

论著 · 临床研究

昆明地区儿童地中海贫血筛查和 基因诊断分析

温柏平¹ 樊茂¹ 代宏剑¹ 庄宇¹ 刘红林¹ 杨俊逸¹ 杨晓红¹ 邓文国²

(1. 昆明市儿童医院检验科, 云南 昆明 650034; 2. 广州达安临床检验中心, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的 调查云南省昆明地区儿童地中海贫血(地贫)基因突变类型和频率。方法 对昆明地区1338例儿童进行RBC脆性、MCV、血红蛋白电泳生化筛查。对筛查阳性的 α -地贫患儿用gap-PCR方法、 β -地贫用PCR-RDB方法进行基因诊断。结果 地贫生化筛查阳性率为11.36%(152例), 基因诊断阳性率为8.59%(115例)。115例经基因诊断确诊为地贫的样本中, α -地贫43例, β -地贫68例, α 合并 β 地贫4例;43例 α -地贫中,--SEA/ $\alpha\alpha$ 型占47%, $-\alpha 4.2/\alpha\alpha$ 型占21%,HbH病占14%;68例 β -地贫共检测出6个基因位点发生突变,突变频率依次为 βE (32%)、CD41-42(24%)、CD17(23%)、IVS-II654(10%)、CD71-72(10%)、-28(1%)。结论 昆明地区儿童地贫基因突变率较高,开展婚检及产检生化筛查和基因诊断十分必要。

[中国当代儿科杂志,2011,13(2):104-106]

[关键词] 地中海贫血;生化筛查;基因诊断;儿童

[中图分类号] R72 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)02-0104-03

Biochemical screening and genetic diagnosis of thalassemia in children from Kunming

WEN Bai-Ping, FAN Mao, DAI Hong-Jian, ZHUANG Yu, LIU Hong-Ling, YANG Jun-Yi, YANG Xiao-Hong, DENG Wen-Guo. Department of Clinical Laboratory, Kunming Children's Hospital, Kunming 650034, China (Email:ketixiezuo@126.com)

Abstract: Objective To investigate the types and frequency of gene mutations in children with thalassemia in Kunming, Yunnan Province. **Methods** A biochemical screening for thalassemia was performed by testing RBC fragility, MCV and hemoglobin electrophoresis on 1338 children from Kunming, Yunnan Province. Genetic diagnosis was performed on the children with α -thalassemia by gap-PCR and on the children with β -thalassemia by PCR-RDB. **Results** The positive rate of the biochemical screening for thalassemia was 11.36% (152 cases). The positive rate of genetic diagnosis was 8.59% (115 cases). Of the 115 cases, α -thalassemia was found in 43 cases, β -thalassemia in 68 cases and α -combined- β thalassemia in 4 cases. --SEA/ $\alpha\alpha$ accounted for 47%, $-\alpha 4.2/\alpha\alpha$ accounted for 21%, and HbH disease accounted for 14%. Six genotypes were found in 68 cases of β -thalassemia and the mutation frequency of βE was the highest (32%), followed by CD41-42 (24%), CD17 (23%), IVS-II654 (10%), CD71-72 (10%), and -28 (1%). **Conclusions** The frequency of gene mutations for thalassemia is high in children from Kunming, Yunnan Province. Premarital and prenatal screenings and genetic diagnosis for thalassemia should be carried out in this area.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (2):104-106]

Key words: Thalassemia; Biochemical screening; Genetic diagnosis; Child

地中海贫血(简称地贫)是由于编码珠蛋白的 α 类或 β 类珠蛋白基因缺失、突变或缺陷使 α 类或 β 类珠蛋白链缺如或不足所致的贫血。根据缺乏的珠蛋白链的种类及缺乏程度分为 α 、 β 等几种类型,其中以 α 、 β 地贫最多见^[1]。

分子遗传流行病学资料显示地贫基因突变类型和频率具有明显的地理和种族特异性,广泛地流行

于地中海中部和东部地区。东南亚地区也是地贫的高发区,中国大陆主要集中在广东、广西及周边省份,如湖南、湖北、江西、福建、四川、云南、贵州等。我国 α -地贫以缺失型为主, β -地贫以点突变为主。 α -地贫常见的有东南亚型缺失(SEA型)、右侧缺失(3.7型)和左侧缺失(4.2型); β -地贫迄今发现170多种突变类型,其中10种为缺失型,其余均为

[收稿日期]2010-05-25;[修回日期]2010-11-08
[作者简介]温柏平,教授,主任医师。

点突变,我国已报道 29 种点突变^[1]。

云南是我国最大的少数民族聚居地,基因种群结构丰富。为了解昆明地区儿童地贫发生率及基因型,本研究对 2008 年 6 月至 2009 年 12 月在我院进行就诊的部分儿童进行了地贫生化筛查和基因诊断,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2008 年 6 月至 2009 年 12 月我院体检或就诊的儿童 1338 例,籍贯均为云南昆明地区,其中男 578 例,女 760 例,年龄 0~14 岁。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 α -地贫基因诊断试剂盒(批号:2009006)和 β -地贫基因诊断试剂盒(批号:2009006)购自中山大学达安基因股份有限公司。全自动血球分析仪为西森美康 XL2100 型;定性 PCR 仪为 BIO-RAD C1000 型;凝胶扫描仪为 UVP EC3 Imaging System;电泳仪为北京六一仪器厂生产的 DYY-8C 型。

1.2.2 流程 先用生化指标 RBC 脆性(<57%)、MCV(<80 fl)、铁蛋白(>12 $\mu\text{g/L}$)对研究样本进行筛查,筛查为阳性的样本再根据血红蛋白电泳中 HbF<3.2% 和 HbA₂<3.5% 两个指标初诊为 α 地贫,对初诊为 α 地贫的样本再进行 SEA 型、3.7 型、4.2 型基因诊断。另根据血红蛋白电泳:HbF>3.2% 和(或)HbA₂>3.5% 初诊为 β -地贫,对初诊为 β -地贫的样本采用 PCR-RDB 方法检测 14 种点突变^[2]。

1.2.3 生化筛查 RBC 脆性测定采用广州米基公司红细胞渗透脆性试验试剂盒,按说明书操作;MCV 测定采用 Sysmex 公司 XE-2100 血液分析仪测定,血红蛋白电泳按文献进行^[1];血清铁蛋白检测用固相放射免疫法检测。

1.2.4 基因诊断 对生化筛查阳性的样本做基因诊断。按 α -地贫基因诊断试剂盒说明书提取样本基因组 DNA 用于 α -地贫和 β -地贫的基因诊断。 α -地贫采用 gap-PCR 法,其原理和引物设计示意图参考文献^[3]; β -地贫采用 PCR-RDB 法,其原理参考文献^[4]。操作均按说明书进行。

2 结果

2.1 生化筛查结果

1338 例标本中,RBC 脆性<63%、MCV<80 fl

和铁蛋白>12 $\mu\text{g/L}$ 的共 152 例,地贫筛查阳性率为 11.36%。其中 HbF<3.2% 和 HbA₂<3.5% 者 69 例,初诊为 α -地贫,占地贫筛查阳性的 45.4%; HbF>3.2% 和(或)HbA₂>3.5% 者 83 例,初诊为 β -地贫,占筛查阳性的 54.6%。

2.2 基因诊断结果

152 例地贫筛查阳性样本中基因诊断为阳性的 115 例,占 8.59%(115/1338),其中 α -地贫阳性 43 例, β -地贫 68 例, α 合并 β 地贫 4 例。43 例 α -地贫中,--SEA/ $\alpha\alpha$ 型 20 例,占 47%;- α 4.2/ $\alpha\alpha$ 型 9 例,占 21%。见表 1。 α -地贫基因型电泳见图 1。--SEA/ $\alpha\alpha$ 型阳性对照和--SEA/ $\alpha\alpha$ 型在 1800 bp 和 1300 bp 出现两条电泳条带;--SEA/- α 4.2 型,在 1600 bp 和 1300 bp 出现两条电泳条带; - α 3.7/ $\alpha\alpha$ 型,在 2000 bp 和 1800 bp 出现两条电泳条带;正常样本仅在 1800 bp 出现 1 条电泳条带;- α 4.2/ $\alpha\alpha$ 型在 1800 bp 和 1600 bp 出现两条电泳条带。

表 1 α -地贫基因型的构成比 (n=43,%)

基因型	临床分类	例数	构成比
--SEA/ $\alpha\alpha$	轻型	20	47
--SEA/- α 3.7	HbH 病	2	5
--SEA/- α 4.2	HbH 病	4	9
- α 3.7/ $\alpha\alpha$	静止型	5	12
- α 4.2/ $\alpha\alpha$	静止型	9	21
- α 4.2/- α 4.2	轻型	2	5
- α 3.7/- α 4.2	轻型	1	2

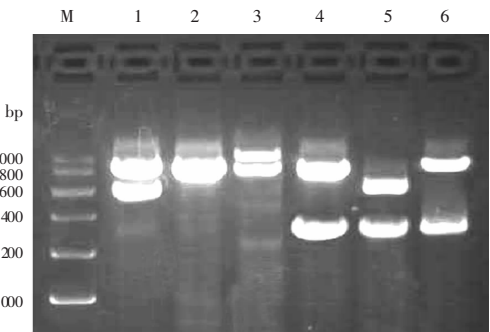


图 1 α -地贫电泳图 1:- α 4.2/ $\alpha\alpha$; 2:正常样本; 3:- α 3.7/ $\alpha\alpha$ 型; 4:--SEA/ $\alpha\alpha$ 型; 5:--SEA/- α 4.2 型; 6:--SEA/ $\alpha\alpha$ 型阳性对照

68 例 β -地贫中轻型 50 例,占 73%;中间型 14 例,占 21%;重型 4 例,占 6%。以 β E 位点突变频率最高,达 32%,其次是 CD41-42 位点突变,达 24%。见表 2,3。 β -地贫膜条正常位点、突变位点及显色控制点均显色清楚,无非特异显色位点出现。

表 2 β-地贫基因型构成 (n=68,%)

基因型	临床分类	例数	构成比
CD41-42/N	轻型	14	21
βE/N	轻型	12	18
CD17/N	轻型	9	13
IVS-II654/N	轻型	8	12
βE/CD17	中间型	6	9
CD71-72/N	轻型	6	9
CD41-42/βE	中间型	5	7
βE/βE	中间型	3	4
CD71-72/CD17	重型	2	3
CD41-42/CD17	重型	1	1
-28/N	轻型	1	1
CD17/CD17	重型	1	1

表 3 β-地贫基因型突变频率 (n=82,%)

突变位点	杂合子	纯合子	双重杂合子	合计	突变频率
CD41-42	14	0	6	20	24
βE	12	3	11	26	32
CD17	9	1	9	19	23
IVS-II654	8	0	0	8	10
CD71-72	6	0	2	8	10
-28	1	0	0	1	1

注:纯合子被重复计算,双重杂合子两个突变位点被分别计算

4 例 α-地贫合并 β-地贫患儿均为轻型 β-地贫合并轻型或静止型 α-地贫,β-地贫突变频率最高的 CD41-42 位点突变合并 α-地贫占 3/4。见表 4。

表 4 α合并 β-地贫基因型构成 (例)

β-地贫基因型	α-地贫基因型		合计
	--SEA/αα	-α4.2 /αα	
CD41-42/N	2	1	3
CD17/N	0	1	1
合计	2	2	4

3 讨论

地贫的生化筛查有血常规、RBC 脆性试验、血红蛋白电泳、异丙醇试验、变性血红蛋白包涵体检测等,这些检测费用低廉、操作相对简单、仪器设备要求不高,在一些地区起着重要作用。特别是血红蛋白电泳作为地贫筛查方法具有较高价值^[5],为了提高灵敏度和特异性,地贫筛查通常将 MCV、RBC 脆性试验及血红蛋白电泳 3 种方法联合应用^[6]。本研

究中昆明地区儿童地贫生化筛查阳性率为 11.36%,对生化筛查阳性者进行常见地贫基因突变检测,确诊率为 8.59%。这提示着云南昆明地区存在罕见的稀有突变类型,因此开展地贫稀有突变的诊断有一定意义。对于筛查阳性,而常见突变点的基因诊断为阴性的样本有必要采用测序等方法进一步补充检测。

本研究昆明地区儿童地贫基因确诊率为 8.59%,比昆明地区群体地贫基因携带率高^[7],这可能是因贫血来我院就诊的患儿比例较高。在经基因确诊的 α-地贫中,以--SEA/αα 型和-α4.2/αα 型为主,分别占 47%、21%,值得注意的是 α⁺ 地贫的 -α4.2/αα 型,它与正常、α⁺ 地贫、α⁰ 地贫的组合在本次研究中都有检出,且所占比例较高,4 例 α 合并 β-地贫中也有 2 例为-α4.2/αα 型。

本研究 β-地贫突变基因共检出 6 型,并发现昆明地区儿童 β-地贫双重杂合子和纯合子的占总 β-地贫的 27% (18/68)。这表明昆明地区重型 β-地贫患儿的出生干预需要加强,这不但要求政府部门行政干预、落实经费投入,同时还要求各个医院特别是妇产医院提高地贫婚检和产检的诊断水平。

[参 考 文 献]

[1] 张俊武,龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2003:204-234,261-302.

[2] 李巍,何蕴韶. 遗传咨询[M]. 郑州:郑州大学出版社,2003:405-419.

[3] Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α-thalassemia[J]. Blood, 2000, 95(1):360-362.

[4] Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma[J]. JAMA, 2005, 293(7):843-849.

[5] 陈忠领,魏新燕,范美珍,郑志贤,刘苏. 血红蛋白电泳在地中海贫血筛查中的应用价值[J]. 现代预防医学, 2007, 34(6):1132-1134.

[6] 杜若甫. 中国人群体遗传学[M]. 北京:科学出版社,2004:300-695.

(本文编辑:俞 燕)