

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.05.012

论著·临床研究

新复合杂合突变致婴儿型低磷酸酯酶症1例及其家系分析

李登峰 蓝丹 钟京梓 Roma Kajal Dewan 谢彦舒 杨莹

(广西医科大学第一附属医院儿科, 广西南宁 530021)

[摘要] 该文对1例婴儿型低磷酸酯酶症(HPP)患儿及其家系进行临床特点分析及碱性磷酸酯酶基因(ALPL)检测。先证者,男,5个月,多发骨骼畸形:胸骨凹陷、双侧桡骨弯曲畸形、双膝外翻畸形,伴喂养困难、体重下降、发育迟滞、反复肺炎并呼衰,血碱性磷酸酶显著降低。患儿父母、姐姐、叔父、姨母(其他家系成员未能配合)中除父母及姨母的碱性磷酸酶略低,姨母可见脊柱侧弯畸形,余均无临床表型及实验室异常。患者ALPL基因检测到来源于母亲的c.228delG突变及来源于父亲的c.407G>A复合杂合突变,其姨母携带c.228delG突变。c.407G>A突变为已报道的HPP致病突变,c.228delG为新的致病性突变。低磷酸酯酶症是由ALPL基因突变所致,ALPL基因检测是有效的诊断方法。该研究拓展了ALPL基因突变谱,为HPP的基因诊断提供了理论依据。 [中国当代儿科杂志, 2017, 19(5): 539-544]

[关键词] 低磷酸酯酶症; ALPL基因; 家系; 儿童

Infantile hypophosphatasia caused by a novel compound heterozygous mutation: a case report and pedigree analysis

LI Deng-Feng, LAN Dan, ZHONG Jing-Zi, Roma Kajal Dewan, XIE Yan-Shu, YANG Ying. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Lan D, Email: land6785@163.com)

Abstract: This article reported the clinical features of one child with infantile hypophosphatasia (HPP) and his pedigree information. The proband was a 5-month-old boy with multiple skeletal dysplasia (koilosternia, bending deformity of both radii, and knock-knee deformity of both knees), feeding difficulty, reduction in body weight, developmental delay, recurrent pneumonia and respiratory failure, and a significant reduction in blood alkaline phosphatase. Among his parents, sister, uncle, and aunt (other family members did not cooperate with us in the examination), his parents and aunt had a slight reduction in alkaline phosphatase and his aunt had scoliosis; there were no other clinical phenotypes or abnormal laboratory testing results. His ALPL gene mutation came from c.228delG mutation in his mother and c.407G>A compound heterozygous mutation in his father. His aunt carried c.228delG mutation. The c.407G>A mutation had been reported as the pathogenic mutation of HPP, and c.228delG mutation was a novel pathogenic mutation. Hypophosphatasia is caused by ALPL gene mutation, and ALPL gene detection is an effective diagnostic method. This study expands the mutation spectrum of ALPL gene and provides a theoretical basis for genetic diagnosis of this disease. [Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(5): 539-544]

Key words: Hypophosphatasia; ALPL gene; Pedigree; Child

低磷酸酯酶症(hypophosphatasia, HPP, MIM146300, 241500, 241510)是一种以骨矿化不足、血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)含量及活性降低、骨特异性碱性磷酸酶(bone-

specific alkaline phosphatase, BALP)活性丧失为主要临床特征的遗传代谢性骨病^[1]。其遗传方式不确定,轻型的遗传方式可为常染色体隐性或显性,重型的多为常染色体隐性遗传。本病系罕见病,

[收稿日期] 2016-11-11; [接受日期] 2017-01-25

[基金项目] 广西医科大学第一附属医院科研启动基金资助项目(No.2010001)。

[作者简介] 李登峰,男,硕士研究生,医师。

[通信作者] 蓝丹,女,主任医师,教授。

欧洲发病率约为1:300000, 美国报道的发病率为1:100000^[2]。根据发病年龄和骨骼病变程度, HPP分为6型: 先天致死型(围生期致死)、婴儿型、儿童型、成年型、齿型及假性低磷酸酯酶症^[1-3]。各型之间临床表现可有交叉。婴儿型多在1~6个月发病, 多因体重不增、生长落后、颅骨软化、肋骨串珠等就诊, 易被误诊为佝偻病^[4]。本研究通过对1例婴儿型HPP患儿及其家系的临床特点、碱性磷酸酯酶基因(alkaline phosphatase liver/bone/kidney, ALPL)测序结果进行分析, 阐述该病的遗传学发病机制, 以期提高临床医生对本病的认识, 加强对本病的遗传咨询和产前诊断, 降低此类患儿的出生率。

1 资料与方法

1.1 研究对象

患儿, 男, 5个月。因体重不增4月余, 气促、反应差5d入院。既往因肺炎住院4次, 因呼吸衰竭多次抢救治疗。患儿为第二胎第二产, 足月顺产出生, 出生体重3100g, 出生时无窒息史。人工喂养, 新生儿晚期即有喂养困难, 体重不增并逐渐下降。至今不会抬头、翻身。入院查体: 体重2590g, 身长56cm。体温36.0℃, 心率147次/min, 呼吸59次/min。皮肤干皱, 皮下脂肪消失, 前囟5×5cm, 骨缝宽, 枕部触诊乒乓球感。双耳位偏低, 下颌小, 呼吸急促、见吸气三凹征, 胸骨凹陷, 可见肋骨串珠, 双侧桡骨弯曲畸形, 双膝外翻畸形。母孕期体健, 否认毒物、放射线接触史。否认近亲婚配及家族遗传病史。辅助检查: 血常规WBC 13.1×10⁹/L, 余项正常; 肝功能: 谷丙转氨酶86U/L(参考值9~50U/L)、谷草转氨酶54U/L(参考值15~45U/L), 余项正常; 肌酸激酶(CK)正常; 7次血钙波动在3.19~4.40mmol/L(参考值2.08~2.60mmol/L); 5次碱性磷酸酶波动在9~17mmol/L(参考值40~750mmol/L); 1,25-二羟基维生素D₃(VitD₃)正常; 甲状旁腺素3.5pg/mL(参考值: 6~80pg/mL); 降钙素22.1pg/mL(参考值: 0~18pg/mL)。血串联质谱分析未见异常。尿气相质谱示4-羟基苯乳酸偏高。胸部X线片:

支气管肺炎。左腕关节正位片: 骨矿化不良, 左侧尺、桡骨远端干骺端先期钙化带骨小梁模糊, 并可见干骺端不规则骨质缺损, 未见骨化中心(见图1)。胸腰椎正位X线片: 各椎体骨质疏松、椎间隙窄、肋骨串珠及骨质密度普遍降低。

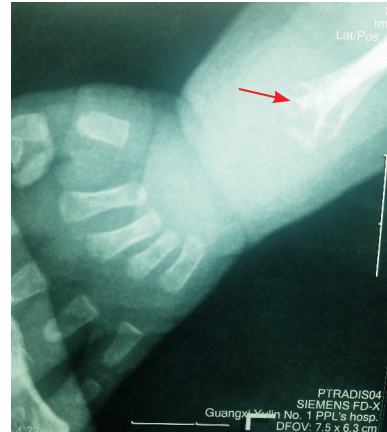


图1 患儿5月龄左腕正位片 骨矿化不良, 未见骨化中心; 左侧尺、桡骨远端干骺端先期钙化带骨小梁模糊, 并可见干骺端不规则骨质缺损(如箭头所示)。

1.2 家系临床资料收集

收集先证者家系3代共计10人的病史资料, 以及患儿及其父母、叔父、姨母、姐姐(其他家系成员未能配合)的VitD₃、PTH、降钙素、ALP、血钙等检查结果。

1.3 目的基因扩增

获得医院医学伦理委员会批准及家属知情同意后采集先证者外周血5mL及其父母、叔父、姨母、姐姐(其他家系成员未能配合)的外周血各2mL。使用QiagenFlexiGene DNA Kit提取基因组DNA。http://genome.ucsc.edu/ 检索野生型ALPL基因序列(NM-000478)。使用引物设计软件Primer 5.0进行引物设计(见表1), 经NCBI Blast验证所有引物的特异性。反应体系(总体积25μL): DNA样品1μL, 上、下游引物各0.5μL, 2×Taq PCR superMix 12.5μL, ddH₂O 10.5μL。PCR扩增, 预变性94℃ 5min, 变性94℃ 15s, 退火60℃ 30s, 72℃延伸30s, 35个循环后予末次延伸72℃ 5min。采用2%琼脂糖凝胶电泳检验PCR产物, 溴乙锭染色。

表1 ALPL 基因编码区引物序列

外显子	引物序列 (5' to 3')
1	Forward primer AAGCCAGATATGTTGACAGA Reverse primer GCCATTAAGTTCAACCA
2	Forward primer ATGTCATCTCTGGGCTCCAGGGA Reverse primer CAGCTTTTAAATACTTTGG
3	Forward primer CTGAGATAGGAGGCTATCCT Reverse primer GGTCTCCTAGCTAGTGTCTG
4	Forward primer AGGAGCACGAGAGACTGAGG Reverse primer CTGGCTGCTGCATGTTGAG
5	Forward primer CCTCACGCCCCAGTCCCCAT Reverse primer GCTGGCCCTGCTCCCCACT
6	Forward primer CCAAACCCGCCCTCCTGCG Reverse primer AATTCATGCCAGCCTGGCCTGAGCCTC
7	Forward primer CAGGAGTCCAGGTTCCAAGC Reverse primer AGGCCACCTATGCAGCCACAT
8	Forward primer AGGCCTCAGATTTTGATAGC Reverse primer GGCTTTGTCGCCAGGTGTTGG
9	Forward primer ATTCCTGAGACACCCACG Reverse primer CAGGGCCGTGTTCCAGCAG
10	Forward primer TCCCTCCTCCCTCACCGAGG Reverse primer TTGCTGGCTCTCCACCCAC
11	Forward primer TGGGGGCTGGGACTGTACT Reverse primer CCCTGTCCCCTCCCAGCCCT
12	Forward primer GGGCATGTGACTCCATCTTTCTCTG Reverse primer GCTGCCGTGTGGGAAGTTGGCATC

1.4 Sanger 测序验证及分析

PCR 产物送北京康旭医学研究所行基因测序，对先证者及其家系成员所发现的 ALPL 基因突变位点进行 Sanger 测序验证。Swiss-model 在线软件预测，并用 Molpobity 软件评价分析组织非特异性碱性磷酸酶 (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNAP/TNSALP) 蛋白的三级结构模型。检索 PubMed、HGMD、ESP6500 及 SESEP 实验室 ALPL 基因数据库，并结合相关文献行家系分析。

2 结果

2.1 家系的临床表现及实验室检查结果

该家系 (图 2) 三代共计 10 人，男女各 5 人，

除先证者及其姨母有骨骼畸形 (查体及脊柱 X 线见脊柱侧弯畸形)，余均无异常临床表型。家系中收集了 VitD₃、PTH、降钙素、ALP、血钙等结果的成员中，患儿血钙增高、ALP 明显降低，1,25-二羟基维生素 D₃、PTH 均正常；其父母、姨母的碱性磷酸酶略低，1,25-二羟基维生素 D₃、血钙、PTH 正常；患儿叔父、姐姐的血钙、ALP、1,25-二羟基维生素 D₃、PTH 均正常。

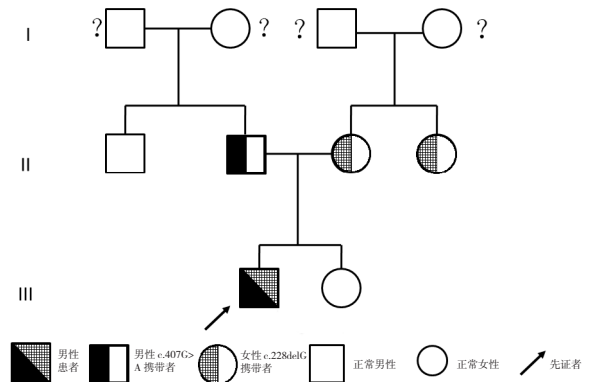


图2 患儿家系图 患者父亲为 c.407G>A 突变携带者，母亲及姨母为 c.228delG 突变携带者。? 示未行基因检测。

2.2 患儿及家系基因测序结果

该家系中患儿及其父母、叔父、姨母、姐姐 (其他家系成员未能配合) 进行了 ALPL 基因测序。患儿 ALPL 基因存在复合杂合突变，分别位于 chr1: 21887636 及 chr1: 21889712，引起 c.228delG 和 c.407G>A 两处突变；患儿父亲携带 c.407G>A 突变；患儿母亲及姨母携带 c.228delG 突变；患儿姐姐、叔父的两突变位点均正常。见图 3。

2.3 TNAP 蛋白三级结构预测

用 Swiss-model 在线软件分别构建野生型及突变型 TNAP 蛋白三级结构模型，预测 c.228delG 及 c.407G>A 突变对 TNAP 蛋白结构的影响，并用 Molpobity 软件评价分析 TNAP 蛋白三级结构模型。结果显示：两突变致使 TNAP 蛋白 A 链结构发生改变，c.228delG 影响一小段肽段，c.407G>A 导致一个氨基酸位点改变，见图 4。

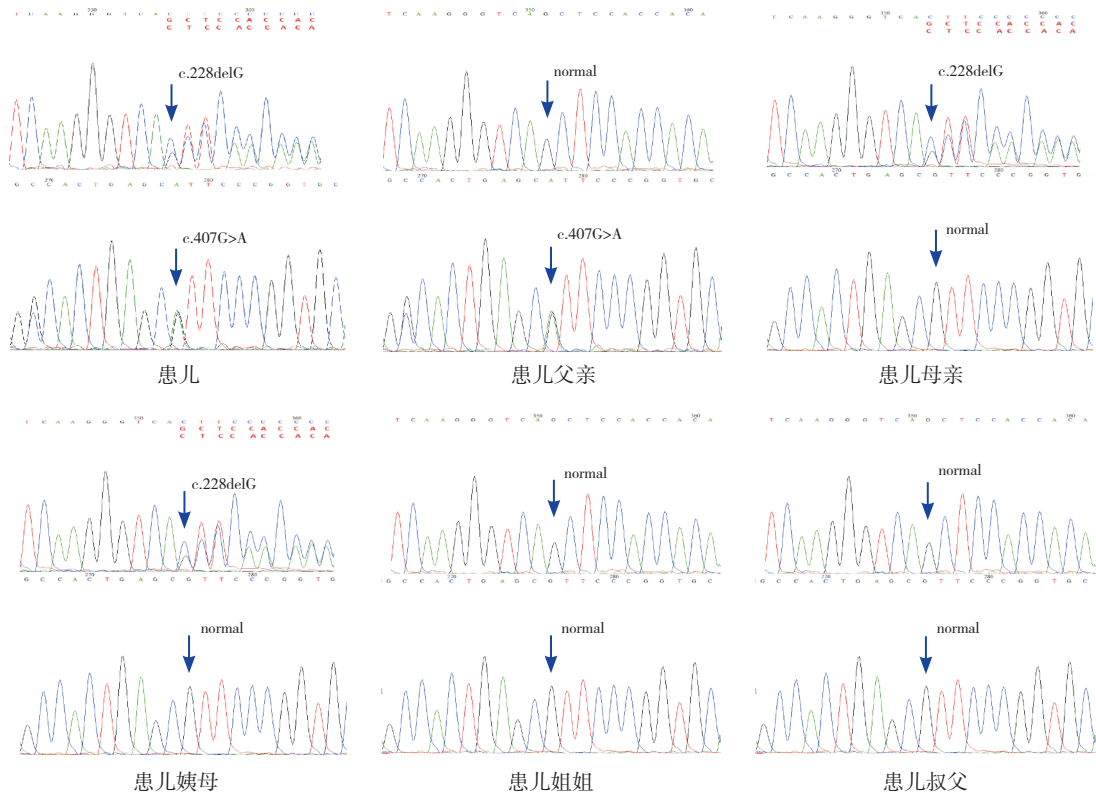


图3 患儿家系ALPL基因测序结果 患儿ALPL基因存在c.228delG(A)和c.407G>A(B)的复合突变;患儿父亲为c.407G>A突变携带者;母亲及姨母为c.228delG突变携带者;患儿姐姐、叔父的两突变位点均正常。突变位点如箭头所示。

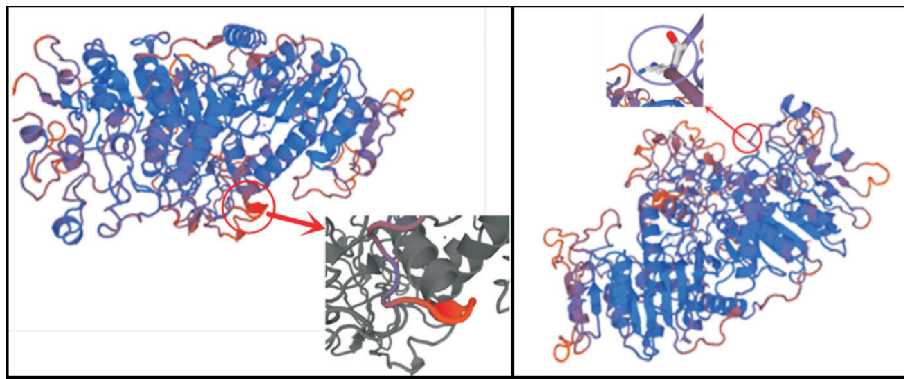


图4 TNAP蛋白质结构飘带图 红色圈内为突变影响区域。左图右下角的灰色小图为受影响区域放大图,其涂色段为c.228delG突变影响的肽段;右图左上角小图为突变影响位点的放大图,其紫色圈内为c.407G>A突变的氨基酸突变位点。

3 讨论

HPP在1948年由Rathbun首次报道,又称Rathbun综合症^[5],系因ALPL基因(又称TNS-ALP基因,编号:249;MIM-171760)突变所致。ALPL基因定位于染色体1p36-34,编码TNAP。TNAP在软骨细胞、成骨细胞、成牙本质细胞以及这些细胞分泌的基质小泡中都有表达,TNAP水解细胞外矿化抑制物无机焦磷酸盐(pyrophosphate,

PPi),从而启动并促进骨组织矿化^[1]。TNAP蛋白有5个重要的结构域,包括激活点、激活谷、钙结合位点、同型二聚体区及冠区,当基因突变使这些重要的结构区域发生改变时,组织非特异性碱性磷酸酶活性受到严重影响^[6],进而影响骨骼矿化而致病。

HPP分为先天致死型(围生期致死型)、婴儿型、儿童型、成年型、齿型、假性低磷酸酯酶症6型。先天致死型最严重,多因死胎或出生后

呼吸衰竭死亡^[7]。婴儿型多在1~6个月发病,1岁左右死亡,常表现为体重不增、生长落后及类佝偻病,继发高钙血症者可致肾结石、肾损害,以及食欲差、呕吐、便秘、多饮、多尿、发热等^[4,8]。儿童型在2岁后发病,多因牙列早脱就诊,ALP显著减低,并且与疾病严重程度相关。成年型多中年以后发病,少数患者有关节、肌腱、椎间韧带钙化。牙型仅有牙冠矿化受阻表现如牙齿生长异常及恒牙早脱^[2]。假性低磷酸酯酶症极罕见,临床表现及X线特点与婴儿型、儿童型、成年型相同,但ALP正常。国内报道的婴儿型HPP,除麻宏伟等报道的1例出生胎龄28周早产儿7月龄发病外,均于1~6月龄发病,均有反复的呼吸道感染、呼吸衰竭、喂养困难、营养不良等表现^[9-14]。本研究先证者5月龄,新生儿晚期即出现喂养困难、体重不增并逐渐下降,具有骨矿化不全、骨骼畸形以及ALP水平降低、血钙增高等表现,符合婴儿型HPP的临床特点。

HPP临床表现的异质性及影像学表现的多样性不影响X线作为HPP临床诊断的重要依据^[15]。几乎所有HPP患者的X线均可见骨矿化不足、骨质疏松、类佝偻病表现。本例患儿左腕X有骨矿化不良,骨化中心消失,干骺端先期钙化带骨小梁模糊等表现;脊柱X线显示各椎体骨质疏松、肋骨串珠、骨质密度普遍降低,符合HPP的X线特点。

ALPL基因突变是诊断HPP的金标准。目前国内已报道的婴儿型HPP患儿的突变位点包括ALPL基因第1、5、7、9、12外显子^[10,12-13]。国外HPP基因检测开展较早,报道的ALPL基因突变位点达332种,以点突变为主,大片段缺失仅9例。本研究使用二代基因测序筛查出可疑致病突变点,并用Sanger测序法验证,检测到先证者ALPL基因c.228delG和c.407G>A复合杂合突变。

c.228delG位于第4外显子,引起编码区第228号核苷酸G缺失,导致从第76号氨基酸谷氨酰胺(Gln)开始的氨基酸合成改变,并在改变后的第46个氨基酸即第112号氨基酸处终止(p.Gln76HisfsTer46),故为移码突变;该突变来源于其母,其姨母亦有此突变。c.407G>A位于第5外显子,即编码区第407号核苷酸由G变为A,导致第136号氨基酸由精氨酸(Arg)转变

为组氨酸(His)(p.Arg136His);该突变来源于其父亲。患儿姐姐、叔父未见上述两种突变,且无临床症状。检索PubMed、HGMD、ESP6500及SESEP实验室的ALPL基因数据库,发现c.407G>A的致病性已有文献报道,与HPP相关^[16];SIFT、MutationTaster及PolyPhen-2软件预测也提示c.407G>A导致p.Arg136His,136号氨基酸精氨酸参与蛋白质残基侧链间的相互作用。c.228delG的致病性尚未见报道。经检索1000Genomes、dbSNP数据库,该变异也不属于多态性变化,在人群中发生的频率极低。SIFT、MutationTaster及PolyPhen-2蛋白质功能预测软件提示,c.228delG导致从第76号氨基酸谷氨酰胺(Gln)开始的氨基酸合成发生改变,并在改变后的第46个氨基酸即第112号氨基酸处终止;由于110号氨基酸所处位置是酶激活位点及金属离子结合位点^[17],推测突变可能影响酶与底物的结合以及蛋白功能。本研究先证者遗传了来自父亲的c.407G>A及来自母亲的c.228delG复合杂合突变,出现典型的临床症状;其父、母亲及姨母分别为c.407G>A、c.228delG突变携带者,无临床症状,故两突变在本家系中的遗传方式可能为常染色体隐性遗传,先证者同胞中基因型正常的概率为25%,如果该家系中患儿父母再次孕育,应当寻求适当的遗传学帮助,并进行产前诊断。

部分轻症HPP可自愈,病情较重者需采取多学科综合管理。血钙增高程度较重者可使用鲑降钙素治疗,并注意骨骼脱矿化所致的骨缺损及骨折的矫形管理,以及营养不良者的饮食管理和抗炎止痛药的应用。美国食品药品监督管理局于2013年批准了靶标酶置换药Asfotase Alfa作为先天致死型、婴儿型、儿童型HPP的治疗用药。Scott等^[18]对11例3岁以下低磷酸酯酶症患儿予以24周的Asfotase Alfa治疗后,患者骨折愈合、畸形减轻、骨质重塑;并明显改善了因严重呼吸道感染所致呼吸衰竭患儿的呼吸功能;患儿的大运动、精细运动,以及认知发育、肌力均得到改善,并观察到追赶性生长。

综上,本研究通过1例婴儿型低磷酸酯酶症患儿的家系分析,总结了HPP的临床特点,发现了ALPL基因的一个新致病突变,对于提高临床医生对HPP的认识和诊断能力,以及加强对本病的

遗传咨询和产前诊断、降低 HPP 患儿的出生率有一定的意义。

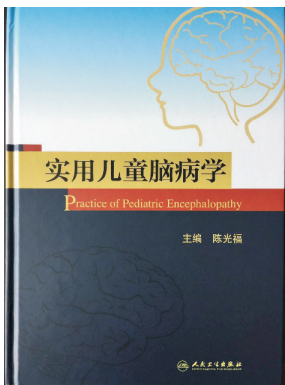
[参 考 文 献]

- [1] Mumm S, Jones J, Finnegan P, et al. Hypophosphatasia: molecular diagnosis of Rathbun's original case[J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(9): 1724-1727.
- [2] Mornet E, Yvard A, Taillandier A, et al. A molecular-based estimation of the prevalence of hypophosphatasia in the European population[J]. *Ann Hum Genet*, 2011, 75(3): 439-445.
- [3] Di Mauro S, Manes T, Hessle L, et al. Kinetic characterization of hypophosphatasia mutations with physiological substrates[J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(8): 1383-1391.
- [4] 麻宏伟. 表现为类佝偻病的遗传性疾病[J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(11): 923-927.
- [5] Rathbun JC. Hypophosphatasia; a new developmental anomaly[J]. *Am J Dis Child*, 1948, 75(6): 822-831.
- [6] Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, et al. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(33): 31171-31178.
- [7] Jaruratanasirikul S, Chanvitan P. Hypophosphatasia: the importance of alkaline phosphatase in bone mineralization[J]. *J Med Assoc Thai*, 1999, 82(12): 1268-1272.
- [8] 张碧丽, 杨瑄, 黄乐, 等. 喂养困难生长发育落后高钙血症和低碱性磷酸酶血症[J]. *中国当代儿科杂志*, 2001, (6): 723-725.
- [9] 段泓宇, 王一斌. 婴儿型碱性磷酸酶过少症 1 例报告[J]. *临床儿科杂志*, 2010, 28(12): 1112.
- [10] 郑雯洁, 杨宇真, 陈晓英, 等. 婴儿型低磷酸酶血症 1 例报告及文献复习[J]. *临床儿科杂志*, 2009, 27(2): 163-164.
- [11] 麻宏伟, 马健. 婴儿型低碱性磷酸酶血症 1 例[J]. *中国循证儿科杂志*, 2008, 3(4): 318-319.
- [12] 刘海娟, 李梅, 邢小平, 等. 低磷酸酶血症一家系组织非特异性碱性磷酸酶 (TNSALP) 基因突变分析[J]. *基础医学与临床*, 2011, 31(3): 263-267.
- [13] 赵真, 夏维波, 邢小平, 等. 婴儿型低磷酸酶血症组织非特异性碱性磷酸酶基因突变检测[J]. *中华内科杂志*, 2013, 52(10): 824-828.
- [14] 王崇伟, 谢丽尔. 婴儿型低磷酸酯酶症 1 例[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2011, 26(20): 1611-1612.
- [15] Berkseth KE, Tebben PJ, Drake MT, et al. Clinical spectrum of hypophosphatasia diagnosed in adults[J]. *Bone*, 2013, 54(1): 21-27.
- [16] Taillandier A, Zurutuza L, Muller F, et al. Characterization of eleven novel mutations (M45L, R119H, 544delG, G145V, H154Y, C184Y, D289V, 862+5A, 1172delC, R411X, E459K) in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) gene in patients with severe hypophosphatasia. Mutations in brief no. 217. Online[J]. *Hum Mutat*, 1999, 13(2): 171-172.
- [17] Le Du MH, Millan JL. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(51): 49808-49814.
- [18] Scott LJ. Asfotase Alfa: A review in paediatric-onset hypophosphatasia[J]. *Drugs*, 2016, 76(2): 255-262.

(本文编辑: 俞燕)

· 消息 ·

《实用儿童脑病学》新书介绍



儿童脑损伤和脑病是危害儿童健康成长和人口素质的主要疾病,严重影响儿童社会交往能力、适应能力、注意力和学习能力,甚至导致癫痫、视听障碍、语言障碍、智力障碍、脑性瘫痪、植物状态等神经伤残。

由陈光福教授主编、人民卫生出版社出版的《实用儿童脑病学》,全书共 30 章,139 万字,460 多幅图(部分彩图),涉及儿童神经发育、神经解剖、神经影像学检查、脑功能检查、神经学检查评估、神经保护治疗、神经免疫治疗、神经修复治疗与康复治疗,以及各种儿童脑疾病的病因、发病机制、病理、临床表现、诊断方法与治疗进展等内容。

本书编委为从事儿童神经发育基础、神经影像、神经电生理、神经内科、神经外科、儿童康复和新生儿等专业的专家,专家们历时 2 年精心撰写,反复修改、补充,力求反映本领域近 5 年国内外的最新研究进展、诊治指南和专家共识,以及作者的临床经验与研究成果,并对新的探索性治疗应用前景进行了述评和展望。全书图文并茂、条理清晰、内容丰富、可读性强,是一部具有先进性、科学性和实用性的专业参考书。

有意购买者请联系王波医师,电话:13823108103,邮箱:66286432@qq.com。