

遗传性球形红细胞增多症红细胞膜蛋白基因突变的临床特征研究

孙秀娟 李海燕 李大鹏 刘永泽 张家源 尹颜科
苏明环 潘虹 李秋玲 胡波 刘宏 施均

【摘要】 目的 探讨遗传性球形红细胞增多症(HS)红细胞膜蛋白基因突变与患者临床表现的关系。**方法** 对25例HS患者的HS常见突变进行靶向测序,并根据突变与患者临床特征评估两者相关性。**结果** 25例患者中男13例,女12例,中位年龄20(4~55)岁。中位HGB为105(65~150)g/L,其中代偿性溶血9例,轻度贫血9例,中度贫血3例,重度贫血4例。18例(72%)患者携带与HS致病相关的基因突变,包括6例ANK1突变、6例SLC4A1突变、5例SPTB突变和1例EPB41突变;7例(28%)无相关突变。SPTB突变与SLC4A1突变患者中以男性为主,携带基因突变的HS患者发病年龄($P=0.130$)与HGB水平($P=0.585$)与无突变患者差异无统计学意义,但EMA标记缺失的程度($P=0.015$)、酸化甘油溶血试验(AGLT50)($P=0.032$)以及红细胞渗透脆性试验(Eof)开始溶血浓度($P=0.027$)显著高于无突变患者。**结论** HS红细胞膜蛋白基因突变筛查对明确诊断有指导意义,无突变患者临床溶血表现较轻。

【关键词】 遗传性球形红细胞增多症; 红细胞膜蛋白; 基因突变

Clinical manifestations of erythrocyte membrane protein coding gene mutations in hereditary spherocytosis Sun Xiujuan, Li Haiyan, Li Dapeng, Liu Yongze, Zhang Jiayuan, Yin Yanke, Su Minghuan, Pan Hong, Li Qiuling, Hu Bo, Liu Hong, Shi Jun. Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Shi Jun, Email: shijun@ihcams.ac.cn

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the erythrocyte membrane protein gene mutations and the clinical severity of hereditary spherocytosis (HS). **Methods** Targeted sequencings were performed on 25 HS patients, correlation between HS mutations and patients' clinical characteristics were evaluated. **Results** A total of 25 HS patients were enrolled, including 13 males and 12 females with median age of 20 (4–55) years, including 9 compensatory hemolysis patients, 9 patients with mild anemia, 3 patients with moderate anemia and 4 patients with severe anemia. Of them, 18 patients (72%) harbored HS-related mutations, including ANK1 mutation in 6 cases, SLC4A1 mutation in 6 cases, SPTB mutation in 5 cases and 1 case with EPB41 mutation. Seven patients (28%) didn't carry common HS mutations. SPTB and SLC4A1 mutations mainly affected male patients. There was no significant difference between the age of diagnosis ($P=0.130$) and HGB level ($P=0.585$) in patients with HS mutation and those without mutation, however, the EMA binding fluorescence intensity ($P=0.015$), AGLT50 ($P=0.032$) and Eof minimal hemolytic concentration ($P=0.027$) were significantly different in these two groups of HS patients. **Conclusion** To screen erythrocyte membrane protein coding gene mutations could favor the diagnosis of HS, and patients without mutations have mild clinical phenotype.

【Key words】 Hereditary spherocytosis; Erythrocyte membrane protein; Mutations

遗传性球形红细胞增多症(HS)是一种由于红细胞膜的骨架蛋白缺陷所致的常见遗传性溶血性

贫血,临床主要表现为贫血、黄疸和脾肿大。大部分HS为常染色体显性遗传,少数为常染色体隐性遗传或新生突变所致。目前报道的大多数病例中,与HS发病相关的突变主要发生在ANK1、SPTB、SLC4A1、EPB42和SPTA1基因上,分别导致锚蛋白、β收缩蛋白、带3蛋白、4.2蛋白和α收缩蛋白缺陷或异常,其中以ANK1基因突变最为常见^[1-2]。然而

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.11.008

作者单位:300020 天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(血液学研究所);实验血液学国家重点实验室

通信作者:施均,Email:shijun@ihcams.ac.cn

不同突变与 HS 患者临床表现是否相关尚不明确,目前仍缺乏相关报道。本研究我们对我院近半年收治的 25 例 HS 患者及部分患者亲属的外周血进行 HS 相关基因突变检测,分析突变基因与 HS 患者临床表现的关系,进一步明确不同突变基因的分布情况以及所致红细胞脆性与贫血程度的差异。

病例与方法

1. 病例:收集我院 2017 年 7 月至 2017 年 12 月明确诊断为 HS 的 25 例患者,诊断均符合文献[3]标准。综合 HS 诊断分型标准^[4-5],将 HS 患者分为:①HS 性状/携带者:男性 HGB \geq 120 g/L、女性 HGB \geq 110 g/L;②轻型:男性 HGB 101~119 g/L、女性 HGB 101~109 g/L;③中型:HGB 81~100 g/L;④重型:HGB \leq 80 g/L。

2. 临床表型检测:检测患者 HGB、网织红细胞比值、网织红细胞绝对值(ARC)、EMA 结合试验、酸化甘油溶血试验(AGLT50)及红细胞渗透脆性试验(EOF)等指标。

3. 基因检测:采集患者及部分患者亲属的外周血,置于 EDTA 抗凝管内。标本进行全基因组 DNA 提取后进行片段化处理,利用北京迈基诺基因科技股份有限公司的 NGS+MygenoCap 技术平台对红细胞疾病相关基因 panel,涵盖了鉴别先天性红细胞增多症 panel 相关基因(包括 ANK1、EPB41、JAK2、SPTB、SLC4A1、EGLN1、EPB42、TET2、EPAS1、

EPOR、SPTA1、VHL)进行捕获(少数患者使用了包括更多基因的其他血液系统 panel),通过二代测序分析相关基因的单个碱基置换、碱基插入缺失、基因片段的缺失重复、染色体变异等情况。

4. 统计学处理:应用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,非正态分布的计量资料数据组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、一般资料

25 例患者中男 13 例(52%),女 12 例(48%),中位年龄 20(4~55)岁。中位 HGB 为 105(65~150)g/L,其中代偿性溶血 9 例(36%),轻度贫血 9 例(36%),中度贫血 3 例(12%),重度贫血 4 例(16%)。中位网织红细胞比值为 8.04%(2.74%~18.5%),中位 ARC 为 283.0(71.4~641.9) $\times 10^9$ /L。

二、基因突变

25 例患者中 18 例(72%)携带与 HS 致病相关的基因突变,包括 6 例 ANK1 突变,6 例 SLC4A1 突变,5 例 SPTB 突变和 1 例 EPB41 突变;7 例(28%)未检测到上述 5 种基因突变。18 例携带基因突变的患者中,10 例携带突变来源于父母,2 例为自发突变(表 1)。

三、基因突变与临床表型

1. 基因突变与性别(图 1A):三种重现性突变

表 1 18 例遗传性球形红细胞增多症患者致病相关基因突变情况

例号	基因	核苷酸变化	氨基酸变化	遗传方式	变异来源
1	ANK1	c.3889eIC	p.L1297Cfs*6	AD	自发突变
2	ANK1	c.3753-1G>C	splicing	AD	未知
3	ANK1	c.2682-1G>A	splicing	AD	未知
4	ANK1	c.3509G>T	p.s11701	AD	父亲
5	ANK1	c.2887dupC	p.R963Pfs*195	AD	自发突变
6	ANK1	c.3713C>T	p.A1238V	AD	父亲
7	SPTB	c.4978C>T	p.Q166QX	AD	母亲
8	SPTB	c.154C>T	p.R52W	AD	父亲
9	SPTB	c.3190C>T	p.Q1064X	AD	母亲
10	SPTB	c.1422C>G	p.Y474X	AD	父亲
11	SPTB	c.38562A>G	splicing	AD	父亲
12	SLC4A1	c.2287G>A	p.G763R	AD	未知
13	SLC4A1	c.2287G>A	p.G763R	AD	未知
14	SLC4A1	c.620delG	p.G207Afs*24	AD	父亲
15	SLC4A1	c.6544G>C	p.D2182H	AD	母亲
16	SLC4A1	c.1970C>A	p.s657Y	AD	未知
17	SLC4A1	c.1468C>T	p.R490C	AD	未知
18	EPB41	c.419A>G	p.K140R	AD	母亲

注:AD:常染色体显性异常;未知:父母已死亡,无法检测基因

中,SPTB突变与SLC4A1突变以男性为主(SPTB:男性占80.0%,女性占20.0%;SLC4A1:男性占66.7%,女性占33.3%),ANK1突变患者男女比例相当(男性占50.0%,女性占50.0%)。

2. 基因突变与年龄:携带基因突变的患者中位发病年龄与无相关突变患者相比差异无统计学意义[19.5(4~55)岁对41(18~45)岁, $z = -1.515$, $P = 0.130$]。与其他基因突变患者相比,SLC4A1突变的患者年龄明显偏大[44(14~55)岁对15(4~28)岁, $z = -2.537$, $P = 0.011$](图1B)。携带ANK1突变及SPTB突变患者与携带其他突变患者年龄比较差异无统计学意义。

3. 基因突变与贫血程度:携带基因突变与无相关基因突变患者HGB水平差异无统计学意义[106(73~150)g/L对104(65~123)g/L, $z = -0.545$, $P = 0.585$](图1C)。并且ANK1、SLC4A1及SPTB突变患者与携带其他突变患者比较,贫血程度亦无明显差异。

4. 基因突变与EMA标记缺失程度:携带基因突变患者的EMA标记缺失的程度[33.12%(10.94%~41.27%)]显著高于无相关突变患者[27.25%(-4.8%~33.03%)], $z = -2.421$, $P = 0.015$](图1D)。但是,携带ANK1、SLC4A1及SPTB突变患者与携带其他突变患者比较差异无统计学意义。

5. 基因突变与红细胞渗透脆性:所有患者AGLT50均低于正常值。携带基因突变患者的AGLT50[55(30~90)s]显著低于无相关突变的患者[80(50~120)s], $z = -2.149$, $P = 0.032$](图1E)。但是,携带ANK1、SLC4A1及SPTB突变患者与携带其他突变患者比较差异无统计学意义。

携带基因突变患者的EOF开始溶血盐水浓度[0.48%(0.48%~0.60%)]显著高于无相关突变的患者[0.60%(0.48%~0.60%)], $z = -2.208$, $P = 0.027$](图1F)。但是,携带ANK1、SLC4A1及SPTB突变患者与携带其他突变患者比较差异无统计学意义。

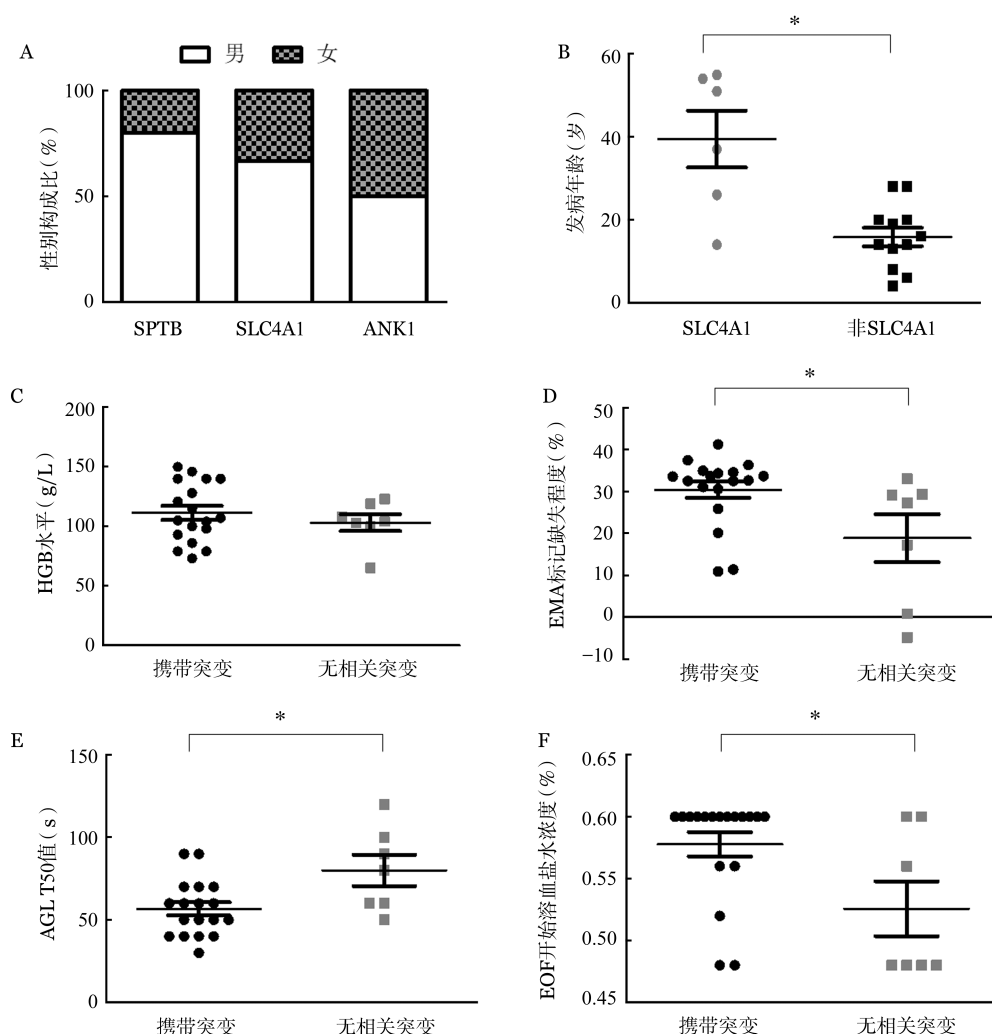
讨 论

HS作为常见的遗传性溶血性疾病,由基因突变引起相应红细胞膜的骨架蛋白缺陷所致。约75%的HS为常染色体显性遗传,25%为常染色体隐性遗传,还有部分为新生突变导致^[6]。不同人群的红细胞膜蛋白缺陷类型有所不同,如日本人多发生4.2蛋白缺陷,韩国人多数为锚蛋白或未明确的膜蛋白发生缺陷,意大利人常见带3蛋白和收缩蛋白缺陷,

而墨西哥人往往发生多种膜蛋白联合缺陷^[7-8]。目前国外报道的大多数病例中,与HS发病相关的突变有ANK1、SPTB、SLC4A1、EPB42和SPTA1,分别导致锚蛋白、 β 收缩蛋白、带3蛋白、4.2蛋白和 α 收缩蛋白缺陷或异常。本研究我们通过对25例HS患者常见相关基因突变进行靶向测序,分析临床表型在携带不同突变患者间的差异,进一步明确不同突变基因的分布情况以及致病强度的差异。

我们的研究发现,72%患者携带HS相关突变,28%患者未检测到常见已知的相关突变,其中最常见的突变分别为ANK1突变(24%)、SLC4A1突变(24%)和SPTB突变(20%),以上基因分别编码锚蛋白、 β 收缩蛋白和带3蛋白缺陷。ANK1基因位于8号染色体P11.2,相对分子质量为 160×10^3 ,含42个外显子,其编码的蛋白称为锚蛋白,主要有3个功能结构域^[9-11]。锚蛋白位于红细胞膜,两端分别与 β 收缩蛋白和带3蛋白相连,起到把膜骨架固定于脂质双分子层的作用^[11]。锚蛋白缺陷会造成膜骨架与脂质双分子层间的垂直相互作用力减弱,造成脂质双分子层的不稳定,进而脱离丢失。ANK1基因突变的HS主要为显性遗传,常见突变类型包括无义突变、移码突变和剪切突变。本研究中6例携带ANK1突变的患者有2例移码突变,2例错义突变和2例剪切突变,未检测到无义突变。其中2例患者父母均不携带该突变,明确为自发突变,其他4例患者因未获得父母亲双方样本无法确定突变来源,与已报道的ANK1自发突变比例高相吻合^[4]。携带ANK1突变的患者发病年龄显著低于未检测到突变的患者($P = 0.001$),但与未发生ANK1突变的其他患者相比年龄上差异无统计学意义($P = 0.126$),可能与本研究入组患者例数较少有关。除此之外,ANK1突变与HS任何临床指标均无显著相关性,说明锚蛋白缺陷导致的HS并无统一的临床表型。

SLC4A1基因位于17号染色体q21,相对分子质量为 18×10^3 ,含20个外显子,其编码的蛋白为带3蛋白,同样包含3个功能结构域^[11]。带3蛋白可以与锚蛋白、4.1蛋白和4.2蛋白相互作用,主要以二聚体或四聚体的形式结合在红细胞膜上,介导阴离子的交换。由于与锚蛋白结合,带3蛋白缺陷能够产生与膜蛋白缺陷相似的影响,最终导致HS的发生。本研究中6例突变患者除1例发生移码突变外,其余5例均为错义突变。带3蛋白往往发生杂合突变,而野生型带3蛋白能够弥补缺陷蛋白的部分功能,导致患者疾病严重程度和确诊率的降低



A: 基因突变与性别的相关性; B: 基因突变与发病年龄的相关性; C: 基因突变与HGB的相关性; D: 基因突变与EMA标记缺失程度的相关性; E: 基因突变与酸化甘油溶血试验(AGLT50)的相关性; F: 基因突变与红细胞渗透脆性试验(EOF)开始溶血浓度的相关性。携带突变: 携带ANK1、EPB41、SPTB、SLC4A1任一基因突变者; 无相关突变: 未检测到ANK1、EPB41、SPTB、SLC4A1基因突变

图1 遗传性球形红细胞增多症患者基因突变与临床特征相关性分析(* $P < 0.05$)

[12], 这与本研究中携带SLC4A1基因突变的患者年龄显著高于未携带SLC4A1基因突变患者的发现相符。此外6例患者中3例发病年龄较低者均在SLC4A1基因突变的同时协同发生其他位点的突变, 1例为SPTA1, 1例为SPTB, 此外还有1例患者因检测了包含更多基因的贫血panel发现携带FANCC、FANCD2、PIGM和TFR2突变, 说明协同突变的发生能够加速SLC4A1基因突变导致的HS表型。对比各临床指标发现携带SLC4A1基因突变的患者红细胞平均血红蛋白量和中位红细胞平均血红蛋白浓度均显著高于未发生该突变的患者, 其发生机制有待进一步研究。

SPTB基因位于14号染色体q23.3, 相对分子质

量为 246×10^3 , 含38个外显子, 编码 β 收缩蛋白, 与锚蛋白和带3蛋白均能相互作用。目前对于 β 收缩蛋白在HS中的研究较少, 仅在一个针对韩国HS患者的研究中报道出现较高的突变率, 且突变跨越整个蛋白功能域[13]。本研究的5例携带该突变患者人群中, 3例发生无义突变, 1例缺失突变, 1例剪切突变。4例患者明确其突变来自于父母亲的其中一方。与前期报道的SPTB突变常见于儿童HS相符[14], 本研究中携带SPTB突变的患者发病年龄显著小于其他患者, 中位发病年龄为14(6~19)岁。患者除该突变外均未检测到其他常见协同突变, 说明SPTB突变导致的HS恶性程度较高。但奇怪的是该突变与HS任何临床指标均无显著相关性, 其

发病年龄小的机制有待深入探索。

除三种重现性突变外,本研究中还有2例患者携带非重现性突变。其中1例13岁女性患者携带来自母亲的EPB41突变,该患者各临床指标接近所有患者平均水平;另1例患者携带ATRX、PIEZO1和PKLR突变,目前尚无与HS的致病相关的报道。该患者血浆游离血红蛋白26.6 mg/L,EMA标记缺失程度0.84%,均为正常水平,但其他表型可以明确诊断其疾病为HS。上述基因突变可能会是导致HS的新突变,其功能和机制尚需进一步挖掘。

此外,本研究中有7例患者未检测到常见HS基因突变,这部分患者的发病年龄显著高于携带突变的患者,且诊断HS的关键临床指标与突变患者相比更接近正常人,提示HS的致病突变主要集中在目前已报道的常见突变中,其他突变或表型疾病严重程度低。

HS是由于基因突变导致红细胞膜蛋白缺陷而产生的溶血性疾病,主要致病基因包括ANK1、SLC4A1、SPTA1、SPTB和EPB42。研究发现不同的人群基因突变模式不同,早期研究通过SDS-PAGE诊断HS发现患者膜蛋白缺陷类型与临床指标无明显关联^[8]。本研究我们通过对25例HS患者的重现性突变ANK1、SLC4A1和SPTB进行研究分析,发现携带不同突变的患者发病年龄具有显著差异,未发生常见突变的患者临床症状较轻。我们的研究说明不同突变对于疾病的严重程度贡献不同,患者在相似的临床表型下可能具有不同的疾病发生机制。该结论提示对常见突变的筛查能够为HS患者的诊断及治疗提供指导。

参考文献

[1] Yang MQ, Laflamme K, Gotea V, et al. Genome-wide detection of a TFIID localization element from an initial human disease mutation[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(6): 2175-2187. DOI: 10.1093/nar/gkq1035.

- [2] Gundel F, Eber S, Heep A. A new ankyrin mutation (ANK1 EXON E9X) causing severe hereditary spherocytosis in the neonatal period[J]. Ann Hematol, 2011, 90(2): 231-232. DOI: 10.1007/s00277-010-0989-y.
- [3] 张之南, 沈悒. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2007: 43-46.
- [4] Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis[J]. Lancet, 2008, 372(9647): 1411-1426. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61588-3.
- [5] Kaushansky, Lichtman, Beutler, et al. Williams Hematology [M]. The McGraw-Hill Companies, 2010: 572-588.
- [6] Tse WT, Lux SE. Red blood cell membrane disorders[J]. Br J Haematol, 1999, 104(1): 2-13.
- [7] Sánchez-López JY, Camacho AL, Magaña MT, et al. Red cell membrane protein deficiencies in Mexican patients with hereditary spherocytosis[J]. Blood Cells Mol Dis, 2003, 31(3): 357-359.
- [8] Mariani M, Barcellini W, Vercellati C, et al. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect[J]. Haematologica, 2008, 93(9): 1310-1317. DOI: 10.3324/haematol.12546.
- [9] 杨旺, 林发全. ANK1基因突变与遗传性球形红细胞增多症[J]. 广东医学, 2015, 36(12): 1942-1944.
- [10] Ipsaro JJ, Huang L, Mondragón A. Structures of the spectrin-ankyrin interaction binding domains[J]. Blood, 2009, 113(22): 5385-5393. DOI: 10.1182/blood-2008-10-184358.
- [11] 马诗玥, 韦红英, 林发全. 遗传性球形红细胞增多症与带3蛋白的相关性研究进展[J]. 广东医学, 2016, 37(18): 2843-2845.
- [12] Delaunay J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders[J]. Blood Rev, 2007, 21(1): 1-20.
- [13] Park J, Jeong DC, Yoo J, et al. Mutational characteristics of ANK1 and SPTB genes in hereditary spherocytosis[J]. Clin Genet, 2016, 90(1): 69-78. DOI: 10.1111/cge.12749.
- [14] Miraglia del Giudice E, Lombardi C, Francese M, et al. Frequent de novo monoallelic expression of beta-spectrin gene (SPTB) in children with hereditary spherocytosis and isolated spectrin deficiency[J]. Br J Haematol, 1998, 101(2): 251-254.

(收稿日期: 2018-04-13)

(本文编辑: 刘爽)