

MYH9 相关综合征家系临床和基因突变分析

史瑞明 曹晓琴 罗树舫 房夏玲 王荣花 刘志刚

(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 MYH9 相关综合征家系进行临床表现和相关致病基因分析,探讨其早期诊断的方法和发病机制。方法 对一个 MYH9 相关综合征家系 3 名患者及家族 3 代共 11 人进行外周血检查,采用 PCR 扩增、DNA 直接测序技术进行 MYH9 基因突变分析。同时进行 100 名健康对照人群的 MYH9 基因检测。结果 外周血检测发现家系患者血小板减少,血小板体积增大,中性粒细胞中有包涵体。基因检测经 PCR-DNA 直接测序在先证者 MYH9 基因第 30 号外显子发现了碱基 G/A 错义突变,该突变导致 GAC 编码的第 1424 位天冬酰胺(D)突变为 AAC 编码的天冬氨酸(N),即 D1424N 突变。家系中患者检出与先证者相同的突变,而家系内健康人和家系外 100 名健康对照未发现这种突变。结论 MYH9 相关综合征患者临床表现不一。MYH9 基因突变是该综合征的分子发病机制,D1424N 突变是国内未曾报道过的新突变。MYH9 相关综合征的早期诊断有赖于家系调查和相关检查的早期开展。

[中国当代儿科杂志,2012,14(9):678-682]

【关键词】 MYH9 相关综合征;MYH9 基因;突变;儿童
【中图分类号】 R596.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1008-8830(2012)09-0678-05

Clinical manifestations and gene mutations of a Chinese family with MYH9-related syndrome

SHI Rui-Ming, CAO Xiao-Qin, LUO Shu-Fang, FANG Xia-Ling, WANG Rong-Hua, LIU Zhi-Gang. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China (Email: srm1975@sohu.com)

Abstract: Objective To explore the method for early diagnosis and pathogenesis of MYH9-related syndrome through analysis of the clinical manifestation and gene mutation of a Chinese family with MYH9-related syndrome. **Methods** Peripheral blood samples were collected from a three-generation Chinese family with MYH9-related syndrome (11 individuals, including 3 patients) and 100 healthy individuals. Polymerase chain reaction (PCR) amplification and direct sequencing of DNA were performed to analyze mutations of MYH9 gene. **Results** Thrombocytopenia, increased volume of platelet, and granulocyte inclusion bodies were found in the patients with MYH9-related syndrome via a peripheral blood test. A missense mutation of a base pair (G→A) in exon 30 was revealed by PCR amplification and direct sequencing of MYH9 of the proband. That lead to Asp-Asn substitution at position 1424 (D1424N mutation). The mutation was the same as in other patients with MYH9-related syndrome. It was not found in healthy people from the Chinese family or in the other 100 healthy individuals. **Conclusions** Patients with MYH9-related syndrome show diverse symptoms. Mutation of MYH9 gene may be the molecular mechanism of MYH9-related syndrome, and D1424N mutation of MYH9 has not been reported in Chinese people. Early diagnosis of MYH9-related syndrome can be carried out by investigating family history and making early examinations.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(9):678-682]

Key words: MYH9-related syndrome; MYH9 gene; Mutation; Child

MYH9 相关综合征是一类少见的常染色体显性遗传病,以血小板减少、血小板体积增大、中性粒细胞包涵体为临床特点,还可伴有听力减退、白内障、肾功能损害等^[1]。由于发病率低,且临床表现不一,有些仅表现为轻度或中度皮肤紫癜,故临床上易误诊为特发性血小板减少性紫癜(ITP)。本研究在 2010 年 10 月至 2011 年 6 月间对 1 个 3 代 MYH9 相关综合征

家系进行了家系调查和 MYH9 基因筛查,报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1 个 3 代共 11 人的 MYH9 相关综合征家系,共 3 名患者(图 1)。家系成员均调查病史,行血尿粪

[收稿日期]2012-03-25;[修回日期]2012-04-18
[作者简介]史瑞明,女,博士,副主任医师。

常规、外周血涂片、肝肾功能检查。

先证者(Ⅲ-3),女,7岁,因间断双下肢及面部散在出血点11个月入院。入院11个月前感冒后间断出现双下肢及面部散在出血点,未予诊疗,皮疹可自行消退。入院前3d再次出现双下肢散在出血点,面部散在出血点及瘀斑,逐渐增多,无鼻衄及牙龈出血,无呕血及黑便,无头痛、腹痛,无血尿。患儿无视力异常,无听力下降。血常规:WBC $5.72 \times 10^9/L$, N $3.24 \times 10^9/L$, L $2.46 \times 10^9/L$, RBC $4.62 \times 10^{12}/L$, Hb 95g/L, PLT $43 \times 10^9/L$ 。骨髓检查:增生骨髓象。血小板抗体 PAIgG、PAIgM、PAIgA 均阴性。尿粪常规正常。肝肾功能正常。给予口服泼尼松每日1.5 mg/kg 2周,皮疹渐消退,血小板波动于 $51 \times 10^9/L \sim 84 \times 10^9/L$ 之间,泼尼松渐减停。随访6个月,血小板波动于 $36 \times 10^9/L \sim 95 \times 10^9/L$ 之间,偶有双下肢出血点,可自行消退。

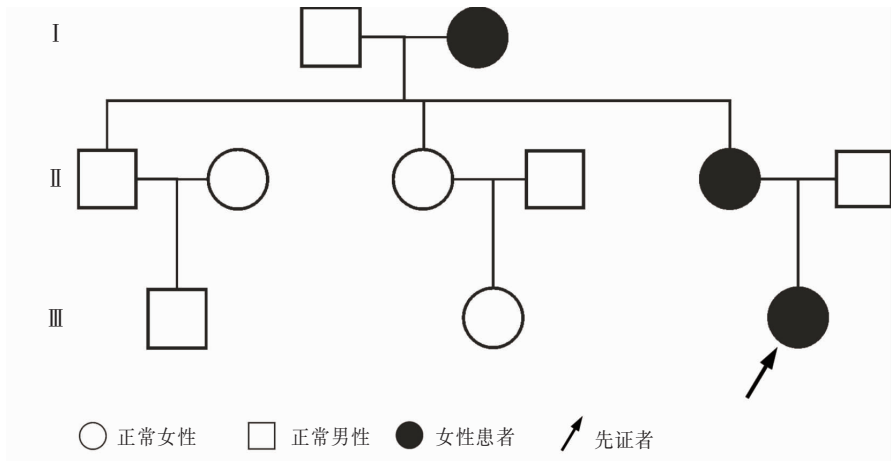


图1 家系图谱

先证者母亲(Ⅱ-5),35岁,平素偶有下肢出血点,未予重视。曾于剖腹产手术时因血小板低下(具体不详)输注血小板。体查全身未见出血点及瘀斑,视力正常,左耳听力下降。血常规:WBC $6.13 \times 10^9/L$, N $3.86 \times 10^9/L$, L $2.35 \times 10^9/L$, RBC $3.76 \times 10^{12}/L$, Hb 114g/L, PLT $27 \times 10^9/L$ 。尿粪常规正常。肝肾功能正常。

先证者外祖母(Ⅰ-2),67岁,平素无反复皮肤出血点及牙龈出血、鼻出血等。体查全身未见出血点及瘀斑,视力正常,左耳听力下降,右耳感音神经性耳聋。血常规:WBC $5.13 \times 10^9/L$, N $2.54 \times 10^9/L$, L $2.45 \times 10^9/L$, RBC $3.51 \times 10^{12}/L$, Hb $10^3g/L$, PLT $16 \times 10^9/L$ 。尿粪常规正常。肝肾功能正常。

家系其他成员体健,听力及视力正常。查血尿粪常规正常。肝肾功能正常。

1.2 方法

1.2.1 外周血涂片检查 家系成员共11人行外周血涂片检查。瑞氏染色后光学显微镜下观察血小板数量、体积,观察有无中性粒细胞包涵体。

1.2.2 血样采集及DNA提取 抽取家系成员及100名健康对照每人外周血10 mL(EDTA抗凝),采用Gentra公司提供的基因组纯化试剂盒抽提DNA,1×TB溶解,-20℃保存。

1.2.3 引物设计 MYH9基因引物参照文献合成^[2],为确保全部外显子序列及剪切位点序列被测

出,内含子引物被设计在距离外显子剪切位点20个碱基以外的地方,所有引物由北京奥科生物工程公司合成。

1.2.4 DNA扩增 以白细胞基因组DNA为模板,在ABI公司生产的9700PCR仪上扩增,PCR反应体系如下:50 μL反应体系中含DNA模板2 μL(浓度100 ng/μL),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。PCR反应条件:95℃预变性5 min后;94℃变性30 s,55~65℃退火30 s,72℃延伸45 s,循环30~35次;最后72℃延伸5~10 min。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 基因突变检测 PCR产物用Promega公司提供的Wizard™ 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,将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

2.1 患者外周血涂片

患者外周血涂片中血小板体积增大,数量减少。约 68% 左右的中性粒细胞中可见灰蓝色包涵体(图 2)。家系其他成员未见异常。

2.2 基因筛查结果

在先证者 MYH9 基因第 30 号外显子发现了碱

基 G/A 错义突变,反向测序验证该突变(图 3)。将第 30 号外显子测序结果在 Genbank 中行 BLAST 比对(www.ncbi.nlm.nih.gov),证实患儿 MYH9 基因第 30 号外显子 G/A 错义突变导致 GAC 编码的第 1424 位氨基酸天冬酰胺(D)突变为 AAC 编码的天冬氨酸(N),即 D1424N 突变。家系中先证者母亲(II-5)及外祖母(I-2)MYH9 基因第 30 号外显子检出相同突变。家系其他成员及健康对照未检出该突变。

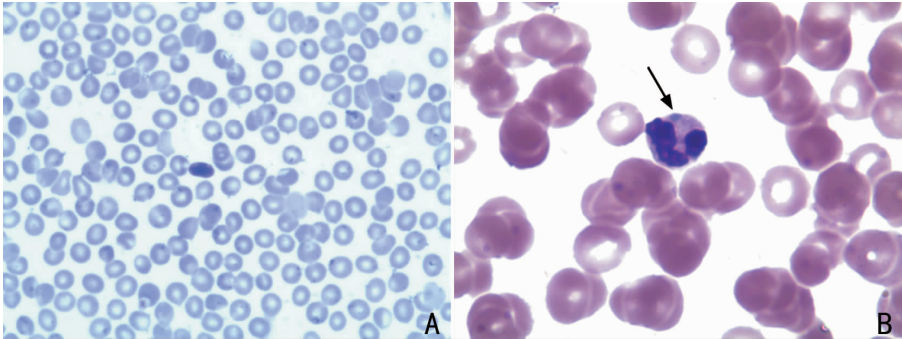


图 2 患者外周血涂片(瑞氏染色) A: 血小板减少且体积增大(×400);B: 中性粒细胞可见包涵体(×1000),如箭头所示。

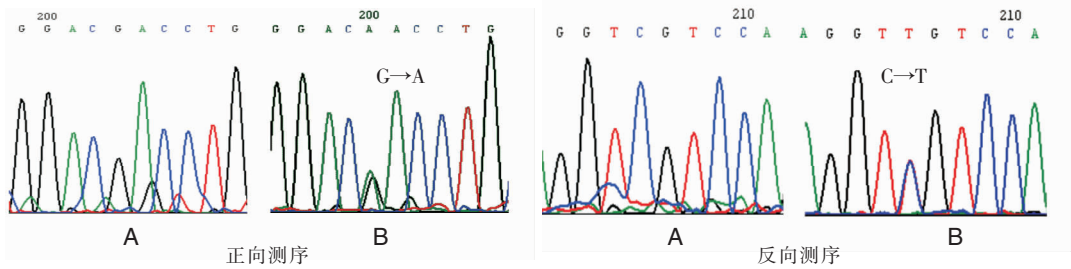


图 3 MYH9 基因 30 号外显子测序图 A: 正常人;B: 先证者

3 讨论

MYH9 相关综合征是一种常染色体显性遗传的血小板减少性疾病,临床表现为血小板巨大、血小板减少、中性粒细胞包涵体,或伴有耳聋、肾炎和白内障^[1],包括 Fechtner 综合征、May-Hegglin 综合征、Sebastian 综合征、Epstein 综合征 4 种疾病(表 1)。由于 MYH9 相关综合征发病率低,患儿的临床表现不一,血常规检查提示血小板减少,骨髓检查缺乏特

异性,在临床上易误诊为 ITP。患儿可在生后即表现出血,也可在成人或是老年因肾功能衰竭、耳聋而发现异常,临床表现差异较大。本研究先证者起病时亦诊断为 ITP,常规治疗疗效欠佳,后经家族史调查发现家族成员有血小板减少症,遗传方式符合常染色体显性遗传,外周血涂片血小板体积巨大,中性粒细胞中可见包涵体,符合 MYH9 相关综合征诊断特点。先证者外周血检测提示为小细胞低色素贫血,考虑与慢性失血有关。

表 1 MYH9 相关综合征 4 种疾病鉴别表

	血小板减少	巨大血小板	中性粒细胞包涵体	神经性耳聋	间质性肾炎	白内障
Fechtner 综合征	+	+	+	+	+	+
May-Hegglin 综合征	+	+	+	-	-	-
Sebastian 综合征	+	+	+	-	-	-
Epstein 综合征	+	+	-	+	+	-

既往认为 MYH9 相关综合征包括的 4 种疾病,其主要鉴别点在于实验室检查有无中性粒细胞包涵体,中性粒细胞包涵体超微结构差异及临床表现上有无耳聋、肾炎、白内障。近一步的研究发现,起初诊断为 May-Hegglin 综合征、Sebastian 综合征的仅有血液系统表现的患者,可逐步表现出 Fechtner 综合征、Epstein 综合征的肾脏损害及白内障^[3];同一家系的患者可以表现为 Epstein 综合征,也可表现为 Fechtner 综合征,由此提出 MYH9 相关综合征包括的 4 种疾病其实是同一疾病的不同表现形式,统称为 MYH9 相关综合征更为确切^[4]。本研究家系 3 名患者的临床表现也不一致,先证者仅表现为血小板减少、巨血小板及中性粒细胞包涵体;另两名年长者则除血液改变外,还有听力下降表现,随年龄增长听力下降更为明显。家系患者无白内障及肾炎。这提示 MYH9 相关综合征的不同疾病表现可能是患者随病程的变化经历的不同疾病阶段。

由于发病率低、基因结构复杂和临床表现差异大等原因,从 2000 年后国外才对此病开始分子生物学研究,并最终明确 MYH9 基因是该病的致病基因^[5]。该基因共有 40 个外显子,编码非肌性肌球蛋白重链 II-A (NMMHC-IIA)。NMMHC-IIA 主要表达于造血细胞。目前发现的 MYH9 基因突变多达 40 多种,大部分突变为错义突变且集中在 1 号、6 号、16 号、26 号、30 号、38 号、40 号外显子^[6-8]。个别报道有无义突变、移码突变、缺失突变^[9-10]。MYH9 基因突变造成 NMMHC-IIA 在中性粒细胞中的聚集从而形成包涵体^[11]。既往认为巨血小板及血小板减少是单倍体剂量不足引起的,进一步的研究认为突变造成的血小板早熟和不成熟血小板的提前释放是其原因^[12]。MYH9 基因突变造成血液系统外表现的原因有待进一步研究。已有研究发现 MYH9 基因突变使肾小球足细胞结构及功能异常,导致肾小球滤过屏障受损,从而造成肾脏损害^[13]。

基因检测在 MYH9 相关综合征的诊断中有重要意义。一方面是由于该病临床表现多样,基因检测可以早期明确诊断。因为该基因外显子多,检测全部 40 个外显子花费多且时间长,故首先对突变较常出现的 1 号、6 号、16 号、26 号、30 号、38 号、40 号外显子的检测值得提倡。本研究检测到的突变 D1424N 就位于 30 号外显子,是 MYH9 基因突变的热点位点之一^[14],但在我国尚未见报道。另一方面是由于不同的基因突变位点与疾病表现密切相关。如位于基因前部 16 号外显子的突变 R702C 就可引起严重的巨血小板症、肾小球肾炎、耳聋等临床表

现,患者可死于肾功能衰竭;位于基因后部 40 号外显子的突变其临床表现轻微,预后良好;位于中间外显子如 30 号、28 号的突变,临床表现介于其中^[15]。故早期进行基因检测对于明确诊断、判断预后都有重要意义。

MYH9 相关综合征目前尚无特效治疗。更深入的分子生物学研究及基因敲除动物模型的建立有利于进一步明确发病机制,开展治疗研究。临床医生应提高对本病的认识,在血小板减少症患者的病史询问中注意家族史的调查,常规方法治疗 ITP 疗效欠佳时应考虑诊断的正确性,外周血检查不仅应注意血小板数量,还应注意血小板体积和有无中性粒细胞包涵体,以早期识别并诊断本病,避免误诊漏诊。有条件时应尽早进行基因检测,以明确诊断、判断预后。

[参 考 文 献]

- [1] Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, Amemiya N, Choi YM, Hosaka N, et al. Identification of six novel MYH9 mutations and genotype-phenotype relationships in autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions [J]. J Hum Genet, 2001, 46(12): 722-729.
- [2] Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savige J, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin Anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-Like syndromes [J]. Am J Hum Genet, 2001, 69(5): 1033-1045.
- [3] Antonio G, Silvia V, Emanuela B, Fabrizio F. Thrombotic events in MYH9 gene-related autosomal macrothrombocytopenias (old May-Hegglin, Sebastian, Fechtner and Epstein syndromes) [J]. J Thromb Thrombolysis, 2011, 32(4): 474-477.
- [4] Seri M, Pecci A, Di Bari F, Cusano R, Savino M, Panza E, et al. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness [J]. Medicine (Baltimore). 2003, 82(3): 203-215.
- [5] Seri M, Cusano R, Gangarossa S, Caridi G, Bordo D, Lo Nigro C, et al. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner syndrome consortium [J]. Nat Genet, 2000, 26(1): 103-105.
- [6] Balduini CL, Pecci A, Savoia A. Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias [J]. Br J Haematol, 2011, 154(2): 161-174.
- [7] Yi Y, Sen Zhang G, Xu M, San Ling Z, Ru Shao X, Zeng Li J, et al. Analysis of clinical manifestations, mutant gene and encoded protein in two Chinese MYH9-related disease families [J]. Clin Chim Acta, 2006, 373(1-2): 49-54.
- [8] Pecci A, Canobbio I, Balduini A, Stefanini L, Cisterna B, Marseglia C, et al. Pathogenetic mechanisms of hematological abnormalities of patients with MYH9 mutations [J]. Hum Mol Genet, 2005, 14(21): 3169-3178.
- [9] Kunishima S, Matsushita T, Hamaguchi M, Saito H. Identifica-

tion and characterization of the first large deletion of the MYH9 gene associated with MYH9 disorders[J]. Eur J Haematol, 2008, 80(6): 540-544.

[10] Miyazaki K, Kunishima S, Fujii W, Higashihara M. Identification of three in-frame deletion mutations in MYH9 disorders suggesting an important hot spot for small rearrangements in MYH9 exon 24 [J]. Eur J Haematol, 2009, 83(3): 230-234.

[11] Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, Sako M, Kimura F, Jo EK, et al. Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations[J]. Lab Invest, 2003, 83(1): 115-122.

[12] Kunishima S, Hamaguchi M, Saito H. Differential expression of wild-type and mutant NMMHC-IIA polypeptides in blood cells suggests cell-specific regulation mechanisms in MYH9 disorders[J]. Blood, 2008, 111(6): 3015-3023.

[13] Ghiggeri GM, Caridi G, Magrini U, Sessa A, Savoia A, Seri M, et al. Genetics, clinical and pathological features of glomerulonephritis associated with mutations of nonmuscle myosin IIA[J]. Am J Kidney Dis, 2003, 41(1): 95-104.

[14] Mhatre AN, Kim Y, Brodie HA, Lalwani AK. Macrothrombocytopenia and progressive deafness is due to a mutation in MYH9[J]. Otol Neurotol, 2003, 24(2): 205-209.

[15] Pecci A, Panza E, Pujol-Moix N, Klersy C, Di Bari F, Bozzi V, et al. Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease[J]. Hum Mutat, 2008, 29(3): 409-417.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

《中国当代儿科杂志》征订征稿启事

《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。辟有国外儿科研究、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。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,向国内外公开发行人。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。

为更好地与读者、作者进行沟通互动,我刊于 2012 年 2 月入驻国内著名医学媒体丁香园博客,网址:<http://i.dxy.cn/cjcp>。

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>