

论著 · 临床研究

# 471例儿童α地中海贫血 缺失型基因谱分析

林业辉<sup>1</sup> 范联<sup>1</sup> 张章<sup>1</sup> 潘志伟<sup>1</sup> 宋春林<sup>2</sup>

(南方医科大学附属佛山市妇幼保健院 1. 儿科; 2. 中心实验室, 广东 佛山 528000)

**[摘要]** **目的** 探讨儿童α地中海贫血(α地贫)常见缺失型基因谱的分布特征。**方法** 在佛山市妇幼保健院就诊和体检的儿童中,血细胞分析检测红细胞体积(MCV) < 82 fl者抽取静脉血2 mL(EDTA抗凝),采用GAP-PCR法进行α地贫基因分析。**结果** 血细胞分析MCV < 82 fl者1341例,检出α地贫471人,检出率为35.1%,且随年龄增长而增高。基因缺失以东南亚缺失型(--<sup>SEA</sup>)为主,占75.3%;其次为右侧缺失型(-a<sup>3.7</sup>),占17.0%;左侧缺失型(-a<sup>4.2</sup>)占7.7%。基因型分布前3位分别是:--<sup>SEA</sup>/aa(73.2%), aa/-a<sup>3.7</sup>(12.5%)和--<sup>SEA</sup>/-a<sup>3.7</sup>(5.5%)。**结论** 对MCV < 82 fl儿童进行α地贫的基因诊断是必要的。该资料中α地贫患儿基因缺失以东南亚缺失型(--<sup>SEA</sup>)占主导地位,基因型以--<sup>SEA</sup>/aa多见。

[中国当代儿科杂志,2012,14(4):264-266]

**[关键词]** 地中海贫血; 基因分析; 儿童

**[中图分类号]** R556.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)04-0264-03

## Spectrum of gene deletion in 471 children with α-thalassemia

LIN Ye-Hui, FAN Lian, ZHANG Zhang, PAN Zhi-Wei, SONG Chun-Lin. Department of Pediatrics, Foshan Women and Children's Hospital, Southern Medical University, Foshan, Guangdong 528000, China (Fan L, Email: fsfyfl@21cn.com)

**Abstract: Objective** To study the distribution of common α-thalassemia gene deletion in children. **Methods** Blood cell analysis was performed on children who visited the clinic of the Foshan Women and Children's Hospital. Blood samples (2 mL, EDTA anticoagulant) was collected from children with MCV < 82 fl for analysis of α-thalassemia gene using the GAP-PCR method. **Results** MCV < 82 fl was found in 1341 children. Of the 1341 children, 471 (35.1%) were diagnosed with α-thalassemia. The prevalence of α-thalassemia increased with increasing age. --<sup>SEA</sup> was a major type of α-thalassemia gene deletion (75.3%), followed by -a<sup>3.7</sup> (17.0%) and -a<sup>4.2</sup> (7.7%) in the 471 patients. The top three genotypes were --<sup>SEA</sup>/aa (73.2%), aa/-a<sup>3.7</sup> (12.5%) and --<sup>SEA</sup>/-a<sup>3.7</sup> (5.5%). **Conclusions** Genetic testing is necessary for the diagnosis of α-thalassemia in children with MCV < 82 fl. --<sup>SEA</sup> is a common type of α-thalassemia gene deletion, and --<sup>SEA</sup>/aa is a common gene type of α-thalassemia in the subjects of this study.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(4):264-266]

**Key words:** Thalassemia; Gene analysis; Child

α地中海贫血(α-thalassemia,简称α地贫)是由于α-珠蛋白基因缺失或功能缺陷(点突变)而导致α-珠蛋白链合成障碍的一种常染色体不完全显性遗传性疾病。我国南方是α地贫的高发区,研究资料表明广东地区α地贫的检出率为8.3%<sup>[1-2]</sup>,已成为当今严重的公共卫生问题。本研究对我院确诊的471例儿童α地贫患儿基因缺失类型进行分析,探讨α地贫缺失型基因的分布特征,为确诊儿童将来的遗传咨询和婚育指导提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

2009年1月至2011年7月在佛山市妇幼保健院儿科门诊和儿童保健科就诊、体检的儿童中,将血细胞分析检测平均红细胞体积(MCV) < 82 fl者纳入本研究。

[收稿日期]2011-11-14;[修回日期]2011-12-27  
[基金项目]佛山市科技局科技攻关课题(No. 200808048)。  
[作者简介]林业辉,男,硕士研究生,主治医师。  
[通信作者]范联,主任医师。

1.2 仪器和试剂

Sysmex XT-2000i 全自动血细胞分析仪由日本希森美康公司生产,XT-2000i 所用测定试剂由该公司提供。PCR 扩增仪为美国 BioRad 公司生产的 icycler 扩增仪(或美国 ABI 公司生产的 2720 扩增仪),DNA 抽提试剂盒、 $\alpha$  地贫 gap-PCR 基因诊断试剂盒由深圳亚能生物技术有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 MCV 的测定 使用 Sysmex XT-2000i 全自动血细胞分析仪对全部受检儿童进行血细胞分析。

1.3.2  $\alpha$  地贫基因分析 对经血细胞分析 MCV  $<82$  fl 者用无菌 EDTA 抗凝管抽取静脉血 2 mL,采用以缺口 PCR (gap-PCR) 为原理的单管多重 PCR (multiplex PCR, M-PCR) 进行缺失型  $\alpha$  地贫基因检测。

(1)PCR 扩增:用全血(EDTA 抗凝)DNA 快速提取试剂盒按操作说明提取 DNA。单管 PCR 反应混合液为 21  $\mu$ L (已含有 7 种引物、反应用酶 1.0  $\mu$ L),加入待测样本 DNA 4.0  $\mu$ L,总反应体系为 25  $\mu$ L。按以下条件循环:96 $^{\circ}$ C 预变性 15 min;然后 98 $^{\circ}$ C 变性 45 s,64 $^{\circ}$ C 退火 90 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

(2)电泳:用 0.5  $\times$  TBE 缓冲液配制 0.8% 琼脂糖凝胶,以 Gold view 为染色剂,取 3  $\mu$ L 扩增产物加于水平电泳仪上,恒压 5 V/cm,电泳约 1.0 h,在紫外凝胶透射成像仪上观察。每次反应均设阳性对照、阴性对照、空白对照和 Marker。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据处理。计数资料采用率(%)表示,不同性别  $\alpha$  地贫检出率比较采用  $\chi^2$  检验,不同年龄组  $\alpha$  地贫检出率比较采用趋势  $\chi^2$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1  $\alpha$  地贫检出率

血细胞分析示 MCV  $<82$  fl 者 1341 例,其中男 896 例,女 445 例,年龄为 0~14 岁。经  $\alpha$  地贫基因检测,确诊  $\alpha$  地贫患儿 471 例(35.1%),其中男 302 例,女 169 例。不同性别患儿  $\alpha$  地贫检出率差异无统计学意义( $\chi^2=2.382, P=0.129$ );不同年龄患儿  $\alpha$  地贫检出率差异有统计学意义( $\chi^2=24.88, P<0.01$ ),随着年龄的增长, $\alpha$  地贫检出率增加。见表 1,表 2。

表 1 不同性别儿童  $\alpha$  地贫检出率

| 组别 | MCV $<82$ fl(例) | $\alpha$ 地贫 [例(%)] |
|----|-----------------|--------------------|
| 男童 | 896             | 302(33.7)          |
| 女童 | 445             | 169(38.0)          |

表 2 不同年龄组儿童  $\alpha$  地贫检出率

| 组别           | MCV $<82$ fl(例) | $\alpha$ 地贫 [例(%)] |
|--------------|-----------------|--------------------|
| 婴儿期( $<1$ 岁) | 621             | 195(31.4)          |
| 幼儿期(1岁~)     | 493             | 166(33.7)          |
| 学龄前期(3岁~)    | 175             | 73(41.7)           |
| 学龄期(7~14岁)   | 52              | 37(71.2)           |
| $\chi^2$ 值   | -               | 24.88              |
| P 值          | -               | $<0.01$            |

2.2  $\alpha$  地贫基因型和基因频率

本反应体系可扩增出长度约为 1.8 kbp、2 kbp、1.6 kbp 和 1.3 kbp 的 4 个条带,分别代表人类  $\alpha$ -珠蛋白基因(即正常人)、3.7 缺失型、4.2 缺失型、SEA 缺失型的扩增产物。阴性对照管无扩增产物,阳性对照管出现长度约为 1.3 kbp 和 1.8 kbp 的 2 个条带,分别为 --<sup>SEA</sup>缺失型和正常  $\alpha$  珠蛋白基因扩增的产物。本组资料以 --<sup>SEA</sup>基因型最常见,占 75.3%;并以 --<sup>SEA</sup>/aa 基因型多见,占 73.2%,其次为 aa/-a<sup>3.7</sup>基因型(12.5%)和 --<sup>SEA</sup>/-a<sup>3.7</sup>基因型(5.5%)。见表 3~4。

表 3 儿童  $\alpha$  地贫等位基因及其频率

| 基因类型              | 等位基因数 | 构成比(%) |
|-------------------|-------|--------|
| -- <sup>SEA</sup> | 389   | 75.3   |
| -a <sup>3.7</sup> | 88    | 17.0   |
| -a <sup>4.2</sup> | 40    | 7.7    |
| 合计                | 517   | 100    |

表 4 儿童  $\alpha$  地贫基因型及其频率

| 基因型                                  | 病例数 | 构成比(%) | 表型    |
|--------------------------------------|-----|--------|-------|
| -- <sup>SEA</sup> /-a <sup>4.2</sup> | 18  | 3.8    | HbH 病 |
| -- <sup>SEA</sup> /-a <sup>3.7</sup> | 26  | 5.5    | HbH 病 |
| -- <sup>SEA</sup> /aa                | 345 | 73.2   | 标准型   |
| -a <sup>3.7</sup> /-a <sup>3.7</sup> | 1   | 0.2    | 标准型   |
| aa/-a <sup>4.2</sup>                 | 20  | 4.2    | 静止型   |
| aa/-a <sup>3.7</sup>                 | 59  | 12.5   | 静止型   |
| -a <sup>3.7</sup> /-a <sup>4.2</sup> | 2   | 0.4    | 静止型   |
| 合计                                   | 471 | 100    |       |

3 讨论

$\alpha$  地贫是一组常染色体单基因遗传性疾病,具有高度的遗传异质性和明显的地理分布特征,且发病率高,严重威胁儿童健康和影响我国人口素质。

不同程度  $\alpha$  珠蛋白基因缺失导致不同的临床表型, 并主要取决于  $\alpha$  基因缺失的数目<sup>[3]</sup>。本研究对 1341 例血常规  $MCV < 82$  fl 儿童进行  $\alpha$  地贫基因检测, 阳性结果 471 例, 检出率为 35.1%, 明显高于文献报道<sup>[2,4-5]</sup>, 主要与本研究对就诊和体检儿童先进行血常规  $MCV$  初筛,  $MCV < 82$  fl 者才进行  $\alpha$  地贫基因检测有关。本资料显示  $\alpha$  地贫儿童男、女发病率差异无统计学意义, 说明  $\alpha$  地贫的发病与性别无关。作为常染色体遗传性疾病,  $\alpha$  地贫的发病并无年龄差异, 但本组资料通过对  $MCV < 82$  fl 者进行基因分析发现, 随着年龄的增长,  $\alpha$  地贫的检出率增加, 提示随着年龄增长,  $MCV$  降低与地贫的一致性越高。婴幼儿  $MCV$  值降低除受地贫影响外, 亦受缺铁性贫血的影响, 婴幼儿是缺铁性贫血的高发年龄, 而年长儿缺铁的发生率则明显下降, 其  $MCV$  值受缺铁因素的影响亦明显降低。因此,  $MCV < 82$  fl 作为年长儿地贫的预测指标较婴幼儿更可靠。但是, 儿童时期各年龄段  $MCV$  值具有动态变化, 新生儿红细胞体积较儿童及成人大, 出生时  $MCV$  值可大于 94 fl, 随后逐渐下降, 约至生后 6 个月时降至 70 ~ 84 fl, 随后  $MCV$  的正常值逐渐上升, 青春期达成人水平。考虑到  $MCV$  值作为血液学指标具有以上变化, 必定会对  $\alpha$  地贫检出率产生一定影响, 因此以  $MCV$  值异常来预测地贫诊断, 还需结合年龄因素进行综合分析。本研究未能根据  $MCV$  值的动态变化进行年龄分组研究, 这是本研究的不足之处。

引起  $\alpha$  地贫的基因异常有两种类型, 即缺失型和非缺失型(点突变), 各地缺失型与非缺失型比例不同, 缺失型约从 40% 到 70% 不等。在我国南方, 引起  $\alpha$  地贫的分子基础主要是  $\alpha$ -珠蛋白基因簇 3 种缺失: ①右侧缺失型( $-a^{3.7}$ ): 缺失一个 3.7 kb 的基因片段; ②左侧缺失型( $-a^{4.2}$ ): 缺失一个 4.2 kb 的基因片段; ③东南亚缺失型( $--^{SEA}$ ): 同一染色体上 2 个  $\alpha$ -珠蛋白基因全部缺失。 $-a^{3.7}$  缺失型和  $-a^{4.2}$  缺失型统称为  $\alpha^+$  地贫,  $--^{SEA}$  缺失型称为  $\alpha^0$  地贫。 $-a^{3.7}$  缺失型是全球分布最广、频率最高的基因型, 而我国南方则以  $--^{SEA}$  基因型最常见。本研究对  $MCV$  值降低儿童进行上述常见的 3 种缺失型基因分析, 检出 471 例  $\alpha$  地贫患儿中, 以东南亚缺失型占主导地位, 占 75.3%, 约是  $-a^{3.7}$  和  $-a^{4.2}$  两基因总和的 3 倍;  $\alpha^+$  地贫中以右侧缺失型( $-a^{3.7}$ ) 占优势, 是左侧缺失型

( $-a^{4.2}$ ) 的 2.2 倍, 与黄钰君等<sup>[6]</sup> 报道结果相似。本研究显示儿童  $\alpha$  地贫基因型以标准型最为常见, 占 73.4%, 并以  $--^{SEA}/aa$  为主, 占总数的 73.2%, 与广州和珠海等地相似<sup>[5,7]</sup>, 明显高于昆明地区<sup>[8]</sup>, 说明  $\alpha$  地贫基因型分布具有明显的地理差异。HbH 病占 9.3%, 静止型占 17.1%, 两者基因型构成比均以右侧缺失型占多数, 与基因频率的分布一致。本研究未能进行非缺失型检测是本研究的另一不足之处, 在今后的临床研究中将进一步完善这方面的工作。

综上所述, 本研究 471 例  $\alpha$  地贫患儿基因缺失以东南亚缺失型占主导地位, 基因型以标准型中的  $--^{SEA}/aa$  多见。本地区儿童出生缺陷性疾病中  $\alpha$  地贫基因名列第 5 位<sup>[9]</sup>, 是高发的地方性遗传病, 因此有必要对  $MCV < 82$  fl 的儿童人群常规进行基因诊断, 并建议建立  $\alpha$  地贫基因网络档案库, 为计生部门采取有效措施防止重型地贫患儿的出生提供参考依据。

[参 考 文 献]

[1] 全国血红蛋白病研究协作组. 20 省、市、自治区 60 万人血红蛋白病调查[J]. 中华医学杂志, 1983, 63(6): 382-385.

[2] 曾瑞萍, 胡彬, 金龙金. 广东地区血红蛋白 H 病基因型分析及高危胎儿基因诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 1996, 13(5): 266.

[3] 肖威威, 徐湘民, 徐铃. 中国人缺失型  $\alpha$ -地中海贫血的分子基础及产前基因诊断[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(1): 68.

[4] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, Liao C, Zhou M, Chen PY, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517-522.

[5] 黄钰君, 区小冰, 余一平, 张力. 广州地区儿童  $\alpha$  地中海贫血的发生率及缺失基因检测结果分析[J]. 中国小儿血液, 2005, 10(5): 205-208.

[6] 黄钰君, 伍绍国, 区小冰, 张力, 余一平. 儿童地中海贫血的发生率及发病基因分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(6): 28-31.

[7] 田文芳, 唐喜军, 易素芬. 广东省珠海地区  $\alpha$  和  $\beta$  地中海贫血基因突变类型研究[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(12): 1487-1488.

[8] 温柏平, 樊茂, 代宏剑, 庄宇, 刘红林, 杨俊逸, 等. 昆明地区儿童地中海贫血筛查和基因诊断分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(2): 104-106.

[9] 贾德勤, 王星, 伍捷阳, 吴雪丽. 佛山市 2007 ~ 2009 年围产儿出生缺陷监测分析[J]. 重庆医学, 2011, 40(6): 590-605.

(本文编辑: 邓芳明)