

## • 个案分析 •

罕见 IVS II-705(T>G) β-地中海贫血基因携带者 2 例报道并文献复习<sup>\*</sup>黄心怡<sup>1</sup>, 林 靖<sup>2△</sup>

1. 成都中医药大学医学与生命科学学院, 四川成都 611137; 2. 贵州省人民医院输血科, 贵州贵阳 550002

**关键词:**地中海贫血; 罕见突变; 基因检测**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2022.22.027**文章编号:**1673-4130(2022)22-2814-03**中图法分类号:**A556.3+1**文献标志码:**C

β-地中海贫血(简称 β-地贫)是我国南方地区常见的一种遗传性溶血性贫血病, 临床表现为小细胞低色素性贫血。β-地贫是由于 β-珠蛋白(HBB)基因突变导致 β-珠蛋白肽链缺如( $\beta^0$ )或合成不足( $\beta^+$ )引起的常染色体隐性遗传病<sup>[1-2]</sup>。到目前为止, 在人类血红蛋白(Hb)变异和地中海贫血数据库(HbVar; <https://globin.bx.psu.edu/>)中收录的 β-地贫突变类型有 300 多种。不同地域和人群之间的 β-地贫基因突变谱存在较大差异。目前在中国人群中已发现 129 种 HBB 基因点突变(含异常 Hb)和 16 种 β-地贫缺失突变。其中 8 种突变(c. 124\_127delTTCT、c. 52A>T、c. 316-197C>T、c. -78A>G、c. 216\_217insA、c. 79G>A、c. 92+1G>T、c. -79A>G)占中国人 β-地贫突变总体的 95% 以上<sup>[3]</sup>。随着测序技术在临床上的广泛运用, 一些罕见突变类型也不断被发现, 为临床遗传咨询和产前诊断提供了更多的依据<sup>[4-5]</sup>。本研究发现了 2 例罕见 IVS II-705(T>G) β-地贫携带者, 现对其临床表型及基因型进行分析。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 2 例患儿之间无血缘关系, 患儿 1 为女性, 年龄 10 个月; 患儿 2 为男性, 2 岁。患儿在贵州省人民医院血常规检测时发现有小细胞低色素贫血表现, Hb 电泳发现 HbA<sub>2</sub> 升高, 需进一步做 β-地贫基因检测。经家属知情同意后抽取乙二胺四乙酸二钾抗凝外周静脉血 2 mL。

**1.2 主要仪器与试剂** Sysmex XN-9000 全自动血细胞分析仪及配套试剂; 法国 Sebia 毛细管电泳仪及配套试剂; 天隆 NP968 核酸自动提取仪, E-Cycler TM 96 PCR 扩增仪; β-地贫基因突变检测试剂盒由凯普生物科技有限公司提供。

**1.3 方法**

**1.3.1 血液学检测** 在仪器最佳状态下检测标本,

严格按照操作程序检测红细胞计数(RBC)、Hb 水平、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞体积分布宽度的标准差(RDW-SD)等红细胞参数。采用 Sebia 毛细管电泳仪检测 HbA、HbA<sub>2</sub>、HbF 等 Hb 成分的相对水平。

**1.3.2 β-地贫基因检测** 采用 PCR 结合反向点杂交(RBD-PCR)技术<sup>[6]</sup>, 检测 17 种 HBB 基因点突变, 依次为 CD41-42(-TCTT)、IVS-II-654(C>T)、CD17(A>T)、-28(A>G)、CD26(G>A)、CD71-72(+A)、CD43(G>T)、-29(A>G)、Int(T>G)、CD14-15(+G)、CD27-28(+C)、-32(C>A)、-30(T>C)、IVS-I-1(G>T)、IVS-I-5(G>C)、CD31(-C)、CAP+40-+43(-AAAC)。对罕见 β-地贫基因突变类型, 应用 PCR 技术扩增 HBB 基因全长, 引物序列为 F: 5'-ACGGCTGTCATCACTTAGAC-3', R: 5'-CTCCCCA-CATTCCCTTTTAG-3'。扩增产物送至上海生物工程有限公司进行双向测序, 测序结果与 GeneBank 上的 HBB 基因参考序列进行比对分析, 查找是否存在其他罕见突变类型。

**2 结 果**

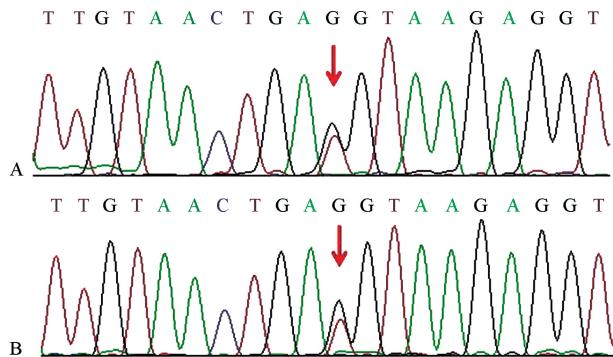
**2.1 血液学检测结果** 2 例患儿的血液学检测结果均为轻度小细胞低色素贫血, MCV、MCH 降低, 血红蛋白电泳 HbA<sub>2</sub> 水平升高, HbF 水平轻度升高, 提示为轻型 β-地贫(携带者)。见表 1。

**2.2 基因检测结果** 2 例患儿均未检出 17 种中国人群常见的 β-地贫基因突变类型。经 HBB 基因序列分析, 发现 2 例患儿均为 HBB 基因 IVS II-705(T>G) 杂合突变, 国际命名法(HGVS name)为 HBB:c. 316-146T>G。该突变为 HBB 基因第二个内含子的 705 号碱基 T 突变为 G, 为致病性突变, 临床表型为  $\beta^+$ 。见图 1。

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家自然科学基金项目(81960040)。<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 359149882@qq.com。

表 1 2 例患儿的血液学表型结果

编号	RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	RDW-SD (fL)	HbA (%)	HbA <sub>2</sub> (%)	HbF (%)
患儿 1	5.13	90.0	54.79	17.5	319.0	33.4	89.7	5.0	5.3
患儿 2	6.42	96.0	57.90	18.2	314.0	35.8	87.9	5.3	6.8



注: A、B 分别为患儿 1、患儿 2 的 HBB 基因 IVS II-705(T>G)杂合突变(箭头所示为突变基因位点)。

图 1 2 例患儿 HBB 基因测序结果

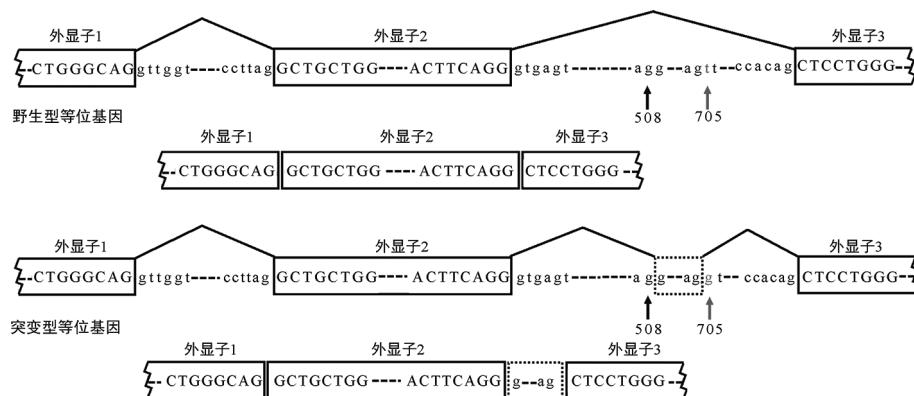
### 3 讨 论

$\beta$ -地贫是一种遗传异质性较大的溶血性贫血病,已发现的 HBB 基因突变类型有 800 多种,其中致病性突变有 300 多种。不同地域和人群的  $\beta$ -地贫基因突变谱存在较大差异。尽管我国南方地区常见  $\beta$ -地贫基因突变类型基本一致,但不同地区最常见的突变类型有所不同,如广东、广西以 CD41-42(-TCTT)最为常见,福建、江西以 IVS II-654(C>T)最为常见,贵州、重庆以 CD17(A>T)最为常见,云南以 CD26(G>A)最为常见<sup>[7]</sup>。目前国内临床实验室常用  $\beta$ -地贫基因检测方法可检出中国人群常见的 17 种突变类型,但不能检测到罕见的突变类型,在临床应用上具

有一定的局限性。

本研究中的 2 例患儿均表现为轻度小细胞低色素性贫血,且 Hb 电泳 HbA<sub>2</sub> 升高,为典型的轻型  $\beta$ -地贫表型。采用常用的  $\beta$ -地贫基因检测方法未检测出中国人群常见的 17 种突变类型,考虑可能存在罕见  $\beta$ -地贫基因类型。采用 Sanger 测序发现 2 例患儿均为 HBB 基因 IVS II-705(T>G)杂合携带者。在 HbVar 数据库的收录信息显示为致病性突变,临床表型为  $\beta^+$ 。2 例患儿的基因型与表型一致,诊断轻型  $\beta$ -地贫明确。

IVS II-705(T>G)是一种非常罕见的  $\beta$ -地贫基因突变类型,最早是由美国学者 MAQUAT 等<sup>[8]</sup>于 1980 年报道。随后,DOBKIN 等<sup>[9]</sup>研究发现,IVS II-705(T>G)突变导致了在 HBB 基因 IVS II 内产生了一个新的功能性的 5' 剪接位点 GAG GTA AGA,与 IVS II 正常的 3' 剪接受体之间产前一个潜在的剪接体。同时,IVS II-705(T>G)突变还激活了 IVS II 第 508 位潜在的 3' 剪接受体,与 IVS II 正常的 5' 剪接体之间产前异常剪接。因此,IVS II-705(T>G)突变阻止了 IVS II 正常的 5' 剪接位点与 3' 剪接受体之间的剪接,从而形成异常的 HBB 基因 mRNA 剪接体(见图 2)。



注:标识 508 的箭头为 IVS II-508 位点,潜在的 3' 剪接受体;标识 705 的箭头为 IVS II-705(T>G)突变位点,产生 5' 剪接位点。

图 2 IVS II-705(T&gt;G)突变引起异常剪接示意图

国内外对 IVS II-705(T>G)突变位点的报道很少。国内仅 JIANG 等<sup>[10]</sup>在广东的一个家系中发现 2

例 IVS II-705(T>G)杂合携带者,红细胞参数均表现为 MCV、MCH 降低, HbA<sub>2</sub> 升高,其中 1 例有轻度

贫血。MURAD 等<sup>[11]</sup>在一个叙利亚家系中发现 2 例 IVS-I-1(G>A)/IVS-II-705(T>G)复合杂合患者,临床表现为重型  $\beta$ -地贫,Hb 分别为 46 g/L 和 52 g/L。本研究发现的 2 例 IVS-II-705(T>G)杂合携带者均表现为轻度小细胞低色素贫血。因此,IVS-II-705(T>G)突变携带者临幊上表现为轻型  $\beta$ -地贫,多数有轻度贫血。当 IVS-II-705(T>G)突变合并有其他  $\beta$ -地贫基因突变位点时,可表现为重型或中间型  $\beta$ -地贫。其他人群中尚未见该突变位点报道。本研究在贵州地区发现较罕见的 IVS-II-705(T>G)突变。

IVS-II-705(T>G)突变位点不在常规实验室  $\beta$ -地贫基因突变检测的位点范围内,容易造成漏诊。为提高  $\beta$ -地贫基因突变检测的灵敏度,需要结合患者的血液学表型和基因型进行综合分析。经血液学表型检查提示为  $\beta$ -地贫,但常规方法检测为阴性的样本,需要进一步采用 Sanger 测序和 MLPA 技术等二线技术检测罕见的 HBB 基因点突变和大片段缺失突变。此外,有条件的实验室也可采用二代测序(NGS)技术直接检测  $\beta$ -地贫基因突变。有研究报道 NGS 可将地中海贫血高风险夫妇基因突变的检出率提高到 23.2%<sup>[12-13]</sup>。尽管 NGS 检测  $\beta$ -地贫基因的灵敏度很高,尤其是提高了罕见突变类型的检测率,但仍存在一些不能检出的位点。由于检测过程中还存在其他影响因素,任何一种检测方法均存在假阴性的可能。因此,临幊上仍然要重视  $\beta$ -地贫表型分析,当表型与基因型不一致时,需要重新检测或采用多种方法联合检测以避免假阴性的发生。

## 参考文献

- [1] SHANG X, XU X. Update in the genetics of thalassemia: what clinicians need to know[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 39(2): 3-15.
- [2] METTANANDA S, HIGGS D R. Molecular basis and genetic modifiers of thalassemia[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2018, 32(2): 177-191.
- [3] 商璇,吴学东,张新华,等.  $\beta$ -地中海贫血的临幊实践指南[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, (3): 243-251.
- [4] ZHONG L, WANG Y, LIN W, et al. Prenatal genetic counseling in a Chinese pregnant woman with rare thalassemia: a case report[J]. Front Genet, 2021, 12: 670168.
- [5] MUNKONGDEE T, CHEN P, WINICHAGOON P, et al. Update in laboratory diagnosis of thalassemia[J]. Front Mol Biosci, 2020, 7(1): 74.
- [6] HAN W, HUANG L, LI Y, et al. Reference intervals for HbA<sub>2</sub> and HbF and cut-off value of HbA<sub>2</sub> for  $\beta$ -thalassemia carrier screening in a Guizhou population of reproductive age[J]. Clin Biochem, 2019, 65(1): 24-28.
- [7] HUANG S W, LIU X M, LI G F, et al. Spectrum of  $\beta$ -thalassemia mutations in Guizhou Province, PR China, including first observation of codon 121 (GAA>TAA) in Chinese population[J]. Clin Biochem, 2013, 46(18): 1865-1868.
- [8] MAQUAT L E, KINNIBURGH A J, Beach L R, et al. Processing of human beta-globin mRNA precursor to mRNA is defective in three patients with beta+-thalassemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980, 77(7): 4287-4291.
- [9] DOBKIN C, PERGOLIZZI R G, BAHRE P, et al. Abnormal splice in a mutant human beta-globin gene not at the site of a mutation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983, 80(5): 1184-1188.
- [10] JIANG F, CHEN G, ZHOU J, et al. First report of the rare IVS-II-705 (T>G)  $\beta$ -thalassemia mutation in a Chinese family[J]. Hemoglobin, 2017, 41(4/6): 286-287.
- [11] MURAD H, MOASSAS F. First report on the coinheritance of  $\alpha$ -thalassemia and a rare  $\beta$ -thalassemia compound heterozygosity for the IVS-I-1 (G>A)/IVS-II-705 (T>G) mutations in a Syrian family[J]. Hemoglobin, 2019, 43(1): 66-68.
- [12] SHANG X, PENG Z, YE Y, et al. Rapid targeted next-generation sequencing platform for molecular screening and clinical genotyping in subjects with hemoglobinopathies[J]. EBioMedicine, 2017, 23: 150-159.
- [13] HE J, SONG W, YANG J, et al. Next-generation sequencing improves thalassemia carrier screening among premarital adults in a high prevalence population: the Dai nationality, China[J]. Genet Med, 2017, 19(9): 1022-1031.

(收稿日期:2021-12-26 修回日期:2022-08-11)