

粤北地区育龄期夫妇异常血红蛋白病和 β 地中海贫血的筛查情况

钟永红¹, 张浔¹, 江帆², 钟延东¹, 屈艳霞², 唐盈², 刘如芹³, 陈桂兰^{2*}

基金项目: 韶关市卫生计生科研计划项目(项目编号: Y18024), 广州市卫生和计划生育委科技项目(项目编号: 20181A011035)

作者单位: 1. 512026 广东 韶关, 汕头大学医学院附属粤北人民医院产科; 2. 510623 广东 广州, 广州市妇女儿童医疗中心产前诊断中心; 3. 510006 广东 广州, 广东药科大学

作者简介: 钟永红, 毕业于湖南医科大学, 本科, 主任医师, 主要研究方向为重症产科、优生优育

* 通讯作者, E-mail: chenguilan108@163.com

【摘要】目的 应用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测广东省粤北地区育龄期夫妇异常血红蛋白病和 β 地中海贫血的携带情况。**方法** 选取2018年1月至2019年6月汕头大学医学院附属粤北人民医院参加产前检查和孕前检查的育龄期夫妇6204例。HPLC和平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、平均血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin, MCH)作为筛查方法, Gap-PCR检测和反向斑点杂交法(reverse dot blot, RDB)用于常见 α 、 β 地中海贫血基因确诊, 异常血红蛋白病采用基因测序验证。**结果** 参加HPLC检测共6204例, 检测出38例异常血红蛋白, 包括Hb E 12例, Hb H 12例, Hb Q-Thailand 5例, Hb J-Bangkok 3例, Hb Bart's 3例, Hb CS 2例, Hb G-Honolulu 1例, 异常血红蛋白发生率为0.59% (38/6204); 基因诊断确认211例 β 地中海贫血, β 地中海贫血发生率为3.40%; 最常见类型 β 地中海贫血基因类型是CD41-42/N、IVS-2-654/N、-28/N。**结论** 在育龄期人群, HPLC联合血常规中的MCV、MCH值以及地中海贫血基因检测可以有效筛查异常血红蛋白病和 β 地中海贫血, 有助于减少中间型、重型地中海贫血患儿的出生。

【关键词】 粤北地区; 异常血红蛋白病; 高效液相色谱技术; 地中海贫血; 育龄期夫妇; Hb H

【中图分类号】R 556.7; R 556.9 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1674-4020(2020)10-064-04

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2020.10.18

Screening of abnormal hemoglobin disease and β -thalassemia in couples of childbearing age in northern Guangdong

ZHONG Yonghong¹, ZHANG Xun¹, JIANG Fan², ZHONG Yandong¹, QU Yanxia², TANG Ying², LIU Ruqin³, CHEN Guilan^{2*}

1. Yue-bei People's Hospital Affiliated to Shantou Medical College, Shantou University, Shaoguan Guangdong 512026; 2. Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Guangdong 510623; 3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong 510006, P. R. China

* Corresponding author, E-mail: chenguilan108@163.com

【Abstract】Objective High performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect abnormal hemoglobin disease and beta thalassemia in couples of childbearing age in northern Guangdong, Guangdong Province. **Methods** The study population included couples of childbearing age who participated in prenatal and pre-pregnancy examinations at the Yue-bei People's Hospital Affiliated to Shantou Medical College, Shantou University from January 2018 to June 2019. HPLC and mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) were used as screening methods. Gap-PCR detection and reverse dot blot (RDB)

were used for diagnosis of common alpha, beta thalassemia gene, and abnormal hemoglobin disease was verified by gene sequencing.

Results A total of 6 204 cases participated in the HPLC test, and 38 cases of abnormal hemoglobin were detected, including 12 cases of Hb E, 12 cases of Hb H, 5 cases of Hb Q-Thailand, 3 cases of Hb J-Bangkok, 3 cases of Hb Bart's, and 2 cases of Hb CS, 1 case of Hb G-Honolulu. Abnormal hemoglobin incidence was 0.59 % (38/6 204). Genetic diagnosis confirmed 211 cases of beta thalassemia, with incidence rate of 3.40 %, the most common type of thalassemia gene type were CD41-42/N, IVS-2-654/N, -28/N.

Conclusion In people of childbearing age, HPLC combined with blood routine MCV, MCH values and thalassemia gene testing can effectively screen for abnormal hemoglobin disease and beta thalassemia, and help to reduce the birth of children with intermediate and severe thalassemia.

【Key words】 northern Guangdong; abnormal hemoglobin disease; HPLC; β -thalassemia; childbearing age; Hb H

血红蛋白病是珠蛋白基因突变或缺如引起的常见单基因遗传病,包括地中海贫血和异常血红蛋白病。广东省是地中海贫血和异常血红蛋白病高发地区之一^[1],粤北地区是广东省的北部地区,是汉族、瑶族和畲族等多民族聚居的地区,也是地中海贫血和异常血红蛋白病高发地区之一^[2]。本文将广东省粤北地区孕龄期夫妇中检测到的异常血红蛋白病和 β 地中海贫血筛查情况报道如下。

1 研究对象和方法

1.1 研究对象

2018 年 1 月至 2019 年 6 月汕头大学医学院附属粤北人民医院参加产前检查和孕前检查的育龄期夫妇共 6 204 例,抽取 EDTA-K 2 抗凝血 2.0 mL。女方 20 ~ 44 岁,男方 24 ~ 46 岁。

1.2 研究方法

1.2.1 平均红细胞体积、平均血红蛋白浓度和高效液相色谱法初筛 通过血常规 (Sysmex_XE-2100 全自动血液分析仪,日本) 检测平均红细胞体积 (mean corpuscular volume, MCV)、平均血红蛋白浓度 (mean corpuscular hemoglobin, MCH); 采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) (BIORAD variant II, 美国) 进行血红蛋白分析,参照文献^[3]的方法进行检测,试剂均为仪器配套试剂。MCV \leq 82 fl, MCH \leq 27 pg 为筛查异常,且 Hb A 2 \geq 3.5 %,考虑 β 地中海贫血;异常血红蛋白依据滞留时间、洗脱峰含量及色谱图形特征进行筛查。

1.2.2 PCR-反向斑点杂交方法 (reverse dot blot, RDB) 检测 严格按地中海贫血 PCR 检测试剂盒 (亚能生物技术有限公司,中国深圳) 说明书进行缺失型 α 地中海贫血、非缺失型 α 地中海贫血及 β 地中海贫血基因检测。检测中国人常见的 3 种缺失型 α 地中海贫血基因突变 (--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$)、3 种非缺失型 α 地中海贫血基因突变 ($\alpha^{CS}\alpha$ 、 $\alpha^{OS}\alpha$ 和 $\alpha^{WS}\alpha$) 和 17 种 β 地中海贫血基因突变 (41-42M、654M、-28M、71-72M、17M、 β EM、IVS-I-1M、IVS-I-5M、27/28M、43M、-29M、-30M、31M、-32M、14-15M、IntM 和 CAPM)。

1.2.3 基因测序 从 UCSC 数据库中调取 α 珠蛋白基因 (HBA1 和 HBA 2 基因) 和 β 珠蛋白基因的基因序列。应用 Primer 5 软件设计引物,分别扩增 HBA 1、

HBA 2 和 HBB 基因,引物由美吉生物医药科技有限公司 (中国广州) 合成。PCR 反应体系购自大连宝生物工程有限公司,PCR 产物送美吉生物医药科技有限公司 (中国广州) 进行双向测序,具体方法参见文献^[4]。

2 结果

2.1 异常血红蛋白病的高效液相色谱法检测结果

参加初筛共 6 204 例,检出 38 例异常血红蛋白,包括 Hb E 12 例, Hb H 12 例, Hb Q-Thailand 5 例, Hb J-Bangkok 3 例, Hb Bart's 3 例, Hb CS 2 例, Hb G-Honolulu 1 例。异常血红蛋白病的检出率为 0.59 % (38/6 204)。异常血红蛋白的 HPLC 图像详见图 1 (见下页)。

2.2 7 种异常血红蛋白滞留时间及 HbA 2/E 洗脱峰含量详见表 1。

表 1 7 种异常血红蛋白滞留时间及 HbA 2/E 洗脱峰含量

异常血红蛋白	例数	滞留时间 (min)	HbA 2/E 洗脱峰含量 (%)
Hb E	12	3.68 \pm 0.03	25.39 \pm 3.95
Hb H	12	0.2 \pm 0.12	20.5 \pm 2.62
Hb Q-Thailand	5	4.65 \pm 0.03	27.60 \pm 4.08
Hb Bart's	3	0.2 \pm 0.08	34.2 \pm 1.55
Hb J-Bangkok	3	2.05 \pm 0.01	44.2 \pm 2.98
Hb CS	2	5.06 \pm 0.02	2.2 \pm 1.02
Hb G-Honolulu	1	3.83	25.6

2.3 地中海贫血基因诊断

将 38 例异常血红蛋白和 216 例初步诊断为 β 地中海贫血的血样进行了常见地贫基因检测。38 例异常血红蛋白中检测出 α 地中海贫血 23 例,其中 (--SEA/ $-\alpha^{3.7}$ 10 例, --SEA/ $-\alpha^{4.2}$ 5 例, $\alpha^{4.2}$ / $\alpha\alpha$ 5 例, $-\alpha^{CS}$ / $\alpha\alpha$ 2 例, --SEA/ $\alpha\alpha$ 1 例); 检测出 β 地中海贫血 211 例,检出率为 3.40 % (211/6 204)。其中 Hb E 12 例,和 HPLC 结果一致,其他基因型的 β 地中海贫血具体基因分型见表 2 (见下页)。

2.4 基因测序

Hb Q-Thailand、Hb J-Bangkok、Hb G-Honolulu 进行基因测序进一步验证,结果也与 HPLC 结果一致。基因测序图见图 3 (见下页)。

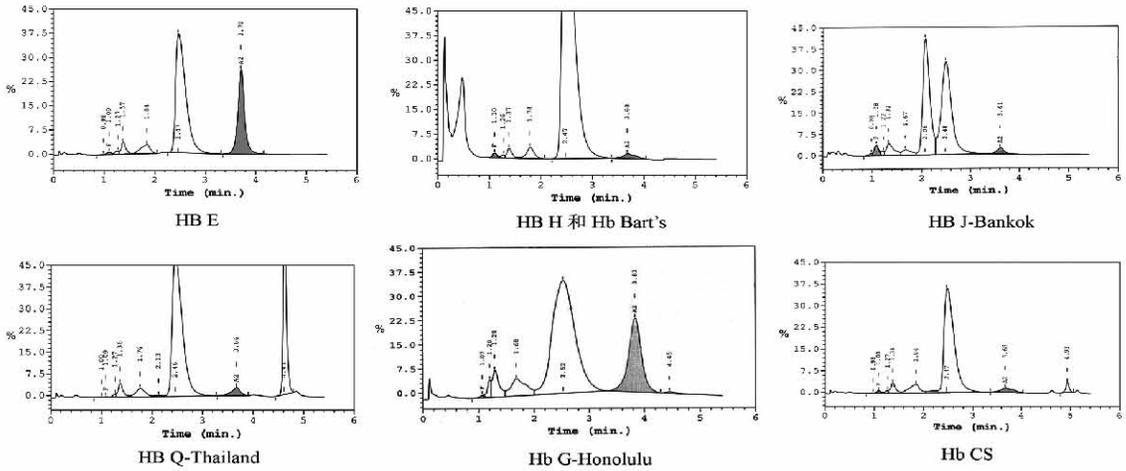


图 1 异常血红蛋白的 HPLC 图像

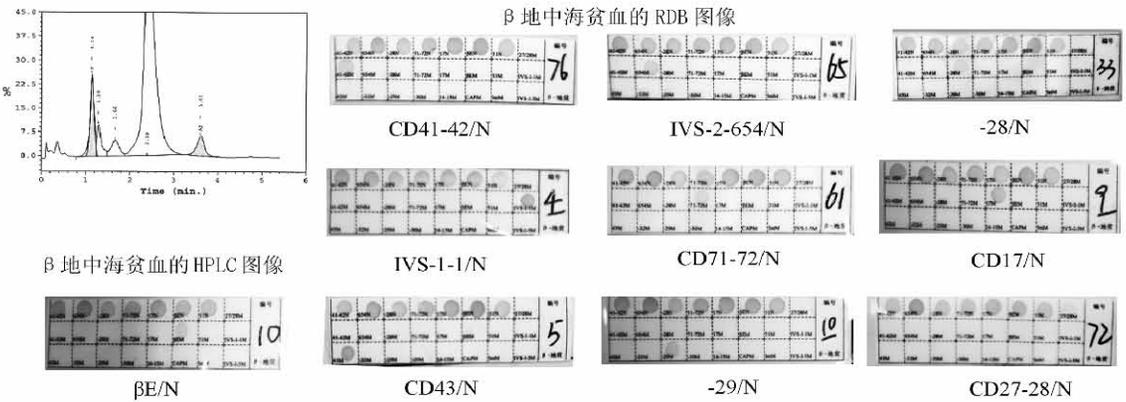
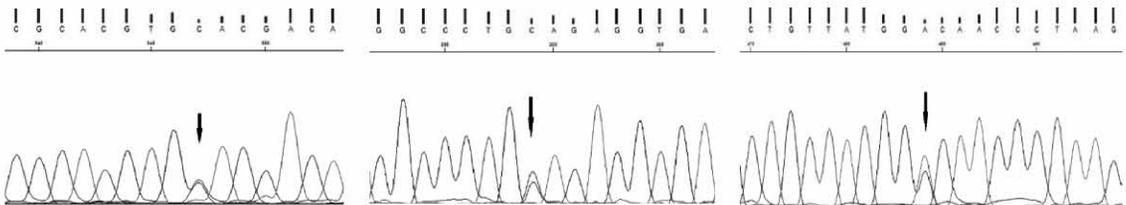


图 2 RDB 确诊 beta 地中海贫血基因的 HPLC 图像和 RDB 图像



Hb Q-Thailand(HBA1; c. 223 G > C) Hb G-Honolulu (HBA 2; c. 91G > C) Hb J-Bangkok(HBB; C. 170 G > A)

图 3 3 种异常血红蛋白病的基因测序图

表 2 211 例 beta 地中海贫血基因类型

基因型	例数	比例 (%)	基因型	例数	比例 (%)
CD41-42/N	90	42.65	CD71-72/N	5	2.37
IVS-2-654/N	43	20.38	CD43/N	3	1.42
-28/N	48	22.74	-29/N	2	0.95
betaE/N(CD26/N)	12	5.69	CD27-28/N	2	0.95
CD17/N	5	2.37	IVS1-1/N	1	0.48

3 讨论

重型 beta 重型地中海贫血出生时无临床症状,通常在出生后 3~6 个月逐渐出现症状。如果不进行治疗,患

儿多在 5 岁前死亡。中间型地中海贫血临床表型轻重不一,可以无明显的临床症状,也可表现为轻至中度贫血、黄疸、肝脾肿大等,严重时需输血治疗。其中,中间型 alpha 地中海贫血又称 Hb H 病。HPLC 能快速、灵敏、高通量分离鉴定血红蛋白变异体以及定量测定 Hb A 及 Hb F,且有针对性的定值质控品,2012 年被国际血液标准化委员会(ICSH)推荐为分离鉴定血红蛋白变异体和定量测定 Hb A 及 Hb F 的标准方法^[5,6]。对于 beta 地中海贫血以及 Hb H、Hb Q-Thailand、Hb J-Bangkok 和 Hb S 等异常血红蛋白,HPLC 筛查在方法学上具有优势^[7]。

(下转第 71 页)

症疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26 (27): 3012-3014.

- [11] 郑军状, 崔云, 江大为. 基于肝肾同源理论探析精索静脉曲张不育症病机 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33 (10): 2378-2380.
- [12] 古宇能, 陈慰填, 温志鹏, 等. 调肝活血汤联合 palomo 手术对精索静脉曲张患者精浆氧化应激干预的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22 (5): 651-654.
- [13] 黄小庆, 苏劲松, 徐云森, 等. 加味桂枝茯苓汤治疗肾虚血瘀型精索静脉曲张性不育患者疗效观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (8): 173-177.
- [14] 宋爱敏, 张俊. 滋阴活血中药联合马栗树籽提取物治疗肾虚血瘀型精索静脉曲张性不育疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂

志, 2019, 28 (12): 1316-1318.

- [15] 宋景艳, 孙振高. 精索静脉曲张致睾丸生精功能障碍的机制研究进展 [J]. 生殖医学杂志, 2016, 25 (2): 186-189.
- [16] 廖森成, 谢纯平, 王君龙, 等. 精索静脉曲张患者睾丸微循环变化与血清抑制素 B 及精液质量的关系 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32 (11): 1844-1846.
- [17] 毕海宁. 益肾祛瘀方治疗精索静脉曲张不育对精子质量和氧化应激的影响 [J]. 实用中医药杂志, 2019, 35 (4): 389-390.
- [18] 俞保柱, 曹莉, 王健, 等. 五子衍宗丸加味治疗精索静脉曲张性不育肾虚血瘀证的临床研究 [J]. 中国性科学, 2019, 28 (6): 23-26.

(收稿日期: 2020-04-29 编辑: 吕永胜)

(上接第 66 页)

本文应用血常规的 MCV, MCH 与 HPLC 联合初筛, 参加初筛共 6 204 例, 检出 38 例异常血红蛋白, 异常血红蛋白病的检出率为 0.59%。我国平均异常血红蛋白病的发病率为 0.337%, 本地区发病率高于全国平均水平。本地区最常见的异常血红蛋白是 Hb E、Hb H 和 Hb Q-Thailand, 是南方人群常见的异常类型, 与文献报道一致^[8]。中国人群缺失型 Hb H 病的基因突变类型主要是 $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$ 和 $-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$, 非缺失型 Hb H 病主要是 $\alpha^{CS}/--^{SEA}$ 和 $\alpha^{QS}/--^{SEA}$ 。非缺失型 Hb H 病比缺失型 Hb H 病患儿的临床表现要严重。Hb Q-Thailand 是 HBA1: c. 223 G > C 位点的突变导致的, 天门冬氨酸 (Asp) 替换成组氨酸 (His) 所致, Hb Q-Thailand 常与 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 连锁存在。由于基因突变改变的氨基酸存在于血红蛋白分子的外部, 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, 临床表现与 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 比较无明显差异^[9-10]。Hb J-Bangkok 是 HBB: C. 170 G > A 突变, 甘氨酸 (Gly) 替换为天冬氨酸 (Asp) 所致^[11], 本研究这例合并 $--^{SEA}/\alpha\alpha$, 临床表现与 $--^{SEA}/\alpha\alpha$ 相似。Hb G-Honolulu 是 HBA2: c. 91 G > C, 谷氨酸 (Glu) 替换成谷氨酰胺 (Gln) 所致^[12]; 地贫基因检测或基因测序与 HPLC 一致。

采用 $MCV \leq 82$ fl, $MCH \leq 27$ pg 和 $Hb A2 \geq 3.5\%$, 筛查 β 地中海贫血 216 例, 基因诊断确认 211 例, β 地中海贫血发生率为 3.40%, 而广东省 β 地中海贫血发生率为 2.52%, 高于全国平均水平。最常见的基因类型是 CD 41-42/N、IVS-2-654/N、-28/N, 与省内其他报道一致^[13-14]。Hb E 是 HBB: c. 79 G > A 位点的突变导致的, 除产生异常血红蛋白 Hb E 外, 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。研究表明 Hb E 复合 β 地中海贫血的临床表现差异较大, 可导致中重度贫血, 合并 α 地中海贫血时可以减轻症状^[14]。

鉴于中间型和重型 β 地中海贫血对家庭和社区的巨大危害, 采用 HPLC 联合 MCV、MCH 值以及地中海贫血基因检测可以有效筛查和鉴定 β 地中海贫血、异常血红蛋白病, 有利于预防本地区中间型、重型 β 地中海贫血患儿的出生, 有利于本地区孕产妇优生优育。

【参考文献】

- [1] 索明环, 温冬梅, 张秀明, 等. 轻型 β 地中海贫血对糖化血红蛋白 A1c 检测的影响 [J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38 (10): 691-695.
- [2] 马占忠, 杨辉, 林敏, 等. 广东韶关地区异常血红蛋白的分子流行病学调查 [J]. 实用检验医师杂志, 2014, 6 (3): 179-181.
- [3] Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60 000 samples in a clinical diagnostic laboratory [J]. Clinical Chemistry, 2004, 50 (10): 1736-1747.
- [4] 唐海深, 王志丹, 张艳芳, 等. 2 例未知基因型地中海贫血的产前诊断 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2017, 9 (2): 64-67.
- [5] Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, et al. ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin A [J]. Int J Lab Hematol, 2012, 34 (1): 1-13.
- [6] Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, et al. ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin F [J]. Int J Lab Hematol, 2012, 34 (1): 14-20.
- [7] 陈桂兰, 屈艳霞, 江帆, 等. 应用 HPLC 方法筛查广州市育龄期夫妇的异常血红蛋白病 [J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25 (6): 1768-1771.
- [8] 谢建红, 汪国庆, 肖奇志, 等. 高效液相色谱法在异常血红蛋白病筛查中的应用 [J]. 中华生物医学工程杂志, 2012, 18 (6): 473-476.
- [9] 钟泽艳, 陈剑虹, 官志扬, 等. 45 例血红蛋白 Q-Thailand 的表型和基因型分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2018, 35 (5): 723-726.
- [10] Li Y, Chen Z, Liang L, et al. Analysis of the phenotype-genotype relationship of hemoglobin Q-Thailand in Guangxi [J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2016, 33 (2): 164-168.
- [11] 何建萍, 郭薇薇, 唐健, 等. 云南 4 种罕见异常血红蛋白突变型分析 [J]. 国际检验医学志, 2019, 40 (8): 932-934, 938.
- [12] You Qiongli, Mao Tian, Ting Qin, et al. Capillary electrophoresis resolves inconclusive HPLC analysis for hemoglobin variants: a study of two cases [J]. Clinical laboratory, 2018, 64 (7): 1305-1309.
- [13] Jiang F, Chen G L, Li J, et al. Pre gestational thalassemia screening in mainland China: The first two years of a preventive program [J]. Hemoglobin, 2017, 41 (4-6): 1-6.
- [14] 杜丽, 秦丹卿, 王继成, 等. 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 [J]. 中国产前诊断杂志 (电子版), 2019, 11 (1): 34-37.

(收稿日期: 2020-02-25 编辑: 杨叶)