



UNC13D基因剪接突变所致家族性嗜血细胞综合征1例报告

颜宏利, 王瑶, 刘明华

引用本文:

颜宏利, 王瑶, 刘明华. UNC13D基因剪接突变所致家族性嗜血细胞综合征1例报告[J]. 中国临床医学, 2020, 27(6): 1057–1061.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200237>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

全球冠状病毒研究态势分析及其启示

Analysis of the global coronavirus related research status and its enlightenment for the present and future
中国临床医学. 2020, 27(1): 1–12 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200199>

唐氏综合征合并先天性心脏病相关基因的研究进展

Research progresses on genes related to Down's syndrome complicated with congenital heart disease
中国临床医学. 2018, 25(3): 487–491 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20170830>

以慢性肾功能衰竭为突出表现的新发致病突变非典型Bardet-Biedl综合征1例报告

A novel pathogenic mutation of BBS5 in atypical Bardet-Biedl syndrome patient with prominent clinical manifestation of chronic renal failure: case report

中国临床医学. 2018, 25(4): 676–678 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20170866>

系统性间变大细胞淋巴瘤临床特征及预后分析

Clinical features and prognosis of patients with systemic anaplastic large cell lymphoma

中国临床医学. 2019, 26(4): 586–589 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190004>

银屑病合并骨髓增生异常综合征1例报告

Psoriasis combined with myelodysplastic syndrome: case report

中国临床医学. 2020, 27(4): 725–727 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20191243>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200237

UNC13D 基因剪接突变所致家族性嗜血细胞综合征 1 例报告

颜宏利*, 王 瑶, 刘明华

海军军医大学第一附属医院生殖医学中心, 上海 200433

[关键词] 家族性嗜血细胞综合征; UNC13D; 剪接突变

[中图分类号] R 552 [文献标志码] B

Familial hemophagocytic syndrome induced by splicing mutation of UNC13D: a case report

YAN Hong-li*, WANG Yao, LIU Ming-hua

Center for Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China

[Key Words] familial hemophagocytic syndrome; UNC13D; splicing mutation

嗜血细胞综合征, 又称嗜血细胞性淋巴组织细胞增多症 (hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH), 是一种由免疫紊乱所致的严重威胁生命的血液系统疾病, 其特征为发热、肝脾肿大、高三酰甘油血症、凝血障碍和中枢神经系统症状。HLH 分为原发性和继发性 2 种类型, 原发性 HLH 包括家族性 HLH (FHL) 和遗传性免疫缺陷相关 HLH, 继发性 HLH 常与感染、恶性肿瘤、风湿免疫性疾病相关^[1-2]。

FHL 是一种罕见的常染色体隐性遗传疾病, 由基因穿孔素基因 (PRF1, 导致 FHL2)^[3]、UNC13 同系物 D 基因 (UNC13D, 导致 FHL3)^[4]、突触融合蛋白 11 基因 (STX11, 导致 FHL4)^[5] 及突触融合蛋白结合蛋白 2 基因 (STXBP2, 导致 FHL5)^[6-7] 突变引起, 多在婴幼儿期发病。由于 FHL 病情凶险、进展迅速, 且药物治疗易复发, 异基因造血干细胞移植是其治愈的唯一方法, 所以对症及时、有效治疗十分重要。然而, 婴幼儿在许多疾病中表现为非特异性体征, 明确诊断存在一定困难。本文就 1 例 FHL 患儿发病及诊断情况报告如下, 并回顾相关文献, 以供同行参考。

1 病例资料

1.1 一般情况 患儿, 女, 2 月龄, 因“发热伴面色

苍白 4 d”于 2015 年 11 月 16 日收治入院。体格检查: 发热, 体温最高达 39.7℃, 面色稍苍白, 颜面皮肤可见出血点; 口腔散在白色凝乳状物; 肝脾肋下约 4 cm。患儿哥哥于 2013 年 5 月因嗜血细胞综合征去世。

1.2 实验室检查

1.2.1 常规检查 血常规: 白细胞 $4.3 \times 10^9/L$, 中性粒细胞绝对值 $0.47 \times 10^9/L$, 血红蛋白 61 g/L, 血小板 $22 \times 10^9/L$ 。肝功能: 丙氨酸转氨酶 (ALT) 265 U/L, 天冬氨酸转氨酶 (AST) 206 U/L, 总胆红素 (TB) 38.6 $\mu\text{mol/L}$, 直接胆红素 (DB) 29.8 $\mu\text{mol/L}$ 。三酰甘油 (TG) 2.43 mmol/L。血浆纤维蛋白原测定: 纤维蛋白原 (FIB) 2.36 g/L; 血清铁蛋白 $>1\ 650\ \mu\text{g/L}$ 。

1.2.2 骨髓细胞学检查 骨髓增生极度活跃, 未见嗜血细胞。

1.3 基因分析 经患儿家属同意, 留取患儿及其父母静脉血标本行免疫缺陷病基因检查, 采用高通量测序技术分析其致病基因, Sanger 测序方法对所发现的突变及父母源性进行验证。

患儿溶酶体转运调控基因 (LYST) 4 号外显子检出杂合突变: c. 281C>T (p. Thr94Ile), 经家系验证分析, 发现该变异来自患儿父亲。UNC13D 基因检出 2 个杂合突变: (1) 15 号外显子剪接突变 (c. 1299-1G>A), 该位点可能影响蛋白质编码, 但

[收稿日期] 2020-02-09

[接受日期] 2020-10-12

[基金项目] 科技部“生殖健康及重大出生缺陷防控研究”重点专项 (SQ2018YFC100248, SQ2018YFC100231), 军事医学创新工程 (18JS003)。Supported by Key Special Project of ‘Reproductive Health and Prevention and Control of Major Birth Defects’ of Ministry of Science and Technology of China (SQ2018YFC100248, SQ2018YFC 100231), Military Medical Innovation Project (18JS003)。

[作者简介] 颜宏利, 博士, 教授, 主任技师, 博士生导师。

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162048, E-mail: hongliyan@smmu.edu.cn

目前尚无相关文献确切报道;(2)28 号内含子剪接突变(c. 2709+1G>A),该突变可导致 UNC13D 的剪接错配^[8]。经家系验证分析,(1)、(2)变异分别来自患儿父亲、母亲(图 1A~1D)。

进一步对患儿及其父母与正常人 UNC13D 基

因表达量进行相对定量分析。引物序列如下:上游引物为 5'-TCT ACG AGG ACG CAC TCT ACA-3';下游引物为 5'-CCT TGG CCT GTT TCA CTG TTG-3'。结果(图 1E)发现,与正常对照相比,患儿及其父母 UNC13D 基因相对表达量显著降低。

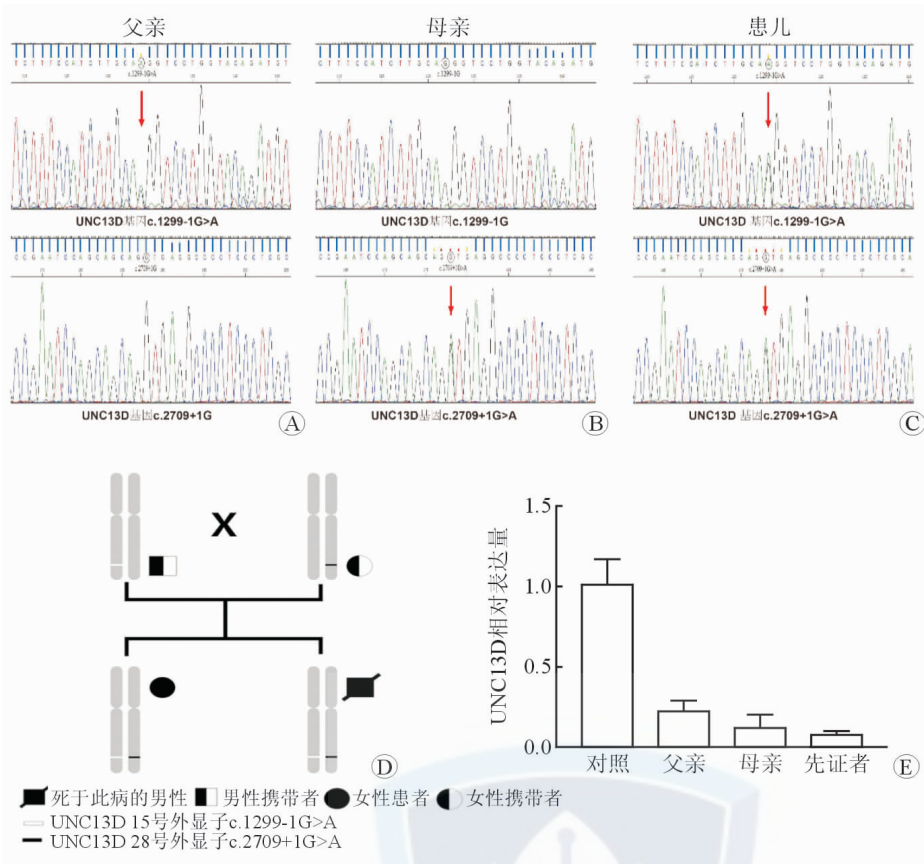


图 1 UNC13D 基因突变家系及基因相对表达量分析

A: 患儿父亲 UNC13D 基因 15 号外显子剪接位点杂合突变(c. 1299-1G>A);B: 患儿母亲 UNC13D 基因 28 号内含子剪接位点杂合突变(c. 2709+1G>A);C: 患儿 UNC13D 基因 15 号外显子剪接位点杂合突变(c. 1299-1G>A),28 号内含子剪接位点杂合突变(c. 2709+1G>A),红色箭头标注为突变位点;D: 患儿遗传家系图谱;E: 患儿及其父母 UNC13D 基因相对表达量

1.4 流式细胞术分析 抽取患儿外周血标本送至北京爱普达检验中心,采用流式细胞术检测自然杀伤细胞(NK 细胞)对转染荧光靶细胞的杀伤活性,采用 CD107a 激发实验检测 NK 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL 细胞)脱颗粒功能。结果(图 2)显示,患儿 NK 细胞活性为 13.93%,较参考值(正常参考范围 $\geq 15.11\%$)降低,说明 NK 细胞和 CTL 细胞脱颗粒功能可能存在异常。

1.5 诊疗经过及预后 患儿入院后予抗感染、补充血小板、输注红细胞、丙种球蛋白支持治疗;根据患儿及其父母基因学检查,结合实验室常规检查结果,对照 HLH 诊断标准(HLH-2004)^[9],患儿 FHL 诊断明确,根据 HLH-2004 方案^[9]进行化疗。患儿

于 2 岁半时去世。

2 讨论

FHL 是常染色体隐性遗传病,包括 FHL1-FHL5 5 个亚型,除 FHL1 的基因突变未知外,FHL2-FHL5 亚型分别与 PRF1、UNC13D、STX11、STXBP2 相关^[3-7]。LYST、RAS 原癌基因家族成员 RAB27A(RAB27A)基因、接头相关蛋白复合物 3 亚基 $\beta 1$ (AP3B1) 基因、含 SH2 结构域蛋白 1A (SH2D1A) 基因及 X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)基因突变与遗传性免疫缺陷相关性 HLH 有关^[10-13]。

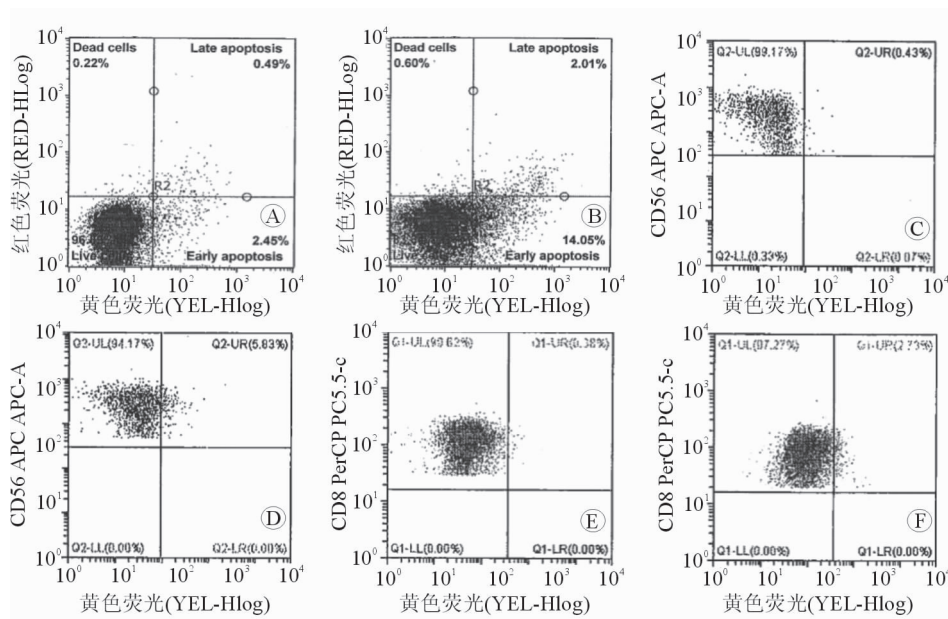


图2 本病例外周血的流式细胞术分析

A: NK 细胞活性流式检测中单纯靶细胞自然凋亡背景;B: NK 细胞活性流式检测中患儿 NK 细胞对靶细胞的杀伤比例;C~F: CD107a 激发实验结果,其中 C、E 为患儿 NK 和 CTL 细胞在静息状态下细胞膜上 CD107a 分子的表达,D、F 为经刺激后 CD107a 分子分别在 NK 和 CTL 细胞膜上表达

现将原发性 HLH 分类及突变基因总结如表 1,其中,根据 ClinVar 数据库,目前已经证实的与 FHL 相关的 UNC13D 突变有 300 多种。研究^[14]表明,虽然 FHL 亚型的基因突变各不相同,但都会导致 NK 细胞和 T 细胞的细胞毒性功能受损。在颗粒介导的细胞毒性途径中相互关联,干扰穿孔素介导的细胞毒性功能,从而阻断触发凋亡或激活诱导凋亡机制,细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞不能有效杀死靶细胞,免疫反应过度激活、持续高炎性状态,引

起 HLH 症状。主要临床表现:与机体免疫反应过度激活相关的发热、贫血、出血、肝脾肿大、中枢神经系统症状等。由于这些症状并非特异性表现,临床医生不一定能在第一时间诊断出 HLH。同时,许多患者的相关临床表现往往不会同时出现,并不能严格达到 HLH-2004 诊断标准^[9] 8 项中的 5 项。因此,对于疑似患者,推荐及早进行基因诊断和 NK 细胞、CTL 细胞功能检测。

表 1 原发性 HLH 基因分类及致病途径

名称	突变基因	位置	编码蛋白	致病途径
FHL1	不明	9q21.3-22	不明	不明
FHL2	PRF1	10q22.1	穿孔素蛋白	穿孔素蛋白溶细胞效应缺失
FHL3	UNC13D	17q25.1	Munc13-4	淋巴细胞脱颗粒缺陷
FHL4	STX11	6q24.2	Syntaxin11	影响囊泡结合及胞膜融合
FHL5	STXBP2	19p13.2	STXBP2	影响囊泡结合及胞膜融合
Chediak-Higashi 综合征(CHS)	LYST	1q42.3	LYST	影响囊泡运输
X 连锁淋巴组织增生综合征 1(XLP1)	SH2D1A	Xq25	SAP	多方面影响,包括影响 CTL 及 NK 细胞的细胞毒性
X 连锁淋巴增生综合征 2(XLP2)	XIAP	Xq25	XIAP	影响细胞凋亡抑制及多条信号转导通路调控
Griscelli 2(GS2)	RAB27A	15q21.3	RAB27A	可能影响免疫细胞释放胞内毒性颗粒
Hermansky-Pudlak 2	AP3B1	5q14.1	AP3B1	可能影响溶酶体、黑色素体、血小板致密颗粒等形成

本例患儿为 2 个月大的女婴,高热 4 d 入院治疗。查体发现脾大,外周血三系减少,AST、ALT、

TB、DB 水平升高,血清铁蛋白增加。骨髓检查排除恶性肿瘤。虽然这些临床表现与 HLH 诊断标准

(HLH-2004)^[9]相符,但非特异,结合患儿哥哥因 HLH 去世的情况,因此高度怀疑此其为 FHL。

对患儿及其父母进行基因检测,发现 2 个与 HLH 相关的基因存在突变,即 LYST 基因和 UNC13D 基因。(1)患儿与其父 LYST 基因 4 号外显子区域存在 c. 281C>T,导致编码的第 94 位苏氨酸被异亮氨酸代替,为杂合突变,而其母 LYST 基因 4 号外显子区域正常无突变,从而,该突变来源于患儿父亲;(2)患儿 UNC13D 基因 15 号外显子剪接位点存在 c. 1299-1G>A(杂合突变),且 UNC13D 基因 28 号内含子区域剪接位点存在 c. 2709+1G>A(杂合突变),前者可于其父基因内检测到,后者可于其母基因内检测到,表明患儿 UNC13D 基因所测得的 2 个剪接位点突变分别来自其父亲和母亲。

FHL 是常染色体隐性遗传病,这意味着一般双等位基因均发生突变才可致病。本例患儿 LYST 基因虽存在突变,但 2 个等位基因中仅存在 1 个等位基因突变,为杂合突变,且患儿父亲也存在该杂合突变且未发病,考虑由 LYST 基因引发疾病的可能性不大。而患儿 UNC13D 基因存在分别位于 2 个等位基因上的剪接位点杂合突变,所以推测 UNC13D 为致病基因,将该患儿归为 FHL3。进一步,根据患儿及其父母 UNC13D 基因相对定量检测结果进行推测,这是由无义介导的 mRNA 降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)机制介导的机体识别和降解含有提前终止密码子的转录产物导致的基因表达量降低,导致蛋白发生变化而致病。本文报告突变与近年报道^[15]的 1 例 18 岁女性 FHL 患者 UNC13D 基因突变位点相同,均为 2 个剪接位点突变,c. 1299-1G>A 及 c. 2709+1G>A,父母也分别是 c. 1299-1G>A 和 c. 2709+1G>A 的携带者,但是两者发病年龄差异较大。NK 细胞活性减低或缺失是 HLH-2004^[9]的 8 项诊断标准之一,对临床筛查有重要价值。CD107a 是一种高糖基化蛋白,约占溶酶体膜蛋白的 50%,当细胞毒性颗粒与细胞质膜融合时瞬时在细胞膜上表达^[16]。CD107a 激发实验对于细胞脱颗粒相关基因(UNC13D、STX11、STXBP2、RAB27A、LYST 及 AP3B1)突变的诊断准确度良好,可用于区分是否由遗传因素导致的脱颗粒缺陷,为临床意义不明的基因突变的解释提供帮助。本例患儿 NK 细胞活性检测及 CD107a 激发实验结果显示,其 NK 细胞活性降低、NK 细胞和 CTL 细胞脱颗粒功能可能存在

异常,这与基因检测结果相互印证。同时,由于 CD107a 激发实验与基因测序相比,报告结果更为迅速,且与穿孔素蛋白联合检测和 NK 细胞毒性检测实验相比有更好的灵敏度和特异度,推荐作为原发性 HLH 的筛查实验^[17]。

综上所述,本研究报告了 1 例由 UNC13D 复杂等位基因突变导致的 FHL,为临床诊断提供参照。近年来,随着基因测序技术的发展,研究^[18-20]发现并报道了许多 HLH 相关的新的基因突变,这对于新突变的解释及致病机制等的研究有重要的临床意义,同时也为疾病的精准治疗和异基因造血干细胞移植选择提供了可能。未来希望能够通过新的技术手段更好地了解 HLH 相关的新的基因突变和病理生理机制,进而快速诊断、精准治疗、降低疾病死亡率、提高患者生存质量。

参考文献

- [1] GUPTA S, WEITZMAN S. Primary and secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis: clinical features, pathogenesis and therapy[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2010, 6(1): 137-154.
- [2] 王桂芝,左晓燕. 儿童感染相关性噬血细胞综合征 22 例分析[J]. 中华全科医学, 2010, 8(1): 19-21.
- [3] STEPP S E, DUFOURCQ-LAGELOUSE R, LE DEIST F, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. Science, 1999, 286 (5446): 1957-1959.
- [4] FELDMANN J, CALLEBAUT I, RAPOSO G, et al. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3) [J]. Cell, 2003, 115 (4): 461-473.
- [5] ZUR STADT U, SCHMIDT S, KASPER B, et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11[J]. Hum Mol Genet, 2005, 14(6): 827-834.
- [6] CÔTE M, MÉNAGER M M, BURGESS A, et al. Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells[J]. J Clin Invest, 2009, 119(12): 3765-3773.
- [7] ZUR STADT U, ROHR J, SEIFERT W, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc18-2 and impaired binding to Syntaxin 11[J]. Am J Hum Genet, 2009, 85(4): 482-492.
- [8] ZHIZHUO H, JUNMEI X, YUELIN S, et al. Screening the PRF1, UNC13D, STX11, SH2D1A, XIAP, and ITK gene mutations in Chinese children with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Pediatr

- Blood Cancer, 2012, 58(3): 410-414.
- [9] HENTER J I, HORNE A, ARICÓ M, et al. HLH-2004: diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2007, 48(2): 124-131.
- [10] BARBOSA M D, NGUYEN Q A, TCHERNEV V T, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes[J]. *Nature*, 1996, 382(6588): 262-265.
- [11] MÉNASCHÉ G, PASTURAL E, FELDMANN J, et al. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(2): 173-176.
- [12] SCHWARTZBERG P L, MUELLER K L, QI H, et al. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(1): 39-46.
- [13] RIGAUD S, FONDANÈCHE M C, LAMBERT N, et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome [J]. *Nature*, 2006, 444(7115): 110-114.
- [14] USMANI G N, WODA B A, NEWBURGER P E. Advances in understanding the pathogenesis of HLH [J]. *Br J Haematol*, 2013, 161(5): 609-622.
- [15] LIU D, HU X, JIANG X, et al. Characterization of a novel splicing mutation in UNC13D gene through amplicon sequencing: a case report on HLH[J]. *BMC Med Genet*, 2017, 18(1): 135.
- [16] BRYCESON Y T, PENDE D, MAUL-PAVICIC A, et al. A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes[J]. *Blood*, 2012, 119(12): 2754-2763.
- [17] RUBIN T S, ZHANG K, GIFFORD C, et al. Perforin and CD107a testing is superior to NK cell function testing for screening patients for genetic HLH[J]. *Blood*, 2017, 129(22): 2993-2999.
- [18] AKYOL S, OZCAN A, SEKINE T, et al. Different clinical presentation of 3 children with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with 2 novel mutations[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2020, 42(7): e627-e629.
- [19] HIEJIMA E, SHIBATA H, YASUMI T, et al. Characterization of a large UNC13D gene duplication in a patient with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3[J]. *Clin Immunol*, 2018, 191: 63-66.
- [20] HU X, LIU D, JIANG X, et al. Identification of a novel nonsense mutation in the UNC13D gene from a patient with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report[J]. *BMC Med Genet*, 2018, 19(1): 82.

[本文编辑] 王 迪, 贾泽军

