

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.09.002

论著·临床研究

## 婴儿神经轴索营养不良的临床特点及 PLA2G6 基因分析

陆瑶 刘春花 王杨

(咸宁市中心医院 / 湖北科技学院附属第一医院新生儿科, 湖北 咸宁 437100)

**[摘要]** 婴儿神经轴索营养不良 (INAD) 是一种罕见的神经退行性疾病。该文报道 2 例男性患儿, 年龄分别为 3 岁、4 岁 2 个月, 均以精神运动发育落后 / 倒退就诊, 出生史无异常, 目前肌力、肌张力均低下, 其中 1 例患儿已不能独站, 且视力下降。肌电图示神经源性损害; 头颅 MRI 示小脑萎缩。全外显子组测序发现 2 例患儿 PLA2G6 基因均存在复合杂合突变, 其中 1 例患儿携带的 IVS11-1G>T、c.1984C>G 突变为新突变, 免疫组化示该患儿肌肉组织中 PLA2G6 蛋白表达量降低。INAD 主要临床表现为精神运动发育落后 / 倒退、小脑萎缩等, 基因测序可协助临床确诊。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(9): 851-855]

**[关键词]** 婴儿神经轴索营养不良; 临床特点; PLA2G6 基因; 基因突变; 儿童

### Clinical features of infantile neuroaxonal dystrophy and PLA2G6 gene testing

LU Yao, LIU Chun-Hua, WANG Yang. Department of Neonatology, Xianning Central Hospital/First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei 437100, China (Wang Y, Email: cjlwusyt@126.com)

**Abstract:** Infantile neuroaxonal dystrophy (INAD) is a rare neurodegenerative disease. Two boys aged 3 years and 4 years and 2 months respectively, were admitted to the hospital due to delayed mental and motor development. There were no abnormalities at birth, and both children had low muscle strength and tension on admission. One child was not able to stand alone and had impaired vision. Electromyography showed neurogenic damage, and head MRI revealed cerebellar atrophy. High-throughput sequencing revealed compound heterozygous mutations in the PLA2G6 gene in the two children. The mutations (IVS11-1G>T and c.1984C>G) in one child were new mutations, and immunohistochemistry showed a reduction in the protein expression of PLAG6 in the muscular tissue of this child. INAD has the main clinical manifestations of psychomotor developmental regression and cerebellar atrophy. High-throughput sequencing can help with clinical diagnosis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(9): 851-855]

**Key words:** Infantile neuroaxonal dystrophy; Clinical feature; PLA2G6 gene; Mutation; Child

婴儿神经轴索营养不良 (infantile neuroaxonal dystrophy, INAD, OMIM 256600) 又称婴儿型 PLA2G6 相关神经变性, 是一种罕见的常染色体隐性遗传的神经变性疾病<sup>[1]</sup>。典型的患儿 2 岁以内起病, 中枢及周围神经系统的神经轴索均可累及, 临床表现为精神运动发育落后 / 倒退、四肢及躯干肌张力低下、部分患儿伴有视神经萎缩等症状, 且病情进展迅速<sup>[2-3]</sup>。研究发现, 编码非 Ca<sup>2+</sup> 依赖型磷脂酶 A2-VIA 的 PLA2G6 基因为 INAD 唯一致病基因<sup>[4]</sup>。目前世界范围内 INAD 报道的病例不多,

尚无发病率数据。本文分析我院诊治的 2 例 INAD 患儿, 结合临床特征并利用分子诊断、突变功能验证以及免疫组化的方法进行确诊, 并探讨该病的临床表现及遗传学特点, 以提高临床医师对该病的认识。

### 1 资料与方法

#### 1.1 研究对象

患儿 1, 男, 3 岁, 因精神运动发育落后 1 年

[收稿日期] 2019-03-24; [接受日期] 2019-06-19

[作者简介] 陆瑶, 女, 本科, 主管护师。

[通信作者] 王杨, 男, 副主任医师。Email: cjlwusyt@126.com。

就诊。2岁开始出现四肢无力、走路及上楼梯困难，并呈现进行性加重的状态，逐渐失去行走能力；2岁时语言仅会两个字的称呼，至今无进展；叫之反应差，吞咽功能倒退。患儿系第2胎第2产，足月顺产，出生史无异常，3月龄可抬头，8月龄可独坐，2岁开始说话，但进展缓慢，至今仅会说2~3个字的词语。患儿平素身体一般，否认传染病史、外伤史。父母体健，非近亲结婚。有一姐姐，体健；无相关疾病家族史。入院体查：面容正常，体型瘦小，头围49 cm，身高87 cm（-2 SD），体重11.5 kg（-2 SD），学习及辨物能力差，听指令和模仿能力差，不易逗笑，追光追物迟缓，主动抓握慢，精细度和灵活度欠佳；可扶墙缓慢移动，不能独立行走；咽反射正常。双肺呼吸音稍粗，未闻及干湿性啰音；心腹检查未见异常。四肢肌力Ⅲ级，四肢肌张力低下，膝腱反射可引出，双侧巴氏征阳性。辅助检查：肝功能示门冬氨酸氨基转移酶（AST）61 U/L（参考值：10~40 U/L）；心肌酶示肌酸激酶同工酶（CK-MB）27.3 U/L（参考值：0~25 U/L），乳酸脱氢酶（LDH）321 U/L（参考值：15~65 U/L）；血遗传代谢病氨基酸和酰基肉碱谱分析及尿有机酸分析无异常。双下肢肌电图示神经源性损害。头颅MRI示小脑体积较小，脑沟增宽（图1A~B）。脑电图未见异常。

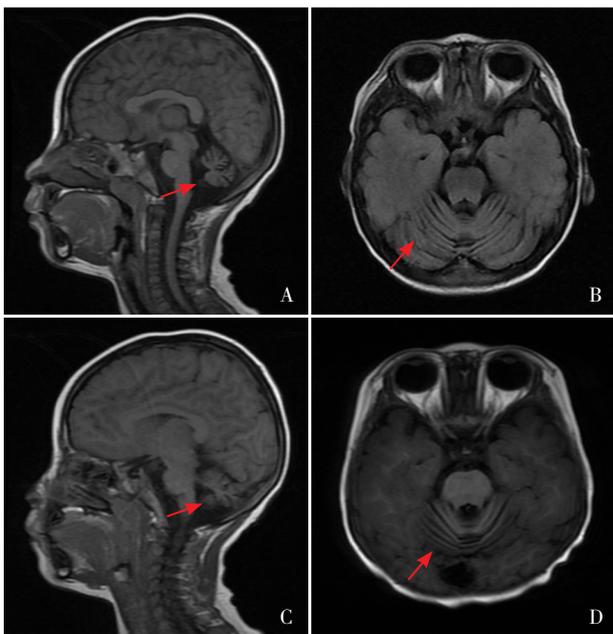


图1 患儿头部MRI结果 图A~B为患儿1矢状位和轴位T1相结果，提示小脑脑沟增宽，体积略小；图C~D为患儿2矢状位和轴位T1相结果，提示小脑萎缩。图中红色箭头示异常部位。

患儿2，男，4岁2个月，因精神运动、语言发育落后2年，倒退1年就诊。患儿3岁时可说简单句子，可独坐、扶走，可清楚辨物；近1年发育呈倒退趋势，目前语言仅会“爸爸”、“妈妈”等简单称呼，不能独坐，不能独走，不能辨物且咀嚼能力变差。患儿系第1胎第1产，出生史无异常，3月龄翻身，6月龄可独坐，1岁半会说话，2岁半扶走。父母非近亲结婚，无相关疾病家族史。患儿平素身体一般，否认传染病史、外伤史。入院体查：面容正常，体型瘦小，头围50 cm，身高95 cm（-2 SD），体重13.5 kg（-2 SD），精神一般，仅会2个字的叠音，抬头稍困难，不能独坐、不能独走，精细动作欠佳；咽反射减弱。心肺腹检查无异常。双上肢肌力Ⅲ级，双下肢肌力Ⅱ级，四肢肌张力低下，四肢肌肉轻度肌萎缩。膝腱反射对称引出，病理征未引出。辅助检查：肝功能示AST 84 U/L；心肌酶示CK-MB 31 U/L，LDH 412 U/L。血氨、乳酸、血遗传代谢病氨基酸和酰基肉碱谱分析及尿有机酸分析无异常。双下肢肌电图示神经源性损害。脑电图示背景活动缓慢，睡眠期可见少量低中波幅的棘波尖波发放。颅脑MRI示小脑萎缩可能（图1C~D）。心电图无异常。

### 1.2 致病基因检测

抽取患儿及父母外周静脉血各2 mL，利用全血基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA，并测定浓度，委托北京康旭医学检验所进行全外显子组测序，并进行Sanger测序验证；致病基因PLA2G6的引物由上海生工合成。

本研究得到咸宁市中心医院医学伦理学委员会审核批准（LL20180524009）及患儿家属的知情同意。

### 1.3 生物信息学分析

对检测到的基因变异进行单核苷酸多态性数据库（dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>）、千人基因组（<http://www.internationalgenome.org>）、人类基因突变数据库（HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>）及文献分析，未见报道的新变异按照美国医学遗传学与基因组学学会（American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG）发布的序列变异解读标准和指南<sup>[5]</sup>评估变异的致病性。

### 1.4 剪接位点功能验证

取患儿及父母外周血 1 mL，分离白细胞并提取 RNA，体外反转录为 cDNA，针对剪接位点区域前后设计引物，利用 PCR 方法扩增相应的片段，并进行 Sanger 测序。

### 1.5 肌肉组织免疫组化检测

患儿 2 家长签署知情同意书后，采取患儿 2 腓肠肌肌肉活检，新鲜肌肉组织放入 10% 中性福尔马林固定，脱水浸蜡包埋，切片后进行免疫组织化学染色，比较肌肉组织中 PLA2G6 蛋白的表达水平，实验按照免疫组化试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司）说明书进行，PLA2G6 抗体购自 Proteintech（货号 22030-1-AP，稀释比例 1:50）。

## 2 结果

### 2.1 遗传学检测结果及致病性分析

全外显子组测序及 Sanger 测序验证发现患儿 1 的 PLA2G6 基因存在复合杂合变异，分别为

c.1772G>A 及 c.1957G>A 变异，分别使 PLA2G6 基因编码的蛋白第 591 位氨基酸由精氨酸变为谷氨酰胺（p.R591Q），第 653 位氨基酸由甘氨酸变为丝氨酸（p.G653S）；2 个变异均为已知致病突变，分别遗传自父母。患儿 2 的 PLA2G6 基因检测到 2 个变异为 IVS11-1G>T 和 c.1984C>G 变异，分别遗传自父母。其中 IVS11-1G>T 变异为剪接位点变异，位于经典的剪接位点区域，推测影响 mRNA 成熟加工，进一步影响蛋白的功能；依据 ACMG 指南，该变异为可能致病性变异（PVS1：功能丧失变异可能导致基因功能丧失；PM1：数据库未收录，属于低频变异）。c.1984C>G 变异导致 PLA2G6 基因编码的蛋白第 662 位氨基酸由亮氨酸变为缬氨酸（p.L662V），该变异在 HGMD、dbSNP 数据库、千人基因组数据库中均未见收录，文献亦未见报道。依据 ACMG 指南，该变异为可能致病性变异（PM1：错义变异位于无良性变异的外显子功能域；PM2：低频变异，数据库未收录；PM：多种软件及保守性分析得出变异对基因功能有影响）。见图 2~3。

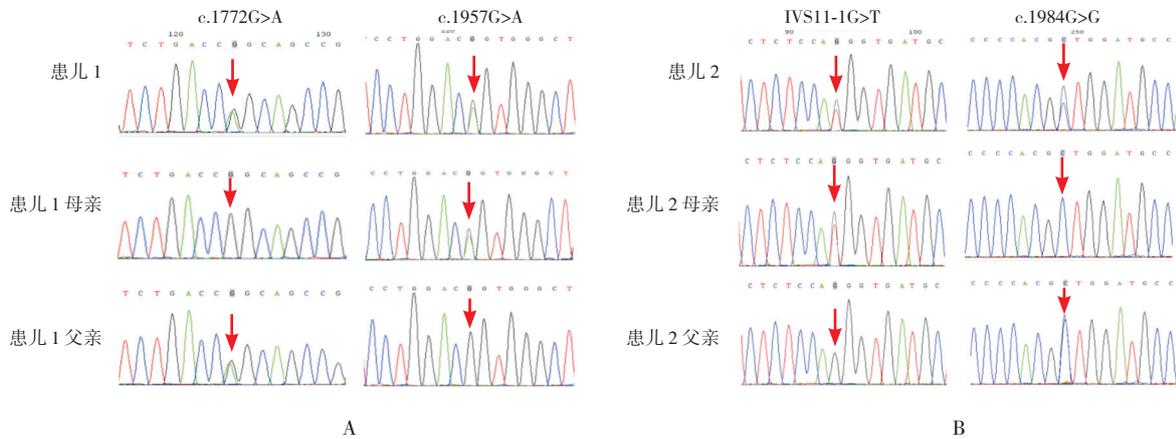


图 2 两例患儿及其父母 PLA2G6 基因 Sanger 测序图 图 A 示患儿 1 所携带的 c.1772G>A 及 c.1957G>A 复合杂合变异分别遗传自父母；图 B 示患儿 2 携带的 IVS11-1G>T 及 c.1984C>G 变异分别遗传自父母。变异位点如箭头所示。

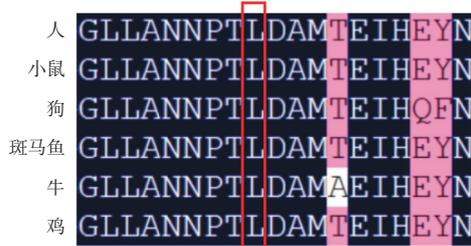


图 3 PLA2G6 基因 c.1984C>G 变异在不同物种间保守性分析 图中红色框内表示不同物种间该区域均是亮氨酸。

### 2.2 剪接位点变异功能验证

利用 PLA2G6 基因特异性引物分析剪接位点变异对 RNA 加工成熟的影响，结果显示与正常对照相比，患儿 2 的 RNA 出现 2 种转录本，对 2 种转录本进行切胶回收，测序分析发现其中一个转录本为野生型，另外一个转录本缺失外显子 12，结果表明 IVS11-1G>T 影响 PLA2G6 基因 mRNA 的加工，见图 4。

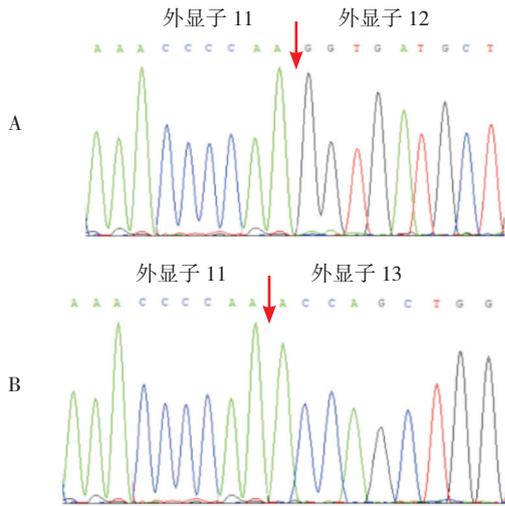


图4 IVS11-1G>T 剪接位点功能验证 图A示正常剪接异构体；图B示异常剪接异构体（外显子12缺失）。

### 2.3 免疫组化分析

患儿2携带两个未见报道的变异，为证明该变异是否影响蛋白的表达量，取患儿腓肠肌进行PLA2G6蛋白的免疫组化分析。与正常对照相比，患儿2组织中PLA2G6蛋白的表达量降低。见图5。

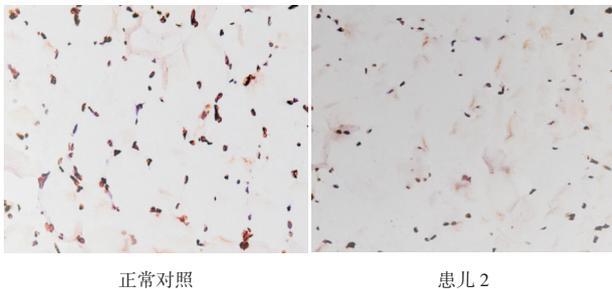


图5 正常对照和患儿2腓肠肌PLA2G6蛋白免疫组化结果（400×） 棕色为目标蛋白染色，提示患儿2组织中PLA2G6蛋白的表达量降低。

### 2.4 治疗及预后

2例患儿明确诊断后，给予维生素B<sub>1</sub>、甲钴胺营养神经等对症支持治疗，并进行针对性的康复训练，效果不佳，患儿语言、运动均未见改善。目前2例患儿均不能行走，语言能力几乎丧失，预后差。

## 3 讨论

INAD是一种罕见的常染色体隐性遗传病，由

Seiteberger于1952年首次报道<sup>[6]</sup>。其典型的临床表现为6个月~2岁起病，进行性运动、智力倒退，躯干肌张力低下发展至痉挛型四肢瘫；部分患儿伴有视神经萎缩，部分可能有癫痫发作；一般在10岁之前死亡<sup>[4,7]</sup>。由于许多临床医生对INAD认识不足，多数患儿在就诊时被误诊为脑瘫、脊髓性肌萎缩或其他神经肌肉病等。目前世界范围内共报道了200多例INAD<sup>[8]</sup>。INAD的诊断标准包括以下几个方面：（1）临床起病早，通常3岁以内；精神运动发育倒退，肌张力低下；视神经萎缩或视力异常；（2）实验室检查可见AST、ALT水平升高，CK、CK-MB、LDH水平升高；（3）影像学检查可见小脑发育不良或小脑萎缩；（4）肌电图可见神经源性损害；部分患儿脑电图可见快节律波发放等异常<sup>[9]</sup>。

PLA2G6基因定位于22q13.1，长度约为6 Mb，由17个外显子组成，编码胞浆内非Ca<sup>2+</sup>依赖的磷脂酶A2-VIA。PLA2G6基因在机体早期的神经系统发育过程中具有非常重要作用，在胚胎组织的神经细胞和非神经细胞中广泛表达<sup>[10]</sup>，该基因功能异常可导致神经细胞膜磷脂代谢紊乱、脂质过氧化反应、高尔基体形态改变、细胞内铁沉积等异常，最终可导致细胞凋亡和机体神经退行性病变<sup>[11]</sup>。目前研究发现PLA2G6基因异常除导致INAD外，还可以引起不典型神经轴索营养不良以及肌张力障碍-帕金森综合征等疾病<sup>[11,12]</sup>。

本文的2例患儿均在2岁内发病，发育落后且呈语言、运动倒退的趋势；肌张力低下；AST、CK-MB、LDH等水平升高；头颅MRI示小脑发育不良或小脑萎缩；血遗传代谢病氨基酸和酰基肉碱谱分析及尿有机酸分析无异常。患儿初步怀疑神经肌肉病，为进一步明确诊断，完善遗传学检测，发现2例患儿PLA2G6基因均存在复合杂合变异，生物信息学分析及功能实验证实变异为可能致病/致病性突变。结合患儿的临床表型及遗传学分析结果，2例患儿最终确诊为INAD。

张平等<sup>[14]</sup>曾对26例INAD患儿进行随访，发现患儿平均发病年龄为1岁3个月，临床表现为进行性智力、运动发育倒退；约80%患儿存在小脑萎缩，50%存在眼球震颤或斜视；约95%以上患儿肌电图示神经源性损害，且大多数患儿脑电图异常。本研究中的2例患儿临床表现符合文

献报道。26例患儿中,23例患儿存在PLA2G6基因变异,且发现外显子2可能是变异热点<sup>[14]</sup>。本研究中的4个变异位点均不在外显子2附近,变异热点需要更多的病例进一步分析,国内外文献暂未见基因型和表型的相关性研究。

目前INAD无有效治疗手段,以对症康复治疗为主。INAD患儿的预后一般比较差,多数10岁以内死亡。国外研究随访发现INAD患儿的平均死亡年龄为9.4岁<sup>[15]</sup>,国内暂无相关数据。INAD病情进展较快,我们应加强随访,密切关注2例患儿病情变化。

综上所述,INAD患儿临床表现为精神运动发育落后、倒退,四肢及躯干肌张力低下、小脑萎缩、部分患儿伴有视力异常等症状,且病情进展迅速;全外显子组测序可以尽早的帮助临床诊断。通过本研究可提高临床医生对该疾病的认识,提高疾病的诊断率,尽早明确诊断并进行对症治疗及遗传咨询。

#### [参 考 文 献]

- [1] Iodice A, Spagnoli C, Salerno GG, et al. Infantile neuroaxonal dystrophy and PLA2G6-associated neurodegeneration: an update for the diagnosis[J]. *Brain Dev*, 2017, 39(2): 93-100.
- [2] Elsayed LEO, Mohammed IN, Hamed AAA, et al. Case report of a novel homozygous splice site mutation in PLA2G6 gene causing infantile neuroaxonal dystrophy in a Sudanese family[J]. *BMC Med Genet*, 2018, 19(1): 72.
- [3] Mascacchi M, Mari F, Berti B, et al. Fast progression of cerebellar atrophy in PLA2G6-associated infantile neuronal axonal dystrophy[J]. *Cerebellum*, 2017, 16(3): 742-745.
- [4] Morgan NV, Westaway SK, Morton JE, et al. PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 752-754.
- [5] 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.
- [6] Crome L, Weller SD. Infantile neuroaxonal dystrophy[J]. *Arch Dis Child*, 1965, 40(213): 502-507.
- [7] Ozes B, Karagoz N, Schüle R, et al. PLA2G6 mutations associated with a continuous clinical spectrum from neuroaxonal dystrophy to hereditary spastic paraplegia[J]. *Clin Genet*, 2017, 92(5): 534-539.
- [8] 马秀伟,朱丽娜,辜蕊洁,等. 婴儿神经轴索营养不良1例临床和PLA2G6基因变异分析[J]. *临床儿科杂志*, 2018, 36(4): 252-255.
- [9] Nardocci N, Zorzi G, Farina L, et al. Infantile neuroaxonal dystrophy: clinical spectrum and diagnostic criteria[J]. *Neurology*, 1999, 52(7): 1472-1478.
- [10] Polster B, Crosier M, Lindsay S, et al. Expression of PLA2G6 in human fetal development: implications for infantile neuroaxonal dystrophy[J]. *Brain Res Bull*, 2010, 83(6): 374-379.
- [11] Ramanadham S, Ali T, Ashley JW, et al. Calcium-independent phospholipases A2 and their roles in biological processes and diseases[J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(9): 1643-1668.
- [12] Kapoor S, Shah MH, Singh N, et al. Genetic analysis of PLA2G6 in 22 Indian families with infantile neuroaxonal dystrophy, atypical late-onset neuroaxonal dystrophy and dystonia parkinsonism complex[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155605.
- [13] Zhang P, Gao Z, Jiang Y, et al. Follow-up study of 25 Chinese children with PLA2G6-associated neurodegeneration[J]. *Eur J Neurol*, 2013, 20(2): 322-330.
- [14] 张平平,高志杰,王静敏,等. 中国婴儿神经轴索营养不良患儿临床随访及分子遗传学研究[J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(9): 692-696.
- [15] Gregory A, Westaway SK, Holm IE, et al. Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A<sub>2</sub>[J]. *Neurology*, 2008, 71(18): 1402-1409.

( 本文编辑: 王颖 )