

血红蛋白 E 病中血红蛋白 A2 和血红蛋白 F 水平及其分布研究

苏恒学, 梁亮, 李友琼, 田矛, 覃婷

基金项目: 广西卫健委科研课题(编号:Z2011449)

作者单位: 537500 广西, 容县人民医院检验科(苏恒学); 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院产前诊断中心(梁亮, 李友琼, 田矛, 覃婷)

作者简介: 苏恒学(1978-), 男, 大学本科, 医学学士, 主管技师, 研究方向: 临床生化和免疫检验、地中海贫血筛查。E-mail: 1323332796@qq.com

通讯作者: 李友琼(1979-), 男, 医学硕士, 副主任技师, 研究方向: 血红蛋白病的筛查与诊断、产前筛查与诊断。E-mail: liyouqiong327@163.com

[摘要] **目的** 了解血红蛋白 E(Hb E)病中血红蛋白 A2(Hb A2)和血红蛋白 F(Hb F)水平及其分布规律。**方法** 选择 Hb E 病样本 170 例,以基因分析结果分为 Hb E 杂合子组、Hb E 纯合子组、Hb E 合并 α 地中海贫血(简称地贫)组和 Hb E 合并 β 地贫组。采用毛细管电泳法分析 Hb A2 及 Hb F 的水平及其在各组的分布情况。**结果** Hb E 杂合子组 125 例, Hb E 纯合子组 5 例, Hb E 合并 α 地贫组 21 例, Hb E 合并 β 地贫组 19 例, 四组的 Hb A2 平均水平分别为 $(3.66 \pm 0.38)\%$ 、 $(9.64 \pm 0.76)\%$ 、 $(3.70 \pm 0.37)\%$ 和 $(5.83 \pm 1.49)\%$ 。Hb E 纯合子组和 Hb E 合并 β 地贫组的 Hb F 水平分别为 $(5.22 \pm 3.90)\%$ 和 $(36.81 \pm 13.97)\%$ 。Hb E 合并 β 地贫组和 Hb E 纯合子组 Hb A2 水平主要落在高值区域($\text{Hb A2} \geq 4.0\%$), 其他两组主要是低值($2.5\% < \text{Hb A2} \leq 3.5\%$)或中值($3.5\% < \text{Hb A2} < 4.0\%$)区域。Hb E 合并 β 地贫组的 Hb F 水平分布在高值区域($\text{Hb F} \geq 10.0\%$), 其他三组的 Hb F 水平在低值区域($\text{Hb F} \leq 3.0\%$)。**结论** 在 Hb E 病中, Hb A2 和 Hb F 的水平及其分布频率因基因型不同而不同, 一般随着疾病严重程度而升高。

[关键词] 血红蛋白 E 病; 毛细管电泳; 血红蛋白 A2; 血红蛋白 F

[中图分类号] R 556.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)12-1300-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.12.11

Study on the levels and distributions of hemoglobin A2 and hemoglobin F in hemoglobin E disease SU Heng-xue, LIANG Liang, LI You-qiong, et al. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Rongxian, Guangxi 537500, China

[Abstract] **Objective** To study the levels and distributions of hemoglobin A2(Hb A2) and hemoglobin F(Hb F) in hemoglobin E(Hb E) disease. **Methods** One hundred and seventy samples from the Hb E disease patients were selected and were divided into Hb E heterozygotes group, Hb E homozygotes group, Hb E with α -thalassemia group and Hb E with β -thalassemia group according to the thalassemia gene analysis results. The levels of Hb A2 and Hb F and their distributions in each group were analyzed by capillary electrophoresis. **Results** The results showed 125 cases in the Hb E heterozygotes group, 5 cases in the Hb E homozygotes group, 21 cases in the Hb E with α -thalassemia group, and 19 cases in the Hb E with β -thalassemia group. The average levels of Hb A2 in the four groups were $(3.66 \pm 0.38)\%$, $(9.64 \pm 0.76)\%$, $(3.70 \pm 0.37)\%$ and $(5.83 \pm 1.49)\%$, respectively. The level of Hb F was $(5.22 \pm 3.90)\%$ in the Hb E homozygotes group, and $(36.81 \pm 13.97)\%$ in the Hb E with β -thalassemia group. In the Hb E homozygotes group and the Hb E with β -thalassemia group, the Hb A2 levels were mainly in the high value region($\text{Hb A2} \geq 4.0\%$), and in the other two groups the Hb A2 levels were mostly in the low value($2.5\% < \text{Hb A2} \leq 3.5\%$) or median value($3.5\% < \text{Hb A2} < 4.0\%$) regions. The Hb F level distribution of the Hb E with β -thalassemia group was in the high value region($\text{Hb F} \geq 10.0\%$), and the Hb F level distributions of the other three groups were in the low value region($\text{Hb F} \leq 3.0\%$). **Conclusion** In Hb E disease, the levels and distribution frequencies of Hb A2 and Hb F vary with genotypes, and generally increase with the severity of the disease.

[Key words] Hemoglobin E(Hb E) disease; Capillary electrophoresis; Hemoglobin A2(Hb A2); Hemoglobin F(Hb F)

血红蛋白 E(Hb E)病是由 β 珠蛋白肽链基因位点 CD26 突变引起的遗传性血红蛋白病,在广西人群中携带率较高^[1]。我们在前期研究^[2]中探讨了 Hb E 表型与基因型的关系,并注意到血红蛋白 A2(Hb A2)和血红蛋白 F(Hb F)水平在部分 Hb E 病患者中处于正常参考范围,部分是升高的。鉴此,我们增加了样本,探讨 Hb A2 和 Hb F 在 Hb E 病患者中的分布频率,及其与病情的关联性。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选择我院 2012-06 ~ 2014-05 门诊和住院部送检的经地中海贫血(简称地贫)基因确诊的 170 例(份)样本,其中 Hb E 杂合子 125 例,Hb E 纯合子 5 例,Hb E 合并 α 地贫 21 例(其中静止型 10 例,轻型 11 例),Hb E 合并 β 地贫 19 例(其中 β^0 4 例, β^+ 15 例)。男 74 例,女 96 例,年龄 1 ~ 78(30.06 \pm 12.73)岁。所有患者为广西籍贯。

1.2 标本采集 使用 EDTA 抗凝真空管和柠檬酸钾真空采血管分别采集 3 ml 静脉血,混匀后,送实验室行地贫基因和血红蛋白电泳分析。

1.3 仪器与试剂 Capillarys 2 型毛细管电泳仪及其配套试剂(法国 Sebia 公司);C-1000 型 PCR 扩增仪、GelDoc™ XR+ 型凝胶成像仪、PowerPac Basic 型水平电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);HL-2000 型分子杂交仪(美国 UPV 公司)。地贫基因检测试剂盒购自深圳益生堂生物公司。

1.4 地贫基因分析和判断标准 采用 α 地贫基因分析试剂盒检测中国人常见的 3 种缺失型($-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$)和 3 种非缺失型(点突变),即血红蛋白 Constant Spring(Hb CS)、血红蛋白 Westmead(Hb WS)、血红蛋白 Quong Sze(Hb QS)。采用 β 地贫基因分析试剂盒检测 β 珠蛋白肽链中国人常见的 17 种突变位点,包括-28、-29、-30、-32、CDs14-15、CD17、CD26(βE)、CDs27-28、CD31、CDs41-42、CD43、CDs71-72、IVS- I -1、IVS- I -5、IVS- II -654、CAP +1、initiation condon。 α 地贫基因 3 种缺失型检测试剂扩增参数为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,66 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 70 s,共 33 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。 α 地贫基因缺失型鉴定:将扩增产物 2 μl 上样到 10 g/L 的琼脂糖凝胶中进行电泳,根据试剂说明书的判断标准,并综合是否扩增出片段及片段长度进行判读。 α 地贫基因 3 种非缺失型(点突变)和 β 地贫基因 17 种突变检测试剂通用的扩增参数为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,66 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 150 s,共 35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。按照试剂说明书,将扩增产物进行斑点杂交,洗膜,显

色。 α 地贫基因点突变和 β 地贫基因点突变鉴定:当膜条对照点显色,突变点不显色为该位点阴性结果;当膜条对照点显色,突变点也显色为该位点突变杂合子;当膜条对照点不显色,突变点显色则为该位点突变纯合子;当膜条的对照点均不显色或有些位点的对照点不显色,则为实验失败,需要重做。

1.5 毛细管电泳 将送检的样本进行 3 000 r/min 离心 5 min,弃上层血浆。毛细管电泳仪自检定位通过后,用 Hb A2 质控样品保证仪器运行良好,样本检测均在 4 h 内完成。以电泳所得血红蛋白所有条带的峰值为 100%,各个条带峰值所占比例表示含量。观察指标为 Hb A2 和 Hb F,以 Hb A2 > 3.5% 和(或)Hb F > 3.0% 为 β 地贫筛查阳性标准。

1.6 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组计数资料比较采用 R \times C 表 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hb A2 水平在 Hb E 病各组中的分布比较 Hb A2 水平按 2.5% < Hb A2 \leq 3.5%、3.5% < Hb A2 < 4.0% 和 Hb A2 \geq 4.0% 分三个区域观察,Hb E 杂合子组和 Hb E 合并 α 地贫组在三个区域均有分布,而 Hb E 合并 β 地贫组和 Hb E 纯合子组,Hb A2 水平主要落在 Hb A2 \geq 4.0% 区域(分别占 94.74% 和 100.00%)。四组分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 Hb A2 水平在 Hb E 病各组中的分布比较[n(%)]

组别	例数	2.5% < Hb A2 \leq 3.5%	3.5% < Hb A2 < 4.0%	Hb A2 \geq 4.0%
Hb E 杂合子组	125	42(33.60)	55(44.00)	28(22.40)
Hb E 纯合子组	5	0(0.00)	0(0.00)	5(100.00)
Hb E 合并 α 地贫组	21	8(38.10)	9(42.86)	4(19.04)
Hb E 合并 β 地贫组	19	0(0.0)	1(5.26)	18(94.74)

注: $\chi^2 = 51.764, P = 0.000$

2.2 Hb F 水平在 Hb E 病各组中的分布比较 Hb F 水平按 Hb F \leq 3.0%、3.0% < Hb F < 10.0% 和 Hb F \geq 10.0% 分三个区域,Hb E 杂合子组和 Hb E 合并 α 地贫组 Hb F 水平大多在 \leq 3.0% 区域,Hb E 合并 β 地贫组的 Hb F 水平均 \geq 10.0%。四组分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 Hb F 水平在 Hb E 病各组中的分布比较[n(%)]

组别	例数	Hb F \leq 3.0%	3.0% < Hb F < 10.0%	Hb F \geq 10.0%
Hb E 杂合子组	125	118(94.40)	5(4.00)	2(1.60)
Hb E 纯合子组	5	1(20.00)	4(80.00)	0(0.00)
Hb E 合并 α 地贫组	21	20(95.24)	1(4.76)	0(0.00)
Hb E 合并 β 地贫组	19	0(0.00)	0(0.00)	19(100.00)

注: $\chi^2 = 202.500, P = 0.000$

2.3 Hb E 病各组中 Hb A2 和 Hb F 的平均水平比较在 Hb E 杂合子、Hb E 合并 α 地贫、Hb E 合并 β 地贫和 Hb E 纯合子四组中, Hb A2 和 Hb F 水平以 Hb E 合并 β 地贫和 Hb E 纯合子组升高明显, Hb E 纯合子组 Hb A2 水平达 $(9.64 \pm 0.76)\%$, Hb E 合并 β 地贫组的 Hb F 水平达到 $(36.81 \pm 13.97)\%$ 。但是在 Hb E 杂合子组和 Hb E 合并 α 地贫组中大部分标本没有检出 Hb F。Hb A2 水平在四组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), Hb F 在两组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 Hb E 病各组中 Hb A2 和 Hb F 的平均水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Hb A2 (%)	Hb F (%)
Hb E 杂合子组	125	3.66 \pm 0.38	-
Hb E 纯合子组	5	9.64 \pm 0.76	5.22 \pm 3.90
Hb E 合并 α 地贫组	21	3.70 \pm 0.37	-
Hb E 合并 β 地贫组	19	5.83 \pm 1.49	36.81 \pm 13.97
<i>F</i>	-	222.204	290.731
<i>P</i>	-	0.000	0.000

注:“-”为能测量的标本量少,不具比较意义

3 讨论

3.1 Hb A2 是地贫筛查的主要指标^[3~5],特别是对于 β 地贫非常灵敏。Hb E 作为一种异常血红蛋白,部分杂合子具有类 β 地贫的表型^[6],因此,在中国将其归类于 β 地贫突变进行常规检测^[7]。 β 地贫的 Hb A2 值绝大部分是 $\geq 4.0\%$ 。本研究结果显示, Hb E 杂合子组的 Hb A2 值 $\geq 4.0\%$ 的百分比为 22.40%, 处于临界值 ($3.5\% < \text{Hb A2} < 4.0\%$) 占 44.00%, 提示 Hb E 可以提升 Hb A2 水平。这似乎印证了将 Hb E 病归类于 β 地贫,但是还是有 33.60% 患者的 Hb A2 值处于正常参考范围 ($2.5\% < \text{Hb A2} \leq 3.5\%$), 这又表明了 Hb E 作为一种异常血红蛋白存在。Hb E 纯合子组和 Hb E 合并 β 地贫组的 Hb A2 水平分布区域几乎均处于 $\geq 4.0\%$ 。本研究结果也提示,随着病情的严重, Hb A2 值分布区域会向高值区域靠近。有研究^[2,8]显示, Hb E 合并 β 地贫临床症状是中间型/重型 β 地贫,大部分患者都需要依赖性输血^[9~11], 据此 Hb E 病的筛查就显得非常重要。血常规存在部分漏诊,而血红蛋白电泳则可以简易检出 Hb E^[2]。目前,毛细管电泳是最有效的检测技术,可以轻易将与 Hb A2 重叠的异常条带(高效液相色谱法)分离出来,比如将 Hb E 和 Hb Materna 分离^[12,13],以便定量 Hb A2,探讨其在 Hb E 病中的分布规律。

3.2 在广西地区,将 Hb F $> 3.0\%$ 作为 β 地贫筛查阳性的标准之一^[14]。但是轻型 β 地贫的 Hb F 水平绝大部分是 $< 3\%$ 的,只有当合并 Hb E、突变双重杂

合子或者突变纯合子时, Hb F 升高才明显^[15]。本研究结果显示, Hb E 杂合子、Hb E 合并 α 地贫组的 Hb F 值绝大部分分布在 $\leq 3.0\%$ 区域。因此,我们认为将 Hb F $> 3.0\%$ 作为 β 地贫筛查阳性的标准并不合适,临床工作中我们发现很多孕妇的 Hb F 值是升高的,但是极少超过 10.0%, 提示了 Hb F 升高不能作为轻型 β 地贫筛查的单独指标,可以将截距值修改为 Hb F $> 10.0\%$ 。本研究显示,病情越严重, Hb F 值的分布越靠近高值区段,提示 Hb F 可以作为中间型/重型 β 地贫的辅助指标。

综上所述,在 Hb E 病中, Hb A2 和 Hb F 的分布频率因基因型不同而不同, Hb A2 和 Hb F 平均值一般随着疾病严重程度而升高,这为 Hb E 病的筛查和诊断提供了参考信息。

参考文献

- Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China [J]. Clin Genet, 2010, 78(2):139-148.
- 李友琼, 黄惠嫔, 覃桂芳, 等. 血红蛋白 E 的表型与基因型分析 [J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(10):861-864.
- 韩文平, 王树辉, 徐琴, 等. 贵阳地区育龄人群 HbA2 筛查轻型 β -地中海贫血截断值的确定 [J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(10):1121-1124, 1129.
- 杨胜, 沈国松, 金帆. 浙江北部地孕妇地中海贫血筛查及基因型构成分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(5):519-521.
- 韩媛媛, 戴薇, 刘兴梅, 等. 13738 例孕妇的地中海贫血筛查及基因检测结果分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 34(4):588-591.
- Vichinsky E. Hemoglobin e syndromes [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007, (1):79-83.
- 黄超群, 曾云, 杨海涛, 等. 941 对育龄高危夫妇地中海贫血基因结果分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 34(2):299-301.
- Riewpaiboon A, Nuchprayoon I, Torcharus K, et al. Economic burden of beta-thalassemia/Hb E and beta-thalassemia major in Thai children [J]. BMC Res Notes, 2010, 3:29.
- 王明月, 赖永榕. 血红蛋白 E 复合 β 地中海贫血 [J]. 医学综述, 2009, 15(6):860-864.
- 林敏辉, 胡建达, 吴联煌. Hb E 复合 β -地中海贫血 5 家系分析 [J]. 临床血液学杂志, 2004, 17(6):351-352.
- 陈文强, 陈萍, 李树生, 等. 异常血红蛋白 E 复合 α - β -地中海贫血基因型和临床表现的分析 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(15):1511-1512.
- 李友琼, 黄惠嫔, 覃桂芳, 等. 毛细管电泳在 Hb E 病筛查中的应用评价 [J]. 现代预防医学, 2013, 40(12):2308-2309, 2312.
- Li YQ, Ye LH, Mo Y. Hb Materna (HBB: c.167 T > A): A Second Case Detected in a Pregnant Chinese Woman by the Capillary Electrophoresis Method [J]. Hemoglobin, 2016, 40(2):125-126.
- 邓俊耀, 龙安翼, 李慧. 桂林市城镇育龄人群地中海贫血现状调查 [J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(2):156-158.
- 王文杰, 陈发钦, 王琳, 等. 广西地中海贫血不同基因型血常规参数 MCV MCH 及血红蛋白电泳检测结果的差异分析 [J]. 中国临床新医学, 2017, 10(5):426-431.

[收稿日期 2019-01-29][本文编辑 余军 吕文娟]