

论著·临床研究

X连锁血小板减少症家系 WASP 基因分析

史瑞明 刘志刚 杨永华

(西安交通大学医学院第一附属医院儿科,陕西 西安 710061)

[摘要] 目的 对X连锁血小板减少症(XLT)家系进行病史调查和WASP基因分析,探讨其临床特点和发病机制。方法 应用PCR扩增,DNA直接测序技术对1例XLT患儿及家族3代人共13名家系成员进行WASP基因突变分析。结果 患儿WASP基因2号外显子291号碱基G/A突变,导致该基因所编码的第86号氨基酸由精氨酸变为组氨酸,为错义突变。患儿母亲为X染色体突变基因杂合子携带者。结论 WASP基因突变是XLT的分子学发病机制,G291A是WASP基因突变位点之一。 [中国当代儿科杂志,2010,12(10):784-787]

[关键词] X连锁血小板减少症;基因突变;儿童

[中图分类号] R558+.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)10-0784-04

WASP gene mutation analysis of a family of X-linked thrombocytopenia

SHI Rui-Ming, LIU Zhi-Gang, YANG Yong-Hua. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China (Email: srm1975@sohu.com)

Abstract: Objective This study investigated the history and gene mutations of a family with X-linked thrombocytopenia, in order to understand the clinical characteristic and molecular pathogenesis of the disease. **Methods** A three-generation X-linked thrombocytopenia family with 13 family members was investigated using PCR-DNA direct sequencing method to screen the exons of WASP gene for mutation analysis. **Results** The WASP gene sequencing of the proband revealed a missense mutation in exon 2 (G291A), resulting in a change of amino acid 86 from arginine to histidine. The patient's mother was the carrier of the heterozygosis mutation in X-chromosome. **Conclusions** WASP mutations may be attributed to the molecular mechanism of X-linked thrombocytopenia. G291A is one of the mutations of WASP. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (10):784-787]

Key words: X-linked thrombocytopenia; Gene mutation; Child

X连锁血小板减少症(X-linked thrombocytopenia, XLT)是一种罕见的X连锁隐性遗传病。自1995年发现其由WASP基因突变引起后,认为该病是湿疹血小板减少伴免疫缺陷综合征(Wiskott-Aldrich syndrome, WAS)的等位基因病^[1]。因为该病缺乏WAS典型的血小板减少、湿疹和免疫缺陷三联征,仅表现为间歇性或慢性血小板减少,临床确诊有一定难度。本研究在2009年10月至2010年2月对1个XLT家系进行了家系调查和WASP基因筛查,报告如下。

(图1)。家系全部成员均调查病史。

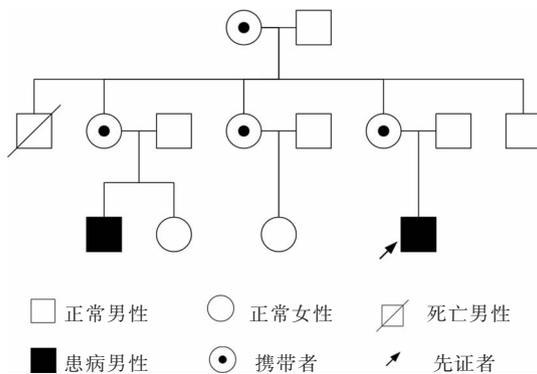


图1 XLT家系图谱

1 资料与方法

1.1 临床资料

1个3代共13人的XLT家系,其中2名患者

先证者,男,1岁3月,因发现皮肤淤斑半月,鼻出血2d入院。入院前半月磕碰后双下肢皮肤淤

[收稿日期]2010-02-18; [修回日期]2010-03-20
[作者简介]史瑞明,女,硕士,主治医师。

斑,无鼻及齿龈出血,无呕血及黑便,无头痛、腹痛,下肢淤斑及出血点渐增多同时累及颜面部,2 d 来鼻出血3次,压迫可止,量不多,大小便如常。既往体健,偶患感冒,有一过性湿疹。查体:神志清,精神可,轻度贫血貌。全身散在淤点、淤斑,以颜面部为著,心肺腹未见明显异常。入院血常规:WBC $6.76 \times 10^9/L$,N $2.46 \times 10^9/L$,L $3.73 \times 10^9/L$,RBC $4.18 \times 10^{12}/L$,Hb 94 g/L,PLT $18 \times 10^9/L$,血小板平均容积(MPV) 5.6,血小板压积(PCT)0.01%。血小板抗体阴性。骨穿结果:符合特发性血小板减少性紫癜骨髓象,巨核细胞成熟障碍。免疫全套正常。给予丙种球蛋白(1 g/kg 共1 d)加地塞米松(0.5 mg/kg,共5 d)治疗,复查血常规 WBC $8.71 \times 10^9/L$,RBC $4.59 \times 10^{12}/L$,Hb 108 g/L,PLT $39 \times 10^9/L$,MPV 7.1,PCT 0.03%,地塞米松渐减量,带强的松口服出院治疗(每天1 mg/kg)。出院半月复查血常规:WBC $6.85 \times 10^9/L$,N $4.62 \times 10^9/L$,L $1.36 \times 10^9/L$,RBC $4.62 \times 10^{12}/L$,Hb 95 g/L,PLT $49 \times 10^9/L$,MPV 5.4,PCT 0.027%。出院1月复查血常规:WBC $6.08 \times 10^9/L$,N $4.46 \times 10^9/L$,L $1.33 \times 10^9/L$,RBC $5.23 \times 10^{12}/L$,Hb 105 g/L,PLT $41 \times 10^9/L$,MPV 5.8,PCT 0.024%。

家族中其表兄有相似病史:3岁时因反复皮肤出血点1年伴鼻血丑1次住院治疗,检查血小板抗体阴性,血常规 WBC $10.5 \times 10^9/L$,N $7.12 \times 10^9/L$,L $2.2 \times 10^9/L$,RBC $3.82 \times 10^{12}/L$,Hb 116 g/L,PLT $43 \times 10^9/L$,MPV、PCT 测不出。骨穿结果:符合增生性骨髓象,巨核细胞成熟障碍。先后给予地塞米松、达那唑、环胞素A治疗(具体不详),PLT未正常,波动于 $19 \sim 59 \times 10^9/L$,多次MPV测不出。现年12岁。无湿疹、反复呼吸道及皮肤感染病史。

先证者舅舅于1岁时死亡,具体情况不详。家族中其他成员无类似病史,均体健。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 抽取家系成员每人外周血6~8 mL(EDTA抗凝),采用Gentra公司提供的全血基因组纯化试剂盒抽提DNA,1×TB溶解,-20℃保存。

1.2.2 引物设计 参考文献合成WASP基因引物共9对^[2],序列如下(表1)。扩增产物包括全部外显子序列和部分内含子序列。

1.2.3 目的基因的扩增 以提取的基因组DNA为模板,在9700PCR仪上扩增,反应条件如下:50 μL反应体系中含DNA模板1.5 μL(浓度90 ng/mL),上下游引物各2 μL(浓度10 mmol/L),

dNTP 4 μL(浓度各2.5 mmol/L),TaqDNA聚合酶0.5 μL(浓度5 U/μL),镁离子2.0 mmol/L,95℃预变性5 min后,94℃变性30 s,60~66℃退火30 s,72℃延伸50 s,循环30~35次,最后72℃延伸10 min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测。

表1 WASP基因扩增引物

| 序号 | 前向引物5'-3' | 后向引物5'-3' |
|-----|------------------------|------------------------|
| 1 | GGTCTAAGCAGTCAAGTGG | GGAAGGGTGGATTATGACC |
| 2 | CGTCATAATCCACCCTTCC | CTTGAAGCTATGGACACATATG |
| 3/4 | TGTAATCTCCAAACCAGAC | CATGAGAGGGGACTTTTCTAG |
| 5/6 | GGCTCCCAATCCATCTATC | ACTCTTACCATCCATCCAG |
| 7 | ACACACAGATTTCCTCAAG | CAGCTGTCCACTGTTCATG |
| 8/9 | CAAGAGGGTTTCACTATGAAGG | GCCTATCTTAGCTATGAGCTGC |
| 10 | GCTTCAGTCAGGAGTTGCTC | TCCTGACTTAGACGGGAGAC |
| 11 | CCTAAGCCCTCTGTGCTG | TGGGAGCCAGGTTTGAG |
| 12 | GCATCTTATCTTTGCTTTCCC | GTTGGTGGGGAAGAAATG |

1.2.4 基因突变检测 PCR产物用Promega公司提供的Wizard TM PCR产物纯化试剂盒纯化。以PCR反应的引物为测序引物,用PE公司提供的Bigdye末端标记测序反应试剂盒,用4色荧光标记4种脱氧核苷酸,按Sanger双脱氧终止法进行测序反应。PCR反应条件:96℃变性10 s,55℃退火5 s,60℃延伸4 min,共30个循环。反应产物用70%乙醇沉淀,95℃变性5 min后,在美国PE公司的ABI377测序仪上进行测序,上机电泳。采用PolyPhred软件对测序结果进行分析,根据测序结果识别突变位点。

2 结果

在先证者及家系患者WASP基因2号外显子发现了第291号碱基发生了G→A突变,导致该基因所编码的第86号氨基酸由精氨酸(R)变为组氨酸(H),即发生了WASP基因R86H错义突变。家系中2名患者的母亲、外祖母均为突变基因杂合携带者。见图2。

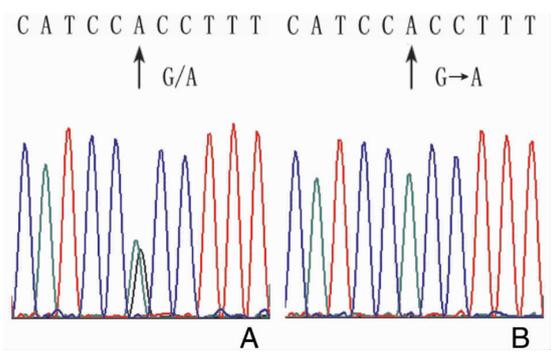


图2 WASP基因2号外显子测序结果 A:患儿母亲测序显示第291号碱基为G/A突变携带者;B:患儿测序显示第291号碱基为G/A突变。

3 讨论

WAS 是一种罕见的 X 连锁隐性遗传免疫缺陷病,其特点是血小板减少、湿疹和细胞及体液联合免疫缺陷所致的反复感染,临床预后欠佳。一般为男性患病,女性携带,偶见由于正常 X 染色体失活所致的女性携带者患病报道^[3]。WAS 的致病基因定位于 X 染色体短臂 p11.22-p11.23,其编码的蛋白是 WASP。1995 年 Villa 等^[1]证实 XLT 与 WAS 是由于 WASP 基因突变引起的同一疾病的不同表型。

WAS 的表型评分标准是用血小板减少、血小板小、湿疹、免疫缺陷、感染、自身免疫性疾病或和恶性疾病等 4 项指标进行表型评分^[4]。1 分(轻型 XLT):仅有血小板减少、血小板小,无或轻度免疫缺陷;2 分(重型 XLT):为轻型 XLT 伴轻度或暂时湿疹、轻度免疫缺陷,感染不频繁,无并发症;3 分(轻型 WAS):血小板减少、血小板小、中度湿疹、免疫缺陷和感染;4 分(重型 WAS):轻型 WAS 伴严重、难以控制的湿疹和危及生命的感染;5 分:XLT 或 WAS 伴自身免疫性疾病或和恶性疾病。

多数 WAS/XLT 患者在生后即有表现,主要包括淤点、淤斑及血便。WAS/XLT 患者的 T 细胞免疫和 B 细胞免疫均可受累,在婴儿期,循环淋巴细胞数目可以正常或轻度降低,6 岁时典型 WAS 患者均有淋巴细胞减少症,XLT 患者除外^[5-6]。B 细胞数目可以正常或轻度减少,IgG 正常,IgM 轻度减低、或正常、增加,IgA 和 IgE 通常增加。WAS/XLT 患者的血小板数目减少程度不等,血小板体积约为正常人的一半,脾切除有效说明血小板减少的部分原因是破坏增加,血小板生成不良也是原因之一。约 84% 的 WAS/XLT 病人有出血史,其中 2% 是颅内出血。典型 WAS 患者的另一个临床表现是湿疹,可轻可重,持续时间不等,甚至可持续至成人期,XLT 患者可以没有湿疹表现。自身免疫性疾病多见于典型 WAS 患者,约 40% 的患者可以发生自身免疫性溶血性贫血,以及血管炎、肾脏病变、过敏性紫癜样皮疹等。既往认为 XLT 发生自身免疫性疾病的比例很小,但一项日本报道发现 IgA 肾病是日本人 XLT 患者的常见并发症^[7]。典型 WAS 患者在儿童期即可发生肿瘤,XLT 患者发生肿瘤的比例较 WAS 少。

轻型 XLT 因为缺乏湿疹和免疫缺陷的临床表现而易被忽视,确诊时间较晚,或在病初诊断为特发性血小板减少性紫癜。值得注意的是,WAS/XLT 均有血小板体积小,故对于家族史不明确的散发男性

血小板减少患者,有持续血小板减少并血小板体积小的临床表现时要高度关注 XLT 的诊断。典型 WAS/XLT 患者大多于 6 月内发病,但本研究中的两名患者起病均较晚,先证者起病年龄大于 1 岁,病初诊断为特发性血小板减少性紫癜,在家族史询问中有阳性发现,患儿经治疗后血小板仍持续减少,伴血小板体积小,患儿及家系另一患者均为男性,结合家系图谱符合 X 连锁隐性遗传特点,从而考虑 XLT 进行 WASP 基因筛查最后确诊本病。家系另一患者因发病时间早,缺乏家族史,故诊断 XLT 较晚。两名患者均无明显免疫缺陷,无肿瘤,先证者有一过性湿疹。两名患者表型评分均为 1 分,属于轻型 XLT。家系中女性有突变基因携带者,均无临床表现。

WASP 是富脯氨酸的细胞内蛋白,广泛存在于 CD34⁺ 干细胞起源的细胞系中,所以 WASP 基因异常会影响淋巴细胞、中性粒细胞、血小板、树突状细胞和 Langerhans 细胞。对 WASP 的功能研究尚不完全清楚,认为其主要参与细胞内的信号传导,尤其是在细胞骨架蛋白肌动所需的信号传导中起重要作用^[8]。在上述细胞对外界刺激反应时传导信号和组合细胞骨架。WASP 基因突变将影响这些细胞的信号传导和细胞骨架组合,影响血小板聚集功能、淋巴细胞迁移功能、微绒毛功能的发挥及微绒毛的数量。WASP 基因为 9 Kb,共 12 个外显子,编码 502 个氨基酸。已经发现的 WASP 基因突变超过 150 余种,最多见的是错义突变。WASP 基因突变临床表型存在差异,对突变与功能的相关性研究发现:WASP 基因错义突变往往使 WASP 表达减少,患者临床表型一般为 XLT;WASP 基因缺失、插入、同义突变往往使 WASP 表达缺失,患者通常表现为典型的 WAS,预后差,不做干细胞移植难以存活^[9]。本研究发现的 R86H 突变在国内尚未见报道,欧美和日本等国家已有报道,该位点位于 WASP 的 EVH1 功能区,在同一位点已报道的还有 R86L、R86C 突变,亦有女性 R86H 患者表现 XLT 临床症状的报道,故 86 号精氨酸是 WASP 基因突变的热点区域^[10-11]。对 R86C 的研究发现该突变导致 WASP 表达减少。亦有研究发现,R86H 突变通过影响 WIP 蛋白与 WASP 的结合从而使 WASP 表达减少^[12]。本研究提示中国 XLT 患者与国外患者有同样的致病基因突变热点。

WAS 的治疗包括避免外伤、出血、抗感染、静脉丙种球蛋白输注,激素治疗及脾切除,目前有效的根治方法是脐血或骨髓干细胞移植。基因治疗是一个新的方法。对 XLT 患者而言,目前报道脾切除和干

细胞移植有效^[13]。早期识别并诊断 WAS/XLT 患者非常重要,临床医师应提高对该病的认识,基因筛查是有效的确诊方法。

[参 考 文 献]

[1] Villa A, Notarangelo L, Macchi P, Mantuano E, Cavagni G, Brugnoli D, et al. X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene[J]. *Nat Genet*, 1995, 9(4):414-417.

[2] Thompson LJ, Lalloz MR, Layton DM. Unique and recurrent WAS gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 1999, 25(3-4):218-226.

[3] Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(4):725-738.

[4] Remold-O'Donnell E, Rosen FS, Kenney DM. Defects in Wiskott-Aldrich syndrome blood cells[J]. *Blood*, 1996, 87(7):2621-2631.

[5] Park JY, Shcherbina A, Rosen FS, Prodeus AP, Remold-O'Donnell E. Phenotypic perturbation of B cells in the Wiskott-Aldrich syndrome[J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 139(2):297-305.

[6] Gallego MD, de la Fuente MA, Anton IM, Snapper S, Fuhlbrigge R, Geha RS. WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1alpha[J]. *Int Immunol*, 2006,

18(2):221-232.

[7] Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations[J]. *Blood*, 2004, 103(2):456-464.

[8] Millard TH, Sharp SJ, Machesky LM. Signalling to actin assembly via the WASP-family protein and the Arp2/3 complex[J]. *J Biochem*, 2004, 38(1):1-17.

[9] Notarangelo LD, Notarangelo LD, Ochs HD. WASP and the phenotypic range associated with deficiency[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2005, 5(6):485-490.

[10] Proust A, Guillet B, Picard C, de Saint Basile G, Pondarré C, Tamary H, et al. Detection of 28 novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia based on multiplex PCR[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 39(1):102-106.

[11] Andreu N, Pujol-Moix N, Martinez-Lostao L, Oset M, Muniz-Diaz E, Estivill X, et al. Wiskott-Aldrich syndrome in a female with skewed X-chromosome inactivation[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, 31(3):332-337.

[12] De la Fuente MA, Sasahara Y, Calamito M, Antón IM, Elkhali A, Gallego MD, et al. WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(3):926-931.

[13] Ochs HD, Filipovich AH, Veys P, Cowan MJ, Kapoor N. Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, clinical and laboratory manifestations, and treatment[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, 15(1):84-90.

(本文编辑:黄 榕)

· 消息 ·

欢迎订阅 2011 年《中国当代儿科杂志》

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊,北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊。同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、专家讲座、综述等栏目。本刊也发表国外专家来稿,附有详细的中文摘要。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊,每月 15 日出版,向国内外公开发行。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价 12 元,全年 144 元。邮发代号:国内 42-188;国外 3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统,免收审稿费。审稿周期 4~6 周。欲浏览本刊或投稿,请登录本刊网站。网站提供免费全文下载。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008

电话:0731-84327402 传真:0731-84327922 Email:ddek7402@163.com

网址: [http:// www.cjcp.org](http://www.cjcp.org)