

异常血红蛋白 Hb Phnom Penh[α 117(GH5)Phe-Ile- α 118(H1)Thr (α 1)]家系的分子诊断与临床特征分析

姚翠泽^{1#} 张蕊^{2#} 秦丹卿¹ 王继成¹ 梁杰¹ 梁凯玲¹ 杜丽^{1*}

(1. 广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442; 2. 惠州市第二妇幼保健院 产前诊断中心, 广东 惠州 516000)

【摘要】 目的 对携带一种罕见的异常血红蛋白 Hb Phnom Penh 家系进行分子诊断, 并探讨该异常血红蛋白的临床特征。方法 应用血常规和血红蛋白电泳分析家系成员外周血的血液学指标, 采用 PCR-流式荧光杂交法及基因测序方法进行基因诊断, 采集羊水细胞进行产前诊断。结果 该家系先证者血液学表型提示无小细胞低色素征, 仅血红蛋白电泳 Hb A2 值略低于正常值, 无异常血红蛋白带。基因测序结果显示先证者 α 1 珠蛋白基因第 117/118 密码子中间插入三联体 ATC (codon 117/118+ATC) 杂合突变, 为异常血红蛋白 Hb Phnom Penh。该家系中携带有同种突变的其他家系成员的临床表现与先证者类似。结论 Hb Phnom Penh 杂合子无明显地中海贫血临床表型, 血红蛋白电泳无异常血红蛋白带。该点突变的发现丰富了中国人 α 珠蛋白异常血红蛋白谱, 为异常血红蛋白病的临床诊断和遗传咨询提供了参考。

【关键词】 异常血红蛋白; Hb Phnom Penh; 分子诊断; α 1 珠蛋白基因

【中图分类号】 R714.56 **【文献标识码】** A

Molecular diagnosis and clinical characteristics of a rare hemoglobin variant Hb Phnom Penh [α 117(GH5)Phe-Ile- α 118(H1)Thr (α 1)]

Yao Cuize¹, Zhang Rui², Qin Danqing¹, Wang Jicheng¹, Liang Jie¹, Liang Kailing¹, Du Li^{1*}

1. Medical Genetics Center, Guangdong Women and Children Health Care Hospital, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 2. Prenatal Diagnosis Center, Huizhou Second Maternal and Child Health Care Hospital, Huizhou, Guangdong 516000, China

Corresponding author: Du Li, E-mail: lier28@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the molecular diagnosis of a rare heterozygous family with hemoglobin variant Hb Phnom Penh and to explore the clinical features of this hemoglobin variant. **Methods** Blood routine and hemoglobin electrophoresis were used to analyze the hematologic indicators of fresh peripheral blood samples of members. PCR-flow fluorescence hybridization and gene sequencing method were used to carry out gene diagnosis. Amniotic fluid cells were collected for prenatal diagnosis. **Results** The clinical phenotype of the proband in this family was normal. Only HbA2 decreased slightly and no abnormal hemoglobin was observed. The proband sequence analyses identified this in-frame mutation at codons 117/118 (+ATC) in exon 3 of the α 1-globin gene. Other family members with the Hb Phnom

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2020.04.014

* 通信作者: 杜丽, E-mail: lier28@163.com

姚翠泽和张蕊为共同第一作者

Penh heterozygous were similar to the clinical phenotypes of the proband. **Conclusion** Hb Phnom Penh heterozygotes showed no thalassemia phenotype; and hemoglobin electrophoresis showed no abnormal hemoglobin band. The discovery of this point mutation enriched the α -globin hemoglobin variant spectrum in Chinese population, and provided reference for the clinical diagnosis and genetic consultation of abnormal hemoglobin disease.

【Key words】 Hemoglobin variant; Hb Phnom Penh; Molecular diagnosis; $\alpha 1$ -globin gene

血红蛋白(hemoglobin, Hb)是人体内运输氧的载体,每个血红蛋白由2条(珠蛋白链和2条(珠蛋白链组成,而珠蛋白基因发生缺陷导致珠蛋白链分子结构发生异常,称为异常血红蛋白。若这种珠蛋白氨基酸异常发生在血红蛋白分子内部,对其空间构象和功能影响较大,则临床表现明显;若这种改变发生在血红蛋白分子外部,则对其影响不大,没有明显的临床表现^[1]。目前血红蛋白变异体数据库(<http://globin.bx.psu.edu/>)已报道了1800余种珠蛋白变异体,其中包括1300余种异常血红蛋白。在中国南方人群中常见的 α -珠蛋白链上的异常血红蛋白主要有Hb Constant Spring (Hb CS)、Hb Quang Sze (Hb QS)、Hb Westmead (Hb WS)、Hb Q-Thailand 等变异类型,若同时复合其他 α^0 缺失型突变时会导致Hb H病,出现贫血症状^[2]。鉴于此情况,异常血红蛋白的筛查和分子诊断需要得到临床工作者的重视。本研究检测到一种罕见的异常血红蛋白Hb Phnom Penh [$\alpha 117(\text{GH}5)\text{Phe-Ile-}\alpha 118(\text{H}1)\text{Thr}(\alpha 1)$] 并对其进行了全面的家系调查和临床表型分析,现报道如下:

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 先证者男,36岁,广东省惠州市人。其妻子曾生育一男孩,于孕20⁺周夫妇双方在惠州第二妇幼保健院行地中海贫血(地贫)筛查,检出先证者血红蛋白电泳Hb A2值低,遂转入本院进一步行地中海贫血基因检测。

1.1.2 家系其他成员该家系成员主要包括I 1(先证者父亲)、I 2(先证者母亲)、II 2(先证者妻子)、II 3(先证者妹妹)、III 1(先证者儿子)、III 2(胎儿,孕20⁺周),家系图如图1所示。

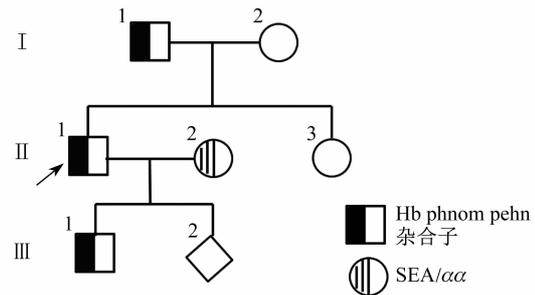


图1 异常血红蛋白Hb Phnom Penh病例家系图

1.2 研究方法

1.2.1 血液学分析 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝采血管采集外周血2ml,采用XN5000全自动血细胞分析仪及配套试剂(日本Sysmex公司)进行红细胞参数分析。采用法国CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING全自动毛细管电泳分析系统及配套试剂(法国Sebia公司)进行血红蛋白组分分析。

1.2.2 DNA制备和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)提取外周血基因组DNA,应用Qiagen DNA提取试剂盒从羊水脱落细胞中提取胎儿DNA;应用PCR-流式荧光杂交法对中国南方常见的23种地中海贫血突变进行检测,包括:3种 α -地中海贫血缺失型($-\alpha^{3.7}/$ 、 $-\alpha^{4.2}/$ 、 $--\text{SEA}/$),3种 α -地中海贫血点突变型($\alpha^{\text{QS}}\alpha/$ 、 $\alpha^{\text{CS}}\alpha/$ 、 $\alpha^{\text{WS}}\alpha/$)及17种 β -地中海贫血点突变(CD41-42、IVS-II-654、-29、-28、CD71-72、CD17、CD43、CD26、CD27-28、CD31、-32、-30、CD14-15、IVS-I-1、IVS-I-5、Int、Cap)(试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司)

1.2.3 α -珠蛋白基因测序 用Primer Premier5.0软件针对 α -珠蛋白基因设计2对引物(引物由上海生工生物合成),分别扩增 $\alpha 1$ -和 $\alpha 2$ -珠蛋白基因(HBA1和HBA2),PCR扩增后产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后送生工生物有限公司进行双向测序。引物序列如下:Hba1 5'-TGGAGGGTGGAGACGT

CCTG-3'和 5'-TCCATCCCCTCCTCCCGCCCTG CCTTTTC-3';*HbA2* 5'-TGGAGGGTGGAGACG TCCTG-3'和 5'-CCATTGTTGGCACATTCGG-3',扩增产物大小分别为 1181 bp 和 1085 bp。PCR 扩增条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 30 s→66℃ 30 s→72℃ 1 min,33 个循环,72℃ 延伸 10 min。

2 结果

表 1 Hb Phnom Penh 病例家系成员血细胞参数、血红蛋白电泳及基因型

| 家系成员 | 性别 | 年龄(岁) | 标本类型 | Hb (g/L) | MCV (fl) | MCH (pg) | Hb A (%) | Hb A2 (%) | Hb F (%) | α-基因型 | β-基因型 |
|-------|----|---------------------|------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|------------------|--------------------------------|
| I 1 | 男 | 61 | 外周血 | 147 | 89.8 | 30.8 | 98.0 | 2.0 | / | Hb Phnom Penh/αα | β ^N /β ^N |
| I 2 | 女 | 56 | 外周血 | 130 | 94.9 | 32.5 | 96.6 | 2.6 | 0.8 | αα/αα | β ^N /β ^N |
| II 1 | 男 | 36 | 外周血 | 148 | 88.8 | 30.3 | 97.9 | 2.1 | / | Hb Phnom Penh/αα | β ^N /β ^N |
| II 2 | 女 | 29 | 外周血 | 101 | 71.0 | 21.0 | 97.8 | 2.2 | / | --SEA/αα | β ^N /β ^N |
| II 3 | 女 | 34 | 外周血 | 127 | 81.9 | 27.6 | 97.6 | 2.4 | / | αα/αα | β ^N /β ^N |
| III 1 | 男 | 4 | 外周血 | 122 | 78.1 | 26.5 | 97.8 | 2.2 | / | Hb Phnom Penh/αα | β ^N /β ^N |
| III 2 | / | 孕 20 ⁺ 周 | 羊水 | / | / | / | / | / | / | αα/αα | β ^N /β ^N |

注:各参数参考值 MCV 82~100 fL;MCH 27~34 pg;Hb 130~175 g/L(男),115~150 g/L(女);HbA 94.50%~97.35%;HbA2 2.7%~3.5%;HbF 0%~2.5%

2.2 基因检测结果分析 液相芯片法结果提示该家系成员除 II 2 为东南亚型缺失杂合子以外,其他成员结果均为阴性。α-珠蛋白基因测序检出该家系成员 I 1、II 1、III 1(先证者父亲、先证者、先证者儿子)均为 α1 珠蛋白基因第 117/118 密码子中间插入三联体 ATC (codon 117/118+ATC) 杂合突变,结果如图 2 所示。经与血红蛋白数据库比对(<http://globin.bx.psu.edu>),该突变为异常血红蛋白 Hb Phnom Penh。家系成员基因型结果见表 1。

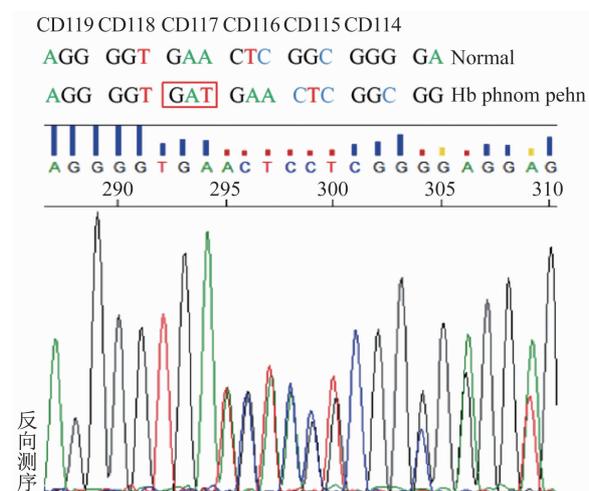


图 2 α1 珠蛋白基因第 117/118 密码子杂合突变 (codon 117/118+ATC) 的反向测序结果

2.1 血液学参数分析 该家系中异常血红蛋白 Hb Phnom Penh 杂合子成员 I 1、II 1、III 1 红细胞参数 [Hb、平均红细胞体积 (mean corpuscular volume, MCV)、平均红细胞血红蛋白量 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)] 均为正常,无小细胞低色素性贫血症状,详细参数见表 1,毛细管血红蛋白电泳显示无异常血红蛋白带。

3 讨论

本研究中先证者的血液学各参数 (Hb 148g/L、MCV 88.8fL、MCH 30.3pg) 均在正常值范围内,血红蛋白电泳 Hb A₂ 略低于 2.5%,无异常血红蛋白带检出,提示可能携带 α-地中海贫血。因先证者妻子常规地中海贫血基因检测结果为 --SEA/αα,为避免地中海贫血患儿的出生,先证者是否携带同型其他基因突变以及针对双方携带的基因突变类型进行产前基因诊断尤为重要。该先证者经常规的地中海贫血基因检测后未发现异常突变,遂对其进行了 α-珠蛋白基因测序,测序结果显示 α1 珠蛋白基因第 117/118 密码子杂合突变 (codon 117/118+ATC)。随后,我们对其家族三代成员进行家系调查,研究发现 I 1(先证者父亲)、II 1(先证者)、III 1(先证者儿子)均为 Hb Phnom Penh 杂合子。

α-地贫广泛分布于世界许多地区,在我国长江以南各省发病率较高,其中广东、广西人群中的发病率分别高达 4.11% 和 14.95%^[3]。α-地中海贫血大多数是由于 α-珠蛋白基因缺失引起的 α⁺ 和 α⁰-地中海贫血较为常见,除了常见的 --SEA、-α^{3.7}、-α^{4.2} 3 种片段缺失类型以外,阅读框内的缺失也屡有报道^[4-7],而阅读框内插入突变较为少见。本研究的惠州家系病例先证者检测为 Hb Phnom Penh [α117 (GH5)Phe-Ile-α118 (H1)Thr (α1)] 是一种比较罕见的由于阅读框内插入突变引起的异常血红蛋白,

这种插入突变通过基因测序定位于 $\alpha 1$ 珠蛋白基因第三个外显子上,于第 117/118 号密码子中间插入三联体 ATC(异亮氨酸残基)。Hb Phnom Penh 于 1998 年在一名柬埔寨儿童和他父亲的病例中首次报道^[8],随后在中国和泰国人中也相继报道了 Hb Phnom Penh 突变体的病例且 Hb Phnom Penh 杂合子血液学参数均为正常^[9,10],与本研究家系中检出的 Hb Phnom Penh 杂合子成员的血液学表型一致。Wajcman 等^[8]研究认为 Hb Phnom Penh 突变的形成可能是由于该插入突变位点前后碱基序列趋向于发生碱基互补配对而容易发生断裂,通过基因转换补偿机制形成 TCATCA 的重复,使得 α -珠蛋白链上的氨基酸数量由 141 个增加到 142 个氨基酸,但经血红蛋白毛细管电泳和高相液相色谱检测均无异常血红蛋白带被检出^[10],且异丙醇沉淀和热不稳定性实验也均为阴性^[9]。以上病例研究将 Hb Phnom Penh 杂合子定义为 α^+ -地中海贫血类型,无贫血症状。遗憾的是我们没有对该家系 Hb Phnom Penh 突变进行功能性研究,无法了解该种突变对 α -珠蛋白链表达的影响。既往多个研究报道^[9,11-13],Hb Phnom Penh 杂合突变复合其他地中海贫血突变可引起小细胞低色素的临床表型,提示尽管 Hb Phnom Penh 杂合子无临床表型,但当复合其他 α^0 -地中海贫血突变时可能加重临床表型,出现贫血症状。此外,有研究在携带该突变病例中发现应用高相液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测时出现糖化血红蛋白值(HbA1c)偏高的现象,揭示这种异常血红蛋白会干扰 HbA1c 的 HPLC 测定,为临床检测准确性带来影响^[9,13]。

目前针对此类无明显临床表现的异常血红蛋白病例仅通过血常规、毛细管电泳、HPLC 以及常规的地中海贫血基因检测容易导致漏诊,必须通过 α -珠蛋白基因测序或其他检测手段就罕见突变类型进行明确的分子诊断,在临床检测过程中应加以重视。本研究对于 Hb Phnom Penh 杂合子的临床特征分析和分子诊断可以提高临床工作者对该种异常血红蛋白的认识并为异常血红蛋白病的临床诊断和遗传咨询提供参考。

参考文献

- [1] 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.
- [2] LEUNG YY, MA SK, CHAN YY, et al. Molecular diagnosis of a case of hbphnompenh [$\alpha 117(\text{gh}5)\text{phe-i}18$

- (h1)thr ($\alpha 1$)][J]. Hemoglobin, 2006, 30(3):397-399.
- [3] 杜娟. 16443 例地中海贫血结果分析与研究[J]. 中国妇幼保健, 2008,23(31): 4435-4436.
- [4] TRAEGER-SYNODINOS J, HARTEVELD CL, KANAVAKIS E, et al. Hbaghiasophia [$\alpha 62(\text{e}11)\text{val}\rightarrow 0(\alpha 1)$], an "in-frame" deletion causing α -thalassemia [J]. Hemoglobin, 1999, 23(4): 317-324.
- [5] DIMISIANOS G, TRAEGER-SYNODINOS J, VRETTOU C, et al. A rare 33 bp in-frame deletion ($\alpha 63-74$ or $\alpha 64-74$ or $\alpha 65-75$) in the $\alpha 1$ -globin gene causing α^+ -thalassemia: A second observation[J]. Hemoglobin, 2004, 28(2): 7.
- [6] DOUNA V, PAPASSOTIRIOU I, METAXOTOU-MAVROMMATI A, et al. Further identification of the hyperunstable α -globin chain variant hbheraklion [codons 36/37 (-ccc); pro $\rightarrow 0(\alpha 1)$] in greek cases with co-inherited α^+ -thalassemia mutations[J]. Hemoglobin, 2008, 32(4): 379-385.
- [7] DOUNA V, LIAPI D, KAMPOURAKIS D, et al. First observation of hbtabye [codons 38/39 (?acc) thr $\rightarrow 0(\alpha 1)$] in greece: Clinical and hematological findings in patients with co-inherited α^+ -thalassemia mutations [J]. Hemoglobin, 2008, 32(4): 371-378.
- [8] WAJCMAN H, PRÉHU M O, PRÉHU C, et al. Hemoglobin Phnom Penh [$\alpha 117\text{Phe}(\text{H}1) - \text{Ile} - \alpha 118\text{Thr}(\text{H}2)$]; evidence for a hotspot for insertion of residues in the third exon of the $\alpha 1$ -globin gene[J]. Human Mutation, 1998, 11(S1): S20-S22.
- [9] CHEN C F, TAI Y K. A rare haemoglobin variant (hbphnompenh) manifesting as a falsely high haemoglobin a1c value on ion-exchange chromatography [J]. Singapore Med J, 2014, 55(8): e126-128.
- [10] ZHAI Y S, TANG H S, ZHOU J Y, et al. A novel case of hbphnompenh: Codons 117/118 (+atc) as a cause of $\alpha<\text{sup}>+\alpha</sup>$ -thalassemia[J]. Hemoglobin, 2012, 36(3): 289-292.
- [11] SINGHA K, SRIVORAKUN H, FUCHAROEN G, et al. Association of hbthailand [$\alpha 56(\text{e}5)\text{lys}\rightarrow\text{thr}$] and hbphnompenh [$\alpha 117(\text{gh}5)\text{-ile-}\alpha 118(\text{h}1)$] with $\alpha 0$ -thalassemia: Molecular and hematological features and differential diagnosis[J]. Hemoglobin, 2013, 37(1):37-47.
- [12] LEUNG Y Y, MA S K, CHAN Y Y, et al. Molecular diagnosis of a case of hbphnompenh [$\alpha 117(\text{gh}5)\text{phe-i}18-\alpha 118(\text{h}1)\text{thr}(\alpha 1)$][J]. Hemoglobin, 2006, 30(3): 397-399.
- [13] HARA K, KOGA M, SHINOZAKI H, et al. A case of hbphnompenh showing falsely high or reasonable hba1c values depending on the type of high-performance liquid chromatography system [J]. Internal Medicine, 2020, 59(6):805-809.

(收稿日期:2020-09-23)

编辑:宋文颖