

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.15.017

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200316.1115.007.html\(2020-03-17\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200316.1115.007.html(2020-03-17))

## 中缅边境疟疾流行区常见血红蛋白病基因突变谱分析\*

江伟阳<sup>1</sup>, 易浩安<sup>1</sup>, 唐健<sup>2</sup>, 李宏<sup>1</sup>, 杨芳<sup>1</sup>, 何永蜀<sup>1△</sup>

(1. 昆明医科大学细胞生物学与医学遗传学系, 昆明 650500; 2. 云南省昆明市

妇幼保健院医学遗传与产前诊断科 650031)

**[摘要]** **目的** 调查中缅边境云南省德宏州盈江县那邦镇景颇族和腾冲市汉族常见血红蛋白病的携带率及基因突变谱, 探讨上述疟疾流行区人群血红蛋白病的流行现状及与疟疾自然选择的关系。**方法** 用 PCR 直接测序和缺口 PCR(GAP-PCR)方法对本标本进行  $\beta$  珠蛋白基因突变和缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血检测。**结果** 719 例景颇族标本中有 320 例进行缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血检测, 发现  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血携带者 25 例, 携带率为 7.81%, 变异型包括  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  (18/320, 5.62%)、 $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  (6/320, 1.87%) 和  $-\alpha^{sea}/\alpha\alpha$  (1/320, 0.31%); 对所有标本进行  $\beta$  珠蛋白基因突变检测, 发现 HbE ( $\beta^{26\text{Glu}\rightarrow\text{Lys.GAG}\rightarrow\text{AAG}}$ ) 携带者 113 例, 携带率为 15.72%, 包括:  $\beta^E/\beta^A$  (95/719, 13.21%),  $\beta^E/\beta^E$  (18/719, 2.50%)。1 016 例腾冲汉族中发现缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血携带者 54 例, 携带率为 5.31%, 包括:  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  (49/1 016, 4.82%),  $-\alpha^{sea}/\alpha\alpha$  (5/1 016, 0.49%), 发现 HbE 携带者 35 例, 携带率为 3.44%, 仅发现  $\beta^E/\beta^A$  杂合子。**结论** 中缅边境景颇族、汉族人群血红蛋白病基因型以缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血携带者 ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ) 和 HbE 为主, 可能与疟疾自然选择和地理隔离有关。

**[关键词]** 血红蛋白病; 突变; 景颇族; 汉族; 中缅边境**[中图分类号]** R394.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)15-2487-04

## Analysis of gene mutations spectrum identification of common hemoglobinopathies in malaria-endemic areas along China-Myanmar border\*

JIANG Weiyang<sup>1</sup>, YI Hao'an<sup>1</sup>, TANG Jian<sup>2</sup>, LI Hong<sup>1</sup>, YANG Fang<sup>1</sup>, HE Yongshu<sup>1△</sup>

(1. Department of Cell Biology and Medical Genetics, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China; 2. Department of Medical Genetics and Prenatal Diagnosis, Kunming City Maternal and Child Health Hospital, Kunming, Yunnan 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the carrying rate and gene mutations spectrum of common hemoglobinopathies of Jingpo ethnicity in Nabang town, Yingjiang county, Dehong prefecture and Han ethnicity in Tengchong city, Yunnan province along China-Myanmar border, and to explore the relationship of hemoglobinopathies and malaria natural selection in the malaria-endemic regions. **Methods** Direct PCR sequencing and GAP-PCR are used to identify  $\beta$ -globin gene mutations and deletional  $\alpha$ -thalassemia. **Results** Of the 719 Jingpo ethnicity samples, 320 samples were carried out for deletional  $\alpha$ -thalassemia, and 25 samples were identified with deletional  $\alpha$ -thalassemia carriers, with the rate of 7.81% including  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  (18/320, 5.62%),  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  (6/320, 1.87%) and  $-\alpha^{sea}/\alpha\alpha$  (1/320, 0.31%). All the samples were carried out for  $\beta$ -globin gene mutations, 113 samples were found to be carriers of HbE ( $\beta^{26\text{Glu}\rightarrow\text{Lys.GAG}\rightarrow\text{AAG}}$ ), with the rate of 15.72%, including  $\beta^E/\beta^A$  (95/719, 13.21%),  $\beta^E/\beta^E$  (18/719, 2.50%). Of 1 016 samples of Han ethnicity population from Tengchong city were carried out for above study, 54 samples were found to carry deletional  $\alpha$ -thalassemia with rate of 5.31%, including  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  (49/1 016, 4.82%),  $-\alpha^{sea}/\alpha\alpha$  (5/1 016, 0.49%), 35 samples were identified to carry HbE with  $\beta^E/\beta^A$  heterozygote with the incidence of 3.44%. **Conclusion**  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  and HbE are the prevalence gene mutation in the above two regions, which may be related to the natural selection of malaria and geographical isolation of the population.

**[Key words]** hemoglobinopathies; mutation; jingpo ethnicity; han nationality; China-Myanmar border

血红蛋白病是一类由于血红蛋白结构异常或合成不足引起的常染色体隐性遗传病,是世界上最常见的遗传性溶血性疾病之一。2001 年报道显示,血红蛋白病的发病率在 5 种最常见的遗传性出生缺陷病中排第 3 位,其分为珠蛋白生成障碍性贫血和异常血红蛋白病,我国西南和华南为高发区<sup>[1]</sup>。其中珠蛋白生成障碍性贫血是因  $\alpha$  和  $\beta$  珠蛋白链合成数量不平衡所引起的疾病,异常血红蛋白病则是由于珠蛋白肽链结构异常或合成受阻引起的血红蛋白异常。云南省血红蛋白病发病率高于全国平均水平<sup>[2]</sup>。既往研究显示血红蛋白病的发生与疟疾流行相关<sup>[3]</sup>,中缅边境一带由于地理位置特殊和经济欠发达的原因,是疟疾流行区。因此,对中缅边境常见血红蛋白病分子特性及携带率进行研究,将有助于研究疟疾选择压力下血红蛋白病特殊的基因突变谱。本文对中缅边境一带云南省德宏州盈江县那邦镇景颇族和腾冲市汉族常见血红蛋白病(珠蛋白生成障碍性贫血和异常血红蛋白病)进行研究,探讨上述地区疟疾选择压力下血红蛋白病的分子特性和与疟疾自然选择的关系,并为该地区血红蛋白病的预防提供基础数据,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取中缅边境德宏州盈江县那邦镇 719 例景颇族健康个体,年龄 1~79 岁。纳入标准:(1)研究对象来源明确;(2)所抽取研究对象相互间无亲缘关系;(3)所有个体 3~5 代未和其他民族通婚。排除标准:研究对象有严重疾病。对所有研究对象(男 268 例,女 451 例)进行  $\beta$  珠蛋白基因突变检测;对其中的 320 例(男 124 例,女 196 例)进行缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血检测。同时选取腾冲市 1 016 例汉族健康个体(男 648 例,女 368 例,年龄 10~83 岁)进行缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血和  $\beta$  珠蛋白基因突变检测。参与者签署知情同意书,本研究经昆明医科大学伦理委员会批准。

### 1.2 方法

(1)标本准备。抽取受试者乙二胺四乙酸(EDTA)静脉血 1 mL 或滤纸血,使用 Roche 全血 DNA 提取试剂盒(宝生物工程大连有限公司)及 QIAamp DNA Microbiome Kit 试剂盒(昆明滇工科技有限公司)提取 DNA,所有操作均严格按照说明书进行。(2)缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因型分析采用经典的缺口 PCR(GAP-PCR),试剂盒购于深圳益生堂公司,可进行常见 14 种缺失型珠蛋白生成障碍性贫血基因型检测。(3)6 种常见的  $\beta$  珠蛋白基因突变(-28、CD17、CD41/42、CD71/72、HbE、C.9T>C)使用巢式 PCR(NEST-PCR)扩增及直接测序法进行分析,

根据 NCBI GenBank  $\beta$  珠蛋白基因序列用 primer premier 5.0 设计巢式 PCR 引物,外引物:W1(5'-TAT CTT AGA GGG AGG GCT GAG GGT T-3')、R1(5'-TCA AGC GTC CCA TAG ACT CAC C-3');内引物:W2(5'-GGA CAG GTA CGG CTG TCA TC-3')、R2(5'-GTG AGC CAG GCC ATC ACT A-3'),PCR 条件:95 °C 预变性 5 min,进入循环,95 °C 变性 30 s,52 °C 复性 40 s,72 °C 延伸 40 s,共 35 个循环后,72 °C 延伸 10 min,最后 4 °C 保存。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析,计数资料以频数或百分率表示,比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 缺失型 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因型检测

320 例景颇族标本中发现缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血携带者 25 例,基因携带率为 7.81%,基因型包括: $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (18/320, 5.62%)、 $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ (6/320, 1.87%)和  $-\alpha^{sea}/\alpha\alpha$ (1/320, 0.31%);1 016 例腾冲汉族中发现缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血携带者 54 例,基因携带率 5.31%,基因型包括: $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (49/1 016, 4.82%)、 $-\alpha^{sea}/\alpha\alpha$ (5/1 016, 0.49%),见图 1。



1: Marker; 2, 4, 6:  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ; 3, 5, 7~10:  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 。

图 1  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因型

### 2.2 $\beta$ 珠蛋白基因突变基因检测

对上述 6 种  $\beta$  珠蛋白基因突变进行检测,在上述两个群体中仅发现 HbE 基因型。其中 719 例景颇族标本中发现 HbE 113 例,携带率为 15.72%,包括: $\beta^E/\beta^A$ (95/719, 13.21%)、 $\beta^E/\beta^E$ (18/719, 2.50%);1 016 例腾冲汉族标本中发现 HbE 35 例,携带率为 3.44%,见图 2。

### 2.3 那邦景颇族血红蛋白基因突变谱分析

那邦景颇族缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血以  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  突变为主,突变率为 5.62%(18/320),其次为  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ,突变率为 1.87%(6/320);1 例为  $-\alpha^{sea}/\alpha\alpha$ ,突变率为 0.31%(1/320);HbE 携带率为 15.72%(113/719),以杂合子  $\beta^E/\beta^A$  类型为主,突变

率为 13.21%(95/719)。

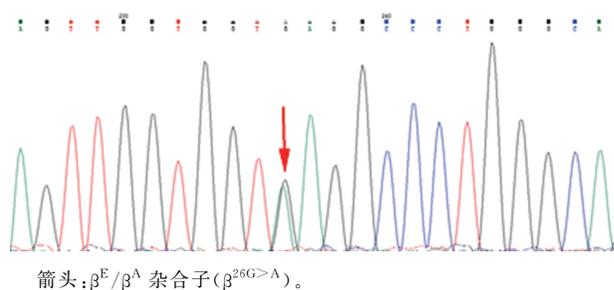


图 2  $\beta$  珠蛋白基因测序图

### 2.4 腾冲汉族血红蛋白基因突变谱分析

腾冲汉族缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血、HbE 携带率分别是 5.31%(54/1 016)、3.44%(35/1 016)。  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血以  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  为主, 突变率为 4.82%(49/1 016), 其次是  $-\alpha^{sea}/\alpha\alpha$ , 突变率为 0.49%(5/1 016), 没有检测到  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  突变类型; HbE 基因突变只有  $\beta^E/\beta^A$  杂合子, 突变率为 3.44%(35/1 016)。

### 2.5 那邦景颇族和腾冲汉族血红蛋白病携带率比较

那邦景颇族缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率高于腾冲汉族, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。那邦景颇族 HbE 携带率高于腾冲汉族, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 那邦景颇族和腾冲汉族血红蛋白病携带率比较

项目	那邦景颇族	腾冲汉族	$\chi^2$	$P$
$\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因[n(%)]			2.728	0.099
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	295(92.18)	962(94.64)		
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	18(5.36)	49(4.82)		
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	6(1.88)	0		
$-\alpha^{sea}/\alpha\alpha$	1(0.31)	5(0.49)		
合计(n)				
人数	320	1 016		
突变率	7.81	5.31		
HbE[n(%)]			81.259	<0.001
$\beta^A/\beta^A$	606(77.18)	981(96.56)		
$\beta^E/\beta^A$	95(13.21)	35(3.44)		
$\beta^E/\beta^E$	18(2.50)	0		
合计(n)				
人数	719	1 016		
突变率	15.72	3.44		

## 3 讨 论

血红蛋白病在我国西南和华南为高发区, 云南省血红蛋白病发生率已超过 10%<sup>[4]</sup>。从全球范围来看, 疟疾高发区与血红蛋白病在地理位置上高度一致, 因

此普遍认为疟疾与血红蛋白病关系密切, 血红蛋白病可能是疟疾自然选择的结果。盈江县那邦镇和腾冲市同属于中国云南省与缅甸接壤地界, 历史上地理相对隔离, 经济发展相对落后, 是历史和现今的输入性疟疾高发区<sup>[5]</sup>, 在疟疾长期的选择压力下, 中缅边境可能会形成特殊的血红蛋白基因突变谱。

本文在对那邦景颇族和腾冲汉族缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血的研究中发现其基因携带率分别是 7.81% 和 5.31%, 与邹团标等<sup>[6]</sup>在德宏州盈江县调查结果(5.00%)相似, 低于张瀚文等<sup>[2]</sup>对德宏州成人的调查结果(42.48%), 也低于广西、广东和湖南等地  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率<sup>[7-9]</sup>。本次调查中缅边境那邦景颇族和腾冲汉族  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率较低, 可能与检测的方法有关。同时, 由于未进行非缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血检测, 这部分频率没有计算入内, 也是总频率低的原因。  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  为静止型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血, 没有临床症状, 这种突变在疟疾自然选择中的作用还有待进一步证实。

HbE 是由  $\beta$  链氨基酸替换 ( $\beta^{26 \text{Glu} \rightarrow \text{Lys}}$ ) 所引起, 在东南亚地区的泰国、老挝、柬埔寨和印度等国都有很高的发生率<sup>[10-13]</sup>。HbE 一般无临床症状, 若 HbE 杂合子复合  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血, 则可产生严重贫血等症状。在解释东南亚 HbE 高频率的原因中, 一种观点认为这是疟疾自然选择的结果, HbE 通过减少红细胞侵袭, 降低红细胞内寄生虫的生长, 增加被感染红细胞的吞噬细胞来消除疟疾的有害影响。HbE 红细胞可以抑制间日疟患者体内疟原虫的生长, 防止疟疾的不利影响, 体外研究也表明 HbE 在受到疟原虫侵染时对红细胞有保护作用。本研究表明, 那邦景颇族和腾冲汉族 HbE 基因携带率分别是 15.72%、3.44%, 那邦景颇族 HbE 基因携带率明显高于腾冲汉族, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。笔者推测盈江县那邦镇景颇族 HbE 携带率高发的原因: (1) 当地是中国历史和现今高发的输入性疟疾流行区, HbE 对疟疾的抗性优势使这个基因在景颇族中具有较高的携带率, 是疟疾自然选择的结果; (2) 本研究取样的村寨几乎全是景颇族人群, 由于景颇族世代居住于山区, 相对的地理隔离和外界交流的缺乏, 当地同族的婚配习惯使得高发的 HbE 突变频率在这个群体中得以固定下来。这个结果与 HE 等<sup>[14]</sup>对云南省景颇族 HbE 携带率调查结果基本一致。

本文的研究丰富了中缅边境云南一侧血红蛋白病的遗传流行病学资料, 同时也探究了上述两个疟疾高发区血红蛋白的基因突变谱, 本研究发现缺失型  $\alpha$ -珠蛋白基因突变型以  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  为主要的突变类型, 与

国内其他地区明显不同<sup>[15]</sup>。景颇族较高的 HbE 突变携带率,可能与 HbE 对疟疾的抗性优势有关,是否与疟疾的种类有关还有待进一步的探究。本研究的结果为中缅边境疟疾高发区制订符合本地区的血红蛋白病的预防策略提供了基础数据。

## 参考文献

- [1] 程海,刘容容. 血红蛋白 H 病的治疗进展[J]. 中国比较医学杂志,2019,29(12):110-115.
- [2] 张瀚文,杨雯,贺静,等. 云南省珠蛋白生成障碍性贫血的血液学初筛与分析[J]. 中国妇幼保健,2016,31(11):2344-2348.
- [3] FENG J, XIAO H, XIA Z, et al. Analysis of malaria epidemiological characteristics in the People's Republic of China, 2004—2013[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2015, 93(2):293-299.
- [4] 丁雪梅,曾小红,朱宝生,等. 5 450 例云南省育龄人群珠蛋白生成障碍性贫血筛查结果分析[J]. 临床检验杂志 2014,32(9):693-696.
- [5] HU T, LIU Y B, ZHANG S S, et al. Shrinking the malaria map in China; measuring the progress of the national malaria elimination programme[J]. *Infect Dis Poverty*, 2016, 5(1):52.
- [6] 邹团标,姚莉琴,李智,等. 中国云南省 23 个民族育龄人群珠蛋白生成障碍性贫血基因检测与分析[J]. 中国公共卫生,2019,35(11):1504-1509.
- [7] YIN A, LI B, LUO M, et al. The prevalence and molecular spectrum of alpha-and beta-globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong province, China [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e89855.
- [8] TANG W, ZHANG C, LU F, et al. Spectrum of alpha-thalassemia and beta-thalassemia mutations in the Guilin region of southern China[J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(16):1068-1072.
- [9] 刘沁,贾政军,席惠,等. 湖南地区 5 018 例珠蛋白生成障碍性贫血基因突变类型的分析[J]. 中国实验血液学杂志 2019,27(6):1938-1942.
- [10] SHI B, ZHENG J, QIU H, et al. Risk assessment of malaria transmission at the border area of China and Myanmar[J]. *Infect Dis Poverty*, 2017, 6(1):108.
- [11] HINNOUHO G M, BARFFOUR M A, WESSELLS K R, et al. Comparison of haemoglobin assessments by HemoCue and two automated haematology analysers in young Laotian children[J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71(6):532-538.
- [12] MUNKONGDEE T, TANAKULMAS J, BUTTHERP P, et al. Molecular epidemiology of hemoglobinopathies in Cambodia [J]. *Hemoglobin*, 2016, 40(3):163-167.
- [13] BHATTACHARYYA K K, CHATTERJEE T, MONDAL U B. A comprehensive screening program for beta-thalassemia and other hemoglobinopathies in the Hooghly District of West Bengal, India, dealing with 21 137 cases[J]. *Hemoglobin*, 2016, 40(6):396-399.
- [14] HE J, ZENG X, ZHANG Y, et al. Prevalence of hemoglobin E in Yunnan province of Southwest China[J]. *Hematology*, 2016, 21(1):54-59.
- [15] LAI K, HUANG G, SU L, et al. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):920.

(收稿日期:2019-11-28 修回日期:2020-02-25)