

## 重庆地区儿童珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断分析\*

孟凡飞, 李 毅, 蒲晓允 (第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

**摘要:**目的 分析重庆地区珠蛋白生成障碍性贫血患儿的发病率及基因突变类型和构成比。方法 采用多聚合酶链式反应(PCR)和膜杂交术,对566例小细胞低色素贫血疑似珠蛋白生成障碍性贫血患儿进行珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断分析。结果 566例贫血儿童中,检出珠蛋白生成障碍性贫血289例(51.06%),其中 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血98例(33.91%), $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血189例(65.40%),复合型珠蛋白生成障碍性贫血2例(0.69%)。98例 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血患儿的基因突变类型以缺失型为主88例(89.80%),缺失类型主要为 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 64例(65.31%), $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 16例(16.33%), $-\alpha^{3.7}/-\text{SEA}$ 6例(6.12%), $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ 2例(2.04%)。非缺失型6例(6.12%),其中 $\alpha\alpha^{\text{CS}}/\alpha\alpha$ 3例(3.06%), $\alpha\alpha^{\text{QS}}/\alpha\alpha$ 2例(2.04%), $\alpha\alpha^{\text{WS}}/\alpha\alpha$ 1例(1.02%)。缺失突变复合型4例(4.08%),其中 $\alpha\alpha^{\text{CS}}/-\text{SEA}$ 2例(2.04%), $\alpha\alpha^{\text{QS}}/-\alpha^{3.7}$ 2例(2.04%)。189例 $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血患儿主要为CD41-42(-TCTT)基因型68例(35.98%),CD17(A $\rightarrow$ T)63例(33.33%),IVS-2-654(C $\rightarrow$ T)30例(15.87%)。复合型珠蛋白生成障碍性贫血 $-\text{SEA}/\alpha\alpha/\text{CD17}$ , $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha/\text{CD41-42}$ 各1例。结论 重庆地区儿童珠蛋白生成障碍性贫血基因突变率较高,应选择有针对性的分子诊断技术并加强疾病预防策略,减少珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生。

**关键词:**珠蛋白生成障碍性贫血;基因分析;儿童

**中图分类号:**R556.61;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)06-041-03

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2016.06.011

珠蛋白生成障碍性贫血,是一组由于珠蛋白基因缺失或缺陷而引起珠蛋白合成障碍所致的遗传性溶血性贫血疾病<sup>[1]</sup>,较为常见的有 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血和 $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血,分子流行病学资料表明该病在世界各地的发病存在明显的地理分布差异性,主要以热带及亚热带疟疾高发区为主,在我国则主要集中在广东、广西及周边省份。由于重庆地区人口基数大,流动人口多,病例数也不少,加强珠蛋白生成障碍性贫血的筛查对优生优育有重大意义<sup>[2]</sup>。为初步了解该地区珠蛋白生成障碍性贫血患儿的发生率及基因突变类型,本研究对2014年07月~2016年3月到本院就诊的566例贫血患儿进行珠蛋白生成障碍性贫血筛查和基因检测分析,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选择2014年7月~2016年3月在本院就诊的经筛选疑似珠蛋白生成障碍性贫血患儿566例,其中男性314例,女性252例,年龄0~15岁,平均年龄3.2岁(标准差为2.7岁)。

筛选标准为:采用全自动血细胞分析仪进行血常规分析。国际珠蛋白生成障碍性贫血协会<sup>[3]</sup>推荐使用的珠蛋白生成障碍性贫血筛查诊断截断值(cutoff values)是 $\text{MCV}<79\text{fl}$ 和 $\text{MCH}<27\text{pg}$ ,国内实验室 $\text{MCV}$ 一般取值 $<80\text{fl}$ 。

**1.2 试剂与仪器** 自动血细胞分析仪为希森美康XL2100型,血液基因组DNA提取试剂盒(离心柱型), $\alpha$ -和 $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因检测试剂

盒(PCR+膜杂交法)均由潮州凯普生物化学有限公司提供。Thermo NanoDrop1000分光光度计,ABI Veriti PCR扩增仪。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本采集:**采用EDTA-K<sub>2</sub>无菌真空抗凝管抽取2ml静脉血并混匀,标本采集后立即送检或保存,待测标本于 $-4^{\circ}\text{C}$ 保存不超过3天, $-20^{\circ}\text{C}$ 保存不超过3个月。

**1.3.2 DNA的提取、扩增和杂交:**按照血液基因组DNA提取试剂盒说明书提取全血DNA。用Thermo NanoDrop1000分光光度计测定DNA吸光度, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值为1.5~2.5。DNA浓度为20~40 ng/ $\mu\text{l}$ 。分别按说明书进行 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血和 $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血PCR扩增, $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断:诊断中国人常见的3种缺失型( $-\text{SEA}$ , $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$ )及2种突变型(CS,QS)。 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血PCR扩增反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$  15 min,98 $^{\circ}\text{C}$  40 s,64 $^{\circ}\text{C}$  70 s,72 $^{\circ}\text{C}$  150 s,35个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min,即可得到扩增产物。 $\beta$ -地中海贫血基因诊断:诊断中国人群中常见的11种 $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因突变类型,包括CD41-42(-TCTT),CD17(A $\rightarrow$ T),IVS-2-654(C $\rightarrow$ T), $\beta\text{E}$ (G $\rightarrow$ A),-28(A $\rightarrow$ G),-29(A $\rightarrow$ G),CD43(G $\rightarrow$ T),CD71-72(+A),CD27-28(+C),CD14-15(+G),IVS-1-1(G $\rightarrow$ T)。 $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血PCR扩增反应条件:37 $^{\circ}\text{C}$  5 min,94 $^{\circ}\text{C}$  3 min,然后94 $^{\circ}\text{C}$  30 s,55 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  30 s,40

\* 作者简介:孟凡飞(1985-),男,本科,检验师,研究方向:适配体筛选与应用,发表核心期刊3篇,Tel:15123955898,E-mail:mff006@163.com。

通讯作者:蒲晓允,男,博士,教授/博导,研究方向:快速检验,发表论文113篇,Tel:023-68774702,E-mail:312201439@qq.com。

个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。将扩增产物与标记有不同缺失或突变类型珠蛋白生成障碍性贫血基因探针的尼龙转印膜在导流杂交仪上进行导流杂交,然后通过酶标与 NBT/BCIP 底物化学显色对结果进行判读。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,组间率的比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 总体情况 在 566 例疑为珠蛋白生成障碍性贫血的患儿中,共检出 289 例患者携带有珠蛋白生成障碍性贫血基因,检出率为 51.06%。其中  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血 98 例,占 33.91%; $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血 189 例,占 65.40%,明显高于  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血检出率,差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 115.362, P = 0.000$ );复合型珠蛋白生成障碍性贫血 2 例占 0.69%,男女性患儿中检出率分别为 51.59% (162/314) 和 50.39% (127/252),两者比较差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.393, P = 0.546$ )。

2.2  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因的筛查情况 见表 1。

表 1  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因类型的分布 ( $n=98$ )

基因突变类型	<i>n</i>	构成比(%)
--SEA/ $\alpha\alpha$	64	65.31
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	16	16.33
$-\alpha^{3.7}/-\text{SEA}$	6	6.12
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	2	2.04
$\alpha\alpha^{\text{CS}}/\alpha\alpha$	3	3.06
$\alpha\alpha^{\text{QS}}/\alpha\alpha$	2	2.04
$\alpha\alpha^{\text{WS}}/\alpha\alpha$	1	1.02
$\alpha\alpha^{\text{CS}}/-\text{SEA}$	2	2.04
$\alpha\alpha^{\text{QS}}/-\alpha^{3.7}$	2	2.04

2.3  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因的筛查情况 见表 2。

2.4 复合型珠蛋白生成障碍性贫血的基因筛查情况 --SEA/ $\alpha\alpha$ /CD17,  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ /CD41-42 各 1 例,共占珠蛋白生成障碍性贫血总数的 0.69%。

3 讨论 珠蛋白生成障碍性贫血又称海洋性贫血,是一类染色体遗传性缺陷所致蛋白链合成障碍性疾病<sup>[4]</sup>。根据患者血液学参数及临床特征,又可分为轻型、中间型和重型。轻型轻度贫血患者可无症状,中间型轻度至中度贫血,患者大多可存活至成年,重型珠蛋白生成障碍性贫血新生儿出生数日即可出现贫血、肝脾肿大、黄疸,预后极其不良,要

靠规范化的终身输血联合去铁治疗维持生命,这给家庭带来沉重的精神和经济负担。因此,如何预防本病,特别是避免重型患儿的出生,是珠蛋白生成障碍性贫血高发地区预防工作的重点。本研究中通过血细胞参数对重庆地区 566 例疑似珠蛋白生成障碍性贫血患儿进行基因诊断分析,阳性 289 例,阳性率达 51.06%。 $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血阳性率(65.40%)明显高于  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血(33.91%),男女性患儿检出率差异不明显,与四川<sup>[5]</sup>报道一致而与两广地区则相反。提示珠蛋白生成障碍性贫血是造成本地区儿童贫血的主要原因。基因诊断分析结果也可作为珠蛋白生成障碍性贫血预防工作提供参考。

表 2  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因类型的分布 ( $n=189$ )

基因突变类型	<i>n</i>	构成比(%)
CD41-42(-TCTT)	68	35.98
CD17(A→T)	63	33.33
IVS-2-654(C→T)	30	15.87
$\beta\text{E}$ 位单碱基突变杂合子	2	1.06
-28(A→G)	2	1.06
-29(A→G)	2	1.06
CD17(A→T)/IVS-2-654(C→T)	8	4.23
IVS-2-654(C→T)/ $\beta\text{E}$ (G→A)	2	1.06
CD17(A→T)/CD43(G→T)	6	3.17
CD17(A→T)/ $\beta\text{E}$ (G→A)	2	1.06
CD17(A→T)/CD17(A→T)	2	1.06
CD41-42(-TCTT)/CD41-42(-TCTT)	2	1.06

中国南方人群中  $\alpha$ -珠蛋白基因缺陷主要分为以下三种:左侧缺失型( $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ ),右侧缺失型( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ )和东南亚缺失型( $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ )。本研究 98 例  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血中,东南亚缺失型和右侧缺失型构成比达到 81.64%。提示重庆地区儿童  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因型以东南亚型缺失( $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ )和右侧缺失( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ )为主,遗传异质性较小,与陈红英等<sup>[5]</sup>结果相符。 $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血是由于  $\beta$  珠蛋白基因突变所引发的  $\beta$  球蛋白合成性障碍所引发的慢性溶血性贫血。调控  $\beta$  蛋白合成的相关基因多位于 11 号染色体上。目前人类不同种族中已发现至少 186 种  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血突变基因<sup>[6]</sup>。本研究 189 例  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血患儿共检出 12 种基因突变类型,以 CD41-42(-TCTT) 68 例、CD17(A→T) 63 例、IVS-2-654(C→T) 30 例为主,占 83.18%。另外发现本地区儿童  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血双重杂合子和纯合子占总  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血的 13.64% (22/189),表明重庆地区重型  $\beta$ -珠蛋白生

成障碍性贫血患儿的出生干预需要加强。本次共检出复合型珠蛋白生成障碍性贫血2例,在以往文献中已见报道珠蛋白生成障碍性贫血目前尚无良好的根治方法,最有效的预防手段是防止重症珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生。在我国大部分地区,尤其在珠蛋白生成障碍性贫血广泛流行的广西、广东、贵州、云南等地,医疗水平相对落后,珠蛋白生成障碍性贫血检查的基因技术不能广泛开展,因此建立简单、快捷、经济、有效的珠蛋白生成障碍性贫血初步筛查的手段,不仅能减轻珠蛋白生成障碍性贫血流行地区群众的经济负担,还能有效预防并减少珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生。

#### 参考文献:

- [1] Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future[J]. *Curr Mol Med*, 2008, 8(7): 592-599.
- [2] 王欢,刘申,黄君富,等. 953例重庆地区地中海贫血基因突变类型分析[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(17): 1802-1804.  
Wang H, Liu S, Huang JF, et al. The 953 case thalassemia gene mutation analysis of Chongqing[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2012, 34(17): 1802-1804.
- [3] Modell B, Harris R, Lane B, et al. Informed choice in genetic screening for thalassaemia during pregnancy: audit from a national confidential inquiry[J]. *BMJ*, 2000, 320(7231): 337-341.
- [4] 喻晶,张恋,刘晓翌,等. 孕妇珠蛋白生成障碍性贫血的临床血液学筛查指标分析[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(1): 138-140.  
Yu J, Zhang L, Liu XY, et al. Analysis of the hematological parameters of pregnant women with thalassemia[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2013, 28(1): 138-140.
- [5] 陈红英,邹艳,刘春艳,等. 四川泸州地区贫血患儿珠蛋白生成障碍性贫血筛查和基因诊断结果分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(11): 1139-1141.  
Chen HY, Zou Y, Liu CY, et al. Biochemical screening and genetic diagnosis of thalassemia in children with anemia from Luzhou[J]. *Chinese Journal of Child Health Care*, 2013, 21(11): 1139-1141.
- [6] 于洁,宪莹,姚秀云,等. 重庆市学龄前儿童 $\alpha$ -地中海贫血的分子流行病学研究[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(5): 419-423.  
Yu J, Xian Y, Yao XY, et al. Prevalence and molecular analysis of  $\alpha$ -thalassaemia in preschool children from Chongqing city[J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2014, 35(5): 419-423.

收稿日期:2016-06-24

修回日期:2016-08-24

(上接40页)

- [3] 张保平,刘珊,董莉,等. 血清HE4和CA125检测及ROMA模型在恶性卵巢癌诊断中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(1): 76-78, 82.  
Zhang BP, Liu S, Dong L, et al. Application of detecting serum HE4 and CA125 and ROMA model in malignant ovarian cancer diagnosis[J]. *J Mod Lab Med*, 2014, 29(1): 76-78, 82.
- [4] 郭晓英,王晓静,李炳霞,等. 卵巢恶性肿瘤风险值在卵巢癌及其FIGO分期中的应用与诊断价值[J]. 国际免疫学杂志, 2015, 38(4): 329-332.  
Guo XY, Wang XJ, Li BX, et al. The application value of risk of ovarian malignancy algorithm index in the diagnosis and FIGO stage of ovarian carcinoma[J]. *Int J Immunol*, 2015, 38(4): 329-332.
- [5] Sasa K, Aleksander S, Katarina J et al. The utility of human epididymal protein 4, cancer antigen 125, and risk for malignancy algorithm in ovarian cancer and endometriosis[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2012, 22(2): 238-244.
- [6] Goonewardene TI, Hall MR, Rustin GJ. Management of asymptomatic patients on follow-up for ovarian cancer with rising CA125 concentrations[J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8(9): 813-821.
- [7] Havrilesky LJ, Whitehead CM, Rubatt JM, et al. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(3): 374-382.
- [8] Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(16): 847-853.
- [9] 欧燕兰,黄丽英,黄千峰,等. 联合检测HE4, CA125和CA199在卵巢癌和良性卵巢囊肿的应用价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(18): 2677-2678.  
Ou YL, Huang LY, Huang QF, et al. Study on the clinical value of combined detection of HE4, CA199 and CA125 in diagnosis of ovarian cancer and benign ovarian cysts[J]. *Int J Lab Med*, 2015, 36(18): 2677-2678.

收稿日期:2016-10-19

修回日期:2016-11-09