

# 血常规、血清铁及血红蛋白电泳联合检测 在地中海贫血非高发地区的筛查意义

吴蓓颖 江岑 王也飞 顾燕英 林琳 蔡刚

**【摘要】** 目的 通过分析血常规、血清铁含量及血红蛋白电泳对地中海贫血(地贫)检出率的影响,寻找在地贫非高发区高效的联合检测方法。方法 抽取上海交通大学医学院附属瑞金医院门诊血液科及妇产科1 000例疑似地贫患者外周血,EDTA抗凝管及血清管。抽提全血DNA,以跨越裂口PCR(GAP-PCR)及反向斑点杂交法进行地贫常见突变基因检测;进行血常规及血红蛋白电泳检测;GAP-PCR及Sanger法测序进行稀有 $\alpha$ 及 $\beta$ 地贫基因检测;作血清铁含量测定。结果 1 000份标本经常规基因检测,诊断 $\alpha$ 地贫225例(22.5%),其中静止型28例,标准型138例及HbH病59例; $\beta$ 地贫403例(40.3%),其中 $\beta$ 地贫携带者390例, $\beta$ 双重杂合子7例以及 $\beta$ 纯合子6例; $\alpha\beta$ 复合地贫15例(1.5%);未检出常见突变的有357例。1 000例患者中红细胞平均体积(MCV)或红细胞平均血红蛋白含量(MCH)增高的有38例,无一例检出地贫基因;血清铁含量增高且MCV不增高的48例患者,42例(87.5%)检出地贫基因;血红蛋白电泳异常的38例患者中35例为HbH病,另3例为HbF含量高的其他类型地贫患者,符合率为100%。1 000例患者中,有5例患者血红蛋白电泳异常并伴有MCV及MCH降低、血清铁不低,虽常规基因检测未发现突变,经进一步测序分析,均发现稀有突变。结论 MCV及MCH不低于正常参考范围可基本排除地贫,血清铁含量高为地贫提示及分类指标,血红蛋白电泳异常提示地贫可能。此三者联合检查结果均异常而基因检测未显示异常的,建议进一步进行稀有分型的测序分析。三者联合检测可提高非地贫患者的排除率及地贫患者的检出率。

**【关键词】** 地中海贫血; 血常规; 血清铁; 血红蛋白电泳; 联合检测

**Significance of the combined detection of routine blood test, serum iron and hemoglobin electrophoresis in screening thalassemia in non-high incidence area** Wu Beiyang, Jiang Cen, Wang Yefei, Gu Yanying, Lin Lin, Cai Gang. Department of Laboratory Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China  
Corresponding author: Cai Gang, Email: caigangsmmu@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the role of combined detections of routine blood test, serum iron and hemoglobin electrophoresis in screening thalassemia in non-high incidence area. **Methods** Peripheral blood and serum samples of 1 000 outpatients from the department of hematology and the department of gynecology and obstetrics were obtained. Common mutations of thalassemia were detected by using GAP-PCR and reverse dot blotting, and Sanger sequencing was performed to discover rare mutations of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia. Routine blood test, serum iron and hemoglobin electrophoresis were also performed for every patient. **Results** Among 1 000 samples, 225 (22.5%) are detected as  $\alpha$ -thalassemia, 403 (40.3%)  $\beta$ -thalassemia and 15 (1.5%) composite thalassemia. Among 225  $\alpha$ -thalassemia patients, 28 were silent, 138 were intermedia, and 59 were HbH disease. Of 403  $\beta$ -thalassemia, 390 were carriers, 7 were double heterozygote, and 6 were homozygote. In all samples, there were 357 patients detected with no common mutations, 38 patients had higher result values for both MCV and MCH and none detected with thalassemia gene. There were 48 patients who had higher serum iron but normal or lower MCV, 42 of them (87.5%) had thalassemia gene. Furthermore, 38 patients showed abnormal hemoglobin electrophoresis, 35 of them were HbH disease, while the other 3 were HbF-related thalassemia. Five

patients showed abnormal hemoglobin electrophoresis, lower MCV and MCH, as well as higher serum iron, had no frequent mutation but rare ones. **Conclusion** Patients with higher MCV and MCH can mostly be excluded to have thalassemia, while higher serum iron represents thalassemia possibility and can provide a preliminary indication of thalassemia type, and last but not least abnormal hemoglobin electrophoresis indicates the disease. It is recommended to further carry out sequencing of rare mutations for those who had abnormal results in the combined screening, and detected with no frequent mutation. Combination of these three examinations can improve the detection efficiency of patients with thalassemia.

**【Key words】** Thalassemia; Blood routine test; Serum iron; Hemoglobin electrophoresis; Combined detection

地中海贫血(地贫)是一组严重威胁人类健康的遗传性血液病,地贫基因携带者表现为临床症状轻重不等的慢性进行性溶血性贫血<sup>[1]</sup>。我国广东、广西、海南及福建等地均为地贫高发地区,以 $\alpha$ 和 $\beta$ 珠蛋白生成障碍最为常见<sup>[2-3]</sup>。近年来,上海地区地贫检出率也逐年增高,在未开展基因筛查的情况下,我们试图通过血常规、血清铁含量及血红蛋白电泳的联合检测来提高地贫的排除率及检出率,也为进一步的地贫基因测序提供依据。

### 对象与方法

1. 研究对象:以 2012 年 3 月至 2015 年 10 月来我院就诊的疑诊地贫患者 1 000 例为研究对象。抽取静脉血 3 ml, EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝,分别用于血常规、血红蛋白、地贫基因分析和 DNA 测序;血清管离心后得到血清 2 ml,用于血清铁检测。标本保存:全血室温不超过 24 h;血清 2~8 ℃ 不超过 1 周;DNA -18 ℃ 保存不超过 2 年, -70 ℃ 可长期保存,冷冻保存避免反复冻融。

2. 血常规:采用 XS-800i 全自动血液分析仪(日本 SYSMEX 株式会社产品)进行血常规检测,测定红细胞平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH)HGB 等参数。MCV 正常参考范围为 >99.1 fl; MCH 正常参考范围为男 >33.8 pg、女 >33.3 pg; HGB 正常参考范围为男 >160 g/L、女 >150 g/L。

3. 血红蛋白电泳:采用 D-10 血红蛋白检测仪(美国 Bio-Rad 公司产品)检测 HbA、HbA<sub>2</sub>、HbF 及异常血红蛋白含量。

4. 常见基因检测:采用跨越裂口 PCR (Gap-PCR) 方法检测--<sup>SEA</sup>、- $\alpha^{3.7}$  和 - $\alpha^{4.2}$  基因缺失三种缺失型。采用反向斑点杂交(RDB)法对 $\alpha$ 和 $\beta$ 地贫非缺失型点突变基因进行检测,包括 3 种 $\alpha 2$ 珠蛋白基因突变类型 $\alpha^{ws}$ 、 $\alpha^{os}$ 及 $\alpha^{cs}$ 和 17 种 $\beta$ 珠蛋白基因突变类型[-28、-29、-30、-32、CD14-15、CD17、CD26( $\beta^E$ )、CD27-28、CD31、CD41-42、CD43、CD71-72、IVS- I -

1、IVS- I - 5、IVS- II - 654、CAP + 1、initiation con- don]。地贫基因检测试剂盒购自深圳亚能生物有限公司。按照试剂盒说明书进行操作和结果判断。

5. 稀有基因检测方法:对于血红蛋白电泳异常或血清铁含量异常增高而无法用常规地贫基因检测结果解释或实验室结果无法解释临床表型的患者,血样送深圳亚能生物有限公司进行 DNA 测序。针对怀疑 $\beta$ 珠蛋白基因突变的,进行 Taiwanese、 $\gamma^+(\alpha\gamma\delta\beta)^0$ 、SEA-HPFH 以及 $\beta$ 珠蛋白基因测序;针对怀疑 $\alpha$ 珠蛋白基因突变的,进行 Thai、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 1$  基因测序, X1/X2 融合片段(HK $\alpha\alpha$ 或 anti4.2 的特异片段)扩增。

6. 统计学处理:采用 EXCEL 2013 及 SAS 9.0 统计软件进行数据分析;用描述性方法分析各参数对地贫检出率的影响。正态分布的指标组间比较用 *t* 检验,非正态分布的指标取自然对数后进行 *t* 检验,组间用 GLM 相关性分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 地贫基因检出率:经地贫基因检测试剂盒进行常规基因检测,在 1 000 份标本中,检出 $\alpha$ 地贫 225 例(22.5%), $\beta$ 地贫 403 例(40.3%), $\alpha\beta$ 复合地贫 15 例(1.5%),未检出 357 例(35.7%)。 $\alpha$ 地贫中,标准型最多,占 61.3%(138/225)。静止型 28 例;HbH 病 59 例。 $\beta$ 地贫中, IVS- II - 654 (163/418) 和 CD41-42 (141/418) 两种基因突变最常见,各基因突变频率及等位基因频率见表 1。

2. 血常规指标对地贫筛查的影响:MCV、MCH 或 HGB 高于正常参考范围的有 38 例,无一例检出地贫基因。在地贫患者中,以 $\beta$ 纯合子及 $\beta$ 双重杂合子的 HGB 最低, HbH 患者次之。 $\alpha$ 静止型的 MCV 为(82.4±1.1) fl, MCH 为(25.8±1.1) pg, 仅轻微低于正常参考值范围, HGB 为(122±1.2) g/L, 基本接近正常参考范围(表 2)。

表1 各基因突变频率及等位基因频率(%)

分类	基因	突变频率	等位基因频率
α地贫	-SEA	199	99.5
	-α <sup>3.7</sup>	63	31.5
	-α <sup>4.2</sup>	17	8.5
	α <sup>WS</sup>	10	5.0
	α <sup>OS</sup>	6	3.0
	α <sup>CS</sup>	24	12.0
β地贫	CD14-15	3	1.5
	CD17	80	40.0
	-28	17	8.5
	CD27-28	8	4.0
	CD41-42	141	70.5
	IVS- I -1M	1	0.5
	IVS- I -5M	2	1.0
	IVS- II -654	163	81.5
	CD26(β <sup>E</sup> )	3	1.5
	CD43	2	1.0
	CD71-72	12	6.0

注:地贫:地中海贫血

表2 不同基因类型地贫患者年龄及血常规参数比较(̄x±s)

组别	例数	年龄(岁)	MCV(fl)	MCH(pg)	HGB(g/L)
α静止型	28	30.1±1.3	82.4±1.1 <sup>A</sup>	25.8±1.1 <sup>a</sup>	122.0±1.2
α标准型	138	24.8±2.2	69.3±1.1 <sup>B</sup>	21.4±1.1 <sup>b</sup>	114.0±1.2
HbH病	59	23.6±1.8	64.8±1.1 <sup>B</sup>	19.0±1.2 <sup>c</sup>	83.3±1.2
β地贫携带者	390	23.3±2.6	65.7±1.1 <sup>B</sup>	20.7±1.1 <sup>bc</sup>	98.3±1.2
β纯合子	6	3.0±1.9	76.6±1.1 <sup>A</sup>	25.1±1.1 <sup>a</sup>	59.2±1.3
β双重杂合子	7	1.5±5.0	67.7±1.1 <sup>B</sup>	20.3±1.2 <sup>bc</sup>	50.2±1.4
αβ复合地贫	15	19.3±3.0	64.8±1.1 <sup>B</sup>	20.7±1.1 <sup>bc</sup>	100.4±1.3

注:地贫:地中海贫血;MCV:红细胞平均体积;MCH:红细胞平均血红蛋白含量;各组数值非全部组都呈正态分布而转换成自然对数后进行统计学描述,用GLM进行组间相关性分析,P<0.05为差异有统计学意义,具有相同上标的为差异无统计学意义

3. 血清铁对地贫筛查的影响:血清铁含量高于正常参考范围且MCV未高于正常参考范围的48例患者,检出地贫基因的有42例(87.5%)。β地贫患者血清铁含量高于α地贫患者,又以纯合子及双重杂合子更高,血清铁含量最高的为β纯合子,达到(39.1±1.0)mol/L,最低的是αβ复合地贫[(13.1±1.4)mol/L](表3)。

4. 血红蛋白电泳检测对地贫筛查的影响:α地贫的HbA<sub>2</sub>为1.44%,明显低于正常参考范围,以HbH病最低(0.9%);β地贫的血红蛋白电泳结果中,HbA<sub>2</sub>达到了(4.5±1.7)%,显著高于正常参考范围

(P<0.01),HbF也高达(4.6±1.3)%。检出有血红蛋白电泳异常的38例,其中35例均为HbH病患者,另3例为HbF含量高的其他类型地贫患者,符合率为100%。5例患者血红蛋白结果异常并伴有MCV及MCH小于正常参考范围,试剂盒未检出基因异常而经测序分析,均发现伴有不同的稀有突变。

表3 不同基因类型地中海贫血(地贫)患者血清铁及血红蛋白电泳检测结果(̄x±s)

组别	例数	血清铁(mol/L)	HbA(%)	HbA <sub>2</sub> (%)	HbF(%)
α静止型	28	16.3±1.7 <sup>bc</sup>	97.0±1.0	1.8±2.1	0.6±1.8
α标准型	138	13.6±1.7 <sup>c</sup>	97.0±1.0	1.9±1.5	0.8±2.0
HbH病	59	18.8±1.5 <sup>abc</sup>	87.3±1.1	0.9±2.1	1.6±2.5
β地贫携带者	390	19.8±1.6 <sup>abc</sup>	90.7±1.1	4.7±1.6	2.5±2.4
β纯合子	6	39.1±1.0 <sup>a</sup>	32.0±4.0	1.8±2.4	36.2±2.2
β双重杂合子	7	36.4±1.4 <sup>ab</sup>	24.3±3.1	3.0±4.5	30.5±4.7
αβ复合地贫	15	13.1±1.4 <sup>c</sup>	78.3±1.6	4.6±1.7	2.5±5.1

注:各组数值非全部组都呈正态分布而转换成自然对数后进行统计学描述,方差分析P<0.05为差异有统计学意义,具有相同上标的为差异无统计学意义

## 讨 论

血红蛋白病遍布全球近160个国家,据WHO估计,全球有近5亿人口为地贫基因携带者,占总人口的7%。据现有流行病学调查资料显示,我国南方地区人群的α地贫基因携带者检出率为2%~18%,β地贫基因为1%~7%。根据遗传平衡定律,在一个稳定的人群中,地贫基因携带率是不会有太大改变的。而在上海地区,检测到的β地贫多于α地贫,我们推测导致这种结果的可能性有两个:①地贫基因具有遗传异质性,中国的南方地区与华东地区有显著的地域差异;②本组患者多因贫血而就诊,而静止型α地贫患者往往无贫血表现,仅在体检筛查中被发现。我们检出的418例β地贫携带者中,IVS-II-654和CD41-42最常见,与文献[4]报道一致。

多数地贫基因携带者可表现为MCV和MCH降低的小细胞低色素贫血<sup>[5-6]</sup>。在我们检测的1000份标本中,通过患者MCV、MCH或HGB增高而初步准确排除地贫的患者有38例,经基因检测验证,无一例为地贫基因携带者,排除率达到100%。而需要注意的是,若MCV、MCH或HGB这三个指标正常,并不能排除地贫,可能会造成某些型别特别是α静止型的漏诊。

地贫是一类铁利用障碍性贫血,大部分患者在

可出现血清铁增高<sup>[7]</sup>。在 MCV、MCH 及 HGB 这三项指标未能排除地贫且血清铁含量增高的 48 例患者中,我们检出了 42 例(87.5%) $\beta$ 地贫患者。由此可见,血清铁含量有助于诊断 $\beta$ 地贫,且在我们的研究中发现 $\beta$ 地贫患者与未查出地贫的患者的血清铁的差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而对于 $\alpha$ 地贫,尤其是 $\alpha$ 静止型患者,血清铁的作用略小( $P = 0.1112$ )。值得注意的是,在同时伴有缺铁的地贫患者,仅凭借血清铁将低而排除地贫引起漏诊。在临床上,也可见合并缺铁性贫血的女性或儿童地贫患者,并且有时 MCV 的界限可疑,可能是由于维生素 B<sub>12</sub> 缺乏所致。

地贫患者由于合成珠蛋白链的基因突变,导致血液中血红蛋白成分发生改变,产生 $\alpha$ 、 $\beta$ 链的不平衡,或合成异常血红蛋白而产生包涵体,表现为血红蛋白电泳结果异常,HbA<sub>2</sub>被视为 $\beta$ 地贫的良好检出指标<sup>[6]</sup>。地贫患者就诊的年龄往往与患者的临床症状有关,就诊年龄最低的为 $\beta$ 纯合以及 $\beta$ 双重杂合患者,HGB 仅为(54.5 $\pm$ 1.4)g/L,临床表现为重度贫血,血红蛋白电泳表现为特征性的 HbF 升高(34.0%)。 $\beta$ 地贫携带者一般为轻度贫血,但是 MCV 和 MCH 的改变较为明显,最常见的 3 种 $\beta$ 突变基因分别为 $\beta^+$ 的 41-42/N[HGB 为(99.1 $\pm$ 1.2)g/L]、 $\beta^0$ 的 654/N[HGB 为(97.5 $\pm$ 1.3)g/L]和 $\beta^0$ 的 17/N[HGB 为(96.7 $\pm$ 1.2)g/L],虽然其血红蛋白链的完整性与功能上有差别,但其 HGB ( $P = 0.664$ )、MCV ( $P = 0.071$ )及 MCH ( $P = 0.479$ )间的差异无统计学意义,与文献<sup>[6]</sup>不一致,其原因有待进一步研究。 $\beta$ 地贫携带者最显著的特征是在血红蛋白电泳中,HbA<sub>2</sub>(5.1%)及 HbF(4.3%)显著升高。本组 38 例血红蛋白电泳异常的患者中 35 例有 HbH 条带,基因检测证实为 HbH,另 3 例经证实为其他类型地贫,符合率高达 100%,由此可见特征性的异常血红蛋白电泳条带在地贫的分型判断中有相当重要的意义。

我们发现 5 例患者血红蛋白结果异常(HbA<sub>2</sub>或

HbF 异常升高),排除缺铁引起的 MCV 及 MCH 降低,但常规基因检测未发现突变,进行进一步的测序分析,发现其中的 5 例为稀有突变的地贫携带者。

综上所述,血常规、血清铁以及血红蛋白电泳的联合检测,可以根据 MCV、MCH 及 HGB 排除一部分非地贫患者;同时可以通过 HbA<sub>2</sub>及血清铁含量对地贫患者进行初步分类;血红蛋白电泳可以作为地贫诊断依据之一。因而这三者的联合筛查对于常规基因检测不能诊断的稀有地贫可起到良好的提示作用,减少漏检。在地贫的非高发区,在地贫基因测序的相对较高检测费用的情况下,联合筛查具有一定的经济优势;同时对于在地贫非高发区进行常见突变基因未能发现突变的漏检地贫的诊断,也显示出不可或缺的作用。

#### 参考文献

- [1] SILVER HK. Mediterranean anemia [J]. Calif Med, 1952, 76 (3):162-164.
- [2] Embury SH, Lebo RV, Dozy AM, et al. Organization of the alpha-globin genes in the Chinese alpha-thalassemia syndromes [J]. J Clin Invest, 1979, 63 (6):1307-1310. doi: 10.1172/JCI109426.
- [3] Zeng YT, Huang SZ, Chen B, et al. Hereditary persistence of fetal hemoglobin or (delta beta) o-thalassemia: three types observed in South-Chinese families [J]. Blood, 1985, 66 (6): 1430-1435.
- [4] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China [J]. PLoS One, 2014, 9(2):e89855. doi: 10.1371/journal.pone.0089855.
- [5] Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia [J]. Orphanet J Rare Dis, 2010, 5:13. doi: 10.1186/1750-1172-5-13.
- [6] Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia [J]. Orphanet J Rare Dis, 2010, 5:11. doi: 10.1186/1750-1172-5-11.
- [7] Cao A, Moi P, Galanello R. Recent advances in  $\beta$ -thalassemias [J]. Pediatr Rep, 2011, 3(2):e17. doi: 10.4081/pr.2011.e17.

(收稿日期:2016-02-15)

(本文编辑:刘爽)