

## 全羧化酶合成酶缺乏症临床特点和基因突变分析

古霞<sup>1</sup>, 郝虎<sup>1</sup>, 蔡尧<sup>1</sup>, 肖昕<sup>1</sup>, 石聪聪<sup>2</sup>, 李思涛<sup>1</sup>  
(中山大学附属第六医院 1. 儿科, 2. 遗传代谢病实验室, 广东 广州 510655)

**摘要:**【目的】探讨全羧化酶合成酶缺乏症(HCS D)的临床及基因突变特点。【方法】回顾性分析2014至2017年经我院遗传代谢病实验室基因检测确诊的6例HCS D患儿的基因检测结果及其临床资料。【结果】共有6例患儿(3女3男),发病年龄7月~7岁3月。临床表现以反复顽固性皮疹为主,部分合并有生长发育落后、神经系统症状。实验室检查3例有高乳酸血症,尿GC-MS检测:均有3-羟基异戊酸(3HIV)、3-甲基巴豆酰甘氨酸(3HMG)、3-羟基丙酸(3HP)和甲基枸橼酸(Me-citrate)增高。血串联质谱检测:均有3-羟基异戊酰基肉碱(C5-OH)增高。患儿入院后予口服生物素及对症治疗,1周后皮疹明显消退。例1~4患儿均为HLCS基因第11外显子发生c.1522C>T纯合子突变。例5患儿HLCS基因第8外显子发生c.1088T>A纯合子突变。例6患儿HLCS基因第11外显子发生c.1544G>A与c.1558G>A复合杂合突变。其中,c.1558G>A未见报道。【结论】全羧化酶合成酶缺乏症的临床表现缺乏特异性,对临床疑诊的病人可进行尿GC-MS和血MS-MS检测。基因检测有助于HCS D的诊断,c.1522C>T纯合子突变可能与早发型HCS D有关;c.1558G>A为新生突变。

**关键词:**全羧化酶合成酶缺乏症;HLCS基因;基因检测

**中图分类号:**R72 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2018)05-0682-05

### Clinical Findings and Gene Mutations Analysis in Holocarboxylase Synthetase Deficiency

GU Xia<sup>1</sup>, HAO Hu<sup>1</sup>, CAI Yao<sup>1</sup>, XIAO Xin<sup>1</sup>, SHI Cong-cong<sup>2</sup>, LI Si-tao<sup>1</sup>

(1. Department of Pediatrics, 2. Laboratory of Inborn Metabolism, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Corresponding to: LI Si-tao; E-mail: sitaoli918@126.com

**Abstract:** 【Objective】 To analyze the clinical feature and gene mutation in holocarboxylasesynthetase deficiency (HCS D). 【Methods】 The genetic test results of 6 children with HCS D diagnosed by genetic Metabolic Disease laboratory in our hospital in recent 3 years and the clinical data were retrospectively analyzed, and review the relevant literatures. 【Results】 3 cases were female and 3 male. The age of onset ranged from 7 months to 7 years and 3 months. The clinical manifestations were mainly recurrent skin rashes, some of which had growth retardation and neurological symptoms. The laboratory examination showed that there were cases with Hyperlactic acidemia, with 3-hydroxy-isovaleric acid (3HIV), 3-hydroxy-methylglutaric acid (3HMG), 3-hydroxy-propionic acid (3HP) and methyl-citrate (me-citrate) in urine increased, with elevated level of hydroxyisovalerylcarnitine (C5-OH) in the blood. After admission, the patients were treated with oral biotin and symptomatic treatment, and the rash was significantly reduced after one week. Genetic analysis found homozygous mutation of c.1522C>T of the HLCS gene 11th exon in patients 1-4, found homozygous mutation of c.1088T>A of the HLCS gene 8th exon in patient 5, found heterozygous mutations of c.1544G>A and c.1558G>A in patient 6. Among them, C.1558G>A has not been reported. 【Conclusion】 The clinical manifestations of HCS D are lack of specificity, which can be used to detect the urine GC-MS and blood MS-MS in patients with clinical misdiagnosis. Gene detection is also helpful for the diagnosis of HCS D, c.1522C>T mutation may be related to the early-onset HCS D, and

收稿日期:2018-03-09

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212133);广州市科技计划项目(201604020154)

作者简介:古霞,硕士研究生,研究方向:小儿遗传代谢病,E-mail:1150417525@qq.com;李思涛,通信作者,医学硕士,主治医师,研究方向:新生儿及小儿遗传代谢病,E-mail:sitaoli918@126.com

c.1558G>A is neonatal mutation which have not been reported.

**Key words:** holocarboxylase synthetase deficiency; HLCS gene; gene detection

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(5):682-686]

多种羧化酶缺乏症(multiple carboxylase deficiency, MCD)是一种罕见的、生物素代谢相关的有机酸代谢性疾病,属于常染色体隐性遗传,表现为依赖生物素的多种羧化酶的活性缺失,导致血中有机酸聚积,从而导致包括皮肤、神经、免疫、呼吸及消化等多个系统的损害。根据缺乏酶的不同,分为两种类型,全羧化酶合成酶缺乏症(Holocarboxylase synthetase deficiency, HCS D)和生物素酶缺乏症(Biotinase deficiency, BTD),其中HCS D多在新生儿期及婴儿期起病,少数可见于学龄前期及学龄期,BTD多于青少年期发病<sup>[1-4]</sup>。由于该疾病的临床表现缺乏特异性,多数患者首次就诊时常被误诊或漏诊,因此尽早对疑似该疾病患者进行基因检测可帮助诊断。本文报告6例HCS D基因检测结果及患儿临床资料并对相关文献进行复习,探讨HCS D的临床及基因特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料收集

收集2014年至2017年来我院就诊,并经我院遗传代谢病实验室确诊的6例HCS D患儿的临床资料和基因检测结果。本研究经医院医学伦理委员会批准,所有受试患儿家属均知情同意并签署知情同意书。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验室和质谱检测** 所有患儿均进行气相色谱质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS,美国Agilent Technologies GC-MS 5975C)联用分析方法及串联质谱(MS-MS)方法检测患儿尿液有机酸、血氨基酸及酰基肉碱分析。同时通过血、尿常规检查、血气分析、血氨、血糖、血乳酸、肝肾功能、心肌酶谱、氨基酸分析、头颅MRI等辅助检查,了解病情并排除其他原因引起的酮症酸中毒。

**1.2.2 基因检测** 分别抽取患儿及其父母静脉血各2 mL,利用Qiagen公司的DNA提取试剂盒(the QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen)提取基因组DNA,用Nano-drop 2000超微量核酸蛋白测定仪

(Thermo公司,美国)对样本DNA进行质控。HLCS基因、BTD基因序列分别参考GenBank数据库NM\_000411.6及NM\_000060.3,采用Primer 5.0设计引物以扩增HLCS基因和BTD基因外显子及相邻内含子区域,PCR扩增由中山大学附属第六医院遗传病实验室进行,扩增产物送至英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序。

**1.2.3 突变分析** 对于测序结果中的变异位点,参照寡核苷酸多态性数据库(dbSNP)、人类基因突变数据库(HGMD)和ClinVar数据库确定变异位点性质。对比数据库中未收录的突变位点,应用The ExPASy(<http://www.expasy.ch/>)和蛋白质二级结构预测软件predictprotein(<https://www.predictprotein.org/>)对正常蛋白和突变蛋白二级结构进行预测和比对,从而推断该突变是否为致病性突变。

## 2 结果

### 2.1 患儿临床及实验室检查结果

6例患儿(男3女3)发病年龄为7月至7岁3月。临床表现:患儿均有反复皮疹,其中2例有运动发育落后,1例有抽搐。根据实验室检查结果:3例血乳酸升高,尿GC-MS检测均有3羟基异戊酸(3-hydroxy-isovaleric acid, 3HIV)、3甲基巴豆酰甘氨酸(3-hydroxy-methylglutaric acid, 3HMG)、3羟基丙酸(3-hydroxy-propionic acid, 3HP)和甲基枸橼酸(methyl-citrate, Me-citrate)升高,血串联质谱检测均有3羟基异戊酰基肉碱(hydroxyisovalerylcarnitine, C5-OH)升高(表1)。

### 2.2 治疗及随访

6例患儿入院后予每天口服生物素10~40 mg、补充复合维生素B、左旋肉碱等治疗,例3、5、6患儿存在高乳酸血症,予碳酸氢钠纠正酸中毒治疗。治疗1周后6例患儿顽固性皮疹均明显消退,例6患儿未再发抽搐,复查血尿代谢提示相关代谢产物均有明显下降,效果显著,未出现其他严重症状。6例患儿出院后均予口服生物素(每天

表1 患儿主要临床表现及实验室检查结果

Table 1 The main clinical manifestations and laboratory examination of patients

(n=6)

No.	Gender	Age	Main clinical manifestations	Laboratory examination (abnormal)	MS-MS( $\mu\text{mol/L}$ )	GC-MS
1	M	2Y	Rash, anemia, development retardation	HGB 98 g/L, pH 7.428, LAC 3.0 mmol/L	C5-OH: 14.22, 23.7 times higher than normal limit	3HIV, 3HMG, 3HP, Me-citrate increase
2	F	7M	Rash, growth retardation	HGB 95 g/L, pH 7.39, LAC 3.2 mmol/L	C5-OH: 6.84, 11.4 times higher than normal limit	3HIV, 3HMG, 3HP, Me-citrate increase
3	F	2Y5M	Recurrent skin rashes	HGB 110 g/L, pH 7.30, LAC 9.1 mmol/L	C5-OH: 9.17, 15.2 times higher than normal limit	LAC, 3HI, 3HMG, 3HP, Me-citrate increase
4	F	2Y1M	Recurrent skin rashes	HGB 112 g/L, pH 7.38, LAC 3.1 mmol/L	C5-OH: 5.59, 9.3 times higher than normal limit	3HIV, 3HMG, 3HP, Me-citrate increase
5	M	7Y3M	Recurrent skin rashes	HGB 118 g/L, pH 7.27, LAC 6.2 mmol/L	C5-OH: 3.67, 11.4 times higher than normal limit	LAC, 3HIV, 3HMG, 3HP, Me-citrate increase
6	M	2Y	Recurrent skin rashes, convulsion	HGB 110 g/L, pH 7.25, LAC 8.2 mmol/L	C5-OH: 2.354, 3.9 times higher than normal limit	LAC, 3HIV, 3HMG, 3HP, Me-citrate increase

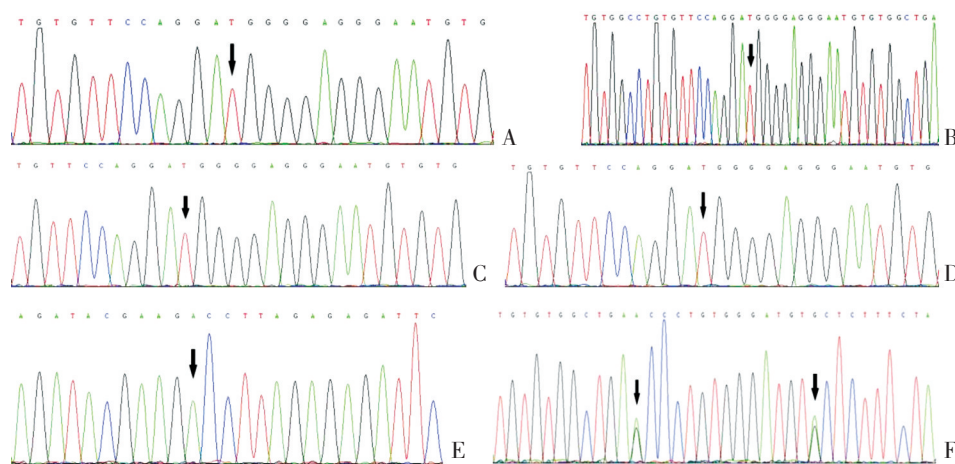
M: male; F: female; Y: years; M: months; HGB: hemoglobin; LAC: lactic acid. MS-MS: tandem mass spectrometry; GC-MS: gas chromatography-mass spectrometry. C5-OH: hydroxyiso-valerylcarnitine; 3HIV: 3-hydroxy-isovaleric acid; 3HMG: 3-hydroxy-methylglutaric acid; 3HP: 3-hydroxy-propionic acid.

5 mg)维持治疗,门诊复诊时均无酸中毒、高乳酸血症,皮疹、抽搐无再发,例1及例2患儿通过综合康复治疗的生长发育有明显追赶。

### 2.3 基因突变分析

基因检测结果显示(表2):例1-4患儿HLCS基因c.1522C>T(R508W),两个致病突变分别来自其父亲和母亲。在分析例2患儿HLCS基因外显子序列的同时也发现其邻近的侧翼序列有2个

位点的纯合子突变:1452-46G>T、1795+159C>T,但这也有可能是中国人群的单核苷酸多态性位点,理论上这两个突变并不改变全羧化酶合成酶的氨基酸序列。例5患儿HLCS基因c.1088T>A(V363D),两个致病突变分别来自其父亲和母亲。例6患儿HLCS基因c.1544G>A(S515N)、c.1558G>A(A520T)复合杂合突变。以下是6例患儿基因检测结果(图1)。



A: NO.1 c.1522C>T(R508W); B: NO.2 c.1522C>T(R508W); C: NO.3 c.1522C>T(R508W); D: NO.4 c.1522C>T(R508W); E: NO.5 c.1088T>A(V363D); F: NO.6 c.1544G>A(S515N) and c.1558G>A(A520T)

图1 患儿HLCS基因DNA测序结果

Fig.1 DNA sequencing results of HLCS Gene in patients

表2 全羧化酶合成酶缺乏症患儿及父母 HLCS 基因检测结果  
Table 2 HLCS Genetic result of six HCSD patients and parents

No.	Mutation type	Genotype	Amino acid change	Paternal mutation	Maternal mutation
1	Homozygous	c.1522C>T	R508W	c.1522C>T	c.1522C>T
2	Homozygous	c.1522C>T	R508W	c.1522C>T	c.1522C>T
3	Homozygous	c.1522C>T	R508W	c.1522C>T	c.1522C>T
4	Homozygous	c.1522C>T	R508W	c.1522C>T	c.1522C>T
5	Homozygous	c.1088T>A	V363D	c.1088T>A	c.1088T>A
6	Compound heterozygous	c.1544G>A and c.1558G>A	S515N and A520T	- c.1558G>A	c.1544G>A -

#### 2.4 新变异位点 c.1558G>A 的致病性预测

例6患儿HLCS基因的c.1558G>A突变在人类基因突变数据库(HGMD)和Clinvar数据库中的人群携带频率极低,表明该变异不是人群多态性位点。在Pubmed和ClinVar等数据库的临床案例中,未见该变异位点的报道。运用预测软件PolyPhen-2对c.1558G>A突变的保守性、致病性及危害性进行预测,结果显示该变异所在的区域是全羧化酶合成酶蛋白结构的重要组成部分,该区域在多种不同物种间的氨基酸序列高度保守,预测该区域影响蛋白质结构和功能的可能性较大。

### 3 讨论

HCSD是由于全羧化酶合成酶活性下降,不能催化生物素与生物素依赖的羧化酶(乙酰CoA羧化酶、丙酰CoA羧化酶、丙酮酸羧化酶及3-甲基巴豆酰CoA羧化酶)的结合,影响生物素依赖的羧化酶的活性,使脂肪酸合成、糖原异生及氨基酸的分解代谢发生障碍,乳酸、3-羟基异戊酸、3-甲基巴豆酰甘氨酸、甲基枸橼酸及3-羟基丙酸等异常代谢产物在体内蓄积,出现不同程度的皮肤、黏膜及神经系统的损害<sup>[5-6]</sup>。

本研究中6例患儿均因顽固性皮疹入院,临床研究表明,顽固性皮疹是HCSD常见的临床表现之一,包括湿疹、全身性红斑、脱屑以及尿布皮炎等,常累及颈项部、双耳、会阴、臀部和手足等皮肤皱褶处。此外,还可有喂养困难、生长发育迟缓、呕吐、骨骼肌张力减退、嗜睡及惊厥发作等,可合并酮症,代谢性酸中毒、高乳酸血症、免疫缺陷等<sup>[7-8]</sup>。

本组6例患儿均检测到HLCS基因的突变。

HCSD的致病基因HLCS位于21号染色体q22.13区域,共有14个外显子,其中6~14号外显子包含了所有的编码序列,至今国内外已有38种相关基因突变被报道(The Human Gene Mutation Database),均为常染色体隐性遗传。日本曾报道HLCS的发病率约为1:10 000<sup>[9]</sup>。目前并未发现泛种族的基因突变类型,其中A508T、G581S、V550M突变在日本与非日本人群中均有发现,655-656insA、L237P、780delG突变是日本人特有的突变类型,IVS10+5G->A(c.1519+5G>A)突变是欧美国家最主要的突变类型<sup>[10]</sup>。本组6例患儿中有4例基因突变类型为c.1522C>T(R508W),这种类型的突变会导致HLCS基因编码的氨基酸序列中的第508氨基酸残基由精氨酸突变为色氨酸,发病年龄较早,经生物素补充治疗后效果明显,预后良好<sup>[11]</sup>。结合相关文献<sup>[12]</sup>,c.1522C>T(R508W)突变是中国人群HCSD患儿尤其是早发型常见的突变类型。

例5患儿7岁发病,学龄期发病,属于晚发型。HLCS基因检测发现第8外显子发生c.1088T>A(V363D)纯合子突变,已有报道<sup>[12]</sup>,分别来自母亲和父亲,HLCS基因第8号外显子c.1088T>A是导致其患有的全羧化酶合成酶缺乏症的原因。该突变为错义突变,可导致其编码的氨基酸序列中第363位氨基酸残基由缬氨酸突变为天冬氨酸,推测该位点可能对蛋白质的功能影响较小,因此发病较晚。

例6患儿HLCS基因检测发现第11外显子发生c.1544G>A(S515N)与c.1558G>A(A520T)复合杂合突变,均为错义突变,其中c.1544G>A为已知致病突变<sup>[13]</sup>,来自母亲,c.1558G>A来自父亲,HGMDpro数据库未见报道,为新发现的突变位点。此两个突变位点分别位于两条染色体上,导

致氨基酸改变 p.S515N, p.A520T(丝氨酸>天冬酰胺,丙氨酸>苏氨酸),为复合杂合突变,支持 HCSD 诊断。

综上所述,HCSD 表型多样,患者的临床表现以反复顽固性皮炎为主,部分合并有生长发育落后、神经系统症状。血尿代谢筛查、基因检测可在

发病早期帮助确诊及分型,早期明确病因,早期干预,可改善预后。c.1522C>T(R508W)可能是早发型 HCSD 的一个分子标记。另外本研究发现 c.1558G>A(A520T)为新生突变,可丰富 HCSD 疾病的基因突变谱,为临床诊断提供依据。

#### 参考文献

- [1] 林书详,舒剑波,王朝,等. 15 851 例遗传代谢病高危患儿的临床分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(12): 1243-1247.  
Lin SX, Shu JB, Wang C, et al. Clinical analysis of 15851 children at risk of inherited metabolic diseases[J]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2017, 19(12): 1243-1247.
- [2] Mukhopadhyay D, Das MK, Dhar S, et al. Multiple carboxylase deficiency (late onset) due to deficiency of biotinidase [J]. Indian J Dermatol, 2014, 59(5):502-504.
- [3] 李秀珍,刘丽,盛慧英,等. 多种羧化酶缺乏症 15 例临床分析及长期随访[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29(8):590-594.  
Li XZ, Liu L, Sheng HY, et al. Clinical analysis and long-term follow-up of multiple carboxylase deficiency in 15 children [J]. J App Clin Pediatr, 2014, 29(8):590-594.
- [4] 张豪正,王广新. 生物素酶缺乏症研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(8):637-640.  
Zhang HZ, Wang GX. Advances studies on biotinidase deficiency [J]. J App Clin Pediatr, 2016, 31(8): 637-640.
- [5] Wolf B. Why screen newborns for profound and partial biotinidase deficiency? [J]. Mol Genet Metab, 2015, 114(3):382-387.
- [6] Donti TR, Blackburn PR, Atwal PS. Holocarboxylasesynthetase deficiency pre and post newborn screening [J]. Mol Genet Metab Rep, 2016, 7(1): 40-44.
- [7] Morrone A, Malvagia S, Donati MA, et al. Clinical findings and biochemical and molecular analysis of four patients with holocarboxylasesynthetase deficiency [J]. Am J Med Genet, 2002, 111(1): 10-18.
- [8] Kuroishi T. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2015, 93(12): 1091-1096.
- [9] Suzuki Y, Yang X, Aoki Y, et al. Mutations in the holocarboxylasesynthetase gene HLCS [J]. Hum Mutat, 2005, 26(4): 285-290.
- [10] Yang X, Aoki Y, Li X, et al. Structure of human holocarboxylasesynthetase gene and mutation spectrum of holocarboxylasesynthetase deficiency [J]. Hum Genet, 2001, 109(5): 526-534.
- [11] Hui J, Law E, Chung C, et al. The first reported HLCS gene mutation causing holocarboxylasesynthetase deficiency in a Vietnamese patient [J]. World J Pediatr, 2012, 8(3): 278-280.
- [12] 王彤,叶军,韩进书,等. 羧化全酶合成酶缺陷病的临床诊治及基因突变分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(8): 609-612.  
Wang T, Ye J, Han LS, et al. Diagnosis, treatment and gene mutation analysis in children with holocarboxylase synthetase deficiency [J]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2009, 11(8): 609-612.
- [13] 郑宏,卢婷婷,陆相朋,等. 全羧化酶合成酶缺乏症 1 例临床及基因分析 [J]. 临床儿科杂志, 2017(8): 605-608.  
Zheng H, Lu TT, Lu XP, et al. The clinical and genetic features of holocarboxylasesynthetase deficiency in a male patient [J]. J Clin Pediatr, 2017, 21(8): 605-608.

(编辑 余菁)