

• 个案分析 •

# 1 例 $\alpha_2$ 珠蛋白新突变型分析\*

郭薇霞<sup>1</sup>, 唐 健<sup>2#</sup>, 何建萍<sup>2</sup>, 罗胜军<sup>2</sup>, 黄 锐<sup>1</sup>, 林克勤<sup>1</sup>, 褚嘉祐<sup>1</sup>, 杨昭庆<sup>1△</sup>

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所遗传室, 云南昆明 650118;

2. 昆明市妇幼保健院遗传室, 云南昆明 650031)

**关键词:** 异常血红蛋白;  $\alpha_2$  珠蛋白基因; 新突变; 血红蛋白电泳

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.035 **中图法分类号:** R566

**文章编号:** 1673-4130(2019)09-1148-03 **文献标识码:** C

异常血红蛋白是由于珠蛋白基因突变导致珠蛋白分子结构和功能异常的一类血红蛋白, 当产生临床表现时称为异常血红蛋白病<sup>[1]</sup>。异常血红蛋白的种类和分布频率存在地域和人种差异<sup>[2]</sup>, 根据人类血红蛋白变异体数据库 HbVar (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>) 结果显示, 目前全世界报道的发生在  $\alpha$  珠蛋白肽链上的异常血红蛋白超过 490 种, 我国报道的有 38 种。大多数异常血红蛋白是由于珠蛋白链上单个碱基替换引起的, 不产生临床症状, 因此需要借助血红蛋白电泳和基因检测才能确诊<sup>[3]</sup>。本研究通过对血红蛋白电泳结果异常的 1 例样本进行了基因诊断, 检出了 1 例  $\alpha$  珠蛋白基因新突变型, 现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 先证者: 女, 26 岁, 就诊于云南省昆明市妇幼保健院。由于无法联系到这患者及其家属, 未采集到家系其他成员血样。

## 1.2 方法

**1.2.1 血液学检查** 取静脉血 2 mL, 乙二胺四乙酸钾(EDTA-K<sub>2</sub>) 抗凝后, 采用血细胞分析仪日本 sysmex XT-2000i 检测红细胞数量、血红蛋白含量(Hb)、平均红细胞体积(MCV)和平均血红蛋白含量(MCH)等血常规指标。采用欧洲 helena V8 全自动毛细管电泳仪进行血红蛋白电泳检测。

**1.2.2 常见地贫突变基因检测** 采用 PCR-反向点杂交法检测 23 种中国人常见的地中海贫血基因型(SEA、 $-\alpha 3.7$ 、 $-\alpha 4.2$ 、 $\alpha CS\alpha$ 、 $\alpha QS\alpha$ 、 $\alpha WS\alpha$ 、41-42M、654M、 $-\alpha 28M$ 、71-72M、17M、 $\beta EM$ 、IVS-I-1M、IVS-I-5M、27/28M、43M、 $-\beta 29M$ 、 $-\beta 30M$ 、31M、 $-\beta 32M$ 、14-15M、IntM 和 CAPM)。所用试剂为亚能生物技术(深圳)有限公司提供的地中海贫血基因检测试剂盒。

**1.2.3  $\alpha$  和  $\beta$  珠蛋白基因片段扩增** 采用 Axygen 公司的 AxyPrep 血基因组 DNA 小量制备试剂盒, 严格按照说明书操作提取全血 DNA。根据 NCBI 中  $\alpha$ 、 $\beta$  珠蛋白基因序列设计引物扩增包括转录启动子序列及 3 个外显子在内  $\alpha$ 、 $\beta$  珠蛋白基因序列。引物序列如表 1 所示, 由昆明硕擎生物技术有限公司合成。PCR 扩增采用大连宝生物公司的 TaKaRa LA Taq 酶, 仪器使用美国 ABI 公司的 9700 PCR 扩增仪。 $\beta$  基因、 $\alpha_1$  基因、 $\alpha_2$  基因 PCR 扩增体系均为 30  $\mu$ L: 每一反应体系含 2 $\times$ GC Mix Buffer 15  $\mu$ L、上下游引物各 0.3  $\mu$ L、LA Taq 0.2  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 11.2  $\mu$ L、DNA 模板含量约 100 ng。反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 4 min, 94  $^{\circ}$ C 45 s, 64  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 共 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 20 min。

**1.2.4  $\alpha$  和  $\beta$  珠蛋白基因片段测序** 纯化 PCR 产物后, 送昆明硕擎生物技术有限公司进行测序, 见表 1。

表 1  $\alpha$ 、 $\beta$  珠蛋白基因扩增引物

扩增基因	引物序列	产物长度(bp)
HBB	上游引物: 5'-TGGTATGGGGCCAAGAGATA-3'	1 973
	下游引物: 5'-TTTGCAGCTCACCTTCTTT-3'	
HBA1	上游引物: 5'-TGGAGGGTGGAGACGTCCTG-3'	

\* 基金项目: 云南省科技计划项目(2016FA048); 国家重点研发计划(2016YFC1201704)。

# 并列第一作者。  $\Delta$  通信作者, E-mail: zyang@imbcams.com.cn。

本文引用格式: 郭薇霞, 唐健, 何建萍, 等. 1 例  $\alpha_2$  珠蛋白新突变型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(9): 1148-1150.

续表 1 α、β 珠蛋白基因扩增引物

扩增基因	引物序列	产物长度(bp)
HBA2	下游引物: 5'-TCCATCCCCTCCTCCCGCCCTGCCTTTTC-3'	1 181
	上游引物: 5'-TGGAGGGTGGAGACGTCCTG-3'	
	下游引物: 5'-CCATTGTTGGCACATTCCGG-3'	1 085

2 结 果

2.1 血常规结果 先证者血常规结果为: RBC 4.61×10<sup>12</sup>、Hb 143 g/L、MCV 92.4 fL、MCH 31 pg, 为正细胞正色素, 无明显异常。

2.2 血红蛋白毛细管电泳结果 先证者 HbA 占总血红蛋白含量为 76.35%、血红蛋白 A2(HbA2) 为 1.42%、血红蛋白(HbF) 含量异常升高, 达到了 18.56%, 产生一个未命名的未知条带, 含量为 3.10%, 如图 1 所示。

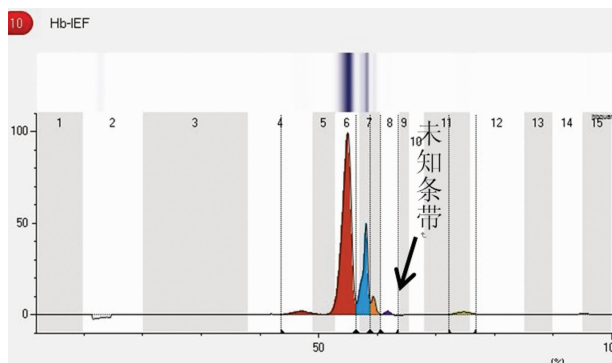
2.3 基因型检测结果 先证者检出 HbA2 基因第 27 位密码子 GAG>CAG, Glu>Gln 杂合突变, 采用人类基因组变异协会(HGVS)命名规则命名为 HBA2:c.82G>C(图 2), 未检出 α、β 地贫基因突变。

查结果显示云南异常血红蛋白发生率最高, 达到了 5.93%<sup>[4]</sup>。目前云南报道较多、最常见的异常血红蛋白为 HbE<sup>[5]</sup>, 也有一些罕见异常血红蛋白如 Hb Rush 的报道<sup>[6]</sup>。而本研究此次检出的 Hb Mile 为世界范围内首次报道。

该突变携带者是 26 岁女性在进行地中海贫血产前筛查时, 常见地贫基因检测结果都为阴性, 但是血红蛋白电泳检查结果却较为罕见与复杂。经过复查后发现该突变产生的未知异常血红蛋白条带与 F 带利用等点聚焦毛细管电泳技术不能完全分开, 在电泳结果图上表现为 F 带与异常条带波谷融合, 此时检测到的 F 带含量为 18.56%, 是 HbF 和部分异常条带含量的总和。为了进一步明确异常血红蛋白条带产生的原因所以进行了血红蛋白基因测序检查, 最终检出 α 珠蛋白基因 HBA2 第 27 位密码子 GAG>CAG 杂合突变。

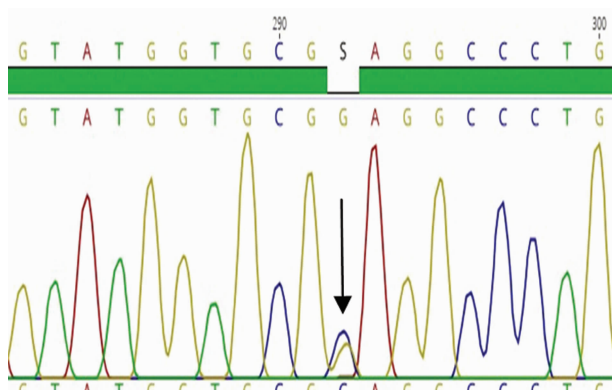
本研究检出的 Hb Mile 是由于 α<sub>2</sub> 珠蛋白基因第 27 位密码子 GAG>CAG 杂合突变(HGVS 命名 HBA2:c.82G>C), 导致该位置上的谷氨酸(Glu)被替换为谷氨酰胺(Gln), 该突变先前未见相关报道, 这是首次报道, 并以先证者的籍贯地云南弥勒命名。蛋白质三维结构分析显示该突变位于 α 珠蛋白的保守区域, 与 β 珠蛋白交联的位点<sup>[7]</sup>。尽管该 G>C 突变从未报道过, 但是该位置上报道过其他突变类型 Hb Shuangfeng (HBA2 or HBA1:c.82G>A), 这一突变在一中国汉族家系中发现, 它是第 27 位密码子谷氨酸被赖氨酸替代, 产生含量为 13% 的不稳定异常血红蛋白, 杂合子个体即产生了溶血性贫血的临床症状<sup>[8]</sup>。提示这一位点在维持血红蛋白稳定性方面发挥重要作用, 但是本研究中 Hb Mile 先证者血液学参数正常, 推测可能是由于替换的氨基酸 Gln 与原来的 Glu 性质相似, 所以突变后对血红蛋白的功能影响较小, 携带者不产生临床表现。

由于大多数异常血红蛋白不产生临床表现, 所以只通过血常规指标难以有效筛查血红蛋白病, 而毛细管电泳具有更高的分辨率和准确性, 目前已经成为实验室诊断血红蛋白病的重要手段之一<sup>[9]</sup>。但是由于异常血红蛋白具有异质性, 同一电泳区带可能是由多种突变造成<sup>[10]</sup>, 而本研究中则出现了利用毛细管电泳技术也不能将异常条带与 F 带完全分离的罕见状况。



注:产生与 HbF 未完全分离的未知异常条带

图 1 Hb Mile 血红蛋白电泳图



注:α 珠蛋白基因第 27 位密码子 GAG>CAG 杂合突变, 箭头表示突变

图 2 Hb Mile 测序图

3 讨 论

我国异常血红蛋白的发生率和分布存在明显遗传多态性, 2003 年全国各地区异常血红蛋白发生率普

若能重新采集患者及家系成员血样,可以考虑使用分辨率较高的高效液相色谱法对异常血红蛋白含量进行检测。因此将血红蛋白电泳和基因诊断相结合,才有利于检出更多的异常血红蛋白突变型,基因检测结果能指导电泳结果进行正确解读。

#### 4 结 论

本研究首次报道了  $\alpha$  珠蛋白基因突变型 Hb Mile (HBA2:c. 82G>C, CD27:Glu>Gln), 丰富了我国和人类血红蛋白突变谱。通过对表型进行初步分析,该突变不产生明显临床症状,但是由于云南是地中海贫血和异常血红蛋白病高发区,异常血红蛋白突变有较大概率产生复合杂合子,因此其临床危害性和人群发生率有待于继续研究。

#### 参考文献

[1] SRIVORAKUN H, SINGHA K, FUCHAROEN G, et al. A Large Cohort of Hemoglobin Variants in Thailand: Molecular Epidemiological Study and Diagnostic Consideration[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108365.

[2] LIN M, WANG Q, ZHENG L, et al. Prevalence and molecular characterization of abnormal hemoglobin in eastern Guangdong of southern China[J]. Clin Genet, 2012, 81(2): 165-171.

[3] 庞丹凤, 罗元标. 全自动毛细管血红蛋白电泳在地中海贫血

血筛查中的作用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(7): 36-37.

[4] 秦良道. 我国异常血红蛋白发生率、分布及遗传多态性[J]. 医学研究通讯, 2003, 32(12): 12-14.

[5] HE J, ZENG X, ZHANG Y, et al. Prevalence of hemoglobin E in Yunnan Province of Southwest China[J]. Hematology, 2016, 21(1): 54-59.

[6] 葛世军. 不稳定血红蛋白 Hb Rush 的血液学表型和基因型分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 1(34): 15-20.

[7] GELL D A, FENG L, ZHOU S, et al. A cis-proline in  $\alpha$ -hemoglobin stabilizing protein directs the structural reorganization of  $\alpha$ -hemoglobin[J]. J Biol Chem, 2009, 284(43): 29462-29469.

[8] CHIHCHUAN L, HAINAN T, HWEIYUEN L, et al. Hemoglobin Shuangfeng (alpha 27 (B8) Glu substituting for Lys): a new unstable hemoglobin variant[J]. Hemoglobin, 1981, 5(7-8): 691-700.

[9] 李文瑞, 叶敏南, 彭琪, 等. 12 898 例全自动血红蛋白电泳检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(4): 438-439.

[10] 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(3): 338-341.

(收稿日期:2018-11-10 修回日期:2018-12-30)

#### • 个案分析 •

## 干细胞移植治疗产生高滴度抗核抗体 1 例报道及文献复习\*

张乃丹<sup>1,2</sup>, 谢其冰<sup>3</sup>, 武永康<sup>1△</sup>

(1. 四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041; 2. 德阳市人民医院检验科, 四川德阳 618000; 3. 四川大学华西医院风湿免疫科, 四川成都 610041)

**关键词:** 抗体, 抗核; 干细胞移植; 移植物抗宿主病; 贫血, 再生障碍性; 病例报告

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2019. 09. 036

**中图法分类号:** R446. 62; R556. 5

**文章编号:** 1673-4130(2019)09-1150-03

**文献标识码:** C

抗核抗体(ANA)是临床应用最多的自身免疫标志物,而间接免疫荧光技术被认为是筛查 ANA 有效、灵敏和综合性的方法。阳性荧光模型可提示参与反应的细胞核抗原定位,并有助于鉴别诊断。本研究随访了 1 例异基因造血干细胞移植治疗(allo-HSCT)再生障碍性贫血 1 年后产生 ANA 的患者,目前为移植术后 4 年 5 个月,患者 ANA 表现为高滴度核仁型,现

报道如下。

### 1 临床资料

患者,男,32 岁,已婚,汉族,乙型肝炎病毒携带者。4 年前患者门诊检查血常规:血小板计数  $7 \times 10^9 L^{-1}$ ,白细胞  $0.60 \times 10^9 L^{-1}$ 。入院后骨髓活检:造血细胞增生极低下,三系均低,细胞形态未见明显异常,网状纤维不增加。病理诊断:重型再生障碍性贫血。

\* 基金项目:四川省科技厅项目(2016JY0035);四川省卫健委项目(16PJ326)。

△ 通信作者, E-mail: vipwyk@163. com。

本文引用格式:张乃丹,谢其冰,武永康. 干细胞移植治疗产生高滴度抗核抗体 1 例报道及文献复习[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(09):