

遗传性球形红细胞增多症家系 ANK1 基因新发剪切位点突变的不典型表型及表型差异探讨

丁红珂^{1,2} 潘小英^{1,2} 吴新华³ 张彦^{1,2} 吴菁^{1,2} 刘玲^{1,2} 曾玉坤^{1,2}

余丽华^{1,2} 兰菲菲^{1,2,*}

(1. 广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442; 2. 广东省妇幼保健院 妇幼代谢与遗传病重点实验室, 广东 广州 511442; 3. 广东省妇幼保健院 信息管理科, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 对疑似遗传性球形红细胞增多症家系进行基因检测, 探讨家系成员的不典型表型及表型差异。**方法** 利用核心家系医学外显子测序进行基因突变检测, 一代测序验证结果。根据家系检测发现的基因突变情况, 充分知情同意后行第二胎产前诊断。**结果** 外显子测序发现先证者 ANK1 基因存在一个剪切位点 c. 4381+1delG 杂合突变, 遗传自父亲。该位点在物种间高度保守, 生物信息学软件预测提示 c. 4381+1delG 可能影响剪切, 本实验室参考人群(2000 人)外显子数据中未发现此突变位点, 提示人群频率低。产前诊断结果提示胎儿遗传了父亲的基因突变。**结论** 在遗传性球形红细胞增多症家系中首次发现 ANK1 基因 c. 4381+1delG 杂合突变, 数据库中未见报道, 丰富了 ANK1 基因突变谱。先证者及父亲携带基因突变, 但没有典型的临床表现且表型存在差异, 可能是因为该突变未导致锚蛋白功能全部丧失, 红细胞膜损伤程度较低, 并且不同个体间存在遗传背景差异所致。胎儿遗传了父亲突变位点, 为胎儿今后的发病风险提供遗传咨询信息。

【关键词】 遗传性球形红细胞增多症; ANK1 基因突变; 表型差异

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To detect the suspected hereditary spherocytosis family gene mutation and discuss the probable cause of atypical phenotypes and phenotypic differences. **Method** The core family medical exome sequencing was used for gene mutation detection and Sanger sequencing verified the results. Prenatal diagnosis of the second fetus was performed with full informed consent according to the genetic mutation found in the family. **Results** Exome sequencing found that there was a split-site heterozygous mutation c. 4381+1delG in ANK1 gene in proband, which was inherited from her father. The position is highly conserved between species and the prediction of bioinformatics software suggested that the splicing might be affected. The mutation was not found in the exome sequencing database of the reference population (2000 people) in our laboratory, suggesting low population frequency. Prenatal diagnosis indicated that the fetus inherited the mutation from the father. **Conclusions** The new mutation c. 4381+1delG of ANK1 gene was found in a family with hereditary spherocytosis, which enriches the mutation spectrum of ANK1 gene. The proband and the father carried the mutation, but they don't have typical clinical manifestation and the phenotype was different, which may be caused by the mutation did not lead to the complete loss of anchor protein function, the degree of erythrocyte membrane damage was mild, and the genetic back-

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2019.03.001

* 通讯作者: 兰菲菲, E-mail: shuyue88@163.com

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(B2017057)

ground variation between different entities result in variable phenotype. The foetus inherited the paternal mutation, which provides genetic counseling information for the disease risk.

【Key words】 hereditary spherocytosis; ANK1 gene mutation; variable phenotype

遗传性球形红细胞增多症(hereditary spherocytosis, HS)是一种遗传性溶血性贫血,是由于基因突变导致红细胞膜蛋白缺陷而引起的贫血,发病率约为1/5000,临床表现为贫血及相关症状,且表现程度不一,存在一定的遗传异质性,通常表现为不同程度的贫血、黄疸、脾肿大、球形红细胞增多、红细胞渗透脆性增加等^[1,2]。目前发现并证实的与HS发病相关的基因有ANK1、SPTA1、SPTB、SLC4A1和EPB42,分别编码锚蛋白、 α 血影蛋白、 β 血影蛋白、带3蛋白和4.2蛋白,参与红细胞膜之间的相互作用和脂质双分子层的构成,其中以ANK1基因突变最为常见^[3-6]。HS大部分为常染色体显性遗传,少数为常染色体隐性遗传。

本文利用高通量测序方法发现临床表现不典型家系先证者和其父亲在ANK1基因存在一个剪切位点的杂合突变:c.4381+1delG杂合(转录本号:NM_000037)(chr8:41,688,155),染色体位置参考GRCh38/hg38版本,该突变位点尚未见报道。同时分析该家系基因突变遗传学特点与临床表现的关系,并对第二胎进行产前诊断和遗传咨询。并为临床遗传咨询医生对HS临床表现型差异的认识提供更多的资料。

1 资料与方法

1.1 基本资料 实验样本来自广东省妇幼保健院医学遗传中心遗传咨询门诊患者夫妇和患儿,母亲为妊娠状态。患儿女性,11岁,出生后发现贫血,并伴有黄疸。辅助检查:血红蛋白在70~110g/L左右波动,间接胆红素升高58.5 μ mol/L,红细胞生存时间28天,网织红比例10.8%,红细胞渗透脆性增加,抗碱血红蛋白轻度升高3.25%。骨髓穿刺、末梢血涂片、地中海贫血基因、G6PD检查未见明显异常。腹部超声提示胆囊多发小结石,脾大(厚35mm,斜径106mm,肋下15mm),怀疑为遗传性球形红细胞增多症,并对先证者及其父母进行了高通

量医学外显子基因检测。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 经孕妇和家属同意,签署知情同意后采集夫妻双方及先证者外周静脉血样本2ml。发现突变后,孕妇于孕19周在超声引导下进行羊膜腔穿刺术抽取胎儿羊水5ml用于基因检测。

1.2.2 基因组DNA提取 羊水5ml用2000 rpm离心10min,丢弃上清留取羊水细胞待用。取外周血全血200 μ l及羊水细胞,使用Qiagen DNA Blood Mini Kit提取试剂盒(Qiagen公司,德国)提取基因组DNA,按照试剂盒的操作说明书进行DNA提取操作。

1.2.3 高通量外显子基因检测 提取的父母子家系DNA送广州嘉检医学检测公司进行医学外显子(与人类疾病相关的4000个基因)基因测序,测序范围包括50902个编码区总共含有8591731个碱基,包含外显子与内含子交界区。平均覆盖深度221+/-140 $\times$,大于10 $\times$ 覆盖区间占99.7%,大于20 $\times$ 覆盖区间占99.2%。

1.2.4 疑似新发突变的一代测序验证 针对高通量测序发现的疑似致病位点,设计引物进行PCR特异扩增后Sanger测序进行验证。

1.2.5 测序结果分析 一代测序的结果与数据库的序列进行比对,确定二代测序发现的疑似致病突变。参考序列数据来自UCSC Genome Browser(<http://genome.ucsc.edu>)数据库,序列版本号:GRCh38/hg38。

1.2.6 产前诊断 告知疑似致病突变的临床意义,经家属知情同意后,用一代测序的方法进行胎儿产前诊断。

2 结果

2.1 高通量外显子基因检测结果 父母子核心家系医学外显子测序发现先证者及先证者父亲ANK1基因存在一个剪切位点的杂合突变:c.4381+1delG

The image displays a genomic analysis of a family. At the top, a genomic map shows a region with blue and red segments. Below this, three tracks are shown: 'father' (父亲), 'proband' (先证者), and 'mother' (母亲). Each track includes a reference sequence and a list of variants. The bottom section shows a detailed sequence alignment of the three individuals, with red arrows indicating specific variant positions.

娩一女孩,目前 5 月龄,截至该文撰稿时血常规检查未发现异常情况(图 2)。

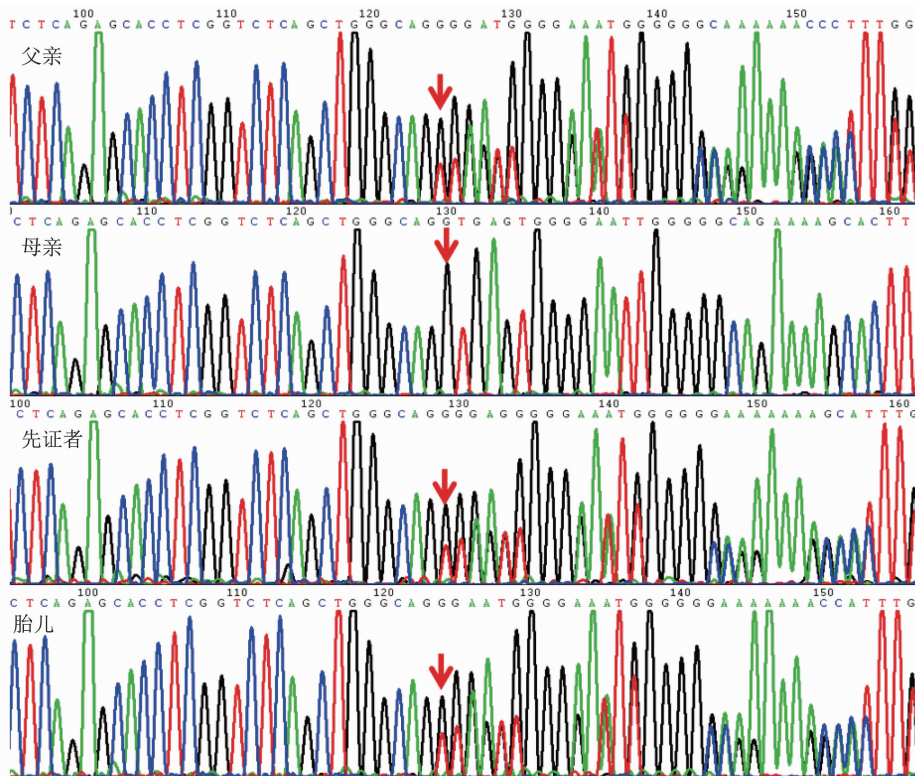


图2 父母子及胎儿一代测序结果

2.3 突变位点致病性分析

2.3.1 人群频率 c. 4381+1delG 杂合位点,未见中国人群频率数据库收录(<https://diseasedx.virgilbio.com/search?search=8:41688155Cdel&version=38>),提示人群频率较低,属于罕见变异,排除多态性可能。

2.3.2 软件预测 生物信息学软件预测提示可能影响剪切功能,分析预测值如图 3。

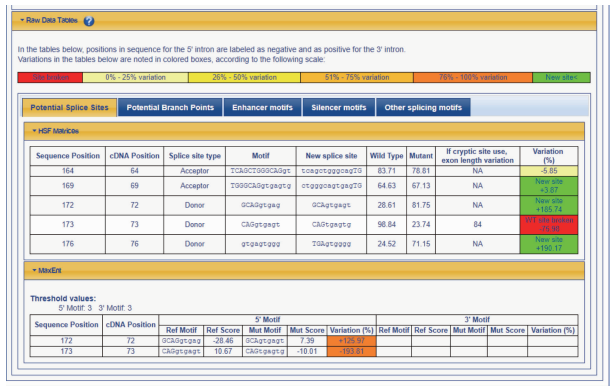


图 3 生物信息学软件预测结果

2.3.3 保守性分析 c. 4381+1delG 杂合(NM_000037)在物种间高度保守(图 4)。



图 4 c. 4381+1 位点物种间保守型分析(ANK1 基因为反义链编码基因)

3 讨论

红细胞膜组成成分包括蛋白质、脂质和糖,胞膜蛋白主要由跨膜蛋白和外周锚蛋白组成。ANK1 基因编码外周锚蛋白,HS 的发病原因与 ANK1 基因突变导致锚蛋白异常有关,研究报道的 ANK1 基因突变有几十种^[7,8],突变导致 HS 的临床表现型也各不相同。ANK1 基因位于 8 号染色体 p11.2 区域,42 个外显子共编码 1881 个氨基酸^[9],具有不同的转录本。锚蛋白是红细胞膜蛋白的重要组成部分,主要功能是维持红细胞膜的稳定性。锚蛋白缺陷或者其他异常会导致红细胞膜不稳定,红细胞形状改变成球形^[10],容易发生破裂。本研究中先证者高通量测序发现 ANK1 基因存在 c. 4381+1delG 杂合突变,遗传自父亲,该突变点位于经典的剪切位点上,软件预测可以导致 mRNA 产生新的剪切位点,影响野生蛋白结构。该突变位点国内外尚未见报道,结合先证者病史和临床表现,考虑该突变位点为疑似致病性突变。

HS 的临床表现主要为不同程度的溶血性贫血、黄疸、脾肿大、红细胞球形改变、红细胞渗透脆性增加,HS 的临床表现型差异较大,有的仅仅表现为轻微的贫血,容易漏诊或者误诊^[11]。本研究中的先证者出生后发现贫血症状,血红蛋白在 70~110g/L 左右波动,伴有黄疸。胆囊有多发小结石,脾肿大(厚 35mm,斜径 106mm,肋下 15mm),检测结果排除了 G6PD 和地中海贫血。实验室检查发现间接胆红素升高(58.5μmol/L),红细胞生存时间降低,网织红比例增加,红细胞渗透脆性增加,抗碱血红蛋白轻度升高 3.25%。骨髓穿刺无异常,血涂片并未见到球形红细胞改变,不属于典型的 HS 表现,提示该突变位点对锚蛋白的功能影响可能不是高度破坏性的,至少在维持红细胞的形态上没有明显的功能损害,推测可能与突变位置有关,该突变位点位于 cDNA 的后 1/4 区域,剪切位点,发生改变,从而影响了之后 7 个外显子的翻译,该蛋白的主要功能区位于第 1~827 位氨基酸的 89 kDa 结构域、第 1234~1362 位氨基酸的 UPA 结构域和第 1383~1881 位氨基酸的 55 kDa 调节结构域,本家系突变

位于 55 kDa 调节结构域区域,剪切后产生新的氨基酸序列,未能完全破坏该蛋白功能,可能是导致先证者有红细胞渗透脆性的增加但并无球形红细胞典型表现的遗传学因素。先证者父亲外周血检测仅提示平均红细胞血红蛋白浓度 MCHC 值偏高(356g/L),血涂片无异常,临床表现明显轻于先证者。这种表现型的差异,可能与个体之间不同的遗传背景相关,提示可能存在基因之间的相互作用关系。产前诊断提示胎儿也存在该位点突变,但家属经过考虑后决定继续妊娠,后正常分娩一女婴,目前血常规检查未提示有异常情况,需要进一步随访观察。

本研究发现的 HS 患者,由于其没有典型的球形红细胞改变,父亲只有轻度 HS 相关的临床表型,临床诊断容易漏诊或者误诊。通过基因检测发现该家系 ANK1 基因 1 个未见报道的剪切突变位点,且家系临床表型差异较大,丰富了 ANK1 基因的突变谱,同时提示该突变存在表现型差异,为临床诊断提供新的遗传学证据。

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] 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] 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.
- [5] Yang MQ, Laflamme K, Gotea V, et al. Genome-wide detection of a TFIID localization element from an initial human disease mutation[J]. Nucleic Acids Res, 2011,39(6):2175-2187.
- [6] Gundel F, Eber S, Heep A. A new ankyrinmutation(ANK1 EXON E9X) causing severe hereditary spherocytosis in the neonatal period[J]. Ann Hematol, 2011, 90(2):231-232.
- [7] 杨旺,林发全. ANK1 基因突变与遗传性球形红细胞增多症[J]. 广东医学,2015,36:1942-1944.
- [8] 廖林,丘玉铃,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,2013,28:6002-6004.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Guan H, Liang X, Zhang R, et al. Identification of a denovo ANK1 mutation in a Chinese family with hereditary spherocytosis [J]. Hematology, 2017, 3:1-5.

(收稿日期:2019-07-30)

编辑:宋文颖