

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.09.016

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190301.1333.022.html(2019-03-04)

SEC23B 基因突变诊断先天性红细胞生成异常性贫血 II 型 1 例并文献复习*

孙慧敏,姜中兴[△],王卫敏

(郑州大学第一附属医院血液科,郑州 450000)

[摘要] **目的** 探讨分子生物学基因突变检测对于复杂、罕见遗传性疾病诊断的重要性,以提高对先天性红细胞生成异常性贫血(CDA)的认识。**方法** 运用高通量二代测序技术对申请人进行血液系统疾病相关基因全外显子编码区及剪切区序列测定,在确定致病基因后,应用 Sanger 测序法进行验证,同时检测申请人父母的基因型。通过分析此病例资料并复习相关文献。**结果** 申请人为年轻女性,成年后发现贫血、黄疸,脾大,胆囊结石,血象呈正细胞轻度贫血;血片可见 6%球形红细胞;光镜下骨髓形态存在双核幼红细胞,以哑铃核、花核多见,偶见点彩,占有核红细胞的 12%;申请人及其父母血液系统疾病基因筛查(高通量二代测序):申请人存在 SEC23B 基因 c.74C>A(p. Pro25His)和 c.1588C>T(p. Arg530Trp)复合杂合变异;其母存在 SEC23B 基因 c.74C>A(p. Pro25His)杂合变异;其父存在 SEC23B 基因 c.1588C>T(p. Arg530Trp)杂合变异。未行骨髓电泳、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检查。诊断为 CDA II 型(CDA II),因其未出现严重的铁过载等并发症,观察随访。**结论** SEC23B 基因 c.74C>A(p. Pro25His)和 c.1588C>T(p. Arg530Trp)复合杂合变异是本例 CDA II 患者的可能分子发病机制,积极开展与该病相关的 CDAN1、C150RF41、SEC23B、KIF23、KLF1 和 GATA1 基因检测极为重要。

[关键词] 贫血,红细胞生成障碍性,先天性;高通量二代测序;SEC23B 基因**[中图分类号]** R555+.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)09-1513-03

A case of diagnosis of congenital dyserythropoietic anemia II with SEC23B gene mutation and the literature review*

SUN Huimin,JIANG Zhongxing[△],WANG Weimin

(Department of Hematology,the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University,Zhengzhou,Henan 450000,China)

[Abstract] **Objective** To emphasize the importance of gene mutation detection in the diagnosis of complex and rare genetic diseases, and to enhance the understanding of congenital dyserythropoietic anemia (CDA). **Methods** High-throughput second-generation sequencing technology was used to identify the applicant's hematopathy-related gene total exon coding and splicing sequence. After determining the pathogenic gene,utilized the Sanger sequencing method for verification,and the applicant,parents genotype were also tested. The case of CDA II was reported and the related literatures were reviewed. **Results** The applicant was a young woman. When she was adult,she was found as anemia,jaundice,splenomegaly and gallbladder stone,and the blood routine showed mild anemia of normal cell. Blood smear showed 6% spherical red blood cells. Under the light microscope,there were dinuclear red blood cells in the form of bone marrow occupying 12% of nucleated red blood cells. The dumbbell nuclear and flower nuclear red blood cells were common,occasionally spotted nuclear were found. The blood system disease genetic screening (high-throughput second-generation sequencing) from applicant and her parents showed;the applicant had SEC23B gene c.74C>A(p. Pro25His) and c.1588C>T(p. Arg530Trp) complex heterozygous variation,and her mother had SEC23B gene c.74C>A(p. Pro25His) heterozygous variation and her father had SEC23B gene c.1588C>T(p. Arg530Trp) heterozygous variation. The applicant was diagnosed with CDA II. and received follow-up for the time being because there were no complications such as severe iron overload. **Conclusion** The SEC23B gene c.74C>A(p. Pro25His) and c.1588C>T(p. Arg530Trp) complex heterozygous variation is the molecular pathogenesis

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81700138)。 作者简介:孙慧敏(1991-),在读硕士研究生,主要从事红细胞相关疾病及急性白血病等的诊治研究。 [△] 通信作者,E-mail:jiangzx313@126.com。

of this patient with CDA II. To improve the understanding of CDA, it is extremely important to actively carry out the detection of CDAN1, C150RF41, SEC23B, KIF23, KLF1 and GATA1 gene related to the disease.

[Key words] anemia, dyserythropoietic, congenital; high-throughput second-generation sequencing technology; SEC23B gene

先天性红细胞生成障碍性贫血(congenital dyserythropoietic anemia, CDA)是临床上少见的遗传性红细胞疾病,其特征在于无效的红细胞生成,成红细胞形态学异常,溶血、红细胞膜蛋白和脂质的低糖基化。这种疾病有 4 种类型(I~IV),都与红细胞前体异常成熟和分裂有关^[1]。高通量二代测序技术具有灵敏度、特异度高及重复性好等优点,能够同时筛查多种基因突变,适用于遗传异质性疾病的突变筛查^[2]。本院应用上述技术首次确诊了 1 例 CDA II 患者,现将病例相关资料报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,女,23 岁,汉族,河南籍,因“发现脾大、胆红素高 10 月余”于 2018-02-10 入本院。初步考虑:溶血性贫血?既往史无特殊。未婚未育。父母均存在轻度贫血病史。查体:面色苍黄,全身皮肤黏膜无皮疹、皮下出血、皮下结节、瘢痕,全身浅表淋巴结未触及,心肺听诊未见明显异常。腹软,无压痛、反跳痛、肌紧张,肝脏肋缘下未触及,脾脏肋缘下 1.00 cm。血常规:白细胞计数 $4.40 \times 10^9/L$,红细胞计数 $2.73 \times 10^{12}/L$,血红蛋白 89.00 g/L,血小板计数 $101.00 \times 10^9/L$,平均红细胞体积 96.20 fL,平均红细胞血红蛋白量 33.30 pg,平均红细胞血红蛋白浓度 346.00 g/L,网织红细胞百分数 6.38%,网织红细胞绝对值 $174.10 \times 10^9/L$;总胆红素 44.39 $\mu\text{mol}/L$,间接胆红素 31.40 $\mu\text{mol}/L$;铁蛋白 125.50 ng/mL;珠蛋白生成障碍性贫血(地贫)全套基因、遗传球基因、红细胞渗透脆性实验、血红蛋白电泳、微小病毒 B19 抗体、Coombs、高铁血红蛋白还原实验、CD55/CD59、冷凝集素测定均未见明显异常。彩超及 CT 提示:脾大、胆囊多发结石。骨髓电镜、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)等因实验室技术有限未行检测。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 在征得患者及家属的知情同意后,采集患者及家属的乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝外周血 3~5 mL,用试剂盒提取外周血 DNA,置于 -20°C 保存备用。

1.2.2 目标序列捕获与高通量测序 将提取的 DNA 用超声波打断并制备 DNA 文库,通过捕获芯片对血液系统疾病相关基因全外显子及其邻近的内含子区域的 DNA 进行富集,用通用引物对捕获的序列进行 PCR 扩增,最后应用 Ion Torrent PGM 平台对扩增产物进行高通量测序,以检测包括遗传球的致病基因 ANKI、SPTB、SLC4A1、EPB42、SPTA1, CDA

的致病基因 CDAN1、C150RF41、SEC23B、KIF23、KLF1、GATA1 在内的血液系统疾病相关基因。

1.2.3 Sanger 测序 在确定申请人的致病基因型后,对申请人及其父母的外周血 DNA 进行 Sanger 测序。最终将检测结果与人类基因突变数据库(Human Genetic Mutation Database, HGMD)进行比对。

2 结果

2.1 目标序列捕获及高通量测序分析 应用目标序列捕获与高通量测序分析,检测了申请人血液系统疾病相关的基因,检测出 CDA II 型致病基因 SEC23B 存在复合杂合变异,患者存在 SEC23B 基因 c.74C>A(p.Pro25His)和 c.1588C>T(p.Arg530Trp)复合杂合变异。血涂片检查:成熟红细胞大小不等,色素充盈尚可,少见球形红细胞,球形红细胞计数 6%。骨髓细胞学:增生极度活跃骨髓象,其中以红系增生明显活跃,中晚幼红细胞比值增高,中晚幼红细胞易见炭核,晚幼红细胞易见双核,可见哑铃核、花核,偶见点彩,占有核红细胞的 12%。成熟红细胞大小不等,可见大红细胞、嗜多红细胞,血红蛋白充盈可。

2.2 Sanger 测序分析 应用 Sanger 测序对申请人 SEC23B 基因的突变进行验证,结果与二代测序完全一致,并在申请人母亲中检测出 SEC23B 基因 c.74C>A(p.Pro25His)杂合变异,申请人父亲中检测出 SEC23B 基因 c.1588C>T(p.Arg530Trp)杂合变异。

2.3 随访 该患者目前未出现严重的铁过载等并发症,现仍在观察随访中。

3 讨论

随着分子生物学在血液肿瘤发病机制和临床诊疗研究中的不断深入,二代测序作为新的分子生物检测手段被广泛地应用于临床,为血液病的诊疗提供了有效地帮助。

自 2009 年发现编码细胞衣壳蛋白复合物 II(COPII)成分的 SEC23B 基因为 CDA II 的致病基因以来^[3],人类基因突变数据库已经发表了 120 个 SEC23B 基因变体:错义/无义,剪接,调节,缺失,插入^[4]。本研究申请人骨髓及网织红细胞提示增生性贫血,且存在遗传可疑性,运用二代测序发现申请人存在 SEC23B 基因 c.74C>A(p.Pro25His)和 c.1588C>T(p.Arg530Trp)复合杂合变异,目前国内尚无此基因型报道,而国外有研究者在早些年已证实 c.74C>A(p.Pro25His)、c.1588C>T(p.Arg530Trp)突变与 CDA II 相关^[3,5]。另外本研究并未发现家庭成员中存在原发性铁超负荷的致病性 HFE2 基因突变。鉴于申请人轻度贫血,无严重的铁

过载,胆囊结石未活动,暂时给予观察。截至目前,国内仅有 4 篇关于 SEC23B 基因突变的病例报道,其中李思路等^[6]应用高通量二代测序检测出 2 月龄患儿 20 号染色体 SEC23B 基因存在 2 处杂合改变, c. G53A; P. R18H, G>GA 杂合性改变(2 号外显子)和 C. C1831T; P. R611W, C>CT 杂合性改变(16 号外显子),且证实 2 号外显子突变来源于母亲遗传,而 16 号外显子突变源自后天获得;李栋梁等^[2]运用高通量二代测序技术得出复合杂合错义突变 c. 1727T>C (p. F576S)和 c. 1831C>T (p. R611W)可能是该 CDA II 家系的分子发病机制;RU 等^[7]发现 CDA II 家系中存在 c. 938G>A 纯合突变;WANG 等^[8]在 1 例 CDA II 患者中检测到 SEC23B 基因存在一个无义突变 c. 71G>A 及 1 个错义突变 c. 74C>A。可见,大多数 CDA II 患者为错义/无义的纯合子或复合杂合子突变,且发病年龄不一,正确的诊断通常延迟到青春期或成年期。

CDA II 呈常染色体隐性遗传,是 CDA 中最常见的类型。CDA II 患者大多呈正细胞正色素性轻度贫血,黄疸,脾大,胆囊结石和由于铁超负荷导致的皮肤病,且通常随着年龄的增长贫血逐渐减轻,大多数成人患者血红蛋白维持在 90~100 g/L^[7]。有研究发现,其血涂片检查可见异形红细胞,偶尔可见球形红细胞明显增多;光镜下 CDA II 双核及多核幼红细胞占有核红细胞的比率常大于 10%;平行于有核红细胞膜表面的双层膜状结构为其电镜的特征性表现;红细胞膜蛋白的 SDS-PAGE 显示带 3 较窄且迁移率较快,带 4、5 也可出现类似变化^[9]。值得注意的是,继发血色病是 CDA II 患者最重要的远期并发症,严重者预后不良。因此准确诊断 CDA II 对于早期发现和治疗铁超负荷,提供适当的遗传咨询,实现有效的治疗并避免无效的治疗很重要。

而与 CDA II 相比较,CDA I 患者贫血症状重,发病年龄早^[10];骨髓形态中存在有核红细胞核间桥及大量(高达 60%)异染色质的海绵状结构;CDA I 型患者多伴有先天性异常,包括身材矮小,椎体变平,皮肤色素沉着和肢体末端异常斑块等^[11];CDAN1 为 CDA I 型的主要致病基因,通过编码 codanin-1 蛋白,影响着红系成熟;AHMED 等^[12]指出约 20% CDA I 型患者未发现任何基因异常;而 BABBS 等^[13]运用全基因组测序发现 CDA I 患者的 1 个新的基因突变:C150RF41 基因的 c. 533T>A 纯合突变(导致 p. L17Q 错义突变)及 c. 281A>G 纯合突变(导致 p. Y94C 突变)。因此,除 CDAN1、C150RF41 外,CDA I 的致病基因谱仍有待探索。CDA III 型患者贫血多不明显;巨大的多个细胞核为其红系特征性的骨髓形态表现,有核红细胞常显示出细胞核破裂,细胞核膜的异常和大的自体吞噬泡等结构变化;部分患者可出现视网膜血管纹样改变、单克隆丙种球蛋白病及骨髓瘤;KIF23 为 CDA III 型的靶

基因,通过编码有丝分裂驱动蛋白样蛋白(MKLP)1,参与纺锤体的形成,维持中间体的稳定^[14]。CDA IV 型患者呈酸化血清溶血试验阴性的遗传性成红细胞多核病;部分患者存在血象异常,主要表现为粒细胞及血小板的减少。此外,IOLASCON 等^[15]研究报道了与 CDA 表型相关的新的致病基因 KLF1 和 GATA1。

综上所述,CDA 因临床表现异质性大,临床医师对疾病的认知能力不同,而导致临床诊疗相对困难,本文意在强调对于一些复杂、罕见的遗传性疾病,及早地进行基因检测,可减少漏诊、误诊,早期实现有效的治疗。

参考文献

- [1] CHRISTOFORIDOU A, FASOULAKIS Z, KONTOMANOLIS E N. Diagnosis and management of congenital dyserythropoietic anaemia type II in a secundigravida [J]. *Cureus*, 2017, 9(10): e1811.
- [2] 李栋梁, 李博伦, 瞿珊珊, 等. 一个 II 型先天性红细胞生成异常性贫血家系的 SEC23B 基因型及表型分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2017, 34(6): 874-878.
- [3] SCHWARZ K, IOLASCON A, VERISSIMO F, et al. Mutations affecting the secretory COP II coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(8): 936-940.
- [4] MORENO-CARRALERO M I, HORTA-HERRERA S, MORADO-ARIAS M, et al. Clinical and genetic features of congenital dyserythropoietic anemia (CDA) [J]. *Eur J Haematol*, 2018, 101(3): 368-378.
- [5] LIU G, NIU S W, DONG A L, et al. A Chinese family carrying novel mutations in SEC23B and HFE2, the genes responsible for congenital dyserythropoietic anaemia II (CDA II) and primary iron overload, respectively [J]. *Br J Haematol*, 2012, 158(1): 143-145.
- [6] 李思路, 王小勤, 冒青, 等. 基因诊断先天性红细胞生成异常性贫血 1 例 [J]. *中华儿科杂志*, 2016, 56(11): 860-861.
- [7] RU Y X, LIU G, BAI J, et al. Congenital dyserythropoietic anemia in China; a case report from two families and a review [J]. *Ann Hematol*, 2014, 93(5): 773-777.
- [8] WANG L, LIU G, ZHANG Q, et al. Congenital dyserythropoietic anemia type II with novel mutations in SEC23B and HFE2 genes; a Chinese family survey [J]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2013, 34(8): 704-708.
- [9] AYDIN K S, KARAPINAR T H, OYMAK Y, et al. Identification of a novel mutation in the SEC23B gene associated with congenital dyserythropoietic anemia type II through the use of next-generation sequencing panel in an undiagnosed case of nonimmune hereditary hemolytic anemia [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2018, 40(7): e421-423.
- [10] EL-SHEIKH A A, HASHEM H, HOLMAN C, et al. Congenital dyserythropoietic anemia type I (下转第 1519 页)

吞咽功能相较于对照组有明显改善($Z = -3.247$, $P < 0.05$),治愈率和显效率均高于对照组($Z = -3.383$, $P < 0.05$),并且患者吸入性肺炎的发生率也低于对照组($\chi^2 = 6.601$, $P = 0.017$),说明 V-VST 是一种简单有效的评估方法,指导患者更为科学、精准的饮食,同时能够筛选出隐性误吸患者,有效降低吸入性肺炎发生率,这与常红等^[14]通过量化评估脑卒中吞咽障碍患者的饮食类型进而减少患者误吸发生的研究结果相似。

综上所述,V-VST 是一种临床检查吞咽功能障碍的简单方法,不仅可以筛选出隐性误吸,还能充分反映患者吞咽不同性状食物的状况。让患者和医务人员直观地看到吞咽困难患者的严重程度。可以根据患者的评价结果制订出一个更为科学、精准、个性化的饮食方案,进行系统化和循序渐进的护理干预,以提高患者的吞咽功能,减少因未食或进食不当而发生营养不良或吸入性肺炎,从而改善其生活质量。

参考文献

[1] SOMMER C J. Ischemic stroke: experimental models and reality[J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(2): 245-261.

[2] 肖卫红,吴碧玉. 脑卒中后吞咽障碍的康复研究进展[J]. *中国康复理论与实践*, 2017, 23(7): 783-787.

[3] 董强,郭起浩,罗本燕,等. 卒中后认知障碍管理专家共识[J]. *中国卒中杂志*, 2017, 12(6): 519-531.

[4] 朱亚芳,张晓梅,肖瑞,等. 经口摄食功能评估量表与洼田饮水试验应用于急性脑卒中患者中的信效度研究[J]. *中国全科医学*, 2018, 21(3): 318-321.

[5] CLAVÉ P, ARREOLA V, ROMEA M, et al. Accuracy of the volume-viscosity swallow test for clinical screening of oropharyngeal dysphagia and aspiration[J]. *Clin Nutr*, 2008, 27(6): 806-815.

[6] ROFES L, ARREOLA V, MUKHERJEE R, et al. Sensitivity and specificity of the eating assessment tool and the volume-viscosity swallow test for clinical evaluation of oropharyngeal dysphagia[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2014, 26(9): 1256-1265.

[7] GUILLÉN-SOLÀ A, MARCO E, MARTÍNEZ-ORFILA J, et al. Usefulness of the volume-viscosity swallow test for screening dysphagia in subacute stroke patients in rehabilitation income[J]. *NeuroRehabilitation*, 2013, 33(4): 631-638.

[8] 王拥军,王少石,赵性泉. 中国卒中吞咽障碍与营养管理手册[J]. *中国卒中杂志*, 2017, 9(12): 951-967.

[9] MCCALLUM S L. The national dysphagia diet: implementation at a regional rehabilitation center and hospital system[J]. *J Am Diet Assoc*, 2003, 103(3): 381-384.

[10] 李超,曾妍,戴萌,等. 不同病灶部位脑卒中患者吞咽障碍特点分析[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2018, 40(1): 20-23.

[11] 董小方. 基于循证构建脑卒中吞咽障碍患者管理方案及效果评价[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.

[12] 柏慧华,姚秋近,祝晓娟,等. 脑出血患者术后早期吞咽困难筛查及康复护理[J]. *中华护理杂志*, 2013, 48(4): 299-301.

[13] 石磊,王建祥,彭翔,等. 洼田饮水试验和 Gugging 吞咽功能评估量表在老年亚急性脑出血患者中的应用价值[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(11): 2688-2690.

[14] 常红,赵洁,张诗涵,等. 量化食物稠度对减少脑卒中吞咽障碍患者误吸的效果评价[J]. *中华护理杂志*, 2018, 53(1): 32-35.

[15] 安德连,窦祖林,卫小梅,等. 容积-黏度测试在老年吞咽障碍患者中的应用[J/CD]. *实用临床护理学电子杂志*, 2018, 3(29): 2, 14.

(收稿日期:2018-08-18 修回日期:2018-12-17)

(上接第 1515 页)

presenting as persistent pulmonary hypertension with pigeon chest deformity[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2014, 61(8): 1460-1462.

[11] DUKKA S, KING M J, HILL Q A. The diagnostic challenge of congenital dyserythropoietic anaemia: two cases of CDA type II[J]. *J Clin Pathol*, 2014, 67(4): 367-369.

[12] AHMED M R, CHEHAL A, ZAHED L, et al. Linkage and mutational analysis of the CDAN1 gene reveals genetic heterogeneity in congenital dyserythropoietic anemia type I[J]. *Blood*, 2006, 107(12): 4968-4969.

[13] BABBS C, ROBERTS N A, SANCHEZ-PULIDO L, et al. Ho-

mozygous mutations in a predicted endonuclease are a novel cause of congenital dyserythropoietic anemia type I[J]. *Haematologica*, 2013, 98(9): 1383-1387.

[14] LILJEHOLM M, IRVINE A F, VIKBERG A L, et al. Congenital dyserythropoietic anemia type III (CDA III) is caused by a mutation in kinesin family member, KIF23[J]. *Blood*, 2013, 121(23): 4791-4799.

[15] IOLASCON A, HEIMPEL H, WAHLIN A, et al. Congenital dyserythropoietic anemias: molecular insights and diagnostic approach[J]. *Blood*, 2013, 122(13): 2162-2166.

(收稿日期:2018-09-02 修回日期:2019-01-16)