

杭州地区血红蛋白变异体的流行及其对糖化血红蛋白检测系统的影响

吴宣岚 饶舜 吴胜军

浙江大学医学院附属邵逸夫医院钱塘院区检验科, 杭州 310018

通信作者: 吴胜军, Email: 3202107@zju.edu.cn

【摘要】 目的 探究杭州地区血红蛋白(Hb)变异体的主要类型及其对毛细管电泳法和高效液相色谱法糖化血红蛋白(HbA1c)检测系统的影响情况。方法 收集 2021 年 1—8 月浙江大学医学院附属邵逸夫医院钱塘院区住院、门诊患者以及健康体检者血液样本 5 068 份, 分别检测受试者 Hb、平均红细胞体积(MCV)、平均 Hb 浓度(MCH)、空腹血糖(FPG)和毛细管电泳法 HbA1c, 并对仪器提示的变异体样本进行 Hb 电泳和基因测序, 确认变异体类型。Hb 变异体样本进行高效液相色谱法 HbA1c 复检, 统计分析其差异性。结果 5 068 份血液样本中共检出变异体 20 份, 占总数的 0.39%, 变异体包括 10 份 HbG-Taipei, 3 份 HbG-Honolulu, 2 份 HbE, 2 份 HbQ-Thailand, 1 份 HbG-Coushatta, 1 份 HbUbe-2 和 1 份 HbNew York。10 份 HbG-Taipei 变异体中, 高效液相色谱法检测 HbA1c 偏倚率均>20%, 其中 5 份 HbA1c 异常误判为正常, 且该方法对 HbA1c 的检测结果为(4.66±0.86)%, 低于毛细管电泳法的(6.19±0.88)%, 差异有统计学意义($t = -9.37, P < 0.001$)。结论 HbG-Taipei 为杭州地区最流行的 Hb 变异体, 对该变异体 HbA1c 的检测, 毛细管电泳法较高效液相色谱法的结果更加真实可靠。

【关键词】 血红蛋白类; 基因型; HbG-Taipei; 糖化血红蛋白; 毛细管电泳法

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划(2018KY494)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220213-00027

Prevalence of hemoglobin variants in Hangzhou and their influence on glycated hemoglobin detection system

Wu Xuanlan, Rao Shun, Wu Shengjun

Department of Clinical Laboratory, Qiantang Section of Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310018, China

Corresponding author: Wu Shengjun, Email: 3202107@zju.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the main types of hemoglobin(Hb) variants in Hangzhou and the their influence on capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography on glycated hemoglobin(HbA1c) detection system. **Methods** A total of 5 068 serum samples were collected from inpatients, outpatients and health examiners in Qiantang Section of Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine from January to August 2021. Levels of Hb, mean erythrocyte volume (MCV), mean erythrocyte Hb(MCH), fasting blood glucose(FPG) and HbA1c by capillary electrophoresis were detected. Hb electrophoresis and gene sequencing were performed on the variant samples suggested by the instrument. Hb variant samples were re-examined for HbA1c by high performance liquid chromatography, and their differences were statistically analyzed. **Results** A total of 20 variants were detected in 5 068 samples, accounting for 0.39%. These variants included 10 HbG-Taipei variants, 3 HbG-Honolulu variants, 2 HbE variants, 2 HbQ-Thailand variants, 1 HbG-Coushatta variant, 1 HbUbe-2 variant and 1 HbNew York variant. The bias rates of HbA1c detected by high performance liquid chromatography were all >20% in 10 HbG-Taipei variants, and 5 variants were misdiagnosed as normal. There was statistically different between capillary electrophoresis[(6.19±0.88)%] and high performance liquid chromatography[(4.66±0.86)%]($t = -9.37, P < 0.001$). **Conclusions** HbG-Taipei is the most popular Hb variant in Hangzhou area, and the detection results of HbA1c by capillary electrophoresis are more reliable than those by high performance liquid chromatography.

[Key words] Hemoglobins; Genotype; HbG-Taipei; Glycated hemoglobin; Capillary electrophoresis

Fund program: Zhejiang Medical Science and Technology Project(2018KY494)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220213-00027

血红蛋白(Hb)变异体是由位于 Hb 的 α -、 β -、 γ -、 δ -珠蛋白链上的点突变而引起的 Hb 氨基酸序列的改变,其携带者大多不表现出生理功能的改变,但当人体患有复合 α 或 β 型地中海贫血时,会加重其临床症状,表现为中到重度贫血^[1]。由于突变、迁徙、融合与隔离等因素的影响,Hb 变异体存在地域差异,我国长江以南地区变异体携带率明显高于长江以北地区^[2-3]。因此对高发地区进行筛查,特别是对我国南方地区 Hb 变异体的流行病学研究对于地中海贫血的早期发现和治疗具有重要意义。关于杭州地区 Hb 变异体的流行情况,至今鲜有报道。

糖化 Hb(HbA1c)是人体血液中葡萄糖与 Hb β 链 N 末端缬氨酸残基以共价键结合形成的稳定化合物,可反映糖尿病患者过去 2~3 个月的平均血糖水平^[4]。目前临床上常用的 HbA1c 检测技术有离子交换高效液相色谱法和毛细管电泳法^[5]。前期有研究发现 Hb 变异体 HbS、HbC、HbE 对离子交换高效液相色谱法 HbA1c 检测系统会产生一定干扰^[6],本研究拟通过 Hb 电泳技术和基因测序技术,分析本地区主要 Hb 变异体流行型别,通过比较分析两种 HbA1c 检测系统对 Hb 变异体的检测结果,判断检测效能,现报道如下。

材料与方法

一、材料

收集 2021 年 1—8 月浙江大学医学院附属邵逸夫医院钱塘院区住院、门诊患者以及健康体检者血液样本 5 068 份,分别检测并记录受试者 Hb、平均红细胞体积(MCV)、平均血红蛋白浓度(MCH)、空腹血糖(FPG)和毛细管电泳法 HbA1c 结果,并对仪器提示的变异体样本进行 Hb 电泳和基因测序确认变异体类型。离子交换高效液相色谱法对变异体样本进行 HbA1c 重新检测。本研究经邵逸夫医院伦理委员会审批通过(伦理审批号:伦审 2022 研第

0064 号)。

二、仪器和试剂

血常规检测采用迈瑞 BC-6800 全自动血细胞分析仪及配套试剂,血糖检测采用贝克曼 AU5831 全自动生化分析仪及配套试剂,HbA1c 检测采用毛细管电泳法 Sebia Capillary 3 TERA 和离子交换高效液相色谱法 TOSOH HLC-723G8 全自动 HbA1c 分析仪及配套试剂。所有检测严格按试剂盒和仪器说明书执行。

三、研究方法

抽取受试者静脉血,实验室同时检测其血常规、FPG 和 HbA1c。血细胞分类、计数采用鞘流阻抗法、激光散射法、接合荧光染色的流式细胞技术,Hb 测定采用比色法,血糖监测采用己糖激酶法,以毛细管电泳法检测系统 Sebia Capillary 3 作为参比方法。Hb 电泳采用 Sebia Capillary 3 OCTA 血红蛋白电泳仪,Hb 测序采用 Applied Biosystems 3730XL 测序仪。HbA1c 正常值范围为 4.0%~6.0%。

四、统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件对两种仪器 HbA1c 检测结果进行分析处理,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、Hb 变异体分离率及类型

5 068 份血液样本中,共检出 Hb 变异体 20 份,占总数的 0.39%,变异体包括 10 份 HbG-Taipei,3 份 HbG-Honolulu,2 份 HbE,2 份 HbQ-Thailand,1 份 HbG-Coushatta,1 份 HbUbe-2 和 1 份 HbNew York。

二、Hb 变异体样本 HbA1c 检测差异性

将 20 例 HbA1c 异常者编号 1~20,表 1 显示,以 Sebia Capillary 3(毛细管电泳法)作为参比仪器,TOSOH HLC-723G8(离子交换高效液相色谱法)和

Sebia Capillary 3 TERA (毛细管电泳法) 检测, 结果除 HbNew York 外, 其他均表现为负偏倚。10 份 HbG-Taipei 变异体样本中, 离子交换高效液相色谱法检测 HbA1c 偏倚率均 >20%, 且该方法将 5 份 HbA1c 异常样本误判为正常 (编号分别为 3、4、9、15 和 17)。离子交换高效液相色谱法与毛细管电泳法的 HbA1c 检测结果分别为 (4.66±0.86)% 和 (6.19±0.88)%, 差异有统计学意义 ($t=-9.37, P<0.001$)。

三、基因测序结果

经基因测序结果显示, 20 份变异体样本均与 Hb 电泳分析型别结果一致, 测序突变位点及其突变氨基酸详见表 2。

四、Hb 变异体电泳图

图 1 为 α 链 Hb 变异体电泳图, 包含 HbG-Honolulu、HbUbe-2 和 HbQ-Thailand 等类型, 图 2 为 β 链 Hb 变异体电泳图, 包含 HbG-Taipei、HbG-

表 1 Hb 变异体样本来源患者空腹血糖及其 HbA1c 检测结果 (n=20)

编号	HbA1c (%)		偏倚	空腹血糖 (mmol/L)	占比 (%)	类型	临床诊断
	G8	C3					
1	4.2	5.5	-23.6	5.92	35.7	HbG-Taipei	体检
2	4.1	5.8	-29.3	5.61	37.7	HbG-Taipei	体检
3	4.7	6.5	-27.7	6.95	36.3	HbG-Taipei	甲减
4	4.7	6.8	-30.9	7.01	37.7	HbG-Taipei	体检
5	3.9	5.5	-29.1	5.04	36.7	HbG-Taipei	体检
6	3.3	5.0	-34.0	5.10	20.0	HbG-Honolulu	乏力
7	7.0	8.2	-14.6	8.07	12.3	HbG-Honolulu	贫血
8	4.4	6.8	-35.3	5.98	38.6	HbG-Coushatta	体检
9	4.6	7.7	-40.3	8.40	36.6	HbG-Taipei	颈动脉闭塞
10	4.9	5.9	-16.9	6.37	22.8	HbE	体检
11	5.1	6.1	-16.4	5.94	14.7	HbG-Honolulu	一般检查
12	4.6	7.0	-34.3	5.02	68.9	HbUbe-2	体检
13	3.9	5.4	-27.8	5.43	26.6	HbQ-Thailand	颅骨骨折
14	4.5	5.3	-15.1	5.23	22.7	HbE	体检
15	5.5	7.5	-26.7	7.50	35.1	HbG-Taipei	糖尿病
16	6.5	6.0	8.3	5.75	36.1	HbNew York	体检
17	4.4	6.0	-26.7	6.14	36.8	HbG-Taipei	冠心病
18	3.9	5.4	-27.8	5.43	25.1	HbQ-Thailand	硬膜外血肿
19	4.4	5.6	-21.4	5.06	35.9	HbG-Taipei	体检
20	4.5	5.8	-22.4	4.96	36.9	HbG-Taipei	冠心病

注: Hb: 血红蛋白; HbA1c: 糖化血红蛋白; G8: TOSOH HLC-723G8 (离子交换高效液相色谱法) 检测结果; C3: Sebia Capillary 3 TERA (毛细管电泳法) 检测结果; 偏倚=(G8- C3)/ C3; 占比 (%): 血红蛋白变异体在总血红蛋白中所占百分比

表 2 Hb 变异体基因突变信息 (n=20)

变异体类型	份数 (份)	突变链	突变位点	突变基因	突变氨基酸
HbG-Taipei	10	β	68	GAA →GGA	谷氨酸→甘氨酸
HbG-Honolulu	3	α	91	GAG →CAG	谷氨酸→谷氨酰胺
HbG-Coushatta	1	β	68	GAA →GCA	谷氨酸→丙氨酸
HbE	2	β	79	GAG →AAG	谷氨酸→赖氨酸
HbUbe-2	1	α	68	AAC →GAC	天冬酰胺→天冬氨酸
HbNew York	1	β	113	GTC →GAG	缬氨酸→谷氨酸
HbQ-Thailand	2	α	223	GAC →CAC	天冬氨酸→组氨酸

注: Hb: 血红蛋白; 突变基因中加粗字体为突变碱基

Coushatta、HbE 和 HbNew York 等类型。

讨 论

了解 Hb 变异体的携带情况，并采用精准的方法进行不同变异体的检测，有助于地中海贫血的早发现 and 早治疗。2001 年全国大规模分子流行病学调查研究发现 Hb 变异体基因携带率为 0.33%，其中长江以南地区为 0.367%^[2]，高于全国水平，因此对杭州地区 Hb 变异体的流行情况进行检测，对疾病防控有着重要意义。

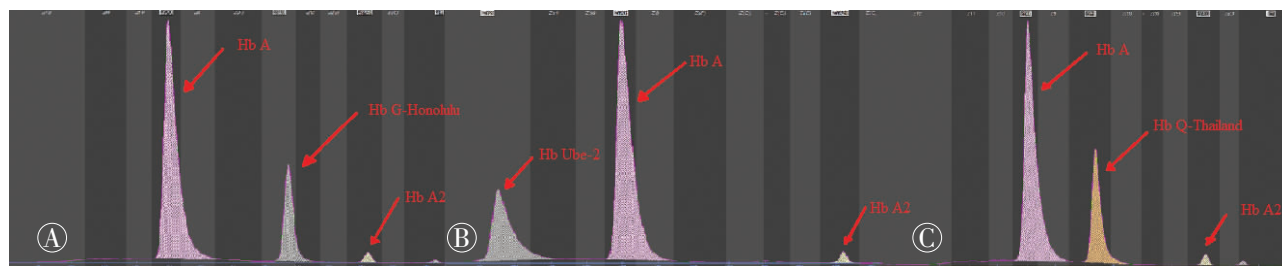
一、杭州地区 Hb 变异体流行以 HbG-Taipei 类型为主

本研究发现杭州地区变异体携带率为 0.4%，略高于长江以南地区报道^[2]。全球已经发现的 Hb 变异体有 1 000 余种，其中最常见的是 HbS、HbC、HbE 及 HbD^[7]。本研究对杭州地区发现的 20 份变异体血样本进行测序发现，主要的 Hb 变异体为 HbG-

Taipei，占总变异体的 50%。HbG-Taipei(β22 谷氨酸→甘氨酸)是 Blackwell 等^[8]于 1969 年在我国台湾地区汉族人中首次发现的，之后在我国多个省份的汉族及少数民族中均有发现。目前认为 HbG-Taipei 为中国特有的一种 Hb 变异体^[9]。HbG-Taipei 和 Hb A 具有相同的氧亲和力，变异后只引起分子表面电荷的变化，而不会影响 Hb 结构的稳定性或引起高级构象的改变，患者临床症状往往不明显。文中的 10 例 HbG-Taipei 携带者，均未表现出血液系统相关疾病。目前 HbG-Taipei 虽在国内外华人中多有报道^[10-11]，但如此高比例 HbG-Taipei 的出现，值得本地区深入探究其流行和播散趋势。

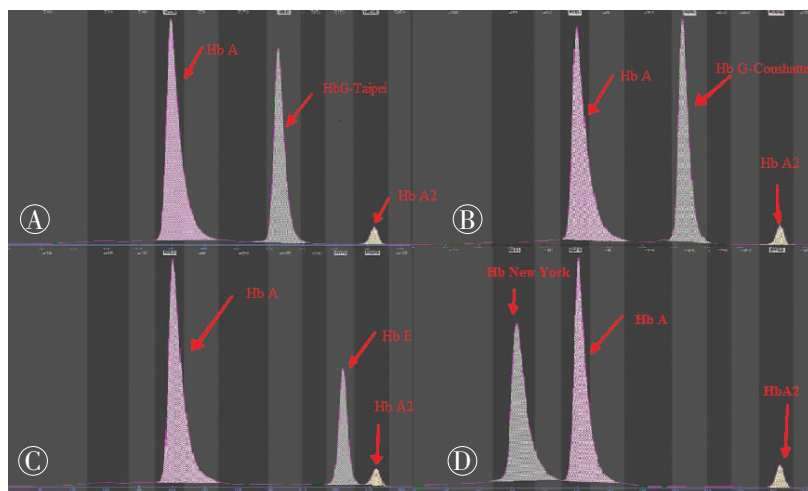
二、HbG-Taipei 变异体对 HbA1c 检测有一定影响

近期研究发现 HbS、HbC、HbE 和 HbG 等变异体对 HbA1c 会产生一定干扰，离子交换高效液相色谱法受干扰最为明显^[12]。分析其原因，主要是离子交



注：Hb：血红蛋白；(A)为 HbG-Honolulu 变异体；(B)为 HbUbe-2 变异体；(C)为 HbQ-Thailand 变异体

图 1 杭州地区 α 链 Hb 变异体电泳图



注：Hb：血红蛋白；(A)为 HbG-Taipei 变异体；(B)为 HbG-Coushatta 变异体；(C)为 HbE 变异体；(D)为 HbNew York 变异体

图 2 杭州地区 β 链 Hb 变异体电泳图

换高效液相色谱法虽对 HbA1c 具有很强的分辨能力,但其未能将 Hb 变异体和 HbA0、HbA1c 完全分离,造成 HbA1c 检测结果受干扰。随着糖尿病发病率的逐年升高以及 Hb 变异体分布区域的逐渐扩大,常见 Hb 变异体对 HbA1c 影响的结果解读变得越来越重要。HbG-Taipei 变异体对 HbA1c 检测系统的影响,国内外少有报道,2012 年曾有 1 例 HbG-Taipei 携带者 FPG 为 9.6 mmol/L,离子交换高效液相色谱法检测 HbA1c 结果正常的报道^[13]。本研究发现的 10 份 HbG-Taipei 变异体样本中,离子交换高效液相色谱法检测 HbA1c 偏倚率均>20%,且该方法将 5 例 HbA1c 异常者误判为正常。离子交换高效液相色谱法 HbA1c 检测系统目前临床实验室中应用广泛^[12],因此今后使用过程中应随时关注 Hb 变异体的影响。

毛细管电泳法检测 HbA1c 技术 2012 年首次推出^[14],其能准确将正常和异常 Hb 区分开来,从阴极到阳极依次为 HbA2、HbE、HbS、HbD、HbF、HbA0、其他 HbA、HbG、HbA1c 和 HbH 等,因此能反映异常 Hb 携带者的真实 HbA1c 水平,目前国内关于该新技术的临床应用较少^[15]。本研究发现该方法不仅能准确检测 HbA1c 水平,还能对变异体进行 Hb 电泳分析。

综上所述,HbG-Taipei 为杭州地区最为流行的 Hb 变异体。相比离子交换高效液相色谱法,毛细管电泳法检测系统在 HbG-Taipei 变异体样本 HbA1c 检测中更能准确反映受试者真实血糖水平。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 吴宣岚:数据分析、设计实验和文章撰写;饶舜:数据收集、统计分析;吴胜军:对文章的知识性内容作批评性审阅、指导和经费支持

参 考 文 献

- [1] 王婷. 广东东莞地区的异常血红蛋白分子流行病学研究[D]. 广州:广州医科大学,2014.
- [2] Zeng Y, Huang S. The studies of hemoglobinopathies and thalassemia

- in China—the experiences in Shanghai Institute of Medical Genetics[J]. *Clin Chim Acta*, 2001,313(1-2):107-111. DOI: 10.1016/s0009-8981(01)00660-x.
- [3] 田洁,唐德国,阳少辉,等. 湖南省永州地区人群血红蛋白病的分子流行病学调查[J]. *中华医学遗传学杂志*,2017,34(5):662-665. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2017.05.009.
- [4] 高冉,程歆琦. 血红蛋白变异体对解读糖化血红蛋白结果的影响[J]. *中华检验医学杂志*,2019,42(11):899-903. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2019.11.001.
- [5] 纪玲. 糖化血红蛋白检测技术的发展[J]. *中华检验医学杂志*, 2018,41(11):808-811. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2018.11.004.
- [6] 温冬梅,张秀明,张德才,等. Hb E 变异体对 5 种糖化血红蛋白检测系统测定结果的干扰评价[J]. *中华检验医学杂志*,2014,37(12):921-927. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2014.12.012.
- [7] Abadie JM, Koelsch AA. Performance of the Roche second generation hemoglobin A1c immunoassay in the presence of HB-S or HB-C traits[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2008,38(1):31-36.
- [8] Blackwell RQ, Yang HJ, Wang CC. Hemoglobin G-Taipei: alpha-2-beta-2-22 glu replaced by gly[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1969, 175(2):237-241.
- [9] 王也飞,吴蓓颖,夏文权,等. 异常血红蛋白病患者血液学表型和基因型分析[J]. *中国实验血液学杂志*,2021,29(4):1280-1288. DOI: 10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2021.04.042.
- [10] 王继成,姚翠泽,杜丽,等. 异常血红蛋白 Hb G-Taipei 的临床特征分析和基因诊断[J]. *中国优生与遗传杂志*,2018,26(11):18-20.
- [11] Gao R, Yu S, Su W, et al. Comparison of glycation degrees of HbG-Coushatta and HbG-Taipei with HbA using liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *Clin Chim Acta*, 2021,521:144-150. DOI: 10.1016/j.cca.2021.06.028.
- [12] 徐安平,陈卫东,周宇,等. 常见异常血红蛋白对 4 种离子交换高效液相色谱法检测糖化血红蛋白的影响[J]. *中华检验医学杂志*,2018,41(10):765-769. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2018.10.012.
- [13] Lo VM, Ma ES, Chau EM, et al. A spuriously 'normal' haemoglobin A1c result[J]. *Ann Clin Biochem*, 2012,49(Pt 4):408-411. DOI: 10.1258/acb.2011.011202.
- [14] Jaisson S, Leroy N, Meurice J, et al. First evaluation of Capillaries 2 Flex Piercing[®] (Sebia) as a new analyzer for HbA1c assay by capillary electrophoresis[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2012,50(10): 1769-1775. DOI: 10.1515/cclm-2012-0017.
- [15] 李卿,刘文彬,金中淦,等. 毛细管电泳法检测糖化血红蛋白的分析性能评估[J]. *检验医学*,2015,30(2):181-184. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2015.02.019.

(收稿日期:2022-02-13)