

云南 4 种罕见异常血红蛋白突变型分析*

何建萍¹, 郭薇霞^{2&}, 唐 健¹, 罗胜军¹, 吕梦欣¹, 党峰博¹, 林克勤², 杨昭庆^{2△}

(1. 昆明市妇幼保健院遗传室, 云南昆明 650031; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所遗传室, 云南昆明 650118)

摘要:目的 明确 7 例血红蛋白电泳检出的异常条带产生的基因分子基础, 探讨基因型与血液学表型的关系。方法 用血常规指标和血红蛋白电泳进行表型分析, 采用 PCR-反向点杂交法检测 α 地贫和 β 地贫, 应用 PCR 产物测序技术对 α 、 β 基因全长进行测序, 检测基因突变类型。结果 7 例样本中检出 4 种异常血红蛋白突变型: 1 例中国首次发现的 Hb San Bruno (HBB:c. 120G>C)、2 例 Hb New York (HBB:c. 341T>A)、2 例 Hb J-Bangkok (HBB:c. 170G>A)、2 例 Hb G-Coushatta (HBB:c. 68A>C), 血常规参数均无明显异常。结论 云南存在多种异常血红蛋白突变型, 多数单纯异常血红蛋白罕见突变都不产生临床表型, 但是云南作为地中海贫血的高发地区, 异常血红蛋白病合并地中海贫血的临床意义和危害性有待于进一步研究。

关键词:异常血红蛋白; 血红蛋白电泳; 基因型; 血液学表型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.08.010

中图法分类号:Q343.1+3

文章编号:1673-4130(2019)08-0932-04

文献标识码:A

Detection of four rare hemoglobin variants in Yunnan Province*

HE Jianping¹, GUO Weixia^{2&}, TANG Jian¹, LUO Shengjun¹, LYU Mengxin¹,
DANG Fengbo¹, LIN Keqin², YANG Zhaoqing^{2△}

(1. Department of Medical Genetic, Kunming City Maternal and Child Health Hospital, Kunming, Yunnan 650031, China; 2. Department of Medical Genetic, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: Objective To determine the molecular basis of the 7 abnormal hemoglobin (Hb) cases, and to explore the relationship between genotype and hematological phenotype. **Methods** Complete blood counts and quantification of Hb levels performed by capillary electrophoresis were used to hematological analysis. The PCR-reverse dot blot was used to detect α and β thalassemia and the molecular characterization was performed using sanger sequencing. **Results** 4 different Hb variants were detected; one case of Hb San Bruno (HBB:c. 120G>C), 2 cases of Hb New York (HBB:c. 341T >A), 2 cases of Hb j-bangkok (HBB:c. 170G>A), and 2 cases of Hb G-Coushatta (HBB:c. 68A>C). All the cases are hematological normalities. **Conclusion** Most of the rare Hb mutations clinical are asymptomatic, but the impact of its combination with thalassemia remains to be further studied.

Key words: abnormal hemoglobin; hemoglobin electrophoresis; genotype; phenotype

血红蛋白病是由于珠蛋白基因突变导致血红蛋白结构或合成量异常的最常见的遗传病, 包括异常血红蛋白病和地中海贫血两大类^[1]。该病分布广泛, 全世界约有 7% 的人群携带血红蛋白病基因^[2]。目前人类血红蛋白变异体数据库 HbVar (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>) 收录的血红蛋白突变已经超过了 1 300 多种, 我国报道的已经超过 80 余种。

早期我国大范围血红蛋白病调查结果都显示我国异常血红蛋白分布以云南发生率最高, 达到了 6.06% 和 5.9%^[3-4]。目前云南异常血红蛋白报道较多的是以产生异常条带 E 为主的 β 珠蛋白基因突变 HbE (G>A)^[5]。本研究通过对 7 例毛细管电泳检出的罕见异常血红蛋白条带 (F、K、J、D) 进行分析, 确定其突变的基因分子基础, 初步探讨罕见基因型与表型的关系。

* 基金项目: 云南省科技计划项目 (2016FA048); 国家重点研发计划 (2016YFC1201704)。

作者简介: 何建萍, 女, 副主任医师, 主要从事产前诊断与遗传咨询工作。 & 并列第一作者。 △ 通信作者, E-mail: zyang@imb-

1 资料与方法

1.1 一般资料 获取到云南省昆明市妇幼保健院进行地中海贫血产前筛查时血红蛋白毛细管电泳检出异常血红蛋白条带的女性 7 例。

1.2 方法

1.2.1 血液学检查 取乙二胺四乙酸盐(EDTA)抗凝静脉血 2 mL,采用日本 sysmex XT-2000i 血细胞分析仪检测各项血常规指标。血红蛋白电泳采用欧洲 helena V8 全自动毛细管电泳仪进行检测。

1.2.2 常见地中海贫血突变基因检测 采用 PCR-反向点杂交法检测 23 种中国人常见的地中海贫血基因型 (SEA、-α3. 7、-α4. 2、αCSα、αQSα、αWSα、41-42M、654M、-28M、71-72M、17M、βEM、IVS-I-1M、IVS-I-5M、27/28M、43M、-29M、-30M、31M、-32M、14-15M、IntM 和 CAPM)。所用试剂为亚能生物技术(深圳)有限公司提供的地中海贫血基因检测试剂盒。

1.2.3 α 和 β 珠蛋白基因片段扩增 采用 QIAGEN 公司提供的全血试剂盒,严格按照说明书进行操作,提取 DNA 样本进行 PCR,扩增包含启动子序列及 3 个外显子在内的 α、β 珠蛋白基因序列。引物序列参照文献[6],PCR 扩增采用 TaKaRa LA Taq 高保真酶,仪器采用美国 ABI 公司的 9700PCR 扩增仪。HBA1、HBA2、HBB 基因 PCR 扩增体系均为 30 μL:每一反应体系含 2×Mix Buffer 15 μL、上下游引物各 0.3 μL、LA Taq 0.2 μL、H₂O 11.2 μL、DNA 模板含量约 100 ng。反应条件为:94 °C 4 min,94 °C 45 s,64 °C 40 s,72 °C 90 s,共 35 个循环,72 °C 延伸 20 min。

1.2.4 α 和 β 珠蛋白基因片段测序 纯化 PCR 产物后,使用 ABI3700 测序仪进行测序。

2 结果

2.1 血常规检测结果 7 例样本血常规参数均为正细胞正色素,无明显异常。见表 1。

表 1 4 种罕见异常血红蛋白突变型血液学参数特征

编号	基因型	HGVS 命名法	年龄 (岁)	血红蛋白 (g/L)	平均红细胞体积 (fL)	平均红细胞血红蛋白量(pg)	HbA2 (%)	异常血红蛋白条带	Hb 变异体 (%)
1	Hb San Bruno	HBB;c. 120G>C	21	109	85.2	27.6	3.36	F	39.27
2	Hb New York	HBB;c. 341T>A	24	143	93.9	31.0	2.36	K	54.37
3	Hb New York	HBB;c. 341T>A	23	135	89.7	29.5	2.85	K	54.51
4	Hb J-Bangkok	HBB;c. 170G>A	36	123	93.9	31.3	2.26	J	61.37
5	Hb J-Bangkok	HBB;c. 170G>A	25	117	89.8	29.8	1.66	J	59.62
6	Hb G-Coushatta	HBB;c. 68A>C	32	127	91.3	31.6	3.19	D	40.24
7	Hb G-Coushatta	HBB;c. 68A>C	24	154	87.5	30.1	2.95	D	38.32

2.2 血红蛋白电泳结果 7 例标本共检出 4 种异常血红蛋白电泳条带:分别为 F、K、J、D 带,占总血红蛋白的含量范围从 38.32%到 61.37%。其中代表性的含量异常升高的 F 带见图 1。

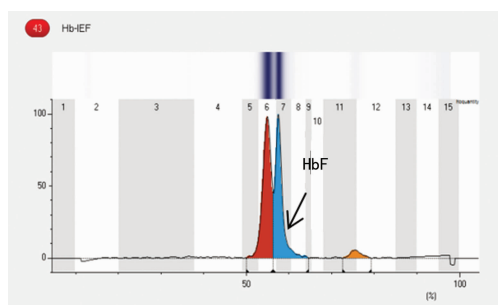


图 1 Hb San Bruno 电泳结果图(Hb F 含量升高)

2.3 基因型检测结果 α 和 β 珠蛋白序列分析检出 4 种异常血红蛋白突变型:1 例 F 带为 Hb San Bruno (HBB:c. 120G>C)、2 例 K 带为 Hb New York (HBB:c. 341T>A)、2 例 J 带为 Hb J-Bangkok (HBB:c. 170G>A)、2 例 D 带为 Hb G-Coushatta

(HBB:c. 68A>C)。7 例异常血红蛋白均未检出 α、β 地中海贫血基因突变。见图 2。

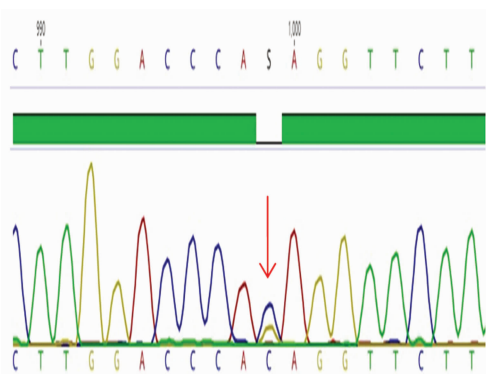


图 2 Hb San Bruno 测序结果图(β 珠蛋白基因 CD39 CAG->CAC 杂合突变),箭头示突变

3 讨论

我国异常血红蛋白分布和发生率具有明显的遗传多态性,在我国南方如广东、广西地区已报道过 Hb Q-Tailand、Hb New York、Hb G-Chinese 等多种突变

种类^[6]。本研究对来本院进行地中海贫血筛查时血红蛋白电泳检出异常条带的 7 例女性样本进行了回顾性分析,通过基因检测确诊了 4 种血红蛋白的罕见突变,进一步丰富了云南的异常血红蛋白突变谱。

本研究检出了 1 例 Hb San Bruno 罕见突变。它是 β 珠蛋白第 39 位密码子谷氨酰胺(CAG)突变为组氨酸(CAC)的杂合突变,该突变能产生相对稳定的血红蛋白。这一突变于 2002 年 HOYER 在非洲裔美国女性中首次发现^[7],此后未见相关报道,这是第二例报道,也是我国首次发现该突变,提示该突变在不同种族之间都有分布。本次检出的这一例 Hb San Bruno 除了产生占总血红蛋白含量 39% 的异常 F 带,其他血液学参数无明显异常,这与美国报道的携带者呈小细胞低色素贫血不相符,但是美国的携带者呈小细胞低色素贫血是由于该携带者合并了子宫肌瘤造成的。研究进一步支持了该突变不会产生临床表现这一结论。本研究还检出了 2 例 Hb New York 和 2 例 Hb J-Bangkok,分别产生异常 K 带与 J 带,这与广西和广东报道的我国南方常见异常血红蛋白种类和特点相符^[8-9]。此外,本研究检出了 2 例 Hb G-Coushatta, ZHANG 等^[10] 2017 年的时候在 566 例云南 β 珠蛋白突变携带者中也曾检出 1 例,而既往报道显示 Hb G-Coushatta 分布以北方人群为主^[4],但近年来,在广东^[11]和江苏无锡^[12]等南方地区都有检出,提示 Hb G-Coushatta 在南方人群中也有分布。

本研究检出的 Hb San Bruno、Hb New York、Hb J-Bangkok 和 Hb G-Coushatta 血红蛋白电泳分别产生异常的 F 带、K 带、J 带和 D 带,其他血液学参数均无明显异常。这是由于大多数异常血红蛋白是由于血红蛋白分子外部氨基酸发生替代突变,这类替代绝大多数不影响血红蛋白分子的稳定性和功能,因此突变携带者通常无临床表现^[13]。尽管本研究检出的四种罕见突变都不产生临床表现,但是云南作为异常血红蛋白发生率最高的地区,曾报道过罕见的血红蛋白突变型 Hb Rush(HBB:c. 304G>C)^[14],该突变会产生不稳定的血红蛋白,能导致溶血性贫血的临床症状,因此在血红蛋白电泳筛查出异常条带后,有必要对异常血红蛋白病进行基因检测确诊。另一方面,云南是除广州、广西外的地中海贫血高发地区, α 地中海贫血发病率 3.18%~9.46%, β 地中海贫血发病率 1.6%~3.56%^[15],因此这些罕见突变有较高的概率合并地中海贫血,有可能产生更严重的血液学表型。有研究报道其他罕见突变类型 Hb Gran Via、Hb Macarena 和 Hb EI Retiro 合并 α 地中海贫血会产生血红蛋白 H 病,导致中到重度的溶血性贫血^[16]。因此,在云南这样容易产生异常血红蛋白和地中海贫血

双重杂合子的地区,当血红蛋白毛细管电泳检出异常条带时,有必要对异常血红蛋白突变进行基因检测,积累数据明确其临床表型和危害性,从而更好地指导遗传咨询。

由于异常血红蛋白病绝大多数无临床表现,因此往往不能引起人们的重视。但是这些异常血红蛋白的存在会对糖化血红蛋白(HbA1c)检测结果造成干扰^[17]。HbA1c 是评价糖尿病患者长期血糖控制水平及糖尿病并发症的重要指标,研究表明利用高效液相色谱法检测时,Hb J-Bangkok 会使 HbA1c 水平假性降低^[18],而 Hb New York 会使 HbA1c 水平假性升高^[19],此时检测出的 HbA1c 不能反映患者近 2~3 个月的血糖控制水平。因此,在像云南这样异常血红蛋白发生率高的地区,在应用 HbA1c 评估糖尿病患者血糖控制状况时,应先了解患者的血红蛋白情况,排除因血红蛋白变异体存在而导致 HbA1c 临床应用风险。

4 结 论

本研究报道了中国首例 Hb San Bruno 罕见异常血红蛋白突变型,进一步丰富了我国异常血红蛋白种类。通过对基因型和表型进行探讨,绝大多数异常血红蛋白突变携带者没有任何临床症状,但由于云南是地贫高发区,其合并地中海贫血的临床意义和危害性还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] PATRINOS G P, GIARDINE B, RIEMER C, et al. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32 (Database issue): D537-D541.
- [3] ZENG Y T, HUANG S Z. Disorders of haemoglobin in China[J]. J Med Gene, 1987, 24(10): 578-583.
- [4] 秦良谊. 我国异常血红蛋白发生率、分布及遗传多态性[J]. 医学研究通讯, 2003, 32(12): 12-14.
- [5] HE J, ZENG X, ZHANG Y, et al. Prevalence of hemoglobin E in Yunnan Province of Southwest China[J]. Hematology, 2016, 21(1): 54-59.
- [6] 莫宗平, 张玲, 喻长顺, 等. 异常血红蛋白 81 例基因分析[J]. 广东医学, 2012, 33(3): 338-341.
- [7] HOYER J D, MCCORMICK D J, SNOW K, et al. Four new beta chain hemoglobin variants without clinical or hematological effects: Hb San Bruno [β 39 (C5) Gln->His]; Hb Fort Dodge [β 93 (F9) Cys-(下转第 938 页)]

BASFI 评分不相关 ($P > 0.05$), 与 BASDAI、ASDAS 评分呈正相关; 进一步说明 MMP-9 与 AS 疾病活动度有着良好的相关性, 对疾病的好转起预示作用。

4 结 论

综上所述, AS 患者血清 DKK-1 呈低表达, MMP-9 呈高表达, TNF- α 拮抗剂能明显下调 MMP-9 水平, 对 DKK-1 无明显影响, MMP-9 可反映 AS 的疾病活动度, DKK-1 与疾病活动度无明显相关, 但 DKK-1 能在一定程度上反映 AS 的骨化进程。

参考文献

[1] 路海平. 强直性脊柱炎患者心脏受累的患病率及危险因素研究[J]. 河北医学, 2017, 23(8): 1358-1362.

[2] 黄勤, 毛慧慧. 不同免疫疗法对强直性脊柱炎患者疗效及骨代谢指标的影响[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(12): 1396-1398.

[3] 田丽贞, 杜红卫, 童爱飞, 等. DKK-1 在强直性脊柱炎患者外周血中的表达及临床意义研究[J]. 中国全科医学, 2017, 20(z1): 131-133.

[4] 中华医学会风湿病学分会. 强直性脊柱炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(8): 557-559.

[5] 李爱国, 彭兴梅, 董玉珍, 等. 血清瘦素水平与强直性脊柱

炎男性患者韧带骨赘形成之间的关联性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(24): 31-36.

[6] SIEPER J, LISTING J, PODDUBNYY D, et al. Effect of continuous versus on-demand treatment of ankylosing spondylitis with diclofenac over 2 years on radiographic progression of the spine: results from a randomised multicentre trial (ENRADAS) [J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(8): 1438-1443.

[7] 冯雪琴, 侯志铎, 林玲. 评价强直性脊柱炎病情活动度的生物标志物研究进展[J]. 山西医药杂志, 2016, 45(11): 1288-1291.

[8] LIAO H T, LIN Y F, TSAI C Y, et al. Bone morphogenetic proteins and Dickkopf-1 in ankylosing spondylitis [J]. Scand J Rheumatol, 2018, 47(1): 56-61.

[9] 刘亚, 张晓军. 外源性骨强化蛋白对强直性脊柱炎小鼠的疗效研究[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(6): 597-599.

[10] 黎旭军, 何晖, 黄健林, 等. 强直性脊柱炎早中期腰背痛的中医疗干预研究[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(4): 786-789.

[11] 李远峰, 宋寒冰, 徐伟明, 等. 补肾强督祛湿法治疗肾虚督寒型强直性脊柱炎疗效及对 MMP-9, TIMP-1 水平的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(13): 1385-1388.

(收稿日期: 2018-09-24 修回日期: 2019-01-12)

(上接第 934 页)

Tyr]; Hb Rhode Island[beta116(G18)His-->Tyr]; and Hb Inglewood[beta142(H20)Ala-->Thr][J]. Hemoglobin, 2002, 26(3): 299-303.

[8] 赵颖, 商璇, 熊符, 等. 异常血红蛋白 (Hb J-Bangkok) 合并 β -地中海贫血的临床表型分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(2): 148-151.

[9] 张强, 范歆, 何升, 等. Hb New York 病 ARMS-PCR 检测及临床表型分析[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(9): 706-707.

[10] ZHANG J, HE J, MAO X, et al. Haematological and electrophoretic characterisation of β -thalassaemia in Yunnan province of Southwestern China[J]. BMJ Open, 2017, 7(1): e013367.

[11] 赖兆新, 严伟玲. 血红蛋白 G 病检验结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(18): 2755-2757.

[12] 王妍, 林敏, 韩志君, 等. 江苏省无锡地区异常血红蛋白病的流行病学调查[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(2): 316-318.

[13] 莫桂玲, 胡朝晖, 张玲, 等. 我国罕见异常血红蛋白突变型 [β 43(CD2)Glu->Lys] 分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(9): 918-919.

[14] 葛世军. 不稳定血红蛋白 Hb Rush 的血液学表型和基因型分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 34(1): 15-20.

[15] LAI K, HUANG G, SU L, et al. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 920.

[16] DE LA FUENTE-GONZALO F, NIETO J M, VELASCO D, et al. HB Puerta del Sol[HBA1:c. 148A>C], HB Valdecilla[HBA2:c. 3G>T], HB Gran Via[HBA2:c. 98T>G], HB Macarena[HBA2:c. 358C>T] and HB El Retiro[HBA2:c. 364_366dupGTG]; description of five new hemoglobinopathies[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(4): 553-560.

[17] XU A, CHEN W, XIA Y, et al. Effects of common hemoglobin variants on HbA1c measurements in China: results for alpha- and beta-globin variants measured by six methods[J]. Clin Chem Lab Med, 2018, 56(8): 1353-1361.

[18] ZHANG X M, WEN D M, XU S N, et al. Effects of hemoglobin variants HbJ Bangkok, HbE, HbG Taipei, and HbH on analysis of glycated hemoglobin via ion-exchange high-performance liquid chromatography[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(1): e22214

[19] 索明环, 温冬梅, 王伟佳, 等. 5 个糖化血红蛋白检测系统对 Hb New York 合并 β 地中海贫血标本异常结果预警能力比较[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(9): 649-653.

(收稿日期: 2018-09-25 修回日期: 2018-12-31)