

让罕见病“不罕见”

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002933

糖原累积病 I a 型 *G6PC* 基因的一个新突变

张贵萍, 李 磊, 束晓梅

(遵义医科大学附属医院儿科, 遵义 563003)

A novel mutation of the *G6PC* gene identified in a child with glycogen storage disease type I a

Zhang Guiping, Li Lei, Shu Xiaomei

(Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University)

【中图分类号】R725.8

【文献标志码】B

【收稿日期】2021-01-14

糖原累积病 I a 型(glycogen storage disease I a, GSD I a) (MIM: 232200) 是一种常染色体隐性遗传病, 是由 *G6PC* 基因突变导致的机体糖原代谢异常, 并主要累及肝脏的碳水化合物代谢性疾病, 临床以低血糖、乳酸血症、高脂血症、显著肝肿大为主要特征, 年长儿因生长迟缓导致严重矮小。在肝糖原累积病中该类型发病率约占 GSD 的 25%^[1]。本研究对 1 例病理报告为肝糖原累积病的病例进行基因检测和突变位点来源验证, 证实为 *G6PC* 基因突变所致的 GSD I a, 其中突变 c.992C>A 为患儿的新发突变, 进一步对该变异位点进行亲源链鉴定, 发现其位于父源链, 经生物信息学等分析为可能致病变异, 判断为一个高度疑似致病的突变新位点, 为丰富 *G6PC* 基因致病谱提供参考。

1 临床资料

患儿, 男, 10 岁, 以“身材矮小”为主诉于 2019 年 1 月就诊于遵义医科大学附属医院儿科。现病史: 7 年前发现患儿显著生长迟缓, 体格发育明显低于同龄儿, 伴间断性腹胀及间断无诱因鼻出血, 偶有无诱因血尿。体格检查: 体质量 18 kg (-5.5SD, 同年龄体质量中位值 33 kg)、身高 105 cm (-5.5SD, 同年龄身高中位值 144 cm)。匀称性矮小体型, 幼稚面容, 面色稍苍白, 面颊多发陈旧出血点, 余皮肤毛发无特殊。腹膨隆, 肝肋缘下 10 cm 可触及, 脾肋缘下 4 cm 可触及, 外阴无畸形, Tanner I 期。辅助检查: 白细胞计数 7.9×10^9 个/L, 红细胞计数 3.06×10^{12} 个/L, 血红蛋白 83 g/L, 血小板计数 $532 \times$

10^9 个/L; 凝血酶原时间 7.6 s; 丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT) 62 U/L, 天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST) 139 U/L; 尿酸 676 μ mol/L; 空腹血糖 2.85 mmol/L; 甘油三酯 11.41 mmol/L, 总胆固醇 7.0 mmol/L; 乳酸 9.7 mmol/L; 人生长激素(growth hormone, GH)基础值 4.28 ng/mL, 胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF) 5.51 nmol/L, GH 激发峰值 4.5 ng/mL。尿 OB(+++), 红细胞 21 935 个/ μ L; 阴离子间隙(anion gap, AG) 20.12 mmol/L, 提示代谢性酸中毒。肾功、电解质、甲功正常, 性激素基础值无异常; 骨龄 7.3 岁; 垂体磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI): 垂体发育不良; 腹部彩超: 肝肾弥漫性病变, 肝右叶低回声包块。全腹部计算机断层扫描术(computer tomography, CT): 肝脏增大, 肝脏肿块并多个结节, 双肾弥漫性病变, 疑髓质海绵肾, 右肾积水, 右输尿管盆腔段结石; 肿瘤相关抗原未见异常; 其他全身情况评估: 呼吸、循环及除生长轴外的其他内分泌功能无异常; 肝穿活检病理(图 1): 肝小叶存在, 肝细胞肿胀, 排列紊乱, 肝窦受压, 汇管区纤维组织增生, 肝细胞胞质空泡样, 可见少量糖原核, 部分肝细胞脂肪样变, 肝小叶间未见明显纤维组织; 糖原染色(periodic acid-schiff stain, PAS)可见糖原沉积; 淀粉酶消化后糖原染色(diastase periodic acid-schiff stain, D-PAS)(-); 符合肝糖原沉积病。肾组织病理见肾间质纤维组织增生伴散在慢性炎细胞浸润, 个别肾小球纤维化玻变。

为进一步明确诊断, 征得家长同意并签署知情同意书、报医院医学伦理委员会批准, 进行相关基因检测。采集研究对象的外周血 4 mL 及其父母的外周血各 2 mL, 委托北京康旭医学检验有限公司对糖原贮积症致病基因(共 29 个)采用目标区域捕获、二代基因测序方法进行检测。结果显示患儿 *G6PC*(NM_000151)基因检出 2 个杂合突变 c.648G>T 和

作者介绍: 张贵萍, Email: 2181897374@qq.com,

研究方向: 儿童内分泌遗传代谢。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20211206.1503.006.html>

(2021-12-07)

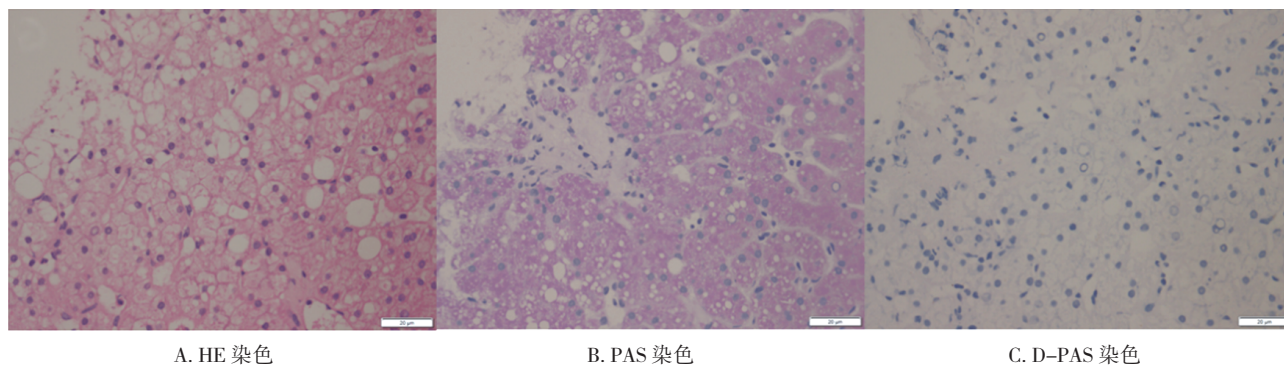


图 1 患儿肝脏穿刺活检病理

c.992C>A。其中 c.648G>T 为同义变异(图 2),该位点突变导致 pre-mRNA 剪接时形成的成熟 mRNA 的第 5 外显子少 91 bp,使蛋白的表达或功能受影响,致病机制已明确^[2]。其表型健康的母亲检测到相同变异;c.992C>A 变异为患儿新生变异(图 3),此变异导致第 331 氨基酸由 Ala 变为 Glu (p.Ala331Glu),为错义变异,可能导致蛋白质功能受到影响,蛋白损伤预测为可能致病。进一步通过克隆测序,对变异 c.992C>A 进行父源、母源新生来源验证,发现患儿新生变异 c.992C>A 位于父源链,与变异 c.648G>T 构成复合杂合,符合常染色体隐性遗传的致病方式。

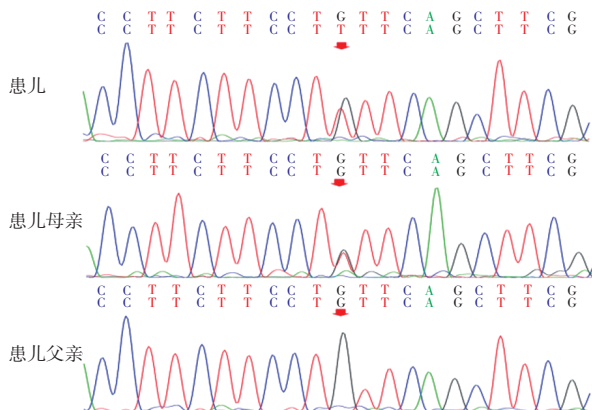


图 2 患儿及家系 G6PC c.648 (箭头所示)一代测序图

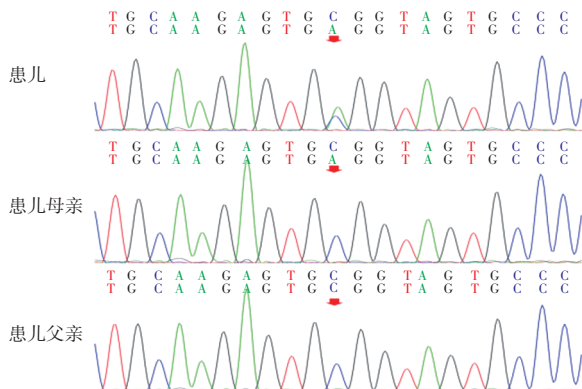


图 3 患儿及家系 G6PC c.992 (箭头所示)一代测序图

因临床文献对 G6PC 基因的 c.992C>A 未有相关报道,笔者对其生物信息学分析,该变异位点通过 mutation taster (<http://www.mutationtaster.org/index.html>) 预测分析结果该位点突变是致病的(图 4);PolyPhen-2 发现不同物种该位点的氨基酸高度保守(图 5),通过 ESE finder(<http://krainer01.cshl.edu/tools/ESE2/>) 分析发现该 c.992C>A 突变后,SRSF6 外显子剪接增强子结合位点消失,也可能会影响该基因正确剪接效率(图 6),对患儿在 G6PC 蛋白 p.A331E 氨基酸改变在不同物种中进行保守性比对,如 *Homo sapiens* (NP_000142.2), *Bubalus bubalis* (AIM41261.1), *Sus scrofa* (ACH87579.1), *Mus musculus* (NP_032087.2), *Bos taurus* (NP_001069592.1), *Danio rerio* (NP_001003512.2), *Gallus gallus* (XP_004948688.1), 发现其该位点高度保守(图 7)。按美国 ACMG 遗传变异分类标准对新突变分级提示 c.992C>A 为疑似致病性突变:①中等证据 PM2——ESP 数据库、千人基因组数据库、EXAC 数据库中正常对照人群中未发现该变异;②中等证据 PM3——G6PC 变异导致的糖原累积病 Ia 型是一种常染色体隐性遗传病,患者遗传自母亲的变异位点 c.648G>T 为已知致病性变异,而变异位点 c.992C>A 位于父源链,与已知致病位点组成复合杂合变异;③支持证据 PP3——经 SIFT、Polyphen2、MutationTaster 三种不同软件预测均提示该变异会对葡萄糖-6-磷酸酶功能造成有害影响;④支持证据 PP4——患者的临床表型与糖原累积病 Ia 型的特征高度一致。

本例显著生长障碍、肝肿大、低血糖、高乳酸血症、乳酸酸中毒、高脂血症,但无反复感染及肌张力障碍等相关症状体征,经临床鉴别,结合肝脏病理检查,临床诊断“糖原累积病 Ia 型”,参考基因诊断结果,本患儿确诊“糖原累积病 Ia 型”。家长及患儿要求应用重组人生长激素 (recombinant human growth hormone, rhGH) 改善生长,鉴于本病肝损害的进展性不良预后,建议放弃 rhGH,嘱予生玉米淀粉疗法治疗。随诊中肝功能损害、低血糖、乳酸血症和高甘油三酯血症时

有波动,AG 介于 18.82~22.21。追问发现患儿对生玉米淀粉
疗法依从性差,考虑为影响疗效的主要原因。联合营养科营

养指导等治疗,家长及患儿配合仍差,贫血、酸中毒及生长情
况无改善。



mutation t@sting

Alteration *G6PC*.992C>A

Prediction

disease causing

Model: *simple_aae*, prob: 0.999998861666445

Summary

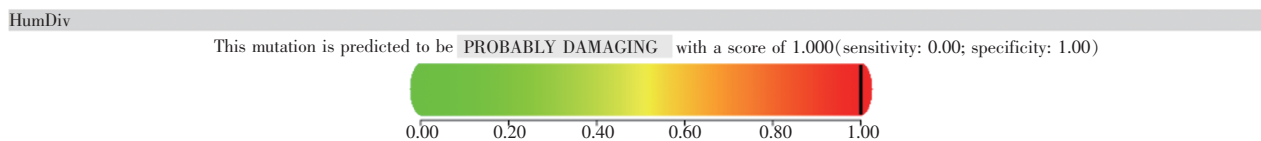
- amino acid sequence changed
- protein features (might be) affected
- splice site changes

[hyperlink](#)

analysed issue	analysis result
name of alteration	G6PC.992C>A
alteration(phys. location)	chr17:41063361C>A show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	G6PC
Ensembl transcript ID	ENST00000253801
Genbank transcript ID	NM_000151
UniProt peptide	P35575
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.992C>A cDNA.1071C>A g.10548C>A
AA changes	A331E Score: 107 explain score(s)

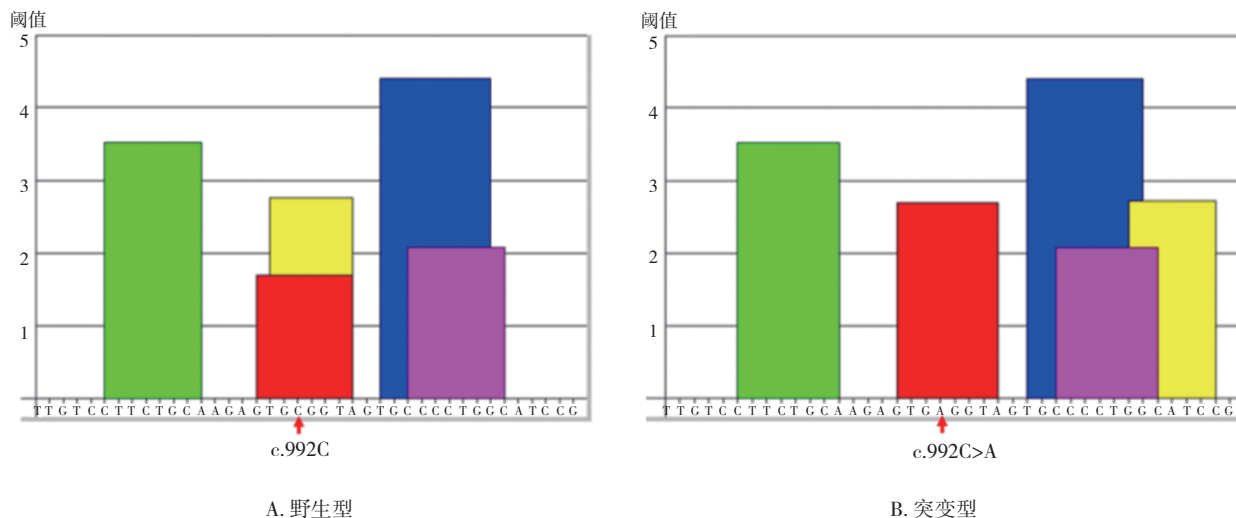
注:蓝色框为预测结果

图 4 *G6PC* c.992C>A mutation tasting 预测分析结果



注:PolyPhen-2 预测分数接近于 1,致病可能性很大

图 5 *G6PC* p.Ala331Glu PolyPhen-2 预测分析结果



	p.A331E
Patient	FYVLSFCKSEVVPLASVSVIP
<i>Homo sapiens</i>	FYVLSFCKSAVVPLASVSVIP
<i>Bubalus bubalis</i>	FYVLSFCKSAAVPLASVSVIP
<i>Sus scrofa</i>	FYVLSFCKSAAVPLASVSVIP
<i>Mus musculus</i>	FYILSFCKSATVPLASVSVIP
<i>Bos taurus</i>	FYVLSFCKSAAVPLASVSVIP
<i>Danio rerio</i>	FYLLSFCKSAVALLLPTALVP
<i>Gallus gallus</i>	FYVLSFCKSAVPLATVGLIP

注:不同物种 G6PC 蛋白序列;*Homo sapiens* (NP_000142.2), *Bubalus bubalis* (AIM41261.1), *Sus scrofa* (ACH87579.1), *Mus musculus* (NP_032087.2), *Bos taurus* (NP_001069592.1), *Danio rerio* (NP_001003512.2), *Gallus gallus* (XP_004948688.1)

图 7 G6PC p.A331E 不同物种保守性分析

2 讨论

糖原是葡萄糖的主要储存形式,糖原代谢在运动和血糖调节中起重要作用。应激状态下,糖原可迅速降解为葡萄糖,是骨骼肌、肝脏甚至大脑等组织的重要能量来源^[3],糖原的合成和降解涉及不同的酶促反应^[4]。控制糖原合成,调节和降解的酶功能异常会导致多种先天性疾病,统称为糖原贮积病 (glycogen storage disease, GSD)。GSD 表型存在很大差异,发病年龄可从胎儿期至成年,临床主要根据受影响的酶进行分类。

糖原累积病 I a 型是由于葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6PC) 缺陷所致。G6PC 在肝脏、肾脏、小肠等组织中表达,是糖原降解的限速酶。G6PC 催化亚单位先天缺陷,使糖原酵解和糖异生途径受阻,当外源性葡萄糖耗尽时,血糖水平迅速下降,脂肪代谢和升糖激素的旁路代谢亢进,大量脂肪酸和乳酸产生,导致高乳酸血症、高酯血症,大量糖原累积在肝脏而出现肝肿大。年长患儿由于能量供应障碍导致生长严重迟缓,骨发育明显落后,且多伴有骨质疏松,一项关于 42 例 GSD I a 患者的研究中,23 例 (55%) 骨密度及平均血清 25-羟维生素 D 浓度较低^[5]。此外, GSD I a 还累及多系统:血液系统主要表现为贫血和出血倾向,血液系统受累机制尚不明确,有学者报道 163 名 GSD I a 患者中 68 名出现贫血,其中 8 例为重度贫血,在进行肝腺瘤切除后贫血缓解,认为严重贫血与合并肝腺瘤相关,其机制可能是肝腺瘤引起患者凝血因子合成降低,甚至凝血不良^[6]。且红细胞属于无线粒体细胞,能量供应极其依赖糖代谢。本例患儿临床尚无肝腺瘤发生,但表现中重度贫血,反复面部点状出血,间断血尿,血小板计数增多,凝血酶原时间缩短;常规检查已排除骨髓异常增生、原发性肾病等其他系统疾病的独立病因,故血液系统受累考虑与红细胞糖代谢障碍及能量供应不足、间断失血以

及消化吸收障碍所致摄入不足有关。GSD I a 病患可发生肾脏肿大、局灶性节段性肾小球硬化、肾钙化等,既往文献报道 163 例 GSD I a 病患中 15 例合并肾功能损害,2 例肾衰竭^[6]。本例患儿肾脏超声提示弥漫性病变,病理有少量炎性细胞浸润,但尚未出现肾功能损害,仍需继续监测肾功改变。

GSD I a 病患是由于 G6PC 基因突变导致其编码的蛋白酶活性降低甚至完全失活所致。G6PC 基因位于染色体 17q21,包含 5 个外显子,编码 357 个氨基酸,于 1993 年首次被克隆,至 2019 年 12 月已有 100 多种不同的突变类型被 HGMD (Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>) 收录。G6PC 基因突变有明显的人种和地区差异^[7],犹太人最常见的突变是 R83C,巴西裔 GSD I a 患者中最常见的突变是 p.Arg83Cys (c.247C>T) 和 p.Gln347*^[8],亚洲人种的热点突变是 c.648G>T 突变,中国患者中该突变约占 54%。本例患儿的 c.992C>A 突变尚未被 HGMD 收录,其位置位于 G6Pase 的 C 端跨膜结构域 (跨膜结构域由第 318-VELVIFYVLSFCK-SAVVP-334 氨基酸残基组成)。目前在 HGMD 数据库中已收录的位于 C 端跨膜结构域的突变有因 c.964T>C 导致的 p.Phe322Leu, c.980_982delTCT 导致的 p.327delPhe, c.969C>A 导致的 p.Tyr323Ter, c.976T>C 导致的 p.Ser326Pro, c.965delT 及 c.979_980delTT 导致的移码突变^[9-13]。上述位于 C 端跨膜结构域的突变位点致病性均已证实,但尚无明确的基因型-表型异质性的相关性证据。一项针对 GSD 患者肝细胞腺瘤的分子特征进行的研究中涉及 c.969C>A 导致 p.Tyr323Ter,但并未作出肯定结论^[11]。本案例患儿的 c.992C>A 也位于该区域,其突变导致 p.Ala331Glu,故推测可能是通过改变 G6Pase 的 C 端跨膜结构域的构象,进而影响酶的活性。其致病机制及是否导致特殊临床表型,有待更多观察研究及从其表达的蛋白活性与转录水平进行验证。

目前 GSD I a 型没有针对性的治疗药物,治疗依赖多系统监测。其中以口服生玉米淀粉 (uncooked cornstarch, UCCS) 为主的饮食管理疗法可维持正常血糖水平,预防低血糖和乳酸性酸中毒,可望使 GSD-1a 患者能够维持正常的乳酸水平并达到或接近正常的生长和青春期发育,被认为是治疗 GSD I a 的革命性方案。但是传统 UCCS 维持血糖时间短,需多次服用^[14]。部分患者服用后淀粉不完全吸收,出现胃胀气、腹泻等肠道不耐受症状^[15]。此外,还可能引起胰岛素抵抗、肾脏疾病和骨质减少等长期并发症^[16-17]。本例患儿显著矮小除了原发病 GSD I a 型,还存在垂体发育不良继发生长激素缺乏,因故放弃 rhGH 治疗,予 UCCS 方案,但随访临床症状及生长障碍无改善,提示 UCCS 方案的实施和患者依从有一定困难。Bhattacharya K 等^[18]研究发现一种新型经化学修饰的淀粉 (WMHM20) 能更长时间维持血糖,且特殊的分子结构能减轻患者的胃肠道不耐受症状。此外,射频消融、肝部分切除或肝肾移植也用于 GSD I a 治疗。近年 G6PC 的替换基因治疗已

进入早期临床试验阶段;已发现腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体质量组可修复相应糖原分解酶的活性,能防止 GSD I a 大鼠模型空腹低血糖的发生,降低近、远期并发症的发生率在临床前的研究中,AAV 8 载体的肝靶向基因治疗有效地纠正了 GSD I a 的糖原储存,进一步的优化有望将基因治疗推广应用于临床^[19-20]。

综上所述,GSD I a 是一种常染色体隐性遗传病,早期发现和及时干预可保证患儿正常能量代谢和生长发育,显著减低致死致残率,并可能避免继发垂体功能低下等一系列并发症。既往 GSD 诊断主要依靠病理活检和酶学检查。随着二代测序技术在临床疾病诊断中的推广,基因测序可及时明确基因突变类型和来源,有望替代传统诊断方法,促进早期诊断,并有助于遗传咨询。本例患儿的 c.992C>A 突变位点致病性分析为可能致病变异,此新位点的发现,有望扩充 G6PC 基因致病谱;本例报道也提示类似的遗传代谢病患儿合并其他疾病时治疗有较大困境,值得进一步探索研究。

参 考 文 献

- [1] 顾学范. 临床遗传代谢病[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015: 168-171.
- [2] Gu XF. Clinical genetic metabolic diseases[M]. Beijing:People's Medical Publishing House Co. LTD, 2015: 168-171.
- [3] Kajihara S, Matsubashi S, Yamamoto K, et al. Exon redefinition by a point mutation within exon 5 of the glucose-6-phosphatase gene is the major cause of glycogen storage disease type I a in Japan[J]. Am J Hum Genet, 1995, 57(3): 549-555.
- [4] Petersen MC, Vatner DF, Shulman GL. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease[J]. Nat Rev Endocrinol, 2017, 13(10): 572-587.
- [5] Adeva-Andany MM, Gonzalez-Lucan M, Donapetry-Garcia C, et al. Glycogen metabolism in humans[J]. BBA Clin, 2016, 5: 85-100.
- [6] Minarich LA, Kirpich A, Fiske LM, et al. Bone mineral density in glycogen storage disease type I a and I b[J]. Genet Med, 2013, 14(8): 737-741.
- [7] Wang DQ, Carreras CT, Fiske LM, et al. Characterization and pathogenesis of anemia in glycogen storage disease type I a and I b[J]. Genet Med, 2012, 14(9): 795-799.
- [8] Chou JY, Mansfield BC. Mutations in the glucose-6-phosphatase- α (G6PC) gene that cause type I a glycogen storage disease[J]. Hum Mutat, 2008, 29(7): 921-930.
- [9] Sperb-Ludwig F, Pinheiro FC, Soares MB, et al. Glycogen storage diseases: twenty-seven new variants in a cohort of 125 patients[J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(11): e877.
- [10] Lei KJ, Shelly LL, Lin B, et al. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene are associated with glycogen storage disease types I a and I aSP but not I b and I c[J]. J Clin Invest, 1995, 95(1): 234-240.
- [11] Trioche P, Francoual J, Chalas J, et al. Genetic heterogeneity of glycogen storage disease type I a in France: a study of 48 patients[J]. Hum Mutat, 2000, 16(5): 444.
- [12] Calderaro J, Labrune P, Morcrette G, et al. Molecular characterization of hepatocellular adenomas developed in patients with glycogen storage disease type I[J]. J Hepatol, 2013, 58(2): 350-357.
- [13] Xu S, Qin S, Gu X, et al. Rapid detection of glycogen storage disease type I a by DNA microarray[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(9): 1229-1234.
- [14] Calderaro J, Labrune P, Morcrette G, et al. Molecular characterization of hepatocellular adenomas developed in patients with glycogen storage disease type I [J]. J Hepatol, 2013, 58(2): 350-357.
- [15] Correia CE, Bhattacharya K, Lee PJ, et al. Use of modified cornstarch therapy to extend fasting in glycogen storage disease types I a and I b[J]. Am J Clin Nutr, 2008, 88(5): 1272-1276.
- [16] Bodamer OA, Feillet F, Lane RE, et al. Utilization of cornstarch in glycogen storage disease type I a[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002, 14(11): 1251-1256.
- [17] Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, et al. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics[J]. Genet Med, 2014, 16: e1.
- [18] Melis D, Rossi A, Pivonello R, et al. Glycogen storage disease type I a (GSD I a) but not Glycogen storage disease type I b (GSD I b) is associated to an increased risk of metabolic syndrome: possible role of microsomal glucose 6-phosphate accumulation[J]. Orphanet J Rare Dis, 2015, 10: 91.
- [19] Bhattacharya K, Orton RC, Qi X, et al. A novel starch for the treatment of glycogen storage diseases[J]. J Inher Metab Dis, 2007, 30(3): 350-357.
- [20] Lee YM, Kim GY, Pan CJ, et al. Minimal hepatic glucose-6-phosphatase- α activity required to sustain survival and prevent hepatocellular adenoma formation in murine glycogen storage disease type I a[J]. Mol Genet Metab Rep, 2015, 3: 28-32.
- [21] Chou JY, Kim GY, Cho JH. Recent development and gene therapy for glycogen storage disease type I a[J]. Liver Res, 2017, 1(3): 174-180.

(责任编辑:唐秋姗)