

PIEZO1 基因突变遗传性口型红细胞增多症 五例报道及文献复习

李园¹ 赵馨¹ 李建平¹ 夏永辉² 李洋¹ 杨文睿¹ 叶蕾¹ 彭广新¹ 韩小兵³
李艳红⁴ 樊慧慧¹ 宋琳¹ 杨洋¹ 周康¹ 熊佑祯¹ 高清妍¹ 武志洁¹
井丽萍¹ 张莉¹ 张凤奎¹

¹中国医学科学院血液病医院(血液学研究所)贫血诊疗中心,天津 300020;²中国医学科学院血液病医院(血液学研究所)检验中心,天津 300020;³河北省迁安市人民医院血液科 064400;⁴河北省迁安市人民医院检验科 064400

通信作者:张凤奎,Email:fkzhang@ihcams.ac.cn

基金项目:国家科技重大专项课题(2017ZX09304024);天津市血液病临床医学研究中心建设项目(15ZXLCYSY00010)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.06.013

Hereditary stomatocytosis with PIEZO1 gene mutations: report of five cases and literature review

Li Yuan¹, Zhao Xin¹, Li Jianping¹, Xia Yonghui², Li Yang¹, Yang Wenrui¹, Ye Lei¹, Peng Guangxin¹, Han Xiaobin³, Li Yanhong⁴, Fan Huihui¹, Song Lin¹, Yang yang¹, Zhou Kang¹, Xiong Youzhen¹, Wu Zhijie¹, Jing Liping¹, Zhang Li¹, Zhang Fengkui¹

¹Therapeutic Center of Anemia, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China; ² Clinical Laboratory Center, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China; ³ Hematology Department, Qian'an People's Hospital, Qian'an 064400, China; ⁴ Clinical Laboratory, Qian'an People's Hospital, Qian'an 064400, China

Corresponding author: Zhang Fengkui, Email: fkzhang@ihcams.ac.cn

遗传性口型红细胞增多症(hereditary stomatocytosis, HSt)是一组以红细胞膜的离子渗透功能异常和成熟红细胞形态改变为特征的罕见遗传性溶血性贫血,包括脱水性HSt[又称遗传性干瘪细胞增多症(hereditary xerocytosis, HX)]和水化性HSt,前者相对多见^[1]。HSt临床表型异质性强而诊断手段有限,容易漏诊或误诊,以致施以不恰当脾切除治疗,增加严重的血栓风险^[2]。本研究我们总结5例PIEZO1基因突变的HSt患者临床资料,现报道如下。

病例与方法

1. 病例:以2014年10月至2017年12月中国医学科学院血液病医院贫血诊疗中心连续收治的5例PIEZO1基因突变的HSt患者为研究对象。该5例患者病史可追溯至孩童时代,溶血原因长期诊断不明,均曾误诊为“遗传性球形红细胞增多症”或“地中海贫血”等。经详细的病史采集(包括家族史)、体格检查、实验室检查并应用二代测序技术(NGS)检测,最终确诊为HX。

2. 实验室检查:应用日本希森美康XN-20全自动五分类血液分析仪,获得平均红细胞体积(MCV)、平均血红蛋白浓

度(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞分布宽度(RDW-SD)、红细胞体积分布宽度(RDW-CV)、红细胞体积分布宽度(RDW-SD)、网织红细胞比例(RET)、网织红细胞绝对值(ARC)和网织红细胞血红蛋白浓度(RET-HE)等参数。外周血涂片采用瑞氏染色,光学显微镜下观察外周血成熟红细胞形态。每次连续计数1000个成熟红细胞,计数其中的典型口型红细胞所占比例。伊红-5-马来酰亚胺(EMA)试验参照文献[3]方法,上流式细胞仪进行检测,定义平均荧光强度(MCF)降低的百分比>16%时为遗传性球形红细胞增多症(HS),<16%为非HS。

3. NGS检测:参照文献[4]方法进行NGS检测,5例样本的平均测序覆盖度为99.64%,平均测序深度为311.58×。将测序结果与dbSNP数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>)、人类基因突变数据库(HGMD)(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)及千人基因组数据库进行比对。确定先证者致病基因型后,对先证者及其父母的外周血DNA进行Sanger测序(由北京迈基诺基因科技股份有限公司完成)。应用MutationTaster和PolyPhen-2软件分别对基因突变位点进行危害性分析,依据突变危害性的预测结果并结合

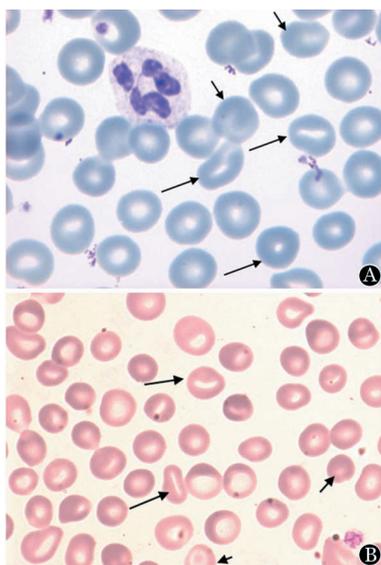
临床等信息,确定致病性突变。

结 果

1. 患者临床特征:5例PIEZO1基因突变的HSt患者中,男4例,女1例,中位确诊年龄23(11~35)岁。全部患者均有不同程度的显性黄疸,尿色加深,劳累或感染后黄疸加重。4例患者脾脏肿大,2例患者有明确的乏力症状,5例患者均无胆石症。5例患者无明确的贫血家族史。

2. 血常规检查:5例患者初诊血常规结果显示,1例患者HGB正常,3例轻度贫血,1例中度贫血,中位HGB为105(70~124)g/L;WBC及PLT正常;网织红细胞明显增多,中位RET为8.08%(5.91%~13.12%),中位ARC为0.254(0.203~0.289) $\times 10^{12}$ /L。中位MCV为98.4(82.8~103.4)fL,中位MCH为35.9(30.6~36.8)pg,中位MCHC为355(344~378)g/L,均接近于正常上限。中位RDW-CV为16.5%(14.6%~18.6%),中位RDW-SD为54.9(43.2~64.4)fL,中位RET-HE为35.9(32.4~37.9)pg, RDW-CV、RDW-SD均升高。

3. 外周血细胞形态学检查:外周血涂片口型红细胞易见,中位比例为14.0%(12.4%~21.0%)。其中例2的外周血涂片尚易见到球形红细胞(图1A),例4的外周血涂片靶形红细胞增多(图1B)。



A: 例2, 易见球形红细胞; B: 例4, 靶形红细胞增多

图1 PIEZO1基因突变遗传性口型红细胞增多症患者外周血涂片红细胞形态(瑞氏染色,高倍,长箭头示口型红细胞,短箭头示干瘪红细胞呈球形改变或靶形改变)

4. 常规实验室检查:5例患者的中位总胆红素(TBIL)为96.4(50.9~252.9) $\mu\text{mol/L}$,中位间接胆红素(IBIL)为80.7(47.7~234.2) $\mu\text{mol/L}$,均明显升高。共3例患者接受血清钾浓度测定,2例血钾浓度正常,1例血钾升高(5.71 mmol/L)。4例检测了血清乳酸脱氢酶(LDH)(正常参考范围:0~246 U/L),其中1例(例2)LDH升高,3例LDH在正常范围。

5例患者红细胞渗透脆性试验(EOF),开始溶血值均在正常范围,除2例完全溶血值减低外,余3例的完全溶血值也在正常范围。3例患者进行了EMA试验,均 $< 16\%$,支持非HS,其中例3高于正常范围,余2例(例1、例5)在正常范围,4例患者进行了酸化甘油试验(AGLT50),均在正常范围。其他溶血试验包括阵发性睡眠性蛋白尿(PNH)克隆、直接抗人球蛋白试验(DAT)、红细胞酶学检测、地中海贫血相关检测均无异常,3例患者进行了腹部B超检查,1例脾脏重度肿大(例1),2例脾脏中度肿大(例3、例5)。3例(例1、例4、例5)患者检测了铁代谢情况,血清铁蛋白(SF)分别为858.4、649.6、512.0 $\mu\text{g/L}$,转铁蛋白饱和度(ISAT)分别为0.65、0.86、0.27。

5. 基因检测结果:5例患者共检出PIEZO1基因的6个位点突变,均呈杂合突变。其中c.7479_7484dup、c.6008C>A为已报道^[5-6]的致病性突变,c.2005G>T、c.7150G>A、c.7219G>A、c.4018C>T 4个位点突变为新发突变,经MutationTaster和PolyPhen-2软件分别进行危害性分析,可引起相应蛋白功能改变,确定为致病性突变。6个位点突变中,小片段插入突变1例和错义突变5例,突变位点涉及PIEZO1基因第16、28、42、50和51号外显子,c.2005G>T、c.7479_7484dup编码的氨基酸位于PIEZO1蛋白胞外区,c.7150G>A、c.7219G>A、c.4018C>T位于胞内区,c.6008C>A位于跨膜区起始位置(近胞浆侧)。其他先天性溶血性贫血致病基因未检出突变。其中2例患者(例1、例2)进行了父母亲代PIEZO1基因突变位点验证,例1为自发突变,另例2遗传自母亲。

讨 论

近年来随着HSt致病离子通道蛋白基因突变的确认和NGS技术的应用,HSt的诊断与鉴别诊断更为便捷、精准。

HSt是罕见的遗传性溶血性疾病,HX是HSt中最常见的亚型。诊断该病主要基于临床特征和外周血红细胞形态。以往认为由于低发病率和临床表型异质性常致该病诊断延误。2018年Kaufman等^[7]报道的近年美国HX发病率为1/8 000,高于经典估测发病率(1/50 000)约6倍,诊断时中位年龄约51岁。本研究中位确诊年龄为23岁,低于Kaufman等^[7]报道,考虑由于采用了NGS检测,提高了诊断效率,简化了诊断流程,降低了鉴别诊断的难度,因而能更早确诊HX。

临床上,HX患者表现为慢性溶血、黄疸,不贫血或贫血较轻,MCV、MCH、MCHC不减低,外周血可见10%以上的成熟红细胞口型改变,红细胞渗透脆性正常或减低,铁代谢检测提示铁过载,本文报告的5例患者均符合HX的临床特征。并应用NGS技术确证了PIEZO1基因突变,明确了诊断。

PIEZO1基因是HX的致病基因之一。PIEZO1基因定位于16q23q24,包含51个外显子,该基因编码的PIEZO1蛋白,主要传导单价离子(如 K^+ 、 Na^+ 、 Li^+ 、 Cs^+)和二价离子(如 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+})^[8]。PIEZO1蛋白是迄今红细胞膜上最

大的离子通道之一,还调控着三磷酸腺苷(ATP)从红细胞释放^[9]。PIEZO1基因突变,可造成PIEZO1蛋白延迟失活,离子通道开放状态延长,引发红细胞胞内过量的钾离子外泄和水分流失,继而RBC形态发生改变。据悉,目前已发现的与HX相关的PIEZO1基因突变共计17种^[5-6,10-12],15种(88.2%)为错义突变。29个独立家系(共133例患者)的HX患者与PIEZO1基因突变相关^[13]。在该133例患者中,以c.7367G>A、c.7463G>A、c.7479_7484dup三种致病性基因突变最为常见。目前已报道的突变位点对应的氨基酸改变多位于PIEZO1蛋白第598位氨基酸至第1358位氨基酸以及第2000位氨基酸至胞浆C末端。

本研究5例患者均检出PIEZO1基因的致病突变,并且不同突变基因型其临床表型稍有差别。2例c.2005G>T基因型的患者黄疸较重,轻度贫血,脾脏中度肿大,MCV接近于正常上限,RDW-CV、RDW-SD、MCHC接近或高于正常上限,其中2例EOF试验提示红细胞脆性减低。基因型c.7150G>A者1例,轻度贫血,黄疸程度轻,MCV接近正常下限,MCHC、RDW-CV高于正常上限,RDW-SD、脾脏大小和EOF均在正常范围。基因型c.6008C>A者1例,中度贫血,黄疸严重,脾脏轻度肿大,MCV、RDW-CV和RDW-SD升高,MCHC、EOF在正常范围。基因型为同时携带c.7479_7484dup、c.7219G>A和c.4018C>T者1例,轻度贫血,黄疸较轻,MCV、RDW-CV及RDW-SD均升高,MCHC正常,EOF提示脆性减低。因而,似乎2例c.2005G>T基因型的患者溶血特征更为突出,但贫血程度较轻,接近于代偿性溶血病,EOF试验检测红细胞脆性减低,提示成熟红细胞脱水程度可能较严重。基因型c.7150G>A者溶血和贫血程度均较轻,这与c.2005G>T者相似;而基因型c.6008C>A者溶血和贫血均突出,较Andolfo等^[5]和Grootenboer等^[14]的表型严重;同时携带c.7479_7484dup、c.7219G>A和c.4018C>T者的溶血和贫血较轻,与本研究中c.7150G>A者表型相近,但与基因型为单独c.7479_7484dup者^[15-16]不同,后者的临床表型较严重。基因型与临床型的关系尚不明确,不同基因型对应的临床表型间的差别,可能源于不同位点突变对蛋白功能的直接影响有异,相同基因型的临床表型不同,可能与调节PIEZO1基因表达的能力不同有关,或者同时携带了其他突变,涉及内含子突变或拷贝数变异(CNV)等。需要进一步进行全基因组测序、PIEZO1蛋白表达水平等方面研究。

目前认为,PIEZO1基因突变所致的HX呈常染色体显性遗传(AD),通常患者伴有类似的家族史。该研究中的5例患者,均无明确的贫血家族史,仍能确定为PIEZO1基因突变的HX。首先,但该5例的突变位点或者为已被证实的致病性突变,或者经MutationTaster软件和PolyPhen-2软件分别进行危害性分析,确定为致病性突变,非单核苷酸多态性(SNP)。其次,例1的突变位点经家系验证属于自发突变,因此无类似家族史;其余未进行家系验证的患者,不能排除自发突变的可能性;最后,携带相同位点突变的基因型而临床表型不同,可能是由于突变位点的表达水平在个体之间

(包括先证者和亲代之间)出现了差异,这也许涉及相关信号通路或者调控基因,确切的机制还需要更深入的基础工作探究和证实。

本研究5例HX患者既往被误诊“遗传性球形红细胞增多症”、“地中海贫血”、“DAT阴性的自身免疫性溶血性贫血”等,或与外周血红细胞形态改变影响有关。HX的外周血红细胞形态有较大变异,可出现小球形红细胞、靶形红细胞或红细胞碎片等特点,这可能与红细胞脱水程度相关,另外,制片条件(例如推片角度、血膜薄厚等)也可能是影响因素,所以细化和统一制片条件是必要的。

总之,HSI是罕见的易误诊的遗传性溶血病,特别是HX,临床表现多样,应用NGS技术可协助诊断并发现新的突变。

参考文献

- [1] Houston BL, Zelinski T, Israels SJ, et al. Refinement of the hereditary xerocytosis locus on chromosome 16q in a large Canadian kindred [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2011, 47 (4):226-231. DOI: 10.1016/j.bcmd.2011.08.001.
- [2] Carli P, Graffin B, Gisserot O, et al. [Recurrence of thromboembolic disease after splenectomy for hereditary xerocytosis] [J]. *Rev Med Interne*, 2007, 28 (12): 879-881.
- [3] 王继英, 郑彬, 赵玉平, 等. 流式细胞术检测伊红-5'-马来酰亚胺标记红细胞在80例遗传性球形红细胞增多症中的诊断价值[J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(7): 598-601. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.015.
- [4] 李园, 彭广新, 高清妍, 等. 应用靶向二代测序诊断疑似先天性贫血46例[J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(5):414-419. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.05.014.
- [5] Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, et al. Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1 [J]. *Blood*, 2013, 121(19):3925-3935, S1-12. DOI: 10.1182/blood-2013-02-482489.
- [6] Beneteau C, Thierry G, Blesson S, et al. Recurrent mutation in the PIEZO1 gene in two families of hereditary xerocytosis with fetal hydrops [J]. *Clin Genet*, 2014, 85 (3):293-295. DOI: 10.1111/cge.12147.
- [7] Kaufman HW, Niles JK, Gallagher DR, et al. Revised prevalence estimate of possible Hereditary Xerocytosis as derived from a large U.S. Laboratory database [J]. *Am J Hematol*, 2018, 93(1): E9-E12. DOI: 10.1002/ajh.24923.
- [8] Gnanasambandam R, Bae C, Gottlieb PA, et al. Ionic selectivity and permeation properties of human PIEZO1 channels [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (5): e0125503. DOI: 10.1371/journal.pone.0125503.
- [9] Cinar E, Zhou S, DeCoursey J, et al. Piezo1 regulates mechano-transductive release of ATP from human RBCs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(38): 11783-11788. DOI: 10.1073/pnas.1507309112.
- [10] Coste B, Mathur J, Schmidt M, et al. Piezo1 and Piezo2 are

- essential components of distinct mechanically activated cation channels [J]. *Science*, 2010, 330(6000): 55-60. DOI: 10.1126/science.1193270.
- [11] Imashuku S, Muramatsu H, Sugihara T, et al. PIEZO1 gene mutation in a Japanese family with hereditary high phosphatidylcholine hemolytic anemia and hemochromatosis-induced diabetes mellitus [J]. *Int J Hematol*, 2016, 104(1):125-129. DOI: 10.1007/s12185-016-1970-x.
- [12] Del Orbe Barreto R, Arrizabalaga B, De la Hoz Rastrollo AB, et al. Hereditary xerocytosis, a misleading anemia [J]. *Ann Hematol*, 2016, 95(9): 1545-1546.
- [13] Andolfo I, Russo R, Gambale A, et al. Hereditary stomatocytosis: An underdiagnosed condition [J]. *Am J Hematol*, 2018, 93(1):107-121. DOI: 10.1002/ajh.24929.
- [14] Grootenboer S, Schischmanoff PO, Laurendeau I, et al. Pleiotropic syndrome of dehydrated hereditary stomatocytosis, pseudo-hyperkalemia, and perinatal edema maps to 16q23-q24 [J]. *Blood*, 2000, 96(7):2599-2605.
- [15] Albuissou J, Murthy SE, Bandell M, et al. Dehydrated hereditary stomatocytosis linked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1884. DOI: 10.1038/ncomms2899.
- [16] Fermo E, Vercellati C, Marcello AP, et al. Hereditary xerocytosis due to mutations in PIEZO1 gene associated with heterozygous pyruvate kinase deficiency and beta-thalassemia trait in two unrelated families [J]. *Case Rep Hematol*, 2017, 2017:2769570. DOI: 10.1155/2017/2769570.

(收稿日期:2018-10-23)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

2019年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

血红蛋白 HGB	辅助性T淋巴细胞 Th细胞	半乳甘露聚糖检测 GM试验
红细胞计数 RBC	调节性T淋巴细胞 Treg细胞	酶联免疫吸附实验 ELISA
白细胞计数 WBC	细胞毒性T淋巴细胞 CTL细胞	噻唑蓝实验 MTT实验
血小板计数 PLT	自然杀伤细胞 NK细胞	磷酸盐缓冲液 PBS
中性粒细胞绝对计数 ANC	白细胞介素 IL	胎牛血清 FBS
丙氨酸转氨酶 ALT	嵌合抗原受体T细胞 CAR-T细胞	乙二胺四乙酸 EDTA
天冬氨酸转氨酶 AST	肿瘤坏死因子 TNF	二甲基亚砷 DMSO
谷氨酰转氨酶 GGT	干细胞生长因子 SCF	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE
碱性磷酸酶 ALP	粒细胞集落刺激因子 G-CSF	美国国家综合癌症网络 NCCN
乳酸脱氢酶 LDH	粒-巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF	国际预后积分系统 IPSS
凝血酶原时间 PT	巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF	国际预后指数 IPI
部分激活的凝血活酶时间 APTT	粒-巨噬细胞集落形成单位 CFU-GM	异基因造血干细胞移植 allo-HSCT
红细胞生成素 EPO	弥散性血管内凝血 DIC	自体造血干细胞移植 auto-HSCT
血小板生成素 TPO	实时荧光定量PCR RQ-PCR	移植物抗宿主病 GVHD
乙型肝炎病毒 HBV	磁共振成像 MRI	人类白细胞抗原 HLA
丙型肝炎病毒 HCV	正电子发射断层扫描 PET	受试者工作特征曲线 ROC曲线
人类免疫缺陷病毒 HIV	荧光原位杂交 FISH	常见不良反应事件评价标准 CTCAE
核因子-κB NF-κB	(1,3)-β-D葡萄糖检测 G试验	

本刊编辑部