

· 病例报告 ·

2例Ⅲ型糖原累积病患儿基因型和表型分析

张志华¹, 郑必霞², 林 谦¹¹南京医科大学附属儿童医院消化科, ²儿科学重点实验室, 江苏 南京 210008

[关键词] 糖原累积病Ⅲ型; AGL基因; 基因突变

[中图分类号] R589.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)04-634-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20210428

糖原累积病Ⅲ型(glycogen storage diseases type III, GSD III, MIM#232400)是一种常染色体隐性遗传的糖代谢障碍疾病,由糖原脱支酶(glycogen debranching enzyme, AGL)基因先天性缺陷所致^[1]。该酶在糖原分解中发挥 α -1,4-葡萄糖基转移酶(EC 2.4.1.25)和淀粉1,6-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.33)的作用。GSD III患者AGL基因先天性缺陷,糖原支链不能完全被分解,导致带短支链的异常糖原(极限糊精)堆积在肝脏、肌肉和心肌中,临床主要表现为肝肿大、空腹低血糖和酸中毒等临床症状和病理生化改变。本文报道2例2017年南京市儿童医院确诊GSD III患儿AGL基因突变和临床表型特点。

1 病例资料

病例1:患儿男,2岁1个月,因“发现腹围增大1年余”入院。患儿家长1年前发现患儿腹围渐增大,无腹痛,未予特殊处理。查体:身高85 cm,体重11.3 kg,在正常同龄儿童身高体重水平。肝脏肋下9 cm,剑突下7 cm,质韧,脾脏肋下2 cm,质韧,腹部无移动性浊音,腹股沟未发现异常,脊柱、四肢无畸形。查腹部B超示肝右叶斜径119 mm,肋下89 mm,形态增大,肝功能示:丙氨酸氨基转移酶864 U/L,天门冬氨酸氨基转移酶1250 U/L,谷氨酰转肽酶425 U/L,甘油三酯7.17 mmol/L,空腹血糖3.4 mmol/L,血糖监测正常,乳酸脱氢酶708 U/L,肌酸激酶102 U/L。血气分析显示为代谢性酸中毒:pH 7.28,实际碳酸氢根浓度13.6 mmol/L,标准碳酸氢根浓度15.2 mmol/L。肝穿刺组织示正常肝小叶结构消失,肝细胞排列紊乱,肝细胞肿胀,胞浆空淡,核小,居中,部分细胞核大,空泡状,汇管区少量炎细胞浸润。电镜下可见肝细胞胞质内糖原颗粒明显增多,

大片堆积,占据大部分胞质,形成糖原湖,线粒体及内质网明显减少。心脏超声未见异常。临床诊断为糖原累积病,为明确其分型,遂进行肝脏受累型糖原累积病基因检测。

病例2:患儿女,年龄2岁7个月,因“发现肝功能异常1年余”入院。查体:体格发育落后,身高86 cm,体重11 kg,低于正常同龄儿童身高、体重2个标准差。辅助检查:肝功能示,丙氨酸氨基转移酶627.8 U/L,天门冬氨酸氨基转移酶536.7 U/L,总胆红素13.7 μ mol/L,直接胆红素6.2 μ mol/L,间接胆红素7.5 μ mol/L。入院后予阿拓莫兰联合复方甘草甜素保肝治疗,监测血糖提示晨起空腹血糖异常低下(2.2~2.5 mmol/L),予口服生玉米淀粉后空腹血糖正常。患儿家属拒绝进行肝脏活检,为明确诊断糖原累积病,遂进行肝脏受累型糖原累积病基因检测。

基因测序:患儿监护人填写知情同意书,本研究获南京儿童医院医学伦理委员会批准。收集患者静脉抗凝血2 mL,使用全血基因组DNA提取试剂盒(北京天根公司)抽提患者及父母DNA,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。采用Primer5软件设计引物扩增G6PC、AGL基因编码蛋白的所有外显子及其侧翼序列,由上海Invitrogen公司合成。采用PCR方法进行扩增,PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,扩增30个循环;最后72 $^{\circ}$ C补充延伸10 min。PCR的体系均为50 μ L。PCR产物纯化回收后,以BigDye Terminator(Applied Biosystems公司,美国)进行产物标记,精制纯化后用ABI Prism 3130 genetic analyzer测序。测序结果与Ensembl基因数据库中G6PC(ENSG00000131482)和AGL(ENSG00000162688)基因标准序列比对。AGL基因突变命名参照的转录

本为NM_000028。

基因测序结果:病例1未筛查到糖原累积病 I a型G6PC基因外显子及其侧翼序列突变。发现患儿AGL基因型结果为c.644A>T/c.655A>G复合杂合型突变(图1A、B)。进一步对其突变来源进行筛查,发现其父亲携带AGL基因c.655A>G杂合突变,母亲携带c.644A>T杂合突变。c.644A>T系错义突变,导致AGL蛋白第215位天冬氨酸突变为缬氨酸(p.D215V),已有文献在GSDⅢ患儿中检测到该突变,为致病性突变。该突变未见数据库及文献报道。c.655A>G系错义突变,导致AGL蛋白第219位天冬酰胺突变为天冬氨酸(p.N219D)。

病例2未筛查到糖原累积病 I a型G6PC基因外显子及其侧翼序列突变。发现患儿AGL基因型结果为c.3142_3158delinsAA纯合突变(图1C),该突变系缺失插入突变,推测导致AGL蛋白第1 048~1 053位氨基酸缺失,同时在该位置插入1个天冬酰胺(p.C1048_F1053delinsN)。进一步对其突变来源进行筛查,发现患儿父母均为c.3142_3158delinsAA突变携带者。该突变未见数据库及文献报道。

新发错义突变致病性分析:病例2携带的p.

N219D错义突变为新发突变,在大型正常人群测序数据库ExAC和1000G中均未发现该突变。我们利用ConSurf(<http://consurf.tau.ac.il>)对该突变所在氨基酸位点保守性进行了分析,发现219位天冬酰胺为高度保守区。Polyphen2(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)软件预测显示其为可能致病性突变(图2)。同时SIFT和Mutationtaster网站预测结果也均显示该突变为致病性突变。

近期随访,2例病例患儿均定期消化科及营养科门诊随访,生玉米淀粉饮食(1.5~2.0 g/kg,每天4次)及高蛋白低糖饮食治疗中。病例1患儿已4岁7个月,血糖监测正常,体格发育同正常同龄儿童,2019年11月复查肝脏超声提示肝肿大好转,肝右叶斜径95 mm,肋下5 mm。病例2患儿已5岁2个月,血糖控制基本良好,但偶有夜间空腹低血糖,近期心脏超声提示心室轻度肥厚,心功能正常。目前身高105 cm,体重16 kg,较正常同龄儿童低1个标准差。

2 讨论

1992年美国学者Yang-Feng等成功将人类AGL基因定位于1号染色体短臂的2区1带(1p21),

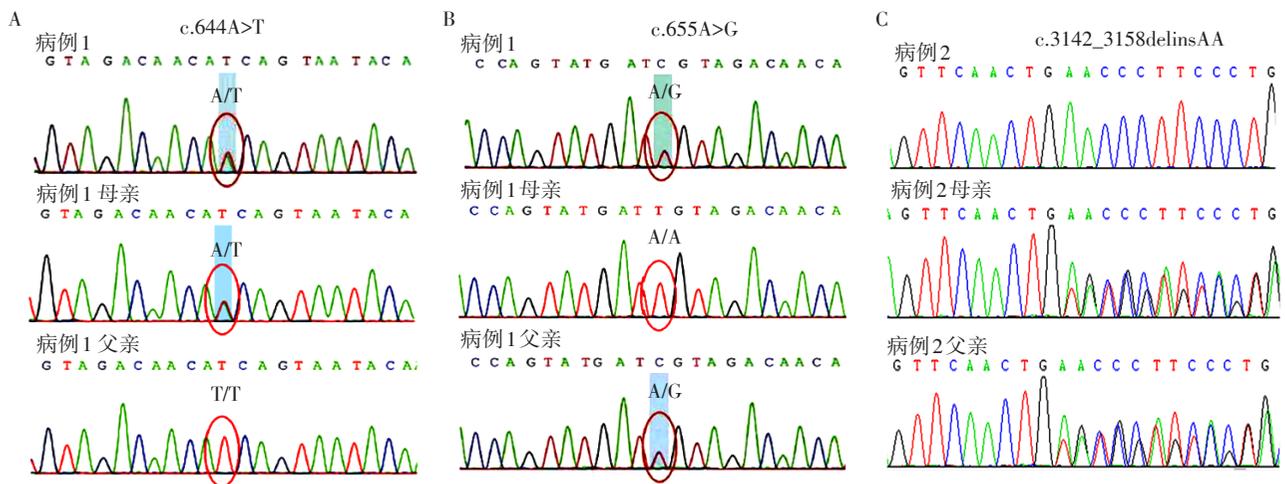


图1 GSDⅢ患儿AGL基因突变测序图

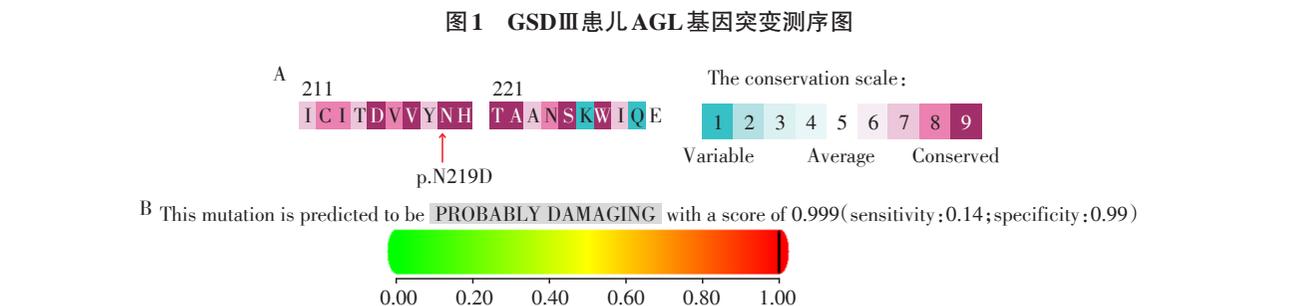


图2 新发错义突变p.N219D生物信息学预测

AGL基因全长85 kb包括35个外显子,在肝脏编码的mRNA长度7.4 kb,AGL mRNA包括编码翻译区(4 596 bp)和3'端非翻译区(2 371 bp);其转录起始点为第3外显子的第69个碱基,终止密码子位于外显子35,AGL单体蛋白包含1 532个氨基酸,分子量为170 kDa^[2]。迄今为止人类基因突变数据库中共收录了162种AGL基因突变,包括错义突变、无义突变、缺失突变、剪切位点突变、重复突变等^[3-4]。AGL酶蛋白有3个重要的结构功能域,糖原结合区位于羧基外显子31~34区域内,它不仅能结合底物,也是稳定酶蛋白构象的重要结构; α -1,4-葡萄糖基转移酶活性功能域由外显子6和外显子13~15的Asp535、Glu564、Asp670位点构成;淀粉1,6-葡萄糖苷酶的活性与外显子26、27的Asp1089、Asp1147位点密切相关^[5]。

本研究中病例1携带AGL基因p.D215V/p.N219D复合杂合型突变,p.N219D错义突变为新发突变,在大型正常人群测序数据库ExAC和1000G中均未发现该突变。蛋白质保守性分析显示该位点为高度保守区,同时经Polyphen2和SIFT软件预测显示其为可能致病性突变。既往文献报道携带纯合突变姐妹,同样没有低血糖表现^[6],提示p.N219D错义突变可能为更轻表型相关的错义突变。在Shaiu等^[7]报道的1例携带IVS32-12A>G纯合突变的糖原累积病患者同样没有低血糖表现,临床表型轻,仅表现为肝脏肿大,无肌肉组织受累情况。本研究中的病例2严重低血糖发作,同时伴有磷酸肌酸激酶增高。病例2携带AGL基因c.3142_3158delinsAA纯合突变基因型,未见数据库及文献报道该突变,c.3142_3158delinsAA推测造成AGL酶蛋白多个氨基酸缺失。GSD III患儿在婴儿期表现出肝大,反复发作的低血糖也是主要表现,GSD III是糖原脱支酶缺陷所致,其中以同时累及肝脏和肌肉的IIIa型最多见,不累及肾脏。由于不影响糖异生,故严重低血糖少见^[7-8]。我国郭丽等^[9]报道1例AGL基因型为c.3710-3711delTA/IVS14+1G>T的患儿,在25月龄时表现为低血糖抽搐。该课题组在2017年又报道的一家系2例患儿均在1岁左右出现严重低血糖抽搐,该家系基因型为c.1735+1G>T和c.959-1G>C,均为经典剪切位点突变^[10]。以上患儿携带的基因突变类型均为造成蛋白翻译提前终止的移码突变或剪切突变,可能对酶活性的影响更为严重。本研究中的病例2为c.3142_3158delinsAA纯合突变,涉及多个氨基酸的缺失,可能同为更严重表型相关的突变类型。总之,GSD III患儿临床表型严重不一,非常可能与基

因型相关,但进一步分子机制需要突变功能研究。

综上,本研究通过对2例糖原累积病患者进行AGL基因测序分析,发现了3种致病突变,其中p.N219D和c.3142_3158delinsAA为新发突变,综述文献报道的相关病例,p.N219D变异可能关联较轻临床表型,而c.3142_3158delinsAA变异可能和更严重的表型相关。AGL的基因诊断可为GSD III患者的治疗、预后评估和家系产前诊断等提供重要依据。

[参考文献]

- [1] CHENG A, ZHANG M, OKUBO M, et al. Distinct mutations in the glycogen debranching enzyme found in glycogen storage disease type III Lead to impairment in diverse cellular functions [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18 (11) : 2045-2052
- [2] YANG B Z, DING J H, ENGHILD J J, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding human muscle glycogen debranching enzyme [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(13) : 9294-9299
- [3] MILI A, BEN C I, MAMAÏ O, et al. Molecular and biochemical characterization of Tunisian patients with glycogen storage disease type III [J]. *J Hum Genet*, 2012, 57 (3) : 170-175
- [4] SHEN J J, CHEN Y T. Molecular characterization of glycogen storage disease type III [J]. *Curr Mol Med*, 2002, 2 (2) : 167-175
- [5] LIU W, MADSEN N B, BRAUN C, et al. Reassessment of the catalytic mechanism of glycogen debranching enzyme [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(5) : 1419-1424
- [6] SENTNER C P, VOS Y J, NIEZEN-KONING K N, et al. Mutation analysis in glycogen storage disease type III patients in the Netherlands: novel genotype-phenotype relationships and five novel mutations in the AGL gene [J]. *JIMD Rep*, 2013, 7: 19-26
- [7] SHAIU W L, KISHNANI P S, SHEN J, et al. Genotype-phenotype correlation in two frequent mutations and mutation update in type III glycogen storage disease [J]. *Mol Genet Metab*, 2000, 69(1) : 16-23
- [8] LUCCHIARI S, FOGH I, PRELLE A, et al. Clinical and genetic variability of glycogen storage disease type III a: seven novel AGL gene mutations in the Mediterranean area [J]. *Am J Med Genet*, 2002, 109(3) : 183-190
- [9] 郭丽, 林伟霞, 张占会, 等. 一个糖原累积症IIIa型家系的临床特点及AGL基因突变分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2015, 32(4) : 502-505
- [10] 郭丽, 林伟霞, 毛曼, 等. 糖原累积病IIIa型一家系两例患儿的分子诊断研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2017, 34(4) : 499-503

[收稿日期] 2020-08-11