

论著·临床研究

脑肌酸缺乏综合征 I 型两家系临床特征及 SLC6A8 基因变异分析

孙卫华¹ 庄丹燕² 王瑶¹ 肖非凡¹ 吴梦圆¹ 董欣然¹
张萍¹ 王慧君¹ 周文浩^{1,3} 吴冰冰¹

(1. 复旦大学附属儿科医院儿科研究所, 上海 201102; 2. 宁波市妇女儿童医院检验科, 浙江 宁波 315010; 3. 复旦大学儿童发育与疾病转化医学研究中心, 上海 201102)

[摘要] 该文报道 2 例由 SLC6A8 基因变异导致的脑肌酸缺乏综合征 I 型 (CCDS1) 的临床及遗传学特征。2 例患儿均为男性, 年龄分别为 2 岁 10 个月、8 岁 11 个月, 主要表现为精神运动发育落后、抽搐。均有一哥哥出现类似症状, 患儿 1 母亲轻度智力低下。经家系基因分析发现 X 染色体上 SLC6A8 基因分别存在 c.200G>A(p.Gly67Asp) 和 c.626_627delCT(p.Pro209Argfs*87) 变异, 变异均来自患儿母亲。这 2 个变异分别评级为可能致病性变异、致病性变异, 既往未见文献报道。该研究拓展了 SLC6A8 基因突变谱, 对精神运动发育落后、癫痫的男性患者的诊断具有重要意义。
[中国当代儿科杂志, 2020, 22(5): 482-487]

[关键词] 脑肌酸缺乏综合征 I 型; SLC6A8 基因; 精神运动发育落后; 癫痫; 儿童

Clinical features and SLC6A8 gene mutations of cerebral creatine deficiency syndrome I: an analysis of two families

SUN Wei-Hua, ZHUANG Dan-Yan, WANG Yao, XIAO Fei-Fan, WU Meng-Yuan, DONG Xin-Ran, ZHANG Ping, WANG Hui-Jun, ZHOU Wen-Hao, WU Bing-Bing. Pediatric Research Institute, Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 201102, China (Wu B-B, Email: bingbingwu2010@163.com)

Abstract: This article reports the clinical and genetic features of two cases of cerebral creatine deficiency syndrome I (CCDS1) caused by SLC6A8 gene mutations. Both children were boys. Boy 1 (aged 2 years and 10 months) and Boy 2 (aged 8 years and 11 months) had the clinical manifestations of delayed mental and motor development, and convulsion. Their older brothers had the same symptoms. The mother of the boy 1 had mild intellectual disability. The genetic analysis showed two novel homozygous mutations, c.200G>A(p.Gly67Asp) and c.626_627delCT(p.Pro209Argfs*87), in the SLC6A8 gene on the X chromosome, both of which came from their mothers. These two novel mutations were rated as possible pathogenic mutations and were not reported in the literature before. This study expands the mutation spectrum of the SLC6A8 gene and has great significance in the diagnosis of boys with delayed development, and epilepsy.
[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(5): 482-487]

Key words: Cerebral creatine deficiency syndrome I; SLC6A8 gene; Delayed development; Epilepsy; Child

脑肌酸缺乏综合征 I 型 (cerebral creatine deficiency syndrome I, CCDS1, MIM 300036), 也称为肌酸转运载体缺乏症 (creatine transporter deficiency, CTD), 是由 SLC6A8 基因突变导致脑肌酸转运载体功能缺陷的一种 X 连锁隐性遗传病。所有脑肌酸缺乏综合征 (cerebral creatine deficiency

syndrome, CCDS) 中, CCDS1 患病率最高, 治疗难度最大, 该病主要为男性受累, 临床表现为中重度智力障碍、语言发育迟缓、癫痫、多动、行为问题如注意力缺陷或孤独症谱系障碍等, 女性携带者可表现正常或轻度的神经系统症状^[1]。自 2001 年报道该病以来^[2-3], 国外共报道 600 余例,

[收稿日期] 2020-02-04; [接受日期] 2020-03-30

[作者简介] 孙卫华, 女, 硕士, 主管技师。

[通信作者] 吴冰冰, 女, 博士, 助理研究员。Email: bingbingwu2010@163.com。

而国内仅有2例报道^[4-5]。本研究继续报道2例因精神运动发育迟滞、抽搐就诊的男性患儿,根据其临床特点和基因分析结果,确诊为CCDS1。通过总结上述2例患儿的临床特征、实验室检查和基因分析结果,综合此病在国外发病情况及近几年取得的治疗和研究进展,希望进一步提高临床医师对CCDS1的认识,为该病的早发现、早诊断、早治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

患儿1,男,2岁10个月。因精神运动发育迟滞2年余,无热抽搐3d就诊。患儿自幼发育迟缓,6月龄抬头,9月龄独坐,16月龄独站,2岁独走。言语语言障碍,一直不会喊爸爸妈妈,只会无意识喊叫。2岁6个月时Gesell发育量表结果为适应性50分,大运动65分,精细动作59分,语言37分,社交40分,为中度到重度发育落后。3d前患儿出现无热抽搐,一天发作1~2次,表现为上肢抖动,双眼上翻,四肢痉挛,持续1~2min,缓解后入睡。为求进一步诊疗来我院。出生史无异常。既往有2次热性惊厥史,未予处理。家族中有一哥哥具有类似症状,未予重视,9岁时意外去世;母亲有轻度智力低下、癫痫病史;父亲体健。入院体检:神志清楚,追光追物可,眼神迟钝,与人交流差,走路和跳可,不会讲话,只会喊叫。呼吸平稳,四肢肌力正常,听力正常。辅助检查:血肌酐 $16\mu\text{mol/L}$ (参考值 $21\sim 44\mu\text{mol/L}$)。尿气相质谱分析显示2-酮戊二酸略高。血串联质谱显示胍基乙酸 $3.62\mu\text{mol/L}$ (参考值 $0.20\sim 3.23\mu\text{mol/L}$)。血尿常规、铜蓝蛋白、微量元素、血糖、血氨、肌酸、肝功能均正常。头颅MRI提示左侧颞极局部脑外间隙较对侧宽,松果体微小囊肿。脑电图显示两侧有尖波、尖慢波阵发,两后头部明显, δ 、 θ 功率增高。

患儿2,男,8岁11个月。因精神运动发育迟滞8年余,无热抽搐5年余就诊。患儿自幼发育落后,4月龄抬头,8月龄独坐,12月龄独站,2岁独走。至今仍只能说1~2字的词汇,不能讲完整句子。3岁时出现无热抽搐,表现为牙关紧闭,上肢抖动,双眼凝视,无呕吐,持续1min左右

自行缓解。于当地医院诊断为“癫痫”,予“丙戊酸钠口服液”治疗后无发作。6岁时Gesell量表结果为适应性58分,大运动66分,精细动作64分,语言55分,社交61分,为轻度发育落后。出生史无异常。家族中有一哥哥16岁,症状相似,口服“丙戊酸钠口服液”治疗后无发作。两兄弟目前精神运动仍明显迟滞。妈妈和姐姐无明显症状,父亲体健。入院体检:神志清楚,双手通贯掌,四肢肌力正常,听力正常。追光追物可,眼神及与人交流欠佳,走路和跳均可,不能表达完整句子。辅助检查:血肌酐 $36\mu\text{mol/L}$ (参考值 $44\sim 133\mu\text{mol/L}$)。血尿常规、微量元素、血糖、血氨、肝功能均正常。血尿质谱分析未做。头颅MRI未见明显异常。3岁时脑电图显示左侧枕区有些尖波和尖慢波,脑电功率 δ 、 θ 增高。

1.2 遗传学检测

征得患儿父母知情同意后行基因检测。采集患儿及父母外周静脉血2mL,EDTA抗凝,提取基因组DNA,患儿1进行家系全外显子组(whole exome sequencing, WES)测序,患儿2进行先证者临床外显子组Panel检测(共2742个基因)。分别使用Agilent SureSelect Human All Exon V5试剂盒(WES)和Agilent ClearSeq Inherited Disease试剂盒,进行捕获建库,Illumina HiSeq平台测序。WES目标区域平均测序深度 $\geq 90X$,其中目标序列的95%测序深度达20X以上。Panel目标区域平均测序深度180~200X,其中目标序列的98%深度达20X以上。测序片段通过BWA与UCSC hg19数据库(www.genome.ucsc.edu)进行对比,对目标区域覆盖度和测序质量进行评估,严格筛选标准,对变异文件进一步分析与过滤。测序实验由上海明码生物科技有限公司完成。我院生物信息技术人员依据测序数据,采用变异软件VEP进行注释,最终与以下3个数据库对比,包括ClinVar(www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar)、OMIM(www.omim.org)和HGMD(www.hgmd.cf.ac.uk/ac)数据库。用于排除正常人群较高频率变异的数据库,包括千人基因组测序(www.1000genomes.org)、ExAC数据库(exac.broadinstitute.org)和ESP数据库(evs.gs.washington.edu/EVS/)。根据WES和外显子结果行Sanger验证。序列参照GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_005629.4)参考序列(SLC6A8,

NM_005629.4)。

1.3 生物信息学分析

参阅美国医学遗传学与基因组学学会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 序列变异解读标准和指南进行致病性分析^[6]。分析 SLC6A8 蛋白晶体结构模型 (PDB ID: 4xph.1.A)，利用 Swiss-PDB viewer 评价 2 变异对蛋白质三维空间结构的影响，采用 PyMOL 2.1 软件进行预测。

1.4 文献回顾

以“脑肌酸缺乏”为关键词检索中国知网、万方、中文科技期刊和中国生物医学文献数据库 (检索时间 2010 年 1 月至 2020 年 2 月)，以“CCDS1”、“creatine transporter deficiency”检索 PubMed (检索时间 2001 年 1 月至 2020 年 2 月)，共 66 篇英文和 1 篇中文，其中中国患者 2 例。

本研究获得患儿家长知情同意及我院医学伦理委员会批准 (2015-130)。

2 结果

2.1 遗传学检查结果

患儿 1 与同胞哥哥 SLC6A8 基因存在 c.200G>A(p.Gly67Asp) 半合子变异，既往未见文献报道，来源于母亲 (图 1A)。患儿临床表现与 CCDS1 表型相符，家系中另有 1 名患者携带相同

变异，突变与疾病在家系中存在共分离现象，符合 PS2；该变异在 ESP、ExAC 和千人数据库正常对照人群中均未发现，符合 PM2；Polyphen-2 预测提示“可能有害”，MutationTaster 预测提示“中等致病”，该位点在种群中具有高度保守性 (图 1B)；因此该变异判定为可能致病性变异。患儿 2 与同胞哥哥存在 c.626_627delCT(p.Pro209Arg fs*87) 半合子变异，姐姐和母亲携带，父亲正常 (图 2A)。该变异表型与患儿临床表现相符，突变与疾病在家系中存在共分离现象，符合 PVS1；在 ESP、ExAC 和千人数据库正常对照人群中均未发现，符合 PM2；在 ClinVar 中有一记录 (编号 635461)，但未报道是否与 CCDS1 有关。MutationTaster 预测提示“高度致病”，该位点在种群中具有高度保守性 (图 2B)；因此该变异判定为致病性变异。

2.2 生物信息学分析

PyMOL 2.1 软件预测蛋白质三维空间结构，结果显示 c.200G>A 野生型甘氨酸 (Gly) 只与 1 个甲硫氨酸 Met 残基有极性连接，而变异型天冬氨酸 (Asp) 与甲硫氨酸、苏氨酸和丙氨酸均有极性连接，可能影响蛋白质三维空间结构稳定性 (图 3 A~B)。c.626_627delCT 导致氨基酸发生移码，从第 209 位脯氨酸 (Pro) 开始变化，编码一个只含 294 个氨基酸的截短蛋白，不到原蛋白结构的一半，导致蛋白质三维结构发生大缺失 (图 3 C~D)。

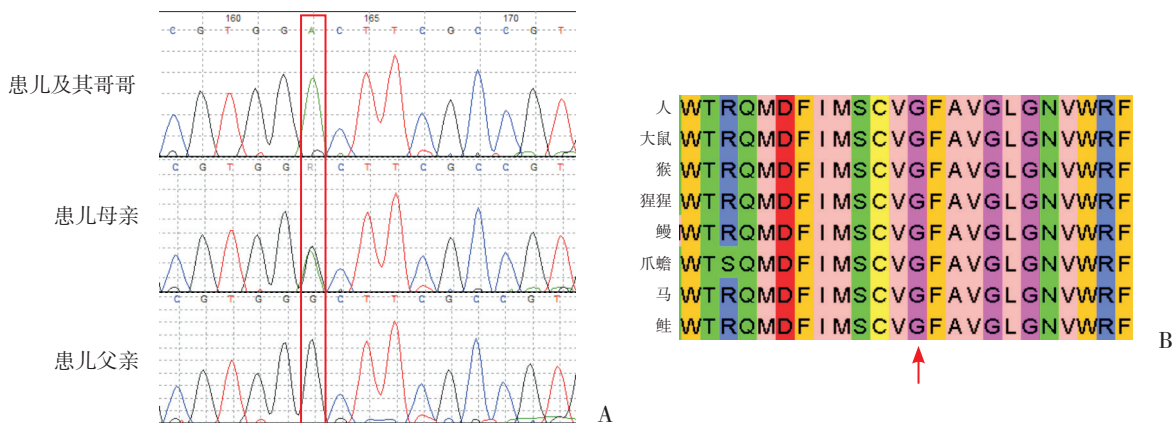


图 1 患儿 1 Sanger 测序图及保守性序列分析 图 A 示患儿 1 及其哥哥存在 c.200G>A(p.Gly67Asp) 变异，患儿母亲携带该变异，患儿父亲正常 (红框所示)；图 B 示 SLC6A8 蛋白在 67 号氨基酸具有高度保守性 (红色箭头所示)。

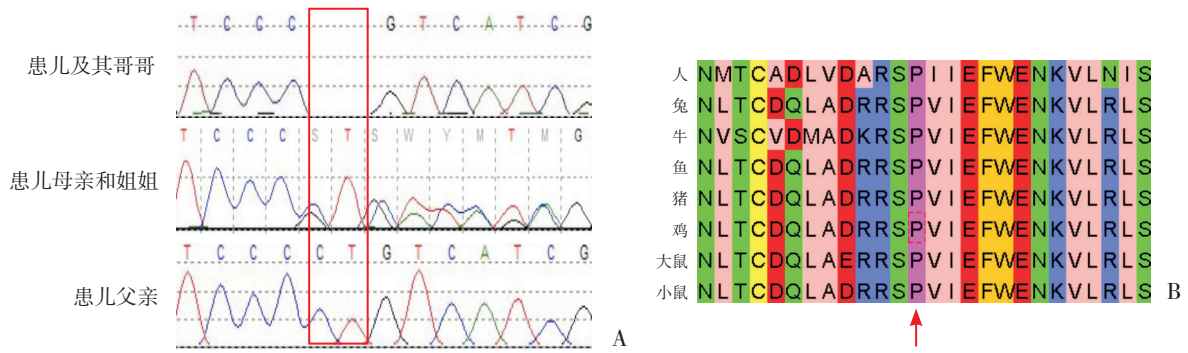


图 2 患儿 2 Sanger 测序图及保守性序列分析 图 A 示患儿 2 及其哥哥存在 c.626_627delCT(p.Pro209Argfs*87) 变异, 患儿母亲和姐姐携带该变异, 患儿父亲正常 (红框所示); 图 B 示 SLC6A8 蛋白在 209 号氨基酸具有高度保守性 (红色箭头所示)。

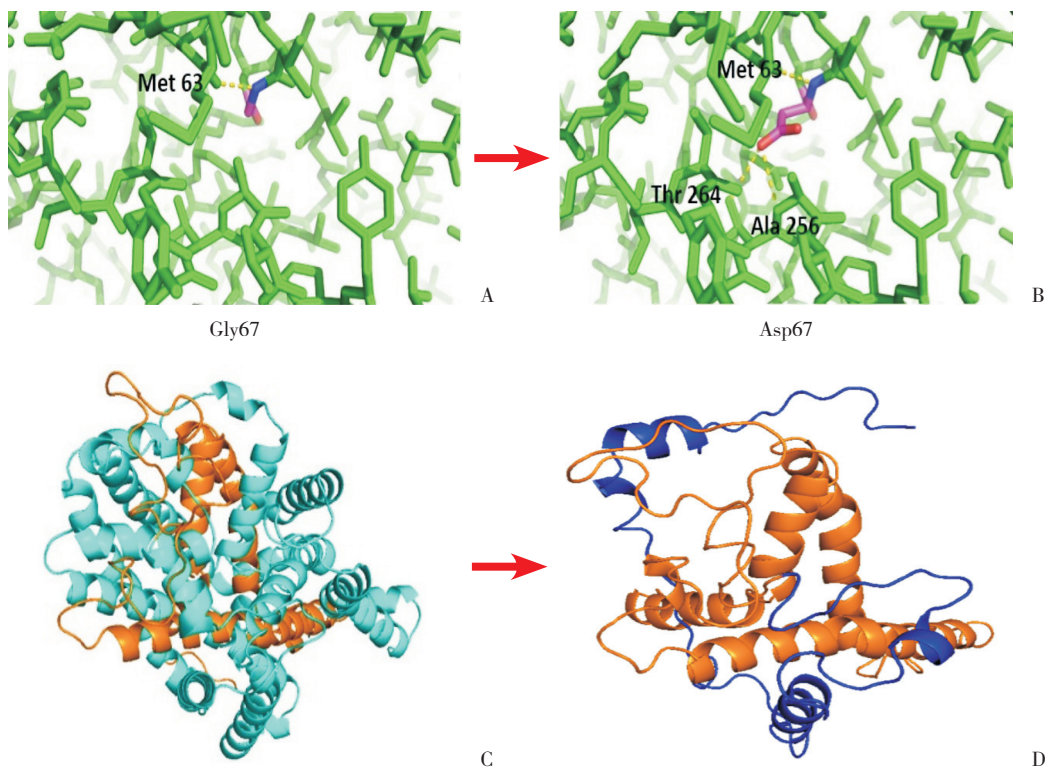


图 3 SLC6A8 基因两突变位点的蛋白质三维结构预测图 患儿 1: 野生型蛋白 67 位为甘氨酸 (3A), c.200G>A 变异型蛋白变为天冬氨酸 (3B); 患儿 2: 野生型蛋白三维结构 (3C), c.626_627delCT 变异蛋白结构 (3D)。棕色为二者共有序列, 青色为野生型独有序列, 蓝色为变异型独有序列。

2.3 治疗与结局

两患儿于 3 岁左右出现抽搐, 予抗癫痫治疗后, 目前均无发作。根据国外报道推荐高剂量补充肌酸、精氨酸和甘氨酸联合治疗, 两家属均未遵循医嘱, 只进行抗癫痫治疗, 偶尔去康复机构进行语言训练, 电话随访 1 年余, 智力与同龄人相比仍明显落后, 言语语言未有进步, 与人很少交流。

3 讨论

肌酸和磷酸肌酸在体内能量存储和转换过程中起着非常重要的作用, 是大脑能量代谢的标志。肌酸合成酶或肌酸转运载体的缺乏可导致 CCDS。患者可表现为精神运动发育落后、言语语言障碍, 有的伴癫痫等。CCDS 有 3 个类型, CCDS1 是临床症状最重, 治疗难度最大。其他两个类型均为常

染色体隐性遗传, CCDS2 由胍基乙酰甲基转移酶导致^[7], CCDS3 由精氨酸甘氨酸咪基转移酶缺乏导致^[8]。

CCDS1 男性患病率明显高于女性, 临床症状也更为严重, 从中度到重度智力障碍、语言表达和构音困难、抽搐和行为异常等。目前报道大部分为婴幼儿及儿童, 成人共报道 12 例, 年龄最大为 68 岁^[9]。CCDS1 在智力障碍男性患者患病率约 0.4%~1.4%, 在 X 连锁智力障碍男性患者中占约 2%^[10], 其中约 30% 患者为新发变异, 约 70% 遗传自母亲^[11]。所有患者尿肌酸/肌酐明显升高, 脑肌酸下降或缺失。女性携带者无临床症状或轻度认知损害、学习困难等, 家系内携带相同变异位点, 表型也会有明显差异^[9]。SLC6A8 基因变异在女性人群中发生率约 0.024%^[12]。国内报道 2 个家系 CCDS1 患儿, 本文继续报道 2 个家系的 2 个患儿, 患儿均表现为全面发育落后, 2 岁左右出现惊厥或抽搐, 丙戊酸可控制。运动随年龄增长有进步, 但语言和运动发育仍明显落后。女性携带者无症状或轻度智力低下, 有癫痫病史^[4-5]。国外报道 600 余例, 绝大部分为婴幼儿及儿童, 临床症状与我们报道一致; 成人患者报道 12 余例, 除智力障碍, 还有身材矮小和肠胃问题等^[9-15]。

CCDS1 诊断依据病史(智力障碍等), SLC6A8 基因分析, 血尿肌酸和肌酐检测, 脑肌酸测定和体外成纤维细胞肌酸摄入测定等, 有些患者头颅 MRI 也有异常^[4,11,13]。脑肌酸缺陷可降低脑白质容量, 引起认知障碍^[15]。SLC6A8 基因位于 X 染色体, 编码一个具有 12 个跨膜区的载体, 是肌肉和大脑摄入肌酸所必须的。目前报道该基因有 141 个变异类型(HGMD 专业版截至 2020 年 4 月 17 日)。2 例患儿血肌酐与国内报道的患者一样均降低^[5]。肌酐为肌酸代谢产物, 可能由于肌酸不能通过肌酸转运载体进行代谢随尿排出体外, 导致患者血肌酐下降。故遇到血肌酐下降, 伴智力障碍的患者, 尤其是男性患者需引起高度注意。

早期研究报道 CCDS1 患者补充肌酸只对女性携带者有改善, 而对男性患者的临床症状和脑肌酸含量无效^[10-11]。近年有研究报道对 17 例 CCDS1 患者联合补充高剂量肌酸(每日 200~400 mg/kg), 精氨酸(每日 100~400 mg/kg)和甘氨酸(每日 100~200 mg/kg)可阻止男性患者症状进一步恶化,

有的患者精神行为、社交及语言障碍也有改善。一男性患者脑 Cr 峰有轻微上升。联合用药对有症状的女性携带者改善更为明显, 一位女性携带者脑 Cr 峰恢复至接近正常, 两位女性携带者中度异常行为消失^[15]。动物实验研究也有新的突破, 有报道将肌酸分子改造成环肌酸后, 对 SLC6A8 基因敲除小鼠的认知能力有很大提高^[16], 药物伴侣 4-羟基丁酸脂可使肌酸转运载体得到部分修复, 可提高肌酸摄取^[17], 人工制备的纳米乳剂做为新的肌酸转运载体, 能明显提高基因敲除小鼠纹状体 ATP 水平, 改善小鼠认知功能^[18]。

综上, 本研究根据两家系患儿的临床表现、遗传模式、基因结果, 采用 ACMG 指南对新变异致病性进行分析, 确诊 4 个男性患者, 为临床 CCDS1 的诊断确定了基础。CCDS1 在精神运动发育落后、伴癫痫的男性患者中具有一定的患病率, 容易存在潜在漏检。二代测序、血尿代谢物测定和脑肌酸测定可以协助这类患者早期诊断。

[参 考 文 献]

- [1] 孙卫华, 王艺. 大脑肌酸缺乏综合征的研究进展[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(6): 445-448.
- [2] Cecil KM, Salomons GS, Ball WS Jr, et al. Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect?[J]. Ann Neurol, 2001, 49(3): 401-404.
- [3] Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, et al. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome[J]. Am J Hum Genet, 2001, 68(6): 1497-1500.
- [4] Wang Q, Yang J, Liu Y, et al. A novel SLC6A8 mutation associated with intellectual disabilities in a Chinese family exhibiting creatine transporter deficiency: case report[J]. BMC Med Genet, 2018, 19(1): 193.
- [5] 张飘飘, 程旭, 陈姿燕, 等. 大脑肌酸缺乏综合征 1 例病例报告并文献复习[J/OL]. 世界最新医学信息文摘(电子版), 2019, 19(16): 241-242.
- [6] 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.
- [7] Stockler-Ipsiroglu S, Apatean D, Battini R, et al. Arginine: glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency: clinical features and long term outcomes in 16 patients diagnosed worldwide[J]. Mol Genet Metab, 2015, 116(4): 252-259.
- [8] Sun W, Wang Y, Zu Z, et al. First reported Chinese case of guanidinoacetate methyltransferase deficiency in a 4-year-old child[J]. Clin Chim Acta, 2017, 470: 42-45.

- [9] Dreha-Kulaczewski S, Kalscheuer V, Tzschach A, et al. A novel SLC6A8 mutation in a large family with X-linked intellectual disability: clinical and proton magnetic resonance spectroscopy data of both hemizygous males and heterozygous females[J]. JIMD Rep, 2014, 13: 91-99.
- [10] van de Kamp JM, Mancini GM, Salomons GS. X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology[J]. J Inher Metab Dis, 2014, 37(5): 715-733.
- [11] van de Kamp JM, Betsalel OT, Mercimek-Mahmutoglu S, et al. Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency[J]. J Med Genet, 2013, 50(7): 463-472.
- [12] DesRoches CL, Patel J, Wang P, et al. Estimated carrier frequency of creatine transporter deficiency in females in the general population using functional characterization of novel missense variants in the SLC6A8 gene[J]. Gene, 2015, 565(2): 187-191.
- [13] Clark JF, Cecil KM. Diagnostic methods and recommendations for the cerebral creatine deficiency syndromes[J]. Pediatr Res, 2015, 77(3): 398-405.
- [14] Heussinger N, Saake M, Mennecke A, et al. Variable white matter atrophy and intellectual development in a family with X-linked creatine transporter deficiency despite genotypic homogeneity[J]. Pediatr Neurol, 2017, 67: 45-52.
- [15] Bruun TUJ, Sidky S, Bandeira AO, et al. Treatment outcome of creatine transporter deficiency: international retrospective cohort study[J]. Metab Brain Dis, 2018, 33(3): 875-884.
- [16] Tao D, Leister W, Huang W, et al. Facile high-performance liquid chromatography mass spectrometry method for analysis of cyclocreatine and phosphocyclocreatine in complex mixtures of amino acids[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(25): 7190-7196.
- [17] El-Kasaby A, Kasture A, Koban F, et al. Rescue by 4-phenylbutyrate of several misfolded creatine transporter-1 variants linked to the creatine transporter deficiency syndrome[J]. Neuropharmacology, 2019, 161: 107572.
- [18] Ullio-Gamboa G, Udobi KC, Dezard S, et al. Dodecyl creatine ester-loaded nanoemulsion as a promising therapy for creatine transporter deficiency[J]. Nanomedicine (Lond), 2019, 14(12): 1579-1593.

(本文编辑: 王颖)

· 消息 ·

延期举办“第四届新生儿生命支持技术高峰论坛”通知

为促进我国新生儿危重病医学的发展以及新生儿生命支持技术的应用与推广,不断提高危重新生儿的救治水平,《中国当代儿科杂志》编辑部、广州市医学会新生儿科学分会、广州市妇女儿童医疗中心原定于2020年5月15~17日在广州市联合举办“第四届新生儿生命支持技术高峰论坛暨第十一届珠三角新生儿医学论坛”因新冠病毒疫情影响,延期至2020年7月24~26日举办。

本次会议系国家级继续医学教育项目(项目编号:2020-06-03-029; I类学分8分),内容突出生命支持技术的“规范化应用与研究进展”特点,涵盖新生儿临床应用的各种生命支持技术,如新生儿急性肾损伤的连续肾替代治疗、NICU开展ECMO常见问题与对策、亚低温治疗新生儿缺氧缺血性脑病的再思考、新生儿肺动脉高压和难治性呼吸衰竭的NO吸入治疗、如何通过呼吸波形波形的解读来评估呼吸支持效果、新生儿机械通气中的肺复张策略、重症新生儿血流动力学管理、新生儿实施HFOV应当注意的一些问题、神经调节通气辅助(NAVA技术)在新生儿科的应用、危重新生儿的输血治疗、新生儿疾病细胞治疗现状与前景、早产儿喂养常见问题与对策、早产儿胃肠外营养的合理使用、新生儿脑损伤药物治疗的循证医学思考等20多个专题。届时将邀请国内知名新生儿医学领域专家、教授演讲与研讨。

报名办法及注意事项:会务费(含资料费)1000元,食宿统一安排,费用自理。有意参会者请来信、电话或电子邮件联系,并注明联系方式以便发送报到通知。主办方联系地址:广州市人民中路318号广州市妇女儿童医疗中心(儿童医院院区)新生儿科,邮编510120;联系人和联系方式:杨晓琪,15626206672, Email: 313778945@qq.com; 魏谋, 15820283738, Email: 1426766569@qq.com。

《中国当代儿科杂志》编辑部、广州市医学会新生儿科学分会、广州市妇女儿童医疗中心