基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1051-03

重庆地区 α 地中海贫血基因型研究

王 莉[1],徐酉华[2]

(1. 四川省宜宾市第二人民医院儿科,宜宾 644000;2. 重庆医科大学附属儿童医院血液科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究重庆地区 α 地中海贫血各种基因型的分布情况、临床表现及实验室相关检查的特点,探讨基因诊断在 α 地中海贫血中的重要作用,对这一常染色体隐性遗传性疾病应如何做好婚检、产前诊断工作,以提高人类出生质量。方法:对来重庆医科大学附属儿童医院就诊的 103 名 α 地中海贫血患者行血清铁(SI)、总铁结合力(TIBC)、转铁蛋白饱和度(TS),血红蛋白电泳及多重单管聚合酶链反应(GSPCR)基因分析,结合其临床表现,采用回顾性及前瞻性方法进行分析。结果:(1)72 例患者查 SI、TIBC、TS,40 例(55.56%)出现 SI 降低,TIBC 升高,TS 降低;(2)92 例患者进行 Hb 电泳检查,29 例出现快速带(31.52%);(3)103 例 α 地中海贫血患者中,缺失型 85 例(82.52%),非缺失型 18 例(17.48%);(4)在 85 例缺失型中,α^0 地中海贫血较 α^+ 地中海贫血多。结论:(1)重庆地区 α 地中海贫血以缺失型为主;(2)α^+ 地中海贫血稍多于 α^0 地中海贫血;(3)基因诊断为确诊 α 地中海贫 血的金标准;(4)为防止重型 α 地中海贫血患儿出生,提高人类生存质量,应做好婚检及产前诊断;(5)α 地中海贫血可与营养性缺铁性贫血合并存在。

【关键词】α 地中海贫血;基因型;多重单管酶联聚合反应

【中国图书分类法分类号】R725.56 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-25

Gene type study of alpha-thalassaemia in Chongqing

WANG Li, et al

(*Department of Pediatrics, the Second People's Hosptial, Yibing City in Sicuan Province*)

【Abstract】*Objectives*: To study the distribution status, clinical manifestations and laboratory test characteristics of alpha-thalassaemia gene type in the city of ChongQing to approach the importance of genetic diagnosis for alpha-thalassaemia, and the significance of thia diagnosis for antenatal screening and prenatal diagnosis to promote the survival quality of human being. *Methods*: This study was performed in the Children's Hospital of Chongqing Medical University. One hundred and three alpha -thalassaemia patients were involved in this study. They had taken the tests of serum iron (SI), total iron binding capacity (TIBC), transferrin saturation (TS), hemoglobin (Hb) electrophoresis and genetic examination. Retrospective study and prospective study were performed with the results. *Results*: (1) A total of 72 patients underwent SI, TIBC and TS, and 55.56 % (40/72) patients had SI decreased, TIBC increased and TS decreased. (2) 92 serum samples from these patients had Hb electrophoresis, in which 31.52% (29/92) presented fast band. (3) In this study, there were 82.52% (85/103) deletional alpha-thalassaemia and 17.48% (18/103) non-deletional alpha-thalassaemia. (4) In 85 deletional alpha-thalassaemia, alpha0-thalassaemia was more than alpha+-thalassaemia. *Conclusion*: (1) Deletion form is the main form of α thalassaemia in ChongQing. (2) alpha0-thalassaemia is less than alpha+-thalassaemia. (3) Genetic diagnosis is the gold standard for this disease. (4) It should be emphasized that antenatal screening and prenatal diagnosis are important for better lives of human beings. (5) Alpha-thalassaemia can affiliate nutritional iron deficiency anemia (NIDA).

【Key words】Alpha-thalassaemia; Gene type; Gap single polymeras chain reaction

地中海贫血是一组先天遗传性溶血性疾病,其共同特点是由于调控珠蛋白的基因缺陷,使血红蛋白(Hb)肽链有一种或几种合成减少或不能合成,导致 Hb 的组分改变。根据珠蛋白基因缺失或点突变的不同而致肽链合成障碍的不同,通常将地中海贫血分为 α、β、δβ、γ 等几种类型,其中以 α 地中海贫血和 β 地中海贫血最为常见。地中海贫血是我国长江以南发病率最高、影响最大的遗传病之一[1]。近年来,随着检测手段的提高,α 地中海贫血的检出率逐渐增高。重庆作为地中海贫血高发区之一,对 β 地中海贫血的报道已较多,但人们对 α 地中海贫血的

作者介绍:王 莉(1981-),女,住院医师,硕士,
研究方向:小儿血液 α 地中海贫血的诊治进展。
通讯作者:徐酉华,女,教授,E-mail:xuyouhua54@163.com。

认识不足,实际就诊率远远低于发病率,目前尚未见到对 α 地中海贫血基因类型的报道。因此,本文对重庆地区 α 地中海贫血各种基因型的分布情况作初步探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2000 年 1 月至 2005 年 11 月期间,重庆医科大学附属儿童医院 α 地中海贫血确诊患者共计 103 例。所有病例都来自重庆地区,均为汉族。其中住院病例 23 例,门诊病例 80 例;男性 56 例,女性 47 例;儿童(<18 岁)72 例,成人 31 例。儿童初诊年龄最小 1 d,最大 16 岁,中位数年龄为 5 岁 11 月,其中小于 6 个月者 6 例。成人 31 例,其中 23 例为患儿父母。

103 例患者中 72 例查血清铁(SI)、总铁结合力(TIBC)、转铁蛋白饱和度(TS)。103 例患者中 92 例查 Hb 电泳。103 例患者均查基因类型。

1.2 实验方法

1.2.1 血清铁、总铁结合力、转铁蛋白饱和度 采用联吡啶法测定。

1.2.2 血红蛋白电泳和 HbF 检测 血红蛋白电泳:2 cm×8 cm 醋纤薄膜在 TEB 液中浸泡 20 min 以上取出,吸去多余水分后,取 Hb 液 10 μl 点样,点样端置于阴极,电压 140~200 V,30~50 min 电泳。电泳完毕,将各区带剪下,加双蒸水 4 ml(HbA 为 8 ml)洗脱 30 min 后比色,计算 Hb 百分比。

测定 HbF:取 Hb 液 0.1ml 加入 1/12N 氢氧化钾 1.6 ml,1 min 后加入半饱和的 $(NH_4)_2SO_4$ 3.4 ml 混匀过滤。另一试管加入 4 ml 双氧水和 0.02 ml Hb 液比色计算结果。

1.2.3 基因检测(多重单管聚合酶链反应) 取病人静脉血 5 ml 提取 DNA。引物序列见表 1。

表 1 α 地中海贫血病人基因检测 DNA 引物序列

DNA 引物	引物序列
SEA-F	5'-GCGATCTGGGCTCTGTGTTC-3'
SEA-R	5'-CCACGTTGTGTTCATGGCTGTG-3'
4.2-F	5'-GCTTTACCCATGTGGTGCCTC-3'
4.2-R	5'-CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC-3'
3.7-F	5'-CCCCTCGCCAAGTCCACCC-3'
3.7-R	5'-AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG-3'
α2-R	5'-AGACCAGCAAGGCCCGGTC-3'
Cs-F	5'-GTAAACACCTCCATTGTTGG-3'
cs-R	5'-GCTGACCTCCAAATACCGTC-3'

1.2.4 PCR 条件 PCR 反应在基因扩增仪 PTC-200 上进行,反应体系总体积 25 μl,含 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4),50 mmol/l KCl,2.0 mmol/L $MgCl_2$,各引物为 0.5 μl,0.2 mmol/L 的 dNTP,2.0U 的 Taq 酶,100 ng 的基因组 DNA。PCR 循环条件:37℃10 min,94℃ 4 min(95℃ 60 s,60℃ 60 s,72℃ 180 s)×36 次循环后,72℃延伸 10 min。反应完成后取 PCR 产物 10 μl,10 g/L 的琼脂糖凝胶水平电泳,最后紫外线荧光摄像仪下摄像分析基因缺失或突变类型。

1.3 统计方法

应用 SPSS13.0 软件进行统计分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清铁、总铁结合力、转铁蛋白饱和度检测

72 例患者查 SI、TIBC、TS,40 例(55.56%)出现 SI<11 μ mol/L,总铁结合力 >70 μ mol/L,TS<20%。

2.2 血红蛋白电泳

共有 92 例患者做 Hb 电泳(图 1),63 例(68.48%)正常,29 例(31.52%)出现快速带,异常 Hb 含量分布于 3.40%~29%之间,异常 Hb 含量的平均数为 11.97%±7.50%。92 例 HbA2 均 <2%,在正常范围。

2.3 基因分析

103 例患者中,缺失 1 个基因者(基因型为 -α/αα)23 例,缺失 2 个基因者(基因型为 --/αα)40 例,缺失 3 个基因者(基因型为 --/-α)22 例,1 个基因突变者(基因型为 αα/αα c.s)9 例,1 个基因突变合并 2 个基因缺失者(基因型为 --/αα c.s)9 例。缺失型 85 例(占 82.52%),非缺失型 18 例(占 17.48%),在 85 例缺失型中 α^0 地中海贫血杂合子 40 例(47.06%),α^+ 地中海贫血杂合子 23 例(27.06%),α^0 地中海贫血与 α^+ 地中海贫血双重杂合子 22 例(25.88%)。45 例 α^+ 地中海贫血中右缺失型 23 例(51.11%),左缺失型 22 例(48.89%)。非缺失型电泳图见图 2,缺失型电泳图见图 3。

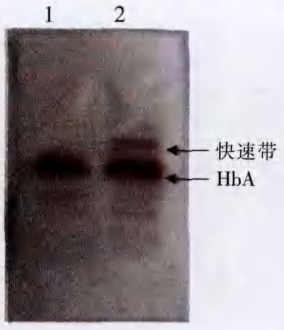
根据基因类型与临床分型之间的关系,103 例患者中,32 例静止型(31.07%),40 例轻型(38.83%),31 例中间型(30.10%),0 例重型(0%)。住院病人 23 例中,静止型 2 例(8.69%),轻型 6 例(26.09%),中间型 15 例(65.22%)。门诊病例 80 例中,静止型 30 例(37.50%),轻型 34 例(42.50%),中间型 16 例(20.00%)。

对 10 例中间型患儿、3 例轻型及 1 例静止型患儿的父母双方或一方行基因检测,发现结果符合遗传规律。

3 讨 论

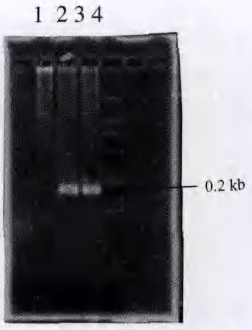
3.1 重庆地区 α 地中海贫血以缺失型为主

α 地中海贫血是由于 α 珠蛋白基因的缺失或功能缺陷(点突变)而导致 α 珠蛋白链合成障碍所引起的一组溶血性贫血。α 珠蛋白基因位于 16 号染色体短臂(16p13.33-p13.11-pter),总长约 29 kb,包含 7 个连锁的 α 类基因或假基因。每条染色体上各有一对控制 α 链合成的 α 基因,从 5'端到 3'端顺序分别为 α2、α1 基因。根据基因的缺失或点突变,可以分为缺失型和非缺失型两大基因类型[2]。α 地中海贫血大多由基因缺失所致,少数为点突变。本研究发现 103 例病例,以缺失型为主,占 82.52%,非缺



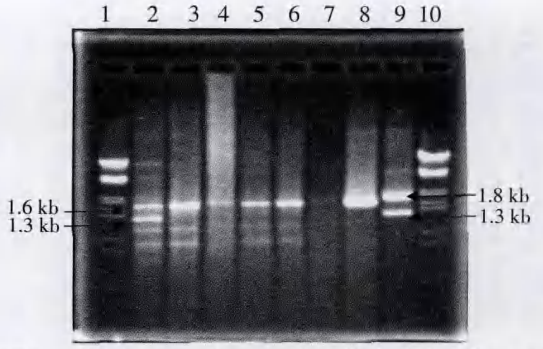
1. marker; 2. patient

图 1 血红蛋白电泳图



1. Control; 2、3. the patients of HbCS; 4. marker

图 2 αα/αα^cs 电泳图



1、10. marker; 2. the patient of $--/-\alpha^{4.2}$; 3、4、5、6、8. normal; 7. control; 9. the patient of $--/\alpha\ \alpha$

图 3 $--/-\alpha^{4.2}$、$--/\alpha\alpha$ 电泳图

失型占 17.38%。

3.2 α^+地中海贫血稍多于 α^0 地中海贫血，左缺失型与右缺失型相差不大

缺失型为 1 个或多个基因缺失所致，分为 α^0 地中海贫血和 α+地中海贫血。本研究中，缺失型 α^0 地中海贫血杂合子（$--/\alpha\alpha$）40 例（38.83%），α^+地中海贫血杂合子（$-\alpha/\alpha\alpha$）23 例（27.06%），α^0 与 α^+地中海贫血双重杂合子（$--/-\alpha$）22 例（25.88%），α^0 地中海贫血杂合子多于 α^+地中海贫血杂合子及 α^0 与 α^+地中海贫血双重杂合子，$P<0.05$。与 2004 年深圳市人民医院对产检妇女进行缺失型 α 地中海贫血检查结果以相似[3]。α^+地中海贫血缺失可累及 1 个 α 基因（α^1 或 α^2），部分 α^2 基因或 α^2 基因的 5'端或 α1 基因的 3'端，目前已发现 8 种基因型，其中最常见的两种缺失型为右缺失型（$-\alpha^{3.7}$）和左缺失型（$-\alpha^{4.2}$）。本研究中右缺失 23 例（22.33%），左缺失 22 例（21.36%），右、左缺失型间无显著差别。与 2004 年深圳市人民医院对产检妇女进行缺失型 α 地中海贫血检查结果右缺失型多于左缺失型（右:左=3.5:1）有明显差异[3]。

3.3 基因诊断为确诊 α 地中海贫血的金标准

α 地中海贫血是由调控 α 珠蛋白的基因缺失或功能缺陷所致，所以基因诊断为确诊该病的金标准。而静止型和轻型患者临床上几乎没有任何表现，血常规、Hb 电泳也可以没有异常发现，临床上常常易漏诊、误诊，更需要依赖基因诊断来确诊。

3.4 地中海贫血的预防

α 地中海贫血为常染色体隐性遗传。轻型地中海贫血的人平时无症状，但能将地中海贫血"致病基因"遗传给下一代[4]。因此，一个轻型地中海贫血病人同正常人结婚，子女有 1/2 机会为轻型地中海贫血；但若轻型地中海贫血男女病人结婚，他们的子女 1/4 机会是正常人，1/2 机会是轻型地中海贫血，1/4 机会是重型地中海贫血。本研究发现 7 例中间型患儿的父母一方为轻型，另一方为静止型患者；1 例轻型患儿父母双方均为轻型患者；1 例中间型患儿一方亲代为静止型；3 例中间型患儿一方亲代为轻型（另一方因为其他原因未检查），与孟德尔遗传规律相符合。因此，在 α 地中海贫血的高发区，应进行普查。尤其是家族中有该病史的人，在生育前要做好地中海贫血筛查，掌握自身的基因状况。在结婚体检时应增加地中海贫血筛查内容，尽量避免两个地中海贫血基因携带者通婚。两个地中海贫血基因携带者生育，在孕期一定要到有条件的医院做产前诊断。

3.5 α 地中海贫血合并营养性缺铁性贫血

α 地中海贫血为溶血性疾病，红细胞破坏后细胞内铁释放出来，不应出现 SI 降低[5]。本研究发现 72 例 α 地中海贫血患者中 40 例（55.56%）SI 降低，TIBC 升高，TS 降低，结合临床表现诊断为营养性缺铁性贫血。其中包括了 23 例静止型，8 例轻型，9 例 HbH 病。本研究提示，不但静止型、轻型 α 地中海贫血可与营养性缺铁性贫血合并存在，HbH 病（中间型）也可合并营养性缺铁性贫血，比例达 55.56%。

参 考 文 献

[1] 陈 萍. α 地中海贫血分子基础与临床研究现状[J].广西医学，2004，5(26)：619-622.

[2] Viprakasit V，Tanphaichitr V S，Pung-Amritt P，et al.Clini cal phenotypes and molecular characterization of Hb H-Pakse disease[J]. Haematologica，2002，87(2)：117-125.

[3] 刘彩艳，李芳芳，方洪辉.基因芯片检测缺失型 α 地中海贫血的研究[J].检验医学教育，2005，6(12)：43-45.

[4] Leung T，Lau T K，Chung T K，et al.Thalassaemia screening in pregnancy[J].Curr Opin Obstet Gynecol，2005，17(2)：129-134.

[5] 陈华琼，邓 兵，游亚萍.不同基因型地中海贫血患儿铁负荷情况的分析[J].第三军医大学学报，2005，27(10)：2080-2082.

（责任编辑：冉明会）