

# 应用靶向二代测序诊断疑诊 先天性贫血46例

李园 彭广新 高清妍 李洋 叶蕾 李建平 宋琳 樊慧慧 杨洋  
熊佑祯 武志洁 杨文睿 周康 赵馨 井丽萍 张凤奎 张莉

**【摘要】** 目的 评估靶向二代基因测序(NGS)在先天性贫血诊断中的价值。方法 设计含217个先天性贫血相关致病基因的NGS基因组合——BDHAP-2014,对2014年8月至2017年7月连续就诊的临床怀疑诊断先天性贫血的患者进行NGS检测和亲代验证。结果 共纳入46例患者,临床疑诊分别为范可尼贫血(FA)11例、先天性红细胞生成异常性贫血(CDA)8例、先天性铁粒幼红细胞性贫血(CSA)6例、先天性溶血性贫血(CHA)12例、先天性角化不良(DC)1例、铁剂难治性缺铁性贫血(IR-IDA)4例及未明原因的血细胞减少(Uc)4例。经靶向NGS检测,28例(60.9%)患者明确了诊断和(或)分型,累及12个基因共44种致病性突变。其中26例(56.5%)基因诊断结果与临床疑诊相符,包括FA(5/11, 45.5%)、CSA(6/6, 100.0%)、CDA(3/8, 37.5%)及CHA(12/12, 100.0%);2例(4.3%)患者的基因诊断结果与临床疑诊不一致,依据NGS纠正了诊断,包括1例DC和1例家族性噬血细胞性淋巴瘤组织细胞增生症(FHL);12例CHA依据基因检查结果进一步明确了溶血类型。18例(39.1%)患者未明确致病基因,最终未能明确诊断。结论 NGS对临床疑诊先天性贫血患者具有重要的诊断价值,可为临床治疗选择提供依据。

**【关键词】** 先天性贫血; 二代基因测序; 诊断

**基金项目:** 国家科技重大专项课题(2017ZX09304024);天津市血液病临床医学研究中心建设(15ZXLCSY00010)

**Using target next-generation sequencing assay in diagnosing of 46 patients with suspected congenital anemias** Li Yuan, Peng Guangxin, Gao Qingyan, Li Yang, Ye Lei, Li Jianping, Song Lin, Fan Huihui, Yang Yang, Xiong Youzhen, Wu Zhijie, Yang Wenrui, Zhou Kang, Zhao Xin, Jing Liping, Zhang Fengkui, Zhang Li. Anemia Therapeutic Center, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Zhang Li, Email: zhangli@ihcams.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To evaluate the impact of the targeted next-generation sequencing (NGS) assay for difficult congenital anemias. **Methods** Blood Disease Hospital Anemia Panel 2014 (BDHAP-2014) including 217 known genes of congenital anemias was developed. NGS and parental verification were performed for patients who were suspected diagnosed with congenital anaemia from August 2014 to July 2017. **Results** A total of 46 patients were enrolled in this study, the clinical suspicion were 11 cases Fanconi anemia (FA), 8 cases congenital dyserythropoietic anemia (CDA), 6 cases congenital sideroblast anemia (CSA), 12 cases congenital hemolytic anemia (CHA), 1 case dyskeratosis congenital (DC), 4 cases iron-refractory iron deficiency anemia and 4 cases unexplained cytopenia (Uc), respectively. 28 (60.9%) of 46 patients became confirmed cases after targeted NGS, corresponding to 44 mutations of which 33 were new. 26(56.5%) patients with results of the assay matching to clinical suspicion, including FA (5/11, 45.5%), CSA (6/6, 100.0%), CDA (3/8, 37.5%) and CHA (12/12, 100.0%). 2 (4.3%) cases not matching to clinical suspicion, including dyskeratosis congenital (DC) was made in 1(2.2%) patients with suspected FA and familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) was made in 1(2.2%) patients with suspected unexplained cytopenia (Uc). In 12 CHA patients, the hemolytic type was further clarified by the NGS. The

remaining 18 cases were not clearly diagnosed. **Conclusion** Targeted NGS assay is of major impact on congenital anemias. The assay should be used routinely in congenital anemias.

**【Key words】** Congenital anemia; Next-generation sequencing; Diagnosis

**Fund program:** National Science and Technology Important and Special Project of China (2017ZX09304024); Tianjin Clinical Research Center for Blood Diseases (15ZXLCSY00010)

正确的诊断是合理治疗的前提。范可尼贫血 (FA)、先天性角化不良 (DC)、先天性红细胞生成异常性贫血 (CDA) 等均为罕见的先天性造血衰竭性疾病,常因临床表现不典型或者各疾病类型之间临床表现重叠,且现有实验室检查不具有特异性,诊断上存在挑战。致病基因检测是诊断这类疾病的重要环节。传统的 Sanger 测序对于有明确致病基因位点的单基因疾病的致病基因检测非常经济和高效,但难以完成没有明确候选基因或候选基因数量较多的疾病的基因诊断。而靶向二代基因测序 (NGS) 具有通量大、精确度高和信息量丰富等优点,可以在短时间内对感兴趣的基因进行精确定位。国外已有研究者尝试将 NGS 技术用于先天性贫血的诊断<sup>[1-3]</sup>,而国内尚未见相关报道。本研究中,我们对 46 例临床疑诊先天性贫血患者应用 NGS 进行了致病基因检测,旨在评估 NGS 在先天性贫血诊断中的应用价值。

### 病例与方法

1. 病例:对 2014 年 8 月至 2017 年 7 月在中国医学科学院血液病医院贫血诊疗中心连续就诊的贫血患者进行筛查,经详细的病史采集(包括家族史)、体格检查和实验室检查而未能明确诊断,参照文献[3-7]标准怀疑诊断“先天性贫血”者被纳入本研究。纳入流程见图 1。在患者本人或者其监护人知情同意下采取外周血标本。

2. NGS 检测基因突变:采集患者外周血标本 5 ml, EDTA 抗凝,应用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (lot#MI218, 北京天根生化科技有限公司产品) 提取 DNA 3~5 μg。设计先天性贫血性疾病相关基因列表 Blood Disease Hospital Anemia Panel 2014

(BDHAP-2014), 该基因组合 (panel) 未申请专利或参加临床试验。BDHAP-2014 包含 217 个先天性贫血致病基因的全部外显子及剪接位点目标序列捕获探针 (表 1)。将提取的 DNA 用超声波打断并制备 DNA 文库,通过捕获芯片对 217 个基因的外显子及其临近的内含子区域的 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 Illumina HiSeq 测序平台对扩增产物进行 NGS (由迈基诺基因科技公司完成),以检测上述目标基因的潜在突变。靶向区域平均基因覆盖度 98.46%, 平均测序深度为 436.75×, 90.14% 的靶向区域覆盖度 > 30×, 60.29% 的靶向区域覆盖度 > 200×。将测序结果与 dbSNP 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>)、HGMD 数据库 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) 及千人基因组数据库进行比对。

3. Sanger 测序:在确定先证者的致病基因型后,对先证者及其父母的外周血 DNA 进行 Sanger 测序 (由北京迈基诺基因科技公司完成)。将检测结果与人类基因突变数据库 (HGMD) 比对。

4. 突变危害性预测:应用 MutationTaster 和 PolyPhen-2 软件分别对基因突变位点进行危害性分析,预测基因突变对蛋白质功能的影响。仅当两种软件均预测同一突变对蛋白功能影响较大时,才认定该突变具有较强的危害性。

5. 突变致病性的确定:依据突变危害性的预测结果,将检出较强危害性的基因突变拟为致病性突变,确定为致病性突变须同时满足:①临床特征符合拟为致病性突变的相应疾病;②如果突变属于文献或专业数据库已报道的致病性突变,则确定为致病性突变;如果不属于已知致病性突变,突变类型为剪接突变、无义突变、移码突变、小片段缺失或发

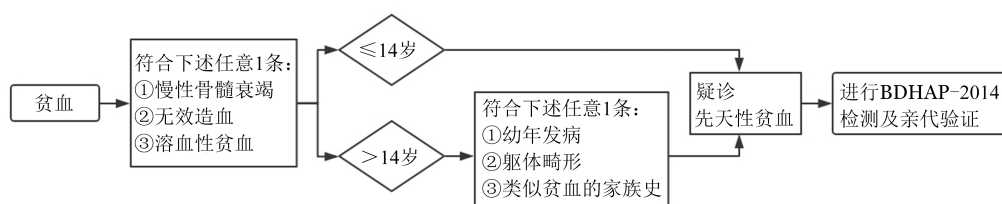


图1 疑诊先天性贫血纳入靶向二代基因测序流程图

表1 BDHAP-2014 基因组合

疾病	基因数量	基因
范可尼贫血	16	FANCA、FANCB、FANCC、FANCD1 (BRCA2)、FANCD2、FANCE、FNACF、FANCG (XRCC9)、FANCI、FANCJ (BACH1/BRIP1)、FANCL、FANCM、FANCN (PALB2)、FANCO (RAD51C)、FANCP (SLX4)、FANCQ (ERCC4)
先天性角化不良症	10	DKC1、TERC、TERT、TINF2、NOP10、WRAP53、CTC1、RTEL1、TCAB1
Diamond-Blackfan 贫血	23	RPS19、RPL5、RPL11、RPL26、RPL35A、RPS7、RPS10、RPS17、RPS24、RPS26、RPL3、RPL7、RPL9、RPL14、RPL15、RPL19、RPL23A、RPL25、RPL35、RPL36、RPS8、RPS15、RPS27A
Shwachman-Diamond 综合征	1	SBDS
先天性红细胞生成异常性贫血	5	CDAN1、SEC23B、KIF23、KLF1、GATA-1
遗传性血小板减少症	17	MPL、THPO、GATA1、GATA2、RUNX1、FLI1、TAL1/SCL、Jak2、HOXA11、ALAS1、BCL2L1、NFE2、GP1BB、GP9、FOG1、ETS、ANKRD26
血小板减少-桡骨缺失综合征	1	RBM8A
周期性与先天性粒细胞缺乏	13	ELANE (ELA-2)、HAX1、CXCR4、WAS、SBDS、GFI1、G6PC3、GATA2、YPS45、GCSF3R、SLC45A2、TAZ、AP3B1
红细胞膜疾病	23	ANK1、SLC4A1、SPTB、SPTA1、EPB42、RhAG、PIEZO1、EPB49、MPP1、EPB72、GYPA、RHD/RHCE、KEL、XK、GYRC、DARC、SLC14A1、LU、ICAM-4、CD151、AQP1、AQP3
红细胞酶缺陷	12	ADA、AK、PFK、PGK、G6PD、GPI、GSR、GSS、HK、NT5C3A、PKLR、TPH1
先天性铁粒幼细胞贫血	11	ALAS2、SLC25A38、GLRX5、ABCB7、PUS1、SLC19A2、GATA1、FECH、UROS、UROD、CPOX
铁代谢相关疾患	67	DNMT1/SLC11A2、DcytB (Cybrd1)、SLC46A1、HOX1、Transferrin、Ferroportin、Hephaeatin、Ceruloplasmin、TfR1、TfR2、Mfrn1/SLC25A37、ABCB10、Mfrn2/SLC25A28、ALAS2、GLRX5、ABCB7、NRAMP1、Hepcidin、Jak2、HFE、Hemojuvelin、GDF11、GDF15、TWSG1、IL1、IL6、TMPRSS6、BMP2、BMP4、BMP6、Alk2、Alk3、ACTRIIA、Neogenin、HIF1、HIF2、EPO、CREBH、CHOP、C/EBPalpha、EXOC6、ZIP14、SLC22A17、Scara5、TIM-2、SLC48A1、Haptoglobin、Hemopexin、PCBP1、TRP1、IRP2、ACO2、CDC14A、HAO1、CDC42BPA、FBXL5、STEAP3、HO-1、CUBN、HRG-1、LVDCC、Len2、Ferritin、FLVCR、SMAD4、HCP1、ERFE
遗传性噬血细胞综合征	18	ITK、CD27、MAGT1、PRF1、UNC13D、STX11、STXBP2、RAB27A、LYST、AP3B1、SH2D1A、BIRC4、FAS、FASLG、CASP10、TNFRSF1A、ITPKC、HPLH1

生于关键结构域的高度保守区的错义突变,参照数据库排除是高频突变或已知单核苷酸多态性 (SNP),确定为致病性突变。拟为致病性突变者,对先证者及其父母的外周血 DNA 进行 Sanger 测序验证。

### 结 果

1. 患者基本特征:共 46 例患者纳入本组研究。≤14 岁者 19 例(41.3%),中位年龄 7(2~14)岁,男 16 例,女 3 例,临床分别疑诊为 FA(9 例),CDA(1 例),先天性铁粒幼红细胞性贫血(CSA)(2 例),先天性溶血性贫血(CHA)(3 例),铁剂难治性缺铁性贫血(IR-IDA)(2 例),未明原因的血细胞减少(Uc)(2 例)。>14 岁者 27 例(58.7%),中位年龄 24(15~57)岁,男 14 例,女 13 例,临床疑诊分别为 FA(2 例),CDA(7 例),CSA(4 例),CHA(9 例),IR-IDA(2 例),DC(1 例),Uc(2 例)。

2. 基因突变情况:28 例(60.9%)患者检出与临床疑诊贫血疾病相关的基因突变,结合临床特征及

基因检测结果明确了诊断。突变累及 12 个基因,共 44 种突变(表 2)。本研究检测到的 11 种(22.4%)基因突变与文献[8-18]报道一致,其余 33 种突变属于新发突变。其中 26 例患者的基因学结果与临床疑诊相符,一致率达 56.5%,病种主要为 FA(5/11, 45.5%)、CSA(6/6, 100.0%)、CDA(3/8, 37.5%)及 CHA(12/12, 100.0%)。2 例患者基因学结果不支持临床疑诊,经重新评估病情,依据基因学结果纠正了诊断,包括 1 例 DC(疑诊 FA)和 1 例家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(FHL)(疑诊 Uc);12 例疑诊 CHA 患者也被明确诊断为 CHA,且根据 NGS 结果确定了溶血的类型,包括遗传性口型红细胞增多症(4 例),遗传性椭圆形红细胞增多症(1 例)、腺苷激酶缺乏症(1 例)、丙酮酸激酶缺乏症(5 例)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症(1 例)。

11 例疑诊 FA 的患者中,5 例确诊 FA。另 5 例临床表现符合 FA 的临床特征,均为自幼出现的骨髓衰竭和身材矮小,合并躯体畸形或类似家族史,丝裂霉素 C 诱导的染色体脆性试验(MMC 试验)均提

表 2 28 例疑诊先天性贫血患者靶向二代测序(NGS)检出的致病基因突变类型

例号	性别	年龄(岁)	NGS后确诊	突变基因及类型
1	男	2.5	FA	FANCA:c.3935-1G>C 剪接突变,c.2941T>C 错义突变
2	男	24	FA	FANCC:c.997-2 A>G 剪接突变
3	男	7	FA	FANCA:IVS33+1 C>T 剪接突变,IVS28+1C>T 剪接突变
4	男	7	FA	FANCI:c.1893 A>C 错义突变
5	男	6	FA	FANCA:c.2358_2368del 小片段缺失,c.2678G>A 无义突变
6	男	4	DC	TERT:c.838G>A <sup>[8]</sup> 错义突变
7	男	20	CSA	ALAS2:c.500G>A <sup>[9]</sup> 错义突变
8	男	26	CSA	ALAS2:c.823+5G>A 错义突变
9	男	18	CSA	STEAP3:c.*27 G>A UTR 突变
10	男	7	CSA	ALAS2:c.1231C>T <sup>[10]</sup> 错义突变
11	男	5	CSA	STEAP3:c.376C>T 错义突变,c.869G>A 错义突变
12	男	31	CSA	ALAS2:c.1354C>T <sup>[11]</sup> 错义突变
13	男	15	CDA 2 型	SEC23B:c.1454C>G 错义突变,c.1504G>C 错义突变
14	女	38	CDA 2 型	SEC23B:c.1831C>T 错义突变,c.1727T>C 错义突变
15	女	33	CDA 2 型	SEC23B:c.74C>A 错义突变,IVS4-1G>A 剪接突变
16	男	24	DHS	PIEZO1:c.2005 G>T 错义突变
17	女	34	DHS	PIEZO1:c.7488_7489insCTGGAG <sup>[12]</sup> 同义突变,c.7219G>A 错义突变,c.4018C>T 错义突变
18	男	35	DHS	PIEZO1:c.2005 G>T 错义突变
19	男	9	DHS	PIEZO1:c.7150G>A 错义突变
20	男	8	AKD	AK1:c.207+1G>A 剪接突变
21	男	4	PKD	PKLR:c.1085delT 移码突变,c.1178A>G <sup>[13]</sup> 错义突变
22	女	39	PKD	PKLR:c.1219G>A <sup>[14]</sup> 错义突变,c.966G>T 错义突变,c.805G>T 错义突变
23	男	18	PKD	PKLR:c.1607G>A 错义突变,c.787G>A <sup>[15]</sup> 错义突变,c.783G>C 错义突变
24	女	18	PKD	PKLR:c.1468C>T <sup>[16]</sup> 错义突变,c.724_733del 移码突变
25	女	16	PKD	PKLR:c.1492C>T <sup>[17]</sup> 错义突变,c.811G>T 错义突变
26	男	17	G6PD	G6PD:c.1268G>A <sup>[18]</sup> 错义突变
27	男	24	HE	EPB41:c.221C>T 错义突变
28	女	9	FHL	UNC13D:c.743T>C 错义突变,c.842A>C 错义突变

注:FA:范可尼贫血;DC:先天性角化不良;CSA:先天性铁粒幼细胞贫血;CDA:先天性红细胞生成异常性贫血;DHS:遗传性口型红细胞增多症;AKD:腺苷激酶缺乏症;PKD:丙酮酸激酶缺乏症;G6PD:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症;HE:遗传性椭圆形红细胞增多症;FHL:家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增生症

示染色体脆性显著增高,但靶向 NGS 仅检出 FA 责任致病基因的单个等位基因杂合突变,不符合隐性遗传规律,暂未能确诊为 FA。1 例疑诊 FA 患者经基因检测后明确为 DC。

6 例疑诊 CSA 的患者均明确诊断为 CSA。其中例 8、例 9、例 11 的突变属于新发突变,临床均表现为自幼出现的小细胞低色素性贫血、铁过载、无效造血、骨髓环形铁粒幼红细胞显著增多,临床表现典型,软件预测新发突变的危害性较强,特别是例 9 的非编码区突变可能影响蛋白翻译。

8 例疑诊 CDA 的患者,3 例确定诊断为 CDA,均为 SEC23B 基因的复合杂合突变,软件预测突变的危害性较强。临床均为自出生即出现黄疸和贫血,长期为轻度贫血,肝脾肿大,无效造血、铁过载,骨髓形态学提示单纯红系比例显著增高,双核的红细胞占有核红细胞的 10% 以上,透射电镜下可见

特征性的有核红细胞“双侧膜”结构,可以确诊 CDA-2 型。

12 例确诊 CHA 的患者,临床上均表现为自幼年发病的溶血性贫血,经 NGS 检测,基因结果符合相应疾病的致病基因和遗传模式,结合突变危害性预测结果确定检出突变为致病性突变,明确了先天性溶血的诊断,且进一步明确了先天性溶血的类型。

例 6 确诊 DC,具备骨髓衰竭的临床特征,基因突变类型为 TERT 基因的单等位基因的杂合突变,是文献报道过的已知致病性突变;例 28 确诊 FHL,其突变为 UNC13D 基因的复合杂合突变,属于新发突变,两个杂合突变均引起编码的 Munc13-4 蛋白的 C2A 结构域改变,突变危害性预测均为较强的危害性,结合临床特征:反复发热(体温最高可达 39℃),脾脏重度肿大,全血细胞减少,纤维蛋白显著减低,

甘油三酯、血清铁蛋白和可溶性IL-2受体显著增高(高于诊断标准),确定为致病性突变,确诊FHL。

3. 未明确诊断的病例:另有18例(39.1%)患者未发现基因突变,未明确诊断,包括疑诊FA 5例、疑诊CDA 5例、疑诊IR-IDA 4例、疑诊Uc 3例、疑诊DC 1例。

## 讨 论

基因检测历来是精准诊断罕见先天性贫血的重要步骤。靶向NGS敏感、精确、经济、及时,可以自行设定兴趣基因谱的广度,而且能保证对兴趣基因的足够的覆盖深度<sup>[19]</sup>,用于临床诊断先天性贫血具备很大优势。在诊断先天性贫血时,NGS可免除许多繁杂的、高条件要求的特殊试验,如诊断FA的FANCD泛素化试验、基因互补试验及诊断CDA的透射电镜检查等;也不同于红细胞酶活性检测等,NGS不受血制品输注的影响,不受病毒感染、再障危象等并发症的影响,临床实用性更好。

Ghemlas等<sup>[2]</sup>通过靶向NGS明确44例(59%)原考虑已分类的遗传性骨髓衰竭综合征(IBMFS)和15例(18%)原考虑未分类的IBMFS的诊断,并直接明确了这44例已分类IBMFS的疾病亚型(共计24种);共检出77种致病性突变,其中44种为已知致病性突变,28种为新发突变。Roy等<sup>[20]</sup>应用靶向NGS诊断出22例(38.6%)先天性贫血,其中17例确认了临床怀疑诊断,5例纠正了临床怀疑诊断;共检出32种致病性突变,其中16种为新发突变。我们的结果与上述研究一致。展现了靶向NGS在诊断先天性贫血方面的优势。

在本研究中,有18例患者经NGS检查后没有找到相应的致病基因,未能确诊。考虑其原因,一方面是NGS技术自身的局限,包括:①不充分的靶向覆盖(0~1.5%),且某些致病基因尚未纳入Panel中;②调控区及部分内含子区存在的致病性变异无法检出;③为保证数据分析的精确性,目标区域内少部分测序质量过低的变异方法学设定被滤掉;④虽然靶向NGS可以分析到小片段缺失/插入变异,但无法检出大片段缺失、拷贝数变异和短串联重复序列。另一方面,是对疾病认知水平的局限。生物信息技术的基础是对已知致病基因的认识,技术水平也受限于此,目前尚不足以鉴定某罕见突变是否属于致病性突变和(或)对已知致病基因的认识不充分。最后也不排除部分患者为非遗传性的

贫血。及时更新NGS的panel,将最新获知的疾病基因纳入NGS检测是必要的。

我们的研究中>14岁患者超过半数,病种以CDA、CSA和CHA为主。说明先天性贫血的诊断易被延误。究其原因:(1)先天性贫血的诊断难度本身较大。由于先天性疾病多属罕见病,发病机制复杂,临床异质性强,不易被关注和识别,尤其缺乏先天性躯体畸形等特征的患者,更不易及时诊断。(2)繁琐的诊断流程和地区间医疗条件的不平衡制约了诊断的效率。(3)现有的检查手段存在较大局限性。因此高效、精准的NGS检查手段在这类疑诊先天性血细胞减少患者的诊断中更显重要。

DHS的致病基因PIEZO1和KCNN4已先后被鉴定<sup>[21-22]</sup>,随着研究的深入,基因型与临床型的关系将有助于临床诊断DHS。我们的靶向NGS检出了33种致病基因突变,其中有许多尚未报道,丰富了基因数据库内容。这些突变的生物学意义和致病性尚不明确,还需要进一步研究相关蛋白表达等,以确定基因突变对携带者的影响,以及与其他基因、临床表型的相互关系,这也为评估疾病预后提供参考。

总之,靶向NGS对于诊断疑诊先天性贫血患者可简化诊断流程,提高诊出效率,并且精准、经济、快速,具有重要的诊断价值。将来随着不断优化的靶向NGS的panel,以及更多致病基因的详细研究,靶向NGS在疑诊先天性贫血的诊断中会越来越广泛应用。

## 参 考 文 献

- [1] Gerrard G, Valgañón M, Foong HE, et al. Target enrichment and high-throughput sequencing of 80 ribosomal protein genes to identify mutations associated with Diamond-Blackfan anaemia [J]. *Br J Haematol*, 2013, 162 (4):530-536. DOI: 10.1111/bjh.12397.
- [2] Ghemlas I, Li H, Zlateska B, et al. Improving diagnostic precision, care and syndrome definitions using comprehensive next-generation sequencing for the inherited bone marrow failure syndromes [J]. *J Med Genet*, 2015, 52 (9):575-584. DOI: 10.1136/jmedgenet-2015-103270.
- [3] Grace RF, Zanella A, Neufeld EJ, et al. Erythrocyte pyruvate kinase deficiency: 2015 status report [J]. *Am J Hematol*, 2015, 90 (9):825-830. DOI: 10.1002/ajh.24088.
- [4] Tsangaris E, Klaassen R, Fernandez CV, et al. Genetic analysis of inherited bone marrow failure syndromes from one prospective, comprehensive and population-based cohort and identification of novel mutations [J]. *J Med Genet*, 2011, 48 (9):618-628. DOI: 10.1136/jmg.2011.089821.

- [5] Gambale A, Iolascon A, Andolfo I, et al. Diagnosis and management of congenital dyserythropoietic anemias [J]. *Expert Rev Hematol*, 2016, 9 (3): 283- 296. DOI: 10.1586/17474086.2016.1131608.
- [6] Cazzola M, Malcovati L. Diagnosis and treatment of sideroblastic anemias: from defective heme synthesis to abnormal RNA splicing[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2015, 2015:19-25. DOI: 10.1182/asheducation-2015.1.19.
- [7] Henter JI, Horne A, Aricó M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2007, 48(2):124-131. DOI: 10.1002/pbc.21039.
- [8] Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, et al. Clinical and genetic features of dyskeratosis congenita, cryptic dyskeratosis congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in Japan [J]. *Int J Hematol*, 2015, 102(5):544-552. DOI: 10.1007/s12185-015-1861-6.
- [9] Harigae H, Furuyama K, Kudo K, et al. A novel mutation of the erythroid-specific gamma-Aminolevulinate synthase gene in a patient with non-inherited pyridoxine-responsive sideroblastic anemia [J]. *Am J Hematol*, 1999, 62(2):112-114.
- [10] Furuyama K, Uno R, Urabe A, et al. R411C mutation of the ALAS2 gene encodes a pyridoxine-responsive enzyme with low activity [J]. *Br J Haematol*, 1998, 103(3):839-841.
- [11] Cotter PD, May A, Li L, et al. Four new mutations in the erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) gene causing X-linked sideroblastic anemia: increased pyridoxine responsiveness after removal of iron overload by phlebotomy and coinheritance of hereditary hemochromatosis [J]. *Blood*, 1999, 93(5):1757-1769.
- [12] Albuisson J, Murthy SE, Bandell M, et al. Dehydrated hereditary stomatocytosis linked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1884. DOI: 10.1038/ncomms2899.
- [13] Baronciani L, Beutler E. Molecular study of pyruvate kinase deficient patients with hereditary nonspherocytic hemolytic anemia [J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(4):1702-1709.
- [14] Pissard S, Max-Audit I, Skopinski L, et al. Pyruvate kinase deficiency in France: a 3-year study reveals 27 new mutations [J]. *Br J Haematol*, 2006, 133(6):683-689.
- [15] Zanella A, Bianchi P, Baronciani L, et al. Molecular characterization of PK-LR gene in pyruvate kinase-deficient Italian patients [J]. *Blood*, 1997, 89(10):3847-3852.
- [16] Uenaka R, Nakajima H, Noguchi T, et al. Compound heterozygous mutations affecting both hepatic and erythrocyte isozymes of pyruvate kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 208(3):991-998.
- [17] Pastore L, Della Morte R, Frisso G, et al. Novel mutations and structural implications in R-type pyruvate kinase-deficient patients from Southern Italy [J]. *Hum Mutat*, 1998, 11(2):127-134.
- [18] Beutler E, Kuhl W, Gelbart T, et al. DNA sequence abnormalities of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(7):4145-4150.
- [19] Meienberg J, Bruggmann R, Oexle K, et al. Clinical sequencing: is WGS the better WES? [J]. *Hum Genet*, 2016, 135(3):359-362. DOI: 10.1007/s00439-015-1631-9.
- [20] Roy NB, Wilson EA, Henderson S, et al. A novel 33-Genes targeted resequencing panel provides accurate, clinical-grade diagnosis and improves patient management for rare inherited anaemias [J]. *Br J Haematol*, 2016, 175(2):318-330. DOI: 10.1111/bjh.14221.
- [21] Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, et al. Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1 [J]. *Blood*, 2013, 121(19):3925-3935, S1-12. DOI: 10.1182/blood-2013-02-482489.
- [22] Glogowska E, Lezon-Geyda K, Maksimova Y, et al. Mutations in the Gardos channel (KCNN4) are associated with hereditary xerocytosis [J]. *Blood*, 2015, 126(11):1281-1284. DOI: 10.1182/blood-2015-07-657957.

(收稿日期:2017-12-17)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

## 作者投稿须知

1. 按本刊要求写作:登录《中华血液学杂志》网站(<http://www.hematoline.com>),参见首页作者中心栏中的“投稿须知”及“写作指导”栏目。

2. 作者注册:请打开本刊网站首页点击“在线投稿”即进入中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)。在网站首页注册并申请为杂志作者(用户名和密码为您在中华医学会统一的登录信息,请牢记!忘记密码可通过电子信箱索取)。

3. 投稿:注册成功后进入“业务中心”。点击【远程稿件管理系统】,相应的功能即显示在下方。点击“作者投稿”,按要求填写内容,摘要在字数允许范围内尽可能详细,并上传原稿(点击“暂存”稿件进入【我的草稿】模块)。选择《中华血液学杂志》,并点击“投稿”。

4. 邮寄纸稿及介绍信:请在投稿平台上下载论文投送介绍信及授权书,签字盖章后连同原稿打印件(注明稿件编号)一并寄至本刊编辑部。

本刊编辑部