

分类号: R722.11

密 级: 公开

单位代码: 10422

学 号: 2015120007



山东大学

SHANDONG UNIVERSITY

# 博士学位论文

Dissertation for Doctoral Degree

(专业学位)

论文题目: 尿素循环障碍的临床与遗传学研究及  
PBMC 来源 hiPSC 和肝类器官的建立

Clinical characteristics, mutation analysis and the establishment of iPS  
cells line with liver organoid derived from peripheral blood  
mononuclear cells of Urea Cycle Disorder patients

作者姓名	阎贝贝
培养单位	齐鲁医学院
专业名称	儿科学
指导教师	盖中涛 教授
合作导师	

2021 年 5 月 29 日



---

## 原创性声明

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得山东大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。

作者签名：   闫  贝        日期：   2021  年   5  月   29  日

## 学位论文授权使用授权书

本人完全了解山东大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权山东大学可以将本学位论文的全部或部分内内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

作者签名：   闫  贝        导师签名   闫  贝        日期：   2021  年   5  月   29  日

## 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	7
符号说明.....	14
前言(文献综述).....	15
第一部分 尿素循环障碍的临床表现与遗传学研究.....	28
1 材料与方法 .....	28
2 结果.....	37
3 讨论.....	56
第二部分 OTCD病人PBMC来源iPS细胞系构建及验证.....	76
1 材料与方法 .....	76
2 结果.....	80
3 讨论.....	85
第三部分 OTCD病人iPS细胞来源肝类器官的建立及OTC表达验证.....	88
1 材料与方法 .....	88
2 结果.....	93
3 讨论.....	99
结    论.....	102
不足与展望.....	103
附    表.....	104
参考文献.....	134
致    谢.....	150
攻读学位期间发表论文目录.....	151
学位论文评阅及答辩情况表.....	152
英文论文 1.....	153
英文论文 2.....	174

## CONTENTS

Abstract in Chinese.....	1
Abstract in English.....	7
Abbreviation.....	14
Premise.....	15
Part 1 Clinical characteristics and gene mutation analysis of children with UCD.....	28
1 Materials and methods.....	28
2 Results.....	37
3 Discussion.....	56
Part 2 Establishment of iPSC line from PBMC of OTCD patients.....	76
1 Materials and methods.....	76
2 Results.....	80
3 Discussion.....	85
Part 3 Establishment of liver organoid derived from iPS cell lines of OTCD patients.....	88
1 Materials and methods.....	88
2 Results.....	93
3 Discussion.....	99
Conclusion.....	102
Shortage and Expectation.....	103
Charts and Figures.....	104
Reference.....	134
Acknowledgement.....	150
Index of published articles.....	151
Tables of review .....	152
Paper in English 1.....	153
Paper in English 2.....	174

# 尿素循环障碍的临床与遗传学研究及 PBMC 来源 hiPSC 和肝类器官的建立

博士研究生 阎贝贝

博士生导师 盖中涛 教授

专 业 儿科学

## 中文摘要

### 研究背景

尿素循环障碍 (Urea Cycle Disorders, UCD) 是由于参与尿素循环的六种酶中任意一种酶的基因发生突变而导致的出生缺陷, 发病率据文献报道从 1:8000 到 1:45,000 不等。除鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺陷(Ornithine Transcarbamylase Deficiency, OTCD)为 X 连锁遗传外, 其余五种均为常染色体隐性遗传。UCD 根据发病时间分为早发型和晚发型, 临床多表现为高氨血症的疾病过程。早发型 UCD 因酶严重缺乏或缺失而致临床症状极其严重, 进展迅速, 死亡率高达 50% 以上, 存活者神经系统后遗症多严重; 晚发型则可反复出现程度不一的高氨血症, 亦合并神经系统损害, 严重影响人类健康和生活质量。然而, 由于 UCD 的罕见性和临床症状的不典型性, 临床上面临识别难、诊断难、治疗难的困境, 死亡率和致残率居高不下。因此, UCD 患者的早期识别、早期诊断、早期干预, 对挽留患者生命和改善患者预后都有着极为重要的意义。

诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 是由体细胞经重编程而获得的具有胚胎干细胞特性和功能的干细胞, 其细胞来源广, 诱导和培养技术成熟, 建立后可长期培养, 且病人来源的 iPSC 天然携带病人的致病基因, 是建立疾病细胞模型的理想选择。将其诱导分化为目的细胞, 可进行疾病模型的建立、治疗方法的对比、药物的筛选和毒理的研究并应用于再生医学领域的研究, 应用前景广阔。

鉴于上述研究背景, 本论文围绕汇总 UCD 病人的临床资料和构建其外周血单个核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC)来源的 iPSC 与肝类器官这两方面展开研究, 试图为 UCD 的诊疗提供循证医学依据, 并期望将 iPSC 和肝类器官作为 OTCD 的体外细胞模型。

## 研究目的

1. 对 7 例 UCD 患儿的临床特征、疾病过程、实验室检查及基因检测结果进行汇总分析，总结疾病过程及特点，探索基因型与临床表型之间的关系。
2. 建立 OTCD 患儿 PBMC 来源的 iPS 细胞系，并通过 3D 培养技术诱导分化为肝类器官，以期将其作为研究 OTCD 的体外疾病模型。

## 研究方法

1. 对 2016 年 10 月至 2020 年 12 月期间于山东大学齐鲁儿童医院就诊的 16154 名遗传代谢病高危儿进行血和尿串联质谱筛查，同时对临床出现意识障碍、惊厥等脑病表现的患儿进行血浆氨检测与遗传学检查，共确诊 7 例 UCD 的患儿，分析其临床表型、实验室检查及基因检测结果。
2. 分离不同基因变异 OTCD 患儿的 PBMC，以非整合方法进行重编程，挑取具备干细胞形态的克隆进行纯化和培养。采用细胞免疫荧光技术对 iPSC 进行多能性分子标记物鉴定；利用 qRT-PCR 方法检测内源性多能基因的表达；并采用拟胚体自分化实验检测三个胚层的分子标记物表达情况，验证 iPSC 多向分化潜能；通过 PCR 技术证明外源基因的表达消失来验证非整合性重编程模式。利用染色体核型鉴定、qRT-PCR 和 Sanger 测序技术确认所构建的 iPSC 具有 OTCD 病人特异性。
3. 将 OTCD 患儿的 iPSC 与正常儿童 iPSC 同时诱导分化为定型内胚层细胞 (definitive endodermal cells, DEC)，然后利用 3D 培养方式进行悬浮培养，使其分化成熟为肝脏类器官。分别应用 qRT-PCR 和免疫荧光的方式对不同阶段特异性基因和肝特征性蛋白的表达进行检测，从而证明肝类器官构建成功。在基因和蛋白水平对肝类器官中 OTC 的表达进行检测，初步探讨新发变异对 OTC 的影响。

## 研究结果

1. 临床资料及实验室检查：7 例 UCD 患儿中有 6 例早发型病例，1 例晚发型病例，均表现为急性高氨血症的临床过程，且合并多脏器功能障碍，但以神经系统症状为突出表现。凝血功能障碍先于肝酶异常出现，且其中纤维蛋白原的降低与血浆氨的升高有明显相关性。早发型 UCD 患者均合并低钙血症，且血筛中均有血丙氨酸和脯氨酸水平的显著升高。2 例患者在接受血液净化治疗以后，虽然血浆氨水平明显下降，但临床症状均未见明显好转。

2. 遗传学结果：7个病例发现6个新发变异，包括5个点变异和1个3-9号外显子缺失，均位于基因保守区域；导致早发型病例的基因变异均造成蛋白结构的改变。对比基因型和临床表型发现，2个无义变异和3-9号外显子缺失的患儿或病情进展更迅速，或临床症状更严重、治疗效果差。

3. iPSC的建立和鉴定：重编程后，OTCD患儿来源的PBMC呈现出显著的胚胎干细胞形态。重编程所得的2株OTCD-iPSC不但可表达TRA-60、TRA-81、OCT4、SSEA4和NANOG等多能性标志物以及OCT4、SOX2、NANOG等内源性多能基因，还可自分化形成典型的拟胚体结构，并可以检测到内、中、外胚层的特异性标志物。构建的iPSC与患儿外周血样本染色体核型相同，且保留了细胞源原有的基因变异，未整合质粒基因。

4. 肝类器官的建立和鉴定：不同时期的细胞明场图证明iPS细胞经历不同的阶段最终呈现肝细胞形态，随着iPSC向肝细胞方向分化，定型内胚层的标记物在基因和蛋白两个层面的表达均下降，而肝细胞特征性标记物，如ALB、CYP3A4、AFP等的表达则逐渐升高。3-9号外显子缺失患儿PBMC来源的肝类器官不表达细胞源缺失的外显子，且OTC蛋白的表达量也显著下降。

## 研究结论

1. 凝血功能障碍可能是UCD病人肝损伤更早期的表现，且需动态监测早发型UCD病人的血钙水平；血丙氨酸和脯氨酸水平可能对早发型近端UCD病人有辅助诊断价值。

2. 血液净化治疗可有效降低血浆氨浓度，但其临床症状的改善可能与血浆氨的降低不成比例；其临床表型和预后仍取决于基因变异对酶的结构和/或功能的影响程度；发生在基因保守区域、酶反应域、严重影响蛋白结构的变异以及大的片段缺失和无义变异可能对酶的影响更为明显，从而导致更为严重的临床表型。

3. 采用非整合重编程技术成功构建2株PBMC来源的OTCD病人特异性的iPS细胞系；将其向肝细胞方向诱导，成功建立了该病首个PBMC来源的肝脏类器官，可作为OTCD潜在的肝类器官模型进行相关研究。

**关键词：**尿素循环障碍，高氨血症，诱导性多能干细胞，肝类器官



**Clinical characteristics, mutation analysis and the establishment  
of iPS cells line with liver organoid from Chinese patients with  
Urea Cycle Disorder**

**ABSTRACT**

Postgraduate Beibei Yan

Supervisor Prof. Zhongtao Gai

Major Pediatrics

**Background**

Urea Cycle Disorder (UCD) is an inborn error disease which caused by mutations in any one of the six enzymes involved in the Urea Cycle. The incidence of UCD varies from 1:8,000 to 1:45,000, as reported in the literature. Except for the X-linked inheritance of Ornithine Transcarbamylase Deficiency (OTCD), the other five are all autosomal recessive inheritance. According to the onset time, UCD can be divided into early onset and late onset, which is clinically manifested as the disease process of hyperammonemia. The clinical symptoms of early-onset UCD are extremely serious due to severe enzyme deficiency or missing. The mortality rate is as high as 50%, and the survivors are often suffered from severe neurological sequelae. The late onset patients can experience repeatedly hyperammonemia episode in different degree, often complicated with nervous system damage, seriously affecting human health and quality of life. However, due to the rarity of UCD and the atypical clinical symptoms, it is difficult to identify, diagnose or treat UCD clinically, as a result, the mortality and disability rates remain high. Therefore, early identification, early diagnosis and early intervention of UCD patients are of great significance to retain the lives of patients and improve the prognosis of patients.

Induced pluripotent stem cells (iPSC) is acquired by reprogramming somatic cells with pluripotent factors and generating features and functions of stem cells. Owing to the wide cell source, mature induction and culture techniques, long-term culture ability, carrying the same mutation genes with patients, iPSC is an ideal kind of cells to establish disease cell models. After induce iPSC to target cells, it can be used to

establish disease model, compare therapeutic methods, screen drugs and study toxicology, and be used in regenerative medicine field, which has promising prospect.

Based on the above research background, this thesis focuses on the summary of clinical data of UCD patients and the construction of iPSCs and hepatic organoids derived from Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMC), in an attempt to provide evidence-based medical evidence for the diagnosis and treatment of UCD, and establish in vitro cell models of OTCD.

### **Objectives**

1. Summarized and analyzed the clinical characteristics, disease course, laboratory examination and genetic test results of 7 children with UCD, to sum up disease characteristics, and explore the relationship between genotype and phenotype.
2. Established iPSC cell lines derived from PBMC in children with OTCD and subsequently differentiate into liver organoid by 3D culture technology, in order to serve as an in vitro disease model for the study of OTCD.

### **Methods**

1. A total of 16,154 children at high risk of genetic metabolic diseases who were presented in Qilu Children's Hospital of Shandong University from October 2016 to December 2020 were screened by blood and urine tandem mass spectrometry. Meanwhile, plasma ammonia test and genetic examination were performed on children with clinical symptoms of encephalopathy such as disturbance of consciousness and convulsion. A total of 7 children with UCD were diagnosed. The results of clinical phenotype, laboratory examination and gene test were analyzed.
2. PBMC of OTCD children with different genetic variants was isolated, and reprogrammed by non-integration method. Clones with stem cell morphology were selected for purification and culture. The pluripotent molecular markers of iPSCs were identified by cellular immunofluorescence technique. The expression of endogenous pluripotent genes was detected by qRT-PCR. The expression of molecular markers in the three germ layers was detected by embryoid body self-differentiation assay to verify the multidirectional differentiation potential of iPSCs. The unintegrated reprogramming pattern was verified by PCR to prove that the expression of the foreign gene disappeared. Chromic karyotype identification, qRT-PCR and Sanger

sequencing were used to confirm that the constructed iPSC was patient specific for OTCD.

3. The iPSCs of OTCD children and normal children were both induced to differentiate into definitive endodermal cells (DEC) at the same time, and then cultured using 3D culture method to differentiate into liver organoid. The expression of specific genes and liver characteristic proteins at different stages were detected by qRT-PCR and immunofluorescence respectively, which proved the successful construction of liver organs. The expression of OTC in liver organoid was detected at both gene and protein levels to preliminarily explore the influence of newly emerged variation on OTC.

## Results

1. Clinical and laboratory data: Among the 7 UCD cases, 6 of them belonged to early onset type and 1 with late onset type, all of which showed the clinical process of acute hyperammonemia, combined with multiple organ dysfunction, but neurological symptoms were the prominent manifestations. Coagulation dysfunction precedes liver enzyme abnormality, and the decrease of fibrinogen is significantly correlated with the increase of plasma ammonia. All the patients with early onset UCD were complicated with hypocalcemia, and the serum alanine and proline levels were significantly increased. After receiving blood purification treatment, although the plasma ammonia level was significantly decreased in 2 patients, the clinical symptoms were not significantly improved.

2. Genetic results: 6 new variations were found in 7 cases, including 5 spot variations and 1 deletion of exon 3-9, all of which were located in the conserved region of genes. The genetic variations that cause early onset cases all result in altered protein structure. By comparing genotypes and clinical phenotypes, it was found that the children with 2 nonsense variations and the deletion of exon 3-9 had more rapid disease progression, or more severe clinical symptoms and poor treatment effect.

3. Establishment and identification of iPSCs: After reprogramming, PBMC from children with OTCD showed significant embryonic stem cell morphology. The two OTCD-iPSCs obtained by reprogramming could express pluripotent markers such as TR-60, TR-81, OCT4, SSEA4 and Nanog, as well as endogenous pluripotent genes such as OCT4, SOX2 and Nanog. Both of these two iPSCs can self-differentiate into

typical embryomoid structures with expressing specific markers of endoderm, mesoderm and ectoderm. The constructed iPSCs had the same chromosome karyotype as the children's peripheral blood samples, and retained the original gene variation of cell origin and unintegrated plasmid genes.

4. Establishment and identification of liver organoid: The cell bright field maps at different stages showed that iPSC cells underwent different stages and finally presented hepatocyte morphology. With the differentiation of iPSCs toward hepatocytes, the expression of markers in the formalized endoderm decreased at both gene and protein levels, while the expression of characteristic markers of hepatocytes, such as ALB, CYP3A4, AFP, were all gradually increased. The PBMC-derived liver organoid of the children with exon deletion 3-9 did not express the cell-derived exon deletion, and the expression of OTC protein was also significantly decreased.

#### Conclusion

1. Coagulopathy may be an earlier manifestation of liver injury in patients with UCD, and dynamic monitoring of serum calcium levels in patients with early onset of UCD is needed. Serum alanine and proline levels may be of auxiliary diagnostic value in early onset proximal UCD patients.

2. Blood purification therapy can effectively reduce plasma ammonia concentration, however, the improvement of clinical symptoms may not be proportional to the decrease of plasma ammonia. Its clinical phenotype and prognosis still depend on the effect of gene variation on the structure and/or function of the enzyme. Variations occurring in conserved gene regions, enzyme reactivity domains, severely affecting protein structure, as well as large fragment deletions and meaningless variations may have more pronounced effects on enzymes, leading to more severe clinical phenotypes.

3. Two PBMC-derived OTCD patient-specific iPSC cell lines were successfully established by non-integrated reprogramming technique. The first liver organoid derived from PBMC for this disease was successfully established by inducing it to liver cells, which can be used as a potential liver organ model for OTCD for related studies.

**Key words:** Urea Cycle Disorder, Hyperammonemia, iPSCs, Liver organoid

## 符号说明

英文缩写	英文全称	中文全称
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	外周血单个核细胞
hiPSC	Human induced pluripotent stem cells	人诱导性多能干细胞
UCD	Urea Cycle Disorders	尿素循环障碍
OTCD	Ornithine Transcarbamylase Deficiency	鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺陷
CPS1D	Carbamoyl Phosphate Synthetase I Deficiency	氨甲酰磷酸合成酶 I 缺陷
DEC	definitive endodermal cells	定型内胚层细胞
NAGSD	N-Acetylglutamate synthase deficiency	乙酰谷氨酸合成酶缺陷
ASSD	Argininosuccinate synthetase deficiency	精氨酸琥珀酸合成酶缺陷
ASLD	Argininosuccinate lyase deficiency	精氨酸琥珀酸裂解酶缺陷
ARGD	Arginase Deficiency	精氨酸酶缺陷
ESC	embryonic stem cells	胚胎干细胞
EB	Embryoid bodies	拟胚体
AFP	Alpha-fetoprotein	甲胎蛋白
ALB	Albumin	白蛋白
AAT	Alphao-antitrypsin	$\alpha$ 抗胰蛋白酶

## 前言（文献综述）

### 一、尿素循环障碍概述

#### 1. 尿素循环的过程及功能

尿素循环（Urea cycle），也称鸟氨酸循环（Ornithine cycle），由 Hans Krebs 等人于 1932 年在鼠肝切片的体外实验中发现，后来被 Kurt Henseleit 等人完善 (Krebs H, 1932)，是人类发现的第一个代谢循环。

哺乳动物的尿素循环主要发生在肝细胞中，共 5 个反应，其中 2 个发生在线粒体内，3 个发生在细胞质内（图 1）。在肝细胞线粒体内，1 分子的氨(NH<sub>3</sub>)和 1 分子的二氧化碳(CO<sub>2</sub>)在氨甲酰磷酸合成酶 I (Carbamoyl Phosphate Synthetase I, CPS1)催化下生成氨甲酰磷酸(Carbamoyl phosphate)。CPS1 以 N-乙酰谷氨酸(N-Acetylglutamate, NAG)为辅助因子，乙酰谷氨酸合成酶(N-Acetylglutamate Synthase, NAGS)活性升高可以通过 NAG 的增多而增强氨甲酰磷酸的合成，从而促进尿素生成。

在线粒体中，氨甲酰磷酸和鸟氨酸在鸟氨酸氨甲酰基转移酶(Ornithine Transcarbamylase, OTC)催化下生成瓜氨酸，后者被转运至胞液，在精氨酸琥珀酸合成酶 1(Argininosuccinate Synthetase 1, ASS1)的作用下，瓜氨酸与天冬氨酸缩合成精氨酸琥珀酸，精氨酸琥珀酸分解酶(Argininosuccinate Lysase, ASL)将精氨酸琥珀酸裂解成精氨酸和延胡索酸，最后，精氨酸在精氨酸酶(Agrinase, ARG)的催化下分解为鸟氨酸和尿素。鸟氨酸可进入线粒体再参与鸟氨酸循环，尿素则扩散入血，随尿排出。总的方程式为： $2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + 3\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{尿素} + 2\text{ADP} + 4\text{Pi} + \text{AMP} + \text{PPi}$  (Krebs H, 1932)，概括为两个氨与一个二氧化碳消耗了三个 ATP 形成了尿素的过程。

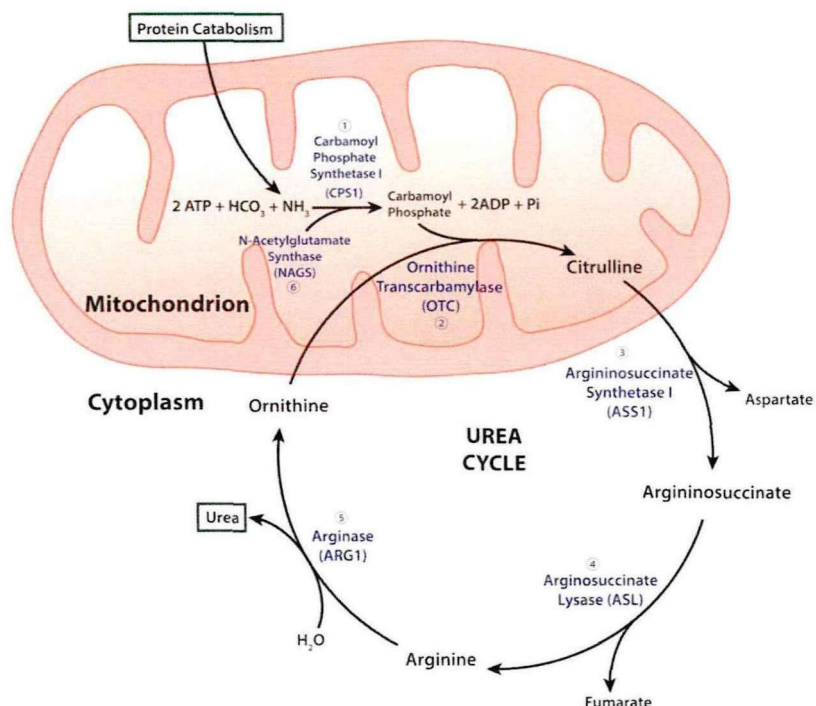


图 1 尿素循环过程图(Blair NF, 2015)

蛋白质作为人体三大营养物质之一，参与各项生理活动。生物体中的蛋白质并不是固定不变的，而是处于分解与合成的动态平衡之中。内生的蛋白质分解为氨基酸，氨基酸再合成新的蛋白，这个过程消耗的蛋白（300-400 克/天）约为人类每天摄入蛋白质（50-80 克/天）的 5-6 倍（新生儿、生长发育中的儿童更高）(Schutz Y, 2011)，中间会产生大量的代谢产物——氨。氨对于机体是有毒的，神经系统尤为敏感，除再利用外，多余的氨必须排出，而尿素循环则担负着这个重要的使命——将有毒的氨转换为无毒的尿素排出体外，维持机体正常的血氨水平。尿素不仅是机体清除废物氨的途径，也是氨在体内转运的安全形式。

所有的动物，从无脊椎动物到哺乳动物，天生都可以合成尿素，也就相应地都拥有尿素循环(Withers PC, 1998)。在哺乳动物，尿素循环在胎儿期就已经发挥作用，以此保证氨基酸可以作为能量来源维持胎儿的生长(Schutz Y, 2011)。因此，尿素循环对生长发育和健康生存中都有着举足轻重的作用。

## 2. 尿素循环障碍

如上所述，尿素循环是机体内维持氨平衡的最重要的代谢通路，当尿素循环障碍(Urea cycle defects, UCD)发生时，机体的氨平衡被打破，从而产生轻重不一的临床症状，严重者则致命。

UCD 的病因是尿素循环相关的六种酶的缺陷导致的氨代谢异常，除鸟氨酸

氨甲酰基转移酶基因位于 X 染色体外，其余五种均位于常染色体。UCD 的发病率因临床症状的不典型性和疾病程度的轻重差别而很难估测，文献报道从 1:8000 到 1:45,000 不等(Walker V, 2014)。临床症状的轻重取决于酶缺陷的严重程度，完全缺陷的患者多在生后数天即发病，死亡率可高达 50%；而部分缺陷者可出现非常轻微的甚至被忽视的临床症状，也有的会发生反复出现的高氨血症(Nassogne MC, 2005)。

## 2.1 氨甲酰磷酸合成酶-1 缺陷 (Carbamoylphosphate Synthetase 1 Deficiency, CPS1D)

氨甲酰磷酸合成酶-1 (Carbamoylphosphate Synthetase 1, CPS1)是尿素循环的第一个酶，也是整个尿素循环的限速步骤。编码 CPS1 的基因在 2 号染色体长臂 2q35(Summar ML, 1995)，包括 38 个外显子和 37 个内含子，4500 个编码核苷酸。在形成 CPS1 蛋白时，氮端的 38 个氨基酸会与碳端的 1462 个成熟氨基酸区段分离。人类的 CPS1 蛋白含有 4 个亚基，其作用是将氨和碳酸氢根合成氨甲酰磷酸，反应式为  $2\text{ATP} + \text{NH}_3 + \text{HCO}_3^- \rightarrow 2\text{ADP} + \text{HPO}_4^{2-} + \text{NH}_2\text{CO}_2\text{PO}_3^{2-}$  (Rubio V, 1993)。这个过程共有三步，分别为碳酸氢盐和氨基甲酸酯的磷酸化 (ATP 依赖) 以及氨基甲酸酯的合成过程。图 2 分别指出了上述三步反应及发生的位置 (Díez-Fernández C, 2014)。

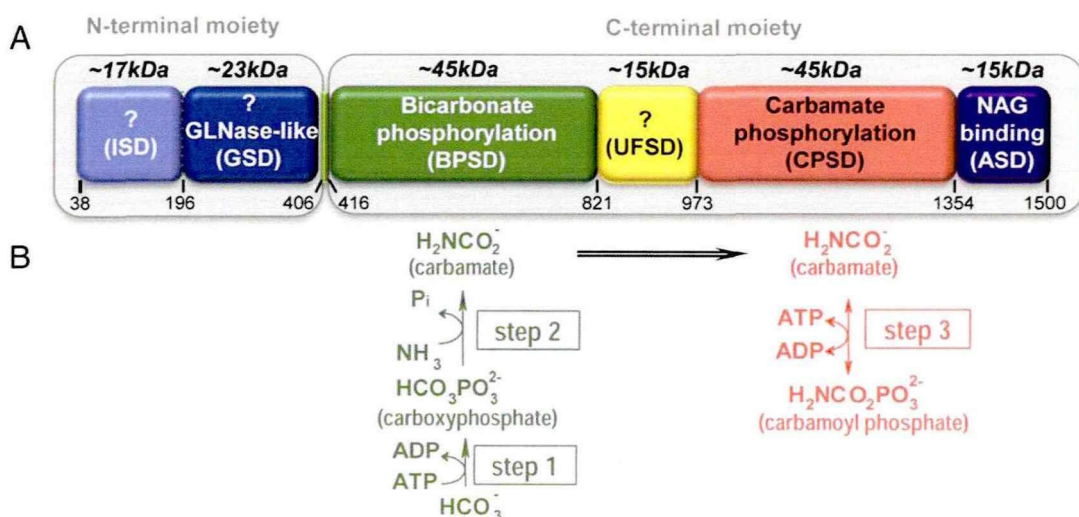


图 2 氨甲酰磷酸合成酶-1 的结构及反应步骤

图 2A: CPS1 包括 40kDa 的氮端亚基和 120kDa 的碳端亚基，绿色的 BPSD 表示碳酸氢根发生磷酸化的部位，而红色的 CPSD 表示氨基甲酸酯磷酸化的部位。

图 2B: 分步解释了碳酸氢根与氨形成氨甲酰磷酸的过程。第一步是碳酸氢根的磷酸化



过程,形成羧基磷酸盐,后者与氨形成氨基甲酸酯,氨基甲酸酯被运送到另一个亚基(CPSD)进行磷酸化,形成氨甲酰磷酸(Carbamoyl phosphate)。

CPS1D 即是由于 CPS1 基因出现不同类型的突变而发生的酶异常性先天性出生缺陷,发病率在美国报道为 1:975,000(Batshaw ML, 2014),而在日本报道约为 1:800,000(Nagata N, 1991)。由于 CPS1 是尿素循环的限速步骤,大多数 CPS1D,尤其是早发型多为致命性的。一项历时 6 年的 UCD 研究显示,新生儿期发病的 UCD 总的死亡率约 24%,但 CPS1D 的死亡率可达 42%,为各种 UCD 之首(Batshaw ML, 2014)。早发型目前仍缺乏有效的治疗方法,新生儿期的幸存者日后会因感染或摄入蛋白过多而经历反复的高氨血症。而晚发型的患者则出现类似于杂合子的临床表现,如摄食困难、生长发育落后、精神运动迟滞等表现。

## 2.2 乙酰谷氨酸合成酶缺陷 (N-Acetylglutamate synthase deficiency, NAGSD)

谷氨酸与乙酰辅酶 A 在乙酰谷氨酸合成酶的催化下形成乙酰谷氨酸 (NAG), NAG 作为 CPS1 的协同因子,在尿素循环的第一步上也发挥着重要作用。由于两者实际上是导致同一个酶功能异常,因此,要诊断 CPS1D 需要先排除 NAGSD。

NAGSD 是尿素循环中最少见的一种,仅占尿素循环的 0.5-1%,其发病率估计在 1/3,500,000-7,000,000(Summar ML, 2013),NAGSD 的发病年龄可从新生儿期到 50 岁以后(Tuchman M, 2008)。由于 NAGS 与 CPS1 的密切关系,其临床表现与 CPS1D 类似;实验室检查上也可以表现为血氨和谷氨酰胺水平的升高,血瓜氨酸和尿乳清酸水平的降低。目前已有至少来自 45 个家庭的 59 名病人被报道为 NAGSD, NAGS 基因的突变也是非常个体化的(Eiman H. Al Kaabi, 2016)。尽管 NAGSD 的发病率很低,但它却是唯一一个有特殊治疗方法的 UCD。氨甲酰谷氨酸(N-carbamylglutamate, NCG)作为 NAG 的类似物,可以激活 CPS1。有证据表明,给 NAGSD 的新生儿提供 NCG 可以重新恢复体内的尿素生成过程,并可以在今后的慢性过程中减少其他药物的应用和饮食的限制(Nicholas Ah Mew, 2011),甚至有建议说所有高氨血症疑似 UCD 的新生儿均应该接受 NCG 的治疗,因为这对于 NAGSD 患儿是可以挽救生命的治疗方法,且对某些 CPS1D 的病例也有一定的效果(Guffon N, 2005)。

## 2.3 鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺陷 (Ornithine transcarbamylase deficiency,

## OTCD)

鸟氨酸氨甲酰基转移酶(Ornithine transcarbamylase, OTC)也是线粒体酶,其作用是催化氨甲酰磷酸和鸟氨酸形成瓜氨酸。人类的 OTC 基因位于 X 染色体的 Xp21.1 (Lindgren V, 1984),因此 OTCD 是尿素循环障碍中唯一一个伴性遗传的疾病。UCD 中大概有一半是 OTCD (Seminara J, 2010),其发病率约 1/62,000-77,000,至 2015 年,共报道了 417 种致病性基因突变 (Caldovic L, 2015)。由于是 X 连锁基因突变,绝大多数的患者都是男性纯合子,且约 50%的新生儿期发病的男性患儿均难以存活(Lichter-Konecki U, 2013)。对于女性携带者,约 20%会表现出临床症状 (Maestri NE, 1996)。

OTCD 的临床症状还是呈现较为经典的高氨血症的过程。在治疗上,除常规的限制氨基酸摄入等经典治疗外,目前已有对 OTCD 的产前干预及早期干预的报道。如对两位怀有男婴且携带 OTCD 基因的孕母在分娩前给予 Ammonul (苯甲酸钠和苯乙酸钠的复合制剂)、精氨酸及含糖液体静脉输注,出生之后立即给予婴儿维持剂量的 Ammonul、精氨酸和高热卡的营养供给,结果显示患儿的谷氨酰胺水平正常,生后 2 天的血氨水平均在正常范围,且未出现任何高氨血症的神经系统症状(Wilnai Y, 2018)。而对于一个晚发型 OTCD 家族中多个携带基因的女性分娩的 OTCD 患儿的早期干预结果显示,自新生儿期即开始接受精氨酸治疗的患儿没有出现高氨血症,且生长发育同正常儿童(Fujisawa D, 2015)。这些结果一方面提示基因诊断的重要性,另一方面也为提高 OTCD 患儿生存率和生活质量提供了诊疗方向和依据。

## 2.4 精氨酸琥珀酸合成酶缺陷 (Argininosuccinate synthetase deficiency, ASSD (Citrullinemia I, CTLN1))

精氨酸琥珀酸合成酶 (Argininosuccinate synthetase, ASS) 的作用是催化瓜氨酸与天冬氨酸形成精氨酸琥珀酸,ASS 的缺陷导致瓜氨酸在体内累积,因此 ASSD 是瓜氨酸血症中的一种。编码 ASS 的基因是 ASS1,位于 9 号染色体 q34.1,含 16 个外显子,编码 412 个氨基酸,目前已报道至少 137 种致病基因(Diez-Fernandez C, 2017)。经典型 CTLN1 表现为新生儿期发病的致命性的高氨血症,晚发型和/或轻微症状的表现为轻度瓜氨酸血症,还有一大部分无临床症状、仅被新生儿筛查检测出的为生物学表型(Lin, 2019)。但是需要注意的是,瓜氨酸的增高在 II

型瓜氨酸血症 (Citrin 缺乏)、精氨琥珀酸裂解酶缺乏、丙酮酸羧化酶缺乏等疾病中同样可以见到, 应注意鉴别 (Sander J, 2003)。

Zielonka 建立了一种哺乳动物等位基因的表达系统来预测 ASS 的酶活性, 发现酶活性在 8% 以下的患者有更频繁且更严重的高氨血症事件, 认知功能也较酶活性在 8% 以上的低 (Zielonka, 2019)。治疗方面, 除饮食控制外, 肝脏移植对新生儿期发病的 CTLN1 有非常理想的疗效, 不但可使病人在正常饮食情况下仍保持血氨和瓜氨酸在正常水平, 还对患者的发育落后有良好的改善效果 (Liu, 2021)。

## 2.5 精氨琥珀酸裂解酶缺陷 (Argininosuccinate lyase deficiency, ASLD)

精氨琥珀酸裂解酶 (Argininosuccinate lyase, ASL) 是尿素循环的第五个酶, 其作用是将精氨琥珀酸裂解成为精氨酸和延胡索酸。ASLD 发病率约为 1/70000 (Brusilow SW, 2009), 仅次于 OTCD。编码 ASL 的基因位于 7q11.21, 存在超过 300 种基因多态型, 至少 67 种致病变异。Balme 等人对 134 个 ASLD 病人的样本进行了基因分析, 发现绝大多数的基因突变是错义突变; 虽然没有发现非常明显的突变热点, 但 4 号, 6 号和 12 号外显子的突变可能会导致更为严重的临床表型 (Balmer C, 2013)。ASLD 也分为早发型和晚发型, 早发型与其他 UCD 一样, 以高氨血症为主要临床表现, 但 ASLD 有比较特征性的表现, 即肝脏肿大和结节性脆发症 (Brusilow SW, 2009)。而晚发型则临床表现差异显著, 可能表现为周期性的高氨血症, 也可能完全没有因高氨血症就诊却发生严重的神经认知障碍、肝脏疾病 (甚至肝纤维化) 及系统性高血压 (Sandesh C, 2013)。

## 2.6 精氨酸酶缺陷 (Arginase Deficiency, AGD)

精氨酸酶是尿素循环的最后一个酶, 催化精氨酸水解为鸟氨酸和尿素, 前者再次进入尿素循环, 而后者则作为氨的最终代谢产物被排出体外, 从而实现氨的解毒过程。AGD 的发病率从 1/300,000 到 1/2,000,000 不等, 欧美国家的数据显示约在 1/950,000 (Summar ML, 2013)。编码 ARG 的基因位于 6q23, 目前已知至少 43 种致病的变异, 多数为错义突变 (Sin YY, 2015)。

AGD 通常不会导致非常严重的高氨血症, 而以严重的高精氨酸血症为主要表现, 神经系统对于高精氨酸的毒性非常敏感 (Carvalho DR, 2012)。因此, 虽然 AGD 通常不会在新生儿期发病, 但其发病后可表现为严重的痉挛、运动能力丧

失、肠道和膀胱控制能力的完全丧失、惊厥、生长落后及严重的智力受损等(Kirtika H, 2018)。由于 AGD 的病人多数经历较为漫长的疾病过程, 相对于其他 UCD, 对于 AGD 治疗的研究更为广泛和深入。基础的标准治疗仍然是饮食控制, 包括低蛋白饮食联合无精氨酸或瓜氨酸的必须氨基酸供给(Haberle J, 2012), 但各种基于细胞移植、mRNA 及基因编辑技术的动物实验均为 AGD 提供了更为广阔的治疗空间和潜在的精准治疗可能(Stephanie A.K.A, 2019; Kirtika H, 2018; Sin YY, 2017)。

## 二、诱导性多能干细胞的研究进展

### 1. 诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC)的发现和建立

进入 21 世纪以来, 细胞和基因水平的研究日新月异, 但是, 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)的研究面临多重挑战, 如细胞来源、伦理限制等。因此, Takahashi 等人发明了一种替代 ESC 的方法, 在培养 ESC 的条件下, 利用 Oct3/4, Sox2, c-Myc 以及 Klf4 这四种因子将小鼠胚胎或人纤维母细胞来源的多能干细胞进行诱导, 使其不仅可以出现 ESC 同样的形态学和生长特性, 还可以表达 ESC 的标记基因, 他们将这种细胞命名为诱导性多能干细胞(iPSC)。将这些细胞注入裸鼠后, 生长出来的肿瘤包含了三个胚层的不同组织, 注入囊胚的 iPSC 也有助于胚胎的发育(Takahashi K, 2006)。随后的研究证实了这四种因子同样可以重编辑人类的细胞, 包括胚胎干细胞和体细胞, 使它们也成为 iPSC(Park IH, 2008)。上述多能性转录因子在重编程细胞的过程中使 DNA 发生了甲基化并修饰组蛋白, 使得染色质结构发生了改变, 效仿了胚胎阶段的状态(Palakkan AA, 2017)。对于体细胞来说, 这些转录因子并不能完全控制其表观状态, 但是这些转录因子的长时间表达和正向调节反馈环缓慢地改变着体细胞的表观状态, 从而建立起新的多能性路径, 改变了细胞的命运(Young RA, 2011)。

重编程并不能改变所有细胞的命运, 如果在有限的时间窗内去检测重编程因子的表达率, 重编程的效率其实很低(Bilic J, 2012), 这就需要建立一套标准来验证是否真正建立了 iPSC。Stem Cells 杂志认为这个标准包括重编程后的细胞需要呈现出胚胎干细胞的形态学特征, 有一定的增殖效率, 可以形成畸胎瘤, 并能在囊泡中促进胚胎的发育等; 而外源性多能转录基因需要在重编程的细胞中先激活后消失。最后, iPSC 应该能够通过四倍体胚胎互补技术形成一个完整的动物(图

3)。然而受限于现实条件，这些指标在大多数细胞株上都难以实现，譬如最后一项就受限于伦理(Bilic J, 2012)。因此，目前对多数 iPSC 细胞系的鉴定都是在上述标准中选择其中的几项作为依据。

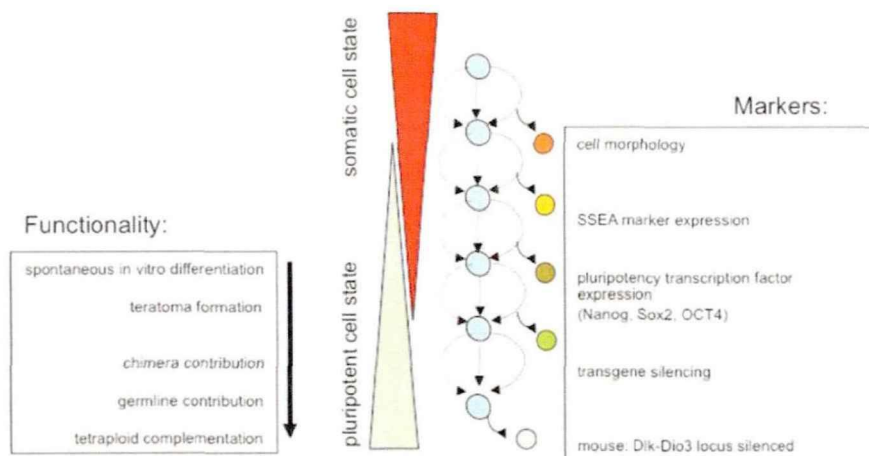


图 3 体细胞来源的 iPSC 的鉴定指标(Bilic J, 2012)

## 2. iPSC 的应用

iPSC 的发现避开了伦理学的束缚，使培养“定制”多能细胞成为可能，也是特定病人、特定疾病模型的理想细胞，并且可应用于再生医学和生殖医学(Pessôa LVF, 2019)，因此成为近年来研究的热点。除人类外，其他物种，如啮齿类(Liao J, 2009)、灵长类(Liu H, 2008)、反刍类、家畜类(Esteban MA, 2009)的 iPSC 也已经被建立，某些甚至形成了特定的动物模型被应用于各领域的研究。譬如羊，由于与人类有着更相似的多基因特性、更相似的体型及寿命(Harding J, 2013)，因此被更广泛地应用于母婴医学的研究中(Morrison JL, 2018)。

在肝脏相关疾病的研究中，iPSC 也发挥了重要的作用(图 4)。Song 等人首先将人类来源的 iPSC 诱导为类肝细胞，发现后者不仅可以表达白蛋白(ALB)、甲胎蛋白(AFP)和细胞角蛋白 18(CK18)等肝脏的特异性标记物，还能表达  $\alpha 1$  抗胰蛋白酶(AAT)和细胞色素 3A4(CY3A4)等功能蛋白，与内源性的正常肝细胞有着相似的表型(Song Z, 2009)，为 iPSC 在肝脏疾病领域的研究揭开了序幕。作为肝脏疾病之一的尿素循环障碍，在近十年间也利用 iPSC 进行了多项研究。利用 ASLD 的小鼠模型和通过 ASLD 病人的 iPSC 衍生的内皮细胞，Jordan 等人证实缺乏 ASL 的内皮细胞会因一氧化氮的合成降低、氧化应激增多及血管再生能力受损而导致高血压(Jordan K, 2018)。Sin 等人试图通过修复 AGD 小鼠缺失的外显

子来恢复精氨酸酶的功能。他们将修复后的 iPSC 诱导成为类肝细胞，发现后者不仅表达了肝细胞的标记物，还具有糖原贮存的功能。尽管这些类肝细胞只表现出了非常微弱的尿素循环的功能，但诱导出来的肥大细胞却表达出了一定量的精氨酸酶，为基因编辑治疗 AGD 提供了理论基础(Sin YY, 2017)。虽然尚未开展 iPSC 来源的肝细胞的临床研究(Viviana C, 2020)，但已有研究表明，由 iPSC 诱导分化出的肝细胞可以在动物模型体内成熟(Touboul T, 2010)，为今后的临床应用奠定了一定基础。

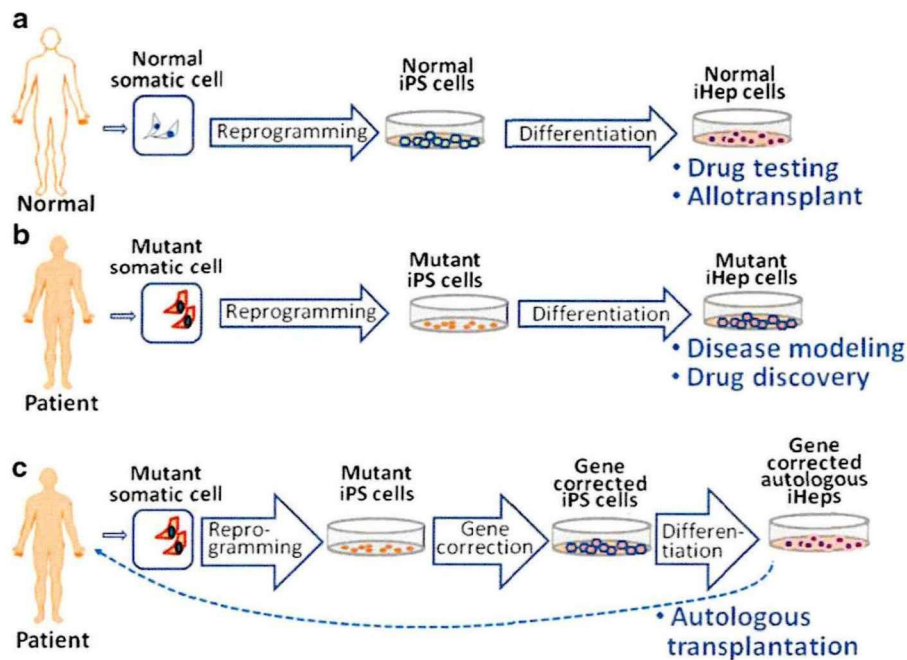


图 4 人类 iPSC 在肝脏疾病中的用途(Roy-Chowdhury N, 2016)

当然，iPSC 仍面临很多挑战，如重编程的效率并不高，在重编程的过程中细胞还可能会出现异质性；且相对于 ESC，iPSC 在表观遗传学上仍可能会受来源细胞的记忆基因的影响(Bilic J, 2012)，但是不可否认的是，iPSC 具备与 ESC 相似的多能分化潜能却没有 ESC 的伦理约束，而且，iPSC 已经被成功诱导分化成多种细胞、组织用于药学研究、疾病模型和再生生物学中，有着良好的发展前景和广阔的应用空间。

### 三、肝脏类器官的(Liver Organoids)的研究进展

类器官最早的研究高峰期可以追溯到1965-1985年期间，至今已有半个多世纪的历史(Clevers H, 2016)。到目前为止，类器官仍没有非常统一确定的界定标准，但均认为类器官是细胞（包括干细胞、原代细胞或组织等）在3D培养模式中培

养出的类似某种器官的组织(Shamir ER, 2014; Lancaster MA, 2014; Clevers H, 2016; Fatehullah A, 2016)。分类阐述更为详细，譬如对于乳腺，类器官被定义为将上皮小管放在3D基质胶中培养出的组织；肠道类器官则是将胚胎干细胞或者iPSC在没有间充质或者与上皮间充质共培养的环境下衍生出的原始上皮干细胞的克隆(Shamir ER, 2014)。

Clevers团队将Lgr-5阳性的干细胞诱导分化成小肠组织，标志着干细胞分化为类器官的开端(Sato T, 2009)。在过去的十余年间，科学家们建立了多种类器官的培养条件，培养出的类器官作为人类发育和疾病的良好模型，极大促进了干细胞领域的发展(Simian M, 2016)。由于人类和动物在器官的功能和发育上存在差异，在某些器官的研究领域，用类器官作为疾病模型有着动物模型不可替代的优势，比如脑、皮肤和肝脏(Lancaster MA, 2013; Nuciforo S, 2020)。随着3D培养技术的飞速发展，目前已经建立了多种类器官(图5)，除上面提到的脑(包括垂体、皮质、海马等)、肝和皮肤外，还有视网膜、肺、甲状腺、胃、肠等类器官，均为相关疾病的研究提供了良好疾病模型(Clevers H, 2016)。

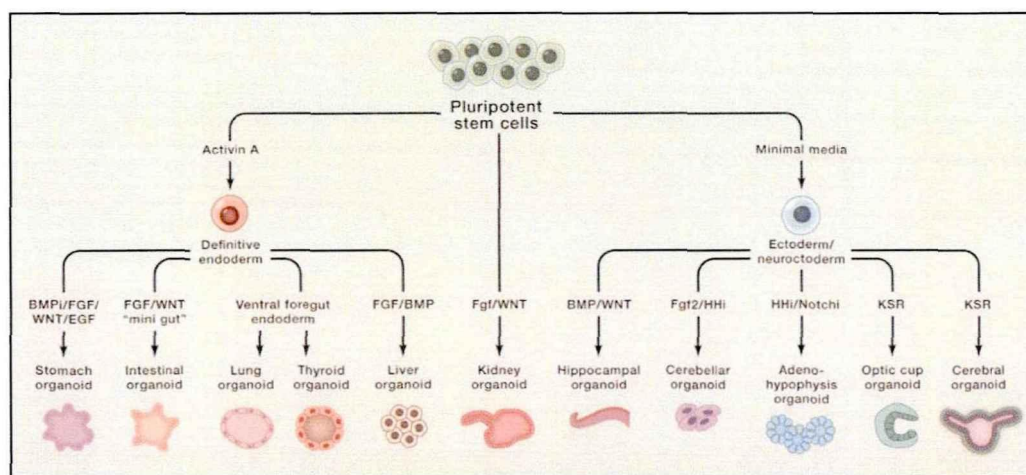


图5 iPSC来源的不同类型的类器官(Clevers H, 2016)

由于3D的培养模式可以增加细胞间的接触，从而增加了细胞间的交流，有利于物质交换(Saltzman WM, 2014)，因此，相对于2D培养同类肝细胞，3D培养所得的肝脏类器官具有更高的P450酶活性、更高的白蛋白水平、更高的基因表达水平和更高的细胞均质性(Ng SS, 2018; Kulkeaw K, 2020)。而且，细胞在3D培养的过程中可以正确地完成染色体的分裂，从而降低了2D培养可能造成基因和表观学变异的可能性以及染色体的不稳定性(Lund RJ, 2018; Knouse KA, 2018)。甚

至有研究表明，3D培养所得的肝小芽有与成人肝细胞类似的血氨清除能力 (Takebe T, 2017)，因此，肝类器官是目前再生生物学的研究热点和未来的发展方向。

人们最早尝试使用成人和胎儿的肝组织去培养类器官，这样的类器官有葡萄样的结构，细胞成多角形(Mun SJ, 2019)。相较于原代肝细胞，虽然此种类器官分泌的AAT明显减低，但却有很好的白蛋白分泌能力；而且，胎儿肝脏来源的类器官有长期培养的能力，可以传16代以上(Hu H, 2018)。然而，成人和胎儿肝组织的供体来源都非常有限，成为这类类器官研究的最大限制，而iPSC则很好地解决了这个问题。如上所述，iPSC可来源于病人自身，是“定制”的细胞株。因此，将其分化为类器官再移植回人体，不仅可以代替病变脏器的功能，而且极大降低了免疫排斥反应的可能性，更重要的是没有伦理的限制。

从iPSC到肝细胞的体外分化过程主要包括3个主要的阶段(Palakkan AA, 2017)。第一阶段是从iPSC分化成定型内胚层细胞，第二阶段是从定型内胚层向肝干细胞分化的过程，最后则是肝细胞的成熟过程(图6)。

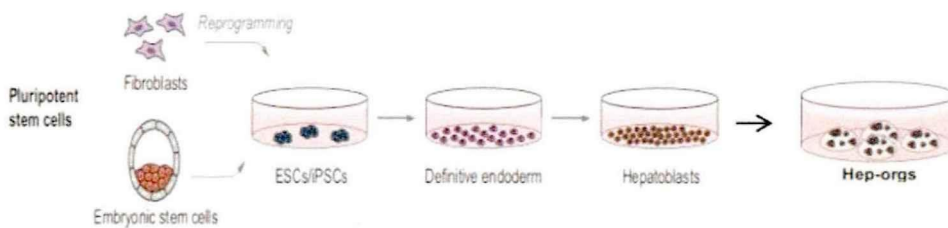


图6 干细胞分化为肝类器官的过程示意图(Edited from Nuciforo S, 2020)

在传统2D培养的基础上，Takebe团队首先将iPSC分化出的内胚层细胞与间充质干细胞以及人脐血上皮细胞共同培养，分化成为iPSC-肝芽组织，标志着肝脏类器官的开始(Takebe T, 2013)。在随后的研究中，不同的分化条件培养出的不同结构和功能的肝类器官被相继报道，为肝脏疾病提供了多种新的可能的体外疾病模型，这些肝脏模型可用于治疗方案的对比筛选、新药研发、毒理测试甚至基因编辑后进行移植等(图7)。



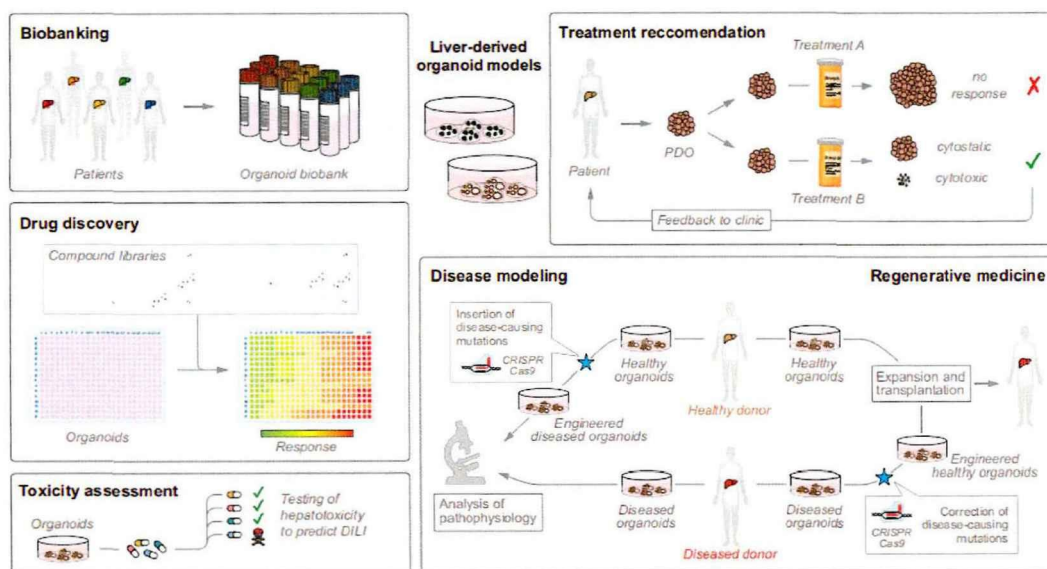


图7 肝类器官模型的应用前景(Nuciforo S, 2020)

因ASSD导致的CTLN1就已经建立了肝脏类器官模型，该类器官模型有着与正常肝类器官相同的分化潜能和形态学特征，而且蛋白分泌、糖原贮备和脂肪摄入功能等也类似。区别的是CTLN1病人来源的肝类器官中氨的蓄积明显增多，而这可被ASS基因的过表达所纠正，为今后用基因编辑技术治疗CTLN1提供了良好的理论基础(Akbari S, 2019)。在其他单基因疾病中，利用肝类器官进行的研究达到了更深层次。如因ATP7B基因突变而导致铜代谢异常的肝豆状核变性(Wilson病)，Nantasanti团队先将从铜代谢异常的狗来源的iPSC进行基因纠正，然后将由此分化出的肝类器官通过门静脉移植回体内，发现类器官可在体内存活2年以上，为今后自体移植的安全性提供了证据(Kruitwagen HS, 2020)。酒精性肝病是常见的慢性肝损伤，为此建立的肝类器官模型是用胚胎干细胞与胎儿肝间充质干细胞联合培养分化的。将其暴露于酒精后，该类器官表现出与酒精性肝病相同的病理过程，如细胞色素酶的上调、氧化应激反应、细胞外基质的沉积及细胞凋亡等(Wang S, 2019)。此外，为研究病毒与宿主之间的相互作用关系，Nie等利用乙型肝炎病毒去感染iPSC来源的肝类器官，发现病毒的多种RNA和DNA都出现于类器官的肝细胞中，且相对于2D培养的肝细胞，肝类器官对病毒有更高的易感性(Nie YZ, 2018)。在原发性肝癌的研究中，人们期待能够建立瘤细胞来源的类器官并进行免疫缺陷鼠的移植，从而既能研究肿瘤细胞的遗传学和组织学特征，又能研究肿瘤和宿主的相互作用。然而，肿瘤活检组织到类器官的诱导率只有约26% (Broutier L, 2017)，而手术切除组织的分化诱导率也只有约27% (Nuciforo S,

2018) , 肝癌方面的类器官研究尚未成熟。

综上所述,类器官因其具有更好的器官功能和更稳定的遗传学特征成为体外疾病模型研究的首选。肝脏疾病严重危害着人类健康,肝脏移植是终末期肝病的唯一治疗方法,却长期面临供体来源严重匮乏的困境,因此,我们迫切需要建立更多功能性好、安全性高、遗传学稳定的肝脏类器官来作为研究肝脏疾病发病机制、病理特征、药物筛选和精准治疗的应用平台。

## 第一部分 尿素循环障碍的临床表现与遗传学研究

尿素循环障碍是因基因突变导致的出生缺陷，早发型病例死亡率高，晚发型病例临床表现多样，病程迁延反复，且不论早发型还是晚发型均缺乏特异性临床表现。由于UCD发病率低，且基因突变个体化显著，因此UCD的文献资料多为个案报道，缺乏系统性的梳理分析，导致临床认识不足，极易出现漏诊和误诊。本研究对7例UCD病例的临床资料、实验室检查及遗传学检测结果进行分析研究，提供循证医学依据，意在提高临床医生对UCD的认识，从而将UCD的诊断治疗窗口提前，降低病死率和致残率。

### 1. 材料与方法

#### 1.1 伦理学声明

本研究征得山东大学齐鲁儿童医院伦理委员会同意，在进行临床及实验室检查前，已详细将实验目的等告知患儿监护人，并取得同意。保证病人所有信息均保密、不外泄，保证血液样本和体液样本均仅用于本课题研究。本研究工作所有相关规章制度及实验步骤均遵循赫尔辛基宣言，整个工作过程中所有病人的信息均被匿名化处理。

#### 1.2 研究对象

2016年10月至2020年12月期间在山东大学齐鲁儿童医院就诊并最终确诊为UCD的7例病例，分别来自无任何血缘关系的中国家庭，孩子的父母及祖父母均身体健康且非同族关系，采血前均告知家长并取得书面同意书。

#### 1.3 主要实验仪器

GC/MS-QP2010 ultra (日本岛津公司气相色谱质谱联用仪)；  
BS800 全自动生化分析仪 (深圳迈生物仪器有限公司)；  
LC-MS/MS 3200QTRAP 液相串联质谱仪 (ABI 3200, 美国应用系统公司)；  
超微量生物检验仪 (ND-2000, THERMO, 美国)；  
ABI 2720 Thermocycler PCR 仪 (Life Technologies, 美国)；  
ScanSpeed Mini 离心机 (LaboGene, 丹麦)  
ScanSpeed 416 96 孔板离心机 (LaboGene, 丹麦)  
VORTEX GENIE 2 涡旋混匀仪 (Scientific Industries, 美国)

Nano-100 微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司, 中国)  
Qubit 2.0 超微量分光光度计 (Life Technologies, 美国)  
Tanon-1600 电泳系统 (上海天能科技有限公司, 中国)  
Invitrogen-DynaMag-2 magnet 磁力架 (Life Technologies, 美国)  
P1000N/P200N/P100N/P10N 移液器 (Gilson, 美国)  
Bioruptor plus DNA 超声破碎仪 (Diagenode, 比利时)  
Fragment Analyzer Automated CE System DNA 片段分析仪 (Advanced Analytical Technologies, 美国)  
真空浓缩仪 (Eppendorf, 德国)  
BCD-568E2W 冰箱(-20/4℃) (惠而浦投资有限公司, 中国)  
高通量基因分析仪 (Illumina HiSeq2000, 美国)  
微量移液枪 (Eppendorf, 德国)  
微型离心机 (珠海黑马, 中国)  
vortex QL-901 型旋涡混合器 (其林贝尔, 中国)  
低温高速离心机 (Sigma 3k15, 德国)  
全自动雪花制冰机 (宁波新芝, 浙江宁波)  
数显恒温水浴锅 (HH-4, 国华电器有限公司, 中国)  
超微量分光光度计 (ND-2000, Thermo, 美国)  
PTC-200 PCR 仪 (BIO-RAD, 德国)  
微波炉 (美的, 中国)  
琼脂糖凝胶电泳仪 (Tanon EPS300, 上海天能科技有限公司, 中国)  
凝胶电泳条带观察成像系统 (Tanon 2500, 上海天能科技有限公司, 中国)  
低温冰箱 (海尔, 中国)  
-80℃低温冰箱 (DW-HL668, 中科美菱, 中国)  
定量 PCR 仪 (LightCycler480, 美国)  
Sanger 基因测序仪 (ABI 3730, 美国)

#### 1.4 主要实验试剂及耗材

血液 DNA 提取试剂盒 (Qiagen, 德国)  
SureSelectXT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library Kit (Agilent Technologies, 美国);

Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies, 美国)  
Agencourt® AMPure® XP Kit (Beckman Coulter, 美国)  
Herculase II Fusion DNA Polymerase (400 Reactions)(Agilent Technologies, 美国)  
PCR grade Water (Sigma, 日本)  
Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit (1-6000bp) (Advanced Analytical Technologies, 美国)  
KAPA Library Quant Kit (KAPA, 美国)  
Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, 美国)  
无水乙醇 (Sigma, 日本)  
BSTFA+TMCS(99:1) (Sigma, 日本)  
Proteinase K (TIANGEN, 中国)  
醋酸钠 (天津市广成化学试剂有限公司, 中国)  
异丙醇 (天津市富宇精细化工有限公司, 中国)  
无水乙醇 (烟台市双双化工有限公司, 中国)  
2×Taq Master Mix (novoprotein, 中国)  
引物合成 (BioSune, 中国)  
DNA Marker (D2000) (TIANGEN, 中国)  
SYBR GREEN DNA 染料 (Solarbio, 中国)  
6×DNA Loading Buffer (TIANGEN, 中国)  
琼脂糖 (Solarbio, 中国)  
电泳缓冲液( 25×TAE, RNase free ) (北京雷根生物技术有限公司, 中国)  
Alkaline Phosphatase 磷酸酶 (TaKaRa, 日本)  
Exonuclease I 外切酶 (TaKaRa, 日本)  
BigDye® Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit (ABI PRISM, 美国)

## 1.5 研究方法

### 1.5.1 临床资料

所有患儿入院后均经仔细询问病史,采集信息包括:现病史、既往史、喂养史、个人史、家族史,并按系统进行详细的体格检查。结合患儿的发病年龄、临床表现、家族遗传史、母亲孕期异常产科病史等信息做出初步诊断,与相关疾病

进行鉴别诊断，进而制定相应的治疗方案。

## 1.5.2 实验室检查和遗传学检测

### 1.5.2.1 血标本

收集 7 例患儿的外周静脉血标本分别进行血常规、血浆氨、血气分析、血乳酸、肝功能、肾功能、血糖、心肌酶、C 反应蛋白(C-Reactive Protein, CRP)、降钙素原(Procalcitonin, PCT)、血培养等常规实验室检查；并将外周血干纸片应用液相串联质谱技术 (Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 进行血液氨基酸分析(以下简称血筛)。对高度怀疑 UCD 的患儿同时抽取患儿及其父母的外周静脉血进行遗传学检测。门诊代谢病高危儿仅留取外周血干纸片进行血筛检查。

#### (1) 血筛的标本处理

切取适当大小的血点片，经过提取、反应（衍生化法）等步骤，对氨基酸、有机酸和脂肪酸代谢进行筛查和诊断。

#### (2) 内标准品的溶解和日常萃取工作溶液的配制

将氨基酸同位素内标准品及肉碱同位素内标准品，按体积比 1:110 的比例稀释成萃取工作液。

#### (3) 样品处理

使用手动打孔器将质控和待测样本打孔，依次放入洁净的 U 型底微孔板中。每孔加入配制好的萃取工作溶液 100 $\mu$ l，粘性封片覆盖后立即置于振荡器内，30 $^{\circ}$ C ( $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)，650~750rpm，振荡孵育 45 分钟，然后转移 75 $\mu$ l/孔至对应孔位的 V 型底微孔板。铝箔覆盖后放入自动进样器中进行检测。

#### (4) 上机检测

平衡预热后，启动 Analyst<sup>®</sup>软件采集数据，应用 ChemoView 软件处理数据，最后自动生成系列样品报告。

### 1.5.2.2 尿液标本（尿液有机酸检测，简称尿筛）

#### (1) 尿液收集

收集 7 例患儿的尿液样本应用气相色谱质谱技术 (Gas chromatography mass spectrometry, GC/MS) 进行尿液有机酸分析。

#### (2) 样本前处理

先利用生化仪测定样本尿液的肌酐值，然后取相当于 0.2mg 肌酐的患儿尿液，加入尿素酶等去除蛋白质，萃取有机酸并用氮气吹干，柱前衍生前处理后上样于 GC/MS 检测分析系统（岛津 GCMS-2010 ultra）。

### (3) 结果分析

利用日本岛津研配套的 inborn errors of metabolism screening system 软件，对上样结果进行数据分析与处理。

### (4) 尿筛前处理操作规程

计算尿量：将报告单上 Cr(mmol/l)结果 $\times 113.1/10$ ，换算成单位为 mg/dl 的值。见表 1-1；计算加入水量方法见表 1-2。

表 1-1 计算尿量方法

尿肌酐浓度(mg/dl)	尿量
10-100	按实际计算尿量
<10	2000ul (尿样不足 2000ul 时, 记录实际加入量)
>100	实际计算尿量 $\times 2$ 倍(备注记录尿量)
>200	实际计算尿量 $\times 4$ 倍(备注记录尿量)

表 1-2 计算加入水量方法

尿肌酐浓度(mg/dl)	TA/IS 量
>10	40ul
<10	尿肌酐浓度 $\times 4$ (如 20ul 以下均加 20ul)

### (5) 检测分析

在气相色谱质谱分析仪上进行样本的检测，然后利用新生儿遗传代谢分析软件 4.0 对结果进行分析。

#### 1.5.3 基因捕获和下一代测序

利用基因捕获和高通量测序技术，采用 Illumina Hiseq 2000 测序系统。重点分析与尿素循环障碍相关的基因。简要步骤如下：

##### (1) 外周血基因组 DNA 提取

Qiagen 血液 DNA 提取试剂盒提取患儿外周血中的 DNA，测量 DNA 的浓度后使用仪器配套软件进行分析。

样品满足高通量测序的要求为：1. 浓度为 20 ng/ $\mu$ l-200 ng/ $\mu$ l 的基因组 DNA 共需 1.5  $\mu$ g；2. 凝胶电泳验证基因组 DNA 无降解；3. 基因组 DNA 未经扩增；4. 经 RNase 处理清除残余 RNA 的基因组 DNA；5. OD 值：A260/A280 $\geq 1.8$ , A260/A230 $\geq 1.9$ 。

## (2) 文库构建

首先通过酶切的方法将 DNA 样品片段化，目标片段化长度为 200-250 bp；然后利用磁珠化试剂盒（AMPure XP beads DNA Purification kit）对已经片段化的 DNA 进行纯化。之后分别进行片段分析、末端修复及纯化、3'端加入 A 碱基及纯化、接头连接及纯化、扩增接头文库及纯化、片段分析等一系列步骤。

## (3) 文库捕获

包括以下步骤：DNA 文库浓缩；使用磁珠富集捕获文库；扩增富集捕获文库；扩增富集捕获文库纯化；片段分析。

## (4) 高通量测序

利用 Illumina HiSeq X ten 平台进行高通量测序，主要应用桥式 PCR 原理，边合成边测序。

## (5) 数据分析

测序数据采用 NextGeneV 2.3.4 软件与 UCSC hg 19 人类参考基因组序列进行比对和鉴别遗传变异，并收集目标区域的覆盖度和平均测序深度等质量参数，对目标序列的 97.45%测序深度达 20X 以上。同时采用 NextGeneV 2.3.4 进行注释，并对遗传变异进行进一步的筛选。临床解读主要依据送检医生提供的家族史和临床表型，结合已知的基因-疾病相关性知识。依据美国医学遗传学与基因组学学会（ACMG）的《序列变异解读标准及指南》（2015 版）对遗传变异的致病性进行评估，并采用 HGVS 命名法。

### 1.5.4 Sanger 测序

#### 1.5.4.1 测序片段的扩增

##### (1) 全血基因组 DNA 的提取

试剂盒提取患儿及其父母外周血 DNA，并测定浓度，具体操作步骤同 1.5.3。

##### (2) 引物设计

使用 UCSC 数据库（<http://genome.ucsc.edu/>）查找基因序列，利用引物设计软件 primer5.0 进行引物设计，并由 BioSune 公司完成引物合成。本研究中所用引物如表 1-3 和表 1-4 所示。

表 1-3 CPS1 及 OTC 基因变异位点 Sanger 验证引物

基因	Forward	Reverse	产物(bp)
CPS1_E24	GGGTTTCCAGAGACTAATAGAGA	CCACTCTACCACTAAATAGCTGTA	388
CPS1_E7	AACTGCCAGTCACTCCCTAGTAG	CCATGTTTTAGTGCCCTTGAGG	460



<i>OTC</i>	TACGCCTGGATTTCATCTCC	AGCCTTTGTGGTGGTAATGC	483
------------	----------------------	----------------------	-----

**表 1-4 OTC 基因外显子缺失定量 PCR 引物**

基因	Forward	Reverse	产物 (bp)
<i>OTC-1</i>	CCGTGACCTTCTCACTCTAA	TGTTACATACCTCTCCTTTCTG	110
<i>OTC-6</i>	TTGCCACAGTGTATTGTCTAGC	GTGAGGTAATCAGCCAGGATCT	156

### (3) PCR 扩增反应

PCR 反应体系如表 1-5 所示。

**表 1-5 20ul PCR 反应体系**

材料	容量	最终浓度
2x Kapa Fast qPCR Master Mix	10 ul	1x
10uM FP	0.4 ul	200 nM
10uM RP	0.4 ul	200 nM
Template	10 ng	<20 ng
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 ul	N/A
		Total 20 ul rxn

### (4) PCR 扩增条件

PCR 扩增条件如表 1-6 所示。

**表 1-6 PCR 扩增条件**

反应温度	时间
94°C	2 min
94°C	30 s
65~55°C	30 s
72°C	30 s
循环	35 cycles
72°C	5 min
4°C	forever

### (5) 琼脂糖凝胶电泳

安装模具：选择 1.5×18 孔的梳子插在安装好并水平放置的模具上；

配制电泳缓冲液：将 25×TAE 电泳缓冲液以去离子水稀释，配制成 1×TAE 缓冲液倒入电泳槽中；

制备琼脂糖凝胶：将 1.2 g 琼脂糖与 TAE 缓冲液加热混悬液成浓度为 1.5% 的凝胶。冷却片刻后将胶液垂直倒在模具塑料板上，然后冷却 40 min，待胶完全凝固后拔出梳齿，将琼脂糖凝胶缓缓置于电泳槽中；

配制上样混合物和参照标记物：用 1 ml 去离子水和 1 ml 的 6×DNA Loading Buffer 上样缓冲液将 1 μl SYBR GREEN 核酸染料原液稀释至 1:2000，振荡混匀，配制成染料工作液，避光保存。上样混合液由 2 μl 工作液与 5 μl PCR 产物混匀配制，参照标记物为 2 μl 工作液与 6 μl DNA Marker(D2000)混匀配制。两种混合

液均需避光反应 15 min 待染色充分。

上样：吸取样品，并将样品缓缓推至点样孔中间位置，不要产生气泡。

电泳：电压 90 V，电泳时间约为 30 min，条带前进至凝胶 2/3 位置时停止电泳。

观察并拍照：将凝胶在凝胶成像系统下观察 DNA 条带，并保存图片。

#### 1.5.4.2 一代测序

##### (1) PCR 纯化产物配置

将 TaKaRa Alkaline Phosphatase 虾碱酶和 TaKaRa Exonuclease I 外切酶各 0.5  $\mu\text{l}$  混匀，配制成消化液，加入到 PCR 反应液中。PCR 仪进行纯化，程序为 SAP：37 $^{\circ}\text{C}$  60 min，80 $^{\circ}\text{C}$  15 min，4/15 $^{\circ}\text{C}$  forever。

##### (2) 测序反应

SEQ MIX 成分表如表 1-7 所示；SEQ 程序如表 1-8 所示。

表 1-7 SEQ MIX 成分表

试剂	用量
BigDye	0.4 $\mu\text{l}$
Sequencing Buffer	0.8 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	1.8 $\mu\text{l}$
Primer(引物可单加)	1 $\mu\text{l}$
模板(纯化后的产物)	1 $\mu\text{l}$

表 1-8 SEQ 反应条件

反应温度	时间
96 $^{\circ}\text{C}$	2 min
96 $^{\circ}\text{C}$	10 s
55 $^{\circ}\text{C}$	5 s
60 $^{\circ}\text{C}$	90 s
循环	25 cycles
4/15 $^{\circ}\text{C}$	forever

##### (3) DNA 纯化与测序

利用去离子水配制浓度为 0.125 mol/L EDTA-Na<sub>2</sub> 溶液，65 $^{\circ}\text{C}$  水浴加热并间歇震荡混匀直至完全溶解，定容至 50 ml，震荡混匀；测序反应板离心，加入 2.5  $\mu\text{l}$  /孔 EDTA-Na<sub>2</sub> 溶液和 40  $\mu\text{l}$  85%乙醇，充分震荡 3 min，4 $^{\circ}\text{C}$ ，3000 g 离心 30 min；之后将测序反应板倒置于吸水纸上，倒离心至离心力达 900 rpm 时立即停止离心；然后每孔加入 50  $\mu\text{l}$  70%乙醇，充分震荡 1 min，在 4 $^{\circ}\text{C}$  下 3000 g 离心 15 min；重复倒离心步骤后避光风干大约 15~30 min，每孔加 10  $\mu\text{l}$  HIDI，离心，PCR 仪中

96℃反应 2 min, 降温至 4℃后取出, 然后上测序仪 ABI 3730 进行测序。

#### (4) 测序结果分析

应用 Finch TV 软件分析测序图谱, 并与 UCSC Blast 中 Feb. 2009 (GRCh3 7/hg19) 进行比对, 以明确变异位点在染色体上的位置。将 Blastc 的序列提交到 NCBI 中的 Global Align 进行比对, 以明确其变异类型。

#### 1.5.4.3 实时荧光定量 PCR(qPCR)

##### (1) 建立 qPCR 反应体系

以正常男性和女性 DNA 为参照物, 选取 GAPDH 作为内参定标, 利用日本 KATARA 公司的 Syber Green 试剂盒进行扩增, 其反应体系如表 1-9 所示。

表 1-9 qPCR 反应体系

成分	体积
ddH <sub>2</sub> O	~25 μl
Syber Green	7.5 μl
Primer-r	2 μl
Primer-f	2 μl
DNA	5 μl

##### (2) 验证扩增效率

将正常人 DNA 按 1:4 梯度依次稀释为 10ng/μl, 2ng/μl, 0.4ng/μl, 0.08ng/μl, 并且每个浓度梯度 DNA 均特异性扩增目的 DNA 和内参 GAPDH。然后, 根据四个浓度的对数值与相应的 Ct 值作图, 得到扩增效率。结果显示扩增效率效果最佳的浓度是 2 ng/μl。

##### (3) 设定实时荧光定量 PCR 反应程序

在 LightCycler480 上将反应程序设定如表 1-10:

表 1-10 qPCR 反应程序

qPCR	反应时间	循环次数
95℃ 预变性	10min	
95℃ 变性	10s	} 循环 45 次
59℃ 退火	15s	
72℃ 延伸	15s	

45 次循环后, 将延伸的 72℃ 逐步升至 95℃, 每升温 0.2℃ 停留 1 秒收集一次荧光信号, 绘制引物的溶解曲线; 然后按标准确定靶片段的拷贝数变异。

#### 1.5.5 抗生素杀菌计数

在平板上随机挑取大肠杆菌 K12 单菌落至 5mL LB 培养基中, 37℃, 200rpm 过夜培养。3000g 离心收菌, PBS 洗三次后, 用不含有 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的 M9 培养基重悬。

配制含有氨苄西林(AMP, 300mg/L)或美罗培南(MEM20mg/L)的 M9 培养基, 分别加入 0.1mL 106CFU/mL 菌液和氯化铵/氨水。37°C 静止培养 6h 以后, 稀释计数。对照组仅含有抗生素 (AMP 或 MEM)。

## 1.6 数据处理

应用上述技术筛选并验证的潜在致病性位点变异, 利用 UCSC、Ensembl 数据库、Clustx 和 GERP 等进行蛋白质保守性预测; PolyPhen2、Mutation\_taster 等生物信息学软件进行致病性预测; Swiss-PDB Viewer 软件进行蛋白质新变异位点的三级结构预测。利用 SPSS 21.0 进行数据相关性分析,  $p < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2. 结果

### 2.1 临床病史及实验室检查结果

病例1: 患儿女, 3天, 因“发热、反应差2天, 惊厥2次, 青紫伴昏迷半天”入院。患儿系胎龄40周经阴分娩, 出生体重2.95 kg, 无缺氧复苏史, 生后半小时内即开奶, 混合喂养, 吃奶可。但生后第2天出现发热、反应差等症状, 于当地医院就诊, 给予物理降温、抗生素、补液等治疗。入院5小时出现惊厥发作2次, 住院第2天出现呼吸循环衰竭给予管插管呼吸机辅助通气、生理盐水扩容等治疗, 体温仍波动在37.8-38.9°C之间。首次血浆氨浓度为1404  $\mu\text{mol/L}$ , 给予乳果糖、精氨酸等治疗, 血浆氨仍进行性升高至1663  $\mu\text{mol/L}$ 。入院后处于反复抢救状态, 后家长放弃治疗, 患儿死亡。

病例2: 患儿女, 3天, 因“反应差、呻吟半天”入院。母亲系G2P2, 平素体检, 第1胎为足月顺产男婴, 生后3天不明原因夭折。患儿胎龄39<sup>+4</sup>周, 经阴分娩, 出生体重2.9 kg, Apgar评分10分。生后第3天出现反应差、呻吟、少哭、吃奶差等表现, 起病5小时后于当地医院就诊, 给予机械通气、抗生素等治疗, 但患儿病情进行性加重, 出现“肺出血、消化道出血”等表现而转运来我院。首次血浆氨为650  $\mu\text{mol/L}$ , 给予乳果糖、精氨酸等治疗后血浆氨亦升高至830  $\mu\text{mol/L}$ , 后家长放弃治疗, 患儿死亡。

病例3: 患儿男, 4天, 因“气促4天, 水肿2天, 反应差1天, 惊厥1次”入院。患儿胎龄37<sup>+2</sup>周, 选择性剖宫产娩出, 出生体重2.8 kg, Apgar评分10分。生后因“气促、呻吟、口周青紫、口吐泡沫”转入当地医院NICU, 给予“吸氧”治疗。生

后第3天患儿出现水肿，伴尿量减少，且出现吃奶差、反应差，并呼吸暂停1次，遂转入当地上级医院治疗，但病情进行性加重，出现发热、惊厥及肺出血，先后给予呼吸机辅助通气、肺表面活性物质气管内注入、抗感染、止血等治疗，效果欠佳。首次血浆氨 $1546\ \mu\text{mol/L}$ ，除乳果糖、精氨酸等治疗外还立即开展了持续血液透析加滤过治疗，血浆氨曾最低降至 $297\ \mu\text{mol/L}$ （图1-1），但患儿意识状态仍呈昏迷状，家长放弃治疗，患儿死亡。

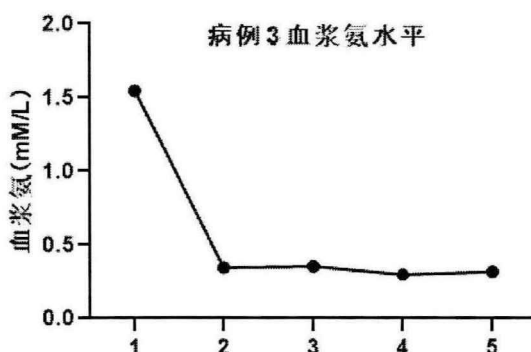


图1-1 病例3血液净化前后血浆氨的变化

病例4：患儿男，3天，因“呼吸困难3天，发热1天，无尿半天”入院。患儿胎龄 $38^{+3}$ 周顺产娩出，生后不久即出现呼吸困难，表现为气促、呻吟、四肢末梢青紫，转入当地医院新生儿科，给予“CPAP辅助通气、抗生素”等治疗，呼吸困难一度好转，并曾给予胃肠道喂养，但病情很快出现恶化，出现刺激无反应、四肢抖动、反复发热、全身发花、四肢湿冷、低血压、少尿、水肿等表现，给予气管插管机械通气、肺表面活性物质、血管活性药物等治疗，效果欠佳。患儿炎症指标明显升高，且痰培养提示肺炎克雷伯菌(ESBLs)。首次血浆氨为 $725\ \mu\text{mol/L}$ ，曾应用盐酸精氨酸、乳果糖治疗，入院第2天家长由于个人原因放弃治疗，患儿死亡。

病例5：患儿男，3天，因“吃奶差、反应差进行性加重2天，惊厥1次”入院。母亲39岁，G7P5A2；曾有一子，生后3-4天不明原因夭折；第4个孩子为女孩，生后1岁余因“呕吐、精神差”等症状于当地医院住院十余天死亡，其血筛提示为“鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺陷”；目前存活2个女孩，分别15岁、4岁，身体状况可，但饮食不喜肉类，身材偏瘦。患儿系胎龄39周顺产，出生体重 $3.2\ \text{kg}$ 。生后2小时开奶，无异常，但第2天即出现吃奶差、反应差，生后第3天出现青紫，伴叹息样呼吸，并出现惊厥发作1次，给予气管插管、机械通气等治疗，当地查血浆氨 $744.2\ \mu\text{mol/L}$ ，入我院后首次血浆氨高达 $1670\ \mu\text{mol/L}$ ，立即给予禁食、停

止氨基酸摄入，并应用乳果糖、精氨酸等治疗，患儿血浆氨仍进行性升高至3234  $\mu\text{mol/L}$ ，入院第2天家长放弃治疗，患儿死亡。

病例6：患儿男，3天，因“反应差进行性加重1天，惊厥1次”入院。母亲系G3P2A1，平素体健，自然流产1次。曾与前夫有一子，生后2天因“青紫”于当地医院抢救无效夭折。患儿胎龄39<sup>+2</sup>周，出生体重4.1 kg，否认窒息抢救复苏病史。生后即开始经口喂养，但生后第2天出现反应差、嗜睡、吃奶差，并出现惊厥1次，后因呼吸微弱、青紫，查血气分析提示“II型呼吸衰竭”，给予气管插管、机械通气后转入我院。入院查血气分析：PH: 7.51, PO<sub>2</sub>: 77 mmHg, PCO<sub>2</sub>: 23 mmHg, HCO<sub>3</sub>: 18.4 mmol/L, BE: -4.6 mmol/L；乳酸: 10.2mmol/L，多次给予生理盐水、白蛋白等扩容治疗，并给予多巴胺改善循环，后复查血气分析仍提示代谢性酸中毒及高乳酸血症，多次给予碱性液治疗。患儿首次血浆氨高达2698  $\mu\text{mol/L}$ ，家长不同意进行血液滤过，因此给予乳果糖及精氨酸治疗。患儿查心脏超声提示左室射血分数减低，后血压难以维持，应用多种血管活性药物。经治疗患儿多次复查血浆氨波动于420-701  $\mu\text{mol/L}$ 之间，意识状态较前好转，后血筛及尿筛结果提示OTCD后家长放弃治疗，患儿死亡。

病例7：患儿男，4岁，因“呕吐2天，嗜睡、发热1天，惊厥半天”入院。患儿系G1P1，双胎之大，足月因“双胎妊娠”行剖宫产娩出，出生体重2.7 kg，否认窒息缺氧病史，生后至发病前生长发育同正常同龄儿童，其双胞胎妹妹身体健康。患儿于入院前2天无明显诱因出现非喷射性反复呕吐，第2天出现嗜睡、语言交流能力差，随后出现烦躁不安、胡言乱语，偶有口吐泡沫及咬牙动作，伴发热，体温最高达39.2℃，就诊于当地医院，给予“抗感染”治疗，效果欠佳。入院前半天突然出现惊厥发作，并出现昏迷。血浆氨高达1263  $\mu\text{mol/L}$ ，立即开展血浆置换，血浆氨很快降至123  $\mu\text{mol/L}$ ，后多次复查维持在40-60  $\mu\text{mol/L}$ 之间(图1-2)，但患儿入院时即呈脑死亡状态，住院近4月意识状态仍无好转，且期间合并惊厥、低血压、凝血功能障碍等多种合并症，最终家长放弃出院。

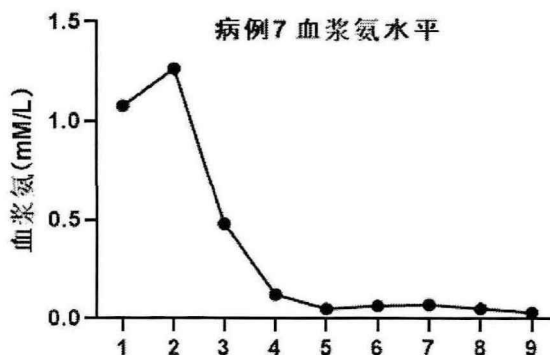


图1-2 病例7血液净化前后血浆氨的变化

上述7个病例的一般资料、临床表现、入院查体分别总结于表1-11、表1-12和表1-13。

表1-11 尿素循环障碍患儿的一般资料

	病例1	病例2	病例3	病例4	病例5	病例6	病例7
性别	女	女	男	男	男	男	男
母亲既往孕产史	G2P1,药物流产1次	G2P2,第一胎生后3天不明原因夭折	G1P1	G2P2,第1胎孕4月时发现胎儿唇腭裂行人工流产	G7P5,1子生后3-4天天折, 1女在1岁余时夭折, 血筛提示“OTCD”	G3P2A1,曾与前夫有一子, 生后2天因“青紫”夭折;	G1P1
孕期疾病	轻度贫血	无	高血糖、低血压、阴道炎	孕32周时出现腹痛, 接受“保胎”治疗	无	轻度贫血	无
孕期药物	无	无	口服药, 外用药	“保胎”治疗	无	无	无
近亲婚配	否	否	否	否	否	否	否
胎龄(周)	40	39 <sup>+5</sup>	37 <sup>+2</sup>	38 <sup>+3</sup>	39	39 <sup>+2</sup>	足月
分娩方式	经阴分娩	经阴分娩	剖宫产	经阴分娩	经阴分娩	剖宫产	剖宫产
出生体重(kg)	2.95	2.9	2.8	3.18	3.2	4.1	2.7
Apgar评分	10	10	10	不详	10	不详	不详
发病年龄	第2天	第3天	第3天	第2天	第2天	第2天	4岁
病程	3天	2天	3天	3天	2天	8天	103天
临床过程	急性高氨血症	急性高氨血症	急性高氨血症	急性高氨血症	急性高氨血症	急性高氨血症	急性高氨血症
治疗	乳果糖、精氨酸	乳果糖、精氨酸	床旁血滤	乳果糖、精氨酸	乳果糖、精氨酸	乳果糖、精氨酸	血浆置换
转归	死亡	死亡	死亡	死亡	死亡	死亡	死亡

表1-12 尿素循环障碍患儿的临床表现

	病例1	病例2	病例3	病例4	病例5	病例6	病例7
<b>神经系统</b>							
发热	+	+	+	+	-	-	+
惊厥	+	+	+	+	+	+	+
反应差	+	+	+	+	+	+	+
昏迷	+	+	+	+	+	+	+
<b>呼吸系统</b>							

青紫	+	+	+	+	+	+	+
呼吸困难	自主呼吸弱	呻吟、抽泣样呼吸	气促、呻吟、呼吸暂停	气促、呻吟、抽泣样呼吸	叹息样呼吸	自主呼吸弱	气促，不规则
呼吸支持	常频机械通气	高频机械通气	高频机械通气	高频机械通气	常频机械通气	常频机械通气	常频机械通气
肺出血	-	+	+	+	-	-	-
<b>循环系统</b>							
心率	先慢后快	正常	正常	增快	减慢	增快	增快
心音	极低钝	低钝	低钝	低钝	低钝	低钝	有力
心功能不全	+	+	+	+	-	+	-
低血压	+	-	+	+	+	+	+
高乳酸血症	+	+	+	+	+	+	+
扩容剂	+	+	+	+	+	+	+
水肿	-	-	+	+	-	+	-
血管活性药物	多巴胺、多巴酚丁胺、米力农	多巴胺、多巴酚丁胺	多巴胺、多巴酚丁胺、肾上腺素、去甲肾上腺素	多巴胺、多巴酚丁胺、去甲肾上腺素	多巴胺	多巴胺、多巴酚丁胺、米力农、肾上腺素、去甲肾上腺素	多巴胺、多巴酚丁胺、肾上腺素、去甲肾上腺素
<b>消化系统</b>							
喂养困难	+	+	+	+	+	+	+
腹胀	+	+	-	-	-	-	-
消化道出血	-	+	-	+	-	+	-
<b>泌尿系统</b>							
尿量	少尿	少尿	“少尿”	少尿	少尿	血尿	正常
肾功能不全	+	+	-	+	-	+	-
尿滞留	-	-	+	-	+	+	-
<b>血液系统</b>							
贫血	-	+	-	-	-	-	-
凝血功能障碍	+	+	+	+	+	+	+

表1-13 尿素循环障碍患儿的入院查体

查体	病例 1	病例 2	病例 3	病例 4	病例 5	病例 6	病例 7
发育异常	-	-	-	双眼眼距宽、鼻梁低平、耳位低	-	-	-
肤色	黄染	苍灰	苍灰，肢端青紫	尚红润	苍黄、晦暗	苍黄、发灰，四肢末端发绀	尚红润
意识状态	昏迷	昏迷	昏迷	昏迷	昏迷	昏迷	昏迷
自主呼吸	无	抽泣样	无	抽泣样	无	无	无
瞳孔直径(mm)	3	4	3	5	4	3	3
瞳孔对光反射	消失	消失	迟钝	消失	消失	消失	迟钝
心率(次/分)	180	120	148	148	120	151	190
心音	低钝	低钝	低钝	低钝	低钝	低钝	有力
CRT(秒)	5	4	4	4	4	4	3
肺部啰音	-	湿罗音	-	-	痰鸣音	-	-
腹部	平软	膨隆	平软	平软	平软	平软	平软
肝脾肿大	-	-	-	-	-	-	-



肠鸣音	消失	消失	消失	消失	消失	消失	消失
肌张力	低	低	低	低	低	低	低
原始反射	消失	消失	消失	消失	消失	消失	消失

## 2.2 实验室检查

7 例患儿的实验室检查均表现出典型的高氨血症，峰值最高者为病例 5，达 3234  $\mu\text{mol/L}$ ，但病例 6 的首次血浆氨浓度最高，为 2698  $\mu\text{mol/L}$ ，而这两例病人都是有不良家族史的。血气分析多表现为难以纠正的代谢性酸中毒，如有机酸代谢异常；但是由于氨为碱性物质，UCD 患儿的血气分析的代谢性酸中毒相对于有机酸代谢异常较轻，且呼吸性碱中毒可见于 50% 以上的新生儿 UCD 病例 (Martin-Hernandez E, 2014)。内环境方面，7 例患儿均合并不同程度的电解质紊乱，其中以低钙血症最为突出，所有 6 例早发型病例均合并不同程度的低钙血症，与文献报道一致 (Nakip OS, 2020)。所有病例都出现多脏器功能障碍，除神经系统、呼吸系统、循环系统的临床表现外，实验室检查提示转氨酶异常并不是非常普遍的现象(3/7)，反而更需要注意的是凝血功能障碍(7/7)，且有 4 例病人出现不同程度的出血表现。经相关性分析发现，血氨与纤维蛋白原的相关性系数为 0.75( $p = 0.026$ )，而与谷丙转氨酶的相关性系数仅为 0.45。

尿素循环障碍作为代谢性疾病的一种，必然会导致血和尿中代谢产物的变化，典型的 CPS1D 患者可见到非常低的瓜氨酸水平和升高的谷氨酰胺水平，而尿中则可见降低的乳清酸水平 (Funghini S, 2012)。OTCD 患儿则同样可见到升高的谷氨酰胺和降低甚至缺失的瓜氨酸，但尿中的乳清酸水平是升高的。病例 1 和病例 2 都是 CPS1D 病例，血和尿的有机酸分析均提示血中瓜氨酸降低，而尿中除均未检测到乳清酸。反观 OTCD 病人的有机酸分析结果，血筛结果与 CPS1D 类似，但尿筛却提示乳清酸明显升高。本研究还发现，CPS1D 的病人和早发型 OTCD 的病人血筛中还可见丙氨酸和脯氨酸的显著升高，而晚发型 OTCD 的病例有轻度升高(表 1-14)。

表 1-14 尿素循环障碍病例的实验室检查结果

	病例 1	病例 2	病例 3	病例 4	病例 5	病例 6	病例 7
<b>血浆氨(18-72 <math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>							
首次值	1404	650	1546	725	1670	2698	1263
复查值	1663	823	297	-	3234	420-701	40-70
<b>动脉血气分析</b>							
PH (7.25-7.45)	7.13↓	7.10↓	7.29↓	7.49↑	7.23↓	7.51↑	7.46↑
PO <sub>2</sub>	67	72	54	58	58	77	100

(50-80 mm Hg)							
PCO <sub>2</sub> (40-60 mm Hg)	42	62↑	30↓	23↓	54↑	23↓	26↓
HCO <sub>3</sub> (19-30 mmol/L)	12↓	19.2	14.4↓	17.5↓	20.1	18.4↓	18.5↓
BE (±3)	-8↓	-0.5	-12.2↓	-5.8↓	-5.0↓	-4.6↓	-5.3↓
乳酸 (0.7-2.1 mmol/L)	5.8↑	5.6↑	11.9↑	6.6↑	7.5↑	10.2↑	4.8↑
<b>生化检查</b>							
葡萄糖 (3.3-6.1mmol/L)	0.3↓	12↑	0.8↓	0.76↓	6.08	3.5	9.2↑
钾(3.5-5.5 mmol/L)	7.4↑	4.6	5.8↑	7.27↑	5.9↑	6.8↑	3.6
钠 (135-145 mmol/L)	154↑	142	135	129↓	138	144	146↑
钙 (2.2-3 mmol/L)	1.78↓	1.86↓	1.21↓	1.4↓	1.44↓	1.39↓	2.27
谷丙氨酸 (0-38 U/L)	48 ↑	24	13	223↑	14	32	64↑
谷草转氨酶 (0-38 U/L)	199↑	78↑	124↑	2049↑	51	98↑	82↑
肌酸激酶 (21-220 U/L)	2000↑	780↑	646↑	1255↑	388↑	693↑	1364↑
肌酸激酶同工酶 (0-25 U/L)	128↑	67↑	132↑	106↑	22	47↑	18
肌酐 (15-55 umol/L)	187↑	16	77↑	175↑	58	73↑	30
尿素 (1.8-6.4 mmol/L)	6.1	1.6	1.8	3.2	1.6	2.6	3.8
<b>血常规</b>							
白细胞 (5.0-14.5×10 <sup>9</sup> /L)	22.06↑	24.77↑	17.65	14.66	36.73↑	11.49	14.45
红细胞 (3.5-5.5×10 <sup>12</sup> /L)	5.68↑	3.35↓	3.83	3.96	5.72↑	5.24	5.56↑
血小板 (100-300×10 <sup>9</sup> /L)	354↑	290	237	104↓	270	242	390
血红蛋白 (138-218g/L)	195	117↓	143	149	200	196	151
<b>C反应蛋白</b> (0-10 mg/L)	<3.11	<3.11	<3.11	<3.11	<3.11	<3.11	<3.11
<b>降钙素原</b> (≤0.5 ng/ml)	67.322↑	0.794↑	18.83↑	58.10↑	4.48↑	0.721↑	—
<b>凝血功能</b>							
凝血酶原时间 (10-15s)	16.2↑	20.7↑	28.9↑	129.6↑	19.5	17.3↑	120.0↑
国际标准化比值 (0.8-1.25)	1.35↑	1.73↑	2.54↑	11.06↑	1.64↑	1.49↑	10↑
部分凝血酶原时间 (14-21s)	33.9↑	35.2↑	56.70↑	87.6↑	39.2↑	37.8↑	180.0↑
凝血酶时间 (14-21s)	23.4↑	26.5↑	24.8↑	26.0↑	25↑	22.3	150.0↑
纤维蛋白原 (2-4g/L)	1.33↓	0.81↓	0.6↓	0.38↓	1.21↓	1.6↓	1.10↓
D二聚体 (0-1mg/L)	1.52↑	2.12↑	2.24↑	30.03↑	0.52	3.9↑	0.34↓

血质谱分析							
瓜氨酸 (4-30 μmol/L)	3.82↓	3.08↓	2.82↓	5.21	19.91	2.93↓	3.83↓
丙氨酸 (62.9-328 μmol/L)	1264.40↑	3337.99↑	1359.70↑	1417.87↑	1469.40↑	1594.40↑	327.9
脯氨酸 (72-293 μmol/L)	634.45↑	413.38↑	483.60↑	1209.17↑	3017.88↑	682.79↑	278.03
尿有机酸测定							
尿乳清酸 (0-2mmol/L)	0	0	57.4↑	-	155↑	315.5↑	256.1↑

### 2.3 基因测序学结果

7例病人中有3例存在明确的家族史：病例3的哥哥生后3天即不明原因夭折；病例5的哥哥和姐姐均幼年夭折，且姐姐的血筛报告提示OTCD；而病例6的母亲与两任丈夫生育的男孩均生后早期就出现疑似遗传代谢性疾病的临床症状。其他4例虽无明显家族史者，但所有病例的临床过程和初步实验室检查均高度提示代谢性疾病，UCD可能性大，在征得监护人同意后对7名患儿进行了遗传学检测，并对致病基因进行了变异来源的传递验证。

病例1的基因检测结果为CPS1基因存在两个错义变异，分别为15号外显子上的c.1631C>T(p.T544M)和17号外显子上的c.1981G>T(p.G661C)，两者均为杂合变异；患儿父亲携带c.1631C>T(p.T544M)的杂合变异，而患儿母亲携带c.1981G>T(p.G661C)的杂合变异(图1-3)。

A

基因	染色体坐标 (GRCh37/hg19)	核苷酸改变	NM号	基因 亚区	纯合 杂合	氨基酸改变	MAF	致病性分析	疾病表型	遗传 方式	突变 来源
CPS1	chr2:211463360	c.1631C>T	NM_0018754	CDS15	杂合	p.T544M	NA	致病性突变	羧甲酰磷酸	AR	父源
	chr2:211469970	c.1981G>T		CDS17	杂合	p.G661C	NA	疑似致病性突变	合成酶I缺乏症		母源

AR: 常染色体隐性遗传

B

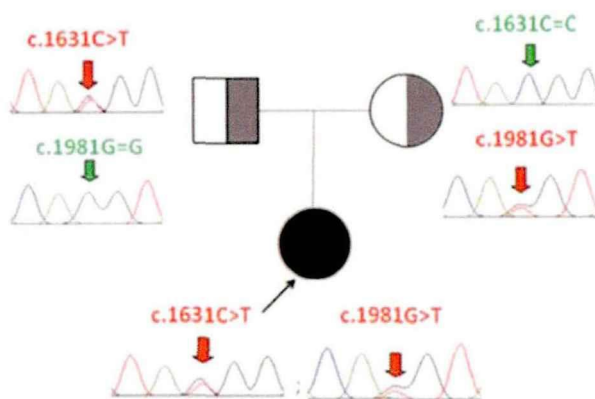


图 1-3 病例 1 的基因学检测结果及变异溯源

图 1-3A: 病例 1 的 CPS1 基因存在两个错义变异, 分别为 15 号染色体的 c.1631C>T(p.T544M), 由苏氨酸变异为蛋氨酸; 17 号染色体的 c.1981G>T(p.G661C), 由甘氨酸变异为半胱氨酸。

图 1-3B: 病例 1 的家系图提示患儿父亲携带 c.1631C>T(p.T544M), 而患儿母亲携带 c.1981G>T(p.G661C), 但均正常无表型, 患儿同时存在上述两个变异, 罹患 CPS1D。

c.1631C>T(p.T544M) 被报道为已知致病性变异 (Finckh U, 1998), 虽然 c.1981G>T(p.G661C) 未被报道过, 但在该位点发生过其他的致病性变异 (p.G661R) (Funghini S, 2012)。我们利用生物信息分析软件 Human Splicing Finder (HSF) 进行了变异对剪接位点影响的预测, 结果显示 c.1981G>T 很可能影响剪接位点。致病性分析软件 SIFT、Mutation Taster 以及 PolyPhen-2 均认为 c.1981G>T 与 CPS1D 发病有关, 其中 PolyPhen-2 将其预测为很有可能的损害, 其预测得分为 1.000 (敏感性: 0.00, 特异性: 1.00, 图 1-4A)。利用 ClustalX 和 GERP 对变异位点保守性的评价显示 p.G661 在不同的物种都是高度保守的, 且 c.1981G>T(p.G661C) 这个错义变异被预测为可改变 CPS1 高度进化保守的氨基酸变异 (图 1-4B)。另外, CPS1 的 3D 结构显示, p.G661C 的变异可以改变 CPS1 的侧链结构和氢键 (图 1-5)。

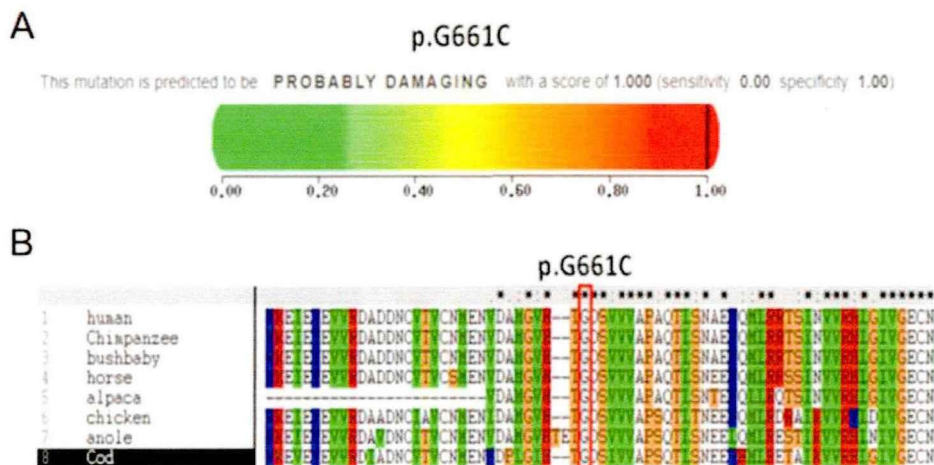


图 1-4 c.1981G>T (p.G661C) 变异位点的致病性和保守性分析结果

图 1-4A: PolyPhen-2 对 CPS1 的 c.1981G>T(p.G661C) 变异的致病性分析结果提示“很有可能的损害”, 预测得分为 1.000 (敏感性: 0.00, 特异性: 1.00)。

图 1-4B: 对 CPS1 基因 p.G661 位点的计算机模拟分析结果显示在人类、黑猩猩、丛猴、马、羊驼、鸡、变色龙及鳕鱼等不同物种中均高度保守。

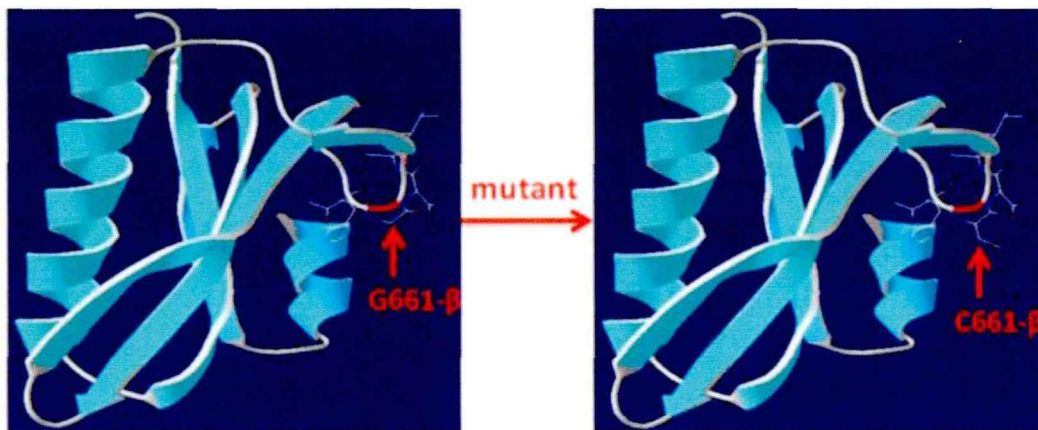


图 1-5 野生型和病例 1 变异后的 CPS1 3D 结构

图 1-5: 左图为野生型 CPS1 p.G661 的结构, 右图为变异后的结构, 这一变异改变了侧链结构和氢键。

病例 2 的基因检测结果显示患儿存在 CPS1 的 2 个杂合变异, 其中 7 号内含子上的 c.622-3C>G 为剪切变异, 而 24 号外显子上的 c.2896G>T (p.E966X)为无义变异。患儿母亲携带 c.622-3C>G 的杂合变异, 父亲携带 c.2896G>T(p.E966X)的杂合变异(图 1-6)。

A

基因	染色体坐标	核苷酸改变	NM号	基因亚区	纯合/杂合	氨基酸改变	MAF	致病性分析	疾病表型	遗传方式	突变来源
CPS1	Chr2:211452779	c.622-3C>G	NM_001875.4	Intron7	杂合	剪切变异	NA	致病性突变	羧甲基磷酸合成酶缺乏症	AR	母亲
	Chr2:211804720	c.2896G>T		CDS24	杂合	p.E966X	NA	致病性突变			父亲

AR: 常染色体隐性遗传

B

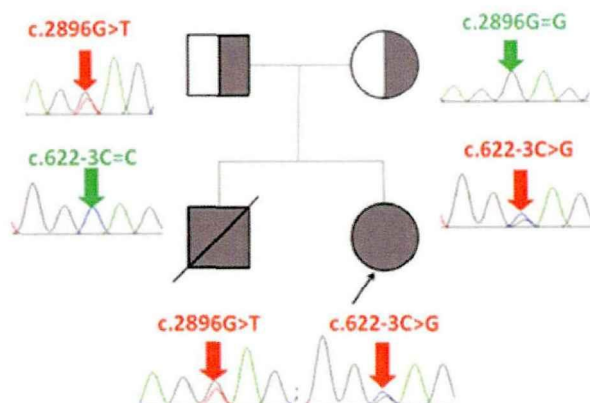


图 1-6 病例 2 的基因学检测结果及变异溯源

图 1-6A: 病例 2 CPS1 基因的两个杂合变异分别为 7 号内含子上的 c.622-3C>G 的剪切变

异和 24 号外显子上 c.2896G>T (p.E966X)的无义变异。

图 1-6B: 病例 2 的家系图提示患儿父亲携带 c.2896G>T( p.E966X), 母亲携带 c.622-3C>G, 但均正常无表型, 患儿同时存在上述两个变异, 罹患 CPS1D。

我们查阅了既往的文献及 OMIM, UCSC, HGMD, dbSNP, 1000genomes, ExAC, gnomAD 等人类基因数据库, 均未见 c. 622-3C>G 和 c. 2896G>T 的记录, 为新发变异。HSF 预测上述两个新发变异可能影响 mRNA 的正常剪切。ClustalX 的结果显示 p.E996 位点在不同的物种均是高度保守的(图 1-7A), 这个无义变异会产生一个提前的终止子, 翻译出一个缺失了 CPS1 保守位点并减少了 534 个氨基酸的缺失蛋白(图 1-7B)。

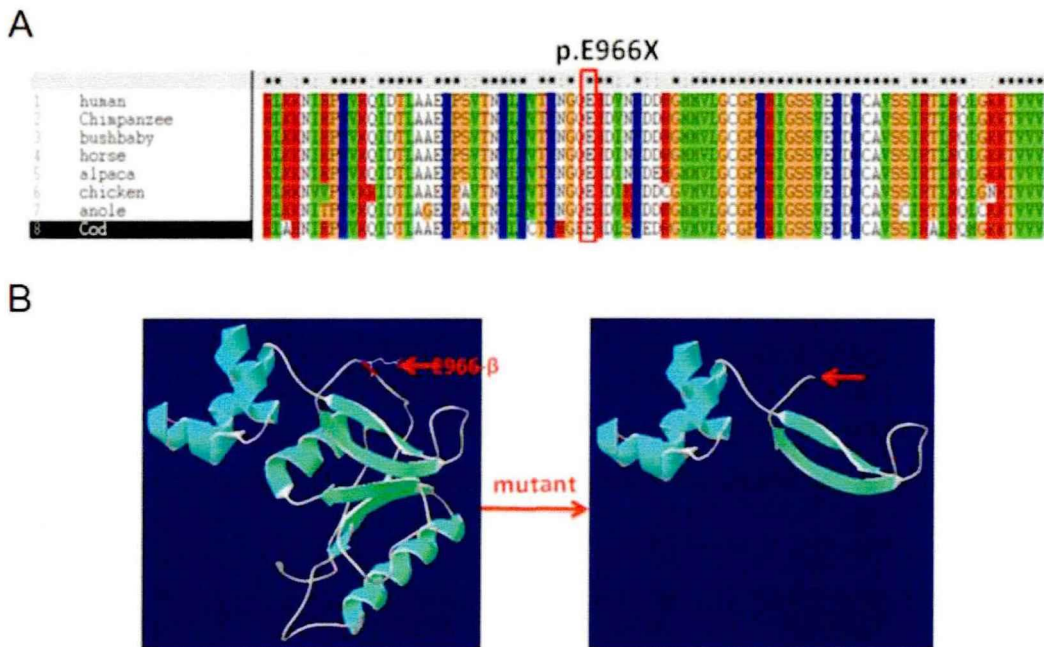


图 1-7 病例 2 p.E966X 位点的保守性分析和变异后的蛋白结构

图 1-7A: 对 CPS1 基因 p.E966 位点的计算机模拟分析结果显示该位点在人类、黑猩猩、丛猴、马、羊驼、鸡、变色龙及鳕鱼等不同物种中都是高度保守的。

图 1-7B: 左图为野生型 CPS1 的 E966 结构, 右图为变异后的结构, 这一变异使翻译出的蛋白减少了 534 个氨基酸。

我们应用高通量测序的方法检测了病例 3 患儿 X 染色体上 HGMD 报道的深度内含子区域致病位点的 1315 个基因共 6524 个位点, 结果显示该患儿的 OTC 基因出现了 3-9 号外显子的大面积缺失(chrX:38229039-38271274)(图 1-8A), 长度约 42235bp, 相关文献及各基因组数据库未见报道, 为新发变异。对缺失来源的 qPCR 验证结果显示, 患儿母亲和患儿的 OCT 基因的 1 号外显子均是正常的,

而 6 号外显子则均出现了缺失(图 1-8B); 蛋白模拟图提示该片段缺失导致 OTC 蛋白发生了明显改变(图 1-8C)。

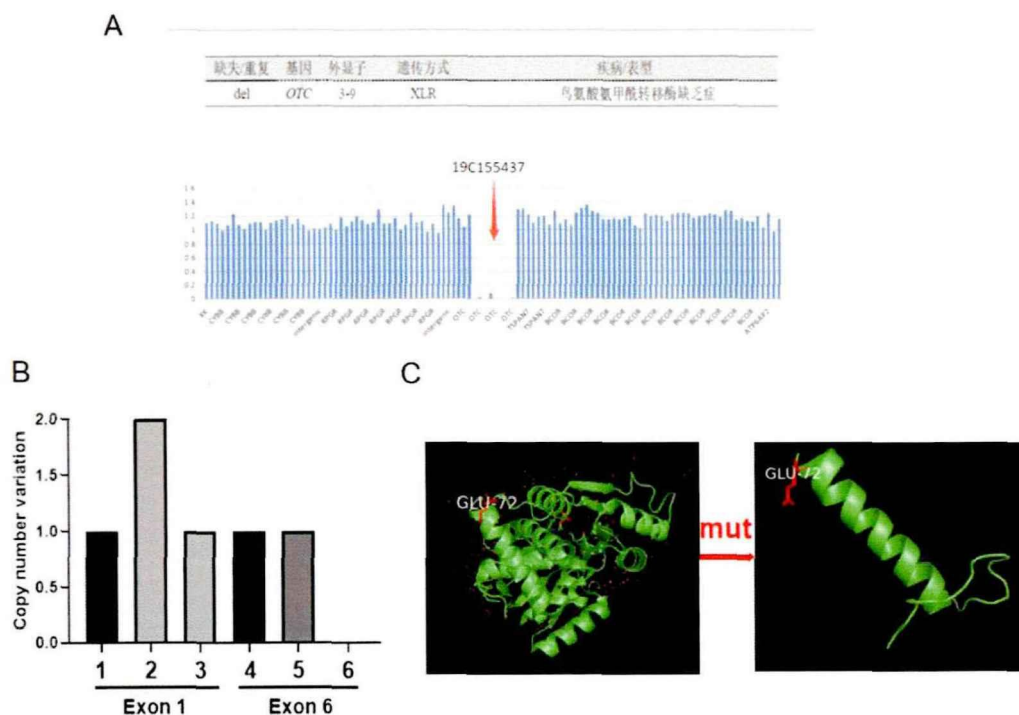


图 1-8 病例 3 的基因学检测结果、溯源验证及三维结构图

图 1-8A: 对 X 染色体上所有可能致病的基因位点进行检测, 结果显示患儿的 OTC 基因出现了 3-9 号外显子的缺失。

图 1-8B: 利用 qPCR 对患儿及其母外周血单核细胞 OTC 基因不同外显子拷贝数进行检测, 其中 1, 2, 3 代表 1 号外显子: 1 为正常男性, 2 为患儿母亲, 3 为患儿; 4, 5, 6 代表 6 号外显子: 4 为正常男性, 5 为患儿母亲, 6 为患儿。该图显示未缺失的 1 号外显子患儿与正常男性的拷贝数一致, 其母由于有 2 条 X 染色体故拷贝数为 2; 而包含在缺失部分 (3-9 号外显子) 的 6 号外显子, 母亲的拷贝数与正常男性一致, 证明有一条染色体上出现了 OTC6 号外显子的缺失, 而患儿拷贝数为 0, 为完全缺失, 证明患儿的片段缺失来源于其母。

图 1-8C: 3-9 号外显子的缺失使得 OTC 蛋白的结构发生了明显的改变, 仅残损少部分结构(右图)。

病例 4 也携带了 OTC 基因的一个新发变异 c.633+2T>G, Sanger 测序证明患儿母亲存在该位点的杂合变异变(图 1-9A, 1-9B)。该变异为内含子上的剪接变异, 根据 ACMG 指南可判定为疑似致病性变异(Likely pathogenic), 在 SpliceAI 上的预测结果是“可能影响剪切”。但是这个病人存在外观发育异常, 其染色体核型分析提示为 47XXY。目前仅有一篇克氏综合征合并 OTCD 的病例报道, 具体发

病原因仍不明确(Swarts L, 2007), 因此难以判断染色体异常与 OTCD 之间的联系。

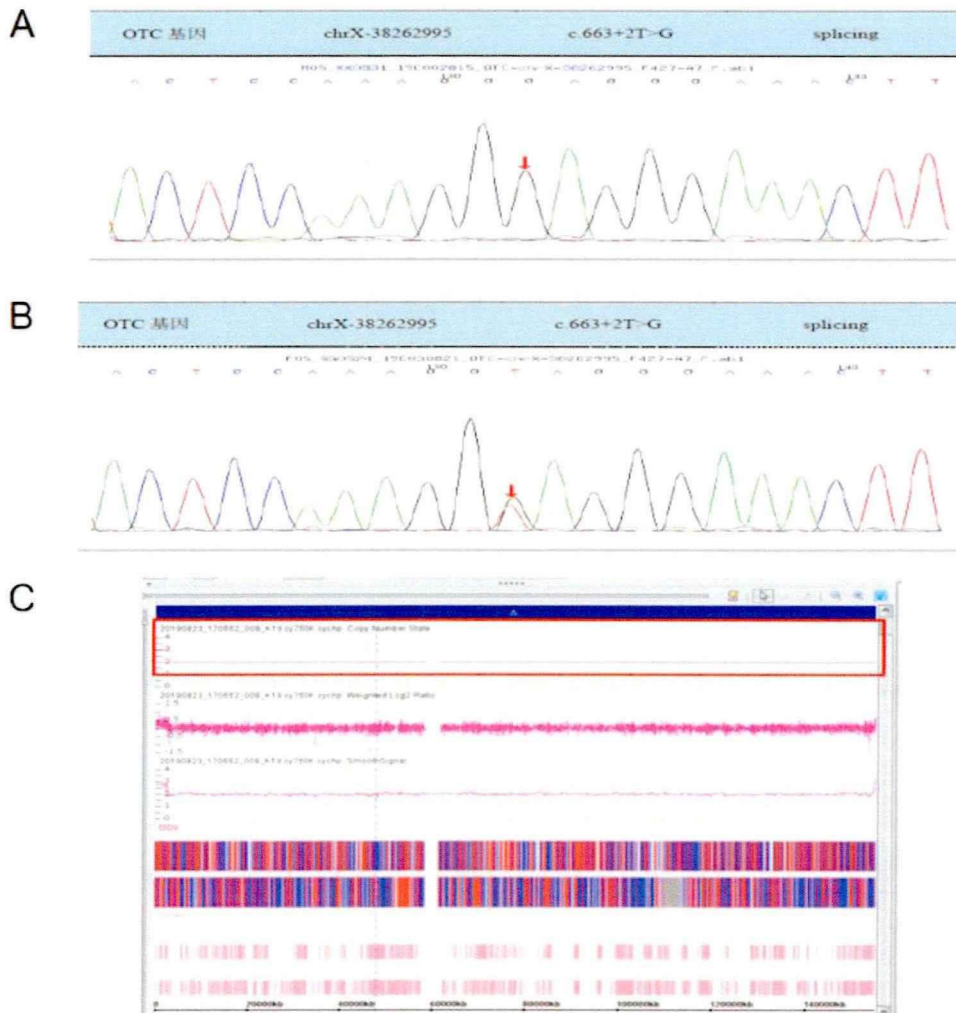


图 1-9 病例 4 的基因学检测及染色体核型分析结果截屏

图 1-9A: 病例 4 患儿的 Sanger 测序结果显示其 OTC 基因 6 号外显子上游的第 2 个内含子的 T 碱基变异为 G 碱基, 导致剪切变异。

图 1-9B: 病例 4 母亲的 Sanger 测序结果显示其携带与患儿相同的剪切变异。

图 1-9C: 图中红框提示病例 4 的 X 染色体拷贝数为 2, 证明其存在两条 X 染色体。

病例 5 有非常明确的家族史, 因此我们同时收集了全家五口的外周血进行基因学检测。结果显示患儿携带 OTC 基因 c.274C>T (p.R92X) 的半合子变异, 即基因编码区第 274 位碱基由 C 碱基变异为 T 碱基, 导致编码蛋白的第 92 位氨基酸由精氨酸变异成终止密码子。Sanger 验证提示患儿母亲、大姐、二姐均携带该位点的杂合变异(图 1-10)。



A

基因 (参考转录本)	染色体坐标 (GRCh37/hg19)	核苷酸/ 氨基酸变化	基因 亚区	合子 状态	变异 分类	疾病/表型	遗传 模式	家系验证
<i>OTC</i> NM_000531.5	ChrX 38229106	c.274C>T/ p.R92X	CDS3	半合子	P	鸟氨酸氨基甲酰转移酶缺乏症	XR	母源, 大姐、二姐均杂合携带

备注: 变异分类: P (Pathogenic, 致病的); 遗传模式: XR (X连锁隐性)

B

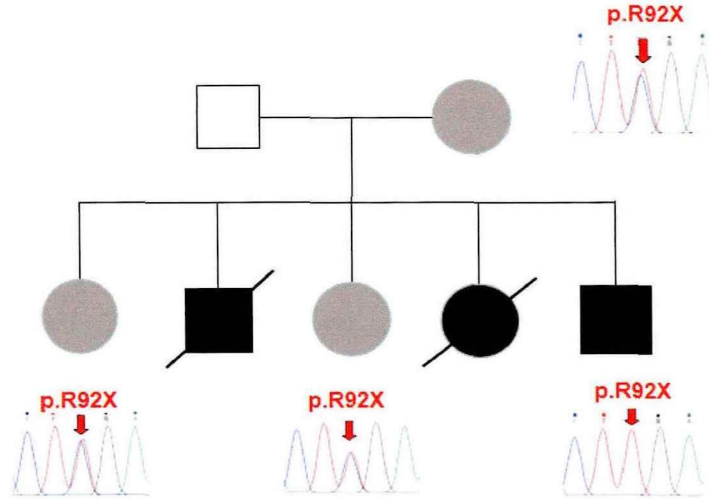


图 1-10 病例 10 的基因学检测结果及溯源验证

图 1-10A: 病例 5 的基因检测结果提示发现了 *OTC* 基因 c.274C>T (p.R92X) 的无义变异;

图 1-10B: 家系图表明患儿母亲和现存的两个姐姐均携带该位点的杂合变异。

c.274C>T (p.R92X) 为已知的发生在 3 号外显子上的无义变异(Grompe M, 1991)。从计算机模拟的 *OTC* 蛋白 3D 结构上可以看出, 该变异导致蛋白翻译的提前终止, 翻译出的蛋白缺少了 263 个氨基酸(图 1-11)。

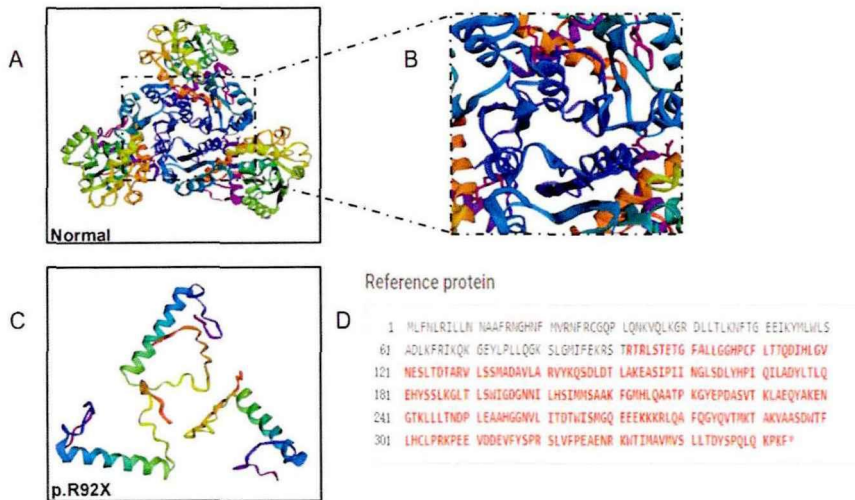


图 1-11 病例 5 的基因变异所致 OTC 蛋白三维结构的改变

图 1-11A: OTC 蛋白的正常结构; 图 1-11B: OTC 蛋白 p.R92 位点的正常结构; 图 1-11C: OTC 蛋白 p.R92 发生无义变异后的结构; 图 1-11D: 红色字母部分为 OTC 蛋白 p.R92 位点发生无义变异后翻译缺失的氨基酸序列。

病例 6 的家族史高度提示 X 连锁的遗传性疾病, 基因检测结果证实患儿 OTC 基因第 761 位的 C 碱基变异为 A 碱基, 导致第 254 位氨基酸由丙氨酸变异为谷氨酸, Sanger 测序提示患儿母亲存在 c.761C>A(p.A254E) 的杂合变异, 父亲不携带该变异基因 (图 1-12)。

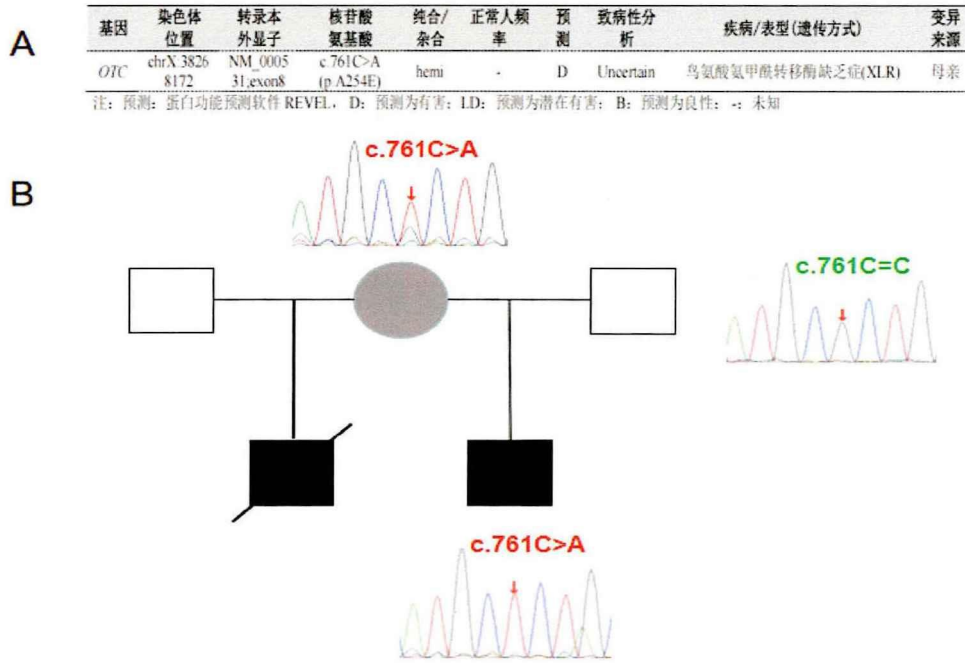


图 1-12 病例 6 的基因学检测结果及溯源验证

图 1-12A: 患儿存在 OTC 基因的 c.761C>A(p.A254E) 变异, 该变异来源于患儿母亲, 被 REVEL 软件预测为有害性变异。

图 1-12B: 患儿母亲存在 OTC 基因的 c.761C>A(p.A254E) 的半合子变异, 而患儿父亲不携带该变异。

该变异未见文献报道, PolyPhen-2 对其致病性的预测结果显示为“很可能有害”, 预测得分为 1.000 (图 1-13A)。保守性分析提示 p.A254 在不同的物种都是高度保守的 (图 1-13B), 该变异可导致 OTC 蛋白的侧链发生改变 (图 1-13C)。

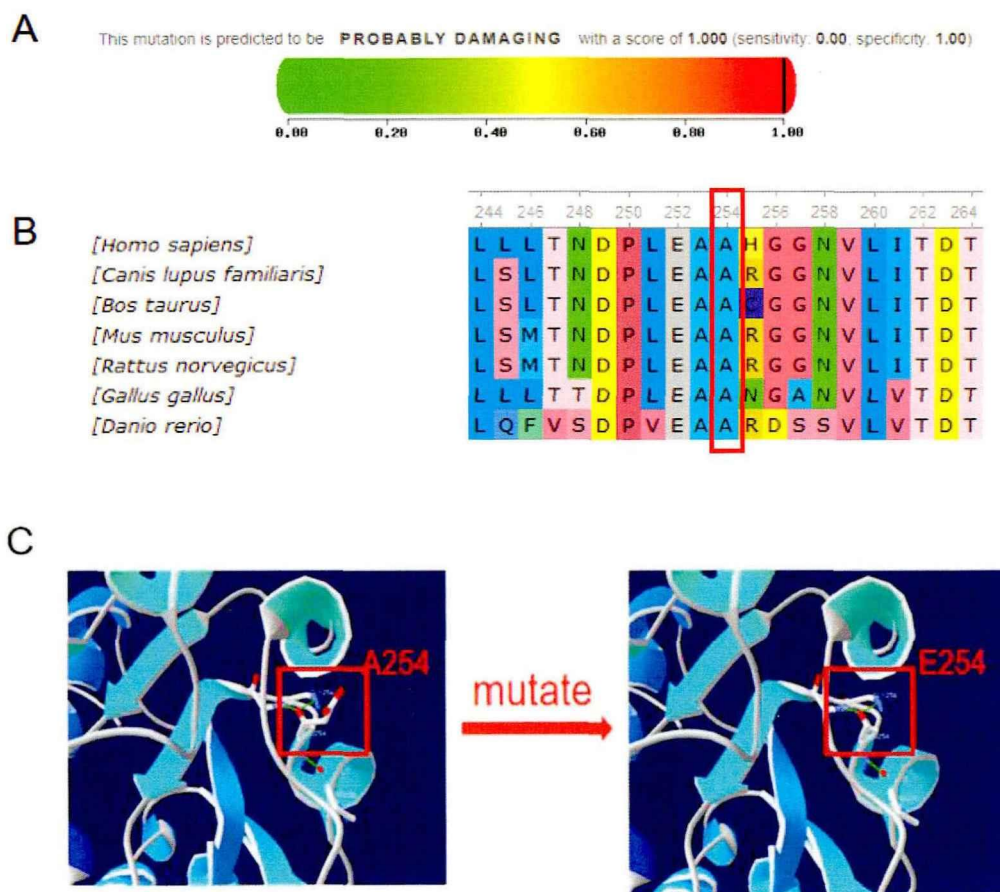


图 1-13 病例 6 变异位点的致病性和保守性分析以及对蛋白结构的影响

图 1-13A: PolyPhen-2 对 OTC 基因 c.761C>A(p.A254E) 变异的致病性分析结果提示“很有可能的损害”，其预测得分为 1.000(敏感性: 0.00, 特异性: 1.00)。

图 1-13B: 对 OTC 基因 p.A254 的计算机模拟分析结果显示该位点在人类、黑猩猩、牛、小家鼠、褐家鼠、鸡、斑马鱼等不同物种中都是高度保守的。

图 1-13C: 左图为正常的 OTC 蛋白 p.A254 位置的结构, 右图为该位点变异为谷氨酸后的侧链结构。

病例 7 是一个晚发型病例, 但起病急、病情重, 表现为急性高氨血症的临床过程。基因检测结果显示该患儿 OTC 基因的第 119 位碱基的 G 变异为 A; 这个位于 2 号外显子的错义变异使第 40 位氨基酸由精氨酸变为了组氨酸。患儿母亲存在 c.119G>A(p.R40H)的杂合变异, 而患儿父亲该位点无变异 (图 1-14)。

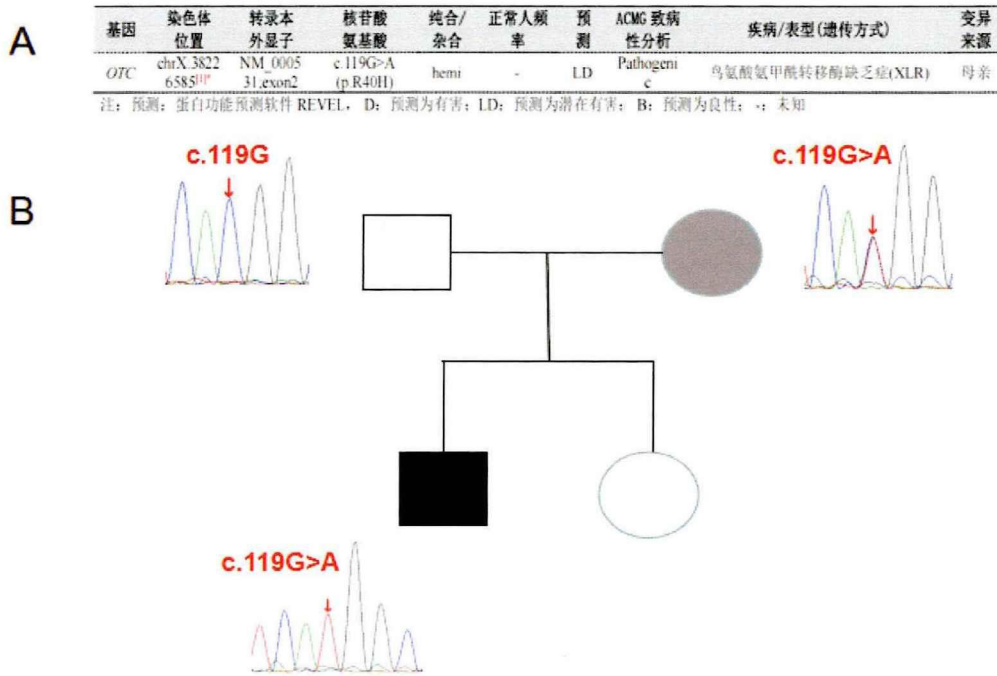
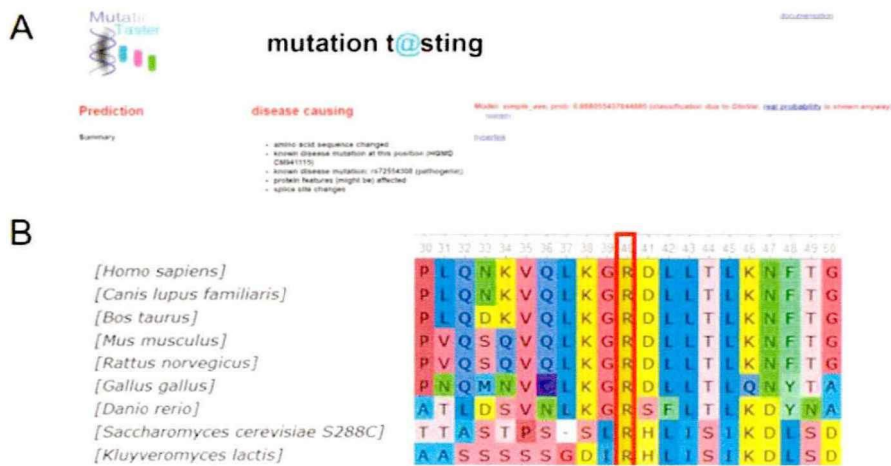


图 1-14 病例 7 的基因学检测结果及溯源验证

图 1-14: 患儿存在 OTC 基因的 c.119G>A(p.R40H) 变异, 该变异来源于其母。

该变异为已知变异, 且既往报道的病例也是晚发型病例(Tuchman M, 1994b), Mutation taster 对该变异的有害性分析结果提示为致病性变异(图 1-15A); 保守性分析提示 p.R40 在不同物种均高度保守(图 1-15B), 但是三维模拟图显示这个变异并没有导致蛋白结构发生改变(图 1-15C)。



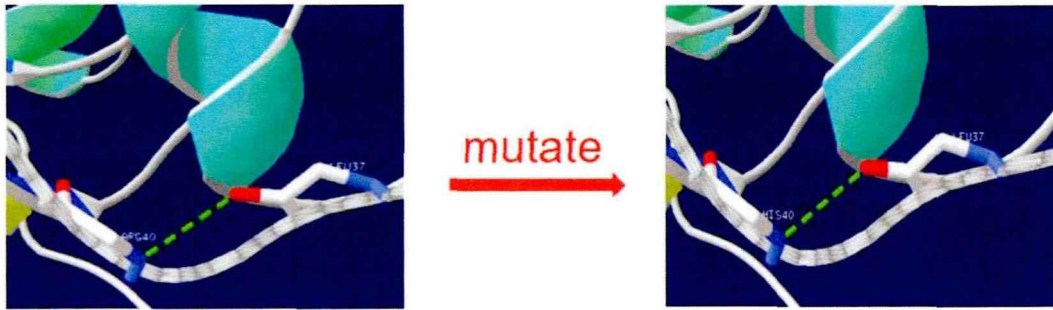


图 1-15 病例 7 变异位点的致病性和保守性分析

图 1-15A: Mutation taster 的预测结果提示 c. 119G>A(p.R40H) 变异为致病性变异。

图 1-15B: 对 OTC 基因 p.R40 位点的计算机模拟分析提示该位点在人类、狼、牛、小家鼠、褐家鼠、鸡、斑马鱼、酵母菌等不同物种中呈高度保守。

图 1-15C: 左图为野生型 OTC 蛋白 p.R40 位点的结构，右图为变异为组氨酸后该位点的结构，对比显示该变异并未造成 OTC 蛋白的结构改变。

7 例 UCD 病人的基因学检测共发现了 5 个新发的点变异和 1 个 3-9 号外显子长达 42235b 的大片段缺失，由于大片的外显子缺失可导致蛋白翻译的严重缺失，是 ACMG 中 PVS1 致病等级的变异方式，因此，仅将 5 个新发点变异的有害性预测和保守性分析结果总结入表 1-15。

表 1-15 UCD 新发变异位点的分析汇总

病例	基因	变异位点	GERP	SIFT	Poly_ph en2	Mutation taster	Revel	ACMG 致病性分析	ACMG 证据
1	CPS1	c.1981G>T (p.G661C)	C, 5.61	D 0	D 1	D 1	D 0.963	P	PM3_Strong, PM1, PM2, PM5, PP3
2	CPS1	c.622-3C>G	-	-	-	-	-	LP	PM3_Strong, PM2
2	CPS1	c.2896G>T (p.E966X)	C, 5.42	-	-	A 1	-	P	PVS1, PM3_Strong, PM2
4	OTC	c.633+2T>G	C, 5.91	D 0.001	D 0.998	D 1	D 0.977	U	PM1, PM2, PP3
6	OTC	c.761C>A (p.A254E)	C, 4.54	D 0.018	D 1	A 0.988	D 0.613	P	PS4, PM1, PM2, PM5

注: GERP: Genomic Evolutionary Rate Profiling, 用于衡量进化中跨物种基因序列的保守情况。C 代表保守, 高 GERP 分数意味着序列高度保守, 因此改变是有害的。

SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant, 预测错义替换是否影响蛋白质功能, 从而得知这个氨基酸替代是否有害; 分数范围 0-1, 分值 < 0.05 的位置被预测为有害 D: Deleterious, 分值 ≥ 0.05, 则预测为无害 T: Tolerated.

PolyPhen2: Polymorphism Phenotyping v2, 预测结果 D: Probably damaging (很可能有害, 分值 ≥ 0.909), P: Possibly damaging (可能有害, 0.447 ≤ 分值 ≤ 0.909), B: Benign (无害, 分值 ≤ 0.446).

Mutation taster: 用于预测内含子和非同义变异、短插入缺失变异以及跨越内含子-外显子边界变异的对功能的影响。预测结果 A: Disease causing automatic (有害), D: Disease causing (可能有害), N: Polymorphism (可能无害), P: Polymorphism automatic (无害)。

Revel: 单个变异的预测得分范围 0-1, 分值越高致病可能越大。

ACMG 致病性分析: P: Pathogenic, 致病; LP: Likely pathogenic, 可能致病; U: Uncertain, 不确定。

## 2.4 氨对抗生素杀菌效率的影响

研究证实, 代谢物可以提高抗生素的杀菌效率, 延胡索酸因为可以增强氨基糖苷类抗生素的杀菌效率, 已经被美国食品药品监督管理局批准用于临床治疗

(Meylan S, 2017)。本研究对 UCD 患者临床资料的分析发现, 感染可加重 UCD 的临床表型, 但抗生素的选择却只能经验用药。因此, 我们利用大肠杆菌 K12 作为模式菌进行了氨对抗生素杀菌效率影响的初步研究, 以期为 UCD 患儿抗生素的临床应用提供一定的理论基础。

在加入不同浓度的氯化铵以后, 实验组大肠杆菌的生存率比对照组显著下降。对比分析不同氯化铵浓度的影响, 氨苄西林 (AMP) 在 0.2mM 氯化铵浓度下使大肠杆菌的生存率下降最显著 (13.1 倍), 其余两组 (0.02mM, 2mM) 分别下降了 6.8 和 7.8 倍 (图 1-16A)。美罗培南 (MEM) 则未表现出浓度依赖效应, 三个实验组的生存率相近, 大肠杆菌的生存率相比对照组下降 4.1-5.9 倍。因此在含有氯化铵的培养基中, AMP 和 MEM 的杀菌效率均显著增强 (图 1-16B)。

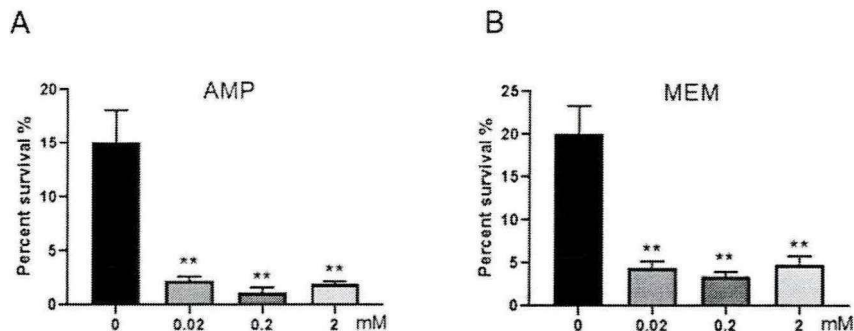


图 1-16 不同浓度氯化铵对氨苄西林和美罗培南杀菌效率的影响

由于氯化铵溶液呈弱酸性，氨水呈弱碱性，为排除 pH 对抗生素杀菌效率的干扰，采用相同方法检测了氨水对 AMP 和 MEM 杀菌效率的影响。结果显示，氨水对 AMP 和 MEM 杀菌效率的影响相近，实验组的生存率下降 4.3-6.6 倍（图 1-17）。因此，铵离子对 AMP 和 MEM 杀菌效率的影响与 pH 无关。此外还检测了氯化铵对头孢他啶和环丙沙星的影响，结果未发现显著差异。

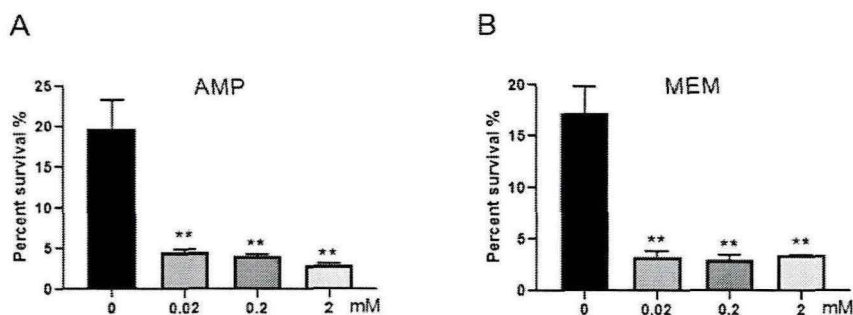


图 1-17 不同浓度氨水对氨苄西林和美罗培南杀菌效率的影响

### 3. 讨论

#### 3.1 尿素循环障碍的临床和分子生物学表现

##### 3.1.1 尿素循环障碍的临床表现

2012 年，由欧洲的代谢病儿科专家与医学生物学家、心理学家、代谢营养师及神经放射学家历时 3 年联合制定的第一个 UCD 诊疗推荐指南首次发表 (Haberle J, 2012)，并在 2019 年进行了更新 (Haberle J, 2019)。根据这两个指南，UCD 的临床症状可发生于任何年龄段，可以是急性的、慢性的或者是间断性的。对于急性高氨血症，最常见的临床症状是神经系统症状，如意识障碍、急性脑病表现、惊厥、脑梗塞样表现、短暂的视觉丧失，并可合并精神病症状，如幻觉、偏执、躁狂和情绪改变等，还易出现呕吐、多脏器功能衰竭、外周循环衰竭等症状。新生儿期主要表现为败血症样的临床症状，以及体温的不稳定、呼吸窘迫、过度通气等。慢性病人则较多的表现为乏力、头晕、头疼、学习障碍、蛋白质回避、生长发育落后、反复的腹痛和呕吐、肝脏肿大、肝酶升高等非特异性表现。比较特异性的表现是 ALSD 的结节性脆发症和 ARG1D 的进行性痉挛性截瘫（表 1-16）。诱发高氨血症的原因除了脱离母体环境导致新生儿期发病以外，常见的有感染、发热、呕吐、消化道出血、能量摄入的降低或者过度的蛋白摄入等。

本研究的 7 例 UCD 患者有 6 例为新生儿期发病，在脱离母体的代谢环境并开始摄入蛋白后很快就出现了高氨血症典型的临床过程：首先是吃奶差、反应差，伴呼吸窘迫，后迅速进展为意识障碍、惊厥、呼吸衰竭，最终合并多脏器功能衰竭。但是，UCD 的临床表现可能是多种因素共同作用的结果，需要注意鉴别。首先，新生儿期发病的 UCD 临床表现与新生儿败血症极为类似，而且，还可能与之同时存在。病例 1 和病例 2 均为 CPS1D 的病人，理论上病例 2 的变异为无义变异，蛋白翻译被截断，很可能翻译出没有功能的酶，但是其血浆氨浓度却低于病例 1。分析临床资料发现，两个病人均有发热的表现，但是病例 1 的降钙素原明显升高，考虑其血浆氨的显著升高可能是 UCD 和败血症共同作用的结果。病例 4 携带 OTC 基因的内含子剪接变异，其血浆氨水平为 5 例 OTCD 病人最低，但却出现了类似于其他病例非常严重的临床表型，结合其 PCT 为 OTCD 病人中的最高值，且有反复发热，痰培养提示耐碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌，考虑其全身发花、四肢湿冷、低血压、少尿、水肿等表现为革兰氏阴性杆菌败血症休克的表现。由于感染不仅为 UCD 病人出现急性高氨血症最常见的触发因素，还可增加病人住院次数、住院时间等(Guire PJM, 2013)，因此，病例 1 和病例 4 严重的临床表型很可能是感染加重了 UCD 的表现。其次，病例 3 自生后即因“呼吸急促、呻吟”等呼吸窘迫的症状于当地医院新生儿科进行治疗，但直至生后第 3 天才出现病情的快速恶化。鉴于患儿为胎龄 37<sup>+2</sup> 周经选择性剖宫产所生的男婴，易合并新生儿湿肺和/或新生儿呼吸窘迫综合征，且经初始呼吸支持后病情好转，考虑生后的呼吸窘迫表现并非为高氨血症所致，真正的高氨血症导致的呼吸系统症状是在生后第 3 天出现的呼吸暂停，需注意鉴别。

病例 7 是晚发型的 OTCD 病人，首发表现为反复呕吐，符合 UCD 病人常见的临床症状。该病人携带的 c.119G>A(p.R40H)突变使 OTC 酶活性降至正常的 28% (Nishiyori A, 1997)，而 10-20% 的 OTC 酶活性即可维持基本低限的尿素合成功能(Bachmann C, 1981; Kuchel PW, 1977)，因此，病例 7 在发病前的 4 年间并没有出现 OTCD 的相关症状，且生长发育正常。但是，相较于正常 OTC，突变后的酶更为不稳定，且衰减更快 (Nishiyori A, 1997)，故当其出现呕吐、进食差时，体内糖异生增加，蛋白分解的增多导致氨的代谢负担加大，从而使本就不稳定的突变 OTC 酶衰减加速，无法维持正常的尿素循环，进而出现了高氨血症的临床症状。另外，该患儿入院前即有发热病史，入院后炎症指标进行性升高，



且在血浆置换后因脓毒血症进行了血液滤过治疗,因此,其起病后疾病迅速进展且表型严重亦考虑与感染因素有关。

病例 5 的家庭是一个 OTCD 的家族,至少已有两个孩子死于 OTCD,母亲和现存的两个姐姐均携带同样的致病基因。详细追问病史发现,这两个女孩平素不喜摄入蛋白类食物,很少吃如排骨、炖肉等含大量蛋白的食物,体格相对于同龄儿童也偏矮偏瘦,考虑这两个女孩可能存在轻度的慢性高氨血症症状,但家长不同意进一步检查,未能进行明确。该家族疑似死于 OTCD 的女孩在 1.5 岁时发病,其临床症状也是首先表现为呕吐,后进展为脑病表现,与病例 7 的临床过程极为相似,因此认为呕吐可能是晚发型 UCD 病例发病时较为常见的首发症状和触发因素。

总结上述 UCD 病人的临床表现认为,即使是急性高氨血症,临床表现仍缺乏特异性,且可能在任何年龄被多种因素所诱发。对于新生儿,当出现与败血症类似的临床表现又不能以颅内感染解释脑病表现时,需完善血浆氨的检查来排除 UCD。而对于其他年龄的儿童,当出现反复呕吐合并神经系统表现时,亦需考虑到晚发型 UCD。

### 3.1.2 氨在脑中的代谢及其影响

高氨血症引起的神经系统症状是 UCD 最主要的临床表现。脑中的氨主要来源于血液,少部分来源于脑脊液和脑的自身代谢(Brusilow SW, 2010, Cooper AJL, 2012)。谷氨酰胺(Glutamine, Gln)在谷氨酸脱氢酶(Glutamic dehydrogenase, GDH)作用下发生氧化脱氨基作用生成的氨可能是脑自身代谢形成的氨的主要来源(Brusilow SW, 2010)。

正常脑氨与血氨的比例是 1.5-3.0:1 (Cooper AJL, 1987)。目前的证据认为大部分的氨是通过不饱和弥散的形式进入脑中的(Cooper AJL, 2012),弥散量与血液的 pH 成正比而与脑血流(cerebral blood flow, CBF)成反比。氨对所有动物都具有神经毒性 (Ip YK, 2010),因此,氨在脑中的稳态受到的严格调控(图 1-18)。氨由血液入脑后,在谷氨酰胺合成酶(Glutamine Synthetase, GS)的作用下合成 Gln,是脑中氨最主要的解毒方式。这个过程发生得非常迅速,但也是有限的,如果氨的入脑速度超过了 Gln 的合成速度,则无法维持氨在脑中的稳态。

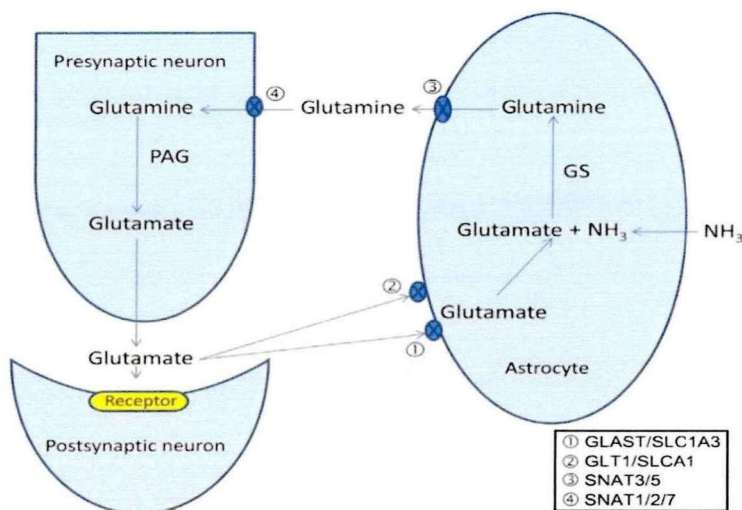


图 1-18 谷氨酸/谷氨酰胺循环(Walker V, 2014)

图 1-18: 氨进入星形胶质细胞后在 GS 的作用下与谷氨酸(Glutamate, Glu)合成谷氨酰胺(Gln), 被 SNAT 转运到细胞外间隙, 然后由一个或多个 SNAT 运输进谷氨酸能神经元并被 PGA 水解成 Glu 和氨。由于 PAG 会被 Glu 和氨所抑制, 因此 Glu 的产生即被控制。释放到突触间隙且不被突触后受体所结合的 Glu 被 GLAST 和 SLC1A3 转运回星形胶质细胞, 再次用来合成 Gln。

缩写: PAG, 磷酸活化的谷氨酰胺酶; SNAT, 钠耦合的氨基酸转运蛋白; GLAST, 谷氨酸-天冬氨酸转运蛋白; SLC1A3 (EAAT1, 兴奋性氨基酸转运蛋白-1); GLT1, 谷氨酸转运蛋白-1; SLCA1 (EAAT2), 兴奋性氨基酸转运蛋白-2; R, NMDA 受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor)即 N-甲基-D-天冬氨酸受体。

过多的氨对神经系统的损伤机制一直是神经学家的研究热点。由于 GS 仅表达于星形胶质细胞, 因此大量的研究集中于氨对星形胶质细胞的影响上。最早的理论认为, 升高的氨抑制了 Glu 生成  $\alpha$  酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -KG), 从而导致三羧酸循环的原料不足, ATP 产生减少(Bessman SP, 1995)。但在随后几十年的研究中发现, 过多的氨并没有明显影响  $\alpha$ -KG 的浓度(Bosoi CR, 2014), 真正影响的是 Gln 的浓度, 因此提出了胶质细胞的渗透损伤假说(Brusilow SW, 2010)。即在星形胶质细胞中, 升高的氨导致 Gln 合成增多, 由于渗透作用使细胞水肿, 进而发生颅内压的升高, 影响了细胞功能和大脑结构, 最终产生一系列临床症状。然而, 细胞水肿并不能解释高氨血症的所有神经毒性(Joshi D, 2014)。其他可能的途径还包括: 1. 高氨损伤了星形胶质细胞的氧化代谢, 通过增强糖酵解导致脑内乳酸的危险性升高(Dam G, 2013; Bosoi CR, 2014)。2. 氨离子作为一种弱碱可能通过改变 pH 以及与钠-钾-ATP 酶、钾离子通道或钠-钾-氯协同转运蛋白上的

钾离子竞争,打破了钾离子的稳态而影响细胞功能(Rangroo TV, 2014)。3. 细胞外急性升高的氨和钾离子都可以导致 $\gamma$ 氨基丁酸(GABA)平衡蛋白的去极化,从而发生神经元细胞的抑制,这很可能是高氨血症导致惊厥的原因(Rangroo TV, 2013)。4. 由于氨水平的升高,NMDA受体被过度激活,通过神经毒性途径导致轴突变性和细胞死亡;另一方面,激活的钙调磷酸蛋白使得钠-钾-ATP酶出现去磷酸化,严重增加了ATP的消耗(约80%),产生的自由基诱发氧化应激反应,也增加了细胞的死亡(Paprocka J, 2012)。5. 高氨也有可能影响脑血流的自调节功能,导致脑充血(Ducharme-Crevier L, 2016)。总之,关于高氨血症造成脑病和脑损伤的机制目前仍没有确定的解释,多数都是假说,大量的研究仍在进行中。

### 3.1.3 尿素循环障碍的分子生物学表现

UCD的首要分子生物学表现即为高血氨,但是需要注意的是,血氨的正常范围有年龄差异。根据临床生物学及实验室医学协会的标准(Hawke L, 2012),早产儿血氨的正常范围是 $<150 \mu\text{mol/L}$  ( $255 \mu\text{g/dl}$ );足月新生儿 $<100 \mu\text{mol/L}$  ( $170 \mu\text{g/dl}$ );婴儿和儿童 $<40 \mu\text{mol/L}$  ( $68 \mu\text{g/dl}$ );青少年和成人为 $11\text{--}32 \mu\text{mol/L}$  ( $19\text{--}54 \mu\text{g/dl}$ )。一旦发现高氨血症,需要立即完善血浆氨基酸、全血和血浆酰基肉碱、有机酸测定和乳清酸等检查,同时完善血气分析、血尿素、电解质、肝功能、凝血检查、血糖、乳酸以及尿酮体等基本的实验室检查(UK National Metabolic Biochemistry Network)。

除高血氨外,血谷氨酰胺水平的升高也是尿素循环障碍的特征性表现之一,而二者的同时显著增高则预示病人易发生高氨血症性脑病(Brusilow SW, 1995)。遗憾的是本院的血筛检查未能包括谷氨酰胺的测定。

氨甲酰磷酸和鸟氨酸在鸟氨酸转氨甲酰酶的催化下生成瓜氨酸,因此,在UCD中,只有CPS1D和OTCD会导致血瓜氨酸水平的降低。氨甲酰磷酸同时参与尿素循环和嘧啶合成,由于尿素循环相关酶的缺乏,氨甲酰磷酸积聚,导致嘧啶生物合成中间产物乳清酸明显升高。因此,绝大多数UCD病人尿中的乳清酸是升高的。而CPS1D的病人由于不能合成或者只能少量合成氨甲酰磷酸,故尿中乳清酸水平是降低甚至缺失的,这也是CPS1D区别于其他UCD的主要鉴别点(表1-16)。

表 1-16 尿素循环障碍的临床及分子生物学特征

疾病名称	临床特点	有机酸的特异性改变		尿乳清酸
		血	尿	
CPS1D	高氨血症	瓜氨酸↓	/	-
OTCD	高氨血症	瓜氨酸↓	/	++
ASSD	高氨血症	瓜氨酸↑	瓜氨酸↑	++
ASLD	高氨血症	精氨酸琥珀酸↑	/	+
	肝脏肿大	瓜氨酸↑		
	结节性脆发症			
ARG1D	高氨血症	精氨酸↑↑	精氨酸↑	++
	发育迟滞		赖氨酸↑	
	痉挛性截瘫		胱氨酸↑	
NAGSD	高氨血症	/	/	-

本研究中病例 1 和病例 2 均表现为血瓜氨酸水平的升高，而尿中未检测到乳清酸，符合 CPS1D 病人典型的血尿筛表现。对于 5 位 OTCD 的病人，其中 3 人出现血瓜氨酸的明显减低伴尿乳清酸的明显升高，亦符合 OTCD 的血尿筛表现。病例 6 的瓜氨酸水平虽然在正常范围，但其尿乳清酸水平出现数十倍升高，结合患儿明确的家族史，仍可初步诊断为 OTCD。既往文献也有报道 OTCD 病人的血瓜氨酸在正常范围(Zheng Z, 2019)，因此，在对高氨血症的患儿应同时完善血筛和尿筛的检查，并将两者以及家族史等多方面信息进行综合分析。

另外，本研究还发现，所有早发型 UCD 病人的丙氨酸和脯氨酸都是明显升高的。CPS1D 和 OTCD 作为 UCD 的前两步限速反应，均可导致鸟氨酸的蓄积和瓜氨酸的降低。鸟氨酸在天冬氨酸转氨酶 1(GOT1)的催化下可生成脯氨酸，故鸟氨酸的蓄积导致脯氨酸水平的升高(图 1-19)，但该反应是可逆的。将 OTCD 病人血瓜氨酸和脯氨酸数值进行相关性分析发现，二者的相关性系数达 0.99,  $p < 0.05$ ，考虑为脯氨酸的过多蓄积导致脯氨酸向鸟氨酸转化，进而促使机体利用仅存的 OTC 将鸟氨酸转化为瓜氨酸；且精氨酸也可在一氧化氮合成酶的催化下少量合成瓜氨酸，因此，病例 4 和病例 5 的血瓜氨酸水平在正常范围。另一方面，天冬氨酸由于瓜氨酸的减低不能进行后续的尿素循环而出现蓄积，过多的天冬氨酸可通过天冬氨酸脱羧酶形成丙氨酸，从而导致丙氨酸的升高。晚发型病例可能由于突变后的酶仍具有一定程度的活性，虽丙氨酸和脯氨酸已有升高(达正常值上限)，但未及早发型病例如此显著。因此，丙氨酸和脯氨酸的升高可为早发型

CPS1D 和 OTCD 的诊断提供一定的指导意义。

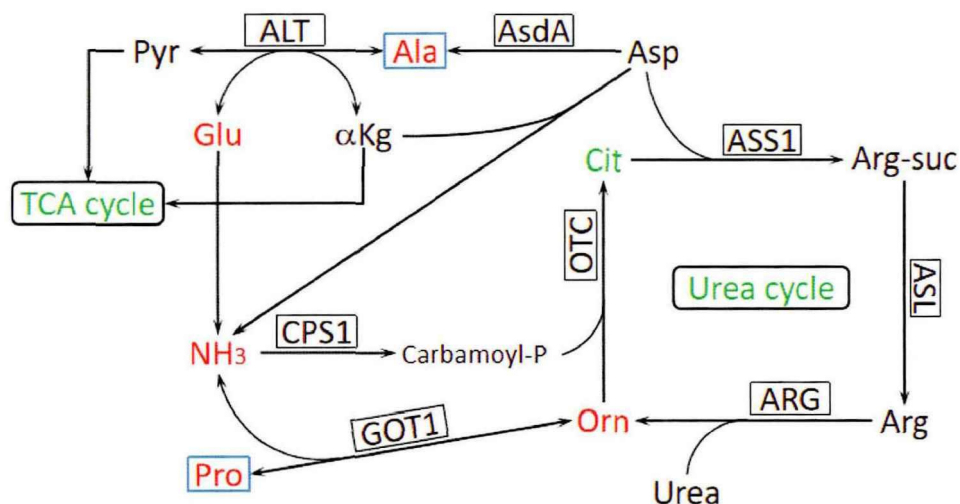


图 1-19 丙氨酸和脯氨酸与尿素循环的关系

缩写: TCA cycle: 三羧酸循环; Pyr: 丙酮酸; ALT: 谷丙转氨酶; Ala: 丙氨酸; AsdA: 天冬氨酸脱羧酶; Asp: 天冬氨酸; ASS1: 精氨酸琥珀酸合成酶 1; Arg-suc: 精氨酸琥珀酸; ASL: 精氨酸琥珀酸分解酶; Arg: 精氨酸和延胡索酸, ARG: 精氨酸酶; Urea: 尿素; Orn: 鸟氨酸; OTC: 鸟氨酸转氨甲酰酶; Cit: 瓜氨酸; GOT1: 天冬氨酸转氨酶 1; Pro: 脯氨酸; CPS1: 氨甲酰磷酸合成酶 1; Carbamoyl-P: 氨甲酰磷酸; Glu: 谷氨酸;  $\alpha$  Kg:  $\alpha$  酮戊二酸。

分析 7 例患儿的生化检查发现, 所有 6 例新生儿病例均出现了低钙血症。新生儿因母源性高降钙素的影响且自身对甲状旁腺素反应延迟, 在生后早期易出现低钙血症(Jain A, 2008)。但需要指出的是, 有研究对 85 例 UCD 病人的回顾性分析发现, 低钙血症与血氨的峰值明显相关(Nakip OS, 2020), 因此, 需注意监测高氨血症患儿的血钙水平, 避免加重惊厥等脑损伤症状。

尿素循环主要发生在肝脏中, 因此肝功能损伤甚至急性肝衰竭(Acute Liver Failure, ALF)是 UCD 常见的并发症, 且易合并凝血功能障碍(Mori T, 2002; de Groot MJ, 2011; Gallagher RC, 2014)。既往的研究认为, 高氨血症导致肝脏合成凝血因子功能降低, 因此 OTCD 的病人在高氨血症时会合并国际标准化比值(International Normalized Ratio, INR)的升高和 VII 因子的减少(Laemmle A, 2016); 高氨血症合并凝血功能障碍先于血清转氨酶峰值的出现可能是女性 OTCD 患者肝功能异常的特征性表现形式(Clarkston K, 2021)。而对精氨酸血症患者的分析则

发现这些患者均存在凝血酶原时间(prothrombin time, PT)和 INR 的延长, 但他们的肝酶却大多正常或仅轻度升高(Kiykim E, 2018)。本研究的 7 例 UCD 病人仅有 1 例出现明显的肝酶升高, 却全部合并凝血功能障碍, 且有 4 例病人存在症状性出血, 与上述研究结果吻合。但对血浆氨水平与 INR、PT、部分凝血酶原时间、纤维蛋白原等凝血功能指标进行的相关性分析显示, 与血浆氨水平呈明显相关的是纤维蛋白原( $r = 0.75, p = 0.026$ )。由于纤维蛋白原也是由肝细胞合成, 考虑凝血功能障碍仍继发于肝功能损伤。综合上述文献研究结果及本研究的发现, 认为凝血功能障碍可能是 UCD 患者肝功能损伤的早期标记物。因此, 对不明原因的肝功能损害、凝血功能异常的病人也要进行血浆氨的检查, 排除 UCD。

### 3.2 新生儿筛查在尿素循环中的应用价值

新生儿筛查(Newborn Screening, NBS)是指在新生儿生后几小时到几天内进行的多种检测, 其目的是为了预防新生儿出现严重的健康问题甚至死亡。广义的新生儿筛查包括利用血液和尿液样本进行的遗传代谢病筛查以及听力检测、先天性心脏病筛查等多种检查(Therrell BL, 2015), 对 UCD 病人来说, 最为重要的是血筛和尿筛的早期检查。

新生儿疾病筛查已有半个世纪的历史, 随着实验技术的进步, 质谱分析很快应用到遗传代谢性疾病的筛查中 (Tanaka K, 1967), 如今, 以串联质谱分析作为技术手段, 干燥血片作为样本的新生儿疾病筛查已可以检测超过 50 种先天性遗传代谢性疾病(Therrell BL Jr, 2010)。在美国和加拿大, NBS 已达到全覆盖, 大多数发达国家的覆盖率也超过 95%。我国新生儿疾病筛查起步于 20 世纪 80 年代初, 在 2004 年开始利用串联质谱进行扩展的 NBS, 随后, 这项检测在全国范围内逐渐推广, 但并不包括 UCD 的筛查。

目前, 世界卫生组织的 Wilson-Jungner 标准仍然是决定 NBS 筛查范围的金标准。根据这个标准, 如果一种疾病符合以下特征, 则需要筛查: (1)重要的健康问题; (2)需要了解疾病的自然过程; (3)需要在疾病早期就被识别的疾病; (4)有合适的检测或者检查方式; (5)检测方式需要被大众所接受; (6)需要决定定期复查的时间; (7)有可接受的治疗方法; (8)有可以进行诊断和治疗的设备; (9)应该有公认的标准来决定哪些人是病人; (10)花费应与益处达到经济学的平衡(Wilson JM, 1968)。在 2012 年的 UCD 建议指南中, 新生儿筛查被认为对于 UCD

的病人意义不大。原因是新生儿发病的 UCD 临床表型都非常严重，即使早期诊断也不能对患儿的预后产生决定性的作用。而且，对于 NAGSD, CPS1D 和 OTCD, 分子生物学的改变主要是血中谷氨酰胺水平的升高和瓜氨酸水平的降低，而在新生儿筛查的检测方法中，前者不稳定，后者的特异性和敏感性都很低(Cavicchi C, 2009)。美国、澳大利亚和我国台湾地区曾通过干血片法进行瓜氨酸、精氨酸和精氨酸琥珀酸的检测来筛查 ASSD, ARG1D 和 ASLD。但随后发现很多 ASLD 筛查阳性的新生儿仅是 ASL 的部分缺陷，临床并不会出现症状，于是澳大利亚政府停止了对 ASLD 的筛查(Mercimek-Mahmutoglu S, 2010)。2019 年 UCD 的更新指南认为，对于 NAGSD, CPS1D 和 OTCD, 即使早期诊断对于患儿家长再生育时有一定的产前保健意义，仍不推荐进行筛查；而对于 ASSD, ASLD 和 ARG1D, 需要更多的评估来衡量利弊(Haberle J, 2019)。尽管如此，Vasquez-Loarte 对 PubMed 上关于近端 UCD, 即 CPS1D、OTCD 和 NAGSD 的 31 篇文献进行的系统分析，认为 NBS 对以上三种疾病的患儿有改善发育落后、降低死亡率的显著意义，建议开展针对近端 UCD 的筛查，但需要提高 NBS 的敏感性和特异性(Vasquez-Loarte T, 2020)。

本院在 4 年期间共进行了 16154 例高危儿童的遗传代谢病筛查，最终经基因检测确诊的均为近端 UCD 病例，虽最终未能改变这些病人的预后，但对病人父母今后的生育选择有重大意义；而且，这 7 例病人均为外地转入病人，入院前已出现了非常严重的高氨血症和难以逆转的脑损伤，如能早期发现和确诊可能改善患儿的预后。另外，近端 UCD 的筛查所需指标较为单一，仅需血谷氨酰胺、瓜氨酸和尿乳清酸等指标即有特异性的提示意义，技术成熟、操作简便且不会对病人家庭或社会造成巨大的经济负担，因此认为可以考虑将近端 UCD 的筛查加入到 NBS 的范围中。

### 3.3 尿素循环障碍的基因学分析

由于 UCD 的罕见性和临床表现的不典型性，其诊断很大程度上依赖于实验室检查。但如上所述，虽然有谷氨酰胺、瓜氨酸、尿乳清酸等较为特异的代谢产物异常，但很难单独依靠生化检查来诊断 UCD 并与有机酸代谢异常等其他遗传代谢病相鉴别；而酶活性的检测需要进行相关组织的活检（如肝脏、肠粘膜等），因此，遗传学检查成为 UCD 确诊的首选检查(Haberle J, 2012)。基因突变检测的

敏感性至少有 80%( Yamaguchi S, 2006), 除诊断外还可以用于携带者的识别、产前诊断、家系分析、遗传咨询以及分析基因型和临床表型的相关性, 甚至可以让某些基因治疗成为可能。下面, 就我们 7 例病人的两种 UCD 的基因学检测做一总结分析。

### 3.3.1 氨甲酰磷酸合成酶 1 缺陷的基因学分析

CPS1 基因位于 2 号染色体 q34, 长度约 122kb, 含有 38 个外显子, 编码一个含 1500 个氨基酸的多肽。CPS1 基因的变异类型包括错义变异、无义变异、小的缺失、小的插入、小的插入重复以及大的缺失。包括我们发现的 3 个, 目前至少已有 274 个不同的 CPS1 基因变异被报道(附表 1)。其中最常见的是错义变异, 而最少见的是小的插入缺失和大的插入/重复(图 1-20)。CPS1 基因有非常大的变异性, 且非常个体化, 重复性非常低(Häberle J, 2011), 我们的统计也进一步证实了这一点。

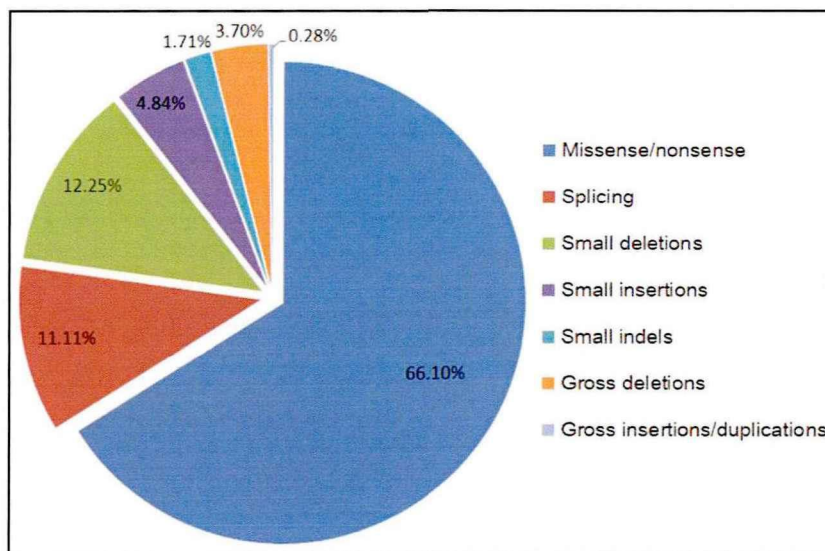


图 1-20 CPS1D 基因变异类型的比例分布

病例 1 的基因检测发现了 CPS1 的两种错义变异, 分别为 c.1631C>T (p.T544M) 和 c.1981G>T(p.G661C), 其中 c.1631C>T (p.T544M)为已知突变 (Finckh U, 1998; Häberle J, 2011)。利用大肠杆菌对该突变进行重组发现, 该突变影响了碳酸氢根磷酸化的区域(BPSD), 而这个区域是 CPS1 酶最初的两步反应发生的位置, 因此, 包括 ATP、碳酸氢根及氨在内的所有底物的催化都受到了影响。而对酶活性的检测发现, 该突变使碳酸氢根的  $K_m$  值增加了约 60 倍, NAG 的  $K_a$  值增加了约 20 倍; 而氨的最大反应速度  $V_{max}$  值则降低了 4 倍,  $K_m$  值增加



了 4 倍, 从而导致 CPS1 活性的严重下降。NAG 的  $K_a$  值虽然增加了 20 倍, 但是并没有直接影响 NAG 的位置, 而是阻碍了 BPSD 和 NAG 连接区的交叉反应, 从而严重降低了 NAG 与 CPS1 的亲和力(Diez-Fernandez C, 2013)。

病例 1 的另一个变异 c.1981G > T(p.G661C)是我们新发现的变异。如结果中所示, 这个氨基酸位点在不同的物种是高度保守的, 多个致病性预测分析软件均认为其为致病性变异, HSF 软件对剪接位点影响的评估认为其可能使 5'端出现了一个错误从而影响了 mRNA 的剪接。因此, p.G661C 从甘氨酸到半胱氨酸的变异被预测为不仅影响了甘氨酸的保守位点, 而且还改变了 CPS1 蛋白的侧链结构, 从而改变了其晶体学形态, 产生了一个有缺陷的蛋白。一个与之在同一位置的类似变异 c.1981G > T(p.G661R)导致一个大的侧链取代了甘氨酸, 从而降低了蛋白结构的稳定性(Funghini S, 2012)。因此, 我们推断 c.1981G > T(p.G661C)也可能影响 CPS1 蛋白的稳定性。综上所述, 病例 1 的两个变异的综合作用是既影响了蛋白的结构也影响了蛋白的功能, 从而导致了严重的临床症状。

病例 2 的基因检测发现了一个新的无义变异和一个剪接位点的改变, 分别为 c.2896G > T (p.G966X)和 c.622-3C > G。其中无义变异发生在 24 号外显子的第一个外显子上, HSF 认为其很可能通过改变了外显子剪接的加强子而影响了剪接; 而终止密码子的提前出现导致 CPS1 蛋白缺失了 534 个氨基酸, 蛋白 3D 结构的模拟图也进一步说明该变异产生的是一个明显缩短了蛋白。c.622-3C > G 变异发生在 7 号内含子上, HSF 的预测认为其改变了 CPS1 基因的连接点位置并影响了 mRNA 的剪接。

结合临床看, 虽然病例 2 的血氨水平低于病例 1, 但是病例 2 的病情进展更为迅猛, 起病后 5 小时即于当地医院就诊, 却迅速发生了“肺出血”这种多脏器衰竭终末期才易出现的合并症, 转入我院后仅 13 小时即死亡, 考虑在这两个变异的综合作用下产生的 CPS1 是没有功能的酶, 导致了极为严重的临床表型。另外, 该患儿曾有一哥哥生后 3 天即不明原因夭折, 我们有理由相信这个男婴可能也携带相同的基因, 最终死于 UCD, 若母亲再次妊娠, 产前诊断尤为重要。

CPS1 蛋白是一个复杂的多区域蛋白, 包括 40kDa 的氮端部分和 120kDa 的碳端部分以及两个未知功能的区域, 其中碳端部分又包含了四个域, 分别为碳酸氢根磷酸化区(BPSD), 整合区(Integrating domain, ID), 氨基甲酸酯磷酸化区(Carbamate phosphorylation domain, CPSD)以及 NAG 的变构结合区(allosteric

NAG binding domain, ASD) (Häberle J, 2011)。其中碳端部分包含了两个 ATP 的结合点, 且对 CPS1 在形成过程中的折叠也发挥着至关重要的作用, 对蛋白结构和功能都有重要意义, 而多数的错义变异也发生在此(Häberle J, 2011; Diez-Fernandez C, 2013; Diez-Fernandez C, 2014)。我们分析了已经报道的 274 种 CPS1 基因的变异, 发现仅有 1/4 的变异发生在氮端, 3/4 发生在碳端。病例 1 的两个变异均在 BPSD; 病例 2 的两个变异中无义变异在碳端的 ID, 剪接变异在氮端的 GSD(图 1-21), 即 3 个在碳端部分, 1 个在氮端部分, 与之前的报道比例相符。由于病例 1 的两个错义变异均发生在 BPSD 这个即结合 ATP 又发生磷酸化反应的区域, 导致病例 1 为早发型病例。而病例 2 的无义变异发生在 ID, 导致 CPSD 区域的翻译缺失, 而这部分是第二个磷酸化反应发生的部位, 故这个缺失的蛋白不能完成底物的催化, 进而出现酶功能的严重缺失。

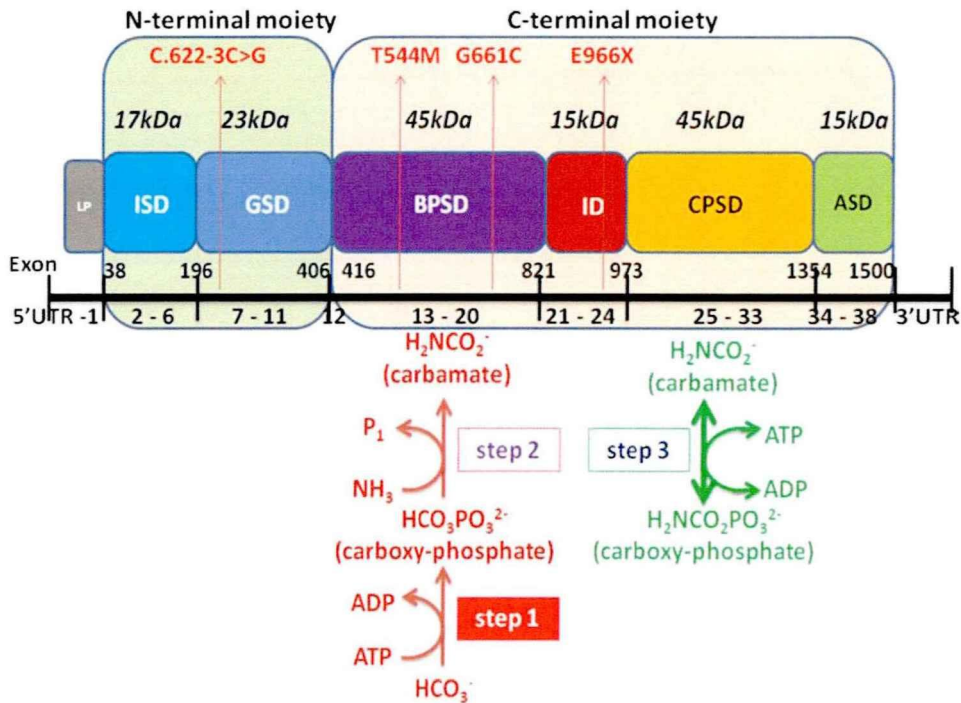


图 1-21 病例 1 和病例 2 的变异位点在 CPS1 基因上的位置

图 1-21: 本图源自本人发表的文章。CPS1 多肽含有 40kDa 的氮端部分和 120kDa 的碳端部分, 不同的颜色代表不同的区域: LP 是线粒体靶向肽, 不在成熟的 CPS1 中; 氮端包括 ISD(Inter subunit domain, 亚基内区域)和 GSD (原始无活性的谷氨酰胺酶); 而碳端包含 BPSD, ID, CPSD 和 ASD。贯穿各个区域的黑线及数字显示了从 5'的氮端到 3'的碳端不同区域所对应的 38 个外显子分别的位置。图中可见与 ATP 相关的两步反应分别发生在 BPSD 和 CPSD。图中的四个红色箭头分别表示我们报道的四个基因变异所在的位置: 即病例 1 的 2 个变异, c.1631C > T (p.T544M)和 c.1981G > T (p.G661C)均在 BPSD; 病例 2 的 2 个变异,

c.2896G > T (p.E966X)在 ID, c.622-3C > G 在氮端的 GSD。

综上所述, CPS1 基因的变异种类很多, 90%以上为个体变异, 且不均等地分布在不同的外显子上, 提示 CPS1 酶的某些区域酶的稳定性、折叠或者功能上可能有着比其他区域更为重要的作用(Diez-Fernandez C, 2014)。当变异出现在这些可能更为重要的区域上, 或者出现无义变异等对蛋白结构影响较大的变异时, 则可能导致更为严重的后果, 即导致酶的活性更低甚至完全失活, 出现更为严重的临床表型。

### 3.3.2 鸟氨酸转氨甲酰酶缺陷的基因学分析

人类的 OTC 基因在 X 染色体短臂的 Xp21.1 上, 包含 10 个外显子和 9 个内含子, 长度约 73kb, 开放阅读框由 1062 个核苷酸组成(Horwich AL, 1984; Hata A, 1986)。OTC 前体蛋白共有 354 个氨基酸, 分子量约 39.9kDa, 在进入线粒体时, 氮端一个含 32 个氨基酸的前导序列被移除(Horwich AL, 1986), 因此, 成熟的 OTC 蛋白共有 322 个氨基酸, 分子量为 36.1kDa。OTC 的功能部分是一个同源三聚体, 并有 3 个位于蛋白单体界面之间的活性位点(Shi D, 1998)。表达上, OTC 主要表达在于肝脏和肠粘膜中。肠粘膜中的 OTC 也可以将氨甲酰磷酸和鸟氨酸催化形成瓜氨酸和磷酸, 但是肠粘膜中的尿素循环并不是完整的尿素循环, 只能将氨转化到瓜氨酸-精氨酸的前体, 也是一氧化氮信号途径的中间体(Brusilow SW, 2011)。

关于 OTC 基因变异和多态性的总结目前有五次, 分别在 1995, 1998, 2002, 2006 和 2015(Tuchman M, 1995; Tuchman M, 1998; Tuchman M, 2002; Yamaguchi S, 2006; Ljubica C, 2015)。在 2015 年的更新中, 共报道了 417 种基因变异, 我们在此基础上查询了 OTCD 的相关文献, 并将我们新发现的 1 个 3-9 号外显子的缺失、1 个剪接变异、1 个错义变异添加后, 将 520 种 OTCD 相关的基因变异总结于附表 2。分析变异类型可以看出, 变异类型还是以错义变异为主, 占半数以上, 最少见的同样为小的插入缺失和大的插入/重复(图 1-22)

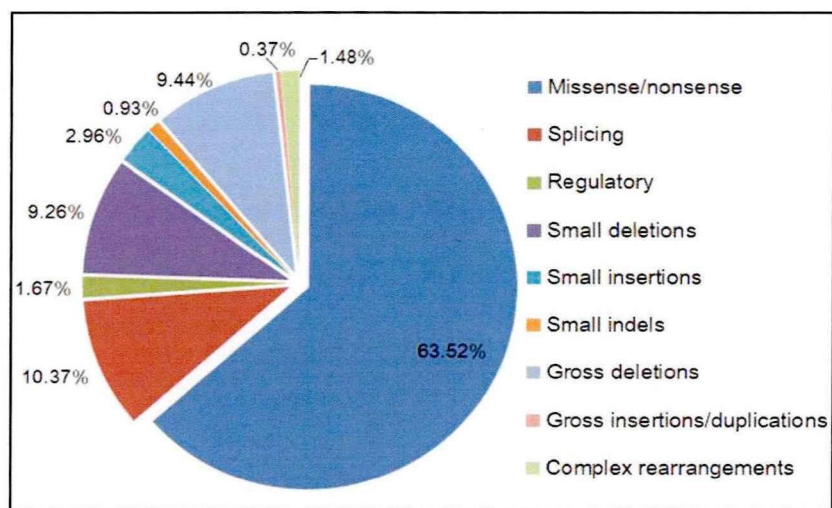


图 1-22 OTCD 基因变异类型的比例分布

新生儿期发病的 OTCD 多为 OTC 的完全缺乏，大的缺失是其中一个重要的原因，另外还包括框移、无义突变和能够终止酶活性或折叠的错义突变(Ljubica C, 2015)。Tuchman 认为，OTC 基因大的缺失约占 OTCD 的 10-15% (Tuchman M, 1995)。既往对于 OTC 基因大片缺失的机制研究非常有限，Quental 对于 2 号外显子和 6-9 号外显子缺失的研究显示，2 号外显子的缺失可能是由于两个重复的反向 Alu 元件形成了一个二级结构，促进了复制滑动而导致；而 Alu-Alu 的同源重组可能导致了 6-9 号外显子的缺失(Quental R, 2009)。

在 2015 年 OTC 基因变异的更新中，共报道了 52 种基因缺失，但没有包括 3-9 号外显子的缺失，病例 3 的大片缺失为首次报道。根据 ACMG 指南，大片的缺失被认为是 PVS1 级别的最高等级致病性 (Richards S, 2015)。千人数据库 (1000g2015aug\_all)和 ExAC\_ALL 数据库的数据均显示该位点在正常人数据库中为低频变异，为中等致病性的证据(PM2)，因此我们认为该 3-9 号外显子的缺失为致病性变异。结合该患儿生后虽因呼吸系统症状于当地医院治疗，但病情曾一度好转，生后第 3 天却出现了明显的病情变化，且进展迅速、临床表型严重，即使进行了积极治疗，并应用了床旁血滤技术，但患儿的临床症状并没有好转，考虑 OTC 基因的大片缺失导致了 OTC 的完全或近似完全的失活；对变异后 OTC 蛋白的三维结构图模拟也可看出，该变异导致 OTC 仅残存少部分结构，亦与临床表型的严重性相符。

在病例 5 家庭中检测出的 c. 274C>T (p.R92X) 变异为 OTCD 已知的无义变异。既往的研究认为，症状性女性 OTCD 病人携带的变异如果发生在男性患者，

则均为新生儿期发病的病例(McCullough BA, 2000)。患儿的三个姐姐均有轻重不同的症状, 且该变异为无义变异, 可使 OTC 完全失活(Ljubica C, 2015), 因此, 病例 5 患儿的血浆氨上升速度极为迅猛(第一次为 744.2  $\mu\text{mol/L}$ , 第二天升至 1670  $\mu\text{mol/L}$ ), 峰值也是所有病例之最(3234  $\mu\text{mol/L}$ )。

对于症状性女性杂合子, 其疾病严重程度除决定于基因型外还与变异的 X 染色体的失活程度有关系。X 染色体的失活是发生于胚胎早期的一个随机的过程, 但是对于某些个体, 这个过程却非常有倾向性。如果个体更多地表达了携带变异基因的 X 染色体, 那这个伴性遗传的疾病则可能导致女性杂合子发病(Yorifuji T, 1998)。Musalkova 对携带 OTCD 变异基因的女性进行肝脏活检的结果显示, 携带变异基因的 X 染色体失活的比例变化很大, 从 59:41 到 82:18 不等, 且失活比与 OTC 酶的活性成反比(Musalkova D, 2018)。回归病例 5 的家庭, 四个女性成员从妈妈的无症状, 两个姐姐的蛋白规避到小女儿的死亡, 临床表型差距非常大, 考虑可能为各自携带变异基因的 X 染色体的失活程度不同所致。

本研究病例 6 为 OTC 基因 c.761C>A(p. A254E)的变异, 为新发变异。相对于其他病例, 该患儿突出的临床表现为严重的循环衰竭, 表现为顽固的低血压和高乳酸血症, 心脏超声提示左室射血分数降低, 待其循环衰竭症状逐渐纠正后, 其血浆氨水平也明显下降(图 1-23)。该病例还是 7 例 UCD 病例中唯一应用精氨酸、乳果糖等治疗高氨血症药物后临床有效的病例。在应用药物治疗 1 次后其血浆氨水平即由 2698  $\mu\text{mol/L}$  降至 669  $\mu\text{mol/L}$ , 且住院第 3 天出现自主呼吸, 第 5 天刺激后出现肢体回缩动作。反观存在 OTC 基因 3-9 号外显子缺失的病例 3, 即使应用血滤治疗临床仍无改善, 而携带 OTC 基因无义变异的病例 5 血浆氨水平上升极为迅速, 对于精氨酸等药物治疗无反应, 血浆氨仍进行性升高。因此认为, c.761C>A(p. A254E) 变异对 OTC 酶活性的影响应低于大片缺失和无义变异, 其临床表型主要表现为循环功能衰竭, 循环衰竭的纠正可能与血浆氨下降互为因果, 故临床需注意对该变异病人的循环支持。

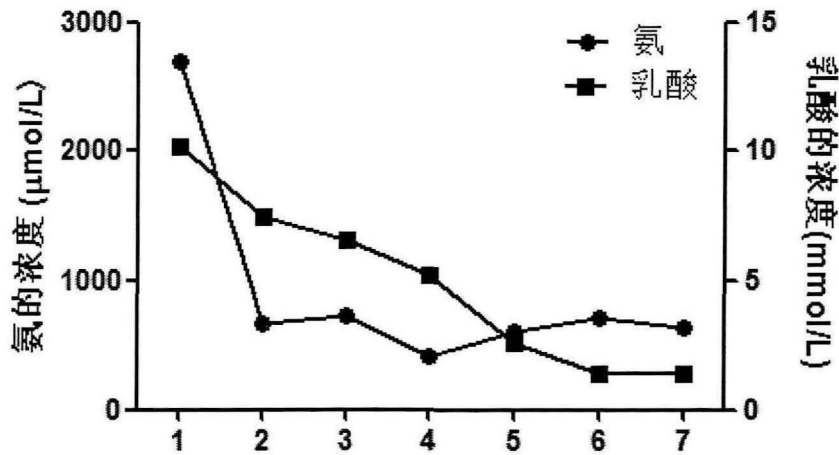


图 1-23 病例 6 住院期间血浆氨和乳酸水平的变化

病例 7 是本研究中唯一一个晚发型病例，其携带的 c.119G>A(p.R40H) 变异为已知的 OTC 基因的错义变异。这个变异最早报道于日本九州岛，随后发现该地区频发，因此 Nishiyori 等对该变异的 6 例病人进行了汇总分析，结果发现，该变异虽然发生在 OTC 基因的保守区域，但在 mRNA 水平的表达与野生型 OTC 相似(Nishiyori A, 1997)，且我们利用三维模拟图发现，该变异并未对 OTC 的蛋白结构造成影响。因此，该变异的病例均为晚发型病例。

综上所述，基因学检测仍是 UCD 确诊的首要方法。对酶影响较大的因素可能包括：1. 发生在基因保守区域的变异；2. 发生在酶与底物反应区域的变异；3. 对蛋白结构影响较大的变异；4. 无义变异和大的缺失变异；5. 症状性女性 OTCD 患者携带的变异。对于伴性遗传的 OTCD，发病的早晚及疾病程度除取决于基因表型外，女性携带者的 X 染色体失活程度对疾病过程也起着非常重要的作用。

### 3.4 高氨对抗生素杀菌效率的影响

新生儿期发病的 UCD 与新生儿败血症难以区别，我们对上述 7 例 UCD 病人的临床资料分析也发现，感染会加重 UCD 的临床表型，此类患儿的临床治疗均会经验性应用抗生素，但是抗生素的选择却没有指南或文献指导。因此，我们利用模式菌种大肠杆菌 K12 和氯化铵进行了氨对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类和喹诺酮类抗生素杀菌效率影响的检测。结果表明，氯化铵可增强氨苄西林和美罗培南对大肠杆菌的杀菌效率，且不受 pH 的影响，而对头孢他啶和环丙沙星则无影响。

新陈代谢是一切生命活动的基础,细菌细胞内代谢物的平衡状态对细菌的生存有重要意义。外源添加代谢物可以打破细菌细胞内的代谢平衡状态,而后者与抗生素杀菌效率密切相关。细菌对抗生素表现出两种代谢状态,一种是抗生素敏感状态,另一种是耐药状态,而外源添加代谢物可以将细菌由耐药状态转变为敏感状态,从而提高抗生素的杀菌效率(Peng B, 2015)。2011年,Allison等人在Nature发表论文指出,葡萄糖、果糖和丙酮酸等代谢物可以通过提高质子动力势(PMF),促进氨基糖苷类抗生素进入细菌细胞内,最终提高抗生素对耐药菌的杀菌效率(Allison KR, 2011)。随后Peng等人通过GC-MS结合同位素示踪法发现葡萄糖和丙氨酸等代谢物流向TCA循环,从而提高卡那霉素对多重耐药的金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌的杀菌效率(Peng B, 2015)。另有研究发现,果糖和甘露醇可以通过TCA循环提高卡那霉素对迟缓爱德华菌和铜绿假单胞菌的杀菌能力(Su YB, 2015; Barraud N, 2013),因此,代谢物可通过多种方式改变细菌的生存状态进而影响抗生素的杀菌效率。UCD患儿血浆氨的显著升高不仅打破了人体内环境的稳定,也会对细菌的生存环境产生多方面的影响。虽然我们并不能确定氨增强青霉素类和碳青霉烯类抗生素杀菌效率的分子机制,但该现象提示,高氨血症患儿的抗生素选择可考虑首选上述两类抗生素,可能对合并感染者能达到事半功倍的治疗效果。

### 3.5 血液净化治疗在尿素循环障碍中的应用

高氨血症是尿素循环障碍的主要临床表现,研究证明,如果血氨浓度高于800  $\mu\text{mol/L}$  超过24小时或者高氨性昏迷超过2-3天,则可能造成神经系统的不可逆的损伤(Leonard JV, 2002)。日本在10年间对177名UCD病人的治疗评估显示,血氨浓度超过360  $\mu\text{mol/L}$  即与严重的脑损伤相关(Kido J, 2012)。因此,多个UCD指南都指出,当病人对饮食治疗及药物治疗效果不佳而血氨浓度仍明显升高时(美国指南血氨浓度为 $>700 \mu\text{mol/L}$ , 欧洲指南为 $>500 \mu\text{mol/L}$ ),应立即进行血液净化治疗来尽快清除血中的氨(Häberle J, 2012; Häberle J, 2019; NORD online guideline)。

血液净化可以非常快速有效地清除血液中的氨,从而减少氨对神经系统的毒性,降低致残率和死亡率。目前常用的净化方式包括血液透析(Hemodialysis, HD),持续肾脏替代治疗(Continuous Renal Replacement Therapy, CRRT),血液

滤过(Hemofiltration, HF), 血浆置换(Plasma Exchange, PE)和腹膜透析(Peritoneal Dialysis, PD)。由于置管、病人耐受性等多方面因素影响, 持续静脉-静脉血液透析(continuous veno-venous hemodialysis, CVVHD)或持续静脉-静脉血液滤过(continuous hemodiafiltration, CVVHDF)是新生儿或小婴儿更为理想的血液净化方式, 可作为一线选择(Häberle J, 2019); 而发生代谢性危象时, CRRT 可能是 UCD 是更为理想的治疗方法(Picca S, 2001)。相较于 HD 或 HF, PD 的滤过效能明显不足, 其原因可能是由于腹膜的多层细胞结构形成了一个天然的距离而阻碍了有毒物质的弥散(Devuyst O, 2008), 因此, PD 并未被 UCD 的指南所推荐。而 PE 自上世纪五十年代应用于肝衰竭病人的治疗以来, 文献报道其对肝性脑病的有效率可达 100%(Stenbøg P, 2013), 且高容量的 PE 可纠正降低的凝血因子和 INR(Tygstrup N, 1997)。然而, 血氨水平并不是决定预后的唯一因素。2019 年的 UCD 指南认为, 提示预后不良的因素包括昏迷大于 3 天, 血浆氨浓度 $>1000 \mu\text{mol/L}$  等。Celik 的研究则表明, 除了高氨血症持续的时间外, 影响预后最重要的因素是导致高氨血症的原因: UCD 比有机酸血症的死亡率高了 8.3 倍(Celik M, 2019), 而其中预后最差的 CPS1D。Pela 等人的研究则表明, 相较于透析方式, 高氨血症性昏迷持续的时间对于预后有更重要的预测价值(Pela I, 2008)。

病例 3 入院时处于昏迷状态, 血氨高达  $1546 \mu\text{mol/L}$ , 达到血液净化的标准, 因此立即进行了持续血液滤过治疗, 患儿血浆氨水平很快降至  $346 \mu\text{mol/L}$ 。然而, 临床上该患儿并没有明显的好转, 仍然处于昏迷状态, 这也是家长最终放弃治疗的主要原因。而病例 7 是晚发型 OTCD 病人, 转入我院 PICU 后即刻进行了血浆置换治疗, 其血氨水平很快由  $1263 \mu\text{mol/L}$  降至  $480 \mu\text{mol/L}$ , 并于 48 小时内降至  $123 \mu\text{mol/L}$ , 后维持在  $40-65 \mu\text{mol/L}$  之间。然而遗憾的是, 患儿在入院时即呈现脑死亡状态, 血液净化治疗仍难以改变患儿预后。两例患儿在进行血液净化时血浆氨水平均超过  $1000 \mu\text{mol/L}$ , 且均为昏迷后转入我院, 考虑高氨血症严重, 对神经系统已造成不可逆的损伤, 即使血液净化后血浆氨水平迅速下降, 仍难以逆转不良结局。

鉴于上述经验我们认为, HD 和 HE 均可以达到良好的血氨清除作用, 但病人最终预后如何还取决于病人的原发疾病、血滤前血浆氨的水平及高氨性脑损伤的持续时间。



## 第二部分 OTCD 病人 PBMC 来源 iPS 细胞系的构建及验证

通过对 UCD 患儿临床资料和遗传学检测结果的分析我们发现,UCD 有一定的病例特点,但其临床症状仍然缺乏特异性,不易与败血症等疾病相鉴别,且 OTC 基因变异位点和种类繁多,难以与临床表型针对性地关联,亦缺乏特效的治疗方法。因此,深化 OTCD 的基础研究,明确 OTCD 的病理生理过程、致病机制,在此基础上进一步寻找特异性的诊断方法和针对性的治疗手段,是解决 UCD 早期识别、早期诊断、有效治疗的根本方法。

iPSC 是一类由多种细胞经重编程后产生的具有多种分化潜能的干细胞,由于其细胞来源广、免疫原性小且跨越了伦理限制,已经迅速成为干细胞领域的研究热点。自 iPSC 建立至今的 15 年期间,不论是重编程技术还是培养条件都有了飞速的发展,且将其定向诱导分化后培养出的各种类型的细胞和/或类器官已经成为各系统疾病理想的细胞研究平台。

本研究拟通过将 OTCD 患儿的 PBMC 进行重编程,使其重新具有多潜能分化能力而建立 OTCD 患儿的 iPS 细胞系,并对其多能基因和特异性标记物的表达、自分化能力、遗传信息以及基因缺陷等进行鉴定,为进一步建立 OTCD 的肝类器官模型构建理想的细胞源,奠定前期工作基础。

### 1. 材料与方法

#### 1.1 伦理学声明

本研究经山东大学齐鲁儿童医院伦理委员会审核通过,由本人在山东大学齐鲁儿童医院儿科研究所进行,保证本工作所有实验均遵循赫尔辛基宣言。采样过程及样本用途均向患儿监护人详细说明,并取得书面同意书;保证样本仅供本研究所用且病人所有信息均被保密。

#### 1.2 研究对象

自 2019 年 3 月至 2020 年 12 月收住于山东大学齐鲁儿童医院新生儿监护室的 3 名鸟氨酸转氨甲酰酶缺陷的患儿,并将日龄(生后第 7 天)、性别(均为男婴)相匹配的非遗传性疾病新生儿作为对照组。

#### 1.3 主要实验材料

Knockout™ DMEM/F12 培养液 (Gibco, 美国)  
IMDM 培养基 (Gibco, 美国)  
F12K nutrient mixture 培养液 (Gibco, 美国)  
ReproTeSR™-E7™ 重编程培养基 (StemCell Technologies, 美国)  
mTesR1 人胚胎干细胞培养基 (StemCell Technologies, 美国)  
L-谷氨酰胺 (Gibco, 美国)  
Chemically Defined Lipid Concentrate (Gibco, 美国)  
ReLeSR™ 细胞消化液 (StemCell Technologies, 美国)  
胎牛血清 (Hyclone, 美国)  
抗坏血酸 (Sigma, 美国)  
牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma, 美国)  
硫代甘油 (Sigma, 美国)  
hSCF, IL-3, IGF-1 (PeproTech, 美国)  
Ficoll 试剂 (G&E Healthcare, 德国)  
Trizol (赛默飞世尔科技中国有限公司, 中国)  
Triton X-100(Sigma, 美国)  
BCKDH-E1 $\alpha$  (E4T3D) Rabbit mAb (Cell Signaling, 美国)  
 $\beta$ -Actin 抗体 (北京中杉金桥公司, 中国)  
辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (亲和纯化) (北京中杉金桥公司, 中国)  
辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L) (亲和纯化) (北京中杉金桥公司, 中国)  
氯仿、异丙醇、75%乙醇 (天津市大茂化学试剂厂, 中国)  
RNase free 水 (北京天根生化科技有限公司, 中国)  
TakaRa 试剂盒 (TaKaRa, 日本)  
无水乙醇 (天津市大茂化学试剂厂, 中国)  
异丙醇 (天津市大茂化学试剂厂, 中国)

#### 1.4 主要实验仪器 (同第一章实验仪器)

#### 1.5 实验方法

##### 1.5.1 PBMC 的分离及培养

无菌条件下取外周血 2ml, 立即放入肝素抗凝管中, 混匀避免凝集。用生

理盐水稀释后移入含 Ficoll 的离心管，离心后取中间的白色云雾层，用生理盐水重悬，离心洗涤最终得到单个核细胞。随后用含转铁蛋白、地塞米松、EPO、SFM、IL-3 等成分的红系培养基进行培养。

### 1.5.2 PBMC 重编程

应用电转仪对上述培养 4-6 天的细胞进行质粒组合的核转染。电转后第二天，观察细胞状态，及时更换 ReproTeSR 培养液，直至出现明显的干细胞形态，换成 mTesR1 培养基；待克隆达一定数量和大小后挑取克隆，用 TRA-1-60 进行活染鉴定，并对克隆进行纯化和培养。

### 1.5.3 干细胞体外自分化过程

用 ReLeSR™ 在 37℃ 条件下消化多能干细胞，离心后用 EB 溶液（含 DMEM/F12、20%knock-out 血清置换液，1% L-GlutaMax，0.1% β-巯基乙醇等）重悬并进行悬浮培养。3-7 天后把形成的 EBs 转移到包被有基质胶的孔中，继续培养 3-7 天，使细胞持续进行分化。

### 1.5.4 免疫荧光法检测 iPSC 多功能性标志物

将第十代的 iPSC 接种到已提前做好细胞爬片的 24 孔培养板上，多聚甲醛固定 30min，并用 PBS 洗去多聚甲醛。0.1%Triton-X-100 进行透膜处理后用 5% 山羊血清和 0.3% BSA 以 PBS 作为溶剂配制的封闭液进行封闭。PBS 洗去封闭液后与一抗孵育，4℃ 过夜。第二天用 PBS 洗去一抗，再用二抗在 37℃ 条件下孵育 2h，期间注意避光。PBS 洗去二抗后用 DPAI 染核，拍照。

### 1.5.5 qRT-PCR 检测系统

#### 1.5.5.1 RNA 提取

预先配制 75%乙醇，置于冰上备用；离心机提前预冷至 4℃ 备用。取适量 Trizol 充分裂解细胞后，加入 200 μl 三氯甲烷，涡旋震荡 15 s，冰上静置 3-5 分钟。4℃ 离心机 12000 转/分钟离心 15 分钟。小心吸取上层水相液转入新 EP 管，加入等体积异丙醇，轻柔颠倒数次，冰上放置 10 分钟，4℃ 离心机 12000 转/分再次离心 10 分钟。小心弃去上清，加入 1 ml 预冷的 75%乙醇轻柔洗涤，7500 转/分钟，4℃ 离心 5 分钟。然后吸弃上层的乙醇，将 EP 管置于管架上，等待乙醇挥发干净，再在管中加入适量的 RNase free 水，反复吹打至 RNA 完全溶解，然后利用紫外核酸蛋白分析仪测 RNA 浓度。

### 1.5.5.2 RNA 逆转录合成 cDNA

第一步去除基因组 DNA，在冰上配制以下反应体系：

5×gDNA Eraser Buffer	2 μl
gDNA Eraser	1 μl
Total RNA	1 μg
RNase free dH <sub>2</sub> O	Up to 10 μl

反应条件：42℃, 2min; 4℃, holder。

第二步为逆转录反应，冰上配制以下反应体系：

Prime ScriptRt Enzyme MIX	1 μl
RT Primer MIX	1 μl
5x Prime Script Buffer2	4 μl
RNase free dH <sub>2</sub> O	4 μl

将第一步和第二步所得的各 10ul 体系混合，上机，反应条件为 37℃, 15min; 85℃, 5s; 4℃, holder。

### 1.5.5.3 qRT-PCR

提前备好冰，取出 cDNA、TakaRa 荧光定量试剂盒以及引物放置在冰上缓慢融化。按照试剂盒说明书配置 15 μl 反应体系上机检测，以 GAPDH 为内参，每个样本做 3 个复孔，采用相对定量法比较相关基因的 mRNA 表达差异。

### 1.5.6 载体的非整合性 PCR 检测

提取培养状态良好的第 10 代多能干细胞的 DNA 进行 PCR 验证，以 β-Actin 作为内参。配置 20ul 的反应体系如下：

2xEasy Taq Super Mix	10 μl
Primer MIX	1 μl
DNA 模板	100 ng
ddH <sub>2</sub> O	Up to 9 μl

反应条件：在 94℃ 2min; 94℃ 30s; 55℃ 30s; 72℃ 30s; 总循环数 35 次，最后在 72℃ 条件下再延伸 3min。取 PCR 结束后的产物跑琼脂糖凝胶电泳（具体步骤参照第一部分 1.5.4.1 的琼脂糖凝胶电泳），然后拍照，观察，分析。

### 1.5.7 核型分析和 STR 分析

将秋水仙碱固定后的细胞离心 10 分钟之后去上清。KCL 低渗处理后进行预固定，离心 10 分钟，去上清，留沉淀物加入固定液。重复以上固定和离心操作 3 次后制片，然后进行染色分析。

### 1.5.8 基因缺陷验证

按照说明书应用 3130XL DNA Analyzer 分析仪来进行 Sanger 测序, 验证是否存在基因缺陷。

## 1.6 统计学分析

qRT-PCR 采用相对定量法进行比较相关基因的 mRNA 表达差异, 计数资料采用卡方检验, 计量资料采用方差分析进行统计分析,  $p < 0.05$  差异具有统计学意义。

## 2. 实验结果

### 2.1 OTCD-iPSC 展现多能性细胞的形态

3 例 OTCD 病人的 PBMC 进行重编程后共建立 2 株 iPSC, 成功建立 iPSC 的 PBMC 在重编程后逐渐产生边缘锐利, 与周围分界清楚的细胞克隆, 呈现显著的胚胎干细胞的形态及特征(图 2-1)。另 1 例病人的 PBMC 在电转后未见明显胚胎干细胞形态的克隆出现。



图 2-1 iPSC 克隆的形态

注: 左图为病例 3 iPSC 克隆的形态, 右图为病例 4 iPSC 克隆的形态。

### 2.2 OTCD-iPS 细胞表面多能性标志物的检测结果

利用免疫荧光技术检测两株 OTCD 病人来源的 iPSC 的多能性, 结果显示多能性细胞表面标志物(TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA4)以及多潜能特异性转录因子(OCT4 和 NANOG)均成功表达(图 2-2)。

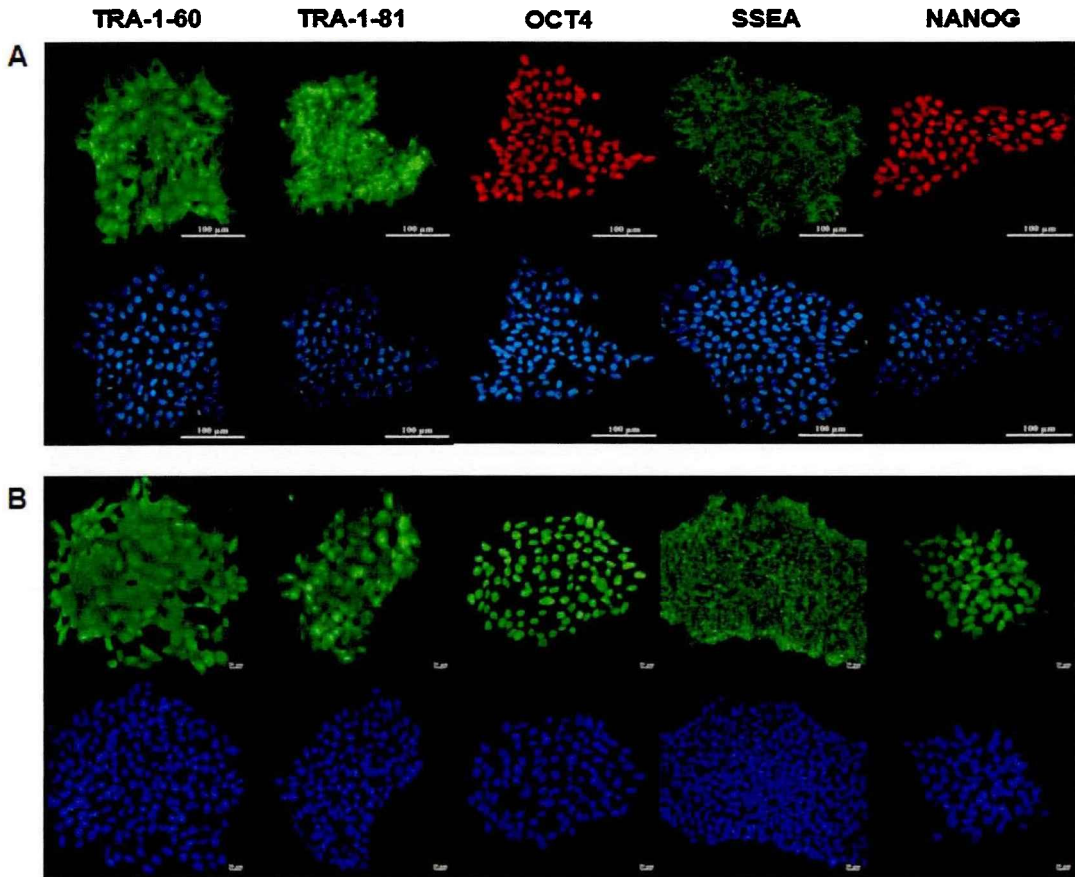


图 2-2 免疫荧光检测 iPSC 多能性

图 A 和图 B 分别为病例 3 和病例 4 的 PBMC 经重编程后多能性细胞表面标志物及转录因子的免疫荧光检测结果。图中第一排的绿色和红色荧光为不同抗体的特异性表达情况，第二排的蓝色为细胞核的 DAPI 染色。

### 2.3 qRT-PCR 对内源性多能基因表达的验证

利用 qRT-PCR 的方法检测 3 种内源性多能基因 OCT4、SOX2、NANOG 的表达情况。结果显示上述三者转录水平均有与胚胎干细胞相近的表达量(图 2-3A)，而不具有多能性的 PBMC 则不表达这些基因(图 2-3B)。

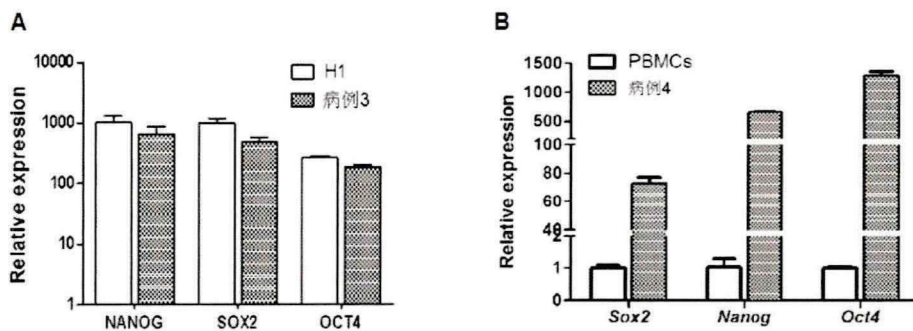


图 2-3 qRT-PCR 检测内源性多能基因在 iPSC 中的表达情况

图 2-3A: 图中标注 H1 为胚胎干细胞, 结果显示病例 3 来源的 iPSC 内源性多能基因的表达量与胚胎干细胞相似。

图 2-3B: 病例 4 来源的 iPSC 内源性多能基因表达显著, PBMC 为阴性对照。

## 2.4 三个胚层标志物的表达情况的检测

iPSC 具有与 ESC 类似的多向分化潜能, 因此, 我们将 iPSC 诱导成拟胚体 (Embryoid bodies, EB), 然后选用了三个胚层不同的特异性标志物进行检测。qRT-PCR 的结果显示两株 iPSC 分化成的拟胚体均可表达三个胚层的特异性标志物 (图 2-4)。

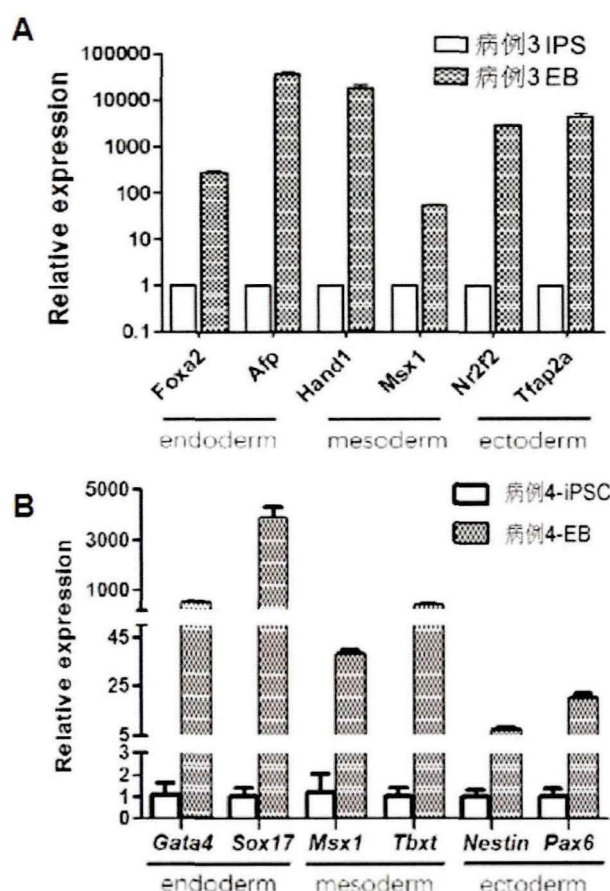


图 2-4 qRT-PCR 检测 EB 三个胚层标志物的表达情况

图 2-4A: 选取 FoxA2 和 Afp 作为内胚层标志物, Hand1 和 Msx1 作为中胚层标志物, Nr2f2 和 Ttf2a 作为外胚层标志物进行三胚层分化潜能的检测, 结果显示病例 3 来源的 iPSC 自分化出的 EB 高表达上述标志物基因。

图 2-4B: 图中 Gata4 和 Sox17 为内胚层标志物, Msx1 和 Tbx1 为中胚层标志物, Nestin 和 Pax6 为外胚层标志物。qRT-PCR 结果显示病例 4 来源的 iPSC 自分化出的 EB 高表达上述标志物基因。

## 2.5 染色体核型鉴定结果

病例 3 的染色体核型分析提示该患儿染色体核型为 46XY，而病例 4 为异常的 47XXY。对诱导出的多能干细胞进行核型分析结果显示二者的染色体核型均与外周血结果相一致（图 2-5）。

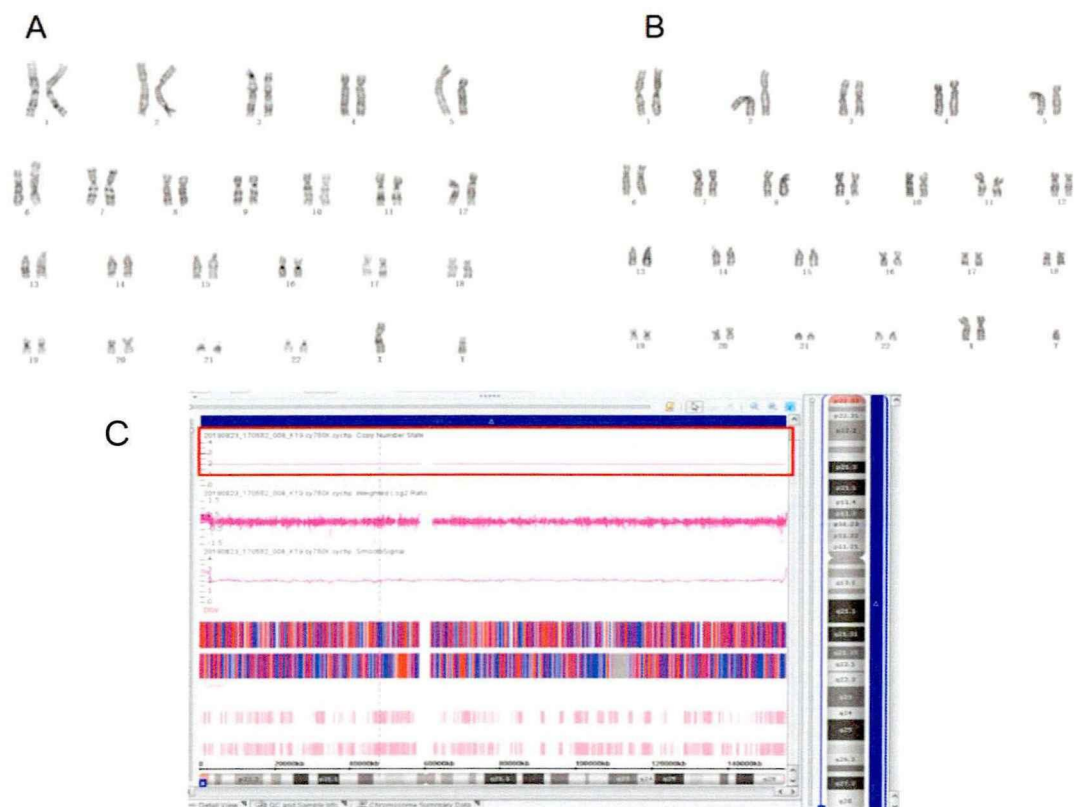


图 2-5 两株 iPSC 核型分析及验证图

图 2-5A: 病例 3 来源的 iPSC 的染色体核型分析显示该患儿染色体核型为正常男性的 46XY。

图 2-5B: 病例 4 来源的 iPSC 的染色体核型分析显示该患儿染色体核型为 47XXY。

图 2-5C: 病例 4 外周血样本染色体核型分析结果，红框中显示其 X 染色体的数目为 2。

## 2.6 外源质粒验证

我们的 iPSC 是以质粒为载体，通过非整合性电转方式进行重编程构建，随着细胞扩增传代，外源质粒应消失。图 2-6 的结果显示第十代的 iPSC 已无质粒基因的表达。



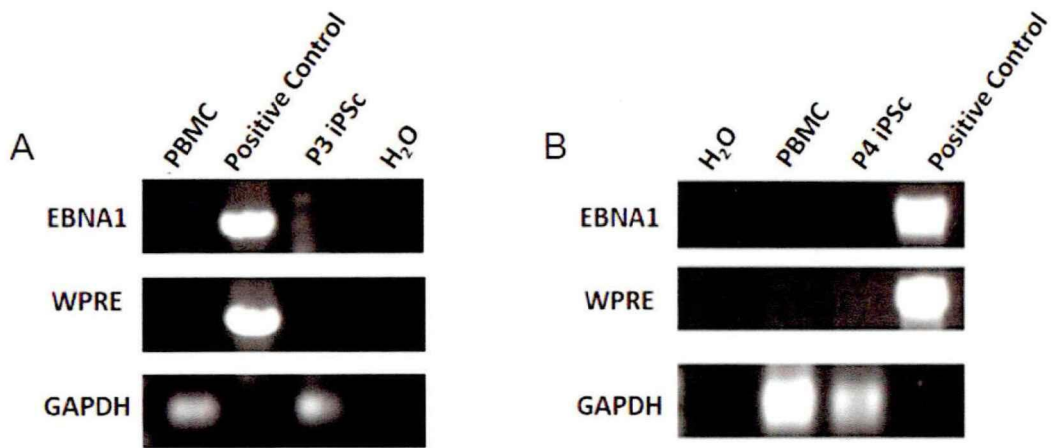


图 2-6 外源质粒非整合的验证

图 2-6: 图中 EBNA1 和 WPRE 为质粒基因, GAPDH 为正常组织细胞和血细胞中表达的甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 即内参; PBMC 为阴性对照, 质粒为阳性对照; 图 A 为病例 3 的验证结果, 图 B 为病例 4 的验证结果。图中的结果显示两个病例来源的 iPSC 均无质粒基因的表达。

### 2.7 iPSC 的基因变异验证结果

病例 3 的 OTC 基因存在 3-9 号外显子的大片缺失, 利用 qRT-PCR 的方法对患者外周血单核细胞和 iPSC 中 OTC 基因进行缺失验证, 结果显示 iPSC 的 OTC 基因缺失的外显子与外周血单核细胞相符 (图 2-7)。

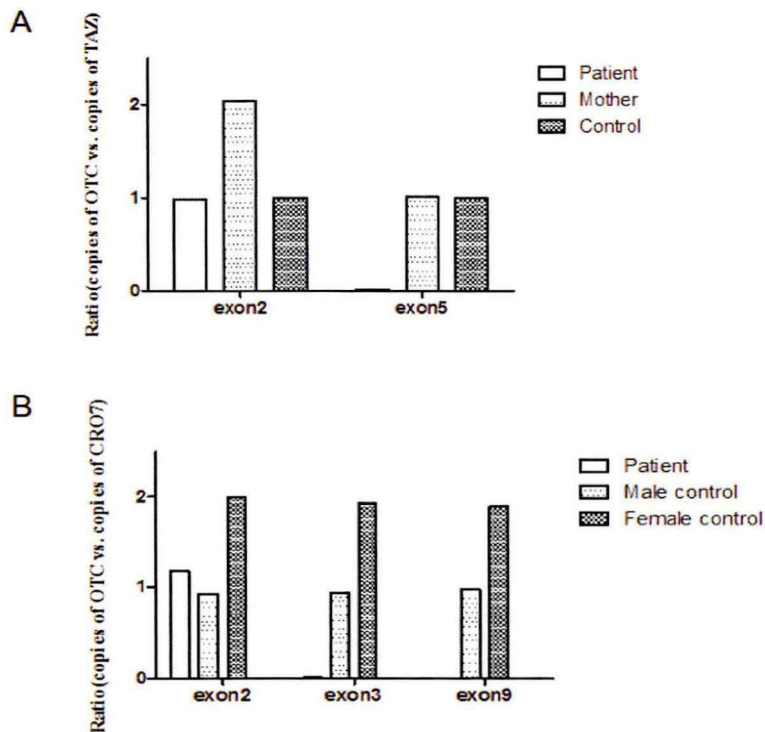


图 2-7 qPCR 检测病例 3 的 OCT 基因缺失

图 2-7A: 病例 3 及其母 OCT 基因不同外显子的 qPCR 结果, 证明患儿及其母均可正常表达 OCT 的 2 号外显子, 而包含在缺失中的 5 号外显子患儿没有表达, 其母表达量减半, 说明该外显子的缺失来源于母亲。

图 2-7B: 利用正常男性和正常女性的 DNA 作为对照来检测病例 3 患儿 iPSC 中 OCT 基因多个外显子的表达情况, 结果显示 iPSC 可表达正常的 OCT 的 2 号外显子, 而 3 号和 9 号外显子均没有表达。

病例 4 为 OCT 基因内含子的剪接变异, Sanger 测序的结果显示诱导出的 iPSC 存在与患儿外周血细胞相同的剪接变异 (图 2-8)。

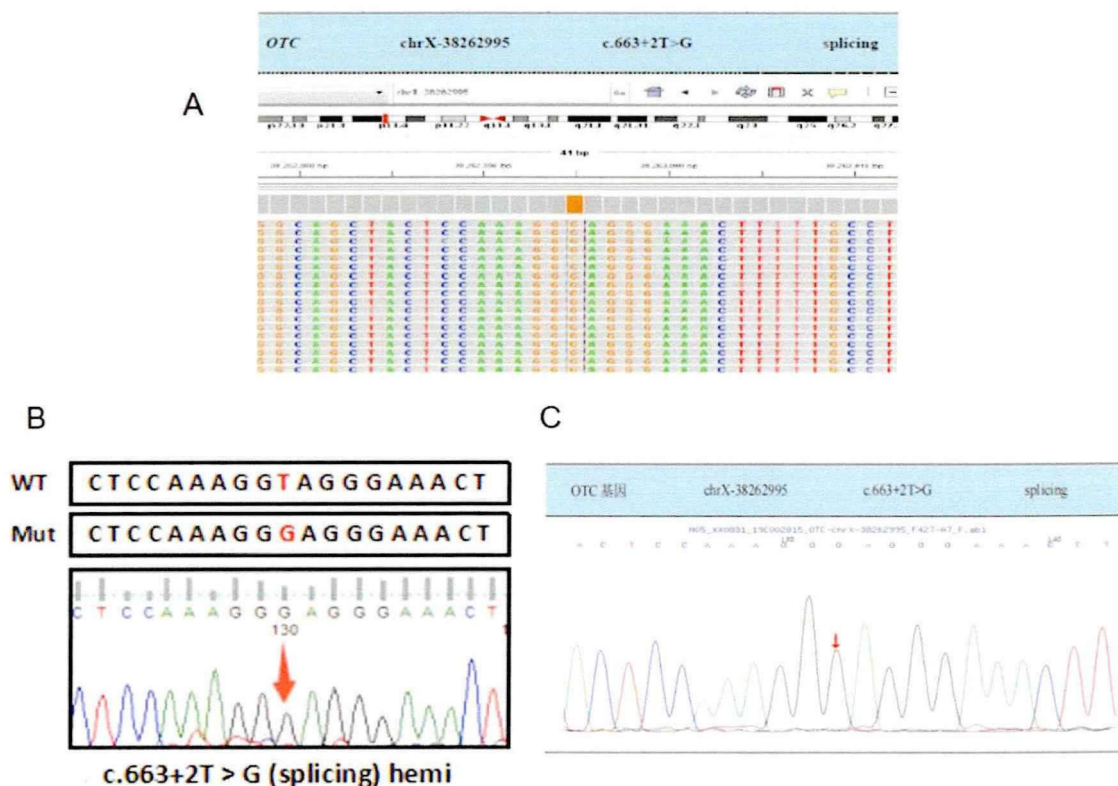


图 2-8 病例 4 外周血及 iPSC 细胞 OCT 基因的测序结果

图 A 为病例 4 外周血单核细胞 OCT 基因的二代测序结果截屏, 图 B 和 C 分别为对该患儿 iPSC 和外周血 OCT 基因的 Sanger 检测结果截屏, 均提示存在 c.663+2T>G 的剪接变异。图 B 中 WT 为野生型 OCT 基因, Mut 为该患儿在该位点的碱基序列, 显示 T 碱基变异为 G 碱基。

### 3. 讨论

自 iPSC 建立至今, 多种类型的细胞被重编程为 iPSC, 如皮肤成纤维细胞、尿中的肾小管上皮细胞、脐血的上皮细胞、骨髓细胞等(Roy-Chowdhury N, 2016)。

我们选择利用 PBMC 作为 iPSC 的细胞来源主要有以下三方面原因。首先, 我们曾尝试利用尿液的肾小管上皮细胞建立 iPSC, 由于儿童尿量尤其是新生儿尿量很少, 因此可用细胞量过少, 不适宜进行儿童, 尤其是新生儿 iPSC 的建立。其次, 虽然脐血间充质干细胞具有最低的免疫原性, 是再生医学良好的细胞来源 (Mebarki M, 2021), 但即使是早发型 UCD, 发病时间至少是出生数天, 难以留取脐血进行重编程。最后, 皮肤和骨髓等细胞的获取需要进行活检或骨髓穿刺等有创操作, 增加了患儿痛苦。相对来说, 外周血的获取操作简单、创伤性小、价格低, 是最方便可得的细胞来源。而且, 有文献报道, PBMC 来源的 iPSC 比皮肤成纤维细胞来源的更容易分化为类肝细胞 (Roy-Chowdhury N, 2016)。因此, 就我院近年来的研究认为, PBMC 至少是儿童建立 iPSC 的良好细胞来源。

iPSC 是通过转入多能性转录因子进行细胞重编程而获得, 多能基因的转入方式分为整合型和非整合型。整合型转入方式最大的问题是基因的随机转入会造成细胞原基因组的改变, 从而增加了细胞基因突变的机会和成瘤性 (Okita K, 2007; Ben-David U, 2011); 而且, 转入基因的持续存在会影响 iPSC 的分化 (Kaji K, 2009)。非整合型转入方式则可保持原细胞的基因组, 避免了插入突变的产生和转入基因的再激活, 而这是 iPSC 能够最终应用于临床的前提条件 (Haridhasapavalan KK, 2019)。质粒转入的重编程形式属于非整合型转入的一种, 通过检测十代后 iPSC 质粒基因的表达消失, 证明转入的多能性因子并未整合到原体细胞中, 保证了 iPSC 的安全性。

重编程后的体细胞具有与胚胎干细胞类似的特性和功能, 其形态特征也相似。但是在重编程的过程中, 会出现多种不同的克隆, 而挑选“高质量”克隆的首要标准就是形态学, 即好的 iPSC 克隆应是如胚胎干细胞一样的排列整齐紧密, 且边缘锐利的细胞团 (Meissner A, 2007)。从培养的过程中我们也发现, PBMC 在重编程后 2 周左右会出现不同形态的克隆, 我们挑取的克隆均符合上述标准, 为最终成功建立 iPSC 提供了保障。

iPSC 是具有多向分化潜能的一类干细胞, 因此, 对于来自两例不同病人的 iPSC, 我们分别用免疫荧光和 qRT-PCR 的方法对多能性因子和标志物进行了鉴定, 证明 PBMC 经重编程后的 iPSC 表达上述因子和标志物, 具有多向分化潜能。随后, 我们将 iPSC 进行自分化为拟胚体, 进一步验证 iPSC 的分化能力。EB 的形成过程是多能干细胞自我组织的过程, 在这个过程中, 相对均质的上皮细胞样

的多能干细胞克隆分化为多种细胞类型，可以反映早期的胚胎形成过程(Zeevaert K, 2020)，因此，形成 EB 的能力被认为是 ES 和 iPSC 的天然能力 (Brickman JM, 2017)。本研究构建的 iPS 细胞系不仅成功自分化为拟胚体，且表达三个胚层的特异性基因，再次验证构建的 iPSC 具有多能性。

最后，我们对两个 iPS 细胞系进行了基因缺陷的验证，以此说明构建的 iPSC 可以作为病人特异性的细胞模型。对病例 3 患儿外周血和 iPSC 中 OTC 基因的多个外显子的检测结果显示，其 OTC 基因的 2 号外显子表达正常，而包含在 3-9 号缺失中的多个外显子均无表达；而对病例 4 来源 iPSC 的 Snger 测序也检出了与外周血相同的变异位点，且染色体核型一致，证明此两株 iPSC 均保留了原细胞来源的基因缺陷。

总结上述分析，本研究通过对 OTCD 患儿外周血单个核细胞进行非整合型重编程，成功将两个不同变异方式的 OCTD 患儿的 PBMC 诱导为 iPSC，经检索国内外各大数据库未见相关报道，创新性强。这两个 iPS 细胞模型的建立为深入进行 OTCD，甚至 UCD 的相关研究奠定了科学基础。

## 第三部分 OTCD 病人 iPSC 细胞来源肝类器官的建立及 OTC 表达验证

iPSC 是一类具有多种分化潜能的细胞, 但却不具备任何一种体细胞的功能。尿素循环主要发生在肝细胞中, 因此, UCD 理想的体外细胞模型应该建立在肝细胞的基础上。iPSC 来源的类肝细胞/肝类器官可以帮助我们了解遗传代谢性肝脏疾病的发病机制, 亦可以作为毒理研究和药物筛选的良好平台; 而基于单基因代谢病病人的 iPSC 建立的类肝细胞/肝类器官则可以在某些特异的方面反应疾病的特点, 并提供可能的治疗方法(Park IH, 2008), 有良好的应用前景。OTCD 作为 X 连锁的单基因代谢病, 是 UCD 发病率最高的疾病, 虽然可以通过敲除 OTC 基因的 2 号外显子来建立 spf 小鼠模型, 但是小鼠毕竟与人类在发育和代谢各方面都有差异, 且纯合子雄鼠发育不良, 不易存活, 因此, 建立 OTCD 病人来源的人源肝细胞模型对深化 OTCD 乃至 UCD 的研究都有着重要意义。

本课题前期工作已经建立了 OTCD 病人 PBMC 来源的 iPSC, 经过鉴定具备多向分化潜能并携带病人原致病基因, 是建立 OTCD 类器官模型的良好细胞源。因此, 我们将前期建立的 OTCD-iPSC 进行肝细胞方向的分化诱导, 并利用 3D 培养模式进行类器官的培养, 为 OTCD 的研究建立良好的肝类器官模型。

### 1. 实验材料与实验方法

#### 1.1 主要试剂

mTesR1 人胚胎干细胞培养基 (StemCell Technologies, 美国)

Activin A (R&D Systems, 美国)

RPMI Medium 1640 培养基 (Gibco, 美国)

GlutaMAX™-I (Gibco, 美国)

人非必须氨基酸 (Men NEAA) (Gibco, 美国)

CHIR99021 (Tocris, 美国)

Advanced DMEM/F12 培养基 (Life Technologies, 美国)

Accutase 消化液 (Life Technologies, 美国)

定型内胚层分化血清替代品 (上海弗元生物科技有限公司, 中国)

肝类器官分化试剂盒 (上海弗元生物科技有限公司, 中国)

CELLSAVING 细胞冻存液(新赛美生物科技有限公司, 中国)

Triton X-100 (Sigma, 美国)

TRIzol™ Reagent (Thermo Scientific, 美国)

ChamQ SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 中国)

牛血清白蛋白(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, 中国)

O. C. T. Compound(Sakura Finetek, 美国)

## 1.2 荧光定量 PCR(qRT-PCR)引物序列

基因	正向引物 (5' to 3' )	反向引物(5' to 3' )
GAPDH	ACAAC TTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC
FOXA2	GGAGCAGCTACTATGCAGAGC	CGTGTTTCATGCCGTTTCATCC
SOX17	GTGGACCGCACGGAATTTG	GGAGATTCACACCGGAGTCA
AFP	CTTTGGGCTGCTCGCTATGA	GCA TGTTGATTTAACAAGCTGCT
ALB	GAGACCAGAGGTTGATGTGATG	AGTTCCGGGGCATAAAAGTAAG
HNF4A	CGAAGGTCAAGCTATGAGGAA	ATCTGCGATGCTGGCAATCT
GGT1	CTGAGCTGATCGAGCACCC	CTCTACGATGCGGTGGTACG
CYP3A4	AAGTCGCCTCGAAGATACACA	AAGGAGAGAACACTGCTCGTG
CK18	TCGCAAATACTGTGGACAATGC	GCAGTCGTGTGATATTGGTGT
CK19	ACCAAGTTTGAGACGGAACAG	CCCTCAGCGTACTGATTCCT
OTC exon1-2	TGCTGTTTAATCTGAGGATCCTGT	GCCCTCAGCTGCACTTTATTT
OTC exon9-10	TCGATCACTAGTGTCCAGAG	TCTGGAGCTGAGGTGAGTAATC

## 1.3 抗体

抗体	稀释比例	生产厂家	货号
SOX17	1:100	Becton,Dickinson and Company (BD)	562205
FOXA2	1:100	Becton,Dickinson and Company (BD)	561589

ALB	1:100	Invitrogen	MA5-29022
AFP	1:50	Santa Cruz	SC-130302
CYP3A4	1:50	Abcam	SC-53850
OTC	1:250	Abcam	ab262864
Donkey anti-Mouse IgG(H+L)	1:500	Thermo Scientific	A32766
Donkey anti-Mouse IgG(H+L)	1:200	Thermo Scientific	A32794

## 1.4 仪器和设备

CostarR 超低粘附 6 孔细胞培养板(Corning 公司, 美国)

SORFA 3.5mm 细胞培养皿(Life Science, 美国)

-80°C超低温冰箱: Thermo Scientific

医用-20°C低温冰箱、医用 40C 冷藏箱: 青岛海尔特种电器有限公司

CO<sub>2</sub> 培养箱: Thermo Scientific

超净工作台: Esco 公司

倒置显微镜: 德国卡尔蔡司公司

正置激光共聚焦显微镜(LSM 880): 德国卡尔蔡司公司

NanoDrop 2000 超微量紫外可见分光光度计: Thermo Scientific

BioerPCR 仪: 杭州博日科技有限公司

CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪: 美国 Bio-Rad 公司

CM3050S 冰冻切片机: 徕卡公司

## 1.5 实验方法(本部分实验由本人在中国科学院广州生物医药与健康研究院进行)

### 1.5.1 iPSC 的复苏和培养

提前至少 1 小时将用 DMEM/F12 稀释好的 Matrigel 以 1 ml/孔加入 6 孔板孔, 置于 37°C 培养箱备用。从液氮冻存盒中取出需诱导的 iPSC, 快速移入 37°C 水浴锅中晃动至冻存管余少许碎冰后转入 15 ml 离心管, 加入约 5 倍细胞液体积的 mTesR1 培养基, 1000 转/分钟, 离心 5 分钟。弃上清后用 mTesR1 培养基重悬细胞。吸弃 Matrigel 后将细胞接种于培养板, 置于 37°C 培养箱中培养。

### 1.5.2 iPSC 向定型内胚层细胞分化

6 孔板细胞生长至 90%汇合度时, 用 Accutase 消化液消化细胞, 用含 10 μM

Rock inhibitor 的 mTesR1 培养基轻柔吹打细胞数次，将细胞收集于 15ml 离心管中。1000 转/分钟离心 5 分钟后弃上清，重悬细胞，以 600  $\mu$ l/孔种入 4 个 24 孔板的孔。过夜后观察细胞状态，24 孔板内细胞汇合度达 90%时开始进入定型内胚层细胞诱导分化阶段。吸弃原 mTesR1 培养基，RPMI Medium 1640 培养基轻柔洗一次，加入 600  $\mu$ l/孔定型内胚层细胞诱导分化培养基(含 100 ng/ml ActivinA 和 2  $\mu$ M CHIR99021)。然后每天按时换液，换液前无需用其他培养基洗。培养 72 小时后 iPSC 分化成为定型内胚层细胞。

### 1.5.3 定型内胚层细胞分化为肝类器官

这个阶段细胞需经历三个时期，分别为肝前体类器官诱导分化时期(S1 期)、胎肝类器官诱导分化时期 (S2 期)、成熟肝类器官诱导分化时期 (S3 期)，其中 S1 期 4-6 天，S2 期 6-8 天，S3 期 8-10 天。将定型内胚层细胞用 Accutase 消化后离心，S1 培养基重悬后将细胞种入超低粘附的 6 孔板中。自 S1 期开始，细胞进入悬浮培养阶段，每天半量换液。更换阶段时需用巴氏管将细胞团转移到离心管中，50-80g 离心 3 分钟后用下一阶段的培养基重悬细胞团，然后再种回原超低粘附板中。

### 1.5.4 RNA 的收集和提取

分别收集培养开始(D0)、第 3 天(D3，代表 DEC)、第 13 天(D13，代表类器官前体)和第 21 天(D21，代表成熟类器官)时的细胞 RNA 进行每个阶段特异性基因的检测。取各个阶段的细胞/细胞团，离心后用 Trizol 充分裂解，置于-80°C 冰箱保存。RNA 提取的步骤请参照第三部分 1.5.5 中 RNA 提取部分。

### 1.5.5 RNA 逆转录为 cDNA

按照试剂盒说明书配制 20ul 的反应体系。

RNA	2 ug
Oligo dT	1 $\mu$ l
dNTP	4 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	+RNA=9 $\mu$ l

65°C 水浴 5min 后立即放冰上。然后再加入 5 x RT buffer 4 ul , RRI 1  $\mu$ l, RNase Ace 1  $\mu$ l。上机，反应程序为 42°C 60min; 99°C 5min; 16°C holder。

### 1.5.6 qRT-PCR

根据 ChamQ SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒说明书配置 20  $\mu$ l 反应体系，如下：

cDNA(稀释 50 倍后)	8 $\mu$ l
----------------	-----------



2x SYBR GREEN MIX	10 $\mu$ l
F/R primers (2.5 M)	1.6 $\mu$ l
H2O	0.4 $\mu$ l

每个样本做 2-3 个复孔，反应条件如下：

步骤	温度(°C)	时间	循环
1	95	1 分钟	-
2	95	10 秒	-
3	60	20 秒	40
4	70	5 秒	-

### 1.5.7 冰冻切片制备

将 3D 立体分化得到的肝类器官制备为冰冻切片样品进行相关蛋白的检测。将分化至 21 天的肝类器官用巴氏管移入 1.5 ml EP 管中，加入 4%多聚甲醛甲酫，4°C固定过夜；DPBS 洗 3 次后小心将类器官移入包埋盒，加入 O. C. T，放入干冰盒中速冻后按照实验需要行冰冻切片，切片厚度为 16 $\mu$ m，切片置于-80°C 保存。

### 1.5.8 免疫荧光染色

将自-80°C冰箱取出的冰冻切片在 DPBS 中泡洗 2 次，然后用疏水笔画出样本所在区域，加 0.2%的 TritonX-100 室温通透 40 分钟，DPBS 洗去 TritonX-100。5%牛血清白蛋白(BSA)4°C封闭 4 小时后小心弃去 BSA，加入一抗，4°C孵育过夜。第二天将样品置于 DPBS 中洗 2-3 次，洗去一抗；然后加入适量二抗，室温避光孵育 2 小时；同样用 DPBS 洗去二抗；最后用 DAPI 染核；DPBS 洗去 DAPI 后封片、拍照。

## 1.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件对实验结果进行统计学处理和分析，计量资料两组比较采用 t 检验；两组以上比较采用单因素方差检验。数据以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD)表示， $p < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2. 实验结果

### 2.1 iPSC 至肝类器官的形态学改变

iPSC 分化成为肝脏类器官的过程经历了定型内胚层期、肝类器官形成前期、类器官扩增期以及类器官成熟等 4 个不同的阶段。分化过程及不同时期的形态改

变如图 3-1 所示。进入 3D 培养模式后，细胞呈现小球状；在肝细胞逐渐成熟后表现出“葡萄”样形态，并可见多角形肝细胞出现。

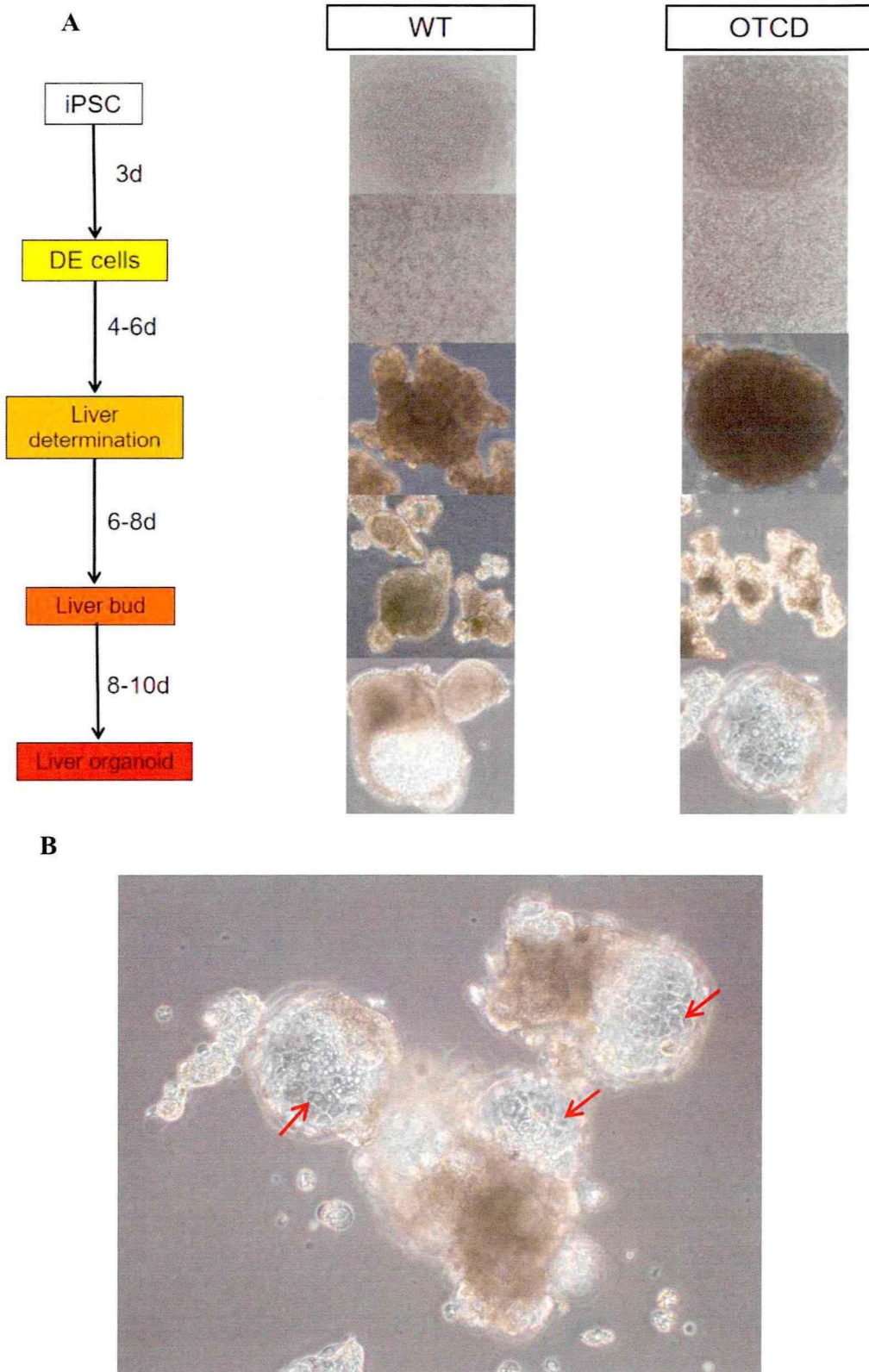


图 3-1 肝类器官分化的阶段及相应的形态

图 3-1A: iPSC 分别经历了定型内胚层细胞、肝类器官形成前期、肝芽期以及类器官期不同阶段分化成熟为肝类器官, 每个阶段的细胞呈现不同的形态。

图 3-1B: 第 21 天的类器官整体呈现“葡萄”样形态, 其中可见多角形的肝细胞(图中箭头标注处)。

## 2.2 免疫荧光检测定型内胚层细胞特异性抗体

利用免疫荧光的方法检测了 DEC 特异性基因 SOX17 和 FOXA2 在第 3 天细胞中的表达, 结果证实第三天的细胞为 DEC, 且分化效率较高(图 3-2)。

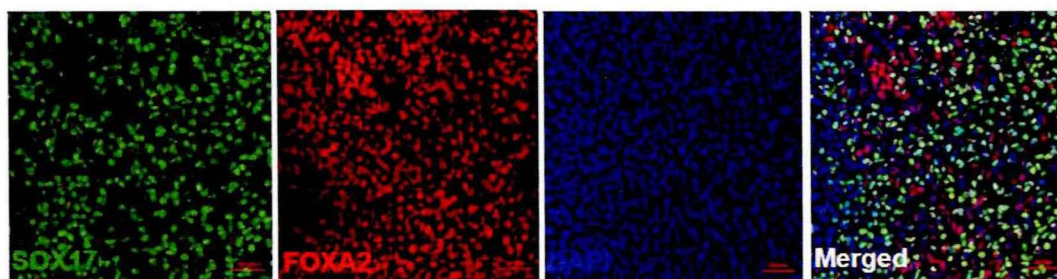


图 3-2 DEC 特异性基因 SOX17 和 FOXA2 在第 3 天细胞 RNA 中的表达

## 2.3 qRT-PCR 检测肝分化不同阶段特异性基因的表达

细胞在不同的分化阶段会表达不同的特异性基因。定型内胚层阶段的特异性基因为 SOX17 和 FOXA2, 结果显示这两个基因在 iPS 细胞不表达, SOX17 在第 3 天的 DEC 阶段达到高峰, 后随着细胞逐渐向肝细胞方向分化而迅速衰减, FOXA2 的高峰期有所延迟, 但在肝细胞的成熟期(D21)亦明显下调。而肝细胞特征性基因 AFP、ALB、GGT1、CYP3A4、HNF4A、GGT1、CK18、CK19 等则随着肝细胞的逐渐成熟表达量逐渐上调(图 3-3, 图 3-4)。

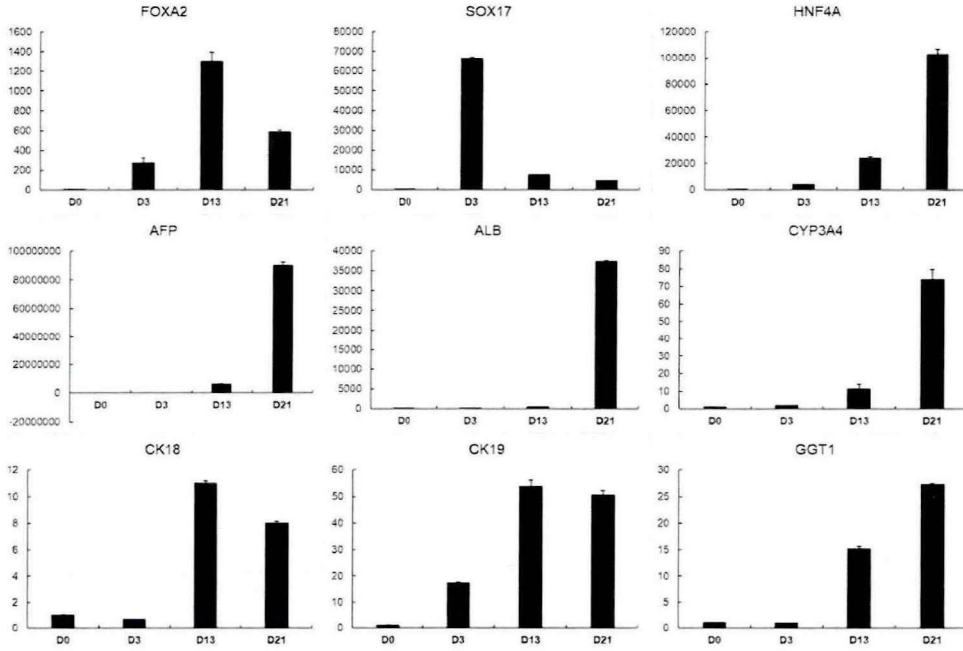


图 3-3 对照组 iPSC 肝分化不同阶段特异性基因的表达

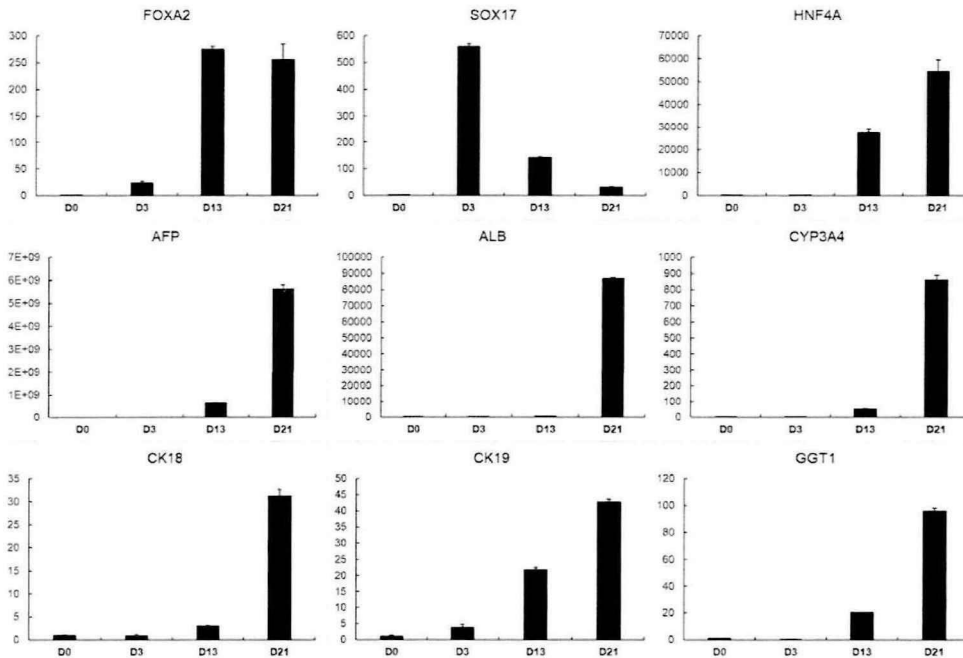


图 3-4 OTCD 病人 iPSC 肝分化不同阶段特异性基因的表达

## 2.4 免疫荧光检测肝细胞特异性蛋白的表达

利用免疫荧光的方法检测白蛋白、甲胎蛋白、细胞色素酶（CYP3A4）在肝类器官的表达情况，结果显示诱导分化出的对照组和病例组肝类器官均特异性地表达上述三个标记物（图 3-5，图 3-6）。

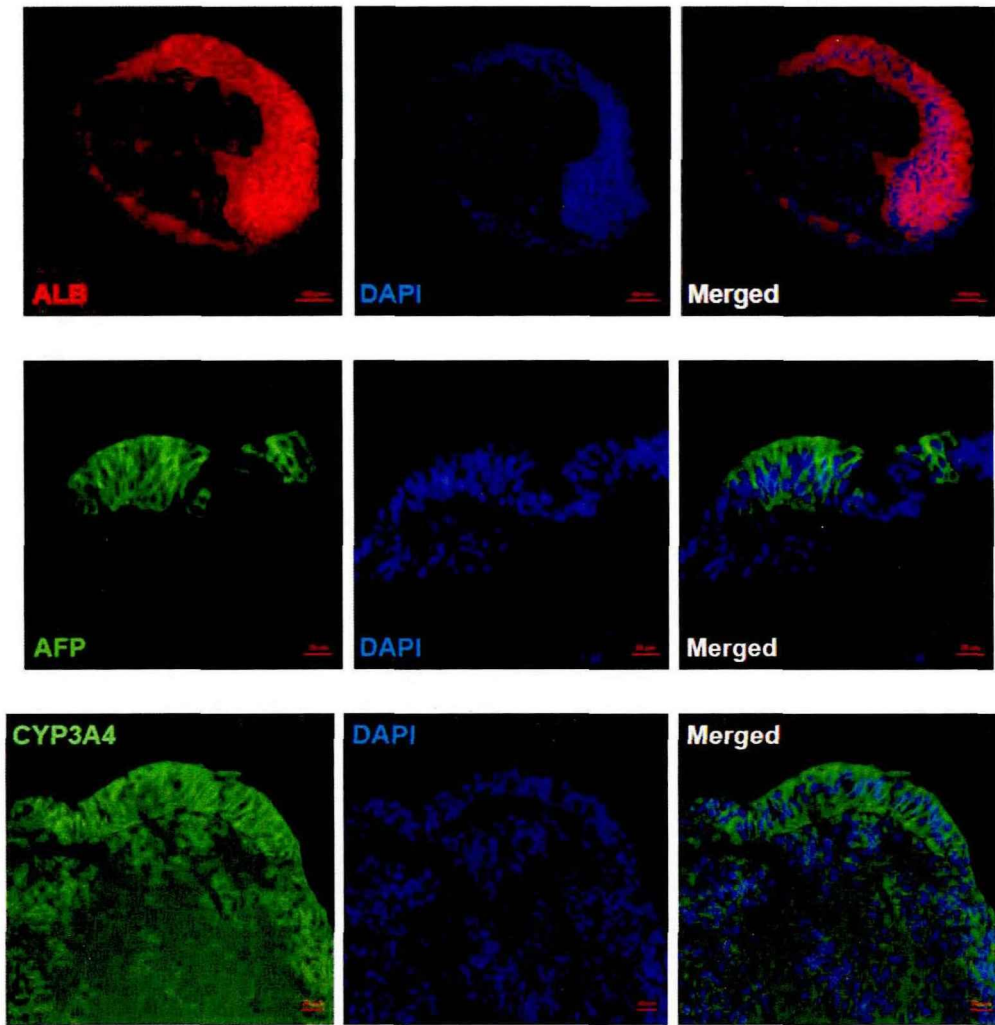
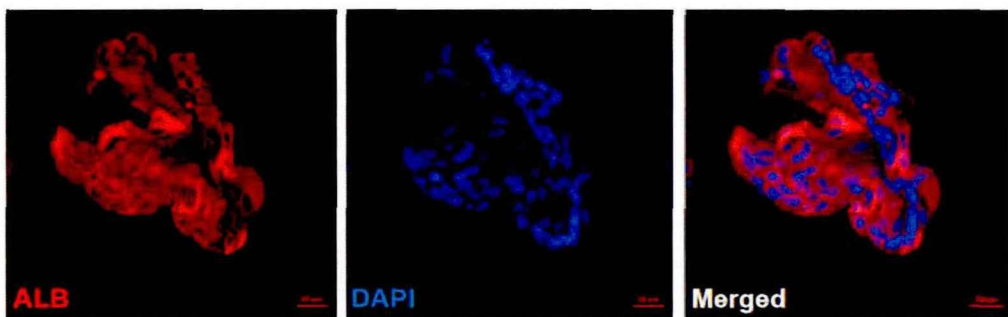


图 3-5 对照组肝类器官特异性蛋白表达情况



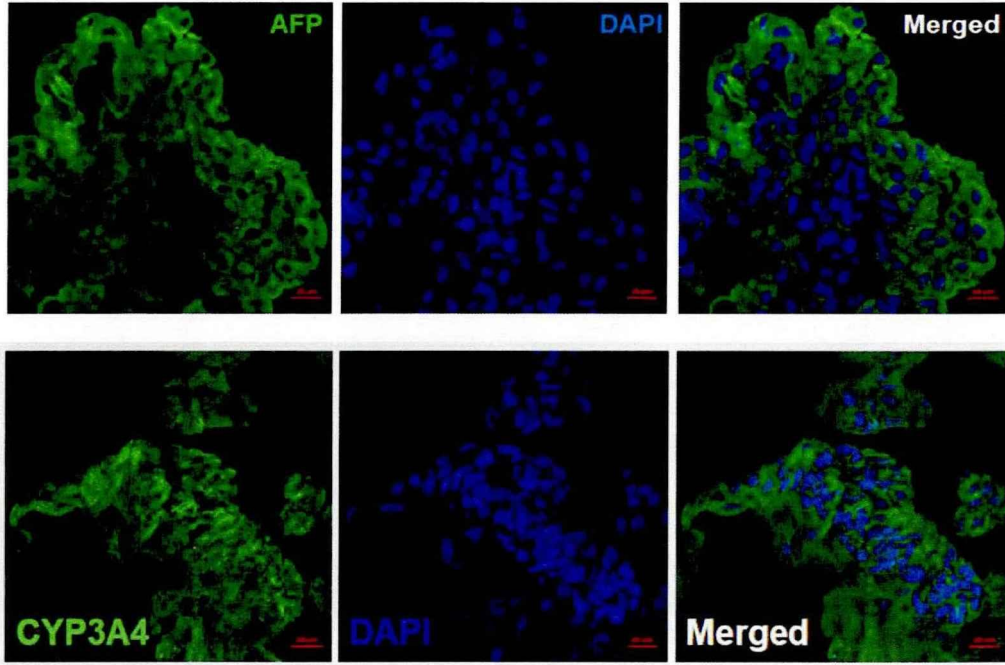


图 3-6 OTCD 肝类器官特异性蛋白的表达

### 2.5 OTC 在肝类器官中的表达

利用 qRT-PCR 的方法检测了 OTC 基因不同外显子在两组类器官中的表达情况。随着肝细胞的成熟，OTC 基因表达量逐渐升高。病人未缺失的 OTC 基因 1-2 号外显子的在正常肝类器官和病人肝类器官均正常表达，但包含了病人缺失外显子的 9-10 号外显子表达量则相对于正常组明显减低。

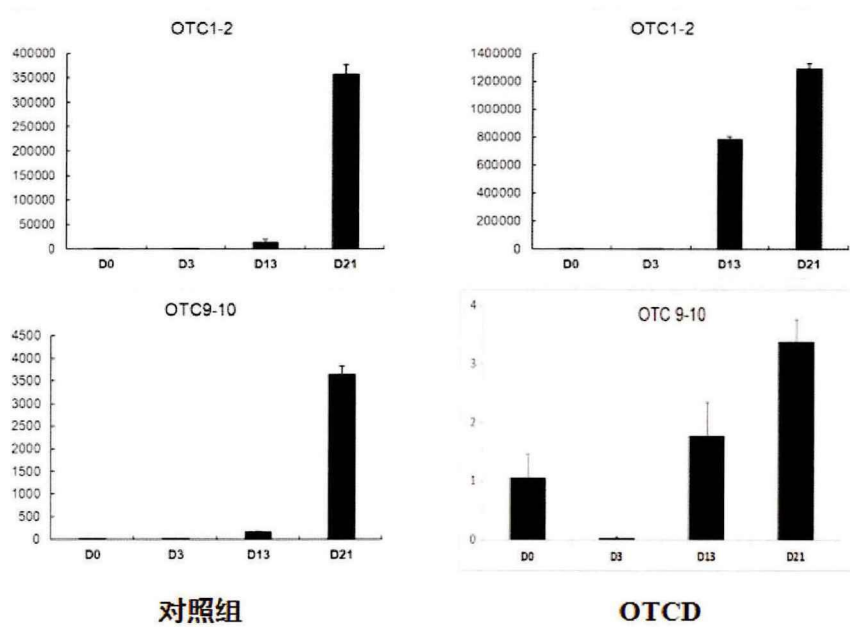


图 3-7 OTC 基因在肝类器官中的表达

利用免疫荧光法对 OTC 再病例组和对照组类器官中的表达进行检测(图 3-8), 并利用 Image J 软件进行平均荧光强度分析, 从而对特异性蛋白表达进行半定量分析。结果显示病例组 OTC 蛋白的平均荧光强度明显低于对照组, 即蛋白表达量减低(图 3-9)。

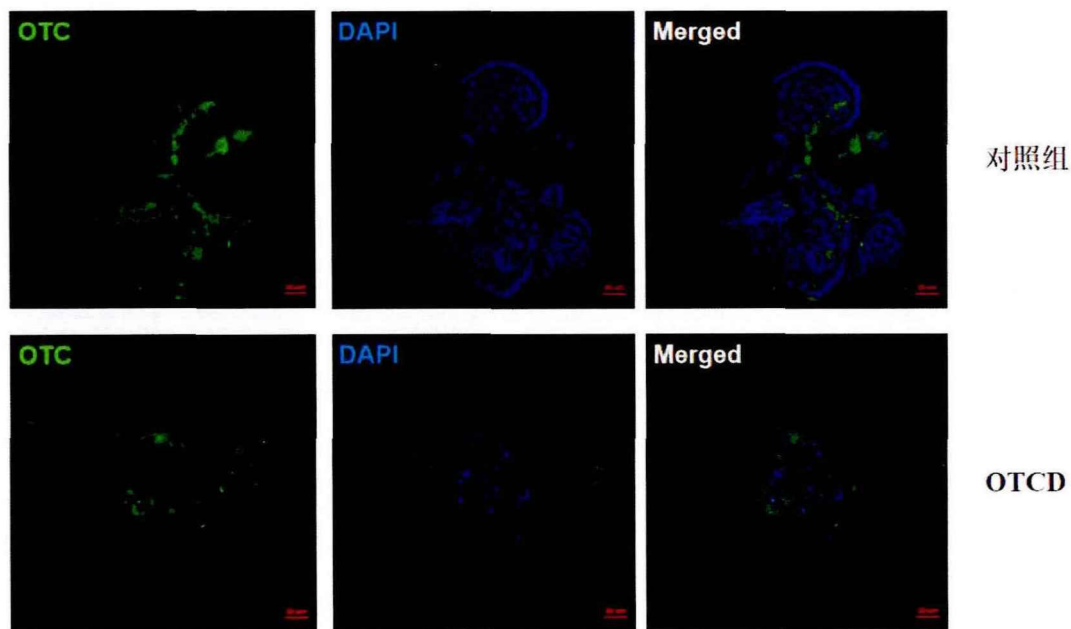


图 3-8 OTC 蛋白在肝类器官中的表达

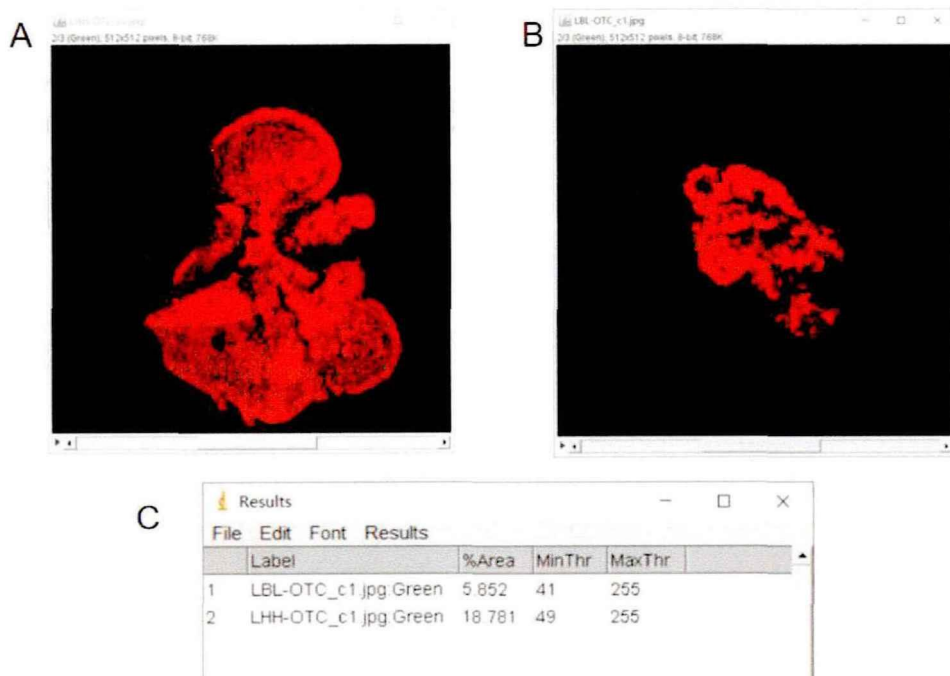


图 3-9 ImageJ 对 OTC 蛋白表达的半定量分析结果

### 3. 讨论

关于肝脏的形成和发育,目前的理论认为,肝脏中最主要的两种细胞,即肝细胞和胆管细胞,都是来源于原肠期的前原条形成的内胚层,在人类胚胎的第三周即已经出现(Gordillo M, 2015)。对胚胎肝细胞模型的研究发现,有两极分化特性的中内胚层先形成 DEC,然后分化为前肠、中肠和后肠,其中前肠细胞逐渐形成肝脏(Tremblay KD, 2005)。肝母细胞细胞在胚胎第 5 周开始形成肝芽(Migliaccio G, 1986),自胚胎第 56-58 天开始向肝细胞和胆管细胞分化(Gordillo M, 2015)。

从诱导分化的流程图中可以看出,肝脏类器官的诱导分化就是在体外模拟上述分化过程。首先在形态学上,细胞进入悬浮培养阶段后形成多个细胞球,随着肝细胞的成熟逐渐呈现出典型的“葡萄”样形态,表面可以看到与肝实质细胞相同的多角形态(Mun SJ, 2019),这与将正常成人肝组织进行体外培养所获得的肝类器官具有相同的单层上皮细胞样结构(Huch M, 2015),从形态学上证明该类器官为肝脏类器官。

不同阶段的细胞会表达特异性的基因。核蛋白 SOX17 是 DEC 发育过程中至关重要且高度保守的调节因子(Séguin CA, 2008),在定型内胚层和内脏内胚层细胞都高表达(Manuel V, 2014),且 SOX17 阴性的细胞无法继续在前肠或中肠发育(Lewis SL, 2006)。而 FOXA2 虽然也是内胚层细胞的标记物,但是其在哺乳动物自胚胎发育到器官形成的多个生命阶段都发挥重要作用,尤其是在肝脏的发育过程中,是重要的调节因子(Usama FS, 2018)。SOX17 和 FOXA2 的表达标志着肝分化过程的开始(Kumar PS, 2020)。免疫荧光结果均显示,SOX17 和 FOXA2 在第三天的 DEC 高表达,证明我们的诱导分化经历了确定的定型内胚层时期,且分化效率较高,为下一步向肝细胞方向的分化奠定了坚实的基础。qRT-PCR 结果所示 FOXA2 表达高峰出现在第 13 天,可能是由于 FOXA2 在肝的器官形成中亦发挥调节作用,而 iPSC 在肝分化过程中存在着细胞的不均质性有关。但第 21 天的结果显示二者的表达均下调,而肝细胞特异性基因上调,说明肝类器官中成熟的肝细胞形成并增多。

对于肝细胞的鉴定,我们首先在 RNA 水平用 qRT-PCR 的方法检测了肝细胞特异性基因的表达情况,包括 HNF4A, AFP, ALB, GGT1, CYP3A4, CK18, CK19。从结果中我们可以看到,随着 DEC 逐渐分化为肝细胞,这些肝细胞的特征性基因在肝芽期(D13)即开始明显升高,到类器官的成熟期(D21)达到高峰,证明我们



分化培养出的确定是肝脏的类器官。另外，代表成人肝细胞的基因 ALB、CYP3A4(Hannan NRF, 2013)在肝芽期表达非常低，而到了成熟期明显上调，证明我们培养出的类器官已经相对成熟。然后，我们进一步用免疫荧光的方法在蛋白水平验证了白蛋白、细胞色素酶及甲胎蛋白在类器官切片中的表达，结果显示上述三种蛋白在肝类器官中大量表达，再次证明我们诱导分化的类器官是相对成熟的肝脏类器官。

由于 iPSC 是 OTCD 病人来源的，我们还检测了 OTC 基因的表达情况。病例 3 存在 OTC 基因 3-9 号外显子的大缺失，是一个新发变异，我们检测了 OTC 基因 1-2 号外显子和 9-10 号外显子的表达情况，结果显示其 1-2 号外显子在对照组和病例组的肝类器官中均正常表达，而 OTCD 肝类器官中 9-10 号外显子的表达量则明显降低。在蛋白水平，OTC 蛋白在对照组和病例组均有表达，但蛋白半定量分析显示病例组 OTC 蛋白的表达量亦降低，证明 OTC 基因新发的 3-9 号外显子的缺失在转录和翻译两个水平均影响了酶的形成，从而导致临床症状。

已有文献报道成功建立了 OTCD 的体外细胞模型，分别来源于 OTCD 病人的原代肝细胞和肝成纤维细胞(Su S, 2019; Zabulica M, 2021)。原代肝细胞来源的肝类器官被认为是最接近于正常肝脏生理功能的(Lauschke VM, 2019)，然而，众所周知，原代肝细胞在体外无法长时间培养传代，即使 Su 等建立的原代肝细胞来源的 OTCD 类肝细胞可稳定传代 15 代，仍对下游实验提出了非常严格的时间限制，且不利于将来应用于再生医学中。而肝成纤维细胞的获取仍需要采用肝脏穿刺这类有创操作的方式，损伤大，病人痛苦大，且类器官的培养分化周期近 1 月。我们利用病人 PBMC 重编程为 iPSC，然后进一步分化培养为肝脏类器官，不仅细胞来源简单易得，成本低，病人痛苦小，而且诱导分化为类器官的周期更短（21 天），白蛋白、CYP3A4 等功能蛋白的表达高，是此类细胞模型非常理想的建立模式，可以推广应用于其他肝脏相关疾病的类器官模型建立和研究中。

综上所述，我们利用前期工作建立的 OTCD 病人 PBMC 来源的 iPSC，诱导分化成病人特异性的肝类器官，成功搭建了首个 OTCD 病人 PBMC 来源的肝类器官，并利用该模型进行了 OTC 基因 3-9 号外显子缺失致病机制的初步探讨，为深入进行 OTCD/UCD 的病理生理过程、药物筛选及基因编辑等治疗技术提供了潜在的体外肝类器官模型。

## 结论

本研究回顾性分析了 7 例尿素循环障碍患儿的临床特征、实验室检查、基因学检查，并将其中 2 例病人的 PBMC 经过重编程技术获得多能型诱导干细胞，进一步诱导分化为病人特异性的肝脏类器官，得出以下结论：

1. 对临床有败血症表现的新生儿和呕吐伴神经系统症状的儿童均应进行血浆氨的检测来排除 UCD；凝血功能障碍可能是 UCD 病人肝损伤更早期的表现，且需动态监测早发型 UCD 病人的血钙水平；血丙氨酸和脯氨酸水平可能对早发型近端 UCD 病人有辅助诊断价值。
2. 感染可加重 UCD 病人的临床表型，对于合并感染的高氨血症患者，可考虑首选氨苄西林和美罗培南作为抗感染药物；血液净化可有效降低血浆氨水平，但预后不单纯取决于后者。
3. 7 例病人的遗传学检查共发现 6 个新发变异，UCD 的临床表型和预后仍主要取决于其基因型；发生在基因保守区域和酶反应区域的、显著影响蛋白结构的、以及大的缺失和无义变异可能对酶的影响更为明显，从而导致更为严重的临床表型。
4. 利用非整合性重编程的方法成功构建了 2 株 OTCD 病人 PBMC 来源的 iPS 细胞系，并在 3D 培养条件下诱导分化为肝脏类器官，成功构建了首个 OTCD 病人 PBMC 来源的肝类器官；利用该类器官证实，OTC 基因 3-9 号外显子的缺失在转录和翻译水平均导致 OTC 的表达降低，从而导致尿素循环障碍。

## 不足与展望

### 不足

1. 由于尿素循环障碍的罕见性，我们的病例数仍较少，所得临床部分结论仍需进一步验证。
2. 未能建立 CPS1D 的 iPSC 及类器官模型。
3. 对已经建立起的 OTCD 病人的肝类器官模型需进一步进行功能检测。

### 展望

1. 我院作为区域性儿童医学中心，将联盟山东大学齐鲁医疗集团内多家医疗机构或筛查中心，整合多方资源，进行 UCD 的流行病学研究和产前筛查，开展对基因携带家庭、孕妇的早期干预，避免悲剧反复发生，提高人口质量。
2. 我院作为山东省最大的危重儿转运中心，可发挥自身优势，对可疑病例进行尽早转运，尽力提供最好的治疗和生命支持。
3. 在已经建立的 OTCD 的 iPSC 模型的实验基础上，争取收集更多 OTCD 及其他 UCD 病人的标本，建立山东乃至全国的 UCD 基因库、iPSC 库。
4. 利用已经建立的 OTCD 的 iPS 模型和肝脏类器官模型，进一步优化培养条件，完善类器官的肝功能，尤其是代谢功能，进行发病机制研究及寻找相应治疗方法，如可尝试基因编辑治疗的基础研究，并逐渐延伸至产前干预和临床早期干预，提高产前筛查率和患儿存活率，并通过早期诊断和早期识别改善患儿的生活质量和神经系统预后。

附表

附表 1-A CPS1 基因变异—错义变异

序号	外显子	核苷酸改变	氨基酸改变	参考文献
1	2	c.128C>T	p.A43V	Häberle et al., 2011
2	2	c.173G>A	p.G58D	Häberle et al., 2011
3	2	c.173G>T	p.G58V	Chen et al., 2018
4	2	c.194C>T	p.S65F	Häberle et al., 2011
5	2	c.212T>G	p.V71G	Häberle et al., 2011
6	2	c.236G>A	p.G79E	Kurokawa et al.,2007
7	3	c.259C>T	p.P875S	Häberle et al., 2011
8	3	c.265T>G	p.Y89D	Häberle et al., 2011
9	3	c.296C>T	p.P99L	Kretz et al., 2012
10	3	c.368C>T	p.S123F	Summar et al., 1998
11	3	c.368C>A	p.S123T	Ali et al., 2016
12	4	c.323G>A	p.G108E	Yang et al., 2017
13	4	c.446T>C	p.L149S	Chen et al., 2017
14	5	c.478G>A	p.A160T	Fan et al., 2020
15	5	c.494A>G	p.D165G	Häberle et al., 2011
16	5	c.520C>T	p.R174W	Ali et al., 2016
17	7	c.634T>A	p.Y212N	Kurokawa et al., 2007
18	7	c.671A>T	p.D224V	Häberle et al., 2011
19	7	c.697C>T	p.R233C	Häberle et al., 2011
20		c.713G>C	p.R238P	Xu et al., 2020
21	8	c.728A>C	p.H243P	Häberle et al., 2011
22	8	c.773G>A	p.G258E	Häberle et al., 2011
23	8	c.788G>A	p.G263E	Häberle et al., 2011
24	8	c.794C>T	p.P265L	Kretz et al.,2012
25	8	c.796G>A	p.G266R	chen et al., 2018
26	8	c.840G>C	p.K280N	Kurokawa et al.,2007
27	9	c.902G>A	p.G301E	Eeds et al.,2006
28	9	c.911C>T	p.A304V	Häberle et al., 2011
29	10	c.950G>A	p.G317E	Häberle et al., 2011
30	10	c.1010A>G	p.H337R	Aoshima et al., 2001
31	10	c.1022 T>C	p.L341S	Funghini et al.,2012
32	10	c.1063A>G	p.N355D	Eeds et al., 2006
33	10	c.1072G>C	p.D358H	Häberle et al., 2011
34	11	c.1145C>T	p.P382L	Häberle et al., 2011
35	12	c.1166A>G	p.Y389C	Eeds et al., 2006
36	12	c.1169T>G	p.L390R	Eeds et al., 2006
37	12	c.1201G>C	p.G401R	Häberle et al., 2011
38	13	c.1291G>A	p.G431R	Häberle et al., 2011
39	13	c.1295G>T	p.G432V	Häberle et al., 2011
40	13	c.1312G>A	p.A438T	Häberle et al., 2011
41	13	c.1312G>C	p.A438P	Kurokawa et al., 2007
42	13	c.1348A>G	p.K450E	Häberle et al., 2011
43	14	c.1370T>G	p.V457G	Funghini et al., 2003
44	14	c.1412C>A	p.T471N	Pekkala et al., 2010
45	14	c.1492G>C	p.A498P	Häberle et al., 2011

46	15	c.1592T>A	p.V531E	Häberle et al., 2011
47	15	c.1592T>G	p.V531G	Häberle et al., 2011
48	15	c.1631C>T	p.T544M	Finckh et al.,1998; Häberle et al., 2011; 本文
49	16	c.1759C>T	p.R587C	Häberle et al., 2011
50	16	c.1760G>A	p.R587H	Kurokawa et al., 2007; Wang et al., 2011; Häberle et al., 2011
51	16	c.1760G>T	p.R587L	Häberle et al., 2011
52	16	c.1765G>A	p.A589T	Eeds et al., 2006
53	16	c.1777G>C	p.G593R	Kurokawa et al., 2007
54	16	c.1790C>T	p.S597L	Häberle et al., 2011
55		c.1799G>A	p.C600Y	Zhang et al.,2018
56	17	c.1864G>A	p.V622M	Häberle et al., 2011
57	17	c.1883G>A	p.G628D	Häberle et al., 2011
58	17	c.1895T>G	p.I632R	Häberle et al., 2011
59	17	c.1913G>C	p.R638P	Häberle et al., 2011
60	17	c.1918G>T	p.A640S	Eeds et al., 2006
61	17	c.1943G>A	p.C648Y	Häberle et al., 2011
62	17	c.1951G>A	p.E651K	Kurokawa et al., 2007
63	17	c.1958T > G	p.V653G	Fan et al., 2020
64	17	c.1961A>T	p.D654V	Häberle et al., 2011
65	17	c.1981G>C	p.G661R	Funghini et al., 2012
66	17	c.1981G>T	p.G661C	This study
67	18	c.2021A>T	p.N674I	Kurokawa et al., 2007
68	18	c.2022T>A	p.N674K	Häberle et al., 2011
69	18	c.2033A>C	p.Q678P	Pekkala et al., 2010
70	18	c.2093A>G	p.N698S	Häberle et al., 2011
71	18	c.2148T>A	p.N716K	Summar et al., 1998; Eeds et al., 2006
72	18	c.2153G>A	p.R718K	Häberle et al., 2011
73	18	c.2162G>A	p.R721Q	Häberle et al., 2011
74	18	c.2170G>C	p.A724P	Häberle et al., 2011
75	18	c.2176G>A	p.A726T	Häberle et al., 2011
76	19	c.2300A>T	p.D767V	Häberle et al., 2011
77	19	c.2321C>T	p.P774L	Pekkala et al. [2010]
78	19	c.2339G>A	p.R780H	Kurokawa et al., 2007; Häberle et al., 2011
79	19	c.2376G>C	p.M792I	Häberle et al., 2011
80	20	c.2407C>A	p.R803S	Häberle et al., 2011
81	20	c.2407C>G	p.R803G	Ono et al.,2009; Häberle et al., 2011
82	20	c.2407C>T	pR803C	Häberle et al., 2011
83	20	c.2413T>C	p.F805L	Eeds et al., 2006
84	20	c.2414T>C	p.F805S	Häberle et al., 2011
85	20	c.2429G>A	p.Q810R	Funghini et al., 2003 & Eeds et al., 2006
86	20	c.2440C>T	p.R814W	Rokicki et al., 2017; Häberle et al., 2011
87	20	c.2446T>C	p.C816R	Häberle et al., 2011
88	20	c.2528T>C	p.L843S	Häberle et al., 2003

89	20	c.2537C>T	p.P846L	Zhang et al., 2018
90	20	c.2548C>T	p.R850C	Kurokawa et al., 2007
91	20	c.2549G>A	p.R850H	Wakutani et al., 2004; Häberle et al., 2011
92	21	c.2611A>C	p.T871P	Kretz et al., 2012
93	21	c.2623A>G	p.K875E	Häberle et al., 2003
94	22	c.2732G>A	p.G911E	Häberle et al., 2011
95	22	c.2732G>T	p.G911V	Eeds et al., 2006
96	22	c.2738C>T	p.S913L	Häberle et al., 2011
97	22	c.2740G>C	p.D914H	Häberle et al., 2011
98	22	c.2741A>G	p.D914G	Häberle et al., 2011
99	22	c.2752T>C	p.S918P	Wakutani et al., 2004
100	23	c.2758G > C;	p.D920H	Mehrdad et al., 2019
101	22	c.2795G>C	p.R932T	Häberle et al., 2011
102	23	c.2845G>A	p.A949T	Häberle et al., 2011
103	23	c.2873T>C	p.L958P	Eeds et al., 2006
104	23	c.2876A>G	p.Y959C	Häberle et al., 2011
105	23	c.2885A>G	p.Y962C	Häberle et al., 2011
106	23	c.2891G>A	p.G964D	Funghini et al., 2012
107	24	c.2933T>A	p.V978E	Häberle et al., 2011
108	24	c.2944G>A	p.G982S	Eeds et al., 2006
109	24	c.2945G>A	p.G982D	Kurokawa et al., 2007; Häberle et al., 2011
110	24	c.2945G>T	p.G982V	Wang et al., 2011; Häberle et al., 2011
111	24	c.2950T>C	p.Y984H	Häberle et al., 2011
112	24	c.2957T>C	p.I986T	Häberle et al., 2011
113	24	c.2959G>T	p.G987C	Häberle et al., 2011
114	25	c.2975T>C	p.F992S	Häberle et al., 2011
115	25	c.2993C>T	p.S998F	Eeds et al., 2006
116	25	c.3047A>G	p.N1016S	Häberle et al., 2011
117	25	c.3050C>T	p.P1017L	Häberle et al., 2011
118	25	c.3065C>T	p.T1022I	Häberle et al., 2011
119	25	c.3101A>G	p.E1034G	Häberle et al., 2011
120	25	c.3134A>G	p.H1045R	Häberle et al., 2011
121	26	c.3161T>G	p.I1054R	Rapp et al., 2001
122	26	c.3176A>G	p.Q1059R	Häberle et al., 2011
123	26	c.3194C>A	p.A1065E	Häberle et al., 2011
124	26	c.3265C>T	p.R1089C	Khayat et al., 2009; Häberle et al., 2011
125	26	c.3266G>T	p.R1089L	Summar et al., 1998; Eeds et al., 2006
126	26	c.3308A>G	p.Q1103R	Kurokawa et al., 2007
127	28	c.3422T>G	p.V1141G	Wakutani et al., 2004; Kurokawa et al., 2007
128	28	c.3443T>A	p.M1148K	Zhang et al., 2018
129	28	c.3464C>A	p.A1155E	Häberle et al., 2011
130	28	c.3464C>T	p.A1155V	Häberle et al., 2011
131	29	c.3500C>G	p.T1167R	Funghini et al., 2012

132	30	c.3582A>C	p.E1194D	Kretz et al., 2012
133	30	c.3584A>C	p.H1195P	Kurokawa et al., 2007
134	30	c.3607T>C	p.S1203P	Summar et al., 1998; Eeds et al., 2006
135	30	c.3608C>T	p.S1203L	Häberle et al., 2011
136	30	c.3613G>A	p.D1205N	Eeds et al., 2006
137	30	c.3632C>G	p.P1211R	Sufin et al., 2019
138	30	c.3643A>G	p.I1215V	Kurokawa et al., 2007
139	31	c.3683G>A	p.R1228Q	Häberle et al., 2011
140	31	c.3691G>C	p.A1231P	Rokicki et al., 2017
141	31	c.3723C>A	p.N1241K	Kurokawa et al., 2007
142	32	c.3760A>T	p.I1254F	Ali et al., 2016
143	32	c.3765G>C	p.E1255D	Häberle et al., 2011
144	32	c.3785G>A	p.R1262Q	Häberle et al., 2011
145	32	c.3785G>C	p.R1262P	Häberle et al., 2011
146	32	c.3820G>C	p.D1274H	Häberle et al., 2011
147	33	c.3945G > A	p.W1315X(186)	Fan et al., 2020
148	33	c.3949C > T	p.R1317W	Fan et al., 2020
149	33	c.3979T>C	p.C1327R	Häberle et al., 2011
150	33	c.3980G>A	p.C1327Y	Rokicki et al., 2017
151	33	c.3991T>C	p.S1331P	Eeds et al., 2006
152	33	c.3998G>A	p.G1333E	Häberle et al., 2011
153	35	c.4112G>T	p.R1371L	Häberle et al., 2011
154	35	c.4132G>A	p.A1378T	Eeds et al., 2006
155	35	c.4142T>C	p.L1381S	Summar et al., 1998
156	36	c.4172C>T	p.T1391M	Häberle et al., 2011
157	36	c.4192C>G	p.L1398V	Häberle et al., 2011
158	36	c.4232C>T	p.P1411L	Summar et al., 1998; Eeds et al., 2006
159	37	c.4316C>T	p.P1439L	Häberle et al., 2011
160	37	c.4327A>G	p.T1443A	Eeds et al., 2006
161	37	c.4357C>T	p.R1453W	Häberle et al., 2011; Pekkala et al., 2010
162	37	c.4358G>A	p.R1453Q	Pekkala et al. , 2010
163	37	c.4385C>G	p.P1462R	Häberle et al., 2011
164	38	c.4471T>C	p.Y1491H	Summar et al., 1998

附表 1-B CPS1 基因变异—无义变异

序号	外显子	核苷酸改变	氨基酸改变	参考文献
165	2	c.130C>T	p.Q44X	Ihara et al., 1999; Kurokawa et al., 2007
166	3	c.267C>G	p.Y89X	Häberle et al., 2011
167	4	c.420C>A	p.Y140X	Eeds et al., 2006
168	6	c.580C>T	p.Q194X	Choi R et al., 2017
169	8	c.712C>T	p.R238X	Häberle et al., 2003
170	11	c.1123C>T	p.Q375X	Aoshima et al., 2001b
171	13	c.1289C>G	p.S430X	Rokicki et al., 2017
172	14	c.1432C>T	p.Q478X	Eeds et al., 2006
173	15	c.1615G>T	p.E539X	Häberle et al., 2011

174	15	c.1642C>T	p.Q548X	Ali et al., 2016
175	16	c.1770T>G	p.Y590X	Häberle et al., 2011
176	18	c.2161C>T	p.R721X	Häberle et al., 2003
177	19	c.2359C>T	p.R787X	Rapp et al., 2001; Kurokawa et al., 2007
178	23	c.2893C>T	p.Q965X	Häberle et al., 2011
179	24	c.2896G>T	p.E966X	This study
180	25	c.3093C>A	p.Y1031X	Kurokawa et al., 2007
181	25	c.3136C>T	p.Q1046X	Rokicki et al., 2017
182	26	c.3317G>A	p.W1106X	Häberle et al., 2011
183	29	c.3520C>T	p.R1174X	Häberle et al., 2011
184	32	c.3784C>T	p.R1262X	Wakutani et al., 2004; Eeds et al., 2006; Kurokawa et al., 2007; Ono et al., 2009
185	33	c.3953T>A	p.L1318X	Funghini et al., 2012
186	36	c.4229G>A	p.W1410X	Kretz et al., 2012

附表 1-C CPS1 基因变异 — 缺失、插入、剪接错误变异

序号	外显子	核苷酸改变	氨基酸改变	参考文献
187	1	c.125delA	p.K42RfsX15	Häberle et al., 2011
188	2	c.154_160delGATGGAA	p.D52LfsX3	Häberle et al., 2011
189	Intron 2/Exon 3-Exon 38	Intron 2_3'UTRdel134kb_767kb(Intron 2_3'UTRdelExon3-38)	No exact breakpoints available	Wang et al., 2011
190	4	c.409_410insTATA	p.S137IfsX2	Häberle et al., 2011
191	5	c.527_528insGA	p.G177RfsX25	Häberle et al., 2011
192	7	c.700delC	p.L234CfsX2	Häberle et al., 2011
193	8	c.731delT	p.L244X	Eeds et al., 2006
194	9	c.848delA	p.E283GfsX16	Häberle et al., 2011
195	9	c.850delA	p.S284VfsX15	Rokicki et al., 2017
196	9	c.860delA	p.K287RfsX12	Kurokawa et al., 2007
197	9	c.866delC	p.P289HfsX10	Häberle et al., 2011
198	9	c.900_901insAG	p.G301EfsX24	Häberle et al., 2011
199	12	c.1195_1196delAA	p.K399EfsX22	Eeds et al., 2006
200	14	c.1390_1397delCCAAACAT	p.P464CfsX7	Häberle et al., 2011
201	14	c.1413_1414insC	p.N472QfsX2	Häberle et al., 2011
202	14	c.1440_1441delTA	p.Thr481CysfsX58	Funghini et al., 2012
203	14	c.1528delG	p.G510AfsX5	Wakutani et al., 2004; Kurokawa et al., 2007
204	14	c.1547delG	p.G516AfsX5	Kurokawa et al., 2007
205	Intron14	c.1549+1G>T (c.1420_1549del130)	p.V474EfsX15 Donor splice site error	Häberle et al., 2011
206	16	c.1778insG	p.G594WfsX42	Kretz et al., 2012
207	intron16	c.1837-8A>G (c.1836_1837insTTTCTAG)	p.A613FfsX25 Acceptor splice site error	Eeds et al., 2006
208	17	c.1974delT	p.H659TfsX22	Häberle et al., 2011
209	Intron17	c.1981+2T>G (c.1837_1981delExon17)	p.A613VfsX20	Häberle et al., 2011
210	17	C.2023delT	p.Cys675fs	Yang et al., 2017



211	18	c.2115_2216ins35	p.A717AfsX28	Häberle et al., 2003
212	18	c.2170_2173delGCTCinsCCA	p.A724PfsX27	Rapp et al., 2001
213	18	c.2173delC	p.L725WfsX19	Häberle et al., 2011
214	19	c.2227delC	p.L743X	Häberle et al., 2011
215	19	c.2252delA	p.K751RfsX42	Häberle et al., 2011
216	19	c.2283_2287delTTTTGinsA	p.C761X	Häberle et al., 2011
217	19	c.2338delC	p.R780VfsX13	Eeds et al., 2006
218	20	c.2404delG	p.G802VfsX19	Häberle et al., 2011
219	20	c.2494_2495insT	p.E832VfsX5	Kurokawa et al., 2007
220	20	c.2494delGinsAA	p.E832KfsX9	Kurokawa et al., 2007
221	22	c.2719_2721delGCAinsCC	p.A907PfsX25	Häberle et al., 2011
222	22	c.2797delT	p.L933X	Wakutani et al., 2004
223	22	c.2809_2810delAT	p.I937PfsX5	Häberle et al., 2011
224	23	c.2865_c.2869delAAACT	p.T955Tfs*12	Fan et al., 2020
225	23	c.2876_2877delAT	p.Y959CfsX9	Häberle et al., 2011
226	23	c.2883_2895delI3	p.Y962SfsX11	Eeds et al., 2006
	Intron 23			
227	/Exon 24/Intron 24	c.2895+429_c.2960-281del2559 (c.2896_2959delExon24)	p.E966AfsX27	Häberle et al., 2011
228	25	c.3044_3045insG	p.C1015WfsX4	Eeds et al. 2006
229	26	c.3185delA	p.N1062TfsX38	Eeds et al. 2006
		c.3337-1G>T (c.3337_3404delExon27)	p.N1113WfsX10	
230	Intron 26		Acceptor splice site error	Häberle et al., 2011
231	27	c.3341_3342insTTAAAATGA	p.E1114DX	Häberle et al., 2011
232	27	c.3358_3359delAA	p.K1120VfsX25	Summar et al., 1998
233	29	c.3484delC	p.H1162TfsX5	Wang et al., 2011; Häberle et al., 2011
234	29	c.3485delA	p.H1162PfsX5	Kretz et al., 2012
235	31	c.3680_3681insTTTC	p.R1228FfsX24	Häberle et al., 2011
236	32	c.3869_3870insCC	p.E1290DfsX12	Eeds et al., 2006
237	33	c.3965_3966insCC	p.D1322AfsX5	Eeds et al., 2006
238	33	c.3969_3970insC	p.I1324HfsX5	Kurokawa et al., 2007
239	33	c.3969_3970insCC	p.I1324PfsX3	Häberle et al., 2011
240	Intron 34	c.4102-239A>G (c.4101ins89)	p.Q1368SfsX17	Häberle et al., 2011
241	33	c.3972delT	p.L1325X	Rokicki et al., 2017
242	33	c.3979delT	p.C1327VfsX21	Ali et al., 2016
243	35	c.4148delA	p.N1383MfsX44	Häberle et al., 2011
244	37	c.4397_4398insT	p.Q1468SfsX8	Eeds et al., 2006
	Exon 37/Intron 37			
245		c.4404+1G>A (c.4275_4404delExon37)	p.L1426X	Häberle et al., 2011
246	Intron 37	c.4405-9T>G (c.4404ins8)	p.V1469IfsX2	Häberle et al., 2011

附表 1-D CPS1 基因变异 — 框内缺失、插入、剪接错误变异

序号	外显子	核苷酸改变	氨基酸改变	参考文献
247	Intron 2	c.236+6T>C (mRNA change not determined)	Possible donor splice site error	Kurokawa et al., 2007
248	3	c.306_311dupGAATGG	p.N103_G104insGN	Summar et al., 2011; Eeds et al., 2006

249	Intron 4	c.471+1G>A (c.382_271delExon4)	p.128V_157Kdel30 Donor splice site error	Häberle et al., 2011
250	Intron 5	c.529-3T>G (mRNA change not determined)	Acceptor splice site error	Eeds et al., 2006
251	Intron7	c.622-3C>G	Acceptor splice site error	This study
252	Intron 7	c.622 -7A>G (c.621_622insTGGCAG)	p.K207_D208insWQ Acceptor splice site created within intron 6	Häberle et al., 2011
253	7	No DNA change identified (c.622_711delExon7)	p.D208_K236del30	Häberle et al., 2011
254	Intron 7	c.711+1G>A (c.622_711delExon7)	p.D208_K236del30 Donor splice site error	Häberle et al., 2011
255	8-10	c.711+686_1164+136del4260(c.712-1086delExons 8-10)	p.R238_E362del125	Aoshima et al., 2001
256	8	c.840G>C (c.832_840delGTCAGAAAG)	p.V278_K280delVRK	Hoshide et al., 1993
257	Exon 9/Intron 9/Exon 10	c.841-194_1086+77del1440(c.841_1086delExons9-10)	P.I281_E362del	Wang et al., 2011
258	Exon 9/Intron 10/Intron 10/Exon 11	c.841_212_c.1164+26del2395(c.841_1164delExons9-11)	P.I281_E388del108	Wang et al., 2011
259	Intron 10	c.1087-1G>T (mRNA change not determined)	Acceptor splice site error	Eeds et al., 2006
260	Intron 11	c.1164+1G>A (c.1087_1164delExon11)	p.G363_E388del26 Donor splice site error	Häberle et al., 2011
261	Intron 12	c.1263+5G>C (c.1165-1263delExon12)	p.Y389_E421del33 Donor splice site error	Häberle et al., 2003
262	17	c.1923_1925delTGA	p.D642del	Rokicki et al., 2017
263	Intron 23	c.2895+1G>A (c.2830_2895delExon23)	p.I944_Q965del22 Donor splice site error	Häberle et al., 2011
264	25	c.2995_2997delAGT	p.S999del	Häberle et al., 2011
265	25	c.3036_3038delGGT	p.V1011del	Häberle et al., 2003
266	25	c.3037_3039delGTG	p.V1013del	Kretz et al., 2012
267	26	c.3159_3161delCAT	p.I1054del	Häberle et al., 2011
268	Intron 27	c.3404+1G>C	Donor splice site error	Funghini et al., 2012
269	Intron 28	c.3405-8C>T	Acceptor splice site error	Funghini et al., 2012
270	Intron 29	c.3558+1G>C (c.3481_3558delExon29)	p.E1161_R1186del26 Donor splice site error	Häberle et al., 2003
271	Intron 29	c.3559-2A>G (c.3559_3666delExon30)	p.V1187_K1222del36 Acceptor splice site error	Häberle et al., 2011
272	Intron 31	c.3756+1G>A (c.3667-3756delExon31)	p.V1223_L1252del30 Donor splice site error	Häberle et al., 2011
273	34	c.4088_4099del12	p.L1363_I1366del	Häberle et al., 2011; Kretz et al., 2012
274	Intron 34	c.4101+2T>C (c.4003_4101delExon34+c.4101_4102ins42)	p.V1335-Q1367del33+(p.Q1367_Q1368insASGLWLCA CPWSYM)	Häberle et al., 2003; Klaus et al., 2009

附表 2-A OTC 基因变异汇总

序号	外显子	密码子	氨基酸位点	氨基酸改变	变异方式	疾病类型	参考文献
1			c.-366A>G		Regulatory	Female	Luksan et al [2010]
2	Exon 1	1	c.1A>G	p.Met1Val	Missense	Female	Oppliger Leibundgut et al [1995]
3		1	c.1A>T	p.Met1Leu	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
4		1	c.2T>C	p.Met1Thr	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
5		1	c.3G>A	p.Met1Ile	Missense	Female	Climent and Rubio [2002b]
6		9	c.25T>G	p.Leu9*	Nonsense	Neonatal	Kim et al. [2006]
7		10,11	c.28_31delAACA	p.Asn10_Asn11	Frameshift	Female	Yamaguchi et al [2006]
8		10	c.29dupA	p.fsX	Frameshift	Female	Yamaguchi et al [2006]
9		14	c.40delT	p.Phe14Leufs	Frameshift	Neonatal	Hwu et al. [2003]
10		18	c.53delA	p.His18Profs	Frameshift	Neonatal	Tuchman et al. [2002]
11		23	c.67C>T	p.Arg23*	Nonsense	Neonatal	Grompe et al [1991]
12		26	c.77G>A	p.Arg26Gln	Missense	Neonatal	Grompe et al [1989]
13		26	c.77G>C	p.Arg26Pro	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
14	Intron 1		c.77+1G>T		Splice site error	Female	Tuchman et al. [1997]
15			c.77+1G>A		Splice site error	Female	Yamaguchi et al [2006]
16			c.77+2dupT		Splice site error	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
17			c.77+3_6delAAGT		Splice site error	Female	Tuchman et al. [2002]
18			c.77+4A>C		Splice site error	Neonatal	Hoshida et al [1996]
19			c.77+5G>A		Splice site error	Neonatal	Tuchman et al. [1997]
20			c.78-3C>G		Splice site error	Female	Bisanzi et al [2002]
21			c.78-1G>C		Splice site	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]

				error			
22	Exon 2	32	c.94C>T	p.Gln32*	Nonsense	Female	Opplinger Leibundgut et al [1995]
23		34	c.102dupA		Frameshift	Neonatal	Shao et al [2017]
24		35	c.103insA	p.Val355SerfsX7	Frameshift	Late	Shao et al [2017]
25		36	c.106C>T	p.Gln36*	Nonsense	Female	Genet et al [2000]
26		39	c.115G>T	p.Gly39Cys	Missense	Late	Calvas et al [1998]
27		39	c.116G>A	p.Gly39Asp	Missense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
28		39	c.116G>T	p.Gly39Val	Missense	No Information	Zheng et al [2020]
29		40	c.118C>T	p.Arg40Cys	Missense	Late	Opplinger Leibundgut et al [1995]
30		40	c.119G>A	p.Arg40His	Missense	Late	Tuchman et al. [1994b]
31		40	c.119G>T	p.Arg40Leu	Missense	Late	Cavicchi et al [2014]
32		41	c.122A>G	p.Asp41Gly	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
33		43	c.126_128delTCT	p.Leu43del	In frame indel	Neonatal	Storkanova et al [2013]
34		43	c.127C>T	p.Leu43Phe	Missense	Female	Opplinger Leibundgut et al [1997]
35		44	c.131C>T	p.Thr44Ile	Missense	Female	Yoo et al [1996]
36		45	c.133C>G	p.Leu45Val	Missense	Female	Tuchman et al. [1998]
37		45	c.134T>C	p.Leu45Pro	Missense	Neonatal	Grompe et al [1989]
38		45	c.135dupA	p.fsX	Frameshift	Female	Yamaguchi et al [2006]
39		45-47	c.135delA	p.Asn47Thrfs	Frameshift	Neonatal	Calvas et al [1998]
40		46	c.137A>G	p.Lys46Arg	Missense	Neonatal	Wang et al [2019]
41		47	c.140_141insG	p.Asn47delinsLysLeufs	Frameshift	Neonatal	Shimadzu et al [1998]
42		47	c.140A>T	p.Asn47Ile	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [1997]
43		47	c.140A>C	p.Asn47Thr	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
44		48	c.143T>C	p.Phe48Ser	Missense	Female	Genet et al [2000]
45		49	c.145A>C	p.Thr49Pro	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
46		50	c.148G>A	p.Gly50Arg	Missense	Late	Tuchman et al. [1997]
47		50	c.148G>T	p.Gly50*	Nonsense	Female	Feldmann et al [1992]

48		c.154G>A	p.Glu52Lys	Missense	Neonatal	McCullough et al [2000]
49		c.154G>T	p.Glu52*	Nonsense	Female	McCullough et al [2000]
50		c.155A>G	p.Glu52Gly	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
51		c.156A>T	p.Glu52Asp	Missense	Late	McCullough et al [2000]
52		c.158T>C	p.Ile53Thr	Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
53		c.158T>G	p.Ile53Ser	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
54		c.163T>G	p.Tyr55Asp	Missense	Late	Nishiyori et al [1998]
55		c.164A>G	p.Tyr55Cys	Missense	Neonatal	Prasad et al [2018]
56		c.167T>C	p.Met56Thr	Missense	Late	Tuchman et al. [1997]
57		c.170T>A	p.Leu57Gln	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
58		c.170T>C	p.Leu57Pro	Missense	No Information	Choi et al [2015]
59		c.174G>A	p.Trp58*	Nonsense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
60		c.176T>G	p.Leu59Arg	Missense	Late	Azevedo et al [2006]
61		c.176T>G	p.Leu59Pro	Missense	No Information	傅大林等 [2017]
62		c.179C>T	p.Ser60Leu	Missense	Female	Tuchman et al. [1997]
63		c.184G>C	p.Asp62His	Missense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
64		c.185A>G	p.Asp62Gly	Missense	Female	Caldovic et al [2015]
65		c.188T>C	p.Leu63Pro	Missense	Female	Oppliger Leibundgut et al [1997]
66		c.200T>G	p.Ile67Arg	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
67		c.205C>T	p.Gln69*	Nonsense	Female	Climent et al [1999]
68		c.209_210delAA	p.Lys70Argfs*	Frameshift	No Information	Chongsrisawat et al [2018]
69		c.214G>T	p.Glu72*	Nonsense	No Information	Marquetand et al [2020]
70	Intron 2	c.216+1G>A		Splice site error	Late	Oppliger Leibundgut et al [1996a]
71		c.216+1G>T		Splice site error	Late	Azevedo et al [2002]
72		c.217-1G>A		Splice site error	Neonatal	Tuchman et al. [1992]
73	Exon 3	c.219T>G	p.Tyr73*	Nonsense	Neonatal	Storkanova et al [2013]
74		c.221G>A	p.Lys221Lys	Missense	Late	Fujisawa et al [2015]

75												
76	c.227T>C	p.Leu76Ser	Missense	Neonatal	Genet et al [2000]							
77	c.231G>C	p.Leu77Phe	Missense	Neonatal	Shao et al [2017]							
77	c.231G>T	p.Leu77Phe	Missense	Late	McCullough et al [2000]							
78	c.232C>T	p.Gln78*	Nonsense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]							
79	c.236G>A	p.Gly79Glu	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [1992]							
80	c.238A>G	p.Lys80Glu	Missense	Female	Schultz and Salo [2000]							
81	c.240G>T	p.Lys80Asn	Missense	Late	Galloway et al [2000]							
82	c.243_245delCTT	p.Leu244del	In frame indel	Female	Tuchman et al. [1995]							
83	c.245T>G	p.Leu82*	Nonsense	Female	Tuchman et al. [2002]							
84	c.245T>A	p.Leu82*	Nonsense	Neonatal	Caldovic et al [2015]							
85	c.245_246delTAinsAG		Frameshift	Neonatal	Ali et al [2018]							
86	c.248G>A	p.Gly83Asp	Missense	Neonatal	Bartholomew and McClellan [1998]							
87	c.256dupT	p.fsX	Frameshift	Neonatal	Caldovic et al [2015]							
88	c.258dupT		Frameshift	Neonatal	Caldovic et al [2015]							
89	c.264A>T	p.Lys88Asn	Missense	Late	Reish et al [1993]							
90	c.268A>G	p.Ser90Gly	Missense	Female	Takanashi et al [2002]							
91	c.269G>A	p.Ser90Asn	Missense	Neonatal	McCullough et al [2000]							
92	c.270T>G	p.Ser90Arg	Missense	Female	Tuchman et al. [1998]							
93	c.271delA	p.Thr91Leufs	Frameshift	Female	Genet et al [2000]							
94	c.274C>G	p.Arg92Gly	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]							
95	c.274C>T	p.Arg92*	Nonsense	Neonatal	Gronpe et al [1991]							
96	c.275G>T	p.Arg92Leu	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]							
97	c.275G>A	p.Arg92Gln	Missense	Neonatal	Gronpe et al [1991]							
98	c.275G>C	p.Arg92Pro	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]							
99	c.277A>G	p.Thr93Ala	Missense	Late	Tuchman and Plante [1995]							
100	c.281G>C	p.Arg94Thr	Missense	Late	Tuchman et al. [1992]							
101	c.284T>C	p.Leu95Ser	Missense	Late	McCullough et al [2000]							
102	c.286T>C	p.Ser96Pro	Missense	No Information	Ali et al [2018]							

103		98	c.292G>A	p.Glu98Lys	Missense	Female	Bisanzi et al [2002]
104	Intron 3		c.298+1G>A		Splice site error	Neonatal	Garcia-Perez et al [1995]
105			c.298+1G>T		Splice site error	Late	Yamaguchi et al [2006]
106			c.298+1_5delGTAAG		Splice site error	Female	Tuchman et al. [1997]
107			c.298+2T>G		Splice site error	Female	Yu et al [2019]
108			c.298+5G>C		Splice site error	Female	Yamaguchi et al [2006]
109			c.299-8T>A		Splice site error	Late	Caldovic et al [2015]
110			c.299-7A>G		Splice site error	Neonatal	Caldovic et al [2015]
111	Exon 4	100	c.298G>C	Gly100Arg	Missense	Late	Kim et al. [2006]
112		100	c.299G>A	p.Gly100Asp	Missense	Female	Oppliger Leibundgut et al [1997]
113		102	c.304G>C	pAla102Pro	Missense	Neonatal	Storkanova et al [2013]
114		102	c.305C>A	p.Ala102Glu	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [1997]
115		105	c.314G>T	p.Gly105Val	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
116		105	c.314G>A	p.Gly105Glu	Missense	Late	Cavicchi et al [2014]
117		106	c.316G>A	p.Gly106Arg	Missense	Female	McCullough et al [2000]
118		106	c.317G>A	p.Gly106Glu	Missense	Female	Takanashi et al [2002]
119		106	c.317G>T	p.Gly106Val	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
120		109	c.325T>C	p.Cys109Arg	Missense	No Information	Caldovic et al [2015]
121		109	c.327T>C	p.Cys109Arg	Missense	Female	Caldovic et al [2015]
122		109-110	c.327delT	p.Cys109Cysfsx	Frameshift	Neonatal	Calvas et al [1998]
123		111	c.332T>C	p.Leu111Pro	Missense	No Information	Grompe et al [1989]
124		114	c.341-342delAA	p.fsX	Frameshift	Female	Azevedo et al [2006]
125		117	c.350A>G	p.His117Arg	Missense	Late	Matsuura and Matsuda [1998]

126	117	c.350A>T	p.His117Leu	Missense	Late	Tuchman et al. [1994a]
127	120	c.358_359delGT	p.Val120Glufs	Frameshift	Female	Yamaguchi et al [2006]
128	122	c.364_365insTT	p.Glu122delinsValLysfs	Frameshift	Female	Yamaguchi et al [2006]
129	125	c.374C>T	p.Thr125Met	Missense	Neonatal	Gilbert-Dussardier et al [1996]
130	125	c.375delG	p.Thr125Thrfs	Frameshift	Female	Yamaguchi et al [2006]
131	126	c.377A>G	p.Asp126Gly	Missense	Neonatal	Matsuura et al [1994]
132	129	c.386G>C	p.Arg129Pro	Splice site error	Female	Yamaguchi et al [2006]
133	129	c.386G>A	p.Arg129His	Splice site error	Late	Tuchman et al. [1994b]
134	129	c.386G>T	p.Arg129Leu	Splice site error	Late	Strautnieks and Malcolm [1993]
135	129	c.385C>T	p.Arg129Cys	Splice site error	No Information	Shchlechkov et al [2009]
136	Intron 4	c.386+1G>T		Splice site error	Late	Yamaguchi et al [2006]
137		c.386+1G>A		Splice site error	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
138		c.386+1G>C		Splice site error	Female	Ogino et al [2007]
139		c.386+2T>C		Splice site error	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
140		c.386+4delT		Splice site error	Late	Mohamed et al [2015]
141		c.386+5G>A		Splice site error	Neonatal	Caldovic et al [2015]
142		c.387-2A>T		Splice site error	Neonatal	Carstens et al [1991]
143		c.387-2A>C		Splice site error	Neonatal	McCullough et al [2000]
144		c.387-2A>G		Splice site error	Neonatal	McCullough et al [2000]
145	Exon 5	c.390_391insTTA	p.Val130_Leu131insLeu	In frame	Female	Tuchman et al. [2002]



	indel				
146		p.Leu131Ser	Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
147	c.392T>C	p.Ser132Pro	Missense	Late	Bisanzi et al [2002]
148	c.394T>C	p.Ser132Phe	Missense	Late	Gyato et al [2004]
149	c.395C>T	p.Ala135Glnfs	Frameshift	Neonatal	Tuchman et al. [1992]
150	c.403delG	p.Ala135Glu	Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
151	c.404C>A	p.Asp136Val	Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
152	c.407A>T	p.Ala137Pro	Missense	Female	Azevedo et al [2006]
153	c.409G>C	p.Ala137Thr	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
154	c.409G>A	p.Leu139Ser	Missense	Female	Tuchman et al. [1997]
155	c.416T>C	p.Ala140Pro	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
156	c.418G>C	pAla140Asp	Missense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
157	c.419C>A	p.Arg141Gly	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
158	c.421C>G	p.Arg141*	Nonsense	Neonatal	Hata et al [1989]
159	c.421C>T	p.Arg141Gln	Missense	Neonatal	Maddalena et al [1988b]
160	c.422G>A	p.Arg141Pro	Missense	Female	Tuchman et al. [1997]
161	c.422G>C	p.Val142Glu	Missense	Late	Tuchman et al. [2002]
162	c.425T>A	p.Tyr143*	Nonsense	No Information	Makhtar et al [2013]
163	c.429T>A	p.Lys144*	Nonsense	Female	Tuchman and Plante [1995]
164	c.430A>T	p.Ser146*	Nonsense	Neonatal	Genet et al [2000]
165	c.437C>G	p.Leu148Ser	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
166	c.443T>C	p.Leu148Trp	Missense	Female	McCullough et al [2000]
167	c.443T>G	p.Leu148Phe	Missense	Female	Komaki et al [1997]
168	c.444G>C	p.Leu148Phe	Missense	Female	Matsuura and Matsuda [1998]
169	c.444G>T				
170	c.449delC	p.fsX	Frameshift	Female	Tuchman et al. [2002]
171	c.452T>G	p.Leu151Arg	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
172	c.455C>T	p.Ala152Val	Missense	Late	Kogo et al [1998]
173	c.460G>T	p.Glu154*	Nonsense	Neonatal	Grompe et al [1989]

173	c.461_471del	154	p.Glu154Alafs*18	Frameshift	Neonatal	Storkanova et al [2013]
174	c.463G>T	155	p.Ala155Ser	Missense	Female	Tuchman et al. [2002]
175	c.463G>C	155	p.Ala155Pro	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
176	c.464C>A	155	p.Ala155Glu	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
177	c.472C>T	158	p.Pro158Ser	Missense	Late	Storkanova et al [2013]
178	c.476T>C	159	p.Ile159Thr	Missense	Late	Garcia-Perez et al [1995]
179	c.477T>G	159	p.Ile159Met	Missense	Late	Ben-Ari et al [2010]
180	c.479T>G	160	p.Ile160Ser	Missense	Female	Ciliment and Rubio [2002b]
181	c.479T>A	160	p.Ile160Asn	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
182	c.479T>C	160	p.Ile160Thr	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
183	c.481A>G	161	p.Asn161Asp	Missense	Neonatal	Genet et al [2000]
184	c.482A>G	161	p.Asn161Ser	Missense	Neonatal	Tuchman and Plante [1995]
185	c.483T>A	161	p.Asn161Lys	Missense	Female	Takanashi et al [2002]
186	c.483T>G	161	p.Asn161Lys	Missense	Female	Takanashi et al [2002]
187	c.484G>C	162	p.Gly162Arg	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
188	c.484G>A	162	p.Gly162Arg	Missense	Neonatal	Feldmann et al [1992]
189	c.485G>A	162	p.Gly162Glu	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
190	c.490T>C	164	p.Ser164Pro	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
191	c.491C>G	164	p.Ser164*	Nonsense	Female	Matsuda and Tanase [1997]
192	c.493G>T	165	p.Asp165Tyr	Missense	Late	Genet et al [2000]
193	c.501C>A	167	p.Tyr167*	Nonsense	Neonatal	Garcia-Perez et al [1995]
194	c.501C>G	167	p.Tyr167*	Nonsense	Neonatal	Shimadzu et al [1998]
195	c.503A>C	168	p.His168Pro	Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
196	c.503A>G	168	p.His168Arg	Missense	Female	Vella et al [1996]
197	c.504T>A	168	p.His168Gln	Missense	Late	Tuchman et al. [1997]
198	c.505C>G	169	p.Pro169Ala	Missense	Female	Tuchman et al. [2002]
199	c.506C>T	169	p.Pro169Leu	Missense	Neonatal	Genet et al [2000]
200	c.506C>A	169	p.Pro169His	Missense	Female	Caldovic et al [2015]
201	c.513G>T	171	p.Gln171His	Missense	No Information	Ali et al [2018]
202	c.514A>T	172	p.Ile172Phe	Missense	Female	Ciliment et al [1999]

203	172	c.515T>A	Ile172Asn	Missense	Late	Ogino et al [2007]
204	172	c.516C>G	p.Ile172Met	Missense	Neonatal	Matsuura et al [1994]
205	174	c.520G>C	p.Ala174Pro	Missense	Female	Tsai et al [1993]
206	175	c.524A>G	p.Asp175Gly	Missense	Late	Genet et al [2000]
207	175	c.524A>T	p.Asp175Val	Missense	Female	Tuchman et al. [1997]
208	176	c.526T>C	p.Tyr176His	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [2002]
209	176	c.527A>G	p.Tyr176Cys	Missense	Late	Oppliger Leibundgut et al [1996b]
210	176	c.527A>C	p.Tyr176Leu	Missense	Female	Azevedo et al [2006]
211	178	c.533C>T	p.Thr178Met	Missense	Neonatal	Oppliger Leibundgut et al [1995]
212	177-178	c.530_533dupTCAC	p.fsX	Frameshift	Neonatal	Gilbert-Dussadier et al [1996]
213	178-179	c.532_537delACGCTC	p.Thr178_Leu179del	In frame indel	Neonatal	Shimadzu et al [1998]
214	179	c.535C>T	p.Leu179Phe	Missense	Late	Fantur et al [2013]
215	179	c.536T>C	p.Leu179Pro	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
216	180	c.538C>T	p.Gln180*	Nonsense	Neonatal	Caldovic et al [2015]
217	180	c.539A>C+540G>C	p.Gln180Pro	Missense	Neonatal	Hübner et al [2001]
218	180	c.540G>C	p.Gln180His	Splice site error	Neonatal	Tuchman et al. [1997]
219	Intron 5	c.540+1G>C		Splice site error	Neonatal	Oppliger Leibundgut et al [1996b]
220		c.540+1G>A		Splice site error	Neonatal	Larovere,et al [2018]
221		c.540+2T>C		Splice site error	Neonatal	Matsuura et al [1995]
222		c.540+2T>A		Splice site error	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
223		c.541-2A>G		Splice site error	Neonatal	Genet et al [2000]
224		c.540+265G>A		Splice site error	Late	Ogino et al [2007]

					Splice site error	No Information	Shchlechkov et al [2009]
225		c.540+2T>G			Missense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
226	Exon 6	c.542A>G		p.Glu181Gly	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [1998]
227		c.545A>T		p.His182Leu	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [1994a]
228		c.547T>G		p.Tyr183Asp	Missense	Female	Oppliger Leibundgut et al [1997]
229		c.548A>G		p.Tyr183Cys	Missense	Neonatal	Reish et al [1993]
230		c.548A>T		p.Tyr183Phe	Missense	No Information	Gao et al [2015]
231		c.557T>C		p.Leu186Pro	Missense	Female	Azevedo et al [2006]
232		c.561delA		p.Gln188fs	Frameshift	Female	Caldovic et al [2015]
233		c.562G>C		p.Gly188Arg	Missense	Neonatal	Gilbert-Dussadier et al [1996]
234		c.562-563delGG		p.Gly188SfsX36	Frameshift	No Information	Shchlechkov et al [2009]
235		c.563G>T		p.Gly188Val	Missense	Female	Climent et al [1999]
236		c.563G>C		p.Gly188Ala	Missense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
237		c.568delA		p.T190PfsX16	Frameshift	No Information	Shchlechkov et al [2009]
238		c.571C>T		p.Leu191Phe	Missense	Late	Climent and Rubio [2002b]
239		c.571delC		p.Leu191SerfsX15	Frameshift	Neonatal	Kim et al. [2006]
240		c.572T>G		p.Leu191Arg	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
241		c.576C>G		p.Ser192Arg	Missense	Neonatal	Matsuura et al [1993]
242		c.577T>C		p.Trp193Arg	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
243		c.577T>G		p.Trp193Gly	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
244		c.578G>A		p.Trp193*	Nonsense	Neonatal	Shimadzu et al [1998]
245		c.579G>C		p.Trp193Cys	Missense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
246		c.581T>C		p.Ile194Thr	Missense	Late	Caldovic et al [2015]
247		c.583G>A		p.Gly195Arg	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [1994b]
248		c.583delG		p.Asp196Metfs	Frameshift	Female	Climent and Rubio [2002b]
249		c.584G>C		p.Gly195Ala	Missense	Neonatal	Laemmle et al [2016]
250		c.586G>A		p.Asp196Asn	Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
251		c.586G>T		p.Asp196Tyr	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [1998]
252		c.586G>C		p.Asp196His	Missense	No Information	Lin et al [2010]

253	196	c.587A>T	p.Asp196Val	Missense	Neonatal	Matsuura et al [1993]
254	197	c.589G>A	p.Gly197Arg	Missense	Female	Climent et al [1999]
255	197	c.589G>T	p.Gly197Trp	Missense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
256	197	c.590G>A	p.Gly197Glu	Missense	Female	Tuchman et al. [1998]
257	197	c.591C>A	p.Leu201Met	Missense	Late	Shao et al [2017]
258	198	c.593A>T	p.Asn198Ile	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
259	198	c.594C>A	p.Asn198Lys	Missense	Female	Popowska et al [1999]
260	199	c.595A>C	p.Asn199His	Missense	No Information	Ali et al [2018]
261	199	c.595A>G	p.Asn199Asp	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
262	199	c.596A>G	p.Asn199Ser	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [2002]
263	199-200	c.(597_598)delTA	p.fsX	Frameshift	Neonatal	Tuchman et al. [1994b]
264	201	c.602T>C	p.Leu201Pro	Missense	Neonatal	Shimadzu et al [1998]
265	202	c.604C>T	p.His202Tyr	Missense	Late	Tuchman et al. [1997]
266	202	c.605A>C	p.His202Pro	Missense	Female	Staudt et al [1998]
267	203	c.608C>G	p.Ser203Cys	Missense	Female	Tuchman et al. [1994a]
268	205	c.613A>G	p.Met205Val	Missense	Neonatal	Genet et al [2000]
269	205	c.614T>C	p.Met205Thr	Missense	Neonatal	Kim et al. [2006]
270	206	c.617T>G	p.Met206Arg	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [1997]
271	206	c.618G>C	p.Met206Ile	Missense	Female	Climent and Rubio [2002b]
272	207	c.620G>A	p.Ser207Asn	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
273	207	c.621C>A	p.Ser207Arg	Missense	Neonatal	Shimadzu et al [1998]
274	208	c.622G>A	p.Ala208Thr	Missense	Late	van Diggelen et al [1996]
275	208	c.626C>A	p.Ala209Glu	Missense	No Information	Bailly et al [2015]
276	209	c.626C>T	p.Ala209Val	Missense	Neonatal	Garcia-Perez et al [1995]
277	210	c.628A>C	p.Lys210Glu	Missense	Female	Storkanova et al [2013]
278	210	c.630A>C	p.Lys210Asn	Missense	Female	Azevedo et al [2006]
279	210	c.628A>C	p.Lys210Gln	Missense	Female	Valik et al [2004]
280	213	c.637T>A	p.Met213Lys	Missense	Female	Opplinger Leibundgut et al [1997]

281	213	c.637T>C	p.Met213Thr	Missense	Female	Caldovic et al [2015]
282	213	c.638T>G	p.Met213Arg	Missense	No Information	Caldovic et al [2015]
283	213	c.638T>C	p.Met213Thr	Missense	No Information	Ali et al [2018]
284	214	c.640C>T	p.His214Tyr	Missense	Neonatal	Yoo et al [1996]
285	215	c.643C>T	p.Leu215Phe	Missense	Female	Ueta et al [2001]
286	215-216	c.645_646insT	p.Gln216delinsSerGlyfs	Frameshift	Neonatal	Tuchman et al. [1994a]
287	216	c.646C>G	p.Gln216Glu	Missense	Neonatal	Grompe et al [1989]
288	217	c.650C>A	p.Ala217Glu	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
289	218	c.653C>T	p.Ala218Val	Missense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
290	220	c.658C>G	p.Pro220Ala	Missense	Late	Oppliger Leibundgut et al [1996b]
291	220	c.658C>T	p.Pro220Ser	Missense	Female	Yu et al [2019]
292	220	c.659C>T	p.Pro220Leu	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
293	221	c.663G>C	p.Lys221Asn	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
294	221	c.663G>A	p.Lys221Lys	Splice	Late	Shimadzu et al [1998]
295	Intron 6	c.663+1G>A		Splice site error	Female	Tuchman et al. [1997]
296		c.663+1G>T		Splice site error	Female	Oppliger Leibundgut et al [1996a]
297		c.663+1delG		Splice site error	No Information	Shchlechkov et al [2009]
298		c.663+2T>C		Splice site error	Neonatal	Tuchman et al. [1997]
299		c.663+2T>G		<b>Splice site error</b>	<b>Neonatal</b>	本文
300		c.663+2dupT		Splice site error	Female	Tuchman and Plante [1995]
301		c.664-1G>A		Splice site error	Neonatal	Tuchman et al. [2002]
302		c.664-1delG	p.fsX	Frameshift	Female	Tuchman et al. [1997]
303	Exon 7	c.664-667delinsAC	p.Gly222Thrfs*2	Frameshift	Neonatal	Lee et al [2014]

304		224	c.670G>T	p.Glu224*	Nonsense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
305		225	c.673C>A	p.Pro225Thr	Missense	Late	Tuchman et al. [1994b]
306		225	c.674C>G	p.Pro225Arg	Missense	Neonatal	Garcia-Perez et al [1997]
307		225	c.674C>T	p.Pro225Leu	Missense	Neonatal	Hentzen et al [1991]
308		233	c.697delG		Frameshift	No Information	Larovere et al [2018]
309		233	c.698C>T	p.Ala233Val	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
310		234	c.700G>T	p.Glu234*	Nonsense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
311		239	c.716A>T	p.Glu239Val	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
312		239	c.716A>G	p.Glu239Gly	Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
313		239	c.717G>C	p.Glu239Asp	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
314		239	c.717G>A	p.Glu239Glu	Splice site error	Female	Tuchman et al. [1997]
315	Intron 7		c.717+1G>T		Splice site error	Female	Tuchman et al. [2002]
316			c.717+1G>A		Splice site error	Neonatal	Genet et al [2000]
317			c.717+2T>C		Splice site error	Neonatal	Carstens et al [1991]
318			c.717+3A>G		Splice site error	Neonatal	Carstens et al [1991]
319			c.717+7_22delTCTTT ACATGTAAAGC		Splice site error	Neonatal	Calvas et al [1998]
320			c.718-2A>G		Splice site error	Female	Popowska et al [1999]
321			c.718-4_729delCTAG AATGGTACCAAG		Splice site error	Female	Yamaguchi et al [2006]
322	Exon 8	242	c.725C>T	p.Thr242Ile	Missense	Late	Tuchman et al. [1997]
323		244	c.731T>A	p.Leu244Gln	Missense	Late	Calvas et al [1998]
324		247	c.740C>A	p.Thr247Lys	Missense	Neonatal	Tuchman and Plante [1995]
325		244-247	c.731_739delTGTGCTGA		In frame indel	Female	Calvas et al [1998]

326		c.746A>G	p.Asp249Gly	Missense	Neonatal	Kim et al. [2006]
327		c.749C>T	p.Pro250Leu	Missense	Late	Caldovic et al [2015]
328		c.757G>A	p.Ala253Thr	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
329		c.757G>C	p.Ala253Pro	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
330		c.759delA	p.fsX	Frameshift	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
331		c.760A>T	p.Ala254	Nonsense	Female	Caldovic et al [2015]
332		c.761C>A	<b>p. A254E</b>	<b>Missense</b>	<b>Neonatal</b>	<b>本文</b>
333		c.764A>C	p.His255Pro	Missense	Female	Tuchman et al. [1998]
334		c.773_790delATGTAT TAATTACAGACA		In frame indel	Neonatal	Bijarnia-Mahay et al [2018]
335		c.779T>C	p.Leu260Ser	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
336		c.780_781insCAGGC AGTGT		Frameshift	No Information	Song et al [2016]
337		c.782T>C	p.Ile261Thr	Missense	No Information	Li et al [2018]
338		c.784dupA	p.Thr262AsnfsTer	Frameshift	Neonatal	易丽君等 [2018]
339		c.784_792dupACAGA CACT		Frameshift	Neonatal	Caldovic et al [2015]
340		c.785C>A	p.Thr262Lys	Missense	Late	Giorgi et al [2000]
341		c.785C>T	p.Thr262Ile	Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
342		c.787G>A	p.Asp263Asn	Missense	Female	Tuchman et al. [1997]
343		c.788A>G	p.Asp263Gly	Missense	Female	Tuchman et al. [1998]
344		c.790A>G	p.Thr264Ala	Missense	Late	Matsuura et al [1993]
345		c.791C>A	p.Thr264Asn	Missense	No Information	Hwu et al. [2003]
346		c.791C>T	p.Thr264Ile	Missense	Late	Shimadzu et al [1998]
347		c.793T>C	p.Trp265Arg	Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
348		c.794G>T	p.Trp265Leu	Missense	Late	Giorgi et al [2000]
349		c.795G>A	p.Trp265*	Nonsense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
350	265-268	c.796_805del	p.Ile265_Gly268delinsA sfsX19	Frameshift	Neonatal	Kim et al. [2006]
351	267	c.799A>C	p.Ser267Arg	Missense	Female	Shimadzu et al [1998]
352	267	c.799dupA		Missense	Neonatal	Choi et al [2015]



353	268	c.802A>G	p.Met268Val	Missense	No Information	Jamroz et al [2013]
354	268	c.803T>C	p.Met268Thr	Missense	Late	Matsuura et al [1993]
355	269	c.805G>A	p.Gly269Arg	Missense	No Information	Shao et al [2017]
356	269	c.806G>A	p.Gly269Glu	Missense	Neonatal	Zimmer et al [1995]
357	270	c.808C>T	p.Gln270*	Nonsense	Neonatal	McCullough et al [2000]
358	270	c.809A>C	p.Gln270Pro	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
359	270	c.809A>G	p.Gln270Arg	Missense	No Information	Wang et al [2019]
360	271-272	c.810_811delAGinsC	p.fsX	Frameshift	Neonatal	Khoo et al [1999]
361	272-273	c.817_819delGAG	p.Glu273del	In frame indel	Late	Segues et al [1996]
362	273	c.818delA	p.Glu273Glyfs	Frameshift	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
363	277	c.829C>T	p.Arg277Trp	Missense	Late	Finkelstein et al [1990a]
364	277	c.830G>A	p.Arg277Gln	Missense	Late	Tuchman et al. [1994b]
365	277	c.830G>T	p.Arg277Leu	Missense	Late	Tuchman et al. [2002]
366	278-280	c.834_840delCCAGG CT	p.Gln279fs	In frame indel	Late	Lee et al [2018]
367	279	c.835C>T	p.Gln279*	Nonsense	Neonatal	Tuchman et al. [2002]
368	281	c.842T>C	p.Phe281Ser	Missense	Neonatal	Kim et al. [2006]
369	282	c.846A>G	p.Asp249Gly	Missense	No Information	Choi et al [2015]
370	283	c.850T>A	p.Tyr284Asn	Missense	No Information	Chongrisawat et al [2018]
371	284	c.852C>G	p. Tyr284	Nonsense	Late	Wu et al [2018]
372	284	c.853delC	p.Phe284fsX38	Frameshift	Neonatal	Kim et al. [2006]
373	285	c.853C>T	p.Gln285*	Nonsense	Female	Storkanova et al [2013]
374	286-289	c.867G>Ar.856_867de IGTTACAATGAG	p.Val286_Lys289del	In frame indel	Late	Storkanova et al [2013]
375	287	c.859A>C	p.Thr287Pro	Missense	No Information	Caldovic et al [2015]
376	287	c.860A>C	p.Thr287Pro	Missense	Female	This Report
377	287	c.860C>T	p.Thr287Ile	Missense	Late	Laemmle et al [2016]
378	287	c.861insAC	p.fsX	Frameshift	Female	Caldovic et al [2015]
379	289	c.867G>C	p.Lys289Asn	Missense	Neonatal	Caldovic et al [2015]
380	289	c.867G>T	p.Lys289Asn	Missense	Neonatal	McCullough et al [2000]

381	Intron 8	c.867+1G>A		Splice site error	Neonatal	Tuchman et al. [1998]
382		c.867+1G>T		Splice site error	Neonatal	Oppliger Leibundgut et al [1996a]
383		c.867+1126A>G		Splice site error	Late	Engel et al [2008]
384		c.868-3T>C		Splice site error	Late	Lee et al [2014]
385	Exon 9	c.875delA	p.Val293Leufs	Frameshift	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
386		c.882delT	p.Ala295Profs	Frameshift	Neonatal	Reish et al [1993]
387		c.889G>T	p.Aso297Tyr	Missense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
388		c.889_892delGACT	p.fsX	Frameshift	Neonatal	Yamanouchi et al [2002]
389		c.892_893delTG	p.Trp298Aspfs	Frameshift	Female	Schimanski et al [1996]
390		c.892T>C	p.Trip298Arg	Missense	Female	Caldovic et al [2015]
391		c.893G>C	p.Trp298Ser	Missense	Neonatal	Ensenauer et al [2005]
392		c.898delT	p.300Phefs	Frameshift	No Information	刘宁等 [2020]
393		c.902T>C	p.Leu301Ser	Missense	Female	Caldovic et al [2015]
394		c.903A>T	p.Leu301Phe	Missense	Late	Ciliment and Rubio [2002b]
395		c.904C>T	p.His302Tyr	Missense	Neonatal	Oppliger Leibundgut et al [1996b]
396		c.905A>G	p.His302Arg	Missense	Neonatal	Genet et al [2000]
397		c.905A>T	p.His302Leu	Missense	Female	Gilbert-Dussadier et al [1996]
398		c.906C>G	p.His302Gln	Missense	Late	Tuchman et al. [1997]
399		c.906delC	p.Cys303Alafs	Frameshift	Female	Yamaguchi et al [2006]
400		c.907T>C	p.Cys303Arg	Missense	Neonatal	Calvas et al [1998]
401		c.907T>G	p.Cys303Gly	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [2002]
402		c.908G>A	p.Cys303Tyr	Missense	Female	Tuchman et al. [1997]
403		c.912G>T	p.Leu304Phe	Missense	Late	Tuchman et al. [1992]
404		c.913C>T	p.Pro305Ser	Missense	No Information	Im et al [2018]
405		c.914C>G	p.Pro305Arg	Missense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]

406						Missense	Female	Climent and Rubio [2002b]
407	c.914C>A	305	p.Pro305His			Nonsense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
408	c.916A>T	306	p.Arg306*			Missense	No Information	Guo et al [2018]
409	c.916A>G	306	p.Arg306Gly			Missense	No Information	Meng et al [2013]
410	c.917G>C	306	p.Arg306Thr			In frame indel	Late	Tuchman et al. [1994b]
411	c.(925-927)delGAA	309-310	p.Glu309del			Missense	Neonatal	Navarrete et al [2019]
412	c.928G>A	310	p.Glu310Lys			Nonsense	Neonatal	Reish et al [1993]
413	c.928G>T	310	p.Glu310*			In frame indel	Late	Storkanova et al [2013]
414	c.929_931delAAG	310	p.Glu310del			Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
415	c.929A>G	310	p.Glu310Gly			Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
416	c.931G>A	311	p.Val311Met			Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
417	c.932T>A	311	p.Val311Glu			Missense	Neonatal	Caldovic et al [2015]
418	c.940_942delGAA	314	p.Glu314del			In frame indel	Female	Yamaguchi et al [2006]
419	c.943G>T	315	p.Val315Phe			Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
420	c.944T>A	315	p.Val315Asp			Missense	Female	Tuchman et al. [2002]
421	c.944T>G	315	p.Val315Gly			Missense	Female	Tuchman et al. [2002]
422	c.947T>C	316	p.Phe316Ser			Missense	Female	Tuchman et al. [2002]
423	c.953C>T	318	p.Ser318Phe			Missense	Female	Genet et al [2000]
424	c.958C>T	320	p.Arg320*			Nonsense	Neonatal	Yoo et al [1996]
425	c.959G>T	320	p.Arg320Leu			Missense	Neonatal	Grompe et al [1991]
426	c.962C>A	321	p.Ser321*			Nonsense	Neonatal	Tuchman et al. [2002]
427	c.964C>G	322	p.Leu322Val			Missense	Female	Caldovic et al [2015]
428	c.965T>C	322	p.Leu322Pro			Missense	No Information	Shchlechkov et al [2009]
429	c.967G>A	323	p.Val323Met			Missense	Late	Kim et al. [2006]
430	c.976G>A	326	p.Glu326Lys			Missense	Female	Popowska et al [1999]
431	c.982G>T	328	p.Glu328*			Nonsense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
432	c.988A>T; 989_990delGA	330	p.f.sX			Frameshift	Female	Climent and Rubio [2002b]
433	c.988A>G	330	p.Arg330Gly			Missense	Female	Tuchman et al. [1997]

433		331	c.991A>T	p.Lys331	Nonsense	Female	Yamaguchi et al [2006]
434		332	c.994T>A	p.Trp332Arg	Missense	Neonatal	Rapp et al [2001]
435		332	c.995G>A	p.Trp332*	Nonsense	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
436		332	c.996G>A	p.Trp332*	Nonsense	Neonatal	Matsuura et al [1994]
437		332	c.995G>C	p.Trp332Ser	Missense	Neonatal	Wang et al [2014]
438		335	c.1005G>A	p.Met335Ile	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [2002]
439	Intron 9		c.1005+1G>T		Splice site error	Neonatal	Tuchman et al. [1997]
440			c.1005+2T>C		Splice site error	Neonatal	Tuchman et al. [2002]
441			c.1006-3C>G		Splice site error	Late	Climent and Rubio [2002b]
442			c.1006-1G>A		Splice site error	Neonatal	Gyato et al [2004]
443			c.1005_1091C>G		Splice site error	Late	Engel et al [2008]
444	Exon 10	336	c.1006G>T	p.Ala336Ser	Missense	Late	Tuchman et al. [1998]
445		337	c.1009G>C	p.Val337Leu	Missense	Late	Matsuda and Tanase [1997]
446		339	c.1015G>C	p.Val339Leu	Missense	Neonatal	Tuchman et al. [1997]
447		339	c.1016T>G	p.Val339Gly	Missense	Neonatal	Wang et al [2014]
448		340	c.1018T>C	p.Ser340Pro	Missense	Female	Oppliger Leibundgut et al [1997]
449		341	c.1022T>C	p.Leu341Pro	Missense	Female	Climent and Rubio [2002b]
450		343	c.1028C>G	p.Thr343Arg	Missense	Neonatal	This Report
451		343	c.1028C>A	p.Thr343Lys	Missense	Female	Tuchman and Plante [1995]
452		345	c.1033T>C	p.Tyr345His	Missense	Late	Yamaguchi et al [2006]
453		345	c.1033T>G	p.Tyr345Asp	Missense	Female	Tuchman et al. [1997]
454		345	c.1034A>G	p.Tyr345Cys	Missense	Female	Caldovic et al [2015]
455		347	c.1039C>A	p.Pro347Thr	Missense	Female	Yamaguchi et al [2006]
456		347	c.1039C>T	p.Pro347Ser	Missense	Neonatal	Caldovic et al [2015]
457		347	c.1040C>T	p.Pro347Leu	Missense	Female	Caldovic et al [2015]

458	348	c.1042C>T	p.Gln348*	Nonsense	Female	Opplinger Leibundgut et al [1997]
459	348	c.1043delA	p.Gln348Argfs47	Frameshift	Female	Storkanova et al [2013]
460	348	c.1046T>C	p.Leu349Pro	Missense	Female	Caldovic et al [2015]
461	354	c.1061T>G	p.Phe354Cys	Missense	Late	Myers and Shook [1996]
462	355	c.1063T>C	p.355Glu*	Extending	Female	Caldovic et al [2015]
463	355	c.1065A>T	p.355Cys*	Extending	Late	Storkanova et al [2013]
464	378	c.1132C>T	p.Gln378*	Nonsense	No Information	Wang et al [2019]

附表 2-B OTCD 重复变异

序号	长度	重复区域	HGVS description	疾病类型	参考文献
1	approx .0.63 Mb	TSPAN7-OTC-RGPR -SRPX	-	Asymptomatic Male	Shchelochkov et al. [2009]

附表 2-C OTCD 符合重组变异

序号	长度	变异描述	HGVS description	疾病类型	参考文献
1	4.5 kb and 5.5 kb	Exon 1-4 duplication; exon 5 deletion; 3'end deletion	-	Female	Shchelochkov et al. [2009]
2	250 kb and 8.83 Mb	205 kb deletion within IL1RAPL1; GK through OTC deletion	Xp11.4p21.2	Female	Shchelochkov et al. [2009]

附表 2-D OTCD 缺失变异

序号	长度	变异描述	HGVS description	疾病类型	参考文献
1	≥10 Mb	X short arm	46,Xdel(X)(p11)	Female	Joost et al [2010]
2	≥10 Mb	NROB1	-	Female	Francke U [1984]

	through OTC				
3	≥10 Mb NROB1 through OTC	-	Neonatal	Old et al. [1985]	
4	≥10 Mb DMD through OTC	-	Neonatal	Segues et al. [1995]	
5	≥10 Mb DMD through OTC	-	Female	Climent et al. [1999]	
6	≥10 Mb MAGEB1 through OTC	-	Female	Shchelochkov et al. [2009]	
7	~5-10 Mb intron44 through OTC	-	Female	Jakubiczka et al [2007]	
8	~5-10 Mb FTHL17 through OTC	-	Female	Balasubramaniam et al [2010]	
9	~5-10 Mb GK through OTC	-	Female	Shchelochkov et al. [2009]	
10	~5-10 Mb DMD through OTC	-	Female	Shchelochkov et al. [2009]	
11	~5-10 Mb DMD through OTC exon 4	Xp11.4-21.2	Female	Wong et al. [2008]	
12	<5 Mb RPGR through OTC	-	Female	Segues et al [1995]	
13	<5 Mb TMEM through OTC	Xdel(p11.4)(21-1)	Neonatal	Deardorff et al [2008]	
14	<5 Mb RPGR through TSPAN7	-	Neonatal	Arranz et al. [2007]	
15	<5 Mb RPGR through TSPAN7	1,023,226 bp to 2,077,444 bp relative to NT_079573	Neonatal	Ono et al. [2010]	
16	<5 Mb TMEM4 through OTC		Neonatal	Shchelochkov et al. [2009]	
17	<5 Mb SRPX through OTC		Female	Shchelochkov et al. [2009]	
18	<5 Mb TSPAN7 through OTC		Neonatal	Quental et al [2009]	

19	Whole OTC gene	Exon 1-10	-	Female	Wong et al. [2008]
20	Whole OTC gene	Exon 1-10	-	Neonatal	Grompe et al [1991]
21	Whole OTC gene	Exon 1-10	-	Neonatal	Grompe et al [1991]
22	Whole OTC gene	Exon 1-10	-	Neonatal	Grompe et al [1991]
23	Whole OTC gene	Exon 1-10	-	Neonatal	Rozen et al [1986]
24	Whole OTC gene	Exon 1-10	-	Neonatal	Tuchman et al [2002]
25	Whole OTC gene	Exon 1-10	-	Neonatal	Suess et al. [1992]
26	Whole OTC gene	Exon 1-10	-	Female	Shchelochkov et al. [2009]
27	Whole OTC gene	Exon 1-10	-	Female	Shchelochkov et al. [2009]
28	Whole OTC gene	Exon 1-10	-	Neonatal	Yamaguchi et al [2006]
29		Exon 1-10	g.1276_445398delins 63	Neonatal	Storkanova et al. [2013]
30	119 kb	RPR3 through OTC exon 1	arr Xp11.4(37982502- 38102292)x1	Female and Neonatal	Quintero-Rivera et al. [2010]
31		Exon 1	-	Female	Lee et al. [2014]

32	Exons 1-3	-	Neonatal	Tuchman et al. [1997]
33	>24 kb	-	Female	Shechelochkov et al. [2009]
34	>27.9 kb	-	Female	Shechelochkov et al. [2009]
35	Exons 1-5	-	Female	Azevedo et al. [2006]
36	Exons 1-8	-	Neonatal	Yamaguchi et al. [2006]
37	Exons 1-9	-	Neonatal	Yamaguchi et al. [2006]
38	15,921 bp	c.78-3544_217-126del 15921	Female	Quental et al. [2009]
39	Exons 2-4	-	Female	Yamaguchi et al. [2006]
40	Exons 2-4	c.77+6024_c.216+474 del9095	Neonatal	Engel et al. [2008]
41	Exon 3	-	Neonatal	Yamaguchi et al. [2006]
42	42,235b p	chrX:38229039-3827 1274	Neonatal	本文
43	35,832 bp	c.298+8029_c.1--5+1 740del35,832	Female	Engel et al. [2008]
44	Exons 4-10	-	Neonatal	Yamaguchi et al. [2006]
45	Exons 5-6	g.42940_52876delins T	Neonatal	Storkanova et al. [2013]
46	Exons 5-8	-	Late; somatic mosaic	Yamaguchi et al. [2006]
47	10,862 bp	c.541-600_1005 + 1880del10862	Female	Quental et al. [2009]
48	Exons 7-8	-	Neonatal	Suess et al. [1992]
49	Exon 7-9	-	Late; somatic mosaic	Yamaguchi et al. [2006]
50	Exon 9	-	Female	Yamaguchi et al. [2006]
51	Exon 9	-	Neonatal	Suess et al.[1992]
52	Exons 9-10	g.57467_82002delins CCT	Female	Storkanova et al. [2013]



53	Partial OTC deletion	-	Rozen et al. [1985]
----	----------------------	---	---------------------

## 参考文献

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010; (7): 248-249.
- Akbari S, Sevinc GG, Ersoy N, Basak O, Kaplan K, Sevinc K, et al. Robust, long-term culture of endoderm-derived hepatic organoids for disease modeling. *Stem Cell Rep*. 2019;13: 627-641.
- Ali EZ, Khalid MKNM, Yunus ZM, Yakob Y, Chin CB, Latif KA, et al. Carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency: clinical, biochemical, and molecular characterization in Malaysian patients. *Eur. J. Pediatr*. 2016; 175 (3), 339-346.
- Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*. 2011; 473: 216-221.
- Angarita SAK, Truong B, Khoja S, Nitzahn M, Rajbhandari AK, Zhuravka I, et al. Human Hepatocyte Transplantation Corrects the Inherited Metabolic Liver Disorder Arginase Deficiency in Mice. *Mol Genet Metab*. 2018; 124(2): 114-123.
- Aoshima T, Kajita M, Sekido Y, Kikuchi S, Yasuda I, Saheki T, et al. Novel mutations (H337R and 238-362del) in the CPS1 gene cause carbamoyl phosphate synthetase I deficiency. *Hum. Hered*. 2001a; 52 (2), 99-101.
- Aoshima T, Kajita M, Sekido Y, Mimura S, Itakura A, Yasuda I, et al. Carbamoyl phosphate synthetase I deficiency: molecular genetic findings and prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn*. 2001b; 21 (8), 634-637.
- Asrani KH, Cheng L, Cheng CJ, Romesh R. Subramanian Arginase I mRNA therapy – a novel approach to rescue arginase 1 enzyme deficiency. *RNA Biol*. 2018; 15(7): 914-922.
- Bachmann C, Colombo JP. Computer simulation of the urea cycle: trials for an appropriate model. *Enzyme*. 1981; 26: 259-264.
- Balmer C, Pandey AV, Rüfenacht V, Nuoffer JM, Fang P, Wong LW, Häberle J. Mutations and Polymorphisms in the Human Argininosuccinate Lyase (ASL) Gene. *Human Mutation*. 2014, 35(1): 27-35.
- Barraud N, Buson A, Jarolimek W, Rice SA. Mannitol enhances antibiotic sensitivity of persister bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One*. 2013; 8(12): e84220.
- Batshaw ML, Tuchman M, Summar M, Seminara J. Members of the urea cycle

- disorders consortium. A longitudinal study of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab.* 2014; 113: 127-30.
- Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Cancer.* 2011; 11, 268.
- Bessman SP, Bessman AN. The cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with an hypothesis for the mechanism of hepatic coma. *J Clin Invest* 1955; 34: 622-8.
- Bilic J, Belmonte JCI. Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or Yet Too Far Apart? *Stem Cells*. 2012; 30: 33-41.
- Blair NF, Cremer PD, Tchan MC. Urea cycle disorders: a life-threatening yet treatable cause of metabolic encephalopathy in adults. *Practice Neurology.* 2015; 15(1): 45-8.
- Bosoi CR, Zwingmann C, Marin H, Parent-Robitaille C, Huynh J, Tremblay M, Rose CF. Increased brain lactate is central to the development of brain edema in rats with chronic liver disease. *J Hepatol.* 2014; 60: 554-560.
- Brickman JM, Serup P. Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2017, 6.
- Broutier L, Mastrogiovanni G, Versteegen MM, Francies HE, Gavarro LM, Bradshaw CR, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med* 2017; 23: 1424-1435.
- Brusilow SW, Koehler RC, Traystman RJ, Cooper AJL. Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics.* 2010; 7(4): 452-70.
- Brusilow SW, Horwich AL. *Online Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* 2009.
- Brusilow SW, Horwich AL. Urea Cycle Enzymes. In: Scriver, CR.; Beaudet, AL.; Sly, WS.; Valle, D., editors. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease.* McGraw-Hill: 2001. p. 1909-1963.
- Brusilow SW, Horwich AL. Urea cycle enzymes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 7th ed. New York: McGraw-Hill Information Services Co; 1995. p.1187-232.
- Caldovic L, Abdikarim I, Narain S, Tuchman M, Morizono H. Genotype–Phenotype Correlations in Ornithine Transcarbamylase Deficiency: A Mutation Update. *J Genet Genomics.* 2015; 20; 42(5): 181-194.

- Carvalho DR, Brum JM, Speck-Martins CE, Ventura FD, Navarro MM, Coelho KE, et al. Clinical features and neurologic progression of hyperargininemia. *Pediatr Neurol.* 2012; 46(6): 369-374.
- Cavicchi C, Malvagia S, la Marca G, Gasperini S, Donati MA, Zammarchi E, Guerrini R, Morrone A, Pasquini E. Hypocitrullinemia in expanded newborn screening by LC-MS/MS is not a reliable marker for ornithine transcarbamylase deficiency. *J Pharm Biomed Anal.* 2009, 49: 1292-1295.
- Celik M, Akdeniz O, Ozgun N. Efficacy of peritoneal dialysis in neonates presenting with hyperammonaemia due to urea cycle defects and organic acidemia. *Nephrology.* 2019; 24: 330-335.
- Cernigliaro V, Peluso R, Zedda B, Silengo L, Tolosano E, Pellicano R, Altruda F, Fagooneet S. Evolving Cell-Based and Cell-Free Clinical Strategies for Treating Severe Human Liver Diseases. *Cells.* 2020; 9(2): 386.
- Chen X, Yuan L, Sun M, Liu Q, Wu Y. Two novel CPS1 mutations in a case of carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency causing hyperammonemia and leukodystrophy. *J. Clin. Lab. Anal.* 2018; 32 (5), e22375.
- Clarkston K, Lee J, Donoghue S, Asai A, Eiroa H, Shah AA, Loomes K, et al. Acute liver dysfunction with delayed peak of serum aminotransferase levels as a presentation of ornithine transcarbamylase deficiency in females. *Am J Med Genet A.* 2021; 185(3): 909-915.
- Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell.* 2016; 165: 1586-1597.
- Cooper AJL, Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia, *Physiol. Rev.* 1987; 67 (2): 440-519.
- Cooper AJL. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in cerebral ammonia homeostasis, *Neurochem. Res.* 2012; 37 (11): 2439-2455.
- Dam G, Keiding S, Munk OL, Ott P, Vilstrup H, Bak LK, et al. Hepatic encephalopathy is associated with decreased cerebral oxygen metabolism and blood flow, not increased ammonia uptake. *Hepatology.* 2013; 57: 258-265.
- Dasarathy S, Mookerjee RP, Rackayova V, Thrane VR, Vairappan B, Ottet P, et al. Ammonia toxicity: from head to toe? *Metab Brain Dis.* 2017; 32: 529-538.
- Devuyst O, Goffin E. Water and solute transport in peritoneal dialysis: models and clinical applications, *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008; 23: 2120-2123.
- de Groot MJ, Cuppen M, Eling M, Verheijen FW, Rings EH, Reijngoud DJ, et al.

- Metabolic investigations prevent liver transplantation in two young children with citrullinemia type I. *J Inher Metab Dis.* 2011; 33 Suppl 3:S413–6.
- Dhawan A, Iansante V, Mitry RR, Filippi C, Fitzpatrick E. Human hepatocyte transplantation for liver disease: Current status and future perspectives. *Pediatric Research.* 2018; 83(2) : 232-240.
- Díez-Fernández C, Hu L, Cervera J, Häberle J, Rubio V. Understanding carbamoyl phosphate synthetase (CPS1) deficiency by using the recombinantly purified human enzyme: effects of CPS1 mutations that concentrate in a central domain of unknown function. *Mol Genet Metab.* 2014;112(2):123-32.
- Diez-Fernandez C, Rufenacht V, Haberle J. Mutations in the human Argininosuccinate Synthetase (ASS1) gene, impact on patients, common changes, and structural considerations. *Hum Mutat.* 2017; 38(5): 471-84.
- Ducharme-Crevier L, Dupont-Thibodeau G, Lortie A, Maranda B, Tasker R, Jouvét P. Metabolic encephalopathies in children. In: Nichols D, ed. *Rogers Textbook of Pediatric Intensive Care.* Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins. 2016; 1053-1065.
- Eeds AM, Hall LD, Yadav M, Willis A, Summar S, Putnam A, et al. The frequent observation of evidence for nonsense-mediated decay in RNA from patients with carbamyl phosphate synthetase I deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2006; 89 (1-2), 80-86.
- Eiman H. Al Kaabi, Ayman W. El-Hattab. N-acetylglutamate synthase deficiency: Novel mutation associated with neonatal presentation and literature review of molecular and phenotypic spectra. *Mol Genet Metab Rep.* 2016; 8: 94-98.
- Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, Jiang Z, Chen J, Deng K, Zhong M, Cai J, Lai L, Pei D. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem.* 2009; 284:17634-17640.
- Fan L, Zhao X, Jiang L, Xie L, Ma J, Li X, Cheng M. Molecular, biochemical, and clinical analyses of five patients with carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency. *J Clin Lab Anal.* 2020; 34(4): e23124.
- Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat. Cell Biol.* 2016; 18:246-254.
- Finckh U, Kohlschuetter A, Schaefer H, Sperhake K, Colombo JP, Gal A. Prenatal diagnosis of carbamoyl phosphate synthetase I deficiency by identification of a missense mutation in CPS1. *Hum. Mutat.* 1998; 12 (3), 206-211.

- Fujisawa D, Mitsubuchi H, Matsumoto S et al.. Early intervention for late-onset ornithine transcarbamylase deficiency. *Pediatrics International*. 2015; 57, e1-e3.
- Funghini S, Thusberg J, Spada M, Gasperini S, Parini R, Ventura L, et al. Carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency in Italy: clinical and genetic findings in a heterogeneous cohort. *Gene*. 2012; 493:228-234.
- Gallagher RC, Lam C, Wong D, Cederbaum S, Sokol RJ. Significant hepatic involvement in patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *J Pediatr*. 2014; 164(4): 720-56.
- Ginn SL, Amaya AK, Liao SHY, et al.. Efficient in vivo editing of OTC-deficient patient-derived primary human hepatocytes. *JHEP Rep*. 2019; 2(1): 100065.
- Gordillo G, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Development*. 2015; 142(12): 2094-108.
- Grompe M, Caskey CT, Fenwick RG. Improved molecular diagnostics for ornithine transcarbamylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet*. 1991; 48, 212-222.
- Guffon N, Schiff M, Cheillan D, Wermuth B, Haberle J, Vianey-Saban C. Neonatal hyperammonemia: the N-carbamoyl-L-glutamic acid test. *J Pediatr*. 2005;147(2): 260-262.
- Guire PJM, Lee HS, members of the Urea Cycle Disorders Consortium, Summar M. Infectious precipitants of acute hyperammonemia are associated with indicators of increased morbidity in patients with Urea Cycle Disorders. *J Pediatr*. 2013; 163(6): 1705-1710.
- Häberle J, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Karall D, Lindner M, Mandel H, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders: First revision. *J Inherit Metab Dis*. 2019; 42(6): 1192-1230.
- Haberle J, Boddaert N, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Huemer M, et al.. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet J Rare Dis*. 2012; 7:32.
- Häberle J, Shchelochkov OA, Wang J, Katsonis P, Hall L, Reiss S, et al.. Molecular defects in human carbamoyl phosphate synthetase I: mutational spectrum, diagnostic and protein structure considerations. *Hum. Mutat*. 2011;32 (6), 579-589.
- Häberle J, Schmidt E, Pauli S, Rapp B, Christensen E, Wermuth B, et al.. Gene structure of human carbamylphosphate synthetase 1 and novel mutations in patients with neonatal onset. *Hum. Mutat*. 2003; 21 (4), 444.
- Hannan NRF, Segeritz C-P, Touboul T, Vallier L. Production of hepatocyte- like cells

- from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2013 8(2): 430-7.
- Harding J, Roberts RM, Mirochnitchenko O. Large animal models for stem cell therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4: 23.
- Haridhasapavalan KK, Borgohain MP, Dey C, Saha B, Narayan G, Kumar S, et al.. An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells. *Gene.* 2019; 686:146-159.
- Hata A, Tsuzuki T, Shimada K, Takiguchi M, Mori M, Matsuda I. Isolation and characterization of the human ornithine transcarbamylase gene: structure of the 5'-end region. *J. Biochem.* 1986; 100: 717-725.
- Hawke L. Ammonia (plasma, blood). <http://www.acb.org.uk/whatwedo/science/-AMALC.aspx>. Published 2012.
- Hoshida R, Matsuura T, Haraguchi Y, Endo F, Yoshinaga M, Matsuda I. Carbamylphosphate synthetase I deficiency. One base substitution in an exon of the CPS1 gene causes a 9-basepair deletion due to aberrant splicing. *J. Clin. Invest.* 1993; 91 (5), 1884-1887.
- Horwich AL, Fenton WA, Williams KR, Kalousek F, Kraus JP, Doolittle RF, et al.. Structure and expression of a complementary DNA for the nuclear coded precursor of human mitochondrial ornithine transcarbamylase. *Science.* 1984; 224:1068-1074.
- Horwich AL, Kalousek F, Fenton WA, Pollock RA, Rosenberg LE. Targeting of pre-ornithine transcarbamylase to mitochondria: definition of critical regions and residues in the leader peptide. *Cell.* 1986; 44: 451-459.
- Hu H, Gehart H, Artegiani B, López-Iglesias C, Dekkers F, Basak O, et al. Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids. *Cell.* 2018;175:1591-1606.e19.
- Ihara K, Nakayama H, Hikino S, Hara T. Mutation in CPS1. *Hum. Genet.* 1999; 105, 375.
- Ip YK, Chew SF. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. *Front Physiol.* 2010; 1:134.
- Jain A, Agarwal R, Sankar MJ, Deorari AK, Paul VK. Hypocalcemia in the newborn. *Indian J Pediatr.* 2008; 75(2): 165-9.
- Joshi D, O'Grady J, Patel A, Shawcross D, Connor S, Deasy N, et al. Cerebral oedema is rare in acute-on-chronic liver failure patients presenting with high-grade hepatic encephalopathy. *Liver Int.* 2014; 34: 362-366.
- Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free

- induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 2009; 458, 771.
- Kho J, Tian X, Wong WT, Bertin T, Jiang MM, Chen S, et al. Argininosuccinate Lyase Deficiency Causes an Endothelial-Dependent Form of Hypertension. *Am J Hum Genet*. 2018; 103(2): 276-287.
- Kido J, Nakamura K, Mitsubuchi H, Ohura T, Takayanagi M, Matsuo M, et al. Long-term outcome and intervention of urea cycle disorders in Japan. *J Inherit Metab Dis*. 2012; 35: 777-85.
- Kiykim E, Zubarioglu T, Cansever MS, Celkan T, Häberle J, Zeybek ACA. Coagulation Disturbances in Patients with Argininemi. *Acta Haematol*. 2018; 140(4): 221-225.
- Kretz R, Hu L, Wettstein V, Leiteritz D, Häberle J. Phytohemagglutinin stimulation of lymphocytes improves mutation analysis of carbamoylphosphate synthetase 1. *Mol. Genet. Metab*. 2012; 106(3), 375-378.
- Kuchel PW, Roberts DV, Nichol LW. The simulation of the urea cycle: correlation of defects due to inborn errors in the catalytic properties of the enzymes with clinical-biochemical observations. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1977; 55: 309-326.
- Kumar PS, Chandrasekhar C, Srikanth L, Sarma PVGK. Down-regulation of SOX17, GATA4 and FoxA2 promotes differentiation potential of hepatocytes from human hematopoietic stem cells. *Tissue Cell*. 2020; 62:101312.
- Kurokawa K, Yorifuji T, Kawai M, Momoi T, Nagasaka H, Takayanagi M, et al. Molecular and clinical analyses of Japanese patients with carbamoylphosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency. *J. Hum. Genet*. 2007; 52 (4),349–354.
- Kruitwagen HS, Oosterhoff LA, van Wolferen ME, Chen C, Nantasanti Assawarachan S, Schneeberger K, et al. Long-term survival of transplanted autologous canine liver organoids in a COMMD1-deficient dog model of metabolic liver disease. *Cells*. 2020; 9: 410.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non- synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm, *Nat. Protoc*. 2009, (4): 1073-1081.
- Laemmle A, Stricker T, Häberle J, Stricker T, Gautschi M, Nuoffer JM, et al. Frequency and Pathophysiology of Acute Liver Failure in Ornithine Transcarbamylase Deficiency (OTCD). *PloS one*. 2016; 11(4): e0153358.
- Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling



- development and disease using organoid technologies. *Science*. 2014; 345:1247125.
- Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al.. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013; 501:373-379.
- Lee KW, Lee JH, Shin SW, Kim SJ, Joh JW, Lee DH, et al.. Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. *Cell Transplant*. 2007, 16, 629-637.
- Leonard JV, Morris AA. Urea cycle disorders. *Semin Neonatology*. 2002; 1: 27-25.
- Lewis SL, Tam PP. Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function. *Dev Dyn*. 2006; 235(9): 2315-29.
- Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, et al.. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*. 2009; 4: 11-15.
- Lichter-Konecki U, Caldovic L, Morizono H, Simpson K. Ornithine Transcarbamylase deficiency. University of Washington, Seattle; 1993 - 2019.
- Lin Y, Gao H, Lu B, Zhou S, Zheng T, Lin W, et al. Citrullinemia type I is associated with a novel splicing variant, c.773 + 4A > C, in ASS1: a case report and literature review. *BMC Med Genet*. 2019; 20: 110.
- Lindgren V, de Martinville B, Horwich AL, Rosenberg LE, Francke U. Human ornithine transcarbamylase locus mapped to band Xp21.1 near the Duchenne muscular dystrophy locus. *Science*. 1984; 226: 698-700.
- Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, et al.. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 587-590.
- Liu Y, Luo Y, Xia L, Qiu B, Zhou T, Feng M, et al.. Outcome of Liver Transplantation for Neonatal-onset Citrullinemia Type I. *Transplantation*. 2021; 105(3): 569-576.
- Lund RJ, Närvä E, Lahesmaa R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nature Reviews Genetics*. 2012; 13, 732-744.
- Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, Bassett SS. Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. *N. Engl. J. Med*. 1996; 335:855-859.
- Martin-Hernandez E, Aldamiz-Echevarria L, Castejon-Ponce E, Pedrón-Giner C, Couce ML, Serrano-Nieto J, et al. Urea cycle disorders in Spain: an observational, crosssectional and multicentric study of 104 cases. *Orphanet J Rare Dis*. 2014; 9: 187.
- McCullough BA, Yudkoff M, Batshaw ML, Wilson J M, Raper SE, Tuchman M.

- Genotype spectrum of ornithine transcarbamylase deficiency: correlation with the clinical and biochemical phenotype. *Am J Med Genet.* 2000; 93(4): 313-9.
- Mebarki M, Abadie C, Larghero J, Cras A. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products. *Stem Cell Res Ther.* 2021; 12(1): 152.
- Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RAFM. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function, *Physiol. Rev.* 1990; 70 (3): 701-748.
- Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007; 25: 1177-1181.
- Mercimek-Mahmutoglu S, Moeslinger D, Häberle J, Engel K, Herle M, Strobl MW, et al.. Long-term outcome of patients with argininosuccinate lyase deficiency diagnosed by newborn screening in Austria. *Mol Genet Metab.* 2010; 100: 24-28.
- Meyburg J, Das AM, Hoerster F, Lindner M, Kriegbaum H, Engelmann G, et al.. One liver for four children: First clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. *Transplantation.* 2009; 87, 636-641.
- Meylan S, Porter CBM, Yang JH, Belenky P, Gutierrez A, Lobritz MA, et al.. Carbon sources tune antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via tricarboxylic acid cycle control. *Cell Chem Biol.* 2017. 24(2):195-206.
- Migliaccio G, Migliaccio AR, Petti S, Mavilio F, Russo G, Lazzaro D, et al.. Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac–liver transition. *J. Clin. Invest.* 1986; 78, 51-60.
- Mori T, Nagai K, Mori M, Nagao M, Imamura M, Iijima M, Kobayashi K. Progressive liver fibrosis in late-onset argininosuccinate lyase deficiency. *Pediatr Dev Pathol.* 2002; 5: 597-601.
- Morrison JL, Berry MJ, Botting KL, Darby JRT, Frasch MG, Gatford KL, et al.. Improving pregnancy outcomes in humans through studies in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2018; 315: R1123-R1153.
- Mun SJ, Son YS, Lee MO, Son YS, Oh SJ, Cho HS, et al.. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids. *J Hepatol.* 2019; 71(5): 970-985.
- Musalkova D, Sticova E, Reboun M, Sokolova J, Krijt J, Honzikova J, et al.. Variable X-chromosome inactivation and enlargement of pericentral glutamine synthetase zones in the liver of heterozygous females with OTC deficiency. *Virchows Arch.* 2018; 472(6): 1029-1039.

- Nagata N, Matsuda I, Oyanagi K. Estimated frequency of urea cycle enzymopathies in Japan. *Am J Med Genet.* 1991; 39: 228-9.
- Nagamani SCS, Erez A, Lee B. Argininosuccinate Lyase Deficiency. *Genet Med.* 2012; 14(5): 501-507.
- Nakip OS, Yildiz Y, Tokatli A. Retrospective evaluation of 85 patients with urea cycle disorders: one center experience, three new mutations. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2020; 33(6): 721-728.
- Nassogne MC, Heron B, Rabier D, Saudubray JM. Urea cycle defects: management and outcome. *J Inherit Metab Dis.* 2005; 28: 407-414.
- Nicholas Ah Mew, Ljubica Caldovic. N-acetylglutamate synthase deficiency: an insight into the genetics, epidemiology, pathophysiology, and treatment. *Appl Clin Genet.* 2011; 4: 127-135.
- Nie YZ, Zheng YW, Miyakawa K, Murata S, Zhang RR, Sekine K, et al.. Recapitulation of hepatitis B virus-host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells. *EBioMedicine.* 2018; 35: 114-123.
- Nishiyori A, Yoshino M, Kato H, Matsuura T, Hoshide R, Matsuda I, et al.. The R40H mutation in a late onset type of human ornithine transcarbamylase deficiency in male patients. *Hum Genet.* 1997; 99(2): 171-6.
- Ng SS, Saeb-Parsy K, Blackford S, Segal JM, Serra MP, Horcas-Lopez M, et al. Human iPS derived progenitors bioengineered into liver organoids using an inverted colloidal crystal poly (ethylene glycol) scaffold. *BIOMATERIALS.* 2018; 182, 299–311.
- NORD Physician Guide to the UCDs. Available at <https://rarediseases.org/physician-guide/urea-cycle-disorders/>. Accessed 29 July, 2020.
- Nuciforo S, Fofana I, Matter MS, Blumer T, Calabrese D, Boldanova T, et al. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies. *Cell Rep.* 2018; 24: 1363-1376.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007; 448, 313.
- Ono H, Suto T, Kinoshita Y, Sakano T, Furue T, Ohta T. A case of carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency presenting symptoms at one month of age. *Brain Dev.* 2009; 31 (10), 779-781.
- Palakkan AA, Nanda J, Ross JA. Pluripotent stem cells to hepatocytes, the journey so

- far. *Biomed Rep.* 2017; 6: 367-373.
- Paprocka J, Jamroz E. Hyperammonemia in children: on the crossroad of different disorders. *Neurologist.* 2012; 18(5): 261-265.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al.. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008; 451: 141-146,.
- Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, et al.. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell.* 2008; 134(5): 877-886.
- Pekkala S, Martinez AI., Barcelona B, Yefimenko I, Finckh U, Rubio V, et al.. Understanding carbamoyl-phosphate synthetase I (CPS1) deficiency by using expression studies and structure-based analysis. *Hum. Mutat.* 2010; 31 (7), 801-808.
- Pela I, Seracini D, Donati MA, Lavoratti G, Pasquini E, Materassi M. Peritoneal dialysis in neonates with inborn errors of metabolism: Is it really out of date? *Pediatr. Nephrol.* 2008; 23: 163-8.
- Peng B, Su YB, Li H, Han Y, Guo C, Peng XX, et al.. Exogenous alanine and/or glucose plus kanamycin kills antibiotic-resistant bacteria. *Cell Metab.* 2015. 21, 249-261.
- Pessôa LVF, Bressan FF, Freude KK. Induced pluripotent stem cells throughout the animal kingdom: Availability and applications. *World J Stem Cells.* 2019; 11(8): 491-505.
- Picca S, Dionisi-Vici C, Abeni D, Pastore A, Rizzo C, Orzalesi M, et al.. Extracorporeal dialysis in neonatal hyperammonemia: Modalities and prognostic indicators. *Pediatr. Nephrol.* 2001; 16: 862-7.
- Quental R, Azevedo L, Rubio V, Diogo L, Amorim A. Molecular mechanisms underlying large genomic deletions in ornithine transcarbamylase (OTC) gene. *Clin Genet.* 2009; 75: 457-464.
- Rangroo TV, Thrane AS, Wang F, Cotrin ML, Smith NA, Chen M, et al.. Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. *Nat Med.* 2013; 19:1643-1648.
- Rapp B, Häberle J, Linnebank M, Wermuth B, Marquardt T, Harms E, et al.. Genetic analysis of carbamoylphosphate synthetase I and ornithine transcarbamylase deficiency using fibroblasts. *Eur. J. Pediatr.* 2001; 160 (5), 283-287.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. *Genet Med.* 2015; 17(5): 405-24.
- Rokicki D, Pajdowska M, Trubicka J, Thong MK, Ciara E, Piekutowska- Abramczuk D, et al.. 3-Methylglutaconic aciduria, frequent but underrecognized finding in carbamoyl phosphate synthetase I deficiency. *Clin. Chim. Acta.* 2017; 471, 95-100.
- Roy-Chowdhury N, Wang X, Guha C, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hepatol Int.* 2017; 11 (1): 54-69.
- Rubio V. Structure-function studies in carbamoyl phosphate synthetases. *Biochem. Soc. Trans.* 1993; 21: 198–202.
- Saltzman WM, Kyriakides TR. Chapter 20 - Cell Interactions with Polymers. In: *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*. Lanza R, Langer R, Vacanti J, Editors. 2014, Academic Press: Boston, 385-406.
- Sander J, Janzen N, Sander S, Steuerwald U, Das AM, Scholl S, et al.. Neonatal screening for citrullinaemia. *Eur J Pediatr.* 2003;162(6): 417-20.
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009; 459: 262-265.
- Savy N, Brossier D, Brunel-Guitton C, Ducharme-Crevier L, Du Pont-Thibodeau G, Jouvét P. Acute pediatric hyperammonemia: current diagnosis and management strategies. *Hepat Med.* 2018; 10: 105-115.
- Schutz Y. Protein turnover, ureagenesis and gluconeogenesis. *Int J Vitam Nutr Res.* 2011;81(2-3):101-7.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. Mutation Taster 2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014, (11): 361-362.
- Séguin CA, Draper JS, Nagy A, Rossant J. Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008; 3(2): 182-95.
- Seminara J, Tuchman M, Krivitzky L, Krischer J, Lee HS, Lemons C, et al.. Establishing a consortium for the study of rare diseases: The Urea Cycle Disorders Consortium. *Mol. Genet. Metab.* 2010; 100(Suppl. 1): S97-S105.
- Shalan UF, Ibrahim NL, Ehsan NA, Sultan MM, Naser GM. Reduced Immunohistochemical Expression of Hnf1 $\beta$  and FoxA2 in Liver Tissue Can Discriminate Between Biliary Atresia and Other Causes of Neonatal Cholestasis.

- Abd El-Fatah 3Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2019; 27(4): e32-e38.
- Shamir ER, Ewald AJ. Three-dimensional organotypic culture: Experimental models of mammalian biology and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014; 15:647-664.
- Shi D, Morizono H, Ha Y, Aoyagi M, Tuchman M, Allewell NM. 1.85-Å resolution crystal structure of human ornithine transcarbamoylase complexed with N-phosphonacetyl-L-ornithine. Catalytic mechanism and correlation with inherited deficiency. J. Biol. Chem. 1998; 273: 34247- 34254.
- Simian M, Bissell MJ. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. J Cell Biol. 2017; 216(1): 31-40.
- Sin YY, Price PR, Ballantyne LL, Funk CD. Proof of concept gene editing for the murine model of inducible arginase-1 deficiency. Sci Rep. 2017; 7: 2585.
- Sin YY, Baron G, Schulze A, Funk SD. Arginase-1 deficiency. J Mol Med. 2015; 93:1287-1296.
- Song Z, Cai J, Liu Y, Zhao D, Yong J, Duo S, et al.. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. Cell Res. 2009; 19: 1233-1242.
- Stenbørg P, Busk T, Larsen FS. Efficacy of liver assisting in patients with hepatic encephalopathy with special focus on plasma exchange. Metab Brain Dis. 2013; 28(2): 333-5.
- Su S, Di Poto C, Kroemer AH, Cui W, Roy R, Liu X, et al. Establishment of ornithine transcarbamylase deficiency-derived primary human hepatocyte with hepatic functions. Exp Cell Res. 2019; 384(1): 111621.
- Su YB, Peng B, Han Y, Li H, Peng XX. Fructose restores susceptibility of multidrug-resistant *Edwardsiella tarda* to kanamycin. J Proteome Res. 2015. 14(3): 1612-1620.
- Summar ML, Koelker S, Freedenberg D, Mons CL, Haberle J, Lee HS, et al. European Registry and Network for Intoxication Type Metabolic Diseases (E-IMD); Members of the Urea Cycle Disorders Consortium (UCDC). The incidence of urea cycle disorders. Mol Genet Metab. 2013; 110:179–180
- Summar ML. Molecular genetic research into carbamoyl-phosphate synthase I: molecular defects and linkage markers. J. Inherit. Metab. Dis. 1998; 21 Suppl 1, 30–39.
- Summar ML, Dasouki MJ, Schofield PJ, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Tuchman M, et al. Physical and linkage mapping of human carbamylphosphate synthetase I (CPS1) and reassignment from 2p to 2q35, Cytogenet. Cell Genet. 1995;

- 71: 266–267.
- Swarts L, Leisegang F, Owen EP, Henderson HE. An OTC deficiency 'phenocopy' in association with Klinefelter syndrome. *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30(1): 101.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663-676.
- Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature.* 2013; 499: 481-484.
- Takebe T, Sekine K, Kimura M, Yoshizawa E, Ayano S, Koido M. Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells. *Cell Reports.* 2017; 21: 2661-2670.
- Talebi M, Mehrjardi MYV, Kalhor K, Dehghani M. Is there any relationship between mutation in CPS1 Gene and pregnancy loss?. *Int J Reprod Biomed (Yazd).* 2019; 17(5): 371-374.
- Tanaka K, Isselbacher KJ. The isolation and identification of N-isovalerylglycine from urine of patients with isovaleric acidemia. *J Biol Chem.* 1967; 242: 2966-72.
- Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, Kneisser I, Saadallah A, Borrajo GJ, Adams J. Current Status of Newborn Screening Worldwide: 2015. *Semin Perinatol.* 2015; 39(3): 171-87.
- Therrell BL Jr. Newborn dried blood spot screening. In: Driscoll CJ, McPherson B, et al., eds. *Newborn Screening Systems-The Complete Perspective.* San Diego: Plural Publishing, Inc; 2010. 133-156.
- Touboul T, Hannan NRF, Corbinau S, Martinez A, Martinet C, Branchereau S, et al. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology.* 2010; 51, 1754-1765.
- Tremblay KD, Zaret KS. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev. Biol.* 2005; 280, 87-99.
- Tuchman M, Plante RJ, McCann MT, Qureshi AA. Seven new mutations in the human ornithine transcarbamylase gene. *Hum. Mutat.* 1994b; 4, 57-60.
- Tuchman M, Plante RJ. Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase gene: mutation update addendum. *Hum. Mutat.* 1995; 5, 293-295.
- Tuchman M, Morizono H, Rajagopal BS, Plante RJ, Allewell NM. The biochemical and molecular spectrum of ornithine transcarbamylase deficiency. *J. Inherit. Metab.*

- Dis. 1998;21, 40-58.
- Tuchman M, Jaleel N, Morizono H, Sheehy L, Lynch MG. Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase gene. *Hum. Mutat.* 2002; 19, 93-107.
- Tuchman M, Caldovic L, Daikhin Y, Horyn O, Nissim I, Nissim I, et al. N-carbamylglutamate markedly enhances ureagenesis in N-acetylglutamate deficiency and propionic acidemia as measured by isotopic incorporation and blood biomarkers. *Pediatr Res.* 2008; 64(2): 213–217.
- Tygstrup N, Larsen FS, Hansen BA. The value of high volume plasmapheresis in fulminant hepatic failure. In: Williams R, Lee W (eds) *Acute liver failure.* Cambridge University press, Cambridge. 1997; 267-278.
- UK National Metabolic Biochemistry Network. Guidelines for the Investigation of Hyperammonaemia. <http://www.metbio.net/docs/MetBio-Guideline-AMUP100834-21-07-2010.pdf>.
- Vasquez-Loarte T, Thompson JD, Merritt JL. Considering Proximal Urea Cycle Disorders in Expanded Newborn Screening. *Int J Neonatal Screen.* 2020; 6(4): 77.
- Viotti M, Nowotschin S, Hadjantonakis AK. SOX17 links gut endoderm morphogenesis and germ layer segregation. *Nat Cell Biol.* 2014;16(12):1146-56.
- Wakutani Y, Nakayasu H, Takeshima T, Mori N, Kobayashi K, Endo F, et al. A case of late-onset carbamoyl phosphate synthetase I deficiency, presenting periodic psychotic episodes coinciding with menstrual periods. *Rinsho Shinkeigaku.* 2001; 41 (11), 780-785.
- Walker V. Ammonia metabolism and hyperammonemic disorders. *Adv Clin Chem.* 2014;67:73-150.
- Wang S, Wang X, Tan Z, Su Y, Liu J, Chang M, et al. Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury. *Cell Res.* 2019; 29:1009-1026.
- Waterlow JC. The mysteries of nitrogen balance. *Nutr. Res. Rev.* 1999; 12 (1), 25-54.
- Wilnai Y, Blumenfeld YJ, Cusmano K, Hintz SR, Alcorn D, Benitz WE, et al.. Prenatal treatment of ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2018; 123(3): 297-300.
- Wilson JM, Jungner YG. Principles and practice of mass screening for disease. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1968; 65:281-393.
- Withers PC. Urea: diverse functions of a “waste” product. *Clin. Exp. Pharmacol.*



- Physiol. 1998; 25, 722-7.
- Xu J, Zhang A, Huang F. Biallelic mutations in carbamoyl phosphate synthetase 1 induced hyperammonemia in a neonate: A case report. *Exp Ther Med.* 2020; 20(1): 623-629.
- Yamaguchi S, Brailey LL, Morizono H, Bale AE, Tuchman M: Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase (OTC) gene. *Hum Mutat.* 2006; 27: 626-632.
- Yang XY, Shi J, Lei HH, Xia B, Mu DZ. Neonatal-onset carbamoyl phosphate synthetase I deficiency. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96 (26), e7365.
- Yap S, Gougeard N, Hart AR, Barcelona B, Rubio V. N-carbamoylglutamate-responsive carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency: A patient with a novel CPS1 mutation and an experimental study on the mutation's effects. *JIMD Rep.* 2019; 48(1): 36-44.
- Yorifuji T, Muroi J, Uematsu A, Tanaka K, Kiwaki K, Endo F, et al.. X-inactivation pattern in the liver of a manifesting female with ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency. *Clin Genet.* 1998; 54: 349-353.
- Yoshitoshi-Uebayashi EY, Toyoda T, Yasuda K, Kotaka M, Nomoto K, Okita K, et al.. Modelling urea-cycle disorder citrullinemia type 1 with disease-specific iPSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 486(3):613-619.
- Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell.* 2011;144: 940–954.
- Zabulica M, Jakobsson T, Ravaoli F, Vosough M, Gramignoli R, Rooyackers O, et al.. Gene Editing Correction of a Urea Cycle Defect in Organoid Stem Cell Derived Hepatocyte-like Cells. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(3): 1217.
- Zeevaert K, Elsafi Mabrouk MH, Wagner W, Goetzke R. Cell Mechanics in Embryoid Bodies. *Cells.* 2020; 9(10): 2270.
- Zielonka M, Kölker S, Gleich F, Stützenberger N, Nagamani SCS, Gropman AL, et al.. Early prediction of phenotypic severity in Citrullinemia Type 1. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019; 6(9): 1858–1871.

## 致谢

本课题在我的导师盖中涛教授的悉心指导和严格要求下业已完成，从课题的选取、研究的实施以及论文的撰写，无不凝聚着老师的心血和汗水，不仅在学习期间，而且在平时医院的工作中，也始终感受着导师的精心指导和无私的关怀，使我受益匪浅。老师的每一次指导，每一次提点，都有醍醐灌顶之感。在此向盖老师表示深深的感谢和崇高的敬意。

本课题能够顺利的完成，还要特别感谢山东大学齐鲁儿童医院儿科医学研究所所长刘毅教授。刘毅老师是我们医院的科研领军人物，身兼数职，日理万机，但每次我的实验遇到问题，不知道如何行进的时候刘毅老师总是挤出时间不遗余力地帮助我，给我新的思路，引领我走向正途，继续前进。刘毅老师醉心科研多年，她对科研的精益求精、孜孜不倦深深打动了我，鼓励着我在科研的道路上砥砺前行。

同时，衷心感谢我的直系领导李晓莺教授和中国科学院广州生物医药与健康研究院潘老师、舒老师和陈勇博士对本研究的指导。李老师是我硕士研究生的同门师姐，从我一进医院就一直支持我、照顾我，不论在工作、学习还是科研上都给予我莫大的帮助，是我的良师益友。潘老师、舒老师和陈博在干细胞及再生医学领域均硕果累累，对本人进行第二和第三部分的基础实验提供了巨大帮助。

一个篱笆三个桩，一个好汉三个帮。在此还要感谢儿研所和新生儿科各位老师，各位同仁对我的支持和帮助，尤其是在我出国期间对我课题的继续进行起到了至关重要的作用。

最后，感谢我的家人，感谢他们能够一如既往地理解我、支持我，让我在繁忙的工作中能够专心、专注，没有任何后顾之忧。

值此论文完成之际，衷心地向我的老师们、同事们、家人朋友们致以我最崇高的敬意和最真诚的谢意！

## 发表的学术论文目录

1. Beibei Yan, Chao Wang, Kaihui Zhang, Haiyan Zhang, Min Gao, Yuqiang Lv, Xiaoying Li, Yi Liu and Zhongtao Gai. Novel Neonatal Variants of the Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 Deficiency: Two Case Reports and Review of Literature. *Frontiers in Genetics*. 2019; 10: 718. 第一位
2. Xiaomeng Yang, Beibei Yan, Haiyan Zhang, Yanyan Ma, Qi Zhou, Yue Li, Jingyun Guan, Dong Wang, Yi Liu, Zhongtao Gai. Generation of an induced pluripotent stem cell line (SDQLCHi009-A) from a patient with 47, XXY and ornithine transcarbamylase deficiency carrying a hemizygote mutation in OTC. *Stem Cell Research*. 2020; 43: 101704. 共同一作
3. Jingyun Guan, Beibei Yan, Haiyan Zhang, Chen Liu, Yue Li, Xiaomeng Yang, Zilong Li, Zhongtao Gai, Yi Liu. Generation of a human induced pluripotent stem cell line (SDQLCHi036-A) from a patient with ornithine transcarbamylase deficiency carrying a deletion involving 3–9 exons of OTC gene. *Stem Cell Research*. 2021; 52: 102220. 共同一作
4. 阎贝贝, 李晓莺. 新生儿难治性化脓性脑膜炎的临床分析. *中国医药指南*. 2018; 16(1): 14-15, 18. 第一位
5. 阎贝贝, 王超. 耐药肺炎克雷伯菌感染的研究进展. *中国卫生标准管理*. 2018; 5: 102-103. 第一位
6. 阎贝贝, 李晓莺. 新生儿肠道菌群及其相关疾病研究进展. *中国实用儿科杂志*. 2018; 7: 556-560. 第一位

### 学位论文评阅及答辩情况表

论文评阅人	姓名	专业技术 职 务	是否博导 (硕导)	所 在 单 位		总体评价	
	匿名					优秀	
	匿名					合格	
	匿名					优秀	
	匿名					合格	
	匿名					合格	
答辩委员会成员	姓名	专业技术 职 务	是否博导 (硕导)	所 在 单 位			
	主席 汪运山	主任医师	博导	山东大学济南市中心医院			
	委 员	史卫峰	教授	博导	山东第一医科大学		
		李霞	主任医师	博导	山东第一医科大学基础医学院		
		于华凤	主任医师	硕导	山东大学齐鲁儿童医院		
		高媛	研究员	硕导	山东大学基础医学院		
答辩委员会对论文的 总体评价		B	答辩秘书	吕欣	答辩日期	2021. 5. 26	
备注							



# Novel Neonatal Variants of the Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 Deficiency: Two Case Reports and Review of Literature

Beibei Yan<sup>1</sup>, Chao Wang<sup>2</sup>, Kaihui Zhang<sup>3</sup>, Haiyan Zhang<sup>3</sup>, Min Gao<sup>3</sup>, Yuqiang Lv<sup>3</sup>, Xiaoying Li<sup>1</sup>, Yi Liu<sup>3\*</sup> and Zhongtao Gai<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Neonatology Department, Qilu Children's Hospital of Shandong University, Ji'nan, China, <sup>2</sup> Shandong Freshwater Fisheries Research Institute, Ji'nan, China, <sup>3</sup> Pediatric Research Institute, Qilu Children's Hospital of Shandong University, Ji'nan, China

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Tielu Shi,  
East China Normal University,  
China

### Reviewed by:

Dong Dong,  
East China Normal University,  
China  
Abdallah El-Sayed Allam,  
Tanta University, Egypt

### \*Correspondence

Yi Liu  
Zhongtao Gai

### Specialty section:

This article was submitted to  
Genetic Disorders,  
a section of the journal  
Frontiers in Genetics

Received: 29 June 2018

Accepted: 09 July 2019

Published: 22 August 2019

### Citation:

Yan B, Wang C, Zhang K, Zhang H,  
Gao M, Lv Y, Li X, Liu Y and Gai Z  
(2019) Novel Neonatal Variants of the  
Carbamoyl Phosphate Synthetase 1  
Deficiency: Two Case Reports and  
Review of Literature.  
Front. Genet. 10:718.  
doi: 10.3389/fgene.2019.00718

Carbamoyl phosphate synthetase I (CPS1) deficiency (CPS1D), is a rare autosomal recessive disorder, characterized by life-threatening hyperammonemia. In this study, we presented the detailed clinical features and genetic analysis of two patients with neonatal-onset CPS1D carrying two compound heterozygous variants of c.1631C > T (p.T544M)/c.1981G > T (p.G661C), and c.2896G > T (p.E966X)/c.622-3C > G in *CPS1* gene, individually. Out of them, three variants are novel, unreported including a missense (c.1981G > T, p.G661C), a nonsense (c.2896G > T, p.E966X), and a splicing change of c.622-3C > G. We reviewed all available publications regarding *CPS1* mutations, and in total 264 different variants have been reported, with majority of 157 (59.5%) missense, followed by 35 (13.2%) small deletions. This study expanded the mutational spectrum of *CPS1*. Moreover, our cases and review further support the idea that most ( $\geq 90\%$ ) of the mutations were "private" and only  $\sim 10\%$  recurred in unrelated families.

**Keywords:** carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency, carbamoyl phosphate synthetase 1, urea cycle disorders, next-generation sequencing, missense, nonsense, deletion, splicing

## INTRODUCTION

Carbamoyl phosphate synthetase I (CPS1) deficiency (CPS1D) is a rare autosomal recessive urea cycle disorder, characterized by hyperammonemia with the incidence of 1/50,000 to 1/300,000 (Díez-Fernández et al., 2015). CPS1D is currently divided into two types of neonatal onset and late onset, whereas CPS1D with severe manifestations of hyperammonemia is common in neonatal-onset patients (Choi et al., 2017; Rokicki et al., 2017; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2018). Typically, the neonatal-onset patient with CPS1D appears to be healthy at birth, but deteriorates rapidly into severe hyperammonemia, presenting poor feeding, vomiting, hypotonia, irritability, seizures, hypothermia, lethargy, coma, apnea, and even death after first feeding (Funghini et al., 2012; Choi et al., 2017; Rokicki et al., 2017; Zhang et al., 2018).

The function of urea cycle is to transform toxic ammonia into non-toxic urea. CPS1 catalyzes the initial and limiting step of the urea cycle, which is critical in the detoxification of excess ammonia, so CPS1D patient suffering from hyperammonemia will present a decreased level of citrulline but elevated glutamine in blood amino acid analysis, and a low level of orotic acid in urine test (Funghini et al., 2012; de Cima et al., 2015; Ali et al., 2016).

It is difficult to timely diagnose CPS1D due to atypical manifestations like sudden onset, rapid progress, and low morbidity, as well as complicated and non-recurrent genetic mutations in *CPS1* gene (Choi et al., 2017; Rokicki et al., 2017; Zhang and Li, 2017). For more than a decade, the diagnosis of CPS1D has been mainly relied on the laboratory tests of tandem mass spectrometry (MS/MS) including liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). MS/MS is a high-throughput technique for measurement of the intermediate metabolites and has been widely used to distinguish dozens of metabolic diseases (Lehotay et al., 2011; Janecková et al., 2012; Hao et al., 2018). However, this technology cannot differentiate CPS1D from *N*-acetylglutamate synthase deficiency (NAGSD) in UCDs due to their similar intermediate metabolites. Until recently, next-generation sequencing (NGS), a powerful DNA sequencing technology, has revolutionized genomic research with great utility in the molecular diagnosis of genetic disorders (Choi et al., 2017; Jia et al., 2017; Rokicki et al., 2017; Li et al., 2018; Zhang et al., 2018), and has been proven reliable and important to detect *CPS1* mutation for early diagnosis of CPS1D, as the severity of clinical manifestations in CPS1D patients is determined by the extent of *CPS1* deficiency (Choi et al., 2017; Chen et al., 2018; Zhang et al., 2018).

In this study, we performed the clinical examinations and mutation analysis on two neonatal patients with CPS1D. The LC-MS/MS and GC/MS were carried out to detect amino acids in blood and organic acidurias in the urine, and then NGS was utilized to test the gene mutation. Strikingly, for the first time, we identified three novel pathogenic mutations of *CPS1*. To our knowledge, there have been so far only three reports of using NGS to detect *CPS1* mutations for CPS1D diagnosis (Choi et al., 2017; Chen et al., 2018; Zhang et al., 2018). Our novel findings further expanded the mutational spectrum of *CPS1* and demonstrated additional evidences of using NGS for precise identification of *CPS1* mutations in patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients, Samples and Ethical Approval

This study was approved by Medical Ethics Committee of Qilu Children's Hospital of Shandong University. The written informed consents were obtained from the parents of each study participant, and the patients' information was anonymized before submission. All the procedures performed in the study were in accordance with the Declaration of Helsinki.

Two patients from two unrelated families who were from the neonatal intensive care unit (NICU) of Qilu Children's Hospital of Shandong University (QCHSU) were firstly screened by LC/MS-MS and GC/MS. The parents of both patients were healthy and non-consanguineous. Blood samples were obtained from the patients and their parents in accordance with informed consents in the study.

In addition, 100 blood samples from healthy children were collected as control samples for mutations validation.

### Routine Examination and Biochemical Laboratory Tests

Routine physical examination, complete blood count (CBC), C-reactive protein (CRP), hemoculture, and biochemical laboratory tests, such as liver function, kidney function, glucose, ammonia, lactic acid, and blood gas analyses, were carried out.

The level of orotic acids in urine was measured by GC/MS with GCMS-QP2010 analyzer (Shimadzu, Tokyo, Japan) and analyzed by the Inborn Errors of Metabolism Screening System software (Shimadzu), whereas amino acids level in blood was detected by LC-MS/MS with Applied Biosystems API 3200 analyzer (ABSCIEX, Foster City, CA) and analyzed by the ChemoView software (ABSCIEX).

### Next-Generation Sequencing and Variant Discovery

Genomic DNA was extracted and purified from peripheral blood of the two patients and their parents using TIANamp Blood Genomic DNA Purification Kit (Tiangen Biotech, Beijing, China). Whole-exome sequencing was applied to test mutation of genes in both patients. Approximately 3  $\mu$ g of genomic DNA was randomly fragmented. An exome enriched kit (Agilent, Santa Clara, CA) was used to obtain the coding exons and flanking intronic regions. The sequencing was performed using HiSeq2000 sequencer (Illumina, San Diego, CA). The obtained mean exome coverage was over 99.2%, and average sequencing depth of each sample was 100%. Raw data obtained from the sequencer were further analyzed including read alignment, variant calling, and annotation by SinoPath Enterprise Ltd (Beijing, China). Low-quality reads (quality score  $\leq 20$  and sequencing depth  $\leq 5$ ) in the raw data were removed. Filtered reads were aligned to the human reference genome (UCSC hg19 Feb.2009) using the Burrows-Wheeler Aligner (Raney et al., 2014). Single-nucleotide variants (SNVs) and small insertions/deletions (indels) can be detected. Annotation was carried out by ANNOVAR for gene information, protein functional predictions, and population allele frequencies (Wang et al., 2010). Variants outside of coding regions and greater than 1% MAF (minor allele frequency) in the population were excluded.

### Bioinformatic Analysis and Verification of Mutations

All known variants were reported according to the following databases: OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/limits>), UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>), Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), 1000 Genomes Database (<http://browser.1000genomes.org>), ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/about>), and gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>). *In silico* analysis of the variants was carried out using PolyPhen-2 and SIFT and Mutation Taster to predict the pathogenicity. Human Splicing Finder (HSF) was applied to predict the effect of splicing variant. The multiple-sequence alignments were carried out by ClustalX. Modeling of affected protein structure was processed using

SWISS-MODEL. The data analysis was conducted referring to the document (Jin et al., 2018). All the selected variants were classified as pathogenic, likely pathogenic, a variant of unknown significance (VUS), likely benign, or benign according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines (Richards et al., 2015). The potential pathogenic mutations were validated by Sanger sequencing.

## RESULTS

### Clinical Characteristics of Two Patients

The clinical manifestations and laboratory data from the two patients were summarized in Table 1. Both patients were neonatal-onset type presenting fulminant symptoms due to serious hyperammonemia so that the life-sustaining mechanical ventilation, medications of vasopressors, liquid infusion, and ammonia scavengers were administered.

Patient 1 (P1), a full-term female, the first child of healthy unrelated parents, was vaginally delivered. Her mother had regular prenatal care starting from 12 weeks of pregnancy. She was apparently healthy at birth with weight of 2.95 kg, Apgar score of 10 at 1 min and 5 min after birth. The following day, however, she had a fever, and then gradually developed hyporeactiveness presenting respiratory distress, seizures, and acute circulatory collapse so she was immediately transported to NICU in QCHSU from local hospital. Laboratory tests revealed the abnormal blood indexes of ammonia, 1,404  $\mu\text{mol/L}$  (reference, 18–72  $\mu\text{mol/L}$ ); citrulline, 3.82  $\mu\text{mol/L}$  (reference, 4–30  $\mu\text{mol/L}$ ); alanine, 1,264.4  $\mu\text{mol/L}$  (reference, 62.9–328  $\mu\text{mol/L}$ ); lactic acid, 5.8 mmol/L (reference, 0.7–2.1 mmol/L); glucose, 0.3 mmol/L (reference, 3.3–6.1 mmol/L); and white blood cells  $22.06 \times 10^9/\text{L}$  (reference,  $5.0\text{--}14.5 \times 10^9/\text{L}$ ), as well as abnormal urinary indexes of undetected orotic acid and elevated 3-MGA 15.7 mmol/L (ref. 0–4 mmol/L). The chest radiograph result reported pneumonia and possible atelectasis. Patient heart rate reached up to 180 beats/min but the ejection fraction was only 38% and no signs of congenital heart disease (Table 1).

The mechanical ventilation and medications of vasopressors, liquid infusion, and antibiotics, ammonia scavengers, such as dopamine, dobutamine, dilator, meropenem, lactulose, and L-arginine were administered immediately. Meanwhile, oral feeding was forbidden, and total parenteral nutrition with lower amino acid was administered. Unfortunately, the patient deteriorated continually into multiple-organ failure and even had cardiac arrest with no spontaneous breathing. Considering the poor prognosis, her parents gave up her treatment, and she died at age of 5 days.

Patient 2 (P2), a full-term girl, the second child of healthy unrelated parents, was vaginally delivered. The first child of the family died suddenly at the third day after birth without a definite diagnosis. Her mother had regular prenatal care, and she was normal at birth with a weight of 2.9 kg, Apgar score of 10 at 1 and 5 min after birth. On the third day, however, she had a sudden onset of hyperlactacidemia and deteriorated even faster than P1 did. At the beginning, she was hyporeactive presenting grunting and anorectic, but no manifestations of

**TABLE 1 |** Clinical and laboratory data of the two patients with CPS1D.

Patients	P1	P2
<b>Gender</b>	Female	Female
<b>Age at onset</b>	2D	3D
<b>Age deceased</b>	5D	4D
<b>Complications during pregnancy</b>	uneventful	uneventful
<b>Weeks gestation at delivery</b>	40	39 <sup>s</sup>
<b>Birth weight (kg), Apgar score</b>	2.95, 10	2.9, 10
<b>Clinical course</b>	fulminant	fulminant
<b>Clinical features</b>		
Fever	+	–
Seizure	+	–
Coma	+	+
Cyanosis	+	+
Breathing	weak	grunting
Hemorrhage	–	Lung, stomach
Cardiac failure	+	+
Poor feeding	+	+
Abdominal distention		+
Urine	oliguria	anuria
<b>Arterial blood gas analysis</b>		
PH (reference, 7.25–7.45)	7.13↓	7.10↓
PO <sub>2</sub> (reference, 50–80 mm Hg)	67	72
PCO <sub>2</sub> (reference, 40–60 mm Hg)	42	62↑
HCO <sub>3</sub> (reference, 19–30 mmol/L)	12↓	19.2
BE (reference, –3 to +3)	–18↓	–10.5↓
<b>Blood routine test</b>		
Red blood cells (reference, $3.5\text{--}5.5 \times 10^{12}/\text{L}$ )	5.68↑	3.35↓
White blood cells (reference, $5.0\text{--}14.5 \times 10^9/\text{L}$ )	22.06↑	24.77
Platelet count (reference, $100\text{--}300 \times 10^9/\text{L}$ )	354↑	290
Hemoglobin (reference, 138–218 g/L)	195	117↓
<b>Urine routine test</b>		
BLD (negative)	++	+++
PRO (negative)	++	+
KET (negative)	–	–
<b>Blood biochemical tests</b>		
ALT (reference, 0–38 U/L)	37	24
Lactic acid (reference, 0.7–2.1 mmol/L)	5.8↑	5.6↑
Glucose (reference, 3.3–6.1 mmol/L)	0.3↓	12↑
Potassium (reference, 3.5–5.5 mmol/L)	7.4↑	4.6
Sodium (reference, 135–145 mmol/L)	154↑	142
AST (reference, 0–38 U/L)	130↑	78↑
CK (reference, 21–220 U/L)	936↑	780↑
CK-MB (reference, 0–25 U/L)	30↑	67↑
PCT (reference, <0.5 ng/ml)	67.322↑	0.794↑
ammonia (reference, 18–72 $\mu\text{mol/L}$ )	1404↑	823↑
<b>Blood mass spectrometry profile</b>		
Citrulline (reference, 4–30 $\mu\text{mol/L}$ )	3.82↓	3.08↓
Alanine (reference, 62.9–328 $\mu\text{mol/L}$ )	1264.4↑	3337.99↑
Proline (reference, 72–293 $\mu\text{mol/L}$ )	634.45↑	413.38↑
Ornithine (reference, 42–358 $\mu\text{mol/L}$ )	69.01	106.95
<b>Urinary organic acids</b>		
Urinary orotic acid (reference, 0–2 mmol/L)	0	0
Urinary 3-MGA (reference, 0–4 mmol/L)	15.7↑	45.75↑
<b>Chest X-ray</b>		
Pneumonia	+	–
Pneumorrhagia	–	+
<b>Echocardiography</b>		
Ejection fraction	38%↓	37%↓
Patent ductus arteriosus	+	–
Patent foramen ovale	+	+
<b>CPS1 sequencing</b>		
Allele 1 (from father)	c.1631C > T (p.T544M)	c.2896G > T (p.E966X)
Allele 2 (from mother)	c.1981G > T (p.G661C)	c.622–3C > G

+positive, ↑elevated, ↓decreased.

fever, vomiting, and seizures. Five hours later, she developed pneumorrhagia, gastrointestinal hemorrhage, and anuria, so that she was immediately transferred to NICU in QCHSU from her local hospital. On the way to the hospital, her heart rate and oxygen saturation could not be maintained; cardio-pulmonary resuscitation and mechanical ventilator had to be administered. Nevertheless, she deteriorated very quickly, presenting coma, shock, and irregular respirations. When she was admitted, she looked pale with reduced perfusion and a low ejection fraction (37.9%) in her echocardiography. The blood flowed out of her intratracheal tube and nose. Her pupil diameter was about 4 mm, and pupillary reflex disappeared. Laboratory tests revealed abnormal blood indexes of ammonia, 823  $\mu\text{mol/L}$ ; citrulline, 3.08 mmol/L; alanine, 3,337.99  $\mu\text{mol/L}$  (reference, 62.9–328  $\mu\text{mol/L}$ ); lactic acid, 5.6 mmol/L; glucose, 12 mmol/L; and white blood cells,  $24.77 \times 10^9/\text{L}$ , as well as abnormal urinary indexes of undetected orotic acid and increases 3-MGA 45.75 mmol/L. The chest radiograph showed exudative lesions, which matched her pulmonary hemorrhage.

This patient received immediate treatment that was similar as P1 with mechanical ventilation, vasopressors, liquid infusion, ammonia scavengers (such as lactulose and L-arginine), dopamine, dobutamine, dilator, as well as total parenteral nutrition with lower amino acid. She continued to deteriorate with tremendous speed and no sign of improvement after 13 h of admission and died at the age of 4 days.

## Genetic Analysis and Pathogenicity Prediction

Whole-exome sequencing showed two compound heterozygous variants of the CPS1 gene in both P1 and P2, individually, including two missense variants of c.1631C > T (p.T544M) and c.1981G > T (p.G661C) found in P1, a nonsense variant c.2896G > T (p.E966X) and a splicing variant c.622-3C > G detected in P2. Of which, the variant c.1631C > T (p.T544M) was a known pathogenic mutation causing CPS1D (Finckh et al., 1998; Häberle et al., 2011) (Table 1 and Figures 1A, B), whereas the remaining three variants of c.1981G > T (p.G661C), c.622-3C > G, and c.2896G > T (p.G966X) were novel and unreported in publications and public databases of OMIM, UCSC, HGMD, dbSNP, 1000 genomes, ExAC, and gnomAD. The missense c.1981G > T (p.G661C) occurred with an amino acid change from a nonpolar amino acid of glycine (G) to a polar amino acid of cysteine (C); the nonsense c.2896G > T (p.G966X) would create a premature stop codon; the splicing change c.622-3C > G was predicted to affect acceptor splice site. There were no mutations found in the control samples by using Sanger sequencing.

The pathogenicity of three novel variants was further analyzed using various prediction online tools. In brief, HSF was applied to assess the potential impacts on the splicing of three novel variants as all these variants located near intron-exon junction. The predicted results showed that all three variants in the exon 17 (c.1981G > T), intron 7 (c.622-3C > G), and exon 24 (c.2896G > T) probably affect the splice sites (Figures 2A–C). The missense mutations of c.1981G > T (p.G661C)

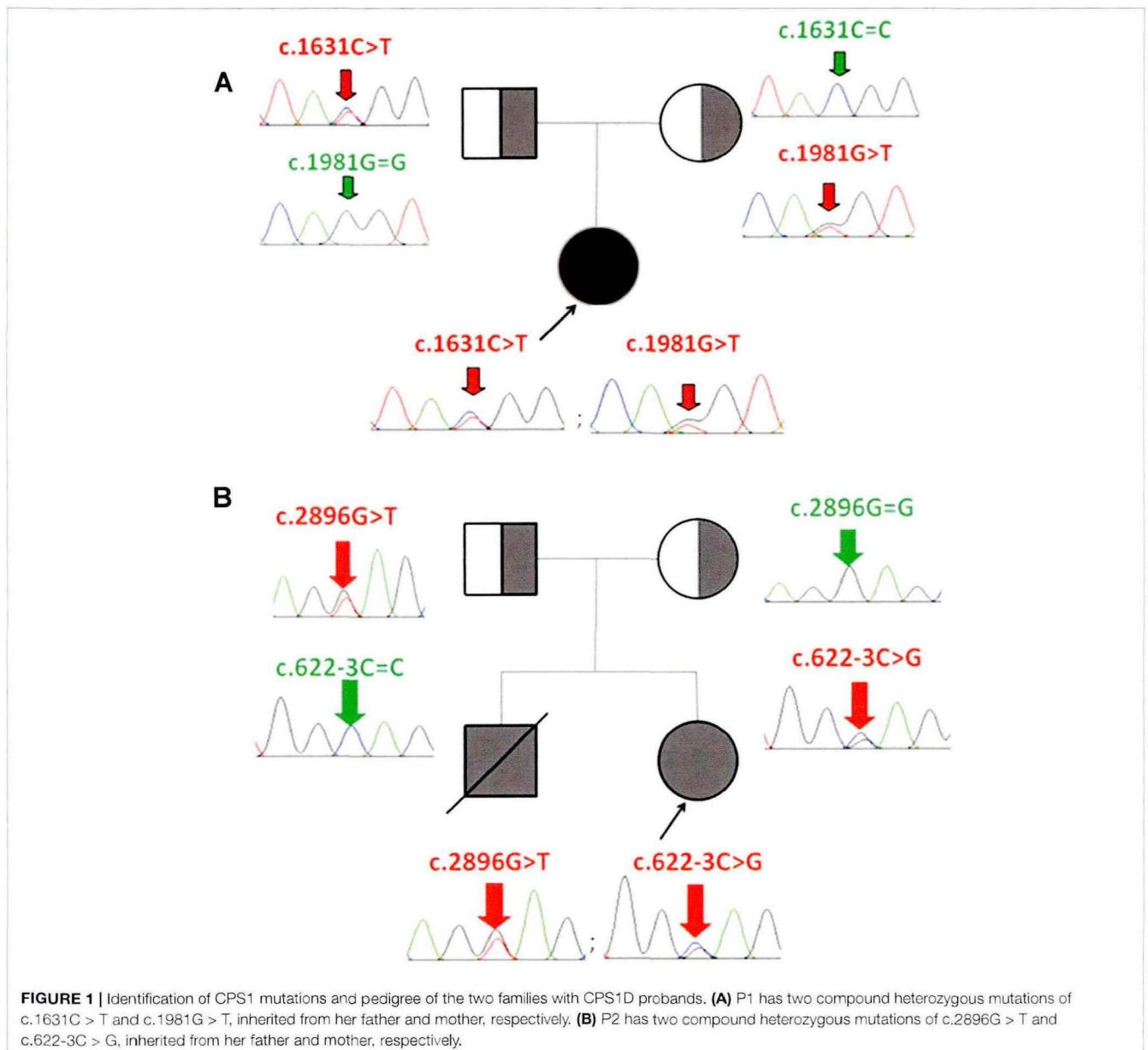
were predicted to be pathogenic by SIFT, MutationTaster, and PolyPhen-2 (Figure 3A). The conservation analysis of the variants of c.1981G > T (p.G661C) and c.2896G > T (p.G966X) in CPS1 showed that both sites were highly conservative in different species by using ClustalX (Figures 3B, C), whereas the missense variant c.1981G > T (p.G661C) was predicted to change the highly evolutionary conserved amino acid in CPS1, and the nonsense variant c.2896G > T (p.G966X) causing a premature stop could generate a truncated protein with missing conserved site of CPS1. In addition, the CPS1 protein crystallographic structure of both mutant types (p.G661C and p.G966X) revealed the changes of side strand structure and H-bond in variant of p.G661C, and a truncated protein with loss of 534 amino acids in variant of p.G966X (Figures 4A, B). All the mutation information and clinical data were uploaded into eRAM (Jia et al., 2018).

## DISCUSSION

Pediatric rare diseases are often rapid deterioration with high mortality, which can be obviously improved by early diagnosis and treatment (Ni et al., 2017). CPS1D is a rare inborn error of UCD caused by CPS1 deficiency manifesting sudden onset, rapid progress, and low morbidity. In this study, we presented the detailed clinical manifestations and mutation analysis of two neonatal CPS1D cases. First, the blood ammonia, amino acids, and urine organic acids test results reported severe hyperammonemia on both patients, and the patients have very high levels of alanine and decreased levels of citrulline in blood, as well as the increased levels of 3-MGA and decreased levels of orotic acid in urine. We therefore referred patients for whole-exome sequencing to determine the genetic cause of this inborn error of metabolism. After validation of Sanger sequencing, two compound heterozygous variants in CPS1 were identified in both patients, and one missense variant (c.1631C > T, p.T544M) was of known pathogenicity (Finckh et al., 1998; Häberle et al., 2011), whereas other three were novel and predicted to be pathogenic. Therefore, both patients were finally diagnosed as neonatal-onset CPS1D caused by CPS1 mutations. To our knowledge, this study is the fifth case report of CPS1D in China and the 262–264th novel mutations in CPS1 documented in the world (Chen et al., 2013; Yang et al., 2017; Chen et al., 2018; Zhang et al., 2018), which expands the mutation spectrum of CPS1 (Supplementary Tables S1 to S4).

CPS1 is an enzyme that catalyzes the first and rate-limiting reaction of three steps in ammonia detoxification of the urea cycle from ammonia to carbamoyl phosphate (de Cima et al., 2015; Ali et al., 2016). Normal function of the urea cycle requires six enzymes, including CPS1 as well as two mitochondrial transporters (Helman et al., 2014). CPS1 deficiency caused by CPS1 gene mutation usually leads to accumulation of ammonia in the blood and thereby presents severe hyperammonemia, which is neurotoxic resulting in neonatal death or severe and irreversible brain damage in the developing and mature brain (Funghini et al., 2012; Choi

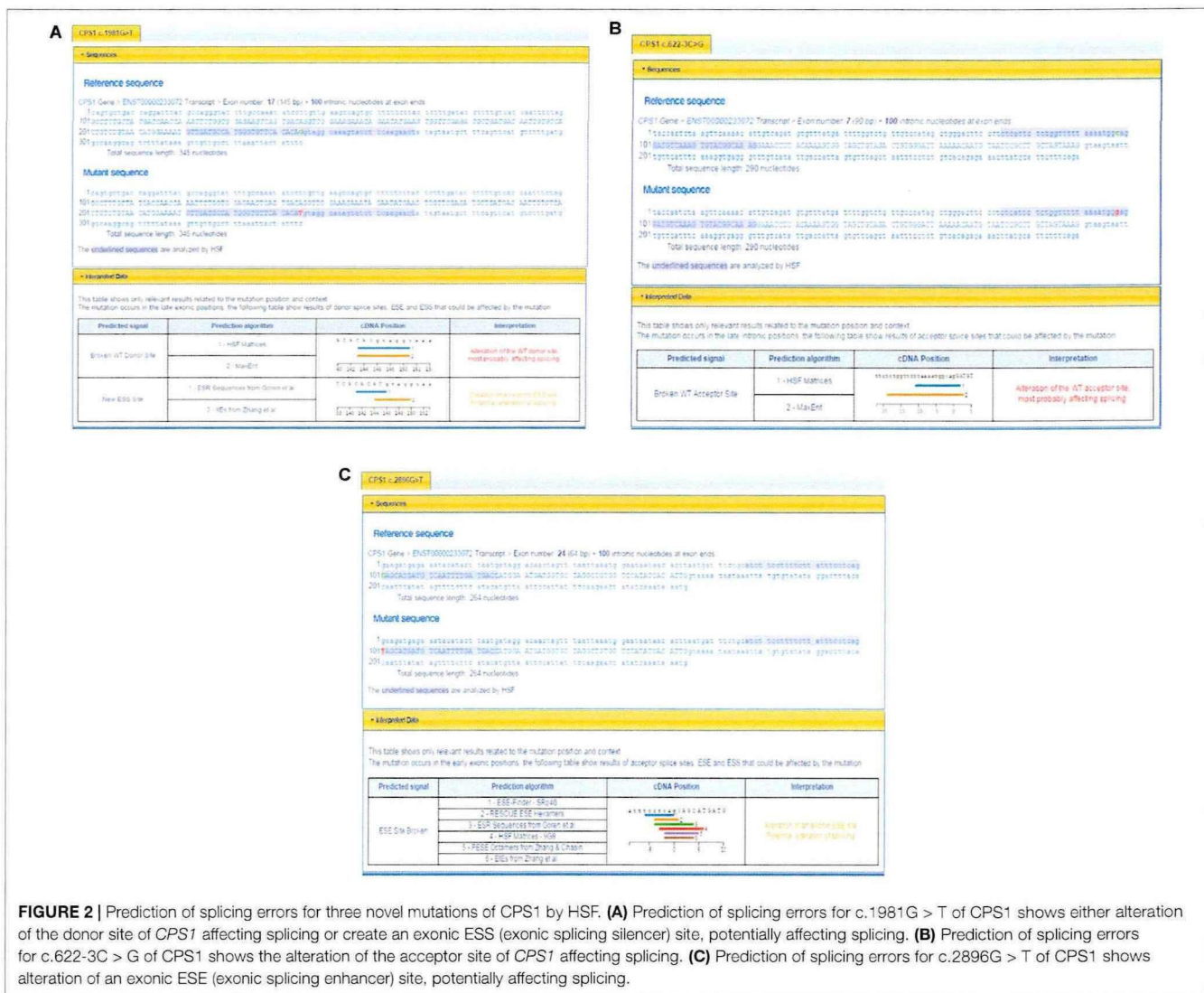




et al., 2017; Rokicki et al., 2017; Yang et al., 2017). CPS1D are divided into two types of lethal neonatal-onset or less severe late-onset based on the age of onset, clinical features, and severity of CPS1 deficiency (Diez-Fernandez et al., 2017). To date, most of the reported CPS1D cases are neonatal-onset with severe hyperammonemia and usually died of multiorgan failure. Signs and symptoms in patients with CPS1D are often atypical with rapid progression and extremely low morbidity, which makes the clinical diagnosis difficult (Funghini et al., 2012; Choi et al., 2017; Rokicki et al., 2017).

As a result, the diagnosis of CPS1D is heavily dependent on laboratory data, such as blood ammonia, blood amino acids, urine organic acids, and genetic testing. The determination of blood ammonia concentration is critical for early clinical

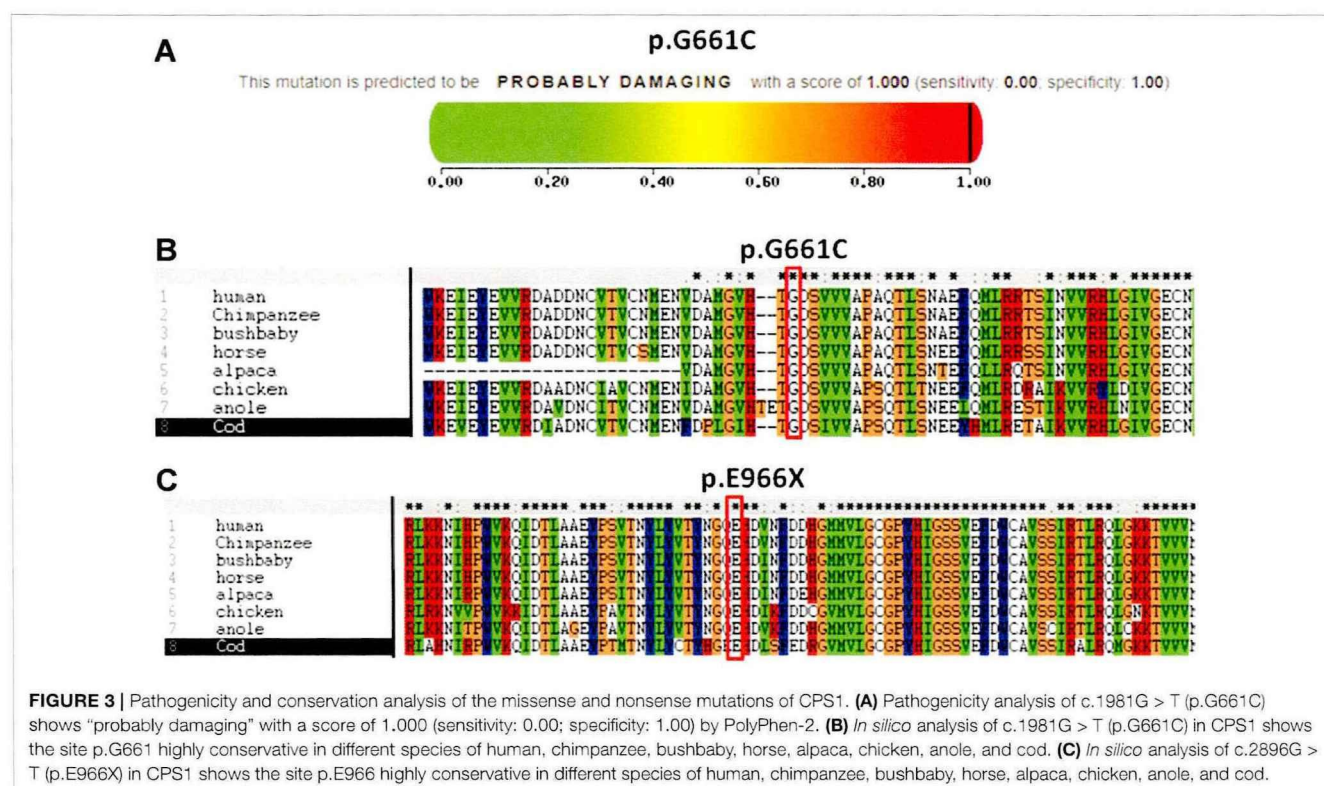
evaluation as it often reaches 150  $\mu\text{mol/L}$  or higher in acute stage (László et al., 1991). Abnormal level of amino acids can be detected by mass spectrometry, like elevated blood glutamate, glutamine, and alanine, and reduced citrulline and arginine, whereas decreased urinary orotic acid and increased urinary 3-MGA (Lehotay et al., 2011; Janecková et al., 2012). Next-generation sequencing has been increasingly accessible in clinical laboratory for precise diagnosis of inborn errors of metabolism, including CPS1D (Choi et al., 2017; Yang et al., 2017; Li et al., 2018); for the biochemical tests mentioned above, one cannot distinguish from different types of UCD, particularly N-acetylglutamate synthase deficiency (NAGSD) from CPS1D due to similar intermediary metabolites (Choi et al., 2017).



**FIGURE 2 |** Prediction of splicing errors for three novel mutations of CPS1 by HSF. **(A)** Prediction of splicing errors for c.1981G > T of CPS1 shows either alteration of the donor site of CPS1 affecting splicing or create an exonic ESS (exonic splicing silencer) site, potentially affecting splicing. **(B)** Prediction of splicing errors for c.622-3C > G of CPS1 shows the alteration of the acceptor site of CPS1 affecting splicing. **(C)** Prediction of splicing errors for c.2896G > T of CPS1 shows alteration of an exonic ESE (exonic splicing enhancer) site, potentially affecting splicing.

CPS1 (NM\_001875.4) located on chromosome 2q34, spans over 122 kb consisting of 38 exons, which encode a polypeptide of 1,500 amino acids. Up to now, different variations of CPS1 have been reported, including missense, nonsense, small deletions, small insertions, small indels (insertions+deletions), and large deletions. As far as both cases of this study are concerned, two missense variants of c.1631C > T (p.T544M) and c.1981G > T (p.G661C) were found in a 2-day neonate girl (P1) with severe hyperammonemia. The variant of c.1631C > T (p.T544M) was a previously reported mutation (Finckh et al., 1998; Häberle et al., 2011) and was proven in the expression study causing large decrease of the enzyme activity due to hampering of the cross-talk between the bicarbonate phosphorylation domain (BPSD) and the allosteric NAG binding domain (ASD) (Diez-Fernandez et al., 2013). Another missense mutation (c.1981G > T, p.G661C) in P1 was novel and unreported. The pathogenicity of c.1981G > T (p.G661C) was analyzed and predicted as “deleterious” by SIFT, “protein features affected”

by MutationTaster, and “probably damaging” with a score of 1.000 (sensitivity: 0.00; specificity: 1.00) by PolyPhen-2 (Figure 3A). As the variant occurred at the last exon base of the 17 exon, the potential splicing effect was assessed by HSF, which revealed a possible donor site error affecting the splicing of mRNA (Figure 2A). Moreover, the amino acid substitution site was highly conservative in different species analyzed by ClustalX (Figure 3B), so the alteration of p.G661C from glycine to cysteine was predicted to not only interrupt the conserved position of glycine but also change the side strand structure in the CPS1 protein crystallographic model, which produced a defective protein (Figure 4A). In addition, the mutation site of c.1981G > T (p.G661C) is identical as that of a known variant c.1981G > C (p.G661R) with the substitution of a small glycine residue by a large side chain, which was predicted to decrease structural stability of the protein (Funghini et al., 2012). Thus, we inferred that the substitution of amino acids from glycine to cysteine (p.G661C) might have a similar damage to the CPS1



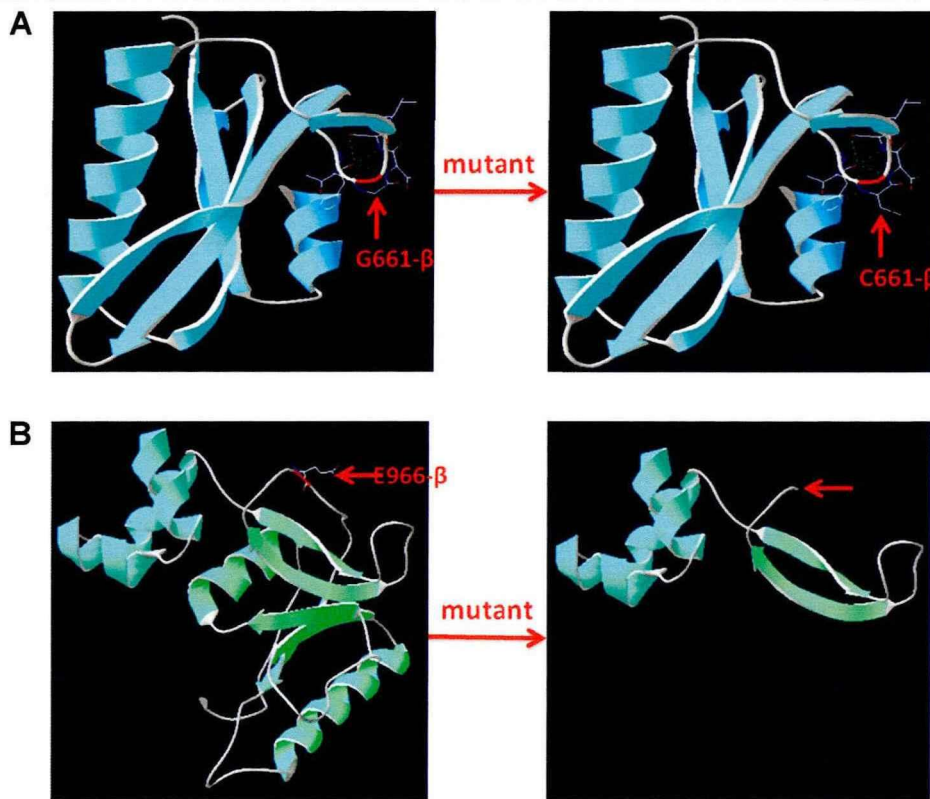
**FIGURE 3 |** Pathogenicity and conservation analysis of the missense and nonsense mutations of CPS1. **(A)** Pathogenicity analysis of c.1981G > T (p.G661C) shows “probably damaging” with a score of 1.000 (sensitivity: 0.00; specificity: 1.00) by PolyPhen-2. **(B)** *In silico* analysis of c.1981G > T (p.G661C) in CPS1 shows the site p.G661 highly conservative in different species of human, chimpanzee, bushbaby, horse, alpaca, chicken, anole, and cod. **(C)** *In silico* analysis of c.2896G > T (p.E966X) in CPS1 shows the site p.E966 highly conservative in different species of human, chimpanzee, bushbaby, horse, alpaca, chicken, anole, and cod.

stability, and both missense mutations in *CPS1*, leading to defects of enzyme function, are therefore the genetic cause of the patient with CPS1D.

A nonsense variant of c.2896G > T (p.G966X) and a splicing site change of c.622-3C > G were detected in a 3-day neonatal girl (P2). Since the nonsense variant site (c.2896G > T, p.G966X) is the first exon base of the 24th exon, its probable impact on splicing was assessed by HSF and revealed a potential effect of splicing with the alteration of an ESE (exonic splicing enhancer) site (Figure 2C). Besides, this position of glycine was highly conservative in different species analyzed by ClustalX (Figure 3C); the variant was predicted to generate a truncated protein with a loss of 534 amino acids and abolish the activity of the enzyme. The crystallographic structure model of the G966X further demonstrated the truncated protein (Figure 4B). The mutation of c.622-3C > G in intron 7 was a splicing site change that was predicted to alter the acceptor site of *CPS1* gene and affect mRNA splicing, which would produce a nonfunctional enzyme (Figure 2B). The severe phenotype of P2 with more rapid progress to multiple-organ failure within 13 h from her onset suggested that both alleles encode a nonfunctional protein. Additionally, an unusual death of the first boy in the family drew our attention. The first child was born at term and apparently healthy after a normal pregnancy. He had sudden deterioration and died on the third day without a definite diagnosis. The retrospective analysis of the first boy from this family demonstrated that he had similar features as P2. We conjectured that the first child might carry

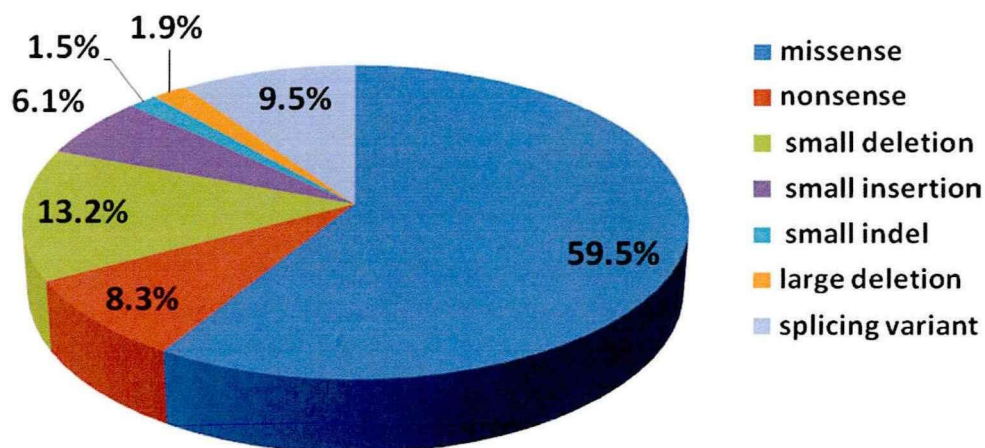
the identically compound heterozygous variants inherited from their father and mother as his sister P2. On this occasion, genetic counseling and prenatal genetic testing are necessary for the subsequent pregnancy. Considering the positions of the novel mutations and their potential splicing defects, RT-PCR should be used to identify the possibly aberrant transcripts; unfortunately, we failed to get the RNA from both patients due to their parents’ refusal.

We reviewed all publications of *CPS1* variants in cases of CPS1D, and a total of 264 *CPS1* different variations (including the 3 variants in this study) have been reported. Among them, the missense variants were the majority accounting for 157 (59.5%), followed by small deletions of 35 (13.2%), splice site changes of 25 (9.5%), and nonsense of 22 (8.3%), whereas the minority of the variants were 4 (1.5%) small indels and 5 (1.9%) large deletions with missing 1,000 bp to 767 kb, which were detected by genomic microarray (Figure 5). Of the variants, 81 (30.7%) were predicted to cause protein truncation, including 22 nonsense, 31 small deletions, 16 small insertions, 4 small indels, 6 splicing site changes, and 2 large deletions. Our reviewing data further clarified that most *CPS1* variants (>90%) were “private” with non-recurrence, and the few recurrent mutations tended to occur at CpG dinucleotides, which made the diagnosis more complicated (Supplementary Tables S1 to S4) (Hoshida et al., 1993; Finckh et al., 1998; Summar et al., 1998; Ihara et al., 1999; Aoshima et al., 2001a; Aoshima et al., 2001b; Rapp et al., 2001; Wakutani et al., 2001; Häberle et al., 2003; Eeds et al., 2006; Kurokawa et al., 2007;



**FIGURE 4** | 3D structure of wild type and mutant type of p.G661C and p.E966X in CPS1. **(A)** Wild type and mutant type of p.G661 in CPS1 shows the mutation of G661C changes the side strand structure and H-bond. **(B)** Wild type and mutant type of E966 in CPS1 shows the mutation of E661X leading to a truncated protein with missing 534 amino acids. The red arrows marked the sites of wild-type G661, E966, and mutated C661, X966.

### Distribution of mutation spectrum in CPS1



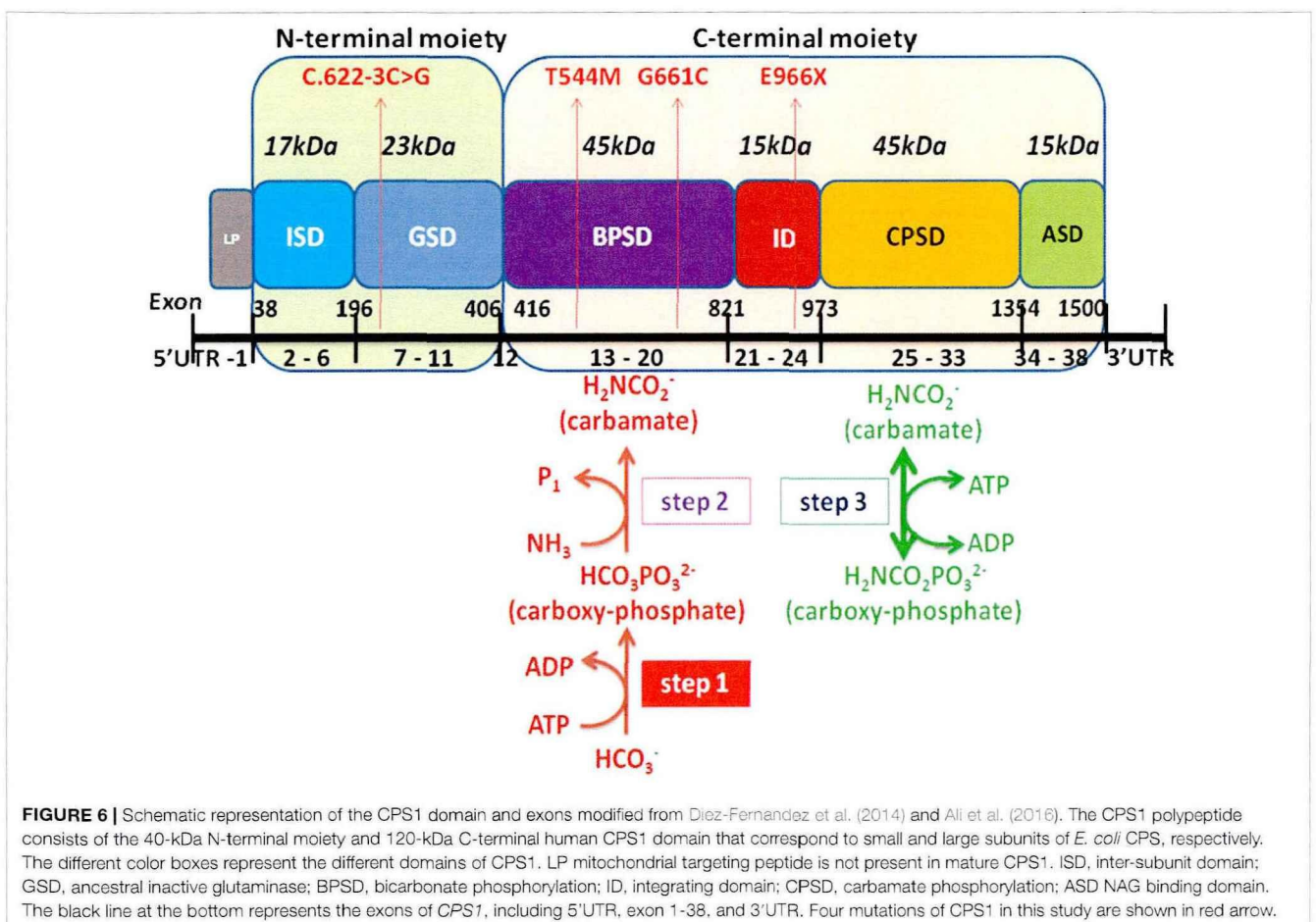
**FIGURE 5** | Distribution of mutation spectrum in CPS1 reported in both cases and literature. A total of 259 mutations in CPS1 include 58.7% missense, 8.5% nonsense, 13.5% small deletion, 6.2% small insertion, 9.6% splicing, 1.6% small indel, and 1.9% large deletion.

Khayat, 2009; Ono et al., 2009; Pekkala et al., 2010; Häberle et al., 2011; Wang et al., 2011; Funghini et al., 2012; Kretz et al., 2012; Diez-Fernandez et al., 2014; Ali et al., 2016; Choi et al., 2017; Rokicki et al., 2017; Yang et al., 2017; Chen et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Encoded by *CPS1* gene, CPS1 is a complex multidomain enzyme, composed of a 40-kDa N-terminal moiety with two unknown function domains and a 120-kDa C-terminal moiety involving four domains of bicarbonate phosphorylation (BPSD), integrating (ID), carbamate phosphorylation (CPSD), and allosteric NAG binding (ASD) (Diez-Fernandez et al., 2014; de Cima et al., 2015). The C-terminal moiety contains two ATP-binding sites, catalyzing the synthesis of carbamoyl phosphate from bicarbonate, ATP, and ammonia and has been discovered to possess missense mutations of *CPS1* with high frequency and plays a critical integrating role in folding of structural elements leading to decreased yield of CPS1 (Figure 6) (Häberle et al., 2011; Diez-Fernandez et al., 2013; Diez-Fernandez et al., 2014). We analyzed the distribution of the 264 mutations and found that 66 (25%) variants were located at N-terminal moiety, whereas 198 (75%) mutations were at C-terminal moiety involving 76 variants at BPSD, 29 at ID, 75 at CPSD, and 18 at ASD.

Three novel mutations were found in the study, two located at BPSD of C-terminal and one at N-terminal moiety, which further supported the importance of the C-terminal moiety in maintaining the function of CPS1.

At present, the treatment of CPS1D is to strictly follow the recommendations of UCDs, which focuses on reduction of ammonia production by a restricted protein diet and management of ammonia scavengers, such as sodium benzoate, sodium phenylbutyrate, and sodium phenylacetate, as well as drugs of L-arginine and L-citrulline to improve the residual urea cycle function and the renal excretion of ammonia (Diez-Fernandez and Häberle, 2017). In case of severe hyperammonemia, hemodialysis or peritoneal dialysis can be administered (Häberle, 2012; Diez-Fernandez and Häberle, 2017). However, these approaches cannot cure CPS1D, and the only available cure currently is liver transplantation, which has demonstrated excellent results with approximately 90% survival rate in UCD children, though it is limited by donor sources (Diez-Fernandez and Häberle, 2017; Zhang and Li, 2017). To date, most of the CPS1D patients died before receiving the confirmed diagnosis, so the detection of blood ammonia, blood amino acids, urine organic acid, and next-generation sequencing should be performed as early as possible.



## CONCLUSION

In this study, we presented the detailed clinical features and genetic analysis of two patients with neonatal-onset CPS1D and discovered three novel pathogenic variants in *CPS1* by whole-exome sequencing with a comprehensive outline of available publications regarding *CPS1* gene mutations. A total 264 different variants of *CPS1* have been reported with the majority of 157 (59.5%) missense, followed by small deletions of 35 (13.2%), and the minority of 5 (1.9%) large deletions and 4 (1.5%) indels, of which 81 (30.7%) were predicted to cause protein truncation. Our data further expand the spectrum of *CPS1* mutation and support the clinical applicability of whole-exome sequencing for genetic diagnosis of UCD.

## ETHICS STATEMENT

The work was approved by Medical Ethics Committee of Qilu Children's Hospital of Shandong University. Written informed consents was obtained from the patients' parents and the patients' information was anonymized before submission. All the procedures performed in the study were in accordance with the Declaration of Helsinki.

## REFERENCES

- Ali, E. Z., Khalid, M. K. N. M., Yunus, Z. M., Yakob, Y., Chin, C. B., Latif, K. A., et al. (2016). Carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency: clinical, biochemical, and molecular characterization in Malaysian patients. *Eur. J. Pediatr.* 175 (3), 339–346. doi: 10.1007/s00431-015-2644-z
- Aoshima, T., Kajita, M., Sekido, Y., Kikuchi, S., Yasuda, I., Saheki, T., et al. (2001a). Novel mutations (H337R and 238-362del) in the *CPS1* gene cause carbamoyl phosphate synthetase I deficiency. *Hum. Hered.* 52 (2), 99–101. doi: 10.1159/000053360
- Aoshima, T., Kajita, M., Sekido, Y., Mimura, S., Itakura, A., Yasuda, I., et al. (2001b). Carbamoyl phosphate synthetase I deficiency: molecular genetic findings and prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* 21 (8), 634–637. doi: 10.1002/pd.123
- Chen, M., Zhang, A., and Xu, Q. (2013). A case report of carbamoyl phosphate synthetase I deficiency. *Jilin Med. (in Chinese)* 34 (35), 7563–7564.
- Chen, X., Yuan, L., Sun, M., Liu, Q., and Wu, Y. (2018). Two novel CPS1 mutations in a case of carbamoyl phosphate synthetase I deficiency causing hyperammonemia and leukodystrophy. *J. Clin. Lab. Anal.* 32 (5), e22375. doi: 10.1002/jcla.22375
- Choi, R., Park, H. D., Yang, M., Ki, C. S., Lee, S. Y., Kim, J. W., et al. (2017). Novel pathogenic variant (c.580C > T) in the *CPS1* gene in a newborn with carbamoyl phosphate synthetase I deficiency identified by whole exome sequencing. *Ann. Lab. Med.* 37 (1), 58–62. doi: 10.3343/alm.2017.37.1.58
- de Cima, S., Polo, L. M., Díez-Fernández, C., Martínez, A. I., Cervera, J., Fita, I., et al. (2015). Structure of human carbamoyl phosphate synthetase: deciphering the on/off switch of human ureagenesis. *Sci. Rep.* 5, 16950. doi: 10.1038/srep16950
- Díez-Fernández, C., and Häberle, J. (2017). Targeting CPS1 in the treatment of carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency, a urea cycle disorder. *Expert Opin. Ther. Targets* 21 (4), 391–399. doi: 10.1080/14728222.2017.1294685
- Díez-Fernández, C., Martínez, A. I., Pekkala, S., Barcelona, B., Perez-Arellano, L., Guadalupe, A. M., et al. (2013). Molecular characterization of carbamoyl-phosphate synthetase (CPS1) deficiency using human recombinant CPS1 as a key tool. *Hum. Mutat.* 34 (8), 1149–1159. doi: 10.1002/humu.22349
- Díez-Fernández, C., Hu, L., Cervera, J., Häberle, J., and Rubio, V. (2014). Understanding carbamoyl phosphate synthetase (CPS1) deficiency by using the recombinantly purified human enzyme: effects of CPS1 mutations that concentrate in a central domain of unknown function. *Mol. Genet. Metab.* 112 (2), 123–132. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.04.003
- Díez-Fernández, C., Gallego, J., Häberle, J., Cervera, J., and Rubio, V. (2015). The study of carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency sheds light on the mechanism for switching on/off the Urea Cycle. *J. Genet. Genomics* 42 (5), 249–260. doi: 10.1016/j.jgg.2015.03.009
- Eeds, A. M., Hall, L. D., Yadav, M., Willis, A., Summar, S., Putnam, A., et al. (2006). The frequent observation of evidence for nonsense-mediated decay in RNA from patients with carbamyl phosphate synthetase I deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 89 (1–2), 80–86. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.04.006
- Finckh, U., Kohlschütter, A., Schaefer, H., Sperhake, K., Colombo, J. P., and Gal, A. (1998). Prenatal diagnosis of carbamoyl phosphate synthetase I deficiency by identification of a missense mutation in CPS1. *Hum. Mutat.* 12 (3), 206–211. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:3<206::AID-HUMU8>3.0.CO;2-E
- Funghini, S., Thusberg, J., Spada, M., Gasperini, S., Parini, R., Ventura, L., et al. (2012). Carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency in Italy: clinical and genetic findings in a heterogeneous cohort. *Gene* 493 (2), 228–234. doi: 10.1016/j.gene.2011.11.052
- Hao, C., Guo, J., Guo, R., Qi, Z., Li, W., and Ni, X. (2018). Compound heterozygous variants in *POR* gene identified by whole-exome sequencing in a Chinese pedigree with cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Pediatr. Invest.* 2 (2), 90–95. doi: 10.1002/ped4.12035
- Häberle, J. (2012). Carglumic acid for the treatment of N-acetylglutamate synthase deficiency and acute hyperammonemia. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 7 (3), 263–271. doi: 10.1586/eem.12.17
- Häberle, J., Schmidt, E., Pauli, S., Rapp, B., Christensen, E., Wermuth, B., et al. (2003). Gene structure of human carbamylphosphate synthetase 1 and novel mutations in patients with neonatal onset. *Hum. Mutat.* 21 (4), 444. doi: 10.1002/humu.9118
- Häberle, J., Shchelochkov, O. A., Wang, J., Katsonis, P., Hall, L., Reiss, S., et al. (2011). Molecular defects in human carbamoyl phosphate synthetase I: mutational spectrum, diagnostic and protein structure considerations. *Hum. Mutat.* 32 (6), 579–589. doi: 10.1002/humu.21406
- Helman, G., Pacheco-Colon, I., and Gropman, A. L. (2014). The urea cycle disorders. *Semin. Neurol.* 34 (3), 341–349. doi: 10.1055/s-0034-1386771
- Hoshida, R., Matsuura, T., Haraguchi, Y., Endo, F., Yoshinaga, M., and Matsuda, I. (1993). Carbamylphosphate synthetase I deficiency. One base substitution in an exon of the *CPS1* gene causes a 9-basepair deletion due to aberrant splicing. *J. Clin. Invest.* 91 (5), 1884–1887. doi: 10.1172/JCI116405

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

This study was conceived and designed by ZG and YL. The experiments were conducted by KZ, MG, YQL, and HZ. Data analyzed by KZ and YL. BY, XL and ZG contributed clinical diagnosis of the patients. The paper was written by BY, CW and YL.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by Science and Technology Foundation of Shandong Province (2013GSF11829) and Jinan Excellent Science and Technology Innovation Team Project (20150515). The authors are grateful to the patients and their parents for their contribution to the study.

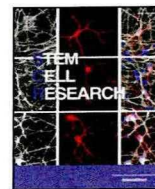
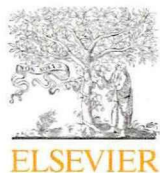
## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00718/full#supplementary-material>

- Ihara, K., Nakayama, H., Hikino, S., and Hara, T. (1999). Mutation in CPS1. *Hum. Genet.* 105, 375.
- Janecková, H., Hron, K., Wojtowicz, P., Hlídková, E., Baresová, A., Friedecký, D., et al. (2012). Targeted metabolomics analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders. *J. Chromatogr. A* 1226, 11–17. doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.074
- Jia, J., and Shi, T. (2017). Towards efficiency in rare disease research: what is distinctive and important? *Sci. China Life Sci.* 60 (7), 686–691. doi: 10.1007/s11427-017-9099-3
- Jia, J., An, Z., Ming, Y., Guo, Y., and Li, W. (2018). eRAM: encyclopedia of rare disease annotations for precision medicine. *Nucleic Acids Res.* 46, D937–D943. doi: 10.1093/nar/gkx1062
- Jin, Y., Zhang, L., Ning, B., Hong, H., Xiao, W., Tong, W., et al. (2018). Application of genome analysis strategies in the clinical testing for pediatric diseases. *Pediatr. Invest.* 2 (2), 72–81. doi: 10.1002/ped4.12044
- Khayat, M. (2009). Novel human pathological mutations. Gene symbol: CPS1. Disease: carbamoyl phosphate synthetase I deficiency. *Hum. Genet.* 125 (3), 336. doi: 10.1007/s00439-009-0642-9
- Kretz, R., Hu, L., Wettstein, V., Leiteritz, D., and Häberle, J. (2012). Phytohemagglutinin stimulation of lymphocytes improves mutation analysis of carbamoylphosphate synthetase I. *Mol. Genet. Metab.* 106 (3), 375–378. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.04.011
- Kurokawa, K., Yorifuji, T., Kawai, M., Momoi, T., Nagasaka, H., Takayanagi, M., et al. (2007). Molecular and clinical analyses of Japanese patients with carbamoylphosphate synthetase I (CPS1) deficiency. *J. Hum. Genet.* 52 (4), 349–354. doi: 10.1007/s10038-007-0122-9
- László, A., Karsai, T., and Várkonyi, A. (1991). Congenital hyperammonemia: symptomatic carrier girl patient and her asymptomatic heterozygous mother for ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency: specific enzyme diagnostic and kinetic investigations for the detection of heterozygous genostatus. *Acta Paediatr. Hung.* 31 (3), 291–297.
- Lehotay, D. C., Hall, P., Lepage, J., Eichhorst, J. C., Etter, M. L., and Greenberg, C. R. (2011). LC-MS/MS progress in newborn screening. *Clin. Biochem.* 44 (1), 21–31. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.08.007
- Li, X., Yang, Y., Gao, Q., Gao, M., Lv, Y., Dong, R., et al. (2018). Clinical characteristics and mutation analysis of five Chinese patients with maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 33 (3), 741–751. doi: 10.1007/s11011-017-0168-0
- Ni, X., and Shi, T. L. (2017). The Challenge and promise of rare disease diagnosis in China. *Sci. China Life Sci.* 60 (7), 681–685. doi: 10.1007/s11427-017-9100-1
- Ono, H., Suto, T., Kinoshita, Y., Sakano, T., Furue, T., and Ohta, T. (2009). A case of carbamoyl phosphate synthetase I deficiency presenting symptoms at one month of age. *Brain Dev.* 31 (10), 779–781. doi: 10.1016/j.braindev.2008.12.013
- Pekkala, S., Martínez, A. I., Barcelona, B., Yefimenko, I., Finckh, U., Rubio, V., et al. (2010). Understanding carbamoyl-phosphate synthetase I (CPS1) deficiency by using expression studies and structure-based analysis. *Hum. Mutat.* 31 (7), 801–808. doi: 10.1002/humu.21272
- Raney, B. J., Dreszer, T. R., Barber, G. P., Clawson, H., Fujita, P. A., Wang, T., et al. (2014). Track data hubs enable visualization of user-defined genome-wide annotations on the UCSC Genome Browser. *Bioinformatics* 30, 1003–1005. doi: 10.1093/bioinformatics/btt637
- Rapp, B., Häberle, J., Linnebank, M., Wermuth, B., Marquardt, T., Harms, E., et al. (2001). Genetic analysis of carbamoylphosphate synthetase I and ornithine transcarbamylase deficiency using fibroblasts. *Eur. J. Pediatr.* 160 (5), 283–287. doi: 10.1007/s004310100725
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., et al. (2015). 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. *Genet. Med.* 17, 405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30
- Rokicki, D., Pajdowska, M., Trubicka, J., Thong, M. K., Ciara, E., Piekutowska-Abramczuk, D., et al. (2017). 3-Methylglutaconic aciduria, frequent but underrecognized finding in carbamoyl phosphate synthetase I deficiency. *Clin. Chim. Acta* 471, 95–100. doi: 10.1016/j.cca.2017.05.023
- Summar, M. L. (1998). Molecular genetic research into carbamoyl-phosphate synthase I: molecular defects and linkage markers. *J. Inher. Metab. Dis.* 21 Suppl 1, 30–39. doi: 10.1023/A:1005349306311
- Wakutani, Y., Nakayasu, H., Takeshima, T., Mori, N., Kobayashi, K., Endo, F., et al. (2001). A case of late-onset carbamoyl phosphate synthetase I deficiency, presenting periodic psychotic episodes coinciding with menstrual periods. *Rinsho Shinkeigaku* 41 (11), 780–785.
- Wang, J., Shchelochkov, O. A., Zhan, H., Li, F., Chen, L. C., Brundage, E. K., et al. (2011). Molecular characterization of CPS1 deletions by array CGH. *Mol. Genet. Metab.* 102 (1), 103–106. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.08.020
- Wang, K., Li, M., and Hakonarson, H. (2010). ANNOVER: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 38, e164. doi: 10.1093/nar/gkq603
- Yang, X. Y., Shi, J., Lei, H. H., Xia, B., and Mu, D. Z. (2017). Neonatal-onset carbamoyl phosphate synthetase I deficiency. *Medicine (Baltimore)* 96 (26), e7365. doi: 10.1097/MD.0000000000007365
- Zhang, Y., and Li, B. (2017). Cell and gene therapy for carbamoyl phosphate synthetase I deficiency. *J. Pediatr. Neonatal Care* 7 (1), 00273.
- Zhang, G., Chen, Y., Ju, H., Bei, F., Li, J., Wang, J., et al. (2018). Carbamoyl phosphate synthetase I deficiency diagnosed by whole exome sequencing. *J. Clin. Lab. Anal.* 32 (2), e22241. doi: 10.1002/jcla.22241

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Yan, Wang, Zhang, Zhang, Gao, Lv, Li, Liu and Gai. The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Lab resource: Stem Cell Line

## Generation of an induced pluripotent stem cell line (SDQLCHi009-A) from a patient with 47,XXY and ornithine transcarbamylase deficiency carrying a hemizygote mutation in *OTC*



Xiaomeng Yang<sup>a,1</sup>, Beibei Yan<sup>b,1</sup>, Haiyan Zhang<sup>a</sup>, Yanyan Ma<sup>a</sup>, Qi Zhou<sup>b</sup>, Yue Li<sup>a</sup>, Jingyun Guan<sup>a</sup>, Dong Wang<sup>a</sup>, Yi Liu<sup>a,\*</sup>, Zhongtao Gai<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Pediatric Research Institute, Qilu Children's Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250022, China

<sup>b</sup> Neonatology Department, Qilu Children's Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250022, China

### ABSTRACT

An induced pluripotent stem cell (iPSC) line was generated from peripheral blood mononuclear cells of a 3-day-old boy with 47,XXY and ornithine transcarbamylase deficiency carrying hemizygote mutation (c.663 + 2T > G (slipping)) in *OTC*. The iPSCs had original 47,XXY, and mutation in *OTC*, expressing pluripotency markers and bearing differentiation potential in vitro.

### Resource Table

Unique stem cell line identifier	SDQLCHi009-A
Alternative name(s) of stem cell line	N/A
Institution	Pediatric Research Institute, Qilu Children's Hospital of Shandong University
Contact information of distributor	
Type of cell line	iPSC
Origin	Human
Additional origin info	Age: 3 days old
Sex: male	
Ethnicity if known: Han Chinese	
Cell Source	Peripheral blood mononuclear cells
Clonality	Clonal
Method of reprogramming	Transgene free (episomal vectors)
Genetic Modification	YES
Type of Modification	Hereditary
Associated disease	47,XXY; ornithine transcarbamylase deficiency
Gene/locus	47,XXY; <i>OTC</i> (NM_000531; exon6), ChrX: 38260683 c.663 + 2T > G (on Assembly GRCh37/hg19)
Method of modification	N/A
Name of transgene or resistance	N/A
Inducible/constitutive system	N/A
Date archived/stock date	March 2019

Cell line repository/bank <https://hpscreg.eu/user/cellline/edit/SDQLCHi009-A>  
 Ethical approval The study was approved by Medical Ethics Committee of Qilu Children's Hospital of Shandong University, Approval number:ETYY-2019203

### 1. Resource utility

Ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD, 311250) is an X-linked hyperammonemia caused by mutation in the gene encoding ornithine carbamoyltransferase (*OTC*, 300461) on chromosome Xp11 (Scott et al., 1972). Induced iPSC lines from OTCD patient will provide a helpful cellular model for investigating the pathogenic mechanisms of OTCD related to *OTC* mutations.

### 2. Resource details

Ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD) is an X-linked inborn error metabolism of the urea cycle, characterized by the triad of hyperammonemia, encephalopathy, and respiratory alkalosis. Ornithine carbamoyltransferase (*OTC*) is a nuclear-encoded mitochondrial matrix enzyme that catalyzes the second step of the urea cycle in mammals. Mutations in *OTC* gene can lead to OTCD. The most common sex chromosome aneuploidy, karyotype 47,XXY, also known as Klinefelter syndrome, occurs in 1 of every 600 male births. The extra X chromosome affects testicular development, resulting in infertility and hypogonadotropic hypogonadism in adult men (Davis et al., 2015). A 3-

\* Corresponding authors.

E-mail address:

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101704>

Received 22 December 2019; Accepted 5 January 2020

Available online 17 January 2020

1873-5061/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



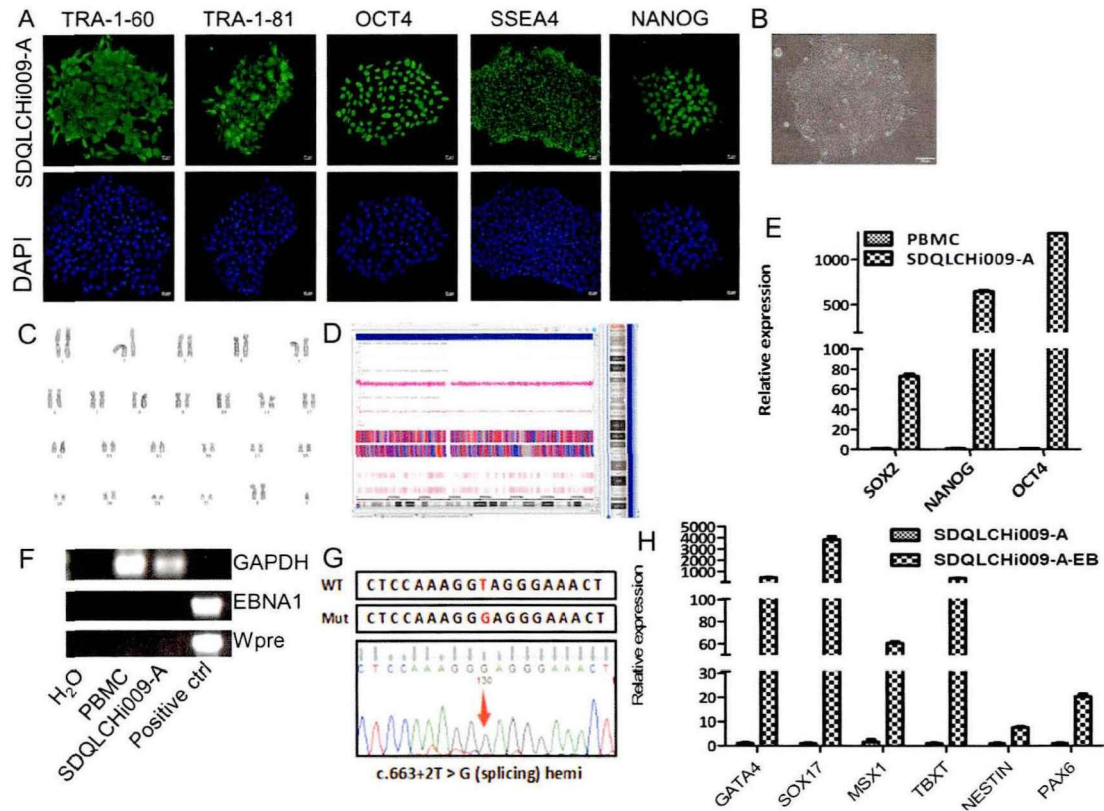


Fig. 1. Characterization of SDQLChi009-A.

day-old boy with multiple organs failure was referred to our institute for detection of genetic cause. A novel *OTC* hemizygote mutation was detected by next generation sequencing and identified to be the genetic etiology of OTCD in this patient. Meanwhile, his aneuploidy variation of 47,XXY was found and validated by chromosome karyotyping and chromosome microarray analysis (CMA). His peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from the patient and transfected with EBNA1/oriP based episomal vectors delivering reprogramming factors *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *BCL-XL* and *c-MYC* by integration-free and feeder-free electroporation methods. Human embryonic stem cell (hESC)-like colonies were collected and expanded successfully in mTeSR1 medium after 13 days. The established hiPSC line presented typical hESC morphology (Fig. 1B, scale bar, 100  $\mu$ m). Immunofluorescence assay demonstrated that the iPSCs expressed typical pluripotency markers such as *TRA-1-81*, *TRA-1-60*, *SSEA4*, *OCT4* and *NANOG* (Fig. 1A, scale bar, 20  $\mu$ m). Quantitative reverse transcription real time PCR (qRT-PCR) further supported the activation of endogenous pluripotent genes *OCT4*, *SOX2* and *NANOG* (Fig. 1E). Conventional G-band chromosome analysis in passage 20 revealed a karyotype of 47, XXY (Fig. 1C), consistent with the result of his blood (Fig. 1D). SDQLChi009-A cells were free from mycoplasma contamination (Supplementary Fig. S1) and no longer harbored the exogenous episomal vectors which were proved by PCR (Fig. 1F). Sanger sequencing confirmed the hemizygote mutation (c.663+2T>G (splicing)) in *OTC* gene in SDQLChi009-A cells (Fig. 1G). Furthermore, SDQLChi009-A cells were able to form typical embryoid bodies (EBs) with high expression levels of representative markers of three germ layers, including the ectodermal markers *NESTIN*, *PAX6*, the endodermal markers *GATA4*, *SOX17* and the mesodermal markers *MSX1*, *TBXT* (Fig. 1H). STR analysis profile of the SDQLChi009-A matched its original PBMCs at all 20 loci. Characterization of SDQLChi009-A cells is summarized in Table 1.

### 3. Materials and methods

#### 3.1. Cell culture

Two milliliter venous blood was obtained from the patient after obtaining informed consent. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by standard density gradient centrifugation with Ficoll-Hypaque (1.077 g/ml) (G&E Healthcare) at 400 g for 30 min. Cells were cultured for 5 days to expand in erythroid medium containing 50% Ham's F12 (Gibco), 50% IMDM (Gibco), 1% ITS-X (Gibco), 1% l-glutamine (Gibco), 1% chemically defined lipid concentrate (Gibco), 200  $\mu$ M 1-thioglycerol (Sigma-Aldrich), 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 5 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich) and supplemented with 10 ng/ml IL-3 (PeproTech), 40 ng/ml IGF-1 (PeproTech), 100 ng/ml hSCF (PeproTech), 2 U/ml EPO (R&D Systems), 1  $\mu$ M dexamethasone (Sigma-Aldrich) and 100  $\mu$ g/ml holotransferrin (R&D Systems).

#### 3.2. PBMCs reprogramming

$2 \times 10^6$  PBMCs were collected and electroporated with non-integrated vectors (2  $\mu$ g pEV-SFFV-OCT4-E2A-SOX2-Wpre, 1  $\mu$ g pEV-SFFV-Myc-Wpre, 1  $\mu$ g pEV-SFFV-KLF4-Wpre and 0.5  $\mu$ g pEV-SFFV-BCL-XL-Wpre, purchased from NovoBiotechnology, Beijing, China) using an Amaxa P3 Primary Cell Nucleofactor Kit according to the standard protocol on 4D Nucleofactor System (Lonza), program EO-100. After transfection, resuspended cells in erythroid medium were plated onto 12-wells pre-seeded with mitomycin (Stem Cell Technologies)-inactivated murine embryonic fibroblast (MEF) feeder cells. The next day, medium was half-changed with ReproTeSR medium (Stem Cell Technologies). iPSC colonies were manually picked at around days 15 and expanded in mTeSR1 medium (Stem Cell Technologies) on plates pre-coated with Matrigel (BD Biosciences). We renewed the medium daily and passaged cells using 0.5 mM EDTA dissociation with a 1:3

**Table 1**  
Characterization and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology Phenotype	Photography	Normal	Fig. 1 panel B
	Qualitative analysis	Positive staining for <i>TRA-1-81</i> , <i>TRA-1-60</i> , <i>SSEA4</i> , <i>OCT3/4</i> , <i>NANOG</i>	Fig. 1 panel A
	Immunocytochemistry Quantitative analysis qRT-PCR	Expression of endogenous pluripotent markers <i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> and <i>NANOG</i>	Fig. 1 panel E
Genotype Identity	Karyotype (G-banding) and resolution	47XXY, Resolution 400–500	Fig. 1 panel C
	Microsatellite PCR (mPCR) OR STR analysis	N/A 20 loci analyzed, all matching	N/A submitted in archive with journal
	Mutation analysis (IF APPLICABLE)	Sequencing	chromosome microarray analysis/ mutations in <i>OTC</i> gene
Microbiology and virology Differentiation potential	Southern Blot OR WGS	N/A	N/A
	Mycoplasma Embryoid body formation	Mycoplasma testing by luminescence. Negative Expression of genes of all three germ layers: <i>NESTIN</i> , <i>PAX6</i> (ectoderm), <i>GATA4</i> , <i>SOX17</i> (endoderm), and <i>MSX1</i> , <i>TBXT</i> (mesoderm)	N/A supplementary Fig. 1 panel H
Donor screening (OPTIONAL) Genotype additional info (OPTIONAL)	HIV 1 + 2 Hepatitis B, Hepatitis C	N/A	N/A
	Blood group genotyping	N/A	N/A
	HLA tissue typing	N/A	N/A

split ratio every 5 days. Cells were cultured at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in cell incubator.

### 3.3. Immunocytochemistry

iPSCs were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature (RT). After washed by PBS three times, cells were permeabilized and blocked with QuickBlock™ Blocking Buffer for Immunol Staining (Beyotime, China) at RT. Afterwards, iPSCs were incubated with primary antibodies (Table 2) in QuickBlock™ Primary Antibody Dilution Buffer for Immunol Staining (Beyotime, China) at 4 °C overnight, following by incubation of secondary antibodies at RT for 1 h (Table 2). The samples were counterstained with DAPI (KeyGEN BioTECH, China) for 5 min at RT and observed under the confocal microscope (LSM800, Zeiss).

### 3.4. PCR

For qRT-PCR, total RNA was extracted from iPSCs and PBMCs using Trizol (Invitrogen) and cDNA was synthesized using the Reverse-Transcribe Kit (TIANGEN, Beijing, China) according to the manufacturer's instructions. Real-time qPCR was performed on LightCycler 480 II machine (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with SYBR Premix Ex Taq™ II PCR reagent kit (TaKaRa, Dalian, China) and indicated primers (Table 2). All samples were normalized to *GAPDH* with PBMCs as negative control.

PCR was performed with PTC-200 machine (BIO-RAD) and Taq MasterMix (CWBI, Beijing, China) under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 2 min, 30 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, and a final elongation step 72 °C for 3 min. The primer details are provided in Table 2.

### 3.5. Karyotyping

Cells at passage 16 were arrested in metaphase via treatment with 0.32 µg/mL Colcemid (Gibco) for 55 min. Collected cells were swelled with 0.075 M hypotonic KCl solution followed by fixation with Carnoy's fixative (methanol: Acetic Acid = 3:1). The preparations were transferred to the Cytogenetic laboratory of our hospital for preparation of metaphase spreads and cytogenetic analysis by G-banding. Over 50 metaphase chromosome spreads and G-banding were examined using imaging software for humans according to the International System for

Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2016).

### 3.6. Short tandem repeat (STR) analysis

STR analysis for the DNA typing of SDQLCHi009-A and PBMCs were performed using an Applied Biosystems Genetic Analyzer (ABI3130, ABI) and analyzed by GeneMapper ID version3.2 (Applied Biosystems).

### 3.7. Chromosome microarray analysis

Affymetrix CytoScan 750 K was used to analyze genotypes of venous blood samples. DNA digestion, ligation, fragmentation, labeling, hybridization, staining and scanning were performed following the Affymetrix's protocol (Affymetrix, Santa Clara, CA). Cychip files from the array results were evaluated using Affymetrix CHAS 3.0 software (Affymetrix). Data analyses revealed that the affected boy had two X chromosome.

### 3.8. Mutation analysis

Genomic DNA of SDQLCHi009-A was isolated as above and PCR amplified under the conditions above for the regions including *OTC* mutations. Fragments were subjected to Sanger sequencing on a 3130XL Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the protocol.

### 3.9. In vitro spontaneous differentiation

iPSCs were digested with collagenase IV (Gibco) for about 30 min at 37 °C, big-sized cell pellets were collected and plated in Ultra-Low Attachment plate (Corning) in EB medium (DMEM/F12, 20% Knockout serum replacement, KSR (Gibco), 1% NEAA (Gibco), 1% L-GlutaMax (Gibco), 1% β-mercaptoethanol (Gibco)). After 5 days, the EBs were collected by sedimentation and transferred onto matrigel coated plate for another 5 days. The harvested cells were subjected to qRT-PCR for assessment of three germ layer markers respectively.

### 3.10. Mycoplasma detection

Cells grown on a coverslip are fixed, air-dried, stained with DNA-specific fluorescent Hoechst 33258 (KeyGEN BioTECH, China) and examined microscopically.

**Table 2**  
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-citometry Description	Antibody	Dilution	Company Cat # and RRID
Pluripotency Markers	Mouse anti-OCT3/4	1:200	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc5279, RRID: AB_628051
Pluripotency Markers	Mouse anti-SSEA-4	1:100	Life Technology Cat# MC813-70, RRID:AB_1658242
Pluripotency Markers	Mouse anti-TRA-1-81	1:100	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-21,706, RRID:AB_628,386
Pluripotency Markers	Mouse anti-TRA-1-60	1:100	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-21705, RRID:AB_628385
Pluripotency Markers	Rabbit anti-Nanog	1:200	Abcam Cat#ab21624, RRID:AB_446437
Secondary antibodies	Goat anti-mouse IgM Alexa Fluor 488 conjugated	1:1000	Abcam Cat# ab150121, RRID: AB_2801490
Secondary antibodies	Donkey anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 conjugated	1:1000	Abcam Cat#ab150105, RRID:AB_2732856
Primers			
			Forward/Reverse primer (5' - 3')
Episomal Plasmids (PCR)	EBNA1		TTTAATACGATTGAGGGGCT/GGTTTGAAGGATGGATTAAAG
Episomal Plasmids (PCR)	Wpre		CCTGCTTCGGCTTCGTTC/AAGCCATACGGGAAGCAATA
References for PCR	GAPDH		GTGGAGCTGACCTGCCGTCT/GGAGGAGTGGGTGCGGTGT
Pluripotency Markers (qRT-PCR)	OCT4(endogenous)		CCTCACTTCACTGCACCTGA/CAGGTTTCTTTCCCTAGCT
Pluripotency Markers (qRT-PCR)	SOX2(endogenous)		CCCAGCAGACTTCAACATGT/CCTCCCAITTCCTCGTTT
Pluripotency Markers (qRT-PCR)	NANOG		TGAACCTCAGCTCAAAACAG/TGGTGTAGGAAGAGATAAAG
House-keeping Genes (qRT-PCR)	GAPDH		GTGGACCTGACCTGCCGTCT/GGAGGAGTGGGTGCGGTGT
Targeted mutation analysis(sanger sequencing)	OTC		TACGGCTGGATTTCATCTCC/AAATTCTGTGGCTCACCTG
Embryoid body formation (RT-PCR)	NESTIN		GGAGAAGGACCAAGAACTG/ACCTCCTCTGTGGCATTTC
Embryoid body formation (RT-PCR)	PAX6		GTCCATCTTGTCTTGGGAAA/TAGCCAGGTTGGGAAGAACT
Embryoid body formation (RT-PCR)	GATA4		CTAGACCGTGGTTTTGCAAT/TGGGTTAAGTCCCTCTGTAG
Embryoid body formation (RT-PCR)	SOX17		CTCTGCCCTCCTCCAGAA/CAGAATCCAGACCTGCACA
Embryoid body formation (RT-PCR)	MSX1		CGAGAGACCCGCTGGATGCAGAG/GCGGGCCATCTTCAGCTTCTCCAG
Embryoid body formation (RT-PCR)	TBXT		AATTGGTCCAGCCTTGGAT/GGTTGCTCACAGACACA

### Acknowledgments

This study was funded by the National Natural Science Foundation of China, Grant number: 81671362.

### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in

the online version, at doi:10.1016/j.scr.2020.101704.

### References

- Scott, C.R., Chiang-Teng, C., Goodman, S.I., et al., 1972. X-linked transmission of ornithine-transcarbamylase deficiency. *Lancet* 2 (7787), 1148.
- Davis, S.M., Rogol, A.D., Ross, J.L., 2015. Testis development and fertility potential in boys with Klinefelter syndrome. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 44 (4), 843–865.