

溶血病因系统分析在遗传性溶血性贫血诊断和鉴别诊断中的应用

李津婴 顾海慧 郑素娟 查占山 花美仙 蒋瑾瑾
蔡斌 周霖 贾音 方超平 钱宝华

【摘要】 目的 探讨溶血病因系统分析策略在遗传性溶血性贫血病因诊断和鉴别诊断中的应用。方法 以溶血病因系统分析方法对疑似溶血性贫血的1 506例患者进行分析。结果 ①1 506例疑似溶血性贫血患者中,男799例,女707例,中位年龄22岁(4 d~86岁)。涉及三大遗传性溶血病因的患者共1 413例(94%),其中单一病因溶血1 044例(74%),复合型溶血369例(26%)。②在涉及三大遗传性溶血病因的患者中,单一病因血红蛋白病、红细胞膜病及红细胞酶病分别为235例(22%)、656例(63%)及153例(15%)。单一溶血病因与复合溶血病因合并统计,涉及血红蛋白病、红细胞膜病及红细胞酶病分别为489例(29%)、948例(57%)及239例(14%)。上述两种基数统计的三大遗传性溶血病因构成比差异均无统计学意义(P 值均 >0.05)。③369例(26%)复合型溶血中,不同类型遗传缺陷以血红蛋白病合并红细胞膜病最常见(50%,184/369),亦见于红细胞酶病合并红细胞膜病(18%,66/369),血红蛋白病合并红细胞酶病(4%,13/369)。相同类型遗传缺陷复合型血红蛋白病、复合型膜病、复合型酶病分别为29例(8%)、57例(15%)、9例(2%)。其他复合型溶血、贫血、黄疸占3%(11例),见于合并后天因素、继发因素及其他系统异常。结论 三大遗传性溶血病因同期检查能对94%的患者进行分类,常见的遗传性溶血病因依次为红细胞膜病、血红蛋白病和红细胞酶病。复合型溶血并非少见,仅单一因素分析不足以提供充分确诊依据。

【关键词】 贫血,溶血性,先天性; 系统分析

基金项目:国家自然科学基金(31070734、81570185、81400152);上海市科委基础研究重点项目(09JC1400100)

Application of systematic etiological analysis in final and differential diagnosis of hereditary hemolytic anemia Li Jinying, Gu Haihui, Zheng Sujuan, Zha Zhanshan, Hua Meixian, Jiang Qinqin, Cai Bin, Zhou Lin, Jia Yin, Fang Chaoping, Qian Baohua. Department of Transfusion Medicine, Changhai Hospital, PLA Research and Innovation Base of Pediatric Hemolytic Anemia, Shanghai 200433, China
Corresponding author: Qian Baohua, Email: qianbh1963@163.com

【Abstract】 **Objective** Study on the application of the systematic analysis strategies of etiology in final and differential diagnosis of hereditary hemolytic anemia (HHA). **Methods** Analysis of 1 506 patients with suspected hemolytic anemia (HA) in systematic hemolytic etiological analysis. **Results** ①1 413 (94%) of the total 1 506 patients [male 799, female 707, median age 22-year-old (4 days to 86-year-old)] were caused by membranopathy, hemoglobinopathy and enzymopathy, documented the three major causes of HHA. 369 cases (26%) of the 1 413 patients showed complex type of HA, which had the coexistence of two or more hereditary defects concerning HA in red cells, the other 1 044 cases (74%) were HA with single hemolytic cause. ②In 1 044 cases of single HA, hemoglobinopathy, membranopathy and enzymopathy was 22%, 63% and 15%, respectively. When single HA plus complex HA, the hemoglobinopathy, membranopathy and enzymopathy was 29%, 57% and 14% respectively. The difference was not statistically significant ($P>0.05$). ③The most common double heterozygosis with different genetic defects was hemoglobinopathy complicated with membranopathy (50%, 184/369). The complex HA was also found in patients with the enzymopathy complicated with membranopathy (18%, 66/369) and

with hemoglobinopathy (4%, 13/369). Some of complex HA patients had the same kinds of genetic defects which means double hemoglobinopathies (29 cases, 8%), membranopathies (57 cases, 15%) and enzymopathies (9 cases, 2%). Other kinds (11 cases, 3%) of complex HA, anemia and jaundice were seen in HAA patients accompanied with acquired and secondary defects or other system abnormalities.

Conclusion The parallel etiologic examination of three major genetic hemolytic diseases can be 94% of patients for classification. The results showed that the first cause of HAA was membranopathy, second hemoglobinopathy and then enzymopathy. Complex hemolysis is not uncommon and single factor analysis alone is not enough to provide scientific basis for diagnosis.

【Key words】 Anemia, hemolytic, congenital; Systematic analysis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (31070734, 81570185, 81400152); Key Project of Basic Research of Shanghai Science and Technology Committee (09JC1400100)

遗传性溶血性贫血的病因复杂多样,不同溶血病因的贫血患者常具有相同或相似的临床症状。溶血指征(红细胞寿命缩短、破坏增多、代偿增生)可以方便地判断是否存在溶血,但是溶血病因的判断需要针对不同病因的特殊试验逐步排查。然而,试验的敏感性常受到输血、高网织红细胞计数、多重遗传缺陷等因素干扰,加之试验本身的局限性,易影响溶血病因的诊断而造成漏诊或误诊,进而影响治疗选择。本文旨在探讨遗传性溶血疾病系统分析策略在溶血病因诊断及鉴别诊断中的作用。

病例与方法

一、病例

以 2012 年 1 月至 2015 年 2 月 1 506 例疑诊溶血性贫血患者为研究对象,其中男 799 例,女 707 例,中位年龄 22 岁(4 d~86 岁)。本研究获得我院伦理委员会批准。

二、溶血病因系统分析方法

根据临床表型、溶血指征、溶血场所、溶血初筛试验和血常规参数提示,选择针对遗传性溶血病因的专项检查,同时排查后天获得性、继发性等非遗传性溶血病因,排查非溶血性黄疸、贫血、脾大病因,对疑难病例同期进行三大遗传溶血病因(血红蛋白病、红细胞膜病和红细胞酶病)检查,并行家系调查,仍不能确诊者进行基因检测;综合上述试验结果并结合患者病史资料,参照文献[1-2]标准确诊溶血病因。

1. 溶血初筛试验:以溶血指征、铁代谢指标、肝功能指标、免疫学指标及影像学检查等手段鉴别溶血性和非溶血性贫血。根据病史、家族史、溶血场所、临床表现等排查后天性或继发性溶血因素,如免疫性、病毒性、药物性、外源寄生物、营养性及生物物理等诱因。常用溶血筛查试验为抗人球蛋白

试验、酸化血清溶血试验、蔗糖溶血试验、流式细胞术检测外周血 CD55/CD59 等。上述结果及红细胞形态和血常规指标可作为下一步针对病因分类的诊断提示。

2. 血红蛋白病检查:地中海贫血(Th,地贫)和其他血红蛋白病诊断方法参照文献[3],以高压液相层析、血红蛋白光谱分析、热变性试验、异丙醇试验、乙酰苯肼试验、高渗结晶试验、镰变试验、Hb F 试验、血红蛋白电泳(pH8.6、pH6.5)、红细胞包涵体检查等方法进行分析。

3. 红细胞膜病检查:参照文献[4-5]方法进行检测,包括红细胞形态学检查(活体细胞相差显微镜镜检、干燥血涂片瑞氏-吉姆萨染色镜检)、红细胞膜渗透脆性检查(盐水渗透脆性试验、酸化甘油溶血试验、高渗冷溶血试验)、红细胞膜蛋白定性定量分析[SDS-PAGE、伊红-马来酰亚胺(EMA)结合法]。

4. 红细胞酶病检查:参照文献[6],采用国际血液学标准委员会(ICSH)推荐方法,通过压积红细胞三重过滤法去除白细胞、血小板,以特异底物速率法测定恒温条件下的红细胞酶的催化活性;以紫外分光光度法测定核苷酸酶代谢产物;以比色法测定还原型谷胱甘肽。

5. 其他特殊溶血试验:参照文献[6],采用荧光法排查先天性红细胞生成性卟啉症,酸富集等方法检查寄生虫病,扫描电镜和荧光标记共聚焦等方法辅助检查溶血疑难病例。

6. 基因分析:对有诊断提示的疑诊病例,采用高通量单核苷酸多态性分型(SNPscan)和高通量拷贝数检测(CNVplex)等技术,溶血相关基因富集芯片、二代高通量测序、Singer 法反正向测序等方法进行基因分析,由苏州天昊生物医药科技有限公司协助完成测定,具体操作参照文献[7]。

7. 家系分析:根据患者溶血阳性指标提示,对

病因诊断不明者进行家系验证。

三、统计学处理

采用SPSS19.0进行统计学分析,率的组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、病例资料

1 506例患者中,513例(34%)为本院首诊,995例(66%)为外院转诊。按婴儿(<1岁)、幼儿(1~6岁)、少儿(7~16岁)、青年(17~35岁)、中年(36~55岁)及老年(>55岁)6个年龄段分组,送检溶血项目的患者年龄分布情况见图1。6岁以内患儿占30%;青年组(17~35岁)比例最高,占36%(542/1 506),其中198例(37%)无贫血(HGB:男120~160 g/L;女110~150 g/L)、62例(11%)轻度贫血(HGB:男100~120 g/L;女100~110 g/L)。这些患者多因黄疸影响入学、入职、择偶,或因体检发现脾肿大、红细胞平均体积(MCV)低下、连续死胎、孕期贫血等原因而就诊。约三分之一老年组患者主诉在中青年时无贫血或轻度贫血,近期表现为明显黄疸及不同程度贫血而就诊,就诊时11%老年组患者无贫血或仅有黄疸和(或)脾肿大。

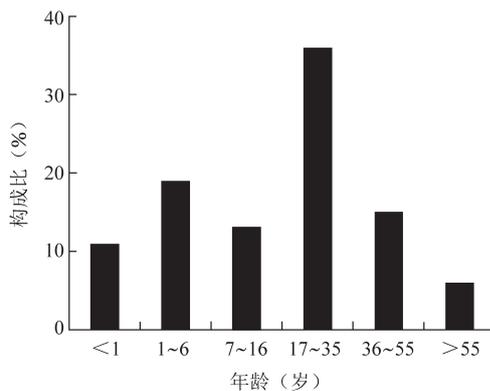


图1 1 506例疑诊溶血性贫血患者年龄分布情况

二、病因分析

(一)病种分类

在送检排查遗传性溶血病因的1 506例中,归因于三大遗传性溶血病因的患者共1 413例,占93.8%;其他原因溶血12例(0.8%);非溶血性黄疸、脾大、贫血30例(2.0%);全部溶血指标阴性30例(2.0%),为婚检孕检排查地贫者;溶血原因未明21例(1.4%),包括近期输血待复查者及无病史资料者。

(二)病因分类

1. 三大遗传性溶血病因分布:在归因于三大遗传性溶血病因的1 413例患者中,单一溶血病因患者1 044例(占74%,其中血红蛋白病占17%、红细胞膜病占46%、红细胞酶病占11%),经家系调查确诊同一患者存在两种及以上红细胞缺陷的复合型溶血369例(占26%)。以单一病因统计,血红蛋白病、红细胞膜病和红细胞酶病分别为235例(22%)、656例(63%)和153例(15%)。单一病因溶血与复合型溶血合并统计,血红蛋白病489例(29%)、红细胞膜病948例(57%)、红细胞酶病239例(14%)。上述两种基数统计方式分别以血红蛋白病与非血红蛋白病、膜病与非膜病、酶病与非酶病分组进行卡方检验, P 值分别为0.33、0.39和0.84。即无论以何种基数统计,本组患者中三大遗传性溶血病因的构成比相近,常见病因依次为红细胞膜病、血红蛋白病和红细胞酶病。

(1)血红蛋白病:涉及血红蛋白病的患者共计489例,其中单纯血红蛋白病235例,血红蛋白病合并其他溶血因素254例。489例血红蛋白病中289例(59%)为 β Th,88例(18%)为 α Th,39例(8%)其他血红蛋白病包括不稳定血红蛋白病、镰状细胞综合征、血红蛋白E病、血红蛋白C病、血红蛋白CS病、异常血红蛋白病(除HbH以外的电泳变异型)及遗传性持续性胎儿血红蛋白增高症等。尚有73例(15%)患者虽然血常规及形态学表现符合地贫(排除缺铁性贫血),但血红蛋白电泳及相关定量指标均阴性,需进一步家系和基因分析验证。

(2)红细胞膜病:涉及红细胞膜病的患者共计948例,其中单纯膜病表现656例,胞膜病杂合其他溶血因素292例。红细胞膜病中以遗传性球形红细胞增多症(HS)最为常见,占66%,其他膜病包括遗传性口形红细胞增多症(HSt)、遗传性椭圆形红细胞增多症(HE)、遗传性热异形红细胞增多症(HPP)、红细胞膜脂异常疑诊待排等。

(3)红细胞酶病:涉及红细胞酶病的患者共计239例,其中单纯酶病表现153例(64%),酶病合并其他溶血因素86例(36%)。酶病中70%为丙酮酸激酶(PK)缺乏症,其他为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)、磷酸果糖激酶(PFK)、嘧啶5'-核苷酸酶(P5'N)、谷胱甘肽还原酶(GR)、细胞色素b5还原酶(Cb5R)等缺乏症。

2. 其他溶血原因:12例其他溶血原因包括阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、免疫性溶血性贫血(AIHA)、先天性红细胞生成不良性贫血(CDA)、

Wilson病、微血管病性溶血、附红细胞体感染、卟啉病等。

3. 非溶血性的黄疸、脾大、贫血:共30例患者表现为非溶血性的黄疸、脾大、贫血,包括缺乏铁、叶酸和维生素B₁₂的营养性贫血、转铁蛋白缺乏性贫血、体质性黄疸、肝硬化引起的脾大、酒精性肝病黄疸、骨髓增生异常综合征(MDS)等。

(三)复合型溶血病因

通过对亲缘父母和祖辈的家系调查及基因分析,发现369例(25%)患者存在两种或以上红细胞缺陷,经溶血病因系统分析明确为复合型溶血。

1. 不同类型病因:最常见血红蛋白病合并红细胞膜病(占复合型溶血50%),如 α Th/HS、 α Th/HSt、 β Th/HS、 β Th/HSt、 β Th/HE。不同病因的复合溶血还见于血红蛋白病与红细胞酶病、红细胞酶病与红细胞膜病的复合缺陷,如 α Th/P5'ND、 α Th/G6PDD、 β Th/G6PDD、 β Th/PKD、HS/PKD、HS/G6PDD、HS/P5'ND、HS/Cb5RD、HE/PKD、HSt/PKD等。有2例患儿为三重病因溶血(β Th/HS/HSt),通过家系分析证实亲代一方具有两种遗传缺陷。

2. 相同类型病因:见于并存两种血红蛋白病 α Th/ β Th、 β Th/HbE;两种红细胞膜病HS/HSt、HS/HE;两种红细胞酶病PKD/G6PDD、PKD/PFKD、PKD/Cb5RD等。

3. 其他复合型溶血、贫血、黄疸:见于合并后天因素、继发因素及其他系统异常,如3例微血管病性溶血中有2例为原有基础病HS和HSt(病史、溶血参数和家系调查证实),心脏瓣膜置换术后发生机械损伤性急性溶血。溶血性疾病合并非溶血性黄疸见于先天溶血病因合并体质性黄疸。另外部分患儿存在双重贫血因素,即遗传溶血因素合并铁、叶酸、维生素B₁₂缺乏。少见双重溶血或双重贫血病例尚见于HSt/PNH、 β Th/PNH、 β Th/骨髓增殖性肿瘤(MPN)(JAK2+)、HS/系统性红斑狼疮、X连锁 α Th/精神发育迟滞(ATR-X综合征)等。

讨 论

本组三分之二病例为至少就诊3家医院仍诊断不明的外院转诊患者,其溶血初筛数据中绝大多数缺乏对红细胞形态的观察分析,而形态和血常规参数可以及早对溶血原因进行病种分类,以选择针对病因的特异试验,使患者尽早得到正确处理。例如,红细胞形态对膜病和血红蛋白病的提示、MCV对地贫的提示、红细胞平均血红蛋白浓度对HS的

提示、MCV/MCH对HSt的提示等。忽视这些溶血初筛指标,无疑将影响溶血病因诊断进程。

针对溶血病因鉴别诊断问题,我们提出对遗传性溶血疾病系统分析策略,提倡同时对遗传性溶血的三大病因(血红蛋白病、红细胞膜病、红细胞酶病)进行检查,并排查继发、合并黄疸和贫血因素,尽量避免仅做单一病因检查时可能发生的漏诊,便于溶血疑难病例的鉴别诊断。例如,红细胞深染或球形变既见于HS,也见于AIHA、PKD、HSt、寄生物感染等,因此单一因素分析常不足以提供充分确诊依据。再如,溶血危象期骨髓细胞形态学可显示MDS样改变,如果不结合病史进行溶血系统分析,可能漏诊、误诊甚至因误治而致命^[8]。复合型溶血是疑难溶血病例难以确诊的原因之一,本组病例中复合型溶血高达26%,对此必须经溶血系统分析才能明确病因,进而选择治疗方式。如G6PDD合并另一溶血因素时,鉴于中国人群大多数是血管内溶血为主的G6PDD II型或III型,因此需根据合并因素及溶血程度,慎重考虑是否选择脾切除术。

家系调查是溶血系统分析策略的重要组成部分,对双重溶血、对常染色体隐性遗传的红细胞酶病的诊断尤其重要,在基因分析中也需要家系样本进行验证。例如1例儿时诊断为HS的患者成年时复诊,EMA结合试验显示轻度低下,系统分析提示HS/PKD,家系的生化指标和该家系基因测序结果佐证诊断。在红细胞酶病合并血红蛋白病的诊断中,因红细胞膜表面积/体积比的性质相反的改变,使得溶血试验敏感性受干扰,需家系调查得以确诊^[4]。重症红细胞酶病患者可表现红细胞膜病指标部分阳性,家系调查及基因分析有助于鉴别原发或继发性红细胞膜病。常染色体隐性遗传的酶病患者常因高网织红细胞、输血等因素,酶活力在正常值下限而疑诊,家系成员杂合子可表现明显酶缺陷,因此红细胞酶病诊断应尽可能行家系调查。

溶血系统分析中还应注意排查影响诊断实验敏感性的诸多因素。①近期输血和高网织红细胞计数,对红细胞膜病和酶病检测指标的干扰明显,通常建议输血3个月后复查。②婴儿红细胞特征与婴幼儿营养状态的影响必须考虑。婴儿红细胞具有体积大、异形多、氧化还原酶催化活力低等代谢特点,是分析红细胞膜病和酶病诊断实验结果时应考虑的因素^[9-10];婴儿期 γ 珠蛋白基因的启闭特点对地贫的诊断影响明显;营养不良特别是缺乏叶酸时对红细胞膜病诊断指标影响明显。故此期做溶血

检测必须同时进行家系调查,患儿周岁后复查。③特异实验方法的局限性和实验条件选择。血样储存时间、温度、抗凝剂种类对红细胞酶病检测的影响、不同抗凝剂对红细胞渗透脆性试验的影响、以光吸收为基础原理的仪器分析的峰值饱和现象等,都是溶血试验结果分析中须排查的影响因素。即使先进的高通量二代基因测序也不能涵盖一些缺失突变、拷贝数变异。

因此,溶血病因系统分析不仅强调病因学上的鉴别诊断思路,也需要方法学上互补,如定性定量指标结合,生物化学、形态学及分子生物学方法相互印证,以期完善对遗传性溶血病因的诊断及鉴别诊断。

参考文献

[1] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[J]. 3版. 北京:科学出版社,2007: 1-92

[2] Buetler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other red cell enzyme abnormalities//Buetler E, Lichtman MA, Coller B, et al. Williams Hematology [M]. 6th ed. NewYork: McGraw-Hill Professional, 2001:527-545.

[3] 林东红. 溶血的检验. 许文荣, 王建中. 临床血液学检验[J]. 5

版. 北京:人民卫生出版社, 2012: 133-148.

[4] Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis--2011 update [J]. Br J Haematol, 2012, 156 (1):37- 49. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08921.x.

[5] Barcellini W, Bianchi P, Fermo E, et al. Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects [J]. Blood Transfus, 2011,9(3):274-277. doi: 10.2450/2011.0086-10.

[6] 李津婴. 溶血性疾病诊断实验//李津婴, 万树栋. 溶血性疾病[M]. 上海:复旦大学出版社, 2008: 267-338

[7] Pabinger S, Dander A, Fischer M, et al. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data [J]. Brief Bioinform, 2014, 15(2):256-278. doi: 10.1093/bib/bbs086.

[8] Yarali N, Duru F, Sipahi T, et al. Parvovirus B19 infection reminiscent of myelodysplastic syndrome in three children with chronic hemolytic anemia [J]. Pediatr Hematol Oncol, 2000, 17 (6):475-482.

[9] Steiner LA, Gallagher PG. Erythrocyte disorders in the perinatal period [J]. SeminPerinatol, 2007, 31(4): 254-261.

[10] Gallagher PG. Abnormalities of the erythrocyte membrane [J]. Pediatr Clin North Am, 2013, 60(6): 1349-1362. doi: 10.1016/j.pcl.2013.09.001.

(收稿日期:2015-10-23)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

关于重视引用国内文献的意见

部分作者在撰写论文时,只引用国外文献(或非中文语种的文献)。诚然,在医学的许多领域,国内的研究水平确实有待提高,有引用国外文献的必要。但是,不引用国内相关文献,将存在以下问题:①作者没有阅读国内文献,这样作者阅读的文献就不全面,作者所撰写的论文、综述等的科学性、先进性就值得商榷。②不引用国内文献,就不能准确、全面地反映国内的研究水平和进展,毕竟本刊发表的文章主要的阅读对象是中国医师。③有的作者虽然阅读了国内文献,但未引用。不引用国内文献的想法可能更为复杂,如轻视或忽略国内同行,或暗示首创权。除非是专门的国外医学文摘或国外文献综述,均应有国内文献的复习、引用和注解。本刊倡导在论文的撰写中应维护参考文献的科学性,鼓励作者在引用国外文献的同时检索并引用国内相关的文献。

本刊编辑部