论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1404-04

24例 Wiskott-Aldrich 综合征患儿基因型与临床表现型的关系

赵 琴,蒋利萍,于 洁,肖剑文,赵晓东 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院肾脏免疫科)

【摘要】 **目的** 分析24例 Wiskott-Aldrich 综合征(Wiskott-Aldrich syndrome, WAS)患儿基因型与临床表现型关系。**方法** 收集24例 WAS 患儿临床资料,进行临床表现型评分。流式细胞术检测患儿外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)、WAS 蛋白(Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP)的表达。对 WASP 基因进行直接测序,并分析基因型与表现型的关系。**结果** 24例患儿系男性,2例临床表现型评分为2分,为 X 连锁血小板减少症(X-linked thrombocytopenia, XLT);其余患儿评分均≥3分,为典型 WAS。除1例 WASP 正常表达,2例 WASP 表达减少外,其余患儿 WASP 均为阴性。发现 WASP 基因突变包括7例错义突变、4例无义突变、6例缺失突变及7例拼接位点突变。共发现基因突变21种、新发突变3种,即 180 C>T(A49V)、342-343del CA(S103fsX121)、IVS7+2 T>C。发现已报道的热点突变6种,包括 291 G>A(R86H)、291G>T(R86L)、1035del G(G334fsX444)、665 C>T(R211X)、IVS6+5 G>A、IVS8+1 G>A。错义突变患儿2例为 XLT,其余均为典型 WAS。无义突变、缺失突变及拼接位点突变的患儿均为评分3~5分的典型 WAS,部分患儿表现型严重。**结论** WASP 下游区域的基因突变、无义、缺失、拼接位点突变类型则更可能导致 WASP 表达缺失、不稳定或截短型 WASP,临床表型多为典型 WAS。环境因素可导致患儿表现型加重。

【关键词】 Wiskott-Aldrich 综合征;WASP 表达;基因型;临床表现型

【中图法分类号】 R725.5;R725.96 【文献标志码】 A

Genotype and phenotype correlation of Wiskott-Aldrich syndrome: a report based on 24 Chinese patients

Zhao Qin, Jiang Liping, Yu Jie, Xiao Jianwen, Zhao Xiaodong (Department of Immunology and Nephrology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study genotype-phenotype correlation preliminarily in 24 Chinese Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) patients. **Methods** Clinical data of 24 Chinese male WAS patients from 21 unrelated families were collected, then patients' phenotypes were scored according to international scoring standards. Flow cytometry was used to analyze WAS protein (WASP) expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). WASP gene was directly sequenced, then the genotype-phenotype correlation was analyzed. **Results** Among the 24 patients, 2 of them were X-linked thrombocytopenia (XLT) with scores 2, and the others were classic WAS with scores 3 to 5. WASP of 1 patient was of normal expression, that of 2 was of reduced expression, and that of the others was of negative expression. We had found 7 missenses, 4 nonsenses, 6 deletions, and 7 splice site mutations. Among 21 detected unique mutations, there were 3 novel mutations, that is, 180 C>T (A49V), 342-343del CA (S103fsX121) and IVS7+2 T>C. There were 6 hot spot mutations were reported which were 291 G>A(R86H), 291G>T(R86L), 1035del G(G334fsX444), 665 C>T(R211X), IVS6+5 G>A and IVS8+1 G>A. Two of all missense mutation patients were XLT, the others were classic WAS. All nonsense, deletion and splice site mutations patients were classic WAS, some of whose phenotype were severe. **Conclusion** Mutations in downstream of WASP gene, nonsense, deletion and splice site mutations probably lead to negative expression of WASP, unstable or trancated WASP production,

【基金项目】 重庆市杰出青年科学基金(CSCT2008BA5040)

【通信作者】 赵晓东,电话:(023)63632554,E-mail:zhaoxd530@yahoo.com.cn

with typical clinical manifestations of WAS. What 's more, environmental affections might worsen patients phenotypes.

[Key words] Wiskott-Aldrich syndrome; Wiskott-Aldrich syndrome protein expression; genotype; phenotype

Supported by the Science Foundation of Chongqing Outstanding Young Scholars (CSCT2008BA5040). Corresponding author: Zhao Xiaodong, Tel: 86-23-63632554, E-mail: zhaoxd530@yahoo.com.cn

Wiskott-Aldrich 综合征(Wiskott-Aldrich syndrome, WAS)即湿疹、血小板减少、免疫缺陷综合征,为X连锁隐性遗传,是以湿疹、血小板减少伴小血小板、反复感染、易患淋巴系统恶性肿瘤和自身免疫性疾病为特征的原发性免疫缺陷病(primary immunodeficiency diseases, PIDs)。该病致病基因编码的蛋白质为WAS蛋白(Wiskott-Aldrich protein, WASP),是由502个氨基酸构成的富含脯氨酸的蛋白质。WASP表达于所有非红系造血细胞,作用于细胞膜表面肌动蛋白细胞骨架形成的信号转导,并有助于细胞伪足小体的形成,对细胞的移动起重要作用。WASP基因位于X染色体短臂的Xp11.23-p11.22区域,含12个外显子。WASP基因突变将影响血小板生成、聚集及淋巴细胞迁移、接受抗原刺激、信号转导及活化等功能[1]。不同于典型WAS,X连锁的血小板减少症(X-linked thrombocytopenia, XLT)为WAS的一种轻型表现型。XLT仅以血小板减少伴小血小板为临床特征,患儿可能出现轻度湿疹,并可能具有正常的免疫功能。XLT及WAS均系WASP基因突变导致[2-3]。近年来,Wiskott-Aldrich综合征患儿基因型及临床表现型的关系已成为讨论热点。本研究将报告24例Wiskott-Aldrich综合征患儿的WASP表达情况、基因突变类型,并初步探讨其与临床表现型的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2009年3月至2010年12月重庆医科大学附属儿童医院门诊及住院疑诊WAS患儿的临床资料,进行临床表现型分析。共发现24例WAS患儿,均为男性,平均2.9岁,来源于22个无亲缘关系的中国家系。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[3-4]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。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA制备及cDNA的合成 采用QIAamp® DNA Mini Kit(美国,QIAGEN公司)提取患儿及家属外周血基因组DNA。采用Total RNA Purification Kit(Genemega公司)提取患儿及家属外周血总RNA。以1 μg RNA为模板,采用PrimeScript™RT reagent kit(TaKaRa公司)进行RT-PCR反转录合成cDNA。

1.2.2 外周血单个核细胞(PBMC)分离及流式细胞术 收集患儿及其家属外周血,肝素抗凝,相同条件下Ficoll-Hypaque密度梯度离心分离得到PBMC。PBS液洗涤2次后,分别加入Cytofix/Cytoperm液(美国,BD. Pharmingen公司)0.5ml室温固定细胞20 min。Perm/Wash液(美国,BD. Pharmingen公司)洗涤2次,加入0.25 mg/ml抗人WASP(美国,BD. Pharmingen公司)单克隆抗体室温放置30 min,用Perm/Wash液洗涤后加入1:5稀释的FITC标记的羊抗鼠IgG2a(美国,Southern Biotech公司)室温反应30 min。利用流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickinson)分析患儿及其家属PBMC的WASP表达。

1.2.3 PCR反应扩增 根据文献[3]设计2对WASP cDNA扩增引物,并设计10对扩增WASP 12个外显子编码区及侧翼拼接点序列的引物[3,5-8]。PCR反应体系25 μl, 2×*Taq* PCR MasterMix(Tiangen公司)12.5 μl, 正向及反向引物各1 μl, gDNA 2 μl。PCR扩增反应条件为:94 ℃预变性5 min,94 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,循环35次后72 ℃终延伸10 min。

1.2.4 序列分析 PCR产物经琼脂糖凝胶电泳确定目的片段,采用Axygen琼脂糖胶回收试剂盒纯化。所得产物采用ABI-PRISM3730进行直接测序。

2 结果

2.1 临床表现及评分

24例患儿中23例起病时间在生后5个月以内,其中18例于新生儿期即发病,4例起病于生后1个月,1例起病于生后3个月。1例XLT患儿于1岁4个月起病。以发现皮肤出血点或淤斑淤点为初始症状的患儿10例;9例以血便为初始症状,其中6例伴有腹泻;5例初始症状为湿疹。病程中,所有患儿反复发生不同程度的血小板减少,激素治疗效果差;18例曾患反复感染;19例反复发生湿疹。15例有阳性家族史。24例患儿中,评分2分者2例,为XLT;评分3分者11例,评分4分者10例,1例因严重出血死亡而评分为5分。4岁以上患儿7例,6例评分为4分。

表1 24例WAS患儿WASP基因突变情况

序号	年龄(岁)	评分	外显子/内含子	突变类型	gDNA突变	cDNA突变	预测蛋白改变	WASP表达	携带者
1	0.2	3	1	无义突变	71 C>T	71 C>T	R13X	阴性	母
2	0.3	3	1	无义突变	134C>T	134C>T	R34X	阴性	母
3	2.6	4	1	缺失突变	141-142del TT	—	F36X	阴性	母
4	10.5	4	1	无义突变	155 C>T	155 C>T	R41X	减少	母
5	0.3	5	2	错义突变	180 C>T	—	A49V	阴性	无
6	4.2	4	2	错义突变	252 C>A	252 C>A	C73Y	阴性	母/姐
7	10.6	4	2	错义突变	291 G>A	291 G>A	R86H	阴性	母
8	8.0	4	2	错义突变	291 G>A	291 G>A	R86H	阴性	母
9	0.2	3	2	错义突变	291G>T	291G>T	R86L	阴性	母
10	0.9	4	3	缺失突变	342-343del CA	—	S103fsX121	阴性	母
11	3.1	2	3	错义突变	354A>G	354A>G	Y107C	阴性	母
12	0.4	3	7	无义突变	665 C>T	665 C>T	R211X	阴性	母
13	4.9	3	7	缺失突变	619-620del GG	—	G196fsX205	阴性	无
14	0.7	3	7	缺失突变	619-620del GG	—	G196fsX205	阴性	无
15	4.3	4	8	缺失突变	797 del C	—	Q55fsX60	阴性	无
16	1.8	4	10	缺失突变	1035del G	—	G334fsX444	阴性	母
17	2.5	2	11	错义突变	1412 C>T	—	P460S	阳性	母
18	2.9	3	内含子1	拼接位点突变	IVS1+1 G>A	—	—	阴性	母
19	1.0	4	内含子3	拼接位点突变	IVS3+1 G>A	—	—	—	—
20	0.3	3	内含子6	拼接位点突变	IVS6+5 G>A	—	—	阴性	母
21	4.9	4	内含子7	拼接位点突变	IVS7-1 G>A	—	80% exone8 del 20%正常	减少	母/妹
22[a]	0.1	3	内含子7	拼接位点突变	IVS7+2 T>C	—	—	阴性	母
23	0.5	3	内含子7	拼接位点突变	IVS7+2 T>C	—	—	阴性	无
24	3.2	3	内含子8	拼接位点突变	IVS8+1 G>A	—	—	—	—

a:患儿初诊时WASP表达缺失,半年后WASP部分表达

2.2 WASP的表达

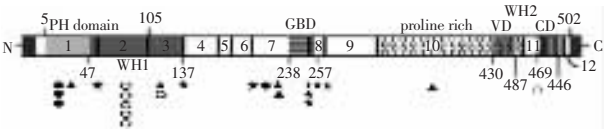
患儿若PBMCs中无或仅极少量WASP表达,即认为WASP为阴性。除1例WASP正常表达、1例WASP部分表达、1例WASP表达减少外,其余患儿WASP均为阴性(表1)。患儿22初诊时WASP表达缺失,半年后复查WASP变为部分表达;患儿21于第7内含子发生可变剪接位点突变,WASP表达减少。发生无义突变的患儿4 WASP部分表达。

2.3 基因突变分析

从mRNA、gDNA水平对24例患儿的WASP基因突变进行分析,共发现基因突变21种。突变类型包括:错义突变、缺失突变、无义突变、拼接位点突变(表1)。7例患儿发生错义突变,分别位于第2、3、11外显子。6例发生缺失突变,分别位于第1、3、7、8、10外显子。4例发生无义突变,突变位点分别位于第1、7外显子。7例患儿发生拼接位点突变,分别位于第1、3、6、7、8内含子,其中3例位于第7内含子。共发现新发突变3种,即180 C>T(A49V)、342-343del CA(S103fsX121)、IVS7+2 T>C。发现已报道的热点突变6种,包括291 G>A(R86H)、291G>T(R86L)、1035del G(G334fsX444)、665 C>T(R211X)、IVS6+5 G>A、IVS8+1 G>A。外显子1、2、3、7、8、10、11,内含子1、3、6、7、8均发现基因突变。在17例患儿家系中发现携带者。见表1。

2.4 基因突变与WASP主要功能区关系

24例患儿基因突变与WASP主要功能区的关系,如图1所示,错义突变的7例患儿中,6例位于WH1功能区。缺失突变分别位于PH、WH1、GBD、VD区。拼接位点突变分别位于PH、WH1、GBD区。



○:错义突变;●:无义突变;▲:缺失突变;★:拼接位点突变;1个符号代表1例患儿。PH:Pleckstrin同源区;WH1:WAS同源1区;GBD:GTP酶结合区;VD:verprolin同源区;CD:丝切蛋白同源区

图1 24例WAS患儿基因突变与WASP主要功能区的关系

3 讨论

从Wiskott-Aldrich综合征患儿基因组DNA及cDNA水平分析其WASP基因突变以及基因突变对WASP表达的影响,结合患儿临床表现,我们初步分析了WAS患儿基因型及表现型可能存在的关系。由于既往研究发现WASP基因突变可位于WASP基因的任何位置,因而我们对来自21个无亲缘关系中国家系的24例患儿进行了全基因序列分析,结果发现21种基因突变、3种新发突变、6种热点突变,其中8例已报道[9]。突变类型包括错义突变、缺失突变、无义突变

及位于内含子、外显子交界区域的拼接位点突变。

6 种热点突变,2 种为第 86 号精氨酸分别由组氨酸及亮氨酸替代。另一热点突变 G334fsX444 发生于外显子 10,该区为脯氨酸富集区,较常发生的突变类型为缺失突变或插入突变,本研究发现的缺失突变 1035del G,导致截短型 WASP 生成,使得 VCA 区功能丧失,由此严重影响 WASP 的功能,故该突变患儿为典型的 WAS。文献[10]报道称因移码突变导致 WASP 氨基酸于 444 位提前终止的患儿易患自身免疫性疾病或恶性肿瘤,因此上述患儿应注意密切随访。

本研究发现的错义突变主要分布于 WASP 5′端,除 2 例(354A > G、1412 C > T)为 XLT 外,其余均为典型 WAS。Zhu 等[11]认为 WASP 5′端涉及 PH 区,外显子 1 ~ 3 位于该区。发生于该区的错义突变仅部分抑制 WASP 的功能,并可能通过抑制血小板从骨髓巨核细胞释放而影响血小板的数量及体积,因此错义突变发生于该区的患儿多为 XLT。但本研究中,错义突变位于上述区域的患儿仅 1 例为 XLT,其余均为典型 WAS,这些患儿临床表现型似重于国外学者描述,具体原因尚不清楚。

本研究中无义突变、缺失突变分布具有随机性,患儿均为典型 WAS。拼接位点突变多分布于 WASP 下半段,与已有报道的拼接位点突变多分布于第 6 ~ 11 内含子相似[12-13]。拼接位点突变常可生成多种拼接产物,且可有小部分正常 WASP 产生,如患儿 21、22。由于观察随访时间尚有限,拼接正确率影响因素及其对临床表现的影响还有待进一步研究。

无义突变、缺失突变、拼接位点突变均可导致 WASP 表达缺失,或生成截断型或不稳定的 WASP,或生成多种拼接产物,由此导致患儿临床表现型多为典型 WAS。而环境因素对患儿表现型的影响作用可能不容小觑,如感染常见或部分少见病原体、未能在生后早期诊断并及时开始治疗等。实际上,我们发现环境因素确有使本病表现型随年龄加重的趋势。而 2 岁以内患儿的表现型评分常低于该位点基因突变类型评分的预测,因此 2 岁以内的 XLT 患儿的评分可能并不确切。

WAS 患儿起病均在 1 岁以内,且多起病于新生儿期,XLT 患儿起病可较晚。WAS 患儿起始症状多以发现皮肤出血点或血便为主,血便多发生于腹泻时。患儿在病程中均有不同程度的血小板减少,且激素治疗效果差。多数患儿有明确的阳性家族史。因此,对于生后 1 年内(特别是新生儿期)即反复出现血小板减少且激素治疗效果差,同时有湿疹及反复感染证据的男性患儿应高度警惕本病。

我们现已实现 WAS 患儿 WASP 快速诊断、基因诊断、携带者筛查及产前诊断。而今 WAS 基因型及临床表现型的关系尚需进一步研究,我们还将收集更多病例以弄清两者的关系。部分轻型病例表现不典型,临床医师应加深对该病的认识,使更多的患儿得到及时的诊断及治疗。

参考文献:

[1] Blundell M P, Worth A, Bouma G, *et al*. The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function[J]. Dis Markers, 2010, 29(3/4): 157 - 175.

[2] Villa A, Notarangelo L, Macchi P, *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.

[3] Zhu Q, Zhang M, Blaese R M, *et al*. The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene[J]. Blood, 1995, 86(10): 3797 - 3804.

[4] Ochs H D, Thrasher A J. The Wiskott-Aldrich syndrome[J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(4): 725 - 738.

[5] Jones L N, Lutskiy M I, Cooley J, *et al*. A novel protocol to identify mutations in patients with wiskott-Aldrich syndrome[J]. Blood Cells Mol Dis, 2002, 28(3): 392 - 398.

[6] Derry J M, Kerns J A, Weinberg K I, *et al*. WASP gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia[J]. Hum Mol Genet, 1995, 4(7): 1127 - 1135.

[7] Kwan S P, Hagemann T L, Radtke B E, *et al*. Identification of mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome gene and characterization of a polymorphic dinucleotide repeat at DXS6940, adjacent to the disease gene[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(10): 4706 - 4710.

[8] Chan K W, Lee T L, Chung B H, *et al*. Identification of five novel WASP mutations in Chinese families with Wiskott-Aldrich syndrome[J]. Hum Mutat, 2002, 20(2): 151 - 152.

[9] Zhang Z Y, Xiao H Q, Jiang L P, *et al*. Analysis of clinical and molecular characteristics of Wiskott-Aldrich syndrome in 24 patients from 23 unrelated Chinese families[J]. Pediatr Allergy Immunol, 2010, 21(3): 522 - 532.

[10] Jin Y, Mazza C, Christie J R, *et al*. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation[J]. Blood, 2004, 104(13): 4010 - 4019.

[11] Zhu Q, Watanabe C, Liu T, *et al*. Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia: WASP gene mutations, protein expression, and phenotype[J]. Blood, 1997, 90(7): 2680 - 2689.

[12] Lemahieu V, Gastier J M, Francke U. Novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene and their effects on transcriptional, translational, and clinical phenotypes[J]. Hum Mutat, 1999, 14(1): 54 - 66.

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

(收稿 2010-12-13 修回 2011-01-12)

(编辑 王小宴)