doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.08.013

论著·临床研究

首例非白人婴儿肝衰竭综合征1型患儿 临床特点和分子诊断研究

林伟霞 郑琪琪 郭丽 程映 宋元宗

(暨南大学附属第一医院儿科,广东广州 510630)

[摘要] 婴儿肝衰竭综合征 1 型(ILFS1)是一种由胞质亮氨酰 -tRNA 合成酶基因(LARS)突变所导致的常染色体隐性遗传病。本研究报道首例非白人 ILFS1 患者的临床特点和分子诊断经过,为 ILFS1 的诊治提供参考。患者为 2 岁 9 个月男孩,因发现肝脾肿大 1 年余就诊。1 岁 5 个月时发现肝脾大,实验室检查发现丙氨酸氨基转移酶和门冬氨酸氨基转移酶偏高、低蛋白血症、凝血功能异常和贫血,肝脏病理提示肝硬化和脂肪肝; SLC25A13 基因高频突变筛查和一代测序分析仅检测到一个父源性突变 c.1658G>A, cDNA 克隆分析也未发现母源性 SLC25A13 等位基因异常转录子;代谢性肝病相关基因外显子组捕获二代测序在患儿 LARS 基因检出 父源性突变 c.2133_2135del(p.L712del)和母源性突变 c.1183G>A(p.D395N),经一代测序验证,最终确诊为 ILFS1。目前随访至 4 岁,肝功能正常,无贫血,仍有低蛋白血症。

[中国当代儿科杂志,2017,19(8):913-920] [关键词] 婴儿肝衰综合征1型;LARS基因;SLC25A13基因;二代测序

Clinical feature and molecular diagnostic analysis of the first non-caucasian child with infantile liver failure syndrome type 1

LIN Wei-Xia, ZHENG Qi-Qi, GUO Li, CHENG Ying, SONG Yuan-Zong. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China (Song Y-Z, Email: songyuanzong@hotmail.com)

Abstract: Infantile liver failure syndrome type 1 (ILFS1) is a Mendelian disease due to biallelic mutations in the cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase gene (LARS). This study aimed to report the clinical and molecular features of the first non-caucasian ILFS1 patient, providing reliable evidences for the definite diagnosis of ILFS1. The 2 years and 9 months old male patient was referred to the hospital with hepatosplenomegaly over 1 year. At age 17 months, he was found to have hepatosplenomegaly and anemia. Since then, he had been managed in different hospitals. The laboratory tests showed liver dysfunction, hypoproteinemia, coagulopathy and anemia, along with histologically-confirmed cirrhosis and fatty liver; however, the etiology remained undetermined. The subsequent SLC25A13 mutation analysis by means of prevalent mutation screening and Sanger sequencing only revealed a paternally-inherited mutation c.1658G>A, and no aberrant SLC25A13 transcripts could be detected from the maternal allele on cDNA cloning analysis, ruling out the possibility of citrin deficiency. Further target exome high-throughout sequencing of genes relevant to genetic liver diseases detected a paternal c.2133_2135del (p.L712del) and a maternal c.1183G>A (p.D395N) mutation in LARS gene. This finding was then confirmed by Sanger sequencing, and ILFS1 was thus definitely diagnosed. The child has been followed up till age 4 years, and his condition became stabilized. **[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(8): 913-920]**

Key words: Infantile liver failure syndrome type 1; LARS gene; SLC25A13gene; Next generation sequencing

[[]收稿日期] 2017-05-18; [接受日期] 2017-06-27

[[]作者简介]林伟霞,女,博士,医师。

[[]通信作者]宋元宗,男,主任医师,教授。

婴儿肝衰竭综合征 1 型 (infantile liver failure syndrome type 1, ILFS1, OMIM #615438) 是 一 种 由胞质亮氨酰-tRNA 合成酶基因 (leucyl-tRNA synthetase gene, LARS) 突变导致的常染色体隐性 遗传病^[1-2]。LARS 基因定位于染色体 5q32,含有 32个外显子,转录子全长 4766 bp, 编码由 1176 个氨基酸组成并位于胞质的亮氨酰-tRNA 合成酶 (leucyl-tRNA synthetase, LeuRS)^[3]。LeuRS 属 于 第一类氨基酰-tRNA 合成酶(aaRS),其作用 是通过氨酰化反应把氨基酸共价连接到与其对应 的tRNA上,而氨酰化反应的第一步是氨基酸的 活化反应,即ATP和氨基酸发生反应生成氨基 酰-AMP及焦磷酸; 第二步是 tRNA 的氨酰化反应, 即氨基酰被转移到 tRNA 的 3' 端核糖上,产生氨 基酰-tRNA, 并释放AMP。此外, aaRS还具有 水解错误活化的氨基酰-AMP(转移前编辑, pretransfer editing)和错配的氨基酰-tRNAs(转移后 编辑, post-transfer editing)的功能,确保从mRNA 到蛋白质翻译过程的高度精确性[4-7]。

2012年, Casey 等^[1]首次报道 ILFS1, 描述了 一个爱尔兰家系的6位本病患者。之后该课题组 又陆续发现4位 ILFS1 患者^[2], 其中3位来自于另 一爱尔兰家庭,还有一位来自美国的犹太人。迄 今未见本病非白人患者的报道。ILFS1临床表现常 涉及多个系统,患者通常在1岁以内表现为低出 生体重、肝功能异常、低蛋白血症、贫血和生长 发育迟缓等, 肝脏病理显示显著的脂肪肝和纤维 化。肝功能异常主要出现在发热时,且病情随着 年龄增长逐渐改善。部分患者可能出现肝功能衰 竭、惊厥和脑病等严重表现,甚至死亡。本研究 旨在报道首例非白人 ILFS1 患者的临床特点和分 子诊断结果,为本病诊治研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

患者,男,2岁9个月,因发现肝脾肿大1年 余入院。患者1岁5个月时因发热2天于当地医院 就诊,血常规示中度贫血,B超示肝脾肿大(具体 不详)。诊断"肝脾肿大待查、急性上呼吸道感染、

中度贫血"。抗感染1天后热退,补铁、护肝治 疗半个月后贫血及肝脾肿大无改善。1岁6个月查 体示肝右肋下 8 cm、剑突下 5 cm, 质硬; 脾肋下 3 cm, 质中; 实验室检查发现丙氨酸氨基转移酶和 门冬氨酸氨基转移酶偏高、低蛋白血症、小细胞 低色素性贫血和凝血功能异常等,见表1;骨髓细 胞学检查未见明显异常,巨细胞病毒、EB 病毒、 乙肝和丙肝等病毒及自身免疫性肝炎相关抗体检 查阴性; 血串联质谱遗传代谢病筛查示多种氨基 酸轻度下降,尿有机酸气相质谱分析提示酮尿; SLC25A13 基因 c.851_854del4、c.1638_1660dup、 IVS6+5G>A、IVS16ins3kb 和 IVS11+1G>A 突变筛 查均阴性。肝脾肿大、贫血原因不明, 予护肝等 对症等治疗,临床表现无明显改善。1岁7个月曾 行 B 超及 CT 检查,提示肝内血管瘤可能性大; 行腹腔镜探查和肝活检术,发现肝脏明显肿大, 表面布满大小不等黄白色结节; 肝脏病理显示肝 硬化和脂肪肝。2岁8个月时行代谢性肝病相关的 544 个基因外显子高通量测序,在 SLC25A13 基因 中发现一父源性的杂合突变 c.1661G>A(p.R5540), 其余基因未见明确致病突变。患者肝功能及贫血 症状随年龄增长渐改善,但病因仍不明。

患儿系第一胎第一产,足月顺产,出生体重2500g(-2.1SD),身长50cm(-0.23SD)。生后3d出现皮肤轻度黄染,持续1个月,停止母乳喂养后黄疸渐消退。平素易患上呼吸道感染,9月龄时曾患重症肺炎。否认家族类似病史。

体格检查:体重 13.5 kg(-0.04 SD),身长 89 cm(-1.23 SD),头围 47.5 cm(-1.25 SD)。 神清,皮肤巩膜无黄染,双肺呼吸音清,心界不大, 心律齐,心音有力,各瓣膜区未闻及杂音。腹平软, 肝脏右肋下 2.5 cm、质中,脾未触及。四肢肌张力 正常,腹壁和膝腱反射可引出,克布氏征、巴氏 征均阴性。

辅助检查: 血常规和生化检查大致正常(表1)。 肝脏病理切片会诊(图1)提示: 肝内大小不等的 结节形成, 纤维瘢痕及纤维间隔内较大量炎细胞 浸润, 小胆管增生明显, 轻度界面炎; 部分结节 内肝细胞大泡性脂肪变性, 窦周纤维化可见, 考 虑肝硬化(活动期)。

第	19卷第8期	月
2	017年8月	

中国当代儿科杂志 Chin J Contemp Pediatr

		<u> ネー ぶんの人工た、皿市然及産皿切形性旦泊木</u>												
指标	参考范围 -	年龄(月)												
		18.0	18.6	19.0 ^a	20.0	21.7	23.0	32.6	33.6 ^b	37.0	43.0			
生化														
ALT	9~50 U/L	47	73.9	37.7	27.9	29	43	37	40	36	30			
AST	15~40 U/L	99	169.1	84.4	64.3	65	24	37	53	47	35			
GGT	10~60 U/L	50	57.3	43.6	49.9	41	32	27	31	37	29			
ALP	40~500 U/L	343	567	497	434	464	713	318	396	380	361			
Tbil	5.1~23.0 µmol/L	9.8	12.5	7.1	9.9	7.9	7.4	10.6	12.7	14.2	12.5			
Dbil	$0.6{\sim}6.8~\mu\mathrm{mol/L}$	5.2	3.7	1.7	2.6	1.8	3.5	2.3	2.8	5.2	4.1			
Ibil	$1.7{\sim}17~\mu{\rm mol/L}$	4.6	8.8	5.4	7.3	6.1	3.9	8.3	9.9	9.0	8.4			
TBA	$0{\sim}10~\mu{\rm mol/L}$	_	34.21	45.3	19.1	16.3	-	7.92	9	2.1	-			
TP	$65.0 \sim 85.0 \text{ g/L}$	45.2	62.5	55.6	53.9	55.7	56.5	56.6	63.1	63.4	58			
Alb	$40.0{\sim}55.0~{\rm g/L}$	26.8	36.7	33.5	35.2	37.0	41.7	43.5	46.1	43.9	46.9			
Glb	$20.0 \sim 40.0 \text{ g/L}$	18.4	25.8	22.1	18.7	18.7	14.8	13.1	27.0	19.5	11.1			
TG	$0.56{\sim}1.70~\mathrm{mmol/L}$	2.12	1.29	1.58	1.19	-	-	0.40	1.36	0.50	-			
TCHOL	$3.1\sim5.7$ mmol/L	1.6	2.7	3.0	2.5	-	_	3.7	4.5	3.2	-			
HDL-C	$0.91{\sim}2.05~\mathrm{mmol/L}$	0.18	0.87	0.81	0.7	-	_	1.57	1.49	1.08	-			
LDL-C	$1.57{\sim}3.76$ mmol/L	0.12	1.27	1.50	1.34	_	_	1.94	2.06	1.80	-			
血常规														
WBC	$(4 \sim 10) \times 10^9 / L$	5.96	13.53	5.95	11.71	10.03	5.7	-	10.13	7.14	8.66			
NE	50%~70%	15.1	25.4	-	76.7	36.6	35.7	-	25.6	39.2	30.6			
LY	20%~40%	78.2	66.7	-	20.2	56	56.4	-	66.2	47.9	59.8			
MO	1%~8%	5	6	-	2	3	5	-	6	11	7			
RBC	$(3.8 \sim 5.8) \times 10^{12} / L$	4.2	4.9	4.2	4.9	5.4	4.8	-	5.3	5.8	5.2			
HGB	120~140 g/L	82	94	81	92	104	93	-	128	134	127			
HCT	35%~51%	27	34	27	32	34	31	-	41	43	39			
MCV	80~100 fL	66	69	63	64	64	66	-	77	75	75			
MCH	27~35 pg	20	19	19	19	19	20	-	24	23	24			
MCHC	320~360 g/L	300	280	303	292	302	296	-	312	311	325			
PLT	$(100 \sim 300) \times 10^{9}/L$	109	180	142	140	168	120	-	147	136	182			
凝血功能														
PT	10.2~13.4 s	16.9	14.7	13.8	13.8	14.7	-	-	-	-	-			
INR	0.9~1.2	1.4	1.3	1.2	1.2	1.2	_	-	-	_	-			
FIB	$1.8 \sim 3.5 \text{ g/L}$	1.8	1.6	1.1	1.5	1.8	_	-	-	-	_			
APTT	25.7~39.0 s	42.9	44.2	44.1	44.3	46.0	-	-	-	-	-			
TT	14~21 s	23.3	22.8	-	-	17.8	_	_	-	_	-			

表 1 患儿历次生化、血常规及凝血功能检查结果

注: a示进行腹腔镜探查和肝脏病理检查时年龄; b示我院首诊年龄; -示未检测。[ALT]丙氨酸氨基转移酶; [AST]门冬氨酸氨基转移酶; [CGT]γ-谷氨酰转肽酶; [ALP]碱性磷酸酶; [Tbil]总胆红素; [Dbil]结合胆红素; [Ibil]非结合胆红素; [TBA]总胆汁酸; [TP]总蛋白; [Alb] 白蛋白; [Clb]球蛋白; [TG]甘油三酯; [TCHOL]总胆固醇; [HDL-C]高密度脂蛋白; [LDL-C]低密度脂蛋白; [WBC]白细胞; [NE]中性粒 细胞百分比; [LY]淋巴细胞百分比; [MO]单核细胞百分比; [RBC]红细胞; [HGB]血红蛋白; [HCT]红细胞压积; [MCV]红细胞平均体积; [MCH]平均红细胞血红蛋白含量; [MCHC]平均红细胞血红蛋白浓度; [PLT]血小板; [PT]凝血酶原时间; [INR] 国际标准化比值; [FIB] 纤 维蛋白原; [APTT] 活化部分凝血活酶时间; [TT] 凝血酶时间。



图 1 肝脏组织病理检查结果 A(HE染色, 100×):肝内大小不等的结节形成,纤维瘢痕及纤维间隔内大量 炎细胞浸润,轻度界面炎,部分结节内肝细胞大泡性脂肪变性; B (Masson染色,100×):纤维组织增生分隔肝实质(胶原纤维绿 色,肌纤维红色);C(CK19染色,200×):小胆管增生明显(棕 色,如箭头所示);D(Vimentin染色,200×):窦周纤维化(棕 色,如箭头所示)。

1.2 SLC25A13 基因高频突变筛查和 Sanger 测 序分析

本研究获得暨南大学附属第一医院医学伦理 委员会批准及患儿父母知情同意。采集患儿及其 父母静脉血2mL(EDTA抗凝),按DNA抽提 试剂盒(Simgen公司,中国)说明书提取基因组 DNA。利用PCR、PCR-RFLP和LA-PCR技术筛查 SLC25A13基因c.851_854del4、c.1638_1660dup、 IVS6+5G>A和IVS16ins3kb4种高频突变^[8-10]。利 用PCR和LA-PCR技术扩增SLC25A13基因18个 外显子及其侧翼区^[9-13],将产物纯化后,通过ABI 3730xl测序仪(Invitrogen,美国)及应用双脱氧 链终止法技术对样品进行Sanger测序。

1.3 SLC25A13 cDNA 克隆分析

参考文献^[14]进行 SLC25A13 cDNA 克隆分析。 用淋巴细胞分离液(MP Biomedicals,美国)分离 外周血淋巴细胞,加 RNAiso plus(TaKaRa,日本) 裂解细胞后,提取总 RNA。以总 RNA 为模板,按 照 M-MLV 逆转录酶(Invitrogen,美国)说明书合 成第一链 cDNA。巢式 PCR 扩增 SLC25A13 基因 编码区,切胶纯化 PCR 产物后与 PMD 18-T Vector (TaKaRa,日本)进行连接克隆。转化感受态细胞, 涂布于加有 Amp(50~100 µg/mL)的 LB 平板培养 基上,37℃培养箱培养过夜,形成单菌落。随机 挑选单菌落,接种于含 Amp 的 500 µL LB 液体培 养基中,37℃振荡培养3~5h。取1µL菌液为模板,进行PCR扩增,电泳检测有无目的条带,并挑选24个阳性克隆菌液进行Sanger测序。

1.4 靶向外显子组捕获测序分析

提取基因组 DNA 3~5 µg,将其打断、扩增, 建立含有与代谢性肝病相关目标基因(JAG1、 ATP8B1、GALT、MUT、MMAA、MARS 和 LARS 等共 249 个基因)的全基因组文库,并对文库样 本进行定量,保证文库样本总量在 3 µg 以上。用 液相捕获试剂盒(MyGenostics,中国)捕获目标基 因,利用测序仪 HiSeq 2000(Illumina,美国)进行 高通量测序,平均深度不小于 200×。获取原始短 序列,通过生物信息学分析单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)或插入/缺失(Indel), 找出相关基因的突变信息。靶向外显子组捕获测 序分析由北京迈基诺基因科技有限责任公司完成。

1.5 Sanger 测序验证

根据外显子组捕获测序结果,对患儿及其 父母 DNA 进行 Sanger 测序, 验证 LRAS 基因 突变。根据 LRAS 基因序列,运用 Premier 5.0 软件设计引物(上海立菲生物技术有限公司 合成)。其中,外显子12的上游引物为F9_F (5'-AGTCCCACAGCGTAGTTCAGC-3'),下游引 物为 F9_R (5'-TCTTGGTGCATCACTTTCTGC-3'), 产物为 321 bp; 而外显子 21 的上游引物为 F8_F (5'-AAGTGATCCTCCCACCTTGG-3'), 下游引 物 为 F8_R (5'-TTTATGTAGCCAGTCCTTTGATT TG-3'),产物为402bp。PCR反应体系包含:5 µL 10×Buffer, 4 µL dNTP, 0.25 µL rTaq DNA 聚合酶 (TakaRa, 日本), 各1 µL上下游引物(10 µmol/L), 0.1 μg DNA, 加灭菌双蒸水至 50 μL; 扩增条件 为94℃预变性5min,94℃变性30s,53℃退火 30 s, 72℃延伸 50 s, 共 35 个循环, 最后再 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物纯化后进行 Sanger 测序。

1.6 生物信息学分析

突变的人群频率从大数据库 Exom Aggregation Consortium (ExAC) (http://exac.broadinstitute. org/) 中搜索。分析氨基酸保守性,不同物种 LeuRS 同源蛋白序列从 NCBI (www.ncbi.nlm.nih. gov)数据库下载,采用软件 Clustal Omega (http:// www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)进行比对。突变 致病性通过 PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard. edu/pph2/)、PROVEAN (provean.jcvi.org/index. php) 和 MutationTaster (http://mutationtaster.org/ MutationTaster/index.html) 三种软件进行预测。此 外, LeuRS 蛋白的结构模型使用在线软件 SWISS MODEL 构建 (http://swissmodel.expasy.org),并采 用 SWISS-PdbViewer 4.1.0 (http://www.Expasy.org/ spdbv/) 对突变的蛋白结构进行预测。

2 结果

2.1 SLC25A13 基因突变分析和 cDNA 克隆分析 结果

SLC25A13 基因高频突变筛查和测序分析仅 检测到一个父源性的突变 c.1658G>A。SLC25A13 cDNA 克隆分析结果显示,来自父源性的等位基因 的克隆子共有 7 个,均含有点突变 c.1658G>A;而 来自母源性的等位基因的克隆子共有 17 个,但未 发现异常的转录子,因此排除了希特林缺陷病导 致的新生儿肝内胆汁淤积症。

2.2 外显子组捕获测序和 Sanger 测序结果

代谢性肝病相关的 249 个基因外显子捕获测 序检测到患儿 LARS 基因两个突变 c.2133_2135del 和 c.1183G>A。Sanger 测序结果(图 2)证实,患 儿为 LARS 基因 c.2133_2135del 和 c.1183G>A 突变 的复合杂合子,前者来自父亲,后者来自母亲。

2.3 生物信息学分析结果

突变 c.1183G>A (p.D395N) 和 c.2133_2135del

(p.L712del)在ExAC大数据库中的人群频率分别为0.005%和0.002%。比对包括人类、黑猩猩、狗、奶牛、大鼠、小鼠、鸡、热带爪蟾和线虫在内的9种真核生物物种之间的LeuRS同源蛋白序列,结果显示D395和L712均为保守氨基酸。两种突变的MutationTaster分析均>0.9999,PROVEAN分析的分数分别为-4.92和-13.23;PolyPhen-2分析错义突变 c.1183G>A的分数为0.999,均提示此两种突变可能为致病性突变。

进行蛋白结构预测时, p.D395 野生型选取的 蛋白结构模型为人胞质的亮氨酰-tRNA 合成酶的 编校结构域(2WFD, 258-509位氨基酸),序列 一致性为 99.21%^[15]。采用 SWISS-PdbViewer 4.1.0 软件将 p.D395 野生型模型的第 395 位氨基酸由 D 变成 N, 突变后进行模型能量最小化, 并比对两 者构象的差异。第395位氨基酸由天冬氨酸变成 天冬酰胺,使其附近氨基酸之间的氢键距离改变, 同时伴有氢键生成和消失(图3)。由于 2WFD 不 能覆盖 L712, 分析突变 p.L712del 的野生型和突变 型选取的蛋白结构模型为嗜热古菌亮氨酰-tRNA 合成酶和 tRNALeu 复合物晶体结构(1wz2.1.B), 序列一致性分别为 32.41% 和 32.45%[16]。两者进 行比对: 第712位亮氨酸缺失, 可破坏709-713 和 753-755 位氨基酸构成的 β 折叠结构,同时, KMSKS 模体(第716-720 位氨基酸) 与第155-164 位氨基酸构成的α螺旋结构缠绕在一起(图4)。







图 3 p.D395N 突变前后空间结构预测图 第 395 位 氨基酸由天冬氨酸(A、B)变成天冬酰胺(C、D),使其附近 氨基酸之间的氢键距离改变,同时伴有氢键生成和消失;T298 和 D399 与附近氨基酸之间的氢键距离也受影响。绿色虚线表示氢键, 相应数字表示氢键距离。



图 4 p.L712del 突变前后空间结构预测图 A、B 为 野生型蛋白结构模型,C、D 为突变后蛋白结构模型,第 712 位亮 氨酸缺失破坏了 709-713 和 753-755 位氨基酸构成的β 折叠结构, 而位于第 716-720 位氨基酸的 KMSKS 模体与第 155-164 位氨基酸 构成的α螺旋结构缠绕在一起(如C 图箭头所示)。

2.4 诊治经过与结局

根据患儿病史、临床表现和实验室检查,考 虑遗传性肝病导致的肝硬化。行 SLC25A13 基因突 变分析和 cDNA 克隆分析,排除希特林缺陷病。但 病因仍不明,未予特殊治疗。最终(3岁时)经代 谢性肝病相关基因外显子组捕获二代测序和 Sanger 测序验证,确诊为 LARS 基因突变导致的 ILFS1。 目前随访至4岁,肝功能正常,但仍有低蛋白血症, 无贫血,见表1; B 超显示肝内回声较前改善。

3 讨论

本研究患儿主要表现为肝脾肿大以及出生体 重偏低、肝功能异常、低蛋白血症、贫血、凝血 功能异常等,同时肝脏病理检查显示肝硬化和脂 肪肝,这些表现均与希特林缺陷病的临床特点相 似^[17]。此外, SLC25A13 基因检测还发现一杂合突 变点 c.1661G>A (p.R554Q),因此高度疑诊希特 林缺陷病。然而外周血淋巴细胞 SLC25A13 cDNA 克隆分析在另一个等位基因上没有发现异常的转 录子,从而排除了希特林缺陷病。提示希特林缺 陷病的诊断需要借助 SLC25A13 基因突变分析或 mRNA 分析等特异性手段^[17-18]。该患者骨髓细胞 学检查、病原体检查及自身免疫性肝炎相关抗体 检查均未见明显异常,腹腔镜探查和肝脏病理检 查也排除了肿瘤可能;此外,血串联质谱遗传代 谢病筛查提示多种氨基酸改变,因此高度怀疑遗 传性肝病。但目前报道的相关基因多达数百个, 根据临床和常规检测手段难以确定致病基因。本 研究通过外显子组捕获二代测序及 Sanger 测序 验证,确认该患儿为LARS 基因 c.2133_2135del 和 c.1183G>A 突变的复合杂合子。这两个突变在 ExAC 大数据库中的人群频率非常低,且均位于重 要功能区内,多种生物信息学软件从进化保守性、 蛋白结构和功能、序列同源性等方面的分析均提 示这两个突变可能致病。值得注意的是,患者在 外院曾接受过高通量测序检查,由于检测目标没 有覆盖 LARS 基因而漏诊,提示高通量测序的检测 范围对于遗传性肝病的病因诊断至关重要。

LARS 基因编码的人胞质 LeuRS 以多酶复合体(multi-tRNA synthetase complex, MSC)形式存在。根据特有的结构特征,LeuRS 归属于第一类 aaRS,其氨酰化反应的催化活性中心是一个由两个β3α2 结构组成的 Rossmann 折叠结构域,首尾包含 HIGH 和 KMSKS 两个特征肽段,能与 ATP 结合^[19]。在 Rossmann 折叠的两个β3α2 结构之间插入一个连接肽段 CP1 结构域(connecting peptide 1 domain, 260-509aa),具有编辑功能^[4,20]。该编辑活性中心含有两个保守位点,一个是富苏氨酸区,其中 T298 高度保守,与底物专一性结合相关;另一个是天冬氨酸 D399^[21]。此外,LeuRS 还含有一个接近 C 末端的结合反密码子的结构域和 C 末端

附加结构域,前者与tRNA^{Leu} 接受茎结合,后者与 MSC 的其他相关蛋白相互作用^[3-4]。研究表明^[21], 保守位点 T298 突变为丙氨酸,则 p.T298A 影响编 辑活性位点的专一性,通过改变活性中心口袋的 构象,使正确氨酰化的 Leu-tRNA^{Leu} 被水解而不能 累积。D399 突变为丙氨酸,则 p.D399A 的氨酰化 活性较野生型的偏低,突变通过远距离影响氨酰 化活性中心,导致第一步氨基酸活化反应的效率 降低; 该突变还改变编辑活性中心口袋的构象, 从而影响其水解错误氨酰化 tRNA^{Leu} 的编辑能力。 本研究患儿c.1183G>A(p.D395N)位于CP1结构域, 蛋白结构预测结果显示, D395 突变为天冬酰胺后, 不仅改变第395位氨基酸附近氨基酸之间的氢键, 同时也影响 T298 和 D399 与其它氨基酸之间的氢 键,由此可能改变 CP1 结构域的活性构象,从而 影响该区域的编辑功能。此外, c.2133_2135del (p.L712del) 突变刚好位于 Rossmann 折叠结构域 的 KMSKS 肽段(716-720aa)之前, 蛋白结构预 测结果显示, 第712位氨基酸L缺失, 破坏709-713 和 753-755 位氨基酸构成的 β 折叠结构, 而 KMSKS 与第 155-164 位氨基酸构成的 α 螺旋结构 缠绕在一起,由此影响氨酰化活性中心的功能。 两个突变影响了LeuRS蛋白的氨酰化和编辑功能, 致使患儿出现 LSF1 的一系列临床表现。

LSF1临床表现可累及消化道、神经和血液等 多个系统^[1-2],其发病机制尚未清楚。这种多系统 受累的疾病,很容易让人联想到线粒体功能受损。 然而 Casey 等^[1]构建了敲除 LARS 基因的 HEK293 细胞模型,发现其线粒体的基因、形态及功能均 未受影响。有研究^[22]发现,LARS 基因可以活化 mTOR C1(mammalian target of rapamycin complex 1), 而 mTOR C1 可以抑制自噬,当LARS 基因缺陷时, mTOR C1 的活化受到影响,从而导致机体自噬能 力增强。也有研究表明,肝脏 mTOR C1 的活性减 低可导致肝细胞损伤^[23]。因此,Casey 等^[2]提出关 于 LARS 基因突变是通过降低 mTOR C1 活性使机 体自噬能力增强,从而导致多系统受累的设想。

即使 LSF1 患者仅出现轻度的感染症状,也应 当及早干预以防肝衰等严重表现,同时保证有足 量的蛋白摄入。然而,Casey 等^[2]还发现,LSF1 患者即使在蛋白摄取充足及肝功能正常的状态下, 仍表现有持续的低白蛋白血症。白蛋白中亮氨酸 含量最高,虽然 LSF1 患者的 LARS 基因突变导致 人胞质 LeuRS 功能受影响,但亮氨酸水平正常, 因此补充亮氨酸也并不能改善低白蛋白血症。

本研究分析了第一例非白人 ILSF1 患儿的临床表现、实验室检查特点。通过外显子组捕获测序和 Sanger 测序验证,发现患儿为 LARS 基因新突变 c.2133_2135del 和 c.1183G>A 的复合杂合子,确诊为 ILSF1,扩展了 LARS 基因突变谱,同时为患儿诊断及其家庭遗传咨询提供了实验依据。

[参考文献]

- Casey JP, McGettigan P, Lynam-Lennon N, et al. Identification of a mutation in LARS as a novel cause of infantile hepatopathy[J]. Mol Genet Metab, 2012, 106(3): 351-358.
- [2] Casey JP, Slattery S, Cotter M, et al. Clinical and genetic characterisation of infantile liver failure syndrome type 1, due to recessive mutations in LARS[J]. J Inherit Metab Dis, 2015, 38(6): 1085-1092.
- [3] Ling C, Yao YN, Zheng YG, et al. The C-terminal appended domain of humancytosolic leucyl-tRNA synthetase is indispensable in its interactionwith arginyl-tRNA synthetase in the multi-tRNA synthetase complex[J]. J Biol Chem, 2005, 280(41): 34755-34763.
- [4] Cusack S, Yaremchuk A, Tukalo M. The 2 Å crystal structure of leucyl-tRNA synthetase and itscomplex with a leucyl-adenylate analogue[J]. EMBO J, 2000, 19(10): 2351-2361.
- [5] Ibba M, Soll D. Aminoacyl-tRNA synthesis[J]. Annu Rev Biochem, 2000, 69: 617-650.
- [6] Hu QH, Huang Q, Wang ED. Crucial role of the C-terminal domain of Mycobacterium tuberculosis leucyl-tRNA synthetase in aminoacylation and editing[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(3): 1859-1872.
- [7] Yan W, Ye Q, Tan M, et al. Modulation of aminoacylation and editing properties of leucyl-tRNA synthetase by a conserved structural module[J]. J Biol Chem, 2015, 290(19): 12256-12267.
- [8] 宋元宗,牛饲美晴,盛建胜,等. Citrin 缺陷导致的新生儿肝 内胆汁淤积症家系 SLC25A13 基因突变研究 [J]. 中华儿科杂 志,2007,45(6):408-412.
- [9] Lu YB, Kobayashi K, Ushikai M, et al. Frequency and distribution in East Asia of 12 mutations identified in the SLC25A13 gene of Japanese patients with citrin deficiency[J]. J Hum Genet, 2005, 50(7): 338-346.
- [10] Tabata A, Sheng JS, Ushikai M, et al. Identification of 13 novel mutations including a retrotransposal insertion in SLC25A13 gene and frequency of 30 mutations found in patients with citrin deficiency[J]. J Hum Genet, 2008, 53(6): 534-545.
- [11] Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, et al. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein[J]. Nat Genet, 1999, 22(2): 159-163.
- [12] Yasuda T, Yamaguchi N, Kobayashi K, et al. Identification

of two novel mutations in the SLC25A13 gene and detection of seven mutations in 102 patients with adult-onset type II citrullinemia[J]. Hum Genet, 2000, 107(6): 537-545.

- [13] Yamaguchi N, Kobayashi K, Yasuda T, et al. Screening of SLC25A13 mutations in early and late onset patients with citrin deficiency and in the Japanese population: Identification of two novel mutations and establishment of multiple DNA diagnosis methods for nine mutations[J]. Hum Mutat, 2002, 19(2): 122-130.
- [14] Zhang ZH, Lin WX, Deng M, et al. Molecular analysis of SLC25A13 gene in human peripheral blood lymphocytes: Marked transcript diversity, and the feasibility of cDNA cloning as a diagnostic tool for citrin deficiency[J]. Gene, 2012, 511(2): 227-234.
- [15] Seiradake E, Mao W, Hernandez V, et al. Crystal structures of the human and fungal cytosolic leucyl-tRNA synthetase editing domains: A structural basis for the rational design of antifungal benzoxaboroles[J]. J Mol Biol, 2009, 390(2): 196-207.
- [16] Fukunaga R, Yokoyama S. Aminoacylation complex structures of leucyl-tRNA synthetase and tRNALeu reveal two modes of discriminator-base recognition[J]. Nat Struct Mol Biol, 2005, 12(10): 915-922.
- [17] Kobayashi K, Saheki T, Song YZ. Citrin deficiency[M/OL]// Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al. GeneReviews. Seattle

(WA): University of Washington, Seattle: 1993-2017. 2005 Sep 16 [updated 2014 Jul 31].

- [18] Song YZ, Zhang ZH, Lin WX, et al. SLC25A13 gene analysis in Citrin deficiency: Sixteen novel mutations in east Asian patients, and the mutation distribution in a large pediatric cohort in China[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74544.
- [19] Burbaum JJ, Schimmel P. Structural relationships and the classification of aminoacyl-tRNA synthetases[J]. J Biol Chem, 1991, 266(26): 16965-16968.
- [20] Chen X, Ma JJ, Tan M, et al. Modular pathways for editing non-cognate amino acids by human cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(1): 235-247.
- [21] Pang YL, Martinis SA. A paradigm shift for the amino acid editing mechanism of human cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase[J]. Biochemistry, 2009, 48(38): 8958-8964.
- [22] Han JM, Jeong SJ, Park MC, et al. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway[J]. Cell, 2012, 149(2): 410-424.
- [23] Umemura A, Park EJ, Taniguchi K, et al. Liver damage, inflammation, and enhanced tumorigenesis after persistent mTORC1 inhibition[J]. Cell Metab, 2014, 20(1): 133-144.

(本文编辑:俞燕)