

## 论著·临床研究

Hb E/Hb Hope 双重杂合子的血液学特征和分子诊断<sup>\*</sup>葛世军<sup>1</sup>,郭薇霞<sup>2#</sup>,易 薇<sup>1</sup>,潘云华<sup>1</sup>,杨必清<sup>1</sup>,褚嘉祐<sup>2</sup>,杨昭庆<sup>2△</sup>

(1. 德宏傣族景颇族自治州人民医院检验科, 云南芒市 678402; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所医学遗传学研究室, 云南昆明 650118)

**摘要:**目的 分析1个傣族血红蛋白(Hb)E复合Hb Hope家系的血液学特征。方法 采用全血细胞计数和毛细管Hb电泳检测该家系成员的血液学特点,采用PCR-流式荧光杂交法检测常见的 $\alpha$ 、 $\beta$ 珠蛋白生成障碍性贫血基因突变,用Sanger DNA测序方法检测 $\alpha$ 、 $\beta$ 珠蛋白基因中的罕见突变。结果 该家系中先证者的基因型为Hb E复合Hb Hope双重杂合子,血常规检测呈现小细胞低色素,Hb电泳检出含量为71.1%的异常电泳区带HbX,25.2%的Hb E区带,HbA<sub>2</sub>含量为3.7%,未检出HbA;先证者父亲为Hb Hope杂合子,血常规结果正常,检出含量约为40%的HbX,校正后的HbA<sub>2</sub>含量为2.9%;先证者母亲为Hb E杂合子,检出24.9%的Hb E带,HbA<sub>2</sub>高于3.5%。结论 Hb E复合Hb Hope异常血红蛋白病可呈现出较单独的杂合突变更为复杂的血液学表型,结合基因检测有助于揭示复杂血液学结果的分子机制,从而明确诊断,避免误诊和漏诊。

**关键词:**异常血红蛋白; 血红蛋白E; 毛细管电泳**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.19.012 **中图法分类号:**R556**文章编号:**1673-4130(2019)19-2352-04**文献标识码:**A

**The molecular diagnosis and hematological characterization of compound heterozygosity for hemoglobin (Hb) Hope/Hb E<sup>\*</sup>**

GE Shijun<sup>1</sup>, GUO Weixia<sup>2#</sup>, YI Wei<sup>1</sup>, PAN Yunhua<sup>1</sup>, YANG Biqing<sup>1</sup>, CHU Jiayou<sup>2</sup>, YANG Zhaoqing<sup>2△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Dehong Dai and Jingpo Autonomous Prefecture, Mangshi, Yunnan 678402, China; 2. Department of Medical Genetics, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Kunming, Yunnan 650118, China)

**Abstract: Objective** To analyze the hematological characterization of compound heterozygosity for hemoglobin (Hb) Hope/Hb E in a family. **Methods** Whole blood cells count and capillary electrophoresis of hemoglobin fractions were used to identify the hematological characteristics of the subjects. PCR-flow fluorescence hybridization was used to detect common thalassemia gene mutations, and sanger DNA sequencing was used to detect rare  $\alpha$  and  $\beta$  globin gene mutations. **Results** The proband with Hb E/Hb Hope compound heterozygote showed microcytic hypochromic, 71.1% of abnormal hemoglobin fraction HbX, 25.2% of Hb E and 3.7% of HbA<sub>2</sub> hemoglobin fractions but without detectable HbA. The father was diagnosed as Hb Hope heterozygote, his blood indexes were in normal range, and capillary electrophoresis revealed 40.0% HbX and 2.9% corrected HbA<sub>2</sub> fractions. The mother was Hb E heterozygote with 24.9% of the Hb E and more than 3.5% of HbA<sub>2</sub>. **Conclusion** Compound heterozygosity of Hb Hope/Hb E could present more complex electrophoretic phenotypes than that of single heterozygote. Molecular genetic assays are helpful to reveal the molecular mechanism underlined complex hematological phenotypes and to make diagnosis.

**Key words:** abnormal hemoglobin; hemoglobin E; capillary electrophoresis

异常血红蛋白病是一类由于珠蛋白基因突变导致合成的珠蛋白肽链的结构及功能发生异常的遗传

<sup>\*</sup> 基金项目: 云南省应用基础研究计划重点项目(2016FA048); 国家重点研发计划项目(2016YFC1201704)。作者简介: 葛世军,男,副主任技师,主要从事地中海贫血的产前诊断研究。 作者简介: 郭薇霞,女,在读硕士,主要从事疾病的基因诊断研究。 <sup>#</sup> 共同第一作者。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: zyang@imbcams.com.cn。

本文引用格式: 葛世军,郭薇霞,易薇,等. Hb E/Hb Hope 双重杂合子的血液学特征和分子诊断[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(19): 2352-2355.

性血液疾病,绝大多数异常血红蛋白病是由于珠蛋白基因单个碱基置换所引起,常常不产生显著的症状<sup>[1]</sup>。目前异常血红蛋白病在临床实践中主要通过血红蛋白(Hb)电泳方法进行筛查,以 Hb 电泳出现异常区带为主要特征<sup>[2]</sup>。人类 Hb 变异体数据库 Hb-Var(<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>)显示我国人群中存在的异常 Hb 种类超过 80 多种,较为常见的有 Hb E、Hb Q-Thailand、Hb New York 和 Hb G-Chinese 等<sup>[3-4]</sup>。早期的较大规模人群调查显示云南的异常 Hb 发生率居全国之首,存在有较多种类的珠蛋白基因突变,除了单一珠蛋白基因突变以外、该地区人群中还存在珠蛋白基因复合突变的情况,产生复杂的血液学表型<sup>[5-6]</sup>。国内外有较多研究表明异常 Hb 复合突变可因突变位点效应之间的相互作用,使携带突变的个体呈现出特殊及罕见的血液学表型特征,尤其是呈现出复杂的 Hb 电泳检验结果,常易造成漏诊和误诊,从而影响对患者的治疗、预后判断和遗传咨询<sup>[7-8]</sup>。本研究对 1 个中国人群中罕见的 Hb E 复合 Hb Hope 家系的基因型和血液学表型特征分析,为复合突变所致异常血红蛋白病在临床诊断中的血液学表型特点和分子机制提供更多实验数据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 先证者:男,29岁,傣族,已婚,未采集到配偶及其子女血样。家系成员:父亲,53岁,傣族;母亲,54岁,傣族。正常对照:1例来源于未检出常见珠蛋白生成障碍性贫血基因突变的体检人群,女,23岁,汉族。

## 1.2 方法

**1.2.1 血液学检查** 在知情同意原则下,取上述成员 2.5 mL 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝静脉血,采用全自动血细胞分析仪 Sysmex XT-2100i(日本,Sysmex 公司)检测血红蛋白含量(HGB)、红细胞

平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH)等血常规各项指标。Hb 定量采用 CAPILLARYS 全自动毛细管电泳仪(法国,sebia 公司)及配套试剂进行检测分析。

**1.2.2  $\alpha$ 、 $\beta$  珠蛋白基因常见缺失和突变检测** 采用 AxyPrep 血基因组 DNA 小量制备试剂盒(中国杭州,Axygen 公司)提取全血样本 DNA。采用 PCR-流式荧光杂交法的商品试剂盒(中山大学达安基因有限公司)检测  $\alpha$ 、 $\beta$  珠蛋白生成障碍性贫血基因常见缺失突变和点突变位点,包括 3 个  $\alpha$  基因点突变( $\alpha$ CS、 $\alpha$ QS 和  $\alpha$ WS)、3 种  $\alpha$  基因缺失型突变( $-SEA$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ )和 17 个  $\beta$  基因位点突变(CD41-42、IVS-2-654、CD17、-28、CD26、CD71-72、CD43、-29、Int、CD14-15、CD27-28、-32、-30、IVS-1-1、IVS-1-5、CD31、Cap)。

**1.2.3  $\alpha$ 、 $\beta$  珠蛋白基因全长测序** 参考文献[1]设计引物,使用 9700 PCR 扩增仪(美国,ABI 公司)扩增  $\alpha$ 、 $\beta$  珠蛋白基因全长。扩增采用 TaKaRa LA Taq 高保真酶(大连宝生物公司)。HBA1、HbA<sub>2</sub>、HBB 基因 PCR 扩增体系均为 30  $\mu$ L:每一反应体系含 2  $\times$  Mix Buffer 15  $\mu$ L、上下游引物各 0.3  $\mu$ L、LA Taq 0.2  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 11.2  $\mu$ L、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。PCR 扩增产物用 BigDye Terminator V3.1(美国 Applied Biosystems 公司)试剂盒,按说明书方法进行 Sanger DNA 双向测序并根据测序结果寻找突变位点。

## 2 结 果

**2.1 血常规结果** 该家系成员及正常对照血常规结果见表 1。家系 3 人的 HGB 高于 120 g/L,均未表现出贫血症状。其中先证者红细胞(RBC)呈明显的小细胞低色素(MCV<80 fL、MCH<28 pg),而其母亲和父亲的红细胞参数均在正常参考值范围。

表 1 家系成员及正常对照血常规及 Hb 电泳检测结果

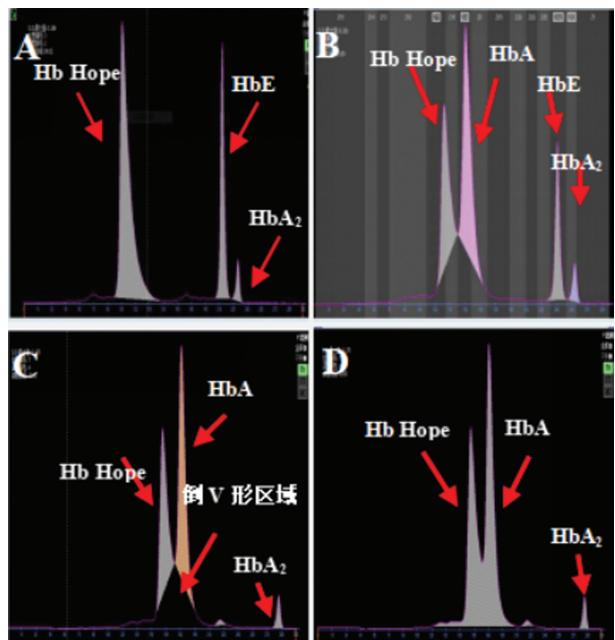
家系成员	RBC( $\times 10^{12}/L$ )	HGB(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	HbA <sub>2</sub> (%)	HbA(%)	HbX(%)	Hb E(%)
先证者	5.71	135	72.7	23.6	3.7	0.0	71.1	25.2
母亲	3.68	133	104.9	36.1	4.2	67.7	0.0	24.9
父亲	4.13	133	96.9	32.2	4.2	53.6	40.5	0.0
父亲(校正)	4.13	133	96.9	32.2	2.9	96.4 <sup>*</sup>	96.4 <sup>*</sup>	0.0
正常对照	4.07	121	93.4	29.7	3.0	97.0	0.0	0.0

注:<sup>\*</sup> 表示该数值为 HbA 合并 HbX 的含量

**2.2 Hb 电泳结果** 该家系成员的毛细管 Hb 电泳定量结果见表 1。其中,先证者 Hb 电泳检测时,毛细管电泳仪未能进行各电泳条带的自动定位和 Hb 种类的识别,见图 1A。通过正常对照样本与先证者血液样本等比例混合后可对各区带进行和定位和区分,见图 1B,结果显示在 Z10 区存在异常血红蛋白 HbX,

结合基因检测和 Hb 毛细管电泳数据库,确定该条带为 Hb Hope,据此可知先证者中 3 个电泳区带和定量分别为 Hb Hope、Hb E、HbA<sub>2</sub>,未检测到 HbA,见图 1A。先证者的父亲电泳结果也未能自动定位各电泳区带、并在两峰之间形成“倒 V 形”的空白区域,见图 1C。按分析要求对倒 V 形区域进行手动校正后

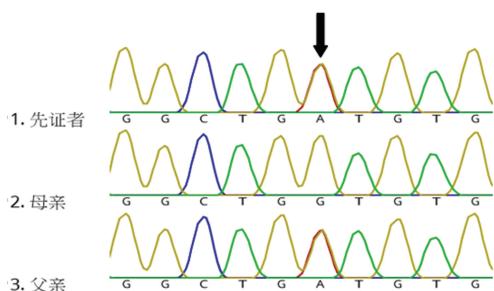
HbA<sub>2</sub>含量由4.2%降低为2.9%见图1D。利用正常样本定位后显示先证者父亲Z10区存在异常血红蛋白Hb Hope(40.5%)。先证者母亲血红蛋白电泳检出E带(24.9%)。



注: A 为先证者; B 为先证者与正常对照样本等比例混合; C 为先证者父亲; D 为先证者父亲校正后

图1 家系成员的Hb毛细管电泳图

**2.3  $\alpha$ 、 $\beta$ 珠蛋白基因突变检测** 常见 $\alpha$ 和 $\beta$ 珠蛋白生成障碍性贫血突变基因检测结果显示该先证者及其母亲为Hb E杂合子、其父亲未检测到常见珠蛋白生成障碍性贫血基因突变类型。珠蛋白基因测序结果见图2。该家系中先证者及其父亲存在Hb Hope( $\beta$ 珠蛋白基因136位密码子:GGT>GAT, HGVS命名法:HBB:c. 410G>A)杂合突变;该家系中3人均未检出 $\alpha$ 基因突变。结果表明该先证者的基因型为Hb E复合Hb Hope双重突变杂合子,其父亲为Hb Hope杂合子,其母亲为Hb E杂合子,先证者的两个突变分别来自其父母。



注:箭头表示突变位点,先证者母亲在该位点未检出该突变

图2 家系成员Sanger DNA测序部分结果图

### 3 讨 论

本研究中先证者确诊为Hb E复合Hb Hope的双重杂合子,其中Hb E病是由于 $\beta$ 珠蛋白基因第26位谷氨酸碱基替代突变为赖氨酸(HGVS命名法:

HBB:c. 79G>A),所导致的轻型 $\beta$ 珠蛋白生成障碍性贫血类型。Hb E是东南亚地区最常见的 $\beta$ 珠蛋白基因突变类型,在云南异常Hb分布中也居于首位<sup>[9]</sup>。Hb Hope突变是由于 $\beta$ 珠蛋白肽链第136位密码子发生碱基替代突变(GGT>GAT),编码的甘氨酸被天冬氨酸取代所导致<sup>[10]</sup>。这一突变在泰国人群中较为常见,中国人群中对这一突变的报道较少<sup>[11]</sup>。Hb E/Hb Hope复合突变杂合子在泰国人群中有较多报道<sup>[12]</sup>,本研究证实了该复合突变类型在中国人群中的存在,并对该家系的血液学特点进行了分析,旨在进一步明确复合突变的异常血红蛋白病的实验室诊断特点,避免误诊和漏诊。

本研究中先证者血常规结果呈明显的小细胞低色素、HbA<sub>2</sub>含量>3.5%,这与Hb E轻型 $\beta$ 珠蛋白生成障碍性贫血特点相似,提示Hb E复合Hb Hope时,血液学特征以Hb E的表现为主,这一研究结果与国外的报道一致<sup>[8]</sup>。而其父亲Hb电泳定量时,Hb Hope(Z10带)与HbA两个区带之间形成了倒“V”形的空白区域(图1C),国外已有多个研究报道表明,由于毛细管电泳仪自动定量时未能将这一空白区域计算入Hb总量中,因此可导致HbA<sub>2</sub>呈现假性升高,需人工调整基线和校正,才能得到准确的HbA<sub>2</sub>含量<sup>[13-14]</sup>。本研究中先证者父亲校正前HbA<sub>2</sub>含量为4.2%,而校正后为2.9%,如果不进行校正的话,则易将单纯的Hb Hope杂合子误诊为 $\beta$ 珠蛋白生成障碍性贫血,从而产生误诊。有研究报道利用高效液相色谱技术(HPLC)能够将Hb Hope与HbA完全分离,从而得到准确的HbA<sub>2</sub>含量<sup>[13]</sup>,因此,在进行复杂异常血红蛋白病,尤其是复合突变型个体的Hb鉴定中,采用不同的Hb电泳方法和组合将有助于异常电泳区带的区分和鉴定。

该家系中,Hb E/Hb Hope的先证者呈现出与父亲Hb Hope杂合子和母亲Hb E杂合子不同的电泳特征,表现为异常血红蛋白Hb Hope含量升高及HbA的缺乏。既往研究显示临床Hb电泳检验中,Hb Hope杂合子通常产生含量为40%~50%的异常Hb<sup>[15]</sup>,本研究中先证者Hb Hope异常条带的含量高达70.0%,显著高于单纯的Hb Hope杂合子(其父亲Hb Hope的含量为40.5%),这与国外报道的Hb E复合Hb Hope的电泳特点相似<sup>[11]</sup>,表明同处于 $\beta$ 肽链的Hb Hope与Hb E相互作用时会显著影响异常血红蛋白Hb Hope的含量,提示异常Hb复合突变会导致不同异常Hb组分的含量改变。本研究中Hb E复合Hb Hope另一个显著的Hb电泳特点是会导致HbA缺乏,这是由于人体中的HbA是由于正常的两条 $\alpha$ 链和两条 $\beta$ 链形成的四聚体蛋白质( $\alpha_2\beta_2$ )<sup>[16]</sup>,而该先证者的两条 $\beta$ 链中一条来源于父亲 $\beta^{\text{Hope}}$ ,一条来源于母亲 $\beta^{\text{E}}$ ,两条链均发生了不同形式的杂合突变,

因此不能形成正常的 HbA，类似的现象在 Hb E 合并其他  $\beta$  链突变的个体中也有报道，例如 Hb E 合并 Hb Rush 也可导致 HbA 区带消失<sup>[5]</sup>。由于当样本中缺少 HbA 或 HbA<sub>2</sub> 时，临床检测中常用的 CAPILLARYS 毛细管电泳仪无法对各组分进行自动定位，难以鉴定异常电泳区带，利用正常样本和异常样本的混合有助于进行定位。而先证者父亲电泳结果同样出现定位区带的消失，这是因为 Hb Hope 与 HbA 迁移时间相似，出峰时间有部分重叠，因此该仪器无法自动识别 HbA，故同样出现电泳定位区带消失的情况。

#### 4 结 论

本研究报道了 Hb E 复合 Hb Hope 家系的血液学特征，结果显示不同的异常 Hb 突变类型共存时可能存在相互作用，从而使复合突变的异常血红蛋白病可能呈现出与单独杂合突变显著不同的血液学电泳表型。利用毛细管电泳技术筛查遗传性血红蛋白病时可能存在复合异常 Hb 难以鉴别、异常 Hb 组分的定量误差需要校正等特殊情况，因此还需要结合基因分析，并进一步揭示基因型和表型的关联性和机制，为疾病诊治、预后和遗传咨询提供可靠的检验数据，避免漏诊和误诊。

#### 参考文献

- [1] 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.
- [2] COTTON F, WOFF F, GULBIS B. Automated capillary electrophoresis in the screening for hemoglobinopathies[J]. Methods Mol Biol, 2013, 984(1): 227-235.
- [3] 李育敏, 张水兰, 阎丽娟, 等. 深圳地区异常血红蛋白病的分子特征与表型分析[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(11): 873-875.
- [4] LIN M, WEN Y F, WU J R, et al. Hemoglobinopathy: molecular epidemiological characteristics and health effects on Hakka People in the Meizhou region, southern China[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55024.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] GALLIVAN M V, LAPUZ C, OU C N. Interference of hemoglobin Hope on beta-thalassemia: diagnosis by the capillary electrophoresis method[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 137(3): 499-500.
- [8] INGLE J, ADEWOYE A, DEWAN R, et al. Hb hope[ $\beta$ 136(H14)gly → asp (GGT → GAT)]: interactions with Hb S[ $\beta$ 6(a3)glu → Val(GAG → GTG)], other variant hemoglobins and thalassemia[J]. Hemoglobin, 2004, 28(4): 277-285.
- [9] 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.
- [10] DELACOUR H, KONOPACKI J, PLANTAMURA J, et al. Hb hope[ $\beta$ 136gly → asp] and Hb gra-dy[ $\alpha$ 119\_120insGluPheThr] compound heterozygosity in a mauritanian patient[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(2): 35-36.
- [11] PANYASAI S, FUCHAROEN G, FUCHAROEN S. Hemoglobin variants in northern Thailand: prevalence, heterogeneity and molecular characteristics[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2016, 20(1): 37-43.
- [12] CHUNPANICH S, FUCHAROEN S, SANCH AISURIYA K, et al. Molecular and hematological characterization of hemoglobin Hope/hemoglobin E and hemoglobin Hope/alpha-thalassemia 2 in Thai patients[J]. Lab Hematol, 2004, 10(4): 215-220.
- [13] PANYASAI S, SUKUNTHAMALA K, JAIPING K, et al. Interference of hemoglobin hope on  $\beta$ -Thalassemia diagnosis by the capillary electrophoresis method[J]. Am J Clin Pathol, 2011, 136(1): 14-18.
- [14] KEREN D F, SAMPLE L R. Accounting for artificially elevated HbA(2) in cases of Hb hope when measured by capillary electrophoresis[J]. Am J Clin Pathol, 2011, 136(6): 996-997.
- [15] PORNPRASERT S, PANYASAI S, KONGTHAI K. Comparison of capillary electrophoregram among heterozygous Hb Hope, Hb Hope/alpha-thalassemia-1 SEA type deletion and Hb Hope/beta(0)-thalassemia[J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(9): 1625-1629.
- [16] TAHER A T, WEATHERALL D J, CAPPELLINI M D. Thalassaemia[J]. Lancet, 2018, 391(10116): 155-167.

(收稿日期: 2019-02-25 修回日期: 2019-06-18)

(上接第 2351 页)

- [18] 邓国军, 黎明泳, 蒙象沛, 等. 腹腔镜与开腹手术治疗胃癌术后对免疫细胞水平和凝血功能的影响[J]. 上海医药, 2016, 37(15): 33-36.
- [19] 罗晓琴, 张檀, 刘庆, 等. 围手术期保温对胃癌手术患者凝血功能和应激指标的影响研究[J]. 癌症进展, 2016, 14(7): 681-683.

- [20] 段雪辉, 吴伟东, 谭燕萌, 等. 血浆 TAFI 和 TAT 水平与胃癌的关系[J]. 肿瘤, 2016, 36(2): 215-219.
- [21] 马伟达, 王树生, 金正贤, 等. 老年胃癌患者凝血指标、血小板计数变化与肿瘤侵犯深度、分期及淋巴结、血行转移的关系[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(21): 6022-6023.

(收稿日期: 2019-02-24 修回日期: 2019-06-19)