

一个遗传性出血性毛细血管扩张症家系的基因分析

王丽红 张志华 谷翠红 林丽 王陶然 郝长来

【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、ACVRL1、SMAD4基因突变情况,探讨其分子发病机制。方法 对1例HHT患者进行临床诊断和家系调查。采集先证者及其长子外周血标本,应用芯片捕获高通量测序法进行ENG、ACVRL1、SMAD4基因分析,对检出的突变以Sanger测序法进行验证。结果 71名家系成员中有9名被临床诊断为HHT,均以反复鼻腔出血为主要表现。基因分析结果显示,先证者及其长子ENG基因9号外显子存在框移突变c.1502-1503insGG(p.Gly501GlyfsX18),未检出ACVRL1、SMAD4基因突变。结论 ENG基因框移突变c.1502-1503insGG(p.Gly501GlyfsX18)是这个HHT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; ENG基因; 框移突变; 系谱

Gene identification in a family of hereditary hemorrhagic telangiectasia Wang Lihong, Zhang Zhihua, Gu Cuihong, Lin Li, Wang Taoran, Hao Changlai. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China

Corresponding author: Hao Changlai, Email: haochanglai882@163.com

【Abstract】 Objective To study the mutation of ENG, ACVRL1, and SMAD4 genes in one of a family of hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) and explore its molecular pathogenesis. **Methods** A family spectrum of a patient with a clinical diagnosis of HHT was surveyed. Peripheral blood samples from proband and their eldest were collected, and ENG, ACVRL1 and SMAD4 gene analysis was performed by chip capture high-throughput sequencing. The mutation detected was verified by Sanger. **Results** 9 of the 71 family members were diagnosed with HHT with the main manifestation of recurrent nasal bleeding. Genetic analysis showed that the proband and the eldest son of ENG gene exon 9 frameshift mutation: c.1502-1503insGG (p.Gly501GlyfsX18), and mutations in ACVRL1 and SMAD4 genes were not detected. **Conclusion** The frameshift mutation c.1502-1503insGG (p.Gly501GlyfsX18) of the ENG gene is the genetic basis for the pathogenesis of this HHT family.

【Key words】 Telangiectasia, hereditary hemorrhagic; Gene, ENG; Frameshift mutation; Pedigree

遗传性出血性毛细血管扩张症(hereditary hemorrhagic telangiectasia, HHT)又称为 Rendu-Osler-Weber 综合征,是由编码TGF β /BMP9信号通路的基因发生突变致病。大约85%的HHT患者存在ENG或ACVRL1基因突变,3%的患者存在SMAD4基因突变^[1]。BMP2、BMP9基因突变亦有报道^[2-3]。我们对1例HHT患者进行家系调查并进行ENG、ACVRL1、SMAD4基因检测,报道如下。

病例资料

一、先证者临床资料

先证者,女,70岁,满族,因反复鼻出血50年、加重伴乏力头晕4年入院。患者50年前开始反复发作鼻出血,未予重视。近4年鼻出血较前频繁,并逐渐出现头晕、乏力。既往白内障病史4年,未行手术治疗。家族史:父母已故,具体死因不详。家系4代71名成员中9名有鼻出血反复发作病史(图1)。体格检查:重度贫血貌,结膜苍白,舌面可见散在鲜红色点状毛细血管扩张(图2)。入院后血常规:WBC $2.26 \times 10^9/L$, HGB 50 g/L, PLT $269 \times 10^9/L$;血清铁 $1.8 \mu\text{mol/L}$ (正常参考值 $6.6 \sim 32.4 \mu\text{mol/L}$),铁蛋白 $6.7 \mu\text{g/L}$ (正常参考值 $13.0 \sim 150.0 \mu\text{g/L}$),可溶性转铁蛋

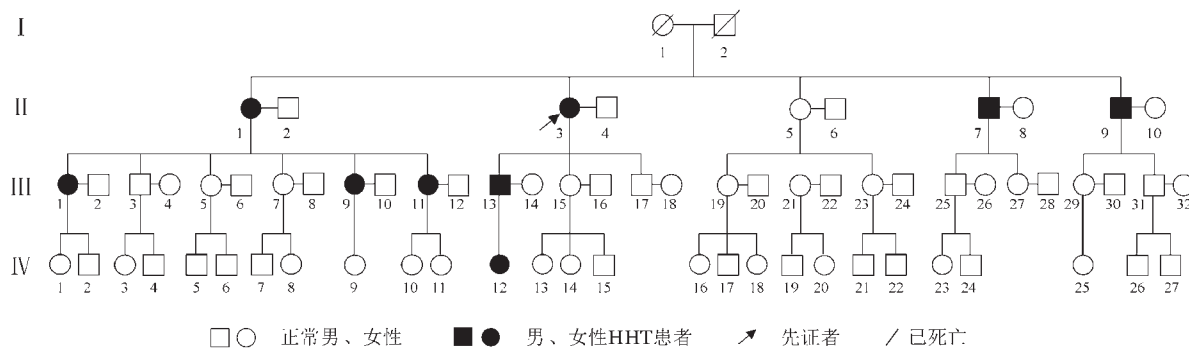


图1 遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)家系图

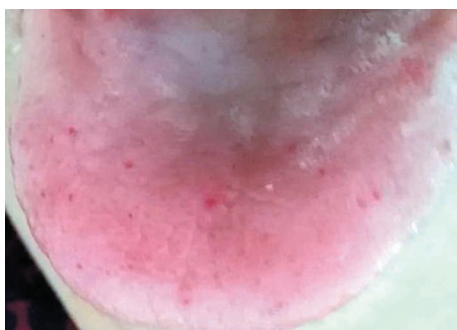


图2 遗传性出血性毛细血管扩张症患者舌体表面毛细血管扩张

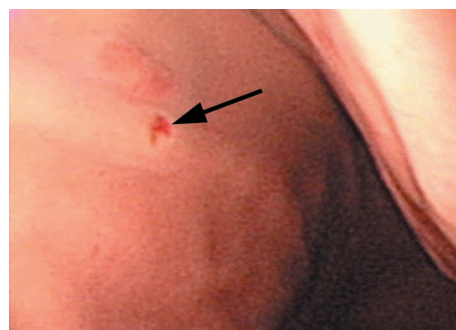
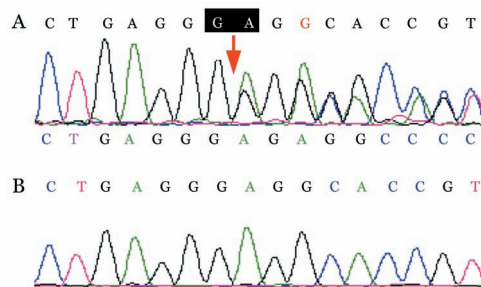


图3 遗传性出血性毛细血管扩张症患者胃、十二指肠黏膜多发毛细血管扩张

白受体9.91 mg/L(正常参考值0.76~1.76 mg/L);尿便常规、肝肾功能、血电解质、肿瘤标志物、溶血及免疫等相关检查均正常;超声心动图:左心右室扩大、肺动脉高压;心电图、肺CT、腹部及泌尿系B超均未见明显异常;骨髓象:小细胞低色素性贫血骨髓象;胃镜:胃、十二指肠毛细血管扩张,轻触可见出血,盐水冲洗可止血,未见溃疡形成、食管胃底静脉曲张及胃黏膜糜烂性出血(图3)。参照文献[4]诊断标准诊断为HHT。入院后给予输注悬浮少白红细胞6 U纠正贫血,并予右旋糖酐铁及维生素C口服及鼻黏膜涂覆红霉素软膏,头晕、乏力症状缓解,HGB升至78 g/L,鼻出血频率降低,病情好转出院。其他8名有反复发作鼻出血家族成员亦符合文献[4] HHT诊断标准。

二、基因分析结果

采集先证者及其长子外周血2~3 ml,送深圳华大临床检验中心有限公司以芯片捕获高通量测序法进行ENG、ACVRL1、SMAD4基因检测,以Sanger测序验证。结果显示,先证者及其长子ENG基因9号外显子存在框移突变c.1502-1503insGG(p.Gly501GlyfsX18),未检出ACVRL1、SMAD4基因突变(图4)。NCBI数据库检索结果



A:先证者ENG基因第9号外显子框移突变c.1502-1503insGG(p.Gly501GlyfsX18);B:野生型

图4 遗传性毛细血管扩张症家系ENG基因测序图

显示,ENG基因9号外显子框移突变c.1502-1503insGG(p.Gly501GlyfsX18)为新发现的突变。

讨论及文献复习

HHT发病率约为1/5 000^[4]。是一种遗传性疾病,主要表现为皮肤黏膜毛细血管扩张及动静脉畸形。鼻出血是HHT最常见的临床表现,发生率达95%,平均发病年龄12岁,约80%的患者在20岁之前会发生鼻出血^[5-6]。毛细血管扩张可以贯穿全胃肠道,常见部位是胃、十二指肠,大约1/4的HHT患者发生胃肠道出血。肝脏动静脉畸形发生率

8.0%~30.0%,肺动静脉畸形发生率4.6%~30.0%,中枢神经系统动静脉畸形发生率4.0%~10.0%,脊髓动静脉畸形发生率约1.0%^[7]。HHT的诊断主要依赖于病史及特征性临床表现,目前采用Curacao诊断标准^[4]:①一级亲属患有HHT;②反复发作的自发性鼻出血;③内脏损伤(肺、肝、脑、胃肠、脊髓动静脉畸形);④毛细血管扩张。符合以上3~4项可确诊HHT,符合2项为可疑,符合0~1项可排除。本例患者20岁开始反复发生鼻出血,胃镜示胃黏膜毛细血管扩张,多名家系成员有反复自发性鼻出血,符合文献^[4]HHT诊断标准。

HHT为常染色体显性遗传病,男女均可发病。目前已知HHT的致病基因主要有3种:①ENG基因:编码endoglin蛋白的ENG基因定位于9q34.11,是转化生长因子(TGF- β)家族的辅助性受体;②ACVRL1基因:编码ALK-1蛋白的ACVRL1基因定位于12q11-q14,是TGF- β 超家族I型细胞表面配体的受体;③SMAD4基因:编码MADH4蛋白的SMAD4基因定位于18q21,是TGF- β 超家族的重要细胞内信号转导的共同效应分子。以ENG和ACVRL1基因突变最为常见,三种突变基因编码的蛋白均与TGF- β 超家族介导的信号传导有关。ENG、ACVRL1和SMAD4基因突变导致内皮细胞对TGF- β 的反应发生变化,导致血管生成和修复出现异常,这可能是HHT患者动静脉畸形、毛细血管扩张类型复杂多变的原因之一。患者的基因表型与临床类型有相关性,ENG基因多态性与肺动静脉畸形相关,ACVRL1基因多态性与肝脏动静脉畸形有关^[8],两种基因型同时出现可导致多系统血管畸形(HHT 1型和HHT 2型)。SMAD4基因突变见于HHT伴幼年息肉病患者^[9]。另外,Rigelsky等^[2]报道了1例合并肺动脉高压的HHT患者,BMPR2基因突变阳性而ENG、ACVRL1、SMAD4基因均正常,提示BMPR2基因突变可能与肺动脉高压和HHT发病均相关。Wooderchak-Donahue等^[3]在3例无关HHT患者中证实BMP9基因与血管新生相关,可能导致HHT发生。

本例患者检出ENG基因9号外显子框移突变c.1502-1503insGG(p.Gly501GlyfsX18),导致氨基酸编码蛋白提前终止,产生截短蛋白,从而影响内皮细胞对TGF- β 的反应,导致血管畸形。HHT基因突变NCBI数据库显示ENG突变可以发生在1号至14号任何外显子,突变类型共280余种,包括无义突变、错义突变、剪接点突变、移码突变、缺失突变

等。本例患者的突变位点在数据库中尚无记载。

对于HHT患者的鼻出血,保守治疗是一种低风险、非侵袭性的一线治疗方法,主要是应用生理盐水或润滑剂形成黏膜保护层,以达到减少鼻出血发生的治疗目标。药物治疗包括雌激素和新药贝伐单抗。贝伐单抗是血管内皮细胞生长因子抑制剂^[10-11],广泛用于治疗转移性结肠癌。近年来研究证实,贝伐单抗能使HHT患者的鼻出血和胃肠道出血减轻^[12-13]。鼻出血的外科治疗包括电凝止血、热凝固、氩等离子凝固、低温消融、射频治疗、激光治疗及冷冻治疗,病情严重者可选择鼻中隔植皮术、前鼻孔闭合术及数字减影血管造影介入栓塞等^[11]。重要脏器局部血管畸形需要手术治疗。

参考文献

- [1] Pawlikowska L, Nelson J, Guo DE, et al. The ACVRL1 c.314-35A>G polymorphism is associated with organ vascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia patients with ENG mutations, but not in patients with ACVRL1 mutations [J]. *Am J Med Genet A*, 2015, 167 (6):1262-1267. DOI: 10.1002/ajmg.a.36936.
- [2] Rigelsky CM, Jennings C, Lehtonen R, et al. BMPR2 mutation in a patient with pulmonary arterial hypertension and suspected hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. *Am J Med Genet A*, 2008, 146A(19):2551-2556. DOI: 10.1002/ajmg.a.32468.
- [3] Wooderchak-Donahue WL, McDonald J, O'Fallon B, et al. BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 93 (3):530-537. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.07.004.
- [4] 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.
- [5] AAssar OS, Friedman CM, White RI Jr. The natural history of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. *Laryngoscope*, 1991, 101(9):977-980. DOI: 10.1288/00005537-199109000-00008.
- [6] 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. DOI: 10.1136/jmg.40.8.585.
- [7] Chin CJ, Rotenberg BW, Witterick IJ. Epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: an evidence based review of surgical management [J]. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2016, 45:3. DOI: 10.1186/s40463-016-0116-8.
- [8] Lesca G, Olivieri C, Burnichon N, et al. Genotype-phenotype correlations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: data from the French-Italian HHT network [J]. *Genet Med*, 2007, 9(1):14-22. DOI: 10.1097/GIM.0b013e31802d8373.

- [9] O'Malley M, LaGuardia L, Kalady MF, et al. The prevalence of hereditary hemorrhagic telangiectasia in juvenile polyposis syndrome [J]. *Dis Colon Rectum*, 2012, 55 (8):886-892. DOI: 10.1097/DCR.0b013e31825aad32.
- [10] Wee JW, Jeon YW, Eun JY, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia treated with low dose intravenous bevacizumab [J]. *Blood Res*, 2014, 49 (3): 192-195. DOI: 10.5045/br.2014.49.3.192.
- [11] 徐丛, 王洪田. 贝伐单抗治疗遗传性出血性毛细血管扩张症所致难治性鼻出血研究进展 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 51 (6): 476-479. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2016.06.021.
- [12] Thompson AB, Ross DA, Berard P, et al. Very low dose bevacizumab for the treatment of epistaxis in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. *Allergy Rhinol (Providence)*, 2014, 5(2):91-95. DOI: 10.2500/ar.2014.5.0091.
- [13] Fodstad P, Dheyaudeen S, Rinde M, et al. Anti-VEGF with 3-week intervals is effective on anemia in a patient with severe hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. *Ann Hematol*, 2011, 90(5):611-612. DOI: 10.1007/s00277-010-1063-5.

(收稿日期:2017-11-08)

(本文编辑:徐茂强)

·病例报告·

伴 E2A-PBX1 融合基因阳性骨髓纤维化一例

周必琪 王谈真 徐杨 吴德沛

Myelofibrosis with E2A-PBX1 fusion gene in an adult: a case report

Zhou Biqi, Wang Tanzhen, Xu Yang, Wu Depei
Corresponding author: Wu Depei, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Institute of Hematology, Institute of Blood and Marrow Transplantation, University, Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Collaborative Innovation Center of Hematology 215006, China. Email: wudepei@medmail.com.cn

患者,男,51岁。2016年11月因发热就诊于当地医院。血常规检查示重度贫血,外周血涂片示成熟红细胞大小不一,可见泪滴状、棘形红细胞。骨髓象:有核细胞增生减低,部分骨髓液稀释可能。JAK2 V617F 突变阳性,CALR、MPL 基因突变阴性。骨髓活检示“骨髓纤维化”。彩超检查发现双侧腹股沟、颈部、腋窝淋巴结肿大,行颈部淋巴结活检病理示“淋巴结肉芽肿伴坏死(结核可能),局灶见个别多核细胞,符合髓外造血表现”。胸部CT示“两肺间质性改变,左下肺纤维灶”。诊断:骨髓纤维化,2型糖尿病,慢性乙型肝炎。于2016年11月22日转至我院进一步诊疗。入院后查体示脾脏肿大,下缘达脐水平线下3cm,右缘越过中线1cm。血常规:WBC $1.83 \times 10^9/L$, HGB 67 g/L, PLT $52 \times 10^9/L$,

中性粒细胞绝对计数 $1.49 \times 10^9/L$ 。骨髓象:骨髓液稀释。MDS 免疫分型(HLA-DR、CD2、CD7、CD10、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD33、CD34、CD56、CD64、CD66、CD71、CD117、GPA):分析1.1%的幼稚细胞群体,未见异常表达;淋巴瘤免疫分型(CD45、CD3、CD4、CD5、CD8、CD10、CD11c、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD38、CD79b、CD103、Kappa、Lambda、FMC7、IgM):分析6.3%成熟淋巴细胞群体,未见异常。FLARE 检测阴性;TCR/IgH 重排示“TCRG 克隆性重排阳性”。染色体核型分析:标本分裂象数量少,仅见2个染色体不足46条的核型,无法判断是否存在染色体随机丢失,无法得出结论;骨髓多重PCR:E2A/PBX1 融合基因阳性。二代测序:JAK2 V167F 突变阳性(突变比例79.6%),ZRSR2 R119fs 突变阳性(突变比例49.4%)。骨髓活检:造血组织少见,少量组织粒系各阶段细胞可见,以中晚幼及成熟粒细胞为主;红系各阶段细胞可见,以中晚幼红细胞为主;巨核细胞增生;纤维组织明显增生, MF-2。考虑患者为原发性骨髓纤维化。予糖皮质激素治疗1个月后,改为芦可替尼15 mg/d,同时予抗感染、祛铁以及对症支持治疗。患者血象回升、脾脏缩小(平脐)、感染控制,予以出院。出院后继续口服芦可替尼15 mg/d及抗感染药物等。2017年5月复诊:血常规示WBC $6.98 \times 10^9/L$ 、中性粒细胞绝对计数 $5.93 \times 10^9/L$ 、HGB 52 g/L、PLT $122 \times 10^9/L$;外周血多重PCR示E2A/PBX1 融合基因阴性;二代测序示JAK2 V167F 突变阳性,ZRSR2 R119fs 突变阳性。骨髓活检示造血组织增生减低,实质被纤维组织替代,脂肪细胞显著减少;粒系增生减低,各阶段粒细胞少见;红系增生减低,幼红细胞簇少见;巨核细胞增生,多形性明显;骨小梁增宽,纤维组织广泛增殖, MF-3。

(收稿日期:2017-11-01)

(本文编辑:徐茂强)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.06.008

基金项目:国家重点研发计划(2016YFC0902800);江苏省创新能力建设专项(BM2015004);国家自然科学基金(81470346);江苏省自然科学基金(BK20171205)

作者单位:215006 苏州大学附属第一医院、江苏省血液研究所,苏州大学造血干细胞移植研究所;卫生部血栓与止血重点实验室,血液学协同创新中心

通信作者:吴德沛,Email: wudepei@medmail.com.cn