

· 论 著 ·

# 毛细管电泳血红蛋白 A<sub>2</sub> 增高对诊断 β-珠蛋白生成障碍性贫血符合率分析及应用价值

许伟华, 刘冬霞, 龙 辉, 汤美芬, 欧阳慧

(广东省清远市妇幼保健院优生与遗传实验诊断中心 511515)

**摘要:**目的 分析毛细管电泳血红蛋白 A<sub>2</sub> 增高患者 β-珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)确诊符合率,探讨其在 β-地贫中诊断中的应用价值。**方法** 选择该院 2014 年 5 月至 2015 年 5 月门诊及住院血红蛋白 A<sub>2</sub> 增高患者 260 例进行地贫基因检测。**结果** 260 例血红蛋白 A<sub>2</sub> 增高患者中,有 257 例检测到 β-地贫基因突变,符合率达 98.85%,另外 3 例未检测出常见的 17 种 β-地贫基因突变,后续经进一步进行罕见型 β-地贫基因检测及 β 珠蛋白基因测序,发现 1 例为 SEA-HPFH β 缺失型,1 例为 Taiwanese β 缺失型,1 例为 Codon 89-93(-AGT GAG CTG CAC TG)杂合突变,证实 3 例未检测出 17 种常见 β-地贫基因突变的血红蛋白 A<sub>2</sub> 增高标本仍为 β 链发生突变或大片段缺失引起。同时 257 例 β-地贫基因突变标本中有 42 例复合 α-地贫,占 β-地贫的 16.34%。**结论** 毛细管电泳血红蛋白 A<sub>2</sub> 增高能为 β-地贫的诊断提供快速准确的依据,但不能排除复合 α-地贫的可能,当患者血红蛋白 A<sub>2</sub> 增高时,应同时进行 α-地贫和 β-地贫基因诊断。

**关键词:**毛细管电泳; 血红蛋白; 珠蛋白生成障碍性贫血

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)04-0458-03

## Analysis on coincidence rate of capillary electrophoresis hemoglobin A<sub>2</sub> increase for β-thalassaemia diagnosis and its application value

XU Weihua, LIU Dongxia, LONG Hui, TANG Meifen, OUYanghui

(Aristogenesis and Genetic Experimental Diagnosis Center, Qingyuan Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Qingyuan, Guangdong 511515, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze the coincidence of the patients with capillary electrophoresis hemoglobin A<sub>2</sub> increase with definitely diagnosed beta thalassaemia and to investigate its application value in the diagnosis of beta thalassaemia. **Methods** Two hundreds and sixty outpatients and inpatients with hemoglobin A<sub>2</sub> increase in our hospital from May 2014 to May 2015 were performed the genetic testing. **Results** Among 260 patients with hemoglobin A<sub>2</sub> increase, beta thalassaemia gene mutations were detected in 257 cases, the coincidence rate reached 98.85%, and the common 17 beta thalassaemia gene mutations were not detected in the other 3 cases, follow-up further detection of rare beta thalassaemia gene and beta globin gene sequencing was performed, 1 case of SEA-HPFH β deletion type was found, 1 case was Taiwanese β deletion type and 1 case was Codon 89-93(-AGT GAG CTG CAC TG) heterozygous mutation, it was verified that 3 cases of hemoglobin A<sub>2</sub> increase without detecting 17 kinds of common beta thalassaemia gene mutations were still beta chain mutation occurrence or big fragment deletion. At the same time, among 257 specimens of beta thalassaemia gene mutations, 42 cases were compound alpha thalassaemia, accounting for 16.34% of beta thalassaemia. **Conclusion** Capillary electrophoresis hemoglobin A<sub>2</sub> increase can provide a fast and accurate basis for beta thalassaemia diagnosis, but which can not rule out the possibility of compound alpha thalassaemia, when the patient's hemoglobin A<sub>2</sub> is increased, alpha and beta thalassaemia genetic diagnosis should be simultaneously carried out.

**Key words:** capillary electrophoresis; hemoglobin; thalassaemia

珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)是一种发病率很高的血液系统遗传疾病,主要是由珠蛋白链不平衡导致。其中,β-地贫的病因是由 β-珠蛋白基因发生突变或缺失导致 β-珠蛋白链合成减少或缺如所引起的遗传性血液病,由于血红蛋白中 β 链减少,多余的 α 链与 δ 链结合,导致血红蛋白 A<sub>2</sub>(HbA<sub>2</sub>)增加,因此 HbA<sub>2</sub> 是一项用于检测 β 地贫的特征性指标<sup>[1]</sup>。

本文以 PCR 体外扩增和跨越断裂位点-聚合酶链反应(Gap-PCR)、反向点杂交-聚合酶链反应(RDB-PCR)方法为金标准,同时检测 3 种(-SEA、-α<sup>3.7</sup>、-α<sup>4.2</sup>)缺失型 α-地贫基因、3 种常见(α<sup>CS</sup>α、α<sup>QS</sup>α、α<sup>WS</sup>α)非缺失型 α-地贫和中国人中最常见的 8 个位点和 9 个少见位点突变的 β-地贫基因,对 630 例血

蛋白电泳 HbA<sub>2</sub> 增高患者建议进行基因检测,其中 260 例患者知情同意进行基因检测,回顾性分析高压毛细电泳技术血红蛋白分析中的 HbA<sub>2</sub> 的增高对诊断 β-地贫的符合率,并指导当血红蛋白电泳中 HbA<sub>2</sub> 增高时,进一步进行基因确诊的方向。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2014 年 5 月至 2015 年 5 月在本院门诊及住院患者,经 HbA<sub>2</sub> 增高患者 630 例,知情同意进行进一步基因检测 260 例,其中男 98 例,女 162 例;年龄 2~42 岁,平均(24±2)岁。

**1.2 仪器与试剂** 法国 Sebia 公司生产的 Capillarys2 全自动毛细管电泳仪及其配套血红蛋白电泳试剂盒 Capillarys He-

moglobin(E)。地贫基因检测试剂盒由深圳亚能公司提供, DNA 提取为厦门至善全自动核酸提取仪 Lab-Aid820, 扩增仪为伯乐 BIO RAD-100 扩增系统; 杂交仪为韩国 fine PCR 公司 Combi H12 杂交仪, 电泳为 DYY-8C 型电泳仪。

1.3 方法

1.3.1 毛细管血红蛋白电泳 按照仪器操作说明书进行, 标本用新鲜 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝全血无需洗涤、溶血和离心, 直接装上样本架送入 Capillarys2 全自动毛细管电泳仪检测, 约 30 min 读取结果。

1.3.2 地贫基因检测 新鲜枸橼酸钠抗凝全血, DNA 提取、扩增反应、Gap-PCR 检测缺失型  $\alpha$ -地贫、RDB-PCR 检测非缺失型  $\alpha$ -地贫及  $\beta$ -地贫基因分析, 操作程序严格按照 SOP 进行, 检测中国人常见的 3 种缺失型  $\alpha$ -地贫:  $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ ; 3 种非缺失型  $\alpha$ -地贫  $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 、 $\alpha^{\text{QS}}\alpha$ 、 $\alpha^{\text{WS}}\alpha$ ; 17 种  $\beta$ -地贫基因突变 CD41-42(-TTCT)、IVSII-654 (C  $\rightarrow$  T)、-29 (A  $\rightarrow$  G)、-28 (A  $\rightarrow$  G)、CD71-72(+A)、CD17 (A  $\rightarrow$  T)、CD43 (G  $\rightarrow$  T)、CD26 (GAG  $\rightarrow$  AAG)、CD27/28(+C)、CD31(-C)、-32 (C  $\rightarrow$  A)、-30 (T  $\rightarrow$  C)、CD14-15(+G)、IVS-I-1 (G  $\rightarrow$  A, G  $\rightarrow$  T)、IVS-I-5 (G  $\rightarrow$  C)、Int (ATG  $\rightarrow$  AGG)、CAP(A  $\rightarrow$  C)。

1.4 统计学处理 使用 SPSS12.0 软件完成数据的统计分析, 计数资料采用  $\chi^2$  检验, 计量资料采用  $t$  检验。

2 结果

2.1 HbA<sub>2</sub> 增高患者  $\beta$ -地贫基因检测分型情况 260 例 HbA<sub>2</sub> 增高患者中, 有 257 例检测到  $\beta$ -地贫基因突变, 符合率达 98.85%, 另外 3 例未检测出常见的 17 种  $\beta$ -地贫基因突变, 后续经进一步进行罕见型  $\beta$ -地贫基因检测及  $\beta$ -珠蛋白基因测序, 发现 1 例为 SEA-HPFH  $\beta$  缺失型, 1 例为 Taiwanese  $\beta$  缺失型, 1 例为 Codon 89-93(-AGT GAG CTG CAC TG) 杂合突变, 证实未检测出 17 种常见  $\beta$ -地贫基因突变的 HbA<sub>2</sub> 增高标本仍为  $\beta$  链发生突变或大片段缺失引起。260 例 HbA<sub>2</sub> 增高患者  $\beta$ -地贫基因检测分型情况见表 1。

表 1 260 例 HbA<sub>2</sub> 增高患者  $\beta$ -地贫基因检测分型情况

基因型	n	百分率(%)
$\beta$ CD14-15/ $\beta$ A	2	0.77
$\beta$ CD17/ $\beta$ A	16	6.15
$\beta$ CD27/28/ $\beta$ A	1	0.38
$\beta$ -28/ $\beta$ A	36	13.85
$\beta$ -29/ $\beta$ A	4	1.54
$\beta$ CD41-42/ $\beta$ A	109	41.92
$\beta$ CD43/ $\beta$ A	9	3.46
$\beta$ CD71-72/ $\beta$ A	7	2.69
$\beta$ IVS-II-654/ $\beta$ A	69	26.54
$\beta$ CD26/ $\beta$ A	4	1.54
$\beta$ A/ $\beta$ A	3	1.15
总数	260	100.00

2.2 42 例  $\beta$ -地贫复合  $\alpha$  地贫分布情况 其中 257 例  $\beta$ -地贫患者中, 单纯  $\beta$ -地贫 215 例, 占所检出  $\beta$ -地贫总数的 83.66%。 $\beta$ -地贫复合  $\alpha$  地贫 42 例, 占所检出  $\beta$ -地贫总数的 16.34%, 其中

以  $\beta$ -地贫复合  $-\text{SEA}/\alpha\alpha$  最为多见, 检出 24 例, 占  $\beta$ -地贫百分率 9.34%; 其次为  $\beta$ -地贫复合  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ , 检出 12 例, 占  $\beta$ -地贫百分率 4.67%; 再次为  $\beta$ -地贫复合  $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ , 检出 4 例, 占  $\beta$ -地贫百分率 1.56%; 最后是  $\beta$ -地贫复合  $\alpha\alpha(\text{WS})/\alpha\alpha$ , 检出 2 例, 占  $\beta$ -地贫百分率 0.78%。见表 2。

表 2 42 例  $\beta$ -地贫复合  $\alpha$  地贫分布情况(n)

基因型	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha(\text{ws})/\alpha\alpha$	$-\text{SEA}/\alpha\alpha$	合计
$\beta$ CD17/ $\beta$ A	2	1	0	1	4
$\beta$ -28/ $\beta$ A	1	0	0	7	8
$\beta$ CD41-42/ $\beta$ A	5	0	1	8	14
$\beta$ IVS-II-654/ $\beta$ A	4	1	1	5	11
$\beta$ -28/ $\beta$ A	0	1	0	0	1
$\beta$ -29/ $\beta$ A	0	1	0	0	1
$\beta$ CD26/ $\beta$ A	0	0	0	1	1
$\beta$ -28/ $\beta$ CD26	0	0	0	1	1
$\beta$ CD71-72/ $\beta$ A	0	0	0	1	1
合计	12	4	2	24	42

3 讨论

地贫是一组严重威胁人类健康的致死、致残的遗传性血液病<sup>[2]</sup>, 是由珠蛋白链的合成比例不平衡(正常的  $\alpha : \beta$  比值为 1)所造成的一类单基因遗传性溶血性疾病。

$\beta$ -地贫的分子基础是由于位于人类 11 号染色体 11p15.3 中的两个  $\beta$  珠蛋白基因发生碱基置换、缺失或插入, 导致  $\beta$ -珠蛋白合成减少或缺如, 多余的  $\alpha$ -珠蛋白沉积在红细胞膜上, 造成红细胞损坏, 引起的一种遗传性溶血性贫血, 是我国南方十分常见的遗传性血液病<sup>[3]</sup>。HbA<sub>2</sub> 是成人血中的次要血红蛋白, 在健康成人中为 2.5%~3.5%。在  $\beta$ -地贫基因携带者中, 由于  $\beta$ -珠蛋白基因发生缺陷, 导致  $\delta$  珠蛋白基因表达产物相对增多, 与多余的  $\alpha$ -珠蛋白链结合而形成 HbA<sub>2</sub>( $\alpha_2\delta_2$ ), HbA<sub>2</sub> 增高。因此, HbA<sub>2</sub> 的改变, 在  $\beta$ -地贫的筛查和诊断中有重要意义。

$\beta$ -地贫是地中海地区、中东、印度、东南亚及我国南方等地区最常见和发病率最高的遗传性溶血性贫血, 也是危害最严重的血红蛋白病之一<sup>[4]</sup>。由于  $\beta$ -基因主要在出生后才有较高的表达水平, 在胎儿发育直至出生时, 该基因基本处于关闭状态, 导致  $\beta$ -地贫的突变对基因的抑制作用在出生时难以显示, 只有在出生后当  $\beta$ -基因开放时, 由于突变使  $\beta$ -基因明显受到抑制而不能表达或很低水平的表达, 受累纯合子患儿才表现出贫血的临床病症, 重型  $\beta$ -地贫患儿会在出生后几个月发病, 并随着生长发育逐渐加重, 必须依靠长期输血及应用铁螯合剂治疗以维持生命。 $\beta$ -地贫患者的临床表现复杂, 症状差异大, 目前尚无有效的根治方法, 因此, 预防是最为有效的应对措施。通过健康教育、人群地贫基因携带者的筛查以及产前基因诊断可以有效地阻断重型地贫患儿的出生, 从而提高人口质量。

$\beta$ -地贫具有高度的遗传异质性, 致使其突变类型和突变频率随地域和人种变化而呈现明显的地域性和群体特异性。目前世界上已发现 170 多种  $\beta$ -珠蛋白基因突变可引起  $\beta$ -地中海的发生<sup>[5]</sup>, 导致中国人  $\beta$ -地贫发生的突变基因有 29 种<sup>[6]</sup>, 且中国人群最常见的种突变依次为 6 种: CD41-42(-TTCT) 占

41.6%、IVSII-654(C→T)占 21.8%、CD17(A→T)占 18.0%、-28(A→G)占 8.0%、CD71-72(+A)占 3.9%和-29(A→G)占 1.2%<sup>[7]</sup>。本文 HbA<sub>2</sub> 增高 260 例,β-地贫基因检测分型情况以 CD41-42(-TTCT)占 41.92%、IVSII-654(C→T)占 26.54%、CD17(A→T)占 6.15%、-28(A→G)占 13.85%占与 Xiao 等<sup>[7]</sup>报道接近。

αβ 复合型地贫,主要发生在 α-地贫与 β-地贫杂合之间婚配而生的儿童中<sup>[8]</sup>。在广东,α-地贫和 β-地贫的育龄夫妇携带率分别为 12.96%和 4.51%<sup>[9-10]</sup>,如果这两类地贫的携带者婚配,就有可能生育 αβ 复合型地贫的后代。αβ 复合型地贫患者,由于患者的 α 肽链和 β 肽链合成均降低,但由于 HbA<sub>2</sub> 的比例相对增高<sup>[11]</sup>,所以就呈 β-地贫基因特征,从而掩盖了 α-地贫的基因特征,研究显示,成人 β 复合 α 地贫患者血液学表现为 β 地贫的类型<sup>[12]</sup>。如果 HbA<sub>2</sub> 增高患者不同时进行 α-地贫和 β-地贫的基因检测,就有可能造成漏诊。在本组研究中,257 例 β-地贫患者中有 42 例复合 α 地贫,占 β-地贫的 16.34%,与张慧敏等<sup>[13]</sup>报道接近。

综上所述,Sebia CapillaryS2 全自动毛细管电泳 HbA<sub>2</sub> 增高能为 β-地贫的诊断提供快速准确的依据,同时,当患者 HbA<sub>2</sub> 增高时同时进行 α-地贫和 β-地贫基因检测对降低漏诊率有重要的作用。

#### 参考文献

- [1] 刘基铎,肖明锋,袁晴,等. 高压毛细电泳技术检测 β-地中海贫血的结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2013,20(4):427-429.
- [2] 张新华,尹晓林. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京:人民军医出版社,2011:35-38.
- [3] 全国血红蛋白病研究协作组. 20 省、市、自治区 60 万人血红蛋白病调查[J]. 中华医学杂志,1983,63(6):382-385.
- [4] 郑琳,黄海龙,范向群,等. 高效液相色谱技术检测 β-地中海贫血的临床价值探讨[J]. 中国妇幼保健,2011,11(1):

1665-1666.

- [5] 孙大光,韩健,金孝华,等. 悬浮点阵技术用于分析 β 地中海贫血基因突变类型[J]. 中华血液学杂志,2004,20(4):50-52.
- [6] Tosto F,Salvatore M,Falbo V. The Italian scheme of External Quality Assessment for beta-thalassemia: genotyping and reporting results and Testing strategies in a 5-year survey[J]. Genet Test Mol Biomarkers,2009,13(1):31-36.
- [7] Xiao W,Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography:A review[J]. Hum Mutat,2001,17(6):439-474.
- [8] 李莉艳,李强,宋兰林,等. 69 例 αβ 复合型地中海贫血的血液学和基因型研究[J]. 实用妇产科杂志,2011,27(5):378-382.
- [9] Yin A,Li B,Luo M,et al. The prevalence and molecular spectrum of α-globin and β-globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China [J]. PLoS One,2014,9(2):89855.
- [10] Li B,Zhang XZ,Yin AH,et al. High prevalence of thalassemia in migrant populations in Guangdong Province,China[J]. BMC Public Health,2014,14(1):905.
- [11] 刘绮婷,何秋贤. αβ 复合型地中海贫血的血液学和基因型相关分析[J]. 中国医药指南,2015,27(1):85-86.
- [12] 黄道连,袁春雷,冯丹艺. αβ 复合型地中海贫血筛查结果分析[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志,2011,20(5):214-216.
- [13] 张慧敏,李少英,刘维强,等. αβ 复合型地中海贫血的分子检测及血液学分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,32(7):31-32.

(收稿日期:2016-09-28 修回日期:2016-11-19)

(上接第 457 页)

- [5] Japanese[J]. PLoS One,2011,6(10):26911.
- [6] Black R,Black D,Azizkhan-Clifford J. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer[J]. J Cell Physiol,2001,188(2):143-160.
- [7] Kaczynski J,Cook T,Urrutia R. Sp1-and krppel-like transcription factors[J]. Genome Biol,2003,4(2):206.
- [8] Fernandez-Zapico E,Lomberk A,Tsuji S,et al. A functional family-wide screening of SP/KLF proteins identifies a subset of suppressors of KRAS-mediated cell growth[J]. Biochem J,2011,435(2):529-537.
- [9] Parker-Katirae L,Carson R,Yamada T,et al. Identification of the imprinted KLF14 transcription factor undergoing human-specific accelerated evolution[J]. PLoS Genet,2007,3(5):65.
- [10] Truty J,Lomberk G,Fernandez-Zapico E,et al. Silencing

of the transforming growth factor-beta (TGFbeta) receptor II by Kruppel-like factor 14 underscores the importance of a negative feedback mechanism in TGFbeta signaling[J]. J Biol Chem,2009,284(10):6291-6300.

- [10] Gonzalez R,Vallcaneras S,Calandra S,et al. Involvement of KLF14 and egr-1 in the TGF-beta1 action on Leydig cell proliferation[J]. Cytokine,2013,61(2):670-675.
- [11] Nicklas J,Wang X,You T,et al. Effect of exercise intensity on abdominal fat loss during calorie restriction in overweight and obese postmenopausal women:a randomized,controlled trial[J]. Am J Clin Nutr,2009,89(4):1043-1052.
- [12] Teslovich TM,Musunuru K,Smith AV,et al. Biological,clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids[J]. Nature,2010,466(737):707-713.

(收稿日期:2016-10-15 修回日期:2016-12-06)