

- IL-4, IL-10, IL-17) and Treg cytokine (TGF-beta1) levels in adults with immune thrombocytopenia [J]. *Pharmazie*, 2014, 69 (9):694-697.
- [8] Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, et al. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22 (10):533-536. DOI: 10.1016/S1471-4906(01)02034-8.
- [9] Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, et al. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2011, 22(3):127-147. DOI: 10.1684/ecn.2011.0288.
- [10] Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, et al. Interleukin 37 is a fundamental inhibitor of innate immunity [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 1014-1022. DOI: 10.1038/ni.1944.
- [11] Chen B, Huang K, Ye L, et al. Interleukin-37 is increased in ankylosing spondylitis patients and associated with disease activity [J]. *J Transl Med*, 2015, 13:36. DOI: 10.1186/s12967-015-0394-3.
- [12] Wawrocki S, Druszczynska M, Kowalewicz-Kulbat M, et al. Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention [J]. *Acta Biochim Pol*, 2016, 63 (1):59-63. DOI: 10.18388/abp.2015\_1153.
- [13] 单宁宁, 王欣, 姜玉杰, 等. ITP 患者脾细胞分泌 IL-18 及 IL-18 结合蛋白的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(4):975-978.
- [14] 宋立军. 免疫调控基因 IL-37 和 TIPE2 在 SLE 患者的表达及其意义 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [15] Prud'homme GJ, Piccirillo CA. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases [J]. *J Autoimmun*, 2000, 14 (1):23-42. DOI: 10.1006/jaut.1999.0339.
- [16] Arandi N, Mirshafiey A, Jeddi-Tehrani M, et al. Alteration in frequency and function of CD4-CD25-FOXP3- regulatory T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2014, 13(2):85-92.
- [17] Andersson J. Cytokines in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) [J]. *Acta Paediatr Suppl*, 1998, 424:61-64.
- [18] Sharma S, Kulk N, Nold MF, et al. The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines [J]. *J Immunol*, 2008, 180 (8):5477-5482. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5477.

(收稿日期: 2017-01-14)

(本文编辑: 徐茂强)

## 二例丙酮酸激酶缺乏症 PKLR 基因突变确证

黄振东 施均 邵英起 聂能 张静 黄金波 李星鑫 葛美丽 郑以州

### Identification and characterization of PKLR gene mutation in two patients with erythrocyte pyruvate kinase deficiency

Huang Zhendong, Shi Jun, Shao Yingqi, Nie Neng, Zhang Jing, Huang Jinbo, Li Xingxin, Ge Meili, Zheng Yizhou

Corresponding author: Zheng Yizhou, Institute of Hematology & Hospital of Blood Diseases, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China. Email: zheng\_yizhou@hotmail.com

丙酮酸激酶缺乏症 (PKD) 是一种常见的遗传性红细胞酶病, 可引起遗传性非球形红细胞溶血性贫血<sup>[1]</sup>。PK 活性检测是诊断 PKD 的传统方法, 然而 PK 活性易受患者年龄、

同工酶代谢及检测方法的影响, 并且部分患者的 PK 活性降低不明显甚至代偿性升高, 给临床诊断带来困难<sup>[2]</sup>。基因检测则不受上述因素的影响, 目前已成为确诊 PKD 的重要手段。我们收治了 2 例先天性溶血性贫血患者, 常规溶血检查均正常, 通过二代靶向测序技术诊断为双重杂合子 PKD。现报道如下并进行文献复习。

### 病例资料

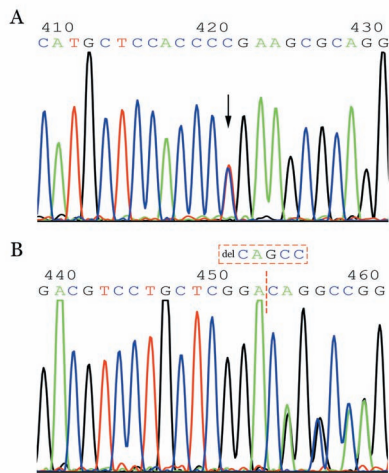
例 1, 女, 3 岁, 籍贯山东。患儿于出生后 24 h 即出现重度黄疸, 总胆红素 (TBIL) 501  $\mu\text{mol/L}$ , 间接胆红素 (IBIL) 482  $\mu\text{mol/L}$ , HGB 60 g/L。考虑为“溶血性贫血”, 给予输注红细胞及对症治疗, 黄疸有所减退。曾于院外行 Coombs 试验、酸溶血试验、红细胞渗透脆性试验 (EOF 试验)、酸化甘油溶血试验 (AGLT<sub>30</sub> 试验) 及红细胞酶相关检查, 均未发现异常。曾给予泼尼松治疗 4 个月, 无效。患儿 1 岁前每月输注红细胞 0.5 U, 2 岁时每月输注红细胞 1 U, 目前 1 个半月输注

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.07.017

作者单位: 300020 天津, 中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院

通信作者: 郑以州, Email: zheng\_yizhou@hotmail.com

红细胞2 U。其父母无黄疸、贫血病史。入院查体:发育正常,中度贫血貌,皮肤与巩膜重度黄染,心尖部可闻及Ⅱ级收缩期杂音,肝脾肋缘下未触及。入院相关检查,血常规示:WBC  $7.24 \times 10^9/L$ , HGB 74 g/L, PLT  $232 \times 10^9/L$ , 网织红细胞比例(Ret) 31.34%。生化检查示:TBIL 111.4  $\mu\text{mol/L}$ , IBIL 102.3  $\mu\text{mol/L}$ , LDH 1 540 U/L。溶血相关检测:EOF试验、伊红-5'-马来酰亚胺标记的流式细胞术(EMA试验)、AGLT<sub>50</sub>试验、Coombs试验、酸溶血试验、冷凝集素试验、变性珠蛋白小体检查、血红蛋白A2定量、抗碱血红蛋白检测、血红蛋白电泳分析、高铁血红蛋白还原试验、热不稳定试验、异丙醇试验、变性珠蛋白试验、葡萄糖-6-磷酸酶活性检测、丙酮酸激酶活性检测、红细胞5'-嘧啶核苷酸酶活性检测均正常。B超检查:中度大,脾长10.4 cm,厚3.4 cm。其父母上述检查均未发现异常。二代靶向测序:检测红细胞膜缺陷相关基因SPTB、SPTA1、EPB41、EPB42、ANK1、SCL4A1;红细胞酶缺陷相关基因PKLR、G6PD、GSS、HK1、NT5C3A;地中海贫血相关基因HBA1、HBA2、ATRX、HBB等。发现PKD相关基因PKLR存在双重杂合突变,分别为第6外显子c.788-792del(p.263-264del)和c.823G>C(p.Gly 275 Arg)(图1)。经千人基因组数据库查询,例1 c.823G>C有相关致病报道<sup>[3]</sup>。应用常规Sanger测序法分别对患者及其父母PKLR基因12个外显子的编码区及其侧翼序列的DNA片段进行测序验证,其结果与靶向测序结果完全一致。从其父亲处遗传c.788-792del,从其母亲处遗传c.823G>C。经SIFT和PolyPhen.2数据库分析表明,这两种突变在人群中的发生率极低,对其进行蛋白质功能预测均显示为有害,考虑为本病的致病基因突变。

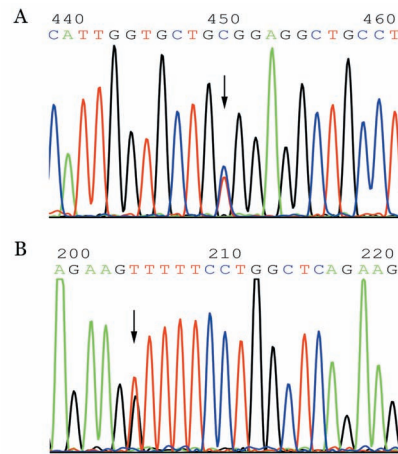


A: c.823G>C 错义突变; B: c.788-792del 缺失突变

图1 例1 PKLR 基因第6外显子突变测序图(箭头所示为突变位点)

例2,男,38岁,籍贯河南。患者30余年前发现皮肤、巩膜黄染,伴有尿色加深,未予重视。入院前8个月无明显诱因突发胸闷、乏力,就诊于当地医院。血常规示:WBC  $3.5 \times 10^9/L$ , HGB 95 g/L, PLT  $139 \times 10^9/L$ 。血生化:TBIL 103.7

$\mu\text{mol/L}$ , IBIL 90.44  $\mu\text{mol/L}$ 。阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)克隆检测、Coombs试验、酸溶血试验均正常。骨髓造血细胞增生活跃。予退黄对症治疗。其父母、5个姐姐及2个哥哥均无贫血、黄疸病史。入院查体:轻度贫血貌,皮肤、巩膜黄染,肝脾肋缘下未触及。入院相关检查,血常规:WBC  $3.53 \times 10^9/L$ , HGB 96 g/L, PLT  $215 \times 10^9/L$ , Ret 4.5%。生化检查:TBIL 73.2  $\mu\text{mol/L}$ , IBIL 58  $\mu\text{mol/L}$ , LDH 186 U/L。上述溶血相关检测均正常。B超检查:脾轻度大,长11.4 cm,厚3.6 cm,伴有胆囊多发结石。其父母相关检查均正常。二代靶向测序:检测上述溶血相关基因,发现PKD相关基因PKLR存在双重杂合突变,分别为第9外显子c.1379T>C(p.Val 460 Ala)和第7外显子c.1045G>T(p.Val 349 Phe)。经千人基因组数据库查询,未发现相关致病报道。Sanger测序法验证表明,患者分别从其父亲处遗传c.1379T>C,从其母亲处遗传c.1045G>T(图2)。经SIFT和PolyPhen.2数据库分析表明,这两种突变在人群中的发生率极低,对其进行蛋白质功能预测均显示为有害,考虑为本病的致病基因突变。



A: 第9外显子c.1379T>C 错义突变; B: 第7外显子c.1045G>T 错义突变

图2 例2 PKLR 基因突变测序图(箭头所示为突变位点)

### 讨论

PKD为常染色体隐性遗传病,是发病率仅次于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)缺乏症的红细胞酶病。于1961年由Valentine等<sup>[4]</sup>首先报道。全球均见报道,大多数分布于北欧,在白色人种中发病率约为1/20万<sup>[5]</sup>。

PKD是由PKLR基因突变所致。PKLR基因位于1号染色体(1q21),编码L-PK与R-PK 2种同工酶。PKLR基因由12个外显子组成,序列全长9.5 kb。迄今为止,国内外已报道了260余种PKLR基因突变,其中大多数为基因编码区的点突变,其次为缺失和插入突变<sup>[6]</sup>。三个最普遍的突变位点依次为c.1529G>A、c.1456C>T和c.1468C>T,而且这些突变有着种族和地区分布特点。c.1529G>A最常见于北美和中北欧,c.1456C>T常见于南欧(瑞士、葡萄牙、意大利等国家),而Zanella等<sup>[7]</sup>报道c.1468C>T亚洲最为常见。但Yavarian等<sup>[8]</sup>对亚洲PKD高发地区伊朗统计发现11号外显

子c.G1168G>A、c.1529G>A突变占54%。Warang等<sup>[9]</sup>报道印度最常见的突变为c.1436G>A(18.33%)、c.A992A>G(11.66%)及c.1456C>T(11.66%)。目前国内只有少数个案报道,包括c.661G>T、c.1528C>T<sup>[10]</sup>、c.119G>A、c.1015G>C、c.941G>C、c.848T>C<sup>[11]</sup>、c.809G>C、c.1330G>T、c.1339C>A<sup>[12]</sup>和c.941T>C<sup>[13]</sup>。

本研究中,2例患者诊断为先天性溶血性贫血,但病因不明,包括血红蛋白、红细胞酶学、红细胞膜异常的相关检查均未发现异常。应用二代靶向测序结合Sanger测序技术检测了先天性溶血的相关基因,发现PKLR基因编码区存在双重杂合突变。其中例1存在c.788-792del缺失突变和c.823G>C错义突变,通过Sanger测序法验证,分别遗传自父亲的c.788-792del缺失突变和母亲的c.823G>C错义突变。而例2也为双重杂合子突变,分别遗传自父亲c.1379T>C错义突变和母亲c.1045G>T错义突变。应用SIFT和PolyPhen-2数据库分析预测4种突变对蛋白质功能均为有害,其中c.823G>C有相关病例报道<sup>[3]</sup>;c.788-792del缺失突变、c.1379T>C错义突变和c.1045G>T错义突变目前未发现相关致病报道。上述3种未见报道的错义突变位点可能为今后PKD的基因诊断提供新的检测证据。

临床上PKD患者多数双重杂合子,纯合子较少。贫血严重程度差异性较大,轻的无贫血表现或轻度贫血;重者自幼发病,需依赖输血维持,主要与PK突变类型有关。本研究2例患者均为双重杂合子发病,父母均为杂合子,无临床表现。而2例患者临床表现差异较大,例1自出生即有重度贫血,频繁输血;而例2并没有明显临床症状,为轻度贫血,考虑与突变位点不同有关。2例患者及其父母常规酶学检测均未发现异常,通过基因检测而确诊。许多PKD患者PK活性下降不明显甚至增高,其确切机制尚不明确,但细胞年龄较轻、溶血发作期、大量新生红细胞进入循环、外周血网织红细胞增多、近期输血等均可导致酶活性升高。此外,PK同工酶中白细胞PKM2活性比红细胞PKR高300倍,白细胞去除不彻底亦可能明显影响酶活性的测定值。上述诸多因素均可影响PK活性。而基因测序检查则不受上述因素干扰。除可提供明确诊断的证据外,同时可发现新的基因突变。尤其是目前的二代测序技术具有速度快、准确率高、成本低、覆盖度广,与生物学表型结合更为直接等优点,能够同时检测大量基因。对于遗传性溶血性疾病及其他遗传性疾病,具有良好的应用潜力,亦为检测PKD相关的基因突变提供了更为准确和直观的诊断依据。

综上所述,二代靶向测序方法可临床用于PKD基因诊断(尤其是常规溶血检查不能确诊的病例),而且有助于发现PKLR基因新型突变类型。本研究中发现的PKLR基因新突变类型c.788-792del缺失突变、c.1379T>C错义突变和

c.1045G>T错义可导致PKD的发生。

## 参考文献

- [1] Tanaka KR, Zerez CR. Red cell enzymopathies of the glycolytic pathway[J]. Semin Hematol, 1990, 27(2):165-185.
- [2] Zanella A, Bianchi P. Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations[J]. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 2000, 13(1): 57-81.
- [3] Zanella A, Bianchi P, Baronciani L, et al. Molecular characterization of PK-LR gene in pyruvate kinase-deficient Italian patients[J]. Blood, 1997, 89(10): 3847-3852.
- [4] VALENTINE WN, TANAKA KR, MIWA S. A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia[J]. Trans Assoc Am Physicians, 1961, 74:100-110.
- [5] Beutler E, Gelbart T. Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gene frequency in the general white population[J]. Blood, 2000, 95(11): 3585-3588.
- [6] Canu G, De Bonis M, Minucci A, et al. Red blood cell PK deficiency: An update of PK-LR gene mutation database[J]. Blood Cells Mol Dis, 2016, 57(3):100-109. DOI: 10.1016/j.bcmd.2015.12.009.
- [7] Zanella A, Fermo E, Bianchi P, et al. Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects[J]. Br J Haematol, 2005, 130(1): 11-25.
- [8] Yavarian M, Karimi M, Shahriary M, et al. Prevalence of pyruvate kinase deficiency among the south Iranian population: quantitative assay and molecular analysis[J]. Blood Cells Mol Dis, 2008, 40(3):308-311.
- [9] Warang P, Kedar P, Ghosh K, et al. Molecular and clinical heterogeneity in pyruvate kinase deficiency in India[J]. Blood Cells Mol Dis, 2013, 51(3):133-137. DOI: 10.1016/j.bcmd.2013.05.006.
- [10] 李栋梁,张静,焦保全,等.一个丙酮酸激酶缺乏症家系PKLR基因的突变分析及产前诊断[J].中华医学遗传学杂志,2016,33(1): 53-56. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2016.01.013.
- [11] 黄小航,李本尚,罗长纓,等. PK-LR基因新突变丙酮酸激酶缺乏患儿经异基因造血干细胞移植治愈[J].国际输血及血液学杂志,2014,37(5): 400-405. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-419X.2014.05.003.
- [12] 曹永彬,李津婴,闵碧荷,等.红细胞丙酮酸激酶缺陷症基因变异型的研究[J].第二军医大学学报,2002,23(9): 963-966.
- [13] 曲莹,何海燕,杜鹃,等.一个Ile314Thr纯合突变所致红细胞丙酮酸激酶缺乏症家系[J].中华血液学杂志,2014,35(7): 601-604. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.07.007.

(收稿日期:2016-12-07)

(本文编辑:刘爽)