

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000074

T2 基因突变致 3-酮硫解酶缺乏症

李 莉, 朱 岷, 毛会英, 朱丹丹, 熊 丰

(重庆医科大学附属儿童医院内分泌科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、
重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:在非糖尿病性酮症酸中毒病例中寻找 3-酮硫解酶(3-ketothiolase, 3KT)(以下简称 T2)基因异常情况,进一步为 3KT 缺乏症(3-ketothiolase deficiency, 3KTD)的诊断提供依据,揭示 T2 在异亮氨酸代谢过程中的作用,并探讨基因突变导致该疾病的潜在机制。**方法:**采集先证者及家属外周血,同时采集 50 例正常儿童外周血为正常对照,提取外周血 DNA,用 PCR 法扩增 T2 基因全部外显子及其侧翼,对扩增产物进行直接测序,检测突变位点。**结果:**先证者外显子 5 第 46 位 C 突变为 T,该突变导致 T2 蛋白第 127 位氨基酸由丙氨酸突变为缬氨酸,先证者父母、哥哥及正常对照组该位点均未见突变;先证者外显子 1、内含子 5、内含子 8 发现多个单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP)。**结论:**T2 基因外显子 5 A127V,可能是 3KTD 的潜在病因。

【关键词】3-酮硫解酶;非糖尿病性酮症酸中毒;异亮氨酸代谢;3-羟基丁酸;T2 基因

【中图分类号】R781.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-23

3-ketothiolase deficiency induced by T2 gene mutation

Li Li, Zhu Min, Mao Huiying, Zhu Dandan, Xiong Feng

(Department of Endocrinology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: To research the gene mutation of 3-ketothiolase (3KT) (T2) in non-diabetic ketoacidosis, to provide references for diagnosis of 3-ketothiolase deficiency (3KTD), to reveal the role of T2 in isoleucine metabolism and to explore potential mechanisms of 3KTD by gene mutations. **Methods:** DNA was extracted from peripheral blood of the patients, his family members and healthy children. The entire coding regions of T2 gene with flanking intronic regions were amplified by PCR and the amplified products were directly sequenced and mutation sites were detected. **Results:** A127V missense mutation in exon 5 was identified in proband and no mutation was observed in other tests. Some single nucleotide polymorphisms (SNPs) of T2 gene were detected. **Conclusion:** A127V in exon 5 of T2 gene may be a potential pathogenesis of 3KTD.

【Key words】3-ketothiolase; non-diabetic ketoacidosis; organic acid urine; 3-hydroxybutyric acid; T2 gene

3-酮硫解酶缺乏症(3-ketothiolase deficiency, 3KTD)也称线粒体乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶缺乏症(mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency)、 β -KTD 是异亮氨酸代谢障碍的常染色体隐性遗传疾病^[1]。人类 T2 基因位于染色体 11q22.3-23.1^[2],长约 27 kb,共 12 个外显子^[3],编码 427 个氨基酸前体蛋

白其中包括 33 个氨基酸领导多肽^[4]。自 1971 年报告首例该疾病以来,目前国际上对该疾病基因异常的报道并不多(<100 例),目前我国并没有该疾病的相关研究。Fukao 等^[5]发现 T2 基因并无热点突变位点。本研究从非糖尿病性酮症酸中毒病例中寻找 T2 基因异常,为 3KTD 的诊断提供依据,分析基因型与患儿临床表现进一步揭示 T2 在代谢过程中的具体作用及基因突变所致该病的可能机制。

作者介绍:李 莉,Email: sclili86@163.com,

研究方向: T2 基因与 3-酮硫解酶缺乏症。

通信作者:朱 岷,Email: zhumin323@hotmail.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000074.html>

1 对象与方法

1.1 研究对象

先证者,男,5月23d,反复出现非糖尿病性酮症酸中毒,以咳嗽或腹泻为首发症状,后发展为严重非糖尿病性酮症酸中毒,惊厥,昏迷等;实验室检查:表1。串联质谱分析:血液:3-羟丁酰肉碱 58.71 $\mu\text{mol/L}$ (参考值:0.00~0.60 $\mu\text{mol/L}$);尿液:3-羟丁酰肉碱、乙酰甘氨酸、乳酸、3-羟基丁酸、3-羟基丙酸增高(参考值:0.00 $\mu\text{mol/L}$),提示有机酸尿。正常儿童作为对照组,纳入标准:①出生至今无低血糖、高乳酸、酮酸血症、酮尿、惊厥、意识障碍、昏迷等临床表现;②发育良好,智力正常;③无先天性及遗传性疾病、器官功能衰竭、外伤、内分泌功能异常等疾病。本研究征得所有研究对象及家长同意后,抽取外周静脉血 2 ml。

1.2 主要试剂及仪器

全血基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);2 $\times$ Power Taq Plus PCR MasterMix DNA 聚合酶(北京天根生化科技有限公司);DNA 测序仪(ABI3100Genetic Analyzer)。

1.3 方法

提取全血基因组 DNA,对 T2 基因的 12 个外显子及其侧

翼进行 PCR 扩增,上下游引物如表 2 所示。30 μl PCR 反应体系,TIANGEN Taq Plus PCR MasterMix DNA 聚合酶,PCR 反应条件,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸,扩增 35 个循环,PCR 产物纯化后直接测序,结果与 GenBank 中相应 T2 基因序列(GenBank NG_009888.1)进行比对,并在正常对照组及其家属中进行筛查,筛选致病突变。

2 结 果

先证者外显子 5:第 46 位碱基 C 突变为 T(c.456C>T),导致 T2 蛋白第 127 位氨基酸由丙氨酸(alanine,Ala)突变为缬氨酸[valin,Val(以下简称 V),GCT $\rightarrow$ GTT,A127V],先证者父母及正常对照组该位点正常。

先证者及其哥哥外显子 1:第 89 位碱基 G 突变为 C(c.89G>C),导致 T2 蛋白第 5 位氨基酸由丙氨酸突变为脯氨酸[(proline,Pro(以下简称 P),GCG $\rightarrow$ CCG,A5P)]及第 68 位碱基 T 突变为 A(c.68T>A),先证者父母及正常对照组该位点正常。

先证者及其家属、正常对照组内含子 5:第 78 位碱基 A 突变为 C(IVS5+78 A to C)、内含子 8 第 83、84 位碱基之间插入 AAGT(IVS8+84insAAGT),见图1。

表 1 先证者实验室检查结果

Tab.1 Laboratory test results of prohand

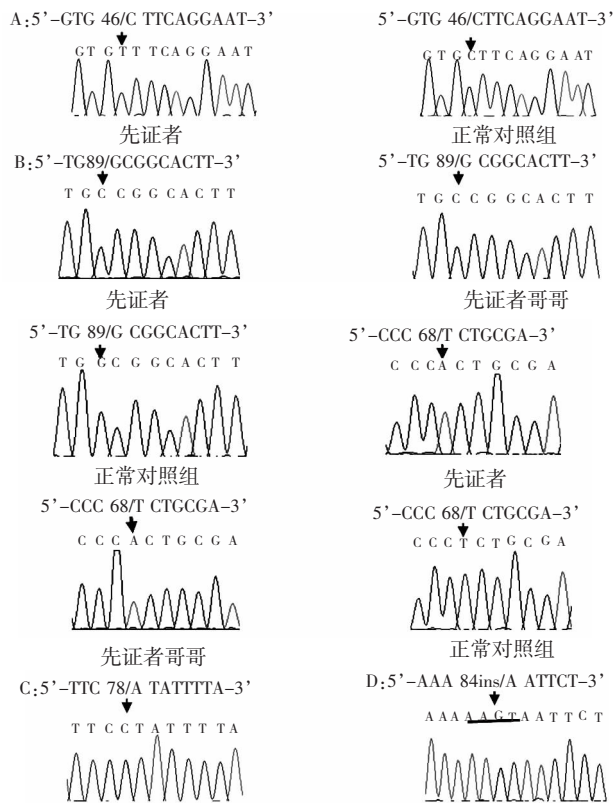
	血气分析				乳酸 (mmol/L)	血糖 (mmol/L)	血氨 ($\mu\text{mol/L}$)	电解质			尿常规 酮体
	pH	pCO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	剩余碱 (mmol/L)				K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	
第一次	6.99 ↓	20	4.8 ↓	-24.8	0.9	5.19	10	3.38 ↓	141.3	107.4	+++
第二次	7.09 ↓	8.25	3 ↓	-8	1	12.44	12	3.24 ↓	141	108.1	+++

参考范围:pH:7.35~7.45;pCO₂:4.86~5.98 mmHg;HCO₃⁻:21.4~27.3 mmol/L;剩余碱:-3~3 mmol/L;乳酸:0.7~2.1 mmol/L;血糖:3.89~6.11 mmol/L;血氨:9~13 $\mu\text{mol/L}$;K⁺:3.5~5.5 mmol/L;Na⁺:132~149 mmol/L;Cl⁻:97~111 mmol/L;尿常规:酮体(阴性)

表 2 T2 基因 1~12 外显子 PCR 扩增上下游引物序列

Tab.2 PCR upstream and downstream primers of T2 gene 1~12 exons

外显子	上游引物序列	下游引物序列
Exon1	5'-GAGGCGACTATTGGAGGAAG-3'	5'-GATGATTACGCCGAGACCTT-3'
Exon2	5'-ATGATCATAAGGATGCAGGAAGAAA-3'	5'-CGTCTAGAGGAATGTGTGTTTG-3'
Exon3~4	5'-GCTTCTGCTCCTCAAACCTCCTG-3'	5'-GTTGGCCAGGATGGTCTCCATC-3'
Exon5	5'-CATGCTCTATTAAGTTCTGCAG-3'	5'-ATGGATCCAGACACTCTTGAGC-3'
Exon6	5'-GACCTCAAGTGATCCACCTGC-3'	5'-CACATTGGCCAAGCCGGTCTC-3'
Exon7	5'-CACCTCCGGCCTAAGAAATA-3'	5'-TGAAGTGGCAACTCTTCACTTT-3'
Exon8	5'-GATGAGTGTCTTACTTGGGATGG-3'	5'-CTCTTGAACATAGGGACCAG-3'
Exon9	5'-TGCAGTTAGCTGTGTACATG-3'	5'-ATGATCATGCCACCATGCTCAGC-3'
Exon10	5'-GGGCTAAACTTGGCTTGTGTC-3'	5'-CATCAGCCAGCATTCCTCC-3'
Exon11	5'-GGAGGCTGAGACAGGAGAAC-3'	5'-TGGGTGACTGACAGGTGC-3'
Exon12	5'-CAGCAAGTAGTAGTGGCTAGTAAGG-3'	5'-CTTCAGAGCTGCAATTGAGGG-3'



箭头所指为突变位点

A 为外显子 5 c.456C>T; B 为外显子 1 c.89G>C、c.68T>A; C 为内含子 5 IVS5+78 A 到 C; D 为内含子 8 IVS8+84insAAGT

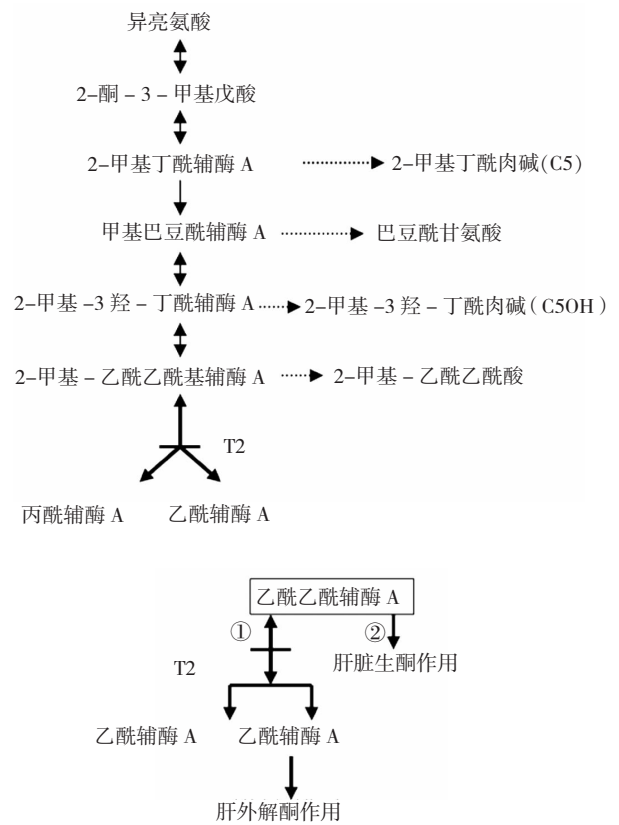
图 1 T2 基因突变测序图

Fig.1 Sequence of T2 gene mutation

3 讨论

3KTD 是一种异亮氨酸代谢异常的常染色体隐性遗传疾病^[1],是有机酸病的一种。临床表现差异较大,最常见为间歇性酮症酸中毒、生长障碍等非特异性临床表现,严重者可致智力障碍、神经系统发育落后及死亡等。T2 在异亮氨酸分解第 6 步中使 2-甲基-乙酰乙酰基辅酶 A 分解为乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A。也在酮体分解和脂肪酸氧化过程中起着重要作用^[6]。T2 缺乏导致上游产物的堆积,临床以血和尿液中酮体增加,酸中毒,有机酸尿(尿液中 2-甲基乙酰乙酸、3-羟基丁酸和甲基巴豆酰甘氨酸异常增高)等为主要特征,如图 2。

本研究发现先证者外显子 5 突变,c.456C>T,即第 46 位碱基 C 突变为 T,导致 T2 蛋白第 127 位氨基酸由丙氨酸突变为缬氨酸。Nakamura 等^[7]曾在 1 例患者中发现该位点突变。c.456C>T 突变可以激活



①肝外酮体分解途径;②肝内酮体生成途径;T2 缺乏时①途径阻断,②途径增加

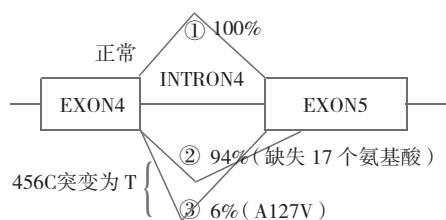
图 2 异亮氨酸代谢、酮体分解代谢途径示意图

Fig.2 Diagram of isoleucine and ketone body metabolism pathways

1 个沉默的隐蔽剪接位点,并且导致突变点上游 5' 端异常剪接,该突变并没有导致内含子 4 真正的剪接受体位点突变,但影响该剪接位点活性。异常剪接导致从 112 谷氨酸到 128 丝氨酸的 17 个氨基酸缺失,其中包括第 126 位半胱氨酸的活性部位,该部位可形成 1 个 S-酰基酶的中间体^[7]。用 PHD-predictprotein 软件对缺失的 17 个氨基酸进行分析,显示 T2 蛋白 N 端第 3 个 β 螺旋(N β 3)结构消失, T2 蛋白空间构象发生改变,临床症状出现早且表型重。经内含子 4 真正剪接位点转录没有氨基酸缺失, T2 蛋白空间构象未发生改变,仅 127 丙氨酸突变,临床表型轻,如图 3。

本资料中先证者出生 5 个月后反复出现非糖尿病性酮症酸中毒,串联质谱分析 3-羟基丁酸、乙酰甘氨酸、3-羟基丁酸及 3-羟基丙酸增加,说明异亮氨酸及酮体分解存在障碍,符合 3KTD 临床诊断^[8]。对 T2 基因进行扩增测序,从分子水平为 3KTD 诊断提供依据。先证者发病年龄小且病情严重,说

明 456C>T 突变最大可能是经异常剪接途径进行转录且可能是 3KTD 的潜在病因。本研究并没有发现先证者父母该位点突变,由于病例数少且目前对 3KTD 家系研究少,不排除自发或获得性突变可能。



①为正常未突变转录途径;②456C>T,经过异常剪接位点转录途径;③456C>T,经过真正剪接位点转录途径

图3 经正常或异常剪接位点转录示意图

Fig.3 Diagram of transcription pathway of normal and aberrant splice site

先证者及其哥哥 T2 基因外显子 1 突变, c.89G>C 及 c.68T>A, 先证者父母亲及对照组 T2 基因测序结果正常。c.89G>C 导致 T2 蛋白第 5 位氨基酸由丙氨酸突变为脯氨酸。先证者哥哥未出现过任何 3KTD 症状。Fukao 等^[9-10]曾在 1 例 3KTD 患者中找到该位点突变,证实该突变可产生 1 个新的 MspI 位点多态性, MspI 位点多态性的杂合性在正常日本人中为 0.49。本研究结果进一步证实 MspI 位点多态性不能导致 3KTD。c.68T>A 经 NCBI 数据库单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 筛选,证实该位点为 SNP。

研究发现先证者及其父母、哥哥, 8 例正常对照组 (8/50, 16%) 内含子 5 第 78 位碱基 A 突变为 C (IVS5+78 A to C)、内含子 8 第 83、84 位碱基之间插入 AAGT (IVS8+84insAAGT), 说明该位点为 SNP。

迄今为止, 与 T2 基因相关的缺失、插入、错义突变、剪切位点突变及复制有较多报道^[11-13], 但暂无同一位点相同突变的报道。本研究进一步证实 c.456C>T 可能是 3KTD 的潜在病因, 且可提高临床医生对 3KTD 的认识, 对疑为 3KTD 的患者应从分子生物及蛋白水平确诊, 并对其家系进行基因筛查, 确保早诊断、早预防, 改善预后。

参考文献

[1] Daum RS, Lamm P, Mamer OA, et al. A 'new' disorder of isoleucine catabolism[J]. Lancet, 1971, 2(7737): 1289-1290.

[2] Masuno M, Kano M, Fukao T, et al. Chromosome mapping of the human mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase gene to 11q22.3-q23.1 by fluorescence in situ hybridization[J]. Cytogenet Cell Genet, 1992, 60(2): 121-122.

[3] Kano M, Fukao T, Yamaguchi S, et al. Structure and expression of the human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase-encoding gene[J]. Gene, 1991, 109(2): 285-290.

[4] Fukao T, Yamaguchi S, Kano M, et al. Molecular cloning and sequence of the complementary DNA encoding human mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase and study of the variant enzymes in cultured fibroblasts from patients with 3-ketothiolase deficiency[J]. J Clin Invest, 1990, 86(6): 2086-2092.

[5] Fukao T, Nguyen HT, Vu DC, et al. A common mutation, R208X, identified in Vietnamese patients with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency[J]. Mol Genet Metab, 2010, 100(1): 37-41.

[6] Catanzano F, Ombrone D, Stefano C, et al. The first case of mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency identified by expanded newborn metabolic screening in Italy: the importance of an integrated diagnostic approach[J]. J Inher Metab Dis, 2010, 33(s3): S91-S94.

[7] Nakamura K, Fukao T, Perez-Cerda C, et al. A novel single-base substitution (380C>T) that activates a 5-base downstream cryptic splice-acceptor site with exon 5 in almost all transcripts in the human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene[J]. Mol Genet Metab, 2001, 72(2): 115-121.

[8] Zschocke J. Vademecum metabolicum: diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism[M]. 3rd ed. Heidelberg: Verlag Press, 2011: 95.

[9] Fukao T, Yamaguchi S, Orii T, et al. Molecular studies of mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase in two original families[J]. Hum Mutat, 1993, 2(3): 214-220.

[10] Fukao T, Yamaguchi S, Orii T, et al. Molecular basis of β -Ketothiolase deficiency: mutations and polymorphisms in the human mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase gene[J]. Hum Mutat, 1995, 5(2): 113-120.

[11] Fukao T, Horikawa R, Naiki Y, et al. A novel mutation (c.951C>T) in an exonic splicing enhancer results in exon 10 skipping in the human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene[J]. Mol Genet Metab, 2010, 100(4): 339-344.

[12] Fukao T, Boneh A, Aoki Y, et al. A novel single-base substitution (c.1124A>G) that activates a 5-base upstream cryptic splice donor site within exon 11 in the human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene[J]. Mol Genet Metab, 2008, 94(4): 417-421.

[13] Fukao T, Maruyama S, Ohura T, et al. Three Japanese patients with Beta-Ketothiolase deficiency who share a mutation, c.431A>C (H144P) in ACAT1: subtle abnormality in urinary organic acid analysis and blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry[J]. JIMD Rep, 2012(3): 107-115.

(责任编辑: 关蕴良)