

Fechtner 综合征异常家系的临床与分子缺陷

杨 惊¹, 华宝来², 王书杰², 葛昌文², 范连凯², 韩晔华³, 赵永强²

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 ¹ 急诊科 ² 血液内科, 北京 100730

³ 中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所电镜室, 北京 100005

通信作者: 赵永强 电话: 010-65295020, E-mail: pumchzhaoyq@yahoo.com.cn

【摘要】目的 分析一先天性血小板减少症家系的临床、实验室特点, 并探讨其分子发病机制。**方法** 收集该家系成员的临床资料, 采集先证者及其家系成员的静脉血, 分别进行全自动及人工血小板计数; 显微镜下观察血小板形态; 流式细胞术分析血小板膜蛋白; 透射电镜观察中性粒细胞胞浆包涵体。聚合酶链反应扩增非肌性肌球蛋白重链 9 基因 (non-muscle myosin heavy chain 9 gene, MYH9) 的 40 个外显子, 分析 PCR 产物的核苷酸序列, 并直接测序确定突变位点。**结果** 镜下观察外周血涂片巨大血小板占 90% 以上, 血小板膜糖蛋白 (CD41、CD61、CD42a、CD42b) 均在正常范围内, 血小板功能正常; 中性粒细胞胞浆透射电镜可见无包膜分隔的包涵体, MYH9 基因 38 号外显子第 5521 位核苷酸存在 G→A 杂合突变 (GAG→AAG), 从而导致其编码的非肌性肌球蛋白重链 A (NMMHC2A) 第 1841 位谷氨酸变为赖氨酸, 正常对照及该家系正常者未见此突变。**结论** MYH9 基因点突变并伴有血小板减少及巨大血小板是 Fechtner 综合征的主要特征。

【关键词】 Fechtner 综合征; 血小板; 基因; 包涵体

【中图分类号】 R558; R394.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-9081(2010)02-0171-05

Fechtner Syndrome in a Chinese Family: A Case Report and Literature Review

YANG Jing¹, HUA Bao-lai², WANG Shu-jie², GE Chang-wen²,
FAN Lian-kai², HAN Ye-hua³, ZHAO Yong-qiang²

¹Department of Emergency, ²Department of Hematology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

³Electronic Microscope Room, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Corresponding author: ZHAO Yong-qiang Tel: 010-65295020, E-mail: pumchzhaoyq@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To analyze the clinical and laboratory abnormalities and genetic defect of inherited thrombocytopenia in a Chinese family. **Methods** We collected the clinical data and blood samples of a proband and his family members, examined the characteristic morphological features of platelets and leukocytes on blood smears with Wright's-Giemsa staining, observed the ultrastructure of platelet and leukocyte under electron microscope, and detected expression of platelet membrane protein by flow cytometry. Genomic DNA was isolated from the peripheral blood of the proband and 3 members of his family. All the exons and exon-intron boundaries of the MYH9 gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR), followed by direct sequencing. **Results** In the peripheral blood smears, 90% of platelet were large platelets, the expressions of platelet membrane glycoproteins (CD41, CD61, CD42a, CD42b) and platelet function were within the normal range. Electron microscope showed no capsule separating the inclusion bodies in neutrophil cytoplasmic. A heterozygous G to A mutation

was found in the proband and two members of his family at nucleotide 5521 in exon 38 of MYH9 gene, leading to the encoding of non-myosin heavy chain A (NMMHC2A) No. 1841 of glutamate into lysine. **Conclusion** MYH9 gene mutation and thrombocytopenia and giant platelets are the main features of Fechtner syndrome.

【Key words】Fechtner syndrome; platelet; gene; inclusion

Med J PUMCH, 2010, 1(2): 171-175

非肌性肌球蛋白重链 9 基因 (non-muscle myosin heavy chain 9 gene, MYH9) 相关血小板减少综合征是一种散在的、少见的常染色体显性遗传性出血性疾病, 以家族性血小板减少、血小板体积大和中性粒细胞胞浆包涵体 (Döhle 样小体) 为主要特征。1909 年国际上首次报道了家族性血小板减少的家系, 1960 年将此类家族性血小板减少、大血小板并有中性粒细胞胞浆包涵体表现的疾病命名为 May-Hegglin 异常 (May-Hegglin abnormality, MHA)^[1]。1985 年 Peterson 首次描述了类似 MHA 的另一个遗传性血小板减少家系, 以 Alport 综合征 (肾炎、白内障、耳聋) 和中性粒细胞胞浆包涵体为特征, 命名为 Fechtner 综合征 (Fechtner syndrome, FS)^[2]。1999 年将该类综合征定位为 22q 染色体短臂的异常, 统称为 MYH9 相关血小板减少综合征, 并以是否同时合并类 Alport 综合征表现而分为 May-Hegglin 异常 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM 155100)、Fechtner 综合征 (OMIM 153640)、Sebastian 综合征 (OMIM 605294) 和 Epstein 综合征 (OMIM 153650)。在临床上此类患者的血小板减少易误诊为免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP), 而血小板体积偏大易误诊为巨大血小板病 (Bernard-Soulier 综合征)。最近, 笔者发现 1 例先天性血小板减少家系, 对其进行临床资料、基因诊断等综合分析, 证实为 MYH9 相关的 Fechtner 综合征。

对象和方法

先证者及其家系资料

先证者, 男, 32 岁, 汉族。自幼经常出现皮肤瘀点, 20 岁时因闭角型青光眼而行小梁切除手术未发

现明显出血过多; 4 年前常规体检发现血小板减少 (具体不详), 但未针对血小板减少进行特殊治疗。本次门诊就诊, 多次血常规检查白细胞 $(3.4 \sim 3.9) \times 10^9/L$, 血小板计数 $(25 \sim 52) \times 10^9/L$ (全自动与显微镜下计数), 平均血小板体积 (MPV) 17.8 fl; 尿常规示蛋白 (-), 红细胞 15/ μl ; 肝肾功能正常; 抗核抗体 (antinuclear antibody, ANA)、抗双链 DNA 抗体 (anti-double strand DNA antibody, ds-DNA)、抗磷脂抗体 (antiphospholipid antibody, APL) 均阴性; 电测听结果正常; 眼科检查示先天性白内障, 骨髓检查示增生活跃, 全片巨核细胞 49 个, 颗粒型巨核细胞 47 个, 裸核型巨核细胞 2 个, 血小板较少见, 大血小板易见。血小板膜糖蛋白检查: CD41 阳性细胞 (GP II b) 84%, CD61 阳性细胞 (GP II a) 85%, CD42a 阳性细胞 (GP IX) 85%, CD42b 阳性细胞 (GP I b2a) 84%, 血涂片瑞特-姬姆萨染色发现巨大血小板占 90% 以上, 且中性粒细胞胞浆中见灰色包涵体呈梭形。Ivy 法出血时间为 5 min。患者血小板对二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP)、胶原、瑞斯托霉素 (1.2 及 0.6 mg/dl) 诱导的血小板聚集反应均为正常低限。

先证者父亲, 10 余年前因气胸就诊时发现白细胞、血小板计数下降, 未行特殊治疗。血常规检查白细胞 $3.15 \times 10^9/L$, 血小板计数 $33 \times 10^9/L$ (全自动与显微镜下计数); 尿常规示蛋白 (-), 尿红细胞 15/ μl ; 肝肾功能正常; 抗核抗体、抗双链 DNA 抗体、抗磷脂抗体均阴性; 电测听示感音神经性耳聋; 眼科检查未见异常; 血小板膜糖蛋白检查、血小板聚集试验、血涂片及电镜所见同先证者。先证者父母为非近亲婚配, 家系图见图 1。

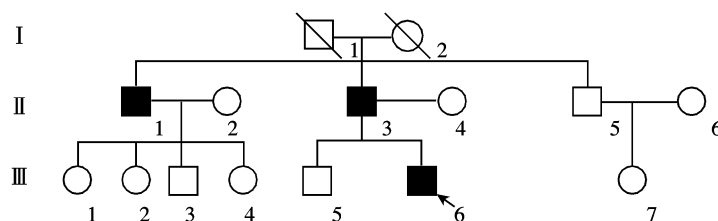


图 1 Fechtner 综合征家系图谱

(圆形、方形分别代表女性、男性, 下斜线代表已去世患者, 箭头指向先证者)

标本采集及 DNA 制备

取先证者父亲、哥哥、母亲静脉血 5 ml, 分别以 EDTA 或枸橼酸钠抗凝, 进行全血细胞自动分析仪计数和人工镜下计数血小板, 血涂片观察中性粒细胞胞浆包涵体。用 DNA 纯化试剂盒 (AxyPrep 基因组 DNA 小量试剂盒) 抽提基因组 DNA。

透射电镜分析

取先证者及家系成员静脉全血 5 ml, 静置 45 min 后取白膜层, 1000 g/min 离心 10 min 后加入 2.5% 戊二醛, 4℃ 固定 2 h, 用磷酸缓冲液冲洗, 1% 锇酸后固定, 透射电镜常规处理, 在透射电镜下观察血小板及白细胞结构并摄片。

聚合酶链反应

用 Primer 设计聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物共 40 对, 覆盖 MYH9 40 个外显子。PCR (MJ PTC-220) 反应条件: 95℃ 5 min 预变性; 95℃ 30 s 变性; 60℃ 30 s 退火; 72℃ 45 s 延伸, 共 35 个循环。72℃ 10 min 延伸, PCR 产物经 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳。家系成员在明确先证者 MYH9 突变区后扩增相应片段。

PCR 产物测序

PCR 产物割胶纯化后在 DNA 测序仪 (ABI 3730XL DNA 分析仪, 美国) 进行直接测序, 测试结果与 GeneBank 已知的 DNA 序列进行比较, 寻找突变, 对异常测序结果重新进行 PCR 扩增及正向、反向测序, 以确定基因突变。

结 果

家系成员临床表现

先证者 (Ⅲ-6) 及其父 (Ⅱ-3)、伯父 (Ⅱ-1) 为 Fechtner 综合征患者, 均有血小板减少, 瑞特-姬姆萨染色显示 90% 的中性粒细胞胞浆中可见包涵体 (图 2)、巨大血小板 ($7.5\ \mu\text{m} \times 10.0\ \mu\text{m}$) 占 90% 以上, 且

有耳聋或尿检异常或白内障 Alport 综合征表现 (表 1)。

透射电镜观察结果

3 例 Fechtner 综合征患者血小板体积增大, 但致密颗粒、线粒体等颗粒数量未见异常, 开放系统基本正常。中性粒细胞形态大致正常, 但胞浆中存在包涵体, 周围无膜分隔, 内为粗面内质网碎片和核糖体 (图 3)。

MYH9 基因突变位点检测

先证者与其父 38 号外显子编码区 (相当于 mRNA 第 5521 位置) 存在 G→A 杂合突变, 突变后 1841 位的氨基酸由谷氨酸 (E, Glu) 突变成赖氨酸 (K, Lys) (E1841K); 而先证者母亲及兄长未检出此突变 (图 4)。

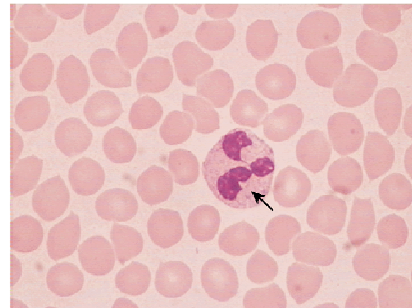


图 2 先证者血涂片可见类 Döhle 包涵体 (箭头所示) 瑞特-姬姆萨染色

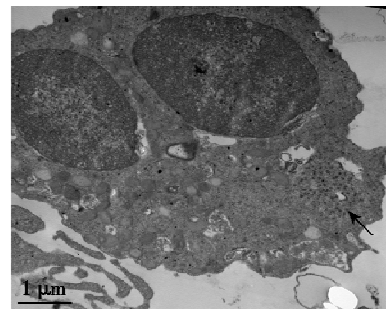


图 3 先证者透射电镜可见中性粒细胞胞浆包涵体 (箭头所示)

表 1 Fechtner 综合征家系成员临床表现

家系成员	白细胞减少	血小板减少	大血小板	耳聋	尿检异常	白内障
Ⅱ-1	有	有	是	有	无	不详
Ⅱ-3	有	有	是	有	有	无
Ⅱ-5	无	无	否	无	无	无
Ⅲ-1	无	无	否	无	无	无
Ⅲ-2	无	无	否	无	无	无
Ⅲ-3	无	无	否	无	无	无
Ⅲ-4	无	无	否	无	无	无
Ⅲ-5	无	无	否	无	无	无
Ⅲ-6	有	有	是	无	有	有
Ⅲ-7	无	无	否	无	无	无

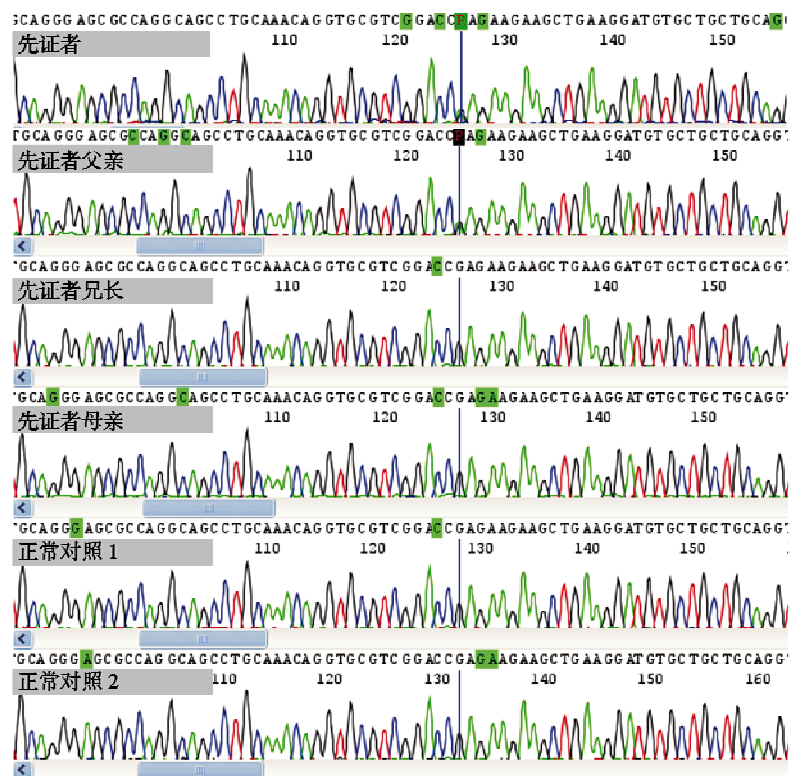


图4 先证者 MYH9 基因外显子 38 部分测序图示, 先证者及其父 RNA 第 5521 位存在 G→A 杂合突变 (正向测序)

讨论

此家系先证者及其父、伯父具有大血小板、血小板减少、中性粒细胞胞浆包涵体等特点, 同时合并 Alport 综合征的某些表现 (肾脏受累、感音性耳聋和白内障), 经基因检测证实有 MYH9 基因点突变, 符合 MYH9 相关 Fechtner 综合征的诊断。

Fechtner 综合征于 1985 年首次报道, Fechtner 综合征具有 MYH9 相关综合征的大血小板、血小板减少、中性粒细胞胞浆包涵体的共同特点, 与 MYH9 相关的其他综合征与 Fechtner 不同的是后者同时合并有 Alport 综合征的表现 (肾脏受累、感音性耳聋和白内障)^[2]。Fechtner 综合征患者中性粒细胞胞浆包涵体为灰蓝色, 形状不规则, 与感染时的中毒性颗粒 Döhle 小体相似。电镜下 Döhle 小体为平行排列的粗面内质网, 而 Fechtner 综合征的类 Döhle 包涵体则为含有核糖体和粗面内质网碎片的集合体, 并无明确的包膜与胞浆分离开^[3]。本家系患者电镜下所见与文献报道相同。

2000 年 Toren 等^[4]提出巨血小板综合征的致病基因位于染色体 22q11-13, 后证实编码非肌性肌球

蛋白的 MYH9 基因突变是 May-Hegglin 异常、Fechtner、Sebastian、Epstein 综合征的发病基础, 从而命名为 MYH9 相关综合征。非肌性肌球蛋白 IIA 参与了胞质微丝的形成, 并主要位于细胞的应力纤维和分裂细胞的收缩环^[5], 而且它还参与了细胞的吞噬作用和胞质分裂^[6]。因此, 推测 MYH9 基因突变引起巨核细胞骨架重排导致了血小板减少和巨大血小板。到 2009 年为止, 在 PubMed 共检索到 101 个 MYH9 相关综合征的家系报道, 其中 23 个为已证实突变位点的 Fechtner 综合征家系, 其突变常见于 1、16、26、30、38、40 外显子^[7]。而我国仅香港 2006 年、内地 2007 年各报道 1 例, 提示国内对此类疾病的认识尚不足^[8]。本家系的突变为 E1841K, 共有 20 个家系见于报道^[7]。E1841K 突变可表现为 MYH9 相关综合征中的任何一型, 表现为 Fechtner 综合征则仅有 2 例报道^[4]。

MYH9 相关综合征患者的血小板减少多为轻度至中度, 血涂片可见血小板增大, 全自动血细胞分析仪进行血小板计数可能会低于患者实际的血小板数值^[7]。出血表现多不明显, 因血小板功能多正常, 本家系患者的出血时间、血小板聚集功能及血小板表面标记等亦均正常。MYH9 相关 4 种综合征的临

床表现鉴别有一定困难(表2),肾脏受累可表现为从镜下血尿到肾功能衰竭等不同症状,并可随年龄逐渐进展,听力障碍为感音性耳聋。Alport 综合征的肾脏受累、听力障碍、先天性白内障表现在同一个家系有可能不同。本家系先证者及其父亲突变相同,先证者与其父亲均有有镜下血尿,但先证者有先天性白内障无听力障碍,而其父亲则有感音性听力障碍,同一家系受累器官不一可能与各人非肌性肌球蛋白 IIA、IIB、IIC 之间的平衡不同有关,具体原因有待进一步研究^[9]。

MYH9 综合征因出血表现不明显,故多在查体

时发现,血小板减少在临床上易误诊为免疫性血小板减少症,血常规如发现血小板体积增大,应完善血涂片,注意是否易见大血小板;仔细观察中性粒细胞中是否有包涵体;同时应仔细询问病史及家族史,进行尿常规检查、眼科检查排查白内障、耳鼻喉科测听力。若误诊为免疫性血小板减少,患者则可能承受不必要的药物,甚至切脾等治疗。通常此类综合征不会出现大的出血事件,需对患者及其家系成员宣教其疾病的性质,避免不必要的治疗。在创伤或手术时可紧急行血小板输注预防出血。

表2 MYH9 相关综合征的临床表现

综合征	大血小板	中性粒细胞胞浆包涵体	感音性耳聋	肾脏受累	先天性白内障
May-Hegglin 异常	有	有	无	无	无
Sebastian 综合征	有	有	无	无	无
Fechtner 综合征	有	有	有	有	有
Epstein 综合征	有	无	有	有	无

参 考 文 献

- [1] Scholer H, Schnoes M. Observations on another carrier of the May-Hegglin anomaly of leukocytes and blood platelets [J]. Schweiz Med Wochenschr, 1960, 90:1269-1273.
- [2] Peterson LC, Rao KV, Crosson JT, et al. Fechtner syndrome--a variant of Alport's syndrome with leukocyte inclusions and macrothrombocytopenia [J]. Blood, 1985, 65: 397-406.
- [3] Clauser S, Cramer-Borde E. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders [J]. Semin Thromb Hemost, 2009, 35:213-223.
- [4] Toren A, Rozenfeld-Granot G, Rocca B, et al. Autosomal-dominant giant platelet syndromes: a hint of the same genetic defect as in Fechtner syndrome owing to a similar genetic linkage to chromosome 22q11-13 [J]. Blood, 2000, 96:3447-3451.
- [5] Maupin P, Phillips CL, Adelstein RS, et al. Differential localization of myosin-II isozymes in human cultured cells and blood cells [J]. J Cell Sci, 1994, 107 (Pt 11):3077-3090.
- [6] Mansfield PJ, Shayman JA, Boxer LA. Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase [J]. Blood, 2000, 95:2407-2412.
- [7] Althaus K, Greinacher A. MYH9-related platelet disorders [J]. Semin Thromb Hemost, 2009, 35:189-203.
- [8] 杨海燕, 阮长耿. 一例 Fechter 综合征临床与分子缺陷研究(附文献复习) [J]. 中华血液学杂志, 2007, 28:160-163.
- [9] 杨海燕, 王兆钺, 曹丽娟, 等. Fechtner 综合征的非肌性肌球蛋白重链 IIA 的表达与功能研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16:871-874.

(收稿日期: 2010-07-09)