

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.14.007

## 广东惠州地区 102 例异常血红蛋白病分析\*

何 静<sup>1</sup>, 余小燕<sup>1</sup>, 温玮霞<sup>1</sup>, 陈江涛<sup>2</sup>, 纪 妍<sup>1</sup>

(广东省惠州市中心人民医院:1. 产前诊断中心;2. 一分院办公室 516001)

**摘要:**目的 调查广东惠州地区异常血红蛋白(Hb)的分子流行病学特征。方法 对 2015 年 7 月至 2017 年 6 月在该院体检、就诊的 22 546 例调查对象进行血常规和 Hb 电泳筛查,对电泳异常标本进行基因测序。结果 共发现 102 例异常 Hb 患者,发生率为 0.45%,其中 J 区带 15 例,K 区带 15 例,Q 区带 22 例,G/D 区带 31 例,E 区带 19 例。基因测序结果显示, $\alpha$  珠蛋白突变体 55 例,基因频率为  $1.02 \times 10^{-3}$ ;  $\beta$  珠蛋白突变体 47 例,基因频率为  $1.22 \times 10^{-3}$ ;发现 8 种  $\alpha$  珠蛋白突变体,包括 32 例 Hb CS,7 例 Hb G-Honolulu,7 例 Hb Q-Thailand,3 例 Hb Queens,2 例 Hb Ottawa,2 例 Hb Beijing, Hb Ube-2 和 Hb Arya 各 1 例;发现 6 种  $\beta$  珠蛋白突变体,包括 19 例 Hb E,12 例 Hb New York,10 例 Hb G-Taipei, Hb J-Bangkok, Hb J-Kaohsiung 和 Hb Maputo 各 2 例。结论 惠州地区是异常 Hb 的高发区,且基因种类较多,符合所在广东地区异常 Hb 的地域流行特征。

关键词:血红蛋白; 分子流行病学; 珠蛋白; 基因测序

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)14-2049-04

## Analysis of abnormal hemoglobin disease of 102 cases in Huizhou area of Guangdong province\*

HE Jing<sup>1</sup>, YU Xiaoyan<sup>1</sup>, WEN Weixia<sup>1</sup>, CHEN Jiangtao<sup>2</sup>, JI Yan<sup>1</sup>

(1. Center of Prenatal Diagnosis; 2. Office of First Branch, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou, Guangdong 516001, China)

**Abstract: Objective** To investigate the molecular epidemiological characteristics of abnormal hemoglobin (Hb) in Huizhou, Guangdong Province. **Methods** A total of 22 546 local people from July 2015 to June 2017 were selected to blood cell analysis and Hb electrophoresis screening. Electrophoresis was used to test further gene sequencing of abnormal specimens. **Results** There were 102 cases of abnormal Hb. The incidence was 0.45%, including 15 case J zone, 15 case K zone, 22 case Q zone, 31 case G/D zone and 19 case E zone. Gene sequencing results showed that there were 55 cases  $\alpha$  globin mutation and 47 cases  $\beta$  globin mutation, and the gene frequency were  $1.02 \times 10^{-3}$  and  $1.22 \times 10^{-3}$ . There were 8 different kinds of  $\alpha$  globin mutation, including 32 cases Hb Constant Spring, 7 cases G-Honolulu, 7 cases Hb Q-Thailand, 3 cases Hb Queens, 2 cases Hb Ottawa, 2 cases Hb Beijing, 1 cases Hb Ube-2 and 1 case Hb Arya. There were 6 different kinds of  $\beta$  globin mutation, including 19 cases Hb E, 12 cases Hb New York, 10 cases Hb G-Taipei, 2 cases Hb J-Bangkok, 2 cases Hb J-Kaohsiung and 2 cases Hb Maputo. **Conclusion** Huizhou region has a high incidence of abnormal Hb, and the kinds of genes are rich, which is consistent with the regional epidemic characteristics of abnormal Hb in Guangdong.

Key words: hemoglobin; molecular epidemiology; globin; gene sequencing

血红蛋白病是一类珠蛋白基因变异而导致血红蛋白异常的遗传病,是世界上最常见的单基因遗传病。全世界目前发现的珠蛋白基因变异类型超过 1 500 种<sup>[1]</sup>,大约 1.5 亿人携带有相关基因<sup>[2]</sup>,以热带和亚热带地区分布较广。我国血红蛋白病存在明显的民族和地域的差异性,其中我国南方地区尤其是两广和海南地区发病率较高,给相关家庭和社会造成了严重的生理、心理和经济负担。惠州地区位于广东省中南部,珠三角东北端,是客家人的重要聚居和集散地之一,具有高携带风险的地域特征。本研究收集

2015 年 7 月至 2017 年 6 月于本院体检者及门诊、住院患者静脉血,以血液学特征为基础,与基因型研究相结合,旨在获得异常血红蛋白的分子流行特征,以便更好地指导优生方面的临床工作,为重型地中海贫血患儿出生的预防工作提供依据。现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2015 年 7 月至 2017 年 6 月于本院体检,以及门诊、住院患者静脉血,受试者总数为 22 546 例,年龄 10~65 岁。

\* 基金项目:广东省惠州市科技计划项目(2016Y026)。

作者简介:何静,女,主管技师,主要从事产前诊断方面的研究。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本采集及血常规分析方法** 分别采集受试者静脉血 2 mL 于乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝的真空管,红细胞的各项参数采用日本 Sysmex XT-1800i 全自动血细胞分析仪进行分析。主要血液学参数指标有:血红蛋白、平均红细胞血红蛋白量(MCH)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)和红细胞体积分布宽度(RDW)。下列情况之一者确定为有异常血红蛋白可能:(1)MCH<27 pg;(2)MCV<80 fL。

**1.2.2 血红蛋白电泳及异常条带定量** 参照《全国检验操作规程(第4版)》的微量醋酸纤维膜血红蛋白电泳法行筛选异常血红蛋白及血红蛋白 F>5%的标本,用 Sebia 电泳仪进一步确认和确定其水平,异常血红蛋白电泳区带位置将区带分为:H、J、K、A、F、Q、G/D 和 E 区带。

**1.2.3 DNA 提取** 使用 Fujifilm DNA 提取仪,取初筛阳性者抗凝血 100 μL,按照全血基因组 DNA 提取试剂盒(深圳亚能生物科技有限公司)说明书提取基因组 DNA。

**1.2.4 α 和 β 珠蛋白的基因扩增** 对于 MCV<80 fL 且血红蛋白 A<sub>2</sub><2.5%的标本行 α 地贫基因筛查;对于 MCV<80 fL 且血红蛋白 A<sub>2</sub>>3.5%的标本行 β 地贫基因筛查;对于出现异常血红蛋白电泳条带的标本,异常血红蛋白水平<40%或有血红蛋白 A 衍生条带行 α 地贫基因筛查,异常血红蛋白水平>25%行 β 地贫基因筛查。α 地贫基因筛查程序为:用提取的全血基因组 DNA 先采用裂口 PCR(gap-PCR)技术测定 4 种常见缺陷型 α 地贫基因(-SEA、-α3.7、-α4.2、-THAJ),其检测阴性者继续用反向斑点杂交(PCR-RDB)技术测定 3 种常见非缺失型 α 地贫基因;β 地贫

基因筛查方法为用 PCR-RDB 法测定 17 种 β 地贫基因;PCR-RDB 法中 PCR 后,RDB 检测满足的条件为,当非缺失型 α 地贫基因样本行 PCR 后可见 1 000 bp 片段扩增条带,β 地贫基因样本行 PCR 后可同时见 600 bp 和 200 bp 片段两条扩增。所有基因检测试剂盒均为中山大学达安基因公司提供,操作程序按照试剂盒说明书进行,引物序列和扩增体系均参照文献[3]。

**1.2.5 PCR 扩增产物的序列测定** 对其 PCR 产物纯化后,使用 ABI3730 双向测序。

**1.3 统计学处理** 采用 Microsoft Excel2007 对数据进行整理。

## 2 结果

**2.1 电泳筛查结果** 22 546 例研究对象中,异常血红蛋白共计 102 例,其发生率为 0.45%(102/22 546)。包括 14.7%(15/102)J 区带血红蛋白异常、14.7%(15/102)K 区带血红蛋白异常、21.6%(22/102)Q 区带血红蛋白异常、30.4%(31/102)G/D 区带血红蛋白异常和 18.6%(19/102)E 区带血红蛋白异常。

**2.2 异常血红蛋白基因类型** 102 例异常血红蛋白标本中,检出 α 珠蛋白突变类型 8 种,见表 1。变异体共计 55 例,基因频率为 1.02×10<sup>-3</sup>;α 珠蛋白变异体最常见的变异类型为血红蛋白 CS,共 32 例,占 58.2%(32/55);其中血红蛋白 CS 是通过 PCR-RDB 法鉴定,其他 7 种均通过 PCR 测序鉴定。检出 β 珠蛋白突变类型 6 种,见表 2,变异体共计 47 例,基因频率为 1.22×10<sup>-3</sup>;β 珠蛋白变异体最常见类型为血红蛋白 E,共 19 例,占 40.4%(19/47);其中血红蛋白 E 是通过 PCR-RDB 法鉴定出来,其他 5 种均通过 PCR 测序鉴定。

表 1 α 珠蛋白变异体类型及各类型所占比例

α 珠蛋白变异体	α 基因突变	突变位点	氨基酸改变	检出情况[n(%)]
血红蛋白 CS	HBA2:c.427T>C	142	Stop>Gln	32(58.2)
血红蛋白 G-Honolulu	HBA2:c.91G>C	30	Glu>Gln	7(12.7)
血红蛋白 Q-Thailand	HBA1:c.223G>C	74	Asp>His	7(12.7)
血红蛋白 Queens	HBA:c.104T>G	34	Leu>Arg	3(5.5)
血红蛋白 Ottawa	HBA:c.46G>C	15	Gly>Arg	2(3.6)
血红蛋白 Beijing	HBA:c.51G>T	16	Lys>Asn	2(3.6)
血红蛋白 Ube-2	HBA:c.205A>G	68	Asn>Asp	1(1.8)
血红蛋白 Arya	HBA:c.142G>A	47	Asp>Asn	1(1.8)

表 2 β 珠蛋白变异体类型及各类型所占比例

β 珠蛋白变异体	β 基因突变	突变位点	氨基酸改变	检出情况[n(%)]
血红蛋白 E	HBB:c.79G>A	26	Glu>Lys	19(40.4)
血红蛋白 New York	HBB:c.241T>A	113	Val>Glu	12(25.4)
血红蛋白 G-Taipei	HBB:c.68A>G	22	Glu>Gly	10(21.3)
血红蛋白 J-Bangkok	HBB:c.170G>A	56	Gly>Asp	2(4.3)
血红蛋白 J-Kaohsiung	HBB:c.179A>C	59	Lys>Tyr	2(4.3)
血红蛋白 Maputo	HBB:c.142G>T	47	Asp>Tyr	2(4.3)

### 3 讨 论

血红蛋白病是由于构成血红蛋白的珠蛋白肽链发生单个或几个氨基酸的替换、插入或重复而导致异常血红蛋白链产生或因为某种珠蛋白合成被抑制而导致血红蛋白合成量减少而引起的贫血,分别被称为异常血红蛋白病和地中海贫血。异常血红蛋白病是遗传上缺陷导致珠蛋白链分子结构异常的一类血红蛋白异常的疾病,表现在一级结构上可以是  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$  珠蛋白的任何一种结构的异常。其分子学异常是以基因结构改变为基础的,常见的基因结构改变模式有:(1)密码子中单个碱基突变;(2)密码子缺失和插入;(3)移码突变;(4)终止密码子变异;(5)不同基因间的交换产生融合基因。而这些基因结构改变引起的血红蛋白分子结构的异常可以分为以下几种情况:(1)珠蛋白上发生单个氨基酸替代,如  $\beta$  链上第 26 位谷氨酸被赖氨酸替代的血红蛋白 E;(2)珠蛋白链中发生两个或以上的氨基酸被替换,如  $\beta$  链上第 9 位丝氨酸被酪氨酸替换和 121 位谷氨酸被谷氨酰胺替换的血红蛋白 D-Agri;(3)氨基酸缺失,如  $\beta$  链上第 6 位谷氨酸缺失的血红蛋白 Leiden;(4)重复氨基酸的嵌入,如  $\alpha$  链上第 119 位脯氨酸后出现前面 117~119 位 3 个氨基酸(Phe-Thr-Pro)重复的血红蛋白 Grady;(5)珠蛋白肽链末端延长,如  $\alpha$  链上第 142 位终止密码子变成谷氨酰胺导致肽链延长的血红蛋白 Constant Spring;(6)珠蛋白肽链末端缩短,如  $\beta$  链上第 145 位酪氨酸和 146 位组氨酸缺失的血红蛋白 McKees Rocks;(7)融合型珠蛋白肽链,如  $\delta$  链和  $\beta$  链融合的血蛋白 Lepore。以上模式里又以单个碱基突变最为常见,导致珠蛋白链中单个氨基酸替换而引起结构异常<sup>[4]</sup>。本研究中所出现的异常血红蛋白的 8 种  $\alpha$  珠蛋白变异体和 6 种  $\beta$  珠蛋白变异体都属于这种情况。

国内血红蛋白病的主要类型为  $\alpha$  和  $\beta$  地中海贫血,其高发区为我国南方的两广和海南地区,发病率为 4.4%~15.2%<sup>[5-6]</sup>。学者们对广东省地贫基因人群携带情况研究较多,但对该地区人群异常血红蛋白的研究相对较少。我国目前已发现 80 多种异常血红蛋白,大多临床症状轻微甚至无临床症状,但当合并地贫时可能会表现出中到重度贫血,而目前缺少有效的治疗手段,患者只能依赖长期输血进行治疗,给家庭和社会都造成了沉重的负担。有研究表明<sup>[7]</sup>,我国长江以南地区异常血红蛋白平均发生率为 0.367%,明显高于长江以北的 0.290%;其中北方以甘肃和新疆发病率最高,平均为 0.414%;而南方的高发地区是云南、福建、广西、广东和江西,其中又以云南最高,达 6.06%,其中血红蛋白 E 最为常见。有研究者在 2009 年和 2011 年在广东潮州和梅州地区分别进行了涉及 10 000 余人的血红蛋白流行病学调查,梅州地区异常血红蛋白发生率为 0.479%,其中  $\alpha$  珠蛋白变异体 33 例(45.2%), $\beta$  珠蛋白变异体 40 例(54.8%);潮州地区

异常血红蛋白发生率为 0.358%,其中  $\alpha$  珠蛋白变异体 19 例(46.4%), $\beta$  珠蛋白变异体 22 例(53.6%)<sup>[8-9]</sup>;马占忠等<sup>[10]</sup>调查广东韶关地区异常血红蛋白的发生率为 0.46%, $\alpha$  珠蛋白变异体 25 例(55.6%), $\beta$  珠蛋白变异体 20 例(44.4%);王婷<sup>[3]</sup>调查广东东莞地区异常血红蛋白的发生率为 0.4%, $\alpha$  珠蛋白变异体 74 例(56.5%), $\beta$  珠蛋白变异体 57 例(43.5%)。本研究中广东惠州地区异常血红蛋白的发生率为 0.45%, $\alpha$  珠蛋白变异体 55 例(53.9%), $\beta$  珠蛋白变异体 47 例(46.1%),表明惠州地区跟广东省其他地区相似,异常血红蛋白及所并发的地中海贫血也是该地区重要的公共健康问题之一。惠州地区地处广东省中南部,珠三角东北端,居民以客家人为主。客家民系是客家先民(南迁汉族移民)进入岭南后与闽粤赣地区的古越族先民融合而形成的,该民系具有北方人群和南方人群交汇融合的特点。从本研究看,既有较高比例的北方人群常见的异常血红蛋白 G/D 区带,也具有南方人群常见的异常血红蛋白 E 和 J 区带。本研究表明,该地区异常血红蛋白以血红蛋白 CS、血红蛋白 E、血红蛋白 New York、血红蛋白 Q-Thailand、血红蛋白 G-Taipei 和血红蛋白 G-Honolulu 为主,这与王婷<sup>[3]</sup>报道的梅州和东莞地区的研究结果较为接近,可能与两地地理位置接近有关。

综上所述,广东惠州地区是异常血红蛋白的高发区,且基因种类较多,以血红蛋白 CS 和血红蛋白 E 最为常见,其次血红蛋白 New York、血红蛋白 Q-Thailand、血红蛋白 G-Taipei 和血红蛋白 G-Honolulu 也较多见。该地区异常血红蛋白基因有其独特性,但也与周边地区区域流行种类较为接近,符合广东地区异常血红蛋白的地域流行特征。

### 参考文献

- [1] 王文娟,解珺丹,王谦,等.中国江苏地区人群血红蛋白病基因型分析[J].中国实验血液学杂志,2015,23(6):1742-1748.
- [2] ZHENG X, LIN M, YANG H, et al. Molecular epidemiological characterization and health burden of thalassemias in the chaoshan region, People's republic of China[J]. Hemoglobin, 2016, 40(2): 138-142.
- [3] 王婷.广东东莞地区的异常血红蛋白分子流行病学研究[D].广州:广州医科大学,2014:11-25.
- [4] WU M Y, LI D Z. The codon 35(a>G)(HBB:c.107A>G) at the  $\alpha$ - $\beta$  chain interface of the  $\beta$ -Globin gene: a silent mutation? [J]. Hemoglobin, 2015, 40(1): 56-58.
- [5] ZHANG C M, WANG Y, GAO L S, et al. Molecular epidemiology investigation of beta-thalassemia in Zhongshan City, Guangdong Province, People's Republic of China [J]. Hemoglobin, 2010, 34(1): 55-60.
- [6] YAO H X, CHEN X, LIN L, et al. The spectrum of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia mutations of the Li People in Hainan Province of China[J]. Blood Cells Mol Dis, 2014, 53(1/2): 16-20.

在本研究中,SAH 患者血清 IL-17 水平与对照组比较显著升高,且改良 Fisher 分级越高,血清 IL-17 水平越高,说明其与 SAH 出血程度相关。因此可以推断,SAH 后脑水肿、血脑屏障破坏等因素促进 Th17 细胞、中性粒细胞、NK 细胞等进入炎症部位,释放 IL-17,进一步加重炎症反应,反之,IL-17 也可透过血脑屏障进入血液循环,使外周血 IL-17 水平上升。

在 SAH 后炎症反应急性期中,黏附分子大量表达,一系列级联反应引发内皮功能障碍及钙内流,产生白三烯及 ET-1 等缩血管物质,消耗 NO 诱导 CVS 的发生。而 IL-17 作为一种强大的致炎因子很有可能参与这些生理过程。本研究结果显示,发生 CVS 的患者血清 IL-17 水平显著高于未发生 CVS 组。说明血清 IL-17 水平与 CVS 的发生存在一定的相关性。另外,SAH 后 CVS 的发生导致脑血流量下降,引起继发性缺血性脑损伤,使正常的脑组织细胞坏死。在本研究中,利用 Hunt-Hess 分级和 GCS 评分这两种能够直观反映脑损伤的严重程度的分级评分标准,将入组患者分组,结果显示,Hunt-Hess 分级级别越高,IL-17 的表达也越高;GCS 评分越低,IL-17 的表达水平越高。但是由于本研究的样本量较小,使结果存在一定局限性,因此想要得到更标准的预测临界值及更高的准确度,仍需要更为深入的研究。

综上所述,本研究结果提示 IL-17 可能是参与 SAH 发病过程的重要因子,测定患者血清 IL-17 的水平,对于判断 SAH 患者出血程度、脑损伤严重程度以及预测 CVS 的发生具有重要意义,同时提示 IL-17 可以作为治疗和控制 SAH 诱发的炎症反应的靶向标志物,而 IL-17 拮抗剂可能成为治疗 SAH 的有效药物。

## 参考文献

- [1] MURAKAMI K, KOIDE M, DUMONT T M, et al. Subarachnoid hemorrhage induces gliosis and increased expression of the pro-inflammatory cytokine high mobility group box 1 protein[J]. *Transl Stroke Res*, 2011, 2(1): 72-79.
  - [2] NI W, GU Y X, SONG D L, et al. The relationship be-
- 
- (上接第 2051 页)
- [7] ZHANG J, ZHU B S, HE J, et al. The spectrum of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia mutations in Yunnan Province of Southwestern China[J]. *Hemoglobin*, 2012, 36(5): 464-473.
  - [8] 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.
  - [9] LIN M, WEN Y F, WU J R, et al. Hemoglobinopathy:

tween IL-6 in CSF and occurrence of vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011; 110(Pt 1): 203-208.

- [3] LAD S P, HEGEN H, GUPTA G, et al. Proteomic biomarker discovery in cerebrospinal fluid for cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2012, 21(1): 30-41.
- [4] ZHOU M L, SHI J X, HANG C H, et al. Potential contribution of nuclear factor-kappaB to cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(9): 1583-1592.
- [5] RAYCHAUDHURI S P. Role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013, 44(2): 183-193.
- [6] 冯路,徐菱霜,黄睿. 自发性蛛网膜下腔出血 CTA 阴性患者 21 例分析[J]. *中国现代医生*, 2012, 50(6): 147-149.
- [7] FOUNTAS K N, TASION A, KAPSALAKI E Z, et al. Serum and cerebrospinal fluid c-reactive protein levels as predictors of vasospasm in aneurysmal subarachnoid hemorrhage clinical article[J]. *Neurosurg Focus*, 2009, 26(5): E22.
- [8] GABR M A, JING L, HELBLING A R, et al. Interleukin-17 synergizes with IFN $\gamma$  or TNF $\alpha$  to promote inflammatory mediator release and intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) expression in human intervertebral disc cells[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(1): 1-7.
- [9] 杨彩云,李小梅. 缺氧缺血性脑病新生儿血清 IL-23、IL-17 水平的变化及其临床意义[J]. *中南医学科学杂志*, 2014, 42(3): 290-294.
- [10] 毕胜,范佳,陈光,等. 脑出血患者外周血 IL-17、IL-23 的表达及意义[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(15): 4315-4316.
- [11] WANG D D, ZHAO Y F, WANG G Y, et al. IL-17 potentiates neuronal injury induced by oxygen-glucose deprivation and affects neuronal IL-17 receptor expression[J]. *J Neuroimmunol*, 2009, 212(1/2): 17-25.
- [12] 温志锋. 大鼠蛛网膜下腔出血后血清中 IL-17 含量的变化和意义探讨[D]. 沈阳:中国医科大学,2007.

(收稿日期:2017-10-29 修回日期:2018-01-24)

molecular epidemiological characteristics and health effects on Hakka People in the Meizhou region, southern China[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55024.

- [10] 马占忠,杨辉,林敏,等. 广东韶关地区异常血红蛋白的分子流行病学调查[J]. *实用检验医师杂志*, 2014, 6(3): 179-181.

(收稿日期:2017-12-26 修回日期:2018-02-23)