·信息研究·

婴儿肥厚型心肌病一家系 GAA 基因的突变分析

陈素琴，陈路明，田秋红，蒋玮莹*
（中山大学中山医学院医学遗传学教研室，广东 广州 510080）

摘 要：【目的】鉴定一个婴儿肥厚型心肌病家系 GAA 基因的致病性突变。【方法】分析一例患病女婴的临床及家系资料；提取先证者及其父母和姐姐的外周血 DNA，PCR 扩增 GAA 基因的全部 20 个外显子及剪接位点序列，对 PCR 产物进行直接测序。【结果】家系分析表明该病的遗传方式可能为常染色体隐性遗传；心脏彩超提示患儿有肥厚型心肌病；先证者 GAA 基因有两个复合杂合性突变：遗传自母亲的外显子 13 的 c.1843G>A（p.G615R）错义突变和遗传自父亲的外显子 18 的 c.2608C>T（p.R870X）无义突变。先证者未患病的姐姐只携带了 c.2608C>T 杂合性突变。该两种突变均尚未在大陆地区患者中发现。该两个突变已被证实可引起突变等位基因编码的蛋白残存的 GAA 酶活性严重减少。【结论】GAA 基因的 c.1843G>A 和 c.2608C>T 复合杂合性突变导致了该患儿出现以肥厚型心肌病为特征的经典婴儿型 Pompe 病（或糖原贮积症Ⅱ型）。该研究进一步证实了 c.1843G>A 突变与婴儿型 Pompe 病相关；同时也表明了对常染色体隐性遗传的婴儿肥厚型心肌病进行 GAA 基因检测或 GAA 酶活性检测的必要性。

关键词：肥厚型心肌病；GAA 基因；糖原贮积症Ⅱ型；Pompe 病
中图分类号：R394.3 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2014)01-0139-05

Analysis of the GAA Gene Mutations in a Chinese Family with Infantile Hypertrophic Cardiomyopathy

CHEN Su-qin, CHEN Lu-ming, TIAN Qiu-hong, JIANG Wei-ying*
(Department of Medical Genetics, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To identify pathological mutations of the GAA gene in a Chinese family with two patients affected with infantile hypertrophic cardiomyopathy.【Methods】 The clinical data and the family history of the proband, a 6-month-old affected female infant, were investigated. DNA was extracted from peripheral blood of the proband, her parents and sister. All 20 exons and the intron-exon splice sites of GAA gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Mutations were detected by direct sequencing the PCR products. 【Results】 The echocardiography indicated that the infant had hypertrophic cardiomyopathy. Pedigree analysis suggested that the mode of inheritance might be autosomal recessive. The infant was found to be compound heterozygous for two mutations in the GAA gene: c.1843G > A (p.G615R) missense mutation in the exon 13 from her mother and c.2608C > T (p.R870X) nonsense mutation in the exon 18 from her father. The proband's unaffected sister only carried the heterozygous c.2608C > T mutation. The c.1843G>A mutation was first discovered in the patients with infantile form of Pompe disease in Taiwan, and the c.2608C>T mutation was first found in the Argentineans patients and then in the German patients. To the best of our knowledge, this is the first report for the two variants in the GAA gene in the Mainland China. Both the mutant alleles had been verified to code for the mutant protein with very low GAA activity respectively. 【Conclusion】 The compound heterozygous c.1843G > A and c.2608C > T mutations caused the infant's condition, the classic infantile form of Pompe disease (or glycogen storage disease type II) characterized by hypertrophic cardiomyopathy. This study confirms that c.1843G>A mutation is related to the classic infantile form of Pompe disease. It also indicates the necessity of performing the analysis of the GAA gene or GAA activity for patients with the autosomal reccesive infantile hypertrophic cardiomyopathy.

Key words: hypertrophic cardiomyopathy; GAA gene; glycogen storage disease type II; Pompe disease
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(1): 139-143]

收稿日期：2013-09-08
基金项目：国家自然科学基金(81200402)
作者简介：陈素琴，博士，讲师，E-mail：chensq@mail.sysu.edu.cn；*通信作者：蒋玮莹，教授，博士生导师，E-mail：jweiying@yahoo.com

糖原贮积症Ⅱ型(Glycogen storage disease type Ⅱ, GSDⅡ;MIM 232300),也称 Pompe 病,是一种罕见的常染色体隐性溶酶体储积症,其代谢基础为酸性 α-葡萄糖苷酶 (acid alpha-glucosidase, GAA, 或酸性麦芽糖酶,EC 3.2.1.20,Swiss-Prot P10253)缺陷,糖原不能被分解,堆积在溶酶体和胞质中,造成溶酶体的增生和破坏、相应的脏器结构和功能损害。根据发病年龄、病变累及的主要脏器、病情轻重及进展缓慢,GSDⅡ可分为婴儿型和晚发型;其中婴儿型又可分为经典及非经典两类,晚发型可进一步分为儿童、青少年及成年起病型[1-2]。所有的病人均表现为进行性骨骼肌无力及由此引起的运动、呼吸功能衰退。经典婴儿型症状最为严重,肥厚性心肌病为其特征性表现;如不及时治疗,多在 1 岁内死亡。GSDⅡ是由于 GAA 基因(NM_000152)突变引起的 GAA 酶活性降低所致[3]。GSDⅡ的确诊依赖于 GAA 酶活性的测定或 GAA 基因分析。目前全世界范围内均有确诊病例报道;而国内除台湾地区外,迄今仅有少数几篇关于 GAA 突变分析的报道[4-8]。本文对一个先天性肥厚型心肌病家系进行 GAA 基因的突变分析。

1 材料与方法

1.1 对 象

本项目研究对象为临床诊断为“肥厚型心肌病”的一例女婴及其父母和姐姐(图 1)。该家系来自广东,汉族。先证者 II:3,2012 年 11 月出生,足月顺产,5 个月大时因“呼吸困难”于 2013 年 3 月 29 日在河南一医院入院抢救。入院查体未见明显的肝脾肿大及舌体肥大。心脏彩超报告显示:左心室对称性肥厚,心室肌异常肥厚,以室间隔及左室壁为著,收缩期间室间隔与左、右室壁贴服。室间隔收缩期最厚约 19.5 mm, 右室前壁厚 11.5 mm, 左室后壁厚约 14 mm,室间隔回声增粗、增强。左室流出道流速 2.2 m/s,右室流出道流速 1.9 m/s。二尖瓣瓣环内径 11.4 mm, 三尖瓣瓣环内径 12.4 mm。房室瓣启闭运动可及。左右侧冠状动脉始端可见,左侧冠状动脉内径 1.6 mm,左回旋动脉内径 1.0 mm,右侧冠状动脉内径 1.3 mm。左室 Tel 指数 0.47。该结果提示:左心室肥厚、左右室流出道流速增快、左心功能减低和肺动脉高压,符合肥厚型心肌病的声像表现[9]。先证者的哥哥 II:2,也在出生 5 个月时被诊断为“肥厚型心肌病”,并在 10 个月时因心功能不全和肺部感染而死亡。先证者父母为非近亲婚配,先证者父母和姐姐有均无心脏、骨骼或肌肉的异常表现,血缘亲属中无相应病史。家系分析表明,该病的遗传方式可能为常染色体隐性遗传。

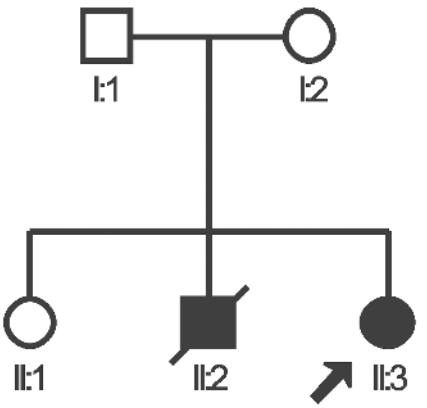


图 1 一个婴儿肥厚型心肌病的家系

Fig.1 A pedigree with infantile hypertrophic cardiomyopathy

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 经患者家属知情同意,并经中山大学伦理委员会批准后,取患者及其父母外周血 2 mL,按常规酚/氯仿/异戊醇抽提法进行。

1.2.2 基因序列分析 对患者及其父母和姐姐的 GAA 基因的全部 20 个外显子及其剪接位点进行直接序列分析。根据 NM_000152.3 序列,从 UCSC 数据库(http://genome.ucsc.edu)中获取人类 GAA 基因的 DNA 序列。以在线软件 Primer3(http://frodo.wi.mit.edu/)进行引物设计,由上海生工生物公司合成。PCR 反应条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 45 s、60 ℃退火 45 s、72 ℃延伸 2 min,共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳、回收纯化,并直接测序。测序结果用 Chromos Lite 2.1.1 软件 (Technelysium Pty 公司,澳大利亚)进行分析,所得序列与数据库中的 GAA 基因序列进行比对。变异位点的描述按人类基因组变异协会所推荐的命名法则(http://www.hgvs.org/mutnomen/)[10],即 +1 位为NM_000152.3 中转录起始密码子 ATG 中的 A。

2　结　果

患儿 GAA 基因有两个复合杂合性突变：c.1843G>A 和 c.2608C>T。其中位于第 13 外显子的 c.1843G>A 突变，使第 615 位密码子 GGG 变为 AGG，导致正常的甘氨酸(G)变为精氨酸(R)，即 p.G615R 错义突变(图 2)；位于第 18 外显子的 c.2608C>T 突变，使第 870 位密码子 CGA 变为 TGA，导致正常的精氨酸(R)变为终止密码子，即 p.R870X。其中 c.1843G>A 突变来自母亲，母亲为该突变的杂合子；c.2608C>T 突变来自父亲，父亲为该突变的杂合子。患儿未患病的姐姐，II：1，仅为 c.2608C>T 突变的杂合子，即继承了父亲的突变等位基因和 c.1843 位点母亲正常的等位基因。由于 GAA 基因位于常染色体上，该突变在此家系中的传递符合孟德尔遗传规律，遗传方式符合常染色体隐性遗传病的特征。GAA 基因的 c.1843G>A 和 c.2608C>T 复合杂合性突变导致了该患儿出现以肥厚型心肌病为特征的经典婴儿型 Pompe 病。

3　讨　论

GSD Ⅱ也称 Pompe 病，由荷兰病理学家 Pompe 于 1932 年首次报道，患者为一例心脏明显扩大的 7 个月大的婴儿，入院后很快死亡；该患者为经典婴儿型 GSD Ⅱ[11]。GSD Ⅱ为常染色体隐性遗传病，在世界范围内发病率很低，约为 1/1.4 万 ~ 1/25 万[12]；中国台湾地区发病率为 1/1.7 万[13]，而大陆地区仅见散发病例报道，尚缺乏详细的流行病学资料。

GAA 基因是 GSD Ⅱ的致病基因[3]。GAA 基因位于 17q25.3，全长 18 325 ku，其 5’非编码区有 3 种不同的剪接方式，但编码区完全相同，编码 952 个氨基酸(http://genome.ucsc.edu)。GAA 酶蛋白相对分子质量为 105 000，其前体需经过广泛的翻译后修饰，才成为成熟的酶；翻译后修饰包括天冬酰胺残基的糖基化和甘露糖残基的磷酸化，以锚定溶酶体，参与蛋白水解过程。GAA 基因突变可影响 GAA 酶的合成、修饰、转运和分泌等各环节[14]。迄今全世界已发现的引起 GSD Ⅱ的 GAA 基因突变约 420 种 (http://www.hgmd.cf.ac.uk，HGMD Professional 2013.1)。突变类型主要为错义突变及无义突变，其它突变依次是小缺失、剪接位点突变、小插入、小插入及缺失、大片段缺失。其中大部分突变在各群体中散在分布，但部分突变的分布具有群体差异性。至少有 4 种突变被认为具有建

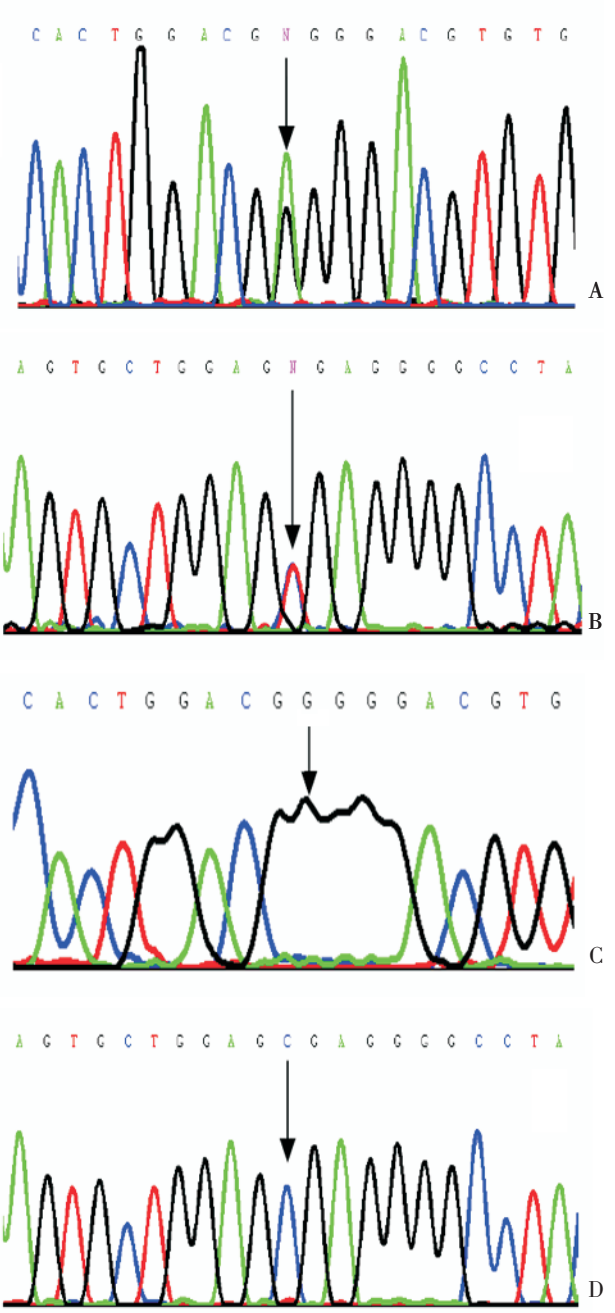


图 2　GAA 基因外显子 13 和 19 的部分测序结果

Fig.2　Partial nucleotide sequences of exon 13 and 18 of GAA gene

A：the patient and her mother’s c.1843G>A mutation；B：the patient and her father’s c.2608C>T mutation；C：the normal c.1843G sequence；D：the normal c.2608C sequence.

立者效应[12]:在非洲裔美国人患者中,最常见的突变为 c.2506C>T(p.R854X)[15];在中国台湾及其沿岸,最常见的突变为 c.1935C>A (p.D645E)[16];c.2481+102_246C+31del(18 外显子缺失)突变多见于部分高加索患者中[17];在所有高加索患者中,最常见的突变为 c.-32-13T>G 突变[18]。

GSD Ⅱ可发病于任何年龄,表现出很强的临床表型异质性。GSD Ⅱ临床表型的严重程度与残留的 GAA 酶活性呈明显的负相关。经典婴儿型的 GAA 酶活性低于正常的 1%;儿童及成年起病型残存部分 GAA 酶活性,但一般不超过正常的 30%[1-2,13]。GAA 基因突变类型与 GAA 酶活性及临床表型之间有较好的相关性[12]。如位于第 1 内含子的 c.-32-13T>G 突变,有 80% ~ 90%的转录产物第 2 外显子被错误剪接,有 10% ~ 20%的转录产物是完全正常的;故该突变的 GAA 酶活性为正常的10% ~ 20%[18]。因此携带 c.-32-13T>G 突变复合另一严重突变的个体一般发病于儿童期或成年期[13,19]。中国台湾地区婴儿型患者中最常见的突变 c.1935C>A (p.D645E),该突变等位基因的产物 GAA 酶活性严重减少[16,20]。c.1843G>A (p.G615R) 突变为台湾地区另一常见突变,c.1843G>A 复合 c.1935C >A 突变或 c.1843G >A 复合 c.1411_1414del 突变见于婴儿型患者中[20]。c.2608C>T (p.R870X)为无义突变,引起肽链的缩短,预测该突变等位基因的产物 GAA 酶活性严重减少[21-22]。目前全世界已报道的患者中仅有 2 例携带该突变(分别为西班牙裔及德国裔患者),且都合并 c.-32-13 突变,引起晚发型 GSD(发病年龄分别为 29 岁和 30 岁)。本研究中的患儿携带 c.1843G>A (p.G615R)与 c.2608C>T (p.R870X)突变,由于该两种突变均可引起 GAA 酶活性的严重减少,故该患儿的基因型与婴儿型肥厚型心肌病的临床表现相符。。当然,遗传背景及环境因素也对 GSD Ⅱ的表型有一定的修饰作用[21-22]。

Myozyme(重组 GAA 酶)替代治疗是目前治疗婴儿型 GSD Ⅱ的唯一特异性治疗方法;治疗越早,疗效越显著[23-24]。然而其治疗费用极其昂贵、部分患者存在免疫反应及神经肌肉的不可修复损害等。因此,遗传携带者的检出、症状前诊断及产前诊断(基因诊断或细胞 GAA 酶活性的测定),对于早期治疗及防止重症患儿的出生,有着重要的意义。

参 考 文 献

[1] Leslie N, Tinkle BT. Glycogen Storage Disease Type II (Pompe Disease) [M] // Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editors. GeneReviews [Internet]. 2007 [Updated 2013]: 1993-2013 Seattle (WA): University of Washington, Seattle, Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1261/

[2] van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease [J]. Lancet, 2008, 372 (9646):1342-1353.

[3] Martiniuk F, Bodkin M, Tzall S, et al. Isolation and partial characterization of the structural gene for human acid alpha glucosidase [J]. DNA Cell Biol, 1991, 10 (4):283-292.

[4] 傅立军,窦薇,周爱卿,等. 糖原累积病 II 型的临床分析和基因学检测 [J].临床儿科杂志, 2006, 24(12): 962-965.
Fu LJ, Dou W, Zhou AQ, et al. Clinical and genomic study of infant with glycogen storage disease type II [J]. J Clin Pediatr, 2006, 24(12):962-965.

[5] 仇佳晶,魏珉,张为民,等. 幼年起病的 2 例晚发型糖原贮积症Ⅱ型/Pompe 病临床和基因分析[J]. 中华儿科杂志, 2007,45(3):760-764.
Qiu JJ, Wei M, Zhang WM, et al. Clinical and molecular genetic study on two patients of the juvenile form of Pompe disease in China [J]. Clin J Pediatr, 2007, 45(10): 760-764.

[6] 曾敏慧,邱文娟,顾学范,等. 一个糖原累积病Ⅱ型家系的酸性 α-葡萄糖苷酶及其产前基因诊断[J]. 中华医学遗传学杂志,2011, 28(3): 261-265.
Zeng HM, Qiu M, Zhang WM, et al. Application of enzyme assay and gene analysis in the prenatal diagnosis for a family with glycogen storage disease type II [J]. Clin J Med Genet, 2011, 28(3): 261-265.

[7] 曾敏慧,邱文娟,顾学范,等. 1 例糖原累积病患儿酸性 α-葡萄糖苷酶基因的新无义突变 p.W738X [J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(5): 401-406.
Zeng HM, Qiu M, Gu XF, et al. A novel nonsense mutation pW738X of GAA gene identified in a Chinese patient with infantile glycogen storage disease type II [J]. J Clin Pediatr, 2011, 29(5): 401-406.

[8] 操基清,张成,刘友章,等. 糖原贮积症Ⅱ型一家系的临床特点及基因突变分析 [J]. 中华神经科杂志, 2013, 46(1): 31-36.

Cao JQ, Zhang C, Liu YZ, et al. Clinical features and genetic analysis of one pedigree of glycogen storage disease type II [J]. Clin J Neurol, 2013, 46(1): 31-36.

[9] Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, et al. 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. Circulation, 2011,124(24):e783-831.

[10] den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion [J]. Hum Mutat, 2000, 15 (1): 7-12.

[11] Pompe JC. Over idiopatische hypertropie van het hart [J]. Ned Tijdscr Geneeskd, 1932, 76(9): 304-309.

[12] Kroos M, Hoogeveen-Westerveld M, van der Ploeg A, et al. The genotype-phenotype correlation in Pompe disease [J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2012, 160 (1): 59-68.

[13] Chiang SC, Hwu WL, Lee NC, et al. Algorithm for Pompe disease newborn screening: results from the Taiwan screening program [J]. Mol Genet Metab, 2012, 106 (3):281-286. [13]

[14] Sugawara K, Saito S, Sekijima M, et al. Structural modeling of mutant alpha-glucosidases resulting in a processing/transport defect in Pompe disease [J]. J Hum Genet, 2009, 54 (6): 324-330.

[15] Becker JA, Vlach J, Raben N, et al. The African origin of the common mutation in African American patients with glycogen-storage disease type II [J]. Am J Hum Genet, 1998, 62 (4): 991-994.

[16] Shieh JJ, Lin CY. Frequent mutation in Chinese patients with infantile type of GSD II in Taiwan: evidence for a founder effect [J]. Hum Mutat, 1998, 11 (4): 306-312.

[17] Dagnino F, Stroppiano M, Regis S, et al. Evidence for a founder effect in Sicilian patients with glycogen storage disease type II [J]. Hum Hered, 2000, 50(6): 331-333.

[18] Kroos MA, Pomponio RJ, Hagemans ML, et al. Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13T->G haplotype[J]. Neurology, 2007, 68:110-115.

[19] Boerkoel CF, Exelbert R, Nicastri C, et al. Leaky splicing mutation in the acid maltase gene is associated with delayed onset of glycogenosis type II [J]. Am J Hum Genet, 1995, 56(4): 887-897.

[20] Ko TM, Hwu WL, Lin YW, et al. Molecular genetic study of Pompe disease in Chinese patients in Taiwan V [J]. Hum Mutat, 1999, 13 (5): 380-384.

[21] Palmer RE, Amartino HM, Niizawa G, et al. Pompe disease (glycogen storage disease type II) in Argentineans: clinical manifestations and identification of 9 novel mutations [J]. Neuromuscul Disord, 2007, 17 (1): 16-22.

[22] Herzog A, Hartung R, Reuser AJ, et al. A cross-sectional single-centre study on the spectrum of Pompe disease, German patients: molecular analysis of the GAA gene, manifestation and genotype-phenotype correlations [J]. Orphanet J Rare Dis, 2012, 7(1): 35-49.

[23] Kishnani PS, Corzo D, Leslie ND, et al. Early treatment with alglucosidase alpha prolongs long-term survival of infants with Pompe disease [J]. Pediatr Res, 2009, 66 (3): 329-335.

[24] Chien YH, Hwu WL, Lee NC. Pompe disease: early diagnosis and early treatment make a difference [J]. Pediatr Neonatol, 2013, 54(4): 219-227.

(编辑　徐　杰)