

3 个 VHL 综合征家族的基因检测及临床调查

吴鑫尧¹, 陈江明², 赵义军¹, 谢坤¹, 刘付宝¹, 耿小平¹

摘要 目的 明确 von Hippel-Lindau 综合征(VHL 综合征) 家族基因突变及临床表现特点, 筛查出家族内基因突变携带者行临床筛查, 综合家族发病特点行家族健康指导。方法 通过流行病学调查, 共 3 例先证者临床诊断 VHL 综合征。抽取先证者及家族自愿者外周血, 应用聚合酶链反应(PCR) 体外扩增得到 *vhl* 基因片段, 通过测序得到基因信息; 再对家族内具有 *vhl* 基因突变的携带者进行头颅 MRI、腹部 B 超等对全身多系统进行临床筛查; 综合家族发病特点给出家族健康指导。结果 3 例先证者均发现 *vhl* 基因发生突变, 家族 1 中 5 例成员基因阳性, 突变方式为外显子 1 c. 330C > A; 家族 2 先证者外显子 3488delC; 家族 3 发现 7 例基因阳性者, 突变方式为外显子 1 c. 233G > A。其中, 家族成员 III3、3III1、3III4、3IV3 确定为基因突变携带者, 临床检查显示其中 3 例成员已发病, III3 表现为双肾多发囊肿, 胰腺多发囊肿; 3III1 表现为胰腺多发囊肿; 3III4 表现为视网膜血管母细胞瘤、胰腺多发囊肿, 视网膜血管母细胞瘤接受激光治疗。3IV3 由于年龄较小, 临床检查未见明显异常。所有基因携带者接受规范化随访。结论 基因检测可早期确诊 VHL 综合征, 临床上对 *vhl* 基因突变患者需进行严密随访, 从而提高患者治疗效果、延长生存期或改善生活质量。

关键词 VHL 综合征; *vhl* 基因; 基因检测

中图分类号 R 394.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0635-05

von Hippel-Lindau 综合征(VHL 综合征) 是一种常染色体显性基因遗传性疾病, 是染色体 3P25 (OMIM 193300) 长约 10 bp 的 VHL 肿瘤抑制基因突变所致。发生率约 1/36 000, 60 岁之前, 基因外显率达 95%^[1]。临床上常表现为视网膜及中枢神经系统的血管母细胞瘤、肾透明细胞癌、嗜铬细胞瘤和胰腺肿瘤。尽管目前对该病分子生物学的认识以及手术时机的选择有所进展, 但 VHL 综合征患者的平均生存年龄仅 49 岁^[2]。该研究通过对 3 例临床诊

断 VHL 综合征的患者及其家族内 27 例自愿者行 *vhl* 基因检测, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 病例资料 安徽医科大学第一附属医院 2011 年 1 月~2013 年 12 月有 3 例患者临床诊断为 VHL 综合征, 3 个家族共 31 例成员均自愿加入本研究, 签署知情同意书, 抽取每个家族成员外周血 5 ml, 于 -80 °C 冰箱保存, 并收集临床资料。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 用血液基因组 DNA 提取试剂盒 Flexigene DNA kit (Qiagen, 51204) 提取外周血 DNA, 并以电泳检测提取 DNA 纯度, 检测条件为 150 V、100 mA 电泳 20 min, 见图 1。

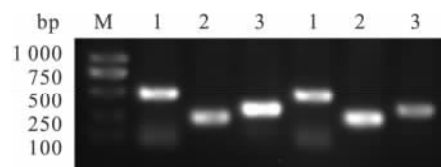


图 1 1% 琼脂糖凝胶电泳观察 DNA 纯度
M: Marker; 1: 外显子 1; 2: 外显子 2; 3: 外显子 3

1.2.2 聚合酶链式反应 (polymerase chain reactions, PCR) 用 Primer 5.0 软件设计引物, 引物涵盖 VHL 基因全部 3 个外显子编码区域, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 见表 1。PCR 将基因组 DNA (100~200 ng) 扩增, 25 μl PCR 反应体系包括: 15.5 μl 蒸馏水, 5 μl 5 × buffer 缓冲液, 1 μl 脱氧核苷三磷酸 (5 mmol/L), 1 μl DNA 模板, 0.5 μl DNA 聚合酶, 40 mmol/L 的上下游引物各 1 μl。PCR 反应扩增条件: 外显子 1 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 20 s, 共 35 个循环, 最终 72 °C 下延伸 10 min。外显子 2 和外显子 3 在 60 °C 下行 PCR 扩增。1% 琼脂糖电泳, 150 V、100 mA 电泳 20 min 后使用紫外凝胶成像仪进行 PCR 结果检测。

1.2.3 PCR 反应纯化及测序 PCR 产物经 AxyPrep-96 Kit 纯化后送生工测序。

1.2.4 测序结果分析 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中找到 VHL 基因, 其包含 3 个

2015-02-13 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1308085MH133)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院器官移植中心, 合肥 230022

²安徽医科大学第二附属医院普外科, 合肥 230601

作者简介: 吴鑫尧, 男, 硕士研究生;

刘付宝, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: liufubao88@163.com

表1 *vhl* 基因外显子片段大小和用于 PCR 扩增及测序的引物信息

外显子	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)
Exon1	F: CCCGGTGGTCTGGATCGCGGAGGGAA	420
	R: GACCGTGTATCGTCCCTGCTGGGTCGG	
Exon2	F: ACCGGTGTGGCTCTTTAACAACCTTTGC	220
	R: ATCCTGTACTTACCAGAACAACCTTATC	
Exon3	F: TGTTCGTTCTTGTACTGAGACCCTAGT	280
	R: TCAAAAAGCTGAGATGAAACAGTCTAAAGT	

外显子共 642 个密码子, 编码 214 个氨基酸(包含末端不翻译氨基酸的 3 个终止密码子), Multalin 方法对测得 DNA 序列比对 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)。测得序列在 <http://web.expasy.org/translate/> 中将可能表达氨基酸翻译, 并与 NCBI 数据库中进行比对。

1.3 临床检查方法 行 VHL 家族调查, 并对家族内基因突变携带者行头颅 MRI、B 超(肝、胆、胰、脾、肾、肾上腺及盆腔)、眼底、血尿常规及尿儿茶酚胺检测。

2 结果

2.1 基因检测结果 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结

果显示均获得预期大小的扩增片段。3 个家族 31 例健在成员均自愿接受基因分析, 并绘制树状图。结果包括先证者在内, 家族 1 中 5 例成员 *vhl* 基因阳性, 家族 2 中 1 例, 家族 3 中 7 例。4 例(1 III 3、3 III 1、3 III 4、3 IV 3) 家族成员确定为基因突变携带者, 3 个家族基因突变方式分别为: 家族 1 外显子 1 第 330 位碱基 A 替换为碱基 C, 导致 *vhl* 基因编码的第 110 个氨基酸组氨酸变为脯氨酸。家族 2 外显子 3 第 488 位碱基 C 缺失, 结果致 *vhl* 编码的氨基酸 162 位以后全部紊乱。家族 3 外显子 1 第 233 位碱基 A 转换为碱基 G, 导致 *vhl* 基因编码的第 98 个氨基酸天冬酰胺酸变为丝氨酸, 见表 2。

表2 3 个家族基因突变位点、家系基因筛查结果以及 VHL 综合征发病类型

项目	已发病 (n)	自愿者 (n)	基因突变位点	氨基酸变化	基因表现型	基因筛查阳性 (n)
家族 1	4	12	ex: 1c. 330C > A	His110Pro	II	5
家族 2	3	2	ex: 3488delC	氨基酸紊乱	II	1
家族 3	4	17	ex: 1c. 233G > A	sn78Ser	II	7

2.2 临床检查

2.2.1 家族调查 家族 1: 先证者 I II 1 男, 48 岁,

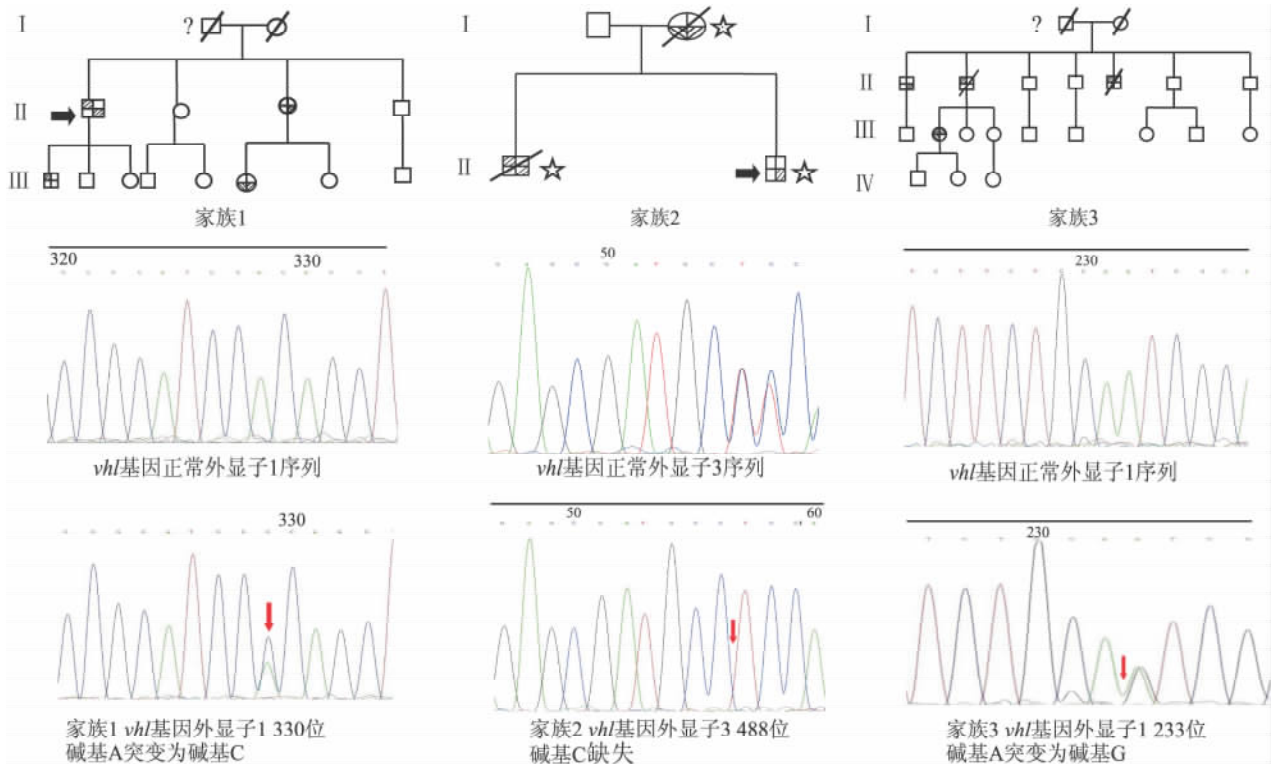


图2 3 个 VHL 综合征家族树状图及各自突变位点

□: 正常男性; ■: 男性中枢神经系统血管母细胞瘤; ▨: 男性视网膜血管母细胞瘤; ▩: 男性胰腺病变; ○: 正常女性; ⊕: 女性中枢神经系统血管母细胞瘤; ⊕: 女性视网膜血管母细胞瘤; ⊕: 女性胰腺病变; ▨: 男性肾脏病变; ⊕: 女性肾脏病变; ☆: 嗜铬细胞瘤; /: 死亡病例; ?: 疑似病例; —: 先证者

1991年因进行性的头痛入安徽医科大学第一附属医院行“小脑血管母细胞瘤切除”,术后恢复良好,至今无复发。患者2003年出现肉眼血尿,行“左肾透明细胞癌切除术”,术后入安徽医科大学第一附属医院泌尿外科二病区规范随访,2007年行“右肾透明细胞癌切除术”2012年行“左腰部转移瘤切除+左侧肾脏肿瘤射频消融”,术后不久发现左侧腰部肿块复合,呈进行性增大,考虑肾透明细胞癌转移,2014年1月行“左腰部肿瘤活检+左肾肿瘤射频消融术”,术后镜检于腰部脂肪组织见透明细胞肿瘤结节。患者1II1因多年头痛48岁去世。患者1II3 47岁,10年前因头晕发现肾上腺嗜铬细胞瘤,双肾多发囊肿,一直保守治疗。2012年因双肾囊肿于南京军区总医院行双肾囊肿开窗引流术,治疗效果不佳,囊肿无法完全根治,在患者诊治期间,其女儿(1III6) 23岁,医生建议后体检发现多囊肝,双肾多发囊肿,至今尚无明显临床症状。先证者儿子(1III1) 25岁,2年前因头晕,行走不稳,入安徽医科大学第一附属医院诊断小脑血管母细胞瘤,手术切除肿瘤,至今无复发。

家族2:先证者2II2,男,45岁,2013年12月因出现肉眼血尿半月余,安徽医科大学第一附属医院诊断多发肾脏占位、肺部转移可能、双侧肾上腺占位,失去治疗时机,现肿瘤前列腺、骨多发转移,于合肥市第五人民医院保守对症治疗,一般状况极差,见图3A。患者2I2 23岁体检发现肾上腺占位、多发胰腺囊肿、多囊肾,并于上海市中山医院行肾上腺嗜铬细胞瘤切除术,胰腺囊肿未予处理。49岁出现血尿,诊断肾癌多发转移,50岁去世。患者2II1,为先证者孪生哥哥,2011年因头晕,行头颅MRI见左侧小脑半球囊性病变,于北京天坛医院行小脑肿瘤切除术,术后证明为血管母细胞瘤。2013年因肾透明细胞癌多发转移去世。

家族3:先证者3III2,女,27岁,2007年因行走不稳诊断小脑肿瘤,见图3B。手术切除后2010年、2013年两次复发,再次手术治疗。先证者左眼视物不清7年,失明1年,一直未予诊治,近期出现左眼胀痛,发作频繁,经指导下检查发现左眼眼底反光异常,正常红光反射消失,网膜可见不规则渗出病灶,静脉淤曲明显,并见自视乳头颞侧生成粗大扭曲滋养血管,并见后极部增殖膜,远端见瘤体,见图3C。先证者父辈发病3例,患者3III 58岁,2014年2月因肉眼血尿1d于淮南市人民医院就诊,诊断双肾多发肾癌晚期,失去治疗时机,纳入随访。患者

3II2,1990年因头晕行小脑肿瘤切除术,1993年肿瘤复发,再次手术切除,因术后出血死亡。患者3II5,15年前因头痛、头晕急性发作,入淮南市矿三院,诊断双肾上腺嗜铬细胞瘤、小脑肿瘤,治疗期间颅内出血死亡。家族成员3III1平日偶感腹胀,症状可自行缓解,未予诊治。

2.2.2 临床检查 对4例(1III3、3III1、3III4、3IV3)基因突变携带者进行头颅MRI(3IV3年龄小于15岁未行MRI检查)、B超(肝、胆、胰、脾、肾、肾上腺及盆腔)、眼底、血常规及尿儿茶酚胺检测,其中3例(1III3、3III1、3III4)携带者检查发现异常。1III3 21岁,腹部CT提示多发胰腺囊肿,见图3D。3III1 33岁,平日偶感腹胀,未予重视,此次基因检查突变阳性后行腹部CT发现胰腺及双肾多发囊肿,见图3E。3III4 22岁,基因检测阳性情况下眼底检查发现双侧眼底视网膜血管母细胞瘤,造影见瘤体及粗大扭曲的滋养血管,见图3F。

3个家族共14例发病患者,男女发病比例4:3,其中3例患者经基因筛查后临床检查证实已发病。14例发病患者首次出现症状的年龄为19~58(30.2 ± 10.7)岁。病变部位包括中枢神经系统血管网状细胞瘤6例、肾透明细胞癌5例、视网膜血管母细胞瘤2例、胰腺多发囊肿6例、肾脏多发囊肿8例、嗜铬细胞瘤5例。中枢神经系统血管母细胞瘤患者除家系3中3II5未手术即死亡外,余患者共7次小脑肿瘤手术,肿瘤平均复发时间5.8年。5例肾透明细胞癌的患者,仅1例患者7年内连续行4次肾脏手术,肿瘤平均复发时间1.75年,余4例均因发现晚而延误治疗。3个家族共5例患者死亡,死亡率35.7%。2例死于中枢神经系统血管母细胞瘤,3例死于肾癌,平均死亡年龄33岁。

3 讨论

VHL综合征是常染色体显性遗传病,因*vhl*肿瘤抑癌基因突变所致,遗传率50%,该抑癌基因包含3个外显子,共转录213个氨基酸。外显子2的表达(亚型I)或不表达(亚型II)导致基因转录为2种不同的剪接RNA。亚型I有2种转录结果:pVHL30和pVHL19,两者在人体组织中均广泛表达并扮演着控制转录伸展率的角色,二者统称为pVHL。低氧诱导因子HIF1和HIF2是DNA结合转录因子,掌控基因转录激活促进细胞在低氧环境下适应及生长。pVHL可与elongin B、elongin C、cullin-2及Rbx1等其他蛋白结合形成复合物VCB-Cu12,

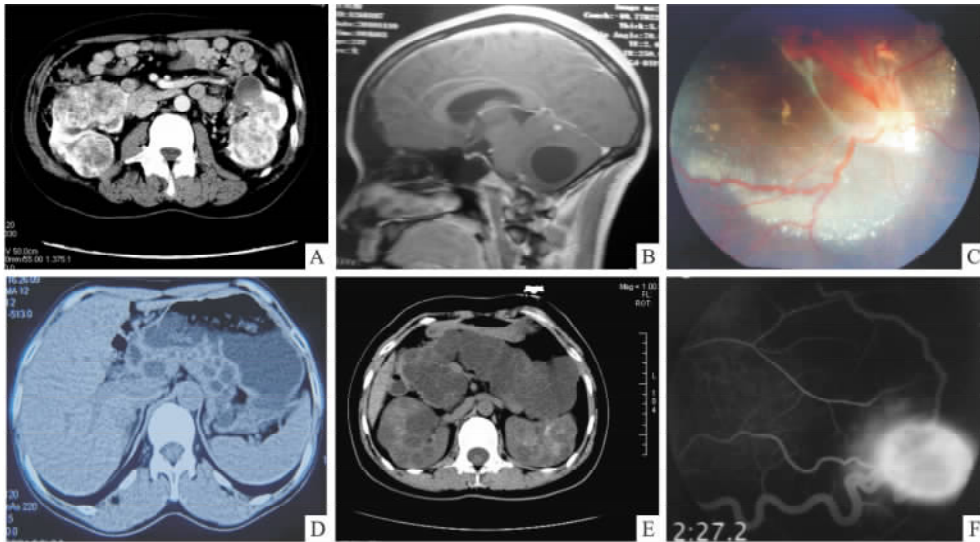


图3 临床检查图像

A: 先证者 2II2 的腹部增强 CT 检查, 见多发肾脏占位、双侧肾上腺占位; B: 先证者 3III2 首次术前头颅 CT 检查, 见小脑肿瘤, 术后病理为小脑血管母细胞瘤; C: 先证者 3III2 眼底检查; D: 基因突变携带者 1III3 腹部 CT 平扫, 可见多发胰腺囊肿; E: 基因突变携带者 3III1 腹部 CT 平扫, 可见胰腺及双肾多发囊肿; F: 基因突变携带者 3III4 眼底造影见视网膜血管母细胞瘤及粗大扭曲的肿瘤滋养血管

表3 3个家族15例基因检测阳性者临床发病特点

家族成员	相关疾病症状及首次发病年龄(岁)					手术次数	死亡年龄(岁)
	CB	RB	PC	CD	Phe		
1III1	27	-	-	35	-	5	-
1III3	-	-	-	37	37	1	-
1III1	23	-	-	-	-	1	-
1III3	-	-	21	-	-	-	-
1III6	-	-	23	23	-	-	-
2I2	-	-	23	49	23	-	50
2III1	40	-	-	43	43	1	44
2II2	-	-	44	44	44	-	-
3III1	-	-	-	58	-	-	-
3II2	28	-	-	-	-	1	30
3II5	25	-	-	-	25	-	25
3III1	-	-	33	33	-	-	-
3III2	20	19	-	-	-	3	-
3III4	-	22	22	-	-	1	-
3IV3	-	-	-	-	-	-	-

CB: 中枢神经系统血管母细胞瘤; RB: 视网膜血管母细胞瘤; PC: 胰腺囊性病; CD: 肾脏病变(肾细胞癌或肾脏囊性病); Phe: 肾上腺嗜铬细胞瘤

继而作用于 HIF1 和 HIF2α 亚基来调节泛素介导的蛋白降解。低氧的环境或 pVHL 丧失及活性下降时, HIF1 和 HIF2 稳定并成为低氧反应的转录因子。这种低氧反应影响了葡萄糖的摄取和代谢, 使血管生成, 形成细胞外基质和细胞增殖, 从而涉及 VHL 综合征相关肿瘤的产生^[3-6]。

张进等^[7]完成了中国9个VHL家族的基因突变研究, 其中错义突变最多(7/9), 突变的位置主要

集中在第1外显子的后1/3。有学者对中国各地共70个家族基因检测结果进行总结, 发现点突变80%, 大片段缺失17.3%, 18个突变位于外显子1(26个家族), 7个突变位于外显子2(7个家族), 11个突变位于外显子3(18个家族), 1个突变位于外显子2, 1个突变位于3'-UTR。可见外显子1和外显子3为突变高发区域(51%)^[8]。本组研究显示第1、3家族均为点突变, 家族突变位点均位于外显子1后2/3, 另1个家族外显子3碱基C缺失。

临床上VHL综合征多采用 Maher et al^[2]提出的诊断标准: ①有家族史, 患中枢神经系统血管母细胞瘤或视网膜血管母细胞瘤、肾细胞癌、嗜铬细胞瘤以及内囊淋巴瘤其中任一疾病, 建立诊断。②无家族史, ≥2种中枢神经系统血管母细胞瘤, 或者有1种中枢神经系统血管母细胞瘤合并一处内脏病变建立诊断。本组3个先证者有明确家族史, 已临床诊断VHL综合征。家族成员1III3、3III1、3III4、3IV3, 基因筛查阳性, 临床检查表明3例家族成员已发病。前2例患者表现为胰腺和肾脏囊肿, 可能为胰腺神经内分泌肿瘤及肾透明细胞癌的癌前病变, 予之随访观察。患者3III4表现为视网膜血管母细胞瘤, 为防止病灶逐渐扩大及相关并发症影响视力, 2014年7月在临床指导下行激光治疗。

研究^[2]显示 *phl* 基因型与临床表现型存在相关性, 基因错义突变所编码的蛋白常表现为嗜铬细胞瘤。本组家族1因外显子1第330位碱基A替换为

碱基 C ,发生错义突变 ,家族 3 因外显子 1 碱基 A 转换为碱基 G ,导致错义突变。但是同一家族之间可见发病的时间与病变累及部位不尽相同。如家族 2 先证者与其孪生哥哥 ,都有肾脏病变及嗜铬细胞瘤 ,但先证者未出现中枢神经系统血管母细胞瘤。

临床调查表明 VHL 综合征具有发病年龄轻、多呈隐匿发病、肿瘤易复发、死亡率高、患者生存时间短的特点。本组 14 例发病患者 ,首次出现症状的平均年龄为 30.2 岁 ,5 例患者出现症状后无法手术治疗。5 例中枢神经系统血管母细胞瘤患者共 7 次小脑肿瘤手术 ,肿瘤平均复发时间 5.8 年。1 例肾透明细胞癌患者 7 年内连续行 4 次肾脏手术 ,肿瘤平均复发时间 1.75 年。5 例患者死亡 ,死亡率 35.7% ,平均死亡年龄 33 岁。

VHL 综合征表现为全身多系统病变 ,病变部分早期隐匿 ,临床上难以早期诊断 ,导致患者治疗效果不佳 ,死亡率高。该疾病在患者家族引起恐慌 ,基因检测可明确诊断并筛选出基因突变携带者 ,消除家族成员恐慌情绪。对基因突变阳性成员进行临床随访 ,可以把握患者治疗时机、提高治疗效果、延长生存时间及提高生活质量。

参考文献

- [1] Maher E R , Iselius L , Yates J R , et al. von Hippel-Lindau disease: a genetic study [J]. *Med Genet* , 1991 28(7) : 443 - 7.
- [2] Maher E R , Yates J R , Harries R , et al. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease [J]. *Q J Med* , 1990 , 77(283) : 1151 - 63.
- [3] Richards F M , Phipps M E , Latif F , et al. Mapping the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene: identification of germline deletions by pulsed field gel electrophoresis [J]. *Hum Mol Genet* , 1993 , 2(7) : 879 - 82.
- [4] McNeill A , Rattenberry E , Barber R , et al. Genotype-phenotype correlations in VHL exon deletions [J]. *Am J Med Genet A* , 2009 , 149A(10) : 2147 - 51.
- [5] Richards F M , Schofield P N , Fleming S , et al. Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis [J]. *Hum Mol Genet* , 1996 , 5(5) : 639 - 44.
- [6] Kaelin W G Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer [J]. *Nat Rev Cancer* 2008 , 8(1) : 865 - 73.
- [7] 张进 , 黄翼然 , 潘家骅 , 等. 中国人 von Hippel-Lindau 综合征种系突变研究 [J]. *中华医学遗传学杂志* , 2007 24(2) : 124 - 7.
- [8] Wu P , Zhang N , Wang X , et al. Family history of von Hippel-Lindau disease was uncommon in Chinese patients: suggesting the higher frequency of de novo mutations in VHL gene in these patients [J]. *J Hum Genet* , 2012 57(4) : 238 - 43.

Mutation analysis and clinical investigation of three Chinese families with VHL disease

Wu Xinyao¹ , Chen Jiangming² , Zhao Yijun¹ , et al

(¹ Organ Transplantation Center , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022;

² Dept of General Surgery , The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230601)

Abstract Objective To detect the genetic mutations of *vhl* gene of three families who were diagnosed in clinical , and screen the carriers for clinical guiding treatment. **Methods** The *vhl* gene was screened for mutation using a direct DNA sequencing analysis for 31 members from three families. The genetic mutations carriers were required to undergo further clinical examination , surveillance and treatment. **Results** The genetic testing results were based on positive three probands. 5 members of family 1 had positive genes , 1 member in family 2 , 7 members in family 3. The position of three von Hippel-Lindau syndrome (VHL) families genes mutations sites was separately on c. 330C > A in exon1 , 488delC in exon3 and c. 233G > A in exon1. In DNA sequencing analysis , we found four potential carriers (1 III3 , 3 III1 , 3 III4 , 3 IV3) and combined with clinical examination , three (1 III3 , 3 III1 , 3 IV3) of them had disease. 1 III3 was diagnosed with multi-cysts on kidney and pancreas , 3 III1 was diagnosed with pancreatic multi-cysts. 3 III4 was diagnosed with retinal hemangioblastoma. We had guided the member 3IV3 for eye surgery. 3IV3 was not found with abnormal symptoms because of her young age. And all of the gene carriers should have the follow-up visit. **Conclusion** Genetic testing can diagnose VHL syndrome early. To improve patients' treatment , prolong survival and improve the quality of life , the patients with *vhl* gene mutations need follow-up closely.

Key words von Hippel-Lindau syndrome; *vhl* gene; gene detection