中国儿童Blau综合征患者基因突变及临床表型研究

李彩凤*, 张俊梅, 李士朋, 韩彤昕, 邝伟英, 周怡芳, 邓江红, 檀晓华

国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院风湿免疫科, 北京 100045

* 联系人, E-mail: caifeng_li@yeah.net

收稿日期: 2018-07-02; 接受日期: 2018-07-11; 网络版发表日期: 2018-09-11

中华医学会临床医学专项资金(批准号: 12040690369)资助

摘要 研究30例中国儿童Blau综合征患者半胱天冬酶募集域基因15(CARD15)突变情况和临床表型. 共发现10个突变位点, R334W, R334Q, G481D, M513T和R587C在国外均有报道, R334L, E383D, R471C, C495R, D512F为新发现的突变位点, 其中R334W, R334Q和C495R发生频率最高. Blau综合征生后早期发病, 最常以鳞屑样皮疹和对称性关节炎起病. 除典型皮疹、关节炎和虹膜睫状体炎外, 大动脉炎、心脏受累也易出现. 此外还发现有神经性耳聋、肾脏受累、软骨瘤、中枢神经系统受累的患者. 中国儿童Blau综合征患者有独特的基因突变位点, 临床表型复杂多样, 对于疑似患者应尽早行病理检查或CARD15基因突变检测来确诊.

关键词 Blau综合征, 基因突变, 临床表型

1985年, Edward Blau^[1]描述了4代11位家族成员患有皮肤、关节和眼睛的肉芽肿性疾病. 后发现类似症状有以家族形式发病者, 也有以散发形式发病者, 现统一命名为Blau综合征^[2,3]. Blau综合征是以肉芽肿性多关节炎、眼葡萄膜炎和皮疹三联征为特点的早期发病的自身炎症性疾病. 目前全世界报道Blau综合征患者200余例, 无明显种族和性别差异.

Blau综合征是5岁以前发病的以肉芽肿性关节炎、色素膜炎和皮疹典型三联征为主要表现的呈常染色体显性遗传的慢性炎症性疾病, 目前发病率尚不清楚. 其中有以家族形式发病者, 也有以散发形式发病者. 本病发病与半胱天冬酶募集域基因15(Caspase Recruitment Domain, CARD15)突变有关. Blau综合征临床表

现复杂多样, 脏器受累及严重程度各不相同. 本研究对我院收集的30例儿童Blau综合征患儿进行CARD15基因突变分析, 并回顾性分析其临床表现和脏器受累情况, 从而发现中国儿童Blau综合征患者CARD15基因突变和临床表型特点.

1 材料与方法

1.1 对象

2006年11月至2016年12月在北京儿童医院风湿免疫科住院确诊的30例儿童Blau综合征患者, 至少具有典型的囊样肿胀性关节炎、色素膜炎和鱼鳞病样皮疹三联征之一, 皮疹或关节滑膜病理证实均为非干酪样

引用格式: 李彩凤, 张俊梅, 李士朋, 等. 中国儿童Blau综合征患者基因突变及临床表型研究. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 962–966, doi: [10.1360/N052018-00130](https://doi.org/10.1360/N052018-00130)

英文版见: Li C F, Zhang J M, Li S P, et al. Gene mutations and clinical phenotypes in Chinese children with Blau syndrome. Sci China Life Sci, 2017, 60: 758–762, doi: [10.1007/s11427-017-9090-6](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9090-6)

肉芽肿性病变. 其中男16例, 女14例, 男:女为1.14:1; 年龄为1岁1月至13岁2月, 平均年龄4岁6月; 病程10个月至12年2月.

1.2 *CARD15*基因突变检测

经患儿家长知情同意后取患儿外周血1 mL, 以0.5 mL EDTA溶液抗凝, 常规盐析法提取基因组DNA.

(1) 引物设计. 应用美国Whitehead生物医学研究所基因研究中心的Web服务器提供的软件组中的Primer 3软件, 根据已知*CARD15*外显子4序列按引物设计原则进行引物设计. 引物序列及扩增片断长度见附表1(电子版), 由北京赛百盛基因技术有限公司合成, *T_m*值为57.3~59.4°, 用上游引物进行测序.

(2) PCR扩增. 50 μ L PCR反应体系中, 去离子水31.6 μ L, 10 $\times$ Buffer 5 μ L, dNTP混合物4 μ L, 正反向引物各2 μ L, DNA聚合酶0.4 μ L, 基因组DNA 5 μ L, 以上反应物购自宝生物工程(大连)有限公司. 采用美国MJ公司自动扩增仪, 扩增条件统一为: 95°C预变性2 min, 94°C变性1 min, 60°C复性1 min, 72°C延伸1 min, 共35个循环, 最后72°C再延伸5 min, 产物用琼脂糖凝胶电泳, EB染色, 紫外光下鉴定产物.

(3) 测序. PCR扩增产物经Multiscreen纯化板纯化后, 取以上纯化产物2 μ L为模板, 用ABI PRIMERTM, Big-Dye末端标记试剂盒, 以PCR反应正向引物进行测序, 反应体系10 μ L, 应用ABI 3730自动测序仪完成. 应用chromas231软件对测序图进行分析, 应用DNAMAN软件进行序列对比. 对于测序结果不十分明确, 可疑为突变位点时, 再以反向引物进行测序.

1.3 临床表型分析

收集30例儿童Blau综合征患者完整的临床资料, 对其发病年龄、首发表现、临床表现、脏器受累情况进行归纳总结. 所有临床资料和发现的基因突变均已被收入罕见病资料库(<http://www.pediascape.org/eram/>). 我们申明本研究无任何利益争议, 并且均已签署知情同意书.

2 结果

2.1 *CARD15*基因突变

经测序共发现10个突变位点, 分别为1000C/T

(R334W)、1001G/A(R334Q)、1001G/T(R334L)、1149G/T(E383D)、1411C/T(R471C)、1443G/A(G481D)、1483T/C(C495R)、1538C/T(M513T)、1759C/T(R587C)和1534-5AG/TT(D512F), 测序峰形图详见图1. 其中, 1411C/T(R471C)为纯合突变, 其他位点均为杂合突变.

以上10个突变位点中, R334W, R334Q, G481D, M513T和R587C在国外均有报道, R334L, E383D, R471C, C495R, D512F为在中国儿童Blau综合征患者新发现的突变位点. 30例患者中有7例发生R334W突变, 4例发生R334Q突变, 3例发生C495R突变, 表明R334W, R334Q和C495R是中国儿童Blau综合征患者最常见的基因突变位点.

2.2 临床表型

(1) 起病情况. 30例患儿均为生后早期起病, 最早者生后即发病, 最晚发病时间为3岁6月. 以反复发作的鳞屑样皮疹起病的有23例患儿(76.7%), 其他7例患儿(23.3%)以囊样肿胀性关节炎起病. 患儿症状反反复复, 随着病程进展, 逐渐出现其他临床表现.

(2) 临床表现和脏器受累. 30例儿童Blau综合征患者临床表现和脏器受累情况详见表1. 所有患儿均有关节炎, 关节症状多数于3岁以内出现, 仅1例患儿于8岁时出现. 关节炎表现为对称性多关节炎, 大小关节均可受累, 关节周围可见多个大小不等的囊样包块, 受累关节无明显疼痛和活动受限(图2), 最常受累的关节依次为踝关节(90%)、腕关节(76.7%)、膝关节(66.7%)和指间关节(50%).

30例患儿中27例有典型的皮疹, 主要表现为细碎的鳞屑样皮疹或粉红色/棕褐色的丘疹样皮疹, 常见于面部、躯干和四肢, 可以反复发作(图3).

19例患者有虹膜睫状体炎, 病程早期可仅表现为角膜云翳、角膜充血或角膜白斑, 逐渐加重出现虹膜睫状体炎、青光眼、白内障等病变, 常为双侧, 其中2例患儿单眼病变重, 仅存微弱的光感.

此外, 除典型的三联征外, 本研究发现15例患儿有肝脾和淋巴结的无痛性肿大, 13例患儿存在不同程度发热, 多为低中度发热, 抗感染治疗无效. 8例患儿存在大动脉炎, 其中4例合并高血压, 2例有严重的肾动脉狭窄. 心脏受累患者有5例, 主要表现为心包积液、左室内径增大. 3例患儿存在神经性耳聋. 2例患儿合并肾

图 1 中国儿童Blau综合征患者*CARD15*基因突变位点(1)~(10)

图 2 儿童Blau综合征患者受累关节表现

脏病变, 临床主要表现为镜下血尿. 2例患儿合并软骨瘤. 1例患儿出现中枢神经系统脱髓鞘病变, 但是无明显

显的神经系统症状, 行常规头颅核磁检查发现, 经治疗后复查病变消失. 30例患儿均无肺部病变.

(3) 辅助检查. 在疾病发作期可有血常规白细胞升高($10.13 \sim 15.1 \times 10^9/L$)、血小板升高($304 \sim 571 \times 10^9/L$), 疾病缓解期可降至正常. 可有轻中度贫血, 血色素为 $80 \sim 120 \text{ g/L}$. 血沉、CRP和纤维蛋白原等炎性指标也可不同程度地升高, 经治疗可降至正常. 所有患儿的ANA, ds-DNA, RF, ANCA均为阴性. 30例患儿的关节影像学检查均未见到骨质破坏.

3 讨论

Blau综合征是常染色体显性遗传性疾病, 研究表明其致病基因是位于16p12.1-13的半胱天冬酶募集域基因15(*CARD15*)^[4], 即*NOD2*基因. 迄今为止, 在不同种族和地区已报道Blau综合征相关的*CARD15*基因突

表 1 30例儿童Blau综合征患者临床表现

临床表现	例数	百分比
关节炎	30/30	100%
不同皮疹	27/30	90.0%
虹膜睫状体炎	19/30	63.3%
肝脾淋巴结肿大	15/30	50.0%
发热	13/30	43.4%
大动脉炎	8/30	26.7%
心脏受累	5/30	16.7%
神经性耳聋	3/30	10.0%
肾脏受累	2/30	6.7%
软骨瘤	2/30	6.7%
中枢神经系统受累	1/30	3.3%
肺脏	0/30	0.0%

图 3 儿童Blau综合征患者皮疹表现

变位点有10余种. 其中R334W, R334Q和L469F是最早发现的基因突变位点^[5], R334W和R334Q也是已发现突变位点中出现频率最高的, 达50%以上^[6,7]. van Duist^[8]对一个意大利Blau综合征的家系研究发现一个新的突变位点, 即E383K. Milman等^[9]报道了一个T605N所致的Blau家系. 对散发性Blau综合征患者的进一步研究发现了更多的突变位点, 如D382E, E383G, G464W, G481D, W490L, C495Y, H496L, M513T, R587C, T605P, A612T和N670K.

在本项研究中, 共检测到10个突变位点. R334W,

R334Q, G481D, M513T和R587C在国外均有报道, R334W和R334Q突变是最常见的突变位点, 这与国外的研究结果一致. R334L, E383D, R471C, C495R, D512F为在中国儿童Blau综合征患者新发现的突变位点, 可能与种族有关, 有待进一步扩大样本量来证实.

Blau综合征患者发病年龄小, 本研究中患者最晚发病年龄是3岁6月. 本病以鳞屑样皮疹起病者居多, 生后早期出现, 反反复复, 其次是关节炎, 随着病程进展逐渐出现眼葡萄膜炎及其他脏器受累. 但是本研究发现, Blau综合征并不一定都具备典型的三联征, 所有患儿都有关节炎表现, 极少数患儿无典型皮疹, 50%以上患儿出现虹膜睫状体炎.

自20世纪80年代开始, 陆续有家族性肉芽肿性大动脉炎伴多关节炎病例的报道, 甚至合并大动脉瘤^[10-12], 近年Khubchandani^[13]报道了一例有大动脉炎的Blau综合征患儿, 并发现大动脉炎这一临床表型可能与G464W突变有关. 本研究中有8例患儿存在大动脉炎, 提示大动脉炎也是Blau综合征的常见临床表现, 中等大血管均可受累, 其中2例有严重的肾动脉狭窄. 本研究中心心脏受累患者有5例, 主要表现为心包积液、左室内径增大、心功能减退. 此外, 本研究中还发现有2例患儿有镜下血尿, 提示肾脏受累, 必要时可行肾活检明确肾脏病理表现. 2例患儿合并软骨瘤, 国外目前尚无Blau综合征合并软骨瘤的报道. 本研究发现1例患儿存在中枢神经系统脱髓鞘病变, 国外也有报道Blau综合征患者出现中枢神经系统受累的临床表现^[14]. 近期Kamio等^[15]报道了一例Blau综合征合并腿部难治性皮肤溃疡的患者. 国外曾有报道一例有R334Q突变的Blau患者存在肺部间质改变^[16], 但本研究中30例患儿均无肺部受累的表现和影像学依据.

Blau综合征实验室检查可有轻度贫血, 血常规白细胞、血小板、血沉和CRP可升高. 所有患者自身抗体均为阴性. Blau综合征除典型临床表现外, 确诊需要通过皮肤或滑膜活组织检查以及基因检测来确诊.

Blau综合征临床表现复杂多样, 脏器受累轻重不等, 尤其在三联征不典型时容易误诊或漏诊. 当患者出现单一鳞屑样皮疹或对称性囊样关节炎时应尽早完善病理活检或基因检查以明确诊断. 诊断明确后尽早给予治疗可明显改善症状, 减少重要脏器损害程度, 提高生活质量.

参考文献

- 1 Blau E B. Familial granulomatous arthritis, iritis, and rash. *J Pediatrics*, 1985, 107: 689–693
- 2 Sfriso P, Caso F, Tognon S, et al. Blau syndrome, clinical and genetic aspects. *AutoImmun Rev*, 2012, 12: 44–51
- 3 Wouters C H, Maes A, Foley K P, et al. Blau syndrome, the prototypic auto-inflammatory granulomatous disease. *Pediatr Rheumatol*, 2014, 12: 33
- 4 Tromp G, Kuivaniemi H, Raphael S, et al. Genetic linkage of familial granulomatous inflammatory arthritis, skin rash, and uveitis to chromosome 16. *Am J Hum Genet*, 1996, 59: 1097–1107
- 5 Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, et al. *CARD15* mutations in Blau syndrome. *Nat Genet*, 2001, 29: 19–20
- 6 Milhøvet F, Cuisset L, Hoffman H M, et al. The infefers autoinflammatory mutation online registry: update with new genes and functions. *Hum Mutat*, 2008, 29: 803–808
- 7 Rodríguez-Pérez N, Aguinaga-Barrilero A, Gorroño-Echebarria M B, et al. Blau syndrome-related *CARD15/NOD2* mutations are not linked to idiopathic uveitis in Spanish patients. *Dis Markers*, 2009, 27: 1–5
- 8 van Duist M M, Albrecht M, Podsiadek M, et al. A new *CARD15* mutation in Blau syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13: 742–747
- 9 Milman N, Ursin K, Rødevand E, et al. A novel mutation in the *NOD2* gene associated with Blau syndrome: a Norwegian family with four affected members. *Scandinavian J Rheumatol*, 2009, 38: 190–197
- 10 Rotenstein D, Gibbs D L, Majmudar B, et al. Familial granulomatous arteritis with polyarthritis of juvenile onset. *N Engl J Med*, 1982, 306: 86–90
- 11 Gedalia A, Shetty A K, Ward K, et al. Abdominal aortic aneurysm associated with childhood sarcoidosis. *J Rheumatol*, 1996, 23: 757–759
- 12 Mourad F, Tang A. Sinus of valsalva aneurysm in Blau's syndrome. *J Cardiothorac Surg*, 2010, 5: 16
- 13 Khubchandani R P, Hasija R, Touitou I, et al. Blau arteritis resembling Takayasu disease with a novel *NOD2* mutation. *J Rheumatology*, 2012, 39: 1888–1892
- 14 Emaminia A, Nia A E, Nabavi M, et al. Central nervous system involvement in Blau syndrome: a new feature of the syndrome? *J Rheumatol*, 2007, 34: 2504–2505
- 15 Kamio Y, Kanazawa N, Mine Y, et al. Intractable leg ulcers in Blau syndrome. *J Dermatol*, 2016, 43: 1096–1097
- 16 Becker M L, Martin T M, Doyle T M, et al. Interstitial pneumonitis in Blau syndrome with documented mutation in *CARD15*. *Arthritis & Rheumatism*, 2007, 56: 1292–1294