

142 例血红蛋白 H 病患者血液学与分子生物学检测结果分析*

阮丽明, 周艳洁[△], 朱茂灵, 丁进龙, 何桂琼, 梁 萧(南宁市人口和计划生育服务中心 530022)

【摘要】 目的 分析 α -珠蛋白生成障碍性贫血(地贫)血红蛋白 H 病(HbH 病)在临床血液学参数分析及分子生物学检测中的特点并探讨其原因。**方法** 回顾性分析南宁市农村地区 142 例用分子生物学诊断为 HbH 病患者的 CE 结果和相关的血液学指标。**结果** 142 例 HbH 病患者中, 缺失型 HbH 病 89 例, 占 62.68%, 非缺失型 HbH 病 53 例, 占 37.32%; 缺失型 HbH 病 CE 可见 HbH 峰, HbCS 复合 HbH 病既可见 HbH 峰, 又可见 HbCS 峰。血红蛋白电泳及血液学分析显示非缺失型 HbH 病患者的 HbH 水平及贫血程度高于缺失型 HbH 病($P < 0.05$)。**结论** 南宁市农村地区 HbH 病基因突变类型多样, 以缺失型为主; HbCS 复合 HbH 病在 CE 中可出现特异的 HbCS 峰; 高 HbH 含量以及 CS 链在红细胞膜上的聚集是造成 HbCS 复合 HbH 病患者临床表现比缺失型 HbH 病患者严重的主要原因。

【关键词】 血红蛋白 H 病; 毛细管电泳; 血液学特点

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.20.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)20-2648-02

Results analysis of hematology and molecular biology detection among 142 patients with characters in 142 patients with hemoglobin H disease* RUAN Li-ming, ZHOU Yan-jie[△], ZHU Mao-ling, DING Jin-long, HE Gui-qiong, LI-ANG Xiao(Nanning Family Planning Service Center, Nanning, Guangxi 530022, China)

【Abstract】 Objective To analyze the results of hematology and molecular biology detection in patients with hemoglobin H(HbH) disease. **Methods** Results of capillary electrophoresis(CE) detection and related hematology analysis were analyzed in 142 patients with HbH disease in rural areas of Nanning, definitely diagnosed by molecular biology detection. **Results** In 142 patients with HbH disease, 89 cases were with deletion HbH disease, accounting for 62.68%, while 53 cases were with non-deletion HbH disease, accounting for 37.32%. CE detection of patients with deletion HbH disease showed a HbH peak, of patients combined with HbH and HbCS disease showed a HbH peak and a HbCS peak at the same time. Hemoglobin electrophoresis and hematology analysis indicated that HbH level was higher and disease condition of anaemia was more severe in patients with non-deletion HbH disease than in patients with deletion HbH disease($P < 0.05$). **Conclusion** The gene mutation types in patients with HbH disease of rural areas of Nanning could be various, most of which might be deletion type. Specific HbCS peak could be detected in patients combined with HbCS and HbH disease by CE detection. High level of HbH and the aggregation of CS chain on membrane of red blood cells could be the main reasons, causing the disease condition of patients combined with HbCS and HbH is severe than patients with deletion HbH disease.

【Key words】 hemoglobin H disease; capillary electrophoresis; hematology characteristics

血红蛋白 H 病(HbH 病)属于 α -珠蛋白生成障碍性贫血(地贫)中间型^[1]。HbH 病基因由缺失型 α -地贫基因($-/-\alpha$)或与非缺失型 α -地贫基因双重杂合所构成($-/\alpha^T$)。其分子机制具有较大的遗传异质性, 临床上贫血表现轻重不一。血红蛋白电泳分析可见异常 HbH (β_4)区带^[2]。本文对南宁市农村育龄人群中用分子生物学确认的 142 例 HbH 病的毛细管血红蛋白电泳和血细胞参数进行了分析, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 1 月至 2012 年 12 月在本中心进行地贫项目筛查的广西省南宁市户籍的农村新婚夫妇, 用分子生物学技术进行地贫基因检测(包括 $\alpha^{3.7}/\alpha^{4.2}/-\alpha^{SEA}/$; Hb Constant Spring、Hb Quong Sze、Hb Westmead)诊断为 HbH 病的 142 例(年龄 20~43 岁, 男 86 例, 女 56 例, 广西籍 138 例, 广东籍 3 例)。

1.2 仪器与试剂 全血基因组提取试剂盒和基因诊断试剂盒

由深圳益生堂生物企业有限公司生产。毛细管区带电泳用法国 Sebia 公司生产的 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪(The Capillary Sebia, Parc Leonard de Vinci, CP 8010 Lisses, 91008 EVRY, France, 法国 Sebia 公司 6.11 软件版本 Capillarys[®]; 及其配套血红蛋白电泳试剂盒 CAPILLARYS HEMOGLOBIN (E)。血常规测定用日本光电 6318K 全自动血细胞分析仪。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集及处理 受检育龄夫妇现场用一次性真空采血管(含乙二胺四乙酸二钾抗凝剂)抽取静脉血 2 mL。标本保存要求: 血细胞分析, 置于 20℃ 以下室温保存, 电泳前置于 2~8℃ 低温保存, 基因检测前置于 -18℃ 保存。

1.3.2 外周血白细胞 DNA 提取 取 2 mL 静脉血二胺四乙酸(EDTA)抗凝血, 低渗溶血收集白细胞, 酚-氯仿法提取基因组 DNA, 适量 TE 液溶解, 置于 -70℃ 保存。

1.3.3 地贫基因诊断 采用深圳益生堂生物企业有限公司生

产的基因诊断试剂盒进行检测,按说明进行操作。其中采取 Gap-PCR 方法诊断中国人常见的 3 种缺失型 α 地贫即:东南亚型缺失($-^{SEA}/\alpha\alpha$)、右缺失($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)和左缺失($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)。Gap-PCR 和反向斑点杂交(RDB)法对 α 地贫基因突变进行检测,包括 3 种 α 珠蛋白基因突变类型[HbWS(CD122),CAC $\rightarrow$ CAG;HbQS(CD125),CTG $\rightarrow$ CCG;HbCS(CD142),TAA $\rightarrow$ CAA]。缺失型 α 地贫用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,根据扩增产物的片段长度判断基因缺失类型。非缺失型 α 地贫通过杂交膜条斑点显色特点确定基因型,正常斑点全部显色且无异常突变斑点同时显色为基因型正常,突变斑点及其相应正常斑点同时显色,根据显色突变斑点的基因型确定为相应基因型的地贫杂合子,突变斑点显色而相应正常斑点不显色,为显色突变斑点基因型地贫纯合子。

1.3.4 血细胞分析 测定时取 EDTA 抗凝静脉血,用日本光电 6318K 全自动血细胞分析仪检测血红蛋白(Hb)、红细胞(RBC)及平均红细胞体积(MCV)、平均血红蛋白浓度(MCH)、红细胞分布宽度(RDW)等各项参数,严格按仪器操作规程进行检测。毛细血管区带电泳用法国 Sebia 公司生产的 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪及其配套血红蛋白电泳试剂盒,按照仪器操作说明书进行。

1.4 统计学处理 使用 SPSS17.0 统计学软件进行分析处理。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,例数的比较采用 χ^2 检验,数值的

比较使用 t 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 142 例 HbH 病的基因型构成比 在 142 例经分子生物学检测分析基因型,缺失型 HbH 病 89 例(62.68%),包括 $-^{SEA}/-\alpha^{3.7}$ 60 例(42.25%)和 $-^{SEA}/-\alpha^{4.2}$ 29 例(20.42%);非缺失型 HbH 病 53 例(37.32%),包括 $-^{SEA}/-\alpha^{CS}$ α 50 例(35.21%)和 $-^{SEA}/-\alpha^{QS}$ α 3 例(2.11%)。

2.2 HbH 病的毛细管电泳结果 142 例 HbH 病电泳中单独出现 HbH 区带(Z15)36 例;出现 HbH+HbBart's 区带 103 例,其中合并有 HbCS 区带(Z2)50 例。有 1 例 β 地贫复合 $-^{SEA}/-\alpha^{3.7}$ HbH 病在 CE 检测中漏诊。CE 分析显示,非缺失型 HbH 病患者的平均 HbH 水平高于缺失型 HbH 病,而平均 HbA2 水平则低于缺失型 HbH 病($P<0.05$),见表 1。

表 1 缺失型 HbH 病与非缺失型 HbH 病 HbA2 和 HbH 的比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	<i>n</i>	HbA2	HbH
缺失型 HbH 病	89	1.71 $\pm$ 0.43	6.78 $\pm$ 4.84
非缺失型 HbH 病	53	1.22 $\pm$ 0.65	10.30 $\pm$ 6.55
<i>P</i>		<0.05	<0.05

表 2 缺失型 HbH 病与非缺失型 HbH 病血液学参数的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	RBC($\times 10^{12}/L$)	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)
缺失型 HbH 病	89	4.58 $\pm$ 0.76	98.16 $\pm$ 14.48	56.32 $\pm$ 6.60	16.78 $\pm$ 2.02
非缺失型 HbH 病	53	3.74 $\pm$ 1.05	77.15 $\pm$ 9.53	65.98 $\pm$ 10.45	20.08 $\pm$ 2.23

2.3 142 例 HbH 病基因型与血液学参数分析 缺失型与非缺失型 HbH 病患者均表现出小细胞低色素性贫血,但程度差异较大。HbCS-H 型贫血较严重,而 MCV 水平高于缺失型 HbH 病患者(表 2)。

3 讨 论

α 地贫常见于中国南方和东南亚等地,部分地区人群中携带率高达 40%。最常见的缺失型 α 地贫基因突变是东南亚型缺失型 α 地贫-1($-^{SEA}$),非缺失型突变为 HbCS,后者在东南亚地区的携带率达 8%^[3]。HbH 病在东南亚、地中海和中东等地区人群发病率较高,广西是地贫的高发区。蔡稔等^[4]报道柳州地区人群 HbH 病的发生率为 0.205%。Xiong 等^[5]对广西地区中小学生的流行病学调查提示 HbH 病的发生率为 0.432%。

HbH 病的分子遗传学机制有异质性,其分子缺陷的背景十分复杂,具有种族和地域差异。本研究对 142 例 HbH 病患者的基因检测分析表明,HbH 病以缺失型为主(62.68%),非缺失型 HbH 病占 HbH 病的比例较小(37.32%),且主要为 HbCS 复合 HbH 病。HbH 病中 α 珠蛋白链的减少或缺乏使 γ 珠蛋白链和 β 珠蛋白链相对增多,多余的 γ 链聚合成 Hb Bart's(γ_4), β 链则聚合成 HbH(β_4)。Hb 分析可检测到不同水平的 HbH,HbH 含量约为 0.18%~40%^[6]。在 α 地贫中,成人用毛细血管血红蛋白电泳方法检出的异常区带有 HbH、HbBart's 和 HbCS,HbH 病和 HbCS 与基因分析的符合率为 97.83%和 95.00%,漏诊的主要原因可能与不稳定血红蛋白的降解及 β 地贫复合 HbH 病有关^[7]。本研究结果显示,非缺

失型 HbH 病患者的平均 HbH 水平高于缺失型 HbH 病,而平均 HbA2 水平则低于缺失型 HbH 病($P<0.05$),与国内外文献报道一致^[1,8]。全自动毛细管区带电泳对血红蛋白变异体的分辨效果好,且具有自动化程度高、样品处理简单、检测时间短等优势。所以作者认为全自动毛细管电泳法基本可以为 HbH 病的筛查及诊断提供快速准确的诊断依据。

大量研究表明非缺失型病患者的临床表现要比缺失型 HbH 患者严重^[9]。本研究中的血液学参数亦支持这一观点,非缺失型患者的 Hb 含量和红细胞数量低于缺失型 HbH 病患者,红细胞 MCV、MCH 增大。HbH 的性质不稳定,易形成包涵体,沉积于红细胞内,使红细胞的变形性和通透性发生改变,红细胞在通过脾脏时易于被破坏,出现贫血等临床症状。HbCS 复合 HbH 病患者有高水平的 HbH 含量外,还有多余的 α CS 链。 α CS 链在红细胞膜上的聚集可损害红细胞膜上的 NaK 联合转运通道,其氧化产物还会与红细胞膜上的骨架蛋白发生作用,造成红细胞膜的水化改变,破坏红细胞膜对红细胞 MCV 的调节作用,使红细胞 MCV 增大,进而使红细胞膜的脆性增大,变形能力变差,在通过脾窦毛细血管时易于被破坏而造成溶血^[10]。作者认为正是以上原因,造成了非缺失型 HbH 病患者的临床表现更严重。临床上正确区分 HbH 病类型对指导 HbH 病的遗传咨询与治疗预后非常重要。本地区人群中 HbH 病基因携带率高。对于中重型 α 地贫目前尚无有效的治疗方法,因此做好人群中 α 地贫携带者的筛查、基因诊断和产前诊断、预防中重型 α 地贫患儿出生才能从根本上提高本地区出生人口素质。(下转第 2651 页)

3 讨 论

支气管哮喘是由多种细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、嗜中性粒细胞、气道上皮细胞等)和细胞成分参与的气道慢性炎症性疾病,属中医学哮证范畴。小儿多见支气管哮喘,主要源自小儿肺、脾、肾先天不足,故应从肺、脾、肾三脏论治^[1]。

麻杏石甘汤源自伤寒论,其主要作用是清宣肺热,降逆平喘^[2]。麻黄辛散,宣泄肺中部热而定喘;原方石膏用量多于麻黄一倍,借以监制麻黄辛温之性而转为辛凉清热之用;杏仁宣降肺气,协同麻黄以治喘;甘草和中缓急,调和诸药该方配伍精当,简单易行,被后世医家广泛应用于咳嗽诸症中,特别适用于咳嗽属热邪塞肺者^[3]。现代医药证明,炙麻黄含麻黄、伪麻黄碱,可解除支气管痉挛,松弛支气管平滑肌,且作用较缓而持久^[4];杏仁中的有效成分苦杏仁甙受杏仁中的苦杏仁酶及樱叶酶等 B-葡萄糖甙酶水解,可生成野樱皮甙和扁桃腈,再分解生成苯甲酸和氢氰酸,最终分解产生镇咳、祛痰的氢氰酸,从而达到润肺止咳的效果^[5];生石膏的成分主要含有硫酸钙,对支气管神经、肌肉有抑制及镇静的作用,并且能降低支气管通透性,解除支气管痉挛的作用;甘草含甘草酸及 18 α -甘草次酸,具有抗炎、抗过敏反应及抑制平滑肌活动而解痉的作用^[6]。四者联合用药有显著的镇咳、平喘、抗炎、抗过敏作用^[7]。有报道称麻杏石甘汤治疗组哮喘小鼠的肺组织在肺泡壁、支气管以及血管旁的淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润、支气管上皮损害均较哮喘组显著减轻,支气管痉挛状态明显改善,管腔内分泌物减少^[8]。

有实验证实麻杏石甘汤灌肠液有明显抑制过敏豚鼠的支气管平滑肌收缩幅度及抑制支气管收缩频率作用,对组胺所致气管痉挛有松弛解痉作用,并可延长引起哮喘的潜伏期^[9]。另有研究发现,麻杏石甘汤可缓解哮喘天竺鼠立即性反应期的呼吸道阻力,降低呼吸道炎症,可显著延长小鼠咳嗽发作潜伏期及减少咳嗽发作次数^[10]。

氟替卡松具有强大的炎症细胞聚集作用, β 受体激动剂

可兴奋气道平滑肌和肥大细胞等细胞膜表面受体而舒张气道平滑肌,降低微血管的通透性增加气道上皮纤毛的摆动,两者连用可明显缓解哮喘症状。

本研究结果发现,中西医结合治疗组总有效率优于单纯中医治疗组及单纯西医治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

总之,麻杏石甘汤加味治疗小儿哮喘疗效肯定,与西医联合治疗,可大大改善患者症状,提高治愈率。

参考文献

- [1] 王琳,田建辉.“痰饮伏肺”与哮喘病机[J]. 陕西中医, 2003,24(4):334-336.
- [2] 王忠薪. 略论肺与血证[J]. 浙江中医杂志,2004,39(2):57.
- [3] 乐明番. 麻杏石甘汤治疗小儿咳嗽的体会[J]. 内蒙古中医药,2010,29(4):22.
- [4] 沈明,沈立. 泻白散合麻杏石甘汤治疗小儿咳嗽变异性哮喘 42 例[J]. 江西中医药,2012,43(8):52-53.
- [5] 王伟光,施旭光,翟理祥,等. 不同配伍对麻杏石甘汤主要化学成分含量的影响[J]. 中药材,2007,30(5):602-605.
- [6] 王伟光,施旭光,翟理祥,等. 麻杏石甘汤及其配伍抗急性肺损伤的实验研究[J]. 中药材,2007,30(8):984-989.
- [7] 梁光义,贺祝英,武孔云,等. 麻杏石甘汤麻黄碱含量影响因素的研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(24):2600-2603.
- [8] 贺祝英,武孔云,梁光义,等. 麻杏石甘汤的不同配伍对甘草酸含量的影响[J]. 中国药学杂志,2008,43(4):264-267.
- [9] 赵宇昊,史成和,陈绍红,等. 麻杏石甘汤方证探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(15):244-245.
- [10] 邵国荣. 中西医结合治疗支气管哮喘 31 例[J]. 河北中医,2007,29(8):729.

(收稿日期:2013-03-28 修回日期:2013-05-18)

(上接第 2649 页)

参考文献

- [1] 陈萍. α 地中海贫血[M]. 南宁:广西科学技术出版社, 2003:205-261.
- [2] 张力,区小冰,颜慕霞. 血红蛋白 H 病的高效液相色谱与血液学特点分析[J]. 中国实验诊断学,2010,14(9):1417-1419.
- [3] Vichinsky EP. Alpha thalassemia major-new mutations, intrauterine management, and outcomes[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program,2009(1):35-41.
- [4] 蔡稔,李莉艳,梁昕,等. 广西柳州市血红蛋白 H 病的分子流行病学和血液学研究[J]. 中华血液学杂志,2002,23(5):261-262.
- [5] 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.

- [6] 陈萍,李树全,李敏清,等. 泰国缺失型 α 地中海贫血-1 的产前基因诊断[J]. 中华医学遗传学杂志,2007,24(3):247-250.
- [7] 阮丽明,周艳洁,丁进龙,等. 全自动毛细管电泳在血红蛋白分析中的应用[J]. 海南医学,2012,23(1):15-17.
- [8] Laosombat V, Viprasak V, Chotsampancharoen T, et al. Clinical features and molecular analysis in Thai patients with HbH disease[J]. Ann Hematol,2009,88(12):1185-1192.
- [9] 余新圆,陈萍,陈文强,等. 广西地区 200 例儿童 A 地中海贫血血红蛋白 H 病基因突变的研究[J]. 广西医科大学学报,2011,28(3):365-368.
- [10] Pootrakul P, Sirankapracha P, Hemsorach S, et al. A correlation of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in thai patients with thalassemia[J]. Blood,2000,96(7):2606-2612.

(收稿日期:2013-01-24 修回日期:2013-05-22)