

# 琼脂糖凝胶电泳筛查珠蛋白生成障碍性贫血 20 041 例分析

李东明 韦媛 玉晋武 何升 张强 唐燕青 陈秋莉 郑陈光

**【摘要】** 目的 评价琼脂糖凝胶电泳在珠蛋白生成障碍性贫血筛查与诊断中的价值。方法 采用琼脂糖凝胶电泳对 20 041 例标本进行血红蛋白分析, PCR 结合琼脂糖凝胶电泳和反向点杂交技术对 3772 例标本进行  $\alpha$ -或  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因检测, ROC 曲线  $HbA_2$  和 Hb Bart's 的筛查截断值。结果 20 041 例标本中检出珠蛋白生成障碍性贫血和血红蛋白病共 2740 例 (13.7%)。经基因诊断  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血重型 8 例、中间型 28 例和轻型 1594 例, 以 CD41-42、CD17、-28、IVS-II-654、CD26、CD71-72 和 IVS-I-1 及其复合最为常见, 占 97.6%。以  $HbA_2 > 3.8$  筛查轻型  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血的灵敏度和特异性为 96.3% 和 98.7%。电泳筛查 HbH 病和 HbCS 的准确性为 100%, 可筛出罕见型 HbH 病。以  $Hb\ Bart's > 12.0\%$  和  $> 60.9\%$  筛查重型和中间型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血的灵敏度均为 100%, 特异性为 100% 和 96.8%。结论 本地区珠蛋白生成障碍性贫血发生率较高, 琼脂糖凝胶电泳能有效的筛出  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血, 筛查 HbH 病和 HbCS 的准确性较好; 能有效地检出中间型、重型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血。

**【关键词】** 电泳, 琼脂凝胶;  $\beta$  地中海贫血;  $\alpha$  地中海贫血; 筛查

**Analysis on 20 041 cases screen of thalassaemia using agarose electrophoresis** LI Dong-ming, WEI Yuan, YU Jin-wu, HE Sheng, ZHANG Qiang, TANG Yan-qing, CHEN Qiu-li, ZHENG Chen-guang. Department of Genetic Metabolism, Obstetrics and Gynecology Hospital, Maternal and Children Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530003, China

Corresponding author: ZHENG Chen-guang, Email: jy20070718@126.com

**【Abstract】** **Objective** To evaluate the application of agarose electrophoresis in screen of thalassemia(thal). **Methods** Agarose electrophoresis was used to perform hemoglobin(Hb) electrophoresis for 20 041 cases. DNA analysis of 3772 samples were further examined by PCR combined with Agarose electrophoresis and reverse dot blot. **Results** Among 20 041 cases, there were 2740 cases detected as thal or abnormal hemoglobin disease. The rate was 13.7%. By NDA analysis, 8 were homozygous of  $\beta$ -thal, 28 were double heterozygote of  $\beta$ -thal, and 1594 were heterozygote of  $\beta$ -thal. The main gene types were CD41-42, CD17, -28, IVS-II-654, CD26, CD71-72, IVS-I-1 and the Composite genotype of them, and which accounted for 97.6%. To diagnose heterozygote of  $\beta$ -thal by  $HbA_2$  above 3.8%, the sensitivity and specificity were 96.3% and 98.7%.The accuracy of screening HbH disease and HbCS was 100%. Meanwhile, rarely HbH disease also can be found. The optimal cutoff values of Hb Bart's for screening of  $\alpha$ -thalassemia intermit and major were 12.0% and 60.9%, and the sensitivity of them was also 100%, and the specificity of each were 100% and 96.8%, respectively. **Conclusions** The population in Guangxi are at high risk of thalassemia. Agarose electrophoresis is an effective screening method for  $\beta$ -thal, and it was exact to screen HbH disease and HbCS. women carrying a fetus with Hb Bart's hydrops fetalis syndrome is easy to be found by analysis cord blood.

**【Key words】** Electrophoresis, agar gel; beta-Thalassemia; alpha-Thalassemia; Screening

珠蛋白生成障碍性贫血是广西最常见血液遗传病, 人群中  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血、 $\beta$ -珠蛋白生成

障碍性贫血和血红蛋白病均有较高的发生率, 分别为 7.80%~17.51%, 6.43%~7.53%, 0.38%~0.52%<sup>[1-3]</sup>, 这可能导致重型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血 (Hb Bart's 症)、中间型或重型- $\beta$  珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生。因此, 为避免该类患儿的出生或尽早发现该类患儿, 在人群中进行筛查, 对高危人群进行基因诊断, 对高危妊娠进行产前诊断, 这些已经在本地

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.23.071

基金项目: 广西重点课题 (2012020); 国家自然科学基金 (81260093)

作者单位: 530003 南宁, 广西壮族自治区妇产医院 妇幼保健院遗传代谢中心实验室

通讯作者: 郑陈光, Email: jy20070718@126.com

区广泛的实施。本研究采用琼脂糖凝胶电泳对 20 041 例就诊人群进行珠蛋白生成障碍性贫血筛查，并对筛查阳性者进行基因诊断，现报道如下。

### 资料与方法

#### 一、对象

2010年6月至2013年5月，在广西壮族自治区妇产医院、妇幼保健院就诊及住院的患者 17 513 例，男 7220 例，年龄 1 d 至 60 岁，女 10 293 例，年龄 1 d 至 77 岁。另有因珠蛋白生成障碍性贫血、唐氏综合征高风险和高龄等进行产前诊断的孕妇 2528 例，年龄 16~46 岁，孕 18~36 周。

#### 二、方法

1. 血红蛋白分析：取静脉血 2 ml 于枸橼酸钠抗凝管，或在超声引导下经腹行脐静脉穿刺术取脐血 2~3 ml 分别置于 EDTA-K<sub>2</sub> 和枸橼酸钠抗凝的 2 个试管。血红蛋白电泳采用法国 Sbei 公司 HYDRASYS 电泳仪及配套试剂，HbA<sub>2</sub>>3.5% 或 HbF>4.0% 为 β 地贫表型阳性，HbA<sub>2</sub>>10% 疑为 HbE 病，出现 HbH、HbCS 及 HbBart's 等为 α 地贫表型阳性。

2. 珠蛋白基因诊断：采用 Gap-PCR 增结合琼脂糖凝胶电泳进行 α-珠蛋白生成障碍性贫血缺失型基因：--<sup>SEA</sup>、-α<sup>3.7</sup> 及 -α<sup>4.2</sup> 检测，罕见 α-珠蛋白生成障碍性贫血泰国缺失型--<sup>Thai</sup> 采用 Gap-PCR 结合琼脂糖凝胶电泳检测，引物由上海捷瑞公司合成，序列为 F：5'-CACGAGTAAACATCAAGTACCCACCC-3'；R：5'-TGGATCTGCACCTCTGGGTAGGTTCTGTACC-3'，扩增条件为：95℃ 预变性 10 min 后进入 35 个循环扩增，每个循环包括 98℃ 变性 45 s，62℃ 杂交 1 min 30 s，72℃ 延伸 3 min，循环结束后 72℃ 延伸 5 min；采用单管多重 PCR 结合反向点杂交技术检测 3 种 α-珠蛋白生成障碍性贫血突变型基因 α<sup>CS</sup>α、α<sup>WS</sup>α 及 α<sup>QS</sup>α 和 17 种中国人常见 β-珠蛋白基因突变，试剂盒购于深圳亚能生物公司，按试剂盒说明书进行操作、质量控制及结果判断。

#### 三、统计学方法

数据采用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，SPSS 17.0 软件处理，ROC 曲线确定 HbA<sub>2</sub>、Hb Bart's 截断值。

### 结 果

1. 筛查情况：17 513 例外周血中，检出 β-珠蛋白生成障碍性贫血表型 1784 例 (10.2%)，α-珠蛋白生成障碍性贫血表型 272 例 (1.6%)，异常血红蛋白病 163 例 (0.9%)，异常检出率为 12.7% (2219/17 513)；2528 例脐血中，检出 α-珠蛋白生成障碍性贫血表型 521

例 (20.6%)，总异常检出率为 13.7% (2740/20 041)，具体结果见表 1。

2. β-珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断：1753 例外周血进行 β-珠蛋白基因检测，检出 β-珠蛋白生成障碍性贫血重型 8 例、中间型 28 例和轻型 1594 例。其基因型以 CD41-42、CD17、-28、IVS-II-654、CD26、CD71-72 和 IVS-I-1 及其复合最为常见，占 97.6%。以 HbA<sub>2</sub>>3.8% 为临界值筛查轻型 β-珠蛋白生成障碍性贫血的灵敏度和特异性为 96.3% 和 98.7%；中间型、重型 β-珠蛋白生成障碍性贫血 HbF 含量在不同个体间差异较大，HbA<sub>2</sub> 含量表现为降低、正常或升高，见表 2。

表 1 筛查阳性标本血红蛋白含量

参数	检出数	%， $\bar{x} \pm s$ (范围)
HbH(>0%) <sup>a</sup>	107	7.0±5.9(0.3~23.3)
HbCS(>0%)	184	0.9±0.5(0.2~3.2)
Hb Bart's(>0%) <sup>b</sup>	524	14.5±21.3(0.3~88.4)
HbA <sub>2</sub> (>3.5%)	1679	5.61±0.51(3.6~7.7)
HbF(>4.0%) <sup>c</sup>	226	13.9±20.0(4.1~93.8)
HbA <sub>2</sub> (>10%)	96	27.0±8.9(13.4~74.2)
HbJ	12	25.6±9.9(11.4~44.8)
HbG	19	26.5±14.3(14~83.1)
HbK	27	39.3±8.6(16~47.5)
HbD	9	18.3±4.8(15.1~28)

注：<sup>a</sup>复合 HbCS 22 例，<sup>b</sup>包括外周血 3 例，<sup>c</sup>合并 HbA<sub>2</sub> 升高 121 例

表 2 1630 例 β-珠蛋白生成障碍性贫血基因型及其 HbA<sub>2</sub> 和 HbF(%)

基因类型	例数	HbA <sub>2</sub>	HbF
CD41-42/CD41-42	6	2.8±1.57(1.4~5.8)	62.8±34.2(19.7~97.6)
CD17/CD17	2	2.9±0.1(2.8,2.9)	90.45±3.3(88.1,92.8)
CD41-42/CD17	6	2.4±0.6(1.6~3.2)	72.5±21.1(36.3~92.8)
CD17/CD26	5	53.9±5.6(47.3~59.4)	39.2±13.0(25.1~50.1)
CD41-42/IVS-II-654	4	2.1±1.5(0.7~4)	60.1±24.0(31.5~83.2)
IVS-II-654/CD17	4	1.6±0.9(0.8~2.5)	94.8±4.0(90.6~98.2)
CD41-42/-28	2	4.4±1.1(3.6,5.2)	59.7±30.7(81.4,38.0)
CD17/-28	2	2.8±0.4(2.5, 3.1)	80.0±4.2(76.6, 83.4)
CD41-42/CD26	1	37.2	60.7
CD41-42/CD43	1	2.5	62.9
IVS-I-1/CD17	1	5.8	92.5
CD71-72/CD17	1	1.6	36.6
CD17/-29	1	2.9	46.1
CD41-42	678	5.0±1.0(3.4~7.5)	1.8±7.2(0~18.3)
CD17	457	5.2±1.3(3.9~7.6)	2.1±8.2(0~10.1)
-28	113	5.1±1.5(2.8~7.6)	1.0±1.6(0~5.8)
IVS-II-654	92	4.6±0.7(3.3~6.7)	1.6±3.1(0~16.9)
CD26	80	26.7±4.0(11.6~32.2)	1.2±2.6(0~10.5)
CD71-72	78	5.2±1.0(4.0~7.5)	1.3±3.0(0~17.8)
IVS-I-1	59	5.1±1.0(3.8~7.2)	1.2±1.8(0~5.7)
-29	11	4.7±1.0(3.6~6.4)	2.5±1.4(0~3.4)
CD43	20	5.0±1.1(3.6~7.2)	0.7±0.6(0~4.7)
CD27-28	4	5.3±1.1(4.7~7.2)	1.0±1.1(0~2.2)
CD14-15	2	6±0.1(5.9, 6.1)	1.1±0.5(0.7, 1.4)

注：部分数据用  $\bar{x} \pm s$  (范围) 表示

3.  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血诊断: 筛查阳性的 258 例外周血中均检出  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因, 包括例 147 例  $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$ , 4 例  $\alpha^{CS}\alpha/\alpha^{CS}\alpha$ , 其 HbCS 含量分别为  $(0.7\pm 0.3)\%$  和  $(2.4\pm 0.8)\%$ ; 1 例  $--^{SEA}/\alpha^{OS}\alpha$ , 24 例  $--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$ , 27 例  $--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$ , 53 例  $--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$ , 1 例  $--^{Thai}/-\alpha^{3.7}$ , 1 例  $--^{Thai}/\alpha^{CS}\alpha$ , 其 HbA<sub>2</sub> 含量均明显降低为  $(1.6\pm 0.4)\%$ 。1761 例脐血中检出  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血 572 例, 见表 3, 电泳筛查灵敏度和特异性为 93.9% 和 98.7%。以 Hb Bart's  $>60.9\%$  和  $>12.0\%$  为截断值, 电泳筛查重型和中间型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血的灵敏度均为 100%, 特异性为 100% 和 96.8%。

表 3 572 例  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因型及其 Hb Bart's 含量

基因型	例数	Hb Bart's
$--^{SEA}/--^{SEA}$	58	80.2±2.1(71.3~88.4)
$--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$	31	23.8±4.8(20.9~28.8)
$--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$	14	23.8±3.2(20.5~27.1)
$--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$	14	24.8±7.4(14.4~34.6)
$--^{SEA}/\alpha^{OS}\alpha$	2	28.4±5.8(21.8,32.6)
$--^{SEA}/\alpha^{WS}\alpha$	15	15.5±2.3(12.9~19.4)
$--^{SEA}/\alpha\alpha$	196	8.6±1.9(5.5~30.5)
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	2	8.6±0.2(8.4, 8.7)
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	1	7.6
$-\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}\alpha$	1	9.3
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	50	2.8±1.9(0~5.9)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	95	2.6±1.5(0~5.6)
$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	49	4.0±2.8(0.3~9.3)
$\alpha^{OS}\alpha/\alpha\alpha$	3	4.6±0.5(4.1~5.1)
$\alpha^{WS}\alpha/\alpha\alpha$	41	1.9±3.7(0~4.7)

注: 部分数据用均数(范围)表示

### 讨论

胎儿水肿综合征是广西地区主要出生缺陷之一, Hb Bart's 症新生儿不能存活, 且孕妇可能发生子癲前期、难产或产后出血等并发症; 而中间型、重型  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血患儿缺少有效的治疗方法, 绝大多数依靠输血维持生命, 这给家庭带来沉重的负担<sup>[4-5]</sup>。产前干预是预防该类患儿出生的有效方法, 而产前筛查和出生后筛查也显得尤为重要, 其是对高风险夫妇进行产前诊断的基础, 也是珠蛋白生成障碍性贫血的临床诊治的依据。本研究采用琼脂糖凝胶电泳对 20 041 例标本进行检测, 共检出珠蛋白生成障碍性贫血表型和异常血红蛋白共 2740 例, 检出率为 13.7%。高于中山<sup>[6]</sup>地区的 10.36%, 远低于南宁地区的<sup>[7]</sup>22.43%, 这表明本地区珠蛋白生成障碍性贫血的发生较高, 且在不同人群中的检出差异较大。

流行病学调查<sup>[8]</sup>显示本地区  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血的发生率较高, 中间型和重型患儿在贫血患儿中占的比例很高。本研究对 17 513 例人群外周血进行  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血筛查, 阳性检出率为 10.19%, 高于索明环等<sup>[6]</sup>报道的 8.20%, 远低于田玉玲等<sup>[7]</sup>报道的 23.78%, 这可能与选择的研究对象和检测方法等不同有关。经基因分析确诊  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血 1630 例, 以 CD41-42、CD17、-28、IVS-II-654、CD71-72 和 IVS-I-1 及其复合型最为常见, 占 97.61%。其中检出中间型和重型  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血共 36 例, 这表明在本地区育龄人群中加强  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血的产前筛查与诊断是非常必要的。中间型和重型  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血表现为 HbF 升高为 19.7%~98.2%, HbA<sub>2</sub> 含量表现为降低、正常或升高; 而轻型  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血有 96.3% 的表现为 HbA<sub>2</sub> 升高 (3.9%~7.6%), HbE 病与其复合的珠蛋白生成障碍性贫血基因不同其 HbA<sub>2</sub> 的水平差异较大为 11.6%~59.4%, 结果显示琼脂糖凝胶电泳可有效地筛出  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血和 HbE 病等。

$\alpha$ -珠蛋白基因缺失或突变可导致珠蛋白肽链合成减少或异常, 非  $\alpha$ -链可形成 Hb Bart's 和 HbH 或导致 HbCS 等异常血红蛋白的形成, 通过电泳区带分析可有效地诊断该类血红蛋白异常性疾病。本研究对 2528 例脐血采用琼脂糖凝胶电泳进行血红蛋白分析, 其中 1761 例经基因分析确诊  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血 572 例, 其筛查灵敏度和特异性为 93.9% 和 98.7%。以 Hb Bart's  $>60.9\%$  筛查重型  $\alpha$  珠蛋白生成障碍性贫血具有较高的价值, 其灵敏度和特异性均为 100%, 与田矛等<sup>[9]</sup>报道一致。而筛查其他类型的  $\alpha$  珠蛋白生成障碍性贫血有不同程度的漏诊或误诊, 这些类型  $\alpha$  珠蛋白生成障碍性贫血的最终确诊必须依靠基因分析。琼脂糖凝胶电泳筛查 HbH 病和 HbCS 均有较高的特异性为 100%, 而其检出率却明显低于毛细管电泳<sup>[10]</sup>, 但两种方法均不能检出 HbH-WS 病, 与 Yin 等<sup>[11]</sup>报道一致, 这表明该方法对 HbH 病和 HbCS 的筛查存在一定的漏诊, 值得注意的是本研究中 2 例外周血中检出 HbH 区带, 而常规  $\alpha$ -珠蛋白基因检测为  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  和  $\alpha^{CS}/\alpha^{CS}\alpha$ , 最后诊断为泰国缺失型 HbH 病; 1 例脐带血 Hb Bart's 含量为 30.5%, 而基因分析为  $--^{SEA}/\alpha\alpha$ , 不排除其他类型罕见 HbH 病。

综上, 本地区珠蛋白生成障碍性贫血的发生率较高, 采用琼脂糖凝胶电泳能有效的检出所有中间型、重型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血和绝大多数  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血; 而对其他类型的  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血存在漏诊, 因此, 临床应根据各项检测结果结合

临床表现进行综合分析。

### 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. *Clin Genet*, 2010, 78: 139-148.
- [2] 吕福通, 谢丹尼, 陈美佳, 等. 地中海贫血干预的跟踪随访工作探讨. *中国计划生育学杂志*, 2009, 17: 308-308.
- [3] 李东明, 玉晋武, 韦媛, 等. 高效液相色谱分析在 HbE 筛查中的应用价值. *检验医学与临床*, 2013, 10: 1808-1809, 1811.
- [4] Yang Y, Li DZ. A survey of pregnancies with Hb Bart's disease in Mainland China. *Hemoglobin*, 2009, 33: 132-136.
- [5] Yin XL, Wu ZK, He YY, et al. Treatment and complications of thalassemia major in Guangxi, Southern China. *Pediatr Blood Cancer*, 2011, 57: 1174-1178.
- [6] 索明环, 温冬梅, 张秀明, 等. 全自动毛细管电泳检测 11 519 例血红蛋白的结果分析. *检验医学与临床*, 2013, 10: 913-914.
- [7] 田玉玲, 雷力民. 983 例血红蛋白电泳检测结果的分析及临床意义. *检验医学与临床*, 2013, 10: 319-320.
- [8] Pan HF, Long GF, Li Q, et al. Current status of thalassemia in minority populations in Guangxi, China. *Clin Genet*, 2007, 71: 419-426.
- [9] 田矛, 覃婷, 张继红, 等. 脐血血红蛋白电泳在产前诊断中的价值. *广西医学*, 2013, 35: 1174-1175.
- [10] Liao C, Zhou JY, Xie XM, et al. Screening for Hb Constant Spring in the Guangdong Province, SouthChina, using the Sebia capillary electrophoresis system. *Hemoglobin*. 2011, 35: 87-90.
- [11] Yin XL, Zhang XH, Zhou TH, et al. Hemoglobin H Disease in Guangxi Province, Southern China: Clinical Review of 357 Patient. *Acta Haematol*, 2010, 124: 86-91.

(收稿日期: 2013-10-17)

(本文编辑: 戚红丹)

李东明, 韦媛, 玉晋武, 等. 琼脂糖凝胶电泳筛查珠蛋白生成障碍性贫血 20 041 例分析[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(23): 10700-10703.

