

# 遗传性球形红细胞增多症3例全外显子组基因测序报道

沈克锋 高强 王瑾 罗莉 肖敏

华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科,湖北武汉 430030

**摘要** 目的:探讨遗传性球形红细胞增多症(HS)的分子致病机制、临床表现、治疗管理及全外显子组测序(WES)技术的应用价值。方法:采用WES技术对3例HS患者进行基因变异检测,依据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)指南对变异进行致病性评估。查阅HS相关最新文献,对其分子机制、临床表型和治疗管理进行系统综述。结果:3例患者的临床表现(贫血、黄疸、脾肿大)和主要实验室检测结果(如外周血涂片见球形红细胞明显增多)符合典型HS特征,WES分别检测出SLC4A1(p. R808H)、SPTB(p. Y1606<sup>\*</sup>)、SPTA1(p. L2380R)基因突变,口腔黏膜脱落细胞Sanger测序验证均证实为胚系杂合突变,依据ACMG指南均归为致病性突变,其中SPTB(p. Y1606<sup>\*</sup>)和SPTA1(p. L2380R)突变属于新发现的致病突变,丰富了相关基因致病突变谱范围。结论:WES技术可发现新的致病基因突变,在HS的分子诊断、治疗管理和遗传咨询等方面发挥重要作用。

**关键词** 遗传性球形红细胞增多症;全外显子组测序;基因突变;发病机制;临床表现;遗传咨询

**中图分类号** R556.6<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20240305

**Whole exome gene sequencing report of 3 cases of hereditary spherocytosis** SHEN Ke-feng, GAO Qiang, WANG Jin, LUO Li, XIAO Min. Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China

Corresponding author: XIAO Min, E-mail: xiaomin@tjh.tjmu.edu.cn

**Abstract** Objective: To investigate the molecular pathogenesis, clinical manifestations and therapeutic management of hereditary spherocytosis (HS) and the value of whole exome sequencing (WES). Methods: WES technology was used to detect genetic variants in suspected HS patients, and variants were evaluated for pathogenicity according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guideline. The latest literature related to HS was reviewed to provide a systematic review of the molecular mechanisms, clinical phenotypes and therapeutic management. Results: Clinical manifestations (anemia, jaundice, splenomegaly) and major laboratory test results (e. g., markedly increased spherical red blood cells seen in peripheral blood smears) of the 3 patients were consistent with typical HS features, and mutations in the SLC4A1 (p. R808H), SPTB (p. Y1606<sup>\*</sup>), and SPTA1 (p. L2380R) genes were detected by WES, respectively, and Sanger sequencing validation using exfoliated buccal mucosal cells confirmed that all of them were germline heterozygous mutations, and the 3 mutations were classified as pathogenic mutations according to the ACMG guideline. Additionally, the SPTB (p. Y1606<sup>\*</sup>) and SPTA1 (p. L2380R) mutations were newly discovered pathogenic mutations, which expanded the pathogenic mutation spectrum of the related genes. Conclusion: WES can identify novel pathogenic mutations and play an important role in molecular diagnosis, therapeutic management and genetic counseling of HS.

**Key words** Hereditary spherocytosis; Whole exome sequencing; Gene mutations; Pathogenesis; Clinical manifestations; Genetic counseling

遗传性球形红细胞增多症(hereditary spherocytosis, HS)是一组先天性红细胞膜缺陷导致外周血中球形红细胞增多的遗传性疾病,临床表现存在异质性,部分患者可无症状或很轻微,部分患者可能发生重度溶血性贫血而急需输血;典型临床表现为溶血性贫血、脾肿大、黄疸、溶血危象、胆囊结石等<sup>[1]</sup>。

HS致病机制主要是红细胞膜骨架蛋白缺陷,红细胞变形性降低,异常红细胞在脾脏滞留和破坏,导致溶血性贫血、脾脏肿大和胆红素代谢异常等<sup>[2]</sup>;主要致病基因有SPTA1、SPTB、ANK1、SLC4A1、EPB41、EPB42,此类基因主要参与编码红细胞膜骨架蛋白<sup>[1,3]</sup>。近年来,以靶向二代测序、全外显子组测序

(whole exome sequencing, WES)、全转录组测序等为代表的高通量测序技术发展较快,其在血液系统肿瘤或血液系统遗传性疾病中的应用价值日益受到重视<sup>[4,5]</sup>。本研究运用 WES 技术对 3 例 HS 患者基因进行检测,探讨 WES 技术在 HS 辅助诊断、遗传咨询等方面的应用价值,并总结 HS 的新进展。

## 资料与方法

1. 一般资料:选取 2016 年 1 月-2023 年 12 月就诊于华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科的 3 例 HS 患者,分析患者的临床表现、体格检查、家族史、实验室检查、影像学检查及治疗情况等资料,留取患者的外周血和口腔黏膜脱落细胞标本备用。本研究符合《世界医学大会赫尔辛基宣言》等伦理要求,经医院医学伦理委员会批准(批号:TJ-IRB20230821),患者或家属均知情并签署同意书。

2. DNA 提取和 WES 测序:使用 QIAamp DNA Investigator 试剂盒提取总 DNA(德国凯杰公司)。投入 500 ng 提取的基因组 DNA,超声波随机打断成 150~250 bp 的片段,运用 TargetSeq<sup>®</sup> 杂交捕获测序技术(北京艾吉泰康生物科技有限公司)进行全基因组测序文库构建,采用 Nextseq 550 测序平台 150 bp 双端测序(美国 Illumina 公司)。生信分析流程时,FastQC 软件剔除低质量数据,BWA 软件进行生信比对,参考基因组版本为 GRCh37/hg19,GATK(The Genome Analysis Toolkit)工具包进行注释分析等。

3. 致病基因突变位点分析:重点关注遗传性溶血性贫血相关的 33 个基因(ABCB6、ABCG5、ABCG8、ADA、AK1、ALDOA、ANK1、BPGM、CYB5R3、EPB41、EPB42、G6PD、GCLC、GPI、GPX1、GSR、GSS、GYPC、HK1、KCNN4、NT5C3A、PFKM、PGK1、PIEZO1、PKLR、RHAG、SLC2A1、SLC4A1、SPTA1、SPTB、TPH1、UGT1A1、XK),剔除在 gnomAD、ExAC 及 1000G 数据库中碱基频率 >0.01 的突变,SIFT、PolyPhen-2 和 MutationTaster 软件进行功能学预测,检索 ClinVar、OMIM、HGMD 数据库查看收录情况,依据美国医学遗传学与基因组学学会/分子病理学协会(American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, ACMG/AMP)指南<sup>[6]</sup>评估突变致病性,使用口腔黏膜脱落细胞 DNA 标本对致病性突变进行 Sanger 测序验证。

4. 文献综述:查阅 HS 相关文献和本中心诊治经验,总结 HS 的分子致病机制、临床表现和治疗管

理等方面的新进展。

## 结果

### 1. 病例 1:SLC4A1 基因 R808H 突变

患者女,25 岁,因“皮肤巩膜黄染、乏力、脾肿大 10 年”于 2016 年 2 月就诊于华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科。入院查血常规血红蛋白 79.2 g/L、白细胞和血小板计数正常、网织红细胞比例增高,血清胆红素水平增高且间接胆红素增高为主(总胆红素 88.5 μmol/L、间接胆红素 69.4 μmol/L),抗人球蛋白试验(Coombs 试验)阴性,红细胞渗透脆性试验显示红细胞渗透脆性增加(开始溶血 NaCl 浓度 4.9 g/L,正常值 4.2~4.6 g/L;完全溶血 NaCl 浓度 3.5 g/L,正常值 2.8~3.2 g/L),外周血涂片可见成熟红细胞大小不等、球形红细胞占 8.5%,见图 1,腹部超声示脾肿大、胆囊结石。

询问家族史,其父亲有反复巩膜黄染、贫血病史,但未明确诊断和治疗。考虑患者为 HS,征得其同意后,抽取外周血提取 DNA,在本实验室行 WES,检测到 SLC4A1 基因 R808H 杂合突变,并通过口腔黏膜脱落细胞 Sanger 测序验证,见图 1。本例 R808H 突变属于人群罕见突变,未见于 gnomAD、ExAC 及 1000G 数据库;SIFT、PolyPhen-2 和 MutationTaster 软件均预测为有害性突变;在 ClinVar 数据库收录,鉴定为 Pathogenic/Likely pathogenic(no conflicts)。再结合相关病史,依据 ACMG/AMP 指南<sup>[6]</sup>,本例突变归为致病性突变。患者明确诊断为 HS,详细临床资料和治疗情况见表 1。

### 2. 病例 2:SPTB 基因 Y1606\* 突变

患者男,24 岁,因“黄疸、脾肿大 2 年”于 2021 年 6 月就诊于华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科。入院查血常规血红蛋白 61.0 g/L、白细胞和血小板计数正常、网织红细胞比例增高,血清胆红素水平增高且间接胆红素增高为主(总胆红素 103.9 μmol/L、间接胆红素 78.4 μmol/L),Coombs 试验阴性,红细胞渗透脆性试验显示红细胞渗透脆性增加(开始溶血 NaCl 浓度 5.4 g/L,正常值 4.2~4.6 g/L;完全溶血 NaCl 浓度 3.9 g/L,正常值 2.8~3.2 g/L),外周血涂片可见成熟红细胞大小不等、球形红细胞占 24.0%,见图 1,腹部超声示脾肿大、胆囊结石。

考虑患者为 HS,征得其同意后,抽取外周血提取 DNA,在本实验室行 WES,检测到 SPTB 基因 Y1606\* 杂合突变,并通过口腔黏膜脱落细胞 Sanger 测序验证,见图 1。本例 Y1606\* 突变为新检出突

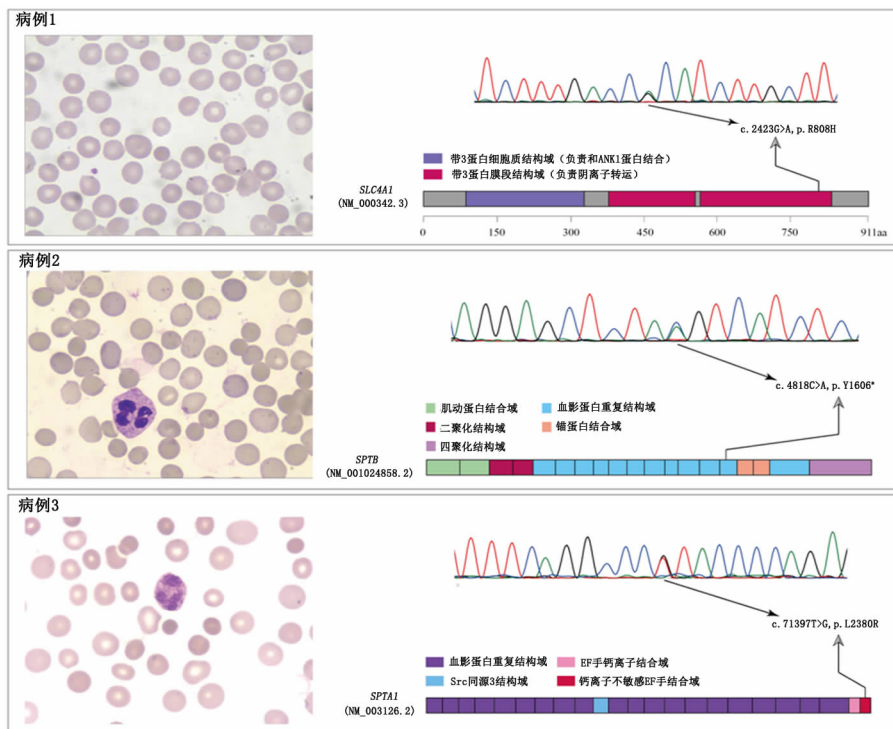


图1 3例HS患者的外周血涂片、致病基因结构示意图及胚系突变Sanger测序验证结果

表1 3例HS患者的临床表现、实验室检测结果及治疗

项目	病例1	病例2	病例3
基因突变	SLC4A1;p. R808H	SPTB;p. Y1606*	SPTA1;p. L2380R
年龄(岁)	25	24	32
性别	女	男	女
临床症状			
脾肿大	有	有	有
黄疸	有	有	有
胆囊结石	有	有	有
实验室检测结果			
RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	2.3	1.8	1.9
HGB (g/L)	79.2	61.0	62.0
MCV (fL) (82.0 ~ 100.0)	80.7	78.2	101.6
MCH (pg) (27.0 ~ 34.0)	29.5	30.2	32.6
MCHC (g/L) (316.0 ~ 354.0)	365.6	386.2	321.0
RDW (%) (< 14.9)	18.3	29.5	24.9
网织红细胞比例 (%)	17.2	22.8	18.9
总胆红素 ( $\mu\text{mol}/L$ )	88.5	103.9	109.4
直接胆红素 ( $\mu\text{mol}/L$ )	19.1	25.5	27.5
间接胆红素 ( $\mu\text{mol}/L$ )	69.4	78.4	81.9
LDH (U/L)	218	242	229
红细胞渗透脆性	↑	↑	正常
Coombs 试验	阴性	阴性	阴性
治疗			
红细胞输注	是	是	是
脾切除术	是	是	是
胆囊切除术	否	是	否

注:Y1606\*为无义突变;RBC为红细胞;HGB为血红蛋白;MCV为平均红细胞体积;MCH为平均血红蛋白含量;MCHC为平均血红蛋白浓度;RDW为红细胞分布宽度;LDH为乳酸脱氢酶。

变,未在 ClinVar、OMIM 等数据库收录;属于人群罕见突变,gnomAD、ExAC 及 1000G 数据库碱基频率 <0.00001;为无义截短型突变,导致 mRNA 转录提前中止,推测为有害性突变。再结合相关病史,依据 ACMG/AMP 指南<sup>[6]</sup>,本例突变归为致病性突变。患者明确诊断为 HS,详细临床资料和治疗情况见表 1。

### 3. 病例 3:SPTA1 基因 L2380R 突变

患者女,32 岁,因“腹痛伴皮肤巩膜黄染 20 余天”于 2022 年 4 月就诊于华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科。既往有反复多次黄疸及腹痛病史,脾肿大,怀疑 HS。入院查血常规血红蛋白 62.0 g/L、白细胞和血小板计数正常、网织红细胞比例增高,血清胆红素水平增高且间接胆红素增高为主(总胆红素 109.4 μmol/L、间接胆红素 81.9 μmol/L),Coombs 试验阴性,红细胞渗透脆性试验结果正常(开始溶血 NaCl 浓度 4.2 g/L,正常值 4.2~4.6 g/L;完全溶血 NaCl 浓度 2.8 g/L,正常值 2.8~3.2 g/L),外周血涂片可见成熟红细胞大小不等、球形红细胞占 6.0%,见图 1,腹部超声示脾肿大、胆囊结石。

征得患者同意后,抽取外周血提取 DNA,在本实验室行 WES 检测到 SPTA1 基因 L2380R 杂合突变,并通过口腔黏膜脱落细胞 Sanger 测序验证,见图 1。本例 L2380R 突变为新检出突变,未在 ClinVar、OMIM 等数据库收录;SIFT、PolyPhen-2 和 MutationTaster 软件均预测为有害性突变。再结合相关病史,依据 ACMG/AMP 指南<sup>[6]</sup>,本例突变归为致病性突变。患者明确诊断为 HS,详细临床资料和治疗情况见表 1。

## 讨论

WES 是一种检测基因组全部外显子区域的高通量测序技术,虽外显子区域只占基因组大小的 1%~1.5%,但约 85% 的人类遗传性疾病致病基因变异发生在外显子区域;相较于其它高通量测序技术,WES 兼具覆盖面广和高效经济的优势,广泛应用于各种遗传性疾病的筛查或产前诊断等<sup>[7]</sup>。HS 是一组编码红细胞膜结构蛋白的基因缺陷导致红细胞由正常的双凹圆盘状变成球形的先天溶血性疾病。球形红细胞变形能力和悬浮稳定性下降,易滞留在脾脏,无法顺利通过脾脏血窦,并被脾脏巨噬细胞识别和破坏,从而发生血管外溶血<sup>[8]</sup>;故 HS 临床多表现为慢性溶血性贫血、脾肿大和黄疸等。

HS 临床表现主要有黄疸(间接胆红素升高导

致)、贫血(面色苍白)、脾肿大(可伴腹痛)、黑色胆色素结石(可继发胆囊炎、胆管结石等)。每例 HS 患者具体临床表现可能存在差异,轻度可无症状或轻微贫血(占 20%~30%),中度主要表现为贫血、黄疸和脾肿大(占 60%~75%),重度可发生溶血危象、宫内胎儿水肿而危及生命(占 <5%)<sup>[9]</sup>;临床表现严重程度主要取决于致病基因型、外显率和临床合并症(如病毒感染)等<sup>[10,11]</sup>。HS 除导致溶血性贫血外,也可导致红细胞膜面积减少,引发肺泡和血液循环中红细胞气体交换效率降低,进一步加重机体缺氧症状<sup>[12]</sup>。此外,球形红细胞顺应性和流动性较差,易沉降堆积在微血管,导致血液粘稠度升高,故 HS 患者易伴随深静脉血栓或心血管疾病<sup>[13]</sup>。大部分 HS 患者可在儿童期或青少年期被诊断,但部分症状不典型患者可能被诊断较晚,或因其它疾病(如胆囊结石)而被意外诊断。

HS 致病机制主要是编码红细胞膜结构蛋白(血影蛋白 Spectrin、锚蛋白 Ankyrin、带 3 蛋白 Band-3 protein、带 4.1 蛋白 Protein-4.1 和带 4.2 蛋白 Protein-4.2)的基因缺陷导致,主要致病基因有 SPTA1(编码 α-spectrin)、SPTB(编码 β-spectrin)、ANK1(编码 Ankyrin-1)、SLC4A1(编码 Band-3 protein)、EPB41(编码 Protein-4.1)、EPB42(编码 Protein-4.2)等<sup>[1,3,9]</sup>。SPTA1 和 SPTB 基因编码 Spectrin 蛋白,其缺陷可导致红细胞质膜和肌动蛋白细胞骨架之间的链接失效或减弱,红细胞正常形态无法维持<sup>[14,15]</sup>。ANK1 基因编码蛋白主要介导红细胞质膜和 Spectrin 蛋白之间的锚定<sup>[15]</sup>。SLC4A1 基因编码的 Band-3 蛋白是红细胞膜中最丰富的蛋白,其缺乏可导致红细胞质膜的脂质稳定性降低和完整性破坏<sup>[16]</sup>。EPB41 和 EPB42 基因编码的 Protein-4.1 和 Protein-4.2 蛋白,也是红细胞膜细胞骨架网络的重要成员蛋白,可调节 Band-3 蛋白和 Ankyrin-1 蛋白之间的链接,在红细胞形态维持和变形性中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。

HS 诊断主要依据实验室辅助诊断检测有:①Coombs 试验阴性(可排除自身免疫性溶血性贫血),红细胞渗透脆性增高(但约患者 25% 假阴性),酸化甘油溶血试验阳性;②红细胞相关参数如血红蛋白减少、平均红细胞体积正常或轻度减少、平均血红蛋白浓度增高、红细胞分布宽度增高、网织红细胞比例增高,间接胆红素增高,游离结合珠蛋白下降,乳酸脱氢酶增高;③外周血涂片可见球形红细胞;④流式细胞术检测伊红-5-马来酰亚胺标记红细胞试验阳性<sup>[18]</sup>;⑤部分患者可能铁过载;⑥基因测序可

检测出 SPTA1、SPTB、ANK1、SLC4A1、EPB41、EPB42 等基因致病性突变。2011 年版英国血液学标准委员会 (British Committee for Standards in Haematology, BCSH)《遗传性球形红细胞增多症诊断和管理指南》<sup>[9]</sup> 推荐:凡是有 HS 家族史、典型 HS 临床表现 (贫血、黄疸、脾肿大等) 和血象参数 (有球形红细胞、平均血红蛋白浓度增高、网织红细胞增高), 无须进一步检查即可明确诊断。

HS 治疗依据 2011 年版 BCSH 指南<sup>[9]</sup> 推荐:① 输血治疗。血红蛋白稳定在 50~60g/L 的 1 周岁以上患者可以不再输血, 减少铁过载和输血相关不良反应。② 药物治疗。对症治疗为主, 补充叶酸等造血原料以防止溶血危象和再障危象, 9 个月龄以下患儿可给予促红细胞生成素 (Erythropoietin, EPO) 促进造血。③ 手术治疗。脾切除可明显改善临床症状, 但有增加感染风险, 主张术前疫苗、术后抗生素预防; 6 岁以下患儿因免疫系统不健全不建议脾切除; 若并发胆石症, 可同时行胆囊切除术。

病例 1~3 的临床表现 (贫血、黄疸、脾肿大) 和外周血涂片见球形红细胞明显增多、WES 检测出致病基因突变等符合典型 HS 特征。但值得讨论的是:① 病例 3 的平均红细胞体积轻度增高和平均血红蛋白浓度正常, 而典型 HS 表现是平均红细胞体积降低和平均血红蛋白浓度升高, 这可能与病例 3 合并有营养性贫血 (如叶酸缺乏) 等其它合并症有关。② SPTA1 基因相关 HS (OMIM# 270970), 遗传模式为常染色体隐性遗传, 而病例 3 是 SPTA1 基因杂合突变, 可能不符合致病模式。但目前已有多个 SPTA1 基因杂合突变导致 HS 发病的病例报道<sup>[11]</sup>, 具体机制有待进一步阐明;③ HS 患者发病年龄偏年轻, 多数处于育龄期和面临生育下一代的问题。75% 的 HS 病例呈常染色体显性遗传 (即后代 50% 的概率再次罹患 HS), 多数患者可有家族史, 家族成员存在遗传咨询的需求。从优生优育的角度, WES 检测可提前筛查出携带致病基因突变的患者和家族中其他暂时无症状但携带致病基因突变的成员, 当有生育意愿时, 可运用试管婴儿技术和产前诊断筛查技术, 根绝致病基因突变在后代中的传播。

#### 参考文献

- 1 Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis [J]. *Lancet*, 2008, 372(9647):1411-1426.
- 2 Eber S, Lux SE. Hereditary spherocytosis--defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer [J]. *Semin Hematol*, 2004, 41(2):118-141.

- 3 He BJ, Liao L, Deng ZF, et al. Molecular genetic mechanisms of hereditary spherocytosis: current perspectives [J]. *Acta Haematol*, 2018, 139(1):60-66.
- 4 Agarwal AM, Nussenzweig RH, Reading NS, et al. Clinical utility of next-generation sequencing in the diagnosis of hereditary haemolytic anaemias [J]. *Br J Haematol*, 2016, 174(5):806-814.
- 5 张炜, 沈克锋, 张美兰, 等. 中国人群中弥漫性大 B 细胞淋巴瘤基于基因变异的分型及其预后意义 [J]. *内科急危重症杂志*, 2022, 28(3):186-190.
- 6 Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the association for molecular pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists [J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(1):4-23.
- 7 Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, et al. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing [J]. *BMC Genet*, 2017, 18(1):14.
- 8 Delaunay J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders [J]. *Blood Rev*, 2007, 21(1):1-20.
- 9 Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, et al. General haematology task force of the british committee for standards in haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis--2011 update [J]. *Br J Haematol*, 2012, 156(1):37-49.
- 10 Tole S, Dhir P, Pugi J, et al. Genotype-phenotype correlation in children with hereditary spherocytosis [J]. *Br J Haematol*, 2020, 191(3):486-496.
- 11 van Vuren A, van der Zwaag B, Huisjes R, et al. The complexity of genotype-phenotype correlations in hereditary spherocytosis: a cohort of 95 patients: genotype-phenotype correlation in hereditary spherocytosis [J]. *Hemisphere*, 2019, 3(4):e276.
- 12 Cynober T, Mohandas N, Tchernia G. Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity [J]. *J Lab Clin Med*, 1996, 128(3):259-269.
- 13 Mozos I. Mechanisms linking red blood cell disorders and cardiovascular diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:682054.
- 14 Chonat S, Risinger M, Sakthivel H, et al. The spectrum of SPTA1-associated hereditary spherocytosis [J]. *Front Physiol*, 2019, 10:815.
- 15 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.
- 16 Qin L, Nie Y, Zhang H, et al. Identification of new mutations in patients with hereditary spherocytosis by next-generation sequencing [J]. *J Hum Genet*, 2020, 65(4):427-434.
- 17 Gallagher PG, Forget BG. Hematologically important mutations: band 3 and protein 4.2 variants in hereditary spherocytosis [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 1997, 23(3):417-421.
- 18 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.