

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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[1-3]</sup>。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<sup>[4]</sup>。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 13.1×10<sup>9</sup>/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D<sub>3</sub>(VitD<sub>3</sub>)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。

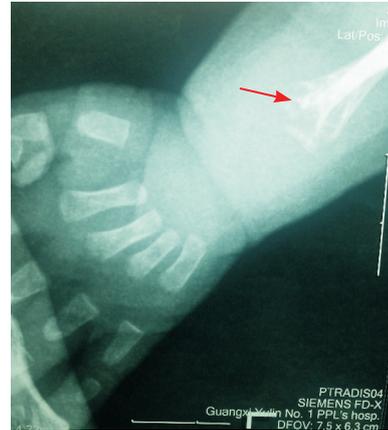


图1 患儿5月龄左腕正位片 骨矿化不良, 未见骨化中心; 左侧尺、桡骨远端干骺端先期钙化带骨小梁模糊, 并可见干骺端不规则骨质缺损(如箭头所示)。

### 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VitD<sub>3</sub>、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, ddH<sub>2</sub>O 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 CTGGCTGCTGTCATGTTGAG
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 TGGGGGTGGGACTGTACT 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 VitD<sub>3</sub>、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 D<sub>3</sub>、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 D<sub>3</sub>、血钙、PTH 正常；患儿叔父、姐姐的血钙、ALP、1,25-二羟基维生素 D<sub>3</sub>、PTH 均正常。

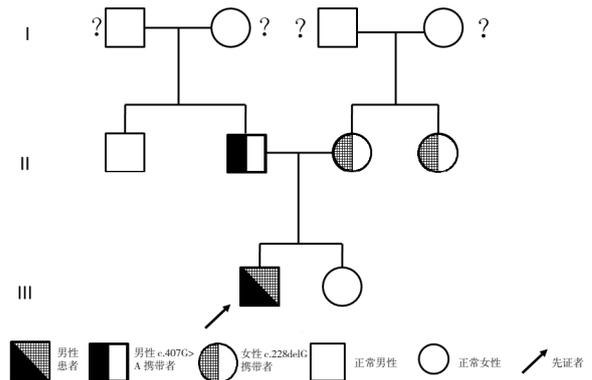


图 2 患儿家系图 患者父亲为 c.407G>A 突变携带者，母亲及姨母为 c.228delG 突变携带者。? 示未行基因检测。

### 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。

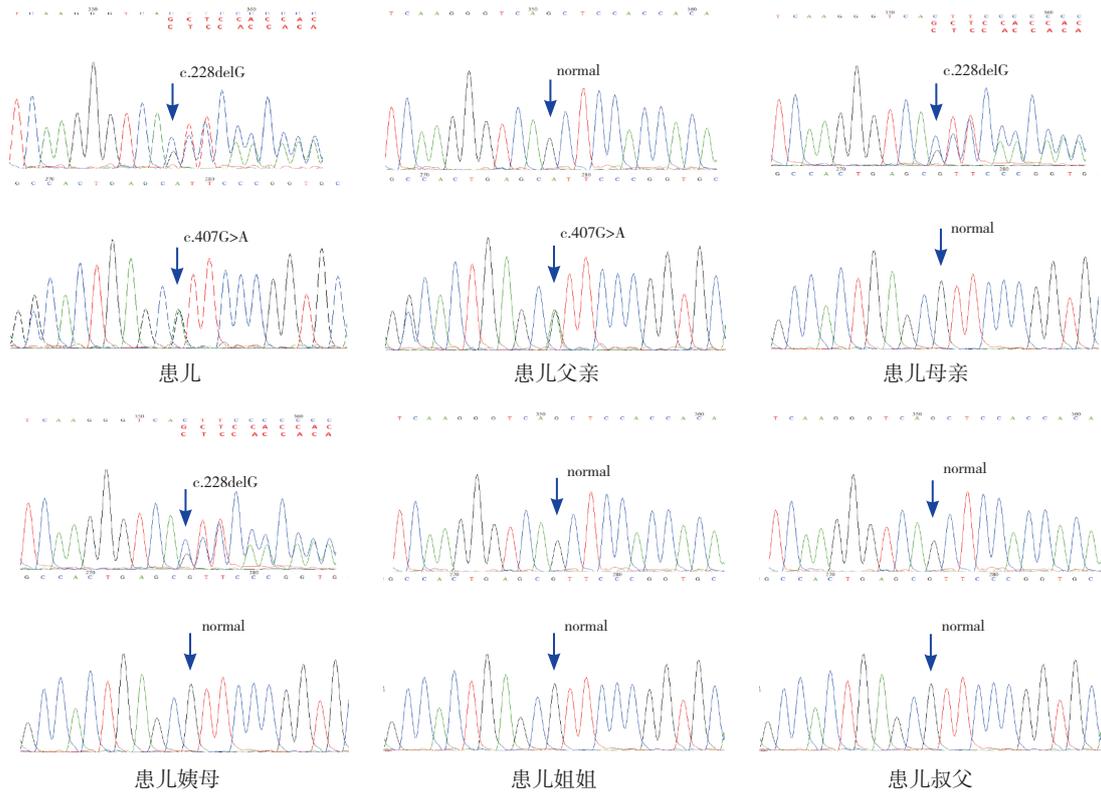


图3 患儿家系 ALPL 基因测序结果 患儿 ALPL 基因存在 c.228delG (A) 和 c.407G>A(B) 的复合突变; 患儿父亲为 c.407G>A 突变携带者; 母亲及姨母为 c.228delG 突变携带者; 患儿姐姐、叔父的两突变位点均正常。突变位点如箭头所示。

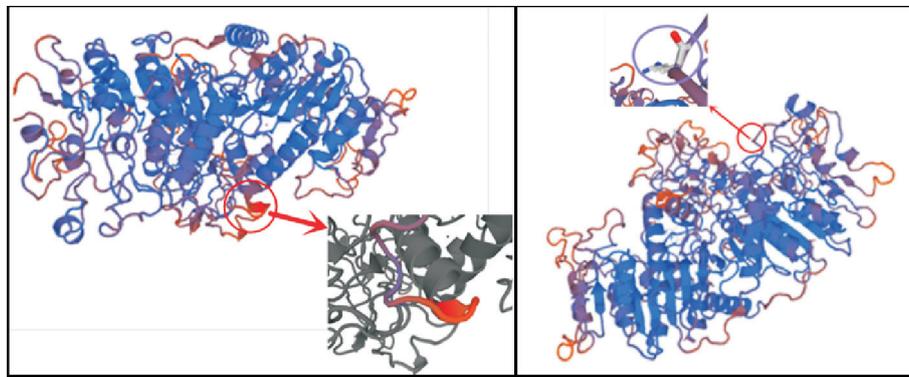


图4 TNAP 蛋白质结构飘带图 红色圈内为突变影响区域。左图右下角的灰色小图为受影响区域放大图, 其涂色段为 c.228delG 突变影响的肽段; 右图左上角小图为突变影响位点的放大图, 其紫色圈内为 c.407G>A 突变的氨基酸突变位点。

### 3 讨论

HPP 在 1948 年由 Rathbun 首次报道, 又称 Rathbun 综合症<sup>[5]</sup>, 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[6]</sup>, 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<sup>[7]</sup>。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<sup>[4,8]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[9-14]</sup>。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<sup>[15]</sup>。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<sup>[10,12-13]</sup>。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<sup>[16]</sup>;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<sup>[17]</sup>,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<sup>[18]</sup>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。

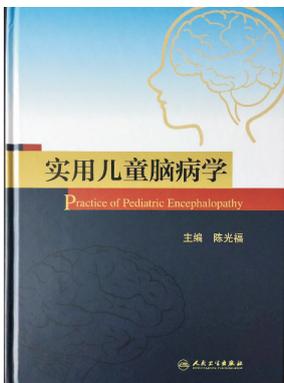
[参 考 文 献]

- [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。