

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.03.03

· 临床研究 ·

异常血红蛋白 Hb J-Bangkok 的分子诊断及血液学特征分析*

胡听听,郭浩,秦丹卿,杜丽,尹爱华(广州医科大学附属省妇儿医院医学遗传中心妇幼代谢与遗传病重点实验室,广州 511440)

摘要:**目的** 分析基因检测为异常血红蛋白 Hb J-Bangkok 患者的血液学特征。**方法** 采集 9 例经血红蛋白电泳筛查为 Hb J 带患者的外周血标本进行血常规检测和血红蛋白电泳检测;采用液相芯片检测和基因测序方法检测患者的基因型。**结果** 9 例患者均检出 β 珠蛋白基因 c.170 G>A 突变 (codon 56 GGC>GAC),为异常血红蛋白 Hb J-Bangkok;其红细胞参数指标中血红蛋白含量(Hb)、平均红细胞体积(MCV)和平均血红蛋白含量(MCH)正常或轻度异常;5 例红细胞参数完全正常;1 例血红蛋白筛查 Hb A2(1.9%)降低,其他红细胞参数略有降低,基因芯片检测结果为(α QS α /)杂合突变;1 例 Hb 和 MCV 均降低,血清铁蛋白(FER)降低;1 例 Hb 较低(103 g/L),其他红细胞参数正常;1 例血红蛋白轻度降低(114 g/L),其他血液学指标正常,其测序结果为 β 珠蛋白基因 c.170 G>A 纯合突变(homo codon 56 GGC>GAC)。**结论** 单纯的 Hb J-Bangkok 杂合子或纯合子对临床血液学影响不明显,但合并其他血液学疾病时其红细胞参数多可改变。

关键词: Hb J-Bangkok;异常血红蛋白;地中海贫血;纯合突变

中图分类号: R446

文献标志码: A

Molecular diagnosis and hematological characteristics of abnormal hemoglobin J-Bangkok

HU Tingting, GUO Hao, QIN Danqing, DU Li, YIN Aihua (Maternal and Children Metabolic-Genetic Key Laboratory of Guangdong Province, Medical Genetics Center, Guangdong Provincial Women and Children Health Care Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou 511440, Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To analyze the hematological characteristics of the patients with confirmed Hb J-Bangkok by gene sequencing. **Methods** The peripheral blood samples from 9 patients with Hb J bands in the screening of hemoglobin electrophoresis were collected for routine blood tests and the detection of hemoglobin electrophoresis. The genotypes of the patients were detected by the liquid chip and gene sequencing. **Results** The mutation of β globin gene c.170 G>A (codon 56 GGC>GAC) was detected in all of 9 patients, which led to the occur of abnormal Hb J-Bangkok. In these patients, the parameters of red blood cells (RBC), including hemoglobin content (Hb), mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH), were normal or slightly abnormal. The parameters of RBC were completely normal in 5 patients. In one patient, Hb A2 (1.9%) decreased, other RBC parameters decreased slightly, and the result of the gene chip detection showed the heterozygous mutation of α QS α / $\alpha\alpha$. In one patient, Hb, MCV and serum ferritin (FER) decreased. In one patient, Hb (103 g/L) decreased and other hematological parameters were normal. In another patient, Hb (114 g/L) was slightly reduced, other hematological parameters were normal, and the sequencing result showed the homozygous mutation of β globin gene c.170 G>A (Homo codon 56 GGC>GAC). **Conclusion** The simple Hb J-Bangkok heterozygote or homozygote has no obvious effect on clinical hematology, but its RBC parameters can be changed when combined with other hematology diseases.

Key words: Hb J-Bangkok; abnormal hemoglobin; thalassemia; homozygous mutation

血红蛋白病包括异常血红蛋白病和地中海贫血。异常血红蛋白病是一种血液中结构异常的血红蛋白部分或全部取代正常血红蛋白,引起血液系统或其他系统异常的疾病^[1]。研究证实,大多数结构异常的血红蛋白是由于血红蛋白相关基因发生突变(如插入、缺失、替换、移码突变等)^[2]。目前发现的异常血红蛋白有多种(<http://globin.bx.psu.edu/>),

但只有极少部分可引起临床症状。地中海贫血是由于血红蛋白基因点突变或缺失引起血红蛋白合成相对不足,是一种遗传性溶血性贫血^[3]。有学者证实,如果异常血红蛋白合并地中海贫血,有可能使患者的临床症状加重^[4],并且无症状的血红蛋白病可能随着年龄增长而导致症状加重^[5]。我国南方地区地中海贫血发病率高、影响大,广东和广西地区尤

* 基金项目:广东省自然科学基金(2016A030313787)。

作者简介:胡听听,1989 年生,男,技师,硕士研究生,主要从事胎儿遗传学研究。

通信作者:尹爱华,主任医师,博士研究生导师,E-mail:yinaihua@2980.com。

其高发^[6],有必要对每一种异常血红蛋白进行仔细研究,阐明其分子机制和临床表现。地中海贫血相关研究和报道较多,而异常血红蛋白报道相对较少,故本研究拟对 2015 年至 2019 年我院发现的 9 例携带有异常血红蛋白 Hb J-Bangkok 的患者进行临床血液学和分子诊断学研究。报道如下。

1 病历资料与方法

1.1 病历资料 收集 2015 年 1 月至 2019 年 12 月于我院门诊及住院就诊的血液病患者 9 例,男 4 例,女性 5 例,年龄 21~45 岁,中位年龄 32.67 岁,均行血红蛋白电泳筛查呈异常血红蛋白 J 带,且经基因测序确诊其携带有 β 珠蛋白基因 c.170 G>A 杂合突变(codon 56 GGC>GAC)。患者均自诉没有经历过输血治疗或者骨髓移植。本研究通过广州医科大学附属省妇儿医院医学伦理委员会审核批准,编号:广东省妇幼保健院医伦第[202001008]号,所有研究对象均知情同意。

1.2 主要仪器与试剂 XS-1000i 全自动血细胞分析仪及配套检测试剂盒(日本 Sysmex 公司);Capillar 2 全自动毛细管电泳仪及配套检测试剂盒(法国 Sebia 公司);地中海贫血(α/β)基因检测试剂盒(PCR-流式荧光杂交法,中山大学达安基因公司);Luminex MagPix 多功能液相悬浮芯片系统(美国 Luminex Corporation 公司);MN 外周血全基因组柱提法试剂盒(MN Genomic DNA from blood,德国 Macherey-Nagel GmbH & Co.KG 公司);NanodropND-1000 紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);ABI 3500XL 一代测序仪(美国 Applied Biosystems 公司)

1.3 标本采集 采集各患者就诊时的外周静脉血(无需空腹)4~5 mL,EDTA-K₂ 抗凝,分为两管,一管进行外周血常规及血红蛋白电泳检测,另一管进行基因检测。采集后的标本室温保存并立即送检。

1.4 血细胞参数分析 取各患者 EDTA-K₂ 抗凝外周血标本 2 mL,采用 XS-1000i 全自动细胞分析仪及配套检测试剂盒检测患者血细胞参数,包括 Hb(男:130~175 g/L,女:115~150 g/L)、MCV(参考范围:82~100 fL)、MCH(参考范围:27~34 pg)等,采用 Sebia Capillar2 全自动毛细管电泳仪及配套检测试剂盒分析患者血液血红蛋白组分,包括 HbA(参考范围:94.50%~97.35%)、HbA₂(参考范围:2.7%~3.5%)、HbF(参考范围:0%~2.50%)、HbJ(参考范围:0%)等。以上实验均按照仪器和试剂说明书操作。

1.5 外周血 DNA 提取 取各患者 2~3 mL 外周血,

按照 MN 外周血全基因组柱提法试剂盒说明书操作提取外周血 DNA。使用 NanodropND-1000 紫外分光光度计进行 DNA 浓度和纯度测定。取浓度为 20~100 ng/μL,吸光度(A_{260/280 nm})为 1.8~2.2 的样本用于后续试验,样本置于-20 ℃保存。

1.6 常规地中海贫血基因检测 按照地中海贫血(α/β)基因检测试剂盒(PCR-流式荧光杂交法)及 Luminex MagPix 多功能液相悬浮芯片系统说明书操作对包括 α-珠蛋白基因 3 种缺失(--^{SEA}、-α^{3,7}和 -α^{4,2})、3 种突变(WS122、QS125 和 CS142),β-珠蛋白基因 17 种突变(包括 CD41-42、IVS-II-654、CD17、-28、CD26、CD71-72、CD43、-29、Int、CD14-15、CD27-28、-32、-30、IVS-I-1、IVS-I-5、CD31 和 Cap)进行检测,结果判读参照试剂盒说明书及参考文献[7]进行。

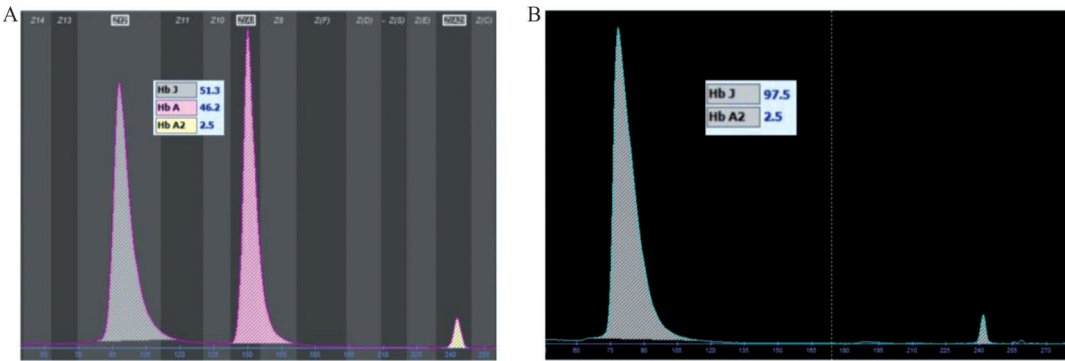
1.7 α/β-珠蛋白基因测序 根据 GenBank 中 β-珠蛋白基因(*HBB*)的序列号(NG_000007.3),使用 Primer Premier 6.0 软件设计 3 对引物扩增 β-珠蛋白基因 3 个外显子(引物序列见表 1),引物由英潍捷基(上海)公司合成;PCR 扩增体系为 50 μL,包括 TaKaRa LA Taq 体系:LA Taq 酶 0.5 μL,10×LA Taq Buffer II (Mg²⁺ Plus)5 μL,dNTP Mixture 8 μL,引物各 1 μL,基因组 DNA 50 ng,灭菌水 28 μL。PCR 循环参数:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。取 PCR 产物送往英潍捷基(上海)贸易公司进行基因测序,所用仪器为 ABI 3500XL 一代测序仪,采用 Sequence Scanner 软件将所测序列片段[NG_000007.3 REGION: complement(5225344..5227106)]与 *HBB* 标准序列进行比对。

表 1 β-珠蛋白基因测序引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	片段长度(bp)	退火温度(℃)
HBB-H1	F:CCAATCTACTCCCAGGAGCAG R:TGAGGTTGTCCAGGTGAGC	582	60
HBB-H2	F:GATCTGTCCACTCCTGATGC R:GCTAGCTGGATTGTAGCTGC	923	60
HBB-H3	F:TTCTGGGTAAAGCAATAGCAA R:AGGGGCTGTTGCCAATGTGC	649	60

2 结果

2.1 毛细管电泳和血常规检测结果 9 例患者均检出 β 珠蛋白基因 c.170 G>A 突变(codon 56 GGC>GAC),为异常血红蛋白 Hb J-Bangkok,其红细胞参数 Hb、MCV 和 MCH 正常或轻度异常;结果见图 1 和表 2。



注:A,患者 1 的血红蛋白电泳结果(杂合 Hb J-Bangkok);B,患者 9 的血红蛋白电泳结果(纯合 Hb J-Bangkok);横坐标,各组分血红蛋白电泳时间;纵坐标,血红蛋白相对含量。

图 1 血红蛋白毛细管电泳结果

表 2 9 例异常血红蛋白 Hb J-Bangkok 血细胞参数和血红蛋白电泳结果

序号	基本信息		血红蛋白电泳				血常规				β-珠蛋白基因测序结果
	性别	年龄 (岁)	Hb A (%)	Hb A2 (%)	Hb J (%)	Hb F (%)	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW	
1	男	35	45.8	2.7	51.3	/	140	91.0	31.2	12.3	HBB;c.170 G>A, HETE
2	男	25	45.2	2.3	52.5	/	145	79.0	24.2	13.7	HBB;c.170 G>A, HETE
3	女	29	47.5	2.7	49.8	/	121	92.2	30.9	13.5	HBB;c.170 G>A, HETE
4	女	44	43.9	1.9	54.2	/	103	73.9	20.9	17.1	HBB;c.170 G>A, HETE
5	男	32	45.0	2.7	52.3	/	167	89.2	29.0	12.0	HBB;c.170 G>A, HETE
6	女	21	46.6	2.7	50.7	/	128	91.9	30.7	15.9	HBB;c.170 G>A, HETE
7	男	45	45.8	2.7	50.6	0.9	159	94.6	32.0	12.4	HBB;c.170 G>A, HETE
8	女	34	45.2	2.3	52.3	0.3	103	83.4	27.5	12.8	HBB;c.170 G>A, HETE
9	女	29	0	2.7	97.3	/	114	91.3	31.1	12.4	HBB;c.170 G>A, HOMO

注:RDW,红细胞分布宽度;HETE,杂合子(heterozygote);HOMO,纯合子(homozygote)。

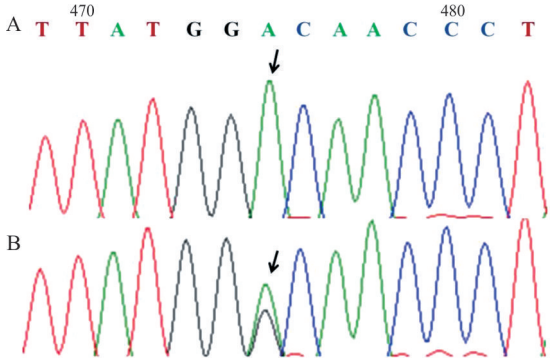
2.2 常规地中海贫血基因检测结果 9 例患者的 DNA 经过液相芯片检测,其中 8 例常规地中海贫血基因检测结果均为阴性,另 1 例男性患者的基因型为 αQSα/αα,为 Hb J-Bangkok 合并 α-地中海贫血。

2.3 α/β-珠蛋白基因测序结果 9 例样本测序结果显示 β 珠蛋白基因 c.170 G>A 突变(codon 56 GGC>GAC),其中 1 例女性为 c.170 G>A 纯合突变(homo codon 56 GGC>GAC),为异常血红蛋白 Hb J-Bangkok。测序结果见图 2。

3 讨论

临床上常用反相高效液相色谱(RP-HPLC)和赛比亚毛细管电泳(Sebia capillary)方法分析并发现特异性的异常血红蛋白,根据电泳时异常带出现的位置对异常血红蛋白进行分组^[8-9]。Hb J-Bangkok 在血红蛋白电泳时见于 J 组,是一种快速的异常血红蛋白。由于同一电泳区带内可包含多种血红蛋白,单纯的电泳不能区分其具体的类型,仍需要通过珠蛋白基因序列分析来鉴定。地中海贫血是一组遗传性溶血性贫血疾病,轻症患者一般无明显临床症状,中度或重度患者需要终身输血治疗或者胎死宫内。由于异常血红蛋白与地中海贫血临床表现相似,通过常规血液学分析难以区分,故需要使用基因序列分析^[10]。有报道显示异常血红蛋白合并地中海贫血时可加重患者的临床症状^[4,11],也有报道认为异常血红蛋白合并地中海贫血表现为单纯的地中海贫血症状^[12],故而多种因素引起的临床贫血症状需要综合分析。

目前,在我国所发现的异常血红蛋白中,最为常见的是血红蛋白分子外部氨基酸发生替代,Hb J-Bangkok即为其中一种。它是由于 β 血红蛋白基



注:A,患者 9 异常血红蛋白 Hb J-Bangkok(箭头所示为 HBB;c.170 G>A, codon 56 GGC>GAC, HOMO);B,患者 1 异常血红蛋白 Hb J-Bangkok(箭头所示为 HBB;c.170 G>A, codon 56 GGC>GAC, HETE)。

图 2 异常血红蛋白 J-Bangkok 测序结果

因点突变导致所编码的血红蛋白 β 链 56 位氨基酸发生改变,由天门冬氨酸取代了正常的甘氨酸。这种改变并不影响血红蛋白分子的功能和稳定,且携带氧气的能力也未降低,因而推测单纯的 Hb J-Bangkok 没有贫血等血液学的改变。本研究检测的 7 例单纯的 Hb J-Bangkok 携带者中,5 例血液学参数均正常,无贫血等临床表现,这与上述推测的结论相同^[4],也与先前文献报道的结果相似^[13]。与以上 5 例携带者不同的是其他 2 例女性携带者有轻度贫血的症状,其中病例 1 提示为明显降低的血清铁蛋白(FER:3.42 ng/mL),诊断为缺铁性贫血^[14]。另一病例为有双胞胎的孕妇,考虑有生理性贫血的可能。本研究发现 1 例 *HBB*:c.170 G>A 纯合突变的病例,血红蛋白电泳显示高达 97.3% 的 Hb J,而无成人正常的血红蛋白 HbA。患者只有轻度降低的血红蛋白量,其他相关血液学指标均正常,表明纯合的 Hb J Bangkok 的患者也仅有轻度贫血的临床表现。此例纯合的 Hb J-Bangkok 病例为国内首次报道。此外还有 1 例男性患者为轻度 α 地贫(α QS α / $\alpha\alpha$)合并 Hb J-Bangkok,其相关血液学指标与轻度 α 地贫相似,显示合并 Hb J-Bangkok 时并不显著影响轻度 α 地贫患者的血液学表现。

综上所述,本研究对异常血红蛋白 Hb J Bangkok 血液学特征的分析,有助于增强和提高我们对常见异常血红蛋白的认识和重视,对遗传咨询和产前诊断也可以具有参考价值。然而,本研究中缺少 Hb J-Bangkok 合并 β 地贫的病例的总结和分析,相关病例的报道和文献也较少,故而无法对 Hb J-Bangkok 对地贫的影响做一个全面的分析。今后我们将继续收集病例,完善资料,进行更深入的相关研究。

4 参考文献

- [1] Thom C, Dickson C, A Gell D, *et al.* Hemoglobin variants: Biochemical properties and clinical correlates[J]. CSH Perspect Med, 2013, 3: a011858.
- [2] Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopa-

- thies and thalassemias: Review and update[J]. Clin Chem, 2000, 46: 1284-1290.
- [3] Viprakasit V, Ekwattanakit S. Clinical classification, screening and diagnosis for thalassemia[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2018, 32: 237-245.
- [4] 杜丽, 秦丹卿, 王继成, 等. 异常血红蛋白合并地中海贫血的基因诊断及血液学指标分析[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2019, 11(1): 34-37.
- [5] Musallam KM, Rivella S, Vichinsky E, *et al.* Non-transfusion-dependent thalassemias[J]. Haematologica, 2013, 98(6): 833-844.
- [6] Zeng YT, Huang SZ. Disorders of haemoglobin in China[J]. J Med Genet, 1987, 24(10): 578-583.
- [7] 王逾男, 林建昌, 张亮, 等. 悬浮阵列技术在地中海贫血基因诊断中的应用[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2015, 7(4): 16-23.
- [8] Wan J, Tian P, Luo W, *et al.* Rapid determination of human globin chains using reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 901: 53-58.
- [9] Greene D, Pyle A, Chang J, *et al.* Comparison of Sebia CapillaryS Flex capillary electrophoresis with the BioRad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413: 1232-1238.
- [10] Sabath D. Molecular diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies: An ACLPS critical review[J]. Am J Clin Pathol, 2017, 148(1): 1-10.
- [11] 索明环, 温冬梅, 王伟佳, 等. 2 例 Hb NewYork 合并 β 地中海贫血临床表型分析并文献复习术[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(6): 472-474.
- [12] Lee A, Ma E, Chan A, *et al.* Double heterozygosity for Hb New York [β 113 GTG $\rightarrow$ GAG; VAL $\rightarrow$ GLU] and β 0-thalassemia mutations manifests as a thalassemia trait[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2009, 25: 227-231.
- [13] 凌少璉, 王黄儒, 陈洛夫, 等. 广东省异常血红蛋白研究: iv. 一例血红蛋白 J Bangkok 的化学结构分析[J]. 暨南理医学报(医学专版), 1986, 4: 19-23.
- [14] Çil B, Ayyıldız H, Tuncer T. Discrimination of β -Thalassemia and iron deficiency anemia through extreme learning machine and regularized extreme learning machine based decision support system[J]. Med Hypotheses, 2020, 138: 109611.

(收稿日期:2020-01-10)

(本文编辑:许晓蒙)