

· 论 著 ·

## HPLC 测定脐带血 HbF 正常参考值的建立及对母血污染的评价分析

汤丽霞, 欧丽群, 曾劲伟, 梁彩红, 禩洁甜, 林蔚, 陈华锦, 杨光

(广东省佛山市第一人民医院临床研究所 528000)

**摘要:**目的 建立高效液相色谱法(HPLC)检测妊娠中晚期脐带血胎儿血红蛋白(HbF)的正常参考值范围,通过检测脐带血 HbF 的浓度筛查母血污染脐带血。方法 对 329 例脐血进行 G 显带染色体核型分析,应用抗碱法检测 HbF 114 例, HPLC 检测 HbF 215 例。应用百分位数法界定两种方法测定 HbF 单侧下限 99% 可信区间的正常参考值。结果 在 329 例胎儿脐带血染色体核型分析中,有 17 例染色体多态,17 例染色体数目异常,7 例染色体结构异常。HPLC 检测脐带血 HbF 单侧下限 99% 可信区间参考值为 79.4%,其中男性胎儿为 83.5%,女性胎儿为 76.2%。秩和检验男女间 HbF 平均值差异无统计学意义。结论 HPLC 脐带血 HbF 浓度在脐血染色体检查中可作为一项母血污染脐血的筛查指标。

**关键词:**胎儿血红蛋白;胎血;产前诊断;色谱法;高压液相

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.28.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)28-2820-02

Establishment of the reference range for normal values of HbF in cord blood and analysis for maternal blood contamination of cord blood

Tang Lixia, Ou Liqun, Zeng Jingwei, Liang Caihong, Xuan Jietian, Lin Wei, Chen Huajin, Yang Guang  
(Clinical Research Institute, First People's Hospital of Foshan, Guangdong 528000, China)

**Abstract:** **Objective** To establish the normal reference values of HbF by HPLC in fetus cord blood on second and third trimester of pregnancy in order to detect maternal blood contamination of cord blood. **Methods** Analysis of G-banded chromosomes of 329 samples of cord blood was developed. HbF in cord blood of 215 samples detected by HPLC and that of 114 samples by alkali resistant assay. The reference values of 99% confidence interval of HbF determined with the method of percentiles. **Results** There were 17 cases of chromosome polymorphism, 17 cases of numerical abnormalities and 7 cases of structural abnormality of chromosomes among 329 cases of cord blood. The unilateral lower limit of HbF on 99% confidence interval was 79.4% of 215 cases by HPLC, 83.5% male and 76.2% female among them, and was 48.7% of 114 cases by alkali-resistant assay, 51.7% male and 48.8% female among them. The mean value of HbF between male and female has no significant difference by rank test. **Conclusion** Concentration of HbF in cord blood can be utilized for screening maternal blood contamination of cord blood.

**Key words:** fetal hemoglobin; fetal blood; prenatal diagnosis; chromatography; high pressure liquid

人类血红蛋白由两对珠蛋白链构成。在个体发育不同阶段,胚胎阶段、胎儿阶段和成人阶段,不同的 $\alpha$ 和 $\beta$ 珠蛋白基因簇的开放与关闭控制着人体珠蛋白表型的变化。成人阶段主要表达血红蛋白 A(HbA)和少量的血红蛋白 A<sub>2</sub>(HbA<sub>2</sub>)。而胎儿阶段以胎儿血红蛋白(HbF)表达为主, HbA 仅有少量。血红蛋白在人体发育各阶段都有正常参考值,抗碱法新生儿的 HbF 的正常参考值为 55%~85%<sup>[1]</sup>,但未见相应高效液相色谱法(HPLC)和抗碱法在妊娠中晚期检测胎儿脐带血 HbF 浓度的正常参考值。本文使用 HPLC 和抗碱法检测产前诊断中晚期妊娠胎儿脐带血 HbF 浓度,计算相应正常参考值范围,并应用于产前诊断抽取脐血过程中母血污染脐血的筛查。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 2006 年 7 月至 2007 年 12 月在本院进行中晚期妊娠产前诊断的孕妇抽取脐带血共 116 例,男性胎儿 56 例,女性胎儿 60 例。2008 年 1 月至 2010 年 6 月使用 HPLC 检测脐带血 HbF 相对含量 220 例,男性胎儿 119 例,女性胎儿 101 例。

**1.2 染色体核型分析** 肝素钠抗凝管脐带血 0.3 mL 加入拜迪生产的外周血淋巴细胞培养基 5 mL 内,37℃ 培养 70 h,加入秋水仙素终浓度 0.04~0.08  $\mu$ g/mL 继续培养 2 h,常规低渗、固定、制片、G 显带程序操作,计数 20 个核型,LEICA CD4000 系统分析大于等于 5 个核型。

**1.3 抗碱法 HbF 定量检测** 方法见文献<sup>[1]</sup>。

**1.4 HbF 定量检测** HPLC 采用美国 Bio-Rad 公司生产的 Hb 自动分析仪-VARIANT™ II ( $\beta$ -thalassemia Short Program)及厂家提供的配套试剂。每次进行 HPLC 分析时先测定厂家配套的高低两个浓度的质控品,室内质控合格才进行研究对象标本 HbF 的分析测定。每例标本(或质控品)取 5  $\mu$ L,用 1 mL 的超纯水稀释,颠倒 7~8 次混匀后放置在专用试管架上自动分析测定,6~7 min 后显示定量测定结果。

## 2 结果

**2.1 抗碱法测定 HbF** 中期妊娠脐带血标本 116 例中,男 56 例,女 60 例。女性标本中有 2 例 HbF 在 3.0% 以下,作为异常值排除,男性 HbF 均值 72.3%, $s=13.8$ ,女性 HbF 均值 72.2%, $s=15.4$ ,男女整体 HbF 均数 72.3%, $s=14.8$ 。秩和检验男女性别之间均值差异无统计学意义。

**2.2 HPLC 测定 HbF** 中晚期妊娠脐带血标本 220 例中,男 119 例,女 101 例。去掉 5 例极端值,其中 4 例 HbF>100% (女 1 例,男 3 例),1 例 HbF $\leq$ 35%(女性)。215 例中,脐带血 HbF 均值 94.5%, $S=5.6$ 。其中男性胎儿 HbF 均值为 95.2%, $s=4.5$ ;女性胎儿 HbF 均值为 93.7%, $s=8.8$ 。秩和检验男女性别之间均值差异无统计学意义。

**2.3 染色体核型分析结果** 在抗碱法检测的 114 例胎儿中,染色体数目异常 5 例,染色体结构异常 4 例,染色体多态 6 例,共计 15 例。HPLC 法检测的 215 例胎儿中,数目异常 12 例,结构异常 3 例,9 号倒位 8 例,其他染色体多态 3 例,共 26 例。

染色体多态和数目结构异常占整体的 12.5%。

**2.4 抗碱法检测 HbF** 单侧下限 99% 可信区间 HbF 正常参考值:百分位数法求得,整体单侧下限  $P_{0.5}=48.7\%$ ,女性胎儿  $P_{0.5}=48.8\%$ ,男性胎儿  $P_{0.5}=51.7\%$ 。

**2.5 HPLC 法检测 HbF** 单侧下限 99% 可信区间参考值:整体为  $P_{0.5}=79.4\%$ ,男性胎儿  $P_{0.5}=83.5\%$ ,女性胎儿  $P_{0.5}=76.2\%$ 。

### 3 讨 论

人类  $\alpha$  和  $\beta$  珠蛋白基因簇按照其在染色体上的排列顺序由 5' 端向 3' 端基因顺序表达和关闭,形成了个体发育的不同时期 6 种珠蛋白表达种类的变化。6 种人类的珠蛋白分别为: HbGower1( $\zeta 2\epsilon 2$ )、HbGower2( $\alpha 2\epsilon 2$ )、Hb potland( $\zeta 2\gamma 2$ )、HbF( $\alpha 2\gamma 2$ )、HbA( $\alpha 2\beta 2$ )、HbA2( $\alpha 2\delta 2$ )。HbGower1 和 HbGower2 在妊娠早期合成,妊娠中晚期主要为 HbF,妊娠晚期出现少量 HbA 和 HbA2。正常情况下出生后 3~4 个月完成成人型血红蛋白肽链转变,HbA 达 95% 以上,少量 HbA2<sup>[2]</sup>。不同血红蛋白的携氧和释氧能力不同,不同类型血红蛋白相互更替对维持正常机体的生理功能具有重要意义。成人阶段胎儿血红蛋白 F 的升高出现在贫血、珠蛋白生成障碍性贫血、白血病或遗传性胎儿血红蛋白持续症等疾病<sup>[3-4]</sup>。本文探讨妊娠中晚期胎儿阶段 HbF 的下限,目的在于对产前诊断胎儿标本抽取过程母血误抽污染胎血的筛查判断。

使用抗碱法和 HPLC 方法检测 336 例产前诊断脐血 HbF 相对浓度,共 3 例女性胎儿 HbF 异常低下,其中 1 例母血污染的女胎脐带血 HbF 相对浓度为 35%,2 例女胎脐带血 HbF 浓度小于 3%。后者属于在脐带血抽取技术开展的初期发生的误抽,其相应的 HbF 浓度值在计算 99% 可信区间单侧下限值过程中被作为极端值去除。抗碱法和 HPLC 法检测 HbF 的数据均呈现非正态分布,进行对数转换后乃呈非正态分布。因此均采用百分位数法确定 99% 可信区间单侧下限正常参考值。

抗碱法是广泛使用的检测胎儿血红蛋白的方法。抗碱法检测 HbF 浓度健康成人 1.0%~3.8%,新生儿为 55%~85%<sup>[1,5-6]</sup>,使用抗碱法检测 114 例中晚期妊娠胎儿脐带血的 HbF,计算抗碱法 HbF 单侧下限 99% 可信区间正常参考值为 48.7%。抗碱法的下限界值估计结果受两侧尾部数据的影响较大,尤其是百分范围大于 95%,样本含量不够大时,结果不够稳定。

HPLC 方法检测 HbF 是继抗碱法之后更敏感、特异和准确的方法<sup>[7-10]</sup>,在珠蛋白生成障碍性贫血的筛查和诊断中已广泛使用。采用 HPLC 方法检测 215 例妊娠中晚期产前诊断的脐带血 HbF,用百分位数法确定 99% 可信区间单侧下限正常参考值 HbF 为 79.4%。HPLC 法检测 HbF 单侧下限 99% 可信区间参考值较抗碱法提高了约 30%,从两种方法的统计描述中可以发现 HPLC 检测 HbF 的数据离散度较抗碱法也明显集中,均有利于母血污染胎血的判断。

随着产前诊断技术的普及应用,临床上越来越多高危孕妇需要进行脐带血染色体核型分析<sup>[11-15]</sup>。作为产前诊断的一部分,染色体分析报告发出之前必须对脐带血的来源进行确证。胎儿脐带血与母体血液如果发生混合,可引起染色体分析结果的误判。在脐带血抽取的过程中,如果发生母血的污染或者误

抽母血的情况,则脐血中 HbF 的相对浓度遭遇母体血的稀释,表现出 HbF 浓度降低。对于 HbF 浓度明显小于 79.4% 单侧下限界值的,高度怀疑为母血污染或误抽,有必要进一步采用亲子鉴定方法予以确证。

HPLC 方法提高了 HbF 的正常参考值下限,并且缩小了检测数据的离散度,在脐带血染色体核型分析中,是一种经济有效的筛查母血污染脐带血的方法。

### 参考文献:

- [1] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 南京:东南大学出版社,1991:52.
- [2] 曾溢滔. 人类血红蛋白[M]. 北京:北京科学出版社,2002:95.
- [3] Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis[M]. Malden MA: Blackwell Publishing Inc,2006:210.
- [4] Randie R, Roberts WL. A Review of Variant Hemoglobins Interfering with Hemoglobin A1c Measurement[J]. J Diabetes Sci Technol,2009,3(3):446-451.
- [5] 汤丽霞,杨光,曾劲伟,等. 用 ROC 曲线确定 Hb-A2 在地贫诊断中的界值[J]. 现代预防医学,2004,1131(13):353-355.
- [6] 汤丽霞,李仲笑,张晶,等. 血红蛋白 A2 在地中海贫血筛查中的应用价值[J]. 中国循证医学杂志,2005,5(1):47-50.
- [7] Shiao SY, Ou CN, Pierantoni Hector. The measurement of accurate fetal hemoglobin and related oxygen saturation by the hemoximeter[J]. Clin Chim Acta,2006,374(1/2):75-80.
- [8] 曾劲伟,杨光,崔金环,等. 高效液相色谱法检测血红蛋白 A2 诊断  $\beta$ -地中海贫血携带者的最佳阈值[J]. 中国循证医学杂志,2009,9(8):828-831.
- [9] Ou CN. Diagnosis of hemoglobinopathies by high-performance liquid chromatography[J]. J Biomed Sci,1997,4(6):315-318.
- [10] Ou CN, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC[J]. Clin Chim Acta,2001,313(1/2):187-194.
- [11] 刘东云,何瑶,文宏贵,等. 胎儿脐血管穿刺产前诊断 100 例临床分析[J]. 重庆医学,2010,39(2):202-203.
- [12] 顾京红,罗来敏,黄亚娟. 脐血管穿刺安全性研究[J]. 中国妇幼保健,2006,219(16):2307-2309.
- [13] 梁雄,张德文. 脐静脉穿刺用于产前诊断 230 例分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2003,19(2):112-113.
- [14] 王丽娟,段程颖,傅文字,等. 902 例产前诊断染色体核型分析[J]. 苏州大学学报:医学版,2008,28(5):862-863.
- [15] 宋桂宁,梁梅英. 胎儿脐血染色体异常与超声异常改变的相关性[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2009,25(11):850-852.