

高效液相色谱分析在 HbE 筛查中的应用价值

李东明, 玉晋武, 韦 媛, 王立芳, 张 强, 阙 婷, 唐燕青, 何 升[△] (广西壮族自治区妇幼保健院遗传代谢中心实验室, 南宁 530003)

【摘要】 目的 探讨高效液相色谱分析法在 HbE 病筛查中的价值。**方法** 应用高效液相色谱分析仪对 24 779 例样本进行血红蛋白(Hb)分析, HbA₂ ≥ 11% 的样本进行 HbE 基因检测。**结果** 24 779 例标本中检出 129 例 HbA₂ ≥ 11% 的样本, 含量为 14.0%~75.2% (27.2% ± 9.4%)。经基因检测均确诊为 HbE 病, 包括 HbE 杂合子、HbE/α-珠蛋白生成障碍性贫血、HbE/β-珠蛋白生成障碍性贫血、HbE/α-β-珠蛋白生成障碍性贫血和 HbE 纯合子, 其 HbA₂ 含量分别为 (26.1 ± 1.3)%、(18.2 ± 1.8)%、(45.9 ± 8.0)%、38.6% 和 (73.9 ± 1.8)%。经 ROC 曲线分析 HbA₂ 筛查 HbE 的临界值为 11.7%。**结论** 高效液相色谱不仅能有效地筛查 HbE 病, 还可以通过 HbA₂ 含量区分 HbE 病突变类型及其复合珠蛋白生成障碍性贫血的类型, 是筛查 HbE 病的有效方法。

【关键词】 高效液相色谱; HbE; 筛查; 珠蛋白生成障碍性贫血

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.14.015 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)14-1808-02

Application value of high performance liquid chromatography in the screening for HbE disease LI Dong-ming, YU Jin-wu, WEI Yuan, WANG Li-fang, ZHANG Qiang, QUE Ting, TANG Yan-qing, HE Sheng[△] (Genetic Metabolic Central of Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530003, China)

【Abstract】 Objective To explore the value of high performance liquid chromatography in the screening for HbE disease. **Methods** 24 779 samples were detected for hemoglobin by high performance liquid chromatography, and HbA₂ ≥ 11% samples for genetic testing of HbE. **Results** Among 24 779 samples identifying 129 samples with HbA₂ ≥ 11%, the content was 14.0%—75.2% (27.2% ± 9.4%). Genetic testing were diagnosed as HbE disease, including HbE heterozygous, HbE/α-thalassemia, HbE/β-thalassemia homozygotes, HbE composited alpha and beta thalassemia and HbE homozygotes, the HbA₂ of which were (26.1 ± 1.3)%, (18.2 ± 1.8)%, (45.9 ± 8.0), 38.6% and (73.9 ± 1.8)%. The cutoff value of HbA₂ in the screening for HbE disease was 11.7% by ROC curve analysis. **Conclusion** High performance liquid chromatography is an effective screening method for HbE disease, which can distinguish between HbE disease mutation type and composite thalassemia by HbA₂ content, is an effective method for screening HbE disease.

【Key words】 high performance liquid chromatography; HbE; screening; thalassemia

HbE 病是由于珠蛋白基因突变导致合成血红蛋白(Hb)的功能异常, 是一种特殊的珠蛋白生成障碍性贫血基因类型^[1], 是 7 种主要珠蛋白生成障碍性贫血基因类型之一, 其发生率为 0.21~0.50%^[2-3]。HbE 病杂合子多无临床表现^[4], 主要通过琼脂糖凝胶电泳、高效液相色谱分析和毛细管电泳筛查而发现, 进而通过基因分析确诊。琼脂糖凝胶和毛细管电泳筛查 HbE 已有较多报道^[3,5], 目前国内尚未有高效液相色谱分析对 HbE 病诊断的系统研究资料, 为此, 本文采用高效液相色谱进行 Hb 分析, 以评价其在 HbE 病筛查中的价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 10 月至 2012 年 10 月, 在本院进行婚前、产前检查, 辅助生殖术前检查, 优生遗传咨询, 儿科门诊就诊的患者共 24 779 例, 其中男 10 536 例, 女 14 243 例, 年龄 6 个月至 60 岁。

1.2 方法 采用血细胞、Hb 分析平行试验进行 Hb 病筛查, 血细胞分析采用 SEY2010 血球仪, Hb 分析采用 Bio-Rad Variant Classic b 高效液相色谱分析仪, 以 HbA₂ ≥ 11% 为 HbE 筛查阳性, 对 HbE (CD26 (GAG → AAG))、CD41-42 (-TCTT)、

IVS-II-654 (C → T)、CD17 (A → T)、-28 (A → G)、CD71-72 (+A)、CD43 (G → T)、-29 (A → G), 起始密码子 ATG → AGG、CD14-15 (+G)、CD27-28 (+C)、-32 (C → A)、-30 (T → C)、IVS-I-1 (G → T)、IVS-I-5 (G → C)、CD31 (-C)、CAP+40+43 (-AAAC) 等 17 种中国人常见 β-珠蛋白基因突变, 东南亚缺失型 α-珠蛋白生成障碍性贫血 1 杂合子 (-sea), α-珠蛋白生成障碍性贫血 2 杂合子 [-α3.7, -α4.2 缺失型或 HbCS (CD142TAA → CAA)、QS (125CTG → CCG) 及 WS (CD122CAA → CAG)] 进行检测。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS17.0 软件处理, ROC 曲线分析。

2 结 果

2.1 高效液相色谱分析 经高效液相色谱分析 Hb, 共检出 HbA₂ ≥ 11% 的样本 129 例, 筛查阳性率为 0.52% (129/24 779)。以检出所有 Hb 总和为 100.0% 计算, HbA₂ 定量为 14.0%~75.2%, 平均为 (27.2% ± 9.4%)。高效液相色谱分析图, 见图 1~4。

2.2 基因诊断 129 例筛查阳性标本, 经基因分析均确诊为 HbE 病, 其中 HbE 杂合子 98 例, HbE/α-珠蛋白生成障碍性贫血

[△] 通讯作者, E-mail: 13481054684@163.com。

血 21 例, HbE/ β -珠蛋白生成障碍性贫血 7 例, HbE/ α - β -珠蛋白生成障碍性贫血 1 例, HbE 纯合子 2 例, 见表 1。

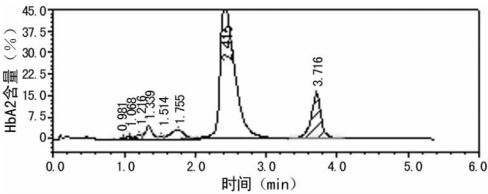


图 1 HbE/ α -珠蛋白生成障碍性贫血 HbA2=15.4%

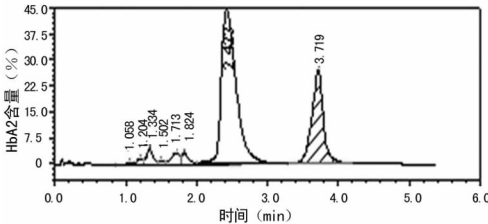


图 2 HbE 病杂合子 HbA2=27.1%

2.3 高效液相色谱筛查 HbE 评价 经 ROC 曲线分析, 以 HbA2 $\geq$ 11.7% 作为临界值筛查 HbE 病的曲线下面积为 1, 其筛查的灵敏度、特异性、阳性预测值和阴性预测值均为 100.0%。HbA2 定量分析能有效地区分 HbE 杂合子、HbE/

α -珠蛋白生成障碍性贫血、HbE/ β -珠蛋白生成障碍性贫血、HbE/ α - β -珠蛋白生成障碍性贫血和 HbE 纯合子, 其 HbA2 含量为 (26.1 $\pm$ 1.3)% (22.3%~29.1%)、(18.2 $\pm$ 1.8)% (14.0%~21.0%)、(45.9 $\pm$ 8.0)% (33.5%~59.4%)、38.6% 和 (73.9 $\pm$ 1.8)% (72.6%, 75.2%)。

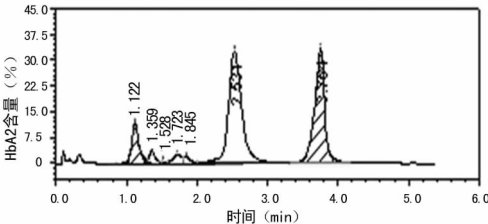


图 3 HbE/ β -珠蛋白生成障碍性贫血 HbA2=33.5%

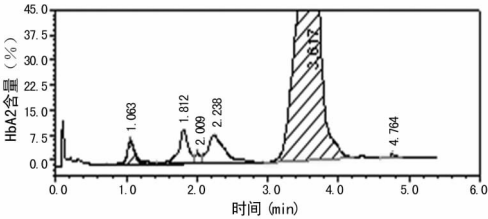


图 4 HbE 病纯合子 HbA2=75.2%

表 1 129 例 HbE 病血液学指标分析 ($\bar{x}\pm s$)

基因类型	n	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	HbA2(%)	HbF(%)
CD26 / β N, -sea /- α 3.7	2	86.5 $\pm$ 4.4	59.9 $\pm$ 3.8	17.5 $\pm$ 1.1	16.3 $\pm$ 3.2	1.3 $\pm$ 0.5
CD26 / β N, -sea / α CS α	1	100.8	65.5	19.9	17.4	1.4
CD26 / β N, -sea / $\alpha\alpha$	9	101.7 $\pm$ 14.4	65.6 $\pm$ 5.5	21.6 $\pm$ 2.4	18.2 $\pm$ 2.1	0.9 $\pm$ 0.4
CD26 / β N, α CS α /- α 3.7	1	129.5	78.3	26.6	20.6	1.9
CD26 / β N, - α 3.7 / $\alpha\alpha$	4	106.7 $\pm$ 15.3	83.4 $\pm$ 4.4	27.4 $\pm$ 2.6	18.1 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1
CD26 / β N, - α 4.2 / $\alpha\alpha$	2	111.4 $\pm$ 9.7	81.1 $\pm$ 3.7	26.6 $\pm$ 0.3	18.4 $\pm$ 1.1	2.3 $\pm$ 1.9
CD26 / β N, α CS α / $\alpha\alpha$	2	113.2 $\pm$ 16.1	78.26 $\pm$ 2.9	26.3 $\pm$ 1.9	19.9 $\pm$ 1.6	0.7 $\pm$ 0.1
CD26 /CD17, - α 3.7 / $\alpha\alpha$	1	92.1	59.6	18.7	38.6	0.8
CD26 /CD17, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	6	65.4 $\pm$ 8.0	61.1 $\pm$ 4.3	19.0 $\pm$ 1.9	47.9 $\pm$ 8.4	25.5 $\pm$ 21.8
CD26 /CD41-42, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	1	63.7	61.4	18.2	41.6	40.1
CD26 / CD26, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	2	119.5 $\pm$ 2.1	59 $\pm$ 2.0	20.7 $\pm$ 0.8	73.9 $\pm$ 1.8	9.7 $\pm$ 7.3
CD26 / β N, $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	98	103 $\pm$ 18.0	81.1 $\pm$ 3.5	26.6 $\pm$ 1.4	26.1 $\pm$ 1.3	1.1 $\pm$ 1.2

注: MCV: 平均红细胞体积; MCH: 平均红细胞 Hb 含量。

3 讨 论

广西地区 Hb 病发生率居全国之首, 长期以来重型珠蛋白生成障碍性贫血作为主要出生缺陷之一, 严重影响本地区人口素质^[6]。目前该病的筛查与诊断方案较多, 临床较多采用的方案^[7]是以 MCV 和 MCH 值降低作为初筛, 对筛查阳性者进行 Hb 分析, 以区分是 α -珠蛋白生成障碍性贫血还是 β -珠蛋白生成障碍性贫血或异常 Hb 病。研究表明, 这种方案可有效地筛查绝大多数珠蛋白生成障碍性贫血携带者或患者^[2], 但却会漏筛 HbE 等异常 Hb 病。

本研究对 24 779 例大样本人群采用血液学分析和 Hb 分析平行试验筛查 HbE 病, 共筛出阳性 129 例, 阳性率为 0.52%, 与李友琼等^[3]采用毛细管电泳筛查的阳性率 0.50% 相近, 高于 Xiong 等^[2]报道的 0.21%。近年来研究显示, HbE 是本地区 7 种主要 β -珠蛋白生成障碍性贫血突变类型之一^[6-8], 应引起临床重视, 避免 HbE 的漏诊导致中间型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生。阳性标本中 HbA2 定量为 14.0%~75.2%, 平均为 (27.2 $\pm$ 9.4)%; 经基因诊断分析, 筛查

与诊断符合率为 100.0%。基于高效液相色谱筛查 HbE 病的准确性, 为减少患者经济负担, 对于非婚育人群 Hb 分析 HbA2 $\geq$ 14.3% 者可考虑作为临床诊断依据, 不再进行基因检测。

Joutovsky 等^[9]研究表明采用高效液相色谱法分析 Hb 时, HbE 和 HbA2 有同样的出峰时间, 检测结果是 HbE + HbA2 总值, 而 HbE 病复合不同类型珠蛋白生成障碍性贫血时 HbA2 定量存在差异。本研究检测结果显示 HbA2 定量为 14.0%~75.2%, 经基因分析共检测 HbE 杂合子、HbE/ α -珠蛋白生成障碍性贫血、HbE/ β -珠蛋白生成障碍性贫血、HbE/ α - β -珠蛋白生成障碍性贫血和 HbE 纯合子 5 种基因组合 12 种基因型; 进一步分析各种基因组合及其基因型 HbA2 定量, 各基因组合 HbA2 定量分别为 (22.3%~29.1%)、(14.0%~21.0%)、(33.5%~59.4%)、38.6% 和 (72.6%, 75.2%), 其 HbA2 定量范围存在明显差异, 且未发现重合。根据 HbA2 定量不仅能区分 HbE 杂合子和纯合子, 也能有效地对各基因组进行区分。但由于 α -复合 β -珠蛋白生成障碍性贫血往往表现为 β -珠蛋白生成障碍性贫血血液学特点, 若(下转第 1811 页)

2.2 5 项甲状腺功能指标检测结果 未患甲状腺疾病的妊娠晚期妇女 FT4 和 T4 水平明显低于对照组妇女, 差异有统计学意义($P<0.01$); T3、TSH 和 FT3 水平两组对比差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 2。

3 讨 论

目前, 随着妊娠期妇女甲状腺疾病检测和诊治越来越受到众多家庭的关注, 医院已经开始重视妊娠期妇女甲状腺疾病的筛查工作^[7]。当然, 随着实验室化学发光免疫分析法特别是电化学发光检测技术在临床上的应用, 妊娠期妇女甲状腺疾病的临床诊断技术也有了很大的提高^[8]。近年来, 妊娠期妇女患有妊娠合并甲状腺疾病的病例呈现逐年增长的趋势^[9]。在本组实验中总发病率为 9.47%, 71 例患有甲状腺疾病的妊娠晚期妇女中, 患有甲状腺功能减退症的有 37 例(4.93%), 患有甲状腺功能亢进症的有 34 例(4.53%), 二者的发病概率基本为 1:1, 应引起临床的高度重视。

妊娠期妇女血液中的 T3、T4 水平稳定是维持孕妇体内胎儿正常发育的重要因素, 甲状腺激素对于妊娠期妇女维持正常生理活动具有重要作用^[10]。其中, 患有甲状腺功能减退症的妊娠期妇女容易发生自发性流产、妊娠高血压、贫血、胎盘剥离、早产、产后出血等危险, 易出现出生低体质量或死胎, 新生儿也容易患有呼吸窘迫综合征^[11]。另外, 值得注意的是, 孕妇体内甲状腺激素水平对于胎儿大脑的发育影响较大, 如果妊娠期妇女发生甲状腺功能减退症, 容易导致胎儿神经发育不全; 而患有甲状腺功能亢进症的妊娠期妇女流产、早产、心力衰竭或高血压的危险性也较高^[12], 胎儿在母体内发育受到限制或直接死亡。可见, 及时诊断和有效治疗妊娠期妇女的甲状腺功能, 能够有效消除甲状腺疾病对妊娠期妇女带来的巨大危害。加强有效的诊断和治疗手段, 保障妊娠期妇女的健康和胎儿的正常发育也就势在必行。因此, 妊娠期尤其是妊娠晚期妇女的甲状腺功能检测在临床上具有较高的研究和应用价值。

参考文献

[1] 吴辉. 甲状腺功能检测在妊娠妇女中的应用价值[J]. 国

(上接第 1809 页)

夫妇一方为 α -珠蛋白生成障碍性贫血, 一方为 HbE/ β -珠蛋白生成障碍性贫血的应同时进行 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因分析。

综上所述, 本地区 HbE 病有一定的发生率, 有必要在人群中进行筛查, 尤其是夫妇一方 β -珠蛋白生成障碍性贫血筛查阳性。高效液相色谱分析 Hb 筛查 HbE 具有操作方便、准确等优点, 是筛查 Hb 病理理想的方法。

参考文献

[1] Vichinsky E. Hemoglobine syndromes[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007, 1: 79-83.
[2] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet, 2010, 78(2): 139-148.
[3] 李友琼, 黄慧嫔, 覃桂芳, 等. 毛细管电泳在 HbE 病筛查中的应用评价[J]. 现代预防医学, 2012, 39(18): 1.
[4] Tatu T, Kasinrerker W. A novel test tube method of screening for hemoglobin E[J]. Int J Lab Hematol, 2012, 34(1):

际检验医学杂志, 2012, 33(12): 1508-1509.
[2] Abalovich M, Amino N, Barbour LA, et al. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: fill endocrine society clinical practice guideline[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(Suppl 8): 541-547.
[3] 郭延云, 唐松涛, 潘天荣. 妊娠晚期妇女甲状腺功能变化 Meta 分析[J]. 安徽医药, 2012, 16(5): 647-648.
[4] Shan ZY, Chen YY, Teng WP, et al. A study for maternal thyroid hormone deficiency during the first half of pregnancy in China[J]. Eur J Clin Invest, 2009, 39(1): 37-42.
[5] 王薇薇, 单忠艳. 妊娠期甲状腺疾病筛查策略[J]. 中国实用内科杂志, 2010, 30(4): 386-388.
[6] 沈伶, 卢焕霞, 胡瑞霞, 等. 妊娠合并甲状腺功能减低 29 例临床分析[J]. 热带医学杂志, 2011, 6(28): 673-675.
[7] 贾文丽, 李冬梅. 妊娠妇女甲状腺功能异常对妊娠影响的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2012, 44(4): 452-454.
[8] Vaidya B, Anthony S, Bilous M, et al. Detection of thyroid dysfunction in early pregnancy: universal screening or targeted high-risk case finding? [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(1): 203-207.
[9] 单忠艳, 滕卫平. 甲状腺疾病与妊娠[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2006, 10(5): 295-302.
[10] Dosiou C, Sanders GD, Araki SS, et al. Screening pregnant women for autoimmune thyroid disease: a cost-effectiveness analysis[J]. Eur J Endocrinol, 2008, 158(6): 841-851.
[11] 戴丽, 王鲲, 夏春玲. 早孕妇女甲状腺功能检测与护理临床意义[J]. 中国误诊学杂志, 2012, 12(7): 1566.
[12] Cleary-Goldman J, Malone FD, Lambert-Messerlian G, et al. Maternal thyroid hypofunction and pregnancy outcome [J]. Obstet Gynecol, 2008, 112(1): 85-92.

(收稿日期: 2012-11-21 修回日期: 2013-02-12)

59-64.
[5] 彭兰芬, 汤惠华, 付文金, 等. 东莞市地中海贫血基因类型与异常血红蛋白种类调查分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2): 142-144.
[6] Pan HF, Long GF, Li Q, et al. Current status of thalassemia in minority populations in Guangxi, China[J]. Clin Genet, 2007, 71(5): 419-426.
[7] 姚莉琴, 徐咏梅, 张毅, 等. 血液学参数对儿童珠蛋白生成障碍性贫血筛查的价值[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(20): 2560-2562.
[8] Zheng CG, Liu M, Du J, et al. Molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations detected in the population of Guangxi Zhuang Autonomous Region, People's Republic of China[J]. Hemoglobin, 2011, 35(1): 28-39.
[9] Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory[J]. Clin Chem, 2004, 50(10): 1736-1747.

(收稿日期: 2012-12-11 修回日期: 2013-03-16)