

·临床研究·

中国南方三个 Hunter 综合征家系的病因学研究

郑诗瑶¹, 唐佳^{2,3}, 艾阳², 吴晓昀², 谢杰², 黄颖², 郭奕斌^{1,2}

(1. 中山大学医学院医学遗传室, 广东深圳 518107; 2. 中山大学中山医学院医学遗传室, 广东广州 510080;

3. 广东省生殖科学研究所, 广东广州 510600)

摘要:【目的】揭示中国南方3个 Hunter 综合征家系的分子发病机制, 阐明患者表型和基因型的相关性, 为今后的产前或植入前基因诊断奠定基础。【方法】在临床初诊和系谱分析的基础上, 首先进行尿糖胺聚糖定性检测, 然后抽取患儿及其亲属的抗凝血, 提取 DNA 并通过 PCR、Sanger 测序对 *IDS* 基因进行序列分析。对发现的新变异采用 RT-PCR 和生物信息分析等多种方法进行致病性鉴定。【结果】3 个家系的患者尿检结果均为强阳性(++)。家系 1~3 先证者为男性, *IDS* 基因均发生半合子突变且突变均来自其母, 突变位点分别为: c.615_622delCATACAGT, c.847_848delGT 和 IVS7 ds+1 G>A。跨物种保守性分析结果显示 *IDS* 基因突变部位所在的氨基酸在物种进化过程中具有高度保守性。与正常蛋白相比, 突变蛋白的高级结构预测结果存在明显差异。根据 ACMG 标准, 3 个家系的变异均为致病性突变。【结论】先证者所患疾病为 Hunter 综合征, *IDS* 基因的 c.615_622del(p.Ile206Valfs*18)、c.847_848del(p.Val283Alafs*57) 和 IVS7 ds+1 G>A (p.G336Dfs*12) 均是新的致病性突变, 它们是引起患儿发病的内在原因。本研究进一步丰富了 *IDS* 基因的突变谱。

关键词: Hunter 综合征; *IDS* 基因; 艾杜糖-2-硫酸酯酶; 新突变

中图分类号: R394.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2023)03-0490-07

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0317

The Etiological Study of Three Hunter Syndrome Families in Southern China

ZHENG Shi-yao¹, TANG Jia^{2,3}, AI Yang², WU Xiao-yun², XIE Jie², HUANG Ying², GUO Yi-bin^{1,2}

(1. Department of Medical Genetics, School of Medicine, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China;

2. Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080,

China; 3. Guangdong Provincial Reproductive Science Institute, Guangzhou 510600, China)

Correspondence to: GUO Yi-bin; E-mail: guoyibin@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To reveal the molecular pathogenesis of Hunter syndrome in three families in southern China and to clarify the correlation between phenotype and genotype, so as to lay a foundation for future prenatal or preimplantation genetic diagnosis. 【Methods】 On the basis of initial clinical diagnosis and pedigree analysis, qualitative detection of glycosaminoglycans in urine was performed first, and then anticoagulant blood samples were collected from the children and their relatives. DNA was extracted and the *IDS* gene sequence was analyzed by PCR and Sanger sequencing. Various methods such as RT-PCR and bioinformatics analysis were used to identify the pathogenicity of the new variants. 【Results】 The urine test results of the patients in the three families were all strongly positive (++) . Proband were all male, with hemizygous mutations in *IDS* gene from their mothers, and the mutation sites were c.615_622delCATACAGT, c.847_848delGT and IVS7 ds+1 G>A, respectively. The cross-species conservation analysis showed that the amino acid of *IDS* gene mutation site was highly conserved during species evolution. Compared with the normal protein, mutant proteins exhibited

收稿日期: 2023-03-17

基金项目: 中山大学同创智慧医疗交叉学科人才培养基金(76160-3090319); 闽粤合作科研基金(71010025)

作者简介: 郑诗瑶, 硕士生, 研究方向: 遗传性骨病的诊断, E-mail: zhengshy36@mail2.sysu.edu.cn; 郑诗瑶、唐佳为共同第一作者; 郭奕斌, 通信作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: guoyibin@mail.sysu.edu.cn

significant differences in the predicted results of advanced structure. The variants identified in the three families were classified as pathogenic by ACMG criteria.【Conclusions】The three probands were diagnosed with Hunter syndrome. The c.615_622del (p.11206Valfs*18), c.847_848del (p.Val283Alafs*57) and IVS7 ds+1 G>A (p.G336Dfs*12) of *IDS* gene are all novel pathogenic mutations, which are the underlying causes of morbidity in children. This study has further enriched the mutation spectrum of *IDS* gene.

Key words: Hunter syndrome; *IDS* gene; iduronate-2-sulfatase; novel mutation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(3): 490-496]

Hunter 综合征 (Hunter syndrome, OMIM # 309900), 也称黏多糖贮积症 II 型 (mucopolysaccharidosis type II, MPS II), 是一种严重致残、致死性的 X 连锁隐性遗传病, *IDS* 基因发生致病性突变是导致该病发生的根本内因。本病临床表现多样, 重型患儿发病年龄早 (多于 2 岁左右起病), 症状严重, 进展快, 预后差, 寿命短, 一般在青春期前后死于呼吸道感染或心力衰竭, 最严重的甚至不到 5 岁就夭折, 有些家系甚至是多代人多个患者先后早逝, 危害十分严重^[1]。本病采用常规的临床检查和尿糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 检测只能初诊, 酶测定法也不能完全准确鉴定携带者, 因此, 开展基因诊断是揭示患儿病因的最有效手段。Hunter 综合征具有高度遗传异质性, 不同种族民族、不同家庭的患者, 其发病原因往往存在差异甚至相去甚远。本病至今仍无切实有效的根治疗法, 多选择酶替代疗法 (enzyme replacement therapy, ERT) 或造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)。ERT 可改善躯体功能, 但在某些组织中的疗效有限, 而 HSCT 后患者可能会发生移植物抗宿主病或移植相关并发症^[2]。因此, 对先证者及其家系成员进行病因学研究, 揭示其分子发病机制, 在此基础上, 对高危胎儿实施产前或植入前基因诊断, 防止患胎出生仍是目前预防该病发生的最佳策略和最有效措施。本研究对来自广东、湖南、四川的 3 个拟诊为 Hunter 综合征的家系进行了 *IDS* 基因的突变检测和新变异的致病性鉴定, 揭示了 3 个家系先证者发病的内因, 为今后实施产前、植入前基因诊断等奠定了良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 病例资料

家系 1: 先证者为一 6 岁 3 个月的男孩, 来自广

东。临床表现为骨骼畸形, 爪形手, 腹部膨隆有脐疝, 面容奇特, 凸额, 鼻梁塌, 颈短, 背部臀部蓝斑多, 智力低下, 但视、听力正常, 能发单音和简单词语。B 超显示肝脏肿大, 心脏瓣膜未闭合。患儿父母表型均正常, 非近亲结婚。系谱图如图 1A 所示, 家族中有 3 名男性患者, 均为其各自的母亲所遗传, 符合 XR 遗传规律。

家系 2: 先证者为一 4 岁男孩, 来自湖南。X 片显示患儿四肢长骨粗短, 骨皮质连续, 两侧髌臼稍浅平。肋骨变宽、扁平, 呈飘带状改变。腰椎体呈“鸟嘴状”改变, 椎间隙增宽。颅脑 MRI 显示双侧侧脑室扩大, 室周及半卵圆区脑白质显著减少, 额叶容积相对减小, 所示脑沟裂相对增宽。患儿父母表型均正常, 非近亲结婚, 系谱图如图 1B 所示。

家系 3: 先证者为一 2 岁 1 个月男孩, 来自四川, 身高 87 cm, 体质量 15.5 kg, 头围 51 cm, 囟门未闭, 前额凸, 鼻梁凹, 腹胀, 脐疝, 腹股沟疝, 背部有蓝色斑块, 爪形手, 智力尚可。患儿父母表型均正常, 非近亲结婚, 系谱图如图 1C 所示。

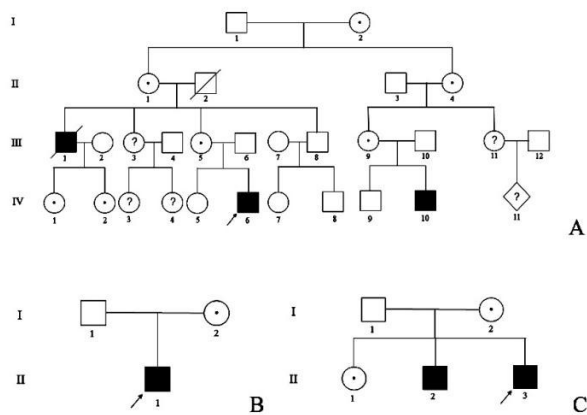
本研究是在患者及其家属签署知情同意书的情况下开展的, 并获得了中山大学医学院医学伦理委员会的批准 (批准号: 医学院医伦 [2021] 第 57 号)。

1.2 尿 GAGs 定性检测

糖胺聚糖 (GAGs) 在体内贮积可通过尿液排出, 导致尿 GAGs 含量升高, 这是黏多糖贮积症 (MPS) 的一个重要特征, 利用这一特征进行尿 GAGs 检测, 可以对 MPS 及相关遗传性骨病进行初步诊断和鉴别诊断。尿检按我室建立的甲苯胺蓝法进行^[3], 根据加样区有无染色圈及染色圈深浅程度与阴、阳性对照比较后确定 GAGs 含量多少。

1.3 基因诊断

1.3.1 PCR 和 Sanger 测序 采集全部受试者的外周血, 提取基因组 DNA 并进行浓纯度测定。利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计 (参考序列



A: pedigree map of family 1. B: pedigree map of family 2. C: pedigree map of family 3.

图1 中国三个拟诊为 Hunter 综合征家系的系谱图

Fig. 1 Pedigree map of three Chinese families with pre-liminary diagnosis of Hunter syndrome

NG_011900.3)(表1),所有引物交由北京华大基因公司合成。按以下条件扩增IDS基因编码区的9个外显子及其相邻的内含子序列:94 °C预变性4 min后,94 °C变性40 s,(50~65) °C退火40 s,72 °C延伸40 s,完成35个循环后于72 °C继续延伸5 min,然后

置于4 °C备用。扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳检测,并采用ABI PRISM 3730型测序仪进行双向测序(上海Invitrogen生物技术公司)。使用Chromas软件读取Sanger测序结果,并与参考序列进行比较分析。

1.3.2 逆转录PCR(RT-PCR) 从受试者新鲜外周血中提取总RNA(Magen试剂盒),使用逆转录试剂(Yeasen)反向转录1 000 ng RNA。将得到的cDNA作为RT-PCR模板,引物为F: 5'-CGTTGGGTAT-CATAAGCC-3', R: 5'-AAGTCACGGAATC-GAAAA-3'。PCR反应条件同1.3.1,对逆转录PCR产物进行双向测序并与野生型cDNA序列对比从而识别剪切位点突变对转录造成的影响。

1.4 变异分析和致病性评估

通过检索HGMD(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)、ClinVar(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)、dbSNP和千人基因组计划等相关数据库以及近5年的相关文献确认所发现的突变为未曾报道的新突变后,使用Clustal Omega软件^[4]对10个不同进化阶段的物种的IDS蛋白质序列进行跨物种保守性分析。此外,使用SWISS MODEL在线分

表1 IDS基因gDNA引物的名称、序列、退火温度和扩增产物长度

Table 1 Name, sequence, annealing temperature and amplified product length of gDNA primers of IDS gene

Primer	Sequence(5'→3')	Annealing temperature/°C	Product length/bp
IDS-1F	AGCAAAGGCAAAAAGACG	65	543
IDS-1R	GGAGAAGAGATGGCAGGG		
IDS-2F	CTTAGTAACCTAGCACCTAC	54	300
IDS-2R	CTGACAATAGCTGAAGCTC		
IDS-3F	GCTGTTTGCTAGGAGCCTCG	55	461
IDS-3R	CACTTTGGGTGAAAACGTGGC		
IDS-4F	TCCACTTGCCCATTTGTT	50	371
IDS-4R	TGAAGCCACTGCTCCTGT		
IDS-5F	CTGTCTTAGTTCTACTTCTG	54	475
IDS-5R	CATCAGGCAACCATGGTGC		
IDS-6F	GCTTAGAGGAAAAGGCAGTA	54	364
IDS-6R	GACATTATAGGTGGAGTTGTG		
IDS-7F	CTGAGAAAATCATTAAAGGGC	54	310
IDS-7R	TTCACAGGAAAAGTTCAGATG		
IDS-8F	TCTGTGGTAATTCCAAGTG	55	417
IDS-8R	CCCCCAAAGCCTATGATTC		
IDS-9F	ATGTAACCCATTCTGCTCTG	55	554
IDS-9R	GCTGGAAGGGAGCACATC		

析软件^[5]对突变蛋白的三维结构进行建模并使用可视化 UCSF Chimera 软件^[6]分析蛋白质的三级结构。结合临床资料、分子遗传学检测结果和新变异的一系列鉴定结果,我们参照 ACMG 指南^[7-8]综合评估 *IDS* 基因 3 个新变异的致病性。

2 结果

2.1 尿检结果

参照我室建立的尿 GAGs 甲苯胺蓝滤纸法定性检测标准,家系 1~3 的先证患儿的 GAGs 均为“++”(强阳性)。

2.2 基因诊断结果

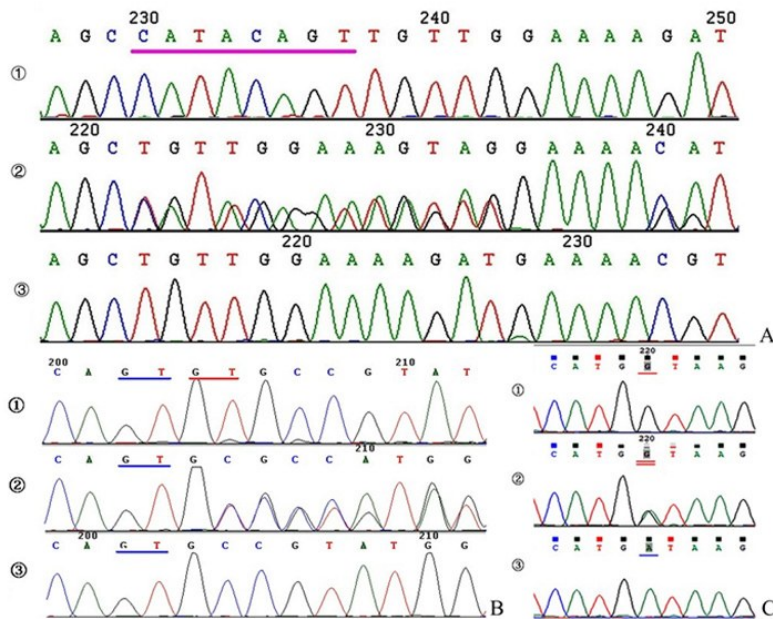
从 *IDS* 基因的测序结果可知,家系 1~3 先证者分别为 c.615_622delCATACAGT(图 2A),c.847_848delGT(图 2B)和 IVS7 ds+1 G>A(图 2C)半合子突变,其母都是相应突变的杂合子,而其父与正常对照一样,都无此变异。

在家系 3 中发现一剪切位点突变 IVS7 ds+1 G>A,该突变位于 *IDS* 基因第 7 内含子的供体端(donor site)。RT-PCR 测序结果显示,该突变会对转录本

造成影响。从测序峰形可见突变的 cDNA 序列增加了碱基“ATAAGCATTTTGAAATTCCTG”,这是由于突变导致基因原剪接位点“gt”发生了移位,移到其后 22 个碱基处的另一个“gt”处,使 mRNA 增加了 22 个碱基(图 3)。由于先证者血样不足无法提取 RNA,故仅检测了正常父亲和杂合子母亲,以此来判断突变对转录本的影响。

2.3 突变致病性鉴定结果

经检索 HGMD、ClinVar、dbSNP 和千人基因组计划数据库等以及近 5 年的相关文献,确认本研究发现的 *IDS* 基因的 c.615_622del 和 c.847_848del 变异均未被报道。IVS7 ds+1 G>A 变异虽已在 2006 年被我室报道过,后期印度学者也在 Clin Var 数据库上传此变异,但均未做深入研究。应用序列比对在线软件 Clustal Omega 对 10 个跨物种的 *IDS* 蛋白质的氨基酸序列进行分析比对,不同的物种包括:斑马鱼(Danio)、热带爪蟾(Xenopus)、原鸡(Gallus)、褐鼠(Rattus)、小鼠(Mus)、牛(Bos)、犬(Canis)、恒河猴(Macaca)、黑猩猩(Pan)、人(Homo)。蛋白跨物种保守性分析结果显示,p.206I(异亮氨酸)在 10 个物种中均高度保守(图 4A),p.283V(缬



A: results of mutation detection of family 1. ① patient's father: normal ② patient's mother: c.615_622 del CATACAGT mutant heterozygote carrier ③ patient: c.615_622 del CATACAGT mutant hemizygote. B: results of mutation detection of family 2. ① patient's father: normal ② patient's mother: c.847_848delGT mutant heterozygote ③ patient: c.847_848delGT mutant hemizygote. C: results of mutation detection of family 3. ① patient's father: normal ② patient's mother: IVS7 ds+1 G>A mutant heterozygote ③ patient: IVS7 ds+1 G>A mutant hemizygote.

图2 三个家系 *IDS* 基因测序比对图

Fig. 2 Alignment of *IDS* gene sequencing in three families

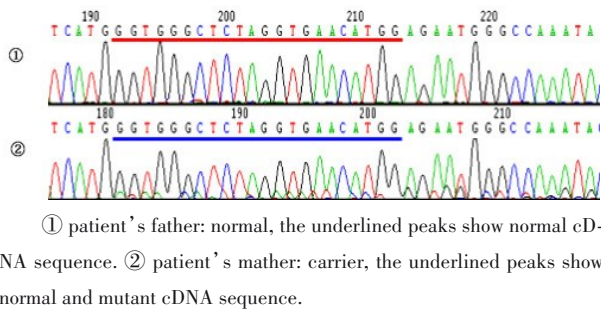


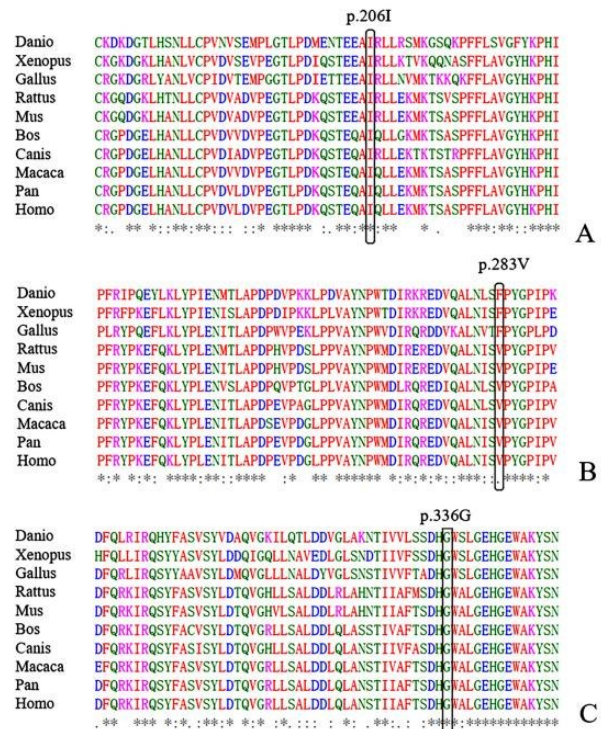
图3 家系三IDS基因cDNA测序比对图

Fig. 3 Alignment of IDS gene cDNA sequencing in Family Three

氨酸)在后7个物种中高度保守(图4B), p.336G(甘氨酸)在10个物种中均高度保守(图4C),且它们后续的氨基酸序列也较为保守。

三个新突变均引起阅读框的改变并导致终止密码提前出现。通过对突变蛋白的一级结构进行分析, c.615_622del突变会导致IDS蛋白第206位氨基酸由异亮氨酸突变为缬氨酸并产生新的阅读框,终止于下游18号密码子处,导致多肽链缩短为223个氨基酸,比正常蛋白减少327个氨基酸。c.847_848del突变会导致IDS蛋白第283位氨基酸由缬氨酸突变为丙氨酸并产生新的阅读框,终止于下游57号密码子处,导致多肽链缩短为339个氨基酸,比正常蛋白减少211个氨基酸。IVS7 ds+1 G>A突变会导致IDS蛋白第336位氨基酸由甘氨酸突变为天冬氨酸并产生新的阅读框,终止于下游12号密码子处,导致多肽链缩短为347个氨基酸,比正常蛋白减少203个氨基酸。肽链明显截短可能导致iduronate-2-sulfatase的功能受到严重干扰。与野生型IDS蛋白(图5A)相比,三种突变蛋白的空间构象均发生显著变化(图5B-D)。

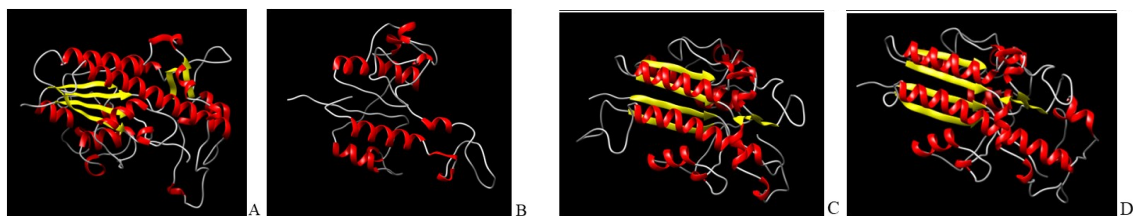
根据ACMG/AMP指南,遗传变异依据不同的



A: The amino acid at position 206 of the protein is highly conserved among the ten species. B: The amino acid at position 283 of the protein is conserved among the last seven species. C: The amino acid at position 336 of the protein is highly conserved among the ten species.

图4 10个不同物种的IDS蛋白氨基酸进化保守性分析
Fig. 4 Evolutionary conservation analysis of IDS protein amino acids from 10 different species

标准可描述为“致病的”、“可能致病的”、“意义不明确的”、“可能良性的”和“良性的”五级。其中,1个非常强+1个中等+1个支持证据即可判定变异为致病的。对三个新变异的致病性等级进行评定,我们找到1个非常强的致病性证据(PVS1),1个中等致病性证据(PM2)和3个支持性证据(PP1、PP3、PP4),因此可判断c.615_622del、c.847_848del和IVS7 ds+1 G>A突变均为致病性突变。



A: The wild type. B: c.615_622del(p.Ile206Valfs*18) mutant type. C: c.847_848del(p.Val283Alafs*57) mutant type. D: IVS7 ds+1 G>A (p.G336Dfs*12) mutant type.

图5 IDS蛋白的野生型和突变型三级结构

Fig. 5 The wild type and mutant type tertiary structures of IDS protein

3 讨论

Hunter 综合征 1917 年由加拿大 Charles Hunter 首次报道^[9],是一种严重致残、致死性的溶酶体贮积症,是七大型 MPS 中唯一一种 XR 遗传的黏多糖(即糖胺聚糖, GAGs)代谢性疾病,也是 42 组遗传性骨病中排在“NO27. 伴骨骼畸形累及的溶酶体贮积病”多发性发育不良组中的一种^[10]。在家系中,患儿的父亲通常是正常个体,而患儿母亲一般是携带者,通过交叉遗传,隐性致病基因就会遗传给儿子,发病风险为 50%。由于男性只有 1 条 X 染色体,没有同源的等位基因保护,只要带有 1 个隐性致病基因也会发病。本病患病率存在种族和地区差异,欧洲多数国家活产新生儿患病率为(0.13~0.71)/10 万,而亚洲人群患病率则相对高些,如日本和中国台湾活产新生儿患病率分别为 0.84/10 万和 1.07/10 万^[11]。

IDS 基因发生致病性突变是导致该病发生的根本内因。*IDS* 基因突变导致艾杜糖-2-硫酸酯酶(iduronate-2-sulfatase, EC 3.1.6.13)缺乏或活性降低,导致硫酸皮肤素(dermatan sulfate, DS)和硫酸己酰肝素(heparan sulfate, HS)不能降解并在全身脏器和组织内沉积而发病,表现为多脏器和组织病变,最终引起智力低下、肝脾肿大、呼吸道感染、心力衰竭等症状^[12-15]。

本病具有高度遗传异质性,突变类型包括错义突变、无义突变、剪切突变、插入突变、缺失突变和复杂突变等,其中错义/无义突变为主要的突变类型。自 1991 年 Wraith 等^[16]报道第 1 个突变后,至今人类基因突变数据库(HGMD Professional 2023.1)已报道的 *IDS* 基因病理性突变共有 835 种,包括错义突变/无义突变 397 种,拼接位点突变 75 种,调控区突变 1 种,小缺失突变(缺失片段小于 20 bp)149 种,小插入 73 种,小的缺失伴插入 21 种,大缺失 67 种,大插入 7 种,复杂突变 22 种。这些突变发生在各个外显子,但并不是平均分配在整个 *IDS* 基因上,而是集中在外显子 3、8 和 9。其中以第 9 外显子突变最多见,其次是 Exon 3,再次是 Exon 8^[17]。

IDS 基因定位于 Xq27.32-Xq28,编码由 550 个氨基酸组成蛋白质。该酶蛋白的 Asp334 和 Lys347 都是重要的活性位点残基,任何改变这些活性位点的突变都有可能破坏酶的结构和功能,导致 *IDS* 酶缺陷,进而影响 GAGs 的正常代谢造成 DS、

HS 在体内大量贮积,最终引起 Hunter 综合征。另外,在活性位点之外,位于酶的溶剂可及表面上的少量氨基酸突变可改变局部表面电荷,干扰糖基化,而大部分埋藏在折叠中的氨基酸突变可造成蛋白局部不稳定甚至是错误折叠^[18]。

本研究发现的 2 个缺失突变和 1 个剪切突变均发生移码,引起阅读框架变化,均会影响甚至改变原活性位点处的残基。由于活性位点完整性受到干扰、酶的 3D 折叠状态受到破坏和/或亚细胞运输发生缺陷,所以会导致酶活性降低,这是三个 Hunter 综合征家系先证患者发病的根本内因^[19-20]。从三个家系先证者的临床表现严重、症状典型、尿 GAGs 检测呈强阳性也得到证实。

关于图 3 cDNA 测序比对图,需作一点补充说明。母亲(样本②)是杂合子,其测序图是一个杂合双峰,只不过正常链峰形高,明显;突变链峰形很低,不明显。这是由于发生了 IVS7 ds+1 G>A 的 splicing 突变后,导致转录的 mRNA 的合成量明显减少的缘故。由测序图可见,从蓝色下划线起开始出现双峰,其中一条与父亲(样本①)的“GGTGGGCTCTAGGTGAACATGG”完全相同,另一条为插入了 IVS7 的前 22 bp 的序列“ATAAGCATTGTTGAAATTCCTG”。其中,加框的第 1 个碱基“A”是由 G 突变而来的,剩余的 21 bp 与 Exon7 与 Intron7 交界部位的“TAAGCATTGTTGAAATTCCTG”完全一致,之后的序列就直接连到 Exon8 的“ggtgggctc-taggtga……”序列了。可见,经过 IVS7 ds+1 G>A 突变后,剪接位点已经发生了变化,由原来 E7-I7 交界部位的“gt”移到了 22 bp 后的“gt”位置,导致突变的 mRNA 多了 22 bp,致使密码子发生移位,终止密码提前出现。

本研究所揭示的来自中国南方三个家系的 c.615_622del (p.Ile206Valfs*18)、c.847_848del (p.Val283Alafs*57)和 IVS7 ds+1 G>A (p.G336Dfs*12)均是我室首报的新变异,经系谱分析、遗传方式确认、临床症状/体征观察、影像学检查、尿 GAGs 初诊、多态性变异排查、跨物种保守性分析、蛋白高级结构预测、RT-PCR 等多种方法均证实为新的致病性突变,不但揭示了三个 Hunter 综合征患者的发病机理,进一步丰富了人类 *IDS* 基因突变谱,更重要的是为这些高危家庭今后再次孕育时实施产前或植入前基因诊断,防止患胎出生,从而真正实现优生打下了坚实的基础。同时,也为将来建立动物模型乃至实施靶向治疗创造了必要的前提条件。

参考文献

- [1] Guo YB, Pan JX, Meng YX. A new mutation (1062 del 16) of iduronate-2-sulfatase gene from a Chinese patient with hunter syndrome [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2007, 8(8): 566-569.
- [2] Matsuhisa K, Imaizumi K. Loss of function of mutant IDS due to endoplasmic reticulum-associated degradation: new therapeutic opportunities for mucopolysaccharidosis type II [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12227.
- [3] 黄艳, 孟亚仙, 郭奕斌. 微量快速检测尿 GAG 方法的建立 [J]. *中山大学学报论丛*, 2007(3): 138-140.
Huang Y, Meng YX, Guo YB. Establishment of a method for rapid detection of GAG in microurine [J]. *J Sun Yat-sen Univ Forum*, 2007(3): 138-140.
- [4] Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W276-W279.
- [5] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [6] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis [J]. *J Comput Chem*, 2004, 25(13): 1605-1612.
- [7] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology [J]. *Genet Med*, 2015, 17(5): 405-424.
- [8] 王秋菊, 沈亦平, 郭玲仟, 等. 遗传变异分类标准与指南 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47(6): 668-688.
Wang QJ, Shen YP, Wu LQ, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants [J]. *Sci Sin(Vitae)*, 2017, 47(6): 668-688.
- [9] Hunter C. A rare disease in two brothers [J]. *Proc R Soc Med*, 1917, 10(Sect Study Dis Child): 104-116.
- [10] Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, et al. Nomenclature and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision [J]. *Am J Med Genet A*, 2019, 179(12): 2393-2419.
- [11] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组. 黏多糖贮积症 II 型临床诊断与治疗专家共识 [J]. *中华儿科杂志*, 2021, 59(6): 446-451.
The Subspecialty Group of Endocrinologic, Hereditary and Metabolic Diseases, The Society of Pediatrics, Chinese Medical Association. Experts consensus on diagnosis and treatment of mucopolysaccharidosis type II [J]. *Chin J Pediatr*, 2021, 59(6): 446-451.
- [12] D'Avanzo F, Rigon L, Zanetti A, et al. Mucopolysaccharidosis type II: one hundred years of research, diagnosis, and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1258.
- [13] Mohamed S, He QQ, Singh AA, et al. Mucopolysaccharidosis type II (hunter syndrome): clinical and biochemical aspects of the disease and approaches to its diagnosis and treatment [J]. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 2020, 77: 71-117.
- [14] Scarpa M, Almássy Z, Beck M, et al. Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2011, 6: 72.
- [15] Sousa Martins R, Rocha S, Guimas A, et al. Hunter syndrome: the phenotype of a rare storage disease [J]. *Cureus*, 2022, 14(2): e21985.
- [16] Wraith JE, Cooper A, Thornley M, et al. The clinical phenotype of two patients with a complete deletion of the iduronate-2-sulphatase gene (mucopolysaccharidosis II—hunter syndrome) [J]. *Hum Genet*, 1991, 87(2): 205-206.
- [17] Zhang Z, Ma M, Zhang W, et al. Phenotypic and genetic characteristics of 130 patients with mucopolysaccharidosis type II: a single-center retrospective study in China [J]. *Front Genet*, 2023, 14: 1103620.
- [18] Demydchuk M, Hill CH, Zhou A, et al. Insights into hunter syndrome from the structure of iduronate-2-sulfatase [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15786.
- [19] Lin HY, Tu RY, Chern SR, et al. Identification and functional characterization of IDS gene mutations underlying Taiwanese hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 114.
- [20] Verma S, Pantoom S, Petters J, et al. A molecular genetics view on mucopolysaccharidosis type II [J]. *Mutat Res*, 2021, 788: 108392.

(编辑 余菁)