

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.03.06

1 例罕见中间型 β 地中海贫血基因诊断及家系分析*任振敏^a, 刘永秋^a, 刘景^a, 刘四喜^b, 李长钢^b, 陈运生^a (深圳市儿童医院 a. 检验科, b. 血液肿瘤科, 广东深圳 518038)

摘要:目的 对 1 例罕见中间型 β 地中海贫血(地贫)家系进行分析,为中间型 β 地贫的诊断及遗传咨询提供新的依据。方法 采集该家系成员静脉血样本,采用血细胞分析仪和毛细管血红蛋白电泳仪进行血液学分析;采用 PCR-反向膜点杂交法(PCR-RDB)以及 Sanger 测序法对该家系成员进行 β 地贫基因检测。结果 先证者为 -86(C>A) β^+ 复合 IVS-II-654(C>T) β^+ 双重杂合子,中度贫血;其父亲为 IVS-II-654(C>T) β^+ 杂合子,无贫血症状,仅表现为小细胞;其母亲为 -86(C>A) β^+ 杂合子,轻度贫血。结论 成功检出 -86(C>A)复合 IVS-II-654(C>T) 中间型 β 地贫,丰富了中国人中间型 β 地贫基因突变谱。

关键词:地中海贫血;中间型;罕见;家系分析

中图分类号:R446

文献标志码:A

Gene diagnosis and pedigree analysis of intermediate β thalassemia: a rare case report

REN Zhenmin^a, LIU Yongqiu^a, LIU Jing^a, LIU Sixi^b, LI Changgang^b, CHEN Yunsheng^a (a. Department of Laboratory Medicine, b. Department of Hematology and Oncology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, Guangdong, China)

Abstract: Objective To provide new evidence for the diagnosis and genetic consultation of intermediate β thalassemia by analyzing a rare pedigree with intermediate β thalassemia. **Methods** The venous blood samples of the family members were collected. The hematological analysis was performed with the hematology analyzer and capillary hemoglobin electrophoresis, and the β -thalassemia gene was detected by the polymerase chain reaction-reverse dot blot hybridization (PCR-RDB) and Sanger sequencing. **Results** The proband displayed moderate anemia, and had the heterozygous mutation of -86(C>A) β^+ combined with IVS-II-654(C>T) β^+ . Her father displayed only small cells and no anemia symptom, and had the heterozygous mutation of IVS-II-654(C>T) β^+ . Her mother displayed mild anemia, and had the heterozygous mutation of -86(C>A) β^+ . **Conclusion** The intermediate β -thalassemia with the heterozygous mutation of -86(C>A) combined with IVS-II-654(C>T) is successfully detected, which enriches the mutation spectrum of intermediate β -thalassemia in Chinese population.

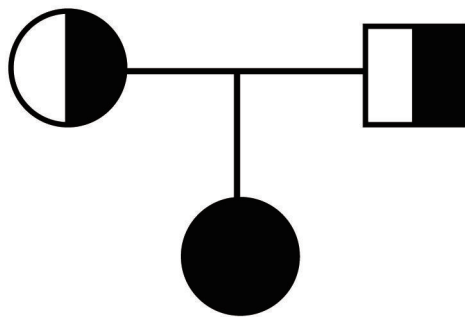
Key words: thalassemia; intermediate type; rare; pedigree analysis

β 地贫是由于 β -珠蛋白基因突变使 β -珠蛋白肽链合成不足(β^+)或完全缺乏(β^0)而引起的溶血性贫血^[1]。目前,市场上的试剂盒可以检出在我国常见的 17 种突变类型,且随着测序技术的发展,可检测的突变类型逐年增加。研究表明,-86 突变在我国非常罕见,-86(C>G)杂合突变仅见 3 例报道^[2-4],而-86(C>A)在我国尚未见报道。本研究检出-86(C>A)复合 IVS-II-654(C>T) 中间型地贫 1 例,并对其进行基因诊断以及家系分析,报告如下。

1 资料与方法

1.1 病历资料 先证者,女,3 岁 4 月因面色苍白、发热、咳嗽于 2018 年 12 月来本院就诊。外院血常规检测 Hb 为 54 g/L,查体肝脾肿大。其父亲,云南人,29 岁,无贫血症状。其母亲,安徽人,26 岁,孕 1 育 1,血常规显示轻度贫血,HbA2 为 4.5%,疑似 β

地贫。采集先证者及其父母的空腹静脉血标本进行基因检测,并对该家系进行分析。家系图谱见图 1。



注: \bullet , 母亲($\beta^N/\beta^{-86(C>A)}$); \blacksquare , 父亲($\beta^N/\beta^{IVS-II-654(C>T)}$); \bullet , 先证者($\beta^{IVS-II-654(C>T)}/\beta^{-86(C>A)}$)。

图 1 该患者的家系图谱

1.2 主要的仪器与试剂 XS-800i 全血细胞分析仪及配套试剂(日本 Sysmex 公司);全自动毛细管电

* 基金项目:深圳市卫生计生系统科研项目(SZFZ2017051)。

作者简介:任振敏,1981 年生,女,副主任技师,硕士研究生,主要从事遗传病的分子研究。

通信作者:陈运生,主任技师,E-mail:chenyunsheng66@163.com。

泳仪及配套试剂(法国 Sebia 公司);KingFisher Flex 核酸提取仪(美国赛默飞公司);PCR 扩增仪和凝胶成像系统(德国耶拿分析仪器公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);5430 小型台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司);YN-H16 恒温杂交仪和珠蛋白生成障碍性贫血基因检测试剂盒(深圳亚能公司);核酸提取试剂(广州美基生物公司)。

1.3 血液学分析 按照 XS-800i 全血细胞分析仪及配套试剂说明书操作检测 RBC、Hb、MCV、MCH 等血液学参数,RBC 参考范围:(3.5~5.5)×10¹²/L, Hb 参考范围:110~160 g/L, MCV 参考范围:82~96 fL, MCH 参考范围:27~32 pg。按照全自动毛细血管血红蛋白电泳仪及配套试剂说明书操作检测 Hb A、Hb A2 以及 Hb F 等参数。HbA 参考范围:94.5%~96.5%, Hb A2 参考范围:2.5%~3.5%, Hb F 参考范围:0.26%~2.3%。

1.4 突变位点检测

1.4.1 DNA 提取 采集先证者以及父母就诊时的空腹静脉血各 1 mL, EDTA-K₂ 抗凝,充分混匀。取 200 μL 抗凝血,采用磁珠法,按照 KingFisher Flex 核酸提取仪及核酸提取试剂说明书操作提取 DNA。取吸光度(A_{260/280 nm})为 1.8~2.0 的样本用于后续试验,样本置-20 °C 保存。

1.4.2 PCR-RDB 法检测 采用 Gap-PCR 法以及 PCR-RDB 法,按照 PCR 扩增仪及珠蛋白生成障碍性贫血基因检测试剂盒说明书操作进行 PCR 扩增及结果判读,检测常规 17 种 β 珠蛋白基因突变类型[-28、-29、-30、-32、CD14-15、CD17、CD26(βE)、CD27-28、CD31、CD41-42、CD43、CD71-72、IVS-I-1、IVS-I-5、IVS-II-654、CAP+1、起始密码子(initiation condon)],排除合并常见 α 缺失(-α^{4,2}、-α^{3,7}、-^{SEA})以及常见 α 突变[αWS(CD122),CAC-CAG;αQS(CD125),CTG-CCG;αCS(CD142),TAA-CAA]。

1.4.3 Sanger 测序 取先证者及其母亲的静脉血标本 500 μL,送深圳亚能公司进行 Sanger 测序。测序结果与野生型序列进行对比分析,以确定是否存在碱基突变。

2 结果

2.1 该家系血常规检测结果 先证者抗感染后表现为中度贫血;其父亲无贫血症状;其母亲表现为轻度贫血(表 1)。

表 1 先证者及其父母的血液学分析结果

参数	先证者	父亲	母亲
RBC(×10 ¹² /L)	3.04	6.83	4.64
Hb(g/dL)	81	132	105
MCV(fL)	75.0	61.3	73.8
MCH(pg)	26.6	19.3	22.6
Hb A(%)	67.4	93.5	94.2
Hb A2(%)	4.6	5.5	4.5
Hb F(%)	28.0	1.0	1.3

2.2 该家系 PCR-RDB 法检测结果 先证者基因型为 β^{IVS-II-654(C>T)}/β^N, 其父亲基因型为 β^N/β^{IVS-II-654(C>T)}, 其母亲未见突变。

2.3 该家系 Sanger 测序检测结果 先证者 Sanger 测序结果为 β 基因上存在双重杂合突变, α 基因未见突变。其母亲 Sanger 测序结果为 β 基因上存在 1 个罕见突变, α 基因未见突变。测序结果见图 2。根据血常规以及血红蛋白电泳的结果,其父亲未进行测序检测。

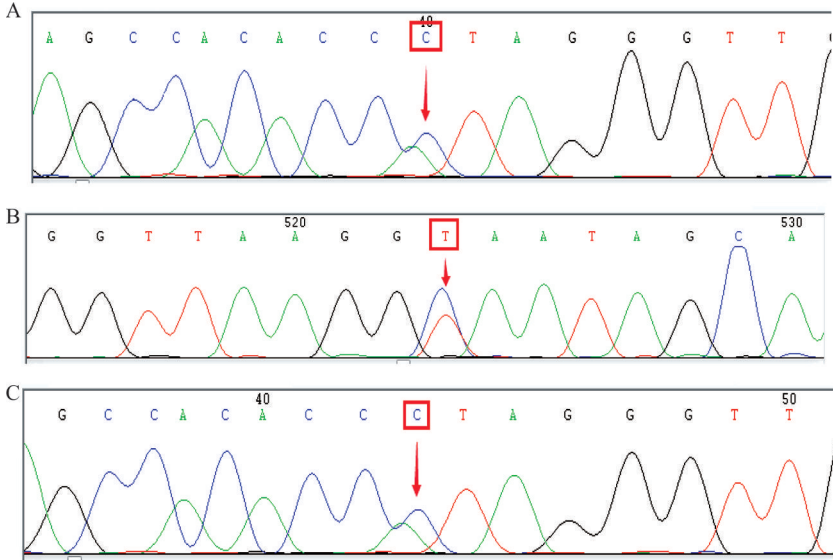
3 讨论

中间型 β 地贫常见的基因型为 β⁰/β⁺或者 β⁺/β⁺, 临床表现具有异质性,轻症者仅表现为轻度贫血,重症者需常年输血^[5]。本研究发现的-86(C>A)突变位于高度保守的近端启动子 CACCC 序列,此序列是 EKLF(erythroid Krüppel-like factor)的红细胞特异性结合位点。EKLF 作为一种锌指转录因子,在红细胞生成和 β 珠蛋白转换调节中具有重要的作用。研究表明,该位点突变可破坏 EKLF 的结合,从而引起轻型 β 地贫(β⁺)^[6]。此外,IVS-II-654也可引起轻型 β 地贫(β⁺),本例先证者(β⁺/β⁺)平日血常规表现为中度贫血,至本院初诊时因为存在感染情况,表现为重度贫血,感染控制后恢复为中度贫血。另有文献报道-86(C>G)纯合子(β⁺/β⁺)仅表现为轻度贫血^[7]。而本例先证者(β⁺/β⁺)表现为中度贫血,表明临床表型不仅仅取决于基因型,还可能与种族差异性和遗传修饰有关^[8]。

笔者进一步行流行病学调查结果发现,先证者的母亲籍贯为安徽,居住地为江苏徐州,均不属于地贫高发区,故而轻度贫血症状在其怀孕期间并未引起重视。先证者出生后在居住地医院就诊时也是首先考虑为缺铁性贫血进行治疗。有学者报道,HbA2 在筛查轻型 β 地贫中具有较高的敏感性和特异性^[9-10]。故而推测,先证者母亲如果早期进行 Hb 电泳检查,或可发现 HbA2 升高,并结合其父亲的地贫结果,从而进行产前诊断。本例先证者的 HbA2 表达水平升高,与常规检出的轻型地贫类型相符,但是

其 HbF 为 28%,提示可能是中间型地贫。目前临床上常规的地贫基因检测试剂盒不能覆盖所有的中国人突变类型。随着检测技术的进步,可检测到的突变类型尤其是一些稀有类型突变逐年增加^[11]。但

目前测序技术价格昂贵,仍然无法普及至边远地区,所以要重视血常规以及血红蛋白电泳等地贫筛查,如发现基因型与表型不一致的情况下,要做进一步检测,以避免漏诊。



注:A,先证者-86(C>A)HBB;c.-136C>A;B,先证者 IVS-II -654(C>T)HBB;c.316-197C>T;C,先证者母亲-86(C>A)HBB;c.-136C>A。

图 2 该家系 β 珠蛋白基因 Sanger 测序结果

4 参考文献

[1] Origa R. β-Thalassemia[J]. Genet Med, 2017, 19(6): 609-619.

[2] He S, Qin Q, Yi S, et al. First description of a β-Thalassemia mutation, -86(C>G)(HBB: c.-136C>G), in a Chinese Family[J]. Hemoglobin, 2015, 39(6): 448-450.

[3] 陈碧艳, 邓建平, 覃茜, 等. 罕见 β 地中海贫血基因-86(C>G)突变家系的分子诊断[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(5): 438-440.

[4] 陈碧艳. 3 例罕见地中海贫血家系分子诊断和产前诊断[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(4): 26-30.

[5] 张力, 区小冰, 余一平. 广东地区中间型 β 地中海贫血的基因分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(4): 358-360.

[6] Moi P, Faà V, Marini MG, et al. A novel silent β-thalassemia mutation in the distal CACCC box affects the binding and responsiveness to EKLF[J]. Br J Haematol, 2004, 126(6): 881-884.

[7] Moassas F, Alabloog A, Murad H. Description of a rare β-globin

gene mutation: -86(C>G)(HBB: c.-136C>G) observed in a syrian family[J]. Hemoglobin, 2018, 42(3): 203-205.

[8] 张倩倩, 商璇, 林宛颖, 等. 影响 β-地中海贫血表型的遗传修饰作用[J]. 遗传, 2019, 41(8): 669-676.

[9] 韩文平, 王树辉, 徐琴, 等. 贵阳地区育龄人群 HbA2 筛查轻型 β-地中海贫血截断值的确定[J]. 贵阳医学院学报, 2017, 42(10): 1121-1124.

[10] 霍梅, 吴文苑, 刘妹, 等. 中国深圳地区孕妇毛细血管血红蛋白电泳筛查地中海贫血截断值的探讨[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(2): 536-539.

[11] 任振敏, 蔡德丰, 肖伟伟, 等. 深圳地区小儿 α 和 β 地中海贫血基因类型分析[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(8): 605-608, 636.

(收稿日期:2019-09-03)
(本文编辑:许晓蒙)