

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.01.006

论著·临床研究

## 4例遗传性球形红细胞增多症患者的 临床及遗传学分析

张勇刚<sup>1</sup> 徐之良<sup>1,2</sup>

(1. 汉川市人民医院儿科, 湖北 汉川 431600; 2. 武汉大学人民医院儿科, 湖北 武汉 430060)

**[摘要]** 4例遗传性球形红细胞增多症患者(男、女各2例), 年龄3岁7个月至5岁, 均有轻中度贫血、轻度肝脾肿大, 以及间接胆红素增高为主的黄疸、网织红细胞比例增高、外周血涂片球形红细胞>10%和渗透性脆性增加。高通量测序分析发现病例1、2的SLC4A1基因分别存在新突变: c.37G>A和c.340T>C, 其父母该基因均未见异常。c.37G>A和c.340T>C突变经Mutation Taster预测有致病意义; Polyphen2预测值分别为0.87、0.83, 提示可能有害; SIFT的预测值分别为0.008、0.09, 提示可能有害。病例3、4的ANK1基因分别存在已报道的c.830A>G和c.985G>C杂合突变; 病例3的父母未做基因检测; 病例4的母亲为遗传性球形红细胞增多症患者, 也检出ANK1基因c.985G>C杂合突变。病例3的Hb常低于80 g/L, 于5岁6个月行脾切除术, 术后定期复查Hb均大于105 g/L。HS是一种由于红细胞膜蛋白异常导致的遗传性溶血性疾病, 基因检测可协助确诊。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(1): 29-32]

**[关键词]** 遗传性球形红细胞增多症; SLC4A1基因; ANK1基因; 儿童

### Clinical and genetic features of children with hereditary spherocytosis: an analysis of 4 cases

ZHANG Yong-Gang, XU Zhi-Liang. Department of Pediatrics, Hanchuan People's Hospital, Hanchuan, Hubei 431600, China (Email: zhangyonggang\_83@126.com)

**Abstract:** Four children (two boys and two girls), aged from 3 years and 7 months to 5 years, had mild or moderate anemia, mild hepatosplenomegaly, jaundice (mainly an increase in indirect bilirubin), an increase in the percentages of reticulocytes and spherical erythrocytes in peripheral blood smear and an increase in erythrocyte osmotic brittleness. High-throughput sequencing found two novel mutations in the SLC4A1 gene, c.37G>A and c.340T>C, in case 1 and case 2 respectively, and these two mutations were predicted to be pathogenic by Mutation Taster. The Polyphen2 scores of these two mutations were 0.87 and 0.83 respectively, which suggested that these mutations were probably damaging. The SIFT scores of these two mutations were 0.008 and 0.09 respectively, suggesting that these mutations were probably damaging. No abnormality in this gene was found in their parents. Two reported heterozygous mutations in the ANK1 gene, c.830A>G and c.985G>C, were found in case 3 and case 4 respectively. Gene detection was not performed for the parents of case 3. The mother of case 4 was diagnosed with hereditary spherocytosis and had a heterozygous mutation of c.985G>C in the ANK1 gene. All four children were diagnosed with hereditary spherocytosis. Case 3 had a hemoglobin level of <80 g/L and underwent splenectomy at the age of 5 years and 6 months, and regular postoperative reexamination showed a hemoglobin level of >105 g/L. Hereditary spherocytosis is a hereditary hemolytic disease caused by abnormality in erythrocyte membrane protein, and gene detection helps to make a confirmed diagnosis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(1): 29-32]

**Key words:** Hereditary spherocytosis; SLC4A1 gene; ANK1 gene; Child

[收稿日期] 2018-07-26; [接受日期] 2018-11-08

[作者简介] 张勇刚, 男, 本科, 副主任医师。Email: zhangyonggang\_83@126.com。

遗传性球形红细胞增多症 (hereditary spherocytosis, HS) 是一种由红细胞膜先天性缺陷而引起的溶血性贫血, 典型表现为外周血球形红细胞增多、皮肤黄染、贫血、肝脾肿大等<sup>[1-2]</sup>。HS的发病机制为基因缺陷导致的红细胞膜蛋白异常, 目前已经证实 ANK1, SLC4A1, EPB42, SPTB 以及 SPTA1 等基因异常与 HS 相关<sup>[4-5]</sup>。本文报道汉川市人民医院近两年利用高通量测序方法确诊的 4 例 HS 患者, 总结其临床及遗传学特点, 为进一步加深临床医生对该病的认识提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

4 例患儿 (男性 2 例、女性 2 例) 年龄 3 岁 7 个月至 5 岁, 均以面色苍白、黄疸入院。查体均有贫血、皮肤巩膜黄染和轻度肝、脾肿大。实验室检查: 红细胞计数  $2.4\sim 3.3 \times 10^{12}$ , 血红蛋白  $67\sim 92$  g/L、网织红细胞比例升高 (2.9%~4.2%); 总胆红素水平上升 ( $88\sim 207$   $\mu\text{mol/L}$ )、以间接胆红素为主; 外周血涂片球形红细胞比例均超过 16% (16%~28%); 红细胞渗透脆性增高; 抗人球蛋白试验均阴性。2 例行腹部超声检查者未见胆囊结石。患者 4 的母亲外院诊断为遗传性球形红细胞增多症。4 例患者均有贫血、肝脾肿大, 以及间接胆红素增高为主的黄疸、网织红细胞比例增高、外周血涂片球形红细胞 >10%, 红细胞渗透脆

性增加, 均可临床诊断 HS。

### 1.2 血液系统疾病相关基因高通量测序

取 4 例患者及其父母 (患者 3 的父母未行基因测序) 外周静脉血 2 mL, 提取基因组 DNA, 委托康旭公司进行血液系统疾病相关基因高通量测序, 并采用 Sanger 测序对高通量测序结果验证。

### 1.3 生物信息学分析

对新突变利用 Mutation Taster、Polyphen2 及 SIFT 在线软件预测其致病性。利用 MEGA-X 软件进行不同物种间 SLC4A1 蛋白序列的保守性分析。以结晶的 SLC4A1 蛋白的三维结构 (PDB 数据库 ID: 4KY9) 为模版, 应用 SWISS-MODEL 软件预测单个氨基酸改变后 SLC4A1 蛋白的三维结构。

## 2 结果

### 2.1 基因检测结果

患者 1 的 SLC4A1 基因检出新的突变: c.37G>A 杂合突变 (NM\_000342), 其父母该位点未见异常; 患者 2 的 SLC4A1 基因发现新的突变: c.340T>C 杂合突变 (NM\_000342), 其父母该位点未见异常; 患者 3 的 ANK1 基因存在 c.830A>G 杂合突变 (NM\_000037), 为已报道的致病性突变, 其父母未行基因检测; 患者 4 的 ANK1 基因发现错义突变 c.985G>C (NM\_000037), 为已报道的致病性突变, 变异遗传自其母, 其母 (HS 患者) 也检出 ANK1 基因突变 c.985G>C。见图 1。

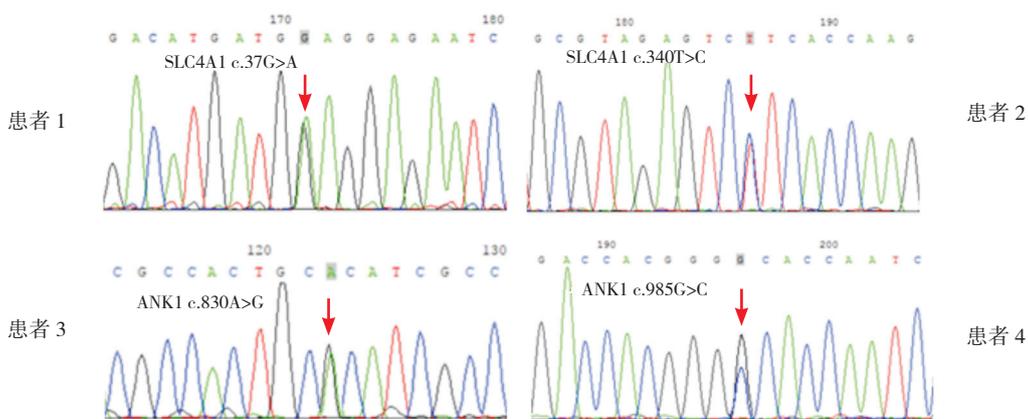


图1 4例患者的基因检测结果 患者1的 SLC4A1 基因存在 c.37G>A 杂合突变; 患者2的 SLC4A1 基因存在 c.340T>C 杂合突变; 患者3的 ANK1 基因存在 c.830A>G 杂合突变; 患者4的 ANK1 基因发生错义突变 c.985G>C。突变位点如箭头所指。

## 2.2 突变基因的生物信息学分析

患者1和2的SLC4A1基因突变c.37G>A和c.340T>C经Mutation Taster软件预测(预测值分别为58和22),提示突变具有致病性;Polyphen2的预测值分别为0.87、0.83,提示突变有害的可能性大;SIFT预测值为0.008、0.09,提示突变有害可能性大。保守序列分析发现该位点在不同的物种之间(人、小鼠、褐家鼠、鸡、牛、猕猴)保

守,见图2。利用Swiss Model软件对SLC4A1基因突变进行蛋白质结构预测发现,c.37G>A突变(p.Gln13Lys)导致第13位谷氨酰胺转变为赖氨酸,c.340T>C突变(p.Phe114Leu)导致第114位氨基酸由苯丙氨酸突转变为亮氨酸,但与野生型SLC4A1蛋白的三维结构相比,这些氨基酸变化并没有改变蛋白的三级结构,见图3。

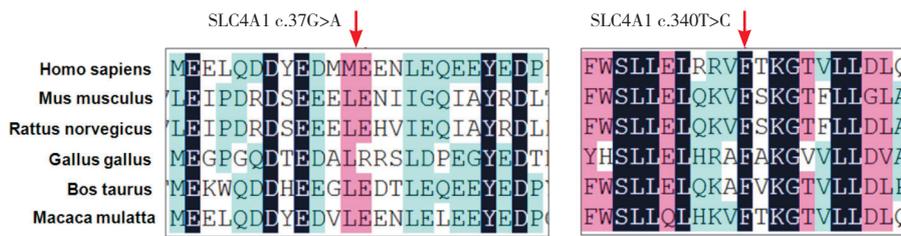


图2 SLC4A1基因突变c.37G>A以及c.340T>C在不同物种之间的保守性分析 红色箭头所指提示保守的氨基酸。

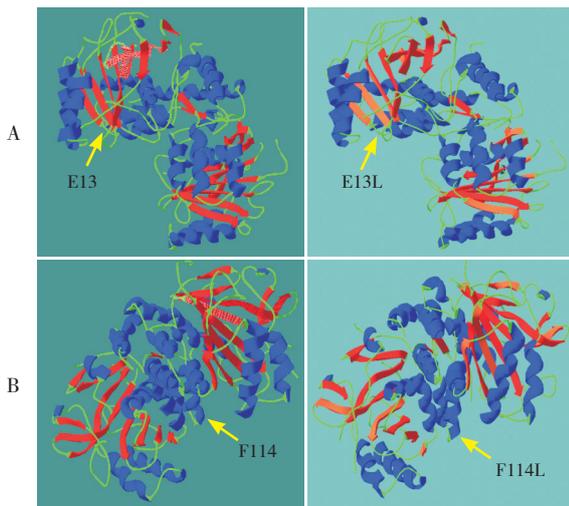


图3 p.Gln13Lys和p.Phe114Leu突变前后的SLC4A1、蛋白三维结构预测 A图表示p.Gln13Lys突变前后SLC4A1蛋白结构,B图表示p.Phe114Leu突变前后SLC4A1蛋白结构。图A、B的左图均为野生型结构,氨基酸位点改变如箭头所示。

## 2.3 诊治经过

病例3因为接近重度贫血,入院后进行了红细胞输注,出院时血红蛋白104g/L,因Hb常<80g/L,于5岁6个月于外院行脾切除术,术后半年随访,病情较稳定,偶有感染但容易控制;定期复查Hb均>105g/L。其余3例患者诊断时为轻度贫血,予以补充叶酸等对症治疗,但后期随访发现患者因贫血加重均进行过输血治疗。

## 3 讨论

HS是一种由于红细胞膜蛋白异常导致的遗传性溶血性疾病,欧美地区发病率高达1/2000~5000,我国发病率不详<sup>[3]</sup>。约75%的HS病例为常染色体显性遗传;25%左右的患者无家族史,可能与常染色体隐性遗传或新突变有关<sup>[8]</sup>。目前已发现5种HS致病基因:ANK1、SLC4A1、SPTA1、SPTB和EPB42,分别编码锚蛋白、带3蛋白、 $\alpha$ -收缩蛋白、 $\beta$ -收缩蛋白以及红细胞膜蛋白带4.2蛋白<sup>[5]</sup>。

SLC4A1基因又称为AE1或者Band3基因,位于17号染色体q21.31区域,编码的蛋白属于碳酸氢盐转运体SLC4家族成员之一,该蛋白含有两个功能域:N端位于胞浆区43KD大小的结构域和位于细胞膜内12~14个跨膜元件组成的结构域<sup>[9]</sup>。N端功能域负责蛋白质之间的相互作用来锚定细胞骨架与质膜,而跨膜结构域负责细胞转运功能。SLC4A1基因突变导致编码的蛋白功能异常,进一步致红细胞膜及其碳酸氢盐转运异常<sup>[10]</sup>。本研究的患者1和患者2均临床诊断HS,高通量测序发现两例患者均存在SLC4A1基因新突变,Mutation Taster、Polyphen2及SIFT软件预测这两个突变可能具有致病性,保守序列分析发现这两个位点在不同的物种(人、小鼠、褐家鼠、鸡、牛、猕猴)

高度保守,但 Swiss-Model 预测这两个位点的突变未引起相应的蛋白结构变化,推测这两种突变可能是通过影响 SLC4A1 蛋白的稳定性或者表达进而导致红细胞膜异常,还需在细胞水平进一步验证。

ANK1 基因位于 8 号染色体 p11.2 区域,由 42 个外显子组成,编码 1881 个氨基酸组成的锚蛋白<sup>[11]</sup>。锚蛋白是红细胞膜蛋白的成分之一,对膜的稳定性起着重要作用,该蛋白异常可造成细胞膜脂质双分子层不稳定、红细胞由双凹圆盘状变为球形<sup>[13]</sup>。本研究的患者 3 和患者 4 的 ANK1 基因分别存在 c.830A>G 杂合突变和 c.985G>C 错义突变,均为已报道<sup>[14]</sup>的 HS 致病性突变,可分别导致 ANK1 基因编码的蛋白 277 位氨基酸由组氨酸突变为精氨酸 (p.H277R),329 位氨基酸由丙氨酸改变为脯氨酸 (p.A329P)。

HS 患者的红细胞呈球形,红细胞膜可塑性降低,在循环中容易被脾脏截获而遭到破坏,因此脾切除可以最大程度延长红细胞寿命、减少输血、降低胆石症的发生率和改善预后<sup>[2,15]</sup>。HS 患者 Hb 小于 80 g/L,且网织红细胞比例 >10%;或者 Hb 80~120 g/L,网织红细胞 6%~8% 时,可行脾切除手术,除少数贫血严重或多次出现再障和溶血危象以至反复输血不能维持生命者外,手术年龄应在 5 岁以后<sup>[1-2]</sup>。年龄较小的儿童可选择部分脾切除,既能达到治疗效果,又可保留脾脏免疫功能。本研究中 1 例患者的 Hb 常低于 80 g/L,于 5 岁 6 个月行脾切除术,术后随访 Hb 均大于 105 g/L。

综上所述,本研究通过基因检测对临床诊断为 HS 的 4 例患者予以了确诊,发现了 SLC4A1 基因两个未见报道的突变,为进一步探索 HS 的发病机制提供了参考。

#### [参 考 文 献]

[1] Manciu S, Matei E, Trandafir B. Hereditary spherocytosis

-diagnosis, surgical treatment and outcomes. a literature review[J]. *Chirurgia (Bucur)*, 2017, 112(2): 110-116.

[2] Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis--2011 update[J]. *Br J Haematol*, 2012, 156(1): 37-49.

[3] 姜敏, 鲁洁, 钟雁, 等. 新生儿遗传性球形红细胞增多症 ANK1 基因新突变一例 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33(1): 44-47.

[4] He BJ, Liao L, Deng ZF, et al. Molecular genetic mechanisms of hereditary spherocytosis: current perspectives[J]. *Acta Haematol*, 2018, 139(1): 60-66.

[5] Wang R, Yang S, Xu M, et al. Exome sequencing confirms molecular diagnoses in 38 Chinese families with hereditary spherocytosis[J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(8): 947-953.

[6] 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 585.

[7] Deng Z, Liao L, Yang W, et al. Misdiagnosis of two cases of hereditary spherocytosis in a family and review of published reports[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 441: 6-9.

[8] Greth A, Lampkin S, Mayura-Guru P, et al. A novel ENU-mutation in Ankyrin-1 disrupts malaria parasite maturation in red blood cells of mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38999.

[9] Cordat E, Casey JR. Bicarbonate transport in cell physiology and disease[J]. *Biochem J*, 2009, 417(2): 423-439.

[10] Reithmeier RA, Casey JR, Kalli AC, et al. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1858(7 Pt A): 1507-1532.

[11] 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.

[12] Guan H, Liang X, Zhang R, et al. Identification of a de novo ANK1 mutation in a Chinese family with hereditary spherocytosis[J]. 2018, 23(6): 357-361.

[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.

[14] Leite RC, Basseres DS, Ferreira JS, et al. Low frequency of ankyrin mutations in hereditary spherocytosis: identification of three novel mutations[J]. *Hum Mutat*, 2000, 16(6): 529.

[15] Seims AD, Breckler FD, Hardacker KD, et al. Partial versus total splenectomy in children with hereditary spherocytosis[J]. *Surgery*, 2013, 154(4): 849-853.

( 本文编辑: 俞燕 )