

努力提高“遗传性球形红细胞增多症”的诊断水平*

Improving the diagnostic level of hereditary spherocytosis

薛军¹

[关键词] 遗传性球形红细胞增多症;红细胞膜病;分子诊断

Key words hereditary spherocytosis; RBC membrane disorder; molecular diagnosis

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2020.11.002

[中图分类号] R555.1 [文献标志码] A



专家简介:薛军,医学博士,主任医师,副教授,硕士生导师。中华医学会血液学分会委员,江苏省医学会血液学分会委员,从事血液病临床教学科研工作 35 年,发表医学论文 40 多篇,参与和主持国家自然科学基金和省局级科研基金项目 6 项,获得省级科技成果一项,主要研究方向是遗传性血液疾病,铁代谢与血液病。

遗传性球形红细胞增多症(hereditary spherocytosis, HS)是一种先天性红细胞膜骨架蛋白异常所致的遗传性溶血性贫血。与其他溶血性贫血临床表现类似,HS 有贫血、黄疸、脾肿大、胆结石、外周血球形红细胞增多及红细胞渗透脆性增加等特征。患者以散发性就诊,不易引起临床医生重视,常常导致误诊和漏诊,国外报道 HS 发病率为 1/2 000。在我国此病也并非罕见,近 15 年来我们中心确诊了 30 例成人 HS 患者,大多数为轻型患者,全部延误诊断,最长病史达 37 年,可见诊断水平不够;从治疗结果来看,部分患者确诊后给予切脾治疗,血红蛋白能恢复正常,取得了明显的疗效。所以,努力提高对 HS 的认识和诊断水平就显得尤其重要。

1 发病率

HS 是遗传性红细胞膜病中发病率最高的溶血性贫血,各种族中均有发生,北欧和北美高加索人种发病率最高,在 1/5 000~1/2 000^[1]。由于该病散发,目前国内无大宗病例统计资料,第二军医大学长海医院李津婴教授统计资料显示^[2],先天性溶血性疾病患者中红细胞膜病占 43%,血红蛋白病占 34%,红细胞酶病占 23%,膜病中 HS 最多,占 84%。Wang 等^[3]将 1978—2013 年在中国医学期

刊上发表的 HS 病例统计后发现,36 年间共报道病例数 2 043 例,1994 年以后此病报道例数明显增加,最后这 10 年病例数为 979 例,几乎占有病例的一半,这说明临床医生越来越重视 HS 的诊断,另一方面,也说明对 HS 认识上有所提高;有趣的是,医科大学附属医院诊断的病例数占 71%,而市级医院占 22%,这说明基层医院的医生对 HS 不太了解;从地区分布来看,主要在东南部省份,如上海、北京、辽宁、湖北等,而西藏、青海和贵州只有少数病例报道;模型分析显示 65 岁后病例数陡然增加,85 岁达顶峰,这可能是由于年轻时症状轻,长期反复溶血,随着年龄增长,器官功能减退,症状加重,因此就医频繁或症状典型化而被确诊。

2 诊断方法

勿容置疑,如果患者有典型临床表现:皮肤巩膜黄染,酱油样尿或血尿,脾肿大甚至巨脾,胆结石,外周血球形红细胞增多,红细胞脆性试验阳性,加之有家族遗传病史,即可诊断。但是由于 HS 临床表现迥异,尤其是轻型和隐匿患者,确诊困难性增加,以下诊断手段都不是特异性方法,需要医生搞懂搞精,注意比较排查,不能以一种实验异常做出此病的诊断。

2.1 血常规和外周血涂片

此法简单首选,不可缺少,否则可能造成漏诊误诊,且多参数应用更佳。由于血球计数仪包含软件不一样,红细胞参数也不一样。常用参数是平均红细胞体积(MCV)<80 fL,平均红细胞血红蛋白

*基金项目:南京市卫生健康委员会医学重点科技发展项目课题(No:ZKX17025)

¹南京医科大学附属南京第一医院血液科(南京,210006)

通信作者:薛军, E-mail: xuejun64@sina.com

浓度(MCHC) >354 g/L,红细胞分布宽度(RDW) $>14\%$,其诊断 HS 的灵敏度为 63% ,特异度为 100% ^[4]。较少使用指标是正常人球形红细胞平均体积(MSCV) $>MCV$, $(MCV-MSCV)>9.6$ fL 时,诊断 HS 的灵敏度为 100% ,特异度为 90.57% , $MSCV/MCV<1$ 是诊断 HS 较为简便、实用和准确的筛查指标^[5]。新近日本产血细胞计数仪对 4 000 多份血样分析结果表明,网织红细胞 $\geq 100\times 10^9/L$,同时小红细胞(MicroR) $\geq 2.6\%$,诊断未切脾 HS 的敏感度达 100% 。近年来研究强调浓染细胞增多($>4\%$)比球形红细胞更具诊断价值,这种红细胞中空淡染区消失,染色深,在高网织红细胞和高 RDW 情况下,患者 MCHC 无明显增高、小球形变化不甚明显,此时浓染细胞增多可提示 HS。在这方面成人血液科医生经验可能不多,儿童血液科医生可能更有体会。

2.2 孵育红细胞渗透脆性试验(OF)

以往认为此方法是金标准。虽然孵育后敏感性提高至 81% ,但特异性下降,而且对于球形红细胞较少者敏感性和特异性都要下降,由于 20% 的 HS 患者 OF 试验正常,故此试验如果正常仍不能排除 HS。为了提高检测阳性率,近年采用流式细胞仪方法,实验敏感性达 100% ,特异性达 98% ^[6],缺点是不易在普通实验室开展,而且指南中也没有作为筛查试验推荐。

2.3 酸化甘油溶血试验(AGLT50)

此试验优点是方法简单,仪器设备要求不高(只要一台酶标仪),但它只能作为一种筛查方法;缺点是灵敏度虽高,但特异性降低,既使不典型患者,如网织红细胞正常和(或)外周血无球形红细胞,AGLT50 和孵育 OF 的敏感度仍可达 99% ,受多种因素影响,AGLT50 阳性也可见于自身免疫性溶血性贫血,G6PD 酶缺乏,丙酮酸激酶缺乏症,部分孕妇和肾衰竭透析患者等。

2.4 伊红-马来酰亚胺结合试验(EMA-BT)

伊红-马来酰亚胺是一种染料,它既能与红细胞膜上的带 3 蛋白(band3)结合,也能与 CD47 和 Rh 相关糖蛋白结合,用此判定膜蛋白缺乏,此染料易购得,上流式细胞仪检测,2 h 可得到结果,故 EMA-BT 试验简单易操作,是目前公认的特异性和敏感性最高的 HS 实验诊断方法。该方法可以检测 Rh 相关的膜内蛋白和带 3 的相对数量,其中检测带 3 缺陷敏感性为 92.7% ,特异性为 99.1% 。此法易操作,EMA 结合试验还可用于遗传性口形红细胞增多症和遗传性热异形细胞增多症的鉴别诊断^[7]。Bianchi 等^[8]检测了 108 例 HS 患者和 42 例其他类型的溶血性贫血患者 EMA 结合试验的敏感度和特异度分别为 87% 和 98% 。

2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western blot 法检测红细胞膜蛋白

它是检测红细胞膜蛋白缺陷非常有用的实验方法,但此方法操作步骤多,实验结果不稳定,费时费力,需要一定的实验技术水平,难以在临床上常规用于红细胞膜蛋白缺陷性疾病诊断。它可检测包括 α -血影蛋白、 β -血影蛋白、锚蛋白、带 3、带 4.2、带 4.1 六种膜蛋白的相对含量变化。尽管某种蛋白缺乏,但也可影响其他蛋白组装时含量相应的改变,此时会造成另一种蛋白缺乏的假象。Mariani 等^[9]检测 300 例 HS,发现 11% 的 HS 采用 SDS-PAGE 无法确定膜蛋白缺陷类型。它对先天性红细胞生成异常性贫血 II 型具有鉴别诊断价值。

2.6 基因测序技术

红细胞膜骨架蛋白的相关基因和突变位点已确定,可采用基因测序方法检测外显子或内含子突变位点,协助诊断或确诊 HS。分子诊断方法先进,费用稍高,通常作为最后的选择,尤其是对于有症状患者,常规实验方法不能确诊时可帮助确诊。随着测序技术发展,从 Sanger 测序到二代测序、整个外显子组以及全基因组测序,不仅能发现新的突变位点,还能够发现两种遗传性疾病共存的现象,如 HS 合并地中海贫血。Roy 等^[10]选择 33 种突变基因组合,采用靶向基因测序的方法显示特异性为 100% ,敏感性为 99.7% ,我们的实验结果也与之相同。

以上 6 种方法临床较常用,国外还提到渗透梯度激光衍射细胞测量术(ektacytometry)等诊断技术方法,由于国内无此条件,故在此不赘述。

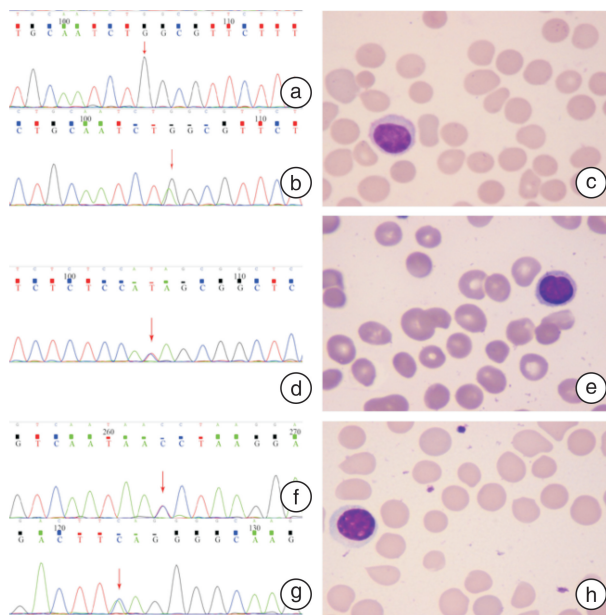
3 成人轻型 HS 3 例典型病例

病例 1,女,18 岁,头昏,乏力 10 d 入院。入院体检:轻度贫血貌,巩膜轻度黄染,脾脏肋下未触及,Hb 105 g/L,WBC $13.36\times 10^9/L$,PLT $418\times 10^9/L$,MCV 79.9 fL,MCH 22.8 pg,网织红细胞 $9.8\%\sim 12.6\%$,外周血片可见幼稚细胞,红细胞大小不等,溶血筛查试验:Coombs 阴性,血浆游离血红蛋白 38.4 mg/L,结合珠蛋白 1.08 Hb/L,糖水试验阴性,尿胆原(++),总胆红素 16.5 $\mu\text{mol/L}$,直接胆红素 7.3 $\mu\text{mol/L}$,间接胆红素 9.2 $\mu\text{mol/L}$,OF 试验 5.2 g/L 开始溶血, 4.0 g/L 完全溶血,乳酸脱氢酶 2399 U/L。骨髓像显示红系增生明显活跃,部分细胞巨幼样变,嗜多色性红细胞多见,红细胞浅染区小,B 超示脾脏大小 $125\text{ mm}\times 48\text{ mm}$ 。基因突变分析发现 SPTB 基因有 1 个杂合突变:c.6238C $>$ T(编码区第 6238 号核苷酸由胞嘧啶变异为胸腺嘧啶),导致氨基酸改变 p.Q2080X(无义突变),该变异在正常人群数据库频率为(-),蛋白功能预测软件 SIFT、

PolyPhen_2、REVEL 的预测结果分别为未知、未知、未知,在 HGMD 专业版数据库中未见报道。家系验证分析,受检人之母亲和姐姐该位点无变异(患者父亲死亡)(图 1a,b,c)。

病例 2,男,59 岁,40 年前发现贫血但病因不明,患者因发热伴尿黄 4 d 入院,畏寒,高热,尿黄或红茶水样,皮肤和巩膜轻度黄染,Hb 75 g/L,WBC 2.48×10^9 /L,PLT 35×10^9 /L,MCV 114.4 fL,MCH 38.5 pg,网织红细胞 6.2%,尿胆原(+++),尿胆红素阴性,维生素 B₁₂ 128.10 pmol/L,EPO > 750 mIU/ml,CD55(+)/CD59(+)+97.89%,肝胆脾胰及双肾 B 超显示脾脏轻度肿大。骨髓像显示红系增生明显活跃,粒红巨核系均见病态造血现象。溶血九项筛查抗碱血红蛋白增高 25%。EMA 9.94%,MDS 相关 13 种突变基因检测未见异常,染色体核型分析正常。基因突变检测分析发现 ANK1 基因有 1 个杂合突变:c.3194A>G(编码区第 3 194 号核苷酸由腺嘌呤变异为鸟嘌呤),导致氨基酸改变 p.Y1065C(第 1 065 号氨基酸由酪氨酸变异为半胱氨酸),为错义突变,该变异不属于多态性位点,在人群中发生频率极低,在 HGMD 专业版数据库中未见报道(图 1d,e)。

病例 3,男,62 岁,反复头晕、乏力、尿黄眼黄几十年,一直病因不明,其哥哥有类似病史。Hb 158 g/L,WBC 9.6×10^9 /L,PLT 298×10^9 /L,网织红细胞 12%,尿常规正常,铁蛋白 964.7 ng/mL,总胆红素 92.4 μ mol/L,直接胆红素 10.5 μ mol/L,间接胆红素 81.9 μ mol/L。腹部 B 超:胆囊结石,脾脏厚度 62 mm,长径 184 mm,骨髓像显示红系增生明显活跃,粒系占 38%,红系占 49%,以中晚幼红为主,部分细胞巨幼样变,多色性红细胞多见,溶血筛查试验:Coombs 阴性,糖水试验弱阳性,其他未见异常,CD55(+)/CD59(+)+99%,Flaer 阴性细胞 0。OF 试验 4.4 g/L(开始溶血),3.6 g/L(完全溶血)。基因突变检测分析发现 SPTB 基因有 2 个杂合突变:①c.4993C>A(编码区第 4 993 号核苷酸由胞嘧啶变异为腺嘌呤),导致氨基酸改变 p.Q1665K(第 1 665 号氨基酸由谷氨酰胺变异为赖氨酸),为错义突变,该变异在正常人群数据库频率为 0.000 10,蛋白功能预测软件 SIFT、PolyPhen_2、REVEL 的预测结果分别为有害、有害、良性。在 HGMD 专业版数据库中未见报道;②c.877G>A(编码区第 877 号核苷酸由鸟嘌呤变异为腺嘌呤),导致氨基酸改变 p.V293I(第 293 号氨基酸由缬氨酸变异为异亮氨酸),为错义突变,该变异在正常人群数据库频率为(-),蛋白功能预测软件 SIFT、PolyPhen_2、REVEL 的预测结果分别为有害、有害、良性,在 HGMD 专业版数据库中未见报道(图 1f,g,h)。



病例 1 先证者(b)SPTB 基因有 1 个杂合突变 c.6238C>T,其母和姐姐为野生型(a);病例 2 先证者(d)ANK1 基因有 1 个杂合突变 c.3194A>G;病例 3 先证者(f,g)SPTB 基因有 2 个杂合突变 c.4993C>A 和 c.877G>A。3 例先证者红细胞皆呈小球形状(c,e,h)。

图 1 3 例 HS 患者外周血红细胞形态(瑞特染色 $\times 1\ 000$)和 SPTB 及 ANK1 基因突变

4 诊断路径

欧洲早在 2004 年就公布了 HS 诊断治疗指南^[11],2011 年又做了更新^[12],具有典型临床症状并且有遗传家族史患者较易诊断,路径图强调 EMA 结合实验的重要性,同时也强调了 SDS-PAGE 实验在鉴别各种类型遗传性红细胞疾病的意义,路径繁杂不适合临床工作,是否符合国情有待证明。2017 年韩国学者提出了诊断路径,它从临床部分(溶血症状体征,特别是家族病史),常规实验检查(溶血筛查项目)到特殊实验检查(强调外周血涂片观察,OF,EMA),最后基因测序确诊的流程,简单明了,更适合临床工作^[13]。在此基础上,我们提出了更加简单易操作的 HS 诊断路径图^[14]。

5 国内研究现状及存在的问题(成人 HS)

从国内学者在国内外杂志发表的文章来看,早期多是个案报道,近十年来,也可见一定数量的临床报道。我们中心于 2014 年发表了 7 例成人 HS 临床特点分析^[15],2019 年发表了靶向基因富集测序技术在成人遗传性球形红细胞增多症诊断中的临床应用^[16],结果表明此项测序技术是确定红细胞膜疾病基因突变的有效工具,可以促进准确的诊断,实验结果与临床特征吻合良好。2020 年我们发表了中国成人遗传性球形红细胞增多症的临床与实验研究^[14],系统总结了国内成人 HS 的临床特

点,首次将电镜扫描技术应用于诊断,并且提出了简易诊断 HS 的路径图。天津血研所张凤奎教授对 37 例遗传性球形细胞增多症基因突变特征分析^[17],发现中国 HS 以 ANK1 和 SPTB 基因突变最常见,突变类型主要为错义突变和无义突变;不同 HS 相关基因突变与 HS 严重程度间无明显相关。协和医科大学 Wang 等^[18]发表的外显子测序证实 38 例中国人 HS 的分子诊断,也同样证实了基因测序方法是诊断的重要工具,提高了我们对中国人 HS 基因谱的认识,并表明基于家系,尤其是亲子三人组的测序分析有助于提高诊断效率。对于 EMA-BT 试验和流式 OF 技术的推广以及技术细节还需要探索和改进。

目前国内对 HS 的认识还处在逐步提高的过程,血液学会组织的会议也很少谈到这个主题,国外已经有 HS 的诊断共识和诊断路径,比较规范化,而国内还没有。以后期望由医学会组织,特别是红细胞学组同仁们组织编写我国的 HS 诊断规范,当然这需要建立在国内对此病的研究基础之上。

6 结语

遗传性溶血性贫血临床表现类似,因此需要重视这些疾病之间的鉴别诊断。大多数误诊病例常常是无症状轻型和隐匿的 HS 患者,为避免误诊,进行广泛特定的实验室筛查是必需的。实验诊断技术还在不断的改进中,切记每一种方法都不是万能的,生化检测技术进步和新的现代分析仪器应用于实验室诊断可以使长期未诊断或误诊患者的数量逐步减少。尽管新技术出现,然而,完整全面的血细胞分析是提高先天性溶血性贫血一线筛查和鉴别诊断的第一步。

参考文献

- [1] Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis[J]. *Lancet*, 2008, 372: 1411–1426.
- [2] 李津婴,黄正霞,许燕群,等. 溶血性疾病中的双重杂合因素及溶血系统分析的临床意义(附 506 例贫血黄疸病因分析)[J]. *临床血液学杂志*, 2005, 18(4): 204–206.
- [3] Wang Chao, Cui Yazhou, Li Yan, et al. A systematic review of hereditary spherocytosis reported in Chinese biomedical journals from 1978 to 2013 and estimation of the prevalence of the disease using a disease model[J]. *Intractable Rare Dis Res*, 2015, 4: 76–81.
- [4] Eberle SE, Sciuccati G, Bonduel M, et al. Erythrocyte indexes in hereditary spherocytosis[J]. *Medicina (B Aires)*, 2007, 67: 698–700.
- [5] Broseus J, Visomblain B, Guy J, et al. Evaluation of mean sphere corpuscular volume for predicting hereditary spherocytosis[J]. *Int J Lab Hematol*, 2010, 32: 519–523.
- [6] Warang P, Gupta M, Kedar P, et al. Flow cytometric osmotic fragility—an effective screening approach for red cell membranopathies[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2011, 80: 186–190.
- [7] Kar R, Mishra P, Pati HP. Evaluation of eosin-5-maleimide flow cytometric test in diagnosis of hereditary spherocytosis[J]. *Int J Lab Hematol*, 2010, 32: 8–16.
- [8] Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, et al. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics[J]. *Haematologica*, 2012, 97: 516–523.
- [9] Mariani M, Barcellini W, Vercellati C, et al. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect[J]. *Haematologica*, 2008, 93: 1310–1317.
- [10] Roy NB, Wilson EA, Henderson S, et al. A novel 33-Gene targeted resequencing panel provides accurate, clinical-grade diagnosis and improves patient management for rare inherited anaemias[J]. *Br J Haematol*, 2016, 175: 318–330.
- [11] Bolton-Maggs PH, Stevens RF, Dodd NJ, et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis[J]. *Br J Haematol*, 2004, 126: 455–474.
- [12] 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: 37–49.
- [13] Kim Y, Park J, Kim M. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era[J]. *Blood Res*, 2017, 52: 84–94.
- [14] Xue J, He Q, Xie XJ, et al. A clinical and experimental study of adult hereditary spherocytosis in the Chinese population[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36: 552–560.
- [15] 何清, 薛军. 成人球形红细胞增多症临床分析[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(8): 603–605.
- [16] Xue J, He Q, Xie X, et al. Clinical utility of targeted gene enrichment and sequencing technique in the diagnosis of adult hereditary spherocytosis[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7: 527.
- [17] 彭广新, 杨文睿, 赵馨, 等. 37 例遗传性球形细胞增多症基因突变特征分析[J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(11): 898–903.
- [18] 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: 947–953.

(收稿日期: 2020-08-12)