

异常血红蛋白合并地中海贫血的基因诊断及血液学指标分析

杜丽¹ 秦丹卿¹ 王继成¹ 卢建¹ 张艳霞¹ 姚翠泽¹ 杜娜²

(1. 广东省妇幼保健院 医学遗传中心、广东省妇幼代谢与遗传病重点实验室, 广东 广州 511442; 2. 广东省妇幼保健院 新生儿科, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 对于异常血红蛋白合并地中海贫血的病例进行基因诊断并分析其血液学指标, 为遗传咨询提供指导。**方法** 对于血红蛋白电泳检测出的异常血红蛋白病例采用 PCR-流式荧光杂交法及基因测序方法进行基因诊断, 并对明确诊断的异常血红蛋白合并地中海贫血的病例进行回顾性血液学指标分析。**结果** 在血红蛋白电泳分析检出的异常血红蛋白 226 例中, 基因诊断出 Hb Q-Thailand 复合 4.2 缺失型 HbH 病 4 例, 血红蛋白 96~112 g/L。检出 Hb NewYork 复合 β 地中海贫血 3 例, 血红蛋白 95~101 g/L。检出 HbE 复合 β 地中海贫血 4 例, 血红蛋白水平 62~97 g/L。检出 HbE 复合中国型 $G\gamma + (A\gamma\delta\beta)^0$ 地贫 2 例, 血红蛋白水平 108~109 g/L。**结论** 不同异常血红蛋白合并地中海贫血的临床表型差异较大, 是否需要产前诊断需要依据不同的异常血红蛋白来具体分析。

【关键词】 异常血红蛋白; 地中海贫血; 泰国型血红蛋白 Q; 血红蛋白 New York; 血红蛋白 E

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To conduct gene diagnosis and investigate the hematologic characterization of common hemoglobin variants compounding thalassemia. **Method** PCR-flow cytometry fluorescence hybridization assay and gene sequencing were performed to the cases with hemoglobin variants, and analyzed the hematological datas of hemoglobin variants compounding thalassemia. **Results** In all 226 cases, 4 cases of Hb Q-Thailand compounding HbH disease were detected, with hemoglobin 96~112 g/L. 3 cases of Hb NewYork compounding β -thalassemia were detected, with hemoglobin 95~101 g/L. 4 cases of HbE compounding β -thalassemia were detected, with hemoglobin 62~97 g/L. 2 cases of HbE compounding Chinese $G\gamma + (A\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia were detected, with hemoglobin 108~109 g/L. **Conclusions** The phenotype are different in cases of hemoglobin variants compounding thalassemia. The analysis of clinical presentation can provide an effective genetic counseling.

【Key words】 hemoglobin variants; thalassemia; Hb Q-Thailand; Hb New York; Hb E

地中海贫血和异常血红蛋白均属血红蛋白病, 前者是由于珠蛋白基因缺陷导致珠蛋白链的合成减少, 而后者为珠蛋白链的结构异常。在中国南方地区已发现多种类型的异常血红蛋白, Hb Q-Thailand、Hb NewYork、HbE 是广东省最常见的异常血红蛋白^[1,2]。对于这几种异常血红蛋白杂合子的临床表现我们已经在相关文章中进行了阐述^[3,4], 然

而临床医生比较困惑的问题是这些异常血红蛋白合并地中海贫血时的临床表型如何, 夫妻双方一方为地贫一方为异常血红蛋白时是否需要进行产前诊断。所以本文重点讨论异常血红蛋白合并地中海贫血的临床表型, 我们希望通过这些病例的总结和分析, 为临床遗传咨询提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择自 2014 年 1 月至 2018 年 6

月在广东省妇幼保健院医学遗传中心进行地贫筛查血红蛋白电泳检测出的异常血红蛋白病例 226 例,采用 PCR-流式荧光杂交法及基因测序方法进行基因诊断,对明确诊断为异常血红蛋白合并地中海贫血的病例 13 例进行回顾性血液学指标分析。这 13 个病例的年龄为 8 个月至 35 岁。

1.2 方法

1.2.1 血细胞参数分析 采用 Sysmex XN5000 全自动血液分析仪进行红细胞参数分析,红细胞参数包括血红蛋白(Hb)、平均红细胞容积(MCV)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)。

1.2.2 血红蛋白分析 采用法国 Sebia 公司生产的 CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING 全自动毛细管电泳仪及配套试剂进行血红蛋白分析,检测指标包括血红蛋白 A(HbA)、血红蛋白 A2(HbA2)、血红蛋白 H(HbH)、血红蛋白 F(HbF)、血红蛋白 E(HbE)、血红蛋白 K(HbK)血红蛋白 Q(HbQ)等。

1.2.3 地中海贫血基因诊断 采用 MagPure Tissue&Blood DNA KF Kit 试剂盒(广州美基生物),按试剂盒说明书提取步骤进行 DNA 的提取。采用 PCR-流式荧光杂交法检测 α 珠蛋白基因 3 种

常见缺失($-\text{SEA}/-$ $\alpha^{3.7}/-$ $\alpha^{4.2}/$)、3 种点突变($\alpha^{\text{CS}}\alpha/$ $\alpha^{\text{WS}}\alpha/$ $\alpha^{\text{QS}}\alpha/$)及 β 珠蛋白基因 17 种突变。基因诊断试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供。

1.2.4 α 、 β 珠蛋白基因测序 引物设计及反应条件参考文献^[5],引物由铂尚生物技术(上海)有限公司合成,PCR 反应体系购自大连宝生物工程有限公司。PCR 产物送上海英潍捷基生物有限公司进行双向测序。

2 结果

在 226 例异常血红蛋白病例中共检测到 Hb Q-Thailand 合并 4.2 缺失型 Hb H 病 4 例,Hb New-York 合并 β^0 地贫 3 例,2 例为成人,1 例为婴儿,HbE 合并 β^0 地贫 3 例,HbE 合并 $\beta+$ 地贫 1 例,HbE 合并中国型 $\text{G}\gamma+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫 2 例。Hb Q-Thailand 合并 4.2 缺失型 HbH 病的血液学指标分析及基因诊断结果详见表 1。Hb NewYork 合并 β 地贫的血液学指标分析及基因诊断结果详见表 2。HbE 合并 β 地贫或中国型 $\text{G}\gamma+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫的血液学指标分析及基因诊断结果详见表 3。

表 1 4 例 Hb Q-Thailand 合并 4.2 缺失型 Hb H 病的血液学指标分析及基因诊断结果

病例	性别	年龄(岁)	α 基因型	β 基因型	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	Hb Q (%)	HbH (%)	Hb Bart's (%)
病例 1	男	26	$-\text{SEA}/-\alpha^{4.2-Q}$	β^N/β^N	112	66.4	19.2	88.7	11.5	0.8
病例 2	女	30	$-\text{SEA}/-\alpha^{4.2-Q}$	β^N/β^N	96	78.1	22.1	75.9	23.5	0.6
病例 3	男	35	$-\text{SEA}/-\alpha^{4.2-Q}$	β^N/β^N	103	61.6	18.0	78.9	20.1	0.5
病例 4	男	31	$-\text{SEA}/-\alpha^{4.2-Q}$	β^N/β^N	112	70.0	19.3	82.5	17.5	0

表 2 3 例 Hb NewYork 合并 β 地贫的血液学指标分析及基因诊断结果

病例	性别	年龄(岁)	α 基因型	β 基因型	Hb (g/L)	MCV (fl)	MCH (pg)	Hb A2 (%)	Hb F (%)	Hb A (%)	Hb K (%)
病例 1	女	31	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\beta^{\text{CD17}}/\text{Hb NewYork}$	95	63.8	19.0	5.4	2.8	0	91.8
病例 2	女	23	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\beta^{\text{CD41-42}}/\text{Hb NewYork}$	101	62.7	20.6	4.9	2.6	0	92.5
病例 3	男	8m	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\beta^{\text{CD71-72}}/\text{Hb NewYork}$	95	64	21	3.2	26.8	0	70

表 3 6 例 HbE 合并 β 地贫或中国型 $\text{G}\gamma+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫的血液学指标分析及基因诊断结果

病例	性别	年龄(岁)	α 基因型	β 基因型	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	Hb A2 (%)	Hb F (%)	Hb A (%)	Hb E (%)
病例 1	男	24	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\beta^{\text{CD41-42}}/\beta^E$	74	57.5	19.5	6.4	45.5	0	48.1
病例 2	女	25	$-\text{SEA}/\alpha\alpha$	$\beta^{\text{CD41-42}}/\beta^E$	95	51	16.7	9.8	10.3	0	79.9
病例 3	女	34	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\beta^{\text{CD71-72}}/\beta^E$	62	72	18.7	4.5	55.2	0	40.3
病例 4	女	19	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	β^{28}/β^E	97	63.4	20.3	6.3	28.1	20.4	45.2
病例 5	女	22	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\beta^E/\text{中国型 } \text{G}\gamma+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$	108	73	22.7	2.4	58.3	0	39.3
病例 6	女	28	$-\text{SEA}/\alpha\alpha$	$\beta^E/\text{中国型 } \text{G}\gamma+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$	109	63.3	19.4	4.2	34.0	0	61.8

3 讨论

异常血红蛋白是由于珠蛋白基因缺陷导致血红蛋白分子结构发生改变的一组遗传性血红蛋白病,我国人群中,多数类型的异常血红蛋白没有明显的临床表现,但有少数异常血红蛋白复合地中海贫血时会加重地中海贫血的临床表现,表现为中间型或重型地中海贫血。Hb Q-Thailand、Hb NewYork、HbE 是我国南方地区相对比较常见的异常血红蛋白,然而很多临床医生对于这些异常血红蛋白合并地贫时的临床表现不是非常清楚,例如 Hb Q-Thailand 合并 4.2 缺失型 HbH 病时会不会出现水肿胎,夫妻双方一方为 β 地贫,一方为 Hb NewYork 需不需要进行产前诊断等问题,在进行遗传咨询时存在很多困惑,明确这些异常血红蛋白合并地贫的临床表现对于地中海贫血的遗传咨询和产前诊断有非常重要的意义。

Hb Q-Thailand 是由于 HBA1:c.223 G>C 位点的突变导致的,且常与 4.2 缺失型 α 地贫连锁存在^[6]。由于 HBA1:c.223 G>C 位点的点突变导致的编码氨基酸的改变存在于血红蛋白分子的外部,本身并不影响血红蛋白分子的结构和稳定性,Hb Q-Thailand 的携带氧气的的能力比较好,从我们以往报道来看 Hb Q-Thailand 连锁 4.2 缺失型 α 地贫的杂合子(基因型: $-\alpha^{4.2}-Q/\alpha\alpha$)除筛查结果提示含有 20~30% 异常血红蛋白 Q 之外,MCV 和血红蛋白水平与 4.2 缺失型 α 地贫无明显差异^[3]。本研究中 Hb Q-Thailand 合并 4.2 缺失型 HbH 病(基因型: $-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}-Q$)血细胞分析提示 MCV 及 MCH 水平明显降低,呈小细胞低色素性表现,血红蛋白分析提示血红蛋白成分以 HbQ 为主,其次为 HbH,无 HbA,血红蛋白 96~112g/L,没有明显加重 HbH 病的临床表现,与文献研究结果相似^[7]。Hb Q-Thailand 合并 4.2 缺失型 HbH 病的遗传咨询和产前诊断原则可以参照 HbH 病。我们以往的研究曾报道了一例 Hb Q-Thailand 合并 4.2 缺失型 HbH 病胎儿水肿的病例,胎儿水肿与地贫的关系可能需要更多的病例验证^[3]。

Hb NewYork 是由于 HBB:c.341 T>A 点突

变引起的异常血红蛋白,在血红蛋白电泳中多见于 K 组,是 HbK 最常见的类型。我们以往的研究已经报道了 25 例单纯的 Hb NewYork 杂合子病例的临床表现,MCV、MCH 均正常,血红蛋白电泳提示 43.9%~52.0% 的 HbK 异常带^[4]。本文所研究的 3 例 Hb NewYork 合并 β 地贫的患者,血细胞分析提示 MCV 及 MCH 水平均降低,呈小细胞低色素性表现,血红蛋白分析提示血红蛋白成分以 HbK 为主,少量的 HbF、HbA₂,血红蛋白 95~101 g/L,均表现为轻度贫血,这与文献报道中无贫血的症状有一定差异^[8,9],可能是由于个体差异或我们的病例有两例为孕妇存在生理性贫血的可能。尽管如此,目前未见 Hb NewYork 合并 β 地贫引起中重度贫血的报道,所以对于夫妻双方一方为 β 地贫,一方为 Hb NewYork 杂合子者,本课题组不建议进行产前诊断。

HbE 是 HBB:c.79 G>A 位点的突变导致的,除产生 HbE 外,这种突变还激活了隐蔽剪切位点导致 β 珠蛋白基因合成减少,属于类地中海贫血样变异。HbE 在印度、泰国、老挝、柬埔寨等地的携带频率很高,已有多个研究表明 HbE 复合 β 地贫的临床表现差异较大,可导致中重度贫血,合并 α 地贫时可以减轻症状^[10-12]。本研究 HbE 复合 β 地贫的病例血细胞分析提示 MCV 及 MCH 水平均明显降低,呈小细胞低色素性表现,血红蛋白分析提示血红蛋白成分以 HbE 和 HbF 为主,HbE 合并 β^+ 地贫有 HbA,其余病例无 HbA。我们的病例中 HbE 合并 β^0 地贫无 α 地贫者 2 例,血红蛋白分别为 62 g/L 和 74 g/L。HbE 合并 β^0 地贫有轻型 α 地贫者 1 例,血红蛋白为 95 g/L。HbE 合并 β^+ 地贫无 α 地贫 1 例,血红蛋白为 97 g/L,临床表现与文献一致。HbE 合并中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)^0$ 地贫 2 例,血红蛋白分别为 108 g/L 和 109 g/L,是因为中国型 $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)^0$ 地贫导致血红蛋白 F 生成增加所致,表型相对较轻。

从我们的研究可见,不同异常血红蛋白合并地贫时的临床表现差异较大,夫妻一方是地贫一方是异常血红蛋白是否进行产前诊断需要依据不同的异常血红蛋白来具体分析。

参 考 文 献

[1] Lin M, Wen YF, Wu JR, et al. Hemoglobinopathy; molecular epidemiological characteristics and health effects on Hakka people in the Meizhou region, southern China [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55024.

[2] 莫宗平, 张玲, 喻长顺, 等. 异常血红蛋白 81 例基因分析 [J]. 广东医学, 2012, 33(03): 338-341.

[3] 王继成, 秦丹卿, 杜丽, 等. 异常血红蛋白 Hb Q-Thailand 复合 HbH 病的分子诊断和产前诊断 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(02): 12-13.

[4] 卢建, 王继成, 姚翠泽, 等. 异常血红蛋白 Hb New York 的分子诊断及血液学特征分析 [J]. 新医学, 2018, 49(06): 421-424.

[5] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2011: 101-115.

[6] Higgs DR, Hunt DM, Drysdale HC, et al. The genetic basis of Hb Q-H disease [J]. Br J Haematol, 1980, 46(3): 387-400.

[7] Singsanan S, Karnpean R, Fucharoen G, et al. Hemoglobin Q-Thailand related disorders : origin, molecular, hematological and diagnostic aspects [J]. Blood Cells Mol Dis, 2010, 45(3): 210-214.

[8] Lee AC, Ma ES, Chan AY, et al. Double heterozygosity for Hb New York [β 113 GTG > GAG; VAL > GLU] and β 0-thalassemia mutations manifests as a thalassemia trait [J]. Pediatr Hematol Oncol, 2008, 25(3): 227-231.

[9] Li DZ. Hemoglobin New York is not a matter in prenatal screening and diagnosis for beta-thalassemia [J]. Pediatr Hematol Oncol, 2008, 25(8): 769-771.

[10] Olivieri NF, Pakbaz Z, Vichinsky E. HbE/ β -thalassemia: basis of marked clinical diversity [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2010, 24(6): 1055-1070.

[11] Zhang J, He J, Mao X, et al. Haematological and electrophoretic characterisation of β -thalassaemia in Yunnan province of Southwestern China [J]. BMJ Open, 2017, 7(1): e013367.

[12] Italia K, Dabke P, Sawant P, et al. Hb E- β -Thalassemia in five Indian states [J]. Hemoglobin, 2016, 40(5): 310-315.

(收稿日期: 2019-01-30)

编辑: 宋文颖