

1 例家族性血友病因子缺乏症基因突变及家系调查

曹永平¹ 叶梦秋²

(1 都昌县人民医院血液内科 江西 都昌 332600; 2.都昌县人民医院检验科 江西 都昌 332600)

摘要:目的 分析 1 例儿童血友病因子缺乏症家系的基因缺陷。方法 检测先证者及其家系成员的 vWF: Ag, 通过直接测序法分析 vWF 基因突变。结果 患儿家系中 3 位成员 2 位 vWF: Ag 降低, 1 位 vWF: Ag 正常。先证者及多个家系成员中发现 vWF 基因 C.478G>A (P.Gly160Arg) 突变, 1 位正常。结论 C.478G>A (P.Gly160Arg) 杂合突变是导致此家系血友病因子缺乏症的基因发病机制。
关键词: 血友病因子缺乏症; 遗传性; 基因; 突变; 家系;

血管性血友病因子(vonWillebrandFactor,vWF),是由第 12 号染色体的短臂所编码的糖蛋白。vWF 是一种重要的血浆成分,正常人血浆 vWF 浓度约为 10mg/L。在内皮细胞受刺激或损伤以及集体处于应激状态时,血浆 vWF 水平升高。vWF 及某些止血与纤溶成分都是血栓性疾病的独立危险因素。相反,当 vWF 基因发生缺失、插入点突变、剪切点替换或提前形成转录终止信号时,导致血浆 vWF 量有显著减低或有质的缺陷,不能完成其正常的止血功能时,即为 vWD。针对基因缺陷的诊断临床上尚未能常规开展。本案例通过分析 1 例 vWF 缺乏症先证者及其家系成员的临床表现,实验室检测结果及基因测序结果,发现了导致此家系 vWF 缺乏的基因突变位点,报道如下。

1 对象及方法

1.1 先证者及其家系调查

先证者为 12 岁男患儿,父母非近亲结婚,2010 年自发性关节出血于我院就诊,行 APTT 延长,凝血酶原时间(PT),纤维蛋白原正常,后转入上海市华山医院,诊断为血管性血友病,出院后反复于我院输注冷沉淀治疗,2018 年 11 月于我院行 VIII 降低, VII 升高, vWF 降低,仍诊断为血友病。调查先证者兄弟、及其家系(父母)成员共 3 例,所有家系成员均无自发性出血史及外伤后出血不止史。本研究获研究对象或其法定监护人知情同意,并通过都昌县人民医院伦理委员会批准。

1.2 实验试剂和引物信息

材料及试剂: 2* TaqPCR Master Mix PCR 板磁珠法血液基因组 DNA 提取试剂(DP601-T6), BigDye 磁珠法 PCR 产物回收盒(PCR-CE-5030), 引物包括 chr12-6219594-F 和 chr12-6219594-R。

1.3 测序方法:

本方法以受检者的血液来源的基因组 DNA 为检测材料,采用超声波高性能样品处理系统(Covaris)DNA 碎片化以构建文库,通过安捷伦(Agilent)Agilent SureSelect Human All Exon V6 试剂盒进行目标区域的捕获和富集,使用 Illumina HiSeq4000 平台进行高通量测序。原始数据(rawdata)下机并通过数据质控后,使用 Burrows-Wheeler Aligner(BWA,v0.7.17)软件与人类参考基因组(GRCH37/hg19)进行比对。比对结果再使用 Picard-tools(v4.1.1.0)去除 PCR 重复片段;使用 Genome Analysis Toolkit(GATK,v4.1.1.0)软件进行 SNV 和小片段插入、缺失检测,并使用 Annovar(v201804)软件对变异结果进行注释。

2 结果:

2.1 基因结果分析

病人 1、病人 2、病人 3、病人 4 vWF:Ag 分别为 8.7%、20.3%、21.2%、46.8%。

2.2 基因结果分析

病人 1、病人 2、病人 3、病人 4 vWF 基因结果分别为:C.478G>A (P.Gly160Arg)结果+、+、+、-。

讨论:

血管性血友病分两种,一种遗传性血管性血友病,一种是获得性血管性血友病,遗传性血管性血友病是一种常染色体遗传性疾病,多为显性遗传,部分隐性遗传。以自幼发生的出血倾向、出血时间延长、血小板黏附性降低、瑞斯托霉素诱导的血小板聚集缺陷,及血浆 vWF Ag 缺乏或结构异常为特点。遗传性血管性血友病 vWF 主要存在于内皮细胞、巨核细胞及血小板,生理功能:与血小板膜 GPIIb-IIIa 复合物及内皮下胶原结合,介导血小板在血管损伤部位的黏附;与因子 VIII 结合,作为载体具有稳定因子 VIII 的作用。

vWF 基因的 c.478>A(p.Gly160arg)突变是一个错义突变,导致基因编码蛋白的第 160 位氨基酸有甘氨酸突变为精氨酸,已有该突变在血管性血友病患者中的报道^[1],也有同一位点的 c.478>c(p.Gly160arg)和的 c.478>T(p.Gly160Trg)报道^[2]。

通过本病例研究通过一代测序,发现 C.478G>A(P.Gly160Arg) 是此家系谱基因缺陷,该病人哥哥及父母无血管性血友病出血症状,也证实了血管性血友病即可表现为显性遗传,也可表现为隐性遗传,对于未婚反复关节、皮肤、肌肉出血等病人,建议常规行凝血功能同时行 vWF 检查,有条件者可行基因检测,减少下一代血管性血友病发病显性发病率。

参考文献:

[1]Borras N, Battle, Perez-Rodriguez A, et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): comprehensive genetic analysis by next-generation sequencing of 480 patients[J]. *haematologica*, 2017, 102(12): 2005-2014.

[2]Liang Q, Qin H, Ding Q, et al. Molecular and clinical profile of vWD in a Chinese population: application of next-generation sequencing and CNVplex® technique[J]. *Thrombosis and haemostasis*, 2017, 117(08): 1534-1458.