·短篇论著·

1例希特林缺陷病合并丙酮酸激酶缺乏症的临床特征和基因特点

王闽莹[1] 王旭东[2] 庄 玮[3] 陈云娥[1] 陆 妹[1,*]
1.厦门大学附属妇女儿童医院/厦门市妇幼保健院儿内科 (福建 厦门 361000)
2.厦门大学附属妇女儿童医院/厦门市妇幼保健院新生儿疾病筛查中心 (福建 厦门 361000)
3.厦门大学附属妇女儿童医院/厦门市妇幼保健院药学部 (福建 厦门 361000)

【摘要】**目的** 探讨希特林缺陷病合并丙酮酸激酶缺乏症患儿的临床表型及基因型特点。**方法** 总结本院1例希特林缺陷病合并丙酮酸激酶缺乏症患儿诊断、治疗及随访。**结果** 患儿出生后即出现重度溶血性贫血、高胆红素血症、棘形红细胞增多。血串联质谱检测显示瓜氨酸增高，遂予以无乳糖奶粉喂养、输血等治疗。患儿1月龄后再次出现重度贫血。全外显子组测序检测结果显示：该患儿携带PKLR基因c.1418T>A/c.1248_1269delinsGCTCCCT复合杂合突变和SLC25A13基因c.852_855delTATG纯合突变，因此被诊断为希特林缺陷病合并丙酮酸激酶缺乏症。患儿需要约1.5月/次的反复输血治疗，生长发育正常，但伴肝脾肿大、血清铁蛋白增高，2岁开始口服祛铁治疗。**结论** 希特林缺陷病合并丙酮酸激酶缺乏症的案例在临床上非常罕见，患儿出生后表现重度贫血，棘形红细胞数目明显增加，输血依赖，需要早期干预。

【关键词】希特林缺陷病，丙酮酸激酶缺乏症，SLC25A13，PKLR，瓜氨酸
【中图分类号】R725.8
【文献标识码】A
DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.03.003

Clinical and Genetic Variation Characteristics of A Child with Citrin Deficiency and Pyruvate Kinase Deficiency

WANG Min-ying[1], WANG Xu-dong[2], ZHUANG Wei[3], CHEN Yun-e[1], LU Mei[1,*].
1.Department of Pediatrics, Women and Children's Hospital, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian Province, China
2.Department of Newborn Screening Center, Women and Children's Hospital, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian Province, China
3.Department of Pharmacy, Women and Children's Hospital, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian Province, China

Abstract: Objective To investigate the clinical and genetic characteristics of a child with Citrin deficiency and pyruvate kinase deficiency. Methods We summarized the diagnosis, treatment and follow-up of the patient with Citrin deficiency and pyruvate kinase deficiency in Women and Children's Hospital, School of Medicine, Xiamen University. Results The patient was born with severe hemolytic anemia, hyperbilirubinemia, and acanthocytosis. Tandem mass analysis of blood sample showed that the concentration of Citrulline (Cit) increased. He was accepted with lactose free milk feeding and blood transfusion. Severe anemia occurred again after 1 month. Whole exome sequencing results showed that this child carried c.1418 T>A plus c1248_1269 delinsGCTCCCT compound heterozygous mutation in PKLR and c.852_855 delTATG homozygous mutation in SLC25A13. Consequently, he was diagnosed with Citrin deficiency and pyruvate kinase deficiency. The patient needed to receive blood transfusion for once about every 45 days. Meanwhile, we found his serum ferritin was increased with hepatosplenomegaly. Oral iron removal treatment was began at the age of 2. Conclusion It is very rare for an individual to suffer from both Citrin deficiency and pyruvate kinase deficiency. Anemia was the first manifestation after birth with increased acanthocytosis significantly. Early intervention is very important.

Keywords: Citrin Deficiency, Pyruvate Kinase Deficiency, SLC25A13, PKLR, Citrulline

希特林缺陷病(citrin deficiency，CD)是一种较为常见的新生儿遗传代谢病性疾病，其发病率仅次于甲基丙二酸血症，其发病机制是由于肝型线粒体内天冬氨酸/谷氨酸载体即Citrin缺陷,最初见于日本，近年来在中国、韩国、越南、以色列、捷克、美国和英国等也相继发现，具有明显地区和种族差异性[1]。本文报道1例希特林缺陷病(CD)同时合并丙酮酸激酶缺乏症(Pyruvate kinase deficiency，PKD)患儿的诊断、治疗及随访，探讨其临床特点、诊断和治疗方法，提高对该疾病的认识。

1 病例资料

患儿，男，系G2P1，孕36+3周因“胎儿宫内窘迫”剖宫产娩出，出生体重2.29kg，出生后因肤色明显苍白住院，血常规显示血红蛋白59 g/L(参考范围：130~175 g/l)，网织红细胞百分数16.6%(参考范围3~6%)，血总胆红素升高(252.5 umol/L)，以间接胆红素升高为主，诊断“重度溶血性贫血、新生儿高胆红素血症”，予以输注滤白红细胞治疗后，患儿黄疸消退，血红蛋白恢复正常水平后出院。患儿的血串联质谱结果提示瓜氨酸显著增高(416.55 μM，参考范围5.5~45 μM)，考虑其可能患有“希特林缺陷病”，给予无乳糖、高中链脂肪酸奶粉喂养。

患儿于1月龄回院复查，血常规结果显示血红蛋白再次降至64 g/L，骨髓常规检查提示：增生活跃骨髓象，红系比例增高；外周血涂片见大量棘形红细胞(图1)。全外显子组测序服务委托深圳华大临床检验中心进行，并获得患儿监护人的知情同意，采集患儿及父母亲的全血，结果显示先证者PKLR基因c.1418T>A和c.1248_1269delAGCGGTGAAGATGCAGCATGCGinsGCTCCCT复合杂合变异，SLC25A13基因c.852_855delTATG纯合变异(表1)，ACMG评分信息(见表2)，一代测序验证结果(见图2)，最终该患儿被确诊为希特林缺陷病合并丙酮酸激酶缺陷性贫血，予饮食治疗、补充叶酸、脂溶性维生素等，多次复查血串联质谱Cit正常，无凝血功能、血脂、脂肪肝等异常，定期随访监测血常规，患儿输血后约1.5月后即再出现中重度贫血，依赖于定期输注滤白红细胞治疗(图3)，治疗期间肝脾逐渐肿大，而血清铁蛋白自1月龄开始明显增高，根据地拉罗司适应症，2岁开始口服250mg/日/次进行祛铁治疗，定期复查中(见图4)。

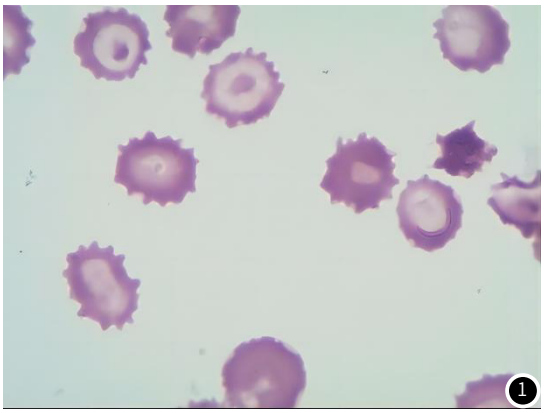
【第一作者】王闽莹，女，住院医师，主要研究方向：儿童遗传代谢病。Email：1577134852@qq.com
王旭东，男，助理研究员，主要研究方向：新生儿疾病筛查和分子诊断。Email：wangxudong0524@163.com
【通讯作者】陆 妹，女，副主任医师，主要研究方向：儿童遗传代谢病。Email：lm800529@xmu.edu.cn

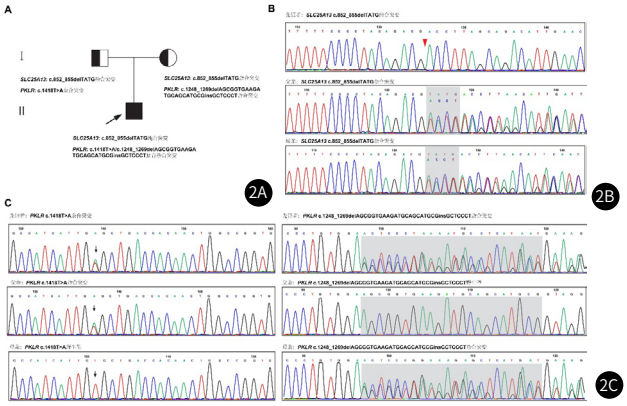
表1 先证者全外显子组测序结果

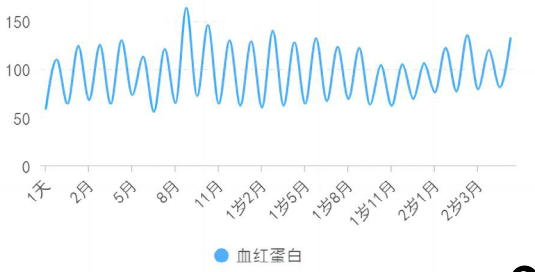
基因	染色体	核苷酸变化(氨基酸变化)	外显子	基因型	父亲/母亲	
PKLR	chr1:155262986	c.1418T>A (p.Val473Glu)	EX9	杂合	父亲：杂合型	母亲：野生型
PKLR	chr1:155263228	c.1248_1269delAGCGGTGAAGATGCAGCATG CGinsGCTCCCT(p.Ala417_Ala423delinsLeuPro)	EX8	杂合	父亲：野生型	母亲：杂合型
SLC25A13	chr7:95818683	c.852_855delTATG (p.Met285Profs*2)	EX9	纯合	父亲：杂合型	母亲：杂合型

表2 先证者PKLR基因变异及基于ACMG指南致病性分析

基因	核苷酸变化(氨基酸变化)	基于ACMG指南的致病证据				分类
		非常强	强	中等	支持证据	
PKLR	c.1418T>A (p.Val473Glu)			PM1+PM2	PP2+PP3	疑似致病
PKLR	c.1248_1269delAGCGGTGAAGATGCAGCATGCG insGCTCCCT(p.Ala417_Ala423delinsLeuPro)			PM1+PM2+PM4		疑似致病







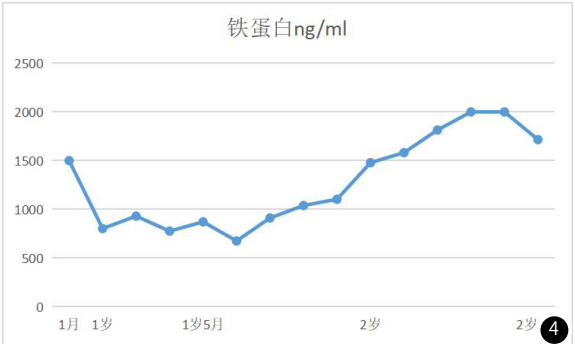


图1 外周血涂片可见散在的棘形红细胞。**图2** 图2A：希特林缺陷病合并丙酮酸激酶缺乏症的家系图谱。图2B：先证者SLC25A13基因(NM_014251.2)c.852_855delTATG纯合变异；先证者父亲和母亲SLC25A13基因(NM_014251.2)c.852_855delTATG杂合变异。图2C：先证者PKLR基因(NM_000298.5)c.1418T>A和c.1248_1269delAGCGGTGAAGATGCAGCATGCGinsGCTCCCT复合杂合变异；先证者父亲PKLR基因(NM_000298.5)c.1418T>A杂合变异；先证者母亲PKLR基因(NM_000298.5)c.1248_1269delAGCGGTGAAGATGCAGCATGCGinsGCTCCCT杂合变异。**图3** 血红蛋白变化情况。**图4** 血清铁蛋白自1月龄开始持续增高。

2 讨 论

希特林缺陷病(Citrin deficiency)是由于7号染色体的SLC25A13基因发生变异所致，该疾病在日本地区的发病率为1/34,000~1/17,000，台湾地区的发病率约为1/10,000~1/20,000，我国广东地区的发病率约为1/8,800[1-2]。基于发病年龄和临床特点，可分为希特林蛋白缺乏致新生儿肝内胆汁淤积症(NICCD)，希特林蛋白缺乏致生长迟缓和血脂异常(FTTDCD)及成年发作瓜氨酸血症II型(CTLN2)三种临床表型，其中NICCD表型在临床最为常见，发病年龄多小于1岁，尤以小于4个月龄的患儿居多，男女比例差异不显著，临床表现不同，可有严重的肝内胆汁淤积、半乳糖血症、低白蛋白血症、低血糖反应、抽搐、高氨基酸血症、凝血障碍等[3]。该疾病的管理主要是无乳糖和高中链甘油三酯配方奶粉、补充脂溶性维生素等，多数预后良好，可通过饮食干预和随访有效预防NICCD向CTLN2的转化或在严重临床表征出现前及时给予适当的药物和饮食治疗[4]。本研究的患儿出生后出现严重的溶血性贫血，棘形红细胞增多，血串联质谱中瓜氨酸水平明显升高，SLC25A13基因c.852_855delTATG纯合变异为已报道的致病变异，诊断希特林缺陷病明确，但无典型的黄疸、胆汁淤积、脂肪肝等表现，与早期的严重贫血及早期饮食介入治疗有关。宋元宗等[5]对22例Citrin缺乏病患儿的红细胞形态进行显微镜观察，发现7例患儿存在棘形红细胞增多的现象，具体病因尚不明确。以往研究中棘形红细胞增多症可能发生在高胆红素血症、尿毒症、不同严重程度的肝脏疾病以及脾血管瘤等疾病，其发生机制与异常的高密度脂蛋白分子、细胞内钙离子升高和血浆pH水平升高等[5-9]。

丙酮酸激酶缺乏症(PKD)是糖酵解途径中最常见的红细胞酶异常疾病，也是导致遗传性非球形细胞溶血性贫血最常见的原因[10]。PKD是一种常染色体隐性遗传性疾病，其致病是由于染色体1q21上PKLR基因的两个等位基因发生基因变异[11]。在西方人群中，PKD的发病率约在1/32000~1/110000 [12]。健康个体的红细胞可以通过糖酵解产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate，ATP)，其中丙酮酸激酶是糖酵解途径的关键催化酶，可催化磷酸

烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸并产生ATP，ATP对于红细胞结构和功能的完整性保持具有至关重要作用，丙酮酸激酶缺乏会导致细胞膜的可塑性丧失、细胞脱水，在外周血涂片中可见棘形红细胞增多[13-14]。由于糖酵解缺陷导致ATP合成减少，无法维持红细胞的电化学梯度和细胞膜的完整性，网织红细胞和红细胞的寿命缩短，受损的丙酮酸激酶缺陷红细胞在脾脏中发生活跃溶血[15]。

目前，已鉴定和报道的PKLR基因突变有250余种，包括错义或无义突变、剪接和调控突变、小插入、微缺失和大片段缺失，不同基因变异导致不同严重程度的溶血性贫血[16]。Bianchi等[17]的研究报告了257名PKD患者的自然病史及分子特征，检测到127种基因变异，其中84种是错义突变，43种是非错义突变(20种移码变异、11种剪接变异、5种大片段缺失变异、4种框内缺失变异和3种启动子区变异)，两个非错义突变的患者血红蛋白水平较低，终生输血次数较高，并发症发生率较高，包括铁超载、髓外造血和肺动脉高压。罕见的严重并发症，包括下肢溃疡和肝衰竭，在非错义突变或以严重蛋白质不稳定性为特征的错义突变患者中更常见。本例患儿主要表现为早发严重的慢性溶血性贫血，需依赖输血治疗，基于全外显子组测序及一代测序验证结果明确在PKLR基因发生2个位点变异，人类孟德尔遗传数据库(online mendelian inheritance in man，OMIM)数据库上均尚未报道，根据ACMG评分，均为疑似致病变异，虽未能完善丙酮酸激酶活性检测，但根据患儿临床发病的特点和基因变异结果诊断明确。

PKD患者严重程度差别很大，从轻度贫血或完全代偿性溶血到危及生命的贫血都有可能发生，甚至需要进行新生儿换血及定期输血支持。在一项PKD患者自然病程的研究中[15]，65例PKD患者(53.3%)需要定期输血，30例(24.6%)需要偶尔输血，27例(22.1%)不需要进行输血治疗。此外，PKD还具有严重的并发症，包括铁超载(48%)、胆结石(45%)和骨折(17%)。PKD管理主要是支持治疗，常规的叶酸补充剂是维持骨髓网织红细胞代偿的关键，而是否需要输血主要取决于患者的贫血程度和代偿反应[18-19]。本研究的例患儿发病较早，贫血程度严重，需定期输注红细胞维持足够的血红蛋白含量，以保证其生长发育的需要。在治疗和定期监测中，发现该患儿的铁蛋白呈逐渐升高趋势。PKD患者可能发生继发性铁超载。虽然反复输血被认为是主要原因，但未输血的PKD患者也可能会出现[20]。铁超载的发病机制可能是多因素导致，包括慢性溶血、无效的红细胞生成、脾切除术等。约50%的18岁以下PKD儿童患有铁超载，铁负荷风险是终身伴随[11]。Mojzikova等[21]在10个PKD散发家系的11名患者中发现了9种PKLR基因变异，其中c.1553delG(p. Arg518Leufs*12)不仅导致丙酮酸激酶缺乏，还与一种新生儿高铁蛋白血症相关。本研究的患儿1月龄铁蛋白即明显增高，移码突变可能是导致其铁蛋白严重升高的一个因素，还需扩大更多的样本量深入研究。对于PKD患儿，定期输血和不定期输血的患者铁超载的发生率均较高，应该定期监测铁超载和及时进行祛铁治疗[20]。频繁输血的儿童建议进行脾切除术，脾切除术也有助于改善慢性贫血的相关症状[22]。脾切除术只能部分改善PKD的贫血状况[13]，而且会增加感染及血栓形成的风险[23]。基于脾切除术后脓毒症的风险与输血和铁负荷的风险等因素，脾切除术的实施通常被推迟到5岁以后[11]。本研究患儿2岁后开始祛铁治疗，铁蛋白水平仍较高，但其年龄尚小，需密切观察随访有无其他并发症的出现。

修饰治疗可能是未来发展的方向，Mitapivat是一种变构小分子PK激活剂，已被证明可以在体外激活野生型和广泛突变的PK酶，目前已进入临床试验阶段[24-25]。但该药目前仅用于成人，缺乏儿童治疗的经验和数据，是否适合儿童使用有待进一步的研究。对于PKD患者的造血干细胞移植(hematopoietic allogeneic stemcell transplantation，HSCT)有治愈PKD的潜力，但考虑到移植风险，通常建议进行脾切除术和/或常规红细胞输血，而不是HSCT[26]。目前已有基于PKD动物模型的基因治疗研究，结果发现基因治疗可以纠正糖酵解途径功能，并未出现遗传毒性[11]。这些研究进展为PKD基因治疗提供了坚实的理论基础。

本例患儿出生后即出现严重贫血，经基因检测早期诊断为希特林缺陷病合并丙酮酸激酶缺乏症，这种病例在既往相关文献中未见报道。这两种罕见病均可引起棘形红细胞增多，故而该患儿发病时间早，棘形红细胞增多明显，容易输血依赖。该患儿早期使用无乳糖配方喂养，同时进行定期输血和祛铁治疗，目前生长发育良好，未来可能仍需要进行脾切除术等进一步治疗。目前，该疾病只能通过定期监测和个体化管理，为其提供最佳的治疗策略。PK激活剂和基因治疗有望改变患者的临床表型，为丙酮酸激酶缺乏症的治疗提供新思路。

参考文献

[1]Zhang ZH,Yang ZG,Chen FP,et al.Screening for five prevalent mutations of SLC25A13 gene in Guangdong,China:a molecular epidemiologic survey of citrin deficiency.Tohoku J Exp Med,2014,233(4):275-281.

[2]KeikoKobayashi,MiharuUshtkai,Yuan-ZongSong,et al.Overview of citrin deficiency:SLC25A13 mutations and the frequency.Chinese Clinical Journal of Practical Pediatrics,2008,23(20):5.

[3]Hayasaka K.Metabolic basis and treatment of citrin deficiency. J Inherit Metab Dis,2021,44(1):110-117.

[4]Pinto A,Ashmore C,Batzios S,et al.Dietary management,clinical status and outcome of patients with citrin deficiency in the UK. Nutrients,2020,12(11).

[5]Song Y-Z.Genotypic and phenotypic features of citrin deficiency:Five-year experience in a Chinese pediatric center. International Journal of Molecular Medicine,2011.

[6]Owen JS,Brown DJ,Harry DS,et al.Erythrocyte echinocytosis in liver disease. Role of abnormal plasma high density lipoproteins.J Clin Invest,1985,76(6):2275-2285.

[7]Mark M,Walter R,Harris LG,et al.Influence of parathyroid hormone,calcitonin,1,25(OH)2 cholecalciferol,calcium,and the calcium ionophore A23187 on erythrocyte morphology and blood viscosity.J Lab Clin Med,2000,135(4):347-352.

[8]Altomare I,Desman G,Aledort LM.Echinocytosis--an unusual manifestation of hemangioma.Am J Hematol,2006,81(7):532-534.

[9]Gedde MM,Yang E,Huestis WH.Shape response of human erythrocytes to altered cell pH. Blood,1995,86(4):1595-1599.

[10]Bianchi P,Fermo E.Molecular heterogeneity of pyruvate kinase deficiency.Haematologica,2020,105(9):2218-2228.

[11]Grace RF,Barcellini W.Management of pyruvate kinase deficiency in children and adults.Blood,2020,136(11):1241-1249.

[12]Secrest MH,Storm M,Carrington C,et al.Prevalence of pyruvate kinase deficiency:A systematic literature review.Eur J Haematol,2020,105(2):173-184.

[13]Nathan DG,Oski FA,Miller DR,et al.Life-span and organ sequestration of the red cells in pyruvate kinase deficiency.N Engl J Med,1968,278(2):73-81.

[14]Agarwal AM,Rets A. Laboratory approach to investigation of anemia with a focus on pyruvate kinase deficiency.Int J Lab Hematol,2020,42 Suppl 1:107-112.

[15]Boscoe AN,Yan Y,Hedgeman E,et al.Comorbidities and complications in adults with pyruvate kinase deficiency.Eur J Haematol,2021,106(4):484-492.

[16]Canu G,De Bonis M,Minucci A,et al.Red blood cell PK deficiency:An update of PK-LR gene mutation database.Blood Cells Mol Dis,2016,57:100-109.

[17]Bianchi P,Fermo E,Lezon-Geyda K,et al.Genotype-phenotype correlation and molecular heterogeneity in pyruvate kinase deficiency.Am J Hematol,2020,95(5):472-482.

[18]Bianchi P,Fermo E,Glader B,et al.Addressing the diagnostic gaps in pyruvate kinase deficiency:Consensus recommendations on the diagnosis of pyruvate kinase deficiency.Am J Hematol,2019,94(1):149-161.

[19]Fattizzo B,Cavallaro F,Marcello A,et al.Pyruvate kinase deficiency:current challenges and future prospects.J Blood Med,2022,13:461-471.

[20]van Beers EJ,van Straaten S,Morton DH,et al.Prevalence and management of iron overload in pyruvate kinase deficiency:report from the Pyruvate Kinase Deficiency Natural History Study.Haematologica,2019,104(2):e51-e53.

[21]Mojzikova R,Koralkova P,Holub D,et al. Iron status in patients with pyruvate kinase deficiency:neonatal hyperferritinaemia associated with a novel frameshift deletion in the PKLR gene(p.Arg518fs),and low hepcidin to ferritin ratios.Br J Haematol,2014,165(4):556-563.

[22]Iolascon A,Andolfo I,Barcellini W,et al.Recommendations regarding splenectomy in hereditary hemolytic anemias.Haematologica,2017,102(8):1304-1313.

[23]Grace RF,Bianchi P,van Beers EJ,et al.Clinical spectrum of pyruvate kinase deficiency:data from the Pyruvate Kinase Deficiency Natural History Study.Blood,2018,131(20):2183-2192.

[24]Al-Samkari H,Galactéros F,Glenthøj A,et al.Mitapivat versus Placebo for Pyruvate Kinase Deficiency.N Engl J Med,2022,386(15):1432-1442.

[25]Costa FF. Mitapivat for treatment of pyruvate kinase deficiency.Lancet Haematol,2022,9(10):e708-e709.

[26]van Straaten S,Bierings M,Bianchi P,et al.Worldwide study of hematopoietic allogeneic stem cell transplantation in pyruvate kinase deficiency. Haematologica,2018,103(2):e82-e86.

(收稿日期：2023-01-18)
(校对编辑：谢诗婷)