

广西南宁地区 Hb Q-Thailand 基因分析*

张 强, 范 歆, 韦 媛, 陈秋莉, 唐燕青, 何 升 (广西壮族自治区妇幼保健院儿童医院, 南宁 530000)

【摘要】 目的 了解广西南宁地区异常血红蛋白 Hb Q-Thailand 分子特征。**方法** 回顾性分析 2013 年 1 月至 2014 年 1 月来广西壮族自治区妇幼保健院·儿童医院做地贫筛查的 23 026 例患者资料, 通过毛细管电泳方法, 确定可疑 Hb Q-Thailand 患者, 运用扩增不应突变系统对可疑阳性患者进行确诊。**结果** 在 23 026 例中共确诊 Hb Q-Thailand 阳性患者 29 例, 占筛查人数的 0.13%。且有 1 例是我国首次发现的 Hb Q-Thailand 不与 4.2 左侧缺失型 α -地贫连锁的患者。**结论** Hb Q-Thailand 作为异常血红蛋白的一种, 有其独特的分子特征, 在日常工作中应引起足够的重视。

【关键词】 Hb Q-Thailand; ARMS-PCR; 基因分析
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.20.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)20-2803-02

Genetic analysis on HB Q-Thailand in Nanning city of Guangxi ZHANG Qiang, FAN Xin, WEI Yuan, CHENG Qiu-li, TANG Yan-qing, HE Sheng (the Children's Hospital, the Obstetrics and Gynecology Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530000, China)

【Abstract】 Objective To understand the molecular features of abnormal hemoglobin Hb Q-Thailand in Nanning city of Guangxi Zhuang autonomous region. **Methods** Data of 23 026 patients screened thalassemia were analyzed retrospectively. Capillary electrophoresis were used to determine the suspicious patients with HB Q-Thailand, and ARMS-PCR method was applied to make a definite diagnosis among suspected positive patients. **Results** A total of 29 patients in 23 026 suspicious patients were confirmed as HB Q-Thailand positive 29 cases, accounted for 0.13% of the number of screening. **Conclusion** HB Q-Thailand as a kind of abnormal hemoglobin, has unique molecular characteristics and a certain occurrence rate in Nanning, should be causes enough attention in daily work.

【Key words】 HB Q-Thailand; ARMS-PCR; gene analysis

血红蛋白(Hb)疾病分为异常 Hb 和珠蛋白生成障碍性贫血(地贫)^[1]。广西是地贫和异常 Hb 的高发省份, 人群携带率分别为 23.98% 和 2.19%^[2]。Hb Q-Thailand 属于异常 Hb 的一种, 是由 Vella 等^[3]在一个华侨家庭中发现, 随后在我国大陆以及泰国等地均有发现。本文通过毛细管电泳联合扩增不应突变系统-聚合酶链式反应(ARMS-PCR)发现 29 例 Hb Q-Thailand。其中 Hb Q-Thailand 不与 4.2 左侧缺失连锁, 但与东南亚缺失(SEA)复合 β^{11-42} 杂合子同时存在患者为国内首次报道。

1 材料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2013 年 1 月至 2014 年 1 月来本院做地贫筛查的 23 026 例患者资料。取受检者外周血 2 份, 每份 2~5 mL, 1 份经乙二胺四乙酸抗凝, 用于血常规检测和 DNA 提取。1 份经枸橼酸钠抗凝, 用于毛细管电泳检测。

1.2 方法

1.2.1 血细胞分析 使用日本 Sysmex XE-2100 全自动血液分析仪进行检测, 正常范围: 平均红细胞体积(MCV)80~100 fL。平均红细胞血红蛋白量(MCH)27~34 pg。男性 Hb>120 g/L, 女性 Hb>110 g/L。

1.2.2 Hb 电泳定量分析 采用法国 sebia 毛细管电泳定量检测 Hb 各参数的水平。正常范围: HBA₂ 2.5~3.5%。HbF<5%(6 个月至 2 岁)或 HbF<2%(大于 2 岁)

1.2.3 地贫基因诊断 使用深圳益生堂生物技术有限公司提

供的试剂进行 3 种缺失型 α -地贫($-\alpha^{3.7}/$, $-\alpha^{4.2}/$, $-\text{SEA}/$)检测。对疑似 α -地贫且已排除 α 缺失型地贫的标本利用非缺失型试剂盒检测($\alpha^{\text{CS}}/$, $\alpha^{\text{WS}}/$, $\alpha^{\text{QS}}/$ 点突变)。利用反向杂交(RDB)联合 PCR 技术检测中国人常见的 17 种 β 珠蛋白的基因突变。突变位点包括: CD41-42, IVS-II-654, CD17,-28, CD26, CD71-72, CD43,-29, Int(ATG→AGG), CD14-15, CD27-28,-32,-30, IVS-I-1, IVS-I-5, CD31 和 CAP+40/+43。

1.2.4 Hb Q-Thailand 确诊 采用 ARMS-PCR 检查 $\alpha 1$ 珠蛋白基因的 Q-Thailand 点突变。上游引物 F1: 5'-CAA CGC CGT GGC GCA CGT GC-3'。下游引物 R1: 5'-GAG GCC CAA GGG GCA AGA AGC AT-3'扩增片段大小为 416 bp。在 β 上选取 268 bp 的片段作为内参, 上游引物 F2: 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3', 下游引物 R2: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'

2 结 果

2.1 筛查结果 23 026 例标本中共检测出 29 例 Hb Q-Thailand 患者, 占筛查人数的 0.13%。其中 28 例为本院地贫筛查中 Hb 异常患者, 1 例因中度贫血来本院儿科门诊就诊。其中男 10 例, 女 19 例, 年龄 1~43 岁。

2.2 Hb Q-Thailand 患者血液学参数及地贫基因类型 将 Hb Q-Thailand 患者按照地贫基因类型分类, 共分 6 组, 统计每组中血液学参数的均值和标准差, 分析 Hb Q-Thailand 复合不同地贫后血液学参数特征。Hb Q-Thailand 患者血液学参

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(H0815); 广西自然科学基金资助项目(2013GXNSFAA019247); 广西卫生厅重点项目(重 2012020)。
作者简介: 张强, 男, 本科, 技师, 主要从事代谢疾病检测。

数及地贫基因结果见表 1。

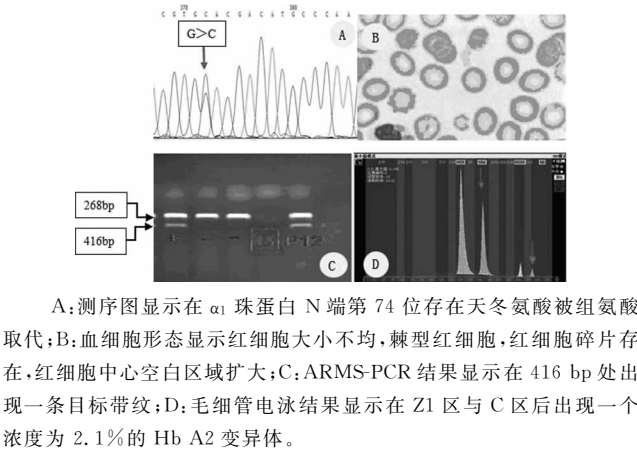
2.3 P29 患者血液学及分子生物学结果

P29 患者是我国首

次发现的 Hb Q-Thailand 不与 4.2 左侧缺失型 α -地贫连锁,但与 SEA 复合 β^{11-42} 杂合子同时存在患者,结果如图 1。

表 1 Hb Q-Thailand 患者血液学参数及地贫基因类型

患者	地贫基因类型	血液学参数					
		HB(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	HbA2(%)	HbF+HbQ(%)	HbA ₂ 变异体(%)
P1	$-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}, \beta^N/\beta^N$	115.0	68.0	22.5	1.3	44.1	1.0
P2	$-\alpha^{4.2}/-\text{SEA}, \beta^{\text{CD}17}/\beta^N$	74.0	39.8	12.8	6.0	93.9	0.1
P3~P5	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}, \beta^N/\beta^N$	113.3±26.2	68.8±2.5	21.3±1.9	1.6±0.2	38.93±5.9	0.9±0.2
P6~P26	$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha, \beta^N/\beta^N$	125.1±16.8	78.1±5.8	26.4±1.3	2.0±0.2	28.1±2.8	0.7±0.2
P27~P28	$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha, \beta^{\text{CD}11-42}/\beta^N$	129.5±7.5	72.2±1.0	22.5±0.7	4.8±0.1	20.5±3.5	1.4±0.3
P29	$-\text{SEA}/\alpha\alpha, \beta^{\text{CD}11-42}/\beta^N$	102.0	72.2	22.1	3.8	33.4	2.1



A:测序图显示在 α_1 珠蛋白 N 端第 74 位存在天冬氨酸被组氨酸取代;B:血细胞形态显示红细胞大小不均,棘红细胞,红细胞碎片存在,红细胞中心空白区域扩大;C:ARMS-PCR 结果显示在 416 bp 处出现一条目标带纹;D:毛细管电泳结果显示在 Z1 区与 C 区后出现一个浓度为 2.1% 的 Hb A2 变异体。

图 1 P29 患者血液学及分子生物学结果

3 讨 论

广西壮族自治区是我国西南地区与越南北部接壤的省份,是现代人类在“走出非洲”迁徙中,由东南亚进入中国大陆的第一站^[4]。异常 Hb 是珠蛋白基因突变所致珠蛋白分子结构改变疾病^[5]。已有研究显示,广西地区在中国南方各省区中 Hb 病携带率最高^[6]。Hb Q-Thailand 是一种异常的 Hb,是由于 α_1 珠蛋白 N 端第 74 位密码子天冬氨酸被组氨酸取代。主要发生于泰国,在我国各地也有零星报道^[7]。本次研究共检测出 Hb Q-Thailand 29 例,占筛查人数的 0.13%。其中依据与地贫复合的关系分成 6 类,除 P29 患者外 Hb Q-Thailand 均伴随一个 4.2 缺失型 α -地贫的发生,这与曾溢滔^[7]和 Singasanan 等^[8]的研究结果一致。从血细胞参数上分析,单纯 Hb Q-Thailand 连锁 4.2 缺失型 α -地贫并没有明显的贫血症状,复合 3.7 或 4.2 缺失纯合子时,血液学参数降低,与轻型地贫的血液学参数类似^[9-10]。因 α_1 第 74 位的天冬氨酸是位于分子表面非功能位置的氨基酸,它被取代并不影响 Hb 分子的构想和功能,所以 Hb Q-Thailand 临床上并无贫血表现^[11]。但当复合 α_0 -地贫时,即缺失了 3 个 α 基因,仅剩下 1 个带有 Hb Q-Thailand 突变的 α_1 基因,则其无 HB A 和 HB A₂ 合成,取而代之的为 HBQ-Thailand($\alpha_2\alpha_2\beta_2$)和 HBQA2($\alpha_2\alpha_2\delta_2$)两种变异体的生成^[12]。患者表现为 Hb QH 病^[13],故 Hb 水平会明显降低。29 例标本除 β -地贫携带者外 Hb 参数均表现为 Hb A₂ 偏低,Hb F 升高。结果也从侧面说明,Hb Q-Thailand 既符合异常 Hb 病的特征,但又有独特的血液学表现,在实验室检测和临床诊断中应关注其特殊性。在本研究中,P29 患者是我国

首次报道,此患者经 sebia 毛细管电泳筛查提示胎儿 Hb (HbF)水平高于正常范围,且在 Z1 区与 C 区后出现一个浓度为 2.1% 的 Hb A2 变异体。地贫基因检测结果为 SEA 复合型 β^{11-42} 位点突变杂合子。初步考虑为 Hb Q-Thailand,采用 ARMS-PCR 对此标本进行 Hb Q-Thailand 验证,结果显示在 416 bp 处出现一条目标带纹,证实为 Hb Q-Thailand。但因地贫基因检测未发现 4.2 左侧缺失存在,与以往文献报道不符,故对 α_1 珠蛋白基因进行一代测序,测序结果证实此患者在 α_1 珠蛋白 N 端第 74 位存在天冬氨酸被组氨酸取代,故确诊为 Hb Q-Thailand 患者,基因型为 $-\text{SEA}/\alpha\alpha^Q$ 复合 β^{11-42}/β^N 。从血液学表型可知此患者并无明显贫血症状,但 MCV、MCH 偏低,HbF 升高。对外周血进行推片染色,观察红细胞形态,看到视野中红细胞大小不均,棘红细胞,红细胞碎片存在,红细胞中心空白区域扩大,提示有轻度贫血表现。以上数据可以看出,Hb Q-Thailand 通常会伴随一个 4.2 左侧缺失型地贫,在本研究中伴随 4.2 缺失型地贫的占到 Hb Q-Thailand 总检出的 96.5%。因 Hb Q-Thailand 是 Hb 分子外部氨基酸发生替代所以本身并不影响分子的稳定性和功能,但它在复合地贫尤其是与 α_0 -地贫复合时,会加重患者贫血程度。广西是地贫的高发地区,Hb Q-Thailand 复合地贫的可能性大大增加,这就要求在日常的工作中对 Hb Q-Thailand 患者或其他异常 Hb 携带者加以重视,做到预防为主,优生优育。

综上所述,本研究报道了南宁地区 Hb Q-Thailand 的分子遗传学和分子病理学特征,分析与不同类型地贫复合后的血液学表现,对患者给予遗传指导与临床治疗具有十分重要的意义。

参考文献

[1] Shin HC, Er TK, Chang TJ, et al. Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis [J]. Clin Biochem, 2009, 42(16/17): 1667-1676.
[2] 徐湘民, 张新华. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 2011: 28.
[3] Vella FR, Well HC, Agra J, et al. A hemoglobinopathy involving hemoglobin H and new (Q) hemoglobin [J]. Br Med J, 1958, 73(5): 752-755.
[4] Ke Y, Su B, Song X, et al. African origin of modern humans in East Asia: a tale of 12,000 Y chromosomes [J]. Science, 2001, 292(21): 1151-1153. (下转第 2807 页)

血清中 Mb 水平极低,当骨骼肌有病变时,早期血清中 Mb 水平便会升高,因而它能反映横纹肌的损伤程度。由于多发伤患者都有不同程度的肌肉损伤,因此血清 Mb 水平有很大的改变。目前国内外关于 Mb 的研究主要集中在对急性心肌梗死、横纹肌溶解综合征等疾病的监测。最近研究显示热运动后血清 Mb 升高 3 倍^[1];Thorpe 和 Sunderland^[2]发现与赛前相比,足球运动员血清中 Mb 水平增加了 238%。近年来,血清 Mb 与多发伤预后预测等研究已经开始受到重视^[3-5]。IL-6 是由 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及内皮细胞产生的,它能提高自然杀伤细胞的活力。但 IL-6 的持续释放不仅会造成组织急性炎症反应,还会导致其他重要抗炎介质和细胞因子抑制剂的表达失控,具有放大炎症反应的作用^[6-7]。IL-6 水平的增加与多发伤患者损伤程度和病死率密切相关^[8]。由于其有更长的半衰期,在外周血中更易测定,并能预示创伤的结局,因此 IL-6 是多发伤预后判断的理想标志物之一。多发伤患者多个器官受到损伤,可改变细胞膜的通透性,释放多种酶,其中 CK 是肌肉系统损伤最敏感的指标^[9-10]。

本研究结果显示,多发伤轻、中、重度创伤组血清 Mb、CK 和 IL-8 水平在伤后第 3 天升高至高峰,随后呈下降趋势,且 3 组间血清 Mb、CK 水平在第 3 天时比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。重度创伤组血清 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平在伤后第 1 天即明显高于中度创伤组和轻度创伤组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

本研究结果显示,非 MODS 组和 MODS 组患者血清 Mb 和 CK 在伤后第 1 天明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MODS 组血清 Mb 和 CK 在伤后第 1~7 天与非 MODS 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。外周血 Mb、CK、IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平升高程度与多发伤患者 ISS 评分高低有一定的相关性。通过比较灵敏度、特异度、阳性预测率和阴性预测率认为,Mb、IL-6 和 CK 可作为预测多发伤患者并发 MODS 的诊断指标,并且 Mb 的效率高于 IL-6 和 CK。

综上所述,联合监测 Mb、IL-6 和 CK 水平及其动态变化可为多发伤患者伤情判断及 MODS 并发情况提供一定帮助。但本研究由于时间等原因,留取样本量相对较少,例如多发伤并发 MODS 患者仅为 7 例,因此需进一步研究。

参考文献

- [1] Nybo L, Girard O, Mohr M, et al. Markers of muscle damage and performance recovery following exercise in the heat[J]. Med Sci Sports Exerc, 2012, 12(4): 111-114.
- [2] Thorpe R, Sunderland C. Muscle damage, endocrine and immune marker response to a soccer match[J]. J Strength Cond Res, 2012, 26(10): 2783-2790.
- [3] 徐善祥, 张茂, 干建新, 等. 多发伤患者血清肌红蛋白的动态变化及临床意义[J]. 中华创伤杂志, 2011, 27(1): 12-16.
- [4] 陈劲涛, 郁晓明. 多发伤患者血清酶含量及肌红蛋白肌钙蛋白 I 水平变化及其意义[J]. 中国急救医学, 2005, 25(10): 778-779.
- [5] Sugimura T, Wang EL, Kashiwagi M, et al. Renal immunohistochemical investigation for the differentiation of the cause of multiple trauma fatalities[J]. Leg Med, 2012, 14(1): 1-5.
- [6] Yadav K, Zehtabchi S, Nemes PC, et al. Early immunologic responses to trauma in the emergency department patients with major injuries[J]. Resuscitation, 2009, 80(1): 83-88.
- [7] Andrejaitiene J, Sirvinskas E, Zebrauskiene I. Procalcitonin; a new infection marker. Its use in intensive care[J]. Medicina (Kaunas), 2002, 38: 491-498.
- [8] Stensballe J, Christiansen M, Tonnesen E, et al. The early IL-6 and IL-10 response in trauma is correlated with injury severity and mortality[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2009, 53(4): 515-521.
- [9] Sahjian M, Frakes M. Crush injuries; pathophysiology and current treatment[J]. Nurse Pract, 2007, 32(9): 13-18.
- [10] 张文, 陈楠, 陈晓农, 等. 横纹肌溶解综合征致急性肾衰竭 23 例诊治分析[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(2): 73-76.

(收稿日期: 2014-02-25 修回日期: 2014-05-16)

(上接第 2804 页)

- [5] 余伍忠, 李厚钧, 李力, 等. 中国“丝绸之路”地区血红蛋白病的遗传流行病学特点[J]. 人类学学报, 2001, 20(1): 69-75.
- [6] 林敏, 杨立业, 吴教仁, 等. 异常血红蛋白家系的分子诊断[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(2): 83-86.
- [7] 曾溢滔. 人类血红蛋白[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 150-175.
- [8] Singsanan S, Karnpean R, Fucharoen GA, et al. Hemoglobin Q-Thailand related disorders: Origin, molecular, hematological and diagnostic aspects[J]. Blood Cells Mol Dis, 2010, 43(3): 210-214.
- [9] 黄王莹, 郭柳薇. 东南亚缺失型 α 地中海贫血的临床血液学分析[J]. 实用妇产科杂志, 2009, 25(8): 504-505.
- [10] 温应方, 林敏, 刘桂荣, 等. 广东梅州地区的异常血红蛋白

的分子流行病学调查[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(12): 1496-1499.

- [11] 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.
- [12] Beris P, Huber P, Miescher PA, et al. Hb Q-Hb H disease in a Chinese living in Geneva, Switzerland; characterization of the variant and identification of the two α -thalassemic chromosomes[J]. Am J Hematol, 2009, 24(10): 395-400.
- [13] Lin M, Wu JR, Yang LY. Hb Q-H disease; two cases in a Cantonese family[J]. Blood Cells Mol Dis, 2008, 41(3): 259-260.

(收稿日期: 2014-01-25 修回日期: 2014-06-20)