

论著·临床研究

四川泸州地区 α 珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断结果分析*

陈红英, 刘春艳, 邹艳

(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 α 珠蛋白生成障碍性贫血(简称 α 地贫)基因突变类型及构成比,探讨基因诊断的临床应用价值。方法 采用 PCR 方法结合 DNA 芯片杂交技术,对 116 例可疑 α 地贫患者进行基因检测分析。结果 116 例可疑 α 地贫患者中,39 例检出 α 地贫基因,检出率为 33.62%。共检出 7 种突变基因型,其中 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ 缺失型占 41.03%, $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 缺失型占 25.64%。结论 四川泸州地区 α 地贫基因突变以 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ 缺失型为主;基因诊断是确诊 α 地贫的重要标准。

关键词: α 地中海贫血;基因突变;基因诊断

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.12.009

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)12-1434-02

Analysis on gene diagnosis results of α -thalassemia in Luzhou area*

Chen Hongying, Liu Chunyan, Zou Yan

(Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To analyze the genetic mutation patterns and the constituent ratio of α -thalassemia in Luzhou area and to investigate the clinical application value of the gene diagnosis. **Methods** The PCR method combined with DNA chip hybridization technique was adopted to conduct the gene detection and analysis on 116 cases of suspected α -thalassemia. **Results** Among 116 suspicious cases of α -thalassemia, 39 cases were found with genotypes of α -thalassemia, the detection rate was 33.62%. 7 kinds of mutation genotypes were detected, in which the deletion type of $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ accounted for 41.03% and the deletion type of $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ accounted for 25.64%. **Conclusion** The main gene mutation of α -thalassemia in Luzhou area is the deletion type of $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$. The gene diagnosis is an important criterion for definitely diagnosing α -thalassemia.

Key words: α -thalassemia; gene mutation; gene diagnosis

α 珠蛋白生成障碍性贫血(简称 α 地贫)是一种由于 α 珠蛋白基因突变导致肽链表达失衡而产生的单基因常染色体不完全显性遗传血液病,是中国长江以南各省市地区发病率最高、危害最大的遗传性疾病之一^[1]。轻型或静止型 α 地贫患者在临床上缺乏明显的症状体征和血液学改变指征,极易漏诊、误诊;而重型 α 地贫往往由于重度胎儿水肿而导致死胎或流产。随着分子生物学技术的发展,基因诊断已成为地贫最为可靠的诊断依据应用于临床^[2]。目前由于对 α 地贫尚无根本有效的治疗方法,所以对人群中 α 地贫基因携带者进行筛查,开展产前基因诊断,防止 α 地贫患儿出生,是控制本病发生的最有效措施。泸州是 α 地贫高发地区,为初步了解该地区 α 地贫的基因突变类型,本文对本院就诊的可疑 α 地贫患者进行基因检测分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 1 月至 2013 年 2 月在泸州医学院附属医院门诊就诊或住院的可疑 α 地贫患者 116 例,血常规检测均为小细胞低色素性贫血,以平均红细胞容积(MCV) <82 fL,平均红细胞血红蛋白(MCH) <26 pg 为筛查依据^[3],或有阳性 α 地贫家族史,需进一步明确诊断者。116 例患者均来自泸州地区,均为汉族。其中男 65 例,女 51 例;儿童 72 例,成人 44 例;儿童初诊年龄为 46 d 至 12 岁,中位年龄为 4 岁 10 个月。

1.2 方法

1.2.1 仪器和试剂 全自动 Sysmex XT-2000i 血细胞分析仪由日本希森美康公司生产,全自动琼脂糖凝胶 HLC-723G7 型电泳仪分析系统,包括全自动光密度扫描仪以及相应配套的 Alkaline 血红蛋白(Hb)琼脂糖凝胶电泳试剂由美国 Helena 公司生产;DNA 提取试剂、 α 地贫基因分析检测试剂盒由深圳亚能生物技术有限公司提供。

1.2.2 血常规检测 采用全自动 Sysmex XT-2000i 血细胞分析仪对全部受检者进行外周血常规测定,取 MCV <82 fL, MCH <26 pg 为截断值。

1.2.3 Hb 电泳 采用全自动琼脂糖凝胶 HLC-723G7 型电泳仪分析系统进行 Hb 电泳检测。标本用生理盐水洗涤红细胞 4 次,四氯化碳萃取后制备 Hb 液,经适当稀释后分别加至样品槽中,由仪器自动定量于样品孔中,点样于琼脂糖平板上进行电泳。

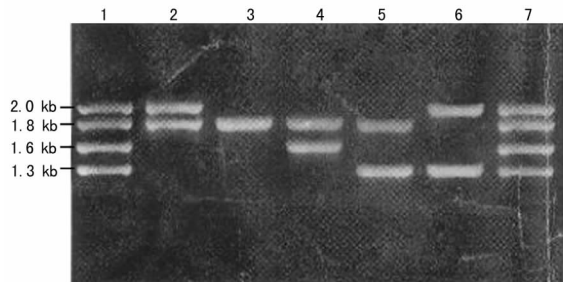
1.2.4 α 地贫基因检测 (1)基因组 DNA 提取:抽取受检者静脉血 2 mL,放入含枸橼酸钠抗凝剂管中,采用酚-氯仿抽提法,试剂盒由亚能公司提供,按照要求提取样本的人基因组 DNA 备用。(2)PCR 扩增:单管 PCR 反应混合液为 21 μ L,加入待测样本 DNA 4.0 μ L,总反应体系为 25 μ L。按以下条件进行扩增:96 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 98 $^{\circ}$ C 变性 45 s,65 $^{\circ}$ C 退火 90 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,共 10 个循环;紧接 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s,65 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,共 25 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。(3) α 地贫基因检测:取 PCR 扩增产物 5 μ L 与电泳加样

* 基金项目:2011 年四川省卫生厅科研项目(100274)。 作者简介:陈红英(1971-),副主任医师,硕士研究生,主要从事小儿血液系统疾病诊治研究。

缓冲液 2.0 μL 混匀,用 1.0%琼脂糖凝胶电泳在稳压 5 V/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。

2 结 果

2.1 样本基因电泳图 本反应体系可扩增出长度约为 1.8、2.0、1.6、1.3 kb 的 4 个条带,分别代表人类 α 珠蛋白基因(即正常人)、3.7 缺失型、4.2 缺失型、SEA 缺失型的扩增产物。 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 缺失型在 2.0、1.8 kb 出现 2 条电泳条带; $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 缺失型在 1.6、1.8 kb 出现 2 条电泳条带; $-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$ 缺失型在 1.3、2.0 kb 出现 2 条电泳条带; $-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}$ 缺失型在 1.3、1.6 kb 出现 2 条电泳条带。α 地贫基因电泳图检测结果,见图 1。



1,7: 标记物; 2: $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$; 3: $\alpha\alpha/\alpha\alpha$; 4: $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$; 5: $-\alpha\text{SEA}/\alpha\alpha$; 6: $-\alpha^{3.7}/-\alpha\text{SEA}$ 。

图 1 缺失型 α 地贫基因电泳图

2.2 基因型分析 本组资料基因检测结果显示,116 例筛查者中,39 例检出 α 地贫基因,检出率为 33.62%。其中 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 缺失型 16 例, $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 缺失型 10 例, $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 缺失型 6 例, $-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$ 缺失型 3 例, $-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}$ 缺失型 2 例, $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ 缺失型 1 例, $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ 缺失型 1 例。根据基因型与临床分型的关系,39 例 α 地贫患者中,静止型 16 例(41.03%),14 例患者无血常规及 Hb 电泳异常;标准型 18 例(46.15%),6 例患者无贫血表现,仅有 MCV 下降;中间型 5 例(12.82%)。α 地贫基因型、等基因及构成比,见表 1、2。

表 1 α 地贫基因型及构成比 (n=39)

基因型	n	表型	构成比(%)
$-\text{SEA}/\alpha\alpha$	16	标准型	41.03
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	10	静止型	25.64
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	6	静止型	15.39
$-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$	3	中间型	7.69
$-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}$	2	中间型	5.13
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	1	标准型	2.56
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	1	标准型	2.56
合计	39		100.00

表 2 α 地贫等位基因及构成比

基因类型	等位基因数	构成比(%)
$-\text{SEA}$	21	46.67
$-\alpha^{3.7}$	15	33.33
$-\alpha^{4.2}$	9	20.00
合计	45	100.00

3 讨 论

人类 α 珠蛋白基因簇位于第 16 号染色体短臂末端(16p13.3),总长约 29 kb,包含 7 个连锁的 α 类基因或假基因。正常人每条染色体各有 2 个 α 珠蛋白基因,一对染色体共有 4 个 α 珠蛋白基因^[4]。大多数 α 地贫是由于 α 珠蛋白基因缺失所造成的,极少数是由于基因点突变所导致。不同程度 α 珠蛋白基因缺失而导致不同的临床表现,且主要取决于 α 珠蛋白基因缺失的数目^[5]。若每一条染色体上的 2 个 α 基因均缺失,则无 α 肽链的合成,称为 α0 地贫(也称为 α 地贫 1);若仅是一条染色体的一个 α 基因缺失,则 α 肽链的合成部分受抑制,称为 α+ 地贫(也称为 α 地贫 2)。临床上 α 地贫常分为 4 种类型:(1)重型 α 地贫:又称为 HbBart's 胎儿水肿综合征,胎儿多于宫内死亡或流产,缺失 4 个 α 基因,是 α0 地贫的纯合子;(2)中间型或 HbH 病:常表现中至重度贫血,缺失 3 个 α 基因,往往是 α0 与 α+ 地贫的双重杂合子;(3)标准型(轻型):仅表现为轻度贫血或无临床症状,缺失 2 个 α 基因,是 α0 杂合子或 α+ 杂合子;(4)静止型:无明显临床症状,缺失 1 个 α 基因,是 α+ 杂合子。本组资料结果中,5 例中间型有 3 例为 $-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$ 双重杂合子,2 例为 $-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}$ 双重杂合子。18 例标准型中,α0 杂合子 16 例,α+ 杂合子 2 例。16 例静止型均为 α+ 杂合子,其中 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 杂合子 10 例, $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 杂合子 6 例。

α 地贫具有高度的遗传异质性和明显的地域分布特征,常发生在非洲和东南亚人群^[6]。中国长江以南广大地域为该病的高发区,尤以广西、广东和海南最为严重^[7],四川省目前还缺乏有关 α 地贫发病率的大宗样本人群调查结果分析。本文资料中,116 例可疑患者中检出 39 例 α 地贫基因,检出率为 33.62%,低于李贵芳等^[8]报道贵州地区 α 地贫检出率和林业辉等^[5]报道的佛山地区 α 地贫检出率。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^[9],而中国南方则以东南亚型缺失($-\text{SEA}$)、右缺失(V)、左缺失($-\alpha^{4.2}$)这 3 种突变基因型常见,其中东南亚型缺失($-\text{SEA}$)最为普遍^[10-11],广东、广西等地区 α 地贫基因型中东南亚型缺失($-\text{SEA}$)占 45% 以上^[12-13]。本文资料中,共检出 7 种突变基因型,其中 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 缺失型占 41.03%, $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 缺失型占 25.64%,显示本地区 α 地贫的基因突变类型及构成比与国内其他地区一致。

α 地贫严重威胁人类生命和健康,重度 α 地贫常有致死性胎儿水肿,中间型往往伴有中重度贫血而影响生命质量,轻型或静止型 α 地贫临床可无症状,但能将 α 地贫致病基因遗传给下一代。轻型或静止型 α 地贫患者同正常人结婚,子女有 1/2 的概率为轻型或静止型 α 地贫患者;但若轻型或静止型 α 地贫患者之间结婚,他们的子女 1/4 的概率是正常人,1/2 可能是轻型或静止型 α 地贫患者,而 1/4 可能是重型患者^[14]。本组资料 18 例标准型患者中,6 例患者无贫血表现,仅有 MCV 下降,16 例静止型患者中,14 例均无血常规及 Hb 电泳异常。因此,在 α 地贫高发地区,如何筛选出这些没有任何症状的地贫基因携带者,避免基因携带者之间联姻,是预防本病最行之有效的方法^[15]。α 地贫是由于调控 α 珠蛋白的基因缺失或功能缺陷所致,血液学筛查可能漏诊基因携带者,而基因诊断才是确诊该病的重要标准。

解释冠心病患者停药氯吡格雷后出现缺血性事件,但血小板功能恢复的病理、生理过程需要更进一步的研究来证实。

参考文献:

- [1] Ho PM, Peterson ED, Wang L, et al. Incidence of death and acute myocardial infarction associated with stopping clopidogrel after acute coronary syndrome [J]. *JAMA*, 2008, 299(5):532-539.
- [2] Ho PM, Tsai TT, Wang TY, et al. Adverse Events After Stopping Clopidogrel in Post-Acute Coronary Syndrome Patients: Insights From a Large Integrated Healthcare Delivery System [J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2010, 3(3):303-308.
- [3] Cundiff DK. Benefit of clopidogrel for acute coronary syndrome and percutaneous coronary interventions in doubt due to rebound adverse events [J]. *Am J Cardiol*, 2008, 102(2):248.
- [4] Lordkipanidze M, Diodati JG, Pharand C. Possibility of a rebound phenomenon following antiplatelet therapy withdrawal; a look at the clinical and pharmacological evidence [J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 123(2):178-186.
- [5] Collet JP, Montalescot G, Steg PG, et al. Clinical outcomes according to permanent discontinuation of clopidogrel or placebo in the CHARISMA trial [J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2009, 102(6/7):485-496.
- [6] Kimura T, Morimoto T, Nakagawa Y, et al. Antiplatelet therapy and stent thrombosis after sirolimus-eluting stent implantation [J]. *Circulation*, 2009, 119(7):987-995.
- [7] Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, et al. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods [J]. *Clin Chem*,

2005, 51(6):957-965.

- [8] Antonopoulos CN, Sfyroeras GS, Kakisis JD, et al. The role of soluble P selectin in the diagnosis of venous thromboembolism [J]. *Thromb Res*, 2013, 133(1):17-24.
- [9] Scialla JJ, Plantinga LC, Kao WH, et al. Soluble P-selectin levels are associated with cardiovascular mortality and sudden cardiac death in male dialysis patients [J]. *Am J Nephrol*, 2011, 33(3):224-230.
- [10] Frelinger AL 3rd, Barnard MR, Fox ML, et al. The platelet activity after clopidogrel termination (PACT) study [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2010, 3(5):442-449.
- [11] Sibbing D, Stegherr J, Braun S, et al. A double-blind, randomized study on prevention and existence of a rebound phenomenon of platelets after cessation of clopidogrel treatment [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(6):558-565.
- [12] Diehl P, Halscheid C, Olivier C, et al. Discontinuation of long term clopidogrel therapy induces platelet rebound hyperaggregability between 2 and 6 weeks post cessation [J]. *Clin Res Cardiol*, 2011, 100(9):765-771.
- [13] Yedidya I, Netzer A, Vaduganathan M, et al. Clopidogrel tapering as a strategy to attenuate platelet rebound phenomenon in patients with bare-metal stents [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2012, 33(1):16-21.
- [14] Ford I, Scott NW, Herd V, et al. A randomised controlled trial of platelet activity before and after cessation of clopidogrel therapy in patients with stable cardiovascular disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(3):233-239.

(收稿日期:2013-09-18 修回日期:2013-12-22)

(上接第 1435 页)

参考文献:

- [1] 任兆瑞, 黄淑幀. 珠蛋白生成障碍性贫血的基因诊断 [J]. *诊断学理论与实践*, 2010, 9(5):405-408.
- [2] 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(5):385-389.
- [3] 蔡稔, 梁昕, 潘丽珍, 等. 血液学指标在育龄人群地贫筛查中的诊断价值 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2003, 11(1):129-132.
- [4] 伍曼仪, 黄绍良. 现代小儿血液病学 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2003:244-250.
- [5] 林业辉, 范联, 张章, 等. 471 例儿童 α 地中海贫血缺失型基因谱分析 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(4):264-266.
- [6] Dasanu CA. Alpha-thalassemia genetic testing: an important anemia diagnostic tool in patients of African heritage [J]. *Conn Med*, 2010, 74(10):585-587.
- [7] 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.

- [8] 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.
- [9] 陈晨春, 仇小强. α -地中海贫血流行状况 [J]. *中国妇幼保健*, 2009, 24(6):858-860.
- [10] Thomas L. 临床实验诊断学 [M]. 吕元, 朱汉民, 沈霞, 译. 上海: 上海科学技术出版社, 2004:462-468.
- [11] Chui DH. Alpha-thalassemia: Hb H disease and Hb Barts hdrops fetalis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005(1054):25-32.
- [12] Xu, XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(5):517-519.
- [13] Pan HF, Long GF, Li Q, et al. Current status of thalassemia in minority populations in Guangxi [J]. *China Clin Genet*, 2007, 71(5):419-421.
- [14] 王莉, 徐西华. 重庆地区 α 地中海贫血基因型研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(8):1051-1053.
- [15] 沈晓明, 王卫平. 儿科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008:196-199.

(收稿日期:2013-10-08 修回日期:2013-12-10)