

遗传性血小板减少症家系 TBXAS1 基因突变及巨核细胞形态 临床研究

李 芳 李 芹 刘红玲 李雯雯 殷雨梅 赵 薇

宁夏回族自治区人民医院，宁夏医科大学第三临床医学院 宁夏银川 750002

摘 要：目的：分析遗传性血小板减少症（Hereditary thrombocytopenias, HT）患者家系的骨髓涂片及骨髓组织中巨核细胞形态及基因突变情况。方法：采用家系调查研究方法，收集 2023 年 6 月在我院就诊的一例血小板减少症家系。对参与调查的家庭成员进行病史采集及临床检查。采集 3 例患者和 3 例表型正常外周血各 5mL 提取基因组 DNA，采用外显子捕获技术及生物信息学筛查方法对先证者进行全外显子测序和突变基因筛选，采用 Sanger 测序对候选突变基因进行验证。同时采集患者骨髓穿刺及活检组织标本镜下观察骨髓增生程度，粒系、红系、巨核系细胞形态。结果：该家系为常染色体显性遗传，共两代 6 人，其中患者 3 例，3 例表型正常者。三例血小板减少患者全外显子测序结果显示 TBXAS1 基因 7 号染色体 5 个转录本突变。Sanger 测序分析结果显示 TBXAS1 基因仅存在于血小板减少 3 例患者中，在表型正常者中不存在。3 例患者骨髓粒系、红系、巨核系三系增生活跃，巨核细胞形态以少分叶及分叶不良病态颗粒巨核细胞为主，产板巨核细胞比例减低。结论：骨髓巨核细胞形态异常是该家系三例血小板减少患者的共同特征，TBXAS1 基因变异可能为该家系患者的致病基因，新变异的检出丰富了 TBXAS1 基因变异谱，为国内首次报道。TBXAS1 基因 5 个突变位点在 HT 病例中是否影响巨核细胞形态及分化需进一步验证研究。

关键词：血小板减少症；TBXAS1 基因；巨核细胞

遗传性血小板减少症（Hereditary thrombocytopenias, HT）是一类罕见且具有复杂基因变异和临床表现的疾病，发病率 0.001%，占出血性疾病 1/3，形态学表现为骨髓巨核细胞及血小板正常/异常形态，但其出血程度往往和血小板减少程度并不相符。HT 是一组异质性的先天性疾病，根据血小板功能障碍或血小板减少症的严重程度，会有广泛的症状。因临床表现和骨髓形态的异质性，遗传性血小板减少症可被误诊为原发性免疫性血小板减少症（ITP）和骨髓增生异常综合征（MDS），从而采取一些不必要的输血、脾切除及化疗治疗，从而增加输血风险及治疗成本。因此，遗传学证据对于准确诊断遗传性血小板减少症是必要的。在本研究中，我们通过对宁夏回族自治区医院血液科收治一例血小板减少症患者诊疗过程分析，该患者作为先证者进而追踪到患者子代中两个血小板减少女儿，并同时对该家系全部成员进行基因检测，筛选出 TBXAS1 候选致病基因。现对该病例及家系临床研究报道如下。

1. 资料和方法

1.1 病例资料

先证者，男性，53 岁，患者 2009 年因感冒就诊我院门诊，血常规：WBC $13.42 \times 10^9/L$ ，RBC $6.01 \times 10^{12}/L$ ，血红蛋白 $169.0g/L$ ，PLT $19 \times 10^9/L$ ，遂以“血小板减少原因待查”收住我院血液科。入院后查外周血涂片提示：血小板散在分布少见，大血小板偶见，白细胞分类及比例正常。骨髓涂片显示：三系增生活跃，产板巨核细胞比例减低，考虑 ITP 可能性大？予以激素、抑酸护胃等对症治疗后复查血小板上升不明显，患者自动出院。2012 年 8 月 17 日主因“血小板减少 12 年，鼻出血 1 天入院”，骨髓涂片及骨髓活检结果示：粒系增生明显活跃伴局灶纤维组织象，巨核系可见单个核及多个核病态造血，考虑 MDS 待排？血液肿瘤免疫分型示：在 CD4/SSC 点图上设门分析，单核细胞异常表达 CD56，未见明显异常免疫表型的细胞。给予环孢素、沙利度胺、达那唑及骨化三醇口服治疗。骨髓染色体核型分析示：46，

XY[20], MDS 相关基因检测均阴性, 根据以上结果, 修正诊断“血小板减少症”, 症状好转后出院。此后患者规律口服上述药物, 定期复查血常规监测血小板维持在 $20 \times 10^9/L$ 左右。2023 年 6 月 14 日患者因被牛踢伤鼻部、右侧胸部致右侧胸部疼痛及鼻出血, 自行填塞不止, 遂就诊于我院西夏分院急诊科, 完善血常规示: 白细胞 $8.71 \times 10^9/L$, 中性粒细胞计数 $6.36 \times 10^9/L$, 血红蛋白 $146.0g.L^{-1}$, 血小板 $9 \times 10^9/L$; 腹部 B 超: 脾大、脾回声增粗, 脾静脉增宽; 肺 CT 示: 右肺下叶陈旧性索条, 胸廓诸骨未见明确骨折征象; 颅脑 CT 未见明显异常, 请我科会诊后考虑患者病情危重, 建议住院治疗。病程中患者神清, 精神、饮食、睡眠尚可, 二便正常, 近期体重未见明显变化。

先证者大女儿, 32 岁, 血小板 $47 \times 10^9/L$, 生化凝血无异常, 未治疗。

先证者小女儿, 25 岁, 血小板计数 $67 \times 10^9/L$, 生化凝血无异常, 未治疗。

因先证者有家族史, 故对其配偶、子女进行全血外显子基因分析。本研究为回顾性病例分析, 经我院伦理委员会批准(批准文号: 2022-NZR-136), 并征得患者的知情同意。

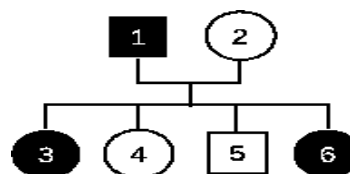
1.2 家系调查

询问先证者出生时情况, 并对先证者配偶、子女进行既往史及临床表现调查, 绘制家系图谱。并行外周血全外显子检测, 同时对两个血小板减少症女儿行骨髓穿刺及骨髓活检查。

2. 结果

2.1 家系图

该家系非近亲结婚, 两代均有患者, 符合常染色体显性遗传规律, 初步绘制家系图(图 1)。



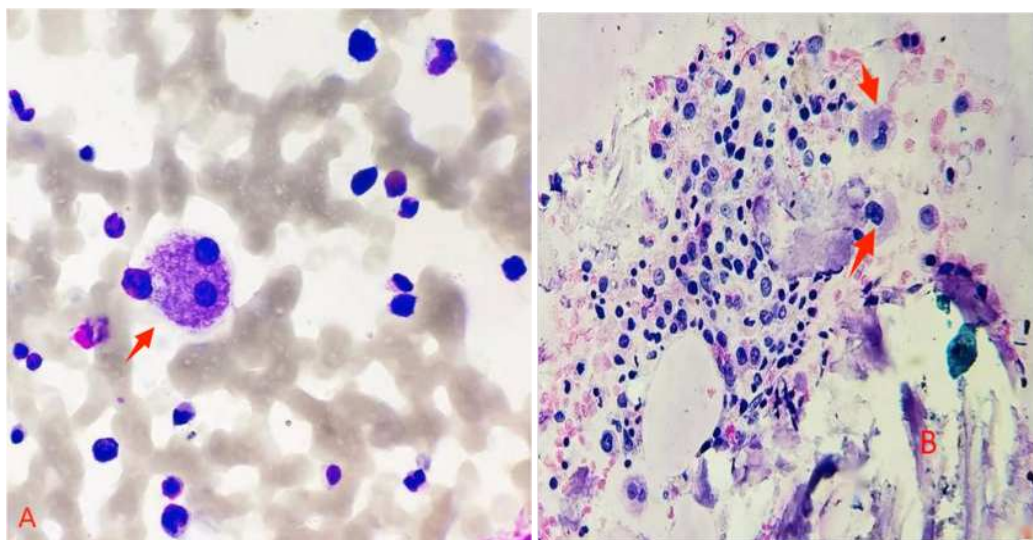
1 先证者 3 先证者大女儿 6 先证者小女儿

图 1 血小板减少症家系图

2.2 临床表现及骨髓形态学

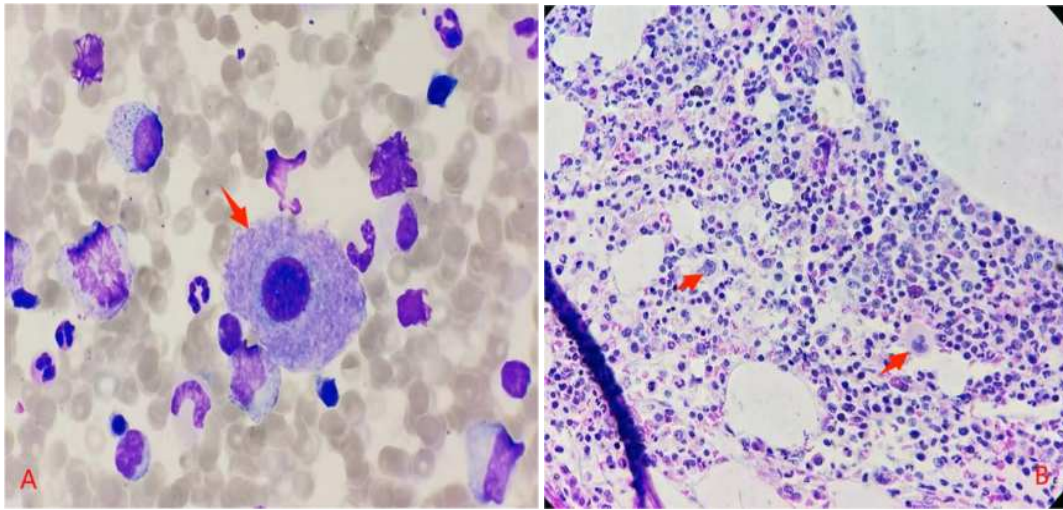
先证者, 表现为皮肤瘀点, 鼻出血。骨髓形态: 粒系增生明显活跃伴局灶骨纤维组织象, 巨核系增生活跃, 产板巨核细胞比例减低, 可见单个核及多个核病态巨核细胞(图 2)。

先证者大女儿, 偶有皮肤瘀点, 月经量偏多。生化凝血无异常; 骨髓形态: 骨髓三系增生活跃, 粒系比例正常, 早中阶段粒细胞比例偏高, 部分粒细胞可见颗粒减少。红系比例正常, 以中晚幼红细胞为主, 成熟红细胞形态大致正常。淋巴系比例及形态正常。全片见 210 个巨核细胞, 巨核细胞数量及比例正常, 可见低核叶及多个核病态巨核细胞。血小板散在分布, 数量偏少。诊断为三系增生活跃伴产板不良骨髓象(图 3), 未治疗。



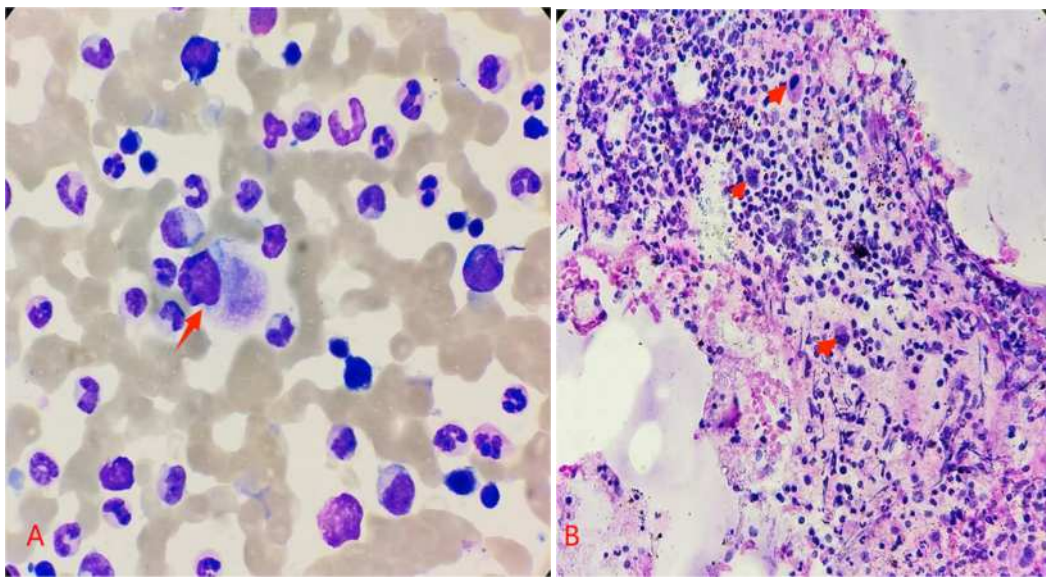
A 骨髓涂片(瑞氏-吉姆萨染色 $\times 1000$): 可见双圆核病态巨核细胞 B 骨髓活检(HGF 染色 $\times 400$): 可见单个核及多个核病态巨核细胞

图 2 先证者骨髓涂片及骨髓活检形态



A 骨髓涂片 (瑞氏 - 吉姆萨染色 $\times 1000$) 粒系增生活跃, 可见单圆核病态巨核细胞 B 骨髓活检 (HGF 染色 $\times 400$) 粒系增生活跃, 可见单圆核病态巨核细胞

图 3 大女儿骨髓涂片及骨髓活检形态



A 骨髓涂片 (瑞氏 - 吉姆萨染色 $\times 1000$) 粒系增生活跃, 可见单圆核病态巨核细胞 B 骨髓活检 (HGF 染色 $\times 400$) 粒系增生活跃, 可见单个核及双圆核病态巨核细胞

图 4 小女儿骨髓涂片及骨髓活检形态

先证者小女儿, 表现为皮肤瘀点, 偶有鼻衄。生化凝血无异常; 骨髓形态: 骨髓增生活跃, 粒系增生明显活跃, 各阶段粒细胞可见, 少量粒细胞可见胞浆颗粒减少。红系增生相对减低, 以中晚幼红细胞为主, 成熟红细胞形态大致正常。淋巴系增生减低, 形态大致正常。全片见 166 个巨核细胞, 产板巨核细胞比例减低 (4%), 可见单个核 / 多个核及双圆核病态巨核细胞。血小板散在分布, 数量偏少。诊断:

粒系增生明显活跃, 产板巨核细胞比例减低骨髓象 (图 4), 未治疗。

3. 基因检测 与先证者血型同为 O 型的大女儿及小女儿均发现血小板减少, 凝血功能试验、肝肾功能、自身抗体谱检测均正常。先证者配偶及其他三个子女血小板数量及形态均正常。三例患者采用外周血全外显子建库测序分析, 从有害变异中筛选出符合筛选条件的变异位点。TBXAS1

(thromboxane A synthase 1) 该基因编码细胞色素 P450 超家族成员中的一种酶。该基因存在编码不同亚型的剪接转录本。

TBXAS1:NM_001061:exon11:c.G1348A:p.E450K,
TBXAS1:NM_030984:exon11:c.G1348A:p.E450K,
TBXAS1:NM_001166253:exon12:c.G1486A:p.E496K,
TBXAS1:NM_001166254:exon13:c.G1144A:p.E382K,
TBXAS1:NM_001130966:exon15:c.G1348A:p.E450K

先证者、先证者大女儿、先证者小女儿的验证序列图中均存在 G 到 A 改变, 依据碱基配对原则, 提示先证者、先证者大女儿、先证者小女儿存在 7 号染色体外显子碱基 G 到 A 突变, 且为杂合突变, 证实先证者、先证者大女儿、先证者小女儿均携带有 TBXAS1 突变基因, 该位点的碱基突变使基因剪切异常从而影响蛋白由表达酸性谷氨酸 (E) 突变为碱性赖氨酸 (K)。先证者配偶及其他子女无血小板减少相关的突变基因, 突变的意义有待进一步实验验证。

3 讨论

全基因组测序 (WGS) 和全外显子组测序 (WES) 陆续发现几种新的基因突变及与表型的关系等^[1]。WGS 与 WES 是目前 DNA 水平高通量测序的主要研究内容, 人类基因组包含约 31.6 亿脱氧核糖核苷酸碱基对, 其中外显子组占 1-2%, 包含约 85% 的已知致病突变^[2]。因此检测基因组中所有的外显子, 即全外显子组测序, 对于筛选致病突变具有重要意义。

我们在研究工作中通过全外显子测序 (WES) 从一例血小板减少症家系中检测到 TBXAS1 基因突变, 符合常染色体显性遗传。该基因存在五个编码不同亚型的剪接转录本, 五个转录本均存在 TBXAS1 基因突变。三例患者采用外周血全外显子建库测序分析, 从有害变异中筛选出符合筛选条件的变异位点。

TBXAS1 全称血栓素合成酶基因 (Thromboxane A synthase 1 gene), 位于染色体 7q34, 包含 13 个外显子和 12 个内含子, 全长约 193Kb, 基因编码血栓素合成酶。血栓素合成酶是细胞色素 P450 超家族的成员之一, 是合成血栓素 A2 (Thromboxane A2, TXA2) 的关键酶^[3]。血栓素合成酶在血小板、血管平滑肌细胞、单核细胞、巨噬细胞均有表达, 参与心梗、缺血性脑卒中及造血系统疾病过程。国外已有研究显示在遗传性血小板功能障碍中发现了 TBXAS1 基

因突变会引起 TBXA 受体缺陷, 但 TBXAS1 基因在遗传性血小板减少症中对于巨核细胞生成和血小板分化中的作用机制不详^[3-4]。TBXAS1 基因是否参与巨核细胞向产板巨核细胞分化的过程, 及 TBXAS1 突变是否抑制血小板的激活和聚集, 我们在后续细胞实验中进一步验证。

本研究在一例遗传性血小板减少症 (HT) 家系中发现三例血小板减少患者的血小板形态未见明显异常, 骨髓涂片及骨髓活检组织中见到的少分叶及分叶不良巨核细胞不具有特异性, 产板巨核细胞比例减少, 需要结合病史和其他实验室检查与 ITP 和 MDS 等疾病进行鉴别诊断。

HT 是一类明显异质性疾病, 出血严重程度与血小板减少程度不符。患者血小板形态和数量正常, 家族史阳性并非诊断必要条件, 因此基因检测是确诊遗传性血小板减少症的重要手段之一^[5-7]。

综上所述: HT 的诊断需要依靠详细的病史、家族史, 结合外周血涂片及基因检测, 必要时完善骨髓细胞学以排除 ITP 和 MDS 等其它免疫相关血小板减少症。当出现家族中有不明原因血小板减少并对激素、丙种球蛋白治疗效果不理想时, 需进一步完善外周血、骨髓细胞学检查及基因检测以明确诊断。重视形态学检验及夯实检验医生的临床知识储备, 有望提高遗传性血小板减少症等相关罕见疾病的检出率^[8-10]。

参考文献:

- [1]Wilcox DA. Megakaryocyte- and megakaryocyte precursor-related gene therapies. *Blood*. 2016;127(10):1260-1268.
- [2]MacLachlan, A, S.P. Watson and N.V. Morgan, Inherited platelet disorders:InsigIT from platelet genomics using next-generation sequencing. *Platelets*, 2017;28(1): p14-19.
- [3]Selina A, Kandagaddala M, Madhuri. A Recurrent Biallelic Pathogenic Variant in TBXAS1 Gene Causing Ghosal Hematodysplasia. *V.Indian J Pediatr*. 2021;88(4):p381-382
- [4]Noris P, Pecci A. Hereditary thrombocytopenias: a growing list of disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017;2017(1):385-399.
- [5]施慧萍, 王兆钱, 新一代测序技术在遗传性血小板病基因诊断中的应用. *中国实验血液学杂志*, 2018. 26(1):

278–282.

[6]Almazni I, Stapley R, Morgan NV. Inherited Thrombocytopenia: Update on Genes and Genetic Variants Which may be Associated With Bleeding. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:80. Published 2019 Jun 19.

[7] Greinacher A, Pecci A, Kunishima S, et al. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *J Thromb Haemost.* 2017;15(7):1511–1521.

[8] 师晓东, 师丽晓, 加强对血小板减少症的遗传学诊断. *中国医刊*, 2017.52(4): 3–6

[9]Palma-Barqueros V, Revilla N, S á nchez A, et al. Inherited Platelet Disorders: An Updated Overview. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4521. Published 2021 Apr 26.

[10] 陈子兴, 巨核细胞发育和血小板生成的调控机理及巨核细胞和血小板的临床应用. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(10): 1901–1908.

作者简介:

李芳 (1977—), 女, 硕士, 主任医师, 研究方向临床血液学实验诊断。

基金项目:

宁夏自然科学基金项目 (2023AAC03501)。