论著·临床研究

# 羧化全酶合成酶缺陷病的临床诊治及基因突变分析

王彤,叶军,韩连书,邱文娟,张惠文,张雅芬,高晓岚,王瑜,顾学范

(上海交通大学医学院附属新华医院,上海市儿科医学研究所内分泌遗传代谢病研究室 200092)

[摘 要] **目的** 报道羧化全酶合成酶(holocarboxylase synthetas, HCS)缺陷病的诊治及随访情况,了解该疾病的基因突变谱。**方法** ①采用质谱分析及生物素酶活性测定进行 HCS 缺陷病的诊断。②采用聚合酶链反应-直接测序法进行 HCS 基因突变分析。③11 例 HCS 缺陷病患儿中 10 例接受了生物素的治疗(10~40 mg/d),对其疗效进行随访观察。**结果** ①11 例患儿均有不同程度精神萎靡、嗜睡及代谢性酸中毒,10 例患儿有皮肤损害。质谱分析血 3-羟基异戊酰肉碱,尿 3-甲基巴豆酰甘氨酸、甲基枸橼酸等增高。生物素酶活性与正常对照者生物素酶活性的比值 >30%。②发现 4 种突变:c.1522C>T(R508W),c.1088T>A(V363D),c.126G>T(E42D),c.1994G>C(R665P)(新变异)。实变频率分别为 50%,29%,7%,14%。③10 例接受生物素治疗的患儿,1~2 周后临床症状消失,2~6 月后异常代谢产物多下降至正常。**结论** HCS 缺陷病以神经系统及皮肤损害、代谢性酸中毒为特征。质谱分析、生物素酶活性测定、基因突变分析有助于明确诊断,口服生物素疗效显著。突变 R508W 和 V363D 可能是中国患儿的常见突变。 [中国当代儿科杂志,2009,11(8):609-612]

[关 键 词] 羧化全酶合成酶;生物素酶;串联质谱;气相色谱质谱;基因;儿童

[中图分类号] R596.1 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)08-0609-04

## Diagnosis, treatment and gene mutation analysis in children with holocarboxylase synthetas deficiency

*WANG Tong, YE Jun, HAN Lian-Shu, QIU Wen-Juan, ZHANG Hui-Wen, ZHANG Ya-Fen, GAO Xiao-Lan, WANG Yu, GU Xue-Fan. Department of Pediatric Endocrinology and Genetic Metabolism, Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai* 200092, *China* (*Ye J, Email: yejun2314@yahoo.com.cn*)

**Abstract: Objective** To report the clinical diagnosis, treatment and follow-up of children with holocarboxylase synthetas (HCS) deficiency and explore the gene mutation spectrum of the disease. **Methods** Eleven children with HCS deficiency were enrolled. Mass spectrometry analysis and biotinidase activity determination were used for diagnosis of HCS deficiency. HCS gene mutations were analyzed by PCR directed sequencing methods. Ten patients received oral biotin treatment (10-40 mg/d). Clinical effects of biotin treatment were observed. **Results** All 11 cases developed apathetic, lethargy and metabolic acidosis at different degrees, and 10 cases presented with skin lesions. The average blood 3-hydroxyisovaleryl-carnitine concentrations and urinary 3-methylcrontonylglycine and methylcitrate concentrations increased significantly. The biotinidase activity increased, being higher over 30% of the normal reference value. Four mutations in HCS gene were identified, and they were c.1522C>T (R508W), c.1088T>A (V363D), c.126G>T (E42D) and c.1994G>C (R665P) (a new variant) and the frequency was 50%, 29%, 7% and 14% respectively. The symptoms disappeared in 10 cases 1-2 weeks after biotin treatment, and blood and urinary abnormal metabolites were gradually reduced to normal 2-6 months after treatment. **Conclusions** HCS deficiency is characterized by nervous system damage, skin lesions and metabolic acidosis. Mass spectrometry analysis, biotinidase activity determination and gene mutation analysis may be helpful in the definite diagnosis of this disorder. The effect of early biotin treatment is satisfactory. The mutations R508W and V363D might be hot-spots in Chinese children with HCS deficiency.

[**Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (8): 609-612**]

**Key words:** Holocarboxylase synthetas; Biotinidase; Tandem mass spectrometry; Gas chromatography/ mass spectrometry; Gene; Child

多种羧化酶缺陷病(multiple carboxylase deficiency, MCD)是一种以神经系统及皮肤损害为特征

[收稿日期]2009-02-02;[修回日期]2009-03-04
[基金项目]国家高技术研究发展计划(863 计划)(2007AA02Z447);"十一五"国家科技支撑计划支撑项目(2006BAI05A05 2006BAI05A07);上海交通大学医学院科技基金项目(06XJ21024)。
[作者简介]王彤,男,硕士,医师。主攻方向:多种羧化酶缺陷病。
[通讯作者]叶军,女,主任医师,上海交通大学医学院附属新华医院,上海市儿科医学研究所内分泌遗传代谢病研究室,邮编:200092。

的常染色体隐性遗传有机酸代谢病。MCD 的病因包括羧化全酶合成酶(holocarboxylase synthetas, HCS)缺陷病(MIM# 253270)和生物素酶(biotinidase deficiency, BTD)缺陷病(OMIM:253260)两种类型。由于生物素治疗疗效显著,因此早期进行筛查诊断,早期治疗,对降低神经系统后遗症的发生率及死亡率极为重要。世界上最先实施遗传代谢病新生儿筛查的是美国。现在全美国的筛查覆盖率几乎达到 95% 以上,筛查病种 3 ~ 23 种,其中包括 BTD 缺陷病。中国的新生儿筛查和先进国家相比,起步略迟,迄今为止仅有北京、上海等城市筛查覆盖率达到 97%,且筛查病种有限[1]。我院曾对非特异临床表现而疑似遗传性代谢病住院的病例进行临床生化检查的同时行血串联质谱和尿气相质谱检测,在 132 例中诊断遗传性代谢病 15 例[2]。本研究室于 2003 ~ 2008 年对 7 700 余例临床诊断不明、表现为代谢性脑病、消化系统、皮肤损害,代谢性酸中毒等症状的患儿进行遗传代谢病筛查[3],共发现了 11 例 HCS 缺陷病。本文旨在报道 HCS 缺陷病患儿的临床诊治及疗效随访。通过基因突变分析以从分子生物学水平证实临床诊断,并了解 HCS 缺陷病的基因突变谱。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

11 例 HCS 缺陷病患儿,男 7 例,女 4 例,来自中国江苏、安徽、福建、河南、浙江、湖南、广西省,均为汉族。其中 2 例为亲兄妹,其余 9 例之间无血缘关系。

### 1.2 方法

1.2.1 常规实验室检查　肝、肾功能、心肌酶谱、血乳酸、血氨、血糖、尿酮体、血气分析、头颅 CT/MRI 等。

1.2.2 串联质谱分析(tandem mass spectrometry, MS/MS)　采集直径 > 3 mm 外周血 1 滴于干滤纸片上,经甲醇萃取,盐酸正丁醇衍生,API2000 MS/MS 仪进行检测[4]。

1.2.3 尿气相色谱质谱分析(gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)　收集新鲜尿液 5 ~ 10 mL 或尿滤纸片,采用 ShimadzuGCMS2QP2010 分析仪及 GC-MS solution 软件分析尿中 132 种代谢产物。此方法是半定量法,结果根据待测物质与内标的相对总离子流面积的比值数表示[5,6]。

1.2.4 生物素酶活性测定　采集外周血 3 滴于干滤纸片上,由德国柏林医学检验技术(北京)有限公司采用化学发光法进行生物素酶活性测定。HCS 缺陷病患儿生物素酶活性与正常对照者生物素酶活性的比值 > 30%。

1.2.5 基因诊断　①在征得家长知情同意后,留取患儿及其父母外周血标本,采用 OMEGA 公司的 E1Z1N1A1 Blood DNA Kit 试剂盒提取基因组 DNA,经 PCR 扩增 HCS 基因 6 ~ 14 号编码外显子,扩增产物经纯化后进行测序寻找突变。②对携带 HCS 基因突变的患儿做相应外显子的反向测序,并对其父母的相应外显子进行测序;对未报道的新变异,采用 PCR-限制性酶切片断长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism PCR-RFLP)分析及对 50 个正常对照者(100 个等位基因)进行酶切分析证实。

### 1.3 治疗与随访

对 HCS 缺陷病患儿确诊后立即给予生物素 10 ~ 40 mg/d,急性期辅助肉碱每天 50 ~ 100 mg/kg 及每天 0.5 ~ 1.0 g/kg 的低蛋白质饮食等治疗,治疗后每 1 ~ 2 月随访临床症状,3 ~ 6 月复查 MS/MS 及 GC/MS 以观察血、尿中异常代谢产物的下降情况,代谢控制后每 6 ~ 12 月随访一次,包括生长发育及智能发育。

## 2 结果

### 2.1 临床表现

患儿发病年龄 5 d 至 4.8 岁,均有不同程度的精神萎靡、嗜睡,4 例伴呼吸困难,9 例呕吐或/和腹泻,10 例难治性的皮肤损害,其中 8 例在头面部、颈部、躯干、臀部等部位皮肤红疹或红斑、溃烂或水疱、糠状或片状鳞屑,或皮肤干糙、脱皮等,2 例仅在口周、肛周出现皮疹。

### 2.2 常规实验室检查

所有患儿均有代谢性酸中毒,血气分析 pH 6.95 ~ 7.14, BE −25 ~ −7.6, 5 例乳酸增高 7.7 ~ 8.7 mmol/L, 1 例血氨增高 232 μmol/L, 2 例低血糖, 8 例尿酮体阳性。肝肾功能及心肌酶谱均正常。6 例头颅 MRI 检查发现脑白质异常、或脑室扩大/脑萎缩、或脑积水等。

### 2.3 MS/MS 分析

诊断时所有患儿平均血 3-羟基异戊酰肉碱(3-hydroxyisovaleryl-carnitine, C5-OH)浓度为 7.48 ± 3.25 μmol/L,明显高于正常(< 0.5 μmol/L),5 例伴血丙酰肉碱或/和丙酰肉碱/游离肉碱、丙酰肉碱/乙酰肉碱增高。

### 2.4 GC-MS 分析

除病例 5 死亡未留取尿液标本外,余 10 例尿

3-甲基巴豆酰甘氨酸、甲基枸橼酸、甲基巴豆酰甘氨酸等增高。

### 2.5 生物素酶活性

11 例 HCS 缺陷病患儿生物素酶活性分别是正常对照者生物素酶活性的 42.9%，147%，65.3%，85.3%，38.3%，140%，71.5%，78.3%，132%，108%，127%，平均为(94.1 ± 38.8)%，其中 2 例生物素酶活性在 30% ~50% 之间，已通过基因诊断证实为 HCS 缺陷病。

### 2.6 基因诊断

11 例 HCS 缺陷病中 8 例(7 个家庭)接受了基因诊断，突变的检出率为 100%。8 例患儿携带 4 种 HCS 基因突变(表 1)，突变类型及突变频率分别为 c.1522C > T[50%(7/14)]，c.1088T > A[29%(4/14)]，c.126G > T[7%(1/14)]，c.1994G > C[14%(2/14)]。c.1522C > T(R508W)和 c.1088T > A(V363D)为热点突变[79%(11/14)]，外显子 11 为 HCS 基因最常发生突变的部位，占 50%(7/14)。c.1994G > C(R665P)为未见报道的新变异，该变异已通过反向测序证实，通过父母相应外显子测序也证实了该变异来自父母遗传，符合常染色体隐性遗传规律(图 1)。另通过设计引物引入 Sau3AI 内切酶酶切位点，采用 PCR-RFLP 法对该患儿及 50 个正常对照者进行酶切分析进一步证实该变异为突变(图 2)。

**表 1 8 例 HCS 缺陷病患儿 HCS 基因突变检测结果**

| 病例 | 突变部位 | 突变 1 | | 突变 2 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 核苷酸改变 | 突变效果 | 核苷酸改变 | 突变效果 |
| 例 2 | Ex13 | c.1994G > C* | R665P | c.1994G > C* | R665P |
| 例 4 | Ex8 | c.1088T > A | V363D | c.1088T > A | V363D |
| 例 5 | Ex11 | c.1522C > T | R508W | c.1522C > T | R508W |
| 例 6 | Ex7；Ex8 | c.126G > T | E42D | c.1088T > A | V363D |
| 例 7 | Ex7；Ex8 | c.126G > T | E42D | c.1088T > A | V363D |
| 例 8 | Ex8；Ex11 | c.1088T > A | V363D | c.1522C > T | R508W |
| 例 10 | Ex11 | c.1522C > T | R508W | c.1522C > T | R508W |
| 例 11 | Ex11 | c.1522C > T | R508W | c.1522C > T | R508W |

注：* 新突变；Ex 外显子

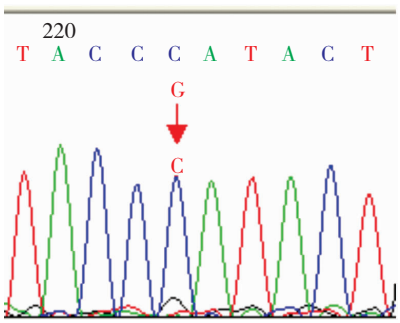


**图 1 c.1994G > C 纯合突变的基因测序结果**

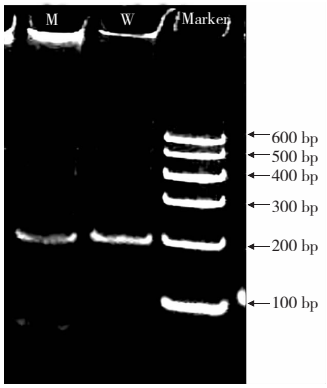


**图 2 c.1994G > C 纯合突变的 PCR-RFLP 结果** 野生型 PCR 产物经 Sau3AI 酶切后生成 207 bp、53 bp、21 bp(未显示)3 个片段，该患儿携带 c.1994G > C 纯合突变，PCR 产物经酶切后生成 207 bp、74 bp 两个片段。

W：野生型；M：突变型

### 2.7 治疗随访

11 例患儿除例 5 在诊断时死亡外，余 10 例患儿在生后 3 个月至 4.8 岁开始接受生物素治疗(10 ~40 mg/d)，其中 4 例辅助肉碱、低蛋白饮食治疗。治疗起效快，约 4 ~5 d 后临床症状好转，治疗 1 ~2周后临床症状包括皮疹、糜烂等消失，酸中毒纠正，血乳酸、血氨恢复正常，以后单纯生物素维持治疗，治疗 2 ~6 月血、尿中异常代谢产物逐步下降至正常或接近正常。1 例治疗 4 个月自行停服生物素，皮疹等症状复发，再治疗 2 周后症状消失。10 例患儿至今治疗疗程 5 月至 3 年，末次随访年龄 14 月至 7 岁，生物素维持剂量为 5 ~30 mg/d，血 C5-OH 浓度为 0.50 ± 0.49 μmol/L，尿有机酸异常代谢产物均正常。所有患儿营养、体格及生长发育正常。除 1 例智能发育落后外，余 9 例智能发育接近正常，其中 5 例患儿接受智能测试，智商(86.2 ± 11.7)分。

## 3 讨论

日本曾报道 HCS 缺陷病的发病率约 1/100 000[7]；我国对于该病的发病率尚无报道。根据本研究室多年临床资料分析，在 MCD 中 HCS 缺陷病较多见，而 BTD 缺陷病相对少见。由于 HCS 活性下降，不能催化生物素与生物素依赖的羧化酶(乙酰 CoA 羧化酶，丙酰 CoA 羧化酶，丙酮酸羧化酶及 3-甲基巴豆酰 CoA 羧化酶)结合，从而影响上述生物素依赖的羧化酶的活性，使脂肪酸合成、糖原异生及氨基酸的分解代谢发生障碍，乳酸、3-羟基异戊酸、3-甲基巴豆酰甘氨酸、甲基枸橼酸及 3-羟基丙酸等异常代谢产物在体内蓄积，出现不同程度的临床

症状[8]。HCS 缺陷病患儿多在新生儿、婴儿早期发病[9],本研究报道的 11 例 HCS 缺陷病患儿发病集中在生后 3 周至 6 月,仅 3 例 1 岁后发病。该病临床表现无特异性,单纯依靠常规生化检测难以鉴别,易误诊。本报道中 1 例患儿在诊断时已死亡,因此该病如未能及时治疗,死亡率较高[10]。

本研究单位自 2003 年开展 MS/MS 遗传代谢病筛查以来,在 7 700 余例临床高危患儿中发现了 11 例 HCS 缺陷病。HCS 缺陷病在高危儿中的发病率约 0.14%(11/7 700)。MS/MS 检测血 C5-OH 增高及尿 GC-MS 检测 3-甲基巴豆酰甘氨酸增高是诊断 MCD 的主要指标,由于丙酰 CoA 羧化酶活性受影响,患儿可伴血丙酰肉碱或/和丙酰肉碱/游离肉碱、丙酰肉碱/乙酰肉碱增高。尿 3-羟基丙酸、丙酰甘氨酸、甲基枸橼酸、甲基巴豆酰甘氨酸、乳酸、丙酮酸及酮体增高[11]。单纯依靠上述质谱技术不能鉴别 HCS 缺陷病和 BTD 缺陷病,需通过酶活性测定及基因突变分析进一步鉴别。由于 HCS 活性测定较困难,临床上对 MCD 患儿常规通过 BTD 活性测定来鉴别:BTD 活性低于正常者比值的 30% 者诊断为 BTD 缺乏,酶活性正常者考虑 HCS 缺陷病。本研究 11 例患儿 BTD 活性均大于正常人比值的 30%。随着基因诊断技术的普及,可通过对 HCS 患儿进行 HCS 基因突变分析,以从分子生物学角度证实临床诊断。本研究对 8 例 HCS 患儿基因突变分析结果显示,这些患儿的两个等位基因均存在 HCS 基因突变,分别来源于父母,发现的 4 种突变中 c.1522C > T(R508W)和 c.1088T > A(V363D)可能是中国 HCS 缺陷病患儿中的热点突变[79%(11/14)],本研究 1 例患儿 2 个等位基因均携带 c.1994G > C 新变异,经全部外显子及侧翼序列测序未发现其他突变,考虑该突变可能是致病突变,导致 665 位上的 Arg 被 Pro 替代,有条件可进一步通过体外表达研究证实。此外通过基因诊断可为产前诊断提供科学依据。本研究病例 5 已死亡,患儿父母希望生育第二胎,通过基因突变分析显示该患儿携带 c.1522C > T(R508W)纯合突变(已报道),因此可以为此家庭提供产前诊断。

HCS 缺陷病患儿生物素治疗疗效显著,疾病初期合并代谢性酸中毒或高氨血症时需补充肉碱、限制蛋白质摄入、大量葡萄糖供能等治疗。10 例 HCS 缺陷病患儿生物素治疗有效,多数患儿生物素 10 ~ 40 mg/d治疗数日至 2 周,临床症状明显改善,生化指标正常化,尿异常代谢产物也随之快速下降至正常,但血 C5-OH 浓度下降较缓慢,需增加生物素剂量至 30 ~ 40 mg/d 后才明显下降。有文献报道部分患儿需要的生物素治疗剂量较大,甚至高达 100 mg/d,但有些病例即使在使用大剂量生物素治疗后病情仍有进展[12]。生物素治疗剂量及效果的差异可能与患儿的基因型有关。有报道已证实突变 c.1522C > T(R508W)发生的区域可能是生物素结合位点,从而导致酶与生物素的结合能力下降,体外表达证实此突变导致的残余酶活性高于其他突变者,对生物素治疗应答性好[13]。突变 c.1088T > A(V363D)经体外表达证实,在相同的生物素浓度下,该突变导致的残余酶活性比突变 R508W 低,对生物素治疗为中等应答性[13]。但本研究 8 例经基因诊断的患儿未发现基因型与临床表型及治疗疗效方面存在显著关系。此外,本研究中 1 例患儿停药后复发,因此需长期治疗。

## [参 考 文 献]

[1] 张春花. 先天性代谢异常的预防诊断与治疗[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(5):477-480.
[2] 谢利娟,朱建幸,朱晓东,李华军,韩连书,顾学范. 经高危筛查发现的遗传性代谢病 15 例分析[J]. 中国当代儿科杂志,2008,10(1):31-34.
[3] Han LS, Ye J, Qiu WJ, Gao XL, Wang Y, Gu XF. Selective screening for inborn errors of metabolism on clinical patients using tandem mass spectrometry in China: a four-year report[J]. J Inherit Metab Dis, 2007, 30(4):507-514.
[4] 韩连书,高晓岚,叶军,邱文娟,顾学范. 串联质谱分析干血滤纸片酰基肉碱方法的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(1):88-91.
[5] 宋金青,杨艳玲,孙芳,张月华,包新华,钱宁,等. 气相色谱-质谱联用分析在有机酸尿症筛查与诊断中的应用[J]. 中国医刊, 2006, 41(2):38-40.
[6] 宋元宗,方素珍,封志纯,王自能. 尿素酶预处理-气相色谱-质谱法在多种羧化酶缺陷病诊断治疗中的应用[J]. 中国当代儿科杂志,2004,6(2):128-130.
[7] Suzuki Y, Yang X, Aoki Y, Kure S, Matsubara Y. Mutations in the holocarboxylase synthetase gene HLCS [J]. Hum mutat, 2005, 26(4):285-290.
[8] Wolf B. Disorders of biotin metabolism[M]. //Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8th ed. New York:McGraw Hill, 2001, 3935-3962.
[9] 邹丽萍,王旭. 疑难病研究—生物素酶缺乏症[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(5):435-438.
[10] Morrone A, Malvagia S, Donati MA, Funghini S, Ciani F, Pela I, et al. Clinical findings and biochemical and molecular analysis of four patients with holocarboxylase synthetase deficiency[J]. Am J Med Genet, 2002, 111(1):10-18.
[11] 叶军,韩连书,邱文娟,张惠文,高晓岚,王瑜,等. 联合质谱技术在多种羧化酶缺陷病诊治中的应用[J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(8):582-585.
[12] Santer R, Muhle H, Suormala T, Baumgartner ER, Duran M, Yang X, et al. Partial response to biotin therapy in a patient with holocarboxylase synthetase deficiency: clinical, biochemical, and molecular genetic aspects[J]. Mol Genet Metab, 2003, 79(3):160-166.
[13] Dupuis L, Campeau E, Leclerc D, Gravel RA. Mechanism of biotin responsiveness in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency[J]. Mol Genet Metab, 1999, 66(2):80-90.

(本文编辑:吉耕中)