短篇论著

文章编号:1000-5404(2012)17-1802-03

953例重庆地区地中海贫血基因突变类型分析

王 欢[1,2],刘 申[1],黄君富[1],徐 莉[1],苗 杰[1],张晓莉[1],府伟灵[1] (400038 重庆,第三军医大西南医院检验科[1];322000 浙江 义乌,91867部队医院检验科[2])

[摘要] **目的** 了解重庆地区α与β地中海贫血(地贫)的基因突变类型和频率,预防地中海贫血患儿的出生,减少出生缺陷。**方法** 采用多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和反向斑点杂交(reverse dot blot,RDB)技术对1 709例我院小细胞低色素贫血疑似地贫患者进行地贫基因诊断分析。**结果** 1 709例受检者确诊为地贫者953例,其中α型地贫381例(1 511例受检),阳性率为25.22%,包括$--^{SEA}/\alpha\alpha$缺失295例(77.43%),$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$缺失44例(11.55%),$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$缺失10例(2.62%),$-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$ 15例(3.94%),$-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$缺失2例(0.52%),$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$缺失1例(0.26%),$--^{SEA}/--^{SEA}$缺失(Bart's水肿胎)4例(1.05%),Hb Constant Spring (HbCS) 5例(1.31%)、Hb Quong Sze (HbQS) 5例(1.31%)。β型地贫555例(1 370例受检),阳性率为40.51%,其中CD41-42(-TCTT)基因类型158例为最常见,CD17(A→T)154例和IVS-2-654(C→T)133例基因突变类型略低于CD41-42(-TCTT)基因突变类型。β-地贫中杂合子共534例,双重杂合子20例,CD17纯合子1例。α复合β地贫17例(1 172例受检),阳性率为1.45%。**结论** 初步阐明重庆地区人口中的α与β地贫的基因突变类型和频率。应加强重庆地区地中海贫血的筛查,以减少地中海贫血患儿的出生。

[关键词] 地中海贫血;基因突变;聚合酶链反应;反向斑点杂交

[中图法分类号] R394.5;R556.61 [文献标志码] A

地中海贫血临床上常见类型有α地贫和β地贫两种,目前还没有有效的治疗方法。对于α、β地贫造成的严重贫血,只能依赖长期输血维持生命。应用DNA分析技术对该病进行早期产前诊断和选择性终止妊娠以防重症患儿出生,是国际上公认的首选办法,有着重要的优生学意义[1-2]。α、β地贫的分布基本一致,主要分布在南方,如广东、广西有较高的发病率[3]。在其他南方省份,如云南、贵州、四川等也有一定的发病率。为了解重庆地区的地中海贫血分型,预防地中海贫血患儿的出生,减少出生缺陷,本研究对2007年以来我院疑似患者进行地中海贫血筛查和基因型分析,现将结果总结报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2007年5月至2011年6月本院住院或门诊患者1 709例,年龄1~42岁,包括新生儿236例,余男性450例,女性1 023例,主要为重庆市及周边居民。其中收集血液标本1 287例,患者有贫血症状或有地贫家族史,羊水186例,脐血236例。

1.2 方法

1.2.1 地贫筛查 采用全自动血细胞分析仪进行血常规分析。国际地贫协会[2]推荐使用的地贫筛查诊断截断值(cutoff values)是MCV<79 fL和MCH<27 pg,国内实验室MCV取值较为广泛,一般取值<80 fL[4-5]。

[通信作者] 府伟灵,E-mail:weilingfu@yahoo.com.cn
张晓莉,E-mail:xlzhang227@yahoo.com.cn

1.2.2 标本采集和制备 TIANGEN试剂盒提取血液筛查阳性者的EDTA2K2抗凝外周静脉血、高风险胎儿的脐血或羊水、携带者分娩后的脐带血DNA。

1.2.3 地贫基因诊断 采用深圳益生堂生物企业有限公司生产的检测试剂盒进行。α地贫基因诊断:采取Gap-PCR方法诊断中国人常见的3种缺失型α地贫,即东南亚型($--^{SEA}/\alpha\alpha$)基因缺失、$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$基因缺失和$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$基因缺失。PCR反应条件:96 ℃ 15 min,98 ℃ 45 s→64 ℃ 90 s→72 ℃ 90 s,35个循环,最后72 ℃延伸7 min,取2~4 μl的PCR产物在1.2%的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察基因图谱为1 800、2 000、1 600、1 300 bp的条带,分别为α珠蛋白正常基因、$-\alpha^{3.7}$型、$-\alpha^{4.2}$型和$--^{SEA}$缺失型的扩增产物。Gap-PCR和反向斑点杂交(reverse dot blot,RDB)法对α地贫基因突变进行检测,包括3种α珠蛋白基因突变类型[HbWS(CD122),CAC→CAG;HbQS(CD125),CTG→CCG;HbCS(CD142),TAA→CAA]。β地贫基因检测:采用RDB方法诊断中国人群中常见及稀少突变的共17种β地贫基因突变类型,包括:CD41-42(-TCTT),IVS-2-654(C→T),CD17(A→T),-28(A→G),CD26(G→A),CD71-72(+A),CD43(G→T),-29(A→G),起始密码子ATG→AGG,CD14-15(+G),CD27-28(+C),-32(C→A),-30(T→C),IVS-1-1(G→T),IVS-1-5(G→C),CD31(A→C),CAP +40-+45(-AAAC)。按照操作说明书进行操作。取DNA 2 μl加入反应管中,PCR条件:50 ℃ 15 min,95 ℃ 10 min,然后94 ℃ 60 s→55 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s经35个循环,最后72 ℃延伸5 min。将扩增产物与结合有中国人较常见的17种β地贫基因突变寡核苷酸探针的膜条进行反向点杂交,鉴定β地贫基因突变的类型。非缺失型α地贫和β地贫通过杂交膜条斑点显色特点确定基因型,正常斑点全部显色且无异常突变斑点同时显色为基因型正常,突变斑点及其

相应正常斑点同时显色,根据显色突变斑点的基因型确定为相应基因型的地贫杂合子,突变斑点显色而相应正常斑点不显色,为显色突变斑点基因型地贫纯合子。

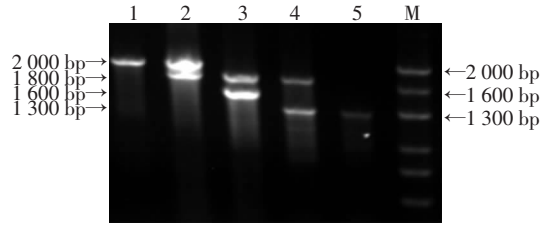
2 结果

2.1 1 709 例地贫检测结果

血常规筛查 1 709 例疑为地贫患者,进行 PCR 和 RDB 地贫基因诊断检测,检出地贫基因者 953 例,其中基因类型分别为 α 地贫基因 381 例、β 地贫基因 555 例、β 和 α 地贫基因复合存在 17 例。

2.2 α 地中海贫血基因检测结果

Gap-PCR 反应后,可根据扩增产物的片段长度判断出不同类型的异常缺失类型(图 1)。检出 α 地中海贫血 381 例,基因突变频率为 39.98%,其中包括 $--^{SEA}/\alpha\alpha$ 缺失 295 例(77.43%),$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 缺失 44 例(11.55%),$-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$ 15 例(3.94%),$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 缺失 10 例(2.62%),$-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$ 缺失 2 例(0.52%),$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ 缺失 1 例(0.26%),并发现 $--^{SEA}/--^{SEA}$ 缺失(Bart's 水肿胎)4 例(1.05%),Hb Constant Spring(HbCS)5 例(1.31%)、Hb Quong Sze(HbQS)5 例(1.31%)。



1:$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$;2:$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$;3:$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$;4:$--^{SEA}/\alpha\alpha$;5:$--^{SEA}/--^{SEA}$;M:标准 λDNA/*Hind* Ⅲ + *Eco*R Ⅰ

图 1 α-珠蛋白基因突变异常电泳结果

2.3 β 地中海贫血基因检测结果

555 例 β 地贫中,共检出 11 种基因突变类型,其中 CD41-42(-TCTT)基因类型最常见,CD17(A→T)和 IVS-2-654(C→T)基因突变类型略低于 CD41-42(-TCTT)基因突变类型。β-地贫中杂合子共 534 例,双重杂合子 20 例,CD17 纯合子 1 例。各基因型的例数及构成比如表 1 所示。

表 1 重庆地区人群地中海贫血的基因类型及构成比

基因类型	*n*	构成比(%)
α 杂合子		
$--^{SEA}/\alpha\alpha$	295	30.95
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	44	4.62
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	10	1.05
α 双重杂合子		
$-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$	15	1.57
$-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$	2	0.21
α 纯合子		
$--^{SEA}/--^{SEA}$	4	0.42
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	1	0.10
α 点突变		
$\alpha\alpha^{QS}/\alpha\alpha$	3	0.32
$\alpha\alpha^{CS}/\alpha\alpha^{CS}$	4	0.42
α 缺失突变复合		
$\alpha\alpha^{QS}/--^{SEA}$	2	0.21
$\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$	1	0.10
β 杂合子		
CD41-42(-TCTT)	158	16.58
CD17(A→T)	154	16.16
CD71-72(+A)	14	1.47
CD43(G→T)	15	1.58
IVS-2-654(C→T)	133	13.96
-28(A→G)	20	2.1
-29(A→G)	10	1.05
IVS-1-1(G→T)	1	0.10
CD14-15(+G)	6	0.63
CD27-28(+C)	12	1.26
βE 位单碱基突变杂合子	11	1.15
β 双重杂合子		
-29/βE	1	0.10
CD41-42/IVS-2-654	1	0.10
CD27-28/-28	2	0.21
CD71-72/IVS-2-654	1	0.10
CD17/βE	1	0.10
-28/-29	1	0.10
CD41-42/CD17	3	0.32
CD41-42/CD27-28	1	0.10
IVS-2-654/βE	2	0.21
CD27-28/βE	1	0.10
CD17/CD31	1	0.10
CD17/-28	1	0.10
CD17/IVS-2-654	3	0.32
-29/IVS-2-654	1	0.10
β 纯合子		
CD17(A→T)/CD17(A→T)	1	0.10
α/β 复合杂合子		
$--^{SEA}/\alpha\alpha$/CD17	3	0.32
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$/CD17	2	0.21
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$/IVS-2-654	5	0.52
$--^{SEA}/\alpha\alpha$/IVS-2-654	1	0.10
$--^{SEA}/\alpha\alpha$/CD41-42	2	0.21
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$/CD41-42	1	0.10
$--^{SEA}/\alpha\alpha$/CD27-28	1	0.10
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$/CD41-42	1	0.10
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$/IVS-2-654	1	0.10
合计	953	100

3 讨论

地中海贫血在人类遗传病中较为常见,是指因珠蛋白合成肽链时受阻而引发的特异性隐性遗传病[6]。地中海贫血在东南亚、地中海等地区多见[7],在我国则常见于南方人群。由于重庆地区人口基数大,流动人口多,病例数也不少,加强地贫的筛查对优生优育有重大意义。本研究病例为门诊或住院有小细胞低色素性贫血症状疑似地贫的患者,以及来我院做产科检查的孕妇。在筛查的病例中,基因诊断的阳性率为 55.76%,其中 α 地贫的阳性率为 25.22%,β 地贫的阳性率为 40.51%,β 阳性率略高于 α。与四川地区报道[8] β 地贫基因携带率高于 α 地贫相似,而与两广地区则相反。

α-地中海贫血与 α-珠蛋白肽链合成被抑制密切相关。临床症状轻者仅表现出细微的血液学变化,重者则可能导致胎死腹中或早产后死亡。α 地中海贫血分为缺失型和非缺失型 2 种,目前人类不同种族中已发现至少有 43 种此类缺失,中国人群中发现有 9 种。其中临床常见的缺失型 α 地贫主要有 3 种:东南亚型

(--^{SEA}/αα)基因缺失、(-α$^{3.7}$/αα)基因缺失和(-α$^{4.2}$/αα)基因缺失。本组中381例α缺失地中海贫血中,东南亚型(--^{SEA}/αα)缺失型为295例,右缺失型(-α$^{3.7}$/αα)杂合子44例、左缺失型(-α$^{4.2}$/αα)杂合子10例,提示本地区的α地中海贫血基因主要以东南亚缺失型为主,遗传异质性较小。β-地中海贫血是因β-珠蛋白合成时基因发生突变,最终导致球蛋白合成减少而发病[9]。目前人类不同种族中已发现至少186种β地中海贫血突变基因[10],中国人中已发现有29种,其中CD41-42(-TCTT)、IVS-2-654(C→T)、CD17(A→T)、-28(A→G)、CD71-72(+A)、-29(A→G)、CD43(G→T)是常见的7个突变位点[11]。本研究共检出11种β地贫的基因突变类型,是国内报道中检出基因组合较多的,说明此地区β地中海贫血基因异质性较大、遗传背景较复杂。β地贫以CD41-42(-TCTT)、IVS-2-654(C→T)和CD17(A→T)为主,占82.88%。其中,CD41/42(-TCTT)是最常见的β地贫基因突变类型,与国内文献[12]报道一致。本研究对受检对象地贫基因诊断除了做α缺失和β突变外还进行α点突变的检测,有10例发生了α点突变,突变率0.66%。

珠蛋白基因检测是地贫的确认实验,目前比较成熟、可用于临床诊断的实验技术有PCR扩增结合凝胶电泳技术、膜反向斑点杂交技术、DHPLC技术、液态悬浮点阵技术等[13-16],这些技术虽然检测特异性高,但是都具有局限性,有一定的适用范围。PCR扩增结合凝胶电泳技术常规仅用于对α-缺失型地贫基因的检测,本研究应用改良Gap-PCR多重检测技术,对α珠蛋白基因上--^{SEA}、-α$^{3.7}$和-α$^{4.2}$基因位点的缺失进行了检测。膜反向斑点杂交技术和液态悬浮点阵技术属于基因芯片技术范畴,膜反向斑点杂交技术以膜作为杂交载体,而液态悬浮点阵技术是以荧光微球作为杂交载体[16],也被称为"液相芯片",具有杂交速度快、杂交反应不需洗涤、对实验室污染少等优点,为较好的实验技术平台。但目前液态悬浮点阵技术只能对β-地贫基因的8个常规突变点进行检测,有待于进一步开发。本研究应用的膜芯片反向点杂交技术可进行β-地贫基因上17个位点突变和α-地贫基因上α^{CS}、α^{QS}和α^{WS} 3种点突变类型的临床诊断,是目前国内检测珠蛋白基因突变位点最多的芯片系统,具有较高的临床应用价值。反向斑点杂交技术被公认为准确可靠的β-地中海贫血的基因诊断方法[17]。DHPLC技术是近年发展起来的一种高效、快速和准确的核酸片段大小、点突变检测技术,该技术不需要杂交实验,可用PCR产物直接检测,在几分钟内出结果[15,18],是一个很有潜力的技术平台,但是目前该技术只能对β-地贫基因的8个常规突变点进行检测。专家指出,基因诊断是确诊重型β-地中海贫血的"金标准",但在采用反向斑点杂交技术诊断地中海贫血时,需注意"假阴性"。因此,临床诊断地贫,要同时选择检测基因缺失和基因突变的方法,对重症患者在基因未能明确诊断时,应在调查家族资料证实父母均为轻型地中海贫血的背景下,采用基因测序技术加以诊断。

参考文献:

[1] Peres M J, Carreiro M H, Machado M C, *et al*. Neonatal screening of hemoglobinopathies in a population residing in Portugal[J]. Acta Med Port, 1996, 9(4/6): 135-139.

[2] Modell B, Harris R, Lane B, *et al*. Informed choice in genetic screening for thalassaemia during pregnancy: audit from a national confidential inquiry[J]. BMJ, 2000, 320(7231): 337-341.

[3] 陈赤.2279例地中海贫血基因诊断的分析与研究[J].中国优生与遗传杂志, 2006, 14(6): 25-26.

[4] 何雅军, 杨小华, 马福广, 等. 红细胞平均体积和脆性及血红蛋白电泳联合检测在地中海贫血诊断中的价值[J].中华检验医学杂志, 2005, 28(3): 244-246.

[5] 陈剑锋, 龙桂芳, 吴晓宁. 改良单管多重PCR检测低平均红细胞体积儿童3种缺失型α地中海贫血基因[J]. 中国实用儿科杂志, 2005, 20(11): 689-690.

[6] 李霞, 杨林, 杨承东, 等. 地中海贫血的筛查与产前诊断[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(2): 43, 78.

[7] Hu H, Li C, Xiong Q, *et al*. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia by chip-based capillary electrophoresis[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(3): 222-229.

[8] 王霞, 江虹, 贾劲, 等. 四川地区人群地中海贫血的筛查及基因分析[J]. 生物医学工程学杂志, 2011, 28(1): 135-137.

[9] 刘元力, 胡朝晖, 曾征宇, 等. β地中海贫血一个特殊基因突变的家系分析[J]. 中国医药导报, 2008, 5(5): 25-26.

[10] Huisman T H, Carver M F. The thalassemia repository (Ninth Edition; Part II)[J]. Hemoglobin, 1998, 22(3): 287-310.

[11] 武大林, 张彦. β地中海贫血研究进展与出生干预[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(3专辑): 153-154.

[12] 周玉球, 李文典, 吴丽蓉, 等. 婚前β地中海贫血的大人群筛查及预测性产前诊断[J]. 中国优生优育, 1999, 10(2): 67-69.

[13] 朱学海, 魏代奎. 地中海贫血的基因诊断分析[J]. 中国实用医药, 2008, 3(13): 126-127.

[14] 荣卡彬, 黄革, 蒋文玲, 等. 中间型β地中海贫血家系基因分子生物学特征分析[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(4): 412-416.

[15] 张松, 吴意, 邹汉良, 等. 变性高效液相色谱技术在β地中海贫血分型诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(8): 887-889.

[16] 孙大光, 韩健, 金孝华, 等. 悬浮点阵技术用于分析β地中海贫血基因突变类型[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(4): 239-241.

[17] Tosto F, Salvatore M, Falbo V, *et al*. The Italian scheme of External Quality Assessment for beta-thalassemia: genotyping and reporting results and testing strategies in a 5-year survey[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2009, 13(1): 31-36.

[18] Xiao W, Oefner P J. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review[J]. Hum Mutat, 2001, 17(6): 439-474.

(**收稿**:2012-02-23;**修回**:2012-05-19)

(编辑 邓强庭)