

# 异常血红蛋白 Hb New York 的分子诊断及血液学特征分析

卢建 王继成 姚翠泽 张艳霞 刘玲 骆明勇 秦丹卿

**【摘要】 目的** 对 34 例异常血红蛋白 Hb New York 患者进行基因诊断并分析其血液学特征。**方法** 应用血常规检测和血红蛋白电泳对所有采集的外周血标本进行分析,使用 gap-PCR、PCR-RDB 和 DNA 测序方法对所有提取的 DNA 标本进行  $\beta$  珠蛋白基因的鉴定。**结果** 经基因检测,25 例病例为单纯的 Hb New York 杂合子,其红细胞参数表现为正常或轻度降低,血红蛋白电泳提示 43.9% ~ 52.0% 的 Hb K 异常带;1 例为 Hb New York 合并  $\beta^0$ -地中海贫血,表现为明显降低的红细胞参数和升高的 Hb K(91.8%);8 例为 Hb New York 合并  $\alpha$ -地中海贫血,其血液学特征也有不同的改变。**结论** 单纯的 Hb New York 杂合子无明显的临床表现,但合并其他地中海贫血时可改变其血液学特征。

**【关键词】** Hb New York; 地中海贫血; 血液学特征

## Molecular diagnosis and hematologic characteristics of patients with abnormal hemoglobin New York

Lu Jian, Wang Jicheng, Yao Cuize, Zhang Yanxia, Liu Ling, Luo Mingyong, Qin Danqing. Medical Genetics Center of Guangdong Women and Children Hospital, 511442 Guangzhou, China  
Corresponding author, Qin Danqing, E-mail: qindanqing1985@163.com

**【Abstract】 Objective** To conduct molecular diagnosis and investigate the hematologic characteristics of 34 cases with abnormal hemoglobin Hb New York. **Methods** The collected peripheral blood samples were subject to routine blood test and hemoglobin electrophoresis. Gap-PCR, PCR-RDB and DNA sequencing were adopted to identify the  $\beta$ globin gene of the extracted DNA samples. **Results** Gene detection revealed that 25 cases were identified with heterozygote of Hb New York and presented with normal or a slight decrease in the hemoglobin level. Hemoglobin electrophoresis prompted 43.9% -52.0% of abnormal Hb K band. One case was diagnosed with Hb New York complicated with  $\beta^0$ -thalassemia, manifested with a significant decrease in the hemoglobin level and an increase in Hb K (91.8%). Eight patients were diagnosed with Hb New York complicated with  $\alpha$ -thalassemia, presenting with certain changes in the hematologic characteristics. **Conclusion** Patients with the heterozygote of Hb New York present with no significant clinical symptoms. Those complicated with other thalassemia are manifested with certain changes in the hematologic characteristics.

**【Key words】** Hb New York; Thalassemia; Hematologic characteristics

血红蛋白病是一类由于血红蛋白结构异常或者合成量不足引起的遗传性疾病,该病主要分布在热带和亚热带地区,在我国多见于广东、广西和海南等南方地区<sup>[1]</sup>。血红蛋白病可分为两种:第一种是由  $\alpha$ -或  $\beta$ -珠蛋白合成量不足引起的疾病称为地中海贫血(简称地贫);第二种是由珠蛋白的一级结构发生改变而引起的血红蛋白的分子结构发生改变的疾病称为异常血红蛋白。我国 80 年代对全国 20 个省市进行了大规模血红蛋白病的调查,显示

我国的南方为异常血红蛋白高发区,其中 Hb K 是广东省第二常见的  $\beta$ -珠蛋白链异常血红蛋白病,仅次于 Hb E<sup>[2]</sup>。Hb New York 是由  $\beta$ -珠蛋白链上的点突变引起的异常血红蛋白,在血红蛋白电泳中多见于 K 组,是 Hb K 最常见的类型。Hb New York 自 1967 年首次被发现是在纽约的一个祖籍广东的华裔美国人的家庭中,随后陆续在中国和东南亚也被发现并报道<sup>[3-5]</sup>。但对于 Hb New York 的临床特征的分析,尤其是合并地贫时的血液学表现的

报道还比较少。我们收集了 34 例基因诊断为 Hb New York 的病例并对其进行分析, 报告如下。

## 对象与方法

### 一、研究对象

2015 年至 2017 年于广东省妇幼保健院就诊, 血红蛋白电泳显示有 Hb K 且经基因检测确诊为 Hb New York 的 34 例患者。所有患者均为广东籍居民, 年龄为 19~48 岁, 平均为 29.7 岁。取其外周血用于血常规和血红蛋白电泳分析, 提取外周血 DNA 用于珠蛋白基因检测。

### 二、方法

#### 1. 血液学分析

使用 EDTA-K2 采血管采集受检者外周静脉血, 应用 Sysmex X S. 1000i 全自动血细胞分析仪(日本希森美康株式会社)完成包括红细胞计数、血红蛋白量及 MCV、MCH 等红细胞指数的分析。采用全自动毛细管电泳仪(Capillar 2, 法国 Sebia 公司)进行血红蛋白的分析。以上实验均按照仪器使用说明书操作。

表 1  $\beta$ -珠蛋白基因测序引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增片段大小 (bp)
HBB E1-F	CCAATCTACTCCCAGGAGCAG	503
HBB E1-R	TGAGGTGTCCAGGTGAGC	
HBB E2-F	GATCTGTCCACTCTGATGC	923
HBB E2-R	GGTAGCTGGATTGTAGCTGC	
HBB E3-F	TTCTGGGTTAAGGCAATAGCAA	649
HBB E3-R	AGGGGCTGTTGCCAATGTGC	

## 结 果

### 一、异常血红蛋白 Hb New York 患者血液学表型分析结果

34 例患者中, 25 例单纯的 Hb New York 杂合子病例的血液学表现差别不大, 血红蛋白电泳提示 43.9%~52.0% 的 Hb K 异常带; 1 例为 Hb New York 合并  $\beta^0$ -地贫, 表现为明显降低的红细胞参数和升高的 Hb K(91.8%); 8 例为 Hb New York 合并  $\alpha$ -地贫, 其血液学也有不同的改变。详细的血常规和血红蛋白电泳结果见图 1、表 2。

### 二、基因检测结果

经常规地贫基因检测方法(gap-PCR 和 PCR-RDB)的检测, 共发现 5 例基因型为--/ $\alpha\alpha$ , 2 例基因型为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ , 1 例基因型为 $\alpha^{ws}\alpha/\alpha\alpha$ , 以及一

### 2. 常规珠蛋白基因诊断

应用厦门致善生物公司生产的磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒和自动化仪器(Lab-Aid 820)提取所有病例的外周血基因组 DNA。采用亚能生物技术有限公司(深圳)提供的  $\alpha$ -和  $\beta$ -地贫基因检测试剂盒(gap-PCR 和 PCR-RDB 方法)对所有 DNA 标本进行地贫基因检测。检测范围包括  $\alpha$ -地贫 3 种常见缺失类型( $-\alpha^{3.7}/$ 、 $-\alpha^{4.2}/$ 、 $--^{SEA}/$ )和 3 种点突变类型( $\alpha^{QS}\alpha/$ 、 $\alpha^{CS}\alpha/$ 、 $\alpha^{WS}\alpha/$ )以及 17 种  $\beta$ -地贫的点突变。

### 3. $\beta$ -珠蛋白基因测序

对  $\beta$ -珠蛋白基因(HBB)全长约 2 kb 分成 3 个片段进行引物设计和基因测序。PCR 引物序列见表 1。PCR 扩增体系为 30  $\mu$ l: 15  $\mu$ l 的 Premix LA, 10 pmol/ $\mu$ l 的引物各 2  $\mu$ l, 4  $\mu$ l 基因组 DNA。PCR 扩增反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95  $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 60  $^{\circ}$ C 45 s $\rightarrow$ 72  $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。琼脂糖凝胶电泳鉴定产物。将 PCR 扩增产物送上海英骏生物技术有限公司, 使用美国 ABI3100 DNA 测序仪双向测序。

例  $\beta 17/N$ 。 $\beta$ -珠蛋白基因测序发现 34 例患者均检测到 HBB: c. 341 T > A (CD113 GTG > GAG) 杂合突变(见图 2A)。查询血红蛋白数据库(<http://globin.cse.psu.edu/>)可知此突变为 Hb New York。此外一病例还检测到 HBB: c. 52 A > T (CD 17 AAG > TAG) 杂合突变(见图 2B), 与以上地贫常规检查方法检测结果相符, 为 Hb New York 合并  $\beta 17$  地贫患者。

## 讨 论

能引起珠蛋白功能改变的异常血红蛋白包括地中海贫血样变异、溶血性异常血红蛋白和氧亲和力异常性异常血红蛋白病。这些异常血红蛋白在单独存在或复合地贫时, 可表现为中间型或重型地贫<sup>[6]</sup>。目前常用反相高效液相色谱(RP-HPLC)和

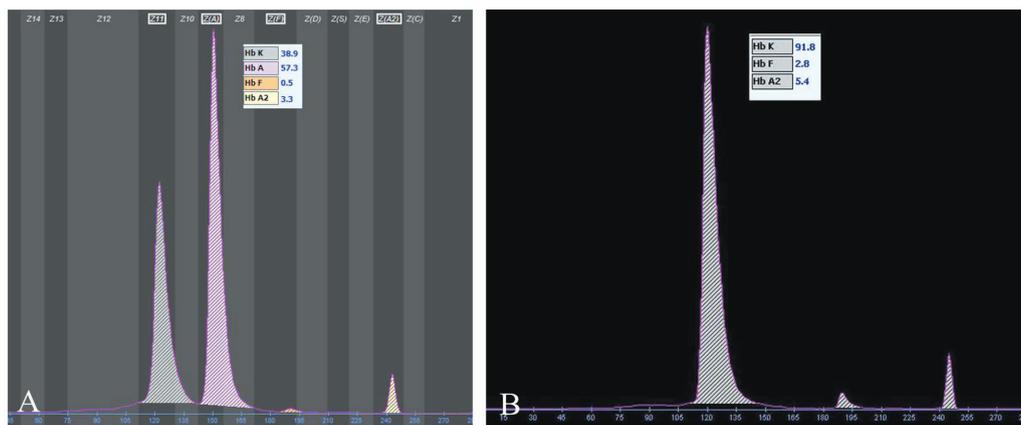


图 1 Hb New York 患者血红蛋白电泳图

A: 单纯 Hb New York 血红蛋白电泳图; B: Hb New York 合并  $\beta^{17}$  血红蛋白电泳图

表 2 Hb New York 的血液学特征

类别	例数	Hb K (%)	Hb A2 (%)	血红蛋白 (g/L)	MCV (fl)	MCH (pg)
单纯 Hb New York 杂合子	25	44.87 ± 7.13	2.83 ± 0.47	127.50 ± 22.50	90.65 ± 6.65	29.62 ± 2.18
Hb New York 合并 $\beta^{17}$	1	91.8	5.4	95	63.8	19.0
Hb New York 合并 $\alpha$ (SEA)	5	33.50 ± 6.40	2.74 ± 0.24	108.52 ± 9.52	66.27 ± 2.67	21.27 ± 0.47
Hb New York 合并 $\alpha$ (3.7)	2	39.95 ± 1.05	3.3 ± 0.0	110.0 ± 1.0	82.7 ± 0.1	26.2 ± 0.2
Hb New York 合并 $\alpha$ (WS)	1	42.2	3.2	147	99.7	31.5

注: MCV 红细胞平均体积, MCH 红细胞平均血红蛋白含量

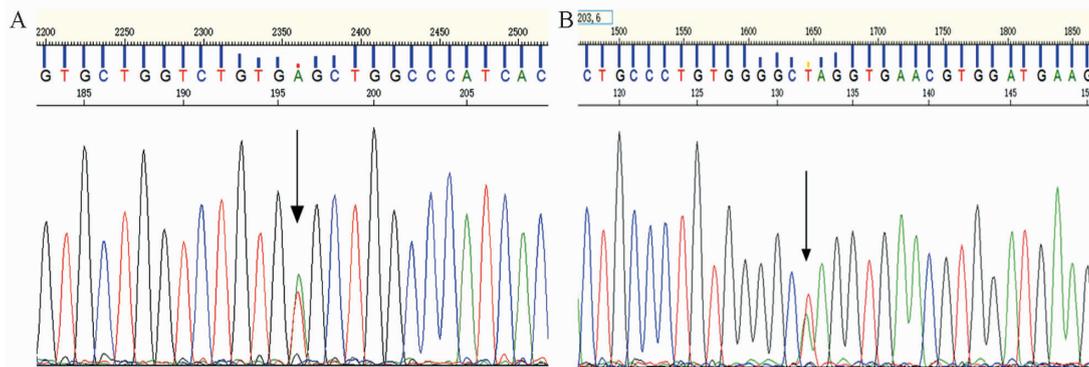


图 2 Hb New York 患者地贫基因检测

A: HBB: c.341 T>A 突变, 即 Hb New York; B: HBB: c.52 A>T 突变, 即  $\beta^{17}/N$

sebia capillary 方法进行血红蛋白分析并发现特异性的异常血红蛋白<sup>[7]</sup>。

Hb New York 一种血红蛋白的变体 [  $\beta^{113}$  (G15) Val → Glu, GTG > GAG ],  $\beta$  链 113 号位的缬氨酸位于螺旋 G15 位, 处于  $\beta$  链分子内部, 是疏水性氨基酸。被酸性氨基酸谷氨酸取代后, 影响了分子内部的疏水性, 所以 Hb New York 的稳定性不如 Hb A, 易于降解<sup>[8]</sup>。但由于  $\alpha$  和  $\beta$  接触面有 3 个氨基酸, 接触面比较广, 单个氨基酸变化可能不会对其稳定性带来明显的影响。所以该突变位点并没有影响到血红蛋白的生物学功能。通过对我们

收集的病例进行血液学特征分析, 单纯 Hb New York 的杂合子是无明显的临床症状的, 且血液学指标也正常, 仅血红蛋白电泳时会出现含量约 50% 的异常血红蛋白, 这与文献报道的基本相同<sup>[9-10]</sup>, 如果不进行基因测序, 就可能就会被忽略。当 Hb New York 合并  $\alpha$ -地贫时, 除血红蛋白电泳中较高比例的 Hb K 外, 其他血液学指标与单纯的  $\alpha$ -地贫也是不同的。其中合并标准型 (SEA) 和静止型 (3.7、WS) 的  $\alpha$ -地贫也有不同的血液学表现。本文中一例 Hb New York 合并  $\beta^0$ -地贫的患者, 表现为轻度的小细胞低色素性贫血, 这与 Lee

和 Li 等<sup>[11-12]</sup>的病例报道中无贫血的症状并不相同,这可能是由于本文的病例是孕妇,存在生理性贫血的可能。

虽然 Hb New York 没有明显的临床表现,但其存在会干扰一些实验室指标的测定,如糖化血红蛋白、血小板计数等<sup>[13]</sup>。而且值得注意的是,由于 Hb New York 合并  $\beta$ -地贫的血红蛋白电泳检测到的 Hb A 比例大幅降低,容易引起误诊为重型  $\beta$ -地贫。在产前诊断中,这类 Hb New York 复合  $\beta$ -地贫胎儿也会因为父母亲轻型的  $\beta$ -地贫表现,被很少关注或者忽略。因此对 Hb New York 及其合并其他地贫的临床特征的认识有助于指导进一步的分子检测和产前诊断,也可以为遗传咨询提供重要的参考价值。当然包括本文在内的文献报道中,Hb New York 合并其他地贫的病例还相对较少,今后我们将继续收集更多的病例,以作更具有统计学意义的比较。

#### 参 考 文 献

- [1] Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of hemoglobin: Genetics, pathophysiology, and clinical management. New York: Cambridge University Press, 2009.
- [2] Jen PC. Abnormal hemoglobins found in Guangdong, P. R. China. Hemoglobin, 1987, 11 (6): 573-579.
- [3] Ranney HM, Jacobs AS, Nagel RL. Haemoglobin New York. Nature, 1967, 213 (5079): 876-878.
- [4] Blackwell RQ, Liu CS, Wang CL. Hemoglobin New York in Chinese subjects in Taiwan. Am J Phys Anthropol, 1971, 34 (3): 329-334.
- [5] Yuthavong Y, Ruenwongsa P. Kinetics of the reaction of the masked sulphhydryl groups of haemoglobins A, E and New York with p-chloromercuribenzoate. Biochim Biophys Acta, 1973, 303 (1): 44-51.
- [6] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南. 北京: 人民军医出版社, 2011: 11-13.
- [7] Wan JH, Tian PL, Luo WH, Wu BY, Xiong F, Zhou WJ, Wei XC, Xu XM. Rapid determination of human globin chains using reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 901: 53-58.
- [8] 曾溢滔, 黄淑贞, 周霞娣, 陈美珏, 盛敏, 仇效坤, 顾兰琴, 丛建平, 黄英, 程观焱, 金华钧, 浦权, 徐镛男, 朱锡珍, 李魁群, 陈舜, 梁晏青, 王美琪, 廖霞, 张小梅, 胡幼华, 李豪德, 霍建强, 王微信, 曾毓华, 丁桂仙, 谢沛林, 廖成玉, 郎金武. 中国人血红蛋白 New York 的研究. 遗传学报, 1982, 9 (2): 125-134.
- [9] Lin M, Wang Q, Zheng L, Huang Y, Lin F, Lin CP, Yang LY. Prevalence and molecular characterization of abnormal hemoglobin in eastern Guangdong of southern China. Clin Genet, 2012, 81 (2): 165-171.
- [10] 李友琼, 黄慧斌, 阳文辉, 陈治中, 赵林, 黄华艺, 覃桂芳. 广西地区血红蛋白 New York 的血液学和分子特征. 中华血液学杂志, 2013, 34 (8): 696-699.
- [11] Lee AC, Ma ES, Chan AY, Szeto SC, Chan LC. Double heterozygosity for Hb New York [ $\beta$  113 GTG-->GAG; VAL-->GLU] and beta degrees-thalassemia mutations manifests as a thalassemia trait. Pediatr Hematol Oncol, 2008, 25 (3): 227-231.
- [12] Li DZ. Hemoglobin New York is not a matter in prenatal screening and diagnosis for beta-thalassemia. Pediatr Hematol Oncol, 2008, 25 (8): 769-771.
- [13] Chu CH, Lam HC, Lee JK, Wang MC, Lu CC, Sun CC, Chuang MJ. Common hemoglobin variants in southern Taiwan and their effect on the determination of HbA1c by ion-exchange high-performance liquid chromatography. J Chin Med Assoc, 2009, 72 (7): 362-367.

(收稿日期: 2018-01-08)

(本文编辑: 杨江瑜)