

四川泸州地区贫血患儿地中海贫血筛查和基因诊断结果分析

陈红英, 邹艳, 刘春艳, 刘文君

泸州医学院附属医院儿科, 四川 泸州 646000

摘要: **目的** 分析四川泸州地区地中海贫血的发病率及基因突变类型和构成比。**方法** 对泸州地区 556 例贫血患儿采用红细胞渗透脆性、血清铁蛋白、血红蛋白电泳进行筛查, 筛查阳性者应用 PCR 方法结合 DNA 芯片杂交技术以及反向斑点杂交法分别进行 α 、 β -地中海贫血基因突变位点分析。**结果** 556 例贫血患儿中, 地贫筛查阳性 176 例(阳性率 31.65%), 基因诊断阳性 136 例(阳性率 24.46%), 其中 α -地贫 53 例, β -地贫 81 例, α 合并 β 地贫 2 例。53 例 α -地贫患儿共检出 7 种突变基因型, 其中 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ 缺失型占 39.62%, $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 缺失型 26.42%。82 例 β -地贫患儿共检测出 7 种基因突变类型, 有 14 种基因组合形式。其中以 CD17(A→T)、IVS-II-654(C→T) 和 CD41/42(-TTCT) 最多见。**结论** 四川泸州地区地中海贫血基因突变发生率较高; 基因诊断是确诊地中海贫血的重要标准。

关键词: 地中海贫血; 筛查; 基因诊断

中图分类号: R725.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-6579(2013)11-1139-03

Biochemical screening and genetic diagnosis of thalassemia in children with anemia from Luzhou. CHEN Hong-ying, ZOU Yan, LIU Chun-yan, LIU Wen-jun. (Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Corresponding author: LIU Wen-jun, E-mail: lwjlyfy@sina.com.cn

Abstract: **Objective** To explore the types and frequency of gene mutations in children with thalassemia in Luzhou, Sichuan Province. **Methods** A biochemical screening for thalassemia was performed by laboratory examination RBC osmotic fragility, serum ferritin and hemoglobin electrophoresis on 556 children with anemia from Luzhou, Sichuan Province. Genetic diagnosis was performed on the children with α -thalassemia by gap-PCR and on the children with β -thalassemia by PCR-Reverse Dot Blot(PCR-RDB). **Results** The positive cases of the biochemical screening for thalassemia were 176(31.65%). The positive of genetic diagnosis was 136(24.46%). Of the 136 cases, α -thalassemia was found in 53 cases, β -thalassemia in 81 cases and α -combined β -thalassemia in 2 cases. 7 types of mutation genotypes were detected in 53 cases of α -thalassemia, the proportions of $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ were 39.62%, the proportions of $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ were 26.42%. 7 different mutation were identified in 81 cases of β -thalassemia, there were 14 different gene types. CD17(A→T), IVS-II-654(C→T) and CD41/42(-TTCT) were the most frequent genic mutations. **Conclusions** The frequency of gene mutations for thalassemia is high in children from Luzhou, Sichuan province. Gene diagnosis is a accurate and reliable method to diagnose thalassemia.

Key words: thalassemia; biochemical screening; gene diagnosis

地中海贫血(简称地贫)又称海洋性贫血、珠蛋白生成障碍性贫血,是遗传性溶血性贫血的一组疾病,其共同特点是珠蛋白基因的缺陷使一种或几种珠蛋白肽链合成减少或不能合成,导致血红蛋白的组成成分改变而临床表现为不同程度的贫血。本病以地中海沿岸和东南亚各国多见,我国以长江以南各省发病率高,在北方较为少见^[1]。本病严重威胁小儿的生命和健康,特别是重型患儿,要靠规范化的终身输血联合去铁治疗维持生命^[2]。因此,如何预防本病,特别是避免重型患儿的出生,是地中海贫血高发地区预防工作的重点。泸州地处地中海贫血高

发地区四川省,为初步了解该地区地中海贫血的发病率及基因突变类型,本研究对 2009 年 10 月—2012 年 12 月到泸州医学院附属医院就诊的 556 例贫血患儿进行地贫筛查和基因检测分析,现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 收集 2009 年 10 月—2012 年 12 月在本院儿科住院或门诊就诊的贫血患儿 556 例,年龄 52 d~12 岁,其中男 192 例,女 164 例。血常规检查呈不同程度的小细胞低色素性贫血,经红细胞渗透脆性试验、血清铁蛋白以及血红蛋白电泳分析等检测后,进一步进行地中海贫血基因诊断分析。

1.2 方法

1.2.1 血常规检测 用日本全自动 Sysmex XT-

【作者简介】 陈红英(1971-),女,四川人,副主任医师,硕士学位,主要研究方向为小儿血液。

【通信作者】 刘文君, E-mail: lwjlyfy@yahoo.com.cn

2000i 血细胞分析仪进行血常规分析,取 Hb < 110g/L、MCV < 80fl 为截断值。

1.2.2 红细胞渗透脆性试验 采用米基公司比色一管定量法,取溶血百分率 < 63% 为截断值。

1.2.3 血清铁蛋白 用德国 Roche 公司 Elecsys 2010 型分析仪进行检测,取铁蛋白 > 12 μg/L 为截断值。

1.2.4 血红蛋白电泳 采用全自动琼脂糖凝胶 HLC-723G7 型电泳仪分析系统进行检测。由美国 Helena 公司生产,包括全自动光密度扫描仪以及相应配套的 Alkaline 血红蛋白琼脂糖凝胶电泳试剂。

1.2.5 基因组 DNA 提取 抽取静脉血 5 mL,放入含枸橼酸钠抗凝剂管中,采用酚-氯仿抽提法,试剂盒由亚能公司提供的全血 DNA 快速提取试剂盒,按照地贫基因检测试剂要求提取样本的人基因组 DNA 备用。

α -地贫基因检测 取 PCR 扩增产物 5 μL 与电泳加样缓冲液 2.0 μL 混匀,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳在稳压 5V/cm 电压下电泳 60 min,分析 PCR 产物 DNA,最后采用凝胶成像分析仪观察并保存结果。 β -地贫基因检测 用 PCR 结合 RDB 技术,扩增产物进行反向斑点杂交、显色观察结果。

1.3 统计学方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用 SPSS 16.0 统计学软件进行方差分析。

2 结果

2.1 地中海贫血筛查结果 556 例贫血患儿中,红细胞渗透脆性实验 < 63%、MCV < 80fl、MCH < 26 pg 和铁蛋白 > 12 μg/L 者共 176 例,地贫筛查阳性率 31.65%。其中,HbA2 < 3.5% 和出现异常血红蛋白带(HbH、HbBart'S)者 78 例,初步判断为 α -地贫,占地贫筛查阳性的 44.32%;HbF > 3.2% 和/或 HbA2 > 3.5% 者 98 例,初步判断为 β -地贫,占地贫筛查阳性的 55.68%。

2.2 地中海贫血基因诊断结果 地贫筛查阳性患儿 176 例都进行地中海贫血的基因诊断,基因诊断阳性患儿为 136 例,其中, α -地贫 53 例, β -地贫 81 例, $\alpha\beta$ 复合型地贫 2 例。基因诊断具体结果见表 1~4。

表 1 53 例 α -地贫基因型及构成比

Tab. 1 53 cases of α -thalassemia genotypes and constituent ratio

基因型	例数	表型	构成比 (%)
--SEA / $\alpha\alpha$	21	标准型	39.62
- $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$	14	静止型	26.42
- $\alpha^{4.2}$ / $\alpha\alpha$	7	静止型	13.21
--SEA / - $\alpha^{3.7}$	5	中间型	9.43
--SEA / - $\alpha^{4.2}$	3	中间型	5.66
- $\alpha^{3.7}$ / - $\alpha^{3.7}$	1	标准型	1.89
- $\alpha^{3.7}$ / - $\alpha^{4.2}$	2	标准型	3.77
合计	53		100.00

表 2 α -地贫等位基因及构成比

Tab. 2 α -thalassemia alleles and constituent ratio

基因类型	等位基因数	构成比 (%)
--SEA	29	46.03
- $\alpha^{3.7}$	22	34.92
- $\alpha^{4.2}$	12	19.05
合计	63	100.00

表 3 81 例 β -地贫患儿基因型及构成比

Tab. 3 81 children cases of β -thalassemia genotypes and constituent ratio

类别	基因型	表型	例数	构成比 (%)
β^0 纯合子	CD41/42/CD41/42	重型	5	6.17
	CD17/CD17	重型	4	4.94
β^0/β^0 双重杂合子	IVS-II-654/CD17	重型	5	6.17
	IVS-II-654/CD41/42	中间型	5	6.17
		重型	3	3.70
		中间型	4	4.94
β^0/β^+ 双重杂合子	CD41/42/CD17	中间型	1	1.23
	IVS-II-654/-28M	重型	2	2.47
	CD41/42/-28M	中间型	2	2.47
β^0 杂合子	CD41/42/-28M	重型	1	1.23
		中间型	1	1.23
	CD17	轻型	16	19.76
	CD41/42	轻型	13	16.06
	IVS-II-654	轻型	10	12.35
	CD43	轻型	2	2.47
β^+ 杂合子	CD14-15	轻型	1	1.23
	CD27-28	轻型	2	2.47
	-28M	轻型	4	4.94
合计			81	100.00

表 4 β -地贫等位基因及构成比

Tab. 4 β -thalassemia alleles and constituent ratio

基因类型	等位基因数	构成比 (%)
CD17	31	29.52
IVS-II-654	31	29.52
CD41/42	28	26.67
-28M	10	9.52
CD43	2	1.91
CD27-28	2	1.91
CD14-15	1	0.95
合计	105	100.00

3 讨论

3.1 地中海贫血的诊断 地中海贫血的实验室诊断分为常规诊断和基因诊断两大类。常规诊断主要为血液学检查项目,用于地中海贫血的血液学表型筛查,主要包括红细胞参数测定、红细胞渗透脆性试验、血红蛋白电泳分析、血清铁代谢指标检测等,这是血红蛋白病专门的实验室诊断指南^[3-4]和国际地中海贫血联合会(Thalasaemia International Federation, TIF)推荐的地贫初诊技术^[5]。这些实验指标对于地贫特征性的筛查和鉴别诊断的意义十分重要,但这些初筛指标没有一种能够单独用于地贫携带者的诊断,必须进行联合检测、综合分析^[6]。本研究中泸州地区 556 例贫血患儿地贫筛查阳性 176

例,阳性率达 31.65%,基因诊断阳性 136 例,阳性率为 24.46%,略低于广西西南地区的地贫发生率^[7],但仍明显高于国内其他地区。这提示本地区地中海贫血发生率较高,因此,有必要在人群中广泛开展地中海贫血的筛查及基因诊断。

3.2 泸州地区 α -地中海贫血以 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 基因缺失型为主 人类 α 珠蛋白基因位于第 16 号染色体短臂末端,该基因突变可使 α -珠蛋白基因下调而抑制 α 珠蛋白链产生。 α -地贫基因突变主要为缺失型,全球已发现约 65 种不同的缺失型,右缺失 ($-\alpha^{3.7}$) 是世界各地分布最广最频的基因型^[8],而我国南方则以东南亚型缺失 ($-\alpha^{SEA}$)、右缺失 ($-\alpha^{3.7}$)、左缺失 ($-\alpha^{4.2}$) 这三种突变基因型最常见^[9]。本研究 53 例 α -地贫患儿共检出 7 种突变基因型,其中 $-\alpha^{SEA}$ 占 46.03%, $-\alpha^{3.7}$ 占 34.92%,显示本地区 α -地中海贫血的基因突变类型及构成比与国内其他地区报导接近^[10-11]。

3.3 泸州地区 β -地中海贫血以 CD17、IVS-II-654 和 CD41/42 基因突变最多见 β 珠蛋白基因位于人类 11 号染色体短臂(11p1.2)上, β 珠蛋白基因缺陷大多数是由于该基因的点突变,少数为基因缺失。目前世界范围内已报道 200 多种 β 基因突变类型,中国人中已发现 34 种,其中最常见 5 种热点突变为 CD17、CD41/42、IVS-II-654、-28M 和 CD71-72,约占突变类型的 90%^[12-13]。本报道 81 例 β -地贫患儿共检测出 7 种基因突变类型,其中以 CD17、IVS-II-654 和 CD41/42 最多见,与中国人常见的主要基因突变类型基本一致。

3.4 地中海贫血的预防 α -地贫、 β -地贫均属于常染色体不完全显性遗传血液病,其临床表现与基因突变类型有较密切的关系。轻型或静止型患儿往往缺乏明显的症状体征和血液学改变指标,极易误诊漏诊,这部分患者虽然平时无症状,但能将其“致病基因”遗传给下一代。因此,一个轻型或静止型地贫患者同正常人结婚,其子女为轻型或静止型患者的几率为 1/2;但若轻型或静止型地贫患者之间结婚,其子女是正常人或重型地贫患者的几率均为 1/4,

是轻型地贫患者的几率为 1/2。重型患儿可导致死胎、流产的发生或重度贫血需要终生依靠输血与去铁治疗维系生命。重型地贫患儿的出生已成为一个重大公共卫生问题。因此,在地贫高发地区积极开展人群筛查,做好婚前指导,避免地贫基因携带者之间联姻,以及产前基因诊断是目前控制地贫患儿出生及病理基因扩散的最有效的手段。

参考文献

- [1] 沈小明,王卫平. 儿科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008;361-364.
- [2] 伍曼仪,黄绍良. 现代小儿血液病学[M]. 福建:福建科学技术出版社,2003;244-250.
- [3] Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis[J]. *Br J Haematol*, 2010, 149: 35-49.
- [4] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京:人民军医出版社, 2011.
- [5] Galanello R, Eleftheriou A, Tarager-Synodinos J, et al. Prevention of thalassemias and other haemoglobin disorders [M]. Cyprus: Thalassemia International Federation Publications, 2003; 46-57.
- [6] 刘贵建,孙士鹏. 地中海贫血的实验诊断:项目和方法的选择及临床应用评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2012(35): 385-389.
- [7] 韦莹慧,韦建华. 桂西南地区贫血儿童地中海贫血筛查及基因分析[J]. *中国妇幼保健*, 2010, 25(19): 2740-2742.
- [8] 吕元,朱汉民,沈霞. 临床实验诊断学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2004; 462-468.
- [9] Chui DHK. Alpha-thalassemia; HbH disease and Hb Bart's hdrops fetalis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 10(4): 25-32.
- [10] 王辉林,郭华,熊礼宽. α 地中海贫血研究进展[J]. *中国热带医学*, 2011, 11(9): 1158-1160.
- [11] 李贵芳,胡玫,许吟,等. 贵州地区 α -地中海贫血基因诊断[J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(11): 1667-1669.
- [12] 张力,区小冰,余一平,等. 广东地区 β 地中海贫血的基因分析与临床观察[J]. *临床血液学杂志*, 2008, 21(1): 5-8.
- [13] 朱凌,罗瑞贵,周天红,等. 广西地区 β 地中海贫血基因突变类型与分析[J]. *华南国防医学杂志*, 2009, 23(2): 41-43.

收稿日期:2013-04-27

本刊网址:www.cjchc.net

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅