

# 一个遗传性出血性毛细血管扩张症家系的基因分析

袁冬 殷晓华 代玉红 李冰 梁克纪 魏广祯

**【摘要】** 目的 研究一个遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)家系的ENG基因及ALK-1基因的突变情况,探讨其分子发病机制。方法 采集该HHT家系患者的临床资料,按照HHT的临床诊断标准进行确诊,对先证者及其确诊为HHT的2个女儿进行ENG基因和ALK-1基因筛查。采集母女3人的外周血标本,提取基因组DNA,用聚合酶链反应(PCR)扩增DNA标本中ALK-1基因的2、3、4、5、6、7、8、9、10外显子及周围内含子,并对PCR产物纯化后进行核苷酸测序,确定突变位点。结果 该家系4代41名成员中有11名被临床确诊为HHT,其中先证者及其2个女儿均合并多脏器损害,小女儿仅有影像学表现而无相应临床症状。母女3人的PCR产物序列分析显示,ALK-1基因的9号外显子cDNA上第1321位均发生错义突变(c.1321G>A),该突变导致ALK-1蛋白441位缬氨酸变为蛋氨酸(p.Val1441Met)。结论 报告了1个HHT家系,并发现该家系中ALK-1基因发生错义突变(c.1321G>A, p.Val1441Met)。该突变是这个家系致病的遗传学基础。

**【关键词】** 毛细血管扩张, 遗传性出血性; 基因, ALK-1; 突变; 系谱

**Gene analysis in a family of hereditary hemorrhagic telangiectasia** Yuan Dong, Yin Xiaohua, Dai Yuhong, Li Bing, Liang Keji, Wei Guangyi. Mudanjiang First People's Hospital of Heilongjiang Province, Mudanjiang Institute of Blood Diseases, Mudanjiang 157011, China  
Corresponding author: Yin Xiaohua, Email: mdjyuandong@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the clinical feature of a family with hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), and to study the mutation of its related genes. **Methods** Medical histories of the family were analyzed to detect HHT patients according to the diagnostic criteria. ENG and ALK-1 genes of the proband and her two daughters were analyzed. DNA from the three patients' peripheral blood was extracted. The exons 2-10 and their intron-exon boundaries of ALK1 were amplified by PCR, and then the PCR products were sequenced and analyzed to identify the mutation. **Results** There were 11 people in 41 family members of 4 generations were diagnosed as HHT. The proband and her two daughters suffered from multiple organ damage, the younger daughter appeared only imaging features instead of corresponding clinical symptoms. A missense mutation at the 1321 bp of cDNA (c.1321G>A) was detected in the exon 9 of ALK1, which resulted in valine 441 to methionine replacement in ALK-1 protein (p.Val1441Met). **Conclusion** A Chinese family with HHT was studied and a missense mutation (c.1321G>A, p.Val1441Met) of ALK-1 was discovered. This mutation is the genetic basis of the family with HHT and is reported for the first time in China. This research will not only help to further investigate molecular mechanism of pathogenesis of HHT, but also provide evidences and references for the following gene screening and genetic counseling on HHT family members.

**【Key words】** Telangiectasia, hereditary hemorrhagic; Activin receptor-like kinase 1 gene; Mutation; Pedigree

遗传性出血性毛细血管扩张症(hereditary hemorrhagic telangiectasia, HHT)是一种常染色体

显性遗传性疾病,其特征为血管壁发育和结构异常,皮肤、黏膜等部位毛细血管扩张和出血。鼻出血最为常见,部分患者可有消化道和泌尿生殖道出血,也可出现肝脏、肺等重要脏器的动脉畸形,从而导致相关并发症。我们对1例HHT患者进行了家系调查,并对其进行了ENG(endoglin)基因和ALK-1(activin receptor-like kinase-1)基因检测,现

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.02.006

作者单位:157011 黑龙江省牡丹江市第一人民医院,牡丹江市血液病研究所

通信作者:殷晓华,Email:mdjyuandong@163.com

报道如下。

### 病例和方法

1. 家系资料:该HHT家系4代41名成员中11名有出血表现(图1)。3名成员(I<sub>1</sub>、II<sub>5</sub>、II<sub>7</sub>)表现为严重的消化道出血;3名成员(II<sub>5</sub>、III<sub>13</sub>、III<sub>15</sub>)明确合并多脏器损害,其中1名(III<sub>15</sub>)仅有影像学改变而无相应临床症状;家系中有8名成员仅表现为鼻出血反复发作。

先证者(II<sub>5</sub>):女,62岁,因“乏力伴活动后心悸气短半年”就诊。既往有“贫血”病史20年。体格检查:贫血貌,心脏浊音区增大,脾大肋缘下2横指,肝肋缘下未触及,双下肢凹陷性水肿。血常规:WBC 2.0×10<sup>9</sup>/L,RBC 1.99×10<sup>12</sup>/L,HGB 65 g/L,PLT 186×10<sup>9</sup>/L。便潜血(++)。维生素B<sub>12</sub>172.8 ng/L,铁蛋白2.15 μg/L。骨髓象:符合缺铁性贫血改变。心脏彩超:全心增大,主动脉微量返流,二尖瓣轻度返流,肺动脉高压(轻度),心包积液(中量)。腹部彩超:肝脏大小形态正常,肝内动静脉呈“树枝状”迂曲扩张,肝左静脉1.3 cm,肝中静脉1.1 cm,肝右静脉1.2 cm,下腔静脉内径2.4 cm,门静脉主干1.4 cm,脾厚5.1 cm,脾周液性暗区(最深2.7 cm)。胃镜:食管、胃、十二指肠毛细血管扩张并活动性出血。入院后给予维生素B<sub>12</sub>、铁剂、止血、抑酸治疗。1个月后血常规指标恢复正常,复查肝脏、心脏彩超无明显改善。

先证者大女儿(III<sub>13</sub>)3年前因“肝功能异常”就诊。当时腹部彩超亦提示“肝内动静脉迂曲扩张”;肝脏磁共振成像提示“肝多发占位病变与门静脉海

绵样变”(图2)。肝脏穿刺活检病理:门静脉分支及中央静脉纤维化,部分结节内肝细胞呈良性增生,未见明确异型增生改变。给予保肝、利尿等治疗,无好转。2012年因活动后胸闷、气短再次就诊,肺动脉造影检查示“肺动脉高压(图3)、心包腔少量积液、腹腔少量积液”,超声心动图检查示“肺动脉重度高压,右心扩大,左房扩大,肺动脉增宽,右心功能减低,三尖瓣返流(大量),心包积液(大量)”。下



图2 遗传性出血性毛细血管扩张症患者肝脏磁共振检查结果

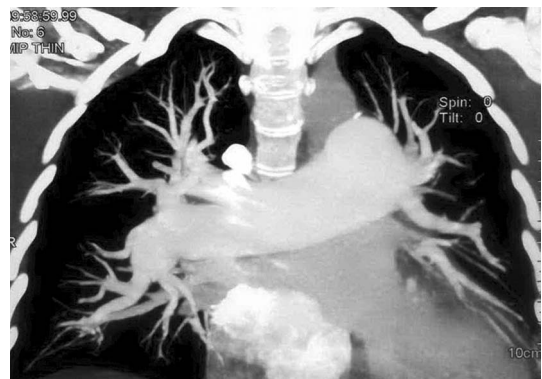
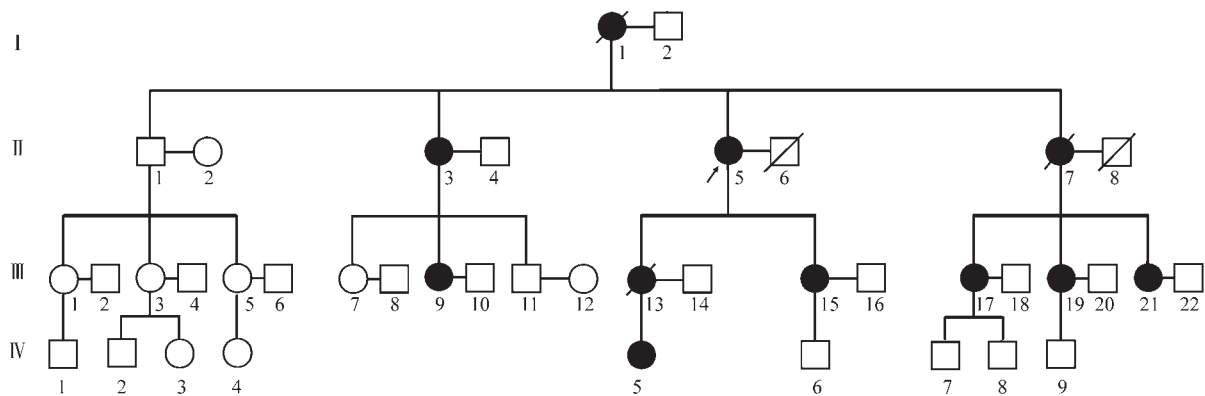


图3 遗传性出血性毛细血管扩张症患者肺动脉造影检查结果



∕ 先证者; ∕ 已故; □○ 正常男、女性; ● 有出血表现者

图1 遗传性出血性毛细血管扩张症家系系谱图

肢深静脉未见异常,肺动脉灌注符合肺动脉高压表现。予以利尿、强心治疗,病情进行性加重,于2014年3月死亡。

先证者小女儿(Ⅲ<sub>15</sub>)仅表现为反复发作的鼻腔及齿龈出血,肝脏彩超及CT检查结果与Ⅲ<sub>13</sub>相似。参照文献[1]提出的HHT诊断标准,母女三人均诊断为HHT。

2. ENG基因和ALK-1基因的外显子及周围内含子的PCR扩增及测序:采集先证者(Ⅱ<sub>5</sub>)及其2个女儿(Ⅲ<sub>13</sub>、Ⅲ<sub>15</sub>)的外周血2~3 ml,枸橼酸钠抗凝,常规分离白细胞,使用全血DNA提取试剂盒(瑞士Roche公司产品)提取基因组DNA,具体方法参照说明书。参照文献[2-3]方法分别对ENG基因的外显子和ALK-1基因的编码区2、3、4、5、6、7、8、9、10号外显子及周围内含子进行PCR扩增。将ENG基因和ALK-1基因的外显子及周围内含子PCR产物进行10 g/L琼脂糖凝胶电泳,对目的条带进行割胶回收,使用胶回收试剂盒(美国Invitrogen公司产品)进行回收纯化。委托北京海斯特检验中心进行核酸序列测序分析,应用DNASTAR软件将测序结果与来自NCBI数据库的正常DNA序列进行比对,确定ENG基因和ALK-1基因是否存在突变、突变位点及类型。

## 结 果

1. ENG基因外显子测序结果:先证者及家系的ENG基因14个外显子的PCR产物碱基序列均为正常序列。

2. ALK-1基因的9号外显子测序结果:ALK-1基因外显子的PCR产物序列分析显示,在ALK-1基因的9号外显子上检测到c.1377+45T>C和c.1377+65A>G内含子突变,通过数据库分析发现,该突变为单核苷酸多态性位点,无致病性。同时亦在9号外显子发现c.1321G>A p.Val1441Met错义突变(图4),该突变导致第441位缬氨酸变为蛋氨酸(p.Val1441Met)。通过文献检索发现,该突变目前致病性不明确。在国外HHT患者中曾有此突变报道。ALK-1基因其余9个外显子碱基序列正常。

## 讨 论

HHT的主要特征为血管壁发育和结构异常。根据致病基因不同分为HHT 1、HHT 2、HHT 3和HHT 4(已完成致病基因定位但尚未克隆)、幼年型

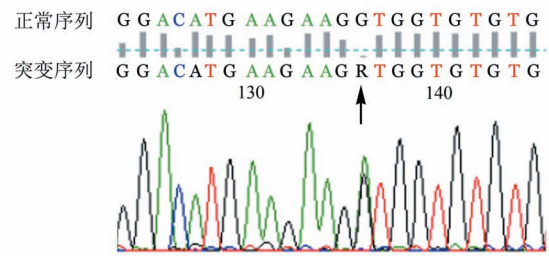


图4 遗传性出血性毛细血管扩张症家系ALK-1基因第9号外显子测序结果(箭头所示为c.1321G>A p.Val1441Met 错义突变)

息肉病、HHT综合征(SMAD 4基因)。HHT的发生与基因位点突变有关系。HHT 1型由定位于9q33-34、编码Engdolin蛋白的ENG基因突变引起<sup>[4]</sup>。HHT 2型由定位于12q13、编码ALK-1蛋白的ALK-1基因突变引起<sup>[5]</sup>。Engdolin蛋白、ALK-1蛋白、Smad 4蛋白均为转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )信号通路重要成员。TGF- $\beta$ 是一组具有调节细胞分化和生长功能的超家族。在调节内皮细胞的增殖、分化、黏附、迁徙及细胞外基质的组成和构建上起着重要的作用<sup>[6]</sup>。因此,ENG和ALK-1基因突变直接影响TGF- $\beta$ 信号传导系统,最终引起血管发育异常和血管畸形。ENG和ALK-1基因突变占HHT的86%,其他为SMAD 4基因或其他未知基因突变所致<sup>[7]</sup>。

HHT患者临床表现与病变累及部位相关。老年患者常表现为上消化道出血,但很少发生于50~60岁前<sup>[8]</sup>,患者临床症状隐匿,常因缺铁性贫血就诊。该家系先证者Ⅱ<sub>5</sub>首发症状为贫血、黑便。Ⅰ<sub>1</sub>和Ⅱ<sub>7</sub>早年死于消化道出血性疾病。HHT肝脏受累在女性患者多见,一般无明显症状<sup>[9]</sup>。肝脏动静脉畸形是肝动脉内血液未经毛细血管网直接进入静脉系统,同时门静脉和肝静脉短路而形成肝内高动力循环状态,引起高输出量心力衰竭、门静脉高压、胆道疾病和肝性脑病等<sup>[9]</sup>。增强CT检查可见腹腔干增粗、肝动脉迂曲扩张、肝门区及肝内动脉迂曲扩张、肝内毛细血管网弥漫性扩张。病理上表现为肝实质非纤维分隔的假小叶形成。本家系中母女三人均有以上肝脏影像学表现。HHT患者肺动静脉畸形的发生率为4.6%~7.0%,常见于HHT 1型,研究显示70%的肺动脉畸形与HHT有关<sup>[10]</sup>。患者可表现为咯血、反复肺内感染、肺动脉高压等。HHT 2患者发生肺动脉高压的风险较高,HHT1型外显率较高且临床表现较严重<sup>[11]</sup>。

本家系中母女三人同时存在多脏器受累,并检出相同的基因突变(ALK-1基因c.1321G>



A p.Va1441Met 错义突变),目前数据库检索该突变临床致病性不明确。类似病例国内少有报道。Abdalla等<sup>[12]</sup>在一个胃肠道出血合并肝脏动静脉畸形的HHT家系中曾发现上述突变。本家系先证者与其大女儿出现的心包积液目前尚不能解释,是否为心脏血管破裂或其他原因所致仍需进一步研究。

HHT目前尚无根治疗法。近年来有人报告沙利度胺<sup>[13]</sup>、抗纤溶药物<sup>[14]</sup>与抗血管内皮生长因子单克隆抗体bevacizumab<sup>[15]</sup>可减少出血危险。

### 参考文献

- [1] Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome)[J]. Am J Med Genet, 2000, 91(1):66-67.
- [2] Cymerman U, Vera S, Karabegovic A, et al. Characterization of 17 novel endoglin mutations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. Hum Mutat, 2003, 21(5):482-492.
- [3] Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, et al. Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(8):1227-1237.
- [4] McDonald MT, Papenberg KA, Ghosh S, et al. A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33-34[J]. Nat Genet, 1994, 6(2):197-204.
- [5] Johnson DW, Berg JN, Gallione CJ, et al. A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12 [J]. Genome Res, 1995, 5(1):21-28.
- [6] Fernández-L A, Sanz-Rodríguez F, Blanco FJ, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway [J]. Clin Med Res, 2006, 4(1):66-78.
- [7] McDonald J, Damjanovich K, Millson A, et al. Molecular diagnosis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: findings in a series tested simultaneously by sequencing and deletion/duplication analysis[J]. Clin Genet, 2011, 79(4):335-344.
- [8] Bayrak-Toydemir P, Mao R, Lewin S, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an overview of diagnosis and management in the molecular era for clinicians [J]. Genet Med, 2004, 6(4):175-191.
- [9] Garcia-Tsao G, Korzenik JR, Young L, et al. Liver disease in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia[J]. N Engl J Med, 2000, 343(13):931-936.
- [10] Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, et al. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia[J]. N Engl J Med, 2001, 345(5):325-334.
- [11] Berg J, Porteous M, Reinhardt D, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations [J]. J Med Genet, 2003, 40(8):585-590.
- [12] Abdalla SA, Cymerman U, Rushlow D, et al. Novel mutations and polymorphisms in genes causing hereditary hemorrhagic telangiectasia[J]. Hum Mutat, 2005, 25(3):320-321.
- [13] Franchini M, Frattini F, Crestani S, et al. Novel treatments for epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: a systematic review of the clinical experience with thalidomide[J]. J Thromb Thrombolysis, 2013, 36(3):355-357.
- [14] Zaffar N, Ravichakaravarthy T, Faughnan ME, et al. The use of anti-fibrinolytic agents in patients with HHT: a retrospective survey [J]. Ann Hematol, 2014 Jul 27. DOI: 10.1007/s00277-014-2169-y.
- [15] Dupuis-Girod S, Ginon I, Saurin JC, et al. Bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and severe hepatic vascular malformations and high cardiac output [J]. JAMA, 2012, 307(9):948-955.

(收稿日期:2014-08-25)

(本文编辑:徐茂强)

## 沉痛悼念邓长安教授

我国著名血液病学家、医学教育家、四川大学华西医院邓长安教授因病于2015年1月22日逝世,享年95岁。

邓长安教授1920年9月10日出生于广东顺德县,1944年毕业于上海圣约翰大学生物系,1947年毕业于华西协合大学医学院,获美国纽约州立大学医学博士学位。邓长安教授历任四川大学华西医院(原四川医学院附属医院、华西医科大学附属第一医院)助教、主治医师、讲师、副教授、教授、血液内科主任、大内科主任。

邓长安教授从医执教70余年,将自己的毕生精力和智慧奉献给了祖国的医学教育和医疗卫生事业,是中华医学会血液学分会创始人之一,四川省医学会血液病专委会创始人。曾任 *Leukemia*、《中华血液学杂志》、《中华医学杂志(英文版)》、《中国实验血液学杂志》、《四川医学》等杂志编委。邓长安教授一生兢兢业业、勤勤恳恳、与人为善、淡薄名利,从不计较个人得失。

邓长安教授的逝世,是我国医学教育界和血液学界的重大损失,我们沉痛哀悼,愿他安息!

本刊编辑部