· 临床研究 ·

广东地区中间型 β 地中海贫血的基因分析

张力, 区小冰, 余一平

(广州市儿童医院检验科血液室, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的 探讨广东地区中间型 β 地中海贫血(β 地贫)的分子遗传学机制,为中间型 β 地贫的基因诊断和基因治疗提供科学依据。方法 应用基因芯片, Southern 印迹杂交和 DNA 直接测序技术,对广东地区 18 例中间型 β 地贫患儿进行 α , β 及 γ 珠蛋白基因的分子遗传学分析。结果 在 18 例中间型 β 地贫患儿中, 1 例为 β 基因 TATA box-28(A $\rightarrow$ G) 突变纯合子, 1 例为 β 基因 β E26(G $\rightarrow$ A) 突变纯合子, 10 例为 TATA box-28(A $\rightarrow$ G) 与其他 β 基因突变的双重杂合子, 2 例为 β E26(G $\rightarrow$ A) 与其他 β 基因突变的双重杂合子, 4 例为 β 地贫同时复合 α 地贫。结论 中间型 β 地贫的分子遗传学机制有高度的异质性, 广东地区中间型 β 地贫的分子遗传机制与中国其他地区相比有差别。 [中国当代儿科杂志, 2007, 9(4): 358-360]

[关键词] 中间型 β 地中海贫血; 珠蛋白基因; 基因芯片技术; 儿童

[中图分类号] R556.6⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)04-0358-03

Molecular analysis of β -thalassemia intermedia in Guangdong Province

ZHANG Li, OU Xiao-Bing, YU Yi-Ping. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Children's Hospital, Guangzhou, 510120, China (Email: gz@yahoo.com)

Abstract: Objective To determine the molecular defects of β -thalassemia intermedia in Guangdong Province and to provide basis for gene diagnosis and gene therapy of this disorder. **Methods** DNA analysis of the α , β and γ globin genes was performed in 18 children with β -thalassemia intermedia from Guangdong Province using polymerase chain reaction (PCR), microarray technique, Southern blot and direct sequencing. **Results** Of the 18 patients, one was identified as the homozygote of TATA box-28 (A $\rightarrow$ G) change, one as the homozygote of β E26 (G $\rightarrow$ A) mutation, ten as compound heterozygotes of TATA box-28 (A $\rightarrow$ G) mutation with other β globin mutations, two as compound heterozygotes of β E26 (G $\rightarrow$ A) mutation with other β globin mutations, and four as double heterozygotes for β globin and α globin mutations including β -SEA and α -4,2. **Conclusions** The molecular defects of β -thalassemia intermedia in Guangdong Province were highly heterogeneous and its spectrum was different from the reports from other provinces of China.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(4): 358-360]

Key words: β -thalassemia intermedia; Globin gene; Microarray technique; Child

β -地中海贫血(β 地贫)是广东地区常见的遗传性疾病,临床上根据患者贫血的严重程度分为轻型,中间型及重型 β 地贫^[1]。中间型 β 地贫主要指那些贫血程度较轻,血红蛋白能维持在 65 g/L 以上,不需输血或仅需偶尔输血的患者^[2]。中间型 β 地贫患者除了有 β 基因的突变外,还受其他遗传因素的影响,其分子缺陷的异质性已引起了人们的广泛关注^[3]。因此,开展中间型 β 地贫的研究,对进一步探讨 β 地贫的发病机制,基因诊断和基因治疗有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

标本来源:根据临床表现,血液学检查及血红蛋白电泳诊断的 18 例中间型 β 地贫患儿,年龄 3 月至 8 岁,男 14 人,女 4 人,均为广东籍人,汉族,其相互间无亲缘关系。

样本 DNA 的抽提:DNA 抽提试剂盒采用德国 Invitex 公司的 Invisorb Spin Blood Mini Kit 血液抽提试剂盒,按试剂盒使用方法抽提外周血白细胞 DNA。

[收稿日期]2006-12-20; [修回日期]2007-01-16

[基金项目]广东省医学科学技术研究基金资助项目(A2003658)。

[作者简介]张力,男,大学,副主任检验师。主攻方向:小儿溶血性贫血的诊断。

1.2 方法

1.2.1 常规血液学检查 血红蛋白含量(Hb) 在美国产 Cell Dyn 1700 血细胞分析仪上进行测定。

1.2.2 血红蛋白电泳 采用琼脂糖凝胶电泳,在美国 Helena 公司出产的全自动快速电泳分析系统 (REP)上进行。

1.2.3 基因芯片分析 引物设计:根据 $-^{SEA}$, $-\alpha^{4.2}$, $-\alpha^{3.7}$ 缺失 DNA 片段的范围以及 HbCS 与 HbQS 的突变位置,我们为 $-^{SEA}$ 设计了引物 S3 / A4, 为 $-\alpha^{4.2}$ 设计了引物 T111/ T111r 与 S1/ T111Rn1, 为 $-\alpha^{3.7}$ 设计了引物 T112 / T112r 与 S2 / T112Rn2, 为 HbCS 及 HbQS 非缺失突变设计了引物 P12s4/ P12a1, 为 11 种 β 珠蛋白基因突变 [CD41-42, CD37, CD71- 72 (+ A), CD71- 72 (+ T), βE^{26} , CD27-28, IVS-I-1, IVS-I-5, -28, CD17, IVS-II - 654] 设计了引物 P2s1 / P202a 与 P25ss / P25a1, 所有的引物均用 Cy5 荧光标记。

芯片点样方式 每张芯片包括 $-^{SEA}$, $-\alpha^{4.2}$, $-\alpha^{3.7}$ 缺失型基因探针及其正常对照探针, HbCS, HbQS 突变探针及其正常对照探针, 11 种 β 珠蛋白基因突变探针及其正常对照探针。

PCR 条件反应分 4 管进行, 每管总反应体系为 25 μ L, 分别包含引物对 S3/A4 与 P12 s4/ P12a1 (或 T111/ T111 与 T112 / T112r, 或 S1/ T111Rn1 与 S2 / T112Rn2 或 P2s1 / P202a 与 P25ss / P25a1) 各 2 μ L, ddH₂O 4.3 μ L, 2 $\times$ PCR 缓冲液 12.5 μ L, dNTP2 μ L, 模板 DNA 2 μ L, LATAq 酶 (Takara 公司) 0.2 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 40 s, 62 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环, 最后置于 72 $^{\circ}$ C 5 min。

杂交: 取各 2 μ L PCR 产物混合, 加入 6 μ L 杂交液, 混匀后 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 迅速插入冰浴 3 min, 然后将全部液体加到芯片点样区, 盖上盖玻片, 放入杂交仓, 于 48 $^{\circ}$ C 温育 1 h。取出基因芯片后, 用 ddH₂O 冲去盖玻片, 放入 35 mL 1 $\times$ SSC 缓冲液中洗 5 min。

荧光扫描和结果分析: 用 Scan Array 5000 扫描仪, 设定合适的扫描精度扫描芯片, 用上海博星基因芯片公司编辑的 Gene Chip 软件根据芯片 Cy 荧光信号的有无, 强弱及位置组合来判定突变类型。

1.2.4 α 珠蛋白基因的 Southern 印迹杂交分析

限制性内切酶为 BgmH I 和 Bgl II, 具体方法按文献[5]。

1.2.5 $G\gamma$ 珠蛋白基因的 DNA 测序 用 DNA 直接测序技术测定 $G\gamma$ 珠蛋白基因上游启动区的-158nt(C $\rightarrow$ T) 突变, 具体方法按文献[6]。

2 结果

杂交结果判定: 在一对探针中, 当缺陷型探针荧光信号值与同一位点野生型探针荧光信号值之比在 0.4 以下时, 表示该对探针所检测的位点没有发生缺陷, 当比值在 0.4 与 2.5 之间时, 表明该对探针所检测的位点发生杂合子型缺陷, 当比值在 2.5 以上时, 表明该对探针所检测的位点发生纯合子缺陷。

18 例患儿的临床表现, 血液学资料及珠蛋白分析结果见表 1 及表 2。

表 1 18 例中间型 β 地中海患儿血液学资料

例号	性别	年龄	地贫体征 ^a	输血情况	Hb (g/L)	HbF (%)	HbA2 (%)
1	男	1岁7月	有	偶尔输血	87	74.8	2.6
2	男	11岁	无	未输血	118	3.1	93.2
3	男	3岁	有	偶尔输血	75	70.1	5.8
4	女	2岁	有	偶尔输血	67	65.1	2.7
5	男	3岁	有	偶尔输血	91	74.3	3.4
6	男	1岁3月	有	偶尔输血	86	71.9	2.9
7	男	5岁	有	偶尔输血	69	80.5	2.1
8	男	8岁	有	偶尔输血	77	59.4	4.3
9	男	3月	无	未输血	99	81.1	1.3
10	女	2岁	有	偶尔输血	74	57.7	4.7
11	男	9月	有	未输血	83	13.4	5.9
12	男	4岁	有	偶尔输血	70	47.7	5.4
13	男	4月	无	未输血	89	54.3	43.7
14	女	3岁	有	偶尔输血	71	27.3	52.7
15	男	1岁3月	无	未输血	104	17.7	3.4
16	男	2岁	有	偶尔输血	75	58.5	2.2
17	男	2岁	有	偶尔输血	81	31.5	2.7
18	女	3岁	有	偶尔输血	77	71.3	2.2

a 地贫体征: 眼距增宽等地贫面容, 肝, 脾大, 地贫骨骼改变等。

表 2 18 例中间型 β 地中海患儿珠蛋白基因分析结果

例号	性别	年龄	β 基因	α 基因	γ 基因
1	男	1岁7月	β -28/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
2	男	11岁	βE / βE	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
3	男	3岁	β 41-42/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
4	女	2岁	β 41-42/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
5	男	3岁	β 41-42/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
6	男	1岁3月	β 41-42/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
7	男	5岁	β 41-42/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
8	男	8岁	β 41-42/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
9	男	3月	β 41-42/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
10	女	2岁	β 41-42/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
11	男	9月	β 17/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
12	男	4岁	β 654/ β -28	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
13	男	4月	β 41-42/ βE	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
14	女	3岁	β 654/ βE	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	正常
15	男	1岁3月	β 71-72/ β 17	-- ^{SEA} / $\alpha\alpha$	正常
16	男	2岁	β 41-42/ β 41-42	$-\alpha^{4.2}$ / $\alpha\alpha$	正常
17	男	2岁	β 41-42/ β 41-42	-- ^{SEA} / $\alpha\alpha$	正常
18	女	3岁	β 41-42/ β 17	-- ^{SEA} / $\alpha\alpha$	正常

3 讨论

人类控制 β 珠蛋白合成的基因位于第11号染色体上,包括3个外显子和2个内含子,长度约为1.7 Kb。当其中某个碱基发生替代,部分缺失或嵌入就能使其转录受阻,不能生成 β 链的mRNA,或生成的mRNA没有功能,这些都能使 β 链的合成减少或缺如,导致红细胞内 α : β 链不平衡,过剩的 α 链在红细胞中形成 α 包涵体,破坏红细胞膜,造成红细胞在骨髓中的无效生成和在外周循环中的溶血。如果一对 β 基因同时发生突变, β 链完全不能合成,在临床上就表现为重型 β 地贫,要靠输血维持生命^[7]。这就是造成重型 β 地贫临床表现的分子病理生理学基础。

TATAbox-28(A $\rightarrow$ G)突变只影响转录效率,尚能合成一定量的正常mRNA,生成部分 β 珠蛋白链,与 α 链合成HbA。 $\beta E^{26}(G\rightarrow A)$ 突变影响内含子接头部位,仍能合成部分 βE 的mRNA,生成 βE 珠蛋白肽链,进而与 α 链合成HbE,HbE的化学性质稳定且功能正常。因此,患儿体内 α : β 链不平衡的严重程度减轻。在本次研究中,检测到14例此2种突变的纯合子或与其他 β 突变所构成的双重杂合子,他们均只有轻度至中度贫血,无需输血或仅需偶尔输血。其中1例 $\beta E^{26}(G\rightarrow A)$ 纯合子患儿血红蛋白达到118 g/L,且无地贫体征。

另外,本组中还有4例重型 β 地贫同时复合 α 地贫的患儿。由于红细胞内 α 链的合成减少,患儿体内 α : β 链不平衡的严重程度也较轻,红细胞中 α 包涵体的生成减少,红细胞的无效生成与溶血都减轻,临床上贫血程度也减轻,表现为中间型 β 地贫。

中间型 β 地贫是一类比较特殊的 β 地贫类型,其分子缺陷是多种多样的,除了有 β 珠蛋白基因的突变外,还涉及到 α 和(或) γ 基因的异常^[8]。从本次研究的结果来看,广东地区中间型 β 地贫的主要遗传因素为:①1对 β 珠蛋白基因突变都属于或有1个属于TATAbox-28(A $\rightarrow$ G)及 $\beta E^{26}(G\rightarrow A)$ 突变。②重型 β 地贫同时复合有 α 地贫。这与蒋南华等^[9]报道的广西地区中间型 β 地贫中G γ 珠蛋白基因上游启动区-158nt(C $\rightarrow$ T)突变占有较高比例,以及陈坚等^[10]报道的江浙一带中间型 β 地贫中 β 地贫杂合子复合 α 珠蛋白基因增多占有较高比例不同。我们认为,这除了有标本例数过少的原因外,正

说明了中间型 β 地贫的分子遗传学机制有高度的异质性。

与中国其他地区相比,广东地区TATAbox-28(A $\rightarrow$ G)突变占较高比例,且 β 地贫同时复合有 α 地贫的发生率也较高^[11]。这说明在广东地区发生中间型 β 地贫的可能性较大。用一般的地贫基因分析方法, α 地贫与 β 地贫需分别检测,费时费力,不利于临床上对中间型 β 地贫的快速基因诊断。地贫基因芯片检测技术是近来发展起来的一项检测地贫的新技术,可同时检测 α 与 β 地贫,具有高通量,特异性及重复性好等优点^[12]。为临床提供了一种快速,准确诊断中间型 β 地贫的方法。

[参 考 文 献]

- [1] 田鸾英,高武红,谢雨芳,易烈致,孙彦香. 应用血液学指标诊断新生儿地中海贫血[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(1):63-64.
- [2] Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia Syndromes[M]. 4th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001, 1-170.
- [3] 张之南. 血液病诊断与疗效标准[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1998,49-59.
- [4] 李西平,刘志杰,钱新华. 中间型 β 地中海贫血的分子机制[J]. 国外医学·输血及血液学分册,2000,23(1):18-19.
- [5] Camaschella C. Different hematological phenotypes caused by the interaction of triplicated α -globin genes and heterozygous β -thalassemia[J]. Am J Hematol, 1997, 55(2): 83-88.
- [6] Ho PJ, Hall GW, Luo LY, Weatherall DJ, Thein SL. Beta-thalassaemia intermedia: is it possible consistently to predict phenotype from genotype? [J]. Br J Haematol, 1998, 100(1): 70-78.
- [7] Pootrakul P, Sirankapracha P, Hemsorach S, Mounsub W, Kumbunlue R, Piangitjagum A, et al. A correlation of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in Thai patients with thalassemia[J]. Blood, 2000, 96(7): 2606-2612.
- [8] 陈剑锋,龙桂芳,林伟雄. β 地中海贫血杂合子基因突变及G γ 珠蛋白基因-158位点SNP与HbF的关系[J]. 中华医学遗传学杂志,2004,21(5):498-501.
- [9] 蒋南华,梁徐,苏承武,金琪,梁荣. 广西地区中间型 β 地中海贫血的基因型和临床表现[J]. 中华血液学杂志,1996,17(4):182-184.
- [10] 陈坚,刘炜培,陈美珏,盛敏,任兆瑞,周润甜,等. 中间型地中海贫血的基因诊断[J]. 中华医学杂志,1997,77(8):575-578.
- [11] 童顺桃,雷慧中,周秀琴,吴爱娟. 清远地区10年间胎儿,新生儿地中海贫血筛查诊断研究[J]. 现代预防医学,2006,33(6):891-897.
- [12] 肖国宏,黎青,孙筱放,陈敦金. 应用DNA芯片技术快速诊断地中海贫血的初步研究[J]. 中国妇幼保健,2006,21(3):2002-2003.

(本文编辑:吉耕中)