

Fabry 病一家系临床调查及 α -半乳糖苷酶 A 基因突变研究

刘晓霞¹, 余朝文², 杨元², 胡章学^{1△}

1. 四川大学华西医院 肾内科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 医学遗传研究室(成都 610041)

【摘要】 目的 分析一个 Fabry 病家系先证者的临床表现,并进行该家系成员 α -半乳糖苷酶 A (GLA) 基因突变检测。**方法** 回顾性分析该家系先证者临床及病理资料,采用聚合酶链式反应(PCR)直接测序法检测先证者及家系成员 GLA 基因编码序列。**结果** ① 先证者表现为下肢皮肤色素沉着、神经性疼痛和肾脏损害,其弟死于尿毒症。肾活检提示继发性局灶节段性肾小球硬化,肾小球足细胞泡沫变性,电镜发现足细胞内大量同心圆排列的具有层状结构的包涵体,确诊 Fabry 病。② GLA 基因测序检测发现 1 个无义突变,位于第 2 号外显子 CAG119TAG(Q119T),终止密码提前出现致使形成一条截短的多肽链。家系发现 2 例杂合子,分别为先证者母亲及侄女。**结论** 本研究从生化、病理及基因水平 3 个层面诊断了一个 Fabry 病家系,确诊致病原因为 GLA 基因点突变[第 2 号外显子 CAG119TAG(Q119T)],该突变在中国人群中首次报道。

【关键词】 Fabry 病 α -半乳糖苷酶 A 基因 突变

Pedigree Investigation of Clinicopathologic Features and Alpha-galactosidase A Gene Mutation in a Family with Fabry Disease LIU Xiao-xia¹, YU Chao-wen², YANG Yuan², HU Zhang-xue^{1△}. 1. Department of Nephrology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Medical Genetics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: hzxawy@hotmail.com

【Abstract】 Objective To analyze the clinical manifestation, clinicopathologic features and alpha-galactosidase A (GLA) gene mutations in a pedigree with Fabry disease. **Methods** In this study, we retrospectively collected the clinical data of the members in the pedigree with Fabry disease, then the clinicopathologic features of the male proband were analyzed by renal biopsy, and GLA gene was detected by PCR and direct sequencing. **Results** ① The proband was characterized by pigmentation of bilateral lower extremities, episodes of neuropathic pain, and renal dysfunction. The renal biopsy showed secondary focal segmental glomerulosclerosis with massive foam-cell like podocytes under light microscope and abundant inclusions in podocytes which were round, comprising concentric layers of dense material separated by clear spaces under electron microscope. ② The proband was identified to present a missense mutation as CAG119TAG (Q119T). The mother and niece of the proband were the carriers of this missense mutation. **Conclusion** We identified a family with Fabry disease resulting from a novel point mutation of GLA gene, which has not been reported before in Chinese population.

【Key words】 Fabry disease Alpha-galactosidase A gene Mutation

Fabry 病是编码 α -半乳糖苷酶 A (GLA) 的基因发生突变所致的一种溶酶体贮积病, X 连锁隐性遗传。病变可累及多个系统, 如心脏、肾脏、神经系统, 其发病率约为 1/117 000^[1], 临床较为罕见。Fabry 病患者的 GLA 基因突变较为分散, 不同家系多具有不同的突变位点, 目前全球报道突变有 400 余种。Fabry 病诊断主要依靠临床病理、GLA 酶活性、基因测序, 但酶活性检测及基因测序在临床较少开展, 而该病早期临床表现无特异性, 组织病理易与其他疾病混淆, 导致该病容易漏诊及误诊。本研究通过分析一个 Fabry 病家系的临床病理表现和致病基因 GLA 基因突变的检测, 以明确家系成员肾功能衰竭病因, 及 Fabry 病基因表型和临床表型的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象和临床病理资料

先证者刘某, 37 岁, 男性, 因“反复双下肢水肿 3⁺ 年”入住我院。3 年前患者逐渐出现双下肢水肿, 时轻时重, 伴尿量逐渐减少, 入院时 24 h 尿量约 800 mL, 无泡沫尿、肉眼血尿, 无面部红斑、关节疼痛、光敏感。追问病史, 患者 7 岁时出现跟腱疼痛, 长期口服卡马西平止痛治疗; 10 余岁出现双下肢皮肤色素沉着伴脱屑。其弟于 33 岁因“尿毒症”死亡, 但基础肾脏病因不明确。查体: 体温 36.5℃, 心率 69 次/min, 呼吸 15 次/min, 血压 134/75 mmHg (1 mmHg = 0.1333 kPa)。神志清楚, 慢性病容, 皮肤巩膜无黄染, 双下肢膝关节以下皮肤色素沉着, 伴少许脱屑, 皮温正常(图 1)。心肺腹未见异常, 双下肢轻度水肿, 足底疼痛。辅助检查: 血

图 1 先证者双下肢皮肤色素沉着,呈鱼鳞样改变;上肢皮肤正常
Fig 1 Skin lesions of proband: pigmentation of bilateral lower extremities

常规,血红蛋白(Hb)114 g/L(120~160 g/L),血小板(PLT) 68×10^9 /L($100\times 10^9\sim 300\times 10^9$ /L),白细胞(WBC) 5.25×10^9 /L;肝功,总胆红素(TB) $5.6\text{ }\mu\text{mol/L}$,直接胆红素(DB) $1.8\text{ }\mu\text{mol/L}$,丙氨酸氨基转移酶(ALT)22 IU/L,门冬氨酸氨基转移酶(AST)18 IU/L,血清白蛋白(ALB)26 g/L(35~55 g/L);肾功,血清胱抑素-C(Cys-C) 2.02 mg/L ($0.51\sim 1.09\text{ mg/L}$),肌酐(Scr) $145\text{ }\mu\text{mol/L}$ ($53\sim 140\text{ }\mu\text{mol/L}$);24 h 尿蛋白定量 2.32 g ($<0.15\text{ g/24 h}$)。肾活检结果示光镜下肾小球局灶节段硬化样改变,大量足细胞空泡变性,电镜下肾小球足细胞胞浆内大量同心圆排列的具有层状结构的包涵体,确诊为 Fabry 病(图 2)。

该家系共 7 例成员,包括 4 例女性及 3 例男性,2 例男性存在肾功能损害,其余成员均无蛋白尿形成及肾功能损害。

1.2 基因突变的检测

1.2.1 提取外周血基因组 DNA 采集家系成员外周血,采用酚-氯仿法提取外周血 DNA。

1.2.2 设计 GLA 基因引物 GLA 基因全序列来自 GenBank(X14448),由 Primer Premier 5.0 设计 PCR 扩增引物,除第 2 号外显子引物参考文献^[2]外,第 1 号外显子及第 3~7 号外显子均自行设计引物共 6 对(引物均由华大基因

图 2 先证者肾脏病理
Fig 2 Renal biopsy of proband

A: Swelling and vacuolation of podocytes in the glomerulus (HE, $\times 200$); B: Segmental sclerosis and vacuolation of epithelial cells in the glomerulus (periodic acid-shiff staining, $\times 400$); C: Abundant inclusions in podocytes which are round, comprising concentric layers of dense material separated by clear spaces under electron microscope (electron microscope, $\times 4000$)

公司合成),见附表。

1.2.3 PCR 反应体系及条件 以基因组 DNA 为模板,PCR 反应扩增 GLA 基因 7 个外显子及其与内含子的连接区域。PCR 反应体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$: $10\times$ PCR 缓冲液 $5.0\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 (25 mmol/L) $3.0\text{ }\mu\text{L}$,dNTP 液 $3.0\text{ }\mu\text{L}$,Taq DNA 聚合酶($5\text{ U}/\mu\text{L}$)(TaKaRa 公司) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 $2.0\text{ }\mu\text{L}$,模板 DNA $2.0\text{ }\mu\text{L}$,ddH₂O $30.7\text{ }\mu\text{L}$,DMSO $2\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件:95℃预变性 2 min,35 个循环(95℃变性 30 s, $56\sim 60\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min), $72\text{ }\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。产物长度及退火温度见附表。

1.2.4 基因测序 PCR 产物经纯化后分别采用 BIG dye terminator 和 EI-terminator 测序试剂盒进行测序反应(华大基因公司测序),在 ABI 3730 自动测序仪进行测序,各 PCR 片段采取双向测序。

附表 PCR 反应引物序列及反应条件

Table Primer sequences and annealing temperature used for PCR and sequencing of GLA gene

Exon	Primer sequence (5'→3')	PCR products (bp)	Annealing temperature (℃)
1	Forward GAAATAGGGCGGGTCAAT	572	56
	Reverse TGATTCTGGGACAGTTTGC		
2	Forward GCTGTGTAATTCTTGTGAT TACTAACCACCT	390	60
	Reverse GCTAACAAAGCTTCTGTACAT AAGTGC		
3	Forward CCCAATACCTGGTGAAG	371	56
	Reverse GATTGGTTCTTTGGCTCA		
4	Forward GACAGACTGAACCCCATC	283	56
	Reverse AGACCTTGGTTTCCTTTG		
5-6	Forward CAAGAGAAGGCTACAAG TGC	643	56
	Reverse CAAGGGGTCCTGATTGATGG		
6-7	Forward CACATCAGCCCTCAAGCC	707	56
	Reverse ATGGAGAAAAAGGACAG		

2 结果

2.1 临床表型

该家系先证者临床表现为双下肢水肿,伴皮肤色素沉着及双下肢神经性疼痛、耳鸣,肾脏损害表现为肾病综合征,无高血压、耳聋及人格改变。肾脏病理表现为肾小球节段硬化,可见足细胞大量泡沫变性,电镜示足细胞大量同心圆层状包涵体。

图 3 患者家系图谱

Fig 3 The pedigree tree of family

图 4 先证者突变位点基因图谱

Fig 4 The aberrant sequence of *GLA* gene in proband

4A: Sequence of exon 2 in *GLA* gene of proband: ttcgctagcta(↓); 4B: Normal sequence of exon 2 in *GLA* gene: ttcgccagcta(↓)

3 讨论

Fabry 病由 Fabry 和 Anderson 于 1898 年首先报道,也称为 Fabry-Anderson 病。该病是一种溶酶体病,因 *GLA* 基因突变使该酶活性降低或者失活致糖鞘脂代谢障碍,致使三己糖酰基鞘脂醇等沉积于多个系统器官出现临床症状,皮肤、心脏、肾脏、神经系统受累为主^[3]。根据其临床表现分为经典型和迟发型,男性患者均表现为经典型,大部分女性携带者为迟发型。Fabry 病多见于高加索人,男性人群中发病率约 1/40 000,新生儿中约 1/117 000,其中经典型与迟发型比率约 7:1~11:1^[1]。

Fabry 病为病因明确的 X 连锁隐性遗传病,其致病基因 *GLA* 位于 Xq22.1,长度约 17 kb,共含 7 个外显子^[3]。目前全球报道可致 Fabry 病的 *GLA* 突变约 400 余种。经典型 Fabry 病呈多系统性受累,临床表现多样,大部分为青少年时期发病,可早期出现发作性肢端疼痛、少汗、皮疹等。其中皮肤系统受累常表现为泛发性血管角质瘤、丘疹,为此病皮肤损害特点^[4];神经系统受累可分为周围神经系统和中枢神经系统,周围神经系统常表现为发作性肢端疼痛、感觉异常^[5],中枢神经系统主要为血栓形成所致脑卒中,18% 患者甚至出现神志紊乱,78% 可表现为感觉神经性耳聋^[6];眼部表现为结膜和视网膜血管瘤样扩张,白内障形成;泌尿系统受累出现较晚,多在 20 岁以后出现,早期可表现为多尿、夜尿,逐渐出现蛋白尿和/或血尿,甚至肾病综合征,50% 以上的男性半合子在 50 岁之前可进展至终末期肾功能衰竭^[5];心血管系统病变可包括肥厚性心肌病、瓣膜病、心律失常等^[7];亦有消化系统、精神神经系统等受累报道。迟发型 Fabry 病起病较晚,病情较轻,缺乏特异性临床表现,不同患者变异很大。

Fabry 病确诊依靠 *GLA* 活性及 *GLA* 基因检测,病变部位病理活检辅助诊断,其中 *GLA* 基因测序为 Fabry 病诊断

2.2 基因测序结果

通过对先证者 *GLA* 基因测序发现 1 个点突变,该突变位于 *GLA* 基因第 2 号外显子 CAG119TAG(Q119T),为无义突变,终止密码提前出现在 mRNA,致使形成一条不完整的多肽链。通过测序该家系成员 *GLA* 基因发现 2 例女性杂合子,分别为先证者母亲及侄女,基因突变位点与先证者一致。根据所有家系基因测序结果绘制该家系 Fabry 病遗传家系图,见图 3,基因测序结果见图 4。

金标准。临床上酶活性主要通过检测血浆和中性粒细胞酶活性得到,对于男性患者具有极高的敏感性和特异性,但女性携带者的酶活性可能属于正常范围,需进一步检测 *GLA* 基因明确诊断。

本家系先证者临床出现皮肤角质化、色素沉着,神经性疼痛,伴蛋白尿及肾功能损害,同时存在耳鸣,表现为全身多个器官受累;同时行肾活检病理显示光镜下肾小球上皮细胞明显肿胀和空泡变性,免疫荧光全阴性,电镜下见大量分层的环状包涵体;*GLA* 基因突变检测发现点突变 CAG119TAG(Q119T),位于第 2 号外显子的无义突变,该突变位点由 Davies 等^[8]首次报道,它使编码氨基酸序列的 mRNA 提前出现终止密码,编码一条不完善肽链,从而影响 α -半乳糖苷酶的合成,该突变在中国人群中首次发现。该家系成员中先证者弟弟的临床表现与先证者相似,同时也存在肢端疼痛、皮肤少汗及色素沉着、耳聋、耳鸣、蛋白尿,伴有人格改变,但初期被忽略导致发展为终末期肾病。该家系先证者临床症状、病理诊断、基因测序均符合 Fabry 病,且通过家系分析确诊先证者弟弟为 Fabry 病致肾功能衰竭。

当 Fabry 病临床表现以肾脏损害为主时易被误诊为局灶节段肾小球硬化(FSGS)。原发性 FSGS 临床上以大量蛋白尿或肾病综合征为特征;然而 Fabry 病肾脏损害虽然也可出现蛋白尿甚至肾病综合征,但存在其他系统病变,如皮肤色素沉着、血管角质瘤、肢端发作性疼痛等,需仔细追问病史。病理上细胞型及塌陷型 FSGS 光镜下均存在足细胞增生、肥大以及空泡变性,甚至假新月体形成,电镜下肾小球硬化节段的基底膜皱缩,毛细血管管腔闭塞,系膜基质增生,上皮细胞足突广泛融合或微绒毛形成,胞浆内大量吞噬空泡、脂肪滴;Fabry 病肾脏病理光镜下以肾小球足细胞明显肿胀和空泡变性为主,可出现节段硬化的表现,电镜下可见呈分层的环状髓样小体和排列的斑马小体,而原发性 FSGS 电镜下无此特征性改变。组织电镜检查是 Fabry 病和原发

性 FSGS 鉴别诊断的重要病理手段。实际上 FSGS 是一种组织形态学描述,多种原发和继发性肾小球疾病均可造成这种病变,光镜下呈现大量足细胞空泡变性需排除相关继发性因素,同时行电镜检查进一步鉴别诊断。

目前 Fabry 病的治疗手段主要为对症治疗和酶替代治疗(ERT)^[9]。ERT 为一种终生治疗措施,促使沉积的 GLA 代谢,减少细胞内神经酰胺三己糖苷的堆积,从而减缓症状,改善肾脏病变及功能,预防及延缓疾病进展;推荐剂量为 α -半乳糖苷酶 0.2 mg/(kg·d), β -半乳糖苷酶 1 mg/(kg·d)^[10]。随着 ERT 进入临床试验阶段,近年来大量研究证实 Fabry 病患者应用 ERT 治疗可有效稳定肾功能,改善心功能,减轻疼痛,提高生活质量^[11-16]。目前国内尚无半乳糖苷酶,我们主要采取对症治疗,积极控制高血压、减轻疼痛等。

本研究通过分析该家系先证者临床症状、肾脏病理及致病基因诊断一个 Fabry 病家系,家系分析符合 Fabry 病遗传规律,发现其致病基因为 GLA 基因点突变,该突变在中国人人群中首次报道。Fabry 病发病率低,早期临床表现亦缺乏特异性,易被临床医生误诊或漏诊而使用不必要的免疫抑制治疗,增加药物的毒副作用,加重病情进展。Fabry 病早期诊断非常重要。对于青少年时期出现不明原因发作性肢端疼痛、感觉异常等需警惕该病,对肾脏病理表现为大量足细胞空泡变性的 FSGS 患者也需进行鉴别。高度怀疑 Fabry 病的患者可行 GLA 活性检测及 GLA 基因测序明确诊断。

参 考 文 献

1 Schiffmann R. Natural history of Fabry disease in males; preliminary observations. J Inherit Metab Dis, 2001; 24 (Suppl 2): 15-17; discussion 11-12.

2 Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, *et al.* Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. Am J Hum Genet, 1993; 53 (6): 1186-1197.

3 MacDermot KD, Holmes A, Miners AH. Anderson-Fabry disease; clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. J Med Genet, 2001; 38 (11): 750-760.

4 Mohrenschlager M, Braun-Falco M, Ring J, *et al.* Fabry disease; recognition and management of cutaneous manifestations. Am J Clin Dermatol, 2003; 4 (3): 189-196.

5 Mehta A, Ricci R, Widmer U, *et al.* Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. Eur J Clin Invest, 2004; 34 (3): 236-242.

6 Ramaswami U, Whybra C, Parini R, *et al.* Clinical manifestations of Fabry disease in children; data from the Fabry Outcome Survey. Acta Paediatr, 2006; 95 (1): 86-92.

7 Linhart A, Kampmann C, Zamorano JL, *et al.* Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease; results from the international Fabry outcome survey. Eur Heart J, 2007; 28 (10): 1228-1235.

8 Davies JP, Eng CM, Hill JA, *et al.* Fabry disease; fourteen alpha-galactosidase A mutations in unrelated families from the United Kingdom and other European countries. Eur J Hum Genet, 1996; 4 (4): 219-224.

9 Mehta A, Beck M, Eyskens F, *et al.* Fabry disease; a review of current management strategies. QJM, 2010; 103 (9): 641-659.

10 Schiffmann R, Askari H, Timmons M, *et al.* Weekly enzyme replacement therapy may slow decline of renal function in patients with Fabry disease who are on long-term biweekly dosing. J Am Soc Nephrol, 2007; 18 (5): 1576-1583.

11 Vedder AC, Linthorst GE, Houge G, *et al.* Treatment of Fabry disease; outcome of a comparative trial with agalsidase alfa or beta at a dose of 0.2 mg/kg. PLoS One, 2007; 2 (7): e598.

12 Pastores GM. Agalsidase alfa (Replagal) in the treatment of Anderson-Fabry disease. Biologics, 2007; 1 (3): 291-300.

13 Banikazemi M, Bultas J, Waldek S, *et al.* Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease; a randomized trial. Ann Intern Med, 2007; 146 (2): 77-86.

14 Schiffmann R, Martin RA, Reimschisel T, *et al.* Four-year prospective clinical trial of agalsidase alfa in children with Fabry disease. J Pediatr, 2010; 156 (5): 832-837.

15 Eng CM, Germain DP, Banikazemi M, *et al.* Fabry disease; guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement. Genet Med, 2006; 8 (9): 539-548.

16 Hoffmann B, Beck M, Sunder-Plassmann G, *et al.* Nature and prevalence of pain in Fabry disease and its response to enzyme replacement therapy—a retrospective analysis from the Fabry Outcome Survey. Clin J Pain, 2007; 23 (6): 535-542.

(2012-05-21 收稿, 2012-09-17 修回)

编辑 余 琳