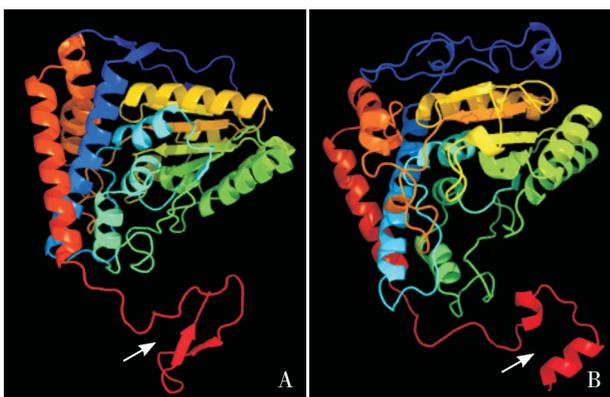


图 4 蛋白质的三级结构对比图 A 为正常 PDHA1 蛋白; B 为 c.1111_1158dup48bp 突变后的 PDHA1 蛋白。通过对比, 发现野生型和突变型蛋白末端结构(即白色箭头所指区域)发生了明显变化。

3 讨论

PDHA1 基因突变患儿临床表现复杂多样, 个体差异较大, 临床诊断困难。因此, 对怀疑本病的患儿行 PDHA1 基因检测是十分重要的^[7]。PDHA1 编码 E1 α 亚基, 其 cDNA 已被克隆, 全长约 1.5 kb, 包含 11 个外显子, 编码 390 个氨基酸^[8]。通过晶体结构分析, 发现 α 亚基二级结构包括 6 个平行式 β 折叠与 10 个螺旋组成的核心区域, N 端 28 个氨基酸残基, C 端 36 个氨基酸残基。 β 折叠与 5 个螺旋共同参与结合 Mg^{2+} , TPP 的焦磷酸片段 PP 或 PP' 域, 其中第 275~285 位氨基酸残基组成的螺旋结构参与 α 亚基的磷酸化作用^[9]。但目

前尚无关于第11外显子中第371~386位等氨基酸残基的功能报道。

查阅HGMD数据库(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)及近期文献,PDHA1基因共有150余种的致病突变,突变分布在整个基因,包括错义突变、无义突变、剪接突变、插入突变及缺失突变等,其中错义突变约占50%,插入和缺失突变约占38%,剪切突变约占8%。PDHA1基因插入和缺失突变主要集中在基因3'端,包括第8~11外显子,表明这一区域是编码PDHA1蛋白的关键区域^[10]。其中第11外显子为突变热区,已报道超过15种突变,以插入突变为主(c.1162_1163ins4、c.961_975dup15、c.977_978ins15、c.1078-1079ins46、c.1087_1119dup33、c.1088-1089ins18、c.1093-1094ins9、c.1143_1144ins24、c.1159_1162dup4等)^[3,10]。已报道PDHA1基因突变多发生在美国、英国、西班牙、日本等,中国人群较少PDHA1基因突变的报道,目前仅报道2个已知错义突变^[5]。本研究发现的插入突变c.1111_1158dup48bp为未见文献报道和记录的首发新突变,为中国人群在PDHA1基因发现的首个插入突变。通过序列比对,发现在插入突变位点末端存在相同的48bp碱基,发生了48个碱基重复。经生物学分析,该突变改变了蛋白质结构,可能导致E1 α 功能障碍、PDHC酶活性下降。此突变报道丰富了人类PDHA1基因突变数据库。由于患儿母亲不携带此突变,我们推测可能是减数分裂偏差或复制错配而导致序列重复,导致该病发生,具体机制还有待进一步研究。

本例先证者精神运动发育迟缓,乏力,感染后乏力加剧,实验室检查提示持续高乳酸血症,MRI扫描提示苍白球病变,MRS提示脑内病变区域乳酸峰升高。根据临床表现和MRI检查等,诊断为Leigh病,考虑为线粒体能量代谢障碍引起的疾病。进一步分析Leigh病的病因,行外周血乳酸/丙酮酸比值测定,血中丙酮酸含量升高更明显,乳酸/丙酮酸比值正常,提示可能为PHD或丙酮酸羧化酶缺乏症^[7]。结合PDHA1基因和PC基因检测结果,诊断为PHD。PHD预后较差,多在儿

童期死亡。而早期给予维生素B₁和辅酶Q等治疗,可以改善临床症状及预后,所以早期行基因检测明确诊断十分必要。女性杂合子可因X染色体随机失活发病,可不发病或仅出现轻微症状。对先证者家系进行PDHA1基因突变检测,可以发现无症状或症状轻微的致病基因携带者,也为家族遗传咨询提供依据。

[参 考 文 献]

- [1] Patel KP, O'Brien TW, Subramony SH, et al. The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: clinical, biochemical and genetic features in 371 patients[J]. *Mol Genet Metab*, 2012, 106(3): 385-394.
- [2] Linda JDM, Michele B, Angel GC. Disorders of pyruvate metabolism and the tricarboxylic acid cycle[M]//Jean MS, Georges VDB, John HW. *Inborn Metabolic Diseases*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2012: 187-200.
- [3] Steller J, Gargus JJ, Gibbs LH, et al. Mild phenotype in a male with pyruvate dehydrogenase complex deficiency associated with novel hemizygous in-frame duplication of the E1 α subunit gene (PDHA1)[J]. *Neuropediatrics*, 2014, 45(1): 56-60.
- [4] Barnerias C, Saudubray J, Touati G, et al. Pyruvate dehydrogenase complex deficiency: four neurological phenotypes with differing pathogenesis[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2010, 52(2): e1-e9.
- [5] 吴莫龄, 刘丽, 蔡燕娜, 等. 丙酮酸脱氢酶复合物缺乏症一例的临床特点及基因检测[J]. *中华儿科杂志*, 2014, 52(11): 863-866.
- [6] 张尧, 孙芳, 杨艳玲, 等. 丙酮酸脱氢酶E1 α 亚单位缺陷导致Leigh综合征[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(3): 216-219.
- [7] 吴莫龄, 刘丽. 丙酮酸脱氢酶复合物缺乏症的研究现状[J]. *国际儿科学杂志*, 2014, 41(6): 610-613.
- [8] Lissens W, De Meirleir L, Seneca S, et al. Mutation analysis of the pyruvate dehydrogenase E1 alpha gene in eight patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency[J]. *Hum Mutat*, 1996, 7(1): 46-51.
- [9] Ciszak EM, Korotchkina LG, Dominiak PM, et al. Structural basis for flip-flop action of thiamin pyrophosphate-dependent enzymes revealed by human pyruvate dehydrogenase[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(23): 21240-21246.
- [10] Imbard A, Boutron A, Vequaud C, et al. Molecular characterization of 82 patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency. Structural implications of novel amino acid substitutions in E1 protein[J]. *Mol Genet Metab*, 2011, 104(4): 507-516.

(本文编辑: 邓芳明)