

• 临床检验研究论著 •

南川地区地中海贫血基因型的分析^{*}杨 夕, 汪文明[△], 安 刚, 刘利航, 张体永, 陈 嵌

(南川区人民医院检验科, 重庆 408400)

摘 要:目的 探讨南川地区人群中 α 和 β 地中海贫血的基因类型及构成比。方法 采用跨越断裂点 PCR 技术(gap-PCR)和反向斑点杂交(RDB)技术对南川地区疑似地中海贫血患者进行 α 、 β 地中海贫血基因诊断分析。结果 1 001 例受检者中确诊为地中海贫血的患者 390 例(38.96%), 其中, α 地中海贫血 171 例(17.08%), β 地中海贫血 219 例(21.88%)。 α 地中海贫血最常见的缺失类型为 -sea/aa, 其次为 -3,7/aa、-4,2/aa; 其构成比分别为 74.27%、23.39%、1.75%。 β 地中海贫血最常见的基因突变类型为 CD17 型(88 例), 其次为 CD41-42 型(65 例)、IVS-II-654 型(35 例)、CD43 型(15 例)、-28 型(8 例)、-29 型(3 例)、CD17-28 型(2 例)、CD14-15 型(1 例)、CD71-72 型(1 例)、 β E 型(1 例)。 α 地中海贫血合并 β 地中海贫血 15 例。结论 南川地区地中海贫血基因突变的类型以 -sea/aa 及 CD17 型为主。

关键词:地中海贫血; 突变; 聚合酶链反应; 南川地区

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2830-02

Analysis of thalassemia genotypes in Nanchuan region^{*}Yang Xi, Wang Wenming[△], An Gang, Liu Lihang, Zhang Ti Yong, Chen Qian

(Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Nanchuan District, Chongqing 408400, China)

Abstract: Objective To explore the α and β thalassemia genotypes and their constituent ratios among people in Nanchuan region. Methods Gap-PCR and reverse dot blot(RDB) techniques were employed to perform diagnostic analysis for α and β thalassemia genes in suspected thalassemia patients in Nanchuan region. Results Among 1 001 subjects, 390(38.96%) were diagnosed as thalassemia definitely with 171(17.08%) cases of α thalassemia and 219(21.88%) cases of β thalassemia. The most common deletion genotype of α thalassemia was -sea/aa, followed with -3,7/aa and -4,2/aa. Their constituent ratios were 74.27%, 23.39%, 1.75%, respectively. The most common mutation genotype was CD17(80 cases), followed with CD41-42(65 cases), IVS-II-654(35 cases), CD43(15 cases), -28(eight cases), -29(three cases), CD17-28(two cases), CD14-15(one case), CD71-72(one case), β E(one case). There was 15 cases of α thalassemia combined with β thalassemia. Conclusion The major mutation types of thalassemia gene are -sea/aa and CD17 in Nanchuan region.

Key words: thalassemia; mutation; polymerase chain reaction; Nanchuan region

地中海贫血又称海洋性贫血,是目前发病率最高的单基因遗传性血液病。该病主要发生于东南亚地区,在中国以广东、广西、海南、四川为高发区域。地中海贫血是由于珠蛋白合成受到抑制所引起的溶血性贫血。根据该病缺乏的球蛋白链的种类及缺乏程度分为 α 、 β 、 $\delta\beta$ 和 δ 等 4 种类型,其中以 α 、 β 地中海贫血最为常见。 α 地中海贫血是由于 α 珠蛋白基因的缺失或点突变使 α 珠蛋白合成减少或缺失导致,分缺失型和非缺失型 2 种,其中缺失型是中国 α 地中海贫血的主要类型。临床上 α 地中海贫血分 4 种类型,分别为静止型、轻型(标准型)、中间型(HbH 病)、重型 α 地中海贫血(Hb Bart's 胎儿水肿综合征)。 β 地中海贫血是由于 β 珠蛋白链合成显著减少或缺失所致, β 地中海贫血的基因缺陷主要是由于点突变所致,临床上将 β 地中海贫血分为 3 种类型,分别为轻型、中间型和重型,目前本病尚无有效治疗方法,携带者检查及产前基因诊断是惟一防止新的患儿出生,提高人口素质的有效措施。本文对南川地区 390 例地中海贫血患者的基因突变类型进行研究,探讨该地区地中海贫血基因突变的类型及构成比,为遗传咨询和产前诊断提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 2 月至 2013 年 1 月于本院就诊的南川地区疑似地中海贫血的小细胞低色素贫血患者 1 001 例作为研究对象,其中,男 419 例,女 582 例;年龄 0~89 岁。

1.2 主要仪器与试剂 主要仪器:SI1000 梯度 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)、Combi-D24-全自动杂交箱(韩国 FINE- MOULD 公司)、5415D 小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。主要试剂: α 地中海贫血基因检测试剂为亚能生物技术(深圳)有限公司产品, β 地中海贫血基因检测试剂为深圳益生堂生物企业有限公司产品, DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 地中海贫血的筛查 采用五分类全自动血细胞分析仪对乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗凝的外周血进行平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、平均红细胞血红蛋白(mean corpuscular hemoglobin, MCH)检测^[1-3],符合 $MCV \leq 80$ fL 和 $MCH < 27$ pg 筛查阳性者直接进行 α 和 β 地中海贫血基因检测。

1.4 基因型检测 取患者外周血 3 mL,用枸橼酸钠抗凝,以

^{*} 基金项目:重庆市卫生局科研项目(2011-2-053)。 作者简介:杨夕(1963~),男,副主任技师,主要从事病原微生物的分子诊断工作。

[△] 通讯作者, E-mail: wwenming@foxmail.com。

DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。 α 地中海贫血基因分析采用跨越断裂点 PCR 技术 (gap-PCR) 检测-SEA、 $-\alpha 3, 7$ 、 $-\alpha 4, 2$ 三种常见缺失型突变, β 地中海贫血基因分析采用 PCR-反向斑点杂交法 (reverse dot blot, RDB) 检测 17 种突变类型。具体步骤严格按说明书进行操作。

2 结 果

2.1 α 地中海贫血患者基因缺失类型及其构成比 1 001 例受检者中确诊为地中海贫血的患者 390 例 (38.96%), 其中, α 地中海贫血 171 例 (17.08%), 最常见的缺失类型为 $-\text{sea}/\text{aa}$, 其次为 $-\alpha 3, 7/\text{aa}$ 、 $-\alpha 4, 2/\text{aa}$; 其构成比分别为 74.27%、23.39%、1.75%, 见表 1。

表 1 171 例 α 地中海贫血患者基因缺失类型及其构成比			
基因类型	<i>n</i>	携带率 (%)	基因构成比 (%)
$-\text{sea}/\text{aa}$	127	12.69	74.27
$-\alpha 3, 7/\text{aa}$	40	4.00	23.39
$-\alpha 4, 2/\text{aa}$	3	0.30	1.75
$-\alpha 3, 7/-\alpha$	1	0.10	0.58

2.2 β 地中海贫血患者基因突变类型及其构成比 390 例地中海贫血患者中, β 地中海贫血 219 例 (56.15%), 共检出 10 种基因突变类型, 最常见的基因突变类型为 CD17 型 (88 例), 其次为 CD41-42 型 (65 例), IVS-II-654 型 (35 例), CD43 型 (15 例), $-\alpha 28$ 型 (8 例), $-\alpha 29$ 型 (3 例), CD17/28 型 (2 例), CD14-15 型 (1 例), CD71-72 型 (1 例), βE 型 (1 例), 见表 2。 α 地中海贫血合并 β 地中海贫血 15 例。

表 2 219 例 β 地中海贫血基因突变类型及其构成比			
基因类型	<i>n</i>	携带率 (%)	基因构成比 (%)
-28	8	0.80	3.65
-29	3	0.30	1.37
CD14-15	1	0.10	0.46
CD17	88	8.79	40.18
CD27/28	2	0.20	0.91
CD41-42	65	6.49	29.68
CD43	15	1.50	6.85
CD71-72	1	0.10	0.46
IVS-II-654	35	3.50	15.98
βE	1	0.10	0.46

3 讨 论

地中海贫血是一组常染色体单基因隐性遗传病。它是由于珠蛋白基因突变, 珠蛋白生物合成受阻、产量不足或缺如所致, 导致慢性溶血或严重缺氧。该病以地中海沿岸国家和东南亚各国多见, 中国南方的广西、广东、海南、香港、台湾等及其周边也是其高发地区。 α 地中海贫血是世界上常见的单基因遗传病之一, 目前已知的地中海贫血基因突变类型至少有 77 种, 其中 44 种为点缺失, 33 种为缺失性突变^[4]。 α 地中海贫血是因第 16 号染色体短臂末端 α 珠蛋白基因缺陷所致, 有缺失型和非缺失型 2 种, 缺失型是中国主要类型, 中国 α 地中海贫血的基因型主要为 $-\alpha 3, 7$ 、 $-\alpha 4, 2$ 和 $-\text{SEA}$ 这 3 种缺失型。 α 地

中海贫血根据受累基因可分为 4 种: 累及 1 个基因的静止型 ($-\alpha/\text{aa}$), 累及 2 个基因的轻型 ($-\alpha/\text{aa}$ 或 $-\alpha/-\alpha$), 累及 3 个基因的中间型 (HbH 病, $-\alpha/-\alpha$) 与 4 个基因都累及的重型 (Hb Bart's 胎儿水肿综合征, $-\alpha/-\alpha$)^[5]。本研究发现, 在 171 例确诊 α 地中海贫血基因中检出 127 例 $-\text{sea}/\text{aa}$ 型 (74.27%), 表明 $-\text{sea}/\text{aa}$ 是该地区 α 地中海贫血基因的主要缺失型。而从临床分型来看, 静止型、轻型和中间型的构成比分别为 25.04%、74.27%、0.11%, 可见轻型 α 地中海贫血在临床所占比例最多, 这与轻型中的基因型以东南亚型为主有关。

β 地中海贫血是由于第 11 号染色体短臂 β 珠蛋白基因缺陷所致, 绝大多数是由于基因发生了点突变, 少数是因为基因发生了缺失。 β 地中海贫血往往是由于 β 珠蛋白基因点突变而造成的 β 链 mRNA 生成变少, 从而使珠蛋白链合成减少, 致 HbA 明显缺乏或全无^[6-7]。目前国内、外文献报道, β 珠蛋白基因突变类型有 360 种以上, 且不同地区、种族的人群中基因突变类型存在差异^[7]。国内 β 地中海贫血高发区, CD41-42 基因突变在广东、广西、海南、福建 4 省占首位^[8-12]。IVS-II-654 基因突变在香港、台湾占首位, 而在广东、四川、海南等位居 CD41-42 突变之后^[8]。CD17 基因突变在广西仅次于 CD41-42 突变^[13], 而在云南、贵州、四川 3 省占首位^[14-16]。本研究中, 对 1 001 例疑似地中海贫血者确诊 β 地中海贫血 219 例, 共检出 10 种基因突变类型, 其中, 突变类型前 5 位分别是 CD17 型、CD41-42 型、IVS-II-654 型、CD43 型、 $-\alpha 28$ 型, 基因构成比分别为 40.18%、29.68%、15.98%、6.85%、3.65%。表明本地区 β 突变主要类型是 CD17 型, 与云南、贵州、四川有一定的相似性, 频率最高的变异位点都为 CD17, 且都有 CD17、CD41-42 这二个相同的变异位点, 这与两地区人口之间相互迁徙交流有关。

地中海贫血是一种遗传性溶血性贫血。遗传后代不分男女, 机会均等。目前对地中海贫血的治疗尚无较好的办法, 因此, 本病重在预防, 应用基因检测技术进行产前诊断可预防重症地中海贫血儿的出生。gap-PCR 法和 PCR 结合 RDB 技术成熟, 是临床应用中检测缺失型 α 、 β 地中海贫血的主要基因检测方法, 也可用于少见 α 、 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因缺失型的研究^[17]。本次研究应用 gap-PCR 法和 PCR 结合 RDB 技术进行产前地中海贫血基因检测, 为本地区地中海贫血筛查和诊断提供了一种简便、实用的方法, 揭示了本地区地中海贫血基因突变的类型、频率和分布。

参考文献

[1] 王耕, 王琳. 平均红细胞体积和平均红细胞血红蛋白含量筛查妊娠合并轻型地中海贫血的价值[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(4): 65-66.

[2] 陈颖研. 平均红细胞体积在筛查孕妇地中海贫血中的临床应用分析[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(15): 2272-2274.

[3] 郭华, 蓝慧娟. 珠蛋白生成障碍性贫血基因检测技术的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1090-1092.

[4] 杜娟. 16443 例地中海贫血结果分析与研究[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23 (32): 4435-4436.

[5] Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment[J]. Dtsch Arztebl Int, 2011, 108(31-32): 532-540.

[6] Galbiati S, Brisci A, Damin F, et al. Fetal DNA in maternal plasma: a noninvasive tool for prenatal diagnosis of (下转第 2834 页)

酰硫代胆碱法测定的血清胆碱脂酶为拟胆碱酯酶,全部来源于肝脏,是肝细胞合成代谢的水解酶,半衰期为 10 d^[10]。当肝细胞受损时,胆碱脂酶合成减少,血清胆碱脂酶活性降低。它是肝细胞损伤后惟一活性下降的酶,其降低程度与肝脏病变程度成正比,血清胆碱脂酶活性的持续下降提示肝功能恶化,活性升高则为病情改善或治疗有效^[11-12]。

本研究显示,在不同肝脏疾病患者中,前清蛋白、胆碱脂酶活性均有不同程度的降低,尤其在重型肝炎组和肝硬化组。由于前清蛋白、胆碱脂酶的降低程度与肝脏病变程度成正比,反映在 ROC 曲线上,即为 AUC 降低,提示在肝细胞实质性受损时,前清蛋白、胆碱脂酶比其余 3 个指标更具肝硬化和重型肝炎的诊断价值。因此,在肝炎患者进行肝功能检测时,建议对前清蛋白、胆碱脂酶进行检测,以监测患者病情和治疗效果。

ADA 是嘌呤代谢中重要的酶类之一,在核苷酸代谢中起脱氨基作用,催化腺苷转变为次黄嘌呤腺苷。据报道,ADA 活性在肝硬化时明显升高^[12]。AFU 属溶酶体酸性水解酶类,肝硬化、肝癌等患者血清 AFU 升高的确切机制尚未完全清楚,EL-Houseini 等^[13]推测其可能与肿瘤细胞的蛋白合成增加有关。5'-NT 以肝脏含量最为丰富,肝内 5'-NT 主要分布于胆小管、肝窦和星形细胞,肝硬化、肝癌患者的肝细胞损伤、变形严重,引起肝内胆汁淤积,从而导致 5'-NT 活性明显升高,因此,5'-NT 检测对肝硬化、肝癌有重要诊断价值^[14]。本研究结果显示,ADA、AFU、5'-NT 活性在肝炎患者中有不同程度的升高,以重型肝炎和肝硬化尤为突出,而在慢性肝炎组中,上述 3 个指标的升幅不大。不同肝脏疾病患者血清 ADA、AFU、前清蛋白、胆碱脂酶和 5'-NT 的 AUC 数据亦支持上述研究结果,这表明 ADA、AFU、5'-NT 在肝脏疾病中有较好的诊断价值。血清 ADA、AFU、前清蛋白、胆碱脂酶和 5'-NT 在诊断肝脏疾病中的 ROC 显示,5 个检测指标的诊断价值以 ADA 最高,前清蛋白、胆碱脂酶、5'-NT 次之,AFU 最低。

综上所述,通过对不同肝脏疾病患者和健康体检者血清 ADA、AFU、5'-NT、前清蛋白、胆碱脂酶的测定,表明其血清浓度与肝脏疾病的进程、肝实质受损严重程度有关,具有重要的诊断价值。因此,建议临床应重视血清 ADA、AFU、5'-NT、前清蛋白、胆碱脂酶的检测。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(3): 164-166.
- [2] 中华医学会. 临床诊疗指南消化系统疾病分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 83-85.
- [3] 周永兴. 第一讲重型肝炎的临床分型及诊断标准[J]. 实用肝脏病杂志, 2004, 7(1): 1-2.
- [4] 杨光华. 病理学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 204-206.
- [5] 姚光弼. 临床肝脏病学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2011: 230-413.
- [6] 马锦洪, 史伟峰, 姜庆波. 血清前白蛋白、腺苷脱氨酶、凝血酶原时间联合检测对肝硬化的诊疗价值[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(12): 1122-1123.
- [7] 张文利, 刘莉平, 邓宏, 等. 血清前白蛋白、胆碱脂酶、总胆汁酸在肝硬化中的检测价值[J]. 华西医学, 2009, 24(10): 2683-2684.
- [8] 张瑞霞, 杨义明. 血清丁酰胆碱酯酶、前白蛋白评价肝硬化患者肝脏储备功能的临床价值[J]. 山东医药, 2006, 46(31): 31-32.
- [9] 姜宇海. 肝硬化患者中血清前白蛋白、胆碱酯酶、腺苷脱氨酶的变化[J]. 检验医学, 2009, 24(9): 634-635.
- [10] 白洲霞, 田春兰, 牛媛瑕. 血清假性胆碱酯酶及前清蛋白检测在肝炎和肝硬化诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(12): 1495-1496.
- [11] 王雪梅, 朱东来. 肝硬化患者前白蛋白、纤维蛋白原及肝纤维化指标与 Child-Pugh 分级的关系[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2007, 17(3): 261-263.
- [12] 任国庆, 牛海玲, 陈庆勇. 血清胆碱酯酶和前白蛋白检测在判断肝胆病变中的意义[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 4(2): 52-53.
- [13] EL-Houseini ME, Sherbiny ME, Awad ME, et al. Serum alpha-L-Fucosidase enzyme activity as a marker for hepatocellular carcinoma: comparison with AFP using ROC analysis[J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2001, 13(4): 277-283.
- [14] Novo FJ, Tutor JC. Electrophoretic separation of 5'-nucleotidase multiple forms[J]. Clin Biochem, 1991, 24(2): 179-183.

(收稿日期: 2013-05-10)

(上接第 2831 页)

- beta-thalassemia[J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12 Suppl 1(12): S181-187.
- [7] Firdous N, Gibbons S, Modell B. Falling prevalence of beta-thalassemia and eradication of malaria in the Maldives[J]. J Community Genet, 2011, 2(3): 173-189.
 - [8] 石西南. 中国不同省区 β 地中海贫血基因变异的分布特征[J]. 医学综述, 2011, 17(4): 495-497.
 - [9] 谢健敏, 梁玉全, 吴素琴. 广东顺德地区 β -地中海贫血流行病学调查[J]. 中国热带医学, 2008, 8(10): 1687-1688.
 - [10] 唐宁. 广西柳州市常住人口 β -地中海贫血的基因型及其分布[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(4): 371-372.
 - [11] 周代锋, 王政, 蔡望伟. 海南省汉、黎族人群中 6 种 β -地中海贫血基因突变的研究[J]. 海南医学院学报, 2007, 13(1): 5-7.
 - [12] 江雨, 王文博, 周裕林. 闽西南地区地中海贫血筛查及产前诊断的研究[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(32): 4627-4629.
 - [13] Zheng CG, Liu M, Du J, et al. Molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations detected in the population of Guangxi Zhuang Autonomous Region, People's Republic of China[J]. Hemoglobin, 2011, 35(1): 28-39.

- [14] 杨跃煌, 李翠莲, 刘洪玉, 等. 41 例地中海贫血患者的基因诊断与临床分析[J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2007, 10(4): 67-69.
- [15] 单可人, 谢渊, 马娇, 等. 贵州从江侗族和江口土家族人群 β -地中海贫血基因突变型的研究[J]. 中国地方病学杂志, 2005, 24(5): 526-529.
- [16] 李熙鸿, 王晓阳, 汪凤兰, 等. 四川地区重型 β -地中海贫血患儿及双亲基因突变的研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2004, 35(3): 388-390.
- [17] Phylipsen M, Vogelaar IP, Schaap RA, et al. A new alpha(0)-thalassemia deletion found in a Dutch family $-(AW)$ [J]. Blood Cells Mol Dis, 2010, 45(2): 133-135.

(收稿日期: 2013-05-12)