调查研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.025

广东梅州地区的异常血红蛋白的分子流行病学调查

温应方[1],林 敏[2],刘桂荣[1],吴教仁[2],王 前[3],郑 磊[3],黄 樾[2],
林 芬[2],詹小芬[2],林春萍[2],翁秋青[1],黄芬婷[1],杨立业[2]
(1.广东省梅州市梅县人民医院检验科,梅州 514011;2.南方医科大学附属潮州中心医院检验实验中心,潮州 521000;
3.南方医科大学附属南方医院检验科,广州 510120)

【摘 要】目的:了解广东省梅州地区异常血红蛋白病的分子流行病学特征。方法:共有 15 229 人参加了本次异常血红蛋白的电泳筛查,每人用 EDTA-K2 抗凝真空管采血 2 ml。用 Sysmex XT-1800i 全自动血球分析仪检测各项红细胞参数,Gap-PCR 与反向斑点杂交检测地贫及 Hb E。采用 PCR-测序法检测异常血红蛋白点突变。结果:梅州地区的异常血红蛋白发生率为 0.479%(73/15 229)。本次筛查共发现 10 种异常血红蛋白,包括 1 例 Hb J-Broussais、7 例 Hb J-Bangkok、4 例 Hb Wenchang-Wuming、12 例 Hb K NewYork、13 例 Hb Q-Thailand、2 例 Hb Queens、12 例 Hb G-Chinese、1 例 Hb G-Waimanalo、3 例 Hb G-Siriraj 和 18 例 Hb E。结论:广东省梅州地区的异常血红蛋白病发生率高于全国平均水平,异常血红蛋白的基因品种及频率体现出客家人群特有的南方人群以及北方人群交汇融合的特点。

【关键词】异常血红蛋白;分子流行病学;DNA 测序
【中国图书分类法分类号】R446.11 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-09-28

Molecular epidemiology investigation of abnormal hemoglobin in Meizhou area of Guangdong Province

WEN Ying-fang[1], LIN Min[2], LIU Gui-rong[1], WU Jiao-ren[2], WANG Qian[3], ZHENG Lei[3], HUANG Yue[2], LIN Fen[2], ZHAN Xiao-fen[2], LIN Chun-ping[2], WENG Qiu-qing[1], HUANG Fen-ting[1], YANG Li-ye[2]
(*1. Department of Laboratory, Meixian People's Hospital of Meizhou in Guangdong Province; 2. Central of Laboratory, Chaozhou Central Hospital, Southern Medical University; 3. Department of Laboratory, Nanfang Hospital, Southern Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the molecular epidemiological characteristics of abnormal Hbs in Meizhou area of Guangdong Province. *Methods*: A total of 15 229 people were included in this hemoglobin electrophoresis screening. Samples of 2 ml EDTA-K2 blood were analyzed by Sysmex XT-1800i blood analyzer; thalassemia genotypes and Hb E variant were identified by gap-PCR and/or reverse dot blot(RDB). The genotypes of Hb variants were detected by PCR and sequencing. *Results*: The incidence of abnormal Hbs was 0.479%(73/15 229). Totally, 10 kinds of abnormal hemoglobin were found including 1 case of Hb J-Broussais, 7 cases of Hb J-Bangkok, 4 cases of Hb Wenchang-Wuming, 12 cases of Hb K-NewYork, 13 cases of Hb Q-Thailand, 2 cases of Hb Queens, 12 cases of Hb G-Chinese, 1 case of Hb G-Waimanalo, 3 cases of Hb G-Siriraj, and 18 cases of Hb E. *Conclusion*: The incidence of abnormal Hbs of Meizhou area is higher than the average incidence of China. It shows a genetic characteristic of gene flow confluence of the north and south of China.

【Key words】abnormal hemoglobin; molecular epidemiology; DNA sequencing

作者介绍:温应方(1972-),男,主管技师,
研究方向:血红蛋白病及血细胞形态学。
通信作者:杨立业,男,主任医师,Email:yangleeyee@sina.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81101329);广东省医学科研基金资助项目(编号:A2009781、B2010348);梅州市科技计划资助项目(编号:2011B31);潮州市社会发展计划资助项目(编号:2009S14)。

血红蛋白疾病(Disorders of hemoglobin)可以分为异常血红蛋白(Abnormal hemoglobin,Hb)病和地中海贫血(Thalassemia)地贫两大类,其分子基础都是珠蛋白基因的突变[1]。目前,通过查找血红蛋白变异体数据库,全世界已经发现了超过 1 000 种的珠蛋白基因的变异，我国已经发现超过 80 余种异常血红蛋白品种,其中大部分血红蛋白变异体没有任何临床症状[2]。广东省于 1979-1985 年期间,在全省范围内开展了大范围的血红蛋白蛋白病普查，总人数达到了 308 308 人。由于当时对异常血红蛋白的鉴定采用氨基酸分析技术,所需血标本量大,操作繁琐耗时,而且只有有限的几个单位能对异常血红蛋白进行鉴定。因此,当时筛查出来 858 个家系仅有 206 个家系得到鉴定,其他大部分异常血红蛋白的品种未得到鉴定。

梅州市处于广东的东部地区，它的东部与福建省交界,南部与广东省潮州市、揭阳市、汕尾市毗邻,西部与广东省河源市接壤,北部与江西省相连。梅州市人口约 424 万,除了占极少数的畲族等少数民族和潮汕人外,绝大部分是客家人。在全市的 6 县 1 市 1 区中,除丰顺县外,其它都是客家人口数占 90%以上的"纯客住县"。为了明确广东省梅州地区异常血红蛋白的分子流行病学特征,我们于 2011 年 2 月 21 日至 2011 年 6 月 2 日在梅州地区(6 县 1 市 1 区)进行了 1 次大规模的血红蛋白分子流行病学调查,其调查结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

我们采集 2011 年 2 月 21 日至 2011 年 6 月 2 日梅州市(6 县 1 市 1 区)的正常体检人群作为调查对象,总人数为 15 229 人,其中大埔县 1 100 人、五华县 1 072 人、蕉岭县 1 000 人、兴宁市 1 227 人,丰顺县 1 042 人,平远县 1 086 人,梅县与梅江区 8 772 人。调查人群的年龄在 5~70 岁之间。

1.2 方法

1.2.1 血液学分析

1.2.1.1 标本采集及红细胞参数分析 用 EDTA-K2 抗凝的真空管(湖南省浏阳市医用仪器厂)分别采集参与调查的成员 2 ml 静脉血,然后用日本 Sysmex XT-1800i 血液分析仪进行红细胞的各项参数分析，血常规分析在各个参与医院完成。

1.2.1.2 血红蛋白电泳 按照《全国检验操作规程》第三版,采用微量醋酸纤维薄膜电泳进行筛查,依照电泳区带位置分为 H、J、K、A、F、Q、G/D 及 E 组。

1.2.1.3 血红蛋白 A2 及异常条带定量 取上述抗凝血 0.1 ml,用四氯化碳提取,制备血红蛋白液,将其加样于已浸透 Tris 缓冲液的醋酸纤维薄膜条上,置 pH 8.5 的缓冲液中电泳 30 min,各区带剪下直接洗脱于蒸馏水中比色测定(721 分光光度计,上海箐华仪器厂),对异常血红蛋白的含量进行定量。

1.2.1.4 抗碱血红蛋白测定 将待检的溶血液与一定量的 NaOH 溶液混合,作用 1 min 后加入半饱和硫酸铵中止碱变性反应。Hb A 变性沉淀,Hb F 抗碱变性能力强,没有变性而存在于上清液中,Hb A 变性沉淀，取上清液于 540 nm 处测定吸光度,检测出 Hb F 的浓度。

1.2.1.5 异丙醇实验 检查各种异常血红蛋白的稳定性,采用 17%异丙醇溶液 2 ml,置于有塞试管中,37℃水浴预热数分钟后,加入 0.2 ml 的上述 Hb 溶液,加塞混匀,计时观察,同时和正常人对照。

1.2.1.6 肽链鉴定.:采用对-氯化汞苯甲酸肽链裂解法。

1.2.2 DNA 提取 取抗凝血各 100 μl,采用深圳亚能生物科技有限公司生产的 DNA 提取试剂盒提取 DNA[3]。

1.2.3 地中海贫血基因鉴定 采用深圳亚能生物科技有限公司的地中海贫血诊断试剂盒,用 Gap-PCR 检测 3 种常见缺失型 α 地贫基因(--SEA/,$-\alpha^{3.7}$/,$-\alpha^{4.2}$/),反向斑点杂交鉴定3种突变型的 α 地贫基因(Hb Constant Spring、Hb Quong Sze、Hb Westmead)和 17 种 β 地贫基因。

1.2.4 引物设计 根据 NCBI 发表的 α 和 β 珠蛋白的基因序列,应用 Primer Premier 5 设计引物,对所有筛查阳性样本的 α 珠蛋白基因全序列和 β 珠蛋白基因进行 PCR 扩增,引物见表 1。珠蛋白基因扩增体系均为 50 μl,其中包括基因组 DNA 100 ng,200 μmol/L dNTPs,2.0 mmol/L $MgCl_2$,上下游引物各 1 μmol/L,2.5 U HotStar Taq DNA 聚合酶(大连宝生物工程公司)。α 珠蛋白基因扩增条件为:95℃预变性 5 min,94℃ 1 min,55℃ 30 s,72℃ 1 min 30 s 扩增 35 个循环，最后 72℃ 延伸 5 min。β 珠蛋白基因扩增条件为:95℃预变性 5 min,94℃ 1 min,55℃ 30 s,72℃ 1 min 扩增 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。对其 PCR 产物进行纯化,使用 ABI3730 双向测序,查找突变点[2]。

表 1 扩增珠蛋白基因所用的引物

基因	引物名称	序列(5'~3')	扩增片段
α_1 蛋白基因	L	TCCCCACAGACTCAGAGAGAACC	889 bp
	B	CCATGCCTGGCACGTTTGCTGAG	
α_2 珠蛋白基因	L	TCCCCACAGACTCAGAGAGAACC	889 bp
	D	AACACCTCCATTGTTGGCACATTCC	
β珠蛋白基因(外显子1-2号)	B1-F	GTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCA	680 bp
	B2-R	TGCAGCTTGTCACAGTGCAGCTCACT	
β珠蛋白基因(外显子3号)	B3-F	GTGTACACATATTGACCAAA	480 bp
	B3-R	AGCACACAGACCAGCACGTT	

2 结 果

2.1 电泳筛查结果及分组

梅州市 6 县 1 市 1 区共调查 15 229 人共检出异常血红

蛋白 73 例，发生率为 0.479%。其中 J 区带 12 例、K 区带 12 例、Q 区带 15 例、G/D 区带 16 例、E 区带 18 例。另外发现血红蛋白 H 病 12 例及胎儿血红蛋白持续增多症 2 例。

2.2 异常血红蛋白基因类型及血液学特征

本次筛查共发现 10 种异常血红蛋白（测序结果见图 1），其中包含 α 珠蛋白基因变异的异常血红蛋白 33 例（45.2%、33/73），基因频率为 1.08×10^{-3}；β 珠蛋白基因变异的异常血红蛋白 40 例（54.8%，40/73），基因频率为 1.31×10^{-3}。本研究发现在梅州客家人地区的异常血红蛋白品种中以 Hb E（24.7%，18/73）和 Hb Q-Thailand（17.8%，13/73）居首位，其次是 Hb New York（16.4%，12/73）和 Hb G-Chinese（16.4%，12/73），这 4 种主要的异常血红蛋白合占了 68.5%。此外的 6 种异常血红蛋白分别是 Hb J-Broussais（1 例）、Hb J-Wenchang-Wuming（4 例）、Hb J-Bangkok（11 例）、Hb Queens（2 例）、Hb G-Waimanalo（1 例）、Hb G-Siriraj（3 例）。在本次调查之中之中，发现的这 1 例 Hb J-Broussais（又名 Hb Tagawa-Ⅰ），经测序验证为 α_2 基因的 90 号密码子的 AAG 突变 AAT，因此导致了赖氨酸（Lys）被天冬酰胺（Asn）代替。这例 Hb J-Broussais 为国内首次发现。

2.3 异常血红蛋白合并地中海贫血

本次调查所有的 Hb Q-Thailand 均连锁-$\alpha^{4.2}$ 地中海贫血基因，与以往文献报道的一致[4-6]。13 例 Hb E 中有两例复合 β 地中海贫血 CD41-42(-CTTT)，两者均有肝脾肿大，贫血。镜下红细胞形态异常，靶形及畸形红细胞增多。

3 讨 论

本次研究调查了梅州地区 15 229 人，约占人口总数的 0.36%，发现异常血红蛋白 73 例，发生率为 0.479%，相对低于 80 年代年梅州普查的 0.575%[7]，高于广东省的平均发生率（0.368%）和全国的平均发生率（0.337%），亦高于长江以南 14 省的平均水平（0.367%）和长江以北 15 省的平均水平（0.290%）[8]。从总发生率来说，梅州客家地区的异常血红蛋白在全国各地区来说仅低于云南（5.94%）和江西（0.507%）[9]。

据历史记载，汉族源于北方古老的华夏部落[11]，在秦统一中原后，公元前 216 年开始向南方扩张，击败当地土著，秦军及其随军家属逐渐进入岭南，开创了中原汉民大规模移民的先河[12]。从两宋开始，中原汉民大举南迁，经赣南、闽西到

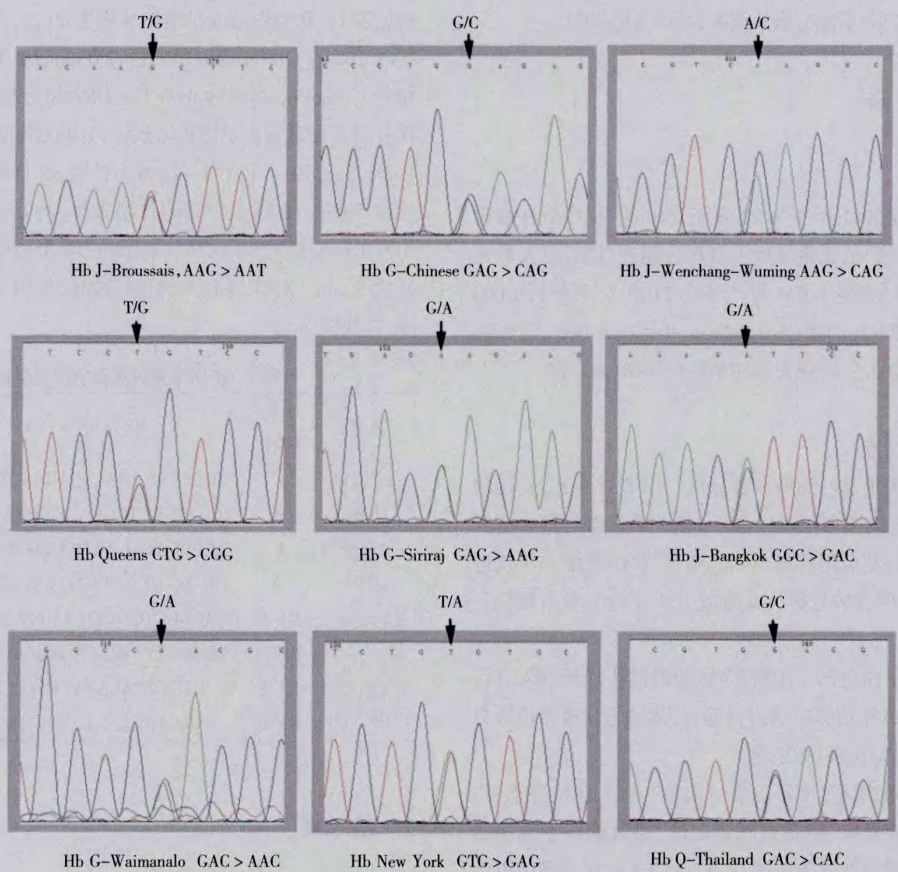


图 1 9 种异常血红蛋白的测序图（包括 Hb J-Broussais、Hb G-Chinese、Hb J-Wenchang-Wuming、Hb Queens、Hb G-Siriraj、Hb J-Bangkok、Hb G-Waimanalo、Hb New York、Hb Q-Thailand）

达梅州，最终形成相对成熟的、具有很强稳定性的客家民系。客家先民，就是这一时期进入岭南的中原移民，在南迁过程与闽粤赣三角地区的古越族移民混化融合而形成客家民系[12]。从本次梅州客家地区的异常血红蛋白分子流行病学调查发现的基因品种及频率可以看出，客家人群具有南方人群与北方人群交汇融合的特点，即既有较高比例的北方人群常见的异常血红蛋白 G/D 组，也具有南方人群常见的异常血红蛋白 E 组和 J 组。该地区的异常血红蛋白以 Hb E、Hb Q-Thailand、Hb NewYork 和 Hb G-Chinese 为主。Hb E 是一种常见的异常血红蛋白，它和 Hb New York 和 Hb J-Bangkok 主要分布在长江以南地区，这些异常血红蛋白的基因频率和发生率呈现由南往北逐步下降，呈现南高北低的情况[9]，梅州客家地区的此类异常血红蛋白的发现符合南方地区的特征。此外 Hb Q-Thailand 的发生率 0.008 5%(13/15 229)明显高于其他地区和民族的此种异常血红蛋白的发生率，支持以往的“Hb Q-Thailand 主要分布于客家人，随着客家人祖先南迁和漂泊传递到世界地区”的推论[9]。本次调查发现 Hb Q-Thailand 在梅州地区分布平均，未呈现明显的地域性，不像以往文献报道的“Hb Q-Thailand 主要集中于大埔和丰顺 2 县”，推测其可能因为随着经济发展，本地区之间人员流动加剧，导致了这种地区分布不均的特点消失。广东省的 Hb NewYork 发生率在全国最高，第 1 例 Hb New York 也是在华侨中发现的，本次研究中发现 12 例 Hb New York，占总体比率的 16.4%，远高于临近潮州地区和广州地区。这一点也支持以前的“Hb New York 主要发源我国客家人的”的观点[9]。

在本次调查之中，发现 1 例 Hb J-Broussais，此种异常血红蛋白在 1966 年于 1 个法国家庭中发现[13]，此后分别在澳大利亚人、法裔加拿大人和日本人中发现，此次发现在中国人中尚属首次[14,15]。此种异常血红蛋白结构稳定，携带氧气的能力正常，因此携带者无任何症状。由于为 α_2 基因的 90 号密码子的 AAG 突变 AAT，因此导致了赖氨酸(Lys)被天冬酰胺(Asn)代替，由于赖氨酸的等电点为 9.94，天冬酰胺(Asn)的等电点为 5.41，因此造成次异常血红蛋白在 pH8.4 的电泳场下快速涌动，形成快带。

综上所述，广东省梅州地区为异常血红蛋白高发区，且基因品种丰富。该地区的遗传基因不仅具有独立的特性，而且还体现了南方人群以及北方人群相互交叉、相互融合的特征，具有鲜明的遗传流行病学特点。

参 考 文 献

[1] Shih H C,Er T K,Chang T J,et al.Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis[J].Clin Biochem,2009,42(16-17):1667-1676.

[2] Hardison R C,Chui D H,Giardine B,et al.Hb Var:a relational datebase of human hemoglobin variants and thalassemia mutation at the globin gene server[J].Ham Matat,2002,19(3):225-233.

[3] Huang Y,Lin M,Lin C P,et al.Molecular and clinical characteristics of hemoglobin Ottawa detected in a Chinese population[J].Mol Med Report,2011,4(3):581-583.

[4] Singsanan S,Karnpean R,Fucharoen G,et al.Hemoglobin Q-Thailand related disorders:origin,molecular,hematological and diagnostic aspects[J].Blood Cells Mol Dis,2010,45(3):210-214.

[5] Lin M,Wu J R,Yang L Y,et al.Hb Q-H disease:two cases in a Cantonese family[J].Blood Cells Mol Dis,2008,41(3):259-260.

[6] 林 敏，杨立业，吴教仁，等.异常血红蛋白家系的分子诊断[J].分子诊断与治疗杂志，2011，3(2)：59-62.

[7] 王玉昭，江广安，张建华，等.梅县地区 50234 人中血红蛋白病普查情况报告[J].梅江医药，1983，12(1)：40.

[8] 秦良谊.我国异常血红蛋白发生率、分布及遗传多态性[J].医学研究通讯，2003，32(12)：12-14.

[9] 杜若甫.中国人群体遗传学[M].北京：科学出版社.2004.202-206.

[10] 李 辉.东亚人的遗传系统初识.国立国父纪念馆馆刊(台北)[M].台北：国立国父纪念馆.2002.10:123-136.

[11] 李晓昀，苏 敏，黄海花，等.潮汕人与广府、客家人母系遗传背景差异的分析[J].西安交通大学学报(医学版)，2010，6(31)：664-668.

[12] 李 辉，潘悟云，文 波，等.客家人起源的遗传学分析 [J].遗传学报，2003，30(9)：873-879.

[13] De Traverse P M,Lehmann H,Coquelet M L,et al.Study of an alpha J hemoglobin not previously described,in a French family[J].C R Seances Soc Biol Fil,1966,160(12):2270-2272.

[14] Fleming P J,Arnold B J,Thompson E O,et al.Hb Ⅰ alpha16 Lys leads to Glu and Hb Broussais alpha90 Lys leads to Asn in Australian families[J].Pathology,1978,10(4):317-327.

[15] Braconnier F,Cohen-Solal M,Schlegel N,et al.Broussais alpha-2 90 Lys leads to Asn beta-2A(FG2) discovered in a Martinique family.Comparison of several analytical technics[J].Nouv Rev Fr Hematol,1975,15(3):333-342.

（责任编辑：冉明会）