

一例含葡萄糖-6-磷酸酶新突变的复合杂合突变 致华人糖原累积症 Ia 型的遗传特点

黎婧怡¹，许莉军²，姜艳²，邱正庆³，姚凤霞⁴，李文慧²，肖新华²，邢小平²

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院¹ 内科² 内分泌科 卫生部内分泌重点实验室

³ 儿科⁴ 临床遗传学实验室，北京 100730

通信作者：姜艳 电话：010-69155073，E-mail：sinojenny@126.com

【摘要】目的 探讨1例糖原累积症Ia型(glycogen storage disease type Ia, GSD Ia)患者的临床特点及遗传机制。
方法 详细收集患者临床资料，包括病史、体格检查、实验室检查结果。提取患者及其父母的外周血DNA，进行葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基(glucose-6-phosphatase catalytic subunit, G6PC)基因5个外显子测序，对新突变进行蛋白功能预测。
结果 患者为27岁男性，有低血糖、高乳酸血症、高尿酸血症和高脂血症的典型临床表现，肝穿刺活检支持GSD Ia。患者G6PC基因第2个外显子检测到c.248G>A(p.R83H)错义突变，第5个外显子检测到c.674T>C(p.L225P)错义突变，患者父亲和母亲分别是携带c.674T>C(p.L225P)及c.248G>A(p.R83H)突变的杂合子。采用Polyphen 2和SIFT软件对新发现的c.674T>C(p.L225P)突变蛋白功能进行预测，提示为致病突变，可能损害葡萄糖-6-磷酸酶蛋白功能。
结论 G6PC基因的复合杂合突变是本例GSD Ia患者的致病基础，发现G6PC基因新的致病突变，拓宽了华人GSD Ia的致病基因谱。

【关键词】 糖原累积症；葡萄糖-6-磷酸酶；基因突变

【中图分类号】 R589.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-9081(2016)04-0264-05

DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.2016.04.005

A Novel Compound Heterozygous Mutation in Glucose-6-Phosphatase Gene in a Chinese Patient with Glycogen Storage Disease Ia

LI Jing-yi¹，XU Li-jun²，JIANG Yan²，QIU Zheng-qing³，YAO Feng-xia⁴，LI Wen-hui²，
XIAO Xin-hua²，XING Xiao-ping²

¹ Department of Internal Medicine, ² Department of Endocrinology, Key Laboratory of Endocrinology of Ministry of Health,

³ Department of Paediatrics, ⁴ Laboratory of Clinical Genetics, Peking Union Medical College Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Corresponding author: JIANG Yan Tel: 010-69155073, E-mail: sinojenny@126.com

【Abstract】Objective To analyze the clinical features and genetic mechanism of a Chinese glycogen storage disease type Ia (GSD Ia) patient. **Methods** Clinical features of the patient including medical history, physical examination and laboratory results were collected in detail. DNA was extracted from peripheral blood of the patient and his parents. Mutation analysis was performed for the five exons of glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC) gene using DNA sequencing, prediction of protein function was conducted for novel mutation.

Results The patient was a 27-year-old male Chinese GSD with typical symptoms of hypoglycemia, hyperlactaci-

demia, hyperuricemia and hyperlipidemia, and the diagnosis of GSD Ia was confirmed by liver biopsy. Missense mutations of c. 248G > A (p. R83H) in the second exon and c. 674T > C (p. L225P) in the fifth exon were detected in G6PC gene in this patient, which were separately carried in his mother and father, respectively. The pathogenicity of novel mutation c. 674T > C (p. L225P) was supported by Polyphen2 and SIFT software analysis, which showed that the mutation might damage the function of glucose-6-phosphatase protein. **Conclusions** The compound heterozygous mutation in G6PC gene causes GSD Ia in this patient. Our findings of the novel pathogenic mutation of G6PC gene expands the spectrum of G6PC gene mutations in Chinese.

【Key words】 glycogen storage disease; glucose-6-phosphatase; gene mutation

Med J PUMCH, 2016, 7(4):264-268

糖原累积症 Ia 型 (glycogen storage disease type Ia, GSD Ia) 是一类常染色体隐性遗传病, 发病率为 1/30 万~1/10 万, 病理生理机制为葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase) 缺乏, 肝糖原不能释放葡萄糖, 临床表现为儿童早期即出现低血糖、高乳酸血症、高尿酸血症和高脂血症, 可出现生长发育落后和青春期延迟, 由于糖原累积而致肝脏增大, 大部分患者在 20~30 岁时发现肝腺瘤, 可能转化为肝癌^[1]。该病诊断主要依靠肝脏穿刺酶学检测及基因检测, 而葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基 (glucose-6-phosphatase catalytic subunit, G6PC) 基因检测因其创伤小、准确率高等优势已成为诊断该病的最常用手段^[2-3]。本研究通过对 1 例 GSD Ia 患者进行临床及遗传学分析, 探讨该病的致病机制。

对象和方法

对象

北京协和医院内分泌科收治的 1 例男性 GSD Ia 患者, 经患者及其家属同意并签署知情同意书后, 进一步收集患者及其父母的外周血, 提取基因组 DNA 进行分析。

临床资料收集

详细收集患者的一般临床资料, 进行体格检查、实验室检查和腹部 CT 检查。

基因分析方法

基因组 DNA 提取及扩增: 按酚-氯仿法提取 DNA, 5 对引物如下^[2]: 外显子 1: 5'-TCTGCTGACATCTTCCT-3', 5'-GCCTCTTTCTTGCTGA-3'; 外显子 2: 5'-GCA-TTCATTCACTAACCC-3', 5'-TCCACTCAGCTCTGTCT-3'; 外显子 3: 5'-CACCTTACTCCATTCTC-3', 5'-GT-GGTGTCAGCTACA-3'; 外显子 4: 5'-GCCAGGCTG-CAACATTT-3', 5'-GGAGAGAACGGAATGG-3'; 外显子

5: 5'-CTTCCTATCTCTCACAG-3', 5'-TCACTTGCTCCA-AATACC-3'。50 μl PCR 扩增的反应液中含有 250~500 ng 的基因组 DNA, 20 μmmol/L dNTP 4 μl, 缓冲液 5 μl, Taq DNA 多聚酶 0.5 μl, 20 μmol/L 引物 2 μl, PCR 条件为 94 °C 变性 60 s, 57 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 90 s, 总循环 30 次, 最终 72 °C 延伸 7 min。

纯化测序: PCR 纯化采用 MOBIO 试剂盒, 测序用美国 AB 公司的 AB3130 测序仪及配套的 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit。

家系分析: 将患儿及父母的基因组 DNA 分别进行扩增、纯化和直接测序。

DNA 序列的突变分析: 测序结果与美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GeneBank 数据库及人类基因突变数据库 (human gene mutation database, HGMD) 中 G6PC 基因的基因组 DNA、cDNA 序列进行比对。

蛋白功能评估: 采用 Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) 和 SIFT 软件 (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html) 对突变的危害性进行预测, 以判断该突变的致病性^[4-5]。

结 果

临床资料

患者男性, 27 岁, 因腹胀 27 年, 鼻衄 25 年, 关节疼痛 8 年入院。患者出生时腹部膨隆, 婴幼儿时期食量大, 需频繁喂食, 爬行、说话及走路均晚于同龄儿。自 20 个月始间断鼻衄, 8 岁时查 B 超示肝肋下 7 cm。患者清晨或进食少时偶有头晕、乏力, 无意识不清、晕厥发作, 未测血糖, 自行加餐。8 年前出现多关节疼痛, 后逐渐出现多发皮下结节, 左膝关节结节穿刺抽出尿酸盐结晶。2006 年肝穿刺活检后诊断

“糖原累积症”，建议口服生玉米淀粉，但患者未坚持。否认遗传性疾病家族史。入院查体：贫血貌，体重指数 16 kg/m^2 ，双耳、双手、双前臂、双肘、臀部、双膝、双足散在多发质硬皮下结节，直径 $0.5 \sim 2 \text{ cm}$ 。心肺未见异常，肝脏锁中线肋缘下 10 cm ，剑下 10.5 cm ，压痛、叩击痛阳性。实验室检查：血红蛋白 37 g/L ，血糖 3.0 mmol/L ；乳酸 6.2 mmol/L ；尿酸 $893 \mu\text{mol/L}$ ，甘油三酯 2.1 mmol/L ；丙氨酸转氨酶 7 U/L ，白蛋白 31 g/L ，总胆红素 $2.7 \mu\text{mol/L}$ ，直接胆红素 $1.5 \mu\text{mol/L}$ ，肌酐 $54 \mu\text{mol/L}$ ，血气分析：pH 7.335 ，碱剩余 -5 mmol/L 。腹部增强 CT：肝脏多发占位，部分占位动脉期明显强化（图 1）。



图 1 患者腹部增强 CT 示肝脏多发实质性占位

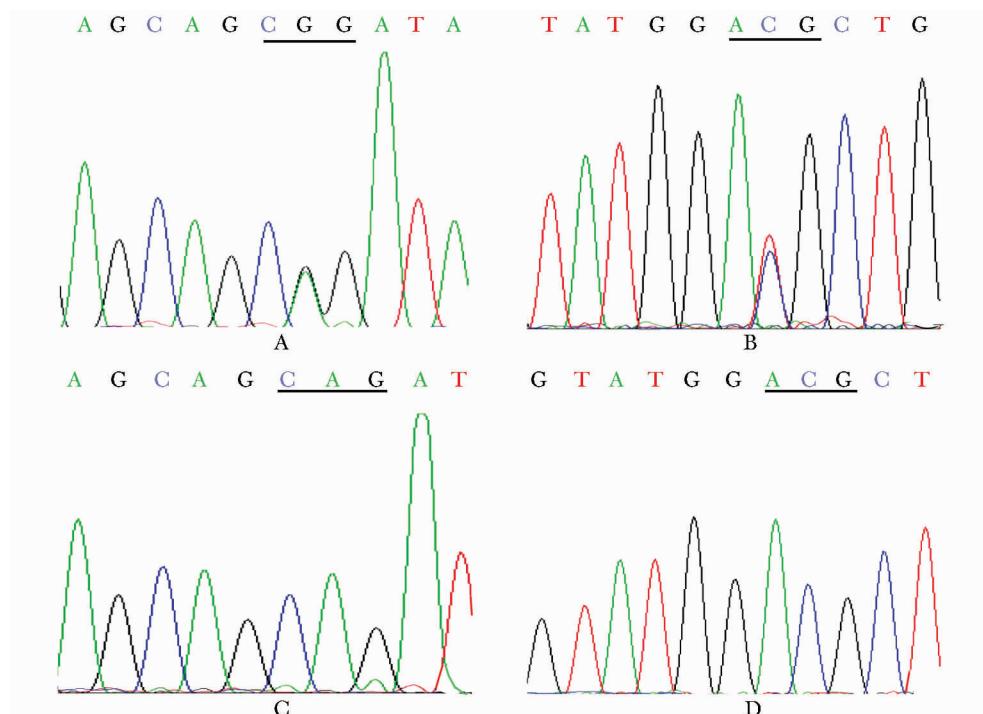


图 2 患者及父母基因测序图（反向测序结果）

A. 患者 G6PC 基因外显子 5 内父源 $c.674T > C$ (p. L225P) 突变；B. 患者 G6PC 基因外显子 2 内母源 $c.248G > A$ (p. R83H) 致病突变；C. 患者母亲 G6PC 基因外显子 5 正常序列，外显子 2 序列同图 B；D. 患者父亲 G6PC 基因外显子 2 正常序列，外显子 5 序列同图 A

治疗

给予生玉米淀粉 70 g 每日 4 次加水口服，低脂、低嘌呤膳食，每日主食约 150 g ，别嘌醇、碳酸氢钠口服并输血治疗，治疗 10 d 后，患者食量下降，精神改善，复查血红蛋白 51 g/L ，血糖 4.4 mmol/L ，乳酸 2.2 mmol/L ，尿酸 $511 \mu\text{mol/L}$ ，甘油三酯 2.26 mmol/L ；血气分析：pH 7.437 ，碱剩余 3.3 mmol/L 。

基因分析结果

PCR 测序表明，患者 G6PC 基因第 2 个外显子检测到 $c.248G > A$ (p. R83H) 突变，第 5 个外显子检测到 $c.674T > C$ (p. L225P) 突变，为复合杂合突变，患者父亲和母亲分别是携带 $c.674T > C$ (p. L225P) 及 $c.248G > A$ (p. R83H) 突变的杂合子（图 2）。经查询 NCBI 及 HGMD 数据库， $c.674T > C$ (p. L225P) 突变国内外文献未见报道。

G6Pase 蛋白功能

对新突变 $c.674T > C$ (p. L225P) 采用 Polyphen-2 和 SIFT 软件进行预测，预测值分别为 0.999 和 0.001 ，表明该突变造成的结果为有害，可能导致 G6Pase 蛋白结构改变，进一步证实 $c.674T > C$ (p. L225P) 突变是一种新的致病性突变。

讨 论

本例为青年男性，自幼起病，慢性病程，表现为腹部膨隆、肝大，反复鼻衄，多关节红肿热痛，皮下多发结节；查体可见贫血貌，多关节肿大变形，皮下散在多发质硬结节，肝大，肋缘下 10 cm；检验提示严重贫血、低血糖、高甘油三酯、高乳酸及高尿酸血症。临床符合糖原累积症表现，并行肝脏穿刺活检证实为 GSD Ia。GSD Ia 的起病与 G6PC 活性减低或缺失相关。G6PC 为糖原合成及糖异生过程中的关键酶，GSD Ia 患者因缺乏 G6PC，糖原分解成 6-磷酸葡萄糖后不能被水解为葡萄糖，从而导致严重低血糖，低血糖刺激分泌的胰高血糖素促使部分 6-磷酸葡萄糖进入糖酵解途径，产生大量乳酸，部分 6-磷酸葡萄糖进入磷酸戊糖途径，产生大量尿酸，部分患者可如本例一样形成痛风结节。此外，低血糖引起胰岛素水平降低，脂肪代谢紊乱，产生高甘油三酯血症^[3]。GSD Ia 患者长期处于低血糖状态，并存在多种代谢紊乱，可出现生长发育落后及青春期延迟，且糖原累积而致肝脏增大，大部分患者在 20~30 岁时发现肝腺瘤，部分进一步进展为肝癌^[1]。本例患者合并严重小细胞低色素性贫血，贫血为糖原累积症的常见表现之一，多种因素可导致贫血的发生。首先，GSD Ia 患者血小板功能的降低可增加出血风险，长期慢性出血可表现为小细胞低色素性贫血。其次，在合并肝腺瘤的 GSD Ia 患者中，铁调素表达增加，铁调素与巨噬细胞膜上的铁转运蛋白 1 结合后促使后者内吞降解，减少胞内铁向胞外转移，从而引起铁利用障碍；铁调素介导的铁转运障碍通过抑制肠道重吸收铁，加重贫血^[6]；部分病例中，腺瘤切除或肝移植可改善贫血^[7-8]。

GSD Ia 为常染色体隐性遗传病。Lei 等^[9]于 1993 年证实 G6PC 基因突变导致 G6PC 失活或活性降低，从而引起 GSD Ia。G6PC 基因定位于染色体 17q21，全长 12.5 kb，含有 5 个外显子，编码了一个由 357 个氨基酸组成，包含 9 个跨膜螺旋结构的疏水蛋白^[10]。G6PC 的表达具有组织特异性，最主要的表达部位是肝脏、肾脏和肠道。在 G6PC 基因克隆之前，GSD Ia 的诊断主要依靠临床表现及血液生化检验，并且需要肝脏活检来测定 G6PC 活性^[1-2]，随着对 G6PC 基因研究的逐渐深入，无创并且精确的基因检测已逐步代替了传统的肝脏活检病理，因而明确突变基因对于疾病的诊断尤为重要。目前已经报道 85 种以上

的 G6PC 基因突变，其中，64% 为错义突变^[1]。在华人中，c. 648G > T 是最常见的突变，约占 54%^[11-12]。本例为复合杂合突变，其中一个杂合突变来自母亲，发生在外显子 2 上，c. 248G > A (p. R83H) 突变已有报道，导致组氨酸代替了精氨酸，该突变在华人突变中的比例占 26%^[11]，纯合的 c. 248G > A (p. R83H) 突变可造成 G6PC 活性的完全失活^[9, 11]。本例中另一杂合突变来自父亲，发生在第 5 外显子上，c. 674T > C (p. L225P) 导致脯氨酸代替了赖氨酸，目前尚未见报道，突变位于 G6Pase 蛋白的跨膜区，易造成功能损害，采用 Polyphen-2 及 SIFT 软件对 c. 674T > C (p. L225P) 的预测支持该突变有害，且预测结果与临床表现相符合，因此，笔者认为 c. 674T > C (p. L225P) 是一种新的致病突变。GSD Ia 患者临床表现异质性强，有文献报道，部分基因型如 c. 648G > T 纯合突变患者可无明显低血糖表现^[11]。本例患者呈重度贫血，而低血糖症状不明显，考虑可能与患者基因型有一定关系。

GSD Ia 的治疗方面，日间多次少量进食和进食吸收慢的碳水化合物如生玉米淀粉的饮食治疗是目前验证有效的唯一治疗方式，其中口服生玉米淀粉最为常用，具体为每 4~6 h 口服生玉米淀粉混悬液（约 1.5~2 g/kg），以维持血糖水平在 3.6~4.7 mmol/L 左右。需要监测每天的能量摄入，摄入量少则不足以改善代谢状况，摄入过多会导致高脂血症、糖原负荷过重、肝大及肥胖^[13]。若患者可保持血糖正常，高尿酸血症、高乳酸血症等代谢紊乱可被改善，肝腺瘤发生率也将减低，贫血可部分纠正，但高甘油三酯血症仍可能存在^[14]。辅助治疗包括维生素、钙剂、铁剂的补充，口服别嘌醇治疗高尿酸血症。若出现尿微球蛋白，则应予血管紧张素转化酶抑制剂预防肾脏并发症^[15]。

GSD Ia 患者的早期诊断和长期规范治疗能显著改善疾病预后，维持正常血糖可以改善代谢异常和临床症状，虽不能完全避免肾脏和肝脏损害的发生，但能够显著减少肝脏腺瘤的发生率^[1]，而本例患者明确诊断时间较晚、未能坚持治疗是其早期就出现严重并发症的重要原因。因而提倡早期对疑似病例进行无创性基因检测，对于该病的及时诊断及规范治疗尤为重要。

综上，G6PC 基因的复合杂合突变是本例 GSD Ia 患者的致病基础，本研究发现 G6PC 基因新 c. 674T > C (p. L225P) 的致病突变，拓宽了华人 GSD Ia 的致病

基因谱, 提倡对此病早期诊断和规范治疗。

参 考 文 献

- [1] Froissart R, Piraud M, Boudjemline AM, et al. Glucose-6-phosphatase deficiency [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2011, 6: 27.
- [2] 邱正庆, 魏珉, 刘歌, 等. 糖原累积症 Ia 型-纯合 G727T 突变患儿的表型分析 [J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41: 252-255.
- [3] 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.
- [4] Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations [J]. *Nat Methods*, 2010, 7: 248-249.
- [5] Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2 [J]. *Curr Protoc Hum Genet*, 2013, Chapter 7: Unit7.20.
- [6] Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, et al. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease [J]. *Blood*, 2002, 100: 3776-3781.
- [7] Reddy SK, Austin SL, Spencer-Manzon M, et al. Liver transplantation for glycogen storage disease type Ia [J]. *J Hepatol*, 2009, 51: 483-490.
- [8] Wang DQ, Carreras CT, Fiske LM, et al. Characterization and pathogenesis of anemia in glycogen storage disease type Ia and Ib [J]. *Genet Med*, 2012, 14: 795-799.
- [9] Lei KJ, Chen YT, Chen H, et al. Genetic basis of glycogen storage disease type 1a: prevalent mutations at the glucose-6-phosphatase locus [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 57: 766-771.
- [10] van de Werve G, Lange A, Newgard C, et al. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267: 1533-1549.
- [11] Chou JY, Mansfield BC. Mutations in the glucose-6-phosphatase-alpha (G6PC) gene that cause type Ia glycogen storage disease [J]. *Hum Mutat*, 2008, 29: 921-930.
- [12] Zhu J, Xing Y, Xing X, et al. A novel type heterozygous mutation in the glucose-6-phosphatase gene in a Chinese patient with glycogen storage disease Ia [J]. *Gene*, 2012, 511: 122-124.
- [13] Sever S, Weinstein DA, Wolfsdorf JI, et al. Glycogen storage disease type Ia: linkage of glucose, glycogen, lactic acid, triglyceride, and uric acid metabolism [J]. *J Clin Lipidol*, 2012, 6: 596-600.
- [14] Shah KK, O'Dell SD. Effect of dietary interventions in the maintenance of normoglycaemia in glycogen storage disease type 1a: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Hum Nutr Diet*, 2013, 26: 329-339.
- [15] Melis D, Parenti G, Gatti R, et al. Efficacy of ACE-inhibitor therapy on renal disease in glycogen storage disease type 1: a multicentre retrospective study [J]. *Clin Endocrinol*, 2005, 63: 19-25.

(收稿日期: 2015-09-30)