

遗传性出血性毛细血管扩张症致严重鼻出血的 早期基因诊断*

籍灵超¹ 王志新² 王倩³ 张静¹ 贾婧杰¹ 尤少华¹ 白银¹
周雪筠¹ 赵素萍¹ 周颖¹ 张革化³ 王洪田¹

[摘要] 目的: 探讨遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT) 致严重鼻出血的早期基因诊断。方法: 对 2 个 HHT 家系共 23 例成员进行详细的临床检查及评估, 提取外周静脉血 DNA, 聚合酶链反应扩增目的基因 ENG 和 ACVRL-1, 测序并进行序列分析, 判断突变的致病性。结果: NMG-1 家系采集到静脉血标本的 11 例中有 6 例携带 ACVRL-1 基因的错义突变 c. 263A > G。GD-2 家系采集到静脉血标本的 12 例中有 5 例携带 ACVRL-1 基因的错义突变 c. 199C > G。有鼻出血病史者突变基因检出率为 100%, 无鼻出血者史突变基因检出率为 25%。结论: 基因诊断极高的灵敏度和特异性在 HHT 早期诊断中具有重要的应用价值, 可成为临床常规检测项目。

[关键词] 鼻出血; 遗传性出血性毛细血管扩张症; 基因; 诊断

[中图分类号] R765.23 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1781(2013)05-0241-05

Early genetic diagnosis in patients with HHT induced severe nosebleed

Ji Lingchao¹ WANG Zhixin² WANG Qian³ ZHANG Jing¹ JIA Jingjie¹
YOU Shaohua¹ BAI Yin¹ ZHOU Xuejun¹ ZHAO Suping¹
ZHOU Ying¹ ZHANG Gehua³ WANG Hongtian¹

(¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China; ²Department of Otolaryngology, Liaoning Lingyuan Prison Branch Administration Central Hospital; ³Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University)

Corresponding authors: WANG Hongtian, E-mail: wht301@263.net

ZHANG Gehua, E-mail: gehuazh@hotmail.com

Abstract Objective: To study the early gene diagnosis of hereditary hemorrhagic telangiectasia(HHT) induced severe nosebleed. **Method:** Clinical features of 23 family members in two HHT pedigrees were examined. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples. PCR amplification was conducted to screen ENG and ACVRL-1 genes with their specific primers. Direct sequencing was performed to detect the mutation. Mutation analysis was carried out to evaluate its significance. **Result:** A heterozygous c. 263A > G mutation was identified in exon 3 of ACVRL-1 in 6 out of 11 members in NMG-1 pedigree. In GD-2 pedigree, 5 of 11 members carried c. 199C > G mutation. Mutation detection rate was 100% in subjects with nosebleed history and 25% in family members without epistaxis. **Conclusion:** Gene diagnosis characterized by high sensitivity and specificity is of great practical significance and early genetic screening should be a clinical routine test for HHT induced severe nosebleed.

Key words nosebleed; hereditary hemorrhagic telangiectasia; gene; diagnosis

鼻出血是耳鼻咽喉头颈外科最常见的急症, 顽固性鼻出血也很常见。大量、反复鼻出血是遗传性出血性毛细血管扩张症(hereditary hemorrhagic telangiectasia, HHT) 最主要的症状。HHT 是一种常染色体显性遗传病⁽¹⁻²⁾。国外流行病学调查显示, HHT 发病率为 1/2351 ~ 1/16500^(3,4)。我国尚无流行病学调查资料, 但按照 1/10000 保守估计中国至

少有 140 万 HHT 典型患者, 未发病和可疑病例则更多⁽⁵⁾。

HHT 的诊断主要依靠临床表现, 但大部分临床医生对该病不够熟悉, 极易漏诊和误诊。患者常不能得到及时诊断和治疗, 其家属也不了解现有的筛查和治疗程序, 这就导致儿童和成人患者经常发生危及生命的出血和(或) 中风。2000 年 Shovlin 等⁽⁶⁾根据 HHT 的 4 项临床表现提出了临床诊断标准: ①自发反复鼻出血; ②鼻黏膜、舌头、面颊、口唇、掌指、结膜等处毛细血管扩张形成出血点; ③胃肠道、肺、肝脏、脑、脊髓等处内脏器官血管畸形; ④父母、子女、兄弟姐妹(直系血亲和 3 代以内的旁系

* 基金项目: 军队“十一五”科技攻关课题(No: 08G128)

¹解放军总医院耳鼻咽喉头颈外科(北京, 100853)

²辽宁省凌源监狱管理分局中心医院耳鼻咽喉科

³中山大学附属第三医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者: 王洪田, E-mail: wht301@263.net

张革化, E-mail: gehuazh@hotmail.com

血亲) 有此种疾病患者。符合 3 项及以上者为临床确诊,符合 2 项及以上者为临床可疑,仅 1 项为临床排除。

与临床诊断相比,基因诊断有其独特的优势。在筛查到先证者的突变基因后,可以对家系中所有成员进行基因筛查。经基因诊断技术确诊的患者可及早就医,做到早期诊断、早期治疗,预防致命性并发症的发生。本研究利用分子诊断技术筛查已经发现的 HHT 致病基因 ENG 和 ACVRL-1,对 HHT 家系中无鼻出血者进行早期基因诊断。

1 资料与方法

1.1 研究对象

我们对收集到的 2 个较大的 HHT 家系用 Cyrillic 软件完成家系图绘制,所有家系成员均经详细的家系调查。根据家系图分析,2 个家系完全符合显性遗传的规律。NMG-1 家系目前有成员 27 例,其中 6 例有鼻出血史,在我们初步获得的 11 例血液标本中 4 例有反复严重鼻出血史,7 例目前尚无鼻出血史(图 1);该家系长期居住在内蒙古东北部农村,汉族,无近亲婚姻史。GD-2 家系目前有成员 17 例,初步获得了 12 例血液标本,其中 3 例有反复严重鼻出血史,9 例目前尚无鼻出血史(图 2);该家系长期居住在广东省山区,汉族,亦无近亲婚姻史。本研究得到解放军总医院伦理委员会的批准,也征得患者及家属的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 临床表现及检查 采集病史,填写调查问卷,包括鼻出血起始年龄、频率、出血量、止血方法、输血量及频率、血红蛋白等。临床检查项目包括鼻内镜检查、血常规、凝血四项、胸部 CT、颅脑 MRI、心脏超声、肝胆胰脾肾超声等。

1.2.2 采集外周静脉血及提取 DNA 采集 2 个家系中 23 例成员的外周静脉血,每人 5~10 ml,枸橼酸钠抗凝,并按天根 DNA 分离试剂盒(北京天根生化有限公司)提供的标准流程进行 DNA 提取,提取的 DNA 样品经紫外分光光度计和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测纯度和浓度后于 -20℃ 保存备用。

1.2.3 目的片段 PCR 扩增 应用 PRIMER3 在线引物设计软件在 ACVRL-1 基因(2~9 外显子)和 ENG 基因(1~15 外显子)外显子上下游各 500 bp 序列区域分别设计上下游引物(引物由 Invitrogen 公司提供),以扩增目的片段。PCR 反应体系为 25 μ l: 10 $\times$ buffer 2.5 μ l, Primer (10 pmol/L) 1 μ l $\times$ 2, dNTP (1 mmol/L) 4 μ l, Taq Polymerase 1.5 U, 模板 DNA 2 μ l, 无菌去离子水补至 25 μ l。PCR 反应在 9700 热循环仪(美国 ABI 公司)上完成,95℃ 预变性 5 min 后按如下 2 种循环条件完成 PCR 扩增。95℃ 变性 30 s, 63℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 14 个循环; 95℃ 变性 30 s, 56℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 45

s, 共 21 个循环, 72℃ 后延伸 7 min。PCR 产物 4℃ 保存。取 2 μ l PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳(含溴化乙锭 0.5 mg/L) 检测产物。

1.2.4 DNA 序列分析 对 PCR 产物进行 Big-Dye 测序,测序在美国 ABI3730-Avant Genetic Analyzer 测序仪上进行,测序结果通过 Gene Tool Lite1.0 软件进行比对分析。标准序列选自 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov/sites/entrez>), ACVRL-1 标准序列选用 NM 00020.2, ENG 标准序列选用 NM 001114753.1, 发现可疑的突变峰点后用 Chromas2 软件读取测序结果的峰图文件,进行确认或排除。首先对家系中 1 例先证者与 1 例正常同胞的 DNA 样本进行 ACVRL-1 基因的全部外显子及外显子与内含子的交界处序列的双向测序。ACVRL-1 基因在外显子检测到致病突变后,即在家系全部成员中都对此基因片段进行扩增并双向测序分析。

1.2.5 SIFT 分析 使用 SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) 分析检测到点突变的致病性。SIFT 是一种点突变预测程序,主要通过 BLAST 搜索程序和多重序列比对技术来评价和预测点突变对蛋白质功能的影响。通过 SIFT 计算的概率 P , 将点突变影响蛋白质功能的程度分为 3 个等级: 良性 ($P > 0.05$)、中度 ($0.01 < P < 0.05$) 及严重 ($P < 0.01$), 以此为标准来评价点突变对蛋白质功能的影响^[7]。

2 结果

2.1 家系成员的临床特征

NMG-1 家系目前有成员 27 例,我们初步获得了 11 例血液标本,其中 4 例有反复严重鼻出血史,7 例目前尚无鼻出血史。先证者为 II 6, 女, 51 岁,反复鼻出血 12 年,在绝经后鼻出血加剧,血红蛋白经常在 35 g/L 左右,需要经常输血维持生命,每次输 400 ml 全血或 2 U 红细胞,每 1~2 个月 1 次。其女儿 III 16, 24 岁,无鼻出血病史,但舌头有明显的出血点。IV 1 无鼻出血史和皮肤黏膜的出血点。4 例有鼻出血病史者中 2 例男性发病年龄都在 25 岁左右,2 例女性约在 40 岁;3 例呈逐渐加重趋势,1 例逐渐减轻。皮肤黏膜有出血点表现者 2 例,见于面颊部、舌、指端。胸部 CT 排查肺血管畸形,颅脑 MRI 排查脑血管畸形,肝胆胰脾肾超声检查腹腔畸形血管。经检查所有患者均未见异常。

GD-2 家系目前有成员 17 例,初步获得了 12 例血液标本,其中 3 例有反复严重鼻出血史,9 例目前尚无鼻出血史。先证者 II 5, 男, 57 岁,反复大量鼻出血 31 年,血红蛋白经常在 62 g/L,需要间

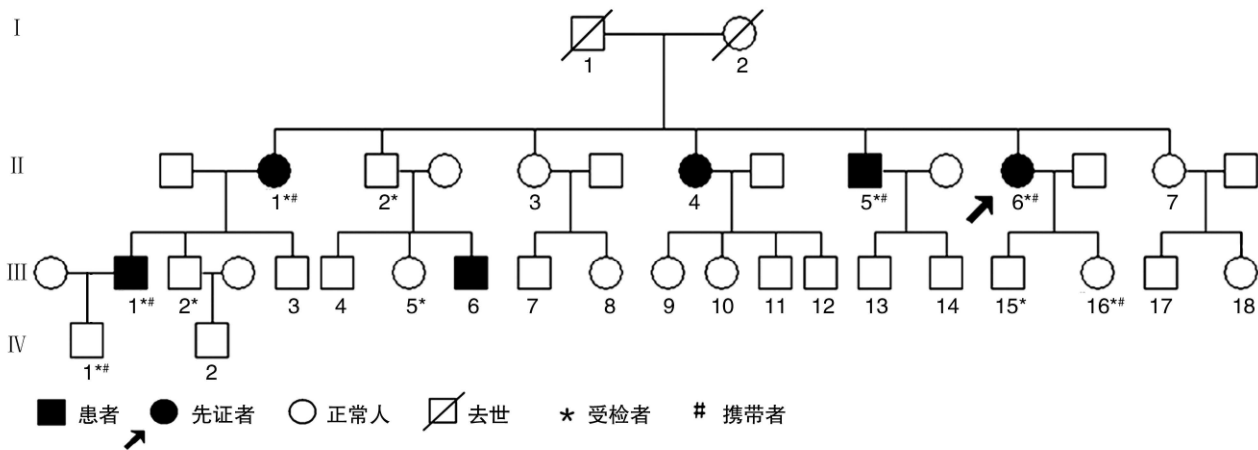


图1 NMG-4 家系图

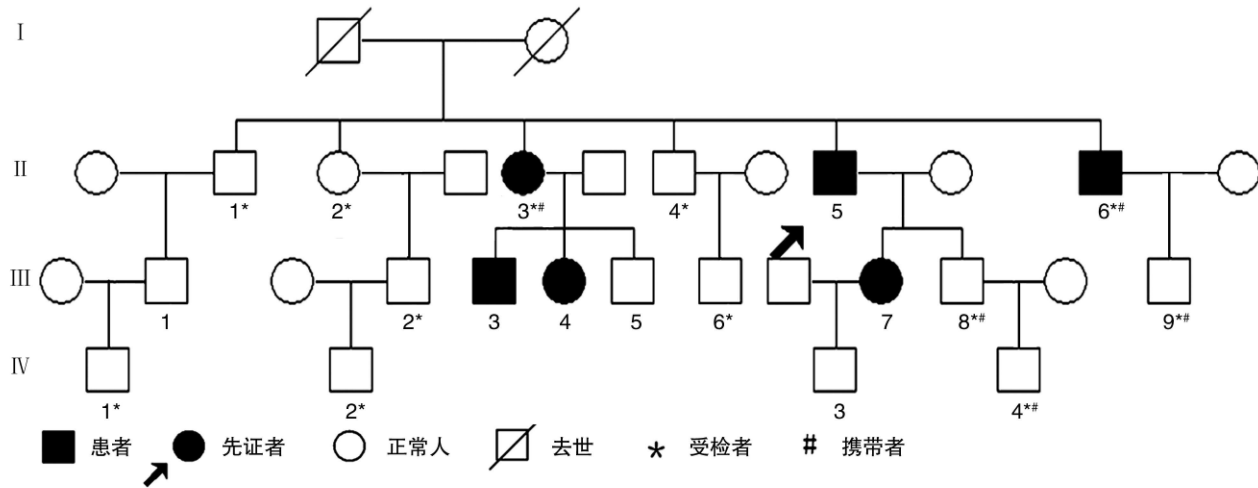


图2 GD-2 家系图

断输血,每3~6个月1次。其女儿Ⅲ7,29岁,亦有严重鼻出血史3年,逐渐加重;其儿子Ⅲ8和孙子Ⅳ4均无鼻出血史。

2.2 基因测序结果

2个家系的基因筛查结果见表1。NMG-4家系采集到静脉血标本的11例中有6例携带突变基因,GD-2家系采集到静脉血标本的12例中有5例携带突变基因。23例接受血检者中,11例携带突变基因,12例未检测到突变基因。有鼻出血史者突变检出率为100%(7/7),无鼻出血史者突变检出率为25%(4/16)。

NMG-4家系的6例基因筛查阳性者,突变位点全部位于ACVRL-1基因第3外显子内的错义突变c.263A>G,导致了第88位编码子编码的野生型酪氨酸(Tyrosine、Tyr或Y)被突变型的半胱氨酸(Cysteine、Cys或C)替代(图3),而家系中正常个体及50例正常对照未检测到类似的核苷酸改变。通过SIFT分析,p.Y88C的P=0.20,认为是良性变异,但此变异仅见于临床患病者,正常人未见此位点突变,因此,应该仍是致病突变。

GD-2家系的5例患者的共同突变位点是ACVRL-1基因第3外显子内错义突变c.199C>G,因此,第67位密码子编码的不带电荷的甘氨酸(Glycine、Gly或G)取代了带电荷的精氨酸(Arginine、Arg或R)(图4)。Olivieri于2002年发现并报道了c.199C>T,证实了其致病性。本家系中正常个体及50例正常对照者此位点未见突变,SIFT分析,p.R67G的P<0.05,认为是致病突变。

表1 2个家系鼻出血史与突变基因检出情况 例				
		有鼻出血史	无鼻出血史	合计
NMG-4家系	基因筛查阳性	4	2	6
	基因筛查阴性	0	5	5
GD-2家系	基因筛查阳性	3	2	5
	基因筛查阴性	0	7	7
合计		7	16	23

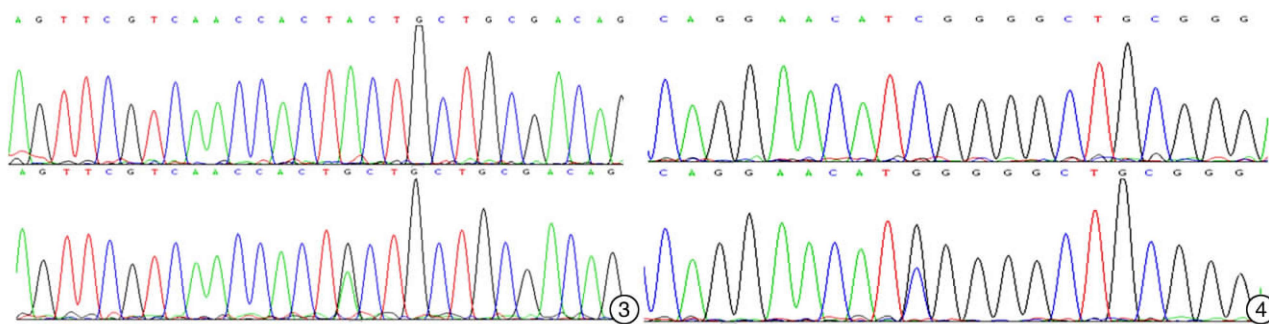


图 3 NMG-1 家系 ACVRL-1 基因突变位点 c.263A > G, 导致第 88 位编码子编码的野生型酪氨酸被突变型半胱氨酸替代; 图 4 GD-2 家系位于 ACVRL-1 基因的内错义突变 c.199C > G, 导致第 67 位密码子编码的不带电荷的甘氨酸取代了带电荷的精氨酸

3 讨论

HHT 又称 Osler-Rendu-Weber 综合征^[8], 发达国家对其研究已经很深入, 有诊疗指南、基金会、网站、学会、患者协会、论坛等^[9]。鼻出血是 HHT 最常见的症状, 皮肤黏膜的毛细血管扩张是最常见的体征, HHT 也常并发脑、肺、胃肠道和肝脏等的动静脉畸形 (AVM)^[10]。在 PubMed 网站上搜索 HHT, 可以发现 1 136 篇文献, 时间跨度是 1974-01 - 2012-10。然而在中国知网上搜索 HHT, 仅有 234 篇文章, 时间跨度是 1978-01 - 2012-06, 许多文章是个案报告或综述^[11]。由于 HHT 临床表现的多样性, 患者经常首诊于耳鼻咽喉科、血液科、神经科、呼吸科、消化科、皮肤科等; 因此, 多学科协作对 HHT 的临床诊断显得十分重要。HHT 基金会在北美、西欧和日本等国家成立了 34 家诊疗中心, 由遗传学、耳鼻咽喉科、消化科、呼吸科、神经外科、神经介入科、放射介入科等专家共同参与, 实现对 HHT 患者的全面评估和综合治疗^[12]。2009 年多国科学家合作制定了 HHT 临床诊疗指南^[13]。HHT 的基因文库已收录 470 条 ENG 突变基因及 374 条 ACVRL-1 突变基因^[14]。2010 年《Nature》杂志发表了沙利度胺治疗 HHT 患者鼻出血的研究论著^[15], 2012 年又对 HHT 修饰基因的发现进行了报道^[16]。可见我国对 HHT 的临床和基础研究都远远落后。

HHT 的临床诊断一直沿用 Shovlin 等^[6]在库拉索岛制定的标准。本研究中, 根据临床表现和 HHT 诊断标准, 把受检者分为 3 类: 临床确诊、临床可疑、临床排除。符合 3 条临床标准的确诊患者突变检出率为 100%, 临床可疑 (2 条标准符合) 患者突变检出率亦为 100%, 临床排除者的突变检出率仅为 17.4% (4/23)。可见临床评估对于诊断有重要意义, 但对于家系中无鼻出血的成员, 基因检测成为早期诊断最有利的手段。

HHT 是显性遗传, 突变基因携带者的表型外显率为 100%, 即突变基因携带者肯定会发病。但其

症状和体征是延迟发生的, 随着年龄增长而逐渐显现^[12]。本研究中鼻出血患者平均发病年龄为 30 岁, 无鼻出血的 4 例突变携带者年龄均小于 20 岁。因此经过病史问诊和体检后, 只有 1 条标准符合 Shovlin 等的临床诊断标准时, 不能完全排除 HHT, 尤其是 30 岁以下的患者。按照临床诊断标准进行诊断时, 需考虑年龄因素。我们发现, 体征往往早于症状出现。本文 2 个家系中 3 例无鼻出血史, 但舌头、面颊部皮肤有点状毛细血管扩张症。因此, 在 HHT 的诊断中, 面部指尖和舌头的出血点有重要指示作用。

目前已经发现 HHT 致病基因如 ENG、ACVRL-1。ENG 引起的 HHT 称为 I 型, ACVRL-1 引起的 HHT 为 II 型。据文献报道, 这 2 型占有 HHT 的 86%。所以, 我们针对这 2 种基因进行筛查。本研究中的 2 个家系均为 ACVRL-1 基因突变。其中 4 例年轻患者无鼻出血、毛细血管扩张等表现, 检查实质器官的血管畸形未见异常, 应该是临床排除。但分子检测同样发现了 ACVRL-1 基因突变, 为 HHT 基因携带者。

综上所述, 由于基因诊断的高度特异性和灵敏度, 基因检测对 HHT 家系成员早期诊断有重要意义。

参考文献

- [1] GUTTMATCHER A E, MARCCHUK D A, WHITE R I Jr. Hereditary haemorrhages telangiectasia [J]. New Eng J Med, 1995, 333: 918 - 924.
- [2] GEDGE F, MCDONALD J, PHANSALKAR A, et al. Clinical and analytical sensitivities in hereditary hemorrhagic telangiectasia testing and a report of de novo mutations [J]. J Mol Diagn, 2007, 9: 258 - 265.
- [3] OLIVIERI C, MIRA E, DELÙ G, et al. Identification of 13 new mutations in the ACVRL1 gene in a group of 52 unselected Italian patients affected by hereditary haemorrhagic telangiectasia [J]. J Med Genet, 2003, 39: 145 - 148.

- [4] NG P C, HENIKOFF S. Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function [J]. *Genome Res*, 2002, 12: 436 – 446.
- [5] 贾婧杰, 张静, 赵立东, 等. II型遗传性毛细血管扩张症临床特点和 ACVRL1 基因筛查 [J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(16): 1107 – 1111.
- [6] SHOVLIN C L, GUTTMACHER A E, BUSCARINI E, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber Syndrome) [J]. *Am J Med Genet*, 2000, 91: 66 – 67.
- [7] MCGEE T L, SEYEDAHMADI B J, SWEENEY M O, et al. Novel mutations in the long isoform of the USH2A gene in patients with Usher syndrome type II or non-syndromic retinitis pigmentosa [J]. *J Med Genet*, 2010, 47: 499 – 506.
- [8] GIORDANO P, NIGRO A, LENATO G M, et al. Screening for children from families with Rendu-Osler-Weber disease: from geneticist to clinician [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4: 1237 – 1245.
- [9] PLAUCHU H, CHADAREVIAN J P, BIDEAU A, et al. Age-Related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population [J]. *Am J Med Genet*, 1989, 32: 291 – 297.
- [10] ABDALLA S A, LETARTE M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease [J]. *J Med Genet*, 2006, 43: 97 – 110.
- [11] 田佳新, 周兵, 许康, 等. 遗传性出血性毛细血管扩张症一家系 ALK1 基因突变研究和临床微创治疗 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2009, 16(4): 209 – 213.
- [12] WAITE K A, ENG C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF- β family [J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4: 763 – 773.
- [13] FAUGHNAN M E, PALDA V A, GARCIA-TSAO G, et al. International guidelines for the diagnosis and management of hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. *J Med Genet*, 2011, 48: 73 – 87.
- [14] SCOTTI C, OLIVIERI C, BOERI L, et al. Bioinformatic analysis of pathogenic missense mutations of activin receptor like kinase 1 ectodomain [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e26431 – e26431.
- [15] LEBRIN F, SRUN S, RAYMOND K, et al. Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. *Nat Med*, 2010, 4: 420 – 428.
- [16] BENZINOU M, CLERMONT F, LETTEBOER T, et al. Mouse and human strategies identify PTPN14 as a modifier of angiogenesis and hereditary haemorrhagic telangiectasia [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 616 – 621.

(收稿日期: 2012-12-06)

(上接第240页)

参考文献

- [1] 张速勤, 王顺林, 王素敏. 原发于肾脏的鼻窦转移性透明细胞癌一例 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2005, 40(7): 551 – 552.
- [2] ZUR K B, BRANDWEIN M, WANG B, et al. Primary description of a new entity, renal cell-like carcinoma of the nasal cavity: van Meegeren in the house of Vermeer [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2002, 128: 441 – 447.
- [3] MOHD HADI U, KAHWAJI G J, MUFARRIJ A A, et al. Low grade primary clear cell carcinoma of the sinonasal tract [J]. *Rhinology*, 2002, 40: 44 – 47.
- [4] STORCK K, HADI U M, SIMPSON R, et al. Sinonasal renal cell-like adenocarcinoma: report on four patients [J]. *Head Neck Pathol*, 2008, 2: 75 – 80.
- [5] NEGAHBAN S, DANESHBOD Y, KHADEMI B, et al. Sinonasal clear cell adenocarcinoma: a case report [J]. *Acta Cytol*, 2009, 53: 597 – 600.
- [6] 刘兴海, 王军, 李瑞英, 等. 原发鼻腔透明细胞癌3例及文献复习 [J]. *中国肿瘤临床*, 2005, 32(18): 1056 – 1057.
- [7] 王哲, 黄高昇, 李青, 等. 原发性鼻腔透明细胞癌1例并文献复习 [J]. *诊断病理学杂志*, 2002, 9(3): 147 – 148.
- [8] 张伯垣, 杨继洲. 原发性鼻腔透明细胞癌一例 [J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1996, 31(2): 114 – 115.
- [9] 杨宇明, 邓绍光, 何胜利. 原发鼻腔鼻窦透明细胞癌1例 [J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2006, 20(14): 665 – 666.
- [10] ERENO C, GRANDE J, ALIJA V, et al. Hyalinizing clear cell carcinoma of the hypopharynx metastasizing to lung: a case report [J]. *Histopathology*, 2000, 37: 89 – 91.
- [11] 阎华庆. 鼻咽癌 [M] // 李树玲. 头颈肿瘤学. 天津: 天津科学技术出版社, 1993: 536 – 602.

(收稿日期: 2012-10-21)