

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.19.014

惠州地区 5 500 例珠蛋白生成障碍性贫血的基因检测分析*

刘宇鹏¹,李雪莲^{2#},刘瑞玉^{3△}

(1.南方医科大学第二临床医学院,广州 510515;2.广东医学院,广东湛江 524001;

3.广东省惠州市中心人民医院检验中心 516001)

[摘要] 目的 运用基因诊断技术检测患者珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)基因,了解主要的基因突变类型及其频率。

方法 以 2010 年 1 月至 2014 年 10 月就诊于惠州市中心人民医院血液科(门诊和体检)的 5 500 例患者为研究对象,采用跨越断裂点的 PCR(GAP-PCR)技术及膜反向杂交技术分别对 α -和 β -地贫进行基因分析。结果 检出 α -地贫基因改变 1 604 例,占 29.16%;检出 β -地贫基因改变 1 096 例,占 19.93%,检出 $\alpha\beta$ -复合型地贫患者 119 例。结论 α -和 β -地贫的基因筛查为婚育指导提供了有价值的基础资料。

[关键词] 珠蛋白生成障碍性贫血;基因突变;基因检测;基因频率

[中图分类号] R556

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)19-2635-03

Analysis on gene detection in 5 500 cases of thalassemia in Huizhou region*

Liu Yupeng¹,Li Xuelian²,Liu Ruiyu^{3△}

(1. Second Clinical Medical College of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China;

2. Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China;

3. Clinical Laboratory Center, Huizhou Municipal Central People's Hospital, Huizhou, Guangdong 516001, China)

[Abstract] Objective To use the genetic diagnosis technique to perform the gene detection in the patients with thalassemia

for understanding the main gene mutation types and their gene frequencies. Methods Totally 5 500 outpatients and individuals undergoing physical examination in the hematology department of the Huizhou Municipal Central People's Hospital from January 2010 to October 2014 were taken as the research subjects. The GAP-PCR and membrane reverse hybridization technology were adopted to conduct the gene analysis of α - and β -thalassemia. Results A total of 1 604 cases of α -globin gene change were detected, accounting for 29.16% of the total detected subjects; 1 096 cases of β -globin gene change were detected, accounting for 19.93% of the total detected subjects; 119 cases of $\alpha\beta$ -complex thalassemia were detected. Conclusion The gene screening of α - and β -thalassemia provides the valuable basic data for conducting the marital and fertility instructions.

[Key words] thalassemia; gene mutation; genetic testing; gene frequency

珠蛋白生成障碍性贫血(thalassemia),又称地中海贫血(简称地贫),是一种危害极大的常染色体隐性遗传的血红蛋白疾病。主要分为 α -地贫和 β -地贫,其发病机制是 α 及 β 珠蛋白基因的先天性缺陷,造成 α 及 β 珠蛋白肽链合成减少或缺失,而引起血红蛋白生成障碍,导致无效造血和溶血性贫血。地贫广泛分布于全球各地,尤其是地中海地区,我国广东、广西、海南等地为高发区。重型 α -地贫胎儿(Barts水肿)多在妊娠末期胎死腹中或产下便死亡。而血红蛋白H病(HbH病)及重型 β -地贫患儿一般在出生后4~6个月发病,呈进行性贫血,要靠输血维持生命,易产生多种并发症^[1]。为了解广惠州地区 α -地贫和 β -地贫的基因突变类型及其频率分布,本研究对疑似地贫的5 500例患者进行 α -和 β -地贫的基因检测诊断,现将检测结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以2010年1月至2014年10月于惠州市中心人民医院血液科就诊的患者(包括门诊及住院)5 500例为研究对象,年龄14~90岁。

1.2 仪器与试剂 血红蛋白电泳采用中压电泳仪及其配套的

GSG-2000 核酸/蛋白凝胶图像分析管理系统。采用跨越断裂点 PCR(又称裂口 PCR, GAP-PCR)技术检测常见的 3 种缺失型 α 地贫基因($-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$),试剂盒由深圳益生堂生物企业有限公司提供;采用 PCR 探针法定性检测人基因组 DNA 中的 17 种 β -地贫基因,试剂盒由深圳益生堂生物企业有限公司提供。DNA 扩增仪为美国 ABI 公司 7500 实时荧光定量 PCR 系统,所有操作严格按说明书进行。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集及处理 使用新采集的或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 存放1个月以内的枸橼酸钠或乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血,不可用肝素抗凝全血。

1.3.2 α -地贫基因检测 α -地贫采用 GAP-PCR 法检测东南亚型缺失($-\text{SEA}$)、右侧缺失($-\alpha^{3.7}$)和左侧缺失($-\alpha^{4.2}$)。从 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏的试剂盒中取出 PCR 反应管,根据样品 DNA 浓度加入待测 DNA 样品溶液 $1\sim 3\text{ }\mu\text{L}$,不足部分补加灭菌双蒸水,使总体积达到 $25\text{ }\mu\text{L}$,盖严管盖,短暂离心。将扩增管直接插入 PCR 仪中,按 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min ; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s , $66\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 180 s , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min , $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存或立即电泳。

* 基金项目:广东省惠州市科技计划项目(2014y015)。△ 作者简介:刘宇鹏(1993-),在读本科,主要从事临床医学方面的研究。

共同为第一作者。△ 通讯作者,E-mail:liuruiyu301@163.com。

取 PCR 产物 5~10 μL , 依次加入 1.2% 的琼脂糖凝胶加样孔中。接通电源, 调至稳压 5~8 V/cm, 电泳约 40 min, 置于紫外凝胶透射成像仪上观察, 根据扩增产物长度得出诊断结果。电泳结果的判定: 1.9、1.7、1.4、1.2 kb 扩增带分别对应 α -珠蛋白基因右侧缺失 ($-\alpha^{3.7}$)、无缺失、左侧缺失 ($-\alpha^{4.2}$)、东南亚型缺失 ($-\text{SEA}$)。

1.3.3 β -地贫基因检测 β -地贫采用膜反向杂交技术检测中国人常见的 8 个位点, 即 CD41-42(-TCTT)、ISV-2-654 C \rightarrow T、CD17 A \rightarrow T、-28 A \rightarrow T、CD26 G \rightarrow A、CD71-72(+A)、CD43 G \rightarrow T、-29 A \rightarrow G, 以及 9 个少见位点突变, 即起始密码子 ATG \rightarrow AGG、CD14-15(+G)、CD27-28(+C)、-32 C \rightarrow A、-30 T \rightarrow C、IVS-1-1 G \rightarrow T、IVS-1-5 G \rightarrow C、CD31(-C)、CAP +40~+43(-AAAC)。取出试剂盒中的 PCR 扩增管, 5 000 r/min 离心数秒, 分别加入 45 μL PCR 反应液, 然后小心吸取 3 μL 待测 DNA 样品溶液置于 PCR 扩增管中, 混匀, 5 000 r/min 离心数秒。将扩增管直接插入 PCR 仪中 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 当天检测或置于一 20 $^{\circ}\text{C}$ 存放 1 周内使用。PCR 产物与试剂盒配置的含探针的膜条置于 43 $^{\circ}\text{C}$ 杂交仪进行反向点杂交过夜, 次日取出进行洗膜和显色。根据膜上出现的蓝色斑点判断 β -珠蛋白基因相应位点是否有突变, 并判断突变为杂合子或纯合子。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理, 计数资料以例数或百分率表示。

2 结果

2.1 α -和 β -地贫基因改变的检出率 在进行地贫基因检查的 5 500 例患者中, α -珠蛋白基因改变 1 604 例, 占 29.16%; β -珠蛋白基因改变 1 096 例, 占 19.93%。

2.2 α -地贫基因检测情况 检测出 α -珠蛋白基因缺失 1 367 例, 其中东南亚型地贫 1 249 例, 基因诊断为 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$; HbH 病 83 例, 基因诊断为 $-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$ 64 例, $-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}$ 19 例; 静止型 α -地贫 256 例, 基因诊断为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 195 例, $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 61 例; 纯合子 12 例, 基因诊断为 $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ 10 例, $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$ 2 例; 双重杂合子 4 例, 基因诊断均为 $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{3.7}$ 。见表 1。

表 1 α -地贫患者的基因类型及其构成比

基因类型	<i>n</i>	构成比(%)
东南亚型	1 249	22.71
HbH 病	83	1.51
标准型	12	0.22
静止型	256	4.65
双重杂合子	4	0.07
其他	3 896	70.84
合计	5 500	100.00

2.3 β -地贫基因检测情况 检测出 β -珠蛋白基因突变类型 27 种, 共 1 096 例, 分为杂合子、双重纯合子和双重杂合子。其中杂合子 1 064 例, 占 19.35% (1 064/5 500), 基因诊断为 CD41-42 位突变 447 例、ISV-2-654 位突变 332 例、CD17 位突变 104 例、-28 位突变 81 例、 βE 位突变 30 例、CD71-72 位突变 19 例、CD14-15 位突变 19 例、CD27/28 位突变 19 例、IVS1-1 位点突变位点突变 8 例、CD43 位突变 6 例、 βCAP 位点突变 3 例、CD17-18 位突变 1 例。双重纯合子共 10 例, 占 0.18% (10/5 500), 基

因诊断为 -28/-28 (5 例)、CD17/17 (2 例)、ISV-2-654/ISV-2-654 (3 例)。双重杂合子共 22 例, 占 0.40% (22/5 500), 基因诊断为 CD-28/ISV-2-654 (4 例)、ISV-2-654/-28 (3 例)、ISV-2-654/ βE (2 例)、CD71-72/17 (2 例)、CD41-42/ βE (2 例)、-28/CD17 (2 例)、CD17/41-42 (2 例)、CD17/ βE (1 例)、CD43/17 (1 例)、ISV-2-654/14-15 (1 例)、IVS1-1/ISV-2-654 (1 例)、 βE /ISV-2-654 (1 例)。见表 2。

表 2 β -地贫患者的基因类型及其构成比

基因类型	<i>n</i>	构成比(%)
杂合子		
CD41-42/N	447	8.13
ISV-2-654/N	332	6.04
CD17/N	104	1.89
-28/N	81	1.47
CD71-72/N	19	0.34
βE /N	30	0.55
CD14-15/N	19	0.34
CD27/28/N	19	0.34
CD43/N	6	0.1
βCAP 位点突变	3	0.05
$\beta\text{I7-18}$ /N	1	0.02
$\beta\text{IVS1-1}$ 位点突变	8	0.15
纯合子		
-28/-28	5	0.09
CD17/17	2	0.04
ISV-2-654/ISV-2-654	3	0.05
双重杂合子		
-28/ISV-2-654	4	0.07
ISV-2-654/-28	3	0.05
ISV-2-654/ βE	2	0.04
CD71-72/17	2	0.04
CD41-42/CDE	2	0.04
-28/CD17	2	0.04
CD17/41-42	2	0.04
CD17/ βE	1	0.02
CD43/17	1	0.02
ISV-2-654/CD14-15	1	0.02
IVS1-1/ISV-2-654	1	0.02
βE /ISV-2-654	1	0.02
其他	4 399	79.98
合计	5 500	100.00

2.4 $\alpha\beta$ -复合型地贫基因检测情况 检出 $\alpha\beta$ -复合型地贫 119 例, 主要的复合类型为: 东南亚型地贫合并 CD41-42 位单基因突变 (27 例)、静止型地贫合并 CD41-42 位单基因突变 (18 例)、东南亚型地贫合并 ISV-2-654 位单基因突变 (16 例)、静止型地贫合并 -28 位单基因突变 (13 例)。见表 3。

表 3 β 地贫复合 α 地贫基因型分布[n(%)]

基因类型	n	东南亚	HbH 病	静止型
CD41-42/N	47	27(22.69)	2(1.68)	18(15.13)
ISV-2-654/N	26	16(13.45)	1(0.84)	9(7.56)
CD17/N	10	9(7.56)	0(0)	1(0.84)
-28/N	19	6(5.04)	0(0)	13(10.93)
-29/N	1	1(0.84)	0(0)	0(0)
CD71-72/N	1	0(0)	0(0)	1(0.84)
CD14-15/N	4	2(1.68)	0(0)	2(1.68)
CD27/28/N	1	1(0.84)	0(0)	0(0)
CD43/N	2	2(1.68)	0(0)	0(0)
ISV-2-654/ISV-2-654	1	1(0.84)	0(0)	0(0)
CD41-42/41-42	1	0(0)	0(0)	1(0.84)
CD41-42/ β E	1	1(0.84)	0(0)	0(0)
β CAP 位点突变	2	0(0)	2(1.68)	0(0)
CD43/17	1	0(0)	1(0.84)	0(0)
-28/CD17	1	0(0)	0(0)	1(0.84)
-28/ISV-2-654	1	1(0.84)	0(0)	0(0)
合计	119	67(56.30)	6(5.04)	46(38.66)

3 讨 论

地贫是我国长江以南各省发病率最高、影响最大的一类血红蛋白病,其中尤以广西、广东和海南三省(区)为甚,广东省发病率为 8%~10%,广西和海南更高^[2]。健康成人血红蛋白中的珠蛋白由 4 条肽链组成,包括 α 、 β 、 γ 、 δ 珠蛋白肽链,分别由相应的基因编码,这些基因的缺失或点突变可造成各种肽链的合成障碍,致使血红蛋白的组分改变。地贫就是由珠蛋白基因的缺失或点突变导致,通常分为 α 、 β 、 γ 和 δ 4 种类型,以 β -和 α -地贫较为常见。 α -地贫分为最轻、轻、中间及重型; β -地贫分为轻、中、重型^[3]。地贫是最为常见的单基因遗传病,主要表现为慢性溶血性贫血,重型患者胎死宫内或生后依赖输血生存且绝大部分在幼年期夭折。中间型地贫有明显的遗传异质性,临床表型变化大,大多数患者的生存质量会受影响,需要偶尔或不定期的输血治疗,患儿生长发育也会受到严重影响^[4-5]。

采用 GAP-PCR 技术检测 α -地贫在中国人中最为常见的 3 种缺失类型,检出 α -地贫阳性者 1 604 例,占 29.16%。其中阳性率最高的 3 种类型分别为东南亚型缺失(-^{SEA})、右侧缺失(- $\alpha^{3.7}$)和左侧缺失(- $\alpha^{4.2}$),共 1 505 例,占总 α -地贫阳性者的 93.83%(1 505/1 604)。仅东南亚缺失型(-^{SEA})就检出 1 249 例,占总 α -地贫阳性者的 77.87%(1 249/1 604),提示本地区 α -地贫基因型以东南亚缺失型为主,与同类研究结果吻合^[6-7]。

采用 PCR 膜反向点杂交技术检测 β -地贫的 17 种基因位点突变,本研究中检出 β -地贫阳性者 1 096 例,占 19.93%。其

中 CD41-42、IVS-2-654、CD17、-28 和 CD71-72 是中国人常见类型,共 983 例,占总 β -地贫阳性者的 89.69%(983/1 096)。以 CD41-42 突变频率最高,占总 β -地贫阳性者的 40.78%(447/1 096),其次是 IVS-2-654(30.29%)、CD17(9.48%)和-28(7.39%),与广东地区同类研究结果基本吻合^[8-9]。

共检测出 $\alpha\beta$ -复合型地贫患者 119 例,检出率为 2.16%。在 α -和 β -地贫双重杂合子时 α -地贫特征通常被掩盖,临床表型多呈现 β -地贫特征,因此临床常诊断为 β -地贫。地贫是一种遗传性溶血性贫血,大部分中间型和所有重型地贫患者需要靠输血维持生命,在精神上和经济上给社会及家庭带来极大的负担。夫妇双方都带有地贫基因,即两人都是轻型地贫,其子女则有 25%的可能性是重型地贫,50%的可能是轻型地贫,只有 25%的可能是正常;如果只有一方是轻型地贫患者,其子女有 50%的可能为正常,50%的可能为轻型地贫,不会出现重型地贫,对于一方已确诊携带有标准型(-^{SEA}/aa)或 β -地贫基因的夫妇,另一方必须进行地贫基因检测,以防止中重型地贫患儿出生,从而达到优生、优育,提升人口素质的目的。本研究为惠州地区更好地开展地贫的诊断、遗传咨询和产前诊断提供了客观依据。

参考文献

- [1] 李莉,林晓丹,陈文璟. 400 例地中海贫血基因检测分析[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2012,33(2): 209-212.
- [2] 杜传书. 地中海贫血研究的现状与未来[J]. 中华医学遗传学杂志,1996,13(5):257.
- [3] 蓝柳燕,王君,林漫燕. 822 例地中海贫血患者基因检测结果分析[J]. 实验与检验医学,2011,29(3):212-214.
- [4] Peters M, Heijboer H, Smiers F, et al. Diagnosis and management of thalassaemia[J]. BMJ,2012(344):e228.
- [5] Muncie HL, Campbell J. Alpha and beta thalassemia[J]. Am Fam Physician,2009,80(4):339-344.
- [6] 陈亚军,陈培院,夏玉英,等. 用 gap-PCR 筛查 α -珠蛋白合成障碍性贫血基因携带者的评价[J]. 临床检验杂志,2006,24(4):259-261.
- [7] 田文芳,唐喜军,易素芬. 广东省珠海地区 α -和 β -地中海贫血基因突变类型研究[J]. 检验医学与临床,2011,8(12):1487-1488.
- [8] 华亮,李婉玲,朱冰,等. 5042 例地中海贫血高风险儿童 β -地中海贫血基因分析[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志,2011,16(3):125-128.
- [9] 纪妍,林静吟,李旭艳. 地中海贫血的产前筛查及产前诊断探讨[J]. 海南医学,2009,20(9):104-105.

(收稿日期:2016-01-08 修回日期:2016-03-20)

