

Human embryonic ζ - globin chains ในเลือดสายสะดือทารก

รัชณี อัครรุ่งนิรันดร์, วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)*

บทคัดย่อ

Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะมากที่สุดวิธีหนึ่งในการตรวจ human embryonic ζ -globin chains ซึ่งในการศึกษานี้เราได้ใช้ ELISA ตรวจหา ζ - globin chains ในเลือดสายสะดือของทารกปกติ และทารกที่เป็น α - thalassemia เช่นเดียวกันเราใช้วิธีนี้ตรวจเลือดจากผู้ใหญ่ที่เป็น α - thalassemia, β - thalassemia, Hb E และผู้ใหญ่ปกติพบว่าในเลือดสายสะดือของทารกปกติจะมี ζ - globin chain สูงกว่าในผู้ใหญ่ปกติ ส่วนในเลือดสายสะดือของทารกและในผู้ใหญ่ที่มี α - thalassemia-1 (Southeast Asian type) จะมี ζ - globin chains สูงมาก

Abstract

Human embryonic ζ - globin chains in newborn cord blood

Ruchanee Ausavarungnirun, M.S. (Clinical Pathology)*

A sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for human embryonic ζ - globin chains was used to study normal newborn cord blood and α - thalassemia cord blood as well as blood from adults with α - thalassemia, β - thalassemia Hb E and normal. In cord blood hemolysates from normal newborns, the levels of ζ - globin chain content were higher than normal adults. Newborns and adults who were carriers of α - thalassemia-1(Southeast Asian type) had very high levels of ζ - globin chains. (MJS 1999 ; 2 : 65 - 69)

บทนำ

ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในเม็ดเลือดแดงของคน มีหน้าที่นำออกซิเจนจากปอดไปยังเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย การสร้าง

ฮีโมโกลบินในคนนั้นสัมพันธ์กับขั้นตอนของการเจริญเติบโตตั้งแต่เป็น embryo มาเป็น fetus และ adult โมเลกุลของฮีโมโกลบินที่สังเคราะห์เริ่มต้นตั้งแต่ในระยะเวลาที่เป็น embryo คือ Hb Gower 1 ($\zeta_2 \epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) และ Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$) ต่อมา

* ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Department of Pathology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

เมื่อเด็กในครรภ์มีอายุประมาณ 8 สัปดาห์การสร้าง embryonic Hb จะน้อยลงและเริ่มมีการสังเคราะห์ fetal Hb (Hb F) ขึ้น ภายหลังจากนี้ fetal Hb จะถูกสร้างเพิ่มมากขึ้นจนมีปริมาณถึงร้อยละ 90 ของฮีโมโกลบินทั้งหมดใน fetus และจะมีปริมาณคงที่อยู่เช่นนี้ จนถึงระยะใกล้คลอด Hb A ถูกสร้างขึ้นในปริมาณน้อยๆ ตั้งแต่ fetus อายุประมาณ 6 สัปดาห์ จึงพบ Hb A ประมาณร้อยละ 5-10 เมื่อครรภ์มีอายุประมาณ 30 สัปดาห์การสังเคราะห์ Hb F จะลดลง และ Hb A ถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้นพร้อมกับการสังเคราะห์ Hb A₂ ด้วย ภายหลังคลอดประมาณ 6 เดือน พบว่าฮีโมโกลบินส่วนใหญ่ร่างกายเป็น Hb A และ Hb F มีปริมาณน้อยลงกว่าร้อยละ 1 ของฮีโมโกลบินทั้งหมด¹

แต่เดิมเชื่อกันว่าทารกในครรภ์สร้าง embryonic ζ -globin chain เฉพาะช่วงอายุครรภ์ 2 เดือนแรก เท่านั้น² ยกเว้นทารกที่เป็น Hb Bart's hydrops fetalis ซึ่งไม่มี α -globin gene เลยนั้นจะยังคงสร้าง ζ -globin ได้จนถึงระยะใกล้คลอดต่อมา Chui และคณะตรวจพบ ζ -globin ใน hemolysate ของผู้ใหญ่ที่มี α -thalassemia 1 (Southeast Asian type) ด้วย^{3,4}

ในการศึกษานี้เราใช้ ELISA ตรวจหา human embryonic ζ -globin chains ในเลือดสายสะดือทารกแรกเกิดที่ปกติพบว่ามี embryonic ζ -globin chains ในเลือดสายสะดือทารกแรกเกิดที่ปกติ สูงกว่าในผู้ใหญ่ปกติเล็กน้อยและในเลือดสายสะดือทารกแรกเกิดและในผู้ใหญ่ที่มี α -thalassemia 1 (Southeast Asian type) จะมี embryonic ζ -globin chains สูงมาก หนึ่งการทดสอบ ELISA ที่เรามาใช้ในการศึกษานี้เป็นการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะมากที่สุดวิธีหนึ่งที่รู้ชื่และคณะได้ทำการศึกษามาแล้ว^{5,6,7} กล่าวคือมี sensitivity ถึง 100% และมี specificity ถึง 99.5 %

วัตถุประสงค์

เพื่อจะเปรียบเทียบค่า embryonic ζ -globin chains ในเลือดสายสะดือเด็กทารกปกติว่ามีค่าสูงกว่าในผู้ใหญ่ปกติ และเพื่อเปรียบเทียบกับค่า embryonic

ζ -globin chains ในเด็กทารกและในผู้ใหญ่ภาวะที่เป็น thalassemia ชนิดต่างๆ

วัสดุและวิธีการ

เก็บตัวอย่างเลือดทั้งเลือดสายสะดือและเลือดผู้ใหญ่ การแยกชนิดของตัวอย่างเลือดทำโดยการตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา การวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบิน (Hb type) การวัดปริมาณ Hb Bart's ด้วย HPLC Variant การวิเคราะห์ α -thalassemia 1 ในบางรายด้วย PCR technic และจากการทำ family study การเก็บเลือดสายสะดือนั้นมีจำนวนทั้งสิ้น 204 รายแบ่งเป็นสายสะดือปกติ 91 ราย, α -thalassemia 1 15 ราย, Hb H disease 2 ราย EA Bart's 1 ราย, EF Bart's 1 ราย, other α -thalassemia 90 ราย และ Hb Bart's hydrops fetalis 4 ราย ส่วนเลือดผู้ใหญ่มี 5 กลุ่มคือคนปกติ 32 ราย ผู้ที่เป็นพาหะ β -thalassemia trait 17 ราย Hb E trait 31 ราย HbE/ α -thalassemia 1 trait 18 ราย และ α -thalassemia 1 trait 22 ราย

การตรวจ ELISA ทำโดยเคลือบ solid phase ด้วย ζ -globin ซึ่งอยู่ในน้ำยามาตรฐาน (standard) ซึ่งได้จาก Hb Bart's hydrops fetalis หรือใน hemolysate ของตัวอย่างตรวจ ล้างและอบด้วย antibody ต่อ ζ -globin ที่มี enzyme ติดอยู่ (horse-radish peroxidase - conjugated anti - ζ -antibody) ล้างและเติม substrate (TMB solution) จะเกิดสีฟ้าขึ้น ปริมาณของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงไปจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ ζ -globin เมื่อเติม 0.2 M sulfuric acid เพื่อหยุดปฏิกิริยา สีฟ้าจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่านค่า O.D. ที่ 450 nm. โดยใช้ ELISA plate reader ในการทดลอง ทุกครั้ง ทุก plate ที่ทำ ELISA ต้องมี Standard ζ -globin ที่ความเข้มข้น 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 และ 0% ζ -globin ค่า % ζ -globin ของตัวอย่างตรวจนั้นได้จากการเทียบค่า O.D ของตัวอย่างตรวจกับค่าที่ได้จาก standard curve

ผลการศึกษา

ตารางที่ 1 ค่า ζ -globin chain ในเลือดสายสะดือทารก

กลุ่ม	จำนวน	ζ -globin chain (%)	
		Range	Mean \pm SD
Normal	91	0 – 0.14	0.01 \pm 0.03
α – thalassemia 1	15	0.21 – 0.83	0.57 \pm 0.21
Hb H disease	2	0.34, 0.57	
EA Bart's	1	0.42	
EF Bart's	1	0.31	
Other α – thalassemia	90	0 – 0.17	0.04 \pm 0.06
Hb Bart's hydrops fetalis	4	0.72 – 1.72	1.24 \pm 0.46

ตารางที่ 1 และตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าค่า ζ -globin chain ในทารกปกติ นั้นสูงกว่าในผู้ใหญ่ปกติ กล่าวคือในจำนวนทารกปกติ 91 คน สามารถตรวจพบ ζ -globin chain ได้ 20 % และมีค่า % ζ -globin chain เท่ากับ 0.01 ± 0.03 ส่วนในผู้ใหญ่ปกติ นั้นตรวจพบเพียง 1 คน ในจำนวนทั้งหมด 32 คน และมีค่า % ζ -globin เพียง 0.001 ± 0.004 เท่านั้น ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าแม้ในทารกปกติเรายังสามารถตรวจพบ ζ -globin chain ได้จำนวนน้อยๆ

ส่วนในเลือดสายสะดือทารกกลุ่ม other α -thalassemia จำนวน 90 คนนั้นสามารถตรวจพบ ζ -globin chain ได้ถึง 43.3 % และมีค่า % ζ -globin

chain เท่ากับ 0.04 ± 0.06 (จากตารางที่ 1)

เลือดสายสะดือทารกอีก 23 รายที่มี α -thalassemia 1 นั้น พบว่ามี % ζ -globin สูงมาก กล่าวคือ α -thalassemia 1 trait 15 คนมี % ζ -globin 0.57 ± 0.21 Hb H disease 2 คนมีค่า % ζ -globin 0.34 และ 0.57 ตามลำดับ EA Bart's 1 คน มีค่า % ζ -globin 0.42 EF Bart's 1 คน มีค่า % ζ -globin 0.31 และ Hb Bart's hydrops fetalis 4 คน มีค่า % ζ -globin 1.24 ± 0.46 (จากตารางที่ 1)

ในเลือดผู้ใหญ่ (ดูตารางที่ 2) จะพบว่าพวกที่ไม่มียีน α -thalassemia 1 ซึ่งได้แก่ในกลุ่มคนปกติ,

ตารางที่ 2 ค่า ζ -globin chain ในเลือดผู้ใหญ่

กลุ่ม	จำนวน	ζ -globin chain (%)	
		Range	Mean \pm SD
Normal	32	0–0.02	0.001 \pm 0.004
β – thalassemia trait	17	0–0.02	0.002 \pm 0.007
HbE trait	31	0–0.08	0.0026 \pm 0.01
Hb E/ α -thalassemia1 trait	18	0.05–0.86	0.461 \pm 0.262
α -thalassemia 1 trait	22	0.03–1.05	0.40 \pm 0.35

β -thalassemia trait, Hb E trait นั้นแทบจะตรวจไม่พบ ζ -globin chain เลยคือในกลุ่มคนปกติ 32 คนตรวจพบ % ζ -globin chain 0.02 จำนวน 1 คน ในกลุ่ม β -thalassemia trait 17 คน ตรวจพบ % ζ -globin chain 0.02 2 คน และในกลุ่ม Hb E trait 31 คน ตรวจพบ % ζ -globin chain 0.08 1 คน ตามลำดับ แต่ในกลุ่มผู้ใหญ่ที่มี α -thalassemia 1 นั้น สามารถตรวจพบ ζ -globin chain ได้ทุกราย และมีค่าสูงเช่นเดียวกับในกลุ่มเลือดสายสะดืออาหาร กล่าวคือ Hb E/ α -thalassemia 1 trait 18 คน พบ % ζ -globin chain 0.46 ± 0.262 และ α -thalassemia 1 trait 22 คน พบ % ζ -globin chain 0.40 ± 0.35

วิจารณ์

Human embryonic ζ -globin chains คือ α -globin like chains ซึ่งเคยเชื่อกันว่าจะพบในช่วง 7 สัปดาห์แรกของการตั้งครรภ์เท่านั้น² ต่อมา Hecht et al เป็นกลุ่มแรกที่เริ่มรายงานว่าพบ Hb Portland 1 ($\zeta_2 \gamma_2$) ในเลือดสายสะดืออาหารปกติ 2 คน โดยใช้ IRC-50 chromatography พบ % Hb Portland มีค่า 0.1 และ 0.2 ตามลำดับ³ จากนั้นได้มีการศึกษาพบว่า ζ -globin m RNA transcripts มีอยู่ใน peripheral blood cells และ liver cell ของ fetus อายุ 10-25 สัปดาห์⁹⁻¹¹ นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาพบว่ามี ζ -globin m RNA อยู่ในเลือดสายสะดืออาหารปกติ¹² ต่อมา Chui และคณะใช้ RIA (radioimmunoassay) สำหรับตรวจ ζ -globin chain เลือดทารกในครรภ์แม่ปกติที่มีอายุครรภ์ 17 ถึง 30 สัปดาห์ พบ % ζ -globin chain 0.27 ± 0.15 ส่วนที่มีอายุครรภ์ 31 ถึง 37 สัปดาห์ พบ % ζ -globin chain 0.14 ± 0.11 และในเลือดสายสะดือเด็กแรกคลอดที่ปกติพบ % ζ -globin chain 0.15 ± 0.11 ส่วนในเด็กปกติที่คลอดแล้วอายุ 3 เดือน ถึง 2 ปี นั้นไม่พบ ζ -globin chain เลย และในทารกแรกคลอดที่มี α -thalassemia -1 (Southeast Asian type) จะตรวจพบ % ζ -globin สูงมากทุกราย^{13,14} นอกจากนี้ Kutlar et al ใช้ HPLC (High-performance liquid chromatography) ตรวจเลือดสายสะดือทารกแรกคลอดคนผิวดำ สามารถตรวจพบ

ζ -globin chain 12 คนในจำนวนทารกทั้งหมด 23 คน¹⁵ ในการศึกษาที่เราพบ ζ -globin chain ในเลือดสายสะดือทารกปกติ 20% และมีค่า % ζ -globin chain 0.01 ± 0.03 ในกลุ่มเลือดสายสะดือทารก other α -thalassemia จำนวน 90 คนนั้น สามารถตรวจพบ ζ -globin chain ได้ถึง 43.3% และมีค่า % ζ -globin chain เท่ากับ 0.04 ± 0.06 (จากตารางที่ 1) ส่วนในผู้ใหญ่ปกติที่ตรวจพบ ζ -globin chain เพียง 1 คน ในจำนวนทั้งหมด 32 คน และมีค่า % ζ -globin เพียง 0.001 ± 0.004 เท่านั้น การศึกษานี้เป็นการยืนยันการศึกษาของผู้อื่นที่กล่าวมาแล้วว่าสามารถตรวจพบ ζ -globin chain ได้ แม้ในทารกแรกคลอด แต่เมื่อเด็กทารกโตขึ้นมา ζ -globin chain จะหายไป ยกเว้นในผู้ใหญ่ที่มี α -thalassemia -1 (Southeast Asian type) ที่จะมี % ζ -globin chain สูงตั้งแต่แรกคลอดและค่าสูงจนเติบโตเป็นผู้ใหญ่ ดังตารางที่ 1, 2

เอกสารอ้างอิง

1. Karlsson S, Nienhuis AW: Developmental regulation of human globin genes. Annu Rev Biochem 1985; 54 : 1071.
2. Peschle C, Mavilio F, Cae A, Migliaccio G, Migliaccio AR, Salvo G, Samoggia P, Petti S, Guerriero R, Marinucci M, Lazzaro D, Russo G, Mastroberardino G: Haemoglobin switching in human embryos: Asynchrony of $\zeta \rightarrow \alpha$ and $\epsilon \rightarrow \gamma$ globin switches in primitive and definitive erythropoietic lineage. Nature 1985; 313 : 235.
3. Chui DHK, Wong SC, Chung S-W, Patterson M, Bhargava S, Poon M-C: Embryonic ζ -globin chains in adults: a marker for α -thalassemia -1 haplotype due to a > 17.5 kb deletion. N Engl J Med 1986; 314 : 76.
4. Chung SW, Wong SC, Clarke BJ, Patterson M, Walker WHC, Chui DHK: Human embryonic ζ -globin chains in adult patients with α -thalassemias. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81 : 6188.
5. Ausavarungnirun R, Winichagoon P, Fucharoen S, Epstein N and Simkins R: Detection of ζ -globin chains in the cord blood by ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay): rapid screening for α -thalassemia 1 (Southeast Asian type) Am J Hemato 1998; 57: 283-6.
6. รัตน์ ชัยรุ่งนรินทร์, ปราณี วินิจจะกุล, Nava Epstein, Ronald Simkins, สุทัศน์ พุเจริญ Detection of zeta globin chains, a marker for Southeast Asian type α -thalassemia 1, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Thai J Hematology Transfusion Med 1996; 3 : 185 - 9.

7. ริชชี อัครรุ่งนรินทร์ คำถามจากภาพ เวชสารคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 2539 ; 2 : 117 และ 99.
8. Hecht F, Jones RT, Koler RD : Newborn infants with Hb Portland 1, an indicator of α - chain deficiency. Ann Hum Genet Lond 1967 ; 31 : 215.
9. Hill AVS, Nicholls RD, Thein SL, Higgs DR : Recombination within the human embryonic ζ - globin locus : A common ζ - ζ chromosome produced by gene conversion of the $\psi\zeta$ gene. Cell 1985 ; 42 : 809.
10. Yagi M, Gelinas R, Elder JT, Peretz M, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Groudine M : Chromatin structure and developmental expression of the human α - globin cluster. Mol Cell Biol 1986 ; 6 : 1108.
11. Ley TJ, Maloney KA, Gordon JI, Schwartz AL : Globin gene expression in erythroid human fetal liver cells. J clin Invest 1989 ; 83 : 1032.
12. Albitar M, Peschle C, Liebhaber SA : Theta, zeta and epsilon globin m RNAs are expressed in adults. Blood (in press)
13. Chui DHK, Mentzer WC, Patterson M, Iarocci TA, Embury SH Human embryonic ζ - globin chains in fetal and newborn blood. Blood 1989 ; 4 : 1409 - 14.
14. Chui DHK, Iarocci TA, Embury SH, Mentzer WC : Human embryonic zeta globin chains in newborn blood. Blood 1986 ; 68 : 72 a.
15. Kutlar F, Fei YJ, Wilson JB, Kutler A, Huisman THJ : Detection of the embryonic ζ chain in blood from newborn babies by reversed phase high performance liquid chromatography. J chromatogr 1987 ; 394 : 333.