

WASP 基因突变所致 Wiskott-Aldrich 综合征 1 例并文献复习

李栋梁¹ 位欣丽² 刘跃辉² 袁军清²

[摘要] 目的:分析 1 例 Wiskott-Aldrich 综合征患儿的临床特征、基因突变及蛋白表达。方法:总结患儿的临床特征,提取患儿外周血基因组 DNA,针对 WASP 基因所有编码外显子及外显子和内含子交界处进行 PCR 扩增测序,并采用流式细胞术(FCW)检测 WASP 表达。结果:本例患儿具有典型的 WAS 表型,并伴有自身抗体 ANA 阳性,临床评分为 3 分。患儿为 WASP 基因第 8 外显子剪接位点突变:c.777+1G>A,编码蛋白质终止于 aa246;FCW 检测 WASP 表达阴性。结论:本例男性 Wiskott-Aldrich 综合征患儿具有典型的 WAS 表型与自身抗体阳性的临床特点,其发病是由少见的 WASP 基因剪接位点突变所致。

[关键词] Wiskott-Aldrich 综合征;基因;突变;DNA 序列

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2015.03.009

[中图分类号] R392.2 **[文献标志码]** A

A case of Wiskott-Aldrich syndrome caused by WASP gene mutation and literature review

LI Dongliang¹ WEI Xinli² LIU Yuehui² YUAN Junqing²

(¹Department of Hematology, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang, 050082, China; ²Xuekang Hospital of Wuji)

Corresponding author: LI Dongliang, E-mail: ldle2008@sina.com

Abstract Objective: To explore the clinical characteristics, genetic mutations and protein expression of a patient with Wiskott-Aldrich syndrome (WAS). **Method:** The clinical features of a boy suffering from WAS were analyzed, DNA samples were obtained from the peripheral blood of patient. All the exons and intron-exon boundaries of the WASP gene were analyzed by the polymerase chain reaction(PCR) and sequencing; WASP expression was detected by Flow cytometry(FCW). **Result:** The case had a classical WAS phenotype and positive antibody to nuclear antigen (ANA); his clinical score was 3; Sequencing revealed a splice site mutation in exon8 of WASP gene, c.777+1G>A, and this mutation led to premature translational termination at amino acid position 246; FCW analysis revealed that WASP was negative. **Conclusion:** The boy with classical WAS phenotype and positive ANA results from the rare splice site mutation of WASP gene.

Key words wiskott-aldrich syndrome; gene; mutation; DNA sequence

Wiskott-Aldrich 综合征(WAS)是一种罕见的 X 连锁隐性遗传性疾病,主要临床特点为湿疹、血小板减少伴免疫缺陷,易患自身免疫性疾病及淋巴系统肿瘤。WAS 基因编码位于 X 染色体短臂的 Xp11.22-Xp11.23,1994 年通过定位克隆技术分离出致病基因,其编码的蛋白质(Wiskott-Aldrich Protein, WASP)^[1]广泛存在于所有造血干细胞起源的细胞系中。由于本病较为罕见且临床表现差异较大,因此易被误诊和延误治疗。最近我们诊治了 1 例 WAS 患儿,并对 WASP 基因进行了测序及其蛋白检测,现结合相关文献,探讨 WAS 患者的临床特点、基因突变及蛋白表达。

1 资料与方法

1.1 资料

患儿,男,8 岁,主因反复“感染、皮肤出血点及皮疹”7 年余入院。患儿于出生后 1 个月左右即无明显诱因出现皮肤出血点、皮疹、腹泻伴发热,体温最高 39.5℃,当时查血常规:WBC $38.6 \times 10^9/L$,中性分叶核粒细胞 0.40,中、晚幼粒细胞 0.20,单核细胞 0.02,异形淋巴细胞 0.02,淋巴细胞 0.36, Hb 98 g/L, MCV 72 fl, Ret 1.32%, PLT $76 \times 10^9/L$, MPV 6.5 fl;尿常规阴性;便潜血阳性、轮状病毒抗原阳性;肝、肾功能及电解质基本正常。胸部 X 片:肺炎。诊断:①血小板减少症;②腹泻;③肺炎。给予抗感染、止泻、营养及对症支持治疗后病情好转。之后患儿反复发生上述症状,3 岁时复查血常规:WBC $8.35 \times 10^9/L$, Hb 108 g/L, PLT $24 \times 10^9/L$, MPV 6.4 fl;血块退缩试验显示收缩不良;粪便轮

¹解放军白求恩国际和平医院血液病科(石家庄,050082)

²河北无极血康医院

通信作者:李栋梁, E-mail: ldle2008@sina.com

状病毒抗原阳性;免疫球蛋白:IgG 7.447 g/L、IgA 2.379 g/L、IgM 0.173 g/L、IgE 267.3 IU/ml、补体 C3、C4 正常;自身抗体:抗核抗体(ANA)阳性(胞浆纤维型 1:100);骨髓像:骨髓有核细胞增生活跃,粒、红系各阶段细胞比例及形态基本正常,全片巨核细胞共计 312 个,其中原巨 4 个,幼巨 46 个、颗粒巨 262 个,未见产板巨核细胞,血小板少见;符合免疫性血小板减少性紫癜(ITP)骨髓像。骨髓细胞染色体分析仅见 6 个分裂像,未发现肿瘤相关的克隆性染色体数目或结构异常。期间曾按 ITP 给予丙种球蛋白($0.4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 5d)冲击治疗,患儿血小板数无明显上升,维持在 $20 \times 10^9/\text{L}$ 左右。患儿 6.5 岁时复查血常规:WBC $9.15 \times 10^9/\text{L}$, HGB 98 g/L, PLT $21 \times 10^9/\text{L}$, MPV 6.5 fl;免疫球蛋白:IgG 7.447 g/L、IgA 2.072 g/L、IgM 0.173 g/L、IgE 111.5 IU/ml。近一年余患儿仍间断出现发热、湿疹、黑便及皮肤紫癜,在当地医院给予抗感染、输血及对症治疗,感染及湿疹得到暂时控制,而应用糖皮质激素及丙种球蛋白后血小板数仍无明显上升,为求进一步诊治来院就诊,门诊以“血小板减少原因待查”收入院。患儿父母体健,家族中无遗传病及类似疾病史。入院后体格检查:T 36.4℃, P 106 次/min, R 21 次/min 分, BP 96/64 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。发育正常,营养欠佳。皮肤黏膜苍白,全身可见散在出血点、陈旧性皮疹,双侧颌下及腋下可触及肿大淋巴结,质软,触痛,无粘连。咽无充血,扁桃体 I°肿大,双肺呼吸音粗,未闻及干湿性啰音,心率 106 次/min,各瓣膜听诊区未闻及病理性杂音,腹平坦,肝脾肋下未触及,双下肢无浮肿,神经系统检查未见异常。腹部超声示脾脏肿大(厚度 46 mm)。实验室检查:血常规:WBC $9.38 \times 10^9/\text{L}$, HGB 80 g/L, MCV 73 fl, Ret 1.25%, PLT $27 \times 10^9/\text{L}$, MPV 6.5 fl。抗人球蛋白直接、间接试验均阴性;肝、肾功能,心肌酶、血脂及电解质均正常;免疫球蛋白:IgG 6.66 g/L(降低)、IgA 2.05 g/L(升高)、IgM 0.44 g/L(降低)、补体 C₃、C₄ 均正常。乙肝 5 项、丙肝抗体均阴性;细胞毒抗体、空泡酶抗体、尿毒酶抗体均阴性;细小病毒 19、EB 病毒、单纯疱疹病毒及巨细胞病毒检测均阴性;血清铁 $9.1 \mu\text{mol/L}$ ($9.0 \sim 32 \mu\text{mol/L}$)、总铁结合力 $85.5 \mu\text{mol/L}$ ($45 \sim 75 \mu\text{mol/L}$)、铁蛋白 13.68 ng/L($14 \sim 323 \text{ ng/L}$)、血清叶酸、维生素 B12 正常;T 细胞亚群:CD3⁺ 52.59% ($55\% \sim 78\%$), CD4⁺ 26.73% ($27\% \sim 53\%$), CD3⁺ CD8⁺ 22.98% ($19\% \sim 34\%$)。血清 ANA⁺⁺ 阳性。根据患儿出生后即反复出现肠道及肺部感染和皮肤紫癜及湿疹,实验室检查示血小板计数减少、体积减小、小细胞低色素性贫血、免疫功能低下及部分自身抗体阳性,初步诊断:①Wiskott-

Aldrich 综合征;②缺铁性贫血;③未分化结缔组织病。下一步将进行 WASP 基因测序及其蛋白表达的检测以确诊 Wiskott-Aldrich 综合征。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 制备 采集患儿 EDTA 抗凝外周血 5ml,分离外周血单个核细胞(PBMC),用 QIAJEN 试剂盒提取 DNA,经紫外分光光度计检测,提取的基因组 DNA 终浓度为 $50 \sim 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$, OD260/OD280 比值介于 1.7~1.9。

1.2.2 引物设计 根据 NCBI 公布的相应基因序列及相关文献设计引物^[2],并由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增 反应体系 25 μL :DNA 模板 1 μL , 2 $\times$ PCR MasterMix 12.5 μL , 上、下游引物 ($10 \mu\text{M}/\mu\text{L}$) 各 1 μL , 补双蒸水至 25 μL 。在 PCR 仪 (GeneAmp PCR System 9700 型) 上按下列条件进行反应: 95°C 、5 min $\rightarrow$ (94°C 、30 s $\rightarrow$ 57°C 、45 s $\rightarrow$ 72°C 、30 s) $\times$ 40 个循环 $\rightarrow$ 72°C 、10 min $\rightarrow$ 4°C 保温。取 PCR 产物 5 μL , 加 1 μL 上样缓冲液,在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶成像仪检测。

1.2.4 PCR 产物测序 PCR 产物纯化后,由北京海思特临床检验所应用 Sanger 法-双脱氧链终止法进行测序,测序结果与 GeneBank 已知的 DNA 序列(序列号 NM-000377)进行比对。

1.2.5 PBMC 分离及 FCM 检测 WASP 表达 采集患儿肝素抗凝外周血, Ficoll-Hypaque 密度梯度离心分离得到 PBMC。应用 0.25 mg/ml 抗人 WASP(美国 BD. Pharmingen 公司)单克隆抗体和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG2a(美国 Southern Biotech 公司),用流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickinson)检测患儿 PBMC 的 WASP 表达。

2 结果

2.1 临床特点及评分

患儿出生后不久相继出现腹泻、肺炎与皮肤湿疹及出血点,血常规示血小板数量减少、体积减小及血块收缩不良,伴感染所致的白细胞增高及失血性或(和)营养不良性贫血;体液免疫测定示 IgG 轻度降低、IgA 及 IgE 升高、IgM 降低、补体 C₃、C₄ 基本正常;细胞免疫测定提示 CD3、CD4 及 CD8 均偏低。通过评估患儿 WAS 相关症状的严重程度,依据现有的 WAS 表型评分标准^[3]对本病的临床表现型进行评分。1 分:仅出现血小板减少及小血小板,不伴其他临床表现;2 分:血小板异常,曾患轻度、短暂的湿疹,伴或不伴轻度感染;3 分:血小板异常,患有持续但可控制的湿疹和(或)反复发生需抗生素治疗的感染;4 分:血小板异常,患有持续、难治性湿疹及反复发生可能危及生命的感染;5 分:血小板异常,除湿疹和(或)反复感染外,发生自身免疫性疾病和(或)恶性肿瘤。根据上述评分标准,该患

儿存在血小板异常、可控制的湿疹和(或)反复发生需抗生素治疗的感染,评分为3分。

2.2 WASP 基因突变分析及其蛋白表达

对患儿 PCR 产物进行 WASP 基因 12 个外显子测序,检测到第 8 外显子(Exon8)剪接位点突变:c. 777+1G>A, cDNA 缺失 Exon8, 编码蛋白质终止于 aa246(图 1), 经文献检索该突变未见于多态性数据库;FCM 检测 WASP 表达阴性。

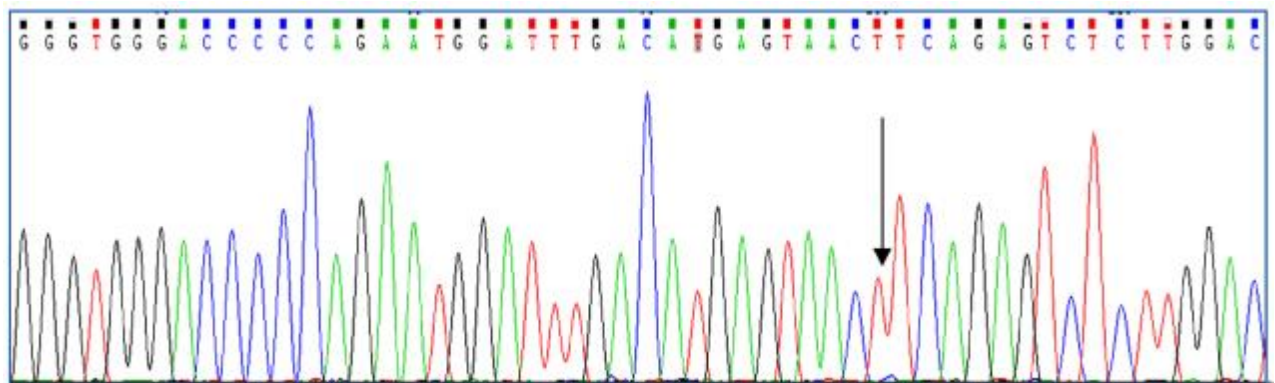
3 讨论

WAS 是一种罕见的 X 连锁隐性遗传性免疫缺陷病,有学者统计国内 1991-01—2013-10 共报道了 54 例 WAS 患者^[4],多起病于 6 个月内婴儿,成人少见,一般男性发病,女性携带,偶见由 X 染色体非随机灭活所致女性携带者患病的报道。WAS 的临床表现呈较大的异质性,其表型可分为典型 WAS、X 连锁的血小板减少症(X-linked thrombocytopenia, XLT)和 X 连锁的中性粒细胞减少症(X-linked neutropenia, XLN)。WAS 临床表现与 ITP 极为相似,常被误诊误治,这可能与该病比较罕见,临床医师的认识有限有关。本患儿既往曾按 ITP 给予糖皮质激素及丙种球蛋白治疗,但疗效欠佳,血小板数量基本无上升。

WAS 患儿大多具有反复感染、湿疹和血小板减少三联征表现。我国自 1991 年以来关于 WAS 大多为个案报道,其临床表现与欧美及其他亚洲国家的病例无明显差异,患儿均有出血倾向,90.7% 发生湿疹,87.0% 有出现反复感染,且大多数为反复腹泻。WAS 为联合免疫缺陷病,均有不同程度的体液、细胞免疫功能缺陷,并随年龄增长而加重。自身免疫性疾病在 WAS 患儿中的发生率为 22%~72%。本患儿出生后不久即发生反复肠道感染、肺炎及皮肤紫癜、湿疹;血常规示血小板数量减少、体积减小,体液免疫功能检测示 IgG 水平轻度下降, IgM 水平下降,而 IgA 和 IgE 水平升高,细胞免疫功能检测示效应 T 淋巴细胞和辅助 T 淋巴细胞功

能缺陷。患儿多次查 ANA 滴度显示升高,虽无相应的临床表现,但不能排除诊断未分化结缔组织病,将来有进展为典型结缔组织病的可能。

WASP 基因包括 12 个外显子,基因组 DNA 长约 9 kb,其 cDNA 由 1821 个碱基组成,编码含 502 个氨基酸的 WASP。WASP 是一种仅在造血细胞系表达、富含脯氨酸的细胞质蛋白,主要参与细胞内信号传导及细胞骨架重新组合,与造血细胞的分化增殖功能有关^[1]。目前已发现 WASP 存在 350 多种突变,其中 EVH1 区的突变约占一半,国内最常见的突变类型为缺失突变,其次是无义突变、错义突变、剪接突变和插入突变。缺失突变最常见在 Exon 7~10,无义突变最常见于 Exon1 和 7,错义突变最常见于 Exon 2,拼接突变散在分布,以内含子 6~12 多见,插入突变较少,未发现分布规律。而国外资料报道最常见是错义突变,其次是剪接突变、缺失突变、无义突变、插入突变,大多数错义突变位于 Exon 1~4,剪接突变在内含子 6~10,缺失突变、无义突变、插入突变则散在分布 WAS 基因的各个部分。国外报道的 WASP 基因热点突变有 168 C>T、290 C>N/291 G>N, IVS6+5G>A、665 C>T 和 IVS8+1G>N,其中前 3 种导致 XLT,而后 2 种导致典型 WAS^[5]。临床表现较轻的错义突变均发生在 EVH1 区,即 Exon 1~4,患儿表现为 XLT,而典型 WAS 的突变集中于 Exon 6~12。本例患儿在 Exon8 发生剪接突变 c. 777+1 G>A,导致 cDNA 缺失 Exon8,编码蛋白质终止于 aa246。发生在此位点的剪接突变十分罕见,目前仅见于国外^[5]报道的 1 例患儿,但此患儿未进行 WASP 表达的检测,亦未见免疫学指标的异常。剪接位点突变多发生于 WASP 基因下游(内含子 6~11),由于剪接点的不同,剪接产物呈现异质性,可变剪接位点突变可产生多种剪接产物,包括少量正常的 WASP;而不可变剪接位点突变通常无 WASP 生成。因而剪接位点突变导致



注:箭头所示为 c. 777+1G>A 剪切位点突变。

图 1 WASP 基因测序结果

参考文献

- [1] Bhagavathi S, Fu K. Primary bone lymphoma[J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133: 1868—1871.
- [2] Ramadan KM, Shenkier T, Sehn LH, et al. A clinicopathological retrospective study of 131 patients with primary bone lymphoma: a population based study of successively treated cohorts from the British Columbia Cancer Agency[J]. Ann Oncol, 2007, 18: 129—135.
- [3] Power DG, Mcvey GP, Korpanty G, et al. Primary bone lymphoma: single institution case series[J]. Ir J Med Sci, 2008, 177: 247—251.
- [4] Ha-ou-nou FZ, Benjilali L, Essaadouni L. Sacral pain as the initial symptom in primary Hodgkin's lymphoma of bone[J]. J Cancer Res Ther, 2013, 9: 511—513.
- [5] Unni KK, Hogendoom P. World health organization classification of tumours pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone [M]. Lyon: ARC Press, 2002: 194—198.
- [6] Mikhael NG. Primary bone lymphoma[J]. Clin Oncol, 2012, 24: 366—370.
- [7] Zhang X, Chang CK, Song LX, et al. Primary lymphoma of bone: a case report and review of the literature [J]. Med Oncol, 2011, 28: 202—206.
- [8] Castro-Bouzas D, Prieto-Gonzalez A, Serramito-Garcia R, et al. Primary cranial vault lymphoma[J]. Rev Neurol, 2011, 53: 735—738.
- [9] Cirakli A, Elli M, Dabak N, et al. Evaluation of primary bone lymphoma and the importance of positron emission tomography [J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2014, 48: 371—378.
- [10] Dar SH, Wazir HS, Dar IH, et al. Primary bone lymphoma with multiple vertebral involvement [J]. J Cancer Res Ther, 2013, 9: 487—489.
- [11] Ford DR, Wilson D, Sothi S, et al. Primary bone lymphoma: treatment and outcome[J]. Clin Oncol, 2007, 19: 50—55.
- [12] Nasiri MR, Varshoe F, Mohtashami S, et al. Primary bone lymphoma: a clinicopathological retrospective study of 28 patients in a single institution[J]. J Res Med Sci, 2011, 16: 814—820.
- [13] Bosch-Barrera J, Arbea L, García-Velloso MJ, et al. Primary bone lymphoma of the mandible and thyroid incidentaloma identified by FDG PET/CT: a case report[J]. Cases J, 2009, 2: 6384—6384.
- [14] 黄慧强, 林旭滨, 潘战和, 等. CEOP 方案治疗 121 例非霍奇金淋巴瘤[J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(5): 391—395.
- [15] Cai L, Stauder MC, Zhang YJ, et al. Early-stage primary bone lymphoma: a retrospective, multicenter Rare Cancer Network (RCN) study[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012, 83: 284—291.
- [16] Liu YC, Gau JP, Yu YB, et al. Prognostic factors and treatment efficacy in patients with Primary Diffuse Large B-cell Lymphoma of the bone: single institute experience over 11 years[J]. Intern Med, 2014, 53: 95—101.
- [17] Lei Y, Zi L, Long S, et al. Primary bone lymphoplasmacytic lymphoma presenting with spinal cord compression: a case report[J]. Turk J Hematol, 2013, 30: 409—412.
- [18] Undabeitia J, Noboa R, Boix M, et al. Primary bone non-Hodgkin lymphoma of the cervical spine[J]. Turk Neurosurg, 2014, 24: 438—442.

(收稿日期: 2014-08-14)

(上接第 217 页)

了临床表型的多样性, 其中 WASP 阴性者更容易发生自身免疫性疾病, 往往预后较差。本例患儿通过 FCM 检测 WASP 表达阴性, 且存在发生结缔组织病的倾向, 符合上述剪接位点突变的特点。

WAS 的治疗方案需根据临床严重程度、病程、WAS 基因突变和 WASP 的表达情况而定。对典型 WAS, 支持治疗和抗生素的预防治疗是必需的。此外, 必要时可予丙种球蛋白和血小板输注。早期进行造血干细胞移植是目前治疗 WAS 最有效的手段, HLA 同型同胞供体移植效果最佳。无条件移植患者, 可行脾切除, 使患儿血小板数量上升, 但无法纠正减小的血小板体积, 但也有报道脾切除术后, 循环中血小板大小得到了明显纠正^[6], 这表明血小板破坏加速也是血小板减少的原因之一。急性期以控制感染、止血、输血及对症支持治疗为主。

参考文献

- [1] Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome[J]. Cell,

1994, 78: 635—644.

- [2] Chan KW, Lee TL, Chung BH, et al. Identification of five novel WASP mutations in Chinese families with Wiskott-Aldrich syndrome[J]. Hum Mutat, 2002, 20: 151—152.
- [3] Ochs HD. The Wiskott-Aldrich syndrome[J]. Isr Med Assoc J, 2002, 4: 379—384.
- [4] 彭方, 农光民, 蒋敏, 等. Wiskott-Aldrich 综合征临床特点与基因测序分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29(9): 675—679.
- [5] Jin Y, Mazza C, Christie JR, et al. Mutations of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation[J]. Blood, 2004, 104: 4010—4019.
- [6] Burns S, Cory GO, Vainchenker W, et al. Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease[J]. Blood, 2004, 104: 3454—3462.

(收稿日期: 2014-08-21)