

• 案例分析 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.07.039

全外显子测序鉴定 1 例遗传性球形红细胞增多症 SPTB 基因新突变^{*}温晓君¹, 李志明², 方小武^{1△}

广东省中山市博爱医院:1. 生殖医学中心;2. 产前诊断中心, 广东中山 528403

关键词:遗传性球形红细胞增多症; 全外显子测序; SPTB 基因

中图分类号:R446.11

文献标志码:C

文章编号:1672-9455(2023)07-1020-03

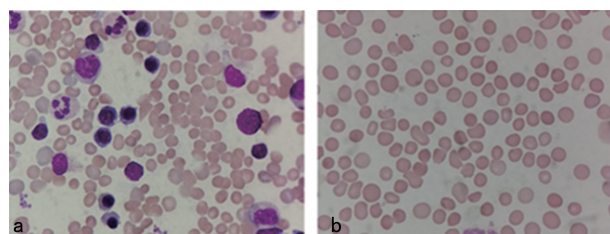
遗传性球形红细胞增多症(HS)是最常见的遗传性溶血性贫血,其特征是外周血涂片上出现球形红细胞,具有广泛的临床表现(无症状到严重溶血),其中贫血、黄疸和肝脾肿大是其典型的表现^[1]。HS在世界各地均有发病,尤其北欧和北美人群更为常见,发病率分别为 1/5 000 和 1/2 000,该病在中国人群中相对罕见,相关研究报道较少^[2]。在临床上 HS 基于多种临床指标进行诊断,具有高度的临床异质性,因此 HS 往往容易被误诊或漏诊^[3],特别是在珠蛋白生成障碍性贫血高发地区。HS 的发病机制是由基因缺陷导致红细胞膜蛋白异常,迄今为止已发现 5 个基因与 HS 有关。本文报道了 1 例中国年轻女性由 SPTB 基因移码突变 c.4967delC(NM_000347)导致的 HS。

1 资料与方法

1.1 一般资料 先证者,女,21岁,因贫血及高胆红素血症入院,发病年龄 18 岁。查体发现肝脾肿大。实验室血液学检查结果:红细胞计数为 $3.43 \times 10^{12}/L$,血红蛋白为 105 g/L,平均红细胞体积为 83.8 fL,平均红细胞血红蛋白含量为 30.6 pg,平均红细胞血红蛋白浓度为 360 g/L,总胆红素为 80.0 $\mu\text{mol}/L$,直接胆红素为 12.9 $\mu\text{mol}/L$,间接胆红素为 67.1 $\mu\text{mol}/L$ 。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)筛查及 Coombs 试验均为阴性。经血红蛋白电泳, α 和 β 球蛋白基因分析排除珠蛋白生成障碍性贫血。红细胞脆性试验显示,开始溶血为 0.50%(正常范围 0.42%~0.46%),完全溶血为 0.36%(正常范围 0.28%~0.32%)。家族史:家庭其他成员经常规检查,表观健康,血液学表型正常。骨髓涂片显示:(1)骨髓增生明显活跃($G=42, E=43, G:E=0.98$);(2)粒系增生,以晚幼、杆状粒细胞为主;(3)红系增生显著,以中、晚幼红细胞为主,成熟红细胞大小不一,球形红细胞较多(图 1a)。外周血涂片显示成熟红细胞形状和大小不同,球形红细胞最常见(图 1b),初步诊断为 HS。

为了进一步明确先证者溶血性贫血类型及发病机制,笔者采用高通量全外显子测序技术(WES)对遗

传性溶血性贫血相关基因进行检测、分析。



注:a为先证者骨髓涂片 Wright-Giemsa 染色;b为先证者外周血涂片 Wright-Giemsa 染色。

图 1 先证者的骨髓和外周血涂片结果

1.2 方法

1.2.1 外周血 DNA 提取 在征得患者及家属知情同意后,抽取先证者及家庭成员外周血 2 mL 于 EDTA 抗凝管中,采用柱式法(Blood Genomic DNA Extraction Kit, Qiagen)提取基因组 DNA,使用 Nanodrop2000 和 Qubit4.0 核酸定量仪进行 DNA 水平和纯度的测定,最后用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 是否降解。

1.2.2 高通量全外显子测序 (1)DNA 片段化:取基因组 DNA 100 ng,利用超声打断仪将其随机打断成 150~200 bp 的片段。(2)文库构建:对打断后的 DNA 小片段进行末端修复、磷酸化以及加 polyA,片段两端分别连接接头后进行纯化,纯化后的每个样本分别加入不同的 index,制备 DNA 文库,最后使用 Qubit4.0 进行文库水平测定。(3)测序上机:根据文库的有效水平及数据产出需求在 illumina HiSeq 测序仪上进行测序。

1.2.3 生物信息学分析 原始数据下机后根据不同样本的 index 标记进行数据拆分,将初始数据进行低质量过滤后,以 NCBI 人类基因组参考序列(hg19, GRCh38)为模板进行比对,采用 BWA 软件对单核苷酸多肽性(SNP)位点进行注释。

1.2.4 基因突变位点致病性评级 根据遗传变异分类标准与指南对突变位点进行致病性评级^[4]。

1.2.5 Sanger 测序进行位点验证 从全外显子测序数据筛选出与先证者临床表型相符的疑似致病变异,

* 基金项目:广东省中山市社会公益与基础研究项目(2022B1002、2021B1082)。

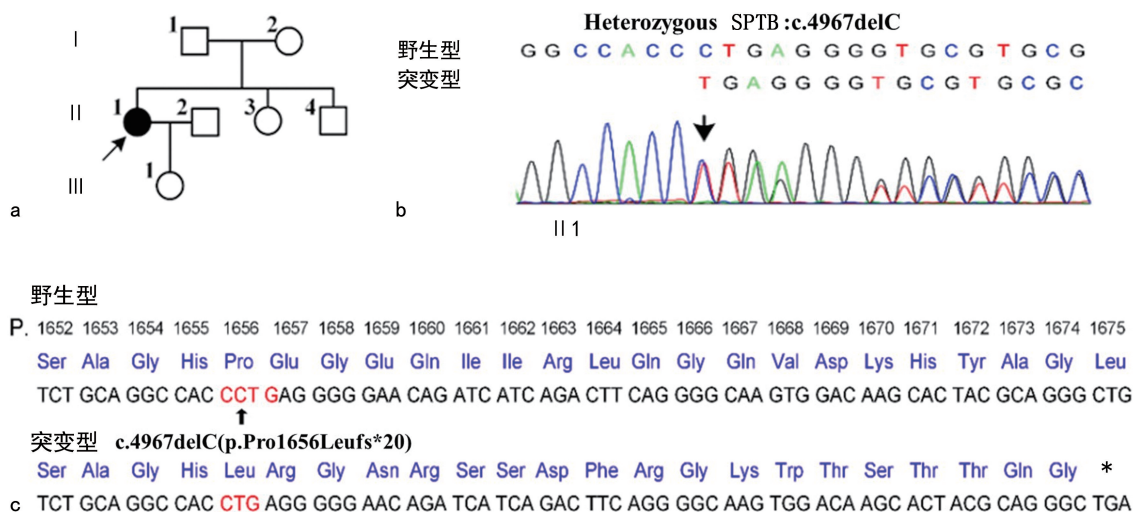
△ 通信作者, E-mail:fxw86@126.com。

再利用 Sanger 一代测序技术对先证者及其家庭成员的外周血 DNA 进行位点验证。SPTB c. 4967delC (NM_000347) 的上游引物: 5'-TGTCCACACAAGC-CTACTCCC-3'; 下游引物: 5'-AGAGCACCAA TTTCCGAAGG-3'。扩增片段长度为 494 bp。扩增体系 25.0 μL: 基因组 DNA 约 30 ng, 10× 扩增缓冲液 2.5 μL, dNTP 混合物 (2.5 mmol/L) 4.0 μL, 上、下游引物 (10 pmol/L) 各 1.0 μL, LA Taq (5 U/μL) 0.5 μL, 用无核酸酶水定容至 25.0 μL。反应条件: (1) 95 °C 变性 5 min; (2) 95 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 循环 35 次; (3) 总延伸 72 °C 5 min。PCR 产物于 ABI3500 测序仪进行测序, 测序结果与 UCSC 数据库中 SPTB 基因序列比对分析。

2 结 果

2.1 Sanger 测序结果及全外显子测序结果

利用 Sanger 测序对先证者及家庭成员中 SPTB 基因突变进行鉴定, 证实了先证者携带该突变, 但家庭其他成员均未携带上述突变。见图 2a。利用全外显子测序对该患者行进一步基因研究发现, 存在 SPTB 基因的 1 个杂合移码缺失 (c. 4967delC/p. Pro1656Leufs * 20), 即在 SPTB 基因 (NM_000347) 第 23 个外显子编码区 4967 位置缺失了 1 个 C 碱基, 使第 1656 位氨基酸由脯氨酸变成亮氨酸, 并在突变点后第 20 位氨基酸提前出现终止密码, 生成一个截短的 mRNA (图 2b 和图 2c)。



注: a 为 HS 家系分析, 黑色代表 HS 患者, 白色代表临床表型正常成员, 箭头代表先证者; b 为 Sanger 测序鉴定了 1 个新发的杂合 SPTB 移码突变 (SPTB:c. 4967delC), 其他家庭成员没有携带这种突变, 黑色箭头代表 c. 4967delC 突变位点; c 为移码突变的氨基酸序列预测, 黑色箭头表示 c. 4967delC 突变位点, * 表示提前终止密码子。

图 2 Sanger 测序结果及 SPTB 基因移码突变的氨基酸序列预测

2.2 基因突变位点致病性评级

(1) PM2: ESP6500 种群、1000 基因组数据、ExAC 数据库, 以及 HGMD、Clinvar、GnomAD 数据库均未发现该突变。(2) PVS1: 该突变为移码突变, 影响蛋白质功能。(3) PS2: 在家系中, 该突变为新发突变, 且无家族史。综上所述, SPTB c. 4967delC 变异被归为致病性变异。

3 讨 论

HS 主要是由于红细胞膜蛋白及骨架蛋白相关基因突变导致的遗传性溶血性疾病, 由于临床表现具有高度的异质性, 且目前尚没有十分可靠的实验室指标进行确诊, 因此在临床上常常被漏诊或误诊^[5-6]。有研究报道 5 个与 HS 相关的致病基因分别为 ANK1、SPTA1、SPTB、EPB42、SLC4A1^[7-8], 但是这些基因突变位点是分散的、无热点突变, 采用常规分子诊断方法 (Sanger 靶向测序) 进行基因突变分析具有一定的挑战性。随着全外显子组技术在临床诊断上的普及, 以及其具有价格低, 覆盖广等优势, 可以一次性同时检测 HS 相关基因, 大大缩短了检测时间, 提高了检

测效率^[9-11]。

SPTB 基因编码血影蛋白的 β 亚基, 是血影蛋白基因家族的一员, 定位于 14q23.3, 长 100 kb, 由 35 个外显子组成, 其编码的蛋白是构成红细胞膜的细胞骨架上层结构, 在红细胞膜的稳定性中起着重要的作用。SPTB 基因突变与 II 型球形红细胞增多症、遗传性椭圆形红细胞增多症及新生儿溶血性贫血有关。在欧洲国家和美国, HS 患者中约有 25% 由 SPTB 基因的杂合变异所致。一般来说, SPTB 基因常见的突变类型包括无义突变、移码突变和剪接突变, 这些突变通常能导致 mRNA 缺陷或 β 血影蛋白截短。在本研究中, 先证者患轻度的溶血性贫血和高胆红素血症, 骨髓和外周血涂片均发现球形红细胞, 初步诊断为 HS。经过全外显子测序显示先证者存在 1 个 SPTB 基因的移码突变, 为 c. 4967delC, 经过一代测序验证家庭其他成员未携带突变, 该突变属于新发突变, 且在相关疾病数据库和人群数据库中均未被收录。SPTB 基因 c. 4967delC 导致了 SPTB 基因编码

的蛋白质转录提前终止,形成截短的 mRNA,使红细胞膜 β -血影蛋白的功能改变,从而诱导疾病发生。有研究报道其他 SPTB 基因移码突变通常会形成一个截短的 mRNA,从而导致 HS^[12-14]。

综上所述,本研究报道了 1 例年轻女性 HS 患者的临床表现、实验室检测及基因测序结果。全外显子测序技术能够同时对 HS 所有的相关基因进行测序,使临床症状不明显、自发突变、散发的 HS 能够得到及时诊断,从而降低疾病严重程度和减少不良预后。

参考文献

- [1] 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.
- [2] DA COSTA L, SUNER L, GALIMAND J, et al. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer[J]. Blood Cells Mol Dis, 2016, 56(1): 9-22.
- [3] HE B J, LIAO L, DENG Z F, et al. Molecular genetic mechanisms of hereditary spherocytosis: current perspectives[J]. Acta Haematol, 2018, 139(1): 60-66.
- [4] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. Genet Med, 2015, 17(5): 405-424.
- [5] 张勇刚,徐之良. 4 例遗传性球形红细胞增多症患者的临床及遗传学分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(1): 29-32.
- [6] ZHU F, LIANG M, XU L, et al. A tetranucleotide dele-

tion in the ANK1 gene causes hereditary spherocytosis: a case of misdiagnosis[J]. Gene, 2020, 726: 144226.

- [7] FARIAS M G. Advances in laboratory diagnosis of hereditary spherocytosis[J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55(7): 944-948.
- [8] 廖瑶林,邱玉铃,邓增富等. 遗传性球形红细胞增多症患者的基因突变研究[J]. 中国妇幼保健, 2013, 36(28): 6002-6004.
- [9] ZHAO R Q, JIANG F, LI J, et al. A novel SPTB frameshift deletion causing hereditary spherocytosis identified by next-generation sequencing in a Chinese family[J]. Int J Lab Hematol, 2021, 43(6): e294-e297.
- [10] BOGUSLAWSKA D M, SKULSKI M, MACHNICKA B, et al. Identification of a novel mutation of β -spectrin in hereditary spherocytosis using whole exome sequencing[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 11007.
- [11] FAN L L, LIU J S, HUANG H, et al. Whole exome sequencing identified a novel mutation (p. Ala1884Pro) of β -spectrin in a Chinese family with hereditary spherocytosis[J]. J Gene Med, 2019, 21(2/3): e3073.
- [12] BARCELLINI W, BIANCHI P, FERMO E, et al. Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects[J]. Blood Transfus, 2011, 9(3): 274-277.
- [13] PWRROTTA S, GALLAGHER P G, MOHANDAS N. Hereditary spherocytosis[J]. Lancet, 2008, 372(9647): 1411-1426.
- [14] IOLASCON A, AVVISATE R A. Genotype/phenotype correlation in hereditary spherocytosis[J]. Haematologica, 2008, 93(9): 1283-1288.

(收稿日期:2022-08-29 修回日期:2022-12-28)

• 案例分析 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 07. 040

朗格汉斯细胞组织细胞增生症合并 ASXL1 突变 1 例

徐道晶¹, 张 晓², 孙荣同^{1△}

1. 山东省威海市立医院检验科, 山东威海 264200; 2. 威海卫人民医院关节骨病科, 山东威海 264200

关键词: 朗格汉斯细胞组织细胞增生症; 溶骨破坏; BRAF-V600E 突变; ASXL1 突变

中图法分类号: R446. 11+3

文献标志码: C

文章编号: 1672-9455(2023)07-1022-03

朗格汉斯细胞组织细胞增生症(LCH)发病原因不明、发病率极低,相关研究甚少,该病是一种多系统起病,临床表现多样化的罕见病。现报道 1 例起源于脊柱溶骨破坏的 LCH 供大家参考。

1 临床资料

1.1 一般资料 患者,男,56 岁,“脂肪肝、酒精肝”10 余年未系统治疗。2020 年 3 月无诱因出现腰背部疼痛,无发热,就诊于当地医院。检查提示 T₁₀ 压缩性骨折、T₅ 隐裂,经手术治疗好转。2021 年 10 月患者无诱因出现前胸、后背疼痛,无发热,再次入院。

1.2 影像学及病理学检查 PET/CT: T₃₋₅ 椎体不同程度溶骨破坏伴软组织肿块硬化或压缩骨折,代谢活性不同程度增高或明显增高,考虑为恶性可能,建议取 T₃ 椎体处肿物进行病理活检。胸部 CT 提示:右肺下叶微结节,多发肺大泡,双肺少许纤维灶; T₃、T₅、T₁₀ 椎体改变。CT 引导下 T₃ 椎体肿物穿刺活检术,病理结果显示:(椎体肿物穿刺)少量纤维结缔组织,可见多处组织细胞增生,伴大量淋巴细胞及嗜酸性粒细胞浸润。免疫组化:细胞角蛋白 AE1/AE3(一),波形蛋白 Vimentin(+),细胞增殖指数 Ki67

△ 通信作者, E-mail: 415211246@qq.com.