

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.02.009

论著 · 临床研究

先天性纯红细胞再生障碍性贫血的临床及基因特点

何旭 徐之良

(武汉大学人民医院儿科, 湖北 武汉 430060)

[摘要] **目的** 探讨先天性纯红细胞再生障碍性贫血 (DBA) 的临床及致病基因特点。**方法** 回顾性分析 2 例 DBA 患儿的临床及致病基因特点, 并进行文献复习。**结果** 2 例患者 (2~3 个月的婴儿) 均呈慢性重度正细胞正色素贫血, 不伴白细胞及血小板计数异常, 网织红细胞计数均降低, 血清铁、血清铁蛋白轻度升高, 骨髓细胞学提示红细胞比例明显降低、幼红减少或缺如, 1 例 DBA 致病基因检测发现已报道的 RPS19 基因致病性杂合突变: c.212G>A (p. Gly71Glu), 其父母未见突变; 另 1 例患儿检测到新的 RPL5 基因杂合突变: c.740T>C (p. I247L), 其父母未见突变, 生物信息学分析该突变可能致病。**结论** DBA 患儿多在婴儿早期发病, 以红系缺乏为表现, 编码核糖体亚基蛋白的基因突变为常见病因, 进行分子检测有利于 DBA 早期诊断。

[中国当代儿科杂志, 2017, 19(2): 171-175]

[关键词] 先天性纯红细胞再生障碍性贫血; 临床特点; RPS19 基因; RPL5 基因; 突变; 儿童

Clinical features and pathogenic gene detection of Diamond-Blackfan anemia

HE Xu, XU Zhi-Liang. Department of Pediatrics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China (Xu Z-L, Email: zlxu-rm@163.com)

Abstract: Objective To investigate the clinical features of Diamond-Blackfan anemia (DBA) and related pathogenic genes. **Methods** A retrospective analysis was performed for the clinical data of two children with DBA, and related literature was reviewed. **Results** The two children with DBA (2-3 months old) manifested with severe normochromic normocytic anemia, decreased reticulocyte count, and increased serum iron and serum ferritin. Normal white blood cell and platelet counts were noted in the two patients. Bone marrow examination showed a decreased percentage of erythrocytes and rare normoblasts in the two patients. Gene screening showed a reported pathogenic heterozygous mutation in RPS19 gene, c.212G>A (p. Gly71Glu), in one patient, and there were no mutations in his parents. In the other patient, gene screening showed a heterozygous mutation in RPL5 gene, c.740T>C (p. I247L), which had not been reported in literature, and there were no mutations in her parents. A bioinformatic analysis showed that this might be a pathogenic mutation. **Conclusions** The onset age of DBA is early infancy in most children, with a manifestation of erythroid deficiency. RPS19 and RPL5 gene mutations are common causes of this disease. Molecular detection helps with the early diagnosis of DBA.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(2): 171-175]

Key words: Diamond-Blackfan anemia; Clinical feature; RPS19 gene; RPL5 gene; Mutation; Child

先天性纯红细胞再生障碍性贫血又称 Diamond-Blackfan 贫血 (Diamond-Blackfan anemia, DBA) 是一种少见的先天性骨髓衰竭性疾病, 其血液学特点为巨幼红细胞性贫血, 网织红细胞计数减少, 骨髓粒系、巨核系细胞增生正常、红系细胞明显缺乏, 因 Diamond 和 Blackfan 于 1938 年首先报道而得名^[1-2]。欧美国家 DBA 的发病率为

5~7/100 万, 国内暂没有 DBA 发病率的统计^[3]。首先被证实与 DBA 发生有关的基因为编码核糖体小亚基蛋白 19 的 RPS19 基因, 随后发现编码其他核糖体蛋白的基因, 如 RPL5、RPS17、RPS24、RPS7 基因突变也可导致 DBA 发生^[4-5]。本文结合 2 例 DBA 患者并进行相关文献复习, 总结该病的临床及基因特点, 以提高临床医师的认识。

[收稿日期] 2016-08-27; [接受日期] 2016-10-31

[作者简介] 何旭, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 徐之良, 男, 主任医师。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病例1,男,3个月。因面色苍黄近一个月入院,无皮肤黏膜出血,无发热、呕吐、抽搐,大小便正常。查体:T37.2℃,P132次/min,R36次/min,头颅五官无畸形,面色苍黄,全身皮肤无黄染、未见皮疹、无水肿。双肺未闻及罗音;心律齐,心音有力,心脏各听诊区均未闻及杂音;腹软,肝脾肋下未触及;脊柱四肢无畸形。实验室检查:白细胞及血小板数正常,Hb 37 g/L,RBC降至 $1.08 \times 10^{12}/L$,红细胞压积(HCT)降至9.2%,网织红细胞计数 $4.1 \times 10^9/L$ (参考值:24~84 $\times 10^9/L$),红细胞平均体积、平均血红蛋白、平均血红蛋白浓度正常;血清铁42.1 mmol/L(参考值:14.3~26.9 mmol/L)、血清铁蛋白484.2 ng/mL(参考值:12~290 ng/mL)。红细胞脆性实验未见异常。骨髓细胞学显示:红系比例约2%、明显降低,幼红细胞罕见(早幼红细胞缺如,中幼红细胞约1.5%,晚幼红细胞约0.5%),粒系比例约为62%,淋巴细胞系比例约为26%,单核细胞比例约为4%,提示纯红细胞再生障碍性贫血(pure red cell anemia, PRCA)可能性大。患儿既往无特殊,父母非近亲结婚,家族中均无类似病史。

病例2,女,2个月。面色苍黄20 d。不伴皮肤黏膜出血及发热、抽搐,偶有咳嗽和间断吐奶,大小便正常。查体:T36.9℃,P130次/min,R35次/min,贫血面容,神志清楚,全身皮肤未见皮疹,头颅五官无畸形,双侧呼吸运动对称,双肺未闻及罗音,心律齐,心音有力,各听诊区未闻及杂音,腹平软,肝脾未及。脊柱四肢无畸形。实验室检查:白细胞及血小板数目正常,Hb 41 g/L,RBC $1.35 \times 10^{12}/L$,

红细胞压积降至13.4%,网织红细胞计数 $4.3 \times 10^9/L$ (参考值:24~84 $\times 10^9/L$);红细胞平均血红蛋白为38.4 pg(正常值:25~35 pg),红细胞平均体积、平均血红蛋白浓度正常;血清铁44.1 mmol/L(参考值:14.3~26.9 mmol/L),血清铁蛋白467.6 ng/mL(参考值:12~290 ng/mL);骨髓细胞学:有核红细胞难以见到(红系缺如或比例极低),粒系细胞比例约为63%,淋巴细胞系比例约为29%,单核细胞比例约为5%。腹部彩超未见异常。患儿既往无特殊,父母非近亲结婚,家族中均无类似病史。

根据DBA诊断标准^[6]:(1)发生在出生后12个月以内的大细胞正色素性贫血,白细胞数正常或稍降低,血小板数正常或稍增加;(2)网织红细胞明显减少;(3)骨髓增生活跃,选择性红系前体细胞明显减少;(4)血清促红细胞生成素水平增高;(5)排除继发性单纯红细胞再生障碍性贫血。本研究2例患儿均符合第2、3条诊断标准,且无细小病毒B19感染依据,无苯妥英钠、氯霉素等用药史,DBA可能性大。

1.2 致病基因检测

采集患者及家属的外周静脉血2 mL,提取基因组DNA。DBA致病基因RPS19及RPL5的引物由上海生工合成,引物序列见表1。PCR反应体系及扩增程序:基因组DNA 50~100 ng, dNTP 200 $\mu\text{mol/L}$, MgCl_2 1.5 mmol/L,上下游引物各0.5 $\mu\text{mol/L}$,Taq DNA聚合酶0.5 U(大连TAKARA公司),加水至终体积25 μL 。94℃预变性3 min,94℃变性30 s,55~60℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;72℃延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后送上海生工生物公司进行Sanger测序分析。

本研究获得医院医学伦理学委员会批准及患者家属知情同意。

表 1 RPS19 基因以及 RPL5 基因的引物序列

外显子	上游引物 (5' → 3')	下游引物 (5' → 3')	片段大小 (bp)
RPS19			
exon1-2	GTACCACGGTTTAGGATGCCG	TTTGTGCCAG GGGTCACCCA GCTC	602
exon3	CAGTGAGAATTAGCTGTTTACAG	CCTCAAGGCT ACTCCATCAA TGCAG	317
exon4	GCTTTTTGAGAAGCCTGGCTCACAG	CTACCTGACA AAGTATGGGC TTTGG	228
exon5	GTGAGAATTAGATGAGATAGATG	GTCTTACGAA TGAGGCAATT TA	206
RPL5			
exon1	AGGTCTCTGTCGAGCAGCGGAC	CTCGACCAA GTCAGAGCTA GCAAT	185
exon2-3	CTACAAGTGACAGTTGTCTGTTTAC	CACACCATGTGCTTTGCTTCCCAAG	477
exon4	GCTAAGAGTCTTAAGCATTTTAAG	AAGCAATCAG CCACAAACTA CATC	319
exon5	TGTCAGTGGTCTTACGGTTATG	GGTTATCTCC ACAGTCCAAC TAG	379
exon6	CATATGATGCGATAATTGTTTCAAG	CCAAAACAAGTAATAAACCTATTTTC	359
exon7	GAATCTGGCTTAGAAGGACAAGAT	GCACAATTAC ACCAACAGTC TG	268
exon8	CCTGCAGGTCTCTGTCGAGCAG	CATAAGAATA AGAGCTTAAC ACAG	329

1.3 生物信息学分析

利用 Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、及 SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) 软件对致病基因检测发现的新突变进行功能预测分析。并利用 NCBI 数据库进行不同物种间的保守序列分析。

为 0.00 (得分 <0.05 可能影响蛋白质功能)。并在 NCBI 数据库中应用不同物种之间的保守序列分析发现, RPL5 蛋白 247 位的异亮氨酸 (c.740T>C 突变导致编码的 RPL5 蛋白在 247 位由异亮氨酸变为亮氨酸) 十分保守, 见图 2, 说明该位点突变对蛋白发挥正常功能具有重要影响。

2 结果

2.1 致病基因测序分析

利用 RPS19 基因及 RPL5 基因特异性引物扩增该基因全部外显子, 并对 PCR 产物进行测序分析, 发现: 病例 1 的 RPS19 基因存在 c.212G>A (p. G71Q) 杂合突变 (图 1), 患儿父母在该位点均未见突变。病例 2 的 RPL5 基因存在 c.740T>C (p. I247L) 突变 (图 1), 其父母在该位点未见异常。

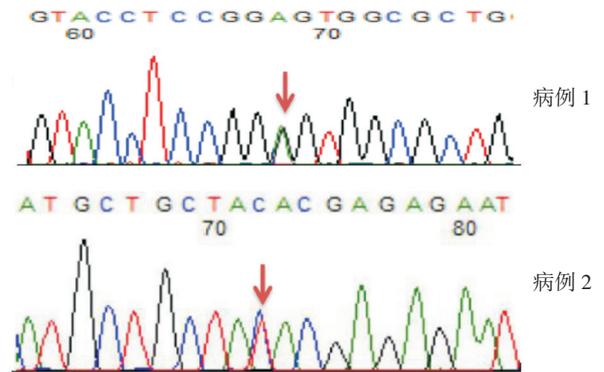


图 1 2 例患儿的 RPS19 基因及 RPL5 基因测序
病例 1 的 RPS19 基因存在 c.212G>A (p. G71Q) 杂合突变, 病例 2 的 RPL5 基因存在 c.740T>C (p. I247L) 突变。突变位点如箭头所示。

2.2 生物信息学分析

利用生物信息学的方法预测病例 2 RPL5 基因的 c.740T>C (p. I247L) 突变是否为致病性突变。Polyphen2 软件预测分数为 1.00 (得分越接近 1.00 者, 致病的可能性越大), SIFT 软件预测的结果

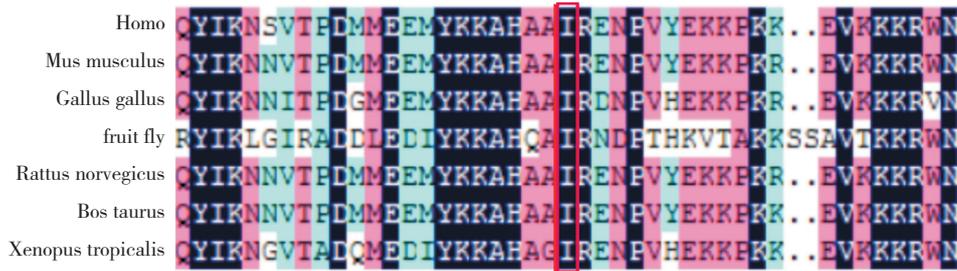


图 2 RPL5 蛋白 247 位氨基酸保守性分析 红色框内为该位点, 在不同的物种间(家鼠、原鸡、果蝇、褐鼠、牛以及非洲爪蟾)均高度保守。

2.3 治疗与随访

两例患儿入院后均予以红细胞输注, 出院时患者 1 的 Hb 为 93 g/L, 患者 2 为 88 g/L; 出院后均口服甲泼尼龙片(每日一次, 每次 7.5 mg), 并定期随访, 目前已随访 5 个月。患者 1 出院 1 个月时 Hb 降至 54 g/L, 再次输注红细胞, 之后 Hb 维持在 82~92 g/L; 患者 2 出院以后 Hb 维持在 83~91 g/L。

3 讨论

DBA 是一种罕见的遗传性骨髓衰竭性疾病, 但在儿童先天性骨髓衰竭性疾病中所占比例较高, 仅次于范可尼贫血^[7]。一般在生后数月起病, 男女发病比例大致相同, 大部分为散发, 约 10%~25% 的患者有家族史^[8]。

DBA 的发病机制可能与红系祖细胞内在异常、红系造血调控异常以及核糖体相关蛋白的功能异常有关。DBA 与核糖体蛋白的关系是 DBA 发病机制研究的热点, 目前已将该疾病归类于核糖体病^[9,10]。有研究发现约 25% 的 DBA 患者有 RPS19 基因突变, 2% 的 DBA 存在 RPS24 基因突变, 编码核糖体蛋白的 RPS17 基因、RPL5 基因、RPL11 基因以及 RPL35a 基因突变也可导致 DBA 发生^[5,11]。

RPS19 基因定位于 19q13.2 区域, 全长 11 kb, 包括 6 个外显子, 其编码的 RPS19 蛋白是首先被发现的与 DBA 发病相关的核糖体蛋白^[13]。RPS19 蛋白非常保守, 含有 144 个氨基酸, 可能参与 40S 核糖体前体的组装和成熟, 从而实现细胞内翻译、转运调控功能^[12]。RPL5 基因位于 1p22.1 区域, 其编码的蛋白是属于核糖体 60S 的一个亚单位, 且该蛋白可结合 5S rRNA 形成 RNP, 维持核糖体的正常功能^[13]。

本研究中的 2 例患者均呈重度贫血, 骨髓细

胞学检测提示幼红细胞罕见, 进行 DBA 相关致病基因检测, 发现 1 例患儿的 RPS19 基因存在 c.212G>A (p. G71Q) 杂合突变, 该突变为错义突变, 导致编码的 RPS19 蛋白在 71 位由甘氨酸突变为谷氨酸。有报道该位点突变为致病性突变^[14], 但患儿父母的 RPS19 基因该位点未见异常, 因此患儿可能为新发突变。另 1 例患儿的 RPL5 基因存在 c.740T>C (p. I247L) 突变, 此突变可导致编码的 RPL5 蛋白在 247 位由异亮氨酸转变为亮氨酸, 检索 NCBI 数据库及千人基因组数据库 (1000 genomes) 发现该位点不是多态性位点, 且 DBA 在该位点的突变未见报道; 但根据生物信息学分析预测、不同物种间保守性分析以及患者的临床表现, 推测该位点可能为致病性位点, 但仍需要进一步细胞水平及动物实验的验证。

约 1/3 的 DBA 患者合并先天畸形, 如发育迟缓、尿道畸形、先天性心脏病以及拇指三指节畸形等, 且该类患儿易并患急性非淋巴细胞白血病及非造血系统肿瘤^[9]。有研究发现 RPL5 基因与 RPL11 基因的突变与 DBA 合并畸形相关, 编码核糖体蛋白基因突变的 DBA 患儿畸形发生率大于 40%, 明显高于无突变患儿^[15], 但本文两例患者暂未发现明显畸形, 不排除与患儿年龄尚小有关, 应注意这方面的随访。

DBA 主要采用糖皮质激素进行治疗。郑杰等^[8]研究显示, 约 60%~75% 的 DBA 患者对糖皮质激素有反应, 部分患儿能获得持续性缓解 (29 例接受激素治疗的 DBA 患儿中 3 例完全缓解)。其次为红细胞输注对症治疗, 但长期输血有并发血色素病的可能。有条件可行造血干细胞移植进行 DBA 根治性治疗, 但干细胞来源以及移植相关并发症在一定程度上限制了其临床应用^[8]。

综上, DBA 多在半岁以内起病, 表现为巨幼

红细胞性贫血、红系明显减少，编码核糖体亚基蛋白的基因突变，因此应尽早进行相关致病基因检测以明确诊断。

[参 考 文 献]

- [1] Ear J, Huang H, Wilson T, et al. RAP-011 improves erythropoiesis in zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia through antagonizing lefty1[J]. *Blood*, 2015, 126(7): 880-890.
- [2] Jaako P, Debnath S, Olsson K, et al. Gene therapy cures the anemia and lethal bone marrow failure in a mouse model of RPS19-deficient Diamond-Blackfan anemia[J]. *Haematologica*, 2014, 99(12): 1792-1798.
- [3] Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S, et al. Inherited bone marrow failure syndrome in 2012[J]. *Int J Hematol*, 2013, 97(1): 20-29.
- [4] Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia[J]. *Nat Genet*, 1999, 21(2): 169-175.
- [5] Wang R, Yoshida K, Toki T, et al. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia[J]. *Br J Haematol*, 2015, 168(6): 854-864.
- [6] Valchos A, Ball S, Dahl N, et al. Diagnosing and treating Diamond-Blackfan Anaemia: results of an international clinical consensus conference[J]. *Br J Hematol*, 2008, 142(6): 859-876.
- [7] Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, et al. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia[J]. *Blood*, 2012, 119(10): 2376-2384.
- [8] 郑杰, 吴润晖. Diamond-Blackfan 贫血临床和分子生物学研究进展 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2009, 24(2): 148-150.
- [9] Quarello P, Garelli E, Carando A, et al. Ribosomal RNA analysis in the diagnosis of Diamond-Blackfan Anaemia[J]. *Br J Haematol*, 2016, 172(5): 782-785.
- [10] Aspesi A, Pavesi E, Robotti E, et al. Dissecting the transcriptional phenotype of ribosomal protein deficiency: implications for Diamond-Blackfan anemia[J]. *Gene*, 2014, 545(2): 282-289.
- [11] Delaporta P, Sofocleous C, Stiakaki E, et al. Clinical phenotype and genetic analysis of RPS19, RPL5, and RPL11 genes in Greek patients with Diamond-Blackfan anemia[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2014, 61(12): 2249-2255.
- [12] Morimoto K, Lin S, Sakamoto K. The functions of RPS19 and their relationship to Diamond-Blackfan anemia: a review[J]. *Mol Genet Metab*, 2007, 90(4): 358-362.
- [13] Quarello P, Garelli E, Carando A, et al. Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations[J]. *Haematologica*, 2010, 95(2): 206-213.
- [14] Boria I, Garelli E, Gazda HT, et al. The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update[J]. *Hum Mutat*, 2010, 31(12): 1269-1279.
- [15] 刘天峰, 万杨, 陈玉梅, 等. Diamond-Blackfan 贫血患儿的临床分析 [J]. *国际输血及血液学杂志*, 2014, 37(5): 406-411.

(本文编辑: 俞燕)