

两种方法检测血红蛋白 H 百分比一致性比较^{*}

王阿慧, 凌艳英, 庄秋容, 邓家德(广东省广州市第一人民医院检验科 510180)

【摘要】 目的 比较高效液相色谱方法(HPLC)和醋酸纤维素薄膜碱性电泳(CAFE)方法对血红蛋白(Hb)H 定量的一致性。**方法** 采用 HPLC 和 CAFE 对广州市第一人民医院已行基因确诊的 50 例缺失型 HbH 病患者标本进行检测,详细记录和分析其相关血液学指标。**结果** 缺失型 HbH 病患者经 HPLC 检测可出现特异 HbH 异常峰,出峰时间为(0.42±0.05)s,CAFE 可得到特异的 HbH 带。两种方法得到的 HbH 百分比经配对 *t* 检验差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** HPLC 是一种高效快速检测 HbH 的方法,是能满足临床快速检测缺失型 HbH 病的有效手段。

【关键词】 缺失型血红蛋白 H 病; 高效液相色谱方法; 醋酸纤维素薄膜碱性电泳

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.03.040 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)03-0385-02

海洋性珠蛋白生成障碍性贫血是我国华南地区常见的以慢性进行性溶血为特点的一组遗传病。根据临床表现的严重程度,α 珠蛋白生成障碍性贫血可分为静止型、轻型、中间型和重型。血红蛋白(Hb)H 病属于 α 珠蛋白生成障碍性贫血的中间型,由于 4 个 α 基因中有 3 个缺失或缺陷,α 链严重合成不足,相对过剩的 β 链自行聚合为 4 聚体即 HbH。HbH 性质不稳定,易形成包涵体沉积在红细胞内,使红细胞在通过脾脏时易于被破坏,出现贫血等症状^[1]。由于珠蛋白生成障碍性贫血除干细胞移植外,尚无有效治疗手段,因此采用相应技术方法,筛查出高风险夫妇,并采取孕期产前诊断以阻止重症患儿出生,是国内外公认的首选预防措施^[2]。缺失型 HbH 病在外周血中可检测出 HbH。传统的检测 HbH 的常用方法有醋酸纤维素膜碱性电泳(CAFE)、Hb 电泳、包涵体试验等。本试验中采用碱性 CAFE 及高效液相色谱方法(HPLC)检测 HbH 百分比,以比较二者之间的一致性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 全部病例为 2012~2013 年在广州市第一人民医院诊治的患者,经基因检测为 α 珠蛋白生成障碍性贫血缺失型 HbH 病 50 例。抽取患者 4 mL 肝素锂抗凝血备用。

1.2 仪器与试剂 美国 Bio-Rad 公司 Variant II Hb HPLC 分析系统及配套 β-thalassemia 试剂;北京市六一仪器厂生产的 DYY-2C 型电泳仪及电泳槽。其他试剂为一般分析纯。

1.3 Hb HPLC 分析 取肝素锂抗凝全血 4 mL,无需制备溶血液直接进行高效液相色谱分析。按仪器说明书操作,Hb 各成分定量约 7 min 后由 HPLC 分析仪自动分析计算。

1.4 CAFE HbH 定量肝素锂抗凝血,用四氯化碳抽提制备 Hb 液,取 20 μL 加样于已浸透 Tris 缓冲液的醋酸纤维素薄膜上,置于 pH 8.6 的硼酸缓冲液中电泳约 30 min,分别剪取 HbA₂、HbA、HbH,加蒸馏水浸泡,待 Hb 完全洗脱后,用 723 分光光度计以 415 nm 波长比色,计算 HbH 百分比。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,两种方法得到的 HbH 百分比比较采用配对 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分离 HbH 条带 将抗凝血球用生理盐水洗涤,四氯化碳萃取 Hb 液,以 20 μL 量点样于醋酸纤维素薄膜上,经 pH 8.6 的碱性缓冲液电泳可获得 HbH 条带。图 1 示自负极向正极泳动条带依次为 HbA₂(HbH 患者标本中 HbA₂ 降低显著,电泳时 HbA₂ 带隐约可见)、HbA、HbH。将条带依次剪下,洗脱于相应体积蒸馏水中并用 723 分光光度计以 415 nm 波长处比色,经计算即可获得 HbH 占 Hb 的百分含量,计算公式为: $HbH(\%) = 2 \times A_{HbH} / (5 \times A_{HbA} + 2 \times A_{HbH} + A_{HbA_2}) \%$ 。

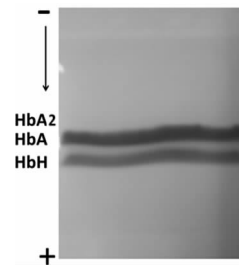


图 1 Hb 经 CAFE 分离出 HbH 条带(pH 8.6)

2.2 HPLC 检测 HbH 取肝素锂抗凝全血 4 mL,无需前处理直接上样于 Variant II HPLC 分析仪,约 7 min 后得到分析图谱,相应出峰时间范围可见一明显的异常洗脱峰,见图 2、3。在设置中将 START TIME 由 0.55 s 改为 0.00 s,显示按出峰时间(0.42±0.05)s 对应异常峰的峰面积即是 HbH 百分比。

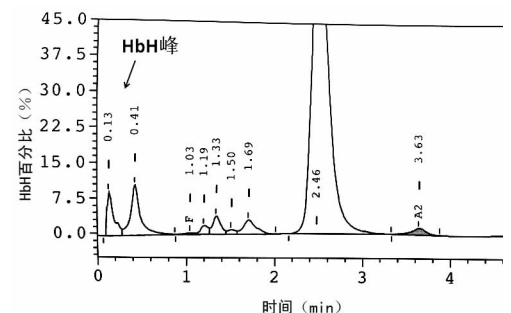


图 2 HPLC 检测 HbH 可见 HbH 异常峰

* 基金项目:广东省广州市医药卫生科技项目(20131A011013)。

出峰蛋白	定标后面积	面积	出峰时间	峰面积
Unknown	---	4.5	0.13	57204
Unknown	HbH	7.4	0.41	95209
F	0.2	---	1.03	2831
Unknown	---	1.1	1.19	13530
P2	---	2.3	1.33	29364
Unknown	---	0.6	1.50	7256
P3	---	2.8	1.69	35846
A0	---	79.6	2.46	1023223
A2	1.5	---	3.63	20485

图 3 HbH 患者 HPLC 图分析结果

2.3 两种方法检出 HbH 百分比的一致性比较 CAFE 测得 HbH 百分比为 $(7.96 \pm 3.01)\%$, HPLC 为 $(8.06 \pm 3.04)\%$ 。两种方法测得的 HbH 百分比采用配对 t 检验,其差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

临床上筛查常用检测 Hb 的方法有 Hb 电泳、红细胞指数、红细胞脆性试验等。这些方法虽操作要求低,成本低廉,但又因其敏感性和特异性较低,人为影响因素较大,存在较多漏诊和误诊现象。目前临床上对珠蛋白生成障碍性贫血的诊断和鉴别主要依靠 Hb 分析,该方法所用标本无需前处理,容易操作,并进行质控,准确性和重复性也比较好^[3]。

近年来发展起来的基于阳离子交换的 HPLC 是以物理化学原理为主的分离分析方法,特别适合于生物大分子,如各种蛋白组分的分离,已实现高通量全自动化分析,操作简单,人为因素影响少。在分离的同时,根据出峰位置可以定性;根据峰面积可以定量,选择性、灵敏度、准确性高,适合目前珠蛋白生成障碍性贫血大规模筛查与常规诊断^[4]。HPLC 已成为目前对于珠蛋白生成障碍性贫血非基因检测手段中最经典的方法,广泛应用于临床。尤其在对于 β -珠蛋白生成障碍性贫血的检测,HPLC 是介于筛查和确诊之间的一种理想方法,已被国际珠蛋白生成障碍性贫血协会推荐为 β -珠蛋白生成障碍性贫血的常规筛查方法^[5]。

Variant II β -thalassemia Short program HPLC 分析系统专用于检测 β -珠蛋白生成障碍性贫血且可同时检测各种异常 Hb。尽管对于 α -珠蛋白生成障碍性贫血的检测存在一定的漏检,但是对于缺失型 HbH 病患者,异常 HbH 的检出还是有优势的^[6]。本文比较应用 CAFE 和 HPLC Hb 分析仪在定量 HbH 方面是否存在一致性,以本院已行基因确诊的 50 例缺失型 HbH 病患者标本进行检测,经 HPLC 检测出现异常峰标本,CAFE 均能发现 HbH 带。有研究显示,CAFE 对于 HbH 的分离能力要优于琼脂糖凝胶电泳,可清楚地分离出 HbH 带及 HbBart's 带^[7-8]。但是作为手工法,CAFE 存在很多不足,

分辨率较差仅能分辨出 HbH、HbBartS、HbA、HbA2 条带,操作较繁琐费时且影响因素多,重复性差。醋酸纤维素薄膜脆而易碎,区带颜色易掉,不易保存。而 HPLC 可快速高效地分离出 Hb 各组分,重复性高^[9]。本次研究使用的全自动 Hb 分析仪采用 HPLC 对人 Hb、HbA2 及 HbF 进行自动化定量测定,可将珠蛋白生成障碍性贫血初步分类为 α 珠蛋白生成障碍性贫血和 β 珠蛋白生成障碍性贫血,同时还可检出 HbH、HbS、HbE、HbQ、HbJ 等异常 Hb,具有高效快速,自动化程序高,准确性和重复性良好等优点,是介于筛查和确诊的试验。

但在实践工作中,必须根据特定仪器及配套试剂的适应范围,总结经验,并结合受检者家族史,血液学表型红细胞指数等其他实验室检查结果,进行综合分析,以避免误诊和漏检。

参考文献

[1] 邓家栋,扬崇礼,扬天楹,等. 临床血液学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:623-624.

[2] Chen FE,Ooi C,Ha SY,et al. Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients[J]. N Engl J Med,2000,343(8):544-550.

[3] 马升俊,肖永君,韦子斌,等. 全自动血红蛋白分析仪在地中海贫血筛查诊断中的应用[J]. 中国医药导报,2013,10(9):92-93.

[4] Colah RB,Surve R,Sawant P,et al. HPLC studies in hemoglobinopathies[J]. Indian J Pediatrics,2007,74(7):657-662.

[5] 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,2011,26(11):1665-1666.

[6] 彭建宏,刘运科,肖春燕. 离子交换高效液相色谱法血红蛋白分析筛查地中海贫血的研究[J]. 国际医药卫生导报,2012,18(4):539-543.

[7] Liao C,Zhou JY,Xie XM,et al. Screening for Hb constant spring in the Guangdong province,South China,using the sebia capillary electrophoresis system[J]. Hemoglobin,2011,35(1):87-90.

[8] 陈永秀,周云珍,陈锦宏,等. 两种电泳方法血红蛋白分析一致性的比较[J]. 检验医学,2013,28(3):229-232.

[9] 谢建红,张永良,肖奇志,等. 应用高效液相色谱法检测 β -地中海贫血及异常血红蛋白[J]. 广东医学,2011,32(11):1473-1476.

(收稿日期:2014-08-07 修回日期:2014-10-28)

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序,可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键,包括医学专业设计和统计学设计,医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查,要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析,包括进行统计描述和统计推断。